

猪瘟病毒 p80 基因丝氨酸蛋白酶功能区的原核表达及小鼠免疫试验

鲁 絮^{1,2}, 许信刚^{2*}, 张彦明², 张淼涛², 李少方²

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 根据已发表的猪瘟病毒 Alfort 株的全基因组序列, 设计 2 对引物以 Shimen 细胞毒株为材料, 一步法提取总 RNA, 利用 RT-PCR 和套式 PCR, 成功扩增出 p80 全长基因, 包括丝氨酸蛋白酶以及 NTPase/ RNA 解旋酶功能区, 大小约为 2.0kb。将 p80 基因中的丝氨酸蛋白酶基因克隆到原核表达载体 pET-32a 中, 获得重组质粒 pET-p80。将重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)中, IPTG 诱导表达得到分子量约为 43ku 的目的蛋白, 与理论大小相符。将菌体蛋白经 Ni 柱纯化, 获得纯化重组 p80 蛋白, Western blot 检测表明, 表达的目的蛋白能与 CSFV 阳性血清发生反应。用纯化的 p80 蛋白免疫 Bal b/c 小鼠, 成功制备了抗 p80 蛋白的抗血清。

关键词: 猪瘟病毒; p80 基因; 原核表达; 免疫

中图分类号: S852.651

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)06-0014-05

Expression of Serine Proteinase Functional Domain of p80 Gene of CSFV in *E. coli* and Mice Immune Test

LU Xu^{1,2}, XU Xin-gang^{2*}, ZHANG Yan-ming², ZHANG Miao-tao² and LI Shao-fang²

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Two pairs of primers were designed based on the sequence of CSFV Alfort strain. Serine protease and NTPase/ RNA helicase functional domain, about 2.0kb of p80 genes of CSFV Shimen strain were amplified by RT-PCR and nPCR. Serine protease gene was cloned into prokaryotic expression vector pET-32a. The inserted position, the orientation and the ORF of the recombinant plasmids pET-p80 were proven to be correct by PCR, restriction enzyme digestion and sequence analysis. The about 42ku target protein was expressed in *E. coli* Rosetta(DE3) induced with IPTG. Western blotting showed that the expressed proteins could be recognized by CSFV positive serum. Balb/c mice were injected in abdomen with purified p80 protein and its antiserum was made successfully.

Key words: CSFV; Shimen strain; p80 gene; Prokaryotic expression; Immune

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)是影响畜牧业生产最重要的病原体之一。CSFV 属于黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(*Pestivirus*),其 RNA 是线状单股正链,约 12.3 kb,

含有单一的开放阅读框架(ORF),从 5' 端到 3' 端,CSFV 的 ORF 可顺次翻译 C(p14)、Erns(gp48)、E1(gp33)和 E2(gp55)4 种结构蛋白以及七种非结构蛋白 Npro、P7、NS2-3、NS4A、

收稿日期: 2007-04-13

修回日期: 2007-06-15

基金项目: 农业部畜禽病毒学重点开放实验室资助课题; 2005 西北农林科技大学博士科研启动经费(编码 01140507)。

作者简介: 鲁 絮(1983-),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事病毒分子生物学研究。

* 通讯作者: 许信刚。Email: xuxingangzhangqi@yahoo.com.cn

NS4B、NS5A 和 NS5B。NS3 蛋白具有丝氨酸蛋白酶^[2]、NTPase^[3]、RNA 解螺旋酶活性^[4],它的丝氨酸蛋白酶活性与下游一系列非结构蛋白的加工有关,NTPase、解螺旋酶活性在病毒基因组复制中起一定的作用^[5]。非致细胞病变型(noncytopathogenic, nCP)瘟病毒在其感染宿主细胞内只表达 NS2-3 聚蛋白(p 125),而在致细胞病变型(cytopathogenic, CP)瘟病毒感染的细胞中,NS2-3 聚蛋白被加工成 NS2(p 54)和 NS3(p80),因此非结构蛋白 p80 可作为 CP 型瘟病毒在蛋白质水平上的分子标志^[6~8]。为了进一步研究 p80 蛋白与 CSFV 致 CPE 的关系,需要研制出 p80 蛋白的单克隆抗体,来检测 CSFV 感染时 p80 蛋白在发生 CPE 的细胞与不发生 CPE 的细胞中的表达情况。本试验克隆了 p80 基因的全长基因将其进行了原核表达,Western blotting 检测表明该重组蛋白能与猪瘟阳性血清中的 p80 抗体特异性结合,同时用纯化的重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠,成功制备了抗 p80 蛋白的抗血清。为下一步制备 p80 蛋白单克隆抗体提供了基础材料,也为进一步深入研究非结构蛋白 p80 在 CSFV 复制以及 CSFV 致细胞病变中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株、质粒及试验动物

CSFV Shimen 株购自中国兽药监察所。受体菌 DH5 α 、JM109、载体 pET-32a 为农业部畜禽病毒学重点开放实验室保存。大肠杆菌 Rosetta 菌株由武汉大学病毒所馈赠。pMD-18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司。Balb/c 小鼠购自西安交通大学医学院。

1.2 主要试剂

TRIZOL 试剂盒购自 Invitrogen 公司。Ex-TaqDNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶 *Sac*I、*Xho*I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL2000、蛋白低分子量 Marker 购自大连宝生物工程有限公司。X-gal、IPTG、溶菌酶、反转录酶(M-MLV)购自 Promega 公司。DNA 快速纯化回收试剂盒及质粒微量提取试剂盒购自安徽优晶公司。猪瘟阳性血清购自中国兽药监察所。辣根过氧化物酶标记的鼠抗猪 IgG 及羊抗鼠 IgG 购自北京博奥森公司,His-Bind purification Kit 购自 Novagen 公司。

1.3 引物设计与合成

根据 Shimen 株全基因序列,分别在 p80 基因的起始密码子上游和终止密码子下游设计两对引物 P1、P2 和 P3、P4,进行 PCR 和套式 PCR 扩增 p80 基因。上游引物 P1:5'-TAGAGTTCTG-TAACACCTTGCTG-3',下游引 P2:5'-AGGC-TACTATCAACGCATTCTCAG-3'。套式 PCR 上游引物 P3:5'-GAGCTCGGGCCTGC-CGTTTGCAAG A -3',(下划线处为 *Sac*I 酶切位点)下游引物 P4 5'-CTCGAGCTAGAC-CAACTACCTGTTTGA GTGCTCTGC-3'(下划线处为 *Xho*I 酶切位点)。

1.4 病毒 RNA 提取、p80 基因 RT-PCR 扩增及其产物鉴定

依据参考文献[9]的方法,参照 Invitrogen 公司的 TRL ZOLR LS Reagent 的 Total RNA isolation system 进行。在 0.5 mL PCR 反应管中加入总 RNA 悬液 10.5 μ L、P2(50 pmol/ μ L)1.0 μ L,混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,迅速冰浴 5 min 后加入 5 $\times$ 反转录酶缓冲液 4 μ L、RNasin(50 u/ μ L)0.5 μ L、2.5 mmol dNTP Mixture 2 μ L、反转录酶(AMV)(10 u/ μ L)1 μ L、DEPC 处理水 2 μ L,42 $^{\circ}$ C 水浴反应 1 h。取反转录产物 5 μ L,10 $\times$ PCR buffer 5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L,10 mmol/L dNTP 4 μ L,引物 P1 和 P2 各 1 μ L,加水至 50 μ L,进行 PCR 扩增。反应条件 98 $^{\circ}$ C 8 min 后加 0.5 μ L TaqDNA 聚合酶,然后 95 $^{\circ}$ C 1 min,48 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,32 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。二扩反应条件取一扩产物 5 μ L,加入引物 P3 和 P4 各 1 μ L。反应条件为:98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 原核表达载体 pET-p80 的构建及原核表达

纯化回收 PCR 产物,与 pMD18-T 载体连接并转化感受态细胞 DH5 α ,筛选阳性克隆。将阳性重组质粒用 *Sac*I 和 *Hind* III 进行双酶切,凝胶回收丝氨酸蛋白酶基因片段 580 bp,再将丝氨酸蛋白酶基因亚克隆到原核表达载体 pET-32a 上,并进行 PCR 及酶切分析鉴定。阳性克隆送宝生物工程(大连)公司测序,以确定插入位置、方向、读码框的正确性。含正确插入目的基因的重组质粒分别命名为 pET-p80。阳性质粒转化到大肠杆菌 Rosetta(DE3)中,接种含氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的 LB 培养

基,37℃摇床中以 220 r/min 振培至 OD600 达到 0.6~1.0,加入 IPTG 至终浓度为 2.5 mmol/L,继续培养。

1.6 表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

取诱导后的细菌悬液 1 mL,离心后加 PBS 液 50 μ L 悬浮,再加等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,煮沸裂解 10 min 后上样 20 μ L,进行 SDS-PAGE 电泳并进行考马斯亮蓝染色(以未经 IPTG 诱导的重组质粒转化菌为对照)。将 SDS-PAGE 凝胶,直接用 Bio-rad 电转移装置将其转印于 PVDF 膜(0.45 μ m)上(100 V 湿法转移 1.5 h),转印结束后,进行 Western blotting。一抗使用猪瘟高免血清(1:100),二抗使用辣根过氧化物酶标记的鼠抗猪 IgG(1:2000),最后用 DAB 显色。

1.7 表达蛋白的纯化及动物免疫试验

应用 Novagen 公司的 His-Bind purification Kit 纯化目的蛋白,具体步骤参照试剂盒说明书进行。用纯化的融合蛋白免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠 8 只。免疫剂量和免疫程序如下:第 1 d,50 μ g 抗原加弗氏完全佐剂两侧腹股沟皮下注射;第 14 天,100 μ g 抗原加弗氏不完全佐剂颈背部皮下多点注射;第 28 天,100 μ g 抗原不加佐剂腹腔注射;7 d 后采血测抗体效价,当效价符合要求后(以间接 ELISA 法检测,抗体效价在 105 以上),最后再用 100 μ g 抗原尾静脉加强免疫,3 d 后摘眼球放血收集抗血清,分装冻存于-70℃备用。应用间接 ELISA 检测小鼠血清抗体的效价。用 2 μ g/mL 抗原包被酶标板,倍比稀释的待测血清作为一抗,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(1:1000),最后用 TMB 显色,于波长 450 nm 处,用 TECAN 酶标仪测各孔 A 值,A 值>阴性对照的 2.1 倍,即为阳性。

2 结果与分析

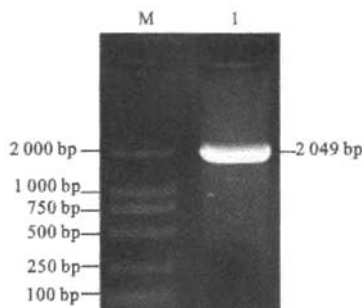
2.1 p80 基因 PT-PCR 扩增

用特异性引物 P1/P2 和 P3/P4,做 RT-PCR 和 nPCR 扩增出了约 2.0 kb 大小的一条带(图 1),与预期扩增的基因片段大小相符。

2.2 克隆载体 pMD18-T-p80 的 PCR 和酶切鉴定

从平板上挑单菌落,提取质粒,经 PCR 扩增,产物大小大约为 2 000 bp。经 *Sac* I 和 *Xho* I 双

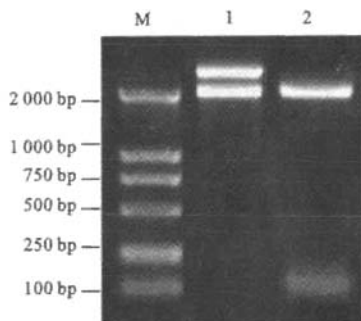
酶切,得到大小约为 2 000 bp 和 2 600 bp 的两个片段,与预期结果一致,证明含 p80 基因的重组质粒 pMD18-T-p80 构建成功(图 2)。



DNA 分子质量标准,DL2000 maker; p80 基因的 RT-PCR 扩增产物,RT-PCR product of p80

图 1 NS3 的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR product of p80 gene



M:DL2 000 DNA 分子质量标准,Marker DL2 000;1: pMD18-T-p80 双酶切产物,Restriction analysis of pMD18-T-p80;2: pMD18-T-p80 的 PCR 产物,PCR products of pMD18-T-p80

图 2 重组质粒 pMD18-T-p80 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-p80

2.3 重组原核表达载体 pET-p80 的酶切鉴定

将插入 p80 丝氨酸蛋白酶基因的重组质粒以 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切,结果得到约为 5 900 bp 和 580 bp 的两个片段(图 3)。测序结果表明插入基因的位置、方向以及读码框均正确。

2.4 p80 蛋白的诱导表达、SDS-PAGE 电泳及蛋白纯化

用 IPTG 诱导后 4 h 表达量达到最高。SDS-PAGE 分析结果显示,在 43 ku 处可见一条含量丰富的蛋白条带,与推测的目的蛋白大小相符(图 4),初步表明 p80 丝氨酸蛋白酶基因表达成功。将经 Ni 柱亲和层析纯化的融合蛋白,经 SDS-PAGE 及薄层扫描分析表明,融合蛋白的纯度在

90%以上(图 4)。经紫外线吸收法检测表明,融合蛋白的浓度约为 0.5 mg/mL。

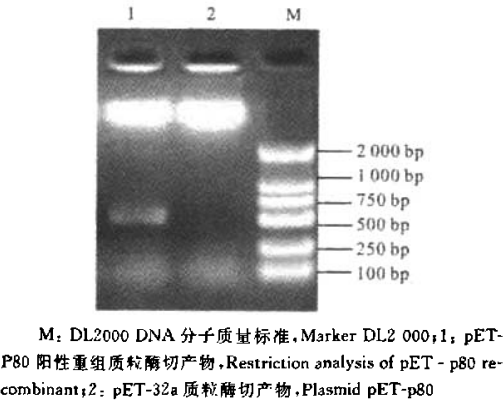


图 3 原核表达载体 pET- P80 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-p80

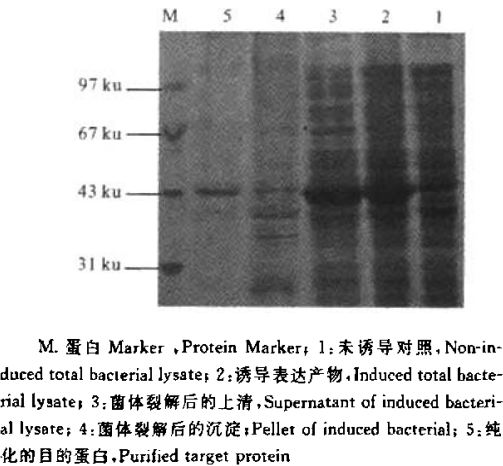


图 4 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 4 SDS-PAGE detection of protein expressed in *E. coli*

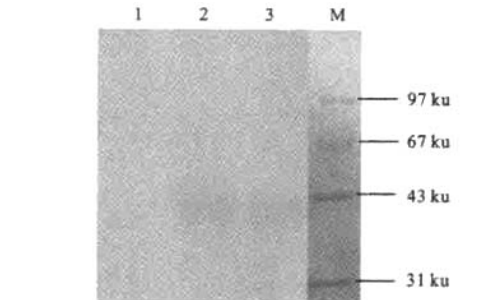


图 5 表达蛋白的 Western blotting 检测结果

Fig. 5 Western blotting detection of protein expressed in *E. coli*

2.5 Western blot 分析及抗血清效价的测定

Western blotting 显色结果表明,经诱导的重组质粒转化菌,在 43 kd 处出现一条特异条带,而对照的未诱导菌无条带(图 5)。证明该融合蛋白可被 CSFV 阳性血清中的 p80 抗体所识别。应用间接 ELISA 法检测,结果表明小鼠抗血清效价达到 5×10^5 以上。

3 讨论

猪瘟病毒 NS3 基因是一个高度保守的基因,它编码的 p80 蛋白不仅在病毒 RNA 复制和多聚糖蛋白的加工过程中具有重要作用,而且在病毒与宿主细胞的相互作用中似乎也扮演了一个十分重要的角色。Myers^[12]、Tautz^[13]等在体外构建了 CT 型和 nCP 型瘟病毒 RNA 复制子,并在体外经细胞转录来研究瘟病毒对细胞致病变作用的机制,结果表明宿主细胞中 p80 的表达或者超量表达与细胞发生病变之间有着非常重要的联系。那么,究竟是瘟病毒 p80 蛋白单独表达或超量表达就可以导致宿主细胞发生 CPE,还是 p80 与病毒其他蛋白共同作用而导致宿主细胞发生病变,目前未见报道。笔者认为,猪瘟病毒感染猪血管内皮细胞的病理变化,很可能是由 CSFV 基因表达的 p 125 加工成 p80 所引起的。那么,p125 加工成 p80 和 p 54 是由 CSFV 本身的蛋白酶或是内皮细胞的酶在起作用呢?笔者认为,将 p125 加工成 p80 和 p54 是由猪血管内皮细胞产生的酶在起作用(不管这种酶起直接作用或是起间接作用)。这个假设是不是成立,就需要通过试验来检验猪瘟病毒感染猪血管内皮细胞后是否在其中能产生 p80 蛋白,而感染其他猪源细胞不能在其中产生 p80 蛋白。这就需要研制 p80 蛋白单克隆抗体来进行检测。

本试验克隆了 p80 基因的全长基因将其进行了原核表达。在原核表达过程中,目的基因的长短是决定目的蛋白表达量的重要因素之一,在预试验中本来想表达完整的 p80 全长蛋白,但是效果不理想。最后实验选取了 p80 基因保守性极强的丝氨酸蛋白酶基因活性功能区段进行了表达。Western blotting 检测表明该重组蛋白能与猪瘟阳性血清中的 p80 抗体特异性结合,而且表达产量较高。同时用纯化的重组蛋白免疫 Bal b/c 小鼠,成功制备了抗 p80 蛋白的抗血清。为下一步制备 p80 蛋白单克隆抗体提供了基础材料,也为

进一步深入研究非结构蛋白 p80 在 CSFV 复制以及 CSFV 致细胞病变中的作用奠定了基础。

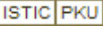
参考文献:

- [1] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L, *et al.* Flaviviridae[J]. Arch Virol Suppl, 1991, (2): 223~233.
- [2] Wiskerchen M M, Collett M S. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing[J]. Virol, 1991, 184: 341~350.
- [3] Tamura J K, P Warrenner, Collett M S. RNA-stimulated NTPase activity associated with p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus[J]. Virol, 1993, 193: 1~10.
- [4] Warrenner P, Collett M S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity[J]. Virol, 1995, 69: 1720~1726.
- [5] Baohua G, Liu Changbao, Juili Lin-Goerke. The RNA Helicase and Nucleotide Triphosphatase Activities of the Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Protein Are Essential for Viral Replication[J]. Virol, 2000, 74: 1794~1800.
- [6] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestivirus[J]. Adv Virus Res, 1996, 47: 53~118.
- [7] Meyers G, Thiel H J, Rumenapf T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles[J]. Virol, 1996, 70: 1588~1595.
- [8] Beate M, Kummerer, Meyers G. Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viability and Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone[J]. Virol, 2000, 74: 390~400.
- [9] 庄淑珍, 刘湘涛, 韩雪清, 等. 猪瘟病毒 p80 基因 NTPase/RNA 解旋酶功能区在 *E. coli* 中的表达[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 12~15.
- [10] Meyers G, Thiel H J. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles[J]. Virol, 1995, 69: 3683~3689.
- [11] Tautz N, Harada T, Kaiser A, *et al.* Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons [J]. Virol, 1999, 73: 9422~9432.

试验

作者: 鲁絮, 许信刚, 张彦明, 张森涛, 李少方, LU Xu, XU Xin-gang, ZHANG Yan-ming, ZHANG Miao-tao, LI Shao-fang

作者单位: 鲁絮, LU Xu(中国农业科学院兰州兽医研究所, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州, 730046; 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100), 许信刚, 张彦明, 张森涛, 李少方, XU Xin-gang, ZHANG Yan-ming, ZHANG Miao-tao, LI Shao-fang(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100)

刊名: 西北农业学报 

英文刊名: ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA

年, 卷(期): 2007, 16(6)

参考文献(11条)

1. [Francki R I B;Fauguet C M;Knudson D L Flaviviridae 1991\(02\)](#)
2. [Wiskerchen M M;Collett M S Pestivirus gene expression:p80 of the bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing 1991](#)
3. [Tamura J K;P Warrenner;Collett M S RNA-stimulated NTPase activity associated with p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus 1993](#)
4. [Warrenner P;Collett M S Pestivirus NS3 \(p80\) protein possesses RNA helicase activity 1995](#)
5. [Baohua G;Liu Changbao;Juili Lin-Goerke The RNA Helicase and Nucleotide Triphosphatase Activities of the Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 Protein Are Essential for Viral Replication 2000](#)
6. [Meyers G;Thiel H J Molecular characterization of pestivirus 1996](#)
7. [Meyers G;Thiel H J;Rumenapf T Classical swine fever virus:recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles 1996](#)
8. [Beate M;Kummerer;Meyers G Correlation between Point Mutations in NS2 and the Viabilityand Cytopathogenicity of Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon Analyzed with an Infectious cDNA Clone 2000](#)
9. [庄淑珍, 刘湘涛, 韩雪清, 张彦明, 张永国, 薛青红, 冯卫权, 谢庆阁 猪瘟疫病毒p80基因NTPase/RNA解旋酶功能区在 E. coli中的表达\[期刊论文\]-病毒学报 2003\(3\)](#)
10. [Meyers G;Thiel H J Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles 1995](#)
11. [Tautz N;Harada T;KaiserA Establishmentand characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons 1999](#)

本文读者也读过(10条)

1. [贾洪林. 仇华吉. 李娜. 朱庆虎. 罗玉子. 童光志. JIA Hong-lin. QIU Hua-ji. LI Na. ZHU Qing-hu. Luo Yu-Zi. TONG Guang-zhi 猪瘟Erns基因在大肠杆菌中的高效表达\[期刊论文\]-中国预防兽医学报2005, 27\(3\)](#)
2. [鲁絮. 张彦明. 许信刚. LU Xu. ZHANG Yan-ming. XU Xin-gang 猪瘟疫病毒石门株NS3基因在大肠杆菌中的表达\[期刊论文\]-西北农林科技大学学报\(自然科学版\)2007, 35\(2\)](#)
3. [常华. 花群义. 段纲. 杨云庆. 周晓黎. 董俊. 尹尚莲. 项勋. 曾昭文. CHANG Hua. HUA Qun-yi. DUAN Gang. YANG Yun-qin. ZHOU Xiao-li. DONG Jun. YING Shang-lian. XIANG Xun. ZENG Zhao-wen 非洲猪瘟疫病毒VP73基因克隆及在大肠杆菌中的高效表达\[期刊论文\]-中国生物工程杂志2006, 26\(11\)](#)

4. [吕宗吉, 涂长春, 余兴龙, LU Zong-ji, TU Chang-chun, YU Xing-long](#) [猪瘟病毒基因组结构与功能的研究进展](#)[期刊论文]-[广东畜牧兽医科技](#)2001, 26(4)
5. [庄淑珍, 刘湘涛, 韩雪清, 张彦明, 张永国, 薛青红, 冯卫权, 谢庆阁](#) [猪瘟病毒p80基因NTPase/RNA解旋酶功能区在E. coli中的表达](#)[期刊论文]-[病毒学报](#)2003, 19(3)
6. [周顺, 李俊, 温建新, Zhou Shun, Li jun, Wen Jianxin](#) [猪瘟病毒E2蛋白部分抗原区基因在原核系统的分泌表达与鉴定](#)[期刊论文]-[中国动物检疫](#)2010, 27(8)
7. [黄茜华, 张楚瑜, Huang Qianhua, Zhang Chuyu](#) [猪瘟病毒石门株NS5A基因的序列测定及同源比较](#)[期刊论文]-[华中农业大学学报](#)1999, 18(2)
8. [高华峰, 李富祥, 张念祖, 李华春, GAO Hua-feng, LI Fu-xiang, ZHANG Nian-zu, LI Hua-chun](#) [猪瘟病毒Erns基因的克隆及原核表达](#)[期刊论文]-[动物医学进展](#)2007, 28(2)
9. [鲁絮, 张彦明, 郑增忍, 穆杨, 龚振华, 李葳, 徐浩, 余欣, LU Xu, ZHANG Yan-ming, ZHENG Zeng-ren, MU Yang, GONG Zhen-hua, LI Wei, XU Hao, YU Xin](#) [抗猪瘟病毒NS3\(p80\)蛋白单克隆抗体的制备及其特性鉴定](#)[期刊论文]-[中国预防兽医学报](#)2008, 30(6)
10. [程晓盈, 张彦明, 王\(韦\)华, 邢福珊, 郭抗抗, 洪海霞, CHENG Xiao-ying, ZHANG Yan-ming, WANG Wei, XING Fu-shan, GUO Kang-kang, HONG Hai-xia](#) [猪瘟病毒E2基因的克隆及原核表达](#)[期刊论文]-[西北农林科技大学学报\(自然科学版\)](#) 2005, 33(12)

引用本文格式: [鲁絮, 许信刚, 张彦明, 张淼涛, 李少方, LU Xu, XU Xin-gang, ZHANG Yan-ming, ZHANG Miao-tao, LI Shao-fang](#) [猪瘟病毒p80基因丝氨酸蛋白酶功能区的原核表达及小鼠免疫试验](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(6)