

# H1 亚型猪流感病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立及其应用

高蕾<sup>1</sup>, 刘思当<sup>1</sup>, 肖一红<sup>1</sup>, 刘为民<sup>2</sup>, 刘文军<sup>3</sup>, 孙蕾<sup>3</sup>

1 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018

2 佛山科学技术学院, 佛山 528231

3 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

**摘要:** 为建立 H1 亚型猪流感病毒抗体检测方法, 扩增了 H1N1 亚型猪流感病毒流行株的血凝素基因 HA1 部分, 构建原核表达载体 pET30a-HA1, 并转化大肠杆菌 BL21 表达重组蛋白。对重组蛋白包涵体进行变性、复性和 Ni-NTA 亲和层析纯化。以纯化后的蛋白作包被抗原, 建立间接 ELISA 检测方法。利用该方法检测了 2008-2009 年采集的猪血清 785 份, 阳性率为 15.54%, 不同省份的阳性率存在差异 (8%~47%)。以 IDEXX 相关试剂盒检测结果作为参照, 该方法的诊断特异性达到 91%, 诊断敏感性达到 95%。

**关键词:** H1 亚型猪流感病毒, 血凝素, 间接 ELISA

## Indirect ELISA for detection of antibodies against swine influenza virus (H1N1)

Lei Gao<sup>1</sup>, Sidang Liu<sup>1</sup>, Yihong Xiao<sup>1</sup>, Weimin Liu<sup>2</sup>, Wenjun Liu<sup>3</sup>, and Lei Sun<sup>3</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2 Foshan University, Foshan 528231, China

3 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** In order to detect antibody against swine influenza virus (H1N1), HA1 region of hemagglutinin gene in epidemic swine influenza virus (H1N1) strain was amplified and subcloned into prokaryotic expression vector pET30a. Then recombinant HA1 protein was expressed by *Escherichia coli* BL21. The purified recombinant HA1 protein was obtained after the treatment of denaturing, refolding and affinity chromatography with immobilized nickel chelating NTA (Ni-NTA). An indirect enzyme-linked

**Received:** October 28, 2010; **Accepted:** January 24, 2011

**Supported by:** Major Special Technological Program of Transformation of Initiatively Innovative Achievements in Shandong Province (No. 2008ZHGX1A1101), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (Nos. KSCX2-YW-R-158, KSCX2-EW-Q-14), National Key Technology R&D Program (No. 2010BAD04B01-7), Open Fund of Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Chinese Academy of Sciences (No. 2009CASPMI-005).

**Corresponding author:** Sidang Liu. Tel: +86-538-8248204; E-mail: liusid@sdau.edu.cn

Lei Sun. Tel: +86-10-64807497; E-mail: sunlei362@im.ac.cn

山东省自主创新成果转化重大专项 (No. 2008ZHGX1A1101), 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (Nos. KSCX2-YW-R-158, KSCX2-EW-Q-14), 国家科技支撑计划 (No. 2010BAD04B01-7), 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室开放基金 (No. 2009CASPMI-005) 资助。

immunosorbent assay (ELISA) method was established using the purified protein as antigen. Then 785 swine serum samples collected during 2008–2009 were detected by this method, and the positive ratio was 15.54%. There were diversities among provinces (8%–47%). The diagnostic specificity and diagnostic sensitivity of this method arrived at 91% and 95% respectively, using the results of IDEXX ELISA kit as reference.

**Keywords:** swine influenza virus (H1N1), hemagglutinin, indirect ELISA

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由 A 型流感病毒引起的一种急性、传染性猪的呼吸道疾病, 其特征为突发、咳嗽、呼吸困难、发热、衰竭, 还可导致怀孕母猪繁殖障碍<sup>[1-3]</sup>。H1 与 H3 亚型猪流感病毒, 特别是 H1N1、H3N2 和 H1N2 亚型猪流感病毒是引起猪呼吸系统疾病的重要原因<sup>[1]</sup>。在我国大陆, 郭元吉等于 1991 年 10 月至 1992 年 1 月间首次在表面健康猪群中分离到了经典 H1N1 亚型 SIV<sup>[4-5]</sup>。2000 年之前, 未见我国大陆猪群中有经典 SI 流行的报道, 而 2000 年后经典 SIV 的活动显著提高。2001–2008 年, 在我国不同地区和省份的猪场都有分离出 H1N1 亚型 SIV 和 H3N2 亚型的报道<sup>[6-9]</sup>。研究表明, 猪体内既含有人流感病毒受体, 又含有禽流感病毒受体, 因此猪是人流感病毒株与禽流感病毒株的中间宿主和混合器。可通过基因重排产生抗原转移而导致新流感病毒株的出现, 进而使病毒可能突破种间障碍, 扩大感染谱系, 危害动物及人类健康<sup>[10]</sup>。因此, 无论是血清学方面还是病原学方面, 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, 都具有十分重要的公共卫生学意义。本研究旨在利用原核高效表达系统在大肠杆菌中表达 SIV (H1N1) 流行毒株的 HA1 重组蛋白, 以此为检测抗原建立检测 SIV (H1N1) 抗体的间接 ELISA 方法, 并用该方法检测我国 H1 亚型猪流感病毒的抗体水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 由本实验室保存; PMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司; pET30a 表达载体购自基因动力公司。

#### 1.1.2 病毒和血清

猪流感病毒 H1N1 亚型毒株, 2008 年分离自山东, 本实验室保存; 785 份猪血清, 2008–2009 年采集自河北、山东、广东, 本实验室保存; 猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 阳性血清、猪瘟病毒 (CFSV) 阳性血清、猪圆环病毒二型 (PCV2) 阳性血清、猪流感病毒 H1N1 亚型阳性血清和阴性血清和猪流感病毒 H3N2 亚型 (SIV H3N2) 阳性血清, 由本实验室保存。

#### 1.1.3 主要试剂

*Pfu* 酶、*Taq* 酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、TMB 底物购自北京博迈德公司; Ni-NTA 纯化柱购自 QIAGEN 公司; 96 孔酶标板购自 Jet 公司; 猪流感 H1N1 亚型 ELISA 抗体检测试剂盒购自 IDEXX 公司; HRP 标记的羊抗猪 IgG 购自 Sigma 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 原核表达并纯化 H1N1 亚型猪流感病毒重组 HA1 蛋白

原核表达载体 pET30a-HA1 的构建: 以猪流感病毒 H1N1 亚型流行株的 cDNA 为模板, 设计一对引物 (上游引物: 5'-CGCGGATCCGCAGACACAC TATG-3', 下划线所示为 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTCAAGATTGAATAGAC-3', 下划线所示为 *Xho* I 酶切位点), 扩增编码血凝素蛋白 (HA) 基因精氨酸裂解位点之前的 HA1 部分 (不含信号肽), 共 981 bp。扩增出的目的片段连接到 T 载体上, 转化并挑取阳性克隆测序。测序正确的重组质粒经过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 连接到同样双酶切的表达载体 pET30a (带有 His 标签) 上, 转化

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经 PCR 和双酶切鉴定正确后, 送至北京博迈德科技发展有限公司测序。将测序正确的重组表达质粒命名为 pET30a-HA1。

重组蛋白的表达、纯化以及 Western blotting 检测: 经鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 1:100 接种于含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 分摇床培养至 OD 值为 0.6~0.8, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 再培养 4 h。SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。诱导后的重组菌 4 000 r/min 离心 20 min 收菌, 超声破碎, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min 分离上清和沉淀, SDS-PAGE 检测蛋白表达方式。离心后的沉淀用 PBST 重悬后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 再用 1 mmol/L NaCl 溶液重悬离心, 交替 2 次洗涤沉淀。沉淀用变性剂 (6 mol/L 盐酸胍, 2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L DTT) 溶解后, 采用稀释复性法进行复性。复性后的蛋白利用 Ni 柱亲和层析纯化, 操作按照步骤。纯化后的蛋白使用 BCA 法检测蛋白浓度。Western blotting 检测重组 HA1 蛋白: 操作按照步骤<sup>[13]</sup>: 重组蛋白进行 SDS-PAGE 后, 转膜。一抗 (1:500) 为猪流感 H1N1 亚型标准阳性血清, 对照为阴性血清。二抗 (1:5 000) 为 HRP 标记的羊抗猪 IgG。

### 1.2.2 间接 ELISA 方法的建立

基本步骤: 抗原包被。每孔包被抗原 50~200 ng, 4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜或 37  $^{\circ}\text{C}$  包被 5 h。用封闭液 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 3 h 或 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, 然后用 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。将猪血清用稀释液按一定比例稀释后, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min, 用 PBST 洗涤 5 次。HRP 标记二抗用稀释液按一定比例稀释后, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min, 用 PBST 洗涤 5 次。每孔加入 TMB 显色液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min 后加入终止液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。最后酶标仪测定  $A_{450}$ 。

反应条件的优化: 采用棋盘法<sup>[8]</sup>。重组蛋白用包被液分别稀释至 0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 包被到 96 孔板上。标准阳性血清和阴性血清按照

1:50、1:100、1:200、1:400 梯度稀释。棋盘法确定最佳反应条件。酶标二抗按照 1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 梯度稀释, 确定最佳反应条件。标准阳性血清  $OD_{450}$  值在 1.0 左右, 标准阴性血清  $OD_{450}$  值较低, 二者之比最大时的反应条件为最佳。

特异性试验: 分别将常见猪病病毒阳性血清作最佳稀释, 进行 ELISA 检测, 同时设立猪流感病毒 H1N1 亚型阳性血清和阴性血清作对照。

重复性试验: 批内重复性: 将同一批次包被有重组抗原的 ELISA 检测板分别检测 10 份血清, 每份重复 3 次, 计算其变异系数。批间重复性: 将不同批次的包被有重组抗原的 ELISA 检测板分别检测 10 份血清, 每份重复 3 次, 计算其变异系数。

临界值的确定: 结果计算:  $S/P$  值=(待测样本  $OD_{450}$ -阴性对照  $OD_{450}$ )/(阳性对照  $OD_{450}$ -阴性对照  $OD_{450}$ ), 以猪流感 H1N1 亚型 ELISA 抗体检测试剂盒 (IDEXX) 作为参照, 将试剂盒检出的 100 份阳性血清和 100 份阴性血清用本方法进行检测。二者的结果输入统计软件 SPSS (14.0) 进行 ROC 分析确定临界值。

### 1.2.3 临床样本的检测及与试剂盒检测结果的比较

检测 2008~2009 年采集自河北省、山东省、广东省的猪血清 785 份, 并与 IDEXX 试剂盒检测结果比较, 使用统计软件 SPSS (14.0) 进行 ROC 分析, 计算其诊断特异性 (Diagnostic specificity, DSP) 和敏感性 (Diagnostic sensitivity, DSN)。DSN=真阳性样本数/(真阳性样本数+假阴性样本数), DSP=真阴性样本数/(真阴性样本数+假阳性样本数)。

## 2 结果

### 2.1 H1N1 亚型猪流感病毒重组 HA1 蛋白的原核表达及纯化

#### 2.1.1 原核表达载体 pET30a-HA1 的构建

PCR 产物及重组载体 pET30a-HA1 双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 1 000 bp 处有特异性条带

(图 1)。测序结果表明,目的基因序列未发生突变碱基,且阅读框正确,表明成功构建含有 HA1 基因的重组表达载体 pET30a-HA1。

### 2.1.2 重组蛋白的表达、复性和纯化

重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 在 37 °C, 诱导剂 IPTG 浓度为 1 mmol/L, 培养 4 h, 蛋白得到高效表达。蛋白表达情况经 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 (图 2), 目的蛋白大小约为 50 kDa, 可以与猪流感病毒 H1N1 亚型阳性血清发生特异性反应。纯化后的蛋白浓度为 0.410 mg/mL。

## 2.2 间接 ELISA 方法的建立

### 2.2.1 反应条件的优化

棋盘法结果表明: 抗原最佳包被量、血清最佳稀

释倍数、酶标二抗最佳稀释倍数分别为: 0.5 μg/mL, 1:100 和 1:10 000 (图 3A)。

### 2.2.2 特异性试验和重复性试验

特异性试验: 包被抗原与其他常见猪病病毒阳性血清没有交叉反应 (图 3B), 其中猪流感病毒 H3N2 亚型标准阳性血清的检测值 (0.20) 与阴性血清的检测值 (0.18) 没有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 说明该 H1 亚型猪流感病毒包被抗原与 H3 亚型猪流感病毒标准阳性血清没有交叉反应。

重复性试验: 批内重复性, 变异系数为 0.56%~8.21%, 低于 10%; 批间重复性, 变异系数为 4.15%~14.5%, 低于 15%, 说明该体系较稳定。

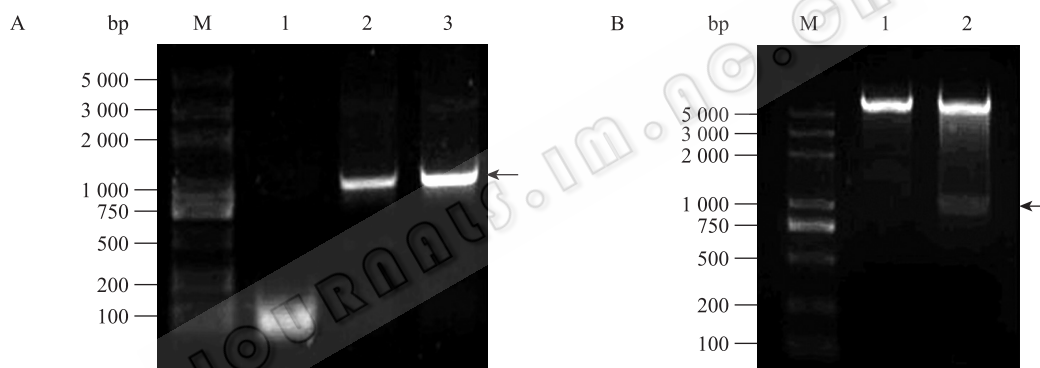


图 1 PCR 及重组载体双酶切鉴定结果

Fig. 1 Results of PCR and recombinant plasmid digested by restriction endonucleases. (A) PCR products of HA1 gene. M: DNA marker; 1: negative control; 2,3: PCR products. (B) Identification of recombinant plasmid digested by restriction endonucleases. M: DNA marker; 1: negative control; 2: digestion products.

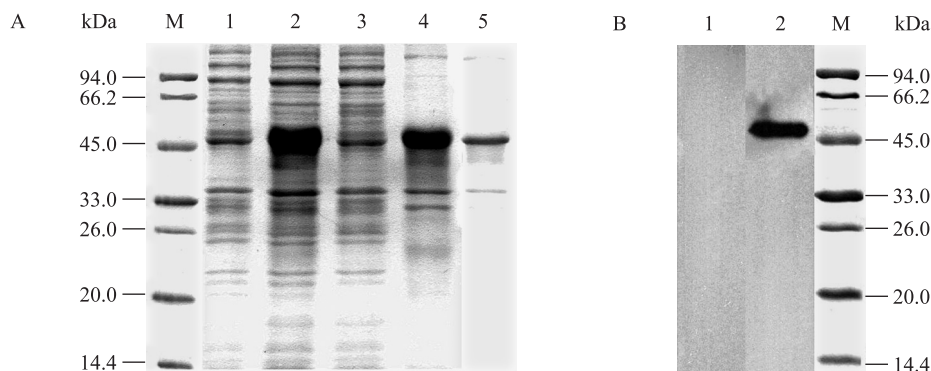


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B) 结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis (A) and Western blotting analysis (B) of the recombinant protein. (A) SDS-PAGE analysis. M: protein marker; 1: bacteria lysate before inducing; 2: bacteria lysate after inducing; 3: supernatant; 4: sediment; 5: the purified protein. (B) Western blotting analysis of the purified recombinant HA1-protein. 1: treating with negative serum; 2: treating with anti-SIV H1N1 serum; M: protein marker.

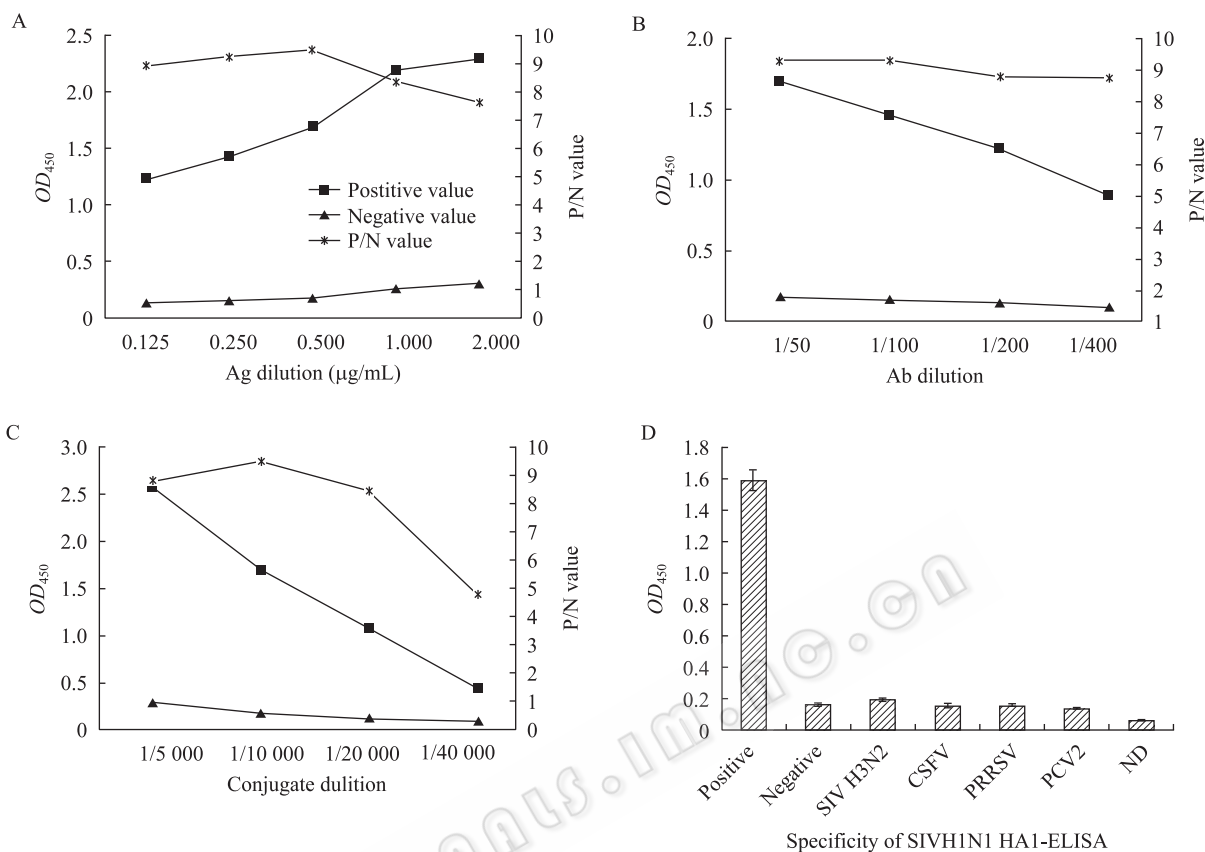


图 3 反应条件的优化和特异性实验

Fig. 3 Optimization of ELISA working conditions and specificity of ELISA. optimization of antigen concentration (A), serum sample dilution (B), conjugate dilution (C) and specificity of ELISA (D).

### 2.2.3 临界值的确定

通过 ROC 分析, 临界值为  $S/P=0.26$ , 检测结果高于 0.26, 判定为阳性; 低于 0.26, 判定为阴性。

## 2.3 临床样本的检测及与试剂盒检测结果的比较

### 2.3.1 临床样本的检测

共检测 2008–2009 年采集自河北省、山东省、广东省的猪血清 785 份。其中阳性 122 份, 阴性 663 份, 阳性率为 15.54%, 各省的阳性率分别为河北省 8.15% (30/368); 山东省 9.78% (27/276); 广东省 46.10% (65/141)。

### 2.3.2 与 IDEXX 试剂盒检测结果的比较

使用猪流感 H1 亚型 ELISA 抗体检测试剂盒 (IDEXX) 对 785 份血清进行检测, 将 SIV(H1)ELISA 检测结果与试剂盒检测结果进行比较 (表 1): 以

表 1 H1N1 亚型猪流感 ELISA 检测与 IDEXX 试剂盒检测 785 份猪血清的结果比较

Table 1 Comparison of the SIV (H1N1) ELISA and the IDEXX ELISA for 785 field sera

SIV(H1N1)ELISA	IDEXX ELISA		
	Positive	Negative	Total
Positive	87	35	122
Negative	9	654	663
Total	96	689	785

IDEXX 试剂盒检测结果作为参照, SIV(H1)ELISA 检测的诊断特异性 (DSP) 达到 95% (87/96), 诊断敏感性 (DSN) 达到 91% (654/689)。

## 3 讨论

血凝素 (HA) 是 SIV 变异、病毒毒力和宿主特

异性的主要决定因素,是病毒的表面抗原<sup>[9-10]</sup>,具有免疫原性,也是诱导体液免疫最主要的保护性抗原<sup>[17-18]</sup>。HA分为重链HA1和轻链HA2,两者之间以一个精氨酸相连。HA的大部分抗原决定簇集中在HA1上,因此,HA1具有HA的主要抗原表位<sup>[19-20]</sup>。本实验利用原核表达系统表达了2008年分离到的SIV(H1N1)毒株的HA1区域,重组蛋白以包涵体形式表达,并对其进行了变性、复性,使其蛋白构象更接近于其天然构象,从而保证其抗原表位的准确性。Western blotting检测结果表明,HA1蛋白能够被H1N1亚型SIV抗血清所特异性识别,证明所表达的重组蛋白具有很好的免疫学活性。

H1与H3亚型猪流感病毒,特别是H1N1、H3N2和H1N2亚型猪流感病毒是引起猪呼吸系统疾病的重要原因,在世界范围内显地方流行性<sup>[1]</sup>。经过长期的进化,这3种亚型的病毒已成为猪体内的适应毒株,长期稳定存在于猪群中,严重危害着养猪业的健康发展。2009年爆发的甲型H1N1流感,其病原甲型H1N1流感病毒的所有基因片段来源于目前流行的SIV<sup>[3-10]</sup>,而且近年来国内外不断有分离到基因重排H1亚型猪流感病毒的报道<sup>[21-23]</sup>。了解猪流感的感染情况,不仅可为促进养猪的健康发展提供制定防控计划的科学依据,也是防控人流感的重要环节。血清学调查是防控猪流感的必要手段,而建立行之有效的检测方法就成了当务之急。本研究利用建立的ELISA方法检测了2008-2009年自河北、山东、广东省所采集的猪血清共785份,发现其阳性率为15.54%(122/785),不同省份的阳性率也存在差异(8%~47%)。其中河北省与广东省检测阳性率差异较大(分别为8.15%和46.1%),分析其原因比较复杂,一方面可能是由于地理位置相隔较远,气候和环境的不同导致H1亚型猪流感的感染和流行情况有差异;另一方面,采样时机和采样猪场也对检测结果有较大的影响;而且每个省我们只检测了数百份样品,可能未能充分地反映当地猪群的抗体水平。其他文献报道<sup>[24-25]</sup>,2004-2007年采集自福

建省的猪血清,H1亚型猪流感抗体阳性率为45.5%(413/908);1999-2009年全国范围内采集的猪血清,H1亚型猪流感抗体阳性率为31.1%(3478/11168),不同地区存在差异(2.4%~38.0%),说明猪场存在较普遍的H1亚型猪流感的感染。

我们将临界值定为0.26(S/P),本方法的检测结果与常用的IDEXX试剂盒检测结果相比,诊断敏感性达到91%,诊断特异性达到95%,说明两种方法的符合率很高。而对于大规模的血清学检测来说,在保证检测准确性的前提下,检测成本以及安全性也是重要的因素。本研究建立的SIV(H1N1)ELISA利用原核表达获得重组蛋白,容易获得纯化的蛋白,保证检测的特异性,与全病毒包被抗原相比,杜绝了安全隐患,大大降低了生产成本,具有较好的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*, 2000, 74(1/2): 29-46.
- [2] Heinen PP, De Boer-Luijtz EA, Bianchi ATJ. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic influenza A virus infection. *J Gen Virol*, 2001, 82(11): 2697-2707.
- [3] Choi YK, Goyal SW, Joo HS. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the unitedstates. *Arch Virol*, 2002, 147(6): 1209-1220.
- [4] Guo YJ, Webster RG, Zhuge YH, et al. The discovery and source-investigation of swine influenza virus (H1N1) in Chinese pig population. *Chin J Exp Clin Virol*, 1992, 6(4): 347-351.  
郭元吉, Webster RG, 诸葛亚辉, 等. 我国猪群中猪型(H1N1)流感病毒的发现及其来源的调查. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1992, 6(4): 347-351.
- [5] Guo YJ, Webster RG, Wang M. Analysis of nucleotide sequence of Haemagglutinin gene of swine Influenza A virus. *Chin J Exp Clin Virol*, 1995, 9(1): 11-14.  
郭元吉, Webster RG, 王敏. 猪型流感病毒血凝素基因的核苷酸全序列分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1995, 9(1): 11-14.

- [6] Wang LX, Bi YZ, Cao YC. Cloning and sequence analysis of the HA partial gene of six strains of swine influenza virus. *Chin J Vet Sci*, 2003, 23(5): 438-441.  
王连想, 毕英佐, 曹永长. 6 株猪流感病毒分离株 HA 部分基因的克隆和序列分析. *中国兽医学报*, 2003, 23(5): 438-441.
- [7] Chen JY, Li HY, Shen ZY, et al. Molecular evolution of hemagglutinin gene of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated from the mainland of China. *Chin J Pre Vet Med*, 2005, 27(1): 13-17.  
陈君彦, 李海燕, 申之义, 等. H1N1 亚型猪流感病毒中国分离株血凝素基因分子演化的研究. *中国预防兽医学报*, 2005, 27(1): 13-17.
- [8] Wei H, Zhang DM, Zhuang XS, et al. Isolation and identification of a prevalent swine influenza virus strain from Fujian. *J South China Agri Univ*, 2007, 28(2): 119-121.  
魏宏, 张德明, 庄向生, 等. 猪流感福建流行毒株的分离、鉴定. *华南农业大学学报*, 2007, 28(2): 119-121.
- [9] Wen NH, Wu DM, Song YH, et al. Isolation and identification of type A swine influenza virus. *Protein Vet Med*, 2008, 29(4): 53-55.  
温纳华, 吴德铭, 宋延华, 等. 猪流感病毒的分离与鉴定. *动物医学进展*, 2008, 29(4): 53-55.
- [10] Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*, 1998, 72(9): 7367-7373.
- [11] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [12] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 2009, 325(5937): 197-201.
- [13] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: A840-A854.
- [14] Crowther JR. *The ELISA Guidebook/Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 2000: 1-413.
- [15] Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*, 1999, 73(10): 8851-8856.
- [16] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258(1): 1-20.
- [17] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69(7): 531-569.
- [18] Raymond FL, Caton AJ, Cox NJ, et al. The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. *Virology*, 1986, 148(2): 275-287.
- [19] Bush RM, Fitch WM, Bender CA, et al. Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(11): 1457-1465.
- [20] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*, 1982, 31(2 Pt 1): 417-427.
- [21] Choi YK, Goyal SM, Farnham MW, et al. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of influenza A virus from pigs in the United States. *Virus Res*, 2002, 87(2): 173-179.
- [22] Jung K, Chae C. Phylogenetic analysis of an H1N2 influenza a virus isolated from a pig in Korea. *Arch Virol*, 2004, 149(7): 1415-1422.
- [23] 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.
- [24] Song XH, Xiao H, Huang Y, et al. Serological surveillance of influenza a virus infection in swine populations in Fujian province, China: no evidence of naturally occurring H5N1 infection in pigs. *Zoonoses Public Health*, 2010, 57(4): 291-298.
- [25] Liu W, Wei MT, Tong Y, et al. Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza a viruses in the Chinese pig population: a pooled data analysis. *Vet J*, 2011, 187(2): 200-206.