

韩凯凯, 赵冬敏, 毕可然, 等. 小鼠转录因子 STAT1 真核表达质粒的构建及生物学功能分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 136-141.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.020

小鼠转录因子 STAT1 真核表达质粒的构建及生物学功能分析

韩凯凯, 赵冬敏, 毕可然, 章丽娇, 刘青涛, 刘宇卓, 黄欣梅, 杨婧, 李银
(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 本研究以小鼠组织的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增得到小鼠信号转导子和转录激活子 1 (STAT1) 基因完整开放阅读框的碱基序列, 然后将其克隆到真核表达载体 pDsRed-N1 中, 构建 pDsRed-N1-STAT1 重组质粒。测序成功的真核质粒转染至 BHK-21 细胞, 通过 α 干扰素 (IFN- α) 分子刺激, 检测细胞中 STAT1 分子的活化状态与定位, 最终通过坦布苏病毒刺激, 荧光显微镜检测 STAT1 分子的细胞内定位。结果表明, 小鼠的 STAT1 基因开放阅读框为 2 250 bp, 编码 749 个氨基酸。同源性比对结果表明, 小鼠 STAT1 与人、大鼠、猪、马等哺乳动物 STAT1 氨基酸序列的一致性分别为 92%、97%、91%、91%。转染结果表明, 构建的 pDsRed-N1-STAT1 真核表达质粒在 BHK-21 细胞中成功表达, 无 IFN- α 刺激时, 红色荧光只在 BHK-21 细胞的细胞质中出现, 而加入 IFN- α 后, 红色荧光则大多分布于细胞核内。用坦布苏病毒感染细胞后, 红色荧光多分布于细胞质中。说明, 构建的真核质粒 pDsRed-N1-STAT1 在哺乳动物细胞中能够正确表达融合蛋白质 Red-STAT1, 而且在 IFN- α 刺激下, Red-STAT1 可由细胞质向细胞核转运, 同时发现, 坦布苏病毒感染能够有效抑制 STAT1 分子的核转运。

关键词: 小鼠; 信号转导子和转录激活子 1; α 干扰素

中图分类号: S852.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0136-06

Eukaryotic expression plasmid construction and biological function analysis of mouse transcription factor STAT1

HAN Kai-kai, ZHAO Dong-min, BI Ke-ran, ZHANG Li-jiao, LIU Qing-tao, LIU Yu-zhuo, HUANG Xin-mei, YANG Jing, LI Yin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, a full-length open reading frame (ORF) of signal transduction and activators of transcription 1 (STAT1) gene was cloned from tissues and organs of mouse using RT-PCR. The mouse STAT1 gene was successfully

cloned into the eukaryotic expression vector pDsRed-N1 to construct recombinant plasmid pDsRed-N1-STAT1. The successfully sequenced eukaryotic plasmid was transfected into BHK-21 cells, and the activation state and localization of STAT1 in the cells were detected by IFN- α molecule stimulation. The intracellular localization of mouse STAT1 was detected by fluorescence microscopy under the stimulation of duck tembusu virus (TMUV). The open reading

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31502101); 国家重点研发计划项目 (2017YFD0500804)

作者简介: 韩凯凯 (1983-), 男, 河南新乡人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽病毒分子生物学研究。 (E-mail) hankk0917@126.com

通讯作者: 李银, (E-mail) muziyin08@163.com

frame of the *STAT1* gene in mice was 2 250 bp and 749 amino acids were encoded. The amino acid sequence of STAT1 in mouse shared high identity with that in human (92%), rat (97%), wild pig (91%), horse (91%). Transfection results showed that eukaryotic expression vector pDsRed-N1-*STAT1* was successfully expressed in BHK-21 cells. The DsRed-STAT1 fusion protein was predominantly located in the cytoplasmic compartment of the untreated BHK-21 cells. Under the stimulation of IFN- α , the DsRed-tagged STAT1 mainly localized in the nucleus. The constructed eukaryotic plasmid pDsRed-N1-*STAT1* can correctly express the fusion protein Red-STAT1 in mammalian cells, and under the stimulation of IFN- α , Red-STAT1 can be transported from the cytoplasm to the nucleus, and it is found that the infection of TMUV can effectively inhibit nuclear transport of STAT1 molecules.

Key words: mouse; signal transduction and activators of transcription 1 (STAT1); IFN- α

Jak-STAT (Janus activated kinases-signal transducer and activator of transcription) 是近年来发现的一条重要胞内信号通路,在机体生长发育和稳态维持等生理过程中发挥重要作用^[1]。胞外刺激信号(细胞因子、生长因子、激素等)与受体结合,激活 Janus 激酶(*Jak*),*Jak* 磷酸化信号转导子和转录激活子(STAT)上保守的酪氨酸位点,STAT 形成同源或异源二聚体后进入细胞核,调控目标基因转录^[2]。信号转导子和转录激活子 1 (STAT1) 是信号转导子和转录激活子 STATs 蛋白质家族成员之一,在免疫调控,促进细胞生长,抗凋亡,维持细胞周期等方面发挥重要作用。在研究干扰素调控基因转录的过程中,STAT1 和 STAT2 作为复合体首先被发现。之后,陆续有其他结构和功能相关的信号转导子和转录激活子被发现。到目前为止,STAT 家族共有 7 个成员 (STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6)^[3]。

STAT1 的作用很多,首先,STAT1 分子对病原体入侵有免疫调节作用,*STAT1* 基因缺陷型小鼠在感染病毒后 8 h 内死亡^[4]。其次,随着病原体的进化,针对 *Jak*-STAT 信号通路研究出很多抵御策略,尤其在 STAT1 激活的步骤上,比如其入核作用或者磷酸化作用。黄病毒属中的很多病毒,如乙型肝炎病毒、西尼罗河病毒、登革病毒、蜱传脑炎病毒都有抑制 IFN- α 通路的作用^[5-7]。此外,STAT1 可以调控细胞凋亡,诱导半胱天冬酶原的表达,而且已经证实 STAT1 可以诱导 Caspase-1、Caspase-3 和 Caspase-11 的表达^[8]。因此,STAT1 可以作为一个重要的分子靶标。本研究拟以小鼠 *STAT1* 为研究对象,构建 *STAT1* 真核表达质粒,并对其转染细胞后的核定位进行初步研究,以期达到深入研究病原体与机体细胞相互作用分子机制的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Escherichia coli DH5 α 菌株、真核表达载体 pDsRed-N1 均由本实验室保存,6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自青龙山养殖场。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶等购自宝生物工程有限公司,Dulbecco 改良培养基 (DMEM)、胎牛血清购自 Gibco 公司,质粒小量提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 生物科技有限公司,重组小鼠 IFN- α A/D 购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。基因序列合成、引物合成和测序由金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中登录的小鼠 *STAT1* 基因序列,设计 1 对 PCR 扩增引物,上游引物为 SF: 5'-CTC-GAGATGTCACAGTGGTTCCAG-3',下划线部分为引入的 *Xho* I 酶切位点。下游引物为 SR: 5'-ATA-AGCTTTTATACTGTGCTCATCA-3',下划线部分为引入的 *Hind* III 酶切位点。这对引物预期扩增片段大小约为 2 250 bp。

1.4 小鼠 *STAT1* 基因的克隆

剖杀 6 周龄 BALB/c 小鼠,快速取大脑、心脏、肝脏、脾脏、肌肉等,在液氮中充分研磨至粉末,取大约 500 mg,按照 Axygen 公司 Total RNA Extraction kits 说明书的步骤,提取总 RNA。最后,将提取的 RNA 用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 溶解,存储在 -70 °C 超低温冰箱中备用。进行反转录时,参照 TaKaRa 公司的反转录试剂盒说明书将其反转录成 cDNA 备用。以小鼠 *STAT1* cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25.0 μ l,其中双蒸水 15.0 μ l,

10×*Ex* PCR Buffer 2.5 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl, 25.0 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl, 上、下游引物 (25.0 pmol/μl) 各 1.0 μl, cDNA 产物 1.5 μl, *Ex* Taq (5 U/μl) 0.5 μl。PCR 反应程序设置如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。循环反应结束后, 对 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 切取目的条带进行胶回收。纯化的 PCR 产物片段首先与 pMD18-T 克隆载体进行连接, 转入 *E. coli* DH5α 感受态细胞。经酶切鉴定后, 挑选阳性克隆质粒, 由金斯瑞生物科技有限公司测定其基因序列。

1.5 生物信息学分析

用 DNASTar 7.0 软件对不同物种间 *STAT1* 的基因序列和推导的氨基酸序列进行同源性比对, 分析不同物种之间的序列差异。用 MEGA 5.0 软件构建小鼠 *STAT1* 的系统发育树。用 ProtParam Tool 软件分析氨基酸组成、等电点等理化性质。使用在线软件 NetPhos2.0 Server 和 Conserved Domain Search Service 分别进行 *STAT1* 蛋白质磷酸化位点预测和蛋白质功能域分析。

1.6 小鼠 *STAT1* 基因表达质粒 pDsRed-N1-*STAT1* 的构建

分别用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切 pMD18-T-*STAT1*、pDsRed-N1 质粒。用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 *STAT1* 基因与 pDsRed-N1 载体连接, 转入 DH5α 感受态细胞, 构建重组表达质粒。经酶切鉴定后, 挑选阳性克隆质粒送金斯瑞生物科技有限公司进行基因序列测定, 并进行序列分析。将鉴定正确的质粒命名为 pDsRed-N1-*STAT1*, 然后大量提取 pDsRed-N1-*STAT1* 重组质粒, 用于真核转染。

1.7 小鼠 *STAT1* 基因在 BHK-21 细胞中的表达

采用常规复苏方法复苏 BHK-21 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞。转染前第 24 h, 将 $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个细胞种植到 500 μl 无抗生素的培养基中, 转染时保证细胞铺满 80% ~ 90% 板底。参照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒操作说明, 用 1 μg pDsRed-N1-*STAT1* 重组质粒进行转染, 并设置不转染任何质粒的细胞为阴性对照。转染后 4~6 h 更换培养液, 24 h 后用荧光显微镜观察并拍照记录。

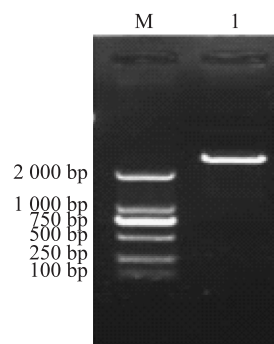
1.8 pDsRed-N1-*STAT1* 转染后核定位检测

将 $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个细胞种植到 500 μl 无抗生素的培养基中, 待 BHK-21 细胞铺满 80%~90% 板底时, 用 1 μg pDsRed-N1-*STAT1* 重组质粒进行瞬时转染, 转染后 4~6 h 更换含有 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养液中同时加入 2 500 U/ml 的小鼠 IFN-α A/D 试剂, 继续培养 15 h。IFN-α 作用细胞 16 h 后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 2 次。使用甲醇溶液固定细胞 5 min, 再用 PBS 清洗细胞 2 次, 1 次 5 min, 在倒置荧光显微镜下观察红色荧光在细胞中的分布情况。将 BHK-21 细胞预先与坦布苏病毒孵育 (*MOI* = 10) 1 h, 然后转染 pDsRed-N1-*STAT1*, 6 h 后加入 2 500 U/ml 的小鼠 IFN-α A/D, 以不加入 IFN-α A/D 的为对照, 继续培养 15 h, 固定, 镜检观察。

2 结果与分析

2.1 小鼠 *STAT1* 基因的克隆与序列分析

提取小鼠组织的 RNA, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 加上特异性引物 SF、SR 进行 PCR 扩增, 得到约 2 200 bp 的基因片段。经序列测定, 小鼠 *STAT1* 基因开放阅读框为 2 250 bp (图 1), 表明成功获得小鼠 *STAT1* 的基因序列。将小鼠 *STAT1* 氨基酸序列与马 (XP_001499419)、猪 (HQ450761)、人 (GU211347)、大鼠 (AF205604) 的 *STAT1* 氨基酸序列进行比对, 同源性比对结果表明, 小鼠 *STAT1* 氨基酸序列与大鼠 *STAT1* 氨基酸序列的同源性最高, 为 97%, 与人、猪、马的 *STAT1* 氨基酸序列的同源性分别为 92%、91%、91%。说明, *STAT1* 分子在进化上相对保守。



M: DNA 分子质量标准; 1: 小鼠 *STAT1* 的 PCR 扩增产物。

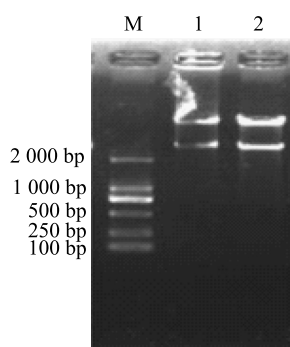
图 1 小鼠 *STAT1* 基因的扩增

Fig.1 Amplification of mouse *STAT1* gene

利用 ProtParam Tool 软件对小鼠 STAT1 蛋白质理化性质进行分析, *STAT1* 基因编码 749 个氨基酸, 蛋白质分子质量为 87 200, 等电点为 5.42。STAT1 蛋白质磷酸化是其执行功能过程中的重要环节, 为了进一步了解蛋白质在哪些氨基酸上发生磷酸化, 利用 NetPhos 2.0 Server 软件对 STAT1 蛋白质的潜在磷酸化位点进行预测分析。小鼠 STAT1 蛋白质可能在 31 个氨基酸位点上发生磷酸化, 这些位点分别是第 62、72、86、144、177、223、245、432、434、583、604、606、607、620、640、708、727 和 744 位的丝氨酸 (Ser), 第 162、373、451、510、560、635 和 719 位的苏氨酸 (Thr), 第 68、106、170、289、666 和 701 位的酪氨酸 (Tyr)。STAT1 蛋白质保守结构域预测结果表明, 第 2~121 位氨基酸残基处存在 STAT_int 结构域, 第 139~315 处为 STAT_alpha 结构域, 第 317~566 处为 STAT_bind 结构域, 第 557~707 处为 SH2_STAT1 结构域, 第 715~739 处为 STAT1_TAZ2bind 结构域。

2.2 重组质粒 pDsRed-N1-STAT1 的构建

利用 *Xho* I 酶和 *Hind* III 酶双酶切 pMD18-T-*STAT1* 质粒, 同时用这 2 种酶双酶切 pDsRed-N1 载体, 将回收的基因片段与载体片段连接转化后, 提取质粒, 利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 对 pDsRed-N1-*STAT1* 进行双酶切鉴定, 分别获得了约 2 200 bp 和 4 700 bp 的 2 条酶切片段 (图 2), 与理论值相符。质粒送金斯瑞生物科技有限公司测序, 测序结果也表明 pDsRed-N1-*STAT1* 重组质粒构建成功。



M: DNA 分子质量标准; 1、2: pDsRed-N1-*STAT1*。

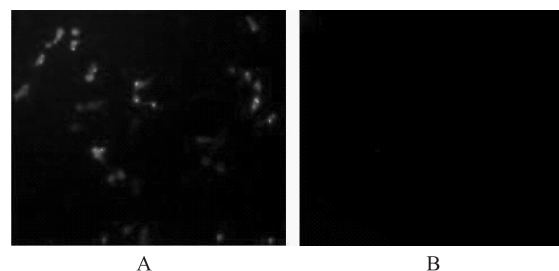
图 2 重组质粒 pDsRed-N1-*STAT1* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pDsRed-N1-*STAT1* by enzyme digestion

2.3 重组质粒 pDsRed-N1-STAT1 的表达

将构建成功的真核表达质粒 pDsRed-N1-*STAT1*

转染至 BHK-21 细胞, 转染后第 24 h 换液观察, 未转染质粒的对照组细胞无任何荧光信号, 转染 pDsRed-N1-*STAT1* 重组质粒的细胞有明显的红色荧光 (图 3)。说明, *STAT1* 基因和 *Red* 基因以 Red-STAT1 融合蛋白质的形式在 BHK-21 细胞内表达。



A: 重组质粒 pDsRed-N1-*STAT1*; B: 阴性对照。

图 3 重组质粒 pDsRed-N1-*STAT1* 在 BHK-21 细胞中的表达

Fig. 3 The expression of pDsRed-N1-*STAT1* plasmid in BHK-21 cells

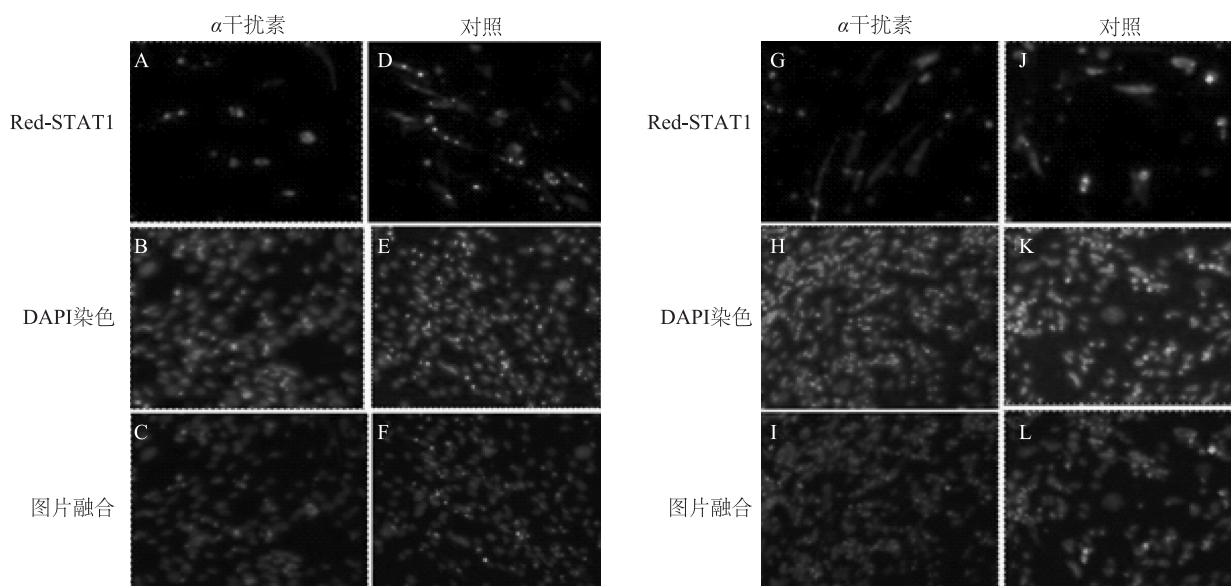
2.4 pDsRed-N1-STAT1 转染后的核定位检测

图 4 显示, 无 IFN- α 刺激时, 红色荧光只在 BHK-21 细胞的细胞质中出现, 而加入 IFN- α 后, 红色荧光则大多分布于细胞核内。说明, 所构建的重组质粒 pDsRed-N1-*STAT1* 在哺乳动物细胞中能够正确表达融合蛋白质 Red-STAT1, 而且在 IFN- α 刺激下, Red-STAT1 由细胞质向细胞核转运。Red-STAT1 和内源性 STAT1 一样, 都具有在 IFN- α 刺激下, 向细胞核转运的特性。而对于 pDsRed-N1 空载体转染组, 无论加入还是不加入 IFN- α , DsRed 蛋白质都只在细胞质中表达。

图 5 显示, 感染坦布苏病毒的细胞未经 IFN- α 刺激, 其融合蛋白质 Red-STAT1 主要分布于细胞质中, 受 IFN- α 刺激后, 融合蛋白质部分分布于细胞核中, 表明在坦布苏病毒感染状态下, IFN- α 介导 STAT1 的核转运受到了明显抑制。说明, 细胞内的 *Jak*-STAT 通路信号状态可以用 Red-STAT1 融合蛋白质来加以检测。

3 讨论

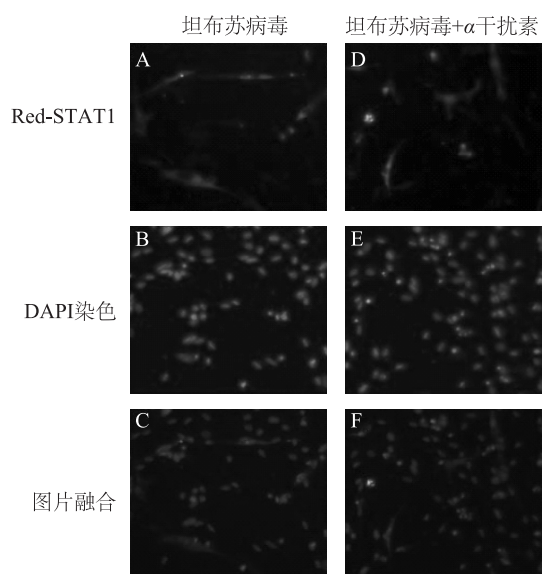
细胞中内源性的 STAT1 分子在 IFN- α 作用下可由细胞质向细胞核转运, 为了观察重组质粒 pDsRed-*STAT1* 在哺乳动物细胞中能否正确表达, 是否具有内源性 STAT1 的特性, 本研究将所构建的重组质粒 pDsRed-N1-*STAT1* 瞬时转染至 BHK-21 细胞,



DAPI;4',6-二脒基-2-苯基吡啶。

图 4 融合蛋白质 Red-STAT1 的表达及其在 IFN- α 介导下的细胞内定位情况

Fig.4 Expression of fusion protein Red-STAT1 and the intracellular localization mediated by IFN- α



DAPI;4',6-二脒基-2-苯基吡啶。

图 5 坦布苏病毒感染对融合蛋白质 Red-STAT1 细胞内定位作用

Fig.5 The cellular localization of fusion protein Red-STAT1 by the infection of tembusu virus

于转染后第 24 h 在细胞培养液中加入商品化的 IFN- α , 刺激 16 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察红色荧光在细胞中的分布情况。结果发现, 在没有 IFN- α 刺激时, 红色荧光只在 BHK-21 细胞的细胞质中

出现, 而加入 IFN- α 作用后, 红色荧光则大多分布于细胞核内。表明, 所构建的重组质粒 pDsRed-N1-STAT1 在哺乳动物细胞中能够正确表达融合蛋白质 Red-STAT1, 而且在 IFN- α 刺激下, Red-STAT1 可由细胞质向细胞核转运。Red-STAT1 与内源性 STAT1 具有相同的特性, 重组质粒 pDsRed-N1-STAT1 构建成功, 可以为观察病毒非结构蛋白质细胞内 IFN- α 介导的 *Jak*-STAT 信号转导通路的活化状态奠定基础。

STAT 家族蛋白质是一种重要的干扰素信号调节因子。STAT1 属于 STAT 转录因子家族, 在细胞对病毒、细菌和寄生虫的免疫调控中起着关键作用。同时, 随着病原体的进化, 它们已经能够有效克服机体的防御。病原体针对 *Jak*-STAT 信号通路发展出很多抵御策略, 尤其在 STAT1 激活的步骤上, 比如其入核作用或者磷酸化作用。Qiu 等^[9]证明 V 蛋白质能够泛素化降解 I 型干扰素刺激后的磷酸化 STAT1 蛋白质, 但不能引起 II 型干扰素刺激诱导产生的磷酸化 STAT1 蛋白质的降解。I 型干扰素刺激是 V 蛋白质降解磷酸化的先决条件。磷酸化 STAT1 蛋白质的降解引起了 STAT 总量的变化。Rodriguez 等^[10]发现亨德拉病毒的 V 蛋白质可以抑制 STAT1 和 STAT2 在细胞核内的聚集, 从而抑制 I 型干扰素信号通路的下游信号。Rothlisberger 等^[11]

通过免疫荧光试验证明,犬瘟热病毒(CDV)的V蛋白质能在不影响STAT1及STAT2磷酸化的情况下阻止二者的入核作用,进而抑制I型IFN所介导的信号传递。除了作为IFN的下游效应因子,STAT1还可以参与病毒的早期复制,在禽流感病毒研究中,张守平^[12]发现,活化的STAT1蛋白质P-STAT1参与H5N1流感病毒的早期复制过程,阻断其活化后可以抑制流感病毒vRNA的合成及炎症反应,但是并不影响流感病毒RNPs的核质输出。因此,本研究构建了重组质粒pDsRed-N1-STAT1,并证明其在哺乳动物细胞中能正确表达,而且具有内源性STAT1的特性,这为进一步研究宿主与病毒之间的相互作用打下基础,同时为生产出安全有效的疫苗提供重要参考。

参考文献:

- [1] CHEN S, CHENG A, WANG M. Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 82.
- [2] GORAYA M U, WANG S, MUNIR M, et al. Induction of innate immunity and its perturbation by influenza viruses [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(10): 712-721.
- [3] KIM H S, LEE M S. STAT1 as a key modulator of cell death[J]. *Cellular Signalling*, 2007, 19(3): 454-465.
- [4] PILZ A, RAMSAUER K, HEIDARI H, et al. Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons[J]. *Embo Reports*, 2003, 4(4): 368-373.
- [5] GUO J, HAYASHI J, SEEGER C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(3): 1343-1350.
- [6] HO L J, HUNG L F, WENG C Y, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN- α but not IFN- γ antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(12): 8163-8172.
- [7] LIN R J, LIAO C L, LIN E, et al. Blocking of the α interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78: 9285-9294.
- [8] LEE C K, RAO D T, GERTNER R, et al. Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function [J]. *Journal of Immunology*, 2000, 165(7): 3571-3577.
- [9] QIU X, FU Q, MENG C, et al. Newcastle disease virus V protein targets phosphorylated STAT1 to block IFN-I signaling. [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0148560.
- [10] RODRIGUEZ J J, WANG L F, HORVATH C M. Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(21): 11842-11845.
- [11] ROTHLISBERGER A, WIENER D, SCHWEIZER M, et al. Two domains of the V protein of virulent canine distemper virus selectively inhibit STAT1 and STAT2 nuclear import [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(13): 6328-6343.
- [12] 张守平. p-STAT1 蛋白参与调节 A 型流感病毒的复制及炎症反应的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2015.

(责任编辑:王 妮)