

猪瘟疫行毒株 E2 基因主要抗原区的原核高效表达

朱小甫,董志强,朱 辉,张文丽,乔 琦,吴旭锦,陈德坤

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】构建猪瘟疫病毒(Classical Swine Fever Virus,CSFV)E2 基因主要抗原区原核表达质粒载体,高效表达 E2 蛋白,为进一步研究 E2 亚单位疫苗提供物质基础。【方法】用 RT-nested PCR 技术扩增 CSFV 流行毒株 SX-YL 株 E2 基因主要抗原区,克隆于表达载体 pET32a 中,成功构建表达质粒 pET32a-E2,将 pET32a-E2 转入 BL21 (DE3)受体菌并用 IPTG 诱导表达 E2 蛋白,对 E2 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、Western-blot 分析和可溶性鉴定。【结果】CSFV E2 基因得到了高效表达,表达蛋白量占菌体蛋白量的 33.2%,表达蛋白 E2 主要以包涵体形式存在;免疫印迹分析结果表明,表达蛋白 E2 能识别天然猪瘟疫多克隆抗体。【结论】E2 蛋白表达量高并具有生物学活性。

【关键词】 猪瘟疫;E2 基因;原核表达

【中图分类号】 S852.23 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)02-0007-05

Study on pronucleus expression of key antigen region domain E2 gene of Classical Swine Fever Virus prevailing strain in *E. coli*

ZHU Xiao-fu,DONG Zhi-qiang,ZHU Hui,ZHANG Wen-li,QIAO Qi,
WU Xu-jin,CHEN De-kun

(College of Veterinary Medicine,Northwest A & F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The study is to construct plasmid vector of key antigen region domain CSFV E2 gene and express E2 protein highly efficient,to offer substantial foundation for studding E2 subunit vaccine. 【Method】 Cloned key antigen region domain E2 gene of strain SXYL by RT-nested PCR,connected it with pET32a to fabricate expressing plasmid pET32a-E2 successfully,translated pET32a-E2 to BL21(DE3) and induced it express E2 protein by IPTG,identified E2 protein by SDS-PAGE,Western-blot and ultrasonic. 【Result】 Recombined *E. coli* could express E2 protein highly efficient,the quantity of expression is 33.2%,most E2 protein is inclusion bodies,the E2 protein could identify natural polyclonal antibody of CSFV. 【Conclusion】 The quantity of expression protein is high and it has biological activity.

Key words: Classical Swine Fever;E2 gene;pronucleus expression

猪瘟疫(Classical Swine Fever,CSF)是由猪瘟疫病毒(Classical Swine Fever Virus,CSFV)引起的一种高度接触性传染病,是养猪业的大敌,被世界动物卫生组织列为 A 类传染病,我国农业部列为一类传染病。CSFV 为黄病毒科瘟病毒属成员,基因组为单股正链 RNA,全长约为 12 300 bp,仅含有 1 个大的开放阅读框(Open Reading Frame,ORF),编码 4 种

结构蛋白(C、E0、E1 和 E2)和 7 种非结构蛋白(N^{PRO}、P7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[1-2]。有研究证实,E2 蛋白是 CSFV 中最重要的保护性抗原,从功能上可将 E2 蛋白分为 A、B、C、D 4 个功能区域,A 区又分为 A1、A2 和 A3 3 个亚区,其中 B 区和 C 区及 A1 亚区均能诱导机体产生中和抗体^[3-4]。

* 【收稿日期】 2007-03-05
 【作者简介】 朱小甫(1977—),男,陕西眉县人,硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:zhuxiaofu1996@163.com
 【通讯作者】 陈德坤(1964—),男,陕西渭南人,教授,博士,主要从事动物免疫学研究。E-mail:chendekunmsn@hotmail.com

采用表达载体对基因进行表达,是研究基因及相关蛋白功能的重要手段。首先,表达的蛋白可以作为检测抗体的抗原,尤其对于基因缺失疫苗而言,可用表达的缺失基因蛋白作为标准抗原,区分疫苗免疫和流行毒株感染产生的抗体^[5-6]。其次,用表达的蛋白制备单克隆抗体,对研究蛋白的抗原表位意义重大^[7-8]。另外,表达的蛋白可作为亚单位疫苗,用于预防流行毒株的感染^[9-10]。

迄今为止,针对 CSFV E2 基因进行蛋白表达取得了诸多成果。许信刚等^[7]在真核表达系统中表达了 CSFV Shimen 株 E2 蛋白,并进行了单克隆抗体制备研究;周鹏程等^[9]成功应用大肠杆菌表达了 Shimen 株 E2 蛋白,并进行了 DNA 疫苗免疫试验;余兴龙等^[10]获得了 CSFV HCLV 株 E2 基因表达蛋白,并进行了免疫原性的鉴定。这些研究大多是表达 HCLV 株或 Shimen 株 E2 基因,但当前我国 CSFV 流行毒株基因和 HCLV 株相比变异较大,尤其是 E2 基因保守性差,易发生变异^[11-14],用 HCLV 株或 Shimen 株表达的 E2 蛋白免疫动物,产生的抗体能否很好的识别流行毒株,值得关注。

本试验对 CSFV 流行毒株 E2 基因主要抗原区进行了表达,为研究流行毒株 E2 亚单位疫苗对当前我国流行毒株的免疫保护力,以及转移因子作为免疫佐剂对亚单位疫苗免疫效果的影响提供物质基础。

表 1 引物名称、序列、相对位置及扩增产物长度

Table 1 Name, sequence, position and length of the primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列 Nucleotide sequence	相对 Shimen 株位置/bp Position	扩增产物长度/bp Length
E2P1	5'-AGATTGGTGGCCGTATGA-3'	2 233~2 250	953
E2P2	5'-TGACAACGACGCTAGCTCTGT-3'	3 185~3 165	
E2BF	5'-CTC <u>GGATCC</u> ATGGCCTTACGGGCACTGAGG-3'	2 300~2 317	621
E2BR	5'-CGC <u>AAGCTT</u> TATTAGGCTTCTCTCTCTGAA-3'	2 920~2 903	

E2BF 序列中引入 *Bam*H I 酶切位点,E2BR 序中引入 *Hind*Ⅲ酶切位点(表 1 中以斜体加下划线表示)。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 CSFV 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

取 SXYL 株细胞毒悬液 250 μ L,参照 TRIzol LS Reagent 试剂说明书进行总 RNA 的提取。空气中自然干燥总 RNA 后,用 10.0 μ L DEPC 处理水充分溶解,加入下游引物 E2P2(25.0 μ mol/L)1.0 μ L,置 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,取出后立即冰浴 5 min,再分别加入 dNTP 4.0 μ L,5 $\times$ AMV Buffer 4.0 μ L,AMV 0.5 μ L, HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μ L,总体积 20.0 μ L。42 $^{\circ}$ C 水浴反转录 90 min 后取出得

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 CSFV 流行毒株 疑似猪瘟疫病的脾脏及淋巴结,采自陕西杨凌某农户。充分研磨,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液接种 PK-15 细胞,盲传 3 代收毒,命名为 SXYL 株。

1.1.2 试剂、菌株和载体 TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品;AMV 反转录酶(5 U/ μ L)、HPR I RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)、DEPC 处理水、*rTaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP (2.5 mmol/L)、pMD18-T 载体克隆试剂盒、*Bam*H I (15 U/ μ L)、*Hind*Ⅲ (15 U/ μ L)限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶,均为大连宝生物公司产品;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,购自生工生物工程(上海)有限公司;DH5a 大肠杆菌、BL21(DE3)大肠杆菌和 pET32a 表达载体,由西北农林科技大学动物医学院实验室保存;猪瘟高免血清,由动物医学院动物免疫研究室制备;辣根过氧化物酶标记鼠抗猪 IgG,为 Sigma 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物的设计和合成 根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株(GenBank 登录号 AF092448)及 HCLV 株(GenBank 登录号 AF091507)全基因序列,设计了 E2P1/E2P2 和 E2BF/E2BR 2 对引物,引物序列及相对位置见表 1。

到第一链 cDNA,−20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 CSFV E2 基因主要抗原区的 nested PCR 扩增及鉴定

取第一链 cDNA 4.0 μ L 作为模板进行 nested PCR 反应,第 1 次扩增反应体系中其他成分为:超纯水 34.0 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μ L,dNTP 4.0 μ L,25.0 μ mol/L 上下游引物 E2P1、E2P2 各 1.0 μ L,*rTaq* DNA 聚合酶 1.0 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,54 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第 2 次扩增取稀释 10 倍的第 1 次扩增产物 4.0 μ L 作为模板,反应体系同第 1 次扩增,上下游引物为 E2BF 和

E2BR。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 50 s,60 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应完毕后取 5.0 μL PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统中观察照相。

1.4 PCR 产物的回收及表达载体的构建

按照 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明进行 PCR 产物纯化,将回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5a 感受态细胞,涂 Amp⁺ 平板培养,挑取单个菌落,37 ℃、200 r/min 摇动培养至饱和,进行菌液 PCR 鉴定。提取阳性菌液质粒,进行 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切,并回收 E2 基因主要抗原区片段。同时对 pET32a 空载体进行 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切,并回收载体。用 T4 DNA 连接酶将酶切回收的 E2 基因片段和 pET32a 载体连接,转化 DH5a 感受态细胞,涂 Amp⁺ 平板培养,挑取单个菌落,37 ℃、200 r/min 摇动培养至饱和,进行菌液 PCR 鉴定。提取阳性菌液质粒,进行 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切,对酶切鉴定为阳性的质粒进行测序。测序正确的质粒命名为 pET32a-E2,预计表达的融合蛋白分子质量为 42.9 ku。

1.5 重组质粒在 BL21(DE3)中的诱导表达

用 pET32a-E2 转化 BL21(DE3)感受态细胞,涂 Amp⁺ 平板培养,挑取单个菌落,37 ℃、200 r/min 摇动培养至饱和,进行菌液 PCR 鉴定。取鉴定为阳性的菌液 50 μL,接种于 5 mL 含 AMP⁺ 的 2×YT 培养基,200 r/min 摇动培养至 OD₆₀₀ 达 0.5~1.0 时,分别用 0.1,0.3,0.5,0.7,1.0,1.5 和 2.0 mmol/L IPTG 于 37 ℃、150 r/min 条件下诱导表达,5 h 后收集菌液,同时以空载体 pET32a 为阴性对照。

1.6 CSFV E2 基因表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析

将收集的菌液于 12 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,细菌沉淀中加入上样缓冲液吹打均匀,沸水浴 5 min 裂解菌体,12 000 r/min 离心 3 min,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳,积层胶质量浓度为 50 g/L,分离胶质量浓度为 120 g/L,每孔上样 15 μL,积层胶中电压 80 V,分离胶中电压 100 V,至溴酚兰离胶底 1 cm 左右终止电泳,染色脱色后照相,薄层扫描分析蛋白表达量。证实有目的蛋白表达时电转印至硝酸纤维素膜上,用自制的猪瘟高免血清作为一抗、辣根过氧化物酶标记鼠抗猪 IgG 作为二抗进行 Western-blot 分析,显色后观察照相。

1.7 CSFV E2 基因表达蛋白的可溶性鉴定

取 1.5 中诱导 5 h 后含有目的蛋白 E2 的菌液

500 mL,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,细菌沉淀先用 pH 7.4 PBS 洗剂 2 次,弃上清液;将细菌沉淀再用含 2 mol/L 尿素的 pH 7.4 PBS 洗剂 1 次,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。在细菌沉淀中加入 100 mL Binding Buffer 重悬,以 300~400 W 超声波裂解 15~20 min,直至菌液变澄清,6 000 r/min 离心 20 min 后,分别收集上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 CSFV E2 基因主要抗原区的扩增结果

从 SXYL 株中成功扩增出了 E2 基因主要抗原区片段,长度为 621 bp,与预期结果一致(图 1)。

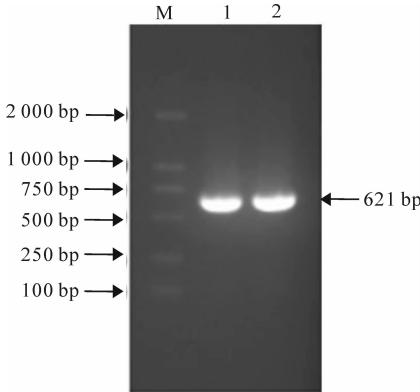


图 1 CSFV E2 基因主要抗原区的 nested PCR 扩增结果
M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~2. nested PCR 扩增的 E2 基因

Fig. 1 Cloning CSFV E2 gene key antigen region
by RT-nested PCR

M. DL2000 Marker;1-2. E2 gene key antigen region

2.2 表达质粒 PET32a-E2 的鉴定

pET32a-E2 和空载体 pET32a 经过 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后电泳,结果显示,pET32a 经双酶切后出现单条带,pET32a-E2 经双酶切可见 621 bp 的目的片段以及 pET32a 单条带(图 2),表明重组质粒 pET32a-E2 构建成功。对 pET32a-E2 进行序列测定,结果表明,扩增的 E2 基因主要抗原区读码框正确,可用于 E2 蛋白的表达,E2 蛋白的氨基酸序列为 ALR ALR DLT RVW NSA STT AFL ICL IKV LRG QIV QGV IWL LLV TGA QGR LAC KED YRY AIS STN EIG LLG AGG LTT TWK EYS HDL QLN DGT VKA ICV AGS FKV TAL NVV SRR YLA SLH KGA LLT SVT FEL LFD GTN PST EEM GDD FGF GLC PFD TSP VVK GKY NTT LLN GSA FYL VCP IGW TGV IEC TAV SPT TLR TEV VKT FRR EKP。

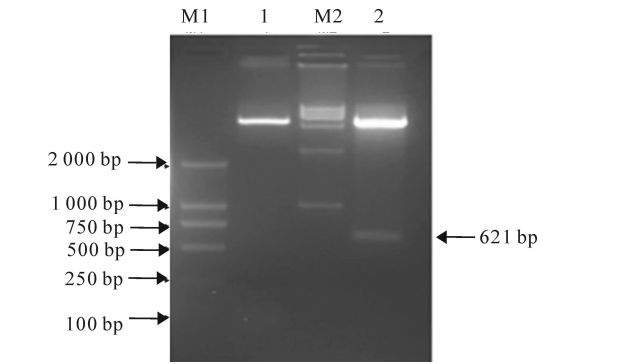


图 2 重组质粒 pET32a-E2 的 *Bam* II 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果

M1. DL2000 DNA 分子质量标准;M2. DL15000 DNA 分子质量标准;

1. 空载体 PET32a 酶切产物;2. pET32a-E2 重组质粒酶切产物

Fig. 2 Restriction analysis of plasmid of pET32a-E2

M1. DL2000 Marker;M2. DL15000 Marker;1. Restriction analysis of plasmid PET32a;2. Restriction analysis of plasmid pET32a-E2

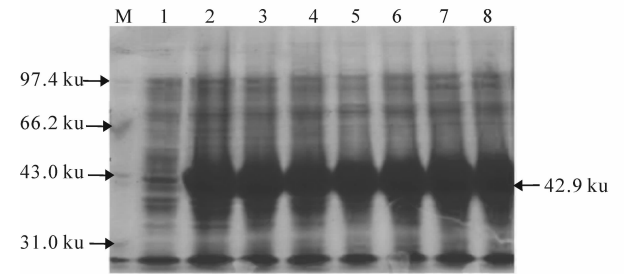


图 3 不同浓度 IPTG 诱导表达 CSFV E2 蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 低分子量蛋白质标准;1. 阴性对照;2~8. 0. 1,0. 3,0. 5, 0. 7,1. 0,1. 5 和 2. 0 mmol/L IPTG 诱导表达产物

Fig. 3 Result of induced pET32a-E2 express CSFV E2 protein by IPTG

M. Low molecular weight protein marker;1. Negative control; 2—8. Express E2 protein production by 0. 1,0. 3,0. 5, 0. 7,1. 0,1. 5 and 2. 0 mmol/L IPTG

3 讨 论

本研究在构建 pET32a-E2 表达质粒时,将 *E2* 目的片段先连接在 pMD18-T 载体上,再进行酶切回收,获得了带有设计酶切位点粘性末端的表达基因片段;薄层扫描分析结果表明,pET32a-E2 在 BL21(DE3)中的表达量高达 33.2%;超声波裂解后的 SDS-PAGE 电泳结果表明,E2 蛋白主要以包涵体形式存在,pET32a 载体表达蛋白带有 His 标签,为镍柱亲和层析纯化蛋白创造了有利条件。下一步试验将大量诱导表达 E2 蛋白,裂解收集包涵体,经过变性、复性和纯化,就能得到高产量的纯化 E2 蛋

2. 3 CSFV *E2* 基因表达蛋白 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 的分析结果

图 3 表明,将重组质粒 pET32a-E2 阳性菌液经 7 个浓度 (0. 1,0. 3,0. 5,0. 7,1. 0,1. 5 和 2. 0 mmol/L)IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 电泳结果显示,诱导表达产物相对分子量为 42. 9 ku,7 个浓度的 IPTG 诱导效果无明显差异。薄层扫描分析结果表明,蛋白表达量约占菌体蛋白的 33. 2%。

由图 4 可见,有 1 条特异的抗原抗体结合带,提示表达的 CSFV E2 蛋白能识别天然猪瘟多克隆抗体,具有生物学活性。

2. 4 CSFV *E2* 基因表达蛋白可溶性的鉴定结果

超声波裂解 1. 5 中诱导表达的菌体,SDS-PAGE 电泳结果表明,目的蛋白 E2 在裂解上清液和沉淀中均存在,但主要存在于沉淀中,显示表达的 CSFV 蛋白主要以包涵体形式存在,也有部分以可溶性蛋白形式存在。

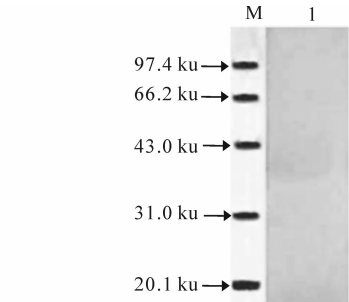


图 4 CSFV *E2* 基因表达蛋白的 Western-blot 分析结果

M. 低分子量蛋白质标准;1. E2 蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 4 Result of western-blot detection of E2 protein expressed in *E. coli*

M. Low molecular weight protein marker;1. Immunoblotting of E2 protein

白。本研究中,Western-blot 分析结果表明,表达的 E2 蛋白能识别天然猪瘟多克隆抗体,具有生物学活性,为进一步研究 E2 亚单位疫苗准备了物质材料。

E2 蛋白是 CSFV 中和抗体的主要诱导者,疫苗免疫后产生的中和抗体,对于猪抵抗流行毒株感染有重要意义。但由于多年来我国防控 CSF 执行疫苗免疫为主的策略,在长期的免疫压力下,CSFV 流行毒株基因逐渐远离疫苗株方向变异,尤其是 *E2* 基因变异更大^[11-14],因此本试验用流行毒株 *E2* 基因的表达蛋白作为抗原,进行免疫保护力研究,探讨流行毒株 E2 亚单位疫苗是否对目前流行毒株有较高的保护率,更具有现实意义。

在机体的免疫应答过程中,B 细胞分泌抗体需要双重信号的刺激才能活化,其中 Th 细胞起重要的辅助作用。目前表达蛋白多用基因的一个片段,相对于全病毒而言,大量的 T 细胞表位丢失,或许这是表达蛋白作为亚单位疫苗免疫抗体水平及保护力较低的原因之一。笔者下一步拟用本研究室制备的猪瘟特异性转移因子作为佐剂,协同表达的 E2 蛋白免疫动物,研究转移因子活化 T 细胞后对 E2 蛋白抗体水平及保护力的影响,以期为 E2 亚单位疫苗的研究奠定基础。

〔参考文献〕

- [1] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus [J]. Virology, 1989, 171: 555-567.
- [2] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Meer B V D, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genome region encoding envelope protein E1 [J]. Virology, 1990, 177: 184-198.
- [3] Van Rijn P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia [J]. Veterinary Microbiology, 1992, 33: 212-230.
- [4] Van Rijn P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus [J]. Journal of general virology, 1994, 68: 3934-3942.
- [5] 张永国, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 猪瘟病毒 E2 基因抗原结构域 A、B、C、D 区在大肠杆菌中的表达 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(2): 182-185.
- Zhang Y G, Liu X T, Han X Q, et al. Study on the expression antigen region A, B, C, D domain E2 Gene of Classical Swine Fever Virus in *E. coli* [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2004, 35(2): 182-185. (in Chinese)
- [6] 陈振海, 王 琴, 范学政, 等. 猪瘟病毒 E0 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国病毒学, 2005, 20(2): 135-139.
- Chen Z H, Wang Q, Fan X Z, et al. Prokaryotic expression of CSFV E0 Protein and development of an indirect ELISA for detection of antibody [J]. Virologica Sinica, 2005, 20(2): 135-139. (in Chinese)
- [7] 许信刚, 胡建和, 张彦明, 等. 猪瘟病毒 E2 基因在真核细胞中表达及抗 E2 蛋白单克隆抗体的制备 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12): 1318-1322.
- Xu X G, Hu J H, Zhang Y M, et al. Expression of CSFV E2 envelope protein gene in eukaryotic cells and preparation of monoclonal antibodies against CSFV E2 envelope protein [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2005, 36(12): 1318-1322. (in Chinese)
- [8] 马 刚, 李作生, 余兴龙, 等. 猪瘟病毒保护性抗原 E2 蛋白单抗的制备及其抗原表位的初步分析 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 121-124.
- Ma G, Li Z S, Yu X L, et al. Preparation and epitope analysis of monoclonal antibodies against CSFV envelope glycoprotein E2 [J]. Chin J Vet Sci, 2002, 22(2): 121-124. (in Chinese)
- [9] 周鹏程, 陆 宇, 陈建国, 等. 猪瘟病毒 E2(gp55) 基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究 [J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 243-251.
- Zhou P C, Lu Y, Chen J G, et al. Molecular cloning and expression of E2 gene of the chinese Classical Swine Fever Virus (Shimen Strain) and preliminary studies of its DNA vaccine [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(3): 243-251. (in Chinese)
- [10] 余兴龙, 涂长春, 徐兴然, 等. 猪瘟病毒 E2 基因的定点突变、在大肠杆菌中的高效表达及表达产物的免疫原性 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(4): 439-443.
- Yu X L, Tu C C, Xu X R, et al. Site-directed mutagenesis of the major antigen E2 gene of CSFV, its high level expression in *Escherichia coli* and the immunogenicity of recombinant E2 protein [J], 2003, 19(4): 439-443. (in Chinese)
- [11] 王 宁, 傅烈振, 张楚瑜, 等. 猪瘟病毒石门株 E2 基因序列分析 [J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 74-78.
- Wang N, Fu L Z, Zhang C Y, et al. Sequencing analysis of E2 gene of Classical Swine Fever Virus (CSFV) Shimen Strain [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(1): 74-78. (in Chinese)
- [12] 李红卫, 涂长春, 吕宗吉, 等. 异源猪瘟病毒 C 株 E2 基因保护性抗原编码区的序列分析与比较 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 112-114.
- Li H W, Tu C C, Lv Z J, et al. Sequence analysis and comparison of protective antigen encoding region of E2 Gene of hog cholera virus strain C from different sources [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(2): 112-114. (in Chinese)
- [13] 刘伯华, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 急、慢性猪瘟病毒分离株和疫苗株 E2 基因的序列分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(6): 568-575.
- Liu B H, Liu X T, Han X Q, et al. Analysis of E2 genes nucleotide sequences of prevalent virulent from acute and chronic viral strains and C-Strain cell culture of hog cholera virus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2001, 32(6): 568-575. (in Chinese)
- [14] 赵 耘, 王在时, 王 琴, 等. 23 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原编码区序列差异分析 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(3): 3-7.
- Zhao Y, Wang Z S, Wang Q, et al. Analysis of sequence of the major antigen coding regions of E2 genes of 23 hog cholera virus strains [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(3): 3-7. (in Chinese)