

## 牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备及初步鉴定\*

王 姝<sup>1,2</sup> 朱远茂<sup>2</sup> 蔡 红<sup>2</sup> 马 磊<sup>2</sup> 史鸿飞<sup>2</sup> 吕 闯<sup>2</sup> 董秀梅<sup>2</sup> 高欲燃<sup>2</sup> 薛 飞<sup>2\*\*</sup>

(1 东北农业大学 动物医学学院 哈尔滨 150001)

(2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/大动物传染病研究室 哈尔滨 150001)

**摘要** 为制备牛病毒性腹泻病毒(BVDV)糖蛋白 E2 单克隆抗体(MAb),利用原核表达并且纯化的重组糖蛋白 E2(rE2)免疫 BALB/c 小鼠,取免疫后小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 融合。采用以 BVDV 为检测抗原的间接 ELISA 筛选阳性细胞克隆,经 3 次克隆纯化后获得 2 株稳定分泌抗 E2 特异性 MAb 的杂交瘤细胞株,分别命名为 4E3 与 1G11。用 4E3 与 1G11 杂交瘤细胞株接种 BALB/c 小鼠制备腹水,采用 rE2 及 BVDV 包被的 ELISA 测得的效价分别是  $6.21 \times 10^6$  和  $6.83 \times 10^5$  及  $6.83 \times 10^5$  和  $7.5 \times 10^4$ 。间接 ELISA、Western blot、IFA 试验表明两株杂交瘤细胞所分泌的 MAb 具有良好的反应性和特异性。经抗体亚类鉴定 4E3 与 1G11 均为 IgM/ $\kappa$ 。特异性试验表明 4E3 与 1G11 这 2 株 MAb 均不与牛传染性鼻气管炎病毒、牛副流感病毒 3 型、牛腺病毒 3 型反应;其中 4E3 不与猪瘟病毒反应,而 1G11 则可与猪瘟病毒发生交叉反应,这种反应特性可试用于 BVDV 与猪瘟病毒的鉴别诊断。所制备的 4E3 与 1G11 MAb 可以用于 BVDV 抗原的检测,为建立检测 BVDV E2 蛋白血清抗体的 ELISA 奠定了基础。

**关键词** 牛病毒性腹泻病毒 E2 单克隆抗体 IgM

**中图分类号** Q819

牛病毒性腹泻/粘膜病 (bovine viral diarrhea/mucosal disease, BVD/MD) 是由牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的,在牛群中以高热、白细胞减少、沉郁、不食、下痢、大量流涎、减奶以致停奶,反刍停止、结膜炎,口腔粘膜充血并出现溃疡斑为主要临床症状和致病特征的一种传染病<sup>[1]</sup>。BVDV 与猪瘟病毒 (CSFV)、绵羊边界病毒 (BDV) 同属黄病毒科瘟病毒属,是黄病毒科瘟病毒属的代表株。BVD 呈世界性分布,尤其是在很多养牛业发达国家中更为严重。

BVDV 病毒的基因组为单股正链 RNA,有感染性。其基因组编码的结构蛋白有 P14、gP48、gP25、gP53,其

余为非结构蛋白。组成病毒囊膜结构的 3 种糖蛋白,依次为 gP48(E0)、gP25(E1)和 gP53(E2),约位于 268 ~ 1060 氨基酸之间<sup>[2]</sup>。E2 是由 690 ~ 1060 位的 370 个氨基酸残基组成,因糖基化程度的不同而使分子量有所变化,为 51 ~ 55kDa。E2 靠近 N 端的一半含有多种构像依赖性抗原结构域,其 N 端伸出 BVDV 囊膜表面,是决定 BVDV 抗原性的主要部位,也是与 BVDV 抗体结合、介导免疫中和反应及宿主细胞识别、吸附的主要部位。糖蛋白 E2 存在着 2 个高可变结构域,位于病毒粒子的外表面,是病毒引起机体免疫应答的重要保护性抗原决定簇<sup>[3]</sup>。

本研究利用大肠杆菌表达的 BVDV 重组 E2 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,通过细胞融合和杂交瘤细胞株的筛选,制备了针对重组 E2 蛋白的单克隆抗体,对其反应性和特异性进行了鉴定,介绍如下。

收稿日期:2012-12-03 修回日期:2013-01-25

\* 国家科技支撑计划子课题(2012BAD12B03-3)、中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(0302012002)、哈尔滨市科技攻关计划项目(2010AA6AN019;2012AA6BN020)资助项目

\*\*通讯作者,电子信箱:xuefeinh@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 重组表达质粒、表达菌株、病毒株和抗血清

表达 BVDV BA 株 E2 蛋白的重组表达质粒 pET30-E2(不含 E2 蛋白的跨膜区及疏水区)<sup>[4]</sup>与表达菌 BL21 由本实验室保存; BVDV BA 株、牛副流感病毒 3 型(BPIV3)、牛传染性鼻气管炎病毒( IBRV)与牛腺病毒 3 型(BAV3)均由本实验室保存; 兔源 BVDV 的 E2 蛋白多克隆抗体<sup>[5]</sup>由本实验室保存。

### 1.2 实验动物和细胞

6 周龄~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠购自哈尔滨兽医研究所实验动物中心; SP2/0 细胞与 MDBK 细胞由本实验室保存。

### 1.3 试剂

蛋白质纯化试剂盒(Ni-NTA Agarose Kit)购自 Invitrogen 公司; 弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FICA)、HRP-羊抗鼠 IgG、聚乙二醇(PEG, MW1450)、HAT、HT、FITC-羊抗鼠 IgG 均购自 Sigma 公司; TMB 购自北京泰天河生物科技有限公司; MAbs 亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotech 公司; DAB 显色液购自北京中山金桥生物技术有限公司; DMEM 培养基购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自德国 Biochrom AG 公司; 超滤管 Corning® Spin-X® UF 20ml Concentrators 购自上海吉泰生物科技有限公司。

### 1.4 重组 E2 蛋白的表达纯化与鉴定

通过生物学软件 DNASTAR 对 E2 蛋白的抗原性、亲水性和表面展示率进行分析, 最终均是截取抗原性好、亲水性强及表面展示概率高的片段进行克隆及表达。参照已发表的 BVDV 的 VEDEVAC 毒株基因组序列, 利用 Oligo6 生物学软件设计扩增 E2 基因的一对引物, 引入酶切位点并去掉 E2 蛋白的跨膜区及疏水区。通过 RT-PCR 扩增了长约 1000bp 的 E2 基因片段, 克隆到 PMD18-T 载体上, 酶切并测序鉴定。然后将目的片段进一步定向克隆到 pET30a 表达载体, 转化 BL21 表达菌。经过转化菌培养, 并用 IPTG 诱导, 获得了以包涵体形式表达的重组蛋白, 大小为 46kDa<sup>[4]</sup>。将获得的重组 E2 蛋白按蛋白纯化试剂盒推荐的使用说明书进行纯化, 并用超滤管进行复性, 去除尿素及杂蛋白。用 SDS-PAGE 及 Western blotting 对纯化的重组 E2 蛋白进行鉴定, 用紫外分光光度计测定其浓度, 并于 -70℃ 保存备用。

### 1.5 MAbs 的制备

1.5.1 动物免疫 首免时, 取纯化的重组 E2 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂乳化均匀, 皮下多点注射, 100μg/只小鼠。首免后每隔两周进行第二、第三次免疫, 用纯化的重组 E2 蛋白与弗氏不完全佐剂等体积乳化均匀, 腹腔注射, 150μg/只小鼠。三免 7d 后检测抗体效价, 两周后进行加强免疫, 腹腔注射 150μg/只小鼠。加强免疫 3d 后取其脾细胞与 SP2/0 进行融合。

1.5.2 MAbs 检测方法的建立 将 BVDV 在 MDBK 细胞中增值, 反复冻融 3 次, 5000r/min 离心 30min 后收集上清液。病毒上清液 TCID<sub>50</sub>测定结果为 10<sup>6.35</sup>/0.1ml, 作为包被抗原; 以免疫后的小鼠血清作为阳性血清, 未免疫后的小鼠血清作为阴性血清, 采用方阵法确定抗原最佳包被浓度、阳性血清最佳稀释度及判定标准, 建立间接 ELISA。根据阳性血清清的 OD 值接近 1.0, 阴性血清 OD 值 <0.2, P/N >2.1 判定为阳性。

1.5.3 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选 按照常规方法<sup>[6]</sup>进行细胞融合。采用上述建立的间接 ELISA 筛选杂交瘤细胞, 有限稀释法进行阳性细胞筛选与克隆纯化。

### 1.6 腹水的制备

将灭菌液体石蜡以 0.5ml/只腹腔注射 8 周龄 BALB/c 小鼠, 一周后将杂交瘤细胞以 5 × 10<sup>5</sup> 个/只 ~ 1 × 10<sup>6</sup> 个/只腹腔注射小鼠, 待小鼠腹腔明显增大时抽取腹水, 离心去除上层油脂和沉淀, 上清即为 MAbs 腹水。

### 1.7 MAbs 的鉴定

1.7.1 腹水效价的鉴定 用已建立的筛选阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 测定腹水效价, 同时设立 SP2/0 细胞腹水作为阴性对照, 以 P/N 值 >2.1 的抗体最大稀释度为 MAbs 的腹水效价。

1.7.2 MAbs 亚型的鉴定 按照抗体亚类试剂盒说明书进行 MAbs 亚类鉴定。

### 1.8 MAbs 特异性的鉴定

1.8.1 Western blot 分析 将纯化后的 BVDV 及纯化的重组 E2 蛋白进行 SDS-PAGE, 转印至硝酸纤维素膜上, MAbs 腹水(1:50)为一抗, 二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1:1000), 用 DAB 显色判定结果。

1.8.2 间接免疫荧光试验(IFA) 用 BVDV、BPIV3、IBRV 与 BAV3 分别接种 MDBK 细胞, 用 CSFV 接种 PK15 细胞。分别在接种病毒后不同时间内用无水乙醇室温固定细胞, 同时以未接毒的 MDBK 和 PK15 细胞

为阴性对照,加入待检的 2 株单抗作用后,进行间接免疫荧光检测,操作步骤按照参考文献[7]进行。

## 2 结果

### 2.1 重组 E2 蛋白的表达与纯化

用 pET30a-E2 重组表达质粒转化表达菌 BL21,经培养与诱导后表达 BVDV 的重组 E2 蛋白(rE2)。利用蛋白纯化试剂盒纯化 rE2,然后用离心柱去除尿素及杂蛋白,并进行蛋白复性,经 SDS-PAGE 及染色和脱色后,纯化的 rE2 分子量约为 46kDa,与以前的报道完全一致<sup>[4]</sup>。

### 2.2 重组 E2 蛋白 Western blot 分析

对纯化及复性的 rE2 进行 Western blot 分析,结果表明纯化及复性的 rE2 均能够被兔源 BVDV 的 E2 蛋白多克隆抗体特异性识别(图 1)。

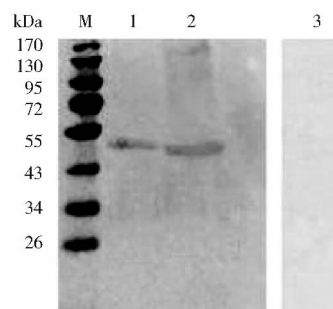


图 1 纯化重组 E2 蛋白的 Western blot 分析

Fig.1 Western blot analysis of the purified recombinant E2 protein

M: Prestained protein Marker; 1: Purified E2 protein;  
2: Refolded purified E2 protein; 3: Negative control

### 2.3 筛选抗 E2 MAb 的间接 ELISA 的建立

采用方阵法确定了抗原最佳包被浓度和阳性血清最佳稀释度,建立了筛选 E2 MAb 的间接 ELISA(表 1)。根据方阵滴定结果,可以初步确定最佳包被抗原浓度为 1:4 稀释的病毒液,阳性血清最佳稀释倍数均为 1:100。

表 1 最佳抗原包被量及阳性血清最佳稀释度的确定

Table 1 Identification of coating antigen and titer of positive serum

病毒液	阳性血清					阴性血清				
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
1:2	0.418	0.42	0.269	0.158	0.108	0.094	0.079	0.066	0.056	0.054
1:4	0.586	0.456	0.319	0.189	0.103	0.088	0.078	0.074	0.061	0.062
1:8	0.576	0.462	0.365	0.173	0.123	0.099	0.073	0.068	0.058	0.056
1:16	0.426	0.294	0.217	0.15	0.098	0.055	0.052	0.057	0.066	0.052
1:32	0.355	0.275	0.207	0.12	0.083	0.055	0.052	0.054	0.051	0.052
1:64	0.312	0.234	0.161	0.114	0.067	0.052	0.051	0.053	0.053	0.052

### 2.4 MAb 腹水抗体效价测定

将收集的杂交瘤细胞 4E3 与 1G11 腹水分别用纯化的 rE2 及 BVDV 包被的 ELISA 板进行效价检测,以 SP2/0 细胞产生的腹水作为阴性对照。用 rE2 检测 4E3 与 1G11 腹水效价分别为  $6.21 \times 10^6$  与  $6.83 \times 10^5$ , 用 BVDV 检测 4E3 与 1G11 腹水效价分别为  $6.83 \times 10^5$  与  $7.5 \times 10^4$ 。

### 2.5 MAb 亚型鉴定结果

利用 SBA Clonotyping™ System/HRP 抗体亚类试剂盒测得杂交瘤细胞株 4E3 与 1G11 所分泌的 MAb 抗体亚型均为 IgM,轻链为  $\kappa$  链。

### 2.6 Western blot 检测结果

将纯化的 rE2 与纯化后的 BVDV 作为抗原经 SDS-PAGE 电泳后,转印到 NC 膜上,分别与 4E3 和 1G11 作用(图 2、图 3),结果表明两株杂交瘤细胞都能与纯化

的 rE2 及 BVDV 发生特异性反应,与阴性对照的 SP2/0 细胞腹水不发生反应。

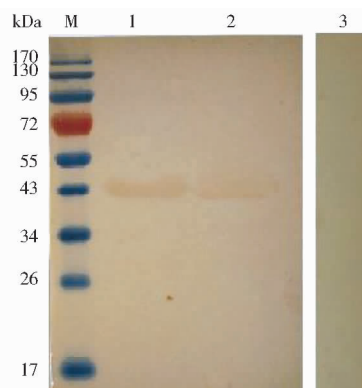


图 2 MAb 4E3 Western blot 分析

Fig.2 Western blot analysis of MAb 4E3

M: Prestained protein Marker; 1: Purified E2 protein;  
2: Purified BVDV; 3: Negative control

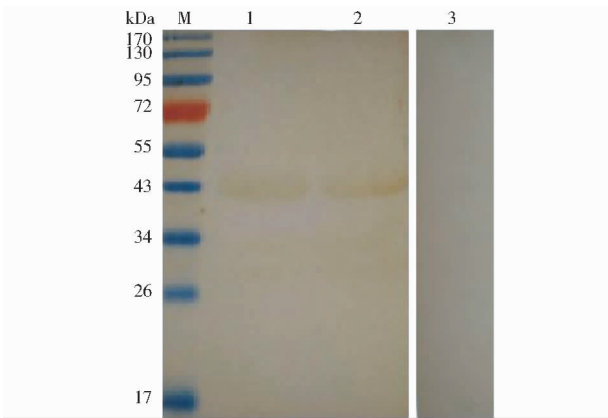


图3 MAb 1G11 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of MAb 1G11

M;Prestained protein Marker; 1:Purified E2 protein;  
2:Purified BVDV;3:Negative control

2.7 IFA 检测结果

用4E3 与 1G11 MAb 进行的 IFA 检测结果表明,感染了 BVDV BA 株的 MDBK 细胞产生了绿色的特异性荧光(图 4-1,图 4-2),而未接种病毒的 MDBK 细胞无荧光反应(图 4-5)。同时,1G11 MAb 可与接种猪瘟病毒 (CSFV)的 PK15 细胞发生反应(图 4-3),但绿色荧光反应强度稍弱;而 4E3 与猪瘟病毒则无反应(图 4-4)。此外,4E3 与 1G11 MAb 与接种牛副流感病毒 3 型 (BPIV3)、牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV) 及牛腺病毒 3 型 (BAV3)的 MDBK 细胞均无反应(图 4-6,图 4-7,图 4-8)。

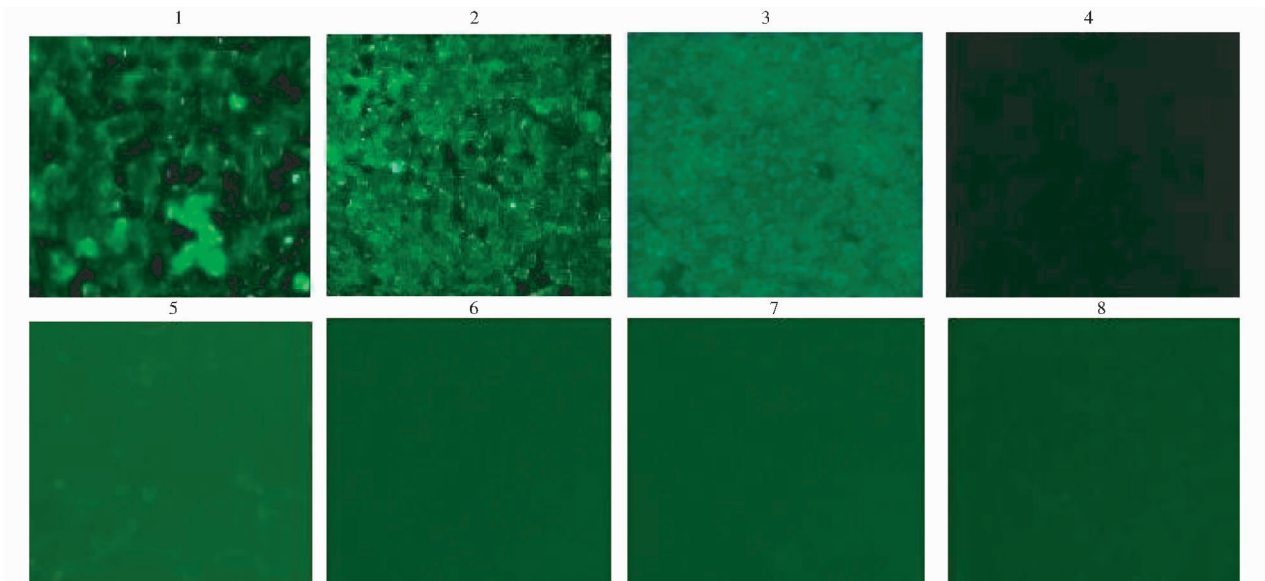


图4 4E3 与 1G11MAb 的 IFA 结果

Fig.4 Reaction of MAbs 4E3 and 1G11 with BVDV and CSFV infected MDBK cells

1: BVDV infected MDBK cells reacted with 4E3; 2: BVDV infected MDBK cells reacted with 1G11;3: CSFV infected PK15 cells reacted with 1G11; 4: CSFV infected PK15 cells reacted with 4E3;5: MDBK cells reacted with 1G11 ; 6 :BPIV3 infected MDBK cells reacted with 4E3; 7: IBR infected MDBK cells reacted with 4E3; 8: BAV3 infected MDBK cells reacted with 4E3

3 讨 论

牛病毒性腹泻在许多养牛业发达国家的流行比较严重,并呈世界性分布。国内自李佑民等于 1980 年从牛流产胎儿脾脏中首次分离到 BVDV 以来,许多地区先后报道有该病毒感染引发的疾病<sup>[8]</sup>。随着我国养牛业的迅速发展,国外不同品种牛的不断引入,该病在我国发生、流行呈上升趋势。E2 蛋白是由牛病毒性腹泻

病毒基因组编码的主要保护性抗原,可诱导宿主产生中和抗体,保护实验动物不受同源毒株的攻击感染。E2 蛋白具有中和活性,含有病毒的主要抗原决定簇,免疫原性最强,是病毒引起机体免疫应答的重要保护性抗原。

本研究大肠杆菌表达的 BVDV 重组 E2 蛋白,经复性后免疫 BALB/c 小鼠,免疫鼠血清与纯化的 BVDV 和重组 E2 蛋白具有良好的反应性,用免疫鼠脾细胞成功

制备了 MAb。在建立筛选 MAb 的间接 ELISA 时,尝试以高速离心、超速离心及 Triton X-100、SDS 裂解处理病毒悬液,筛选结果几乎相当<sup>[9-11]</sup>。最后选择粗分离的 BVDV 作为包被抗原,建立了筛选 E2 MAb 的间接 ELISA,筛选到两株稳定生长并分泌抗 BVDV 的 E2 MAb 的杂交瘤细胞株 4E3 和 1G11。经抗体亚类试剂盒鉴定,4E3 和 1G11 所分泌的 MAb 抗体亚型均为 IgM,轻链为  $\kappa$  链。从 MAb 的亚型鉴定结果来看,用真核系统表达的重组蛋白免疫融合后得到的大多数为 IgM,虽然原核表达系统表达的重组蛋白在结构上不能完全趋近于天然结构,但免疫融合的结果基本趋近于真核系统表达的重组蛋白。IgM 是个体发育过程中最早合成和分泌的抗体,是初次体液免疫应答中最早出现的抗体,因此本研究所获得的单抗可以通过建立固相阻断 ELISA 法检测到抗 BVDV 的抗体。此外,本研究的间接免疫荧光试验表明 4E3 只能与 BVDV 发生反应,与 CSFV、BPIV3、IBRV 和 BADV3 不发生反应,具有良好的反应性与特异性;1G11 则可以与 BVDV 和 CSFV 反应,但不与 BPIV3、IBRV 和 BADV3 发生反应。BVDV 是组织细胞培养及生物制品中最为常见的外源性病毒,特别是用胎牛睾丸等组织细胞培养生产猪瘟疫苗时,BVDV 是必需检测的一个重要外源病毒。因此,4E3 可试用于胎牛血清、培养的组织细胞及生物制品中污染的 BVDV 的检测。同时,上述研究的初步结果表明 4E3 与 1G11 与 BVDV 和 CSFV 具有不同的反应特性,这两种单抗的联合使用可试用于 BVDV 与 CSFV 的鉴别诊断,特别是猪瘟疫苗中可能污染的 BVDV 的检测。本研究为 BVDV 的相关检测提供了便利。

**致谢** 在用本研究制备的 2 株 BVDV 单抗检测接种猪瘟病毒的 PK15 细胞的研究中获得了中国农业科学院哈尔滨兽医研究所猪病研究室仇华吉研究员与李素助理研究员的帮助,在此一并表示感谢。

### 参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学. 第2版. 北京:科学出版社,1997. 631-645.
- Yin Z, Liu J H. Animal Virology. 2<sup>nd</sup> ed. Beijing: Science Press, 1997. 631-645.
- [2] 范进江,薄新文,钟发刚. 牛病毒性腹泻病毒基因组结构与蛋白功能研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(5): 68-72.
- Fan J J, Bo X W, Zhong F G. Advance in genomic structure and protein function of bovine viral diarrhea virus. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 2(5): 68-78.
- [3] Weiland E, Stark R, Haas B, et al. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. Virology, 1990, 64: 3563-3569.
- [4] 李娇,薛飞,朱远茂,等. 牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白的截短表达与鉴定. 中国预防兽医学报, 2008, 30(3): 200-204.
- Li J, Xue F, Zhu Y M, et al. Expression and characterization of truncate E2 protein of bovine viral diarrhea virus in *Escherichia coli*. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(3): 200-204.
- [5] 高欲燃,朱远茂,康健,等. 牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白的多克隆抗体制备及鉴定. 中国预防兽医学报, 2011, 33(3): 227-231.
- Gao Y R, Zhu Y M, Kang J, et al. Preparation and characterization of antisera against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhea virus. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011, 33(3): 227-231.
- [6] Naundor S, Preithner S, Mayer P, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancreatic carcinoma treatment. Int J Cancer, 2002, 100: 101-110.
- [7] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [8] 王新平,任文陟,朱维正,等. 双抗体夹心 ELISA 检测牛病毒性腹泻病毒的研究. 中国兽医学报, 1995, 15(3): 246-249.
- Wang X P, Ren W Z, Zhu W Z, et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus with sandwich ELISA. China Journal of Veterinary Science, 1995, 15(3): 246-249.
- [9] Marzocca M P, Seki C, Giambiagi S M, et al. Truncated E2 of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: A candidate antigen for a BVDV ELISA. J Virol Methods, 2007, 144: 49-56.
- [10] Thomas C, Young N J, Heaney J, et al. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. Vaccine, 2009, 27: 2387-2393.
- [11] 沈敏,王新华,周鹏飞,等. BVD-MDV 细胞毒的快速粗提. 中国畜禽传染病, 1997, 4(95): 58-59.
- Shen M, Wang X H, Zhou P F, et al. Rapid extraction of cytotoxic BVDV/MDV. Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases, 1997, 4(95): 58-59.

## Preparation and Preliminary Characterization of Monoclonal Antibodies against E2 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus

WANG Shu<sup>1,2</sup> ZHU Yuan-mao<sup>2</sup> CAI Hong<sup>2</sup> MA Lei<sup>2</sup> SHI Hong-fei<sup>2</sup> LV Chuang<sup>2</sup>  
DONG Xiu-mei<sup>1,2</sup> GAO Yu-ran<sup>2</sup> XUE Fei<sup>2</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150001, China)

(2 Division of Livestock Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of  
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

**Abstract** To prepare monoclonal antibody (MAb) against glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus (BVDV), BALB/c mice were immunized with purified recombinant E2 (rE2) expressed in *E. coli* and two hybridomas secreting MAb were screened from fusing the SP2/0 cells with the spleen cells of the immunized BALB/c mice by indirect ELISA coated with BVDV. The titers of MAb 4E3 and 1G11 in ascites were  $6.21 \times 10^6$ ,  $6.83 \times 10^5$ ,  $6.83 \times 10^5$ , and  $7.5 \times 10^4$  as detected by rE2 and BVDV, respectively. The MAbs secreted by hybridomas 4E3 and 1G11 had highly reactivity and specificity in indirect ELISA, Western blotting, IFA and identified as IgM with a light chain of  $\kappa$  by indirect ELISA. The specific tests indicated that the MAbs 4E3 and 1G11 had no reaction with bovine infectious rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza virus type 3 and bovine adenovirus type 3. Meanwhile the MAb 4E3 had no reaction with classical swine fever virus (CSFV) and the MAb 1G11 had reaction with CSFV. Therefore the MAbs 4E3 and 1G11 might be used for differentiating BVDV and CSFV. On the other hand, the MAbs 4E3 and 1G11 could be used for establish diagnosis method for BVDV.

**Key words** Bovine viral diarrhea virus E2 protein Monoclonal antibody IgM

## 广 告 索 引

北京中原领先科技有限公司(封面),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(封面拉页),默克化工技术(上海)有限公司(封二),英潍捷基(上海)贸易有限公司(彩1),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(彩2),默克化工技术(上海)有限公司(彩3),上海森松制药设备工程有限公司(彩4),宝生物工程(大连)有限公司(彩5),镇江东方生物工程设备公司(彩6-7),必满贸易(上海)有限公司(彩8),第十三届世界制药原料中国展(彩9),第十一届中国国际科学仪器及实验室装备展览会(彩10),第十八届生物化学工程与分子工程国际大会(彩11),颇尔过滤器(北京)有限公司(目次对页),上海派森诺生物科技有限公司(中插1),上海国强生化装备工程有限公司(中插2-3),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(中插4),安琪酵母股份有限公司(封三),江苏省科海生物工程设备有限公司(封底)