

李 静,谢鹏宇,于天飞,等. 番鸭细小病毒 YL08 株 VP2 和 VP3 蛋白的原核表达及免疫反应性[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):169-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.027

番鸭细小病毒 YL08 株 VP2 和 VP3 蛋白的原核表达及免疫反应性

李 静,谢鹏宇,于天飞,柳芳芳,尹海畅,于志丹

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:为获得番鸭细小病毒(muscovy duck parvovirus,MDPV)重组结构蛋白 VP2、VP3,本研究以含有 MDPV YL08 株 VP1 基因的重组载体 pET-32a-VP1 为 PCR 扩增模板,分别亚克隆 VP2、VP3 基因。构建了重组载体 pGEX-6p-VP2、pGEX-6p-VP3 并将它们转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)中,分别构建了重组菌株 pGEX-6p-VP2/Rosetta(DE3)和 pGEX-6p-VP3/Rosetta(DE3)。2 种重组菌株在 IPTG 诱导下分别获得了重组蛋白 GST-VP2 和 GST-VP3,分子质量分别为 91、86 ku。Western blot 分析结果表明,重组蛋白 GST-VP2 和 GST-VP3 可特异性结合 GST-tag 单克隆抗体和 MDPV 感染番鸭血清,免疫反应性良好。Dot-ELISA 比较分析结果表明,在等质量条件下,GST-VP2 的免疫反应性强于 GST-VP3。

关键词:番鸭细小病毒;VP2;VP3;原核表达;免疫反应性

中图分类号:S852.65⁺7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0169-04

番鸭细小病毒(Muscovy duck parvovirus,MDPV)主要侵害 3 周龄以内的雏番鸭,引起番鸭细小病毒病,国内亦称番鸭“三周病”^[1-2]。我国动物医学专家林世棠于 1991 年最先发现并报道了该病发生^[3]。番鸭细小病毒病发病率为 40%~50%,死亡率在 50%~80% 之间,对番鸭饲养业的危害极大^[4]。MDPV 和亲缘关系密切的鹅细小病毒(goose parvovirus,GPV)一同被列为细小病毒科(Parvoviridae)依赖病毒属(Dependovirus)雁形目依赖细小病毒 1(Anseriform dependoparvovirus 1)^[5]。MDPV 是 1 种单链 DNA 病毒,无囊膜,基因组大小为 5 132 nt,两端为末端倒置重复序列(ITR)^[6]。MDPV 基因组有左、右 2 个开放阅读框,以重叠基因的形式利用转录本可变剪接方式分别编码转译非结构蛋白(NS)和结构蛋白(VP)。已有研究表明,

NS 参与病毒复制,调控病毒基因表达^[7]。VP1、VP2 和 VP3 等 3 种结构蛋白以约 1:1:8 的比例组装病毒衣壳^[8]。已有研究表明,VP2 为重要免疫原性蛋白^[9]。本研究通过原核表达系统表达获得 MDPV YL08 株 VP2、VP3 重组蛋白,以期 MDPV 病毒相关蛋白功能研究奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

含有 MDPV YL08 株全长 VP1 基因的重组载体 pET-32a-VP1^[10]、原核表达载体 pGEX-6p-1、感受态大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta(DE3)由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院动物免疫学研究室制备或保存。

1.2 主要分子生物学试剂

T₄ DNA 连接酶、BamH I 和 Xho I 限制性核酸内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的 GST-tag 单克隆抗体购自 Thermo Fisher 公司。HRP-兔抗鸭 IgY IgG(H+L)购自上海铭修生物科技有限公司。

1.3 试验时间与地点

试验于 2020 年 10 月至 2021 年 2 月在齐齐哈尔大学生命科学与农林学院动物免疫学研究室进行。

收稿日期:2021-07-23

基金项目:黑龙江省自然科学基金(编号:LH2020C110);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费项目(编号:135309344);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费特色学科专项(编号:YSTSXK201881);齐齐哈尔大学研究生创新科研项目(编号:YJSCX2020044);黑龙江省领军人才梯队后备带头人资助。

作者简介:李 静(1996—),女,内蒙古扎兰屯人,硕士,主要从事动物免疫学研究。E-mail:2092263819@qq.com。

通信作者:于天飞,博士,教授,主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail:yutianfei2001@163.com。

1.4 引物设计

参照 MDPV YL08 株 *VP1* 基因序列 (GenBank 登录号: KU589295), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 3 条特异性引物, 由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

VP2F: 5' - CGCGGATCCACGGCTCCTGCTAAA AAG - 3' (划线处为 *Bam*H I 位点);

VP3F: 5' - CGCGGATCCATGGCAGAGGGAGGA AG - 3' (划线处为 *Bam*H I 位点);

VPR: 5' - GGCCGCTCGAGTTACAGATTCTGAG TC - 3' (划线处为 *Xho* I 位点)。

1.5 基因片段扩增及回收纯化

VP2 基因 PCR 反应体系 (50 μ L): 2 μ L 1 : 10 000 稀释的 pET - 32a - *VP1*, 4 μ L dNTPs, 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 1 μ L 上游引物 VP2F (25 pmol/ μ L), 1 μ L 下游引物 VPR (25 pmol/ μ L), 1 μ L *ExTaq* 酶 (5 U/ μ L), 36 μ L 无菌去离子水。PCR 扩增程序为: 94.0 $^{\circ}$ C 5 min; 94.0 $^{\circ}$ C 90 s, 30.0 $^{\circ}$ C 90 s, 72.0 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72.0 $^{\circ}$ C 7 min; 4.0 $^{\circ}$ C 终止反应。

VP3 基因 PCR 反应体系 (50 μ L): 2 μ L 1 : 10 000 稀释的 pET - 32a - *VP1*, 4 μ L dNTPs, 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 1 μ L 上游引物 VP3F (25 pmol/ μ L), 1 μ L 下游引物 VPR (25 pmol/ μ L), 1 μ L *ExTaq* 酶 (5 U/ μ L), 36 μ L 无菌去离子水。PCR 扩增程序为: 94.0 $^{\circ}$ C 5 min; 94.0 $^{\circ}$ C 90 s, 57.0 $^{\circ}$ C 90 s, 72.0 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 72.0 $^{\circ}$ C 7 min, 4.0 $^{\circ}$ C 终止反应。

上述 2 种 PCR 扩增产物分别通过琼脂糖凝胶电泳检测。按照 Omega 公司 DNA 胶回收试剂盒说明书操作流程回收纯化 *VP2*、*VP3* 基因 PCR 扩增片段。

1.6 重组载体 pGEX - 6p - *VP2* 和 pGEX - 6p - *VP3* 的构建

胶回收 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 *VP2*、*VP3* 基因 PCR 扩增片段和表达载体 pGEX - 6p - 1。分别在含有 *VP2*/pGEX - 6p - 1 和 *VP3*/pGEX - 6p - 1 的连接体系中加入 T_4 DNA 连接酶, 于 16 $^{\circ}$ C 的温度下连接过夜。连接产物 *VP2*/pGEX - 6p - 1 和 *VP3*/pGEX - 6p - 1 分别转化 DH5 α 。挑取单个转化后的 DH5 α 菌落于 LB 液体培养基 (氨苄青霉素, 100 μ g/mL) 中, 37 $^{\circ}$ C 温度下培养 14 h, 按照 Omega 公司质粒提取试剂盒说明书操作流程提取质粒。酶切鉴定并测序验证外源基因插入的准确性。获

得的重组载体分别命名为 pGEX - 6p - *VP2*、pGEX - 6p - *VP3*。

1.7 重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 的诱导表达

分别将 pGEX - 6p - *VP2* 和 pGEX - 6p - *VP3* 转化感受态大肠杆菌 Rosetta (DE3), 制备重组菌 pGEX - 6p - *VP2*/Rosetta (DE3)、pGEX - 6p - *VP3*/Rosetta (DE3)。按照 1 : 100 的比例分别将 pGEX - 6p - *VP2*/Rosetta (DE3)、pGEX - 6p - *VP3*/Rosetta (DE3) 接种于 50 mL LB 液体培养基 (氨苄青霉素, 100 μ g/mL) 的中, 220 r/min, 37 $^{\circ}$ C 温度下继续培养至适宜的诱导表达浓度 ($D_{600\text{ nm}} = 0.5 \sim 0.6$) 时, 加入 IPTG 使其在整个诱导体系中的浓度为 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 温度下继续培养 4 h, 间隔 1 h 取样。各个时间段获得的菌液样品以 8 000 g/min 离心 5 min, 弃去上清液。以菌体沉淀湿质量计算, 按照 30 μ L/mg 的比例用 PBS 重悬菌体沉淀。通过 SDS - PAGE 方法检测重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 表达情况。

1.8 重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 的纯化及鉴定

按照文献 [11] 所述方法分别纯化重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3*, Bradford 法测定蛋白浓度^[12]。纯化的 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 转印到硝酸纤维素膜上。将含有转印蛋白的膜片置于 5% 脱脂乳溶液中, 于 4 $^{\circ}$ C 温度下封闭过夜。37 $^{\circ}$ C 温度下置于 PBS (1 : 100) 稀释的 HRP 标记抗 GST - tag 单克隆抗体溶液中孵育 2 h, PBST 溶液洗涤 3 次后以 4 - CN 作为酶促反应底物进行显色。

1.9 重组蛋白 GST - *VP2*、GST - *VP3* 的免疫反应性

按照“1.8”节中的操作方法对重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 进行转印和封闭。封闭后的含有转印蛋白的硝酸纤维素膜在 37 $^{\circ}$ C 温度下依次置于 PBS 稀释 (1 : 200) 的 MDPV 阳性血清中作用 2 h、PBS 稀释 (1 : 1 000) 的 HRP - 兔抗鸭 IgY IgG (H + L) 中作用 1 h, PBST 溶液洗涤 3 次后以 4 - CN 作为酶促反应底物进行显色。

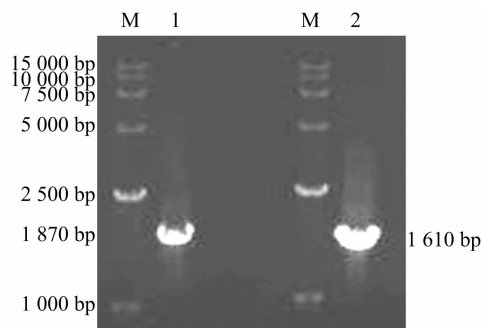
1.10 Dot - ELISA 比较重组蛋白 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 的免疫反应性

将 GST - *VP2* 和 GST - *VP3* 分别以 1 000、100、10、1 ng/点的包被量直接点于硝酸纤维素膜上, 一抗使用 PBS 稀释 (1 : 200) MDPV 阳性血清, 酶标二抗使用 PBS 稀释 (1 : 1 000) 的 HRP - 兔抗鸭 IgY IgG (H + L), 具体操作步骤参照文献 [13] 进行。

2 结果与分析

2.1 MDPV YL08 株 VP2、VP3 基因的 PCR 扩增

通过 PCR 扩增,分别亚克隆获得了与预期大小符合的 1 870 bp (VP2) 和 1 610 bp (VP3) 的 DNA 片段,PCR 的琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。

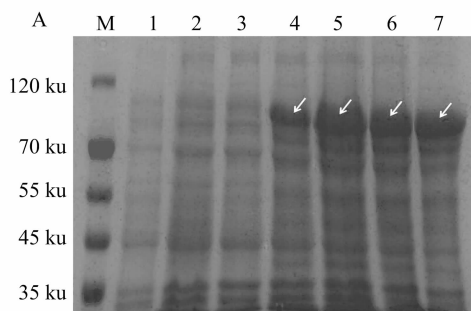


M—DNA 标准分子量 DL15 000; 1—VP2 基因 PCR 产物;
2—VP3 基因 PCR 产物

图1 MDPV YL08 株 VP2、VP3 基因 PCR 扩增结果

2.2 重组载体 pGEX-6p-VP2、pGEX-6p-VP3 的酶切鉴定

酶切鉴定结果表明,pGEX-6p-VP2 经 *Xho* I 酶切得到约 6 800 bp 的条带(表达载体 pGEX-6p-1 和 VP2 基因片段大小之和),经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切得到约 4 900 bp 载体条带和 1 900 bp 的



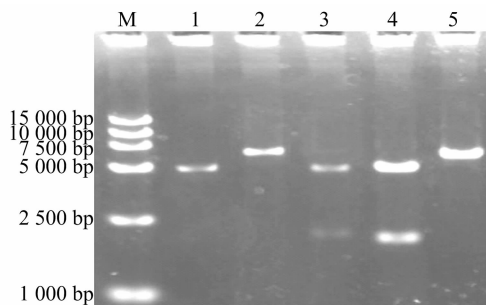
A—GST-VP2 表达的 SDS-PAGE 分析,其中,M—蛋白分子量标准;1—IPTG 诱导前的 pGEX-6p-1/Rosetta(DE3);2—IPTG 诱导 4 h 后的 pGEX-6p-1/Rosetta(DE3);3—IPTG 诱导前 pGEX-6p-VP2/Rosetta(DE3);4~7—IPTG 诱导 1~4 h 后的 pGEX-6p-VP2/Rosetta(DE3);B—GST-VP3 表达的 SDS-PAGE 分析,其中,M—蛋白分子量标准;1—IPTG 诱导前的 pGEX-6p-1/Rosetta(DE3);2—IPTG 诱导 4 h 后的 pGEX-6p-1/Rosetta(DE3);3—IPTG 诱导前的 pGEX-6p-VP3/Rosetta(DE3);4~7—IPTG 诱导 1~4 h 后的 pGEX-6p-VP3/Rosetta(DE3)

图3 重组蛋白 GST-VP2、GST-VP3 表达的 SDS-PAGE 分析

2.4 重组蛋白 GST-VP2、GST-VP3 的纯化及鉴定

由 GST-VP2 和 GST-VP3 纯化结果(图 4),Bradford 法检测 GST-VP2 和 GST-VP3 的浓度分别为 0.77、0.63 mg/mL。GST-VP2 和 GST-VP3 可与 HRP 标记抗 GST-tag 单克隆抗体特异性结合,说明获得的 2 种蛋白为融合于 GST 标签的重组蛋白。

VP2 基因片段条带;单酶切 pGEX-6p-VP3 得到约 6 500 bp 的条带(表达载体 pGEX-6p-1 和 VP3 基因片段大小之和)、双酶切 pGEX-6p-VP3 得到约 4 900 bp 的载体条带和 1 600 bp 的 VP3 基因片段。由图 2 可知,上述酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果与预期相符。测序结果表明,VP2、VP3 基因已正确插入至原核表达载体 pGEX-6p-1 中。

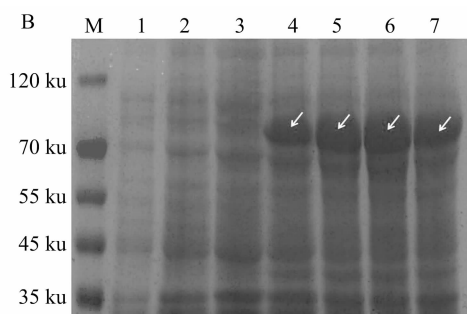


M—DNA 分子量标准 DL1 5000; 1—*Xho* I 单酶切 pGEX-6p-1; 2—*Xho* I 单酶切 pGEX-6p-VP2; 3—*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-6p-VP2; 4—*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-6p-VP3; 5—*Xho* I 单酶切 pGEX-6p-VP3

图2 重组载体 pGEX-6p-VP2和pGEX-6p-VP3的酶切鉴定

2.3 重组蛋白 GST-VP2、GST-VP3 的表达

SDS-PAGE 结果,由图 3 可知,IPTG 诱导后,pGEX-6p-VP2/Rosetta (DE3) 和 pGEX-6p-VP3/Rosetta (DE3) 可分别表达出符合预期大小的 91 ku 和 86 ku 的目的蛋白条带(白色箭头所示)。



2.5 重组蛋白 GST-VP2、GST-VP3 的免疫反应性

由 Western blot 结果(图 5)可知,GST 不与 MDPV 感染番鸭血清结合,硝酸纤维素膜对应位置无代表阳性反应的深色条带;重组蛋白 GST-VP2、GST-VP3 可与 MDPV 阳性血清特异性结合,硝酸纤维素膜对应位置上显示出明显深色条带,免疫反应性良好。

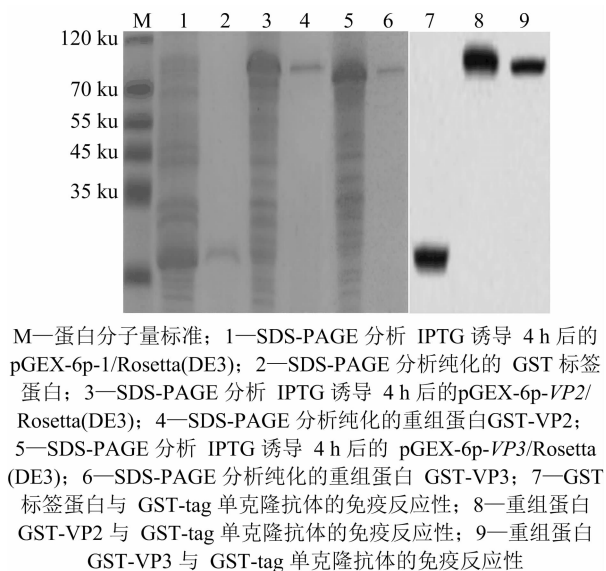


图4 重组蛋白 GST-VP2 和 GST-VP3 的纯化及鉴定

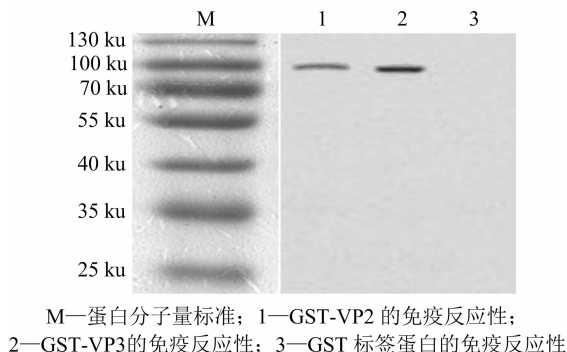


图5 重组蛋白 GST-VP2 和 GST-VP3 的免疫反应性

2.6 Dot - ELISA 比较重组蛋白 GST - VP2 和 GST - VP3 的免疫反应性

重组蛋白 GST - VP2 和 GST - VP3 在抗原包被量为 1 000、100、10 ng/点时,均可与 MDPV 阳性血清发生特异性的结合,形成清晰的阳性反应斑点;抗原包被量在 1 ng/点时,GST - VP3 几乎无可见斑点,GST - VP2 仍可见阳性反应斑点(图 6),表明重组蛋白 GST - VP2 的免疫反应性强于 GST - VP3。

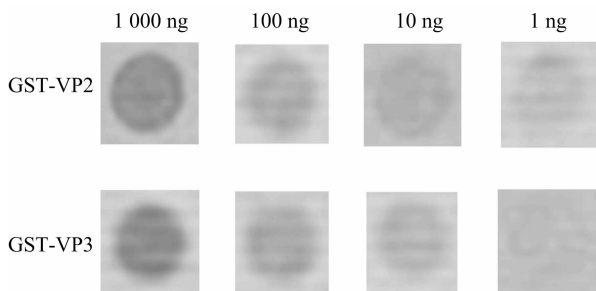


图6 Dot ELISA 比较重组蛋白 GST-VP2 和 GST-VP3 的免疫反应性

3 讨论与结论

MDPV YL08 株为 2008 年笔者所在实验室分离鉴定的 1 株新型 MPDV,重组分析表明其可能起源于不同的 MDPV 之间的重组^[14]。这些新型重组毒株的出现,提示我们在临床上应持续监测、探索番鸭细小病毒病的流行病学及临床进化。Wang 等通过原核系统表达获得了 MDPV VP1 蛋白氨基端的含有 198 个氨基酸的重组蛋白,并以此重组蛋白作为检测抗原通过 Western blot 检测了临床血清样本,检测结果表明,能与该重组蛋白特异性结合的抗体最早出现于番鸭感染 MDPV 之后的第 6 周^[15]。据此认为,基于 VP 蛋白的诊断抗原可用于检测 MDPV 晚期感染。通过杆状病毒/昆虫细胞表达的 MDPV VP2 和 VP3 蛋白亦具有良好的抗原性,可作为诊断抗原^[16]。真核表达系统表达的蛋白相较于原核表达系统表达的蛋白具有更为完善的糖基化等修饰过程,但表达试验操作步骤复杂、成本较高,如果原核表达的蛋白就能满足免疫反应性等要求,采用原核表达系统表达目的蛋白更具有时间成本和经济成本优势。Dot - ELISA 分析中,重组蛋白 GST - VP2 的免疫反应性强于 GST - VP3,这可能是因为 VP2 蛋白比 VP3 蛋白的分子量更大,理论上含有更多的抗原表位。本研究获得了原核表达的抗原性良好的 MDPV 重组 VP2、VP3 蛋白,可为 MDPV 病毒蛋白功能研究奠定一定的物质基础。

参考文献:

- [1] Shen H Q, Huang J F, Yan Z Q, et al. Isolation and characterization of a recombinant Muscovy duck parvovirus circulating in Muscovy ducks in South China[J]. Archives of Virology, 2020, 165 (12): 2931 - 2936.
- [2] 吴 萌,朱善元,吴海涛,等. 番鸭细小病毒 VP3 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):58 - 60.
- [3] 林世棠,郁晓岚,陈炳钊,等. 一种新的雏番鸭病毒性传染病的诊断[J]. 中国畜禽传染病,1991,13(2):25 - 26.
- [4] 袁佐清,吴庆海,曹 铮,等. 番鸭细小病毒病近年研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(15):39 - 42.
- [5] Wang J Y, Mi Q L, Wang Z X, et al. Sole recombinant Muscovy duck parvovirus infection in Muscovy ducklings can form characteristic intestinal embolism [J]. Veterinary Microbiology, 2020, 242: 108590.
- [6] Wang J Y, Wang Z X, Jia J Y, et al. Retrospective investigation and molecular characteristics of the recombinant Muscovy duck parvovirus circulating in Muscovy duck flocks in China[J]. Avian Pathology, 2019, 48(4):343 - 351.

李中波,李 晖,罗世民. 吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫形态学、标签基因选择及其遗传进化分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):173-178.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.028

吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫形态学、标签基因选择及其遗传进化分析

李中波¹, 李 晖², 罗世民¹

(1. 怀化职业技术学院,湖南怀化 418000; 2. 湘西民族职业技术学院,湖南吉首 416000)

摘要:为比较吕氏泰勒虫、尤氏泰勒虫形态学及选择合适基因标签,以期探究它们间的遗传进化关系。借助光学显微镜观察 2 种泰勒虫的形态结构;利用 PCR 技术分别扩增了吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫的 *cox1*、18S rRNA 及 28S rRNA 等 3 个标签基因的部分序列,分别比对它们相应基因的同源性,分析吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫基因差异,并利用其 *cox1*、18S rRNA 和 28S rRNA 基因序列分别构建了它们的遗传进化树。研究表明,吕氏泰勒虫多呈圆点形、卵圆形和短杆状,而尤氏泰勒虫多呈逗点状、十字架状及三叶草形;吕氏泰勒虫 *cox1*、18S rRNA 及 28S rRNA 基因序列的长度分别为 1 122、1 303、1 995 bp;尤氏泰勒虫 *cox1*、18S rRNA 及 28S rRNA 基因序列的长度分别为 1 123、1 303、1 990 bp;两者 *cox1*、18S rRNA 及 28S rRNA 基因序列比对,其相似度分别为 80.32%、95.87% 及 88.64%;所构建的 3 个遗传进化树均显示吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫未处于进化树一分支。提示吕氏泰勒虫与尤氏泰勒虫尽管形态极为相似,但它们间存在较远的亲缘关系,且 *cox1*、18S rRNA 及 28S rRNA 基因序列适用于泰勒虫种属的鉴别。

关键词:吕氏泰勒虫;尤氏泰勒虫;形态学;标签基因;选择;遗传进化

中图分类号:S852.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0173-06

羊泰勒虫病是由隶属于泰勒科、泰勒属的泰勒

原虫经蜱传播,寄生于山羊、绵羊的红细胞、淋巴细胞及巨噬细胞内,引起的一类以高热、消瘦、贫血、黄疸及血红蛋白尿特征性临床症状的血液原虫病^[1-3]。该类疾病分布广泛,自 1914 年首次于埃及发现后,已陆续报道于世界上多个国家和地区^[4]。目前,该病在我国的青海省、甘肃省、辽宁省、内蒙古自治区、山西省、宁夏回族自治区、新疆维吾尔自治区、湖北省、河南省、云南省、贵州省等省(区)均有报道^[5-7]。迄今为止,国内外共发现 6 种泰勒虫

收稿日期:2021-07-13

基金项目:湖南省教育厅项目(编号:20C1810);湖南省怀化市科学技术项目(编号:2020R3107)。

作者简介:李中波(1990—),男,湖南新宁人,硕士,讲师,从事病原分子生物学诊断研究。E-mail:15673191116@163.com。

通信作者:李 晖,硕士,副教授,从事病原分子生物学诊断研究, E-mail:lanling8211@163.com;罗世民(1980—),男,湖南新化人,硕士,副教授,从事宠物诊疗研究, E-mail:124328975@qq.com。

[7] Dong J W, Bingga G L, Sun M H, et al. Application of high-resolution melting curve analysis for identification of Muscovy duck parvovirus and goose parvovirus[J]. Journal of Virological Methods, 2019,266:121-125.

[8] 于天飞,谢鹏宇,尹海畅,等. 脊椎动物细小病毒衣壳结构研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2020(19):25-30,167.

[9] Tu M, Liu P, Liu F, et al. Construction of expression vectors of capsid proteins from goose parvovirus and investigation of the immunogenicity[J]. Acta Virologica, 2018,62(4):415-423.

[10] 于天飞,董慧莹,黎 明,等. 番鸭细小病毒 YL08 株 VP1 基因的克隆及序列分析[J]. 畜牧与兽医,2016,48(7):40-43.

[11] 高慎阳,查恩辉,王 坤,等. 一种“高性价比”切胶纯化原核表达蛋白的方法[J]. 中国农学通报,2010,26(22):24-26.

[12] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.

[13] 于天飞,董慧莹,张喜文,等. 猪传染性胃肠炎病毒血清抗体 Dot-ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2018,40(10):956-959.

[14] Yu T F, Li M. Identification of recombination among VPI gene of Muscovy duck parvovirus from the Mainland of China[J]. Veterinary Microbiology, 2016,195:78-80.

[15] Wang C Y, Shieh H K, Shien J H, et al. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays[J]. Avian Pathology, 2005,34(5):376-382.

[16] le Gall-Reculé G, Jestin V, Chagnaud P, et al. Expression of Muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP₂ and VP₃) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins[J]. The Journal of General Virology, 1996,77:2159-2163.