

利用圆环病毒 2 结构蛋白建立检测其抗体的间接 ELISA 方法

葛猛, 屈泰龙, 罗维, 李杰, 周洪锐, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为建立检测 PCV2 抗体的间接酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 将猪圆环病毒 2(porcine circovirus type 2, PCV2)结构蛋白 Cap(不含核内化信号肽)的基因克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 中, 并在大肠杆菌中表达, 获得可溶性的重组蛋白(Cap Δ 41), 用 Cap Δ 41 作为诊断抗原, 确立了间接 ELISA 的最佳反应条件, 并对来自 4 个猪场的 394 份血清进行检测。结果表明, 与免疫荧光检测相比, 建立的间接 ELISA 的检测敏感性和特异性分别为 93.14%和 95.72%, 且建立的间接 ELISA 的批内与批间差异较小。此外, 对 394 份血清的检测结果显示的 4 个猪场的 PCV2 抗体消长规律与临床结果相符, 表明建立的间接 ELISA 方法可靠, 可以用于 PCV2 抗体的检测。

关 键 词: 圆环病毒 2; 结构蛋白; 抗体检测; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)01-0063-06

An indirect ELISA established using the capsid protein of PCV2 for detection of antibodies to porcine circovirus 2

GE Meng, QU Tai-long, LUO Wei, LI Jie, ZHOU Hong-rui, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To establish an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to PCV2, the cap gene without nuclear localization signal peptide sequence of PCV2 was cloned into the pET-28a(+) vector, and the recombinant Cap Δ 41 protein was expressed in soluble form in *Escherichia coli* (*E. coli*). The optimum working conditions of the indirect ELISA were determined using Cap Δ 41 protein as diagnostic antigen, and 394 pig serum samples from 4 pig farms were tested. The results showed the diagnostic sensitivity and specificity of the established indirect ELISA were 93.14% and 95.17%, respectively, compared with indirect immunofluorescence (IIF). And the inter-assay and intra-assay variations of the ELISA were low. Besides, the seroprofiles of 4 pig farms revealed by the testing results were in accordance with clinical results, indicating the established indirect ELISA is reliable and can be used for detection of antibodies to PCV2.

Key words: porcine circovirus type 2; structural protein; antibody detection; enzyme-linked immunosorbent assay

猪圆环病毒病(porcine circovirus 2 disease, PCVD)主要包括断奶仔猪多系统衰竭综合征(post weaning multisystem wasting syndrome, PMWS)^[1]、皮炎肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy

syndrome, PDNS)^[2]、繁殖紊乱^[3]、肠炎^[4]、增生性与坏死性肺炎(proliferative and necrotising pneumonia, PNP)^[5]以及猪呼吸综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)^[6]等, 其中, PMWS 最为普遍, 主

收稿日期: 2012-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972167)

作者简介: 葛猛(1983—), 男, 湖南岳阳人, 博士研究生, 从事动物疾病防控及免疫诊断研究, gmg02@126.com; *通信作者, xlyu999@126.com

要影响 6~18 周龄猪, 主要症状为消瘦、生长缓慢、呼吸困难、腹股沟淋巴结肿大等^[1]。患 PMWS 的猪的免疫系统会受到损伤, 且更易感染其他病原, 形成复杂的混合感染, 从而加重该病的危害。

血清学检测常用来分析PCV2的感染情况以及评价疫苗的免疫效果。传统的检测PCV2抗体的方法, 如间接免疫荧光(indirect immunofluorescence, IIF)和单层过氧化物酶免疫试验(immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)需要将PCV2接种细胞作为诊断抗原, 操作复杂, 而圆环病毒1(porcine circovirus 1, PCV1)与PCV2的Rep蛋白之间具有较强免疫交叉反应^[7], 对以PCV2全病毒为诊断抗原的检测方法的准确性有一定的影响。Cap蛋白是PCV2唯一的结构蛋白, 免疫原性和反应原性都较强, 且PCV1和PCV2的Cap蛋白没有免疫交叉反应^[8]; 因此, 敏感性高、易标准化、便于大规模应用的以Cap蛋白为诊断抗原的检测PCV2抗体的酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)开始逐渐取代传统的IIF和IPMA, 用于临床检测。但国内检测PCV2抗体的试剂盒普遍存在检测敏感性偏低的问题^[9], 这一方面与生产工艺有关; 另一方面与试剂盒使用的包被抗原的反应活性较低有关。本研究通过表达一种抗原反应性强的重组Cap蛋白, 以期用其作为诊断抗原建立一种敏感性高、特异性好的检测PCV2抗体的间接ELISA方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及主要试剂

含有PCV2 *cap*基因的pUC57-Cap质粒、宿主菌 Rosetta (DE3) plySs及原核表达载体pET28-a(+)为湖南农业大学分子生物与免疫学实验室保存; 辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgG(酶标二抗)、TMB均为 KPL 公司产品; 96孔酶标板以及细胞培养板为 Corning公司产品。

1.1.2 参考血清及供试血清

PCV2 参考阴、阳性血清由湖南农业大学分子

生物与免疫学实验室保存。供试血清主要分为两部分: 第一部分采自 12 头 PCV 阴性猪(经 PCR 检测无病毒血症且抗体检测为阴性), 每周采血 1 次, 共采 5 次, 采集的阴性血清共 60 份; 第二部分为来自临床上有 PMWS 的 A、B、C、D 等 4 个规模化猪场(A、B 场 PMWS 较严重; C、D 场较轻微), 其中 A 猪场 96 份, 包括 2、4、6、8、10、12、14 周龄以及母猪血清各 12 份, B 猪场 108 份, 包括 0、2、4、6、8、10、12、14 周龄以及母猪血清各 12 份, C 猪场 70 份, 包括 2、5、8、11、14、17 周龄以及母猪的血清各 10 份, D 猪场 60 份, 包括 4、8、12、16 周龄以及母猪血清各 12 份。

1.2 原核表达质粒的构建

根据pUC57-Cap质粒序列, 设计1对引物, 其中上游引物序列为5'-GCGAATTCATGATGGGTATTTTAATACTCGTTTATC-3'; 下游引物序列为5'-GCGTCTGACTTACTTAGGGTTAAGTGGGGGGTC-3'(上、下游分别引入EcoR I、Sal I 限制性酶切位点)。引物扩增区域为除去N端信号肽的包含主要抗原表位的*cap* Δ 41基因。以PVC57-Cap质粒为模板, 用设计的引物PCR扩增目的基因, 并将PCR产物及原核表达载体pET-28a(+)分别用限制性内切酶EcoRI、Sal I酶切后回收、连接并转化DH5 α 感受态细胞后, 对重组子的质粒进行酶切鉴定和测序, 获得的重组质粒命名为pET28-Cap Δ 41。

1.3 重组 Cap Δ 41 蛋白的表达、纯化及 Western blot 分析

将经测序证明克隆成功的重组质粒pET28-Cap Δ 41转化表达菌Rosetta(DE3)pLySs。挑取单克隆重组表达菌接种到LB培养基中, 37 °C振荡培养至OD_{600 nm}为0.6左右时, 加入IPTG至终浓度为1 mol/L, 30 °C诱导6 h, 收集菌体, 并用His-Bind Purification Kit进行纯化, 具体步骤参照Novagen公司融合蛋白纯化手册。用SDS-PAGE 电泳测定重组Cap Δ 41蛋白纯化的效果, 并用Western blot 分析纯化蛋白的免疫学活性。

1.4 间接免疫荧光(IIF)检测 394 份血清的 PCV2 抗体

394 份血清样品先用 IIF 检测。将不含 PCV1 的 PK15 细胞接种 PCV2^[10], 培养 72 h 后用等体积混合的甲醇和丙酮在-20 ℃固定 30 min(以含不接毒正常 PK15 细胞作对照); 用 PBS 洗涤 3 次, 加 5%的脱脂奶粉(PBST 溶解)在 37 ℃封闭 1 h; 加入用 PBST 稀释 20 倍和 100 倍的血清样品, 37 ℃孵育 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次; 加入以 1 200 稀释的荧光二抗, 37 ℃孵育 30 min 后, 用 PBST 洗涤 3 次; 用 0.01%伊文思蓝染色液染色 1 min 后, 用 PBST 洗涤 2 次(每次约 30 s); 用 80%的无荧光甘油封底, 在荧光显微镜(BX51, Olympus)下观察, 并拍照。血清样品在 20 倍稀释条件下有荧光则判为阳性。

1.5 间接 ELISA 方法的建立

1.5.1 ELISA 的主要过程及抗原包被浓度和血清稀释度的确定

抗原包被浓度和血清稀释倍数按方阵法确定。将纯化的可溶性表达的 Cap Δ 41 蛋白以 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液(CB; pH9.6)倍比稀释到 8、4、2、1、0.5、0.25 μ g/mL 后, 以每孔 100 μ L 加入到 96 孔酶标板, 4 ℃包被 24 h。PBST 洗涤 3 次后每孔加入 250 μ L 的 5%脱脂奶粉(PBST 溶解), 37 ℃封闭 2 h。封闭之后用 PBST 洗涤 3 次, 并风干酶标板。PCV2 参考阳性及阴性血清从 1 25 至 1 200 倍比稀释 4 列, 每孔加入 100 μ L, 37 ℃作用 30 min 后, 用 PBST 洗涤 4 次; 每孔加入 100 μ L 以 PBST 稀释 10 000 倍的酶标二抗, 37 ℃作用 30 min 后, 用 PBST 洗涤 4 次, 每孔加入 50 μ L 的 TMB, 37 ℃避光显色 10 min 后, 每孔加入 50 μ L 的 2 mol/L H₂SO₄, 用酶标仪读取 OD_{450 nm} 值。根据结果中阳性血清 OD_{450 nm} 值/阴性血清 OD_{450 nm} 值(P/N 值)最大, 并且参考阳性血清的 OD_{450 nm} 值在 1.0 左右的反应条件为最佳。

1.5.2 判断标准的设定以及与 IIF 的对比

在ELISA反应条件确定后, 对394份血清样品进行检测, 并用ROC分析和设定间接ELISA的最佳临

界 $S/P(S/P=(\text{样品的检测}OD - \text{参考阴性的}OD)/(\text{参考阳性的}OD - \text{参考阴性的}OD))$ 。根据临界S/P值统计间接ELISA的检测结果, 并与IIF的检测结果比较, 在此基础上用SPSS软件计算2种方法之间的Kappa值。Kappa值大于0.75表示2种方法之间具有很好的-一致性, 小于0.4表示一致性较差, 在0.4~0.75间表示有一般到较好的一致性^[11]。

1.5.3 重复性试验

批内和批间重复性试验参照Jacobson的方法^[12]。具体做法是选取PCV2抗体阳性和阴性的猪血清各12份, 每个样品重复3孔, 分别在同一块抗原包被板上和3块不同批次的抗原包被板上检测, 计算每份血清的变异系数以及所有血清的平均变异系数, 值越小表示差异越小, 其中同一块板上的结果表示批内差异, 不同板上的检测结果表示批间差异。

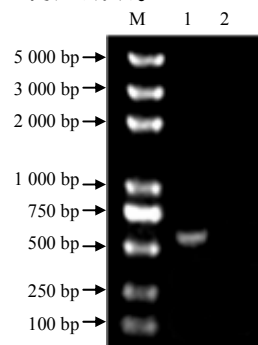
1.6 供试样品来源猪场的 PCV2 抗体消长规律

为了进一步验证该间接ELISA的临床检测效果, 将394份血清样品的检测结果结合其来源的猪场进行PCV2抗体消长规律分析。根据各猪场的进一步评价建立的ELISA检测方法的效果。

2 结果与分析

2.1 原核表达质粒的构建

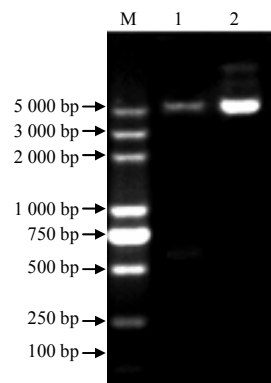
PCR以及重组质粒的酶切鉴定都获得与预期大小(约600 bp)相符的目的片段(图1、图2)。测序结果(结果略)与目的基因序列相符, 说明重组表达质粒 pET28-Cap Δ 41构建成功。



M DNA 相对分子质量标准; 1 目的基因 PCR 结果; 2 阴性对照。

图1 cap Δ 41 基因 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of cap Δ 41 gene



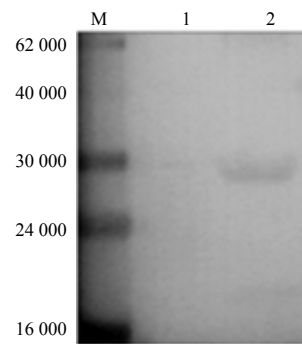
M DNA 相对分子质量标准; 1 pET28-Cap Δ41 质粒酶切; 2 pET28-Cap Δ41 质粒。

图 2 pET28-Cap Δ41 质粒酶切鉴定

Fig.2 Enzyme digestion for the pET28a-Cap Δ41 plasmid

2.2 重组 Cap Δ41 蛋白的表达、纯化及 Western blot 分析

SDS-PAGE显示, 目的蛋白Cap Δ41以可溶性表达为主, 大小约为26 000, 与预期大小相符(封二图3)。Western blot结果显示: 在PVDF膜上目的条带位置出现一条明显的印迹带(封二图3), 说明该纯化产物可被特异性多克隆抗体识别。



M 蛋白相对分子质量标准; 1 阴性对照; 2 重组 Cap Δ41 蛋白 Western blot 结果。

图 3 重组 Cap Δ41 蛋白的 Western blot

Fig.3 Western blot analysis of the Cap Δ41 protein

2.3 IIF 检测结果

12 头阴性猪的 60 份血清的 IIF 检测结果均为阴性, 334 份临床样品中有 277 份阳性, 57 份阴性。A、B、C、D 4 个猪场中大部分的母猪和仔猪的抗体检测结果为阳性, 抗体阴性猪主要在保育阶段(表 1)。

表 1 免疫荧光检测 4 个猪场中各阶段猪的 PCV2 抗体结果

Table 1 Detection of antibodies to PCV2 by IIF in swine serum samples from 4 pig farms

猪场	每个年龄段的 PCV2 阳性血清数/份													母猪
	0 周龄	2 周龄	4 周龄	5 周龄	6 周龄	8 周龄	10 周龄	11 周龄	12 周龄	14 周龄	16 周龄	17 周龄		
A		12	11		10	8	8		9	11			12	
B	12	11	9		8	6	9		10	12			11	
C		8		8		7		5		8		9	10	
D			12			10			7		12		12	

A、B、C、D 猪场每个阶段的血清数分别是 12、12、10、12 份。

2.4 间接 ELISA 方法建立结果

2.4.1 抗原包被浓度和血清稀释度的确定

根据方阵滴定的结果, 当抗原包被浓度为 0.5 μg/mL、血清 100 倍稀释时, 检测 P/N 值最高, 为 12.46±0.37, 并且参考阳性的检测 OD_{450 nm} 值在 1.0 左右, 以这些主要反应条件为最佳条件。

2.4.2 判断标准的设定以及与 IIF 的对比结果

间接ELISA对60份阴性血清的结果均为阴性, 与IIF方法对比检测394份血清的结果列于表2。根据ROC分析的结果, 当间接ELISA临界值取0.28时, 对比IIF的检测结果, 敏感性和特异性总体最好, 分别为93.14%和95.72%。2种方法之间的Kappa系数为

0.87, 具有很好的一致性。

表 2 间接 ELISA 与 IIF 的检测结果

Table 2 Comparison of the indirect ELISA with the IIF

IIF 检测结果	间接 ELISA 检测结果				
	阳性	阴性	特异性	敏感性	Kappa 值
阳性 277 头(份)	253 头(份)	14 头(份)	—	93.14%	0.87
阴性 117 头(份)	7 头(份)	110 头(份)	95.72%	—	

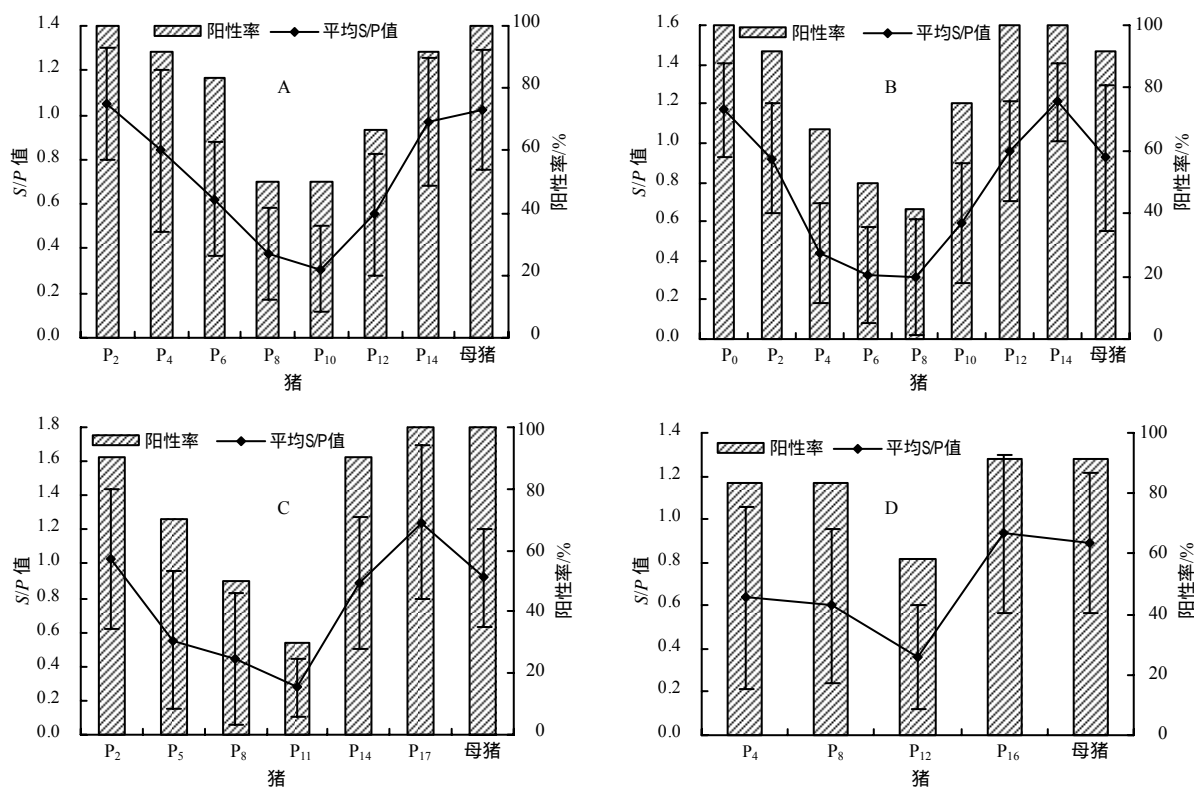
2.4.3 重复性试验结果

批内差异分析显示, 12 份阳性血清变异系数在 2.27%~8.33%, 平均为 5.28%, 而批间差异分析显示, 变异系数在 3.35%~11.13%, 平均 7.15%; 12 份阴性血清的批内和批间差异也较小(数据略)。说明该间接 ELISA 检测结果的重复性较好。

2.5 供试血清样品来源猪场的PCV2抗体消长规律

394份血清样品的抗体检测结果体现的A、B、C、D猪场的PCV2抗体的消长情况(图4)符合临床上阳性猪群的PCV2抗体消长规律^[13-14]。猪群在各个阶段的阳性率都较高,阳性率相对较低的时机在保

育猪阶段(与IIF检测结果一致),而阳性率最低点一般对应抗体S/P值最低点,4个猪群的抗体S/P值最低点分别是10、8、11、12周龄。各猪群母猪的PCV2抗体阳性率都很高,但抗体水平相对肥猪阶段的峰值要低。



P 示仔猪,下标数字示仔猪周龄。

图4 间接ELISA检测A、B、C、D猪场各阶段猪PCV2抗体的S/P值和阳性率

Fig.4 PCV2 antibody titres and seroprevalence in different categories of pigs from farms A, B, C and D detected by the indirect ELISA

3 分析与讨论

原核表达系统相对于真核表达系统具有简单、易操作等优点,且Cap蛋白本身不需要翻译后修饰,已有的研究^[15]也证明,原核表达的Cap蛋白具有较好的反应原性,所以,笔者选择原核表达系统来制备重组Cap蛋白。Cap蛋白N末端41个氨基酸是其核内化信号肽序列,严重影响外源蛋白的表达,一般只有去掉信号肽的Cap蛋白才能在大肠杆菌中表达,但即使去掉该信号肽,也需要与一些促进可溶性表达的功能性蛋白(如谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白、硫氧还蛋白等)融合才能表达^[15],这些功能性蛋白的相对分子质量都较大,融合表达可能会对Cap蛋白的结构造成一定的影响,从而影响反应活

性,用其建立的间接ELISA方法的检测敏感性可能偏低。本研究将不含信号肽的Cap蛋白基因克隆到pET-28a(+)载体中,表达产物仅仅多出一小段多肽序列,对整个蛋白的影响较小,有利于保持其天然反应活性,同时可溶性表达更加有助于维持其抗原活性,以提高检测敏感性。笔者利用可溶性表达的Cap Δ 41蛋白建立的间接ELISA的检测敏感性比利用包涵体形式的Cap Δ 41蛋白建立的间接ELISA的明显要高(数据略)。这些说明诊断抗原空间结构的正确性对检测效果具有重要作用。

IIF荧光是一种经典的抗体检测方法。但是对于PCV2,由于其Rep蛋白与PCV1存在免疫交叉反应,用免疫荧光检测PCV2抗体的结果与用Cap蛋白作为抗原的ELISA检测结果相比可能存在阳性率偏高的

现象。不过尽管之前的报道^[16-18]说PCV1在猪群中普遍存在,但是最近的研究^[19]表明临床上的圆环病毒以PCV2为主,PCV1并不多见,这可能也是IIF检测阳性率略高于以Cap蛋白为诊断抗原的ELISA的检测阳性率,但两种方法整体一致性较好的原因。

A、B、C、D4个规模化猪场的各阶段猪PCV2的抗体水平表明,4个猪场PCV2的感染以及PCV2抗体消长规律大致相同:即在仔猪阶段都有一定的抗体水平(主要是母源抗体),随着母源抗体水平的降低,抗体水平达到最低点,然后由于感染PCV2,机体产生免疫应答,抗体水平和抗体阳性率再次上升,并且抗体能够持续较长时间,所以母猪阶段的抗体阳性率依然很高,但是抗体水平已经有所下降。这一规律与相关报道^[13-14]的结果基本一致,进一步说明了构建的ELISA方法的可靠性。本研究的结果还表明,对于有PMWS的猪场,PMWS的严重程度和PCV2抗体重新转阳的时间之间有一定的相关性,即转阳时间越早,PMWS越严重,如A、B猪场的抗体转阳时间在10周龄左右,其PMWS的严重程度明显高于抗体在14周龄左右转阳的C、D猪场,这之前Blanchard等^[20]报道的PMWS猪场的PCV2抗体转阳时间比无PMWS猪场的PCV2抗体转阳时间要早的结论一致。

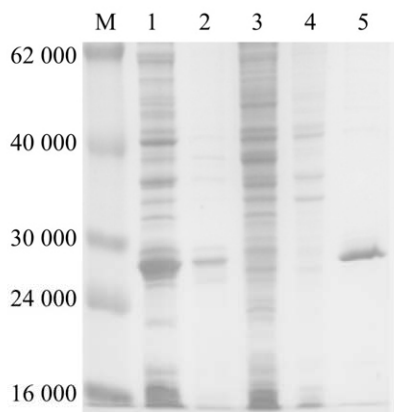
综上所述,利用可溶性表达的Cap 41蛋白建立的检测PCV2的间接ELISA方法敏感性高、特异性好,这为开发检测PCV2抗体的间接ELISA试剂盒打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] Opriessnig T, Meng X J, Halbur P G. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies[J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 19: 591-615.
- [2] Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara J A, et al. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome[J]. Vet Rec, 2000, 146: 40-43.
- [3] West K H, Bystrom J M, Wojnarowicz C, et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2[J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11: 530-532.
- [4] Kim J, Ha Y, Jung K, et al. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs[J]. Can J Vet Res, 2004, 68: 218-221.
- [5] Drolet R, Larochelle R, Morin M, et al. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia[J]. Vet Pathol, 2003, 40: 143-148.
- [6] Kim J, Chung H K, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex[J]. Vet J, 2003, 166: 251-256.
- [7] Magar R, Muller P, Larochelle R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2[J]. Can J Vet Res, 2000, 64: 184-186.
- [8] Mahe D, Blanchard P, Truong C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 1815-1824.
- [9] 吴华伟, 高金源, 邓永, 等. 国内5种猪圆环病毒PCV2抗体检测试剂盒的比较试验[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(6): 11-15.
- [10] 李薇, 罗维, 余兴龙, 等. 3种亚群PCV-2感染性克隆的构建及体内外感染性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(1): 68-72.
- [11] Pottumarthy S, Morris A J, Harrison A C, et al. Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: Potential to replace the Mantoux skin test[J]. Clin Microbiol, 1999, 37: 3229-3232.
- [12] Jacobson R H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases[J]. Rev Sci Tech, 1998, 17: 469-526.
- [13] Carasova P, Celer V, Takacova K, et al. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs[J]. Res Vet Sci, 2007, 83(2): 274-278.
- [14] Gerber P F, Galinari G C, Silva M X, et al. Distribution of antibodies against porcine circovirus type-2 (PCV2) in single site and multi-site farrow-to-finish farms in Brazil[J]. Res Vet Sci, 2009, 87(3): 488-491.
- [15] Zhou J Y, Shang S B, Gong H, et al. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal[J]. J Biotech, 2005, 118: 201-211.
- [16] Hines R K, Lukert P D. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States[J]. Swine Health Prod, 1995, 3: 71-73.
- [17] Magar R, Muller P, Larochelle R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2[J]. Can J Vet Res, 2000, 64 (3): 184-186.
- [18] Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms[J]. Arch Virol, 1995, 140 (8): 737-743.
- [19] Puvanendiran S, Stone S, Yu W, et al. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds[J]. Virus Res, 2011, 157: 92-98.
- [20] Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome[J]. Vet Microbiol, 2003, 94: 183-194.

责任编辑: 罗维

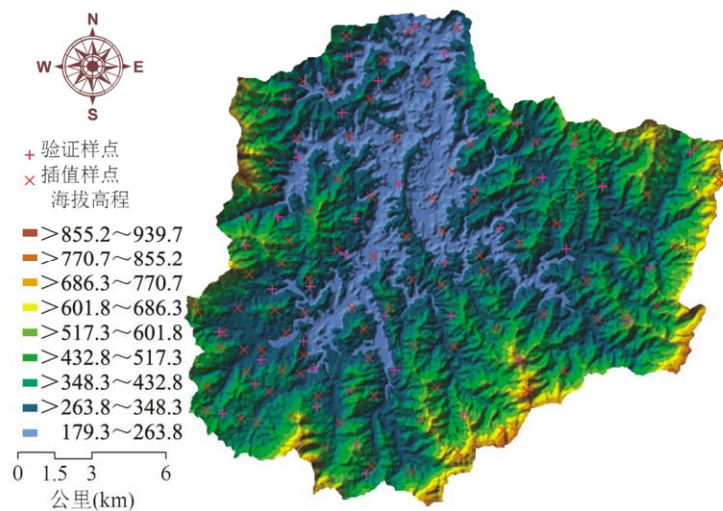
英文编辑: 罗维



M 蛋白相对分子质量标准；1、2 Cap₄₁蛋白表达上清、沉淀；3、4 阴性对照表达上清、沉淀；5 纯化的Cap₄₁蛋白。

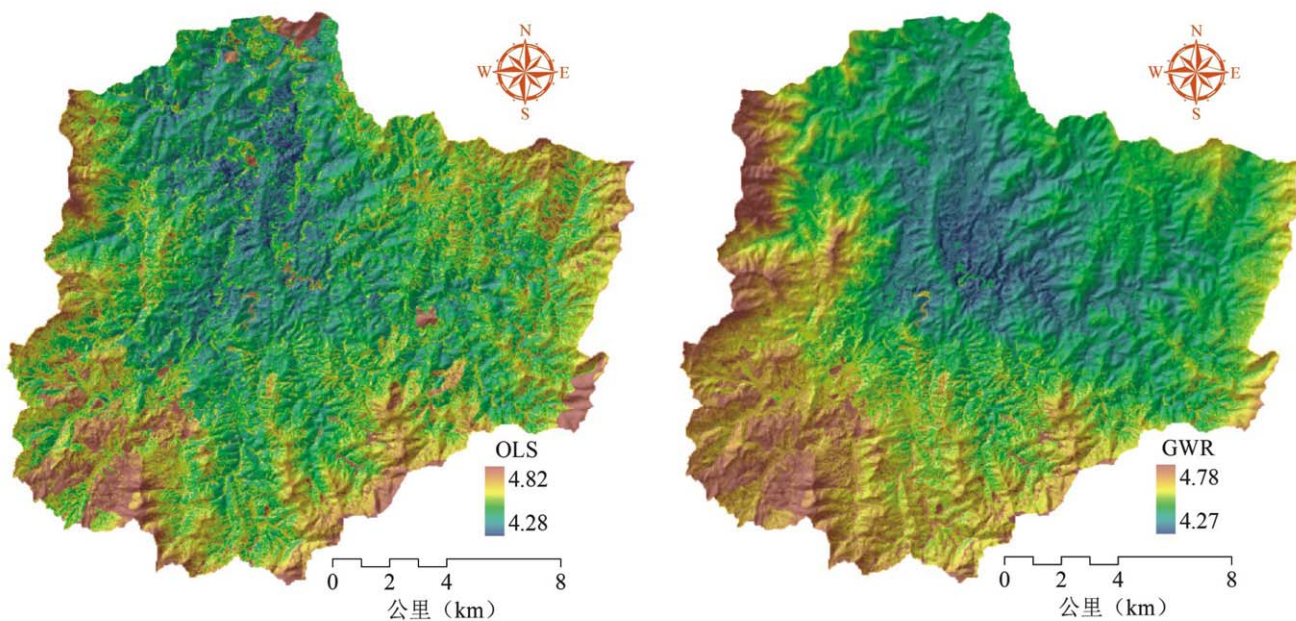
第66页图3 表达与纯化的Cap₄₁蛋白SDS-PAGE

Fig.3 on page 66 SDS-PAGE analysis of the expressed and purified Cap₄₁ protein



第74页图1 研究区与采样点分布

Fig.1 on page 74 Study area and sampling sites



第77页图2 分别用OLS法(左)及GWR法(右)回归得到的土壤pH空间分布

Fig.2 on page 77 Spatial distribution map of soil pH regressed by OLS (left) and GWR (right)