

犬冠状病毒大熊猫株核蛋白基因的克隆、序列分析及其在 *E. coli* 中的高效表达

乔 军¹ 夏咸柱^{1*} 胡桂学² 扈荣良¹ 谢之景¹ 闫 芳¹ 杨松涛¹ 黄 耕¹

(1 中国人民解放军军需大学军事兽医研究所, 长春, 130062)

(2 吉林农业大学动物科技学院, 长春, 130118)

摘要:首次对犬冠状病毒大熊猫株 (CCV GP) 核蛋白 (N) 基因进行了克隆和序列测定。本实验根据 GenBank 中报道的 CCV Insavc-1 株 N 蛋白基因序列, 设计了一对特异性引物, 对分离的 CCV GP 野毒株进行了 RT-PCR 扩增。将扩增的 PCR 产物纯化回收后与 pGEM-T 连接得到重组质粒 pTN, 进行核苷酸序列测定。结果该基因全长 1 146 bp, 编码 382 个氨基酸; 与 CCV 标准毒株 Insavc-1 N 基因相比, 核苷酸的同源性为 92.6%, 推导的氨基酸的同源性为 93.2%。在推导的 N 蛋白 N 端 156-179 位存在一个 SRXX 富集区, 与小鼠肝炎病毒 N 蛋白相应区域相同, 推测可能是 RNA 结合区。预测的 GP 株 N 蛋白疏水性和抗原表位与 Insavc-1 株 N 蛋白存在细微的差异。将 pTN 双酶切, 回收目的基因片段克隆到大肠杆菌表达载体 pET28 a 中构建了重组质粒 pETN, 转化大肠杆菌 BL21, 用 IPTG 进行了诱导表达。结果重组菌菌体裂解物经 SDS-PAGE 电泳可检测到相对分子量为 48 KD 的重组蛋白, 免疫印迹法证实该重组蛋白可以与 CCV 多克隆抗体发生特异性反应。经凝胶薄层扫描分析, 重组 N 蛋白表达量可占菌体蛋白的 49.3%, 表达的蛋白纯化后可用于建立检测大熊猫 CCV 抗体间接 ELISA 用的包被抗原。

关键词:犬冠状病毒大熊猫株; 核蛋白基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2004)03-0248-06

Cloning, Sequence Analysis and Expression in *E. coli* of Nucleoprotein Gene of Canine Coronavirus Giant Panda Isolate

QIAO Jun¹ XIA Xianzhu¹ HU Guixue² HU Rongliang¹ XIE Zhijing¹ YAN Fang¹
YANG Songtao¹ HUANG Geng¹

(1 Institute of Military Veterinary, Quartermaster University of PLA, Changchun, 130062)

(2 Department of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118)

Abstract: Nucleoprotein (N) gene of canine coronavirus giant panda isolate (CCV GP) was firstly cloned and sequenced. According to nucleoprotein gene sequence of CCV strain Insavc-1 accessed by GenBank, a pair of specific primers was designed to amplify N gene of CCV strain GP. The PCR product was purified and cloned into pGEM-T. The positive recombinant pTN was used for sequencing. The complete length of N gene of CCV GP was 1 146 bp, which encoded 382 amino acids. The homologies of nucleic acid and amino acid between CCV strain GP and Insavc-1 were 92.6% and 93.2%, respectively. A region abounding with SRXX was found, which located in the same region with that of MHV. It was deduced to bind genomic RNA. There were some differences in the hydrophobicity and antigenic index plots between two strains. The N gene was further subcloned into the prokaryotic expressing vector pET28a and then transformed into *E. coli* strain BL21 for expression under the induction of IPTG. The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western-blotting analysis. The results revealed that it had a molecular weight of 48 KD, which could be specifically recognized by multiclonal antibody against CCV. The recombinant protein N can account for 49.3% in the total protein of the induced recombinant bacteria by analysis of gel scanning, which can be used for antigen to detect specific antibody against CCV in giant panda's sera.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30000123)

作者简介: 乔军 (1971-), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

收稿日期: 2003-11-19; 修回日期: 2004-04-05

* 通讯作者, E-mail: qj710625@yahoo.com.cn

Key words: Canine coronavirus giant panda isolate; Nucleoprotein gene; Cloning; Sequence analysis

根据血清学试验和种属发生规律, 已知的冠状病毒可分为 3 个血清群, 犬冠状病毒 (Canine coronavirus, CCV) 属血清 I 群, 它是引起犬发生以胃肠炎为主要特征的急性传染病的病原^[1~5], 也是血清 I 群中研究最少的病毒之一。近几年, 通过研究发现, 犬冠状病毒感染的宿主范围有不断扩大的趋势, 甚至大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 和小熊猫 (*Ailurus fulgens*) 等野生珍稀动物也可感染此病^[6~9], 给我国养犬业和珍稀野生动物保护业带来很大的威胁。1996 年, 胡桂学等从四川某大熊猫保护中心病死的 1 只大熊猫肝脏中分离出 1 株冠状病毒, 经过系统的理化学和病毒分子生物学鉴定证实为 1 株 CCV (命名为 GP 株)。鉴于该病毒病原生态学日趋复杂化和目前对该病毒分子生物学背景了解甚少, 我们首次对 GP 野毒株第二大结构蛋白—核蛋白基因进行了全基因克隆和序列分析, 以期探讨 GP 株的遗传演化规律, 同时也为此病的特异性诊断和安全有效的基因工程疫苗研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

CCV GP 株是本实验室胡桂学博士从四川某大熊猫保护中心病死的 1 只大熊猫肝脏中用 F81 和 CRFK 猫肾传代细胞分离得到的, 经系统的病毒学鉴定后保存。

1.2 质粒、菌株及主要试剂

反转录酶 M-MLV、RNase inhibitor、T4DNA 连接酶及 dNTPs 购自 MBI 生物公司; Taqplus DNA 聚合酶和 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司; DMEM 培养基为 GIBCO 产品; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; 限制性内切酶为大连宝生物公司产品。大肠杆菌表达载体 pET28 a、克隆宿主菌 JM109 和表达宿主菌 BL21 由本室保存。

1.3 引物的设计

根据 GenBank 中报道的 CCV Insavc-I 株 N 基因序列, 设计了一对特异性引物。上游引物 P1: 5'-TAGAATTCACCATGGCCTCTCAGGGACAACGTG-3'; 下游引物 P2: 5'-ATCGGCGCCGCTTCGTTACCTCAT-3'。为下一步克隆需要, 分别在上、下

游引物中引入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点(下划线部分), 并加有两个保护性碱基。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4 病毒培养及总 RNA 提取

病毒培养按常规方法进行。总 RNA 提取参照 Chomczynski 等^[10]报道的“异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提分离 RNA 的一步法”进行。

1.5 CCV GP 株 N 基因 RT-PCR 扩增、克隆及序列测定

RT 反应参照乔军等^[11]进行。PCR 采用 50 μ l 反应体系。取反转录产物 2 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 引物 P1 (25 pmol/ μ l) P2 (25 pmol/ μ l) 各 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 各 4 μ l, 水 32.7 μ l, Taqplus DNA 聚合酶 0.3 μ l (5 U/ μ l) 混匀。反应条件为 96 $^{\circ}$ C 预变性 180 s; 94 $^{\circ}$ C, 40 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 110 s, 35 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。目的 DNA 片段用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收, 并将回收 DNA 片段与 pGEM-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 然后按常规方法涂在预制好的含适量 Amp 的 LB 琼脂平板上培养 16 h。用限制性内切酶酶切和 PCR 方法鉴定获得阳性重组质粒 (命名为 pTN), 送上海联合基因生物公司进行序列测定。所测序列用 DNAMAN 和 DNASTar 进行分析。

1.6 原核表达载体 pETN 的构建

用 *EcoR* I 和 *Not* I 同时分别双酶切 pTN 和 pET28 a, 然后回收目的片段, 用 T₄ 连接酶连接进行定向克隆, 构建原核表达载体 pETN。

1.7 重组质粒在大肠杆菌中的表达及表达产物的鉴定

将 pETN 转化感受态菌 BL21 后, 挑选单菌落, 接种含卡那霉素 (30 mg/L) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 1.0, 加 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导 3 ~ 7 h。离心收集菌体, 重悬于 200 μ l TE 中, 加等量 2 倍上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 5 min, 按卢圣栋^[12]方法于 12% 的 SDS-PAGE 上检测目的蛋白的表达情况, 并用双波长非点扫描仪对上述 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带进行扫描。将 SDS-PAGE 凝胶电泳的各蛋白区带转移至硝酸纤

纤维素膜,然后一抗用 CCV 免疫犬多价血清、二抗用辣根过氧化物酶标记的兔抗犬 IgG 进行 Western - blotting 分析^[13]。

2 结果

2.1 CCV GP 株 N 基因 RT-PCR 扩增结果

经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳,CCV GP 株 RT-PCR 产物大小约为 1 146 bp,与预期 N 基因大小相符(图

1)。

2.2 阳性重组质粒 pTN 的鉴定

扩增产物连接到 pGEM - T 载体上,得到重组子 pTN。将重组子 pTN 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,可得到 3 000 bp 和 1 146 bp 两个片段,与预期结果一致(图 2)。以重组子 pTN 为模板,用 PCR 方法进行扩增,可得到 1 146 bp 的核酸片段,表明目的基因已克隆到 T 载体中(图 3)。

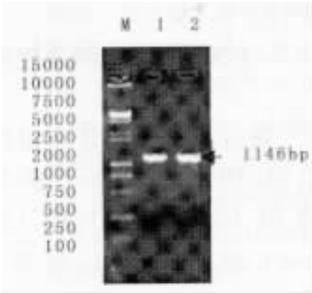


图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of PCR

M : D, L - 15000 + 2000

1 : CCV Insavc - 1

2 : CCV GP

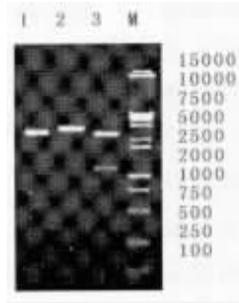


图 2 pTN 酶切鉴定结果

Fig.2 Identification of pTN by enzyme digestion

M : D, L - 15000 + 2000

1 : pTN ; 2 : pTN/*EcoR* I

3 : pTN/*EcoR* I + *Not* I

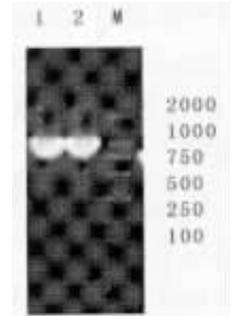


图 3 PCR 鉴定结果

Fig.3 Identification of pTN by PCR

M : D, L - 2000

1 : pTN 1

2 : pTN 2

2.3 CCV GP 株 N 蛋白基因 cDNA 序列测定结果及推导的氨基酸序列

蛋白基因 cDNA 阅读框全长 1 146 bp,编码 382 个氨基酸,与 Insavc - 1 株 N 蛋白大小相同(图 4,Gen-Bank 登录号为 AY436636)。

重组质粒 pTN 经序列测定表明,CCV GP 株 N

```

1*   ATGGCCTCYCAGGGACAACGTGTAGCTGGGAGATGAATCTACCAAAAAACGTGGTCGTTCCAATTCTCGTGGCCGGAAGAATAACTATACTCTTCATTC
1    M A S Q G Q R V S W G D E S T K K R G R S N S R G R K N N T I P L S F
106  TTCAACCCCAATTACCTCCAACAAGGTTCAAATTTTGGAACTATGTCGGAGAGACTTTGTACCCAAAGGAATAGGTAACAAGGATCAACAGATTGGTTATTGG
36   F N P I T L Q Q G S K F W N L C P R D F V P K G I G N K D Q Q I G Y W
211  AATAGACAAAGCCGCTATCGCATGGTGAAGGTCAGCGTAAAGAGCTTCTGAAAGGTGGTCTTCTACTACTAGTACTGGTCTCATGCTGATGCAAAAATTT
71   N R Q S R Y R M V K G Q R K E L P E R W F F Y Y L G T G P H A D A K F
316  AAAGATAGAATAGATGGAGTGTCTGGTGGCCAAAGGATGGTGCATGAATAACCAACTACACTTGGTAATCGTGGTCTAATAATGAATCCAAAGCTTTGAAA
106  K D R I D G V V W V A K D G A M N K P T T L G N R G A N N E S K A L K
421  TTCGATGGTAAAGTACCAGGAGAATTTCAACTTGAAGTGAACCAATCAAGGGACAATCAAGATCACGCTCTCAATCTAGATCTCAGTCTAGAAAATAGATCTCAA
141  F D G K V P G E F Q L E V N Q S R D N S R S R S Q S R S Q S R N R S Q
526  TCTAGAGGAAGGCAACATCCAATAAAGAAGGATGACAAATGTAGAACAAGGTGTCTCTGGTGCCTCAAAAAGTTAGGTGTGACACAGAAAAACAACAACA
176  S R G R Q Q S N N K K D N V E Q A V L A A L K K L G V D T E K Q Q Q
631  CGCTCTCGTTCTAAATCTAAGAACAGTACCAACTCTAAGACAAGAGATACTACACCTAAGAATGAAACAAACACACCTGGAAAGAGAAGTGCAGGTAAGGTTGAT
211  R S R S K S K E R S N S K T R D T T P K N E N K H T W K R T A G K G D
736  GTGACAAAATTTTATGGAGCTAGAAGTAGTTGACGCAATTTGGTGACAGCGATCTCGTTGCCAATGGGAACGGTGCCAAAGTATTACCCACAACCTGGCTGAATGT
246  V T K F Y G A R S S S A N F G D S D L V A N G N G A K Y Y P Q L A E C
841  GTTCCATCTGTATCTAGCATTCTGTTTGGAAAGCTATTGGACTGCAAAAGGAAGTGGCGACAGGATGAAGTACACATTACACATAAATACCACCTGCCAAAGGAT
281  V P S V S S I L F G S Y W T A K E D G D Q I E V T F T H K Y H L P K D
946  GATCCTAAGACTGGACAATTCCTTCAGCAGATTAATGCCTATGCTCGTCCATCAGAGGTGGCAAAGAACAAGACAGACACAGTAAAGCTCGTTCTAAATCTCGAGAA
316  D P K T G Q F L Q Q I N A Y A R P S E V A K E Q R Q R K A R S K S A E
1051 AGGGTAGAGCAAGAGGTTGTACCTGATGCATTAACAGAAAAATATACAGATGTGTTTGTATGACACACAGGTTGAGATTATGATGAGGTAAACGAACTAA
351  R V E Q E V V P D A L T E N Y T D V F D D T Q V E I I D E V T N *

```

图 4 CCV GP 株 N 蛋白基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列,阴影部分为起始密码子;下划线部分为推测的 SRXX 富集区

Fig.4 cDNA sequence of N protein of CCV strain GP and deduced amino acid sequence. The initiation and stop codon were shadowed. The deduced SRXX region was underlined.

用 DNAMAN 对所测序列进行了分析。与 GenBank 中 CCV 标准毒株 Insavc - 1 N 基因相比,两者核苷酸的同源性为 92.6 % ,推导的氨基酸序列的同源性为 93.2%。同时在 GP 株 N 蛋白 N 端 156 - 179 位存在一个 SRXX 富集区,与小鼠肝炎病毒相应区域相同,推测可能是 RNA 结合区。用 BioEdit 软件对推导的 GP 株 N 蛋白氨基酸组成进行了分析,发现赖氨酸(Lys)占有氨基酸残基的 9.40 % (36/382);丝氨酸(Ser)占 9.14 % (35/382);精氨酸(Arg)占 8.36 % (32/382),远高于其他氨基酸含量。另外,用 DNASTar 分析发现 CCV GP 株 N 蛋白与 Insavc - 1 株在疏水性及抗原表位上存在细微差异。

2.4 原核表达载体 pETN 的构建

重组子 pETN 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,可得到 5 369 bp 和 1 146 bp 两个片段;用 *Kpn* I 酶切线性化大小与预期结果一致,表明该重组质粒构建正确(图 5)。

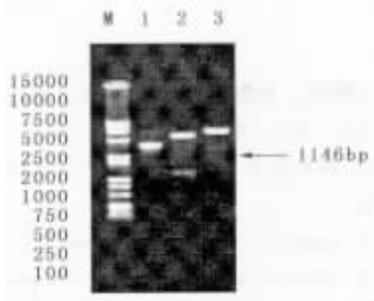


图 5 pETN 酶切鉴定结果

Fig.5 Identification of pETN by enzyme digestion

- M :DL - 15000 + 2000
- 1 pENT
- 2 pETN/*EcoR* I + *Not* I
- 3 pETN/*Kpn* I

2.5 CCV GP 株 N 基因在 *E. coli* 中的表达

2.5.1 重组菌体裂解物的 SDS - PAGE 及 Western - blotting 分析

由图 6 可见,pETN 转化菌的诱导产物在约 48 KD 处有一条特别浓的蛋白带,与预期值相符;而 pET28 a 转化菌的诱导产物和 pETN 转化菌的非诱导产物在该处只有很浅的蛋白带。Western-blotting 可见在 48 KD 处的蛋白可以与抗 CCV 多克隆抗体发生明显的血清学反应,表明所表达的蛋白是 CCV 特异性的(图 6 箭头所指)。

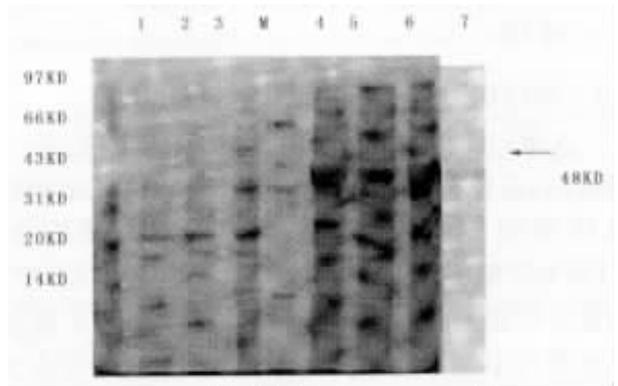


图 6 pETN 转化菌表达产物 SDS - PAGE 电泳及 Western-blotting 分析

Fig.6 SDS - PAGE electrophoresis of pETN transformant expressed and it's Western-blotting analysis

- M :低分子量蛋白 Low molecular protein(97 66 43 31 20 14 KD)
- 1 未诱导的空载体 pET28 a 转化子 No induced pET28 a transformant
- 2 诱导的空载体 pET28 a 转化子 Induced pET28 a transformant
- 3 未诱导的 pETN 转化子 No induced pETN transformant
- 4 - 6 :诱导的重组质粒 pETN 1 ~ 3 转化子 Induced pETN 1 2 3 transformant
- 7 :Western-blotting 分析 Western-blotting analysis

2.5.2 不同诱导时间对重组蛋白表达量的影响

从图 7 中可以看出,在 IPTG 诱导 3 h 后重组蛋白就开始表达,在 6 h 时表达量达到很高。凝胶薄层扫描分析表明,pETN 转化的 *BL21* 菌在 IPTG 诱导 6 h 后表达量可占菌体总蛋白量的 49.3 %。

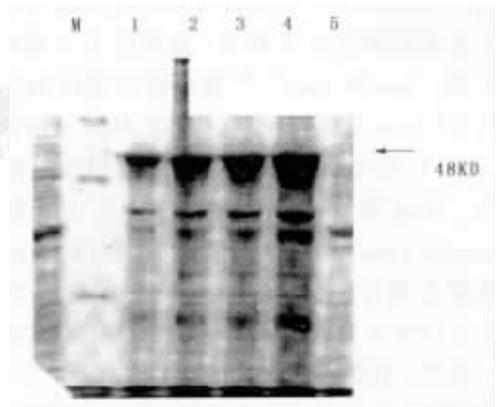


图 7 不同诱导时间对重组 N 蛋白表达量的影响

Fig.7 Effect of different induced time on expressed protein contents

- M :低分子量蛋白 Low molecular protein(97 66 43 31 20 14 KD)
- 1 :3 h 诱导 3 hrs induction ;
- 2 :4 h 诱导 4 hrs induction ;
- 3 :5 h 诱导 5 hrs induction ;
- 4 :6 h 诱导 6 hrs induction
- 5 :未诱导的 pETN 转化子 Uninduced pETN transformant

3 讨论

3.1 冠状病毒 N 蛋白的生物学功能

N 蛋白是犬冠状病毒第二大结构蛋白,是一种磷蛋白,它包绕着基因组 RNA,呈螺旋式结构,构成病毒的核衣壳。经测序,N 蛋白基因全长 1 146 bp,编码 382 个氨基酸,分子量为 48 KD 左右。在保守性研究方面,我们研究结果表明,N 蛋白是结构蛋白中保守性很高的蛋白(保守性顺序为 $N > M > S$),这与其基本的功能是相符的。在对 N 蛋白结构和组成研究方面,Motokawa 等^[14]对猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus,TGEV)N 蛋白进行了研究,发现其氨基酸残基缠绕在一起,C 端呈酸性,丝氨酸残基占氨基酸残基总数的 8%~10%,缠绕程度与丝氨酸的专一磷酸化有关。我们研究发现 GP 株 N 蛋白丝氨酸和赖氨酸远远高于其他氨基酸含量。由于赖氨酸是易于形成 α -螺旋结构的氨基酸,丝氨酸是易于形成 β -转角的氨基酸,因此结果提示 N 蛋白具有高度缠绕和螺旋的结构,这与 Motokawa 等^[14]的研究结果一致。在对 N 蛋白功能研究方面,Laude 等^[15]报道,在体外复制时,TGEV N 蛋白制备的抗血清能抑制 90% 的基因 RNA 的合成,说明它在 RNA 复制加工过程中起重要作用。Garwes 等^[16]在研究 TGEV 时发现 N 蛋白含有 2 个主要抗原位点 A 和 B,分别位于 N 蛋白的 N 端和 C 端。Seo 和 Seah^[17,18]等在研究鸡传染性支气管炎病毒(Avian infectious bronchitis virus,AIBV)时发现 N 蛋白 C 端含有 CTL 表位和多数免疫原性 B 细胞表位。Peng 等^[19]在研究嵌合小鼠肝炎病毒(Murine hepatitis virus,MHV)时发现,N 蛋白第 306-386 位氨基酸之间存在一个区域与病毒的组织嗜性有关;是否 CCV N 蛋白也具有相似的功能尚需进一步研究。另外,在推导的 GP 野毒株 N 蛋白 N 端 156-179 位存在一个 SRXX 富集区,与小鼠肝炎病毒 N 蛋白相应区域相同,推测可能是 RNA 结合区。因此,N 蛋白不仅起结构蛋白及调节 RNA 合成作用,而且在致病性、复制及翻译过程中可能也起到重要作用。

3.2 研究 CCV GP 株主要结构蛋白及其基因的意义

冠状病毒科的病毒是目前已知感染宿主范围较广的病毒,不但可感染哺乳动物,且可感染禽类^[1]。

大熊猫是国家一级保护动物,虽然国家在大熊猫饲养和繁育方面投入了大量的人力、物力和财力,使得它的数量不断增多,但在大熊猫疫病防治方面研究较少。近年来,有研究证实,大熊猫可感染犬瘟热、犬冠状病毒、犬腺病毒、细小病毒、副流感等病毒^[6-9,20];国内夏咸柱和胡桂学等相继从大熊猫肝脏中分离出犬瘟热病毒和冠状病毒,但目前国内尚无预防这些疫病的有效疫苗,因此积极开展大熊猫重要疫病诊断与防治研究对于保护我国大熊猫已迫在眉睫。我们首次对 CCV GP 株进行了详细的分子生物学研究,对该毒株 S、M、N 3 种主要结构蛋白基因进行了克隆和序列分析(关于 S 和 M 基因的克隆与序列分析另文发表),并进行了原核和真核表达,其目的一方面是为探讨其病原生态学改变的生物学意义和遗传演化规律;另一方面为进一步研制出快速诊断试剂和安全有效的基因工程疫苗以防治大熊猫犬冠状病毒病奠定良好的基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M](第2版). 北京:科学出版社,1997,671-703.
- [2] 夏咸柱. 养犬大全[M]. 长春:吉林人民出版社,1993. 561-564.
- [3] Binn L N, Lazar E C, Keenan K P, Huxsoll D L, Marchwicki R H, Scott F W. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea[J]. *Proceedings of the Annual Meeting of the US Animal Health Assoc*, 1974, **78**: 359-366.
- [4] 缪勤. 犬冠状病毒[J]. 中国畜禽传染病, 1993, **4**: 63-65.
- [5] 夏咸柱, 胡桂学, 李金中, 邹啸环, 黄耕. 犬冠状病毒在我国首次分离成功[J]. 中国兽医学报, 1996, **16**(1): 58.
- [6] Mainka S A, Qiu X, He T, Appel M J. Serologic survey of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve, China[J]. *Journal of Wildlife Disease*, 1994, **30**(1): 86-89.
- [7] 何爱华, 杜胜芳, 林桂华, 关家荣, 徐卫健, 沈晓娜, 陈元枝, 何家鑫. 首次从腹泻熊猫粪便中检出冠状病毒简报[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, **4**(3): 4.
- [8] 高凤山, 胡桂学, 夏咸柱, 柏亚铎, 余春, 乔军. 联合 PCR 诊断大熊猫犬瘟热和犬冠状病毒的混合感染[J]. 吉林农业大学学报, 2003, **25**(1): 91-93.
- [9] Tennant B J, Gaskell R M, Jones R C, Gaskell C J. Studies on the epizootiology of canine coronavirus[J]. *Veterinary Record*, 1993, **132**(2): 7-11.
- [10] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analyti-*

cal biochemistry, 1987, **16**(1):156-159.

- [11] 乔军, 孟庆玲, 夏咸柱, 何宏彬, 范泉水. 犬瘟热、犬冠状病毒联合 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 西南农业学报, 2002, **15**(1):93-95.
- [12] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1993. 382-386.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M] (第 2 版). 金冬雁, 黎孟枫, 候云德 译校. 北京: 科学出版社, 1998. 888-898.
- [14] Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid protein of feline, canine and porcine coronavirus[J]. *Journal of Microbiology and Immunology*, 1996, **40**(6):425-433.
- [15] Laude H, Rasschaert D, Delmas B, Godet M, Gelfi J, Charley B. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus[J]. *Vet Virol*, 1990, **23**:147-154.
- [16] Garwes D, Pocock D H, Wllaszka T M. The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus[J]. *J Gen Virol*, 1975, **29**:25-34.
- [17] Seo S H, Wang L, Smith R, Collisson E W. The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induce cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection[J]. *J Virol*, 1997, **71**:7889-7894.
- [18] Seah J N, Yu L, Kwang J. Location of linear B-cell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. *Vet Microbiol*, 2000, **75**(1):11-16.
- [19] Peng D, Koetzner C A, Memahon T, Zhu Y, Masters P S. Construction of murine coronavirus mutants containing interspecies chimeric nucleocapsid proteins[J]. *J Virol*, 1995, **67**:5475-5484.
- [20] 李金中, 夏咸柱, 邱薇, 胡桂学, 范志强, 黄耕, 武银莲, 邹啸环, 范泉水, 袁书智, 乔贵林, 慕德俊. 小熊猫等四种动物犬瘟热病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, **28**(8):8-10.