

网络出版时间:2015-05-11 15:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.06.004

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150511.1502.004.html

NS1 基因主要抗原区的可溶性表达及其 Dot-ELISA 检测方法的建立

赵 朴^{1,2}, 苏红辽³, 刘兴友^{1,2}, 赵 坤^{1,2}, 胡建和^{1,2},
王三虎^{1,2}, 姚四新^{1,2}, 郑玉姝^{1,2}

(1 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2 动物疫病和残留物防控河南省高校工程技术研究中心, 河南 新乡 453003;
3 滑县动物卫生监督所, 河南 安阳 456400)

[摘 要] 【目的】可溶性表达猪流感病毒(SIV) NS1 基因主要抗原区(NS1')蛋白, 获得具有良好抗原性的 NS1'蛋白, 并初步建立检测 NS1 抗体的斑点酶联吸附试验(Dot-ELISA)方法, 为鉴别诊断猪流感病毒感染猪与疫苗免疫猪奠定基础。【方法】以质粒 pET28a-NS1 为模板, PCR 扩增 NS1 基因抗原性较好的区段 NS1', 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后插入 pET-32a(+), 构建 pET32a-NS1', 经 PCR、*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切及 DNA 测序鉴定后, 转化大肠杆菌 Rosetta, 用 IPTG 诱导表达, 纯化 NS1' 并免疫家兔制备多克隆血清, 对其进行 SDS-PAGE、Western blotting 检测和免疫荧光分析, 并以纯化的 NS1' 作为包被抗原初步建立 Dot-ELISA 检测方法。【结果】PCR 扩增获得了长约 250 bp 的 H3N2 SIV NS1' 片段; 成功构建了重组载体 pET32a-NS1'; SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果显示, 融合蛋白 NS1' 大小约 34 ku, 该蛋白可溶, 能与感染 SIV 的猪血清特异性反应, 并且用纯化蛋白 NS1' 制备的多克隆血清能识别 293T 细胞中表达的 NS1, 建立的 Dot-ELISA 检测方法可鉴别猪流感病毒感染猪与疫苗免疫猪。【结论】实现了 H3N2 SIV NS1' 蛋白的可溶性表达, 表达产物具有良好的抗原性, 以 NS1' 作为包被抗原, 建立了检测 NS1 抗体的 Dot-ELISA 方法。

[关键词] 猪流感病毒; 非结构蛋白 1; 主要抗原区域; 可溶性表达; 斑点酶联免疫吸附试验

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)06-0035-06

Soluble expression of main antigen region of NS1 gene from H3N2 SIV in Henan and development of Dot-ELISA detection method

ZHAO Pu^{1,2}, SU Hong-liao³, LIU Xing-you^{1,2}, ZHAO Kun^{1,2},
HU Jian-he^{1,2}, WANG San-hu^{1,2}, YAO Si-xin^{1,2}, ZHENG Yu-shu^{1,2}

(1 Department of Animal Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 Research Center for Animal Diseases Control and Residues Supervision, Xinxiang, Henan 453003, China;

3 Huaxian Animal Hygienic Supervision Institute, Anyang, Henan 456400, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to express the soluble main antigen region(NS1') of NS1 gene, acquire NS1' with good antigenicity, and develop Dot-ELISA method for detecting NS1 antibody so as to differentiate infected from vaccinated pigs. 【Method】 Using pET28a-NS1 as template, NS1' of H3N2 SIV in Henan was amplified by PCR, digested with *EcoR* I and *Xho* I and cloned into prokaryotic expression vector pET-32a(+). The recombinant pET32a-NS1' was identified by PCR, *EcoR* I / *Xho* I digestion

[收稿日期] 2014-11-11

[基金项目] 河南省基础与前沿技术项目(122300410135); 河南省教育厅自然科学研究项目(2011A230008)

[作者简介] 赵 朴(1975—), 男, 河南南阳人, 讲师, 硕士, 主要从事动物病毒学及免疫学研究。E-mail: zhpu2008@163.com

[通信作者] 郑玉姝(1977—), 女, 内蒙古赤峰人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒学及免疫学研究。

E-mail: yszheng2003@163.com

and DNA sequencing. Expression of NS1' was induced by IPTG in Rosetta and purified, and immune serum was prepared by vaccinating rabbits. The recombinant NS1' was then analyzed by SDS-PAGE, Western blotting and immunofluorescence. Using NS1' as coating antigen, Dot-ELISA detection method was developed. 【Result】 NS1' of H3N2 SIV with length of ~ 250 bp was amplified by PCR and the recombinant pET32a-NS1' was constructed. SDS-PAGE and Western blotting showed that the expressed protein NS1' was ~ 34 ku and soluble and it also reacted specifically with serum from pig infected with SIV. Immune serum prepared with NS1' recognized NS1 expressed in 293T cells. The established Dot-ELISA method was able to differentiate infected pigs from vaccinated pigs. 【Conclusion】 NS1' was successfully expressed in soluble form, expressed NS1' has good antigenicity and Dot-ELISA method for detecting NS1 antibody was developed.

Key words: swine influenza virus; nonstructural protein 1; major antigen region; soluble expression; Dot-ELISA

猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)不仅是猪呼吸系统综合征的重要病原体,给养猪业造成了重大的经济损失,而且严重威胁人类健康^[1-4]。2009 年 H1N1 猪流感病毒引发的流感大流行^[5]再次警示人们,控制猪流感即是从源头上控制人流感。因此,监测猪群中流行流感病毒的情况显得尤为迫切,而建立能够鉴别猪流感人工免疫与猪流感病毒感染的诊断方法是有效监测的前提。

A 型流感病毒非结构蛋白 1 (Nonstructural protein 1, NS1) 是 A 型流感病毒重要的毒力因子^[6-8],仅在流感病毒感染过程中表达,因此猪流感灭活疫苗免疫猪对 NS1 的抗体呈阴性,而 SIV 感染猪的 NS1 抗体呈阳性。另外,NS1 是 H3N2 SIV 毒力基因,其缺失后可使病毒毒力大大降低,用缺失 NS1 基因的 H3N2 SIV 鼻内免疫猪,可针对 H3N2 SIV(包括抗原变异株)攻毒产生很好的保护作用,对异型 H1N1 病毒攻毒也可产生部分保护作用^[9-10],并且免疫猪不产生 NS1 抗体^[11]。因此,检测 NS1 抗体,能够区分流感疫苗免疫猪(包括灭活疫苗和 NS1 缺失突变弱毒苗)和流感病毒自然感染猪。

本课题组先前已经表达了 H3N2 SIV 河南分离株 NS1 基因^[12],但表达产物存在于包涵体中,变性与复性耗时费力,并且蛋白大量析出,不便于获得大量具有活性的 NS1 蛋白。为获得可溶性 NS1 蛋白,本研究分析了 NS1 的主要抗原区域(NS1'),并进行克隆、表达,获得了 NS1' 蛋白,SDS-PAGE、Western blotting 和间接免疫荧光表明,表达的蛋白能够与 SIV 感染猪血清发生特异性反应,具有良好的抗原性,并以纯化的 NS1' 作为包被抗原初步建立了检测 NS1 抗体的斑点酶联吸附试验(Dot-ELISA),现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌毒株、质粒、细胞和试验动物 受体菌 Rosetta、293T 细胞、载体 pET-32a(+) 和 pcDNA3.1 均由动物疫病和残留物防控河南省高校工程技术研究中心保存;含 SIV A/swine/Henan/2/2008(H3N2) NS1 基因的 pET28a-NS1 和 pcDNA3.1-NS1 载体由河南科技学院动物科学学院中心实验室构建并保存;普通级健康成年雌性新西兰兔 2 只购自河南新乡医学院实验动物中心。

1.1.2 试剂 Taq DNA 聚合酶、EcoR I 和 Xho I 内切酶及 DNA 小量胶回收试剂盒,购自 Takara 公司;T4 DNA 连接酶和 Lipofectamine 2000,购自 Invitrogen 公司;HRP 标记羊抗猪 IgG,购自 Abcam 公司;Immobilon ECL 发光液,购自 Millipore 公司;Thermo Scientific BCA 蛋白定量试剂盒,购自赛默飞世尔科技公司;弗氏不完全佐剂和弗氏完全佐剂,购自 Sigma 公司;SIV 感染猪血清,采自 A/swine/Henan/2/2008(H3N2) 分离猪场的感染康复猪, -80°C 冻存。

1.1.3 引物设计与合成 根据 A/swine/Henan/2/2008(H3N2) NS1 基因序列,利用 primer5.0 设计 1 对扩增 NS1' 的引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列为(下划线分别为 EcoR I 和 Xho I 酶切位点):上游引物 5'-CTCGAATTCATGGATTCCAACACTGTGTCAAG-3',下游引物 5'-ATACTCGAGTCATTAGGAGGCCATGGTC-ATTTTAAGTG-3'。

1.2 NS1' 基因的 PCR 扩增

反应体系为 $50\ \mu\text{L}$: $10\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲

液 5 μL , 100 倍稀释的 pET28a-NS1 质粒 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 20 pmol/L 上、下游引物各 1.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 灭菌去离子水补足 50 μL ; 反应条件是 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。以质粒 pET28a-NS1 为模板, 在 PTC-100 基因扩增仪上扩增。取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶成像仪检查扩增结果。

1.3 pET32a-NS1' 的构建及鉴定

将 NS1' 基因 PCR 产物纯化, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后切胶回收, 与经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切并胶回收的表达载体 pET-32a(+) 连接, 连接体系为: NS1' 基因 3 μL , pET-32a(+) 1 μL , 5 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μL , T4 DNA 连接酶 1 μL , 灭菌去离子水补足 10 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。将连接产物转化入受体菌 Rosetta, 涂布于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14~16 h, 挑取单个菌落, 培养后进行 PCR 鉴定, 并提取质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 阳性重组质粒命名为 pET32a-NS1'。将阳性重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。NCBI BLAST 分析测序结果。

1.4 pET32a-NS1' 的诱导表达

分别挑取转化表达载体 pET-32a(+) 和 pET32a-NS1' 的 Rosetta, 接种于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 A_{600} 为 0.5~0.6, 然后按 1:100 的体积比加入含有 Amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2~3 h (A_{600} 为 0.5~0.6), 加入 0.1 mol/L IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养 5 h, 吸取诱导表达产物备用。

1.5 重组蛋白 NS1' 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测

1.5.1 SDS-PAGE 检测 将 1.4 中的诱导培养物, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 000 r/min 离心 10 min, 收集诱导表达菌体, PBS 洗涤 3 次, 用 1/10 菌液体积的 PBS 重悬菌体, 冰浴超声 5 次 (10 s/次) 裂解菌体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, 12% SDS-PAGE 分析表达蛋白的可溶性, 用考马斯亮蓝染色液染色, 脱色, 检测表达蛋白。同时设未诱导的 pET32a-NS1' 及诱导的 pET-32a(+) 为对照。

1.5.2 Western blotting 检测 利用 Western blotting 技术检测表达产物的反应原性。利用伯乐半干式电转仪于 15 V 下电转 30 min, 将 SDS-

PAGE 凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC), 50 g/L 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, PBST 洗涤 5 次, 将 SIV 感染猪血清 (1:100 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次, 加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记羊抗猪 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次。暗室内, 将保鲜膜紧密铺于暗盒, 蛋白面朝上放入洗涤好的 NC 膜, 均匀涂上 ECL 发光液, 折回保鲜膜覆盖 NC 膜, 再将 X 胶片放于 NC 膜上, 盖紧暗盒, 曝光 10~15 min, 取出 X 胶片, 经显影-水洗-定影, 晾干, 保存结果。同时设未诱导的 pET32a-NS1' 及诱导的 pET-32a(+) 为对照。

1.6 NS1' 免疫血清的制备

镍柱亲和纯化 NS1', 按 Thermo Scientific BCA 蛋白定量试剂盒操作说明, 采用 BCA 法测定纯化的 NS1' 蛋白质量浓度为 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 超滤管浓缩至 1.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 600 μL 纯化蛋白溶液 (含 600 μg 蛋白) 与等体积弗氏完全佐剂混合, 乳化, 多点背部皮内、皮下免疫健康成年新西兰兔 2 只, 400 $\mu\text{L}/\text{只}$, 21 d 后, 用弗氏不完全佐剂制备疫苗 (方法同弗氏完全佐剂), 400 $\mu\text{L}/\text{只}$ 加强免疫, 21 d 后耳缘静脉采血, 琼脂扩散试验测定效价, 当效价达 1:32 时 (如达不到, 再次加强免疫), 心脏采血, 分离血清, 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.7 NS1' 免疫血清的有效性

用 96 孔板培养 293T 细胞备用。质粒转染按 Lipofectamine 2000 操作说明进行: Lipofectamine 2000 0.5 μL 和 200 ng pcDNA3.1-NS1 分别稀释于 25 μL 无血清 DMEM 中, 孵育 5 min, 两者混合并轻轻混匀, 室温放置 20 min, 加入转染融合度达 80% 的 293T 细胞, 4~6 h 后更换培养基, 转染 48 h 后利用 1.6 制备的兔血清作为一抗, FITC 标记羊抗兔为二抗, 进行免疫荧光检测。以 pcDNA3.1 为对照。

1.8 Dot-ELISA 方法的建立

以纯化的 NS1' 作为包被抗原建立检测 NS1 抗体的 Dot-ELISA, 方法如下: 剪取适当大小的硝酸纤维素膜, 以 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为起始质量浓度进行 2 倍比稀释纯化 NS1', 每点加样 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱干燥, 50 g/L 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤 5 次后, 将 1:100 稀释的 H3N2 SIV 感染猪血清 (对照为 H3N2 灭活疫苗免疫猪血清) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次, 用 1:3 000 稀释 HRP 标记的羊抗猪 IgG 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, PBST 洗涤 5 次, 置于 AEC 显色液中, 至出现明显斑点后, 蒸馏水漂洗终止显色, 拍照记录结果。

2 结果与分析

2.1 NS1'基因的 PCR 扩增

PCR 扩增获得了长度约为 250 bp 的 NS1' 基因片段(图 1),与预期片段长度一致。

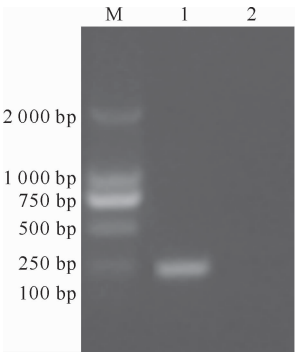


图 1 NS1' 基因的 PCR 扩增
M, DL2000 Marker; 1, NS1' PCR 产物; 2, 阴性对照

Fig. 1 PCR amplification of NS1' gene

M, DL2000 Marker; 1, PCR products of NS1'; 2, Negative control

2.2 pET32a-NS1'的鉴定

pET32a-NS1' PCR 扩增获得了约 250 bp 的片段(图 2-A), pET32a-NS1'的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定获得了约 5 300 和 250 bp 的 DNA 片段(图 2-B),与预期片段大小一致,表明 NS1' 基因已成功插入 pET-32a(+) 载体。NCBI BLAST 分析结果表明,扩增基因与国内外多株 SIV NS1 基因对应序列的同源性 $\geq 99.5\%$ 。

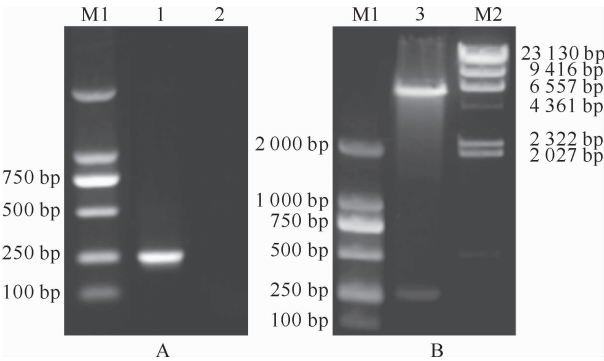


图 2 pET32a-NS1'的 PCR(A)及双酶切(B)鉴定
M1, DL2000 Marker; M2, λ -Hind III digest DNA Marker;
1, pET32a-NS1' PCR 产物; 2, 阴性对照; 3, pET32a-NS1'
EcoR I 和 *Xho* I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of pET32a-NS1' by PCR(A) and double enzyme digestion (B)

M1, DL2000 Marker; M2, λ -Hind III digest DNA Marker;
1, PCR product of pET32a-NS1'; 2, Negative control;
3, pET32a-NS1' digested with *EcoR* I and *Xho* I

2.3 重组蛋白 NS1'的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 检测结果(图 3-A)显示, pET32a-NS1'经 IPTG 诱导表达了约 34 ku 的重组蛋白,而未诱导 pET32a-NS1'转化菌和诱导的 pET-32a(+) 转化菌则未见相应条带,与预期结果一致,并且目的蛋白条带主要存在于超声裂解菌离心后的上清中,表明 NS1 主要抗原区为可溶性表达。

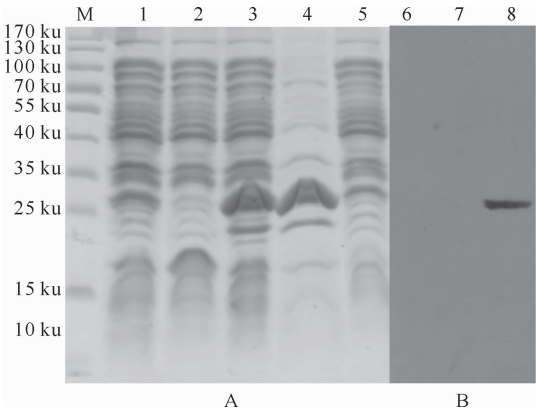


图 3 NS1'重组蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B)检测

M, Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder;
1, 6, 未诱导重组质粒 pET32a-NS1'表达产物; 2, 7, 诱导质粒
pET-32a(+)表达产物; 3, 8, 诱导重组质粒 pET32a-NS1'表达产物;
4, 诱导重组质粒 pET32a-NS1'上清; 5, 诱导重组质粒
pET32a-NS1'沉淀

Fig. 3 SDS-PAGE(A) and Western blotting (B) of NS1' recombinant protein

M, Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder;
1, 6, Expression of non-induced recombinant plasmid pET32a-NS1';
2, 7, Expression of induced plasmid pET-32a(+); 3, 8, Expression of
induced recombinant plasmid pET32a-NS1'; 4, Supernatant of
induced recombinant plasmid pET32a-NS1'; 5, Pellet of induced
recombinant plasmid pET32a-NS1'

2.4 重组蛋白 NS1'反应原性的检测

Western blotting 结果(图 3-B)表明, pET32a-NS1'诱导菌在约 34 ku 处有特异性条带,而未诱导 pET32a-NS1'转化菌和诱导的 pET-32a(+) 转化菌则未见相应条带,表明诱导菌中表达的 NS1' 蛋白能够与 SIV 感染阳性血清发生特异性反应。

2.5 重组蛋白 NS1'免疫原性的检测

免疫荧光试验结果表明, pcDNA3. 1-NS1 转染的 293T 细胞具有特异性绿色荧光(图 4-A),而 pcDNA3. 1 转染的 293T 细胞则没有绿色荧光(图 4-B),这说明用重组蛋白 NS1'制备的兔血清能与 pcDNA3. 1-NS1 表达的 NS1 发生特异性反应,具有良好的免疫原性。

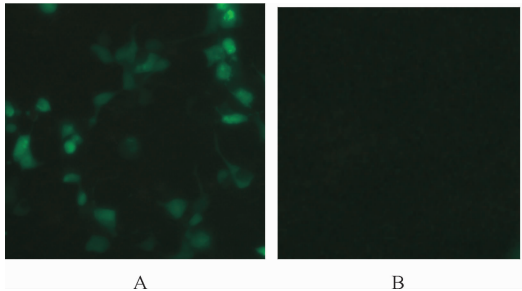


图 4 免疫荧光分析 NS1' 抗血清的反应性(100×)
A. 转染 pcDNA3.1-NS1 的 293T 细胞;
B. 转染 pcDNA3.1 的 293T 细胞

Fig. 4 Reactivity of NS1' antiserum analyzed by immunofluorescence(100×)

A. 293T transfected with pcDNA3.1-NS1;
B. 293T transfected with pcDNA3.1

2.6 Dot-ELISA 方法的建立

由 Dot-ELISA 显色结果(图 5-A)可推算,纯化 NS1' 能与 H3N2 SIV 感染猪血清反应,且呈现可见斑

点的最小量是 32.5 ng/μL,而在对照(图 5-B)中,以等量的纯化 NS1' 与 H3N2 灭活疫苗免疫猪血清反应,没有可见斑点,表明能将重组 NS1' 蛋白作为 Dot-ELISA 的包被抗原,来鉴别诊断 SIV 感染猪和灭活疫苗免疫猪。

3 讨 论

NS1 是 A 型流感病毒的重要多功能毒力因子^[7],并且在 A 型流感病毒中较为保守^[13]。由于猪流感灭活疫苗和 NS1 缺失致弱 SIV 免疫猪不能产生针对 NS1 的抗体,而流感病毒感染猪可产生 NS1 抗体,因此,NS1 抗体是鉴别猪流感病毒感染猪与疫苗免疫猪的理想靶标。为制备 NS1 抗原,多个研究小组都表达了 SIV NS1^[11,14-15],但表达的重组蛋白 NS1 都存在于包涵体中,需要经过变性、复性、透析等复杂过程,才能获得有活性的 NS1 蛋白,不仅耗时费力,而且目的蛋白大量析出。

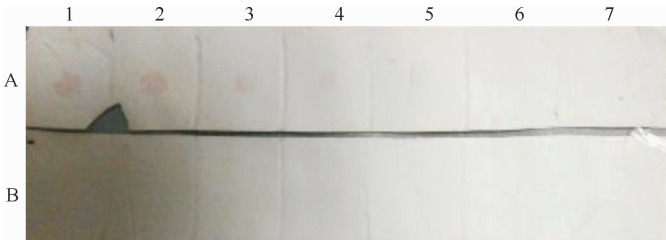


图 5 重组蛋白 NS1' Dot-ELISA 方法的建立
A. NS1' 与 SIV 感染猪血清反应;B. NS1' 与灭活疫苗免疫猪血清反应;1~7. NS1' 质量浓度分别为 260,130,65,32.5,16.3 和 8.2 ng/μL

Fig. 5 Development of recombinant NS1' Dot-ELISA

A. Reaction of NS1' with the serum from pig infected with SIV;B. Reaction of NS1' with the serum from pig immunized with inactivated vaccine;1-7. Concentrations of NS1' are 260,130,65,32.5,16.3 and 8.2 ng/μL, respectively

为了获得可溶性重组 NS1,本研究从 NS1 蛋白、表达载体及表达菌株三方面进行改进,在利用 DNASTAR 分析 SIV A/swine/Henan/2/2008 (H3N2) NS1 主要抗原区的基础上,设计 1 对扩增 NS1 主要抗原区(NS1')的引物,PCR 扩增 NS1';为增加 NS1' 的可溶性,NS1' 酶切后插入 pET-32a(+),构建 pET32a-NS1';由于 Rosetta 菌株可补充大肠杆菌缺乏的 7 种稀有密码子(AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA 及 CGG)对应的 tRNA,因此有助于提高外源基因表达水平,并能促进目的蛋白的可溶性表达,因此,选用 Rosetta 菌株作为表达系统。结果表明,本研究成功表达了可溶性的 H3N2 SIV NS1',该蛋白具有良好的抗原性,并可用作包被抗原建立检测 NS1 抗体的 Dot-ELISA,为鉴别诊断猪流感病毒感染猪和疫苗免疫猪奠定了基

础,为有效监测猪群中流行的流感病毒提供了有效工具。另外,在 NCBI BLAST 分析中发现,本研究得到的 H3N2 亚型 SIV 河南株 NS1 的主要抗原区 NS1',与国内外多个 SIV 毒株 NS1 基因对应序列的同源性≥99.5%,有的可达 100%,这说明将 NS1' 用作诊断抗原具有较好的代表性和实用性。

[参考文献]

[1] 赵 朴,郑玉妹,李海燕. 猪流感: 一个不容忽视的人兽共患病[J]. 中国兽医杂志,2008,44(9):54-56.
Zhao P,Zheng Y S,Li H Y. Swine influenza; Zoonoses which should not be ignored [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2008,44(9):54-56. (in Chinese)
[2] Vincent A L, Ma W, Lager K M, et al. Swine influenza viruses a North American perspective [J]. Adv Virus Res,2008,72:127-154.

- [3] Myers K P, Olsen C W, Gray G C. Cases of swine influenza in humans: A review of the literature [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44 (8): 1084-1088.
- [4] Ma W, Lager K M, Vincent A L, et al. The role of swine in the generation of novel influenza viruses [J]. Zoonoses Public Health, 2009, 56(6/7): 326-337.
- [5] Smith G J, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [6] 赵 朴, 郑玉姝, 贾贝贝, 等. NS1A 在 A 型流感病毒感染中的作用 [J]. 生命的化学, 2008, 28(2): 140-142.
Zhao P, Zheng Y S, Jia B B, et al. Roles of NS1A in the viral infection [J]. Chemistry of Life, 2008, 28(2): 140-142. (in Chinese)
- [7] Hale B G, Randall R E, Ortin J, et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses [J]. J Gen Virol, 2008, 89 (Pt 10): 2359-2376.
- [8] Engel D A. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target [J]. Antiviral Res, 2013, 99(3): 409-416.
- [9] Vincent A L, Ma W, Lager K M, et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine [J]. Vaccine, 2007, 25(47): 7999-8009.
- [10] Kappes M A, Sandbulte M R, Platt R, et al. Vaccination with NS1-truncated H3N2 swine influenza virus primes T cells and confers cross-protection against an H1N1 heterosubtypic challenge in pigs [J]. Vaccine, 2012, 30(2): 280-288.
- [11] Richt J A, Lekcharoensuk P, Lager K M, et al. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine [J]. J Virol, 2006, 80(22): 11009-11018.
- [12] 赵 朴, 赵 坤, 贾贝贝, 等. H3N2 SIV 河南分离株 NS1 基因的克隆及原核表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(6): 665-667.
Zhao P, Zhao K, Jia B B, et al. Cloning and prokaryotic expression of nonstructural protein 1 gene of a H3N2 SIV isolate from Henan province, China [J]. Chinese Journal of Biologics, 2011, 24(6): 665-667. (in Chinese)
- [13] Ozaki H, Sugiura 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.
- [14] 王方昆, 袁秀芳, 王一成, 等. H9N2 亚型猪流感病毒 NS1 基因的克隆表达及反应原性分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41 (2): 587-592.
Wang F K, Yuan X F, Wang Y C, et al. Cloning, prokaryotic expression and antigenicity analyzing of NS1 gene of H9N2 swine influenza virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41 (2): 587-592. (in Chinese)
- [15] 张 博, 郭万柱, 徐志文, 等. H3N2 亚型猪流感病毒 NS1 基因的克隆表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2011, 31(3): 297-302.
Zhang B, Guo W Z, Xu Z W, et al. Cloning and expression of swine influenza virus subtype H3N2 and establishment of an indirect ELISA [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(3): 297-302. (in Chinese)

(上接第 34 页)

- [7] 郝凤奇, 李景梅, 杨桂连. 乳酸菌 Nisin 诱导表达载体的构建和鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2012(8): 624-628.
Hao F Q, Li J M, Yang G L. Construction and application of Nisin-controlled expression plasmid for *Lactococcus acidophilus* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012 (8): 624-628. (in Chinese)
- [8] Frankel G, Candy D C, Everest P, et al. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei* [J]. Infection and Immunity, 1994, 62(5): 1835-1842.
- [9] 孙 晖, 赵爱兰, 白向宁, 等. 不同来源肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 分离株 eae 基因分析 [J]. 实用预防医学, 2014, 21(7): 773-776.
Sun H, Zhao A L, Bai X N, et al. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human beings and different animal species [J]. Practical Preventive Medicine, 2014, 21(7): 773-776. (in Chinese)
- [10] Murphy, Kenneth. Immunobiology [M]. 7th ed. New York, America: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008: 462-464.
- [11] Shortman K, Liu Y J. Mouse and human dendritic cell subtypes [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(3): 151-161.
- [12] van Baaren P, Wells J M, Kleerebezem M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli [J]. Trends in Immunology, 2013, 34(5): 208-215.
- [13] Craig L M, Charles O E, Robin D H, et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system [J]. Nature, 2012, 489: 231-241.
- [14] Richman L K, Graeff A S, Strober W. Antigen presentation by macrophage-enriched cells from the mouse Peyer's patch [J]. Cellular Immunology, 1981, 62(1): 110-118.