

一株 2 型牛病毒性腹泻病毒的分离鉴定 及其在 MDBK 细胞上的克隆纯化

聂兆晶¹, 田夫林², 姜世金^{1,3}

(1. 山东农业大学 动物医学院, 山东泰安 271018; 2. 山东省动物疫病预防与控制中心, 济南 250022;
3. 山东省动物生物技术与疫病防治重点实验室, 山东泰安 271018)

摘 要: 为了解牛病毒性腹泻病毒(BVDV)在猪用活疫苗生产过程中的污染情况, 利用抗原捕获 ELISA 方法对用于制作原代睾丸细胞的犊牛血清进行检测。将检测结果为阳性的 1 份犊牛血清, 接种于 MDBK 细胞上, 盲传 3 代, 出现明显细胞病变。用 BVDV 5'-UTR 端特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 并对扩增片段进行克隆测序和序列分析。结果表明, 分离得到一株 2 型牛病毒性腹泻病毒, 并将其命名为 JN-2。将该病毒用蚀斑方法进行克隆纯化, 并对纯化前后病毒的 TCID₅₀ 进行测定比较, 结果发现纯化后病毒滴度显著提高。

关键词: BVDV; 分离鉴定; 序列分析; TCID₅₀

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1004-1389(2012)01-0021-05

Isolation, Identification and Purification of a Genotype 2 Bovine Viral Diarrhea Virus in MDBK Cells

NIE Zhaojing¹, TIAN Fulin² and JIANG Shijin^{1,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian Shandong 271018, China;
2. Shandong Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Jinan 250022, China; 3. Shandong
Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Taian Shandong 271018, China)

Abstract: In order to study the contamination status of Bovine viral diarrhea virus (BVDV) on the process of live vaccine production for swine, the calf blood serum which served as primary cell was detected by antigen capture ELISA. The positive serum was inoculated on MDBK cells and reproduced blindly for 3 generations, and then the virus caused cells pathological changes. Through the RT-PCR and the gene sequencing, a BVDV of genotype 2 named JN-2 was obtained. By plaque assay and TCID₅₀ detection, the JN-2 isolate was purified and its viral titer rose significantly in MDBK cells.

Key words: BVDV; Isolation and identification; Gene sequence analysis; TCID₅₀

牛病毒性腹泻病毒 (bovine virus diarrhea virus, BVDV) 属黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (*Pestivirus*), 属内还包括猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV)、绵羊边界病毒 (Border disease virus of sheep, BDV) 及新确立的 2 个种 Reindeer-1H38 和 Giraffe-V60^[1]。BVDV 是诱发牛多种临床病症的主要病原, 感染病毒的牛临

床表现为先天性缺陷、腹泻、黏膜病、腹泻、呼吸道疾病以及出血性并发症等, 孕牛感染 BVDV 则导致流产、死胎、胎儿畸形或新生牛的持续性感染 (Persistently infected, PI)^[2]。PI 牛可以成为病毒的贮存库和畜群的污染源, 当 PI 牛再次感染抗原性相关的 BVDV 时, 就会引起致死性的黏膜病。另外, BVDV 还是牛源生物制品 (血清、冻

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011 05-26

基金项目: 山东省自主创新成果转化重大专项计划 (2008ZHZX1A1101)。

第一作者: 聂兆晶, 女, 硕士, 研究方向为动物分子病原学。E-mail: nzj861@163.com

通讯作者: 田夫林, 研究员, 研究方向为动物疫病防控。E-mail: fulin_tian@yahoo.com.cn

姜世金, 教授, 研究方向为动物分子病原学与免疫学。E-mail: sjjiang@sda.edu.cn

精、胚胎、疫苗等)的潜在污染源,给畜牧业生产和相关专业领域造成巨大的经济损失^[3]。

根据病毒基因组 5'非翻译区(5'-UTR)的序列比较,将 BVDV 分成 BVDV-1 和 BVDV-2 两个基因型^[4]。流行病学调查表明,BVDV-1 呈全球分布,BVDV-2 只在少数国家流行。国外 BVD 疫苗主要以 BVDV-1 弱毒苗和灭活苗为主,但严重的临床症状和急性感染多由 BVDV-2 引起。虽然 2 种基因型病毒之间存在交叉保护,但是 BVDV-1 疫苗不足以保护 BVDV-2 所引起的急性感染^[5]。BVDV 除引起牛发病外,还可引起猪、羊、鹿及多种野生动物感染^[6],据报道^[7],猪感染 BVDV 可出现类似于猪瘟的临床症状和病理变化。Fernelius A L 等^[8]1973 年首次从自然感染发病的猪体内分离到 BVDV,从而在病原学上证明 BVDV 可以自然感染猪。王新平等^[9]应用 RT-PCR 方法从内蒙古哲盟地区疑似猪瘟病料中检出 BVDV(ZM-95),从而在国内首次证实 BVDV 可自然感染猪。目前,国内猪群中 BVDV 感染情况方面的研究还较少,大部分报道为猪群感染 BVDV-1 病毒,而对牛致病力较强的 BVDV-2 对猪群的致病力却鲜有报道。本研究分离鉴定并纯化了一株 2 型 BVDV 病毒,可为人工感染猪体试验提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及细胞 病毒为抗原捕获 ELISA 检测为阳性的山东省某奶牛场的犍牛血清,冷冻保存于-80℃冰箱。BVDV Oregon C24V 参考毒株、MDBK 细胞购自中国兽医药品监察所。细胞用含有 $\varphi=10\%$ 供体马血清的 DMEM 培养液传代培养,待长成单层后使用。

1.1.2 试剂及耗材 DMEM 购自美国 GIBICO 公司,供体马血清购自以色列 Biological industries,青链霉素混合液(10 000 U/mL)购自 Solarbio 公司,RNA 提取试剂 Trizol、一步法 RT-PCR 试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,BVDV 抗原捕获 ELISA 试剂盒购自美国 IDEXX 公司,细胞培养板、细胞培养瓶购自 Bio-file 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 室温融化保存于-80℃的犍牛血清,按 V(接毒液):V(培养基)=5:100 的比例,将犍牛血清接种于已长成单层的 MDBK 上,置 37℃、 $\varphi=5\%$ CO₂ 培养箱中培养,培养基为含 $\varphi=10\%$ 马血清的 DMEM。接毒后 24~96 h 内,观察细胞的生长情况。盲传 3 代,观察细胞出现病变情况。将盲传后培养 96 h 的细胞于-80℃冰箱反复冻融 3 次,第 3 次的培养液转移至 50 mL 离心管中,4℃、5 000 r/min 离心 10 min,上清液-80℃保存,备用。

1.2.2 引物合成 分析比较已发表的基因 1 型(BVDV-1)和 2 型牛病毒性腹泻病毒(BVDV-2)的 5'非编码区(5'-UTR)的序列,设计合成针对 BVDV-1(P1F/P2R)、BVDV-2(P2F/P2R)的特异性引物和针对 BVDV-1 和 BVDV-2 的通用引物(P3F/P3R),其扩增大小与参考位置见表 1。

1.2.3 病毒 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增 取 1 mL 反复冻融 3 次并离心的接毒细胞培养液,按照天根生化科技(北京)有限公司生产的 Trizol 试剂使用说明书提取病毒总 RNA。以提取的 RNA 为模板,合成 P1F/P1R、P2F/P2R、P3F/P3R 3 对扩增引物,按照天根生化科技(北京)有限公司 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒所提供操作步骤扩增。反应程序:50℃30 min;94℃3 min;

表 1 检测用引物序列

Table 1 The sequences of primers

引物 Primers	序列 Sequences(5' to 3')	位置/bp Positions	扩增产物长度/bp Expected product size	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Usage
P1F	GGTAGCAACAGTGGTGAG	139~155	221	57	BVDV-1 特异
P1R	GTAGCAATACAGTGGGCC	360~343			BVDV-1 specific
P2F	CGAACTCCATTAGTTGAGG	205~225	117	53	BVDV-2 特异
P2R	GTCCATAACGCCACGAATAG	297~319			BVDV-2 specific
P3F	CATGCCCATAGTAGGAC	108~124	288	50	BVDV 通用
P3R	CCATGTGCCATGTACAG	372~389			General BVDV

94 °C 30 s, 57 °C/50 °C/53 °C 30 s, 65 °C 30 s; 共 30 个循环; 65 °C, 10 min。

1.2.4 扩增片段克隆测序及序列分析 使用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 将以 P3F/P3R 为引物的 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果在 NCBI 中进行 Blast, 利用分析软件 DNASTAR 分析 BVDV JN-2 同属内各个种及 BVDV 各型的代表株 5'-UTR 基因的同源性及其系统发生树。

1.2.5 病毒在 MDBK 细胞上的克隆 MDBK 细胞传至 6 孔板, 备用。将 -80 °C 保存的接毒细胞液融化, 用无菌 PBS 做 10 倍倍比稀释, 稀释度依次为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。将细胞板内的营养液弃去, 用 PBS 把孔内细胞表面清洗 2~3 次后, 再把 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的病毒稀释液各取 500 μL 分别加入 1 个细胞孔中, 置 37 °C 的 CO_2 培养箱培养吸附 1 h。之后弃去毒液, 每孔加入 1 mL 含 $\varphi=2\%$ 马血清的 DMEM 维持液。48 h 后, 将含 $\varphi=4\%$ 马血清的培养液与高压灭菌过的 30 g/L 琼脂等体积混合, 制成混合液加到 6 孔板上, 每孔大约加入 1.5 mL, 使凝固琼脂的厚度达 2 mm, 待琼脂凝固后, 避光条件下将板倒置放入 37 °C 的 CO_2 培养箱培养, 观察细胞出现病变情况。72 h 后用 $w=0.1\%$ 中性红染色, 染色完成后, 继续放入 CO_2 培养箱培养, 观察蚀斑出现情况。待出现蚀斑后, 挑取单个蚀斑, 继续接种于 MDBK 细胞上, 得到 BVDVJN-2 的纯培养。

1.2.6 纯化效果检测 分别将克隆前后收获病毒液进行 TCID_{50} 测定。将纯化前后的病毒原液用无血清培养基 10 倍倍比稀释, 稀释度依次 $10^{-1} \sim 10^{-10}$, 每个梯度稀释成 1 000 μL 。病毒接种到铺满 60% 丰度的 MDBK 细胞的 96 孔板上, 每个稀释度接种 8 孔, 同时做 8 孔对照。

2 结果与分析

2.1 病毒分离

样品接种于 MDBK 细胞后, 培养 72 h 未出现明显的细胞病变, 遂对其盲传, 至第 3 代, 细胞开始出现病变, 病变特征为细胞死亡、变圆、聚集成堆、脱落, 脱落的细胞变圆, 漂浮在维持液中, 并逐渐缩小, 活细胞在瓶壁上呈现拉网状(图 1)。

2.2 分离毒株的 5'-UTR 扩增分型鉴定

分离病毒细胞培养物分别用设计的 3 对特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 结果 BVDV-2 型特异

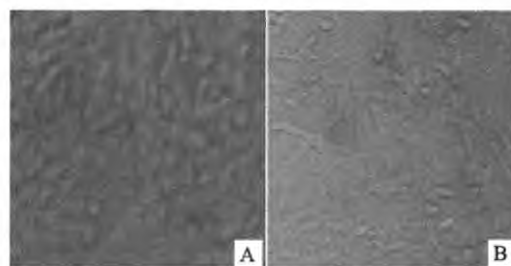
性引物和 BVDV-1 型/BVDV-2 型通用引物均扩增到 117 bp 和 284 bp 的目的条带, 而 BVDV-1 型特异性引物则没有扩增出目的条带(图 2)。

2.3 BVDV-2 型特异性引物和 BVDV-1/BVDV-2 型通用引物对接毒细胞液中病毒的扩增

由图 3 可知, 在 110 bp 和 280 bp 附近有较亮条带, 测序结果表明, 扩增的片段大小分别为 114 bp 和 284 bp。

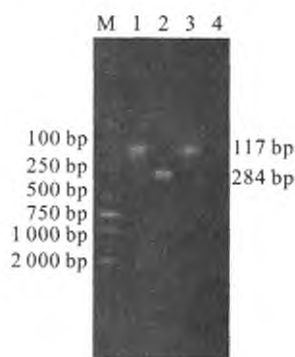
2.4 同源性分析

通过序列同源性比较发现, 分离毒株的扩增片段与 BVDV 713-2 株和 SH-28 株的核苷酸同源性最高, 分别为 98.6% 和 98.2%, 与属内其他 2 型代表毒株的同源性也较高, 都在 94% 以上, 但与 BVDV-1 型各代表毒株同源性在 80.2% 以下, 差异较大。将分离 BVDV 毒株命名为 JN-2 株。



A. 未接毒正常细胞 Normal cell; B. 接毒 3 d 后的病变细胞
The vacuoles of MDBK infected by BVDV

图 1 分离病毒接种 MDBK 细胞后的病变
Fig. 1 The CPE of MDBK cell infected by BVDV



M. DL 2 000 DNA marker; 1, 3. BVDV-2 型特异性引物扩增产物 Amplification of BVDV-2-specific primers; 2. BVDV-1 型/BVDV-2 型通用引物扩增产物 Amplification of BVDV-1/BVDV-2 universal primers; 4. BVDV-1 型特异性引物扩增产物 Amplification of BVDV-1-specific primers

图 2 3 对特异性引物扩增结果

Fig. 2 The RT-PCR results of three primer pairs

由图 4 可知,JN-2 与基因 2 型的代表毒株 890、New York'93 同处于基因 2 型这一分支上,与美洲的 2 株毒株 713-2、5521-95 和中国的 SH-28 亲缘关系最近,而基因 1 型的各代表毒株在另外一支上。

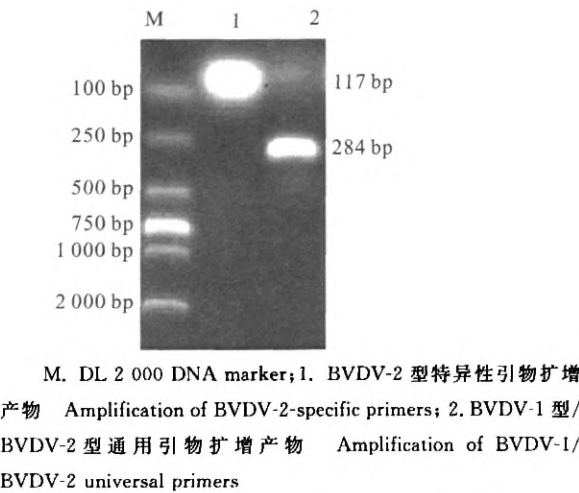


图 3 BVDV-2 型引物和 BVDV-1/BVDV-2 型通用引物扩增结果

Fig. 3 The RT-PCR results of BVDV-2-specific primers and universal primers

2.5 纯化前后 TCID₅₀测定结果

接种 BVDV 3 d 后的细胞经染色,可观察到明显蚀斑。纯化前后 JN-2 株 BVDV 的 TCID₅₀测定结果见表 2 和表 3。根据 Reed-Muench 法可计算出,纯化前病毒的 TCID₅₀为 103.7,纯化后的 TCID₅₀为 105.3,表明纯化后的病毒滴度得到明显提高。

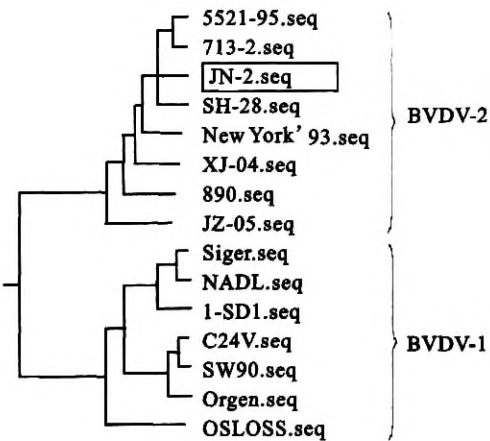


图 4 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 5'UTR sequences

表 2 纯化前 JN-2 株 BVDV 的 TCID₅₀测定结果

Table 2 The TCID₅₀ of JN-2 before purification

病毒稀释梯度 Dilution of JN-2	接种细胞孔数 Inoculated cell wells	无病变细胞孔数 Normal cell wells	有病变细胞孔数 Pathological cell wells	累积总数 Cumulative total numbers		细胞病变孔比例 Ratio of pathological wells	细胞病变率/% Ratio of pathological cells
				无病变孔 Normal wells	有病变孔 Pathological wells		
10 ⁻¹	8	0	8	0	26	26/26	100
10 ⁻²	8	0	8	0	18	18/18	100
10 ⁻³	8	2	6	2	10	10/12	83
10 ⁻⁴	8	5	3	7	4	4/11	36
10 ⁻⁵	8	7	1	14	1	1/14	7.1
10 ⁻⁶	8	8	0	22	0	0/22	0
正常对照 Control	8	8	0				

表 3 纯化后 JN-2 株 BVDV 的 TCID₅₀测定结果

Table 3 TCID₅₀ of JN-2 after purification

病毒稀释梯度 Dilution of JN-2	接种细胞孔数 Inoculated cell wells	无病变细胞孔数 Normal cell wells	有病变细胞孔数 Pathological cell wells	累积总数 Cumulative total numbers		细胞病变孔比例 Ratio of pathological wells	细胞病变率/% Ratio of pathological cells
				无病变孔 Normal wells	有病变孔 Pathological wells		
10 ⁻²	8	0	8	0	30	30/30	100
10 ⁻³	8	0	8	0	22	22/22	100
10 ⁻⁴	8	1	7	1	14	14/15	93
10 ⁻⁵	8	3	5	4	7	7/11	64
10 ⁻⁶	8	6	2	10	2	2/12	17
10 ⁻⁷	8	8	0	18	0	0/18	0
正常对照 Control	8	8	0				

3 讨论

根据病毒基因组 5' 端非翻译区的序列将 BVDV 分成 2 种基因型,即基因 1 和基因 2 型^[4]。BVDV-1 和 BVDV-2 除了在基因组成上不同,在致病性上也存在差异,BVDV-2 型对牛的致病力明显高于 1 型,但是在猪上的感染情况显示,猪群似乎对 1 型 BVDV 更易感^[10-12]。Wensvoort G 等^[6]研究表明,荷兰使用有 BVDV 污染的疫苗而引起仔猪 BVDV 的先天性感染并出现与猪瘟类似的临床症状与病变,从而表明猪用活疫苗污染 BVDV 后,会造成接种该疫苗的猪感染发病。王新平等^[9]应用 RT-PCR 方法对国内一些厂家生产的猪瘟兔化弱毒疫苗进行 BVDV 的检测,结果从多个厂家的疫苗中检测出 BVDV 基因片段,显示中国国产猪用活疫苗中存在较严重的 BVDV 污染。造成猪用活疫苗中 BVDV 污染的主要原因是疫苗生产过程中所用牛源细胞、血清及其相关制品的控制不严。因此,加强猪用活疫苗生产过程中的生物原料的 BVDV 检测,是控制疫苗污染的主要措施。

由于 BVDV 常呈隐性感染并能够通过胎盘屏障从怀孕母牛传给胎牛,所以胎牛血清中常会存在 BVDV 抗体,同时市场上销售的经过放射的牛血清中也会有一定量的 BVDV 核酸片段的残留而可以用 RT-PCR 检测到,从而影响到 BVDV 的分离鉴定。本研究选择马血清作为 MDBK 细胞培养的营养成分之一,能够有效避免牛血清中的 BVDV 抗体和 BVDV 病毒核酸对病毒分离的影响。根据接种细胞培养物是否引起细胞病变,可将 BVDV 分为 2 种生物型(biotype),即致细胞病变型(Cytopathic biotype, CP)和非致细胞病变型(Noncytopathic biotype, NCP)^[13]。CP 型可以引起细胞空泡形成而致死亡,NCP 型只能使培养细胞发生较少的可见变化,感染细胞呈正常状态。本研究分离到的 JN-2 株病毒在 MDBK 细胞上发生细胞病变现象,因此为致细胞病变型 BVDV。

目前,国内外关于猪群感染 BVDV 后是否导致非典型猪瘟或相关症状仍存在争议,但与此相关的动物试验报道却很少。本研究从即将流入疫苗生产过程的犊牛血清中分离到一株 BVDV,经

过 PCR 检测及克隆测序分析表明该毒株为一株 2 型 BVDV。将该毒株在 MDBK 细胞上经过克隆纯化后病毒滴度得到明显提高,为下一步进行猪的致病性试验奠定基础。

参考文献:

- [1] Becher P, Konig M, Paton D, *et al.* Further characterization of bovine viral diarrhoea virus: Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus[J]. *Virology*, 1995, 209: 200-206.
- [2] Baker J C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection[J]. *Vet Clin. North Am Food Anim Pract*, 1995, 11: 425-445.
- [3] Bolin S R, Ridpath J F, Black J, *et al.* Survey of cell lines in the American type culture collection for bovine viral diarrhoea virus[J]. *J Virol Methods*, 1994, 48: 211-221.
- [4] Ridpath J, Fibroin S R, Katz J. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5'-noncoding region for detection of bovine viral diarrhoea virus [J]. *Clin Microbiol*, 1993, 31: 986-989.
- [5] 王丹娜, 吴明福, 王君伟. 牛病毒性腹泻疫苗的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(7): 51-53.
- [6] Wensvoort G, Terpstra C. Bovine viral diarrhoea virus infection in piglets born to sows vaccinated against swine fever with a contaminated vaccine[J]. *Res Vet Sci*, 1988, 45: 143-148.
- [7] Paton D F, Done S H. Congenital infection of pigs with ruminant type pestiviruses [J]. *J Comp Path*, 1994, 111: 151-163.
- [8] Fernelius A L, Amtower W C, Malmquist W A, *et al.* Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine[J]. *Can J Comp Med*, 1973, 37: 96-102.
- [9] 王新平, 涂长春, 李红卫, 等. 从猪瘟病料中检出牛病毒性腹泻病毒[J]. *中国兽医学报*, 1996(4): 341-345.
- [10] 杨永钦. 牛病毒性腹泻病毒的基因分型[J]. *国外兽医学-畜禽传染病*, 1996, 16(3): 56-58.
- [11] Jones L R. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 81(4): 367-375.
- [12] Tajima M. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany[J]. *Vir Res*, 2001, 76(1): 31-42.
- [13] Lee S R, Nanduri B, Pharr G T, *et al.* Bovine viral diarrhoea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009(1): 14-22.

一株2型牛病毒性腹泻病毒的分离鉴定及其在MDBK细胞上的克隆纯化



作者：[聂兆晶](#)，[田夫林](#)，[姜世金](#)，[NIE Zhaojing](#)，[TIAN Fulin](#)，[JIANG Shijin](#)
作者单位：[聂兆晶](#),[NIE Zhaojing](#)([山东农业大学动物医学院](#), [山东泰安](#), 271018)，[田夫林](#),[TIAN Fulin](#)([山东省动物疫病预防与控制中心](#), [济南](#), 250022)，[姜世金](#),[JIANG Shijin](#)([山东农业大学动物医学院](#), [山东泰安](#)271018;[山东省动物生物技术与疫病防治重点实验室](#), [山东泰安](#)271018)
刊名：[西北农业学报](#)[ISTIC](#)[PKU](#)
英文刊名：[Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica](#)
年，卷(期)：2012, 21(1)

参考文献(13条)

1.[Becher P](#);[Konig M](#);[Paton D](#) [Further characterization of bovine viral diarrhea virus:Evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus](#) 1995

2.[Baker J C](#) [The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection](#) 1995

3.[Bolin S R](#);[Ridpath J F](#);[Black J](#) [Survey of cell lines in the American type culture collection for bovine viral diarrhea virus](#) 1994

4.[Ridpath J](#);[Fibroin S R](#);[Katz J](#) [Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' -noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus](#) 1993

5. [王丹娜](#);[吴明福](#);[王君伟](#) [牛病毒性腹泻疫苗的研究进展](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#) 2006(07)

6.[Wensvoort G](#);[Terpstra C](#) [Bovine viral diarrhea virus infection in pig lets born to sows vaccinated against swine fever with a contaminated vaccine](#) 1988

7.[Paton D F](#);[Done S H](#) [Congenital infection of pigs with ruminant type pestiviruses](#) 1994

8.[Fernelius A L](#);[Amtower W C](#);[Malmquist W A](#) [Bovine viral diarrhea virus in swine:characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine](#) 1973

9. [王新平](#);[涂长春](#);[李红卫](#) [从猪瘟病料中检出牛病毒性腹泻病毒](#) 1996(04)

10. [杨永钦](#) [牛病毒性腹泻病毒的基因分型](#) 1996(03)

11. [Jones L R](#) [Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina](#)[外文期刊] 2001(04)

12. [Tajima M](#) [Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany](#)[外文期刊] 2001(01)

13. [Lee S R](#);[Nanduri B](#);[Pharr G T](#) [Bovine viral diarrhea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes](#) 2009(01)

引用本文格式：[聂兆晶](#),[田夫林](#),[姜世金](#),[NIE Zhaojing](#),[TIAN Fulin](#),[JIANG Shijin](#) [一株2型牛病毒性腹泻病毒的分离鉴定及其在MDBK细胞上的克隆纯化](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2012(1)