

猪圆环病毒Ⅱ型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

元永平^{1,2}, 丛丽媛¹, 陈德坤¹, 蒋智勇², 张春红², 宋长绪^{2*}

(1. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 2. 广东省农科院兽医研究所, 广东广州 510640)

摘要: 以纯化复性的猪圆环病毒Ⅱ型(PCV2)Cap 重组蛋白作为免疫原, 按常规方法免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 经间接 ELISA 筛选, 获得了 3 株分泌 PCV2-Cap 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为 1C7A4、4F3F5 和 4G8F7, 其染色体平均数为 98~103, 间接 ELISA 检测 3 株细胞培养上清效价分别为 1:3125、1:3125、1:15625, 小鼠腹水效价分别为 1:390000、1:390000、1:1950000。ELISA 结果显示, 1C7A4、4F3F5 和 4G8F7 仅与融合表达的 PCV2-Cap 蛋白反应, 而与 PET-32a 载体表达的蛋白不反应。相加 ELISA 结果显示 3 株单克隆抗体对应两个不同的病毒抗原位点。间接免疫荧光结果显示, 1C7A4、4F3F5 和 4G8F7 能与 PCV2 发生反应, 而不与 PCV1 发生交叉反应。结果表明所获得的 3 株单抗是 PCV2 型特异性的, 为 PCV1 和 PCV2 鉴别诊断方法的建立奠定了基础。

关键词: 猪圆环病毒Ⅱ型; ORF2 重组蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2008)01-0015-05

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies against PCV2-Cap Recombinant Protein

YUAN Yong-ping^{1,2}, CONG Li-yuan¹, CHEN De-kun¹, JIANG Zhi-yong²,
ZHANG Chun-hong² and SONG Chang-xu^{2*}

(1. Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Veterinary Medicine Institute,
Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: BALB/C mice were regularly immunized with redetatured and purified PCV2-Cap recombinant protein. Spleen cells were collected and infused with SP2/0 cell. Three hybridoma cell strains against PCV2-ORF2 recombinant protein named 1C7A4, 4F3F5 and 4G8F7 were obtained by indirect enzyme-linked immunosorbent assay method. The average number of chromosome of the hybridoma cell lines was 98~103. The ELISA titer for Cap antibodies in culture supernatant were 1:3125, 1:3125, 1:15625 and ascites were 1:390000, 1:390000, 1:1950000 respectively. The results of ELISA indicated that the three monoclonal antibodies were only against PCV cap recombinant protein but not reacted with PET-32a protein. The results of IFA indicated that the three monoclonal antibodies could only react with PCV2 virus rather than the PCV1 virus, suggesting that these monoclonal antibodies were specific to PCV2.

Key words: PCV2; ORF2 recombinant protein; Monoclonal antibodies

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)是近年来新发现的一种病毒, 属圆环病毒科圆环病毒属, 存在 PCV1 和 PCV2 两种血清型, 其中 PCV1 对猪无致病性, 而 PCV2 可引起仔猪多系统衰竭

收稿日期: 2007-08-29 修回日期: 2007-09-21

基金项目: 国家食品安全重大专项(2001BA804A31); 广东省农业科技攻关(2003B21404, 20052490100 和 2006B20301013); 广东省自然科学基金(04002083); 广东省自然科学基金重点项目(06105311)资助。

作者简介: 元永平(1982-), 女, 河南林州人, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学方面的研究。

* 通讯作者: 宋长绪。Email: cxsong2004@163.com, cxsong@yahoo.com。

综合征 (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), 且常与 PRRS、PPV、PNDS 等混合感染引起猪免疫失败, 严重危害养猪业^[1], 目前世界各国都很重视对 PCV2 的研究, 急切希望找到一种快速、准确、适合大规模临床运用的诊断方法。

PCV2 与 PCV1 基因组结构相似, 都包含两个主要的阅读框: ORF1 和 ORF2。ORF1 编码病毒复制相关蛋白 (Rep 蛋白), 常引起 PCV1 和 PCV2 抗原交叉反应, 降低了 PCV2 血清学诊断的准确性; ORF2 编码病毒衣壳蛋白 (Cap 蛋白), 与宿主免疫有关, 在两型 PCV 之间存在抗原特异性的主要原因, 是在分子水平上诊断 PCV2 的理想抗原。所以, 采用一定的方法制备 PCV2 Cap 蛋白的单抗对于 PCV2 的鉴别诊断和治疗有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材料

骨髓瘤细胞 SP2/0 和 PK15 细胞系由广东农科院兽医研究所实验室保存; PET-32a-ORF2 由广东农科院兽医研究所猪病研究室构建保存; BALB/c 小鼠购自广州中山大学实验动物中心; 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司进口分装; 聚乙二醇细胞融合试剂盒购自上海集美公司; RPMI1640 为 GIBCO 产品; HT、HAT 和小鼠单抗 Ig 亚类测定试剂盒为 sigma 公司产品。

1.2 PCV2 ORF2 重组蛋白的诱导表达及纯化复性

用广东农科院兽医研究所猪病研究实验室构建保存的含 PCV2 ORF2 基因的 PET-32a 载体转化大肠杆菌 DH5 α , 诱导表达 PCV2 ORF2 融合蛋白, 经亲和层析将其纯化, 采用分步透析法将其复性, -20℃ 保存备用^[2]。

1.3 动物免疫

将一定量复性的 PCV2 ORF2 蛋白与等体积的完全弗氏佐剂混合并完全乳化后, 小鼠腹股沟两侧靠近淋巴结区皮下注射, 100 μ g/只, 免疫 3 只 BALB/c 小鼠; 21 d 后二免, 免疫剂量为一免的 2 倍, 佐剂用弗氏不完全佐剂; 21 d 后三免, 不用佐剂, 免疫途径、剂量同二免。10 d 后采血测抗体效价, 间隔一周后, 采用腹腔内注射法将抗体

效价高的小鼠加强免疫一次, 3 d 后取脾脏用于融合。

1.4 细胞融合

取免疫小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞按 5 : 1 ~ 10 : 1 比例混合, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 参照 GENMED 聚乙二醇细胞融合试剂盒说明细胞融合, 用 HAT 选择培养基将细胞重悬并轻轻混匀后滴加到提前制备好的 96 孔饲养细胞培养板中, 100 μ L/孔, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。3 d 后半量换液, 以后每隔 2 d 半量换液, 7 d 后换 HT 培养基并开始检测筛选。

1.5 单克隆抗体筛选

用方阵滴定法确立最佳抗原包被量, 建立间接 ELISA 方法, 对杂交瘤培养上清液进行检测^[3,4]。同时用 PET-32a 表达载体转化大肠杆菌表达产物作阴性对照。用有限稀释法对杂交瘤细胞进行多次克隆直至筛选结果 100% 阳性为止。

1.6 单克隆抗体的特性鉴定

1.6.1 单克隆抗体类与亚类的鉴定 按 Sigma 公司的鼠单抗亚类检测试剂盒说明, 以间接 ELISA 方法鉴定。先用腹水 (1 : 5000) 和培养上清液包酶标板, 37℃ 孵育 1 h, 然后加入亚类鉴定试剂 (1 : 1 000), 室温孵育 30 min, 加酶标记的二抗 (1 : 1000), 室温孵育 15 min, 充分洗涤后, OPD-H₂O₂ 免疫底物系统显色, 判定。

1.6.2 杂交瘤细胞的染色体分析 将传代 2~3 d 的杂交瘤细胞和 SP2/0 细胞分别从培养箱中取出, 向细胞瓶内加入含 0.06 μ g/mL 秋水仙素的培养基, 继续培养 6 h, 使染色体停止在分裂中期。离心收集细胞, 用 10 mL 0.075 mol/mL KCl 溶液重悬。置 37℃ 水浴低渗处理 25 min, 加入 1 mL 细胞固定液 (甲醇 : 冰醋酸 = 3 : 1) 预固定 2 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用新鲜固定液将细胞重悬, 在室温固定 20 min。重复操作一次。加固定液混匀细胞, 封闭管口, 4℃ 静置过夜。根据细胞压积的多少留一定量的固定液将细胞悬浮, 滴管吸取细胞悬液少许滴在已用冰水浸泡的洁净载玻片上, 立即吹散, 火焰固定, 用 10% Giemsa 染色液染色 10 min, 洗去染液自然干燥, 于显微镜下观察计数。每株细胞计数 10 个细胞染色体数, 算出平均值^[5]。

1.6.3 腹水的制备 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠每只腹腔注射 0.4 mL 液体石蜡, 10 d 后腹腔注射 5×10^5 个杂交瘤细胞。每日观察小鼠状态, 7

~10 d 后收集腹水,采用间接 ELISA 法测其效价,-20℃保存。

1.6.4 腹水单克隆抗体的纯度鉴定 PCV2 ORF2 融合蛋白与 PET-32a 载体蛋白经 SDS-PAGE 后电转移至 NC 膜上用 1%BSA 37℃封闭 2 h,与单抗 (1:1000 稀释的腹水)37℃作用 2 h,用 PBST 彻底洗涤后,与 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:500 稀释)室温孵育 2 h,再用 PBST 彻底洗涤,加入底物显色 10 min,终止反应,观察结果。

1.6.5 单克隆抗体对应抗原表位分析 采用 ELISA 相加法进行测定。即按建立好的 ELISA 检测方法将反应板包被、封闭,然后先加入第一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应,洗涤,拍干,再加入另一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应。两株单克隆抗体反应完毕后,再加入辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 与之反应,洗涤、显色、测定 OD 值。3 株单克隆抗体均两两配对,按公式分别计算 3 株单克隆抗体两两叠加的增值指数 AI。AI=[(A_{1.2}-A₁)/A₂] $\times$ 100%,A₁、A₂为单抗 1 和 2 的 OD 值,A_{1.2}为单抗 1 叠加单抗 2 的 OD 值,AI 大于 10%即可初步断定两种单抗对应不同的抗原结合位点。

1.6.6 特异性鉴定 将 PK15 细胞培养于 24 孔培养板,用一定浓度 PCV2 感染细胞^[6],同时设阴性对照,连续传代培养 4 次,待细胞长成单层后,弃上清,PBS 洗 3 次,再用丙酮固定细胞,室温放置 10 min,PBS 洗 3 次,再用 10%牛血清封闭,37℃,30 min。用 PBS 洗 3 次,加入小鼠腹水,37℃,45 min,PBS 洗 3 次,再加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 继续孵育,37℃,45 min 后,PBS 洗 3 次,置荧光显微镜下观察^[7,8]。以 PCV1 感染 PK15 细胞,以同样方法做间接免疫荧光试验。

2 结果与分析

2.1 PCV2-ORF2 重组蛋白的表达、纯化及 BALB/c 小鼠的免疫

表达所得 PCV2-ORF2 重组蛋白经纯化复性后测定浓度为 2 mg/mL,用其作抗原按计划免疫 BALB/c 小鼠,第三次免疫后血清效价最高的达到 10⁷,免疫效果很好,将其进行一次加强免疫后用于融合。

2.2 杂交瘤细胞株的建立

免疫脾细胞与 SP2/0 的融合后 3 d 即可见杂交瘤细胞生长,细胞融合率达到 85%以上。间接 ELISA 初次筛选得到 10 余个阳性孔,经 3 次亚克隆化后获得 3 株能稳定分泌抗 PCV2-ORF2 融合蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 1C7A4、4F3F5 和 4G8F7。将其连续传代两个月以及经过冻存复苏后仍能保持分泌抗体的能力。

2.3 单克隆抗体的鉴定

2.3.1 单克隆抗体的效价及亚类 利用间接 ELISA 对所得 3 株单克隆抗体进行检测,小鼠腹水效价明显高于细胞培养上清效价(表 1)。

表 1 3 株单克隆抗体的效价及亚类

Table 1 The titer and Isotypes of 3 PCV2-ORF2 monoclonal antibodies			
单克隆抗体 Monoclonal antibodies	培养上清抗体效价 Antibody titer of culture supernatant	腹水抗体效价 Antibody titer of ascites	抗体亚类 IgG Isotypes
1C7A4	1:3125	1:390000	IgG1
4F3F5	1:3125	1:390000	IgG1
4G8F7	1:15625	1:1950000	IgG2b

2.3.2 染色体分析 3 株杂交瘤细胞的染色体数均在 98~103 之间,多数核型为端着丝点染色体,还有少数核型为中间着丝点的标志染色体,如图中箭头所指(图 1)。

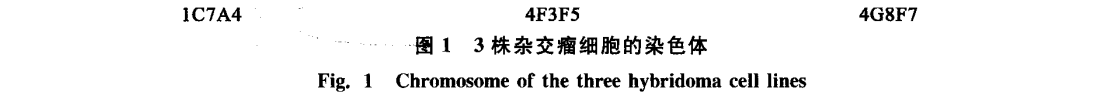


图 1 3 株杂交瘤细胞的染色体
Fig. 1 Chromosome of the three hybridoma cell lines

2.3.3 单抗纯度鉴定 经 Western Blot 分析,3 株单抗均仅在 25 kD 左右处有 1 条清晰条带,说明单抗纯度较高。

表 2 3 株单克隆抗体结合位点的 ELISA 叠加结果(AI%)

Table 2 Results of additivity ELISA for three monoclonal antibodies(AI%)

单克隆抗体 Monoclonal antibodies	1C7A4	4F3F5	4G8F7
1C7A4	0.0	7.2	24.7
4F3F5	5.1	0.0	15.7
4G8F7	16.5	12.1	0.0

2.3.4 单克隆抗体对应的抗原表位分析 4G8F7

和 4F3F5,1C7A4 和 4G8F7 之间反应的 AI 均大于 10%,1C7A4 和 4F3F5 之间反应的 AI 小于 10%。可以初步判定获得的 3 株单克隆抗体有 2 个不同的结合位点。

2.4 间接免疫荧光

PCV2 感染的阳性孔出现明显绿色荧光,且荧光多聚集在 PK-15 细胞的细胞质中,阴性孔无绿色荧光(图 2)。PCV1 感染后的 PK15 细胞间接免疫荧光试验呈阴性。

图 2 3 株单克隆抗体对 PCV2 感染的 PK15 细胞涂片的间接免疫荧光试验结果(10×40)

Fig. 2 Immunofluorescence assay(IFA) of the 3 MAbs on PCV2 infected PK15 cells (10×40)

3 讨论

本试验采用原核表达的 PET-32a-ORF2 融合蛋白作抗原,一方面,该蛋白免疫原性好且便于大量制备提纯,同时避免了基因免疫后效价低、制备单抗困难的缺陷。另一方面,在前期试验中采用 ELISA 方法证实了本实验中采用的融合蛋白与天然 cap 蛋白具有相似的免疫原性,与韩凌霞^[9,10]等原核表达的 cap 蛋白具有病毒特异的免疫原性结果相似,确保了用该蛋白制备单抗的可行性和实用性,减少了试验的盲目性^[11]。

笔者采用常规方法免疫制备单抗,虽然耗时比较长,但取得了较好的免疫效果,制备所得单抗的稳定性和亲和力也表现出明显的优势。在采用间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞的过程中,使用以空表达载体转化的细菌蛋白包板作为对照^[12],快速准确的检测到特异性针对 PCV2 Cap 蛋白的单克隆抗体,并在经 3 次亚克隆后最终获得 3 株能稳定分泌抗 PCV2-ORF2 蛋白单克隆抗体的细胞株 1C7A4、4F3F5 和 4G8F7。

在试验中,对 3 株分泌 PCV2-ORF2 蛋白单抗的杂交瘤细胞株的生物学特性进行了系统鉴定。从杂交瘤细胞染色体核型、经过连续传代培养和冻存后的生物学特性、以及单克隆抗体的亚

类、纯度、效价针对的抗原表位等多方面,全方位考察证明了这 3 株杂交瘤细胞分泌抗体的能力强而且稳定,三种单克隆抗体效价高,对应两个不同的抗原表位,具有一定的应用价值。

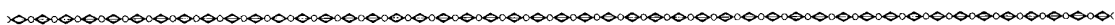
间接免疫荧光试验结果表明 3 株单抗均具有针对 PCV2 病毒天然 Cap 蛋白的结合表位,具有很强的特异性,为 PCV1 和 PCV2 的鉴别诊断方法的研究提供了材料。其中 4G8F7 的亲和力最高,荧光最强,本实验室已经用 4G8F7 单抗建立实验室检测 PCV2 病毒的 IFA 方法,为其初步应用做了一些摸索研究,并希望用这些单克隆抗体做进一步的研究,建立快速、简便的 PCV2 病原的检测方法,为 PCV2 引发的一系列疾病的预防诊断提供帮助。

本研究系在广东农科院兽医研究所猪病研究室完成。

参考文献:

- [1] 郎洪武,王 力,张广川,等.猪圆环病分离鉴定及断奶仔猪多系统衰竭综合征的诊断[J].中国兽医科技,2001,31(3):3-4.
- [2] 蒋智勇,宋长绪,王贵平,等.猪Ⅱ型圆环病毒 ORF1 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J].动物医学进展,2004,25(5):59-62.
- [3] 彭 军,李保全,沈志勇,等.抗 AIV(H9)独特型杂交瘤细

- 胞株检测方法的建立[J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 132-134.
- [4] 崔贞亮, 李红飞, 吴庆侠, 等. LH 抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 26-28.
- [5] Combert A K. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer[J]. J Biotech, 1998, 60: 47-54.
- [6] Mcneilly F, McNair I, Mackie D P, *et al.* Production, characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2[J]. Arch Virol, 2001, 146: 909-922.
- [7] 周继勇, 陈庆新, 叶菊秀, 等. 猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 1-3.
- [8] 中会刚, 周继勇, 陈庆新, 等. 猪圆环病毒 II 型 Rep 基因在 PK15 细胞中的表达及特性[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 244-246.
- [9] 韩凌霞, 司昌德, 刘怀然, 等. 猪 2 型圆环病毒原核表达产物的免疫原性测定[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 118-121.
- [10] Liu Q, Willson P, Attah-poku S, *et al.* Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein[J]. Protein Expr Purif, 2001, 21(1): 115-120.
- [11] 商绍彬, 周继勇, 吴建祥, 等. 重组表达猪圆环病毒 2 型衣壳蛋白的抗原特性分析[J]. 微生物学报, 2005, 43(3): 377-381.
- [12] 陈美玲, 陈焕春, 黄红亮, 等. 抗猪圆环病毒 II 型 ORF2 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 567-569.



(上接第 14 页)

- [5] 朱忠珂, 王建华, 汪 傲, 等. 犬溶菌酶基因的克隆、原核表达及产物活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(4): 55-59.
- [6] 孙怀昌, 张 泉, 施伟庆, 等. 人溶菌酶 cDNA 的克隆及其在小鼠体内的表达[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(2): 157-159.
- [7] 蒋春茂, 孙怀昌, 王 涛. 人溶菌酶基因在奶牛乳腺中的表达试验[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(12): 20-21.
- [8] Huang B, Zhao C, Lei X, *et al.* The cloning, sequencing and analysis of Chinese human lysozyme gene cDNA amplified with RT PCR from human placental total RNA[J]. ChinBiochem J, 1993, 9: 269-273.
- [9] 杨国庆, 戴蕴平, 来宝利, 等. 牛 BLG 基因 5 调控成分的克隆和制备乳腺生物反应器研究[J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26(5): 463-469.
- [10] Itamar Barash, Margaret Nathan, Rachel Kari. Elements within the β -lactoglobulin gene inhibit expression of human serum albumin Cdn and minigenes in transfected cells but rescue their expression in the mammary gland of transgenic mice[J]. Nucleic Acides Research, 1996, 24(4): 602-610.
- [11] Kuss A W, Gogol J, Geldermann H. Associations of a polymorphic AP-2 binding site in the 5'-flanking region of the bovine β -lactoglobulin gene with milk proteins[J]. J. Dairy Sci, 86: 2213-2218.
- [12] Juha-Mtti Hyttinen, Veli-Pekka Korhonen, Mikko O Hiltunen. High-level expression of bovine β -lactoglobulin gene in transgenic mice[J]. Journal of biotechnology, 1998, (61): 191-198.
- [13] 于政权, 樊宝良, 李 宁, 等. 转基因小鼠乳腺表达重组人溶菌酶[J]. 科学通报, 2003, 48(20): 2149-2153.

猪圆环病毒Ⅱ型Cap蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

作者: [元永平](#), [丛丽媛](#), [陈德坤](#), [蒋智勇](#), [张春红](#), [宋长绪](#), [YUAN Yong-ping](#), [CONG Li-yuan](#), [CHEN De-kun](#), [JIANG Zhi-yong](#), [ZHANG Chun-hong](#), [SONG Chang-xu](#)

作者单位: [元永平, YUAN Yong-ping\(西北农林科技大学, 陕西杨凌, 712100; 广东省农科院兽医研究所, 广东广州, 510640\)](#), [丛丽媛, 陈德坤, CONG Li-yuan, CHEN De-kun\(西北农林科技大学, 陕西杨凌, 712100\)](#), [蒋智勇, 张春红, 宋长绪, JIANG Zhi-yong, ZHANG Chun-hong, SONG Chang-xu\(广东省农科院兽医研究所, 广东广州, 510640\)](#)

刊名: [西北农业学报](#) **ISTIC PKU**

英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年, 卷(期): 2008, 17(1)

被引用次数: 2次

参考文献(12条)

1. 郎洪武;王力;张广川 [猪圆环病海分离鉴定及断奶仔猪多系统衰减综合征的诊断](#)[期刊论文]-[中国兽医科技](#) 2001(03)
2. 蒋智勇;宋长绪;王贵平 [猪Ⅱ型圆环病毒ORF1基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达](#)[期刊论文]-[动物医学进展](#) 2004(05)
3. 彭军;李保全;沈志勇 [抗AIV\(H9\)独特型杂交瘤细胞株检测方法的建立](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2005(04)
4. 崔贞亮;李红飞;吴庆侠 [LH抗体间接ELISA检测方法的建立](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(03)
5. Combert A K [Recombinant gene expression in Escherichia coli cultivation using lactose as inducer](#) 1998
6. Mcneilly F;Mcnair I ;Mackie D P [Production, characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2](#)[外文期刊] 2001
7. 周继勇;陈庆新;叶菊秀 [猪圆环病毒2型感染的血清学分析](#)[期刊论文]-[中国兽医学报](#) 2004(01)
8. 中会刚;周继勇;陈庆新 [猪圆环病毒Ⅱ型Rep基因在PK15细胞中的表达及特性](#)[期刊论文]-[中国兽医学报](#) 2005(03)
9. 韩凌霞;司昌德;刘怀然 [猪2型圆环病毒原核表达产物的免疫原性测定](#)[期刊论文]-[中国实验动物学报](#) 2006(02)
10. Liu Q;Willson P;Attoh-poku S [Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2ORF2 fusion protein](#)[外文期刊] 2001(01)
11. 商绍彬;周继勇;吴建祥 [重组表达猪圆环病毒2型衣壳蛋白的抗原特性分析](#)[期刊论文]-[微生物学报](#) 2005(03)
12. 陈美玲;陈焕春;黄红亮 [抗猪圆环病毒Ⅱ型ORF2蛋白单克隆抗体的制备及鉴定](#)[期刊论文]-[中国兽医学报](#) 2005(06)

本文读者也读过(9条)

1. 陈美玲. 陈焕春. 黄红亮. 琚春梅. 宋云峰. CHEN Mei-ling. CHEN Huan-chun. HUANG Hong-liang. JU Chun-mei. SONG Yun-feng [抗猪圆环病毒Ⅱ型ORF2蛋白单克隆抗体的制备及鉴定](#)[期刊论文]-[中国兽医学报](#)2005, 25(6)
2. 梁辰. 张勇. 刘强. 马晶. 苗丽娟. LIANG Chen. ZHANG Yong. LIU Qiang. MA Jing. MIAO Lijuan [2型猪圆环病毒ORF2基因的原核表达](#)[期刊论文]-[吉林农业科技学院学报](#)2010, 19(3)
3. 朱善元. 陈长春. 成大荣. 金山. 李祥瑞. ZHU Shan-yuan. CHEN Chang-chun. CHENG Da-rong. JIN Shan. LI Xiang-rui [猪圆环病毒衣壳蛋白单克隆抗体的制备](#)[期刊论文]-[扬州大学学报\(农业与生命科学版\)](#) 2008, 29(3)
4. 黄立平. 刘长明. 危艳武. 张朝霞. 陆月华. 郭龙军. HUANG Li-ping. LIU Chang-ming. WEI Yan-wu. ZHANG Zhao-xia. LU Yue-hua. GUO Long-jun [抗猪圆环病毒2型Cap蛋白中和性单克隆抗体的制备及鉴定](#)[期刊论文]-[中国预防兽医学报](#)2009, 31(2)
5. 宋云峰. 肖少波. 金梅林. 陈焕春 [PCV2 ORF2自杀性DNA疫苗的构建](#)[会议论文]-2004

6. [王宪文](#), [谢青梅](#), [曹永长](#), [于康震](#), [毕英佐](#) [PCV2 • ORF2基因片段在大肠杆菌中的表达与纯化](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#)2007, 35 (23)
7. [马贯中](#), [韩凌霞](#), [朴范泽](#), [刘怀然](#), [司昌德](#), [姜骞](#), [曲连东](#) [猪圆环病毒Cap蛋白羧基端特异性单克隆抗体的制备](#)[期刊论文]-[黑龙江八一农垦大学学报](#)2006, 18 (2)
8. [张锦秀](#), [晁生玉](#), [史利军](#), [候绍华](#), [李刚](#), [ZHANG Jin-xiu](#), [CHAO Sheng-yu](#), [SHI Li-jun](#), [HUO Shao-hua](#), [LI Gang](#) [猪圆环病毒 II 型修饰Cap蛋白基因的原核表达及纯化](#)[期刊论文]-[中国动物保健](#)2009, 11 (4)
9. [谢彩华](#), [闫若潜](#), [吴志明](#), [张志凌](#), [张健](#), [陈涛](#) [猪圆环病毒2型ORF2基因的表达及活性研究](#)[会议论文]-2009

引证文献(2条)

1. [陆英杰](#), [林涛](#), [欧阳峰](#), [谭铁兵](#), [马春全](#), [邓桦](#) [猪圆环病毒 II 型ORF2重组蛋白抗体诊断试剂IgG的研制](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2009 (5)
2. [刘丹丹](#), [高明春](#), [宋军](#), [宋鸽](#), [曹永生](#), [张润祥](#), [李爽](#), [于力](#), [王君伟](#) [口蹄疫病毒非结构蛋白3AB单克隆抗体的制备及其对应表位区分析](#)[期刊论文]-[中国预防兽医学报](#) 2011 (9)

引用本文格式: [元永平](#), [丛丽媛](#), [陈德坤](#), [蒋智勇](#), [张春红](#), [宋长绪](#), [YUAN Yong-ping](#), [CONG Li-yuan](#), [CHEN De-kun](#), [JIANG Zhi-yong](#), [ZHANG Chun-hong](#), [SONG Chang-xu](#) [猪圆环病毒 II 型Cap蛋白单克隆抗体的制备及鉴定](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2008 (1)