

毕振威,徐立波,夏兴霞,等. 鉴别犬瘟热病毒强弱毒株中和单克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2020,48(20):178-182.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.20.033

鉴别犬瘟热病毒强弱毒株中和单克隆抗体的制备

毕振威¹, 徐立波², 夏兴霞¹, 梁 霆³, 王永山¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;
2. 山东省招远市农业农村局, 山东招远 265400; 3. 江苏省农业农村厅, 江苏南京 210036)

摘要:为了制备鉴别犬瘟热病毒(CDV)流行强毒株和疫苗弱毒株的单克隆抗体,将 CDV 851 弱毒株浓缩后经蔗糖密度梯度离心纯化,免疫 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 瘤细胞进行细胞融合,经 3~5 次克隆,间接 ELISA 筛选,获得稳定分泌抗 CDV 的杂交瘤细胞 2D12 株。该细胞株分泌的单克隆抗体亚类为 IgG1 κ ,与常见犬病毒不发生交叉反应。间接免疫荧光显示,单克隆抗体与 CDV 851 毒株发生特异性反应,与杆状病毒表达的 CDV 851 毒株 H 蛋白发生特异性反应。Western blot 检测发现,单克隆抗体与 2 株 CDV 强毒株 H 蛋白不发生反应,而与 2 株 CDV 弱毒株 H 蛋白有特异性反应。双抗体夹心 ELISA 显示,单克隆抗体能检测 CDV 疫苗弱毒株而不能检测 CDV 强毒株。病毒中和试验证实,单克隆抗体对 CDV 851 弱毒株具有中和能力。制备了区分 CDV 强毒株和疫苗弱毒株的单克隆抗体,为 CDV 的鉴别诊断技术研究奠定了基础。

关键词:犬瘟热病毒;单克隆抗体;流行毒株;疫苗毒株;鉴别检测

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)20-0178-05

犬瘟热(canine distemper,简称 CD)是由犬瘟热病毒(canine distemper virus,简称 CDV)引起的急性、高度接触性传染病。CDV 自然感染宿主范围广泛,除了食肉目所有 8 个科外,还扩展到偶蹄目猪科、灵长目的猕猴属和鳍足目海豹科等多种动物,给养犬行业、经济动物行业和野生动物保护业等造成了巨大的经济损失^[1]。CD 是由流行的 CDV 野毒

株感染引起的,而 CD 的免疫预防普遍使用活疫苗,如 CDV 疫苗弱毒株 Onderstepoort、CDV3 等。CDV 疫苗弱毒株的毒力减弱而不引起免疫犬 CD 发病,但能提供有效的免疫保护。在临床中,CD 疑似犬中检测和分离的 CDV 毒株并不一定是致病毒株,很多临床分离株与疫苗株具有很高的同源性和亲缘关系^[2-3],表明犬感染 CDV 弱毒株的情况可能比较普遍,也可能分离的毒株就是免疫接种的疫苗弱毒株。目前,鉴别和区分 CDV 野毒株和疫苗弱毒株的检测方法很少。通过对 CDV 的基因测序能确定毒株的基因型^[4],但费时、费力,无法实现快速准确诊断,对 CD 的诊断和治疗造成一定的困难。在检测 CDV 血清抗体时,也无法判断是 CDV 疫苗弱毒株还是 CDV 野毒株产生的抗体。因此,有效区分 CDV

收稿日期:2020-06-23

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0501000);国家自然科学基金(编号:31802168)。

作者简介:毕振威(1985—),男,山东文登人,博士,助理研究员,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:bizhenwei@126.com。

通信作者:王永山,博士,研究员,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。E-mail:wangys63@126.com。

[32] Yano Y, Hamano K, Satomi M, et al. Diversity and characterization of oxytetracycline-resistant bacteria associated with non-native species, white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(3): 713-722.

[33] Mirbakhsh M, Akhavansepahy A, Afsharnasab M, et al. Screening and evaluation of indigenous bacteria from the Persian Gulf as a probiotic and biocontrol agent against *Vibrio harveyi* in *Litopenaeus vannamei* post larvae[J]. Iranian Journal of Fisheries

Sciences, 2013, 12(4): 873-886.

[34] Hwang S H, Kim Y J. Meropenem-resistant bacteria in hospital effluents in Seoul, Korea[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(11): 1-8.

[35] Mwirichia R, Muigai A W, Tindall B, et al. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya[J]. Extremophiles, 2010, 14(4): 339-348.

[36] 陈 峰, 张丹丽, 宛宝山, 等. 不同培养基与前处理方法对副溶血弧菌 MALDI-TOFMS 鉴定结果的影响评估[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 264-267.

强弱毒株是目前亟待解决的重要问题。本研究选用与 CDV 野毒株存在抗原性差异的 CDV 851 弱毒株免疫小鼠,制备能与 CDV 弱毒株发生特异性反应而与 CDV 野毒株没有反应的单克隆抗体,为区分 CDV 强弱毒株提供必要的工具。

1 材料与方法

1.1 病毒及主要试剂

Vero 细胞长期传代致弱的 CDV851 毒株由笔者所在实验室保存;6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心;小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由笔者所在实验室保存;抗 CDV N 蛋白单克隆抗体由笔者所在实验室制备^[5];HRP 标记羊抗鼠抗体为 KPL 产品;弗氏完全与不完全佐剂、PEG4000、RPMI-1640 培养基、HAT 和 HT 均购自 Sigma 公司;TMB 显色液购自南京碧云天生物技术有限公司;单抗亚型鉴定试剂盒为 Thermo 公司产品;鼠源抗 Flag 标签抗体购自 Sigma 公司;FITC 标记的羊抗鼠抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;同源重组克隆试剂盒(One Step Cloning Kit-C112)、高保真 DNA 聚合酶(Phanta Max super-fidelity DNA polymerase)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;表达 CDV 851 毒株 H 蛋白的杆状病毒按参考文献[6]构建和鉴定;7 份 CDV 阳性临床样品来自山东烟台和江苏南京的宠物医院。

1.2 抗原纯化和动物免疫

将 CDV 851 毒株接种于 Vero 细胞大量培养。根据文献[7]的方法,采用醋酸锌沉淀浓缩病毒,经蔗糖密度梯度离心,纯化和制备 CDV 抗原。将纯化的 CDV 抗原用等体积弗氏完全佐剂乳化,腹腔注射免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,剂量为 50 μ g/只。以后每隔 14 d 用等体积弗氏不完全佐剂进行乳化,再免疫 2 次。3 免后间隔 7 d 断尾采血,测定血清抗体效价。取免疫小鼠血清和正常 BALB/c 小鼠血清作为阳性血清和阴性血清。于 2011 年 5 月 10 日至 2011 年 6 月 21 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.3 细胞融合、筛选与克隆

取 CDV 免疫的 BALB/c 小鼠的脾脏,制备脾细胞。根据文献[7]方法,采用 PEG4000 将脾细胞与 SP2/0 细胞进行细胞融合。用纯化的 CDV 851 株抗原作为包被抗原,间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞培养上清,选择 2 次检测结果均为阳性的杂交瘤细

胞株。采用有限稀释法对阳性孔进行 3~5 次亚克隆,至克隆后所有细胞孔上清阳性率 100%。将克隆化的 CDV 单克隆抗体杂交瘤细胞株进行扩大培养,腹腔注射到石蜡致敏的 8~10 周龄的 BALB/c 小鼠,7~10 d 后收集小鼠腹水,离心后收集上清,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。于 2011 年 6 月 21 日至 2011 年 8 月 25 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.4 单克隆抗体的效价和亚类测定

用间接 ELISA 测定杂交瘤细胞培养上清和单克隆抗体腹水的效价。按照单克隆抗体亚类鉴定试剂盒操作说明书,测定杂交瘤细胞 2D12 株分泌单克隆抗体的亚类。于 2011 年 9 月 1 日至 2011 年 9 月 7 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.5 单克隆抗体的间接免疫荧光试验

将 Vero 细胞铺在 24 孔细胞培养板中,同步接种 CDV 851 株,培养 48 h,病变后吸弃细胞培养液,用预冷的无水乙醇于 4 $^{\circ}$ C 下固定 30 min,用 PBS 洗 3 次;加入杂交瘤细胞培养上清液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次;加入 200 倍稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 次,置于荧光显微镜下观察。将 Sf9 昆虫细胞铺到 24 孔板中,接种表达 CDV 851 毒株 H 蛋白的杆状病毒,按以上相同的方法进行间接免疫荧光试验。于 2011 年 8 月 26 日至 2011 年 9 月 1 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.6 单克隆抗体的 Western blot 检测

分别用 RT-PCR 方法扩增 CDV 851、疫苗株 Onderstepoort 以及 Asia-4 型野毒株 NJ(11)2 和 Asia-1 型野毒株 NJ(12)3 的 H 基因,采用同源重组的方法克隆到真核表达载体 pCAGGS 载体上,构建 pCAGGS-Flag-H 真核表达质粒。将 293T 细胞铺到细胞板中,次日细胞长至 60%,分别转染以上 4 个毒株 H 蛋白的真核表达质粒,48 h 后裂解细胞,加蛋白上样缓冲液煮 10 min,进行 Western blot 检测。一抗为杂交瘤细胞培养上清液,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,用 ECL 显色试剂盒进行显影。于 2019 年 4 月 7 日至 2019 年 5 月 13 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.7 单克隆抗体的 ELISA 方法

用 HisTrapTM Protein G 亲和层析柱纯化单克隆抗体,按 5 μ g/mL 的浓度包被 ELISA 板,用 10% 小牛血清的 PBST 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, PBST 洗 3 次,加入

CDV 阳性样品,37 ℃ 作用 1 h, PBST 洗 3 次, 然后加入 HRP 标记的抗 CDV N 蛋白单克隆抗体 G3N^[7], 37 ℃ 作用 1 h, PBST 洗 3 次, 进行 ELISA 显色。同时, 用双抗体夹心 ELISA 试验检测犬细小病毒 (CPV)、犬流感病毒 (CIV)、犬腺病毒 1 型 (CAV-1) 和犬冠状病毒 (CCV), 检验单克隆与犬常见病毒的交叉反应性。于 2019 年 6 月 9 日至 2019 年 6 月 30 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

1.8 病毒中和试验

测定 CDV 851 株的 TCID₅₀, 确定其病毒滴度。采用固定病毒稀释抗体的方法检测单克隆抗体的中和活性。将 Vero 细胞消化后, 接种于 96 孔细胞板中。杂交瘤细胞培养上清按 2 倍倍比稀释, 单克隆抗体腹水按 10 倍倍比稀释。将不同稀释度的杂交瘤细胞培养上清和单克隆抗体腹水分别与等体积含 200 TCID₅₀ 的 CDV 851 株悬液混合均匀, 37 ℃ 作用 1 h, 取该病毒-抗体混悬液按 0.1 mL/孔接种于上述 96 孔细胞板中, 并设立 CDV 及正常 Vero 细胞对照, 置 37 ℃、5% CO₂ 温箱中培养, 5~7 d 后观察结果。于 2011 年 9 月 15 日至 2011 年 9 月 30 日在江苏省农业科学院兽医研究所进行。

2 结果与分析

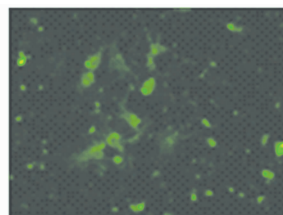
2.1 单克隆抗体的筛选、效价和亚类

融合的杂交瘤细胞经过 3~5 次克隆筛选, 获得分泌抗 CDV 单克隆抗体的杂交瘤细胞 2D12 株。用间接 ELISA 测定杂交瘤细胞培养上清的效价是 1:10³, 单克隆抗体腹水的效价是 1:10⁷。亚类试剂盒鉴定单克隆抗体的重链亚类为 IgG1, 轻链亚类为 κ 型。将杂交瘤细胞传代 20 代以上, 用间接 ELISA 抗体检测细胞培养上清液, 结果分泌的抗体效价没有明显变化, 表明该杂交瘤细胞株具有稳定分泌单克隆抗体的能力。

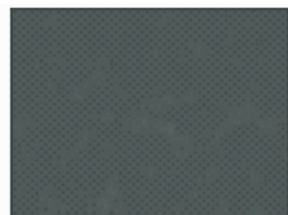
2.2 单克隆抗体的特异性

采用间接免疫荧光试验 (IFA), 检测单克隆抗体的特异性。杂交瘤细胞 2D12 株培养的细胞培养上清与 CDV 851 毒株感染的 Vero 细胞进行间接免疫荧光试验, 结果表明, 单克隆抗体 2D12 与 CDV 851 毒株感染的 Vero 细胞发出绿色荧光, 而与正常 Vero 细胞没有绿色荧光 (图 1), 表明单克隆抗体与 CDV 851 毒株发生特异性反应。将表达 CDV 851 毒株 H 蛋白的重组杆状病毒感染 s9 细

胞, 间接免疫荧光试验显示, 杂交瘤细胞 2D12 株培养的细胞上清与之发出绿色荧光, 而与正常的 s9 细胞无绿色荧光, 表明单克隆抗体与 CDV 851 毒株 H 蛋白发生特异性反应 (图 2)。用双抗体夹心 ELISA 检测犬细小病毒 (CPV)、犬流感病毒 (CIV)、犬腺病毒 1 型 (CAV-1) 和犬冠状病毒 (CCV), 结果均为阴性, 表明该单克隆抗体与犬常见病毒不发生交叉反应。

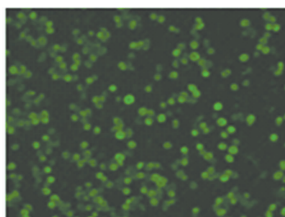


A. CDV 851 毒株感染的 Vero 细胞



B. 正常 Vero 细胞

图1 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体与 CDV 851 毒株的反应性



A. 表达 CDV 851 毒株 H 蛋白
杆状病毒感染的 s9 细胞



B. 野生型杆状病毒
感染的 s9 细胞

图2 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体与表达 CDV 851 毒株 H 蛋白杆状病毒的反应性

2.3 单克隆抗体与不同 CDV 毒株的反应性

将表达 CDV 851 毒株、疫苗株 Onderstepoort 以及 Asia-4 型野毒株 NJ(11)2 和 Asia-1 型野毒株 NJ(12)3 的 H 蛋白的真核表达质粒转染 293T 细胞, 24 h 后收获细胞样品, 进行 Western blot 试验。结果表明, 单克隆抗体与 CDV 851 毒株、Onderstepoort 毒株 H 蛋白在 70 ku 左右出现特异性条带, 与 H 蛋白预期大小相符, 而与 CDV NJ(11)2 毒株、CDV NJ(12)3 毒株没有出现条带 (图 3-A、图 3-B)。用 Flag 抗体检测 CDV NJ(11)2 毒株、CDV NJ(12)3 毒株 H 蛋白, 在 70 ku 左右出现特异性条带, 表明这 2 个毒株的 H 蛋白得到表达 (图 3-C)。以上结果表明, 单克隆抗体特异性地识别弱毒株 CDV 851 和疫苗株 Onderstepoort 的 H 蛋白, 但是与 CDV 野毒株 NJ(11)2 和 NJ(12)3 毒株不发生特异性反应。为了进一步检测单克隆抗体与 CDV 野毒株的反应性, 用该单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法, 检测 9 份犬临床 CD 样品, 检测结果均

为阴性,空白对照也为阴性;而检测 CDV 弱毒株 CDV 851 和 Onderstepoort 株时,则为 CDV 阳性(图 4-A)。用之前建立的双抗体夹心 ELISA^[7]检

测,则均为 CDV 阳性(图 4-B)。以上结果进一步确定单克隆抗体能够识别 CDV 疫苗弱毒株,而不能识别临床 CDV 野毒株。

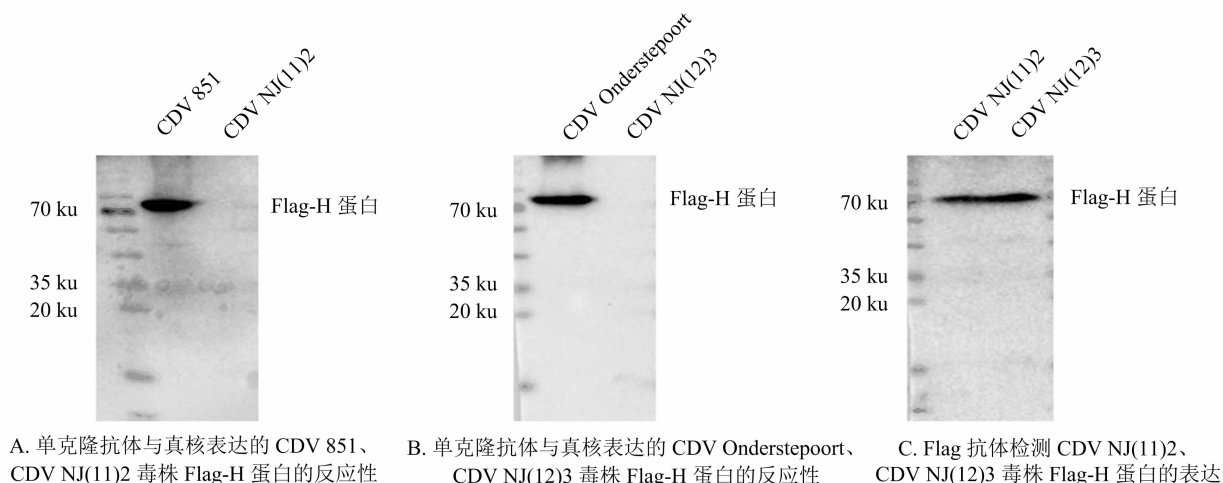


图3 Western blot 检测单克隆抗体与不同 CDV 毒株 H 蛋白的反应性

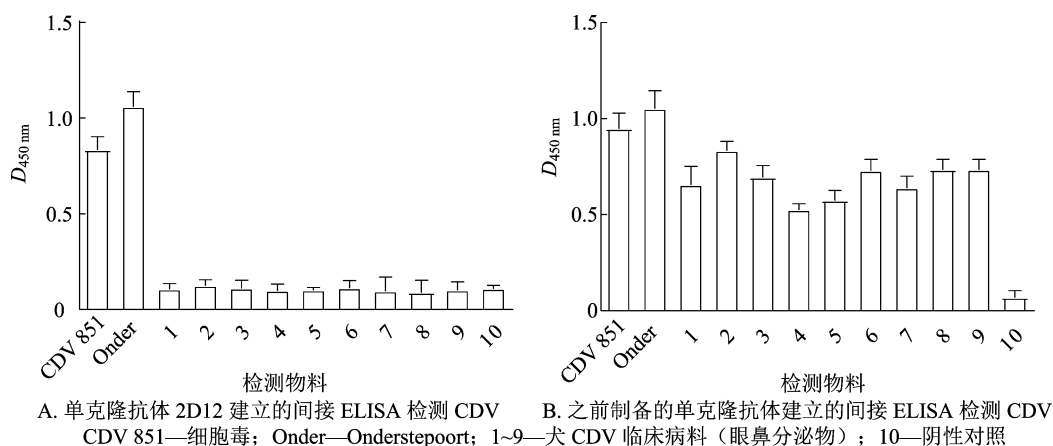


图4 双抗体夹心 ELISA 检测 CD 临床病料

2.4 单克隆抗体的中和活性试验

用 CDV 851 毒株在 Vero 细胞上进行病毒中和试验,检测单克隆抗体的病毒中和活性。杂交瘤细胞 2D12 株培养上清液按 2 倍倍比稀释,测得的中和效价是 1 : 256;单克隆抗体腹水按 10 倍倍比稀释,单克隆抗体腹水的中和效价为 1 : 10⁶。

3 讨论与结论

CDV 引起犬和其他陆生食肉动物产生呼吸系统、消化系统、神经系统等多系统临床症状,危害严重。CDV H 蛋白是刺激机体产生中和抗体的主要蛋白^[8-9]。但是,H 基因的变异率很高,不同 CDV 毒株之间 H 基因的变异性高达 11%。因此,H 基因已经被广泛的用于研究 CDV 的分子流行病学和遗

传进化^[1]。CDV 是副黏病毒科麻疹病毒属的 RNA 病毒,容易发生变异。近年来,新的 CDV 基因型不断地出现。到目前为止,基于 H 基因的进化显示 CDV 至少有 17 个不同的基因型,即 America-1 型(包括几乎所有的商业现有疫苗株)、America-2~5 型、Arctic-like 型、Rockborn-like 型、Asia-1~4 型、Africa-1 和 2 型、Europe wild 型、Europe/South America-1 型、South America-2 和 3^[1,4-5]。目前,中国流行的 CDV 毒株主要是 Asia-1 型 CDV^[4]。H 基因的多样性也影响到了抗原性,单克隆抗体鉴定不同 CDV 毒株 H 蛋白存在抗原差异性^[10-12]。本研究用 CDV 851 弱毒株制备的单克隆抗体 2D12 能区分 CDV 疫苗弱毒株和 CDV 野毒株,且对该毒株具有中和活性。考虑到 H 蛋白的免疫保护性和

较高的抗原变异性,用杆状病毒表达的 CDV 851 株 H 蛋白检测与单克隆抗体 2D12 的反应性,结果为阳性,说明该单克隆抗体结合的是 H 蛋白。

CD 疫苗的使用很好地控制了该病。最近在全世界包括我国,频繁地出现 CD 病例,之后较大规模爆发,包括家养动物和野生动物,甚至是在接种疫苗的动物上。Li 等分离的 9 株 CDV 野毒株,其中 3 个毒株是来自免疫犬^[13]。交叉中和试验结果表明,CDV 野生型分离株之间以及 CDV 野生型分离株与美国目前使用的疫苗株之间存在抗原差异^[14]。本研究制备的单克隆抗体与疫苗弱毒株反应而与野毒株不反应,表明单克隆抗体识别的中和抗原表位在野毒株上已经发生变异。目前 CDV 疫苗仍然有效,但是中和抗原表位的改变可能会降低或者减弱疫苗的免疫效率。

Chen 等从 15 只犬中扩增到 15 个 CDV 毒株的 H 基因,其中 9 个 CDV 毒株属于 Asia-1 型,而 4 个毒株与 Onderstepoort 毒株有着最近的关系^[2]。事实上,在对 NCBI 中注册的 CDV 毒株进行遗传进化分析,发现很多毒株都与疫苗弱毒株有着非常近的关系^[3]。临床 CDV 强弱毒株无法有效鉴别,严重影响 CDV 诊断的准确性。曲丛华等建立了鉴别 CDV 强弱毒株的荧光定量 PCR 方法^[15]。本研究制备的单克隆抗体能用来鉴别 CDV 疫苗弱毒株和流行野毒株。鉴定该单克隆抗体识别的 CDV 中和表位,用该表位建立间接 ELISA 方法可区分 CDV 强弱毒株感染产生的抗体,也可用该单克隆抗体建立竞争 ELISA 方法区分 CDV 强弱毒株产生的抗体,具体研究正在进行中。

H 蛋白主要影响 CDV 的抗原性、宿主范围和组织嗜性,其高变异率使 CDV 种间传播现象加剧^[16]。单克隆抗体通过不同的机制对病毒起到中和作用,如阻断 H 蛋白与受体的结合,干扰 H 蛋白与 F 蛋白的结合而抑制病毒与细胞的融合以及改变病毒蛋白构象等^[17]。本研究制备的单克隆抗体 2D12 也具有中和活性,但其具体的机制须要通过受体结合试验、细胞融合试验、表位鉴定等试验来进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] Rendon - Marin S, da Fontoura B R, Canal C W, et al. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus [J]. *Virology Journal*, 2019, 16(1): 30.
- [2] Chen M, Xin T, Hou S, et al. Genotyping and pathogenic

- characterization of canine distemper virus based on mutations in the hemagglutinin gene in Chinese domestic dogs [J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2018, 21(3): 623 - 629.
- [3] 周 莉,刘志杰,曾智勇,等. 犬瘟热病毒贵州分离株 H 基因的克隆及其序列分析 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(7): 19 - 24.
- [4] Zhao J J, Yan X J, Chai X L, et al. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1/2): 34 - 42.
- [5] Bi Z, Wang Y, Pan Q, et al. Development of CDV - specific monoclonal antibodies for differentiation of variable epitopes of nucleocapsid protein [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 84 - 91.
- [6] 毕振威,王永山,范红结. 犬瘟热病毒核衣壳蛋白基因在昆虫细胞中的表达及其抗原性分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(5): 21 - 26.
- [7] 毕振威. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及其应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [8] Bi Z W, Wang Y S, Wang X L, et al. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in domestic dogs in Nanjing, China [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(2): 523 - 527.
- [9] Sixt N, Cardoso A, Vallier A, et al. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge [J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(11): 8472 - 8476.
- [10] Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, et al. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 71(3/4): 281 - 286.
- [11] Bi Z W, Xia X X, Wang Y S, et al. Development and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against canine distemper virus hemagglutinin protein [J]. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59(4): 202 - 208.
- [12] Shi P, Cao Z G, Cheng Y, et al. Identification of linear B - Cell epitopes on hemagglutinin protein of canine distemper virus using two monoclonal antibodies [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 47.
- [13] Li W, Cai C, Xue M, et al. Phylogenetic analysis of canine distemper viruses isolated from vaccinated dogs in Wuhan [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, 80(11): 1688 - 1690.
- [14] Anis E, Holford A L, Galyon G D, et al. Antigenic analysis of genetic variants of Canine distemper virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 219: 154 - 160.
- [15] 由丛华,张传美,张洪亮,等. 鉴别犬瘟热病毒强弱毒株 SYBR Green I 荧光定量 RT - PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(3): 23 - 25.
- [16] 王雅文,赵建军,闫喜军. 犬瘟热病毒受体及其跨宿主感染 [J]. *病毒学报*, 2017, 33(3): 477 - 482.
- [17] Ader - Ebert N, Khosravi M, Herren M, et al. Sequential conformational changes in the morbillivirus attachment protein initiate the membrane fusion process [J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004880.