

传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的分子生物学研究进展

万 勇 谢金文 余为一

(安徽农业大学 安徽 合肥 230036)

摘要: 本文综述了 IBDV 的保护性抗原蛋白 VP2 与病毒形态、毒力变异、抗原变异间的关系及在诱导宿主细胞凋亡中的作用。同时也探讨了其在新型疫苗开发中的应用等方面的研究进展。

关键词: IBDV VP2 蛋白; 病毒构造; 毒力变异; 抗原变异; 细胞凋亡; 新型疫苗研究

Research Progress on molecular biological characters of VP2 of Infectious Bursal Disease Virus

WANG Yong, XIE Jin-wen, YU Wei-yi

Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

ABSTRACT: In this paper, it is introduced that VP2 protein, which is the main host-protective antigen of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), is relative to virus structure, virulence and antigen variation of IBDV, and it can reduce host-cells apoptosis, meanwhile, it is also investigated that the application of VP2 of IBDV in new vaccine development.

Key words: VP2 of IBDV; Virus conformation; Variation of virulence and antigenicity; Apoptosis; New Vaccine

传染性法氏囊病毒(Infectious Bursal Disease Virus, IBDV)是传染性法氏囊病的病原,该病毒属于双节核酸病毒科(Birnaviridae)禽双节核酸病毒属(Avibirnavirus)的成员,为T=13二十面体的无囊膜的双层衣壳病毒。其基因组结构为双节段的双股RNA构成,包含节段A和节段B。其中节段A大小为3200-3300bp,含有两个开放阅读框(Open Reading Frames, ORF):ORF1和ORF2,ORF1编码病毒前体聚合蛋白VP2-VP4-VP3,而ORF2编码VP5蛋白。节段B大小为2800-2900bp,含有一个ORF,编码病毒的VP1蛋白。目前,研究认为VP2和VP3为病毒的结构性蛋白,其中VP2蛋白为病毒的主要保护性抗原,与病毒的形态、抗原毒力变异以及诱导宿主细胞凋亡等密切相关,是近年来研究IBDV的一大热点,国内外学者从以下几个方面开展了大量的研究工作。

1 VP2 蛋白成熟过程及与病毒形态间关系的研究

早在1974年,Hirai等^[1]用电镜负染技术观察到IBDV为直径55nm的非囊膜病毒。而VP2蛋白是构成IBDV的外壳蛋白,这一结果在B. Botcher等^[2]的病毒形态学研究中得到证实。他们发现,VP2由260个三聚体结构的亚单位小体构成,突出于病毒衣壳表面,它与VP3共同构成的病毒双层衣壳。Christophe C.等^[3]对VP2的前体蛋白pVP2的成熟机理进行了研究,认为VP2的成熟是依赖于pVP2在VP3蛋白形成的内壳上的有效聚集,即pVP2蛋白所附着的VP3蛋白必须为完整内壳的组成元素,而非游离态蛋白或残缺内壳的组成蛋白。Bruno等^[4]进一步研究发现,pVP2的成熟是因为1-512AA的pVP2蛋白裂解为VP2蛋白,同时产生4个小的肽段,分别位于

442-487, 488-494, 495-501, 502-512。这些研究结果分别从形态学和分子生物学的角度完整的揭示了VP2蛋白的位置与成熟机理,进一步证实了VP2蛋白为IBDV主要宿主保护性抗原。

2 VP2 蛋白与 IBDV 抗原性、毒力变异关系的研究

VP2蛋白的基因组结构是位于节段A的ORF1的前1326bp,有部分序列与VP5蛋白重合。1990年,Bayliss等人^[5]对四株IBDV的A节段序列进行比较发现,239-332位的氨基酸差异占整个多聚前体蛋白差异的50%,而其长度只占其总长度的9%,故称之为高变区。后为方便研究,将AclI和SpeI两酶切位点之间的序列(即206-350位间的145个氨基酸)确定为高变区研究序列。

在VP2高变区内,存在三个重要结构,即212-224位、314-324位氨基酸构成的两个亲水区和326-332位的七肽区序列。经典观点认为,两个亲水区占据了大部分构象依赖区并参与了病毒中和性表位的形成,第一亲水区与抗原构象稳定性有关,与抗体中和能力无关;而第二亲水区则与病毒的抗体结合能力密切相关,该位点的变异会直接导致病毒逃避特异性抗体的中和。同时认为病毒的毒力是与VP2的七肽区相关。在VP2高变区两亲水区之间还存在三个小的亲水部位,分别位于248-252位、279-290位、299-305位。目前研究认为它们的变化会诱导抗原或毒力发生一定的变异。

2.1 VP2 蛋白与 IBDV 抗原变异关系的研究

早期的学者在大量试验的基础上,分析认为亲水区的变异与抗原变异有关。Heine等^[6]分析认为,第一亲水区的氨基

作者简介:万勇,(1980-),在读硕士研究生,从事兽医微生物与免疫学方向研究。

通讯作者:余为一,(1953-),男,教授,博士生导师。E-mail: yuwei1@ahu.edu.cn

(收稿日期:2006-02-26 接受日期:2006-03-16)

酸不直接结合 McAbs, 只在稳定抗原表位的构象中起作用, 变异株 E 的 213 和 222 位氨基酸的突变引起 VP2 蛋白的中和性表位的构象改变; 第二亲水区的两个氨基酸突变可能对变异株逃逸病毒中和抗原能力是一个关键且对结合 McAbs 的特性也至关重要。这两个亲水区是病毒中和表位的部分, 特别是第二亲水区的氨基酸改变导致变异株 E 对标准株疫苗的抗体中和作用有抵抗力。

然而, 另外一些学者研究发现, 毒株抗原性的变化并不一定是由亲水区的氨基酸变异引起的。Dormitorio 等^[7]通过分析几株变异株的高变区的基因序列发现, 大多数变异株的两个亲水区都发生了变化, 但 Miss 变异株却例外, 它的两个亲水区与常规 IBDV 毒株 STC/52/70 和 PBC98 等具有完全相同氨基酸序列, 仅 254 位氨基酸为 S。许信刚等^[8]在比较超强毒株 GZ 与其致弱毒株 GZ20 时发现第一亲水区的 222 位氨基酸由 A 变为 P, 而生物学实验证实其抗原并没有发生变化, 说明亲水区氨基酸的变异不一定是毒株抗原性的决定因素。

在进一步研究的基础上, 曹永长^[9]认为, 249 位 K 和 254 位 S 是强毒株变异株的特征性氨基酸, 决定着毒株抗原性的变化。Vanden Berg 等^[10]使用 Jameson 和 Wolf 抗原性指数推导表明, 在两个亲水区之间的疏水区存在 3 个次要的抗原位点, 特别是第一个与第二个抗原位点的改变与中和性表位的构成密切相关。

2.2 VP2 蛋白与 IBDV 毒力变异关系研究的研究

病毒的毒力是目前研究中一个比较争议的问题。早期的研究认为 IBDV 的毒力与七肽区相关, 富含丝氨酸的七肽区序列 S-W-S-A-S-G-S 在强毒株中高度保守。推测可能在 VP2 高变区的二级结构中, 七肽区形成 β 折叠, 丝氨酸充分暴露于分子表面, 通过氢键来实现分子内或分子间的相互作用, 这种作用被认为是病毒毒性所必须的。而一般在致弱毒株中, 由于丝氨酸被其它占较大空间的氨基酸取代, 阻止了分子间的作用, 干扰了病毒的毒力。但 Yamaguchi 等^[11]在比较超强毒株 vvIBDV-OKMY 株与该毒株驯化致弱的 wIBDV-OKMYT 毒株后发现, vvIBDV-OKMYT 毒株虽无致病力, 但仍然保持了 S-W-S-A-S-G-S 七肽区不发生变化。同时发现, 两序列存在 5 个氨基酸差异, 其中 4 个在高变区, 256 位 I、279 位 D、284 位 A、315 位 S 分别变为 T、N、T、F。VP2 高变区的 279-290 位氨基酸之间是其三个小的亲水区之一^[5], 因而 279 位氨基酸和 284 位氨基酸的变化可能导致这一区域的亲水性下降并阻止 α 螺旋的形成, 从而影响到病毒的表面结构, 对病毒的毒力变化起到很关键的作用。许信刚^[7]等人的试验也证实了这一点, 但所不同的是致弱株中的七肽区发生了变异。曹永长^[12]也有类似报道。尽管如此, 至今仍未发现强毒株的七肽区发生变化。Yamaguchi^[13]把两株致弱株经 SPF 鸡传代, 发现 253 位氨基酸由 His 变为 Gln; 而经 CEF 传代培养 Gln 又变回 His, 因此认为 253 位氨基酸与毒力有关。但目前尚不能认定其一定是毒力强弱的标志性氨基酸。

因此, 可以初步认为 SWSASGS 七肽区的保守性以及 279 位 D 和 284 位 A 两个特征性氨基酸是强毒株的重要标志; 而 279N 和 284T 为弱毒株的特征性氨基酸。

此外, 人们还对大量毒株在该区域的酶切位点进行了分析, 运用比序列测定更为简单易行的限制性内切酶分析 (RE) 和限制性长度多肽性分析 (RFLD) 方法来区分各类毒株。Jackwood 等^[14]利用 RT-PCR 对 VP2 基因的 394 个碱基进行酶切分析, 发现除 IN 外的所有被测变异株都缺乏 BstN I 位点和 Sty I 位点, 大部分变异株都有相似的限制酶切图谱, 但大部分经典

毒株都有这两个酶切位点。一般认为, 具有 BstN I 和 Sty I 位点 (222 位氨基酸未发生变异) 的毒为经典毒株; 弱毒株不具有 Spe I 位点; 强毒株具有 Taq I 和 Ssp I 位点。

大量实验证明, VP2 蛋白与病毒的毒力密切相关。尽管如此, 但还不足以说明 VP2 为病毒毒力的唯一决定性因素。Boot 等^[15]利用反向遗传操作技术将超强毒株 D6984 的 VP2 和致弱株 CEF94 的 VP2 置换后, 仍表现出超强毒的特征, 有力的佐证了这一说法。目前其它的一些研究说明, VP3、VP5 蛋白及病毒基因组的非编码区都与病毒的毒力有一定的相关性。

3 VP2 蛋白诱导细胞凋亡的研究

VP2 蛋白是 IBDV 诱导细胞凋亡的因子。Fernandez^[16]用 VT7 LacOI/VP2 感染 Vero (非洲绿猴)、COS-1 (非洲绿猴)、HUTK-143 (人)、Hela (人)、3T3 (鼠)、L249 (鼠) 等哺乳动物细胞, 在 IPTG 的诱导下发生凋亡, 尽管 VP2 蛋白诱导宿主细胞凋亡效应的水平有所不同。Fernandez 等将 VP2 和 VP3 基因分别插入 VOTE 表达系统, 组成 VT7LacOI/VP2 和 LacOI/VP3, 表达产物 VP2 可以阻断所有蛋白的合成, 并诱导细胞内 rRNA 和 DNA 的降解, 而 VP3 则不能。几种 VV 基因可控制细胞程序性死亡^[17, 18], 如 B13R 和 B22R 基因 (该基因编码的多肽属于丝氨酸蛋白酶抑制因子超家族, 类似于牛痘病毒的 crmA 基因), 可以阻止细胞发生凋亡。Fernandez^[15]在研究中发现, 尽管 VV 基因的抗凋亡作用存在, VP2 表达产物依然可以触发细胞发生凋亡。这可能是由于 VP2 的诱导机制与 VV 基因的抗诱导机制不同的缘故。在这一研究中, Fernandez^[19]还发现, 在 CEF 上培养的适应株 Soroa 株不能使 CEF 发生凋亡作用。上述研究分析说明, VP2 编码蛋白可能与其它已知的细胞凋亡诱导因子无相同之处。Lee 等^[19]将表达人 bcl-2 基因的重组病毒 VV-bal-2 与 VT7LacOI/VP2 同时转染到 BSC40 细胞中, 在 IPTG 的诱导下, 发现 Bal-2 表达产物废除了 VP2 阻止所有蛋白合成的作用, 同时也使 rRNA 和 DNA 的降解作用延迟。这说明 VP2 诱导细胞发生凋亡的调节通路位于 Bal-2 的上游。吕英姿等^[20]认为来自不同毒株、毒力的 VP2 基因的表达产物都会导致其诱导细胞凋亡能力的不同。Tham 和 Moon 等^[21]认为病毒的自我复制与病毒诱导细胞凋亡是两个相互独立的过程。但 Annett 等^[22]通过细胞双标记试验认为病毒诱导细胞凋亡的过程与病毒的复制过程是相互协作的, 诱导细胞凋亡的因子有可能是由那些复制 IBDV 病毒的细胞产生的; 同时发现紫外失活的 IBDV 粒子不能诱导细胞凋亡。这一研究结果近一步揭示了 VP2 蛋白的诱导细胞凋亡的作用机理。据此, 可以认为只有在细胞内表达的 VP2 蛋白才有诱导凋亡能力, 而外源 VP2 蛋白则没有。

4 VP2 蛋白体外表达及其在 IBDV 防治中的应用研究

由于 VP2 是 IBDV 主要宿主保护性抗原, 其对于新疫苗的研究和开发有很好的应用前景, 因而许多学者都对其体外表达的技术进行了大量的研究。目前已报道的体外表达系统有大肠杆菌、酵母、重组禽痘病毒、重组杆状病毒、重组火鸡疱疹病毒、重组禽腺病毒、重组痘苗病毒、昆虫表达系统等, 其在体外表达的 VP2 蛋白可在一定程度上诱导中和抗体的产生。

4.1 原核与真核质粒表达

Azad 等^[23]研究认为, VP2 N-端的小融合蛋白可有助于 VP2 基因在大肠杆菌和酵母菌表达系统中获得稳定表达, 并可以减少 VP2 基因在大肠杆菌中表达的包涵体水平; 同时认为

在酵母菌中表达的 VP2 蛋白比大肠杆菌的 VP2 表达产物免疫原性要好的多。Macreadie 等^[24]也证实酵母表达的 IBDV VP2 蛋白与天然表达产物相似,该蛋白免疫鸡群,可使幼鸡获得被动免疫。国内于涟等^[25]将 HZ96 VP2 构建成非融合表达重组体 pBw VP2,并在大肠杆菌中表达,表达量为 8%。姜平等^[26]将南京野毒株 VP2 基因与原核表达质粒 pCYTEXP1(含 PRPL 双启动子)构建了重组质粒 pCVP21,并在大肠杆菌中获得表达,但其未对表达的 VP2 蛋白的免疫原性进行进一步研究。王笑梅等^[27]将 VP2 基因克隆到 pPICZA 载体上构建 pPICVP2 质粒,转染酵母,经甲醇诱导,测得表达蛋白占酵母总蛋白的 16%,表达量为 0.6208g/L。表达产物免疫 SPF 鸡可以保护鸡群免受强毒攻击,具有一定的免疫原性,但还不能保护法氏囊组织免受损害,效果不如常规灭活苗。

4.2 重组子表达

Wang 等^[28]在杆状病毒表达系统表达 VP2 区得到 rVP2 蛋白,在 rVP2 蛋白 C-末端增加六个组氨酸位点成为 rVP2H,由 rVP2H 蛋白形成的 VLPs 经过纯化后表达于杆状病毒表达系统并免疫幼鸡,可得到抗 IBDV 的保护性抗体。以 RVP2H 蛋白肌注 2 周龄 SPF 鸡,6 只注射一次,7 只在 2 周后再次注射,另有五只注射 PBS 作为阴性对照。二次注射后两周均以 vvIBDV 93/4/6 株饲喂。6 只群和 7 只群幼鸡体内都有高水平中和抗体的出现,保护其不受 wIBDV 的侵害,并且没有致死现象的出现,而阴性对照组的死亡率达到 80%。这一实验证明杆状病毒载体表达的 VP2 蛋白诱导的抗体具有很好的免疫保护性。Hu Y. C 等^[29]研究得出杆状病毒重组子在昆虫细胞中表达 IBDV VP2 蛋白的产量受培养基、蛋白酶抑制剂、溶氧浓度等因素影响。但是,一般杆状病毒的表达产量低,难以大规模生产。为此,于涟等^[30]在克隆了 IBDV HZ96 株 VP2 基因后,大胆采用家蚕杆状病毒(BmNPV)表达系统在家蚕细胞和幼虫中高效表达了 VP2 蛋白,约 5ul 的蚕血淋巴中的 VP2 表达量相当于 105 个细胞的 VP2 表达量,大大降低了生产成本。用 ELISA 和 Western-blot 均检测到 VP2 基因的完整表达。并通过实验^[31]证实含重组病毒的蚕血注射或口服都可保护幼鸡免受 vvIBDV 的攻击。这一研究成果有望使 VP2 重组病毒基因工程的产业化生产得以实现。

除杆状病毒重组子外,学者们还对其它重组子进行了大量研究。Tsukamoto 等^[32]以 MDV CVI-988 株表达了 IBDV 的宿主保护性抗原 VP2 于 US 位点上,并以 SV40 早期启动子作为调控元件,成功地得到可抗 wMDV(保护率 100%)又可抗 vvIBDV(保护率 55%)的疫苗。Danteil 等^[33]以火鸡疱疹病毒(rHVT)作为表达载体,表达的 VP2 蛋白对 vvIBDV 有 60% 的保护作用。Sheppard M 等^[34]用禽的腺病毒与 IBDV VP2 构建成重组体 FAV-10/VP2,能够诱导血清中的 VP2 抗体应答,并对 V877 有保护作用。刘毅^[35]、Heine H. G.^[36]、Bayliss C. D.^[37]等都对禽痘重组病毒表达 VP2 蛋白作了报道。

5 展望

VP2 蛋白作为 IBDV 的主要宿主保护性抗原已被国内外学者广泛研究,取得了很多突破性的进展,如 VP2 蛋白的成熟过程、其诱导的 IBDV 毒力变异机制、VP2 体外表达方法等。但目前仍有许多问题亟待深入探讨,如病毒的毒力判断标准、抗原变异机制、诱导细胞凋亡机制、基因工程疫苗的商品化生产等,都将是今后关于 IBDV 的进一步研究的重点。

参考文献

- [1] Hirai K, Shimakura S. Structure of infectious bursal disease virus [J]. J Virol., 1974, 14(4): 957-964

- [2] Botcher B, Kiselev N A, Maschuk V Y, et al. Three-dimensional structure of bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy [J]. J Virol., 1997, 71(1): 325-330
- [3] Christophe Chevalier, Jean Lepault, Inge Erk, et al. The Maturation Process of pVP2 Requires Assembly of Infectious Bursal Disease Virus Capsids [J]. J Virol., 2002, 76(5): 2384-2492
- [4] Da Costa B, Chevalier C, Henry C, et al. The Capsid of Infectious Bursal Disease Virus Contains Several Small Peptides Arising from the Maturation Process of pVP2 [J]. J Virol., 2002, 76(5): 2393-2402
- [5] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, et al. A comparison of the sequence of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2 [J]. J Gen Virol., 1990, 71(Pt 6): 1303-1312
- [6] Heine H G, Haritou Mfala P, Failla P, et al. Sequence analysis and expression of host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I stains [J]. J Gen virol., 1991, 72(Pt8): 1835-1843
- [7] Domititor T V, Giambrone J J, Duck L W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates [J]. Avian Dis., 1997, 41(1): 36-44
- [8] 许信刚,王笑梅,李健强,等. 传染性法氏囊病毒超强毒株致弱的分子生物学特征 [J]. 西北农业学报, 2000, 9(3): 12-15
- [9] 曹永长,毕英佐,罗文新,等. 传染性法氏囊病毒变异株主要免疫原基因的 cDNA 的克隆及鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(9): 3-5
- [10] Vanden Berg T P, Gonze M, Morales D, et al. Acute Infectious Bursal Disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain [J]. Avian Pathol., 1996, 25: 751-768
- [11] Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, et al. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus [J]. Virology, 1996, 223(1): 219-223
- [12] 曹永长,毕英佐,梁志清,等. 超强传染性法氏囊病毒株宿主保护性抗原的分子特征 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(6): 521-526
- [13] Yamaguchi T, Setiyono A, Kobayashi M, et al. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells [J]. Avian Dis., 2000, 44(2): 284-290
- [14] Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States [J]. Avian Dis., 1999, 43(2): 310-314
- [15] Boot H J, ter Huume AA, Hoekman AJ, et al. Rescue of Very Virulent and Mosaic Infectious Bursal Disease Virus from Cloned cDNA: VP2 Is Not the Sole Determinant of the Very Virulent Phenotype [J]. J Virol., 2000, 74(15): 6701-6711
- [16] Fernandez- Arias A, Martinez S, Rodriguez JF. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer [J]. J Virol., 1997, 71(10): 8014-8018
- [17] Kotwal GL, Moss B. Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily [J]. J Virol., 1989, 63(2): 600-606
- [18] Smith, GL, Howard ST, Chan YS. Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors [J]. J Gen Virol., 1989, 70(Pt9): 2333-2343
- [19] Lee SB, Rodríguez D, Rodríguez JR, et al. The apoptotic pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2 and involves ICE-like proteases [J]. Virology, 1997, 231(1): 81-88
- [20] 吕英姿,曹永长,陈峰,等. 传染性囊病病毒 VP2 蛋白诱导细胞

- 凋亡的研究[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(2): 70-73
- [21] Tham K M, Moon C D. Apoptosis in cell culture induced by infectious bursal disease virus following in vitro infection [J]. Avian Dis., 1996, 40, 109-113
- [22] Jungmann A, Nieper H, Muller H. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity [J]. J Gen Virol., 2001, 82 (Pt5): 1107-1115
- [23] Azad A A, Jagadish M N, Brown M A, et al. Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus [J]. Virology, 1987, 161(1): 145-152
- [24] Ian G Macreadie, Paul RV, Anthony JC, et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast [J]. Vaccine, 1990, 8(6): 549-552
- [25] 于涟, 宋坤华, 金勇丰, 等. 传染性法氏囊病毒 HZ96 VP2 cDNA 结构分析及在大肠杆菌中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(2): 97-100
- [26] 姜平, 陈溥言, 蔡宝祥, 等. IBDV 南京野毒株 VP2 结构蛋白克隆与表达[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(4): 61-65
- [27] 王笑梅, 王牟平, 高宏雷, 等. 传染性法氏囊病毒 VP2 在酵母细胞内的高效表达及其免疫原性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 443-447
- [28] Wang MY, Kuo YY, Lee MS, et al. Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography [J]. Biotechnol Bioeng., 2000, 67(1): 104-111
- [29] Hu Y C, Bentley W E. Enhancing yield of infectious Bursal disease virus structural proteins in baculovirus expression systems: focus on mercuric ion, protease inhibitors, and dissolved oxygen [J]. Biotechnol Prog., 1999, 15(6): 1065-1071
- [30] 宋坤华, 金勇丰, 于涟, 等. 重组家蚕病毒表达传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 281-284
- [31] Yu L, Song K H, Zhang Y Z, et al. Study on immunogenicity of infectious bursal disease virus VP2 protein expression in silkworm [J]. J Zhejiang Univ., 2000, 26(1): 9-16
- [32] Tsukamoto K., Kojima C., Komori Y., et al. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2 [J]. Virology, 1999, 257(2): 352-362
- [33] Darteil R., Bubb M., Laplace E., et al. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen protection against an IBDV virulent challenge in chickens [J]. Virology, 1995, 211(2): 481-490
- [34] Sheppard M, Werner W, Tsatsas E, et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease [J]. Arch Virol., 1998, 143(5): 915-930
- [35] 刘毅, 金宁一, 郭志儒, 等. 传染性法氏囊病毒 VP2/VP0 基因在重组鸡痘病毒中的表达[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(2): 126-128
- [36] Heine HG, Boyle DB. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens [J]. Arch Virol., 1993, 131(3-4): 277-292
- [37] Baylis CD, Peters RW, Cook JK, et al. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus [J]. Arch Virol., 1991, 120(3-4): 193-205

(上接第 76 页)

- [5] 戴树玺, 张兴堂, 李蕴才, 等. 气液界面磷脂单分子膜的表面增强拉曼光谱[J]. 物理化学学报, 2003, (12): 1123-1126
- [6] 何平笙, 白建民, 徐百. 长链脂肪酸 LB 膜的 X 射线衍射研究[J]. 高等学校化学学报, 1989, (3): 284-287
- [7] Zakri C, Renault A, Rieu J P et al. Determination of the in-plane elastic tensor of crystalline decanol monolayers on water by x-ray diffraction Phys[J]. Rev. B, 1997, (55): 14163-14173
- [8] Uenien B C, Lenne P F, Zakri C et al. Characterization of the Growth of 2D Protein Crystals on a Lipid Monolayer by Ellipsometry and Rigidity Measurements Coupled to EM[J]. Biophys. J., 1998, (74): 2649-2657
- [9] 邓穗平, 周娜, 欧阳健明. LB 膜的 X-射线衍射分析[J]. 昆明理工大学学报, 2004, (2): 121-125
- [10] Sakamoto N, Sakai K, Takagi K. Phase transition and critical behavior in Langmuir films of myristic acid[J]. Phys. Rev. E, 1996, 53: 6164-6168
- [11] 王少鹏, 隋森芳. 荧光显微镜对气/液界面上脂类单分子层的原位观测[J]. 自然科学进展, 1994, (4): 410-416
- [12] 张恒建, 陈志坚, 毕只初, 等. DMPC 与蛋白质在气/液界面上复合组装过程研究[J]. 化学学报, 2000(9): 1125-1130
- [13] 陈启斌, 董亚明, 刘洪来, 等. 偶联表面活性剂在气/液界面上的区域形貌[J]. 物理化学学报, 2003, (10): 1069-107215
- [14] 何新安, 蒋丽金, 江龙, 等. 藻胆蛋白的 LB 膜 R-藻胆蛋白单分子膜及蛋白构象变化的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1996, (4): 111-117
- [15] 袁锋, 沈涛, 许慧君. 荧光素二长碳链衍生物的 LB 膜研究[J]. 中国科学(B 辑), 1995, (1): 37-41
- [16] 曾鑫华, 欧阳健明, 郑文杰, 等. 二棕榈酰磷脂酰胆碱 LB 膜诱导下草酸钙晶体生长的 SEM 研究[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2001, (1): 70-73
- [17] 袁春波, 丁德胜, 陆祖宏, 等. 磷脂 DMPC LB 膜晶格结构的原子力显微镜研究[J]. 生物物理学报, 1996, (3): 67-70
- [18] 袁春波, 付德刚, 丁德胜, 等. 磷脂酸 LB 膜分子结构的原子力显微术研究[J]. 中国科学(B 辑), 1997, (2): 152-157
- [19] 李新民, 袁春波, 李斌, 等. 锚对磷脂酰胆碱 LB 单分子膜结构影响的原子力显微镜观察[J]. 化学学报, 1998, (56): 688-691
- [20] 史立新, 张晶, 卢迎习, 等. 原子力显微镜对电场诱导组装的酶/聚电解质多层膜表面酶分子聚集拓扑形貌的表征[J]. 吉林大学学报(理学版), 2003, (4): 531-533