

H1 亚型猪流感病毒血凝素基因在昆虫细胞中的表达及其间接 ELISA 方法的初步建立

万春和, 刘明, 刘春国, 张晓霖, 杨涛, 刘大飞, 陈浩, 齐金龙, 乔传玲

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 农业部动物流感重点开放实验室, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要: 根据 GenBank 发表的 H1 亚型猪流感 HA 基因序列设计引物, 扩增出 HA 基因片段, 将其克隆到 pFastBacGP67B 杆状病毒载体上, 筛选阳性重组转座载体 pFastBacGP67B-H1, 转化含有杆状病毒穿梭载体(bacmid)的 *DH10Bac* 感受态细胞, 构建杆状病毒表达载体获得重组转座子(rBacmid-H1), 在脂质体介导下转染 sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒(rBV-H1), 再感染细胞, 收获目的蛋白。通过血凝试验、免疫印迹法、免疫组化分析表明该蛋白得到表达, 且具有良好的生物学活性。利用表达的蛋白作为猪流感间接 ELISA 的抗原, 初步建立 H1 亚型猪流感的间接 ELISA 检测方法, 并对内蒙古、辽宁和黑龙江等地送检的 93 份猪血清进行了检测, 阳性率为 31.18%, 为研制开发快速、准确、简便的 H1 亚型猪流感鉴别诊断试剂盒奠定基础。

关键词: H1 亚型猪流感病毒; 血凝素基因; 昆虫细胞杆状病毒表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0220-06

猪流感是由猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV) 是由正粘病毒科 A 型流感病毒引起的不同日龄、性别和品种猪只的一种急性、热性和高度接触性的呼吸道传染病, 其临床上以突发、高热、咳嗽、呼吸困难、衰竭和死亡为特征。1918 年美国首次报道了 SI 的暴发, 1930 年 Shope 从猪体中首次分离到了 H1N1 亚型猪流感病毒。迄今为止, 已发现的 SIV 包括 H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N1、H4N6、H5N1 和 H9N2^[1-5] 等亚型。SI 已遍布美、欧、亚、非等世界各地, 是一种世界性的猪呼吸道传染病。

当前的流感疫苗主要是针对诱导产生中和抗体的表面糖蛋白血凝素(HA), HA 是流感病毒最重要的表面抗原, 它具有与细胞表面病毒特异性受体结合、介导病毒外膜与细胞内体融合释放病毒核衣壳进入胞浆, 以及刺激机体产生中和性抗体等作用^[6]。禽流感有 16 个 HA 和 9 个 NA 亚型^[7], 且各亚型之间诱导

的抗体不能相互交叉保护, 这就给禽流感防制带来极大的困难。但是, 常见的猪流感主要有 H1N1、H1N2 和 H3N2 等 3 种亚型, 这在一定程度上为猪流感的防控提供便利。本实验通过杆状病毒昆虫细胞表达系统表达 H1 亚型猪流感 HA 蛋白, 并利用其作为抗原初步建立检测 H1 亚型猪流感间接 ELISA 方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌种: 杆状病毒载体 pFastBacGP67B 由兽医生物技术国家重点实验室构建, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH10Bac 和 Top10 感受态细胞由中国农科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室制备并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: Ex-Taq 酶、T4 DNA 连接酶、

基金项目: 国家“973 项目”(2005CB523202); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD06A05)

*通讯作者。Tel: +86-451-85935069; E-mail: liuming04@126.com

作者简介: 万春和(1982-), 男, 湖北鄂州人, 硕士研究生, 主要从事动物流感病毒分子生物学研究。E-mail: chunhewan@126.com

收稿日期: 2007-06-07; 修回日期: 2007-11-12

限制性内切酶、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 邻苯二胺(OPD)、质粒提取试剂盒和小量胶回收试剂盒购自上海华舜公司; CellFectin 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 抗 His 单抗购自天为时代公司; 山羊抗小鼠 IgG/辣根酶(HRP)标记购自中杉金桥公司; 羊抗猪 IgG/辣根酶(HRP)标记购自 Southern Biotech 公司; PCR 仪购自 M J Research 公司; 超声波破碎仪购自 Cole Parmer 公司; 酶标仪购自 Bio-Rad 公司; 离心机购自 Beckman 公司。其它试剂均为商业公司购买的分析纯。

1.1.3 病毒和血清: 猪流感病毒株 A/Swine/Guangdong/LM/05(H1N1)(以下简称 LM 株)以及抗血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存, 猪标准阴性血清、猪繁殖呼吸综合征(PRRS)、猪伪狂犬(PR)、猪瘟(HC)、猪细小病(PP)、猪口蹄疫(FMD)、猪传染性胃肠炎(TGE)、猪圆环病毒(PC)、流行性乙型脑炎(JE)阳性血清由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室保存。现地血清来自内蒙古、辽宁和黑龙江等地。

1.1.4 引物设计: 参照 GenBank 发表的 H1 亚型猪流感 HA 基因序列, 设计合成 HA 基因的特异性上下游引物, 在上下游引物的 5' 端分别引入的 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点, 用下划线表示, 并在下游引物引入 6*His 标签, 用方框表示。上游引物为: 5'-CGCGGA-TCCGACACACTATGTATAGGTTAC-3'; 下游引物为: 5'-GCGAAGCTTCTA GTGATGGTGATGGTGAT GATCGCCAAAATTTGGTAAAT-3'。

通用引物(M13)序列参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统使用手册, 所有引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 杆状病毒表达载体的构建和重组杆状病毒的制备

1.2.1 目的基因的扩增: 按文献[8]提取病毒 LM 株的 RNA, 合成的 cDNA, 用设计的特异性引物对 HA 基因片段进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃ 4min; 94℃ 30s, 56℃ 45s, 72℃ 2min, 循环 30 次; 72℃ 10min。PCR 产物用上海华舜公司胶回收(小量)试剂盒回收。

1.2.2 重组转座载体的构建: 将胶回收 PCR 产物和 pFastBacGP67B 载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后分别回收, 在 16℃ 连接 1h, 转化 *Top10* 感受态细胞, 筛选出阳性重组质粒(pFastBacGP67B-H1), 经酶切初步鉴定后, 将阳性重组载体送由上海英俊生物技术有限公司测序进行鉴定, 并分析测序结果。

1.2.3 重组杆状病毒转移载体的构建: 将阳性重组转座载体 pFastBacGP67B-H1, 转化含有杆状病毒穿梭载体(bacmid)的 *DH10Bac* 感受态细胞, 构建杆状病毒表达载体, 通过蓝白斑筛选重组转座子 rBacmid-H1, 并提取其质粒 DNA, 用 PCR 鉴定。

1.2.4 重组杆状病毒的制备: 按照 Invitrogen Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 使用说明书进行, 将重组转座子 rBacmid-H1 的 DNA 在脂质体介导下转染对数生长期的 sf9 昆虫细胞。经过 3 轮纯化后, 收获高滴度的含有 HA 基因的重组杆状病毒(rBV-H1)种子液。

1.3 表达蛋白的生物学活性检测

1.3.1 重组表达蛋白的血凝活性(HA)检测: 将重组病毒 rBV-H1 以 10 倍感染复数(MOI=10)感染 sf9 细胞 84h 后弃去培养基, 用 PBS 洗 3 次, 刮取底层细胞用 PBS 重悬, 在冰水浴条件下超声破碎离心取上清, 进行微量血凝活性测定, 设以野生型病毒感染的细胞收获的上清对照和 PBS 阴性对照。

1.3.2 重组表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析: 参照文献[9], 取重组病毒感染细胞裂解物上清用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE。将电泳后的凝胶进行转印硝酸纤维素膜, 一抗为 H1 亚型猪流感阳性血清(1:100), 二抗为羊抗猪 IgG/辣根酶(HRP)标记(1:5000), 以野生型病毒感染的细胞上清为阴性对照, 按常规步骤做 Western blot。

1.3.3 重组表达蛋白的免疫组化检测: 参照文献[10], 将重组病毒 rBV-H1 感染 sf9 细胞 72h 后弃去培养基上清, 用 PBS 洗 3 次后用多聚甲醛固定, 以抗 His 单抗(1:1000)为一抗、山羊抗小鼠 IgG/辣根酶(HRP)标记(1:3000)为二抗, 以野生型病毒感染的细胞为阴性对照, 按常规步骤做重组蛋白的细胞免疫组化。

1.4 间接 ELISA 的初步建立

参照文献^[11], 通过交叉连续稀释法确定 ELISA 血清样品稀释度、封闭剂封闭时间、一抗最佳作用时间和酶标二抗最佳作用时间, 初步建立检测 H1 亚型猪流感间接 ELISA 方法。以 OD 值大于 {阴性血清平均值(X)+3 标准差(S)} 判为阳性, 以 OD 值小于 (X+2S) 为阴性, 两者之间为可疑, 重复检测一次, 大于 (X+3S) 判为阳性, 其它均判为阴性。

1.5 特异性试验

在确定好的同一条件下, 对猪繁殖呼吸综合征

(PRRS)、猪伪狂犬(PR)、猪瘟(HC)、猪细小病(PP)、猪口蹄疫(FMD)、猪传染性胃肠炎(TGE)、猪圆环病毒(PC)、流行性乙型脑炎(JE)8种常见猪传染病的阳性血清和 H3 亚型猪流感阳性血清、以野生型病毒感染的细胞收获的上清、猪标准阴性血清为阴性对照, H1 阳性猪流感阴性血清为阳性对照, 进行间接 ELISA 测定, 每次测两遍, 取平均值。

1.6 临床送检样品的检测

根据初步建立的 ELISA 条件, 对内蒙古、辽宁和黑龙江等地现地送检的 93 份猪血清样品进行检测, 每个样品测两次, 同时设阳、阴性对照, 用酶标仪测定 OD_{490} 值后取平均值。并同时对这 93 份猪血清样品进行了 H1 亚型 SIV 的血凝抑制(HI)试验平行比较试验。试验前将猪血清样品进行如下处理: 先将猪血清用 50%的鸡红细胞(RBCs)在 4℃颠倒孵育 30min, 后 2000 r/min 离心 10 min, 收集上清后, 向其中加入受体破坏酶(RDE)37℃过夜来除去血清中的非特异性血清抑制因子, 最后, 56℃水浴 1h 来除去 RDE 的作用。

2 结果

2.1 杆状病毒表达载体的构建和重组杆状病毒的制备

2.1.1 pFastBacGP67B-H1 的构建: pFastBacGP67B-H1 载体经 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切后, 分别切出约 4.8kb 和 1.6kb 的片段, 与预期的相符。经测序进一步序列分析进一步验证插入的基因含有 LM 毒株 HA 基因完整的开放阅读框架, 并且序列正确。

2.1.2 重组转座子 rBacmid-H1 的 PCR 鉴定: 以 rBacmid-H1 的 DNA 为模板, 用 M13 通用上、下游引物进行 PCR 扩增出约 4.1kb(2.5 kb + 1.6 kb)的片段, 与预期的相符, 表明 HA 基因已经转座成功。

2.2 表达蛋白的生物学活性检测

2.2.1 血凝试验: 待重组病毒 rBV-H1 感染对数生长期 Sf9 细胞 84h 后收获细胞, 在冰水浴条件下超声破碎, 离心取上清检测其血凝价时最高为 2^2 , 而以野生型病毒感染的细胞裂解上清则无血凝价。

2.2.2 表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot: 将重组病毒感染细胞裂解上清用 12%的分离胶进行 SDS-PAGE, 结果在 57kDa 左右可见表达产物, 和预期大小一致(图 1-A 箭头)。Western-blot 检测, 在约 57kDa 处出现特异性印迹, 而野生型病毒感染的 sf9 细胞在此位置没有出现特异性印迹(图 1-B 箭头)。

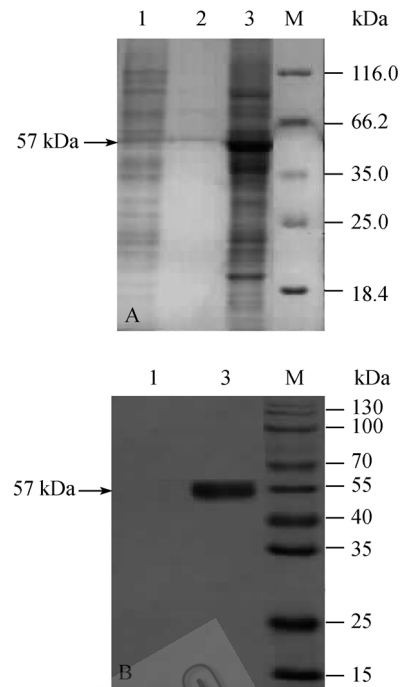


图 1 HA 蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western-blot(B)

Fig.1 SDS-PAGE analysis (A) and Western blot analysis (B) of the HA expression. 1. Control of sf9 cells infected by Bacmid; 2. Control of 1×SDS Buffer; 3. HA protein expressed in Sf9 cells infected recombinant baculovirus; M. protein Marker.

2.2.3 免疫组化: 结果显示(图 2 箭头), 重组病毒 rBV-H1 感染的细胞有大量的细胞着色; 而以野生型

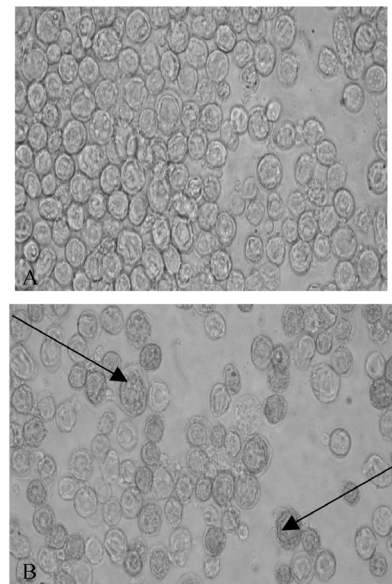


图 2 野生型病毒感染的细胞(A)和 rBV-H1 感染的细胞(B) (400×)

Fig.2 A Bacmid transfected sf9 cells (A) and rBV-H1 transfected sf9 cells (B) (400×).

病毒感染的细胞中就没有，表明重组目的蛋白在昆虫细胞中能良好表达。

2.3 间接 ELISA 条件的初步确立

一抗(猪血清样品)的最适稀释度为 1:800, 二抗(HRP 标记羊抗猪 IgG)的作用浓度为 1:3000, 封闭剂、一抗和二抗的最适作用时间均为 1.5 h, 显色时间为 37℃ 避光反应 8 min。本实验阴性血清的 X 值为 0.07381, S 值为 0.03796, 即 OD 值大于(X+3S≈0.2)为阳性, OD 值小于(X+2S≈0.15)为阴性, 两者之间为疑似, 对疑似样品重复检测一次, 将 OD 值大于 0.2 判为阳性, 其它均判为阴性。

2.4 特异性试验

特异性试验结果显示(表 1), 其它 8 中常见猪传染病血清样品 OD 值均小于 0.15, H3 阳性血清和野生型病毒感染的细胞收获的上清 OD 值也都小于 0.15, 均判为阴性, H1 阳性猪流感血清 OD 值为 0.978, 即没有交叉反应。

2.5 送检样品的结果分析

共检测送检的猪血清样品 93 份, 结果见表 2, 有 29 份血清样品呈阳性, 阳性率为 31.18%。HI 试验有 24 份血清样品呈阳性, 阳性率为 25.81%, 和 ELISA 所检测结果有 29 份阳性血清样品相比, 符合率为 94.62%, 可见间接 ELISA 方法比 HI 试验方法敏感。

表 1 特异性试验结果
Table 1 Results of cross test of indirect ELISA

Other diseases positive sera in pig								Swine influenza control		Cell control
PRRS	PR	HC	PP	FMD	TGE	PC	JE	Negative control(H3)	Positive control(H1)	Negative control(bacmid)
0.124	0.107	0.089	0.094	0.079	0.118	0.124	0.114	0.114	0.978	0.097

表 2 猪血清检测结果
Table 2 The result of sera test

Sample	Positive		Negative		Sum	Seropositivity rates/%	
	ELISA	HI test	ELISA	HI test		ELISA	HI test
Inner Mongolia(内蒙古)	5	4	5	6	10	50	40
Liaoning(辽宁)	13	11	27	29	40	32.5	27.5
Heilongjiang(黑龙江)	11	9	32	34	43	25.58	20.93
In sum	29	24	64	69	93	31.18	25.81

3 讨论

传统疫苗在疾病的防制过程中发挥了重要的作用, 随着科学技术尤其是现代分子生物学技术的发展, 研究人员研发出很多能够诱导机体免疫保护的候选疫苗。HA 基因因其良好的免疫原性使其成为流感基因工程疫苗的首选, 其主要是将 HA 等保护性抗原导入某种表达系统, 获得大量的重组蛋白免疫动物激发动物机体保护性免疫反应, 并在禽流感疫苗研制方面已有相关报道。杆状病毒表达系统由于具有宿主范围广、表达量高、后加工修饰系统完备、使用安全等优点而被人们广泛应用于基因工程、药物开发、疫苗生产等方面, 迄今为止已有数百个基因利用此系统得到了高效表达^[12, 13]。本研究利用 Bac-to-Bac 昆虫细胞杆状病毒表达系统在昆虫细胞中成功表达

H1 亚型 SIV 的 HA 蛋白, 分子量约 57kDa。HA 试验表明所表达的蛋白有血凝活性, 而血凝活性(即鸡红细胞的凝集活性)是血凝素蛋白的主要生物学活性, 至今未见到原核表达的 HA 蛋白具有血凝活性的报道。Western blot 和免疫组化检测结果表明: HA 蛋白能够被 H1 亚型 SIV 抗血清所特异性识别, 证明所表达的 HA 蛋白具有很好的免疫学活性。同时, 本试验所表达的重组蛋白带有 His 标签, 十分有利于蛋白的分离纯化等下游工作的顺利进行。

猪可充当人流感和禽流感病毒的混合器, 是人、禽流感发生重组、重配的主要场所, 猪流感病毒在流感病毒分子生物学和流感病毒传播过程中具有特殊的地位^[14, 15]。近年来, 国内外均有大量重组猪流感病毒被分离的报道^[16~20], 因此, 就迫切需要对猪群做流感病毒的流行病学调查。目前, 国内外常用的猪流

感血清学检测方法主要琼脂扩散试验(AGP)、HI 试验和 ELISA。但是, 由于猪血清中含有非特异性红细胞凝集因子和非特异性血凝抑制因子会给 AGP、HI 试验导致非特异性反应, 甚至假阳性, 在实际应用中还无需预处理, 操作过程复杂、耗时长、且敏感性不高。而且, HI 试验和 ELISA 在检测结果的敏感性上有一定的差异, 不利于猪流感病毒的早期诊断^[20, 21]。而国内尚没有商品化的可用于检测猪血清中流感抗体抗 HA 蛋白单因子血清和分型鉴别诊断 ELISA 试剂盒, 本研究利用杆状病毒表达 H1 亚型 SIV HA 蛋白, 为猪流感的抗 HA 蛋白的单因子血清的制备和 ELISA 分型鉴别诊断试剂盒的研制打下的基础。为掌握猪群中流感病毒的流行病学情况, 从而预测人类流感的发生发展趋势, 具有十分重要的公共卫生学意义。

本试验中对 93 份现地送检猪血清进行 ELISA 检测, 发现其阳性率为 31.18%, 表明在我国北方的某些省份猪群中已广泛存在有 H1 亚型的猪流感病毒, 对猪群接种商业化的猪流感疫苗已迫在眉睫。但阳性猪群感染的流感病毒具体的神经氨酸酶(NA)亚型为 N1 还是 N2、抑或其他亚型, 是否存在同时感染多种亚型的猪流感病毒和(或)多种流感基因片段重组的猪流感病毒, 还有待于我们做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Qi X, Lu CP. Genetic characterization of novel reassortant H1N2 influenza A viruses isolated from pigs in southeastern China. *Arch Virol*, 2006, 151(11): 2289–2299.
- [2] Brown IH, Hill ML, Harris PA, *et al.* Genetic characterization of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. *Arch Virol*, 1997, 142(6): 1045–1050.
- [3] Karasin AI, Brown IH, Carman S, *et al.* Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol*, 2000, 74(19): 9322–9327.
- [4] Xu C, Fan W, Wei R, *et al.* Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus. *Microbes Infect*, 2004, 6(10): 919–925.
- [5] 李海燕, 于康震, 杨焕良, 等. 中国猪源 H5N1 和 H9N2 亚型流感病毒的分离鉴定. *中国预防兽医学报*(*Chinese Journal of preventive Veterinary Medicine*), 2004, 26(1): 1–6.
- [6] Shvartsman DE, Kotler M, Tall RD, *et al.* Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *Cell Biol*, 2003, 163(4): 879–888.
- [7] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814–2822.
- [8] 潘蔚琦, 刘明, 刘春国, 等. 一株对小鼠具有高致病性的 H5N1 亚型禽流感病毒的拯救. *农业生物技术学报*(*Journal of Agricultural Biotechnology*), 2006, 14(6): 831–835.
- [9] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- [11] 郑其升, 张晓勇, 刘华雷, 等. H5N1 亚型禽流感血凝素基因的原核表达及间接 ELISA 方法的初步建立. *微生物学报*(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(1): 58–61.
- [12] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL, *et al.* Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5): 567–575.
- [13] 张晓霖, 刘明, 刘春国, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因在昆虫细胞中的表达及其生物活性鉴定. *中国生物工程杂志*(*Journal of Chinese Biotechnology*), 2007, 27(3): 42–46.
- [14] Ito T, Couceiro JN, Kelm S, *et al.* Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Virus with Pandemic Potential. *J Virol*, 1998, 72(9): 7367–7373.
- [15] Kamps B, Hoffmann C, Preiser W. *Influenza Report 2006*. Paris: Flying Publisher, 2006.
- [16] Olsen, CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*, 2002, 85(2), 199–210.
- [17] Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, *et al.* Influenza: emergence and control. *J Virol*, 2004, 78(17): 8951–8959.
- [18] Ma WJ, Gramer M, Rossow K, *et al.* Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the Midwestern United States. *J Virol*, 2006, 80(10): 5092–5096.
- [19] Chen JM, Ma HC, Chen JW, *et al.* A preliminary panorama of the diversity of N1 subtypes influenza viruses. *Virus Genes*, 2007, 35(1): 33–40.
- [20] Yoon KJ, Janke BH, Swalla RW, *et al.* Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza virus. *J Vet Diagn Invest*, 2004, 16(3): 197–201.
- [21] Jung K, Song DS, Kang BK, *et al.* Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea. *Preventive Veterinary Medicine*, 2007, 79(4): 294–303.

Baculovirus expression and establishment of the indirect ELISA for the HA gene of swine influenza virus H1 subtype

Chunhe Wan, Ming Liu, Chunguo Liu, Xiaoji Zhang, Tao Yang, Dafei Liu, Hao Chen, Jinlong Qi, Chuanling Qiao

(Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China)

Abstract: The hemagglutinin (HA) gene fragment of swine influenza virus A/Swine/Guangdong/LM/05(H1N1) was amplified with HA gene specific primers and cloned into baculovirus transfer plasmid pFASTBacGP67B. The recombinant plasmid pFastBacGP67B-H1 was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing. Following the transformation of DH10Bac *Escherichia coli* component cells by pFastBacGP67B-H1, recombinant bacmids rBacmid-H1 were identified by blue/white selection and PCR analysis. Then recombinant baculovirus rBV-H1 was rescued by lipofectant reagent Cellfectin induced rBacmid-H1 DNA transfection of long-phage sf9 insect cells. The recombinant HA protein was characterized by hemagglutination test, western-blot and immunohistochemistry. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was assessed to detect in pigs IgG against H1 subtype SIV present in Inner Mongolia, Liaoning and Heilongjiang provinces. Positive was found in 31.15% (29 of 93) serum samples tested from swine reared in commercial herds. However, all irrelevant control sera tested were negative. We conclude, therefore, that ELISA performed with recombinant HA as coating antigen was a better tool for swine influenza surveillance in China.

Keywords: H1 subtype SIV; HA gene; baculovirus/insect cell system; indirect ELISA

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523202) and the 11th Five Years Programs for Science and Technology Development Support of China (2006BAD06A05)

*Corresponding author. Tel: +86-451-85935069; E-mail: liuming04@126.com

Received: 7 June 2007/Revised: 12 November 2007

答 作 者 问

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后，即将发表，如果想调整作者并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：(1) 如变单位署名顺序，需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信，证明内容：原署名顺序—现署名顺序—盖章。(2) 如变更作者署名顺序，需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容：原作者姓名及顺序—修改之后的作者姓名及顺序。(3) 将此证明信邮寄回编辑部，新的变更即可生效。