

徐铮, 马晓莉, 林彦星, 等. 猪圆环病毒 2 型重组衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及免疫原性分析[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 1-5.

猪圆环病毒 2 型重组衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及免疫原性分析

徐 铮¹, 马晓莉², 林彦星³, 董建国¹, 王 磊¹, 刘燕玲¹, 刘清神¹, 宋长绪¹

(1 国家生猪种业工程技术研究中心/华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 实验动物中心, 广东 广州 510642; 3 深圳出入境检验检疫局 动植物检验检疫技术中心, 广东 深圳 518045)

摘要:【目的】在昆虫细胞表达猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 衣壳蛋白 (Cap), 并对表达的重组蛋白*Cap 进行免疫原性分析。【方法】将含有 *PCV2-ORF2* 基因的重组杆状病毒质粒 Bacmid-ORF2 转染昆虫细胞进行蛋白表达试验, 再用纯化的*Cap 和质粒 pcDNA3.1-ORF2 分别免疫小鼠, 比较二者的免疫效果。【结果】由 *PCV2-ORF2* 基因编码的 Cap 结构蛋白在昆虫细胞中正确表达, 相对分子质量约为 32 000。*Cap 能够被 PCV2 阳性血清所识别, 具有良好的抗原性。*Cap 免疫组在细胞免疫水平及体液免疫水平的免疫效果均优于 pcDNA3.1-ORF2 免疫组。【结论】重组蛋白*Cap 可替代全病毒, 具有 PCV2 疫苗潜在的应用价值。研究结果为后续的 PCV2 病毒分子诊断、亚单位疫苗以及分子生物学等研究奠定试验基础。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; 衣壳蛋白; 重组杆状病毒质粒; 表达; 免疫
中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0001-05

Expression and immunogenicity of recombinant capsid protein of porcine circovirus type 2 in insect cells

XU Zheng¹, MA Xiaoli², LIN Yanxing³, DONG Jianguo¹, WANG Lei¹, LIU Yanling¹, LIU Qingshen¹, SONG Changxu¹
(1 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Laboratory Animal Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 Inspection and Quarantine Center for Animals and Plants, Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

Abstract: 【Objective】To express the capsid protein (Cap) of porcine circovirus type 2 (PCV2) in insect cells and analyze the immunogenicity of recombinant protein. 【Method】The established recombinant bacmid containing fused *ORF2* gene (Bacmid-ORF2) was transfected into insect cells for protein expression test, and then the purified *Cap and pcDNA3.1-ORF2 plasmid were immunized mice respectively to compare their immunological effects. 【Result】The Cap structural protein encoded by *PCV2-ORF2* gene was correctly expressed in insect cells, and the relative molecular mass was about 32 000. *Cap could be recognized by PCV2 positive serum and had good antigenicity. The immue effect of *Cap group was better than that of pcDNA3.1-ORF2 group in both cellular immunity and humoral immunity levels. 【Conclusion】The recombinant protein *Cap can replace the whole virus and may have potential application values of PCV2 vaccinum. These results

收稿日期: 2017-10-25 优先出版日期: 2018-04-16
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180416.1032.026.html>
作者简介: 徐 铮 (1979—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: stonezen@scau.edu.cn; 通信作者: 宋长绪 (1965—), 男, 研究员, 博士, E-mail: cxsong@scau.edu.cn
基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划 (2015BAD12B02-5); 现代农业产业共性技术创新团队项目 (2016LM2150); 广东省科技计划 (2016A020212021, 2015B020230004); 广州市科技计划 (201508020062)

lay the foundation for the study of molecular diagnosis, subunit vaccine development and molecular biology research of PCV2.

Key words: porcine circovirus type 2; capsid protein; recombinant bacmid; expression; immune

自朗洪武等^[1]2001 年报道我国存在由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 感染导致的断奶仔猪多系统衰竭综合症 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 以来, 由 PCV2 感染引起的相关疾病在全国许多省市的猪场均有发生, 且呈不断蔓延趋势^[2-4], 引起养猪业的广泛重视。PCV2 主要导致猪只免疫系统受抑制^[5], 与多种病原菌混合感染引起严重病症^[6], 而且从临床症状很难做出准确诊断。受 PCV2 感染的细胞不呈现病变^[7], 获得的病毒培养物毒价较低, 抗原制备成本较高。昆虫杆状病毒表达系统具有外源蛋白易纯化、产量较高和免疫原性较好等特点^[8], 在抗原诊断上取得了长足进展, 得到国内外研究者的认同。

PCV2 病毒基因组主要包括 2 个开放的阅读框架 (ORF1 和 ORF2), 其中 ORF1 编码病毒蛋白复制酶 (Replicin protein, Rep)^[9], ORF2 编码病毒衣壳蛋白 (Capsid protein, Cap)^[10]。Cap 是 PCV2 的主要结构蛋白, 目前已成为检测 PCV2 特异性抗体比较理想的目标抗原^[11-13]。本研究将含有 *PCV2-ORF2* 基因的重组杆状病毒接种于昆虫细胞进行真核表达, 并将表达的纯化产物进行免疫小鼠对比试验, 以研究重组蛋白*Cap 的免疫原性, 为进一步研究 PCV2 免疫学特性和亚单位疫苗研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

重组 *PCV2-ORF2* 基因的杆状病毒 Bacmid-ORF2 和质粒 pcDNA3.1-ORF2(包含 ORF2 全阅读框) 由国家生猪种业工程技术研究中心构建、鉴定并保存^[14]; High five 昆虫细胞由中山大学生物防治国家重点实验室赠送; Sf9 昆虫细胞购自 Invitrogen 公司。

DMEM 细胞基础培养基 (高糖型) 购自 GIBCO 公司; Express Five[®] 昆虫细胞无血清培养基、Grace's 培养基和 L-谷氨酰胺购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为中国医学科学院生物工程研究所产品。

BALB/c 小鼠, SPF 级, 雄性, 6 周龄, 购自中山大学实验动物中心。

Cellfectin[®] 细胞转染剂、ProBond[™] 树脂色谱柱及相关试剂购自 Invitrogen 公司; 预染蛋白 Marker、HRP-羊抗 IgG 是晶美生物技术有限公司产品; 咪

唑为 Sigma 公司产品; 尿素购自北京鼎国生物技术有限公司; 去内毒素质粒大量抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; PCV2 抗体检测 ELISA 试剂盒为北京世纪元亨公司产品。

1.2 重组杆状病毒的获得

1.2.1 Sf9 昆虫细胞的转染和收获 在每个 35 mm (6 孔板) 的孔中加入 9×10^5 个 Sf9 细胞、含双抗的 Grace's 培养基 2 mL, 27 ℃ 贴壁生长至少 1~2 h, 用无抗生素的培养基清洗细胞 2 次; 在 100 μL 的无抗生素培养基中加入 5 μL Bacmid-ORF2 和 5 μL 细胞转染剂, 室温放置 30 min, 加入 0.8 mL 培养基, 轻轻混匀, 将脂质体-DNA 的混合物加到细胞表面, 27 ℃ 培养 5 h; 弃去转染混合物, 加入 2 mL 含抗生素的 Grace's 培养基, 28 ℃ 培养 72 h 后收获第 1 代 (P1 代) 种毒。

1.2.2 重组杆状病毒的扩增 以 P1 代重组种毒接种能高效表达的 High five 细胞以制备高滴度的第 2 代 (P2 代) 种毒。挑选处于对数生长期并且生长良好的 High five 细胞 (约 10^5 mL⁻¹), 吸弃培养基, 加入 P1 代重组种毒 20 μL 与 900 μL Express Five[®] 培养基 (含 w 为 10% 的 L-谷氨酰胺) 的混合液, 覆盖住细胞, 27 ℃ 静置 1~2 h, 每间隔 20 min 轻轻摇动培养瓶; 弃掉上清液, 加入 2 mL 含 5%(φ) 胎牛血清的 Express Five[®] 培养基 (含 w 为 10% 的 L-谷氨酰胺), 28 ℃ 培养 48 h 之后, 收集培养上清液, 分成小管于 4 ℃ 保存, 为 P2 代病毒液。

1.3 表达产物 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析

按文献^[15]的方法制胶, 将细胞轻轻吹下, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液加入 200 μL 2×SDS-PAGE Loading Buffer, 煮沸 5 min, 立即冷却; 细胞沉淀用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 200 μL 2×SDS-PAGE Loading Buffer, 将沉淀打散后煮沸 5 min, 立即冷却, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取 15 μL 用于 SDS-PAGE。

根据文献^[15]的方法安装转移装置, 将 SDS-PAGE 电泳的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜, 用含 5% (w) 脱脂奶粉的 TBS(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol·L⁻¹ NaCl) 缓冲液封闭, 以猪 PCV2 阳性血清为一抗、HRP-羊抗猪 IgG 为二抗, DAB 染色。

1.4 重组蛋白*Cap 的大量表达

昆虫细胞培养: 当 High five 细胞铺满细胞

瓶底时, 倒去原液, 加入新的 Express Five® 培养基(含 ϕ 为 10% 的胎牛血清, w 为 10% 的 L -谷氨酰胺, $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素), 按体积比 1:3 分瓶传代, 放入 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静止培养 3~5 d。将 3 瓶长成单层的细胞转入 1 个大细胞瓶中生长, 加入 100 mL 新的 Express Five® 培养液, 再用大细胞瓶按体积比 1:3 分瓶传代。

重组融合蛋白*Cap 的大量表达: 昆虫细胞分瓶后 24 h, 将 ϕ 为 0.5% 的 P2 代种毒液接种于 High five 昆虫细胞上, 放入 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静止培养 96 h, 收集细胞悬液。连续接毒数次, 收集所有细胞及悬液。

1.5 重组蛋白的纯化

参照 ProBond™ 试剂盒说明书进行操作。将收集的细胞悬浮于细胞缓冲液中, 通过 18 号针头, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集细胞液上清, 过柱, 将洗脱液加入到纯化后的重组蛋白中洗脱, 在缓冲液中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。透析后, 分装样品。

1.6 表达蛋白纯化效果检测

SDS-PAGE 电泳检测融合表达蛋白纯化效果。蛋白质质量浓度的测定: 用紫外分光光度计测定波长在 260 和 280 nm 的吸光度 (D), 按下式计算纯化样品中的蛋白质质量浓度 [ρ (蛋白质)]:

$$\rho(\text{蛋白质})=1.45D_{280\text{ nm}}-0.74D_{260\text{ nm}}^{\circ}$$

1.7 pcDNA3.1-ORF2 的大量制备

按照质粒大量抽提试剂盒 (HiPure Plasmid EF Maxi Kit) 说明书进行操作。细菌大量培养后, 经过重悬、裂解和过滤菌液, 将 HiPure EF Maxi Column 套在 50 mL 无菌收集管中, 逐步转移混合液至柱子中洗脱, $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 倒弃滤液, 加入 0.8 mL Buffer TE 至柱子膜中央, 静置 2 min, $7\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 再加入 0.4 mL Buffer TE 至柱子膜中央, $7\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃柱子, 把质粒保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.8 动物免疫试验

30 只 SPF 级雄鼠随机平均分为 3 组, 二次免疫在首次免疫后 10 d 进行, 三次免疫在二次免疫后 14 d 进行。a 组 (pcDNA3.1-ORF2) 在免疫前 3 d 分别在小鼠右后腿股四头肌注射 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸普鲁卡因 $50\text{ }\mu\text{L}$ 进行预处理, 使局部组织变性后再生, 以提高外源基因的表达, 正式免疫时于小鼠相同部位注射质粒 pcDNA3.1-ORF2, 每次免疫每只小鼠注射 $100\text{ }\mu\text{g}$ 。b 组首次免疫用弗氏完全佐剂和 *Cap 制成油乳剂疫苗进行腹腔免疫, 二次免疫和三次免疫使用弗氏不完全佐剂制成的油乳剂疫苗进

行腹腔免疫, 每次免疫每只小鼠注射 $100\text{ }\mu\text{g}$ 。c 组为 PBS 对照组, 于小鼠的右后腿股四头肌注射 PBS 缓冲液, 每次免疫每只小鼠注射 $100\text{ }\mu\text{g}$ 。断尾采血在二次免疫后 10 d 和三次免疫后 7 d 进行。

1.9 免疫小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖试验

三次免疫后第 7 天, 每组随机取 5 只小鼠, 无菌取脾, 在 DMEM 营养液中剪碎, 磨碎后 200 目筛过滤, 将细胞悬液加于等量的淋巴细胞分层液上层, $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸白色淋巴细胞层至另一无菌离心管, 用 DMEM 营养液洗涤 2 次, 离心, 用 DMEM(含 ϕ 为 10% 的小牛血清、双抗 $100\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 将细胞数调到 $1\times 10^7\text{ mL}^{-1}$ 。在 96 孔板中每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 脾细胞液, 同时加刀豆凝集素 ConA 至质量浓度为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱静置 36 h; 每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱静置 3~4 h; 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 10% (w) SDS- $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱静置 2 h; 在酶标仪上读取波长为 570 nm 时的吸光度 (D)。对各组 T 细胞活化数据 ($D_{570\text{ nm}}$) 进行统计学处理, 用 t 检验比较各分组之间差异的显著性。

1.10 小鼠血清抗体检测试验

将 ELISA 检测试剂盒中的二抗用 HRP-羊抗鼠 IgG 替换, 根据 ELISA 试剂盒使用说明书进行操作。

2 结果与分析

2.1 重组转染载体 Bacmid-ORF2 转染昆虫细胞

重组转染载体转染昆虫细胞后, 昆虫细胞逐渐发生改变, 细胞变大变圆, 细胞核变大, 几乎充满细胞, 产生明显的细胞病变, 96 h 后有些细胞溶解、破裂, 溶液中出现细胞碎片 (图 1)。

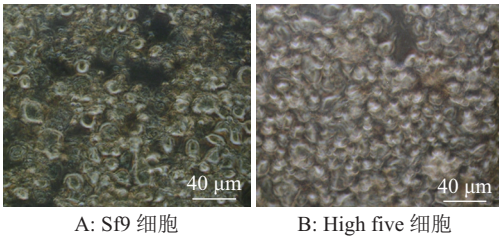


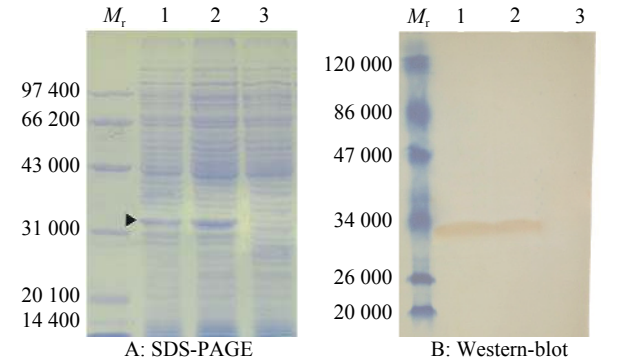
图 1 重组转染载体 Bacmid-ORF2 转染昆虫细胞后的细胞病变

Fig. 1 The cytopathic effect of insect cells transfected by recombinant transfection vector Bacmid-ORF2

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析

ORF2 阅读框编码的蛋白相对分子质量约为 28 000, 同时载体两端序列编码的短肽 (重组蛋白的 C'末端带有的 V5 抗原决定基和六聚组氨酸标记

序列) 相对分子质量约 4 000, 则理论上表达的目的蛋白相对分子质量应为 32 000 左右。重组病毒感染昆虫细胞以后, 用 SDS-PAGE 方法分析表达的蛋白, 比野生型对照组多出 1 条蛋白条带, 分子量与融合蛋白基本一致 (图 2A)。电泳产物电转移至硝酸纤维素膜, 进行 Western-blot 分析。结果显示: 硝酸纤维素膜上有 1 条明显的棕色印迹出现, 无非特异性条带出现, 野生型杆状病毒转染的昆虫细胞表达产物则无颜色反应条带 (图 2B), 说明表达产物抗原性良好。

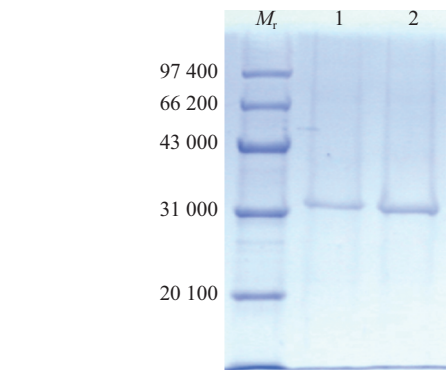


Mr: 标准分子量蛋白 Marker; 1、2: 重组杆状病毒转染 High five 细胞收获的蛋白; 3: 野生型杆状病毒转染 High five 细胞收获的蛋白

图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析
Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blot analyses of recombinant protein

2.3 重组融合蛋白*Cap 纯化效果检测

将收集到的纯化后的重组融合蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色, 结果表明, 纯化后的蛋白只在相对分子质量 32 000 处有 1 条非常明显的蛋白条带 (图 3), 说明重组蛋白已纯化。



Mr: 标准分子量蛋白 Marker; 1、2: 纯化后的重组蛋白
图 3 重组融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant fusion protein

2.4 纯化蛋白质质量浓度的测定

用紫外分光光度计测得该纯化蛋白在 280 和 260 nm 处吸光度并分别代入公式, 得到蛋白质质量浓度为 0.301 87 mg·mL⁻¹。

2.5 免疫小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖试验结果

在三次免疫后 1 周无菌取小鼠脾脏并分离脾淋巴细胞, 以 MTT 法测定其细胞免疫水平, 试验结果见表 1。ConA 能刺激试验组免疫鼠的 T 淋巴细胞增殖转化, 试验组 and 对照组测定结果差异极显著 ($P<0.01$), 表明淋巴细胞增殖, 且能够在病毒的细胞免疫中发挥一定作用, b 组的效果极显著优于 a 组 ($P<0.01$)。

表 1 免疫小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖试验结果
Tab. 1 The spleen T lymphocyte proliferation test results of immunized mice

组别	$D_{570\text{ nm}}^{1)}$
a组 (pcDNA3.1-ORF2)	0.017±0.003B
b组 (*Cap)	0.056±0.006A
c组 (PBS)	0.004±0.001C

1) 同列数据后凡是有一个相同大写字母者, 表示在 0.01 水平差异不显著(t 检验)

2.6 ELISA 检测小鼠血清中抗体结果

免疫小鼠分别在二次免疫后 10 d 和三次免疫后 7 d 断尾采血, 分离血清。用 ELISA 检测试剂盒测定小鼠血清中的抗体, 结果见表 2。a 组二次免疫后所测的 $D_{570\text{ nm}}$ 值与 c 组差别不大, 但 $D_{570\text{ nm}}$ 值在三次免疫后有所增大。b 组二次免疫后产生了特异性抗体, 且抗体免疫水平在三次免疫后略有升高。 t 检验分析显示三次免疫后 c 组和 a、b 2 组差异极显著 ($P<0.01$); 重组质粒制作的基因疫苗能够产生一定的免疫效果。相比之下*Cap 组能诱导小鼠产生特异性抗体, 而 pcDNA3.1-ORF2 组抗体滴度较低, 免疫效果不理想。

表 2 免疫小鼠血清抗体测定结果¹⁾
Tab. 2 The serum antibody test results of immunized mice

组别	二次免疫 $D_{570\text{ nm}}$	三次免疫 $D_{570\text{ nm}}$
a组 (pcDNA3.1-ORF2)	0.061±0.002B	0.091±0.002B
b组 (*Cap)	0.636±0.010A	0.652±0.012A
c组 (PBS)	0.054±0.003B	0.058±0.002C

1) 同列数据凡是有一个相同大写字母者, 表示在 0.01 水平差异不显著(t 检验)

3 讨论与结论

本研究采用的是昆虫杆状病毒表达系统, 在表达真核蛋白时, 可以进行蛋白的翻译后修饰, 使表达的产物更接近天然蛋白, 其优越性远超过细菌表达体系。在使用该系统进行蛋白表达的时候, 细胞系的选择很关键。本试验选用 Sf9 细胞进行病毒扩

增, 重组蛋白表达选用 High five 细胞。因为相比其他的昆虫细胞系, Sf9 细胞病毒扩增的能力比较强, 且容易转染, 易于得到大量重组病毒子。High five 细胞系是目前商业市场最好、表达量最高的细胞系, 其表达量要比 Sf9 细胞高 5~10 倍, 而且 High five 细胞系可以用无血清培养基培养, 方便表达产物的纯化。2000 年, 第 1 个利用昆虫杆状病毒表达系统生产的疫苗面市, 是表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组苗, 随后 2006 年一款名为“CircoFLEX”表达 PCV2-ORF2 蛋白的商业化重组杆状病毒亚单位疫苗问世, 至今已广泛应用^[16]。2009 年, 第 1 个利用昆虫杆状病毒表达系统生产的人用疫苗在美国上市^[17], 该疫苗以重组人乳头瘤状病毒 (Human papillomavirus, HPV)16、18 型 L1 蛋白为主要抗原。尽管该表达系统有着独特的优势, 但也存在一些不足, 如重组蛋白易降解等问题。昆虫杆状病毒表达系统本身就是一个裂解性的系统, 在蛋白质产生的每个阶段都有蛋白酶的分泌, 杆状病毒感染昆虫细胞后, 细胞本身的应激反应也产生蛋白酶, 并随细胞裂解释放出来, 这些蛋白酶会造成重组蛋白的降解。同时采用的无血清培养基缺少血清蛋白质的保护, 使蛋白质水解的问题更加严重^[18], 这或许是本试验重组蛋白表达量不高的原因。

本研究在已构建了成功表达 PCV2 外壳蛋白的重组昆虫杆状病毒的基础上, 将 PCV2 重组 Cap 蛋白杆状病毒在 High five 昆虫细胞中表达。经 SDS-PAGE 电泳可观察到特异性表达条带, 用 PCV2 阳性猪血清对 ORF2 基因重组杆状病毒表达蛋白进行 Western-blot 免疫检测分析, 结果显示重组表达蛋白在变性条件下仍可被 PCV2 多克隆阳性血清所识别, 印迹膜上接近蛋白相对分子质量部位呈现 1 条特异的显色条带, 而野生型杆状病毒表达蛋白无此反应条带, 表明所表达的重组蛋白*Cap 是特异的, 并且具有良好的抗原性。进一步用纯化的*Cap 和质粒 pcDNA3.1-ORF2 分别免疫小鼠, 发现*Cap 不论是在细胞免疫水平还是体液免疫水平其免疫效果均优于 pcDNA3.1-ORF2, 表明其具有 PCV2 疫苗潜在应用价值。

参考文献:

[1] 郎洪武, 王力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(3): 3-4.

[2] 吴佳俊, 张硕, 刘颖昳, 等. 我国种猪主要垂直传播性疾病流行态势分析及控制策略探讨[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(8): 14-16.

[3] 胡帅, 周庆安, 李军, 等. 2013—2014 年广西省主要猪病毒性传染病流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医, 2016, <http://xuebao.scau.edu.cn>

43(6): 1618-1623.

[4] 曹东阳, 王小敏, 钱爱东, 等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型 (PCV2) 分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390-398.

[5] ELLIS J. Porcine circovirus: A historical perspective[J]. Vet Pathol, 2014, 51(2): 315-327.

[6] GU J, XING G, LEI J, et al. Porcine circovirus type 2 and PCV2-systemic disease: A review[J]. Chin J Biotechnol, 2015, 31(6): 880-891.

[7] TISCHER I, RASCH R, TOCHTERMANN G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines[J]. Zentralbl Bakteriell Orig A, 1974, 226(2): 153-167.

[8] CHEN H, SHAFFER P L, HUANG X, et al. Rapid screening of membrane protein expression in transiently transfected insect cells[J]. Protein Expr Purif, 2013, 88(1): 134-142.

[9] SEGALÉS J, KEKARAINEN T, CORTEY M. The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?[J]. Vet Microbiol, 2013, 165(1/2): 13-20.

[10] 杨克礼, 时代, 段正赢, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 基因的克隆与原核表达[J]. 江西农业学报, 2017, 29(1): 96-101.

[11] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2000, 81(9): 2281-2287.

[12] NAWAGITGUL P, HARMS P A, MOROZOV I, et al. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(1): 33-40.

[13] 宋月, 姜艳萍, 崔文, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白在杆状病毒系统表达及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 36-41.

[14] 徐铮, 孙彦伟, 刘镇明, 等. 猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(4): 67-69.

[15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南[M]. 黄培堂, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[16] GEISLER C, JARVIS D L. Innovative use of a bacterial enzyme involved in sialic acid degradation to initiate sialic acid biosynthesis in glycoengineered insect cells[J]. Metab Eng, 2012, 14(6): 642-652.

[17] SOKOLENKO S, GEORGE S, WAGNER A, et al. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 766-781.

[18] DA SILVA JUNIOR H C, DA SILVA E MOUTA JUNIOR S, DE MENDONÇA M C L, et al. Comparison of two eukaryotic system for the expression of VP6 protein of rotavirus specie A: Transient gene expression in HEK293-T cells and insect cell-baculovirus system[J]. Biotechnol Lett, 2012, 34(9): 1623-1627.