

口蹄疫病毒 NSP 3ABC 基因在昆虫细胞中的分泌表达及其活性检测 Secreted Expression of Nonstructural Protein Gene 3ABC of Foot-and-Mouth Disease Virus in Sf9 Cells and Activity Analysis

马江涛^{1,2}, 卢曾军¹, 曹轶梅¹, 郭慧琛¹, 郭建宏¹, 祝秀梅^{1,2}, 杨孝朴², 刘在新^{1*}

MA Jiang-Tao^{1,2}, LU Zeng-Jun¹, CAO Yi-Mei¹, GUO Hui-Chen¹, GUO Jian-Hong¹, ZHU Xiu-Mei^{1,2},
YANG Xiao-Pu² and LIU Zai-Xin^{1*}

1 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046

2 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730076

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou Veterinary Research Institute Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China

2 Veterinary College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

摘要 用设计的特异引物, 扩增得到了 N-端带有 6 × His 编码序列的口蹄疫病毒完整 3ABC 基因序列, 并将其亚克隆入带有蜂毒溶血肽序列的穿梭质粒 pMelBac-B 中, 构建了重组质粒 pMel-3ABC。将该重组质粒与杆状病毒骨架 DNA Bac-N-Blue™ 共转染 Sf9 昆虫细胞, 通过噬斑筛选和 PCR 鉴定, 获得了含有目的基因的重组杆状病毒。重组病毒感染 Sf9 昆虫细胞, 采用通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测, 证明目的基因在昆虫细胞中得到了正确的表达, 表达产物分泌至细胞培养上清中, 并具有良好的生物活性。表达的目的蛋白经过镍柱亲和层析法纯化后, 用间接 ELISA 方法检测与口蹄疫病毒感染动物血清的反应性, 证明表达目的蛋白与感染动物血清有很好的反应性而与正常动物以及免疫动物血清不发生反应。该研究为建立一种更加敏感和特异的口蹄疫病毒感染动物与疫苗免疫动物的鉴别诊断方法奠定了基础。

关键词 口蹄疫病毒, 3ABC 基因, 杆状病毒, 分泌性表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0540-0

Abstract Entire 3ABC sequence of FMDV containing a 6 × his tag coding sequence at the N-terminal was obtained through PCR amplification using a pair of specific primers, subcloned into shuttle plasmid of pMelBac-B with a melittin secretion signal sequence and finally constructed recombinant plasmid of pMel-3ABC. After co-transfected the recombinant plasmid and linearized Bac-N-Blue™ DNA into Sf9 insect cell under intermediary agent of the Cellfectin®, the result showed that we have already acquired recombinant baculovirus by screen of plaque assay and identification of PCR. Though the recombinant baculovirus infecting the Sf9 cells again, experiments indicated that 3ABC gene could express in insect cells and the expressed protein was secreted in the supernatant of Sf9 cell culture possessing favourable biological activities detected by adopting two methods of SDS-PAGE and Western blot. The result verified that the protein could respond with sera derived from FMDV infected

Received: November 8, 2006; Accepted: December 19, 2006.

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China(973) No. 2005CB523201).

* Corresponding author. Tel: +86-13893603044; +86-931-8342587; E-mail: liuke@public.lz.gs.cn

国家重大基础研究发展规划(973)项目资助(No.2005CB523201).

animals, but have no responsibility with sera derived from health animals and vaccinated animals detected by indirect ELISA using antigen of expressed protein after purification with Ni-NTA his bind resin. Therefore, this study has established a solid foundation for establishing an effective diagnosis method to discriminating the FMDV infected animals from vaccinated animals.

Key words FMDV, 3ABC gene, baculovirus, secreted expression

口蹄疫(Food-and-Mouth Disease, FMD)是偶蹄动物的一种急性、烈性、高度接触性传染病,主要侵害牛、羊和猪等具有重要经济价值的动物。该病的暴发流行对一个国家或地区的经济和政治会造成极大的影响,因此,世界各国对该病的防制都极为重视。对于发展中国家来说,疫苗免疫是防制 FMD 的主要措施,但由于口蹄疫病毒(Food-and-Mouth Disease virus, FMDV)型多易变^[1,2],即使免疫动物在接触新病毒后也可形成隐性感染或持续带毒。因此,建立一种能够适用于检测所有血清型病毒感染、且能区分疫苗免疫动物与自然感染动物的诊断方法,对于口蹄疫的防制和消灭显得尤为重要^[3]。

FMDV 非结构蛋白(NSP)在不同血清型之间具有很高的同源性,目前的 FMD 疫苗生产工艺,可以去除绝大部分的 NSP 成分,因此认为,灭活疫苗免疫动物很少产生 FMDV NSP 抗体。自然感染动物由于体内有病毒的活动,因而能够诱导机体产生针对 FMDV 结构蛋白(SP)和 NSP 的抗体,这就为通过检测 NSP 抗体来鉴别自然感染动物和免疫动物提供了理论依据。

目前的研究认为,FMDV NSP 3ABC 抗体水平是用来判断动物是否感染过口蹄疫的一项可靠指标^[4-6]。已经有利用大肠杆菌表达 NSP 建立鉴别诊断方法的报道^[4,7-10]。但由于大肠杆菌宿主范围比较广,在一些健康动物血清中存在大肠杆菌抗体,它们可以与大肠杆菌表达的重组蛋白发生非特异性反应,从而影响试验结果的敏感性和准确性。而利用杆状病毒表达系统表达的重组蛋白在结构及功能上更接近于天然蛋白,而且自然界中杆状病毒具有高度的宿主特异性,它专一寄生无脊椎动物^[11,12]。所以利用这种蛋白作为抗原来检测动物体内特异性抗体,在敏感性和特异性方面要比大肠杆菌表达系统更具优越性。本研究应用带有一段编码蜂毒溶血肽序列的穿梭表达载体,并在引物的 5'端引入 6×His 标签,不但使目的蛋白可以在昆虫细胞中进行分泌性表达,而且还可以利用 6×His 标签较容易地纯化目的蛋白,为高效生产和制备高纯度的 FMD 鉴别诊断抗原和建立基于昆虫细胞表达抗原的间接 ELISA 方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

含 FMDV 毒株 China/99 株 3ABC 基因的重组质粒 pGEM-3ABC 为本实验室构建保存,穿梭质粒 pMelBac-B、杆状病毒骨架 DNA Bac-N-BlueTM、Cellfectin[®] 转染试剂、Sf9 昆虫细胞、Grace's 昆虫细胞培养基和昆虫细胞完全培养基 TNM-FH 均购自 Invitrogen 公司,Nco I、Sal I 限制性内切酶和其他工具酶为宝生物工程(大连)有限公司产品,X-gal、Bluo-gal、辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗溶液(兔抗牛 IgG-HRP、兔抗羊 IgG-HRP、兔抗猪 IgG-HRP)为 Sigma 公司产品,FMDV 感染牛、羊和猪阳性血清和健康牛、羊和猪血清为本实验室保存。

1.2 引物的设计和合成

根据 FMDV 毒株 China/99 株的序列^[13]设计一对扩增引物:上游引物 5'-ACCATGGCACACCATCACCACATCACATCTCAATTCCTTCCC-3'和下游引物 5'-GGGTCGACGTGGTGTGGTTCCGG-3'。其中在上游引物的 5'-端引入 6×His 标签序列和 Nco I 酶切位点,在下游引物的 5'-端引入 Sal I 酶切位点,引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 重组穿梭质粒的构建与序列测定

以 pGEM-3ABC 重组质粒为模板,扩增 3ABC 基因片段,将回收得到的目的基因片段经 Nco I 和 Sal I 双酶切后,与经同样酶切处理的 pMelBac-B 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,重组穿梭质粒经电泳、酶切和 PCR 等方法鉴定筛选,得到阳性重组质粒,序列测定确认正确后命名为 pMel-3ABC。

1.4 重组质粒与杆状病毒共转染昆虫细胞

按照 Bac-N-BlueTM 载体说明书操作。取 4 μ L pMel-3ABC 质粒 DNA 溶于 1mL Grace's 细胞培养基中,再加入 20 μ L Cellfectin[®] 转染试剂和 10 μ L 线性化的杆状病毒骨架 Bac-N-BlueTM DNA,缓慢混匀,室温放置 15min 后,将混合物缓慢加到 Sf9 细胞中,室温孵育 4h 后,每孔添加 1mL 细胞完全培养基 TNM-FH,密封培养皿,27 $^{\circ}$ C 培养 72~120h,观察到细胞发生典型病变后,收获细胞培养上清,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 重组杆状病毒的噬斑筛选

取 1mL 上述细胞培养上清加到 Sf9 细胞中,室

温放置 1h。另将 2mL Grace's 细胞培养基、2mL 低熔点琼脂糖、1mL 胎牛血清、1.5mg X-gal、1.5mg Bluo-gal 和 5mL 细胞完全培养基 TNM-FH 混合物加热至 47℃后混匀。1h 后,吸弃细胞中的培养基,缓慢加入上述混合物,27℃培养至出现蓝白斑。

1.6 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

挑取上述蓝斑进行病毒传代,提取病毒 DNA,利用 Bac-N-Blue™ 载体所附的一对鉴定引物进行重组杆状病毒 PCR 鉴定。上游引物:5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3';下游引物:5'-CAACAACGCACAGAATCTAGC-3'。

1.7 表达产物的 SDS-PAGE 及免疫印迹(Western blot)检测

将重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 71 h 后,4 000 g 离心收集细胞上清液,按常规方法处理后,进行 SDS-PAGE 电泳,以正常昆虫细胞培养上清作为阴性对照。用凝胶成像仪进行薄层扫描分析测定表达产物的相对含量。将电泳蛋白带转印至硝酸纤维素膜上,用 PBST 洗涤硝酸纤维素膜后用 5% 的脱脂奶粉封闭,37℃ 45min 后再用 PBST 洗涤后加入 FMDV 羊阳性血清,37℃ 作用 1 h。同前洗涤后加入相应稀释度的 THRP-兔抗羊 IgG,37℃ 作用 1h。充分洗涤,加入 DAB-H₂O₂ 显色,观察特异性条带。

1.8 表达产物的纯化和间接 ELISA 检测

按照 Novagen 公司在非变性条件下蛋白质纯化 Ni-NTA His binding resin 说明书操作,将重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 71h 后收集的细胞上清用带有 6 × His 标签的镍柱进行亲和层析法纯化,纯化物用于 ELISA 检测。检测方法根据文献报道的方法略加改进^[14,15]。分别将上述纯化蛋白和大肠杆菌表达的 FMDV 3ABC 蛋白纯化物以 2 倍梯度稀释包被 96 孔酶标板,4℃ 过夜,明胶 37℃ 封闭 45min 后,洗涤,分别加入口蹄疫牛、羊、猪阳性血清,37℃ 作用 1h,洗涤后分别加入 HRP-兔抗牛 IgG、HRP-兔抗羊 IgG、HRP-兔抗猪 IgG,37℃ 作用 1h,加入底物 TMB-H₂O₂,37℃ 作用 15min,用终止液结束反应,于 λ 450 处测定其 OD 值。

1.9 表达产物与 FMDV 感染动物血清的特异性反应

在以上建立的间接 ELISA 基础上,分别用昆虫细胞表达的重组蛋白和大肠杆菌表达的重组蛋白作为抗原对 562 份田间牛、羊和猪血清样品进行检测;同时用昆虫细胞表达的重组蛋白作为抗原检测部分 FMD 灭活疫苗免疫的动物血清和 FMDV 感染动物

血清,比较其检测结果。

2 结果

2.1 重组穿梭载体的序列测定与分析

序列测定结果表明目的基因正确的插入到 pMelBac-B 穿梭质粒中,与 O/China/99 株 3ABC 序列同源性达到 99.8%,并按正确的读码框连接成功,含有转录起始和终止所必需的元件,可以进一步与杆状病毒骨架进行细胞内同源重组,以产生带有目的基因表达盒的重组杆状病毒。

2.2 重组杆状病毒的筛选与鉴定

将重组质粒 pMel-3ABC 与杆状病毒骨架共转染 Sf9 细胞后,在含有 X-gal 和 Bluo-gal 的琼脂糖平板上进行蓝白斑筛选,蓝色噬斑为初步判定为发生重组的阳性克隆(图 1-A)。挑取蓝色噬斑感染 Sf9 细胞 71 h 后收集细胞上清,提取病毒 DNA 进行 PCR 鉴定。如果为野生型杆状病毒,PCR 扩增产物大小应为 839bp;如果为重组杆状病毒,PCR 产物大小应为 1700bp;如果噬斑中两种病毒混合,PCR 产物应为两条大小分别为 839bp 和 1700bp 的片段(图 1-B)。通过 PCR 鉴定,筛选出一株发生重组的杆状病毒,将该株重组杆状病毒继续感染 Sf9 细胞 72~96h 后,观察到细胞发生典型病变(图 2),表明转染成功。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

将鉴定正确的重组杆状病毒液接种于 Sf9 细胞,感染后 71h 后收集细胞培养基上清(4℃,5000g 离心 20min),进行 SDS-PAGE 分析表明,FMDV 3ABC 基因在昆虫杆状病毒系统中进行了成功的表达,且大小与预测 NSP 3ABC 大小一至约为 48kD(图 3-A)。对上述表达产物进行 Western blot 分析,结果表明重组表达产物可被 FMDV 3ABC 抗体所识别,证明本实验所得的表达产物为所需的目的蛋白(图 3-B)。

2.4 表达产物反应活性的间接 ELISA 检测

分别用昆虫细胞和大肠杆菌表达的 3ABC 重组蛋白对本实验室保存的 FMDV 感染牛、羊和猪阳性血清和健康牛、羊和猪血清进行间接 ELISA 检测。结果显示,在同一反应条件下,利用昆虫细胞表达的重组蛋白对 FMDV 感染动物血清的结合信号高于利用大肠杆菌表达重组蛋白的 OD 值高,同时与健康动物血清反应,前者的 OD 值较后者的 OD 值低,说明用昆虫细胞表达的重组蛋白对自然感染动物血清的敏感性和特异性较高。

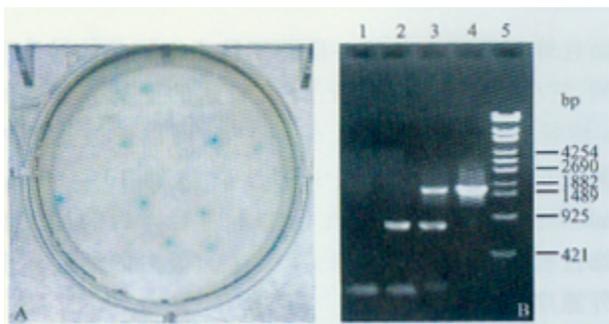


图 1 重组杆状病毒噬斑筛选和 PCR 鉴定结果

Fig.1 Recombinant baculovirus screened by plaque assay and identified by PCR methods

(A) Result of plaque assay; (B) PCR identification of the recombinant baculovirus. 1 :supernatant of normal Sf9 cell ; 2 :wild-type baculovirus plaque ; 3 :mixture of recombinant and wild-type baculovirus plaque ; 4 : purified recombinant baculovirus plaque ; M :λ DNA Eco T14 DNA marker

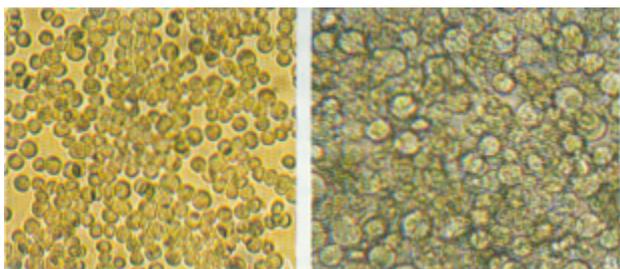


图 2 正常 Sf9 细胞与感染杆状病毒后病变 Sf9 细胞的形态

Fig.2 Comparison of normal Sf9 cell with Sf9 cell infected with recombinant baculovirus

A :Normal Sf9 cell ; B :Sf9 cell infected with recombinant baculovirus.

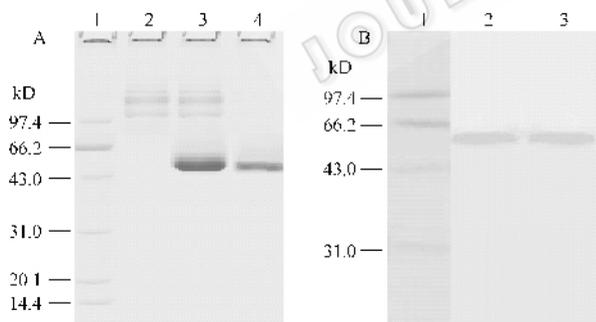


图 3 目的蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

Fig.3 The target detected by SDS-PAGE and Western blot

A : SDS-PAGE of target protein. 1 :protein molecular marker ; 2 : supernatant of normal Sf9 cells ; 3 :supernatant of Sf9 cells infected with recombinant baculovirus ; 4 :purification of target protein using Ni-NTA his bind resin ; B : Western blot of target protein. 1 :protein molecular marker ; 2, 3 : purification of target protein.

2.5 表达产物与 FMDV 感染动物血清的 ELISA 检测结果

经间接 ELISA 检测 结果显示 利用昆虫细胞表达的重组蛋白对田间牛血清的阳性检出率为 14.5% ,可疑率为 2.7% ;对田间羊血清的阳性检出率为 25.6% ,可疑率为 4.5% ;对田间羊血清的阳性

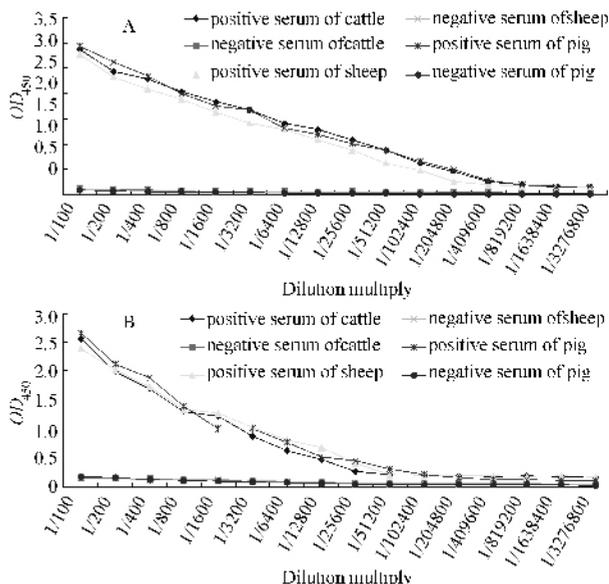


图 4 间接 ELISA 检测纯化 3ABC 蛋白与 FMDV 感染动物血清的反应活性

Fig.4 The reactivity of purified 3ABC protein with serum derived from FMDV infected animals detected by indirect ELISA A : antigen expressed by Sf9 cell ; B : antigen expressed by *E. coli* .

检出率为 35.7% ,可疑率为 1.5%。利用大肠杆菌表达的重组蛋白对田间牛血清的阳性检出率为 13.7% ,可疑率为 3.2% ;对田间羊血清的阳性检出率为 24.3% ,可疑率为 5.2% ;对田间羊血清的阳性检出率为 34.1% ,可疑率为 2.5%。证明利用昆虫-杆状病毒系统制备的抗原蛋白在敏感性和特异性方面要比大肠杆菌表达系统更具优越性。同时对部分 FMD 灭活疫苗免疫的动物血清和 FMDV 感染动物血清检测结果表明 ,利用昆虫细胞表达的 FMDV NSP 3ABC 可以用于鉴别诊断 FMD 灭活疫苗免疫的动物血清和 FMDV 感染动物血清(图 5)。样品效价 = (OD_{样品} - OD_{标准阴性}) ÷ (OD_{标准阳性} - OD_{标准阴性}) 效价 < 0.2 为阴性 效价在 0.2 ~ 0.3 之间为可疑 效价 > 0.3 为阳性。

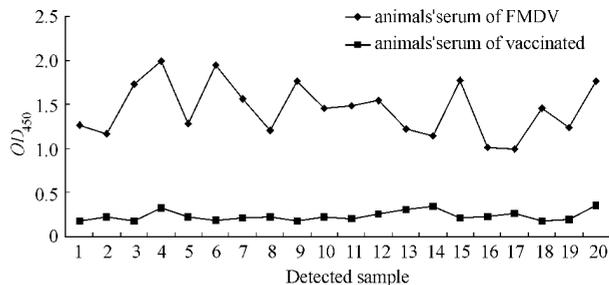


图 5 FMDV 感染动物血清与灭活疫苗免疫动物血清间接 ELISA 检测结果

Fig.5 The result of ELISA detected with serum derived from FMDV infected animals and vaccinated animals

3 讨论

昆虫-杆状病毒表达系统是近几年逐渐发展成熟的一种高效表达系统,使用该系统最大的技术难题是重组杆状病毒的获得。许多研究证实,用传统的杆状病毒表达载体系统(Baculovirus expression vector systems, BEVS)表达蛋白,获得重组杆状病毒需要多轮的噬斑筛选纯化,操作复杂耗时,且易出现假阳性^[16]。本研究所采用的 Bac-N-Blue 表达系统,突破了这一难关。该系统采用在杆状病毒 DNA 中引入三个单一性的 *Bsu36* I 限制性内切酶位点,通过 *Bsu36* I 的酶切作用,使杆状病毒完全线性化,并删除了病毒复制必需序列,其中包括 C 端 ORF1629 序列、多角体基因开放阅读框和多角体基因启动子,使其不能在细胞内复制出成熟的病毒颗粒,只有与携带多角体蛋白基因启动子控制的外源基因和 ORF1629 基因的穿梭载体发生同源重组时,才能被拯救为复制型的重组杆状病毒而在昆虫细胞中复制,而当线性化的杆状病毒与穿梭载体不发生同源重组就无野生型病毒出现,故该系统同源重组率在理论上可达 100%^[17,18]。除此之外,在杆状病毒 Bac-N-Blue 的 ORF603 区和多角体基因启动子之间引入一个筛选标记基因片段 *LacZ*,这样就可以通过细胞蓝白斑筛选直接小量提取重组病毒,再用重组病毒感染 Sf9 昆虫细胞即可大量获得重组蛋白。

昆虫-杆状病毒表达系统作为一种真核表达系统,与细菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统相比,昆虫杆状病毒表达载体系统具有三大优点:①重组蛋白具有完整的生物学功能;杆状病毒表达系统可为高表达的外源蛋白在细胞内进行正确折叠、二硫键的搭配及寡聚物的形成提供良好的环境,可使表达产物在结构及功能上接近天然蛋白,具有良好的免疫原性。②能进行翻译后的加工修饰;杆状病毒表达系统具有完整的翻译后加工能力,包括糖基化、磷酸化、酰基化、信号肽切除及肽段的切割和分解等,修饰的位点与天然蛋白在细胞内的情况完全一致^[19~20]。③表达水平高;该系统最突出的特点是可用高滴度的重组杆状病毒感染昆虫细胞,能高水平的表达重组蛋白,最高可使目的蛋白的表达量达到细胞总蛋白的 50%^[21],而且外源蛋白大部分是可溶性蛋白,容易收集和纯化。

本实验所选用的 pMelBac-B 表达载体中含有一段蜂可毒溶血肽信号序列,它不仅可以引导外源蛋白进行分泌性表达,使其直接分泌至细胞培养上清中;

而且蜂可毒溶血肽是一段源于昆虫细胞的信号肽序列,它引导昆虫细胞进行分泌表达的能利弊普通的 α -淀粉酶分泌信号肽强 6~10 倍,可以使表达的外源蛋白在细胞培养液中的浓度达到 10~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[22]。而信号肽序列在目的蛋白翻译后的加工修饰过程中可以被切除掉,使表达的蛋白的活性不受外源序列的影响。

本研究成功地在昆虫细胞中表达了 FMDV NSP 3ABC,通过用 Ni-NTA 亲和层析法纯化证明,在目的蛋白的 5'端成功的引入了 6 \times His 标签,使分泌表达于细胞培养上清中的目的蛋白得到了进一步纯化,得到比较纯净的目的蛋白。采用 Western blot 和间接 ELISA 方法检测目的蛋白具有很好的反应活性,能够与 FMDV 感染血清发生特异性反应。该研究为制备接近天然的 FMDV NSP 3ABC 抗原提供了一种方法,为建立更为敏感和特异的 FMDV 感染动物与免疫动物鉴别诊断方法奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yin X (殷震), Liu JH (刘景华). *Virology of Animals*. 2nd ed., Beijing: Science Press (科学出版社), 1997, pp. 468-499.
- [2] Van MC. A complex-trapping-blocking (CTB) ELISA, using monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies directed against foot-and-mouth-disease types A, O and C method and characteristics. *Vet Microbiol*, 1990, **24**: 171-178.
- [3] Lu YC (卢永干). The study of the nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate health animals from vaccinated. *Science and Technology of Chinese Journal of Veterinary* (中国兽医科技), 2000, **10**: 18-20.
- [4] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, **143**(8): 1461-1476.
- [5] Malirat V, Neitzert E, Bergmann IE, et al. Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC. *Vet Q*, 1998, **200**(2): 24-26.
- [6] Mackay DKJ, Forsyth MA, Davies PR, et al. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 1997, **16**(5): 446-459.
- [7] Cao YM (曹轶梅), Liu ZX (刘在新), Lu ZJ (卢曾军), et al. Cloning nonstructural protein 3ABC gene and expression 3AB gene of foot-and-mouth disease virus in *Escherichia coli*. *Veterinary Journal of China* (中国兽医学报), 2004, **24**(10): 31-34.

- [8] De Diego M, Brocchi E, Mackay D, *et al.* The nonstructural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol*, 1997, **142**(10): 2021 - 2033.
- [9] Chang HK, Young JK, Won IIK, *et al.* Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine*, 2003, **21**: 1409 - 1414.
- [10] Siberstein E, Kaplan G, Taboga O, *et al.* Foot-and-mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3ABC nonstructural protein. *Arch Virol*, 1997, **142**: 795 - 805.
- [11] Friesen PD, Miller LK. The regulation of baculovirus gene expression. *Curr Top Microbiol*, 1996, **131**: 31 - 49.
- [12] Wang X(王喜军), Hu S(胡森), Ge JY(葛金英), *et al.* Study of fusion protein and attachment glycoprotein of nipah virus expression in recombinant baculovirus. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2006 **5**: 418 - 424.
- [13] Forss S, Strebel K, Schaller H. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucl Acids Res*, 1984, **12**: 6587 - 6601.
- [14] Du NX(杜念兴). *Veterinary Immunology*. 2nd ed, Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai(上海科学出版社), 1989 pp.208 - 209.
- [15] Yang HC(杨汉春). *Immunology of Animals Veterinary Virology*. 2nd ed, Beijing: Chinese Agricultural University Press(中国农业大学出版社), 1996 pp.305 - 306.
- [16] Wang Li(王立良), Song GX(宋国兴), Si JY(司静懿). The study of baculovirus expression vectors. *Foreign medicine sciences* (国外医学), 1998, **20**(5): 222 - 225.
- [17] Gearing KL, Possee RD. Functional analysis of a 603 nucleotide open reading frame upstream of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Gen Virol*. 1990 **71**: 251 - 262.
- [18] Kitts PA, Possee RD. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, 1993, **14**: 810 - 817.
- [19] Ailor E, Betenbaugh MJ. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(2): 142 - 145.
- [20] Joshi L, Davis TR, Mattu TS, *et al.* Influence of baculovirus-host cell interactions on complex N-linked glycosylation of a recombinant human protein. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**(4): 650 - 656.
- [21] Luckow VA, Summers MD. High level expression of nonfused foreign genes with *Autographa California* nuclear polyhedrosis virus expression vector. *Viorlogy*, 1989, **170**(1): 31 - 39.
- [22] Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, *et al.* Enhance secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Microbes and Infection*, 1991, **98**: 177 - 183.