

转录靶向猪瘟病毒 3'-UTR shRNA 细胞株 干扰猪瘟病毒增殖的检测

郭抗抗,徐 浩,张彦明*,张为民,冶贵生,熊奎州,谢林红,党如意

(西北农林科技大学动物医学院,杨凌 712100)

摘要:对筛选的转录猪瘟病毒石门株 3'-UTR shRNA 的 PK-15 细胞株 P-1(114~132 位)、P-2(136~154 位)和 P-3(209~227 位)分别接种猪瘟病毒(CSFV),在接毒后第 72 和 96 小时用半定量反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 CSFV NS3 基因及 β actin 基因,以研究构建细胞株在转录水平上对 CSFV 增殖干扰的效果;接毒后第 72、96 和 148 小时以酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测细胞 NS3 蛋白表达量,通过 OD₄₉₀ 值分析构建细胞株在病毒蛋白表达水平上对 CSFV 增殖的影响。检测结果表明:(1)接毒后第 72 和 96 小时 P-1、P-2 和 P-3 细胞株中 NS3 基因的量明显减少,与接毒的空白 PK-15 细胞比较差异显著($P < 0.05$),说明 P-1、P-2 和 P-3 细胞株转录的 shRNA 能干扰 CSFV RNA 的转录;(2)接毒后第 72 和 96 小时 P-1、P-2、P-3 细胞株中 NS3 蛋白的表达量明显少于接毒的 PK-15 细胞($P < 0.05$),说明转录的 shRNA 在病毒蛋白水平上能干扰 CSFV NS3 基因的表达,但接毒后第 148 小时干扰效果有所降低。

关键词:半定量 RT-PCR;ELISA;猪瘟病毒;3'-UTR

中图分类号:S852.65+1

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)06-0746-06

Detection of the Interference to the Reproduction of CSFV by PK-15 Cell Strains Transcribing shRNA Targeted to the 3'-UTR

GUO Kang-kang, XU Hao, ZHANG Yan-ming*, ZHANG Wei-min,

YE Gui-sheng, XIONG Kui-zhou, XIE Lin-hong, DANG Ru-yi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The P-1(114-132 sites), P-2(136-154 sites) and P-3(209-227 sites) PK-15 cell strains transcribing shRNA targeted to the classical swine fever virus(CSFV) 3'-UTR were infected with CSFV shimen strain respectively. The NS3 and β actin gene of infected cells were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) at the 72nd and 96th hour post-infection, to study the influence of transcribing shRNA on the reproduction of CSFV at RNA level. At the same time, the NS3 protein of cells was detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) at the 72nd, 96th and 148th hour post-infection to estimate the influence at protein level by comparing the optical density at 490 nm. Results showed that:(1) The NS3 genes of P-1, P-2 and P-3 cell strains decreased obviously than that of PK-15 cells(positive control) at the 72nd and 96th hour post-infection, respectively($P < 0.05$), it showed the transcribed shRNA could interfere the reproduction of CSFV at RNA level. (2) The expressing quantity of NS3 protein of P-1, P-2 and P-3 cell strains were obvious less than that of PK-15 cells(positive control) at the 72nd and 96th hour post-infection, respectively($P < 0.05$), indicating that the transcribed shRNA could interfere the reproduction of CSFV at protein level, but the discrepancy

收稿日期:2007-07-17

基金项目:国家自然科学基金项目(30270988)

作者简介:郭抗抗(1973-),男,陕西咸阳人,博士生,主要从事分子病原学与免疫学研究

* 通讯作者:张彦明(1956-),教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究, E-mail: ylzhangym@sohu.com

were not obvious at the 148th hour post-infection.

Key words: semi-quantitive RT-PCR; ELISA; CSFV; 3'-UTR

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)的重要成员,基因组为单股正链 RNA,全长约 12 kb,含有一个大的开放阅读框(ORF)。CSFV ORF 编码一条由结构蛋白和非结构蛋白组成的多聚蛋白,此多聚蛋白由 3 898 个氨基酸残基组成,能进一步被蛋白酶加工成 CSFV 所需的各种功能蛋白。CSFV 基因组结构从 5'到 3'端依次为 5'-非翻译区(5'-UTR)、N^{pro}、C、E^{ms}(E0)、E1、E2、P7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 和 3'-非翻译区(3'-UTR)。3'-UTR 由 226~243 个核苷酸组成,其末端缺乏 poly(A)尾结构,在瘟病毒属内保守性很高。据 Khromykh 等^[1]证实,黄病毒 3'-UTR 及 5'-UTR 参与了病毒的复制调控,与病毒 RNA 聚合酶对 RNA 模板链的识别有关。Behrens 又进一步证实 CSFV 的 3'-UTR 的确参与了病毒 RNA 的复制过程,缺失 3'-UTR 序列将使得病毒核酸无法进行复制^[2]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发现的在生物体内普遍存在的一种古老的生物学现象,是由双链 RNA(dsRNA)介导的、由特定酶参与的特异性基因沉默现象,它在转录水平、转录后水平和翻译水平上阻断基因的表达^[3]。siRNA(Small interfering RNA, siRNA)是 dsRNA 由 Dicer 处理之后的产物,它同样能激活 RNAi 途径来抑制基因表达。shRNA(Small hairpin RNA, shRNA)在细胞内可自动被加工成 siRNA,从而引起靶基因的沉默。本实验室构建了针对 CSFV 3'-UTR 114~132、136~154 和 209~227 位的重组干扰质粒,通过转染 PK-15 细胞,经 G418 抗性筛选得到转录靶向 CSFV 3'-UTR 114~132、136~154 和 209~227 位 shRNA 的 PK-15 细胞株(P-1、P-2 和 P-3),并对 P-1、P-2 和 P-3 细胞株在 RNA 水平和蛋白水平上干扰 CSFV 的增殖情况进行了检测。

1 材料和方法

1.1 试剂和毒株

DMEM 培养基和 G418 为 Gibco 公司产品;胎牛血清购自中国医学科学院生物工程研究所;Trizol 为 Invitrogen 产品;InviRevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 为 Fermentas 产品;

ExTaq 酶购自 TaKaRa 公司;CHEKIT HCV-ANTIGEN 购自 IDEXX;CSFV 石门株购自中国兽医药品监察所。

1.2 转录猪瘟病毒 3'-UTR shRNA 细胞株的建立

分别设计了 3 对针对猪瘟病毒石门株 3'-UTR 114~132、136~154 和 209~227 位的干扰片段,分别与干扰载体 pGenesil-1 连接,转化 DH5 α 细胞,筛选阳性克隆得到重组干扰质粒 pGene-1、pGene-2 和 pGene-3,脂质体介导转染重组干扰质粒至 PK-15 细胞,经 G418 抗性筛选得到 3 株转录靶向猪瘟病毒石门株 3'-UTR shRNA 的 PK-15 细胞株,分别命名为 P-1、P-2 和 P-3,将得到的细胞株于液氮中保存。细胞株的建立部分见文献[4]。

1.3 转录猪瘟病毒 3'-UTR shRNA 细胞株的复苏与接毒

复苏保存的 P-1、P-2 和 P-3 株细胞株于 6 孔板内。待孔内细胞铺满 80%时,用无血清无抗生素的 DMEM 培养基冲洗 3 次,加入 CSFV 稀释液,37℃ 吸附 2 h。吸附结束后用 4%(体积分数)胎牛血清的 DMEM 于 37℃ 5% CO₂ 培养。同时以同样方式处理的 PK-15 细胞为阳性对照,设空白对照(不接 CSFV 作为阴性对照),培养条件同前。

1.4 引物的设计

根据 CSFV 石门株 NS3 和 β actin 基因(内参)序列,使用引物设计软件 Primer5.0 和 Oligo6.0 分别设计用于检测 CSFV 石门株 NS3 和 β actin 基因的 1 对引物,引物由上海生物工程有限公司合成,引物序列如下,NS3-F: 5'-GTGTAATCATCAAACGTCC-3'; NS3-R: 5'-CAAGCTTATGAGTGGAATAC-3'。 β -actin-F: 5'-TTCCTTCTTGGGTATGGAAT-3'; β -actin-R: 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTC-3'。

1.5 CSFV RNA 的提取及 cDNA 合成

接毒后第 72 和 96 小时分别提取 P-1、P-2 和 P-3 细胞、阳性对照细胞、阴性对照细胞的总 RNA。具体操作参照 Trizol LS Reagent 试剂盒和 InviRevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行。

取总 RNA 11 μ L 加入到 20 μ L 反转录体系中,内含下游引物(20 pmol/ μ L)1 μ L、5 \times RT Buffer 4

μL 、dNTPs(10 mmol/L) 2 μL 、鼠源反转录酶(M-MLV, 200 U/ μL) 1 μL 、RNA 酶抑制剂(20 U/ μL) 1 μL 、42℃水浴 60 min 后, 70℃ 10 min 灭活反转录酶, -20℃备用。

1.6 PCR 扩增条件的优化

提取接 CSFV 后第 72 小时后的 PK-15 细胞(阳性对照)的总 RNA, 反转录合成 cDNA 分别做 CSFV NS3 基因引物和 βactin 基因引物在相同反应体系下 22、24、26、28、30、32、34 和 36 个循环的 PCR。CSFV NS3 基因引物反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 90 s, 72℃ 10 min; βactin 基因引物反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 35 s, 48℃ 45 s, 72℃ 45 s, 72℃ 10 min。PCR 反应体系: 模板 cDNA 1 μL , 上下游引物各 1 μL , dNTPs 2 μL , ExTaq 酶 0.5 μL , 10×buffer 2.5 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。扩增后各取 5 μL 混合后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 CSFV NS3 基因及 βactin 基因半定量 RT-PCR

按上述优化的 PCR 扩增条件分别检测接毒后

第 72 和 96 小时 P-1、P-2 和 P-3 株细胞培养物, 阳性对照 PK-15 株细胞培养物中 NS3 基因的量, 通过分析比较, 评价干扰 shRNA 在转录水平上对 CSFV 增殖的影响。同时做阴性对照。

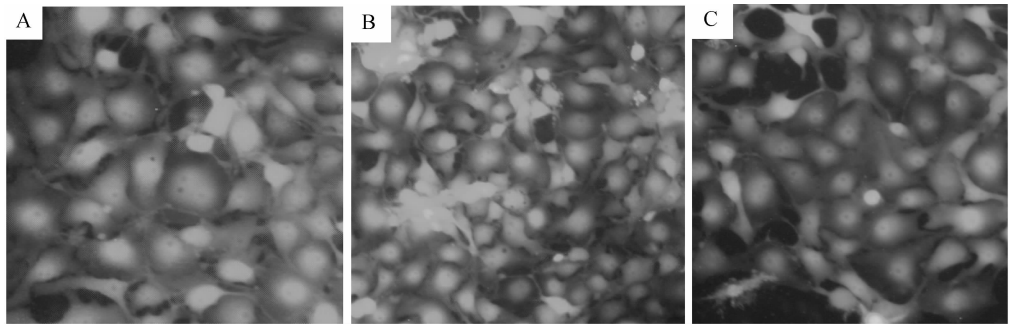
1.8 猪瘟抗原 ELISA 检测

按照猪瘟抗原检测试剂盒操作说明分别检测 P-1、P-2、P-3 株细胞培养物及阳性 PK-15 株细胞培养物接毒后第 72、96 和 148 小时细胞中 CSFV NS3 蛋白的表达量, 通过比较 OD₄₉₀ 值评价干扰 shRNA 在病毒蛋白水平上对 CSFV 增殖的影响。同时做阴性对照。

2 结果

2.1 复苏转录 CSFV 3'-UTR 不同 shRNA 的 P-1、P-2 和 P-3 细胞株

由于选用以绿色荧光蛋白基因为报告基因的 pGenesil-1 干扰载体, 复苏后状态稳定的 P-1、P-2 和 P-3 细胞株均表达绿色荧光蛋白(图 1)。



A. P-1 细胞株; B. P-2 细胞株; C. P-3 细胞株

A. P-1 cell strain; B. P-2 cell strain; C. P-3 cell strain

图 1 复苏稳定的 P-1、P-2、P-3 细胞株 (×100)

Fig. 1 P-1, P-2, P-3 cell strains after recovery (×100)

2.2 PCR 扩增条件的优化

CSFV NS3 与 βactin 基因引物相同体系下 22、24、26、28、30、32、34 和 36 个循环的 PCR 结果显示(图 2~4), 以 30 个循环为 PCR 扩增最佳循环数。此时, CSFV RNA 与 βactin RNA 拷贝数均处于明显的上升期。

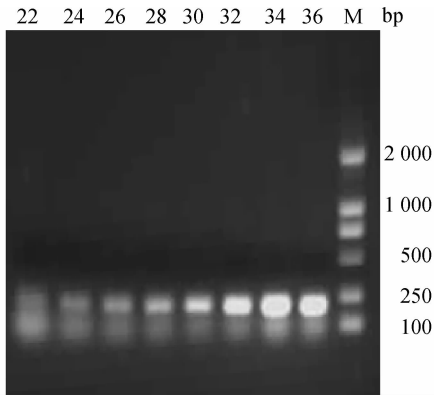
2.3 半定量 RT-PCR 检测结果

P-1、P-2、P-3 及 PK-15 细胞接种 CSFV 后第 72 和 96 小时, NS3 与 βactin 基因 RT-PCR 电泳结果(图 5、6)表明 P-1、P-2 和 P-3 细胞株中 NS3 基因的

转录量明显小于接毒的 PK-15 细胞, 说明其能干扰 CSFV 在细胞中的增殖。SPSS 软件分析 βactin 与 CSFV NS3 基因 RT-PCR 电泳吸光度结果的比值(图 7)显示, 在 P-1、P-2 和 P-3 细胞株中 NS3 基因的量明显减少, 与接毒的 PK-15 细胞比较差异显著 ($P < 0.05$), 说明 P-1、P-2 和 P-3 细胞株转录的 shRNA 能干扰 CSFV RNA 的转录。

2.4 CSFV ELISA 检测结果

P-1、P-2、P-3 及空白 PK-15 细胞接毒后第 72、96 和 148 小时的 CSFV NS3 蛋白 ELISA 检测结果



22~36. PCR 循环数; M. DNA 分子质量标准, 图 3 同

22-36. PCR cycling number; M. DNA marker. The same as Fig. 3

图 2 接毒后第 72 小时 PK-15 细胞中 β -actin 基因不同循环数 PCR 结果

Fig. 2 Different cycles PCR of β -actin gene in PK-15 cell strain at the 72nd hour post-infection of CSFV

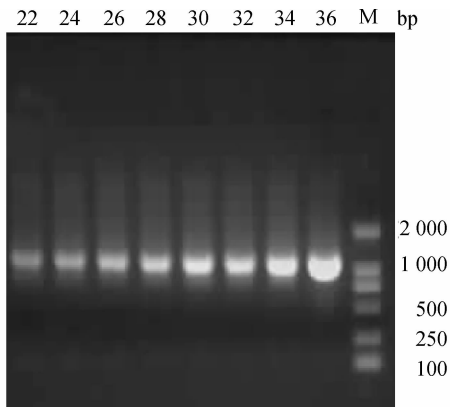


图 3 接毒后第 72 小时 PK-15 细胞中 NS3 基因不同循环数 PCR 结果

Fig. 3 Different cycles PCR of NS3 gene in PK-15 cell strain at the 72nd hour post-infection of CSFV

(图 8) 显示, 接毒后的 P-1、P-2、P-3 细胞株中 NS3 蛋白的表达量明显少于接毒的 PK-15 细胞 ($P < 0.05$)。说明转录的 shRNA 在病毒蛋白水平上能干扰 CSFV NS3 基因的表达。但接毒后第 148 小时后干扰效果有所降低。

3 讨论

3.1 CSFV 3'-UTR 是病毒基因组复制的主要调控位点, 存在着 2 个稳定的茎-环结构基序 (Stem-

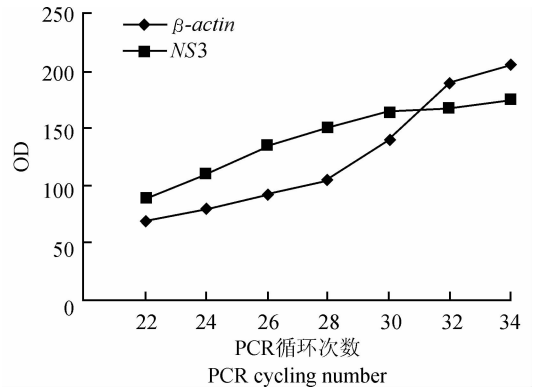
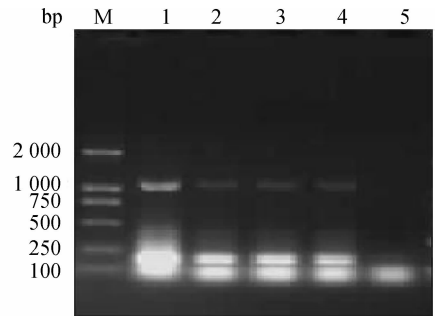


图 4 β -actin 与 NS3 基因不同循环数电泳吸光度值曲线

Fig. 4 The relationship of the optical density (OD) and cycling number for β -actin and NS3 gene of PK-15 cell at the 72nd hour post-infection of CSFV



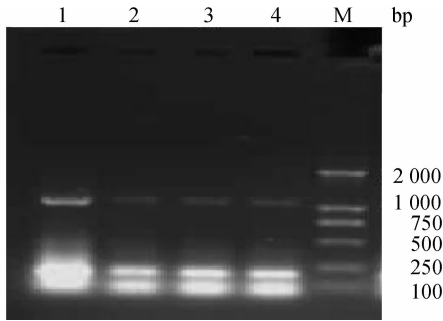
M. DNA 分子质量标准; 1. PK-15 细胞株; 2. P-1 细胞株; 3. P-2 细胞株; 4. P-3 细胞株; 5. 阴性对照

M. DNA marker; 1. PK-15 cell strain; 2. P-1 cell strain; 3. P-2 cell strain; 4. P-3 cell strain; 5. Negative control

图 5 P-1、P-2、P-3、PK-15 细胞株接种猪瘟疫病毒后第 72 小时 β -actin 与 NS3 基因 PCR 结果

Fig. 5 PCR of β -actin and NS3 gene in P-1, P-2, P-3 and PK-15 cell strains at the 72nd hour post-infection of CSFV

loop motif, SL), SL I 和 SL II, 在二者之间有一段较长的单链间隔序列 SS (Single-stranded intervening sequence, SS)。研究证实, SL I 和 SS 基序在病毒基因组 RNA 复制过程中起着重要的作用^[5-9]。研究还发现 CSFV 3'-UTR 中的 21 nt 的核苷酸是 CSFV 复制所必需, 缺失该序列将不能起始 RNA 合成, 且只有该序列而无其余序列的 3'-UTR 能起始合成, 但起始效率急剧下降^[10-11]。在 CSFV 3'-UTR 中的 21 nt 的核苷酸序列中, 216 位的 T 是起

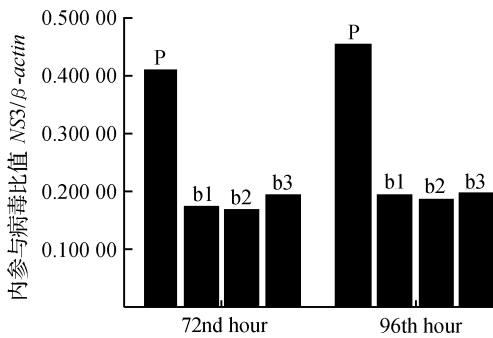


1. PK-15 细胞株; 2. P-1 细胞株; 3. P-2 细胞株; 4. P-3 细胞株; M. DNA 分子质量标准

1. PK-15 cell strain; 2. P-1 cell strain; 3. P-2 cell strain; 4. P-3 cell strain; M. DNA marker

图 6 P-1、P-2、P-3、PK-15 细胞株接种猪瘟病毒后第 96 小时 β -actin 与 NS3 基因 PCR 结果

Fig. 6 PCR products of β -actin and NS3 gene of P-1, P-2, P-3 and PK-15 cell strains at the 96th hour post-infection of CSFV



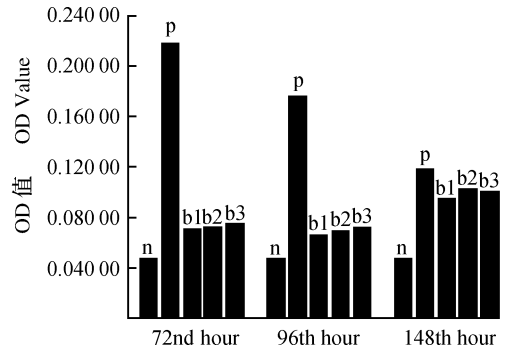
P. PK-15 细胞株; b1. P-1 细胞株; b2. P-2 细胞株; b3. P-3 细胞株

P. PK-15 cell strain; b1. P-1 cell strain; b2. P-2 cell strain; b3. P-3 cell strain

图 7 NS3 与 β -actin 基因电泳 OD 比值

Fig. 7 The proportionality of the AGE results of the NS3 and β -actin gene at the 72nd and 96th hour respectively

始合成的关键碱基, 突变将导致 RNA 合成不能起始; 突变 219 位的 G 和 228 位的 C 会导致起始能力急剧下降, 而突变 212 位的 T 不影响起始过程, 但会降低 RNA 的合成效率, 导致合成量减少^[12-14]。进一步的研究结果证实, CSFV 3'-UTR 在病毒的复制过程中能与病毒的 RNA 复制酶结合, 起始病毒基因组的复制, 且 3'末端的 CCCGG 序列是结合复制酶所必需的, 缺失该序列会导致与病毒复制酶结合能力的丧失^[15]。本试验构建的干扰载体分别靶向 CSFV 石门株 3'-UTR 的 114~132 位、136~154 位和 209~227 位, 包含了上述 CSFV 复制所必



P. PK-15 细胞株; b1. P-1 细胞株; b2. P-2 细胞株; b3. P-3 细胞株; n. 阴性对照

P. PK-15 cell strain; b1. P-1 cell strain; b2. P-2 cell strain; b3. P-3 cell strain; N. Negative control

图 8 P-1、P-2、P-3 和 PK-15 细胞株接种 CSFV 后第 72、96 和 148 小时 NS3 蛋白 ELISA 检测结果

Fig. 8 The ELISA results of NS3 protein of the P-1, P-2, P-3 and PK-15 cell strains at the 72nd, 96th and 148th hour post-infection of CSFV respectively

需的 21 nt 的核苷酸。

3.2 β -actin 是肌动蛋白的一种, 它在各种组织和细胞中的表达相对稳定, 作为内参基因已广泛运用于 RT-PCR 中。在瘟病毒属中 NS3 基因高度保守, CSFV 是瘟病毒属的重要成员, 因此试验分别选用 β -actin 和 NS3 基因作为半定量 RT-PCR 的检测基因。徐兴然^[16]报道, CSFV 感染 PK-15 细胞后其基因组 RNA 高速复制, 在 72 h 达到高峰; 在感染后 8 h 能检测到负链 RNA, 负链 RNA 在病毒增殖过程中维持在较低的水平。CSFV 感染 PK-15 细胞后 8 h 能检测到具有感染性的子代病毒, 病毒的感染滴度在 8~20 h 高速增长, 24~48 h 增长速度减慢, TCID₅₀ 在感染后 48~54 h 达到高峰, 能在 72 h 之内维持较高的感染滴度。据郭慧琛^[17]、田宏^[18]等报道, 运用直接荧光抗体染色法发现在接种 CSFV 石门株 6 h 时, PK-15 细胞质中就隐约可见绿色荧光; 9 h 后荧光充满胞质; 72 h 后整个视野中的细胞几乎全被感染; 随着培养时间的延长, 细胞内荧光强度逐渐减弱, 但感染细胞的数目增加。故本次试验 RT-PCR 和 ELISA 检测的时间段分别选为接种后 72、96 小时和 72、96、148 小时, 以便能更准确地判断 P-1、P-2 和 P-3 细胞株干扰 CSFV 的增殖情况。试验中 ELISA 阳性对照组的结果与上述报道一致。

3.3 结果显示,将构建的 3 个靶向 CSFV 3'-UTR 不同位点的干扰载体转染 PK-15 细胞并经筛选得到的细胞株 P-1、P-2 及 P-3 能干扰 CSFV 石门株在 PK-15 细胞中的增殖($P < 0.05$)。而按照猪瘟疫抗原检测试剂盒的判定标准,在接毒后第 72 和 96 小时, P-1、P-2 及 P-3 细胞株的 ELISA 结果均为可疑,接毒 148 小时后, P-1、P-2 及 P-3 细胞株的 ELISA 结果均可判为阳性。笔者分析,虽然 P-1、P-2 及 P-3 细胞株在接种病毒时均有荧光,但是由于在 pGene-sil-1 中荧光蛋白报告基因与插入的干扰靶序列是分属不同的启动子位于载体的不同区段中,因此细胞发荧光并不能肯定干扰靶序列也转录了,从而发荧光的细胞也可能不能干扰 CSFV 的增殖,这与笔者在半定量 RT-PCR 中也能不同程度地检测到 CSFV NS3 基因的结果一致。

参考文献:

- [1] KHROMYKH A A, KONDRATIEVA N, SGRO J Y, et al. Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(19): 10 623-10 629.
- [2] BEHRENS S E. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(3): 2 364-2 372.
- [3] ZAMOER P D. RNA interference: Listen to the sound of silence[J]. *Nature Structure Biology*, 2001, 8(9): 46-51.
- [4] 徐浩, 张彦明, 冶贵生, 等. 转录靶向猪瘟疫病毒 3'-UTR shRNA 细胞株的初步建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(3): 163-166.
- [5] XIAO M, ZHI Z Z, ZHANG C Y. Qualitative, quantitative and structural analysis of non-coding regions of classical swine fever virus genome[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46: 1 251-1 257.
- [6] XIAO M, ZHI Z Z, JUEPING L, et al. Prediction of recognition sites of classical swine fever virus genomic replication with information analysis[J]. *Molecular Biology*, 2002, 36: 34-43.
- [7] XIAO M, ZHANG C Y, PAN Z S, et al. Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147: 1 779-1 787.
- [8] XIAO M, CHEN J, LI B. RNA-dependent RNA polymerase activity of NS5B proteins expressed in pestiviral host cells[J]. *Acta Virologica*, 2003, 47: 17-26.
- [9] XIAO M, WANG Y, CHEN J, et al. Characterization of RNA-dependent RNA polymerase activity of CSFV NS5B proteins expressed in *Escherichia coli* [J]. *Virus Genes*, 2003, 27: 67-74.
- [10] XIAO M, LU W, CHEN J, et al. The necessary site for initiation of RNA synthesis in 3' noncoding region of classical swine fever virus genome[J]. *Molecular Biology*, 2004, 38: 343-351.
- [11] XIAO M, GAO J F, WANG Y J, et al. Influence of the 12-nt insertion present in 3' untranslated region of classical swine fever virus HCLV strain genome on RNA synthesis[J]. *Virus Research*, 2004, 102: 191-198.
- [12] DENG R, BROCK K V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: Primary and secondary structure analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 1 949-1 957.
- [13] WENGLER G, CASTLE E. Analysis of structural properties which possibly are characteristic for the 3'-terminal sequence of the genomic RNA of flaviviruses [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67: 1 183-1 188.
- [14] YU H Y, GRASSMANN C W, BEHRENS S E, et al. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73: 3 638-3 648.
- [15] XIAO M, GAO J, WANG W, et al. Specific interaction between the classical swine fever virus NS5B protein and the viral genome[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(19): 3 888-3 896.
- [16] 徐兴然. 干扰 RNA 抑制猪瘟疫病毒增殖效果研究[D]. 吉林大学, 2005.
- [17] 郭慧琛. 猪瘟疫病毒 E2 基因同源性比较及在 PK15 细胞中增殖特性的研究[D]. 兰州: 中国农业科学院研究生院, 2001.
- [18] 田宏. 猪瘟疫病毒及其全长 cDNA 在猪肾细胞中增殖表达特性的比较研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.