

云南省边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒遗传多样性分析

张武林 张文东 赵焕云 齐绣花 胡挺松 吕粤 岳亮 邱薇 冯子良
郑颖 范泉水 张应国 贾杏林 张富强

【摘要】 目的 了解云南省边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒遗传多样性。方法 2009—2011 年 7 月在云南省边境地区采集境外家禽和野生鸟类棉拭子样品,经 H5/N1 亚型特异性多重 RT-PCR 检测,阳性样品进行病毒 HA 基因扩增,克隆至 pMD18-T 载体测序,并与已知参考毒株进行序列比对及系统发育分析。结果 36 份阳性样品病毒 HA 基因测序获得 15 种 HA 序列,存在 2 个不同进化分支(2.3.2、2.3.4),2.3.2 进一步可划分为 3 个进化小分支(II-1 ~ II-3),2.3.4 进一步可划分为 2 个进化小分支(I-1 和 I-2)。2.3.2 II-1、II-2 毒株是新出现的 H5N1 亚型病毒变异株。结论 2009—2011 年 7 月云南省边境地区 H5N1 亚型病毒具有遗传多样性,病毒经历了多分支(2.3.2、2.3.4)至单一支(2.3.2)的进化过程。

【关键词】 禽流感病毒; H5N1 亚型; 血凝素; 遗传多样性

Genetic diversification of avian influenza H5N1 virus in boundary areas of Yunnan province

ZHANG Wu-lin^{1,4}, ZHANG Wen-dong², ZHAO Huan-yun², QI Xiu-hua³, HU Ting-song⁴, LV Yue², YUE Liang², QIU Wei⁴, FENG Zi-liang⁴, ZHENG Ying⁴, FAN Quan-shui⁴, ZHANG Ying-guo², JIA Xing-lin¹, ZHANG Fu-qiang⁴. 1 Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2 Yunnan Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention; 3 Yunnan Agriculture University; 4 Chengdu Military Regional Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: ZHANG Fu-qiang, Email: zfq1968@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (No. 201103008), Military Science and Technology Research Program (No. 08G034) and Yunnan Province Science and Technology Program.

【Abstract】 Objective To elucidate the genetic diversifications of avian influenza subtype H5N1 viruses in the boundary regions of Yunnan province during 2009 to July, 2011. **Methods** Swab samples were collected from foreign poultry and wild birds in boundary regions of Yunnan province during 2009 to July, 2011 and tested by H5/N1 subtype-specific multiplex RT-PCR. The HA genes of H5N1 virus from the positive samples were amplified by RT-PCR and cloned into pMD18-T vectors for sequencing. Both alignment and phylogenetic analysis were performed with sequences of the known reference strains. **Results** Fifteen different HA sequences were obtained from 36 representative positive samples and could be divided into 2 distinct Clades (2.3.2 and 2.3.4). Through phylogenetic analysis, Clade 2.3.2 and 2.3.4 could then be further divided into 3 (II-1 to II-3) and 2 smaller clades (I-1 and I-2), respectively. The viruses of Clade 2.3.2 II-1 and II-2 were new variant strains of H5N1 virus. The cleavage sites of HA from positive samples all possessed molecular characterization of highly pathogenic avian influenza virus. Mutation of key amino acids had been found among receptor binding sites, potential glycosylation sites, neutralizing epitopes and others. **Conclusion** It seemed evident that the H5N1 subtype viruses showed genetic diversifications and had undergone the evolution progress of multi-clade (2.3.2, 2.3.4) to single calde (2.3.2) in the boundary regions of Yunnan province, during 2009 to July, 2011.

【Key words】 Avian influenza virus; H5N1 subtype; Hemagglutinin; Genetic diversification

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.03.017

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201103008);军队科技攻关项目(08G034);云南省科技计划项目

作者单位:410128 长沙,湖南农业大学(张武林、贾杏林);云南省动物疫病预防控制中心(张文东、赵焕云、吕粤、岳亮、张应国);云南农业大学(齐绣花);成都军区疾病预防控制中心(张武林、胡挺松、邱薇、冯子良、郑颖、范泉水、张富强)

通信作者:张富强, Email: zfq1968@yahoo.com.cn

禽流感病毒(AIV)的突出生物学特性是极易发生持续变异,而又以病毒血凝素(HA)基因变异最为频繁^[1]。WHO基于病毒HA基因系统发育分析结果,将全球1996年后出现的H5N1亚型毒株划分为10个独立的进化分支(Clade)(0~9),Clade 2可存在5个不同的亚分支(2.1~2.5),其中亚分支2.1进一步划分为3个小分支(2.1.1~2.1.3),亚分支2.3进一步划分为4个小分支(2.3.1~2.3.4)^[2,3]。目前全球主要分布流行Clade 1(类越南株)、2.1(类印度尼西亚株)、2.2(类青海株)、2.3.2(东南亚株)、2.3.4(类福建株)毒株^[4,5]。2007年在我国青海省首次发现存在2.3.2毒株,与2005年的2.2毒株不同^[6,7]。我国先后采用Re-1(H5N1原型毒株AGSGD196、Clade 0)、Re-4(ACKShanxi206、Clade 7)、Re-5(AAnhui105和ADKFJ173405、Clade 2.3.4)毒株生产灭活疫苗,在全国范围内使用。虽然2006年以来全球H5N1亚型疫情报道呈逐年递减趋势,但与云南省接壤或相邻的东南亚及南亚国家,高致病性禽流感疫情及人感染病例延绵不断,每年均有发生,逐渐显现地方流行态势,成为全球高致病性禽流感分布流行的主要区域,难以根除^[8,9]。东南亚及南亚国家高致病性禽流感病毒的持续变异和疫情频繁暴发^[8,9],已对云南省动物健康和公共卫生安全构成严重威胁。本研究曾发现2003—2008年云南省边境地区禽流感H5N1亚型病毒具有遗传差异,呈现单一分支(Clade 2.4)(2003、2004年)一多分支(Clade 1、2.3.2、2.3.4、2.4、7)(2005、2006年)一单一分支(Clade 2.3.4)(2007、2008年)的进化过程^[10,11],但对2009年后的AIV变异及进化情况尚无报道。本研究分析2009—2011年7月云南省边境地区AIV进化特征和遗传多样性。

材料与方法

1. 病毒、野外样品、菌种与质粒:H5N1、H9N2亚型病毒(阳、阴性对照)灭活疫苗购自哈尔滨维科生物技术开发公司;野外样品为2009年至2011年7月采自境外家禽和野禽棉拭子样品800份,置总RNA裂解液中灭活后,4℃运送至实验室;大肠埃希菌DH5 α 感受态细胞,由本实验室制备、保存;pMD18-T Vector购自中国宝生物工程(大连)有限公司。

2. 主要试剂:DL2000 DAN Marker、总RNA提取液(TaKaRa RNAiso Reagent)、病毒RNA/DNA提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Viral DNA/RNA

Extraction Kit Ver.3.0)、TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)、Premix Taq酶购自中国宝生物工程(大连)有限公司;DNA凝胶回收试剂盒、小量柱式质粒纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;感受态细胞制备试剂购自北京博大泰克生物基因公司;氯仿、异丙醇采用分析纯试剂。

3. 总RNA提取、H5N1亚型RT-PCR及多重RT-PCR:按照病毒RNA/DNA提取试剂盒提供的操作手册,自棉拭子样品病毒裂解液和灭活的H5N1、H9N2亚型病毒样品(阳、阴性对照)中提取总RNA,采用课题组已建立的H5N1亚型特异性RT-PCR及多重RT-PCR进行检测^[12]。

4. HA基因扩增、纯化:采用已建立的方法^[13],自多重RT-PCR阳性核酸样品中扩增病毒HA基因。对RT-PCR产物进行凝胶切割纯化,电泳分析定量后稀释至50 ng/ μ l。

5. 重组质粒构建和鉴定:取1 μ l纯化产物与1 μ l pMD18-T载体(50 ng/ μ l)进行连接反应,连接产物转化DH5 α 感受态细胞,孵育后,涂布于Ampicilin抗性平板,37℃过夜培养后,经PCR对单个菌落进行鉴定。阳性菌落接种5 ml含Ampicilin的LB营养液中培养增殖,提取质粒,经电泳分析确认后,送北京三博科技有限公司测序。

6. 序列比对、同源性及系统发育分析:采用DNAMAN分子生物学软件进行序列比对、同源性分析及系统发育分析。

结 果

1. RT-PCR及多重RT-PCR检测:采用H5N1亚型特异性RT-PCR及多重RT-PCR检测800份棉拭子样品,H5N1阳性51份(2009年21份、2010年19份、2011年1—7月11份),阳性率6.38%。选择时间、地点、宿主不同的阳性样品36份(2009年15份、2010年13份、2011年1—7月8份),对病毒HA基因进行克隆、测序。

2. HA基因系统发育分析:2009—2011年7月云南省边境地区禽流感H5N1亚型病毒HA基因具有遗传差异,36份样品测序结果存在15种不同序列,分别对应以下15份样品:ACKHTYX10211、ACKANKMX10311、ADKZT66700111、ACKCJYX10311、ACKBS20410、ACKYX20610、ACKYX40610、ACKWS150110、ADKWS21250110、ADKWS2012050109、ADKBN81850109、ACKKM06100109、ACKWS11150109、ADKWS16201009、ACKKM1711750409。基于15

份阳性样品中病毒HA基因测序数据,与国内外已知代表毒株序列进行系统发育分析。所引用的已知代表毒株序列来自文献和GenBank^[10,11]。基于HA基因构建的系统发育树见图1。禽流感H5N1亚型病毒可划分为2个进化分支(Clade 2.3.2、2.3.4)。2009、2010、2011年1—7月Clade 2.3.2病毒样品所占比例分别为3/15(存在3种不同序列)、6/13(存在2种不同序列)、6/8(存在3种不同序列)。2007、2008年仅检测到2.3.4毒株^[10,11],2009年再次检测到2.3.2毒株,且2010、2011年1—7月2.3.2毒株所占比例显著增加,已呈现取代2.3.4毒株成为该地域分布流行的优势毒株的趋势。

(1)Clade 2.3.2:该分支可进一步划分为3个进

化小分支(II-1~II-3),其中II-1包含2010、2011年病毒阳性样品(ACKYX20610、ACKYX40610、ACKANKMX10311、ADKZT66700111)与中国香港(2010)、中国湖南(2008)、蒙古(2010)、韩国(2008)、老挝(2008)分离毒株遗传关系密切;II-2包含2009、2011年病毒阳性样品(ADKWS2012050109、ADKBN81850109、ACKHTYX10211)与香港2009年候鸟分离毒株遗传关系密切;II-1、II-2与青海2007年候鸟分离毒株(APIKAQHqw2007)属于同一进化亚分支;II-3包含1份2009年阳性样品(ACKKM06100109),与云南边境2005、2006年的2.3.2毒株遗传关系密切(图1)。

(2)Clade 2.3.4:该分支可进一步划分为2个进

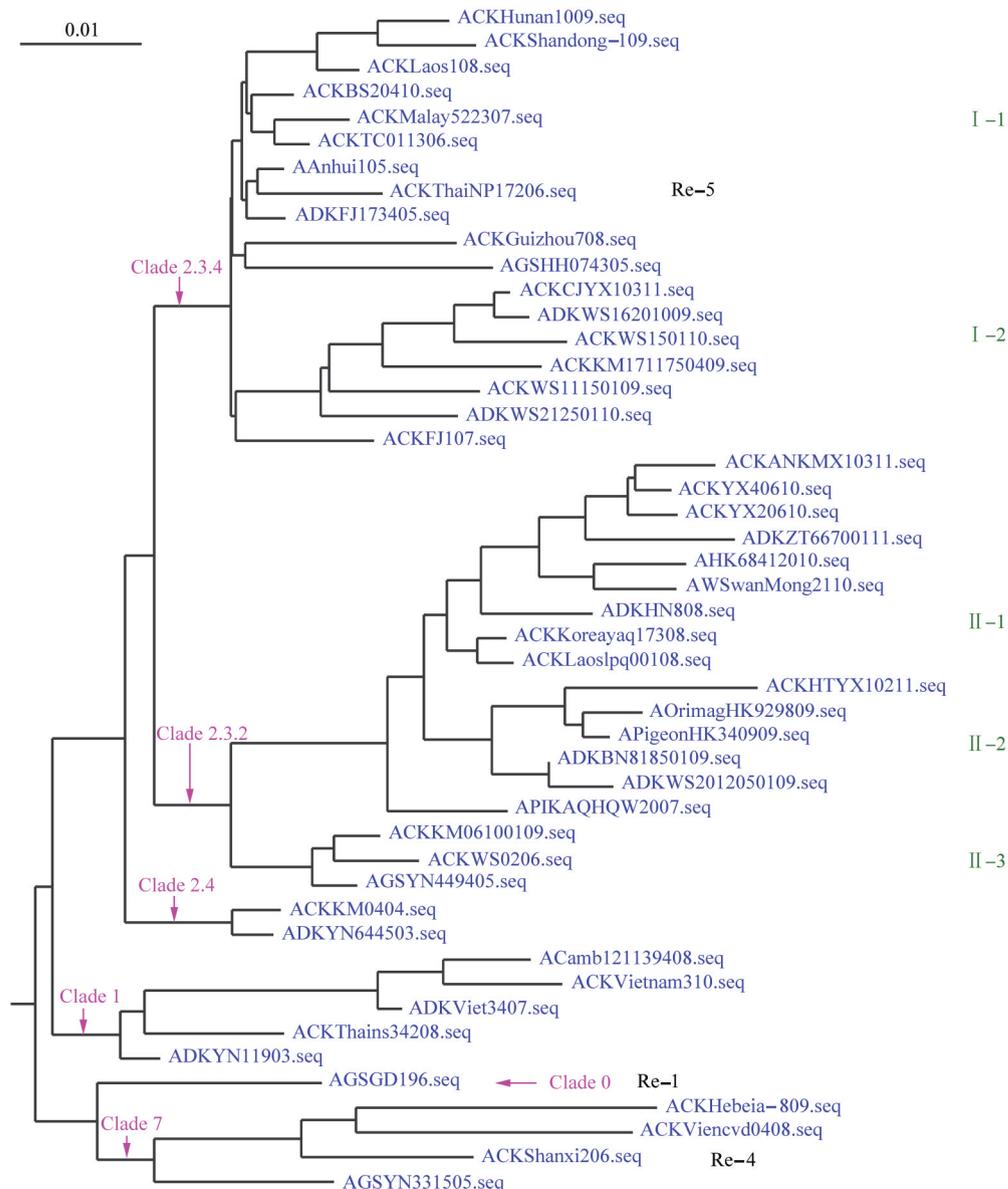


图1 云南省边境地区H5N1亚型病毒HA基因系统发育树

化小分支 I -1 和 I -2。I -1 包含 2005—2008 年在云南省边境地区检测到的 2.3.4 病毒样品, 泰国(2006)、马来西亚(2007)、老挝(2008)及中国贵州(2008)、湖南(2009)、山东(2009)分离株和 Re-5 疫苗毒株(2005 年福建毒株 ADKFJ173405、2005 年安徽毒株 AAnhui105)遗传关系密切; I -2 包含 2009—2011 年 7 月在检测到的 2.3.4 病毒样品, 与福建省 2007 年分离株遗传关系密切(图 1)。

3. HA 基因序列比对及同源性分析: 基于 15 份阳性样品中病毒 HA 基因测序数据, 推导其编码的氨基酸序列, 并与 Re-1 疫苗毒株(H5N1 原型毒株, AGSGD196, Clade 0)、Re-4 疫苗毒株(ACKShanxi206, Clade 7)、Re-5 疫苗毒株(ADKFJ173405、AAnhui105, Clade 2.3.4)、2006 年 2.3.2 云南毒株(ACKWS0206)、2003—2008 年云南边境代表毒株(来自文献[10, 11]和 GenBank)。HA 基因核苷酸、氨基酸序列同源性矩阵见表 1。

(1) Clade 2.3.2: 云南省边境地区 Clade 2.3.2 病毒与 Re-1、Re-4、Re-5 疫苗株 HA 基因核苷酸(氨基酸)序列同源性分别为 92.4% ~ 95.4% (91.3% ~ 94.9%)、90.8% ~ 93.9% (89.4% ~ 92.2%)、93.7% ~ 97.1% (92.4% ~ 97.4%)。云南 Clade 2.3.2 病毒之间 HA 基因核苷酸(氨基酸)序列同源性介于 94.3% ~ 99.0% (93.2% ~ 97.9%)(表 1)。

(2) Clade 2.3.4: 云南省边境地区 Clade 2.3.4 病毒与 Re-1、Re-4、Re-5 疫苗毒株 HA 基因核苷酸(氨

基酸)序列同源性分别为 93.9% ~ 95.8% (91.6% ~ 95.3%)、92.6% ~ 94.5% (89.2% ~ 92.9%)、97.1% ~ 99.5% (96.2% ~ 99.5%)。云南 Clade 2.3.4 病毒之间 HA 基因核苷酸(氨基酸)序列同源性介于 95.4% ~ 99.6% (92.5% ~ 99.3%)(表 1)。

讨 论

基于病毒 HA 基因系统发育分析结果, 将 1996 年以来全球出现的禽流感 H5N1 亚型病毒划分为 10 个进化分支(Clade 0 ~ 9)和多个进化(亚)分支^[2, 3], Clade 2.3.2(东南亚株)、2.3.4(类福建株)、7(类山西株)在 2005 年首次发现。本课题组先前研究发现 2003—2008 年云南省边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒呈现单一分支(Clade 2.4)(2003、2004 年)—多分支(Clade 1、2.3.2、2.3.4、2.4、7)(2005、2006 年)—单一分支(Clade 2.3.4)(2007、2008 年)的进化过程, 不同进化分支或同一进化分支不同毒株 HA 基因分子结构存在变异, Clade 2.3.4 株已成为该区域分布流行的优势毒株^[10, 11]。间隔 2 年(2007、2008 年)后, 2009 年在再次检出 2.3.2 毒株, 且 2010、2011 年 1—7 月 2.3.2 毒株所占比例显著增加, 已呈现取代 2.3.4 毒株成为该地域流行的优势毒株。因此云南省边境地区禽流感 H5N1 亚型病毒可能呈现单一分支(Clade 2.4)(2003、2004 年)—多分支(Clade 1、2.3.2、2.3.4、2.4、7)(2005、2006 年)—单一分支(Clade 2.3.4)(2007、2008 年)—多分支(Clade 2.3.2、2.3.4)

表 1 云南省边境地区 H5N1 亚型病毒 HA 基因同源性矩阵

病毒	进化分支	同源性百分比(%)																		
AGSGD196	0(Re-1)	97.3	92.0	91.4	91.3	93.4	94.2	94.9	91.6	94.7	95.3	92.9	94.0	92.9	95.1	94.9	95.8	96.2	93.6	
ADKYN11903	1	97.2	93.6	93.1	93.3	95.4	96.3	97.0	93.6	96.6	97.2	94.7	96.1	94.7	97.1	96.8	98.0	96.3	93.8	
ACKANKMX10311	II-1	92.5	94.0	97.6	94.3	95.5	93.7	93.4	88.8	92.3	92.8	91.4	92.3	92.1	94.0	93.3	92.4	90.7	89.4	
ADKZT66700111		92.4	94.0	97.9	94.1	94.9	93.5	93.2	88.3	91.8	92.3	90.9	92.1	91.6	93.2	92.7	92.2	90.4	88.9	
ACKHTYX10211	2.3.2 II-2	92.4	93.6	94.8	94.8	96.2	93.5	93.2	88.0	91.4	92.0	91.3	91.6	92.0	92.5	92.4	92.0	90.8	89.4	
ADKBN81850109		93.8	95.3	96.5	96.2	97.2	96.0	95.1	90.9	94.9	95.5	93.7	94.8	93.0	95.4	95.2	94.7	92.4	90.5	
ACKKM06100109	II-3	95.4	96.8	95.0	95.0	94.5	96.1	97.9	92.5	96.7	97.2	95.5	96.5	94.8	97.1	96.8	96.1	94.3	92.2	
ACKWS0206		95.0	96.6	94.7	94.7	94.3	95.8	99.0	93.2	95.6	96.2	94.4	95.5	94.3	97.4	97.2	95.4	94.7	92.5	
AGSHH074305	I-1	94.4	95.6	92.7	92.6	92.2	94.0	95.4	95.1	94.6	95.1	92.5	93.7	92.3	96.2	96.3	93.1	92.0	89.2	
ACKTC011306		96.1	97.2	94.2	94.1	93.7	95.5	96.9	96.7	97.5	99.5	96.7	98.1	96.0	99.3	98.9	97.0	95.0	92.3	
ACKBS20410	2.3.4	95.8	97.2	94.2	94.1	93.7	95.5	97.0	96.7	97.5	99.2	97.2	98.6	96.5	99.8	99.5	97.5	95.6	92.9	
ADKWS16201009		93.9	95.1	92.7	92.6	92.6	94.1	95.5	95.1	95.4	96.9	97.1	97.9	99.3	97.3	96.8	94.7	93.6	92.0	
ADKWS21250110	I-2	94.7	95.8	93.2	93.1	92.9	94.4	95.8	95.6	96.1	97.6	97.7	97.2	97.2	98.5	98.1	96.1	94.5	92.3	
ACKCJYX10311	2.3.4(Re-5)	94.0	95.2	93.0	92.9	92.8	94.3	95.5	95.2	95.5	97.0	97.3	99.6	97.4	97.3	96.8	94.0	93.6	92.0	
AAnhui105		95.9	97.3	94.4	94.1	93.7	95.6	97.1	96.7	97.4	99.1	99.5	97.1	97.7	97.3	99.5	97.3	95.4	92.7	
ADKFJ173405	2.4	96.1	97.3	94.4	94.3	94.0	95.8	97.1	96.8	97.6	99.2	99.2	97.1	97.8	97.2	99.3	96.9	95.2	92.5	
ACKKM0404		96.3	97.6	93.7	93.6	93.5	95.2	96.7	96.5	95.9	97.4	97.4	95.4	95.9	95.5	97.4	97.5	95.3	92.9	
AGSYN331505	7	96.5	96.6	91.6	91.8	91.9	93.1	95.1	94.6	93.8	95.4	95.5	93.8	94.2	93.8	95.6	95.6	95.4	94.9	
ACKShanxi206	7(Re-4)	95.4	95.3	90.9	90.8	91.3	92.3	93.9	93.6	92.6	94.2	94.5	93.0	93.1	93.1	94.4	94.4	94.5	96.1	

注: 黑体字为核苷酸序列同源性百分比, 白体字为推导的氨基酸序列同源性百分比

(2009—2010 年)一单一分支(Clade 2.3.2)的进化过程。

2007 年在我国青海省候鸟体内首次分离获得 2.3.2 毒株,而 2005、2006 年该省分离株属于 Clade 2.2^[5,6],且此毒株与 2005、2006 年分布流行的 2.3.2 毒株不同^[5,6]。2009—2011 年 7 月云南省边境地区 2.3.2 病毒样品可划分为 3 个进化小分支 II-1~II-3,其中除 II-3(ACKKM06100109)与 2005、2006 年的 2.3.2 毒株遗传关系密切外,2.3.2 II-1、II-2 为新出现的变异株,与青海省 2007 年候鸟分离株亲缘关系密切,且先后在我国湖南(2008)、香港(2009、2010)及韩国(2008)、老挝(2008)、蒙古(2010)等地人、家禽和野生鸟类体内发现 2.3.2 II-1、II-2 毒株。因此 2.3.2 II-1、II-2 毒株不是 2006 年以前的 2.3.2 毒株再现,而是一个广泛分布的新变异株,其传播与野生鸟类迁徙密切相关,并已取代 2.3.4 毒株成为该区域分布流行的优势毒株。

2005 年在全球首次发现 Clade 2.3.2(东南亚株)、2.3.4(类福建株)、7(类山西株)。2006 年后我国在家禽中大面积使用 Re-4(Clade 7)、Re-5(Clade 2.3.4)毒株制备的灭活疫苗,在禽流感防控中发挥了重要作用。2009—2011 年 7 月在云南省边境地区检测到 2.3.2 病毒与现在使用的疫苗毒株(Re-4、Re-5)不属同一进化分支,且 2.3.2 II-1、II-2 与 Re-4、Re-5 病毒 HA 氨基酸序列同源性分别为 88.9%~92.5%、92.4%~95.4%,呈现氨基酸序列同源性逐年递减现象和趋势。2009 年以后检测到的 2.3.4 病毒与 Re-5 属于不同进化小分支(2.3.4 I-1、I-2)。总之,云南省边境地区 H5N1 亚型病毒呈现持续变异和进化趋势,存在遗传多样性,对引起病毒进化和变异的特定自然因素和社会因素,有待综合分析和系统研究。现行疫苗对当前变异毒株的侵袭是否能提供有效免疫保护,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ibrahim MS, Watanabe Y, Ellakany HF, et al. Host-specific genetic variation of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1). *Virus Genes*, 2011, 42(3):363-368.
- [2] Guan Y, Smith GJ, Webby R, et al. Molecular epidemiology of H5N1 avian influenza. *Rev Sci Tech*, 2009, 28(1):39-47.
- [3] Lvov DK, Shchelkanov MY, Prilipov AG, et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of

northern Eurasia (2005-08). *Avian Dis*, 2010, 54 Suppl 1: S483-495.

- [4] Neumann G, Green MA, Macken CA. Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 8):1984-1995.
- [5] Li Y, Shi J, Zhong G, et al. Continued evolution of H5N1 influenza viruses in wild birds, domestic poultry, and humans in China from 2004 to 2009. *J Virol*, 2010, 84(17):8389-8397.
- [6] Hu X, Liu D, Wang M, et al. Clade 2.3.2 avian influenza virus (H5N1), Qinghai Lake region, China, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(3):560-562.
- [7] Li Y, Liu L, Zhang Y, et al. New avian influenza virus (H5N1) in wild birds, Qinghai, China. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(2):265-267.
- [8] Eagles D, Siregar ES, Dung DH, et al. H5N1 highly pathogenic avian influenza in Southeast Asia. *Rev Sci Tech*, 2009, 28(1):341-348.
- [9] Keawcharoen J, van den Broek J, Bouma A, et al. Wild Birds and Increased Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) among Poultry, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(6):1016-1022.
- [10] Ye CH, Zhang WD, Song JL, et al. Evolutionary characteristics of hemagglutinin genes of H5N1 subtype avian influenza viruses from boundary region of Yunnan province. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(6):1216-1218, 1247. (in Chinese)
叶丛华, 张文东, 宋建领, 等. 云南边境禽流感 H5N1 亚型病毒血凝素基因进化特征分析. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(6):1216-1218, 1247.
- [11] Ye CH, Zhang WD, Song JL, et al. Molecular characteristics of hemagglutinin genes of avian influenza virus subtype H5N1 in the boundary region of Yunnan province. *Chin J Zoonoses*, 2010, 26(2):101-106. (in Chinese)
叶丛华, 张文东, 宋建领, 等. 云南边境禽流感 H5N1 亚型病毒血凝素基因分子结构特征分析. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(2):101-106.
- [12] Zhang YG, Song JL, Hu YY, et al. Development of RT-PCR and multiplex RT-PCR for detecting avian influenza virus. *Chin J Vet Sci Technol*, 2005, 35(8):600-604. (in Chinese)
张应国, 宋建领, 胡媛媛, 等. 禽流感病毒 RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测技术的建立. *中国兽医科技*, 2005, 35(8):600-604.
- [13] Wang JP, Song JL, Zhang WD, et al. Cloning and expression of hemagglutinin gene of H5N1 subtype avian influenza virus. *J Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2007, 29(6):623-627. (in Chinese)
王金萍, 宋建领, 张文东, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素基因的克隆与表达. *云南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(6):623-627.

(收稿日期:2011-08-26)

(本文编辑:张林东)