

# 猪口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白抗体间接 ELISA 方法的建立 Establishment of Indirect ELISA Diagnose Based on the VP1 Structural Protein of Foot-and-mouth Disease Virus ( FMDV ) in Pigs

王光华<sup>1,2</sup> 独军政<sup>1</sup> 丛国正<sup>1</sup> 邵军军<sup>1</sup> 林 彤<sup>1</sup> 薛慧文<sup>2</sup> 常惠芸<sup>1\*</sup> 谢庆阁<sup>1</sup>

WANG Guang-Hua<sup>1,2</sup> ,DU Jun-Zheng<sup>1</sup> ,CONG Guo-Zheng<sup>1</sup> ,SHAO Jun-Jun<sup>1</sup> ,LIN Tong<sup>1</sup> ,XUE Hui-Wen<sup>2</sup> ,  
CHANG Hui-Yun<sup>1\*</sup> and XIE Qing-Ge<sup>1</sup>

1 中国农业科学院兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部畜禽病毒学重点开放实验室,国家口蹄疫参  
考实验室,兰州 730046

2 甘肃农业大学动物医学院,兰州 730076

1 Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National FMD Reference Laboratory, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou  
Veterinary Research Institute Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China

2 Veterinary College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**摘 要** 将口蹄疫病毒(FMDV)的 VP1 基因,通过 pPROex-HT 表达载体在大肠杆菌 BL21( DE3 )中成功表达,获得大小为 31ku  
的融合蛋白,Western blot 检测证实表达的该蛋白具有良好的生物学活性。以纯化的融合蛋白为抗原建立了猪 FMDV VP1 蛋白  
间接 ELISA 检测方法。通过对 80 份田间血清样品的检测表明,该方法与 FMDV 液相阻断 ELISA( 国标试剂盒 )的总符合率为  
96.25% ,表明建立的 VP1 蛋白间接 ELISA 检测方法具有很好的特异性和敏感性。

**关键词** 口蹄疫病毒抗体,VP1 蛋白,间接 ELISA

中图分类号 文献标识码 A 文章编号 1000-3061( 2007 )05-0961-06

**Abstract** The complete gene encoding the structural protein of FMDV( VP1 ) was subcloned into expression vector pPROex-HT ,  
resulting in the fusion expression plasmid pPROexHT-VP1. After transformed into *E. coli* BL21( DE3 ) and induced by IPTG , the  
fusion protein was expressed in high level. Western blot was performed to confirm that the expressed fusion protein could  
specifically react with antiserum against FMDV. Based on the fusion protein further purified , a novel indirect ELISA ( VP1-  
ELISA ) was developed to detect FMDV antibody in pigs. Comparison between VP1-ELISA and the government standard kit  
( liquid phase block ELISA ) showed the two methods had 96.25 percent agreement by detecting 80 serum samples , indicating  
that the indirect VP1-ELISA was specific and sensitive.

**Key words** antibodies against foot-and-mouth disease virus , VP1 protein , indirect ELISA

口蹄疫( FMD )是危害世界各国畜牧业最严重的 疾病之一,其病原是口蹄疫病毒( FMDV )。该病毒

Received : February 2 , 2007 ; Accepted : May 3 , 2007 .

This work was supported by a grant from “ 973 ” ( No. 2005CB523201 ).

\* Corresponding author. Tel : + 86-13389316819 , + 86-931-8342052 ; E-mail : changhuiyun@126.com

国家重点基础研究发展计划( No.2005CB523201 )和国家支撑计划( 2006BAD06A03 )

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

含有4种结构蛋白,分别为VP1、VP2、VP3和VP4,其中VP1蛋白上不仅存在主要的抗原位点(141-160 200-213),并且含有病毒受体结合区<sup>[1]</sup>。FMDV有7种血清型和众多亚型,并且各个国家流行的优势血清型各不相同,在亚洲主要流行A、O、C、

Asia I 4个血清型,致病性也有强弱之分,从而导致该病的检测和防制非常困难。传统的检测口蹄疫血清抗体的方法主要是采用BHK细胞培养的口蹄疫病毒为抗原的间接ELISA方法,以及液相阻断ELISA方法,虽然它们的特异性和灵敏性均较高,但在病毒生产过程中易造成病毒的扩散,且成本较高,检测所需时间较长。基于以上原因,试验利用本室构建表达的VP1融合蛋白代替传统的病毒抗原,建立了具有较好重复性、特异性、灵敏性的间接ELISA方法,用于检测猪血清中的口蹄疫病毒抗体,为口蹄疫血清学检测提供了一项安全而有效的新技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

重组质粒pProexHT-VP1由本实验室构建并保存,大肠埃希氏菌BL21(DE3)购于大连宝生物公司;蛋白纯化试剂盒购自Novagen公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG,四甲基联苯胺(TMB)为Sigma公司产品;96孔高亲和力酶标板为Costar产品;Bio-Rad680型酶标检测仪购自上海基因公司;超声波裂解仪(美国产);口蹄疫抗体液相阻断ELISA试剂盒由中国农业科学院兰州兽医研究所马军武研究员提供。

FMDV阴性和阳性血清、猪细小病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪瘟阳性血清、猪水疱病阳性血清均为本实验室保存。检测用血清样品采自甘肃、宁夏、青海等地,共80份,置于-20℃保存备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 VP1蛋白的获得与纯化**:按常规方法将重组质粒pProexHT-VP1转化到BL21(DE3)宿主菌中,并将获得的VP1蛋白用蛋白质纯化试剂盒纯化、复性,纯化产物进行Western blot分析<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 最佳包被浓度和最佳血清稀释度的确定(方阵滴定)**:将复性后的蛋白溶液用包被液从1:10开始倍比稀释,横向包被酶标板,100μL/孔,每个浓度包被1列,于37℃温育1h后,置4℃冰箱过夜。取出洗涤3次,每次3min,甩干,然后将血清以相同比例纵向稀释8列做方阵滴定,确定表达产物的最佳包被

浓度<sup>[3]</sup>,100μL/孔,每个浓度包被1行,37℃反应45min,洗涤3次,甩干,加入1:40 000兔抗猪IgG-HRP 100μL/孔,37℃反应30min,经洗涤甩干后,加入TMB底物100μL/孔,37℃反应15min,最后加入100μL 2 mol/L硫酸终止反应,用酶标仪测定OD<sub>450nm</sub>值。

**1.2.3 抗原最佳包被条件的确定**:以(1)37℃ 3h加4℃过夜、(2)37℃ 2h加4℃过夜、(3)37℃ 1h加4℃过夜、(4)4℃过夜4种不同的条件下包被的重组蛋白,用猪口蹄疫阳性血清和阴性血清进行ELISA测定,确定抗原的最佳包被条件。

**1.2.4 酶标二抗最佳工作浓度的确定**:采用方阵滴定法,抗原从1:10开始倍比稀释,纵向包被酶标板,兔抗猪IgG-HRP从1:20 000开始,横向2倍稀释,通过检测标准阳性和标准阴性血清来确定酶标二抗的最佳工作浓度。

**1.2.5 ELISA方法初步建立**:将表达产物按1.2.2确定的最佳包被浓度包被酶标板,100μL/孔,于37℃温育1h后,置4℃过夜,取出后用洗涤液洗涤3次,每次3min,甩干,每孔加入100μL封闭液,37℃封闭1h,然后将待检血清用血清稀释液按最佳稀释倍数稀释后加入酶标板,100μL/孔,37℃反应45min,洗涤3次,甩干,加入1:40 000兔抗猪IgG-HRP,100μL/孔,37℃反应30min,经洗涤甩干后,加入TMB底物100μL/孔,37℃反应15min,最后加入100μL 2 mol/L硫酸终止反应,用酶标仪测OD<sub>450nm</sub>值。

**1.2.6 ELISA阴阳性临界值的确定**:取试验室保存的猪血清(已知FMDV抗体阴性)20份进行间接ELISA检测。每份样品重复两孔,结果取其平均值,计算样本OD<sub>450nm</sub>值的平均值( $\bar{X}$ )和标准方差(SD),根据统计学原则,样本的OD<sub>450nm</sub>值>阴性样本OD<sub>450nm</sub>值的平均值( $\bar{X}$ )+2SD时,可以在99.9%的水平上判为阳性<sup>[3]</sup>。

**1.2.7 特异性试验**:用VP1-ELISA方法分别检测猪细小病毒(PPV)阳性血清、猪圆环病毒(PCV)阳性血清、猪瘟病毒(HCV)阳性血清、猪水疱病病毒(SVDV)阳性血清及猪FMDV阴性血清,观察VP1-ELISA方法的特异性。

**1.2.8 敏感性试验**:将阳性血清做1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640,1:1280 8个稀释度,其余条件按最佳反应条件进行ELISA。

**1.2.9 重复性试验**:选取30份血清,用两次包被的酶标板各进行一次重复试验,计算其变异系数。

**1.2.10** 用 VP1-ELISA 检测待测血清(对比试验)：以 1.2.2 确定的最佳包被度和最佳血清稀释度,以 1.2.4 确定的阴阳性临界值为标准共检测了 80 份血清,并同国标试剂盒口蹄疫病毒液相阻断(liquid phase block ,LPB )ELISA 检测的结果进行了比较。

2 结果

2.1 VP1 蛋白的纯化与特异性检查

对纯化的产物用 SDS-PAGE 分析,并用 Western-blot 试验进行检验,结果如图 1 所示。在目标条带所在位置出现一条明显的黑色印迹,没有杂带出现,证明纯化产物具有良好的特异性,即反应原性。

2.2 最佳包被度和最佳血清稀释度的确定(方阵滴定)

方阵滴定结果(表 1)显示:当血清的稀释倍数为 1:20,抗原的稀释度为 1:40 时,阳性血清  $OD_{450nm}$  值可以达到 1.328,而阴性血清的  $OD_{450nm}$  在 0.2 以

下,阴阳性血清  $OD_{450nm}$  值相差最大,因此选择 1:20 为最佳的血清稀释倍数,抗原的最佳稀释倍数为 1:40。兔抗猪 IgG 酶标抗体工作浓度为 1:40 000。

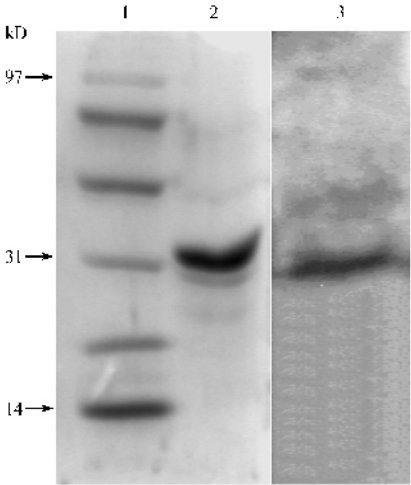


图 1 VP1 蛋白的纯化及其 Western-blot 试验  
Fig. 1 Purified product of VP1 protein and Western blot test  
1 :protein molecular weight marker ;2 :the purified product of rVP1 3 :Western blot test of rVP1 protein.

表 1 方阵滴定的  $OD_{450nm}$  值结果  
Table 1 The  $OD_{450nm}$  of checkerboard titration

Group	Serum dilution	$OD_{450nm}$ of antigen dilution differently					
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Positive Serum	1:10	1.671	1.538	1.415	1.230	0.940	0.794
	1:20	1.506	1.407	1.328	0.926	0.843	0.742
	1:40	1.367	1.319	1.034	0.865	0.751	0.547
	1:80	1.096	0.980	0.752	0.632	0.520	0.420
negative serum	1:10	0.276	0.210	0.160	0.134	0.112	0.084
	1:20	0.213	0.176	0.131	0.113	0.087	0.062
	1:40	0.192	0.134	0.117	0.096	0.079	0.057
	1:80	0.128	0.120	0.089	0.068	0.054	0.041

2.3 抗原最佳包被条件的确定结果

从表 2 可以看出,重组 VP1 蛋白在 37℃ 1h 加 4℃ 过夜的包被条件下,阳性血清与阴性血清的  $OD_{450nm}$  值相差最大,说明包被效果较好,因此将此条件确定为重组蛋白的最佳包被条件。

表 2 最佳包被条件结果  
Table 2 Result of the condition for coating of recombinant protein

Reaction time	(1)	(2)	(3)	(4)
Positive $OD_{450nm}$	1.102	1.213	1.233	1.082
Negative $OD_{450nm}$	0.161	0.152	0.158	0.144

2.4 酶标二抗最佳工作浓度的确定结果

用方阵滴定实验确定抗原和酶标二抗的最佳工作浓度,选取阳性对照  $OD_{450nm}$  大于 1.0,阴、阳性对照差异最大时,抗原和酶标二抗的稀释度为最佳工作浓度。测定结果为抗原 1:40 稀释,酶标二抗 1:40 000 稀释为最佳工作浓度(结果见表 3)。

2.5 VP1-ELISA 阴阳界限的确定结果

通过对 20 份 FMD 阴性血清进行检测(表 4),求得其平均值  $\bar{X}$  为 0.28,标准偏差 SD 为 0.054,确定阴阳性临界点为  $\bar{X} + 2SD = 0.28 + 2 \times 0.054 = 0.39$ 。即待测样品的  $OD$  值大于 0.39 为阳性,小于或等于 0.39 则为阴性。

表 3 酶标二抗最佳工作浓度的确定  
Table 3 The best working titer of anti-pig IgG-HRP

Anti-pig IgG Antigen	1:20 000				1:40 000				1:80 000			
	Positive serum		Negative serum		Positive serum		Negative serum		Positive serum		Negative serum	
1: 10	3.249	3.234	0.510	0.503	2.026	2.115	0.279	0.260	1.013	0.989	0.102	0.095
1: 20	3.130	3.172	0.484	0.461	1.823	1.782	0.210	0.204	0.875	0.860	0.089	0.094
1: 40	2.511	2.437	0.273	0.251	1.471	1.493	0.131	0.128	0.774	0.706	0.074	0.081
1: 80	1.995	1.960	0.189	0.193	1.138	1.124	0.102	0.112	0.521	0.543	0.063	0.070
1:160	1.346	1.375	0.132	0.127	0.856	0.796	0.090	0.085	0.442	0.392	0.059	0.061

表 4 20 份 FMDV 阴性血清 VP1-ELISA 检测结果  
Table 4 The detection results of 20 negative serum using VP1-ELISA

No.	OD <sub>450nm</sub>	No.	OD <sub>450nm</sub>
1	0.265	11	0.236
2	0.344	12	0.201
3	0.315	13	0.286
4	0.245	14	0.234
5	0.340	15	0.264
6	0.370	16	0.265
7	0.289	17	0.201
8	0.274	18	0.209
9	0.354	19	0.358
10	0.241	20	0.298

2.6 特异性试验

采用确立的 ELISA 条件 ,以重组蛋白包被 ELISA 反应板 ,用猪细小病毒、猪圆环病毒、猪瘟、猪水疱病阳性血清进行 ELISA 交叉试验 ,以及 FMD 阳性血清、阴性血清各一份做对照。结果均为阴性 ,表明建立的以重组 VP1 蛋白为抗原检测 FMDV 抗体的 ELISA 方法特异性较好 ,结果见表 5。

表 5 特异性试验结果  
Table 5 The results of intercross test

Item	Positive serum of PPV	Positive serum of PCV	Positive serum of HCV	Positive serum of SVDV
OD <sub>450nm</sub>	0.193	0.169	0.164	0.216

2.7 敏感性试验

VP1 重组蛋白按最佳包被浓度进行包被 ,将猪口蹄疫阳性血清做 1:10 ,1:20 ,1:40 ,1:80 ,1:160 ,1:320 ,1:640 ,1:1 280 ,8 个稀释度 ,其余条件按最适反应条件进行 ELISA 试验。结果当阳性血清稀释到 1:160 时 ,通过 ELISA 显色后靠肉眼观察颜色变化难以判断阴性、阳性结果 ,但酶标仪仍然可以检出 ,1:320 稀释的阳性血清检测结果低于阴性值 ,结果见表 6。

表 6 敏感性试验结果  
Table 6 The results of sensitivity test

Item	The dilution of positive serum						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Positive OD <sub>450nm</sub>	1.664	1.220	0.898	0.628	0.397	0.282	0.154
Negative OD <sub>450nm</sub>	0.190	0.153	0.111	0.080	0.070	0.054	0.047

2.8 重复性试验结果

取 30 份血清 ,用两批包被的酶标板各重复检测 3 次 ,计算标准偏差。结果重复试验中变异系数最大为 7.82% ,最小为 1.49% ,30 份血清变异系数都较小 ,具有较好的重复性。

2.9 对比试验结果

应用 FMDV 液相阻断 ELISA 和本法对血清样品检测 ,检测结果如表 7 所示。VP1-ELISA 的阳性检出率为 27.5% ,阴性检出率为 72.5% ,以 LPB-ELISA 的检测结果为参照 ,将 VP1-ELISA 试验检出结果与其相一致 ,同一样品经两种方法检测均为阴性或阳性 ,的样品数除以检测样品总数 ,即得检测符合率。VP1-ELISA 试验与液相阻断 ELISA 的检测符合率为 96.25%。此结果说明 ,本研究建立的方法在检测结果上与液相阻断 ELISA 试剂盒尚有一定出入 ,在试验的特异性上差异不大 ,但在敏感性方面需做进一步调整。

表 7 对比试验结果  
Table 7 The results of cotrast test

Detection method	Positive	Detection rate/%	Negative	Detection rate/%
LPB-ELISA	20	25.0	60	75.0
VP1-ELISA	23	28.75	57	71.25

3 讨论

本试验选择 pPROexHT-VP1 融合蛋白替代病毒颗粒作为包被抗原 ,建立了检测口蹄疫疫苗免疫和

病毒感染动物血清中抗 VP1 结构蛋白抗体的间接 ELISA 方法。在利用大肠杆菌表达系统表达 VP1 蛋白时,虽然量较大,但表达产物以包涵体形式存在,因此,采用了透析的方法复性,帮助蛋白质形成正确折叠。

在如何利用重组蛋白上,由于本试验中重组蛋白主要用于抗体水平的检测,因此,其与抗猪 FMDV 血清的反应能力好坏就成为其是否具有应用前景的主要依据。在 Western blot 中,该重组蛋白表现了很好的反应原性。

目前,已经建立的利用原核表达蛋白检测口蹄疫病毒抗体的 ELISA 方法主要有:检测非结构蛋白 3AB、3ABC 抗体的间接 ELISA、阻断 ELISA,另外还有合成肽间接 ELISA<sup>[4-9]</sup>。不管用什么方法,判定标准的确定是关键环节。对于间接 ELISA 一般有两种方法来确定判定标准,一种是用测定样本的原始 OD 值和标准差来确定临界值<sup>[10]</sup>;另一种是计算待测样品相对于阳性对照的比值<sup>[11]</sup>,通过测定大量样本效价的频次分布来确定临界值和可疑区间,有些方法则不设可疑区间。本研究在确定阴阳性判定标准时,采用了测定样本的原始 OD 值和标准差的方法。

特异性强和敏感性高是 ELISA 检测方法的最大优点,微量的样品就能引起高效的抗原抗体反应,因此,准确选择抗原的包被浓度和血清样品的稀释度是 ELISA 试验成功的重要环节之一。在研究此检测方法时,我们先以口蹄疫灭活疫苗免疫豚鼠的阳性血清做了敏感性试验,结果比较理想,进而应用于猪血清检测,通过方阵滴定确定了抗原的包被浓度和血清最佳稀释度。在确定封闭液时发现,牛血清白蛋白浓度增加对封闭效果没有明显的作用,而加入 5% 的脱脂奶粉后阴性背景值明显降低,这说明对于不同抗原抗体检测系统,封闭液成分必须进行选择。此外,利用大肠杆菌表达的 VP1 蛋白作为包被抗原检测田间猪血清时,存在宿主蛋白干扰的问题<sup>[12,13]</sup>,即猪血清中存在的大肠杆菌抗体有可能与表达蛋白中残存的宿主蛋白发生非特异性反应,因此在建立本 ELISA 方法的过程中,使用了多种阻断剂,如脱脂奶粉、大肠杆菌裂解液等来消除非特异性反应<sup>[14-16]</sup>。

目前,针对 FMDV 的检测方法主要是间接血凝和全病毒的 ELISA 方法,然而这两种方法都是建立在全病毒的基础上的,存在着一定的安全隐患<sup>[17]</sup>。本研究用基因工程方法得到的抗原建立了 VP1-

ELISA 方法,对 FMDV 灭活苗免疫的猪血清和感染 FMDV 的猪血清都可检测,不仅不存在安全隐患的问题,而且具有很好的特异性,因此,用纯化的 VP1 蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 方法,为 FMDV 的检测提供了一个很好的方法,对 FMD 的防制有着重要意义,今后将进一步利用该法检测牛、羊血清,确定合适的阳性和阴性参考值,进而应用于田间样品的检测。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Wang JH, Liang CM, Peng JM, *et al.* Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2003 **21** 3721 - 3729.
- [2] Joseph S, David W Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [3] Yin Z(殷震), Liu JH(刘景华). *Animal Virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Beijing: Sciences Press(科学出版社), 1997.
- [4] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, *et al.* Differentiation of infection from vaccination in FMD by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1461 - 1476.
- [5] Diego DM, Brocchi E, Mackay D, *et al.* The non-structural polypeptide 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch Virol*, 1997, **142**: 2021 - 2033.
- [6] Mackay DK, Forsyth MA, Davies PR, *et al.* Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 1997, **16**: 446 - 459.
- [7] Rodriguez A, Dopazo J, Saiz JC, *et al.* Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch Virol*, 1994, **136**: 123 - 131.
- [8] Silberstein E, Kaplan G, Taboga O, *et al.* Foot-and-mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 non-structural protein. *Arch Virol*, 1997, **142**: 795 - 805.
- [9] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen EA, *et al.* Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, **143**: 1 - 16.
- [10] Lubroth J, Brown F. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated animals. *Res Vet Sci*, 1995, **59**: 70 - 78.
- [11] Lubroth J, Grubman MJ, Burrage TG, *et al.* Absence of protein 2C from clarified foot-and-mouth disease virus vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated livestock.

- [ 12 ] Pinto AA , Garland AJ. Immune response to virus-infection-associated ( VIA ) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *J Hyg* , 1979 , **82** : 41 – 50.
- [ 13 ] Alonso A , Gomes MPD , Martins MA , *et al* . Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies : comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev Vet Med* , 1990 , **9** : 233 – 240.
- [ 14 ] Berger HG , Straub OC , Ahi R , *et al* . Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structural proteins. *Vaccine* , 1990 , **8** : 213 – 216.
- [ 15 ] Bergmann IE , Mello PA , Neitzert E , *et al* . Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* , 1993 , **54** ( 6 ) : 825 – 831.
- [ 16 ] Lubroth J , Brown F. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated animals. *Res Vet Sci* , 1995 , **59** : 70 – 78.
- [ 17 ] Yu XI( 余晓岚 ) , Xiao SB( 肖少波 ) , Fang LR( 方六荣 ) , *et al* . High expression of the foot-and-mouth disease structural protein P1 in *Escherichia coli* and analysis of its biology activity. *Chinese Journal of Biotechnology* ( 生物工程学报 ) , 2005 , **21** ( 1 ) : 163 – 166.