

分类号：_____

密级：_____

长江大学

硕士研究生学位论文

禽白血病病毒 J 亚群和 K 亚群囊膜蛋白单克隆抗体的制备

专 业： 水产养殖

研究方向： 动物病原学

研 究 生： 刘兰

指导教师： 杨玉莹

论文起止日期： 2015 年 9 月至 2018 年 4 月

分类号：_____

密级：_____



长江大学

硕士研究生学位论文

禽白血病病毒J亚群和K亚群囊膜蛋白单克隆抗体的制备

专 业： 水产养殖

研究方向： 动物病原学

研 究 生： 刘兰

指导教师： 杨玉莹

论文起止日期： 2015 年 9 月至 2018 年 4 月

Preparation of monoclonal antibodies against
envelope protein of avian leukosis virus subgroup J and
subgroup K

Major: Aquaculture Science

Direction of Study: Animal etiology

Graduate Student: Liu Lan

Supervisor: Prof. Yang Yuying

School of Animal Science

Yangtze University

September,2015 to April,2018

研究生学位论文原创性声明和版权使用授权书

原创性声明

我以诚信声明：本人呈交的硕士学位论文是在导师指导下开展研究工作所取得的研究成果。文中关于“建立的检测 ALV-J 和 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法”的结论和关于“制备的禽白血病病毒 J 亚群和 K 亚群囊膜蛋白单克隆抗体”的结果系本人独立研究得出，关于“建立的检测 ALV-J 和 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法”的结论和关于“制备的禽白血病病毒 J 亚群和 K 亚群囊膜蛋白单克隆抗体”的结果系本人独立研究得出，不包含他人研究成果。所引用他人之思路、方法、观点、认识均已在参考文献中明确标注，所引用他人之数据、图件、资料均已征得所有者同意，并且也有明确标注，对论文的完成提供过帮助的有关人员也已在文中说明并致以谢意。

学位论文作者（签字）：刘三

签字日期：2018年5月17日

版权使用授权书

本人呈交的硕士学位论文是本人在长江大学攻读硕士学位期间在导师指导下完成的硕士学位论文，本论文的研究成果归长江大学所有。本人完全了解长江大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权长江大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库，可以采用影印、缩印、数字化或其它复制手段保存论文，学校也可以公布论文的全部或部分内容。（保密论文在解密后遵守本授权书）

学位论文作者（签字）：刘三

签字日期：2018年5月17日

摘要

禽白血病 (Avian Leukosis, AL) 是由禽反转录病毒家族的禽白血病病毒引起的一种鸡的传染性肿瘤疾病。禽白血病不仅造成病禽死亡, 蛋鸡生产性能下降, 还会产生免疫抑制, 致使鸡群免疫应答能力降低, 继发感染其它疾病。自禽白血病病毒 J 亚群发现以来, 其宿主范围不断扩大, 从最早的只感染肉鸡, 蔓延到蛋鸡, 扩大到地方鸡种, 甚至有野鸭感染 ALV-J 的报道。目前几乎可感染所有品系的鸡种, 给养禽业造成了巨大的经济损失。自 2011 年起, 我国一些地方陆续分离到不同于已知的外源性禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus, ALV) 株, 经鉴定发现其不属于 ALV 中的任一亚群, 命名为 K 亚群。K 亚群病毒的发现揭示了我国鸡群中禽白血病病毒感染的复杂性。目前尚无商品化疫苗可以预防此病, 也无有效抗病毒药治疗该病, 只有依靠净化种群, 淘汰阳性鸡来控制 ALV 的传播。因此, 针对亚群特异性单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, MAb) 建立 ALV 抗原检测方法, 实现临床上对疾病的快速诊断显得尤为重要。

ALV 包含三个结构基因, 分别为 gag 基因, pol 基因和 env 基因。env 基因编码病毒囊膜蛋白, 由 gp85 基因和 gp37 基因组成。gp37 基因在 ALV 各亚群间高度保守, gp85 基因在 ALV 各亚群间差异较大, 也是 ALV 各亚群分类的基础。本研究分别针对 ALV-J 和 ALV-K 的 gp85 基因制备了禽白血病病毒 J 亚群和 K 亚群囊膜蛋白单克隆抗体。本研究首先将 ALV-J 和 ALV-K 的 gp85 基因分别构建到 2 种表达载体 pET-28a 和 pGEX-6P-1 上, 然后进行原核表达及纯化, 获得纯化蛋白后, 分别建立了检测 ALV-J 和 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法。经过一系列对比试验确定 ALV-J 抗体间接 ELISA 检测方法的最佳包被液为 pH9.6 碳酸盐缓冲液, 抗原包被浓度为 14 μ g/mL, 封闭液选择 5% 脱脂乳, 血清最佳稀释度为 1:1000, 酶标二抗最佳稀释度为 1:2000, 底物最佳作用时间为 15min。采用建立的检测 ALV-J 抗体间接 ELISA 方法的最佳包被液, 封闭液和底物最佳作用时间, 确定检测 ALV-K 抗体间接 ELISA 方法的抗原最佳包被浓度为 6.6 μ g/mL, 血清最佳稀释度为 1:2000。以带 GST 标签的 J-gp85 重组蛋白免疫小鼠, 利用杂交瘤技术进行细胞融合, 以带 HIS 标签的 J-gp85 蛋白包被酶标板经间接 ELISA 方法筛选阳性细胞, 避免了细胞融合后 ELISA 筛选实验过程中标签蛋白产生抗体造成的假阳性, 经过 5 次细胞融合后筛选出 1 株能稳定分泌 ALV-J-gp85 蛋白的单克隆抗体, 命名为 JB7。以带 HIS 标签 K-gp85 重组蛋白免疫小鼠, 以带 GST 标签的 K-gp85 蛋白包板, 经过 4 次细胞融合筛选出 2 株能稳定分泌 ALV-K 抗体的 MAb, 命名为 KD4 和 KE5。对制备的单抗 JB7 进行 Western blot 检测, 表明该株单抗能特异性识别 ALV-J-gp85 蛋白。进行 IFA 验证, 表明单抗能与 ALV-J 毒株发生特异性反应, 不与 ALV-A 毒株和 ALV-K 毒株反应。对制备的单抗 KD4 和 KE5 进行 Western blot 检测, 表明 2 株单抗都能特异性识别 ALV-K-gp85 蛋白。

进行 IFA 验证，表明 2 株单抗都能与 ALV-K 毒株发生反应，此外，2 株单抗还能识别 ALV-A 毒株。

本次研究制备的 ALV-J 单克隆抗体为制备 ALV-J 国产化抗原诊断试剂盒奠定基础，研制的 ALV-AK 单克隆抗体对于 ALV-K 今后的研究是一个重要的补充，为今后 ALV-AK 抗原检测试剂盒的研制奠定了基础。

关键词：J 亚群禽白血病病毒，K 亚群禽白血病病毒，gp85 基因，间接 ELISA，单克隆抗体

Abstract

Avian Leukosis (AL) is a type of infectious tumor disease caused by avian retrovirus. Avian leukemia not only causes the death of diseased chickens, but also declines in production performance of layer chickens and results in immunosuppression, lower immune response ability and infection of other diseases. Since the discovery of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J), its host range has been expanding, from the earliest infected only broiler chickens to layer chickens, extended to indigenous chickens, and even the wild ducks. At present, ALV can almost infect chicken breeds of all strains, which has resulted in huge economic losses to the poultry industry. Since 2011, some exogenous ALV strains have been isolated from several provinces in China. They have been identified that they do not belong to any subgroup of ALV, designated as subgroup K. The emerging of subgroup K reveals the complexity of avian leukosis virus infection in Chinese flocks. Up to now, there is no commercialized vaccine or effective antiviral drugs to prevent this disease. The eradication program of ALV is the only way to control the spread of ALV. Therefore, it is particularly important to establish the ALV diagnostic method based on subgroup specific monoclonal antibody (Monoclonal Antibody, MAb), so as to achieve the rapid clinical diagnosis.

ALV contains three structural genes: gag gene, pol gene and env gene. The env gene encodes envelope protein composed of gp85 and gp37 genes. gp37 gene is highly conserved among ALV subgroups, and gp85 gene of ALV were different of each other. It is also the basis for classification of ALV subgroups. In this study, primers were designed to amplify the gp85 gene of ALV-J and ALV-K respectively and then cloned into the pET-28a and pGEX-6P-1. The recombinant plasmids were transformed into BL21 to express and purify the fusion protein. After the obtaining of purified protein, we established indirect ELISA methods for detection of ALV-J antibody and ALV-K antibody respectively. After a series of comparative tests, the best reaction conditions for indirect ELISA detection method of ALV-J antibody as follows: 14µg/ml antigen used to coat ELISA plate with pH 9.6 CB Buffer, 5% skimmed milk, 1:1000 of sera as detecting samples. The working concentration of HRP-labelled Goat anti mouse IgG was 1:2000 and the reaction time was 15 min. The best reaction conditions for indirect ELISA detection method of ALV-K antibody as follows: 6.6µg/ml antigen used to coat ELISA plate, 1:2000 of sera as detecting samples. The mice were immunized with recombinant protein GST-J-gp85, and the

cells were fused by hybridoma technology. The positive cells were screened, through indirect ELISA method using HIS-J-gp85 protein as coating antigen. Finally, one hybridoma cells line, named JB7, stably secreting MAb against ALV-J-gp85 protein after five cell fusion was generated. Besides mice were immunized with recombinant protein HIS-K-gp85, and ELISA plate coated with GST-K-gp85 protein. Two hybridoma cells, named KD4, KE5, stably secreting MAb against ALV-K-gp85 protein after four cell fusion was generated. Western blot showed that the MAb JB7 could specifically recognize ALV-J-gp85 protein. IFA approved that the MAb JB7 reacted with ALV-J but not with ALV-A or ALV-K. Western blot using two MAbs (KD4 and KE5) showed that two MAbs could specifically recognize ALV-K-gp85 protein. IFA approved that two MAbs reacted with ALV-K and ALV-A but not with ALV-J.

The ALV-J monoclonal antibody prepared in this study lay the foundation for the preparation of ALV-J localization diagnostic kit. ALV-AK monoclonal antibodies developed here were important for the future research of ALV-K and lay the foundation for the preparation of ALV-AK diagnostic kit.

Key words: avian leukosis virus subgroup J , avian leukosis virus subgroup K , gene of gp85 , indirect ELISA, monoclonal antibody

目录

第一章 文献综述.....	1
1.1 禽白血病概述.....	1
1.2 禽白血病病毒概述.....	2
1.3 禽白血病的研究概况.....	4
1.4 本研究的目的及意义.....	10
第二章 J亚群禽白血病病毒囊膜蛋白单克隆抗体的制备.....	12
2.1 试验材料.....	12
2.2 方法.....	15
2.3 实验结果.....	24
2.4 讨论.....	30
第三章 K亚群禽白血病病毒囊膜蛋白单克隆抗体的制备.....	32
3.1 试验材料.....	32
3.2 方法.....	33
3.3 实验结果.....	35
3.3 讨论.....	40
全文结论.....	42
致谢.....	43
参考文献.....	44
个人简介.....	49
原创性声明版权使用授权书.....	50

第一章 文献综述

1.1 禽白血病概述

禽白血病 (Avian Leukosis, AL) 是由禽反转录病毒引起的一种传染性肿瘤疾病^[1]。常见的有淋巴细胞性白血病和髓细胞性白血病, 禽白血病病毒还能导致其他不常见的肿瘤疾病: 成髓细胞性白血病、成红细胞性白血病、骨石化病和血管瘤等^[2]。有关禽白血病的危害可追溯到 19 世纪末, 尽管养殖户知道该病的危害, 但其造成的损失很小, 在当时并未引起人们对该病的重视。1988 年前, 在鸡群中常见的为淋巴细胞性白血病, 该病的病原为 ALV-A 和 ALV-B。20 世纪 80 年代后期, 英国 Campton 动物保健协会在对肉鸡感染禽白血病病毒的情况进行调查时, 分别从一临床健康的肉鸡和发生髓细胞性白血病的肉鸡病例中分离到几株禽白血病病毒。1991 年, Payne 的研究结果表明这几株外源性禽白血病病毒不属于 A、B、C、D 中的任何一种, 属于一个新的亚群, 命名为 J 亚群, 并将其中的 HPRS-103 株作为 J 亚群原型株进行深入研究^[3]。1999 年, 美国的禽病肿瘤研究所又从许多典型的髓细胞性白血病病例中分离到多株 ALV-J 毒株。随后, 世界上许多地区相继报道白羽肉鸡暴发髓细胞性白血病。我国杜岩等于 1999 年首次从江苏和山东的白羽肉鸡中分离到 ALV-J^[4]。几年时间内, 我国的许多省份也发现白羽肉鸡感染 ALV-J 的病例。徐镔蕊等于 2002 年通过间接荧光抗体法检测到海兰褐蛋鸡也能感染 ALV-J^[5]。经过一段时间严格的种群净化, 基本清除了我国的白羽肉鸡群和蛋鸡群中的禽白血病。然而, 在我国各地饲养的黄羽肉鸡和地方鸡种中也相继暴发了禽白血病, 一时间我国各类鸡群都遭受了禽白血病的侵袭, ALV-J 也成为了危害养禽业最严重的 ALV 的流行亚群^[6]。显然 J 亚群的传染性和致病性远高于 ALV 的其它亚群, 这引起了国内外禽病研究者的高度关注。然而, 自 2010 年来, 通过用 DF1 细胞培养检测我国地方鸡群中 ALV 的感染情况, 分离到一些野毒株, 通过比较他们 gp85 基因的同源性, 发现与已知的外源性禽白血病病毒 gp85 基因同源性不到 90%, 属于一个新的亚群, 命名为 K 亚群。^[7]

1.2 禽白血病病毒概述

1.2.1 禽白血病病毒分类

禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus, ALV) 属于 α 反转录病毒^[8]。早期的禽白血病病毒分为慢转化型病毒和急性转化型病毒, 主要依据病毒引起的临床潜伏期和诱发肿瘤范围划分的。急性转化型病毒主要来自于实验室增值的病毒, 慢转化型白血病病毒为常见的禽白血病病毒^[9]。后期禽白血病病毒分类标准是依据囊膜糖蛋白特征其分为 A-J 十个亚群^[10], 另有新发现的 K 亚群^[11], 根据其传播方式

又可分为内源性病毒（E、F、G、H、I）和外源性病毒（A、B、C、D、J、K）。其中能感染鸡只有 A、B、C、D、E、J 和 K 亚群^[12-13]，F-I 亚群十分罕见，分别存在于环颈雉、黄金雉、匈牙利鹧鸪、冈比亚鹧鸪^[14-15]。E 亚群是鸡体内最常见的非致瘤性禽白血病病毒，除 E 亚群外其余六种外源性病毒都能导致鸡群产生肿瘤，最常见的是 J 亚群诱发髓细胞性白血病，其次是 A，B 亚群诱发淋巴细胞性白血病，C，D 亚群比较罕见，K 亚群大多从临床健康的鸡群中分离到，致病性不强。

1.2.2 禽白血病病毒形态学特征

禽白血病病毒粒子的外形似球状，直径在 80~130nm 之间，外表有长达 8nm 的纤突。外层的囊膜和中心电子致密的核心结构组成病毒粒子，膜表面糖蛋白、跨膜糖蛋白和病毒脂质构成病毒外层囊膜。二倍体的 RNA 和非糖基化结构蛋白构成正二十面体的核心结构。RNA 核酸、脂质和蛋白质成分分别约占病毒成分的 2%，33%和 65%^[16]。

1.2.3 禽白血病病毒的理化特征

病毒对氯仿、乙醚和胆盐等脂溶剂敏感是由于大量的碳水化合物和脂类占据在禽白血病病毒囊膜内。SDS 等去垢剂对禽白血病病毒病毒粒子有裂解作用，能使其核心蛋白和双倍体 RNA 释放出来。禽白血病病毒对热敏感，高温下很快就会失活。在 56℃ 时只需 30min 便会失活，37℃ 时的半衰期为 100~540min，即使是在 -15℃ 时半衰期也只有 1 周，只有 -60℃ 以下才可确保病毒能存活数年。因此，禽白血病病毒保存的一个重要条件是温度。在 pH4.5~9 间病毒能保持较好的活性，pH 不在此范围时均会失去活性。禽白血病病毒对紫外线有抵抗力^[17-18]。

1.2.4 禽白血病病毒基因组结构

反转录病毒属于仅有的二倍体 RNA 病毒，病毒 RNA 不能作为 mRNA 进行直接表达，而是作为模板先反转录成 cDNA^[19]。禽白血病病毒 RNA 基因组结构具备一个典型的序列特性，即 5'-R-U5-gag-pol-env-U3-R-3'，全长约 7.2kb，5' 为甲基化的帽子结构，3' 端有 Poly A 尾巴，末端序列 5'-R-U5 和 U3-R-3' 区域较为保守，为非编码区（uncoding region, UTR），中间序列 gag-pol-env 为编码区。非编码区拥有启动子和增强子活性，在病毒 RNA 转录成 cDNA 时构成长末端重复序列（long terminal repeat, LTR），囊膜糖蛋白基因（env）、聚合酶基因（pol）和衣壳蛋白基因（gag）这三个基因构成编码区主要结构基因^[20]。

gag 基因序列高度保守，编码的是群特异性抗原（gs），编码的蛋白主要有 P19，P2，P10，P27，P12，P15 和 P1。P27 蛋白构成病毒衣壳蛋白的主要成分，该蛋白上存在很多容易被检测出的抗原位点，常常被选作用于临床检测的抗体。P19 蛋白为病毒的基质蛋白，存在于病毒外表面，具备高度保守的氨基酸序列，

是一段 155 个氨基酸的短肽，该蛋白相连于病毒穿膜糖蛋白，影响病毒的出芽生殖^[21]。P2 蛋白一段长 22 个氨基酸的短肽，P2 的缺失对病毒粒子的形成起抑制作用，其它功能尚不清楚。P10 是一段长 62 个氨基酸的多肽，是 gag 基因编码的蛋白上最不保守的一段氨基酸序列，处于病毒囊膜和核心结构之间，在病毒的早期感染和后期装配中发挥作用。P12 是一种包绕 RNA 基因组的强 RNA 结合蛋白，主要负责 RNA 病毒的加工和包装。P15 为病毒的蛋白酶，其作用是切割 gag 和 pol 基因编码的前体蛋白形成成熟蛋白^[22-23]。

pol 基因序列也高度保守，但在 J 亚群有所差别，与其它外源性禽白血病病毒相比，ALV-J 原型株 HPRS-103 的 pol 基因上有终止密码子，位于下游第 5346 碱基处，其所编码的酶蛋白较其他外源性 ALV 少 22 个氨基酸^[24]。pol 基因在病毒基因组插入宿主细胞染色体这一过程中起关键作用，其编码的反转录酶 p68 参与病毒基因反转录成 cDNA 过程，编码的整合酶 p32 参与病毒 cDNA 整合进入宿主 DNA 过程，可以说，病毒的生活周期主要受这两种酶影响。

env 基因序列在 A、B、C、D 亚群间同源性较高，可达 80%~85%，而它们与 J 亚群的同源性仅 40%左右。env 基因编码囊膜糖蛋白，主要包含膜表面糖蛋白亚单位(surface glycoprotein unit, SU)gp85 和跨膜糖蛋白亚单位(transmembrane protein, TM) gp37。gp85 蛋白能对宿主细胞膜上的病毒受体进行特异性识别，对宿主的范围和亚群特异性起决定作用，非糖基化时的 gp85 蛋白大小为 36kDa。gp37 包含胞外区、跨膜区和胞内区三个结构区，胞外区有能介导病毒与细胞融合的融合区，是病毒进入宿主细胞的关键。

1.2.5 缺陷型禽白血病病毒基因结构特征

缺陷型禽白血病病毒是指外源性禽白血病病毒部分基因缺失而形成的缺损病毒，缺陷的部位可以发生在禽反转录病毒基因组的不同位点上。Rouse 肉瘤病毒和缺陷型白血病病毒基因组中，含有病毒性致瘤基因(v-onc)。Rouse 肉瘤病毒除了拥有典型禽白血病病毒基因组结构外，在 3'端单独存在一个与复制无关的 src 基因，即 gag-pol-env-src，额外的 src 基因为致癌基因^[25]。

1.2.6 禽白血病病毒的复制过程

反转录病毒的复制是一个及其复杂的过程，尽管反转录病毒对任何细胞膜都无选择性，然而感染的发生是具有特异性的。特异性的基础在于细胞特异性受体与 SU 亚单位作为配体的相互作用和结合，进而引起 TM 亚单位构象发生变化从而作用病毒与宿主细胞进行融合，并进入宿主细胞^[26]。随后，侵入的病毒失去了病毒囊膜而在胞浆内暴露出带有核衣壳的病毒核心结构，核心结构在胞浆内发生解离，在反转录酶的作用下病毒 RNA 反转录为 cDNA，cDNA 在病毒整合酶的作用下整合进宿主细胞基因组 DNA 中，利用细胞机制完成病毒 RNA 的转录、

翻译、装配病毒子的过程。

1.3 禽白血病的研究概况

1.3.1 禽白血病的流行病学

1.3.1.1 传染源

病鸡是本病的传染源，带毒鸡和感染的蛋种为隐形传染源。带毒鸡由于无明显临床症状，往往被人们忽视，而造成更大的危害。母鸡有病毒血症时，病毒在生殖系统内繁殖，在输卵管的蛋清分泌部含有最多的病毒^[27]。因此，病毒常存在于带毒鸡产的卵中，使得鸡胚被垂直感染。这种感染的鸡胚内大多器官都存在病毒粒子，并且发现其胰腺腺泡细胞内存在大量病毒聚积，这些病毒粒子传染性很高，鸡胚长成雏鸡后，病毒粒子随粪便排出，同时引起水平感染^[28]。所以除病鸡外，带毒鸡（种蛋）及其粪便排泄物等也是及其危险的传染源，不可忽视。

在感染 ALV 的鸡群中分为 4 种血清型：即有病毒血症但无抗体（V+A-）。有病毒血症且有抗体（V+A+）；无病毒血症但有抗体（V-A+）；无病毒血症也无抗体（V-A-）；再通过排毒情况（S±）可确定鸡只的感染状况。病毒的检测可使用 PCR 或免疫荧光方法，抗体检测可通过 ELISA 方法，排毒情况可采用检测群特异性抗原的方法。鸡群中 V-A-S- 鸡为未感染鸡或易感鸡群中有遗传抵抗力的鸡；垂直感染的雏鸡，呈现免疫耐受现象（V+A-S+），有病毒血症，但缺乏抗体，在其血液和组织中病毒浓度较高，长成成鸡后，成为带毒鸡、可排毒，成为重要的传染源。水平感染的鸡，其带毒、抗体和排毒状况与感染日龄有关。1~2 日龄雏鸡感染时和垂直感染鸡胚相似，为 V+A-S+，发病率高、死亡率高。4~8 周龄后感染时，为 V-A+ 或 V+A+，这些感染鸡大部分不排毒（S-），少部分可排毒（S+），此时感染的鸡发病率和死亡率大幅度降低。少数无病毒血症但有抗体的母鸡可间歇性传播该病毒，常发生于抗体滴度较低的鸡^[29]。

传染性病毒粒子最易在肝脏和胰脏内繁殖，也可在胆道上皮细胞、肠道及肠腺体内繁殖。因此，鸡的排泄物中往往携带病毒常，造成了周围环境的污染，形成水平传播的传染源。18 月龄以下的感染母鸡经卵传递病毒的能力较强。

1.3.1.2 传播方式和途径

外源性 ALV 有垂直传播和水平传播这两种传播方式。垂直传播在 ALV 流行病学上格外重要。除 ALV 各亚群的囊膜基因有差异外，其囊膜基因仍在不断发生突变，从而导致抗原的变动，加上和内源性病毒存在相互作用，导致 ALV 在遗传学上不断发生改变，使现有的检测手段难以跟上其变化速度，这是 ALV 极难根除的主要原因。此外，水平传播对促进垂直传播具有一定作用，特别是在孵化期和孵出的一周内^[30]。在一定条件下，经水平传播而感染的母鸡可发展成为持续感染的带毒鸡并将病毒传递给鸡胚。然而，这种情况对 A 亚群而言是极少见

的, 除非由于缺乏母源抗体、发生免疫应激或者是内源性病毒的出现使宿主的易感性增强。本病一般不通过间接接触(分栏饲养的鸡群)进行传播, 可能是因为病毒在鸡体外不易存活的原因。

鸡种的性别对 ALV 水平传播和垂直传播有影响。因此, 公鸡不能经垂直传播传染, 只能是病毒携带者或通过接触和性交传染。由于病毒血症母鸡的输卵管的蛋清分泌部病毒浓度很高, 病毒被排入蛋清造成鸡胚的先天性感染。虽然公鸡和母鸡均带毒, 但仅母鸡能垂直传播, 说明鸡胚感染是由输卵管内大量的 ALV 造成的, 而与体内其他部位转移来的病毒无关。电子显微镜研究结果也表明, 大量病毒在输卵管的膨大部进行复制。尽管这样, 蛋清中带有的 ALV 并非都能引起鸡胚或者雏鸡的感染^[31]。Payne 等、Tsukamoto 等和 Spencer 等的研究表明, 仅有大约 12.5%~50% 的感染是由蛋清中的病毒引起, 而大部分感染还是由水平传播引起, 这种间歇性的遗传传播可能由于病毒被灭活或被卵黄抗体中和导致的。研究发现, 在检测不到群特异性抗原的情况下任然能出现 ALV 的先天性传播^[32]。

ALV-J 的传播方式为垂直传播和水平传播。经垂直传播的鸡胚, 可产生持久的免疫耐受, 抗体呈阴性, 孵出的雏鸡有病毒血症, 这些鸡也会成为子代鸡 ALV-J 的传播者, 易于产生髓细胞性白血病或其它肿瘤。据报道, 实验性接种 HPRS-103 导致髓细胞性白血病的百分率大约为 30%。研究显示, 与 ALV-J 原型株 HPRS-103 关系密切的内源性病毒 ev/J 的 env 基因在鸡胚中的表达和免疫耐受相关, 此特征在 ALV-J 感染的肉鸡中占相当大的比例。不同日龄以及不同品系的鸡感染后的结果不同, 通过接触感染或注射 1 日龄肉鸡会导致部分肉鸡产生持久的耐受病毒血症 (V+A-), 而另一部分肉鸡引起短暂的病毒血症, 随后成为免疫鸡。

一般情况下, 经水平传播而感染 ALV-J 的鸡比经垂直传播而感染鸡的存活率和产蛋率都高^[33]。在排毒鸡的蛋清中能检测到群特异性抗原, 这种母鸡产的蛋在孵化率、质量和重量方面都明显低于正常母鸡。

ALV-J 的水平传播较其他亚群而言更为迅速, 造成的危害更为严重。一研究中表明, 从商品肉种鸡中检测出的 ALV-J, 由孵出雏鸡时的 9% 增长至 4 周龄时的 88%; 在水平感染鸡中, 大约 50% 会成为持续的病毒血症, 大约 25% 的母鸡将病毒传递给了子代。感染 ALV-J 的鸡免疫应答出现多样性, 使感染鸡的水平传播和他生物学特性十分复杂, 而且每次分离到的 ALV-J 毒株在遗传性和抗遗传性上都存在差别。经水平感染的鸡会产生短暂的病毒血症, 可不产生抗体也可产生抗体, 当 ALV-J 感染卵巢时, 才能将病毒传递给子代, 但这些鸡通过排出粪便不断向外界环境扩散病毒^[34]。若切断鸡群间的直接接触, 或将各鸡笼、鸡舍隔离开, 会大大减慢 ALV-J 的传播。

实验室接种 ALV-J 诱导的髓细胞性白血病可形成急性转化型病毒。急性转化型 ALV-J 相比 HPRS-103 株致癌更为迅速。接种 1 日龄雏鸡后, 通常情况下在 5

周龄时出现第一例髓细胞性白血病，平均在 9 周龄发生。这些发现表明急性转化型病毒对于 ALV-J 的感染及流行起到一定的作用，目前尚不清楚其传播效率。

1.3.1.3 易感动物

ALV 病毒感染的宿主主要为鸡，其他宿主也包含雉、鹌鹑、火鸡、鹳和和其他野禽。

1.3.2 禽白血病的临床症状

禽白血病临床症状不仅表现为体表皮肤血管瘤和内脏器官肿瘤，更常见的是鸡出现生长迟缓、产蛋率下降和免疫抑制。鸡群感染 ALV 后的临床病理作用造成的损失不低于肿瘤性死亡造成的损失^[35]。ALV 感染鸡群后的临床表现和病理变化多种多样，对于一些亚临床表现有时很难进行判定，并不是每只感染的鸡表现症状均相同，这与毒株，感染鸡的年龄和遗传性有关。一般情况下，早期感染，尤其是垂直传播时致病性很强，到了性成熟时多发生肿瘤，肿瘤发生部位常见于心脏、肝脏、肾脏、脾脏和卵巢，此外还能见于皮肤、法氏囊、胸腺、肌肉和骨髓。由 ALV 不同亚型的病毒导致鸡发生肿瘤的类型也存在差异，A, B 亚群常引发淋巴细胞性白血病，J 亚群多引起髓细胞性白血病。

1.3.2.1 淋巴细胞性白血病

该病是禽白血病病毒部分毒株侵害法氏囊，使淋巴滤泡囊的依赖细胞（B 细胞）癌变，增生，经血液循环转移至肝、脾等，最后形成肿瘤。该病又名大肝病、淋巴细胞瘤和内脏淋巴瘤等。淋巴细胞性白血病一般在 14 周龄后发病，在临床上虽无特征性症状，但随病程发展鸡群出现精神萎靡，食欲不振，体型瘦弱，鸡冠肉髯苍白、皱缩或发绀，下痢，腹部肿大，能摸到肿大的法氏囊和肝脏。剖检病鸡可见肿瘤发生部位主要在法氏囊、肝和脾，有时也发生在心、肺、肾、性腺、骨髓和肠系膜。肝脏变化率最大，体积明显肿大，比正常肝组织大几倍，故又称为“大肝病”。法氏囊病变明显时呈表现为结节状，病变不明显时时结节较小不易发现。肿瘤有的呈结节状，有的呈粟粒状，有的呈弥散型，有的是这几种类型混合而成。肿瘤光滑亮泽且质地柔软，切面呈乳白色或淡灰色，少见坏死灶。显微镜下镜检可见肿瘤组织均由淋巴母细胞构成，均处于原始发育阶段^[36]。

1.3.2.2 成红细胞性白血病

该病是禽白血病病毒侵害骨髓成红细胞后引起的肿瘤性疾病，临床上表现为贫血型和增生型两种，又称红细胞性骨髓病、红细胞性白血病、成红细胞增多症、原红细胞增生症。该病一般发生在 6 周龄以后的高产鸡，潜伏期不固定，病程由数日到数月不登。发病鸡早期表现为虚弱，嗜睡，鸡冠肉髯苍白或发绀。随病情发展慢慢演变成消瘦，下痢，并伴有毛囊出血，后期表现为严重的贫血。剖检病鸡可见全身性贫血，水肿或积水，各组织出现不同程度出血。贫血严重时，各组织器官发生萎缩，骨髓色淡柔软，呈胶冻样。另一种症状表现为肾脏、肝脏和脾

脏肿大柔软，呈暗褐色或樱桃红色，偶尔可见浅色斑点状病灶。

1.3.2.3 成髓细胞性白血病

该病是由禽白血病病毒侵害成髓细胞（骨髓原始粒细胞）后导致的肿瘤性疾病，主要表现为外周血液中出现大量成髓细胞，占全部血细胞的75%，又称骨髓细胞性白血病、骨髓瘤病、骨髓芽球症、成髓细胞增生性白血病、白细胞骨髓增生、原髓细胞增生病、成粒细胞增多症等。该病潜伏期有很大差别，病程长于成红细胞性白血病。发病鸡早期表现为虚弱，嗜睡，鸡冠肉髯苍白，而后表现为严重贫血，消瘦，脱水并伴有毛囊出血等症状。剖检病鸡可见肝脏等实质器官肿大，易碎。慢性病例发病鸡的实质器官则比较坚实，表面可见灰色弥漫性肿瘤结节。骨髓通常质地坚实，呈灰红色至灰白色。显微镜镜检可见肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等器官血管内外有大量成髓细胞。

1.3.2.4 髓细胞性白血病

该病是禽白血病病毒侵害禽骨髓髓细胞和前体细胞引起的肿瘤性疾病，又名髓细胞瘤病、骨髓瘤病、白血病绿色瘤和非白血病性骨髓细胞性白血病等。该病不同病例的病程差异大，病程长。发病鸡表现为食欲减退，精神不振，虚弱，消瘦，腹泻，鸡冠肉髯苍白，结膜发绀，羽毛蓬乱无光泽，伴有不同程度的贫血，有时甚至出现跛行，更严重的其头部、胸部和腿根处有硬实肿块。剖检病鸡可见新生的肿瘤生长于骨骼表面，大小不等，呈灰白色或黄白色，两侧对称，形状为圆形隆起或结节状，质软易碎，有的质地较硬。肝、脾、肾、睾丸或卵巢有不同程度肿大。肺淤血，有时出现灰白色结节。法氏囊、胸腺有的萎缩甚至消失，有的则正常^[9]。

1.3.2.5 骨石化病

该病是禽白血病病毒侵害骨膜和骨骼引起骨膜下成骨细胞增生，逐渐增厚、硬化形成的肿瘤性疾病，又称骨硬化病、骨型白血病、大理石骨病等。该病一般发生于8~12周龄鸡，常与淋巴细胞性白血病并发。病鸡早期多发育不良，鸡冠肉髯苍白，干骺端或长骨骨干增厚、变硬，偶有温热感，后期跖骨呈典型“长靴状”肿大，行走拘谨或跛行。病变主要发生在骨组织，骨膜增厚，病变一般为对称性，早期易被切开，病变严重时可阻塞骨髓腔。脾脏由轻度肿大到严重萎缩。

1.3.2.6 血管瘤

该病是禽白血病病毒侵害血管系统形成的肿瘤，包含毛细血管瘤、血管内皮瘤、海绵状血管瘤和血管内皮肉瘤等。血管瘤发生于心、肝、脾、肺等器官，也可发生于皮肤及皮下深层组织，多为良性。

1.3.2.7 其他

其他肿瘤病极为少见，如结缔组织肿瘤、成肾细胞瘤、原发性肝癌、卵泡膜细胞瘤和粒层细胞瘤、神经胶质瘤等。

1.3.3 禽白血病的诊断方法

依据禽白血病的流行病学特点和临床病理学检查可做出初步诊断,但鸡的肿瘤性疾病在临床上极易混淆,因为禽白血病、马立克氏病和网状内皮增生症是常见的三种肿瘤性疾病,在外观上不易区分,确诊该病仍需进一步的实验室检验,如病毒分离鉴定,聚合酶链式反应(PCR)技术,血清学检测。

1.3.3.1 病毒分离鉴定

病毒分离是一种检测病原的方法,尤其是对新毒株的鉴定和疫苗的安全性检验非常有效。病毒分离方法的样品为病鸡器官、肿瘤组织、泄殖腔棉拭子、血清、血浆、十日龄鸡胚^[37-42]。将病鸡血液或病变组织悬液过滤后接种至鸡胚成纤维上,由于ALV感染细胞后不使细胞发生病变,需进一步验证,ALV检测方法如下:

抵抗力诱发因子试验(RIF):虽然禽白血病病毒感染鸡胚成纤维细胞后不发生细胞形态学变化,但肉瘤病毒感染成纤维细胞后可使细胞形态发生病变(蚀斑)感染禽白血病病毒的细胞能抵抗同一亚群的肉瘤病毒感染,进而降低了同亚群肉瘤病毒感染细胞的能力。根据这种干扰特性可以广泛用于区分禽白血病病毒亚群。

补体结合(COFAL)试验:是一种检测p27抗原的传统方法。补体结合试验的敏感性较低,需用成纤维细胞接种病毒后获得足够的待检抗原。若采用对不同ALV有抵抗性的细胞,这样该病毒对细胞有抵抗性就不会产生抗原。因此利用补体结合实验就能区分禽白血病病毒亚群。

ELISA免疫检测试验:是一种较为敏感的检测p27抗原的方法。检测外源性病毒的gs抗原时需考虑内源性病毒的gs抗原产生的干扰。为排除内源性病毒的干扰,将病鸡组织悬液过滤接种对E亚群有遗传抗性(C/E)的敏感成纤维细胞,培养数天后使用商品化的禽白血病病毒P27抗原检测试剂盒检测上清液^[43]。

不产毒细胞(NP)活化试验:Rous缺陷性病毒的基因组虽然能复制病毒RNA,但缺乏病毒囊膜基因,产生的子代没有感染性。当感染CEF细胞并使之转化后不能进入新宿主细胞,这样转化的细胞并不能成为Rous肉瘤病毒的生产者,即为不产毒细胞。将被检样品接种至鸡胚成纤维细胞,再将此培养物与NP细胞进行混合培养,若被检测样品中含白血病病毒,不感染的NP细胞成为感染性RSV,检测培养物的上清中是否含有大量RSV确定样品中是否存在禽白血病病毒。

表型混合(PM)试验:PM试验也是一种不产毒细胞活化试验。实验需要用到对A-D亚群病毒均易感的鸡胚成纤维细胞(CEF)、对E亚群病毒有遗传抵抗性的C/E成纤维细胞、不感染C/E成纤维细胞的E亚群种毒RSV(RAV-0)。实验时首先用RAV-0大剂量感染CEF细胞,产生RSV转化细胞,将入待检样品混合培养,7天后在C/E成纤维细胞上检测上清。由于RAV-0不感染C/E成纤维

细胞，因而在 C/E 成纤维细胞上形成的蚀斑即为 RAV-0 与待检样品中的外源性 ALV 表型混合培养结果，表明待检样品中含外源性 ALV。

1.3.3.2 聚合酶链式反应（PCR）技术

鉴于病毒分离鉴定技术耗费时间长、试验成本高、不方便大批量检测样品，应用聚合酶链式反应（PCR）技术能够进行病原的快速诊断。对于禽白血病病毒来说，在各亚群间的 gag 基因和 pol 基因相对保守，env 基因序列差异较大。随着分子病毒学技术的发展，比较禽白血病病毒 env 基因序列来区分各亚群的方法已逐步取代了经典病毒学方法^[44]。

1.3.3.3 血清学检测

所谓血清学检测方法是指针对抗原与抗体在体内或体外发生特异性结合这一特性建立的检测方法。在对病毒的检测中，检测病毒抗体可以监测该病毒在宿主机体内的情况，对于预防控制禽白血病有很重要的意义。

病毒中和试验是血清学检测方法中的一种，该试验敏感且具有特异性。同一亚群的禽白血病病毒只能被该亚群中的其他禽白血病病毒的抗体中和，不能被其他亚群病毒的特异性抗体中和^[45]。

1.3.4 禽白血病的预防和控制

禽白血病不仅造成病禽死亡，蛋鸡生产性能下降，还会产生免疫抑制，致使鸡群免疫应答能力降低，继发感染其它疾病。此外，已陆续出现禽白血病病毒污染其他禽用疫苗、兽用疫苗、以及人用疫苗的报道^[46]，禽白血病病毒对疫苗造成的污染已不容忽视。目前尚无商品化疫苗可以预防此病，也无有效抗病毒药治疗该病，只能从引种，净化，提高鸡群抵抗力，加强管理方面控制该病的发展。

1.3.4.1 种禽场的净化

净化的方式主要是切断该病的垂直传播途径。国外进化禽白血病病毒主要有两种方式，第一种方式是直接挑选无 ALV 感染的母鸡。可有三种方法：①挑选无 ALV 抗体也不排毒（A-S-）的母鸡；②挑选有 ALV 抗体但不排毒（A+S-）的母鸡；③挑选无病毒血症的母鸡。第二种方式是检测母鸡、种蛋、鸡胚和雏鸡有无 ALV 感染，淘汰阳性鸡。主要有四步操作程序：①20 周龄时，检测母鸡和公鸡直肠拭子中的 gs 抗原，淘汰阳性鸡；②22 周龄时，检测母鸡阴道拭子和公鸡直肠拭子中的 gs 抗原，淘汰阳性鸡；③选择阴道拭子为阴性的母鸡产的蛋，检测蛋清中的 gs 抗原，淘汰阳性蛋和母鸡；④孵化检测呈阴性的蛋，检测孵出第一个雏鸡胎粪中的 gs 抗原，淘汰阳性母鸡及其后代。国内一般采用羽-卵法进化，分开产前和开产后两个阶段进化。开产前，采用羽琼法检测鸡骨髓中的 gs 抗原，淘汰阳性鸡；开产后，采用卵琼法检测种蛋蛋清中的 gs 抗原，淘汰阳性鸡。

1.3.4.2 引种

选择无外源性 ALV 感染，实施了严格的孵蛋卫生管理的育种公司，挑选同

时具有遗传抵抗力的鸡种引进。

1.3.4.3 加强疫苗免疫监测

马立克氏病,网状内皮组织增生症等可引起鸡的免疫抑制,从而降低对 ALV 的抵抗力。因此,首先得做好对这些疾病的疫苗免疫工作,选用质量可靠,无污染的疫苗,提高鸡群整体免疫力。

1.3.4.4 严格控制鸡舍环境

带毒鸡通过粪便排毒污染鸡舍是主要的水平传播途径,因此,保持鸡舍环境卫生,定期对鸡舍进行严格的消毒尤为重要,还需对注射用器械等进行消毒。

1.4 本研究的目的及意义

自禽白血病病毒 J 亚群发现以来,其宿主范围不断扩大,从最早的只感染肉鸡,蔓延到蛋鸡,扩大到地方鸡种,甚至有野鸭感染 ALV-J 的报道^[47-48]。目前几乎可感染所有品系的鸡种,给养禽业造成了巨大的经济损失。造成的巨大经济损失主要来源于以下两个方面,一是直接导致发病,鸡感染该病后产生肿瘤,最终导致死亡,成年鸡群死亡率最高,达 20%以上。二是引起感染鸡群产生免疫抑制,影响其它疫苗的免疫效果和继发感染多种疾病^[49-50]。一直以来,我国也未完成对 ALV-J 的彻底净化,反而因 ALV-J 感染鸡群后造成不可挽回的损失。

2012 年,我国的王鑫等在探究地方品种鸡群禽白血病病毒的特点时,从芦花鸡中分离到 3 株外源性禽白血病病毒,通过将他们的囊膜蛋白与已知各亚群 ALV 的囊膜蛋白作氨基酸同源性比较,发现三株新分离到的 ALV 与各亚群同源性显著低于 A、B、C、D、E、J 各亚群内的同源性范围,表明分离到的三株外源性 ALV 属于一个新的亚群,并初步命名为 K 亚群。2011 年至 2014 年间,有关学者对来自江苏、浙江、山东临床样品进行分析,发现 K 亚群的分离比例高于 J 亚群,其中包括一些地方品系鸡种,芦花鸡、琅琊鸡、东乡绿壳蛋鸡,表明 K 亚群病毒在鸡群中的感染呈增长的趋势。据报道,这些分离到的 K 亚群禽白血病病毒大多来自于临床健康鸡,本实验室分离到的 K 亚群病毒来自于临床上表现肿瘤的鸡。

虽然近几年国家在鸡肿瘤性疾病研究方面投入了大量资金,但针对禽白血病一直无有效疫苗可以预防,也无抗病毒药物治疗该病,只能依靠净化淘汰阳性鸡。目前,鸡场禽白血病的诊断主要依靠国外进口诊断试剂盒,价格昂贵,一般小型鸡场及农户无法承担,使得禽白血病的净化受到一定限制。国内一些诊断试剂盒在敏感性和符合度上差于进口试剂盒,因此研制成本低、效果好的本国试剂盒显得尤为重要。单克隆抗体敏感性强、特异性高、重复性好,是建立特异性 ELISA 检测试剂盒的基础。gp85 蛋白在 ALV 各亚群中差异较大,具有亚群特异性,因此制备针对 ALV-J gp85 蛋白亚群特异性单克隆抗体和针对 ALV-K gp85 蛋白亚群特异性单克隆抗体及建立快速 ELISA 检测方法具有较高的应用价值。

本试验的目的在于建立检测 ALV-J 抗体和 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法，为 ALV-J 和 ALV-K 的血清学调查提供检测方法。制备针对 ALV-J gp85 和 ALV-K gp85 蛋白的单克隆抗体，确定其反应特异性，为 J-gp85 蛋白和 K-gp85 蛋白结构与功能的研究奠定基础，为 ALV-J 和 ALV-K 抗原检测试剂盒的研发奠定基础。

第二章 J 亚群禽白血病病毒囊膜蛋白单克隆抗体的制备

2.1 试验材料

2.1.1 病毒与细胞来源

ALV-A HB₂₀₁₅₀₁₂ 病毒株, ALV-J HB₂₀₁₀₀₀₁ 病毒株和 ALV-K HB₂₀₁₅₀₃₂ 病毒株为本实验室保存。

DF1 (鸡胚成纤维细胞) 细胞购自中国科学院上海细胞库, 由本实验室冻存; 小鼠骨髓瘤 (SP2/0) 细胞株购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

2.1.2 菌株、载体和实验动物

E. coli DH5 α 和 *E. coli* BL21 菌株, 原核表达载体 pGEX-6P-1 和 pET-28a 由本实验室保存。所用的六周龄 BALB/c 小鼠购自湖北省疾控中心。

2.1.3 主要试剂

PCR 相关试剂、pMD-19T、DL-2000、DL-5000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司; 蛋白 Marker 为 Thermo 公司产品; 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (GK0222)、质粒小量提取试剂盒(GK2004-50)、琼脂糖凝胶回收试剂盒 (GK2043-50) 为上海捷瑞生物科技有限公司产品; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*BamH* I、*Sal* I, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 氯化钠、酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂粉、琼脂糖、氨苄青霉素、卡那霉素、乙二胺四乙酸 (EDTA)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、Tris 碱、尿素、 β -巯基乙醇、十二烷基磺酸钠 (SDS)、丙烯酰胺、过硫酸铵、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、HAT 选择培养基、HT 选择培养基、多聚甲醛、TritonX-100 购自 SIGMA 公司; 乙醇、氯仿、丙三醇、异戊醇、购自国药公司; 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清购自 GIBCO 公司; TMB 显色液购自天根公司; HRP 标记的羊抗鼠酶标二抗、FITC 标记羊抗鼠 IgG 购自武汉三鹰生物有限公司。

2.1.4 主要仪器设备

PCR 仪 (美国, BIO-RAD, MyCycler)、核酸电泳仪 (北京六一, DYY-10C)、颗粒制冰机 (ScosMan AF-103) 小型高速台式离心机 (Eppendorf, Centrifuge 5418)、冷冻低温高速离心机 (上海天美, C15RT)、外排式二级生物安全柜 (苏州安泰, BHC-1300 II B2)、节能型智能恒温槽 (宁波新芝, DC-1006)、数字电热恒温水浴锅 (江苏金坛环宇, HH-4)、台式空气恒温摇床 (北方同正,

SHK-99-II)、振荡培养箱(上海博讯, SPX-150B-D)、伯乐酶标仪(美国, BIO-RAD 680)、蛋白电泳槽(美国 BIO-RAD, Mini-PROTEAN)、蛋白电泳仪(美国 BIO-RAD, PowerPac™)台式空气恒温摇床(北方同正, SHK-99-II)、紫外光凝胶成像分析仪(美国 BIO-RAD, GELDOC XR)、超声波细胞粉碎仪(宁波新芝, JY92-2D)、集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城, DF-101S)、CO₂细胞培养箱(日本, SANYO MCO-15AC)、倒置荧光显微镜(宁波舜宇, XD30-RFL)。

2.1.5 主要试剂的配制

(1) 细菌培养基

LB 培养基: 配制 100 mL 无抗 LB 液体培养基时, 称取 1 g 氯化钠, 1 g 胰蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 用 80 mL 去离子水溶解, 最后定容至 100 mL; 加入 1.2 g 琼脂粉可配成相应体积的 LB 固体培养基。高温高压灭菌冷却至 50℃ 左右时加入过滤的抗生素可制备选择培养基。

(2) 核酸电泳相关溶液

50×TAE 电泳缓冲液: 配制 1 L 50×TAE 时称取 242 g Tris, 37.2g Na₂EDTA·2H₂O, 加入 800 mL 去离子水溶解后加入 57.1 mL 的醋酸充分搅拌, 最后定容至 1 L。

1%的琼脂糖凝胶: 向稀释至 1×的 100mL TAE 电泳缓冲液中加入 1 g 琼脂糖, 加热溶解后加入核酸染料倒胶。

(3) 蛋白表达及纯化相关溶液

24 mg/mL 的 IPTG: 称取 1.2 g IPTG 加入 40ml 去离子水, 溶解搅拌, 定容至 50 mL, 过滤除菌分装至 EP 管中, -20℃ 保存。

10 mg/mL 的溶菌酶: 称取 0.5 g 溶菌酶, 加入 40 mL 去离子水, 搅拌溶解, 定容至 50 mL, 过滤除菌分装至 EP 管中, -20℃ 保存。

缓冲液 A: 称取 3.0274 g Tris, 0.3 g EDTA, 3 g NaCl, 加去离子水搅拌溶解, 调节 pH 至 8.0, 最后定容至 500 mL, 室温保存。

缓冲液 B: 称取 3.0274 g Tris, 0.3 g EDTA, 3 g NaCl, 加入 5 mL 1% Nonidet P-40, 加去离子水搅拌溶解, 定容至 500 mL, 室温保存。

缓冲液 C: 称取尿素 120 g, Tris 3.0274 g, EDTA 0.15 g, 脱氧胆酸钠 0.2070 g, 加入 TritonX-100 1.25 mL, β-巯基乙醇 180 μL, 加去离子水搅拌溶解, 定容至 250 mL。

缓冲液 I: 称取 Tris 1.5137 g, EDTA 0.15 g, NaCl 1.5 g, 尿素 60 g, 加入 TritonX-100 1.25 mL, 加去离子水搅拌溶解, 调节 pH 至 8.0, 最后定容至 250 mL, 室温保存。

缓冲液 II: 称取 Tris 1.5137 g, EDTA 0.15 g, NaCl 1.5 g, 加入 TritonX-100 7.5

mL, 加去离子水搅拌溶解, 最后定容至 250 mL, 室温保存。

缓冲液III: 称取 Tris 1.5137 g, EDTA 0.15 g, NaCl 1.5 g, 盐酸胍 47.75 g, 加入 TritonX-100 1.25 mL, 加去离子水搅拌溶解, 最后定容至 250 mL, 室温保存。

500 mM 咪唑: 称取 1.7 g 咪唑于 50 mL 离心管中, 加缓冲液 C 水溶解, 最后定容至 50 mL, 室温保存。

(4) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关溶液

1.5 M Tris-HCl: 称取 181.7 g Tris 加入 800 mL 去离子水, 搅拌溶解, 调节 pH 至 8.8, 最后定容至 1 L。

1.0 M Tris-HCl: 称取 121.1 g Tris 加入 800 mL 去离子水, 搅拌溶解, 调节 pH 至 6.8, 最后定容至 1 L。

10%的 SDS: 称取 10 g SDS 加入到 80 mL 去离子水中, 搅拌溶解, 定容至 100 mL。

10%的过硫酸铵: 称取 0.1 g 过硫酸铵粉末加入 1 mL 去离子水中混匀, 4°C 保存。

5×SDS-PAGE 电泳缓冲液: 称取 15.1 g Tris, 94 g Glycine, 5 g SDS 加入 800 mL 去离子水溶解, 最后定容至 1 L。

5×SDS-PAGE loading buffer: 称取 0.5 g SDS, 25 mg 溴酚蓝, 加入 1 M Tris-HCl (pH6.8) 1.25 mL, 2.5 mL 甘油, 加去离子水溶解定容至 5 mL, 500 μL/管, 使用前每管加入 25 μL β-巯基乙醇。

考马斯亮蓝 R-250 染色液: 称取 1g 考马斯亮蓝 R-250 于 1L 烧杯中, 加入 250 mL 异丙醇, 搅拌溶解, 加入 100 mL 冰醋酸, 加入 650 mL 去离子水搅拌均匀, 用滤纸出去颗粒物, 室温保存。

考马斯亮蓝脱色液: 用量筒量取 100 mL 醋酸, 50 mL 乙醇, 850 mL 去离子水于 1 L 烧杯中搅拌混匀, 室温保存。

(5) Western-blot 相关溶液

Western 杂交膜转移缓冲液: 称取 2.9 g Glycine、5.8 g Tris、0.37 g SDS、加水溶解, 加入 200 mL 甲醇, 最后加水定容至 1 L, 室温保存。

Western 杂交膜清洗液: 称取 8.8 g 氯化钠, 加入 20 mL 1M Tris-HCl, 加入 0.5 ml Tween-20, 加水定容至 1 L, 4°C 保存。

Western 杂交膜封闭液: 称取 5 g 脱脂乳加入 100 mL Western 杂交膜清洗液中混匀, 现配现用。

(6) ELISA 相关溶液

0.05 M 碳酸盐缓冲液: 称取 0.795 g 碳酸钠, 1.465 g 碳酸氢钠于 500 mL 烧杯中, 加水溶解, 调节 pH 至 9.6, 最后定容至 500 mL, 4°C 保存。

1×PBS: 称取 NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.79 g, KH₂PO₄ 0.135 g

于 500 mL 烧杯中，加水溶解，调节 pH 至 7.4，最后定容至 500 mL。

PBST 清洗液：取 1 L 1×PBS 加入 500 μ L Tween-20，搅拌均匀。

ELISA 封闭液：称取 5 g 脱脂乳加入 100 mL PBST 清洗液，搅拌均匀。

2 M 硫酸终止液：量取一定体积的去离子水，然后按浓硫酸与去离子水 1:8 的比例，将浓硫酸缓慢加入去离子水中，边加入边搅拌，室温保存。

(7) 细胞培养基相关溶液

10%的 1640 培养基：胎牛血清与 1640 培养基按 1:9 配置。

HAT 选择培养基：取 5 mL 1640 培养基加入瓶装 HAT 粉末（SIGMA）中，用移液枪吹打溶解，全部加入 500 mL 10%的 1640 培养基中摇匀，4 $^{\circ}$ C 保存。

HT 选择培养基：取 5 mL 1640 培养基加入瓶装 HT 粉末（SIGMA）中，同上述方法制备。

(8) 间接免疫荧光相关溶液

4%多聚甲醛：称取 4 g 多聚甲醛粉末溶解于 100 mL PBS（加入一到两滴 1 M NaOH），60 $^{\circ}$ C 水浴 10~20 min，使之溶解，避光 4 $^{\circ}$ C 保存。

10%FBS：FBS 与 PBS 按 1: 9 进行稀释，4 $^{\circ}$ C 保存。

0.5% TritonX-100：取 5 μ L Triton-100 加入到 1 mL PBS 中溶解均匀，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 方法

2.2.1 重组蛋白的制备

2.2.1.1 病毒模板 DNA 的制备

将分离的 ALV-J 病毒接种长至 80%密度的单层 DF1 细胞，孵育 2 h 后弃去病毒液，用 PBS 清洗两遍，以 1% DMEM 培养基培养 5 d 后收集细胞，按 DNA 提取试剂盒说明书提取细胞基因组 DNA。

2.2.1.2 引物设计

参照 GenBank 上 J 亚群禽白血病病毒毒株序列，设计一对特异性引物截短扩增 gp85 基因。上游引物为 5'-CCGGAATTCCTTGGGACCCCAAGAATTG-3'，含有 *EcoR* I 酶切位点；下游引物为 5'-CCGCTCGAGCTTAGCAGTCCCGTT-ATTCCAC-3'，含有 *Xho* I 酶切位点，扩增目的片段大小为 510bp。

2.2.1.3 聚合酶链式反应（PCR）

PCR 反应体系：10×PCR buffer 5 μ L，dNTP（2.5mM）4 μ L，Mg²⁺（25 mM）4 μ L，10 pmol/L 的上下游引物各 2.5 μ L，模板 DNA 1 μ L，rTaq（5U/ μ L）0.5 μ L，加灭菌去离子水补足至 50 μ L。

PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，94 $^{\circ}$ C 变性 40 s，62 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，共 33 个循环，72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.1.4 PCR 产物的纯化回收及重组质粒 pMD -19T-simple-ALV-J-gp85 的构建

扩增的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收 gp85 目的片段。按说明书连接至 pMD -19T-simple 载体上，16℃ 连接过夜。连接产物转化进大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，冰浴 30 min，置于 42℃ 恒温水浴槽热激 90 s，加入无抗液体 LB 培养基后 37℃ 恒温摇床复苏 1 h，涂氨苄平板，置于 37℃ 细菌培养箱培养过夜。挑取单菌落摇菌培养，进行菌液 PCR 鉴定。阳性菌摇菌提质粒，参照质粒小量提取试剂盒说明书提取质粒。

2.2.1.5 ALV-J-gp85 两种不同重组表达质粒的构建及鉴定

将重组质粒 pMD -19T-simple-ALV-J-gp85、pET-28a 和 pGEX-6P-1 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行酶切，酶切体系（50 μL）如下：

10×cutsmart	5 μL
<i>EcoR</i> I	1.5 μL
<i>Xho</i> I	1.5 μL
pMD -19T-simple-ALV-J-gp85/ pET-28a/pGEX-6P-1	12/11/10 μL
ddH ₂ O	30/31/32 μL

酶切体系置 37℃ 恒温水浴槽中 3 h，酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收目的片段。

酶切过的 gp85 基因与酶切过的 pET-28a 和 pGEX-6P-1 载体分别进行连接，连接体系（10 μL）如下：

10×Ligation Buffer	1 μL
Ligase T4	0.5 μL
gp85 基因	5 μL
pET-28a/pGEX-6P-1	3.5 μL

混匀后室温连接 1 h，将连接产物转化进大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，加入无抗液体 LB 培养基后 37℃ 恒温摇床复苏 1 h，分别涂板氨苄培养基和卡那培养基，置于 37℃ 培养箱培养过夜，挑取单菌落摇菌培养，进行菌液 PCR 鉴定。

将鉴定的阳性菌液提质粒，分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶对重组表达质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85 进行双酶切，酶切体系（10 μL）如下：

10×cutsmart	1 μL
<i>EcoR</i> I	0.3 μL
<i>Xho</i> I	0.3 μL
重组质粒	3 μL
ddH ₂ O	5.4 μL

酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，将酶切鉴定正确的阳性菌送武汉擎科

创新生物有限公司测序。

2.2.1.6 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的两种阳性重组质粒转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞，加入无抗液体 LB 培养基后 37℃ 恒温摇床复苏 1 h，分别涂板氨苄培养基和卡那培养基，置于 37℃ 细菌培养箱培养过夜，次日分别挑取单菌落接入 1 mL Amp⁺培养基和 1 mL Ka⁺培养基，37℃ 小摇过夜，次日按 1:100 分别接入 4 mL Amp⁺培养基和 4 mL Ka⁺培养基中 37℃ 大摇，待细菌 OD 值接近 0.6 时，分别取 2 mL 于干净试管，加入 IPTG 至终浓度为 1 mM 设为诱导组，原试管内剩余的 2 mL 设为未诱导组，分别于 25℃、30℃、37℃ 诱导 4 h，每管收集 300 μL 菌液，12000 r 离心 1 min，弃上清，加入 40 μL PBS 重悬菌体，加入 10 μL 5× loading buffer，混匀后，沸水浴 10 min，进行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳结束后经考马斯亮蓝染色，脱色，对 J 亚群 gp85 蛋白表达产物进行鉴定。

此外，若表达效果均不佳可尝试 IPTG 浓度 1 mM，16℃ 低温诱导过夜。

2.2.1.7 两种重组蛋白的超声裂解

将诱导表达出的菌液对应的未表达组的菌液按 1:100 分别接入 5 mL Ka⁺培养基和 5 mL Amp⁺培养基，37℃ 小摇过夜，次日按 1:100 分别接入 500 mL Ka⁺培养基和 5 mL Amp⁺培养基中，待细菌 OD 值接近 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mM，诱导 3 h 收菌。纯化前需对细菌表达的蛋白进行检测，确定其表达蛋白在上清里还是沉淀中。分别取少许细菌沉淀用 4 mL PBS 重悬，加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL，加入蛋白酶抑制剂至终浓度为 1 mM，混匀后冰浴 30 min 后超声破碎菌体，超声功率为 400 w，破碎 10 s，间歇 10 s，工作时间为 30 min，超声结束后 12000 rpm/min 离心 10 min，分离上清和沉淀。分别对上清和沉淀处理后经 SDS-PAGE 检测，两种细菌表达的蛋白均在沉淀中，为包涵体蛋白。

2.2.1.8 重组蛋白 HIS-J-gp85 的纯化

将上一步收集的细菌用 40 mL 缓冲液 A 重悬，12000 rpm，4℃ 离心 10 min，弃上清，用 10 mL 缓冲液 C 重悬菌体，加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL，加入蛋白酶抑制剂至终浓度为 1 mM，混匀冰浴 30 min，超声破碎菌体，超声功率为 400 w，破碎 10 s，间歇 10 s，工作时间为 80 min，超声结束后 12000 r 离心 15 min，分离上清，过滤待用。

超纯水冲洗空柱 2 遍，1×PBS 冲洗空柱 2 遍，关闭阀门，向柱内加入 2 mL Ni 填料，超纯水加满柱子，打开阀门使液体缓慢流出，待柱内液面高于 Ni 填料 1 mL 时再加满超纯水 1 次，以后依次加入 1×PBS 2 次，缓冲液 C 2 次，待柱内缓冲液 C 剩余 1 mL 时关闭阀门，加入过滤好的蛋白液，混匀，移入赶紧小烧杯中，反复操作，尽可能将柱内 Ni 填料都转移进小烧杯中。将小烧杯放入装有冰块的大烧杯中，在小烧杯内放入转子，将大烧杯放入磁力搅拌器中，缓慢搅拌 4 h。期

间将空柱子用超纯水冲洗 2 遍，1×PBS 冲洗 2 遍，关闭阀门待用。

搅拌结束后，将小烧杯内蛋白液和 Ni 填料均转入空柱内，打开阀门，使液体缓慢流出，流出的同时并用小烧杯接流出液，将流出液重新加回柱里，缓慢流出的同时收集流出液，待柱内液面只有 1 mL 时，加入 10 mM 咪唑 5 mL，用 EP 管接流出液，每管接 1 mL，待液面只有 1 mL 时，加入 20 mM 咪唑 2 mL，接流出液，之后依次加入 50 mM 咪唑 3 mL，100 mM 咪唑 5 mL，150 mM 咪唑 4 mL，250 mM 咪唑 2 mL，500 mM 咪唑 5 mL，分别用 EP 管接流出液，每管做好标记，每管取 40 μ L 蛋白液加入 10 μ L 5×loading buffer，煮样，每管剩余的蛋白液放置 -80℃ 保存。

用 500 mM 咪唑加满柱子冲洗，用 1×PBS 加满柱子冲洗 2 次，用超纯水加满柱子冲洗 2 次，关闭阀门，最后用 20%乙醇灌满柱子，塞上塞子，4℃ 保存柱子，以备下次重复利用。

将处理好的样品经 SDS-PAGE 检测，根据跑胶结果检测蛋白纯化的情况。

2.2.1.9 重组蛋白 GST-J-gp85 的纯化

将 2.2.1.6 收集的菌用 40 mL 缓冲液 A 重悬，12000 rpm，4℃ 离心 10 min，弃上清；用 40 mL 缓冲液 B 重悬，加入蛋白酶抑制剂至终浓度为 1 mM，加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL，混匀冰浴 30 min，超声破碎菌体，超声功率为 400 w，破碎 10 s，间歇 10 s，工作时间为 90 min，超声结束后 12000 rpm 离心 15 min，分离上清于干净 50 mL 离心管；用 40 mL 缓冲液 I 重悬菌体，超声破碎菌体，工作时间为 80 min，离心分离上清于干净 50 mL 离心管；用 40 mL 缓冲液 II 重悬菌体，超声破碎菌体，工作时间为 70 min，离心分离上清于干净 50 mL 离心管；用 40 mL 缓冲液 III 重悬菌体，超声破碎菌体，工作时间为 60 min，离心分离上清于干净 50 mL 离心管；用 10 mL 缓冲液 C 溶解菌体，分装至 1.5 mL 干净 EP 管，每管 1 mL，同时取 40 μ L 于 EP 管，加入 10 μ L 5×loading buffer。每次离心分离的上清，取 40 μ L 于 EP 管，加入 10 μ L 5×loading buffer，沸水浴 10 min。将处理好的样品经 SDS-PAGE 检测。

2.2.2 ALV-J-gp85 蛋白单克隆抗体的制备

2.2.2.1 动物免疫及阳性血清的制备

以纯化的 GST-J-gp85 重组蛋白为免疫抗原，与等量的弗氏完全佐剂混合乳化，乳化完皮下多点注射 7 周龄 BALB/c 小鼠，每只小鼠 200 μ L。两周后，将纯化的蛋白中与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化，乳化完皮下多点注射以加强免疫。再间隔两周，按二免的方法再次加强免疫。融合前三天按二免方法进行一次冲击免疫。三免完间隔一周鼠尾静脉采血，1500 rpm/min 离心 10 min，吸取上清液作为阳性血清，-20℃ 保存。

2.2.2.2 检测 ALV-J gp85 间接 ELISA 方法的建立

以纯化的 HIS-J-gp85 蛋白为检测抗原，进行间接 ELISA 检测方法的建立。

2.2.2.2.1 间接 ELISA 检测方法的基本操作

(1) 抗原的包被：以包被液按一定比例稀释纯化的重组蛋白 HIS-J-gp85，充分混匀，以每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，加完后轻轻摇晃使抗原均匀分布孔底，套上封口袋置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

(2) 酶标板的洗涤：取出 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的酶标板，室温下平衡 5 min，倒掉孔内液体，在吸水纸上轻轻拍干，向孔内加满事先配好的 PBST 洗液，静置 5 min，弃掉溶液，反复洗涤 3 次，在吸水纸上轻轻拍干。

(3) 封闭：以每孔 200 μL 加入封闭液，轻轻摇晃使封闭液均匀分布孔底，套上封口袋置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 2 h。

(4) 洗涤：参照 (2) 的方法进行洗涤。

(5) 一抗孵育：用封闭液以一定比例稀释一抗（小鼠血清或杂交瘤细胞上清液），每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，阴性和阳性对照每孔 100 μL 也加入酶标板，轻轻摇晃使一抗均匀分布孔底，套上封口袋置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 1 h。

(6) 洗涤：参照 (2) 的方法进行洗涤。

(7) 二抗孵育：用封闭液以一定比例稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，以每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，轻轻摇晃使一抗均匀分布孔底，套上封口袋置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 1 h。

(8) 洗涤：参照 (2) 的方法进行洗涤。

(9) 显色：提前 15 min 将 TMB 显色液从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱，洗涤完酶标板，以每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，避光显色 15 min。

(10) 终止显色：显色结束后，每孔加入 50 μL 2 M 硫酸，轻轻摇晃使溶液均匀分布孔底，置于酶标仪中读取波长 450 nm 时的吸光值。

ELISA 结果的判定：记录好阳性和阴性孔的 OD 值，计算 $\text{OD}_{\text{阳性}}$ 与 $\text{OD}_{\text{阴性}}$ 比值，只有 $\text{OD}_{\text{阳性}}$ 为 $\text{OD}_{\text{阴性}}$ 2 倍以上时才认为此次检测结果有效，否则重新检测。计算 $\text{OD}_{\text{样品}}$ 与 $\text{OD}_{\text{阴性}}$ 比值，用 P/N 表示，当 $\text{P/N} > 2$ 时，检测样品为阳性；当 $1.5 < \text{P/N} < 2$ 时，样品为可疑；当 $\text{P/N} < 1.5$ 时，样品为阴性。

2.2.2.2.2 间接 ELISA 检测的最佳反应条件确定

抗原包被稀释液的选择：分别以生理盐水，蒸馏水，pH9.6 碳酸盐缓冲液，pH7.4 磷酸盐缓冲液作包被液，以一定比例稀释抗原，每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板，置于 37 恒温培养箱 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜，参照上述步骤对阳性血清进行检测，同一血清至少 2 个孔，读数，计算 P/N 值。选取 P/N 值大且 P 值接近 1 的孔对应的包被液作为最佳抗原稀释液。

封闭液的选择：分别以 5% 脱脂乳、1% BSA 作封闭液，封闭液用 PBST 稀释，每孔 200 μL 加入 96 孔酶标板，同时设立重复组，参照上述步骤对阳性血清进行

检测, 读数, 计算 P/N 值。选取 P/N 值大且 P 值接近 1 的孔对应的封闭液作为最佳封闭液。

二抗最佳稀释浓度的选择: 用封闭液分别对小鼠阳性和阴性血清作 500 倍稀释, 每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 洗涤干净, 用封闭液稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 稀释浓度分别为 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板, 同一稀释度设立重复, 参照上述步骤对阳性血清进行检测, 读数, 计算 P/N 值。选取 P/N 值大且 P 值接近 1 的孔对应的稀释浓度为最佳二抗稀释浓度。

抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的选择: 选取方阵滴定法确定抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度, 用上述确定好的包被液稀释纯化的蛋白, 稀释倍数分别为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640, 每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板, 套上封口袋置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。洗涤, 加入封闭液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱封闭 2 h。洗涤, 每孔加入 100 μL 稀释的阳性和阴性小鼠血清, 稀释浓度分别为 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 同一稀释度设立重复。参照上述步骤对阳性血清进行检测, 读数, 计算 P/N 值。选取 P/N 值大且 P 值接近 1 的孔作为抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。

底物的最佳作用时间选择: 按照上述确定好的最佳包被液, 最佳抗原稀释浓度, 稀释抗原并包被过夜, 选取最佳封闭液封闭后洗涤, 加入最佳一抗稀释浓度孵育, 洗涤, 加入最佳二抗稀释浓度孵育, 洗涤, 加入底物显色, 显色时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min, 同一显色时间设置重复, 加入终止液 2 M 硫酸, 经酶标仪读值, 计算 P/N 值。选取 P/N 值大且 P 值接近 1 的孔作为底物最佳作用时间。

2.2.2.3 细胞融合

SP2/0 细胞的准备: 融合前一天, 将培养状态良好的 SP2/0 细胞进行传代, 调整其密度, 以达到融合时 SP2/0 细胞在培养皿里的密度约 80%。

饲养层细胞的制备: 融合前一晚, 取 6~8 周龄健康阴性 BALB/c 小鼠, 摘除其眼球放血, 并用干净 1.5 mL EP 管收集血清, 然后拉颈处死, 浸泡入 75% 医用酒精消毒 3~5 min。将收集的血清放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内 30 min, 取出置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 第二天离心吸上清 (阴性血清) 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用镊子取出小鼠, 放入事先喷有 75% 医用酒精, 在紫外下照射 15 min 以上的解剖板上固定。取灭菌烘干的眼科剪和小镊子, 剪开小鼠腹部的皮肤, 将小鼠的皮肤与腹腔分离, 暴露其腹腔, 取一次性 5 mL 注射器, 吸取 5 mL HAT 选择培养基注入小鼠腹腔, 勿将针头插入任何脏器, 拔出针头用事先在紫外下灭菌的干净卫生纸, 轻轻按摩腹部 2 min, 插入注射器抽取腹腔液体, 将注射器内抽取的液体注入干净培养皿, 加入 45 mL HAT 选择培养基吹匀, 100 μL 每孔加入 96 孔细胞培养板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$,

5% CO₂ 细胞培养箱内培养。

免疫脾细胞的制备：取一只冲击免疫的小鼠，摘除其眼球放血，同时用干净 1.5 mL EP 管收集血清，然后拉颈处死，浸泡入 75% 医用酒精消毒 3~5 min。将收集的血清放入 37℃ 恒温培养箱内 30 min，取出置于 4℃ 冰箱过夜，第二天离心吸上清（阳性血清）于 -80℃ 保存。将浸泡好的小鼠用镊子取出放入干净培养皿中，取灭菌的眼科剪和小镊子剪开背部皮肤，换一套干净的剪刀镊子剪开腹膜，暴露出脏器，换一套干净的剪刀镊子取出脾脏移入干净的培养皿，用 1640 完全培养基清洗脾脏，同时用剪刀镊子剪干净脾脏周围的脂肪组织。将脾脏移入另一干净培养皿，加入 10 mL 1640 完全培养基，用一次性 5 mL 注射器吸取皿内培养基，用注射器针头在脾脏表面扎出许多小孔，将注射器内液体注入脾脏内吹出脾细胞，再吸取皿内液体反复吹打脾脏直至几乎将脾脏内脾细胞吹出。吸取皿内液体于干净 15 mL 离心管中，并对细胞进行计数。

SP2/0 细胞的收集：取前一天传代的 SP2/0 细胞，用 1×PBS 洗 2 遍，加入适量胰酶后放置 37℃ 培养箱 2 min，取出后吸去胰酶，以 10 mL 1640 完全培养基吹下细胞瓶上的 SP2/0 细胞，并对细胞进行计数。

脾细胞与骨髓瘤细胞的融合：融合前将 PEG、1640 完全培养基、HAT 选择培养基和准备的一杯 37℃ 热水置于 37℃ 水浴锅中，将计数的骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:8 的比例于 50 ml 离心管混匀，1000 r，室温离心 10 min。弃去上清，用移液器吸去残留的液体，将离心管底在手掌上轻轻拍打以使细胞均匀散开。将离心管置于装有 37℃ 热水的烧杯中，用移液枪吸取 1 mL 预热的 50% PEG，在 1 min 内缓慢匀速的滴入离心管底，一边滴加一边轻轻摇晃离心管。滴加完静置 1 min，用移液枪吸取 5 mL 预热的 1640 完全培养基在 5 min 内缓慢匀速地滴入离心管内，一边滴加一边轻轻摇晃离心管。用移液枪吸取 10 mL 预热的 1640 完全培养基在 5 min 内匀速滴入离心管内，一边滴加一边轻轻摇晃离心管。再用移液枪取 12 mL 预热 1640 完全培养基在 2 min 内匀速滴入离心管内，一边滴加一边轻轻摇晃离心管。滴加完 800 r，室温离心 10 min。弃去上清，将离心管底在手掌上轻轻拍打使细胞均匀散开，加入预热的 50 mL HAT 选择培养基将细胞均匀吹散，以每孔 100 μL 加入前一晚制备好的饲养层细胞中。融合后每天需对细胞进行观察，是否存在细胞污染的情况，每 3~4 天进行一次半换液，每孔吸取 100 μL 培养基弃掉，加入 100 μL HAT 选择培养基。对长出细胞团的孔做好标记，待孔里细胞长至培养孔面积 1/5 以上时，可吸取 100 μL 上清液进行 ELISA 检测。

2.2.2.4 间接 ELISA 法筛选阳性细胞

融合后阳性细胞的筛选采用的是间接 ELISA 方法，按照上述建立的最佳 ELISA 检测方法，将纯化的 pET-28a-ALV-J-gp85 重组蛋白稀释后进行包被，封闭，洗涤后加入杂交瘤细胞上清，同时加入稀释的小鼠阳性和阴性血清，洗涤，

加入稀释的二抗，洗涤，加入底物显色，加入终止液，置于酶标仪上读取波长 450 nm 时的吸光值，计算 P/N 值，筛选阳性孔。

2.2.2.5 阳性孔的亚克隆

亚克隆前仍需按实验 2.2.2.3 方法制备饲养层细胞，饲养层细胞改为用 HT 选择培养基培养。采用有限稀释法对筛选出的阳性孔细胞进行亚克隆，尽量选取细胞团单一，读值大的阳性孔进行亚克隆。用枪头将阳性孔底的细胞团吹起吸出转移至 24 孔细胞培养板，加入 HT 选择培养基进行稀释吹匀后，取 50 μ L 进行细胞计数，计算 150 个细胞需要取多少体积的液体，剩余液体留在 24 孔板内继续培养，以免亚克隆不成功导致阳性细胞丢失。用 10 mL HT 选择培养基重悬取出的液体，每孔 100 μ L 加入事先制备好的饲养层细胞内，置于 37 $^{\circ}$ C，CO₂ 培养箱培养。

2.2.2.6 亚克隆细胞的筛选

每 4 天半换液一次，按试验 2.2.2.4 方法进行亚克隆细胞的筛选以及阳性细胞的再次克隆化。

2.2.2.7 杂交瘤细胞的冻存

为防止阳性细胞污染或丢失，挑取的阳性细胞经扩大培养后可部分进行冻存。细胞冻存前先制备冻存液，冻存液由 10%的 DMSO，50%血清，40% 1640 培养基组成，也可由 10%的 DMSO 和 90%血清组成，亦或是其它组分，需保证 DMSO 浓度为 10%，而血清浓度越大越能保证杂交瘤细胞的存活率。弃去细胞瓶里的培养基，用 PBS 洗 2 遍，加入胰酶消化，加入 PBS 用移液枪将瓶上的细胞吹落，移入 15 mL 离心管中，1000 r，离心 10 min，弃上清，用冻存液重悬杂交瘤细胞转移至细胞冻存管，做好标记后放入细胞冻存盒中-80 $^{\circ}$ C 过夜，次日转移进液氮中。

2.2.2.8 腹水的制备

取 8 周龄 BALB/c 小鼠，用一次性 1 mL 注射器吸取弗氏不完全佐剂，每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 致敏，一周后将杂交瘤细胞用 PBS 重悬，每只小鼠注射约 5×10^5 个细胞，一株杂交瘤细胞注射 2 只小鼠。观察小鼠腹部，待腹部明显隆起时用一次性 5 mL 注射器抽取腹水，之后每天都需观察小鼠腹部有无明显隆起，有隆起就立马采集腹水。采集的腹水离心后吸上清于-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.2.9 腹水效价的测定

采用已建立的间接 ELISA 法最佳工作条件测定腹水效价，将腹水按 1:1000 开始稀释，往后依次倍比稀释，按顺序加入酶标板中，进行 ELISA 检测。按照判定标准计算腹水的效价。

2.2.2.10 单抗的 Western blot 分析

为验证所制备的单克隆抗体能识别 ALV-J-gp85 蛋白，以纯化的 HIS-J-gp85

蛋白为检测抗原，含 pET-28a 空载的表达菌液为阴性对照，按比例与 5×loading buffer 混匀，沸水浴 10 min，分别加入事先制备好的 SDS-PAGE 胶内，加满电泳缓冲液，接通电源，电压加大到 80 V，待蛋白 marker 分开后加大电压至 130 V。在另一电泳槽内倒入预冷的转膜缓冲液，放入海绵，滤纸，将事先裁好的 PVDF 膜在甲醇溶液里浸泡 2 min 后一并放入电泳槽内浸泡。电泳结束后，取下凝胶，切去上层胶和溴酚蓝及其以下的胶，放入装有转膜缓冲液的电泳槽内。按照 2 片海绵，一张滤纸，蛋白胶，PVDF 膜，一张滤纸，一片海绵从下至上的顺序安装转印装置，胶和膜之间不能有气泡。倒入转膜缓冲液至淹没转印装置，将电泳槽放置冰水浴中，接通电源，调节电流 230 mA 恒定，转印 80min。转印结束后，拆开转印装置，取出 PVDF 膜，用洗膜液漂洗一次，置于 5%脱脂乳，在水平摇床上室温封闭 2 h。弃去封闭液，TBST 洗 2 次，将稀释的腹水作为一抗（1:1000 5%脱脂乳稀释），水平摇床上室温孵育 1.5 h。弃去一抗，TBST 洗 3 次，每次 5 min，加入稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG（1:2000 5%脱脂乳稀释），水平摇床上室温孵育 1 h。弃去二抗，TBST 洗 5 次，每次 5 min。将 PVDF 膜置于新鲜配制的 DAB 显色液中，避光显色 15 min，取出，TBST 洗一次，查看显色结果。

2.2.2.11 间接免疫荧光实验

为验证所制备的 MAbs 能特异性识别 ALV-J 病毒，在 24 孔板中分别培养阴性 DF1 细胞和感染 ALV-J、ALV-A、ALV-K 的 DF1 细胞，培养 3-5 d 后弃去培养基，PBS 洗 2 次。每孔加入 4%多聚甲醛 300 μL，固定 15 min，弃去，PBS 洗 3 次。每孔加入 300 μL 10%FBS 室温封闭 1 h，弃去，PBS 洗 3 次。每孔加入 300 μL 稀释的单抗（用 10% FBS 作 100 倍稀释），室温孵育 45 min，弃去，PBS 洗 3 次，每次 5 min。每孔加入 300 μL 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG（用 10% FBS 作 150 倍稀释），室温孵育 30 min，弃去，PBS 洗 3 次，每次 10 min。弃去 PBS 后在吸水纸上拍干，置于荧光显微镜下观察结果，出现特异性亮绿色则为阳性，未出现则为阴性。

2.2.2.12 单抗亚型的鉴定

按购买的单克隆抗体亚型鉴定试剂盒说明书进行抗体亚型的鉴定。具体方法如下：将腹水以 1×PBST 1:100000 稀释，每孔 50 μL 加入酶标板条（预包装了针对小鼠 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, Kappa light chain, lambda light chain 的特异性抗体），每个待测样品需 1 条酶标板条，同时每孔加入 50 μL 1×羊抗鼠 IgA+IgM+IgG-HRP，混匀器上轻轻混匀，也可用手轻轻敲击板架两侧 1 min。盖上封板膜，室温孵育 1 h，弃去孔内液体，1×PBST 洗板 3 次，吸水纸上拍干。将显色液 A 液和显色液 B 液按 1:100 混合，混匀后每孔加入 100 μL，室温避光显色 10-20 min 后每孔加入 100 μL 终止液，放置酶标仪读数，记录波长 450 nm 时的吸光值，颜色最深或是 OD 值最高孔对应的即为相应亚型。

2.3 实验结果

2.3.1 ALV-J-gp85 基因的扩增

扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，得到的 ALV-J-gp85 目的片段大小为 510bp，与预期大小相符，如图 1-1。

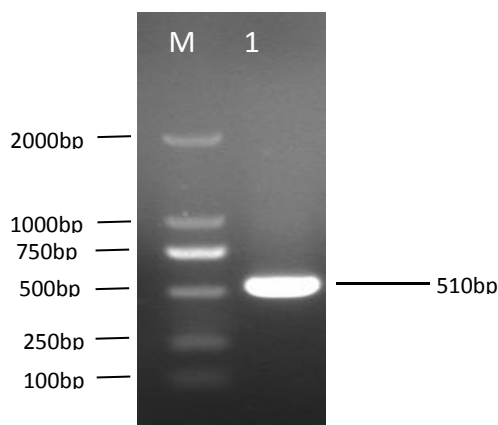


图 1-1 ALV-J-gp85 基因的 PCR 扩增

M: DNA Marker DL-2000; 1: ALV-J-gp85 基因的 PCR 扩增

2.3.2 重组表达载体的双酶切鉴定

挑取转化后的单菌落，提取质粒进行双酶切鉴定，结果表明，重组表达质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切后，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，在 510bp 左右位置均出现目的条带，如图 1-2 和 1-3，表明重组表达质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85 均构建成功。

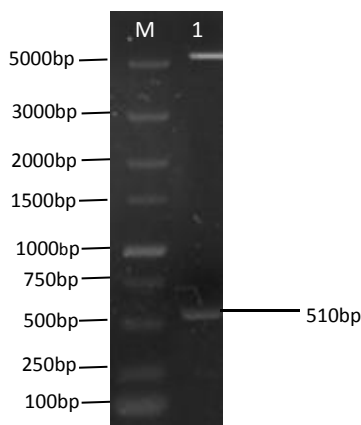


图 1-2 重组质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 双酶切鉴定

M: DNA Marker DL-5000;

1: 重组质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 双酶切

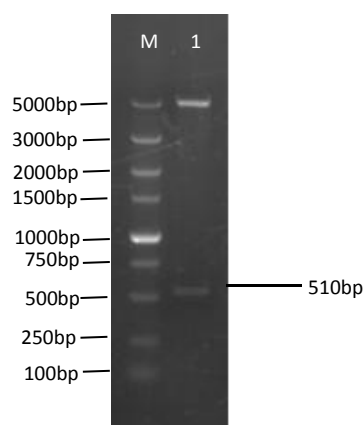


图 1-3 重组质粒 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85 双酶切鉴定

M: DNA Marker DL-5000;

1: 重组质粒 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85 双酶切

2.3.3 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的两种阳性表达质粒转入 BL21 大肠杆菌，经 1 mM IPTG 诱导后，处理诱导产物，通过 SDS-PAGE 胶检测，经不同温度诱导表达重组蛋白 HIS-J-gp85 超声裂解后均在沉淀中，且不同温度诱导时的表达量几乎没有差别，后续下游试验采用 37℃ 诱导表达 HIS-J-gp85 重组蛋白；经不同温度诱导表达重组蛋白 GST-J-gp85 超声裂解后均在沉淀中，而 16℃ 诱导表达量最高，故采用 16℃ 过夜诱导表达 GST-J-gp85 蛋白。根据 gp85 蛋白的分子量加上插入的表达载体的分子量，计算得到的诱导蛋白 HIS-J-gp85 和 GST-J-gp85 分子量大小分别为 25 KDa 和 43 KDa，电泳结果显示的诱导蛋白大小与预期相符，如图 1-4 和 1-5。

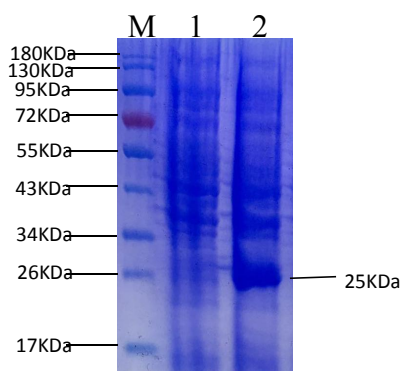


图 1-4 HIS-J-gp85 蛋白诱导表达产物

M: protein marker

1: 未诱导组; 2: HIS-J-gp85 蛋白诱导表达组

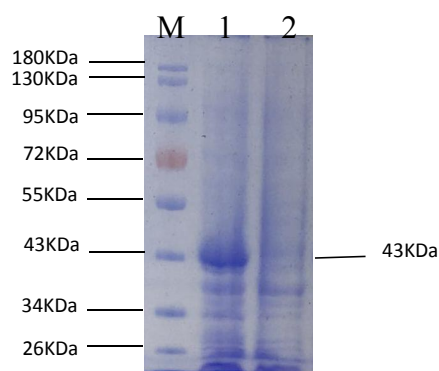


图 1-5 GST-J-gp85 蛋白诱导表达产物

M: protein marker

1: GST-J-gp85 蛋白诱导表达组; 2: 未诱导组

2.3.4 重组蛋白的纯化

重组蛋白 HIS-J-gp85 经 Ni 柱亲和层析的方法，经不同浓度咪唑洗脱，获得的重组蛋白浓度为 2.3 mg/mL。重组蛋白 GST-J-gp85 经洗包涵体的方法纯化，获得的重组蛋白浓度为 4.1 mg/mL。纯化后的两种蛋白经 SDS-PAGE 检测，基本去除了多余的杂带，获得了较纯重组蛋白，如图 1-6 和 1-7。

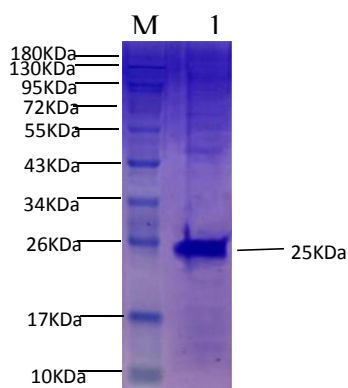


图 1-6 纯化的 HIS-J-gp85 重组蛋白

M: protein marker;

1 纯化的 HIS-J-gp85 重组蛋白

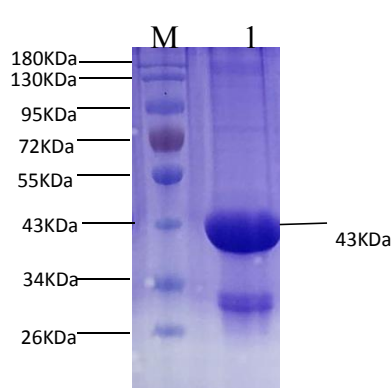


图 1-7 纯化的 GST-J-gp85 重组蛋白

M: protein marker;

1 纯化的 GST-J-gp85 重组蛋白

2.3.5 检测 ALV-J gp85 抗体的间接 ELISA 方法建立

2.3.5.1 最佳抗原包被液的确定

以生理盐水, 蒸馏水, pH9.6 碳酸盐缓冲液, pH7.4 磷酸盐缓冲液作包被液, 将抗原按一定比例进行稀释, 进行 ELISA 检测, 经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值, 计算 P/N 值, 经过对比, pH9.6 碳酸盐缓冲液作抗原包被液的效果明显优于其他几种 (表 1-1)。

表 1-1 最佳包被液的确定
Table 1-1 The optimal coating buffer

包被液	阳性对照	阳性均值 (P)	阴性对照	阴性均值 (N)	P/N
PBS	1.178	1.173	0.112	0.121	10.09
CB	1.213	1.189	0.103	0.115	11.02
生理盐水	0.982	0.827	0.107	0.115	8.15
蒸馏水	1.33	1.392	0.156	0.147	8.98

2.3.5.2 最佳封闭液的确定

根据确定的最佳抗原包被液以一定比例稀释抗原包被酶标板, 以 5%脱脂乳、1%BSA 作为封闭液封闭后进行 ELISA 检测, 经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值, 计算 P/N 值, 经过对比, 发现 5%脱脂乳作为封闭液的效果明显优于 1%BSA (表 1-2)。

表 1-2 最佳封闭液的确定
Table 1-2 The optimal blocking agent

封闭液	阳性对照	阳性均值 (P)	阴性对照	阴性均值 (N)	P/N
1% BSA	1.093	1.101	0.088	0.102	11.55
5%脱脂乳	1.211	1.189	0.103	0.099	12.12

2.3.5.3 酶标二抗最佳稀释浓度的确定

以 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释抗原包被酶标板, 以 5%脱脂乳封闭后, 加入稀释的小鼠阳性和阴性血清, 加入不同稀释浓度的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 进行 ELISA 检测, 经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值, 计算 P/N 值, 经过对比, 发现酶标二抗最佳稀释浓度为 1:2000 时效果最佳 (表 1-3)

表 1-3 酶标二抗最佳稀释度

HRP-羊抗鼠 IgG 稀释比例	阳性对照	阳性均值 (P)	阴性对照	阴性均值 (N)	P/N		
1:2000	1.273	1.1	1.1865	0.099	0.103	0.101	11.75
1:3000	1.055	1.133	1.094	0.103	0.097	0.1	10.94
1:4000	0.91	1.01	0.96	0.095	0.103	0.099	9.70
1:5000	0.978	0.946	0.962	0.119	0.117	0.118	8.15
1:6000	0.82	0.702	0.761	0.101	0.095	0.098	7.77

2.3.5.4 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度的确定

在确定最佳包被液，最佳封闭液，最佳二抗稀释度的基础上，采用方阵滴定法，包被不同稀释浓度的抗原，加入不同稀释浓度的血清，进行 ELISA 检测，经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值，计算 P/N 值，经过对比，发现当抗原稀释度为 1:160，即浓度为 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血清稀释度为 1:1000 时，P/N 值最大（表 1-4），因此确定了抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。

表 1-4 抗原和血清的最佳稀释度

Table 1-4 The optimal dilution of the antigen and serum

血清稀释度	抗原稀释度					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
阳性均值 (1:500)	1.556	1.387	1.358	1.209	1.111	1.114
阴性均值 (1:500)	0.128	0.117	0.111	0.102	0.097	0.103
P/N	12.15	11.85	12.23	11.85	11.45	10.82
阳性均值 (1:1000)	1.415	1.287	1.216	1.199	1.094	1.027
阴性均值 (1:1000)	0.122	0.112	0.101	0.094	0.099	0.087
P/N	11.60	11.49	12.04	12.76	11.05	11.80
阳性均值 (1:2000)	1.213	1.117	1.209	1.118	0.928	1.002
阴性均值 (1:2000)	0.103	0.106	0.102	0.093	0.089	0.093
P/N	11.78	10.54	11.85	12.02	10.43	10.77
阳性均值 (1:4000)	0.911	0.928	0.911	0.896	0.838	0.716
阴性均值 (1:4000)	0.092	0.096	0.093	0.089	0.085	0.088
P/N	9.90	9.67	9.80	10.07	9.86	8.12

2.3.5.5 底物的最佳作用时间的确定

在已确定的最佳包被液,最佳抗原包被浓度,最佳封闭液,最佳血清稀释度,最佳二抗稀释度的反应条件下,优化底物的最佳作用,进行 ELISA 检测后,经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值,计算 P/N 值,经过对比,当底物作用时间为 15 min 时效果最佳(表 1-5)。

表 1-5 底物反应时间的确定
Table1-5 The optimal time of substrate reaction

显色时间	阳性对照		阳性均值	阴性对照		阴性均值	P/N
5min	0.899	0.978	0.9385	0.096	0.098	0.097	9.68
10min	1.024	1.098	1.061	0.103	0.101	0.102	10.40
15min	1.135	1.127	1.131	0.099	0.093	0.096	11.78
20min	1.226	1.108	1.167	0.111	0.105	0.108	10.81
25min	1.235	1.279	1.257	0.122	0.118	0.12	10.48

2.3.6 杂交瘤细胞的建立

一共进行了 5 次细胞融合实验,最后一次经过 2 次亚克隆,筛选出的阳性杂交瘤细胞株扩大培养后进行了 8 次 ELISA 检测,仍能稳定分泌抗体,成功筛选出 1 株杂交瘤细胞,命名为 JB7。

2.3.7 腹水效价的测定结果

以 HIS-J-gp85 蛋白为检测抗原,采用建立的检测 ALV-J 抗体间接 ELISA 方法,对 JB7 单抗进行效价的测定,结果显示小鼠腹水效价为 1: 64000。

2.3.8 单抗 Western blot 检测结果

为验证所制备的 MAbs 能特异性识别 ALV-J-gp85 蛋白,以纯化的 HIS-J-gp85 为检测抗原, pET-28a 空载蛋白为阴性对照,进行 SDS-PAGE 电泳,以 1:1000 稀释的 JB7 单抗作一抗, 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗,进行 Western blot 实验,加 DAB 显色液后 PVDF 膜上约 25KDa 大小处出现一条清晰条带,表明制备的单体 JB7 能特异性识别 J 亚群 gp85 蛋白,如图 1-8。

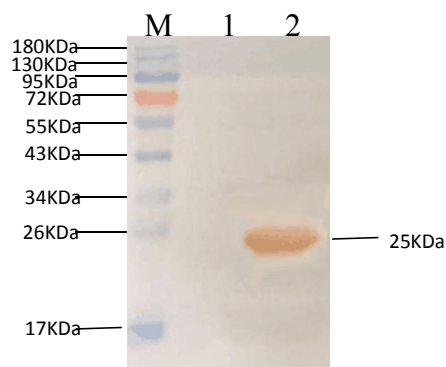


图 1-8 单抗 JB7 的 western blot 鉴定

M: protein marker; 1: pET-28a 空载对照; 2: 单抗 JB7

2.3.9 单抗间接免疫荧光实验结果

在荧光倒置显微镜下观察 IFA 结果，可见制备的单抗与 ALV-J 感染的 DF1 细胞产生了特异性结合，并显示较高的荧光强度，而与 ALV-A，ALV-K 感染的 DF1 细胞未发生反应，阴性对照组也未见荧光，如图 1-9，表明制备的单抗能够特异性识别 J 亚群禽白血病病毒分泌的天然蛋白。

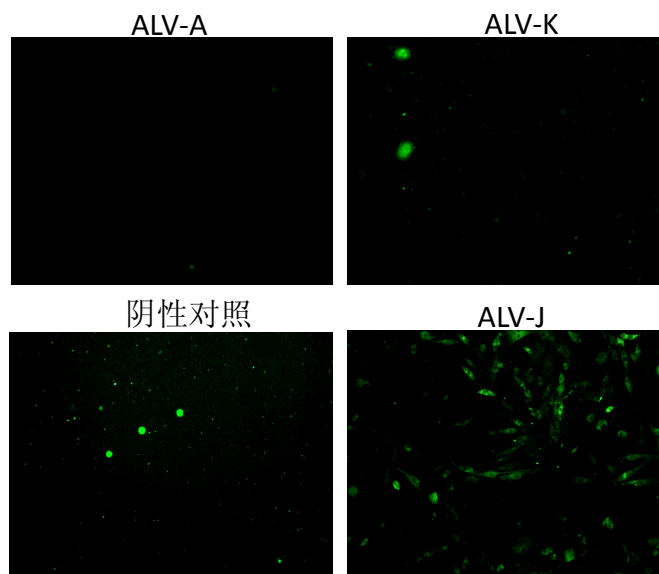


图 1-9 单抗 JB7 的 IFA 鉴定

2.3.10 单抗亚型鉴定结果

免疫球蛋白亚型鉴定试剂盒检测的 1 株 MAb 亚型为 IgG1。

2.4 讨论

禽白血病在鸡群中已有 100 多年的历史,经典的白血病主要由 A、B 亚群病毒导致,但致病性并不强。自 1988 年在英国的白羽肉鸡中发现 J 亚群禽白血病病毒,很快其他许多国家都受到波及,当时很多育种公司被迫倒闭,白羽肉鸡业造成了极大的经济损。ALV-J 的传染性和致病性比 ALV 各经典亚群强得多,其宿主范围不断扩大,几乎能感染所有鸡种^[51]。gp85 基因是 ALV 上最易发生变异的部位,也是 ALV 各亚群分类的基础。ALV-J 的 gp85 基因与 ALV 其他亚群的 gp85 基因同源性最低,保持在 50%左右^[52]。。

单克隆抗体具备特异性强,灵敏度高的优点,在畜禽业的疾病诊断方面运用也越来越广,研制单抗前抗原的制备是最重要的基础工作,免疫抗原的好坏直接影响到细胞融合后阳性杂交瘤细胞的筛选。gp85 蛋白为 ALV 外膜蛋白,作为配体负责识别机体细胞膜上的病毒受体并与之结合,介导病毒与宿主细胞融合,进入宿主, gp85 蛋白可作为检测 ALV-J 特异性抗体的诊断抗原。本试验针对 ALV-J 的 gp85 基因,构建了 2 种原核表达质粒 pET-28a-ALV-J-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-J-gp85, 本实验采用不同温度条件(16℃、25℃、30℃、37℃)通过大肠杆菌表达系统,对目的蛋白进行表达, HIS-J-gp85 重组蛋白最终选择 37℃, 4h 诱导表达, GST-J-gp85 最终选择 16℃过夜诱导表达。

目前单克隆抗体制备技术运用最广的还是小鼠免疫脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞的融合技术,该方法中除免疫时间比较长外,最麻烦和费时的就是融合后阳性杂交瘤细胞的筛选,这一过程需要用到建立好的 ELISA 检测方法筛选能分泌特异性抗体的杂交瘤细胞,以确定下一步需要进行亚克隆的杂交瘤细胞株。因此,本试验在制备 ALV-J gp85 蛋白单克隆抗体前先建立了检测 ALV-J gp85 的间接 ELISA 方法。在试验过程中,为避免通过建立的检测 ALV-J gp85 抗体间接 ELISA 方法筛选阳性细胞时标签蛋白产生抗体造成的假阳性,以纯化的 GST-J-gp85 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠,以纯化的 HIS-J-gp85 蛋白为检测抗原包被酶标板,以三免后采集的小鼠血清为阳性血清,健康小鼠血清为阴性血清,经过多次的间接 ELISA 对比试验,确定了 ELISA 反应的最佳包被液为 pH9.6 碳酸盐缓冲液,抗原包被浓度为 14 μg/mL,封闭液选择 5%脱脂乳,血清最佳稀释度为 1:1000,酶标二抗最佳稀释度为 1:2000,底物最佳作用时间为 15 min。

虽然,目前单克隆抗体制备技术已相对较成熟^[53-55],但是单抗制备过程中的细胞融合实验,细胞培养,阳性细胞的筛选等却又是费时和复杂的工作。本次实验前后一共进行了 5 次细胞融合工作,前几次融合后筛选到的阳性杂交瘤细胞分泌抗体极不稳定,融合后筛选到的阳性细胞亚克隆后通过间接 ELISA 方法检测,筛选不到阳性细胞,经过了 5 次细胞融合工作,融合后每天观察细胞生长状态,当孔内融合细胞约占孔面积 1/5 时,立马进行检测,为确保筛选的杂交瘤细胞株

能稳定分泌特异性抗体，检测为阳性的孔换液后隔天再检，挑选在波长 450nm 时读值大且孔内细胞株单一的杂交瘤细胞进行亚克隆。我们知道抗体分泌量取决于杂交瘤细胞的数量和分泌的时间，细胞株面积大的分泌的抗体更有可能是我们所需的抗体，所以，在采用有限稀释法进行亚克隆，孔内细胞团不单一时，应尽量挑选大的细胞团进行亚克隆，过小的细胞团舍弃，用加样枪对准选取的细胞团进行重悬，不可重悬整个孔内细胞。一共进行了 2 次亚克隆，最后挑选抗体反应较强的孔对应的杂交瘤细胞株扩大培养，筛选出 1 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。对筛选出的杂交瘤细胞注射小鼠后产生的腹水进行 Western blot 鉴定，表明该株杂交瘤细胞产生的腹水能与 ALV-J-gp85 蛋白发生特异性反应。此外，通过对单抗进行 IFA 鉴定试验，表明单抗能与 ALV-J 毒株呈阳性反应，与 ALV-A 和 ALV-K 毒株不发生反应，因此该单抗能特异性识别 ALV-J。

市面上现有的只有 ALV-J 抗体检测试剂盒，通过此试剂盒检测鸡群体内 ALV-J 的抗体水平为养禽场 ALV-J 的净化提供快速有效。我们知道 ALV-J 感染的鸡群出现 4 种血清型，其中无病毒血症有抗体不排毒（V-A+S-），部分有病毒血症有抗体不排毒（V+A+S-），鸡体内中和抗体能抑制病毒数量，单纯检测鸡群体内 ALV-J 抗体水平，不能确保鸡群是否排毒，我国大多数地方品系鸡 ALV-J 抗体检测呈阳性，尽管该诊断方法快速有效，但淘汰的产生 ALV-J 抗体阳性鸡造成的损失过大，因此建立一种直接检测 ALV-J 抗原的诊断试剂盒，使阳性鸡的淘汰率降到最低是目前急需解决的问题。本次研究成功制备的 ALV-J 单克隆抗体经建立的检测 ALV-J 抗体间接 ELISA 方法测定效价为 1: 64000，为进一步开发检测 ALV-J 抗原的双抗体夹心 ELISA 诊断试剂盒奠定基础。

第三章 K 亚群禽白血病病毒 gp85 蛋白单克隆抗体的制备

3.1 试验材料

3.1.1 病毒、细胞、菌株、载体和实验动物

试验所用的主要材料见 2.1.1

3.1.2 主要试剂

试验所用的主要试剂见 2.1.2

3.1.3 主要仪器设备

试验所用的主要仪器设备见 2.1.3

3.1.4 主要试剂配制

实验所用主要试剂配制见 2.1.4

3.2 方法

3.2.1 重组蛋白的制备

3.2.1.1 病毒模板 DNA 的制备

将分离的 ALV-K 病毒接种长至 80%密度的单层 DF1 细胞，剩余步骤同实验 2.2.1.1。

3.2.1.2 引物设计

参照 GenBank 上 K 亚群禽白血病病毒毒株序列，设计一对特异性引物扩增 gp85 基因。上游引物为 5'-CGCGGATCCCCTTACTCGAGCAGCCAGGGAAC-3'，含有 BamH I 酶切位点；下游引物为 5'-ACGCGTCGACGGGTGCTTCGTTTACGTCTTATACC-3'，含有 Sal I 酶切位点，扩增目的片段大小为 1005bp。

3.2.1.3 聚合酶链式反应 (PCR)

PCR 反应体系：10×PCR buffer 5 μL，dNTP (2.5 mM) 4 μL，Mg²⁺ (25 mM) 4 μL，10 pmol/L 的上下游引物各 2.5 μL，模板 DNA 1 μL，rTaq (5 U/μL) 0.5 μL，加灭菌去离子水补足至 50 μL。

PCR 反应条件：94℃预变性 3 min，94℃变性 40 s，65℃退火 30 s，72℃延伸 1min，共 33 个循环，72℃终末延伸 10 min，4℃保存。

3.2.1.4 PCR 产物的纯化回收及重组质粒 PMD -19T-simple-ALV-J-gp85 的构建

扩增的 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收 gp85 目的片段。连接至 PMD -19T-simple 载体上，连接产物转化进大肠杆菌 DH5α感受态细胞，复苏

1 h 后涂氨苄平板，次日进行菌液 PCR 鉴定。

3.2.1.5 ALV-K-gp85 两种不同重组表达质粒的构建及鉴定

将阳性重组质粒 pMD -19T-simple-ALV-K-gp85、pET-28a 和 pGEX-6P-1 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行酶切，酶切体系（50 μ L）如下：

10 \times cutsmart	5 μ L
<i>Bam</i> H I	1.5 μ L
<i>Sal</i> I	1.5 μ L
pMD -19T-simple-ALV-K-gp85/ pET-28a/pGEX-6P-1	15/11/10 μ L
ddH ₂ O	27/31/32 μ L

37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h，酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，胶回收目的片段。

酶切过的 gp85 基因与酶切过的 pET-28a 和 pGEX-6P-1 载体分别进行连接，连接体系（10 μ L）如下：

10 \times Ligation Buffer	1 μ L
Ligase T4	0.5 μ L
gp85 基因	4 μ L
pET-28a/pGEX-6P-1	4.5 μ L

室温连接 1 h，转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，复苏 1 h，分别涂板氨苄培养基和卡那培养基，次日进行菌液 PCR 鉴定。

将鉴定的阳性菌液提质粒，分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性内切酶对重组表达质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 进行双酶切，酶切体系（10 μ L）同实验 2.2.1.5。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，将酶切鉴定正确的阳性菌送武汉擎科创新生物有限公司测序。

3.2.1.6 重组蛋白的诱导表达

将测序正确阳性重组质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 分别转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞，加入无抗液体 LB 培养基后 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床复苏 1 h，分别涂板卡那培养基和氨苄培养基，置于 37 $^{\circ}$ C 细菌培养箱培养过夜，次日分别挑取单菌落接入 1 mL Ka⁺培养基和 1 mL Amp⁺培养基，37 $^{\circ}$ C 小摇过夜，次日按 1:100 分别接入 4 mL Ka⁺培养基和 4 mL Amp⁺培养基中 37 $^{\circ}$ C 大摇，待细菌 OD 值接近 0.6 时，分别取 2 mL 于干净试管，加入 IPTG 至终浓度为 1 mM 设为诱导组，原试管内剩余的 2 mL 设为未诱导组，分别于 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h，收菌后进行 SDS-PAGE 电泳检测。

此外，若表达效果均不佳可尝试 IPTG 浓度 1 mM，16 $^{\circ}$ C 低温诱导过夜。

3.2.1.7 两种重组蛋白的超声裂解

为鉴定两种重组蛋白表达在上清里还是沉淀中，将表达的两种蛋白分别超声破碎后进行 SDS-PAGE 电泳检测，方法同实验 2.2.1.7。

3.2.1.8 重组蛋白 HIS-K-gp85 的纯化

重组蛋白 HIS-K-gp85 的纯化及鉴定方法参照实验 2.2.1.8。

3.2.1.9 重组蛋白 GST-K-gp85 的纯化

重组蛋白 GST-K-gp85 的纯化及鉴定方法参照实验 2.2.1.9。

3.2.2 ALV-K-gp85 蛋白单克隆抗体的制备

3.2.2.1 动物免疫及阳性血清的制备

原核表达并纯化的重组蛋白 HIS-K-gp85 与等体积弗氏完全佐剂混匀后乳化，皮下多点注射 7 周龄 BALB/c 小鼠。两周后将蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化，加强免疫。两周后，同二免方法一样再次免疫小鼠，融合前 3 天再进行一次加强免疫。

3.2.2.2 检测 ALV-K gp85 抗体的间接 ELISA 方法建立

以纯化的 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原，参照实验 2.2.2.2.1 间接 ELISA 检测方法的基本操作，确定抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。

3.2.2.3 细胞融合

SP2/0 细胞的准备：具体方法参照实验 2.2.2.3。

饲养层细胞的制备：具体方法参照实验 2.2.2.3。

免疫脾细胞的制备：具体方法参照实验 2.2.2.3。

SP2/0 细胞的收集：具体方法参照实验 2.2.2.3。

脾细胞与骨髓瘤细胞的融合：具体方法参照实验 2.2.2.3。

3.2.2.4 间接 ELISA 法筛选阳性细胞

具体方法参照实验 2.2.2.4。

3.2.2.5 阳性孔的亚克隆

具体方法参照实验 2.2.2.5。

3.2.2.6 亚克隆细胞的筛选

具体方法参照实验 2.2.2.6。

3.2.2.7 杂交瘤细胞的冻存

具体方法参照实验 2.2.2.7。

3.2.2.8 腹水的制备

具体方法参照实验 2.2.2.8。

3.2.2.9 腹水效价的测定

具体方法参照实验 2.2.2.9。

3.2.2.10 单抗的 Western blotting 分析

为验证所制备的单克隆抗体能识别 ALV-K-gp85 蛋白，以纯化的 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原，pGEX-6P-1 空载蛋白为阴性对照，按比例与 5×loading buffer 按混匀后煮样，进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后转印至 PVDF 膜上，以 1:1000

稀释的腹水作一抗孵育 1.5 h, 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗孵育 1 h, 加入配制的 DAB 显色液避光显色。

3.2.2.11 间接免疫荧光实验

具体方法参照实验 2.2.2.11。

3.2.2.12 单抗亚型的鉴定

具体方法参照实验 2.2.2.12。

3.3 实验结果

3.3.1 ALV-K-gp85 基因的扩增

扩增的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 得到的 ALV-K-gp85 目的片段大小为 1005bp, 与预期大小相符, 如图 2-1。

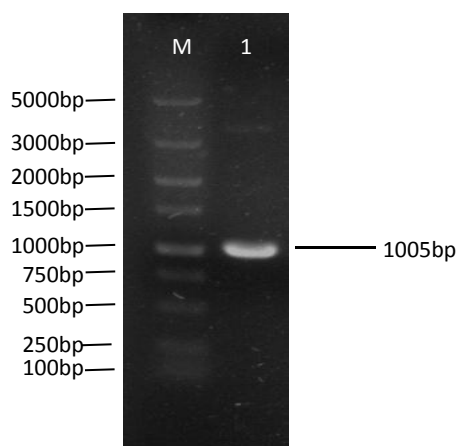


图 2-1 ALV-K-gp85 基因的 PCR 扩增

M: DNA Marker DL-5000; 1: ALV-K-gp85 基因的 PCR 扩增

3.3.2 重组表达载体的双酶切鉴定

挑取转化后的单菌落, 提取质粒进行双酶切鉴定, 结果表明, 重组表达质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性内切酶双酶切后, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1005bp 左右位置均出现目的条带, 如图 2-2 和 2-3, 表明重组表达质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 均构建成功。

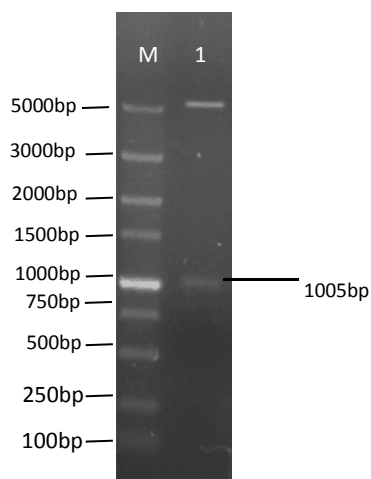


图 2-2 重组质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 双酶切鉴定

M: DNA Marker DL-5000;

1: 重组质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 双酶切

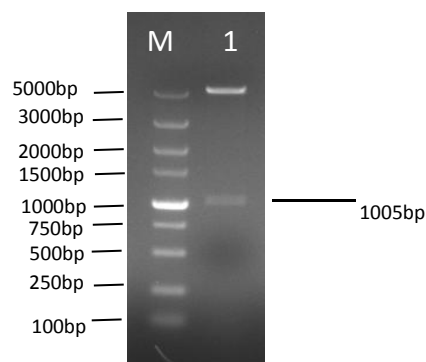


图 2-3 重组质粒 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 双酶切鉴定

M: DNA Marker DL-5000;

1: 重组质粒 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85 双酶切

3.3.3 重组蛋白的诱导表达

将测序正确的两种阳性表达质粒转入 BL21 大肠杆菌，经 1 mM IPTG 诱导后，处理诱导产物，通过 SDS-PAGE 胶检测，经不同温度诱导表达重组蛋白 HIS-K-gp85 和 GST-K-gp85 超声裂解后均在沉淀中，且不同温度诱导时的表达量几乎没有差别，因此，均采用 37℃ 诱导表达。根据 gp85 蛋白的分子量加上插入的表达载体的分子量，计算得到的诱导蛋白 HIS-K-gp85 和 GST-K-gp85 分子量大小分别为 43 KDa 和 62 KDa，电泳结果显示的诱导蛋白大小与预期相符，如图 2-4 和 2-5。

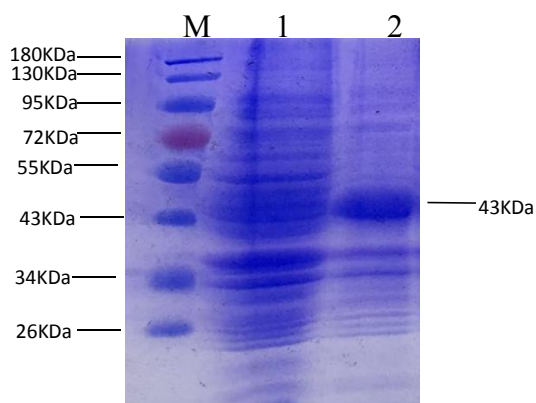


图 2-4 HIS-K-gp85 蛋白诱导表达产物

M: protein marker

1: 未诱导组; 2: HIS-K-gp85 蛋白诱导表达组

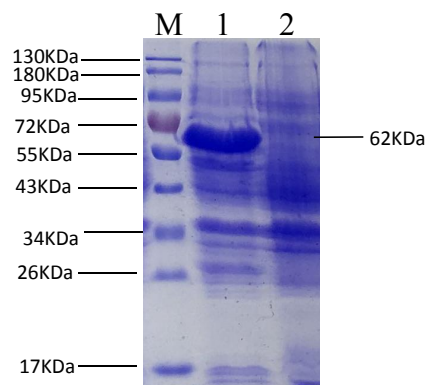


图 2-5 GST-K-gp85 蛋白诱导表达产物

M: protein marker

1: GST-K-gp85 蛋白诱导表达组; 2: 未诱导组

3.3.4 重组蛋白的纯化

重组蛋白 HIS-K-gp85 经 Ni 柱亲和层析的方法, 用不同浓度咪唑洗脱, 获得的重组蛋白浓度为 2.5 mg/mL。重组蛋白 GST-K-gp85 经洗包涵体的方法纯化, 获得的重组蛋白浓度为 4.2 mg/mL。纯化后的两种蛋白经 SDS-PAGE 检测, 基本去除了多余的杂带, 获得了较纯重组蛋白, 如图 2-6 和 2-7。

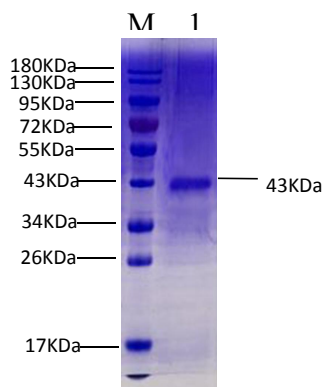


图 2-6 纯化的 HIS-K-gp85 重组蛋白

M: protein marker;

1 纯化的 HIS-K-gp85 重组蛋白

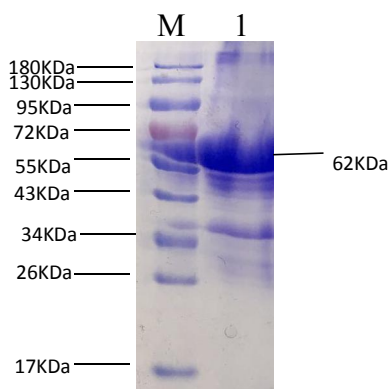


图 2-7 GST-K-gp85 蛋白诱导表达产物

M: protein marker;

1 GST-K-gp85 蛋白诱导表达组

3.3.5 检测 ALV-K- gp85 抗体的间接 ELISA 方法建立

通过建立的检测 ALV-J 抗体间接 ELISA 方法确定的最佳包被液, 最佳封闭液, 最佳二抗稀释度的基础上, 采用方阵滴定法, 包被不同稀释浓度的抗原, 加入不同稀释浓度的血清, 进行 ELISA 检测, 经酶标仪读取波长 450 nm 吸光值, 计算 P/N 值, 经过对比, 发现, 当抗原稀释度为 1:640, 即浓度为 6.6 $\mu\text{g/mL}$, 血清稀释度为 1:2000 时, P/N 值最大 (表 2-1), 因此确定了抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。

表 2-1 抗原和血清的最佳稀释度
Table2-1 The optimal dilution of the antigen and serum

血清稀释度	抗原稀释度					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
阳性均值 (1:500)	1.583	1.357	1.367	1.224	1.107	1.089
阴性均值 (1:500)	0.131	0.122	0.109	0.101	0.099	0.108
P/N	12.08	11.12	12.54	12.11	11.18	10.08
阳性均值 (1:1000)	1.335	1.347	1.256	1.189	1.133	1.107
阴性均值 (1:1000)	0.127	0.129	0.113	0.118	0.101	0.097
P/N	10.51	10.44	11.12	10.08	11.22	11.41
阳性均值 (1:2000)	1.298	1.239	1.254	1.178	1.10	1.059
阴性均值 (1:2000)	0.106	0.116	0.102	0.099	0.103	0.082
P/N	12.25	10.68	12.29	11.90	10.68	12.91
阳性均值 (1:4000)	1.012	0.998	0.908	0.889	0.913	0.828
阴性均值 (1:4000)	0.101	0.096	0.093	0.089	0.097	0.094
P/N	10.02	10.39	9.76	9.99	9.41	8.81

3.3.6 杂交瘤细胞的建立

一共进行了 4 次细胞融合实验, 最后一次经过 2 次亚克隆, 筛选出的阳性杂交瘤细胞株扩大培养后进行了 8 次 ELISA 检测, 仍能稳定分泌抗体, 成功筛选出 2 株杂交瘤细胞, 分别命名为 KD4 和 KE5。

3.3.7 腹水效价的测定结果

以 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原, 采用建立的检测 ALV-K 抗体间接 ELISA 方法, 对单抗 KD4 和 KE5 进行效价的测定, 结果显示小鼠腹水效价为 1: 64000 和 1: 128000。

3.3.8 单抗 Western blot 检测结果

为验证所制备的 MAbs 能特异性识别 ALV-K-gp85 蛋白, 以纯化的 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原, pGEX-6P-1 空载蛋白为阴性对照, 进行 SDS-PAGE 电泳, 以 1:1000 稀释的单抗作一抗, 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作二抗进行 Western blot 实验, 加 DAB 显色液后 PVDF 膜上约 62KDa 大小均处出现一条清晰条带, 表明制备的单体 KD4 和 KE5 均能特异性识别 K 亚群 gp85 蛋白, 如图 2-8 和 2-9。

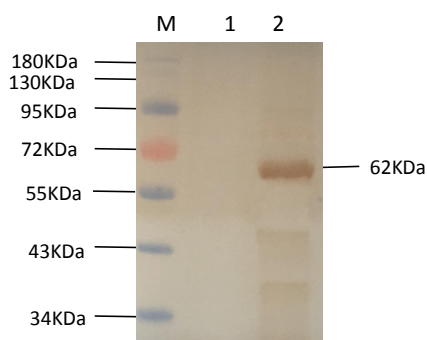


图 2-8 单抗 KD4 的 western blot 鉴定

M: protein marker;

1: pGEX-6P-1 空载对照; 2: 单抗 KD4

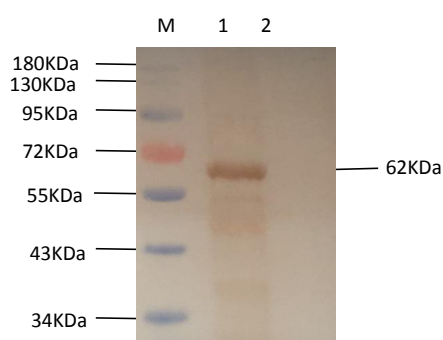


图 2-9 单抗 KE5 的 western blot 鉴定

M: protein marker;

1: 单抗 KE5; 2: pGEX-6P-1 空载对照

3.3.9 单抗间接免疫荧光实验结果

在荧光倒置显微镜下观察 IFA 结果，单抗 KD4 和 KE5 均与 ALV-K 感染的细胞产生了特异性结合，并显示较高的荧光强度，值得注意的是，单抗 KD4 和 KE5 还能与实验室分离的 ALV-A 毒株发生反应，也显示出较高的荧光强度，但不与 ALV-J 感染的细胞发生反应，阴性对照组也未见荧光，这说明单抗 KD4 和 KE5 是特异性抗 ALV-AK 的单克隆抗体，2 株单抗能够特异性识别 A 亚群和 K 亚群禽白血病病毒分泌的天然蛋白，如图 2-10 和 2-11。

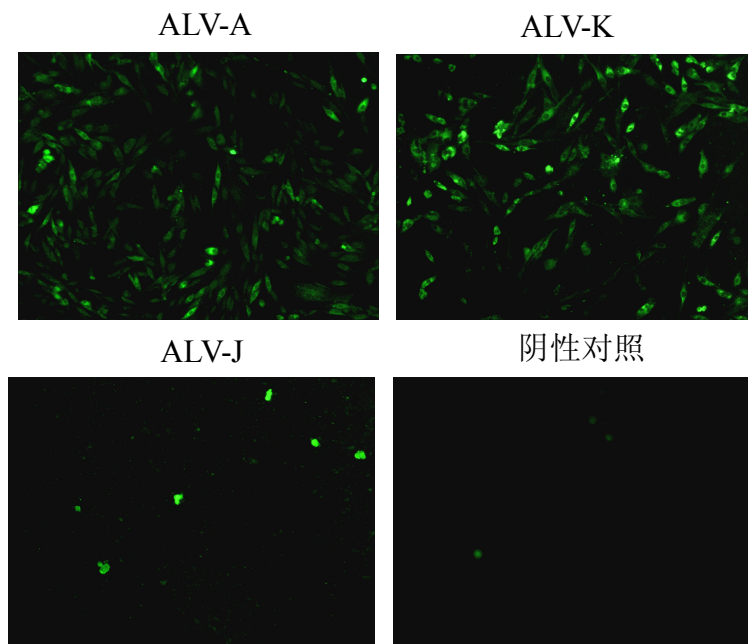


图 2-10 单抗 KD4 的 IFA 鉴定

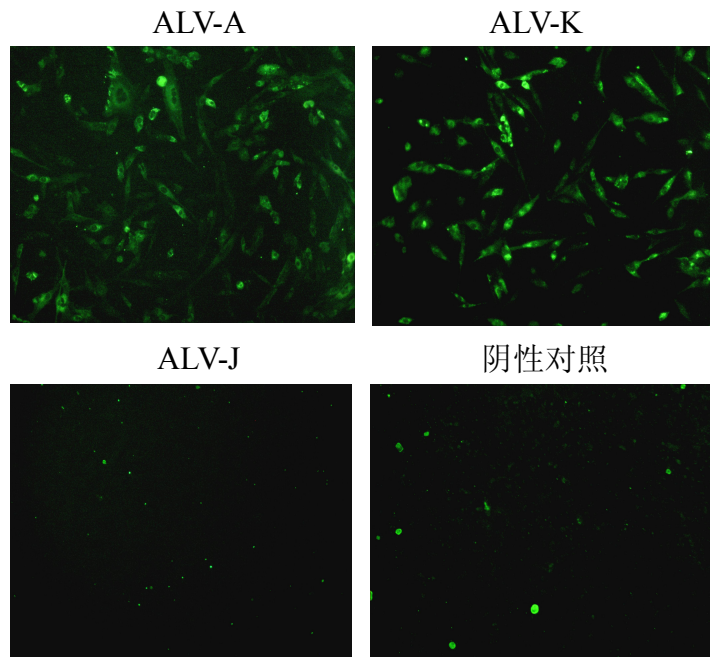


图 2-11 单抗 KE5 的 IFA 鉴定

3.3.10 单抗亚型鉴定结果

免疫球蛋白亚型鉴定试剂盒检测的 2 株 MAb 亚型均为 IgG1。

3.4 讨论

近几年,我国鸡群中 ALV 的感染也越发复杂,大量报道证实在我国蛋鸡群,肉鸡群和地方品种鸡中出现不同亚群 ALV 感染或多种亚群 ALV 的混合感染^[56]。2011-2014 年间,董宣等在对从浙江、江苏和山东的 22 个地方品种鸡收集的 270 份临床样品进行 ALV 流行病学调查时,分离到 47 株 ALV 病毒,包括 4 株 ALV-A 病毒,2 株 ALV-C 病毒,18 株 ALV-J 病毒,23 株 ALV-K 病毒。2012-2016 年间,李阳等在调查浙江、江苏和山东等地的 12 个地方品种鸡 ALV 的感染情况时,分离到 14 株 ALV 病毒,其中包括 2 株 ALV-A 病毒,1 株 ALV-B 病毒,8 株 ALV-J 病毒和 3 株 ALV-K 病毒。我国不同地区饲养着多种地方品种鸡,他们的遗传背景各不相同,基本未做过任何的净化工作,因此,ALV 感染在我国地方品种鸡中相对普遍,K 亚群病毒的发现自然也就不足为奇了。

K 亚群为新发现的禽白血病病毒,有关其研究并不详尽^[57]。2016 年孙鹏等通过扩增 ALV-K gp85 基因,构建原核表达质粒,免疫小鼠制备了特异性识别 ALV-K 的单因子血清^[58];2017 年,袁丽霞等通过原核表达的蛋白包被酶标板建立了检测 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法^[59];2018 年,陈轩等建立了 ALV-K 的实时荧光 RT-PCR 检测方法^[60],曹伟胜等建立了特异性检测 ALV-K 的 SYBR green

real-time PCR 方法^[61]。目前临床上缺少直接检测 ALV-K 的诊断试剂盒，只能通过 P27 抗原检测试剂盒检测为外源性病毒后，再通过病毒分离鉴定，消耗时间较长。仅管孙鹏等通过免疫昆明白小鼠制备了 K 亚群禽白血病病毒 gp85 单因子血清，但每次通过小鼠制备的单因子血清比较有限，不能用于大量生产。若通过杂交瘤技术制备单克隆抗体，获得的单抗不仅特异性强，灵敏度高，还能实现大量生产。

本试验针对 ALV-K 的 gp85 基因，设计一对特异性 PCR 引物，通过大肠杆菌表达系统，构建原核表达载体，试验过程中为避免细胞融合后 ELISA 筛选实验过程中标签蛋白产生抗体造成的假阳性，针对 ALV-K 的 gp85 基因一共构建了 2 种原核表达质粒 pET-28a-ALV-K-gp85 和 pGEX-6P-1-ALV-K-gp85，以纯化的 HIS-K-gp85 免疫小鼠，三免完后采血收集阳性血清。为细胞融合后能筛选到效果较好的杂交瘤细胞，在制备 ALV-K-gp85 蛋白单克隆抗体前先建立了检测 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法，以纯化的 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原，分别以收集的小鼠阳性血清和健康小鼠阴性血清为一抗，经过多次的对比试验，确定了抗原最佳包被浓度为 6.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，血清最佳稀释度为 1:2000。通过建立的检测 ALV-K 抗体的间接 ELISA 方法筛选融合后细胞分泌的抗体，取读值大且孔内细胞株单一的杂交瘤细胞株进行亚克隆，经过这样反复 2 次亚克隆，最后一共筛选出 2 株效果好的杂交瘤细胞株，分别命名为 KD4 和 KE5。在 ELISA 筛选过程中，抗原浓度始终保持在较低水平，使筛选到的杂交瘤细胞产生抗体敏感性高。通过建立的检测 ALV-K 抗体间接 ELISA 方法对收集的腹水进行效价的测定，腹水效价分别达到 1: 64000 和 1: 128000。此外，以 GST-K-gp85 蛋白为检测抗原，以单抗 KD4 和 KE5 为一抗，进行 Western blot 检测，表明 2 株单抗都能与 K 亚群 gp85 蛋白发生特异性反应。同时，通过对单抗进行 IFA 鉴定试验，结果显示 2 株单抗除能识别 ALV-K 毒株外，还能与 ALV-A 毒株发生反应，表明 2 株单抗能同时识别 ALV-AK。

研究表明，目前分离到的 K 亚群禽白血病病毒株 env 基因与 ALV-A env 基因的同源性比较高，达 90%左右^[52]。经过序列比对发现，本实验室分离的 ALV-K 毒株 gp85 基因与本实验室分离的 ALV-A 毒株 gp85 基因的同源性为 88.4%，氨基酸序列同源性为 83.3%。由于单克隆抗体识别的抗原表位较短，而经过序列比对，K 亚群 gp85 氨基酸序列与 A 亚群 gp85 氨基酸序列的同源性较高，推测本次实验筛选到的 2 株 MAb 抗原表位应该位于 ALV-A gp85 基因和 ALV-K gp85 基因同源区段上，这可能是导致本实验未能成功筛选到特异性识别 ALV-K gp85 蛋白单克隆抗体的原因。与此同时，近几年我国报道的分离到的 A 亚群禽白血病病毒株也越来越多，有些鸡群感染 ALV-A 的情况也很严重^[62]，临床上进行禽白血病病毒检测时往往容易忽视对 ALV-A 病原的检测，加之市面上缺少针对 A 亚

群的抗原检测试剂盒。虽然本实验未能成功研制出针对 ALV-K gp85 蛋白的特异性单克隆抗体，但制备了能同时识别 ALV-AK 的 2 株单克隆抗体，能用于临床上 ALV-AK 的检测，对于 ALV-K 的研究也是一个重要的补充，为今后 ALV-AK 抗原检测试剂盒的研制奠定了基础。

全文结论

1. 将 ALV-J-gp85 基因和 ALV-K-gp85 基因分别克隆到原核表达载体 pET-28a 和 pGEX-6P-1 中，成功表达并纯化了 HIS-J-gp85 蛋白，GST-J-gp85 蛋白和 HIS-K-gp85 蛋白，GST-K-gp85 蛋白。
2. 建立了检测 ALV-J- gp85 的间接 ELISA 方法和检测 ALV-K- gp85 的间接 ELISA 方法。
3. 利用杂交瘤技术筛选到 1 株特异性识别 ALV-J 的单克隆抗体和 2 株能同时识别 ALV-AK 的单克隆抗体。

致谢

三年光阴转瞬即逝，转眼间，即将结束我的硕士研究生生涯，投入到一个全新的工作和生活环境中，这三来来的学习让我受益匪浅，是我人生中一个重要的转折点，相信对我以后的工作和学习都有莫大的帮助。在这毕业来临之际，我要感谢所有给过我帮助的老师和家人同学们，是你们的关心和帮助让我走到了现在。

本文的研究工作都是导师杨玉莹教授的悉心指导下完成的，从论文的选题，研究内容的制定，研究方法的教授，数据的分析，毕业论文的修改等，都离不开杨老师的热情细心指导。恩师博大精深的学识、缜密的思维方式、严谨的治学态度使我获益良多。师恩浩荡，无以为报，在此，我要由衷的感谢我的导师杨玉莹教授，感谢他这三年多来的悉心的指导和无私的帮助。

感谢我的师母顾玉芳教授对我在生活中的帮助和实验上的指导。感谢实验室罗静波老师、彭本英老师、肖立新老师对我实验试剂和设备提供上的帮助。感谢靳恒老师，石博妹老师、杨湘虹老师对我研究生培养期间的关心和帮助。

感谢我所有的课题组成员，特别感谢大师兄梁雄燕和师兄李拓凡，他们两位对我研究生期间的实验指导和实验技能的传授给予了莫大的帮助，使我在研究生期间不至于碌碌无为。感谢方春老师对我实验的指导，感谢师姐多婷、张丽华、谷玲军和师兄万亮、赵星、蔡宇威对我的关心和帮助。感谢张元峰、薛娟、尹彩霞、杨谡、杨搏等同学，感谢师弟卢渊录、肖伟、陈雪阳，方小伟和师妹汪琛、高可丽和陈晶对我生活上的关心和学习上的帮助。

深深感谢我的家人对我的关心和爱护，是他们对我的爱一直激励我不断向前拼搏。

最后，由衷感谢在此生活了七年育我成才的母校长江大学。

参考文献

- [1] Pham TD, Spencer JL, Johnson ES. Detection of avian leukosis virus in albumen of chicken eggs using reverse transcription polymerase chain reaction[J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 78:1-11.
- [2] 辛敬凯. B亚群禽白血病病毒单克隆抗体的制备[D]. 山东农业大学, 2014.
- [3] Payne LN. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. *Journal of General virology*, 1991, 73: 2995-2997.
- [4] 杜岩, 崔治中, 秦爱建. 从市场商品肉鸡中检测出J亚群白血病病. *中国家禽学报*. 1999, 1:1-4.
- [5] 徐滨蕊, 董卫星, 何召庆, 冯小宇, 余春明, 张丽, 任艳丽, L F LEE, Mao-xiang LI. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡J亚群禽白血病的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2002(09):7-9.
- [6] Gao YL, Yun BL, Qin LT, Pan W, Qiu Y, Liu ZS, Wang YQ, Qi XL, Gao HL, Wang XM. Molecular Epidemiology of Avian Leukosis Virus Subgroup J in Layer Flocks in China[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50:953-960.
- [7] 王鑫, 赵鹏, 崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病病毒新亚群的鉴定[J]. *病毒学报*, 2012, 28(06):609-614.
- [8] 乔彩霞, 关云涛, 陈洪岩. 禽白血病的研究将进展. *动物医学进展*[J]. 2003, 24(6): 18-21.
- [9] 童淑梅. 鸡内源性类J亚群禽白血病病毒gp85基因的克隆及表达[D]. 内蒙古农业大学, 2007.
- [10] Payne LN. Developments in avian leukosis research[J]. *Leukemia*, 1991, 6:150S-152S.
- [11] Shao HX, Wang L, Sang JJ, Li TF, Liu YL, Wan ZM, Qian K, Qin AJ, Ye JQ. Novel avian leukosis viruses from domestic chicken breeds in mainland China[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(7):2073-2076.
- [12] Ono M, Tsukamoto K, Tanimura N, Haritani M, Kimura KM, Suzuki G, Okuda Y, Sato S. An epizootic of subcutaneous tumors associated with subgroup A avian leukosis/sarcoma virus in young layer chickens[J]. *Avian Disease*, 2004, 48:940-946.
- [13] Venugopal K. Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses[J]. *Research in Veterinary Science*, 1999, 67:113-119.
- [14] Hanafusa T., and H. Hanafusa. Isolation of leucosis-type virus from pheasant embryo cells: Possible presence of viral genes in cells[J].

- Virology, 1973, 51:247-251.
- [15] Fujita D.J., Y.C. Chen, et al. RNA tumor viruses of pheasants, Characterization of avian leucosis subgroup F and G[J]. Virology, 1974, 60: 558-571.
- [16] 刘青. RNA 干扰 J 亚群禽白血病病毒跨膜蛋白 (TM) 表达对病毒复制的影响 [D]. 山东农业大学, 2009.
- [17] Friesen B, H Rubin. Some physicochemical and immunological properties of an avian leukosis virus (RIF) [J]. Virol, 1961, 15: 387-396.
- [18] Rubin H. Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of Rous sarcoma virus [J]. Virol, 1965, 26: 270-276.
- [19] Coffin JM, PN Tsiichlis, KF Conklin, et al. Genomes of endogenous and exogenous avian retroviruses [J]. Virol, 1983, 126: 51-72.
- [20] Bowers W. J., Petrosino J. F., Smith C. D., Ruddell A. Transcriptional regulation of ALV bursal lymphomagenesis [J]. Leukemia, 1994, 8 Suppl 1: S211-S213.
- [21] Vogt P. K. and Ishizaki R.. Reciprocal patterns of genetic resistance to avian tumor viruses in two lines of chickens [J]. Virol, 1965. 26: 664-672.
- [22] Cosset F. L., Legras C., Thomas J. L., Molina R. M., Chebloune Y., Faure C., Nigon V. M., Verdier G. Improvement of avian leukosis virus (ALV)-based retrovirus vectors by using different cis-acting sequences from ALVs [J]. J Virol, 1991, 65 (6) : 3388-3394.
- [23] Thomas J. L., Afanassieff M., Cosset F. L., Molina R. M., Ronfort C., Drynda A., Legras C., Chebloune Y., Nigon V. M., Verdier G. In situ expression of helper-free avian leukosis virus (ALV)-based retrovirus vectors in early chick embryos [J]. Int J Dev Biol, 1992, 36 (2) : 215-227.
- [24] 荆圆圆. J 亚群禽白血病病毒和鸡白痢沙门氏菌在蛋鸡中共感染的研究 [D]. 山东农业大学, 2014.
- [25] 杭柏林. J 亚群禽白血病病毒 JS09GY3 株感染特性及感染鸡法氏囊转录组学分析 [D]. 扬州大学, 2014.
- [26] Weiss P A. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry [J]. The Retroviridae, 1992, 2:108.
- [27] 张洪海. 山东省家禽肿瘤性疾病流行病学调查及 GIS 预警系统的建立 [D]. 山东农业大学, 2009.
- [28] 彭昭录, 刘莉. 浅述禽白血病的发生与流行 [J]. 中国畜禽种业, 2015,

- 11(06):141.
- [29] 李中明. 某蛋种鸡群 ALV 流行病学及生物学特性的初步研究[D]. 山东农业大学, 2010.
- [30] 杨凤. 山东地区禽白血病发病鸡群的流行病学调查及致病特性的研究[D]. 山东农业大学, 2011.
- [31] 尹青. 蛋用型鸡禽白血病的病毒感染动态及病理学研究[D]. 山东农业大学, 2011.
- [32] 于世昌. 蛋鸡、地方种鸡 J 亚群白血病的致病特征研究[D]. 山东农业大学, 2008.
- [33] 申艳玮. 选择压作用下 J 亚群禽白血病病毒突变位点的研究[D]. 山东农业大学, 2014.
- [34] 李传龙. J 亚群禽白血病病毒相关的鸡急性纤维肉瘤人工造病试验[D]. 山东农业大学, 2012.
- [35] Williams SM, Reed WM, Bacon LD, et al. Response of white leghorn chickens of various genetic lines to infection with avian leukosis virus subgroup J[J]. *Avian Dis*, 2004, 48 (1): 61-67.
- [36] 杨玉石. 禽白血病病株与类型症状[J]. *当代畜禽养殖业*, 2013, (01):38.
- [37] Burmester BR, NF Waters. Variation in the presence of the virus of visceral lymphomatosis in the eggs of the same hens[J]. *Poult Sci*, 1956, 35: 939-944.
- [38] Crittenden LB, EJ Smith, W Okazaki. Identification of broiler breeders congenitally transmitting avian leukosis virus by enzyme linked immunosorbent assay[J]. *Poult Sci*, 1984, 63: 492-496.
- [39] Fadly AM, Okazaki W, Smith E J, et al. Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukosis virus infection[J]. *Poult Sci*, 1981, 60(9): 2037-2044.
- [40] Fadly AM and Witter RL. Oncornaviruses: leukosis/sarcoma & reticuloendotheliosis. In D. ESwayne JR Glisson MW, Jackwood, et al (eds). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. Am. Assoc[J]. *Avian Pathologists*: Kennet Square, PA, 1998, 185-196.
- [41] Rubin H, L Fanshier, A Cornelius, WF Hughes. Tolerance and immunity in chicken after congenial and contact infection with an avian leukosis virus[J]. *Virology*, 1962, 17: 143-156.
- [42] Spencer J. L., Crittenden L. B., Burmester B. R., et al. Lymphoid

leukosis: Interrelations among virus infections in hens, eggs, embryos and chicks[J]. Avian Dis, 1977. 21: 331-345.

[43] Yun BL, Li DL, Zhu HB, Liu W, Qin LT, Liu ZS, Wu G, Wang YQ, Qi XL, Gao HL, Wang XM, Gao YL. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of avian leukosis virus p27 antigen[J]. J. Virol. Methods, 2013, 187(2):278-283.

[44] Gao Q, Yun BL, Wang Q, Jiang LL, Zhu HB, Gao YN, Qin LT, Wang YQ, Qi XL, Gao HL, Wang XM, Gao YL. Development and Application of a Multiplex PCR Method for Rapid Differential Detection of Subgroup A, B, and J Avian Leukosis Viruses[J]. J. Clin. Microbiol. 2014, 52(1):37-44.

[45] 刘宏霞. 禽白血病诊断技术概述[J]. 畜禽业, 2011, (04):66-67.

[46] 毛翠. 山东地方品种鸡寿光鸡禽白血病流行特点及病理学研究[D]. 山东农业大学, 2013.

[47] Meng FF, Li QC, Zhang YW, Zhang ZH, Tian SB, Cui ZZ, Chang S, Zhao P. Characterization of subgroup J avian Leukosis virus isolated from Chinese indigenous chickens[J]. Virology journal, 2018, 15(1).

[48] Zeng XW, Liu LL, Hao RJ, Han CY. Detection and Molecular Characterization of J Subgroup Avian Leukosis Virus in Wild Ducks in China[J]. PLOS ONE. 2014, 9(4).

[49] Wen YW, Huang Q, Yang CC, Pan L, Wang GJ, Qi KZ, Liu HM. Characterizing the histopathology of natural co-infection with Marek's disease virus and subgroup J avian leucosis virus in egg-laying hens[J]. Avian Pathol, 2018, 47(1):83-89.

[50] Meng FF, Dong GW, Zhang YB, Tian SB, Cui ZZ, Chang S, Zhao P. Co-infection of fowl adenovirus with different immunosuppressive viruses in a chicken flock[J]. Poultry science, 2018, 97(5): 1699-1705.

[51] 李建亮. 不同遗传背景鸡群来源 J 亚群禽白血病病毒 gp85 的分子演变分析[D]. 山东农业大学, 2015.

[52] 李阳. 我国地方品系鸡群中 ALV 的流行病学调查及 ALV-K 生物学特性的研究[D]. 山东农业大学, 2017.

[53] Li X, Zhu H, Wang Q, Sun J, Gao Y, Qi X, Wang Y, Gao H, Gao Y, Wang X. Identification of a novel B-cell epitope specific for avian leukosis virus subgroup J gp85 protein[J]. Arch Virol. 2015, 160(4): 995-1004.

[54] Li XF, Qin LT, Zhu HB, Sun YJ, Cui XZ, Gao YD, Qi XL, Wang YQ, G

- ao HL, Gao YL, Wang XM. Identification of a linear B-cell epitope on the avian leukosis virus P27 protein using monoclonal antibodies[J]. Arch Viro, 2016, 161(10): 2871-2877.
- [55] Qiu Y, Li X, Fu L, Cui Z, Li W, Wu Z, Sun S. Development and characterization of monoclonal antibodies to subgroup A avian leukosis virus[J]. Veterinary and Comparative Oncology, 2013, 12(1):47-51.
- [56] Wang PK, Yang YL, Lin LL, Li HJ, Wei P. Complete genome sequencing and characterization revealed a recombinant subgroup B isolate of avian leukosis virus with a subgroup J-like U3 region[J]. Virus Genes. 2017, 53(6): 927-930.
- [57] Zhao Z, Rao M, Liao M, Cao W. Phylogenetic Analysis and Pathogenicity Assessment of the Emerging Recombinant Subgroup K of Avian Leukosis Virus in South China[J]. Viruses 2018, 10, 194.
- [58] 孙鹏, 陈孜孟, 赵国梁, 崔宁, 祖铭, 崔治中, 苏帅. K亚群禽白血病病毒gp85单因子血清的制备及其特异性鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(02): 371-376.
- [59] 袁丽霞, 饶明章, 张杰, 赵子君, 陈建, 陈杨一骏, 严立福, 郑晓翠, 谢暮晴, 曹伟胜. K亚群禽白血病病毒抗体间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(11): 1349-1356.
- [60] 陈轩, 赵海燕, 杨素, 曹伟胜, 黄海超, 邵建宏, 赵福振, 沙才华, 廖秀云. K亚群禽白血病病毒实时荧光RT-PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 病毒学报, 2018, 34(02): 224-231.
- [61] Chen J, Zhao ZJ, Yang YJ, Zhang J, Yan LF, Zheng XC, Liao M, and Cao WS. Development and application of a SYBR green real-time PCR for detection of the emerging avian leukosis virus subgroup K[J]. Poultry science, 2018.
- [62] 辛敬凯. B亚群禽白血病病毒单克隆抗体的制备[D]. 山东农业大学, 2014.

个人简介

刘兰，女，汉族，湖北潜江人，出生于1992年1月15日，大学生国家英语六级水平。

2011年9月至2015年7月，就读于长江大学动物科学学院，获动物医学学士学位；

2015年9月至2018年6月，就读于长江大学动物科学学院，攻读水产养殖专业硕士学位。

在校期间参加的科研项目及获奖情况

2015年10月—2016年12月参加“K亚群禽白血病病毒分子特征及其致病性的研究”项目；

2017年10月 获长江大学“研究生国家奖学金”

2017年11月获长江大学“优秀研究生”称号；

在校期间发表的主要学术论文

本人在校期间以第一作者身份发表学术论文3篇，包括中文核心2篇，SCI检索1篇（共同第一作者），如下：

[1]刘兰（**第一作者**）.散养土鸡J亚群禽白血病病毒和网状内皮组织增生症病毒混合感染的诊断[J].中国兽医杂志，2017，53(04): 47-49

[2] 刘兰（**第一作者**）.禽安卡拉病毒 Hexon 蛋白多克隆抗体的制备[J].畜牧与兽医，2018，50(02): 83-85

[3] Lan LIU（**共同第一作者**）.Identified Novel Deletions in the Genomes of Avian Endogenous Retroviruses ev/J in Chicken Breeds in China[J]. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2018,24(3):409-414

在校期间申请的专利

本人在校期间以第一发明人身份申请4项实用新型专利,4项专利均已授权,如下:

刘兰（**第一发明人**）.一种生物组织制片的脱水装置（专利号：2017214226553）

刘兰（**第一发明人**）.一种生物组织切片染色缸（专利号：2017214219545）

刘兰（**第一发明人**）.一种蛋白质印记曝光盒（专利号：2017214325402）

刘兰（**第一发明人**）.一种蛋白胶保存装置（专利号：2017214520829）