

## 犬瘟热病毒核蛋白基因重组腺病毒的构建、鉴定与表达\*

鞠会艳<sup>1,2</sup>, 夏咸柱<sup>1\*\*</sup>, 高玉伟<sup>1</sup>, 杨松涛<sup>1</sup>,  
邹啸环<sup>1</sup>, 黄耕<sup>1</sup>, 李彦舫<sup>2</sup>

(1.军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 2.吉林大学农学部, 吉林长春 130062)

### Construction and Identification of a Recombinant Canine Adenovirus

#### Expressing Nucleocapsid Protein of Canine Distemper Virus

JU Hui-yan<sup>1,2</sup>, XIA Xian-zhu<sup>1\*\*</sup>, GAO Yu-wei<sup>1</sup>, YANG Song-tao<sup>1</sup>,  
ZOU Xiao-huan<sup>1</sup>, HUANG Geng<sup>1</sup>, LI Yan-fang<sup>2</sup>

(1.Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science of PLA, Changchun 130062, China;  
2.Department of Agricultural Science, Jilin University, Changchun 130062, China )

**Abstract:** The nucleocapsid protein gene (N) located 108 to 1679 situation of *Canine distemper virus* (CDV) genome and was immunogenicity protein with strong conservatism, so N gene was choosed as aim gene. A shuttle plasmid pVAXΔE3LPN containing the gene encoding the nucleocapsid protein of CDV was constructed by restriction endonuclease digestion and ligation. A recombinant plasmid pCAV-2-CDVLPN was constructed with pPoly2-CAV-2 vector containing CAV-2 SY genome. The plasmid pCAV-2-CDVLPN was transfected into MDCK cells by Lipofectamine and after three transfections, a typical CAV-2 cytopathic effect (CPE) was observed. We demonstrated that a recombinant canine adenovirus type-2 expressing nucleocapsid protein of canine distemper virus was successfully constructed and observed by electron microscopy, enzyme digestion, PCR and sequencing. The molecular mass of nucleocapsid protein was 58 kDa.

**Key words:** *Canine distemper virus* (CDV); Nucleocapsid Protein; *Canine adenovirus* (CAV); Recombinant virus

**摘要:** 核蛋白基因 (N) 位于犬瘟热病毒基因组的 108—1679 位置处, 是保守性较强的免疫原性蛋白, 因此选择 N 基因作为目的基因, 利用酶切、连接等方法构建了含犬瘟热病毒核蛋白基因的穿梭质粒 pVAXΔE3LPN。以含 CAV-2 SY 株全基因组的 pPoly2-CAV-2 为载体, 构建了重组质粒 pCAV-2-CDVLPN, 利用脂质体介导法转染 MDCK 细胞, 转染三次后, 细胞出现了典型的腺病毒样病变。电镜负染、切片观察, 酶切、PCR 扩增及测序鉴定的结果表明表达犬瘟热核蛋白基因的重组犬 2 型腺病毒构建成功, 表达的核蛋白分子量为 58kDa。

**关键词:** 犬瘟热病毒; 核蛋白; 犬腺病毒; 重组病毒

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0380-05

犬瘟热病毒(*Canine distemper virus*, CDV)是犬瘟热(*Canine Distemper*, CD)的病原。CDV 致病性、传染性强, 由其引起的犬瘟热是一种急性、高度接触

性传染病, 该病几乎呈世界性分布, 对养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业的危害严重。所以, 对 CD 的有效预防已迫在眉睫。疫苗接种是防

收稿日期: 2006-01-24, 修回日期: 2006-04-06

\* 基金项目: 全军医药卫生科研基金课题 01-Z-092

作者简介: 鞠会艳 (1970-), 女, 吉林省乾安籍, 副教授, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学。Tel: 0431-6985519 E-mail:jhuiyan@163.com

\*\* 通讯作者: 夏咸柱 (1939-), 男, 江苏建湖籍, 中国工程院院士。Corresponding author. Tel: 0431-6758799; E-mail: xia\_xianzhu@yahoo.com.cn

治 CD 的有效途径, 虽然, 弱毒疫苗的应用在一定程度上控制了犬瘟热的流行, 但在使用过程中也发现了一些问题<sup>[1~4]</sup>。因而, 急需研究廉价、安全、有效的新型疫苗。近年来, 国内外学者已着手于 CDV 基因疫苗、亚单位多肽苗和重组活苗等新型疫苗的研究, 但尚未见到商品苗。

CDV 属于副粘病毒科麻疹病毒属的负链线性 RNA 病毒, 病毒的主要结构蛋白有 N、P、M、F、H 和 L 蛋白, 其中核蛋白 N 是麻疹病毒属中主要的交叉抗原, 是保守性较强的免疫原性蛋白, 该蛋白在犬瘟热感染的早期免疫应答中起主导作用, 其在病毒感染时可引起强烈的抗体反应。而且, N 蛋白上含有 T 淋巴细胞表位, 在细胞免疫方面发挥着重要的作用<sup>[5~10]</sup>。因此, 针对 N 蛋白构建重组疫苗对预防犬瘟热暴发有十分重要的意义。本试验构建重组病毒时所用的犬 2 型腺病毒载体是利用军事医学科学院军事兽医研究所长期驯化致弱的 CAV-2 (Canine adenovirus-2) SY 株构建的, 该株具有免疫原性好、安全性好以及良好的遗传稳定性等特点。以含 CAV-2 SY 株全基因组的 pPoly2-CAV-2 为载体构建表达犬瘟热核蛋白基因的重组犬 2 型腺病毒, 对进一步研究预防犬瘟热爆发的重组疫苗奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞、细菌和质粒

CAV-2 SY 株、MDCK 细胞、*E.coli* JM109 由军事医学科学院军事兽医研究所实验室保存。含 CAV-2 SY 全基因组的 pPoly2-CAV-2 载体质粒、转移质粒 pVAXΔE3(含 CAV-2 的 E3 区)和真核表达载体 pVAXLPN 均由军事医学科学院军事兽医研究所实验室构建与保存。

### 1.2 主要试剂

各种限制性内切酶、小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP)、DNA Blunting kit 均为 TaKaRa 公司产品; T4 连接酶购自 Promega 公司; Asc I 购自纽英伦生物技术有限公司; 脂质体转染试剂和 DMEM 细胞培养基购于 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购于 Vitagene 公司。

### 1.3 CAV-2 基因组的提取<sup>[11]</sup>

将接种 CAV-2 SY 株种毒的 MDCK 细胞在 37℃ 条件下静置培养至 80% 的细胞出现病变时, 弃上清, 倒置, 使培养液流尽。加入 800 μL 新鲜配置的裂解

液, 37℃ 作用 1h 裂解细胞, 将粘性的裂解物移至离心管中, 往离心管中逐滴加入 5 mol/L NaCl 200 μL, 混匀, 置冰水浴中 1h 以上, 12 000 r/min 离心, 用酚/氯仿、氯仿/异戊醇抽提上清, 取上层水相, 加 1/10 体积 3 mol/L (pH 5.2) NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20℃ 放置 30 min, 离心, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 室温干燥后溶于适量 TE 中, 冻存备用。

### 1.4 犬瘟热病毒核蛋白基因重组腺病毒的构建<sup>[12]</sup>

1.4.1 穿梭质粒 pVAXΔE3LPN 的构建: 真核表达载体 pVAXLPN 经 *Mlu* I 和 *Sph* I 双酶切后, 回收目的片段 CDV N 基因表达盒 (pCMV-N-polyA), 并对该目的片段两端进行平端化; pVAXΔE3 经 *Ssp* I 酶切后, 用小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP) 对其 5' 端去磷酸化。将 CDV N 基因表达盒连接到 pVAXΔE3 的 E3 区缺失处, 并筛选 CDV N 基因表达盒方向与 E3 区转录方向一致的重组子, 获得了含 CDV N 基因表达盒的穿梭质粒, 命名为 pVAXΔE3LPN。用不同的限制性内切酶对所获得的重组子进行酶切鉴定。

1.4.2 重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 的构建: 用 *Nru* I 和 *Sal* I 双酶切穿梭质粒 pVAXΔE3LPN, 回收目的片段, 纯化后定向克隆入预先用 *Nru* I 和 *Sal* I 酶切回收的 pPoly2-CAV-2 中, 构建犬 2 型腺病毒重组质粒 pCAV-2-CDVLPN。用 *Nru* I 和 *Sal* I、*EcoR* I、*BamH* I 分别对重组子 pCAV-2-CDVLPN 进行酶切鉴定。

1.4.3 重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 转染 MDCK 细胞: 重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 经 *Asc* I 酶切后, 获得线性基因组 CAV-2-CDVLPN。用 *Nru* I 和 *Sal* I 分别酶切 CAV-2 SY 全基因组, 用 *Nru* I 酶切的回收大片段, 用 *Sal* I 酶切的回收小片段。这 2 个片段与线性的重组基因组 CAV-2-CDVLPN 按摩尔比 1:1:1 混合, 利用脂质体介导共转染 MDCK 细胞。转染后, 如果不出现 CPE, 则按常规细胞进行传代培养, 每传 1 次则重复转染 1 次, 如果重复转染 5 次, 仍不出现 CPE, 则视为转染失败。如出现 CPE, 则进行常规病毒增殖, 并将获得的重组病毒命名为 CAV-2-CDVLPN, 即为构建的含犬瘟热病毒核蛋白基因的重组犬 2 型腺病毒。

### 1.5 犬瘟热病毒核蛋白基因重组腺病毒的鉴定

第五代重组病毒 CAV-2-CDVLPN 培养物的上清用 0.5% 的磷钨酸负染, 进行电镜观察; 无菌将细

胞刮下以戊二醛与锇酸双固定,用 F812 环氧树脂包埋、切片、染色,作电镜超微结构观察。

当第五代重组病毒培养至 80% 细胞出现 CPE,但是仍未脱落,按提取腺病毒全基因组的方法,提取重组病毒的全基因组,用不同的限制性内切酶对其进行酶切鉴定。

根据 GenBank 中的 CAV-2 Toronto A26/61 株(登录号为 U77082)的 E3 序列设计一对特异性引物,上游引物(E3F): 5' - TGAGGAGAGCATGGA CCAGG TGGAGGTGAA -3'; 下游引物(E3R): 5' - GTCATAATTTGCAGGTAGAGCTCTTCGTGT -3'。以重组病毒基因组 DNA 为模板,扩增分别含有 CDV N 表达盒核酸片段(在两侧含有 E3 区的部分序列),以 1% 琼脂糖凝胶电泳。回收 PCR 产物,将其克隆入 pMD18-T 载体中,利用不同的限制性内切酶对重组子进行鉴定,将鉴定正确的重组子进行测序。

## 1.6 重组病毒中犬瘟热病毒核蛋白表达的检测

1.6.1 N 基因转录水平的检测:用 mRNA 提取试剂盒提取第五代重组病毒的 mRNA,将提取的 mRNA 用 CDV N 基因特异性引物进行 RT-PCR,以检测 N 基因是否转录。同时,用 CAV-2 感染的 MDCK 细胞培养物作为阴性对照。

1.6.2 N 蛋白表达的检测:用第 4 代重组病毒接种一瓶 MDCK 细胞,同时用 CAV-2 接种另一瓶 MDCK 细胞作为阴性对照。37℃ 静置培养至大多数细胞出现 CPE,但是仍未脱落,倒掉细胞培养液,并用 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 3 次,以除去培养液中的血清蛋白。然后,加入适量的 PBS 液,反复冻融 3 次,5000r/min 离心 10min,弃去细胞碎片,收集上清液。将上清用超滤离心管除盐和浓缩;取浓缩产物 10μL 与等体积的 2× 上样缓冲液混匀 100℃ 煮沸 5min,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后转膜,进行 Western-blot 分析。一抗为抗 CDV 多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG 抗体。

## 2 结果

### 2.1 犬瘟热病毒核蛋白基因重组犬 2 型腺病毒的构建

含犬瘟热核蛋白基因的真核表达载体 pVAXL-PN 经 *Mlu* I 和 *Sph* I 双酶切后,切出约 2541bp、1269bp 和 730bp 3 个片段,进行凝胶电泳回收 2541bp

的目的片段 CDV N 基因表达盒(pCMV-N-polyA)。

在 pVAXΔE3 的 E3 区缺失处连接了 CDVLPN 基因表达盒后,获得了 CDV N 基因表达盒方向与 E3 区转录方向一致的重组子 pVAXΔE3LPN。该重组子经 *Nru* I 和 *Sal* I、*Xba* I、*EcoR* V、*EcoR* I、*Xho* I、*Bam*H I 分别酶切鉴定。*Nru* I 和 *Sal* I 切出 5823, 2404, 1311bp 3 个片段,其中 5823bp 的片段即为要回收的含 CDV N 基因表达盒的片段;*Xba* I 切出 4010, 3200, 2328bp 3 个片段;*EcoR* V 切出 6363, 3175bp 2 个片段;*EcoR* I 将重组子 pVAXΔE3LPN 线性化,切出 1 个 9538bp 的片段;*Xho* I 切出 3863, 3347, 2328bp 3 个片段;*Bam*H I 切出 3298, 2878, 1334, 851bp 和 722bp 5 个片段,酶切鉴定结果与理论值一致,表明穿梭质粒 pVAXΔE3LPN 构建正确。

构建的重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 经 *Nru* I 和 *Sal* I、*EcoR* I、*Bam*H I 酶切后,*Nru* I 和 *Sal* I 双酶切出 29.261kb 和含 CDV N 基因表达盒的 5.823kb 2 个片段;*EcoR* I 切出约 2.3, 8.1, 4kb 3 个片段;*Bam*H I 切出约 14, 10, 2.4, 1.8, 0.85, 0.75, 0.5 kb, 等 7 个片段,酶切鉴定结果与理论值一致,表明构建的重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 正确。

重组质粒 pCAV-2-CDVLPN 经 *Asc* I 酶切后,获得了线性基因组 CAV-2-CDVLPN,利用脂质体介导法转染 MDCK 细胞,在 37℃ 条件下,用 10%DMEM 培养,重复转染 3 次后,MDCK 细胞出现典型的 CAV-2 样 CPE,开始时细胞圆肿发亮,逐渐聚集成葡萄串样,最后从瓶壁上脱落。表明重组 pCAV-2-CDVLPN 基因组转染 MDCK 细胞成功,已获得重组病毒 CAV-2-CDVLPN,表达犬瘟热病毒核蛋白的重组犬 2 型腺病毒构建成功。

### 2.2 犬瘟热病毒核蛋白基因重组犬 2 型腺病毒的鉴定

2.2.1 重组病毒 CAV-2-CDVLPN 形态学观察:利用第 5 代重组病毒 CAV-2-CDVLPN 的上清作电镜负染观察,见有呈 20 面立体对称、直径约 80nm、表面具有排列整齐壳粒的腺病毒样粒子(图 1),取细胞成分作电镜超微结构观察,有呈结晶状排列的腺病毒样病毒粒子(图 2)。

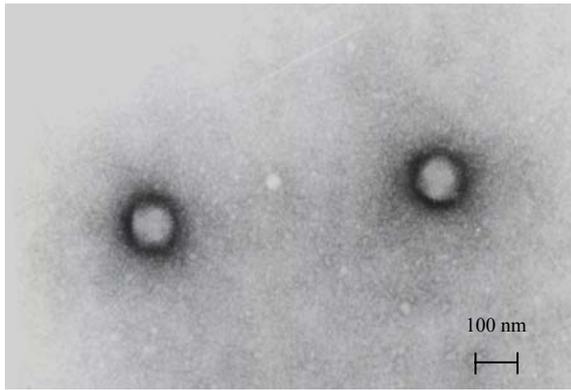


图1 CAV-2-CDVLPN 的负染电镜照片  
Fig.1 E.M. of CAV-2-CDVLPN

100 nm  
┌──┐



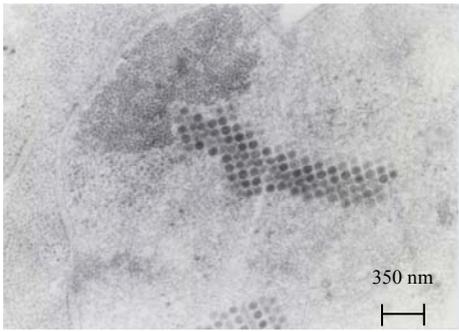


图2 CAV-2-CDVLPN 的电镜超微结构照片

Fig.2 Ultramicroscopic structure of CAV-2-CDVLPN

2.2.2 重组病毒 CAV-2-CDVLPN 基因组酶切鉴定: 按 CAV-2 基因组的提取方法提取第 5 代重组病毒 CAV-2-CDVLPN 全基因组, 分别用 *EcoR* I、*Sal* I 和 *Nru* I、*Kpn* I、*Hind* III、*BamH* I、*EcoR* V、*Ssp* I、*Nde* I 酶切鉴定, 结果与理论值一致, 表明构建的重组病毒正确。

2.2.3 重组病毒 CAV-2-CDVLPN PCR 扩增鉴定: 以提取的重组病毒 CAV-2-CDVLPN 基因组 DNA 为模板, 用 CAV-2 E3 特异性引物扩增出 3348 bp 大小的片段, 而正常 CAV-2 只能扩增出 1500bp 大小的片段; 用 CDV *N* 基因特异性引物从重组病毒 DNA 中扩增出 1571bp 大小的 *N* 基因片段, 而正常的 CAV-2 扩增结果为阴性。

2.2.4 重组病毒 PCR 产物序列测定: 用 CAV-2 E3 特异性引物从重组病毒 CAV-2-CDVLPN 中扩增出特异性片段, 该片段经回收、纯化后进行测序, 测序结果表明该序列中包含 CAV-2 E3 区相关序列、pVAX1 相关序列和 CDV *N* 基因序列, 表明所构建的重组病毒 CAV-2-CDVLPN 完全正确。

### 2.3 犬瘟热病毒核蛋白在重组犬 2 型腺病毒中表

#### 达的检测

以 CDV *N* 基因特异性引物用 RT-PCR 法从重组病毒 CAV-2-CDVLPN 的 mRNA 中扩增出 *N* 基因特异性片段, 而从正常 CAV-2 感染的 MDCK 细胞中扩增的结果为阴性 (图 3)。重组病毒 CAV-2-CDVLPN 表达的 *N* 蛋白可被抗 CDV 多克隆抗体所识别, 表达蛋白分子量约为 58kDa, 与预期的分子量相符, 而正常的腺病毒阴性对照却无此特异性条带 (图 4)。

## 3 讨论

腺病毒载体是最常用的表达外源性蛋白的病毒活载体之一, 是很好的表达重组抗原的载体系

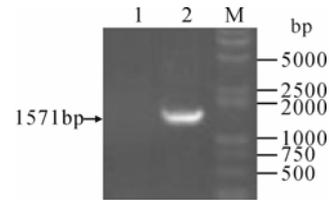


图3 重组病毒 CAV-2-CDVLPN 中 *N* 基因转录的检测

Fig.3 *N* gene transcription identification of CAV-2-CDVLPN virus 1, Normal CAV-2 RT-PCR/ *N* primer; 2, Recombinant CAV-2-CDVLPN RT-PCR/ *N* primer; M, DL-15000+2000 Marker.



图4 重组病毒中表达的 *N* 蛋白

Fig.4 Expression of *N* protein of recombinant virus M, Prestained Protein Marker; 1, *N* protein of recombinant virus; 2, normal CAV-2 virus.

统, 腺病毒载体表达系统由转移质粒、腺病毒基因组、包装细胞构成, 能将外源性基因导入细胞和动物体内进行表达, 具有宿主范围广、重组病毒滴度高、所介导的外源性基因的表达水平高以及病毒基因组与宿主细胞染色体稳定整合的几率很低等优点, 并且腺病毒载体表达的外源蛋白具有天然蛋白的特性。本实验中所用的犬 2 型腺病毒载体 (CAV-2) 是以本实验室长期驯化致弱的 CAV-2 SY 株为基础构建的, 该株具有免疫原性好、安全性好以及良好的遗传稳定性等特点。CAV-2 能在犬的组织细胞中复制生长, 不能在犬、猴及牛等细胞中生长, 安全性好。在此基础上, 本研究以 CAV-2 为载体构建了表达 CDVLP 株核蛋白的重组病毒<sup>[13]</sup>。

腺病毒 DNA 基因组至少有三个区域 (E1、E3 和 E4 区的上游) 可插入外源 DNA。E3 区位于腺病毒基因组的 24920~26441 之间, 约 1500bp, 是腺病毒生长的非必需区, 缺失或取代 E3 区大部分碱基的腺病毒在细胞上仍能生长, 对 E3 区进行缺失可以增加外源基因片段的载容量, 所以 E3 区常被用来插入外源基因构建重组疫苗。在正常情况下, CAV-2 的最大包装容量为野生型腺病毒基因组的 105%, 即在不缺失的情况下可插入约 1.6kb 的外源基因。本实验采用 *Ssp* I 对 E3 区进行酶切,

将 E3 区缺失掉 859bp, 理论上可插入 2500bp 的目的片段。本实验中插入 E3 区的 CDV N 基因表达盒大小为 2541bp。

外源基因表达盒在重组基因组中的方向会影响外源基因的表达, 插到 E3 区的外源基因表达盒的方向与 E3 区的方向一致时, 外源基因才能高效表达。本研究对 CAV-2 SY 的 E3 区的 *Ssp* I 片段进行了缺失, 然后将 CDVLPN 基因表达盒克隆入 E3 缺失处, 获得了 CDVLPN 蛋白基因表达盒与 E3 区转录同向的转移质粒 pVAX Δ E3LPN。

腺病毒是最常用的病毒载体之一, 构建腺病毒载体的方法不断改进。约在 10 年前, 大多数腺病毒载体是用体外连接的方法构建的。改良的体外连接方法是用两个载体在体外进行连接, 不需要进行同源重组, 腺病毒的基因组很大, 单一的酶切位点很少, 但可以选用稀有的限制性内切酶<sup>[14,15]</sup>。本实验采用改良体外连接的方法, 分别用 *Nru* I 和 *Sal* I 对 pPoly2-CAV-2 和 pVAX Δ E3LPN 进行双酶切, 进行凝胶电泳, 回收目的片段, 将两个目的片段在体外进行连接。这样通过 T4 连接酶将 CDV N 基因表达盒定向克隆入 pPoly2-CAV-2, 获得了含有 CDV N 基因表达盒的重组质粒 pCAV-2-CDVLPN。

本实验利用脂质体介导共转染 MDCK 细胞方法, 成功构建了表达犬瘟热核蛋白的重组犬 2 型腺病毒, 为研制有效预防犬瘟热暴发的新型重组疫苗奠定了基础。

## References

- [1] Li J J, Ding Q L (李建军, 丁巧玲). Study advance in canine distemper of our country [J]. Chin J Veter Med (中国兽医杂志), 2003, 39 (1): 34-38.
- [2] Geng Z H X, Tian K G (耿志贤, 田克恭). Progress in molecular biology of canine distemper virus [J]. Chin Veter Med (中国兽医杂志), 1997, 23 (2): 45-46.
- [3] Xu X X, Cui Z Z (徐向明, 崔治中). The development of gene engineering vaccine of canine distemper [J]. Chin J Anim Husban Veter Med (畜牧兽医科技信息), 2002, 6: 10-12.
- [4] Gao W, Yang J (高 娃, 杨 敬). Study advance in molecular biology of canine distemper virus [J]. Chin J Compar Med (中国比较医学杂志), 2004, 14 (4): 241-244.
- [5] Wang G T, Yan Q S, Liu C M (江国托, 闫庆生, 刘长明) *et al.*. Analysis of structural polypeptides of canine distemper virus [J]. Chin J Veter Med (中国兽医杂志), 1995, 21 (12): 5-7.
- [6] HE H B, XIA X Z (何洪彬, 夏咸柱). The development of diagnosis and active immunization of canine distemper [J]. Prog Veter Med (动物医学进展), 2001, 22 (1): 12-21.
- [7] Yin Z, Liu J H (殷 震, 刘景华). Animal Virology (动物病毒学) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [8] Yang J (杨 敬). Cloning and expression of canine distemper virus nucleocapsid protein gene fragment in E.coli [J]. Acta Laborator Anim Sci Sinica (中国实验动物学报), 2002, 10 (3): 165-168.
- [9] Zong W F (宗卫峰). Cloning and expression of canine distemper virus nucleocapsid protein gene [J]. J Yangzhou Univ (扬州大学学报), 2003, 24 (3): 8-11.
- [10] Li J Z, Xia X Z, He H B, (李金中, 夏咸柱, 何洪彬) *et al.* The nucleotide sequence of the 3' end of fusion protein gene of canine distemper virus giant panda strain [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 1999, 14 (2): 174-180.
- [11] Morikazu S. A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells [J]. Microbiol Immunol, 1983, 27 (9): 817-822.
- [12] Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [13] Zhang X Z, Peng Z H (张晓志, 彭朝晖). Security Question about Adenovirus Vector [J]. Foreign Med Sci (Section of Virology) (国外医学 (病毒学分册)), 1999, 6 (1): 24-27.
- [14] He J S, Wang J W, Hong T (何金生, 王健伟, 洪 涛). Progress in construction principle and method of adenovirus vector [J]. Chin J Exper Clin Virol (中华实验和临床病毒学杂志), 2001, 15 (4): 399-400.
- [15] Berkner K L, Sharp P A. Generation of adenovirus by transfection of plasmids [J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11: 6003-6020.