

猪圆环病毒 2 型 DNA 疫苗对小鼠的免疫效果

王建龙^{1,2},赵路易^{1,2},张洪利^{2,3},丛丽媛^{1,2},刘建营^{1,2},杨增岐¹,宋长绪²

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;2 广东省农科院 兽医研究所,广东 广州 510640;
3 广东食品药品职业学院,广东 广州 510520)

【摘 要】 【目的】构建一种猪圆环病毒 2 型 DNA 疫苗,并对其免疫效果进行了研究。【方法】将表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的 1 套真核表达元件系统克隆插入到质粒载体 pMD-18T,构建成 pMD-18T-ORF2,转入 *E. coli* DH5 α ,提取质粒,经肌肉注射途径对 Balb/c 小鼠分别在第 1,14 和 28 天进行免疫,用生理盐水代替 pMD-18T-ORF2 进行相同操作,作为对照组,通过监测免疫小鼠体液免疫和细胞免疫的状况,评估分析 pMD-18T-ORF2 免疫的效果。【结果】初次免疫后小鼠血清中特异性抗体水平持续升高,在第 14 天达到峰值,加强免疫抗体水平无显著变化;试验组脾淋巴细胞体外增值能力较对照组低($P<0.01$);免疫 pMD-18T-ORF2 的小鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性极显著高于对照组($P<0.01$);试验组小鼠脾脏中 Th 细胞含量与对照组小鼠无显著差异($P>0.05$),Tc 细胞含量显著高于对照组($P<0.05$),B 细胞含量较对照组有所减小,但差异不显著($P>0.05$)。【结论】构建的 pMD-18T-ORF2 对小鼠能产生相应的免疫反应,且细胞免疫的效果较体液免疫更显著,非特异性免疫亦有提高。

【关键词】 猪圆环病毒 2 型;DNA 疫苗;小鼠;pMD-18T-ORF2;免疫效果

【中图分类号】 S852.65⁺9.2 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)04-0053-05

The construction of PCV2 DNA vaccine and its
immune response in mouse

WANG Jian-long^{1,2}, ZHAO Lu-yi^{1,2}, ZHANG Hong-li^{2,3}, CONG Li-yuan^{1,2},
LIU Jian-ying^{1,2}, YANG Zeng-qi¹, SONG Chang-xu²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Veterinary Medicine Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong, 510640 China;
3 Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong, 510520, China)

Abstract: 【Objective】 A kind of PCV2 DNA vaccine is constructed and its immune effect is tested. 【Method】 A set of eukaryotic expression elements encoding PCV2 ORF2 is inserted into the plasmid vector pMD-18T, constructed the recombinant pMD-18T-ORF2. pMD-18T-ORF2 is transformed into *E. coli* DH5 α to increase its copies. The Balb/c mice are injected intramuscularly with the recombinant plasmid pMD-18T-ORF2 every 14 days three times totally. The control group is injected with physiological saline solution instead. 【Result】 The monitoring of antibody indicates that the specific antibody to the protein encoding by PCV2 ORF2 increases within the 14 days after the first injection. But the following immune almost make no use of the level of antibody. Compared with the control group, the spleen lymphocytes proliferative ability have a little descent ($P<0.01$) but the NK cells activities are significantly elevated ($P<0.01$). The per-

* 【收稿日期】 2007-04-20
 【基金项目】 国家“863”科技攻关项目(2003AA241110);国家食品安全重大专项(2001BA804A31);广东省农业科技攻关项目(2003B21404,20052490100);广东省自然科学基金重点项目(06105311);广东省自然科学基金项目(031990)
 【作者简介】 王建龙(1980—),男,河北石家庄人,硕士,主要从事动物疫病防治研究。
 【通讯作者】 宋长绪(1965—),男,河南南阳人,研究员,主要从事动物传染病研究。E-mail: cxsong2004@163.com

centage of the Tc lymphocytes in spleen is much higher than the control group($P<0.01$), but the percentage of Th and B lymphocytes have no difference between the two group($P<0.05$). 【Conclusion】 The constructed recombinant pMD-18T-ORF2 has the corresponding immune response to the mice, and cellural immunity is more remarkable than humoral immunity.

Key words: PCV2; DNA vaccine; mouse; pMD-18T-ORF2; immune effect

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是德国学者 Tischerl 在 1974 年首次从 PK-15 细胞中分离出来的病毒^[1], 是猪断奶后多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)发生的主要病原^[2-3]。目前研究发现, PCV2 可以和猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、细小病毒(PPV)等病毒病并发感染, 也可以引起细菌继发感染^[4], 给世界养殖业造成了巨大的经济损失, 因此 PCV2 已成为国内外兽医领域的研究热点之一。PCV2 的生物学特性比较特殊, 其在细胞上增殖滴度很低, 而且不引起细胞病变, 因此研制传统的灭活疫苗和减毒疫苗难度很大^[5]。ORF2 基因是 PCV2 主要的免疫原性基因, 因此可利用 PCV2 ORF2 基因研制 PCV2 DNA 疫苗、基因工程亚单位疫苗和多价重组疫苗, 用于 PCV2 的免疫预防, 如金宁一等^[6]构建了 pVAX I-ORF2、pVAX I-IL18-ORF2、pVAX I-ORF2-ORF1 和 pVAX I-IL18-ORF2-ORF1 4 种核酸疫苗免疫小鼠, 结果表明 pVAX I-IL18-ORF2-ORF1 效果较好; Blanchard 等^[7]用 ORF2 基因的杆状病毒表达产物免疫猪, 可使猪产生对 PCV2 的抵抗力。目前, 在 PCV2 基因工程疫苗的研究上, 虽然一些学者取得了一定的进展, 但还完全处在实验室研究阶段。本研究在广东省农科院兽医研究所猪病室构建的 pAdTrack-ORF2^[8]基础上, 将其中的整套真核表达元件克隆、插入到质粒载体 pMD-18T, 构建了 pMD-18T-ORF2, 并对其免疫效果进行了研究, 以期为进一步开展 DNA 疫苗免疫猪的试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞和动物 SP2/0 细胞, 广东省农科院兽医研究所猪病室保存; 表达 PCV2 ORF2 基因的重组质粒真核表达载体 pAdTrack-ORF2, 广东省农科院兽医研究所猪病室构建、保存; 工程菌 *E. coli* DH5 α , 广东省农科院兽医研究所猪病室保存; Balb/c 小鼠: 雌性, 6~8 周龄, 平均体重 19~21 g,

购于中山医科大学实验动物中心, 属 SPF 级动物。

1.1.2 主要试剂 盐酸利多卡因注射液(泗水希尔康制药有限公司生产); 猪圆环病毒(PCV2)病酶联免疫诊断试剂盒(由华中农业大学动物病毒室提供); 大鼠抗小鼠 PE 标记的抗 CD4⁺ 二抗、FITC 标记的 CD8⁺ 二抗、PE-Cy5 标记的 CD3⁺ 二抗、FITC 标记的 CD19⁺ 二抗(购自美国 BD 公司); 淋巴细胞分离液(沪试国药集团化学试剂有限公司生产); 刀豆蛋白 A(ConA)(购自美国 Sigma 公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 购自美国 Sigma 公司); RI-1640(购自 Invitrogen 公司)。

1.2 真核表达系统 pMD-18T-ORF2 的构建

以广东省农科院兽医研究所猪病室构建的表达 PCV2 ORF2 基因的真核表达载体 pAdTrack-ORF2 为模板设计引物, 引物序列为 P1: 5'-CGG AAT TCA TTC TTT CCC ACC CTT A-3'; P2: 5'-TTG GTA CCA GAT CTC TAG CGG ATC-3'。

反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 然后以 94 ℃ 变性 1 min, 53 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 进行 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。把其中包含强启动子 CMV 和 PolyA 尾巴在内的一整套真核表达元件用 PCR 方法进行扩增, 克隆入 pMD-18T 质粒载体, 转化入工程菌 *E. coli* DH5 α 。

1.3 PCV2 DNA 疫苗的制备

挑取阳性克隆, 接种到 TB 培养基, 加入氨苄青霉素, 使其终质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$, 在 37 ℃、300 r/min 振荡培养 12 h。按文献[9]的方法, 对培养得到的含 pMD-18T-ORF2 的工程菌 *E. coli* DH5 α 进行裂解, 裂解产物通过 4~6 层干酪包布进行过滤, 收集滤液, 加入 RNA 酶, 使终质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 于 37 ℃ 作用 20 min, 然后向滤液中加入 0.6 倍滤液体积的异丙醇, 室温(20~25 ℃)放置 2 min, 沉淀质粒, 再用孔径为 0.22 μm 混合纤维素酯微孔滤膜过滤, 弃去滤液, 质粒留在膜上, 用体积分数 70% 乙醇冲洗混合纤维素酯微孔滤膜 2~3 次, 风干滤膜, 最后用 50~60 ℃ 的双蒸水溶解洗脱质粒 DNA, 即可得到质粒 pMD-18T-ORF2。用 MLTrospec® 3300 pro 核酸蛋白分析仪对所得质粒

的纯度和含量进行分析,以溶解质粒的双蒸水作为对照,并调整质粒质量浓度为0.5 mg/mL。

1.4 PCV2 DNA 疫苗免疫小鼠

选取6~8周龄健康雌性Balb/c小鼠16只,随机分为2组:第1组为对照组,第2组为试验组。每只小鼠在免疫前24 h于后腿股四头肌注射0.2%盐酸利多卡因,100 μ L/只。试验组小鼠在注射盐酸利多卡因的相同部位注射0.5 mg/mL质粒pMD-18T-ORF2 100 μ L/只,对照组用等量生理盐水代替。在第14天和第28天分别加强免疫1次,免疫剂量和方法同上。

1.5 小鼠PCV2抗体效价的检测

免疫前及初次免疫后第7,14,21,28,35,42,49,56天,从小鼠尾部采血,分离血清备用。以广东省农科院兽医研究所猪病室培养的大肠杆菌表达的重组PCV2衣壳蛋白为抗原,用间接ELISA法测定PCV2特异性IgG抗体,用酶联免疫检测仪测定 OD_{450} 。

1.6 小鼠脾淋巴细胞的制备

初次免疫后第56天,摘除眼球放血,断颈椎处死小鼠,浸泡于体积分数75%乙醇中消毒体表。然后在无菌条件下剪开小鼠左侧腹部,取出脾脏,置于放在无菌平皿上的不锈钢网筛上,用玻璃注射器内芯研磨,将脾组织研磨成均浆。将得到的脾组织均浆慢慢加入等体积的淋巴细胞分离液中,2 000 r/min离心10 min,小心吸取淋巴细胞层;加入5 mL无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} HankS液混匀,1 500 r/min离心10 min,弃上清;加入5 mL无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} HankS液混匀,并进行细胞计数,1 500 r离心10 min后用含10%犊牛血清的完全1640培养液,将细胞调整到所需浓度。

1.7 小鼠脾淋巴细胞的增殖反应

初次免疫后第56天取2组小鼠的脾淋巴细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 mL⁻¹。参照文献[10]的MTT比色法,并略作改动,检测小鼠淋巴细胞增殖反应。同时设空白对照组,即加入200 μ L 10%犊牛血清的完全1640培养液。计算刺激指数(SI): $SI = (\text{试验刺激组 } OD_{630} - \text{空白对照组 } OD_{630}) / (\text{试验对照组 } OD_{630} - \text{空白对照组 } OD_{630})$ 。试验重复3次。

1.8 自然杀伤细胞(NK)的活性

取脾脏分离的淋巴细胞,用含体积分数10%犊牛血清的1640培养液将细胞浓度调整至 1×10^6 mL⁻¹,作为检测NK细胞活性的效应细胞。以SP2/0细胞作为靶细胞,培养管用无菌1.5 mL Ep-

pondof管。试验设NK自然杀伤组(Mixtore)、靶细胞自然释放组(Spon)、最大释放组(Max)共3组,并各设3只复管。具体做法是:100 μ L效应细胞和100 μ L靶细胞,效应细胞与靶细胞浓度比为50:1,作为NK自然杀伤组(Mixtore);100 μ L靶细胞和100 μ L 2%犊牛血清的完全1640培养液,作为靶细胞自然释放组(Spon);100 μ L靶细胞和100 μ L 10% TritonX-100,作为最大释放组。加样完毕后混匀,500 r/min离心2 min,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,然后各管加冰冷生理盐水终止效应细胞与靶细胞间细胞毒作用。

将各试验管以3 000 r/min离心5 min,取上清加于40孔聚苯乙烯微量反应板中进行酶促反应,100 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C预温20 min,各孔加入LDH(乳酸脱氢酶)底物液100 μ L,置于37 $^{\circ}$ C恒温箱中反应10 min,取出,各孔加0.1 mol/L柠檬酸30 μ L以终止酶促反应。在酶联免疫检测仪上读取 $A_{630\text{ nm}}$ 。按以下公式计算自然杀伤细胞的自然杀伤率(%)。此百分率值与自然杀伤细胞的杀伤活性呈正相关。自然杀伤率/%=(自然杀伤组 A_{630} -靶细胞自然释放组 A_{630})/(最大释放组 A_{630} -靶细胞自然释放组 A_{630}) $\times 100\%$ 。

1.9 脾淋巴细胞亚群的测定

初次免疫后第56天杀死试验组和对照组小鼠,取脾脏,分离淋巴细胞,分2组分别用PE标记的抗CD4⁺、FITC标记的CD8⁺、PE-Cy5标记的CD3⁺二抗和PE-Cy5标记的CD3⁺、FITC标记的CD19⁺二抗进行标记,用流式细胞仪分析试验组和对照组的脾淋巴细胞中Th细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻)、Tc细胞(CD3⁺、CD4⁻、CD8⁺)和B细胞(CD3⁻、CD19⁺)含量。

2 结果与分析

2.1 免疫后小鼠PCV2抗体水平的变化

由表1可知,初次免疫后小鼠在2周内抗体水平持续升高,在初次免疫后第14天,小鼠体内PCV2抗体水平达到最高值,虽然在第14天加强免疫,但抗体水平并未继续升高,反而下降,第28天再一次加强免疫,抗体略有升高,并维持在这个水平,但未恢复到以前的最高值,直到第56天抗体水平开始有下降趋势;对照组抗体水平无显著变化。

2.2 免疫后小鼠脾淋巴细胞的增殖反应

从图1可以看出,免疫pMD-18T-ORF2的小鼠脾淋巴细胞体外增值能力较对照组低,而且差异极

显著($P<0.01$)。

表 1 免疫后小鼠血清中 PCV2 抗体的监测结果
Table 1 The antibody level in serum of immuned Balb/c mice

时间 Time	OD ₄₅₀	
	对照组 Control group	试验组 Experimental group
免疫前 Before immune	0.160±0.030	0.157±0.035
初次免疫后第 7 天 7 th d after immune	0.166±0.010	0.249±0.072
初次免疫后第 14 天 14 th d after immune	0.116±0.015	0.297±0.024
初次免疫后第 21 天 21 th d after immune	0.132±0.012	0.241±0.046
初次免疫后第 28 天 28 th d after immune	0.132±0.025	0.230±0.024
初次免疫后第 35 天 35 th d after immune	0.112±0.007	0.257±0.067
初次免疫后第 42 天 42 th d after immune	0.123±0.019	0.260±0.013
初次免疫后第 49 天 49 th d after immune	0.125±0.004	0.260±0.068
初次免疫后第 56 天 56 th d after immune	0.128±0.017	0.242±0.043

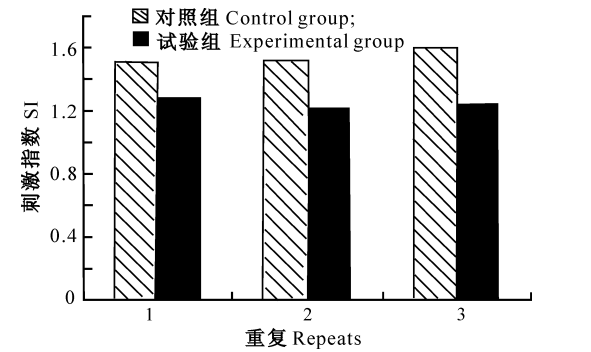


图 1 免疫后小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖反应的结果

Fig. 1 The proliferation of spleen lymphocytes *in vitro*

表 2 免疫后小鼠脾脏中 Th、Tc 和 B 细胞的含量

Table 2 Percentage of the Th, Tc and B cell population of mice spleen in different treatment groups by FACS analysis

组别 Group	Th	Tc	B
对照组 Control group	24.20±3.00 a	5.60±0.47 a	61.77±1.71 a
试验组 Experimental group	27.00±4.07 a	9.13±1.09 b	50.57±5.64 a

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different small letters show notable difference($P<0.05$).

3 讨论

DNA 疫苗作为一种新型疫苗具有独特的优势和研究开发前景,其免疫效果除与所选用抗原本身的类型、特点有关外,还受许多其他因素,如载体骨架的组成元件、疫苗导入方法、疫苗剂量、佐剂及其性质、免疫程序等的影响^[11]。本研究将重组质粒真核表达载体 pAdTrack-ORF2 中的表达元件进行克隆,将其插入质粒载体 pMD-18T 中,构建成 pMD-18T-ORF2, pAdTrack 长度为 9 044 bp,而 pMD-18T 只有 2 692 bp,提取相同质量的质粒, pAdTrack 的拷贝数显著低于 pMD-18T,这可能有利于提高免疫剂量和表达效率。Doria 等^[11]报道,新生细胞吸收外源 DNA 的能力较高,本试验在小鼠注射部位先用麻醉剂盐酸利多卡因处理,使注射

2.3 免疫后小鼠 NK 细胞的活性检测

免疫 pMD-18T-ORF2 的试验组小鼠脾脏 NK 细胞的自然杀伤率为(56.01±4.18)%,极显著高于对照组(29.35±1.42)%($P<0.01$)。说明免疫 pMD-18T-ORF2 对小鼠脾脏 NK 细胞活性有极显著的加强作用。

2.4 免疫后小鼠脾淋巴细胞各亚群含量

由表 2 可见,试验组小鼠脾脏中 Th 细胞含量与对照组无显著差异,但 Tc 细胞含量显著高于对照组($P<0.05$),B 细胞含量较对照组有所减小,但差异不显著($P>0.05$)。

部位血管扩张,从而提高肌细胞对 DNA 的吸收,且导致该部位肌肉再生。

DNA 疫苗主要诱导细胞免疫,而体液免疫不太理想^[12-14]。本试验结果表明,重组质粒 pMD-18T-ORF2 诱导小鼠产生的免疫反应以细胞免疫和非特异性免疫为主,而体液免疫占次要地位。对小鼠外周血中的特异性抗体监测表明,免疫后,小鼠在 2 周内抗体水平持续升高,之后开始下降,虽然在第 14 天和第 28 天加强免疫,但是效果不大,均未达到初免的水平,且维持在较低的水平。从第 49 天开始,特异性抗体开始出现下降趋势。通过对免疫小鼠脾脏淋巴细胞的体外增殖试验及其细胞亚群的分析发现,脾脏淋巴细胞体外增殖能力较对照组低;与对照组比较,试验组 Tc 细胞含量显著升高,B 细胞含量降低,但差异不显著。说明 pMD-18T-ORF2 诱导细

胞免疫效果较体液免疫更显著。小鼠脾脏中NK细胞杀伤活性的检测结果显示,试验组小鼠脾脏NK细胞的自然杀伤率为 $(56.01 \pm 4.18)\%$,极显著高于对照组 $(29.35 \pm 1.42)\%$,这可能与一些DNA序列能够非特异性地提高机体免疫力有关^[15-16]。

【参考文献】

- [1] Tischerl R, Rasch R, Tochtermann G. Characterisation of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig, 1974, 226: 153-167.
- [2] Kennedy S, Moffert D, McNeilly F, et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus [J]. Comp Pathol, 2000, 122: 9-24.
- [3] Segales J, Pineiro C, Lampreave F, et al. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. Res Vet Sci, 2004, 77(2): 177-184.
- [4] Ellis J A, Bratanich A, Clark E G, et al. Coinfection by poxvirus circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12(1): 21-27.
- [5] Resendes A, Segales J, Balasch M, et al. Lack of an effect of a commercial vaccine adjuvant on the development of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in porcine circovirus type 2 (PCV2) experimentally infected conventional pigs [J]. Vet Res, 2004, 35(2): 243-253.
- [6] 金宁一, 秦晓冰, 郑敏, 等. 猪2型圆环病毒核酸疫苗接种 Balb/c 小鼠实验免疫研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(7): 76-79.
- Jin N Y, Qin X B, Zheng M, et al. Experimental study on injecting Balb/c mice with PCV2 nucleotide vaccines [J]. China Biotechnology, 2005, 25(7): 76-79. (in Chinese)
- [7] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type (PCV2) proteins [J]. Vaccine, 2003, 21(31): 4565-4575.
- [8] 祝卫国, 宋长绪, 王贵平, 等. 猪2型圆环病毒 ORF1、ORF2 基因串联重组腺病毒的构建 [C]. 中国畜牧兽医学学术年会论文集. 北京: 中国农业出版社, 2005: 446-449.
- Zhu W G, Song C X, Wang G P, et al. The construction of recombination ADV PCV2 ORF1 and ORF2 [C]. Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine Papers. Beijing: China Agriculture Publishing Company, 2005: 446-449. (in Chinese)
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 26-27.
- Joseph S, David W R. Molecular cloning [M]. 3th ed. Huang P T, Wang J X, Zhu H C, et al, translated. Beijing: Science Publishing Company, 2002: 26-27.
- [10] 宋勤叶. 表达猪圆环病毒2型衣壳蛋白重组质粒的构建及免疫效应 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- Song Q Y. Construction and immune efficacy of recombinant plasmids expressing capsid protein of porcine circovirus type 2 [D]. Beijing: China Agriculture University, 2005. (in Chinese)
- [11] Doria R N A, Haigwood N L. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens [J]. Methods, 2003, 31: 207-216.
- [12] Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Direct gene transfer in skeletal muscle in vivo: factors influencing efficiency of transfer and stability of expression [J]. Hum Gene Ther, 1993, 4: 151-156.
- [13] 宋云峰, 肖少波, 金梅林, 等. 猪2型圆环病毒核酸疫苗免疫效应研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1049-1054.
- Song Y F, Xiao S B, Jin M L, et al. Study on the nucleotide vaccine immune effect of porcine circovirus type 2 virus [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2005, 36(10): 1049-1054. (in Chinese)
- [14] Kamstrup S, Barfoed A M, Frimann T H, et al. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice [J]. Vaccine, 2002, 22(11-12): 1358-1361.
- [15] 周红, 刘玮. CpG 序列的免疫激活机理及应用 [J]. 四川生理科学杂志, 2005, 27(4): 175-177.
- Zhou H, Liu W. Immuno-stimulating characteristics and application prospect of CpG motifs [J]. Sichuan Journal of Physiological Sciences, 2005, 27(4): 175-177. (in Chinese)
- [16] 沈悦斐, 薛雅蓉, 郑冠群. CpG DNA 对猪免疫增强作用的研究现状 [J]. 家畜生态学报, 2006, 27(6): 236-239.
- Shen Y F, Xue Y R, Zheng G Q. Current research of CpG DNA on the enhancement of porcine immunity [J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2006, 27(6): 236-239. (in Chinese)