

# 检测兔出血症病毒抗体胶体金试纸条的 研制及初步应用

魏后军, 范志宇, 王芳\*, 宋艳华, 胡波, 仇汝龙, 陈萌萌, 徐为中, 薛家宾

(江苏省农业科学院兽医研究所·农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室·

国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

**摘要:** 利用免疫层析技术建立快速检测兔出血症病毒(RHDV)抗体的方法, 将胶体金标记重组 RHDV VP60 蛋白, 抗 VP60 单抗 A3C 和金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)分别包被质控线(C线)和检测线(T线), 通过检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清优化试纸条制备条件, 并验证其性能及与血凝抑制试验的符合率。结果显示, 试纸条检测阳性血清时 T 线、C 线颜色深度相同, 强阳性血清 T 线比 C 线颜色深, 弱阳性血清 T 线比 C 线颜色浅, 阴性血清 T 线不显色、C 线显色, 检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清与血凝抑制试验的符合率分别为 93.75%、88.75%、91.25%、95.00%, 总的符合率为 91.54%; 该试纸条具有较好的特异性、敏感性、重复性和稳定性, 为兔病毒性出血症流行病学调查和抗体水平监测提供了有力的检测工具。

**关键词:** 兔病毒性出血症; 兔出血症病毒; VP60; 胶体金试纸条; 抗体

中图分类号: S854.43; S858.2915.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)03-0614-06

## Development and Preliminary Application of a Colloidal Gold Test Strip for Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Antibody

WEI Hou-jun, FAN Zhi-yu, WANG Fang\*, SONG Yan-hua, HU Bo,

QIU Ru-long, CHEN Meng-meng, XU Wei-zhong, XUE Jia-bin

(Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology of Ministry of Agriculture,  
National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Institute of  
Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** A colloidal gold test strip for rapid detection of RHDV antibody was developed based on colloidal gold immunochromatographic assay. The colloidal gold particles were labeled with recombinant RHDV VP60 protein. The anti-VP60 monoclonal antibody A3C and *Staphylococcus aureus* protein A (SPA) were respectively coated on the control line (C line) and test line (T line). The strip was optimized by detecting strong positive, positive, weak positive and negative serum, and its qualities and coincidence rate of HI test were verified. The results indicated that the T and C lines were the same color when the positive serum was detected. The T line was darker than the C line when the strong positive serum was detected. The T line was lighter than the C line when the weak positive serum was detected. Compared with HI test, the coincidence rates of strong positive, positive, weak positive, negative serum were 93.75%, 88.75%, 91.25%, 95.00%, respectively, while the total coincidence rate was 91.54%. The colloidal gold strip has

收稿日期: 2017-07-07

基金项目: 现代农业产业技术体系建设兔体系病毒病预防与控制岗位(CARS-44-C-1); 公益性行业(农业)科研专项(201303046)

作者简介: 魏后军(1986-), 男, 江苏南京人, 本科, 助理研究员, 主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究, Tel: 025-84390337, E-mail: whj280941235@126.com

\* 通信作者: 王芳, 研究员, E-mail: rwangfang@126.com

specificity, sensitivity, repeatability and stability, and provide a tool for epidemiological survey and antibody level monitoring.

**Key words:** rabbit hemorrhagic disease; rabbit hemorrhagic disease virus; VP60; colloidal gold strip; antibody

兔病毒性出血症(RHD),俗称“兔瘟”,是由兔出血症病毒(RHDV)引起的一种高度致死性、急性败血性传染病,该病发病率、病死率极高,给养兔业造成极大经济损失<sup>[1]</sup>。目前,我国主要通过疫苗接种来预防和控制兔瘟。体液免疫应答在兔瘟的感染及免疫中起到重要的作用。通过检测特异性抗体的应答能诊断 RHDV 的感染。检测免疫后或恢复期动物体内特异性抗体滴度可预测家兔抵抗 RHDV 感染的能力。因此,建立能快速、准确检测 RHDV 抗体水平的方法显得尤为重要。目前,检测兔出血症病毒抗体主要使用血凝抑制试验(HI)<sup>[2]</sup>、间接 ELISA 和竞争 ELISA<sup>[3]</sup>,有研究者报道血清血凝抑制效价为  $3\log_2$  以上的家兔,能抵抗 RHDV 强毒攻击<sup>[4]</sup>。但这些方法步骤繁琐,需要专业的设备和技术人员,不适合基层推广。胶体金试纸条在畜禽疾病监测方面得到广泛的研究和应用<sup>[5-8]</sup>,具有快速、简便、准确的特点,非常适合临床应用。

衣壳蛋白 VP60 是 RHDV 的主要结构蛋白,重组杆状病毒表达系统能够高效表达 VP60,并且能够在体外自聚成形态学以及抗原性上与天然 RHDV 病毒粒子几乎无差异的病毒样颗粒<sup>[9-10]</sup>。本实验室已经建立了以重组 VP60 蛋白作为包被抗原检测 RHDV 抗体的 ELISA 方法,具有较高的特异性、敏感性等,同时避免了直接包被病毒存在的散毒风险<sup>[11]</sup>;目前还未见以病毒样颗粒作为金标抗原研制试纸条的报道。一个金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 分子可以和多个 IgG 结合,与兔 IgG 有较强的结合能力<sup>[12-13]</sup>。因此,本研究用纯化的 VP60 蛋白作为金标抗原,具有较好的特异性,并具有良好的生物安全性;在 NC 膜上 C 线、T 线分别包被抗 RHDV VP60 单克隆抗体 A3C、金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA);以检测 HI 效价为  $3\log_2$  的样品,T 线、C 线出现相同颜色深度条带为标准,优化反应条件,研制出可以根据 T 线、C 线显色情况反映兔出血症病毒抗体水平的胶体金试纸条。该试纸条用血清作为样本即可进行抗体检测,为兔病毒性出血症流行病学调查和疫苗免疫效果评价提供了一种快速、便捷的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株及细胞

抗 RHDV VP60 单克隆抗体 A3C<sup>[5]</sup>和杆状病毒表达系统表达的重组 VP60 蛋白<sup>[9]</sup>由本实验室制备<sup>[14-15]</sup>。

### 1.2 血清

兔出血症病毒强阳性(HI 效价大于等于  $4\log_2$ )、阳性(HI 效价为  $3\log_2$ )、弱阳性(HI 效价为  $1\log_2$  或  $2\log_2$ )血清和兔多杀性巴氏杆菌(Pm)、兔支气管败血波氏杆菌(Bb)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)的阳性血清均由本实验制备;阴性血清来自邳州市东方养殖有限公司的 SPF 兔。

### 1.3 主要试剂

金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)购自北京博尔西科技有限公司;不含 IgG 的牛血清白蛋白(BSA)购自上海翊圣生物科技有限公司;PEG 20000 购自 Biosharp 公司;氯金酸、柠檬酸三钠购自国药集团化学试剂有限公司。兔出血症基因工程疫苗<sup>[9]</sup>由本实验室制备,商品化兔出血症组织灭活疫苗购自南京天邦生物科技有限公司。

### 1.4 试纸条材料

硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司,样品垫、金标垫、吸水纸、支撑板、塑料卡购自上海捷宁生物科技有限公司。

### 1.5 胶体金的制备

采用柠檬酸三钠法制备直径 20 nm 的胶体金颗粒<sup>[8]</sup>,用透射电镜观察,2~8 °C 保存、备用。

### 1.6 胶体金试纸条的制备

#### 1.6.1 胶体金标记 VP60 最适 pH 值的选择

取 9 支试管,每支试管加入 1 mL 胶体金溶液,分别加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3$  溶液 1、2、3、4、5、6、7、8、9  $\mu\text{L}$  调节 pH 值,各试管滴加 50  $\mu\text{L}$   $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 VP60,混匀后作用 30 min,加入 10% NaCl 100  $\mu\text{L}$ ,混匀室温放置 30 min 后,记录溶液保持红色的最低  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{CO}_3$  添加量,并用精密 pH 试纸检测该溶液的 pH 值,即为胶体金标记 VP60 最适 pH 值。

### 1.6.2 胶体金标记 VP60 最适蛋白量的选择

取 9 支试管,每支试管加入 1 mL 调节到最适 pH 值的胶体金溶液,分别加入  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 VP60 5、10、15、20、25、30、35、40、45  $\mu\text{L}$ ,混匀后作用 30 min,加入 10% NaCl 100  $\mu\text{L}$ ,混匀室温放置 30 min 后,溶液保持红色的最低 VP60 的添加量,在此基础上增加 20% 即为最适标记蛋白量。

1.6.3 胶体金标记蛋白 向调至最佳 pH 的胶体金溶液中,缓慢加入最适蛋白量的 VP60,室温搅拌 30 min;加入 10% PEG20000 至终浓度 1% 作为稳定剂;将上述胶体金溶液经离心法纯化<sup>[8]</sup>,加入重悬液(含 0.1% PEG20000 的  $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液)重悬至原体积的 1/10,置 2~8  $^{\circ}\text{C}$  备用。

1.6.4 试纸条的组装 依次把吸水垫、金标垫和样品垫粘贴到 NC 膜上,各垫之间有 1 mm 重叠,用切条机切成 4 mm 宽的试纸条,装入塑料卡,置于铝箔袋中,加干燥剂密封。

## 1.7 试纸条条件优化

1.7.1 金标 VP60 溶液稀释度的选择 将金标溶液用重悬液按一定比例稀释,喷在金标垫上,温箱烘干;NC 膜 C 线、T 线分别包被过量的 A3C、SPA;组装成试纸条。用试纸条分别检测 100 倍稀释的强阳性、阳性、弱阳性血清,选择的稀释度满足条件:检测强阳性血清时,T 线颜色比 C 线深;阳性血清时,T 线、C 线颜色相同;检测弱阳性血清时,T 线颜色比 C 线浅。

1.7.2 T 线、C 线的浓度的选择 以 T 线 SPA, C 线 A3C 不同蛋白浓度做点阵,与包被最佳稀释度金标溶液的金标垫等组装成试纸条。用试纸条分别检测 100 倍稀释的强阳性、阳性、弱阳性血清,T 线、C 线浓度的选择满足条件:检测强阳性血清时,T 线颜色比 C 线深;阳性血清时,T 线、C 线颜色相同;检测弱阳性血清时,T 线颜色比 C 线浅。

## 1.8 敏感性

强阳性血清(HI 效价为  $8\log_2$ )用生理盐水依次倍比稀释 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512,即 HI 效价分别为  $7\log_2$ 、 $6\log_2$ 、 $5\log_2$ 、 $4\log_2$ 、 $3\log_2$ 、 $2\log_2$ 、 $1\log_2$ 、 $0\log_2$ 、 $-1\log_2$ ,将生理盐水稀释 100 倍的以上样品和不稀释的强阳性血清,吸取 100  $\mu\text{L}$  滴加到试纸条加样孔中,10 min 判断结果。

## 1.9 特异性

将兔多杀性巴氏杆菌(Pm)、兔支气管败血波氏

杆菌(Bb)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)的阳性血清用生理盐水 100 倍稀释,吸取 100  $\mu\text{L}$  滴加到试纸条加样孔中,10 min 判断结果。

## 1.10 重复性

从 3 批次试纸条中各抽取 40 条,检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清样品,观察试纸条检测结果。

## 1.11 稳定性

试纸条 2~8  $^{\circ}\text{C}$  保存,每隔一个月抽取试纸条检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清样品,观察试纸条检测结果。

## 1.12 符合率

取已测 HI 效价的强阳性血清、阳性血清、弱阳性血清各 80 份,阴性血清 20 份,用试纸条检测并计算与血凝抑制方法的符合率。

## 1.13 试纸条的初步应用

兔出血症基因工程疫苗、兔出血症组织灭活疫苗、PBS 各 1 mL 分别皮下注射 5 只实验兔;在免疫后 0、3、7、14、21 d 采血,用试纸条检测血清,比较两种疫苗的抗体产生期。

# 2 结果

## 2.1 胶体金的制备

采用柠檬酸三钠法制备胶体金颗粒,通过透射电镜扫描观察,胶体金分布均匀、大小均一;随机取 50 个胶体金颗粒,测量其直径,粒径为  $(20.6 \pm 2.0) \text{ nm}$ 。

## 2.2 胶体金标记 VP60 最适 pH 值

胶体金标记 VP60 最适 pH 值选择试验结果显示,每毫升胶体金溶液中最少添加 6  $\mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,溶液仍保持红色,此时溶液 pH 值为 7.5,即为标记 VP60 最适 pH 值。

## 2.3 胶体金标记 VP60 最适蛋白量

胶体金标记 VP60 最适蛋白量的选择试验结果显示,每毫升胶体金溶液中最少添加 15  $\mu\text{L}$   $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 VP60 能使溶液保持红色,在此基础上增加 20%,即 18  $\mu\text{L}$   $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 VP60 为最适蛋白量。

## 2.4 试纸条条件优化

金标 VP60 溶液用重悬液按 1:4 稀释;T 线 SPA 质量浓度为  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,C 线 A3C 质量浓度为  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。优化条件后制备的试纸条检测强阳性血清(HI 效价大于等于  $4\log_2$ )时,T 线颜色比 C 线深;阳性血清(HI 效价为  $3\log_2$ )时,T 线、C 线颜色相同;检测弱阳性血清(HI 效价为  $1\log_2$  或  $2\log_2$ )时,T 线颜色比 C 线浅(图 1)。

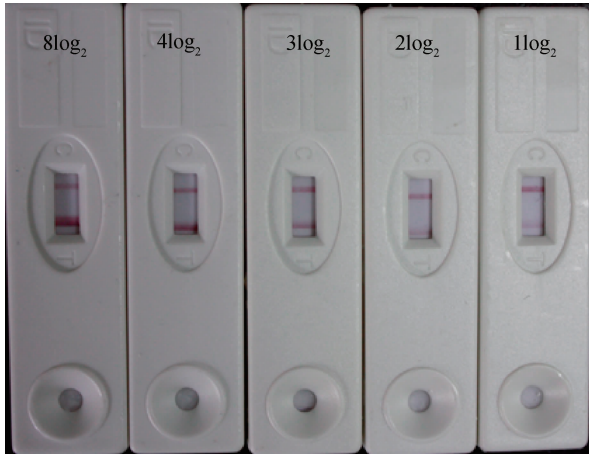


图 1 经优化试纸条的检测结果

Fig. 1 The detection result of optimized strips

## 2.5 敏感性

试纸条敏感性试验结果显示,试纸条可以直接检测强阳性血清,最低可以检测到经生理盐水 100 倍稀释的  $1\log_2$  样品,说明试纸条检测范围为:原液至  $1:12\ 800$ ;试纸条在检测 100 倍稀释的样品时,敏感性与血凝抑制方法相同。

## 2.6 结果判定

待检血清用生理盐水 100 倍稀释后,吸取  $100\ \mu\text{L}$

滴加到加样孔中,10 min 判断结果。T 线颜色比 C 线深判定为强阳性;T 线、C 线颜色相同判定为阳性;T 线颜色比 C 线浅判定为弱阳性;T 线不显色、C 线显色判定为阴性;C 线不显色则试纸条无效。

## 2.7 特异性

试纸条特异性试验显示,兔多杀性巴氏杆菌(Pm)、兔支气管败血波氏杆菌(Bb)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)的阳性血清及阴性(SPF)血清结果均为阴性,而 RHDV 阳性血清检测结果为阳性,说明该试纸条特异性良好。

## 2.8 重复性、稳定性

3 批次试纸条检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清结果一致。试纸条  $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$  保存 6 个月,检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清结果不变。

## 2.9 符合率

胶体金试纸条检测强阳性、阳性、弱阳性、阴性血清的结果与血凝抑制试验的符合率分别为 93.75%、88.75%、91.25%、95.00%,260 份样品中,两种检测方法结果相同的共  $75+71+73+19=238$  份,总的符合率为 91.54%(表 1)。

表 1 胶体金试纸条与血凝抑制试验比较

Table 1 Comparison of colloidal gold test strip with HI test

血清 Serum	数目 Number	试纸条检测结果 Strip detection results				符合率/% Coincidence
		强阳性 Strong position	阳性 Position	弱阳性 Weak position	阴性 Negative	
强阳性 Strong positive	80	75	5	0	0	93.75
阳性 positive	80	6	71	3	0	88.75
弱阳性 Weak positive	80	0	3	73	4	91.25
阴性 Negative	20	0	0	1	19	95.00

## 2.10 试纸条的初步应用

试纸条检测免疫兔血清中的抗体水平,基因工程苗免疫后 0、3 d 5 只均阴性,7 d 2 只弱阳性、3 只阴性,14 d 1 只弱阳性、3 只阳性、1 只强阳性,21 d 4 只强阳性、1 只阳性;组织灭活苗免疫后 0、3、7 d 5 只均阴性,14 d 4 只弱阳性、1 只阴性,21 d 4 只弱阳性、1 只阳性;PBS 免疫后至 21 d 均未检测到抗体。

## 3 讨论

### 3.1 兔病毒性出血症感染率、死亡率高,给养殖业

造成巨大的经济损失。目前主要通过接种疫苗来控制与预防该病。因此,能快速、准确检测疫苗免疫后抗体水平的方法显得尤为重要。检测方法主要有血凝抑制试验和 ELISA 方法<sup>[2,11]</sup>,但这些方法耗时长,操作繁琐。本试验研制的胶体金试纸条,加样后 10 min 得到结果,根据显色情况就能判定血清中抗体水平。兔出血症病毒抗体为阳性或强阳性的兔,能抵抗 RHDV 强毒攻击,弱阳性兔部分抵抗 RHDV 强毒攻击,阴性兔不能抵抗 RHDV 强毒攻击<sup>[4]</sup>,因此,试纸条检测结果为阳性或强阳性时,说明兔不需加强免疫;试纸条检测结果为弱阳性或阴

性时,需加强免疫。

**3.2** 为防止试纸条检测不稀释的强阳性血清时,金标 VP60 被血清中过量的特异性抗体结合,导致没有多余未标记的金标 VP60 和 C 线上的蛋白反应,出现 C 线条带极淡或没有的现象,制备试纸条时,C 线包被的单抗与 VP60 的结合应不被多抗阻断,即 VP60 与多抗结合后仍能结合单抗。因此在选择单抗时,我们用阻断 ELISA 方法<sup>[3]</sup>,以 VP60 包被 ELISA 板,用兔抗 VP60 多抗阻断单抗与 VP60 反应,同时间接 ELISA 方法<sup>[11]</sup>检测单抗效价。结果显示,实验室制备的 4 株单抗均未被阻断,可用于包被 C 线,但 A3C 效价较高,因此选择 A3C 作为质控线包被蛋白。

**3.3** 在临床使用试纸条时,检测全血会比检测血清更加便捷。普通样品垫不能拦截红细胞,会导致 NC 膜红色背景,影响结果判断。本研究使用滤血垫作为样品垫,可以有效地拦截红细胞。全血中约含 50% 的血清<sup>[16]</sup>,因此检测全血样品时,需用生理盐水 50 倍稀释后再检测。

## 4 结 论

成功建立检测兔出血症病毒抗体的胶体金试纸条,可通过试纸条显色结果判定血清中抗体水平,可用于兔病毒性出血症的流行病学调查和抗体水平监测。

## 参考文献 (References):

- [1] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Vet Res*, 2012, 43: 12.
- [2] FITZNER A, NIEDEBALSKI W. Serological survey for RHD antibodies in rabbits from two types of rabbit breeding farms[J]. *Pol J Vet Sci*, 2016, 19(3): 597-607.
- [3] CAPUCCI L, SCICLUNA M T, LAVAZZA A. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome[J]. *Rev Sci Tech*, 1991, 10(2): 347-370.
- [4] 薛家宾, 杨龙圣, 徐为中, 等. 免疫日龄对兔病毒性出血症抗体水平和保护率的影响[J]. *江苏农业科学*, 2006, 34(6): 327-329.
- XUE J B, YANG L S, XU W Z, et al. Effects of immunization age on antibody level and protective rate of

RHD (rabbit hemorrhagic disease)[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2006, 34(6): 327-329. (in Chinese)

- [5] 蔡少平, 王 芳, 贾华敏, 等. 兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(11): 1795-1801.
- CAI S P, WANG F, JIA H M, et al. Development and primary application of an immunochromatographic colloidal gold test strip for rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(11): 1795-1801. (in Chinese)
- [6] JU Y, HAO H J, XIONG G H, et al. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid detection of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 133(2-4): 207-211.
- [7] XU R, FENG J T, HONG Y, et al. A novel colloidal gold immunochromatography assay strip for the diagnosis of schistosomiasis japonica in domestic animals[J]. *Infect Dis Poverty*, 2017, 6: 84.
- [8] 彭伏虎. 禽流感与新城疫胶体金免疫层析快速检测技术及初步应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- PENG F H. Studies on development and preliminary application of the colloidal gold immunochromatographic rapid detecting technology for avian influenza and new castle disease viruses[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [9] 王 芳, 胡 波, 任雪枫, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(10): 1382-1387.
- WANG F, HU B, REN X F, et al. Expression of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus in insect cells and its protective efficacy to rabbits [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(10): 1382-1387. (in Chinese)
- [10] WANG X, XU F T, LIU J S, et al. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(1): e1003132.
- [11] 李超美, 王 芳, 蔡少平, 等. 检测兔出血症病毒抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(3): 546-550.
- LI C M, WANG F, CAI S P, et al. An indirect ELISA for detection of antibodies against rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 26(3): 546-550. (in Chinese)

- [12] 李 迪, 曹永生, 徐晶晶, 等. 金黄色葡萄球菌蛋白 AB 结构域的基因优化与原核表达及其亲和性鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(3): 277-282.  
LI D, CAO Y S, XU J J, et al. Codon optimization, prokaryotic expression and affinity determination of B domain of staphylococcal protein A[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(3): 277-282. (in Chinese)
- [13] MOŢA G, GHETŢIE V, SJÖQUIST J. Characterization of the soluble complex formed by reacting rabbit IgG with protein A of *S. aureus*[J]. *Immunochemistry*, 1978, 15(9): 639-642.
- [14] DHANASOORAJ D, KUMAR R A, MUNDAYOOR S. Subunit protein vaccine delivery system for tuberculosis based on hepatitis B virus core VLP (HBc-VLP) particles [M]//THOMAS S. *Vaccine Design: Methods and Protocols*, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases. New York, NY: Humana Press, 2016: 377-392.
- [15] MATSUDA S, NEROME R, MAEGAWA K, et al. Development of a Japanese encephalitis virus-like particle vaccine in silkworms using codon-optimised prM and envelope genes[J]. *Helixyon*, 2017, 3(4): e00286.
- [16] 谷子林, 秦应和, 任克良. 中国养兔学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 58.  
GU Z L, QIN Y H, REN K L. *China rabbit science* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 58. (in Chinese)

(编辑 白永平)