

陈文杰, 杭柏林, 刘保国, 等. 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性与抗原性分析及细胞表位预测[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(24): 163–167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.032

鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性与抗原性分析及细胞表位预测

陈文杰, 杭柏林, 刘保国, 杨 洋, 刘莉莉, 郭佳佳, 宁春妹

(河南科技学院动物科技学院, 河南新乡 453003)

摘要: 为了解鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性、抗原性和细胞表位的特性, 通过在线工具和软件分析了鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性、二级结构、抗原性、T 细胞表位和 B 细胞表位。结果表明, 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 为分子质量较大、带正电荷、稳定的微疏水性蛋白, 二级结构复杂, 有较好的抗原性, 有 10 条 B 细胞表位和 14 条 T 细胞表位, 其中有 4 条重叠的多肽是 B 细胞表位和 T 细胞表位中的优势多肽, 有 5 条交叉重叠的多肽是 T 细胞表位中的优势多肽。说明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 能刺激机体产生细胞免疫应答和体液免疫应答, 优势表位多肽将为抗鸽毛滴虫的表位疫苗研究奠定基础。

关键词: 鸽毛滴虫; 黏附蛋白; 抗原性; 细胞表位; 生物信息学

中图分类号: S852.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0163-04

鸽毛滴虫 (*Trichomonas gallinae*) 是一种可以感染鸽、鸡等多种禽类的原虫, 引起鸽的疾病称为鸽毛滴虫病 (*Trichomoniasis*) 或鸽瘡^[1-2]。鸽毛滴虫病呈世界性分布, 是鸽子的一种常见病^[3]。因在鸽群中常常连绵不断, 造成的经济损失巨大, 鸽毛滴虫病也被认为是鸽子的一种重大疾病^[4]。目前, 主要通过药物 (中药和西药) 和生物安全措施进行鸽毛滴虫病的治疗和预防^[5-7]。但是, 鸽毛滴虫的耐药性虫株逐渐出现^[8], 同时某些西药如甲硝唑因毒副作用被禁止用于动物^[9]。因此, 必须寻找新的方法来预防鸽毛滴虫病。疫苗免疫是预防传染病最好的方法。目前, 还没有用来预防鸽毛滴虫病的商业性疫苗, 但已有全虫灭活疫苗和重组亚单位疫苗研究的报道^[10-11]。罗锋研究证实, 以鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 制备的重组亚单位疫苗具有较好的免疫保护性^[11]。

表位疫苗是利用结构生物学、分子生物学和免疫学等学科知识筛选抗原表位, 构建串联表位基因, 表达、纯化后与某些免疫增强剂联合使用的一

种疫苗^[12], 具有安全性好、成本低等优点。本研究利用生物信息学方法分析了鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性、二级结构、抗原性和细胞表位等特征, 对深入研究鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的生物学功能具有重要意义, 并为预防鸽毛滴虫病候选疫苗的细胞表位筛选和表位疫苗研究提供候选靶标。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 氨基酸序列来自文献 [11], 共有 309 个氨基酸, 其氨基酸序列为 MLSSSFERNIHQPLLFDIKDTRVVIQIGIGNQCQFHSRLMRQYGTKVVGAVHPKKS GTIIAGLPIFKDMKEVVKKTDANASLIFVPAPGAAQACIDA AAKAGMGLVVCITEHIPQHDMIKVKKVMKETGCCQLIGPNCPLIQPGTHTKLGIPTSIFANGKIGVVSRS GTLT YEAA FATTLAGLGQSTVVGIGGDPFAGQLHTDVVKRFAADPKTEGII LIGEIGGTSEEDAAEWIAKNQLCKEKPVVAFIAGATAPPGKRMGHAGAI VSGGKGTAEGKYKALEAGVRIARHPGNMCKGFIFEEMKRMGKI。

1.2 试验方法

用 DNASTar 软件中的 Protean 工具分析蛋白的抗原性, 用 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白的理化特性, 用 npsa-prabi 工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 分析蛋白的二级结构, 用 T cell class I

收稿日期: 2020-04-21

基金项目: 河南省大学生创新创业训练计划 (编号: 201910467012);

河南科技学院大学生“百农英才”创新项目 (编号: BNYC2018-2-05)。

作者简介: 陈文杰 (1998—), 女, 河南周口人, 主要从事家禽饲养与疾病防治研究。E-mail: 2503596693@qq.com。

通信作者: 杭柏林, 博士, 讲师, 主要从事动物病原和新兽药研究。

E-mail: yzhl001@126.com。

pMHC immunogenicity predictor 工具 (<http://tools.immuneepitope.org/immunogenicity/>) 分析蛋白的免疫反应能力,用 Antibody Epitope Prediction 工具 (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 分析蛋白的 B 细胞表位,用 CD4 T cell immunogenicity prediction 工具 (<http://tools.immuneepitope.org/CD4episcore/>) 分析蛋白的 CD4 T 细胞表位。

2 结果与分析

2.1 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的理化特性

通过 ProtParam 工具分析,可以得到蛋白的一些理化特性。经过分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有 309 个氨基酸,由 20 种氨基酸构成,分子式为 $C_{1447}H_{2356}N_{404}O_{413}S_{15}$,有 25 个带负电荷的氨基酸[天冬氨酸(Asp) + 谷氨酸(Glu)],有 37 个带正电荷的氨基酸[精氨酸(Arg) + 赖氨酸(Lys)];分子质

量为 32 501.98 u,等电点(pI)为 9.5;预测的半衰期:30 h(哺乳动物网状细胞,体外), >20 h(酵母,体内), >10 h(大肠杆菌,体内);不稳定指数(II)为 23.52,表明 AP33 蛋白为稳定蛋白;脂肪性指数为 89.39,GRAVY 指数为 0.031,表明 AP33 蛋白为微疏水性蛋白。

2.2 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的二级结构

通过 SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION 方法(构象状态为 4,相似度阈值为 8,视窗宽度为 17)进行分析,可以预测蛋白的二级结构。如图 1 所示,AP33 蛋白的氨基酸序列中有 100 个氨基酸参与了 α 螺旋,占比 32.36%;66 个氨基酸参与了延伸链,占比 21.36%;36 个氨基酸参与了 β 转角,占比 11.65%;107 个氨基酸参与了随机卷曲,占比 34.63%。这表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有着复杂的二级结构。

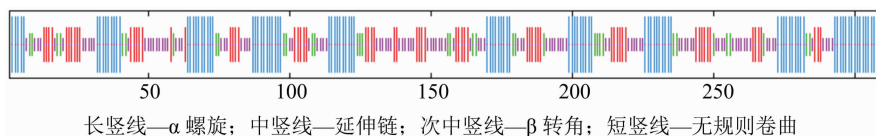


图1 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 二级结构的预测

2.3 抗原性分析

通过 Class I Immunogenicity 方法(常规设置)进行分析,可以预测蛋白引发的免疫反应的强度。经过分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的 MHC I 类免疫反应得分为 0.886 93,表明其能引起宿主较强的免疫反应,说明 AP33 蛋白具有较好的抗原性。通过 DNASTar 软件中的 Protean 工具分析,可以获知蛋

白的抗原性。经过分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的亲水性、表面可及性和抗原性等指数如图 2 所示。亲水性指数(hydrophilicity) > 0、抗原性指数(antigenic index) > 0、表面可及性指数(surface probability) > 1 时,可能存在抗原表位。据此分析,认为鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有较好的抗原性,可能存在抗原表位。

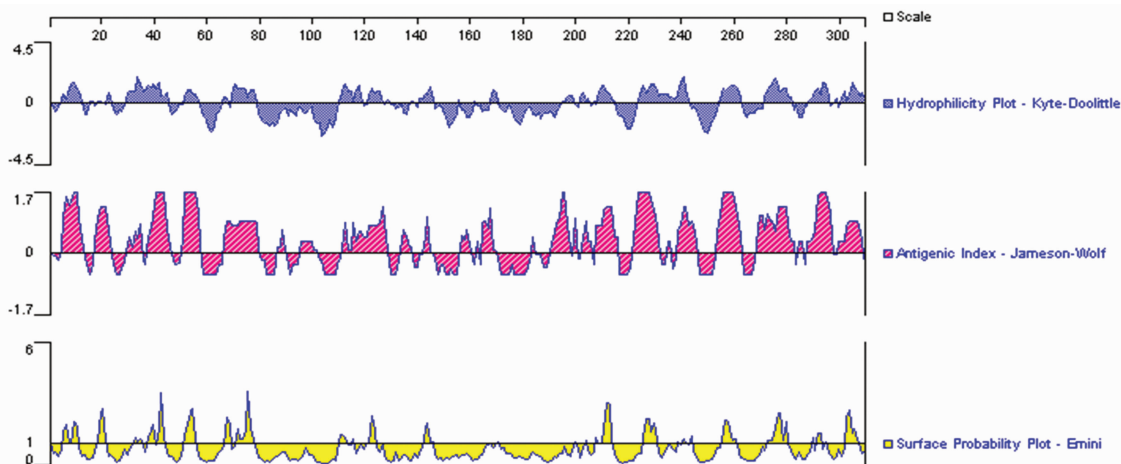


图2 Protean 工具分析鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的抗原性

2.4 B 细胞表位分析

通过 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 方

法(阈值为 0.5)进行分析,可以获得蛋白的 B 细胞表位。经过分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有 10 条

B 细胞线性抗原表位多肽,结果如表 1 所示。从表 1 可以看出,最长的表位多肽有 53 个氨基酸残基,位于序列的中央,最短的有 6 个氨基酸残基,位于序

列的初始部位。这表明,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 能刺激机体产生体液免疫应答。

表 1 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的 B 细胞抗原表位预测结果

序号	位置	氨基酸残基数量 (个)	氨基酸序列
1	6 ~ 11	6	FERNIH
2	18 ~ 58	41	DKDTRVVIQIGIGNQGQFHSRLMRQYGTKVVGAVHPKKSCTI
3	70 ~ 82	13	EVVKKTDANASLI
4	90 ~ 114	25	AQACIDAAKAGMGLVVCITEHIPQH
5	122 ~ 134	13	VMKETGCQLIGPN
6	136 ~ 149	14	PGLIQPGTHTKLGI
7	153 ~ 205	53	SIFANGKIGVVSRSCTLTYYEAAFATTLAGLGQSTVVGIGDPPFAGQLHTDVVK
8	208 ~ 216	9	AADPKTEGI
9	221 ~ 242	22	EIGGTSEEDAAEWIAKNQLCKE
10	250 ~ 294	45	AGATAPPGKRMGHAGAIVSGGKGTAECKYKALEAAGVRIARHPGN

2.5 T 细胞表位分析

通过 immunogenicity 方法(阈值为 90%)进行分析,可以获得蛋白的 CD4 T 细胞表位。经过分析发现,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有 14 条 CD4 T 细胞表位,结果如表 2 所示。从表 2 可以看出,第 13 条多肽得分最高,为 89.570 0 分,第 3 条多肽得分最低,为 60.549 8 分。这表明,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 能刺激机体产生细胞免疫应答。

表 2 鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的 CD4 T 细胞表位预测

序号	肽序列	位置	得分 (分)
1	HQPLLFDKDTRVVI	11 ~ 25	82.615 0
2	QGQFHSRLMRQYGTK	31 ~ 45	74.189 3
3	SRLMRQYGTKVVGAV	36 ~ 50	60.549 8
4	QYGTKVVGAVHPKKS	41 ~ 55	86.616 9
5	GLPIFKDMKEVVKKT	61 ~ 75	82.723 0
6	DANASLIFVPAPGAA	76 ~ 90	88.104 4
7	IPQHDMIKVKKVMKE	111 ~ 125	69.206 4
8	MIKVKKVMKETGCQL	116 ~ 130	72.689 3
9	KLGIPTSIFANGKI	146 ~ 160	72.902 2
10	PTSIFANGKIGVVS	151 ~ 165	74.751 9
11	AGQLHTDVVKRFAAD	196 ~ 210	75.170 8
12	TDVVKRFAADPKTEG	201 ~ 215	87.213 4
13	KEKPVVAFIAGATAP	241 ~ 255	89.570 0
14	GKYKALEAAGVRIAR	276 ~ 290	88.834 1

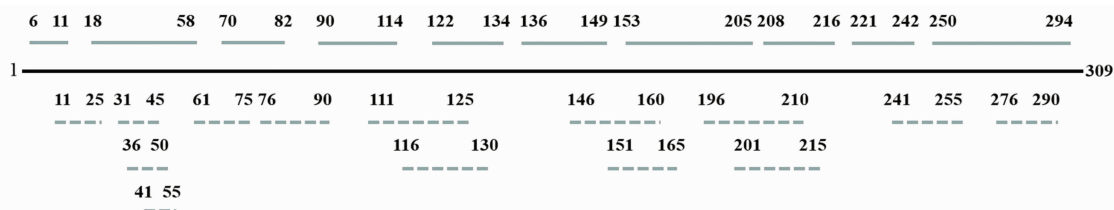
2.6 细胞表位在序列中的分布

将预测的 B 细胞表位和 T 细胞表位在 AP33 蛋白氨基酸序列中的分布进行线性作图,结果如图 3

所示。从图 3 可以看出,T 细胞表位中的 31 ~ 45、36 ~ 50、41 ~ 55 重叠于 B 细胞表位中的 18 ~ 58,T 细胞表位中的 276 ~ 290 重叠于 B 细胞表位中的 250 ~ 294;T 细胞表位中的 31 ~ 45、36 ~ 50、41 ~ 55 之间有交叉重叠,116 ~ 130 与 111 ~ 125 之间有交叉重叠,151 ~ 165 与 146 ~ 160 之间有交叉重叠,201 ~ 215 与 196 ~ 210 之间有交叉重叠。这表明这些重叠或交叉重叠的肽段应为优势肽段,在构成抗原细胞表位中具有重要作用。

3 讨论与结论

构成抗原的条件包括异物性、分子质量、分子结构和物理状态^[13]。对于宿主鸽子而言,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 是来自一种原虫的异物,且鸽子和鸽毛滴虫的种族关系相差很远。因此,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 满足了抗原构成的异物性要求。这表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 应是一种较好的抗原。抗原的分子质量常常要求大于 10 000 u,分子质量越大,抗原性越强^[13]。经软件工具分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的分子质量为 32 501.98 u。因此,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 满足了抗原构成条件中“分子质量大”的要求。这表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的颗粒较大,应有许多抗原表位。蛋白的化学组成和分子结构越复杂,其抗原性越强^[13]。鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 由 20 种不同的氨基酸共 309 个氨基酸残基构成,表明其化学组成复杂。蛋白的二级结构对抗原表位点有一定作用^[14]。经软件工具分析,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的二级结构中有不同数量的



长实线—蛋白 AP33 的氨基酸序列；短实线—预测的 B 细胞表位；短虚线—预测的 T 细胞表位

图3 预测的细胞表位在蛋白氨基酸序列中的分布

α 螺旋区、 β 折叠区、卷曲区和延伸链区,表明其分子结构比较复杂。因此,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 满足了抗原构成条件中“分子结构”的要求。这表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的抗原性较强,应有许多抗原表位。蛋白的物理状态可影响其抗原性,呈聚合状态的物质较单体状态有更强的抗原性^[13]。经软件工具分析可知,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 是一种化学组成和分子结构复杂的且稳定的微疏水性蛋白,有许多不同的结构域,表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 是由不同数量和类型的结构域聚合而成的物质。因此,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 满足了抗原构成条件中“物理聚合状态”的要求。这说明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有较强的抗原性,应有许多抗原表位。

分析蛋白的表面可及性、亲水性和抗原性,可以预测抗原的抗原表位位点^[15]。本研究用软件工具进行分析,结果表明,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 有较多的抗原表位,且鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的 MHC I 类免疫反应得分较高,表明其能引起宿主较强的免疫应答反应。免疫应答反应主要包括细胞免疫应答和体液免疫应答^[13]。体液免疫应答主要由 B 细胞介导,B 细胞识别的抗原表位可称为 B 细胞表位^[13]。细胞免疫应答主要由 T 细胞介导,T 细胞识别的抗原表位可称为 T 细胞表位^[13]。经软件工具分析可知,鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 中存在许多 B 细胞表位和 T 细胞表位。这表明鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 能引发宿主的细胞免疫应答和体液免疫应答。罗锋制备的鸽毛滴虫全虫疫苗和基因工程亚单位疫苗具有较好的保护性^[11]。由此推测,这种较好保护性的分子物质基础就是鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的分子中有较多的 B 细胞表位和 T 细胞表位,从而能引发宿主较强的免疫反应。但是,所预测的表位中哪个表位是保护性表位还须要进一步进行试验验证。

通过生物信息学方法发现新的抗原表位多肽

以指导表位疫苗的研究是“反向疫苗学”常用的策略^[16]。表位疫苗能够集中针对强免疫原性的抗原表位^[17],免疫后能够获得较好的免疫效果。柳玉芳等鉴定的猪流行性腹泻病毒 8 条虚拟表位多肽中,有 1 条表位多肽能诱导小鼠产生具有较好中和作用的中和抗体^[18]。Cubillos 等研究发现,口蹄疫病毒的 T 细胞表位 3A (21 ~ 35) 与 B 细胞表位 VP1 (136 ~ 154) 的合成肽能显著减少病毒排出,减缓临床症状,增强 IFN (干扰素) - γ 的产生^[19]。本试验获得了鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的许多 B 细胞表位和 T 细胞表位,下一步将对这些表位进行深入研究,筛选具有中和和保护作用的表位多肽。把这些表位多肽采取某种策略串联后进行真核或原核表达,可获得针对鸽毛滴虫的串联重组表位疫苗,可能对预防鸽毛滴虫病具有重要的意义。

本研究对鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 进行了理化特性、抗原性和细胞表位的初步分析,为深入研究鸽毛滴虫黏附蛋白 AP33 的功能提供了参考依据,为鸽毛滴虫表位疫苗的研究与应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Qiu S B, Lv M N, He X, et al. PCR identification and phylogenetic analysis of *Trichomonas gallinae* from domestic pigeons in Guangzhou, China[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2017, 55 (3): 333 - 336.
- [2] 赵保华, 戴鼎震, 杨一波. 鸽病防治图谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2017: 138 - 143.
- [3] 步卫东. 乳鸽毛滴虫与白色念珠菌共感染试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013 (10): 98 - 99.
- [4] 罗 锋, 翁亚彪, 张隼菲, 等. 广东省鸽毛滴虫感染情况的调查[J]. 中国家禽, 2006, 28 (17): 24 - 25.
- [5] 孙静静. 体外抗鸽源禽毛滴虫中药的筛选及其作用机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [6] 陈文杰, 杭柏林, 杨 洋, 等. 鸽毛滴虫病预防与治疗研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2020 (2): 58 - 61.
- [7] 张秀玲. 鸽毛滴虫病的发病机理及防治措施[J]. 中国家禽, 2011, 33 (24): 64 - 65.
- [8] 罗 锋, 陈泽华, 苏遂琴, 等. 鸽毛滴虫病的研究进展[J]. 中国

吴玲梅,温智清,杨雪冰,等. 郑州鲤养殖场鲤急性烂鳃病的症状与病原鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):167-172.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.033

郑州鲤养殖场鲤急性烂鳃病的症状与病原鉴定

吴玲梅^{1,2,3}, 温智清^{2,3}, 杨雪冰⁴, 董国栋⁵, 李旭东⁴, 王 飞⁴, 郑晓聪^{2,3}, 刘 荭^{2,3}, 贾 鹏^{2,3}, 毛明光¹

(1. 大连海洋大学, 辽宁大连 116023; 2. 深圳海关动植物检验检疫技术中心, 广东深圳 518045;

3. 深圳市检验检疫科学研究院, 广东深圳 518045; 4. 河南省水产技术推广总站, 河南郑州 450008;

5. 商丘市大栋渔业有限公司, 河南商丘 476000)

摘要:2019 年 6 月, 河南郑州某鲤养殖场发生鲤急性烂鳃病, 累计死亡率约 40%。为研究发病病因和疾病流行规律, 对病鱼解剖, 进行细菌和寄生虫检测、组织病理学检测、PCR 检测和系统进化分析。结果显示, 病鱼体表黏液增多, 眼球凹陷, 头盖骨凹凸不平, 鳃肿胀并伴有溃烂, 肾脏肿大至鳃间隔。体视镜下可见病鱼鳃丝末端钝圆、呈棒状, 鳃丝间充满大量黏液。组织病理学检查可见病鱼鳃丝和鳃小片组织结构严重受损, 鳃丝上皮细胞增生、坏死脱落, 鳃弓远端和近端鳃小片均有明显增生且相互融合。PCR 方法从病鱼中检出鲤浮肿病毒(carp edema virus, CEV), 而 SVCV 和 KHV 检测结果为阴性。另外, 病鱼体表和鳃并未见任何寄生虫, 细菌学检测也未分离到任何与鲤烂鳃病相关的病原菌。遗传进化分析表明, 此次检出的 CEV 毒株属于 II a 基因亚型, 且与中国分离株(AS1/WJ2016)及日本分离株(CyPP3)的同源性最高, 约为 98.8%。初步推断 II a 基因亚型 CEV 可能是引起此次郑州鲤急性烂鳃病的主要病因, 后续养殖中需加强对该病进行防控。

关键词: 鲤急性烂鳃病; 鲤浮肿病毒; 症状; 病原鉴定

中图分类号: S941.42⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2020)24-0167-06

2018 年我国水产养殖业总产量达 4 991.06

万 t, 约占世界水产养殖总产量的 60%, 是世界上唯一水产品养殖总量超过捕捞总量的渔业国家。鲤鱼作为我国第四大淡水养殖品种, 2018 年总产量达到 296.2 万 t^[1], 是我国消费者动物性蛋白的主要来源之一。河南省作为黄河鲤养殖大省, 其 2018 年产量约 23.0 万 t, 居全国第三。然而, 老病新发、外来病和新发疫病等情况成为鲤养殖产业发展的瓶颈, 例如鲤春病毒血症(spring viraemia of carp, SVC)和锦鲤疱疹病毒病(koi herpes virus disease, KHVD)等

收稿日期: 2020-03-31

基金项目: 深圳市自由探索项目(编号: JCYJ2017081840641071); 海关总署科研项目(编号: 2017IK306)。

作者简介: 吴玲梅(1994—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子免疫研究。Tel: (0755) 25588609; E-mail: lingmw0326@163.com。

通信作者: 贾 鹏, 博士, 高级兽医师, 主要从事分子病毒学研究。Tel: (0755) 25588609; E-mail: ajack2012@hotmail.com。

兽医寄生虫病, 2007, 15(3): 51-54.

[9] 王延映. 高效液相色谱法测定饲料中甲硝唑、地美硝唑和异丙硝唑的方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[10] 罗 锋, 李国清. 鸽毛滴虫全虫疫苗免疫效果研究[J]. 养禽与禽病防治, 2017(5): 5-7.

[11] 罗 锋. 鸽毛滴虫的检测与黏附蛋白基因工程疫苗的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2008.

[12] 赵 德, 乔 翠, 张 强, 等. 表位疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2012, 33(1): 102-106.

[13] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2015: 35, 107, 120.

[14] 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 等. 自身抗原 SS-B/La 序列结构分析及抗原性预测[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(9): 471-473.

[15] 杭柏林, 李 杰, 张慧辉, 等. 鸡抗菌肽 NK-lysin 的生物信息

学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(1 上): 29-31, 36, 291-292.

[16] Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics[J]. Immunity, 2010, 33(4): 530-541.

[17] 姚翠梅, 韩文愈, 雷连成, 等. CD4⁺T 细胞表位预测及其应用[C]//中国畜牧兽医学会生物制品学分会、中国微生物学会兽医微生物学专业委员会 2010 年学术年会暨第三届中国兽药大会论文集. 2010: 72-74.

[18] 柳玉芳, 龚 浪, 林 莹, 等. 猪流行性腹泻病毒表位疫苗的研究[J]. 病毒学报, 2019, 35(4): 633-638.

[19] Cubillos C, de la Torre B G, Bárcena J, et al. Inclusion of a specific T cell epitope increases the protection conferred against foot-and-mouth disease virus in pigs by a linear peptide containing an immunodominant B cell site[J]. Virology Journal, 2012, 9: 66.