



中国动物传染病学报
Chinese Journal of Animal Infectious Diseases
ISSN 1674-6422, CN 31-2031/S

《中国动物传染病学报》网络首发论文

题目: 大鼠细小病毒 VP2 原核表达及间接 ELISA 方法建立
作者: 霍娜, 姚威, 于婉琪, 魏晓锋, 萧飒, 陈鸿军
网络首发日期: 2018-05-04
引用格式: 霍娜, 姚威, 于婉琪, 魏晓锋, 萧飒, 陈鸿军. 大鼠细小病毒 VP2 原核表达及间接 ELISA 方法建立. 中国动物传染病学报.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20180503.1451.028.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

大鼠细小病毒 VP2 原核表达及间接 ELISA 方法建立

霍娜^{1,2}, 姚威^{1,2}, 于婉琪^{1,2}, 魏晓锋³, 萧飒^{1*}, 陈鸿军^{2*}

(1. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 2. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241; 3. 上海实验动物研究中心, 上海, 201203)

摘要：本研究以大鼠细小病毒 (Rat parvovirus, RPV) VP2 基因的原核表达产物为抗原建立检测 RPV 抗体的间接 ELISA 方法。通过比对分析不同毒株大鼠细小病毒的 VP2 蛋白序列, 我们筛选出了 RPV 株 VP2 蛋白上长度为 378 bp 的特异性成熟肽序列, 随后构建了 pET30a 原核表达体系, 借助 His 标签对重组表达产物进行纯化。以纯化鉴定后的表达产物为抗原, 免疫 Balb/c 小鼠制备多抗血清并建立检测大鼠细小病毒血清抗体的间接 VP2-ELISA 方法: 抗原包被质量浓度为 0.28 $\mu\text{g/mL}$; 阳性判定标准初步定为 $\text{OD}_{450} \geq 0.5$; 与 H-1 株和 KRV 株的阳性血清存在一定的交叉反应; 批内试验变异系数小于 10%。本研究建立的 RPV VP2-iELISA 检测方法具有良好的特异性、敏感性和重复性, 可用于大鼠细小病毒感染的血清抗体检测。

关键词：大鼠细小病毒; VP2; 原核表达; 间接酶联免疫吸附试验

EXPRESSION OF VP2 GENE OF RAT PARVOVIRUS AND DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT PROTEIN-BASED INDIRECT ELISA METHOD FOR ANTIBODIES DETECTION

Huo Na^{1,2}, Yao Wei^{1,2}, Yu Wanqi^{1,2}, Wei Xiaofeng³, Xiao Sa^{1*}, Chen Hongjun^{2*}

(1. Northwest A & F University, Shan-xi, 712100, China; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS, Shanghai 200241, China; 3. Shanghai Lab. Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Abstract: In this study, an indirect ELISA method was initially established for detecting Rat parvovirus (RPV) antibodies based on VP2 protein expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) strain. According to alignment analysis of VP2 gene from 5 RPV strains published in NCBI, a specific district with 378bp was aimed to execute HYPERLINK "javascript:;" prokaryotic HYPERLINK "javascript:;" expression via pET30a(+) system. Furthermore, we developed an indirect ELISA method in virtue of purified expression product recognized by His Tag accompanying with anti-VP2 serum. Ultimately, an optimal reaction system and criterion were determined: concentration of coated antigen, 0.28 $\mu\text{g/mL}$; positive sample, $\text{OD}_{450} \geq 0.5$. Inter-assay coefficients of variation (CV) of VP2-ELISA were all less than 10%. The cross-reactivity with serum against H-1 and KRV were existed but mild. Comprehensive analysis indicates that the indirect VP2-iELISA is highly sensitive and specific, and could be used for clinical detection of RPV antibodies.

Key words: Rat parvovirus; VP2; prokaryotic expression; indirect ELISA assay

*上海市科委实验动物专项资金资助 (项目编号: 17140900303; 15140900600)

*作者简介: 霍娜 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: 841059087@qq.com。

*通信作者: 陈鸿军 (vetchj@shvri.ac.cn); 萧飒 (saxiao@nwafu.edu.cn)

大鼠细小病毒 (Rat parvovirus, RPV) 是对实验大鼠危害最为严重的病毒之一, 属单股线状无囊膜 DNA 病毒, 分类上属细小病毒科, 细小病毒属, 包括 Kilham 大鼠病毒 (KRV), Toolan 病毒 (H-1), 大鼠细小病毒 a 型 (RPV-1a) 和大鼠微小病毒 (RMV) 这四种毒株^[1,2]。RPV 在实验大鼠和野生大鼠中有较高的感染率, 无任何临床症状和病理变化, 但在细胞内持续性感染, 并可致种鼠群繁殖率下降, 污染肿瘤移植物和细胞系, 对实验研究造成严重干扰, 是实验动物国标中 SPF 级大鼠病毒必检项目之一^[2-4]。

VP 蛋白是结构性或衣壳蛋白, 包括 VP1、VP2 和 VP3。VP1 是次要衣壳蛋白, 其编码序列包含特殊的 N 端残基和 VP2 蛋白。而 VP2 是主要的衣壳蛋白, 参与衣壳组装, 释放大约 85% 的病毒粒子。VP2 蛋白还决定了人肿瘤细胞对于 H-1 毒株的易感性。VP3 蛋白是 VP2 的裂解产物^[5-7]。

为检测大鼠细小病毒、大鼠微小病毒和细小病毒 NS-1 株感染的抗体水平, 本研究参考这三种病原基因组 DNA 序列, 设计引物, 克隆大鼠细小病毒 VP2 抗原的特异性表位, 原核表达后, 以纯化蛋白为包被抗原, 建立间接 ELISA 方法, 可有效地用于大鼠细小病毒血清抗体检测。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种及试剂 表达载体 pET30a、大肠杆菌 BL21(DE3) 由本实验室保存。Balb/c 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.2 血清和试剂 大鼠细小病毒 RPV、H-1 和 KRV 毒株阳性血清和待检血清由上海实验动物研究中心提供。RPV VP2 小鼠单克隆抗体 2E7 由本实验自制。HRP 标记羊抗大鼠 IgG(H+L) 购自上海翊圣生物科技有限公司; Phanta®Max Super-Fidelity DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 均购自英国 NEB 公司, 其他试剂均为分析纯。

1.3 VP2 基因克隆及原核表达

1.3.1 基因分析与引物设计 根据 NCBI 发表的大鼠细小病毒 RPV(ACV32720)、H-1 株 (AFR44451.1)、KRV 株(AAB38328.1)、RMV(AGG38825)和 MVM 株(ABB01355.1)的 VP2 蛋白序列进行比对分析, 找出了一段特异的 378 bp 的 RPV-VP2 的成熟肽:

```
ATGGCTGCTAGAGTTGAGAGAGCAGCTGACGGCAGTGGAGGCTCTGGTGGTGGTGGT
GGTGGTGGTAATGGTGGTGTGTTGGGGTTTCTACGGGGAGCTTTGATAACCAAACGCACT
ATGACTTCCTTGAGGGGGGTGGGTCCGTATCACAGCGTATGCTTCGCGACTTGTTCA
TATAAATATGCCTGCTTCTGAAGAGTACCATAGAATTTTTGTTAGAAATAATACTGAT
ACTGGTCAAAGGGAAAGATGTCTTTGGATGATGTGCACACACAGATCTGGACTCCA
TGGAGTCTGGTAGATGCTAATGCATGGGGCTGTTGGTTTCAGCCAAGTGACTGGCAGT
TTATTCAAACCTCTATGGCTGAACTTAATCTT。根据该序列设计特异性引物, 上游引物
序列为: 5'-CGC GGATCC ATGGCTGCTAGAGTTGAGAGAG-3'; 下游引物: 5'-GCC
```

CTCGAG TCAAAGATTAAGTTCAGCCATAG -3', 下划线分别为限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 的酶切位点, 斜体部分为保护性碱基。

1.3.2 VP2 基因的扩增与克隆 以合成的基因为模板, 特异性引物扩增 VP2 基因, 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 反应产物。纯化后与 pET30a 载体连接, 酶切鉴定正确后命名 pET30a-VP2, 重组质粒送至苏州金唯智公司进行测序。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达与纯化鉴定 将测序正确的 pET30a-VP2 重组质粒接种于 Kan⁺ 抗性培养基中, 37 °C 培养至 OD 值达为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导约 8 h。同时设 pET30a 载体为空白对照。于 4 °C 离心收集细菌培养物, 进行 15% SDS-PAGE 鉴定。确认表达后利用 Ni-琼脂糖凝胶 6FF(His 标签纯化树脂) 对表达产物进行纯化, 具体方法按说明书进行。纯化后产物进行 SDS-PAGE 和免疫印迹分析, 用本实验室制备的 VP2 单克隆抗体作为一抗, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 用 ECL 发光液显色。

1.4 小鼠阳性血清的制备 纯化后的 VP2 蛋白与等体积完全弗氏佐剂混合并完全乳化, 腹腔注射, 50 µg/只免疫 6 周龄的 Balb/c 小鼠; 7 d 后二免, 免疫途径、剂量同一免, 用弗氏不完全佐剂; 14 d 后三免, 不加佐剂, 腹腔注射, 50 µg/只。5 d 后收集血清测抗体效价。

1.5 间接 ELISA 方法的建立

1.5.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定 采用方阵滴定法将纯化的 VP2 重组蛋白用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液按照 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1000、1:2000、1:4000 的梯度稀释, 每个稀释度包被一竖行, 100 µL/孔, 4 °C 包被过夜; 次日弃液, TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 甩干; 5%脱脂奶粉 37°C 封闭 2 h; 弃脱脂奶, 洗涤同上, 甩干; 小鼠阴阳性血清分别按照 1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 的梯度稀释, 每个稀释度加一横行, 100 µL/孔, 37 °C 孵育 60 min; 洗板同上, 甩干; 加入羊抗鼠酶标二抗(1:5000), 100 µL/孔, 37 °C 孵育 45 min; 洗板同上, 甩干; 加入 100 µL/孔 TMB 显色液, 室温避光显色 15 min; 最后加入 50 µL/孔 2 M 浓 H₂SO₄ 终止显色; 酶标仪测定 OD₄₅₀。以 P/N 值最大的稀释度为抗原与血清的最佳稀释度。

1.5.2 临界值的确定 将经进口全病毒间接 ELISA 试剂盒检测为阴性的 55 份大鼠血清在最适反应条件下, 按 iELISA 程序进行测定, 求出 OD₄₅₀ 平均值 X 和标准差 SD。根据统计学原理, OD₄₅₀ ≥ X+3SD 时, 判为阳性; OD₄₅₀ < X+3SD 时, 判为阴性。

1.5.3 交叉反应试验 以纯化重组蛋白作为抗原包被 ELISA 板, 检测 H-1、KRV 阳性血清, 确定重组抗原与其他大鼠病毒阳性血清是否发生交叉反应。

1.5.4 敏感性试验 将 RPV 毒株阳性血清按照 1:50、1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 的梯度稀释, 检测建立的间接 ELISA 方法的灵敏度。

1.5.5 重复性试验 (1)批内重复试验: 抽取血清样品 10 份, 每份血清样品平行做 5 孔, 用建立的间接 ELISA 方法检测, 计算其变异系数。(2)批间重复试验: 在相同的试验条件下, 用 2 批重组 VP2 包被 ELISA 板, 对 10 份血清进行 ELISA 检测, 计算其变异系数。

1.5.6 样品检测 采用本试验建立的 iVP2-ELISA 方法对上海实验动物中心提供的 165 份待检血清进行检测，计算样品阳性率。

2 结果

2.1 VP2 重组蛋白的表达与纯化鉴定 将合成的 VP2 片段克隆入 pET30a 载体中，挑取测序正确的重组菌，经 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 结果显示：0.5 mM IPTG 诱导的重组菌在 20 kDa 左右处可发现特异性的条带。经 His 镍柱纯化后可见明显的单一表达条带（图 1A）。纯化后的重组蛋白经 Bradford 法测定浓度为 0.28 mg/mL。将纯化后产物和空载体菌转移至 NC 膜，利用本实验室制备的 2E7 单抗进行 Western-blot 检测。结果显示：在 20 kDa 左右，重组纯化蛋白具有明显的反应条带（图 1B）。

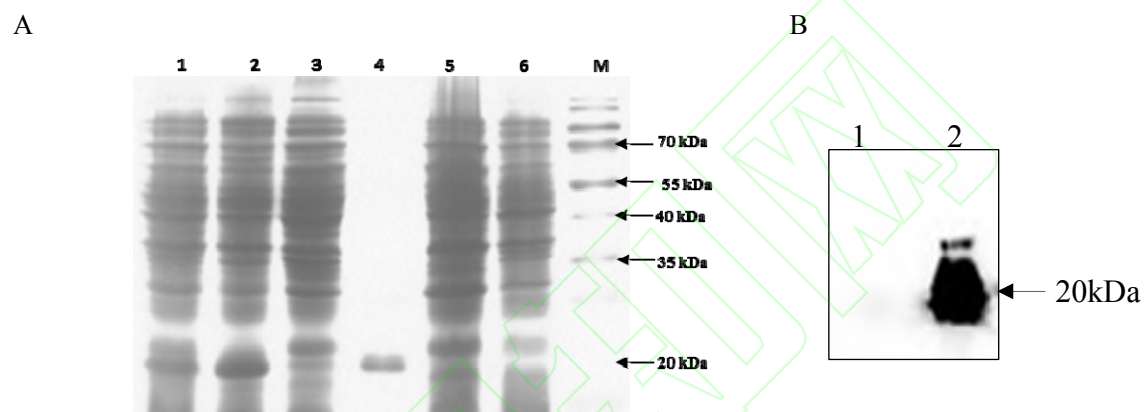


图 1. SDS-PAGE 和 Western-blot 检测 pET30a-VP2 重组蛋白的表达与纯化

Fig.1 Identification of the recombinant protein by SDS-PAGE and Western blotting analysis

A. SDS-PAGE 电泳检测 VP2 重组蛋白 A. Identification of the recombinant protein by SDS-PAGE

1. pET30a-VP2 诱导表达全菌；2. pET30a-VP2 诱导表达后超声破碎的沉淀；
3. pET30a-VP2 诱导表达后超声破碎的上清；4. pET30a-VP2 纯化蛋白；
5. 未诱导表达的 pET30a-VP2；6. pET30a 空载诱导对照；M. 蛋白质分子量标准；
1. pET30a -VP2/ E.coli BL21 after induction; 2. Sediment of pET30a -VP2/ E.coli BL21 after induction;
3. Lysate of pET-NP/E.coli BL21 after induction; 4. Purified pET30a-VP2 protein;
5. pET30a -VP2/ E.coli BL21 without IPTG; 6. pET30a / E.coli BL21 after induction ; M: Protein Marker;

B. Western-blot 检测 VP2 重组蛋白 B. Identification of the recombinant protein by Western blotting

1. pET30a 空载体；2. pET30a-VP2 重组蛋白
1. Vector pET30a; 2. Protein pET30a-VP2

2.2 间接 ELISA 方法的建立

2.2.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定 方阵实验结果表明，当抗原包被最佳稀释倍数为 1:1000（此时蛋白质量浓度为 0.28 $\mu\text{g/mL}$ ）、待检血清以 1:2000 稀释时，P/N 值最大，结合阴阳性血清的 OD450 nm 值，确定抗原最佳包被质量浓度为 0.28 $\mu\text{g/mL}$ （即 28 ng/孔），血清最适稀释度为 1:2000。

2.2.2 临界值的确定 用初步确定的条件，对 55 份（1:100 倍稀释）RPV 阴性血清样本的 OD450 nm 测定后计算得平均值 X 和标准差 SD 分别为 0.263 与 0.079。计算出 RPV VP2 间接 ELISA 的判断标准为：样本 OD450 nm \geq 0.5 为阳性；样本 OD450 nm $<$ 0.5 为阴性。

2.2.3 交叉反应试验 采用 iVP2-ELISA 方法检测 H-1、KRV 阳性血清进行检测的结果表明，上述血清均为阳性，说明制备的 VP2 抗原与上述病原存在一定的交叉反应。

表 1 交叉反应试验结果

Table 1 The result of cross-reaction

样品 Sample	重复次数 Repeats			平均值 Average
	1	2	3	
KPV	0.773	0.774	0.82	0.789
H1	0.625	0.582	0.655	0.621

2.2.4 敏感性试验 采用建立好的 iVP2-ELISA 方法检测不同稀释倍数的 RPV 阳性血清时，可看出当阳性血清稀释到 2000 倍时仍能检测到（表 2），表明本实验建立的 ELISA 检测方法灵敏度较高。

表 2 敏感性试验结果

Table 2 The result of sensitivity test

RPV		血清稀释度						
		Serum Concentration						
		1:50	1:100	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
重复次数	1	2.696	2.695	1.924	1.071	0.519	0.256	0.201
	2	2.618	2.472	1.970	1.092	0.582	0.336	0.237
平均值		2.657	2.584	1.947	1.082	0.551	0.296	0.219

2.2.5 重复性试验 （1）批内重复性试验：选取 10 份血清样品，用建立的 VP2-ELISA 进行 5 次批内重复检测。结果见表 3，批内重复性试验的变异系数集中 2.175%~5.567%之间，表明建立的检测方法具有较好的重复性。（2）批内重复性试验：用建立的 VP2-ELISA，取 10 份血清样品分别用 3 个不同批次包被的酶标板进行检测。结果见表 4，3 次检测的阴、阳性结果完全一致。

表 3 批内重复性试验结果

Table 3 The result of intra-assay of indirect ELISA

样品 Sample	重复次数 Repeats					平均值 Average	标准差 Standard deciation	变异系数/% Coefficiaent of variation/%
	1	2	3	4	5			
1	1.925	1.846	1.946	1.875	1.846	1.888	0.041	2.175
2	0.484	0.467	0.478	0.421	0.454	0.461	0.022	4.853
3	0.313	0.366	0.335	0.320	0.344	0.336	0.019	5.567
4	0.428	0.397	0.438	0.421	0.462	0.429	0.021	4.954
5	0.491	0.479	0.530	0.441	0.476	0.483	0.029	5.930
6	0.353	0.364	0.353	0.354	0.341	0.353	0.007	2.066
7	0.214	0.216	0.225	0.227	0.248	0.226	0.012	5.346
8	0.270	0.284	0.265	0.289	0.292	0.280	0.011	3.800
9	0.239	0.229	0.235	0.254	0.255	0.240	0.010	4.327
10	0.098	0.096	0.089	0.094	0.099	0.095	0.004	3.731

表 4 批间重复性试验结果

Table4 The result of inter-assay of indirect ELISA

样品 Sample	不同批次 Different batches			平均值 Average	标准差 Standard deciation	变异系数/% Coefficient of variation/%
	1	2	3			
1	1.539	1.426	1.461	1.475	0.047	3.202
2	0.553	0.461	0.479	0.498	0.040	7.994
3	0.43	0.336	0.319	0.362	0.049	13.485
4	0.334	0.302	0.252	0.296	0.034	11.400
5	0.168	0.253	0.153	0.191	0.044	23.054
6	0.192	0.195	0.115	0.167	0.037	22.171
7	0.313	0.333	0.238	0.295	0.041	13.862
8	0.175	0.218	0.161	0.185	0.024	13.110
9	0.330	0.357	0.234	0.307	0.053	17.193
10	0.359	0.291	0.245	0.298	0.047	15.714

2.2.6 样品检测结果 采用本试验建立的 iVP2-ELISA 方法对上海实验动物中心提供的 165 份待检血清进行检测, 编号为 31 的样品为阳性, 阳性率为 0.61%。

3 讨论

RPV 在鼠群中感染非常普遍, 且可长期带毒, 这给动物生产和动物实验带来了严重干扰。因此, 研制一种操作简便、快速、敏感性高、特异性好, 适用于检测大规模样品的 ELISA 诊断方法具有重要意义。

细小病毒的 VP2 蛋白是一种重要的结构蛋白, 能诱导宿主产生免疫应答^[8]。有报道显示, 缺失 VP2 基因的猪细小病毒 (PPV) 突变体均丧失了对宿主细胞的再感染性, 而且 VP2 蛋白是 PPV 中和抗体的靶蛋白^[9,10]。Ball-Goodrich LJ 等^[5]研究结果表明在 RPV 的感染过程中大鼠体内产生了抗 VP2 蛋白的特异性抗体。因此, VP2 在诊断细小病毒的感染和对其进行免疫预防都具有重大意义。

本研究分析比大鼠细小病毒 RPV 株、H-1 株、KRV 株、RMV 和 MVM 株的 VP2 蛋白序列, 原核表达了一段特异的 RPV-VP2 成熟肽, 以纯化表达产物为抗原, 建立间接 ELISA 方法。该方法在重复性和敏感性方面优于 HI 法, 且血清检品不需特殊处理和特殊设备, 适于大批量样品的检测^[11,12]。

但是, 本研究也存在一定的不足, 因为所选取的靶蛋白氨基酸序列与 KRV、H-1、MVM 和 RMV 株的同源性在 70%~79%, 所建立的 iVP2-ELISA 方法对于 H-1 和 KRV 株的阳性血清存在轻微的交叉反应。其次, 以原核表达产物为包被抗原所建立的间接 ELISA 法极易受到原核表达系统中杂蛋白成分的干扰而产生假阳性结果, 降低了方法的特异性。为弥补这些不足, 本研究还在制备多株 VP2 单抗, 拟在下一步将 VP2 单抗作为竞争抗体, 建立检测大

鼠细小病毒中和抗体的阻断 ELISA 检测方法。该方法能大大提高检测抗体的特异性，以为大鼠细小病毒、大鼠微小病毒和细小病毒感染的鉴别诊断提供可靠的技术基础。

参考文献

- [1] Xu F J, Yuan W, Zhang T Y, *et al.* Simultaneous detection of 4 prototypic rat parvoviruses using the luminex xTAG assay in laboratory animal health monitoring[J]. *J Virological Methods*,2017,248:61-65.
- [2] 李晓波, 付瑞, 王吉, 等. 大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(06): 46-52.
- [3] Kjell J, Olson L, Abrams MB. Improved recovery from spinal cord injury in rats with chronic parvovirus serotype-1a infection [J]. *Spinal Cord*,2016,54(7): 517-520.
- [4] Robert O. Jacoby, Lisa J. Parvovirus infections of mice and rats[J]. *Seminars in Virology*,1995,6(5).
- [5] Ball-Goodrich LJ, Paturzo FX, Johnson EA, *et al.* Immune Responses to the Major Capsid Protein during Parvovirus Infection of Rats[J]. *J Virol*,2002,76(19): 10044-10049.
- [6] Leuchs B, Frehtman V, Riese M, *et al.* A novel scalable, robust downstream process for oncolytic rat parvovirus: isoelectric point-based elimination of empty particles[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2017,101(8):3143-3152.
- [7] Cho IR, Kaowinn S, Song J, *et al.* VP2 capsid domain of the H-1 parvovirus determines susceptibility of human cancer cells to H-1 viral infection[J]. *Cancer Gene Therapy* ,2015,22:271-277.
- [8] 易立, 程世鹏, 王建科, 等. 犬细小病毒 VP2 蛋白的表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(08): 1038-1042.
- [9] 田莉莉, 李林. 猪细小病毒 VP2 蛋白的截短表达与间接 ELISA 诊断方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(11): 59-64.
- [10] 王鑫. 猪细小病毒 VP2 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[D]. 东北农业大学, 2017.
- [11] 贺争鸣, 卫礼, 张然, 等. 检测大鼠细小病毒抗体的 ELISA、IEA 和 HI 法比较[J]. *上海实验动物科学*, 1993(03): 132-134.
- [12] 陈筱侠. 大鼠中 Kilham 大鼠细小病毒感染的酶联免疫吸附试验诊断[J]. *上海实验动物科学*, 1986(4): 208.