

分类号: S855.3

授予学位单位代码: 10434
学 号: 2022120599

山東農業大學

硕 士 专 业 学 位 论 文

禽网状内皮组织增生症病毒卵黄抗体的制备及其应用

Preparation and Application of Yolk Antibody Against
Reticuloendotheliosis Virus

姓 名 : 韩欣怡
学 位 类 别 : 兽医硕士
专 业 : 兽医
研 究 方 向 : 动物疫病防控
学 院 : 动物医学院
指 导 教 师 : 常爽副教授

2024 年 5 月 21 日

论 文 提 交 日 期： 2024 年 4 月 8 日

论 文 答 辩 日 期： 2024 年 5 月 18 日

学 位 授 予 日 期： 2024 年 6 月

学 位 类 别： 兽医硕士

答 辩 委 员 会 主 席： 秦卓明

符 号 说 明

英文缩写	英文全称	中文全称
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CEF	Chicken embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
CS	Chicken serum	鸡血清
d	Day	天
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMEM	Dulbeco's modified eagle media	达尔伯克改良伊格尔培养基
<i>E.coil</i>	Escherichia coil	大肠杆菌
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
<i>env</i>	Envelope gene	囊膜蛋白基因
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
<i>gag</i>	Group antigen gene	群抗原基因
h	Hour	小时
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IgE	Immunoglobulin E	免疫球蛋白 E
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgY	Immunoglobulin of Yolk	卵黄免疫球蛋白
IPTG	Isopropyl β -d-thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
kb	Kilobase	千碱基对
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Litre	升
LB	Luria-bertini medium	LB 培养基
LTR	Long terminal repeat	长末端重复序列
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Millilitre	毫升

nt	Nucleotide	核苷酸
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PBS	Phosphate-buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
<i>pol</i>	Polymerase	核聚合酶
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	荧光定量 RT-PCR
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖性 RNA 聚合酶
REV	Reticuloendotheliosis virus	禽网状内皮组织增生症病毒
RNA	Ribonucleic acid	核糖核苷酸
rpm	Revolutions per minute	转速
RT	Reverse transcription	反转录
RT-PCR	Reverse transcription-PCR	逆转录 PCR
s	Second	秒
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SN	Serum neutralization test	血清中和实验
SPF	Specific pathogen free	无特定病原体
TAE	Tris-acetate EDTA	Tris-乙酸电泳缓冲液
TCID ₅₀	Median tissue culture infective dose	半数细胞感染量
μL	Microliter	微升
μm	Micrometre	微米

目 录

1 前言.....	1
1.1 禽网状内皮组织增生症病毒的研究进展	1
1.1.1 形态和基因组结构.....	1
1.1.2 病原学特征.....	1
1.1.3 流行病学.....	1
1.1.4 致病机理.....	1
1.1.5 诊断和防治.....	2
1.2 卵黄抗体的研究概述.....	2
1.2.1 卵黄抗体的结构特点.....	2
1.2.2 卵黄抗体的理化特性.....	3
1.2.3 卵黄抗体的优势.....	3
1.2.4 卵黄抗体的应用.....	4
1.3 本研究的目的及意义.....	4
2 材料与方法.....	5
2.1 材料.....	5
2.1.1 毒株的背景与来源.....	5
2.1.2 主要仪器及试剂.....	5
2.2 方法.....	7
2.2.1 REV 的扩增与病毒定量.....	7
2.2.2 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立	9
2.2.3 卵黄抗体的制备.....	16
2.2.4 卵黄抗体的检测.....	18
2.2.5 动物实验.....	23
3 结果与分析.....	26
3.1 REV 的增殖与定量.....	26
3.1.1 病毒滴度测定.....	26
3.1.2 动物回归实验.....	26
3.2 建立荧光定量 PCR 检测方法.....	26
3.2.1 REV 阳性质粒标准品的制备.....	26
3.2.2 荧光定量 PCR 体系的建立	27
3.3 卵黄抗体的检测.....	28
3.3.1 卵黄抗体 ELISA 效价检测	28
3.3.2 卵黄抗体中和效价检测.....	28
3.3.3 卵黄抗体物理性状检测.....	28

3.3.4 卵黄抗体保存期检验.....	29
3.3.5 卵黄抗体安全性检测.....	29
3.3.6 卵黄抗体的相对分子量分析.....	30
3.3.7 卵黄抗体纯度分析.....	31
3.4 卵黄抗体对 REV 垂直传播的作用实验	31
3.4.1 卵黄抗体治疗垂直传播各组的死亡情况	31
3.4.2 不同日龄时治疗垂直传播各组血液的病毒复制情况	32
3.4.3 不同日龄时治疗垂直传播各组肛拭子的排毒情况	32
3.4.4 28 日龄时垂直传播各组主要免疫器官发育指数	33
3.4.5 28 日龄时垂直传播组各脏器中 REV 病毒复制情况	34
3.5 卵黄抗体对 REV 水平传播的作用实验	35
3.5.1 卵黄抗体治疗水平传播各组的死亡情况	35
3.5.2 不同日龄时治疗水平传播各组血液的病毒复制情况	35
3.5.3 不同日龄时治疗水平传播各组肛拭子的排毒情况	36
3.5.4 28 日龄时水平传播各组主要免疫器官发育指数	37
3.5.5 28 日龄时水平传播组各脏器中 REV 病毒复制情况	38
3.6 卵黄抗体对 REV 的预防治疗作用实验	38
3.6.1 卵黄抗体预防治疗各组的死亡情况.....	38
3.6.2 不同日龄时预防治疗各组血液的病毒复制情况	39
3.6.3 不同日龄时预防治疗各组肛拭子的排毒情况	39
3.6.4 28 日龄时预防治疗各组主要免疫器官发育指数	41
3.6.5 28 日龄时预防治疗各组脏器中 REV 病毒复制情况	42
4 讨论.....	42
4.1 卵黄抗体的发展.....	42
4.2 卵黄抗体的制备与检测.....	43
4.3 卵黄抗体临床应用效果.....	44
5 结论.....	47
参考文献.....	48

中文摘要

禽网状内皮组织增生症（Reticuloendotheliosis, RE）是由禽网状内皮组织增生症病毒（Reticuloendotheliosis virus, REV）引起的一种综合征，会引起禽类免疫抵抗能力下降，出壳率降低，容易感染其他病毒。卵黄抗体（Immunoglobulin of yolk, IgY），是一种 γ 球蛋白，存在于鸡的卵黄当中。卵黄抗体制备过程简单，制作成本较低，不用采血，只需采集疫苗免疫后的鸡蛋纯化卵黄即可获得，适合大规模生产。性质稳定，在常温下储存仍可具备一定活性。起效快、治疗效果显著，安全、高效、易吸收、刺激性弱。

目前尚无有效控制 RE 的方法。该病所造成的损失也越来越严重。产蛋种鸡产生 REV 卵黄抗体后，不仅可缓解 REV 的垂直传播，还可为雏鸡提供母源抗体，预防水平传播的发生。在雏鸡的临床治疗中有很大的发展前景。卵黄抗体对各种动物病毒性疾病的作用越来越受到重视，对特定动物疫病的诊断、预防与治疗发挥着越来越重要的作用。在 RE 发病率高且呈现上升趋势及缺乏有效防控制品的情况下，本研究通过制备与使用卵黄抗体来探索卵黄抗体用于治疗 RE 的可行性，为临床防控 RE 提供技术指导。

利用 REV 建立制备抗 RE 卵黄抗体的新方法，免疫蛋鸡后，适宜条件下饲养，定期收集鸡蛋，采用聚乙二醇沉淀法提取、过滤、离心、纯化卵黄抗体，并对卵黄抗体进行浓度测定，测得蛋白含量为 $18.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，浓度范围在 $16 \sim 22 \text{ mg/mL}$ 之间。同时，通过 SDS-PAGE 电泳验证，能够观察到清晰的两条带，分别为重链和轻链，大小分别为 65 kDa 和 25 kDa ，证明所制备的卵黄抗体具有较高的纯度，其相对质量与文献中的数据相匹配。中和效价测定结果显示，实验组能够产生较高水平的抗 REV 的中和抗体，效价为 $10^{-3.58}/100 \mu\text{L}$ 。用 ELISA 试剂盒检测效价，发现所制备的卵黄抗体具有较高的效价，且随着稀释倍数的增加，效价也随之降低。卵黄抗体性状检验结果显示，该抗体为淡黄色透明澄清的液体，久置后会有少量白色沉淀。卵黄抗体安全性良好，在 1 日龄雏鸡的腿部肌肉中注射 0.5 mL 所制备卵黄抗体后观察，未见任何不良反应和副作用。

雏鸡垂直传播模型攻毒治疗试验结果显示，当雏鸡感染 REV 后，注射卵黄抗体组血液、肛拭子和免疫器官中病毒载量呈下降趋势，未注射组卵黄抗体组病毒拷贝数随时间不断上升，且免疫器官发育指数可看出注射卵黄抗体后抑制了垂直传播后胸腺和法氏囊的萎缩（ $P < 0.01$ ），说明注射卵黄抗体治疗可缓解 REV 的侵害。雏鸡同居感染预防

试验结果显示,当雏鸡在 1 日龄腿部肌肉注射卵黄抗体后,血液、肛拭子和免疫器官中均未检测到 REV 病毒阳性,而未注射卵黄抗体组中出现了阳性鸡,卵黄抗体预防水平传播组中病毒载量极显著低于水平传播组 ($P < 0.0001$),且注射卵黄抗体后抑制了胸腺和法氏囊的萎缩,证明所制备卵黄抗体可以有效预防 REV 的水平传播。雏鸡预防保护试验结果显示,当雏鸡在 1 日龄时腿部肌肉注射 0.5 mL 卵黄抗体后,血液、肛拭子和免疫器官中均无 REV 阳性,而攻毒组中出现了阳性鸡 ($P < 0.0001$),且通过比较免疫器官发育指数,卵黄抗体预防组的肝脏肿大、法氏囊、胸腺萎缩得到缓解,证明卵黄抗体可以有效预防 REV 的侵害,预防保护效果良好。

综上所述,用 REV 作为载体接种白羽母鸡可以有效激活鸡的免疫系统并产生高浓度的中和抗体,这表明成功建立了一种用 RE 相关病毒产生卵黄抗体的方法。抗 RE 卵黄抗体的检测和临床研究进一步表明,该方法能获得特异性好、免疫效果好、稳定性好的卵黄抗体。这项研究为生产高效、经济和稳定的抗 RE 抗体提供了一种新的方法,并研究了抗体的生产方法,用于 RE 预防和治疗,为 RE 的防治提供了新思路。

关键词: 禽网状内皮组织增生症病毒, 卵黄抗体, 灭活疫苗, 保护效果, 抗病毒治疗

Preparation and Application of Yolk Antibody Against Reticuloendotheliosis virus

Abstract

Reticuloendotheliosis (RE) is a group of syndromes caused by the avian reticuloendotheliosis virus (REV), which can cause a decrease in the immune resistance, reduced hatching rate, and become more susceptible to infection with other viruses. Immunoglobulin of yolk (IgY) is a type of γ Globulin, that is present in the yolk of chicken eggs. The preparation process of yolk antibodies is simple, with low production cost, no blood collection is required, purified yolk from vaccinated eggs can be obtained, which is suitable for large-scale production. Its properties are stable and it can still have a certain activity when stored at room temperature. It has a fast onset of action, remarkable therapeutic effect, safety, high efficiency, easy absorption, and weak irritation.

Currently, there is no effective method to control RE. The losses caused by RE are becoming increasingly severe. After laying and breeding chickens produce REV yolk antibodies, it can not only can alleviate the vertical transmission of REV, but also provide maternal antibodies for chicks to prevent horizontal transmission. There is great potential for development in the clinical treatment of chicks. The role of yolk antibodies in various animal viral diseases is receiving increasing attention, playing an increasingly important role in the diagnosis, prevention, and treatment of specific animal diseases. The incidence rate of RE is high and it is showing increasing trend, it lack of effective prevention and control products, this study explored the feasibility of using yolk antibodies for the treatment of RE by preparing and using yolk antibodies, provide technical guidance for clinical prevention and control of RE.

A new method for preparing anti RE yolk antibodies using REV was established. This study is based on the REV isolated in previously of the laboratory, and was amplified and quantified. After detecting that the antigen genes carried by REV can be stably expressed, a

large number of REV are packaged to immunize white feathered laying hens that are in the peak egg production period. After immunization of laying hens, they are raised under suitable conditions, and eggs are collected regularly. Yolk antibodies are extracted, filtered, centrifuged, and purified using polyethylene glycol precipitation method assay. The concentration of yolk antibodies was measured, and concentration levels in the range of yolk antibodies was between 16-22 mg/mL. In the mean time, two distinct bands-the heavy and light chains were observed through SDS-PAGE electrophoresis verification, proving that the producted yolk antibodies had a high degree of purity and that its relative mass matched data found in the literature. The neutralization titer test results showed that the high level of neutralizing antibodies against REV was produced from the experimental group. The test results of yolk antibodies properties showed that the antibody product is a light yellow transparent and clear liquid, and there will be a small amount of white precipitate after prolonged storage. The safety of yolk antibody is good. One-day-old chicks were injected with the prepared yolk antibodies by intramuscularly, according to the dosage was 0.5 mL, the observation results showed no adverse reactions or side effects.

The results of the vertical transmission virus challenge and treatment experiment in chicks showed that when chicks were infected with REV, the virus load in the blood, anal swabs, and immune organs of the group injected with yolk antibodies showed a decreasing trend. The virus copy number of the group uninfected with yolk antibodies continued to increase over time, and the development index of immune organs showed that the injection of yolk antibodies inhibited the atrophy of the thymus and bursa after vertical transmission, indicating that the injection of yolk antibodies can alleviate the invasion of REV ($P < 0.01$). The results of the prevention test for cohabitation infection in chicks showed that one-day-old chicks were injected with yolk antibodies by intramuscularly, no positive REV virus was detected in blood, anal swabs, and immune organs ($P < 0.0001$). However, the positive chicks were found in the group uninfected with yolk antibodies, and the injection of yolk antibodies inhibited the atrophy of the thymus and bursa, proving that the prepared yolk antibodies can effectively prevent the horizontal transmission of REV ($P < 0.0001$). The results of the chick prevention and protection test showed that One-day-old chicks were injected with the

prepared yolk antibodies by intramuscularly, according to the dosage was 0.5 mL, there was no REV positive data in the blood, anal swabs, and immune organs, while positive chicks appeared in the challenge group. By comparing the development index of immune organs, the liver enlargement, bursa and thymus atrophy in the yolk antibodies prevention group were alleviated, proving that yolk antibodies can effectively prevent the invasion of REV and has a good preventive and protective effect.

In conclusion, inoculating white feathered hens with REV as a vector can effectively activate the chicken's immune system and produce high concentrations of neutralizing antibodies, indicating the successful establishment of a method for producing yolk antibodies using RE related viruses. The detection and clinical research of anti RE yolk antibodies further demonstrate that this method can obtain yolk antibodies with good specificity, immune efficacy, and stability. This study provides a new method for producing efficient, economical, and stable anti RE antibodies, and investigates the production methods of antibodies for RE prevention and treatment, providing new ideas for the prevention and treatment of RE.

Keywords: Reticuloendotheliosis virus, yolk antibodies, inactivated vaccines, protective effect, antiviral therapy

1 前言

1.1 禽网状内皮组织增生症病毒的研究进展

1.1.1 形态和基因组结构

REV 是一种逆转录病毒，属于 C 型逆转录病毒科。REV 是一种球形病毒，并且有囊膜。REV 对热敏感，对氯仿和乙醚敏感，不耐酸。REV 基因组编码 3 个蛋白。*gag* 蛋白是核心蛋白，具有群特异性抗原特征；*pol* 蛋白具有多种酶活性；*env* 蛋白是一种病毒囊膜蛋白（何宏虎，1988）。

1.1.2 病原学特征

REV 为一种直径为 75~100 纳米的球形病毒，其核心由两条相同的单链 RNA 链、整合酶、蛋白酶和逆转录酶组成，形成中空的锥形；核心外围是病毒衣壳，由核衣壳蛋白组成；包膜为最外层，呈放射状的面包膜蛋白位于包膜表面，长约 6 纳米，直径约 10 纳米。REV 基因组由组特异性抗原（*gag*）、聚合酶（*pol*）和包膜（*env*）基因和两个长末端重复序列（LTR）组成（雷天宇，2022）。

1.1.3 流行病学

1958 年，Twiehaus 首次从一只患有白血病样病变的火鸡身上分离出 REV（Robinson *et al.*, 1974）。之后，世界上许多国家都报告并分离了该病毒。德国、日本（Taniguchi *et al.*, 1977）、澳大利亚（Grimes *et al.*, 1973）、尼日利亚（Okoye *et al.*, 1993）等许多国家都于禽类中分离出 REV。目前，REV 已在全球范围内流行，且一些鸡群的抗体阳性率很高。一项调查显示，埃及和韩国约 34%至 75%的鸡群具有 REV 抗体。2009 年，秦立廷等人对 39 个蛋鸡场的样本进行了检测。样本均显示出不同程度的 REV 感染（秦立廷等，2010）。REV 在中国多个地区也被多次分离，比如江苏和山东（王玉等，2005；Cheng *et al.*, 2007；邓小芸等，2015；Xu *et al.*, 2020）。

1.1.4 致病机理

REV 可以导致感染禽类出现急性网状细胞瘤或者慢性肿瘤（Herzog *et al.*, 1986；

Bolisetty *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2011)。还可以诱导淋巴细胞转化为肿瘤细胞。REV 引起的慢性淋巴肿瘤主要分为两类：法氏囊瘤和非法氏囊瘤 (Witter *et al.*, 1981; Nazerian *et al.*, 1982; Cooper *et al.*, 1991; Drechsler *et al.*, 2009)。

1.1.5 诊断和防治

目前, 由于商品化生产销售的生物制品或药物的缺乏, 无法有效防控 REV 的感染, 因此进行种源净化、提高家禽的免疫抵抗能力、规范所饲养的环境、加强禽用疫苗的检测以及制定科学合理的免疫程序成为防控 REV 所必不可少的措施。由于 REV 与其他的肿瘤病非常类似, 因此仅仅依靠尸体剖检来诊断很难。2022 年, 苗馨元等通过制备单克隆抗体建立了用于检测 REV 的 ELISA 方法。具有较高的灵敏度和特异性, 可达到对疫苗外源病毒污染的快速检测。(苗馨元等, 2022)。2017 年, 任志浩等对鸡传染性法氏囊病毒疫苗毒种中的 REV 病毒进行消除, 这提供了一种技术手段, 可作为纯化受污染疫苗的参考 (任志浩等, 2017)。

1.2 卵黄抗体的研究概述

卵黄抗体 (IgY) 于 19 世纪末第一次被报道, 被 F.Klemperer 发现, 后来在非哺乳类动物、两栖动物 (Zhao *et al.*, 2009) 和爬行动物 (Wei *et al.*, 2009) 中也发现了 IgY, 以及在鸭嘴兽 (Gambón-Deza *et al.*, 2009) 中进一步确定了鸡 IgY-Fc 亚片段的晶体结构, 现在才公认 IgY 是在免疫球蛋白的进化中起着关键作用的一类独特免疫球蛋白。与一般哺乳动物血清免疫球蛋白相比, 卵黄抗体具有许多优点, 例如在动物福利、特异性等各个方面都得到了证明 (高岭等, 2013)。同时, 由于功能结构的差异, 与哺乳动物抗体相比, 卵黄抗体更适合诊断 (张辉等, 2014)。

1.2.1 卵黄抗体的结构特点

IgY 是一种人类免疫球蛋白 G 的禽类同源物, 与 IgG 的结构具有相似性 (Taylor *et al.*, 2009)。二者都是 Y 型结构, 组成部分为两条轻链和两条重链, 每条重链的分子量为 60~70 kDa, 轻链的分子量为 22~30 kDa。每条链都是由恒定区和可变区所组成。恒定区的功能是提供效应器, 可变区则对于抗原识别至关重要。轻链 (VL-CL) 和重链 (VH-CH) 之间的连接通过二硫键进行 (夏民权, 2021)。IgY 和 IgG 的主要区别在于二者的重链

恒定区数量不同，IgY 比 IgG 具有更高的分子量（Michael *et al.*, 2010）。IgY 重链的 CH₂-CH₃-CH₄ 区为可结晶片段（Lee *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2011）。Fab 区的构成主要为多肽序列，主要是用于参与识别和捕获抗原的特异性，而 Fc 区的主要构成部分为多糖序列（Lundström *et al.*, 2014）。

1.2.2 卵黄抗体的理化特性

（1）等电点

IgY 的等电点（pI）位于 5.7~7.6 之间。Fc 片段有主要的疏水基团，正是因为这一特性，IgY 对乳胶微粒吸附具有稳定性（陈小青，2021）。

（2）酸稳定性

一般情况下，能够在 pH 为 4.0~11.0 时保持稳定。IgY 对酸的敏感性与 IgG 相比更强。在 50 %山梨醇的作用下，几乎能够对在 pH=3 时导致的酸灭活完全阻止（陈小青，2021）。

（3）酶稳定性

Schmidt 等在探究 IgY 的消化过程中发现，胃中胰蛋白酶胰岛素和糜蛋白酶能够将 IgY 的活性明显降低。而当高蛋白和碱性溶液作用于 IgY，IgY 的抗酶解能力和抗酸能力则会发生显著提高，对于酶，具有很强的稳定性，能够在酶存在的条件下存活（Pereira EPV, 2019）。

（4）热稳定性

当 IgY 处于温度低于 25℃的条件下，抗幽门螺杆菌的 IgY 能够维持全部中和病原体活性，在大于或等于 37℃时，IgY 仍具有一定的中和活性，而在 63.5℃时活性基本不丧失，IgY 具有明显的热稳定性，能够在高温条件下保持稳定（陈小青，2021）。

1.2.3 卵黄抗体的优势

卵黄抗体的提取方法更加便捷、高效，操作简便，经济便利（高岭，2013）。且与血清不同，仅含有单一类型的抗体 IgY（Kovacs-Nolan *et al.*, 2012）；只需要使用简单的沉淀技术，便能对其进行纯化（Kovacs-Nolan *et al.*, 2004）。鸡年产蛋约为 300 枚，

从每个鸡蛋中可获得约 50~100 mg 的卵黄抗体，产量高，成本低，利于大规模生产应用（Zhang *et al.*, 2003），其中有 2~10% 的卵黄抗体是特异性抗体 IgY（Xu *et al.*, 2011）。一年的时间可以从 1 只免疫蛋鸡中提取大约 2250 mg IgY（Schade *et al.*, 2005）。除此此外，IgY 不会引发细菌产生耐药性。且使用的过程中 IgY 没有任何的毒素风险，同时，IgY 的结构和免疫学特性均优于抗生素（Zhang *et al.*, 2019）。

1.2.4 卵黄抗体的应用

现今，卵黄抗体由于其具有产量高、生产成本低、不具有毒性以及稳定性强等众多优势（Li *et al.*, 2015），已广泛应用于疾病治疗中（Erhard *et al.*, 2000; HatamzadeIsfahani *et al.*, 2020; Karachaliou *et al.*, 2021）。马蕾等（马蕾等，2013）研制了胆囊收缩素特异性卵黄抗体，通过腹腔注射入动物体内，结果发现卵黄抗体能够明显促进动物生长；张晓萍等（张晓萍等，2004）制备的卵黄抗体，用于鸡的饲养过程中，发现能够明显提高鸡的生产性能。张桂枝等（张桂枝等，2009）研制的抗 NDV 和传染法氏囊病的特异性卵黄抗体，注射入鸡体内，临床试验保护率能够高达 100%，治愈率达到 85%，明显预防治疗了疾病的传播。

在疾病治疗领域，卵黄抗体最初是作为一种抗生素的替代品进入大众的视野中（Carlander *et al.*, 2000），有关卵黄抗体的抗菌活性已被广泛研究。在病毒治疗方面，李建（李建等，2013）制备了抗新城疫病毒特异性卵黄抗体，注入动物体内，对新城疫的治疗表现出极高的价值。众多临床试验均表现出极高的存活率和治愈率，为卵黄抗体的临床治疗研究提供了较高的应用价值，具有良好的应用前景。同时，卵黄抗体提纯的方法还有待突破，须继续精进；卵黄抗体在制作和使用过程中可能会遇到细菌病毒，对卵黄抗体的安全性造成影响，进而影响卵黄抗体的实际临床应用。

但是，目前已有多项研究表明卵黄抗体在禽类疾病传染病治疗中具备良好的治疗效果，且不会对鸡体产生影响。同时，由于卵黄抗体具备成本低、产量高、稳定性强、耐酸、易获取、可做到动物福利等众多优势，卵黄抗体可作为一种重要的医用资源。

1.3 本研究的目的及意义

REV 是一种严重的免疫抑制性病毒，可引起肝脏肿大、胸腺和法氏囊等免疫器官出

现萎缩、凋亡，导致死胚、弱雏，最终导致明显抑制体液免疫和细胞免疫，使机体免疫能力低下，容易继发感染其他病毒，引起比较高的致死率，对鸡群的生长发育造成了极大的威胁，且诊断时易与其它疾病发生混淆，进一步的加大了对于该病的防控难度，给我国养禽业带来了严重的经济损失，严重危害了养禽业的发展。本研究将通过制备 RE 的卵黄抗体，并观察其对 REV 的抑制效果，防止 RE 的传播。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 毒株的背景与来源

REV-LN1201 株为 2012 年本实验室从某父母代肉种鸡场疑似感染禽肿瘤病的鸡血浆中分离得到，已完成全基因组测序（GenBank 登录号：KU641115.1）。

2.1.2 主要仪器及试剂

2.1.2.1 主要仪器

生物安全柜（Heal Force，香港）；酶标仪和超微量分光光度计（Thermo Fisher Scientific，USA）；正置荧光显微镜（Nikon，Japan）；PCR 仪（ABI，USA）；实时荧光定量 PCR 仪（QuantStudio™ 5，USA）；超声波均质器（Misonix Sonicator 4,000，USA）；凝胶成像系统和化学发光成像系统（Azure Biosystems，USA）；台式高速冷冻离心机和微型离心机（Eppendorf，Germany）；超净工作台（Cabinets，Canada）；生化培养箱和 CO₂ 培养箱（SANYO，Japan）超低温冰箱（海尔，青岛）；电泳槽、电子天平以及 WD-9405B 型水平摇床（六一，北京）；电动搅拌器（博奥龙，苏州）；恒温水浴锅（Grant，UK）。

2.1.2.2 主要试剂

限制性核酸内切酶（BamHI、XhoI）、dNTP、rTaq 酶、氨苄青霉素等均购自大连宝生物公司；SDS-PAGE 凝胶试剂盒、蛋白质 Marker、20×快速转膜液、通用抗体稀释液；Ni-NTA 亲和层析介质、Protein A 亲和层析介质和层析柱购自金斯瑞生物科技有限公司；PVDF 膜购自美国 Millipore 公司；脱脂奶粉、PBS、PBST、TBST、TMB、50×TAE 显色液购自北京索莱宝科技有限公司；病毒 RNA 快速提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝

胶回收试剂盒均购自美国 OMEGA 公司;DNA Marker、Evo 反转录试剂盒和 SYBR Green Premix Pro taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;DAPI 染色液、4%多聚甲醛、抗荧光淬灭封片液购自北京碧云天生物技术公司;FITC 标记羊抗鸡二抗购自英国 Abcam 公司;6 孔、12 孔、24 孔以及 96 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司;氯化钠、甲醇、无水乙醇、琼脂粉、胰蛋白酶等均为国产分析纯。

2.1.3.3 试剂配制

(1) Amp (100 mg/mL): 用称量纸称取 10 g Amp, 倒入锥形瓶中, 加入 100 mL ddH₂O 溶解, 将其充分混匀之后, 用 0.22 μ m 滤器过滤, 转移至 1.5 mL 离心管中分装, 储存在-20°C冰箱中备用。

(2) LB 培养基 (液体): 用称量纸称取 5 g 酵母提取物、10 g NaCl、10 g 胰蛋白胨, 倒入锥形瓶中, 加入 ddH₂O 溶解, 定容至 1000 mL, 将 pH 调节至 7.0, 分装到广口瓶中, 盖上盖子拧紧后松半圈, 灭菌并储存。

(3) LB 培养基 (固体): 提前准备好广口瓶, 用移液器吸取 100 mL 液体 LB 培养基加入广口瓶, 称取 1.5 g 琼脂粉倒入广口瓶中, 盖好盖子拧紧后松半圈, 灭菌后将温度降至 50°C 左右。将其倒入无菌一次性培养皿中, 等待其冷却, 然后在 4°C 下冷藏。

(4) IPTG: 用称量纸称取 IPTG 粉末, 加入 ddH₂O 定容至 100 mL, 使用 0.22 μ m 滤器过滤除菌之后, 将其分装于无菌离心管, -20°C冰箱避光保存。

(5) 5%脱脂奶: 用称量纸称取 5 g 脱脂奶粉, 倒入广口瓶中, 用 1×PBST 定容至 100 mL, 经磁力搅拌器搅拌均匀后, -20°C冰箱保存。

(6) LE Buffer: 用称量纸称取 3.589 g Na₂HPO₄, 0.121 g Tris HCl, 48 g 尿素, 倒入锥形瓶后, 用去离子水定容至 100 mL, 将 pH 调至 8.0, 充分混合。

(7) 洗涤缓冲液: 用称量纸称取 3.589 g Na₂HPO₄, 0.121 g Tris HCl, 48 g 尿素, 0.068 g 咪唑, 倒入广口瓶中, 用去离子水定容至 100 mL, pH 调至 8.0。

(8) 洗脱缓冲液: 用称量纸称取 3.589 g Na₂HPO₄, 0.121 g Tris HCl, 48 g 尿素, 1.7 g 咪唑, 倒入广口瓶中, 用去离子水定容至 100 mL, pH 调至 8.0。

2.2 方法

2.2.1 REV 的扩增与病毒定量

2.2.1.1 病毒扩增

- (1) 细胞生长液调至 PH 7.2, 过滤除菌之后, 保存于 4°C 中备用。
- (2) 取出生长液与胎牛血清, 将水浴锅提前调至 37°C, 置于水浴锅中, 进行预热。
- (3) 将预先冻存的 DF-1 细胞冻存管取出, 放入水浴锅中, 预热, 细胞解冻恢复常温后放入超净台中。
- (4) 取一个六孔细胞培养板, 提前做好 15%胎牛血清的生长液, 每孔加入 2 mL 生长液, 将解冻之后的细胞按 250 μ L、200 μ L、150 μ L、100 μ L 4 个梯度分别加入于六孔细胞培养板中, 盖上盖子, 轻轻晃匀, 放入 37°C细胞培养箱中培养。
- (5) 4 h 后取出六孔板, 将原有细胞培养液倒掉, 提前配置好的含有 2 mL 10%胎牛血清的生长液, 用移液器从侧壁缓慢加入生长液, 放入 37°C细胞培养箱中培养。
- (6) 次日, 取出六孔板, 换液, 之后正常细胞传代, 在细胞密度生长至 60%~70% 时, 可对细胞进行接毒。
- (7) 从-80°C冰箱中取出病毒液, 放入病毒液于泡沫浮漂, 提前将水浴锅温度调至 37°C, 迅速将病毒液置于水浴锅中, 融化恢复至常温后放入超净台, 并要避免病毒液反复冻融。
- (8) 将病毒液过滤除菌后, 取出 DF-1 细胞, 观察到细胞密度生长至 60%~70%, 将病毒液轻缓加入 DF-1 细胞培养皿中, 每个平皿加入 1 mL 病毒液, 盖上盖子, 缓慢晃动平皿, 使病毒液均匀平铺于平皿。
- (9) 接毒完成后, 将平皿放入细胞培养箱, 培养 4 h 后取出, 用移液器吸取空白生长液, 加入平皿中冲洗皿中存在的死细胞, 提前做好 1%胎牛血清的维持液, 加入维持液, 盖好盖子, 培养 5~6 d。
- (10) 重复传代两次后, 将病毒液用移液器分装转移至无菌离心管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 除去其中的细胞碎片, 将细胞上清转移至无菌离心管中, 充分混匀, 用 0.22

μm 滤器进行过滤除菌，并分装于灭好菌的离心管中， -80°C 冻存备用，对病毒液进行验证，确保无污染。

2.2.1.2 病毒滴度测定

(1) 观察传代的细胞状态，当培养于 96 孔板中的 DF-1 细胞密度至 70%~80%，对病毒进行定量，测定病毒滴度。

(2) 提前准备好足够的 1.5 mL 的无菌离心管，向离心管中加入空白的生长液，每管 900 μL 。

(3) 取出冻存的 REV-LN 1201 病毒液，放入浮漂中，提前将水浴锅温度调至 37°C ，置于水浴锅中预热，恢复至常温融化后转入超净台。

(4) 将每管病毒样品吹打混匀之后，用移液器向第一只 1.5 mL 离心管中加入 100 μL 病毒液，用移液器充分吹打混匀后从第一只离心管中吸取 100 μL 加入第 2 只 1.5 mL 灭菌的离心管中，吹打混匀后用移液器吸取 100 μL ，加入下一个 1.5 mL 灭菌的离心管中，依次类推至第 10 管，对病毒液进行倍比稀释。

(5) 取出培养好的细胞，将稀释好病毒液充分混匀后，依次加入其中，96 孔板中第 1 列为 10^{-1} ，往后每一列依次为 10^{-2} ~ 10^{-10} ，同时在后两列设置阴阳对照，盖上盖子后标号，放入 37°C 细胞培养箱中，4~6 h 后取出，提前配置好浓度为 1% 的维持液，将病毒液倒掉，用维持液轻轻冲洗，换为维持液，盖上盖子，继续在 37°C 细胞培养箱中维持，6~7 d 后取出，进行 IFA，对病毒进行定量。

2.2.1.3 间接免疫荧光试验

(1) 将维持 7 d 后的细胞板取出，倒掉细胞板内的液体。

(2) 用巴氏吸管吸取少量 PBS，缓慢加入，将细胞冲洗三遍，倒掉，并将细胞版轻轻倒扣于吸水纸上吸干液体。

(3) 另取巴氏吸管，吸取少量细胞固定液，缓慢贴壁加入， 25°C 静置 5~8 min。

(4) 用巴氏吸管吸取少量 PBS，将细胞再次冲洗三遍，吸干液体，加入 55~60 μL REV 单抗，盖上盖子，将其放置于 37°C 温箱中培养，恒温孵育 40 min~1 h。

(5) 取出细胞版，弃去其中液体，再次用巴氏吸管吸取少量 PBS，缓慢贴壁加入，

将细胞冲洗三遍，轻轻倒扣吸干液体。

(6) 加入与一抗等量的 FITC 荧光标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗，盖上黑盖子，置于 37℃ 恒温培养箱中，避光孵育 45 min~1 h。

(7) 取出培养板，用巴氏吸管吸取少量 PBS，冲洗三遍，倒扣吸干液体。

(8) 向细胞培养板中滴加少部分 50% 甘油，用荧光显微镜观察试验结果。

(9) 按照 Reed-Muench 法计算其半数细胞感染量 (TCID₅₀)，计算方法为：
lgTCID₅₀=L+d (s-0.5)。

L: 最高稀释度的对数

d: 稀释度对数之间的差

s: 阳性孔比率总和

2.2.1.4 动物回归实验

挑选 10 只 0 胚龄 SPF 鸡胚，平均分成 2 组，7 胚龄时其中一组卵黄囊攻毒 300 TCID₅₀，另外一组注射等体积的无菌生理盐水，作为对照组，置于恒温孵化箱中孵育 21 天，21 天出壳后同等条件下饲养，保证饲料饮水充足，环境适宜、温度恒定，连续观察 10 d，记录试验动物精神状况、临床症状、死亡情况，并对死亡雏鸡剖检观察病理变化。

2.2.2 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

2.2.2.1 引物的设计与合成

根据 GenBank 上已发表的 REV 全基因组序列，设计了针对 *pol* 基因的引物，引物序列见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Preparation of primers

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences	扩增长度 Products size
Pol-F	<u>GAGGAAGGAGAATCAGGGCAACTAAC</u>	142 bp
Pol-R	<u>CATACTGAAGGAGGGAAACGAAAGGG</u>	

2.2.2.2 病毒 RNA 的提取

根据 RNA 提取试剂盒的说明从 REV LN-1201 阳性细胞的上清液中提取 RNA:

- (1) 提前准备足够的无菌 1.5 mL RNA 离心管, 加入 150 μ L 病毒上清液;
- (2) 每个离心管加入 500 μ L Lysis Buffer, 充分吹打混匀, 静置 8 min;
- (3) 每管加入 350 μ L 无水乙醇, 静置 2 min, 12000 rpm 2 min 离心, 将吸附柱放入收集管中, 将离心后的液体每管转移至两个吸附柱中;
- (4) 向每一个吸附柱中加入 500 μ L VHB Wash Buffer, 12,000 rpm 离心 1 min, 换新的收集管, 也可弃去其中液体, 用吸水纸吸干残留液体;
- (5) 加入 500 μ L RNA Wash Buffer, 12,000 rpm 离心 1 min, 换新的收集管;
- (6) 重复前一步操作;
- (7) 更换新的收集管, 12,000 rpm 空离 2 min;
- (8) 换新的无菌 1.5 mL RNA 离心管中, 放入超净台风干 5 min, 使无水乙醇充分挥发, 用移液器吸取 30 μ L DEPC Water, 在柱子膜处分四滴小心滴加, 孵育 5 min 后, 12,000 rpm 离心 2 min;
- (9) 将离心管中的液体用移液器重新点到柱子膜中央, 再离心, 离心管中的液体即为提取的 RNA, 并立即进行 RT 反应, 防止 RNA 的降解。

2.2.2.3 RT-PCR 反应

(1) RT 反应

RNA 提取完成后，立即进行 RT 反应，10 μL RT 反应体系见表 2：

表 2 RT 反应体系

Table 2 Reaction system of RT

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
MgCl ₂	2
RT-PCR Buffer	1
dNTP	1
Reverse Primer	1
AMV	0.5
Sample	4.5
Total	10

反应条件：42°C，60min；99°C，5min；RT 产物 4°C 保存。

(2) PCR 扩增

以 RT 产物作为反应模板，合成的 F 和 R 为上下游引物，配制如表 3 的 PCR 反应体系。

表 3 PCR 反应体系

Table 3 Reaction system of PCR

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
ddH ₂ O	17
10×Buffer	2.5
dNTP	2
POL-F	1
POL-R	1
rTaq 聚合酶	0.5
模板	1
Total	25

反应程序：预变性 95°C，5 min；变性 95°C，30 s；退火 58°C，30 s；延伸 72°C，1 min30s；35 个循环数。延伸 72°C，10 min。扩增后的产物置于 4°C 保存。

2.2.2.4 RT-PCR 产物的凝胶回收纯化

(1) 配置好胶块，向每孔中加入样品和 Maker，放入电泳槽中，待观察到目的片段跑至指定位置时，取出凝胶，放至凝胶成像仪下观察，将目的条带切下，转移至无菌离心管中，进行以下操作：

(2) 向管中加入等体积 XP2 Binding Buffer，准备好水浴锅，将温度提前调至 56℃，将离心管置于水浴锅中，进行水浴，直至胶块完全溶解。

(3) 取出离心管，将 DNA 结合柱套入于收集管内，将离心管中的 DNA 凝胶溶液每管转移至两个 DNA 结合柱中，12,000 rpm 离心 2 min，换新的收集管，或弃除废液，用吸水纸吸干液体。

(4) 向每个 DNA 结合柱中加入 700 μL SPW Buffer，12,000 rpm 离心 2 min，换新的收集管。

(5) 重复上一步操作。

(6) 换取新的收集管中，空离，12,000 rpm 离心 2 min。

(7) 将 DNA 结合柱放入干净的 1.5 mL 离心管上，放入超净台风干 5 min，用移液器吸取 35 μL TE Buffer，分四滴滴加在 DNA 结合柱的基质上，37℃孵育 5 min，12,000 rpm 离心 2 min，以洗脱 DNA。

(8) 重新用移液器将液体点到膜上，12,000 rpm 离心 2 min；以提高回收产率。

2.2.2.5 回收产物的连接

将 2.2.2.4 的产物与 pMD18-T 载体连接，置于 16℃ 恒温水浴锅中连接过夜，反应体系见表 4。

表 4 克隆连接反应体系

Table 4 Reaction system of cloning

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
Insert PCR Product	5
Solution I	4
pMD18-T Vector	1
Total	10

2.2.2.6 转化

(1) 将冰块放入冰盒中，加入一些水，制备冰水混合物，将 DH5 α 感受态细胞迅速放入冰盒中。

(2) 在超净台中取出感受态细胞、连接产物，三烧打开盖子，吸取 10 μ L 连接产物，缓慢加入感受态细胞中，盖好盖子，缠好封口膜，放入于冰水混合物中，冰浴。

(3) 提前打开水浴锅，将温度调至 42°C，冰浴 30 min 后取出，放入恒温水浴锅中进行热激，提前做好闹钟计时，47 s 后迅速取出，放入于冰水混合物中冰浴。

(4) 2 min 取出，转入超净台中，提前做好空白 LB 培养基，用移液器吸取 800 μ L 加入离心管中，在恒温摇床振荡大约 60 min，摇床设置为 37°C 220 rpm/min，观察到离心管中液体浑浊后停止摇床，取出。

(5) 将离心管 4,000 rpm 离心 3 min，注意配平，离心后倒掉部分上清液，大约保留 100 μ L，用于重悬菌体。

(6) 用移液器吹打混匀，将其全部溶解后，吸取菌液，分 3~4 滴，提前做好加入 Amp 抗性的 LB 固体平板培养基，将菌液滴加到平板上，进行涂板，一手轻轻转动培养基，另一只手拿涂板器轻轻滑动，缓慢涂开，使菌液均匀的铺在平板培养基表面，没有液体流动，证明涂抹均匀。盖好盖子后将培养基放入 37°C 恒温培养箱中，先正放 35 min，再倒放培养过夜，直至观察到固体培养基表面生长出菌落便可进行挑菌。

(7) 提前做好无菌离心管，在超净台中取出离心管，提前做好含 Amp 抗性的 LB 液体培养基，用移液器向其中加入 800 μ L，观察，从中选取单个菌落，用枪头轻轻蘸取，放入离心管中，用皮筋将离心管架缠好，随后倾斜 45°放置于 37°C 摇床中 5~6 h，至菌液浑浊。

(8) 参考 2.2.2.3 的条件，进行菌液 PCR 扩增，将所获取的阳性克隆菌液标记好，送至公司进行测序，测序正确后提取质粒。

2.2.2.7 重组质粒的提取

(1) 提前做好 10 mL 灭菌后的离心管，用移液器吸取阳性菌液分装于离心管中，离心机设置为 3,500 rpm 10 min，倒掉液体，得到细菌。

(2) 提前准备好无菌 PBS，用移液器吸取 1 mL 加入至细菌沉淀中，进行重悬，吹打混匀，用移液器转至 1.5 mL 无菌离心管中，离心机设置为 12,000 rpm 1 min，倒掉液体。

(3) 用移液器向离心管中加入 250 μ L Solution I，充分吹打混匀。

(4) 用移液器向离心管中加入 250 μ L 提前预热好的 Solution II，充分吹打混匀，静置 3 min。

(5) 用移液器向离心管中加入 350 μ L Solution III，充分吹打混匀，静置 3 min，离心机设置为 12,000 rpm 10 min。

(6) 将吸附柱套入收集管中，离心后的液体加入吸附柱中，静置 2 min 后，离心机设置为 12,000 rpm 2 min，换新的收集管或倒掉液体，用吸水纸吸干管内液体。

(7) 加入 550 μ L HBC Buffer，静置 2 min，离心，设置为 12,000 rpm 2 min。

(8) 倒掉液体，更换收集管，用移液器向吸附柱中加入 700 μ L DNA Wash Buffer，离心，设置为 12,000 rpm 2 min。

(9) 重复上一步操作。

(10) 点膜：提前准备好 1.5 mL 的无菌离心管，将吸附柱套入离心管中，放入超净台中风干，5 min 后取出，用移液器吸取 35 μ L Elution Buffer，分四滴向吸附柱膜上下左右四点滴加，放入 37°C 恒温培养箱中孵育。

(11) 10 min 后取出，放入离心机中 12,000 rpm 离心 2 min。

(12) 将离心后的液体再次用移液器吸取，分四滴向吸附柱膜上下左右四点滴加，放入 37°C 恒温培养箱中孵育后，12,000 rpm 离心 2 min，收集离心管中的液体，即为所提取的质粒，保存于-20°C。

2.2.2.8 双酶切反应

验证后的重组质粒以及表达载体使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行双酶切。酶切体系见表 5。

表 5 双酶切体系

Table 5 Double enzyme digestion system

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
<i>Xho</i> I	0.5
<i>Bam</i> H I	0.5
10 × G Buffer	1
胶回收产物	8
Total	10

将上述试剂充分混匀后，放入 PCR 仪中 37℃进行酶切反应，1 h 后取出。反应完成后取 10 μL 样品，加入适量 loading buffer，吹打混匀后，将胶块 0.8%的琼脂糖凝胶中进行电泳，放至凝胶成像仪下观察，观察在目标位置是否含有酶切条带。

2.2.2.9 表达质粒构建

(1) 连接

完成酶切反应之后对双酶切产物进行连接，使用 Solution I 连接酶进行克隆连接，反应体系如表 6 所示，于 16℃恒温水浴槽中连接 4 h，连接产物于 4℃冰箱暂存。

表 6 连接体系

Table 6 Connection system

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
Solution I	5
连接产物	1
Target gene	4
Total	10

(2) 连接产物的克隆

按照前面所述步骤将连接产物转化至 Trans 5α感受态细胞中，挑取单克隆并提取质粒，具体操作见 2.2.2.7。

2.2.2.10 重组质粒的鉴定及拷贝数计算

用紫外分光光度计测定，根据公式计算质粒拷贝数，质粒拷贝数 (copies/μL) = $[6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度 (ng/μL)} \times 10^{-9}] / [660 \times (\text{载体长度} + \text{质粒长度})]$ 。

2.2.2.11 荧光定量 PCR 体系的建立

按照表 7 体系进行反应。

表 7 荧光定量 PCR 体系

Table 7 Real-time PCR system

试剂 Reagent	体积 (μL) Volume (μL)
2×SYBRGreen Pro Taq HS Premix	10
Template	2
Primer F	0.4
Primer R	0.4
ddH ₂ O	7.2
Total	20

将构建的质粒标准品以 10^8 copies/μL~ 10^4 copies/μL 5 个浓度梯度为坐标轴横坐标, 进行荧光定量 PCR 反应, 建立标准曲线。反应条件: 预变性 95°C, 30 s; 变性 95°C, 5 s, 退火 60°C, 34 s, 反应进行 40 个循环。溶解曲线分析: 95°C, 10 s; 65°C, 1 min; 97°C, 1 s。

2.2.3 卵黄抗体的制备

2.2.3.1 蛋鸡的饲养和免疫

蛋鸡采用笼养的方式饲养, 时刻确保饲养鸡舍的空气流通, 室内温度适宜, 每天进行 2 次喂食, 早上 8 点和下午 5 点, 喂食中间注意观察饮水和鸡的精神状态, 不定时加水, 保证饮水充足, 并定期对鸡舍进行卫生打扫和消毒, 避免鸡群接触粪便和其他致病菌, 规避感染其他病原的风险。

蛋鸡先饲养观察一周, 以适应新环境, 避免发生应激反应导致产蛋率下降, 进而影响实验结果, 一周以后对蛋鸡进行免疫, 蛋鸡免疫方法采用双翅下胸肌、颈部皮下多点注射, 共进行 4 次免疫, 第一次免疫抗原与等量的弗氏完全佐剂混合乳化做基础免疫, 第二、三、四次免疫抗原与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化做加强免疫, 对照组鸡不进行免疫。

表 8 蛋鸡免疫程序

Table 8 Layer hen immunization procedures

分组	首免	二免 (间隔 10 天)	三免 (间隔 14 天)	四免 (间隔 18 天)	接种方式
A	1.5 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	颈部皮下注射和胸部肌肉 两点注射相结合
B	1.5 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	颈部皮下注射和胸部肌肉 两点注射相结合
C	1 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	颈部皮下注射和胸部肌肉 两点注射相结合
D	1 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	2 mL/只	颈部皮下注射和胸部肌肉 两点注射相结合

2.2.3.2 鸡蛋的收集

鸡蛋的收集：从免疫进行前就开始收集鸡蛋，在第 1 次免疫后，每隔两天收集一次鸡蛋，并用记号笔对鸡蛋做好标记，在产蛋频率发生明显下降时立即停止收集鸡蛋。收集的鸡蛋编号标记之后于 4°C 保存。

2.2.3.3 卵黄抗体的制备

采用聚乙二醇沉淀法，将收集的新鲜鸡蛋用湿毛巾擦净，用酒精对鸡蛋表面进行消毒，对卵黄抗体进行提取，具体操作步骤如下：

(1) 提前准备好灭好菌的镊子和剪刀，点燃酒精灯，将镊子和剪刀用酒精灯外焰烧一下，用镊子或者剪刀在蛋壳上方轻轻敲一个小孔，小心将蛋清从蛋壳中倒出，去除蛋清。

(2) 将蛋清倒出后取出蛋黄，将蛋黄小心放在无尘纸上，轻轻滚动蛋黄，除去表面多余的蛋清，至卵黄的表面呈现磨砂样之后，将卵黄转移至纱布上，用移液枪枪头小心将蛋黄刺破，将蛋黄小心倒入 50 mL 离心管中，小心去除表面的卵黄膜，使离心管中只有卵黄液，获取卵黄原液。

(3) 向其中加入卵黄原液两倍体积的 Tris-HCL 缓冲液，与之充分混合，所述 Tris-HCL 缓冲液的浓度为 0.1 mol/L，pH=7.6。

(4) 再加入总体积 3.5% 的 PEG-6000 (w/v，以 g 计)，涡旋振荡，将其充分溶解。4°C 静置过夜。目的是为了更好去除卵黄中的脂质部分，以便于后续步骤中的抗体的沉淀。

(5) 离心机设置为 4℃ 离心 20 min (10000 g/min), 获取蛋白质水相, 提前准备好无菌的 50 mL 离心管, 离心完成后, 将离心管中的上清液转移至离心管中。

(6) 过滤, 向离心管中加入溶液同等体积的 12% 的 PEG-6000, 震荡使其充分混匀。

(7) 将离心管放入离心机中, 注意配平, 离心机设置为 4℃ 20 min (10000 g/min), 倒掉液体。

(8) 向其中加入 10 mL PBS, 静置 2 min。

(9) 向离心管中加入 12% 的 PEG-6000 (w/v), 震荡混匀, 使其充分溶解;

(10) 将完全溶解混匀后的离心管放入离心机中, 离心机设置为 4℃ 20 min (8000 g/min), 倒掉液体, 向离心管中加入 2 mL PBS, 将沉淀重悬, 吹打混匀, 用移液器转移至 2 mL 离心管中分装。

(11) 提前准备好 0.22 μm 的滤器, 在超净台中将制备的卵黄抗体进行过滤除菌, 除菌后转移至 2 mL 无菌离心管中分装, 分装后于 -20℃ 保存。

2.2.4 卵黄抗体的检测

2.2.4.1 卵黄抗体 ELISA 效价检测

根据 REV 抗体滴度公式进行计算, 判断为阴性或阳性, 具体操作如下:

(1) 将检测试剂盒中所需的实验试剂和 REV 包被板提前放入 37℃ 温箱, 回温至室温。

(2) 提前准备好干净的大锥形瓶中, 向其中加入 1 L 去离子水, 将 1 袋洗液倒入混合, 使其完全溶解。

(3) 提前配置好底物缓冲液, 将 1 片底物放入 10 mL 无菌离心管中, 用移液器加入 6 mL 的底物缓冲液。

(4) 用移液器在样品稀释板加入 5 μL 待测卵黄抗体。

(5) 吸取 245 μL 样品稀释液, 加入稀释样品, 制成 50 倍稀释液, 静置 30 min。

(6) 取出回温的包被板, 用移液器向每孔中加入 50 μL 样品稀释液。

(7) 用移液器吸取稀释好的 50 倍稀释液，加入包被板中，稀释液体，制成 100 倍稀释液。

(8) 在加样孔后面加入 100 μL 阳性对照与阴性对照，设置好两个重复并记录好位置。

(9) 用移液器吸取 100 μL 稀释后的样品，加入到反应板孔中，盖上封板膜，将反应板盖住，室温下静置 30 min。

(10) 将液体倒掉，用巴氏吸管吸取提前配置好的洗液，洗 4 次。

(11) 最后一次洗完后倒掉液体，用吸水纸吸干液体。

(12) 用移液器向每孔加入 100 μL 酶标二抗，贴上封板膜静置 30 min。

(13) 将液体倒掉，用巴氏吸管吸取提前配置好的洗液，洗 4 次。

(14) 最后一次洗完后倒掉液体，用吸水纸吸干液体。

(15) 用移液器向每孔中加入 100 μL 提前准备好的底物试剂，贴好封板膜，静置 20 min。

(16) 向每孔中加入 100 μL 终止液，停止反应进行。

(17) 将仪器空气调零，酶标仪将波长调至 405 nm 处，进行测量，记录数据，测定各孔的吸光度。

(18) 将所得数据转换为抗体滴度，即为 ELISA 效价。

2.2.4.2 中和效价检测

本实验采用固定病毒—稀释卵黄抗体法，操作步骤如下：

(1) 细胞培养：制备 MDBK 细胞悬液，细胞传代后，铺到 96 孔细胞培养板，每孔加 100 μL 细胞悬液，放入 37°C，5% CO_2 细胞培养箱中培养。

(2) 病毒稀释：根据测定的病毒滴度，将其稀释成 100 个 TCTD₅₀。

(3) 血清灭活和卵黄抗体除菌：将血清水浴 56°C 灭活 30 min，卵黄抗体采用 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌。

(4) 抗原-抗体结合：吸取 500 μL 待测卵黄抗体在 2 mL 无菌 EP 管中，进行倍比稀释，从 $2^1 \sim 2^{10}$ 进行稀释，在第一到第十个 EP 管中分别加入 500 μL DMEM，第一个 EP 管加入 500 μL 待测卵黄抗体，吹打混匀后吸取 500 μL 到第二个 EP 管，第二个 EP 管混匀后，吸出 500 μL 到第三个 EP 管，依次类推到第十个 EP 管，即为 $2^1 \sim 2^{10}$ 稀释，然后在每个稀释度的 EP 管中加入 500 μL 稀释成 100 个 TCTD₅₀ 的病毒液，吹打混匀，放在 37°C 培养箱孵育 1 h。

(5) 观察结果：将上述中和卵黄抗体加到长满单层 MDBK 细胞的 96 孔板中，第 11 列加阴性血清，12 列空白对照加细胞培养液，然后放在 37°C 细胞培养箱中进行培养。72 h 之后观察细胞变化，在整个实验过程中对照应该保持正常的生长状态。

(6) 将培养完成后的细胞板取出，倒出其中液体，用巴氏吸管吸取少量 PBS，缓慢加入，将细胞冲洗三遍，倒掉，并将细胞版轻轻倒扣于吸水纸上吸干液体。

(7) 另取巴氏吸管，吸取少量细胞固定液，缓慢贴壁加入，25°C 静置 5~8 min。

(8) 用巴氏吸管吸取少量 PBS，将细胞再次冲洗三遍，吸干液体，加入 55~60 μL REV 单抗，盖上盖子，将其放置于 37°C 温箱中培养，恒温孵育 40 min~1 h。

(9) 取出细胞版，弃去其中液体，再次用巴氏吸管吸取少量 PBS，缓慢贴壁加入，将细胞冲洗三遍，轻轻倒扣吸干液体。

(10) 加入与一抗等量的 FITC 荧光标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗，盖上黑盖子，置于 37°C 恒温培养箱中，避光孵育 45 min~1 h。

(11) 取出培养板，用巴氏吸管吸取少量 PBS，冲洗三遍，倒扣吸干液体。

(12) 向细胞培养板中滴加少部分 50% 甘油，用荧光显微镜观察试验结果，统计细胞病变孔数。

(13) 计算中和效价：采用 Reed-Mench 两氏法进行计算，求得所制备卵黄抗体的中和效价。

2.2.4.3 物理性状检测

用移液器吸取 4 mL 卵黄抗体，转移于 5 mL 提前灭好菌的离心管中，在室温条件下静置 20 min，观察所制备的卵黄抗体溶液的物理状态和透明度。

2.2.4.4 保存期检验

提前准备好聚乙烯瓶，向其中加入适量的卵黄抗体，分别放在-20℃、4℃、37℃不同温度条件下进行储存，保存一段时间后，每隔 30 天对所制备的卵黄抗体进行一次检验。

2.2.4.5 安全性检测

选取 10 只大小、精神状态相同的刚出壳的 1 日龄健康雏鸡，腿部肌肉注射卵黄抗体于雏鸡，0.5 mL/只，同等条件下饲养，保证饲料饮水充足，环境适宜、温度恒定，观察 10~14 d，看是否有不良反应出现。

2.2.4.6 卵黄抗体的相对分子量分析

使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对所制备的鸡卵黄抗体(IgY)的蛋白浓度进行测定。操作如下：

(1) 根据试剂使用说明配制 BCA 工作液，按照 A 液（BCA 碱性溶液）：B 液（硫酸铜溶液）=50:1 的体积比配制一定量 BCA 溶液，吹打混匀，做到现配现用。

(2) 取 10 μL BSA 标准品，用 PBS 将其稀释至 100 μL ，使终浓度为 0.5 mg/mL，向 96 孔板中依次加入 0、1、2、4、6、8、10 μL 蛋白标准品，并用 PBS 将每孔补充到 20 μL 。蛋白标准品的浓度依次为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg·mL⁻¹。

(3) 将待测样品进行倍比稀释，分别将卵黄抗体做四个稀释度，按照 2¹~2⁴ 进行倍比稀释，分别取 20 μL 加入到 96 孔板中。

(4) 分别吸取 200 μL BCA 工作液，加入待测样品孔和蛋白标准品孔，于 37℃ 静置 30 min。

(5) 用酶标仪空气调零，吸光度设置为 A562 nm，记录好数据，测定光度值。

(6) 将所得结果转入表格绘制标准曲线，根据公式计算出样品的蛋白含量。

2.2.4.7 卵黄抗体相对纯度分析

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测所制备的卵黄抗体纯度，脱色结束后用蛋白照胶仪观察分析结果并拍照保存。

① SDS 凝胶配制

(1) 装板：在保持水平的桌面上放置好制胶架，用去离子水将玻璃制胶板冲洗干净，吹干之后使用，将 1.0 mm 玻璃制胶板下端平行对齐，放在制胶架上，配胶之前先加水测试一下所安装好的装置是否漏水，保证不漏水方可使用，以防止胶液从玻璃板的底部漏出。

(2) 凝胶的制备按照索莱宝公司的 SDS 蛋白凝胶试剂盒说明进行配制，配制体系如下表 9。

表 9 SDS-PAGE 蛋白凝胶配制体系

Table 9 SDS-PAGE protein gel preparation system

10% 分离胶 体积	10% Separating gel volume
ddH ₂ O	4.17
30% Arc.bis	3.33
SDS-PAGE Separating Gel Buffer	2.5
10% APS	0.1
TEMED	0.004

分离胶配制完成后，吹打混匀后，滴入两层玻璃板之间的缝隙，到滴加至分离胶与浓缩胶的交界线停止滴加。在胶的上层滴加少量去离子水，以压齐胶面并赶走其中的气泡。静置大约 35min 之后，胶完全凝固，倒掉胶上方的去离子水，再用滤纸小心吸干残留的液体，避免破坏胶块。

表 10 浓缩胶配制体系

Table 10 Reaction system of stacking gel

5% 浓缩胶 体积	Stacking gel volume
ddH ₂ O	2.28
30% Arc.bis	0.68
SDS-PAGE Separating Gel Buffer	1
10% APS	0.04
TEMED	0.004

将配制好的浓缩胶充分混匀之后，迅速将其注入分离胶的上层，立即在上层插上梳子，注意梳子的位置不要歪或者倾斜，经过大约 40 min 之后，浓缩胶完全凝固，制胶过程完成。

② 电泳

分离胶和浓缩胶配制完之后，室温放置 30 min，待胶凝固后，从制胶板上将凝胶取下来，放入电泳槽内，安装好，向其中加入 1×SDS 电泳液，在电泳液中轻轻将梳子拔掉，取 10 μ L 样品、5 μ L 蛋白 MarKer 进行点胶，设置好电泳程序，将浓缩胶的电压设置为 80 V，30 min，分离胶时的电压设置为 120 V，90 min。在整个电泳过程从始至终要保持电压的恒定，当指示剂移动到距离底部还有 1~2 cm 的距离时就可以停止电泳，电泳运行大约为 2 h。

③ 染色与脱色

电泳结束之后，关闭电源，将胶板取出，把装有 SDS 凝胶的两块玻璃板轻轻掀开，将胶块取出，提前在染色盒中加入 0.25% 的考马斯亮蓝染液，然后将胶块放入染色盒中，在摇床上染色 40 min，染色结束之后，将染色液倒掉，用流水对胶块进行冲洗，冲洗 3~4 次，再加入脱色液，在脱色摇床脱色 1 h 后，将脱色液弃去，再加入脱色液进行过夜脱色，直到能够在蛋白照胶仪上可以观察到清晰的蛋白质条带为止。

2.2.5 动物实验

2.2.5.1 卵黄抗体对 REV 垂直传播的作用

(1) 购买 SPF 鸡胚，7 胚龄时卵黄囊攻毒 300 TCID₅₀/只，21 胚龄出壳后，打翅标，构建垂直传播模型，采取抗凝血筛选阳性鸡，分垂直传播组和卵黄抗体治疗垂直传播组两组，每组 14 只鸡。

(2) 治疗实验。2 d 时卵黄抗体治疗垂直传播组肌肉注射卵黄抗体 0.5 mL/只，两组相同条件下饲养。

(3) 持续观察治疗效果及排毒规律。分别在 7、14、21、28 d 采抗凝血、肛拭子，对采集的样品进行 RNA 提取，并进行实时荧光定量检测，检测其中的 REV 病毒载量，观察血液中病毒复制情况及肛拭子排毒规律，28 d 时称重，剖杀，计算免疫器官发育指数及免疫器官中病毒复制情况。分别在 1、7、14、21、28 d 用电子天平称量个体体重 (BW)，并在 28 d 时将各实验组鸡实施安乐死，取肝、脾、胸腺、法氏囊等免疫器官，称重，计算器官发育指数，计算公式：器官重量 (g) / BW (g) × 100%。剖杀后每只鸡取肝、脾、胸腺、法氏囊样品，提取脏器中的 RNA 后进行实时荧光定量 REV 病毒载量检测。具体

步骤参照 2.2.2。

2.2.5.2 卵黄抗体对 REV 水平传播的作用

(1) 购买 SPF 鸡胚，分水平传播组和卵黄抗体预防水平传播组两组，每组 8 只，2 d 卵黄抗体预防水平传播组腿部肌肉注射卵黄抗体 0.5 mL/只。

(2) 与 REV 阳性鸡同居感染。

(3) 持续观察治疗效果及排毒规律。分别在 7、14、21、28 d 采抗凝血、肛拭子，对采取的样品进行 RNA 提取，并进行实时荧光定量检测，检测其中的 REV 病毒载量，观察血液中病毒复制情况及肛拭子排毒规律，28 d 时称重，剖杀，计算免疫器官发育指数及免疫器官中病毒复制情况。分别在 1、7、14、21、28 d 用电子天平称量个体体重 (BW)，并在 28 d 时将各实验组鸡实施安乐死，同 2.4.1 操作。剖杀后每只鸡取肝、脾、胸腺、法氏囊样品，提取脏器中的 RNA 后进行实时荧光定量 REV 病毒载量检测。具体步骤参照 2.2.2。

2.2.5.3 卵黄抗体对 REV 的预防治疗作用

(1) 购买 SPF 鸡胚，分攻毒组和卵黄抗体预防治疗组两组，2 d 卵黄抗体预防治疗组腿部肌肉注射卵黄抗体 0.5 mL/只。

(2) 5 d 攻毒，腹腔注射 3000 TCID₅₀/只，相同条件下饲养。

(3) 持续观察治疗效果及排毒规律。分别在 7、14、21、28 d 采抗凝血、肛拭子，对采取的样品进行 RNA 提取，并进行实时荧光定量检测，检测其中的 REV 病毒载量，观察血液中病毒复制情况及肛拭子排毒规律，28 d 时称重，剖杀，计算免疫器官发育指数及免疫器官中病毒复制情况。分别在 1、7、14、21、28 d 用电子天平称量个体体重 (BW)，并在 28 d 时将各实验组鸡实施安乐死，同 2.4.1 操作。剖杀后每只鸡取肝、脾、胸腺、法氏囊样品，提取脏器中的 RNA 后进行实时荧光定量 REV 病毒载量检测。具体步骤参照 2.2.2。

表 11 动物实验分组治疗信息

Table 11 Group treatment information of animal experiment

分组	数量/只	7 胚龄	1 日龄	2 日龄	5 日龄	7、14、21、 28 日龄
垂直传播组	14	卵黄囊接毒	抗凝血	卵黄抗体（注射+口服）	/	采样、记录
卵黄抗体治疗组	14	卵黄囊接毒	抗凝血	/	/	采样、记录
水平传播组	8	卵黄囊注射生理盐水	/	/	与阳性鸡 同居感染	采样、记录
治疗水平传播组	8	卵黄囊注射生理盐水	/	卵黄抗体（注射+口服）	与阳性鸡 同居感染	采样、记录
攻毒组	8	卵黄囊注射生理盐水	/	/	攻毒	采样、记录
卵黄抗体预防组	8	卵黄囊注射生理盐水	/	卵黄抗体（注射+口服）	攻毒	采样、记录
检测指标	血液病毒载量、肛拭子排毒、体重变化、器官发育指数、器官中病毒载量、体液免疫水平检测					

3 结果与分析

3.1 REV 的增殖与定量

3.1.1 病毒滴度测定

统计 REV LN1201 株病毒液从 10^{-1} 到 10^{-10} 每一个稀释度在细胞上引起的细胞病变孔数目, 重复试验三次, 最终计算得出 REV LN1201 株病毒 $TCID_{50}$ 为 $10^{3.29}/100 \mu\text{L}$ 。

3.1.2 动物回归实验

将 REV 病毒液卵黄囊注射于 7 胚龄鸡胚, 鸡胚在感染 REV 后出壳率下降, 死胚、弱雏, 啄壳率低, 精神沉郁, 无法站立, 呈急性死亡, 而对照组雏鸡均表现正常。



图 1 动物回归实验结果

Fig. 1 Animal regression test results

3.2 建立荧光定量 PCR 检测方法

3.2.1 REV 阳性质粒标准品的制备

PCR 扩增产物经凝胶电泳分析显示, 在 162 bp 处可见目的基因条带 (图 2), 与预期结果相符。

质粒拷贝数(copies/ μL)

$$=[6.02 \times 10^{23} \times \text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}] / [660 \times (\text{载体长度} + \text{质粒长度})]$$

$$=[6.02 \times 10^{23} \times 187.70 \times 10^{-9}] / [660 \times (2696 + 162)]$$

$$=5.95 \times 10^{10} (\text{copies}/\mu\text{L})$$

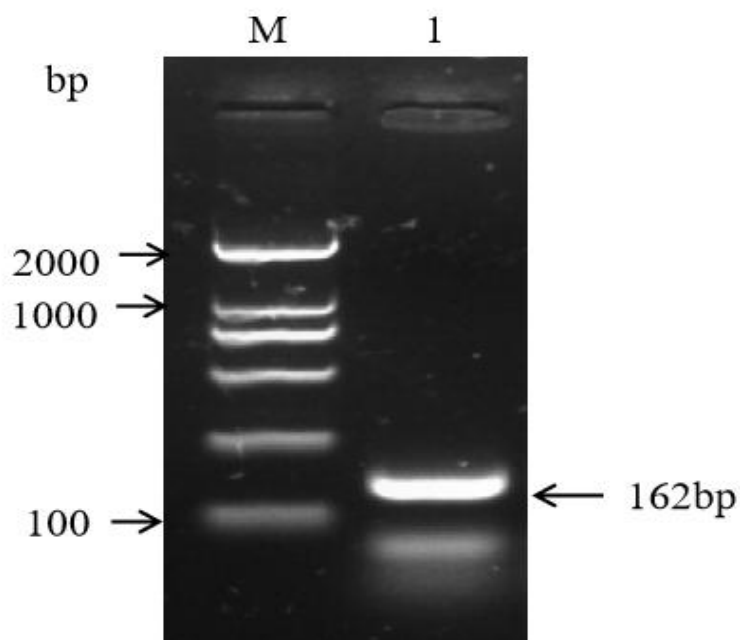
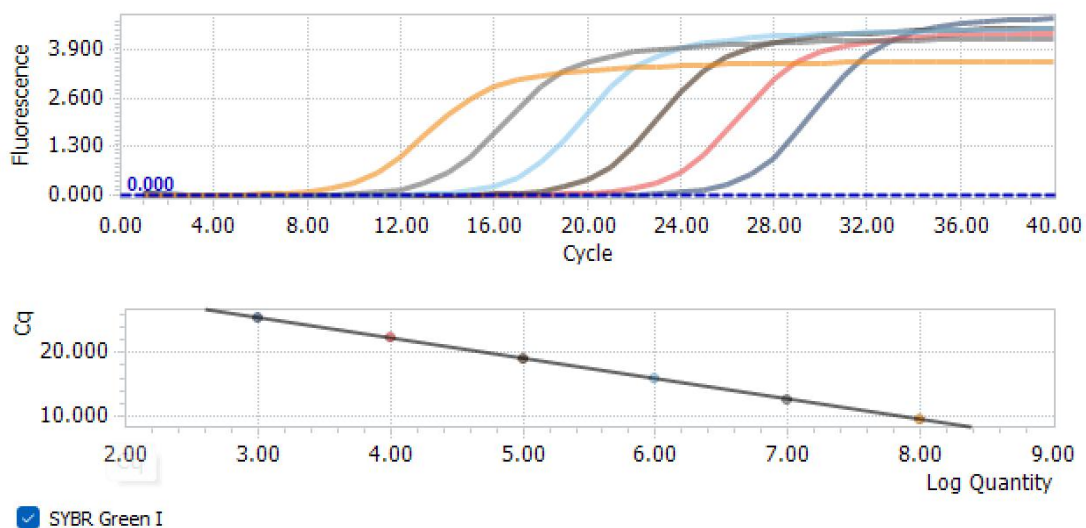


图2 菌液 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR test results of bacterial solution

3.2.2 荧光定量 PCR 体系的建立



Gene Name	None
Slope	-3.2509
Efficiency	2.03
Error	0.07
R ²	1.00
Y-Intercept	35.24

图 3 质粒标准品的标准曲线与扩增曲线

Fig. 3 Standard curves and amplification curves

构建的质粒标准品以 10 倍倍比稀释后,将浓度 10^2 copies/ μ L~ 10^7 copies/ μ L 6 个浓度梯度作为模板,进行荧光定量 PCR 反应,制作荧光定量标准曲线与荧光扩增曲线。

本研究建立的荧光定量 PCR 方法所得 REV 拷贝数 (x) 与 C_q 值 (y) 的方程为 $y = -3.2509x + 35.24$, $R^2 = 1$ 。质粒标准品浓度在 10^2 copies/ μ L~ 10^7 copies/ μ L 的区间内呈现出良好的线性关系。

3.3 卵黄抗体的检测

3.3.1 卵黄抗体 ELISA 效价检测

结果显示,分别稀释 50、100、200、250 倍后测得所制备卵黄抗体效价如下表 12 所示:

表 12 卵黄抗体的 ELISA 效价

Table 12 ELISA titer results of yolk antibody

REV 抗体滴度						
稀释倍数	50	100	200	250	阳对	阴对
滴度	19311	13195	8195	8054	2292	1

3.3.2 卵黄抗体中和效价检测

固定病毒-稀释卵黄抗体的中和实验法测定卵黄抗体的中和活性。

通过 Reed-Muench 法计算得到卵黄抗体的中和效价为 $10^{-3.58}/100 \mu$ L。

3.3.3 卵黄抗体物理性状检测

取 4 mL 抗体加于 5 mL 离心管中,在室温条件下静置 20 min,观察所制备抗体为

澄清透明浅黄色液体，未见有白色沉淀析出。



图 4 抗体物理性状检验

Fig. 4 Antibody physical property test

3.3.4 卵黄抗体保存期检验

通过检测卵黄抗体不同温度条件下储存的效价、物理性状等，发现 37℃ 条件储存的卵黄抗体在 2 个月后失去活性，而 4℃ 和-20℃ 条件下 4 个月之后仍具有活性，证明制备的卵黄抗体在 37℃ 条件下可以贮存 2 个月，在 4℃ 和-20℃ 条件下至少可以贮存 4 个月。

表 13 卵黄抗体保存期检验结果

Table 13 Results of yolk antibody retention period test

贮存时间/月	1	2	3	4
37℃	+	+	-	-
4℃	+	+	+	+
-20℃	+	+	+	+

注：“+”为阳性，“-”为阴性

Note: "+"represents positive, "-"represents negative

3.3.5 卵黄抗体安全性检测

在注射 0.5 mL 卵黄抗体后 1 h、14 d 内均未见有不良反应，剖检也未见有任何病变。

剖检发现，肝、脾、胸腺、法氏囊等脏器均无任何肉眼可见病变。说明 IgY 对雏鸡无副作用，安全性较高。



图 5 雏鸡注射抗体后精神状态

Fig. 5 Mental state of chicks after antibody injection

3.3.6 卵黄抗体的相对分子量分析

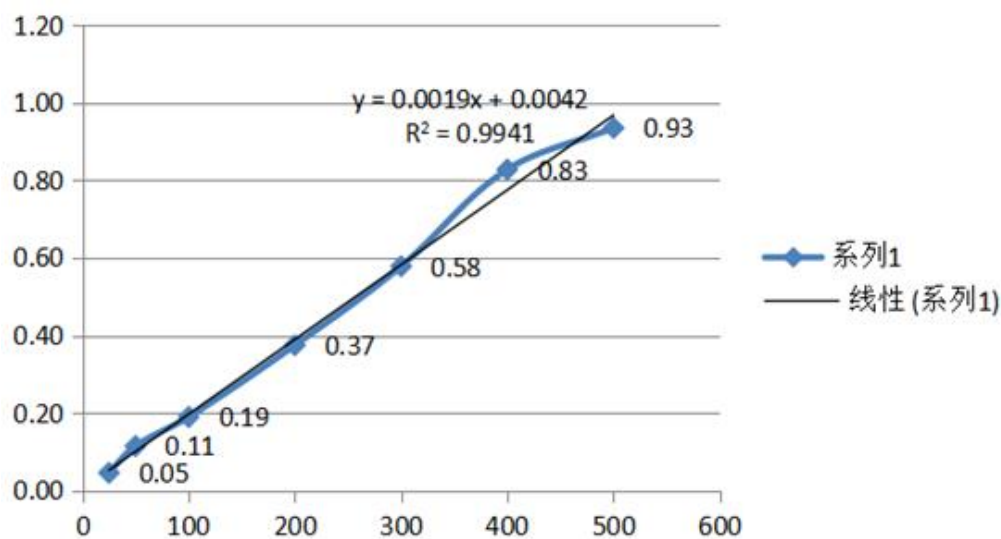


图 6 卵黄抗体蛋白含量结果图

Fig. 6 Result of yolk antibody protein content

BCA 法测定蛋白含量，得到的标准曲线线性方程为 $y=0.0019x+0.0042$ ， $R^2=0.9941$ ，根据线性标准曲线计算卵黄抗体蛋白含量，如图 6，可以发现，IgY 蛋白含量很高，浓

度为 $18.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3.7 卵黄抗体纯度分析

SDS-PAGE 电泳图可见所制备的卵黄抗体有清晰可见的两条带，大小分别为 65 kDa 和 30 kDa，这与文献报道 IgY 分子量为 180 kDa，重链大小约为 60~70 kDa，轻链大小约为 22~30 kDa 相一致，而且可见目的条带比较明显，这表明提取的卵黄抗体的纯度较高。

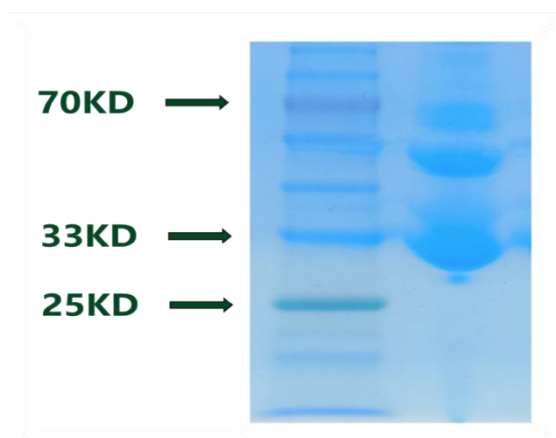


图 7 卵黄抗体 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE electrophoresis of yolk antibody

3.4 卵黄抗体对 REV 垂直传播的作用实验

3.4.1 卵黄抗体治疗垂直传播各组的死亡情况

攻毒治疗后各组死亡情况如表 14，攻毒出壳注射卵黄抗体后，攻毒后出壳率低，死亡率极高，卵黄抗体组治疗垂直传播组死亡率低于攻毒组，说明 REV 感染影响雏鸡的死亡，注射卵黄抗体可降低雏鸡感染 REV 后的死亡率。

表 14 垂直传播组死亡情况

Table 14 Death in the vertical transmission group

组别	免疫情况	攻毒情况	数量/只	死亡情况/只	死亡率	保护率
垂直传播组	无操作	7胚龄接种REV	14	8	57%	43%
垂直传播治疗组	2日龄肌肉注射卵黄抗体500 μL	7胚龄接种REV	14	5	35%	65%

3.4.2 不同日龄时治疗垂直传播各组血液的病毒复制情况

在从感染后每周采集的血液中分离血浆并提取病毒核酸后，参照 2.2.2 的实验步骤，通过荧光定量方法对各组鸡血液中的病毒拷贝数进行检测。感染 REV 后，两组鸡在孵化后 1 天通过荧光定量检测均能检测其血液中的病毒含量极高，呈阳性，垂直传播组病毒拷贝数在一定的时间内呈现上升的趋势，而卵黄抗体治疗垂直传播组病毒拷贝数则呈现下降趋势。整个试验过程中，垂直传播组血浆中的病毒拷贝数显著高于卵黄抗体治疗垂直传播组。虽然统计学差异不明显，但可以看出，注射卵黄抗体后减缓了血浆中病毒载量的升高。说明卵黄抗体有助于缓解 REV 的垂直传播。

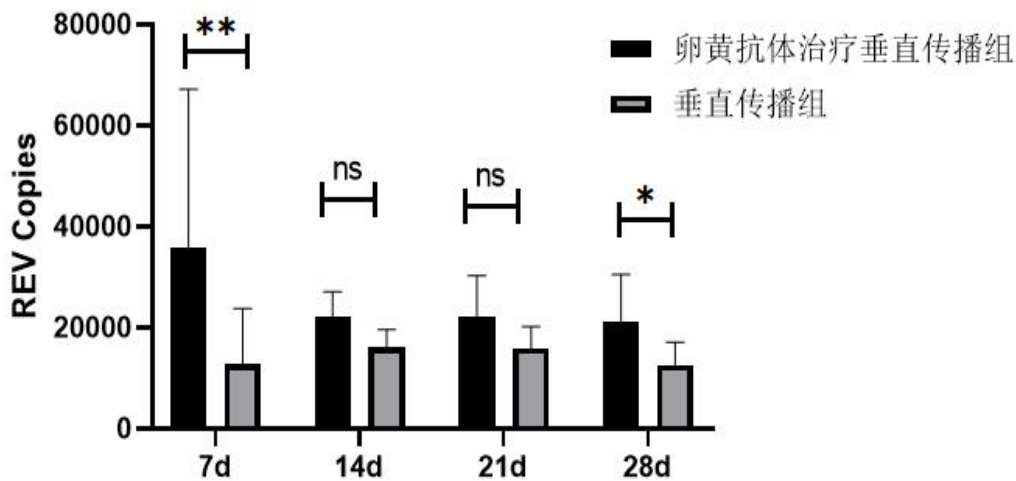


图 8 垂直传播组血液中病毒复制情况

Fig. 8 Viral replication in the blood of the vertical transmission group

3.4.3 不同日龄时治疗垂直传播各组肛拭子的排毒情况

根据 2.2.2 中的方法，从感染后每周采集的泄殖腔拭子中提取 RNA，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量检测方法对两组鸡肛拭子的排毒情况进行测定。攻毒治疗后雏鸡泄殖腔拭子病毒检测结果见图 9：整个试验期间，攻毒组与卵黄抗体治疗垂直传播组的试验鸡均可以检测到病毒阳性。在 SPF 鸡感染 REV 后，在泄殖腔中均可以检测到病毒抗原呈阳性的鸡。其中垂直传播组的鸡自出壳即开始向外界排毒，在第 21 天时达到排毒高峰，而卵黄抗体治疗垂直传播组的鸡在排毒过程中排毒量随时间缓慢变化，且在 21d 时排毒量降低。垂直传播组的泄殖腔阳性率以及排毒量发展趋势高于治疗组。虽然统计

学差异不明显,但可以看出,注射卵黄抗体后 21d 减缓了泄殖腔排毒量的升高。说明卵黄抗体有助于缓解 REV 的垂直传播。

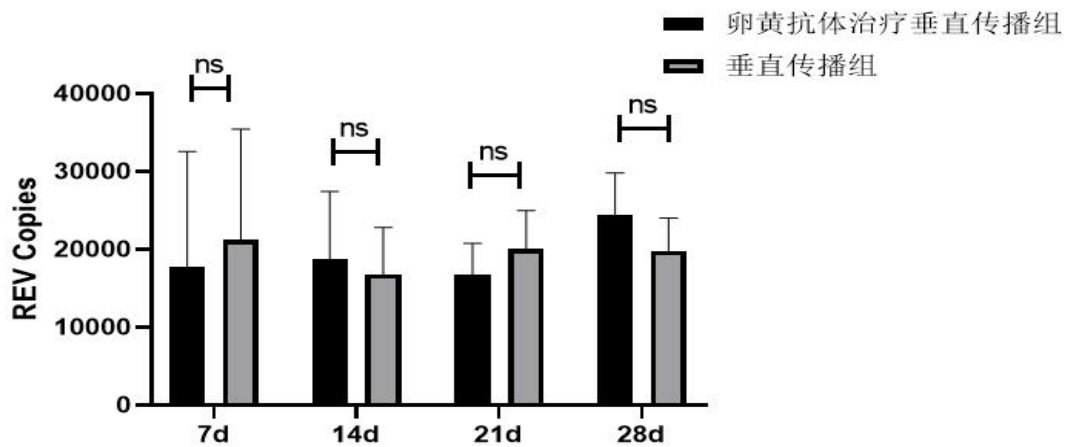


图 9 垂直传播组肛拭子排毒情况

Fig. 9 Anal swab detoxification in the vertical transmission group

3.4.4 28 日龄时垂直传播各组主要免疫器官发育指数

由图 10 可以看出,与垂直传播组相比,卵黄抗体治疗垂直传播组的脾脏肿大,而使用卵黄抗体治疗缓解了脾脏肿大。垂直传播组的法氏囊萎缩,而使用卵黄抗体治疗缓解了法氏囊萎缩。垂直传播组的胸腺萎缩,而使用卵黄抗体治疗显著缓解了胸腺萎缩 ($P < 0.01$)。

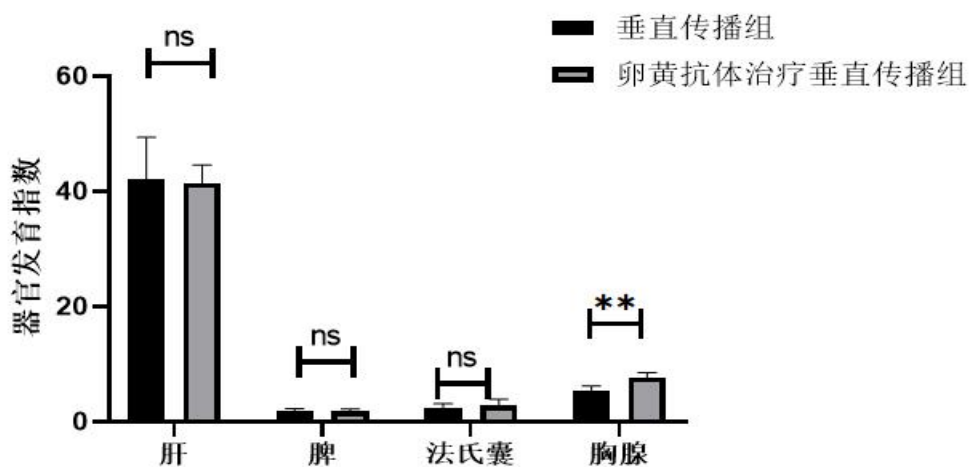


图 10 垂直传播组免疫器官发育指数

Fig. 10 Immune organ development index in the vertical transmission group

3.4.5 28 日龄时垂直传播组各脏器中 REV 病毒复制情况

按照 2.2.2 的方法将感染后 28 天剖杀，取免疫器官提取病毒 RNA 后，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量 RT-PCR 检测方法对各组免疫器官的病毒复制情况进行检测。攻毒治疗后雏鸡免疫器官病毒检测结果见图 11：在 SPF 鸡感染后，荧光定量 RT-PCR 均能在脏器中检测到病毒阳性。其中两组的鸡均法氏囊中病毒载量最高，脾脏中含量低。攻毒组的脏器中病毒载量略高于治疗组。可以看出，注射卵黄抗体后降低了脏器中病毒载量。说明卵黄抗体有助于缓解 REV 的垂直传播。（ $P < 0.05$ ）

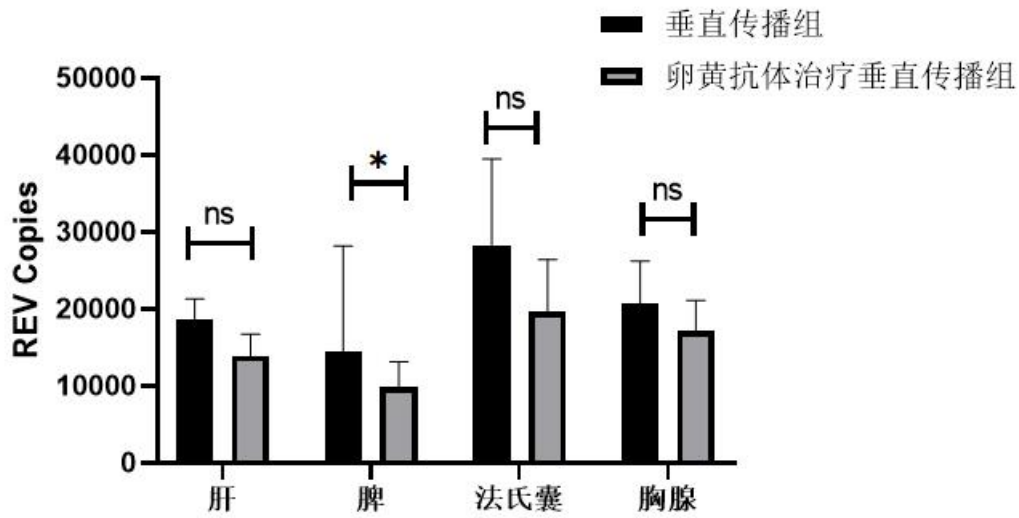


图 11 垂直传播组脏器中病毒载量

Fig. 11 Viral load in organs in the vertical transmission group

3.5 卵黄抗体对 REV 水平传播的作用实验

3.5.1 卵黄抗体治疗水平传播各组的死亡情况

注射卵黄抗体同居感染后各组死亡情况如表 15，出壳注射卵黄抗体后，卵黄抗体组预防水平传播组死亡率低于水平传播组，其中因为雏鸡攻毒前均为空白鸡，总体死亡率不高，说明注射卵黄抗体可降低雏鸡感染 REV 后的死亡率。

表 15 水平传播组死亡情况

Table 15 Deaths in the horizontal transmission group

组别	免疫情况	攻毒情况	数量/只	死亡情况/只	死亡率	保护率
水平传播组	无操作	与REV阳性鸡同居感染	8	1	12.5%	87.5%
水平传播预防组	1日龄肌肉注射卵黄抗体500 μ L	与REV阳性鸡同居感染	8	0	0%	100%

3.5.2 不同日龄时治疗水平传播各组血液的病毒复制情况

在从感染后每周采集的血液中分离血浆并提取病毒核酸后，参照 2.2.2 的实验步骤，通过荧光定量方法对各组鸡血液中的病毒拷贝数进行检测。SPF 鸡感染 REV 后，通过荧光定量检测到水平传播组鸡血液中的病毒含量极高，呈阳性，而卵黄抗体预防水平传播组无阳性鸡。整个试验期间，水平传播组血液中的病毒拷贝数显著高于卵黄抗体治疗垂直传播组。可以看出，注射卵黄抗体后防止了血浆中 REV 病毒载量。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的水平传播。（ $P < 0.0001$ ）

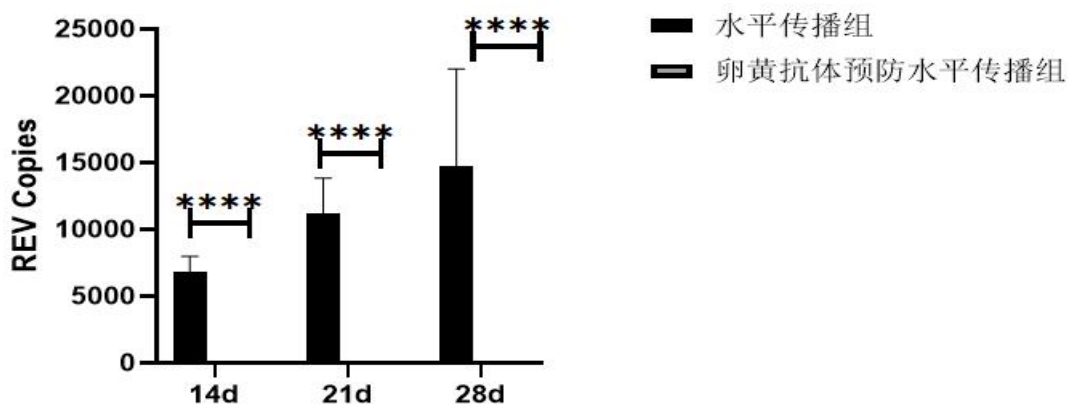


图 12 水平传播组血液中病毒复制情况

Fig. 12 Viral replication in the blood of the horizontal transmission group

3.5.3 不同日龄时治疗水平传播各组肛拭子的排毒情况

根据 2.2.2 中的方法，从感染后每周采集的泄殖腔拭子中提取 RNA，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量检测方法对两组鸡肛拭子的排毒情况进行测定。攻毒治疗后雏鸡泄殖腔拭子病毒检测结果见图 13：整个试验期间，通过荧光定量检测到水平传播组鸡肛拭子中的病毒含量极高，呈阳性，而卵黄抗体预防水平传播组无阳性鸡。同居感染组的泄殖腔阳性率以及排毒量显著高于治疗组。可以看出，注射卵黄抗体后防止了泄殖腔排毒量的升高。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的水平传播。（ $P < 0.0001$ ）

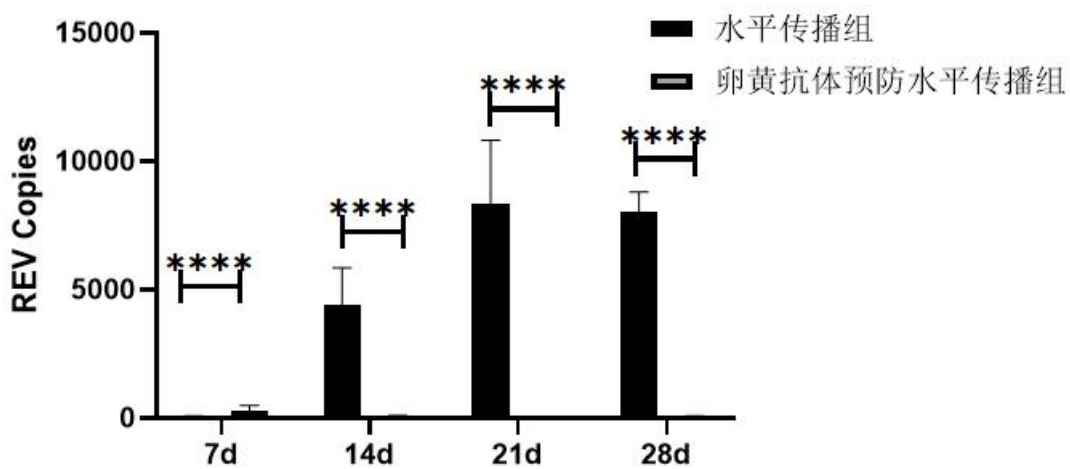


图 13 水平传播组肛拭子排毒情况

Fig. 13 Anal swab detoxification in the horizontal transmission group

3.5.4 28 日龄时水平传播各组主要免疫器官发育指数

由图 14 可以看出：与卵黄抗体预防水平传播组相比，REV 水平传播组的法氏囊萎缩，而使用卵黄抗体预防缓解了法氏囊萎缩。REV 水平传播组的胸腺萎缩，而使用卵黄抗体预防缓解了胸腺萎缩。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的水平传播。

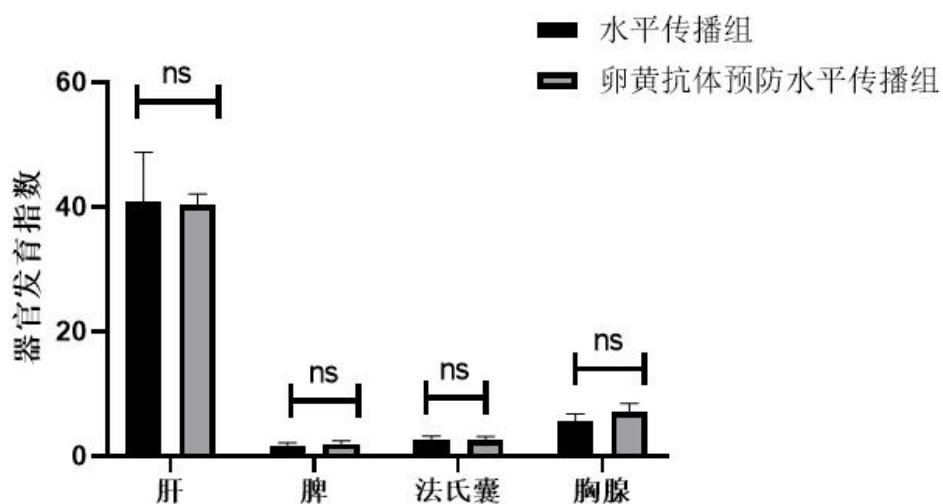


图 14 水平传播组免疫器官发育指数

Fig. 14 Immune organ development index in the horizontal transmission group

3.5.5 28 日龄时水平传播组各脏器中 REV 病毒复制情况

按照 2.2.2 的方法将感染后 28 天剖杀，取免疫器官提取病毒 RNA 后，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量 RT-PCR 检测方法对各组免疫器官的病毒复制情况进行检测。攻毒治疗后雏鸡免疫器官病毒检测结果见图 15：攻毒治疗后，荧光定量检测能够在水平传播组脏器中检测到阳性鸡。而使用卵黄抗体预防水平传播组中并无阳性鸡。可以看出，注射卵黄抗体后降低了脏器中病毒载量。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的水平传播。（ $P < 0.0001$ ）

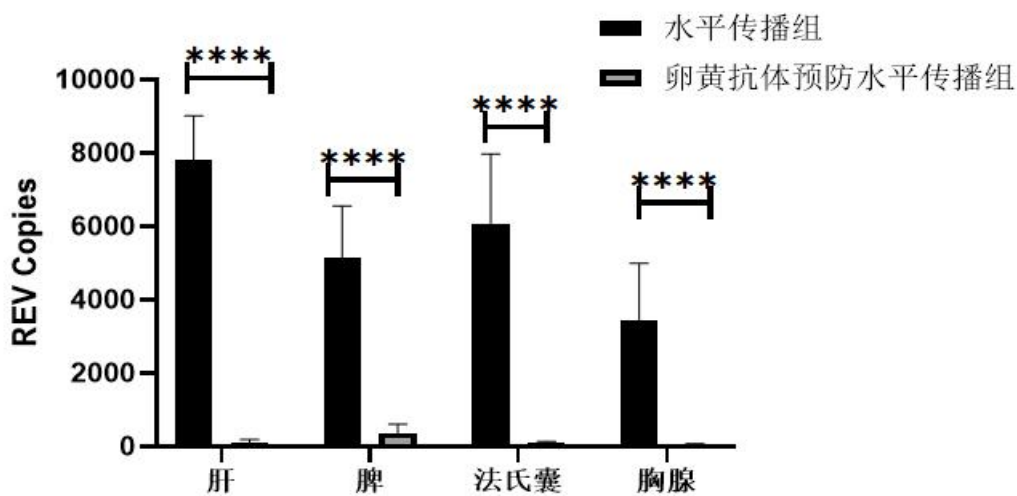


图 15 水平传播组脏器中病毒复制情况

Fig. 15 Viral replication in organs in the horizontal transmission group

3.6 卵黄抗体对 REV 的预防治疗作用实验

3.6.1 卵黄抗体预防治疗各组的死亡情况

注射卵黄抗体腹腔注射 REV 攻毒后各组死亡情况如表 16，出壳注射卵黄抗体后，卵黄抗体组预防治疗组死亡率低于水平传播组，其中因为雏鸡攻毒前均为空白鸡，总体死亡率不高，但攻毒后有部分鸡死亡，说明注射卵黄抗体可降低雏鸡感染 REV 后的死亡率。

表 16 预防治疗组死亡情况

Table 16 Deaths in the prophylactic treatment group						
组别	免疫情况	攻毒情况	数量/只	死亡情况/只	死亡率	保护率
REV攻毒组	无操作	5日龄腹腔注射REV500 TCID ₅₀ /只	8	2	25%	85%
卵黄抗体预防治疗组	1日龄肌肉注射卵黄抗体500 μL	5日龄腹腔注射REV500 TCID ₅₀ /只	8	0	0%	100%

3.6.2 不同日龄时预防治疗各组血液的病毒复制情况

在从感染后每周采集的血液中分离血浆并提取病毒核酸后，参照 2.2.2 的实验步骤，通过荧光定量方法对各组鸡血液中的病毒拷贝数进行检测。如图 16 所示：SPF 鸡感染 REV 后，通过荧光定量检测到攻毒组鸡血液中的病毒含量极高，呈阳性，而卵黄抗体预防治疗组无阳性鸡。整个试验期间，攻毒组血液中的病毒拷贝数显著高于卵黄抗体治疗组。可以看出，注射卵黄抗体后防止了血浆中 REV 病毒载量。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的传播。（ $P < 0.0001$ ）

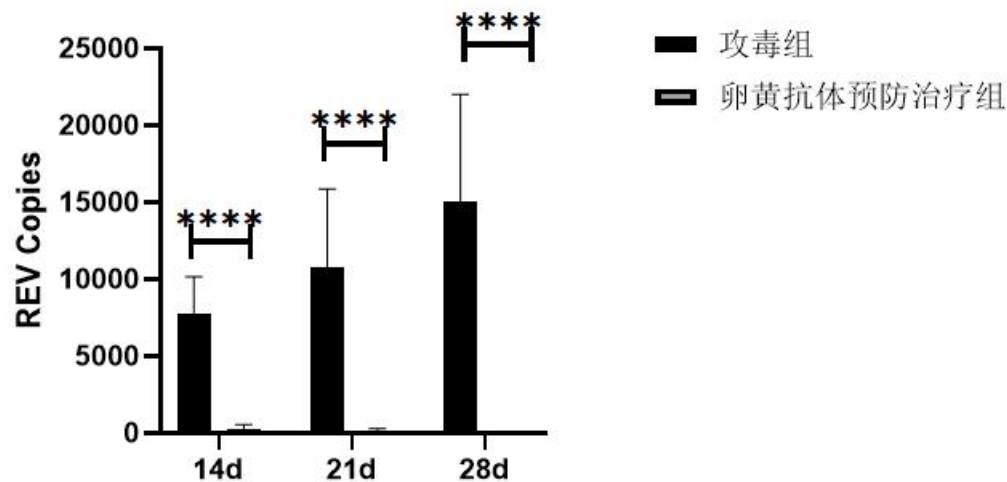


图 16 预防治疗组血液中病毒复制情况

Fig. 16 Viral replication in the blood of the prophylactic treatment group

3.6.3 不同日龄时预防治疗各组肛拭子的排毒情况

根据 2.2.2 中的方法，从感染后每周采集的泄殖腔拭子中提取 RNA，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量检测方法对两组鸡肛拭子的排毒情况进行测定。攻毒治疗后雏鸡泄

殖腔拭子病毒检测结果见图 17：整个试验期间，通过荧光定量检测到攻毒组鸡肛拭子中的病毒含量极高，呈阳性，而卵黄抗体预防治疗组无阳性鸡。攻毒组的泄殖腔阳性率以及排毒量显著高于预防治疗组。可以看出，注射卵黄抗体后防止了泄殖腔排毒量的升高。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的传播。（ $P < 0.0001$ ）

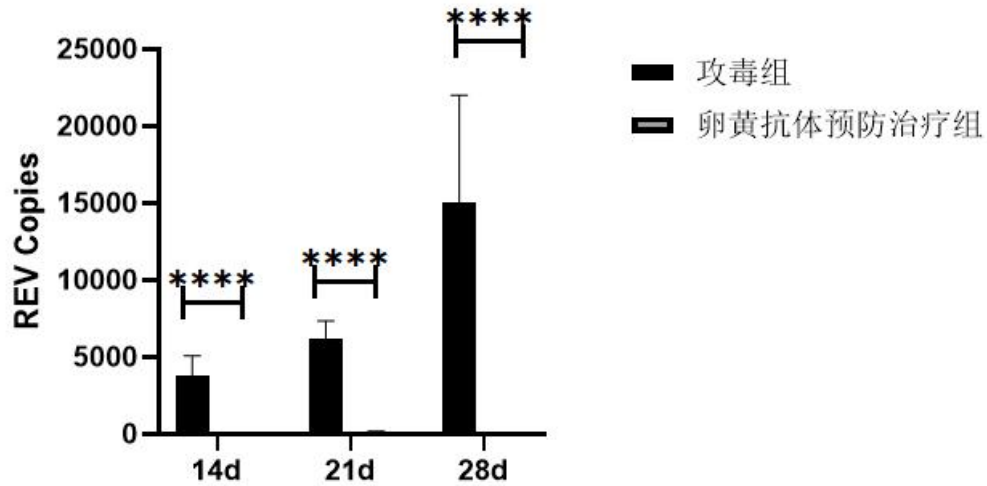


图 17 预防治疗组肛拭子排毒情况

Fig. 17 Anal swab detoxification in the prophylactic treatment group

3.6.4 28 日龄时预防治疗各组主要免疫器官发育指数

由图 18 可以看出：虽统计学分析差异不明显，但可发现，与攻毒组相比，REV 攻毒组的肝脏肿大，而使用卵黄抗体预防治疗缓解了肝脏肿大。REV 攻毒组的法氏囊萎缩，而使用卵黄抗体预防治疗缓解了法氏囊萎缩。REV 攻毒组的胸腺萎缩，而使用卵黄抗体预防治疗缓解了胸腺萎缩。由此可见，卵黄抗体有助于预防 REV 的传播。

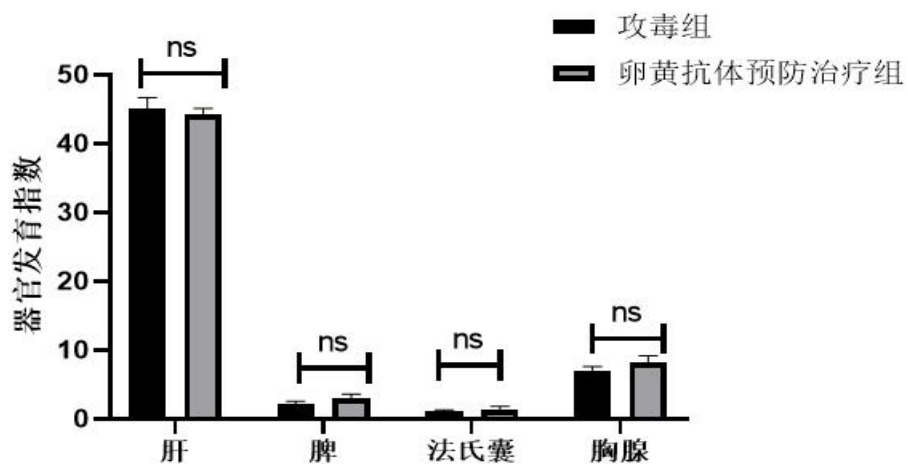


图 18 预防治疗组免疫器官发育指数

Fig. 18 Immune organ development index in the prophylactic treatment group

3.6.5 28 日龄时预防治疗各组脏器中 REV 病毒复制情况

按照 2.2.2 的方法将感染后 28 天剖杀，取免疫器官提取病毒 RNA 后，参照 2.2.2.11 步骤，通过荧光定量 RT-PCR 检测方法对各组免疫器官的病毒复制情况进行检测。攻毒治疗后雏鸡免疫器官病毒检测结果见图 19：攻毒治疗后，荧光定量检测能够在攻毒组脏器中检测到阳性鸡。而使用卵黄抗体预防组中并无阳性鸡。可以看出，注射卵黄抗体后降低了脏器中病毒载量。说明卵黄抗体有助于预防 REV 的传播。（ $P < 0.0001$ ）

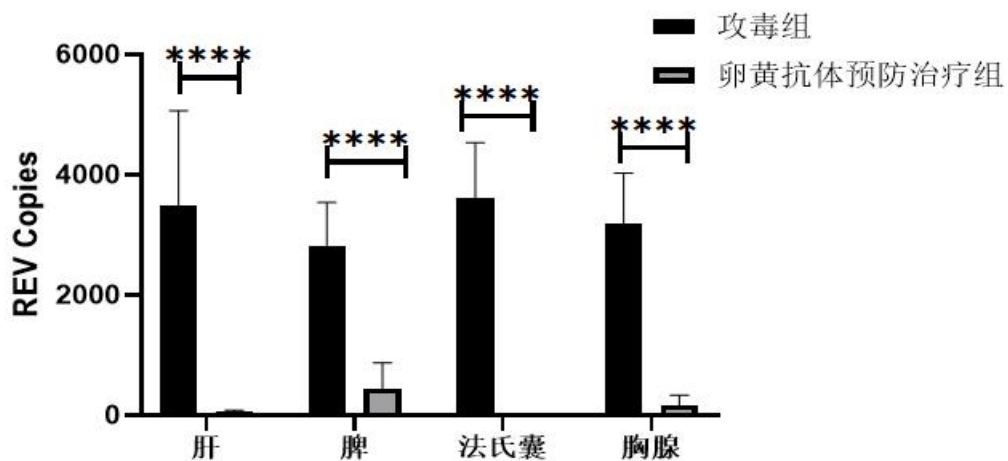


图 19 预防治疗组脏器中病毒复制情况

Fig. 19 Viral replication in organs in the prophylactic treatment group

4 讨论

RE 作为禽类病毒性肿瘤病之一，其广泛流行给家禽养殖业带来不可逆的重大经济损失。REV 易感染低日龄禽类，引起禽类免疫功能紊乱。目前尚无有效控制 RE 的方法。该病所造成的损失也越来越严重。卵黄抗体对各种动物病毒性疾病的作用越来越受到重视，在疫病的诊断、预防与治疗中的作用也越来越重要。因此，本研究通过制备与使用卵黄抗体来探索卵黄抗体用于治疗 RE 的可行性，为临床防控 RE 提供技术指导。

4.1 卵黄抗体的发展

本课题之所以选择制备抗 RE 的卵黄抗体，是考虑到卵黄抗体的诸多优势。首先是抗体的收集与传统的方法不同，是非侵入性的（陈红秀等，2021）。传统的方法通常是

为了收集足够的血液来获得抗体而对动物有不同程度的伤害，甚至会导致动物死亡，而在蛋鸡中产生抗体只需要收集鸡蛋，从动物福利角度看是有益的（方红君等，2016）。其次卵黄抗体的生产成本低廉，产出高效。母鸡的饲养成本低且可以大规模饲养，进一步减少了生产成本；一只母鸡一年有 300 颗鸡蛋的产出，其中每颗鸡蛋约含有 100 mg 左右的卵黄抗体（Rose *et al.*, 1974）。虽然根据提取方法的不同，提取效率也有所差异，但总基数越大代表产出相应也会越高效。最后，卵黄抗体既安全又稳定。安全性是 IgY 优于哺乳动物 IgG 的主要优势，IgY 比 IgG 更安全，因为它们不与人 Fc 受体结合或固定哺乳动物补体成分，因此不会触发潜在危险的免疫应答（李环等，2022）。

目前，已有多例成功制备卵黄抗体用于疾病治疗的应用。李建（李建等，2013）制备了抗新城疫病毒特异性卵黄抗体，注入动物体内，观察发现，在治疗新城疫病毒感染时（薛晓阳，2012），试验动物的存活率达到了 100%，治愈率可高达 90%，对新城疫的治疗表现出极高的价值。众多临床试验均表现出极高的存活率和治愈率，为卵黄抗体的临床研究提供了较高的应用价值，具有良好的应用前景。在鸡 I 群禽腺病毒治疗中（杨秉烨，2023），使用卵黄抗体治疗后的保护率均达到了 100%，治愈率也在 80% 以上，能够有效预防和治疗疾病的传播蔓延。

4.2 卵黄抗体的制备与检测

本研究通过进行细胞传代，细胞状态良好且生长至 60~80% 时对细胞进行攻毒，换液后维持一段时间，离心收取上清液获取扩增病毒液，并通过 RT-PCR 方法，成功扩增出与阳性对照大小相符目的条带，其中 RE 的目的条带为 162 bp，通过对目的片段进行测序分析及攻毒后临床症状，确定扩增的病毒为 REV。将弗氏佐剂和 RE 病毒液 1:1 比例混合制备病毒灭活苗免疫产蛋鸡。采用颈部皮下注射和胸部肌肉注射相结合的免疫方法，共免疫 4 次。免疫蛋鸡后，收集鸡蛋，提取卵黄抗体。参考 2009 年赵玉龙等用牛病毒性腹泻优势毒株免疫产蛋鸡，结果表明卵黄抗体在预防和治疗牛病毒性腹泻有明显效果（赵玉龙等，2009）。

Ig Y 提取及分离纯化的第一步是鸡蛋的处理，收集卵黄，然后逐步去除脂类，收集蛋白质，最后经分离纯化，获得较高纯度的 Ig Y。目前卵黄的收集方法可以为冻融法、透析法、超临界流体提取法、盐析法、超滤法、介电泳技术、双向凝胶电泳技术等 7

种方法。国内学者向冬梅等（向东梅等，2020）通过对辛酸法、水稀释法、氯仿法、硫酸铵沉淀法、聚乙二醇法等五种方法进行比较，发现其提取效率分别为：96.00、89.11、155.50、65.34、46.00 mg/mL，研究认为聚乙二醇法的提取效率更高。国内学者高岭等（高岭等，2015）在研究中使用辛酸法、超滤法、盐析法进行比较发现，使用硫酸铵盐析法的提取效率最高。

本试验通过聚乙二醇法对卵黄抗体进行提取，之后对制备的卵黄抗体进行了 SDS-PAGE 鉴定和蛋白含量的测定。凝胶结果显示有两条链，大小分别为 65 kDa 和 25 kDa，和已知的卵黄抗体重链为 60~70 kDa，轻链分子量为 22~30 kDa 一致。BCA 蛋白定量法在蛋白定量测试上具有方便迅速、稳定可靠等特点，蛋白含量测定可在 10~2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围内，这和李环等关于卵黄抗体理化性质的实验结论相符（李环，2022）。BCA 法测定蛋白含量有很高的准确性，不受其他物质的干扰，该方法可用于检测不同种类的蛋白质，而且基本不产生变异，因此成为蛋白定量的经典方法之一。测得蛋白含量为 18.68 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，低于刘志艺等研究中的 40.76 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，造成这种差异的原因可能与免疫原的种类和提取方法的不同有关（刘志艺等，2021）。

将制备的卵黄抗体稀释 50、100、200、250 倍后用 ELISA 试剂盒检测效价，发现所制备的卵黄抗体具有较高的效价，且随着稀释倍数的增加，效价也随之降低。将所制备的卵黄抗体纯化除菌后按照 $2^1\sim 2^{10}$ 进行梯度稀释后和稀释为 100 TCID₅₀ 的 RE 病毒液混合均匀，接种在 MDBK 细胞上进行中和实验，72h 后观察并记录细胞病变数，中和试验结果得出，所制备 IgY 的浓度为 $10^{-3.58}/100\ \mu\text{L}$ 。综上可得，本实验中和研究的结果表明卵黄抗体具有一定的中和活性，可用于动物实验。且动物注射后 12 h、14 d 后均无不良反应，剖检也不见任何病变，证明所制备的卵黄抗体安全性高。成功制备了稳定性强、安全性高的高价卵黄抗体。

4.3 卵黄抗体临床应用效果

卵黄抗体稳定性强，作用快，在攻毒治疗试验中，给雏鸡注射 0.5 mL/只卵黄抗体对 REV 的保护率达到 65%，减缓了血液和脏器中病毒载量的升高；当雏鸡感染 REV 后，注射卵黄抗体组血液、肛拭子和免疫器官中病毒载量呈下降趋势，未注射组卵黄抗体组病毒拷贝数随时间不断上升，且卵黄抗体治疗垂直传播组在攻毒后 7 d 血液中病毒载量

由极显著高于垂直传播组 ($P < 0.01$) 变为攻毒后 21 d 显著高于垂直传播组 ($P < 0.05$), 且免疫器官发育指数可看出注射卵黄抗体后抑制了垂直传播后胸腺和法氏囊的萎缩 ($P < 0.01$), 由于垂直传播, 病毒已在体内复制, 注射卵黄抗体后不可能完全清除病毒, 说明注射卵黄抗体治疗可缓解 REV 的侵害。在攻毒保护试验和预防保护试验中的预防保护率均能达到 100%, 同时保护效果也是最好的, 均预防了 REV 的传播, 且生长状况良好。雏鸡同居感染预防试验结果显示, 当雏鸡在 1 日龄腿部肌肉注射卵黄抗体后, 血液、肛拭子和免疫器官中均未检测到 REV 病毒阳性, 而未注射卵黄抗体组中出现了阳性鸡, 卵黄抗体预防水平传播组中血液中病毒载量极显著低于水平传播组 ($P < 0.0001$), 泄殖腔排毒情况也可发现卵黄抗体预防水平传播组中病毒复制情况极显著低于水平传播组 ($P < 0.0001$), 同时, 卵黄抗体预防水平传播组中脏器中病毒载量也极显著低于水平传播组 ($P < 0.0001$), 与血液和肛拭子保持一致, 且注射卵黄抗体后抑制了胸腺和法氏囊的萎缩, 证明所制备卵黄抗体可以有效预防 REV 的水平传播。雏鸡预防保护试验结果显示, 当雏鸡在 1 日龄时腿部肌肉注射 0.5 mL 卵黄抗体后, 血液、肛拭子和免疫器官中均无 REV 阳性, 而攻毒组中出现了阳性鸡, 血液中病毒载量极显著高于卵黄抗体预防治疗组 ($P < 0.0001$), 泄殖腔排毒情况也可发现卵黄抗体预防治疗组中病毒复制情况极显著低于攻毒组 ($P < 0.0001$), 同时, 卵黄抗体预防治疗组中脏器中病毒载量也极显著低于攻毒组 ($P < 0.0001$), 且通过比较免疫器官发育指数, 卵黄抗体预防组的肝脏肿大、法氏囊、胸腺萎缩得到缓解, 证明卵黄抗体可以有效预防 REV 的侵害, 预防保护效果良好。

综上所述, 本研究以灭活后疫苗免疫鸡制备抗 REV 抗体。试验表明, 对雏鸡注射卵黄抗体治疗后, 对 SPF 鸡的 REV 感染有明显的保护作用, 提高了雏鸡的存活率, 降低了病毒载量。这项研究的发现可能为抗 REV-IgY 产品的开发奠定了新的基础。目前, RE 已经成为一种具有广泛流行性的疾病, 但是一直缺乏有效的防止措施, 给养殖业带来了巨大的经济挑战 (崔治中, 2010)。卵黄抗体从生产和提取上来说, 都具有特异性较强, 没有任何毒副作用、理化性质稳定、安全性好、均一性强的特异性抗体等特点 (李环, 2022)。除此之外, 鸡卵黄免疫球蛋白 (IgY) 作为一种控制细菌和病毒源传染病的手段, 与哺乳动物 IgG 相比, IgY 具有成本效益高、操作方便、产量高等优点 (薛晓阳, 2012)。和疫苗相比, 有较大优势, 同时也为 REV 的防治提供了一定程度上的技术支持, 具有一定的应用前景。但利用于规模化养殖中仍有一定缺陷, 比如实际生产中成本过大、

卵黄抗体的提纯过程还需进一步优化、以及卵黄抗体制备过程中可能会感染细菌病毒进而影响卵黄抗体在实际操作中的安全性。

5 结论

5.1 免疫高产蛋鸡后，成功制备高效价卵黄抗体，为澄清透明淡黄色液体，纯度高，测得卵黄抗体的中和效价为 $10^{-3.58}/100\text{ }\mu\text{L}$ 。

5.2 在动物实验中，卵黄抗体对 REV 的预防效果明显，可预防 REV 的水平传播，对 REV 的攻毒保护效果也很明显；相比预防效果，治疗垂直传播效果较差，但可缓解 REV 的垂直传播。

参考文献

- 陈红秀, 张小莺, 陈琛. 单克隆卵黄抗体技术研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(4):358-363.
- 陈仕龙, 陈少莺, 王劭. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定. 福建农业学报, 2011, 26(2):170-174.
- 陈丽娟, 张丽华, 李杰. 小分子抗体制备技术及临床应用进展. 实用医药杂志, 2014, 31(3):263-265.
- 陈海燕. 郑州地区鸡场禽白血病和禽网状内皮组织增殖症感染情况检测与分析. 中国动物传染病学报, 2021, 29(06):11-15.
- 陈小青. 抗犬瘟热卵黄抗体的制备及其初步评估. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- 崔治中, 孟珊珊, 姜世金, 魏建萍. 我国白羽肉用型鸡群中 CAV、REV 和 REOV 感染状况的血清学调查. 畜牧兽医学报, 2006(02):152-157.
- 崔治中. 我国鸡群中病毒性肿瘤病的流行动态及其防控措施. 中国家禽, 2010, 32(23):68-70.
- 邓小芸. 禽网状内皮组织增生症及其危害. 北方牧业, 2023(07):42.
- 刁有祥. 禽病学. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012.
- 丁雨善. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)卵黄抗体的研制. 南阳: 南阳师范学院, 2020.
- 方热军, 汤小鹏, 王清平. 卵黄抗体替代抗生素的作用机制及在养猪生产中的应用. 饲料工业, 2016, 37(01):1-6.
- 葛兆宏, 陆广富. 禽网状内皮组织增殖病病毒 PCR 及 RT-PCR 检测方法的研究和 p30 主要抗原域的原核表达. 中国预防兽医学报, 2006, (04):441-445.
- 高岭, 刘聚祥, 杨娜娜. 鸡卵黄抗体及其在养猪业中的应用研究进展. 动物医学进展, 2013, 34(5):110-114.
- 葛世坤, 吴饶, 简思杰, 刘祥. IgY 抗体技术研究取得系列进展. 中国科技产业,

2021, (9):74.

何宏虎, 陈溥言, 蔡宝祥. 禽网状内皮组织增殖病病毒的分离鉴定. 中国畜禽传染病, 1988(02):1-3.

胡杰, 骆永泉, 张步娴, 屈素洁, 尹彦文, 莫胜兰, 栗艳琼. 禽流感危害风险分析及防控策略. 上海畜牧兽医通讯, 2016(04):66-68.

胡瑞鸿. 抗 H 株小鹅瘟病毒卵黄抗体的研制与质量评估. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.

金文杰, 崔治中, 刘岳龙, 秦爱建. 传染性法氏囊病病料中 MDV、CAV、REV 的共感染检测. 中国兽医学报, 2001, (01):6-9.

雷天宇, 庄丽云, 郑新添. 禽网状内皮组织增生症病毒研究进展. 黑龙江畜牧兽医, 2022, (16):33-37+43.

李明亮, 冷超粮, 宋安东. 卵黄抗体的应用及纯化研究进展. 黑龙江畜牧兽医, 2018. (15):34-38.

李环. 牛肠道病毒 HN1817 株全基因组测序及其 VP1 蛋白表达和卵黄抗体的制备. 南阳: 南阳师范学院, 2022.

刘志艺. 抗鹅星状病毒和鹅细小病毒精制卵黄抗体的制备及应用. 北京: 中国农业科学院, 2022.

李天琪. 地方品系鸡群中 ALV 和 REV 感染的检测及其与疫苗外源病毒污染的关系. 泰安: 山东农业大学, 2015.

马超锋. 抗安氏隐孢子虫高免卵黄抗体(Ig Y)制备及其免疫保护和交叉保护性分析. 郑州: 河南农业大学, 2008.

苗馨元. 禽网状内皮组织增生症病毒抗原 ELISA 检测方法的建立与应用. 泰安: 山东农业大学, 2021.

宋扬. 鹅星状病毒的分离鉴定及其卵黄抗体的研制与质量评价. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.

- 孙秀花. 特异性卵黄抗体活性片段的制备及性能研究. 大连: 大连理工大学, 2013.
- 孙心, 姜宇, 梁宛楠. 小鹅瘟病毒卵黄抗体的保存期试验. 兽医导刊, 2018, (11):74-75.
- 孙永林. 新型鹅星状病毒的分离鉴定及卵黄抗体的制备与应用. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- 宋扬, 于镭, 梁宛楠, 李倩. 鹅星状病毒卵黄抗体的制备及安全性、免疫效力研究. 饲料博览, 2021, (09):22-27.
- 吴博, 王爽, 樊兴冬, 刘宇, 李丹, 史同瑞. 不同方法提取卵黄抗体效果的比较. 中国兽药杂志, 2012, 46(06):42-45.
- 吴俊铭, 任晓峰, 邓小芸, 王笑梅. 禽网状内皮组织增生病诊断与防制研究进展. 畜牧兽医科技信息, 2011, 1671-6027.
- 汪六庆, 周银娣, 徐海红. 抗弓形虫腺苷激酶 IgY 的制备及理化性质的研究. 热带医学杂志, 2016, 16(08):958-961.
- 王芳, 付强, 姜胜男, 郭锐华, 周喻, 包斌, 吴文惠. 卵黄抗体的分子结构特征与免疫特性. 药物生物技术, 2016, 23(06):530-534.
- 王业华, 单春乔, 冯柳柳, 陆继爽, 李娟, 刘艳. 卵黄抗体在病毒性疾病防治中的应用. 动物医学进展, 2019, 40(07):120-124.
- 吴伟伟. 禽网状内皮组织增生症及防控. 畜牧兽医科技信息, 2019, 512(08):136.
- 向冬梅, 易思宇, 唐青海. 卵黄抗体五种提取工艺比较及初步应用. 湖北农业科学, 2020, 59(15):108-113.
- 王栋伟. 鸭病毒性肝炎三价卵黄抗体的制备与应用. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- 徐凤霞. REV 不同感染方式对 SPF 鸡的致病性及 I 型干扰素对 REV 的体内外抑制作用研究. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 薛晓阳. 鸡新城疫卵黄抗体的提取工艺及应用研究. 保定: 河北农业大学, 2012.

- 徐永平, 李晓宇, 尤建嵩. 特异性卵黄抗体替代抗生素防控动物疾病并保障食品安全. 大连: 大连理工大学, 2015.
- 徐永平, 徐乐, 李纪彬, 李彩霞, 李晓宇, 王丽丽, 李淑英. 卵黄抗体饲料添加剂在畜牧及水产养殖病害防控中的研究进展. 饲料工业, 2021, 42(18):1-11.
- 阎晓东, 张金坤. 法氏囊卵黄抗体使用效果的观察. 禽业科技, 1994, (6):14.
- 杨菊梅, 何永红, 马建忠, 周延峰, 周小春. 鸡卵黄抗体技术在 5 种草莓病毒快速检测中的应用. 兰州大学学报(自然科学版), 2021, 57(03):353-359+368.
- 杨秉桦. I 群禽腺病毒的分离鉴定和三价卵黄抗体的制备及应用. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 原宇. 鸽 I 型副黏病毒分离鉴定及其灭活疫苗和卵黄抗体制备. 咸阳: 西北农林科技大学, 2022.
- 张宁, 韩昱, 胡晓悦, 郭莉, 吴春英. 禽网状内皮组织增生症最新研究进展. 上海畜牧兽医通讯, 2017(03):16-18+21.
- Abbas A T., El-Kafrawy S A., Sohrab S S.. Ig Yantibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum VaccinImmunother*, 2019, 15(1):264-275
- Bose H.J.. Reticuloendotheliosis virus and disturbance in immune regulation. *Microbiol Sci*, 1984, (5):107-11.2
- Barth C.F. and Humphries E.H.. A nonimmunosuppressive helper virus allows high efficiency induction of B cell lymphomas by reticuloendotheliosis virus strain T. *J Exp Med*, 1988, 167(1):89-108
- Davidson I., Yang H., Witter R.L. and Malkinson M.. The immunodominant proteins of reticuloendotheliosis virus. *Vet Microbiol*, 1996, 49(3-4):273-284
- Bohls R.L., Collisson E.W., Gross S.L., Silvy N.J. and Phalen D.N.. Experimental infection of Attwater's/greater prairie chicken hybrids with the reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis*, 2006, 50(4):613-619

- Barbosa T., Zavala G., Cheng S. and Villegas P.. Pathogenicity and transmission of reticuloendotheliosis virus isolated from endangered prairie chickens. *Avian Dis*, 2007, 51(1):33-39
- Bi Y., Xu L., Qiu L., Wang S., Liu X., Zhang Y., Chen Y., Zhang Y., Xu Q., Chang G. and Chen G.. Reticuloendotheliosis Virus Inhibits the Immune Response Acting on Lymphocytes from Peripheral Blood of Chicken. *Front Physiol*, 2018, 9:4
- Da Silva MTL., Deodato RM., Villar LM.. Exploring the potential usefulness of IgY for antiviral therapy:A current review. *Int J Biol Macromol*, 2021, 189:785-791
- De Sanchez J.R., Parisi M.A. and Blanco N.S.. Malignant reticuloendotheliosis. *Arch Fund Roux Ocefa*, 1972, 6(3):217-221
- Delwart E.L. and Panganiban A.T.. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *J Virol*, 1989, 63(1):273-280
- Dornburg R.. Reticuloendotheliosis viruses and derived vectors for human gene therapy. *Front Biosci*, 2003, 8:d801-d817
- Dou L., Zhang Y., Bai Y.. Advances in Chicken Ig Y-Based Immunoassays for the Detection of Chemical and Biological Hazards in Food Samples. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(4):976-991
- Garry R.F., Shackleford G.M., Berry L.J. and Bose H.J.. Inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase by avian reticuloendotheliosis viruses. *Cancer Res*, 1985, 45(10):5020-5026
- Gandhi S., Alshehri SM.. Molecular stability of the rabbit and chicken egg yolk immunoglobulins. *Front Biosci*, 2021, 13:185-194
- Gutiérrez Calzado E., Cruz Mario E., Samón Chávez T., Vázquez Luna E., Corona Ochoa Z., Schade R.. Extraction of a monospecific coombs-reagent from chicken eggs. *Altex*, 2003, 20:21-25
- Hanson J. and Howell J.. Suspected reticuloendotheliosis in turkeys with cutaneous

- lesions reminiscent of fowl pox. *Can Vet J*, 1979, 20(6):161-164
- Han S., Wen Y., Yang F., He P.. Chicken immunoglobulin of yolk(IgY)protects mice against enterotoxigenic escherichia coli infection through improving intestinal health and immune response. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:662710
- Hauck R., Prusas C., Hafez H.M. and Luschow D.. Serologic response against fowl poxvirus and reticuloendotheliosis virus after experimental and natural infections of chickens with fowl poxvirus. *Avian Dis*, 2009, 53(2):205-210
- Jackson C.A., Dunn S.E., Smith D.I., Gilchrist P.T. and Macqueen P.A.. Proventriculitis, "nakanuke"and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys(HVT). *Aust Vet J*, 1977, 53(9):457-459
- Katayama I., Li C.Y. and Yam L.T.. Histochemical study of acid phosphatase isoenzyme in leukemic reticuloendotheliosis. *Cancer-Am Cancer Soc*, 1972, 29(1):157-164
- Karpala A.J., Morris K.R., Broadway M.M., McWaters P.G., O'Neil T.E., Goossens K.E., Lowenthal J.W. and Bean A.G.. Molecular cloning,expression,and characterization of chicken IFN-lambda. *J Interf Cytok Res*, 2008, 28(6):341-350
- Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., Roth TF.. Quantitation of maternal-fetal Ig G transport in the chicken. *Immunology*, 1985, 54:755-762
- Kubo N., Nishii M., Osada-Oka M., Hatta H.. A comparative study on egg yolk Ig Y production with different adjuvants and their inhibitory effects on staphylococcus aureus. *Poult Sci*, 2021, 58:192-199
- Lee KA., Chang SK., Lee YJ., Lee JH., Koo NS.. Acid stability of anti-helicobacter pyroli IgY in aqueous polyol solution. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 2002, 35:488-493
- Ludford C.G., Purchase H.G. and Cox H.W.. Duck infectious anemia virus associated with Plasmodium lophurae. *Exp Parasitol*, 1972, 31(1):29-38

- Lowenthal J.W., Digby M.R. and York J.J.. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interf Cytok Res*, 1995, 15(11):933-938
- Li K., Gao L., Gao H., Qi X., Gao Y., Qin L., Wang Y. and Wang X.. Protection of chickens against reticuloendotheliosis virus infection by DNA vaccination. *Vet Microbiol*, 2013, 166(1-2):59-67
- Lim Y., Yoon S.E., Cho J., Kim D. and Jung C.W.. Case Report of Erdheim-Chester Disease Successfully Treated with Pegylated Interferon: A Single-Center Experience. *Cancer Res Treat*, 2023
- Maldonado R.L. and Bose H.R.. Separation of reticuloendotheliosis virus from avian tumor viruses. *J Virol*, 1971, 8(5):813-815
- Mussman H.C. and Twiehaus M.J.. Pathogenesis of reticuloendothelial virus disease in chicks--an acute runting syndrome. *Avian Dis*, 1971, 15(3):483-502
- Mosser A.G.. Polypeptide composition of spleen necrosis virus, a reticuloendotheliosis virus. *J Virol*, 1975, 15(5):1088-1095.
- McDougall J.S., Biggs P.M. and Shilleto R.W.. A leukosis in turkeys associated with infection with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol*, 1978, 7(4):557-568
- Motha M.X. and Egerton J.R.. Influence of reticuloendotheliosis on the severity of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Vet Microbiol*, 1984, 9(2):121-129
- Mzula A., Masola S.N., Kasanga C.J. and Wambura P.N.. Existence of variant strains Fowlpox virus integrated with Reticuloendotheliosis virus in its genome in field isolates in Tanzania. *Trop Anim Health Pro*, 2014, 46(5):711-716
- Müller S., Schubert A., Zajac J.. Ig Yantibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutr J*, 2015, 14:109
- Mezouar S. and Mege J.L.. Changing the paradigm of IFN-gamma at the interface between innate and adaptive immunity: Macrophage-derived IFN-gamma. *J Leukocyte Biol*, 2020, 108(1):419-426

- Miao X., Wang Q.,Zhang Y., Chang S., Zhao P. and Wang Y.. Establishment of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting avian reticuloendotheliosis virus. *J Virol Methods*, 2022, 302:114476
- Paul P.S., Pomeroy K.A., Sarma P.S., Johnson K.H., Barnes D.M., Kumar M.C. and Pomeroy B.S.. Naturally occurring reticuloendotheliosis in turkeys:transmission. *Jnci-J Natl Cancer I*, 1976, 56(2):419-422
- Pereira EPV., van Tilburg MF., Florean EOPT.. Egg yolk antibodies(Ig Y)and their applications in human and veterinary health:A review. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73:293-303
- Payne L.N. and Venugopal K.. Neoplastic diseases:Marek's disease,avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Rev Sci Tech Oie*, 2000, 19(2):544-564
- Robinson F.R. and Twiehaus M.J.. Isolation of tha avian reticuloendothelial virus(strain T). *Avian Dis*, 1974, 18(2):278-288
- Ratnamohan N., Grimes T.M., Bagust. and Spradbrow P.B.. A transmissible chicken tumour associated with reticuloendotheliosis virus infection. *Aust Vet J*, 1980, 56(1):34-38
- Rice N.R., Hiebsch R.R., Gonda M.A., Bose H.J. and Gilden R.V.. Genome of reticuloendotheliosis virus:characterization by use of cloned proviral DNA. *J Virol*, 1982, 42(1):237-252
- Trampel D.W., Pepper T.M. and Witter R.L.. Reticuloendotheliosis in Hungarian partridge. *J Wildlife Dis*, 2002, 38(2):438-442
- Vega C., Bok M., Chacana P.. Egg yolk Ig Y: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 142(3-4):156-169
- Visan I.. Non-inflammatory IFN. *Nat Immunol*, 2017, 18(8):876
- Walker M.H., Rup B.J., Rubin A.S. and Bose H.J.. Specificity in the

- immunosuppression induced by avian reticuloendotheliosis virus. *Infect Immun*, 1983, 40(1):225-235
- Wilhelmsen K.C. and Temin H.M.. Structure and dimorphism of c-rel(turkey), the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T. *J Virol*, 1984, 49(2):521-529
- Weinstock D., Schat K.A. and Calnek B.W.. Cytotoxic T lymphocytes in reticuloendotheliosis virus-infected chickens. *Eur J Immunol*, 1989, 19(2):267-272
- Wei K., Sun Z., Zhu S., Guo W., Sheng P., Wang Z., Zhao C., Zhao Q. and Zhu R.. Probable congenital transmission of reticuloendotheliosis virus caused by vaccination with contaminated vaccines. *Plos One*, 2012, 7(8):e43422
- Wu R., Yakhkeshi S., Zhang X.. Scientometric analysis and perspective of Ig Ytechnology study. *Poult Sci*, 2022, 101(4):101713
- Zeigel R.F., Theilen G.H. and Twiehaus M.J.. Electron microscopic observations on RE virus(strain T)that induces reticuloendotheliosis in turkeys,chickens,and Japanese quail. *Jnci-J Natl Cancer I*, 1966, 37(6):709-729
- Zhang J.Y. and Bose H.J.. Acquisition of new proviral copies in avian lymphoid cells transformed by reticuloendotheliosis virus. *J Virol*, 1989, 63(3):1107-1115
- Zhou Z., Zhou R., Tang Z.. Effects of topical application of immunoglobulin yolk on mutans streptococci in dental plaque. *West China journal of stomatology*, 2003, 21: 295-297
- Zuo Y., Fan J., Fan H., Li T., Zhang X.. Prophylactic and therapeutic effects of egg yolk immunoglobulin against porcine transmissible gastroenteritis virus in piglets. *Frontiers of Agriculture in China*, 2009, 3:104-108