

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.12.001

# 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白的原核表达及多抗制备

牛 铮<sup>1,2</sup>, 徐沙沙<sup>1</sup>, 张静怡<sup>1</sup>, 张依玲<sup>1</sup>, 阚子斐<sup>1</sup>,  
张淑娟<sup>1</sup>, 邹 宏<sup>1</sup>, 邹卓岚<sup>1</sup>, 冉 玲<sup>1</sup>, 宋振辉<sup>1,2</sup>

1. 西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 西南大学 医学研究院免疫学研究中心, 重庆 荣昌 402460

**摘要:** 猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)是冠状病毒中的重要成员,也是引起猫传染性腹膜炎的主要病原。参考 GenBank 数据库中 FIPV 核衣壳蛋白基因序列,设计特异性引物,以病料组织中提取的 RNA 为模板,反转录成 cDNA,通过 PCR 特异性扩增 N 基因序列,将其克隆至 pMD19-T 载体并转化至 Trans5 $\alpha$  感受态细胞,经筛选、菌液 PCR 与限制酶双酶切鉴定后,获得重组克隆质粒 pMD19-T-N。以 pMD19-T-N 为模板,亚克隆 N 基因,将其与 Pet-28a 载体连接后转化至表达菌株 Rosetta 感受态细胞,完成 Pet-28a-N 重组表达质粒的构建。用 IPTG 诱导 N 蛋白表达,将纯化后的重组 N 蛋白皮下多点注射免疫比利时兔,制备多克隆抗体。最终通过 Western-Blot 与免疫组化技术检测多克隆抗体的特异性。FIPV N 蛋白多克隆抗体的制备,为猫传染性腹膜炎的进一步研究及临床治疗提供了必备的实验材料。

**关键词:** 猫传染性腹膜炎病毒; 蛋白表达和纯化; 多克隆抗体  
制备; 特异性鉴定

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2021)12-0001-09

## Prokaryotic Expression of N Protein of Feline Infectious Peritonitis Virus and Preparation of Polyclonal Antibodies

NIU Zheng<sup>1,2</sup>, XU Shasha<sup>1</sup>, ZHANG Jingyi<sup>1</sup>,  
ZHANG Yiling<sup>1</sup>, KAN Zifei<sup>1</sup>, ZHANG Shujuan<sup>1</sup>,  
ZOU Hong<sup>1</sup>, ZOU Zhuolan<sup>1</sup>, RAN Ling<sup>1</sup>, SONG Zhenhui<sup>1,2</sup>

1. School of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. Immunology Research Center, Institute of Medical Research, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

**Abstract:** FIPV (feline infectious peritonitis virus), an important member of coronavirus, is the main cause

收稿日期: 2021-04-07

基金项目: 科技部引智计划基金资助项目(G20190022030); 重庆市研究生科研创新项目(CYS19137); 中央高校基本业务专项(XDJK2020RC001)。

作者简介: 牛 铮, 硕士研究生, 主要从事兽医微生物学与免疫学的研究。

通信作者: 宋振辉, 副教授, 硕士研究生导师。

of infectious peritonitis in cats. In this study, specific primers were designed by referring to the nucleocapsid protein gene *N* sequence of FIPV in GenBank database. Using the RNA extracted from diseased tissues as the template, the *N* gene sequence was amplified by RT-PCR, and cloned into pMD19-T vector and transformed into Trans5 $\alpha$  competent cells. The recombinant plasmid pMD19-T-N was successfully constructed after antibiotics resistance gene screening, PCR and double enzyme digestion. Using pMD19-T-N as the template, *N* gene was subcloned, and linked with Pet-28a vector and transformed into Rosetta competent cells to construct the Pet-28a-N recombinant expression plasmid. The expression of *N* protein was induced by IPTG, and polyclonal antibodies were prepared by subcutaneous immunization of Belgian rabbits with the purified *N* protein. Finally, the specificity of the polyclonal antibodies was detected by Western Blot and immunohistochemistry. The preparation of FIPV *N* protein polyclonal antibodies provides necessary experimental materials for further study and clinical treatment of infectious peritonitis in cats.

**Key words:** feline infectious peritonitis virus; protein expression and purification; polyclonal antibody preparation; specificity identification

猫传染性腹膜炎病毒(FIPV)可导致猫科动物传染性腹膜炎(FIP)的发生,使猫科动物内脏器官出现肉芽肿病变、腹腔出现大量腹水以及腹膜出现炎症<sup>[1]</sup>. FIP 的流行病学特点是传染率和死亡率都比较高,感染途径主要是口鼻,经呼吸道、消化道或昆虫媒介进行传播<sup>[2]</sup>. 目前研究表明,猫传染性腹膜炎病毒是因猫冠状病毒发生突变而产生的<sup>[3]</sup>. 猫冠状病毒突变为猫传染性腹膜炎病毒后,在巨噬细胞内进行复制,然后脱离肠道转移至脏器或腹腔,从而引发传染性腹膜炎<sup>[4]</sup>. 迄今为止该病仅能做到在临床上缓解轻微症状,延长患猫的生命,但难以治愈<sup>[5]</sup>. 目前使用常规疫苗和重组疫苗对猫传染性腹膜炎进行预防均没有取得理想的效果. 研究发现, FIPV 的感染具有抗体依赖性增强现象<sup>[6]</sup>,而大部分猫体内都存在猫冠状病毒,如果接种强毒株反而会加剧猫传染性腹膜炎的发作.

猫传染性腹膜炎病毒主要编码了刺突蛋白、膜蛋白、小包膜蛋白和核衣壳蛋白 4 种结构蛋白<sup>[7]</sup>. 研究表明,冠状病毒的核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, *N* 蛋白)作为一个多功能蛋白,能包装病毒的基因组形成核糖核蛋白复合体,与病毒的基因组之间存在相互作用,这对病毒粒子的装配有重要影响<sup>[8]</sup>. 同时, *N* 蛋白作为免疫原性最强的蛋白,其对应的抗体是最早产生的,所以 *N* 蛋白常被用来作为早期诊断的指标<sup>[9]</sup>. 本实验在前人研究的基础上,对 FIPV 的 *N* 基因进行了克隆和原核表达,并以纯化后的重组 *N* 蛋白作为抗原皮下免疫比利时兔,制备出了相应的多克隆抗体. 旨在为进一步研究 *N* 蛋白的生物学功能奠定基础,同时丰富 FIPV 检测技术体系以及为 FIP 的进一步研究和临床治疗奠定基础. 此外有研究表明, FIPV 与猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)有相近的抗原性, FIP 病猫的血清和腹腔液中可检出对 TGEV 的高价中和抗体<sup>[10]</sup>. FIPV *N* 蛋白多抗的制备,也为进一步研究 FIPV 与 TGEV 之间的关系提供了可能.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

含 FIPV 病料收集自重庆市某动物医院患病致死猫. 经基因测序鉴定后,放置于-80 °C 速冻保存备用.

山羊抗鼠 HRP-IgG, 山羊抗兔 HRP-IgG 购自 BBI 公司, FIPV *N* 蛋白鼠源单克隆抗体为实验室保存; 氯霉素, 卡那霉素, DL 1 000 Marker, DL 5 000 Marker, DL 10 000 Marker, 2 $\times$ Taq Master Mix, Prime-Script<sup>TM</sup> RT Master Mix 购自 TaKaRa 公司; E. Z. N. A. <sup>TM</sup> Gel Extraction Kit DNA 购自 Omega Bio-tek 公司; Enhanced BCA Protein Assay Kit 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; LB 购自 Biowest 公司; 蛋白纯化试剂盒 ProteinIso Ni-NTA Resin 购自北京 Transgen 公司.

## 1.2 方 法

### 1.2.1 引物的设计与合成

根据 FIPV 转录组数据 N 基因的序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 并且在引物上增加限制酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 的酶切位点, 预计扩增片段长度为 967 bp, 上下游引物信息见表 1. 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

表 1 引物扩增序列

基因	引物序列	酶切位点
N	CGGAATTCATGGCCACACAGGGACAACG	<i>EcoR</i> I
	CGGTCGACCTAGGAATTGACTAGTTTTGGCATCATCCT	<i>Sal</i> I

### 1.2.2 FIPV 总 RNA 的提取及反转录

采用 Trizol 试剂分别对因患 FIPV 而致死的猫肝脏、肾脏、胃、小肠等组织的总 RNA 进行提取, 采用核酸测定仪检测总 RNA 的浓度和纯度, 以提取的 FIPV 总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ RT Master Kit 试剂盒说明合成 cDNA.

### 1.2.3 N 基因的克隆

以 FIPV 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系(12.5  $\mu$ L):  $2\times$  Taq Master Mix 6.25  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 4.25  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L. PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

按照 Omega Bio-tek 的 E. Z. N. A.™ Gel Extraction Kit DNA 胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收, 与 pMD19-T 载体进行连接, 转化 Trans5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含 16  $\mu$ L IPTG(24 mg/mL) 和 38  $\mu$ L X-GAL(20 mg/mL) 的 LB/Amp<sup>+</sup> 琼脂平板中, 于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 13 h, 然后对阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定.

### 1.2.4 N 蛋白的原核表达

将鉴定正确的质粒命名为 pMD19-T-N, 将 pMD19-T-N 和 Pet-28a 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 将酶切产物进行切胶回收纯化, 构建 Pet-28a-N 重组表达质粒, 经菌液 PCR、双酶切验证后, 转入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 LB(Kana<sup>+</sup>/Camr) 的液体培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡培养 3 h, 测菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8, 加入 IPTG 进行诱导, 具体浓度及时间见表 2, 将菌液于 4  $^{\circ}$ C, 7 500 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 超声波破碎, 分别收集上清和沉淀, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测. 检测到目的蛋白后, 再分别参照表 2 进行时间和 IPTG 浓度的优化.

表 2 不同表达条件

IPTG 诱导	菌 液								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
诱导浓度/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0
诱导时间/h	4	6	8	4	6	8	4	6	8

### 1.2.5 N 蛋白的纯化及鉴定

采用镍柱亲和层析的方法对重组蛋白进行纯化. 首先分别用 15 mL 包涵体洗涤液 I-V 重悬包涵体沉淀, 4  $^{\circ}$ C, 7 000 r/min 离心 20 min 后, 在包涵体中加入 30 mL(pH 值为 8.0)8 mol/L 尿素使其变性溶解, 静置过夜; 4  $^{\circ}$ C, 7 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 弃去沉淀, 上清用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤. 再参照 ProteinIso Ni-NTA Resin 的具体步骤进行蛋白纯化, SDS-PAGE 检测最适纯化结果, 以最佳咪唑浓度对蛋白进行纯化. 将纯化的 N 蛋白进行 Western Blot 鉴定(一抗为 FIPV N 蛋白鼠源单克隆抗体, 二抗为山羊抗鼠 HRP-IgG 抗体).

将洗涤后的包涵体用 PBS 缓冲液重悬, 具体步骤参照 Enhanced BCA Protein Assay Kit 试剂盒进行. 之后将处理后蛋白标准和包涵体沉淀按照 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ L 的体积加入到 SDS-PAGE 胶的泳道内进行跑胶.

跑胶完成后利用 Image J 软件计算出蛋白灰度值, 再根据公式  $C_{\text{测}} = \frac{C_{\text{标}} \times G_{\text{标}} \times V_{\text{测}}}{V_{\text{标}} \times G_{\text{测}}}$ , 测出重组 N 蛋白的浓度, 式中,  $C_{\text{测}}$  为待测蛋白浓度,  $G_{\text{测}}$  为待测蛋白灰度值,  $V_{\text{测}}$  为待测蛋白加样体积,  $C_{\text{标}}$  为标准蛋白浓度,  $G_{\text{标}}$  为标准蛋白灰度值,  $V_{\text{标}}$  为标准蛋白加样体积. 用洗涤过后的包涵体蛋白跑 SDS-PAGE 胶, 跑胶后 KCl 染色, 将目的蛋白的条带切下, 收集切下的目的蛋白条带于 50 mL 灭菌离心管内, 用组织匀浆器进行冰浴研磨, 直至研磨均匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用.

### 1.2.6 多克隆抗体的制备、特异性鉴定

选择 2 只健康的比利时雄兔在脊柱两侧皮下进行多点注射免疫, 采用 1, 15, 30, 45 d 的免疫周期, 免疫剂量为  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ . 首次免疫周龄为 12 周龄, 体质量为 2.5 kg. 免疫 30 d 后耳缘静脉采血 2 mL, 将装有血液的 EP 管呈  $45^{\circ}\sim 60^{\circ}$  度角于室温放置 1 h,  $4^{\circ}\text{C}$  静置过夜. 用移液枪将析出的血清转移至 1.5 mL EP 管内,  $4^{\circ}\text{C}$ , 2 500 r/min 离心 30 min, 分装至 PCR 管内, 封口膜封口后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用. 免疫后 45 d 于耳缘静脉采血 2 mL, 步骤同上.

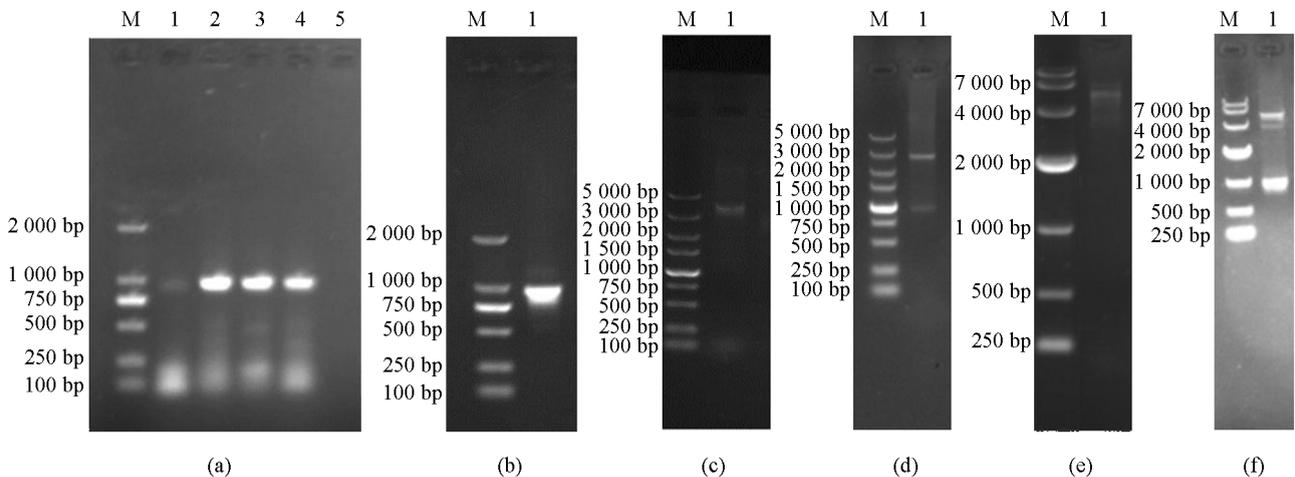
Western Blot 鉴定多克隆抗体与重组 N 蛋白的反应性. 将制备的多克隆抗体用 TBST 按 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:6 000 的比例稀释作为一抗. 将山羊抗兔 HRP-IgG 用 TBST 按 1:5 000 的比例稀释作为二抗.

以实验得到的多克隆抗体作为一抗对病死猫的低温恒冷组织切片进行免疫组织化学实验以验证其是否具有特异性, 并以实验室保存的 FIPV 鼠源单克隆抗体制备的免疫组化切片作为阳性对照. 本实验中, FIPV 鼠源单克隆抗体使用山羊抗鼠 HRP-IgG, 制备的 FIPV 鼠源多克隆抗体使用山羊抗兔 HRP-IgG 作为二抗, 最后使用 DAB 显色液进行显色、染色.

## 2 实验结果

### 2.1 N 基因的克隆及原核表达载体的构建

分别对病死猫肝脏、肾脏、胃、小肠等组织进行检测, 电泳检测显示所有组织的 PCR 产物中均可见 1 条约 967 bp 特异性条带(图 1a). 将该序列克隆至 pMD19-T 载体, 测序结果显示序列长度为 3 659 bp(含限制性内切酶识别序列和保护碱基); 通过 ORF Finder 预测 N 基因的开放阅读框, 可知该基因从第 1 个碱基到第 1 131 个碱基为一个完整的 CDS, 共编码 377 个氨基酸, 编码的蛋白为 N 蛋白. 将该 CDS 序列克隆至 Pet-28a 表达载体, 经双酶切鉴定, 结果表明目的基因成功连接到 Pet-28a 载体上(图 1).



M 为 DNA 相对分子质量标准; (a) N 基因的 PCR 产物扩增(1 为肝脏, 2 为肾脏, 3 为胃, 4 为小肠, 5 为阴性对照); (b) N 基因胶回收鉴定(1 为回收 N 基因); (c) pMD19-T-N 质粒的鉴定(1 为阳性重组 pMD19-T-N 质粒); (d) pMD19-T-N 质粒的双酶切鉴定(1 为双酶切重组质粒 pMD19-T-N); (e) 重组 Pet-28a-N 质粒的鉴定(1 为阳性重组 Pet-28a-N 质粒); (f) Pet-28a-N 质粒的双酶切鉴定(1 为双酶切重组质粒 Pet-28a-N).

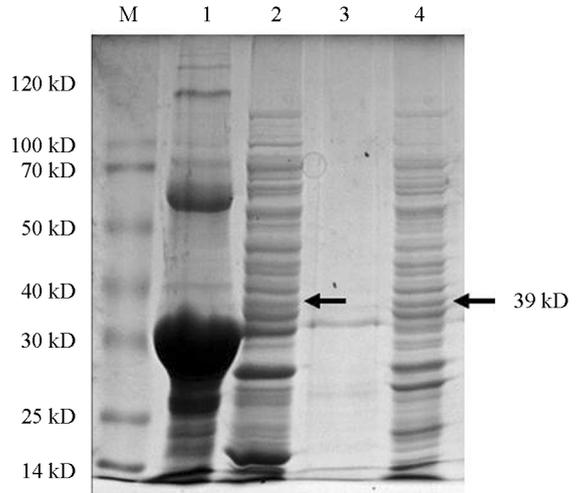
图 1 pMD19-T-N 与 Pet-28a-N 质粒的构建

## 2.2 N 蛋白的表达形式及条件优化

将阳性重组质粒 Pet-28a-N 转化至大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞后, 在 IPTG 诱导下重组 N 蛋白以包涵体形式表达, 蛋白的大小约为 39 kD, 与理论预测值相符(图 2). 对诱导表达条件进行优化, 诱导温度为 16 °C, 诱导时间为 8 h, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时为诱导最佳条件, 目的蛋白表达效率最高(图 3 和图 4).

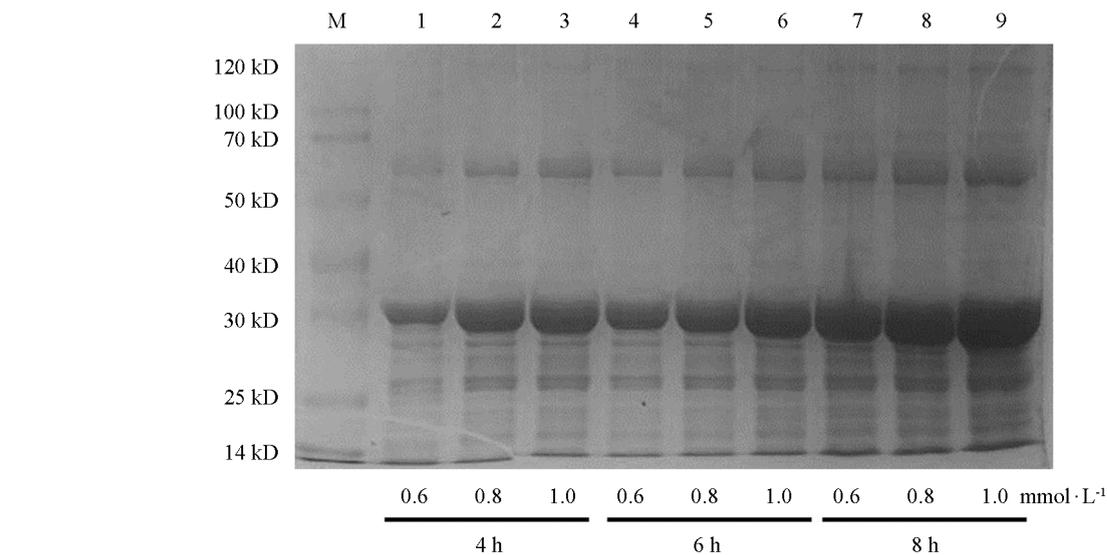
## 2.3 N 蛋白的纯化及鉴定

利用优化的条件大量诱导表达重组蛋白, 参照 Transgen 的 ProteinIso Ni-NTA Resin 对变性后的 N 蛋白进行 4 次纯化, 结果如图 5. 洗脱后经检测在 39 kD 处有目的蛋白, 与预期大小相符. 将纯化的 N 蛋白进行 Western-Blot 鉴定, 结果显示, 在 39 kD 处出现的目的条带, 与实际的 N 蛋白大小一致(图 6).



M 为蛋白相对分子质量标准. 1 为 Pet-28a-N 诱导表达破碎后沉淀; 2 为 Pet-28a-N 未诱导上清; 3 为 Pet-28a-N 诱导表达破碎后上清; 4 为 Pet-28a(空载体)诱导破碎后上清.

图 2 重组 N 蛋白的 SDS-PAGE 分析



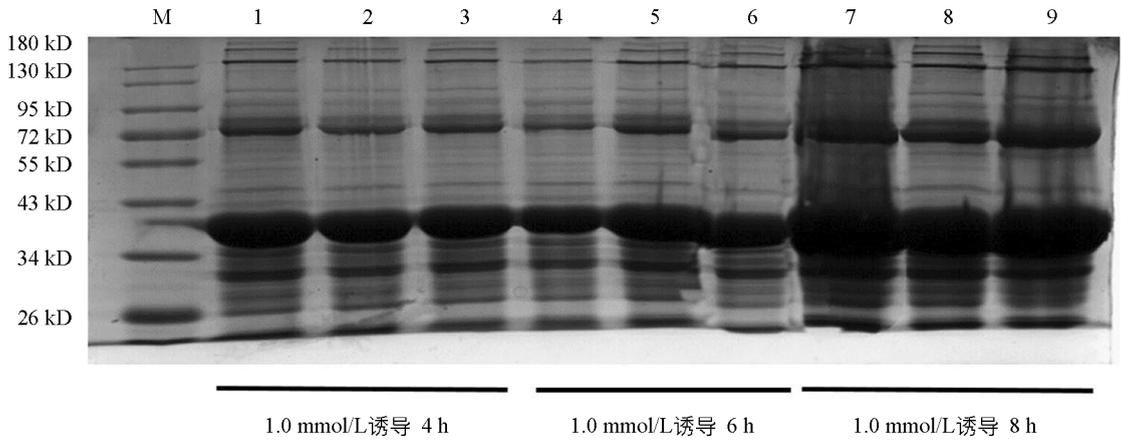
M 为蛋白相对分子质量标准. 1~9 为 Pet-28a-N 诱导沉淀, 其中 1,4,7 为由 0.6 mmol/L IPTG 诱导, 分别在 4,6,8 h 下产生的沉淀; 2,5,8 为由 0.8 mmol/L IPTG 诱导, 分别在 4,6,8 h 下产生的沉淀; 3,6,9 为由 1.0 mmol/L IPTG 诱导, 分别在 4,6,8 h 下产生的沉淀.

图 3 重组 N 蛋白表达条件初筛

## 2.4 包涵体总蛋白与 N 蛋白浓度的测定

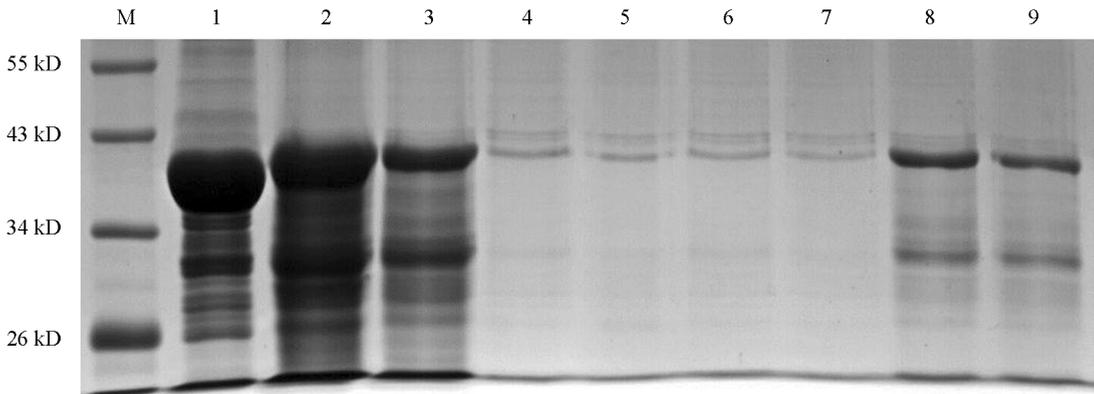
参照 Enhanced BCA Protein Assay Kit 试剂盒测包涵体总蛋白浓度, 标准曲线如图 7.  $R^2 = 0.9984$ , 表明拟合程度较好, 根据标准曲线方程计算出包涵体总蛋白的浓度为 1 320  $\mu\text{g/mL}$ .

将处理后的标准蛋白和包涵体沉淀按照 2,4,6,8,10  $\mu\text{L}$  的体积加入到 SDS-PAGE 胶的泳道内, 结果如图 8. 利用 Image J 软件, 由灰度比和加样体积定量出 N 蛋白浓度为 950  $\mu\text{g/mL}$ .



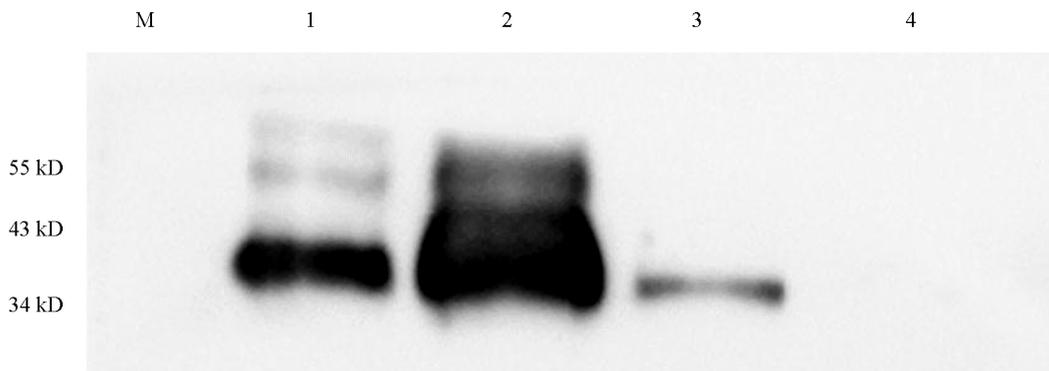
M为蛋白相对分子质量标准. 1~9为1.0 mmol/L IPTG诱导Pet-28a-N产生的沉淀,其中1,2,3为在4 h下产生的沉淀;4,5,6为在6 h下产生的沉淀;7,8,9为8 h下产生的沉淀.

图 4 重组 N 蛋白表达条件复筛



M为蛋白相对分子质量标准. 1为未纯化的包涵体蛋白;2为第1次洗脱液;3为第2次洗脱液;4,5,6和7为洗涤液;8为第3次洗脱液;9为第4次洗脱液.

图 5 重组蛋白 N 的纯化



M为蛋白相对分子质量标准. 1为过柱纯化第1次洗脱液;2为过柱纯化第2次洗脱液;3为切胶纯化蛋白;4为空载体阴性对照.

图 6 重组蛋白 N 的鉴定

## 2.5 多克隆抗体特异性鉴定

以采取到的耳缘静脉血清稀释后作为一抗、山羊抗兔 HRP-IgG 稀释后作为二抗, Western-Blot 检测多克隆抗体与重组 N 蛋白的反应性, 结果如图 9. 不同稀释度的多克隆抗体均能与重组 N 蛋白反应, 表明家兔 3 免后可产生有效抗体, 与重组 N 蛋白反应性良好, 稀释度可达 1 : 6 000. 同时也发现, 在将血清与 TBST 按照 1 : 4 000 的比例进行稀释后, 抗体的反应性最好.

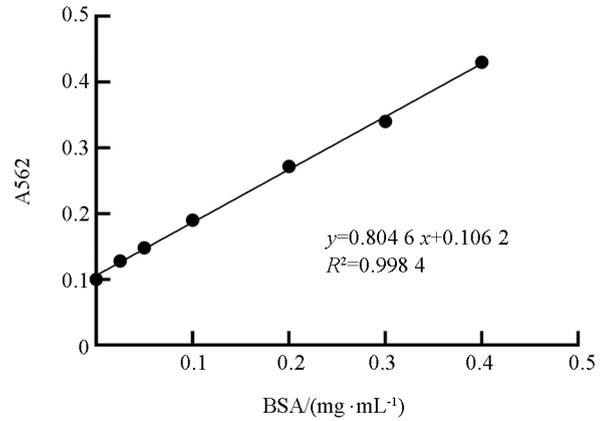
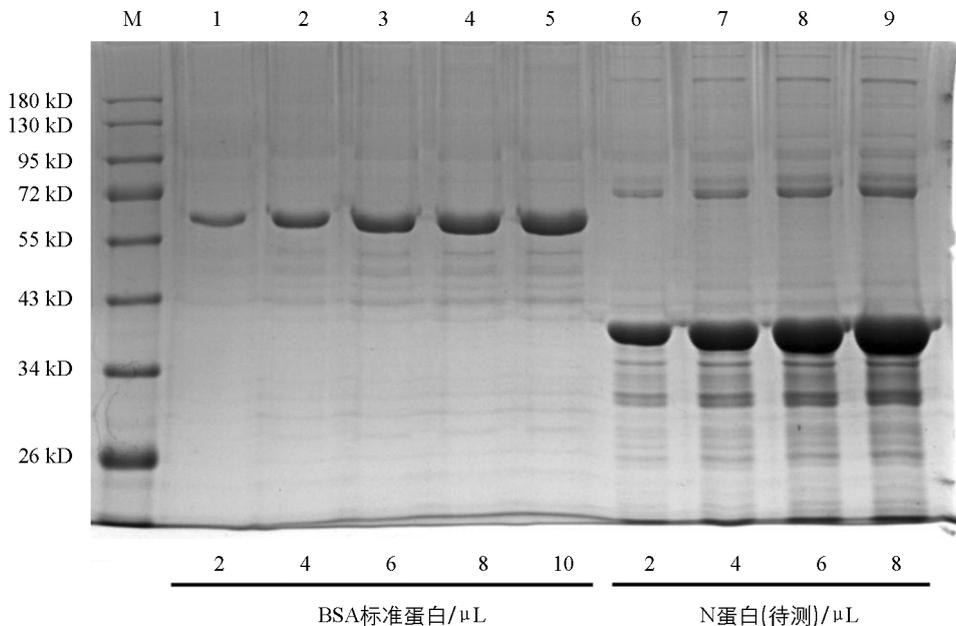


图 7 包涵体总蛋白浓度的测定



M 为蛋白相对分子质量标准. 1,2,3,4,5 分别为 2,4,6,8,10  $\mu\text{L}$  BSA 标准蛋白; 6,7,8,9 分别为 2,4,6,8  $\mu\text{L}$  待测重组 N 蛋白.

图 8 重组 N 蛋白浓度的测定

查阅 DAB 染液说明可知, 经过 DAB 染液染色后 HRP 二抗呈现棕色. 将病变的肝脏组织免疫组化切片放在显微镜下观察, 可在病变组织表层黏膜处发现明显阳性结果(图 10), 因此可证明本实验制备的多克隆抗体能够较好地与 FIPV 特异性结合.

## 3 讨论

抗体作为一种研究工具, 在目前的诊断、科研以及医学治疗等工作中起到举足轻重的作用<sup>[11]</sup>. 多克隆抗体是针对各种抗原决定簇产生的, 其优点是制备周期相对较短, 并且应用广泛, 包括抗原物质的鉴别、定位、分析和纯化, 以及作为疾病的诊断、检疫试剂和治疗制剂等<sup>[12]</sup>. 因此, 在科研领域中多克隆抗体的使用相对较多.



抗体, 为下一步包被 N 蛋白建立间接 ELISA 检测未知抗体或包被纯化后的多克隆抗体建立双夹心法 ELISA 检测未知抗原打下坚实基础. N 基因的表达为进一步研究 N 蛋白在感染过程中的作用机理及基因工程亚单位疫苗的研制奠定了基础. 然而, 重组 N 蛋白的纯化与复性的条件、多克隆抗体纯化方式的优化还需要进一步研究.

### 参考文献:

- [1] 军事医学科学院实验动物中心. 实验动物病毒性疾病 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [2] 师志海, 邢会杰, 张一帆, 等. 猫传染性腹膜炎的诊断与防治 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(8): 48-49.
- [3] KIPAR A, MELI M L. Feline Infectious Peritonitis; Still an Enigma [J]. Veterinary Pathology, 2014, 51(2): 505-526.
- [4] 张 丽, 李月勤, 宋予震, 等. 猫传染性腹膜炎的研究进展 [J]. 现代牧业, 2017, 1(4): 51-53.
- [5] ADDIE D, BELÁK S, BOUCRAUT-BARALON C, et al. Feline Infectious Peritonitis: ABCD Guidelines on Prevention and Management [J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(7): 594-604.
- [6] PEDERSEN N C, LIU H, DODD K A, et al. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis [J]. Viruses, 2009, 1(2): 166-184.
- [7] MYRRHA L W, SILVA F M, PETERNELLI E F, et al. The Paradox of Feline Coronavirus Pathogenesis; a Review [J]. Advances in Virology, 2011(12): 109849.
- [8] 宋振辉, 卿家超, 程方俊, 等. 猪传染性胃肠炎病毒核衣壳蛋白(N)在昆虫细胞中的表达及病毒样颗粒的观察 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(5): 7-12.
- [9] 谭菲菲, 韦祖樟, 袁世山. 套式病毒目病毒核衣壳蛋白的结构与功能研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(9): 984-988.
- [10] 李 健, 陈 沁, 王 权, 等. 猫冠状病毒和猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(11): 32-34.
- [11] 贾慧娜, 罗海玲. 多克隆抗体制备方法的研究进展 [J]. 中国草食动物科学, 2012, 32(S1): 66-69.
- [12] 陈筱侠. 制备多克隆抗体所用动物的选择 [J]. 上海实验动物科学, 1997, 17(4): 248-249.
- [13] CHEN S C, VAN DEN BORN E, VAN DEN WORM S H, et al. New Structure Model for the Packaging Signal in the Genome of Group IIa Coronaviruses [J]. J Virol, 2007, 81(12): 6771-6774.
- [14] 刘 博. 大肠杆菌稳定期特异性启动子的筛选及 pSP 表达载体的构建 [D]. 大连: 大连理工大学, 2007.
- [15] 付明娟, 林接玉, 谢捷明. 包涵体蛋白复性的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(20): 3657-3659.
- [16] 史林启. 自组装分子伴侣及调控蛋白质折叠 [C] // 中国化学会 2017 全国高分子学术论文报告会论文集. 成都, 2017.
- [17] 冯延叶. 变性蛋白复性装置研制及包涵体蛋白变性和复性技术研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [18] 黄 博. 人 *qki* 基因启动子克隆及 TNF 对 *qki* 基因转录调控的初步研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2007.
- [19] 陈 飞, 吴香菊, 齐 静, 等. 口蹄疫病毒 3C 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(1): 71-75.

责任编辑 周仁惠