

通过载体表达 siRNAs 抑制禽流感病毒复制的研究

Inhibition of Avian Influenza Virus Replication via Short Interfering RNA Expressed by Plasmid

操胜 / CAO Sheng^{1,3}, 刘光亮 / LIU Guang-liang¹, 孟庆文 / MENG Qing-wen¹, 杨增岐 / YANG Zeng-qi², 元文宝 / YI Wen-bao¹, 于康震 / YU Kang-zhen², 吴东来 / WU Dong-lai¹

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. 农业部畜牧兽医总站, 北京 100026
3. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100

1. Harbin Veterinary Research Institute, Harbin 150001, China
2. General Station of National Animal Husbandry and Veterinary, Beijing 100026, China
3. Department of Veterinary Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

[摘要] 禽流感病毒是养殖业危害最严重的病原微生物之一。为探讨小干扰 RNA (siRNA) 对 A 型禽流感病毒复制的干扰作用, 以 H5 亚型 AIV PB2 基因为靶序列, 设计合成了 4 对编码 siRNAs 的 DNA 序列, 将其克隆到 psiRNA-hH1neo 载体中, 构建 siRNAs 表达载体, 鉴定正确后将重组质粒转染 MDCK 细胞。采用 G418 筛选建立抗性细胞系, 用血凝 (HA) 试验和 real time RT-PCR 试验检测抑制效果。在细胞水平筛选出具有高效抑制 AIV 复制的 2 个靶位点 PB2-1154、PB2-342, 为 AIV 的基因功能研究、抗病毒药物的开发和转基因动物的研究奠定了基础。

[关键词] 禽流感病毒; 聚合酶 II 基因; RNA 干扰

[中图分类号] S855.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857 (2006) 03-0009-05

Abstract: Avian Influenza virus (AIV) is one of the most harmful pathogens in poultry industry. Because of its antigenic shift and drift, the efficacy of current vaccines and drugs therapy is limited. Here we show that four recombinant plasmids which can express four different kinds of short hairpin RNAs (shRNA) targeting at the polymerase II gene of the avian influenza virus in cell were successfully constructed. The recombinant plasmids and vacancy plasmid were transfected into MDCK cells respectively and five cell lines were established. The hemagglutination assay and real time RT-PCR were used to detect the inhibition efficacy. PB2-1154, PB2-342 were proved that they can specifically inhibit the virus production in MDCK cells.

Key Words: avian influenza virus; polymerase II gene; RNA interfering

CLC Number: S855.3

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)03-0009-05

禽流感病毒(Avian Influenza virus, AIV)属于正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒成员, 通常经飞沫传染, 主要侵袭呼吸道^[1], 可引起鸟类、多种禽类、人类及低等哺乳动物的严重疾病。各种 A 型流感病毒主要侵袭自然宿主, 较少发生交叉感染。但是, 自 1997 年以来, 发生多起 H5N1 亚型禽流感病毒突破种间

障碍, 感染并致人死亡事件, 给人类健康带来极大的威胁。当前主要通过疫苗、药物对流感病毒进行预防和治疗, 但由于流感病毒的抗原漂移和抗原转变特性, 其疗效有限。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是双链 RNA (dsRNA) 介导的序列特异性 mRNA 降解的过程, 也是体内基因

收稿日期: 2006-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30300258)

作者简介: 操胜, 男, 陕西杨凌西北农林科技大学动物科技学院, 硕士研究生, 主要研究方向为分子病毒学;

E-mail: caosheng3312@chinaren.com

孟庆文 (通讯作者), 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, 主要研究方向为 RNAi 抑制病毒复制和基因工程疫苗研究;

E-mail: mengqw2000@hotmail.com

组抵御外在感染和内部转座的一种保护机制。RNA干扰现象广泛存在于各种生物体中,如植物、真菌、昆虫、后生动物和哺乳动物,包括人类^[2]。自然发生的RNAi作用的机制是:外源性(如病毒)或内源性的dsRNA在细胞内被Dicer切割成21-23nt短双链RNA,即siRNA,siRNA能与某些酶形成RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),能特异性识别和降解mRNA,抑制靶基因的表达。在哺乳动物细胞内导入21nt的siRNA同样能够引发RNAi效应,而21nt的siRNA不会引起干扰素效应,从而避免了非特异干扰靶基因表达。siRNA可通过化学合成、体外转录、载体表达等方法获得,其中利用载体表达方法,具有不直接操作RNA、抑制时间长、可长期用于研究等优势^[3]。

RNAi作为一种古老的抗病毒机制,在抵御病毒感染的研究中备受关注。通过诱导RNAi抑制病毒复制的研究已在人免

疫缺陷病毒(HIV)^[4]、肝炎病毒^[5]、口蹄疫病毒(FMDV)^[6]等众多病毒上取得了进展。本试验以H5亚型AIV PB2基因为靶基因,在序列高度保守区设计了4个21nt的靶位点,克隆构建了表达shRNA的表达质粒,并建立抗性细胞系,在细胞水平筛选出了能高效抑制AIV复制的靶位点,从而为后续的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

禽流感病毒A/Goose/Guang dong/96 (H5N1) 毒株由哈尔滨兽医研究所动物流感中心保存。10⁻⁵稀释病毒接种10日龄SPF鸡胚,37℃孵48 h,收集尿囊液,在MDCK细胞上测定其TCID₅₀为10^{-4.95}/0.2 ml,储存于-80℃备用。

1.2 载体与细胞

载体psiRNA-hH1neo和大肠杆菌GT 116均购自Invivogen公司;低代次MDCK细胞购自武汉细胞库。

1.3 试剂

限制性内切酶Bbs I、Ase I为NEB公司产品;T4 DNA连接酶为TaKaRa公司产品;柱离心式胶回收试剂盒、RNA提取试剂盒RNeasy Mini Kit均购自Qiagen公司;质粒纯化试剂盒购自Promega公司;脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;荧光定量PCR试剂盒DyNamo SYBR Green qPCR Kit购自Finnzymes公司。

1.4 引物

重组质粒测序鉴定引物OL381序列为5'-CCCTAACTGACACACATT-3',荧光定量PCR引物利用OLIGO6.0软件设计合成扩增PB2基因特异性引物:上游引物PB2-up序列为5'-ATCTGCAGTATTGAGGGGATT-3',下游序列PB2-low为5'-AGTCCCGTTTCCGTTTCATT-3',扩增长度为161 bp;引物均由上海生物工程公司合成。

表1 siRNA 序列
Tbl. 1 siRNA Sequences

Name	Sequences of siRNAs	GC(%)
PB2-342up	5' - TCCC AACAGTACAGTCCATTATCCTCAAGAGGGATAATGGACTGTACTTGT - 3'	47.62
PB2-342low	5' - CAAAAAACAAGTACAGTCCATTATCCTCTTGAGGATAATGGACTGTACTTGT - 3'	47.62
PB2-1154up	5' - TCCC AAGCACTAGAAGGCTGATTCTCAAGAGGAATCAGCCTTCTAGTTGCTTT - 3'	47.62
PB2-1154low	5' - CAAAAAAGCACTAGAAGGCTGATTCTCTTGAAGATCAGCCTTCTAGTTGCTTT - 3'	47.62
PB2-1566up	5' - TCCC ATCTCCTGAAGAGGTTAGTGTCAAGAGTCACTAACCTCTTCAGGAGATT - 3'	42.86
PB2-1566low	5' - CAAAAAATCTCCTGAAGAGGTTAGTGTCTTGTCACTAACCTCTTCAGGAGAT - 3'	42.86
PB2-2152up	5' - TCCC AGCATCAATGAAGTGAAGCAATTCAGAGATTGCTCAGTTCAATGATGCT - 3'	38.10
PB2-2152low	5' - CAAAAAGCATCAATGAAGTGAAGCAATCTCTGAATTGCTCAGTTCAATGATGCT - 3'	38.10

1.5 siRNA 序列设计及寡核苷酸合成

以H5H1 AIV GD1/96株PB2基因为靶基因,选择在H5亚型流感病毒中均高度保守区,利用Invivogen公司siRNA Designer软件(<http://www.sirnawizard.com>)设计4对编码shRNA DNA片段。所设计的siRNA在同亚型毒株序列上完全一致,并且将其在GeneBank上作Blast分析,使其不能针对任何已知的其它基因。设计的siRNA序列见表1。

1.6 重组质粒的构建与鉴定

在退火缓冲液中分别溶解2个DNA单链片段,并按等摩尔数混合,水浴中加热至80℃ 2 min,然后缓慢降至35℃,即为双链DNA片段。采用胶回收试剂盒回

收退火后的双链DNA片段。载体psiRNA-hH1neo用Bbs I酶切后,胶回收试剂盒回收。将退火后的双链DNA片段克隆到酶切后的psiRNA-hH1neo载体中,转化入大肠杆菌GT 116感受态细胞中。在卡那霉素抗性琼脂板上通过蓝白斑筛选挑取白色菌落,获得阳性重组质粒。分别用Ase I酶切鉴定空载体质粒psiRNA-hH1neo和重组质粒,初步鉴定正确后送交上海生物工程公司测序。

1.7 重组质粒的纯化与抗性细胞系的建立

用Promega公司质粒提取试剂盒提取阳性质粒和psiRNA-hH1neo空质粒,用分光光度计测定核酸纯度及含量,按Invitrogen公司脂质体转染试剂盒

Lipofectamine 2000说明书转染25 cm²细胞培养瓶中生长的单层MDCK细胞。然后依次用400 μg/ml、600 μg/ml、800 μg/ml G418筛选抗性细胞系,待抗性细胞系稳定后,冻存细胞备用。

1.8 血凝试验(HA)检测特异性siRNAs抑制AIV复制效率

将生长对数期的5种抗性细胞系,以及MDCK细胞传代于96孔细胞培养板上,每孔2 × 10⁴细胞,37℃,5% CO₂培养箱培养24 h后,用无血清的DMEM冲洗3遍,接种1 × 10⁴ TCID₅₀的GD1/96 AIV,20 μl/孔,37℃感作1 h后弃除病毒液,加入维持液60 μl,在37℃、5% CO₂环境中培养,每隔12 h,50 μl病毒

上清,用HA 试验检测血凝价。根据文献[6]的公式: $(\text{HA titer-psiRNA} - \text{HA titer-siRNA}) / \text{HA titer-psiRNA} \times 100\%$ 计算抑制效率。

1.9 特异性 siRNAs 抑制 AIV 复制效率的测定

1.9.1 标准品的制备

根据 RNA 提取试剂盒说明书,从鸡胚尿囊液提取 GD1/96 AIV 基因组 RNA,用引物 PB2-up 反转录成 cDNA,反应体系是:模板 5 μl 、5 $\times$ RT buffer 4 μl 、dNTP (10mM) 2 μl 、RNase Inhibitor 0.5 μl 、PB2-up 2 μl 、AMV 反转录酶 2 μl 、DEPC 水 4.5 μl ,于 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,并用引物 PB2-up 和 PB2-low 扩增一段 DNA,克隆到 pMD18-T 载体上,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中筛选得到重组阳性质粒 pT-PB2。酶切和测序鉴定正确后,大量提取并纯化阳性质粒,用分光光度计测定纯度和浓度,并按 Gene 公司荧光定量 PCR 仪 rotor-gene 操作手册提供的公式[公式: $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数} / \text{mol}) \times (\text{浓度} / \mu\text{l}) / (\text{碱基数} \times 660 \text{ dalton} /$

$\text{bp}) = \text{copies} / \mu\text{l}$] 计算拷贝数浓度。

1.9.2 Real time RT-PCR 试验

将生长对数期的 5 种抗性细胞系,以及 MDCK 细胞传代于 12 孔细胞培养板上,每孔 2×10^5 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 后,用无血清的 DMEM 冲洗 3 遍,接种 1×10^5 TCID $_{50}$ 病毒,200 μl / 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 感作 1 h 后弃除病毒液,加入维持液 600 μl ,继续在 CO_2 培养箱中培养。病毒感染后 48 h 将细胞培养物冻融 2 次,8 000rpm 离心取 200 μl 上清提取细胞中总 RNA,用荧光定量 PCR 上游引物反转录 AIV 基因组 RNA 获得 cDNA,然后取逆转录产物 1.0 μl 进行 Real time RT-PCR 反应。反应体系为:2 $\times$ SYBR Green I 10 μl ,上游引物 1 μl ,下游引物 1 μl ,模板 1 μl ,补充 ddH $_2\text{O}$ 至 20 μl ,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,78 $^{\circ}\text{C}$ 15 s (数据获取),共进行 40 个循环。梯度稀释已测得拷贝数的 pT-PB2 标准参照质粒,在相同条件下与待测样品同时进行 real time

RT-PCR 反应,反应结束后用 rotor-gene3000 分析软件分析 Real time RT-PCR 结果。按公式 $(\text{Copies-psiRNA} - \text{Copies-siRNA}) / \text{Copies-psiRNA} \times 100\%$ 计算抑制效率。

2 结果

2.1 重组载体的鉴定

将合成的正链和负链 DNA 片段退火,胶回收,克隆 psiRNA-hH1neo 载体中,并转入大肠杆菌 GT 116 感受态细胞中获得重组质粒。用 AseI 将重组质粒和空质粒分别进行酶切鉴定:psiRNA-hH1neo 空质粒酶切后产生 1 个 2 619 bp 的大片段和 1 个 2 359 bp 的小片段,如图 1 所示。重组质粒由于在克隆时切除了 1 个 AseI 酶切位点,故能产生 1 个 2 674 bp 线性化的片段,如图 2 所示。将酶切鉴定初步正确的重组质粒送上海生物工程公司测序,测序结果与设计的目的序列完全相同,表明已正确构建重组质粒,可进一步用于干扰试验。



图1 重组质粒核酸电泳图

Fig. 1 The electrophoresis of recombinant plasmid

Lane 1: Marker DL-15 000
Lane 2: Control of lined pSiRNA plasmid
Lane 3: Control of pSiRNA plasmid
Lane 4-7: Recombinant plasmids



图2 重组质粒酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Enzyme restriction analysis of recombinant plasmid

Lane 1: Marker DL-15,000
Lane 2: pSiRNA plasmid digested by AseI
Lane 3-6: Recombinant plasmids digested by AseI

提取并纯化4种重组阳性质粒和psiRNA-hH1neo空质粒,由脂质体Lipofectamine 2000介导转染MDCK细胞中,用G 418筛选转染后细胞,并以未转染的MDCK细胞作对照。当G 418浓度达到800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后5 d,转染细胞形成单细胞克隆,而对照MDCK细胞全部死亡。继续加抗性至细胞稳定,建立抗性细胞系。将建立的5种抗性细胞系分别命名为:PB2-342、PB2-1154、PB2-1566、PB2-2152、psiRNA。

2.2 血凝试验结果

以 1×10^5 TCID₅₀的病毒剂量接种培

养在的96孔细胞培养板上5种抗性细胞系及MDCK细胞,每隔12 h取1孔50 μl 细胞培养上清,用1%的鸡红细胞测血凝价。

结果显示:感染病毒后监测足够长时间,MDCK细胞在48~60 h之间达到峰值。空载体对照与MDCK细胞病毒滴度上升曲线基本一致,这表明载体psiRNA-hH1neo无干扰病毒的复制作用。PB2-1566和PB2-2152与psiRNA在24 h检测到HA效价,且病毒滴度曲线与psiRNA相似,无明显抑制效果。PB2-342、PB2-1154在36 h才能检测到HA效价,48 h

血凝价分为3和4,具有显著的抑制效果(如图3)。选取接毒后48 h的HA效价,根据公式计算不同siRNA的抑制效率。PB2-1566从血凝价水平品价无抑制效果, PB2-2152抑制效率为50%, PB2-1154和PB2-342有显著的抑制效果,抑制效率分别达到93.8%和87.5%(如图4)。

2.3 荧光定量PCR试验结果

12孔板上培养抗性细胞系及对照MDCK细胞,接毒48h后提取病毒全基因组RNA,用引物PB2-up反转录得cDNA,取1 μl 反转录产物用于Real-time PCR试验,反应中pT-PB2标准参照质粒的拷

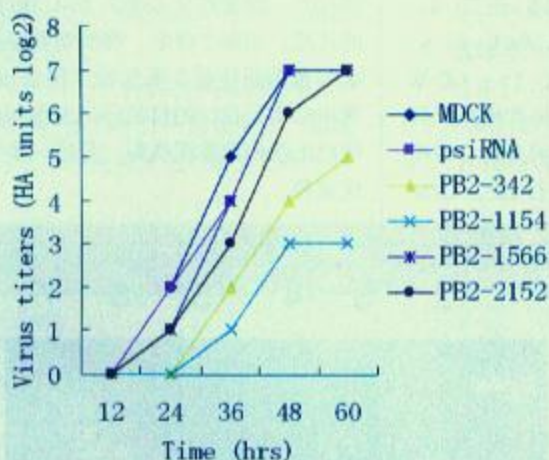


图3 以 1×10^5 TCID₅₀/96接毒,每12h检测培养上清血凝效价

Fig.3 Viral titers in the culture supernatants at different times infection were measured by HA assay

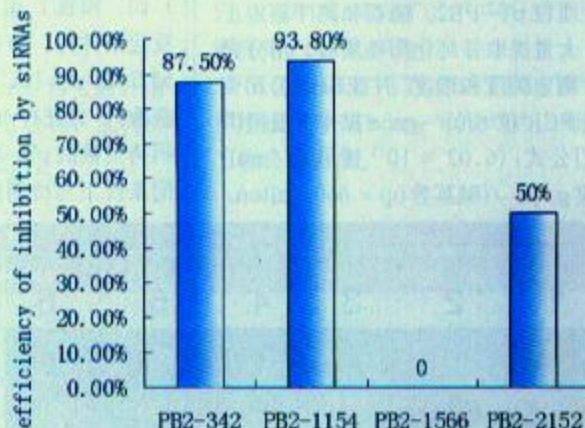


图4 根据HA试验结果计算抑制效率
Fig.4 The efficiency of inhibition base on the results of HA assay

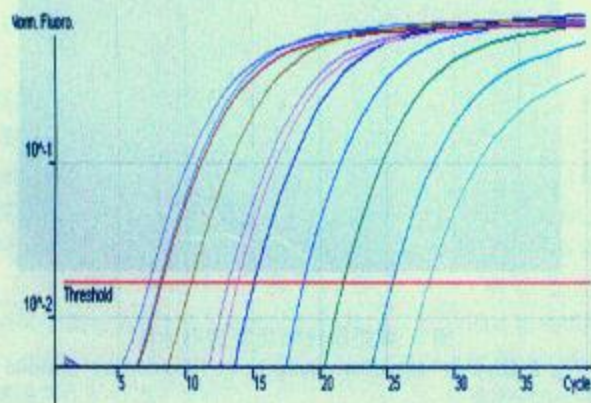


图5 AIV基因pb 2基因real-time PCR扩增曲线
Fig5 the kinetic curves of PA-time PCR of AIV

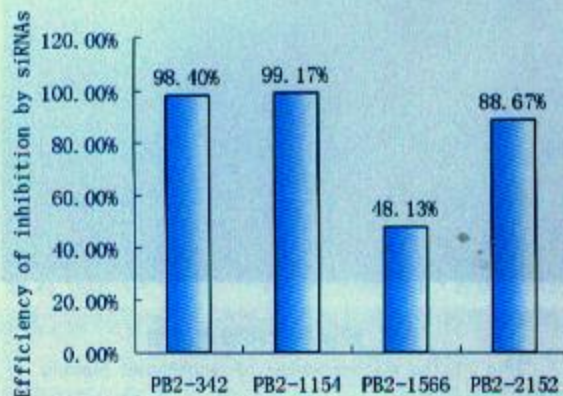


图6 根据realtimeRT-PCR试验结果计算得到的抑制效率
Fig.6 The efficiency of inhibition based on the results of real time RT-PCR

贝数分别是 9×10^1 、 9×10^2 、 9×10^3 、 9×10^4 、 9×10^5 。反应结束后,用 rotor-gene3000 分析软件分析 real time RT-PCR 结果,标准曲线分析结果显示其 R^2 值达到 0.99,表明检测数据具有很高的相关性。

样品的扩增实时检测结果见图 5。分析扩增动态显示,不同样品出现典型扩增所需的循环数不同,表明各个样品中 AIV 基因拷贝数不同。从左向右:第 1 条至第 6 扩增曲线分别为:psiRNA、MDCK、PB2-1566、PB2-2152、PB2-342、PB2-1154; Ct 值分为:7.28、8.08、8.23、10.39、13.18、13.88;系统参照标准曲线测出不同抗性细胞系中病毒拷贝数分为: 2.41×10^6 copies/ μ l、 1.38×10^6 copies/ μ l、 1.25×10^6 copies/ μ l、 2.73×10^7 copies/ μ l、 3.87×10^6 copies/ μ l、 2.37×10^6 copies/ μ l。PB2-1566 与 psiRNA 病毒基因拷贝数处于同一数量级,抑制作用不明显;PB2-2152 相差 1 个数量级,具有一定的抑制作用;PB2-342、PB2-1154 相差 2 个数量级,有极强的抑制作用。

根据公式计算出抑制效率,如图 6 所示:PB2-1566 抑制效率为 48.1%; PB2-2152 为 88.67%; PB2-342 为 98.4%; PB2-1154 为 99.17%。由于 HA 试验只能粗略反映病毒粒子的量,与精确定量的 Real-time PCR 结果存在一个误差范围,所以两者抑制效率基本一致。PB2-342、PB2-1154 对 AIV 有高效抑制作用。

3 讨论及结论

禽流感是养鸡业危害最严重的传染病之一,H5N1 亚型高致病性禽流感 (HPAI) 不但可以引起禽类 100% 死亡率,而且近年来还出现了 AIV 感染人并致人死亡事件,这赋予了 AIV 新的公共卫生意义。

RNAi 在抗病毒感染上已展现了巨大的潜力。目前,一些病毒已被证明 RNAi 不但在细胞水平上能高效抑制病毒的复制,而且在体内也有很好的抑制作用^[7]。其中,1 型人免疫缺陷病毒的 siRNA 药物已经进入临床试验阶段^[9]。在流感病毒的研究上,利用化学合成的方法在细胞水平筛选到高效抑制 H1N1 型流感病毒复制的靶位点,并在小鼠体内干扰 IV 复制获得成

功,为新抗流感病毒药物的开发奠定了基础^[10]。

流感病毒聚合酶 II (PB2) 在病毒 mRNA 转录的起始阶段具有重要作用^[11]。在该病毒转录初始 PB2 与宿主 mRNA 的 5' 端结合,切下 10~13 个核苷酸,这一序列带有帽子结构,可直接作为引物开始初级转录产生 mRNA,所以抑制 PB2 基因的表达能够抑制全病毒的复制,因此,高效抑制 PB2 表达的靶位点是抗流感病毒治疗的合适靶标。

本研究针对 H5 亚型 AIV PB2 基因的高度保守区,设计 siRNAs,运用载体表达的方法,建立胞内能稳定表达 siRNA 的抗性细胞系,用 HA 试验和 real time RT-PCR 试验检测在抗性细胞系中表达的 siRNAs 对 AIV 的抑制作用,筛选高效靶位点。在预试验中,我们分别用 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 TCID₅₀ AIV 感染 96 孔板生长的抗性细胞系,用 HA 试验筛选最佳接毒量。试验显示,siRNA 对病毒的抑制作用与接毒量负相关,当 1×10^1 TCID₅₀ GD1/96 接毒时,抑制作用最明显。以 1×10^1 TCID₅₀ GD1/96 接毒量接毒,用 HA 试验和 real time RT-PCR 试验检测抑制效果,获得 2 个高效靶位点,其抑制效率:PB2-342 达到 87.5%~98.4%; PB2-1154 达到 93.8%~99.17%。

流感病毒自然感染时主要侵袭动物的呼吸道和肺上皮细胞。在感染的初期,呼吸道和肺上皮细胞中病毒粒子数量较少,足够量的 siRNA 导入呼吸道和肺上皮细胞中,能够抑制病毒的复制,可以通过滴鼻、喷雾等方式给药,简单且方便。

RNA 干扰具有类似于基因敲除作用,高效靶位点可用于相关基因功能的研究;利用转基因技术可用于新型抗病毒动物的培育^[12]。

综上所述,本试验成功地设计和构建了 AIV 基因 siRNA 表达质粒,转染 MDCK 细胞,建立了抗性细胞系,通过 HA 试验和 real time RT-PCR 试验初步筛选出能高效抑制 AIV 复制的靶位点,从而为 AIV 的基因功能研究、抗病毒药物的开发和转基因动物的研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] 殷震. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997. 343-348.
- [2] 孟庆文, 施建忠, 于康震. 抑制基因表达的新技术——RNAi [A]. 第八次全国基因结构、表达和调控学术研讨会论文集 [C]. 哈尔滨: 2002. 114-115.
- [3] 陈惠斌, 孟庆文, 仇华吉, 等. RNAi——基因沉默指南 [M]. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [4] MARTINEZ M A, CLOTET B, ESTE J A. RNA interference of HIV replication [J]. Trends Immunol. 2002. 239(12): 559-561.
- [5] HAN BEI, WNAG XIU-MIN, GU XUE-FAN. Double stranded RNA (RNA interference RNAi) in different creatures [J]. Hereditas (Bei-jing). 2002. 24(2): 200-202.
- [6] ELBASIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. Nature. 2001. 411(6 836): 494-498.
- [7] GE Q, MCMANUS M T, NGUYEN T, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibition all virus RNA transcription [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2003. 100. 2 718-2 723.
- [8] GUANGCHAO SUI, CHRISTINA SOOHOO, E I BACHIR AFFAR, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 100. 2 718-2 723. 99. 5 515-5 520.
- [9] WEE-SUNG PARK, NAKO MIYANO-KUROSKI, MASAOKI HAYAFUNE, et al. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference [J]. Nucleic Acids Research. 2002. 30. 4 830-4 835.
- [10] 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 USA. 2004. 101(23): 8 682-8 686.
- [11] 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.

(责任编辑 李慧政)