208-213 684(3)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

流行性出血热病毒M基因片段的结构与特性

董关木 俞永新
(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

R373.32

The Structure and Characterization of M Genome Segment of HFRS Virus

Dong Guanmu Yu Yongxin
(*Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing* 100050)

关键词 流行性出血热病毒,M基因片段,糖蛋白 结构,特性
Key words HFRS virus, M genome segment, Glycoprotein

汉坦病毒(Hantavirus)是引起肾综合征出血热(HFRS)的病原体,是布尼亚病毒科的新成员,它至少有四个血清型,即汉滩(Hantaan Ⅰ型),汉城(Seoul Ⅱ型),Puumala(Puu Ⅲ型)和Prospect Hill(PH Ⅳ型),最近还发现了3～4种新的血清型,汉坦病毒肺综合症(Hantavirus Pulmonary Syndrome, HPS)就是其中之一[1,2]。每个血清型病毒分离自不同的宿主动物,血清Ⅰ型以分离自黑线姬鼠的毒株为主,它与严重的HFRS有关;血清Ⅱ型以分离自褐家鼠的毒株为主,它与轻型但仍具有致死性的HFRS相关;血清Ⅲ型主要分离自棕背䶄的毒株与温和型HFRS相关;而血清Ⅳ型主要来自小田鼠的毒株,与人类疾病无关[3]。1993年爆发于美国西南部的HPS的病原体则分离自北美独有的鹿鼠,虽然该病毒的分型尚不确切,但可以肯定它属于一种新的汉坦病毒[1,2,6,7]。每一种血清型与啮齿类动物的种属关系密切,而与分离的地理区域无关[4,5]。汉坦病毒与其它的布尼亚病毒属一样[8],其核酸都有三个分节段的单链RNA,即大片段(L,分子量约2.2×10^6);中片段(M,分子量约1.3×10^6)和小片段(S,分子量约0.5×10^6)。已知大片段RNA编码RNA聚合酶,小片段RNA合成核壳蛋白;而中片段RNA合成囊膜蛋白,后者先合成前体糖蛋白,经切割后分别为53000和70000道尔顿分子量的G1和G2糖蛋白。它们是在单一连续的开放阅读框架上编码[9],并已证实病毒主要的中和抗原或保护抗原决定簇定位在G1和G2糖蛋白上,是病毒致病性和疫苗研究的重点所在。

1 M片段的基因结构

在对汉坦病毒核酸进行纯化分析的基础上,近年来转向RNA基因的克隆与表达,尤其是对病毒的毒力(或致病力)和抗原性密切相关的M片段的研究,取得了很明显的进展。

汉坦病毒76-118株M片段RNA,在不同实验室进行了cDNA分子克隆[10,11],整个片段含有3616个碱基,其中A、G、C、U分别占29.8%、17.9%、21.4%、30.8%。在开放阅读框

本文于1995年10月16日收到,1996年1月22日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

架内,G1蛋白的编码起始于95～97位碱基、G2蛋白起始于1985到1987位,从第一个起始密码开始到3346～3348位碱基结束,共编码1136个氨基酸,分子量约126 kD。RNA基因排列顺序为5′-G1-G2-3′。G1蛋白起始于第19位氨基酸,止于588～614位。G2蛋白起始于第649位氨基酸而止于1127～1135位氨基酸,分子量约分别为64和54 kD。G1和G2上分别有5个和2个潜在的与天门冬氨酸相连的糖基化位点,G1比G2更易被糖化。相比之下,G2较G1更稳定,3′和5′末端的22个碱基有20个互补,与布尼亚属病毒的一般特性相一致[12]。

此后,有许多研究者将四个血清型的代表株分别进行了克隆和核苷酸序列分析及其特性研究。Mark等[3]分析了Ⅳ型PH株的M片段,并与Ⅱ型的SR-11,Ⅲ型的Hällnäs和Ⅰ型的76-118株作了比较[11,13,14]。分析发现,四个血清型的A、G、C、U的组成比例相仿,PH株M片段开放阅读框架起始于第50～52位核苷酸,终止于3476～3478位,编码1142个氨基酸,比76-118株多6个氨基酸,而比Hällnäs株少6个和比SR-11株多8个氨基酸[11,13,14]。PH、Hälnäs、SR-11和HTN株间G1和G2的半胱氨酸的稳定性很高,分别为78.4%和93.1%。各型代表株G1和G2上的氨基酸同源性PH株和Hällnäs株较高,分别为74%和79%,PH与SR-11和HTN相比则较低(G1为50%,G2为62%)。这一结果与抗原性分析的亲近关系和病毒的致病力强弱相一致。PH株G1蛋白中有4个潜在的糖基化位点而另三株只保留其中的3个,位于527～529位氨基酸位置的糖基化位点不保留。在G2蛋白上,除Hällnäs株有两个糖基化位点外,其余三株只有一个位点是保守的。

最近Spiropoulou等[15]将HPS毒株的M片段的核酸作了序列分析,发现该病毒有3696个核苷酸,比76-118株多80个核苷酸,糖蛋白编码起始于52位,终止于3467位,共编码1132个氨基酸,比76-118株少4个,比PH株少10个氨基酸,HPS的核苷酸序列的同源性与PUU和PH株较接近,分别为66%和65%。而与HTN和SEO较远,同源性只有58%。同样,所有汉坦病毒中的四个糖基化位点HPS完全保留,三个在G1、一个在G2蛋白上。在HTN、SEO、PUU和PH株中的半胱氨酸残基HPS株一样完全保留,这证明了HPS是一种新的汉坦病毒。

将四株病毒进行M片段编码的蛋白亲水基扫描图分析,SR-11、HTN和Hällnäs G1蛋白的最大亲水区峰值位于C末端,起始于跨膜蛋白后14个氨基酸。而PH株最大亲水区峰值位于220到225位氨基酸,接近N末端,前三株的G2蛋白亲水区的最高值也位于C末端,而PH株位于跨膜蛋白前12个氨基酸处。亲水区的差异明显地与PH株G1蛋白中缺失了一个氨基酸有关,这一点是否与PH株不致病相关尚不清楚。

Isegawa等[16]将76-118株感染Vero E6细胞传代后得到两株分别为HVcl-1和HVcl-2毒株,HVcl-1攻击乳鼠呈现高死亡率而HVcl-2毒株无任何症状且可存活。分别将L、M、S片段作序列分析发现,虽然HVcl-1与76-118株之间有几个核苷酸或氨基酸的改变,但是HVcl-2和HVcl-1之间仅在M片段糖蛋白的1124位氨基酸由丝氨酸变为甘氨酸。仅此一个氨基酸的置换造成它的毒力和致病力的改变,这是值得进一步证实的。流感病毒的血凝素蛋白已发现小至一个单一的氨基酸改变即可导致它的致病力改变[17,18]。由于布尼亚病毒M片段RNA表达的蛋白,尤其是G1蛋白,已被证明是毒力和感染性的主要抗原决定簇[19,20,21]。假如这一机理在汉坦病毒属亦是如此,那么PH病毒的G1和G2蛋白大量的氨基

维普资讯 http://www.cqvip.com

酸改变可以解释为什么与其它型病毒相比不引起疾病。而 PH 和 Hällnäs 的 G1 和 G2 蛋白的相似性，可能由于经历了氨基酸的改变导致 PH 和 Hällnäs 的毒力和致病力的减弱。G1 蛋白氨基酸的保守性要比 G2 蛋白低，这可能意味着 HTN 病毒的致病力与 G1 蛋白更密切。

2 病毒 M 片段基因的稳定性

病毒的生物学特性受核酸基因组的控制，有稳定的遗传性。同时，病毒也可由于核酸基因组的改变、突变或基因的杂交而发生变异。

为了研究汉坦病毒 M 片段的变异或稳定性，Kariwa 等[22]将在日本北海道的同一个垃圾场中按不同时间捕获的同种褐家鼠分离的病毒株进行 M 片段的核苷酸序列分析，结果表明 1983、1985 和 1988 年分离到的 KI－83－262、KI－85－1 和 KI－88－15 三株病毒的核苷酸同源性大于 99.8%，G1 和 G2 糖蛋白的氨基酸同源性大于 99.7%，显示了三株病毒来源于同一祖先。同时，他们用单克隆抗体进行位点分析和中和试验证实它们的抗原性是稳定的，而且这种抗原性的稳定是基于核酸稳定的水平。1994 年 Song K－J 等[23]从 1976 年自黑线姬鼠分离到汉坦病毒 76－118 株的同一地点捕获的黑线姬鼠中分离到的三株病毒，进行核苷酸序列分析并与 76－118 株相比较，结果仅发现在 2294 和 2296 两位核苷酸发生变异，变异率 0.6%，经计算 76－118 株每个核苷酸每年的突变率为 1.7×10^{-4}，与 Seoul 型的突变率为 3.3×10^{-4} 很接近[22]。因此认为在自然界中 HFRS 病毒 M 片段是相当稳定的。

Pilaipan 等[24]的试验进一步表明来自不同国家的汉滩型和汉城型毒株间的基因同源性很高，他们将包括中国 A9 株在内的 8 株 HTN 型毒株用直接 RT－PCR 法扩增 M 片段 G1 区第 374～655 位之间的片段进行序列分析，发现来自中国的 A9、南斯拉夫的 Fojnica 和俄国的 CG3883 以及韩国的 Maaji 与 76－118 株的核苷酸同源性很高，达 99.6% 和 99.3%。差异最大的亦只有 7.2%。来自日本、中国、韩国、埃及和美国的不同国家的 SEO 型毒株的同源性也高达 92.8～98.1%。但有的试验表明，同型毒株间 M 片段基因也有一定的或较大的变异，如 Song K－J 等[25]将来自韩国的 22 例 HTN 型急性期病人血清样品，用 RT－PCR 扩增 M 片段 5′端 G2 区分析了 324 个核苷酸序列，结果表明这些病人的病毒株与从韩国野鼠和韩国其他病人的分离毒株可形成同一个组，而与中国的 HTN 型毒株截然不同。

Xiao 等[26]在比较 M 片段 332 个碱基时也发现 HTN 型变异性较 SEO 型大。韩国分离株与中国株有一定差异，中国陈株与 A9 和 HV114 有明显差异，但不同地区来源的 SEO 型毒株则差异很小。

梁米芳等[27]将分离自中国的 9 株经 PRNT 确定为 HTN 型的毒株，以 PCR 法扩增 G2 区的 1970～2334 间的 330 个左右碱基进行序列分析，发现这些 HTN 型毒株间差异更大，序列分析后构建的种系发生树形可将这 9 株毒株分为 3 个分枝，即 H5 和 H3、陈株和 84F 株、A9 和 486 株。这三个分枝对 76－118 的差异分别为 22.5%、14.9% 和 14.1%。三分枝之间的差异 H5 对陈株分枝为 17.1%。但对包括 R22 在内的 10 株中国株 SEO 型病毒的分析结果则株间差异很小，仅为 6% 左右，同时也说明 HTN 型毒株的变异性较 SEO 型大，有的作者的试验则认为不同地理区域间的 SEO 型毒株间也存在较大的基因变异。Kariwa 等[22]在日本同一地区不同年代(1983～1988)从家鼠分离的病毒的 M 片段基因与日本试验室大鼠(SR－11、B－1)、韩国(Seoul)和中国家鼠(R22)等毒株进行比较，结果表明这些毒株核苷酸同源性很高，但中国的 R22 与日本的其它毒株相比其同源性相对较低，只有 93.4%。

维普资讯 http://www.cqvip.com

徐晓等[28]将我国血清Ⅱ型的R22株进行了M片段全序列分析,并与国际代表株进行了分子水平的分析比较,结果表明R22与76-118之间有37个氨基酸置换,而日本的SR-11与76-118仅有6个氨基酸改变。因此,从它们之间的氨基酸分析看,是两株有独立特性的家鼠型病毒,R22整个M片段比SR-11长5个核苷酸,其中3个位于开放阅读框架内,导致G2蛋白多编码一个氨基酸,再加上在G1和G2上有单一或成群出现共有21个氨基酸改变,这些改变可能导致了病毒抗原的改变,表明R22可能在进化过程中有独立的演化过程。在种系发生树形分析中,R22与SR-11有较远的距离[22,26,27]。中国的R22有其独自的进化路线。

Spiropoulou等[15]从美国西北地区的11例PHS病人血清样本和12只鹿鼠分离的病毒样本,用PCR扩增M片段185个核苷酸(2780~2965)进行分析,并与新墨西哥、亚利桑那和科罗拉多州分离的HPS毒株的同一序列进行比较,结果发现病毒核苷酸序列的变异可高达15%以上,而HPS病毒的核苷酸序列的同源性与PH株最高,而后者亦分离自北美独有的啮齿类动物小田鼠,这些资料提示在不同地区HPS病毒与不同的啮齿类动物种群间有着长期的联系,也为汉坦病毒与其各自的宿主之间共同进化的观点提供佐证。

综合上述资料虽然有些不一致的结果,但总的情况分析HTN型间的变异大于SEO型,而不同地理间SEO型毒株也存在一定的基因差异,这些基因差异对病毒抗原性的影响程度多大,疫苗对不同地区流行株病毒的抗原性差异和免疫保护程度影响如何等均有待进一步确证。

3 M蛋白及其生物学特性

病毒结构蛋白的确定,可将病毒纯化后用SDS-PAGE电泳分析确定病毒的蛋白成分。Elliott等[8]分析了76-118株相关蛋白,结果可检出4种结构蛋白,分子量分别为45、56、72和200 kD,用^{3}H-葡萄糖胺标记时可检测到56 kD和72 kD蛋白,与布尼亚病毒的囊膜糖蛋白G1和G2相似。而且亦证明不同毒株的抗原间存在着明显的差异。

Yamanishi等[29]发现76-18株感染的细胞裂解液内有55和50 kD的两种多肽,证明其中55 kD的多肽为糖基化,而分离自日本实验室大白鼠的Ⅱ型B-1株发现有3种多肽,分子量为74、57和50 kD,而其中74和57 kD多肽为糖基化。他们用76-118血清分别对B-1和76-118进行免疫沉淀反应,结果与76-118株的55和50 kD均起沉淀反应,而与B-1株只有50 kD蛋白起反应;反之,用抗B-1株的血清进行免疫沉淀反应时,与B-1株的57和74 kD多肽均有反应,而与76-118株只有55kD多肽与之反应。证明B-1株的57 kD糖蛋白与76-118株的55 kD糖蛋白在免疫学上有密切关系。李德新等[30]用SDS-PAGE分析显示,姬鼠型的76-118、A9及陈株的结构蛋白分子量相同,即G1为70 kD;G2为55 kD;N蛋白为50 kD;家鼠型的R22和L99株结构蛋白的G1和G2也相等,G1为72 kD;G2为57 kD;N蛋白为48 kD。很明显,两个不同血清型间的结构蛋白有显著差异,用放射免疫沉淀法分析的16株HFRS病毒的G2蛋白也发现存在有55 kD和57 kD两种不同分子量,分离自姬鼠的毒株为55 kD,而分离自家鼠的毒株为57 kD。

陈伯权等[31]用针对HFRS病毒的35株McAb对国内外20株病毒进行抗原性分析,表明这些McAb至少有25个不同的抗原决定簇引起。野鼠型(Ⅰ型)有相似的抗原决定簇、变异较小,主要集中于9个抗原决定簇,抗原性似乎较稳定。而家鼠型(Ⅱ型)变异较大,不仅含有大多数Ⅰ型抗原决定簇,而且对Ⅱ型抗原决定簇株间差异较多,其抗原决定簇比Ⅰ型广得多。

Dantaq等[32]应用针对病毒囊膜糖蛋白的15株McAb进行G1和G2蛋白中和抗体靶位

维普资讯 http://www.cqvip.com

分析时发现，具有血凝活性的抗原决定簇主要位于G2上，并发现与中和活性有关的区域与血凝活性抗原位点是分开的。Arikawa等[33]用24株抗G1和G2的McAb进行分析时发现，在G1蛋白上主要存在中和及血凝位点，中和位点主要是针对本株或本型的。但G2上主要存在血凝位点，与中和活性有关的位点较少，但可同时针对各型病毒。这些资料都证明HFRS病毒的主要中和抗原或保护性抗原决定簇定位在G1和G2蛋白上，是制备疫苗重要的抗原成份。研究M片段和G1、G2蛋白的结构和特性，是了解病毒致病力和疫苗研究的主要目标。

各型间M片段核苷酸同源性的差异也决定各型间抗原性和免疫原性的关系，SEO型与HTN型的同源性约为70%，高于PUU和PH型与HTN的同源性(分别为59%和63%)，在血清学上也表现出SEO型与HTN型的交叉中和反应明显地大于后二者[34,35]。根据大多数文献报道，SEO型对HTN型的交叉反应程度大于HTN对SEO型的反应程度，即SEO型表现抗原性更广谱。国内外也曾经发现在SEO型毒株中有对HTN、SEO二型中和反应相同的广谱毒株[35,36]。尽管两型有较大的交互反应，活毒免疫后的动物血清对本型病毒的抗体水平仍明显高于另一型病毒的水平。灭活病毒免疫的动物除个别外对同型病毒的攻击保护可达80%～100%，对异型的保护只有40%～60%[37]。人体免疫灭活疫苗后抗体阳转率对本型可达90%，而对异型仅为30%[38]。以上结果表明研究出血热病毒M片段基因及编码的G1、G2蛋白对筛选抗原性广谱、免疫原性强的疫苗株有重要意义。

参 考 文 献

1 Stone R. Hantavirus outbreak yields to PCR. Science, 1993, 262: 832－833

2 Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S *et al*. Genetic identification of hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science, 1993, 262: 914～917

3 Parrington MA, Lee P-W, Kang CY. Molecular characterization of the Prospect Hill Virus M RNA segment: a comparison with the M RNA segment of other hantaviruses. J Gen Virology, 1991, 72: 1845～1854

4 Lee PW, Gibbs CJ, Gajdusek DC *et al*. Serotype classification of hantaviruses by indirect immunofluoresent antibody and plaqe reduction neutralization test. J of Clinical Microbiology, 1985, 22: 940～944

5 Sugiyama K, Morikawa S, Matsuura Y *et al*. Four serotypes of hemorrhagic fever with renal syndrome viruses identified by polyclonal and monoclonal antibodies. J Gen Virology, 1987, 68: 979～987

6 Nerurkar VR, Song J-W, Song K-J *et al*. Genetic evidence for a hantavirus enzootic in deer mice caputured a decade before the recognization of hantavirus pulmonary syndrome, Virology, 1994, 204: 563～568

7 Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE *et al*, Identification of a new north American hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency, Am J Trop Med Hyg, 1995, 52(2): 117～123

8 Elliott IH, Kiley MP, McCormick JB. Hantaan virus: identification of virion proteins, J Gen Virol, 1984, 65: 1285～1293

9 Elliott RM. Molecular biology of the Bunyaviridae, J Gen Virol, 1990, 71: 501～522

10 Schmaljoh CS, Schmaljoh AL, Dalrymple. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence and gene order, Virology, 1987, 157: 31－39

11 Yoo DW, Kang CY. Nucleotide sequence of the M segment of the genomic RNA of hantaan virus 76-118, Nucleic Acids Res, 1987, 15: 6299～6300

12 抗长寿，宋干. 流行性出血热. 见：医学病毒学基础及实验技术. 黄祯祥主编. 北京：科学出版社，1990. 532

13 Giebel LB, Stohwasser R, Zoller L *et al*. Determination of the coding capacity of M-genome segment of naphropathia epidemia virus strain Hällnäs B-1 by molecular cloning and nucleotide sequence analysis. Virolrgy, 1989, 172: 498～505

14 Arikawa J, Laoenotiere HF, Iacono-Connors L *et al*. Coding properties of the S and the M genome segments of sapporo rat virus: Comparisom to other causative agents of hemorrhagic fever with renal synerome. Virology, 1990, 176: 114～125

15 Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldmann H *et al*. Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syn-

维普资讯 http://www.cqvip.com

drome. Virology, 1994, 200:715～723

16 Isegawa Y, Tanishita O, Keda S, *et al*. Association of serine in position 1124 of hantaan virus glycoprotein with virulence in mice. J Gen Virol, 1994, 75:3273～3278

17 Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss carbonhydrate from the hemagglutinin? Virology, 1984, 139:303～316

18 Philpott M, Hioe C, Sheerar M *et al*. Hemagglutinin mutations related to attenuation and altered cell tropism of a virulent avian influenza a virus. J of Virology, 1990, 64:2941～2947

19 Beaty BJ, Rozhon EJ, Gensemet P *et al*. Formation of reassortant bunyaviruses in dually infected mosquitoes. Virology, 1981, 111:662～665

20 Shope RE, Rozhon EJ, Bishop DHL. Role of the middle-sized buuyavirus RNA segment in mouse virulence, Virology, 1981, 114:273～276

21 Sundin DR, Beaty BJ, Nathanson N *et al*. A G1 glycoprotein epitope of crosse virus: a determinant of infection of aedes triseriatux. Science, 1987, 235:591～593

22 Kariwa H, Isegawa Y, Arikawa J, *et al*. Comparison of nucleotide sequence of M genome segments among Seoul virus strains isolated from Eastern Asia. Virus Research, 1994, 33:27～38

23 Song KJ, Kim SY, Choi YT. Molecular phylogeny of hantaan virus, The prototype virus of hemorrhagic fever renal syndrom, 3rd inter conference on HFRS and Hantaviruses, Helsinki, Finland, 1995. 107

24 Pilaipan P, Michael D, Luck-Ju B *et al*. Comparison of nucleotide sequences among hanaviruses belonging to the same serotype: an analysis of amplified DNA by thermal cycle sequencig. Virus research, 1993, 30:161－169

25 Song KJ, Kim SY, Choi YJ, *et al*. Hantaan and Seoul virus infection: Phylogenetic analysis of viral sequences amplified from sera of Korean patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, 3rd inter confreence on HFRS and Hantaviruses, Helsinki, Finland, 1995, 48

26 Xiao S-Y, Leduc JW, Chu YK *et al*. Phylogenetic analysis of virus isolates in the genus hantavirus family bunyaviridae. Viology, 1994, 198:205～217

27 Mifang L, Dexin L, Shuyuan X *et al*. Antigenic and molecular characterization of hantavirus isolates from China, Virus research, 1994, 31:219～233

28 Xiao X, Suyu LR, Yiwei T *et al*. Molecular characterization and expression of glycoprotein gene of hantavirus R22 strain isolated from Rattus Norvegicus in China. Virus research, 1991, 21:35～52

29 Yamanishi K, Dantas JR, Takahashi M *et al*. Antigenic difference between two viruses, isolated in Japan and Korea, that cause hemorrhagic fever with renal syndrome. J of Virology, 1984, 52:231～237

30 李德新,宋干,杭长寿等.流行性出血热病毒结构蛋白的研究.病毒学报.1990,6(2):99～104

31 陈伯权,付建林,廖化新等.36个流行性出血热病毒McAb对病毒抗原的分析.中华微生物学和免疫学杂志,1985,5(3):136～139

32 Dantas JR, Jr, Okuno Y, Asada H *et al*. Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrom using monoclonal antibody. Virology, 1986, 151:379～384

33 Arikawa J, Schmaljohn AL, Dalrymple LM *et al*. Characterization of hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1989, 70:615～624

34 Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM *et al*. Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. Science, 1985, 227:1041～1044

35 Lee HW, Lee PW, Baek LJ *et al*. Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. Arch Virol, 1990, [Suppl. 1], 5～18

36 俞永新,安琪,姚志慧等.用空斑减少中和试验比较流行性出血热不同毒株的抗原性.中华微生物学和免疫学杂志,1991,11(3):162～64

37 何浩,俞永新,陈云华等.流行性出血热病毒在金黄地鼠体内的交叉保护研究.中华实验和临床病毒学杂志,1990,4(4):447～449

38 俞永新,姚小剑,董关木等.流行性出血热灭活疫苗对同型病毒的抗体应答.生物制品学杂志,1990,3(1):14～16