

H9N2 亚型禽流感病毒河南株 NP 基因的克隆 及其在大肠杆菌中的表达

陈红英¹, 方忠意², 崔保安¹, 李新生¹, 夏平安¹, 金 钺¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450002)

[摘 要] 【目的】克隆 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)河南株核蛋白(NP)基因, 并将 NP 主要抗原表位区在大肠杆菌中进行表达, 为禽流感基因工程诊断抗原的制备和开发奠定基础。【方法】根据 GenBank 公布的禽流感病毒 NP 基因序列设计引物, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 从 H9N2 亚型 AIV 河南株感染的鸡胚尿囊液 RNA 中扩增 AIV 河南株 NP 全基因, 将扩增的 PCR 产物克隆到 pGEM-T easy 载体并进行测序。通过 PCR 和酶切方法将 NP 主要抗原表位区亚克隆到原核表达载体 pET-28a 中, 构建重组表达质粒 pET-28NP, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 IPTG 诱导下表达重组蛋白。【结果】测序结果表明, 克隆的 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP 基因全长为 1 497 bp, 包含 1 个完整读码框, 编码 498 个氨基酸, 与 GenBank 中不同来源、不同亚型的其他 7 株禽流感病毒 NP 基因的核苷酸同源性达到 95% 以上, 氨基酸同源性达到 98% 以上。SDS-PAGE 可检测到相对分子质量约为 42 ku 的重组蛋白。经 1.0 mmol/L IPTG 诱导 5 h 时, 重组蛋白的表达量最高。Western blot 分析表明, 重组蛋白能够与 H9 亚型 AIV 阳性血清发生特异反应。【结论】NP 基因非常保守, 建立的表达系统能够表达 NP 蛋白且表达蛋白具有良好的免疫原性。

[关键词] 禽流感病毒; 河南株; 核蛋白; 克隆; 表达

[中图分类号] S858.352.65⁺9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)10-0019-06

Cloning and expression of NP gene of H9N2 subtype avian influenza virus henan isolate in *Escherichia coli*

CHEN Hong-ying¹, FANG Zhong-yi², CUI Bao-an¹, LI Xin-sheng¹,
XIA Ping-an¹, JIN Yue¹

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: 【Objective】The research was to study cloning and expression of nucleoprotein (NP) gene of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) henan isolate in *Escherichia coli*. 【Method】A pair of specific primers were designed and synthesized according to NP gene sequences published in GenBank. NP cDNA was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from the virus RNA directly extracted from chicken embryo allantoic fluid infected by H9N2 subtype AIV henan isolate, and cloned into pGEM-T easy vector and sequenced. The NP gene segment which encoded the major epitopes of nucleoprotein was subcloned into prokaryotic expression vector pET-28a(+) using PCR and enzyme digestion. The resulting plasmid, pET-28 NP, was used to transform into *E. coli* BL21(DE3), which can highly express re-

* [收稿日期] 2009-02-11

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

[作者简介] 陈红英(1965—), 女, 四川仁寿人, 副教授, 博士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

E-mail: chhy927@163.com

[通信作者] 崔保安(1948—), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

E-mail: baoancui@henau.edu.cn

combinant NP protein by using IPTG induction. 【Result】 The results showed that the nucleotide sequence of NP gene was 1 497 bp in length, which included one open-reading frame, encoding 498 amino acid residues. When the nucleotide sequence of NP gene of henna isolate was compared with that of 7 strains of AIV in GenBank, homology was higher than 95% at nucleotide level, and the deduced amino acid homology was higher than 98%. The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blot. The results showed that recombinant protein was about 45 ku, and can highly be expressed in *E. coli* BL21(DE3) by using 1.0 mmol/L IPTG induction for 5 h. The recombinant protein can react with sera against H9 subtype AIV. 【Conclusion】 NP gene for H9N2 AIV was highly reserved. Recombinant NP protein for H9N2 AIV can be expressed in expression system pET-28NP and had good immunogenicity.

Key words: avian influenza virus; henna isolate; nucleoprotein; cloning; expression

禽流感(Avian influenza, AI)是由正粘病毒科流感病毒属的禽流感病毒(AIV)引起的禽类感染和/或疾病综合征^[1]。该病于 1878 年首次在意大利由 Perroncito 发现并报道, 现已证实 AIV 广泛分布于世界范围内的各种家禽和野禽, 而且各种亚型 AIV 引起的禽流感频繁爆发, 给养禽业造成了巨大的经济损失^[2-3]。1997 年, 以往认为只能感染禽类的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒(HPAIV), 在香港引起 18 人感染和 6 人死亡^[4], 2003 年底到 2004 年 3 月, H5N1 亚型禽流感在亚洲 8 个国家相继爆发, 而且在越南和泰国出现 33 人感染, 并导致其中 22 人死亡^[5]。短暂几年内, H5N1、H9N2、H7N7 亚型禽流感病毒跨越种属屏障直接感染人类^[6-7], 已成为不争的事实, 由此赋予了禽流感病毒全新的公共卫生学意义, 它不仅可以对养禽业, 并随时有可能对人类和其他哺乳动物构成威胁。尽管 AIV 血清学亚型众多, 病毒变异极为频繁, 但主要集中在病毒的血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)2 种表面结构蛋白上, 而其核蛋白(NP)高度保守, 具有种群和型的特异性^[8], 这是禽流感病毒型的分类和诊断基础。核蛋白是构成病毒核衣壳的主要蛋白成分, 能够诱导机体产生细胞免疫^[9]并具有一定的免疫保护作用, 这种作用不受禽流感病毒亚型的影响。因此, 本研究对 1 株 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP 基因进行了克隆及序列分析, 将 NP 主要抗原表位区亚克隆到原核表达载体 pET-28a 中, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 并用 IPTG 诱导表达重组蛋白, 以期为禽流感基因工程诊断抗原的制备和开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株和血清

H9N2 亚型 AIV 河南株(A/chicken/Henan/201/2005(H9N2)), 由河南农业大学河南省动物性

食品安全重点实验室分离, 并由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定。H9 亚型 AIV 阳性血清购自中国动物卫生与流行病学中心国家外来动物疫病诊断中心。

1.2 质粒和受体菌

pGEM-T easy 载体, 购自 Promega 公司; 大肠杆菌 JM109, 购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 购自北京天为时代科技有限公司; 原核表达载体 pET-28a(+), 由河南农业大学河南省动物性食品安全重点实验室保存。

1.3 工具酶及主要试剂

Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI 公司产品; T₄DNA 连接酶, 购自 Promega 公司; 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA marker DL2000、X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D 半乳糖苷)和 IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖)及小量质粒提取试剂盒, 均购自 TaKaRa 公司; Viral DNA/Viral RNA Purification Kit、DNA 凝胶回收试剂盒, 均购自杭州维特洁生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鸡 IgG, 购自 Sigma 公司。

1.4 引物的设计与合成

参照 GenBank 上已发表的禽流感病毒 NP 基因序列, 设计 2 对引物, 用于扩增 NP 全长基因和 NP 主要抗原表位区的基因片段。引物由 TaKaRa 公司合成, 其序列为:

P1: 5'-ATGGCGTCTCAAGGCACCA-3';

P2: 5'-TTAATTGTCATACTCCTCTGC-3';

P3: 5'-CAC GGATCCAACTCAGTGACTA-TGAA-3', 引入酶切位点 *Bam*H I;

P4: 5'-GT AAGCTTGGTCCATTGCTTCCAT-GTT-3', 引入酶切位点 *Hind* III。

1.5 NP 基因的 RT-PCR 扩增

按 Viral DNA/Viral RNA Purification Kit 使

用说明,从 H9N2 亚型 AIV 河南株感染的鸡胚尿囊液中提取病毒 RNA,使用 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 将提取的 RNA 反转录为 cDNA。应用 PCR 技术,用 P1、P2 引物扩增 NP 基因,取 PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳,检查扩增结果。

1.6 PCR 产物的克隆及鉴定

按照 DNA 凝胶回收试剂盒的操作说明,回收纯化 PCR 产物。将回收的 PCR 产物插入 pGEM-T easy 载体,构建重组质粒 pGEM-NP,转化 JM109 感受态细胞,涂布于含有 X-gal (40 μg/mL)、IPTG (40 μg/mL)和氨苄青霉素 (Amp, 50 μg/mL)的 LB 琼脂培养基上,37 ℃培养 12~16 h。挑取白色菌落接种于含有 Amp 的 LB 肉汤中,37 ℃振荡培养 12~16 h,提取重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定。将 PCR 和酶切鉴定正确的阳性重组质粒送 TaKaRa 公司进行测序。

1.7 重组表达质粒的构建及其鉴定

以重组质粒 pGEM-NP 为模板,用 P3、P4 引物进行 PCR 扩增。用 BamH I 和 Hind III 双酶切 PCR 回收产物,电泳、分离和回收 NP 基因,将 NP 基因定向插入到经同样处理的原核表达载体 pET-28a(+)中,构建重组表达质粒 pET-28NP,转化 BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37 ℃培养过夜,利用卡那抗性初步筛选阳性重组子。提取重组表达质粒进一步进行 PCR 扩

增、酶切和测序鉴定。

1.8 重组表达质粒在大肠杆菌中的诱导表达

挑取经鉴定正确的阳性单个菌落进行诱导表达。按照 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 诱导不同时间 (2, 3, 4, 5, 6 h),或在不同 IPTG 终浓度 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mmol/L)下诱导 5 h,比较重组蛋白的产量,确定最佳诱导条件。同时以诱导空载体和受体菌作对照。

1.9 表达产物的检测

1.9.1 SDS-PAGE 检测 参考《分子克隆试验指南》^[10]的操作步骤进行 SDS-PAGE 电泳。

1.9.2 Western blot 检测 首先参考文献^[11-12]的方法,除去 H9 亚型 AIV 阳性血清中的抗大肠杆菌成分。然后参考《分子克隆试验指南》^[10]的操作步骤进行操作。所用的一抗是 H9 亚型 AIV 阳性血清 (1 : 100 稀释),二抗是辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鸡 IgG (1 : 5 000 稀释),底物是 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)。

2 结果与分析

2.1 NP 基因的 RT-PCR 扩增与克隆

用引物 P1、P2 对 H9N2 亚型 AIV 河南株 RNA 进行 RT-PCR 扩增,电泳结果 (图 1) 显示,扩增出 1 条约 1.5 kb 的带,与预期结果相符。

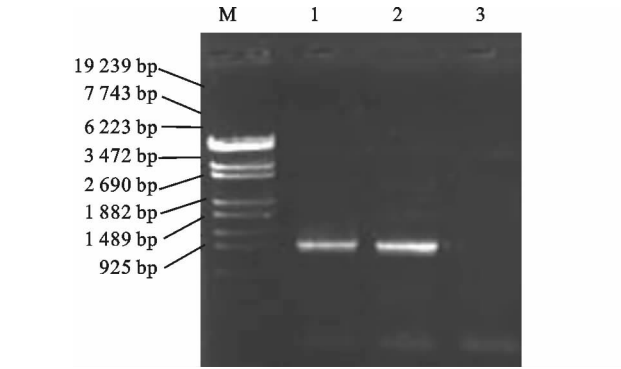


图 1 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP 基因的 RT-PCR 扩增
M. DNA Marker λ-EcoT14 digest; 1, 2. RT-PCR 产物; 3. 阴性对照
Fig. 1 RT-PCR amplification results of NP gene for H9N2 subtype AIV henan isolate

M. DNA Marker λ-EcoT14 digest; 1, 2. RT-PCR products; 3. Negative control

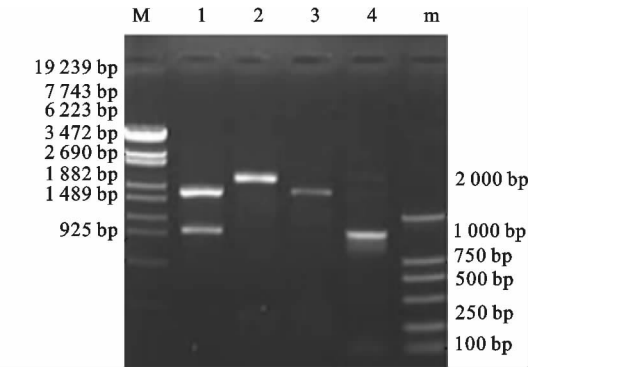


图 2 重组质粒 pGEM-NP 的 PCR 扩增和酶切鉴定
M. DNA Marker λ-EcoT14 digest;
1. EcoR I 酶切重组质粒 pGEM-NP;
2. Sal I 酶切重组质粒 pGEM-NP; 3. 空载体对照;
4. 重组质粒 pGEM-NP 的 PCR 产物; m. DNA Marker DL2000

Fig. 2 Identification results of recombinant plasmid pGEM-NP by digestion (EcoR I, Sal I) and PCR
M. DNA Marker λ-EcoT14 digest;
1. Recombinant plasmid digestion by EcoR I ;
2. Recombinant plasmid digestion by Sal I ; 3. Control;
4. PCR product of recombinant plasmid; m. DNA Marker DL2000

重组质粒 pGEM-NP 的 PCR 和酶切电泳结果(图 2)显示,*Sal* I 酶切后出现 1 条约 4 500 bp 的带;经 *Eco*R I 酶切后出现 2 条带,其中 1 条带为载体质粒(约 3 000 bp),另 1 条带为所克隆的 NP 基因片段(约 1 500 bp)。以质粒为模板进行 PCR 扩增、电泳,出现 1 条约 1 500 bp 的条带。PCR 和酶切鉴定结果与理论结果相一致,证明重组质粒构建成功。

2.2 NP 基因序列的测定及分析

选择 PCR 和酶切鉴定正确的阳性重组质粒,送 TaKaRa 公司进行正反 2 个方向的序列测定。序列测定结果表明,克隆的 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP cDNA 包括终止密码子在内大小为 1 497 bp,编码 498 个氨基酸,与预期结果吻合。将克隆的 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP 基因与 GenBank 上查到的不同来源、不同亚型的其他 7 株禽流感病毒 NP 基因进行比较,发现其核苷酸同源性达 95% 以上,氨基酸同源性达 98% 以上。

2.3 重组表达质粒 pET-28NP 的鉴定

pET-28NP 经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切及 PCR 扩增,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果(图 3)显示,PCR 扩增产物及酶切插入片段均约为 1 000 bp,与预期大小相符。重组表达质粒测序结果证实,编码 NP 基因完全正确地插入到原核表达载体 pET-28a(+)的插入位点,读码框正确。

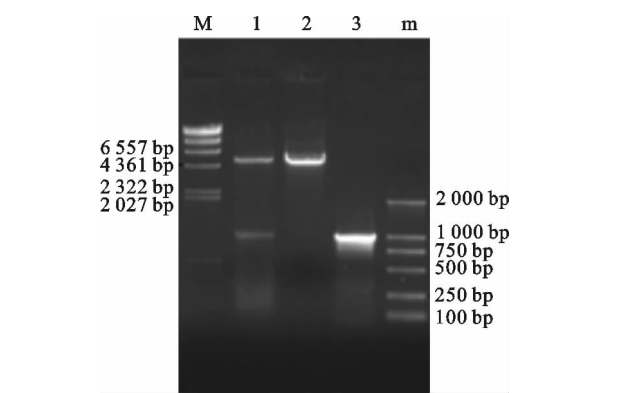


图 3 重组表达质粒 pET-28NP 的 PCR 扩增及酶切鉴定

M. DNA Marker λ -*Hind* III digest;

1. *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组表达质粒 pET-28NP;

2. 空载体对照;3. 重组表达质粒 pET-28NP 的 PCR 产物;

m. DNA Marker DL2000

Fig. 3 Identification results of recombinant plasmid pET-28NP by digestion (*Bam*H I , *Hind* III) and PCR

M. DNA Marker λ -*Hind* III digest;

1. Recombinant plasmid digestion by *Bam*H I + *Hind* III ;

2. Control;3. PCR product of recombinant plasmid;

m. DNA Marker DL2000

2.4 表达产物的检测

2.4.1 表达产物的 SDS-PAGE 检测 电泳结束后经过染色、脱色,发现诱导菌在 42 ku 处出现 1 条粗蛋白带,与预期结果相符,而未诱导菌和诱导的空载体在该位置未出现相同条带。以一定终浓度的 IPTG(1.0 mmol/L)对重组菌进行不同时间的诱导,结果见图 4。由图 4 可知,在一定时间内,随着诱导时间的增加,重组蛋白的产量逐步提高,于诱导 5 h 时达到高峰,然后表达量开始下降。

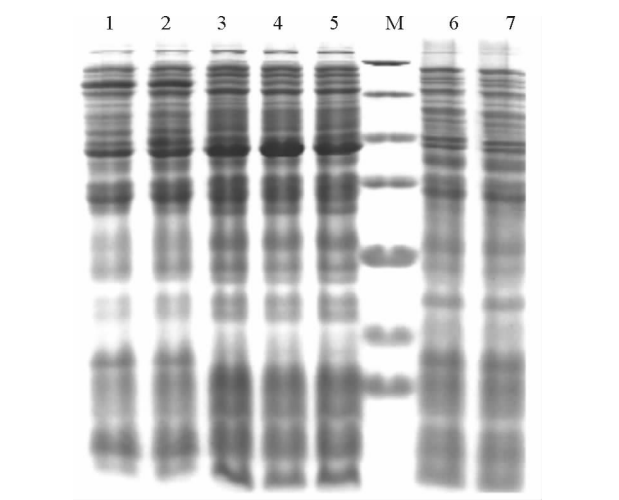


图 4 诱导不同时间重组菌体裂解物的 SDS-PAGE 检测结果

1~5. 分别为诱导 2,3,4,5,6 h 的重组菌体裂解物;

M. 低分子量蛋白 Marker; 6. pET-28a(+)对照;

7. BL21(DE3) 对照

Fig. 4 SDS-PAGE of lysates of recombinant bacteria induced for different time

1—5. Lysates of recombinant bacteria induced for 2,3,4,5 and 6 h, respectively; M. low MW standard protein Marker;

6. pET-28a(+) control;7. BL21(DE3) control

以不同终浓度的 IPTG 对重组菌进行 5 h 的诱导,结果见图 5。由图 5 可见,随着 IPTG 终浓度的增加,重组蛋白的产量逐步提高,于 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 时达到最高。随后随着 IPTG 终浓度的继续增加,重组蛋白产量逐渐下降。以上研究结果表明,重组表达质粒在大肠杆菌中诱导表达的最佳诱导条件为: IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L,诱导时间为 5 h。

2.4.2 Western blot 检测 Western blot 检测结果(图 6)显示,在目标条带位置出现 1 条明显的浅褐色印迹,而诱导的空载体 pET-28a(+)菌培养物无此条带产生,说明所表达的重组蛋白具有良好的免疫原性。

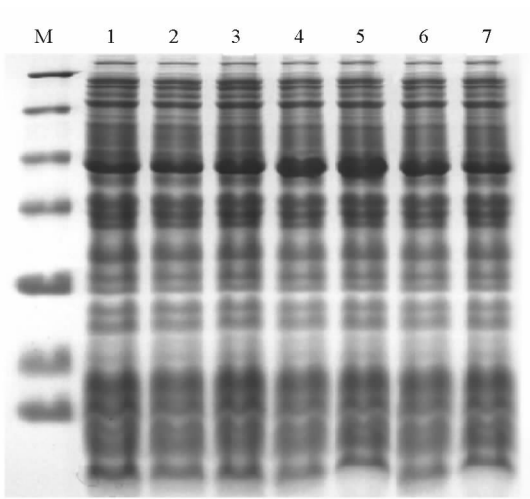


图 5 不同 IPTG 浓度诱导 5 h 时重组菌体裂解物的 SDS-PAGE 检测结果

M. 低分子量蛋白 Marker;1~7. 0. 2,0. 4,0. 6,0. 8,1. 0, 1. 2 和 1. 4 mmol/LIPTG 诱导 5 h 的重组菌体裂解物

Fig. 5 SDS-PAGE of lysates of recombinant bacteria induced for 5 h by different IPTG concentrations

M, low MW standard protein Marker;1—7. Lysates of recombi- ant induced for 5 h by IPTG with 0. 2,0. 4,0. 6,0. 8,1. 0,1. 2 and 1. 4 mmol/L, respectively

3 讨 论

禽流感病毒核蛋白是禽流感病毒基因组 RNA 中的片段 5 编码的一种结构蛋白,其在病毒进化过程中的变异率较低^[13]。将本研究所克隆的 H9N2 亚型 AIV 河南株 NP 基因,与从 GenBank 上查到的不同来源不同亚型的其他 7 株禽流感病毒 NP 基因进行比较,发现其核苷酸同源性达到 95% 以上,氨基酸同源性达到 98% 以上。证明 NP 基因是非常保守的,这与 Shu 等^[13]的研究结果相一致。

禽流感病毒 NP 基因的开放性阅读框(ORF)为 1 497 bp,编码 498 个氨基酸。核蛋白分子至少有 3 个独立的抗原表位(NP50-58、NP147-155、NP366-374),是细胞毒性淋巴细胞(CTL)识别的主要抗原^[14-15]。在研究过程中,曾将 NP 基因完整的开放性阅读框,插入到原核表达载体 pET-28a(+), pGEX-4T-1 和 pGEX-6T-1 中构建原核表达质粒进行表达,多次尝试并改变诱导条件,但目的蛋白的表达量都很微弱,这可能与 NP 基因的三级结构以及含有大量的稀有密码子有关。本研究将包含编码核蛋白主要抗原位点区域的基因片段(第 141 位核苷酸到 1 128 位核苷酸,编码第 48 位到 376 位氨基酸)插入到 pET-28a(+)中,重组蛋白在大肠杆菌

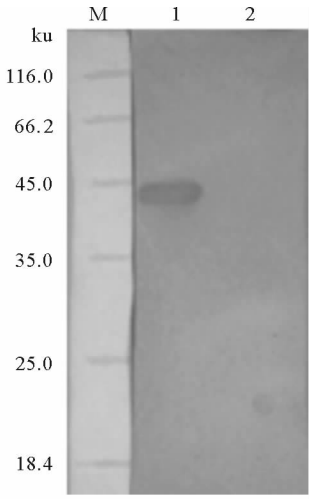


图 6 表达产物的 Western blot 分析

M. 低分子量蛋白 Marker;1. 重组 NP 蛋白;2. 阴性对照

Fig. 6 Western blot analysis of expression products

M, low MW standard protein Marker;

1. Recombinant NP protein;2. Negative control

BL21(DE3)中得到表达,重组蛋白的分子质量也与预期相同。经过诱导条件的筛选,重组菌经 1. 0 mmol/L IPTG 诱导 5 h 时,重组蛋白表达量最高。Western blot 检测证实,重组蛋白能够与 H9 亚型禽流感病毒阳性血清发生特异性反应,表明重组蛋白具有良好的免疫原性。

由于禽流感病毒的核蛋白高度保守,具有种群和型的特异性,而且能够诱导机体产生细胞免疫,同时具有一定的种间交叉保护性,但单个核蛋白在机体内诱导的免疫原性不足以对致死性禽流感病毒的攻击提供有力的保护^[16]。因此,通过基因工程方法对禽流感病毒 NP 基因进行克隆表达,以纯化的重组蛋白代替全病毒作诊断抗原,可以避免散毒的危险,具有较高的生物安全性。本研究将 AIV 核蛋白主要抗原片段在大肠杆菌中进行了成功表达,而且表达量较高,重组 NP 蛋白带有 6 个组氨酸残基,产物容易纯化,为禽流感基因工程抗原的生产与开发以及新型诊断方法的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2002.
Gan M H. Diseases of Chinese poultry [M]. 2nd Ed. Beijing: China Agricultural Press,1991. (in Chinese)
[2] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird

species [J]. Vet Microbiol,2000,74(1-2):3-13.

[3] Tumpey T M,Suarez D L,Perkins L E,et al. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat [J]. J Virol,2002,76(12):6344-6355.

[4] Lee S Y,Mak H K,Saw T A. The avian flu (H5N1):one year on [J]. Public Health & Epidemiology Bulletin,1999,8(1):1-7.

[5] WHO. Avian influenza A (H5N1):Preliminary epidemiological summary of influenza A (H5N1), Vietnam and thailand [J]. Weekly Epidemiological Record,2004,79(7):68-69.

[6] 邹毅,李永岭,叶建洲,等. 韶关市发现(H9N2)感染人的监测报告 [J]. 中华流行病学杂志,2000,21(4):303.

Zou Y,Li Y L,Ye J Z,et al. The report of AIV (H9N2) infected man in Shaoguan district [J]. Chinese Journal of Epidemiology,2000,21(4):303. (in Chinese)

[7] Webby R J,Webster R G. Are we ready for pandemic influenza [J]. Science,2003,302(28):1519-1522.

[8] Scholtissek C. Molecular evolution of influenza virus [J]. Virus Gene,1995,11(2-3):209-215.

[9] Webster R G,Kawaoka Y,Taylor J,et al. Efficacy of nucleoprotein and hemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens [J]. Vaccine,1991,9(5):303-309.

[10] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

[11] 郑其升,张晓勇,刘华蕾,等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素基因的原核表达及间接 ELISA 方法的初步建立 [J]. 微生物学报,2005,45(1):58-61.

Zheng Q S,Wang X Y, Liu H L,et al. The prokaryotic and the establishment of the putative indirect ELISA assay for the HA gene for Avian influenza virus (AIV) H5N1 subtype [J]. Acta Microbiology Sinica,2005,45(1):58-61. (in Chinese)

[12] 余兴龙,涂长春,李作生,等. 以重组 mE2 蛋白为抗原建立检测猪瘟病毒抗体间接 ELISA 方法的研究 [J]. 中国预防兽医学报,1999,21(3):220-222.

Yu X L,Tu C C,Li Z S,et al. Development of indirect ELISA for detection of antibodies against hog cholera virus employing recombinant E2 expressed in *E. coli* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,1999,21(3):220-222. (in Chinese)

[13] Shu L L,Bean W J,Webster R G. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990 [J]. J Virol,1993,67(5):2723-2729.

[14] Webster R G,Bean W J,Gorman O T,et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiol Rev,1992,56(1):152-179.

[15] Thomson S A,Sherritt M A,Medveczky J,et al. Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination [J]. J Immunol,1998,160(4):1717-1723.

[16] Kodihalli S,Kobasa D L,Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines [J]. Vaccine,2000,18(23):2592-2599.