

猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体的制备与特性分析

陈仕龙^{1a,2},林天龙^{1b,2},陈少莺^{1a,2},庄向生^{1a,2},王隆柏^{1a,2},
魏 宏^{1a,2},周伦江^{1a,2},车勇良^{1a,2},黄梅清^{1a,2}

(1 福建省农业科学院 a 畜牧兽医研究所 b 生物技术研究所,福建 福州 350013;
2 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心,福建 福州 350013)

【摘 要】 【目的】制备猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的单克隆抗体,探讨单克隆抗体临床应用的价值及病毒蛋白的结构和功能。【方法】采用差速和蔗糖不连续密度梯度离心纯化的 PRRSV 抗原免疫 Balb/c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞常规融合,经间接 ELISA 的筛选和有限稀释亚克隆,获得能稳定分泌鼠抗 PRRSV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并通过 ELISA、Western blot 和免疫荧光试验等方法分析其特性。【结果】成功地获得了 3 株稳定分泌抗 PRRSV-GP5 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 A61、B47 和 C65。这 3 株单克隆抗体的免疫球蛋白亚类分别为 IgG₁、IgG₃ 和 IgG₁,均具有 ELISA、IFA 和 Western blot 特性,细胞上清液和腹水的 ELISA 抗体效价分别为 $1\times 2^7\sim 1\times 2^8$ 和 $1\times 10^5\sim 1\times 10^6$ 。特异性测定结果表明,3 株单克隆抗体与 Marc-145 细胞、猪 2 型圆环病毒和猪细小病毒均无交叉反应。Western blot 测定结果表明,3 株单克隆抗体均能特异性识别 PRRSV-GP5 蛋白。【结论】获得了特异性识别 PRRSV-GP5 蛋白的单克隆抗体,为 PRRS 免疫诊断试剂盒的研制奠定了基础。

【关键词】 猪繁殖与呼吸综合征病毒;单克隆抗体;酶联免疫吸附试验;免疫荧光试验;Western blot

【中图分类号】 S858.28 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)08-0046-05

Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

CHEN Shi-long^{1a,2},LIN Tian-long^{1b,2},CHEN Shao-ying^{1a,2},ZHUANG Xiang-sheng^{1a,2},
WANG Long-bai^{1a,2},WEI Hong^{1a,2},ZHOU Lun-jiang^{1a,2},
CHE Yong-liang^{1a,2},HUANG Mei-qing^{1a,2}

(1 a. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, b. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 The paper was to obtain monoclonal antibodies against PRRSV for further study of its structure and function. 【Method】 The antigen of PRRSV FZ strain was purified by differential centrifugation and discontinuous sucrose density gradient centrifugation. The spleen cells of Balb/c mice immunized with purified viral antigen were fused with SP2/0 myeloma cells. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against PRRSV were screened by using indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the subcloning approach. The specificities of these monoclonal antibodies were determined by

* 【收稿日期】 2007-07-23
【基金项目】 福建省重大专项(2006NZ0003-2)
【作者简介】 陈仕龙(1979—),男,福建宁化人,助理研究员,主要从事动物传染病免疫学研究。
【通讯作者】 林天龙(1955—),男,福建福州人,研究员,主要从事生物技术研究。

ELISA, Western blotting and Immunofluorescence assay. 【Result】 Three hybridoma cell lines developed could steadily secure specific monoclonal antibodies (McAbs) against PRRSV-FZ and were designated A61, B47 and C65, respectively. The isotyping analysis results showed that both A61 and C65 belonged to IgG₁, and B47 belonged to IgG₃. These McAbs could bind to the antigen of PRRSV FZ in ELISA, IFA and western-blot analysis. Their ELISA titers of the supernatant ranged from 27 to 28 and that of ascites fluid was $10^5 - 10^6$. These McAbs were highly specific and had no cross-reactivity with Marc-145 cells, Porcine parvovirus (PPV) and Porcine circovirus Type 2 (PCV2). Western blot analysis confirmed that three McAbs could recognize 26 Ku structure protein (GP5 protein). 【Conclusion】 3 Monoclonal antibodies of high specificity against GP5 protein were prepared successfully, which laid a foundation for the further study on PRRSV quick-diagnosis.

Key words: PRRSV; monoclonal antibody; ELISA; IFA; Western blot

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的一种严重危害养猪业的传染病^[1]。PRRSV 属动脉炎病毒科动脉炎病毒属。1987 年美国首次报道了 PRRS^[2], 1991 年荷兰首先分离到病毒 PRRSV^[3]。1996 年郭宝清在国内首次分离到 PRRSV, 证实该病在中国也存在; 之后有研究者从福州某败血症的病猪中分离到 PRRSV, 命名为 PRRSV-FZ, 经鉴定证实该毒株为美洲型^[4-5]。由于北美和欧洲两基因型 PRRSV 之间有抗原性差异, 以及不同毒株之间的抗原变异和致病性差异^[6], 不仅使 PRRSV 流行病学问题复杂化, 而且也给 PRRSV 免疫预防和精确诊断带来了困难。由于单克隆抗体具有特异性强、敏感性高、只识别单一抗原位点等特性, 所以其在病原检测、病原亚型鉴别方面具有不可替代的优点。目前, 国内外已研制出针对 PRRS 病毒不同结构蛋白的多种单克隆抗体, 并建立了以单克隆抗体为核心的免疫诊断技术, 用于检测样品中的 PRRSV^[7-11]。目前, 我国尚未见用全病毒蛋白研制抗 PRRSV-GP5 蛋白单克隆抗体的报道。为了进一步探讨 PRRSV 抗原的变异状况, 分析 PRRSV 毒株间保守抗原位点, 建立能够检出各种 PRRSV 毒株的检测方法, 本试验采用纯化的病毒蛋白免疫小鼠, 制备抗 PRRSV-GP5 蛋白的单克隆抗体, 以期 PRRS 诊断和免疫防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和试验动物 PRRSV-VR2332、SP2/0、Marc-145、PK-15 细胞均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜病实验室保存, PRRSV-FZ、猪 2 型圆环病毒 (PCV2) 由福建省农业科学院畜牧兽

医研究所畜病实验室分离、鉴定, PRRSV-FJ-1 由作者分离、鉴定, 猪细小病毒 (PPV) 购自中国兽药监察所, Balb/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.1.2 主要试剂 弗氏完全佐剂和不完全佐剂及 RPMI 1640 均购自 Gibco 公司, DMEM、PEG/DM-SO、单克隆抗体亚级份检测试剂盒、羊抗小鼠 IgG-HRP、HAT 完全培养液和 HT 不完全培养液购自 Sigma 公司, 羊抗小鼠 IgG-FITC 购自华美公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司。

1.2 PRRSV 抗原的制备

将 PRRSV-FZ 株接种于 Marc-145 细胞上传代, 置 CO₂ 体积分数为 5% 的 37 °C 培养箱中培养, 待病毒增殖至细胞出现 70% 的病变 (CPE) 时, 收获细胞培养毒, 经 3 次冻融后, 8 000 r/min 离心 50 min, 取上清液, 45 000 r/min 离心 120 min 后, 弃上清液, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 重悬沉淀物, 即为粗提抗原, 用于 ELISA 包被。取粗提抗原铺垫于质量分数为 25%~55% 蔗糖-PBS 的最上层, 27 000 r/min 离心 150 min, 收集病毒条带, 重悬于 PBS 中, 45 000 r/min 离心 120 min, 洗脱蔗糖, 沉淀重悬于 PBS 中即得纯化病毒抗原, 用于免疫 Balb/c 小鼠。

1.3 PRRSV 感染细胞的制备及间接免疫荧光试验 (IFA)

将 Marc-145 细胞培养于 96 孔细胞板, 至细胞长成单层后, 接种不同的 PRRSV 毒株, 接种量为 100 个半数感染剂量 (TCID₅₀)。当细胞出现约 30% CPE 时, 弃上清液, PBS 洗涤 1 次, 每孔加入冷甲醇 100 μ L, 4 °C 固定 30 min, 甩干, PBS 洗涤 1 次, -30 °C 冻存备用。以经同样条件培养和处理的正常 Marc-145 细胞为阴性对照。检测时, 于上述细胞板中, 每孔加 30 μ L 杂交瘤细胞培养上清液, 于

37 ℃作用 30 min,用 PBS 洗涤 3 次;每孔加羊抗小鼠 IgG-FITC 30 μL ,于 37 ℃作用 30 min,用 PBS 洗涤 3 次,加体积分数 50% 甘油-PBS,每孔 30 μL ,于倒置荧光显微镜(OLYMPUS 型)下观察。

1.4 间接 ELISA 试验

将纯化病毒抗原按预先测定的最佳包被量(20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被聚苯乙烯平底微孔板,每孔 50 μL ,于 4 ℃过夜;洗涤并封闭后,加第一抗体(杂交瘤细胞培养上清液),于 37 ℃作用 1 h;洗涤后加第二抗体(羊抗鼠 IgG-HRP),于 37 ℃作用 1 h;洗涤后加底物联苯二胺(OPD)显色,显色后用 H_2SO_4 终止反应,读取波长 490 nm 处的吸光值(OD_{490})。

1.5 小鼠的免疫程序

取蛋白含量为 2 mg/mL 纯化病毒抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀后,腹腔注射 Balb/c 小鼠,0.2 mL/只,共 4 只。分别于初免后 14,28 d,取等量抗原与弗氏不完全佐剂混匀乳化,进行二免和三免,于融合前 4 d,用等量纯化病毒抗原进行加强免疫。

1.6 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选

将对数生长期 SP2/0 细胞和免疫鼠脾细胞按 1:5 的比例混合,按文献[12]的方法进行融合。融合剂为 37 ℃预热的 PEG/DMSO。融合后用 HAT 完全培养液选择杂交瘤细胞,以间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞生长阳性孔,选取 OD 值高、生长良好且不与正常 Marc-145 细胞反应的阳性细胞孔,经有限稀释法克隆 3 次,直至克隆孔阳性率达 100%,克隆过程中各阶段细胞同时扩大培养并冻存。

1.7 腹水单克隆抗体的制备及特性鉴定

用灭菌液体石蜡腹腔预处理 10~12 周龄 Balb/c 小鼠,10 d 后用于诱导腹水抗体,每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞 1×10^6 个。待小鼠腹部明显膨大时,用 12 号针头引流收集腹水,于 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液即得腹水单克隆抗体,分别测定其 ELISA 和 IFA 效价,分装后于 -20 ℃冰箱保存,并进行特性鉴定。

1.7.1 Ig 亚类鉴定 按照单克隆抗体亚级份检测试剂盒介绍的方法进行。

1.7.2 单克隆抗体中和活性的测定 采用固定病毒稀释抗体的方法,用 RPMI 1640 营养液将 PRRSV-FZ 株稀释成 200 TCID₅₀,各种腹水单克隆抗体按 10 倍比用 RPMI 1640 营养液稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 个稀释度。取各稀释度的腹水单克隆抗体与等体积 200 TCID₅₀ 病毒液混合,37 ℃作用 1 h 后接种于单层 Marc-145 细胞孔,每稀释度 4 孔,20

$\mu\text{L}/\text{孔}$,置 37 ℃、5% CO_2 条件下培养,连续观察细胞病变 120 h。同时设正常细胞对照、阴性腹水对照和病毒对照,按 Karber 法计算中和效价^[13]。

1.7.3 单克隆抗体效价的测定 腹水单克隆抗体用封闭液按 10 倍比稀释,杂交瘤细胞培养上清液用封闭液按 2 倍比稀释,测定单克隆抗体的效价,方法同 1.3 和 1.4。

1.7.4 单克隆抗体的特异性测定 按 1.2 中的方法制备 PRRSV-FZ、PRRSV-V2332、PRRSV-FJ-1 病毒抗原,分别取 PCV2、PPV 病毒接种于 PK-15 细胞,制备相应的 ELISA 和 IFA 抗原,进行单克隆抗体的特异性分析,方法同 1.2 和 1.3。

1.7.5 杂交瘤细胞株分泌抗体的稳定性试验 将分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞体外连续培养 2 个月,每周检测其上清液的抗体效价;将液氮冻存的阳性杂交瘤细胞每月复苏 1 次,连续 3 个月,检测上清液的抗体效价。

1.7.6 单克隆抗体的相加 ELISA 试验 参照文献[14]方法,用 PRRSV-FZ 全病毒包被酶标板,将待测单克隆抗体两两配对进行位点相加 ELISA 试验。根据公式 $AI = (2A_{1+2} / (A_1 + A_2) - 1)$ 判定结果,其中 A_1 和 A_2 分别为两个单克隆抗体单独进行 ELISA 测定的 OD 值; A_{1+2} 为两个单克隆抗体相加测定的 OD 值。若两个单克隆抗体结合同一个抗原表位,则 $2A_{1+2}$ 等于 $A_1 + A_2$, AI 为零;反之,若两个单克隆抗体结合完全不同的抗原表位,则 A_{1+2} 应等于 $A_1 + A_2$, AI 为 1。根据 AI 的大小可以推知两个单克隆抗体所识别位点在空间的位置和重叠程度。

1.7.7 Western blot 试验 参照文献[12]方法,分别以 PRRSV 粗提抗原和 Marc-145 细胞抗原进行 SDS-PAGE 电泳,分离胶质量浓度为 150 g/L,积层胶质量浓度为 50 g/L。转印至 NC 膜(50 mA,50 min),用含 20 g/L BSA 的 TBS-T 封闭,4 ℃过夜,次日弃去封闭液,用 TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min,加入用封闭液以 1:200 倍稀释的腹水单克隆抗体,37 ℃作用 1.5 h,再用 TBS-T 同上洗涤,加入羊抗鼠 IgG 碱性磷酸酶标记抗体(1:15 000,封闭液稀释),室温反应 1.5 h,用 TBS-T 同上洗涤,吸净余液,置于底物 BCIP/NBT 中显色,显色后用去离子水终止显色。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的筛选与建立

融合杂交后,共有 712 个融合阳性孔,融合率为

92.7%，其中抗体分泌阳性细胞的孔有 65 个，抗体阳性率为 9.1%。阳性孔经 3 次克隆和扩大培养后，共获得 3 株能稳定分泌 PRRSV 抗体的杂交瘤细胞株，将其分别命名为 A61、B47、C65。

2.2 单克隆抗体的特性分析

2.2.1 Ig 亚类的鉴定 A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的亚级份分别为 IgG₁、IgG₃ 和 IgG₁。

2.2.2 单克隆抗体的中和活性 用 A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体进行微量病毒中和试验，结果发现，3 株单克隆抗体均不具有中和 PRRSV-FZ 株的中和活性。

2.2.3 单克隆抗体的效价 A61、B47、C65 3 株杂

交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均具有 ELISA 和 IFA 特性，且单克隆抗体的细胞培养上清液和腹水抗体的 ELISA 效价分别为 $1\times 2^7\sim 1\times 2^8$ 和 $1\times 10^5\sim 1\times 10^6$ (表 1)；IFA 效价分别为 1×2^6 和 1×10^4 ，呈现胞质染色 (图 1)。

表 1 杂交瘤细胞培养上清液及腹水中单克隆抗体的效价

杂交瘤细胞 Hybridoma cell line	supernatants and ascites			
	细胞培养上清液 Hybridoma supernatant		腹水 Ascites	
	IFA	ELISA	IFA	ELISA
A61	2 ⁶	2 ⁸	10 ⁴	10 ⁵
B47	2 ⁶	2 ⁷	10 ⁴	10 ⁵
C65	2 ⁶	2 ⁸	10 ⁴	10 ⁶

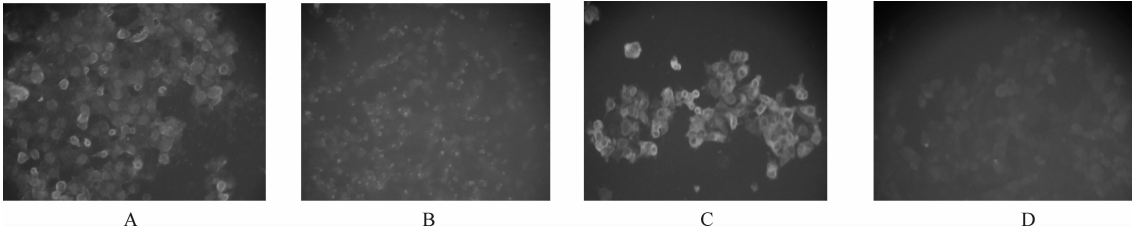


图 1 3 株 PRRSV 单克隆抗体在细胞中 IFA 染色的结果

A. A61;B. B47;C. C65;D. Marc-145 细胞

Fig. 1 Immunofluorescence assay of the three McAbs on PRRSV-FZ infected Marc-145 cells

A. A61;B. B47;C. C65;D. Normal Marc-145 cell

2.2.4 单克隆抗体的特异性 ELISA 结果表明，A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均能识别 PRRSV-FZ、PRRSV-VR2332 和 PRRSV-FJ-1 等不同来源的 PRRSV 毒株。IFA 结果表明，A61 和 B47 杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均能与 PRRSV-FZ 和 PRRSV-VR2332 反应并呈现特异性胞质荧光，但均不与 PRRSV-FJ-1 反应；C65 杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体则能与 PRRSV-FZ、PRRSV-VR2332 和 PRRSV-FJ-1 反应。A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均不与 Marc-145 细胞、PCV2 和 PPV 发生反应。

2.2.5 杂交瘤细胞株分泌抗体的稳定性 在体外连续培养 2 个月，A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞株均能稳定分泌抗体，经液氮冻存、复苏后，细胞生长良好，且上清液抗体效价无明显变化，说明细胞株的抗体分泌性能很稳定。

2.2.6 单克隆抗体识别抗原表位的分析 A61、B47 和 C65 3 株杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体均以各自的饱和量两两配对进行相加 EIISA 试验，结果显示，3 株单克隆抗体两两配对的 AI 值均小于

0.5，初步说明 3 株单克隆抗体均识别同一个抗原表位 (表 3)。

表 2 3 株 PRRSV 单克隆抗体抗原位点的相加 ELISA 试验结果

Table 2 Results of McAbs additivity test			
单克隆抗体的组合 McAbs(Ascites)	OD ₄₉₀	理论值 Theoretical value	AI
A61	0.653	—	—
B47	0.720	—	—
C65	0.441	—	—
A61+B47	0.543	1.373	—0.21
B47+A61	0.663	1.373	—0.03
A61+C65	0.638	1.094	0.17
C65+A61	0.635	1.094	0.16
B47+C65	0.630	1.161	0.09
C65+B47	0.597	1.161	0.03

2.2.7 Western blot 试验 本试验获得的 3 株单克隆抗体均能识别 PRRSV 中约 26 ku 蛋白 (GP5 蛋白)，而不识别其他蛋白，说明这 3 株均是针对 GP5 蛋白的单克隆抗体。

3 讨论

本研究以密度梯度离心纯化的 PRRSV 为免疫原，经免疫 Balb/c 小鼠，杂交融合，筛选出 A61、B47

和 C65 3 株能稳定分泌抗 PRRSV-GP5 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,并制备了相应的腹水抗体。ELISA 结果表明,A61、B47、C65 均能够识别 3 个供试的 PRRSV 毒株,且不与正常 Marc-145 细胞、PCV2、PPV 等病毒反应,具有良好的特异性。相加 ELISA 试验结果显示,3 株单克隆抗体与 PRRSV 反应缺乏加性效应,推测 3 株单克隆抗体可能识别 PRRSV 的同一个抗原表位;IFA 结果表明,A61、B47 两株单克隆抗体只与 PRRSV-FZ、PRRSV-VR2332 两个毒株反应,不与 PRRSV-FJ-1 毒株反应。这一结果提示 PRRSV-FZ、VR2332 与 PRRSV-FJ-1 抗原表位的空间构像存在一定的差异。在 IFA 试验中,病毒样品经有机溶剂处理后,PRRSV-FJ-1 病毒表位抗原发生构像变化或空间几何位置的改变,因此散失了与单克隆抗体的结合能力,并由此导致 ELISA 和 IFA 分析结果上的差异,这种差异为分析不同来源的毒株提供了一种鉴别方法。

本试验在单克隆抗体的制备过程中,进行了多次杂交融合,先期免疫采用差速离心获得的病毒抗原免疫 Balb/c 小鼠,进行了 2 次融合,结果发现假阳性率很高,多数阳性孔与粗提病毒抗原及正常细胞均发生反应,未获得特异性细胞株;随后采用差速和蔗糖不连续密度梯度离心获得的病毒抗原免疫 Balb/c 鼠,融合的积极性率获得了提高,假阳性率降低。这些结果从某种意义上提示 PRRSV 抗原性较弱,经免疫 Balb/c 小鼠后,主要由粗提抗原中细胞成分刺激小鼠产生免疫应答,因此难以获得抗 PRRSV 的杂交瘤细胞株。

GP5 蛋白分子质量大小约为 26 ku,是 PRRSV 的主要免疫原性蛋白,可诱导宿主产生中和性抗体。国内外学者用表达 ORF5 基因的融合蛋白免疫 Balb/c 鼠,获得了抗 GP5 蛋白的单克隆抗体^[9,15-16],而用全病毒蛋白免疫小鼠,研制抗 GP5 蛋白的单克隆抗体却少有报道。本试验用全病毒蛋白免疫小鼠,获得 3 株抗 PRRSV-GP5 蛋白的单克隆抗体。同时这 3 株单克隆抗体均无中和活性,说明 GP5 蛋白中至少存在一个非中和活性抗原表位。GP5 蛋白单克隆抗体的成功制备,为深入研究 GP5 蛋白功能及抗原表位的鉴定奠定了基础。

[参考文献]

[1] Baustista E M,Meulenberg J J,Choi C S,et al. Structural poly-
petides of the American(VR-2332) strain of porcine epidemic

aborion and respiratory virus [J]. Arch Virol,1996,141:1357-1365.

[2] Keffaver K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. American Association of Swine Practitioness Newstetter,1989, 1:1-9.

[3] Wensvoort G,Terpstra C,Pol J M A,et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. J Vet Diagn, 1991,13:121-130.

[4] 庄向生,张德明,周伦江,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报,2003,18(2):93-96.

Zhuang X S,Zhang D M,Zhou L J,et al. Isolation and preliminary characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2003,18(2):93-96. (in Chinese)

[5] 周伦江,王隆柏,魏 宏,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 FJ04A 株的分离及其结构蛋白基因特性分析 [J]. 福建农林大学学报,2001,35(5):527-531.

Zhou L J,Wang L B,Wei H,et al. Isolation and characteristics analyses of structure protein genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain FJ04A [J]. Journal of Fujian Agricultural and Forestry University,2001,35(5):527-531. (in Chinese)

[6] Meng X J,Paul P S,Halbur P G,et al. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. J. Journal of General Virology, 1996, 76: 3181-3188.

[7] Drew T W,Meulenberg J J,Sands J J,et al. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Gen Virol , 1995,76(6):1361-1369.

[8] Magar R,Larochelle R,Nelson E A,et al. Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Can J Vet Res,1997,61(1):69-71.

[9] Zhang Y,Sharma R D,Paul P S,et al. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Vet Microbiol, 1998,63(2-4):125-136.

[10] 张晓梅,杨汉春,任慧英,等. 用 LSAB 免疫组化染色法检测猪生殖-呼吸道综合征病毒抗原的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2000,21(6):427-429.

Zhang X M,Yang H C,Ren H Y,et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen tissue using LSAB immunohistochemical staining [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,1999,21(6):427-429. (in Chinese)

[11] Yan Y,Guo X,Ge X,et al. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res,2007,126(1-2):207-215.