

徐悦, 常晨, 侯继波, 等. PCV2 病毒生物矿化条件的优化[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 159-165.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.026

PCV2 病毒生物矿化条件的优化

徐悦^{1,2}, 常晨^{1,2}, 侯继波^{1,2}, 刘娅梅^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

摘要: 以矿化效率为评价标准, 对猪圆环病毒 2 型(PCV2)生物矿化的反应温度、反应时间及 Ca/P 比、抗原初始 pH、添加剂用量等条件进行优化, 并通过小鼠实验检测矿化病毒的免疫原性。结果显示, 生物矿化最优处理条件为初始 pH 6.5, Ca/P 1.67, 4 °C 矿化 12 h, Mg^{2+}/Ca^{2+} 为 1.0。在该反应条件下, 病毒粒子能够形成球形结构的钙磷 PCV2 粒子, 粒径为 200~500 nm。不同批次 PCV2 抗原矿化率皆在 90% 以上, 且该方法可去除大量杂蛋白。小鼠免疫矿化 PCV2 病毒颗粒后 14~28 d, 抗体水平与商品苗对照组、未矿化 PCV2 病毒组基本相同, 28 d 后对照组抗体水平下降明显, 而 PCV2 矿化颗粒组的抗体基本维持在原水平, 表明 PCV2 矿化颗粒具有缓释抗原的作用。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 生物矿化; 磷酸钙; 浓缩纯化; 抗体水平

中图分类号: S852.4⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0159-07

Optimization of biomineralization conditions of porcine circovirus type 2 (PCV2) viral particles

XU Yue^{1,2}, CHANG Chen^{1,2}, HOU Ji-bo^{1,2}, LIU Ya-mei^{1,2}

(1. National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Biomineralization is a rapid and effective method for the concentration and purification of porcine circovirus type 2 (PCV2). In this study, the conditions of PCV2 biomineralization were optimized, including reaction temperature and time, Ca/P ratio, initial pH of viral culture, and the amount of additives, to reach a high biomineralization rate. The viral culture was adjusted for an initial pH of 6.5, followed by the addition of calcium and phosphate ions (a Ca/P ratio of 1.67). Appropriate amount of Mg^{2+} was added for a final Mg^{2+}/Ca^{2+} of 1.0. The mixture was allowed to react at 4 °C for 12 h. Under this optimized condition, viral particles were wrapped by calcium phosphate, forming spherical nanoparticles (CaP-PCV2) in the size between 200 and 500 nm, as indicated by electron microscopic observation. Different batches of PCV2 viruses biomineralized under this condition and yielded biomineralization rates of more than 90%. Further animal experiments revealed that the PCV2-specific antibody titer in mice injected with biomineralized PCV2 particles was similar to those in untreated PCV2 and commercialized PCV2 vaccine group 14–28 d after immunization. More importantly, the

PCV2-specific antibody titer in biomineralized PCV2 group remained high until day 56, whereas the titers in both untreated PCV2 and commercialized PCV2 vaccine group started to decrease after day 28, indicating a longer duration of high antibodies of biomineralized PCV2.

Key words: porcine circovirus type 2; biomineralization; calcium phosphate; concentration and purification; antibody titer

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项项目[201303046]; 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(11)4037]

作者简介: 徐悦(1986-), 女, 江苏南京人, 硕士研究生, 研究方向为预防兽医。(Tel) 18101599119; (E-mail) xel-los05@163.com

通讯作者: 刘娅梅, (Tel) 18551809901; (E-mail) lym613@hotmail.com

猪圆环病毒 2 型病毒 (PCV2) 可引起多种猪疾病, 如断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS)、猪呼吸道疾病综合征 (PRDC)、猪皮炎肾病综合征 (PDNS)、猪急性肺水肿 (APE)、猪繁殖障碍症等^[1-4], 该病毒主要侵害猪的免疫系统, 导致机体抵抗力降低甚至免疫抑制, 从而引起其他继发疾病。猪圆环病毒病的发病率可达 50%, 因地区不同, 死亡率为 5%~70%^[5], 对中国及世界范围的养猪业造成了严重的危害。目前中国已有自主研发的猪圆环病毒灭活疫苗, 但此类疫苗在生产过程中面临着体外培养病毒增殖能力不强, 滴度不高的困难^[5], 因此开发高效快捷的抗原纯化浓缩处理工艺成为提高抗原含量, 增加免疫效果的有效手段。目前, 应用于兽用疫苗生产的主要浓缩纯化方法包括低、高速离心除杂, 超滤纯化等^[6-8]。但是这些方法效率偏低, 过程复杂或成本较高, 因此急需建立一种高效、经济、便捷的兽用疫苗抗原浓缩纯化方法。

生物矿化是自然界中普遍存在的现象^[9], 利用生物矿化可将生物体形成具有各种结构和功能的有机-无机复合材料^[10-11]。生物矿化现已成为制备具有复杂结构纳米复合材料的一种简单且有效的方法。一些可生物降解的高分子, 如蛋白质^[12]、多肽^[13]、胶原^[14]等, 被认为是进行生物矿化的首选基材。这些高分子材料中的官能团通常是矿化的成核点, 能促使矿物在材料表面沉积, 形成有机-无机复合物颗粒, 无机“壳”使生物材料具有新的特性, 如缓释作用, 对高温环境耐受等^[15]。生物矿化结果受到很多因素制约, 当条件改变时, 矿化效率与矿化产物形态等都会发生很大变化。为得到最优的生物矿化结果, 需要对矿化条件进行优化。本试验拟利用磷酸钙对 PCV2 病毒颗粒进行包裹, 通过设置不同 pH、温度、Ca/P 比, 对生物矿化条件进行优化, 提高矿化率, 优化磷酸钙颗粒形态, 从而达到浓缩纯化病毒的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

PCV2 抗原由本实验室保存并扩增; CaCl_2 、 Na_2HPO_4 等试剂均为分析纯, 购自翼飞雪生物公司, DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞公司, 荧光定量 PCR *Taq* 酶为 TaKaRa 公司的 SYBR Premix *Ex Taq*TM (Tli RNaseH Plus)。主要仪器: 普通 PCR

仪 (TaKaRa 公司产品); 荧光定量 PCR 仪 Light Cycler © 480 II (Roche 公司产品)。猪抗 PCV2 多克隆抗体购自美国 VRDM 公司; FITC 标记的葡萄球菌 A 蛋白购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 生物矿化条件优化

1.2.1 反应温度、反应时间 生物矿化过程参考 He 等^[16]的方法, 取 15 ml PCV2 病毒液, 加入 1 ml 0.100 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 分别置于 4 °C、25 °C、37 °C 下使用磁力搅拌器搅拌 1 h, 再逐滴加入 500 μl 0.125 mol/L Na_2HPO_4 溶液, 分别反应 3 h、6 h, 过夜 (12 h) 后分别取样, 检测矿化效率。

1.2.2 Ca/P 取 15 ml PCV2 病毒液, 加入 1 ml 0.100 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 使用磁力搅拌器在选定温度下搅拌 1 h, 再逐滴加入相应体积 0.125 mol/L Na_2HPO_4 溶液, 使 Ca/P 终浓度比分别为 1.00、1.30、1.50、1.67 和 1.80。反应结束后取样, 检测矿化效率。

1.2.3 初始 pH 在确定 Ca/P 后, 取 15 ml PCV2 病毒液, pH 分别设为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 进行矿化处理, 反应结束后取样进行矿化效率检测及电镜观察。

1.2.4 添加剂添加量 在上述条件优化的基础上, 在收取矿化样品前 30 min, 分别逐滴加入 0.100 mol/L Mg^{2+} 溶液, 使 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 比率分别为 0.5、1.0、1.5、2.0。反应结束后取样检测矿化率。

1.3 不同批次抗原检测优化后的矿化率

7 个不同批次的抗原扩繁方式一样, 但扩繁时初始病毒浓度不同, 保存时间不同, 扩繁规模不同, 最终得到的抗原病毒 DNA 含量不同。将 7 批抗原按照优化后的条件进行矿化处理, 检测其矿化率。

1.4 荧光定量 PCR 检测 PCV2 矿化率

1.4.1 标准品目的片段的获取 根据 GenBank 上公布的 PCV2 cap 蛋白保守序列 (HM009332), 设计特异性引物 5'-CGGATCCATAACCCAGCCCTTCTCCTACC-3'; 5'-CCTTTACATCTGCTGCATCCGTTTCGAAC-3', 以 PCV2 DNA 为模板进行扩增, 将扩增产物连接 T 载体后转化至大肠杆菌 DH5 α , 挑取单克隆过夜培养并提取质粒测序。测序结果正确后使用内切酶酶切质粒, 通过琼脂糖凝胶电泳分离后回收目的片段制成标准品 DNA。

1.4.2 荧光定量 PCR 标准曲线建立 根据 HM009332 序列设计引物, 5'-ATAACCCAGCCCT-

TCTCCTACC-3'; 5'-CCTTTACATCTGGTGCATCCGG-3'。根据重组质粒拷贝数进行 10 倍梯度倍比稀释,选取合适浓度范围($1 \mu\text{l } 10^3 \sim 10^8$ 拷贝数),每个浓度梯度设立 3 个重复样本进行 Real time-PCR。荧光定量 PCR 扩增体系为 $20.0 \mu\text{l}$,其中 SYBR $10.0 \mu\text{l}$,引物 1 (10 pmol/ml) $0.4 \mu\text{l}$,引物 2 (10 pmol/ml) $0.4 \mu\text{l}$, ddH_2O $7.2 \mu\text{l}$,模板 $2.0 \mu\text{l}$ 。反应条件为 95°C 30 s ,1 个循环; 95°C 5 s , 60°C 20 s ,40 个循环。反应结束后,分析溶解曲线,根据各浓度组对应的重复样本 C_t 值,绘制标准曲线,并计算扩增效率。

1.4.3 矿化效率检测 取 1 ml 矿化后样品, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,将上清液和沉淀分离。使用氯仿-Tris 酚法分别抽提上清液和病毒原液 DNA,以抽取的 DNA 为模板,荧光定量 PCR 检测相应的 DNA 拷贝数,根据以下公式得到矿化效率^[16]。

矿化效率 = (原液中 DNA 的总拷贝数 - 上清液中 DNA 的拷贝数) / 原液中 DNA 的总拷贝数 $\times 100\%$

1.5 抗原纯化效果检测

将 1 ml 矿化后样品以 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,分离上清和沉淀。沉淀使用 1 ml 溶解液 (100 mmol/L EDTA , $0.85\% \text{ NaCl}$) 溶解。取 PCV2 病毒液、矿化后沉淀溶解液、矿化后上清液进行 SDS-PAGE 检测,浓缩胶浓度 5% ,分离胶浓度为 12% 。

1.6 矿化 PCV2 颗粒对细胞的感染

选取 1 ml 含 $10^{6.5} \text{ TCID}_{50}$ 的 PCV2 抗原按优化条件进行矿化处理,所得病毒颗粒离心后弃上清液, PBS 清洗 2 遍,使用 PBS 重悬沉淀至矿化前体积。96 孔板上培养单层 PK-15 细胞 24 h 后,分别加入 $200 \mu\text{l}$ 未经矿化处理的 PCV2 病毒液及相同体积的 PCV2 矿化颗粒重悬液。将细胞板置于 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中孵育 48 h ,采用间接免疫荧光检测法检测细胞感染情况。

1.7 小鼠实验检测矿化 PCV2 颗粒免疫原性

选取 1 ml 含 $10^{6.5} \text{ TCID}_{50}$ 的 PCV2 抗原按优化条件进行矿化处理,所得病毒颗粒离心后弃上清液, PBS 清洗 2 遍,使用 PBS 重悬沉淀至矿化前体积,并使用 β -丙内酯灭活处理 24 h ,与等体积法国 SP-PEIC 公司的 206 佐剂乳化,制备疫苗。共设 4 个处理,分别为未经矿化处理的 PCV2 抗原、PCV2 矿化抗原、空白对照 (PBS)、商品疫苗对照 (梅里亚

PCV2 灭活疫苗)。选取 BALB/c $5 \sim 6$ 周龄雌性小鼠,进行颈部、背部多点皮下注射,每只免疫 0.2 ml ,初免两周后,等剂量加强免疫 1 次,免疫后每周采血分离血清,使用武汉科前生物科技有限公司的 PCV2 抗体 ELISA 试剂盒检测其抗体效价。

2 结果

2.1 温度与矿化时间对 PCV2 生物矿化的影响

由图 1 可知,温度对抗原的矿化率有一定影响,相同矿化时间下,温度越高矿化效率越高。经过 3 h 的矿化后, 4°C 下抗原的矿化效率只有 20% , 37°C 下矿化率达到 80% ,而 4°C 下 12 h 后矿化率才达到 70% 以上。虽然 25°C 和 37°C 下相同时间内矿化效率较 4°C 更高,但考虑到抗原反应喜低温的特殊性,且 4°C 的反应温度所达到的矿化效率具有提高的空间,所以选择生物矿化温度为 4°C ,矿化时间为 12 h 。

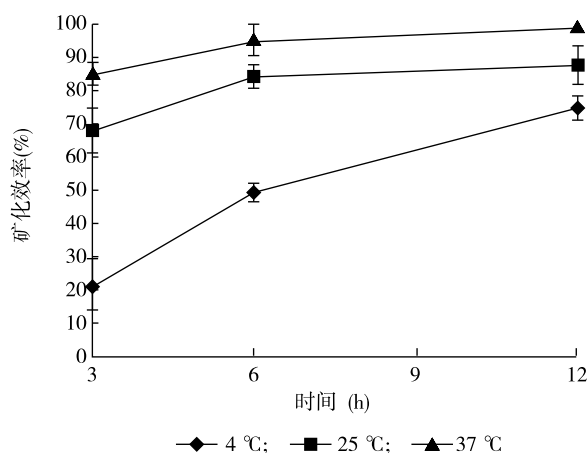


图 1 不同温度下 PCV2 生物矿化效率

Fig.1 Efficiencies of PCV2 biomining at different temperatures

2.2 Ca/P 比率对 PCV2 病毒生物矿化的影响

初始 Ca/P 比率不同,所产生的钙结晶组分也有所变化,通过改变初始反应的 Ca/P 比率可得到不同钙产物^[17]。当 Ca/P 比率为 $1.33 \sim 1.50$ 时,倾向于生成不定形钙^[18];Ca/P 比率为 1.67 时,则更易于生成羟磷灰石^[17],因此需探索在不同种类钙产物中 PCV2 矿化率的变化。通过图 2 得知, Ca/P 为 1.00 时,矿化效率最低,提高钙离子的初始含量,能够有效提高矿化效率,当 Ca/P 达到 1.67 后,矿化

效率稳定在 90%。推测初始 Ca/P 小于 1.67 生成的钙磷化合物不稳定,易于结团,矿化效率低。从矿化效率和成本角度考虑,选择 Ca/P 为 1.67。

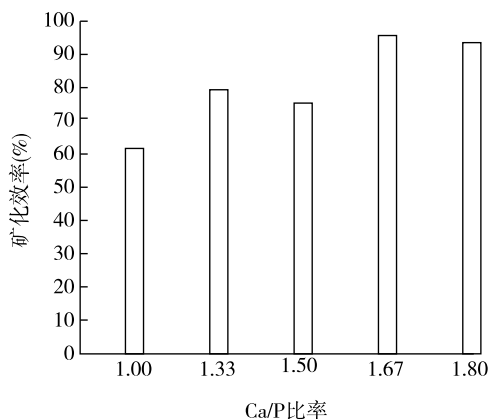


图 2 不同的 Ca/P 下 PCV2 病毒的生物矿化效率

Fig.2 Efficiencies of PCV2 biomining affected by different Ca/P ratios

2.3 初始溶液 pH 值对 PCV2 病毒生物矿化的影响

从图 3 可知,在初始溶液呈酸性的条件下,PCV2 病毒矿化效率较高,随着初始 pH 的升高,矿化效率开始下降,当 pH 为 9.0 时,矿化率只有 20%。不同的 pH 值会对病毒表面电性及病毒蛋白电性产生影响^[19],从而使得磷酸钙-病毒粒子复合产物形

态发生变化。从电镜图片中可以看到,酸性条件(图 4a) pH=4.5 下,复合颗粒为棒状条形颗粒,长度 10~20 μm ,形态明显不符合疫苗生产需要;当初始 pH 为 6.5(图 4b)时,钙磷-PCV2 粒子呈光滑球形,直径为 200~500 nm;当初始环境为碱性 pH=8.5(图 4c)时,复合物呈现不规则的晶体形态,此时 PCV2 吸附在不规则的钙磷化合物表面,直径达到 600~800 nm。初始 pH=6.5 时复合颗粒所形成的光滑球形结构较为理想,符合 PCV2 的保存需要,此时生物矿化率达 85%以上。

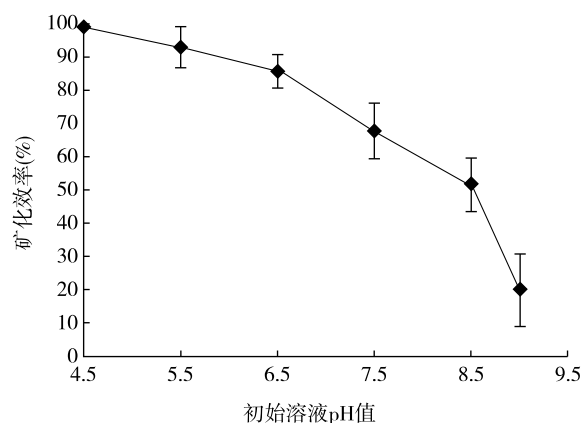
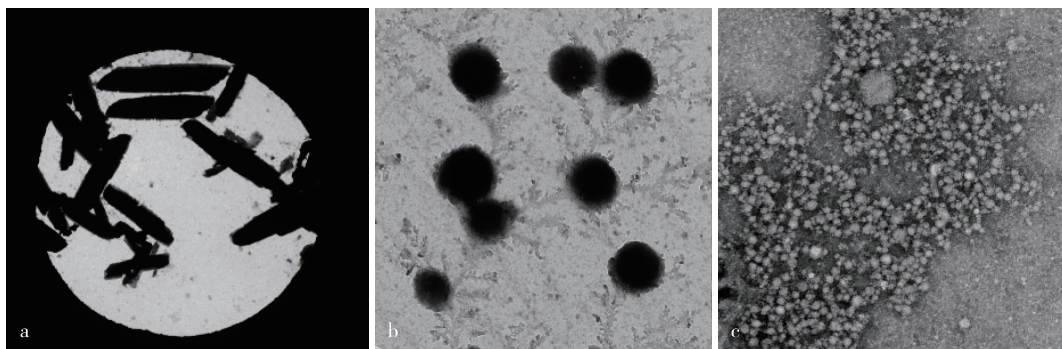


图 3 初始溶液不同 pH 下 PCV2 病毒的生物矿化效率

Fig.3 Efficiencies of PCV2 biomining at different initial pH values of viral culture



a: pH 4.5; b: pH 6.5; c: pH 8.5。

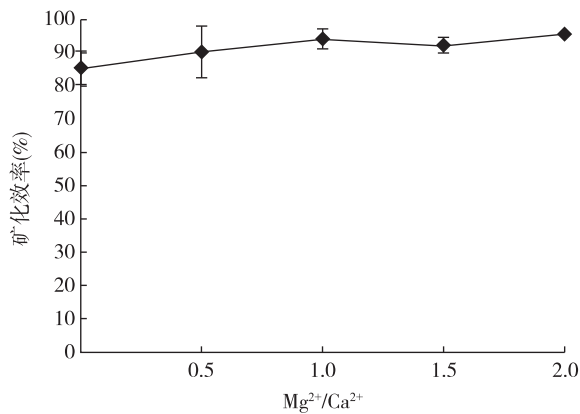
图 4 初始溶液不同 pH 下磷酸钙-PCV2 复合粒子透射电镜形态

Fig.4 Transmission electron microscopic images of CaP-PCV2 particles at different initial pH values of viral culture

2.4 添加剂对 PCV2 病毒生物矿化的影响

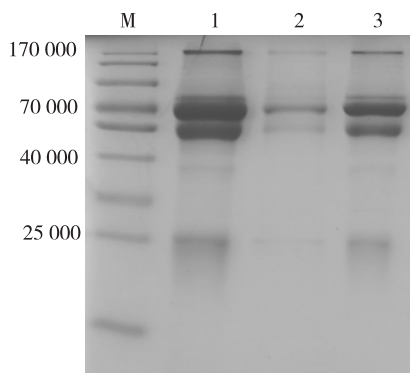
在生物矿化过程中加入可溶性物质,如镁离子、氨基酸、胶原蛋白等可抑制晶体生长^[20];添加柠檬酸能够粗化生物矿化颗粒^[21]。添加 Mg^{2+} 可调控晶

型,抑制晶体生长过程,稳定无定形相^[22]。由图 5 可见, $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+} \geq 1.0$, 矿化率提升了 8%~10%, 因此可通过添加镁离子进一步提高矿化率,兼顾到成本,可选择 $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 为 1.0。

图5 不同 Mg^{2+}/Ca^{2+} 比率下 PCV2 病毒的生物矿化效率Fig.5 Efficiencies of PCV2 biomining affected by different Mg^{2+}/Ca^{2+} ratios

2.5 PCV2 病毒抗原纯化效果

图6显示,杂蛋白主要存在于上清液中,沉淀里杂蛋白含量很少。这说明矿化过程中,只有少量蛋白被磷酸盐包裹,大部分蛋白不参与矿化反应,也说明本方法具有较好的纯化作用。



M: Marker; 1: PCV2 病毒液; 2: 生物矿化沉淀; 3: 生物矿化上清液。

图6 SDS-PAGE 检测 PCV2 病毒生物矿化处理的纯化效果

Fig.6 SDS-PAGE of the purification of PCV2 after biomining

2.6 PCV2 病毒抗原矿化率差异

将7种不同批次的PCV2抗原按优化后条件进行生物矿化处理,抗原pH 6.5,按Ca/P为1.67加入 Ca^{2+} ,矿化结束30 min前逐滴加入 Mg^{2+} (Mg^{2+}/Ca^{2+} 比率为1.0),4℃矿化12 h。取样检测后发现,7个批次的PCV2矿化率均在90.00%以上,有5个

样品矿化率甚至达到95.00%(表1)。矿化率与抗原中DNA拷贝数大小无直接联系(表1)。

表1 不同批次PCV2抗原的生物矿化效率

Table 1 Biomining efficiencies of different batches of PCV2 virus

| 批次 | DNA 拷贝数 | | 矿化率 (%) |
|----|--------------|-------------|---------|
| | PCV2 原液 | 矿化上清液 | |
| 1 | $10^{8.76}$ | $10^{7.41}$ | 95.53 |
| 2 | $10^{10.23}$ | $10^{8.82}$ | 96.11 |
| 3 | $10^{9.81}$ | $10^{8.21}$ | 97.49 |
| 4 | $10^{9.57}$ | $10^{8.51}$ | 91.30 |
| 5 | $10^{8.47}$ | $10^{7.23}$ | 94.24 |
| 6 | $10^{10.79}$ | $10^{8.79}$ | 99.00 |
| 7 | $10^{10.64}$ | $10^{9.10}$ | 97.11 |

2.7 PCV2 矿化颗粒的细胞感染性

经IFA方法检测PCV2矿化颗粒感染PK-15细胞的情况,如图7所示,PCV2矿化颗粒与未矿化对照组对PK-15细胞均具有较高的感染性,经测定毒价达到1 ml $10^{6.0} TCID_{50}$ 。

2.8 PCV2 矿化颗粒对小鼠的免疫原性

图8显示,免疫后14~28 d,PCV2矿化颗粒免疫组抗体水平与未经矿化处理的PCV2以及商品苗对照组基本相同。28 d后,未经矿化处理的PCV2抗原及对照组抗体水平开始明显下降,而PCV2矿化颗粒组和商品苗对照组的抗体基本维持在原水平。表明PCV2矿化颗粒具有较长抗体持续期,推测经钙磷包裹处理后的PCV2矿化颗粒可能具有缓释抗原的作用,从而延长了抗原作用时间。

3 讨论

近年来,使用生物矿化方法浓缩处理病毒、蛋白质的报道越来越多。Koppad等使用该方法对新城疫尿囊液进行处理,得到光滑的球体钙磷颗粒,直径大小为 $(557.44 \pm 18.62) \text{ nm}$ ($n=40$),蛋白包装量达到 $(5401.53 \pm 730.10) \mu\text{g/ml}$,免疫鸡胚后抗体水平优于未经矿化处理的抗原,且具有明显的持续期^[23]。Wang等^[24]矿化处理乙脑(JEV)病毒,得到直径为40~50 nm的颗粒,且该钙磷-JEV复合病毒颗粒具有抗高温特性,放置于37℃及42℃7 d后病毒滴度损失明显少于没有处理过的JEV。病毒生

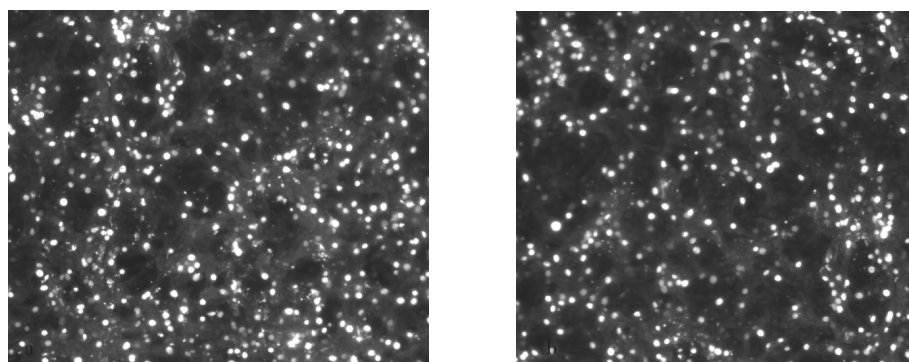


图 7 间接荧光免疫法检测 PCV2 矿化颗粒对 PK-15 细胞的感染性

Fig.7 The cellular infectivities of untreated PCV2(a) and biom mineralized PCV2(b) detected by indirect immunofluorescence (IFA)

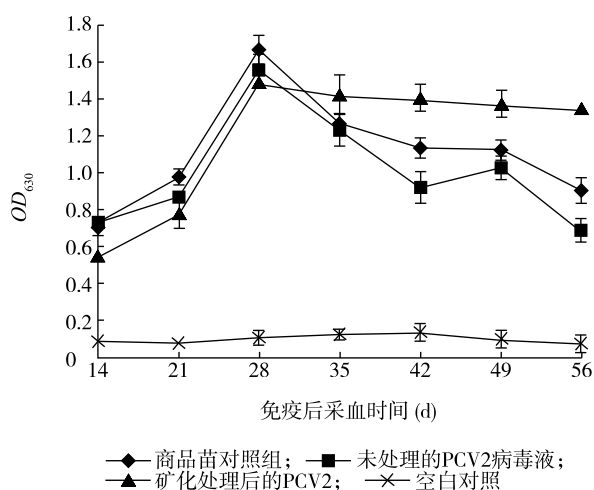


图 8 ELISA 检测小鼠血清抗体水平

Fig.8 PCV2-specific antibody titers in mice detected by ELISA

物矿化不仅操作简便,成本低廉,浓缩效果好,同时具有免疫增强剂和佐剂的功能。但目前该方法尚处于实验室研究阶段,未见将其运用至疫苗生产的工序中。本研究通过对病毒生物矿化反应温度、反应时间、初始 pH、Ca/P 比率等条件下产物的矿化率进行检测,并观察酸性、中性及碱性条件下矿化产物形态,得到适宜于生产的最优条件。在该条件下制得的 PCV2 矿化颗粒能够正常感染细胞,且免疫小鼠血清的抗体水平下降缓慢,具有良好的缓释作用。目前该方法距离实际生产应用还有一段距离,需继续研究:①通过添加表面活性剂等方法增加颗粒的亲水性,减小钙磷-PCV2 复合粒子的直径,令其更易被机体吸收;②解决纳米颗粒团聚问题,提高制苗的稳定性;③检测该矿化颗粒对细胞的毒性。

参考文献:

- [1] GRAU-ROMA L, CRISCI E, SIBILA M, et al. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 128 (1/2): 23-35.
- [2] 郭广富,曹军平,朱爱萍,等.猪圆环病毒 2 型泰州株的分离鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(4):294-295.
- [3] 曹东阳,王小敏,钱爱东,等.江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型(PCV2)分子流行病学调查[J].江苏农业学报,2016,32(2):390-398.
- [4] 孙华伟,张敬峰,何孔旺,等.2014 年江苏省部分中小规模猪场 PCV-2 的流行病学调查[J].山东农业科学,2015,47(4):117-119.
- [5] 郎洪武,陈晓春,吴华伟,等.猪圆环病毒病及其生物制品学的研究进展[J].中国兽医科学,2012,42(5):545-550.
- [6] 张许科,孙进忠,白朝勇.猪圆环病毒 2 型与猪细小病毒二联灭活疫苗及其制备方法:CN 102961742A[P]2013-03-13.
- [7] 吕茂杰,梁武,杨保收,等.一种二联灭活疫苗制备方法:CN 104474542A[P]2015-04-01.
- [8] 李倬,吴全忠,米娜,等.一种猪圆环病毒 2 型纯化方法:CN 201410145472.6[P]2014-07-23.
- [9] WEINER S, DOVE P M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect[J]. Rev Mineral Geochem, 2003, 54(1):1-29.
- [10] 杨宇玲,王广川,唐睿康.基于生物矿化的生物壳工程[J].中国科学:化学,2014,44(4):601-610.
- [11] 李坚,邱坚.生物矿化原理与木材纳米结构复合材料[J].林业科学,2005,41(1):189-193.
- [12] SUBBURAMAN K, PERNODET N, KWAK S Y, et al. Templated biomineralization on self-assembled protein fibers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(40):14672-14677.

- [13] DURUCAN C, BROWN P W. Biodegradable hydroxyapatite-polymer composites [J]. *Advanced Engineering Materials*, 2001, 3(4):227-231.
- [14] BARROUG A, KUHN L T, GERSTENFELD L C, et al. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: *in vitro* controlled adsorption and release [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(4):703-708.
- [15] AMRA T, KESTER M, ADAIR J H. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 2012, 4(1):96-112.
- [16] HE Q, MITCHELL A R, JOHNSON S L, et al. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant [J]. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, 7(6):899-903.
- [17] KUMTA P N, SFEIR C, LEE D H, et al. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications; novel synthesis and characterization [J]. *Acta Biomaterialia*, 2005, 1(1):65-83.
- [18] LI Y, FENG W, YANG J, et al. *In vitro* synthesis and characterization of amorphous calcium phosphates with various Ca/P atomic ratios [J]. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2007, 18(12):2303-2308.
- [19] 王晓雨. 病毒壳工程的研究及其应用 [D]. 杭州:浙江大学, 2011.
- [20] 崔福斋. 生物矿化 [M]. 北京:清华大学出版社, 2012:5.
- [21] 许燕波, 钱春香, 陆兆文. 柠檬酸粗化铜离子矿化产物颗粒粒径的研究 [J]. *材料导报*, 2013, 27(2):92-95.
- [22] COSTA D O, ALLO B A, ROBERT K, et al. Control of surface topography in biomimetic calcium phosphate coatings [J]. *Langmuir the Acs Journal of Surfaces & Colloids*, 2012, 28(8):3871-3880.
- [23] KOPPAD S, RAJ G D, GOPINATH V P, et al. Calcium phosphate coupled Newcastle disease vaccine elicits humoral and cell mediated immune responses in chickens [J]. *Research in Veterinary Science*, 2011, 91(3):384-390.
- [24] WANG G, LI X, MO L, et al. Eggshell-inspired biomineralization generates vaccines that do not require refrigeration [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(42):10576-10579.

(责任编辑:孙 宁)