

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.12.01

副流感病毒 5 型 SH 蛋白单克隆抗体的制备

吴华伟, 刘 丹, 陈晓春, 高金源, 邓 永, 秦义娴*,
苏 佳, 黄小洁, 薛青红, 陈延飞

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 11-0001-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为获得副流感病毒 5 型 SH 蛋白的单克隆抗体, 将构建的重组表达质粒 pET43a-SH 转化 BL21(DE3)plys, 经 IPTG 诱导表达、过镍柱纯化后将重组蛋白作为免疫原, 免疫 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 并按常规方法制备杂交瘤细胞。通过间接免疫荧光方法进行筛选, 获得 3 株杂交瘤细胞株, 命名为 5B9、3G8、4E11, 并进行了培养特性、分泌抗体活性、分泌抗体亚类的鉴定。结果显示: 3 株细胞株连续传代 10 代均稳定分泌单克隆抗体, 细胞上清液 IFA 效价稳定, 分泌单克隆抗体亚型均为 IgG2a。制备并纯化了 1 株(5B9)单克隆抗体, 浓度为 4.26 mg/mL, 纯度不低于 90%, IFA 效价不低于 1:2000, 与猪牛等常见病毒均无交叉反应。

[关键词] 副流感病毒 5 型; SH 蛋白; 单克隆抗体

Preparation of Monoclonal Antibody against SH Protein of Parainfluenza Virus 5

WU Hua-wei, LIU Dan, CHEN Xiao-chun, GAO Jin-yuan, DENG Yong, QIN Yi-xian*,
SU Jia, HUANG Xiao-jie, XUE Qing-hong, CHEN Yan-fei

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: QIN Yi-xian, E-mail: yixianqin87@126.com

Abstract: In order to obtain the monoclonal antibody against SH protein of parainfluenza virus 5 (PIV5), the recombinant expression plasmid pET43a-SH was transformed into BL21 (DE3) plys. The recombinant plasmid pET43a-SH was induced by IPTG, purified by nickel column and used as immunogen to immunize 8-week-old female Balb/c mice, and hybridoma cells were prepared by conventional methods. Three hybridoma cell lines, named 5B9, 3G8 and 4E11, were obtained by indirect immunofluorescence method. Their culture characteristics, antibody secreting activity and subclass were identified. The results showed that the three cell lines stably secreted monoclonal antibodies for 10 passages, and the IFA titer of cell supernatant was stable, and

基金项目: 中国兽医药品监察所级课题(201801)

作者简介: 吴华伟, 研究员, 从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 秦义娴。E-mail: yixianqin87@126.com

the subtype of secreted monoclonal antibodies was IgG2a. A strain of (5B9) monoclonal antibody mouse ascites was prepared and purified, which concentration was 4.26 mg / mL, the purity was not less than 90%, the IFA titer was not less than 1:2000, and the monoclonal antibodies showed no cross reaction with common animal viruses by IFA.

Key words: PIV5; SH protein; monoclonal antibody

副流感病毒 5 型 (Parainfluenza virus 5, PIV5) 属于副黏病毒科腮腺炎病毒属, 基因组为不分节段的单股负链 RNA, 全长 15246 bp, 由 3' 前导序列、5' 尾随序列和 7 个非重叠基因组成: 3'-N-P/V-M-F-SH-HN-L-5', 依次编码核衣壳蛋白 (NP)、磷酸化蛋白 (P)、V 蛋白、膜基质蛋白 (M)、小疏水性蛋白 (SH)、血凝素-神经氨酸酶 (HN)、聚合酶蛋白 (L)^[1]。SH 蛋白作为病毒的主要包膜糖蛋白, 能够抑制 TNF- α 介导的细胞凋亡^[2-4]。2018 年, 中监所采用 RT-PCR 方法首次从某企业的猪伪狂犬病活疫苗中检测到 PIV5 污染^[5], 随后在 PIV5 污染来源筛查中发现细胞和牛血清为主要的污染来源。对于兽用生物制品以及动物源性原辅材料中是否污染 PIV5 外源病毒的检测而言, RT-PCR 方法仅可以作为初筛方法或企业内控方法, 荧光抗体检查法是现行《中国兽药典》检测特定外源病毒的推荐方法。国外已有个别 PIV5 蛋白的单克隆抗体 (如 F 蛋白) 供应, 但国内除 PIV5 RT-PCR 检测试剂盒外, 尚无 PIV5 单克隆抗体或荧光抗体检测试剂供应, 亟需开展 PIV5 单克隆抗体研究。研究采用原核表达的 PIV5 SH 蛋白按常规方法免疫小鼠后, 共筛选到 3 株杂交瘤细胞, 均可识别 PIV5 毒株, 为外源性 PIV5 污染检测用免疫荧光试剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株、重组质粒、实验动物 Vero 细胞、PIV5/01 株, 均由中国兽医药品监察所保存; pET43a-SH 重组质粒, 由中国兽医药品监察所构建及鉴定; 8 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂 表达菌株 BL21 (DE3) plys 购自北京全式金公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购

自碧云天生物技术有限公司; Proterin Marker 购自 TaKaRa 公司; HAT、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 公司产品; Mouse 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒为 proteintech 公司产品; QuickAntibody - Mouse 3 W 佐剂为北京博奥龙免疫技术有限公司产品。

1.3 重组质粒 pET43a-SH 的诱导表达 将重组质粒 pET43a-SH 0.5 μ L 转化 100 μ L BL21 (DE3) plys 感受态细胞, 挑菌于 2 mL 相应抗性的 LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h, 获得种子菌。按 1:100 (V/V) 接种于 3 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养。培养至 OD=0.6-0.8, IPTG (0.5 mmol/L) 诱导, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 2 h。取 1 mL 诱导的菌液, 12000 r/min, 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用 50-100 μ L 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液吹散 (加入缓冲液的量视菌体量而定), 加入与缓冲液等体积的 2 $\times$ loading buffer, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 电泳检测。

1.4 SH 重组蛋白的可溶性分析 接 1~2 μ L 活化的菌液到 5 mL 相应抗性 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养, 200 r/min。将培养的菌液转接到 1000 mL 相应抗性 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 培养至 OD=0.6-0.8, IPTG (0.5 mmol/L) 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。8000 r/min, 离心 6 min, 弃上清。菌体用 30 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液吹散, 超声波破碎 (500 W, 180 次, 每次 5 s, 间隔 5 s)。取 100 μ L 超声后的菌悬液, 12000 r/min, 离心 10 min, 取 50 μ L 上清至另一 EP 管, 上清去除干净后沉淀用 50 μ L 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液吹散。电泳检测。

1.5 SH 重组蛋白的纯化 用去离子水洗镍柱, 至 pH 7.0。挂镍, 至 pH 2-3。用去离子水洗柱至 pH 7.0。用 100 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

溶液平衡镍柱。用 50 mL 含 0.5 mol/L 氯化钠的 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0) 溶液平衡镍柱。稀释样品,使样品中含氯化钠终浓度为 0.5 mol/L,上样。上样结束后,用含 0.5 mol/L 氯化钠的 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0) 溶液洗柱。分别用含 15 mmol/L 咪唑、60 mmol/L 咪唑的 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0) (含 0.5 mol/L 氯化钠) 溶液洗脱,分别收集蛋白峰。SDS - PAGE 电泳检测蛋白纯化效果。

1.6 动物免疫 将纯化后的 SH 蛋白与 Quick-Antibody - Mouse 3 W 佐剂等体积混匀,通过后腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠接种 100 μ L。此后每隔 14 天按相同剂量、相同途径加强免疫,共免疫 3 次。融合前 3 日使用 200 μ L 抗原加强免疫一次。

1.7 细胞融合 无菌条件下取免疫小鼠的脾细胞,用无血清培养基洗 3 次,计数并重悬于 20 mL 培养液中,4 $^{\circ}$ C 放置备用。取处于对数生长期的 SP2/0 细胞,用无血清培养基洗 3 次,计数并重悬,调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,4 $^{\circ}$ C 放置备用。将脾细胞和 SP2/0 细胞按 5:1 混合,4 $^{\circ}$ C 离心,1000 r/min,10 min。轻轻去掉上清,并把细胞沉淀打散,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中,在 1 min 内边混合边逐滴加入 1 mL 50% PEG,继续混合,在 2 min 内加入 2 mL 预热的 DMEM,4 min 内边混合边加入另外 8 mL 含 10% FBS 的 DMEM。4 $^{\circ}$ C 离心,1000 r/min,10 min。加入含 10% FBS 的 DMEM 轻轻混匀,铺板,0.15 mL/孔,每孔 1×10^5 个细胞。加入 0.05 mL HAT,37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 培养。10 d 后收集杂交瘤细胞上清采用间接免疫荧光方法进行检测。

1.8 杂交瘤细胞筛选

1.8.1 荧光筛选板制备 将 PIV5/01 株用病毒培养液稀释为 1000 TCID₅₀/mL,接种已长成细胞单层的 96 孔 Vero 细胞培养板,每孔 100 μ L,同时设立正常细胞对照。置 37 $^{\circ}$ C 培养 96 ~ 120 h。然后弃去培养液,用 80% 冷丙酮每孔加入 100 μ L 固定 30 min,自然风干后作为荧光染色板。

1.8.2 间接免疫荧光试验程序 在 PIV5/01 株接

毒孔和正常细胞孔中各加入 50 μ L 细胞培养上清,置 37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 45 min,用 PBS 液洗涤 5 次,每次 3 min;然后加入二抗(羊抗小鼠 FITC 荧光抗体 1:200),37 $^{\circ}$ C 湿盒作用 45 min,用 PBS 液洗涤 5 次,每次 3 min,置于倒置显微镜下观察结果,以正常细胞对照背景最暗且无特异性荧光,阳性病毒孔出现特异性荧光作为阳性杂交瘤细胞选择的依据。

1.9 杂交瘤细胞的鉴定

1.9.1 类及亚类的鉴定 使用 proteintech 公司的 Mouse 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒鉴定单抗亚类。具体步骤如下:将杂交瘤细胞上清以 $1 \times \text{PBST}$ 1:100 稀释后加入样品孔中,50 μ L/孔。将 $1 \times$ 羊抗鼠 IgA + IgM + IgG - HRP 加入样品孔中,50 μ L/孔。混匀器上轻轻混匀,盖上封板膜,室温孵育 1 h。弃去孔内液体, $1 \times \text{PBST}$ 洗板 3 次,吸水纸上拍干。将显色液 A 液和 B 液按 1:100 混合后加入孔中,100 μ L/孔。室温避光显色 10 ~ 20 min,每孔加入终止液,100 μ L/孔。结果判定:通过酶标仪读取 OD₄₅₀ 值,以 OD₄₅₀ 值最高的孔对应的亚类即为单抗亚类。

1.9.2 IFA 效价测定 用 PBS 将杂交瘤细胞上清分别稀释为 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 后按照 1.8.2 间接免疫荧光方法进行检测,可观察到特异性荧光的最高稀释度即为杂交瘤细胞上清的 IFA 效价。

1.9.3 细胞稳定性检测 将杂交瘤细胞株体外连续培养 10 代,分别取第 1、5、10 代细胞上清及其 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 稀释度,按照 1.8.2 间接免疫荧光方法测定 IFA 效价。以 IFA 效价不低于第 1 代 IFA 效价作为细胞稳定性判定标准。

1.10 单克隆抗体腹水的制备 小鼠腹腔注射液体石蜡致敏,每只 0.5 mL,7 d 后经腹腔注射杂交瘤细胞,将杂交瘤细胞浓度调整为 2×10^6 个细胞/mL,每只小鼠注射 0.5 mL。待小鼠腹腔膨大时收取腹水,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 10 min,收集上清液,即获得单克隆抗体。

1.11 单克隆抗体的纯化与鉴定

1.11.1 单克隆抗体的纯化 将收集的腹水以 10000 r/min 4 ℃ 离心 10 min, 取上清, 用小型滤器过滤, 置于冰上。用预冷的 20 mmol/L PB, 3 mol/L NaCl pH7.4 溶液平衡 5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个柱体积。用预冷的 20 mmol/L PB, 3 mol/L NaCl pH 7.4 溶液将样品稀释 5 倍后上柱结合。上样完毕用预冷的 20 mmol/L PB 3 mol/L NaCl pH 7.4 溶液平衡 2.5 mL 的 HiTrap MabSelect 亲和纯化亲和柱 10 个柱体积。用 200 mmol/L 甘氨酸缓冲液, pH 3.0 溶液洗脱, 收集完毕, 立即加入 300 μ L 调节溶液, 轻轻混匀即可。将收集的组分用 SDS - PAGE 电泳检测进行纯度检测。

1.11.2 浓度测定 采用紫外分光光度计测定纯化后的单克隆抗体浓度。

1.11.3 IFA 效价测定 用 PBS 将纯化后的单克隆抗体稀释为 1:100、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000 后按照 1.8.2 间接免疫荧光方法进行检测, 可观察到特异性荧光的最高稀释度即为单克隆抗体的 IFA 效价。

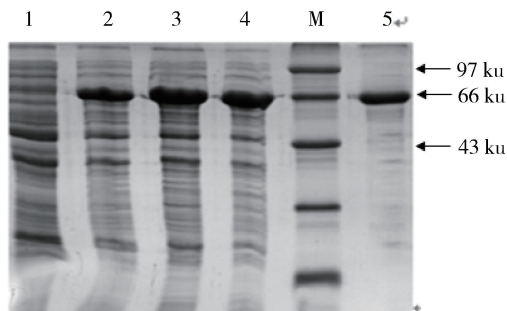
1.11.4 特异性检测 将 BPIV3、BVDV、IBRV、BRV、CSFV、PPV、PRV、PEDV、TGEV、PRRSV、PCV2 等毒株分别稀释为 1000TCID₅₀/ml, 然后接种已长成单层的敏感细胞的 96 孔培养培养板, 同时设正常细胞对照。培养 3~4 日后弃去上清液, 80% 冷丙酮固定后, 采用制备的 PIV5 单克隆抗体进行 IFA 染色, 评价单抗的特异性。

2 结果与分析

2.1 pET43a - SH 的诱导表达 取 1 mL 诱导表达的菌液进行 SDS - PAGE, 结果在 68 ku 处可见表达条带, 符合预期(图 1)。

2.2 重组蛋白的可溶性分析 超声裂解诱导后的菌液, 将菌液上清和沉淀分别进行 SDS - PAGE 电泳, 结果显示, pET43a - SH 蛋白主要出现在上清中, 提示该蛋白在上清中表达(图 2)。

2.3 蛋白纯化结果 将表达蛋白挂镍柱后用不同浓度的咪唑(15 mmol/L、60 mmol/L)洗脱, 分别收集蛋白峰, 进行 SDS - PAGE 电泳检测, 结果显示咪唑



M. 蛋白分子质量标准; 1. 未诱导对照(BL21);

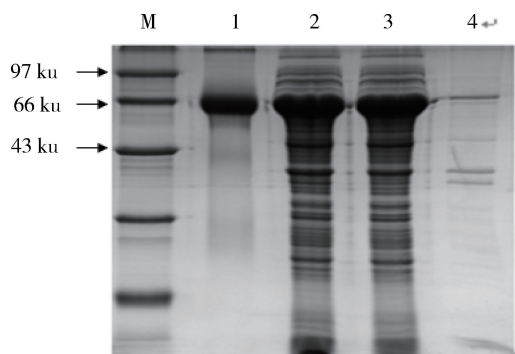
2-4: IPTG 诱导(BL21); 5: 0.5 mg/mL BSA;

M. Protein molecular weight Marker; 1. No induced control(BL21);

2-4: IPTG induced(BL21); 5. 0.5 mg/mL BSA;

图 1 pET43a - SH 诱导表达

Fig 1 The induced expression of pET43a - SH



M. 蛋白分子质量标准; 1. 0.5 mg/mL BSA;

2. 超声后全菌; 3. 超声后上清; 4. 超声后沉淀

M. Protein molecular weight Marker; 1. 0.5 mg/mL BSA;

2. Total bacteria after ultrasound;

3. Ultrasound supernatant; 3. Precipitation after ultrasound.

图 2 pET43a - SH 重组蛋白可溶性分析

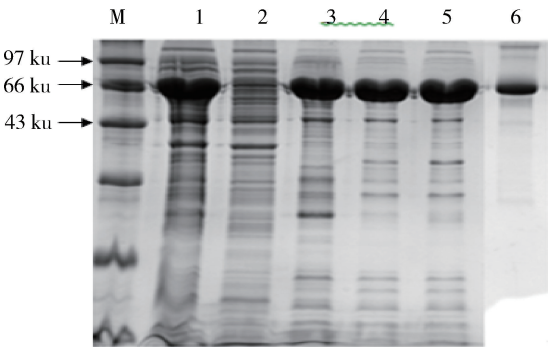
Fig 2 Soluble analysis of pET43a - SH recombinant protein

洗脱的最佳浓度为 60 mmol/L。最终获得纯度较高的 pET43a - SH 重组蛋白, 浓度为 1.7 mg/mL(图 3)。

2.4 杂交瘤细胞筛选 共筛选出 3 株 IFA 荧光阳性杂交瘤细胞株, 分别命名为 5B9、3G8、4E11(图 4)。

2.5 杂交瘤细胞的鉴定

2.5.1 类及亚类的鉴定 采用 Mouse 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对三株杂交瘤细胞进行鉴定, 结果显示 5B9、3G8、4E11 重链类型均为 IgG2a, 轻链类型均为 Kappa(表 1)。

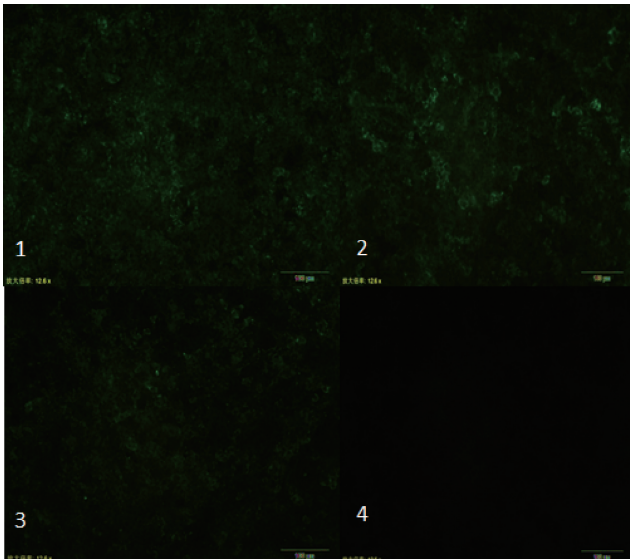


M. 蛋白分子质量标准;1. 蛋白原样;2. 流穿;3.15 mmol/L 咪唑洗脱;
4 -5;60 mmol/L 咪唑洗脱;6.0.5 mg/mL BSA

M. Protein molecular weight Marker; 1. Original protein; 2. Flow through; 3. 15 mmol/L imidazole elution;
4 -5; 60 mmol/L imidazole elution; 6. 0.5 mg/mL BSA

图 3 pET43a –SH 重组蛋白的纯化

Fig 3 Purificaiton of pET43a –SH recombinant protein



1. 杂交瘤细胞株 5B9; 2. 杂交瘤细胞株 3G8;3. 杂交瘤细胞株 4E11;4. 正常细胞对照
Hybridoma cell line 5B9; 2. Hybridoma cell line3G8; 3. Hybridoma cell line 4E11; 4. Normal cell control

图 4 杂交瘤细胞株的间接免疫荧光分析

Fig 4 Indirect immunofluorescence analysis of hybridoma cell lines

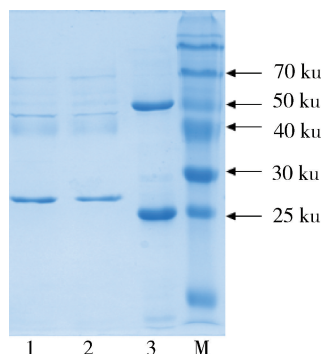
表 1 ELISA 法测定单克隆抗体类及亚类

Tab 1 Detection of subclasses of McAbs by ELISA								
样品编号	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	Kappa	Lambda
5B9	0.0593	1.8703	0.0576	0.0816	0.0596	0.1622	1.3882	0.0556
3G8	0.0632	2.1785	0.065	0.0694	0.0815	0.7162	1.8807	0.1144
4E11	0.0582	1.7814	0.0593	0.0579	0.0556	0.0609	1.5125	0.0612

2.5.2 细胞上清 IFA 效价测定 经测定,5B9、3G8、4E11 三株杂交瘤细胞细胞上清 IFA 效价分别为 1:20、1:10、1:5。

2.5.3 细胞分泌稳定性 将杂交瘤细胞株体外连续培养 10 代,分别取其第 1、5、10 代细胞上清,5B9、3G8、4E11 三株杂交瘤细胞细胞上清 IFA 效价分别为 1:20 ~ 1:40、1:10、1:5 ~ 1:10,稳定性较好。

2.6 腹水纯化结果 将 5B9 杂交瘤细胞株扩大培养后接种小鼠制备腹水。采用 HiTrap MabSelect 亲和纯化方法对采集的腹水进行纯化,获得纯度不低于 90% 的单克隆抗体(图 5)。



M. 蛋白分子质量标准;1. 5B9 腹水挂柱后流穿液;

2. 5B9 腹水挂柱后平衡液洗液;3. 5B9 腹水纯化洗脱液

M. Protein molecular weight Marker; 1. 5B9 ascites was transfused after hanging the column; 2. Cleaning of 5B9 ascites with balanced solution after hanging column; 3. 5B9 ascites purified eluent

图 5 5B9 腹水纯化结果

Fig 5 Results of 5B9 ascites purification

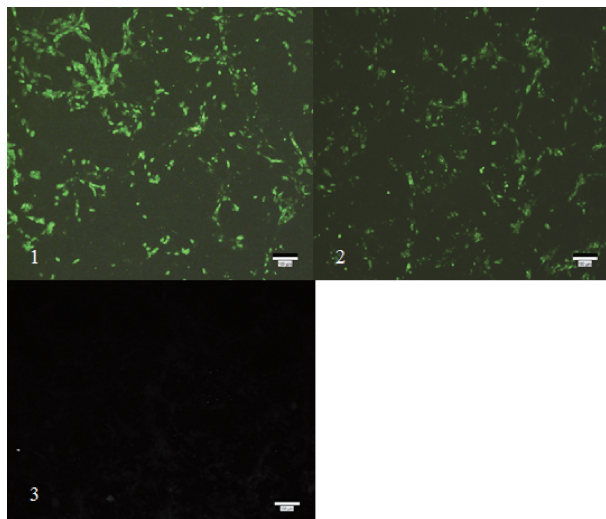
2.7 腹水单抗浓度测定 采用紫外分光光度计检测抗体浓度,浓度为 4.256 mg/mL。

2.8 IFA 效价测定 经测定,纯化后 5B9 单抗 IFA 效价可达到 1:2000(图 6)。

2.9 特异性检验 采用纯化后的 5B9 单抗进行 IFA 染色,除 PIV5/01 株阳性对照外,与 BPIV3、BVDV、IBRV、BRV、CSFV、PPV、PRV、PEDV、TGEV、PRRSV、PCV2 等感染的细胞孔及其正常细胞对照孔均无特异性绿色荧光出现,说明特异性良好。

3 讨论与结论

副流感病毒 5 型自 1956 年从原代猴肾细胞中首次分离^[6]以来,传播迅速,目前已分布至全球。



1. 5B9 腹水 1:1000 染色;2. 5B9 腹水 1:2000 染色;

3. 正常细胞对照

1. 5B9 ascites 1:1000 staining; 2. 5B9 ascites 1:2000 staining;

3. Normal cell control

图 6 5B9 腹水的 IFA 效价测定

Fig 6 Determination of IFA titer of 5B9 ascites

PIV5 感染宿主范围较广,可感染人、犬、猫、猪、牛、虎、小熊猫、豚鼠等多种宿主^[7-9]。PIV5 可通过呼吸道途径在易感动物中水平传播,除犬出现明显的呼吸道症状可诱发感染犬出现“犬窝咳”外,其他动物大都呈现隐性感染,不易被发现,可成为影响兽用生物制品质量的潜在风险。牛血清、细胞(原代细胞或传代细胞)、种毒等为 PIV5 污染的主要来源^[10],除可采用 RT-PCR 方法进行快速初筛外,最终需要采用病毒分离并结合免疫荧光方法才能进行确诊。鉴于国内尚无 PIV5 单克隆抗体及免疫荧光抗体,开展相关试剂研制十分迫切。

目前,常用 ELISA、IFA 等方法作为杂交瘤细胞筛选的方法。相比较 ELISA 方法而言,IFA 方法直接与感染病毒进行反应,能更大可能识别 PIV5 SH 蛋白的天然抗原表位,从而避免采用表达的蛋白可能存在的交叉反应现象,检测时间更短,结果更直观可靠。本研究利用大肠杆菌表达的纯化 PIV5 SH 蛋白,按常规方法免疫小鼠,采用间接免疫荧光方法筛选出 3 株杂交瘤细胞株,制备的腹水单抗 IFA 效价可达到 1:2000,与 BPIV3 等猪牛常见病毒均无

交叉反应,为下一步开展 PIV5 诊断试剂(如 IFA 检测试剂盒)研制奠定了物质基础。

参考文献:

[1] Rima B K, Gatherer D, Young D F, *et al.* Stability of the parainfluenza virus 5 genome revealed by deep sequencing of strains isolated from different hosts and following passage in cell culture [J]. J Virol, 2014, 88(7): 3826–3836.

[2] Abraham M, Arroyo–Diaz N M, Li Z, *et al.* Role of small hydrophobic protein of J paramyxovirus in virulence[J/OL]. J Virol, 2018, 92(20): e00653–18.

[3] Lin Y, Bright A C, Rothermel T A, *et al.* Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene [J]. J Virol, 2003, 77(6): 3371–3383.

[4] Wilson R L, Fuentes S M, Wang P, *et al.* Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus[J]. J Virol, 2006, 80(4): 1700–1709.

[5] 吴华伟, 秦义娴, 陈晓春, 等. 首例兽用活疫苗中污染副流感病毒 5 型的检测 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(12): 16–23.

Wu H W, Qin Y X, Chen X C, *et al.* Detection of contaminated parainfluenza virus type 5 in the first live veterinary vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(12): 16–23.

[6] Hull R N, Minner J R, Smith J W. New viral agents recovered

from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S. V. 1, S. V. 2, S. V. 4, S. V. 5, S. V. 6, S. V. 11, S. V. 12 and S. V. 15 [J]. Am J Hyg, 1956, 63(2): 204–215.

[7] McCandlish I A, Thompson H, Cornwell H J, *et al.* A study of dogs with kennel cough [J]. Vet Rec, 1978, 102(14): 293–301.

[8] Hsiung G D. Parainfluenza–5 virus. Infection of man and animal [J]. Prog Med Virol, 1972, 14: 241–274.

[9] 翟俊琼, 周霞, 邹舒展, 等. 虎源、小熊猫源副流感病毒 5 型的鉴定及 F 基因遗传进化分析 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38(4): 700–704.

Zhai J Q, Zhou X, Zou S Z, *et al.* Identification of parainfluenza virus serotype 5 from tiger and kitten and genetic evolution analysis of F gene [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(4): 700–704.

[10] 夏业才, 陈光华, 丁家波. 兽医生物制品学(第 2 版) [M], 中国农业出版社, 2018, 363–369.

Xia Yecai, Chen Guanghua, Ding Jiabo. Science of veterinary biologicals (2nd edition) [M], China Agricultural Press, 2018, 363–369.

(编辑:陈希)