

鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株 N 基因在大肠杆菌中的表达及产物免疫活性检测

张淑霞¹, 贺秀媛², 崔保安², 王建华¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

[摘要] 鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株核蛋白(N)基因 PCR 产物经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切, 克隆入大肠杆菌原核表达载体 pMAL-p2X, 构建重组表达质粒 pMAL-p2X-N, 转化大肠杆菌 TB1 并进行诱导表达。通过 pMALTM 融合蛋白纯化系统对表达产物进行非变性纯化, 将纯化的 N 蛋白按常规方法免疫新西兰大白兔, 制备兔抗鸡传染性支气管炎病毒 N 蛋白的多克隆抗体, 并用 ELISA 法检测其生物活性。结果表明, 表达的重组核蛋白纯化后出现 2 条带, 相对分子质量分别约为 92 和 82 ku, 与 Western blot 出现的 2 条蛋白带一致; 纯化的重组蛋白经裂解因子作用后, 出现 2 条蛋白带, 相对分子质量分别为 45 和 35 ku, 与预期结果相符合; 制备的多克隆抗体可与不同鸡传染性支气管炎病毒株发生反应, 与亲本毒株的反应性略高于与其他毒株的反应性。以上结果表明, 原核表达的可溶性 N 蛋白具有高度的生物活性, 有望作为新的基因工程抗原用于鸡传染性支气管炎病毒的群特异性诊断。

[关键词] 鸡传染性支气管炎病毒; N 基因; 免疫活性

[中图分类号] S852.65+9.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0032-05

Expression of avian infectious bronchitis virus HN99 strain nucleocapsid protein gene in *E. coli* and immunological activity detection of expressed product

ZHANG Shu-xia¹, HE Xiu-yuan², CUI Bao-an², WANG Jian-hua¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agriculture University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: PCR product of avian infectious bronchitis virus (IBV) HN99 strain nucleocapsid protein gene was inserted into *E. coli* pMAL-p2X expression vector and fused to MBP tag at N-terminus. Then the recombinant plasmid pMAL-p2X-N was transformed into *E. coli* TB1 and induced by IPTG. N protein were purified by affinity chromatography taking advantage of the affinity of MBP for maltose. These purified N proteins were used to raise polyclonal antibody according to classic procedure. SDS-PAGE and Western blot results indicated that MBP-N fusion protein had been successful expressed. Two kinds of protein appeared after expression, with the molecular weight of 92 ku and 82ku respectively. Purification product of MBP-N fusion protein cleavage by Factor Xa, MBP tag were cleaved, and their relative molecular weight was respectively 45 ku and 35 ku. ELLISA confirmed that antiserum to N protein could react with different strains of IBVs, and was more active when it reacted with its relative strains. In conclusion, the non-denaturalized N proteins were active and hopeful as a kind of gene engineering antigen for a group of IBVs diagnosis.

[收稿日期] 2006-09-27

[基金项目] 河南省科技攻关项目(0424050015)

[作者简介] 张淑霞(1967-), 女, 宁夏中宁人, 副教授, 主要从事动物疫病防治研究。

[通讯作者] 贺秀媛(1965-), 女, 湖南道县人, 副教授, 主要从事动物营养代谢病与免疫学研究。

Key words: avian infectious bronchitis virus; N gene; immunological activity

鸡传染性支气管炎(Infectious Bronchitis, IB)是由传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)引起的一种鸡急性、高度接触性传染病^[1]。IBV 为冠状病毒科冠状病毒属代表种,基因组为单链正股 RNA^[2],在转录过程中可形成 6 种 mRNAs(mRNA 1~6)^[3]。IBV 粒子含有 4 种特异性蛋白:纤突蛋白(S)、膜蛋白(M)、核蛋白(N)和小囊膜蛋白(sM)。N 蛋白位于病毒粒子的内部,是一种由 409 个氨基酸残基组成的碱性磷酸化蛋白质,与 S 蛋白相比,其保守性很高^[4]。IBV 的特点是变异频繁,血清型复杂^[5],所致疾病的临床表现差异很大,不同地区、不同时间的地方流行毒株总是以各种面目出现,在鸡群中甚至在免疫鸡群中流行^[6]。IB 常规的诊断方法存在一定的局限性,因此新的分子生物学诊断方法已成为近年来研究的热点。前些年,人们对 IBV 的研究主要集中在 S1 基因上,因为其与 IBV 的免疫原性和变异有密切的联系。但最近几年的研究发现,IBV 的其他结构蛋白也有重要的生物学功能^[7],其 N 基因也易发生变异,新毒株的出现可能与不同地区 IBV 基因的重组有关^[8]。目前,使用以灭活病毒作为包被抗原的商品化 ELISA 试剂盒诊断 IB,虽然具有较高的敏感性和特异性^[9],但不同毒株的血清交叉反应性差异较大,有些很弱甚至根本无交叉反应性^[10],这给 IB 的快速诊断与防制带来一定的困难。在 IB 分子生物学诊断试剂的研究方面,尽管国内外许多学者都做了大量的研究工作,但至今尚未研制出一种商品化、标准化的诊断抗原应用于实际。为了开发研制新型、经济、高效、可靠的血清学诊断试剂,本研究对 IBV HN99 株的 N 基因进行了原核表达,对表达产物进行了纯化并对其免疫活性进行了检测,以期对 IBV 基因工程诊断抗原的进一步研究和临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、血清及试验动物 IBV HN99 株(肾型)由河南农业大学崔保安教授提供;IBV H52、M41、W 株(河南地方毒株)及 IBV 阳性和阴性血清由河南农业大学贺秀媛副教授提供;IBV SX 株(陕西地方毒株,腺胃型)由西北农林科技大学禽病研究室保存;2 月龄新西兰大白兔(雄性,质量 2.5 kg)购

自中国科学院武汉分院病毒研究所实验动物中心。

1.1.2 引物设计与合成 参照 GenBank 中发表的 IBV N 基因序列(登录号:AF352310),采用引物设计软件 Prime Premier 5.0 设计 1 对引物:

上游引物:5'-CGGGATCCATCATGGCAAG-CAGTAAG-3';

下游引物:5'-CCCAAGCTTTTAAAGTTCAT-TCTCTCCC-3'。

上、下游分别设有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点,引物由上海生物工程有限公司合成。

1.1.3 载体、菌株及质粒 表达载体 pMAL™-p2X 购自 New England Biolabs, United Kingdom 公司;大肠杆菌 TB1 由武汉大学医学分子病毒学国家重点实验室提供;含 IBV HN99 株 N 基因的阳性重组质粒 pMD18-T-N 由本课题组构建^[11]。

1.1.4 主要试剂 所用限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;蛋白融合和纯化试剂盒 pMAL™ Protein Fusion and Purification System 购自 New England Biolabs, United Kingdom 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 和碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG 均购自北京中杉生物科技股份有限公司;DNA 快速回收试剂盒购自上海申能博彩生物工程有限公司;质粒快速提取试剂盒购自上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司;DNA Marker 和蛋白质 Marker 购自北京鼎国生物技术有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯级。

1.2 IBV HN99 株 N 基因的 PCR 扩增及扩增产物的回收

IBV HN99 株 N 基因的 PCR 反应体系为 20 μ L:在 PCR 反应管中依次加入质粒 pMD18-T-N 0.1 μ L,上、下游引物各 0.8 μ L,10 $\times$ Taq Buffer 2 μ L,10 mmol/L dNTP 0.4 μ L, Taq DNA 酶 0.2 μ L,ddH₂O 15.7 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,54 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 结束反应。取 15 μ L PCR 扩增产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳。在紫外灯下用刀片切下含有目的片断的凝胶,用凝胶回收纯化试剂盒回收目的片段。

1.3 重组表达载体 pMAL™-p2X-N 的构建

将 N 基因 PCR 产物和表达载体 pMAL™-p2X 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,回收纯化后 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,构建重组表达载体 pMAL™-p2X-N。

连接产物转化 TB1 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。挑选白斑,小量提取质粒,进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,将鉴定为阳性的重组质粒送上海生物工程有限公司测序。

1.4 重组质粒 pMAL™-p2X-N 在大肠杆菌中的表达及表达产物的鉴定

1.4.1 诱导表达 将鉴定后的阳性质粒 pMAL™-p2X-N 转化至表达宿主菌 TB1 中,挑单个菌落接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 200 r/min 摇床培养。待菌液 OD₅₉₀ 为 0.5 时,取 1 mL 菌液作为未诱导对照,剩余菌液加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L,37 °C 振荡诱导培养,分别在诱导后的 2,4 和 6 h 取菌液 1 mL,同时设 TB1 未诱导对照。

1.4.2 表达产物(重组核蛋白)的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定 将不同时间段收集的菌液于 4 °C 5 000 r/min 离心 5 min,收集细菌沉淀,加入菌体积 1/10 的 1×SDS 上样缓冲液重悬,煮沸 5 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 SDS-PAGE。电泳完毕后,切下分离胶,分为两部分,一部分用考马氏亮蓝染色,甲醇-冰乙酸脱色液脱色,观察是否有蛋白质表达;另一部分转移至硝酸纤维素膜进行 Western blot,将转印膜用 5 g/L 脱脂乳封闭过夜,加入 Anti-MBP 抗血清室温反应 1 h,洗膜后加入以 AP 标记的羊抗兔 IgG 室温反应 1 h,洗去二抗,最后用 AP-NBT/BCIP 显色。

1.5 IBV HN99 株重组核蛋白的纯化

挑取单个阳性菌落接种于 200 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中培养,待菌液 OD₅₉₀ 为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mol/L,37 °C 振荡诱导培养 6 h。收集菌液,4 °C 5 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 10 mL column Buffer 重悬沉淀,-80 °C 反复冻融 3 次,超声波裂解菌体,10 000 r/min 离心 20 min。取上清,按照蛋白纯化试剂盒 pMAL™ Protein Fusion and Purification System 的操作步骤,对含有麦芽糖标签的重组核蛋白进行纯化,分阶段收集纯化产物,并进行 SDS-PAGE 检测。将检测出的含量较高的样品,每毫升加入裂解因子 Factor Xa 30 μL,室温作用 8 h,按纯化步骤过柱,收集样品进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 IBV HN99 株重组核蛋白多克隆抗体的制备

将 SDS-PAGE 检测合格的目的蛋白液,用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值,并计算蛋白浓度。取浓度大于 0.5 mg/mL 的样品 0.5 mL,加入等量的

弗氏完全佐剂充分混匀,制成油佐剂疫苗,肌肉注射免疫 2 月龄新西兰大白兔。分别于免疫接种后 15 和 30 d 进行第 2 和 3 次加强免疫(加强免疫疫苗制备方法同前佐剂用佛氏不完全佐剂)。第 3 次免疫后 7 d 采集免疫兔血液,分离血清,-20 °C 保存备用。

1.7 IBV HN99 株重组核蛋白多克隆抗体与不同 IBV 的反应性

将不同的 IBV 毒株(H52、M41、W 和 SX 株)分别用 SPF 鸡胚增殖,收集尿囊液,用 0.1 g/L 胰酶处理,测定其血凝价。然后将收集的尿囊液 4 °C 5 000 r/min 离心 30 min,取上清以 27 000 r/min 离心 2 h,弃去大部分上清(管底留大约 1 mL),吹打混匀,即得 IBV 病毒液。用方阵试验筛选合适浓度的 IBV 病毒液和纯化的重组核蛋白作为抗原,包被反应板后分别与上述多克隆抗血清进行交叉反应,加入以 HRP 标记的羊抗兔 IgG,底物显色后,读取 OD₄₅₀ 值,每样品 6 个重复,取平均值。然后用不同反应板对样品再进行 2 次重复检测。以 S/P(S=样品孔 OD₄₅₀-阴性孔 OD₄₅₀,P=标准阳性孔 OD₄₅₀-阴性孔 OD₄₅₀)为判定标准,S/P>0.268 时,被检血清判定为阳性。

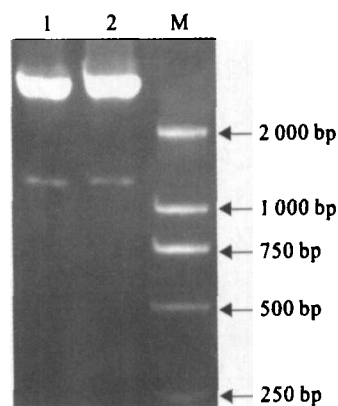


图 1 重组质粒 pMAL™-p2X-N 的 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切鉴定结果

M. DNA 标样;1,2. 重组质粒的 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切产物
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid digested by restriction enzymes (*Bam*H I and *Hind* III)

M. DNA Marker DL 2 000;1,2. Products of recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Hind* III

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMAL™-p2X-N 的构建及鉴定结果

由图 1 可知,重组质粒 pMAL™-p2X-N 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切可得到 6 723 和 1 230 bp 的条带,

与预期结果一致。阳性质粒测序结果表明,读码框正确,插入片段与原始序列相同,说明目的基因克隆到载体的预期位置,可以用于表达。

2.2 IBV HN99 株重组核蛋白基因的表达和鉴定

电泳结果(图 2)显示,诱导菌液在接近 94 ku 处比对照多出一条较粗的蛋白质条带,与理论推测的表达产物的相对分子质量(89 ku)比较接近。Western blot 试验结果显示,表达产物在约 92 和 82 ku 处出现 2 条杂交带(图 2),对照组未见出现条带。

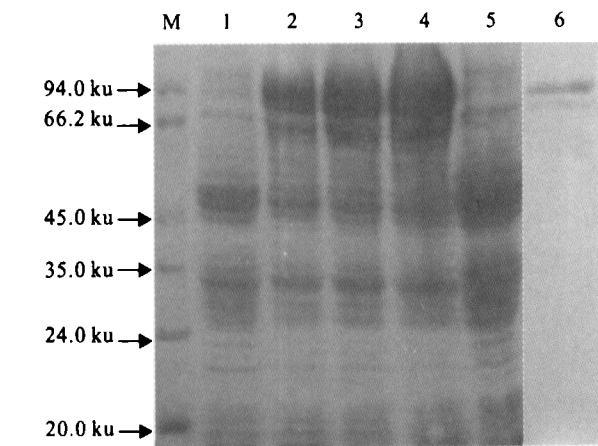


图 2 重组质粒 pMAL™-p2X-N 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析
M. 蛋白标准;1. pMAL™-p2X-N/TB1 未诱导;2~4. 分别为 pMAL™-p2X-N/TB1 诱导 2,4 和 6 h; 5. TB1 未诱导; 6. pMAL™-p2X-N/TB1 诱导 4 h 的 Western blot
Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of product of pMAL™-p2X-N expressed in *E. coli* TB1
M. Protein molecular weight marker;1. pMAL™-p2X-N/TB1 without induction;2,3,4. pMAL™-p2X-N/TB1 induced expression for 2 hours, 4 hours and 6 hours; 5. TB1 without induction; 6. Western blot of pMAL™-p2X-N/TB1 induced expression for 4 hours

2.3 IBV HN99 株重组核蛋白的纯化

图 3 结果显示,重组核蛋白纯化产物出现 2 条蛋白带,相对分子质量分别约为 92 和 82 ku,与 Western blot 的结果一致。纯化后的重组蛋白经裂解因子 Factor Xa 作用后,纯化产物出现 2 条蛋白带,相对分子质量约为 45 和 35 ku(图 4),与预期结果相符,表明重组蛋白中的麦芽糖标签(43 ku)已被切除。

2.4 IBV HN99 株重组核蛋白多克隆抗体与不同 IBV 毒株的反应性

方阵试验筛选结果显示,重组核蛋白抗原最佳包被浓度为 1.80 μg/mL,其他 IBV 抗原最佳包被

浓度为 18 μg/mL,一抗血清稀释度为 1 : 100,二抗血清稀释度为 1 : 1 000,临界值 S/P=0.268。从表 1 可以看出,用纯化的核蛋白免疫新西兰大白兔制备的多克隆抗体与试验用毒株均有交叉反应性,而与核蛋白及亲本毒株的反应性略高于与其他毒株的反应性。

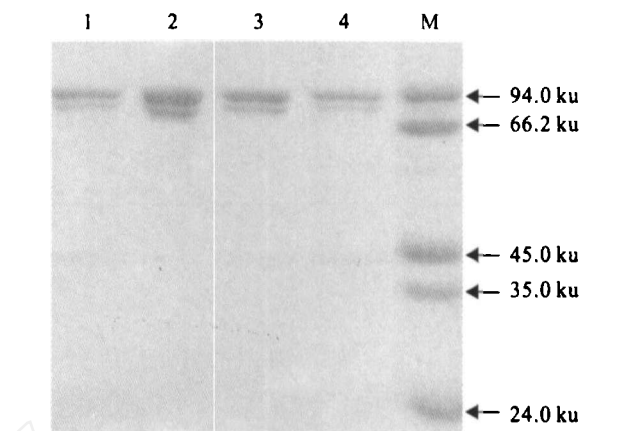


图 3 IBV HN99 株重组核蛋白的纯化
M. 蛋白标准;1~4. 重组核蛋白的纯化产物
Fig. 3 Purification of recombinant nucleocapsid protein of IBV HN99
M. Protein molecular weight marker;1~4. Purification product of recombinant nucleocapsid protein

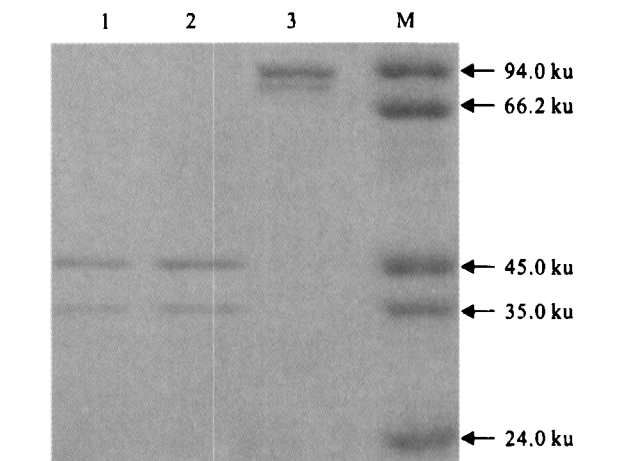


图 4 IBV HN99 株重组核蛋白的裂解结果
M. 蛋白标准;1~2. 裂解重组核蛋白的纯化产物; 3. 重组核蛋白的纯化产物
Fig. 4 Cleavage of recombinant nucleocapsid protein of IBV-HN99
M. Protein molecular weight marker;1~2. Purification product of fusion nucleocapsid protein cleavage 3. Purification product of recombinant nucleocapsid protein

表 1 不同 IBV 毒株在 ELISA 中与抗核蛋白多克隆抗体的反应性 (n=3)

Table 1 Results of different IBV strain reacting against nucleocapsid protein of IBV-HN99 polyclonal antibody

抗 原 Antigen	S/P 值 Results of S/P is replicated for three times		
	1	2	3
IBV-HN99 重组核蛋白 Recombinant nucleocapsid protein of IBV-HN99	1. 031	1. 029	1. 033
IBV-HN99	0. 980	0. 976	0. 972
IBV-H52	0. 952	0. 963	0. 955
IBV-M41	0. 895	0. 892	0. 888
IBV-W	0. 862	0. 856	0. 860
IBV-SX	0. 721	0. 718	0. 725

3 讨 论

根据 IBV HN99 株 N 基因的氨基酸序列可知, N 蛋白的相对分子质量约为 46 ku,本试验所用的表达载体含有相对分子质量约 43 ku 的麦芽糖标签,故可推算重组核蛋白的相对分子质量约为 89 ku。本试验结果显示,在接近蛋白质相对分子质量标准 94 ku 处,出现一条特异性蛋白条带,而且随 IPTG 诱导时间的增加,此蛋白条带也随之增粗,说明重组 IBV 核蛋白基因的表达量随诱导时间的延长而增加;重组表达核蛋白的 Western blot 及蛋白纯化试验出现的特异条带均为 2 条,相对分子质量约为 92 ku 和 82 ku,说明这 2 条带均为目的条带。92 ku 的条带比理论推算的 89 ku 稍大,可能是 IBV HN99 株 N 基因与表达载体中的引导肽融合表达所致;82 ku 的蛋白可能是 92 ku 蛋白的裂解产物。出现两个特异性片段的原因尚不清楚,可能是目的蛋白在受电荷影响最大的地方发生断裂所致,也可能是编码融合蛋白基因在合成时发生错误的产物^[12]。这种现象与杜恩岐^[13]、王宏俊^[12]等的报道相类似。本试验的表达载体为用含麦芽糖标签的 pMAL™-p2X,表达的蛋白均为可溶性蛋白,在非变性条件下较易纯化,不仅表达量大,纯化的蛋白量高,而且表达出的重组蛋白可以用 Factor Xa 裂解因子将麦芽糖标签切除,使表达蛋白成为纯度较高的核蛋白,从而大大提高了 ELISA 试验的准确度和可信度。

许多研究表明^[14-16],核蛋白作为 IBV 的主要结构蛋白,参与病毒衣壳化和病毒的复制,其免疫原性最强,能诱导产生抗体及细胞毒性 T 淋巴细胞的免疫反应性,具有更多的交叉保护性抗原表位及良好

的免疫记忆力,在感染细胞中能大量表达,而且保守程度相对较大;N 蛋白因缺乏糖基化位点,易于在原核、真核表达系统中表达、纯化,其免疫原性接近天然的 N 蛋白。这些特点决定了核蛋白比较适合作廉价、高效、可靠的血清学诊断试剂。本试验用 IBV HN99 株核蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗血清,免疫血清与不同 IBV 毒株均有交叉反应性,与 IBV HN99 株核蛋白及亲本毒株反应性稍高于与其他毒株的反应性。本试验初步表明,鸡传染性支气管炎病毒 N 蛋白可作为群特异性血清学检测诊断抗原应用于 IBV 实际诊断中。

[参考文献]

[1] Hofstad J S,Orbell M W,Huggins M A. Survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated [J]. Vet Rec, 1996,138:178-180.

[2] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 1 版. 北京:中国农业出版社,1999: 43-44.

[3] Lee C W,Jackwood M W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV[J]. Arch Virol,2000,145:2135-2148.

[4] Williams A K,Wang L,Sneed L W,et al. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strain of infectious bronchitis virus and other coronavirus [J]. Virus Res, 1992, 25: 213-222.

[5] Calnek B W,John H,Charles W,et al. Diseases of Poultry[M]. 10th edition. Ames: Iowa State University Press, 1997: 511-526.

[6] 陈德胜,潘杰彦,曹瑞兵,等. 传染性支气管炎病毒(IBV) 国内分离毒株的分子流行病学分析[J]. 病毒学报,2003,19(2): 149-153.

[7] Wang X,Jing Y. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolated from China and Southeast Asia[J]. Avian Dis, 2001,45:201-209.

[8] Park J Y,Pak S I,Sung H W,et al. Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis viruses isolated in Korea[J]. Virus Genes,2005,31(2):153-162.

[9] Abdul N,Aanna K,Wasters B,et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus [J]. J Virol Method, 1998,70(1):37-44.

[10] Finey P M,Box P G,Homes H C. Studies with a bivalent infectious bronchitiss killed virus vaccine[J]. Avian Pathology, 1990,19(3):435-450.

[11] 张淑霞,贺秀媛,崔保安,等. 鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株 N 基因的克隆与序列分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(11):42-46.

(下转第 40 页)

上,这也是许多畜禽传染病流行病学调查的一个难题。因此,在该技术使用时应该紧密结合流行病学调查资料和其他免疫指标,以达到对疫情的正确判断。

与常规单一 PCR 技术相比,建立多重 RT-PCR 技术的关键在于以下几个方面:(1)设计特异性引物,尽量避免引物二聚体的产生,防止因引物与不同模板之间的非特异性结合而造成非特异性扩增,干扰结果的判定。另外,为使各片段得到最佳扩增,还要适当调整各引物的使用浓度。本试验中,ILV、IBV、NDV、AIV 4 种病原的扩增产物大小分别为 620,445,344 和 240 bp,其相应的引物使用浓度分别为 30,25,12.5 和 10 pmol/L,表明扩增片段的长度与引物的浓度成正比,即扩增片段愈长所需引物量愈大。(2)反复优化多重 PCR 的反应参数,尤其要注意 PCR 反应的退火温度要足够高,因为多重 RT-PCR 反应体系中有对引物,退火温度过低往往会导致非特异性扩增产物出现,提高退火温度则可有效减少非特异性扩增产物的生成。另外循环次数应尽量少,以利于检测扩增产物,循环次数增加会导致非特异性扩增的机率增大。(3)在多重 RT-PCR 反应体系中要加入多种模板,其扩增效率并不完全相同,常常是片段较小的优先扩增,因此模板的使用量要多次试验,反复优化,以找出其最佳比例,保证各个目的条带都能得到很好的扩增。因此,在多重 RT-PCR 反应体系中,选择适当引物浓度,是

确保多重 RT-PCR 成功的关键因素之一。

[参考文献]

- [1] 余丽芸,刘建柱,侯喜林.多重 PCR 检测猪瘟病毒、猪细小病毒和猪伪狂犬病病毒的研究[J]. 动物医学进展,2004,25(6):75-77.
- [2] Paula B M S,Cristiane D,Luiz S,et al. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds[J]. Journal of Virological Methods,2005,123:125-130.
- [3] Sung G K,Edward J D. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples[J]. Biologicals,2003,31:103-106.
- [4] 韦 平,何秀苗,王桂军.鸡肿瘤病快速鉴别诊断技术的建立[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2002,2(32):1-5.
- [5] 谢芝勋,谢志勤,庞耀珊,等.应用三重聚合酶链反应同时检测鉴别鸡 3 种病毒性呼吸道传染病的研究[J]. 中国兽医科技,2001,31(1):11-14.
- [6] 邓显文,谢芝勋,谢志勤,等.应用多重聚合酶链反应检测四种霉形体的研究[J]. 中国兽医科技,2003,33(6):14-17.
- [7] 王桂军,韦 平,李康然,等. PCR 和核酸探针技术诊断 MD 和 RE 的比较研究[J]. 中国预防兽医学报,2003,25(6):479-481.
- [8] 韦 平,何秀苗,王桂军,等.鸡肿瘤病快速鉴别诊断试剂盒及其应用研究[J]. 广西科学,2005,12(1):62-67.
- [9] 谢芝勋,邓显文,谢志勤,等.多重聚合酶链反应快速检测鉴别鸡毒支原体强毒株和弱毒疫苗株的研究[J]. 中国预防兽医学,2003,25(6):476-479.
- [10] 刘丽娜,何启盖,陈焕春,等.用多重 PCR 鉴别猪伪狂犬病野毒与疫苗毒的研究[J]. 中国兽医科技,2005,35(2):95-98.
- [12] 王宏俊,陈福勇.利用 IBV 重组 N 蛋白建立 ELISA 抗体检测试剂盒的研究[J]. 中国兽医杂志,2003,39(9):3-6.
- [13] 杜恩岐,刘胜旺,孔宪刚,等.鸡传染性支气管炎病毒核蛋白基因在大肠杆菌中的表达及抗原性初步研究[J]. 病毒学报,2003,19(4):342-347.
- [14] Van M Y,Snijder E J,Dobbe J C,et al. Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication[J]. J Virol,1999,73:7641-7657.
- [15] Denison M R,Spaan W J,Vander M Y,et al. The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from the replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis[J]. J Virol,1999,73:6862-6871.
- [16] Seah J N,Yu L,Kwang J. Localization of linear Bcell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. Veter Microbiol. 2000,75:11-16.

(上接第 36 页)