

分类号：S858.32

授予学位单位代码：10434  
学号：2022120598

山東農業大學

# 硕士学位论文

新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 蛋白单克隆抗体的制备

Preparation of Novel Monoclonal Antibody Against Duck  
Reovirus  $\sigma$ C Protein

姓名：韩明静

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：姜世金 教授

2024年5月26日

论文提交日期：2024年4月6日

论文答辩日期：2024年5月20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：黄金海

本研究由

山东省重点研发计划（2022CXGC010606, 2022CXPT005）

山东省家禽产业技术创新体系（SDAIT-11-03）

提供资助

## 符号说明

缩略词	英文全称	中文全称
Bp	Base pair	碱基对
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water	双蒸水
DEF	Duck embryonic fibroblast	鸭胚成纤维细胞
DF-1	Dermal fibroblast cells	鸡胚成纤维细胞
DHAV	Duck hepatitis A viral	鸭甲型肝炎病毒
DMEM	Dulbecco's modified eagle media	DMEM 培养基
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DTMUV	Duck Tembusu virus	鸭坦布苏病毒
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fatal bovine serum	胎牛血清
g	Gram	克
h	Hour	时
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光法
IgA	Immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
IgG1	Immunoglobulin G1	免疫球蛋白 G1
IgG2a	Immunoglobulin G2a	免疫球蛋白 G2a
IgG2b	Immunoglobulin G2b	免疫球蛋白 G2b
IgG3	Immunoglobulin G3	免疫球蛋白 G3
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
Ig $\kappa$	Immunoglobulin $\kappa$	免疫球蛋白 $\kappa$
Ig $\lambda$	Immunoglobulin $\lambda$	免疫球蛋白 $\lambda$
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -l-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Liter	升
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
M	Mol	摩尔

mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mM	Millimo	毫摩
NC	Nitrocellulose membrane	硝酸纤维素膜
OD	Optical density	光密度值
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
rpm	Round per minute	每分钟转数
s	Second	秒
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
μg	Microgram	微克
V	Volt	伏特
μL	Microliter	微升

---

# 目 录

1 前言.....	1
1.1 NDRV 的研究进展.....	1
1.1.1 NDRV 的形态特征.....	1
1.1.2 NDRV 的理化特性.....	1
1.1.3 NDRV 基因组结构.....	2
1.1.4 NDRV 的编码蛋白及其功能.....	2
1.2 NDRV 的流行病学.....	3
1.2.1 NDRV 的易感动物.....	4
1.2.2 NDRV 的传播途径.....	4
1.3 NDRV 的临床症状和病理变化.....	4
1.3.1 NDRV 的临床症状.....	4
1.3.2 NDRV 的病理变化.....	5
1.4 NDRV 的诊断、治疗和预防.....	5
1.4.1 NDRV 的诊断方法.....	5
1.4.2 NDRV 的治疗措施.....	7
1.4.3 NDRV 的预防方法.....	8
1.5 单克隆抗体技术的研究进展与应用.....	9
1.5.1 单克隆抗体的概述.....	9
1.5.2 单克隆抗体的研究进展.....	9
1.5.3 单克隆抗体的应用.....	10
1.6 研究的目的是和意义.....	11
2 材料与方法.....	12
2.1 材料.....	12
2.1.1 NDRV 病毒、质粒、细胞、实验动物.....	12
2.1.2 主要试剂和仪器.....	12
2.1.3 主要试验试剂的配制.....	13
2.2 方法.....	14
2.2.1 NDRV $\sigma$ C 基因的原核表达.....	14
2.2.2 单克隆抗体的制备.....	20
2.2.3 单克隆抗体特性的测定.....	25
3 结果.....	28
3.1 NDRV $\sigma$ C 蛋白的原核表达及纯化.....	28
3.1.1 NDRV $\sigma$ C 蛋白的扩增.....	28
3.1.2 pET-32a(+)- $\sigma$ C 原核表达载体的构建及鉴定.....	28

3.1.3 $\sigma$ C 蛋白的诱导表达、纯化与复性.....	29
3.1.4 目的蛋白浓度的测定.....	30
3.1.5 Western-Blot 特异性验证 .....	31
3.2 单克隆抗体的制备.....	32
3.2.1 最佳包被浓度和最佳血清稀释度的测定 .....	32
3.2.2 免疫小鼠血清效价的测定.....	33
3.2.3 细胞融合 .....	34
3.2.4 杂交瘤细胞的亚克隆.....	34
3.3 单克隆抗体特性的测定.....	35
3.3.1 单克隆抗体荧光性测定.....	35
3.3.2 单克隆抗体染色体数目鉴定.....	36
3.3.3 单克隆抗体特异性检测.....	36
3.3.4 单克隆抗体中和性检测.....	37
3.3.5 单克隆抗体腹水效价检测.....	39
3.3.6 单克隆抗体亚型鉴定.....	39
3.3.7 单克隆抗体稳定性检测.....	39
4 讨论.....	41
4.1 抗原的制备.....	41
4.2 单克隆抗体的制备.....	42
4.3 单克隆抗体特性检测.....	42
5 结论.....	44
6 参考文献.....	45

## 中文摘要

新型鸭呼肠孤病自 2005 年于中国东南地区出现后, 逐渐发病蔓延至全国, 给我国的水禽养殖业带来了巨大的经济损失。新型鸭呼肠孤病毒是由新型鸭呼肠孤病毒 (Novel Duck Reovirus, NDRV) 导致的鸭发育迟缓、免疫系统受损、腹泻下痢、肝脾出血, 有着高发病率和高死亡率, 能引起多个品种鸭子易感。单克隆抗体在疾病诊断和疾病防治方面发挥着重大的作用。NDRV  $\sigma$ C 蛋白与病毒的致病和感染机制相关, 具有良好的特异性和免疫原性, 能诱导机体产生特异性中和抗体, 还能参与细胞凋亡。本研究以原核表达的 NDRV  $\sigma$ C 蛋白作为免疫原免疫小鼠, 制备了抗  $\sigma$ C 蛋白的单克隆抗体, 为 NDRV 血清学检测方法的建立、抗原表位疫苗的研发、NDRV 致病机理的研究等奠定物质基础。

本实验将实验室分离保存的 NDRV N20 毒株接种于 9 日龄 SPF 鸭胚尿囊腔中, 进行病毒增殖, 并将原核表达的 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白纯化后作为免疫原, 接种 6~8 日龄 Balb/c 小鼠, 接种三次后检测血清效价, 加强免疫后三天进行小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合获得杂交瘤细胞, 经培养后通过间接酶联免疫吸附反应 (Indirect enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 和间接免疫荧光实验 (Indirect immunofluorescence Assay, IFA) 共筛选到 16 孔阳性杂交瘤细胞, 通过有限稀释法进行三次亚克隆, 最终获得四株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 DH3、DH7、AD11、DD10。

对四株单抗杂交瘤细胞株进行染色体检测, 经秋水仙素处理, 低渗处理后固定并用革兰氏染色后油镜下观察, 四株单克隆抗体杂交瘤细胞株染色体均在 100~110 条左右, 为小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞之和。将筛选到的阳性杂交瘤细胞进行体外扩大培养, 接种于 8~10 周龄提前经弗氏不完全佐剂致敏的雌鼠, 每只小鼠接种  $1 \times 10^6$  个杂交瘤细胞, 诱生 Balb/c 小鼠腹水, 进行单抗的大量制备和粗提。对获得的四株单克隆抗体进行抗体亚类鉴定, 四株单克隆抗体均为重链 IgG1 亚类, 轻链为 Ig $\kappa$  亚型。对腹水进行效价检测, 效价均为 1:51,200。IFA 检测结果表明, 四株单抗均能与 NDRV 发生特异性反应。用不同稀释倍数的单克隆抗体杂交瘤细胞培养上清液和病毒相互作用, 然后接种于鸡胚成纤维细胞 (Dermal fibroblast cells, DF-1), 结果显示 4 株不经稀释的杂交瘤细胞上清液中的抗体均可中和病毒, 阻止细胞产生病变。将单克隆抗体进行特异性鉴定, 以鸭甲型肝炎病毒 (Duck hepatitis A viral, DHAV)、鸭坦布苏病毒 (Duck

Tembusu virus, DTMUV)、NDRV 作为包被抗原进行荧光实验, 结果显示 4 株单抗均只与 NDRV 有特异性荧光反应, 与其他病毒无特异性荧光反应。

综上所述, 本研究成功制备了 4 株抗 NDRV  $\sigma$ C 蛋白的单克隆抗体, 并对这 4 株单克隆抗体进行了免疫荧光性、抗体效价、单抗亚型、病毒特异性、中和特性、染色体数目等特性鉴定, 为 NDRV 的检测、疫苗制备、致病机理研究等奠定了基础。

**关键词:** 新型鸭呼肠孤病毒,  $\sigma$ C 蛋白, 原核表达, 单克隆抗体

# Preparation of Novel Monoclonal Antibody Against Duck Reovirus $\sigma$ C Protein

## Abstract

The new type of duck reovirus appeared in southeast China in 2005, and gradually spread to the whole country, which brought huge economic losses to the waterfowl breeding industry in China. Novel Duck Reovirus (NDRV) caused by novel duck reovirus (NDRV) is developmental retardation, immune system impairment, diarrhea and liver and spleen hemorrhage in ducks with high morbidity and mortality. Monoclonal antibodies play an important role in disease diagnosis and prevention. NDRV  $\sigma$ C protein is related to the pathogenesis and infection mechanism of virus, has good specificity and immunogenicity, can induce the body to produce specific neutralizing antibodies, and can also participate in cell apoptosis. In this study, we immunized mice with prokaryotic expression of NDRV  $\sigma$ C protein as the immunogen, and prepared monoclonal antibodies against  $\sigma$ C protein, which laid a material foundation for the establishment of serological detection method of NDRV, the development of antigen epitope vaccine, and the study of the pathogenesis of NDRV.

In this experiment, the NDRV N20 strain isolated and preserved in the laboratory was inoculated into the allanac cavity of SPF duck embryo at 9 days of age for virus proliferation, and the prokaryotic expression of NDRV  $\sigma$ C protein was purified as an immunogen-inoculated Balb/c mice at 6~8 days of age for serum titer detection after three inoculations. Hybridoma cells were obtained by cell fusion of mouse spleen cells and mouse myeloma cells SP2/0 three days after immunization enhancement. After culture, Indirect enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) and Indirect immunofluorescence Assay (Indirect immunofluorescence Assay, A total of 16 positive hybridoma cells were screened and subcloned three times by limited dilution method. Finally, four hybridoma cell lines with stable antibody secretion were obtained, named DH3, DH7, AD11 and DD10, respectively.

The four monoclonal antibody hybridoma cell lines were treated with colchicine, fixed after hypotonic treatment, and observed under the oil microscope after gram staining. The chromosomes of the four monoclonal antibody hybridoma cell lines were about 100~110, which was the sum of mouse spleen cells and myeloma cells. The selected positive hybridoma cells were cultured in vitro and inoculated into 8 to 10 week-old female mice sensitized by Fri's incomplete adjuvant. Each mouse was inoculated with  $1 \times 10^6$  hybridoma cells to induce ascites

of Balb/c mice, and a large number of monoclonal antibodies were prepared and crude extracted. The four strains of monoclonal antibodies were identified as heavy chain IgG1 subclass and light chain Igk subtype. The titers of ascites were all 1:51,200. IFA assay results showed that all four strains could react specifically with NDRV. Hybridoma cells were cultured with different dilution ratios of monoclonal antibody and the virus interreacted, and then inoculated into Dermal fibroblast cells (DF-1). The results showed that the antibodies in the 4 undiluted hybridoma cells could neutralize the virus and prevent the cell from producing pathological changes. Specificity of the monoclonal antibody was identified, and Duck hepatitis A viral (DHAV), Duck Tembusu virus (DTMUV) and NDRV were used as coated antigens for fluorescence assay. The results showed that the four strains only had specific fluorescence reaction with NDRV, and had no specific fluorescence reaction with other viruses.

In summary, this study successfully prepared 4 monoclonal antibodies against NDRV  $\sigma$ C protein, and identified the immunofluorescence, antibody titer, monoclonal antibody subtype, virus specificity, neutralization, chromosome number and other characteristics of these 4 monoclonal antibodies, which laid a foundation for NDRV detection, vaccine preparation, and pathogenesis research.

**Key words: Novel Duck Reovirus,  $\sigma$ C Protein, Prokaryotic Expression, Monoclonal Antibody**

# 1 前言

呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 于 20 世纪 60 年代在人和动物肠道分离出, 分布范围极广, 可引起动植物多个种属患病 (徐宜等, 1978)。呼肠孤病毒 (Reovirus) 感染禽类可产生极大危害, 常见感染禽类的呼肠孤病毒有以下几种: 禽呼肠孤病毒 (Avian reovirus, ARV) 最早从澳大利亚一儿童粪便中分离出 (王全溪, 2004), 由于该病毒症状与呼吸道、肠道相关, 将其命名为呼肠孤病毒 (Schnitzer *et al.*, 1982), 可引起鸡病毒性关节炎, 腱鞘炎, 生长发育不良, 骨质疏松, 呼吸系统、消化系统疾病 (李斌, 2004)。具体症状受年龄品种和感染途径所影响 (刘红, 2008)。番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV), 引起病禽软脚症状, 肝脏出现白色坏死病灶, 不引起肝脏出血 (王劲, 2005)。鹅呼肠孤病毒 (Goose reovirus, GRV) 可引起雏鹅出血性坏死性肝炎, 关节炎, 跛行 (王光锋, 2004)。新型鸭呼肠孤病毒 (Novel Duck Reovirus, NDRV) 2005 年在我国东南等多个地区出现后, 2006 年在北京首次出现鸭呼肠孤病毒感染, 逐渐蔓延至全国, 造成了水禽养殖体系产值下滑, 对水禽养殖业造成了重大影响 (Li, 2016)。NDRV 引起多品种鸭肝、脾、心肌组织出血, 软脚, 精神沉郁, 排白色稀粪, 产蛋下降, 侵害免疫系统, 造成免疫抑制。

## 1.1 NDRV 的研究进展

### 1.1.1 NDRV 的形态特征

NDRV 属呼肠孤病毒科, 正呼肠孤病毒属, 双股 RNA 病毒 (朱英奇, 2014)。呼肠孤病毒粒子呈现六角核芯, 从核芯上排列着短圆柱样壳微体, 壳微体呈辐射状 (刘红, 2008)。NDRV 具有典型呼肠孤病毒的形态结构, 为二十面体对称结构、无囊膜、呈现球形、双层衣壳, 病毒粒子直径约为 60 nm~85 nm (徐宜等, 1978)。病毒粒子在胞浆中呈增殖, 呈晶格状或成堆、大量散在胞浆中 (袁远华等, 2012)。

### 1.1.2 NDRV 的理化特性

NDRV 抵抗力强, 耐高温, 在 37°C 条件下可生存 105 天左右, 在 50°C~60°C 能存活 6~8 h, 在 80°C 高温下能存活 1 h 以上 (辛海宁, 2023)。低温下可长时间保存, 在 -20°C 到 -80°C 可保存 4 年至 10 年之久 (毕庄莉, 2016)。低温下对氯仿、乙醚、5-氟脱氧尿苷

等试剂不敏感，对高温、3%甲醛溶液、0.5%有机碘敏感，对 PH 值 3~9 范围之间有一定耐受力（马明瑞等, 2022）。DNA 抑制物无法抑制 NDRV，没有血凝性，不能凝集鸡、鸭、鹅、鸽子的红细胞（袁远华等, 2012）。病毒在卵黄囊和绒毛尿囊膜生长增殖较好。能导致鸭胚成纤维细胞（Duck embryonic fibroblast, DEF）等细胞产生合胞体、细胞变形、空泡化、圆缩脱落等细胞病变（孙彦伟等, 1990）。

### 1.1.3 NDRV 基因组结构

NDRV 是分节段的 dsRNA，由长片段、中片段、短片段共 10 个 RNA 片段组成（方勤等, 2003），基因组总大小为 23419 bp，长片段包括 L1、L2、L3 和中片段包括 M1、M2、M3，小片段包括 S1、S2、S3、S4。

### 1.1.4 NDRV 的编码蛋白及其功能

根据基因编码蛋白的大小不同，由聚丙烯凝胶电泳的迁移率可将 NDRV 的编码蛋白分为 14 种（陆婧, 2023），L 组病毒基因编码  $\lambda$  蛋白,包括  $\lambda$ A,  $\lambda$ B,  $\lambda$ C 蛋白，M 组病毒基因编码  $\mu$  蛋白，包含  $\mu$ A,  $\mu$ B,  $\mu$ NS 蛋白，S 组病毒基因中 S1 基因节段编码了 P10, P18,  $\sigma$ C 蛋白，S2, S3, S4 基因节段分别编码了  $\sigma$ A,  $\sigma$ B, 蛋白。其中结构蛋白包括  $\lambda$ A,  $\lambda$ B,  $\lambda$ C,  $\mu$ A,  $\mu$ B,  $\sigma$ C, S2, S3, S4，非结构蛋白包括  $\mu$ NS,  $\sigma$ NS, P10, P18（刘红等, 2008）。各编码蛋白功能如表 1。

表 1 NDRV 编码蛋白及其生物学功能

Table 1 NDRV-encoded proteins and their biological functions

基因组片段	片段大小	编码蛋白	分布	主要功能
L1		$\lambda$ A	内衣壳	与病毒感染细胞有关
L2	大片段	$\lambda$ B	内衣壳	具有 RNA 聚合酶的功能活性
L3		$\lambda$ C	基质蛋白	参与 mRNA 5'端帽子结构的合成
M1		$\mu$ A	核上	含有 NTPase 活性位点
M2	中片段	$\mu$ B	外衣壳	与病毒侵入宿主的过程相关
M3		$\mu$ NS	非结构蛋白	与 $\alpha$ -螺旋卷曲的形成有关，推测其参与病毒的组装和复制
S1	小片段	$\sigma$ C	非结构蛋白	吸附细胞和产生型特异性的中和抗体
		P10	非结构蛋白	与诱导细胞融合有关

续表 1

基因组片段	片段大小	编码蛋白	分布	主要功能
		P18	外衣壳	可往返于细胞核和细胞质之间，可抑制宿主免疫反应
S2		$\sigma$ A	内衣核	参与禽呼肠孤病毒对干扰素抗病毒作用的抵抗
S3		$\sigma$ B	外衣壳	ARV 群特异性中和抗原成分之一
S4		$\sigma$ NS	非结构蛋白	可能参与病毒粒子早期组装

$\sigma$ C 蛋白是 NDRV 的重要蛋白质之一，由 S1 基因组第三个开放阅读框编码，全长 966 bp，能诱导机体产生特异识别功能的中和性抗体 (Bodelón *et al.*, 2001)， $\sigma$ C 蛋白可与 S3 基因组编码的  $\sigma$ B 蛋白共同引起动物机体感染。 $\sigma$ C 蛋白作为核衣壳蛋白，自身具有吸附功能，可辅助  $\sigma$ B 蛋白提高病毒侵袭和致病能力 (Yin *et al.*, 1997)。经研究表明， $\sigma$ C 蛋白是 ARV 中特异性较强且比较容易变异的蛋白 (华炯钢等, 2021)， $\sigma$ C 蛋白与 NDRV 的表面抗原相关，该表面抗原可引发感染机体的特异性中和反应，刺激病感染机体产生保护性中和抗体 (罗丹, 2021)。 $\sigma$ C 还能作为外衣壳表面辨别靶细胞的受体，可准确识别并黏附于靶细胞 (Martínez-Costas *et al.*, 1997)，同时具有良好的免疫原性和反应原性。 $\sigma$ C 蛋白会导致多个细胞融合产生合胞体，并对细胞核发生病变 (Theophilos *et al.*, 1995)，并对所形成的合胞体内核具有缩合作用。 $\sigma$ C 蛋白能使原代细胞和细胞系等多种细胞产生病变和凋亡，例如 Vero、DEF、DF-1 细胞。有研究表明 ARV 的  $\sigma$ C 蛋白是病毒分泌凋亡素的重要结构 (Barton *et al.*, 2001)，尤其是  $\sigma$ C 羧基末端诱导细胞凋亡，且据流式细胞仪分析，凋亡程度对作用的剂量和时间有依赖性 (Shih *et al.*, 2004)。 $\sigma$ C 蛋白在 NDRV 中感染机制中的作用机理，是否有其它功能，怎样实现细胞凋亡等还有待进一步探索。

## 1.2 NDRV 的流行病学

NDRV 的传播没有季节性 (张思远等, 2019)，一年四季均可进行传播，秋冬季节发病率较高。自 2005 年我国东南地区发现后，由于早期缺乏相关的诊断、预防和治疗管理措施，发病急，并逐年扩散至全国各地养鸭业集中地区，因此给各地养鸭业的发展带来了严峻挑战。以下为 NDRV 近年来发病情况，2005 年在福建、广东、浙江等个别地区集中检 NDRV；2006 年在山东、江苏等地也检出 NDRV，引起鸭脾组织坏死、生长发育不良，免疫系统抑制等病理现象 (黄显明等, 2011)；2011 年在安徽太湖等地区

养鸭场分离到 NDRV，病死率达到 80%以上，对养鸭业经济收益造成了巨大影响（陈宗艳等, 2012）；2015 年 9 月于山东地区分离到 NDRV 地方流行毒株，该毒株导致部分雏鸭属于下降，呼吸困难，雏鸭大批死亡缺乏。2016 年浙江地区爆发了以引起雏鸭脾坏死和鸭肝出血性坏死性病变为主的 NDRV 毒株（陆新浩等, 2016）；2021 年川渝地区的隆昌、广汉等地区仍有 NDRV 的广泛流行，鉴定为脾坏死型，严重影响了川渝鸭养殖业经济发展（赖如安, 2022）。

### 1.2.1 NDRV 的易感动物

NDRV 的宿主谱比较广泛，能感染鸡胚、鸭胚、鹅及多个品种鸭，主要有番鸭、半番鸭、麻鸭、北京鸭、樱桃谷鸭子，尤其是雏鸭（黄瑜等, 2009）。感染日龄从 3~26 日龄均可感染，感染高峰主要集中在 5~15 日龄雏鸭（张思远等, 2019）。发病率和病死率与日龄密切相关，雏鸭抵抗力较低易患病，发病率和死亡率较成年鸭偏高，发病率在 5%~40%左右，病死率在 10%~70%不等，病雏鸭发病时病毒侵害免疫器官，发生免疫抑制并发多重感染时病死率可高达 90%（陈宗艳等, 2012）。

### 1.2.2 NDRV 的传播途径

NDRV 是主要传播方式为通过水平传播，部分通过垂直方式进行传播（Endo-Munoz *et al.*, 1990）。水平方式传播主要是通过感染该病毒及带毒畜禽与健康畜禽直接接触或通过饲料、饮水、空气等媒介间接接触进行传播，同时该病毒在环境中的耐受能力较强，可在蛋壳、圈舍存活较长时间。垂直方式传播主要是经卵传播，经验证病禽生殖器中含有 NDRV，并可进行垂直传播，但垂直传播效率明显低于水平传播（马明瑞等, 2022）。

## 1.3 NDRV 的临床症状和病理变化

### 1.3.1 NDRV 的临床症状

病禽精神状态萎靡，行动缓慢，食欲不振或逐渐废绝，不喜饮水，羽毛杂乱无光泽（马明瑞等, 2022），部分病鸭出现软脚站立不稳，生长发育不良，腹泻，排黄白色、黄绿色稀状粪便，部分病禽出现呼吸困难，出现症状后病程极短，发病后 24 h 左右死亡，有的死亡病鸭出现角弓反张。2 周龄以内雏鸭难以耐过，耐过后因生长受阻、长势缓慢、跛行等后遗症失去经济价值。

### 1.3.2 NDRV 的病理变化

脾脏有灰白色纤维膜包裹，边缘肿大，呈现暗红色，有白色坏死灶,病例组织学显示脾脏淋巴细胞减少，有大量的炎性细胞浸润，中性粒细胞和巨噬细胞居多（贾文莎, 2022）；肝脏呈现黄色、暗黄色，质地变脆，肝脏表面有点状、针尖状、斑块状出血点、出血斑，边缘严重部位可见黄白色或者灰白色的坏死灶（罗丹等, 2022）；肾脏肿大、充血，肾脏结构发生变性、坏死（韩宏宇, 2016）；心脏肌质发生变性萎缩，心肌间隙变大，可见大量炎性细胞；法氏囊黏膜下有出血点，黏膜上皮肿胀坏死脱落，淋巴细胞减少。脑膜血管充血，有出血点（Luo *et al.*, 2021）。

## 1.4 NDRV 的诊断、治疗和预防

### 1.4.1 NDRV 的诊断方法

诊断 NDRV 的主要方法有环介导等扩增技术（Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP）、酶联免疫吸附实验（Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISA）、间接免疫荧光实验（Indirect Immunofluorescence Assay, IFA）、聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）。

#### 1.4.1.1 聚合酶链式反应

PCR 是通过变性、退火、延伸等步骤在特定温度条件下放大扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术。近些年 PCR 技术广泛应用于 NDRV 疾病的检测中，随着准确率和检测效率的增加，逐渐成为检测疾病的常用方法（谢碧林等, 2021）。

2010 年王劭、陈少莺等人利用 NDRV S3 基因全序列设定合成引物，建立鉴定 NDRV 的 RT-PCR 方法，能在肝脾匀浆、尿囊液、细胞毒的阳性病料中扩增出长度为 568 bp 的特异性片段，建立了可用于 NDRV 临床快速诊断和分子流行病学调查的 RT-PCR 方法（王劭等, 2011）。

2013 年袁远华等人根据 NDRV S3 基因序列设计引物，建立了一种检测 NDRV 的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法，能更加敏感、特异性识别 NDRV 病原，更方便 NDRV 的快速检测和定量分析（袁远华等, 2013）。

2020 年，云涛等人根据 NDRV S3 基因建立了一种检测 NDRV 的 MGB 荧光定量 RT-

PCR 方法，能更为快速准确地检测 NDRV（云涛等, 2020）。同年，张博等人建立了 NDRV TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法（张博等, 2020）。2022 年李海琴等人建立了同时检测 NDRV、NGPV 和 DTMUV 的多重 PCR 检测方法（李海琴等, 2022）。2024 年张景辉等人建立了能同时检验鹅星状病毒（Goose astrovirus, GAstV）与 NDRV 两种病毒的 RT-PCR 检测方法（张景辉等, 2024）。

#### 1.4.1.2 酶联免疫吸附试验

ELISA 是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面，使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行的实验（靳家鑫, 2024）。基本原理是利用了酶化学反应的敏感性和抗原抗体结合的特异性，让酶分子和抗体或抗体分子进行共价结合，酶标记抗体可与结合在固相载体上的抗原或抗体发生特异性结合，滴加底物显色液后，在酶的作用下底物会出现颜色反应，颜色随样本中抗原含量增多而逐渐加深，该颜色反应可利用 ELISA 检测仪在适宜波长下进行检测（陈玉环, 2013）。

2014 年陈海鹏利用 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白建立了间接 ELISA 方法，包被抗原不与 DTMUV、MDRV、禽流感（Avian Influenza, AI）H5N1 和 AI H9N2、番鸭细小病毒（Muscovy Duck Parvovirus, MDP）、小鹅瘟病毒（Gosling Plague Virus, GPV）阳性血清产生交叉反应，对浙江、江苏等地疾病康复和免疫接种后的种群血清样品进行检测，阳性样品检出率可达 98%以上，同一批次内和不同批次之间进行重复实验，检测结果显示变异系数在 10%以下，建立了敏感、重复性好的间接 ELISA 方法（陈海鹏, 2014）。

2016 年王锦祥等人利用 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白  $\sigma$ B 蛋白作为抗原，建立了间接 ELISA 方法用于检测 NDRV，检测结果符合率高于全病毒作为抗原建立的间接 ELISA 方法（王锦祥, 2016）。

2021 年田昂等人通过制备 NDRV 的多克隆抗体并建立了 NDRV 的间接 ELISA 诊断方法（田昂, 2022）。2022 年王思琪等人利用 NDRV  $\sigma$ C 蛋白制备了单克隆抗体并建立了间接 ELISA 方法可用于诊断 NDRV（王思琪, 2023）。

#### 1.4.1.3 间接免疫荧光技术

IFA 分为两种，用于检查相符合抗原或将荧光标记于抗体上进行示踪的方法称为荧光抗体法；用于检测相对应抗体或将抗原进行荧光标记显示踪迹的称为荧光抗原法，目前常用的大多为荧光抗体法（罗玲等, 2021）。主要步骤为用未标记的特异性第一抗

体与抗原反应后，再使荧光标记的二抗和抗原反应，抗原、抗体和荧光二抗相结合成为抗体-抗原-抗体的结构，最后将爬片封片后在荧光显微镜下观察。

#### 1.4.1.4 环介导等温扩增技术

LAMP 是在恒定温度条件下，扩增核酸的方法，用时较短。基本原理主要是针对靶基因上 F3、F2、F1、B1、B2、B3 区域设计四条引物，通过 DNA 聚合酶在恒定温度下进行核酸扩增（张欣, 2018），主要分为启动阶段和循环扩增阶段。

2014 年于可响等人根据 NDRV S3 基因序列 LAMP 引物，建立了具有良好特异性、敏感性的 RT-LAMP 检测方法，此方法对仪器设备要求低，能大大降低检测成本（于可响等, 2014）。

#### 1.4.2 NDRV 的治疗措施

NDRV 的治疗目前主要可通过补液疗法、抗生素治疗、中医药剂、高免卵黄抗体等多种方法。补液疗法可对早期患病病禽补充维生素提高免疫力，补充电解质和葡萄糖保证体液平衡。抗生素疗法可用头孢噻唑钠、利高霉素、丁胺卡那霉素等进行抗病毒治疗。中医药剂目前发现芪苓汤、板蓝根合剂对 NDRV 有一定的治疗作用，2019 年刘佳等人利用芪苓汤清热解毒、利水消肿的功效对感染 NDRV 的雏鸭进行了动物实验，发现芪苓汤能使病鸭体内干扰素分泌增多，参与抗病毒作用，并发现用药过程中能有效保护病雏鸭的免疫器官不造成免疫损伤，恢复和加强病鸭的免疫应答作用，有明显的治疗作用并可提高雏鸭免疫力（刘佳等, 2019）。2022 年朱明恩等人利用板蓝根合剂对 NDRV 攻毒的雏鸭进行了用药治疗，7 d 后发现未用药组和用药组的发病率由 100% 直接降至 10%，表明板蓝根合剂对于 NDRV 的治疗和病毒感染后的阻断有明显的效果，板蓝根作为清热解毒的药物，抗病毒效果显著，而板蓝根多糖不仅可以在病毒感染初期对病毒进行直接抑制和阻断，还可以在感染病毒后参与调节机体免疫活动，间接起到抗病毒作用（朱明恩等, 2022）。高免卵黄抗体近些年来逐渐成为防疫 NDRV 的重要方法，相比血清抗体更加稳定，对温度敏感性更好。2021 年张旭杰研发了针对 NDRV 的卵黄抗体，用于雏鸭后引起体内抗体水平增高，明显降低了 NDRV 的感染率（张旭杰, 2022）。2021 年武华提取 IgY 并研制了 NDRV 的卵黄抗体，经测试预防效率可达到 83%，治疗效率可达到 75%（武华, 2021）。2023 年张淑九研制了 NDRV LY20 株卵黄抗体，能增强雏鸭体内抗体水平，降低病毒对于机体的损伤，没有不良反应，是防治

NDRV 有效的特异性的生物制品 (张淑九, 2024)。

### 1.4.3 NDRV 的预防方法

当前 NDRV 的预防方法主要是通过注射疫苗进行疫病的防控, 目前研发的疫苗种类主要有以下几种: 弱毒疫苗, 自 NDRV 在我国蔓延开来, 一直未能筛到能人工削弱病毒毒力的毒株 (王宇飞等, 2024), 直到 2021 年 Yan 等人在山东省分离到的 4 株 NDRV 毒株中筛选出了 N20 弱毒株, 发现 N20 毒株免疫雏鸭产生的血清抗体可有效抵抗其他 3 株病毒以及 N19 强毒株的感染, 可作为疫苗研发的候选毒株。灭活苗, 是我国防控疫病常用的疫苗剂型, 2017 年陈仕龙等人利用 NDRV 浓缩病毒尿囊液经处理后制成油乳剂灭活苗, 试验后表明该油乳剂疫苗安全性好、免疫持续期长, 免疫保护率可达 100% (陈仕龙等, 2017)。2020 年李静等人筛选出 SDYC 株作为疫苗株制备了油乳剂灭活苗, 该疫苗作用于动物可有效预防 NDRV 感染, 形成良好的免疫保护效果 (李静, 2020)。但由于 NDRV 容易产生突变, 且疫苗产生免疫后产生保护性抗体时间超出雏鸭最易感日龄, 接种过早又易导致雏鸭死亡, 因此油乳剂灭活苗的临床应用需要进一步完善。重组亚单位疫苗, 是将可以诱导患病动物产生特异性中和抗体的蛋白与相应载体构建重组质粒, 并表达病毒蛋白所制备的疫苗 (王宇飞等, 2024)。2014 年毕庄莉等人表达了 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白, 并利用表达蛋白的 sf9 细胞制备了基因工程疫苗, 攻毒保护实验结果显示该疫苗保护率可达到 70%, 2016 年又在该疫苗的基础上将  $\sigma$ C 蛋白进行了纯化, 纯化后的蛋白制备的疫苗可诱导机体产生更多的中和抗体和细胞因子。重组载体疫苗是以可以削弱病毒毒力的活病毒以及降低病毒活力的活菌为载体, 将其部分基因替换后制备成疫苗作用于防病畜禽, 诱导宿主机体产生免疫应答, 产生保护机制的疫苗 (王宇飞等, 2024)。2022 年张洪瑞等人将乳酸乳球菌 MG1363 作为活菌载体, 利用大肠杆菌-乳酸菌组成型穿梭质粒表达了 NDRV  $\sigma$ C 蛋白, 对 2 日龄雏鸭进行了口服免疫, 免疫雏鸭的保护率达到了 76.67%, 重组载体疫苗与其他类型疫苗相比效果略差, 但使用方法更简便容易实现 (张洪瑞, 2022)。核酸疫苗, 主要分为 DNA 疫苗和 mRNA 疫苗 (周仔欣, 2023), 与其他疫苗相比, 有更强的针对性和效率, 2015 年 Zhu 等人研制了自杀性 DNA 疫苗 pSCA- $\sigma$ C 可以有效减少病毒血症的发生的持续时间, 并减少病毒在雏鸭体内的复制, 减少雏鸭死亡率 (Zhu *et al.*, 2015)。

## 1.5 单克隆抗体技术的研究进展与应用

### 1.5.1 单克隆抗体的概述

单克隆抗体作为一项意义重大的分子生物学技术，最早 20 世纪 70 年代由 Kohler 和 Milstein 两位科学家创建 (Kohler., 1975)。单克隆抗体是由某一 B 细胞分泌的只针对单一特定抗原表位的特异性抗体，通过杂交瘤技术实现，特异性强，灵敏度高 (鲁玉等, 2023)。杂交瘤主要由免疫动物脾细胞和小鼠的 SP2/0 细胞进行融合。B 细胞具有分泌抗体的功能，但寿命较短，无法在体外培养或小鼠腹腔内进行细胞增殖；骨髓瘤细胞没有分泌特定抗体的功能，但是可以无限传代，将 B 细胞和骨髓瘤细胞融合形成既能分泌针对某一抗原的特异性抗体又能在体内外培养无限扩大培养的杂交瘤细胞。制备杂交瘤细胞的方法目前有三种，一是生物融合法，常见的有病毒诱导融合法，例如仙台病毒；二是化学融合法，常用聚乙二醇 (PEG) 法进行融合，主要是化学诱导剂使细胞的脂膜分子排列发生改变，去掉化学试剂后脂膜会恢复，在恢复的过程中诱导相接触的细胞可发生融合。三是物理方法，主要是通过电场诱导融合，通过电场刺激使细胞膜暂时性开放，使聚集在一起的细胞发生融合。

### 1.5.2 单克隆抗体的研究进展

单克隆抗体经历了鼠源单抗、部分人源化单抗、全人源单抗。鼠源单抗采取来自小鼠脾脏能分泌特异性抗体的 B 细胞和小鼠的骨髓瘤细胞进行融合，形成能无限扩大数量和分泌特定抗体的杂交瘤细胞，鼠源抗体在生物学和医学领域抗体、检测、疫苗研究等方面都有着重要意义。部分人源化单抗，是由于鼠源单克隆抗体用在人的身上会引起人抗鼠抗体反应 (Human Anti-mouse Antibodies, HAMA)，因此进化成为人鼠嵌合抗体，对鼠源单抗进行部分人源化的改造，主要有三种方式，第一种是嵌合单克隆抗体，主要是将人体产生的特异性抗体恒定区替换非人源抗体的恒定区，最大程度的去掉鼠源化的部分 (任建委等, 2018)；第二种是 CDR 转接法，是将鼠源抗体可变区中的互补决定区 CDR 与人的相对保守的可变区框架区 (FR) 结合 (潘艳等, 2014)，重组表达后的蛋白既能特异性识别抗原，又减少了鼠源部分的比例。第三种是将可变区片段空间表面人源化，主要是将抗体三维结构表面的氨基酸残基进行人源化。全人源化单抗的目前主要通过三种方法，第一种方法是噬菌体抗体库技术，将非特定扩增的人源抗体蛋白序列和噬菌体外壳基因组建数据库，模拟内环境产生特异性抗体，可与目

的基因蛋白互作 (Taylor *et al.*, 1992)。此技术不需要免疫动物, 较常规制备单克隆抗体的方法更快速 (Brüggemann *et al.*, 2015)。第二种是核糖体展示技术, 通过 PCR 方法将目的基因 DNA 文库进行体外表达, 但是此技术体外表达不够稳定 (牟大超等, 2022)。第三种是转基因技术, 是将小鼠体内分泌抗体的相关基因灭活, 再将人源抗体基因移植到小鼠的染色体上, 使小鼠分泌人源抗体序列, 此技术水平要求较高, 且易发生细胞突变 (Kamimura *et al.*, 2019)。

### 1.5.3 单克隆抗体的应用

单克隆抗体在生物领域和医学领域都具有很高的研究价值和应用价值, 能为生物技术、医药、疾病检测等方面带来巨大经济效益, 且极具现实意义, 据统计每年由抗体在市场上带来的收益可高达 200 亿美元 (Maggon K., 2007)。

#### (1) 单克隆抗体可用于疾病的检测和预防诊断

单克隆抗体可制备阻断 ELISA 抗体诊断试剂盒, 用于疾病的检查检测。单克隆抗体可用于疫苗的研发, 产生针对某特定抗原的抗体, 达到监测疾病作用。

#### (2) 单克隆抗体可用于多种类型感染性疾病治疗

单克隆抗体可用于感染性细菌、病毒、真菌、寄生虫等疾病的治疗。对于感染性病毒, 单克隆抗体可在病毒自我复制的早期和晚期与病毒进行特异性结合, 在病毒自我复制的早期组织病毒进入易感细胞, 在病毒自我复制的晚期阻止病毒的扩散, 以此来抵抗和抑制感染性病毒的侵袭。利用感染性细菌制备的单克隆抗体可在细菌的检测、毒性鉴定和分型, 并且有着较高的特异性和灵敏性, 同时对于细菌毒素的作用原理和临床药物的研发上也有着重要的应用 (韩文瑜等, 1990)。真菌毒素单克隆抗体在检测真菌过程中极具灵敏性、特异性强, 1995 年我国刘江曾对发表过真菌毒素单克隆抗体对黄曲霉、单端孢霉、赭曲霉的检测研究 (刘江, 1995)。在 1979 年已经将杂交瘤技术单克隆抗体应用血吸虫方面的研究, 展开了单克隆抗体在寄生虫领域安全疫苗、检测技术的研发, 在寄生虫免疫学的研究中有着广阔的前景 (贾世玉, 1990)。

#### (3) 单克隆抗体可应用于器官移植

单克隆抗体在免疫器官移植的过程中可以作为免疫抑制剂来抑制接受外来器官的机体产生免疫排外反应, 同时还不会对接受移植器官的机体造成不良反应 (Li *et al.*, 2010)。

#### (4) 单克隆抗体可用于肿瘤治疗

单克隆抗体在免疫器官移植的过程中可以作为免疫抑制剂来抑制接受外来器官的机体产生免疫排外反应，同时还不会对接受移植器官的机体造成不良反应（Smith *et al.*, 1987）。

## 1.6 研究的目的是和意义

NDRV 作为一种典型的免疫抑制疾病，在国内外的都多个地区都广泛流行。该病毒感染多个品种的鸭，尤其是雏鸭的发病率和死亡率非常高，发病后可引起病鸭肝、脾、法氏囊等多个脏器出血，并发生免疫抑制导致感染病鸭免疫力急速下降，继发其他病毒、细菌、寄生虫疾病的发生，严重危害了养鸭业的健康发展。本实验将实验室分离保存的 NDRV N20 毒株进行扩大培养，并以原核表达的 NDRV  $\sigma$ C 蛋白作为免疫原免疫小鼠，制备抗  $\sigma$ C 蛋白的单克隆抗体。本实验制备的 NDRV 单克隆抗体将为 NDRV 血清学检测方法的建立、抗原表位疫苗的研发、NDRV 致病机理的研究等奠定物质基础，为该病的科学防控提供技术手段。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 NDRV 病毒、质粒、细胞、实验动物

NDRV N20 毒株为山东地区新希望六和孵化场采集病料并由本实验室分离保存。*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞、*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞、pET-32a(+)均购自 TaKaRa 生物工程有限公司。pET-32a(+) 的抗性为氨苄抗性且带有 His-tag。小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)由山东第一医科大学冻存，Balb/c 小鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。

#### 2.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂和仪器见表 2，表 3。

表 2 主要试剂  
Table 2 Main reagents

试剂 Reagents	厂家 Manufacturers
2 $\times$ Taq PCR Master Mix	苏州雨恒生物科技有限公司产品
限制性内切酶 <i>Bam</i> H, <i>Xho</i> I	赛默飞科技(中国)有限公司
非连接酶依赖型的单片段一步法克隆试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
DNA 凝胶回收试剂盒	康为世纪生物科技有限公司
高纯度质粒小提取试剂盒	康为世纪生物科技有限公司
His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)	金斯瑞生物科技股份有限公司
DNA Marker (2000、10000)	康润生物科技有限公司产品
NcmColor 彩色预染蛋白分子量标准	苏州新赛美生物科技有限公司
IPTG	北京索莱宝科技有限公司
可溶型单组分 TMB 底物溶液	天根生化科技有限公司
10% ExpressCast PAGE 彩色凝胶快速试剂盒	苏州新赛美生物科技有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	天根生化科技有限公司
Hybri-Max <sup>TM</sup> HAT 培养基补充物 (50 $\times$ ) <sup>TM</sup>	Sigma
Hybri-Max <sup>TM</sup> HT 培养基补充物 (50 $\times$ ) <sup>TM</sup>	Sigma
小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定用酶标二抗即用套装(含轻链)	北京博奥龙免疫技术有限公司

续表 2

试剂 Reagents	厂家 Manufacturers
姬姆萨染色液	北京索莱宝科技有限公司
Colchicine	上海源叶生物科技有限公司
PEG1450	Sigma
Goat Anti-Mouse IgG HRP	Abmart
Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	Beyotime
DAPI 溶液	北京索莱宝科技有限公司
DMEM 高糖	武汉普诺赛生命科技有限公司
Fetal Bovine Serum	苏州依科赛生物科技股份有限公司
双抗 (青霉素、链霉素)	北京索莱宝科技有限公司
胰蛋白酶	北京索莱宝科技有限公司
弗氏完全佐剂	Sigma
弗氏不完全佐剂	Sigma
多聚甲醛	北京索莱宝科技有限公司
tritonx-100	北京索莱宝科技有限公司
Tween-20	北京索莱宝科技有限公司
咪唑	北京索莱宝科技有限公司

表 3 主要仪器

Table 3 Main instruments

仪器 Instrument	厂家 Manufacturers
PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
电泳仪	北京君意东方电泳设备有限公司
低温冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
全自动凝胶成像系统	Bio-Rad 公司
酶标仪	Bio-Rad 公司

### 2.1.3 主要试验试剂的配制

#### 2.1.3.1 蛋白纯化和复性相关试剂的配制

A 液：称取 3.1276 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  加 100 mL 无菌水，搅拌至溶解。

B 液：称量 2.8392 g 无水  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  加 100 mL 无菌水，搅拌至溶解。

### 2.1.3.2 单克隆抗体特性检测相关试剂

0.4%KCl 溶液：称取 0.4 g KCl，溶于 100 mL 无菌水中，搅拌溶解。

固定液 1：甲醇和冰醋酸按照 3:1 比例混合均匀。

固定液 2：甲醇和冰醋酸按照 1:1 比例混合均匀。

## 2.2 方法

### 2.2.1 NDRV $\sigma$ C 基因的原核表达

#### 2.2.1.1 病毒的扩增

实验室存 NDRV 病毒尿囊液接种鸭胚扩增病毒，每个 9 日龄 SPF 鸭胚接毒 300  $\mu\text{L}$ ，将接毒针口封蜡后置于 37°C 孵化箱。6~7 h 观察一次，将 24 h 内因接种失误和细菌感染等原因死亡的鸭胚弃掉，24 h 以后 5 d 以内死亡鸭胚 4°C 冰箱过夜，以免取毒时血管破裂污染尿囊液，4°C 放置 6~12 h 收取尿囊液，将收集的尿囊液 4°C、4,000 rpm 离心 10 min，过滤除菌，经 PCR 验证后，标记好放入 -20°C 和 -80°C 冷藏，接毒和收毒过程需保持无菌操作。

#### 2.2.1.2 引物设计

本实验室使用分离保存的 N20 毒株，GenBank 登录号为 MW030530.1，从 NCBI 上下载 NDRV  $\sigma$ C 的基因序列，基因片段长 966 bp。通过 SnapGene 软件设计引物，设计在上下游引物两端分别加上同源臂，在 pET-32a(+) 载体上单一酶切位点引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 两个酶切位点，引物见表 4。

表 4 同源重组引物

Table 4 The primers of homologous recombination

引物 Primer	序列 (5' → 3') Sequence (5' → 3')
NDRV- $\sigma$ C-F	gccatggctgatcggatccATGGATCGCAACGAGGTGAT
NDRV- $\sigma$ C-R	gtggtggtggtgctcagGCCCGTGGCGACGGTGAA

#### 2.2.1.3 感受态细胞的制备

DH5 $\alpha$  (或 BL21) 大肠杆菌感受态细胞的制备: 在超净台内将 10 mL 高温灭菌的 LB 液体培养基加入灭菌试管中, 吸取 20  $\mu$ L 的 DH5 $\alpha$  菌种液体于试管中 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 摇菌至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 之间, 将摇好的菌液分装至无菌 1.5 mL EP 管中。将分装好的菌液 10,000 rpm 离心 3 min, 无菌条件下弃掉上清液, 保留菌体沉淀, 加入预冷 CaCl<sub>2</sub> 将菌体沉淀轻柔地吹打混匀, 重复此操作, 待 CaCl<sub>2</sub> 溶液充分处理后, 将制作好的感受态细胞放在 -80 $^{\circ}$ C 中保存。

#### 2.2.1.4 病毒 RNA 的提取及反转录

用 TRnaZol Reagent 总 RNA 提取试剂盒提取 2.2.1.1 中尿囊液 RNA, 操作步骤按照说明书如下:

(1) 取 100~200  $\mu$ L 尿囊液, 加入 1mL TRnaZol Reagent, 将其吹打混匀, 裂解样品组织, 不晃动放置 5 min。

(2) 向上述溶液中加入 RNA Extraction Buffer, 每使用 1mL TRnaZol Reagent 加入 0.2 mL RNA Extraction Buffer, 剧烈振荡 15 s, 室温静置 5 min。

(3) 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取最上层清亮液体 (500  $\mu$ L 左右) 继续提取 RNA。

(4) 在 (3) 得到水相中, 每管加入 500  $\mu$ L 提前放入低温的异丙醇, 混合均匀后放置 10~12 min。

(5) 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃去上清。

(6) 加 1000  $\mu$ L 75% 无水乙醇轻轻吹打混匀, 然后 8,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。

(7) 弃去上清液, 尽量晾干管壁和沉淀中的水分。

(8) 加入 35  $\mu$ L 的 REB Elution Buffer 溶解 RNA 并分装检测浓度后保存于 -80 $^{\circ}$ C。

将以上提取的 RNA 利用反转录成为 cDNA, 使用愚公生物的三代逆转录去基因组 DNA 试剂, 反应体系如表 5:

表 5 cDNA 反应体系

Table 5 cDNA reaction system

组分 Components	体积 Volume ( $\mu$ L)
All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix	4
dsDNase	1
Nclease-Free Water	14
RNA	1
总量	20

### 2.2.1.5 NDRV $\sigma$ C 基因的扩增及胶回收

将 2.2.1.4 反转录得到的 cDNA 作为模板，利用 2.2.1.2 设计的引物，对 NDRV  $\sigma$ C 基因进行扩增，反应体系如表 6:

表 6 PCR 反应体系

Table 6 PCR reaction system

组分 Components	体积 Volume ( $\mu$ L)
2 $\times$ Taq PCR Master Mix	12.5
ddH <sub>2</sub> O	9.5
NDRV- $\sigma$ C-F	1
NDRV- $\sigma$ C-R	1
模板	1
总量	25

利用全自动凝胶成像仪观察目的条带位置，并在紫外线切胶仪下将目的条带切下（减少紫外照射目的条带时间，胶块大小尽量贴合目的条带胶块），使用 DNA 凝胶回收试剂盒按照说明书回收 PCR 产物。

### 2.2.1.6 重组原核表达质粒 pET-32a(+)- $\sigma$ C 的构建

对 pET-32a(+)质粒按照表 7 的反应体系酶切，加入体系相应试剂后放在 37 $^{\circ}$ C 金属浴中酶切，酶切结束后将酶切产物进行琼脂糖凝胶实验，并将目的条带出切下进行胶回收，用紫外分光光度计进行 DNA 浓度测定，方法同 2.2.1.5。

表 7 酶切反应体系

Table 7 Enzyme digestion reaction system

组分 Components	体积 Volume ( $\mu\text{L}$ )
质粒	6
ddH <sub>2</sub> O	10
限制性内切酶 <i>Bam</i> H I	1
限制性内切酶 <i>Xho</i> I	1
FastDigest Green Buffer	2
总量	20

酶切后胶回收的载体质粒 DNA 与 2.2.1.5 回收的目的基因 DNA 通过诺维赞同源重组试剂盒进行同源重组，体系中 pET-32a(+)质粒用量和目的基因片段用量需根据 2.2.1.5 和 2.2.1.6 中测得核酸浓度及使用说明中的公式计算获得。同源重组体系如表 8 所示。

表 8 酶切反应体系

Table 8 Homologous recombination reaction system

组分 Components	体积 Volume ( $\mu\text{L}$ )
线性化载体质粒	8.4
目的片段质粒	3.2
5 × CE II Buffer	4
Exnase II	2
ddH <sub>2</sub> O	2.4

将同源重组产物于无菌条件下加入 2.2.1.3 中制备的 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中，在冰水上放置 30 min，再在 42°C 水中热激 90 s，然后在冰水浴中 2~3 min；向感受态细胞中加入 700  $\mu\text{L}$  LB 培养基（不加氨苄），后于 37°C 水浴箱中孵育 50 min，8,500 rpm 离心 30 s，保留 200  $\mu\text{L}$  上清液，其余上清液弃掉，将菌体轻柔吹打混匀。吸取 200  $\mu\text{L}$  混匀后的感受态细胞均匀涂抹在提前制备好的固体培养基上，于 37°C 恒温培养箱培养 8~12 h 左右。

观察菌落生长情况，挑取大小适中单个菌落置于 5 mL 含有氨苄的 LB 液体培养基中，37°C 220 rpm 培养 2 h，菌液浑浊后，无菌条件下取少量菌液进行 PCR 验证，验证为阳性的菌液在 37°C 摇床中继续培养过夜。

### 2.2.1.7 重组表达质粒的提取及双酶切鉴定

将培养好的菌液按照说明书操作提取质粒小提取试剂盒提取质粒。

按照说明书操作将上述提取的质粒进行双酶切验证，反应体系和实验方法同 2.2.1.6。酶切验证后将在载体和目的蛋白条带大小处均有条带的质粒送测序。测序正确的重组质粒命名为 pET-32a(+)- $\sigma$ C。

### 2.2.1.8 NDRV $\sigma$ C 基因的诱导表达及表达形式分析纯化及复性

将测序正确的重组质粒菌液摇混提取质粒，转化表达至 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中，方法同 2.2.1.6。转化成功过后固体培养基长出单菌落，挑取单菌落于液体 LB (含氨苄)，在 37°C，180 rpm 摇床中摇 8 h，无菌条件下取一部分菌液在 37°C 恒温摇床中摇到对数期 (OD<sub>600</sub> 在 0.6~0.8 之间)，每 100 mL LB 添加 100  $\mu$ L IPTG，37°C，180 rpm 诱导 6~8 h。空载也进行诱导，作为对照。诱导表达结束后 3,000 rpm 离心 15 min，弃掉上清，用适量 PBS 吹起沉淀后 37°C，200 rpm，重复三次终止诱导表达，通过 SDS-PAGE 验证蛋白是否表达，操作步骤如下。

(1) 将 1.5 mm 玻璃板洗净晾干，安装在仪器上，底部用胶封住，玻璃板放正，按照说明书配制蛋白胶，先加下层胶，后加上层胶。排气泡，插梳子，室温放置 1 h，待胶凝固。

(2) PCR 管中加入 20  $\mu$ L 诱导表达好的菌液，5  $\mu$ L 蛋白上样缓冲液，通过高温使蛋白分子结构和三维构象改变。

(3) 取下梳子，拨正胶条，加入 1 $\times$  甘氨酸电泳液于电泳槽中。

(4) 处理好的蛋白样品加 15~20  $\mu$ L，蛋白 Marker 标准加 4~6  $\mu$ L，150 V 电压电泳 90 min。

(5) 电泳结束后，将胶块取下，切至合适大小，利用考马斯亮蓝染色液显色，以 80 rpm 速度在水平摇床上染色 20~30 min 即可观察。

经验证在目的蛋白大小处有清晰条带的菌液，经大量诱导表达后，分装到 50 mL 管中，4°C，3,000 rpm，离心 20 min 后弃去上清，清洗菌体沉淀终止诱导表达，重悬后用超声破碎仪在冰浴下进行超声破碎，工作模式为 140 W 功率，工作时间为 5 s，间歇时间为 3 s，超声 15 min。超声工作结束后立即菌液破碎物分装到 2 mL EP 管中，4°C，

12,000 rpm, 离心 20 min。分离上清、沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 方法同 2.2.1.8。

### 2.2.1.9 NDRV $\sigma$ C 蛋白的纯化及复性

利用金斯瑞 His 标签蛋白纯化 High Affinity Ni-NTA Resin 对超声破碎后的菌液沉淀进行纯化, 操作步骤如下:

(1) 使用每 2 mg 菌体沉淀大约用 15 mL LE Buffer 溶解沉淀。超声工作模式为 100 W 功率, 工作时间为 5 s, 间歇时间为 3 s, 超声 10 min 后, 室温孵育 30~60 min。

(2) 将 (1) 中的菌液破碎物, 4°C, 12,000 rpm 离心 30 min, 去除沉淀。

(3) 填充 3 mL 镍柱, 加入 12 mL 体积的平衡缓冲液平衡层析介质。

(4) 把样品加入处理好的 Ni-NTA 树脂中, 在冰浴上充分结合 1 h 后, 缓慢收集液体, 待后续可使用 SDS-PAGE 检测纯化效率。

(5) 使用 LE Buffer 洗涤填料, 直到紫外检测仪 A280 值稳定为止。

(6) 用 6 mL 柱体积的洗涤缓冲液洗涤填料。

(7) 使用 6~12 mL 柱体积洗脱缓冲液洗脱。

纯化后的蛋白通过 SDS-PAGE 检验其纯度, 无其他杂蛋白, 方法同 2.2.1.8。用 6 M、4 M、2 M、0 M 尿素梯度的透析液将纯化后的蛋白进行复性, 方法如下:

用 12 cm 处理好的透析袋装入 5~6 mL 纯化好的蛋白, 称取 180 g 尿素、9.5 mL A 液、40.5 mL B 液、25 mL 甘油将尿素溶解后, 加去离子水定容至 500 mL, 将透析袋浸入透析液中, 封闭好后于 4°C 下放 24 h。后续三次分别称取 120、60、0 g 尿素和相同体积的 A 液、B 液、甘油制备透析液, 各浓度分别透析 24 h。

### 2.2.1.10 NDRV $\sigma$ C 蛋白浓度及特异性测定

复性后的蛋白用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后用天根 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定。

同时检测纯化蛋白的特异性, 通过 Western-Blot 验证 NDRV  $\sigma$ C 蛋白的特异性, 实验步骤如下:

(1) 洗净晾干玻璃板, 配置好蛋白彩色凝胶, 煮好蛋白样品加样 20  $\mu$ L, 在 1 $\times$  甘氨酸电泳液中 150 V 电压电泳 90 min, 步骤同 2.2.1.8。

- (2) 电泳结束后, 将目的蛋白凝胶切下, 然后浸泡在转膜液中。
- (3) 根据凝胶的大小, 裁剪适当大小的 NC 膜及滤纸, 浸泡在转膜液中。
- (4) 按转印方向 (从负极到正极) 依次放好海绵垫 (2 个, 白黑各自一层) --滤纸-NC 膜-凝胶-滤纸-海绵顺序是从上到下。
- (5) 按照正负极组装转印夹开始转印, 设置转膜条件 88 V, 288 mA, 1 h 左右。
- (6) 观察膜是否已经转好, 转好后将其放入玻璃皿中用 TBST 清洗 4 次, 5 min/次。
- (7) 放入盒子中, 封闭, 用 5%脱脂奶粉封闭 1~2 h, 洗净封闭液。
- (8) 一抗(Abmart 内参抗体-His-Tag (2A8) Antibody 为一抗, 1:5,000 稀释) 置于 4°C 12 h, 与二抗间隔时间要小于 12 h, 清洗一抗。
- (9) 加入二抗孵育(Abmart Goat Anti-Mouse IgG HRP 抗体, 二抗, 1:5,000 稀释), 4°C, 3 h, TBST 洗 4 次, 4 min/次。
- (10) 加入 TBST, 加入显影液, (新赛美, A 液和 B 液 1:1 混合) 显影。

## 2.2.2 单克隆抗体的制备

### 2.2.2.1 动物免疫

纯化复性后的蛋白经浓度测定后进行动物免疫, 免疫 6 只 6~8 周龄 Balb/c 健康雌鼠 100  $\mu$ g 蛋白每只, 并设置阴性对照组。第一次免疫将弗氏佐剂和 NDRV  $\sigma$ C 蛋白 1:1 混合后用搅拌器充分乳化, 腹腔和颈部皮下多点注射接种小鼠, 后两次将蛋白和不完全弗氏佐剂 1:1 比例乳化后分别间隔 14 d, 采取相同注射方法免疫。第三次免疫后第 7 d, 小鼠尾尖采血, 采血后 37°C 放置 1 h, 4°C 放置 1 h, 3,000 rpm 离心 10 min, 取血清放置 -20°C 保存。检测小鼠免疫血清效价, 血清效价 10,000 以上可进行细胞融合, 融合前三天选取血清效价较高的小鼠, 通过腹腔注射 100  $\mu$ g 蛋白进行加强免疫。

### 2.2.2.2 最佳包被浓度和最佳血清稀释度的测定

选用 96 孔板, 用 2.2.1.9 中纯化的蛋白通过方阵滴定法测最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度。

- (1) 抗原按照稀释倍数为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1,600 进行包被,

每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 清洗 3 遍, 5 min/次。

(2) 封闭 2 h, 封闭液每孔 200  $\mu\text{L}$ , 清洗方法如 (1)

(3) 孵一抗, 小鼠阳性及阴性血清按照比例: 1:200、1:400、1:800、1:1,600、1:3,200、1:6,400、1:12,800、1:25,600、1:51,200、1:102,400、1:204,800、1:409,600 进行稀释, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h。血清孵育结束后 PBST 清洗 3 遍, 5 min/次。

(4) 孵二抗, Goat Anti-Mouse IgG HRP 二抗, 按照 1:5,000 稀释, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 二抗孵育结束后 PBST 清洗 3 遍, 5min/次。

(5) 避光条件下加入显色液, 用锡纸包住避光条件下 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min。

(6) 加终止液每孔 100  $\mu\text{L}$ , 使用酶标仪测  $\text{OD}_{450}$  值, 阳性血清  $\text{OD}_{450}$  nm 在 1 附近、阴性血清  $\text{OD}_{450}$  nm < 0.2、阳性血清  $\text{OD}_{450}$  nm/阴性血清  $\text{OD}_{450}$  nm (P/N) 最大值组合为最佳包被浓度和最佳血清稀释度。

### 2.2.2.3 血清效价的测定

用 NDRV  $\sigma\text{C}$  蛋白包被 96 孔板测定 2.2.2.1 中采集的免疫小鼠血清效价, 采用 2.2.2.2 中测定的最佳蛋白稀释浓度包被, 做三组重复并设置阳性、阴性对照, 血清稀释倍数和实验方法同 2.2.2.2, 使用酶标仪测  $\text{OD}_{450}$ ,  $\text{P/N} > 2.1$ , 且最接近于 1 的血清稀释倍数为血清效价。

### 2.2.2.4 骨髓瘤细胞 (SP2/0) 的复苏

细胞融合需保证骨髓瘤细胞状态稳定、大小均一、饱满透亮, 将细胞快速融化后离心, 用 10% FBS DMEM 细胞培养液将细胞沉淀重悬转移到细胞培养皿中, 复苏过程操作要迅速, 避免细胞常温下在冻存液中过久受到损伤。

### 2.2.2.5 饲养层细胞的制备

融合前 24 h 制备饲养层细胞, 饲养层细胞可分泌细胞因子等细胞外分泌物质, 辅助融合成功的杂交瘤细胞生长, 饲养层细胞可选用小鼠的腹腔巨噬细胞, 也可以选用空白健康小鼠的脾细胞, 制备方法如下:

(1) 阴性空白对照 Balb/c 小鼠眼球采血作为阴性血清备用, 血清处理方法同 2.2.2.1, 小鼠脱颈致死, 浸泡在 75%酒精 5 min 后使用。

(2) 小鼠从酒精中取出放置无菌工作台中灭菌泡沫板上固定，钝性分离小鼠腹部皮肤后采用无菌器械取出小鼠脾脏。

(3) 清洗脾脏后弃掉多余脂肪组织，用 DMEM 基础培养基清洗小鼠脾脏。

(4) 将无菌密封 70  $\mu\text{m}$  细胞筛置于无菌容器上，先用培养基润洗细胞筛，用 1 mL 针管芯末端将小鼠脾脏于细胞筛中碾碎，并用 DMEM 基础培养基冲洗细胞筛，直至脾脏研磨充分，弃掉细胞筛和多余组织。

(5) 将研磨好的小鼠脾细胞 1,000 rpm 离心 8 min，弃去上清，用 2 mL 10% FBS DMEM 培养液重悬小鼠脾细胞，进行细胞计数。

(6) 根据要铺的 96 孔板个数，吸出相应数量脾细胞，按照每板  $10^5$  个脾细胞均匀地分配在 96 孔细胞培养板中，每孔 100  $\mu\text{L}$ ，第二天观察饲养层细胞是否有污染。

#### 2.2.2.6 细胞融合

细胞融合前确保 SP2/0 的状态良好处于对数生长期，饲养层细胞无污染，选取血清效价达 20,000 以上的小鼠进行细胞融合，融合方法如下：

(1) 取一只加强免疫后 3 d 的 Balb/c 小鼠，摘除眼球采血脱颈致死。采集阳性血清后将小鼠浸泡于 75%酒精中消毒，时间不可过长。

(2) 将小鼠取出沥干放入生物安全柜中固定台固定，无菌取脾，将脾的被膜上的结缔组织和脂肪剥离，之后将脾脏放入加入 10 mL DMEM 基础培养基的无菌平皿中清洗。

(3) 将细胞筛拆开放置 50 mL 灭菌离心管上，DMEM 基础培养基润洗细胞筛，将处理好的脾脏放入细胞筛中，用 1 mL 针管芯末端将小鼠脾脏碾碎，并用 DMEM 培养基冲洗细胞筛，直至脾脏研磨充分弃掉细胞筛和多余组织。将脾细胞 1,000 rpm，常温离心 8 min，弃掉上清液，重复此操作，DMEM 基础培养液重悬并细胞计数。

(4) 将生长状态良好的 SP2/0 细胞培养液弃掉，用 DMEM 基础培养液将 SP2/0 细胞吹落，转移到 50 mL 离心管中，常温离心 1,000 rpm，8 min 后弃掉上清液，DMEM 基础培养液重悬重后进行细胞计数。

(5) 计算好铺的板子数量，将 SP2/0 细胞与脾细胞按照比例为 1:5~1:8 进行混合。

(6) 将混合一起的细胞，1,000 rpm，10 min，室温离心。

(7) 去除上清液，将细胞轻轻拍散使细胞尽量均匀贴在离心管底侧部，有利于 PEG 1450 和细胞充分接触，进行细胞融合。

(8) 在 60 s 内缓慢加入预热的 1mL PEG 1450，静止 1 min 30 s，在 5 min 内加入 30 mL DMEM 基础培养液，37°C 放置 10 min，1,000 rpm 离心 7 min。

(9) 弃去上清，并缓慢地逐步地加入 40 mL 20% FBS HAT DMEM 细胞培养液，混匀均匀铺到由饲养层细胞的培养板中培养，于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 温箱中培养，第二天观察有无污染。

(10) 细胞融合后第 4~5 d 采用半换液方式，将每孔中的 20% FBS HAT DMEM 细胞培养液 100 μL 吸出，按 100 μL/孔加入 20% FBS HAT DMEM 细胞培养液进行换液。培养至第 9~11 d 时，用 20% FBS HT DMEM 培养基全换液。

### 2.2.2.7 阳性杂交瘤的筛选

细胞融合后第 3~4 d 未融合的骨髓瘤细胞、骨髓瘤细胞相互融合形成的杂交瘤细胞在 HAT 的抑制作用下逐渐凋亡，未融合的脾细胞、脾细胞与脾细胞融合成的杂交瘤细胞由于在体外不能存活太久也逐渐凋亡。存活下来的杂交瘤细胞为 SP2/0 和 B 细胞融合而成的杂交瘤细胞，能够在体外培养过程中无限传代培养，由于融合形成的杂交瘤细胞有的不能分泌抗 NDRV σC 蛋白的抗体，需要通过间接 ELISA 方法和 IFA 筛选出可分泌抗体的阳性杂交瘤细胞，方法如下：

间接 ELISA 方法检测阳性杂交瘤细胞，用纯化的 σC 蛋白作为抗原包被 96 孔板，4°C 过夜，PBST 清洗三遍。封闭液封闭 2 h，清洗三次。杂交瘤细胞上清液作为一抗，Goat Anti-Mouse IgG HRP 二抗 1:5,000 稀释后作为二抗，测 OD<sub>450</sub> 值，将阳性血清和阴性血清作为对照。

IFA 再次进行验证，将 ELISA 检测为阳性的细胞孔，再次进行荧光检测，步骤如下：

(1) DF-1 细胞铺在细胞培养板中，待细胞密度达生长至 80%~90% 时接毒。

(2) 将 NDRV N20 株细胞毒接种到 DF-1 细胞中，同时设置不接毒孔（方便观察病变）、阴性、阳性对照。（阴性对照为阴性血清，阳性为阳性血清），2 h 后，吸出弃掉病毒液，PBS 清洗两遍，换上 2% FBS DMEM 培养基。

(3) 培养 12~24 h 后,待细胞出现明显病变,弃掉培养液, PBS 贴壁加入细胞孔洗涤 2 次, 5 min/次。

(4) 接着向细胞孔中加多聚甲醛, 固定 15 min。用 PBS 清洗将液体吸出。

(5) 向孔内加入含有 0.2% TritonX-100 作用 12 min, 用 PBS 洗 3 次, 5 min/次, 将液体吸出。

(6) 加入 5%脱脂奶粉常温封闭 1h 后洗净。

(7) 向孔内加入杂交瘤细胞培养上清液, 一抗 4℃孵育过夜, 标记好细胞孔位置, 设置阴性、阳性空白对照。结束后洗净一抗。

(8) 向孔内加入以 PBS 1:500 稀释的 CY3 标记的羊抗鼠 IgG, 置于 37℃温箱中避光孵育 1.5 h, PBS 避光条件下洗涤 3 次, 5 min/次, 结束后吸掉液体。

(9) 染核: DAPI 稀释成 10  $\mu$ g/ $\mu$ L 加入每孔, 避光染色 15 min 后, 避光条件下 PBS 清洗 4 min/次, 清洗两遍。

(10) 加 PBS 在倒置荧光显微镜下观察。吸收和激发波长为 550~570 nm。

### 2.2.2.8 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

间接 ELISA 和间接免疫荧光均为阳性的细胞孔通过有限稀释法进行三次亚克隆, 筛选出能分泌抗 NDRV  $\sigma$ C 蛋白的单克隆细胞扩大培养, 筛选方法如下:

将阳性细胞孔用 PBS 洗两次, 将细胞吹下, 取出少部分依次放入 96 孔板第 1 列, 2~12 列放入 100  $\mu$ L 基础培养基, 依次进行倍比稀释, 稀释好的细胞板放入 37℃温箱中培养 20~30 min, 显微镜下观察将 100 个细胞左右的细胞孔用 10 mL 10% FBS HT DMEM 培养基进行稀释并均匀铺在 96 孔细胞板中, 待第 3~4 d 细胞成团后进行单克隆细胞团标记, 待标记细胞团长至细胞孔的 1/2 时进行 ELISA 和 IFA 检测方法同 2.2.2.8, 挑选阳性单克隆团再次进行有限稀释法进行亚克隆, 共亚克隆三次, 确保筛选到单克隆细胞, 第三次亚克隆结果筛选完毕后, 将稳定分泌的单克隆细胞团体外扩大培养。

### 2.2.2.9 单克隆抗体的体内扩大培养

单克隆抗体的制备采用体内扩大培养方法, 选用 8~12 周龄雌鼠, 诱生小鼠产生腹水由此大量制备单克隆抗体。方法为在接种阳性杂交瘤细胞前一星期, 先用弗氏不完

全佐剂将小鼠致敏，500  $\mu\text{L}$ /只。将体外扩大培养的阳性单克隆细胞吹起并进行细胞计数，并用 DMEM 基础培养基将细胞混匀，每只小鼠接种  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个细胞，接种后 7~8 d，小鼠腹部逐渐隆起，采集小鼠腹水，2~3 d 可再采集一次腹水，采集到的腹水常温 12,000 rpm 离心 10 min，吸弃底部细胞沉淀和上部脂肪层，保留中间清亮腹水， $-20^\circ\text{C}$  保存。

## 2.2.3 单克隆抗体特性的测定

### 2.2.3.1 单克隆抗体免疫荧光性的检测

DF-1 细胞铺在 12 孔细胞培养板中，每孔铺  $3 \times 10^5$  个细胞。待细胞密度达生长至 80%~90% 时用 NDRV N20 株细胞毒接毒，同时设置不接毒孔、阴性、阳性对照孔，向孔内加入 2.2.2.9 采集的小鼠腹水作为一抗  $4^\circ\text{C}$ ，避光条件下向孔内加入以 PBS 1:500 稀释的 CY3 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗，具体实验步骤参照 2.2.2.7，染核结束后在倒置荧光显微镜下观察。吸收和激发波长为 550~570 nm。

### 2.2.3.2 单克隆抗体染色体数目的检测

秋水仙素溶液下稀释后处理生长对数期的 SP2/0 细胞和单克隆细胞，对染色体数目分析。流程如下：

(1) 取培养 24 h 单克隆细胞、SP2/0 细胞，于培养皿内吹打混匀，加秋水仙素溶液，至其终浓度为 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，培养 6 h。

(2) 将细胞吹起混匀，收集于 15 mL 离心管中，室温离心 1,000 rpm，10 min，弃细胞上清。

(3) 将细胞加 5 mL  $37^\circ\text{C}$  预热 0.4% KCl 溶液低渗处理，重悬细胞， $37^\circ\text{C}$  低渗处理 25 min。将细胞低渗处理后室温 1,000 rpm，离心 8 min，弃掉上清液。

(4) 细胞中加入固定液 1，轻柔混匀，2,000 rpm 离心 5 min 后留沉淀。

(5) 加入 5 mL 固定液 2，室温静置 0.5 h，2,000 rpm 离心 5 min 后留沉淀，重复该操作再次固定，固定结束后用 500  $\mu\text{L}$  固定液 2 重悬细胞。

(6) 将载玻片放在  $4^\circ\text{C}$  中预冷，将重悬细胞悬空垂直滴加在载玻片上，在酒精灯火焰上方快速来回划过，放置自然干燥。

(7) 配置好的吉姆萨染色液均匀滴加在细胞上, 对样品染色 10~15 min。用去离子水自一端冲洗, 在 20%无水乙醇中快速脱色, 放至自然干燥。

(8) 在电镜和 100 $\times$ 油镜下观察, 计数 SP2/0 和单克隆抗体染色体数目, 杂交瘤细胞的染色体数目为脾细胞和 SP2/0 细胞之和在 100 条左右。

### 2.2.3.3 单克隆抗体特异性检测

将筛选到的单克隆抗体上清液作为一抗, 用采用间接免疫荧光 (IFA) 方法对 4 株单抗的特异性进行验证。用 DHAV、DTMUV、NDRV 分别接毒 DF-1 细胞, 用单抗细胞上清液作为一抗, 用阳性血清和阴性血清分别作为阳性对照和阴性对照, 设置不接毒细胞孔作为空白对照, 通过荧光反应检测单克隆抗体特异性, 方法如 2.2.3.1。

### 2.2.3.4 单克隆抗体中和性检测

检测制备的四株单克隆抗体对 NDRV 的中和性, 将 DF-1 细胞均匀铺在 96 孔细胞板中, 将小鼠腹水按照不稀释、1:10、1:100、1:1,000 等倍数依次稀释, 并将 NDRV 细胞毒和各浓度的腹水按照 1:1 比例混匀, 放在 37 $^{\circ}$ C 中作用 1~1.5 h, 待细胞生长至 80%~90% 时, 清洗后将细胞毒腹水混合物接种于细胞, 作用 120 min 后, 将病毒液吸出, PBS 清洗两遍, 每孔加 100  $\mu$ L 2% FBS DMEM 培养基, 培养 12 h 后观察细胞是否有病变及病变程度。

### 2.2.3.5 单克隆抗体腹水效价检测

将采集的腹水粗提后用 ELISA 方法检测腹水效价, 用 2.2.1.9 中纯化的蛋白作为包被抗原, 方法如下。

将  $\sigma$ C 蛋白包被在酶标板上四度孵育过夜, 用 5%脱脂奶粉进行封闭, 用小鼠腹水作为一抗, 并按照 1:200 依次向下将小鼠腹水进行倍比稀释 11 次, 最后一次弃掉 100  $\mu$ L 小鼠腹水稀释物。一抗孵育结束后, Goat Anti-Mouse IgG HRP 二抗 1:5,000 稀释孵育 1.5 h。用 TMB 显色液显色后加入终止液测 OD<sub>450</sub> 值, P/N 值最接近于 1 的为腹水效价, 具体方法参照 2.2.2.2。

### 2.2.3.6 单克隆抗体亚型的鉴定

用单克隆细胞上清液作为一抗, 用小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定试剂盒对获得的四株单抗进行亚型鉴定, 步骤如下:

- (1) 包被：将单克隆抗体特异结合的对应 Ag，100  $\mu$ L 置 37°C 温育 2 h 或 4°C 放置 12 h。
- (2) 洗涤：吸去抗原用 PBS-T 手洗 5 遍。。
- (3) 封闭：每孔加 200  $\mu$ L 5% 脱脂奶粉封闭液，置 37°C 温育 2 h。
- (4) 洗涤：吸去封闭液用 PBS-T 手洗 5 遍。
- (5) 待测一抗：准备待测杂交瘤细胞株培养上清，每株待测样本加 16 孔（做重复），每孔 100  $\mu$ L，置 37°C 温育 30 min。
- (6) 洗涤：吸去一抗用 PBS-T 手洗 5 遍。
- (7) HRP 标记分型二抗：8 种酶标记物二抗每种加 2 孔每孔 100  $\mu$ L 共 16 孔，置 37°C 温育 30 min。
- (8) 洗涤：吸去酶标抗体液用 PBS-T 手洗 5 遍。
- (9) 显色：避光加 TMB 显色液 37°C 显色 15 min 加入与显色液等体积终止液反应，后用酶标仪 450、630 nm 双波长读数判定。

### 2.2.3.7 单克隆抗体稳定性鉴定

将四株单克隆杂交瘤细胞连续传代培养 20 次以上，将细胞状扩大培养后冻存于液氮，两个月后取出四株单克隆杂交瘤细胞复苏至状态良好，分别取冻存前后四株单克隆杂交瘤细胞培养上清液作为一抗，以 SP2/0 上清液作为阴性对照，通过间接 ELISA 检测冻存前后四株单克隆杂交瘤细胞分泌抗体效价水平。

### 3 结果

#### 3.1 NDRV $\sigma$ C 蛋白的原核表达及纯化

##### 3.1.1 NDRV $\sigma$ C 蛋白的扩增

对 NDRV 进行尿囊液扩增，并用同源重组引物进行  $\sigma$ C 基因的 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果显示，条带为 966 bp，符合目的基因大小（图 1）。

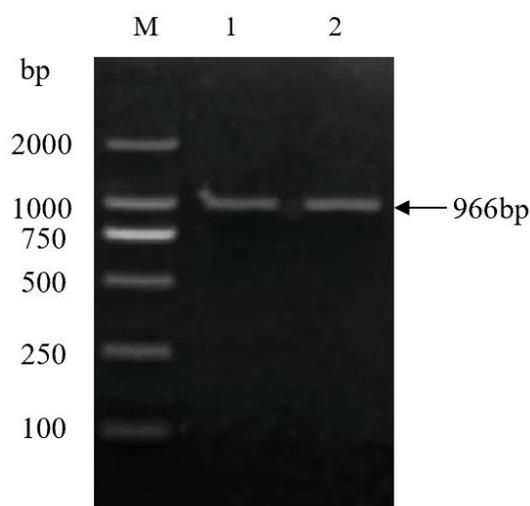


图 1  $\sigma$ C 蛋白 PCR 扩增结果

M: DNA 分子量标准 (DL2501); 1, 2:  $\sigma$ C 基因 PCR 结果

Fig.1 The phylogenetic tree of  $\sigma$ C protein

M: DNA Mark (DL2501) ; 1, 2: PCR production of  $\sigma$ C

##### 3.1.2 pET-32a(+)- $\sigma$ C 原核表达载体的构建及鉴定

用 *Bam*H I 和 *Xho* I 两种酶对 pET-32a(+)- $\sigma$ C 基因重组质粒进行双酶切鉴定，金属浴中酶切 30 min 后将酶切产物跑琼脂糖凝胶电泳，全自动凝胶成像仪显示两条目的与其条带，分别在 5,900 bp 和 966 bp 处（图 2）。

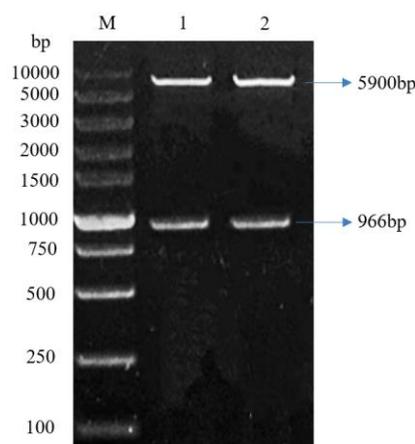


图 2 pET-32a(+)- $\sigma$ C 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

M: DNA 分子量标准 (DL2503); 1, 2: 酶切后的质粒

Fig.2 Identification of pET32-a(+)- $\sigma$ C plasmid double enzyme digested with restriction enzymes *Bam*H I and *Xho* I

M: DNA Mark (DL2503) ; 1, 2: Plasmid double digested by enzyme

### 3.1.3 $\sigma$ C 蛋白的诱导表达、纯化与复性

经酶切验证条带正确，将 pET-32a(+)- $\sigma$ C 送生工生物（上海）股份有限公司测序，测序的碱基序列与 GenBank 公布的新型鸭呼肠孤 N20 毒株（登录号：MKS51868.1） $\sigma$ C 基因的碱基序列相似度达 99%，载体质粒序列和将 pET-32a(+)一致。将验证正确的重组质粒转化到 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中，摇菌到对数期加 IPTG 诱导，通过 SDS-PAGE 验证目的蛋白条带大小正确，空载体无目的蛋白条带，经验证  $\sigma$ C 蛋白被成功表达（图 3）。

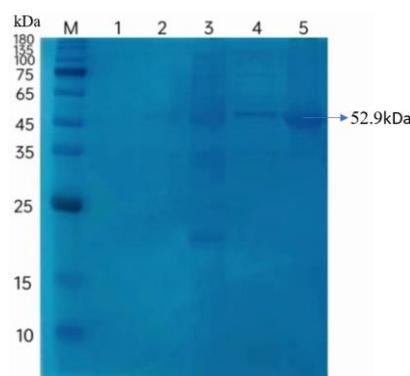


图 3 重组  $\sigma$ C 蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白 Marker; 1: *E.coli* BL21(DE3); 2, 3: 空载体 pET-32a(+)转化入 *E.coli* BL21(DE3) 未经 IPTG 诱导 (2) 和诱导后 (3); 4, 5: 重组质粒 pET-32a(+)- $\sigma$ C 转化至 *E.coli* BL21(DE3) 未经 IPTG 诱导和诱导后

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant  $\sigma$ C protein induced

M: Protein Marker; 1: *E.coli* BL21(DE3); 2, 3: *E.coli* BL21(DE3) transformed empty vector pET-32a(+)without (2) and with IPTG induction (3) ; 4, 5: *E.coli* BL21(DE3) transformed pET-32a(+)- $\sigma$ C without and with IPTG

induction

验证目的蛋白成功表达后，将诱导后的菌液超声破碎后离心，分离出上清和沉淀均进行 SDS-PAGE 验证，确定目的蛋白在沉淀包涵体中表达，将沉淀用 LE Buffer 重悬并取上清用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化后在不同尿素浓度梯度中透析复性并通过 SDS-PAGE 验证纯化效果。（图 4）

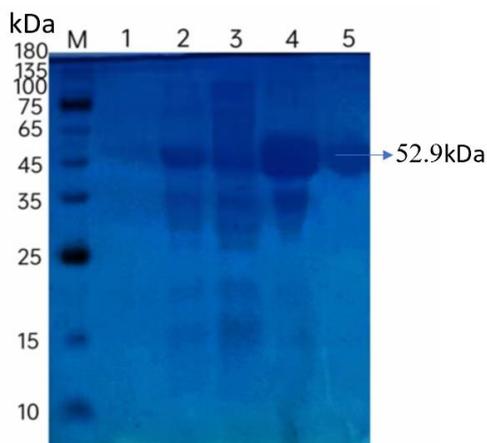


图 4 重组  $\sigma$ C 蛋白表达形式分析

M: 预染蛋白分子量标记; 1: 未诱导的重组菌体 pET-32a- $\sigma$ C 裂解物; 2: 诱导的 pET- $\sigma$ C 菌液; 3: 诱导的菌体裂解上清液; 4: 裂解后的菌体沉淀; 5: 纯化后的重组蛋白  $\sigma$ C

Fig.4 Analysis of recombinant  $\sigma$ C protein expression patterns

M: Predyed protein fractions; 1: uninduced lysate of recombinant mycelium pET-32a- $\sigma$ C; 2: Induced pET- $\sigma$ C bacterial liquid; 3: Induced cell lysis supernatant; 4: Cell precipitation after lysis; 5: The Pure Recombination Protein  $\sigma$ C

### 3.1.4 目的蛋白浓度的测定

蛋白纯化后采用梯度透析法去除离子、小分子化合物和其他杂质，恢复蛋白的生物学活性，通过 BCA 蛋白定量试剂盒中的 BSA 标准样品建立标准曲线后，测定蛋白最终浓度，经测定蛋白浓度为 1.27  $\mu$ g/mL（图 5，图 6）。

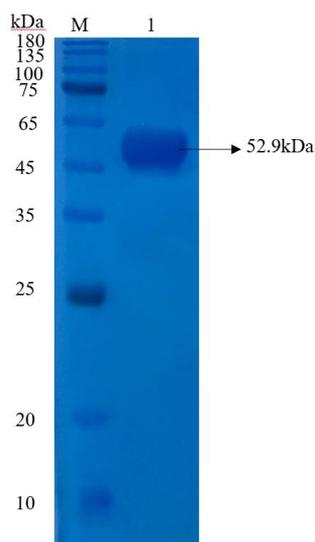


图 5 纯化后的重组  $\sigma$  C 蛋白

M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化后的蛋白

Fig.5 The purified recombinant  $\sigma$ C protein

M: Protein Marker; 1: The purified protein

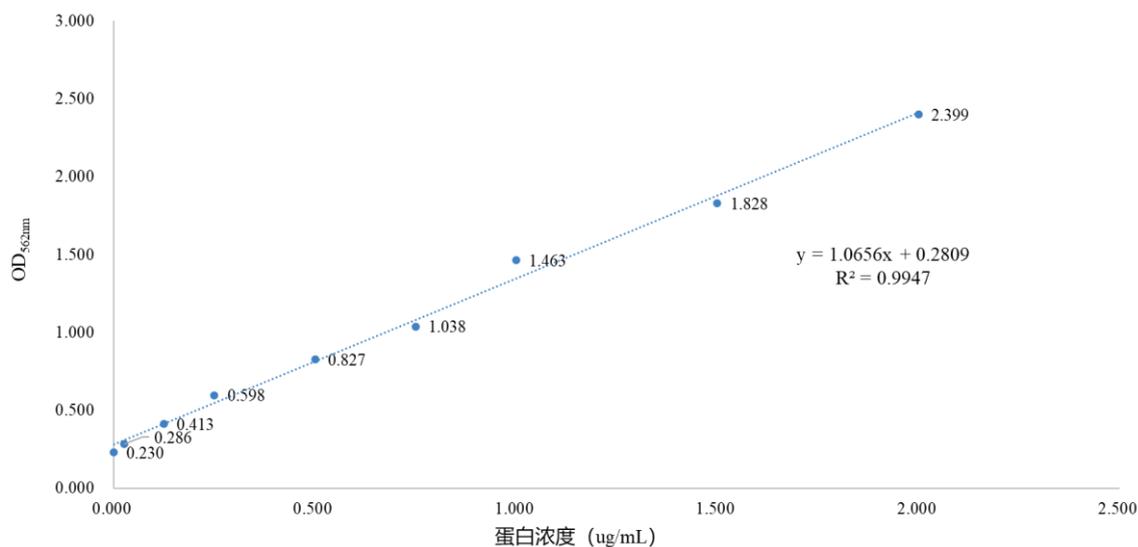


图 6 重组  $\sigma$ C 蛋白浓度的标准曲线

Fig.6 The standard curve for the determination of recombinant  $\sigma$ C protein concentration

### 3.1.5 Western-Blot 特异性验证

以为内参抗体-His-Tag (2A8) Antibody 一抗, Goat Anti-Mouse IgG HRP 抗体为二抗, 通过 Western-Blot 验证蛋白特异性。结果显示, 在 52.9 kDa 处可见明显的特异性条带, 表明重组  $\sigma$ C 蛋白具有较好的反应原性 (图 7)。

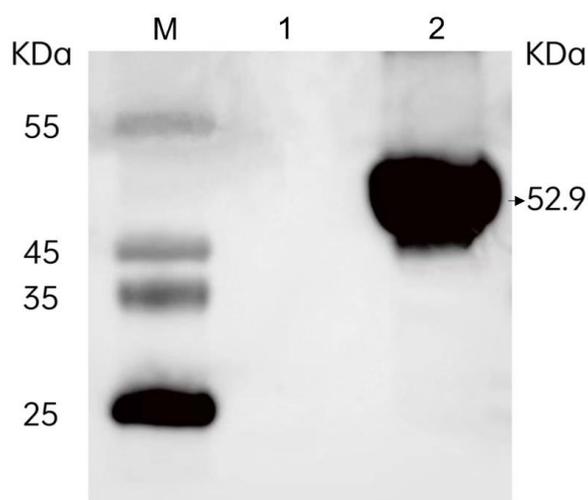


图 7 重组  $\sigma$ C 蛋白的 Western-Bolt 分析

M: 蛋白 Mark; 1: pET-32a; 2: 重组  $\sigma$ C 蛋白

Fig.7 Western-Blot analysis of recombinant  $\sigma$ C protein

M: Protein Mark; 1: pET-32a; 2: Recombinant  $\sigma$ C protein

## 3.2 单克隆抗体的制备

### 3.2.1 最佳包被浓度和最佳血清稀释度的测定

采用棋盘法测试最佳包被浓度和最佳血清稀释度，阳性血清（P）和阴性血清（N）的比值(P/N)最大时的血清稀释度和抗原稀释度为最佳。测试结果显示，当血清稀释度 1:1,000 时 P/N 值最大，抗原稀释度为 1:100 时 P/N 值最大。综上所述，最佳血清稀释度为 1:1,000，最佳蛋白包被浓度为 12.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （表 9）。

表 9 棋盘法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数

Table 9 Determination of optimal antigen coating concentration and serum dilution by chessboard method

血清稀释度 Serum dilution	抗原稀释度 Antigen dilution						
	1: 50	1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1,600	
1:10	P	2.144	1.999	1.948	1.645	1.706	1.976
	N	0.088	0.085	0.078	0.084	0.077	0.071
	P/N	24.36	23.52	24.97	19.58	22.16	27.83
1:100	P	2.506	1.922	2.166	2.102	1.869	2.031
	N	0.122	0.070	0.076	0.098	0.066	0.070
	P/N	20.54	27.46	28.50	21.45	28.32	29.01

续表 9

血清稀释度 Serum dilution		抗原稀释度 Antigen dilution					
		1: 50	1:100	1:200	1:400	1:800	1: 1,600
1:1,000	P	2.070	1.973	1.928	1.911	1.942	1.860
	N	0.063	0.052	0.056	0.053	0.053	0.057
	P/N	32.86	<b>37.94</b>	34.43	36.06	36.64	32.63
1:10,000	P	1.287	0.897	0.922	0.922	0.764	0.956
	N	0.099	0.060	0.051	0.051	0.050	0.053
	P/N	13.00	14.95	18.07	19.45	15.28	18.03
1:100,000	P	0.951	0.613	0.578	0.704	0.498	0.697
	N	0.062	0.066	0.055	0.054	0.056	0.050
	P/N	15.44	9.29	10.50	13.04	8.89	13.94
1:1000,000	P	0.456	0.448	0.378	0.304	0.298	0.297
	N	0.062	0.066	0.055	0.054	0.056	0.050
	P/N	7.35	6.79	6.87	5.63	5.32	5.94

### 3.2.2 免疫小鼠血清效价的测定

小鼠第三次免疫 7 天后，尾尖采血通过间接 ELISA 方法，以测试的最佳抗原浓度包被，使用方阵滴定法检测血清效价，以健康小鼠作为阴性对照，测得 1 号小鼠血清效价为 1:51,200，2 号小鼠血清效价为 1:51,200，3 号小鼠血清效价为 1:25,600，均达到 20,000 以上，达到融合水平（图 8）。

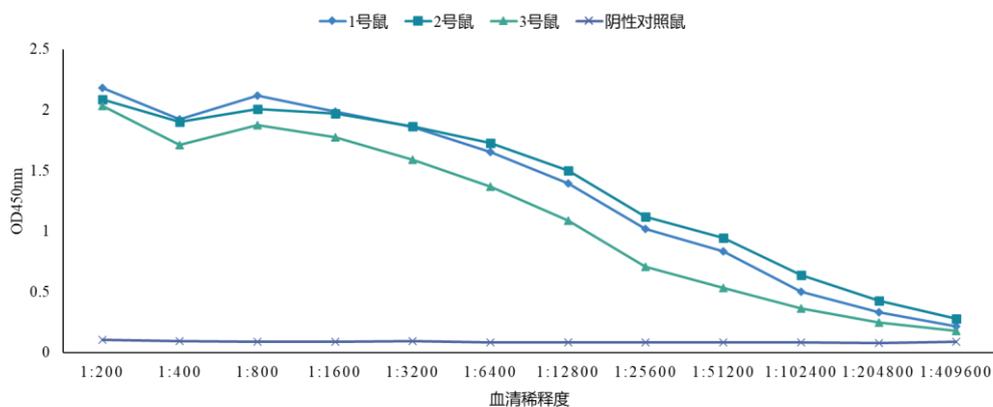


图 8 小鼠血清针对  $\sigma C$  抗体效价测定

Fig.8 Determination of Titer of Sera Against  $\sigma C$  in Sera

### 3.2.3 细胞融合

将 SP2/0 在融合前使细胞状态达到饱满均一，圆润透亮，无老化和细胞碎片，处于生长对数期时融合。融合前一天利用阴性小鼠脾细胞制备饲养层细胞，确保饲养层细胞无污染。细胞融合后 3~4 d 出现杂交瘤细胞聚集情况，进行半换液；9~12 d 杂交瘤细胞明显成团（图 9），进行全换液，待细胞液发黄时进行间接 ELISA 和 IFA 检测。

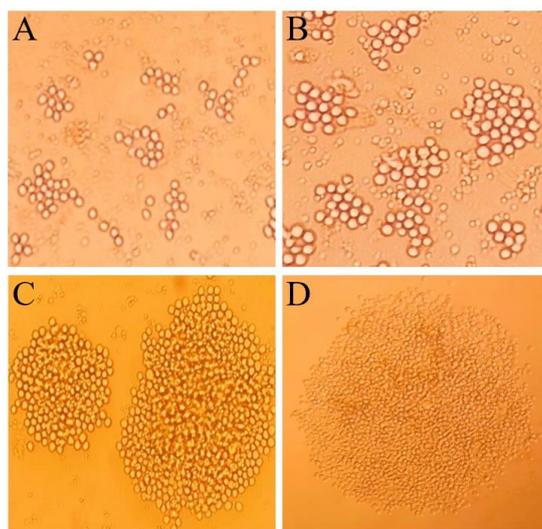


图 9 杂交瘤细胞生长状态图

A: 细胞融合后 4 d; B: 细胞融合后 7 d; C: 细胞融合后 9 d; D: 细胞融合后 12 d

Fig.9 Hybridoma cell growth status map

A: 4 days after cell fusion; B: 7 days after cell fusion; C: 9 days after cell fusion; D: 12 days after cell fusion

### 3.2.4 杂交瘤细胞的亚克隆

通过间接 ELISA 方法筛选出 16 孔阳性杂交瘤细胞孔，对阳性杂交瘤细胞孔利用有限稀释法进行亚克隆，在亚克隆第 2~4 d 出现单克隆细胞团，做出标记，在亚克隆第 8~9 d 单克隆细胞团生长至细胞孔底的 1/4，10~12 d 生长至细胞孔底的 1/2，细胞生长至孔底一半时用单克隆细胞团上清液进行 ELISA 和 IFA 检测，经三次亚克隆共筛选到四株能稳定分泌 NDRV  $\sigma$ C 抗体的单克隆细胞，分别命名为 DH3、DH7、AD11、DD10（图 10）。

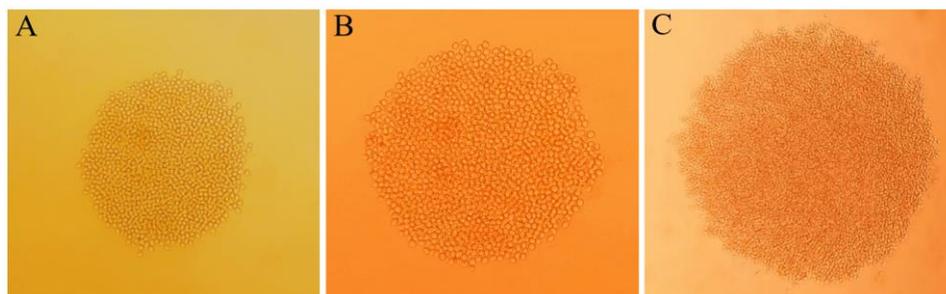


图 10 亚克隆细胞生长状态图

A:亚克隆后 5 d; B: 亚克隆后 9 d; C: 亚克隆后 12 d

Fig.10 Subclonal cell growth state diagram

A: 5 days after subclonal; B: 9 days after subclonal; C: 12 d after subclonal

### 3.3 单克隆抗体特性的测定

#### 3.3.1 单克隆抗体荧光性测定

培养 DF-1 细胞接种 N20 细胞毒，待细胞发生病变后，将筛选到的四株单克隆抗体进行体外扩大培养，待细胞培养上清液变黄，取细胞上清液作为一抗，CY3 标记的羊抗鼠 IgG 作为荧光二抗，在波长 550~570 nm 范围内观察荧光，荧光显微镜下观察，四株单克隆抗体分泌的抗体均能和 NDRV N20 病毒发生特异性荧光反应（图 11）

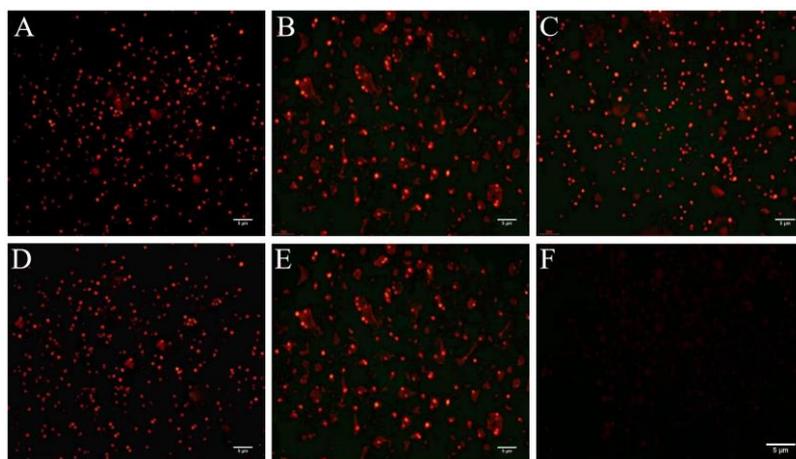


图 11 单克隆抗体在 DF-1 细胞上的间接免疫荧光鉴定图

A:DH3 培养上清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果; B: DH7 培养上清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果;  
C: AD11 培养上清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果; D: DD10 培养上清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果;  
E: 阳性血清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果; F: 阴性血清与 NDRV 感染的 DF-1 细胞 IFA 结果

Fig.11 An Infestation Free Identification Map of Monoclonab in DF1 Cells

A: DH3 culture supernatant and NDRV infection of DF1 cells IFA results; B: IFA results of DF-1 cells infected with DH7 and NDRV C: AD11 culture supernatant and NDRV infected DF1 cells IFA results; D: DD10 culture supernatant and NDRV infected DF1 cells IFA results; E: IFA results of positive serum and NDRV infection of DF1 cells; F: Negative Sera and NDRV Infection of DF1 Cells IFA Results

### 3.3.2 单克隆抗体染色体数目鉴定

用秋水仙素对制备的四株单克隆抗体进行处理，并用吉姆萨染色液染色，以小鼠 SP2/0 细胞作为对照，鉴定结果为，四株单克隆抗体染色体均在 102~108 条之间（图 12）。

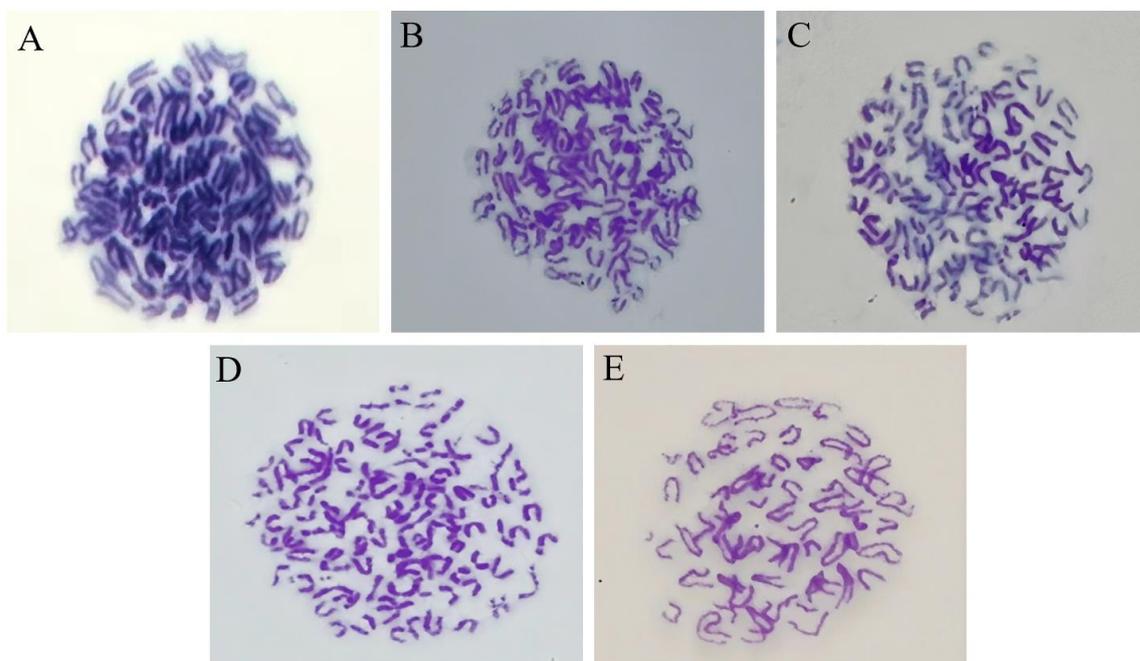


图 12 单克隆抗体染色体鉴定

A:DH3 染色体; B: DH7 染色体; C: AD11 染色体; D: DD10 染色体; E:SP2/0 染色体

Fig.12 Monoclonal antibody chromosome identification

A: DH3 chromosome; B: DH7 chromosome; C: AD11 chromosome; D: DD10 chromosome; E: SP2 / 0 chromosome

### 3.3.3 单克隆抗体特异性检测

用 DHAV、DTMUV、NDRV 作为抗原分别对 DF-1 细胞接毒，以四株单克隆抗体的细胞培养上清液作为一抗进行免疫荧光实验,设置阴性、阳性、空白对照组。实验结果显示四株单抗仅和 NDRV 产生特异性免疫荧光反应，与其他病毒无荧光反应，证明四株单克隆抗体特异性良好（图 13）。

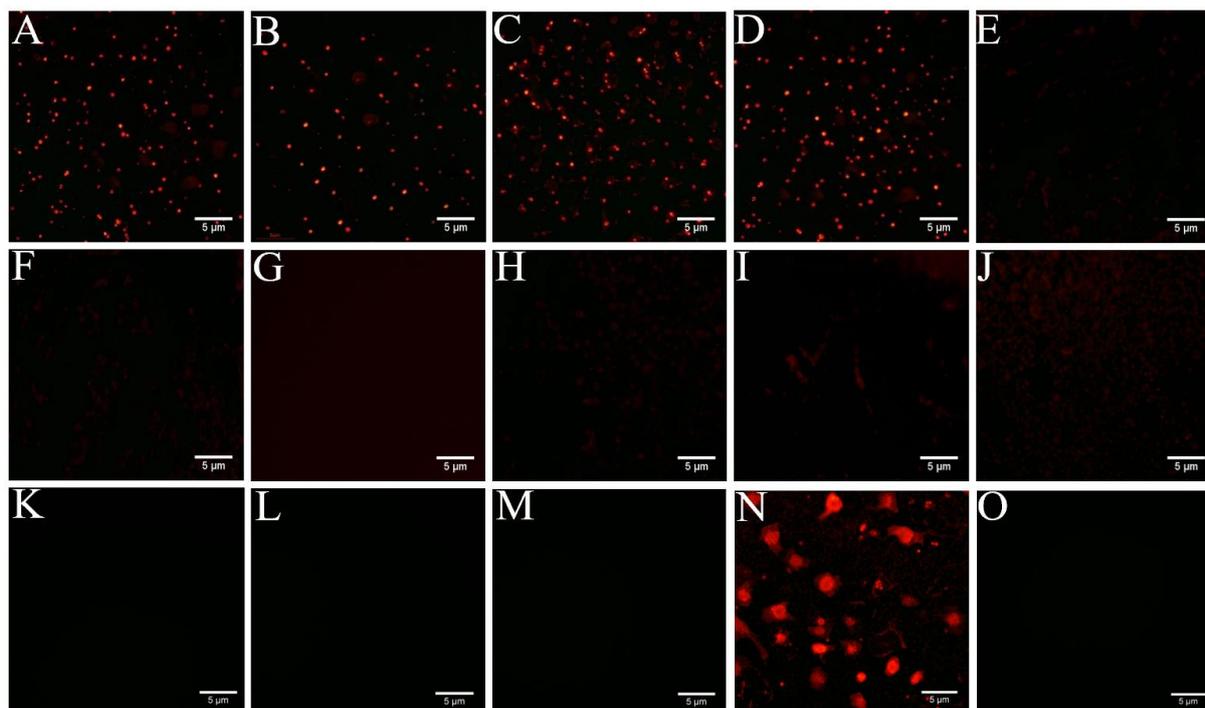


图 13 单克隆抗体特异性免疫荧光鉴定图

A:DH3 培养上清与 NDRV IFA 结果; B: DH7 培养上清与 NDRV IFA 结果; C: AD11 培养上清与 NDRV IFA 结果; D: DD10 培养上清与 NDRV IFA 结果; E: DH3 培养上清与 DHAV IFA 结果; F: DH7 培养上清与 DHAV IFA 结果; G: AD11 培养上清与 DHAV IFA 结果; H: DD10 培养上清与 DHAV IFA 结果; I: DH3 培养上清与 DTMUV IFA 结果; J: DH7 培养上清与 DTMUV IFA 结果; K: AD11 培养上清与 DTMUV IFA 结果; L: DD10 培养上清与 DTMUV IFA 结果; M: 阴性血清与 NDRV IFA 结果; N: 阳性血清与 NDRV IFA 结果; O: 未接毒空白对照

Fig.13 Monoclonal antibody specific immunofluorescence identification chart

A: DH3 culture supernatant and NDRV IFA results; B: DH7 culture supernatant and NDRV IFA results; C: AD11 culture supernatant and NDRV IFA results; D: DD10 culture supernatant and NDRV IFA results; E: DH3 culture supernatant and DHA IFA results; F: DH7 culture supernatant and DHA IFA results; G: AD11 culture supernatant and DHA IFA results; H: DD10 culture supernatant and DHA IFA results; I: DH3 culture supernatant and DTMUV IFA results; J: DH7 culture supernatant and DTMUV IFA results; K: AD11 culture supernatant and DTMUV IFA results; L: DD10 culture supernatant and DTMUV IFA results; M: Negative seroclear and NDRV IFA results; N: Positive Sera and NDRV IFA results; O: Blank control without exposure to poison

### 3.3.4 单克隆抗体中和性检测

检测四株单克隆抗体对于 NDRV 的中和性, 将 NDRV 与不同稀释度单抗细胞上清液进行 1:1 混合, 使抗体与病毒充分反应后将混合液接种于 DF-1 细胞, 观察细胞病变。结果显示细胞上清液不稀释与病毒反应后作用于细胞时, 细胞不产生病变; 将细胞上清液稀释 10 倍、100 倍、1,000 倍后与病毒反应作用于细胞后, 细胞仍可以产生病变, 综上所述四株单克隆抗体的中和活性较弱 (图 14)。

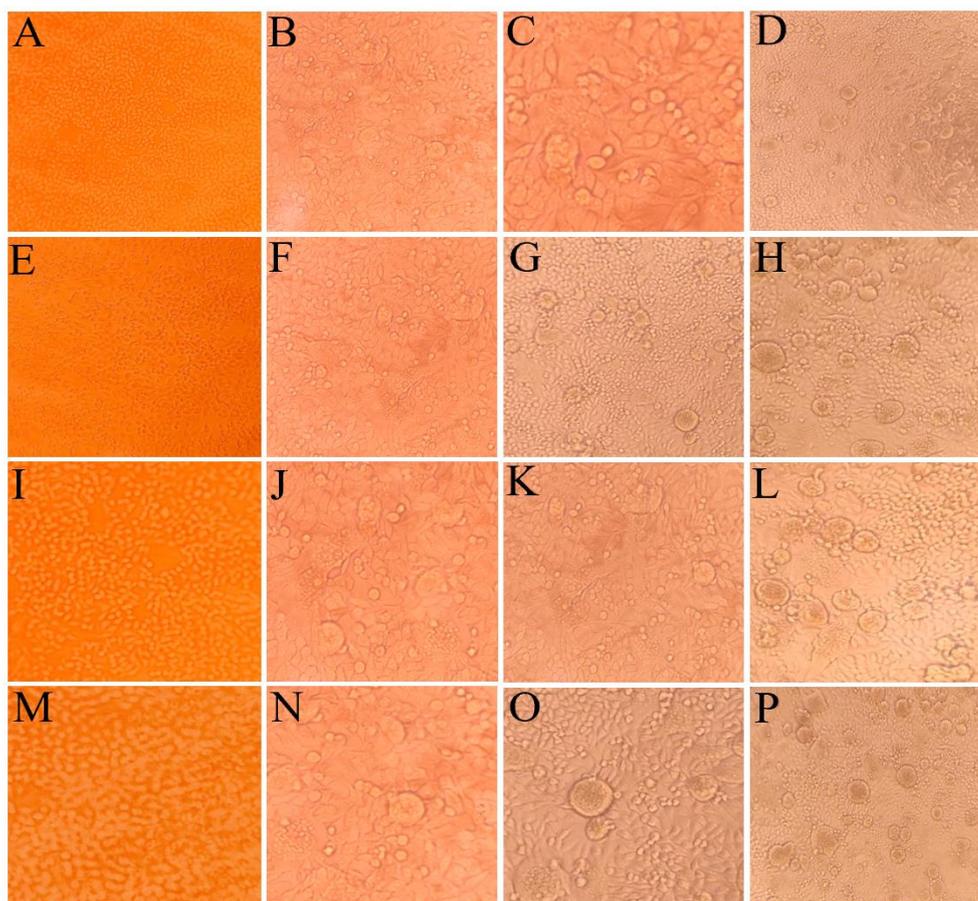


图 14 单克隆抗体中和性鉴定图

A:DH3 培养上清与 NDRV 中和; B: DH3 培养上清 10 倍稀释与 NDRV 中和; C: DH3 培养上清稀释 100 倍与 NDRV 中和; D: DH3 培养上清稀释 1,000 倍与 NDRV 中和; E: DH7 培养上清与 NDRV 中和; F: DH7 培养上清稀释 10 倍与 NDRV 中和; G: DH7 培养上清稀释 100 倍与 NDRV 中和; H: DH7 培养上清稀释 1,000 倍与 NDRV 中和; I: AD11 培养上清与 NDRV 中和; J: AD11 培养上清稀释 10 倍与 NDRV 中和; K: AD11 培养上清稀释 100 倍与 NDRV 中和; L: AD11 培养上清稀释 1,000 倍与 NDRV 中和; M: DD10 培养上清与 NDRV 中和; N: DD10 培养上清稀释 10 倍与 NDRV 中和; O: DD10 培养上清稀释 100 倍与 NDRV 中和; P: DD10 培养上清稀释 1,000 倍与 NDRV 中和

Fig.14 Neutralization identification chart of monoclonal antibody

A: The culture supernatant of DH3 was counterbalanced with NDRV; B: DH3 culture supernatant was diluted 10 times and NDRV was counteracted; The supernatant of C: DH3 was diluted 100 times and NDRV was counteracted; D: DH3 culture supernatant was diluted 1,000 times and NDRV was counterbalanced; E: DH7 culture supernatant and NDRV; The supernatant of F: DH7 was diluted 10 times and NDRV was counteracted; The supernatant of G: DH7 was diluted 100 times and NDRV was counteracted. The supernatant of H: DH7 was diluted 1,000 times and NDRV was counteracted; I: AD11 culture supernatant and NDRV; J: AD11 supernatant was diluted 10 times with NDRV. The supernatant of K: AD11 was diluted 100 times and NDRV was counterbalanced; The supernatant of L: AD11 was diluted 1,000 times and NDRV was counteracted. M: DD10 culture supernatant and NDRV; The supernatant of N: DD10 was diluted 10 times and NDRV was counteracted. The supernatant of O: DD10 was diluted 100 times and NDRV was counteracted; P: DD10 Culture Supermedium Was Reduced to 1,000 Times and Was Msed to Be Treated with NDRV

### 3.3.5 单克隆抗体腹水效价检测

经弗氏不完全佐剂致敏的小鼠腹腔接种单克隆细胞后第七天，小鼠腹腔明显变大，抽取小鼠腹水离心处理，去除细胞沉淀和表面油脂，通过间接 ELISA 方法检测小鼠腹水效价，检测结果显示四株单抗的效价均为 1:51,200（图 15）。

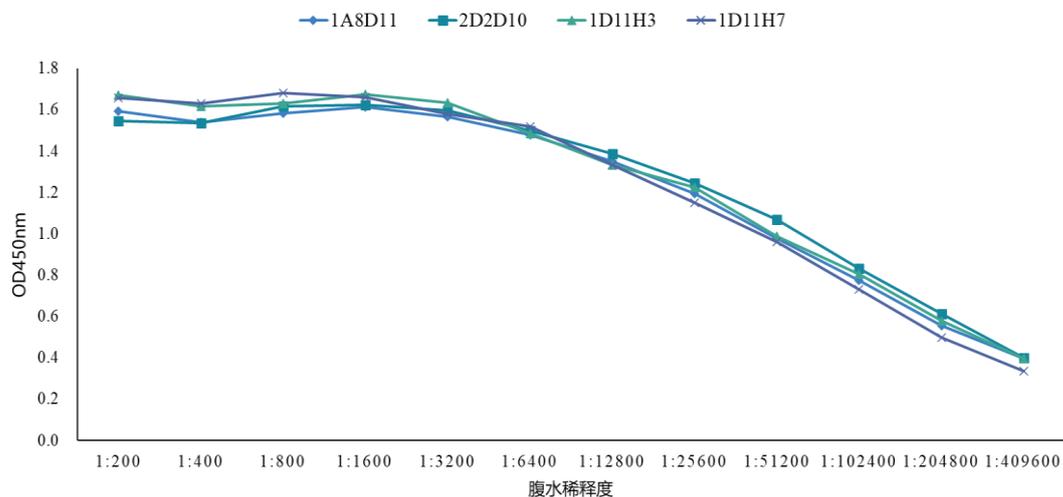


图 15 小鼠腹水抗体效价测定

Fig.16 Determination of Mouse Ascites Antibody Titer

### 3.3.6 单克隆抗体亚型鉴定

取四株单克隆抗体细胞培养上清液作为一抗，利用小鼠 Ig 类亚类鉴定用酶标二抗通过间接 ELISA 方法进行亚型鉴定，结果显示四株单抗均为重链 IgG1 亚类，轻链为 Igκ 亚型（表 10）。

表 10 单克隆抗体亚类鉴定

Table 10 Monoclonal antibody subclass identification

单克隆抗体 Monoclonal antibody	单克隆抗体亚类鉴定 OD <sub>450</sub> 值 Monoclonal antibody subclass identification OD <sub>450</sub> values							
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	Igκ	Igλ
DH3	<b>0.476</b>	0.074	0.089	0.083	0.063	0.055	<b>1.376</b>	0.050
DH7	<b>0.514</b>	0.074	0.073	0.087	0.064	0.053	<b>1.528</b>	0.050
AD11	<b>0.455</b>	0.071	0.065	0.050	0.067	0.050	<b>1.300</b>	0.051
DD10	<b>0.488</b>	0.076	0.076	0.050	0.068	0.061	<b>1.361</b>	0.053

### 3.3.7 单克隆抗体稳定性检测

取四株单克隆抗体连续传代细胞培养上清液和冻存 2 个月后复苏细胞培养上清液通过间接 ELISA 方法检测效价水平，结果显示效价水平变化不大，表示四株单克隆杂交瘤细胞株分泌抗体持续稳定（表 11）。

表 11 杂交瘤细胞稳定性鉴定结果  
Table 11 The stability of hybridism secreted antibody

杂交瘤细胞 hybridoma cells	DH3	DH7	AD11	DD10
冻存前 OD <sub>450nm</sub>	0.989	1.066	0.980	0.977
冻存后 OD <sub>450nm</sub>	0.946	1.004	0.964	0.935

## 4 讨论

NDRV 是一种可以引发鸭免疫抑制 (Li *et al.*, 2020), 脏器出血、生长发育不良的传染病 (孙晓虹等, 2024)。其不同于 MDRV, NDRV 具有更高的感染率和死亡率, 尤其是 2~3 周龄雏鸭 (王鸿志, 2023); 季节性不明显, 四季均易感染; 易感动物更加广泛, 包含多个品种鸭; 传播方式多样, 既可通过饮水、圈舍等水平方式传播, 也可经蛋垂直传播 (李丽等, 2024)。NDRV 目前在全国大部分地区广泛传播, 导致雏鸭生长受阻、发育缺陷 (刘臻臻, 2021), 成鸭肝脾等多个脏器出血病变、产蛋下降等症状, 给鸭养殖业带来诸多损失, 防疫工作效果不显著, 市场上商品化疫苗多以灭活苗和弱毒苗为主, 易出现拮抗和疫苗毒株变异, 给畜禽疾病预防控制带来很大挑战 (李静, 2020)。

针对目前 NDRV 带来的临床和预防问题, 需要加强临床疾病诊断、研发稳定高效疫苗, 从源头最大程度减少传染性病毒的传播, 降低养殖业经济损失, 维护公共卫生安全。单克隆抗体作为能稳定分泌特定抗原表位的抗体, 具有高度的特异性和敏感性、纯度高、容易生产 (常泽杰, 2024), 在生物学领域有着广泛的应用, 可以作为探究病原感染和致病、疾病检测方法、特定抗原表位标记疫苗的强有力工具 (华炯钢等, 2022)。本实验将实验室分离保存的 NDRV N20 弱毒株在鸭胚中充分扩大培养, 通过制备抗 NDRV  $\sigma$ C 蛋白的单克隆抗体, 为 NDRV 病毒的预防和控制提供基础研究材料, 能够更好的减少病毒传播带来的损失, 提高鸭病防控的综合能力。

### 4.1 抗原的制备

免疫小鼠的抗原选择 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白,  $\sigma$ C 蛋白作为 NDRV 的外衣壳蛋白能特异性识别感染宿主细胞抗体, 协同 B 细胞共同引发病毒感染机制 (Kuntz-Simon *et al.*, 2002); 携带有能刺激机体产生特异性中和反应的抗原, 诱导机体产生中和性抗体 (Shih *et al.*, 2004); 自身带有吸附功能, 能识别吸附在禽类细胞上, 在病毒感染和致病过程中发挥着重要作用。因此  $\sigma$ C 蛋白可作为研究 NDRV 致病机理和过程、研发控制疾病疫苗的重要基因。通过大肠杆菌表达蛋白, 由包涵体中纯化目的蛋白 (Grande *et al.*, 2000), 包涵体表达蛋白过程中选择的载体为 pET, pET 作为常用的原核表达载体易获得、成本低, 且具有 His 标签和多个单一性酶切位点, 有利于蛋白纯化和酶切 (辛英

豪, 2011)。蛋白纯化选用能与 His 标签结合的 Ni 离子层析柱, 通过 10 mM 和 250 mM 咪唑洗脱杂蛋白和目的蛋白, 目的蛋白与载体标签部分形成融合蛋白后大小为 52.9 kDa。

## 4.2 单克隆抗体的制备

单克隆抗体采用小鼠的脾细胞和小鼠的骨髓瘤细胞相互融合的方法, 将 B 细胞能分泌特定抗体和骨髓瘤能无限增殖的特性, 形成可分泌特异性抗体且无限增殖的杂交瘤细胞, 并从中筛选出仅分泌某一特定抗原表位的抗体的单克隆细胞 (方水琴等, 2021)。本研究通过腹腔注射和颈部皮下多点注射多种注射方式结合对小鼠进行免疫, 可以更大程度的刺激小鼠产生鼠源抗体 (郝建宇, 2023), 进行细胞融合的小鼠血清效价均达到  $2 \times 10^4$  以上, 并在融合前加强免疫, 确保杂交瘤细胞的阳性率。本研究细胞融合技术方法采用的化学试剂融合, 利用 PEG 1450 进行细胞融合, 主要是使细胞质膜结构发生重排, 膜修复时相邻细胞的细胞膜发生结合, 与其他融合方法相比此方法更加简便, 通过控制外部客观因素条件可增加细胞融合率。融合过程中选择低分子量 PEG, 减少对细胞的毒性; 保证融合前对试剂的预热和融合过程中在  $37^\circ\text{C}$  水浴条件下进行, 细胞融合处理时间控制在 60~90 s 之间, 保证细胞融合的成功率 (刘桃雪, 2024)。阳性杂交瘤细胞的筛选主要是通过间接 ELISA 方法筛选, 在经过 IFA 验证后进行有限稀释法亚克隆 (董璇, 2023), 第一次亚克隆需要制备饲养层细胞辅助杂交瘤细胞生长, 并经过三次亚克隆确定可以稳定分泌抗  $\sigma$  C 蛋白的单克隆抗体并进行扩大培养。

## 4.3 单克隆抗体特性检测

本研究筛选到的四株单克隆抗体连续传代近 20 次并冻存后复苏后培养, 取不同时期培养上清液进行间接 ELISA 检测, P/N 值变化幅度小, 细胞分泌抗体状态稳定 (夏琳琳, 2016)。单克隆细胞腹腔接种致敏小鼠后 7 d 小鼠腹腔明显增大, 去除采集腹水的脂肪和细胞后, 对单克隆抗体的腹水效价进行检测, 效价水平达 1:51,200。本研究采用秋水仙素终止有丝分裂, 采用 0.4% KCl 溶液使细胞膨胀, 酸性溶液排除单克隆细胞细胞器并进行固定, 观察染色体数目正确, 为脾细胞和骨髓瘤细胞染色体之和 (毕振威, 2014)。利用实验室分离保存的 DHAV、DTMUV、NDRV 分别作为包被抗原, 通过 IFA 检测四株单克隆抗体的特异性、免疫荧光性, 显示四株单抗特异性较强, 免疫荧光性良好。将单抗上清液不稀释和 NDRV 互作, 感染 DF-1 细胞, 细胞不发生病变, 表明四

株单克隆抗体具有一定的中和病毒能力（陈宗涛, 2010）。

本研究制备的四株单克隆抗体具有较好的特异性和效价水平，可为 NDRV 诊断方法和亚单位疫苗等提供基础的研究资料，为养鸭业疾病诊断防控和降低养殖风险损失提供研究材料。

## 5 结论

5.1 本研究成功原核表达、纯化、复性了 NDRV 的  $\sigma$ C 蛋白，检测蛋白浓度为 1.27  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

5.2 本研究以  $\sigma$ C 蛋白为免疫原感染小鼠，通过杂交瘤技术成功制备了四株针对  $\sigma$ C 蛋白的单克隆抗体，分别命名为 DH3、DH7、AD11、DD10，可为 NDRV 的检测和表位标记疫苗研究提供材料和基础。

5.3 本研究对制备的四株单克隆抗体进行了初步检测，结果证明在四株单抗具有中和性、良好的特异性和免疫荧光性、染色体数目在 102~108 条区间，效价均可达到 1:51,200，亚型均为重链 IgG1 亚类，轻链为 Ig $\kappa$  亚型。

## 6 参考文献

- Lisbeth Ni Kraft, 赵继勋. 小鼠呼肠孤病毒 3 型感染(肝脑脊髓炎 ECHO 10 病毒感染). 实验动物科学, 1985, (01):18-24.
- 毕振威. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及其应用. 南京: 南京农业大学, 2014.
- 毕庄莉. 新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 基因在昆虫细胞中的表达及其免疫原性的初步研究. 安徽: 安徽农业大学, 2016.
- 常泽杰. 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白关键 Loop 结构单克隆抗体的制备与鉴定. 郑州: 河南农业大学, 2024.
- 陈海鹏. 新型番鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- 陈仕龙, 程晓霞, 肖世峰, 江丹丹, 林锋强, 王劭, 朱小丽, 俞伏松, 邹敏, 陈少莺. 鸭短喙矮小综合征灭活疫苗的研制及免疫效力评价. 中国兽医学报, 2024, 44(02):264-267.
- 陈玉环. I型与新I型鸭肝炎病毒分离鉴定及实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- 陈宗涛. 2型登革病毒特异性单克隆抗体保护作用的实验研究. 重庆: 第三军医大学, 2010.
- 陈宗艳, 朱英奇, 王世传, 李传峰, 李露, 王玢缤, 付玉志, 高景鹏, 王超, 刘光清. 一株新型鸭源呼肠孤病毒(TH11 株)的分离与鉴定. 中国动物传染病学报, 2012, 20(01):10-15.
- 董璇. 鸭源鹅细小病毒单克隆抗体制备及其阻断 ELISA 方法的建立. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- 韩宏宇. 新型鸭呼肠孤病毒检测方法及其细胞适应性的研究. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- 韩文瑜, 黎诚跃, 王世若, 潘荆华, 滕加波, 李秀芝, 沈广. 空肠弯曲菌共同抗原单克隆抗体的研制及其在细菌检验中应用的研究. 细胞与分子免疫学杂志, 1990, (03):41.
- 郝建宇. CCR8 抑制性单克隆抗体的制备与功能研究. 北京: 北京化工大学, 2023.
- 华炯钢, 叶伟成, 倪征, 陈柳, 朱寅初, 云涛, 张存. 新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ B 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定. 中国预防兽医学报, 2022, 44(04):428-434.

- 黄显明, 张小飞, 尹秀凤, 薛家宾, 王伟, 丁美娟, 靳宇田. 鸭脾坏死症的病原学初步研究. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会 2011 年学术年会论文集. 2011:1
- 黄瑜, 傅光华, 施少华, 万春和, 程龙飞, 江斌, 陈红梅, 林芳, 林建生, 张大丙. 新致病型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定. 中国兽医杂志, 2009, 45(12):29-31.
- 贾世玉. 单克隆抗体技术在寄生虫学中的应用. 中国兽医杂志, 1990(01):45-46.
- 贾文莎. 新型鸭正呼肠孤病毒的分离与鉴定. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 靳家鑫. 基于 ASFV 抗原表位肽重组蛋白的间接 ELISA 方法建立及应用. 郑州: 河南农业大学, 2024.
- 赖如安. 川渝部分地区 NDRV 分离株全基因序列分析及病原血清流行病学调查. 重庆: 西南大学, 2023.
- 李斌. 禽呼肠孤病毒感染流行病学调查与广西地方分离株 S1 基因的测序和克隆. 南宁: 广西大学, 2004.
- 李海琴, 傅光华, 康昭凤, 韦启鹏, 谭美芳, 黄江南, 季华员, 黄瑜, 杨群. 新型鸭呼肠孤病毒、新型鹅细小病毒和鸭坦布苏病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用. 福建农业学报, 2022, 37(01):1-6.
- 李静. 新型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定及油乳剂灭活疫苗的制备. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- 李丽, 胡晓楠, 李波. 新型鸭呼肠孤病毒病流行趋势及防控. 北方牧业, 2024(01):37.
- 刘红, 朱朝辉. 浅谈利用  $\sigma$ C 蛋白诊断禽类呼肠孤病毒感染及研制新型疫苗. 中国兽医杂志, 2008(07):88-89.
- 刘佳, 杨颖, 朱兆荣, 刘娟. 芪苓汤对新型呼肠孤病毒试验感染雏鸭治疗效果分析. 中国兽医杂志, 2019, 55(12):68-71+151.
- 刘江. 单克隆抗体在真菌毒素检测中的应用进展. 国外医学. 卫生学分册, 1995(02):90-94.
- 刘桃雪. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备. 郑州: 河南农业大学, 2024.
- 刘臻臻. 死胚和弱雏中新型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- 鲁玉, 白苡含, 刘雨航, 陈琍. 单克隆抗体药物在非肿瘤疾病治疗中的研究进展. 华夏医学, 2023, 36(03):169-176.

- 陆婧. 新型鸭呼肠孤病毒 SL 株的分离鉴定及其荧光定量 PCR 检测方法的建立. 重庆: 西南大学, 2023.
- 陆新浩, 陈秋英, 刘鸿. 宁波地区新型鸭呼肠孤病毒病的流行情况. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会 2016 年学术年会、中国畜牧兽医学会禽病学分会第十八次学术研讨会论文集. 余姚市禽畜病防治研究所; 中国畜牧兽医学会, 2016:1.
- 罗丹, 刘芮, 高玉龙, 李凯, 刘长军, 祁小乐, 崔红玉, 张艳萍, 潘青, 高立, 王笑梅. 新型鸭呼肠孤病毒动物感染模型的建立. 中国预防兽医学报, 2022, 44(04):382-387+422.
- 罗丹. 新型鸭呼肠孤病毒流行株生物学特性研究及 ELISA 抗体检测方法的建立. 中国农业科学院, 2021.
- 罗玲, 商雨, 汪宏才, 李丽, 张蓉蓉, 罗青平, 王红琳, 卢琴, 温国元. 间接免疫荧光法测定新城疫病毒滴度的研究. 中国家禽, 2021, 43(12):102-105.
- 马明瑞, 陈浩, 张斌. 新型鸭呼肠孤病毒研究进展. 现代盐化工, 2022, 49(04):24-27.
- 牟大超, 周轶, 白秀峰. 单克隆抗体技术进展及上市药物分析. 药物生物技术, 2022, 29(01):87-94.
- 潘艳, 张昕. 单克隆抗体技术的研究进展. 吉林工商学院学报, 2014, 30(05):88-90+120.
- 任建委, 小扎桑. 单克隆抗体技术的基本原理、改进及应用. 高原科学研究, 2018, 2(04):110-115.
- 孙晓虹, 郭晶, 沈金艳等. 一株重组新型鸭呼肠孤病毒的遗传演化分析及生物学特性研究. 中国动物传染病学报:1-9[2024-03-17]
- 孙彦伟, 刘福安. 禽呼肠孤病毒的分离和鉴定. 中国畜禽传染病, 1990(05):1-3.
- 田昂. 新型鸭呼肠孤病毒间接 ELISA 检测方法的建立及应用. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- 王光锋. 雏鹅出血性坏死性肝炎病原鉴定及生物学特性的初步研究. 扬州: 扬州大学, 2004.
- 王鸿志. 新型鸭呼肠孤病毒致病性及其诱导巨噬细胞铁死亡的机制研究. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 王锦祥, 程晓霞, 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 王劭, 朱小丽, 肖世峰. 新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ B 和  $\sigma$ C 蛋白间接 ELISA 方法的建立. 福建农业学报, 2016, 31(09):903-907.

- 王全溪. 番鸭呼肠孤病毒病诊断技术研究.福州: 福建农林大学, 2004.
- 王劭, 陈少莺, 陈仕龙, 程晓霞, 林锋强, 朱小丽, 江斌, 李兆龙. 新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 方法的建立与应用. 农业生物技术学报, 2011, 19(02):388-392.
- 王劭. 番鸭呼肠孤病毒 S 组基因序列分析及衣壳蛋白克隆表达. 福州: 福建农林大学, 2005.
- 王思琪. 新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 蛋白单克隆抗体的制备及阻断 ELISA 抗体检测方法的建立. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 王宇飞, 徐思怡, 胡娇. 鸭呼肠孤病毒疫苗药物和抗体的研究进展.中国兽医科学:1-9[2024-02-19].
- 武华. NDRV 间接 ELISA 抗体检测方法的建立及其卵黄抗体的研制. 保定: 河北农业大学, 2021.
- 夏琳琳. DHAV-3 山东分离株 P1 基因序列分析及单克隆抗体的制备. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- 谢碧林, 林志敏, 林彬彬, 翁汉东, 王秀祯. 新型鸭呼肠孤病毒病研究进展. 福建畜牧兽医, 2021, 43(01):23-26+30.
- 辛海宁. 新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 蛋白免疫 Balb/c 小鼠后脾脏 BCR 组库的特征分析. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 徐宜, C.A.Mebus. 呼肠孤病毒(REOVIRMS)和辐状病毒(ROTAVIRMS)感染. 国外畜牧科技资料, 1978(01):76-78.
- 于可响, 韩宏宇, 庞运倩, 张玉瑶, 马秀丽, 黄兵. 新型鸭呼肠孤病毒一步反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法的建立. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会 2014 年学术年会论文集, 2014:1.
- 袁远华, 吴志新, 黄兴国, 黄淑坚. 新型鸭呼肠孤病毒病研究进展. 养禽与禽病防治, 2012(10):18-20.
- 袁远华, 吴志新, 王俊峰, 黄兴国, 贺东生, 黄淑坚. 新型鸭呼肠孤病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 2013, 35(09):738-741.
- 云涛, 华炯钢, 叶伟成, 倪征, 陈柳, 张存. 新型鸭呼肠孤病毒一步法 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 浙江农业学报, 2020, 32(04):571-576.

- 张博, 陈立功, 武华, 阴雅洁, 孟利佳, 郭康康, 侯绍华, 董世山. 新型鸭呼肠孤病毒 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 河北农业大学学报, 2020, 43(05):80-84.
- 张洪瑞. 表达新型鸭呼肠孤病毒  $\sigma$ C 蛋白重组乳酸乳球菌株的构建及免疫效果评价. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 张景辉, 武景琦, 房立春, 刘涛, 吴家强, 于可响, 徐怀英, 吕俊峰, 艾武, 郭慧君, 邱建华, 亓丽红, 宋玲玲. 鹅星状病毒与新型鸭呼肠孤病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立及应用. 中国兽医科学:1-10.
- 张淑九. 新型鸭呼肠孤病毒 LY20 株卵黄抗体的制备及其免疫保护性研究. 泰安: 山东农业大学, 2024.
- 张思远, 卢秀娴, 云鹭, 梁昭平, 潘俊斌, 林举攀, 叶贺佳. 新型鸭呼肠孤病毒广东分离株  $\sigma$ C 蛋白基因序列分析. 中国兽药杂志, 2019, 53(12):1-6.
- 张欣. 坦布苏病毒 SDS-70 株弱毒苗的制备及安全性与免疫效力的初步评价. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- 张旭杰. 新型鸭呼肠孤病毒卵黄抗体的制备及应用. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- 周仔欣. 登革病毒多价核酸疫苗的构建及免疫效果验证. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2023.
- 朱明恩, 王光锋, 提金凤, 李舫, 李汝春, 孙秋艳. 新型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定及板蓝根合剂的预防效果评价. 山东畜牧兽医, 2022, 43(12):13-19.
- 朱英奇. 新型鸭呼肠孤病毒的鉴定及其全基因组序列解析. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- Barton E. S., Forrest J. C., Connolly J. L., Chappell J. D., Liu Y., Schnell F. J., Nusrat A., Parkos C. A. and Dermody T. S.. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. 2001, 9104(3):441-451.
- Bi Z., Zhu Y., Chen Z., Li C., Wang Y., Wang G. and Liu G.. Induction of a robust immunity response against novel duck reovirus in ducklings using a subunit vaccine of sigma C protein. *Sci Rep.*, 2016, 6:39092.
- Bodelón G., Labrada L., Martínez-Costas J. and Benavente J.. The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two

- nonstructural proteins in infected cells. *Virology*. 2001; 290(2):181-191.
- Brüggemann M., Osborn M. J., Ma B., Hayre J., Avis S., Lundstrom B. and Buelow R.. Human antibody production in transgenic animals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*., 2015, 63(2):101-108.
- Endo-Munoz L. B. A Western blot to detect antibody to avian reovirus. *Avian Pathol.*, 1990, 19(3):477-487.
- Grande A., Rodriguez E., Costas C., Everitt E. and Benavente J.. Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *Virology*. 2000, 274(2):367-377.
- Kamimura N., Wolf A. M. and Iwai Y.. Development of Cancer Immunotherapy Targeting the PD-1 Pathway. *J Nippon Med Sch.*, 2019, 86(1): 10-14.
- Köhler G. and Milstein, C.. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, 256(5517), 495-497.
- Kuntz-Simon G., Blanchard P., Cherbonnel M., Jestin A. and Jestin V.. Baculovirus-expressed muscovy duck reovirus sigmaC protein induces serum neutralizing antibodies and protection against challenge. *Vaccine*. 2002, 20(25-26):3113-3122.
- Kuntz-Simon G., Le Gall-Reculé G., de Boissésou C. and Jestin, V.. Muscovy duck reovirus sigmaC protein is atypically encoded by the smallest genome segment. *The Journal of general virology*. 2002, 83(Pt 5), 1189-1200.
- Le Gall-Recul G., Cherbonnel M., Arnauld C., Blanchard P., Jestin A. and Jestin V.. Molecular characterization and expression of the S3 gene of muscovy duck reovirus strain 89026. *J Gen Virol.*, 1999, 80 ( Pt 1):195-203.
- Li M., Yan P., Liu Z., Cai D., Luo Y., Wu X., Wang Q., Huang Y. and Wu Y.. Muscovy duck reovirus enters susceptible cells via a caveolae-mediated endocytosis-like pathway. *Virus Res.*, 2020, 276:197806.
- Li N., Hong T., Wang Y., Wang Y., Yu K., Cai Y., Liu S., Wei L. and Chai T.. The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. *Vet Microbiol.*, 2016, 192:181-185.
- Li, J., and Zhen ping Zhu.. “Research and development of next generation of antibody-based therapeutics.” *Acta pharmacologica Sinica vol.*, 31,9 (2010): 1198-1207.
- Luo D., Liu R., Weng L., Li K., Qi X., Gao Y., Liu C., Zhang Y., Cui H., Pan Q., Gao L. and

- Wang X.. Genomic sequences and pathogenic characteristics of two variant duck reoviruses associated with spleen necrosis. *Infect Genet Evol.*, 2021, 92:104847.
- Maggon K. Monoclonal antibody "gold rush". *Curr Med Chem.*, 2007, 14(18):1978-1987.
- Martínez-Costas J., Grande A., Varela R., García-Martínez C. and Benavente J.. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J Virol.*, 1997, 71(1):59-64.
- Schnitzer T. J., Ramos T. and Gouvea V.. Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J Virol.*, 1982, 43(3):1006-1014.
- Shih W. L., Hsu H. W., Liao M. H., Lee L. H., Liu H. J.. Avian reovirus sigmaC protein induces apoptosis in cultured cells. *Virology*. 2004, 321(1):65-74.
- Smith L. H. and Teng N. N.. Clinical applications of monoclonal antibodies in gynecologic oncology. *Cancer*. 1987, 60(8 Suppl):2068-2074.
- Taylor, L. D., Carmack, C. E., Schramm, S. R., Mashayekh, R., Higgins, K. M., Kuo, C. C., Woodhouse, C., Kay, R. M. and Lon berg, N.. A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins. *Nucleic acids research.*, 1992, 20(23), 6287-6295.
- Theophilos M. B., Huang J. A. and Holmes I. H.. Avian reovirus sigma C protein contains a putative fusion sequence and induces fusion when expressed in mammalian cells. *Virology*. 1995, 208(2):678-684
- Yan H., Xu G., Zhu Y., Xie Z., Zhang R. and Jiang S.. Isolation and characterization of a naturally attenuated novel duck reovirus strain as a live vaccine candidate. *Vet Microbiol.*, 2021, 261:109214.
- Yin H. S., Shieh H. K. and Lee L. H.. Characterization of the double-stranded RNA genome segment S3 of avian reovirus. *J Virol Methods.*, 1997, 67(1):93-101.
- Zhu Y., Li C., Bi Z., Chen Z., Meng C., Wang G. J., Ding C. and Liu G.. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of the sigma C gene of novel duck reovirus. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2015, 165(1-2):88-92.