文章编号:1000-5404(2009)10-0955-04

论著

抗甲型流感病毒短发夹状RNA分子的体外生物合成及功能鉴定

郭述良,罗永艾 (重庆医科大学附属第一医院呼吸内科,重庆 400016)

摘 要:目的 制备抗甲型流感病毒短发夹状RNA分子(short hairpin RNA, shRNA),并鉴定其功能。**方法** 针对甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)核壳蛋白(nucleoprotein, NP)和酸性RNA多聚酶(acidic RNA polymerase, PA)编码mRNA高度保守区序列设计并制备编码shRNA的双链DNA转录模板,分别将其插入pGenSil-1质粒,构建NP-shRNA和PA-shRNA表达载体,测序正确后,采以T_7转录试剂盒制备NP-shRNA和PA-shRNA。将所制备的2种shRNAs分别或联合转入人气道上皮细胞(human bronchial epithelium, HBE),然后感染IAV A/PR8株,通过测定HBE细胞病变效应(cytopathogenic effect, CPE)、培养上清液病毒滴度以及NP、PA mRNA与蛋白表达水平,评估所制备的shRNAs对IAV A/PR8在HBE细胞中复制的抑制效果。**结果** 编码shRNA的2种双链DNA转录模板序列正确。通过体外转录技术制备的NP-shRNA、PA-shRNA每100 μl含量分别为59.4、50.6 nmol,纯度均在2.0以上,浓度和纯度均高。与未转染shRNA的对照组比较,NP-shRNA、PA-shRNA、NP-shRNA+PA-shRNA转染组细胞内NP mRNA分别减少41.7%、44.1%和68.5%,PA mRNA分别减少43.4%、60.9%和73.7%,NP蛋白表达分别降低92.3%、84.0%和91.7%,CPE显著减轻,培养上清液病毒滴度显著下降。**结论** 成功构建了2种抗IAV短发夹RNA分子,所制备的NP-shRNA、PA-shRNA对IAV A/PR8株在HBE细胞中复制有显著的抑制效果。

关键词: 流感病毒,甲型;短发夹状RNA分子;RNA干扰
中图法分类号: R373.13;R392-33;R392.7 **文献标识码:** A

Biosynthesis and function verification of short hairpin RNA targeting to Influenza A virus

GUO Shu-liang, LUO Yong-ai (Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitive effects of biosynthesized short hairpin RNA (shRNA) on the duplication of Influenza A virus (IAV) in human bronchial epithelium (HBE) cells. **Methods** NP-shRNA and PA-shRNA targeting to the highly conservative sequences of IAV nucleoprotein (NP) and acidic RNA polymerase (PA) were designed and biosynthesized by *in vitro* transcription, and then were inserted into the plasmid pGenSil-1. After sequencing analysis, the recombinant plasmids NP-shRNA and/or PA-shRNA were transduced into HBE cells followed by infected with IAV A/PR/8/34 H1N1 (A/PR8) virus. The cytopathogenic effect (CPE) of the HBE cells, hemagglutination assay (HA) and 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) titer of A/PR8 in the culture supernatants were determined respectively. The mRNA and protein expressions of NP and PA were detected by RT-PCR and Western blotting respectively, and the results were compared in order to evaluate the inhibitive efficiency of NP-shRNA and/or PA-shRNA to A/PR8 duplication in HBE cells. **Results** The content of NP-shRNA and PA-shRNA biosynthesized by *in vitro* transcription were respectively 59.4 nmol and 50.6 nmol in each 100 μl. The purity was more than 2.0 and the sequences were verified to be correct after sequencing analysis. The CPE of HBE cells and the virus titer in the culture supernatants of cells transfected with NP-shRNA, PA-shRNA or NP-shRNA + PA-shRNA were markedly lower than those of the control groups. In 3 h after 1 $TCID_{50}$ A/PR8 infection, the mRNA level of NP in NP-shRNA group, the mRNA level of PA in PA-shRNA group and those in NP-shRNA + PA-shRNA group were 41.7%, 43.4%, 68.5% and 73.7% respectively, lower than those of the control group. At 48 h after 1 $TCID_{50}$ A/PR8 infection, NP synthesis were 92.3%, 84.0% and 91.7% respectively of those of the control group. **Conclusion** Anti-IAV

基金项目: 重庆市自然科学基金(2004-54-87)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(2004-54-87)
作者简介: 郭述良,男,四川省德阳市人,博士,主任医师,主要从事呼吸系感染性疾病发病机制与防治方面的研究。E-mail: GUOSL999@sina.com
收稿日期: 2009-02-03;**修回日期:** 2009-03-16

NP-shRNA and PA-shRNA are successfully prepared by *in vitro* transcription. Both of those markedly inhibit the reproduction of IAV A/PR8 and produce a favorable protective effect on HBE cells.

Key words: influenza virus, type A; shRNA; RNA inference

流感主要是由甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)引起的呼吸道传染性疾病,严重威胁人类健康。全球每年约有50万人死于流感,禽流感的流行加剧了这一威胁。由于流感病毒基因和抗原容易变异,现有的疫苗保护力有限,治疗药物效果差,毒副作用大,急需发展新的防治技术和药物[1]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术的出现为流感防治带来了新机遇。根据RNAi原理,本研究设计并在体外成功转录制备了2种浓度和纯度均高的抗IAV短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)分子,经体外细胞水平研究证实对流感病毒复制有较强的抑制作用,旨在为抗IAV RNA干扰药物的研发奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DNA模板(表1) 寡核苷酸模板引物均由上海生工生物工程公司化学合成,其基本结构为:[*Eco*RⅠ] + T_7 启动子 + [正义链] + loop + [反义链] + TT + [*Hind*Ⅲ],其中oligo-NP和oligo-PA分别靶向IAV核壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)和酸性RNA多聚酶(acidic RNA polymerase, PA)编码mRNA,oligo-HK为通用阴性对照。

1.1.2 流感病毒株 IAV A/PR/8/34 H1N1(A/PR8)株由重庆医科大学儿科研究所蒋利萍研究员惠赠。

1.1.3 主要试剂 Pyrobest DNA多聚酶、*Hind*Ⅲ、*Eco*RⅠ、T_7 RNA多聚酶、T_4 DNA连接酶、DNase Ⅰ(RNase free)(NEB公司),DL 2000标准、RT-PCR试剂盒(大连TaKaRa公司),pGenSil-1质粒载体(武汉晶赛公司),质粒小抽及胶回收试剂盒(上海华舜公司),PCR产物纯化试剂盒(北京道普生物公司),T_7 Transcription Kit(立陶宛Fermentas公司),METAFECTENE转染试剂(德国Biontex公司),Mouse anti-IAV NP单克隆抗体(Influenza Virus Type A IgG1 Nucleoprotein, 杭州纽罗西敏),Trizol RNA抽提试剂盒(Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 编码shRNA的DNA模板的制备 将编码甲型流感病毒A/Puerto Rico/8/34(A/PR8)亚型NP和PA的mRNA全基因序列输入RNAi设计软件,在线设计siRNA[2]。结合文献[3]选取针对NP mRNA第1 498和PA mRNA第2 089起始位点以后19个nt序列的2个siRNA,BLAST查询与靶序列以外的其他基因无同源性后,根据靶序列人工合成1对互补并编码shRNA的寡核苷酸链模板引物。退火使2条链互补结合,并通过PCR延伸补平,产生编码shRNA的双链DNA转录模板(表1)。PCR反应条件:预变性,94 ℃,5 min,1次循环;变性,94 ℃,30 s,32次循环;退火,42 ℃→36 ℃,每循环降0.5 ℃,30 s,12次循环;58 ℃,30 s,20次循环;延伸,72 ℃,30 s,32次循环;最后延伸,72 ℃,5 min,1次循环。采用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物并-20 ℃保存备用。

1.2.2 shRNA转录模板的序列测定 pGenSil-1空载质粒和双链DNA转录模板用*Eco*RⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切。T_4 DNA连接酶将酶切后的模板连入线性化的pGenSil-1中,22 ℃水浴反应过夜。连接产物转化感受态细胞DH5α,$Kana^r$抗性筛选,小量提取质粒。重组质粒用*Eco*RⅠ+*Hind*Ⅲ双酶切3 h后1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。送酶切鉴定正确的转化菌液至上海Invitrogen公司对下游链测序。

1.2.3 NP-shRNA与PA-shRNA的体外生物合成 采用T_7转录试剂盒体外转录合成NP-shRNA和PA-shRNA。*Hind*Ⅲ酶切转录模板使之形成带"A"的粘末端。酶切产物分为4管做体外转录,每管50 μl,反应体系如下:5×转录缓冲液10 μl,Ribolock Ribonuclease Inhibitor 2.0 μl,rNTP混合物(10 mmol/L)10 μl,*Hind*Ⅲ酶切产物5.0 μl,T_7 RNA多聚酶1.5 μl,DEPC处理水21.5 μl。振荡混匀后,37 ℃水浴反应过夜,-20 ℃冷却终止反应。加入RNase-free DNAse,37 ℃消化15 min去除双链DNA模板,酚/氯仿、氯仿:异戊醇抽提纯化,测定$D(260)$和$D(280)$值,计算shRNA含量和纯度,产物加入无水乙醇-70 ℃保存。100 μl shRNA含量(nmol) = 100×50×$D(260)$×稀释倍数/相对分子质量。shRNA纯度 = $D(260)/D(280)$。

1.2.4 NP-shRNA和PA-shRNA在体外细胞水平抑制IAV复制效果研究 将体外转录生物合成的NP-shRNA和PA-shRNA单独或联合转入人气道上皮细胞(human bronchial epithelium, HBE)中,感染流感病毒A/PR8株,对比观察NP-shRNA、PA-shRNA、NP-shRNA+PA-shRNA转入组与阴性对照组(包括HK-shRNA转入组及无shRNA转入组,无shRNA转入组中包括H1N1 A/PR8组和正常细胞组)的细胞病变效应(cytopathogenic effect, CPE)、血凝滴度测定(hemagglutination assay, HA)、半数组织细胞感染量(50% tissue culture infective dose, $TCID_{50}$)、RT-PCR、Western blot测定结果,从病毒复制量、细胞病变反应程度、靶mRNA转录水平及靶蛋白翻译水平各层面评估抗IAV shRNAs在HBE细胞中抑制IAV复制的效果。

表1 实验用的DNA模板

DNA模板		序列
oligo-NP	上游	5′-[AATTC] TAATACGACTCACTATAG [GGATCTTATTTCTTCGGAG] TTGAAGAAG [CTCCGAAGAAATAAGATCC] TT [A]-3′
	下游	5′-[AGCTT] AAGGATCTTATTTCTTCGGAGCTTCTTCAACTCCGAAGAAATAAGATCCCTATAGTGAGTCGTATTA [G]-3′
oligo-PA	上游	5′-[AATTC] TAATACGACTCACTATAG [GCAATTGAGGAGTGCCTGA] TTGAAGAAG [TCAGGCACTCCTCAATTGC] TT [A]-3′
	下游	5′-[AGCTT] AAGCAATTGAGGAGTGCCTGACTTCTTCAATCAGGCACTCCTCAATTGCCTATAGTGAGTCGTATTA [G]-3′
oligo-HK	上游	5′-[AATTC] TAATACGACTCACTATAG [GACTTCATAAGGCGCATGC] TTGAAGAAG [GCATGCGCCTTATGAAGTC] TT [A]-3′
	下游	5′-[AGCTT] AAGACTTCATAAGGCGCATGCCTTCTTCAAGCATGCGCCTTATGAAGTCCTATAGTGAGTCGTATTA [G]-3′

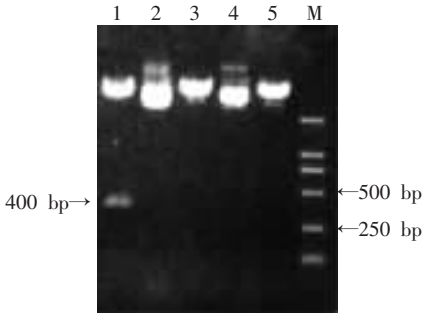
2　结果

2.1　shRNAs 序列及其作用靶位点

所制备的 NP-shRNA 的序列为 5′-GGAUCUUAUUUCUUCG-GAGUUCAAGAAGCUCCGAAGAAAUAAGAUCC-3′,PA-shRNA 的序列为 5′-GCAAUUGAGGAGUGCCUGAUUCAAGAAGUCAGGC-ACUCCUCAAUUGC-3′, 正义序列和与之反向互补的反向序列经 9 bp 的环状连接(划线部分)折叠形成发夹样双链 RNA 结构。NP-shRNA 和 PA-shRNA 作用的 IAV 靶基因序列分别为 GGATCTTATTTCTTCGGAG 和 GCAATTGAGGAGTGCCTGA, 在 IAV 中均高度保守。

2.2　shRNAs 转录模板的构建、鉴定与序列测定

双链 DNA 模板成功插入到线性化的 pGenSil-1 质粒载体中,构建出可转录合成 shRNA 的质粒表达载体。重组质粒载体经双酶切后作电泳鉴定(图 1)。



1:酶切空白 pGenSil-1 对照;2,4: 空白 pGenSil-1 对照; 3: 酶切重组 NP-shRNA 表达载体;5: 酶切重组 PA-shRNA 表达载体;M: DNA 标准(DL 2000)

图 1　重组质粒表达载体酶切电泳图

第 3、5 泳道分别为 *Hind*Ⅲ、*Eco*RⅠ双酶切后的 NP-shRNA 和 PA-shRNA 重组质粒表达载体,除所显示的线性化 pGenSil-1 大片段外,理论上分别还应有 1 个 DNA 双链模板片段,但因太小(仅 70 bp 左右),在 1% 琼脂糖凝胶上难以显示。酶切鉴定结果初步证实,DNA 双链模板被成功克隆到 pGenSil-1,重组质粒表达载体(shRNAs 转录模板)构建成功。

NP-shRNA 及 PA-shRNA 转录模板下游链经序列测定分析,结果完全正确。

2.3　shRNAs 产物浓度与纯度

NP-shRNA 与 PA-shRNA 的相对分子质量为 13.629×10^3。NP-shRNA 与 PA-shRNA 产物浓度和纯度均高(表 2)。

表 2　shRNA 产物的浓度及纯度

产物	$D(260)$	$D(280)$	浓度(nmol/100 μl)	纯度
NP-shRNA	0.054	0.021	59.4	2.57
PA-shRNA	0.046	0.017	50.6	2.71
HK-shRNA	0.047	0.017	51.7	2.76

2.4　shRNAs 在体外细胞水平抑制 IAV 复制效果

NP-shRNA、PA-shRNA、NP-shRNA 联合 PA-shRNA 转染组,A/PR8 攻击 HBE 后,细胞 CPE 及培养上清液中病毒 HA 滴度均显著轻于或低于未转染 shRNAs 的 A/PR8 对照组,尤其是在感染后的 1 ~ 3 d 内(表 3、4)。A/PR8 攻击量越低,shRNAs 的保护作用越明显,保护时间越长。以 1 $TCID_{50}$(HA 滴度1∶1 280 病毒贮存液稀释 $10^{-5.8}$ 倍)A/PR8 感染各组细胞,3 h 后 3 组 shRNA 转染组细胞 NP/β-actin mRNA 分别较 A/PR8 对照组减少 41.7%、44.1% 和 68.5%(图 2),PA/β-actin mRNA 分别较 A/PR8 对照组减少 43.4%、60.9% 和 73.7%(图 3),48 h 后 NP/GAPDH 蛋白表达分别较 A/PR8 对照组降低 92.3%、84.0% 和 91.7%(图 4)。细胞培养上清液病毒 $TCID_{50}$ 滴度分别较 A/PR8 对照组明显降低($P < 0.01$,表 5)。

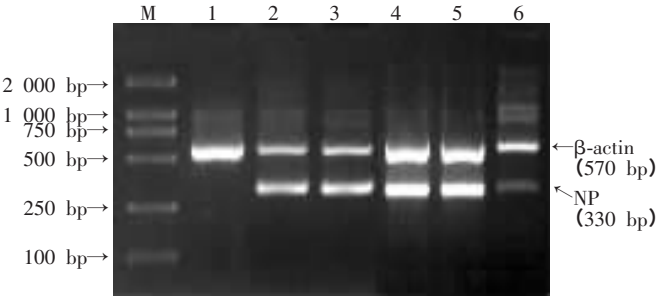
表 3　1 $TCID_{50}$ A/PR8 不同时间致各组细胞病变效应观察结果

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
NP-shRNA + A/PR8	–	+	++	+++	++++
PA-shRNA + A/PR8	–	++	+++	+++	++++
NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8	–	+	++	+++	++++
HK-shRNA + A/PR8	+	+++	++++	++++	++++
H1N1 A/PR8	+	+++	++++	++++	++++

–:无 CPE; +: < 25% 细胞发生病变; ++ :25% ~50% 细胞病变; +++ :51% ~75% 细胞病变; ++++ :76% ~100% 细胞病变

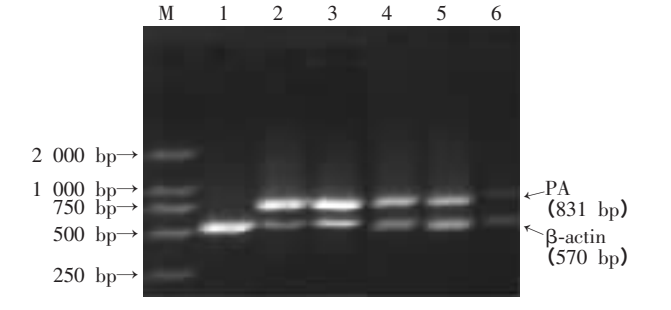
表 4　1 $TCID_{50}$ A/PR8 感染各组细胞培养上清液 HA 滴度测定结果

组别	1 d	2 d	3 d	4 d
NP-shRNA + A/PR8	0	2	8	32
PA-shRNA + A/PR8	0	8	16	32
NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8	0	4	8	32
HK-shRNA + A/PR8	2	16	64	64
H1N1 A/PR8	4	16	64	64



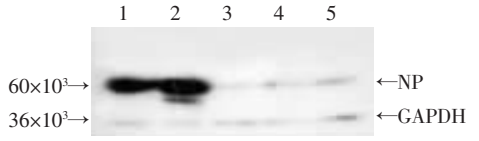
M:DNA 标准(DL 2000);1:正常细胞组;2:H1N1 A/PR8 组;3:HK-shRNA + A/PR8 组;4: NP-shRNA + A/PR8 组; 5: PA-shRNA + A/PR8组;6:NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8 组

图 2　RT-PCR 检测各组细胞 NP mRNA 表达水平



M:DNA 标准(DL 2 000);1:正常细胞组;2:H1N1 A/PR8 组;3:HK-shRNA + A/PR8 组;4: NP-shRNA + A/PR8 组; 5: PA-shRNA + A/PR8组;6:NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8 组

图 3　RT-PCR 检测各组细胞 PA mRNA 的表达水平



1：H1N1 A/PR8 组；2：HK-shRNA + A/PR8 组；3：NP-shRNA + A/PR8组；4：PA-shRNA + A/PR8 组；5：NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8组

图4 Western blot 测定各组细胞内 H1N1 A/PR8 NP 蛋白表达水平

表5 1 $TCID_{50}$ A/PR8 感染 48 h 后各组培养上清液 IAV $TCID_{50}$ 滴度测定结果

组别	$TCID_{50}$	$TCID_{50}$的反对数	抑制率(%)
H1N1 A/PR8	$10^{-3.23}$	1 698[a]	
HK-shRNA + A/PR8	$10^{-3.50}$	3 162[a]	86.2
NP-shRNA + A/PR8	$10^{-2.50}$	316	-81.4
PA-shRNA + A/PR8	$10^{-2.77}$	588[b]	-65.4
NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8	$10^{-2.50}$	316	-81.4

$TCID_{50}$的反对数：能使50% HBE 细胞感染的上清液病毒最高稀释度；抑制率(%) = (shRNA 组最高稀释度 - H1N1 组最高稀释度)/H1N1 A/PR8 组最高稀释度 ×100%

a：$P<0.01$，与 NP-shRNA + A/PR8、PA-shRNA + A/PR8、NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8 组比较；b：$P<0.01$，与 NP-shRNA + A/PR8 及 NP-shRNA + PA-shRNA + A/PR8 组比较

3 讨论

IAV 病毒基因组分 8 个节段，分别编码 3 个 RNA 聚合酶(PB_1, PB_2, PA)、3 个主要的糖蛋白(HA, NP, NA)、1 个基质蛋白(M_1或M_2)和 1 个非结构蛋白(NS_1或NS_2)。其中编码植物血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的基因节段变异性强，不含有 21 个 nt 以上的保守序列，不宜作为 RNAi 的靶基因，其他 6 个节段，均含有 IAV 高度保守序列[4,5]。针对这些保守序列，Ge 等[3]设计、合成了 20 个 siRNAs，在 Madin-Darby 狗肾细胞(MDCK 细胞)及鸡胚中研究发现，其中 55% 的 siRNAs 对 IAV 的复制产生了抑制作用，以针对 NP 和 PA 编码 mRNA 的 2 个 siRNA 作用最为明显。

NP 与病毒体 RNA 及 RNA 聚合酶结合构成 IAV 核壳体结构蛋白(ribonucleoprotein, RNP)，可稳定病毒体 RNA，使其免受 RNase 的作用。NP 在病毒的基因表达和复制过程中也发挥着重要作用。NP 具有型特异性，是流感病毒分型的主要依据。在所有 IAV 中，包括感染人、禽、畜的 H1N1、H3N2、H5N1、H7N7、H9N2 等，NP 高度保守[5,6]。PA 与 PB1 和 PB2 共同组成 RNA 聚合酶复合体。病毒体 RNA 的转录、复制同样也需要 PA 参与[7]。与 NP 一样，PA 在 IAV 中也高度保守[5,8]，因此针对 NP 和 PA 编码 mRNA 来设计小 RNA 干扰分子，具有重要而广阔的应用前景。Tompkins、Li 等[8,9]研究发现，NP-siRNA + PA-siRNA 对 H1、H5、H7、H9 亚型 IAV 均产生了明显的抑制作用。鉴于 NP、PA 的高保守性及其在 IAV 复制中的重要意义，我们同样针对 NP 和 PA 编码保守序列设计抗 IAV 小 RNA 干扰分子。

小 RNA 干扰分子的制备方法很多，其中体外转录生物合成 siRNA 或 shRNA 方法简捷，成本低，质量高，毒性小，稳定性好，转录 siRNA 或 shRNA 只需要 1/10 化学合成浓度就可以达到相同的 RNAi 效果，而且比较接近生理状态。尽管直接导入 siRNA 或 shRNA 产生的 RNAi 效应维持时间较短。但对防控 IAV 感染而言并不存在太大问题，因为流感属急性流行性疾病，在特定地区每次流行时间有限，流行前或流行期间几次给药(如通过手压式定量多次气雾吸入)应该已经足够。基于此，我们体外转录制备了 NP-shRNA 和 PA-shRNA。

经测定，NP-shRNA 和 PA-shRNA 纯度均在 2.0 以上，每 100 μl 含量均 >50 nmol，浓度和纯度均高，标志着制备获得成功。体外细胞水平研究证明，所合成的 NP-shRNA、PA-shRNA 单用或联合使用，对 IAV 在 HBE 细胞内复制有显著抑制作用，其抑制作用主要通过降解 NP mRNA、PA mRNA 从而阻止 NP、PA 蛋白合成有关。与未转染 shRNAs 的对照组相比，IAV 在转染组的培养上清液中滴度显著下降，HBE 的细胞病变效应显著减轻，表明所合成的 NP-shRNA、PA-shRNA 对 HBE 细胞应对 IAV 攻击有明显的保护作用。

参考文献：

[1] McSwiggen J A, Seth S. A potential treatment for pandemic influenza using siRNAs targeting conserved regions of in-fluenza A [J]. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(3): 299 - 313.

[2] Naito Y, Ui-Tei K, Nishikawa T, *et al*. siVirus: web-based antiviral siRNA design software for highly divergent viral sequences [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Web Server is-sue): W448 - W450.

[3] Ge Q, McManus M T, Nguyen T, *et al*. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA tran-scription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (5): 2718 - 2723.

[4] Bennink J R, Palmore T N. The promise of siRNAs for the treatment of influenza[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(12): 571 - 574.

[5] Heiny A T, Miotto O, Srinivasan K N, *et al*. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza a viruses, avian and human, as vaccine targets[J]. PLoS ONE, 2007, 2(11): e1190.

[6] Zhou H, Jin M, Yu Z, *et al*. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice [J]. Antiviral Res, 2007, 76(2): 186 - 193.

[7] Zhou K, He H, Wu Y, *et al*. RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids [J]. J Biotech-nol, 2008, 135(2): 140 - 144.

[8] Tompkins S M, Lo C Y, Tumpey T M, *et al*. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (23): 8682 - 8686.

[9] Li Y C, Kong L H, Cheng B Z, *et al*. Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus[J]. Avian Dis, 2005, 49(4): 562 - 573.

(编辑 吴培红)