

牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿 AP₁-AP₂-BP 基因亚单位抗体的制备

王雪吟^{1,3,4}, 布日额^{1,3,4}, 陈金龙⁵, 王金良², 吴金花^{1,3,4}, 锡林高娃^{1,3,4}

摘要:目的 构建牛乳腺炎无乳链球菌菌毛岛屿 PI-2a 亚单位重组抗原 AP₁-AP₂-BP, 并制备其多亚单位抗体, 为后期研制新型免疫疫苗和检测试剂提供实验基础。方法 利用延伸 PCR 技术构建了 AP₁-AP₂-BP 三联基因, 并将该串联基因进行转化, 诱导, 表达, 纯化, 并将纯化蛋白制作作为抗原, 对家兔免疫, 制备多亚单位抗体, 并通过亲和层析的方式从免疫后的血清中获得纯化的 IgG, 完成多亚单位抗体的制备。结果 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌株通过诱导、表达, 对产物亲和层析等方法获得的纯化蛋白, 其相对分子质量为 65 kDa, 其含量达到 3.3 mg/mL, 并具有较好的免疫原性。经间接 ELISA 可知, 经过 4 周的免疫抗体的滴度已达到 1:5 600 的水平。通过 Protein A280 测量数据表明, 纯化后的 IgG 的含量高达 9.1 mg/mL。结论 牛乳腺炎无乳链球菌的菌毛岛屿 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌经诱导、表达后获得的纯化蛋白 AP₁-AP₂-BP 多亚单位抗原有较好的免疫原性, 为制备相应多亚单位抗体的制备提供了良好的多价抗原, 同时为将研制新型工程疫苗及检测试剂提供了科学的研究基础。

关键词:无乳链球菌; AP₁-AP₂-BP; 蛋白纯化; 亚单位抗体

中图分类号:R378.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)03-0206-06

Preparation of bovine mastitis *Streptococcus agalactiae* PI-2a pili islands AP₁-AP₂-BP subunit antibody

WANG Xue-yin^{1,3,4}, BU Ri-e^{1,3,4}, CHEN Jin-long⁵, WANG Jin-liang²,
WU Jin-hua^{1,3,4}, XI LIN Gao-wa^{1,3,4}

(1. Inner Mongolia Autonomous Region Engineering Technology Research Center of Prevention and Control the Pathogenic Bacteria in Milk, Tongliao 028043, China;

2. Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China;

3. College of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China;

4. Research Institute for Pathogenic in Milk of Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China;

5. Shandong Lvdu Bio-sciences and Technology Co., LTD, Binzhou 256600, China)

Abstract: In this experiment, the subunit recombinant antigen AP₁-AP₂-BP of the pili island PI-2a of bovine mastitis *Streptococcus agalactiae* was constructed and its multi-subunit antibody was prepared, which provided the experimental basis

国家自然科学基金项目(Nos.31560689,31760725);内蒙古自治区乳源性致病菌防控工程技术研究中心开放课题(Nos.MDK2017016、MDK2017018);内蒙古科技厅社会发展领域计划项目(食品安全关键技术研究,2017);内蒙古自治区第七批“草原英才”人才工程产业创新团队建设项目(2017)联合资助

通讯作者:布日额,Email:wjhbre@aliyun.com;

ORCID: 0000-0003-4145-1062

作者单位:1.内蒙古自治区乳源性致病菌防控工程技术研究中心,通辽 028043;

2.山东省滨州畜牧兽医研究院,滨州 256600;

3.内蒙古民族大学生命科学学院,通辽 028043;

4.内蒙古民族大学乳源性致病菌研究所,通辽 028043;

5.山东绿都生物科技有限公司,滨州 256600

for the development of a new immune vaccine and detection reagent in the later stage. The triplex gene of AP₁-AP₂-BP was constructed by extended PCR technique, and the tandem gene was transformed, induced, expressed and purified, and the purified protein was made into an antigen, the rabbits were immunized with it, and prepare multi-subunit antibodies. The purified IgG was obtained from the immunized serum by affinity chromatography, and the preparation of multi-subunit antibodies. The AP₁-AP₂-BP three Gene tandem Recombinant Engineering strains was transformed, induced, expressed. And the purified protein obtained by Affinity Chromatography. The relative molecular weight of purified protein was 65 kDa. The content of purified protein was 3.3 mg/mL. The purified poly-

unit antigen had good immunogenicity. The results of EILSA showed that the titer of antibody in the serum reached 1:5600 after the fourth immunization. The measured data of Protein A280 showed that the content of purified IgG was as high as 9.1 mg/mL. The purified protein AP₁-AP₂-BP multi-subunit antigen obtained from the AP₁-AP₂-BP three Gene tandem Recombinant Engineering strains of bovine mastitis *Streptococcus agalactiae* has good immunogenicity, which provides a good polyvalent antigen for the preparation of the corresponding multi-subunit antibody. At the same time, it provides a scientific basis for the development of new engineering vaccines and detection reagent.

KeyWords: *Streptococcus agalactiae*; AP₁-AP₂-BP; protein purification; subunit antibody

Supported by National natural science foundation project (Nos.31560689, 31760725); opening project of engineering technology research center for prevention and control of milk-borne pathogenic bacteria in Inner Mongolia autonomous region (Nos. MDK2017016, MDK2017018); social development planning project of Inner Mongolia science and technology department (research on key technologies of food safety, 2017); the seventh batch of industrial innovation team construction project of "grassland talents" in Inner Mongolia autonomous region (2017).

Corresponding author: Bu Ri-e, Email:wjhbre@aliyun.com

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是牛乳腺炎(Bovine mastitis)的主要致病菌之一,它不仅会对奶牛的产乳量造成影响,同时可通过“乳腺乳”的传递感染人类,是人兽共患病的典型的致病菌之一^[1-4]。近年来由于生态保护政策的不断提升,“禁牧”政策的严格实施,造成乳牛乳房炎的发病机率逐年增多。因此,奶牛乳腺炎的有效防控就显得极为重要^[5-8]。但是目前全球尚无有效防治牛乳房炎的疫苗上市,传统的疫苗都存在免疫保护不佳,散毒,潜伏感染等现象^[9]。因此,寻找和探索一种安全,有效,多价的非全菌体型基因工程亚单位疫苗是解决奶牛乳腺炎防控难的全球性的科学解决途径^[14-15]。无乳链球菌中致病的因子有很多,除了荚膜,溶血素,链道酶素,链激酶以外,更为重要的是其具有的粘附功能,致病因子是其表向的菌毛,其菌毛有PI-1及PI-2(又称PI-2a,PI-2b)^[16-18]。有研究显示,粘膜免疫可以阻止细菌有效定植目标细胞。因此,无乳链球菌的菌毛结构成为了众多学者关注和研究的热点^[19]。我们针对无乳链球菌中具有致病性的PI-2a菌毛岛屿的三个亚基基因AP₁、AP₂、BP进行探究,将与GBS黏附有关的AP₁基因、具有菌毛锚定的AP₂基因和菌毛骨架蛋白BP基因进行三基因串联,建立表达的载体,从而获得多表位融合的蛋白,通过动物的免疫实验,获得血清,并将血清纯化,并制备多亚单位抗体^[20-21]。为后期研制新型基因工程免疫疫苗及快速检测试剂提供可靠的实验基础,同时也为进一步研究牛乳房炎致病菌无乳链球菌的致病机理提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 重组质粒构建 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组

原核BL21工程菌由内蒙古乳源性致病菌防控工程技术研究中心构建。

1.2 主要试剂 在该实验中利用的主要试剂为NaCl、琼脂、NaOH颗粒、卡那霉素、IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)、KCl、NaHPO₄、甘油、KH₂PO₄、考马斯亮蓝R-250、Tris、浓HCl、SDS、过硫酸铵、Acrylamide、BIS、酵母浸粉、Glycine、胰蛋白胨、BPB、异丙醇、醋酸等,均购自哈尔滨博仕生物科技有限公司。

1.3 实验动物 3只家兔,由山东中医药大学实验动物室提供。

1.4 AP₁-AP₂-BP 克隆基因的表达及样品处理 将AP₁-AP₂-BP三联基因重组工程菌(pET-30(a+)-AP₁-AP₂-BP/BL21)用终浓度为1.0 mmol/L的IPTG进行30℃恒温诱导表达8~9 h。将诱导完成的培养液分装、离心,并将获得的沉淀用PBS缓冲液以1:10的比例悬浮,再对其超声破碎20 min左右,将破碎完全的菌液4℃离心20 min,取上清并用孔径为0.45 μm的滤膜过滤。

1.5 AP₁-AP₂-BP 蛋白粗提取及纯化 选用15%~50%的硫酸铵颗粒对已获得的样品进行粗提取,优化确定其最佳质量浓度,并将其4℃离心,将获得的蛋白质沉淀用含有20 mmol/L咪唑的PBS缓冲液进行悬浮,并将混合液放入透析袋中处理24 h。利用亲和层析的方法对获得样品进行纯化,蛋白层析柱的填料选用Ni NTA Beads 6FF,恒流泵的流速保持在4.5,将样品过柱处理。将获得的纯化蛋白AP₁-AP₂-BP进行SDS-PAGE凝胶电泳及Protein A280测量。

1.6 家兔抗 AP₁-AP₂-BP 融合抗原的亚单位抗体制备 将饲养的3只家兔进行分组,其中2只家兔

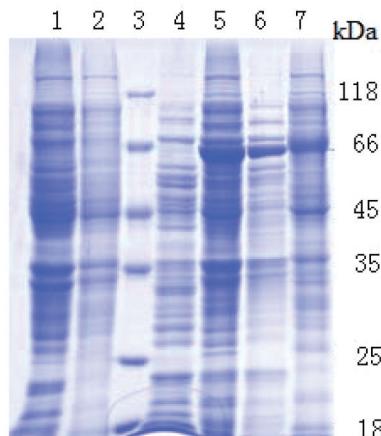
为实验组,另1只为对照组。用铝胶水溶性佐剂与纯化后的AP₁-AP₂-BP蛋白以1:5的比例混合,采用腹部皮下肌肉多点注射的方式进行免疫,每只家兔免疫抗原含量为0.5 mg/mL,免疫剂量为500 μL/只。每次免疫前采集家兔耳静脉血液约10 mL,每隔7 d进行1次免疫,共免疫4次,从第3次免疫开始,免疫剂量调整为1.0 mL/只。

1.7 间接-ELISA检测亚单位抗体滴度 根据检测需求将包被抗原AP₁-AP₂-BP、待测血清、羊抗兔IgG HRP标记抗体进行倍比稀释,根据检测试剂盒的说明进行操作,并通过全自动酶标检测仪读取检测数据,并进行统计学处理。

1.8 AP₁-AP₂-BP亚单位抗体的纯化 根据天地人和抗体的亲和层析柱说明书配置纯化Buffer,并用层析柱对血清IgG进行纯化,将纯化获得的IgG进行SDS-PAGE凝胶电泳及Protein A280检测。

2 结果

2.1 重组质粒诱导表达结果 将AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌进行IPTG诱导后,对其SDS-PAGE凝胶电泳,通过实验图片的条带对比可以确定AP₁-AP₂-BP蛋白的分子量大小约为65 kDa,该结果与预测分子质量大小相符,条带清晰,见图1。

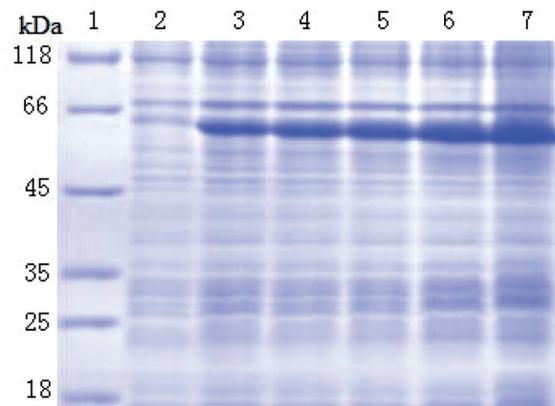


1: IPTG诱导前的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌;2: IPTG诱导前的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎沉淀;3:低分子质量蛋白Marker(116~18 kDa);4: IPTG诱导前的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎上清;5: IPTG诱导后的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌;6: IPTG诱导后的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎上清;7: IPTG诱导后的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎沉淀

图1 表达产物AP₁-AP₂-BP蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression product of AP₁-AP₂-BP

2.2 IPTG诱导剂浓度的优化结果 通过5组(0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L)不同IPTG终浓度对菌液进行相同条件的8 h培养,经SDS-PAGE凝胶电泳鉴定后可知,伴随着IPTG终浓度的不断提高,其蛋白的表达量有所增强,但持续升高IPTG终浓度并没有显著变化,因此,确定IPTG诱导剂终浓度为1.0 mmol/L,见图2。



1:低分子量蛋白Marker;2:IPTG诱导前的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎上清;3-7:分别为0.4~1.2 mmol/L5个浓度梯度的IPTG诱导后的AP₁-AP₂-BP三基因串联重组工程菌破碎上清

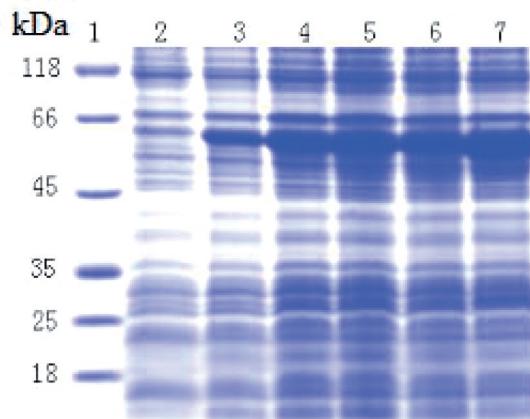
图2 不同浓度的IPTG对AP₁-AP₂-BP蛋白诱导表达的影响

Fig.2 Effect of different concentration of IPTG on expression of AP₁-AP₂-BP protein

2.3 诱导温度优化结果 用最佳的IPTG浓度,分别在27 °C、30 °C、33 °C、36 °C、39 °C条件下对AP₁-AP₂-BP菌液诱导8 h,经SDS-PAGE凝胶电泳鉴定结果发现,随着温度的升高,其蛋白的表达量也有所提升,而且在30 °C的时候,蛋白表达量有显著提高。但再继续升温,蛋白表达量无明显变化,可判定30 °C是最佳的诱导温度,见图3。

2.4 抗原蛋白盐析处理硫酸铵质量浓度优化结果 通过对硫酸铵的质量浓度设置,将上清液分为8组进行AP₁-AP₂-BP蛋白的粗提取,经SDS-PAGE电泳可知,在硫酸铵的浓度为20%时,AP₁-AP₂-BP蛋白的粗提取最理想,该浓度下其杂带最少,见图4。

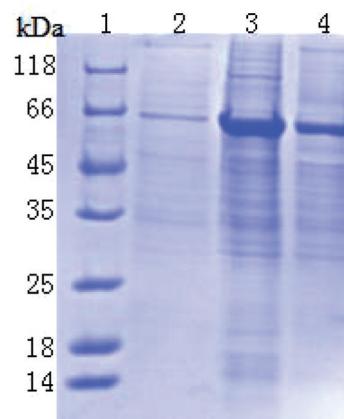
2.5 AP₁-AP₂-BP重组蛋白悬浮缓冲液的优化结果 通过SDS-PAGE凝胶电泳实验结果表明,利用含20 mmol/L咪唑的PBS溶液做悬浮液处理后的回收率比利用pH值为8.5的Tris-Cl溶液处理后的回收率更高,其效果更为理想,见图5。



1:低分子量蛋白 Marker;2:IPTG 诱导前的 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌破碎上清;3-7:在 27 ℃、30 ℃、33 ℃、36 ℃、39 ℃诱导的 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌破碎上清

图 3 不同诱导温度对 AP₁-AP₂-BP 蛋白诱导表达的影响

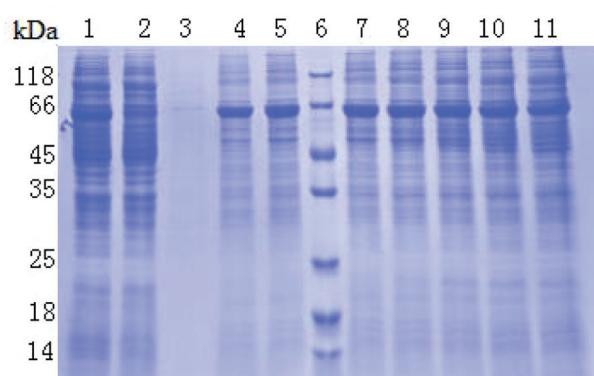
Fig.3 Effect of different culture temperature on expression of AP₁-AP₂-BP protein



1:低分子量蛋白 Marker;2:IPTG 诱导后的 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌破碎上清;3:含有 20 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液的悬浮液;4:pH 值为 8.5 的 Tris-Cl 缓冲液的悬浮液

图 5 不同悬浮缓冲液对 AP₁-AP₂-BP 蛋白的粗提的影响

Fig.5 Effects of different suspension buffers on the crude extraction of AP₁-AP₂-BP protein



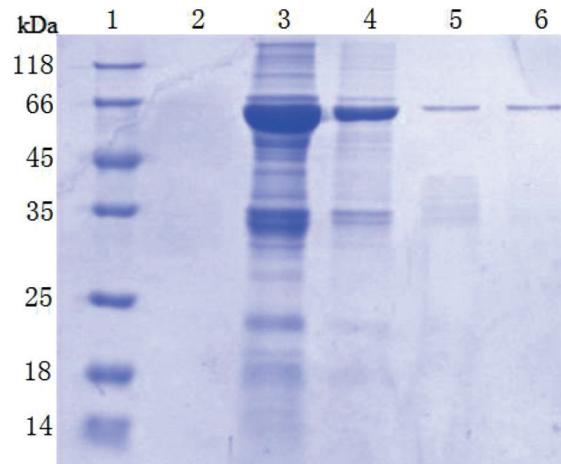
1:IPTG 诱导后三基因串联重组工程菌;2:IPTG 诱导后的 AP₁-AP₂-BP 三基因串联重组工程菌破碎上清;3-5:15%~25% 硫酸铵粗提 AP₁-AP₂-BP 重组蛋白;6:低分子量蛋白 Marker;7-11:30%~50% 硫酸铵粗提 AP₁-AP₂-BP 重组蛋白

图 4 不同浓度硫酸铵对 AP₁-AP₂-BP 蛋白的粗提的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of ammonium Sulfate on the crude extraction of AP₁-AP₂-BP protein

2.6 AP₁-AP₂-BP 重组蛋白最优纯化结果 通过对 AP₁-AP₂-BP 蛋白纯化过程的优化与改良,经 SDS-PAGE 电泳分析,纯化的 AP₁-AP₂-BP 蛋白质量浓度达到 4.353 mg/mL,与优化前直接纯化相比回收率提高了 81%,见图 6。

2.7 血清中抗体的滴度测定结果 对家兔血清中抗体的滴度进行了 ELISA 测定,测定结果显示,家兔血清在免疫后抗体的水平逐渐上升,且从第 3 周开始抗体的水平明显提升,在第 4 周时抗体滴度达 1:5 600,该结果表明家兔经过免疫所产生的抗体



1:低分子量蛋白 Marker;2:洗涤液洗涤;3-6:洗脱液洗脱

图 6 最优条件的 AP₁-AP₂-BP 蛋白纯化

Fig.6 Purification of AP₁-AP₂-BP protein under optimal conditions

具有很高的滴度水平,见图 7。

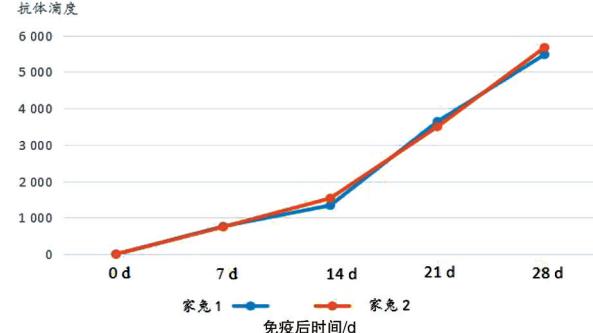
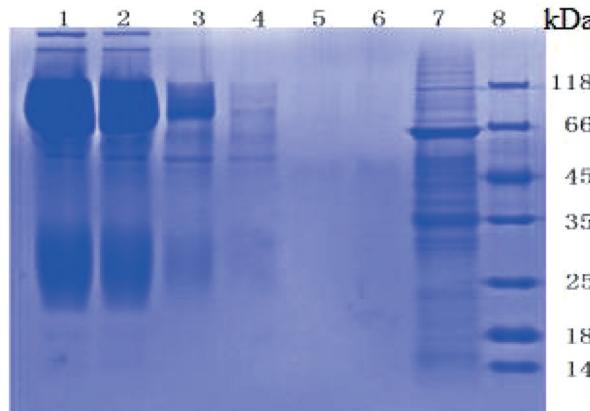


图 7 抗体滴度的检测

Fig.7 Detection of antibody titer

2.8 抗体的制备 通过亲和层析的方法对血清进行纯化, 纯化得到的 IgG 的浓度非常理想, 通过 Protein A280 的测量, IgG 的最高浓度为 9.102 mg/mL, 表明抗体含量达到要求, 符合实验预期, 见图 8。



1-4:洗脱液洗脱;5-6:洗涤液洗涤;7:纯化的 AP₁-AP₂-BP 蛋白;
8:低分子量蛋白 Marker

图 8 血清 IgG 纯化

Fig.8 Serum IgG purification

3 讨 论

本实验用层析的方法对 AP₁-AP₂-BP 重组的蛋白进行了多次相同条件的纯化, 经 SDS-PAGE 电泳可知, 在初步纯化过程中在分子量约为 33 kDa 处出现了明显杂带, 效果不是很理想。因此, 本实验对重组蛋白的纯化过程进行了系统的优化处理, 首先采用硫酸铵沉淀法对重组蛋白进行了粗提取, 其次为提高蛋白回收率对粗提蛋白悬浮液的选择进行了比对实验, 最后再对回收蛋白进行亲和层析纯化, 并将获得的纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳处理, 且通过 Protein A280 比对了重组蛋白的回收率。

实验优化前测得 AP₁-AP₂-BP 纯化蛋白浓度最高为 2.396 mg/mL, 浓度最低为 1.370 mg/mL。实验优化后测得 AP₁-AP₂-BP 纯化蛋白浓度最高为 4.353 mg/mL, 最低为 3.032 mg/mL。且通过 SDS-PAGE 凝胶电泳图对比分析, 不难发现实验优化后的 SDS-PAGE 凝胶电泳图中分子量约为 33 kDa 处的杂带明显减少, 而且 Protein A280 测得的重组蛋白的纯化程度也有显著提升。

本实验首次制备兔源牛乳腺炎致病性无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿 AP₁-AP₂-BP 重组蛋白抗原的亚单位抗体, 为下一步制备快速检测牛乳中致病性无乳链球菌奠定了坚实的基础。

利益冲突: 无

引用本文格式: 王雪吟, 布日额, 陈金龙, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿 AP₁-AP₂-BP 基因亚单位抗体的制备[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(3): 206-211. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.011

参 考 文 献:

- [1] 布日额, 王金良, 吴金花, 等. 基于奶牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿 rAP₁-BP-AP₂ 重组蛋白的间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, (22)4: 1-5.
- [2] 白文丽, 王金良, 锡林高娃, 等. 奶牛乳腺炎无乳链球菌菌毛岛屿 PI-2a 骨架蛋白 BP 基因的克隆及其抗原性预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(4): 294-297.
- [3] 布日额, 王金良, 吴金花, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛辅助蛋白 AP₁-BP 主要抗原域串联表达及其免疫活性鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(7): 609-613, 618.
- [4] 白文丽, 吴金花, 锡林高娃, 等. 奶牛乳腺炎无乳链球菌菌毛岛屿 PI-2a 骨架蛋白 BP 基因的克隆及其序列分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(6): 505-508.
- [5] 吴金花, 布日额, 王金良, 等. 奶牛乳腺炎无乳链球菌 sip、pgk 及 FbsA 基因主要抗原区域的融合表达及抗原性鉴定[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(7): 1292-1299.
- [6] 时永强, 祝宇, 王奇惠, 等. 奶牛乳房炎无乳链球菌的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(15): 163-165, 293.
- [7] 朝洛蒙, 王金良, 布日额, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿辅助蛋白 BP、AP₂ 主要抗原域的串联表达及其免疫活性[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(11): 1140-1145, 1149.
- [8] 锡林高娃, 杜长智, 吴金花, 等. 科尔沁牛乳腺炎临床分离无乳链球菌菌毛岛屿 PI-2a 辅助蛋白 2 基因的克隆及序列分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(12): 1269-1273.
- [9] 锡林高娃, 杜长智, 吴金花, 等. 科尔沁牛乳腺炎无乳链球菌菌毛岛屿 AP₂ 基因部分片段克隆及其抗原性预测[J]. 南方农业学报, 2015, 46(12): 2185-2190.
- [10] 于辰龙, 锡林高娃, 吴金花, 等. 奶牛乳腺炎无乳链球菌菌体蛋白抗原研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2016, 31(4): 317-320.
- [11] 布日额, 王金良, 吴金花, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛辅助蛋白 AP₁、AP₂ 主要抗原域串联表达及其免疫活性鉴定[J]. 中国兽医学报, 2018, (3): 515-520, 543.
- [12] 布日额, 王金良, 吴金花, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿辅助蛋白 AP₁、BP、AP₂ 三基因的串联表达及其免疫原性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018, (2): 138-141.
- [13] 锡林高娃. 科尔沁牛乳腺炎临床分离无乳链球菌菌毛岛屿 PI-2A 辅助蛋白 2 基因的克隆及序列分析[A]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会第五次学术研讨会论文集[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会. 内蒙古自治区通辽市. 2016: 8.
- [14] 于辰龙. 奶牛乳腺炎无乳链球菌菌体蛋白抗原研究进展[A]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会第五次学术研讨会论文集[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医公共卫生学分会. 内蒙古自治区通辽市. 2016: 8.
- [15] 李坤. 利用自制免疫亲和层析柱纯化抗 Ara h 2 抗体[A]. 中国

- 免疫学会. 第十一届全国免疫学学术大会壁报交流集[C]. 中
国免疫学会. 内蒙古自治区通辽市. 2016: 1.
- [16] Bu RE, Wang JL, Wu JH, et al. Indirect enzyme-linked immuno-
sorbent assay method based on *Streptococcus agalactiae*
rSip-Pgk-FbsA fusion protein for detection of bovine mastitis
[J]. Polish J Vet Sci, 2017, 20(2): 138-141. DOI: 10.1515/
pjvs-2017-0043.
- [17] Zhu JJ, Gan X, Ao QW, et al. Basal polarization of the im-
mune responses to *Streptococcus agalactiae* susceptible and re-
sistant tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish Shellfish Im-
munol, 2018, 75: 215-210. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.01.022.
- [18] Ingrid HH, Nils T, Hannah JJ, et al. Latent class analysis of
real time qPCR and bacteriological culturing for the diagnosis of
Streptococcus agalactiae in cow composite milk samples [J].
Preventive Veterinary Medicine, 2018, 31(4): 317-320. DOI:
10.1016/j.prevetmed.2018.03.019
- [19] Wang R, Li LP, Huang Y, et al. Corrigendum: Pathogenicity
of Human ST23 *Streptococcus agalactiae* to fish and genomic
comparison of pathogenic and non-pathogenic isolates [J]. Front
Microbiol, 2018, 9(6): 505-508. DOI: 10.3389/fmicb.2017.
01933.
- [20] 郑珩. 双 Z 结构域亲和层析柱的制备及稳定性研究[A]. 中国
化学会高分子学科委员会. 中国化学会第 18 届反应性高分子
学术研讨会论文集[C]. 中国化学会高分子学科委员会: 2016:
2: 515-520,543.
- [21] 张芮今. 无乳链球菌对奶牛乳腺成纤维细胞几种生长因子表达
的影响[D]. 内蒙古农业大学, 2017, 7(15): 163-165,293.
- [22] 魏慧, 黄海燕, 于芳楠, 等. 大孢粘球菌抗肿瘤活性蛋白
WGF5 分离方法的优化与活性分析[J]. 湖南师范大学自然科
学学报, 2017, 40(6): 44-48.
- [23] 段筱筠, 张爱琳, 苗颖, 等. 花生过敏原初步分离纯化及紫外
光谱分析[J]. 上海农业学报, 2017, 33(6): 91-95.
- [24] 赵玉娟, 段翠翠, 高磊, 等. 乳清中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白
分离制备技术研究[J]. 东北农业科学, 2017, 42(2): 53-59.
- [25] 王维娜, 李金, 田晶, 等. 黑曲霉液态发酵产柚苷酶的分离纯
化及其性质研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(7): 72-78,46.
- [26] 赵小莉, 付洋, 赵强, 等. 硫酸铵沉淀分离富硒大豆蛋白的初
步研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(13): 92-95,100.

收稿日期:2018-06-01 编辑:王晓欢

(上接第 200 页)

- [6] Oladapo OT, Souza JP, De Mucio B, et al. WHO interim guid-
ance on pregnancy management in the context of Zika virus in-
fection[J]. Lancet Glob Health, 2016, 4(8): e510-511. DOI:
10.1016/S2214-109X(16)30098-5
- [7] Pierson TC, Graham BS. Zika virus: Immunity and vaccine de-
velopment[J]. Cell, 2016, 167(3): 625-631. DOI: 10.1016/j.
cell.2016.09.020
- [8] Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serologic
properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State,
Micronesia, 2007[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1232-
1239. DOI: 10.3201/eid1408.080287
- [9] Akey DL, Brown WC, Dutta S, et al. Flavivirus NS1 structures
reveal surfaces for associations with membranes and the immune
system[J]. Science, 2014, 343(6173): 881-885. DOI: 10.1126/
science.1247749
- [10] Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, et al. Secretion of fla-
viviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogen-
esis[M]. Novartis Found Symp, 2006, 277: 233-247; discus-
sion 47-53.
- [11] Kitai Y, Shoda M, Kondo T, et al. Epitope-blocking enzyme-
linked immunosorbent assay to differentiate west nile virus
from Japanese encephalitis virus infections in equine sera[J].
Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(8): 1024-1031. DOI: 10.
1128/CVI.00051-07
- [12] Lorch MS, Collado MS, Arguelles MH, et al. Production of
recombinant NS1 protein and its possible use in encephalitic
flavivirus differential diagnosis[J]. Protein Expr Purif, 2019,
153: 18-25. DOI: 10.1016/j.pep.2018.08.008

收稿日期:2018-07-13 编辑:王晓欢