

鹅细小病毒非结构蛋白和结构蛋白 B 细胞线性抗原表位的鉴定

于天飞^{1,2}, 仇 铮¹, 马 波¹, 袁率珍^{1,3}, 李 隰¹, 王君伟^{1*}

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 齐齐哈尔大学
生命科学与工程学院, 齐齐哈尔 161006; 3. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘 要: 鹅细小病毒是小鹅瘟的病原体, 其基因组含有 2 个主要开放阅读框(ORF), 分别编码非结构蛋白(NS)和结构蛋白(VP)。为了对这 2 种蛋白进行抗原表位作图, 设计了 34 个覆盖非结构蛋白 NS 和结构蛋白 VP 的 50~60 个氨基酸残基的重叠短肽, 并进行了融合表达。用攻毒 10 周龄鹅血清对这 34 个融合蛋白进行蛋白质印迹分析, 结果鉴定出 NS 蛋白线性抗原表位位于 C 末端的 453-627 氨基酸区域; VP 蛋白线性抗原表位位于 35-198、423-491、531-595、616-669 和 678-732 氨基酸区域。

关键词: 鹅细小病毒; 非结构蛋白; 结构蛋白; 线性抗原表位

中图分类号: S852.65⁺9.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)06-0757-07

Localization of Linear B-cell Epitopes on Goose Parvovirus Non-structural Protein and Structural Protein

YU Tian-fei^{1,2}, QIU Zheng¹, MA Bo¹, YUAN Shuai-zhen^{1,3}, LI Li¹, WANG Jun-wei^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 3. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The non-structural protein and structural protein of goose parvovirus were dissected into 15 or 19 fragments, respectively, and expressed in *Escherichia coli*. Then Western blot reactivity of these short peptide fused proteins were surveyed by using viral infected sera. The results showed that the non-structural protein linear B-cell epitopes are located on the C-terminal (453-627 aa) and the structural protein linear B-cell epitopes are located on 35-198, 423-491, 531-595, 616-669, 678-732 aa.

Key words: goose parvovirus; non-structural protein; structural protein; linear epitopes

鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)是小鹅瘟(Gosling plague, GP)的病原体, 由于其感染雏鹅传播快、病死率高, 引起国内外学者的广泛重视^[1]。GPV 在病毒分类上归于细小病毒科依赖病毒属成员, 是一种单股线性 DNA 病毒^[2]。自 1961 年方定一^[3]首次发现并分离到 GPV 后, 国外也有分离到该病毒的报道^[1]。

GPV 基因组由 5 106 个核苷酸组成, 基因组两

端为回文序列折叠形成的发夹结构, 含有 2 个主要开放阅读框(ORF), 编码非结构蛋白(NS)和结构蛋白(VP)。左侧 ORF 编码 2 个非结构蛋白(NS1 和 NS2), 编码二者基因的起始密码子的位置不同, 但共用同一终止密码子, 它们的氨基酸序列按肽链 C 端到 N 端方向完全重叠, 肽链长度大小为 NS1 > NS2; 右侧 ORF 编码 3 个结构蛋白(VP1、VP2 和 VP3)。VP3 为主要结构蛋白, 由 VP2 在蛋白酶的

收稿日期: 2007-07-16

基金项目: 黑龙江“十五”攻关项目(GB01B503202)

作者简介: 于天飞(1980-), 男, 黑龙江龙江县人, 博士生, 讲师, 主要从事分子病毒学研究

* 通讯作者: 王君伟, 博士, 教授, 主要从事动物病毒分子生物学研究, E-mail: jwwang@mail.neau.edu.cn

作用下裂解而来,VP1含有组成VP2、VP3的全部氨基酸序列^[4-6]。由于GPV的2种非结构蛋白以及3种结构蛋白分别具有共同的羧基端,因此在理论上,存在于NS2的抗原表位应该也存在于NS1;存在于VP3的抗原表位应该也存在于VP1和VP2,存在于VP2的抗原表位应该也存在于VP1。

目前国内外对GPV分子生物学的研究远落后于对人细小病毒(B19)、腺联病毒(AAV)、猪细小病毒(PPV)和犬细小病毒(CPV)等细小病毒的研究^[7-11],所以存在许多诸如GPV的转录、转译、复制和调控的机制及病毒蛋白的功能和抗原性等问题需要阐明。虽然GPV最早是由我国学者分离获得,但我国对GPV分子生物学方面的研究却起步较晚。目前,国内外有关GPV的致病机制及变异性等分子生物学方面的研究报道非常有限,深入研究鹅细小病毒的分子机制,对于了解其致病机理和遗传变异能够提供有力的帮助。

本实验室曾克隆表达了NS1、NS2、VP1、VP2和VP3等蛋白^[12-14],抗原性检测结果表明,原核表达产物均可被抗GPV血清识别。因此本试验利用一组覆盖NS和VP蛋白的短肽融合蛋白进一步对其抗原性进行研究。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

质粒pGEX-6P-1、含GPV H1株NS1和VP1基因的重组克隆质粒pMD18-T-NS1^[12]和pMD18-T-VP1^[13],大肠杆菌TG1及Rosetta(DE3)pLysS均为本实验室保存。

1.2 酶与标记物

限制性内切酶BamH I和Xho I为宝生物工程(大连)有限公司产品;T₄DNA连接酶为Invitrogen公司产品,HRP标记抗鹅IgG由本实验室制备;琼脂糖凝胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。

1.3 阳性血清

GPV H1株攻毒10周龄鹅血清和健康鹅血清由本实验室采集制备。

1.4 NS1和VP1短肽融合蛋白的设计

为了对NS1蛋白(627aa)和VP1蛋白(732aa)进行抗原表位作图,分别设计了一套覆盖整个NS1和VP1蛋白的短肽,这些短肽包含50~60个氨基酸,各有10~15个氨基酸重叠。为了表达这些短

肽,共设计合成了34对引物,其中NS1基因15对,VP1基因19对。在正向引物的5'端引入BamH I位点,在反向引物的5'端引入Xho I位点以及终止密码子。引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物名称及序列如表1和2所示。

1.5 短肽融合蛋白表达质粒的构建及表达、纯化

PCR反应体系:H₂O 33 μL,10×PCR缓冲液5 μL,25 pmol/L上下游引物各1 μL,25 mmol/L dNTPs 4 μL,模板DNA 5 μL,Ex-Taq DNA聚合酶1 μL,总体积50 μL。PCR反应条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,退火(温度见表1和表2)30 s,72℃ 30 s,30个循环;72℃ 5 min;4℃保存。PCR产物凝胶回收,再用BamH I和Xho I双酶切回收,-20℃存放备用。BamH I和Xho I双酶切质粒pGEX-6P-1,回收大片段,按凝胶回收按试剂盒说明进行,T₄DNA连接酶连接过夜,转化大肠杆菌TG1,重组子经酶切及PCR鉴定,最后送上海生物工程技术有限公司测序。将经测序鉴定正确的重组质粒转化感受态大肠杆菌Rosetta(DE3)pLysS。大肠杆菌感受态的制备、质粒的转化按常规方法进行。将表达菌种接种于含100 mg/L氨苄青霉素的LB培养基中,37℃培养过夜后,按1:100接种于新鲜LB培养基中,继续培养至对数生长期(A₆₀₀=0.5~0.6),加IPTG至终浓度1 mmol/L诱导4 h,培养物离心后用1/20体积PBS重悬,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳检测表达情况。短肽融合蛋白经12% SDS-PAGE电泳,0.3 mol/L KCl预染5 min,切胶纯化。纯化后测定蛋白质含量,-20℃保存备用。

1.6 蛋白质印迹检测融合蛋白与GPV攻毒鹅血清的免疫反应性

纯化的短肽融合蛋白样品经SDS-PAGE后,转印至硝酸纤维素膜上,5%脱脂乳4℃封闭过夜,PBST洗3遍,浸入1:50稀释的GPV阳性血清或健康鹅血清中,37℃作用2 h,PBST洗3遍后浸入1:500稀释的HRP标记的抗鹅IgG抗体,室温作用1 h,洗涤3次后用4-CN显色。

2 结果

2.1 短肽融合蛋白的表达与纯化

编码各短肽的PCR短链核酸克隆至表达载体pGEX-6P-1,经测序检验表明各编码序列完全正确。重组质粒转化宿主菌Rosetta(DE3)pLysS,用1

表 1 非结构蛋白截短表达引物
Table 1 Primers for non-structural protein short peptides

名称 Name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature
NS(1-60)	NSU(1-60): ATCGCGGATCCATGGCACTTTCTAGGC NSL(1-60): GGCCGCTCGAGTTACATCGGTAGATTCACA	57.1
NS(35-96)	NSU(35-96): ATCGCGGATCCAACCTTTGTAGAATGGCTTT NSL(35-96): TTCCGCTCGAGTTAAATGTACTCACTGCCTTC	56.9
NS(73-139)	NSU(73-139): GGCGCGGATCCCAAAGATGGAATCAGTTCA NSL(73-139): GGCCGCTCGAGTTAAAACCAATCGGGGATC	56.9
NS(117-176)	NSU(117-176): CGCCGGGGGATCCTCTCAGATAAAAAGACTCTATCAT NSL(117-176): GGCCGCTCGAGTTAGTTGGTAAAGGCCATTG	57.0
NS(163-229)	NSU(163-229): TTCGCGGATCCATTCTAAAAAGCAACCT NSL(163-229): AACCGCTCGAGTTAAAGGTTGCTATAGTTCTTTGC	57.0
NS(212-279)	NSU(212-279): AGCGCGGATCCTCAACTGTGGCACC NSL(212-279): GGCCGCTCGAGTTATGTTAATAACATTCAGCACG	57.1
NS(255-314)	NSU(255-314): GGGCGCGGATCCTTTCAAGCGACTTCTTC NSL(255-314): TTGGGCGCTCGAGTTATACGTATTGAGGGTTGT	56.9
NS(301-359)	NSU(301-359): GGCGCGGATCCTATCAAATTCTGAAAATG NSL(301-359): AACCGCTCGAGTTAAACACAGCCATAGAAGG	56.9
NS(346-400)	NSU(346-400): GGGGGGATCCGCAGAAGCTATTGCC NSL(346-400): AGTCCGCTCGAGTTAAGCAGACCCTCCCAA	57.1
NS(379-427)	NSU(379-427): GGGCGCGGATCCTGGGAGGAGGGAAAAAT NSL(379-427): GGGGGGCCGCTCGAGTTAACACATGTCAGTATTACTAG	57.0
NS(413-473)	NSU(413-473): GGGGGGGGCGCGGATCCATTGAACCTACTCCTG NSL(413-473): GGGGGGGGGCCGCTCGAGTTATTTGAAAAATTCTCTGACTTC	57.1
NS(453-514)	NSU(453-514): GGCGCGGATCCTCACATAAATTGGAACCTT NSL(453-514): GGCCGCTCGAGTTACCAGATCTTAGGAGGCT	57.2
NS(485-542)	NSU(485-542): ACGCGGATCCGAGTTCAAAGTCC NSL(485-542): ACCGCTCGAGTTAAGTCACAGGAATTG	57.2
NS(533-598)	NSU(533-598): GGCGCGGATCCTTCTCATCAGTCGCT NSL(533-598): CACCGCTCGAGTTACCACCCATGTTTCATCA	57.0
NS(575-627)	NSU(575-627): GGGGGCGCGGATCCACAGAATGTGAGAAAGC NSL(575-627): GGCCGCTCGAGTTATTGTTTCATTTTCAGCATCATCAAGC	56.9

mmol/L IPTG 37℃诱导 4 h 后,经 SDS-PAGE 分析表明目的基因得到了表达(图 1)。表达产物切胶纯化结果如图 2 所示。

2.2 短肽融合蛋白的蛋白质印迹分析

SDS-PAGE 预制胶每孔加入纯化的截短蛋白及 GST 对照蛋白 15 μg,蛋白质印迹结果表明,表达的融合蛋白 NS(453-514)、NS(485-542)、NS(533-

598)、NS(575-627)、VP(35-100)、VP(81-136)、VP(124-161)、VP(146-198)、VP(423-491)、VP(531-595)、VP(616-669)和 VP(678-732)能被攻毒鹅血清所识别(图 3),但不与健康鹅血清反应(结果未列出)。其中 NS(485-542)、VP(35-100)、VP(81-136)、VP(124-161)、VP(146-198)和 VP(678-732)反应性较强。

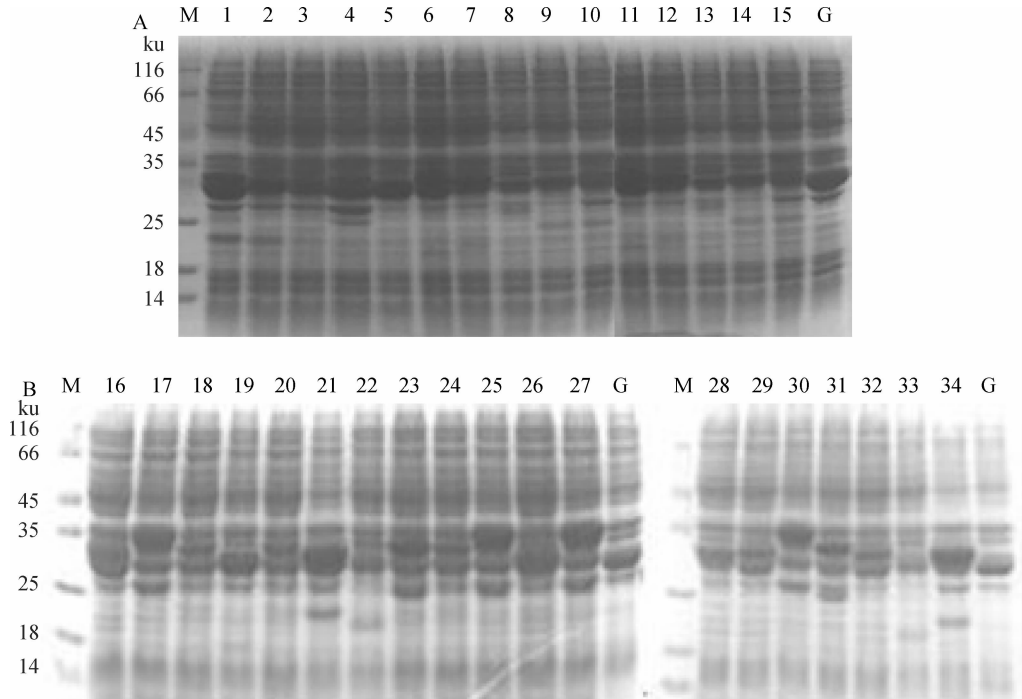
表 2 结构蛋白截短表达引物
Table 2 Primers for structural protein short peptides

名称 Name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature
VP(1-53)	VPU(1-53): GGC GCGGATCCATGTCTACTTTTTT TAGAT VPL(1-53): CCGCTCGAGTTAAAAGCCCCGATTA	57.3
VP(35-100)	VPU(35-100): CGCGGATCCTCTCAGTCTGTGTCTC VPL(35-100): GGGCCGCTCGAGTTATTTTATATATGGAT	56.7
VP(81-136)	VPU(81-136): CGCGGATCCCTTGAACACGACAA VPL(81-136): GGGCCGCTCGAGTTATGGCTCTAAGATAC	56.2
VP(124-161)	VPU(124-161): CGCGGATCCAAGGCTGTATTT CAGGC VPL(124-161): CCGCTCGAGTTACGGGTAATGGTCAG	54.2
VP(146-198)	VPU(146-198): CGCGGATCCACGGCACCTGCAA VPL(146-198): GGGCCGCTCGAGTTATTCAGATGCTGCCAC	60.7
VP(199-256)	VPU(199-256): CGCGGATCCATGGCAGAGGGAGGAG VPL(199-256): GGCCGCTCGAGTTAAATTGCTTTGTAGATGTGG	60.3
VP(237-284)	VPU(237-284): CGCGGATCCACAAAGACCACCAGAAC VPL(237-284): CCGCTCGAGTTAGTGGAAGCGGTTGA	57.3
VP(267-329)	VPU(267-329): CGCGGATCCCAGTATGCAGGATACA VPL(267-329): CCGCTCGAGTTATGCAATGGTCTTTGTT	56.4
VP(310-366)	VPU(310-366): CGCGGATCCAAGATCTTCAATGTCCA VPL(310-366): CCGCTCGAGTTAATAGACATCCGACGG	57.7
VP(347-409)	VPU(347-409): CGCGGATCCCCGTATGTCCTGGGCT VPL(347-409): GCCGCTCGAGTTACTCAAAGTTGTTGCCTGTTC	60.3
VP(391-443)	VPU(391-443): CGCGGATCCTTCTACTGCTTAGAGTAC VPL(391-443): CCGCTCGAGTTAATTCAGAGGTATTG	54.1
VP(423-491)	VPU(423-491): CGCGGATCCTTCGCTCATTACAG VPL(423-491): CCGCTCGAGTTAATAGTTGTCTGTTCCCTCCTG	57.2
VP(468-519)	VPU(468-519): CGCGGATCCC GCAATTGGCTGCCAG VPL(468-519): CCGCTCGAGTTACGCTGACACAGGTCCGGGT	60.5
VP(496-548)	VPU(496-548): CGCGGATCCATCTGGAGTAATGGG VPL(496-548): CCGCTCGAGTTATGTAGTGCTGCCAGAT	56.2
VP(531-595)	VPU(531-595): CGCGGATCCGCTCAA AATATTTTAGG VPL(531-595): CCGCTCGAGTTAAAGA ACTTCCAGATCTG	55.1
VP(574-635)	VPU(574-635): CGCGGATCCG GTAGGACTGTAACGGA VPL(574-635): CCGCTCGAGTTAGCCAAATCCTCCGAG	57.1
VP(616-669)	VPU(616-669): CGCGGATCCGCAAAAATACCGAAGAC VPL(616-669): CCGCTCGAGTTACTGAGTTATGTAGGAATTCCA	57.9
VP(647-694)	VPU(647-694): CGCGGATCCAATACACCAGTGCCTGCA VPL(647-694): CCGCTCGAGTTATTCTGGGTTCCATCTCTTTGAA	57.9
VP(678-732)	VPU(678-732): CGCGGATCCGAGATGGTGTGGGAGCT VPL(678-732): GGGGGGCCGCTCGAGTTACAGATTTTGAGTTAG	56.4

3 讨论

在本试验中主要应用基因表达分析法对 GPV

H1 株非结构蛋白和结构蛋白进行抗原表位作图。这种方法是指采用 PCR 方法将相互重叠的 DNA 片段分别克隆至一种简单的、但是能够高效表达的

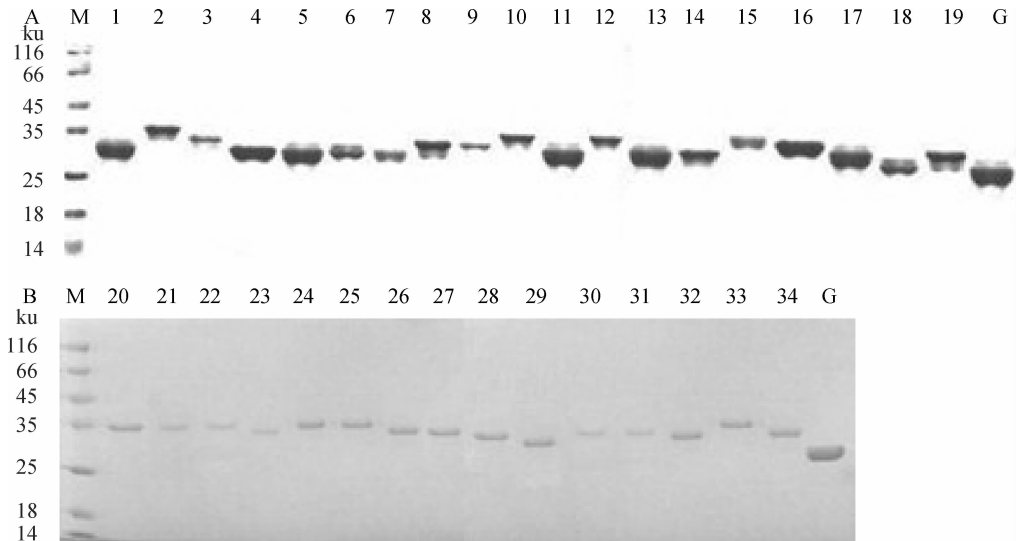


M. 中等分子量蛋白标准; G. GST 对照; 1~15. NS(1-60)~NS(575-627); 16~34. VP(1-53)~VP(678-732)

M. Middle molecular mass marker; G. GST control; 1-15. NS(1-60)-NS(575-627); 16-34. VP(1-53)-VP(678-732)

图 1 NS1(A)和 VP1(B)截短表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of NS1(A) and VP1(B) truncated fusion protein

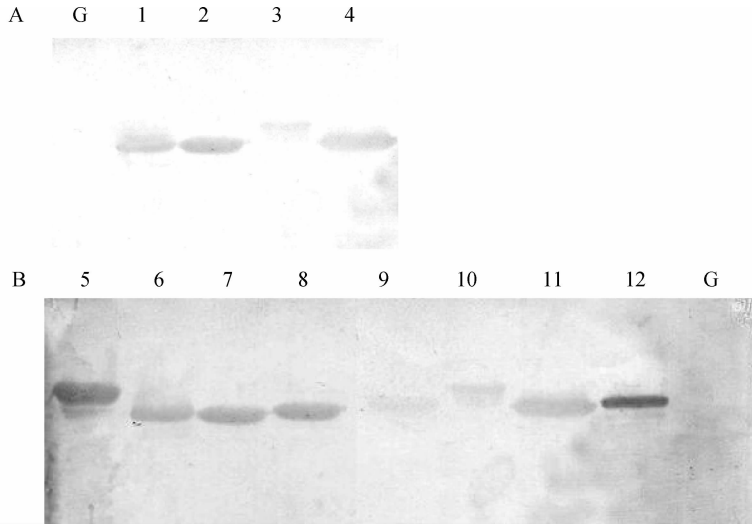


M. 中等分子量蛋白标准; G. GST 对照; 1~19. VP(1-53)~VP(678-732); 20~34. NS(1-60)~NS(575-627)

M. Middle molecular mass marker; G. GST control; 1-19. VP(1-53)-VP(678-732). 20-34. NS(1-60)-NS(575-627)

图 2 NS1 和 VP1 截短蛋白纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of NS1 and VP1 purified truncated fusion protein



G. GST 对照; 1. NS(453-514); 2. NS(485-542); 3. NS(533-598); 4. NS(575-627); 5. VP(35-100); 6. VP(81-136); 7. VP(124-161); 8. VP(146-198); 9. VP(423-491); 10. VP(531-595); 11. VP(616-669); 12. VP(678-732)

G. GST control; 1. NS(453-514); 2. NS(485-542); 3. NS(533-598); 4. NS(575-627); 5. VP(35-100); 6. VP(81-136); 7. VP(124-161); 8. VP(146-198); 9. VP(423-491); 10. VP(531-595); 11. VP(616-669); 12. VP(678-732)

图3 NS1(A)和VP1(B)截短表达蛋白抗原性的Western blot分析

Fig. 3 Western blot analysis of reactivity of NS1(A) and VP1(B) truncated fusion proteins

细菌表达载体中(如含有谷胱甘肽S转移酶GST基因的载体),最后对表达的融合蛋白应用蛋白免疫印迹法进行抗原性检测^[15]。应用该方法在其他病毒蛋白抗原表位的研究中已有成功的先例^[16-17]。

目前结构蛋白抗原表位的相关研究较少,如VP1第1-198氨基酸残基具有抗原性^[18-19];第145-198和231-732氨基酸残基具有抗原性,198-231氨基酸残基之间的肽段中没有线性抗原表位^[20-21],上述研究结果与本试验所鉴定的一些表位位置相符合。NS蛋白还未见有关抗原表位的报道。

研究表明,GPV非结构蛋白抗体在感染初期开始出现,而结构蛋白抗体至感染6~8周才开始出现^[18],因此本试验中所应用的血清为攻毒10周的鹅血清。Wang等^[18]证明在大肠杆菌中表达的GPV非结构蛋白NS1可以作为检测抗原,进而可以鉴别使用重组结构蛋白作为疫苗免疫的水禽和自然感染水禽。本试验所鉴定的NS1蛋白抗原表位区在理论上也可以作为鉴别诊断抗原,且因为蛋白肽段更短,灵敏性应该比全长非结构蛋白作为检测抗原更高,特别是485-542氨基酸抗原区,具有良好的应用前景;Wang等^[18]表达了编码GPV VP1氨基端的1-198氨基酸残基的基因片段,经Western

blot检测发现易感禽在感染GPV6周后才会产生能与该融合蛋白结合的抗体,所以Wang等认为该重组诊断抗原可以用于检测晚期感染鹅。本试验鉴定的位于该位置的抗原表位区是否可用于GPV感染的晚期诊断有待于进一步试验证明。

本试验中所鉴定的GPV非结构蛋白和结构蛋白的线性抗原表位仍需进一步的精确定位,结合单克隆抗体技术对抗原表位的特性研究正在进行中,其中NS(485-542)、VP(35-100)、VP(81-136)、VP(124-161)、VP(146-198)和VP(678-732)等反应性较强的片段所反映的分子生物学意义需要进一步阐明。相信绘制的GPV H1株非结构蛋白和结构蛋白的线性抗原表位图谱,为揭示抗原分子的结构与功能的关系以及研制以短肽替代庞大的蛋白全长氨基酸序列,设计更为有效的基因工程疫苗提供线索、奠定基础,给建立基于抗原表位水平的特异性诊断方法提供有益帮助。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997:1 165-1 167.
- [2] FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus taxonomy [M]. VIIIth report of the ICTV.

- London: Elsevier/Academic Press, 2004.
- [3] 方定一. 小鹅瘟的介绍[J]. 中国兽医杂志, 1962, 8: 19-20.
- [4] BROWN K E, GREEN S W, YOUNG N S. Goose parvovirus-an autonomous member of the dependovirus genus? [J]. *Virology*, 1995, 210: 283-291.
- [5] ZADORI Z, STEFANCSIK R, RAUCH T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2 [J]. *Virology*, 1995, 212: 562-573.
- [6] ZADORI Z, JUDITH E, NAGY J, et al. Characteristics of the genome of goose parvovirus [J]. *Avian Pathol*, 1994, 23: 359-364.
- [7] 曹虹, 贡树基, 赵卫, 等. 人微小病毒 B19 感染的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 332-338.
- [8] WU Z, ASOKAN A, SAMULSKI R J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(3): 316-327.
- [9] 周斌, 刘祥, 陈溥言. 猪细小病毒分子诊断技术与基因工程疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 39(2): 54-57.
- [10] 李昌文, 仇华吉, 童光志. 猪细小病毒研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(1): 36-38.
- [11] TRUYEN U. Evolution of canine parvovirus-a need for new vaccines [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(1): 9-13.
- [12] 王君伟, 李勤, 马波, 等. 鹅细小病毒 NS1 基因的克隆及原核表达[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(1): 10-13.
- [13] 马波, 王君伟, 李洪涛, 等. 鹅细小病毒 VP1 基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(12): 7-10.
- [14] 布日额. GPV VP 及 NS 基因克隆及原核表达产物的研究应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.
- [15] HARLOW E, LANE D. 抗体实验技术指南[M]. 沈关心等译. 北京: 科学出版社, 2002: 232-242.
- [16] SUN T, LU P, WANG X. Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes [J]. *J Virol Methods*, 2004, 119(2): 79-86.
- [17] SEAH J N, YU L, KWANG J. Localization of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus. Nucleocapsid protein [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 75(1): 11-16.
- [18] WANG C Y, SHIEH H K, SHIEN J H, et al. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays [J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(5): 376-382.
- [19] 布日额, 王君伟, 吴金花, 等. 鹅细小病毒 VP1 与 VP3 非重叠序列的克隆与原核表达[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(10): 3-6.
- [20] 邵昱昊, 王静, 王懂帅, 等. 鹅细小病毒 VP 基因片段的原核表达及抗血清的制备[J]. 中国病毒学, 2006, 21(6): 581-584.
- [21] 王静, 王懂帅, 韩宗玺, 等. 鹅细小病毒 VP1 基因片段的原核表达及抗血清的制备[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 788-792.