

替换 HIV-1 衣壳蛋白基因 SHIV 的构建及其活性测定

朱义鑫^{1,2}, 刘畅², 乔文涛², 陈启民², 耿运琪^{2**}, 曾毅^{1,3**}

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052; 2. 南开大学生命科学院, 天津 300071; 3. 北京工业大学, 北京 100022)

Construction and Characterization of SHIV Carrying HIV-1 Capsid

ZHU Yi-xin^{1,2}, LIU Chang², QIAO Wen-tao², CHEN Qi-min², GENG Yun-qi^{2**}, ZENG Yi^{1**}

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, CDC, Beijing 100052 China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071 China; 3. Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: SHIV (SIV/HIV chimeric virus) proviral DNA carrying Human immunodeficiency virus type1 (HIV-1 HXBc2) capsid was constructed on the backbone of *Simian immunodeficiency virus* (SIVmm239). The gene expression of chimeric virus could be detected in 293T cells transfected by SHIV proviral DNA. Chimeric SHIV virions were also obtained in the supernatant of transfected 293T cells. These virions have complete structures, including genomic RNA, reverse transcriptase, core proteins and envelope with glycoproteins. The chimeric Gag precursor could be appropriately cleaved and lead to the conformation of spindle core in the mature virus particles. They could absorb and enter into MT4 cells and complete the course of reverse transcription, without replication.

Key words: *Simian immunodeficiency virus* (SIV); Human immunodeficiency virus (HIV); SIV/HIV chimeric virus (SHIV); Capsid

摘要: 将猴免疫缺陷病毒 (*Simian immunodeficiency virus*, SIVmm239) 中 *gag* 基因的衣壳蛋白部分置换成人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus type1, HIV-1 HXBc2) 的相应部分, 构建出替换了衣壳蛋白基因的人/猴嵌合免疫缺陷病毒 (SHIV) 原病毒 DNA。用此 SHIV 原病毒 DNA 转染 293T 细胞, 细胞中能够检测到嵌合病毒基因的转录与翻译; 在细胞培养液上清中亦可检测到装配出的病毒颗粒。病毒颗粒形态正常, 含有基因组 RNA, 具有反转录酶活性, 嵌合的外源衣壳蛋白能够正确剪切, 形成棒状的核心。将此嵌合 SHIV 病毒感染 MT4 细胞, 病毒能够吸附并进入细胞, 能完成反转录过程, 但不能增殖。

关键词: SHIV; SIV; HIV-1; 衣壳蛋白

中图分类号: R 511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)04-0346-06

人/猴嵌合免疫缺陷病毒 SHIV, 是一种通过基因重组技术, 置换猴免疫缺陷病毒 (*Simian immunodeficiency virus*, SIV) 和人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 的相应基因而构建的人造病毒。自二十世纪九十年代初, 日本与美国学者开始这类研究以来, 人们构建了多株 SHIV 嵌合病毒, 用于不同研究及应用领域^[1,2]。

SHIV 病毒通常是以 SIVmm239 为骨架, 置换不同亚型的 HIV-1 膜蛋白 *env* 基因 (也包括 *tat*, *rev*, *vpu* 等辅助基因), 进而产生能同时感染人细

胞与恒河猴细胞的嵌合病毒。这些 SHIV 病毒通常能感染恒河猴, 在猴体内复制传代, 有些还能使恒河猴产生类艾滋病症状^[3]。基于 HIV 强毒株构建的 SHIV (如 SHIV89.6P) 建立的 SHIV/恒河猴艾滋病模型, 已广泛应用于研究 HIV 致病机理、免疫机制、包膜变异、细胞嗜性和传播途径方面, 并取得较好研究效果^[4,5]。SHIV/恒河猴艾滋病模型主要应用之一是评价疫苗的有效性: 以 SHIV 作为攻击病毒, 来检验各种艾滋病疫苗对恒河猴的保护作用^[6]。

HIV 的主要抗原集中在膜蛋白与核心蛋白, 目

收稿日期: 2004-12-06, 修回日期: 2005-01-17

作者简介: 朱义鑫 (1978 -), 男, 湖北籍, 博士研究生, 研究方向为微生物学。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-67392001; E-mail: zengyi@public.bta.net.cn

前的艾滋病疫苗主要依据这两类蛋白而设计^[7]。但用替换 HIV-1 膜蛋白 *env* 基因的 SHIV 来评价基于 HIV-1 核心蛋白设计的疫苗,问题之一是疫苗激起的免疫反应针对 HIV-1 核心蛋白,而攻击病毒 SHIV 的核心蛋白来自 SIV。虽然它们的同源性较高(40%~50%氨基酸相同,同源程度到60%~70%左右),免疫交叉反应强^[8~10],但毕竟源于不同种病毒,难于评估疫苗真实的保护效果。

曾经有研究者构建过以 SIV 为骨架,换入 HIV-2 *gag-pol* 基因的 SHIV 嵌合病毒^[11]。此嵌合病毒评价疫苗的问题在于 HIV-2 在序列同源性上与 SIV 更接近,与 HIV-1 同源性反而较远^[8,9],因而这种包含 HIV-2 核心蛋白的 SHIV 也难于准确评估基于 HIV-1 核心蛋白的疫苗。目前尚无置换 HIV-1 核心蛋白的 SHIV 报道。为获得更好的评价疫苗攻击毒株,本文尝试置换用 HIV-1 中免疫原性最强的衣壳蛋白置换 SIV 相应部分,以研究 HIV-1 的衣壳蛋白能否与 SIV 基因组相容,进而包装出嵌合的病毒颗粒,并检测其生物学活性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HIV-1 HXBc2 全基因组 cDNA 由本室保存。SIVmm239 全基因组 cDNA 由美国 Yongjun Guan 博士提供。293T 细胞系和 MT4 细胞系由本室保存。

1.2 SHIV_{CA}全基因组原病毒 cDNA 质粒的构建

嵌合的 SHIV *gag* 基因以及 5'LTR 片段通过 PCR 反应得到。PCR 产物的 5'末端含有来自 SIVmm239 质粒载体的单酶切位点 *Clal*I,而 3'末端含有来自 SIVmm239 基因组内部的单酶切位点 *Sse8387*I。PCR 产物经过 *Clal*V *Sse8387*I 双酶切,连入预先已经经过 *Clal*V *Sse8387*I 双酶切的 SIVmm239 基因组中(质粒载体),得到 SHIV_{CA}。

PCR 反应如下:第一次与第二轮,模板为 SIVmm239。反应程序:94 3min; (94 30s, 55 30s, 72 90s) 10cycles; 72 5min。第一轮上游引物 SHIV *gag* up:5' ²ACGACGGCCA GTGAATT G-3',来自 SIVmm239 质粒载体,下游引物 SHIV *gag* 1:5' ²GTTCTGCACTATA GGGTAA TTTCC TCCTCTG,其中 5'22mer 来自 HIV-1 HXBc2 1200-1179,3'18mer 来自 SIVmm239 1715-1698。第二轮上游引物 SHIV *gag* 2:5' ²GATGACAGC ATGTCAA GGAAGTA GGG-3',其中 3'15mer 来自 HIV-1 HXBc2 1827-1841,5'15mer 来自 SIVmm

239 2359-2373;第二轮下游引物 SHIV *gag* low:5' ²CTTCACTAGAGGTA TGGAG-3',来自 SIVmm239 3474-3455。第三轮反应的模板是前两轮的 PCR 产物外加 HIV-1 HXBc2 质粒,上下游引物是 SHIV *gag* up 和 SHIV *gag* low,反应程序:94 3min; (94 30s, 55 30s, 72 3min) 20cycles; 72 5min。

1.3 转染

按 Polyfect (Qiagen) 说明书进行转染,将 SHIV_{CA}、HIV-1 HXBc2、SIVmm239 质粒分别转染到 293T 细胞中。转染 12h 之后,用 PBS 缓冲液洗涤 293T 细胞 3 遍,以除去残余的质粒与脂质体。换上新鲜的细胞培养基,继续培养 60h。

1.4 病毒浓度的测定与病毒颗粒的富集

将转染的 293T 细胞培养基上清通过 0.22μm 滤膜,即得到了不含细胞碎片的病毒悬液。悬液中病毒的浓度通过 HIV-1 p24 Antigen ELISA 试剂盒测定,方法参照 ZeptoMetix 公司的试剂说明书。一部分病毒悬液用于后面的感染试验,另一部分在 4℃ 经过 30 000g 3h 超速离心而富集。

1.5 病毒颗粒的成分分析与形态观察

把离心富集的病毒颗粒分成四份。一份提取基因组 RNA:用 PBS 缓冲液重悬,加入 DNase,37 30min 彻底除去残余的质粒 DNA,然后用酚仿抽提,乙醇沉淀,RT-PCR 检测。一份测定反转录酶活性:照 Reverse Transcriptase Assay colorimetric kit (Roche) 说明进行。一份对杂合的 Gag 蛋白进行 Western 分析:病毒颗粒直接用蛋白上样缓冲液溶解,经 12%SDS-PAGE 电泳,转到硝酸纤维素膜上,一抗为兔的 Anti-HIV-1 CA 抗血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(购自中山),DAB 显色。最后一份通过电镜进行形态观察:2.5%戊二醛固定,磷钨酸负染,然后于透射电子显微镜下观察。

1.6 感染与传代

将病毒悬液与 MT4 细胞 37℃ 孵育 16h,然后用 PBS 缓冲液洗涤细胞三次,以洗去未结合的病毒颗粒和残存的质粒 DNA 以及脂质体,然后加入新鲜的培养基,每 7d 换一次液。每天取出少许细胞与细胞培养基进行检测。

1.7 细胞的 RNA、DNA 与蛋白质的提取

收集转染后的 293T 细胞或者感染后的 MT4 细胞,用 Tri Reagent (Sigma) 溶解,方法按照 Sigma 公司的试剂说明。

1.8 RT-PCR 和 PCR 检测

在检测 293T 细胞中嵌合病毒基因的转录情

况,以及检测病毒颗粒时是否包含基因组 RNA,需要用到 RT-PCR 检测,共有两对引物。第一对引物检测经过剪切之后的 *tat* 基因 RNA,产物长度 250bp:其中上游引物,Stat RT-PCRup5'-CATT TCA GA GCGGA TGC-3',来自 SIV 6620-6637;下游引物,Stat RT-PCR low 5'-CGGGTCCTGTTGG ATA TG-3',来自 SIV 9082-9065。第二对检测 *gag* 基因 RNA,产物长度 640bp:其中上游引物,Hgag (RT) PCR up 5'-GGTACA TCA GGCCATA TC-3'来自 HIV 1215-1232,下游引物,Hgag (RT) PCR low5'-CTCCTACTCCCTGACATG-3' HIV1852-1835。RT-PCR 用一步法,程序:48 30min,94 3min;(94 30s,55 30s,72 45s) 30cycles;72 5min。在检测嵌合病毒在 MT4 细胞中的逆转录情况的时候,用 PCR 检测病毒基因组 DNA 的情况,引

物和 RT-PCR 的第二对引物相同,程序:94 3min;(94 30s,55 30s,72 45s) 30cycles;72 5min。

2 结果

2.1 获得了 SHIV_{CA}嵌合病毒原病毒 DNA

获得了以 SIV_{mm239} 为骨架,嵌入了 HIV HXBc2 衣壳蛋白基因的 SHIV_{CA},质粒 DNA 序列经酶切与接头测序鉴定正确。SHIV_{CA} 的 Gag 蛋白的如图 1 所示。考虑到蛋白酶对剪切位点的识别问题,我们把右侧的替换位置从 CA-p2 剪切处向 N 端移动了 6 个氨基酸,以保证 SIV 蛋白酶能够对嵌合的 SHIV Gag 前体进行正确剪切。

2.2 嵌合病毒 SHIV_{CA}的基因能在转染的 293T 细胞内正确表达

在转录水平,我们提取 293T 细胞的 RNA,用



图 1 SHIV_{CA}的 Gag 蛋白示意图

Fig. 1 Depiction of SHIV_{CA} Gag protein

Underlined sequence is the final sequence of SHIV_{CA} Gag protein. █ from SIV Gag; █ from HIV Gag

RT-PCR 的方法分别检测到来自 HIV、经过正确拼接的早期基因 *tat* 和晚期基因 *gag*,见图 2。在翻译水平,通过 Western blot,我们在 293T 细胞总蛋白中检测到了嵌合 *gag* 基因的前体、部分剪切产物和最终剪切产物,见图 3。

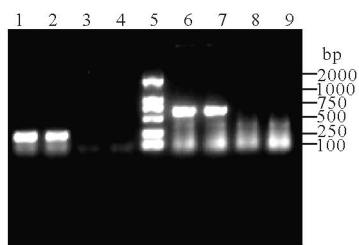


图 2 RT-PCR 检测嵌合病毒基因在 293T 细胞内的表达

Fig. 2 Detection of chimeric virus genes expression in 293T cells by RT-PCR

Lane 1-4, SIV_{tat} gene 250bp. 1, SIV as positive control; 2, SHIV_{CA}; 3/4, Former two samples without R_{Tase} as negative control, 5, DL2000; Lane 6-9, HIV *gag* gene 640bp. 6, HIV as positive control; 7, SHIV_{CA}; 8/9, Former two samples without R_{Tase} as negative control.

2.3 嵌合病毒 SHIV_{CA}能在 293T 中组装出病毒颗粒并释放到胞外

收集转染后的 293T 细胞培养基上清液,经过超速离心之后,电子显微镜观察。能够看到典型的、直径约 100nm 病毒颗粒。颗粒中间有密度较高的棒状内核,显示该颗粒内的核心蛋白已经经过加工和重排,成为成熟的病毒颗粒,见图 4。

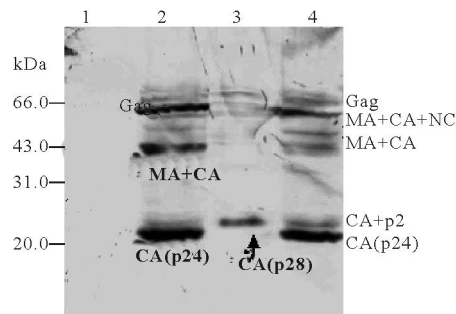


图 3 Western blot 检测嵌合病毒基因在 293T 细胞内的表达

Fig. 3 Detection of chimeric virus genes expression in 293T cells by Western blot

First antibody is anti-HIV CA. Lane1, 293T cell protein as negative control; 2, HIV-1 transfected 293T cells as positive control; 3, SIV transfected 293T cells as positive control; 4, SHIV_{CA} transfected 293T cells.

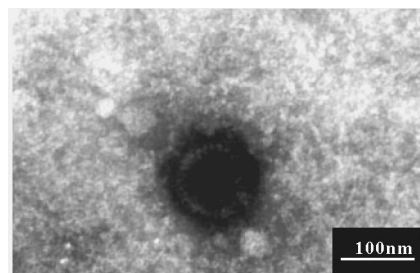


图 4 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒的电镜照片

Fig. 4 EM picture of chimeric SHIV_{CA} virus particle

2.4 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒的 Gag 前体可正确剪切

电镜照片中病毒颗粒形态推测,嵌合的 Gag 前体已经过正确的剪切。为获得直接证据,我们在收集到足够多的病毒颗粒蛋白之后,进行 western blot 分析。分析结果证实,嵌合病毒颗粒的核心蛋白已经过正确剪切,HIV CA 蛋白在病毒颗粒中以单体形式存在,见图 5。

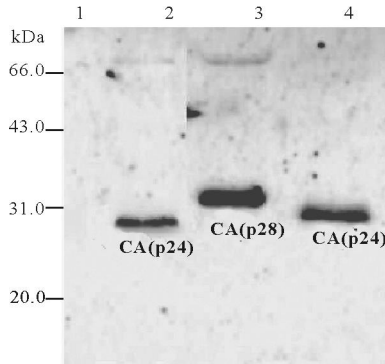


图 5 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒蛋白的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot analysis of virion protein of SHIV_{CA}

First antibody is anti-HIV p24. Lane1. Supernatant of 293T as negative control; Lane2. HIV-1 virus particles as positive control; Lane3. SIV virus particles as positive control; Lane4. SHIV_{CA} virus particles.

2.5 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒具有反转录酶活性和基因组 RNA

为了检验嵌合病毒颗粒的结构完整性,我们检测这些颗粒包含的反转录活性和基因组 RNA。对于反转录酶活性的检测,为了使结果能够定量比较,我们先用 HIV-1 p24 Antigen ELISA 比色法给病毒定量,然后再测定等量的病毒颗粒的反转录酶活性。结果嵌合病毒含有反转录酶活性,在数量上与正对照没有显著差异,见图 6。对于基因组 RNA 检测,我们提取病毒颗粒内的 RNA,用 RT-PCR 的方法进行检测。结果扩增到基因组 RNA 中来自 HIV-1 部分的基因片段,见图 7。

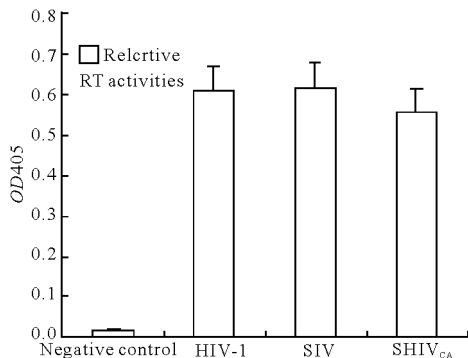


图 6 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒反转录酶活性测定

Fig. 6 Reverse transcriptase assay of SHIV_{CA} chimeric virions

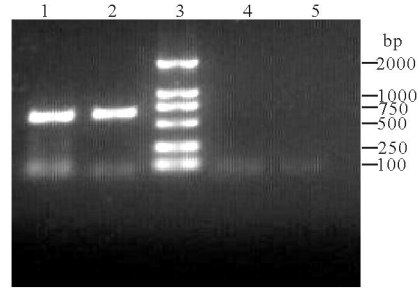


图 7 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒基因组 RNA RT-PCR 检测

Fig. 7 Detection of genomic RNA in SHIV_{CA} chimeric virions by RT-PCR

The amplified fragment is 640bp from HIV gag gene. Lane 1, HIV-1 virions as positive control; 2, SHIV_{CA} virions; 3, DL2000 marker; 4/5. the former 2 samples without RTase as negative control.

2.6 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒能感染 MT4 细胞完成反转录过程

将含有 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒的培养基上清与 MT4 细胞孵育 16h,用 PBS 洗涤三遍,然后换上新鲜培养基再培养 8h。提取细胞的蛋白质和 DNA。通过 Western blot,我们可以在细胞蛋白中检测到 CA 蛋白,说明嵌合病毒能够吸附并且进入 MT4 细胞,见图 8。对于细胞 DNA,通过 PCR 方面能够扩增到 gag 基因,而在 MT4 细胞上清中扩增不到相应的片段。这说明,PCR 的结果不是转染时残留质粒的污染,而是嵌合病毒在 MT4 细胞中完成反转录过程的结果,见图 9。

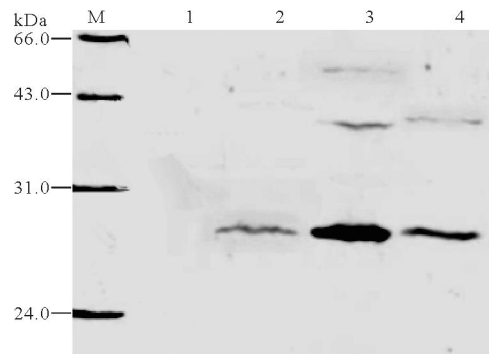


图 8 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒感染 MT4 细胞的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of MT4 cells infected by SHIV_{CA} virus particles.

First antibody is anti-HIV CA. M, Marker; Lane1, MT4 cells as negative control; 2, MT4 cells infected by HIV-1 as positive control; 3, MT4 cells infected by HIV-1 for 7 days as positive control; 4, MT4 cells infected by SHIV_{CA}.

2.7 SHIV_{CA}嵌合病毒颗粒不能在 MT4 细胞中增殖

提取经 SHIV_{CA}嵌合病毒感染后的 MT4 细胞 DNA 与 RNA,通过 Alu-PCR 未能检测到 SHIV_{CA} DNA 的整合;通过 RT-PCR 未能检测到新转录出

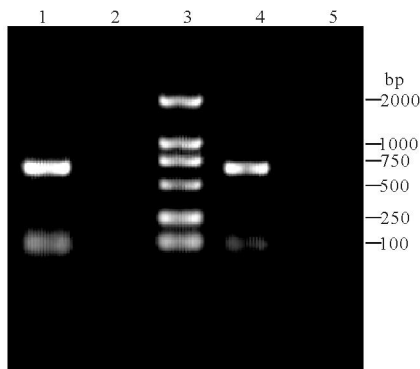


图 9 SHIV_{CA} 嵌合病毒在 MT4 细胞中反转录的 PCR 分析
Fig. 9 Detection of SHIV_{CA} reverse transcripts in MT4 cells by PCR

The amplified fragment is 640bp from HIV gag gene. Lane1, Cellular DNA of MT4 infected by HIV-1 virus as positive control; 2, Supernatant of MT4 cells infected by HIV-1 virus as negative control; 3, DL2000; 4, Cellular DNA of MT4 infected by SHIV_{CA} virions; 5, Supernatant of MT4 cells infected by SHIV_{CA} virions as negative control in proving there is no plasmid DNA remain.

的 RNA。(我们检测的是 *tat* 基因,它在转录后需经剪切,借此可以与病毒携带的基因组 RNA 区别。结果未显示。)此外,我们在三周时间内检测经 SHIV_{CA} 病毒颗粒感染的 MT4 细胞培养基上清中 CA 蛋白浓度的变化。结果显示,CA 蛋白浓度随着细胞换液(RM)而下降,三周后,浓度降低到背景水平,见图 10。

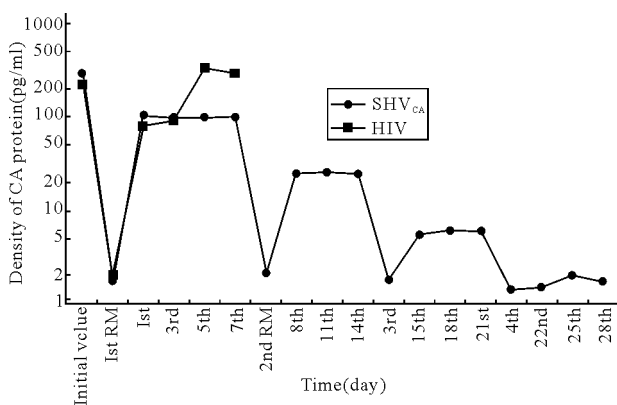


图 10 SHIV_{CA} 病毒感染 MT4 细胞后培养基上清中 CA 蛋白浓度的动态变化

Fig. 10 Dynamics of HIV CA density in the supernatant of MT4 cells infected by SHIV_{CA}

RM: replacement of cell culture medium.

3 讨论

人类与严重传染病斗争的历史经验表明:战胜传染病最有效、最经济的办法就是开发有效的疫苗。鉴于我国目前日益严峻的艾滋病发展趋势,开发有效的 HIV 疫苗应该成为我国的优先考虑及艾滋病研究领域的最终目标^[12]。开发疫苗的前提条件是

建立有效的疫苗评价体系,包括合适的动物模型与攻击病毒。如前所述,即使使用携带我国流行亚型的 SHIV 攻击病毒也无法准确评估基于 HIV-1 *gag* 基因的疫苗。鉴于此,我们进行了替换 HIV-1 *gag* 衣壳蛋白基因替换的 SHIV 构建。

初步实验结果表明,HIV-1 的 CA 蛋白仅可部分替代 SIV CA 的功能。对转染后的 293T 细胞各种成分的分析表明,SHIV_{CA} 嵌合病毒能在人细胞中进行正常的转录、转录后加工、翻译和病毒颗粒的装配。对纯化后富集出的病毒蛋白进行 western blot 分析表明,在病毒颗粒内部,嵌合的 Gag 前体可以正常剪切,导致病毒颗粒核心的重排,产生出成熟的病毒粒子。这与电镜结果一致。对病毒颗粒的进一步分析还表明,这些病毒粒子具有完整的结构,包括基因组 RNA、反转录酶、核心蛋白和膜蛋白。感染实验表明,嵌合病毒可以感染人源的 MT4 细胞,且可完成反转录过程。通过 western blot 可以从细胞中检测到来自病毒的蛋白,也能够通过 PCR 在细胞中检测到来自病毒 RNA 反转录出的 DNA,推测因感染而进入 MT4 细胞的病毒粒子可以再次出芽到细胞外,在 SHIV_{CA} 嵌合病毒感染 MT4 细胞后培养基中新出现的 CA 蛋白,不是源于感染之后产生的子代病毒颗粒。这是因为:首先,时间与病毒的复制周期不符合,子代病毒一般在感染后 48-72h 才出现;其次,CA 蛋白浓度的时间动态变化也没有逐渐积累的过程,CA 蛋白浓度在细胞换液之前几乎维持恒定;第三,与感染细胞内的病毒成分分析结果不符合,我们没有在感染的细胞中检测到病毒基因组 DNA 的整合,也没检测到新产生 RNA。

SHIV_{CA} 嵌合病毒在感染 MT4 细胞后未能产生子代病毒,最大可能在于 SHIV_{CA} 嵌合病毒的前整合复合体通过核孔失败,未能进入细胞核。慢病毒之所以能感染未分裂的细胞,在于它能够通过核孔进入细胞核,无需细胞分裂时的核膜解构^[13]。但是,慢病毒的前整合复合体通过核孔也需要一定条件:以 HIV 为例,反转录后的 HIV 核心要经过复杂的变形,从近于圆形变形为狭长的、直径 28nm、长 3.3 μ m 的前整合复合体结构。在变形与随后的核输入中,基质蛋白、衣壳蛋白、核衣壳蛋白以及 Vpr 都扮演了重要的角色^[14,15]。推测 HIV 衣壳蛋白 CA 在这些过程中不能完全替代行使 SIV 衣壳蛋白 CA 的功能,而导致核输入过程失败。

下一步工作改进方法:一条是减少嵌合替代的区域,把嵌合替代集中到关键性的抗原决定簇,尽量减少对 SIV Gag 蛋白功能的影响,以增加成功率

率;另一条是增加嵌合替代的区域,用 HIV Gag 蛋白替代大部分 SIV Gag 蛋白,使基质蛋白、衣壳蛋白以及核衣壳蛋白之间能够相互协调,可能增加成功的机会。

参考文献

- [1] Shibata R, Sakai H, Kiyomasu T, *et al.* Generation and characterization of infectious chimeric clones between human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus from an African green monkey [J]. *J Virol*, 1990, 64 (12): 5861-5868.
- [2] Li J, Lord C I, Haseltine W, *et al.* Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/ SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1992, 5(7): 639-646.
- [3] Carla K. Reagents for HIV/SIV Vaccine Studies [DB/OL]. 2001, HIV Database Review Available from URL: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/reviews.html>
- [4] Haga T, Kuwata T, Ui M, *et al.* A new approach to AIDS research and prevention: the use of gene-mutated HIV-1/ SIV chimeric viruses for anti-HIV-1 live-attenuated vaccines [J]. *Microbiol Immunol*, 1998, 42(4): 245-251.
- [5] Joag SV. Primate models of AIDS [J]. *Microbes Infect*, 2000, 2(2): 223-229.
- [6] Xu W, Hofmann-Lehmann R, McClure H M, *et al.* Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV [J]. *Vaccine*, 2002, 6; 20(15): 1956-1960.
- [7] IAVI database of AIDS vaccines in human trials [DB/OL]. updated: September 29, 2004. Available from: URL: <http://www.iavireport.org/trialsdb/default.asp>
- [8] Tsujimoto H, Cooper R W, Kodama T, *et al.* Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from man-drills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses [J]. *J Virol*, 1988, 62 (11): 4044-4050.
- [9] Henderson L E, Benveniste R E, Sowder R, *et al.* Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIVMne) [J]. *J Virol*, 1988, 62(8): 2587-2595.
- [10] Chakrabarti L, Guyader M, Alizon M, *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses [J]. *Nature*, 1987, 328:543-547.
- [11] Ranjbar S, Bhattacharya U, Oram J, *et al.* Construction of infectious SIV/ HIV-2 chimeras [J]. *AIDS*, 2000, 14(16): 2479-2484.
- [12] UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic 2004 [DB/OL]. 26-29. Available from URL: http://www.unaids.org/bangkok2004/GAR2004_html/GAR2004_00_en.htm
- [13] Gallay P, Swingler S, Aiken C, *et al.* HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator [J]. *Cell*, 1995, 80 (3): 379-388.
- [14] Fouchier R A, Malim M H. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes [J]. *Adv Virus Res*, 1999, 52:275-299.
- [15] Sherman M P, Greene W C. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4: 67-73.