

HIV-1 初始传播病毒 *Vpr* 基因遗传变异对诱导 G₂ 期阻滞及细胞凋亡的影响

赵建元^{1,2}, 丁寄葳², 米泽云², 周金明², 魏涛¹, 岑山²

1. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100192;

2. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: 人免疫缺陷病毒(HIV-1)急性感染过程中, 病毒的遗传多样性显著减少, 往往只有一株或几株病毒可以建立有效感染, 这种病毒被称为初始传播病毒(Transmitted/Founder virus)。病毒蛋白 R(Vpr)是 HIV-1 的辅助蛋白之一, 在病毒复制过程中起重要作用。研究初始传播病毒 *Vpr* 基因遗传变异与生物学特征对于阐明病毒建立感染的关键环节具有重要意义。文章利用流式细胞术分析了 C 亚型 HIV-1 初始传播病毒株与慢性感染株 MJ4 的 *Vpr* 蛋白诱导细胞 G₂ 期阻滞和细胞凋亡的能力。结果显示, 初始传播病毒 ZM246 和 ZM247 的 *Vpr* 诱导细胞 G₂ 期阻滞和细胞凋亡的能力显著高于慢性感染株 MJ4 *Vpr*。氨基酸序列分析表明, 初始传播病毒 *Vpr* 在第 77、85 和 94 位上存在高频突变。研究结果提示初始传播病毒可能在病毒感染早期, 通过 *Vpr* 基因的遗传突变, 提升病毒诱导细胞停滞 G₂ 期和细胞凋亡的能力, 进而促进病毒在宿主体内的复制和传播。

关键词: 人免疫缺陷病毒; 初始传播病毒; 病毒蛋白 R(Vpr); 细胞 G₂ 期阻滞; 细胞凋亡

Genetic variance in the HIV-1 founder virus *Vpr* affects its ability to induce cell cycle G₂ arrest and cell apoptosis

Jianyuan Zhao^{1,2}, Jiwei Ding², Zeyun Mi², Jinming Zhou², Tao Wei¹, Shan Cen²

1. Department of Food Science, College of Arts & Science of Beijing Union University, Beijing 100192, China;

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical School, Beijing 100050, China

Abstract: In the event of acute infection, only a few HIV-1 viral variants can establish the initial productive clinical infection, and these viral variants are known as transmitted/founder viruses (T/F viruses). As one of the accessory proteins of HIV-1, viral protein R (Vpr) plays an important role in viral replication. Therefore, the characterization of T/F virus *Vpr* is beneficial to understand how virus replicates in a new host. In this study, flow cytometry was used to analyze the effect of G₂ arrest and cell apoptosis induced by the T/F virus *Vpr* and the chronic strain MJ4 *Vpr*. The results showed that the ability of T/F virus ZM246 *Vpr* and ZM247 *Vpr* inducing G₂ arrest and cell apoptosis are more

收稿日期: 2015-01-04; 修回日期: 2015-01-29

基金项目: 北京联合大学研究生创新基金(编号: 12246994501)和国家基金委-加拿大国立卫生研究院研究基金课题(CIHR)合作基金(编号: 81361128017)资助

作者简介: 赵建元, 硕士研究生, 专业方向: 病毒学。E-mail: Zjyuan815@163.com

通讯作者: 岑山, 博士, 研究员, 研究方向: 病毒学。E-mail: shancen@hotmail.com;

魏涛, 硕士, 教授, 研究方向: 病毒学。E-mail: weitao@buu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-004

网络出版时间: 2015-3-18 14:48:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150318.1448.001.html>

potent than the MJ4 *Vpr*. The comparison of protein sequences indicated that the amino acids of 77, 85 and 94 contain high frequency mutations, suggesting that these sites may be involved in inducing G_2 arrest and cell apoptosis. Taken together, our work suggests that in acute infections, T/F viruses increase the capacity of G_2 arrest and cell apoptosis and promote viral replication and transmission in a new host by *Vpr* genetic mutation.

Keywords: HIV-1; founder virus; *Vpr*; cell G_2 arrest; cell apoptosis

病毒蛋白R (Viral protein R, *Vpr*)是人免疫缺陷病毒(HIV-1)*Vpr*基因编码的一个辅助蛋白,由96个氨基酸组成,分子量约14 kDa^[1]。*Vpr*的三级结构含有3个两亲性的 α 螺旋(17~33, 38~50及56~77 aa),这3个 α 螺旋围绕一个疏水核心,参与了*Vpr*和各种细胞蛋白能够相互作用^[2,3]。寡聚化*Vpr*是其发挥功能的结构基础^[4]。在*Vpr* C端的第73~96位氨基酸之间含有6个精氨酸,该区域与富含精氨酸蛋白质转导区(Protein transduction domains, PTD)相似,决定了*Vpr*跨细胞膜脂双层的能力^[5~7]。

*Vpr*在HIV-1复制过程中执行着多种生物学功能,而*Vpr*功能的丧失将会导致HIV-1感染者疾病进程减慢^[8]。*Vpr*通过与HIV-1的Gag p6相互作用被包装进入病毒颗粒,进而维持病毒逆转录过程的高保真性和促进前整合复合物的入核等^[9,10]。此外,*Vpr*可以导致细胞周期停滞在 G_2 期^[11],诱导细胞凋亡^[12],影响宿主和HIV-1基因表达等^[13,14],是HIV-1发病机制和T细胞感染所必须的蛋白质^[2]。

*Vpr*在HIV-1基因组中是高度保守的序列之一,不同毒株间的氨基酸序列相似性高达87%,且其C端都在诱导细胞周期 G_2/M 期停滞及细胞凋亡等方面执行重要作用^[5]。HIV-1 *Vpr*的72~83氨基酸是线粒体毒性区域,可导致线粒体膜通透性增加,而73、77及80位氨基酸突变可使该活性丧失^[2]。Deniaud等^[15]研究也显示,84~96及73、77、80和85位氨基酸是*Vpr*诱导细胞周期 G_2 停滞的关键性氨基酸。在HIV-1长期无进展者(LTNP)中约80% *Vpr*蛋白存在R77Q变异^[16]。上述*Vpr*变异株诱导细胞凋亡的作用明显低于野生株,其机制可能与线粒体外膜损伤、激活caspase 9前体及caspase 3相关^[17]。

在HIV-1粘膜传播过程中,病毒的遗传多样性是显著减少的,表现出严重的“遗传瓶颈”效应和有限的早期进化。研究发现,只有少数的一株或几株HIV-1病毒可以建立有效感染,这种病毒被称为初始传播病毒(Transmitted/Founder virus)^[18]。研究初始

传播病毒的生物学和早期进化特征,有助于阐明HIV-1建立感染的关键因素。目前,对初始传播病毒的研究多侧重于包膜蛋白的进化特征^[19,20],而在*Vpr*基因变异及其功能变化方面鲜有报道。本研究分析了初始传播病毒*Vpr*诱导细胞 G_2 期阻滞和细胞凋亡的能力,发现初始传播病毒*Vpr*的活性明显高于同一亚型的慢性感染株MJ4。氨基酸序列分析表明,初始传播病毒*Vpr*在第77、85和94位上存在高频突变。本研究为阐明初始传播病毒*Vpr*基因变异和进化特征在HIV-1感染过程中的生物学功能奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pZM246F-10和pZM247Fv1为编码C亚型HIV-1初始传播病毒基因组的质粒,由NIH AIDS Reagent Program惠赠。人胚肾上皮细胞293T为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 氨基酸序列比对及突变位点分析

根据NCBI报道的基因序列,选取C亚型HIV-1初始传播病毒株和慢性感染株(MJ4),利用DNA Star基因分析软件对氨基酸序列进行对比。

1.2.2 表达质粒的构建

以初始传播病毒株ZM246F-10和ZM247Fv1的基因组为模板,利用PCR扩增*Vpr*基因,所用的引物如表1所示。慢性感染株MJ4的*Vpr*基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成。将所得到的*Vpr*基因片段分别连接到pcDNA4TM/TO/myc-His B表达载体(Invitrogen公司),得到带有c-myc-标签的*Vpr*表达质粒pZM246-*Vpr*、pZM247FV1-*Vpr*和pMJ4-*Vpr*,并通过测序验证。

1.2.3 细胞培养及转染

293T细胞培养于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM

表 1 *Vpr* 基因扩增引物序列

| 引物名称 | 引物序列(5'→3') | <i>Vpr</i> 基因在全序列的位置 |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| pZM246- <i>Vpr</i> -upper | ATAGGTACCGCCACCATGGAACAAGCCCCAGAAG | 11828(4955~5245) |
| pZM246- <i>Vpr</i> -lower | ATACCGCGGGGATCTATTGGCTCCATTCTTGCT | |
| pZM247Fv1- <i>Vpr</i> -upper | ATAGGTACCGCCACCATGGAACAAGCCCCAGAAG | 11941(4957~5247) |
| pZM247Fv1- <i>Vpr</i> -lower | ATA CCGCGG GGATCTACCGGCTCCATTCTT | |

培养基(Gibco 公司)中。6 孔板每孔接种细胞数为 5×10^5 个,培养 24 h 后,采用转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),按产品说明书方法转染相应的表达质粒。

1.2.4 免疫蛋白印记(Western blot)检测 *Vpr* 蛋白的表达

将 ZM246-*Vpr*(400 ng 和 800 ng)、ZM247Fv1-*Vpr*(600 ng 和 1200 ng)及 MJ4-*Vpr*(300 ng 和 600 ng)分别转染 293T 细胞,48 h 收获细胞。加入 RIPA 冰上裂解 30 min,每 10 min 涡旋振荡一次。然后,加入 20 μ L $5 \times$ 蛋白上样缓冲液,得到细胞总蛋白样品。样品经聚丙烯酰胺蛋白电泳分离和转膜后,先后加入一抗 Anti-c-myc(美国 Sigma 公司,1:3000)或 β -actin(英国 Abcam 公司,1:5000),二抗山羊抗兔或山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,1:5000),进行免疫蛋白印记(Western blot)分析。

1.2.5 流式细胞仪分析细胞周期

用 PBS 洗涤收集转染后 60 h 的细胞,重悬于预冷的 70%乙醇中于 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h 以上,加入终浓度为 100 μ g/mL 的 RNaseA 于 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min,将细胞重悬于含 50 μ g/mL PI(溴化丙锭)的 PBS 中,常温避光孵育 1 h 后,利用流式细胞仪(Guava easyCyte 6HT)进行细胞周期分布分析。

1.2.6 流式细胞仪分析细胞凋亡

用 PBS 洗涤收集转染后 72 h 的细胞,重悬于含 1% FBS(胎牛血清)预冷的 PBS 中,取 100 μ L 样品于 1.5 mL EP 管,加入 100 μ L Guava Nexin Reagent,常温避光孵育 20 min 后,利用流式细胞仪(Guava easyCyte 6HT)进行细胞凋亡分析。

2 结果与分析

2.1 初始传播病毒 *Vpr* 氨基酸序列比对及突变位点分析

首先根据 NCBI 报道的基因序列,利用 DNA Star

基因分析软件,将 C 亚型 HIV-1 初始传播病毒 *Vpr* 与慢性感染株 MJ4 *Vpr* 的氨基酸序列进行了对比,结果如图 1A 所示。初始传播病毒 ZM246 毒株的 *Vpr* 与 MJ4 的 *Vpr* 氨基酸相似度为 89.6%,共发现 T19A、I22L、P36R、Y45H、E48D、T59V、Q77H、Q85R、S94N 和 P96S 共 10 个点突变;而 ZM247Fv1-*Vpr* 与 MJ4-*Vpr* 氨基酸相似度为 88.5%,其中包括 I22L、P36R、P37V、E48D、T55A、T59A、I61V、L84I、Q85P、S94G 和 P96S 共计 11 个点突变。

随后,本研究进一步对 HIV-1 C 亚型共 1287 株初始传播病毒的 *Vpr* 氨基酸序列进行了系统分析。结果表明,92.3%的慢性感染株 *Vpr* 第 77 位均为 Q,而约 37%的初始传播病毒毒株发生了 Q77H 的变异;此外,部分初始传播病毒第 85 位发生了 R85P 和 R85Q 的变异;约 35.8%的初始传播病毒第 94 位发生了 S94N 的变异(图 1B)。当对本实验及文献中常用的初始传播病毒 ZM246、ZM247 和 ZM249 单独进行分析时,也得到了类似的结果。鉴于 *Vpr* 的 C 末端,特别是 R77、R80 等氨基酸残基在诱导细胞周期 G₂/M 期停滞及细胞-凋亡上的重要作用,该序列分析结果提示初始传播病毒的 *Vpr* 的生物学活性可能发生了改变。

2.2 初始传播病毒 *vpr* 表达质粒的构建

为了进一步明确初始传播病毒 *Vpr* 调节细胞周期和细胞凋亡的活性,本研究构建了含 c-myc 标签的 ZM246-*Vpr*、ZM247Fv1-*Vpr* 及 MJ4-*Vpr* 表达质粒,随后将上述 3 种质粒分别转染 293T 细胞,并利用 Western blot 对 *Vpr* 表达进行检测。结果显示,上述 3 种含 c-myc 标签的 *Vpr* 均可表达(图 2)。

2.3 初始传播病毒 *vpr* 对细胞周期的影响

本研究利用流式细胞术,对瞬时表达不同水平(高剂量和低剂量)*Vpr* 的 293T 细胞的细胞周期状态进行了测定。结果显示,当低水平表达 *Vpr* 时,初

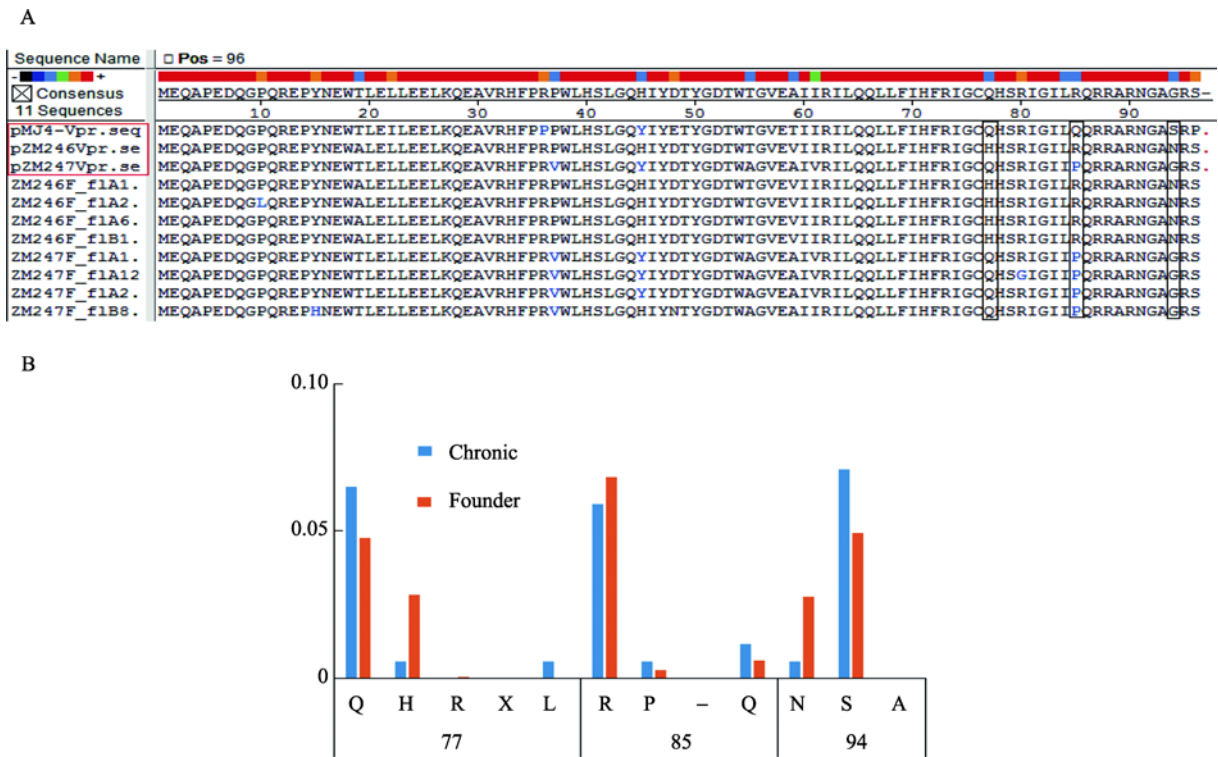


图 1 初始传播病毒 *Vpr* 及 MJ4 *Vpr* 氨基酸序列比对及突变位点分析
A : 初始传播病毒 *Vpr* 氨基酸序列比对结果(其中红色标出的部分为实验时所用的 3 株毒株, 其余 8 株为其他初始传播病毒毒株) ; B : 初始传播病毒 *Vpr* 突变位点分析。

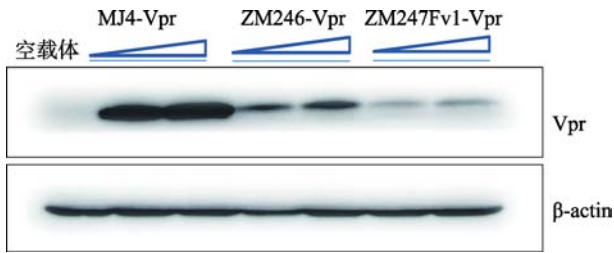


图 2 Western blot 检测 *Vpr* 蛋白的表达
将慢性感染株 MJ4 *Vpr* 及初始传播病毒 *Vpr* 的表达质粒分别转染 293T 细胞(5×10^6 /孔) 48 h 收获细胞并进行 Western blot 检测。

始传播病毒 ZM246 和 ZM247Fv1 的 *Vpr* 诱导细胞 G_2 阻滞的能力均明显高于慢性感染病毒 MJ4 的 *Vpr*(P 分别为 0.0317 和 0.043) ; 但高水平表达时三者诱导细胞 G_2 阻滞的能力无显著性差异(P 分别为 0.1168 和 0.1040)(图 3 , 表 2)。研究结果提示初始传播病毒 *Vpr* 的基因变异将提高其诱导细胞 G_2 阻滞的能力。

2.4 初始传播病毒诱导细胞凋亡的作用

本文利用流式细胞术, 对瞬时表达不同水平(高剂量和低剂量)*Vpr* 的 293T 细胞的细胞凋亡水平进行了测定。数据显示 : ZM246-*Vpr*、ZM247Fv1-*Vpr*

与 MJ4-*Vpr* 相比, 在低浓度时诱导细胞凋亡的能力均显著提高($P=0.01$ 和 $P=0.0326$) ; 高浓度时, ZM247Fv1-*Vpr* 与 MJ4-*Vpr* 的活性显现出显著性差异($P=0.0151$) , 而 ZM246-*Vpr* 与 MJ4-*Vpr* 基本相当($P=0.0967$)(图 4 , 表 3)。

3 讨 论

在 HIV-1 急性感染期, 病毒在传播过程中存在严重的“遗传瓶颈”效应和有限的早期进化。了解初始传播病毒的早期进化和生物学特征, 有助于进一步阐明 HIV-1 在新宿主内成功复制的关键环节, 为有效阻断新感染的防治策略发展提供了理论基础。本研究首先对 C 亚型 HIV-1 初始传播病毒株和慢性感染株 MJ4 的 *Vpr* 氨基酸序列进行比对, 发现初始传播病毒在影响其诱导细胞周期及细胞凋亡能力的一些关键氨基酸均存在突变。细胞生物学实验表明初始传播病毒 *Vpr* 诱导细胞 G_2 期阻滞和细胞凋亡的能力明显高于慢性感染株 MJ4 *Vpr*。上述结果提示, 初始传播病毒可能通过其早期进化, 提高 *Vpr* 的生

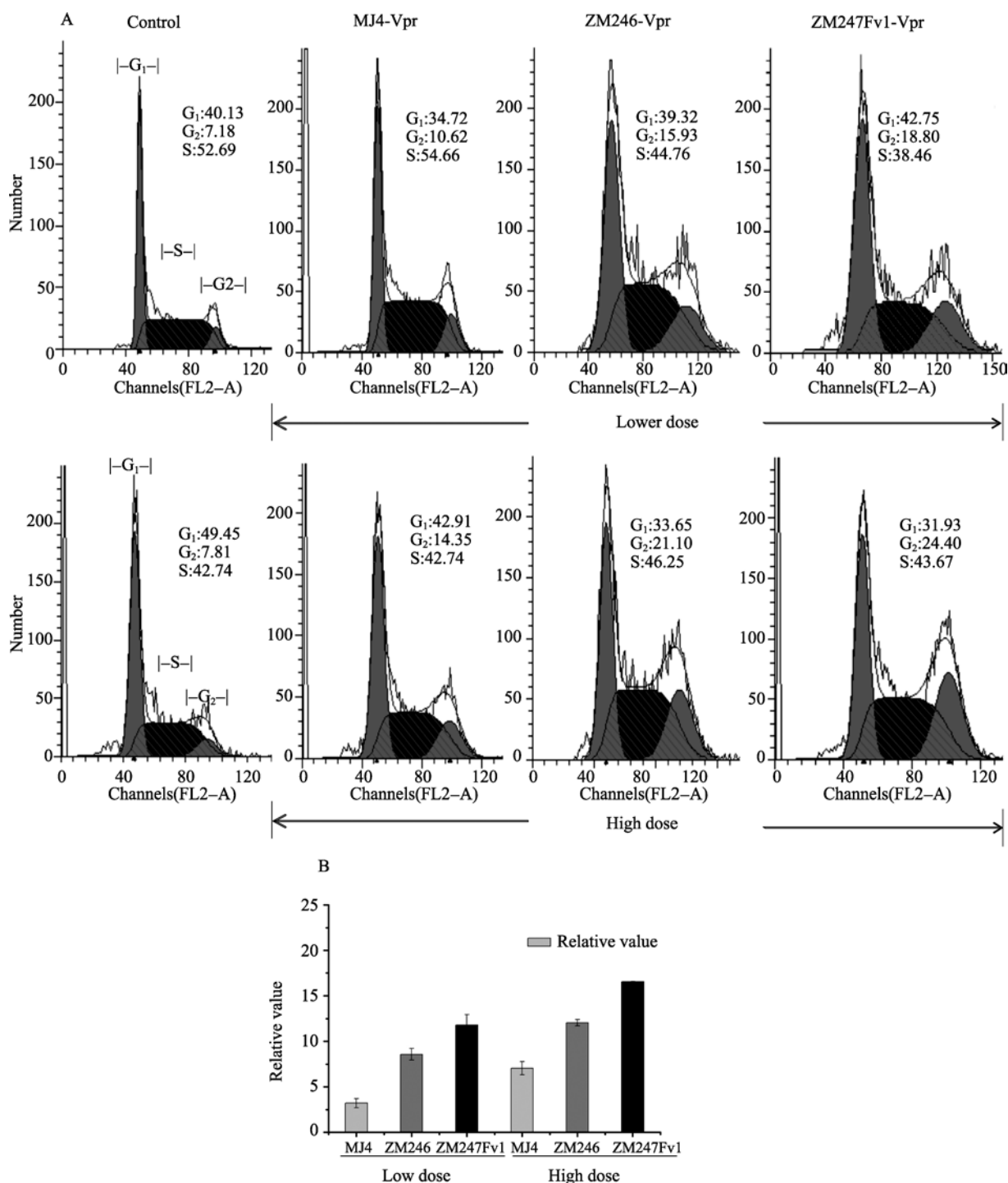


图 3 初始传播病毒 Vpr 诱导细胞 G₂ 期阻滞

A: 慢性感染株 MJ4-Vpr 及初始传播病毒 Vpr 分别转染 293T 细胞, 48 h 进行流式细胞仪分析; B: 慢性感染株 MJ4 Vpr 及初始传播病毒 Vpr 诱导 293T 细胞 G₂ 期阻滞相对定量结果。实验结果为 3 次独立实验。

表 2 Vpr 诱导细胞 G₂ 期阻滞的定量化结果

| | MJ4 | ZM246 | ZM247Fv1 |
|-----|------------|------------|------------|
| 低剂量 | 10.69±0.09 | 16.07±0.64 | 19.29±1.14 |
| 高剂量 | 14.54±0.27 | 19.53±0.10 | 24.05±0.02 |

物活性, 诱导更多的感染细胞停留在 G₂ 期, 导致大量的 CD4T 细胞凋亡, 为病毒传播创造有利条件。

早期的研究结果显示, HIV-1 Vpr 的 72~83aa 是线粒体毒性区域, 73、77 及 80 位氨基酸残基对于

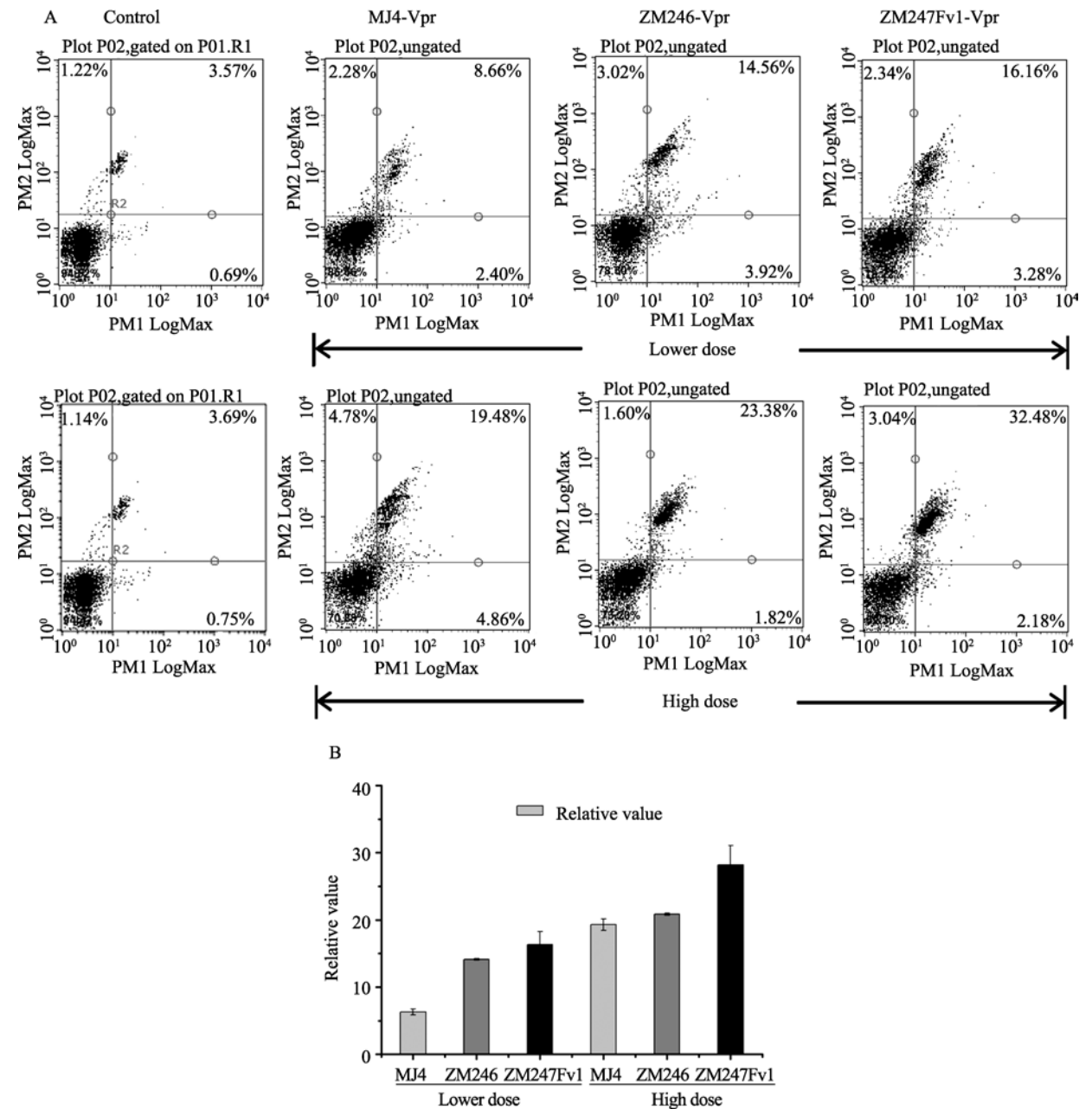


图 4 *Vpr* 诱导细胞凋亡结果
A：慢性感染株 MJ4-*Vpr* 及初始传播病毒 *Vpr* 分别转染 293T 细胞，72 h 进行流式细胞仪分析；B：慢性感染株 MJ4 *Vpr* 及初始传播病毒 *Vpr* 诱导 293T 细胞凋亡相对定量结果。实验结果为 3 次独立实验。

表 3 *Vpr* 诱导细胞凋亡的定量化结果

| | MJ4 | ZM246 | ZM247Fv1 |
|-----|------------|------------|------------|
| 低剂量 | 10.78±0.40 | 18.59±0.16 | 20.82±1.95 |
| 高剂量 | 23.77±0.81 | 25.35±0.21 | 32.63±2.87 |

诱导细胞凋亡活性中执行重要功能^[2]。73、77、80 和 84~96 位氨基酸残基是 *Vpr* 诱导细胞周期 G_2 停滞的关键结构域^[15]。本研究的序列对比分析发现，初

始传播病毒在第 77、85 和 94 位氨基酸存在点突变，提示上述氨基酸取代可能是其 *Vpr* 诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡活性提高的原因。这一设想及其具体的分子机制还有待于进一步实验验证和深入研究。此外，本研究还发现 HIV-1 *Vpr* 诱导细胞 G_2 阻滞的能力与诱导细胞凋亡的能力呈正相关，提示两者的发生机制可能一致或者存在关联性。

参考文献

- [1] Kamiyama T, Miura T, Takeuchi H. His-Trp cation- π interaction and its structural role in an α -helical dimer of HIV-1 Vpr protein. *Biophys Chem*, 2013, 173–174: 8–14. [\[DOI\]](#)
- [2] Guenzel CA, Hératé C, Benichou S. HIV-1 Vpr-a still "enigmatic multitasker". *Front Microbiol*, 2014, 5: 127. [\[DOI\]](#)
- [3] Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol*, 2003, 327(1): 215–227. [\[DOI\]](#)
- [4] Zhao LJ, Jian H, Zhu HH. HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr promotes ubiquitination and turnover of Vpr mutants containing the L64P mutation. *FEBS Lett*, 2004, 563(1–3): 170–178. [\[DOI\]](#)
- [5] Kichler A, Pages JC, Leborgne C, Druillennec S, Lenoir C, Coulaud D, Delain E, Le Cam E, Roques BP, Danos O. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol*, 2000, 74(12): 5424–5431. [\[DOI\]](#)
- [6] Sherman MP, De Noronha CMC, Williams SA, Greene WC. Insights into the biology of HIV-1 viral protein R. *DNA Cell Biol*, 2002, 21(9): 679–688. [\[DOI\]](#)
- [7] Coeytaux E, Coulaud D, Le Cam E, Danos O, Kichler A. The cationic amphipathic α -helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 18110–18116. [\[DOI\]](#)
- [8] Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi Y, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(6): 1133–1143. [\[DOI\]](#)
- [9] Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2001, 75(8): 3626–3635. [\[DOI\]](#)
- [10] Fritz JV, Dujardin D, Godet J, Didier P, De Mey J, Darlix JL, Mély Y, de Rocquigny H. HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between Vpr and Gag. *J Virol*, 2010, 84(3): 1585–1596. [\[DOI\]](#)
- [11] Wen XY, Duus KM, Friedrich TD, de Noronha CMC. The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J Biol Chem*, 2007, 282(37): 27046–27057. [\[DOI\]](#)
- [12] Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HLA, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand JP, Irinopoulou T, Daugas E, Susin SA, Cointe D, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med*, 2000, 191(1): 33–46. [\[DOI\]](#)
- [13] Li G, Bukrinsky M, Zhao RY. HIV-1 viral protein R (Vpr) and its interactions with host cell. *Curr HIV Res*, 2009, 7(2): 178–183. [\[DOI\]](#)
- [14] Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*, 2005, 2(1): 11. [\[DOI\]](#)
- [15] Deniaud A, Brenner C, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr. *Mitochondrion*, 2004, 4(2–3): 223–233. [\[DOI\]](#)
- [16] Wang B, Ge YC, Palasanthiran P, Xiang SH, Ziegler J, Dwyer DE, Randle C, Dowton D, Cunningham A, Saksena NK. Gene defects clustered at the C-terminus of the vpr gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: *in vivo* evolution of vpr quasiespecies in blood and plasma. *Virology*, 1996, 223(1): 224–232. [\[DOI\]](#)
- [17] Lum JJ, Cohen OJ, Nie ZL, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ, Lynch D, Pilon AA, Hawley N, Kim JE, Chen ZX, Montpetit M, Sanchez-Dardon J, Cohen EA, Badley AD. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest*, 2003, 111(10): 1547–1554. [\[DOI\]](#)
- [18] Keele BF. Identifying and characterizing recently transmitted viruses. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010, 5(4): 327–334. [\[DOI\]](#)
- [19] Sagar M, Laeyendecker O, Lee S, Gamiel J, Wawer MJ, Gray RH, Serwadda D, Sewankambo NK, Shepherd JC, Toma J, Huang W, Quinn TC. Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J Infect Dis*, 2009, 199(4): 580–589. [\[DOI\]](#)
- [20] Salazar-Gonzalez JF, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, Derdeyn CA, Farmer P, Hunter E, Allen S, Manigart O, Mulenga J, Anderson JA, Swanstrom R, Haynes BF, Athreya GS, Korber BTM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J Virol*, 2008, 82(8): 3952–3970. [\[DOI\]](#)