

分类号：S855.3

授予学位单位代码：10434

学

号：2016110447

山東農業大學
硕士学位论文

鸡源呼肠孤病毒检测方法的建立及其 σ C蛋白单克隆抗体的制备

Development of Detection Method and Preparation of Monoclonal Antibodies to σ C Protein of Chicken-derived Avian Orthoreovirus

研究生：刘赫

学科专业：预防兽医学

研究方向：禽病学

学院：动物科技学院

指导教师：胡敬东 副教授

2019年6月4日

论文提交日期：2019.03.27

论文答辩日期：2019.06.02

学位授予日期：2019.06

学科门类：农学

答辩委员会主席：田夫林

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所提交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解山东农业大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权山东农业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进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文，同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并向社会公众提供信息服务。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：_____

导 师 签 名：_____

日 期：_____

本研究由
国家重点研发计划项目(2018YFD0500106-3)、
泰山产业领军人才项目(LJNY201610)、
山东省农业重大应用技术创新项目(39703)
提供资助

符号说明

英文缩写	英文全称	中文名称
AA	Amino acid	氨基酸
AGP	Agar gel precipitation	琼脂扩散试验
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
ARV	Avian reovirus	禽呼肠孤病毒
bp	base pair	碱基对
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
cm	centimeter	厘米
d	day	天
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium	达尔伯克改良伊格尔培养基
DNA	deoxyribonucleotide acid	脱氧核糖核酸
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希氏杆菌
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FAV	Fowl adenovirus	禽腺病毒
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
IBDV	Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病病毒
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
kDa	Kilo-dalton	千道尔顿
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
L	Liter	升
LB	Lauria broth	肉汤培养基
g	gram	克
h	hour	小时
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶

min	minute	分钟
mL	milliter	毫升
mm	millimeter	毫米
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
nm	nanometer	纳米
OD	Optical density	光密度值
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate-buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT	Reverse transcription	反转录
s	second	秒
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SPF	Specific pathogen free	无特定病原体
TEMED	N,N,N,N-teral ethylene diamine	N, N, N, N-四甲基乙二胺
TMB	Tetramethyl benzdine	四甲基联苯胺
μL	microliter	微升
μg	microgram	微克
WB	Western blot	免疫印迹试验

目录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
1 前言	1
1.1 禽呼肠孤病毒感染的研究现状	1
1.1.1 病原学.....	1
1.1.2 流行病学.....	5
1.1.3 致病性.....	5
1.1.4 防控措施.....	6
1.2 禽呼肠孤病毒诊断方法的研究进展	7
1.2.1 病毒的分离与鉴定.....	7
1.2.2 血清学诊断方法.....	8
1.2.3 分子生物学诊断方法.....	10
1.3 本研究的的意义	13
2 材料与方法	14
2.1 材料	14
2.1.1 毒株、细胞、载体、血清及实验动物.....	14
2.1.2 主要试剂.....	14
2.1.3 主要仪器设备.....	14
2.1.4 主要溶液的配制.....	15
2.2 方法	17
2.2.1 ARV 地高辛核酸探针检测方法的建立.....	17
2.2.2 ARV σ C 蛋白的原核表达.....	23
2.2.3 检测 ARV 抗体间接 ELISA 方法的建立.....	28
2.2.4 ARV σ C 蛋白单克隆抗体的制备.....	30
3 结果	38
3.1 ARV 核酸探针的制备	38
3.1.1 PCR 扩增.....	38
3.1.2 敏感性试验.....	38

3.1.3 特异性试验	39
3.1.4 稳定性试验	39
3.1.5 临床样品的初步检测	40
3.2 ARVσC 基因的原核表达	40
3.2.1 目的基因的扩增	40
3.2.2 重组表达载体 σ C-pET32a 的双酶切鉴定	41
3.2.3 重组蛋白最佳表达条件的优化	41
3.2.4 重组蛋白的纯化及表达形式的确定	42
3.2.5 Western-blot 分析鉴定	43
3.2.6 蛋白浓度的确定	44
3.3 检测 ARV 抗体的间接 ELISA 方法建立	44
3.3.1 抗原最佳包被浓度与血清稀释度的确定	44
3.3.2 抗原最佳包被条件的确定	45
3.3.3 最佳封闭液的确定	45
3.3.4 兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体最佳稀释度的确定	46
3.3.5 阴阳性临界值的确定	46
3.3.6 特异性试验	46
3.3.7 敏感性试验	47
3.3.8 重复性试验	47
3.3.9 临床样品的检测	48
3.4 ARVσC 单克隆抗体的制备与鉴定	48
3.4.1 免疫小鼠血清抗体效价的测定	48
3.4.2 杂交瘤细胞的筛选	49
3.4.3 单克隆抗体亚类的测定	49
3.4.4 单克隆抗体效价的测定	50
3.4.5 单克隆抗体反应性鉴定	50
3.4.6 间接免疫荧光鉴定	51
3.4.7 稳定性试验	51
3.4.8 腹水纯化	51
4 讨论	53

5 结论.....	56
6 参考文献.....	57
7 致谢.....	65
8 攻读硕士学位期间发表论文情况.....	66

中文摘要

禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*), 主要引起肉鸡的病毒性关节炎和腱鞘炎。近年来, 我国山东、江苏、河北、福建、浙江等地的肉种鸡场和商品肉鸡场先后发生该病疫情的报道, 给肉鸡养殖业带来了严重损失。本研究针对 ARV 野毒株 LY383 建立了地高辛标记的核酸探针检测方法, 同时对其主要抗原蛋白 σ C 进行了原核表达, 进而建立了 ARV 抗体的间接 ELISA 检测方法, 并利用纯化的重组蛋白, 制备了相应的单克隆抗体, 为 ARV 的临床检测和后续研究提供了技术支持, 具体研究内容如下:

根据 ARV S1 基因序列, 设计特异性的引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 229bp 的基因片段, 将纯化后的胶回收产物利用地高辛进行标记, 制备核酸探针, 建立地高辛标记的核酸探针检测 ARV 的方法。特异性试验结果表明, H9 亚型禽流感病毒(H9-AIV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊病病毒(IBDV)、禽腺病毒(FAV)、新城疫病毒(NDV)的核酸无法与探针杂交显色, 只有 ARV 与该探针杂交结果为阳性; 敏感性试验结果表明, 标记探针最低检出量为 50pg/ μ L。对临床采集的 13 份疑似感染病料进行检测, 与 RT-PCR 检测结果的符合率为 100%。制备的探针保存在-20 $^{\circ}$ C 冰箱中 90d 后仍可继续用于检测, 稳定性较好。以上结果表明所建立的 ARV 地高辛标记的核酸探针检测方法具有较好的特异性、敏感性和稳定性, 操作简便, 可大批量检测临床样本。

设计一对特异性引物, 经 RT-PCR 反应扩增出 ARV σ C 基因片段, 克隆至 pMD18-T 载体, 将测序鉴定正确的重组载体 σ C-pMD18-T 和表达载体 pET-32a(+)分别进行双酶切反应后, 构建 σ C-pET-32a 重组表达质粒, 转入 *E. coli* BL21(DE3)表达菌。通过优化蛋白诱导表达的条件, 表达融合蛋白, 经过尿素梯度洗涤法初步纯化和镍柱再次纯化后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 确定目的蛋白的表达形式为包涵体, Western blot 鉴定结果显示, 表达的融合蛋白具有良好的反应性。

利用表达的重组蛋白建立检测 ARV 抗体的间接 ELISA 方法: 棋盘稀释法确定目的蛋白的最佳包被稀释度为 1:1000; 血清最佳稀释度为 1:10; 最佳封闭液为 5%脱脂奶粉; 兔抗鸡 IgG-HRP 酶标二抗稀释度为 1:500。该方法与其他病原体之间无阳性反应, 板间

和板内试验确定其变异系数为 4.85% 至 7.93%，具有较好的重复性，可应用于大规模血清学调查和流行病学监测。

将纯化后的 σ C 重组蛋白作为免疫原，免疫 BALB/c 小鼠，经过筛选和亚克隆最终获得 2 株能稳定分泌 σ C 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 A1S9、B2D9，通过抗体亚类试剂盒测定所获得的单抗为 IgG1 亚型、轻链为 κ 链。ELISA 效价测定结果显示，上清效价为 1:100，小鼠腹水的效价为 1:128000 和 1:256000。Western blot 和 IFA 鉴定结果显示制备的单抗可与 ARV 发生特异性反应。

关键词：禽呼肠孤病毒；地高辛核酸探针； σ C 蛋白；间接 ELISA；单克隆抗体

Development of Detection Method and Preparation of Monoclonal Antibodies to σ C Protein of Chicken-derived Avian Orthoreovirus

ABSTRACT

Avian reovirus (ARV) belongs to the family Reoviridae Orthoreovirus, which mainly causes viral arthritis and tenosynovitis in broilers. In recent years, broiler farms and commercial broiler farms in Shandong, Jiangsu, Hebei, Fujian, Zhejiang provinces were infected with Reovirus and caused serious losses to the broiler breeding industry. In this study, a method of digoxin-labeled nucleic acid probes was established. At the same time, prokaryotic expression was achieved for its main antigenic protein σ C, and an indirect ELISA method for ARV antibody was established. The monoclonal antibody were prepared, which provided technical support for the follow-up research and clinical detection of ARV. The specific research contents are as follows:

According to the S1 gene sequence of the ARV strain LY383, a specific primer was designed, after that a 229 bp gene fragment was amplified by RT-PCR. The product was labeled with digoxin to prepare a nucleic acid probe. Specific test results indicate that except for ARV, H9 subtype avian influenza virus (H9-AIV), Infectious bronchitis virus (IBV), Infectious bursal disease virus (IBDV), Fowl adenovirus (FAV), Newcastle disease virus (NDV) could not hybridize with probe; the sensitivity test showed that the minimum detectable amount of the labeled probe was 50 pg/ μ L. The 13 suspected cases collected in the clinic were tested and the coincidence rate with the RT-PCR results was 100%. The prepared probe can be used for further detection after being stored in a refrigerator at -20 °C at least for 90 days. The results above indicate that the established ARV digoxigenin-labeled nucleic acid probe detection method has good specificity, sensitivity and stability, and can be used to detect disease samples in large quantities.

Design a pair of specific primers to amplify the σ C gene fragment of ARV strain LY383 by RT-PCR, and then clone into pMD18-T vector. The correct recombinant vector

σ C-pMD18-T and the expression vector pET-32a (+) were digested separately then the σ C-pET-32a recombinant plasmid was constructed and transferred into expressing bacteria *E. coli* BL21 (DE3). By exploring the optimal conditions for protein-induced expression, a large amount of fusion protein was expressed and purified by urea gradient method. SDS-PAGE electrophoresis to confirm the expression form of the target protein as inclusion body. Western blot analysis showed that the protein has good immunogenicity.

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay detection for ARV was established using the expressed recombinant protein: the optimal dilution of the target protein was determined to be 1000 folds and the optimal dilution of the serum was determined to be 10 folds; the optimal blocking solution was 5% skim milk powder; HRP-labeled rabbit anti-chicken antibody dilution was determined to be 500 folds. Specificity tests showed that no positive reaction between ARV and other pathogens. The repeatability of this method was determined by the inter assay and intra assay tests with variability ranging from 4.85% to 7.93%. The above results indicate that the assay has strong specificity and good reproducibility which can be applied to large-scale serological investigation and monitoring of antibody levels in ARV infection.

The purified σ C protein was used as an immunogen to immunize BALB/c mice. After screening and subcloning, two hybridoma cell lines stably secreting σ C protein monoclonal antibodies were obtained, named A1S9 and B2D9. The monoclonal antibody obtained by the subclass kit assay is an IgG1 subtype and the light chain is a kappa chain. The ELISA titer assay showed that the supernatant titers were 1:100, the mouse ascites titers were 1:128000 and 1:256000. The results of Western blot and IFA showed that the prepared monoclonal antibody reacted specifically with ARV.

Keywords: Avian orthoreovirus; Digoxigenin-Labeled Nucleic Acid Probe; σ C gene; Indirect enzyme linked immunosorbent assay; monoclonal antibody

1 前言

1.1 禽呼肠孤病毒感染的研究现状

1.1.1 病原学

1.1.1.1 分类及形态特征

禽呼肠孤病毒(Avian Reovirus)属于呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*)的成员之一(Mertens *et al.*, 2004)。根据国际病毒委员会(ICTV)第九次报告内容,将 *Orthoreovirus* 分为 4 个亚群:第 I 亚群为非融合性哺乳动物正呼肠孤病毒(Mammalian orthoreoviruses, MRV);第 II 亚群为融合性呼肠孤病毒,包括禽呼肠孤病毒和从狐蝠体内分离的尼尔森海湾病毒(Nelson Bay virus, NBV);第 III 亚群为狒狒呼肠孤病毒(Baboon reovirus, BRV)。从蛇分离的两合胞体诱导性毒株暂定为第 IV 亚群。

禽呼肠孤病毒为双股分节段的 RNA 病毒,无囊膜,病毒粒子呈二十面体对称,直径为 76nm 左右,核心的直径约为 52nm,具有双层核衣壳结构,内包裹病毒的核酸、一些功能未知的小分子以及富含腺嘌呤的单股寡核酸。完整的病毒粒子浮力密度可以通过密度梯度离心进行纯化。纯化的病毒粒子只包含蛋白质与核酸,平均含量分别为 81.3%和 18.7%(钟丽, 2017; Van *et al.*, 2000)。

1.1.1.2 理化特征

ARV 病毒粒子的氯化铯浮力密度为 1.37g/mL (Spandidos *et al.*, 1976)。病毒对热的抵抗力较强,56°C 环境中可耐受 22~24h,60°C 环境中耐受 8~10h,80°C 耐受 1h,37°C 环境中可耐受时间达 15~16 周,22°C 可耐受 48~51 周,4°C 下可存活 3 年以上,-20°C 可存活 4 年以上,-63°C 条件下保存 10 年以上仍具有活性;MgCl₂ 能够增强 ARV 对热的稳定性,但浓度太大反而会促进其灭活(Jones *et al.*, 2000);病毒粒子对 4.8%的氯仿、0.1mol/L 的盐酸和乙醚均不敏感;对 2%来苏儿和 3%甲醛具有抵抗力,可在 pH3.0~9.0 范围内保持稳定;但是 2%~3%的氢氧化钠溶液和 70%的乙醇可使其灭活;不同 ARV 毒株对胰蛋白酶的敏感性也是不同的,但是对胰蛋白酶敏感的毒株普遍表现出经口感染后

在肠道内复制较差，扩散到其他组织也比较困难；与 MRV 和其他哺乳动物呼肠孤病毒不同的是，ARV 一般无血凝性，无法凝集火鸡、鸡、鸭、兔、绵羊、鼠的红细胞，但能够引起感染细胞发生细胞融合，形成合胞体(Duncan *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1995)。

1.1.1.3 培养特性

ARV 的分离和增殖可以通过 SPF 鸡胚和多种细胞进行，常用的鸡胚接种方式主要为卵黄囊接种和绒毛尿囊膜接种，初次分离宜选用小日龄 SPF 鸡胚(5~7 日龄)经卵黄囊途径接种，一般在接种后 3~5 天内出现死胚现象，鸡胚尿囊绒毛膜增厚，胚体皮下出血严重。

ARV 常用的细胞培养方法多采用禽原代细胞培养，包括鸡胚成纤维细胞、肺、肾、肝、睾丸和巨噬细胞；有些毒株也可适应许多哺乳动物细胞系，如猴肾细胞(Vero)、仓鼠肾细胞(BHK-21/13)、和猪肾细胞(PK)、猫肾细胞(CRFK)等(朱万光等, 1996; 唐雨德等, 1994)。但大多数毒株只在 Vero 细胞上产生以细胞融合为特征的病变(Nwajei *et al.*, 1988; 沈文康等, 2017)，有研究者认为鸡肝癌细胞(LMH)对 ARV 的分离最为敏感，其次为鸡肾细胞，鸡胚成纤维细胞分离效果较差，相反在细胞传代过程中，鸡胚成纤维细胞具有较好效果(Barta *et al.*, 1984)。

1.1.1.4 血清学分类

ARV 各毒株之间具有共同的群特异性抗原，其血清型的分类受到许多因素的影响，常使用血清学方法对 ARV 进行分类或对鸡的相关致病性分群。1980 年 Wood 等通过中和试验对来自德国、美国、日本、英国的 ARV 进行相关性分析，结果表明 ARV 至少存在 11 个血清型。到目前为止，多种病毒株从我国各地分离，但不同毒株血清型之间的关系尚不清楚(赵月兰等, 1995)，因此许多毒株只能作为抗原亚型，却不能成为独立的血清型(唐雨德等, 1992)。

1.1.1.5 分子生物学特征

1.1.1.5.1 基因组结构特点

ARV 的基因组由 10 个节段的双股 RNA 组成，大小约为 23kb。根据聚丙烯酰胺凝

胶电泳的迁移速率不同, 整个基因组可分为大(L)、中(M)、小(S)三组(方勤, 2003)。L组包括 L1、L2、L3 三个片段, M组包括 M1、M2、M3 三个基因片段, S组包括四个基因片段, 分别为 S1、S2、S3、S4(Varela *et al.*, 1994; Varela *et al.*, 1996)。L组分子量为 $2.42\sim 2.25\times 10^6$; M组分子量为 $1.6\sim 1.34\times 10^6$; S组分子量为 $0.98\sim 0.61\times 10^6$ (刘文兴, 2004)。

1.1.1.5.2 主要蛋白研究进展

ARV 的 10 个节段基因组编码的蛋白也可分为三组: 大(λ)、中(μ)、小(σ), 其中包括 10 个结构蛋白, 分别为 λA 、 λB 、 λC 、 μA 、 μB 、 μBC 、 μBN 、 σC 、 σB 、 σA ; 4 个非结构蛋白, 分别是 μNS 、P10、P17、 σNS 。其中 μBC 、 μBN 是 μB 发生剪切后的产物, 为前体蛋白, 其余蛋白为初始转录产物(Varela *et al.*, 1994)。

1.1.1.5.2.1 结构蛋白

λA 由 L1 基因编码合成, L1 节段全长 3959bp。该蛋白是包裹病毒核酸和 RNA 聚合酶的内核蛋白, 组成内层核衣壳。 λA 蛋白可在宿主细胞内迅速地与病毒组装工厂相联系, 扩散在转染细胞的细胞质中。但是与 μNS 蛋白共表达时会形成复合体, 说明 μNS 可介导 λA 蛋白招募进入病毒加工工厂(Benavente *et al.*, 2007)。

λB 由 L2 基因编码合成, 是病毒内衣壳的组分中的一种, 与 MRV 的 $\lambda 2$ 蛋白不同的是, λB 能够融合宿主细胞并产生特异性中和抗体。迄今为止, 没有研究证实该蛋白是否与 RNA 聚合酶活性有关, 但是由于该蛋白的粒子大小与复制数目与其他 RNA 类似, 所以研究者推测 λB 蛋白可能与 RNA 活性有关。

λC 由 L3 基因编码, 研究者通过病毒亲和力放射性标记试验证实该蛋白是病毒加帽酶的一种, 所以加入 GTP 培养病毒粒子时, 该蛋白是唯一一个能够通过磷酸胺键连接 GMP 的蛋白, 一部分 GMP 转移到 GDP 和 GTP 受体中, 参与帽子结构的形成过程。

μA 是由 M1 基因编码的蛋白。该蛋白是内核壳中一个比较小的部分(祁海波等, 2008), 关于该蛋白的研究较少。由于该蛋白与哺乳动物呼肠孤病毒中的 $\mu 2$ 蛋白相对应, 所以有研究者猜测该蛋白是否也与病毒工厂和细胞微管系统的卵定相关, 但是 ARV 的病毒工厂是球状的, 与微管系统无相关性(Touris-Otero *et al.*, 2004), 因此, 禽呼肠孤病毒的 μA 蛋白是否与哺乳动物呼肠孤的 $\mu 2$ 蛋白的功能类似有待于进一步研究。

μB 蛋白由 M2 基因编码, 该蛋白后期可裂解为 μBC 和 μBN 蛋白, 该过程需要完

整的病毒粒子的存在,无法在体外表达系统中完成(Van *et al.*, 2000)。

σ A 由 S2 基因编码,可与病毒双链 RNA 紧密结合(Reiter *et al.*, 2011),即使在高盐浓度情况下也很难分离,表明该蛋白的天然构象与双链 RNA 相契合。正是由于 σ A 的这种特点,使得病毒 RNA 无法被宿主的免疫系统识别,导致机体无法产生干扰素,造成机体的免疫抑制。

σ B 由 S3 基因编码,是病毒外壳蛋白的成分之一。该蛋白能够自发地与感染细胞细胞质中的 μ B 蛋白和 μ BC 蛋白结合,形成异源多聚体(Yin *et al.*, 2013)。由于该蛋白可诱导机体产生中和抗体,故可在体外表达后作为检测抗原。

σ C 蛋白虽然是外壳蛋白中最小的蛋白,但却是 S1 基因中一个非常重要的结构蛋白。该蛋白在 ARV 的感染及其致病的作用上有着重要的作用,它能够产生群特异性中和抗原,刺激机体产生中和抗体,与特异性中和反应有关(Zhang *et al.*, 2006)。有研究表明,在被 ARV 感染的细胞中,仅能提取出 σ C 蛋白,该蛋白也能够特异性结合禽类细胞。另一方面, σ C 蛋白可以使 ARV 与细胞的结合完全阻断,表明 σ C 具有特异性和饱和性吸附宿主细胞的作用(姜晓宁, 2018)。

1.1.1.5.2.2 非结构蛋白

μ NS 蛋白由 M3 基因编码,大小为 70kDa,在细胞中合成后可被切割为大小为 15kDa μ NSN 和 55kDa 的 μ NSC。 μ NS 可被 caspase-3 蛋白酶剪切,其水解过程可被体内的细胞凋亡增强(Touris *et al.*, 2004)。

σ NS 由 S4 基因编码,在感染细胞的细胞质中,可与病毒 RNA 结合,然后以核糖核蛋白复合体的形式,促进 RNA 之间的特异性相互作用,促进基因组片段的分装和重组,是参与病毒复制所必须的重要蛋白(Borodavka *et al.*, 2015)。另外, σ NS 与 μ NS 蛋白结合后共同作用,参与 ARV 的复制与细胞入侵过程(Touris *et al.*, 2004)。

P10 是由 S1 基因的 ORF-1 编码的蛋白,是一种与细胞融合相关的小跨膜蛋白,为 ARV 感染细胞过程中的细胞融合重要蛋白。P10 还有一种病毒孔道蛋白,能够破坏细胞膜的完整性,与细胞凋亡现象有关(孙爱军等, 2006)。

P17 是由 S1 基因的 ORF-2 所编码的一种核质穿梭蛋白,在该蛋白的 C 端具有定位细胞核的信号肽,参与细胞的转录活性。此外,P17 的表达可以激活 PKR、AMPK、PTEN 等蛋白的表达从而增加细胞自噬流,促进病毒复制(吴巧梅等, 2017)。

1.1.2 流行病学

ARV 宿主范围较广, 鸡(Eszter *et al.*, 2013)、火鸡(Sharafeldin *et al.*, 2015)、野鸡(Curtis *et al.*, 1992)、鹅(Palya *et al.*, 2003)、鸭(Zheng *et al.*, 2016)、番鸭(TaoYun *et al.*, 2015)、鸽子(Vindevogel *et al.*, 1982)均可感染。动物对病毒的易感性呈现年龄依赖性, 虽然各种日龄的鸡均易感, 但以 1 周龄的肉用仔鸡多发, 1 日龄雏鸡易感性最高, 随着日龄的增大易感性逐渐降低, 16 周龄以后显著降低, 带毒鸡和病鸡是 ARV 感染的主要传染源。病毒在鸡群中既可通过水平方式传播也可通过垂直方式传播, 但是以呼吸道和消化道水平传播为主, 垂直传播率较低, 在病毒血症期间, 也可以通过吸血昆虫进行传播(Pomeroy *et al.*, 2015)。

1.1.3 致病性

Kiben 等研究表明, ARV 可从患不同疾病的鸡群中分离到, Mustaffa 等发现在正常生长的鸡群中也可分离到病毒(Mackenzie *et al.*, 1977; Ahmad *et al.*, 1973)。ARV 感染可引起肠道疾病和发育迟缓综合征(Dutta *et al.*, 1967; Goodwin *et al.*, 2015), 诱发免疫抑制, 增强感染鸡群继发其他疾病的易感性(Kibenge *et al.*, 1987; Montgomery *et al.*, 1985)。新西兰首次报道肉鸡传染性发育迟缓综合征, 引起肉鸡生长缓慢、发育迟缓, 饲料转化率低(Shapouri *et al.*, 1996; Rosenberge *et al.*, 1985)。Vertommen 从生长缓慢的病鸡中分离到一株 ARV, 回归雏鸡后, 引起雏鸡腹泻; Vander 等将分离到的 ARV 回归 1 日龄肉鸡和 SPF 鸡, 引起了病鸡产生关节炎和股骨头坏死。鸡群感染 ARV 后, Montgomery 等报道出现脾脏肿大、基质细胞数量增多、淋巴细胞浸润、法氏囊粘膜萎缩等病理组织学变化(Montgomery *et al.*, 1986; Yawei *et al.*, 1995)。ARV 与鸡传染性贫血因子共同作用, 可诱发蓝翅病(曹维范等, 1992), 该病于 1988 在欧洲首次报道, 病鸡呈现免疫器官萎缩、皮下及肌肉出血。病鸡毒性关节炎是 ARV 所引发的疾病中, 最典型、危害最为严重的疾病, 该病的主要症状是病鸡跛行和腱鞘肿胀, 成年鸡有时可见腓肠肌肌腱断裂, 随着病程发展, 病鸡表现全身发绀、脱水精沉郁直至死亡。剖检可见皮下有淡黄色胶冻样渗出, 关节腔内含有棕黄色或棕色血染分泌物。组织学切片可观察到患病部水肿伴有易染性细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润、网状细胞增生。滑膜腔内充满易染性细胞、滑落的滑膜细胞和巨噬细胞。此外, ruff 等报道柔嫩艾美尔球虫或巨型艾美尔球虫的协同感染会加强某些呼肠孤病毒的致病作用。虽然 ARV 的毒力表现多样, 但是大部分病毒在实验室

感染雏鸡的试验中均能观察到关节的显微病变(Heide *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1984)。

1.1.4 防控措施

1.1.4.1 弱毒疫苗

Vander 等人首次于 1984 年研制出针对 ARV 的弱毒疫苗, 该疫苗是将 ARV S1133 株接种鸡胚, 连续 235 次传代后, 转移到 CEF 细胞上继续传 65 代后获得的一株减毒的疫苗(P100)。但 P100 疫苗株接种于 1 日龄雏鸡后仅能抵抗同源毒株的感染, 并且影响马立克疫苗的免疫效果, 因此有研究者认为 P100 并非完全减毒(Heide *et al.*, 1983)。Haffer 等人筛选出了弱毒株 UM1-203, 可为 6 日龄雏鸡提供有效保护力(Haffer *et al.*, 1984)。Meanger 等人利用 ARV 弱毒力 RAM-1 株制备弱毒疫苗, 可通过免疫种鸡为子代雏鸡提供母源抗体, 并达到 80%左右的免疫保护力, 但是与 P100 一样, 该疫苗仅能抵抗同源强毒株的攻击, 对异源强毒株的无法提供足够的保护力(Meanger *et al.*, 1997)。肖成蕊分离的 ARV JN-1 株, 其免疫原性优于 S1133 毒株(肖成蕊等, 1989)。唐雨德等将 JN-1 株通过不同细胞交替传代和培养温度升降等一系列致弱程序后, 成功致弱病毒并且无毒力返强现象。用致弱的 JN-1 株免疫雏鸡, 检测血清中的抗体滴度, 并分别于接种后每隔一周用强毒攻毒, 共计 4 次, 持续一个月, 结果显示疫苗为雏鸡的免疫保护力随着时间的延长而提高, 最后一周的免疫保护力高达 100%。

1.1.4.2 灭活疫苗

灭活疫苗对接种动物无致病性, 较为安全稳定, 刺激性小。首个 ARV 灭活苗于 1975 年研制而成, 分别接种种鸡和 1 日龄、30 日龄雏鸡, 免疫效果均较差, 无法提供足够的保护力抵抗同源病毒的感染。1984 年研究者利用 ARV 1733 株和 2408 株制备二价灭活苗, 对种鸡进行免疫接种后可为子代提供维持 21 天以上的母源抗体水平。1985 年中国哈尔滨兽医研究所制备了 ARV 油乳剂灭活苗, 该疫苗免疫周期长、对于不同品种和日龄的种鸡均具有较好的保护力, 免疫期可达 5 个月, 在国内应用范围较广。唐秀英等制备了新城疫、病毒性关节炎、传染性支气管炎三价油乳剂灭活疫苗, 免疫雏鸡后于第十天开始检测到抗体产生, 21 天后抗体水平达到最高峰, 并且可持续 5 个月以上, 免疫种鸡后也可为子代雏鸡提供较高的母源抗体水平, 使子代雏鸡对该病具有较高的抵抗力

(唐秀英等, 1992)。

1.1.4.3 基因工程苗

基因工程亚单位疫苗是指利用 DNA 重组技术在真核表达载体上转入病毒目的基因, 表达特异性目的抗原, 纯化后而制成的疫苗, 由于这类仅保留了病毒的抗原成分, 疫苗中不含病毒的 DNA 或 RNA, 与普通的弱毒疫苗和灭活疫苗相比较为安全。Wu 等人将扩增的禽呼肠孤病毒 σC 基因于转化到粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) 中, 利用诱导表达的 σC 蛋白对 SPF 鸡进行免疫接种, 其免疫保护率高达到 90%以上(Wu *et al.*, 2005)。Lin 等在杆状病毒表面表达呼肠孤病毒 σC 和 σB 蛋白, 并锚定在 Sf-9 细胞表面, 以此方法制备的亚单位疫苗, 可诱导小鼠产生血清中和抗体活性(Lin *et al.*, 2008)。DNA 疫苗是继灭活疫苗和弱毒疫苗、亚单位疫苗之后的“第三代疫苗”, 将编码的病毒抗原的重组真核表达载体注射到动物体内, 激活机体的免疫系统, 刺激机体发生体液免疫应答, 同时也可诱导细胞免疫应答(毛雅元等, 2013)。该类疫苗既具有弱毒疫苗高效免疫的特点, 又具备重组亚单位疫苗安全稳定的优点, 同时不存在逆转的危险。王存伟等研究者构建了介导禽呼肠孤病毒 σC 基因疫苗的重组减毒沙门氏菌株, 免疫 6 日龄雏鸡, 6 周后对雏鸡进行攻毒试验, 结果显示疫苗的保护率可达 66.7%。

1.2 禽呼肠孤病毒诊断方法的研究进展

对该病的初步诊断可通过观察患鸡的临床症状、剖检变化, 特别注意是否存在腱鞘肿胀以及关节腔内血色渗出物。而进一步的确诊该病则需通过采集关节水肿液、腱鞘等部位的病料进行病毒的分离鉴定、血清学诊断和分子生物学诊断。

1.2.1 病毒的分离与鉴定

病毒的分离鉴定是检测病毒是否存在的金标准, 可选择病鸡的关节水肿液、腱鞘、肠内容物等病料进行研磨, 离心后取上清液无菌接种于 5~7 日龄 SPF 鸡胚或鸡胚肝细胞。接种鸡胚后, 弃去 24h 内死胚, 每日早晚照胚两次, 一般于接种后 3~5 天后出现胚体出血以及死胚现象, 继续盲传三代后收集鸡胚尿囊液(魏凤, 2018)。病料上清液接种鸡胚肝细胞后, 37°C 温箱孵育感作 40min, 洗涤后加入细胞培养液培养 5 天。每日观察是否出现以细胞融合为特征的细胞病变(CPE), 继续传代三代病毒稳定后可收集细胞上清(于

新友, 2016)。

1.2.2 血清学诊断方法

1.2.2.1 琼脂扩散试验

由于禽呼肠孤病毒具有群特异性抗原, 所以可用琼脂扩散法检测。王锡坤等阐述了该法应用于检测 ARV 血清及其所用抗原的制备方法(王锡坤等, 1985)。刘佩兰等利用该病毒细胞培养物制备所需抗原, 确定了 ARV 琼扩试验所需的最佳条件, 该方法多用于流行病学调查, 操作便捷, 但是灵敏性较差(刘佩兰等, 1996)。

1.2.2.2 病毒中和试验

采用鸡肾细胞蚀斑减数来测定病毒效价, 以恒量的病毒和不同稀释度的血清来进行蚀斑减数试验。通常效价达到 1:40 及以上视为阳性。但是该方法操作繁琐、工作量大, 应用范围较小, 主要应用于病毒血清型的鉴定。

1.2.2.3 间接免疫荧光试验

荧光抗体试验包括直接荧光抗体试验和间接荧光抗体试验, 采用直接荧光抗体试验多用于检测组织内的抗原, 间接荧光抗体试验可检测抗原又可检测抗体, 适用于病毒定量检测。Ide 等建立了间接荧光抗体试验检测 ARV 抗体的方法(Ide *et al.*, 1982)。肖成蕊等制备了 ARV 高免血清与 ARV 荧光抗体, 建立了直接免疫荧光试验方法(肖成蕊等, 1990)。高春亮等制备了具有免疫荧光特性的抗 MDRV 单抗, 建立了检测 MDRV 抗原的间接免疫荧光试验方法, 该方法检测时间短, 特异性强, 效果较好(高春亮, 2009)。

1.2.2.4 酶联免疫吸附试验

ELISA 是目前发展较快, 应用较为广泛的一种血清学方法。Slaght 等以 S1133 株作为抗原率先应用该法检测 ARV 抗体水平(Slaght *et al.*, 1978)。Shien 等用表达的 σ B 蛋白作为包被抗原, 建立了检测 ARV 抗体的 σ B-ELISA 方法, 该方法可以减少传统 ELISA 的非特异性结合, 稳定性好(Shien *et al.*, 2000)。Liu 等用原核表达载体表达 ARV 的 σ C 和 σ B 蛋白, 建立 σ C- σ B-ELISA 方法检测 ARV 抗体, 与常规 ELISA 相比, 具有较高的

特异性。Chen 等利用纯化的非结构蛋白 σ NS 制备该蛋白的单克隆抗体，建立 ELISA 方法，可用于评价 ARV 灭活苗对鸡群的免疫状况(Chen, 2004)。Xie 等利用纯化的非结构蛋白 σ NS 和 P17 建立了可区分疫苗免疫和野毒感染的鸡群的 ELISA 方法(Xie *et al.*, 2010)。谢志勤等利用浓缩纯化的 S1733 株全病毒制备的单克隆抗体作为包被抗体，建立特异性和敏感性较高的双抗体夹心 ELISA 方法。Yang 等人利用毕赤酵母表达系统表达了 ARV S1133 株的 σ C 蛋白与 1071 株的 σ B 蛋白，并将两种蛋白等量混合作为包被抗原建立了 ARV 抗体的 ELISA 检测试剂盒，与常规 ELISA 检测方法相比具有更高的阳性率(Yang *et al.*, 2010)。

1.2.2.5 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术是一种以胶体金作为示踪标记物，同时结合单克隆抗体制备技术、免疫层析技术的新型固相免疫标记技术。在抗原与相应的抗体发生特异性结合时，我们无法通过肉眼来观测到免疫复合物，只能通过检测相应的标记物来证明特异免疫复合物的形成。相对于酶、放射性同位素、荧光素等传统的免疫学标记物，胶体金颗粒本身呈酒红色，当作为标记物标记抗体用于抗原抗体反应时，可在抗原位置呈现出肉眼可见的红色反应，不需要再进行后续的检测和操作(于相龙, 2018)。

Beggs 等首次应用免疫胶体金技术来检测血清和尿中的人绒毛膜促性腺激素(Osikowicz *et al.*, 1990)，自此，该技术被广泛应用于人类医学诊断领域(Pattarachaya *et al.*, 2012)。近年来，该方法也已开始应用于兽医临床动物病原的诊断，具有广泛的应用价值和市场前景(祖立闯等, 2010)。杨国平制备了鸭坦布苏病毒 NS5 蛋白的单克隆抗体，将其进行胶体金标记后，作为金标抗体，以抗坦布苏病毒 E 蛋白多克隆抗体作为包被抗体，建立了双抗体夹心法胶体金试纸条，该方法与 PCR 方法的检出符合率为 93.8%，是一种敏感性高，特异性好的检测方法(杨国平, 2015)。赵巍利用合成肽 ALV-J-P2 作为抗原，利用制备的 CIgG-5B3 单抗作为金标抗体，制备了胶体金-抗体偶联复合物，商品化羊抗鼠 IgG 作为质控线抗体，制备了可快速检测出血清中 ALV-J 特异性抗体的试纸条(赵巍, 2018)。任倩利用蔗糖密度梯度离心法纯化 H9 亚型禽流感病毒液，并以此免疫小鼠制备单克隆抗体，以不同抗原表位的抗 H9 亚型禽流感病毒单克隆抗体作为包被抗体，建立双抗体夹心胶体金试纸条检测方法，该方法的敏感性为血凝试验的 1.5 倍，并且具有较高的特异性和重复性(任倩, 2014)。

1.2.3 分子生物学诊断方法

1.2.3.1 反转录-聚合酶链式反应

由于 PCR 技术具有快速、灵敏、特异等优点, 被广泛用于疾病的诊断, 是目前实验室检测的重要分子生物学技术。谢芝勋等根据 ARV S1133 株的 S1 基因序列, 建立了套式 RT-PCR 检测方法, 该方法第一次扩增可以检测出 100 pg RNA 模版, 第二次扩增可以检测出 1 fg RNA 模版, 第二次比第一次扩增的敏感性高 10^5 倍, 建立的半套式 RT-PCR 检测方法的敏感性为 1fg 核酸 (谢芝勋等, 2001); 一步法 RT-PCR 方法可检测到 0.16ng 的病毒核酸(廖敏等, 2003); Liu 等建立了一种 RT-PCR 结合限制性片段长度多态性分析(RFLP)的方法, 该方法可以简便快速的鉴定鸡群中是否存在变异株, 或检测特定株在鸡群中的水平传播情况(Liu *et al.*, 2004)。有研究者利用 SYBR Green I 染料建立了实时荧光定量 RT-PCR 方法, 是常规的 RT-PCR 检测限的 1×10^3 倍, 可检测到 5.2×10^2 个拷贝的标准品 RNA(李天芝, 2015)。孙美玉根据 S1 基因的 σ C 基因设计了特异性引物探针, 建立了 Taq Man 探针荧光定量检测方法, 可检测初始模板中 10 个拷贝的病毒 RNA, 是常规 RT-PCR 方法的 100 倍(孙美玉, 2012)。

1.2.3.2 核酸探针技术

核酸探针, 也称基因探针, 包括许多小分子化合物如生物素、荧光素、地高辛等。该技术以核苷酸碱基顺序互补配对原理为基础, 用特异的基因探针识别并结合目的基因, 产生杂交信号, 以达到分子诊断的目的(Walker, 1989)。Hsien 等将 ^{32}P 标记在 ARV S1133 株的 S4 基因上, 获得的放射性标记的探针 pS4-18, 可用于检测 ARV 核酸(Hsien *et al.*, 1998)。谢芝勋等利用限制性核酸内切酶 Hind III 和 pst I 双酶切 ARV S1133-pBluescript 重组质粒, 获得 540bp DNA 片段后利用地高辛和检测试剂盒进行标记, 获得了地高辛标记的 ARV cDNA 探针, 建立了地高辛标记的 cDNA 核酸探针技术, 该探针对 ARV 核酸的最低检出量为 0.45ng, 并且特异性较高, 敏感性好, 可用于临床检测(谢芝勋等, 2001)。

1.2.3.3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型的核

酸扩增方法。相对于常规 PCR, 该方法不需要高温变性、循环扩增以及核酸电泳等过程, 操作简单、灵敏度高、成本低廉, 被广泛应用于疾病的检测。马利等针对 ARV 的 p10 基因设计 6 条 LAMP 引物, 建立了检测 ARV 的 LAMP 检测方法, 该方法最低可检出 10^2 个拷贝的病毒, 敏感性是普通 PCR 的 100 倍。董嘉文等根据禽呼肠孤病毒 S1133 株 S1 基因序列设计了 6 个基因片段的 4 条引物, 以此建立检测 ARV 的 RT-LAMP 检测方法, 该方法的特异性强、重复性好, 检测灵敏度是 RT-PCR 方法的 10 倍(董嘉文等, 2011)。王莹等根据 ARV 的 S1 基因序列设计了 3 对引物, 该方法最低能检测出 1 个拷贝的阳性质粒, 并且能够区分 ARV 标准株和分离株(王莹等, 2010)。

1.2.3.4 单克隆抗体技术

将具有分泌特异性抗体能力的 B 细胞和具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞融合为 B 细胞杂交瘤, 这种技术称为杂交瘤技术, 将这种杂交瘤细胞培养成单细胞系即单克隆。因此单克隆抗体是由单一 B 细胞杂交瘤克隆产生的高度均一, 结构、氨基酸顺序完全一致的仅针对某一特定抗原表位的抗体。1975 年, Kohler 和 Milstein 在自然杂交技术的基础上首次创建了杂交瘤技术(Kohler *et al.*, 1975), 从根本上解决了在抗体制备中长期存在的特异性和可重复性问题, 对生物学领域具有重大意义。

1.2.3.4.1 单克隆抗体技术原理

外界抗原物质感染动物机体后, 刺激 B 淋巴细胞产生针对该抗原的特异性抗体, 由于每一种 B 淋巴细胞都能够分泌一种特异性抗体, 为了获得单一抗体, 需要大量增殖能分泌该单一抗体的 B 淋巴细胞。但是 B 淋巴细胞体外寿命较短, 无法在体外长期增殖培养; 同其他癌细胞一样, 骨髓瘤细胞可以在体外培养条件下无限增殖, 但是无法产生特异性抗体。因此, 在融合剂作用下将小鼠 B 淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合后, 通过连续筛选培养和亚克隆即可在体外条件下能连续增殖培养, 生产大量均一的抗体(孔君等, 2011)。

1.2.3.4.2 单克隆抗体的特点

一方面, 由于单克隆抗体是由单一 B 淋巴细胞产生, 只识别特定的抗原决定簇, 因此具有高度特异性(霍现格, 2015); 原则上, 只要杂交瘤细胞株不发生基因突变, 杂交

瘤可以在体外无限传代，大量产生均一的单克隆抗体，稳定性高，对于以标记抗体为特点的 IRMA 和 ELISA 等免疫学分析方法具有重要意义；另一方面，由于单克隆抗体局限的生物活性和亲和性导致它不能应用于沉淀和凝集反应，限制了其应用范围，在反应强度上，单克隆抗体的反应强度比多克隆抗体略差，并且由于制备技术较为复杂，制备成本价格也较为高昂。

1.2.3.4.3 单克隆抗体的应用现状

单克隆抗体技术自 1975 年创建后，不仅局限于免疫学领域的应用，在生物化学、细胞生物学、遗传学、微生物学、肿瘤学等领域内的应用也非常广泛，特别是在疾病的临床诊断、生物药物治疗、微生物蛋白质结构功能预测分析、疾病的靶位治疗等方面。有关药物也被大范围应用于戒毒、中毒性疾病、血液性疾病、感染性疾病、器官移肿瘤、变态反应性疾病、自身免疫性疾病等方面的诊断和治疗(甄永苏，2000)。

目前单克隆抗体制备技术日趋成熟，针对不同动物和病毒的单克隆抗体已达 200 余种，在激素的研制、动物源传染病的临床诊断、特异性抗体的制备和临床动物疾病的靶位治疗等方面具有巨大的应用价值。同时随着基因工程技术不断成熟，抗体融合蛋白、多价小分子抗体等新型单抗也发展起来，与具有免疫原性低、分子质量小、亲和力较高以及能特异性的增强导向治疗的靶向性等优点，目前已在畜禽疾病诊断方面具有广泛应用(张昶等，2007)。

1.2.3.4.4 单克隆抗体在疾病诊断的应用

单克隆抗体可以与 ELISA、免疫胶体金层析等多种免疫学检测学方法联合应用，特异性识别并结合抗原，从而对病毒进行定性或定量分析，其中以双抗体夹心法 ELISA、竞争 ELISA 和阻断 ELISA 的临床应用范围较广。Starick 等人利用表达纯化的禽流感病毒 NP 蛋白，制备了针对 NP 蛋白的单克隆抗体 HB65，建立了可检测水禽和野鸟血清中的 NP 特异性抗体的竞争 ELISA 方法。Zhang 等人利用制备的禽流感特异性单克隆抗体和 HRP 标记的兔多克隆抗体 IgG 作为捕获抗体和检测抗体，建立了可检测禽流感病毒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法。徐建生等利用氯化铯密度梯度离心提纯的禽脑脊髓炎病毒(AEV) Van Roekel 株免疫 BALB/c 小鼠，制备特异性单抗，建立了 Dot-ELISA、间接 ELISA 和 IFA 检测 AEV 抗原的方法(徐建生等，2006)。汪招雄等人利用猪伪狂犬病

病毒(PRV)Ea 株制备特异性单克隆抗体作为捕获抗体,以纯化的抗猪伪狂犬病病毒 IgG 为检测抗体,建立了检测猪伪狂犬病病毒的双抗体夹心 ELISA 方法(汪招雄等,2006)。谢志勤等人以浓缩纯化灭活后的禽呼肠孤病毒 S1733 株作为抗原,按照 100 μ g 的病毒量免疫 BALB/c 小鼠五次后取脾细胞进行细胞融合,制备单克隆抗体,并利用鉴定后的单抗建立了双抗体夹心 ELISA 方法,具有较高的敏感性和特异性,可用于 ARV 的检测(谢志勤等,2013)。利用单克隆抗体也可进行动物机体感染细菌的种类及亚型鉴定和耐药性检测:徐耀辉等人利用鸡白痢沙门氏菌的脂多糖和 HRP 标记抗沙门氏菌的单克隆抗体建立了可检测鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌感染的阻断 ELISA 方法,具有较高的特异性和敏感性。王崇义等利用制备的单抗标记乳胶凝集试验,可快速鉴定金黄色葡萄球菌及其耐药性大小(王崇义等,2006)。

1.3 本研究的目的及意义

近年来 ARV 感染和流行情况呈不断加重的趋势,并且传播速度快、波及范围广,我国山东、江苏、河北、福建、浙江等地的肉种鸡场和商品肉鸡场均出现感染,加拿大(Palomino-Tapia *et al.*, 2018)、美国(Tang & Lu, 2015)、韩国(Noh *et al.*, 2018)等地也有 ARV 变异株感染爆发的报道。不同日龄和品种的鸡均可感染,商品肉鸡感染后发病最为严重。病鸡感染后表现关节肿胀、腱鞘炎、跛行等症状,给我国养鸡业带来了严重的经济损失,建立有效的诊断方法,对降低 ARV 对养鸡业的威胁,促进我国养鸡业的健康发展具有重要意义。

本研究根据实验室分离的禽呼肠孤病毒 LY383 株基因序列(Chen *et al.*, 2019),建立检测 ARV 核酸的地高辛探针方法和检测 ARV 抗体水平的间接 ELISA 方法,以期能够为当前 ARV 的防控提供技术手段。同时利用表达纯化的 ARV σ C 重组蛋白作为抗原,免疫 BALB/c 小鼠,制备出针对 ARV σ C 蛋白的单克隆抗体,为下一步进行 ARV σ C 蛋白的抗原表位鉴定、结构与功能分析以及鉴别诊断等方面的深入研究提供基础工具。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 毒株、细胞、载体、血清及实验动物

禽呼肠孤病毒 LY383 株由本实验室从山东某发病肉鸡关节滑液和肌腱中分离 (GenBank 登录号: MF183217.1) (Chen *et al.*, 2019)。 *E.coli* BL21(DE3)细胞、原代鸡胚肝细胞、sp2/0 细胞, 克隆载体 pMD18-T 与原核表达载体 pET-32a(+), ARV 阳性参考血清与 ARV 阴性参考血清均为本实验室保存。雌性 SPF BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

2.1.2 主要试剂

反转录酶 MLV、dNTP、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*HI、*Sal*I、T4 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol 试剂、Trans Taq HiFi DNA 聚合酶、Blue Plus II Protein Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; OMEGA Gel Extraction Kit、兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体、氨苄青霉素均购于北京索莱宝科技有限公司; 2000/5000 DNA Marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司; RNA 酶抑制剂(Rnase Inhibitor)购自北京百泰克生物技术有限公司; 可溶性单组分 TMB 底物显色液、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Agar、Tris、Glycine 购自 Biotopped; 超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术; His-Tag Mouse MonoAb 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自碧云天生物技术; DIG-High Primer DNA Labeling and Starter Kit I 购自 Roche 公司; Ni-NTA Resin 蛋白纯化试剂盒购自全式金生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器设备

主要仪器	公司
PCR 扩增仪	德国 Eppendorf 公司
核酸电泳仪	北京君意电泳设备厂
凝胶成像仪	意大利 Biorad
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
酶标仪	美国 Bio Tek 公司
数显型恒温金属浴	卡尤迪生物科技（北京）有限公司
TS-A 脱色摇床	金坛市晶玻实验仪器厂
隔水式恒温培养箱	上海博远实业有限公司
微量核酸蛋白定量仪	美国 Nanodrop 公司
超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技有限公司
高速冷冻离心机	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
台式微量高速离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
紫外分光光度计	日立公司 U2000
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
电子天平	上海精科天美仪器有限公司
荧光定量 PCR 仪	宝日医生物技术(北京)有限公司
数显恒温振荡器	上海知楚仪器有限公司
WIX-miniPRO 垂直电泳槽	韦克斯科技（北京）有限公司
WIX-miniBLOT 垂直转印仪	韦克斯科技（北京）有限公司
倒置显微	尼康仪器（上海）有限公司
CO ₂ 培养箱	松下健康医疗器械(上海)有限公司

2.1.4 主要溶液的配制

(1) DEPC 水: DEPC(diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯)与去离子水按照 1:1000 配置, 剧烈震荡后避光保存, 次日高压灭菌后使用。

(2) 50×TAE Buffer: 分析天平去皮后称取 Tris Base 242g, 加入大烧杯中, 量取 800mL 去离子水, 边搅拌边加入, 固体完全溶解后, 加入 57.1mL 的醋酸, 搅拌均匀, 后定容至 1L, 室温保存。

(3) 1% 琼脂糖凝胶: 分析天平去皮后称取 1.0g 琼脂糖置于盛有 98mL 去离子水的锥形瓶内, 加入 2mL 50×TAE Buffer, 摇匀后置于微波炉中中火加热 3min, 摇动可见大量泡沫并迅速消散即可, 稍冷片刻, 加入 5 μ L 核酸染料, 混合均匀后倒入核酸板中备用。

(4) 变性液: 0.5M NaOH 溶液, 1.5M NaCl 溶液。

(5) 中和液: 0.5M Tris-Cl 溶液, 3.0M NaCl 溶液, 调节 pH 至 7.5。

(6) 预杂交液: 5×SSC, 0.2% SDS, 2%脱脂奶粉。

(7) 洗涤液 I: 2×SSC, 0.1%SDS。

(8) 洗涤液 II: 0.5×SSC, 0.1%SDS。

(9) 缓冲液 I: 0.1M Tris-Cl 溶液, 0.15M NaCl 溶液, 调节 pH 至 7.5。

(10) 缓冲液 II: 每 100mL 缓冲液 I 中加入 2g 脱脂奶粉。

(11) 缓冲液 III: 0.1M Tris-Cl 溶液, 0.1M NaCl 溶液, 0.05M MgCl₂ 溶液, 调节 pH 至 9.5。

(12) 显色液: 缓冲液III 5 mL+50 μ L NBT 和 BCIP 混合物 (试剂盒携带)。

(13) Ampicillin(100 mg/mL): 称取 1 g Ampicillin 粉末溶于 10 mL 去离子水中, 0.22 μ m 滤器过滤除菌后分装为 1mL/管, -20°C 保存备用。

(14) LB 培养基: 称取 5 g Tryptone, 2.5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 加入 400 mL 去离子水溶解后, 调至 pH 值为 7.0, 定容至 500 mL, 灭菌后 4°C 保存备用。

(15) LB/Amp⁺培养基: 称取 5 g Tryptone, 2.5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, 加入 400 mL 去离子水溶解后, 调至 pH 值为 7.0, 定容至 500 mL, 灭菌冷却至室温后, 加入 500 μ L Ampicillin(100 mg/mL)混匀后 4°C 保存备用。

(16) 固体 LB 培养基: 称取 Tryptone 2 g, Yeast Extract 1 g, NaCl 2 g, 琼脂 3g 置于锥形瓶中, 加入 200mL 去离子水, 灭菌后于无菌超净台中铺板, 室温冷却后 4°C 保存。

(17) 固体 LB/Amp⁺培养基: 称取 Tryptone 2 g, Yeast Extract 1 g, NaCl 2 g, 琼脂 3g 置于锥形瓶中, 加入 200mL 去离子水, 灭菌后冷却至 50°C 左右在超净台酒精灯附近加入 200 μ L Ampicillin(100 mg/mL)混匀后倒入培养皿中, 每皿 20mL 左右, 冷却至室温后, 4°C 保存。

(18) 2×YT 培养基: 称取 8 g Tryptone, 5 g Yeast Extract, 2.5 g NaCl 置于锥形瓶中, 加入 400mL 的去离子水搅拌溶解后, 调节 pH 值至 7.0, 然后加入去离子水定容至 500mL, 灭菌后, 4°C 保存。

(19) 纯化液 A (100mM NaCl; 50mM Tris-Cl; 0.5% Triton-X; 10mMEDTA): 称取 NaCl 2.922g, 量取 1M Tris-Cl (pH=8.0) 25mL, 0.5MEDTA (pH=8.0) 10mL, TritonX-100 2.5mL 置于锥形瓶中, 加入 400mL 去离子水震荡溶解后, 用定容至 500 mL。

(20) 纯化液 B: 每 500mL 纯化液 A 中加入 60.1g 尿素。

(21) 纯化液 C: 每 500mL 纯化液 A 中加入 120.2g 尿素。

(22) 考马斯亮蓝 R-250 染色液: 称取 1g 考马斯亮蓝 R-250, 置于烧杯中, 量取 250mL 异丙醇搅拌溶解, 加入 650mL 去离子水, 最后加入 100mL 冰醋酸混匀后, 用滤纸过滤初期颗粒物质后, 室温保存。

(23) 考马斯亮蓝脱色液: 量取 100mL 冰醋酸, 50mL 乙醇, 加入去离子水 850mL 混匀后室温保存。

(24) PBS: 量取 800mL 去离子水于烧杯中, 随后称取 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 1.44 g Na_2HPO_4 溶解后, 调至 pH 值为 7.2, 加去离子水定容至 1L。

(25) PBST: 提前配置好的 1L PBS 中, 加入 0.5 mL Tween-20。

(26) DMEM 完全培养基: 每 500mL DMEM 基础培养基中加入 50mL FBS, 混合均匀后备用。

(27) HAT 培养基: 在 DMEM 完全培养基中加入 1×HAT。

(28) HT 培养基: 在 DMEM 完全培养基中加入 1×HT。

(29) 细胞冻存液: 按照 10%, 20%, 70% DMEM 基础培养基的比例配制。每 70mL 基础培养基中加入 10mL DMSO, 20mL FBS, 混合均匀后过滤器过滤除菌后使用。

2.2 方法

2.2.1 ARV 地高辛核酸探针检测方法的建立

2.2.1.1 病毒增殖

将本实验室分离保存的禽呼肠孤病毒 LY383 株接种于细胞密度为 80% 左右的原代鸡胚肝细胞中, 37°C 孵育 45min, 每隔 15min 轻轻摇晃一次, 使细胞保持湿润, 随后弃去病毒液, 加入含有 2% FBS 的细胞培养液, 当出现细胞病变时, 收集细胞上清。

2.2.1.2 引物设计

根据 LY383 株 S1 基因序列，利用 Primer Premier5.0 软件，设计一对扩增片段长度为 229bp 的特异性引物，由上海生物工程有限公司合成。

F: 5'-CTGCATCGCTTGATAACG-3'

R: 5'-CTGCGATGATACCGAGG-3'

2.2.1.3 病毒 RNA 的提取

- (1) 吸取 400 μ L 病毒液置于 2mL 灭菌离心管，加入 800 μ L Trizol 试剂，剧烈震动，混合均匀后，室温静置 8min；
- (2) 于超净台中用 RNase-free 的枪头加入 200 μ L 氯仿，漩涡震荡，冰盒静置 7min；
- (3) 冷冻离心机调至 4 $^{\circ}$ C，12000 r/min 离心 15min 后，超净台中吸取 500 μ L 水相上清转置 1.5mL RNase-free 离心管中；
- (4) 加入 500 μ L 预冷的异丙醇，颠倒混匀后，-20 $^{\circ}$ C 静置 15min 沉淀 RNA；
- (5) 冷冻离心机调至 4 $^{\circ}$ C，10000 r/min 离心 10min，弃去管内溶液，加入 1mL DEPC 水配置的 75%乙醇；
- (6) 4 $^{\circ}$ C 条件下，8000 r/min 离心 5min，于超净台中弃去管内溶液，并倒置控干残留乙醇；
- (7) 加入 35 μ L RNase-free 水轻轻反复吹打管壁及管底以溶解提取的 RNA；
- (8) -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.1.4 RT-PCR 反应

参照康为世纪 HiFiScript cDNA Synthesiscis Kit 说明书，配置反转录体系（表 1）。

表 1 RT 反应体系

Table. 1 The system of Reverse transcription

试剂	剂量
dNTP Mix	4 μ L
Primer Mix	2 μ L
5 \times RT Buffer	4 μ L
DTT	2 μ L
HiFiScript	1 μ L
RNA +RNase-Free	7 μ L
总体积	20 μ L

反应条件如下：42 $^{\circ}$ C，40min；85 $^{\circ}$ C，5min。反应结束后，以反转录产物 cDNA 为模版进行 PCR 扩增反应，反应条件如下：96 $^{\circ}$ C，5min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s，56 $^{\circ}$ C 复性 30s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，共计 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10min，4 $^{\circ}$ C 终止（表 2）。

表 2 PCR 扩增反应体系

Table. 2 The amplification system of PCR

试剂	体积
dNTP	0.5 μ L
cDNA	2 μ L
上游引物 F	0.5 μ L
下游引物 R	0.5 μ L
HiFi Buffer	2.5 μ L
Trans Taq HiFi DNA 聚合酶	0.3 μ L
ddH ₂ O	18.7 μ L
总体积	25 μ L

反应完成后，吸取 10 μ L PCR 产物于配置好的 1%琼脂糖凝胶上样孔中，进行核酸电泳，完成后置于核酸凝胶成像仪中观察结果，并切下目的条带所在位置的凝胶块。

2.2.1.5 目的片段的回收与纯化

(1)称量凝胶重量，每 0.1g 凝胶中加入 0.1mLBind Buffer，置于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中温育 7min

左右，每隔 2~3min 摇动离心管，直至凝胶块完全融化，上下颠倒混匀；

(2) 将混合液转移到离心柱内，10000×g 离心 1min，弃去离心液，加入 300 μ L Bind Buffer 后，室温 10000×g 离心 1min，弃去离心液；

(3) 离心柱内加入 700 μ L SPW 溶液，室温 10000×g 离心 1min，弃去离心液；

(4) 重复步骤 (3) 操作；

(5) 打开离心柱盖子，室温 10000×g 空离 1min，去除管内残留乙醇，室温晾干；

(6) 将离心柱置于新的离心管中，加入 30 μ L 提前预热的 Elution Buffer，静置 2min 后，室温 10000×g 离心 1min，所得离心液即为目的片段的纯化产物。

2.2.1.6 制备 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞

(1) 从过夜培养的大肠杆菌培养皿中挑取大小适中，活性较好的单菌落接种到含有 LB 培养基的试管中，37°C，220r/min 震荡培养；

(2) 次日，吸取 1mL 过夜培养的菌液加入 100 mL 液体 LB 培养基中，于 37°C，220r/min 的温箱中继续培养直至 OD₆₀₀ 至 0.6~0.8；

(3) 将 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 的菌液加入到预冷的无菌离心管中，冰浴 10 min；

(4) 于低温冷冻离心机中，4°C，3000r/min 离心 10min，倒掉培养上清液，收集底部沉淀细胞；

(5) 加入 30mL 预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液，轻轻垂悬菌体，4°C，3000r/min 离心 30min；

(6) 弃去细菌培养液，加入 4mL 的预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液重悬菌体，按 30% 的比例加入灭菌甘油；

(7) 混合均匀并分装后，保存备用。

2.2.1.7 连接与转化

将 2.2.1.5 中回收的产物连接至 pMD18-T 载体中，参照表 3 所列体系进行连接反应：

表 3 连接体系

Table.3 The system of ligation

试剂	体积
回收产物	5.0 μ L
pMD18-T	0.5 μ L
Solution I	4.5 μ L
合计	10.0 μ L

配置好的连接体系置于连接仪中，16 $^{\circ}$ C 孵育 2h，完成后 4 $^{\circ}$ C 保存。在超净台中将连接产物全部加入到冰上缓慢融化的 DH5 α 大肠杆菌感受态中，轻轻混匀，冰上孵育 30min 后，立即将混合物转移到 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中，热激 1min，然后再次置于冰上孵育 2min。在无菌超净台中加入 800 μ L LB 培养基于混合物中，水平摇床中保持 37 $^{\circ}$ C，220r/min 摇动 45min。完成后室温下 3000r/min，离心 3min，弃去大部分培养基上清，用剩余的约 200 μ L 培养基重悬菌体沉淀。将重悬的大肠杆菌细胞涂布于含有氨苄青霉素的固体琼脂板上。将固体琼脂板于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中过夜培养。次日，待菌落长到 2~3mm，挑取单菌落于含有氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C，220r/min 摇至菌液浑浊。将菌液 PCR 鉴定为阳性的菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序鉴定。

2.2.1.8 核酸探针的标记

根据地高辛试剂盒使用要求，将纯化后的目的片段进行标记。

- (1) 吸取约 300ng 纯化的目的片段，根据目的片段体积加入适量双蒸水使其终体积至 16 μ L；
- (2) 沸水中煮沸 10min 后，立即转入冰水混合物中孵育 5min；
- (3) 变性完成后的目的片段中加入 4 μ L DIG-High Primer，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 24h；
- (4) 次日，调节水浴锅温度至 65 $^{\circ}$ C，孵育 10min，终止反应，完成核酸探针的标记。

2.2.1.9 核酸探针的杂交程序建立

- (1) 将双层滤纸置于 15cm 玻璃皿中，加入适量变性液浸润；
- (2) NC 膜裁剪至适当大小，划格标记完成后，吸取 1 μ L cDNA 核酸样品点样于 NC 膜

- 上，将正面置于已用变性液浸润过的滤纸上变性 10min；
- (3) 变性完成后，NC 膜正面置于已用中和液浸润的滤纸上中和 5min；
 - (4) 室温下放置 30min，使 NC 膜干燥；
 - (5) 80°C 温箱中固定 2h；
 - (6) 预杂交液置于水浴锅中预热至 45°C 后，固定完成的 NC 膜放入其中孵育 30min；
 - (7) 将标记完成的探针置于沸水中煮沸 10min，立即转入冰水中冰浴 5min，处理完成后，加入预杂交液中，轻轻摇晃均匀，完成杂交液的配置；
 - (8) 杂交液预热至 45°C，NC 膜置于其中孵育过夜；
 - (9) 次日，将 NC 膜置于洗涤液 I 中，室温下水平摇床中洗涤 15min，共计两次；
 - (10) 提前预热洗涤液 II 至 68°C，将 NC 膜放入其中洗涤两次，每次 15min，期间注意轻轻摇晃；
 - (11) 缓冲液 I 中快速洗涤 1min；
 - (12) 缓冲液 II 中轻轻摇晃孵育 30min；
 - (13) 重复步骤 11；
 - (14) 10mL 缓冲液 II 中加入 2 μ L 抗 Digoxiaenin 抗体，混合均匀后，将膜置于其中，37°C 水浴锅中孵育 30min；
 - (15) 水平摇床内将膜置于缓冲液 I 中洗涤 5 次，每次 5min；
 - (16) 将膜置于 10mL 缓冲液 III 中浸泡 2min 后，在平皿中加入 200 μ L NBT/BCIP 混合物，轻轻摇匀后，避光显色 40min；
 - (17) 完成后加入 pH 为 8.0 的 TE 缓冲液终止反应，观察结果。

2.2.1.10 敏感性试验

将纯化后的核酸样品经 PBS 分别稀释为：100ng/ μ L、10ng/ μ L、1ng/ μ L、500pg/ μ L，200ng/ μ L、100pg/ μ L、50pg/ μ L，10pg/ μ L，5pg/ μ L，点样于 NC 膜上，按照建立的方法进行杂交显色，确定核酸探针的最低检出核酸量，分析其敏感性。

2.2.1.11 特异性试验

将提取的 H9-AIV、IBV、IBDV、FAV、NDV 的核酸点于 NC 膜上，按照建立的方法进行杂交显色，检测核酸探针的特异性。

2.2.1.12 稳定性试验

探针回收后保存于-20℃冰箱中,并在保存后的第 90d 取出融化,与 ARV、H9-AIV、IBV、IBDV、FAV、NDV 核酸样品进行杂交显色检测核酸探针的稳定性。

2.2.1.13 临床样品的初步检测

采集 13 例疑似 ARV 感染的病料组织,按照常规方法提取病毒核酸,反转录为 cDNA 分别利用建立的核酸探针杂交检测方法和 RT-PCR 进行检测,比较两种方法的符合率。

2.2.2 ARV σ C 蛋白的原核表达

2.2.2.1 引物设计与合成

根据 LY383 株 σ C 蛋白基因序列,利用 Primer Premie5.0 软件,结合 pET-32a(+) 载体的特点,引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 两个酶切位点,设计一对引物,由上海生物工程有限公司合成。

F:5'-AGGATCCATGGACGGATTA~~ACTCAACA~~-3'

R:5'-AGTCGACTTAGGTATCGATGCCCGT-3'

2.2.2.2 病毒 RNA 提取

参照步骤 2.2.1.3 进行。

2.2.2.3 RT-PCR 反应

参照步骤 2.2.1.4 进行。

2.2.2.4 目的片段的回收与纯化

参照步骤 2.2.1.5 进行。

2.2.2.5 制备 DH5 α 大肠杆菌感受态

参照步骤 2.2.1.6 进行。

2.2.2.6 连接与转化

参照步骤 2.2.1.7 进行。

2.2.2.7 阳性质粒的提取

将测序鉴定为阳性的菌液扩大培养后，按照质粒提取试剂盒说明书要求提取质粒。

- (1) 将扩大培养的菌液置于离心管中，12000r/min 离心 3min，弃去培养上清液；
- (2) 加入 250 μ L Buffer P1 溶液，重悬菌体沉淀；
- (3) 加入 250 μ L Buffer P2 溶液,轻轻上下颠倒 6~8 次，可放置于 37°C 温箱孵育 3min，此刻菌液应该清亮粘稠；
- (4) 加入 350 μ L Buffer P3 溶液，立即颠倒混匀，使其充分混匀，此刻出现大量白色沉淀，室温静置 5min；
- (5) 室温 12000r/min 离心 10min；
- (6) 将离心后的上清液转移至收集柱中，室温静置 1min，12000r/min 离心 1min，弃去离心后废液；
- (7) 收集柱中加入 600 μ L 洗涤液 Buffer PW，12000r/min 离心 1min，弃去废液；
- (8) 重复一次步骤 7；
- (9) 将收集柱放入收集管中，12000r/min 空离 2min，使管内残留乙醇挥发；
- (10) 将收集柱转移到新的离心管中，加入 30~50 μ L Buffer EB 溶液，静置 3min，12000r/min 离心 2 min，将提取的质粒溶液收集到离心管中保存备用。

2.2.2.8 原核表达载体的构建

将 2.2.2.7 中提取的质粒溶液与原核表达载体 pET-32a(+)分别进行双酶切反应，酶切体系参照表 4。

表 4 双酶切体系

Table. 4 The system of double enzyme digestion

试剂	体积
质粒	15.0 μ L
ddH ₂ O	1.0 μ L
10×K Buffer	2.0 μ L
<i>Sal</i> I	1.0 μ L
<i>Bam</i> HI	1.0 μ L
总体积	20.0 μ L

将酶切体系置于 37°C 孵育酶切 30min，经 1%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后，采用如下体系连接：酶切后的 σ C 基因 15 μ L，酶切后的 pET-32a 载体 2 μ L，T4 DNA 连接酶 1 μ L，10 × T4 DNA Ligase Buffer 2.0 μ L。连接后的产物参照 2.2.1.7 中步骤进行转化。菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序鉴定后，阳性菌液质粒提取步骤参照 2.2.2.7。

2.2.2.9 σ C 蛋白的初步诱导表达

参照 2.2.1.7 中步骤，将表达载体 σ C-pET-32a 转化至大肠杆菌感受态 BL21(DE3)。次日，挑取生长状态良好的单菌落接种于 10mL 2×YT(Amp⁺)培养基中，于 37°C，220 r/min 摇床中过夜培养。吸取过夜培养的菌液 4mL 接种于 400mL 2×YT(Amp⁺)培养基中，置于摇床中 37°C，220 r/min 培养 2.5h 左右，直至 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0，吸取 1mL 菌液作为诱导前对照，然后加入终浓度为 1mM 的 IPTG，继续震荡培养 5h。同时设置空载体质粒 pET-32a 诱导表达对照。4°C 条件下，5000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀，PBS 重悬后，低温条件下置于超声波细胞破碎仪上裂解菌体，离心后收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达形式。

2.2.2.10 优化蛋白最佳表达条件

参照 2.2.2.9 诱导蛋白表达的步骤，保持其他条件不变的情况下，分别设置 IPTG 诱导剂浓度为 0.2mmol/L~0.8mmol/L，诱导时间为 2~8h，诱导蛋白表达，通过 SDS-PAGE 电泳确定蛋白表达量最大的诱导剂 IPTG 浓度和诱导时间。

2.2.2.11 重组蛋白的大量表达与纯化

在其他条件不变的情况下，采用最佳 IPTG 浓度和诱导时间，大量表达目的蛋白。利用梯度尿素洗涤法对目的蛋白进行纯化，纯化步骤如下：

- (1) 加入 20mL PBS 重悬菌体沉淀，4°C，12000 r/min 离心 5 min，弃去上清液；
- (2) 加入裂解液重悬菌体，4°C 条件下裂解过夜；
- (3) 将裂解过夜的菌液置于冰水混合物中，于超声波破碎仪中超声破碎包涵体，工作程序为：设置电压 220V，工作 2 s 间隙 3 s，共 140 次；
- (4) 超声完成后，4 °C 12000 r/min 离心 15 min，弃去上清。加入纯化液 A，充分重悬菌体沉淀，室温静置 10 min；
- (5) 4°C 12000 r/min 离心 15 min，弃去上清，用纯化液 B 重悬沉淀，室温静置 10 min；
- (6) 4°C 12000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，加入纯化液 C，重悬菌体后，室温静置 10min；
- (7) 4 °C 12000 r/min 离心 15 min，保留上清液，同时用溶液重悬沉淀，4°C 过夜；
- (8) 4 °C 12000 r/min 离心 15 min，保留上清液，即为纯化后的目的蛋白。

利用 Ni-NTA Resin 蛋白纯化试剂盒对初步纯化的蛋白进行再次纯化：

- (1) 将 Ni-NTA 纯化介质充分重悬后加入到层析柱，静置 10min；
- (2) 用 10 倍柱体积的平衡缓冲液充分平衡层析柱；
- (3) 将蛋白样品经离心和滤器过滤后，缓慢滴加到层析柱中；
- (4) 完成上样后，再次将 10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱，并收集流出液；
- (5) 分别采用浓度为 50mM、100 Mm、250Mm、500mM 的咪唑溶液，对层析柱进行梯度洗涤，每一梯度的洗涤液均收集备用；
- (6) 根据 SDS-PAGE 结果分析蛋白纯化结果。

2.2.2.12 SDS-PAGE 电泳

蛋白样品加入 5×Loading Buffer，沸水中煮沸 8min，恢复至室温后，即可进行 SDS-PAGE 电泳。凝胶配置过程如下：

- (1) 组装：按照垂直板式聚丙烯酰胺凝胶电泳槽装置说明，组装玻璃板。
- (2) 配置 12%分离胶：于洁净的小烧杯中，依次加入 3.3 mL 去离子水，2.5 mL pH 为 8.8，浓度为 1.5M Tris，0.1 mL10% SDS，0.1 mL10% 过硫酸铵，4.0 mL 30%

- Acr-Bis, 0.004 mL TEMED, 总体积为 10mL。混合均匀后, 加入到组装好的玻璃板中, 在液面距离玻璃板边缘 3cm 时, 停止加入分离胶, 加去离子水至玻璃板边缘封顶。37°C 放置 30min, 使凝胶充分凝固;
- (3) 配置 5%浓缩胶: 于干净的小烧杯中依次加入 2.1 mL 去离子水, 0.5 mL 30% Acr-Bis, 0.38 mL pH 为 6.8, 浓度为 1.0M 的 Tris, 0.03 mL 10% 过硫酸铵, 0.03 mL 10% SDS, 0.003 mL TEMED, 总体积为 5mL。弃去玻璃板中用于封顶的去离子水, 并将混合均匀的 5%浓缩胶加入至玻璃板顶部边缘, 插入梳子, 置于 37°C 温箱 30min 后, 浓缩胶充分凝固后, 拔下梳子, 置于电泳槽中;
 - (4) 上样电泳: 将电泳液加入到电泳槽中, 并将处理好的样品加入到上样孔中。电泳第一阶段以恒压 60V 进行, 待样品完全压至一条直线时, 调节电压, 以恒压 120V 继续电泳直到结束;
 - (5) 电泳结束后, 打开玻璃板, 切掉浓缩胶, 将分离胶置于考马斯亮蓝染色液中摇动染色 2h;
 - (6) 染色结束后, 将分离胶置于脱色液中充分脱色, 每隔一段时间更换脱色液, 直至脱色完全;
 - (7) 观察电泳结果。

2.2.2.13 Western-blot 鉴定

SDS-PAGE 电泳结束时, 切去浓缩胶等多余部分, 留下目的条带所在区间凝胶, 按照如下步骤进行 western-blot 试验:

- (1) 剪裁 NC 膜, 使之大小与切下来的凝胶大小一致, 于膜转移缓冲液中浸泡电转移所需要的滤纸、海绵垫、NC 膜;
- (2) 按照三明治模式, 在膜转移架上依次平铺放置海绵垫、滤纸、凝胶、滤纸、海绵垫, 凝胶所靠近的一面接入负极, NC 膜所靠近的一面接入正极;
- (3) 于电泳槽中加入膜转移缓冲液, 放入冰水浴中保持低温环境, 恒流 150mA 电泳 1h;
- (4) 完成电泳后, 用 TBST 洗涤 NC 膜三次, 每次 10min, 共计 5 次;
- (5) 洗涤完成后将 NC 膜置于 5% 脱脂奶粉中摇晃封闭 2h, 完成后重复洗涤过程;
- (6) 洗涤完成的 NC 膜于 His-tag mouse MonoAb 中孵育 1h, TBST 洗涤 NC 膜三次,

每次 10min, 共计 5 次;

- (7) 加入 1:2000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)孵育 1 h, TBST 洗涤 NC 膜三次, 每次 10min, 共计 5 次;
- (8) 将 BeyoECL Plus A 液和 B 液按照 1: 1 混合均匀后, 滴加到 NC 膜上, 然后置于荧光成像仪中观察结果。

2.2.2.14 重组蛋白浓度测定

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Enhanced BCA Protein Assay Kit)是目前最常用的两种蛋白浓度检测方法之一, 实现了蛋白浓度测定的简单、高稳定性、高灵敏度和高兼容性, 简要步骤如下:

- (1) 取 0.8mL 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准 (20 mg, BSA) 中, 充分溶解后配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液;
- (2) 将蛋白标准溶液稀释至终浓度为 0.5 mg/mL;
- (3) 根据样品数量, 按 50 倍体积 BCA 试剂 A 加 1 倍体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液;
- (4) 将标准品按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 分别加到 96 孔板的标准品孔中, 再加标准品稀释液补足到 20 μ L;
- (5) 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中, 加标准品稀释液到 20 μ L;
- (6) 每孔加入 200 μ L BCA 工作液, 37°C 放置 20-30 min;
- (7) 酶标仪测定 562 nm 吸光度, 根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

2.2.3 检测 ARV 抗体间接 ELISA 方法的建立

- (1) 将表达的 σ C-pET-32a 重组蛋白用 0.05 M 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到合适的浓度, 以每孔 100 μ L 包被一段时间后, 弃去包被液, 执行洗涤程序。设置 ELISA 洗板机洗涤程序为: 每孔 300 μ L PBST, 水平摇晃 5min, 共计 3 次, 完成后吸干洗涤液;
- (2) 每孔中加入 200 μ L 封闭液, 置于 37°C 温箱中孵育 2h, 完成后执行洗涤程序;
- (3) 将待检血清稀释到适合浓度后, 每孔 100 μ L, 置于 37°C 温箱中孵育 1h, 完成后执行洗涤程序;
- (4) 将 HRP 标记的兔抗鸡 IgG (H+L)稀释到合适浓度后, 每孔中加入 100 μ L, 于 37°C

温箱中孵育 1h，完成后执行洗涤程序；

(5) 每孔 100 μ L TMB 显色液，37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 15min；

(6) 每孔 50 μ L 2M 硫酸作为终止液，终止反应进行；

(7) 酶标仪下测定各孔 OD₄₅₀ 值。

2.2.3.1 棋盘稀释法确定抗原血清最佳稀释度

将表达的 σ C-pET-32a 重组蛋白按照横向 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 倍比稀释，将阳性血清按照 1:10、1:20、1:40、1:80 纵向倍比稀释，每个样本设置两个重复。保持其他条件不变的情况下，进行 ELISA 检测，确定最佳抗原和抗体的稀释倍数。

2.2.3.2 抗原最佳包被条件的确定

用 2.2.3.1 中确定的最佳蛋白包被浓度将重组蛋白稀释到合适浓度后，设置 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育、37 $^{\circ}$ C 2h 孵育、4 $^{\circ}$ C 过夜后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 三个不同孵育时间。保持其他条件不变的情况下，进行 ELISA 检测，根据阳性血清 OD₄₅₀ 与阴性血清 OD₄₅₀ 的比值(P/N)确定蛋白最佳包被条件。

2.2.3.3 最佳封闭液的选择

选择 0.5% BSA、0.1% BSA、2.5%脱脂奶粉、5%脱脂奶粉分别作为封闭液封闭 ELISA 包被板，保持其他条件不变的情况下，进行 ELISA 检测，根据 P/N 的值确定最佳封闭液。

2.2.3.4 兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体最佳稀释度的确定

将兔抗 IgG-HRP 酶标抗体分别按照 1:500、1:1000、1:2000 倍比稀释，保持其他条件不变的情况下，进行 ELISA 检测，根据 P/N 的值确定二抗最佳使用浓度。

2.2.3.5 阴阳性临界值的判定

用建立好的 ELISA 方法检测 20 份 SPF 鸡血清的 OD₄₅₀，每个样本设置 3 个重复，

结果取平均值。计算样本的标准差 (SD) 和平均值 (\bar{X})，阴阳性临界值为按照如下公式计算： $C_n = \bar{X} + 3SD$ 。

2.2.3.6 特异性试验

应用上述已建立的 ELISA 方法检测 IBV、IBDV、H9N2-AIV、FAV 阳性血清 OD₄₅₀ 值，并设置对照，分析该方法的特异性。

2.2.3.7 敏感性试验

将阳性血清按照 1:10、1:20、1:40、1:80、1:100、1:200、1:400 稀释，保持其他条件不变的情况下，进行 ELISA 检测，确定该方法的敏感性。同时从山东省烟台市发病肉鸡场采集 95 份血清样品，分别用本实验建立的方法和 IDEXX 商品化试剂盒检测样本，比较两者的符合率。

2.2.3.8 重复性试验

在同一块 ELISA 板上检测 4 份 ARV 阳性血清的 OD₄₅₀ 值，每个样本重复 3 次，计算批内变异系数(CV)， $CV = SD/\bar{X} \times 100\%$ 。在三块不同的 ELISA 板上检测 4 份 ARV 阳性血清的 OD₄₅₀ 值，每个样本重复 3 次，计算批内变异系数(CV)， $CV = SD/\bar{X} \times 100\%$ 。

2.2.3.9 临床样品的检测

从山东省烟台莱阳市、烟台牟平市、威海市、东营市发病肉鸡场中采集 363 份血清样本，利用本试验建立的方法检测样本的 ARV 抗体水平，根据抗体水平对样本进行定性判定。

2.2.4 ARV σ C 蛋白单克隆抗体的制备

2.2.4.1 免疫 BALB/c 小鼠

将纯化后 σ C 蛋白按 60 μ g 蛋白/只小鼠的量，皮下注射 4 只 6 周龄 SPF BALB/c 雌性小鼠，每隔两周加强免疫，共计免疫三次。选择抗体效价高的小鼠用 50 μ g 蛋白对小鼠实行腹腔注射加强免疫，三天后进行细胞融合，具体免疫流程如表 5 所示。

表 5 BALB/c 小鼠免疫体系

Table.5 The immunization pronunciation procedure of BALB/c mice

免疫次数 (immunity times)	免疫原 (immunogen)	免疫佐剂 (immuno adjuvant)	免疫途径 (immune ways)	剂量(μg) dose(μg)
一免	σC	弗氏完全佐剂	皮下多点注射	30
二免	σC	弗氏不完全佐剂	皮下多点注射	30
三免	σC	弗氏不完全佐剂	皮下多点注射	30
加强免疫	σC	不加佐剂	腹腔注射	50

2.2.4.2 间接 ELISA 方法测定小鼠血清抗体水平

眼眶采集三免后小鼠血液，离心收集血清，采用间接 ELISA 方法对血清抗体水平进行检测。

- (1) 抗原包被：稀释的 σC 纯化蛋白包被于 96 孔 ELISA 检测板，每孔 $100\mu\text{L}$ ， 37°C 包被 2h；
- (2) 将酶标板中抗原包被液吸弃，拍干后每孔中加入 300mL PBST，置于水平摇床上洗涤 3 次，每次 5min，吸弃废液，将板倒扣在干净的吸水纸上吸掉多余水分；
- (3) 每孔加入封闭液 $200\mu\text{L}$ ，轻轻振晃滴定板以使溶液混合均匀，置于 37°C 温箱中孵育 2h；
- (4) 重复步骤 (2) 洗涤过程；
- (5) 每孔 $100\mu\text{L}$ 加入 2 倍比稀释的小鼠血清，并设立阴性对照和空白对照， $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ，轻轻振晃酶标板中溶液混合均匀， 37°C 温箱中孵育 1h；
- (6) 重复步骤 (2) 洗涤过程；
- (7) $100\mu\text{L}$ 每孔加入稀释好的羊抗鼠 HRP-IgG，轻轻振晃酶标板使溶液混合均匀， 37°C 温箱中孵育 1h；
- (8) 重复步骤 (2) 洗涤过程；
- (9) 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 底物显色液， 37°C 温箱避光显色 15min；
- (10) 终止反应：显色结束后，每孔加入 $50\mu\text{L}$ 终止液到 96 孔酶标板中，置于酶标仪中读取 OD_{450} 下的吸光值。效价为大于最大 $\text{OD}/2$ 的最小 OD 读数所对应的稀释度，根据结果选择效价最高的小鼠进行后续细胞融合试验。

2.2.4.3 杂交瘤细胞株的建立

2.2.4.3.1 骨髓瘤细胞 sp2/0 的准备

2.2.4.3.1.1 细胞复苏

打开水浴锅，调节温度至 37°C，当温度稳定后，开始 sp2/0 细胞的复苏。从液氮罐小心快速的取出细胞，立即放入提前预热至 37°C 的水浴锅中，轻轻晃动，加快细胞融化。待细胞完全融化后，将其转移到 15mL 无菌离心管中，加入 10 mL 37°C 预热的含有 10% 的 FBS 的 DMEM 培养基。低速离心，弃上清，将细胞转移到无菌细胞培养瓶中，加入 37°C 预温的含有 10% FBS 的 DMEM 培养基，置于 5%CO₂、37°C 细胞培养箱中培养。

2.2.4.3.1.2 细胞传代培养

对于半贴壁生长的 sp2/0 细胞的传代培养过程如下：

- (1) 当细胞密度达到整个细胞培养瓶底面的 80% 时，开始着手传代培养，防止细胞密度过大，营养和生长空间不足、代谢废物过多，进而影响细胞状态；
- (2) 提前预热含有 10% FBS 的 DMEM 培养基和无血清 DMEM 完全培养基；
- (3) 于生物安全柜中，吸弃细胞培养瓶中的培养液，加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，轻轻拍打瓶壁，使细胞从壁上脱落下来，然后使用无菌巴氏吸管轻轻吹打细胞，混合均匀后进行细胞计数；
- (4) 参照细胞计数结果，加入适量的含有 10% FBS 的 DMEM 培养基，稀释细胞密度达到 1×10^5 个/mL，分装于新的无菌的细胞培养瓶中，37°C 细胞培养箱中保持 CO₂ 浓度为 5% 的条件下培养；
- (5) 连续传代 3 次后，选取对数生长期且状态良好的细胞，用 DMEM 基础培养基轻轻吹下，对培养细胞进行计数备用。

2.2.4.3.2 饲养层细胞的准备

细胞融合前一天，选择一只未免疫的 BALB/c 小鼠，摘眼球取血，拉颈处死，将小鼠放入 75% 的酒精中浸泡 5min 后，转移到生物安全柜中，用剪刀剪开腹部皮肤，用 75% 乙醇对腹膜从内向外划圈消毒。轻轻提起腹膜，无菌注射 10 mL 含 20% 血清的 HAT 培

培养基，轻轻按压小鼠腹部，完成后，将注射到腹腔的培养基吸回，计数后以 100 μL /孔转移到 96 孔细胞培养板中，保持培养箱温度为 37°C，CO₂ 浓度为 5%，培养备用。

2.2.4.3.3 小鼠脾细胞的准备

小鼠摘眼球取血，拉颈处死，放入 75% 的酒精中浸泡 5min 后，转移到生物安全柜中。在平皿中倒入少量无血清的 DMEM，将细胞筛及注射器内芯放入平皿中。用剪刀和镊子轻轻剪开小鼠皮肤和腹膜，取下小鼠的脾脏，用 4°C 预冷的不含血清的 DMEM 冲洗两次，然后放到细胞筛上。用注射器的内芯轻轻地将脾充分碾碎，并将无血清的 DMEM 培养基轻轻滴加在细胞筛上，转移滤液至离心管中，1000r/min，离心 3min，去除细胞上清液，加入 DMEM 培养基重悬后使用台盼蓝进行细胞计数。

2.2.4.3.4 细胞融合

(1) 将状态良好的 sp2/0 细胞转移到离心管中，1500r/min 离心 5min，于生物安全柜中弃掉细胞上清，加入 DMEM 重悬细胞并使用台盼蓝计数；

(2) 制备好的小鼠脾细胞与 sp2/0 按照 5: 1 比例混合后，1500r/min 离心 15min，弃掉细胞上清；

(3) 加入无血清的 DMEM 培养基重悬上步细胞沉淀，2000r/min 离心 15min，弃去大部分培养基上清；

(4) 轻轻敲打离心管底使细胞充分悬浮，悬浮后的离心管放入 37°C 水浴锅中，在 1 分钟内缓慢加入已经预热的 1mL PEG，一边滴加一边轻轻摇晃，完成后，水浴静置 1min；

(4) 缓慢加入 2mL 提前预热的无血清的 DMEM，然后继续在 2min 内缓慢加入 8mL 无血清的 DMEM，终止细胞融合反应，完成后 1000r/min 离心 5min；

(5) 弃掉上清液，加入含有 20% FBS 血清的 HAT 培养基，小心的将细胞吹匀，以每孔 100 μL 体积加入到铺有饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中，放入温箱培养。

2.2.4.4 杂交瘤细胞的筛选

细胞融合 4d 后，用含 20% FBS 的 HAT 选择培养基对 96 孔细胞培养板进行半量换液，融合 8 d 后，选择含 20% FBS 的 HAT 培养基再次对细胞培养板进行半量换液，融合 12d 后，再次用含 20% FBS 的 HT 培养基半量换液。换液完成后，当细胞生长至平铺

孔底的 1/3 面积以上时, 收集细胞上清液, 用所建立的间接 ELISA 检测方法检测细胞上清效价, 同时以 sp2/0 细胞上清为阴性对照, 小鼠的阳性血清为阳性对照, PBS 为空白对照。重复检测 2~3 次, 选出能够稳定分泌抗体的细胞孔进行细胞亚克隆。

2.2.4.5 杂交瘤细胞的亚克隆

应用有限稀释法对杂交瘤细胞进行克隆, 以期选择出能够分泌单一抗体的杂交瘤细胞。参照 2.2.3.3.2 中步骤制备饲养层细胞备用。弃去已筛选出的阳性细胞孔上清液, 用含有血清的培养基小心的将杂交瘤细胞吹离底壁, 使用台盼蓝对活细胞染色计数。根据计数结果采用倍比稀释方法将其稀释到每 200 μ L 含 2、4、10 个杂交瘤细胞, 稀释好的细胞加入到准备好的铺有饲养层细胞的 96 孔培养板中, 每个稀释度 32 个细胞孔, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 温箱中培养。7d 后, 对细胞孔进行换液后继续培养; 2 周后, 收集不同稀释度的上清液, 检测抗体效价, 重复 2~3 次, 直至所有克隆化细胞孔的检测阳性率均为阳性时, 稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株制备完成, 大量培养该细胞株并采用常规方法冻存保存。

2.2.4.6 腹水的制备

杂交瘤细胞分泌的细胞上清抗体浓度较低, 而且纯化难度较高, 因此本试验继续采用体内诱导小鼠产生腹水的方法制备单抗。

(1) 酒精棉球由内至外划圈擦拭 10 周龄左右雌性小鼠腹部皮肤, 消毒完成后, 注射器注射无菌液体石蜡 0.5 mL/只;

(2) 一周后, 轻轻吹打培养的杂交瘤细胞, 使其完全脱离细胞瓶壁。1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 缓慢加入 PBS 轻轻吹打洗涤细胞, 完成后离心计数。调节细胞密度数为 2×10^6 个/mL 后, 无菌注射 0.5 mL 至小鼠腹部;

(3) 接种后持续饲养一周左右, 可见小鼠腹部明显膨大, 触摸腹部皮肤有紧张感时, 即可收集小鼠腹水。4,000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

2.2.4.7 单克隆抗体鉴定

2.2.4.7.1 亚类的测定

参照 SBA 单克隆抗体分型试剂盒说明要求, 对筛选出来的杂交瘤细胞株进行亚类的测定, 主要步骤如下:

- (1) 用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液将包被抗体稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 以每孔 100 μL 体积加入到 ELISA 检测板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;
- (2) 次日, PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;
- (3) 每孔加入 200 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 2h。
- (4) 水平摇床中以 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 洗涤完成后每孔加入 100 μL 杂交瘤上清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 1h;
- (5) 重复洗涤过程; 完成后将 HRP 标记的抗体用封闭液以 1: 2000 稀释后, 100 μL 每孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1h;
- (6) 重复洗涤过程; 每孔加 50 μL 底物溶液, 15min 后于双波长 (450nm, 630nm 测吸光值, 记录保存数据。

2.2.4.7.2 效价的测定

用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 σC 重组蛋白包被 ELISA 板, 进行间接 ELISA 检测。将杂交瘤细胞培养上清按照 1:10 进行倍比稀释。同时, 将接种杂交瘤细胞所获得的腹水按 1:500 进行倍比稀释。测定其 OD₄₅₀, 计算抗体效价。

2.2.4.7.3 western-blot 鉴定

参照 2.2.1.13 中步骤, 以纯化的 σC 蛋白为抗原, 制备的杂交瘤细胞株细胞上清为一抗, HRP-羊抗鼠抗体为二抗, 鉴定杂交瘤细胞株上清的生物活性。

- (1) 剪裁 NC 膜, 使之大小与切下来的凝胶大小一致。于膜转移缓冲液中浸泡电转移所需要的滤纸、海绵垫、NC 膜;
- (2) 按照三明治模式, 在膜转移架上依次平铺放置海绵垫、滤纸、凝胶、滤纸、海绵垫。凝胶所靠近的一面接入负极, NC 膜所靠近的一面接入正极;
- (3) 于电泳槽中加入膜转移缓冲液, 放入冰水浴中保持低温环境, 恒流 150mA 电泳 1h;
- (4) 完成电泳后, 用 TBST 洗涤 NC 膜三次, 每次 10min, 共计 5 次;
- (5) 洗涤完成后将 NC 膜置于 5%脱脂奶粉中摇晃封闭 2h。完成后重复洗涤过程;
- (6) 洗涤完成的 NC 膜于杂交瘤细胞上清中孵育 1h, 重复洗涤过程;

(7) 加入 1:500 稀释的 HRP 标记羊抗鼠抗体，孵育 1 h，完成后重复洗涤过程；

(8) 将 BeyoECL Plus A 液和 B 液按照 1:1 混合均匀后，滴加到 NC 膜上，然后置于荧光成像仪中观察结果。

2.2.4.7.4 IFA 鉴定

(1) 培养原代肝细胞密度达到细胞孔底部面积的 80%时，弃去培养基上清，PBS 洗掉死亡脱落的细胞，接种 ARV，设置对照孔；

(2) 继续培养至细胞出现融合病变时，弃去培养基上清，PBS 洗掉死亡脱落的细胞，每孔以预冷的 4%多聚甲醛 200 μ L 固定细胞，室温孵育 15 min；

(3) PBS 轻轻润洗细胞表面 2 次；

(4) 每个细胞培养孔中加入 50 μ L 稀释后的细胞上清，置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中静置 1h；

(5) PBS 洗涤三次，每次 5min；

(6) 每孔加入 50 μ L100 倍稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG，37 $^{\circ}$ C 温箱中静置 1h；

(7) 重复洗涤过程，完成后在荧光倒置显微镜下观察结果。

判定标准：阴性清对照孔没有荧光，阳性血清对照有荧光，则检测样品孔中如果有特异性荧光，则判断为阳性；检测孔无特异性荧光，则判断为阴性；若只有少量不明显的荧光则判断为可疑。

2.2.4.7.5 稳定性鉴定

将筛选的杂交瘤细胞株冻存后，分别于 1 个月、3 个月、6 个月后采用常规方法进行复苏，收集培养液上清，利用 ELISA 方法检测抗体效价，分析其分泌抗体的稳定性。

2.2.4.7.6 腹水的纯化

由于小鼠体内生产系统制备的腹水中常混有各种杂蛋白，因此需要在纯化后使用：

(1)将滤纸过滤后的腹水与 0.06 M pH 为 4.5 醋酸盐缓冲液按照 1:3 比例混合均匀后，一边搅拌一边缓慢加入正辛酸，直至其最终浓度达到 33 μ L/mL；

(2) 连续搅拌 30 min 后，8000r/min 离心 30 min，滤纸过滤上清液，调节 pH 值至 7.4；

(3) 于滤液中缓慢加入饱和的硫酸铵溶液，当出现白色浑浊时，继续搅拌 20min，4 $^{\circ}$ C 静置 4h；

(4)冷冻离心机中调节温度至 4°C, 转速为 12,000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀用 0.1M Tris-Cl (pH=9.0) 溶液溶解后, 置于 100 倍体积的 0.1M Tris-Cl (pH=9.0) 中 4°C 透析 24h;

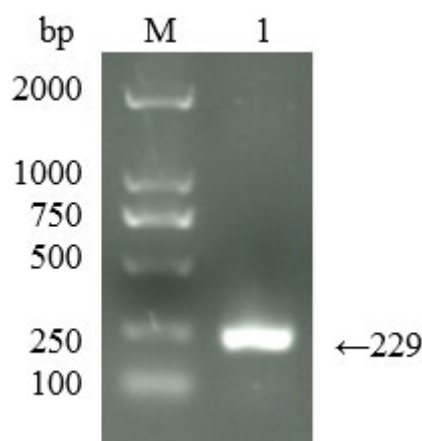
(5) 透析完成后检测抗体纯度, -80°C 保存。

3 结果

3.1 ARV 核酸探针的制备

3.1.1 PCR 扩增

根据设计的特异性引物扩增出一条 229bp 大小条带，与预期大小相符（图 1）。



M:DNA Marker; 1:扩增片段

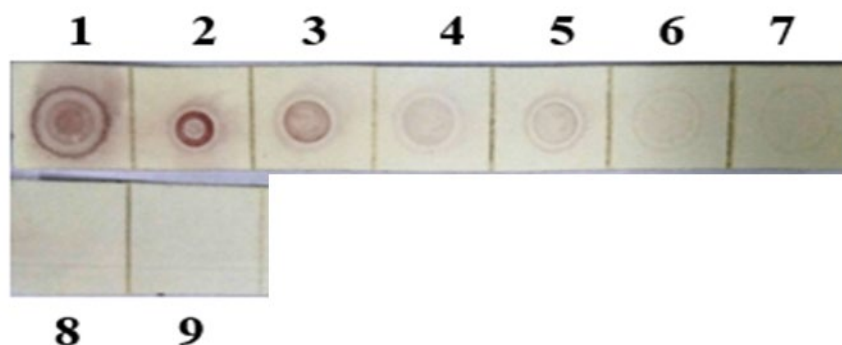
M: DL 2000 Marker; 1: product of PCR

图 1 PCR 扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification of DNA

3.1.2 敏感性试验

将纯化的禽呼肠孤病毒 cDNA 核酸依次稀释成 100ng/ μ L、10ng/ μ L、1ng/ μ L、500pg/ μ L、200ng/ μ L、100pg/ μ L、50pg/ μ L、10pg/ μ L、5pg/ μ L，点样于 NC 膜上，按照常规步骤进行变性、中和、固定、预杂交、杂交、洗膜、显色，最终结果如下图（图 2）：标记探针最低核酸检出量为 50pg/ μ L。



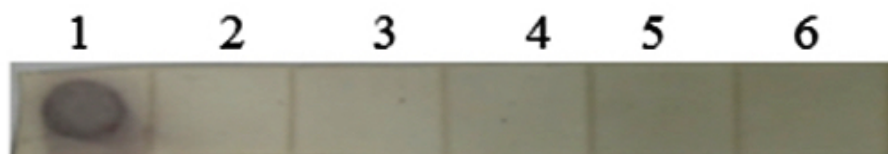
1-9: 100ng/ μ L、10ng μ L、1ng/ μ L、500pg/ μ L、200ng/ μ L、100pg/ μ L、50pg/ μ L、10pg/ μ L、5pg/ μ L ARV cDNA

图 2 ARV 地高辛探针敏感性试验

Fig.2 The sensitivity test of ARV DIG probe

3.1.3 特异性试验

提取 H9-AIV、IBV、IBDV、FAV、NDV 核酸，点样于 NC 膜上，按照常规步骤进行变性、中和、固定、预杂交、杂交、洗膜、显色，结果显示，只有 ARV 与该探针杂交结果为阳性，其余核酸杂交无法与该探针杂交显色，说明本试验制备的探针具有良好的特异性（图 3）。



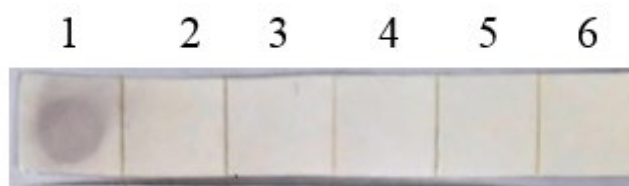
1-6:ARV cDNA、H9-AIV cDNA、IBV cDNA、IBDV cDNA、FAV DNA、NDV cDNA

图 3 ARV 地高辛探针特异性试验

Fig.3 The specificity test of ARV DIG probe

3.1.4 稳定性试验

将制备的探针保存至-20 $^{\circ}$ C 冰箱中，于 90d 后取出，按照常规步骤与 ARV、H9-AIV、IBV、IBDV、FAV、NDV 进行杂交显色，结果显示 ARV 与该探针杂交结果为阳性，其余核酸杂交无法与该探针杂交显色，说明本试验制备的探针具有良好的稳定性（图 4）。



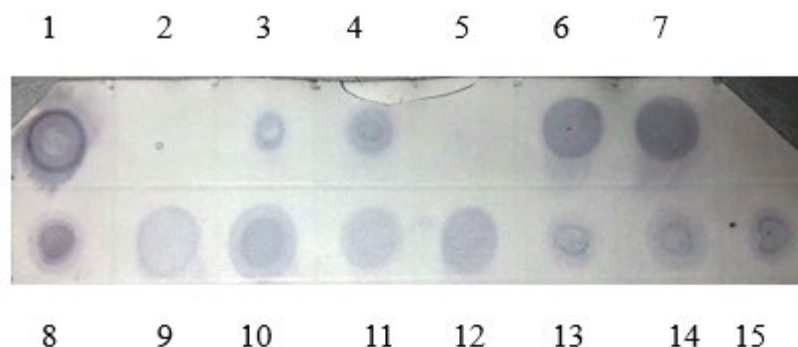
1-6:ARV cDNA、H9-AIV cDNA、IBV cDNA、IBDV cDNA、FAV DNA、NDV cDNA

图4 ARV 地高辛探针稳定性试验

Fig.4 The repeatability test of ARV DIG probe

3.1.5 临床样品的初步检测

采集 13 份疑似 ARV 感染的病料组织，研磨后按照常规方法提取病毒核酸，地高辛核酸探针杂交检测结果显示：阳性样品 12 份，阴性样品 1 份，与 RT-PCR 方法符合率为 100%（图 5）。



1: ARV 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~15: 待检样品

1:positive control; 2: Negative control; 3~15:sample to be inspected

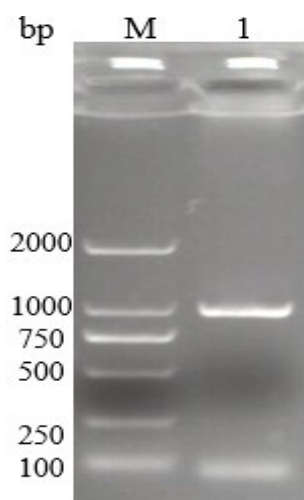
图 5 ARV 临床样品的初步检测

Fig.5 Preliminary detection of ARV clinical samples

3.2 ARV σ C 基因的原核表达

3.2.1 目的基因的扩增

将扩增的 LY383 株禽呼肠孤病毒细胞上清液经过 RNA 提取、RT-PCR 扩增反应后，经 1%琼脂糖凝胶电泳，扩增出 981bp 的 σ C 基因片段，与预期大小相同（图 6）。



M: DNA Marker; 1: σ C 基因扩增产物

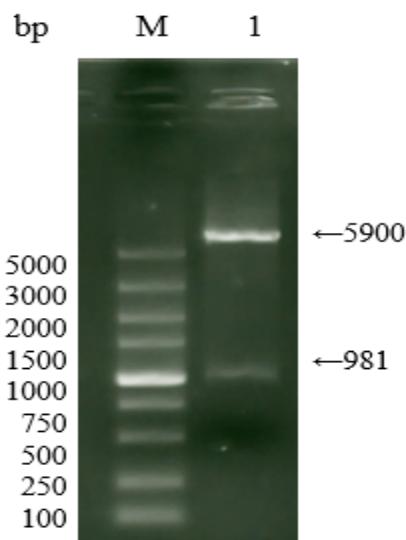
M: DL 2000 Marker; 1: Amplification product of σ C gene

图 6 ARV σ C 基因扩增结果

Fig.6 PCR amplification of σ C gene of ARV

3.2.2 重组表达载体 σ C-pET32a 的双酶切鉴定

将构建的原核表达载体 σ C-pET32a 重组质粒经过限制性核酸内切酶 *BamH I* 和 *Sal I* 的双酶切后，利用 1% 琼脂糖凝胶电泳可观察到两条条带，大小与预期相符（图 7）。



M: DL5000 Marker; 1: σ C-pET-32a/ *BamH I*+*Sal I* 双酶切产物

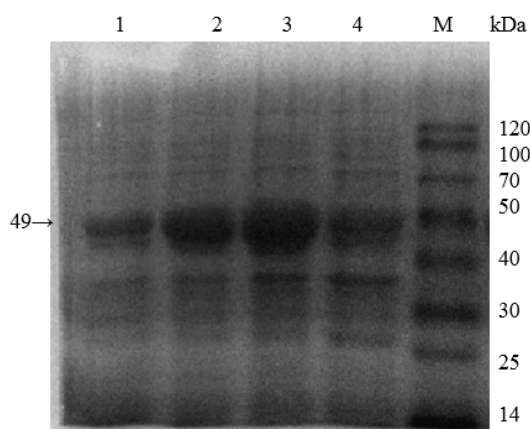
M: DL5000 Marker; 1: σ C-pET-32a/ *BamH I*+*Sal I*

图 7 质粒 σ C-pET-32a 双酶切鉴定结果

Fig.7 Restriction enzyme digestion of σ C-pET-32a

3.2.3 重组蛋白最佳表达条件的优化

经过 SDS-PAGE 分析, 可知当诱导蛋白表达时间为 6 h (图 8), IPTG 诱导浓度为 0.6mM (图 9) 时, 蛋白表达量最大。

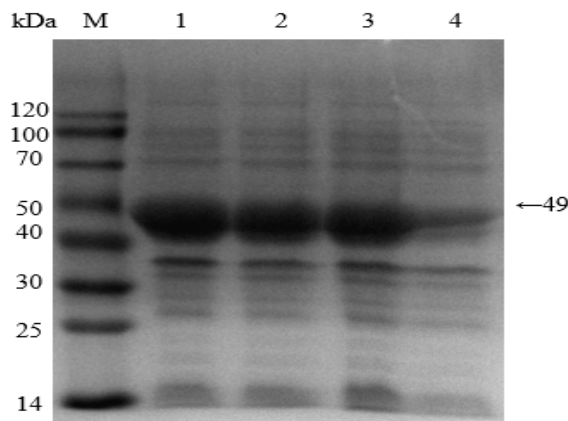


M: 蛋白 Marker; 1-4: 诱导 2、4、6、8h 的蛋白表达量

M: Premixed Protein Marker; 1-4: Protein expression of 2, 4, 6, 8 hours

图 8 不同的诱导时间对重组质粒表达的影响

Fig.8 Influence of expression of restructuring plasmid with different induced time



M: 蛋白 Marker; 1-4: 0.8、0.6、0.4、0.2mM IPTG 诱导蛋白表达量;

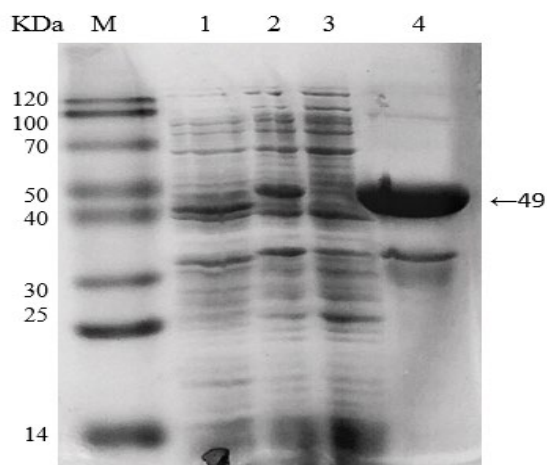
M: Protein Marker(Low); 1-4: Protein expression of IPTG concentration in 0.8,0.6,0.4,0.2mM

图 9 不同的 IPTG 的浓度对蛋白表达的影响

Fig.9 Influence of expression of protein with different IPTG concentration

3.2.4 重组蛋白的纯化及表达形式的确定

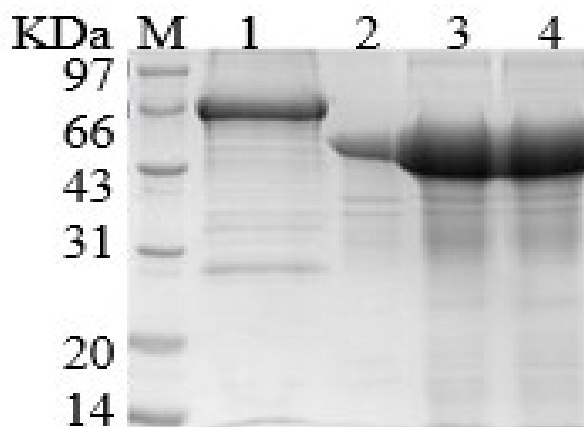
SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的存在形式, 结果显示表达的目的蛋白主要以包涵体的形式存在于重组菌的沉淀中, 利用梯度尿素法对表达的包涵体蛋白进行洗涤纯化, 结果如下图所示 (图 10)。将经过梯度尿素法洗涤的包涵体蛋白经过全式金 Ni-NTA Resin 纯化试剂盒再次纯化, 最终使其纯度达到 85%以上 (图 11)。



M: 蛋白 Marker; 1: pET-32a 空载体; 2: 重组菌诱导前对照; 3: 重组菌裂解液上清; 4: 纯化后诱导菌裂解沉淀
 M: Protein Marker; 1:pET-32a vector; 2: σ -pET-32a without induction; 3:The pellet of bacteria σ -pET-32a lysate; 4:The pellet of bacteria σ -pET-32a lysate after purification

图 10 重组蛋白存在形式及纯化

Fig.10 Existence form of the recombinant protein and the purified of recombinant protein



M: 蛋白 Marker; 1: BSA 上样量为 10 μ L; 2: 上样量为 2 μ L 的纯化后 σ C 蛋白; 3: 上样量为 10 μ L 的纯化后 σ C 蛋白; 4: 上样量为 10 μ L 的纯化后 σ C 蛋白

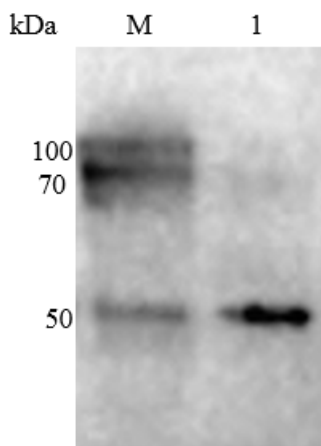
M: Protein Marker; 1:10 μ LBSA; 2:2 μ L σ C protein after purification; 3:10 μ L σ C protein after purification; 4:10 μ L σ C protein after purification

图 11 纯化后的重组蛋白

Fig.11 the purified of recombinant protein

3.2.5 Western-blot 分析鉴定

由于表达的重组融合蛋白中含有 His 标签蛋白，故可利用 His 标签抗体作为一抗，对重组蛋白进行分析鉴定，western-blot 鉴定结果如下（图 12）。



M: 蛋白 Marker; 1: σ C 蛋白;

M: Protein Marker; 1: σ C protein;

图 12. Western-blotting 分析鉴定

Fig.12 Western-blotting analysis of the recombinant protein

3.2.6 蛋白浓度的确定

按照 BCA 蛋白质定量试剂盒操作, 绘制标准曲线, 计算得纯化后的蛋白浓度为 2.0 mg/mL。

3.3 检测 ARV 抗体的间接 ELISA 方法建立

3.3.1 抗原最佳包被浓度与血清稀释度的确定

利用棋盘稀释法倍比稀释蛋白抗原与血清抗体, 结果显示, 当抗原以 1: 1000 倍稀释, 血清按照 1: 10 倍稀释时, P/N 值最大, 故选择抗原 1: 1000 倍稀释作为最佳抗原包被浓度, 血清 1: 10 倍稀释作为最佳血清稀释浓度 (表 6)。

表 6 蛋白与血清的最佳稀释度

Table.6 The best dilution proportion of σ c protein and serum

血清稀释度 Serum dilution (P/N)	蛋白稀释度 Protein dilution factor (P/N Ratio)					
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
1:10	5.25	6.16	5.68	4.08	3.56	3.08
1:20	5.48	5.60	4.17	4.05	3.06	2.24
1:40	5.79	4.76	3.95	2.90	2.85	2.08
1:80	5.02	4.61	4.83	4.09	3.31	2.33

3.3.2 抗原最佳包被条件的确定

在其他条件不变的情况下对抗原包被条件进行优化，然后按照常规的 ELISA 检测程序进行试验，结果显示，抗原经过 37°C 温箱孵育 2h，P/N 值最大，包被效果最佳（表 7）。

表 7 最佳抗原包被条件

Table.7 The best coating condition of σ c protein

OD ₄₅₀ 值 (OD ₄₅₀ values)	抗原包被条件(Coating condition of antigen)		
	37°C 2h	4°C 16h	37°C 2h
Positive value	0.29	0.24	0.33
Negative value	0.07	0.07	0.06
P/N radio	4.45	3.53	5.33

3.3.3 最佳封闭液的确定

分别选择 0.5%BSA 溶液、0.1%BSA 溶液、2.5%脱脂奶粉溶液、5%脱脂奶粉溶液封闭检测孔，在其他条件恒定下进行 ELISA 检测，结果显示，选择 5%脱脂奶粉溶液作为封闭液，封闭效果最好，P/N 值最大（表 8）。

表 8 蛋白最佳封闭条件

Table.8 The best blocking condition of σ c protein

OD ₄₅₀ 值 (OD ₄₅₀ values)	蛋白封闭条件(closure condition of antigen)			
	0.5%BSA	0.1%BSA	2.5%Skim milk powder	5%Skim milk powder
Positive value	0.15	0.15	0.24	0.24
Negative value	0.09	0.09	0.08	0.07
P/N radio	1.73	1.56	3.14	3.53

3.3.4 兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体最佳稀释度的确定

HRP 标记的兔抗鸡 IgG (H+L)抗体按照 1: 500 稀释时, P/N 值最大, 故确定二抗稀释度为 1:500 (表 9)。

表 9 HRP 兔抗鸡酶标二抗最佳稀释倍数

Table.9 The best dilution for HRP labeled Rabbit anti-chicken IgG

OD ₄₅₀ 值 (OD ₄₅₀ values)	IgG-HRP 稀释度(Dilution of IgG-HRP)		
	1:500	1:1000	1:2000
Positive value	0.45	0.24	0.11
Negative value	0.06	0.07	0.06
P/N radio	7.12	3.53	1.90

3.3.5 阴阳性临界值的确定

20 份 SPF 鸡血清的 OD₄₅₀ 平均值(\bar{X})为 0.0595, 样本的标准差(SD)为 0.004, 故确定阴阳性临界值为 0.071, 即阴阳性临界值判定标准为: 若检测样本的 OD₄₅₀ 大于 0.071, 即可认定为 ARV 阳性, 若检测样本 OD₄₅₀ 值小于 0.071, 即可认定为 ARV 阴性。

3.3.6 特异性试验

本试验建立的间接 ELISA 检测方法对 IBV、IBDV、H9N2-AIV、FAV 阳性血清的检测结果的 OD₄₅₀ 值均小于阴阳性判定标准的临界值 0.071, 检测结果均为阴性, 可说明该方法特异性较好。

3.3.7 与商品化试剂盒的比较

95 份血清样品的检测结果显示: 本研究建立方法与 IDEXX 商品化 ELISA 试剂盒均检测为阳性的样品为 46 份, 均检测为阴性的样品为 8 份, 本方法检测为阳性而试剂盒检测结果为阴性的样品为 37 份, 这可能是由于而商品化试剂盒依据传统疫苗株为基础, 对当前毒株的检测存在漏检风险, 两者的符合率为 56.8% (表 10)。

表 10 与 IDEXX 商品化 ELISA 检测试剂盒符合率

Table.10 consistent rate with IDEXX ELISA commercialization test kit

IDEXX-ELISA 检测试剂盒 (IDEXX-ELISA Commodity test kit)	ARV-ELISA			符合率 (Compliance rate)
	阳性 (Positive)	阴性 (negative)	合计 (total)	
阳性(Positive)	46	4	50	92.0%
阴性(negative)	37	8	45	17.8%
合计(total)	83	12	95	56.8%

3.3.8 重复性试验

在同一块 ELISA 板上检测 4 份 ARV 阳性血清的 OD₄₅₀ 值, 每个样本重复 3 次, 其批内变异系数 (CV) 在 5.74%-7.93%之间。在三块不同的 ELISA 板上检测 4 份 ARV 阳性血清的 OD₄₅₀ 值, 每个样本重复 3 次, 其批内变异系数 (CV) 在 4.85%-6.10%之间。该方法的批内变异系数与批间变异系数均小于 10%, 具有良好的重复性 (表 11)

表 11 重复性试验

Table.11 Repeatability text on ELISA

样品 (Serum)	批内试验(intra-assay test)			批间试验(inter-assay test)		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
1	0.29	0.02	5.74%	0.29	0.02	6.10%
2	0.31	0.02	7.93%	0.29	0.01	4.85%
3	0.34	0.02	6.25%	0.33	0.02	6.84%
4	0.32	0.02	7.67%	0.31	0.02	7.62%

CV, Coefficient Variation; SD, Standard Deviation (n=3).

3.3.9 临床样品的检测

应用本试验建立的方法对 363 份从山东省不同发病禽场采集的血清样本进行检测，检测结果显示 ARV 阳性样品 337 份，其阳性率为 92.8% (337/363) (表 12)。

表 12 临床样品的初步检测

Table.12 Detection of clinical samples from incidence farm

地点 (location)	阳性样本数/检测样本数 (Positive samples /Number samples)	阳性率 (%) (Positive rate)
烟台莱阳市	80/90	88.9%
烟台牟平市	87/90	96.7%
威海市	83/90	92.2%
东营市	87/93	93.5%
共计	337/363	92.8%

3.4 ARV σ C 单克隆抗体的制备与鉴定

3.4.1 免疫小鼠血清抗体效价的测定

用制备的纯化 σ C-pET-32a 重组蛋白免疫实验小鼠，三次免疫后，眼眶取血，通过间接 ELISA 法测定小鼠血清效价。以大于最大 OD/2 的最小 OD 读数所对应的稀释度作为抗体效价，结果显示 4 号小鼠血清的抗体效价最高，故选取其中的 4 号小鼠做细胞融合试验 (表 13)。

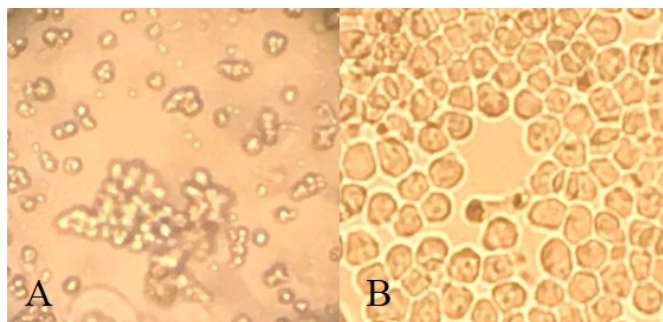
表 13 效价检测结果

Table.13 The results of titer detection

稀释倍数 Dilution multiple	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	空白 Blank control	阴性 Negative control
1 号鼠 Mouse 1	1.821	1.852	1.769	1.705	1.676	1.6	1.459	1.316	1.018	0.701	0.001	0.069
2 号鼠 Mouse 2	1.78	1.78	1.785	1.661	1.741	1.606	1.453	1.292	1.075	0.866	0.001	0.072
3 号鼠 Mouse 3	1.79	1.79	1.715	1.68	1.653	1.616	1.471	1.35	1.042	0.834	0.001	0.071
4 号鼠 Mouse 4	1.785	1.705	1.788	1.751	1.747	1.7	1.579	1.546	1.292	1.034	0.001	0.065

3.4.2 杂交瘤细胞的筛选

用建立的间接 ELISA 检测方法对融合后的细胞孔进行筛选，经过多次筛选及有限稀释法克隆后，筛选出 2 株能够稳定分泌 σ C 蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 A1S9 和 B2D9。下图为显微镜下观察到的融合克隆团细胞以及单克隆细胞状态（图 13）



A: 杂交瘤细胞开始融合的状态; B: 亚克隆阳性单个细胞团

A: The state of hybridoma cell fusion; B: Subcloning positive single cell mass

图 13 显微镜下观察杂交瘤细胞的状态

Fig. 13 State of hybridoma cells observed under microscope

3.4.3 单克隆抗体亚类的测定

利用 SBA 单克隆抗体分型试剂盒对 A1S9 和 B2D9 杂交瘤细胞分泌的抗体类型进行鉴定，结果显示其分泌的抗体为 IgG1 型，轻链为 κ 链(表 14)。

表 14 单克隆抗体亚类鉴定

Table.14 The isotyping of monoclonal antibodies.

抗体类型 The isotyping of monoclonal antibodies.	细胞株名称 The name of cell line	
	A1S9	B2D9
M	0.034	0.071
G1	0.721	0.533
G2a	0.024	0.025
G2b	0.023	0.021
G3	0.037	0.034
A	0.033	0.035
κ	0.078	0.111
λ	0.06	0.062

3.4.4 单克隆抗体效价的测定

利用建立的间接 ELISA 方法测定交瘤细胞上清和制备的小鼠腹水抗体效价，结果显示：细胞上清的效价分别为 1:100，腹水效价分别为 1:128000 和 1:256000（表 15）。

表 15 杂交瘤细胞上清和腹水效价

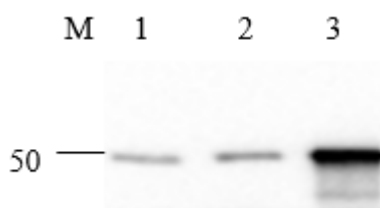
Table.15 Titers of culture supernatants and ascitic fluids by indirect ELISA

单克隆抗体 McAb	细胞上清效价 Antibody titers of culture supernatants	腹水效价 Antibody titers of ascitic fluids
A1S9	1:100	1:128000
B2D9	1:100	1:256000

3.4.5 单克隆抗体反应性鉴定

对筛选出来的杂交瘤细胞株进行 western-blot 分析，结果显示，A1S9 和 B2D9 两株单克隆抗体均能与 ARV σ C 蛋白发生特异性反应，表明制备的单抗特异性和反应原性良

好（图 14）。



M: 蛋白 Marker; 1: A1S9 与 σ 蛋白反应结果; 2: B2D9 与 σ 蛋白反应结果; 3: 阳性对照

M: Protein Marker; 1: A1S9 Mc Ab reacted with purified σ protein;

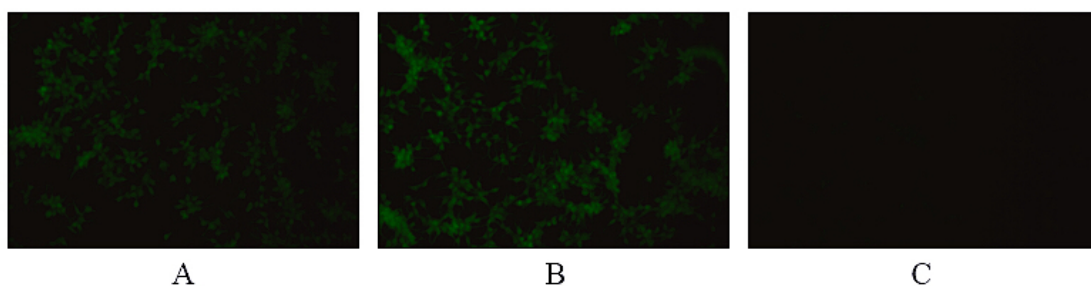
2: B2D9 Mc Ab reacted with purified σ protein; 3: positive control

图 14 Western-blot 分析鉴定

Fig.14 Western-blot analysis

3.4.间接免疫荧光鉴定

利用 ARV 感染的鸡胚肝细胞与制备的单抗进行间接免疫荧光试验，结果显示，制备的 2 株单抗均能够产生绿色的荧光，而对照组未观察到绿色荧光（图 14）。



A:A1S9 B:B2D9 C:阴性对照

A: A1S9 McAb; B:B2D9 McAb; C: Negative control

图 15 间接免疫荧光试验结果

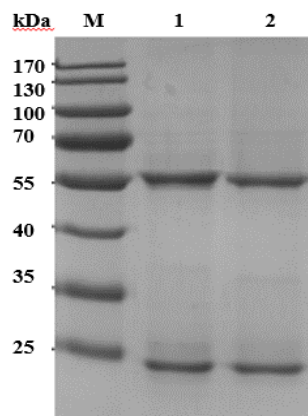
Fig.15 Results of IFA

3.4.7 稳定性试验

将筛选的杂交瘤细胞株分别于冻存后的 1 个月、3 个月、6 个月取出复苏测定效价，细胞培养上清液效价并未减低，说明细胞株分泌抗体的稳定性较好。

3.4.8 腹水纯化

利用 Quantity one 软件分析制备的单抗纯度达到 90%。利用超微量紫外分光光度计对制备的单抗进行浓度测定, 根据公式: 蛋白质浓度= $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 计算可得两株单抗 A1S9、B2D9 的抗体浓度分别是 1.7 mg/mL 和 1.5 mg/mL。纯化后的抗体轻链与重链明显(图 16)。



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 A1S9 单抗; 2: 纯化的 B2D9 单抗

M:Protein Marker; 1:purified McAb A1S9; 2: purified McAb B2D9

图 13 单抗纯化分析

Fig.13 SDS-PAGE analysis of the purified McAb

4 讨论

禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)首次由 Fahey 和 Crawley 于 1954 年从野鸡中分离出来,其引起的特征病变主要表现为关节肿胀、关节炎、腱鞘炎、腱鞘断裂等(Fahey *et al.*, 1954)。自此,ARV 开始在世界范围内被广泛报道,感染宿主广,包括鸡、火鸡、鸭、鹅、鸽子、鸚鵡、鸵鸟和野鸟等各种禽类,给世界各地家禽养殖业尤其是肉鸡养殖业带来巨大的经济损失。目前市面上应用的 ARV 疫苗大部分均以 S1133 株、1733 株为种毒制备,在相当长的一段时间内被推广应用并被证明在世界上大部分地区都有较好的免疫效果,在一定程度上控制了该病的发展。但是近年来各地禽呼肠孤病毒感染频繁发生,世界其他国家呼肠孤病毒变异株也均有报道。加拿大研究人员从萨斯喀彻温省商业禽场疑似 ARV 感染的肉鸡肌腱中分离出 37 株 ARV 毒株,与 S1133 疫苗株的氨基酸相似性仅有 53%; Tang 等人于美国宾夕法尼亚州肉鸡中分离到一株禽呼肠孤病毒 PA5511 株,其 σC 蛋白与 S1133 株核苷酸相似性为 54%,与 1733 株相似性为 54.1% (Tang *et al.*, 2015)。韩国研究者从韩国南部肉鸡场中分离到一株呼肠孤病毒 K738/14 株,该毒株与先前鉴定的 ARV 毒株相比具有较低的核苷酸相似性,其 σC 基因与疫苗株 S1133 株的氨基酸相似性为 59.9% (Noh *et al.*, 2018)。禽呼肠孤病毒野毒株与常规疫苗株(S1133,1733 和 2408)的基因差异,在一定程度上解释了疫苗免疫失败与 ARV 感染情况愈演愈烈的原因。

目前针对禽呼肠孤病毒的各种检测方法大都基于传统的 ARV 疫苗株,与当前流行的病毒株具有较大差异,存在漏检的风险。因此,本研究利用本实验室分离鉴定的 ARV 野毒株 LY383 株开展了血清学和病原学检测方法的建立,为 ARV 的防控提供了必要的技术手段。该毒株的遗传进化分析结果与美国分离的 Reo/PA/Broiler/15511/13 株同属一个进化分支,核苷酸相似性为 95.2%;与标准疫苗株 1733 和 S1133 遗传距离较远,核苷酸相似性分别为 51.3%和 51.2%(姜晓宁, 2018) (Chen *et al.*, 2019)。

4.1 核酸探针的制备

核酸探针可以特异性地与待检测核酸样品中的特定 DNA 或 RNA 发生杂交反应。地高辛是一种非放射性标记物,地高辛标记探针能够与特定的核酸发生杂交显色,并且对人体健康及环境没有危害,是目前应用较为广泛的一种标记方法。制备好的地高辛标记探针至少可以在-20°C 存放一年,变性后可以重复使用多次,极大的节省了试验耗材和时间。

本研究设计一对特异性的引物扩增 ARV 一段长 229bp 的序列,将纯化后的胶回收产物利用地高辛进行标记,制备核酸探针,建立地高辛标记核酸探针检测方法。特异性试验结果表明,H9-AIV、IBV、IBDV、FAV、NDV 核酸无法与该探针杂交显色,只有 ARV 与该探针杂交结果为阳性;敏感性试验结果表明,标记的探针最低可检出 50pg/ μ L 的核酸。将制备的探针保存在-20 $^{\circ}$ C 冰箱中,90d 后取出按照常规步骤杂交显色,仍可检测出阳性核酸样品,表明制备的探针具有较好的稳定性。以上结果表明本研究建立的地高辛标记的 ARV 核酸探针检测方法具有较好的特异性、敏感性和稳定性,操作简便,可大批量检测病料样本,适合进行 ARV 的临床诊断和流行病学调查。

4.2 ARV σ C 蛋白的原核表达

σ C 蛋白是 ARV 外壳表面的重要结构蛋白之一,可以诱导机体产生特异性抗体,激发机体粘膜反应和全身性免疫反应 (Shien *et al.*, 2000),是研制禽呼肠孤病毒 ELISA 检测方法较为理想的抗原蛋白。大肠杆菌等原核表达系统技术相对于真核表达系统更加成熟,并且具有成本低廉、操作简单、表达量大的优点,因此本研究利用原核表达载体 pET-32a 诱导表达 σ C 蛋白,将其作为包被蛋白建立间接 ELISA 检测方法。

首先根据 ARV 的 σ C 基因序列设计一对特异性扩增引物,利用 RT-PCR 方法扩增 σ C 基因并构建重组原核表达质粒 σ C-pET-32a,转入表达菌 DE3(BL21)中,获得以包涵体形式存在的融合蛋白,蛋白纯化后 Western blot 鉴定结果表明该蛋白具有良好的反应性。

4.3 检测 ARV 抗体间接 ELISA 方法的建立

通过棋盘稀释法确定蛋白最佳包被稀释度为 1:1000、血清最佳稀释度为 1:10;抗原最佳封闭条件为 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;最佳封闭液为 5%脱脂奶粉;兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体的最佳稀释度为 1:500。特异性试验表明,ARV 与其他病原体之间无交叉反应。通过板间和板内试验确定其变异范围为 4.85%~7.93%,具有较好的重复性。以上结果说明本研究建立的方法可应用于大规模血清学调查和 ARV 感染中的抗体水平的监测。利用该方法对从发病肉鸡场中采集的 363 份血清样本进行检测,检出率达到 92.8%。ARV 发病肉鸡场的高检出率可能与该病水平传播的主要方式有关(Pomeroy *et al.*, 2015)。

4.4 ARV σ C 单克隆抗体的制备与鉴定

单克隆抗体的制备过程受很多因素的影响,任何一个方面出现差错,都无法获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞,第一个关键因素是小鼠的免疫水平的高低。本研究采用纯化的 σ C 蛋白皮下免疫 BALB/C 小鼠,共计免疫三次,每次间隔两周。与纯化的全病毒为免疫原相比,利用制备的蛋白为免疫原极大提高了筛选细胞株的特异性,接种小鼠之后

可快速刺激小鼠体内 B 淋巴细胞的增殖分化, 产生特异性 B 淋巴细胞为后续细胞融合试验做准备。第二个关键因素是细胞融合的效率高低: sp2/0 细胞的状态、脾细胞和 sp2/0 融合比例、PEG 的质量及融合作用时间、饲养细胞的数量等均对融合的效率有较大影响(史良如等, 1986)。将 sp2/0 细胞连续传代培养 3~4 次后, 选择生长状态良好的细胞进行试验, 在开始融合之前使用 8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)对细胞进行处理, 以消除部分对氨基蝶呤不敏感的细胞, 避免在后期 HAT 选择培养时 sp2/0 细胞出现突变返祖现象。为了促进杂交瘤细胞的生长, 我们在加入培养基选择之前, 添加饲养层细胞来吞噬清除死亡的细胞, 产生生长刺激因子, 为杂交瘤细胞提供良好的生长条件(刁勇等, 2008)。融合剂 PEG4000 需 40°C 水浴预热后使用, 滴加入混合细胞时保证匀速滴加, 并且将时间控制在 2min 以内。

细胞融合产生的杂交瘤细胞的染色体是非常不稳定的, 容易丢失, 因而检测到特异性抗体后, 要及时进行有限稀释法亚克隆, 以防止产生单克隆抗体的细胞株不稳定而丢失染色体。本研究经过筛选鉴定, 保证每次筛选细胞阳性率达到 100%, 最终获得 2 株能稳定分泌 σ C 蛋白 IgG1 型单克隆抗体的杂交瘤细胞株, ELISA 效价测定结果显示, 上清效价为 1:100, 制备的小鼠腹水的效价分别为 1:128000 和 1:256000。Western blot 和 IFA 鉴定结果显示, 制备的单抗可与 σ C 蛋白发生特异性反应。杂交瘤细胞经过连续传代、冻存、复苏后细胞培养液上清效价并未减低, 其分泌抗体的稳定性较好。

5 结论

1. 建立了禽呼肠孤病毒地高辛核酸探针检测方法，该方法最低能检测到 50Pg 的 ARV 核酸，可应用于临床样本批量检测；
2. 建立了检测禽呼肠孤病毒抗体的间接 ELISA 方法；
3. 获得了 2 株能够稳定分泌禽呼肠孤病毒 σ C 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株 A1S9、B2D9，制备了腹水并对其相关特性进行了检测和鉴定，为后续研究提供了基础工具。

参考文献

- 曹维范. 肉鸡爆发蓝翅病时的死亡情况[J].当代畜牧, 1992(3):16-17.
- 董嘉文, 孙敏华, 尚毅, 胡奇林. 禽呼肠孤病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J].中国兽医学报, 2011, 31(7):961-964.
- 方勤, 朱作言. 水生呼肠孤病毒研究进展[J].中国病毒学, 2003(01):84-88.
- 高春亮, 蔡羲, 朱小丽, 陈少莺. 应用间接免疫荧光试验快速检测番鸭呼肠孤病毒病[C].福建省畜牧兽医学会学术年会. 2009.
- 霍现格, 鸭新城疫病毒 HN 蛋白单克隆抗体的制备及间接 ELISA 方法的建立[D].山东农业大学, 2015.
- 姜晓宁, 鸡源呼肠孤病毒的分离鉴定及对肉鸡的致病性研究[D].山东农业大学, 2018
- 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J].免疫学杂志, 2011(2):170-173.
- 李天芝, 于新友, 王金良, 沈志强. 禽呼肠孤病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].家禽科学, 2015(10):10-14.
- 廖敏, 谢芝勋, 谢志勤. 一步法 RT-PCR 检测禽呼肠孤病毒的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(1):53-55.
- 刘佩兰, 朱万光, 杜元钊, 范根成. 鸡病毒性关节炎免疫扩散试验研究[J].中国动物检疫, 1996(02):3-5.
- 刘文兴, 王劭, 吴宝成. 禽类呼肠孤病毒的分子生物学[J].福建畜牧兽医, 2004(26): 10-12.
- 毛雅元, 张力, 王寿山, 张立霞, 康亚男. 鸡病毒性关节炎疫苗的研究进展[J].养禽与禽病防治, 2014, (2):2-4
- 祁海波, 关平原, 乌日罕, 特木尔巴根, 马立峰, 于富丽, 李瑞纲. 禽呼肠孤病毒 C-98 分离株 M1 基因的克隆及序列分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2008, 29(3):26-29.
- 任倩. H9 亚型禽流感病毒单克隆抗体及胶体金试纸条的研制[D]. 扬州大学, 2014.
- 沈文康, 谢芝勋, 王盛. 禽呼肠孤病毒 S1133 株在 LMH 细胞系中增殖特征的研究[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(08): 1032-1035.
- 孙爱军, 庄国庆, 崔治中. 禽呼肠孤病毒分离株 P10、P17、 $\delta 3$ 蛋白基因的表达及抗血清的制备[J]. 病毒学报, 2006, 22(6):476-479.

- 孙美玉. 禽呼肠孤病毒检测方法的建立及病毒分离鉴定[D]. 中国农业科学院, 2012.
- 唐秀英, 王立南. 鸡新城疫、传染性支气管炎、病毒性关节炎三联油乳剂来活苗的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1992(3):10-15.
- 唐雨德, 孔崇华, 李普霖. 鸡病毒性关节炎国内外研究概况[J]. 中国预防兽医学报, 1992(6):57-58.
- 唐雨德, 周宗安, 翟春生, 王元伦, 顾志香. 鸡病毒性关节炎病毒适应 Vero 细胞的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1994(5):3-5.
- 汪招雄, 何启盖, 刘丽娜, 刘正飞, 黄红亮, 陈焕春. 检测伪狂犬病病毒双抗体夹心间接 ELISA 方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2):220-225.
- 王崇义, 俞晓春. 单克隆抗体标志乳胶凝集试验快速检测金黄色葡萄球菌及其耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(2):126-128.
- 王锡堃, 唐秀英, 刘庆祥. 应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎[J]. 家畜传染病, 1985.
- 王莹, 谢芝勋, 刘加波. 禽呼肠孤病毒 RT-LAMP 可视化检测方法的建立[C]. 中国畜牧兽医学会禽病学分会学术研讨会. 2010.
- 魏凤, 王金良, 王艳. 一株鸡呼肠孤病毒的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (02): 103-105+243.
- 吴巧梅, 刘光清, 陈宗艳. 禽源呼肠孤病毒 S1 基因节段分子生物学研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(4):74-81.
- 肖成蕊, 梁基. 鸡病毒性关节炎病毒的分离和鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1989(9):4-6.
- 谢芝勋, 廖敏, 刘加波, 邓显文, 庞耀珊, 谢志勤, 唐小飞. 禽呼肠孤病毒地高辛探针的制备及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6):407-410.
- 谢芝勋, 刘加波, 庞耀珊, 邓显文, 谢志勤. 应用半套式聚合酶链反应检测禽呼肠孤病毒 S1 基因的研究[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(3):6-8.
- 谢志勤, 谢芝勋, 刘加波, 庞耀珊, 邓显文, 谢丽基, 范晴. 禽呼肠孤病毒 S1733 株单克隆抗体的制备及夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(05):49-52.
- 徐建生, 唐波, 成大荣, 董国雄, 吕玲. 禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备与初步应用[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2):89-92.
- 杨国平, 坦布苏病毒 NS5 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定及快速检测胶体金试纸条方法的建立[D]. 山东农业大学, 2015.
- 于相龙. 鹅细小病毒单克隆抗体的制备及胶体金免疫层析检测方法的建立[D]. 山东农业

- 大学, 2018.
- 于新友, 李天芝, 魏凤. 1 株新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 养禽与禽病防治, 2016(08):10-13.
- 张昶, 任向阳, 刘秋燕, 吴青, 陈陆. 单克隆抗体在畜禽疫病诊断中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(5):93-95.
- 赵巍. J 亚群禽白血病病毒抗体快速检测试纸条的研制[D]. 扬州大学, 2018.
- 赵月兰, 秦建华. 鸡病毒性关节炎研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 1995(2):29-31.
- 甄永苏. 单克隆抗体药物治疗肿瘤的研究现状与展望[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(1):9-13.
- 钟丽. 禽呼肠孤病毒流行株的进化及致病性研究[D]. 中国农业科学院, 2017.
- 朱万光, 杜元钊. 鸡病毒性关节炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 1996(2):3-4.
- 祖立闯, 王金良, 李娇. 胶体金免疫层析技术在动物疫病诊断上的应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(8):101-105.
- Ahmad M, Mccaffery A R. Characterization of an avian reovirus isolated in Queensland[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1973, 83(3):387-400.
- Barta V, Springer W T, Millar D L . A Comparison of Avian and Mammalian Cell Cultures for the Propagation of Avian Reovirus WVU 2937[J]. *Avian Diseases*, 1984, 28(1):216-223.
- Benavente J, Jose Martínez-Costas. Avian reovirus: Structure and biology[J]. *Virus Research*, 2007, 123(2):0-119.
- Borodavka A, Ault J , Stockley P G , et al. Evidence that avian reovirus σ NS is an RNA chaperone: implications for genome segment assortment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(14):7044-7057.
- Chen P N. Antibody responses against avian reovirus nonstructural protein sigma NS in experimentally virus-infected chickens monitored by a monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Research in Veterinary Science*, 2004, 76(3):219-225.
- Curtis P E, Al-Mufarrej S I, Jones R C , et al. Tenosynovitis in young pheasants associated with reovirus, staphylococci and environmental factors[J]. *The Veterinary record*, 1992, 131(13):293.

- Kibenge F S B, Jones R C , Savage C E . Effects of experimental immunosuppression on reovirus - induced tenosynovitis in light - hybrid chickens[J].*Avian Pathology*, 1987, 16(1):20.
- Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined Lin Y.H., Lee L.H., Shih W.L., Hu Y.C., Liu H.J., Baculovirus surface display of sigma C and sigma B proteins of avian reovirus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model[J]. *Vaccine*, 2008, 26(50): 6361-6367.
- Liu H J, Lee L H , Shih W L , et al. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism[J]. *Avian Pathology*, 2004, 33(2):171-180.
- Mackenzie M A, Bains B S. Tenosynovitis in chickens.[J]. *Australian Veterinary Journal*, 1977, 53(4):468-470.
- Meanger J, Wickramasinghe R, Enriquez C E. Immune response to avian reovirus in chickens and protection against experimental infection[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 75(6):428-432.
- Mertens. The dsRNA viruses. *Virus Research*, 2004. 101(1): 3-13.
- Montgomery R D, Villegas P, Dawe D L , et al. Effect of avian reoviruses on lymphoid organ weights and antibody response in chickens[J]. *Avian Diseases*, 1985, 29(2):552-560.
- Montgomery R D, Villegas P , Kleven S H . Role of Route of Exposure, Age, Sex, and Type of Chicken on the Pathogenicity of Avian Reovirus Strain 81-176[J]. *Avian Diseases*, 1986, 30(3):460-467.
- Ni Y, Kemp M C. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Diseases* [J], 1995, 39: 554.
- Noh J Y, Lee D H , Lim T H , et al. Isolation and genomic characterization of a novel avian orthoreovirus strain in Korea, 2014[J]. *Archives of Virology*, 2018.
- Nwajei B N C, Al Afaleq A , Jones R C . Comparison of chick embryo liver and vero cell cultures for the isolation and growth of avian reoviruses[J]. *Avian Pathology*, 1988, 17(4):759-766.
- Osikowicz G, Beggs M, Brookhart P, et al. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choriogonadotropin in urine.[J].*Clinical Chemistry*, 1990,

- 36(9):1586.
- Palomino-Tapia, V., Mitevski, D., Inglis, T., van der Meer, F., and Abdul-Careem, M. F. (2018). Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012–2017 based on partial sigma (σ)C gene. *Virology*, 2018,522:138-146
- Palya V, Glávits, Róbert, Dobos-Kovács, Mihály, et al. Reovirus identified as cause of disease in young geese[J]. *Avian Pathology*, 2003, 32(2):129-138.
- Pomeroy D R D S. Avian Reoviruses. I. Isolation and Serological Characterization[J]. *Avian Diseases*, 1969, 13(2):239-243.
- Preechakasedkit P, Pinwattana K, Dungchai W. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in human serum[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 31(1):562-566.
- Reiter D M, Frierson J M, Halvorson E E, et al. Crystal structure of reovirus attachment protein σ 1 in complex with sialylated oligosaccharides.[J]. *Plos Pathogens*, 2011, 7(8):002166.
- Rosenberger M D R K. Concurrent Infections with Reoviruses and Coccidia in Broilers[J]. *Avian Diseases*, 1985, 29(2):465-478.
- Shapouri M R, Arella M , Silim A . Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein.[J]. *Journal of General Virology*, 1996, 77 (Pt 6)(6):1203.
- Sharafeldin T A , Mor S K , Bekele A Z , et al. Experimentally induced lameness in turkeys inoculated with a newly emergent turkey reovirus[J].*Veterinary Research*, 2015, 46(1):11.
- Shien J H, Yin H S , Lee L H . An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to avian reovirus by using protein sigma B as the coating antigen.[J]. *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(2):107-112.
- Slaght S S, Yang T J , Heide L V D , et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity.[J]. *Avian Diseases*, 1978, 22(4):802-805.

- Spandidos D A, Graham A F. Physical and chemical characterization of an avian reovirus[J]. *Journal of Virology*, 1976, 19(3):968.
- Tang Y, Lu H . Genomic characterization of a broiler reovirus field strain detected in Pennsylvania[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 31:177-182.
- Tang Y, Lu H . Genomic characterization of a novel avian arthritis orthoreovirus variant by next-generation sequencing.[J].*Archives of Virology*, 2015, 160(10):2629-32.
- Tao Yun, Haipeng Chen. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to novel duck reovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 220:55-59.
- Touris-Otero F, José Martínez-Costas, Vakharia VN. Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures[J]. *Virology*, 2004, 319(1):94-106.
- TouriS-Otero F, MarttiN C S, José Martnez-Costas. Avian Reovirus Morphogenesis Occurs Within Viral Factories and Begins with the Selective Recruitment of σ NS and λ A to μ NS Inclusions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 341(2):0-374.
- Van D H L. The history of avian reovirus. *Avian Diseases* [J], 2000, 44: 638.
- Van d H L. The history of avian reovirus.[J]. *Avian Diseases*, 2000, 44(3):638-641.
- Varela R, Benavente J . Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133.[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(10):6775.
- Varela R, J Martínez-Costas, Mallo M , et al. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(5):2974-2981.
- Vindevogel H, Meulemans G, Pastoret P P, et al. Reovirus infection in the pigeon[J]. *Annales De Recherches Vétérinaires Annals of Veterinary Research*, 1982, 13(2):149.
- Walker R H. DNA probe technology in parentage testing[J]. *Immunoematology*, 1989,
- Wu H., Williams Y., Gunn K.S., Singh N.K., Locy R.D., Yeast-derived sigma C protein-induced immunity against avian reovirus[J]. *Avian Disease*, 2005, 49(2): 281-284.
- Xie Z, Qin C, Xie L , et al. Recombinant protein-based ELISA for detection and differentiation of antibodies against avian reovirus in vaccinated and non-vaccinated chickens[J].*Journal of Virological Methods*,2010, 165(1):108-111.

- Yang Z J, Wang C Y , Lee L H , et al. Development of ELISA kits for antibodies against avian reovirus using the σ C and σ B proteins expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of virological methods*, 2009, 163(2):169-174.
- Yawei Ni Kemp N M C. A Comparative Study of Avian Reovirus Pathogenicity: Virus Spread and Replication and Induction of Lesions[J]. *Avian Diseases*, 1995, 39(3):554-566.
- Yin C H, Qin L T , Sun M Y , et al. Antigenic Analysis of Monoclonal Antibodies against Different Epitopes of σ B Protein of Avian Reovirus[J]. *PLOS ONE*, 2013, 8.
- Zhang Y, Liu M, Hu Q. Characterization of the σ C-encoding Gene from Muscovy Duck Reovirus. *Virus Genes* [J], 2006, 32: 165.
- Zheng X, Wang D , Ning K , et al. A duck reovirus variant with a unique deletion in the sigma C gene exhibiting high pathogenicity in Pekin ducklings[J]. *Virus Research*, 2016, 215:37-41

致谢

三年的研究生生活即将结束，转眼毕业论文的撰写也到了最后的致谢阶段。回首过去的三年，感慨颇多，收获颇多，也成长了颇多。经过三年的学习与磨砺，让我对兽医学科的认识与了解更加深入，同时在各个方面也得到了锻炼，使自己能够更加适应即将到来的大社会环境。

首先，感谢我的老师胡敬东副教授、刁有祥教授、唐熠教授。本论文从选题到开始试验到最后论文的撰写，都离不开三位老师的耐心指导。胡老师为人谦和，注重细节，时时督促着我们不要松懈、继续向前。刁老师治学严谨，指导试验的进行、关心我们的生活。唐老师学识渊博、年轻有为，在实验过程中为我们拨开迷雾，指引方向。

感谢陈浩师兄、窦砚国师兄、张秉乾师兄、张欣师姐，在他们的帮助下，我完成了从刚进实验室的茫然无知到逐步进入试验的正轨的转变。感谢王振忠师兄、于相龙师兄、牛晓宇师兄，在实验过程中给与的积极建议与帮助。感谢杨晶师姐，在生活与学习上给与的关心与帮助；感谢姜晓宁、孙晓梅、王雅雯、刘乘聿同学，从本科到研究生的持续陪伴。感谢实验室的师弟师妹和所有小伙伴们，希望大家都能有一个美好的未来。

感谢李杰，在各个方面给予的关爱与呵护，感谢你一直的陪伴与鼓励。感谢我的父母与我最乖巧的妹妹，离家七年，你们无条件的支持与鼓励是我最坚强的后盾。

自此，我的学生时代将告一段落，而于我的人生来说却仅仅只是一个逗号，我将以饱满的激情面对新征程的开始！

攻读硕士学位期间发表论文情况

Zhipeng Wei¹, **He Liu**¹, Youjiang Diao, Xudong Li, Shuai Zhang, Bin Gao, Yi Tang, Jingdong Hu^{*}, Youxiang Diao^{*} Pathogenicity of Fowl Adenovirus (FAdV) Serotype 4 Strain SDJN in Taizhou Geese (Accept) 《Avian Pathology》 (2区, IF=1.88) (共同第一, 第二位)