

文章编号:1003-8701(2010)01-0038-04

昆虫杆状病毒表达系统在禽流感病毒研究中的应用

韩庆功,崔艳红,刘保国

(河南科技学院动物科学学院,河南 新乡 453003)

摘要: 禽流感的防控,主要在疫苗的免疫和平时的监测以及发病后的快速诊断等多个方面采取综合措施才能取得较好效果,这就需要建立快速、特异的诊断、检测方法以及不断开发新型疫苗用于禽流感的免疫。昆虫杆状病毒表达系统(BEVS)因具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点,现已成功表达了近千种高价值蛋白。其在禽流感病毒中的应用,为禽流感防控所需的特异性抗原、诊断、检测方法的建立,新型基因工程疫苗的开发奠定了基础。

关键词: 昆虫杆状病毒;表达系统;禽流感病毒

中图分类号:S858.3

文献标识码:A

Application of Baculovirus-insect Cell Expression System in Studies of Avian Influenza Virus

HAN Qing-gong, CUI Yan-hong, LIU Bao-guo

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science
and Technology, Xin xiang 453003, China)

Abstract: To prevent Avian Influenza, comprehensive measures must be taken, for example, the immunization of vaccine, the usual test and quick diagnostic after falling ill, etc. It requests that rapid specific methods of diagnostic and test for the virus must be established and new types of vaccine developed continually. Baculovirus-insect cell expression system has successfully expressed about a thousand highly valued proteins, for it has perfect processing and decorating system after translation and the ability to express the external genes efficiently. The application of this system in Avian influenza virus laid a basis for producing specific antigen for preventing Avian Influenza, the discovery of diagnostic-test-method, and the development of new types of genetic engineering vaccine.

Keywords: Insect baculovirus; Expression system; Avian influenza virus

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科、流感病毒属、A型流感病毒引起的禽类感染和/或疾病综合征。1878年首次发生于意大利,现已几乎遍布全世界。尤其是近年暴发的H5N1亚型高致病性禽流感不仅引起禽类的大面积发病、死亡,更对人类健康构成了严重威胁。加强流行病学监测和采取疫苗免疫是防治禽流感发生的主要措施和关键环节。因此,特异性诊断抗原的制备和新型疫苗的开发在禽流感的防控中就显得尤为重要。

昆虫杆状病毒系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)作为一种真核表达载体系统,具有安全性高,对外源基因克隆容量大,重组病毒易于筛选,具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点^[1],目前已成为基因工程四大表达系统(即杆状病毒、大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统)之一。现就昆虫杆状病毒系统在禽流感病毒研究中的应用做一综述。

1 昆虫杆状病毒表达系统的优越性

与其他表达系统相比,杆状病毒表达系统具有以下优越性:①杆状病毒的衣壳和基因组大,

收稿日期:2009-05-01

作者简介:韩庆功(1976-),男,硕士,讲师,从事动物传染病研究。

可容纳 10 kb 左右外源 DNA ,不影响复制 ,还可同时进行多个外源片段的表达 ;②应用晚期蛋白启动子 ,即使外源基因产物对细胞有毒性 ,也不影响表达水平 ,因为在外源基因表达之前 ,大部分病毒与宿主基因已被关闭 ,病毒已完成复制过程并释放出大量成熟的子代病毒 ;③杆状病毒具有明显的宿主界限 ,对脊椎动物无致病性 ,也不能在脊椎动物细胞内复制表达 ,更不能整合 ,因此 ,重组杆状病毒可以被认为是遗传学上最安全的表达载体 ;④多角体蛋白与 p10 基因是非必需片段 ,启动子均很强 ,既为外源性片段提供插入位点 ,又可高水平表达外源基因 ,可称为超高效表达系统 ;⑤外源基因插入多角体蛋白基因的座位引起后者的缺失或失活 ,无多角体蛋白形成 ,失去了病毒粒子天然保护物 - 多角体蛋白晶体 ,故重组病毒在自然环境下极易失活 ,不会造成对人的危害和对环境的污染 ,重组病毒不含包涵体 ,不在环境中长期存在 ,所以更为安全 ;⑥昆虫细胞作为真核细胞能完成外源蛋白的一系列转译后加工修饰 ,表达产物的理化 and 生物学特性与天然产物相似 ;⑦产量高 ,还能感染昆虫活体 ,高效表达。由于该表达系统具有多项优点 ,目前已有病毒、细菌、真菌、动植物等多种生物基因在昆虫细胞或幼虫体内获得高表达。由于其可以容纳大片段外源基因 ,可以使多个基因共表达 ,因此在检测抗原、亚单位疫苗研究方面中更具优势^[2]。

2 昆虫杆状病毒表达系统的研究发展

经典的体内重组策略获得重组病毒的几率仅为 0.1%~10% ,而且需要几轮的噬斑筛选 ,操作复杂耗时 ,且易出现假阳性 ,这在很大程度上制约了该技术的大规模使用 ,特别在需要表达大量不同种类的蛋白时 ,该技术已远远不能满足要求。20 世纪 90 年代 ,开发了病毒线性化技术 ,即将野生型病毒 DNA 从双链环状切开变成线性化 ,然后再与重组转移质粒发生同源重组“救活”病毒。该技术较好地降低了非重组病毒背景 ,提高了重组效率^[3]。但是 ,其阳性重组率也仅为 10%~25%。为了进一步改进昆虫杆状病毒表达系统重组率低、筛选困难、工作周期长等不足之处 ,近几年随着分子生物学技术上的革新 ,重组杆状病毒的构建和筛选也不断地进行改进和优化。目前 ,已建立了绿色荧光蛋白反向筛选标记系统、非重组失活转移载体筛选系统、外源基因直接克隆产生重组杆状病毒系统、酵母-昆虫细胞穿梭载体筛选系统、体

外重组表达筛选系统、大肠杆菌 *E.coli*-昆虫细胞的穿梭载体筛选系统^[4]和杆状病毒-S2 系统^[5]等。但在实际应用中大肠杆菌 *E.coli*-昆虫细胞的穿梭载体筛选系统应用较为广泛 ,该系统是目前 BEVS 中最为方便、快捷的系统 ,整个重组病毒筛选的周期可缩短 7~10 d ,且可以连续筛选。

3 昆虫杆状病毒表达系统在禽流感病毒研究中的应用

3.1 基于病毒 HA、NA 基因的构建和表达

禽流感病毒 HA 基因编码的蛋白可刺激机体产生中和抗体来中和病毒的感染力 ,抵抗感染和疫病发生 ;NA 基因编码的蛋白也可诱发机体产生相应的抗体 ,虽不属于中和抗体 ,但可抑制病毒在体内的扩散 ;也就是说对机体均具有免疫保护作用。

张晓霁^[6]等应用 Bac-to-Bsc 表达系统 ,在大肠埃希氏菌内发生同源重组 ,通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定获得重组杆状病毒穿梭载体 rBacmid-H5。rBacmid-H5 在脂质体介导下转染 sf9 昆虫细胞 ,SDS-PAGE 蛋白电泳、Western blot、血凝试验和血凝抑制试验分析表明:分子量约 63kDa ,重组血凝素蛋白(rH5)在 sf9 昆虫细胞中实现了高效表达。rH5 具有血凝活性 ,而且其血凝活性能够被 H5N1 禽流感病毒高免血清所抑制 ;rH5 免疫鸡诱导产生针对 H5N1 禽流感病毒亚型特异的血凝抑制抗体 ,说明表达的重组蛋白具有与天然蛋白相似的生物活性。以杆状病毒为载体的 HA 蛋白真核表达系统的建立为研制 H5N1 亚型特异的血清学检测方法 ,抗 HA 蛋白的单因子血清以及基因工程亚单位疫苗奠定了基础。同样顿继凤^[7]、费东亮^[8]、温坤^[9]、詹爱军^[10]等用相似的方法 ,构建和表达了 H5N1 亚型不同毒株的 HA 基因 ,通过各项检测分析 ,HA 基因在 sf9 昆虫细胞中获得了正确表达 ,表达的蛋白不仅具有亚型特异性 ,而且有良好的生物反应性。

杨若松^[11]将禽流感病毒的 HA、NA 基因克隆到转移载体 Pfastbackdual 中 ,然后使其转入到杆状病毒 ,经卡那霉素、四环素、庆大霉素抗性 and 蓝白斑筛选得到阳性克隆 ,转染昆虫细胞 ,获得一株重组病毒。H5N1 亚型禽流感病毒 HA、NA 基因在杆状病毒中的重组体的成功构建 ,为禽流感亚单位疫苗的开发奠定了坚实的基础 ,为禽流感的防治工作开阔了更新、更广的空间。

齐岩^[12]利用 pBlueBacHis2 杆状病毒载体在

昆虫细胞 sf9 中表达 H5 亚型禽流感病毒(AIV)的 HA1 基因。Western-blotting 证明 HA1 在昆虫细胞中得到了表达,其产物具有抗原性;且不与 H7, H9 AIV 的抗血清发生交叉反应,具有良好的特异性。Dot-ELISA 结果显示,表达蛋白可以在非变性条件下与相应抗体作用,同样具有良好的抗原性。试验结果证明,表达的 H5 亚型 AIV 的 HA1 蛋白,为检测禽类体内是否感染 H5 亚型 AIV 和监测免疫禽类血清 H5 抗体水平提供了优良的检测抗原。

李永强^[13]采用昆虫细胞内同源重组的方法,将禽流感病毒 A/Goose/GuangDong/1/96 (H5N1) 的 HA 基因亚克隆到杆状病毒转移载体 pBlueBacHis 4.5,筛选到重组质粒命名为 rpBacHisH5HA。测序正确后,在脂质体介导下,与线性化的杆状病毒 DNA(Bac-N-BlueTM DNA)共转染 sf9 昆虫细胞,挑取蓝色蚀斑,经 3 轮蚀斑纯化,获得数株重组杆状病毒 rBacHisH5HA。提取重组病毒 DNA 经 PCR 证明目的基因片段已插入杆状病毒基因组。为表达、纯化 HA 蛋白及研制预防禽和人禽流感病毒亚单位疫苗的研制奠定了基础。MENG^[14]用不同的杆状病毒转移载体,同样的实验方法,获得了高效表达的 HA 基因蛋白,将其定量乳化后,免疫小鼠,三免后用致死剂量的 HPAIV H5N1 攻击小鼠,免疫组小鼠提供了 100% 的保护力,而对照组小鼠先后发病且死亡;这为研制禽流感 H5N1 亚型病毒亚单位疫苗、防制禽流感奠定了基础。

3.2 基于病毒核蛋白(NP)基因的构建和表达

核蛋白(NP)是禽流感病毒的主要蛋白成分,具有种群和型的特异性,是流感型分类和诊断的基础,并且较为保守,大部分突变为无义突变,基于这一特点,使其成为流感病毒诊断用抗原的理想靶蛋白;另外,NP 还能诱导机体的细胞免疫,产生一定的免疫保护性,同时具有良好的种间交叉反应性,不受 AIV 亚型的影响,这为新型、广谱禽流感疫苗的研制指明了新的研究方向。

万春和^[15]根据 GenBank 上登录的 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒(HPAIV)核蛋白(NP)基因序列设计引物,通过 PCR 扩增出 A/Goose/HLJ/QFY/04(H5N1)毒株的 NP 基因片段,将其克隆到 pFast-BacGP67B 杆状病毒载体上,将筛选的阳性重组转座载体 pFastBacGP67B-NP 转化至含有杆状病毒穿梭载体的 DH10Bac 感受态细胞,经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定,构建了杆状病毒表达载体,获得了重组转座子(rBacmid-NP),在脂质体介导下转染对数

生长期的 sf9 昆虫细胞,获得重组杆状病毒(rBv-NP)。SDS-PAGE 分析、Western-blotting 检测、免疫组化分析和 ELISA 试验结果表明,分子质量约为 54 ku 的重组核蛋白得到了高效表达,并且具有良好的生物学活性。NP 的真核表达为新型、广谱流感疫苗的开发提供了一种新思路。

3.3 基于病毒基质蛋白(M 蛋白)的构建和表达

M 蛋白在各种亚型的流感病毒中均保守,且可诱导机体产生特异性抗体,可作为构建广谱基因疫苗的目的蛋白和流感病毒感染诊断用抗原的理想蛋白。

王幼明^[16]从 pUCM1 质粒中亚克隆禽流感病毒 M 基因至转移载体 pFastBac1 质粒,PCR 鉴定后,转化 DH10Bac 感受态细胞。提取重组杆粒 rBacM,以 M13 为通用引物作 PCR 分析,证明 M 基因已转入其中。用 Cellfectin 试剂包裹 rBacM 杆粒转染 sf9 细胞,96 h 收取感染细胞。细胞表达产物裂解后作 SDS-PAGE 蛋白电泳和 Western-blot 分析,证明 M 基因在昆虫细胞中成功表达且具有与天然 M1 蛋白相似的活性。琼脂扩散试验结果进一步证明,重组 M1 蛋白可作为诊断抗原。

3.4 基于病毒非结构蛋白(NS 蛋白)的构建和表达

NS1 蛋白是 AIV 的非结构蛋白之一,非结构蛋白的出现仅仅限于病毒的感染期,可刺激动物机体产生相应抗体,注射灭活疫苗后由于病毒不复制,不会产生针对 NS1 蛋白的抗体,因而利用 NS1 蛋白作为诊断试剂可鉴别鸡群 AIV 自然感染或灭活疫苗免疫^[17]。

刘春国^[18]将 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV)NS1 基因插入到杆状病毒转移载体 pFastBac1 中,获得重组转移载体 pFastBac1-NS1。将 pFastBac1-NS1 转化到 DH10Bac 感受态细胞中,筛选到重组转座子 rBacmid-NS1。在脂质体转染试剂介导下将 rBacmid-NS1 转染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞获得重组杆状病毒 rBV-NS1。rBV-NS1 感染 sf9 细胞后,通过 SDS-PAGE、Western blot 和 ELISA 分析表明:获得了分子量为 26kDa 的特异性 NS1 蛋白;并且该蛋白可与 H5N1 AIV 攻毒鸭的血清发生特异性免疫反应,而不能与 H5N1AIV 灭活疫苗免疫鸭的血清发生反应。试验结果表明:NS1 在 sf9 昆虫细胞中获得了高效表达,具有与天然蛋白相似的免疫活性,并可以作为区分免疫及自然感染个体的鉴别诊断抗原,为建立禽流感病毒自然感染家禽与禽流感灭活疫苗免疫家禽的鉴别

诊断方法奠定了基础。刘波^[19]分别构建了大肠杆菌表达载体 pET- NS1 和昆虫杆状病毒转移载体 pFast- NS1, 将 H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因分别在大肠杆菌和昆虫细胞中进行表达, NS1 基因在大肠杆菌和昆虫细胞中得到成功表达, 为获得大量 NS1 蛋白进行功能研究及抗体制备奠定了基础。詹爱军^[20]用相似的方法, 获得重组穿梭载体 Bacmid- H5NS1, 然后将其转染昆虫细胞 High Five 中, 试验结果表明, NS1 基因在 High Five 细胞中得到了表达, 而且表达的产物具有特异免疫学反应性。

4 结 语

当前, 对于禽流感的防控, 我国主要采取预防为主, 免疫与扑杀相结合的综合防控措施, 并取得显著成效。应用型特异性禽流感疫苗免疫是预防和控制禽流感的主要措施、关键环节和最后防线。因此, 禽流感的实时监测、快速诊断和新型疫苗的开发是目前研究的重点。

昆虫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、使用安全等优点被人们广泛应用。尤其是其表达产物接近天然产物且可同时进行多基因表达, 这为诊断抗原的制备, 亚单位疫苗的研制奠定了良好的基础, 使得禽流感检测中型的区分、亚型的区分、疫苗免疫与野毒感染的区分、诊断的特异性和疫苗的保护性、抗原使用的生物安全性均有所提高。目前该表达系统不仅在高致病性禽流感 H5、H7 亚型研究中广泛开展, 而且在低致病性禽流感 H9 亚型中、猪流感病毒 H1 亚型中也广泛应用, 流感病毒的多个基因蛋白被表达, 为流感的诊断和疫苗开发奠定了一定基础。但是, 该表达系统通常使用晚期启动子, 重组杆状病毒外源蛋白表达受病毒晚期启动子的控制, 表达效率很高, 但也会带来一些问题, 例如当蛋白产量出现峰值时, 细胞却由于病毒感染而即将死亡。另一方面, 杆状病毒的基因组学, 特别是功能基因组学的研究还相对薄弱, 有关病毒晚期基因的高表达和调控机制等仍不明了。再者表达产物的纯化和多元表达等方面的技术还不够理想等, 这些都是今后需要进一步研究所要解决的问题。

因此, 目前一方面应重点加强杆状病毒的基因组学, 特别是功能基因组学的深入研究, 一是有助于杆状病毒载体的进一步改良, 王煌^[21]研究表明, 对虾白斑综合症病毒(WSSV)的极早期基因 iel

启动子在昆虫细胞中显示出很强的启动子活性, 能够控制报告基因早期高效表达。这对于重组杆状病毒外源基因的早期表达及开发基于重组杆状病毒的哺乳动物细胞转移载体是十分有价值的, 可用于构建高效基因转移载体以及非复制型载体疫苗和亚单位疫苗的研究; 二是随着一些调节外源蛋白表达的基因结构和功能的深入了解, 通过不断改进使外源基因得到有效调控和高效表达。另一方面, 应加强对昆虫细胞系的研究, 不断改造昆虫细胞系、改进昆虫细胞培养技术, 最终使外源基因高效表达且更加接近天然产物。相信随着生物技术的不断进步, 昆虫杆状病毒表达系统的研究必将更加深入、完善, 其在禽流感疫病诊断和疫苗研制中必将发挥越来越重要的作用, 从而为我国禽流感快速、有效的防控奠定基础。

参考文献:

- [1] Possee R D. Baculoviruses as expression vectors [J]. Curr Opin Biotech, 1997, 8(5):569- 572 .
- [2] 郝 婧. 禽流感病毒 H7 亚型 HA 优化基因的表达[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006 .
- [3] 何芳青, 吴小锋. 昆虫杆状病毒表达系统的新技术[J]. 桑蚕通报, 2008, 39(2):10- 13 .
- [4] 李卫国, 王厚伟, 牟志美, 等. 昆虫重组杆状病毒获得技术研究展望 [J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2003, 34(1): 134- 138 .
- [5] Lee D F, Chen C C, Hsu T A, et al. A baculovirus superinfection system: efficient vehicle for gene transfer into- Drosophila S2 cells [J]. J Virol, 2000, 74(24):11873- 11880 .
- [6] 张晓霁, 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 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3): 42- 46 .
- [7] 顿继凤, 周迎春, 蒲 娟, 等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素在昆虫杆状病毒系统中表达与活性鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(4):547- 551 .
- [8] 费东亮, 金宁一, 马鸣潇, 等. H5 亚型禽流感病毒 HA 基因在重组杆状病毒中的表达及检测 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4):387- 389 .
- [9] 温 坤, 丘立文, 王压娣, 等. 禽流感病毒 H5N1 血凝素基因在昆虫细胞中的表达及鉴定 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(1):20- 23 .
- [10] 詹爱军, 王新卫, 王敬师, 等. H5 亚型 AIV HA 基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达[J]. 中国家禽, 2007, 29(15):20- 23 .
- [11] 杨若松, 李明义, 赵雪丽, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 HA、NA 基因在杆状病毒中的重组体的构建[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(1):22- 23 .
- [12] 齐 岩, 孙凌霄, 王 彬, 等. H5 亚型禽流感病毒 HA1 基因在 Sf9 昆虫细胞中的表达及其抗原性检测 [J]. 中国兽医学, 2006, 36(5):352- 356 .
- [13] 李永强, 孟庆文, 冉多良, 等. 表达带 His- tag 的(下转第 44 页)

短山羊黄体期,达到羊群同期发情的目的。但是,阴道栓(CIDR)对乏情期的山羊或存在持久黄体的山羊作用有限,PMSG 却可以诱导乏情期的山羊发情,PGF_{2a} 可以溶掉有效黄体 and 持久黄体。因此,根据羊群、季节、试验要求等因素综合考虑,阴道栓(CIDR)、PMSG(FSH)和 PGF_{2a} 的组合使用可以收到很好的同期发情效果。另外,做好羊群发情记录,选择有效黄体期羊只做一次 PGF_{2a} 注射或全群两次 PGF_{2a} 注射,以克服黄体不应期。对于 PMSG 的大剂量使用要给予特别注意,大剂量 PMSG 会造成黄体 and 卵泡共存,受体移植受胎率降低,严重的会造成卵巢囊肿,可以考虑配合使用 LH、HCG、LHRH,以提高同期发情羊的排卵率、黄体合格率和移植妊娠率。

参考文献:

- [1] 刘建斌,李发弟,刘月琴,等.非繁殖季节太行山羊胚胎移植方案研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(5):5-9.

(上接第 37 页)对绵羊也有致病性,呈地方性流行。主要经呼吸道传染。感染率高,可达 60% 至更高。潜伏期为 18~20 d。主要表现高烧、咳嗽、呼吸困难、流鼻涕。叩诊时肺部有浊音和实音区,听诊时支气管有摩擦音,按压胸部有疼感。有的发生腹泻,口腔黏膜溃疡、唇、乳房有血疹,孕羊流产。病程稍长,造成羊生长缓慢。主要病变在肺和胸膜,呈纤维素性胸膜肺炎。胸腔积液有絮状纤维素。胸膜增厚而粗糙,也有黄白色纤维素沉着,病程长的,肺和胸膜粘连。

防治措施:坚持自繁自养,不从疫区购羊,必须购入时,要严格检疫、隔离观察。淘汰病羊。

①泰乐菌素:用量成年羊 1 次 10 mL,肌肉注射。

(上接第 41 页)禽流感病毒 HA 基因杆状病毒转移载体的构建及重组病毒的鉴定[J].新疆农业大学学报,2005,28(4):53-55.

- [14] MENG Qing-wen, et al. Protection of Mice against a Lethal Avian H5 Subtype Influenza Challenge by Baculovirus-derived Hemagglutinin Vaccines. 2006, 24(3): 5-8.
- [15] 万春和,刘明,刘春国,等. H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 NP 基因在昆虫细胞中的表达及其表达产物的生物学活性[J].中国兽医科学,2008,38(5):380-385.
- [16] 王幼明,邓国华,于康震,等. 禽流感病毒 GD/1/96 株 M 基因在 s9 昆虫细胞中的表达[J]. 中国兽医科技,2002,32(9):3-5.
- [17] Tumpey T M, Alvarez R, Swayne D E, et al. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on

- [2] 林峰,陈玉霞,高腾云,等. 不同处理方法对波尔山羊胚胎移植效果的影响[J]. 中国农学通报,2005,21(7):10-12.
- [3] 田树军,桑润滋. 不同处理方法对山羊同期发情效果研究[J]. 中国草食动物,2002,22(5):32-34.
- [4] 赵霞. 不同品种山羊作受体对胚胎移植受胎率的影响[J]. 黑龙江动物繁殖,2007,15(1):18-19.
- [5] 何生虎,徐全明. 影响胚胎移植受体羊同期发情效果的因素[J]. 中国兽医科技,2003,33(1):55-57.
- [6] 马群山,韩志强. 不同激素影响山羊同期发情的效果试验[J]. 四川畜牧兽医,2004,31(11):27-28.
- [7] 马保华,张红,李键,等. 山羊胚胎移植受体同期发情优化程序研究[J]. 西南农业学报,2004,17(5):664-667.
- [8] 徐小波,王公金,赵伟,等. 胚胎移植用受体山羊同期发情方法的比较[J]. 畜禽业,2004(5):60-61.
- [9] 陈军,蔡涛,彭涛,等. 重构胚胎移植受体山羊同期发情处理效果比较[J]. 黑龙江动物繁殖,2008,16(2):32-33.
- [10] 杨秀娟,丁建平,据书存,等. 同期发情山羊卵泡发生和胚胎移植妊娠率的研究[J]. 现代农业科技,2008(19):269-270.
- [11] 许斌,马青,吕建明,等. 春季诱导母羊同期发情及 PMSG 有效剂量筛选[J]. 中国草食动物,2004,24(6):23-24.
- [12] 田宁宁,杨玉敏,孟祥辉,等. 不同剂量 PMSG 对夏季波杂山羊诱导发情效果的影响[J]. 动物医学进展,2008,29(6):39-42.

②替米考星:本药为泰乐菌素半合成的大环内酯类抗生素,可用于山羊、绵羊支原体感染的治疗。用量是 10 mg/kg 体重,皮下注射。

③氟苯尼考:用量成年羊 1 次 10 mL,肌肉注射。泰乐菌素与本药连用,上午用泰乐菌素,下午用本药,治疗山羊支原体肺炎,治愈率达 90% 以上。

④恩诺沙星:用量 10~12 mg/kg 体重,混于病羊日粮中饲喂。

参考文献:

- [1] 岳文斌,路建新. 舍饲养羊新技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 黄永宏. 肉羊饲养技术[M]. 南昌:江西科学技术出版社,2002.
- [3] the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus[J]. J Clin Microbiol,2005,43(2):676-683.
- [18] 刘春国,刘明,张云,等. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因在昆虫细胞中的表达[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(6):40-44.
- [19] 刘波,薛仁宇,曹广力,等. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(11):1067-1070.
- [20] 詹爱军,王新卫,王宪文,等. H5 亚型 AIV NS1 基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达[J]. 生物技术通报,2008,(2):191-195.
- [21] 王煌,高辉,陈川,等. 不同启动子在昆虫杆状病毒表达系统中的活性分析[J]. 生物工程学报,2008,24(4):598-603.