



叶存栋, 胡静思, 贾 坤, 等. 从噬菌体随机七肽库中筛选抗 H3N2 亚型犬流感病毒多肽的研究[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 12-17.

从噬菌体随机七肽库中筛选抗 H3N2 亚型 犬流感病毒多肽的研究

叶存栋^{1,2}, 胡静思^{1,2}, 贾 坤^{1,2}, 李陆涛^{1,2}, 刘荣昌¹, 涂黎晴^{1,2}, 孙凌霜^{1,2}, 李守军^{1,2}

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】以纯化的 H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 蛋白为作用靶点, 从噬菌体随机七肽库中筛选出具有抗流感病毒活性的亲和多肽。【方法】运用噬菌体展示技术, 以纯化的 H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 蛋白为作用靶点, 从噬菌体随机七肽库中筛选 HA1 蛋白亲和多肽, 并对获得的多肽进行鸡胚水平和细胞水平抗 H3N2 亚型流感病毒活性验证。【结果和结论】经过 4 轮体外亲和筛选获得了 6 条 HA1 蛋白亲和多肽, 6 条多肽对 H3N2 亚型流感病毒有不同程度的抗病毒活性, 其中以 HA-4 的抗病毒活性最强。试验结果表明噬菌体随机肽库技术能够应用于抗病毒研究。

关键词:犬流感病毒; H3N2 亚型; 血凝素 HA1 亲和肽; 噬菌体随机肽库; 抗病毒多肽

中图分类号: S859

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)05-0012-06

A study of anti-H3N2 canine influenza virus polypeptides selected from the phage display random heptapeptide library

YE Cundong^{1,2}, HU Jingsi^{1,2}, JIA Kun^{1,2}, LI Lutao^{1,2}, LIU Rongchang¹,
TU Liqing^{1,2}, SUN Lingshuang^{1,2}, LI Shoujun^{1,2}

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Key Laboratory of Comprehensive Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases of Guangdong Province, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To find specific affinity peptide which inhibited replication of canine influenza virus (CIV), and the ligands on the CIV Hemagglutinin HA1 subunits were screened from the phage display random library. 【Method】The CIV Hemagglutinin HA1 subunits as the target were screened out through affinity selection from the heptapeptide phage library, and the affinity peptide which possessed anti-viral properties of H3N2 subtype of influenza virus were tested in chicken embryos or *in vitro*. 【Result and conclusion】After four rounds of affinity panning, six peptides were identified. Six peptides have various degrees of an antiviral activity of H3N2 subtype *in vitro* or *in vivo*, especially the peptide HA-4, which shows the strongest antiviral activity. Experimental results show that the phage random peptide library technology can be used in the antiviral research.

收稿日期: 2014-11-06 优先出版时间: 2015-07-27

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1455.031.html>

作者简介: 叶存栋 (1990—), 男, 硕士研究生, E-mail: 781935077@qq.com; 通信作者: 李守军 (1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: shoujunli@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31372448); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303042); 国家重点基础研究发展计划 (2011CB504700-G); 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室资助项目 (2013A061401013); 广东省自然科学基金 (S2013020013858); 广东省科技计划项目 (2011B020306007); 促进科技服务业发展计划项目 (2013B040200032)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

Key words: canine influenza virus; H3N2 subtype; HA1 binding peptide; phage display random peptide library; antiviral peptide

2006年,全新的甲型 H3N2 亚型犬流感病毒 (Canine influenza virus, CIV) 在中国广东省被分离,经过基因组序列比对分析显示为禽源性的流感病毒^[1]。随后的研究发现 H3N2 亚型犬流感病毒在犬群中有很高的发病率,该病毒在犬群中流行并可能对犬以及人类健康造成威胁^[2-4]。

面对流感疫情,目前预防和控制主要的方法是接种疫苗和使用抗病毒药物,但是甲型流感病毒易发生变异和重组,并且疫苗的研制相对滞后,导致流感疫苗的作用有限,尤其是在流行的早期,流感的防治必须依靠药物^[5-6]。金刚烷衍生物(金刚烷胺等)和神经氨酸酶抑制剂(奥司他韦等)是目前使用的预防和治疗流感的药物。金刚烷胺等是 M2 离子通道阻断剂,能抑制病毒在感染细胞中的复制^[7];奥司他韦(达菲)等是通过抑制神经氨酸酶的活性,防止病毒从感染的细胞中释放出来^[8]。但是这些药物毒性大,价格高,甚至可能有严重的不良反应,广泛应用还产生了一定程度的耐药性,因此有必要开发新型的抗流感药物^[9]。

H3N2 亚型犬流感病毒属于正黏病毒科的单股负链 RNA 病毒,为 I 型包膜病毒,进入靶细胞的过程需要膜糖蛋白血凝素(Hemagglutinin, HA)的介导^[10]。HA 分子由 HA1 和 HA2 亚基构成。HA1 与靶细胞膜上的唾液酸受体相结合使病毒附着在宿主细胞上,在病毒的侵入过程中起关键的作用,因此 HA1 蛋白可作为靶蛋白用来筛选流感病毒侵入细胞的抑制剂。噬菌体展示技术(Phage display)是近年来出现的一种新的分子生物学技术,它可对含有数以亿计克隆的随机肽库进行快速的高通量筛选,用于与分子识别有关的领域,已经成为抗病毒制剂筛选、抗原表位分析、多肽药物研究和分子诊断试剂开发等强有力的工具^[11-13]。

本研究旨在运用噬菌体随机七肽库对纯化的 H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 蛋白进行 4 轮亲和筛选,使用 ELISA 方法和抗病毒试验验证,以获得具有 HA1 蛋白高亲和力并且能够抑制 H3N2 亚型流感病毒复制的多肽,为开发抗流感病毒药物和诊断试剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

流感病毒毒株 H3N2 亚型犬流感(CIV) A/canine/Guangzhou/01/2006 和 H3N2 亚型禽流感(AIV) A/Duck/Guangdong/W12/2011 由华南农业大学兽医学院外科实验室保存;H3N2 亚型犬流感病毒 HIS-HA1 融合表达蛋白 HA1 相对分子质量约为 58 000,由华南农业大学兽医学院外科实验室表达及纯化^[14],能与 H3N2 亚型 CIV 阳性血清发生特异性反应;MDCK 细胞由华南农业大学兽医学院外科实验室保存,培养于含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液;9 日龄 SPF 鸡胚购自梅里亚维通实验动物技术公司;噬菌体随机七肽库 Ph. D-7TM 为 New England Biolabs 公司产品;M13 HRP 标记单克隆抗体为 GE Healthcare 公司产品;CCK8 试剂盒为凯基生物技术公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 噬菌体随机七肽库筛选 以纯化的 H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 蛋白作为靶分子对随机七肽库进行筛选。将 HA1 蛋白稀释于 NaHCO₃ (0.1 mol · L⁻¹, pH 8.6) 包被液中至质量浓度为 10 μg · mL⁻¹,取 200 μL 包被酶标板,置于湿盒中 4 °C 孵育过夜,链霉亲和素(0.1 mg · mL⁻¹, 100 μL)作为对照同样包被。弃包被液,加满封阻液,4 °C 作用 1 h。TBST (TBS + 体积分数为 0.1% Tween-20) 缓冲液洗涤 6 次后,取 10 μL 噬菌体随机七肽库(2 × 10¹¹ PFU) 稀释于 200 μL TBST 缓冲液中,室温孵育 1 h。TBST 洗涤 6 次后,用 0.2 mol · L⁻¹ Glycine-HCl (pH 2.2) 洗脱结合噬菌体,并用 1 mol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 9.1) 中和。吸取 1 μL 洗脱液测定噬菌体滴度,余下洗脱液吸取 5 μL 进行扩增并测定扩增后噬菌体滴度。共进行 4 轮筛选,每轮包被的抗原量依次递减,分别为 10、5、1、1 μg · mL⁻¹;TBST 缓冲液中 Tween-20 的体积分数依次递增,分别为 0.1%、0.2%、0.5%、0.5%。

1.2.2 筛选产物与靶蛋白 HA1 结合活性的 ELISA 鉴定 将第 4 轮筛选得到的噬菌体库 10 倍系列稀释,感染大肠埃希菌 ER2738 后铺于双层琼脂板中间。从少于 100 个蓝色噬菌斑的平板上随机挑取 30

个,分别进行扩增纯化.纯化后的噬菌体一部分提取核酸用于测序,另一部分滴度测定后用于 ELISA 检测.将 HA1 蛋白以 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包被 ELISA 板,对 4 轮筛选的洗脱产物和挑出的 30 个噬菌体克隆取 2×10^{11} PFU 进行 ELISA 检测,噬菌体克隆进行 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 共 3 个稀释度稀释,同时以野生型 M13 噬菌体为阴性对照,以 BSA 为空白对照.

1.2.3 噬菌体阳性克隆的序列测定 参照噬菌体展示七肽库说明书,使用 NaI 法快速提取纯化后噬菌体的单链 DNA,并以此为模板,PCR 扩增噬菌体展示多肽的 DNA 片段送交华大基因测序,测序引物为 5'-GTATGGGATTTTCTAAACAAC-3'. 根据 DNA 测序结果推导出噬菌体展示多肽的氨基酸序列.

1.2.4 多肽的合成与纯化 本试验中所用的多肽均由北京中科亚光生物科技有限公司合成并纯化.

1.2.5 多肽对 SPF 鸡胚中流感病毒繁殖的影响 取 50 μL 血凝单位为 8 的 CIV 和 AIV 分别与 50 μL 不同浓度的亲和多肽混合并于室温孵育 1 h,将混合液注入 9~11 日龄鸡胚中,测定病毒滴度,PBS 缓冲液作为阴性对照.

1.2.6 多肽在细胞水平对流感病毒复制的影响 选取对数期生长的 MDCK 细胞,铺 96 孔板,每孔 5 000 个细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 细胞培养箱培养 24 h.取不同浓度的多肽和 100 TCID₅₀ 的 CIV 和 AIV 混合,室温作用 1 h 后接种于 MDCK 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后用 PBS 缓冲液洗脱未吸附的病毒,加入含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ TPCK 胰酶的 DMEM 细胞维持液,置培养箱中培养 48 h,每孔重复 3 次,用 CCK8 法检测各孔细胞存活率.

1.2.7 细胞毒性试验 96 孔板中每孔接种约 5 000 个 MDCK 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h,以含有系列稀释度待测多肽的维持液替换培养液,继续培养 48 h,光学显微镜下观察细胞形态并于每孔中加入 $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CCK8 溶液 10 μL ,继续培养 4 h,测定 $D_{450 \text{ nm}}$ 值.每个浓度设 4 孔平行,计算平均值用于评价被测多肽对细胞的毒性.

1.2.8 统计学分析 所有试验至少设 3 个独立的重复.试验数据以平均值 \pm 标准差表示,用 SigmaPlot 12.2 软件进行统计分析.试验组与对照组样本平均数采用单因素方差分析.

2 结果与分析

2.1 噬菌体随机七肽库的筛选

以纯化的 H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 蛋白为作

用靶分子对噬菌体随机七肽库进行 4 轮亲和筛选,每轮筛选前加入的噬菌体量和洗脱后的噬菌体量进行比较,4 轮筛选噬菌体投入产出比逐渐增高(表 1),说明噬菌体得到了很好的富集.ELISA 鉴定结果显示每轮洗脱产物与 HA1 蛋白的亲合力逐步提高(图 1),经过第 4 轮筛选后的噬菌体展示肽库产率和结合力没有很大的提高,说明富集作用已达到最高,故停止筛选.

表 1 亲和筛选噬菌体的产率
Tab.1 Yield ratios of the phage by biopanning

筛选轮数	$\rho(\text{HA1})/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	输入噬菌体数/ (PFU $\cdot \text{mL}^{-1}$)	输出噬菌体数/ (PFU $\cdot \text{mL}^{-1}$)	产率
1	10	2×10^{11}	1.1×10^4	5.5×10^{-8}
2	5	2×10^{11}	3.5×10^6	17.5×10^{-6}
3	5	2×10^{11}	7.4×10^7	3.7×10^{-4}
4	1	2×10^{11}	8.2×10^7	4.1×10^{-4}

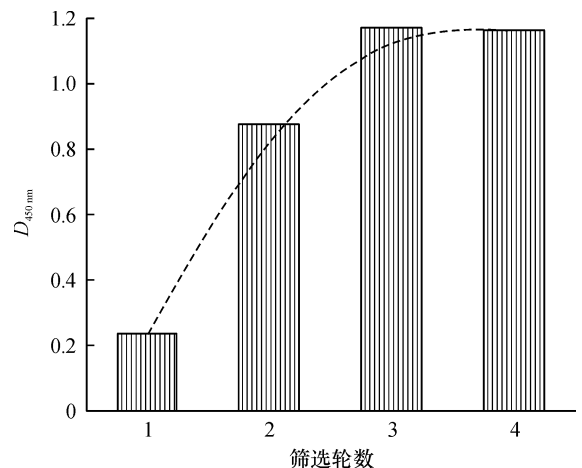


图 1 每轮洗脱产物多克隆噬菌体展示随机多肽与 HA1 蛋白的亲合力

Fig.1 Binding of polyclonal phage display peptides to protein HA1 from round 1 to 4

2.2 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆

第 4 轮筛选后,从少于 100 个蓝色噬菌斑的双层琼脂板中挑选 30 个进行 ELISA 鉴定,采用 BSA 为空白对照,野生型 M13 噬菌体为阴性对照,所测 $D_{450 \text{ nm}}$ 高于阴性对照 3 倍以上即可认定为阳性克隆.ELISA 结果显示挑取的 30 个克隆中有 17 个是阳性克隆,阳性噬菌体克隆的 HA1 蛋白亲合力如图 2 所示(部分数据未列出),野生型 M13 的 $D_{450 \text{ nm}}$ 很小,而阳性单个噬菌体克隆随着稀释度的升高, $D_{450 \text{ nm}}$ 逐渐增大,说明 6 个噬菌体克隆与 HA1 蛋白具有较高的亲合力.

2.3 噬菌体单克隆序列测定及多肽合成

将挑选的 30 个蓝色噬菌斑扩增纯化后进行 DNA 测序,根据测出的 DNA 序列推导出相应的氨基

酸序列,经序列比对并结合 ELISA 鉴定结果共获得 6 条不同的七肽(表 2),HA-4 的克隆累积频率达到 35.3%。北京中科亚光生物科技有限公司合成这 6 条 HA1 蛋白亲和肽,并使用 HPLC 方法纯化后用于后续试验(纯度大于 98.5%)。

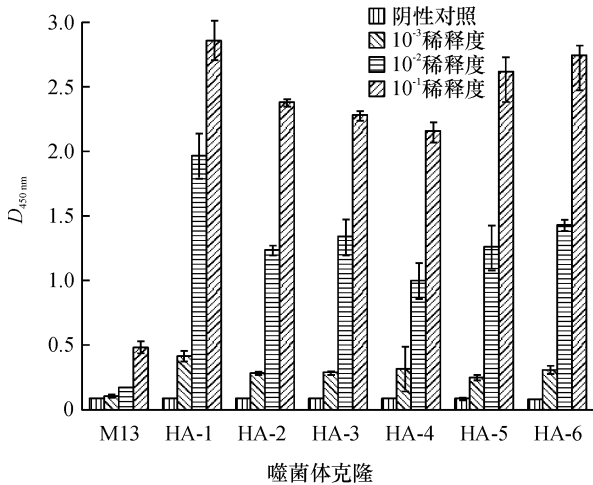


图 2 第 4 轮筛选的 6 个阳性噬菌体克隆不同稀释度的 HA1 蛋白亲和力 ELISA 检验结果

Fig.2 Detection of protein HA1 with monoclonal phage display peptides from round 4 by ELISA

表 2 噬菌体展示筛选得到的 6 条多肽序列

Tab.2 Six peptide sequences selected from the phage display random peptide library

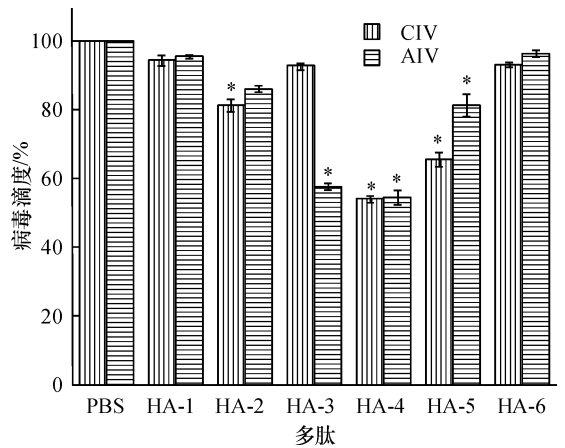
多肽编号	多肽序列	克隆累积频率/%
HA-1	WS***LH	17.6
HA-2	VS***PQ	5.9
HA-3	QL***PS	17.6
HA-4	AM***SK	35.3
HA-5	GQ***HL	17.6
HA-6	ET***AA	5.9

2.4 多肽在鸡胚水平抑制 H3N2 亚型流感病毒复制的验证

取浓度为 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的多肽 HA-1、HA-2、HA-3、HA-4、HA-5 和 HA-6 各 50 μL 分别与 50 μL 血凝单位为 8 的 CIV 和 AIV 混合,室温孵育 1 h 后注入鸡胚尿囊腔中,进行病毒滴度测定,PBS 作为阴性对照。图 3 显示了 6 条多肽在鸡胚内具有不同程度的抗病毒活性,其中 HA-3 对 AIV 的抗病毒活性明显强于 CIV;HA-4 对 2 种流感病毒的抗病毒活性相比其他多肽最好,能够使病毒滴度下降约 50%;HA-5 对 CIV 的抗病毒活性高于 AIV。

2.5 多肽 HA-4 在鸡胚水平和细胞水平抑制 H3N2 亚型流感病毒复制的验证

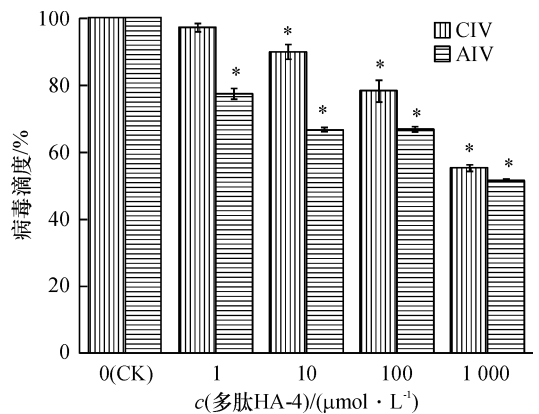
将 HA-4 稀释为 5 个浓度(0、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),各取 50 μL 分别与 50 μL 血凝



相同柱子上,*表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

图 3 亲和多肽在鸡胚内抗 H3N2 亚型流感病毒活性验证
Fig.3 Antiviral activities of binding peptides in chicken embryos

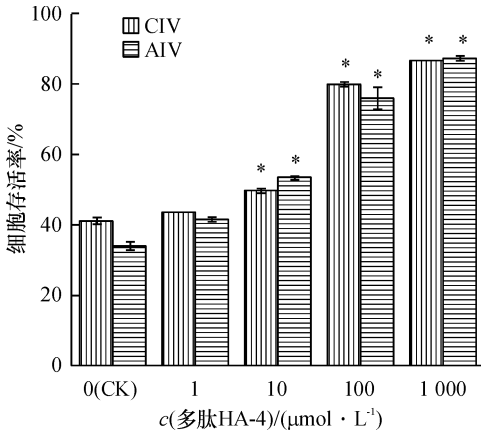
单位为 8 的 CIV 和 AIV 混合,室温下孵育 1 h 后进行鸡胚试验,测定病毒滴度。图 4 中显示了多肽 HA-4 对这 2 株病毒的繁殖都有抑制作用,在 100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下与阴性对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比具有显著性差异,随着多肽浓度的增高流感病毒的滴度在下降,说明多肽 HA-4 在鸡胚水平上抑制流感病毒增殖能力逐渐增强,并且呈现剂量依赖特征。



相同柱子上,*表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

图 4 多肽 HA-4 在鸡胚内抗 H3N2 亚型流感病毒活性
Fig.4 Antiviral activities of peptide HA-4 in chicken embryos

将稀释成 5 个浓度(0、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的多肽 HA-4 与 100 TCID₅₀ 的 CIV 和 AIV 混匀后室温孵育 1 h,接种于 MDCK 细胞,培养 48 h 后用 CCK8 法检测细胞存活率。结果如图 5 所示,多肽 HA-4 对 2 种流感病毒都有比较好的抑制作用,随着多肽浓度的增高,MDCK 细胞的存活率逐渐升高,说明多肽 HA-4 在细胞水平上抑制流感病毒增殖能力逐渐增强,并且呈现剂量依赖特征。

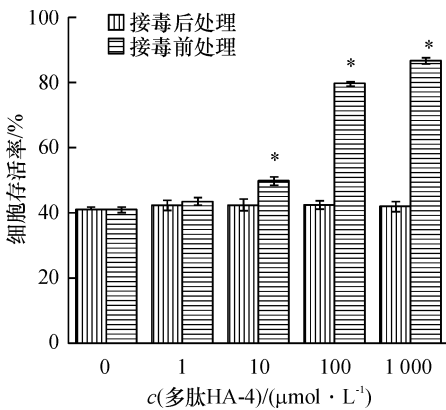


相同柱子上, *表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

图5 多肽 HA-4 在细胞水平抗 H3N2 亚型流感病毒活性

Fig. 5 Antiviral activities of peptide HA-4 in vitro

为了初步探究多肽 HA-4 作用于病毒感染细胞的阶段,细胞接毒前将稀释成 5 个浓度(0、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的多肽 HA-4 与 100 TCID₅₀ 的 CIV 混匀后室温孵育 1 h,接种于 96 孔板,培养 48 h 后用 CCK8 法检测细胞存活率;100 TCID₅₀ 的 CIV 接种于 96 孔板后,在细胞维持液中加入 5 个终浓度(0、1、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的多肽 HA-4,培养 48 h 后用 CCK8 法检测细胞存活率.如图 6 所示,多肽 HA-4 接毒前处理病毒组随着多肽浓度的增高细胞的存活率逐渐增高;接毒后添加多肽组与阴性对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)没有显著性差异,多肽对病毒复制的抑制作用不明显.多肽接毒前处理组比接毒后添加多肽组的细胞存活率明显提高,说明了多肽预处理组抑制流感病毒复制的作用明显,初步验证了多肽 HA-4 可能作用于流感病毒感染靶细胞的黏附阶段,与 HA1 蛋白结合阻止病毒附着靶细胞,从而发挥抗病毒作用。



*表示与阴性对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。

图6 多肽 HA-4 作用于病毒感染细胞阶段的验证

Fig. 6 Exploration of peptide HA-4 function in the stage of virus infect cells

2.6 细胞毒性试验

为了评估多肽对细胞的毒性,通过 CCK8 方法测定了不同浓度下 HA-4 对 MDCK 细胞的毒性. HA-4 在高达 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时仍未表现出明显的细胞毒性(图 7)。

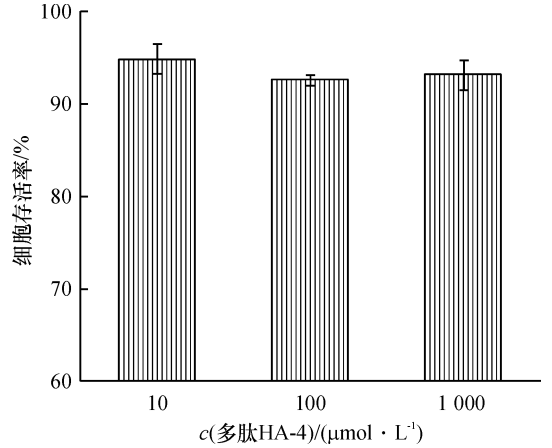


图7 多肽 HA-4 在 MDCK 细胞上的细胞毒性

Fig. 7 In vitro toxicities of peptide HA-4 in MDCK cells

3 讨论与结论

阐明抗原抗体反应的生物学分子作用机制,是研究正常生理学作用和疾病防治的基础和必要的步骤.流感病毒 HA 蛋白在病毒吸附和进入靶细胞的过程中起非常重要的作用,近年来,发现了很多小分子多肽作用于 HA 蛋白而抑制流感病毒的繁殖.2006 年 Jones 等^[15]发现的 1 条来源于成纤维细胞生长因子-4 的 20 个氨基酸的多肽(EB),具有广谱的抗流感病毒活性,作用机理是作用于流感病毒的 HA 蛋白阻止病毒进入细胞.2009 年 Rajik 等^[16]运用噬菌体随机肽库针对禽流感 H9N2 全病毒颗粒筛选出 1 条多肽,经鉴定作用于 HA 蛋白,对于 H9N2 亚型禽流感有非常显著的抗病毒活性.2013 年,汪崇文等^[17]以 H1N1 型流感病毒 HA 蛋白为作用靶点在噬菌体随机十二肽库中筛选出 9 条多肽,其中 H6 有明显的抗病毒活性. Jeon 等^[18]将 HA1 保守区域作为靶分子,通过 SELEX 程序筛选 DNA 寡核苷酸库,获得 2 个与靶分子特异结合最强的适应配体,在体外试验和动物模型中都能有效抑制流感病毒 HA 活性,而且能抑制不同禽流感病毒毒株的感染.这些抗流感病毒多肽的发现,为抗流感病毒药物的研究指明方向。

在本研究中,用 H3N2 亚型禽流感 HA1 蛋白作为靶分子进行噬菌体展示随机七肽库筛选,从而避免了使用全病毒颗粒筛选可能导致的 NA 以及 M2 蛋白的干扰^[16].筛选出来的阳性噬菌体克隆对 HA1

蛋白有很高的亲和力,6条 HA1 亲和多肽对犬流感 A/canine/Guangzhou/01/2006 和禽流感 A/Duck/Guangdong/W12/2011 病毒有不同程度的抑制活性,且成剂量依赖特性. 这些多肽可能模拟不连续的结合位点,与 HA1 蛋白从不同位置形成一个重要的接触面^[19]. 推断出多肽可以作用于 HA 蛋白的保守区域,从而抑制流感病毒与靶细胞受体的结合^[20]. 竞争 ELISA 试验证实了展示于噬菌体上的七肽段与 HA1 蛋白结合而不是噬菌体的其他部分. 阳性噬菌体克隆的 HA1 蛋白亲和力与亲和多肽的抑制病毒复制能力不呈现平行关系,试验显示 HA-4 具有最强抗病毒复制能力,但是噬菌体克隆的亲和力并不是最高. 这可能与不同多肽结合在 HA1 蛋白的不同位点有关,亲和力高的位点不一定跟病毒的黏附和侵入有关^[21]. 然而,需要进一步的研究来验证多肽具体的作用位点和机理,为研制高效的抗病毒分子药物和诊断试剂奠定基础.

参考文献:

- [1] LI S, SHI Z, JIAO P, et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China[J]. *Infect, Genet Evol*, 2010, 10(8): 1286-1288.
- [2] LEE C, SONG D, KANG B, et al. A serological survey of avian origin canine H3N2 influenza virus in dogs in Korea [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 137(3/4): 359-362.
- [3] 栗硕,李华涛,陈济钊,等. 犬流感(H3N2亚型)血清学调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(2): 201-204.
- [4] ZHANG Y, CHEN J, XIE J, et al. Serologic reports of H3N2 canine influenza virus infection in dogs in Northeast China[J]. *J Vet Med Sci*, 2013, 75(8): 1061-1062.
- [5] ELLEBDY A H, WEBBY R J. Influenza vaccines[J]. *Vaccine*, 2009, 27: D65-D68.
- [6] HILLEMANN M R. Realities and enigmas of human viral influenza: Pathogenesis, epidemiology and control [J]. *Vaccine*, 2002, 20(25): 3068-3087.
- [7] WANG C, TAKEUCHI K, PINTO L H, et al. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: Characterization of the amantadine block[J]. *J Virol*, 1993, 67(9): 5585-5594.
- [8] MOSCONA A. Neuraminidase inhibitors for influenza[J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(13): 1363-1373.
- [9] DE JONG M D, THANH T T, KHANH T H, et al. Osetamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection[J]. *New Engl J Med*, 2005, 353(25): 2667-2672.
- [10] SKEHEL J. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase[J]. *Biological*, 2009, 37(3): 177-178.
- [11] AZZAZY H M, HIGHSMITH W J. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations[J]. *Clin Biochem*, 2002, 35(6): 425-445.
- [12] MULLEN L M, NAIR S P, WARD J M, et al. Phage display in the study of infectious diseases[J]. *Trends Microbiol*, 2006, 14(3): 141-147.
- [13] SERGEEVA A, KOLONIN M, MOLLDREM J, et al. Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(15): 1622-1654.
- [14] 张敦伟,熊永忠,远立国,等. H3N2 亚型犬流感病毒 HA1 基因的原核表达及抗原性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(2): 157-159.
- [15] JONES J C, TURPIN E A, BULTMANN H, et al. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells[J]. *J Virol*, 2006, 80(24): 11960-11967.
- [16] RAJIK M, JAHANSHIRI F, OMAR A R, et al. Identification and characterisation of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2[J]. *J Virol*, 2009, 6(1): 74.
- [17] 汪崇文,丁晓然,杨静,等. H1N1 型流感病毒血凝素抑制肽的筛选研究[J]. *国际药学研究杂志*, 2013, 40(1): 48-52.
- [18] JEON S H, KAYHAN B, BEN-YEDIDIA T, et al. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48410-48419.
- [19] BAIR C L, OPPENHEIM A, TROSTEL A, et al. A phage display system designed to detect and study protein-protein interactions[J]. *Mol Microbiol*, 2008, 67(4): 719-728.
- [20] MATSUBARA T, ONISHI A, SAITO T, et al. Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(11): 4441-4449.
- [21] CROSS K J, BURLEIGH L M, STEINHAEUER D A. Mechanisms of cell entry by influenza virus[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 3(21): 1-18.

【责任编辑 柴 焰】