

含 2A 片段的重组黄热病毒 17D 疫苗表达载体的构建 Construction of Recombinant Yellow Fever Virus 17D Containing 2A Fragment as a Vaccine Vector

Xiaowu Pang¹, 付文川², 郭银汉^{1*}, 张立树¹, 谢天培¹, Xinbin Gu³

Xiaowu Pang¹, FU Wen-Chuan², GUO Yin-Han^{1*}, ZHANG Li-Shu¹, XIE Tian-Pei¹ and Xinbin Gu³

1 北京东方天甲科技发展有限公司, 北京 100078

2 天甲丽珠生物科技有限公司, 香港

3 霍华德大学医学院, 华盛顿, 20059 美国

1 Beijing Oriental Tengen Tech Development Co., Ltd., Beijing 100078, China

2 TenGen Livzon Biotech. Co., Ltd., Hongkong, China

3 Medical College, Howard University, Washington, DC 20059 U. S. A

摘 要 黄热疫苗是一种减毒的黄热病毒 17D(YF-17D)活疫苗,是现有疫苗中最安全、最有效的疫苗之一,适于发展为疫苗载体。用 RT-PCR 法扩增出覆盖 YF-17D 全长基因组的 3 个 cDNA 片段:5' cDNA(A)、3' cDNA(B)和中间 cDNA(C),同时引入 SP6 增强子序列、酶切位点和重复序列。顺序将 A 和 B 同 *E. coli*-yeast 穿梭质粒 pRS424 连接,再与 C 共转染酵母菌,利用缺少色氨酸和尿嘧啶的选择性固体培养基筛选出含 YF-17D 全长基因组的 cDNA 质粒。以该质粒为模板,经过 DNA 重组和酵母同源重组,获得含有口蹄疫病毒蛋白水解酶 2A 片段的重组 YF-17D 表达载体。将该表达载体体外转录后,电击转染 BHK-21 细胞。间接免疫荧光检测结果表明,RNA 转录体在 BHK-21 细胞中进行了稳定的表达;滴度测定与形态学观察结果表明,重组病毒在细胞中的生长曲线等特征同母本 YF-17D 十分相似。结果提示,利用酵母菌同源重组在 2A 部位引入异种抗原基因,重组 YF-17D 表达载体 pRS-YF-2A1 具有成为高效活疫苗表达载体的潜力。

关键词 黄热病毒 17D,表达载体,2A 片段,全长 cDNA,同源重组

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0492-07

Abstract The Yellow Fever (YF) vaccine, an attenuated yellow fever 17D (YF-17D) live vaccine, is one of the most effective and safest vaccines in the world and is regarded as one of the best candidates for viral expression vector. We here first reported in China the construction and characterization of the recombinant expression vector of yellow fever 17D which contained the proteinase 2A fragment of foot-and-mouth disease virus (FMDV). Three cDNA fragments representing the full-length YF-17D genome, named 5'-end cDNA (A), 3'-end cDNA (B) and middle cDNA (C), were obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), together with the introduction of SP6 enhancer, necessary restriction sites and overlaps for homologous recombination in yeast. Fragment A and B were then introduced into pRS424 in turn by DNA recombination, followed by transfection of fragment C and the recombinant pRS424 containing A and B (pRS-A-B) into yeast. A recombinant vector containing full length cDNA of YF-17D (pRS-YF) was obtained by screening on medium lack of tryptophan and uracil. A recombinant YF-17D expression vector containing FMDV-2A gene fragment (pRS-YF-2A1) was then constructed by methods of

Received: December 19, 2005; Accepted: February 17, 2006.

This work was supported by Hua Han Bio-Pharmaceutical Holdings Limited and Livzon Pharmaceutical Biotechnology Co. Limited.

* Corresponding author. Tel: 86-10-67304344; E-mail: yguo@tengen-biomed.com

华瀚生物制药控股有限公司和丽珠医药生物科技有限公司资助。

DNA recombination and homologous recombination in yeast described above. *In vitro* transcription of the recombinant vector pRS-YF-2A1 was then carried out and introduced into BHK-21 cells by electroporation. Results of indirect immunofluorescence assay (IFA) and titer determination showed a stable infectious recombinant virus was gotten, whose features such as growth curve were similar to those of the parental YF-17D. The results suggest that the recombinant vector pRS-YF-2A1, by introduction of heterogenous genes via 2A region, is potential to be an effective live vaccine expression vector.

Key words yellow fever virus 17D, expression vector, 2A fragment, full-length cDNA, homologous recombination

黄热 (Yellow Fever, YF) 疫苗是一种用鸡胚生产的减毒黄热病毒 17D (YF-17D) 活疫苗, 1937 年研制成功^[1], 已应用 3 亿人次, 被 WHO 评价为最安全、最有效的活病毒疫苗。在 1945 年批量生产后, 仅发生过 21 例种痘后脑炎 (对于小于 9 个月的婴儿的发生率为 0.5%~4%, 对于大于 9 个月的婴儿的发生率为每 8 百万中发生 1 例)^[2]。90 年代, WHO 制定了一系列黄热疫苗的技术指导原则, 使疫苗的生产控制更严格, 应用更安全。黄热疫苗的保护作用显著, 一次接种的十年有效保护率超过 98%, 免疫后 40 年仍能检测到保护抗体^[3]。因此, 以 YF-17D 作为疫苗载体, 在安全性和生产控制方面均有可靠保障, 在有效性方面也有明显优势。

近年来, 随着对 RNA 病毒基因结构的深入了解和 RNA 病毒载体技术的日益成熟^[4-7], YF-17D 作为疫苗载体成为可能^[8, 9]。研究发现, 嵌合其它黄病毒属病毒结构蛋白或异种抗原表位的 YF-17D 疫苗可有效表达外源蛋白, 同时病毒的生长特性未发生明显改变^[10, 11]。而且, YF-17D 的基因组很小, 基因工程操作方便; 基因组自我复制时产生的双链 RNA 具有免疫增强作用; 结构蛋白小而少, 作为疫苗载体时不易掩盖外源蛋白的作用; 基因表达水平高; 病毒在细胞质中复制, 引发宿主遗传变异的风险小; 重组概率低, 迄今尚未发现其与其它黄病毒之间有遗传重组现象。这些特点以及其突出的安全性、有效性和生产便利性都使 YF-17D 成为重组 RNA 病毒表达载体的极佳候选。本文通过逆转录 PCR、酵母菌同源重组等方式获得了稳定的 YF-17D 全长 cDNA 克隆, 并成功构建了含口蹄疫病毒蛋白水解酶 2A 片段的重组 YF-17D 表达载体, 同时在 BHK-21 细胞中测定了其表达情况。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌种、病毒与细胞: *E. coli*-yeast 穿梭载体 pRS424, 购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC); 细菌感受态细胞 MAX Efficiency Stbl2™, 购自

Invitrogen 公司; 酿酒酵母菌株 YPH857, 本室保藏, 为色氨酸和尿嘧啶缺陷型菌株; 黄热病毒 YF-17D、BHK-21 细胞, 购自 ATCC。

1.1.2 试剂与工具酶: *Not*I、*Eco*RI、*Xho*I、*Kpn*I、*Nhe*I、T4 DNA 连接酶、Pfu 聚合酶、Riboprobe System-SP6 体外转录试剂盒, 购自 Promega 公司; ThermoScript™ RT-PCR System 试剂盒, 购自 Invitrogen 公司; QIAamp HCV kit RNA 提取试剂盒、QIAGEN-Tip100 质粒提取试剂盒、QiaEXII Gel Extraction Kit 核酸片段回收试剂盒, 购自 Qiagen 公司; Kb DNA Ladder plus 等核酸分子量标准, 购自 Promega 公司; 鼠抗 YF-17D 血清及 FITC 标记的山羊抗鼠血清, 购自 ATCC。

1.2 方 法

1.2.1 全长 YF-17D cDNA 克隆的构建和筛选: 重组克隆的方法参考文献 [12]。用 1MOI YF-17D 感染 BHK-21 细胞, 72h 后收集培养物上清, 沉淀病毒。提取病毒的总 RNA, 以 1a/1b、2a/2b 和 3a/3b 引物 (表 1) 分别进行 RT-PCR 反应, 获得 3 个 cDNA 片段, 即 5' cDNA、3' cDNA 和中间 cDNA, 引物中所引入的酶切位点和其他序列见表 1。对 5' cDNA 和 pRS424 载体进行 *Not*I + *Eco*RI 双酶切, 连接、转化后获得重组质粒 pRS-A; 然后以 *Eco*RI + *Xho*I 对 pRS-A 5' cDNA 和 3' cDNA 进行双酶切, 连接、转化得到重组质粒 pRS-A-B。以 *Eco*RI 酶切 pRS424-A-B 质粒, 通过醋酸锂转染法与中间 cDNA 共转化酿酒酵母^[13], 用缺少色氨酸和尿嘧啶的选择性固体培养基初步筛选阳性克隆。制备阳性酵母克隆的基因组 DNA, 根据限制酶酶切的物理图谱筛选重组克隆。将物理图谱正确的克隆转化至大肠杆菌 Stbl2 中, 挑取氨苄青霉素抗性培养基上的小菌落, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定, 获得构建正确的全长 YF-17D cDNA 克隆, 命名为 pRS-YF。

1.2.2 重组 YF 17D 表达质粒的构建和筛选: 用 *Kpn*I + *Nhe*I 酶切 pRS-YF, 得到大小 2 个片段。以小片段为模板, 分别以 4a/4b 和 5a/5b 引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 获得 2 个片段; 再以融合 PCR 方法将两个片段连接, 从而在小片段的 NS2B 和 NS3 基因

之间引入了1个口蹄疫病毒的基因片段2A和1个 *Afl* II 酶切位点。将大片段与修饰后的小片段共转化酿酒酵母,用缺少色氨酸和尿嘧啶的选择性固体培养基筛选阳性克隆。制备阳性克隆酵母的 DNA,

根据 *Afl* II 的酶切图谱筛选所需的重组克隆转化大肠杆菌 Stbl2,挑取氨苄青霉素抗性培养基上的小菌落,提取质粒 DNA,酶切鉴定,获得构建正确的克隆,命名为 pRS-YF-2A1。

表1 构建重组 YF-17D 表达载体所用的引物
Table 1 Primers used in construction of recombinant YF-17D expression vector

Primer	Sequence of primer(5'-3')
1a ¹	cgeg gcggccgc ATTTAGGTGACACTATAG agtaaatcctgtgctaatt (Boldface: Not I)
1b	caccgat gaattc ctctccc (Boldface: EcoR I)
2a	ggagacac cgctgggattc
2b	cacgtagtagcattcatgag
3a	ccatacatgccagatgcttgagaaactggaattgetccaa
3b	ccc ctcgag tggtttggttgtraccca (Boldface: Xho I)
4a	ggatacaagggtcagacgaac
4b ²	aaccatgattcGGGGCCAGGGTTGGACTCGTCTCCCGCAAGCTTAAGAAGGTCAAATTC AACAGCTGeat atgecacaagaatcccacttctc
5a ²	AACCTGGCCCCgaatgatggttcgagcgcgcagcagcggtagcactctgggatattcccactcc taagatcattc
5b	cgtgcccacactctagcggc

1: capital letters represent partial sequence of SP6; 2: capital letters represent partial sequence of 2A.

1.2.3 YF-17D 表达载体 RNA 转录体的制备与转染:用 *Xho* I 酶切 pRS-YF-2A1 质粒 DNA,酶切产物经 2 次酚:氯仿抽提、酒精沉淀后,溶于无 RNA 酶的 ddH₂O 中,终浓度为 0.05 μg/μL。用 DNA 依赖性 SP6 RNA 聚合酶将线性化的 pRS-YF-2A1 转录成重组黄热病毒 RNA。将生长状态良好、密度约 60% 的 BHK-21 细胞(总量约 10⁷ 个细胞)适度消化和洗涤后,以电击法体外转染重组黄热病毒 RNA,参数为 200V 950 μF^[14]。转染产物的一部分在 Culture slide 中进行培养,剩余的接种到六孔板中进行培养,次日换液,每天进行观测。细胞培养液为含 10% FBS 的 MEM 培养液。

1.2.4 转染产物的检测:分别于 24h、48h、72h 弃去 Culture slide 中的培养液,用冰冷的 PBS 漂洗 1 遍,冰冷丙酮固定 20min,空气干燥,滴加 1:100 稀释的鼠抗 YF-17D 血清(效价为 1:300),37℃ 湿盒孵育 1h,用冰冷 PBS 漂洗细胞,每次 5min,共 4 次。然后加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠二抗(效价为 1:220),37℃ 湿盒孵育 30min,用冰冷 PBS 漂洗 4 次后,用含 20% 甘油的 PBS 封片,荧光显微镜观察转染效率和病毒繁殖情况。

培养于六孔板中的转染产物自换液后每日进行观察,至大量蚀斑出现。用灭菌滤纸条挑取形态同亲本病毒所致蚀斑相似的蚀斑,加适量维持液(即无血清的 MEM 培养基)后反复冻融 3 次,取适量冻融物回接密度为 80% 的单层 BHK-21 细胞,待出现蚀斑后,分别取 10 个蚀斑进行病毒回收,并进行 2 次纯化。取纯化的病毒以 0.01 MOI 感染密度为 80%

的单层 BHK-21 细胞,每个病毒作 3 组平行。分别在 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d,采用蚀斑形成法测定各重组 YF-17D 病毒的平均滴度,并绘制生长曲线。

2 结果

2.1 RT-PCR 法构建全长 YF-17D cDNA 克隆

YF-17D 全长 cDNA 克隆的构建策略如图 1a、图 2a 所示。

对 YF-17D 总 RNA 进行 RT-PCR 反应,获得 3 个片段:5'cDNA(A)、3'cDNA(B)和中间 cDNA(C),其中 A 片段为 2 280bp, B 片段为 6 130bp, C 片段为 2 580bp,如图 1b 所示。将 A 片段插入至 pRS424 载体中,获得重组质粒 pRS-A,酶切鉴定结果如图 2b 所示。将 B 片段插入至 pRS-A 中,获得重组质粒 pRS-A-B,酶切鉴定如图 2c 所示。将 C 片段与 pRS-A-B 在酵母中同源重组,获得 YF-17D 全长 cDNA 克隆,全长克隆用内切酶 *Bam* H I、*Eco* R I 和 *Sac* I 进行鉴定,酶切片段理论大小分别为:2.9kb、3.3kb、10.4kb、5.6kb、11kb,和 1.9kb、6kb、8.7kb,酶切鉴定结果如图 2d 所示。在重组表达载体构建过程中,所有获得的 PCR 产物、连接产物均立即进行测序,确认无误的序列方用于下步操作。

2.2 含 2A 片段的重组 YF-17D 表达载体构建

含 2A 片段的重组 YF-17D 表达载体构建策略如图 3a 所示。

利用构建过程中在 2A 序列侧翼引入的 *Afl* II 进行限制性酶切,酶切结果如图 3b 所示,其片段大小为 16.6kb,与理论预期片段的大小一致。

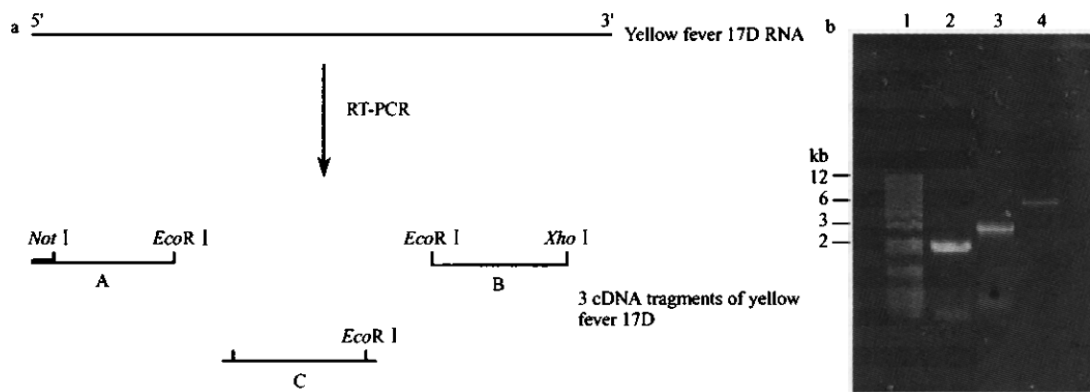


图 1 逆转录 PCR 扩增 YF-17D 片段

Fig.1 Amplification of YF-17D fragments using RT-PCR

a: amplification strategy of YF-17D fragments using RT-PCR. b: RT-PCR products of YF-17D using 1% agarose. 1: DNA marker kb ladder plus; 2: 5'cDNA (A); 3: middle cDNA (C); 4: 3'cDNA (B).

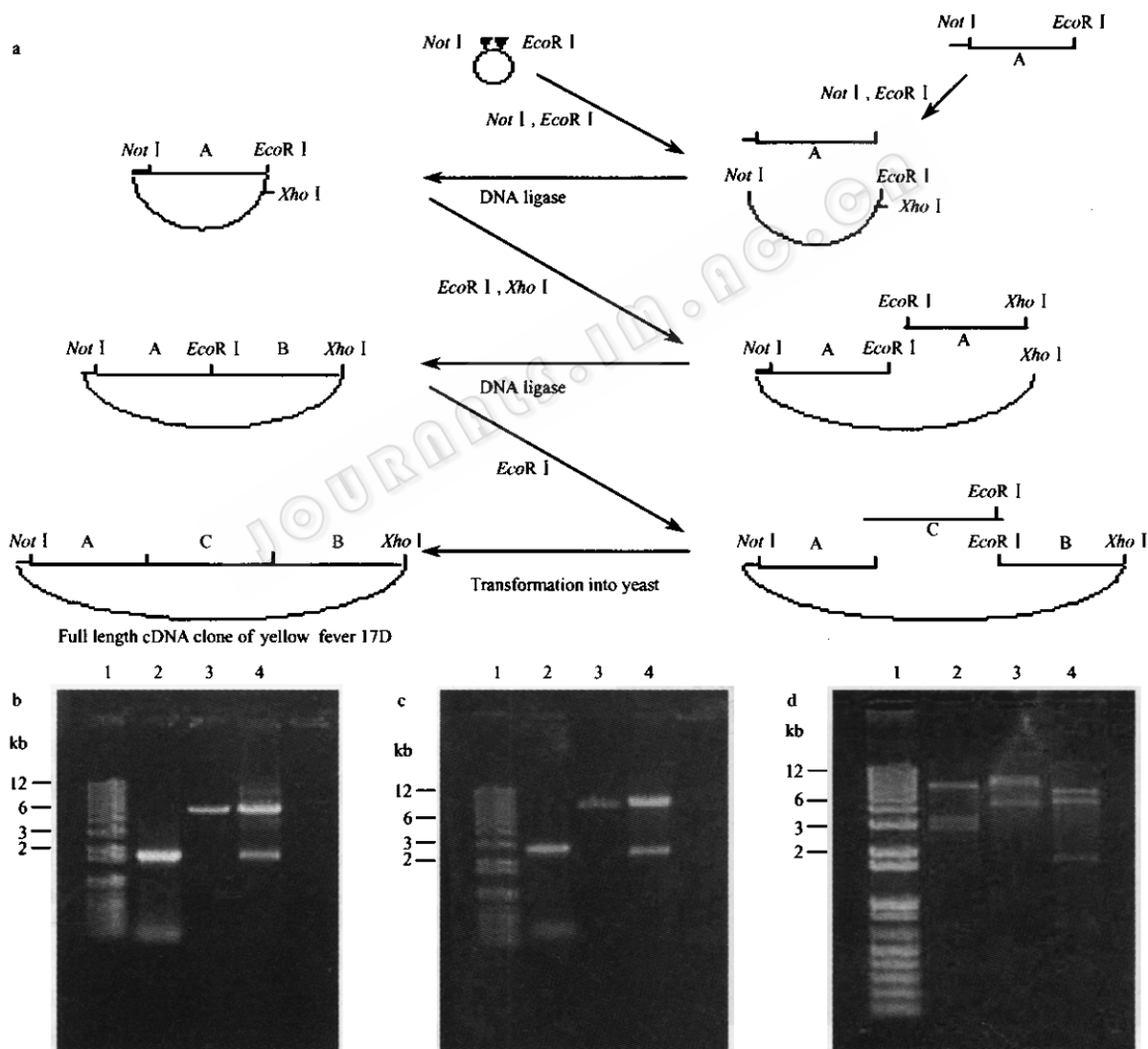


图 2 全长 YF-17D cDNA 的构建

Fig.2 Construction of full-length YF-17D cDNA

a: Construction strategy of full length cDNA of YF-17D.

b: identification of recombinant vector pRS-A. 1: kb ladder plus; 2: fragment A; 3: pRS424 plasmid; 4: pRS-A digested with *Not* I and *Eco* R I .
 c: Identification of recombinant vector pRS-A-B: 1: kb ladder plus; 2: fragment B; 3: pRS-A plasmid; 4: pRS-A-B digested with *Xho* I and *Eco* R I .
 d: identificaion of recombinant vector pRS-A-B-C. 1: kb ladder plus; 2: pRS-A-B-C digested with *Bam*H I ; 3: pRS-A-B-C digested with *Eco* R I ; 4: pRS-A-B-C digested with *Sac* I .

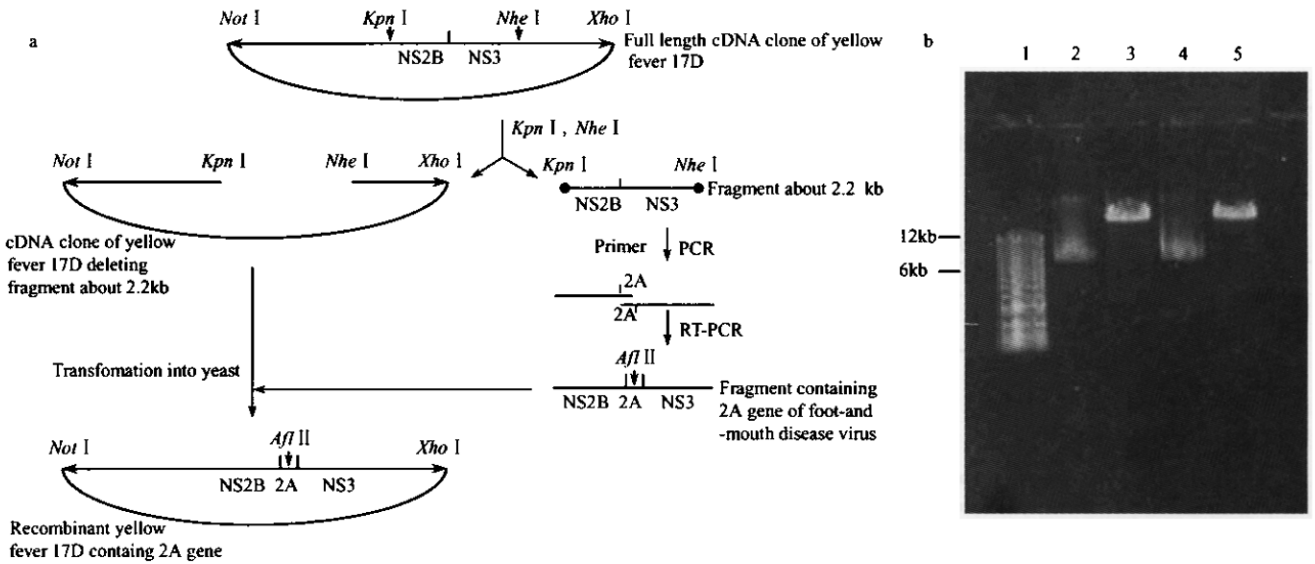


图3 含2A片段的重组YF-17D表达载体的构建

Fig.3 Construction of recombinant YF-17D expression Vector containing 2A fragment

a: construction strategy of recombinant expression vector of YF-17D containing 2A fragment.

b: identification of pRS-YF-2A1 with 0.25% agarose. 1: kb ladder plus; 2: clone 1 of native pRS-YF-2A1; 3: clone 1 of linearized pRS-YF-2A1 by *Afl II*; 4: clone 2 of native pRS-YF-2A1; 5: clone 2 of linearized pRS-YF-2A1 by *Afl II*.

2.3 间接免疫荧光检测重组YF-17D表达载体在宿主细胞中的表达

转染48h后,用YF-17D鼠源多抗进行间接免疫荧光试验(IFA),检测重组YF-17D表达载体在BHK-21细胞中的表达情况,结果如图4所示。从图中可以看出,YF-17D特异性荧光(箭头指示)被检测出,表明重组YF-17D表达载体在宿主细胞内进行了良好的表达。

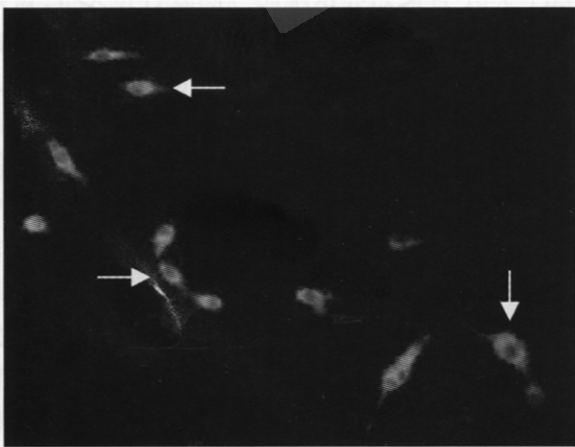


图4 间接免疫荧光检测重组YF-17D表达载体在BHK-21细胞中的表达

Fig.4 Detection of expression of recombinant expression vector of YF-17D in BHK-21 cells using indirect immunofluorescence assay

2.4 重组YF-17D病毒在宿主细胞中的生长曲线

将初步纯化的病毒感染单层BHK-21细胞,测

定其生长曲线。图5为重组YF-17D及亲代YF-17D在BHK-21细胞中的生长曲线。结果显示,重组病毒的生长曲线形状同亲代病毒YF-17D的生长曲线类似,其滴度可达 10^7 Ig PFU/mL。

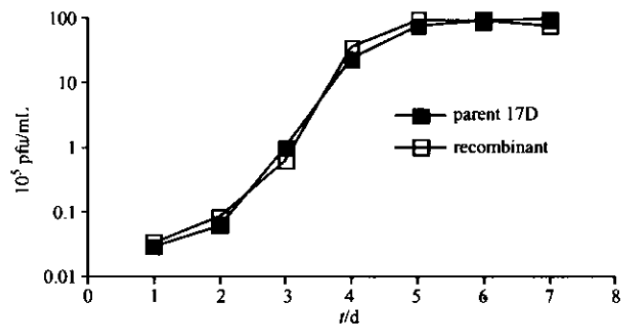


图5 重组YF-17D病毒及亲代YF-17D在BHK-21细胞中的生长曲线

Fig.5 Growth curves of recombinant YF-17D virus and parental YF-17D virus in BHK-21 cells

3 讨论

利用反向遗传技术获得全长cDNA克隆是构建RNA病毒表达载体的前提条件。从理论上讲,黄病毒属病毒的全长cDNA克隆可以在大肠杆菌中利用常规的基因重组操作获得,但是现实研究却发现,多种黄病毒如黄热病毒、二型和四型登革热病毒、日本脑炎病毒、昆津病毒等病毒的全长cDNA的获得极其困难。这可能是由于重组的全长cDNA克隆在大

肠杆菌中发生重组、突变或对细胞的强毒性等原因而变得不稳定。因此,对于这些病毒,全长感染性克隆的研究常采用将基因组分成两段分别进行克隆的方案^[11, 15]。这两段 cDNA 片段分别包含全长 cDNA 约一半的序列,二者连接后直接进行体外转录,然后转染细胞。不过,该方法的效率较低,因为受制于 DNA 连接反应效率和体外转录效率,该方案所需的 DNA 量以及相应的连接、纯化、体外转录、后续病毒鉴定、原始病毒种子库的建立等工作量是巨大的。为解决这一问题,Polo 等利用酵母菌 DNA 同源重组这一特点,成功建立了二型登革热病毒的全长感染性克隆;同时,通过比较在酵母人工染色体(YAC)和酵母菌大肠杆菌高拷贝穿梭质粒 pRS424 中构建全长 DEN2 cDNA,发现利用 pRS424 构建法不仅操作简便,而且获得的阳性克隆效率也很高^[14]。因此,本研究采用 pRS424 方法来构建全长的 YF-17D 感染性克隆,并在该感染性克隆的基础上构建出重组 YF-17D 表达载体。本研究也证实,采用酵母菌同源重组法不但能制备过去许多不能得到的 RNA 病毒全长感染性克隆,而且该方法简便,重组效率高,序列保真率高,从而大大提高了工作效率。虽然近来也有文献表明可以利用特殊的低拷贝数质粒获得黄热病毒的全长 cDNA 克隆^[16],但与本方法相比,无论是在构建方法的便易性、成功率上,还是在后续外源基因片段引入的快捷性上,都略显繁琐。

在许多基因的重组操作过程中,由于外源片段大小不合适、克隆位点受限、克隆序列在大肠杆菌中极不稳定等原因,无法通过酶切、连接等常规操作在大肠杆菌中进行基因克隆研究。研究人员继而发现,利用酵母菌同源重组作为重组表达载体构建中的一个步骤,可成功获得序列完全正确的重组载体^[14]。酵母菌同源重组的机理是酵母菌具有缺口修复的能力,即特定序列可以插入到含有同该序列相同序列的线性化质粒中,从而将外源基因引入其中。引入的序列可长达 5kb,两端的同源重叠区最短可少至 30 ~ 38bp^[17, 18]。该技术已经在质粒构建和体内克隆方面得到应用^[19, 20]。本研究利用该原理,将 RT-PCR 法获得的 A-B 片段与 C 片段在酵母菌中成功实现了重组,发现该技术不但方法简单、操作简便、重组率高、不易引入突变,而且可以通过引入特定序列(本研究为 2A 片段)以方便后续外源基因的插入,从而达到了常规方法不能实现的目的。

与类似研究最大的不同之处在于,本研究在重组载体中插入了口蹄疫病毒的蛋白水解酶 2A 片

段。该片段的引入便于利用酵母菌的同源重组在此位置插入外源片段,而且,研究证明,2A 片段可帮助释放长达 6 ~ 7kb 的外源片段,这是因为 2A 片段的表达产物是一种自我水解酶,与其融合的基因在表达后由于该片段的自我水解作用可得到释放^[21, 22]。此外,2A 的宿主专一性不强,适合各种哺乳动物细胞中表达^[23]。因此,本工作构建的重组表达载体不仅可用于插入并表达释放黄病毒属的结构蛋白,还可插入并表达释放其他外源蛋白,从而扩大了该载体的应用范围。

本研究利用 RT-PCR、酵母菌同源重组和高拷贝穿梭质粒构建出含全长 YF-17D cDNA 并插入口蹄疫病毒蛋白水解酶 2A 片段的重组 YF-17D 表达载体,经体外转录与转染,获得具有感染能力的重组病毒。进一步研究表明,该重组病毒的生长曲线、病毒蚀斑形态等生物学特性同亲代 YF-17D 十分相似。该载体的成功构建,不仅为其它黄病毒全长 cDNA 克隆的制备提供了一种方便快捷的方法学参考,而且为我们进一步利用该载体开发新型、高效的活载体疫苗奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J Exper Med*, 1937, **65**: 787 - 800
- [2] American Medical Association. Fatal viral encephalitis following 17D yellow fever vaccine inoculation. Report of a case in a 3-year-old child. *JAMA*, 1966, **198**:671 - 672
- [3] The Jordan Report. 20th anniversary. Accelerated development of vaccines 2002. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH). 2002. pp.199
- [4] Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2000, **74**(7):3253 - 3263
- [5] Corver J, Lenches E, Smith K *et al*. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol*, 2003, **77**(3):2265 - 2270
- [6] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, **198**:415 - 426
- [7] Ruggli N, Rice CM. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res*, 1999, **53**:183 - 207
- [8] Bonaldo MC, Caufour PS, Freire MS *et al*. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 2000, **95**(Suppl 1):215 - 223
- [9] Guo YH (郭银汉), Wang XP (王晓鹏), Pang XW *et al*. Flavivirus as the vaccine vector. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2005, **21**(6):485 - 487

- [10] Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*, 2001, **75**(16): 7290 - 7304
- [11] McAllister A, Arbetman AE, Mandl S *et al.* Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J Virol*, 2000, **74**:9197 - 9205
- [12] Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001
- [13] Spencer F, Ketner G, Connelly C *et al.* Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast. *Companion Methods Enzymol*, 1993, **5**:161 - 175
- [14] Polo S, Ketner G, Lewis R *et al.* Infectious RNA transcripts from full-length Dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virology*, 1997, **71**(7):5366 - 5374
- [15] Rice CM, Grakoui A, Galler R *et al.* Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *Nat New Biol*, 1989, **1**:285 - 296
- [16] Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B *et al.* A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J General Virology*, 2003, **84**: 1261 - 1268
- [17] Aylon Y, Kupiec M. New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutation Research*, 2004, **566**: 231 - 248
- [18] Hua SB, Qiu MS, Chan E *et al.* Minimum length of sequence homology required for *in vivo* cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid*, 1997, **38**:91 - 96
- [19] Ma H, Kunes S, Schatz PJ *et al.* Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 1987, **58**:201 - 216
- [20] Degryse E, Dumas B, Dietrich M *et al.* *In vivo* cloning by homologous recombination in yeast using a two-plasmid-based system. *Yeast*, 1995, **1**:629 - 640
- [21] Skern T, Sommergruber W, Auer H *et al.* Substrate requirements of a human rhinoviral 2A proteinase. *Virology*, 1991, **181**:46 - 54
- [22] Glaser W, Skern T. Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A *in vitro*. *FEBS Letters*, 2000, **480**:151 - 155
- [23] Chinnasamy D, Milsom M, Neuenfeldt J *et al.* Development of multigene lentiviral vectors containing the encephalomyocarditis virus IRES and foot-and-mouth disease virus 2A cleavage factor. *Molecular Therapy*, 2004, **9**(supplement):s31