

鸭源新城疫病毒 NP 蛋白的原核表达与间接 ELISA 方法的建立

程彦丽,刁有祥*,张 坤,杨建朋,国纪垒,肖 坡 (山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018)

摘要:根据 GenBank 发表的鸭源新城疫病毒 SDWF02 株 NP 基因序列,设计并合成 1 对特异性引物,扩增出鸭源新城疫病毒的 NP 基因,与原核表达载体 pET-28a 构建重组质粒 pET28a-NP,经鉴定后转化 Rosetta 感受态细胞,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 和 Western-blot 分析表明,54 000 的融合蛋白得以表达,该蛋白能与鸭源新城疫的阳性血清发生特异性的反应。以纯化的重组蛋白为包被抗原,建立检测鸭源新城疫抗体的间接 ELISA 方法,经方阵滴定确定最佳包被质量液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液,最佳包被质量浓度为 10 ng/孔,血清最佳稀释度为 1:1 000。经应用试验表明该方法具有良好的特异性、可重复性和敏感性,为临床检测鸭源新城疫抗体水平提供了一种简单、准确、快速的诊断方法。

关键词:鸭源 NDV;NP 蛋白;原核表达;ELISA

中图分类号:S852.657

文献标志码:A

文章编号:1005-4545(2013)01-0024-05

Prokaryotic expression of duck Newcastle disease virus NP protein and establishment of an indirect ELISA based on the recombinant fusion protein

CHENG Yan-li, DIAO You-xiang*, ZHANG Kun, YANG Jian-peng, GUO Ji-lei, XIAO Puo (College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: According to nucleotide sequence of Newcastle disease virus (NDV) isolated from duck flocks SDWF02 strain, a pairs of primers was designed and synthesized. The complete NP gene of a domestic isolate SDFC strain of duck paramyxovirus was amplified by RT-PCR. The fragment was insert into prokaryotic expression vector pET28a to construct recombinant plasmids pET 28a-NP. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta for expression. SDS-PAGE and Western-blot analysis showed that the NP protein was expressed in inclusion bodies with molecular weight of 54 000 and had the well immunogenicity. Then an indirect ELISA was established to detect antibody against duck NDV by using the purified fusion protein as the coating antigen. In the NP-ELISA, the optimal concentration of the recombinant NP for coating was 10 ng/well, the optimal dilution of serum sample was 1:1 000. The detection results revealed that the NP-ELISA assay was confirmed to have a desirable sensitivity and specificity. The method is simple and suitable for large scale surveys of duck NDV antibodies.

Key words: duck NDV; NP protein; prokaryotic expression; ELISA

* Corresponding author

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒

毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的以感染禽类为主的一种急性、高度接触性传染病^[1]。该病以消化道和呼吸道病变为主要特征,发病率和死亡率高,给养禽业带来了严重的危害。以往资料表明,鸭和鹅等水禽对新城疫病毒多呈隐性感染^[2]。1997年,王永坤等^[3]从患病鹅体内分离到 NDV 强毒株,从此打破了 NDV 对水禽的不致病之说。近年来,鸭群发生新城疫在我国多个省市均有报道,且呈上

收稿日期:2011-11-16

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-43-34);国家公益性行业(农业)科研专项基金资助项目(201003012);山东省科技攻关资助项目(2007GG30009001);山东省科技发展项目(鸭源副黏病毒致病性研究)

作者简介:程彦丽(1985-),女,硕士。

* 通讯作者

升趋势,对养鸭业造成重大的经济损失^[4]。

新城疫病毒属于副黏病毒科、副黏病毒亚科、腮腺炎病毒属,禽 I 型副黏病毒(APMV-1)中的成员,其基因组编码的 6 种蛋白依次为核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和大分子量聚合酶蛋白(L)。NP 蛋白是组成核衣壳最主要的结构蛋白,与 P 和 L 蛋白结合包裹基因组 RNA 形成一个螺旋的核糖核蛋白(RNP)复合体^[5]。NP 蛋白在新城疫病毒中的含量相对丰富,并且具有高度的免疫原性和保守性,因此以 NP 蛋白为抗原建立的诊断方法具有更高的稳定性。

本试验对分离的 SDFC 株新城疫病毒的 NP 基因进行了克隆和原核表达,用纯化的 NP 蛋白建立了间接 ELISA 诊断方法,从而为鸭源新城疫的流行病学调查和预防提供了一种快速而有效的方法。

1 材料与方 法

1.1 病毒、抗血清、菌种和试验动物 鸭源新城疫 SDFC 株及其抗血清,由本实验室保存;SPF 鸡胚购自山东省农业科学院家禽研究所;SPF 鸭胚购自哈尔滨兽医研究所;原核表达载体 pET-28a,大肠杆菌工程菌 DH5 α 、Rosetta(DE3)由本实验室保存;克隆载体 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司;

1.2 主要试剂 Trizol 抽提试剂购自 invitrogen 公司;质粒小提试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收(小量)试剂盒购自上海生工生物工程公司;High-Affinity Ni-NTA Resin 蛋白纯化柱购自南京金思特生物技术公司;HRP 标记的兔抗鸭 IgG 购自武汉博士德生物科技有限公司;M-MLV、Ribonuclease Inhibitor、Taq DNA Polymerase 和各种限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 公司;预染蛋白质低分子量标准 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计 参照 GenBank 上发表的鸭源新城疫病毒 NP 蛋白基因序列,并根据 pET-28a(+)原核表达载的特点设计 1 对特异性引物, F: 5'-GAGAATTCATGTCGTCTGTTTTCGA-3';

R: 5'-GGTCTGACTCAGTACCCCCAGTC-3'划线部分分别为 EcoR I、Sal I 酶切位点,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 病毒的增殖 取种毒经尿囊腔接种 9~11 日龄的 SPF 鸡胚(0.2 mL/枚),37℃温箱孵育,弃去 24 h 内的死胚,将 72 h 后将剩余鸡胚放置在 4℃过夜,无菌收集尿囊液,-70℃保存备用。

1.5 病毒基因组 RNA 的提取 取上述鸡胚尿囊液参照 Trizol 试剂盒说明提取病毒 RNA,经 DEPC 水溶解后-80℃保存备用。

1.6 NP 基因 RT-PCR 扩增 反转录采用 10 μ L 体系,其中 5 $\times$ RT Buffer 2 μ L,dNTPs 1.0 μ L,Ribonuclease Inhibitor 0.25 μ L,M-MLV 0.5 μ L,上游引物 F 1.0 μ L,病毒 RNA 5.25 μ L,混匀后 42℃90 min,70℃15 min。PCR 反应采用 25 μ L 体系,其中 ddH₂O 16.2 μ L,10 $\times$ PCR buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L,dNTPs 2.0 μ L,上、下游引物各 1.0 μ L,RT-PCR 产物 2.0 μ L,Taq 酶 0.3 μ L。反应程序:94℃预变性 10 min;94℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 2 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.7 NP 基因原核表达载体的构建 将 NP 基因克隆到 pMD18-T 载体中,经酶切鉴定后进行测序,命名为 pMD18-T-NP。将阳性重组质粒 pMD18-T-NP 和 pET-28a 载体分别用 EcoR I 和 Sal I 进行双酶切。酶切产物纯化后,将载体和目的片段按 1:3 物质的量混合,T₄ 连接酶 16℃连接过夜。转化至 Rosetta(DE3)感受态细胞中,将鉴定为阳性质粒的菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.8 融合蛋白最佳诱导条件的确定 将阳性菌 37℃振荡培养至 D₆₀₀ 值为 0.4~0.6,分别加入不同浓度的 IPTG(0~1.0 mmol/L),诱导 4 h。同时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,分别诱导 0、2、4、6、8 h。表达产物进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 NP 重组蛋白的纯化与定量 按最佳诱导条件,大量诱导重组菌。超声波破碎菌体后,按照 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒说明书进行纯化,其产物进行 Western-blot 鉴定。用 Bradford 法测定纯化后重组蛋白含量,-20℃保存。

1.10 间接 ELISA 方法的建立

1.10.1 ELISA 反应条件的优化 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)包被融合蛋白,按照常规进行间接 ELISA 方法操作,方阵滴定法确定融合蛋白的最佳包被浓度和血清最佳稀释度。固定抗原、血清浓度,分别用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)、0.05 mol/L PBS (pH 7.4)、H₂O(pH 6.5)作为稀释液稀释抗原,以确定最佳包被液。当阳性血清 D₄₅₀(P)和阴性血清的 D₄₅₀(N)比值达到最大时,确定最佳反应条件。

1.10.2 临界值的确定 在最佳反应条件下,测定 36 份 SPF 鸭血清的 D₄₅₀ 值,计算其平均数($\bar{x}$)和标准差(s),则阳性的 Cut-off 值 C_p= $\bar{x}$ +3s;阴性的

Cut-off 值 $C_n = \bar{x} + 2s$ 。运用公式 $S/P = (S - N)/(P - N)$ 来判定结果(S:待检样品的 D_{450} 值;P:阳性对照的 D_{450} 值;N:阴性对照的 D_{450} 值)

1.10.3 重复性试验 用同时包被和不同时包被的酶标板对 6 份抗体效价的血清进行批内和批间重复性检验,每份血清平行测 6 孔,按照文献[6]方法进行,计算批内和批间的变异系数。

1.10.4 特异性试验 按照已建立的 ELISA 分别对鸭瘟病毒、鸭流感病毒(H9N2 亚型)、鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒的阳性血清和 SPF 鸭血清进行检测。

1.10.5 ELISA 与 HI 法的比较 分别用上述建立的间接 ELISA 方法和 HI 方法同时检测 105 份送检的鸭血清,记录并分析检测结果。

2 结果

2.1 NP 基因 RT-PCR 扩增结果 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察到 1 条特异性的条带,约为 1.5 kb(图 1),与预期结果一致。

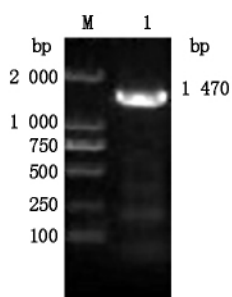


图 1 鸭源新城疫 NP 蛋白基因的 PCR 扩增结果
M, DL2000 DNA Marker; 1, PCR 产物

2.2 重组质粒 pMD18-T 的酶切鉴定 重组质粒 pMD18-T 经 EcoR I、Sal I 双酶切可得到约 1.5 kb 目的片段和约 2 kd 的 T 载体片段(图 2),与预期的结果相符合。测序结果表明,重组质粒 pMD18-T 构建正确。

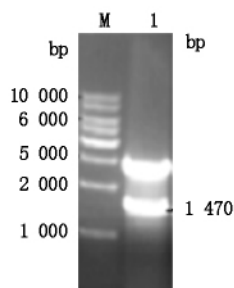


图 2 重组质粒 pMD18-T 双酶切鉴定 M, DL 1 kb Marker; 1, pMD18-T/EcoR I + Sal I 双酶切产物

2.3 重组表达质粒 pET28a-NP 的酶切鉴定 重组质粒 pET28a-NP 经 EcoR I、Sal I 双酶切后,可得到约 1.5 kb 目的条带和约 5 kb 的载体条带(图 3),与预期的结果相符,且测序结果正确。

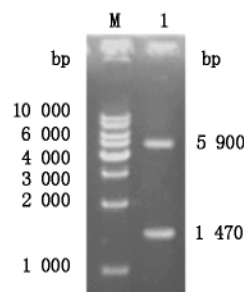


图 3 重组质粒 pET 28a-NP 双酶切鉴定 M, DL1 kb Marker; 1, pET 28a-NP/ EcoR I + Sal I 酶切产物

2.4 重组表达蛋白的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 分析结果表明, IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L(图 4),诱导 6 h(图 5)时蛋白的条带最亮,蛋白的表达量最高。超声波裂解重组表达菌体,离心后取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,检测目的蛋白的可溶性。结果表明,表达的蛋白在上清中含极量低,主要以包涵体的形式存在(图 6)。

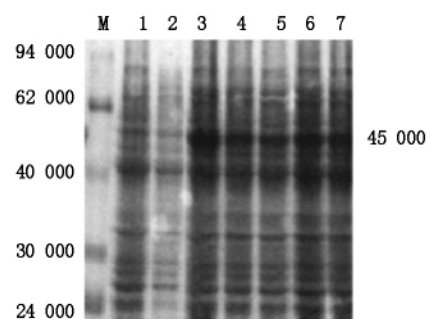


图 4 不同的 IPTG 浓度对重组质粒表达的影响 M, 蛋白低分子量标准; 1, 1.0 mmol/L IPTG 诱导的空载体裂解产物; 2, 0.2 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物; 3, 0.1 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物; 4, 0.2 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物; 5, 0.5 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物; 6, 0.8 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物; 7, 1.0 mmol/L IPTG 诱导的重组细菌裂解产物

2.5 纯化后重组蛋白的 Western-blot 分析 纯化后的重组蛋白与鸭源 NDV 的阳性血清形成了明显的条带,表明其具有良好的抗原性,而空载体诱导后表达的蛋白无抗原性(图 7)。

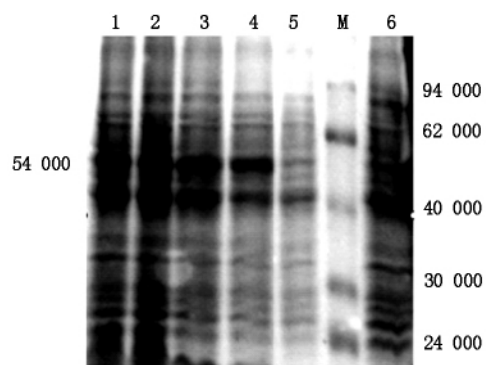


图 5 不同的诱导时间对重组质粒表达的影响 M. 蛋白低分子量标准;1. 诱导 8 h 重组菌裂解产物;2. 诱导 6 h 重组菌裂解产物;3. 诱导 4 h 重组菌裂解产物;4. 诱导 2 h 重组菌裂解产物;5. 添加诱导剂前的重组菌裂解产物;6. 空载体裂解产物

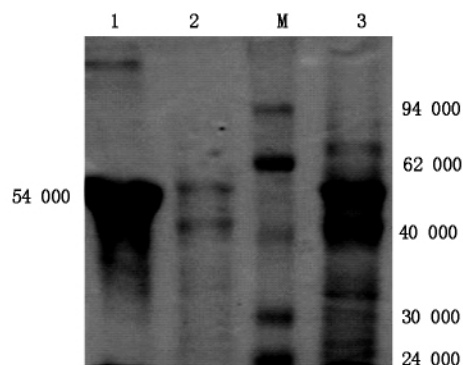


图 6 重组蛋白的存在形式 M. 蛋白低分子量标准;1. 诱导的重组菌裂解液沉淀;2. 诱导的重组菌裂解液上清;3. 诱导的重组菌裂解液

表 1 融合蛋白和血清的最佳稀释比例 (P/N)

抗原稀释度/ ($\text{ng} \cdot \text{孔}^{-1}$)	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000
10 000	1.22	0.97	0.93	3.99	2.64	1.48
1 000	1.25	0.87	1.34	3.98	2.57	1.30
100	1.01	0.99	2.17	4.30	2.37	1.43
10	0.85	1.76	4.75	3.10	1.99	1.21
1	1.07	2.00	1.60	1.73	1.22	1.15
0.1	1.12	1.74	0.97	1.20	0.76	0.93

表 2 抗原最佳包被液的选择 (D_{450})

项目	H ₂ O	PBS	CB
阳性血清	1.132	1.009	1.388
阴性血清	0.693	0.523	0.637
P/N	1.63	1.93	2.179

2.6.3 重复性试验 对 6 份 NDV 阳性的血清进行了 6 次重复测定 (批内重复), 其变异系数 2.0%~9.3%; 对上述样品进行了批间重复, 变异系数最小为 2.7%, 最大为 10.2%, 可见该方法具有良好的重复性。

2.6.4 特异性试验 利用鸭源新城疫 NP 蛋白建

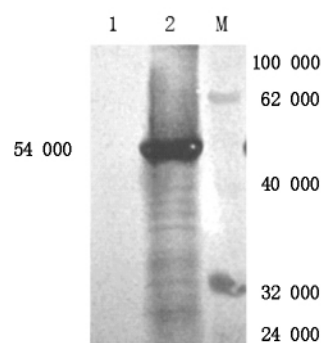


图 7 重组蛋白的 Western-blot 分析 M. 蛋白低分子量标准;1. 纯化的 NP 蛋白;2. 阴性对照

2.6 ELISA 方法的建立

2.6.1 ELISA 反应的条件优化 当融合蛋白的包被浓度为 10 ng/孔, 血清的最佳稀释度是 1:1 000 时, P/N 达到最大 (表 1)。固定融合蛋白的包被浓度和血清稀释度, 分别用碳酸盐缓冲液 (CB)、PBS、H₂O 包被蛋白, 结果表明 CB 作为包被液, 其 P/N 值达到了最大 (表 2)。

2.6.2 ELISA 临界值的确定及结果的判定 对 36 份 SPF 鸭的血清进行了间接 ELISA 测定, 平均值为 0.213、标准差为 0.042 4, 阳性 Cut-off 值为 0.340、阴性 Cut-off 值为 0.297。 $S/P \geq 0.340$, 待检血清为阳性; $S/P < 0.297$, 待检血清为阴性; $0.340 > S/P \geq 0.297$, 判为可疑。

立的 ELISA 方法检测鸭流感病毒、鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒的阳性血清 (表 3), 其 S/P 的值均小于 0.297, 为阴性, 表明建立的 ELISA 方法具有良好的特异性。

表 3 间接 ELISA 特异性

血清	D_{450}	S/P
DPMV(+)	1.102	-
DPMV(-)	0.163	-
空白对照	0.071	-
鸭流感病毒	0.198	0.037 2
鸭瘟病毒	0.177	0.014 9
鸭肝炎病毒	0.172	0.009 5
鸭圆环病毒	0.186	0.024 5

2.6.5 ELISA 与 HI 法的比较 用 ELISA 法检测送检的鸭血清阳性率为 60%(63/105), HI 法检测的阳性率为 52.4%(55/105)(表 4), ELISA 法灵敏度明显的高于 HI 法。

表 4 不同方法检测鸭 ND 抗体的试验 个

检测方法	阳性样本数	阴性样本数	总数
ELISA	63	42	105
HI	55	50	105

3 讨论

鸭源新城疫病毒是一种有囊膜的、单股不分节段的负链 RNA 病毒,其基因组编码 6 种结构蛋白: NP 蛋白、P 蛋白、M 蛋白、HN 蛋白、F 蛋白和 L 蛋白。其中 NP 蛋白、P 蛋白和 L 蛋白共同构成了核衣壳蛋白(内部蛋白)。NP 蛋白有 2 个主要的区域:一是氨基(N)端区域,约占 NP 蛋白的 2/3,与 RNA 直接结合;另一端是羧基(C)端区域,裸露在装备后的核衣壳后面^[7]。核衣壳蛋白与病毒基因组 RNA 紧密结合在一起,形成 1 个螺旋棒状的核糖核蛋白复合体(RNP),保护基因组 RNA 免受 RNA 酶的攻击。虽然 NP 蛋白不是 NDV 毒力的主要决定因素,但是具有高度的免疫原性,能够诱导机体产生抗体^[8],且具有高度的保守性。

新城疫病毒的检测方法主要有病毒的分离与鉴定、电镜检测技术、血清学诊断方法以及分子生物学诊断方法等^[9]。ELISA 方法是目前应用最广泛的一种免疫检测方法,该方法具有敏感性好、特异性强、操作简单、重复性好等优点。姜平等^[10]和丁炜东等^[11]建立检测 NDV 抗体的间接 ELISA 法,其特异性和敏感性均优于 HI。临床上检测鸡源 NDV 抗体的 ELISA 试剂盒已经广泛的生产和使用。由于鸭源 NDV 与鸡源 NDV 的参考毒株 LaSota、F48E9 的核苷酸序列的同源性在 83.8%~90.9%^[12],为了准确的监测鸭源 NDV 抗体水平,本试验以 NP 蛋白为包被抗原建立了间接 ELISA 方法。

本试验利用 pET-28a 表达载体表达了 54 000 大小的融合蛋白, SDS-PAGE 及 Western-blot 分析表明该蛋白具有的良好反应原性和特异性,以纯化后的融合蛋白为包被抗原建立了间接 ELISA 方法(NP-ELISA)。重复性试验表明,样品的 *D* 值的变异系数均低于 0.11%。特异性试验结果表明,该方法与鸭流感病毒、鸭圆环病毒、鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒的阳性血清均不发生反应。分别用 NP-ELISA 方

法与 HI 法对送检的 105 份鸭血清样品进行检测,结果显示 NP-ELISA 方法的阳性检出率为 60%,而 HI 阳性检出率为 52.38%, NP-ELISA 的检出率明显高于 HI 的检出率。同时也说明山东地区鸭场中已存在鸭源新城疫病毒的感染和流行,由此引起的疾病已给这些地区的养鸭业造成了相当大的经济损失^[4]。

在建立间接 ELISA 方法时,常出现假阳性的现象。主要是由于我国的鸭群中普遍存在大肠杆菌病,因此体内不可避免的产生大肠杆菌的抗体。融合蛋白虽然经过 Ni-NTA 亲和层析纯化后的纯度很高,但是不可避免污染大肠杆菌菌体蛋白,该蛋白与鸭体内的大肠杆菌抗体发生非特异性反应^[13]。因此将超声波粉碎含有空载体的宿主菌与待检血清混合, 37℃ 作用 20 min,能够显著的提高 ELISA 的准确度和灵敏度。

综上所述,此次建立的间接 ELISA 方法具有良好的特异性、重复性和敏感性,并且安全、方便、快捷,为临床上监测鸭源新城疫抗体水平提供了一种准确、快速、有效的方法。

参考文献:

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, et al. Disease of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003: 64-87.
- [2] Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, et al. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications [J]. Virus Res, 2006, 120(1/2): 36-48.
- [3] 王永坤, 田慧芳, 周继宏, 等. 鹅副黏病毒病的研究 [J]. 中国畜禽, 1998, 20(4): 3-5.
- [4] Liu H, Wang Z, Wang Y, et al. Characterization of Newcastle disease virus isolated from waterfowl in China. [J] Avian Dis, 2008, 52(1): 150-155.
- [5] Kho C L, Tan W S, Yusoff K. Production of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in Escherichia coli and its assembly of into ring-like and nucleocapsid-like particles [J]. J Microbiol, 2001, 39(4): 293-299.
- [6] Crowther J R. The ELISA guidebook, methods in molecular biology, vol 149 (III-IV) [M]. Totowa, New Jersey: Humana press, 2000: 1-413.
- [7] Seal B S, Crawford J M, Sellers H S, et al. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae [J]. Virus Res, 2002, 83(1/2): 119-129.

(下转 79 页)

量密集黄褐色阳性显色,在黏膜上皮外侧呈线状分布,与图 1、图 3 相对照,断奶 15 日仔猪胃窦部 Obestatin 分布和胃底部、胃体不同,胃窦部以外分泌为主,黏膜内自分泌的含量下降。

综上所述,通过断奶 15 日仔猪不同部位胃壁的免疫组化研究,证明了 Obestatin 在仔猪胃内广泛存在,而且在胃壁的不同部位,其分布、含量有所不同。同时,本试验也从侧面证实了 Obestatin 在猪和其他已证明的动物种属之间结构位点相似,提示 Obestatin 的蛋白序列、结构以及功能在种属间可能高度保守,这需要进一步采用其他分子生物学手段进行研究。同时,Obestatin 在仔猪阶段的分布、含量变化及在其他组织的分布,也需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang J V, Ren P G, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake[J]. Science, 2005, 310: 996-999.
- [2] Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, et al. Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake"[J]. Science, 2007, 315(5813): 766.
- [3] Holst B, Egerod K L, Schild E, et al. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin[J]. Endocrinology, 2007, 148: 13-20.
- [4] Hayashida T, Murakami K, Mogi K, et al. Ghrelin in domestic animals; distribution in stomach and its possible role[J]. Domest Anim Endocrinol, 2001, 21(1): 17-24.
- [5] 刘 磊, 宋志刚. 家禽食欲的外周调节激素研究进展[J]. 中国家禽, 2011, 33(5): 44-46.
- [6] 任安经, 林 丽, 袁文俊, 等. Obestatin 及其生物学效应[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(4): 351-353.
- [7] 苏小舟, 郁 枫, 赵云辉, 等. β -catenin 在胎牛蹄边缘毛囊形态发生中表达的时空变化[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6): 642-646.
- [8] 田树华, 张兰梅. 肥胖抑制素的临床研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(50): 114-115.
- [9] 唐胜球, 江青艳, 张永亮, 等. Obestatin 与 GPR39 受体的最新研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(3): 261-267.
- [10] 吴祯乾, 王维刚, 王志刚, 等. Obestatin 及其受体与胃肠动力[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(26): 2974-2979.
- [11] 赵二军, 李宪起, 王金涛, 等. AQP6 和 AQP5 在人下颌下腺上的免疫组化定位[J]. 现代口腔医学杂志, 2010, 24(5): 370-372.
- [12] 赵翠平, 康冬梅, 姚 慧, 等. 饥饿和再进食对小鼠下丘脑中 obestatin 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(6): 756-759.
- [13] 张宏福, 顾宪红. 仔猪营养生理与饲料配制技术研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001.
- [8] Pham H M, Chang K S, Mase M, et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene of Newcastle disease virus strains in Japan and development of a restriction enzyme-based rapid identifying method[J]. Arch Virol, 2004, 149(8): 1559-1569.
- [9] 张海燕, 陈松林, 周春炎, 等. 新城疫病毒检测方法研究进展[J]. 中国家禽, 2009, 31(24): 9-10.
- [10] 姜 平, 陈傅言, 裔群英. 3 种方法检测鸡新城疫抗体的比较研究[J]. 中国兽医杂志, 1993(5): 21-25.
- [11] 丁炜东, 曹丽萍, 张体银, 等. 检测新城疫病毒中和抗体的间接 ELISA 和竞争 ELISA 方法的初步建立[J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(3): 13-16.
- [12] 孙 杰, 刁有祥, 李建侠, 等. 10 株鸭源新城疫病毒的分离鉴定 F 基因遗传进化分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 1054-1060.
- [13] 潘华奇, 曹瑞兵, 刘 磊, 等. 鸭瘟病毒 gB 蛋白 N 端主要抗原域的表达及间接 ELISA 检测[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 98-102.

(上接 28 页)