93,8(3)
199—206
维普资讯 http://www.cqvip.com
413(1)

第8卷 第3期
1993年9月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 8 No. 3
Sept. 1993

乙型脑炎病毒的分子生物学研究进展*

项秉懿 陈苏民

(第四军医大学分子生物学研究所，西安，710032)

R373.31

Research Progress on Molecular Biology of Japanese Encephalitis Virus

Xiang Biungyi Chen Sumin

(*Institute of Molecular Biology, Fourth Military Medical College, Xi'an* 710032)

关键词：日本脑炎病毒 分子生物学 乙型脑炎

Key words: Japanese Encephalitis Virus Molecular biology

日本脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus, JEV)也称乙型脑炎病毒或简称乙脑病毒，主要引起中枢神经系统损害，属人畜共患的自然疫源性传染病，传播地域广，病死率高，常留有后遗症。目前尚无特效治疗药物，虽有疫苗，但不够理想。

JEV 为 RNA 病毒，原属披膜病毒(Togaviridae)乙组虫媒病毒的黄病毒属(Flavivirus)，分 3 个血清型：JaGAr, Nakayama 和 Mie[1,2]，它们具有不同的生物学特性，包括生长特性和毒力。分子生物学研究发现，黄病毒与披膜病毒科甲病毒的基因组结构和蛋白质合成显著不同，因此，于 1984 年另立黄病毒科(Flaviviridae)[3]。尽管黄病毒的流行病学和致病特性有很大不同，但该科各病毒之间血清学上密切相关，具有相似的结构特征。

JEV 毒粒具有黄病毒科的基本构形，显球形，直径 45—50nm，沉降系数 200s，由核衣壳包裹基因组 RNA 形成病毒核心部位，外层为来源于宿主细胞的脂双层膜和病毒 E 蛋白一起构成的囊膜，其外表有穗状突起。为了研究方便，据 Rice 等(1985)的建议统一了黄病毒蛋白质的名称[4]，本文均用新名称。

1 基因组结构与功能

至今，已发表了几株 JEV 的部分或全部核苷酸序列[5—11]。由此得知，JEV 基因组是一个单股、正链 RNA 分子，约 11kb，分子量约 4×10^6D，沉降系数 42s。5′末端有一个 I 型帽结构(m^7GpppAmp)，用以保护 RNA5′端免受核酸酶或磷酸酶的降解，并促进起始翻译。3′末端没有 polyA[11]，以 CU-OH 结尾。未见亚基因组结构。除含短的 5′和 3′端非编码区外，含有一个几乎跨越整个基因组的单一开放读框(ORF)，共编码约 3 430 个氨基酸残基。基因区顺序：5′-C-

* 本文于 1992 年 12 月 21 日收到，1993 年 2 月 4 日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

prM-M-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3′[6]，分别编码结构蛋白：核心蛋白(C)、囊膜前体蛋白(prM)、囊膜蛋白(M)和囊膜糖蛋白(E)；非结构蛋白，从NS1至NS5，各基因区之间无重叠。基因组RNA就是JEV特异性RNA，具有感染性、携带全部遗传信息、在病毒增殖时，直接起mRNA作用，既可复制子代RNA，又可翻译出病毒蛋白。

Sumiyoshi等(1986)测定了JaOArS982株基因组5′端3 000个核苷酸的序列，通过5′末端标记法测得5′末端序列为Cap-AGAAG，第一个AUG在96—98位，由它起始了一个上面提到的ORF。他们确定5′区就是结构蛋白的编码区。次年他们又首次发表了该毒株的全部核苷酸序列和三种结构蛋白的基因位置，并与黄病毒其它两个成员WNV(西尼罗病毒)和YFV(黄热病毒)的核酸序列做了比较，发现有显著的同源性，JEV和WNV为71.0%，JEV和YEV为59.2%，WNY和YFV为61.3%，可见JEV与WNV的同源比与YFV的同源性更强，这与早已被证实的三种病毒血清学密切相关的结论完全一致。此外，他们还对组成基因组的四种核苷酸做了统计：A占27.8%(共3047)，G占28.4%(共3113个)，C占23.1%(共2531个)和U占20.8%(共2285个)。

为了阐明RNA复制机理，搞清3′端序列的分子结构很重要。3′端不含AU富集区和甲病毒3′端的重复序列[12]。Bujarski等(1985)曾提出，3′端似乎具有病毒RNA聚合酶所识别的位点[13]。Wengler等(1986)发现WNV和YFV3′非编码区的寡核苷酸CAUAUUGAC(A/G)CC(u/A)GGG(U/A)AGA紧挨在能折叠成茎环序列的上游，而且在这两个病毒中都保留了CUAGAGGUUAGAGGAGACCC序列，由此提示黄病毒基因组3′非编码区可能有独特的一级和二级结构[14]。ORF的3′端可能编码一个为病毒所特有的RNA聚合酶[6]。1986年，Takegami等对4株(即JaGAr-01、Nakayama Yoken、Nie44-1和Sagayama)基因组3′端的200个核苷酸序列分析表明：3′端具有二级结构。并与WNV和YFV的相应序列作了比较，发现了几个同源序列，他们推测在黄病毒基因组中，这种结构可能是相似的，与生物学特性可能有关[11]。为了确定黄病毒复制信号的特性，Brinton等(1986)比较了WNV，SLEV(圣路易脑炎病毒)和YEV基因组3′端的核苷酸序列，结果表明这些病毒的3′端都存在一个稳定的二级结构，保守序列就限定在二级结构的环区内，人们提示该保守序列似乎代表病毒RNA多聚酶识别和结合的信号，这种二级结构对核酸复制的翻译及合成调控很重要[15]。计算机分析结果也证明3′端确实有重复序列和反转重复序列[6,16]。经过比较、分析表明3′端非编码区具有以下特点：不含poly A，但是含有一个杂多聚体(Heteropolymetric)序列，它有一个或多个重复的寡核苷酸，从紧靠3′端的核酸序列能折叠成茎环结构，在茎内有错配碱基存在，在茎、环内都含有短的保守序列，可用它们作探针来鉴定被黄病毒感染的细胞[14]。近年来对3′区内的二级结构研究较多，但对其功能尚未完全了解。

Aihara等(1991)借助于计算机分析了四个不同的JEV株，发现非编码区的两个末端具有几个高度同源序列[6,8,10]。虽然这些部位的生物功能还没有阐明，但是可以推断这些序列的保守性对于JEV的复制一定很重要[10]。

2 JEV蛋白质

通过RNA序列分析和推导的氨基酸序列以及对病毒蛋白的研究，提出一个正确的黄病毒蛋白图[17-21]。结构蛋白是毒粒的主要成份，也是维持形态结构的主要物质；现已证实JEV共有

维普资讯 http://www.cqvip.com

7种非结构蛋白,它们是酶或调节蛋白,与病毒复制和生物合成密切相关。

C蛋白:分子量约14kDa,位于第一个AUC起始的单一ORF的N末端,富含赖氨酸和精氨酸,所带正电荷,在形成壳体时,可与基因组相互作用[5,6,22]。C蛋白保护基因组免受核酸酶或其它因素的破坏。

M蛋白:分子量约9.5kDa,其前体蛋白prM存在于感染细胞内未成熟毒粒中。M的氨基末端位于两个Arg残基之后,可能被细胞的高尔基体酶类所识别[20]。M是完全疏水性的,参与病毒囊膜的构成,被包埋在毒粒囊膜的脂双层中[5—7]。M与感染性有关,可能具有分类学上的意义。抗M抗体对JEV具有轻度中和作用[1,8]。

E蛋白:分子量约53kDa,富含甘氨酸和丙氨酸,脯氨酸含量低,不同基因型的毒株,某些氨基酸的含量也不同[2]。目前对E一级结构的了解较多,已测定N末端氨基酸序列为:Phe-Asn-x-Leu-Gly-Met-Gly-Asn-Val-Val-Pha-Lle-[6]。E是含有高甘露糖寡糖侧链的糖蛋白,糖基化位点在Asn-x-Ser(448—450位)的Asn上,它在多数黄病毒中是保守的。E通常显示两性分子的特性,最大的两性分子区之一是420—455位残基之间[23]。E是毒粒表面的重要成份,由它形成表面抗原决定簇,具有血凝活性和中和活性,能和血凝抑制抗体结合,能刺激机体产生中和抗体,保护机体免受病毒攻击。与病毒的吸附、穿入、致病和诱导宿主的免疫应答等作用紧密相关。所以,人们历来把研究的重点放在E上,正深入到高级结构的研究,这将为基础研究和临床应用以及亚单位或基因工程疫苗的研制提供分子水平的依据。

非结构蛋白:Speight等(1989)用^{5}H·标记Lys和羧肽酶B处理Kunjin病毒,对C末端氨基酸进行分析,结果显示NS2a、NS2b、NS3和NS4b具有相同的C末端Lys-Arg,这是许多黄病毒的保守位点[24]。每种非结构蛋白都有独特的结构和功能,目前了解最多的是NS1和NS5。

NS1分子量约42kDa,是分泌型糖蛋白,含高甘露糖寡糖基团,由半胱氨酸形成二硫键,它抗还原反应、抗SDS,但不耐热。常以同二聚体(Homodimer)形式存在于培养液或血清中,有人证明NS1以这种高分子量形式出现是黄病毒感染的一个特点[25]。NS1可能在病毒组装和释放中起作用。NS1是病毒主要抗原成份之一,具有可溶性补体结合活性,因为它不组成毒粒,所以没有中和活性和血凝抑制活性,但是,它可在不出现中和抗体的情况下,诱导保护性免疫,它优于常规疫苗的最大特点是不产生抗体依赖性增强,因此引起人们的极大关注,把它作为研制亚单位疫苗的好材料[26,27]。近来研究揭示,黄病毒NS1的基因和表型具高度同源性、其核酸序列竟可适用于7种黄病毒,其中就有JEV[28],这就为NS1可能发展成一种具有广泛作用的黄病毒亚单位疫苗提供了理论根据。

NS5:分子量约为105kDa。有人提出NS5可能是病毒RNA聚合酶的一种成份,和NS3一起在RNA复制中起RNA聚合酶作用[4,29],有人发现几种不同病毒的RNA聚合酶(包括JEV的NS5)具有序列同源性[6]。

其它非结构蛋白:NS2为疏水性的,同源性最低。NS3是亲水性的,据推测,在聚蛋白翻译后,它可能起蛋白酶的作用或是RNA聚合酶的一种成份,也可能带有这两种酶的活性。NS4a和NS4b均为疏水性蛋白。总之对非结构蛋白的结构和功能还有待进一步研究。

3 JEV的生物合成

一般说来,含正链RNA病毒基因组RNA的复制基本相似。病毒糖蛋白与细胞受体作用,

维普资讯 http://www.cqvip.com

经过吸附、穿入、脱壳后在胞浆中开始复制。以基因组(+)RNA 作为信使，借助于宿主细胞的核糖体，在必要酶和有关生物大分子参与下，首先翻译产生 RNA 聚合酶，该酶以亲代(+)RNA 为模板，在核周区合成高度耐 RNA 酶的双股 RNA，称为复制中间体(Replicative Intermediate，RI)，它含(+)RNA 和与其互补的(−)RNA，它们的 3′端均能形成茎环结构，可能是 RNA 聚合酶识别和结合的位置。RI 中的(−)RNA 从(+)RNA 解离后作为模板，复制成与亲代(+)RNA 完全一样的子代病毒基因组 RNA。新合成的(+)RNA，一部份用来作为病毒基因组，另一部份则作为信使翻译产生病毒蛋白，其中结构蛋白经过组装成为成熟的病毒颗粒，释放到细胞外，就这样周而复始地进行病毒增殖。

迄今，有关 JEV 基因组 RNA 复制的报告不多，可是，JEV 也含(+)RNA，想必它的复制过程也与上述情况相类似，Takegami 等(1990)实验研究了 JaGAr-01 株在感染细胞中病毒特异 RNA 的合成和位置[30]。发现感染后 3—6 小时就能合成 JEV 特异的(−)RNA，它可能相当于 RI 中的(−)RNA，大约在 12 小时，(−)RNA 的数量达最高水平，之后很快下降；到 12 小时才出现与基因组一样长的 42S(+)RNA，直到 24 小时都能检测到，这些结果提示，JEV 的 RNA 复制可能和其它(+)RNA 病毒一样，在复制早期先合成(−)RNA[31]。上述实验中还发现 42S(+)RNA 多集聚在感染细胞膜部位，而(−)RNA 则存在于培养液中，这种现象可能与 JEV 感染的细胞膜和核部位具有高水平的病毒 RNA 聚合酶活性有关[32]。

新合成的(+)RNA，在宿主细胞内质网膜的多核糖体上，在有关酶和生物大分子的参与下，通过共翻译后的加工，形成一个大分子前体蛋白，很快被裂解成数个小分子多肽，经加工、修饰，形成结构和非结构蛋白。至少有三种细胞蛋白酶，加上一个假设的特异蛋白酶参加这些蛋白的切割[30,33]。首先由氨肽酶切除第一个 Met 形成 C 蛋白，在合成部位由 C 端疏水性氨基酸将其暂时固定在粗面内质网膜上，以便装配成核衣壳，用来包裹基因组。prM 带有 N-连接的糖侧链，具有 Asn-X-Thr 序列的糖基化位点，可能由高尔基体中的细胞蛋白酶催化，使 prM 裂解成无糖基的 M 蛋白，具体过程尚不清楚[4,20]。

由于 E 蛋白具有许多重要的生物功能，所以对它的生物合成研究较多，它需要共翻译的蛋白水解酶加工过程，具有信号酶样加工位点，该位点在黄病毒中是高度保守的[7,27]。当翻译成多肽后，经信号酶裂解，在粗面内质网中合成，装配成 E 多肽骨架，到滑面内质网附加糖链，即由 β-N 糖苷键将糖链的 N-乙酰葡糖胺与肽链第 448 位上的 Asn 残基的氨基相连，使之形成带有糖链的 E。其 C 末端是疏水性的，和脂双层膜疏水基团相互作用而结合在囊膜上，然后插入，并包埋在脂双层膜内，成为通透屏障，使病毒外部糖蛋白与内部核心成份相互作用，并维持结构的稳定性。带有高甘露糖寡糖侧链的 N 末端则伸出囊膜表面，组成囊膜子粒(peplomer)的“穗状物”(spikes)，使毒粒具有形态特征[4,27]。各种结构蛋白合成后，经过组装形成成熟的毒粒，随细胞裂解而释放。

对于非结构蛋白的生物合成报告不多。NS1 的 N 末端象 E 一样，有一个信号酶样加工位点，经信号酶切割产生 NS1，研究表明，NS1 在哺乳动物细胞和蚊子细胞中的加工和释放是不一样的。在感染细胞的内质网和高尔基体内，NS1 和 E 共同滞留一段时间，这就为 NS1 在毒粒形成中起一定作用提供了证据[34]。由于被 JEV 感染的细胞生物合成不受抑制，所以给研究带来困难，以至对 JEV 生物合成、组装、转运和释放等问题还没有完全搞清。

近十多年来，通过病毒基因工程的办法，已在 JEV 中展开了各种研究，获得很多成果。已

维普资讯 http://www.cqvip.com

把几株 JEV 的基因组 RNA 的 cDNA 全部克隆[3,8,9,10]。有的克隆基因(多为各种抗原、E 和 NS1)已在原核或真核细胞中获得表达[34—36],以便用于研制基因工程或亚单位疫苗,这是当前分子病毒学的热门课题之一。也有人把基因工程用于合成研究,例如 Fan 等(1990)为了检查内质网中滞留 NS1 的分子基础,用 BHK 细胞表达了 NS1 的 cDNA 片段,结果表明,在只含 NS1 基因的重组质粒转染的细胞中表达的 NS1,就内质网中 NS1 的滞留、分泌、糖基化、膜相关性和二聚化等问题而言,无异于完整毒粒在感染细胞中生成的 NS1[31]。

4 JEV 的株间变异

JEV 不同株间基因组所含核苷酸数目不同,例如,JaOArS982 株共 10 976 个核苷酸,编码 3 432 个氨基酸[6];而 Beiging-1 株却含有 10 965 个核苷酸,编码 3 429 个氨基酸[8]。

Nitayaphan 等(1990)通过核酸序列分析和寡核苷酸指纹印迹研究发现,尽管我国用于免疫人的减毒疫苗株 SA14-14-2(SA(A))与其原毒株 SA14(SA(V))的核苷酸总数相同,但是,在减毒过程中却发生了多形性基因改变(Multiple genetic chages),共有 45 个核苷酸发生变异,导致 15 个氨基酸的改变;他们比较了 SA(A),SA(V)和强毒株 JaOArS982 及 Beijing-1 的核酸序列和推导的氨基酸序列,结果表明它们是高度保守的[9]。进而 Aihara 等(1991)对上述 4 毒株翻译区内的遗传变异作了比较,计算了它们之间全部核苷酸替代的错义突变(Missense mutation)率,SA(V)和 SA(A)之间错义突变率最高,竟达 44.4%,并且对疫苗株基因突变作了鉴定,发现 57 个变异的核苷酸分布在整个基因组中,其中 24 个引起氨基酸改变,数目分别是:C:1、E:8、NS1:3、NS2a:2、NS2b:2、NS3:4、NS4a:1、NS4b:1、NS5:2,3′和 5′非翻译区分别含有 1 和 2 个点突变。由此可见,除 M 外,每种蛋白都含有错义突变,最多在 E。NS5 的碱基替换发生在三联码的第三个字母上,致使该编码区中氨基酸改变率低,该现象指出非结构蛋白氨基酸序列保守性对 JEV 复制来说要比 E 蛋白更重要。这些资料为查明 JEV 的减毒机制提供了分子基础[10]。

Kobayashi 等(1984)用 JEV-单克隆抗体(JEV-McAb)分析不同年份在日本分离的 JEV 抗原时发现,同一时期分离病毒的抗原性较为一致,不同时期分离病毒的抗原性显著不同,从而提示:JEV 的抗原性随时间而漂移;他们还用 JEV 寡核苷酸图谱分析证明不同毒株之间确有差异[37]。

利用指纹法分析病毒基因组,是研究毒株间差异的生态学和流行病学的有力手段。Hori 等(1986)用该法分析了 1935—1984 年间从日本和泰国分离的 12 株 JEV,结果指出,所有日本毒株都有某些共同的指纹点,其中第 96 点是日本株特有的,第 22 点为泰国株特有。他们通过计算毒株间核苷酸的相似率(SR),从分子遗传学角度评价各株间的异同程度,结果发现日本株都比较相似(SR>0.57),相近年份分离的毒株,SR 较高,同一年、同一地区分离的毒株极为相似。近几年分离的泰国毒株与日本毒株的 SR 普遍下降,该结果揭示,地理位置较远的国家,JEV 经历了各自不同的基因突变和选择过程[38]。对这种快速变化的原因尚待进一步研究。

JEV 在自然界的变异问题,于 1990 年有人报道,通过 RNA 模板的引物延伸测序法检查了亚洲不同地区的 46 株 JEV,结果确证,不同毒株间存在基因差异,并且这些遗传变异流传在亚洲的特殊地理区域内。该结果证明,核苷酸序列的比较能够提供对 JEV 进化、传播及致病性的深入了解[39]。此外,对一个 JEV 野生株及其减毒株的寡核苷酸印迹分析表明,它们即使有共同

维普资讯 http://www.cqvip.com

点出现，也有各自的特殊点[40]，说明基因发生了变异。基因变异直接影响着功能改变，Cecilia等(1991)证实，在JEV中和抗性突变中核苷酸改变引起对小鼠神经侵袭力降低[41]。

5 JEV的抗原表位

早在1977年Trent就提出黄病毒表面糖蛋白具有种、亚组和属特异抗原决定簇[42]。十多年来，用淋巴细胞杂交瘤技术获得许多针对JEV单一抗原决定簇的McAb，由于它特异性强、分辨率高，可用于剖析抗原的细微结构和推测结构与功能的关系，大大推动了对JEV抗原表位的研究，报道很多。人们应用针对E蛋白的McAb发现了感染活性、血凝抑制活性和中和活性的抗原决定簇[43-45]。Cecilia等(1988)提出了JEV蛋白的抗原位点图，共划出16个位点，分为A,B,C,D和E5个功能区，其中B区与血凝抑制、中和及保护活性有关，所以最适用于作亚单位疫苗[46]。目前正在研究这些决定簇在蛋白区域的定位。Nason等(1989)利用E. coli表达的Nakayama株E蛋白抗原片段，确定了一组具有中和活性和保护活性的McAb结构域(Domain)的最短序列为95个氨基酸残基，位于304—396[47]。这组McAb在体外都能中和JEV，其中某些还能被动地保护小鼠免受病毒的致死性攻击。通过还原反应和烷基化实验表明，该区段的免疫活性依赖于304和335位上的半胱氨酸形成二硫键，由此可见，这些抗体专有的表位显然是构象抗原域(Comformational antigenic domain)的一部份，它代表毒粒表面上一个很强的抗原决定簇。

此外，有人用溴化氰分割了纯化的E蛋白[48]。经SDS-PAGE出现36kDa、27kDa和8kDa三条带，用它们免疫小鼠，取血清作中和试验均为阳性。用反相高压液相层析柱提纯上述各片段，经N端氨基酸序列分析与E蛋白基因作比较，发现它们都位于E蛋白上，变性-抗性中和表位(Denaturation-resistant neutralizing epitope)在8kDa片段上。

参考文献

1 Takegami T, Miyamoto H, Nakamura H, et al. Biological activities of the structural proteins of Japanese encephalitis virus. Acta Virol, 1982, 26: 312—320

2 Takegami T, Miyamoto H, Nakamura H, et al. Differences in biological activity of the V3 envelope protein of two Japanese encephalitis virus strains. Acta Virol, 1982, 26: 321—327

3 Westaway EG, Brinton MA and Gaidamovich SYA, et al. Flaviridae. Intervirology, 1985, 24: 183—192

4 Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implication for flavivirus gene expression and evolution. Science, 1985, 229: 726—733

5 Sumiyoshi H, Morita K, Mori C, et al. Sequence of 3000 nucleotides at the 5′ end of Japanese encephalitis virus RNA. Gene, 1986, 48: 196—201

6 Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, et al. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. Virology, 1987, 161: 497—510

7 Meada PC, Mason PW, Schmaljohn CS, et al. Partial nucleotide sequence of the Japanese encephalitis genome. Virology, 1987, 158: 348—360

8 Hashimoto H, Nomoto A, Watanabe K, et al. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the genome of Japanese encephalitis virus Beijing-1 strain. Virus Genes, 1988, 1: 305—317

9 Nitayaphan S, Grant JA, Chang GJ, et al. Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its at

维普资讯 http://www.cqvip.com

tenuated vaccine derivative SA-14-14-2. Virology ,1990,177:541—552

10 Aihara S,Rao CM,Yu YX,et al. Identification of mutation that occurred on the genome of Japanese encephalitis virus during the attenuation process. Virus Genes,1991,5:95—109

11 Takegami T,Washizu M and Yasui K. Nucleotide sequence at the 3′ end of Japanese encephalitis virus genomic RNA. Virology, 1986,152:483—486

12 Ou JH,Trent DW and Strauss JH. The 3′-non-coding regions of alphavirus RNAs contain repeating sequences. J Mol Biol,1982, 156:719—730

13 Bujarski JJ,Dreher TW and Hall TC. Deletions in the 3′-terminal tRNA-like structure of brome mosaic virus RNA differentially affect aminocylation and replication in vitro . Proc Natl Acad Sci USA,1985,82:5636—5640

14 Wengler G and Castle E. Analysis of structural properties which possibly are characteristic for the 3′ terminal sequence of the genome RNA of Flaviviruses. J GenVirol,1986,67:1183—1188

15 Brinton MA,Fernadez AV and Dispto JH. The 3′-nucleotides of Flavivirus genomicRNA form a conserved secondary structure . Virology,1986,153:113—121

16 Grange T,Bouloy M and Girard M. Stable secondary structures at the 3′-end of the genome of yellow fever virus (17D vaccine strain). FERS Letters,1985,188:159—163

17 Speight G,Coia G,Parker MD,et al. Gene mapping and positive identification of the nonstructural proteins NS2a,NS2b,NS3, NS4b and NS5 of the flavivirus kunjin and their cleavage sites . J Gen Viral,1988,69:23—24

18 Speight G and Westaway EG. Positive identification of NS4A,the last of the hypothetical nonstructural proteins of flaviviruses. Virology,1989,171:299—301

19 Chambears TJ,Mecourt DW and Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A,NS2B and NS4B:identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. Virology,1989,169:100—109

20 Mandl CW,Heinz FX and Kunz C. Sequence of the structural proteins of tick—borne encephalitis virus(Western serotype)and comparative analysis with other flaviviruses. Virology ,1988,166:197—205

21 Coia G,Parker MD,Speight G,et al. Nucleotide and complete amino acid sequences of kunjin virus:difinitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. J Gen Virol,1988,69:1—21

22 Deubel V,Kinney RM and Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus ,Jamaica genotype:comparative analysis of the full-length genome . Virology ,1988,165:234—244

23 Kutubuddin M,Kolaskar AS,Galande S,et al. Recognition of helper T cell epitopes in envelope(E) glycoprotein of Japanese encephalitis, west nile and Degue viruses. Mol Immunol,1991,28:149—154.

24 Speight G,Westaway EG. Carboxy-terminal analysis of nine protein specified by the flavivirus kujin:evidence that only the intracellular core protein is truncated. J Gen Virol,1989,70:2209—2214

25 Winkler G,Randolph VB and Cleaves GR. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. Virology,1988,162:187—196

26 Walter ER. Current approaches to the development vaccines and related aspects of the molecular biology of flaviviruses . J Infect Dis,1988,157:1105—1111

27 Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. Virology, 1989,169:354—364

28 Gibson CA,Schlesinger JJ and Barrett ADT. Prospects for a virus non-structural protein as a subunit vaccine. Vaccine,1988,6:7—9

29 Mackow E,Makino Y,Zhao B,et al. The nucleotide sequence of dengue 4 virus:analysis of genes coding for nonstrucutral proteins. Virology,1987,159:217—228

30 Takegami T,Hotta S. Synthesis and localization of Japanese encephalitis virus RNAs in the infected cells. Microbiol Immunol, 1990,34:849—857

31 Sawicki DL,Bakhimer DB,Sawicki SG,et al. Temperature sensitive shut-off of alphaviurs minus strand RNA synthesis maps to a nonstructural protein nsP4. Virology,1989,174:43—52

维普资讯 http://www.cqvip.com

32 Takegami T and Hotta S. In virtro synthesis of Japanese encephalitis virus (JEV) RNA, membrane and nuclear fractions of JEV —infected cells possess high level of virus-specific RNA polymerase activity. Virus Res, 1989, 13, 337—350

33 Nowak T, Farber P, Wengler GG, et al. Analysis of the terminal sequences of west nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. Virology, 1989, 169, 365—376.

34 Fan WF, Mason PW. Membrane association and secretion of Japanese encephalitis viurs NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA. Virology, 1990, 177, 470—476

35 Mason PW, Mcada PC, Dalrymple JM, et al. Expression of Japanese encephalitis virus antigens in Escherichia coli, Virology, 1987, 158, 361—372

36 Haishi S, Imai H, Hirai K, et al. Expression of envelope glycoprotein (E) of Japanese encephalitis virus by recombinant vaccinia virus. Acta Viral. 1989, 33(6), 497—503

37 Kobayashi Y, Hasegawa H, Tamai T, et al. Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. Infect Immun, 1984, 44, 117—123

38 Hori H, Morita K and Igarashi A. Oligonucleotide fingerprint analysis on Japanese encephalitis virus strains isolated in Japan and Thailand. Acta Viral, 1986, 30, 353—359

39 Chen WR, Tesh RB and Hosse RR. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. J Gen Virol, 1990, 71, 2915—2922

40 Banerjee K, Ranadive SN. Oligonucleotide fingerprint analysis of a wild strain and its attenuated variant of Japanese encephalitis viurs. Indian J Med Res, 1990, 91, 159—161

41 Cecilia D, Gould EA. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. Virology, 1991, 181, 70—77

42 Trent DW. Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. J Virol, 1977, 22, 608—618

43 Kimura KJ and Yasui K. Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3(E) of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. Virology, 1983, 45, 124—132

44 Kobayashi Y, Hasegawa H and Yamanchi T. Studies on the antigenic structures of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. Microbiol Immun, 1985, 29, 1069—1082

45 Kimura KJ and Yasui K. Antigenic comparision of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1986, 67, 2663—2672

46 Cecilia D, Gadkari DA and Kedarnath N. Epitope mapping of Japanese encephalitic virus envelope protein using monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1988, 69, 2741—2747

47 Mason PW, Dalrymple JM, Gentry MK. Molecular characterization of a neutrolizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. J Gen Virol, 1989, 70, 2037—2049

48 Srivastava AK, Morita K and Igarashi A. Immunogenicity of peptides cleaved by cyanogen bromide from Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein E. Acta Virol, 1990, 34, 228—238