

抗苦马豆素抗体 ELISA 检测方法的建立

王爱华, 王建华, 宋毓民

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 建立一种敏感性高、特异性强的抗苦马豆素(Swainsonine, SW)抗体的 ELISA 检测方法。**【方法】** 用 SW 人工抗原(SW-BSA)免疫小鼠, 制备抗 SW 血清, 通过 ELISA 法进行血清抗 SW 抗体效价检测, 比较以 SW-OVA 或 SW 为包被抗原的检测结果, 分析包被抗原浓度、封闭剂等对测定结果的影响, 以确定测定的最佳条件。**【结果】** 以 SW-OVA 为包被抗原的检测结果明显优于以 SW 为包被抗原; 抗苦马豆素抗体的最佳测定条件为: 以 1.0 $\mu\text{g/mL}$ SW-OVA 作为包被抗原, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h, 选用 15 g/L 的明胶作为封闭剂, 酶标抗体的工作浓度为 1 : 1 500。**【结论】** 建立的抗苦马豆素抗体 ELISA 检测方法, 特异性强、稳定性高, 为进一步研究苦马豆素人工抗原的免疫原性等奠定了基础。

【关键词】 苦马豆素; 抗苦马豆素抗体; ELISA 检测

【中图分类号】 S859.87; S854.4⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)11-0052-05

Establishment of indirect ELISA for detecting the antibody against swainsonine

WANG Ai-hua, WANG Jian-hua, SONG Yu-min

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

Abstract: **【Objective】** This paper aimed to establish an indirect ELISA to determine the level of antibody against SW with high sensibility and specificity. **【Method】** The mice antiserum was prepared by inoculating the mice with SW-BSA. The antibody against SW was measured through indirect ELISA using SW-OVA or SW as coating antigen and the effects of density of coating antigen and different impacting media on the results were analyzed to determine the optimal conditions of the established indirect ELISA. **【Result】** Using the SW-OVA as coating antigen was better than SW. The results showed that the optimal conditions of the method were as follows: the density of coating antigen(SW-OVA) 1.0 $\mu\text{g/mL}$, the working concentration of enzyme labelled antibody of goat against mouse IgG 1 : 1 500, and the impacting medium gelatine of 15 g/L. **【Conclusion】** The method was verified with high specificity and stability via the determination of the antibody against SW in serum of mice, thus providing a basic method for further research of SW artificial antigen.

Key words: swainsonine; antibody against SW; ELISA

疯草(Locoweed)是我国西北地区牧场及世界上许多地区的主要有毒牧草之一,可引起家畜死亡、

* [收稿日期] 2007-12-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571315);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20030712017)

[作者简介] 王爱华(1966—),女,陕西合阳人,副教授,在读博士,主要从事动物微生物学与免疫学研究。

E-mail: wangaihua@nwsuaf.edu.cn

[通讯作者] 王建华(1946—),男,河南南阳人,教授,博士生导师,主要从事动物中毒性及营养代谢性疾病研究。

E-mail: jhwang1948@sina.com

孕畜流产和公畜不育等而造成极大的经济损失^[1-2]。疯草属于豆科植物,是一种潜在的优良牧草,并在防沙固沙等方面具有重要作用。研究证明,苦马豆素(Swainsonine, SW)是疯草引起马、牛、羊等动物中毒的主要有毒成分,其化学成分属于吡啶生物碱^[3-6],除了对动物的毒性作用外,又可能成为一种具有潜在应用价值的抗癌新药^[7-9]。因此,如何有效地预防家畜中毒又充分利用这一资源,已成为目前广泛关注的热点。针对 SW 免疫疫苗的研究,为防治家畜疯草中毒,有效利用疯草资源提供了诱人的前景^[10-11]。但该研究才刚刚起步,SW 免疫原性的分析和免疫效果的确定均有赖于其抗体的准确检测,由于 SW 的分子量低^[1-2],无法用常规的沉淀试验和凝集试验确定,因而抗 SW 抗体的检测方法,成为 SW 人工抗原免疫原性及免疫效果研究的关键和技术难点。以玫瑰花环抑制试验和血凝试验为基础建立的抗 SW 抗体测定技术,因方法本身的限制,其操作程序复杂,难于标准化,且特异性和敏感性均无法满足研究的要求。ELISA 法因具有快速、敏感、准确等优点而广泛应用于许多领域^[12-13],目前已经有人以 SW 作为包被抗原进行抗 SW 抗体的检测^[10-11],但 SW 为小分子生物碱,与酶标板的结合力较弱,因而可能影响到测定结果的可靠性和稳定性。为此,本研究应用以 SW 与卵清蛋白(OVA)偶联制备的 SW-OVA 作为包被抗原,建立了抗 SW 抗体的特异性 ELISA 检测方法,以期提高测定结果的稳定性和特异性,从而为 SW 的进一步研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 Balb/c 小鼠,18~22 g,6~8 周龄,购于第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂与仪器 SW 与牛血清白蛋白(BSA)偶联抗原(SW-BSA)和 SW 与卵清白蛋白(OVA)偶联抗原(SW-OVA),由西北农林科技大学生物毒素与分子毒理学研究室提供;小鼠 IgG、酶标山羊抗小鼠 IgG 抗体,购自北京鼎国生物技术有限责任公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),为 Amresco 公司产品;其他试剂均为进口或国产分析纯。

Mutiskan MK3 酶标仪,热电(上海)仪器有限公司产品;酶标板,Costar 公司产品。

1.2 小鼠抗 SW 血清的制备

取 Balb/c 小鼠 6 只,随机分为 2 组。A 组 5

只,用 SW-BSA 免疫;B 组 1 只,注射磷酸盐缓冲液(PBS)作为阴性对照。初次免疫应用弗氏完全佐剂抗原,每只颈背部分 3 点皮下注射 0.2 mL (含 SW 100 μ g),B 组注射等量磷酸盐缓冲液(PBS)。间隔 2 周用等量弗氏不完全佐剂抗原加强免疫,共免疫 3 次,最后 1 次免疫 1 周后,每只小鼠断尾采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 间接 ELISA 的操作^[12-13]

用 0.1 mol/L 的碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液,将包被抗原稀释至工作浓度,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,弃去孔内液体,用含体积分数 0.5%吐温的 PBS(PBST)洗涤缓冲液洗涤 3 次,每次 3 min(以下简称洗涤);每孔加封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱放置 1 h 后,洗涤;将小鼠血清倍比稀释后每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱放置 1 h,洗涤后,每孔加入工作浓度的 HRP-羊抗鼠 IgG 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温箱放置 1 h,洗涤。之后,每孔加新鲜配制的 TMB-H₂O₂ 底物液 100 μ L,于室温反应 15 min;每孔加终止液(20 mL H₂SO₄) 50 μ L,15 min 内用酶标仪于 450 nm 波长处测定 OD 值(OD₄₅₀)。每块板同时设空白对照(PBS 代替待检血清)、阴性对照(阴性对照组小鼠血清)和阳性对照(抗 SW 阳性血清),以待测孔的 OD₄₅₀ 值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍(即 $P/N \geq 2.1$),判为阳性。

1.4 酶标抗体最适稀释度的确定^[12-13]

于酶标板各孔加入 100 ng/mL 小鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再置 4 $^{\circ}$ C 冰箱包被过夜,弃去孔内液体,洗涤;将酶标抗体系列稀释成 1 : 250,1 : 500,1 : 1 000,1 : 1 500,1 : 2 000,1 : 3 000,1 : 4 000 和 1 : 5 000 共 8 个不同稀释度,进行 ELISA 检测,取 OD₄₅₀ 值最接近 1.0 时的酶标山羊抗小鼠 IgG 抗体的稀释度,作为酶标抗体在工作浓度。

1.5 包被抗原 SW-OVA 最适浓度以及封闭剂的确定

棋盘滴定法选择包被抗原的工作浓度,分别用包被缓冲液将 SW-OVA 稀释至 10.00,1.00,0.10 和 0.01 μ g/mL,以每孔 100 μ L 分别包被酶标板。分别用不同的封闭剂(10.0 g/L OVA、15 g/L 明胶和 50 g/L 脱脂奶粉)封闭。以 PBS 作为空白对照,测定免疫(阳性)小鼠血清、未免疫(阴性)小鼠阴性血清的 OD₄₅₀,计算 P/N ,确定包被抗原的最适包被浓度。

1.6 ELISA 检测小鼠血清的重复性试验

应用上述选定的最佳条件,对小鼠抗 SW-BSA

血清样品 A1~A5 在 3 个不同时间进行 ELISA 检测,对测定结果进行统计学分析,计算批间变异系数。

1.7 以 SW 和 SW-OVA 作为包被抗原时检测结果的比较

取免疫的小鼠血清,用上述试验选定的条件进行 ELISA 测定,同时参照文献[10-11]以 SW 作为包被抗原进行平行测定,比较其测定结果。以 SW 作为包被抗原测定的主要步骤是:1 g/L 鞣酸于 37 ℃处理酶标板 1 h,洗涤 3 次;加入 5 μg/mL 的 SW 100 μL,37 ℃ 2 h 包被酶标板,洗涤 3 次;以 100 μL/孔加入稀释度为 1 : 20,1 : 40,1 : 80,1 : 160,1 : 320 和 1 : 640 的小鼠血清,37 ℃孵育 1 h,洗涤 3 次;再加二抗,37 ℃孵育 1 h,洗涤 3 次;加 TMB 100 μL/孔,37 ℃ 孵育 20 min,加 20 mL/L H₂SO₄ 50 μL/孔终止反应,测 OD₄₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 酶标抗体最适稀释度的确定

试验结果显示,酶标抗体的稀释度为 1 : 250,

表 1 抗 SW 抗体间接 ELISA 检测方法 SW-OVA 包被抗原工作浓度的确定

样品 Sample	10.00 μg/mL		1.00 μg/mL		0.10 μg/mL		0.01 μg/mL	
	OD ₄₅₀	P/N	OD ₄₅₀	P/N	OD ₄₅₀	P/N	OD ₄₅₀	P/N
SW 阳性血清 Positive anti-SW serum	0.571	17.68	0.553	13.84	0.401	6.89	0.348	6.39
阴性对照 Negative mouse serum	0.057		0.064		0.077		0.073	
空白对照 Blank control	0.026		0.027		0.022		0.022	

表 2 抗 SW 抗体间接 ELISA 检测的重复性试验

Table 3 Variation coefficient of the indirect ELISA for detection of SW antibody

血清样品 Sample	测定次数 Time of test			平均值 Mean value	标准差 Standard deviation	变异系数/% CV
	1	2	3			
A1	0.623	0.629	0.638	0.633	0.004 6	0.72
A2	0.628	0.627	0.638	0.631	0.006 1	0.96
A3	0.632	0.625	0.629	0.629	0.003 5	0.56
A4	0.632	0.623	0.626	0.627	0.004 6	0.73
A5	0.624	0.618	0.611	0.618	0.006 5	1.05

2.4 以 SW 和 SW-OVA 作为包被抗原进行抗 SW 抗体间接 ELISA 检测的比较

由表 3 可见,以 SW 或 SW-OVA 作为包被抗原时,阳性对照的 OD₄₅₀ 值均表现稳定。以 SW-OVA 作为包被抗原时,阳性对照的 P/N 值为 19.82,3 个待测样品为 1 : 640 时均为阳性;以 SW 作为包被抗原时,阳性对照的 P/N 值为 2.87,阴性本底值较高,3 个待测样品中,只有 A3 样品的血清稀释度为

1 : 500,1 : 1 000,1 : 1 500 和 1 : 2 000 时,其 OD₄₅₀ 值分别为 1.247 ± 0.012,1.226 ± 0.021,1.176 ± 0.031,1.117 ± 0.014 和 0.956 ± 0.021。稀释度为 1 : 3 000,1 : 4 000 和 1 : 5 000 时,其 OD₄₅₀ 分别为 0.856 ± 0.022,0.763 ± 0.032 和 0.647 ± 0.013。综合分析,本试验选择 1 : 1 500 作为工作浓度。

2.2 包被抗原 SW-OVA 最适浓度以及封闭剂的确定

由表 1 可见,当包被抗原 SW-OVA 浓度为 10 和 1.0 μg/mL 时,P/N 值均较大,且二者之间差异不显著,因而选用 1.0 μg/mL 作为 ELISA 的抗原包被浓度。当用 15 g/L 的明胶封闭时,OD₄₅₀ 值最高,P/N 值最大,所以选择明胶作为封闭剂。

2.3 ELISA 检测小鼠血清的重复性试验

重复性试验结果(表 2)表明,在试验选定的最适条件下,血清抗体 ELISA 检测的 OD₄₅₀ 值批间变异系数(CV)为 0.56%~1.05%,表明测定结果稳定性、重复性好。

表 3 分别以 SW 与 SW-OVA 作为包被抗原时测定结果的比较

Table 3 Comparison between measured result with SW and SW-OVA as coating antigen

包被抗原 Coating Ag	血清样品 Sample	血清稀释度 Dilution of the serum						阴性对照 Negative	阳性对照 Positive
		1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640		
SW-OVA	A1	1.662	1.517	1.303	1.048	0.906	0.655	0.105	2.018
	A2	2.108	2.097	1.960	1.793	1.611	1.454	0.101	2.051
	A3	2.018	1.898	1.785	1.580	1.520	1.295	0.102	2.055
SW	A1	0.498	0.359	0.295	0.258	0.262	0.234	0.404	1.094
	A2	0.620	0.536	0.423	0.461	0.405	0.416	0.354	1.144
	A3	0.716	0.624	0.657	0.536	0.522	0.485	0.353	1.060

3 讨 论

SW 人工抗原的免疫原性分析和免疫效果的确定,均有赖于苦马豆素抗体的准确检测,但由于 SW 的分子量小^[1-2],无法用常规的沉淀试验和凝集试验等确定。童德文等^[10]以血凝试验为基础建立了相应的测定方法,该方法的关键是测定前需要对红细胞进行致敏处理,而致敏的红细胞不易保存,测定结果易受测定者技术水平和熟练程度等的影响,而使该方法的稳定性和敏感性降低。因此,寻求一种结果稳定、敏感性高和准确快速的检测方法,成为研究者关注的焦点。

ELISA 测定技术因其具有快速、敏感、准确等优点,而广泛应用于多个领域,无疑也是解决抗 SW 抗体测定的最佳选择。ELISA 检测方法的特异性,首先取决于包被抗原的种类与纯度,及其与制备待测抗体所用抗原的交叉性^[12-13]。包被抗原与酶标板(聚苯乙烯固相载体)是通过物理吸附结合的,依靠的是蛋白质分子结构上的疏水基团与固相载体表面的疏水基团间的作用。这种物理吸附是非特异性的,但受到蛋白质分子量、等电点和浓度等的影响。对于分子量小,不易与固相载体结合的半抗原,多采用与蛋白载体偶联后作为包被抗原^[12-13]。本试验以 SW-OVA 作为包被抗原,使 SW 通过 OVA 与酶标板结合,并测定了不同浓度的包被效果,证明浓度 1 μg/mL 的包被效果最好。进一步对封闭液进行选择,建立的抗 SW 抗体检测方法对相同样品测定批间的变异系数小于 2%,结果稳定。

童德文等^[10-11]曾用 SW 直接作为包被抗原建立 ELISA 法,分别对免疫家兔和山羊血清中的抗 SW 抗体进行了测定。本试验对免疫小鼠的血清用其介绍的方法和本试验建立的方法同时进行了测定分析与比较(表 3),表明用 SW-OVA 作为包被抗原时可显著提高测定的敏感性和稳定性。这可能是因为 SW 为小分子生物碱,与酶标板的结合力较弱;另一方面,可能是由于 SW 是半抗原,直接吸附后其抗原

决定族不能充分暴露,影响了与相应抗体的结合。比较还发现,以 SW 直接作为包被抗原测定阴性对照时的 OD₄₅₀ 值较高,可能也与 SW 的吸附性弱、易于脱落等有关。而以 SW-OVA 作为包被抗原则避免了上述不足,提高了测定的稳定性和敏感性。

ELISA 法测定抗体的准确性,取决于包被抗原与抗体所针对抗原的交叉性。BSA 和 OVA 都是制备完全抗原时的常用载体蛋白,两者之间抗原交叉性低,以 OVA 为载体的人工抗原常被用作包被抗原检测 BSA 载体抗原的抗体^[12-16]。本研究中选用 SW-OVA 作为包被抗原,避免了测定中可能出现的交叉反应,试验过程中曾用 OVA 作为包被抗原与封闭试验进行了比较(资料未显示),证明所建立的方法具有较高的准确性和特异性。

总之,本试验通过对 SW-BSA 免疫小鼠血清的测定,建立了具有较高敏感性、特异性和稳定性的抗 SW 抗体间接 ELISA 测定方法,其最佳条件是:以 1.0 μg/mL SW-OVA 作为包被抗原,于 4 ℃包被过夜或 37 ℃包被 2 h,选用 15 g/L 的明胶为封闭剂,酶标抗体的工作浓度为 1 : 1 500。该方法的建立,为进一步研究和分析 SW 人工抗原的抗原性及其免疫效果奠定了基础。

[参考文献]

[1] 王建华,张树方. 动物中毒病及毒理学 [M]. 2 版. 台湾:台湾中草药杂志出版社,2002.
Wang J H, Zhang S F. Toxicopathy and toxicology in animal [M]. 2nd Edition. Taiwan: Taiwan Chinese Herbal Medicine Journal Publishing House,2002. (in Chinese)

[2] Martyn A, Tyler J, Offord C, et al. Swainsona sejuncta: a species of ornamental promise or a potential weed? [J]. Australian Journal of Experimental Agriculture,2003,43:1369-1381.

[3] Isis M H, Jose L G, Mitsue H, et al. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of ipomoea carnea in rats [J]. Experimental and Toxicologic Pathology,2007,58:439-446.

[4] Astorga J B, Pfister J A, Stegelmeier B L, et al. Maternal ingestion of locoweed. II. The ability of intoxicated ewes to discriminate their own lamb [J]. Small Ruminant Research,2006,

65;64-69.

[5] Pfister J A, Astorga J B, Panter K E, et al. Maternal ingestion of locoweed. I. Effects on ewe-lamb bonding and behaviour [J]. Small Ruminant Research, 2006, 65: 51-63.

[6] Pfister J A, Davidson T W, Panter K E, et al. Maternal ingestion of locoweed. III. Effects on lamb behaviour at birth [J]. Small Ruminant Research, 2006, 65: 70-78.

[7] Sun J Y, Zhu M Z, Wang S W, et al. Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine [J]. Phytomedicine, 2007, 14: 353-359.

[8] Oladipo A O, Paulette M F H, Ibrahim L, et al. Enhanced proliferation of functionally competent bone marrow cells in different strains of mice treated with swainsonine [J]. International Immunopharmacology, 2003, 3: 445-455.

[9] Masahiro M, Junichi T, Michiko N F, et al. Suppressive effects of swainsonine and N-Butyldeoxynojirimycin on human bone marrow neutrophil maturation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 269: 219-225.

[10] 童德文, 陈德坤, 曹光荣. 苦马豆素-BSA 对家兔的免疫原性研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(5): 11-14. Tang D W, Chen D K, Cao G R. Study on immuneogenicity of swainsonine-BSA [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2001, 29(5): 11-14. (in Chinese)

[11] Tong D W, Mu P H, Dong Q, et al. Immunological evaluation of SW-HSA conjugate on goats [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 58: 61-67.

[12] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989.

Liu Y B, Gou S J. Immunological experiment technology in animal [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Publishing House, 1989. (in Chinese)

[13] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1998.

Shen G X, Zhou R L. The modern technology of immunological experiment [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Publishing House, 1998. (in Chinese)

[14] 李方实, 孙 峰, 刘贤进, 等. 抗异丙隆多克隆抗体的研制 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(2): 298-303.

Li F S, Sun F, Liu X J, et al. Development of anti-isoproturon polyclonal antibody [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(2): 298-303. (in Chinese)

[15] 曾文渊, 张洪友, 夏 成, 等. 乳牛孕酮人工抗原的制备与鉴定 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(12): 1005-1008.

Zeng W Y, Zhang H Y, Xia C, et al. Preparation and identification of progesterone antigen for dairy cow [J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(12): 1005-1008. (in Chinese)

[16] 吕 琦, 王泽华, 邓双胜, 等. 磺胺甲基嘧啶和磺胺二甲基嘧啶单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(6): 638-645.

Lv Q, Wang Z H, Deng S S, Ma L, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against sulfonamides, sulfamerazine and sulfamethazine [J]. Journal of Yunnan University: Natural Science Edition, 2007, 29(6): 638-645. (in Chinese)

(上接第 51 页)

[6] 李 艳, 仇华吉, 王秀荣, 等. 鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1907-1914.

Li Y, Qiu H J, Wang X R, et al. A Reverse transcription-multiplex nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine viruses of classical swine fever virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(9): 1907-1914. (in Chinese)

[7] Barlic-Maganja D, Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridization assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses [J]. Journal of Virology Methods, 2001, 95(1-2): 101-110.

[8] 周绪斌, 上新平, 宣 华, 等. 鉴别牛病毒性腹泻粘膜病毒和猪瘟病毒的复合 PCR 方法及其应用 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(6): 173-179.

Zhou X B, Shang X P, Xuan H, et al. Differentiation of bovine viral diarrhea virus from hog cholera virus by multiplex polymerase chain reaction [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2002, 22(6): 173-179. (in Chinese)

[9] Risatti G, Holinka L, Lu Z, et al. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43: 468-471.

[10] Aguero M, Fernandez J, Romero L J, et al. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples [J]. Veterinary Research, 2004, 35: 551-563.

[11] Dewul J, Koenen F, Mintiens K, et al. Analytical diagnostic performance of several classical swine fever laboratory techniques on live animals for detection of infection [J]. Journal of Virology Methods, 2004, 119: 137-143.

[12] 李红卫, 涂长春, 金扩世, 等. 猪瘟病毒兔化弱毒 5'端调控序列及 P23 基因的扩增与克隆 [J]. 中国兽医学报, 1995, 15(4): 320-323.

Li H W, Tu C C, Jin K S, et al. Amplification and cloning of the 5' regulatory sequence and P23 gene of hog cholera virus C strain [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1995, 15(4): 320-323. (in Chinese)