

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(7) 943-948; 4 July 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

含 RGD 受体结合位点口蹄疫病毒 Asia1/JS/China/2005 株的拯救及初步鉴定

李平花¹, 白兴文¹, 曹伟军², 卢曾军¹, 孙普¹, 殷宏^{1*}, 刘在新^{1*}

(¹ 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046)

(² 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要 【目的】构建含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)受体结合位点口蹄疫病毒(FMDV)Asia1/JS/China/2005 株的全长感染性 cDNA 克隆。【方法】采用定点突变方法, 构建 Asia1 型 FMDV 含有预期突变的全长 cDNA 克隆 pFMDV-RGD。pFMDV-RGD 重组质粒经 *NotI* 线性化后, 与表达 T7 RNA 聚合酶的真核质粒 pcDNAT7P 共转染 BHK-21 细胞, 进行 FMDV-RGD 病毒拯救。【结果】序列测定结果表明成功构建了 FMDV 含有 RGD 受体位点的 Asia1/JS/China/2005 全长 cDNA 克隆。共转染试验获得拯救病毒, 对拯救的病毒分别进行序列测定、间接免疫荧光、电子显微镜观察和乳鼠致病性分析, 表明成功拯救了含有 RGD 受体结合位点的 Asia1/JS/China/2005 株 FMDV。【结论】该试验为进一步研究含有 RGD 和 RDD 受体结合位点 2 个拯救病毒生物学特性的差异奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒; RGD 受体结合位点; 感染性 cDNA 克隆; 病毒拯救

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)07-0943-06

口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)是一个重要的动物病原, 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae), 口蹄疫病毒属, 主要感染猪、牛、羊等主要畜种及其它家养和野生偶蹄动物, 易感动物多达 70 余种。口蹄疫病毒颗粒包括衣壳和 RNA 两部分, 其中衣壳由结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 各 60 个分子组成。结构蛋白 VP1 暴露在病毒颗粒的表面, 含有一个高度易变的 G-H 环, 该环上不仅含有病毒主要的抗原位点, 而且含有一个高度保守的 RGD 基序^[1-3], 该基序是病毒与细胞受体相结合起始感染的关键位点。FMDV 的 RGD 受体识别位点在田间分离株中是高度保守的^[4], 但在抗原压力或环境选择压力下, 包括细胞培养传代, RGD 基序也会

发生变化^[5-9]。如 FMDV C-S8c1 株在细胞上连续传代 100 次后, 产生 RGC 代替 RGD 的突变株, 该变异株可以感染其亲本病毒不能感染的细胞, 扩大了病毒的宿主嗜性^[10]。FMDV A24Cru 在牛体上连续 9 次传代后, 产生 1 株含有 SGD 受体结合位点变异株^[11], 该变异株在 BHK 细胞上形成浑浊的噬斑表型, 并且仅利用 $\alpha\beta 6$ 蛋白作为受体。但该变异株经过在细胞上连续传代后, 病毒回复了 RGD 受体结合位点, 在细胞形成清晰的噬斑, 并能利用 $\alpha\beta 1$ 、 $\alpha\beta 3$ 和 $\alpha\beta 6$ 作为受体, 扩大了受体利用范围。本研究是基于含有 RGD 受体位点的 FMDV Asia1/JS/China/2005 田间分离株, 经 BHK 细胞上连续传代后产生了含有 RDD 细胞结合位点的变异株, 该变异株在细胞

基金项目: 国家支撑计划(2006BAD06A12); 国家“973”项目(2005CB523201)

* 通信作者。Tel: +86-931-8342587; Fax: +86-931-8342052; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

作者简介: 李平花(1973-), 女, 甘肃武威人, 博士研究生, 研究方向为口蹄疫反向遗传学。E-mail: xiaoxiaoyezi510@sohu.com

收稿日期: 2009-02-23; 修回日期: 2009-03-25

上生长良好无法与与亲本病毒区别。为了研究 Asia1 型 FMDV-RGD 和 FMDV-RDD 2 株人工拯救病毒在生物学特性上的差异,本研究利用体外定点突变技术成功构建了含有 RGD 受体位点的全长感染性克隆,为这 2 种病毒的毒力及宿主嗜性的进一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株:FMDV Asia1/JS/China/2005 株全长感染性克隆的重组质粒 pFMDV-A,为兰州兽医研究所基因与分子标识组构建保存,BHK 细胞为本实验室保存。表达 T7 RNA 聚合酶的真核质粒 pcDNAT7P 由英国伦敦大学 Dr. Eagles 惠赠。

1.1.2 工具酶与主要试剂:限制性内切酶、PrimeSTART™ HS DNA Polymerase、dNTP 等购于 TaKaRa 公司;QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 购于 Stragagene 公司,Plasmid Midi Kit 为 QIAGEN 产品;Lipofectamine™2000 为 Invitrogen 产品,Opti-MEM I Medium 为 GIBCO 产品。

1.2 引物设计

根据已构建的 Asia1/JS/China/2005 株的全基因组序列(GenBank 登录号为 DQ156527),设计 2 条突变引物:RGDt1:5'-GAATCCTCGCGGCGTGATC TTGCCGCC -3',RGDt2:5'-GGCGCAAGATCACCAC GCCGCGAGGATTC-3'由上海桑尼生物技术有限公司合成。

1.3 突变全长质粒的快速构建

以提取的全长质粒 pFMDV-A 为模板,用 QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 配置 50 μ L 反应体系。5 μ L 10 \times reaction buffer,1 μ L dNTP mix,1.5 μ L quiksolution reagent,1 μ L quiksolution lightning Enzyme,上下游引物 RGDt1 和 RGDt2 各 1 μ L(100 ng/ μ L),pFMDV-A 模板 0.5 μ L(约 25 ng),补加无核酸酶的去离子水至 50 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 10 s,68 $^{\circ}$ C 6 min,20 个循环,68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后,加入 2 μ L DpnI 酶,轻混后 37 $^{\circ}$ C 作用 10 min,反应液用琼脂糖凝胶电泳鉴定大小,鉴定正确后转化 XL10-Gold 超级感受态。过夜培养后,挑取单克隆接种于 5 mL LB 培养液中,次日提取质粒,琼脂糖凝胶电泳、酶切鉴定及序列测定。构建的阳性重组质粒命名为 pFMDV-RGD。

1.4 质粒共转染

用 QIAGEN Plasmid Midi Kit 制备纯化构建的重

组质粒 pFMDV-RGD 和 pcDNAT7P。质粒 pFMDV-RGD 用 Not I 线性化后,加入蛋白酶 K(终浓度为 0.25 μ g/ μ L)37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后,加入醋酸钠(终浓度为 0.3 mol/L)和 2 倍体积的无水乙醇,-70 $^{\circ}$ C 过夜沉淀后离心,灭菌水溶解沉淀作为转染模板。单层 BHK-21 细胞生长至 70%~80% 时用于转染。转染时各取 2 μ g 线化的 pFMDV-RGD 和 pcDNAT7P 质粒,由 Lipofectamine™2000 介导转染 BHK-21 细胞。同时设立脂质体对照和正常细胞对照。转染后 6 h 吸去细胞上清,加入 2 mL 含 8% 胎牛血清的 DMEM 培养基置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱继续培养,72 h 后收获细胞,反复冻融 3 次后连续在 BHK-21 上传代,至出现典型细胞病变(CPE),收集病毒样品,-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 FMDV-RGD 拯救病毒的鉴定

1.5.1 RT-PCR 检测病毒基因组:按 RNeasy Mini Kit 说明书,从第 2 代细胞毒中提取总 RNA,然后用 RT-PCR 方法扩增含有突变碱基的特定片段,并将 PCR 产物纯化后送上海桑尼生物技术公司测序。

1.5.2 间接免疫荧光检测病毒抗原:将转染的第 1 代细胞上清接种置有载玻片上的 BHK 细胞,24 h 后收取载有接种细胞的载玻片,按常规方法做间接免疫荧光,一抗为 Asia1 型 FMDV 兔阳性血清,二抗为加 FITC 羊抗兔 IgG,同时设正常细胞对照。

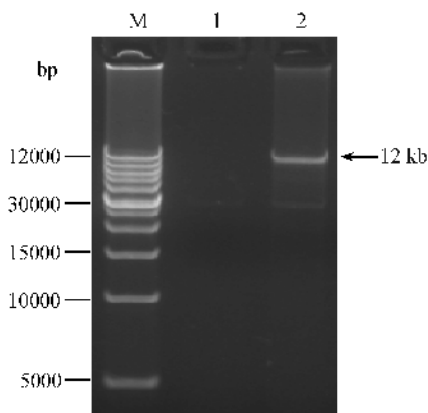
1.5.3 电镜检查:将收获的第 2 代细胞毒在 BHK-21 细胞中大量扩增后,将病变细胞和培养液共 200 mL 反复冻融 3 次后按常规方法加 BEI 灭活,灭活的病毒液 4 $^{\circ}$ C 11000 \times g 离心 40 min 除去细胞碎片。然后再将收集的病毒上清于 4 $^{\circ}$ C 135000 \times g 超速离心 3 h,沉淀加 500 μ L NET 缓冲液重悬,负染后电镜观察。

1.5.4 乳鼠致病力试验:将第 2 代拯救 FMDV-RGD 和 FMDV-RDD 病毒分别用 PBS 缓冲液 10 倍系列稀释,分别取 10⁻⁵ 至 10⁻⁸ 10 倍系列稀释的病毒液经皮下接种 2 日龄乳鼠,每个稀释度接种 4 只,接种剂量为 200 μ L/只,连续观察 7 d。空白对照组 4 只乳鼠只接种 PBS 缓冲液,观察乳鼠死亡情况并记录,用 Read-Muench 法计算 LD₅₀。

2 结果

2.1 体外突变扩增

以提取的重组质粒 pFMDV-A 为模板,用 QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 成功扩增出约 12 kb 的目的带,大小与预期相符(图 1)。

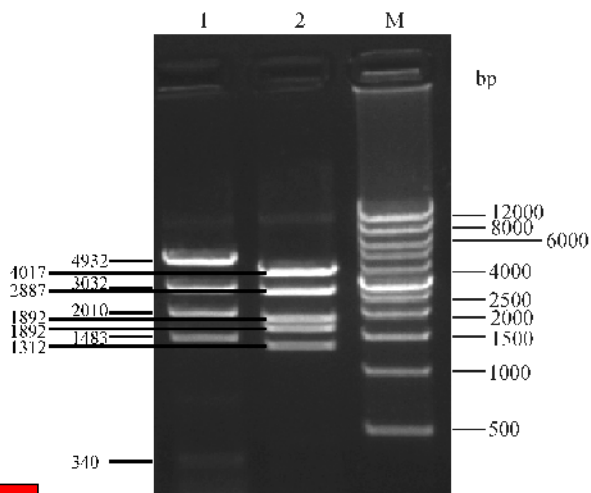


1 定点突变 PCR 结果

Fig.1 PCR amplification result of site-directed mutagenesis. 1. PCR products of 0.5 μ L template ; 2. PCR products of 1 μ L template ; M. 500-12000 bp DNA marker.

2.2 突变重组质粒的鉴定

提取的 pFMDV-RGD 质粒经 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切得到与预期相符合的目的带(图 2)。序列测定结果也说明成功构建了 FMDV Asia1/JS/China/2005 株含有 RGD 受体位点的全长克隆。

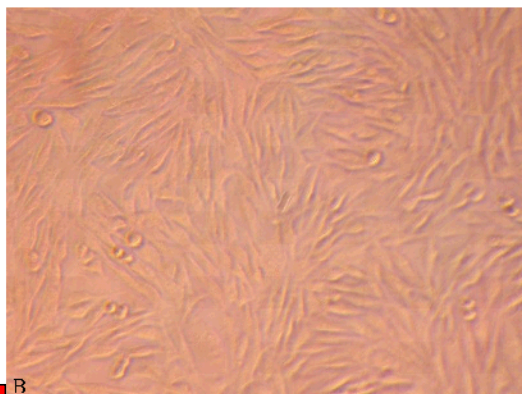
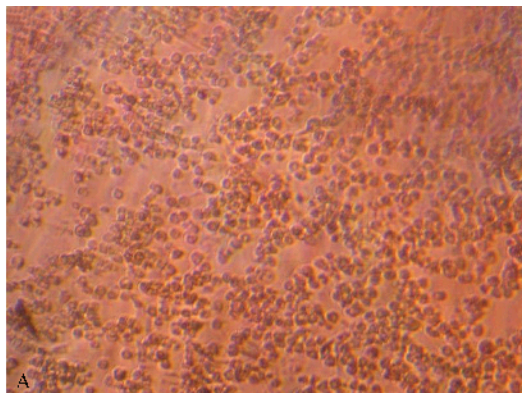


2 重组质粒 pFMDV-RGD 酶切电泳图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pFMDV-RGD with restriction enzyme digestion. 1. The plasmid pFMDV-RGD digested with *Xho* I ; 2. The plasmid pFMDV-RGD digested with *Hind* III ; M. 500-12000 bp DNA marker.

2.3 质粒共转染

线化的 pFMDV-RGD 和 pcDNAT7P 质粒共转染 BHK-21 细胞 72 h 后,没有出现 CPE。转染细胞裂解上清传至第 2 代,56 h 后细胞出现典型 CPE,细胞变圆,成葡萄串状分布。对照组细胞生长良好。将出现 CPE 的细胞培养物连续传代,细胞病变出现的时间缩短,病变更加典型(图 3)。



3 FMDV-RGD 拯救毒在 BHK-21 上引起的致细胞病变效应 CPE

Fig.3 CPE occurred on BHK-21 culture infected with rescued FMDV-RGD. (A):CPE occurred on BHK-21 culture infected with rescued FMDV-RGD ;(B):Normal cell (100 \times).

2.4 拯救病毒的鉴定

2.4.1 拯救 FMDV-RGD 部分序列的测定:收集产生病变的第 2 代细胞及其培养上清提取 RNA 进行 RT-PCR,分别用特定引物扩增出含有 RGD 基序的约 2400 bp 的片段,与预期大小一致。片段测序结果表明拯救病毒含有 RGD 受体识别基序 CGTGGTGAT(图 4)。

2.4.2 间接免疫荧光检测病毒抗原:将接种转染上清 24 h 后的 BHK-21 的和正常 BHK-21 细胞用免疫荧光染色,结果接种细胞在 24 h 后可见绿色特异性荧光(图 5-A),而正常对照细胞无可见荧光(图 5-B),说明接种转染上清的细胞中有 FMDV 的蛋白存在(图 5)。

2.4.3 电镜观察:电镜下可以观察到直径约为 25 nm、球形的 FMDV 病毒粒子,这与 FMDV 特有的形态结构一致(图 6)。

2.4.4 乳鼠致病力试验:接种拯救 FMDV-RGD 和 FMDV-RDD 的乳鼠在接种 36 h 后,高浓度接种乳鼠有部分表现典型的呼吸困难、后肢麻痹等症状。42 h 后各有一只接种乳鼠死亡,对照乳鼠正常。最

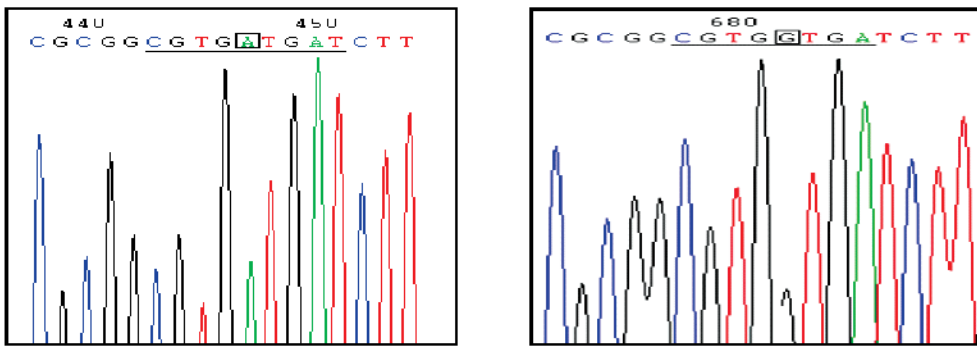


图4 部分测序结果

Fig.4 The part result of sequence. The base in box denotes the site-directed mutagenesis. (A):The sequence of pFMDV template ;(B):The sequence of rescued virus.

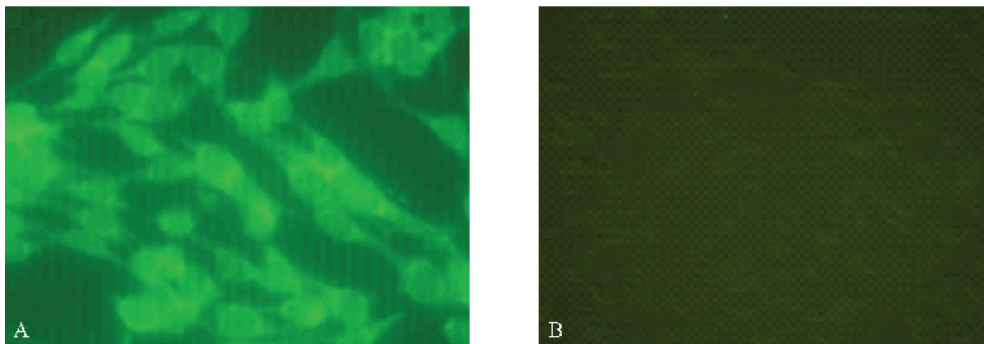
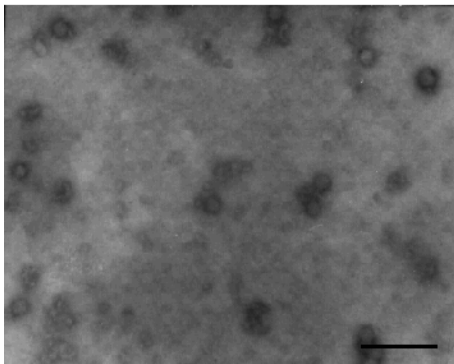


图5 拯救病毒感染 BHK-21 细胞的免疫荧光检测

Fig.5 Identification of FMDV in infected BHK-21 cells by indirect immunofluorescence(200×). (A):BHK-21 cells infected with the rescued virus ;(B):Normal BHK-21 cells.



6 拯救病毒粒子的电镜观察

Fig.6 Electron micrographs of negatively stained FMDV particles(bar = 100 nm).

后根据统计结果,计算出拯救 FMDV-RGD 的 LD_{50} 为 10^6 , FMDV-RDD 的 LD_{50} 为 $10^{6.5}$,二者在致病力上存在差异,但差异不显著。

3 讨论

本文采用体外定点突变方法,快速构建了口蹄疫病毒含有 RGD 受体位点的全长感染性克隆。该方法是以待突变的质粒为模板,用含有突变碱基的

两条引物进行一次 PCR 扩增,扩增产物经甲基化酶 *Dpn* I 处理后,直接转化感受态细胞,就可得到含有预期突变的质粒。该方法与传统的重叠 PCR 相比,不受待突变基因上突变点相对位置的影响,不需多步扩增和多步克隆实验,大大减少了传统定点突变的工作量,简化了实验操作步骤,提高了效率。

反向遗传操作技术就是通过构建动物 RNA 病毒的感染性分子克隆,在 DNA 水平上对病毒基因组进行定向修饰,如核苷酸序列的突变、缺失、插入等,从而对 RNA 病毒的致病机理、病毒结构与功能、宿主嗜性和 DNA 疫苗等的研究提供了新手段。口蹄疫病毒为单股正链 RNA 病毒,借助感染性克隆技术可在 DNA 水平上实现对该病毒基因组的人工操作,然后通过拯救病毒的表型变化来判定这些基因操作的效果,从而可对拯救病毒毒力、病毒的宿主嗜性等进行研究。本试验旨在借助已建立的 FMDV 的反向遗传操作技术平台,即含有 RDD 受体识别位点的 FMDV Asia1/JS/China/2005 的全长感染性克隆,在 DNA 水平上对 RDD 基序内的其中一个碱基进行突变(A-G),造成口蹄疫病毒细胞识别位点的变化

(RDD-RGD),从而通过这些受体位点不同的突变株可能引起的抗原性的变化和细胞受体利用的多样性来阐述这些突变株致病的分子机制。

口蹄疫病毒是 RNA 病毒,在病毒复制过程中具有高的突变率,从而产生了复杂的准种。当外界条件变化时,它会迅速的从准种种群中选择变异株来适应新的环境。口蹄疫病毒 RGD 受体识别位点在田间分离株中是高度保守的,但其他外界条件变化时(如在 BHK 细胞上连续传代和动物上感染)会产生不同的抗原变异株,这些变异株包括在 RGD 基序附近和内部氨基酸的替换。新突变株的产生可能引起病毒结合受体的改变,最终导致宿主嗜性和病毒毒力的变化。FMDV 利用多种整联蛋白($\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 1$ 和 $\alpha v\beta$)作为受体^[12-15],但 FMDV 在细胞上连续传代后,衣壳表面的一些氨基酸发生变化,从而导致突变株能够与硫酸乙酰肝素(HS)相互作用感染细胞,使病毒与细胞结合的受体发生变化^[16-17],导致该突变株对牛的致病力减弱。FMDV C-S8c1 株在细胞上连续传代,在病毒衣壳蛋白发生 6 个氨基酸替换,这个变异株对 BHK 细胞的致病力增强,可以感染 CHO 和 K-562 细胞^[18-19],并且不再以整联蛋白和 HS 作为受体。FMDV Asia1/JS/China/2005 株经细胞上连续传代后产生含有 RDD 受体识别位点的突变株,为了研究该毒株在衣壳蛋白内氨基酸的替换(RDD-RGD)所造成的基因工程病毒的毒力,宿主范围和受体的应用的差异,本研究以自主构建的 FMDV Asia1/JS/China/2005 株含有 RDD 受体结合位点的的全长感染性 cDNA 克隆为骨架,成功构建了含有 RGD 受体识别位点的 FMDV Asia1/JS/China/2005 株的全长质粒 pFMDV-RGD。线化的重组质粒 pFMDV-RGD 与表达 T7RNA 聚合酶的质粒共转染得到拯救病毒。拯救的病毒经序列测定、间接免疫荧光、电子显微镜观察和乳鼠致病性分析,结果证实成功构建了含有 RGD 受体识别位点的 FMDV Asia1/JS/China/2005 株全长感染性克隆。该感染性克隆的成功构建为进一步研究含有 RGD 和 RDD 受体位点的 2 个拯救病毒的生物学特性差异奠定了基础。

参考文献

- [1] Acharya R, Fry E, Stuart D, et al. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9Å resolution. *Nature*, 1989, 337: 709 - 716.
- [2] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362: 566 - 568.
- [3] Mateu MG. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Research*, 1995, 38: 1 - 24.
- [4] Carrillo CER, Tulman G, Delhon Z, Lu A, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2005, 79: 6487 - 6504.
- [5] Bolwell CAL, Brown PV, Barnett RO, et al. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 1989, 70: 45 - 57.
- [6] Diez JM, Mateu, Domingo E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *Journal of General Virology*, 1989, 70: 3281 - 3289.
- [7] Rieder EB, Baxt, Mason PW. Animal-derived antigenic variants of foot-and-mouth disease virus type A12 have low affinity for cells in culture. *Journal of Virology*, 1994, 68: 5296 - 5299.
- [8] Ruiz-Jarabo CMN, Sevilla M, Davila G, et al. Antigenic properties and population stability of a foot-and-mouth disease virus with an altered Arg-Gly-Asp receptor recognition motif. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 1899 - 1909.
- [9] Tami CO, Taboga A, Berinstein JI, et al. Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus in vivo. *Journal of Virology*, 2003, 77: 1219 - 1226.
- [10] Mar' nez MAN, Verdaguer MG, Mateu, et al. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 6798 - 6802.
- [11] Rieder ET, Henry H, Duque, et al. Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site in vitro and its pathogenesis in cattle. *Journal of Virology*, 2005, 79: 12989 - 12998.
- [12] Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, et al. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha v\beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of Virology*, 1995, 69: 2664 - 2666.
- [13] Jackson T, Sheppard D, Denyer M, et al. The epithelial integrin $\alpha v\beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2000b, 74: 4949 - 4956.
- [14] Jackson T, Mould AP, Sheppard D, et al. Integrin $\alpha v\beta 1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2002, 76: 935 - 941.
- [15] Jackson T, Clark S, Berryman S, et al. Integrin $\alpha v\beta 8$ functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role

of the β -chain cytodomain in integrin-mediated infection.

Journal of Virology, 2004, 78: 4533 – 4540.

- [16] Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 1996, 70: 5282 – 5287.
- [17] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, et al. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of*

Virology, 1997, 71: 5115 – 5123.

- [18] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, et al. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Journal of Virology*, 1998, 72: 6362 – 6372.
- [19] Baranowski E, Rui' z-Jarabo CM, Sevilla N, et al. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *Journal of Virology*, 2000, 74: 1641 – 1647.

Rescue and identification foot-and-mouth disease virus Asia1/JS/China/2005 strain with Arg-Gly-Asp RGD receptor recognition site

Pinghua Li¹, Xingwen Bai¹, Weijun Cao², Zengjun Lu¹, Pu Sun¹, Hong Yin^{1*}, Zaixin Liu^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 30046, China)

(² Veterinary College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract [**Objective**] To construct an infectious full-length cDNA clone of Asia1/JS/China/2005 strain with Arg-Gly-Asp (RGD) receptor recognition site. [**Methods**] We constructed foot-and-mouth disease virus type Asia1 full-length cDNA clone pFMDV-RGD by using site-directed mutagenesis. The plasmid pFMDV-RGD contained the desired mutation. The plasmids pFMDV-RGD were linearized with *NotI* enzyme. Linearized plasmid and pcDNAT7P plasmids expressing T7 RNA polymerase cotransfected into BHK-21 cells to rescue FMDV-RGD. [**Results**] We constructed FMDV Asia1/JS/China/2005 strain full-length cDNA clone with Arg-Gly-Asp receptor recognition site by sequence. We obtained rescued virus by plasmid cotransfection. The results of sequencing, indirect immunofluorescence, electron microscope and suck mice pathogenicity analysis showed foot-and-mouth disease virus containing Arg-Gly-Asp receptor recognition site was successfully rescued. [**Conclusion**] The results lay a foundation for further study of biology characteristic diversity of rescued virus with Arg-Gly-Asp and Arg-Asp-Asp (RDD) receptor recognition site.

Keywords: foot-and-mouth disease virus (FMDV); Arg-Gly-Asp (RGD) receptor recognition site; infectious cDNA clones; virus rescue

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)