

研究报告

Research Report

猪瘟疫病毒 NS2-3 抗原集中区基因的原核表达及鉴定

刘卫¹ 朱艳平² 宁红梅¹ 银梅¹ 郭东光¹ 鲁毅¹ 王选年^{1,2*}

1 河南科技学院,新乡,453003; 2 新乡学院生物技术研究中心,新乡,453003

* 通讯作者, xuannianwang@yahoo.com.cn

摘要 为获得猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV) NS2-3 抗原集中区蛋白,并建立 CSFV 抗体快速检测方法。本研究以 CSFV 全长基因组质粒为模板,PCR 扩增 NS2-3 抗原表位集中区,利用扩增片段和克隆载体,构建重组表达质粒,命名为 *pET32a-NS₂₋₃₋₁*。重组表达质粒转化 Rosetta (DE3) 细胞,利用 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 鉴定重组表达产物。结果表明,重组质粒 *pET32a-NS₂₋₃₋₁* 在 28℃ 诱导 5 h 得到高效表达,重组蛋白能够与兔抗 CSFV 阳性血清发生反应。获得 CSFV NS2-3 抗原集中区蛋白,并且获得的重组蛋白具有抗原性,能够作为 CSFV 抗体检测的抗原。

关键词 猪瘟疫病毒, NS2-3, 抗原表位, 原核表达, 免疫印迹

Prokaryotic Expression and Identification of the Main Antigenic Domain Gene in NS2-3 of Classical Swine Fever Virus

Liu Wei¹ Zhu Yanping² Ning Hongmei¹ Yin Mei¹ Guo Dongguang¹ Lu Yi¹ Wang Xuannian^{1,2*}

1 Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, 453003; 2 Bio-technology Centre, Xinxiang University, Xinxiang, 453003

* Corresponding author, xuannianwang@yahoo.com.cn

DOI: 10.3969/gab.032.000165

Abstract To identify the main antigen domain of the classical swine fever virus (CSFV) NS2-3, a method of detecting antibody of classical swine fever virus was established. CSFV genome plasmid as PCR template, the main antigenic domain of CSFV NS2-3 was amplified by PCR, and PCR products was cloned into prokaryotic expression plasmid *pET-32a(+)* vector to obtain the recombinant expression plasmid, named as *pET32a-NS₂₋₃₋₁*. The recombinant expression plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) and inducible expression by IPTG. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and identified by Western-blot. The recombinant plasmid *pET32a-NS₂₋₃₋₁* was highly expressed, induced 5 hours could get a large number of recombinant protein at 28℃, and the recombinant protein reacted strongly with the C-Positive serum of CSFV. The main antigenic domain protein in NS2-3 of CSFV was obtained, which has good antigenicity for detecting antibodies against CSFV.

Keywords Classical swine fever virus (CSFV), NS2-3, Antigenic epitope, Prokaryotic expression, Western-blot

猪瘟疫(classical swine fever, CSF)是危害养猪业的重大传染病之一,CSF 每年都在直接或间接地造成猪的大量死亡,本病仍是制约我国养猪业发展的重大因素。猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科瘟病毒属,基因组为线状单股正链 RNA,长约 12.3 kb,含有单一的开放阅读框(ORF),编码 3 898 个氨基酸残基,经蛋白酶裂解为 12 种结构蛋白和非结构蛋白(Meyers and Thiel, 1996)。CSFV 感染后,主要

产生抗 E0、E2 和 NS2-3 的抗体,其中 NS2-3 是一种非结构蛋白,也是一种免疫优势蛋白,所有感染动物均能产生抗 NS2-3 抗体,但不具有病毒中和性(王家富等, 2000; Monsó et al., 2011)。

目前,人们对 CSFV 的致病机理尚不清楚,尤其是病毒与宿主的相互关系、病毒编码蛋白与宿主细胞内分子之间的相互作用、病毒编码蛋白和宿主分子对病毒生活周期的调控机制等方面的研究刚刚起

步(杨幼聪等, 2011)。防控 CSF 主要包括两个方面: 一是要保证种猪不感染猪瘟疫病毒; 二是对所有猪加强疫苗免疫接种(宁宜宝和吴文福, 2011)。做好这两个方面工作的关键是 CSFV 的诊断和 CSFV 抗体水平的监测。在 CSFV 感染的整个过程中 NS2-3 蛋白大量且持续存在, 因此, 通过检测 NS2-3 蛋白及其抗体, 可以作为 CSFV 感染和 CFS 抗体水平的一个重要途径。

本研究通过构建 CSFV NS2-3 基因的抗原集中区基因的重组原核表达质粒, 在 IPTG 的诱导下进行诱导表达, 获得重组蛋白, 目的在于利用 NS2-3 重组蛋白建立 CSFV 抗体的检测方法, 并为其单克隆抗体的制备奠定基础。

1 结果与分析

1.1 NS₂₋₃₋₁ 基因的扩增和重组表达载体的构建

PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 035 bp 左右出现一可疑性条带(图 1A), 与预期的基因片段大小相符。重组质粒经 *Sac* 和 *Sal* 双酶切, 在 1 035 bp 左右出现目的条带(图 1B)。经进一步的测序鉴定, 目的基因成功克隆入克隆载体, 成功构建重组克隆载体 pMD18-NS₂₋₃₋₁。

pET32a(+) 与目的基因片段连接后获得的重组子经菌液 PCR 和双酶切鉴定, 得到与目的基因大小相符的片段(图 2), 表明成功构建重组表达载体。

1.2 重组表达载体的诱导表达及重组蛋白的 Western-blot 分析

IPTG 诱导重组表达质粒, 在 58 kD 左右出现与

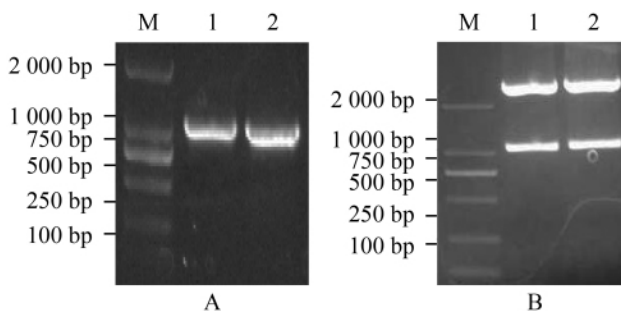


图 1 NS₂₋₃₋₁ 基因的 PCR 扩增和重组克隆质粒 pMD18-NS₂₋₃₋₁ 的酶切鉴定

注: A: M: DL2000 DNA Marker; 1,2: PCR 产物; B: M: DNA Marker DL2000; 1,2: 重组克隆质粒 pMD18-NS₂₋₃₋₁ 双酶切产物

Figure 1 Amplification of NS₂₋₃₋₁ by PCR and identification of the recombinant pMD18-NS₂₋₃₋₁ by restriction enzyme
Note: A: M: DL2000 DNA Marker; 1,2: PCR production; B: M: DNA Marker DL2000; 1,2: Digestion products of the recombinant plasmid pMD18-NS₂₋₃₋₁

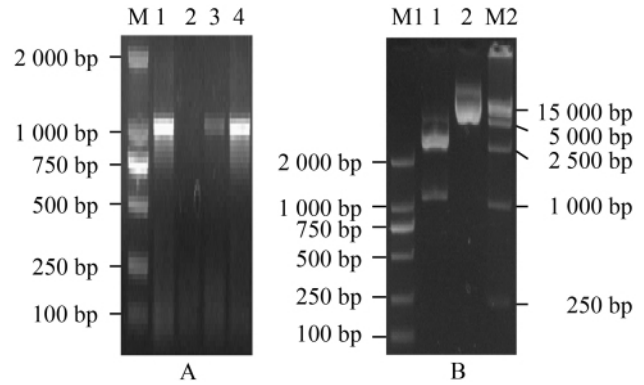


图 2 重组表达载体的 PCR 和双酶切鉴定

注: A: M: DNA Marker DL2000; 1~4: 菌液 PCR 产物; B: M1: DNA Marker DL2000; 1: 重组表达载体 pET32a-NS₂₋₃₋₁ 双酶切产物; 2: 重组质粒 pET32a-NS₂₋₃₋₁; M2: DNA Marker DL15000

Figure 2 Identification of the recombinant expression plasmid pET32a-NS₂₋₃₋₁ by PCR and enzyme digestion

Note: A: M: DNA Marker DL2000; 1~4: PCR product of pET32a-NS₂₋₃₋₁; B: M1: DNA Marker DL2000; 1: Digestion products of the recombinant expression plasmid pET32a-NS₂₋₃₋₁; 2: Recombinant expression plasmid pET32a-NS₂₋₃₋₁; M2: DNA Marker DL15000

目的蛋白大小相符的条带, 初步确定最佳诱导温度为 28℃, 最佳诱导时间为 5 h (图 3)。表达产物经 Western-blot 分析, 在 58 kD 左右有特异性条带, 与重组蛋白大小相符(图 4)。

1.3 表达产物的可溶性分析及目的蛋白的纯化

经超声处理的样品, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示沉淀中含有大量目的蛋白(图 5A), 说明目的蛋白主要以包涵体形式存在。得到的包涵体通过切胶回收进行纯化, 然后经 SDS-PAGE 鉴定纯化结果(图 5B), 纯化后的目的蛋白含量为 0.8 mg/mL。

2 讨论

CSFV 与瘟疫病毒属其它成员如牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)及羊边界病病毒(border disease virus, BDV)在结构上高度相似(Moenig, 1990; Rumenapf et al., 1991)。BVDV 可分为不致细胞病变(Non-cytopathogenic, NCP)和致细胞病变(Cytopathogenic, CP) 2 个生物型, 而 CSFV 体外细胞培养中一般无细胞病变效应(Non-cytopathic effect, Non-CPE) (唐青海, 2010)。对于 BVDV 裂解产生 NS3, 是致病性(CP) BVDV 的一个标志蛋白, 而在非致病性(NCP) BVDV 中, 只能检测到未裂解的 NS2-3 (王茁, 2011)。Moulin 等(2007)的研究结果表明, NS2-3 对于 CSFV 传染性颗粒的形成是必需的, 缺少 NS2-3 病毒

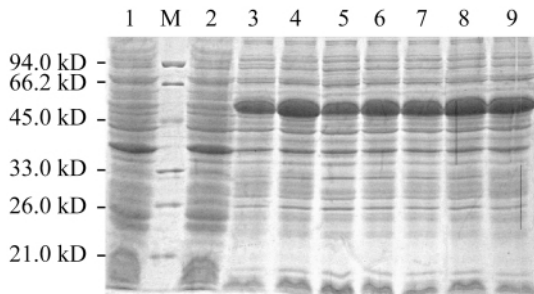


图3 重组表达载体 *pET32a-NS₂₋₃₋₁* 的诱导表达
注: M: 蛋白质 Marker; 1: 空载体对照; 2: 未诱导对照; 3~5: 37°C, 28°C, 18°C 诱导表达产物; 6~9: 5 h, 6 h, 7 h, 8 h 诱导表达产物

Figure 3 Inducible expression of the recombinant expression plasmid *pET32a-NS₂₋₃₋₁*

Note: M: Protein Marker; 1: Rostta (DE3) harboring *pET32a* induced; 2: *pET32a-NS₂₋₃₋₁/Rostta* (DE3) uninduced; 3~5: *pET32a-NS₂₋₃₋₁/Rostta* (DE3) 37°C, 28°C, and 18°C induced; 6~9: *pET32a-NS₂₋₃₋₁/Rostta* (DE3) induced for 5 h, 6 h, 7 h and 8 h

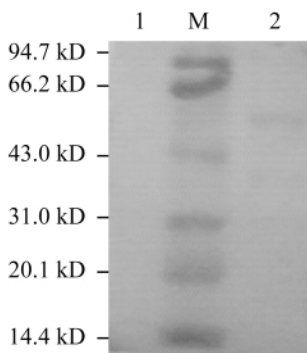


图4 重组蛋白的 Western-blot 鉴定
注: M: 蛋白质 Marker; 1: 未诱导对照; 2: 重组蛋白

Figure 4 Western-blot identification of the recombinant protein
Note: M: Protein Marker; 1: *pET32a-NS₂₋₃₋₁/Rostta* (DE3) uninduced; 2: The recombinant protein

将不具有感染性。黄茜华等(1999)和王家富等(2000)应用 RT-PCR 技术扩增出 CSFV 石门株和兔化弱毒株 NS2-3 基因,并对 NS2-3 基因进行序列测定和分析,证明该片段具有较高的同源性且高度保守。鲁絮(2007)和常天明等(2010)分别利用原核和真核表达系统获得了 NS3 重组蛋白并制备出相应的单克隆抗体,为 CSFV 对猪专一性致病机理的研究奠定了基础。目前,NS2 和 NS3 功能的研究还处于起始阶段,而对 CSFV NS2-3 蛋白功能的研究更少。所以,本研究获得的重组蛋白为今后 CSFV NS2-3 蛋白的研究提供了必要的基础。

CSFV NS2-3 蛋白是一个多功能蛋白,具有很强的免疫优势,在病毒复制过程中大量产生,所有感染动物均产生抗 NS2-3 的抗体,因此可以通过检测

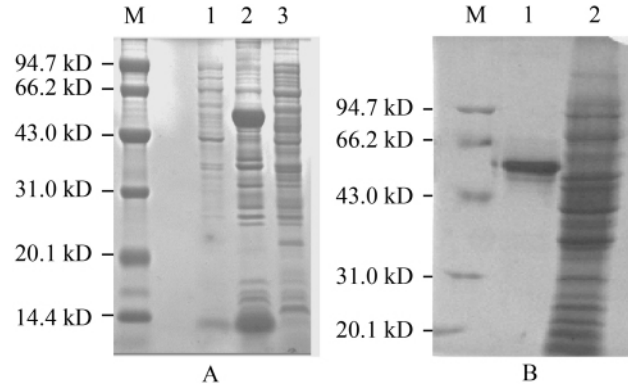


图5 表达产物的可溶性分析及目的蛋白的纯化
注: A: M: 蛋白质 Marker; 1: 超声裂解后的上清; 2: 超声裂解后的沉淀; 3: 空载体对照; B: M: 蛋白质 Marker; 1: 纯化后的目的蛋白; 2: 空载体对照

Figure 5 Soluble analysis and purification of the recombinant protein

Note: A: M: Protein Marker; 1: Supernatant of ultrasonic treatment expression products; 2: Precipitation of ultrasonic treatment expression product; 3: *pET-32a/Rostta* (DE3) induced; B: M: Protein Marker; 1: The recombinant protein by purification; 2: *pET-32a/Rostta* (DE3) induced

NS2-3 基因产物及其抗体检测病毒。目前,部分上市诊断试剂盒以 NS2-3 蛋白作为诊断抗原。研究利用原核表达系统,成功表达猪瘟兔化弱毒株(hog cholera virus lapinized chinese strain, HCLV) NS2-3 蛋白的抗原位点集中区的蛋白,该蛋白能被 CSFV 兔化高免血清所识别,说明该蛋白具有良好的抗原性,为进一步开发诊断试剂盒和研究 NS2-3 蛋白的免疫学功能奠定基础,并为进一步研究 NS2-3 蛋白在猪瘟病毒致病机制中发挥的作用奠定基础。

NS2-3 中大肠杆菌稀有密码子占 15.28%,这在很大程度上影响重组蛋白的表达。本研究将重组表达质粒 *pET32a-NS₂₋₃₋₁* 转化 BL21 后进行诱导表达,未得到目的蛋白,将宿主菌改为 Rosetta 后,目的蛋白成功获得表达,证明 Rosetta 在表达大肠杆菌稀有密码子频率高的基因方面比 BL21 具有明显的优势。通过 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,重组蛋白主要以包涵体形式存在,目的蛋白能够与兔抗 CSFV 阳性血清结合,具有良好的抗原性。将目的蛋白进行切胶回收纯化,获得了纯度达到 0.8 mg/mL 的蛋白,为下一步单克隆抗体的制备提供重要条件。

3 材料与方法

3.1 材料

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、BL21 和表达载体 *pET-32a(+)*,由河南科技学院预防兽医学重点实验室保

存 Rosetta 菌株由新乡学院多肽生物技术中心提供; pMD18-T-simple vector systems 为 TaKaRa 公司产品 猪瘟疫病毒全基因组质粒 由河南科技学院动物科技学院胡建和教授惠赠。

3.2 主要试剂和酶类

琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒 ,OMEGA 公司产品 ;质粒小量提取试剂盒 ,TIANGEN 公司产品 ;猪瘟疫病毒免化高免血清, 由河南科技学院预防兽医学重点实验室保存 ;HRP 标记的羊抗兔二抗 ,北京索莱宝公司产品 ;DAB 显色试剂盒 ,北京中杉金桥生物公司产品。ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、核酸内切酶 *Sac* 、*Sal* 均为 TaKaRa 公司产品 ;普通 *rTaq* DNA 聚合酶 ,北京鼎国公司产品。

3.3 引物设计与合成

利用 DNASTar 5.0 分析 CSFV 免化弱毒株 NS2-3 蛋白的氨基酸序列, 根据获得的 CSFV 免化弱毒株 NS2-3 的抗原集中区的碱基序列 利用 Primer 5.0 引物分析软件 ,设计一对引物 P1、P2 ,引物两端分别引入 *Sac* 和 *Sal* 酶切位点。将该引物送往上海生物工程技术有限公司合成。

3.4 CSFV NS2-3 抗原集中区基因的扩增及重组克隆载体的构建

以 CSFV 全基因组质粒为模板 ,进行 PCR 扩增 ,反应产物经 1%琼脂糖凝胶检测。胶回收试剂盒回收目的基因后连接至克隆载体 pMD18T-simple。连接产物转化 DH5 α ,涂布在含有氨苄的琼脂平板上 ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取可疑阳性单菌落 ,在含有氨苄的液体 LB 培养基中培养过夜。经菌液 PCR 鉴定为阳性的可疑菌落 ,利用质粒提取试剂盒抽提质粒 ,双酶切鉴定 ,将获得的阳性重组质粒命名为 pMD18-NS₂₋₃₋₁ ,送上海生物工程有限公司进行序列测定。

3.5 重组表达载体 pET32-NS₂₋₃₋₁ 的构建

Sac 和 *Sal* 双酶切重组克隆质粒 pMD-NS₂₋₃₋₁ 和空表达载体 pET32a(+), 回收目的基因与表达载体 pET32a(+), 的酶切产物 ,胶回收目的基因 ,连接过夜 ,转化 ,转化产物涂布于含氨苄的平板上 ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取可疑单菌落于含氨苄的 LB 液体培养基中培养。PCR 检测阳性可疑菌落抽提质粒 ,双酶切鉴定 ,将获得的阳性重组质粒命名为 pET32a-NS₂₋₃₋₁ ,送上海生物工程有限公司进行序列测定。

3.6 重组载体的诱导表达及表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

将 3.5 中的阳性重组表达质粒 pET32a-NS₂₋₃₋₁ 转化 Rosetta ,挑取可疑单菌落于含氨苄的 LB 液体培养基中过夜培养。次日 ,按 1%的量接种于 5 mL 含氨苄的 2 \times YT 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD 值为 0.6 左右 ,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L ,分别于 37 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、16 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达 ,在不同时间收集菌、裂解菌体 ,收获重组蛋白 ,进行 SDS-PAGE 鉴定。

3.7 目的蛋白的 Western-blot 鉴定

SDS-PAGE 结束后 ,用半干转膜仪将蛋白转印至 PVDF 膜上。然后取下 PVDF 膜 ,TBST 洗膜 3 次 ;含 5%脱脂乳的 TBST 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜 ;加入 1:200 稀释的兔抗 CSFV 阳性血清 ,室温孵育 2 h ;TBST 洗涤 3 次 ;加入 1:2 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP ,室温反应 1.5 h ;TBST 洗涤 3 次 ,DAB 显色试剂盒显色 ,用去离子水冲洗终止显色。

3.8 目的蛋白的可溶性分析与纯化

将种子液按 1:100 比例接种于 200 mL 含 Amp⁺ (100 μ g/mL)的新鲜 2 \times YT 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右 ,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的无菌 IPTG 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜 ;4 $^{\circ}$ C ,10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。弃上清 ,加入 20 mL 磷酸盐缓冲液重悬菌体 ;将重悬菌液置于冰浴中超声波破碎 10 min ,超声 4 s ,间隔 10 s ;4 $^{\circ}$ C ,5 000 r/min 离心 20 min ,分别收集沉淀和上清 ;按比例分别取沉淀和上清进行 SDS-PAGE 检测 ,确定目的蛋白的表达形式。

将超声裂解得到的菌体沉淀 ,用含 1%曲拉通的 2 mol/L 尿素洗涤缓冲液反复洗涤 5 次 ,加入 8 mol/L 尿素包涵体溶解液 ,4 $^{\circ}$ C 过夜溶解包涵体。将溶解的包涵体进行 SDS-PAGE 电泳 ,0.1 mol/L KCl 染色 15 min 后 ,切下含有目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳胶 ,将电泳胶放入含少量蛋白质电泳液的透析袋中 ,然后将透析袋放入电泳槽中进行水平电泳。电泳结束后 ,将透析袋放入 PBS 中 ,低温透析过夜 ,浓缩后离心取上清 ,做 SDS-PAGE 鉴定并测定目的蛋白浓度。

作者贡献

王选年负责实验整体规划 ;朱艳平在引物设计和实验技术路线的制定给与指导 ;宁红梅、银梅、郭东光和鲁毅在具体实验过程给予很大帮助 ;刘卫负

责实验的整体操作。

致谢

本研究获得国家自然科学基金(31201877)、河南省基础与前沿技术研究(122300410003)(1223004101-50)、河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A2308-37)的资助,在此表示衷心的感谢。胡建和教授赠予猪瘟病毒全基因组质粒,在此表示感谢。

参考文献

- Chang T.M., Sun Y., Li H.Y., He F., Li M., Huang J.H., and Qiu H.J., 2010, Expression of NS3 gene of classical swine fever virus and preparation of monoclonal antibodies against NS3 protein, *Zhongguo Shouyi Kexue (Chinese Veterinary Science)*, 40(02): 144-149 (常天明, 孙元, 李宏宇, 贺番, 李淼, 黄俊华, 仇华吉, 2010, 猪瘟病毒 NS3 蛋白的重组表达及其单克隆抗体的制备, *中国兽医科学*, 40(02): 144-149)
- Huang Q.H., Zhang C.Y., Wang N., Fu L.Z., and Wang J.F., 1999, Sequencing and comparison of NS2-3 gene fragment of classical swine fever virus shimen strain, *Zhongguo Bingduxue (Virologica Sinica)*, 14(2): 163-167 (黄茜华, 张楚瑜, 王宁, 傅烈振, 王家富, 1999, 猪瘟病毒石门株 NS2-3 基因片段的序列测定及比较, *中国病毒学*, 14(2): 163-167)
- Lu X., 2007, Expression of NS3 gene of classical swine fever virus in *E. coli* and preparation and identification of its monoclonal antibodies, Thesis for M.S., Northwest A & F University, Supervisor: Zhang Y.M., pp.8-13 (鲁絮, 2007, 猪瘟病毒 NS3 基因的原核表达及其单克隆抗体的制备与鉴定, 硕士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 张彦明, pp.8-13)
- Meyers G., and Thiel H.J., 1996, Molecular characterization of pestiviruses, *Advances in Virus Research*, 47: 53-118
- Moennig V., 1990, Pestiviruses: A review, *Veterinary Microbiology*, 23: 35-54
- Monsó M., Tarradas J., Torre B.G., de la Torre B.G., Sobrino F., Ganges L., and Andreu D., 2011, Peptide vaccine candidates against classical swine fever virus: T cell and neutral-

- izing antibody responses of dendrimers displaying E2 and NS2-3 epitopes, *J. Pept. Sci.*, 17(1): 24-31
- Moulin H.R., Seuberlich T., Bauhofer O., Bennett L.C., Tratschin J.D., Hofmann M.A., and Ruggli N., 2007, Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation, *Virology*, 365(2): 376-389
- Ning Y.B., and Wu W.F., 2011, New epidemic characteristics of classical swine fever in China and the research of vaccine and immunization, *Zhongguo Shouyao Zazhi (Chinese Journal of Veterinary Drug)*, 45(8): 33-37 (宁宜宝, 吴文福, 2011, 我国猪瘟流行新特点与疫苗免疫研究, *中国兽药杂志*, 45(8): 33-37)
- Rumenapf T., Stark R., Meyers G., and Thiel H.J., 1991, Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protective immunity, *Journal of Virology*, 65: 589-597
- Tang Q.H., 2010, The function of classical swine fever virus NS2 protein, Thesis for M.S., Northwest A & F University, Supervisor: Zhang Y.M., pp.2-4 (唐青海, 2010, 猪瘟病毒 NS2 蛋白功能的研究, 硕士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 张彦明, pp.2-4)
- Wang J.F., Zhang C.Y., Fu L.Z., Huang Q.H., and Zhang P.W., 2000, Sequence analysis of NS2-3 gene of hog cholera virus lapinized Chinese strain, *Zhongguo Bingduxue (Chinese Journal of Virology)*, 16(2): 150-154 (王家富, 张楚瑜, 傅烈振, 黄茜华, 张芑伟, 2000, 中国猪瘟兔化弱毒兔脾毒 NS2-3 基因的序列分析, *中国病毒学*, 16(2): 150-154)
- Wang Z., 2011, The influence in replication of CSFV after the gene of CSFV NS2 transfected into the PK-15 cells, Thesis for M.S., Jilin Agricultural University, Supervisors: Zhao F. G., and Tu C.C., pp.5-7 (王茁, 2011, CSFV NS2 基因导入 PK-15 细胞后对该病毒复制的影响, 硕士学位论文, 吉林农业大学, 导师: 赵福广和涂长春, pp.5-7)
- Yang Y.C., Zhang Y.M., Kang K., Xiang H., Tang Z.H., and Zhang S.D., 2011, Cloning and prokaryotic expression of NS2 gene of CSFV, *Dongwu Yixue Jinzhan (Progress in Veterinary Medicine)*, 32(5): 14-17 (杨幼聪, 张彦明, 康恺, 向华, 汤智慧, 张三东, 2011, 猪瘟病毒 NS2 3' 端基因的克隆与原核表达, *动物医学进展*, 32(5): 14-17)