

H5 亚型禽流感病毒 HA 基因昆虫/杆状病毒系统的表达及对 BALB/c 小鼠的免疫保护

Protection of Mice against a Lethal Avian H5 Subtype Influenza Challenge by Baculovirus-derived Hemagglutinin Vaccines

孟庆文/MENG Qing-wen^{1,2}, 刘光亮/LIU Guang-liang¹, 于康震/YU Kang-zhen³, 童光志/TONG Guang-zhi¹, 刘 娣/LIU Di², 施建忠/SHI Jian-zhong¹, 陈化兰/CHEN Hua-lan¹

1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 农业部动物流感重点开放实验室、兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001
2. 东北林业大学博士后流动站、黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨 150086
3. 农业部畜牧兽医总站, 北京 100026

1. Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China
2. Northeast Forest University Postdoctor Station, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Postdoctor Station, Harbin 150086, China
3. General Station of National Animal Husbandry and Veterinary, Beijing 100026, China

[摘要] 经 RT-PCR 扩增了禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 H5N1 亚型 1.7kb HA 基因的 cDNA, 将其克隆到 pMD18-T 中并测序。亚克隆到杆状病毒转移载体 pMelBacA 的蜜蜂蜂毒素分泌信号下游中, 测序正确后与线性化的杆状病毒 DNA (Bac-N-Blue™ DNA) 共转染 Sf9 昆虫细胞。将重组杆状病毒感染 HFive 细胞, 72h 左右收获细胞, 超声波裂解, SDS-PAGE 结果表明 HA 基因在重组杆状病毒感染的 HFive 细胞中获得表达。蛋白胶薄层扫描分析显示: 表达的 HA 蛋白占重组杆状病毒感染细胞总蛋白含量的 17.1%。Western-blot 及血凝实验结果显示: 表达的禽流感 H5N1 亚型病毒 HA 蛋白具有生物学活性。表达的 H5 HA 蛋白定量乳化后, 皮下多点注射免疫 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠, 免疫后产生了 H5 HA 特异抗体, 并在三免前后达到并保持较高水平。用致死剂量的 HPAIV H5N1 攻击小鼠, 免疫组小鼠提供了 100% 的保护力, 而对照组小鼠先后发病且死亡; 为研制禽流感 H5N1 亚型病毒亚单位疫苗、防制禽流感奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒血凝素; 重组杆状病毒; 亚单位疫苗; 免疫保护

[中图分类号] S855.3, S852.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857 (2006) 03-0005-04

Abstract: The HA gene of a highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) isolate (A/goose/Guangdong/1/96(H5N1)) was cloned and sequenced, then subcloned into the downstream of the baculovirus transfer vector pMelBacA. HA test and Western blot analysis demonstrated stable expression of the HA proteins. The oil-emulsion avian influenza subunit vaccine was prepared using expressed rH5HA (recombination H5HA protein) by allantoic fluid. SPF Balb/c mice were immunized three times with prepared subunit vaccine (contain 2.0 microg rH5HA per mice). Immunized mice generated a more consistent specific HI antibody response with an average geometric mean titer of 160 at 21 days of third post-vaccination. When challenged with highly pathogenic strains of the corresponding AI subtypes, the vaccinated mice were completely protected against lethal infection while all the negative control mice died, and no shedding at 5 days post infection. Vaccine protocols employing these recombinant HA proteins will not elicit an immune response against internal AI proteins and thus will not interfere with epidemiological surveys of natural influenza infections in the field. The results provide a system for the production of an effective recombinant influenza subunit vaccine that can easily be scaled up, and also establishes the baseline for developing people's avian influenza subunit vaccine.

Key Words: avian influenza hemagglutinin; recombinant baculovirus; recombinant vaccine; protective immunity

CLC Numbers: S855.3, S852.4

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)03-0005-04

收稿日期: 2006-02-08

基金项目: 国家“863 计划”项目 (2004AA213050), 黑龙江省博士后基金项目 (LRB05-351)

作者简介: 孟庆文, 男, 黑龙江省哈尔滨市马端街中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 农业部动物流感重点开放实验室、兽医生物技术国家重点实验室副研究员, 东北林业大学博士后流动站、黑龙江省农业科学院博士后工作站博士后, 主要从事基因工程疫苗和 RNAi 抑制病毒复制的研究; E-mail: mengqw2000@hotmail.com

高致病力禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI) 是由 A 型流感病毒中的一些 H5 和 H7 亚型病毒引起的具有高度传染性、危害机体多种器官、高死亡率的禽类的一种系统性疾病, 已被国际兽疫局列为 A 类烈性传染病^[1]。自 1905 年禽流感病原被确认后, 世界上共暴发了 20 余次 HPAI, 给养禽业造成极大的经济损失。并有研究发现, HPAIV 通常是由在自然界广泛流行的低致病力毒株 (LPAIV) 的 HA 基因发生突变而来^[2, 3], 因此, 对于任何一种形式的禽流感, 包括在水禽和野鸟体内持续存在、偶尔传播给家禽导致低致病力禽流感的发生, 都是不容忽视的。

1997 年, “香港禽流感” 发现人感染 AIV 并引起死亡, 引起医学和兽医学界极大的关注^[4, 5]。2004 年初以来暴发高致病性禽流感疫情, 疫情在包括中国在内的亚洲 10 个国家和地区蔓延, 世界各国已出现数十人因感染禽流感而死亡的病例。

在基因工程疫苗中, 由于亚单位疫苗安全性高, 而且已研制出的亚单位疫苗在抵抗同源病毒的攻击方面显示了良好的保护力, 因而具有很好的应用前景。

本研究构建了分泌型表达禽流感病毒 HA 基因杆状病毒转移载体, 血凝和 West-ern-blot 实验结果表明: HA 基因在重组杆状病毒感染的 HFive 细胞中获得了表达并具有良好的生物学活性; 以 BALB/c 小鼠研究禽流感 H5N1 亚型基因工程亚单位疫苗对加强哺乳动物保护力、为 H5N1 亚型人流感疫苗的研制奠定了基础。

1 材料

1.1 病毒和小鼠

流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 简称 GD1/96 毒株, 由哈尔滨兽医研究所动物流感中心分离鉴定; 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 收集尿囊液备用; Sf9 细胞和 Hfive 细胞本室保存。SPF 级 BALB/c 雌性小鼠, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供并饲养于负压隔离器中, 攻毒实验在 P3 实验室进行。

1.2 试剂

pMD18-T 购自 Takara 公司, pMelBacA 购于 Invitrogen 公司, Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 小量胶回收试剂盒为华舜公司产品, RNA 提取试剂 Trizol、M-MLV 反转录酶、T4 DNA 连接酶试剂盒、杆状病毒转染试剂盒 Bac-N-Blue™ 购于 Invitrogen 公司。

1.3 引物设计

利用 OLIGO 4.0 软件设计合成扩增

HA 基因特异性引物:

1) 上游引物序列为:

5'-AAAAATGGAGAGAATAGTGCTT-3';

2) 下游引物序列为:

5'-CGTGGATCCTTATATACAAATAG-3';

下游引物引入 BamH I 位点;

3) 并设计合成去除编码 HA 信号肽的核

苷酸序列特异性上游引物序列为:

5'-ATAGGATCCGACAAAATTTGCCTT-3';

该引物引入 BamH I 位点。

2 方法

2.1 HA 基因的扩增、克隆及鉴定

2.1.1 病毒 RNA 的提取

按 RNA 提取试剂 Trizol 说明书方法进行。

2.1.2 RT 反应

根据 M-MLV 反转录酶说明书方法进行。

2.1.3 PCR

循环参数为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。按华舜小量胶回收试剂盒产品说明书回收 PCR 产物, 插入 pMD18-T vector 中, 按分子克隆方法转化、蓝白斑筛选, 初步 PCR 鉴定后, 将克隆送宝生物公司测序。

2.2 HA 基因重组杆状病毒转移载体的构建

用去除编码 HA 信号肽的序列特异性上游引物与扩增 HA 基因特异性下游引物扩增 1.6 中测序正确的质粒。将 PCR 产物和杆状病毒载体 pMelBacA 用 BamH I 和 Xho I 双酶切, 载体去磷酸化, 分别回收, 按分子克隆方法连接、转化、阳性重组子筛选, 初步 PCR 鉴定后, 将重组转移载体送宝生物公司测序。

2.3 Sf9 昆虫细胞的转染及重组病毒的蚀斑纯化

转染过程按照 Bac-N-Blue™ 转染试剂盒使用手册进行。第 3 次蚀斑纯化后, 收获的培养上清为种毒。

2.4 重组蛋白的检测

2.4.1 血凝活性的检测 (HA)

重组病毒 rpMelH5HA 感染 HFive 细胞, 取 1 ml 培养细胞 500g 离心, PBS 洗 1 次, 再用 PBS 悬浮细胞, 冰水浴条件下超声波裂解, 然后按常规方法用 1% 鸡红细胞进行微量血凝活性鉴定。

2.4.2 重组表达蛋白 SDS-PAGE 及其 Western-blot 检测

方法见分子克隆操作手册^[6]。

2.5 重组表达蛋白最佳表达时间的确定

用重组杆状病毒感染 Hfive 细胞, 培养按不同时间收集细胞, 超声波裂解。

SDS-PAGE 胶电泳后, 薄层扫描分析目的蛋白的表达含量, 确定最佳的诱导时间。

2.6 重组表达蛋白表达优化后蛋白胶薄层扫描分析

利用蛋白胶薄层扫描仪, 扫描 SDS-PAGE 电泳胶片, 按标准 Marker 蛋白含量, 分析所表达蛋白在菌体细胞中所占的百分含量。

2.7 动物实验

2.7.1 亚单位疫苗制备

表达产物经分光光度计 (Ultrospec 3000) 定量后, 以白油为佐剂, 等体积与水相混和, 使其目的蛋白终浓度分别为 10 μg/ml 的 H5HA, 其中加入 0.01% 硫柳汞和青、链霉素各 2 000 U/ml, 充分乳化后 4℃ 保存待用。

2.7.2 分组免疫及采血

取 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 20 只, 共分为 2 组, 每组 10 只, 分别为: H5HA 免疫组和阴性对照组。皮下多点注射免疫组小鼠共分 3 次免疫, 每次免疫剂量均为 0.2 ml, 每 2 周免疫 1 次。分别于一免、二免、三免、攻毒前和攻毒 1 周后取断尾方式采集小鼠血液, 分离出血清。

2.7.3 血清处理及抗体效价 (HI) 监测

将所分离出来的血清按胰酶-高碘酸钾加热法处理, 将处理后的血清用 1% 豚鼠红细胞检测其血凝抑制价 (HI)。

2.7.4 攻毒及病毒分离

第 3 次免疫 3 周后攻毒。攻毒剂量: 100LD₅₀ 的 HPAI 毒株滴鼻。各组小鼠于攻毒后第 3、5 d 分别致死, 取其血液、脑、脾、肺、肾等组织和器官, 分别于无菌的研钵中研磨后, 血液每克溶于 1 ml 含双抗的灭菌 PBS 中, 处理后分别作 6 个梯度稀释。然后将稀释液各取 200 μl 分别接种至 3 枚 9~10 日龄普通鸡胚, 48 h 后收获尿囊液, 检测其是否有血凝活性, 以确定小鼠各脏器是否排毒及排毒量。

3 结果

3.1 GD1/96 株 HA 基因的克隆

以 GD1/96 株禽流感病毒 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到 1.7 kb 左右基因片段, 与预期片段大小相符 (图略)。结果表明克隆基因正确, 命名为 pMDH5HA。

3.2 含 HA 基因的杆状病毒转移载体的构建

用去除编码 HA 信号肽的序列上游引物与扩增 HA 基因下游引物扩增 pMDH5HA, 定向克隆到杆状病毒载体 pMelBacA 中, 命名为 pMelH5HA。测序结果表明已去除编码 HA 信号肽的 48 个核苷酸序列, 并且与杆状病毒载体阅读框架

相吻合。

3.3 重组病毒的筛选、纯化和鉴定

将重组转移载体与线性化的杆状病毒 DNA (Bac-N-Blue™ DNA) 共转染 Sf9 昆虫细胞, 经 3 轮蚀斑纯化, 提取重组病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。证明目的基因片段已插入到杆状病毒基因组中, 获得 4 株重组杆状病毒 rpMelH5HA。重组杆状病毒 PCR 扩增鉴定 (见图 1)。

3.4 重组表达蛋白的血凝活性检测

按常规方法用 1% 鸡红细胞进行微量血凝活性鉴定, 4 株杆状病毒表达的重组蛋白产物 (命名为 rH5HA) 血凝活性分别为 2^6 、 2^5 、 2^4 和 2^5 (见表 1)。

3.5 重组表达蛋白 SDS-PAGE 及其 Western-blot 检测

分析结果显示, 重组杆状病毒 rpMelBacH5HA 感染 HFive 细胞后, 表达的 rH5HA 分子量约为 60KD。SDS-PAGE 电泳分析见图 2。Western-blot 检测图示见图 3。

3.6 重组表达蛋白最佳表达时间的确定

用重组杆状病毒感染的 Hfive 细胞, 培养按 12、24、36、48、60、72、84、96 h 收集细胞, 超声波裂解。SDS-PAGE 胶电泳后, 薄层扫描分析目的蛋白的表达含量, 确定最佳的表达时间为 72~84 h 之间 (见图 4)。

3.7 重组表达蛋白最佳表达时的蛋白胶薄层扫描分析

表达优化后, 以确定的最佳表达时间, 操作重组杆状病毒感染 Hfive 细胞, 收获细胞, SDS-PAGE 分析, 蛋白胶薄层扫描分析结果显示, 表达量为总细胞蛋白量的 17.1% (见图 5)。

3.8 抗体消长

该试验用 SPF 级 Balb/C 雌性小鼠在免疫前经检测为 HI 抗体阴性。免疫后, 试验组小鼠产生了 HI 抗体并在三免前后达到并保持较高水平。攻毒 1 周后, 抗体水平相应上升。对照组小鼠未产生 HI 抗体 (见表 2)。

3.9 排毒状况

将各脏器研磨后, 稀释 6 个梯度后接胚检测排毒情况。结果显示, H5HA 免疫组中小鼠各脏器均未检测到排毒, 而在对照组小鼠, 攻毒 3 d 后肺内病毒含量高达 $10^{4.85} \text{EID}_{50}$, 脾脏次之, 脑组织未检测到病毒。攻毒 5 d 后肺内病毒含量有所降低, 但依然较高, 为 $10^{4.42} \text{EID}_{50}$, 脑组织病毒含量急剧上升至 $10^{3.00} \text{EID}_{50}$, 肾内病毒含量也有所上升 (见表 3)。

3.10 攻毒保护

各组小鼠在三免 3 周后用 HPAIV H5N1 病毒攻击, 对照组小鼠在攻毒 4 d 后出现精神萎靡, 第 7 d 开始死亡, 至第 10 d 时, 全部死亡。而 H5HA 免疫组小鼠攻毒后连续观察 1 个月, 无明显异常出现, 无一例死亡 (见表 4)。

4 讨论及结论

杆状病毒/昆虫表达系统 (Baculovirus Expression Vector system, BEVS) 是真核表达系统中一类应用广泛的表达系统, 它具有同大多数高等

表 1 表达产物 rH5HA 的血凝 (HA) 活性检测

Tbl. 1 Identification of rH5HA by HA test

样品名称	灭活 AIV 对照	细胞对照	PBS 对照	H5HA 表达产物			
				1	2	3	4
血凝价	2^6	2^0	2^0	2^6	2^5	2^4	2^5



图 1 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of recombinant baculovirus.

注: M: DL2000 marker; 1: PCR 水对照; 2: pMelBacA 空载体对照; 3-6: 重组杆状病毒 PCR 产物。

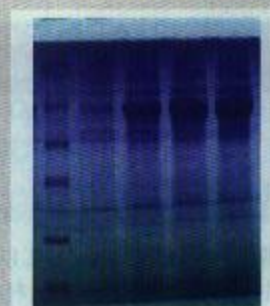


图 2 SDS-PAGE 分析 rH5HA

Fig.2 Identification of rH5HA by SDS-PAGE

注: 1: 蛋白 marker (14.4-116.2KD); 2: HFive 细胞上清; 3-5: rH5HA。

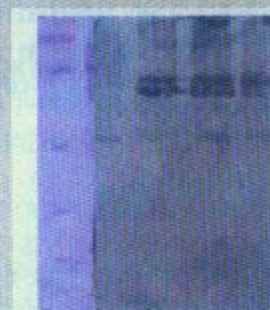


图 3 rH5HA Western-blotting 分析

Fig.3 Identification of rH5HA by Western blotting

注: 1: 蛋白 Marker (14.4-116.2KD); 2: HFive 细胞上清; 3-5: rH5HA。

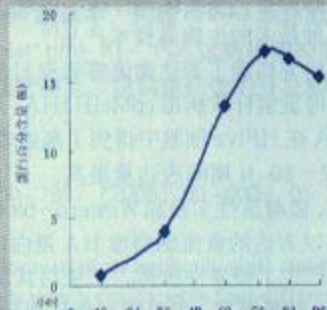


图 4 rH5HA 的生长曲线

Fig.4 rH5HA growth curve

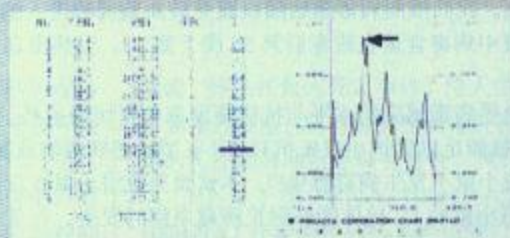


图 5 蛋白扫描数据和蛋白扫描峰图

Fig.5 The date and peak of recombinant protein by Thin Layer-scanning

表 2 小鼠免疫及攻毒后抗体效价 (HI)

Tbl. 2 The specific HI antibody response of the vaccinated mice (HI)

组别	一免前	二免前	三免前	攻毒前	攻毒一周后
H5HA	<10	80	160	160	320
Control	<10	<10	<10	<10	<10

注: * 为待检血清用胰酶-高碘酸钾加热法 (1:10 稀释) 处理去除非特异性后, 未检测到 HI 抗体。

表3 小鼠攻毒后各脏器平均病毒滴度 (EID₅₀)
Tbl.3 Shedding at 3 and 5 days post infection (EID₅₀)

组别	血液		脑		肺		脾		肾	
	3d	5d	3d	5d	3d	5d	3d	5d	3d	5d
H5HA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Control	0.43	1.05	—	3.02	4.85	4.42	5.99	0.233	0.233	1.34

注: * 病毒滴度未分出毒

表4 小鼠攻毒保护状况
Tbl.4 Protective immunity of the vaccinated mice

组别	发病数/总数	死亡数/总数	保护率 (%)
H5HA	0/10	0/10	100
Control	10/10	10/10	0

真核生物相似的翻译后修饰、加工以及转移外源蛋白的能力,表达的蛋白质具有良好的生物学活性,表达水平高。另外,杆状病毒又是非哺乳动物源性病毒,昆虫细胞远离脊椎动物,与哺乳动物源交叉反应少^[1]。因此,每年MEDLINE报道的用其表达的蛋白达数百种。

基因工程亚单位疫苗不能在体内复制,对宿主没有致病风险,是最具安全性和稳定性的一种基因工程疫苗,它仅含有在真核表达系统中高效表达病原的1~2种特定的免疫相关蛋白成份,在体内不能增殖,不存在散毒的危险,安全性可靠。应用基因工程亚单位疫苗易于大规模工业化生产,成本低廉;建立的鉴别诊断方法,可以区分免疫者和自然感染者,不干扰流行病学调查,因此,它将成为本世纪初期基因工程疫苗中投入市场品种最多的生物高技术产品^[1]。

本研究构建了表达禽流感病毒HA基因杆状病毒转移载体,转染Sf9细胞、蚀斑纯化、获得重组杆状病毒rpMelH5HA,感染HFive细胞、收获细胞、SDS-PAGE分析证明,HA在HFive细胞中得到了高效表达。蛋白胶薄层扫描确定最佳表达时间为感染细胞后72~80 h期间表达量最高,HA表达量为细胞总蛋白量的17.1%,分子量近似65KDa。血凝活性实验和Western-blot实验结果表明,表达蛋白具有良好的生物学活性。

在以表达的禽流感病毒HA蛋白定量乳化预制成基因工程亚单位疫苗后免疫小鼠,免疫鼠产生了特异性抗体,二免后其血凝抑制价(HI)达到160。第3次免疫3周后对其攻毒,结果显示,免疫组对致死剂量的H5N1亚型禽流感病毒提供了100%的保护力,而对照组小鼠全部死亡,并伴有典型的流感症状发生。

小鼠攻毒后3 d和5 d,分别取3只,从血液、脑、脾、肺、肾等脏器分毒。结果显示,对照组小鼠攻毒后第3 d肺内病毒含量最高,而第5 d脑内病毒含量较高,同时在血液、脾脏、肾脏也能分离出病毒。据报道,病毒在肺部以外的脏器传播可能取决于病毒感染早期病毒血症的程度^[2]。由于我们模拟了流感病毒的自然感染方式,采取滴鼻攻毒,所以肺内病毒含量高。我们推测病毒随后随血流突破血脑屏障进入脑组织,最后由肾排出。然而,虽然血液中病毒含量在攻毒后第5 d高于第3 d,但病毒总含量都不高。

近来的研究表明,机体免受病毒感染的水平与抗体滴度有着密切的关系。疫苗诱导的血清HI抗体滴度在40以上就能足以保护小鼠抵抗H5N1亚型流感病毒的致死性攻击,而更高的抗体滴度则能彻底使小鼠不发生病毒感染^[3]。本试验免疫组小鼠在攻毒前血清HI抗体滴度达到160,免疫组小鼠的HI抗体能够阻止病毒血症的发生,在免疫组小鼠未分离出病毒。

Johansson等(1999)采用杆状病毒系统表达了A型流感病毒HA和NA蛋白纯化后制备含单一成分的亚单位疫苗单独和联合免疫小鼠,诱导产生了抗两种抗原成分的特异性抗体。无论是采用ELISA还是HI试验检测,抗NA抗体水平联合免疫增高于单独免疫,HA的特异性抗体水平无明显差异,对同种亚型和亲缘关系较远的不同亚型的流感病毒攻击时,免疫小鼠完全阻止了感染的发生,即使对亲缘关系较远的不同种亚型病毒的攻击,其抑制病毒复制的程度也要好于常规灭活疫苗的免疫^[8]。

Crawford等(1999)利用重组杆状病毒表达系统生产H5、H7的含佐剂HA亚单位疫苗,免疫1日龄雏鸡,对重组佐剂疫苗接种组用致死性禽流感病毒攻击,结果所有

的鸡都不发病;而未免疫组攻毒后全部死亡。不加佐剂或低剂量重组HA佐剂疫苗起部分保护作用。实验还证明,H5的重组HA佐剂疫苗免疫的禽攻毒后泄殖腔不排毒^[9]。

本试验研究证明,禽流感基因工程亚单位疫苗H5HA对SPF级BALB/c小鼠可提供100%的保护,为研究H5N1亚型人流感病毒的疫苗奠定了基础。由于该种疫苗易于规模化生产,而且经济方便,因此,用基因工程亚单位疫苗来预防禽流感的前景是乐观的。

参考文献 (References)

- [1] KAWAOKA Y, NESTOROWICZ A, ALEXANDER D J, et al. Molecular analyses of the hemagglutinin genes of H5 influenza viruses. Origin of a virulent turkey strain[J]. *Virology*, 1987, 158: 218-227.
- [2] WALKER J A, KAWAOKA Y. Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74 (2): 311-314.
- [3] SUBBARAO K, KATZ J. Avian influenza viruses infecting humans[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(12): 1770-1784.
- [4] XIUHUA LU, TERRENCE M TUMPEY, et al. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to the influenza A(H5N1) virus isolation from humans[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(7): 5903-5911.
- [5] BROWN E G. Influenza virus genetics[J]. *Biomed Pharmacother*, 2000, 54 (4): 196-209.
- [6] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] ALTMANN F, STAUDACHER E, WILSON I B, et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins[J]. *Glycoconj*, 1999, 16(2): 109-123.
- [8] JOHANSSON B E. Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine[J]. *Vaccine*, 1999, 17(15-16): 2073-2080.
- [9] CRAWFORD J, WILKINSON B, VOSNESENSKY A, et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes[J]. *Vaccine*, 1999, 17(18): 2265-2274.

(责任编辑 李慧政)