

H9N2 亚型禽流感病毒 NS1 基因的原核与真核表达

王晶钰¹, 刘红彦¹, 李河林^{1,2}, 张三东¹, 柳超¹, 温肖会¹, 雷萌桐¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西杨凌绿方生物工程有限公司, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**构建 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV) NS1 基因的原核和真核表达载体,将其分别在大肠杆菌和 293 细胞中进行表达,为进一步研究 NS1 蛋白的功能及其与宿主的相互作用,以及鉴定禽流感疫苗免疫禽和野毒感染禽 ELISA 诊断试剂盒的制备提供理论依据。**【方法】**用 RT-PCR 方法扩增 H9N2 亚型 AIV 的 NS1 基因,将其定向克隆到原核表达载体 pET-32a(+)中构建 NS1 基因的原核重组质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3)后,用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达;同时,将 NS1 基因克隆到真核表达载体 pEGFP-C1 中,构建 NS1 基因真核重组质粒,将其瞬时转染 293 细胞,48 h 后收集感染细胞,对大肠杆菌表达产物和 293 细胞表达产物进行 Western-blotting 分析。**【结果】**成功构建了 NS1 基因的原核表达载体 pET-32a-NS1 和真核表达载体 pEGFP-C1-NS1。Western-blotting 结果表明,大肠杆菌和 293 细胞的表达产物均能检测到特异性条带(大肠杆菌的表达产物在约 44 ku 处出现阳性条带,293 细胞表达产物在约 55 ku 处出现特异条带)。**【结论】**NS1 基因在大肠杆菌和 293 细胞中得到成功表达,获得的 NS1 蛋白具有良好的抗原活性。

[关键词] H9N2 亚型禽流感病毒;NS1 基因;大肠杆菌;293 细胞;原核表达;真核表达

[中图分类号] S855.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)10-0027-06

Prokaryotic and eucaryotic expression of H9N2 avian influenza virus NS1 gene

WANG Jing-yu¹, LIU Hong-yan¹, LI He-lin^{1,2}, ZHANG San-dong¹,
LIU Chao¹, WEN Xiao-hui¹, LEI Meng-tong¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Lvfang Biotechnology Limited Company, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to construct the prokaryotic expression vector pET-32a-NS1 and eukaryotic expression vector pEGFP-C1-NS1 for the expression of the NS1 gene of H9N2 avian influenza virus in *E. coli* and 293 cells. **【Method】**NS1 gene was amplified by RT-PCR. The NS1 gene was cloned directionally into the pET-32a(+). The recombinant prokaryotic expression plasmid was constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3), and induced by IPTG; The NS1 gene was cloned into pEGFP-C1. The recombinant eukaryotic expression plasmid was constructed and transfected into 293 cells by Lipofectamine™ 2000, and the transfected cells were collected 48 hours after transfection. Meanwhile, the expressed products were analyzed with Western-blotting. **【Result】**Results showed that the prokaryotic expression vector and eukaryotic expression vector of NS1 gene were successfully constructed, the special band of NS1 protein expressed in *E. coli* and 293 cells were identified by Western-blotting. **【Conclusion】**NS1 gene was

* [收稿日期] 2010-03-24

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2005K01-G20-2)

[作者简介] 王晶钰(1964—),男,陕西乾县人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事畜禽传染病和兽医公共卫生学研究。

E-mail: wjingyu2004@126.com

successfully expressed in *E. coli* and 293 cells, Western-blotting test showed that the NS1 proteins had very good antigenicity.

Key words: H9N2 avian influenza virus; NS1 gene; *E. coli*; 293 cell; prokaryotic expression; eucaryotic expression

禽流感(Avian influenza, AI)是目前危害养禽业的最严重的疫病。禽流感病毒基因组由 8 条单股、负链、分节段的 RNA 片段构成,其中片段 8 即 NS 基因,含有 2 个读码框,编码 NS1 和 NS2 2 种蛋白质,其中 NS1 为非结构蛋白,NS2 为结构蛋白。A 型流感病毒 NS 基因序列的同源性差异较大,可以分为等位基因群 A 和 B,两者间的同源性仅为 72.3%左右,但同一等位基因群内同源性很高,达 90%以上^[1]。禽流感病毒 NS1 基因属于 B 类等位基因群,在进化中高度保守。另外,NS1 蛋白在流感病毒感染的早期就大量表达,但仅出现于感染细胞内,且主要聚集在细胞核内,能诱导机体产生抗 NS1 蛋白的抗体,而禽流感灭活疫苗免疫的禽群不能产生该抗体,因此 NS1 蛋白可作为一种鉴别诊断标记,用来区分野毒感染和灭活疫苗免疫的禽群,同时也可作为判断早期感染的依据^[2]。NS1 蛋白仅在病毒侵入机体细胞后才能够合成,这提示 NS1 可能在破坏被病毒感染的细胞过程中扮演着一个重要角色,对流感病毒的毒性起着非常重要的作用。鉴于 NS1 基因自身的特点,其在鉴别诊断中有着广泛的应用前景。为此,本研究从陕西省 H9N2 亚型禽流感病毒分离株(WN 株)中克隆到了 NS1 基因,将其分别在大肠杆菌和 293 细胞中进行表达,以期为进一步研究 NS1 蛋白的功能及其与宿主的相互作用提供参考,也为禽流感疫苗免疫禽和野毒感染禽的鉴别 ELISA 诊断试剂盒的制备提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和鸡胚 H9N2 亚型禽流感病毒 WN (A/Chicken/Shaanxi/01/2008)株,由西北农林科技大学畜禽重大疫病防治和畜产品生物安全实验室保存;10 日龄 SPF 鸡胚,由杨凌绿方生物工程有限公司提供。

1.1.2 细胞及菌株 DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3)感受态细胞及 293 细胞,均由西北农林科技大学畜禽重大疫病防治和畜产品生物安全实验室保存。

1.1.3 主要试剂 Trizol Reagent、Lipofectami-

ne™ 2000 脂质体,均购自 Invitrogen 公司;pMD-18T Simple 克隆载体试剂盒、AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶等,均购自宝生物(大连)工程有限公司;原核表达载体 pET-32a(+)、真核表达载体 pEGFP-C1、H9N2 亚型阳性抗血清,均由西北农林科技大学畜禽重大疫病防治和畜产品生物安全实验室保存;胎牛血清、DMEM 培养基,均购自 GIBCO 公司;HRP-羊抗鸡 IgG 酶标结合物,购自华美生物工程公司;其他试剂均为 Sigma 分装或国产分析纯级。

1.2 病毒的增殖

将 H9N2 亚型禽流感病毒 WN (A/Chicken/Shaanxi/01/2008)株适当稀释后接种于 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL,置于 37 °C 恒温箱孵化 72 h,弃去 24 h 内死亡的鸡胚,收集 24~72 h 内死亡的鸡胚及 72 h 存活的鸡胚,置于 4 °C 冰箱过夜后无菌收取鸡胚尿囊液,保存于-20 °C 冰箱备用。

1.3 PCR 引物的设计与合成

参照 GenBank 上已经发表的 H9N2 亚型禽流感毒株(登录号:EU086256、DQ997484)的基因序列,用 Primer 5.0 软件设计 NS1F1/NS1R1 和 NS1F2/ NS1R2 2 对 NS1 基因特异性引物,用于扩增 NS1 基因。引物序列如下。

NS1F1:5'-AA GGATCCATGGATTCCAACA CTGTGTC-3',

NS1R1:5'-GC CTCGAGCTACTTTGGAGGG AGTG-3';

NS1F2:5'-CAA GAATTCAATGGATTCCAACACT-3',

NS1R2: 5'-TTGGATCCTCTACTTTGGAG G/AGAGT-3'。

另外,在引物 NS1F1、NS1R1、NS1F2、NS1R2 的 5'端分别引入 *Bam*H I、*Xho*L I、*Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分)。引物均由上海生物工程有限公司合成,预期扩增片段长度为 654 bp。

1.4 病毒总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

按 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明书,直接从鸡胚尿囊液中提取 H9N2 亚型禽流感病毒基因

组 RNA,根据 MBI 公司 Fermentas 反转录试剂盒说明书合成 cDNA。PCR 反应体系为 50 μL :模板 cDNA 4 μL ,上、下游引物(10 pmol/L)各 1 μL ,5 $\times$ PCR buffer 10 μL ,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL ,补充灭菌超纯水至 50 μL 。扩增反应热循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s(引物 NS1F1/NS1R1)/62 $^{\circ}\text{C}$ 45 s(引物 NS1F2/NS1R2),72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 产物 5 μL ,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 NS1 基因的纯化及克隆鉴定

取 NS1 基因的 PCR 扩增产物,按 DNA 快速纯化回收试剂盒说明书回收目的片段,参照 pMD-18T Simple 克隆载体试剂盒使用说明书,将 PCR 纯化回收产物与 pMD-18T Simple 载体连接,充分混匀后,于 16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中连接过夜。连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 12~18 h,待菌落生长良好而又未相互重叠时挑取白色单个菌落,接种到含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中培养过夜,提取质粒。经菌落 PCR(体系和程序同 1.4)、质粒双酶切和测序鉴定均为阳性的质粒,分别命名为 PMD-NS1y 和 PMD-NS1z。

1.6 NS1 基因原核及真核表达载体的构建

1.6.1 原核表达载体的构建 用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho*L I 同时消化质粒 PMD-NS1y 和原核表达载体 pET-32a(+),回收目的基因和表达载体,构建原核表达载体 pET-32a-NS1,进行菌落 PCR、质粒双酶切和测序鉴定,提取鉴定正确的阳性质粒备用。

1.6.2 真核表达载体的构建 用限制性内切酶 *Eco*R I、*Bam*H I 同时消化质粒 PMD-NS1z 和真核表达载体 pEGFP-C1,回收目的基因和表达载体,构建真核瞬时表达载体 pEGFP-C1-NS1,进行菌落 PCR、质粒双酶切和测序鉴定,提取鉴定正确的阳性质粒备用。

1.7 重组 NS1 基因在大肠杆菌中的表达

挑取转化 pET-32a-NS1 重组表达质粒以及转化 pET-32a(+)空质粒的 BL21(DE3)感受态细胞单克隆,接种于 3 mL 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,次日按体积分数 1% 接种量扩大培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,26 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 5 h。

1.8 重组 NS1 基因在 293 细胞中的表达

将 293 细胞培养在含体积分数 10% 胎牛血清,不含青、链霉素的高糖 DMEM 培养基中,转染前一天接种细胞至 6 孔培养板,接种量以第 2 天细胞的汇合度达到 90%~95% 为宜。按照 Lipofectamine™ 2000 脂质体说明书用重组质粒 pEGFP-C1-NS1 转染 293 细胞,同时设空载体 pEGFP-C1 转染对照组和未转染 293 细胞对照组。转染细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,每间隔 12 h,用荧光显微镜观察转染效率及瞬时表达情况,48 h 后收集细胞。

1.9 NS1 基因表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析

收集大肠杆菌诱导表达产物,经处理后进行 120 g/L SDS-PAGE 分析,一部分凝胶用考马斯亮蓝染色,另一部分用于转印并进行 Western-blotting 分析。收集转染后 48 h 的 293 细胞,处理后进行 Western-blotting 分析。

2 结果与分析

2.1 NS1 基因的 RT-PCR 扩增

以病毒 RNA 反转录产物为模板,分别用 NS1F1/NS1R1 和 NS1F2/NS1R2 2 对引物对 H9N2 亚型禽流感病毒 WN 分离株 NS1 基因进行 PCR 扩增,产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中,均可见 1 条 650 bp 左右的特异性条带(图 1),长度与预期结果相当。

2.2 NS1 基因的克隆

将 2 对引物扩增的 NS1 基因 PCR 产物回收后与 pMD-18T Simple 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,挑取白色菌落提取质粒后进行双酶切鉴定,均得到约 2 700 和 650 bp 的 2 条带(图 2),与预期结果相符,表明 NS1 基因已成功克隆到载体中。

2.3 NS1 基因原核及真核重组质粒的鉴定

对 NS1 基因原核及真核重组质粒的菌落,进行 PCR 鉴定均可见 1 条 650 bp 左右的特异性条带。将 NS1 基因原核重组质粒 pET-32a-NS1 用 *Bam*H I 和 *Xho*L I 双酶切得到 5 900 bp 的 pET-32a(+)载体条带和 650 bp 的 NS1 基因条带(图 3);将 NS1 基因真核重组质粒 pEGFP-C1-NS1 用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切得到 5 000 bp 的 pEGFP-C1 条带和 650 bp 的 NS1 基因条带(图 4)。经双向测序分析,人工合成的 NS1 基因与 GenBank 上公布的国内其他 H9N2 禽流感病毒 NS1 基因核苷酸同源性的

96%~98%，氨基酸同源性为 87%~97%；与中国香港和国外分离株比较，合成的 NS1 基因在羧基端有 13 个氨基酸的缺失，只存在点突变，没有氨基酸

插入现象，符合中国大陆 H9N2 禽流感病毒分离株的标志特征。以上结果表明，目的基因已正确克隆到原核和真核表达载体中。

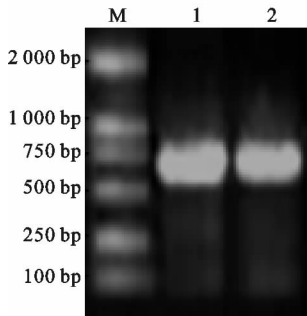


图 1 NS1 基因 RT-PCR 扩增产物的电泳结果
M, DNA Marker DL2000; 1. NS1 PCR 扩增产物 (NS1F1/NS1R1); 2. NS1 PCR 扩增产物 (NS1F2/NS1R2)

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RT-PCR products of NS1 gene

M, DNA Marker DL2000; 1. NS1 gene PCR product (NS1F1/NS1R1); 2. NS1 gene PCR product (NS1F2/NS1R2)

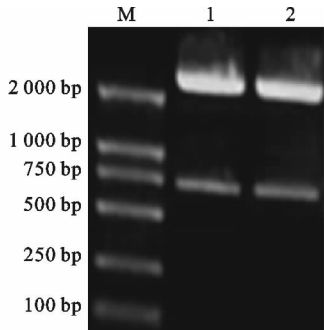


图 2 NS1 基因重组质粒的酶切鉴定
M, DNA Marker DL2000; 1. PMD-NS1y 的 *Bam*H I 和 *Xho*L I 双酶切产物; 2. PMD-NS1z 的 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of NS1 gene recombinant plasmid by restriction endonuclease

M, DNA Marker DL2000; 1. PMD-NS1y digested with *Bam*H I and *Xho*L I ; 2. PMD-NS1z digested with *Eco*R I and *Bam*H I

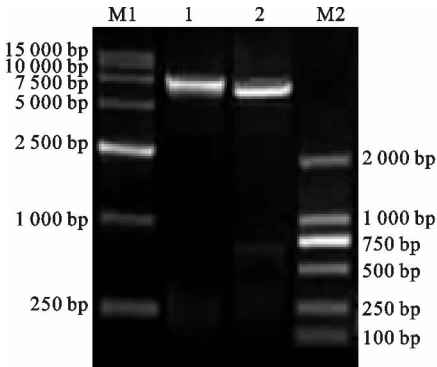


图 3 原核重组质粒 pET-32a-NS1 的酶切鉴定
M1, DNA Marker DL15000; M2, DNA Marker DL2000;
1. *Bam*H I 单酶切 pET-32a-NS1; 2. *Bam*H I 和 *Xho*L I 双酶切 pET-32a-NS1

Fig. 3 Restriction analysis of prokaryotic recombinant plasmid (pET-32a-NS1) with *Bam*H I and *Xho*L I

M1, DNA Marker DL15000; M2, DNA Marker DL2000;
1. Recombinant plasmid digested with *Bam*H I ;
2. Recombinant plasmid digested with *Bam*H I and *Xho*L I

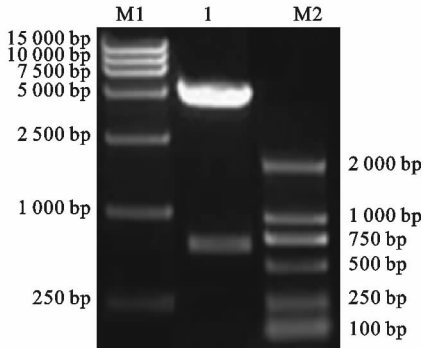


图 4 真核重组质粒 pEGFP-C1-NS1 的酶切鉴定
M1, DNA Marker DL15000; M2, DNA Marker DL2000;
1. *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切 pEGFP-C1-NS1

Fig. 4 Restriction analysis of recombinant eukaryotic expression plasmid (pEGFP-C1-NS1) digested with *Eco*R I and *Bam*H I

M1, DNA Marker DL15000; M2, DNA Marker DL2000;
1. Recombinant plasmid digested with *Eco*R I and *Bam*H I

2.4 NS1 基因原核表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析

SDS-PAGE 电泳结果显示，得到了预期的蛋白条带，其分子质量约为 44 ku，而空载体样品未出现此特异性条带(图 5)，初步表明该 44 ku 蛋白表达条带为 pET-32a-NS1 的表达产物。Western-blotting 分析结果显示，原核表达的 NS1 融合蛋白在约 44 ku 处出现阳性条带(图 6)，表明所表达的蛋白具有

免疫学活性，判定所表达的蛋白为 NS1 蛋白。

2.5 转染真核重组质粒 293 细胞的荧光显微观察结果

构建的 pEGFP-C1-NS1 重组质粒在转染 293 细胞 24 h 后，荧光显微镜下观察发现，空载体 pEGFP-C1 和重组质粒 pEGFP-C1-NS1 转染组细胞均可见绿色荧光，空载体对照组绿色荧光弥散于整个细胞中，而重组质粒试验组荧光则明显集中于核内，

与预期相符,表明 NS1 在体外成功获得了表达。

2.6 NS1 基因真核表达产物的 Western-blotting 分析

转染重组质粒 pEGFP-C1-NS1 的细胞样品在

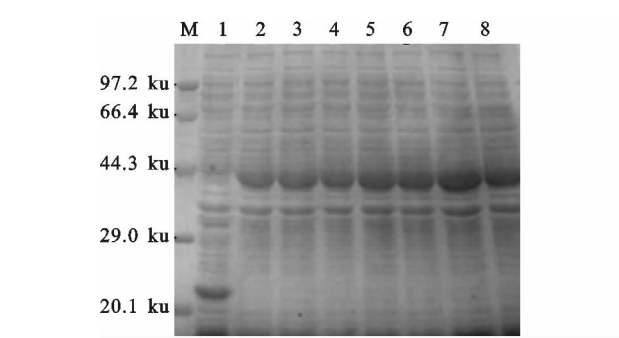


图 5 NS1 基因在 BL21(DE3)宿主菌中的表达
M. 蛋白质分子量标准;1. pET-32a(+)空载体菌;
2~8. 诱导 5 h 后的 pET-32a-NS1 重组菌

Fig. 5 Expression of NS1 in *E. coli* BL21(DE3)
M. Protein molecular weight Marker;
1. Negative control of pET-32a(+) induced by IPTG;
2-8. pET-32a-NS1 induced by IPTG

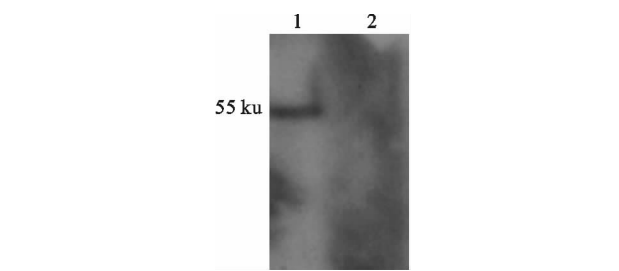


图 7 pEGFP-C1-NS1 转染 293 细胞的
Western-blotting 检测

1. 转染 pEGFP-C1-NS1 质粒的细胞;2. 未转染的细胞
Fig. 7 pEGFP-C1-NS1 transfected 293 cells
in Western-blotting test

1. Cells transfected with pEGFP-C1-NS1;2. Cells untransfected

3 讨 论

(1) 由于流感病毒可能是唯一一个可以在几个月内使世界上人群大量感染的病原体,所以被称为“人类最后的大瘟疫”,引起了世界各国的高度重视,因此防止禽流感的发生与传播成为研究的重点之一^[3]。传统的流感灭活疫苗,虽然可以抑制免疫动物出现临床症状和死亡,但不能阻止感染和排毒,而 HI、ELISA 等常规检测结构蛋白抗体的方法无法区分自然感染动物与灭活疫苗免疫动物,这给禽流感的监测增加了难度。NS1 蛋白由于其自身的特点,在疫苗免疫和野毒感染禽的鉴别诊断方面有着广阔的应用前景。Birch-Marchin 等^[4]和 Ozaki 等^[5]分

约 55 ku 处与 H9N2 亚型阳性抗血清有特异性反应,出现目的条带,而阴性对照在此处无任何条带(图 7),表明重组质粒在 293 细胞中成功表达。

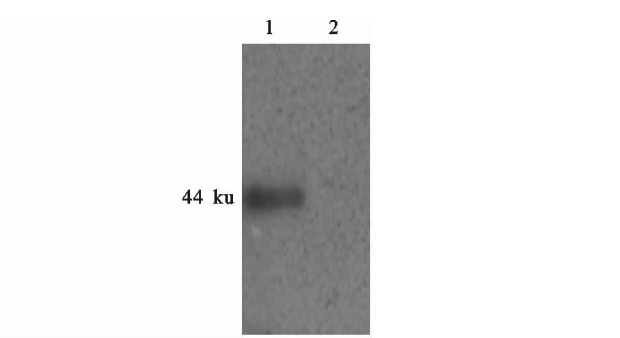


图 6 NS1 表达蛋白的 Western-blotting 鉴定
1. 重组质粒 pET-32a-NS1 与多抗 IgG 的反应;
2. 空载体质粒

Fig. 6 Identification of the specificity of expressed NS1 products by Western-blotting
1. Expression of fusion protein;2. Negative control

别应用 ELISA 技术检测 NS1 抗体,能成功地区分流感病毒感染马和灭活疫苗免疫马。Tumpey 等^[6]引用重组 NS1 蛋白和人工合成的 NS1 多肽(NS1₂₉₋₄₁和 NS1₃₆₋₄₈)作为抗原,建立了区分野毒感染鸡群和灭活疫苗免疫鸡群的方法。王兆鹏等^[7]利用禽流感病毒重组 NS1 蛋白作为检测抗原,建立了检测 AIV NS1 的间接阻断 ELISA 方法,显示了良好的应用前景,但目前尚无商品化的针对禽流感病毒的 NS1 抗体 ELISA 检测试剂盒。

(2) 本研究采用 RT-PCR 方法克隆出 1 株 H9N2 亚型禽流感病毒 WN 分离株 NS1 基因,阳性克隆测序结果表明,克隆的 H9N2 亚型禽流感病毒 WN 分离株 NS1 基因与预期结果相符。NS1 基因序列分析表明,WN 分离株 NS1 基因序列与 GenBank 公布的国内其他 H9N2 禽流感病毒 NS1 基因的核苷酸同源性为 96%~98%,氨基酸同源性为 87%~97%;与中国香港和国外分离株相比,合成的 NS1 基因在羧基端有 13 个氨基酸的缺失,只存在点突变,没有氨基酸插入现象,这符合中国大陆 H9N2 禽流感病毒分离株的标志特征^[8-9]。

(3) NS1 蛋白在流感病毒复制及与细胞蛋白的相互作用中发挥着重要作用。NS1 蛋白决定了病毒在宿主细胞内的破坏作用,对阐明流感病毒的致病机理有重要意义^[10]。NS1 蛋白具有抗 I 型干扰素的作用,能拮抗干扰素的抗 A 型流感病毒感染作

用^[11]。Falcón 等^[12]研究发现,NS1 蛋白参与控制病毒的转录过程,同时在病毒从细胞核到细胞质的转运过程中起关键作用。Zhirnov 等^[13]研究发现,NS1 蛋白对细胞凋亡起负调控作用。因此,研究 NS1 蛋白的功能,对禽流感这种人畜共患病的预防和治疗有重要的意义。本研究构建了 NS1 基因的真核表达载体,用其瞬时转染 293 细胞,对转染 48 h 后裂解的 293 细胞进行 Western-blotting 检测,得到约 55 ku 的特异性条带(pEGFP-C1 载体的分子量为 33 ku,NS1 基因的分子量约为 23 ku),与预期结果相符,表明转染细胞中 NS1 蛋白得到成功表达,且具有良好的免疫学活性。同时,利用融合表达方式在大肠杆菌中表达 NS1 基因,SDS-PAGE 结果显示,NS1 基因在大肠杆菌中得到成功表达;Western-blotting 得到约 44 ku 的特异性条带(pET-32a(+))载体的分子量为 21 ku,NS1 基因的分子量约为 23 ku),证实表达的蛋白具有良好的免疫学活性。NS1 基因在 293 细胞和大肠杆菌中的成功表达,为进一步研究 NS1 蛋白的功能及其与宿主的相互作用提供了依据,同时也为制备禽流感疫苗免疫禽和野毒感染禽的 ELISA 诊断试剂盒提供了物质基础。

[参考文献]

[1] 侯云德. 分子病毒学 [M]. 北京:学苑出版社,1990:321-322.
Hou Y D. Molecular virology [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1990:321-322. (in Chinese)

[2] 赵凤菊,李井春,赵玉军. 禽流感病毒非结构蛋白的研究进展 [J]. 吉林畜牧兽医,2006,27(9):15-17.
Zhao F J, Li J C, Zhao Y J. The research progress on avian influenza virus nonstructural protein [J]. Jilin Animal Science and Veterinary Medicine, 2006, 27(9): 15-17. (in Chinese)

[3] 李凯年,逯德山. 关于禽流感发生与传播的历史回顾与研究进展 [J]. 中国动物保健,2008,113(7):90-95.
Li K N, Lu D S. Historical review and research progress of the occurring and spreading of avian influenza virus [J]. China Animal Health, 2008, 113(7): 90-95. (in Chinese)

[4] Birch-Marchin I, Rowan A, Pick J, et al. Expression of the non-structural protein NS1 of equine influenza A virus; detection of

anti-NS1 antibody in post infection equine sera [J]. Virol Methods, 1997, 65(2): 255-263.

[5] Ozaki H, Susim T, Sugita S, et al. Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses [J]. Vet Microbiol, 2001, 82(2): 111-119.

[6] Tumpey T M, Alvarez R, Swayne D E, et al. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, thenonst ructural protein of influenza A virus [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(2): 676-683.

[7] 王兆鹏,尚绪增,孙进华,等. 禽流感病毒 NS1 抗体间接阻断 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2009, 39(7): 612-616.
Wang Z P, Shang X Z, Sun J H, et al. Establishment of an indirect-blocking ELISA for detection of antibodies against NS1 protein of avian influenza virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2009, 39(7): 612-616. (in Chinese)

[8] Caroline Banet-Noach, Alexander Panshin. Genetic analysis of nonstructural genes (NS1 and NS2) of H9N2 and H5N1 viruses recently isolated in Israel [J]. Virus Genes, 2007, 34: 157-168.

[9] 李建丽,陈恩林,李和平,等. H9N2 亚型禽流感病毒 NS1 基因的进化分析 [J]. 病毒学报, 2008, 24(3): 220-226.
Li J L, Cheng E L, Li H P, et al. Genetic analysis of the non-structural gene(NS1) of H9N2 avian influenza viruses isolated in China [J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(3): 220-226. (in Chinese)

[10] Siamak Zohari, Peter Gyarmati, Peter Thore'n, et al. Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006 [J]. Virus Genes, 2008, 36: 117-125.

[11] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, et al. Molecular pathogenesis of influenza a virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12: 171-176.

[12] Falcón A M, Matión R M, Zurcher T, et al. Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein [J]. J Virol, 2004, 78(8): 3880-3888.

[13] Zhirnov O P, Konakova T E, Wolff T, et al. NS1 protein of influenza a virus down-regulates apoptosis [J]. J Virol, 2002, 76(4): 1617-1625.