

# 人 H5N1 亚型禽流感病毒安徽株 NS1 基因的克隆 及在原核系统的表达

程从升<sup>1</sup>, 蓝雨<sup>1</sup> 柳燕<sup>2</sup> 张智清<sup>1</sup> 舒跃龙<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国疾病预防控制中心病毒病研究所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 100052)

(<sup>2</sup>安徽省疾病预防控制中心 合肥 231000)

**摘 要** 利用 RT-PCR 方法, 从人 H5N1 亚型禽流感病毒安徽株扩增到了 NS1 基因, 对其进行了克隆、序列测定和分析, 并在原核系统高效表达和纯化了 NS1 蛋白。进化分析表明, A/Anhui/01/2005 毒株与近些年国内分离的水禽 H5N1 病毒进化关系更为接近。NS1 与福建、湖南分离的禽流感病毒同源性最高, 分别达到 99.1% 和 98.2%。序列分析表明, 与病毒的致病性相关的 92 位氨基酸为 Asp, 与病毒的细胞因子抗性相关的 80~84 位氨基酸发生缺失, 与断裂/多聚腺苷酸化特异性因子结合的基序改变为 GFEWN 和病毒致死性相关的 PL 基序为 ESEV。随后在大肠杆菌高效表达并纯化了 NS1 蛋白。NS1 基因及其编码产物的特性分析以及在原核系统的表达, 为进一步研究 NS1 的致病机制和抗病毒药物研制奠定了基础。

**关键词**: 禽流感病毒; H5N1; NS1

中图分类号: Q786 Q93 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0418-05

A 型流感病毒基因组包含 8 个片段。NS 是其中最小的一个片段, 在病毒复制时被翻译为一个共线性 mRNA, 最终翻译为 NS1 和 NS2 或 NEP 两个蛋白<sup>[1]</sup>。其中, NS1 蛋白通过结合多聚腺苷酸化的 RNA 和小核 RNA (small nuclear RNAs, snRNA), 阻止前 mRNA 的剪切、抑制宿主细胞 mRNA 的多聚腺苷酸化, 而在病毒的复制和毒力中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。其 RNA 结合活性是基于两个功能区的相互作用: N 末端的 19~38 位氨基酸为 RNA 结合域, 负责结合 mRNA 的 poly(A); 134~161 位氨基酸为效应域, 阻止 mRNA 的核输出。通过 RNA 结合域和断裂/多聚腺苷酸化特异性因子 (CBSF), 使双链 RNA 被隔离开来, 通过效应域抑制多聚腺苷酸化结合蛋白 I, 而这对 RNA 结合域的作用是关键。基于这些区域的作用, NS 蛋白能使病毒逃避宿主细胞的免疫防御, 抑制干扰素及肿瘤坏死因子等介导的抗病毒作用<sup>[3,4]</sup>。

迄今发现的流感病毒有 16 个 HA 亚型、9 个 NA 亚型。其中, H5N1 亚型流感病毒不仅感染禽, 而且还可感染包括人在内的哺乳动物。自 1997 年在香港发现首例人感染 H5N1 亚型流感病毒以来, 随后

又在许多国家和地区发生人感染病例的报道。2005 年 10 月, 我国安徽省发生首例确证的人感染 H5N1 亚型禽流感<sup>[5]</sup>。H5N1 型禽流感病毒的一个重要特征就是很快地在呼吸道系统产生广泛的病变。这种临床特征暗示, 宿主细胞感染病毒后, 病毒很快就增殖到高滴度, 并在细胞间传播。已知 NS1 是 I 型干扰素等参与抗病毒作用细胞因子的拮抗物, NS1 是否参与了这例病毒感染的进程? 为此, 本研究克隆了这株病毒的 NS1 基因, 对其及编码蛋白的特性进行了解析, 以期初步阐明我国人感染 H5N1 型禽流感病毒的 NS1 的分子生物学背景, 随后在原核系统中将 NS1 基因进行表达和纯化, 为 NS1 功能研究和基于 NS1 的抗病毒药物的研制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和毒株**: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 由本室保存, pGEM-Teasy 为 Promega 公司产品; 原核表达载体 pQE-80L 购自 Qiagen (Germany); A/Anhui/01/2005 病毒由国家流感中心提供。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30599433), 国家 973 项目 (2005CB523006)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-63577499; E-mail: yshu@vip.sina.com

作者简介: 程从升 (1972-), 男, 安徽人, 动物病毒学博士。E-mail: cshengc@hotmail.com

其他作者: 姚立红<sup>1</sup>, 温乐英<sup>1</sup>, 王大燕<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 李希妍<sup>1</sup>, 王琦<sup>1</sup>, 赵新生<sup>1</sup>, 黄晶晶<sup>1</sup>, 聂凯<sup>1</sup>, 张晓光<sup>1</sup>

收稿日期: 2006-09-18; 接受日期: 2006-10-13; 修回日期: 2007-01-22

**1.1.2 试剂和仪器:** DNA ladder、*Ex Taq* 聚合酶为 TaKaRa 产品;亲和层析填料 Chelating Sepharose FF 购自 Pharmacia 公司;RNaeasy mini Kit 为 Qiagen 公司产品;Super script II RT Kit、Benchmark™ pre-stained protein marker 为 Invitrogen 公司产品;低分子量蛋白质 Marker 购自华美公司。兔抗山羊 IgG-HR 购自中杉金桥公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

## 1.2 病毒 RNA 的提取及 RT-PCR

将已经鉴定的病毒接种 10 日龄鸡胚。33℃ 培养 48h 后收集鸡胚尿囊液,利用 RNaeasy mini Kit 提取病毒 RNA。提取的 RNA 按 Invitrogen super script II RT Kit 的说明进行反转录。转录得到的 cDNA 产物进行 PCR 扩增。引物序列为 5'-GGATCC GATCCAACACTGTGTC-3'(划线部分为 *Bam*H I 位点)和 5'-CTGCAGTTAAACTTCTGACT CAATTG-3'(划线部分为 *Pst* I 位点),PCR 反应条件:95℃ 5min;95℃ 1min,56℃ 30s,72℃ 1min,共 30 个循环;72℃ 5min。扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶纯化,克隆到 pGEM-Teasy 载体,命名为 pGEM-NS1。重组克隆经限制性内切酶鉴定后,送上海生工生物工程公司测序。

## 1.3 NS 基因的序列测定及序列分析

由上海生工生物工程公司在 ABI377 核酸序列测定仪上测定 DNA 序列。利用 Vector NTI 10.0 advance (Invitrogen)和 DNASTAR Lasergene 6.0 (Clustal W)软件包,将得到的 DNA 序列与流感病毒序列数据库(<http://www.flu.lanl.gov/>)下载的序列进行比对和序列分析,并利用 Mega 3.1 软件构建进化树。随后根据同源建模原理,预测 NS1 的三级结构。

## 1.4 NS1 基因在原核系统的表达

先进行小量表达鉴定。利用 *Bam*H I 和 *Pst* I 自 pGEM-NS1 切下后,与经同样酶消化的 pQE-80L 载体进行连接,得到表达质粒。将该质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,提取质粒。经酶切和序列分析正确后,转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株。过夜培养后,挑取单个菌落接种于 3mL LB 培养基,过夜培养后,1:100 转接到 3mL LB 培养基继续培养。 $OD_{600}$  达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导培养 4h。以 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定是否有蛋白质表达。

大量表达获得目的蛋白。接种菌液至 100mL LB 培养基中,37℃ 培养 1.5h。 $OD_{600}$  达 1.5 左右,加入 IPTG 至 1mmol/L,37℃ 诱导 4h。8000r/min 离心 10min,收集菌体。超声破碎后,12000r/min 离心

30min,上清和重悬后的沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。若表达在沉淀中,进一步进行包涵体洗涤。

## 1.5 重组蛋白的纯化

重组蛋白 N 端融合表达了 His 标签,因此利用金属螯合层析进行纯化。先以 0.2mol/L 硫酸镍溶液处理 Qiagen Chelating sepharose 填料,得到金属螯合层析介质,以 10 个床体积的溶液 A (50mmol/L Tris·Cl,100mmol/L NaCl,6mol/L 盐酸胍,10mmol/L 咪唑,pH8.26)充分平衡填料。将要纯化的蛋白粗品(包涵体)用溶液 A 裂解,然后摇床上轻摇,混合介质与蛋白达 3h。装柱后,以溶液 A 洗脱 5 个床体积,溶液 B (50mmol/L Tris·Cl,100mmol/L NaCl,6mol/L 盐酸胍,20mmol/L 咪唑,pH8.26)洗脱 5 个床体积,随后用 5 个床体积溶液 C (50mmol/L Tris·Cl,100mmol/L NaCl,6mol/L 盐酸胍,100mmol/L 咪唑,pH8.26)洗脱。根据紫外检测仪和记录仪,收集各峰,SDS-PAGE 鉴定目标蛋白。经鉴定的蛋白,在含 4mol/L、2mol/L、1mol/L、0.5mol/L、0mol/L 的盐酸胍蛋白复性液 (50mmol/L Tris-Cl,0.5mmol/L EDTA,50mmol/L NaCl,5% 甘油,5mmol/L 还原性谷胱苷肽,2mmol/L 氧化型谷胱苷肽)中依次透析过夜,将蛋白复性。

## 1.6 重组蛋白的蛋白印迹检测

按常规方法操作,将纯化和复性后的蛋白样品经 SDS-PAGE 后转移到硝酸纤维素膜进行杂交。一抗为山羊 A 型流感病毒 NS1 多抗 (Santa Cruz),二抗为兔抗山羊 IgG-HR。

## 2 结果

### 2.1 推导的 NS1 氨基酸序列及其进化分析

将 NS1 克隆至 pGEM-Teasy 载体后,挑取 3 个克隆送测序。经分析,3 个克隆的序列未见差异,该株病毒的 NS1 基因全长 678bp,编码 226 个氨基酸,大小为 27kDa。将其氨基酸序列与国外分离的人 H5N1 禽流感毒株及国内分离的 H5N1 毒株的 NS1 序列进行比对。结果显示,NS1 比较保守,但是对病毒的生物学特性有影响的一些关键序列均有所变化。与 A/HK/156/97 相比,被认为对病毒毒力有影响的 92 位由 Glu 突变为 Asp。并且在 80~84 位 (TIAVS)发生 5 个氨基酸的缺失。同时发现 184~188 位 (GLEWN)基序突变为 GFEWN,即 Leu 突变为 Phe,该基序被认为对断裂和多腺苷酸化特异性因子 (CBSF)与 RNA 结合结构域的结合有关键作用。和近些年在东南亚分离到的高致病性禽流感病毒类似,该例高致病性 H5N1 人禽流感病毒 NS1 蛋白 C

末端结合 PDZ 结构域的 PL 基序为 ESEV。

同源性分析(图略)表明, A/Anhui/01/2005 毒株的 NS1 与 A/Duck/Hunan/160/2005、A/Duck/Fujian/1734/05 的同源性最高, 分别达到 99.1% 和 98.2%。而与 1997 年分离的人禽流感毒株的 NS1 的同源性则只有 88.1%。A/Anhui/01/2005 与鸭源 H5N1 亚型病毒的进化密切相关, 在进化关系上更倾向于禽源

流感病毒, 而与最早报道的人禽流感病毒 A/HK/156/97 表现出截然不同的进化特点。不同种属之间 NS1 的进化特性有所区别。家禽、猫科动物和猪分别表现出不同的进化特点, 而东南亚分离毒株更趋近于猫科动物。年代的变更对病毒的进化特性也有影响。2000 年分离的鸭 H5N1 病毒和 2005 年分离的鸭 H5N1 病毒其遗传距离明显增加(图 1)。

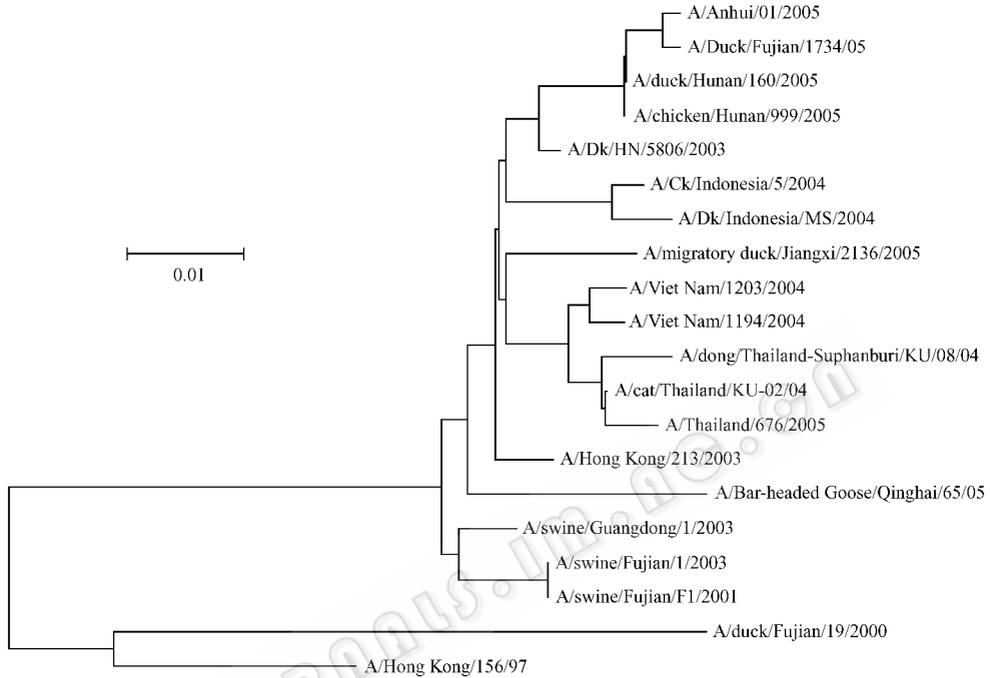


图 1 A/Anhui/01/2005 与其它 H5N1 亚型毒株的 NS1 基因进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of NS1 of A/Anhui/01/2005 and other strains

## 2.2 NS1 的三级结构预测

根据 Bornholdt 等的 NS1 模型<sup>[6]</sup>和测序结果, 采用同源建模原理, 预测了 A/Anhui/01/2005 的 NS1 三级结构(图 2)。NS1 以一个二聚体发挥作用。每个单体包括 7 个  $\beta$  链和 2 个  $\alpha$  螺旋。除最后一个  $\beta$  链外, 6 个  $\beta$  链形成反向平行的  $\beta$  折叠。6 个  $\beta$  链围绕在  $\alpha$  螺旋的周围, 其间通过扭转的  $\beta$  折叠和  $\alpha$  螺旋的疏水相互作用而维持构象。

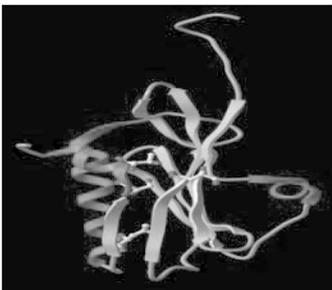


图 2 A/Anhui/01/2005 毒株 NS1 三级结构预测

Fig. 2 Predication of tertiary structure of NS1 of A/Anhui/01/2005 strain based on induced amino acid sequence.

## 2.3 重组克隆的鉴定

将 NS1 以 N-末端融合的方式亚克隆到 pQE-80L 载体的 *Bam*H I 和 *Pst* I 位点之间。以 PCR 验证阳性克隆, 并送测序。测序结果表明读码框正确。以 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切后, 能切出 4.8kb 的载体片段和 678bp 的目的片段。证明 NS1 已成功克隆到原核表达载体。

## 2.4 NS1 在大肠杆菌的表达

将鉴定正确的重组质粒转化 BL21 (DE3) 菌株, 挑取单个克隆小规模表达, 分别收集上清和菌体沉淀, 进行 SDS-PAGE 鉴定。结果显示, 融合了 6 个 His 标签的 NS1 大小为 30kDa 左右, 符合预期设计大小, 且以包涵体形式存在(图 3, 泳道 3)。再将表达的规模放大到 100mL, NS1 能高效表达, 表达量占菌体蛋白总量的 30% 以上。

## 2.5 NS1 蛋白的纯化和免疫原性鉴定

大量表达的 NS1 经 SDS-PAGE 分析确证后, 收集菌体, 超声裂解得到包涵体, 将其充分洗涤, 发现

杂蛋白明显减少(图3泳道2)。再将该蛋白通过金属螯合层析进一步纯化,在100mmol/L的咪唑洗脱下,目的蛋白能被充分洗脱下来。最后回收的蛋白纯度高达90%以上(图3泳道1)。利用蛋白免疫印迹对其进行鉴定,结果可以看到一条大小约30kDa的条带(图3中泳道6),证明其具有良好的免疫学活性。

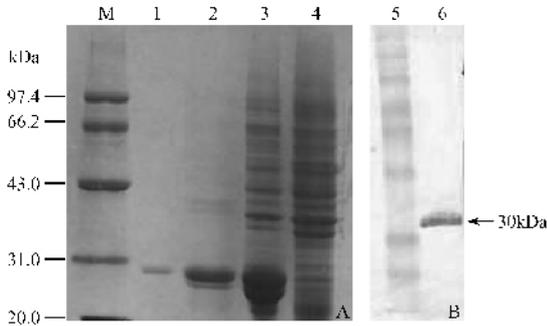


图3 NS1在大肠杆菌的表达及蛋白免疫印迹鉴定

Fig.3 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of expression of NS1 in *BL21(DE3)*. M, Low molecular weight marker; 1~4. Indicated purified NS1, inclusion body of NS1, induced crude lysate of NS1 and uninduced lysate, respectively; 5 and 6. Benchmark™ pre-stained protein marker and a 30kDa band of NS1 respectively.

### 3 讨论

该研究分析了 A/Anhui/01/2005 毒株的进化特点。结果显示, A/Anhui/01/2005 NS1 基因与水禽的进化关系相当密切,由此推测其更可能起源于水禽 H5N1 亚型流感病毒。这也部分证实了以前的结论,即水禽在 H5N1 亚型禽流感病毒的传播链中扮演了重要的角色<sup>[8]</sup>。因此控制水禽 H5N1 的感染,可能对人流感疫情的控制有重要作用。而其与迁徙的鸟类遗传距离却相对大,故推测其起源于迁徙的鸟类的可能性比较小。NS1 基因种属差异性明显,这对于研究禽流感病毒跨种属传播的机制可能有所启示。

A/Anhui/01/2005 毒株的 NS1 的某些与病毒致病性相关的序列表现出新的特点。已知高致病性 H5N1 禽流感病毒的 NS1 蛋白的 92 位 Asp 突变为 Glu 以及 80~84 位氨基酸残基的缺失,能增强病毒毒力或者提高对细胞因子的抗性<sup>[9-11]</sup>。但是,导致感染病例死亡的 A/Anhui/01/2005 毒株,其 92 位氨基酸仍然是 Asp。由此揭示,92 位的氨基酸,对 A/Anhui/01/2005 毒株的致病性可能并非必需的。92 位的氨基酸和病毒毒力的相关性尚须进一步研究。

序列比较结果显示,除 A/HK/156/97 等毒株以

外,包括 A/Anhui/01/2005 在内的其它 17 个毒株的 80~84 位均发现 5 个氨基酸残基-TIASV 的丢失。TIASV 是 RBD 和效应域间的柔性连接肽。这些氨基酸残基的缺失,可能使 NS1 结构更加紧凑,从而使 RBD 更为稳定,导致同 dsRNA 的结合能力增强<sup>[12]</sup>。TIASV 的缺失,对病毒提高对细胞因子的抗性有显著意义。

A/Anhui/01/2005 毒株 NS1 蛋白的另一个特点是,其 C 末端存在一个结合 PDZ 结构域的基序——PL 基序(ESEV)。PL 基序与 PDZ 结构域结合以后,能破坏含 PDZ 结构域的蛋白质参与的细胞信号通路,从而导致病毒的高致死率,这可能也是该株病毒表现出高致死率的因素之一。而对人的致死率较低的病毒,其 NS1 蛋白的 PL 基序为 RSKV,不能和 PDZ 结构域发生相互作用。因此,PL 基序也成为区别高致病性和低致病性流感病毒的标志之一<sup>[13]</sup>,并可能成为潜在的药物靶点。

进一步对 A/Anhui/01/2005 的 NS1 蛋白的三级结构进行解析,发现 NS1 二聚体通过每个单体 N-端的第一个  $\beta$  链连接。这些  $\beta$  链沿着两个单体的界面形成了连续的反向平行折叠,从而形成了一个对称轴。两聚体的相互作用形成了连续的扭转的反向平行  $\beta$  折叠,旁边则是每个单体末端的  $\alpha$  螺旋。被认为与流感病毒的毒力相关的 92 位氨基酸(Asp/Glu),就位于结构上不稳定的裂缝中。并以氢键与 Ser195 和 Thr197 结合。这些残基的磷酸化使 NS1 不稳定,诱导了细胞凋亡,从而使 vRNP 从胞核输出。A/HK/156/97 毒株中,D92 突变为 E92,降低了 NS1 的磷酸化程度,使病毒的生命周期延长,D92E 突变,增强了 NS1 对 dsRNA 的结合能力,提高了病毒对细胞因子的抗性。但是在 A/Anhui/01/2005 等毒株中,92 位 Asp 没有发生突变,证明其对 NS1 的三级结构影响可能不大,NS1 对宿主细胞的毒力和对细胞因子的抗性需要更多因素的协同作用。

对结合 CBSF 起关键作用的残基 GLEWN 位于大的  $\alpha$  螺旋基部。每个二聚体的两侧都有 CBSF 的结合位点。表明 NS1 的每个二聚体结合 2 个 CBSF 亚单位,这就解释了 NS1 为何能高效地拦截成熟 mRNA 的外输。分析 A/Anhui/01/2005 毒株的这个基序,发现 L 突变为 F,即通过 GFEWN 与 CBSF 结合。至于这个位置氨基酸残基的变化,对病毒的特性会造成什么影响,有待研究。由此可见,该病毒的 NS1 基因的生物学特征值得更深入地进行研究。

由上述序列分析结果可见,NS1 具有保守性,而

且其为 RNA 结合蛋白,为此选用了 Qiagen 公司的 pQE-80L 表达载体,在大肠杆菌高效表达并纯化了我国首例人感染禽流感病毒的 NS1 蛋白,为下一步筛选靶向 NS1 蛋白的 RNA 适配子和基于 NS1 蛋白的基因功能分析奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Storch GA. Diagnostic virology. IN: Fields Virology. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1487 - 1531.
- [ 2 ] Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, *et al.* Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol* 2001, **75**( 17 ): 7875 - 7881.
- [ 3 ] Qian XY, Alonso-Caplan F, Krug RM. Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J Virol* 1994, **68**( 4 ): 2433 - 2441.
- [ 4 ] Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly( A )-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly( A ). *J Virol* 1994, **68**( 4 ): 2425 - 2432.
- [ 5 ] Shu Y, Yu H, Li D. Lethal Avian Influenza A( H5N1 ) infection in a pregnant woman in Anhui province, China. *New England journal of medicine* 2006, **354**( 13 ): 1421 - 1422.
- [ 6 ] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Bio* 2006, **13**( 6 ): 559 - 560.
- [ 7 ] García-Sastre A, Egorov A, Matassov D. Influenza A Virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, **252**( 2 ): 287 - 479.
- [ 8 ] Chen H, Smith GJ, Zhang SY, *et al.* Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 2005, **436**( 7048 ): 191 - 192.
- [ 9 ] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Medicine*, 2002, **8**( 9 ): 950 - 954.
- [ 10 ] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Research* 2004, **103**( 1-2 ): 107 - 113.
- [ 11 ] Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol* 2005, **86**( 4 ): 1121 - 1130.
- [ 12 ] Li WX, Li HW, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *PNAS* 2004, **101**( 5 ): 1350 - 1355.
- [ 13 ] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, *et al.* Large-scale sequence analysis of Avian Influenza isolates. *Science*, 2006, **311**( 5767 ): 1576 - 1580.

## Genetic analysis of NS1 fragment of human H5N1 Influenza virus isolated in Anhui province and its expression in *Escherichia coli*

CHENG Cong-sheng<sup>1</sup>, LAN Yu<sup>1</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-qing<sup>1</sup>, SHU Yue-long<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> National Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

(<sup>2</sup> Anhui Center for Disease Control and Prevention, Hefei 231000, China)

**Abstract** NS1 gene was amplified from an H5N1 influenza virus, A/Anhui/01/2005 for cloning, sequence analysis and later expression in *Escherichia coli*. The result showed that NS1 of A/Anhui/01/2005 strain had the close phylogenetic relationship with that of H5N1 avian influenza strains recently isolated in Fujian and Hunan. Correspondingly, its amino acid sequence showed the highest homology with that of Fujian and Hunan strains. The amino acid position of 92 involved in virus virulence was Asp, contrast to Glu in A/HK/156/97. Five amino acid deletion from 80 to 84 was also found in A/Anhui/01/2005, which was considered as a contributor to virus resistance against cytokine, such as IFN, TNF, etc. A motif binding to CBSF, converted to GFWEN, which was different from previous GLEWN found in other 19 strains. Besides, the PL motif of ESEV, binding to PDZ domain, is the same as previous high-mortality H5N1 isolates. Furthermore, this NS1 was efficiently expressed in *Escherichia coli* and the highly purified product demonstrated wonderful activity as confirmed by Western blot. As a result, the work paves the way for further understanding the role of NS1 in human H5N1 infection and development of new antiviral drugs against influenza virus.

**Keywords**: Avian Influenza; H5N1; NS1

Foundation item: Major Project of China National Natural Science Foundation of (30599433); Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523006)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-63577499; E-mail: yshu@vip.sina.com

Other authors: YAO Li-hong<sup>1</sup>, WEN Le-ying<sup>1</sup>, WANG Da-yang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, LI Xi-yan<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, ZHAO Xin-sheng<sup>1</sup>, HUANG Jing-jing<sup>1</sup>, NIE Kai<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-guang<sup>1</sup>

Received: 18 September 2006 / Accepted: 13 October 2006 / Revised: 22 January 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>