

古努尔·吐尔逊, 王登峰, 杨学云, 等. 梅迪-维斯纳病毒 gag 蛋白的原核表达及其交叉反应性[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 978-983.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.024

梅迪-维斯纳病毒 gag 蛋白的原核表达及其交叉反应性

古努尔·吐尔逊, 王登峰, 杨学云, 魏玉荣, 李建军, 孟肖潇, 洪都孜·波拉提, 吴建勇

(新疆畜牧科学院兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830013)

摘要: 为鉴定适用于中国小反刍动物慢病毒 (Small ruminants lentivirus viruses, SRLVs) 血清学诊断的通用蛋白标记物, 本研究以梅迪-维斯纳病毒 (Maedi-Visna virus, MVV) 四川株为模板扩增获得 gag 基因序列, 使用生物信息学方法分析其与中国山羊关节炎-脑炎病毒 (Caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) 分离株 gag 蛋白氨基酸序列和抗原表位相似性, 构建 gag 基因重组表达载体并转入 BL21 (DE3) 宿主菌进行诱导表达, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western blotting 确定其大小、分布和反应原性。结果显示, MVV gag 蛋白氨基酸序列与中国 CAEV 分离株的相似性为 74.7%~74.9%, 它的 11 个抗原表位与 CAEV gag 蛋白的 12 个抗原表位存在较高的序列相似性, 推测其可作为中国 SRLVs 血清学诊断的通用蛋白质标记物; SDS-PAGE 检测结果显示, 重组 gag 蛋白大小约为 55 000, 主要以包涵体形式存在, Western blotting 显示该蛋白可与 MVV 和 CAEV 感染动物血清发生免疫反应, 证实了蛋白序列分析结果。该研究结果可为研制中国 SRLVs 通用血清学检测技术方法奠定基础。

关键词: 梅迪-维斯纳病毒; gag 蛋白; 原核表达; 交叉反应原性; 抗原表位

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)04-0978-06

Prokaryotic expression and cross reactogenicity of maedi-visna virus gag protein

GUNUER Tuerxun, WANG Deng-feng, YANG Xue-yun, WEI Yu-rong, LI Jian-jun, MENG Xiao-xiao, HONGDUZI Bolati, WU Jian-yong

(Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830013, China)

Abstract: To identify the universal protein biomarker for serological diagnosis of small ruminant lentivirus (SRLVs) in China, the gag gene was amplified from maedi-visna virus (MVV) Sichuan strain, and the similarity of its amino acid sequence and epitopes between MVV Sichuan strain and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strain in China was analyzed by bioinformatics method. The recombinant expression vector of gag gene was then constructed and transferred into *Escherichia Coli* BL21 (DE3), SDS-PAGE and western blotting were used to determine the size, distribution and reactogenicity of recombinant gag protein. The results showed that the amino acid sequence of MVV gag protein was 74.7%~74.9%

similar to that of CAEV strain in China, and its 11 epitopes were highly similar to 12 epitopes of CAEV gag protein, suggesting that MVV gag protein could be used as the universal protein biomarker for serodiagnosis of SRLVs in China. The results of SDS-PAGE detection indicated that the recombinant gag protein was about 55 000 in size,

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家重点研发项目 (2016YF0500908)

作者简介: 古努尔·吐尔逊 (1971-), 女, 维吾尔族, 新疆伊犁人, 学士, 高级实验师, 主要从事动物传染病研究。(E-mail) azn120219@126.com

通讯作者: 吴建勇, (E-mail) chienyung@foxmail.com

mainly in the form of inclusion body. Western blotting detection results showed that the protein could react with the sera of MVV and CAEV infected animals, which verified the results of protein sequence analysis. These results lay a foundation for the development of a universal serological detection method for SRLVs in China.

Key words: maedi-visna virus; gag protein; prokaryotic expression; cross reactivity; epitope

梅迪-维斯纳病毒 (Maedi-Visna virus, MVV) 感染也称为梅迪-维斯纳病或绵羊进行性肺炎 (Ovine progressive pneumonia, OPP), 是绵羊的一种以进行性消瘦和呼吸困难为临床特征的慢性传染病^[1]。该病毒由 Sigurdsson 等^[2]在 1960 年首次分离, 是世界上首个得到临床分离的慢病毒属成员, 与山羊关节炎-脑炎病毒 (Caprine arthritis encephalitis virus, CAEV) 一起统称为小反刍动物慢病毒 (Small ruminants lentivirus viruses, SRLVs)^[3]。MVV 主要通过母羊-羔羊垂直传播和接触性传播 2 种途径感染绵羊, 多数感染羊表现出终身带毒, 但无明显临床症状, 导致生产者和兽医极易忽视或误诊梅迪-维斯纳病, 使其发生流行^[4-5]。

目前, MVV 呈世界性分布, 亚洲、欧洲、非洲和美洲大陆均被报道存在该病, 但不同国家的检出率有所不同^[2]。西班牙调查结果显示, 绵羊个体阳性率高达 24.8%~52.8%^[6-7]; 土耳其绵羊 MVV 抗体检出率为 15.3%~23.5% 不等^[8-10]。中国在 20 世纪 80 年代首次分离到该病毒, 并发现该病毒在新疆纯种边区莱斯特羊中的检出率高达 44%^[11-12]; 最近中国采用进口竞争酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒开展了 11 个省份 MVV 血清学调查, 结果显示 4 个省份检出 MVV 抗体阳性羊, 检出率为 0.81%~1.65%^[13], 这说明部分地区仍然存在 MVV 感染和流行。因此, 有必要制备诊断抗原, 建立相关的检测技术方法, 为该病的防控提供技术支撑。

从基因组结构分析可知, MVV 基因组 RNA 全长为 9~10 kb, 由长末端重复序列 (LTR)、结构蛋白编码基因 (*pol*、*gag* 和 *env*) 和调控基因 (*tat*、*rev* 和 *vif*) 等组成^[14], 抗原基因主要分布于 *gag* 和 *env* 基因。其中, *gag* 基因为基因型特异性抗原基因, 基于该基因多态性, 可以将 SRLVs 分为 A、B、C、D 和 E 等 5 个基因型, 不同基因型毒株 gag 蛋白氨基酸序列存在较高的相似性, 有望成为检测或诊断的候选抗原^[15-16]。然而, 中国目前已公开的 MVV 相关基因序列信息极少, 在分析不同基因型毒株 gag 蛋白氨基酸序列和抗原特征等方面存在不足。因此, 需

要从野毒株中扩增 *gag* 基因以了解中国 MVV 毒株 *gag* 基因和蛋白质氨基酸序列的分子特征。

当前, 中国虽然有 SRLVs 检疫技术规范, 但无国产商品化检测试剂盒的生产和供应。过去常采用的琼脂糖扩散试验主要通过病毒的连续批量培养、浓缩后制备成诊断抗原^[17], 因抗原制备过程较为复杂、生产成本较高等原因, 限制了抗原的批量生产与应用。为此, 本研究从实验室保存的 MVV 野毒株中克隆 *gag* 基因, 在生物信息学分析 MVV 与 CAEV gag 蛋白氨基酸序列和抗原表位相似性的基础上, 通过 gag 蛋白原核表达和 Western blotting 验证分析其反应原性, 以期研制 MVV 和 CAEV 通用检测技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌 (毒) 株与载体 梅迪-维斯纳病毒四川株、pET-22b 质粒由本实验室保存, DH5 α 、BL21 (DE3) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.1.2 主要试剂 D15000 DNA marker、DNA 纯化回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒等购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 羧苄青霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、DNA Marker、LB 培养基购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 蛋白质 Marker、*Xho* I、*Nco* I 购自 Thermo Scientific 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗绵羊 IgG 购自 Earthox 公司, 兔抗山羊 IgG 抗体购自 Sigma 公司, DNA 连接酶、GoTaq Green mastermix 购自 Promega 公司, QIAamp DNA mini Kit 购自 QIAGEN 公司。绵羊抗 MVV 血清为绵羊自然感染 MVV 后的阳性血清, 山羊抗 CAEV 血清为山羊感染 CAEV gs-35V 株 (基因组序列 GenBank 登录号为 KT749881) 后的阳性血清, 均为本实验室保存。

1.1.3 引物设计与合成 以 GenBank 上登录的 MVV 基因组 *gag* 基因序列 (登录号: NC001452.1) 为参考序列, 利用 Oligo 7.0 软件设计上游引物 *gag*-F: 5'-CATGCCATGGCGAAGCAAGGCTCAAAGGAGA-3'

(斜体为 *Nco* I 酶切位点)、下游引物 *gag*-R:5'-AA-*ACTCGAGCAACATAGGGGGCGCGGACGGCA*-3' (斜体为 *Xho* I 酶切位点),并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

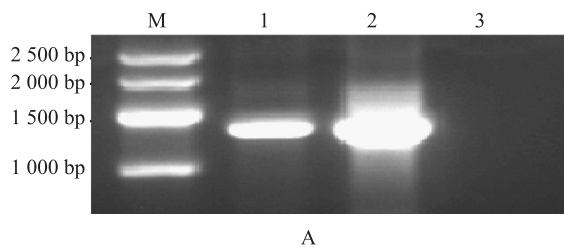
1.2 试验方法

1.2.1 病毒基因组 DNA 的提取 采用 QIAamp DNA mini Kit 提取 MVV 前病毒基因组 DNA,按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 MVV *gag* 基因的 PCR 扩增 采用 50 μ l 反应体系:GoTaq Green mastermix 25 μ l,上、下游引物(20 mmol/L)各 1 μ l,基因组 DNA 2 μ l,水 21 μ l。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,59.5 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 85 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应结束后,取 5 μ l PCR 反应产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,确定其大小后进行胶回收。

1.2.3 重组表达载体的构建 将含 pET-22b 质粒的菌种接种于 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 16 h,采用质粒快速提取试剂盒提取质粒。用 *Nco* I 和 *Xho* I 分别双酶切 *gag*、pET-22b 并回收目的片段,将 *gag* 连接至 pET-22 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,提取重组质粒,采用双酶切方法鉴定重组质粒,阳性质粒 pET-22b-*gag* 交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,验证其阅读框是否正确。

1.2.4 MVV 和 CAEV *gag* 蛋白的生物信息学分析 采用 Lasergene 分析中国 MVV 和 CAEV *gag* 蛋白氨基酸序列相似性,采用 Predicted Antigenic Peptides^[18] 等在线工具分别预测 *gag* 蛋白抗原决定簇。



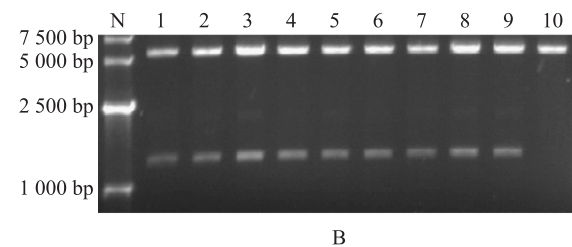
A

1.2.5 重组 *gag* 蛋白的诱导表达及 Western blotting 分析 挑选阳性 pET-22b-*gag* 质粒,转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,接种到含羧苄青霉素的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表达产物。同时,将诱导表达温度降至 28 $^{\circ}$ C 过夜(16~18 h)诱导表达,分别收集诱导表达培养基上清液、菌体超声波裂解物离心上清液和沉淀物,检测目的蛋白的表达形式(可溶表达或不可溶表达)。将表达产物转移至硝酸纤维素膜上进行 Western blotting 检测,一抗、二抗选择如下:(1)以绵羊抗 MVV 血清为一抗,HRP 标记的兔抗绵羊 IgG 抗体为二抗;(2)以山羊抗 CAEV 血清为一抗,HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体为二抗;均用 TMB 进行显色。

2 结果与分析

2.1 MVV *gag* 基因重组质粒的构建

以梅迪-维斯纳病毒前病毒基因组 DNA 为模板,PCR 扩增后得到的目的片段大小约 1.4 kb(图 1A)。将扩增的 *gag* 基因片段插入 pET-22b 质粒载体中,经过双酶切鉴定后可见 1.4 kb 和 6.0 kb 左右 2 个条带(图 1B)。经序列测定后确定插入片段大小为 1 338 bp,与美国 MVV 83/84 株序列(登录号:AY101611.1)的相似性为 94.92%。目前,该序列已提交至 GenBank(登录号:KR011757.1)。



B

图 1 MVV *gag* 基因 PCR 扩增与重组质粒 pET-22b-*gag* 酶切鉴定结果
A: MVV *gag* 基因 PCR 扩增结果,其中 M: DNA Marker G, 1~2: *gag* 基因, 3: 空白对照; B: pET-22b-*gag* 重组质粒双酶切鉴定结果,其中 N: D15000 DNA marker, 1~9: pET-22b-*gag* 阳性重组质粒双酶切鉴定结果; 10: pET-22b 双酶切鉴定结果。

图 1 MVV *gag* 基因 PCR 扩增与重组质粒 pET-22b-*gag* 酶切鉴定结果

Fig.1 The results of maedi-visna virus (MVV) *gag* gene amplified by PCR and recombinant plasmid pET-22b-*gag* by enzymatic digestion

2.2 *gag* 蛋白氨基酸序列与抗原表位分析

将测序获得的 *gag* 基因序列翻译成 *gag* 蛋白氨基酸序列,与 SRLVs A 型(GenBank 登录号为 AY101611)、B 型(GenBank 登录号为 M33677)、C

型(GenBank 登录号为 AF322109)、E 型(GenBank 登录号为 EU293537) *gag* 蛋白氨基酸序列的相似性为 67.7%~96.6%;与国内 CAEV gs-35V 株(GenBank 登录号为 KT749881)、CAEV 山东株(GenBank

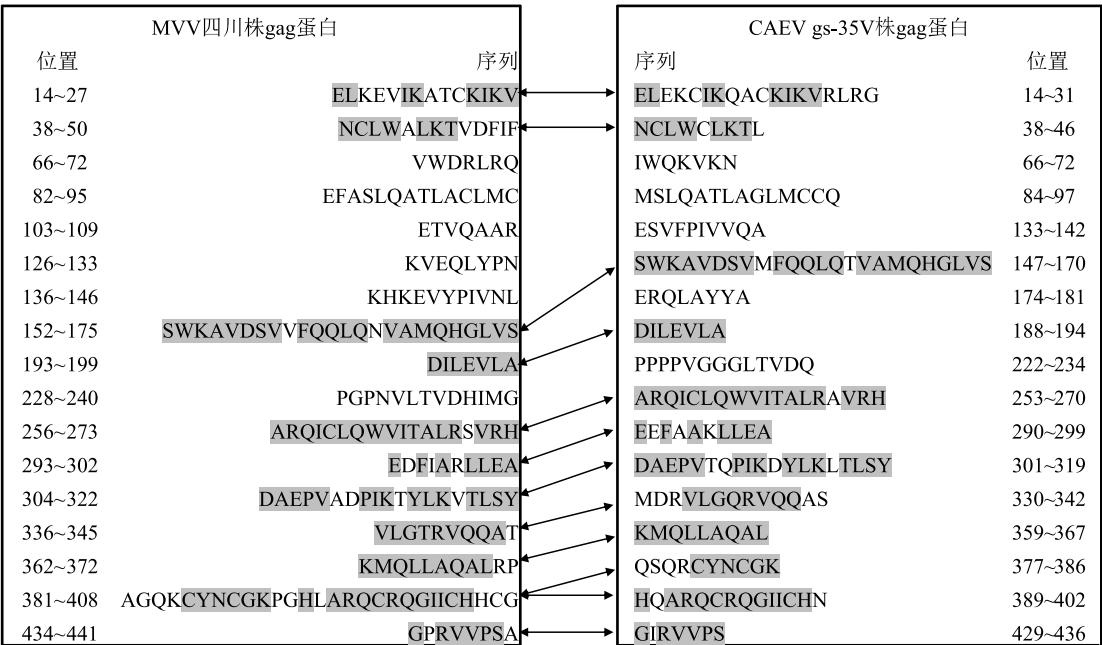
登录号为 KT749878)、CAEV 四川株(GenBank 登录号为 KT214469)、CAEV 贵州株(GenBank 登录号为 KT749880)和 CAEV 陕西株(GenBank 登录号为 KT749879)gag 蛋白氨基酸序列的相似性为74.7%~74.9%(表 1)。

进一步通过抗原表位预测,可以发现 MVV 四

川株和 CAEV gs-35V 株的 gag 蛋白均存在 17 个抗原表位,其中 MVV 四川株 gag 蛋白的 11 个抗原表位与 CAEV gs-35V 株 gag 蛋白的 12 个抗原表位存在较高的序列相似性(图 2),表明本研究中的 MVV gag 蛋白可能具备与抗 CAEV 血清交叉反应的能力。

表 1 MVV 四川株与 SRLVs gag 蛋白氨基酸序列相似性分析结果

类别	相似性(%)								
	AY101611 (A 型)	AF322109 (C 型)	EU293537 (E 型)	M33677 (B 型)	CAEV gs-35V 株	CAEV 贵州株	CAEV 陕西株	CAEV 山东株	CAEV 四川株
MVV 四川株	96.6	67.7	68.8	75.2	74.9	74.9	74.9	74.7	74.9



阴影部分表示氨基酸相似性位点。

图 2 MVV 与 CAEV gag 抗原表位的预测与分析

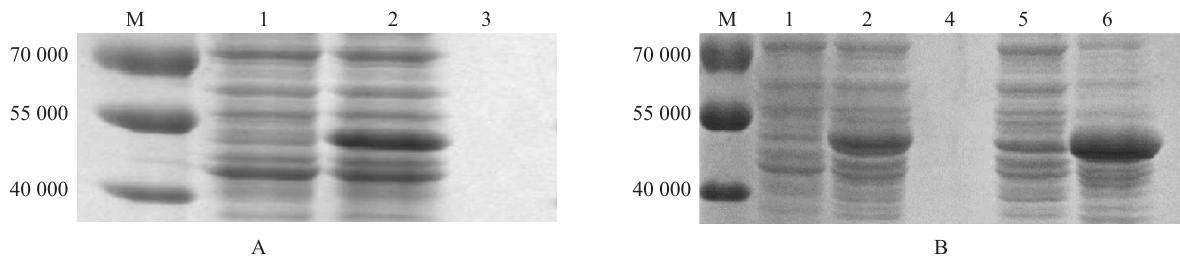
Fig.2 Prediction and analysis of gag epitopes between MVV and Caprine arthritis encephalitis virus(CAEV)

2.3 MVV gag 重组质粒的诱导表达与反应原性分析

根据以上分析结果,将重组表达载体 pET-22b-gag 转入 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达,可见约55 000的目的蛋白条带(图 3A)。经 Band-Scan 5.0 软件分析,目的蛋白质量占总蛋白质量的 23. 6%。低温过夜诱导表达后,菌体超声波裂解离心上清液和沉淀物中均出现了目的条带(图 3B),说明重组 gag 蛋白同时存在可溶性及不可

溶性(包涵体)2 种表达形式,但以包涵体表达形式为主。

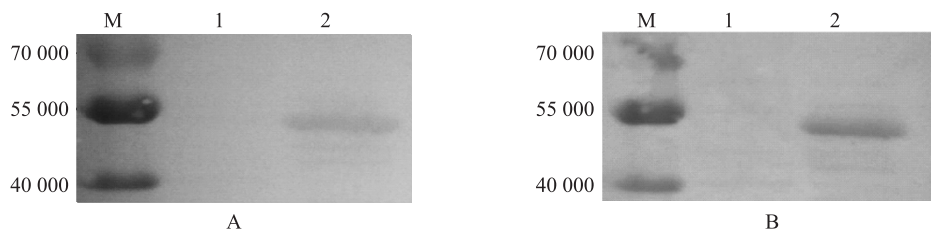
分别采用绵羊抗 MVV 血清和山羊抗 CAEV 血清作为一抗检测重组 gag 蛋白的反应原性,结果表明,重组 gag 蛋白与绵羊抗 MVV 血清(图 4A)和山羊抗 CAEV 血清(图 4B)均出现血清学反应,说明重组 gag 蛋白具有与天然 MVV 和 CAEV gag 蛋白相似的反应原性,证实了生物信息学分析的相关结果。



A: 重组 gag 蛋白诱导表达结果; B: 重组 gag 蛋白表达形式的检测结果。M: 蛋白 Marker; 1: BL21(DE3) 空载对照诱导表达结果; 2: pET-22b-gag/BL21(DE3) 诱导表达结果; 3: 空白对照; 4: pET-22b-gag/BL21(DE3) 诱导表达培养基上清液; 5: pET-22b-gag/BL21(DE3) 诱导表达菌体超声裂解上清液; 6: pET-22b-gag/BL21(DE3) 诱导表达菌体超声裂解沉淀物。

图 3 重组 gag 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中的诱导表达与分布

Fig.3 Induced expression and distribution of recombinant gag protein in *Escherichia coli* BL21(DE3)



A: 以绵羊抗 MVV 血清为一抗的 Western blotting 分析; B: 以山羊抗 CAEV 血清为一抗的 Western blotting 分析; M: 蛋白 Marker; 1: pET-22b-gag/BL21(DE3) 空载对照诱导表达结果; 2: pET-22b-gag/BL21(DE3) 诱导表达阳性对照。

图 4 重组 gag 蛋白交叉反应原性分析

Fig.4 Cross reactogenicity analysis of recombinant gag protein

3 讨论

梅迪-维斯纳病被中国农业农村部列为二类动物疫病,也被中国质量监督检验检疫总局列为出入境贸易需要检疫的动物疫病。它的慢性和隐性感染不仅增加了发现该病的难度,还对中国绵羊养殖业的可持续发展构成了一定的威胁^[19]。国际上一般将 MVV 与 CAEV 合称为 SRLVs,其中,CAEV 为中国科研人员于 20 世纪 80 年代从进口萨能奶山羊中检出并分离的病毒^[20-21],被视为外来输入性传染病原。本实验室保存有中国分离的多数毒株,对这些毒株 [CAEV gs-35V 株 (GenBank 登录号为 KT749881)、CAEV 山东株 (GenBank 登录号为 KT749878)、CAEV 四川株 (GenBank 登录号为 KT214469)、CAEV 贵州株 (GenBank 登录号为 KT749880) 和 CAEV 陕西株 (GenBank 登录号为 KT749879)] 进行 gag 基因相似性分析, gag 基因高度相似 (>99%),说明中国 CAEV 病原较为单一。而中国 MVV 分离株较少,其病原分子生物学特征数据也鲜有报道。本研究尝试以中国 MVV 分离株为模板扩增获得 gag 基因序列,生物信息学分析结

果表明, MVV gag 蛋白氨基酸序列与中国 CAEV 分离株的相似性为 74.7%~74.9%,且其 11 个抗原表位与 CAEV gag 蛋白的 12 个抗原表位具有较高的序列相似性,说明 MVV gag 蛋白具备与抗 CAEV 血清产生免疫交叉反应的结构基础。

在各种表达系统中,大肠杆菌 BL21(DE3) 为主菌的原核表达系统是最为成熟的表达系统之一^[22]。它通过将目的基因片段插入原核表达载体,经过诱导表达与纯化获得所需的重组蛋白。该方法能够在较短时间内获得目的基因表达产物,成本较为低廉,是目前主要选择的原核表达系统。本研究通过将重组 pET-22b-gag 质粒转化 BL21(DE3) 菌株,成功实现了 gag 蛋白的原核表达,经 Western blotting 证实重组 gag 蛋白具备天然 MVV 和 CAEV gag 蛋白相似的反应原性,该研究结果可为进一步研制 SRLVs 通用血清学检测方法提供技术支撑。

综上所述,本研究通过分析中国 MVV 分离株 gag 蛋白氨基酸序列与中国 CAEV 分离株 gag 蛋白氨基酸序列的相似性和两者抗原表位的相似性,推测其可作为中国 SRLVs 的通用血清学诊断标记蛋白;以 MVV 的 gag 基因为模板构建了 gag 基因重组

表达载体并诱导表达,成功实现了重组蛋白的表达,并经 Western blotting 证实了上述推测,研究结果为研制适合中国的 SRLVs 通用血清学检测技术方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] 易海清,阿合买提·买买提,邓普辉,等. 新疆卡拉库羊梅迪/维斯那病毒感染的病理学观察[J]. 动物医学进展,2006,27(2):75-78.
- [2] SIGURDSSON B, THORMAR H, PÁLSSON P A. Cultivation of Visna virus in tissue culture[J]. Archives of virology, 1960, 10(3):368-381.
- [3] GOMEZ-LUCIA E, BARQUERO N, DOMENECH A. Maedi-Visna virus; current perspectives[J]. Veterinary Medicine-Research and Reports, 2018, 9:11-21.
- [4] ARNARSON H, PÁLSSON A, GUDNADOTTIR M, et al. Maedi-Visna virus persistence; antigenic variation and latency[J]. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 2017, 55: 6-12.
- [5] OGUMA K, TANAKA C, HARASAWA R, et al. Isolation of Maedi/Visna virus from a sheep in Japan[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2014, 76(2): 211-218.
- [6] LAGO N, LOPEZ C, PANADERO R, et al. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2012, 103(2/3): 163-169.
- [7] PEREZ M, BIESCAS E, DE ANDRES X, et al. Visna/maedi virus serology in sheep Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain) [J]. Veterinary Journal, 2010, 186(2): 221-225.
- [8] ALBAYRAK H, YAZICI Z, OKUR-GUMUSOVA S, et al. Maedi-visna virus infection in Karayaka and Amasya Herik breed sheep from provinces in northern Turkey[J]. Tropical Animal Health and Production, 2012, 44(5): 939-941.
- [9] AZKUR A K, GAZYAGCI S, ASLAN M E. Serological and epidemiological investigation of bluetongue, Maedi-Visna and caprine arthritis-encephalitis viruses in small ruminant in kirikkale district in Turkey [J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2011, 17(5): 803-808.
- [10] PREZIUSO S, OR M E, GIAMMARIOLI M, et al. Maedi-visna virus in Turkish sheep: a preliminary serological survey using ELISA tests[J]. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2010, 34(3): 289-293.
- [11] 陈爱素,沙音,董宝山. 从绵羊进行性肺炎病例中分离提纯梅迪(Maedi)病毒及其形态观察[J]. 中国兽医杂志,1984,10(2):4-5.
- [12] 王进成,符子华,胡尔玛西,等. 绵羊进行性肺炎流行的血清学调查[J]. 中国兽医杂志,1997,23(4):28-29.
- [13] 孙雨,杨林,王传彬,等. 我国11个省份山羊关节炎-脑炎与绵羊进行性肺炎的血清抗体检测[J]. 中国兽医科学,2018,48(1):34-38.
- [14] WORKMAN A M, DICKEY A M, HEATON M P, et al. Complete genome sequences of two genotype A2 small ruminant lentiviruses isolated from infected U.S. sheep[J]. Microbiology Resource Announcements, 2017, 5(13): e00109.
- [15] RAMIREZ H, REINA R, AMORENA B, et al. Small ruminant lentiviruses; genetic variability, tropism and diagnosis[J]. Viruses-Basel, 2013, 5(4): 1175-1207.
- [16] HIGHLAND M A. Small ruminant lentiviruses; strain variation, viral tropism, and host genetics influence pathogenesis[J]. Veterinary Pathology, 2017, 54(3): 353-354.
- [17] 邓普辉,王正党,苏忠,等. 中国绵羊进行性肺炎(梅迪)流行的血清学调查[J]. 中国兽医杂志,1989,15(4):2-4.
- [18] RECHE P A. Predicted Antigenic Peptides [DB/OL]. (2002-06-01) [2020-02-03]. <http://imedmeducmes/Tools/antigenicpl>.
- [19] 杨义琴,吴建勇,古努尔·吐尔逊,等. 小反刍动物慢病毒通用PCR检测方法的建立与初步评价[J]. 草食家畜,2018(2):13-19.
- [20] 林杰,胡泽渊,胡尔玛西,等. 山羊关节炎脑炎的血清学诊断[J]. 中国兽医杂志,1987,13(10):12-14.
- [21] 胡尔玛希,林杰,胡泽渊,等. 山羊关节炎脑炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技,1989(10):5-6.
- [22] 陈欢欢. 聚乙二醇沉淀法在原核表达系统生物技术药物蛋白分离中的应用研究[D]. 上海:上海交通大学,2017.

(责任编辑:陈海霞)