



分类号 S855.3

学号 2017107074

南京农业大学

硕士学位论文

血清 4 型禽腺病毒 JS 株的分离鉴定及其 hexon 蛋白单克隆抗体的制备

陈雨晴

指导教师	<u>闫丽萍</u>
学科门类	<u>农学</u>
一级学科	<u>兽医学</u>
二级学科	<u>预防兽医学</u>
研究方向	<u>动物病毒学与免疫学</u>
答辩日期	<u>二〇二〇年六月四日</u>

**Isolation and Identification of Serotype 4 Fowl Adenovirus JS
Strain and Preparation of Monoclonal Antibody Against Hexon
Protein**

By

CHEN YUQING

A Thesis

Presented to Nanjing Agricultural University

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master Degree of

Master of Agronomy

in

Preventive Veterinary Medicine

Supervised by

Professor YAN LIPING

Nanjing Agricultural University

Nanjing, China

June 2020

原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者（需亲笔）签名：陈雨晴

2020年 6月 20日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校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。本人授权南京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、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

保密，在____年解密后适用本授权书。本学位论文属于不保密.

（请在以上方框内打"√"）

学位论文作者（需亲笔）签名：陈雨晴

2020年 6月 20日

导师（需亲笔）签名：闵研华

2020年 6月 20日

**本研究由国家重点研发计划项目 (2016YFD0501600)资
助**

**This study was supported by
National Key R&D Program of China (NO.
2016YFD0501600)**

目 录

目 录.....	I
摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
缩略语中英文对照 (ABBREVIATION)	VII
本研究的目的与意义.....	IX
第一部分 文献综述.....	1
第一章 禽腺病毒的研究进展.....	1
1 禽腺病毒的病原学.....	1
1.1 禽腺病毒的分类.....	1
1.2 禽腺病毒结构.....	2
1.3 禽腺病毒蛋白及其功能.....	3
2 禽腺病毒流行病学.....	5
3 禽腺病毒的致病性.....	5
3.1 包涵体肝炎.....	5
3.2 心包积液-肝炎综合征.....	6
3.3 肌胃损伤.....	6
3.4 免疫抑制.....	6
4 禽腺病毒诊断方法.....	7
4.1 免疫学方法.....	7
4.2 分子生物学方法.....	8
5 禽腺病毒单克隆抗体的研究进展.....	9
6 实验目的与意义.....	9
第二部分 实验部分.....	11
第二章 一株禽 4 型腺病毒 JS 株的分离鉴定和基因进化分析.....	11
1 材料与方法.....	12
1.1 病毒采集及 SPF 鸡胚.....	12
1.2 主要试剂.....	12
1.3 仪器设备.....	13
1.4 样品采集.....	13

1.5 病毒鉴定	13
1.6 病毒 DNA 的提取	14
1.7 引物设计与合成	14
1.8 FAdV-4 毒株的鉴定	15
1.9 hexon 基因的扩增	15
1.10 琼脂糖凝胶电泳	16
1.11 pMD-18T-hexon 载体构建	16
1.12 序列分析	16
2 结果	17
2.1 病毒分离与鉴定	17
2.2 hexon 基因全场扩增	17
2.3 hexon 基因序列分析	18
3 讨论	20
4 本章小结	21
第三章 禽腺病毒分离株的适应性及致病性研究	23
1 材料与方法	23
1.1 毒株与细胞	23
1.2 鸡胚与实验动物	23
1.3 主要试剂	23
1.4 设备与仪器	24
1.5 鸡胚尿囊腔接种	24
1.6 LMH 细胞培养	24
1.7 原代鸡胚肾细胞制备	24
1.8 细胞接毒	25
1.9 DNA 提取	25
1.10 PCR 扩增	25
1.11 病毒的生长动力学测定	25
1.12 TCID ₅₀ 测定	25
1.13 病毒对鸡的致病性试验	25
1.14 标准质粒的构建	26
1.15 标准曲线的绘制	26
1.16 病毒的组织分布检测	27

2 结果	27
2.1 JS 株适应性检测	27
2.2 病毒生长曲线	28
2.3 JS 株在 LMH 上传代病毒滴度变化	29
2.4 标准曲线的建立	30
2.5 JS 株对 SPF 鸡的致病性	30
2.6 病毒组织分布	32
3 讨论	34
4 本章小结	35
第四章 4 型禽腺病毒 HEXON 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定	37
1 材料与方法	37
1.1 细胞、实验动物	37
1.2 菌株和毒株	37
1.3 主要试剂	37
1.4 主要仪器	38
1.5 免疫原的制备	38
1.6 动物免疫	39
1.7 多克隆抗体效价检测	40
1.8 骨髓瘤细胞的培养	40
1.9 饲养层细胞的制备	40
1.10 细胞融合	40
1.11 杂交瘤细胞的筛选	41
1.12 亚克隆杂交瘤细胞	42
1.13 单抗细胞保种	42
1.14 单克隆抗体腹水的制备	42
1.15 单克隆抗体鉴定	43
1.16 单抗腹水的制备	43
2 结果	45
2.1 hexon-1 基因的扩增	45
2.2 原核表达载体的验证	45
2.3 单克隆抗体的鉴定	47
2.4 纯化腹水的鉴定	49

3 讨论	50
4 本章小结	51
全文总结	53
参考文献	55
致 谢	67
攻读学位期间发表的学术论文目录	69

血清 4 型禽腺病毒 JS 株的分离鉴定及其 hexon 蛋白单克隆抗体的制备

摘要

血清 4 型禽腺病毒病 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 是以心包积液-肝炎综合征 (hydropericardium-hepatitis syndrome, HHS) 为主要症状的病毒性传染病, 其剖检特征是心包内积聚清澈的浅黄色液体, 肝肿大、变色、可见出血灶。HHS 主要影响 3~6 周龄的肉鸡, 可造成 20~80% 的死亡。2015 年 5 月以来, 我国陆续报道了一种由新型基因型 FAdV-4 导致的 HHS, 给家禽业造成了巨大的经济损失。FAdV-4 的毒力决定因素和 HHS 发病机制的分子机制目前尚不清楚。本研究从发生 HHS 症状的病鸡肝脏组织中分离获得一株 FAdV-4, 并命名为 FAdV-4 JS 株。同时对分离获得的病毒进行适应性和致病性研究并通过杂交瘤技术制备了针对 FAdV-4 hexon 蛋白的单克隆抗体, 为 FAdV-4 的检测及流行病学调查奠定了基础。具体研究如下:

1. 一株禽 4 型腺病毒 JS 株的分离鉴定与 hexon 基因进化分析

本研究成功分离 1 株 I 群禽腺病毒, 命名为 FAdV-4 JS 株。该分离株不具有凝集鸡红细胞的功能。通过对该分离株 hexon 基因的测序, 并与其他禽腺病毒进行同源性分析, 发现 FAdV-4 JS 株与我国现有流行株 CH/HNJZ/2015、SCnj 以及 JSJ13 同源性为 100%, 序列遗传进化树也显示 JS 株与 CH/HNJZ/2015 等参考毒株位于同一分支; 与加拿大分离株 ON1 同源性为 98.7%。因此证明本研究分离株为 I 群禽腺病毒, 血清型为 4 型。通过对 hexon 基因氨基酸序列比对分析发现 JS 株与国内流行毒株 CH/HNJZ/2015、SCnj 以及 JSJ13 等相比, 没有发生突变, 但与 ON1 毒株差异性较大。该分离株的分离鉴定为监测我国禽腺病毒的流行情况提供了一定的参考, 也为本实验室后续研究奠定了基础。

2. 禽 4 型腺病毒 JS 株的适应性及致病性研究

将分离获得的 FAdV-4 JS 株在 SPF 鸡胚上通过尿囊腔接种传代, 同时在鸡胚肾细胞 (chicken embryo kidney cells, CEK) 以及鸡肝癌细胞 (leghorn male hepatocellular, LMH) 上连续传代, 并进行核酸检测。结果显示 FAdV-4 JS 株可以很好的在 LMH 细胞上传代, 且毒价一直稳定在 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 以上, 最高

效价可达到 $10^{8.0}$ TCID₅₀。同时, 将 JS 株以 MOI=0.01 感染 LMH 细胞, 测定其生长曲线, 发现该毒株可以很好的在 LMH 细胞上增殖, 在接毒后 84 h 病毒效价可达 $10^{8.0}$ TCID₅₀。同时, 本研究将 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 的病毒用肌肉注射或口服的方式感染 21 日龄 SPF 鸡, 连续观察 14 d。结果发现, 肌注组鸡在攻毒后 24 h 有精神沉郁的症状, 在攻毒后第 2~3 d 大批量死亡, 死亡率达 90%; 而口服组鸡一直没有观察到明显的临床症状, 死亡率为 0。病死鸡剖检可见心包积液, 肝脏肿大发黄、肾脏肿大出血和脾肿大等明显症状; 荧光定量 PCR 检测结果显示, 病毒在鸡体内多个组织器官均有分布。攻毒后每间隔 1 天收集试验动物的咽、肛拭子并进行病毒的定量检测, 发现在攻毒后 24 h 就可以在咽、肛拭子中检测到病毒存在, 其中第 II 组试验动物在攻毒后第 3 天肛拭子排毒量超过 1000copies/mg; 第 III 组试验动物在攻毒后呈递减趋势, 攻毒后第 1~3 天病毒含量超过 1000copies/mg, 第 5 天病毒含量在 100~1000copies/mg, 第 7 天病毒含量低于 100 copies/mg, 在攻毒后第 9 天转阴, 直至试验结束。

3. 禽 4 型腺病毒 hexon 蛋白单抗的制备与鉴定

选择 hexon 序列前 1500 bp 片段扩增并构建到原核表达载体 pCold I 上, 命名为 pCold I-hexon-1。用纯化的重组蛋白作免疫原, 免疫 BALB/c 雌性小鼠, 用间接 ELISA 法筛选血清抗体效价高的小鼠进行细胞融合, 并筛选阳性杂交瘤细胞。经 4 轮亚克隆, 最终获得 3 株能稳定分泌抗 hexon 单抗的杂交瘤细胞株, 依次命名为 4G9、6C6 和 6E10。间接 ELISA 法检测杂交瘤细胞的抗体效价, 上清效价分别为 1:256、1:4096、1:512, 其中 4G9 和 6E10 腹水抗体效价为 $1:10^7$ 和 $1:10^8$; 三株抗体的亚型鉴定结果是均为 *kappa* 轻链, 其中 4G9 和 6C6 为 IgG1 亚类, 6E10 为 IgG2b。Western blot 和 IFA 分析表明 3 株单抗既能与纯化的 hexon 蛋白反应又能与病毒感染的 LMH 细胞发生特异性反应。这三株单克隆抗体的制备为 FAdV-4 诊断方法的建立奠定了基础, 也为本实验室后续研究提供了有力的工具。

关键词: 血清 4 型禽腺病毒; 分离; 致病性; hexon 蛋白; 单克隆抗体

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FOWL ADENOVIRUS SEROTYPE 4 JS STRAIN AND PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HEXON PROTEIN

ABSTRACT

Fowl adenovirus serotype 4 is a member of the avian adenovirus C family which belongs to the avian adenovirus genus of the *adenoviridae* family. FAdV-4 is the main cause of hydropericardium-hepatitis syndrome, which is characterized by the accumulation of clear light yellow fluid in the pericardium, hepatomegaly, discoloration, visible bleeding. HHS mainly affects broilers at 3 to 6 weeks old, causing 20 to 80% mortality. Since May 2015, China has successively reported HHS outbreaks caused by a new genotype FAdV-4, causing huge economic losses to the poultry industry. The virulence determinants of FAdV-4 and the molecular mechanism of the pathogenesis of HHS are unclear. Studies have confirmed that fiber2 and hexon are closely related to the virulence of FAdV-4. In this study, a FAdV-4 strain was isolated from the liver tissue of sick chickens with HHS symptoms, and named FAdV-4 JS strain. At the same time, the isolated virus was studied for its adaptability and pathogenicity, and monoclonal antibodies against FAdV-4 hexon protein were prepared by hybridoma technology, which laid the foundation for the detection and epidemiological investigation of FAdV-4. The main contents of this researches were as following:

1. Isolation and identification of JS strain of FAdV-4 and evolutionary analysis of hexon gene.

This study successfully separate a strain of group I of fowl adenovirus, named JS FAdV-4 strain. The isolate didn't have the function of agglutinating chicken erythrocytes. Through sequencing analysis of the hexon gene and homology analysis with other avian adenoviruses, it was found that the FAdV-4 JS strain was 100% homologous to the existing epidemic strains CH/HNJZ/2015, SCnj and JSJ13 in China, and the sequence genetic phylogenetic tree also showed that the JS strain was in the same branch with the reference strains such as CH/HNJZ/2015. It has 98.7% homology with Canadian ON1 isolate. Therefore, it was proved that the isolate of this study was group I avian adenovirus, and the serotype was type 4. Analysis of the amino acid sequence of the hexon gene revealed that no mutation occurred in the JS strain compared with CH/HNJZ/2015. However, it is quite different from ON1 strain.

These differences may be responsible for the differences in virulence of the virus. The isolation and identification of the isolate provided a certain reference for detecting the epidemic situation of avian adenovirus in China, and also laid the foundation for subsequent research in the laboratory.

2. Study on the adaptability and pathogenicity of JS strain of avian adenovirus type 4

The isolated FAdV-4 JS strain was inoculated and passed on the SPF chicken embryo through the allantoic cavity, and passed on CEK and LMH continuously, nucleic acid detection was conducted. The results showed that FAdV-4 JS strain could be passed on LMH cells well, and the toxicity value was stable at $10^{6.0}$ TCID₅₀, with the most efficient value reaching $10^{8.0}$ TCID₅₀. At the same time, JS strain was used to infect LMH cells with MOI=0.01, and its growth curve was measured. It was found that this strain could proliferate on LMH cells well. Meanwhile, in this study, $10^{6.0}$ TCID₅₀ virus was injected intramuscularly or orally to infect 21-day-old SPF chickens, observed continuously for 14 days. The results showed that the chickens in the intramuscular injection group had the symptom of mental depression 24 h after the challenge, and died in large quantities on the 2nd ~ 3rd day after the challenge, with the mortality rate up to 90%. In the oral group, no significant psychiatric symptoms were observed and the mortality rate was 0. At autopsy, the dead chicken showed obvious symptoms such as pericardial effusion, liver enlargement and yellowing, kidney enlargement and bleeding, and splenomegaly. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the virus was distributed in many tissues and organs in chickens.

3. Preparation and identification of hexon monoclonal antibody for FAdV-4

The top 1500 bp sequence fragment of hexon gene were choosed for amplification and build to the prokaryotic expression vector pCold I, which named pCold I-hexon-1. The purified prokaryotic expressed recombinant protein pCold I-hexon-1 was used as immunogen to immunize female BALB/c mice, and mice with high serum antibody titer were selected for cell fusion, then the hybridoma cells were screened by indirect ELISA. After 4 subclones, three hybridoma cells stably secreting anti-hexon were obtained, which were named as 4G9, 6C6 and 6E10. The antibody titers of the supernatants of the three hybridoma cells were 1:256, 1:4096 and 1:512 by indirect ELISA, and the 4G9 and 6E10 titers of ascites were $1:10^7$ and $1:10^8$. The isoforms of the three antibodies were all identified as kappa light chain, of which 4G9 and 6C6 were IgG1 subclasses and 6E10 were IgG2b. Western blot and IFA

analysis showed that the three mAbs could react with not only the purified hexon protein but also the virus-infected LMH cells. The preparation of these three monoclonal antibodies provides a good tool for the establishment of the FAdV-4 diagnostic method and a powerful tool for the follow-up research in this laboratory.

KEY WORDS: fowl adenovirus serotype 4; isolation; pathogenicity; hexon protein; monoclonal antibody

缩略语中英文对照 (Abbreviation)

英文缩写	英文名称	中文名称
aa	Amino acid	氨基酸
bp	Base pair	碱基对
CEK	Chicken embryo kidney cells	鸡胚肾细胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FAdV	Fowl adenovirus	禽腺病毒
g	Gram	克
h	Hour	小时
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Immunofluorescence assay	免疫荧光实验
IPTG	Isopropyl-P-D-thiogalactoside	异丙基硫代-P-D-半乳糖苷
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LMH	leghorn male hepatocellular	鸡肝癌细胞
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
ng	Nanogram	纳克
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RPM	Rotation per minute	每分钟转数
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
μL	Microlitre	微升

本研究的目的是与意义

4型禽腺病毒引起的禽类心包积液-肝炎综合征是一种新型疾病，其典型症状的3~5周龄肉鸡、蛋鸡突然死亡，主要病理特征是心包内出现黄色水样或胶冻状物、肝脏肿大等。该病对我国养禽业造成了严重的经济损失。

本研究从江苏某发病鸡场中成功分离一株FAdV-4病毒，分析了该病毒的致病性及适应性并制备了FAdV-4主要结构蛋白hexon的特异性抗体。

本研究将为制备FAdV-4灭活疫苗研究奠定基础，为更好的预防和降低FAdV-4对养禽业的威胁具有重要意义。

第一部分 文献综述

第一章 禽腺病毒的研究进展

从2015年开始,血清4型禽腺病毒(fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4)在我国大范围流行并引起了包涵体肝炎(inclusion body hepatitis, IBH)和心包积液-肝炎综合征(hydropericardium-hepatitis syndrome, HHS),造成鸡群大量死亡,给养禽业带来了巨大的经济损失,引起了养禽业者的关注。其中,I群禽腺病毒(fowl adenovirus group I, FAdV-I)和减蛋下降综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDSV)对家禽影响最大。感染I群禽腺病毒后,鸟类主要有两种不同的临床症状,第一种IBH,典型的剖检变化是灰白色肝脏和出血;第二种是HHS,主要由FAdV-4感染引起,典型的剖检变化是心包积液和肝脏肿大。

1 禽腺病毒的病原学

1.1 禽腺病毒的分类

禽腺病毒是腺病毒科、禽腺病毒属的成员,腺病毒科其他几个属分别为胸腺病毒属、哺乳动物腺病毒属、鱼类腺病毒属和唾液腺病毒属^[1]。其中,禽腺病毒属主要感染的禽类除了常见的家禽,如,鸡、鸭、鹅之外也感染野生动物,如鹌鹑、火鸡等。根据病毒抗原结构的不同,禽腺病毒属可分为三个亚群(I~III)。根据血清交叉中和试验和基因组分析可以将I群禽腺病毒分为5个种(FAdV A~FAdV E)和12个血清型(FAdV 1~7, 8a, 8b, 9~11)^[2]。这类病毒主要导致禽类出现IBH、HHS、砂囊侵蚀和溃疡这三种病理表现^[3]。在12个血清型中,FAdV-2、8a、8b和11血清型普遍引起IBH,而FAdV-4则是引起禽类发生HHS的主要病原体^[4]。近年来,由于病毒毒力增强,FAdV-4导致的HHS在我国暴发,给家禽业造成了巨大的经济损失^[5]。II群禽腺病毒主要为火鸡出血性肠炎病毒(hemorrhagic enteritis virus, HEV)和雏鸡大理石病病毒,其主要症状为出血性肠炎和典型的脾大理石样病变。III群禽腺病毒主要导致的是鸡减蛋下降综合征^[6, 7]。

表 1-1 禽腺病毒分类^[8]

Table 1-1 classification of avian adenovirus		
群	基因型划种	血清分型
I	A	1
	B	5
	C	4、10
	D	2、3、9、11
	E	6、7、8a、8b
II	火鸡出血性肠炎病毒 雏鸡大理石病病毒	
III	减蛋综合征	

1.2 禽腺病毒结构

腺病毒是一种无囊膜的线性双链 DNA 病毒，呈二十面体对称结构（图 1）^[9, 10]。病毒粒子呈球形，直径在 70~90nm，常被用来作为生物载体^[7, 11]。禽腺病毒基因组大小在 26~48 kbp 左右，携带 22~40 个基因，但该病毒不分节段，而是线性的，也正因如此，该病毒非常稳定^[12]。禽腺病毒由 252 个壳粒构成病毒衣壳，其中 240 个壳粒分布在每个面上，构成了六邻体（hexon）；剩下的 12 个壳粒分布在二十面体的顶角上构成了五邻体蛋白（penton），五邻体的基底部分（penton base）可伸出 1~2 个纤突（fiber），长度约 9~77.5nm^[10, 13-15]。腺病毒每条线性 DNA 的 5'端都有一个大小约 55 kDa 的末端蛋白，与病毒的复制有密切联系。不同属的腺病毒的 GC 含量差别较大，其中禽腺病毒的 GC 含量在 54~55%之间；人甲型肝炎病毒的 GC 含量在 48~59%；绵羊腺病毒 GC 含量约 33.6%；鸡减蛋综合征病毒的 GC 含量在 42.5%^[16, 17]。

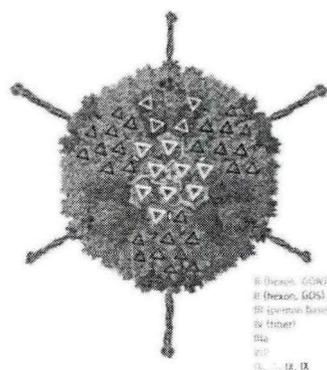


图 1-1 禽腺病毒结构示意图

Fig.1-1 Structure of avian adenovirus

1.3 禽腺病毒蛋白及其功能

腺病毒蛋白一般分为结构蛋白和非结构蛋白两类，其中结构蛋白分为衣壳蛋白和核蛋白；非结构蛋白主要包括 E1A、E1B、E2A、E3、E4 等^[18]。病毒毒粒由 14 条多肽组成。其中，多肽 II 为六邻体；III 为五邻体；IIIa 为五邻体周围蛋白；IV 为纤维蛋白 62K；V 为核心蛋白；VI 为六邻体相关蛋白；VII 为核心蛋白 II；VIII 为五邻体相关蛋白；9 个六邻体构成的特异性蛋白为 IX；TP 为 DNA 的末端蛋白。

1.3.1 六邻体蛋白

六邻体蛋白通常以三聚体形式存在，主要编码 942 个氨基酸，大小约 109 kDa，是腺病毒颗粒中最丰富的蛋白质，最主要的结构蛋白，也是腺病毒抗原特性的主要决定因素^[19-21]。因此 hexon 在研究禽腺病毒鉴别诊断和抗原制备等方面有着重要意义。根据电镜和 X-线晶体衍射可观察到六邻体三聚体有一个五面体的基地和一个三角形的塔尖，包括两个非常保守的基座区 p1、p2 和 4 高变环区 Loop1、Loop2、Loop3、Loop4^[22-24]。L1 和 L2 伸出病毒粒子表面且位于六邻体前段和中段，有大量抗原性高峰及密集的亲水性高峰区域，具有较强的抗原性和暴露性，是产生特异性表位和高价抗病毒特异性抗体的好选择^[9]。其后段主要由 L4 和 p2 组成，疏水性氨基酸残基较多暴露性差，导致其后段抗原性较弱^[25-27]。L3 编码的氨基酸一般位于蛋白表面，是参与免疫反应的重要抗原决定簇^[28-30]。在结构上，六邻体三聚体在每个面上形成平面的片状结构，对粒子的轻微破坏会产生所谓的“GONs”。

1.3.2 五邻体蛋白

五邻体蛋白大小约 63 kDa，由 5 个分子多肽 IIIa 蛋白合在一起构成。该蛋白还有类毒素活性，纯化后的五邻体在没有其他病毒蛋白存在的情况下可导致细胞病变^[27,31]。在病毒感染细胞时，五邻体起着至关重要的作用，它通过与细胞表面的病毒受体结合，而使病毒黏附在细胞表面。五邻体的生物学功能与纤突蛋白密切相关，它不仅和纤突蛋白共同完成对细胞的黏附，而且会与细胞整联蛋白相互作用，从而促进病毒与细胞的结合^[32]。

1.3.3 纤突蛋白

纤突蛋白有 585 个氨基酸，长 25 nm，其 N 端到 C 端按顺序排列着尾区、柄区和顶端球区。I 群禽腺病毒有两条纤突，其他禽腺病毒只有 1 条^[33,34]。纤突蛋白在病毒感染细胞的过程中起着至关重要的作用，它可以识别细胞膜上的特异性受体——柯萨奇和腺病毒受体，并与之结合，造成感染^[12]。同时，纤突蛋白也有一定的抗原性，具有禽腺病毒种特异性抗原决定簇。已有研究报道 fiber-2 可以保护鸡群免受病毒感染^[35,36]。

1.3.4 非结构蛋白

腺病毒非结构蛋白主要包括 E1A、E1B、E2、E3、E4、pol、p IVa II、52/55K、EP、100K、33K 等。

腺病毒 E1A 蛋白在病毒复制周期中起着重要作用，E1A 蛋白表达后可以激活其他早期基因的启动子，增加细胞对肿瘤坏死因子介导的杀伤作用敏感性以及拮抗干扰素^[37]。

腺病毒 E1B 蛋白在腺病毒感染和细胞转化中起到重要作用，腺病毒载体中通常删除 E1B 基因，用于抗癌治疗。E1B 的功能是通过苏素化、磷酸化以及多个伙伴的相互作用来进行调控的，这些相互作用发生在感染后不同的细胞内位置和时间。E1B 参与病毒复制区隔的形成，调节病毒基因组的复制和转录、转录抑制、细胞蛋白的降解以及病毒晚期 mRNA 生物发生的几个核内步骤^[38]。

E2 蛋白是早期基因编码病毒 DNA 复制所必需的蛋白，和 DNA 聚合酶共同参与病毒转录、转录后水平的基因表达调控以及病毒宿主范围的选择^[39]。

E3 编码的几个蛋白可以使病毒逃逸宿主的免疫系统：gp19 蛋白可以一直在细胞表面的表达，10.4、14.5 和 14.7ku 蛋白可抑制 FasL 和 TNF 所介导的凋亡^[40]。

E4 蛋白则可以阻断宿主细胞 mRNA 的转录和翻译^[41, 42]。

蛋白 IX 缠绕在病毒粒子外表面的六邻体之间的缝隙里，将 GONs 凝聚成一个类似风车的装配，同时禁止后面的六邻体添加上去。因此，人们可以想象一个不同的、更大的“蛋白 IX”，并且产生更大的六邻体风车，从而由其他类似的结构元素产生更大的粒子。它的 C 末端片段也以 α 螺旋的形式参与连接相邻的 GON^[9]。

蛋白质 IIIA 以类似蛋白 IX 的方式将五邻体基底部和六邻体连接成一个簇(GOS)。蛋白质 VIII 通过与蛋白质 IIIA 的相互作用参与连接 GON 与 GOS 以及相邻的 GONs 之间的联系的同时也帮助粘合 GON。蛋白质 IIIa 和蛋白质 VIII 都与五邻体和六邻体的内表面接触^[9]。

pIVa II 是一种 DNA 结合蛋白，主要转录激活晚期基因表达。52/55ku 蛋白可与 pIVa II 特异性结合也可参与装配过程中病毒 DNA 与壳粒的识别作用。疏基内肽酶(EP)在腺病毒中比较保守，由病毒毒粒蛋白 PVI 和特异 II 肽协同激活^[43, 44]。

100K 蛋白包含了 10% 的病毒基因组，在腺病毒生命周期的后期起着至关重要的作用^[45]。它可以转运新合成的 hexon 从细胞质到细胞核和 hexon 单体的三聚作用^[46]，否则 hexon 单体会在细胞质中降解^[47]。100K 也可作为病毒衣壳组装的支架平台^[48]。它还可以与来自载体和宿主细胞的 RNA 转录本相互作用，并优先翻译来自腺病毒的晚期基因转录本以促进病毒蛋白合成^[49]。

2 禽腺病毒流行病学

腺病毒主要寄生于哺乳动物和禽类的上呼吸道、黏膜以及消化道内,一般长期潜伏无症状,也有部分病毒对动物有致病性甚至致死^[50]。禽腺病毒的易感动物主要是鸡、火鸡、鸭和鹅等传统禽类^[51]。可以水平传播也可以垂直传播,这给禽腺病毒的防控带来了巨大的挑战^[52-55]。病毒一般可以通过鸡胚尿囊腔、卵黄囊接种后分离获得,也可在鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞、鸡肾细胞、鸡肝细胞以及鸡肝癌细胞上生长^[56,57]。

I群禽腺病毒主要引起鸡鸭的包涵体肝炎和心包积液综合征,通常感染 3~5 周龄肉鸡以及 5~11 周龄蛋鸡,病程一般为 5~7 天,感染后 3~5 天达到死亡高峰。近年来在我国范围内主要流行的病原体是 FAdV-4、FAdV-8a、FAdV-8b,间或感染 FAdV-2。其中 FAdV-4 仍是最主要流行毒株, FAdV-8b 主要在我国北方流行^[5,58-60]。

腺病毒常与其他禽类病毒混合感染。有研究分析了山东省 36 个农场 678 例鸡鸭临床病例发现 FAdV-4 的感染率为 65.2% (443/679),其中种鸭的感染率几乎是鸡的两倍 (68.57% vs 34.3%) 值得注意的是在 443 例阳性病例中, H9N2 禽流感病毒、传染性法氏囊病病毒和/或鸡传染性贫血病毒的共同感染非常常见^[5]。

3 禽腺病毒的致病性

FAdV-I 主要导致 IBH 和 HHS。感染鸡群的各种组织中均可以分离到病毒,其中以肝脏、肾脏和心脏组织中病毒含量最高。鸡群在感染禽腺病毒后,一般无明显症状;感染致病性较强的病毒后,鸡群会出现精神萎靡、蹲伏、羽毛凌乱、鸡冠及眼结膜苍白甚至死亡的情况。FAdV-I 感染鸭群后,其发病症状与鸡群类似,均可以出现肝脏、肾脏病理变化^[60,61]。

3.1 包涵体肝炎

FAdV-2、FAdV-8a、FAdV-8b、FAdV-11 感染鸡群后会致 IBH,剖检病死鸡可见肝脏肿胀、黄染,肾脏肿大并伴有出血点^[62,63]。病理切片观察可见肝脏大面积细胞坏死、淋巴浸润和包涵体,是 IBH 的典型病变,经苏木精-伊红染色后可见嗜酸性和嗜碱性包涵体^[64-66]。

3.2 心包积液-肝炎综合征

FAdV-4 感染后会起鸡群的 HHS，其病程和临床病理表现与 IBH 又相似之出。其中，心包积液是最显著的病理变化，常认为心包积液是 HHS 的特征性病变，不过也有报道中没有心包积液^[67]。肝脏常表现出肿胀、黄染、出血点等病理表现，与 IBH 相似。具有免疫抑制作用的 HHS 毒株还会对淋巴组织也有重大影响，导致淋巴器官变性，淋巴细胞减少^[68, 69]。

3.3 肌胃损伤

FAdV-1 感染会引起肉眼可见的肌胃损伤，偶尔也能从发生肌胃糜烂的病禽组织中检测到 FAdV-8a/8b^[70, 71]。肌胃糜烂主要发生在欧亚大陆，病理剖检可见肌胃由出血和溃疡造成的肌胃棕色或黑色病变，腺胃以及肠道出血。病理切片可见肌胃粘膜、粘膜下层和肌肉层由巨噬细胞和淋巴细胞浸润，角化层糜烂^[72]。

3.4 免疫抑制

II 群禽腺病毒会引起火鸡出血性肠炎并造成免疫抑制，同时导致鸡群抑郁、排出带血粪便甚至死亡^[73]。毒性强的 HEV 株由于脾脏分泌白细胞介素-6 可诱导脾脏细胞凋亡^[74]。免疫抑制是 II 型干扰素刺激产生硝酸的结果^[75]。有报道称，在该病的临床阶段携带 IgM 的 B 细胞大量减少，出现了短暂的免疫抑制。

其他禽类腺病毒也被认为是免疫抑制剂。其中，FAdV-1、FAdV-4、FAdV-8 对胸腺、肝脏、脾脏、肾脏、小肠、法氏囊等脏器的实质细胞、上皮细胞、淋巴细胞、血管及窦内皮细胞等有嗜性，可导致粘液囊、胸腺和脾脏萎缩，从而引起免疫抑制^[76-78]。病毒对淋巴细胞表现出亲和力，从而导致体液和细胞反应的损伤。当鸡群食用了黄曲霉毒素污染的日粮时，该病毒对机体免疫系统的影响更严重^[77]。有些 FAdV 能够增加动物对大肠杆菌感染的敏感性^[79]。

FAdV-I 不仅会造成免疫抑制，也是条件性病原体之一。当它与其他禽类免疫抑制性病毒混合感染时，如马立克氏病、鸡传染性贫血、网状内皮增生症等，具有潜在致病力的腺病毒也会发病导致鸡群死亡^[80, 81]。

4 禽腺病毒诊断方法

目前禽腺病毒的诊断方法主要有免疫学方法和分子生物学方法。

4.1 免疫学方法

4.1.1 血凝抑制实验

大部分I群禽腺病毒没有红细胞凝集的特性,但有些FAdV-4可以凝集大鼠红细胞,最佳反应条件是 pH6~9, 温度 25-37°C。血清型不同的不同毒株,也会在凝血特性上有不同的结果。

4.1.2 中和实验

中和实验是利用中和抗体中和病毒使其失去感染宿主的能力而建立的免疫学实验。该方法既可以进行病原鉴定,也可以确定病原血清型还可以检测血清中和抗体及抗体效价。但是该方法耗时长,费用高对检测人员的操作要求较高。

4.1.3 ELISA

ELISA 常用于检测病原体或抗体,该方法简便快速,特异性和灵敏性高,适合大批量的血清学检测。目前已有许多关于检测禽腺病毒的 ELISA 方法出现,根据检测性质可以分为检测抗原和检测抗体两种。

刘延珂等用纯化的 FAdV-4 病毒作为包被抗原,建立了可以快速检测 FAdV-4 抗体的间接 ELISA 方法。该方法特异性好,与禽流感病毒、新城疫病毒、传染性法氏囊病病毒、传染性支气管炎病毒以及减蛋下降综合征病毒的阳性血清均无交叉反应;批间、批内重复性良好;检测样品结果与 PCR 结果符合率达 100%^[82]。

邵红霞等通过制备了针对 fiber-1 蛋白的单克隆抗体,进而构建了高效检测 FAdV-4 的夹心 ELISA 方法,其检测极限可达到 1000TCID₅₀/mL,为 FAdV-4/10 的检测提供了有效的诊断工具^[83]。

Saifuddin 等建立的 ELISA 方法可以检测 FAdV 特异性抗原,能检测出小于 100TCID₅₀/mL 的病毒;后来他们又建立了一种抗原检测 FAdV 12 种血清型的 ELISA 方法^[84, 85]。

4.1.4 琼脂扩散实验

琼脂扩散实验的原理是利用可溶性抗原与抗体在含有电解质的半固体凝胶中进行的一种沉淀反应,若看到白色沉淀则判定为阳性,反之为阴性。该方法常用于鉴别抗原血清学,检测血清抗体阳性率和抗体效价等。

智海东等制备的禽腺病毒抗原与 1:8 以上稀释倍数的阳性血清反应。8~12 h 后出

现沉淀线,特异性良好,不与其他禽类病毒反应^[86]。这个方法操作简单,但耗时较长,且对抗原本身的浓度及纯度要求较高,敏感性较差。

4.1.5 间接免疫荧光实验

免疫荧光技术是将免疫学、显微镜技术和生物化学结合在一起检验病毒的一项技术。扬州大学的梁广成建立了一种检测 FAdV-4 抗体的间接免疫荧光方法。将纤突蛋白 fiber-1 构建到真核表达载体 pcDNA3.1 中,将其转染到 293T 细胞中,得到表达 fiber-1 的细胞,建立了检测 FAdV-4 抗体的间接免疫荧光方法^[87]。该方法特异性良好,仅与所检测的抗 FAdV-4 抗体反应,不与抗抗鸡马立克病毒、禽白血病病毒、禽流感病毒、鸡新城疫病毒、鸡传染性法氏囊炎病毒和鸡传染性支气管炎病毒等病毒抗体反应。

4.2 分子生物学方法

4.2.1 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 在近年来已成功应用于多种病毒检测和流行病学调查。常规 PCR 检测方法特异性好,敏感性高,操作简便,可以很好的运用于禽腺病毒的检测。

江之遥等建立了可以该研究分别优化了引物浓度、退火温度等反应条件,可以扩增大小为 895bp (FAdV-I)、1600bp (IBV)和 529bp (NDV)的特异性片段,特异性良好,不能扩增出减蛋综合征病毒、马立克病毒、鸡传染性贫血病毒和 H9 亚型禽流感病毒等,临床结果与单项 PCR 结果完全符合^[88]。该方法具有较高的敏感性、特异性和稳定性,可以有效的区分禽腺病毒 I 群、新城疫病毒和传染性支气管炎病毒。

姚明等设计了包括禽腺病毒在内的 7 种病毒的特异性引物,建立了一种多重聚合酶链式反应。该方法可以成功的应用于临床样本的检测,可用于临床诊断鸭源性病毒感染^[89]。

4.2.2 荧光定量 PCR

实时荧光定量聚合酶链式反应融合了传统 PCR 技术和光谱技术的特点,具有特异性强、灵敏度高、重复性好、耗时短等特点。该方法被广泛应用于各种分子病原学诊断,还可以对病原体进行定量分析,也可以分析病原动态分布。

宋玲玲等根据 GenBank 中的 FAdV-4 hexon 的基因序列设计了一对引物,构建了阳性质粒并对反应体系进行了优化,建立了 FAdV-4 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,敏感性为 1.7×10^3 copies/ μ L, 优于常规的 PCR 方法。该方法特异性强,与其他禽病病毒无交叉反应,可用于临床检测^[90]。

5 禽腺病毒单克隆抗体的研究进展

Milstein 和 Kohler 在 1975 年利用杂交瘤技术制备了能产生抗体的杂交瘤细胞^[91, 92]。其基本原理是免疫后小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合。融合后产生的杂交瘤细胞在选择培养基的作用下,既能保持细胞永生性,同时具备分泌特异性抗体的功能。利用有限稀释法进行克隆,可以得到能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体有纯度好,效价高,重复性好,易获得,能被无限供应等亮点,被广泛应用在鉴别诊断、预防和治疗疾病以及进行基础研究等邻域。因此,想要研究禽腺病毒,单克隆抗体是必不可少的一环。

目前禽腺病毒的单抗主要是 fiber-1 和 fiber-2 蛋白的单克隆抗体。叶建强教授实验室分别制备了 1 株 FAdV-4 fiber-2 蛋白的单克隆抗体,命名为 3C2;这株单抗不仅有良好的特异性,不与 FAdV-8 发生反应也不与 FAdV-4 的 fiber-1 蛋白反应,同时它对 FAdV-4 有中和活性,可以有效抑制 FAdV-4 的体外感染。通过表位鉴定得知该抗体识别的表位在 fiber-2 蛋白 C 端 416~448aa 处,该表位可以用于被动免疫治疗和诊断工具或疫苗制备的新肽^[93]。该实验室同时制备了 2 株 FAdV-4 的 fiber-1 蛋白单克隆抗体 3B5 和 6H9。IFA 结果表面这两株单抗可以和 FAdV-4 以及 FAdV-10 反应,不与其他血清型发生反应;尽管这两株单抗均不能识别线性表位,但它们可以有效地在感染 FAdV-4 或转染 pcDNA3.1-fiber-1 的 LMH 细胞中与 fiber-1 蛋白反应^[83]。根据流行病学分析显示,FAdV-8 也是目前家禽中流行的主要致病性 FAdVs 之一。陆浩等制备了两种针对 FAdV-8 纤维蛋白的单克隆抗体(mAbs),分别为 4D9 和 5F10^[94]。虽然 mAb 4D9 和 5F10 不能中和 FAdV-8 感染,但 4D9 和 5F10 具有良好的间接免疫荧光、western blot 和免疫沉淀活性。表位分析显示,mAb 5F10 识别纤维中的 187~219aa,而 mAb 4D9 识别纤维中的 113~149aa。序列分析表明,在 FAdV-7、8a 和 8b 三种血清型中,mAb 5F10 识别的表位是存在的,而 4D9 仅在 FAdV-8b 中存在。FAdV-8 纤维特异性单克隆抗体的产生及 B 细胞表位的鉴定为进一步研究纤维的抗原性及 FAdV-8 的特异性诊断奠定了基础,也为其在识别与纤维相互作用的宿主蛋白以及进一步阐明纤维在 fadv8 发病机制中的作用奠定了基础。除了 fiber 蛋白外,扬州大学的武敏还研制了 FAdV-I 的 IIIa 蛋白单克隆抗体^[95]。

6 实验目的与意义

近年来 FAdV-4 感染引起禽类发生 HHS,由于该病毒发病快,传播快且会造成禽

类免疫抑制的特点，在我国大范围流行^[76]。死亡率高，造成严重经济损失。本研究从江苏某发病鸡场中成功分离一株 FAdV-4 病毒，分析了该病毒的致病性及适应性并制备了 FAdV-4 主要结构蛋白 hexon 的特异性抗体。本研究将为制备 FAdV-4 灭活疫苗研究奠定基础，为更好的预防和降低 FAdV-4 对养禽业的威胁具有重要意义。

第二部分 实验部分

第二章 一株禽 4 型腺病毒 JS 株的分离鉴定和基因进化分析

摘要：自 2015 年以来，HHS 在我国部分地区爆发并造成大量肉鸡死亡，从而给养殖户带来巨大的经济损失。我们在 2017 年从江苏省某发病鸡场的患鸡肝组织中分离获得一株 FAdV-4，将其命名为 JS 株。该分离株不具有凝集鸡红细胞的功能。通过对该分离株 hexon 基因的测序分析，并于其他禽腺病毒进行同源性分析，发现 FAdV-4 JS 株与我国现有流行株 CH/HNJZ/2015、SCnj 以及 JSJ13 同源性为 100%，序列遗传进化树也显示 JS 株与 CH/HNJZ/2015 等参考毒株位于同一分支；与加拿大分离株 ON1 同源性为 98.7%。证明本研究分离株为 I 群禽腺病毒，血清型为 4 型。通过对 hexon 基因氨基酸序列比对分析发现 JS 株与 CH/HNJZ/2015、SCnj 以及 JSJ13 序列一致，但与 ON1 毒株差异性较大。该分离株的分离鉴定为检测我国禽腺病毒的流行情况提供了一定的参考，也为本实验室后续研究奠定了基础。

关键词：禽腺病毒 4 型；分离；心包积液；包涵体肝炎

禽腺病毒属禽腺病毒科禽腺病毒属，是呈二十面体对称的无囊膜双股 DNA 病毒^[96,97]。它由衣壳、纤突、核酸芯髓以及相关蛋白构成。其中 hexon 是病毒表面含量最多的蛋白，常用于做病毒的进化分析^[98]。禽腺病毒可分为 A-E 五个种，12 个血清型（1~7、8a、8b、9~11）。其中，血清 1 型（fowl adenovirus serotype 1, FAdV-1）和 FAdV-4 主要引起禽类的肌胃糜烂或溃疡和 HHS。而血清 2、7、8a、8b、11 型则在世界范围内引起 IBH^[99]。HHS 在鸡群中的感染率很高，其中肉鸡的死亡率在 10%~100%之间^[100]。该病一般发生于 3~5 周龄肉鸡中，其症状主要表现为心脏表面被黄色透明液体包裹，心脏畸形且变软，心包黄染伴有出血点。一般患有心包积液的病鸡其肝脏也伴有病变，如肝脏肿大充血，肾脏肿大出血等^[101]。

禽腺病毒主要感染蛋鸡、肉鸡、鹅和鸵鸟。2007 年之前，IBH 在我国多呈散发，并未造成严重损失；2007 年至 2014 年，IBH 呈地方性流行，个别鸡场发病率可达 30%，

死亡率 15%；从 2015 年开始，FAdV-4 在我国大范围流行并引起了 IBH 和 HHS，造成鸡群大量死亡给养鸡业带来了巨大的经济损失^[102]。经流行病学分析显示 FAdV-4 主要在我国北部和东部流行^[103]。由于有一些弱毒感染鸡群后不导致鸡群发病，而水禽又是 FAdV 的天然储存库，这些因素是导致 FAdV-4 大流行的原因^[96]。2015 年以来已有各种文献报道了高毒力禽腺病毒的发现，其研究大多在流行病学调查、进化分析以及治疗上^[104,105]。本研究从江苏省某发病鸡场分离获得一株禽腺病毒，并将其分离后进行序列分析，为进一步预防和治疗该病提供实验依据，也为下一步研究病毒免疫原性打下基础。

1 材料与方法

1.1 病毒采集及 SPF 鸡胚

病料采集于江苏省某疑似 FAdV-4 感染的鸡场。主要采集发病鸡肝脏组织，-80℃ 保存。SPF 鸡胚购自南京天邦生物科技有限公司，在本实验室自行孵化至 9~11 日龄备用。

1.2 主要试剂

2×taq plus master mix、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 购自 Vazyme 公司；pMD-18T 载体购自 Takara 公司；氨苄青霉素干粉购自索莱宝公司；一次性血凝板购自海门飞世尔公司；病毒基因组 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物有限公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 AXYGENT。

主要试剂的配置：

(1) 10×PBS 配制

分别称量 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8 g， KH_2PO_4 2.7 g，NaCl 80 g，KCl 2 g，加入 800 mL ddH₂O，完全溶解后混匀调节 pH 至 7.4，继续用 ddH₂O 定容至 1 L。

(2) PBS 配置

取 100 mL 上述 10×PBS，添加 800 mL ddH₂O 后定容至 1 L，高压灭菌后室温保存。

(3) 1%鸡血红细胞的制备

用一次性采血针翅静脉采取未免鸡鸡血 1~5 mL 至抗凝管中，轻轻混匀以防止凝血。加入 10 倍体积的 PBS，轻轻混匀后离心 5~10 min，设置转速为 1000 r/min。弃去

上清和上层白细胞薄膜，重复洗涤3次。最后一次尽量将上清全部弃去后，按照每1 mL红细胞配成100 mL悬液的比例，配制相应体积的1%鸡血红细胞悬液，放于4°C冰箱待用，使用之前小心将红细胞重悬混匀。

(4) 氨苄青霉素储存液配置 (50 mg/mL)

称取5 g氨苄青霉素干粉，溶于100 mL无菌ddH₂O中，在无菌操作台中充分混匀后，用0.22 μm小滤器过滤后分装，-20°C保存。

(5) DH5α感受态的制备

1) 取冻存的 *E.coli* DH5α 菌种，解冻后用接种环蘸取少量菌液，划线接种在无抗LB平板上，放于37°C培养过夜；

2) 取一灭菌试管，加入3 mL LB液体培养基，挑取一个单菌落接种于试管中，放于37°C摇床中振摇过夜；

3) 按照培养基体积为菌液的100倍将其扩大培养至100 mL锥形瓶中，37°C振摇培养。待菌液OD₆₀₀在0.4~0.5之间时，停止培养，无菌转移至50 mL离心管中，冰上放置10 min；

4) 4000 rpm，4°C离心10 min，弃净培养基；

5) 加入25 mL冰冷的0.1M CaCl₂，将沉淀轻轻吹悬，冰浴30 min；

6) 4000 rpm，4°C离心10 min，弃去上清，用含有20%甘油的CaCl₂溶液悬浮细胞；

7) 按照每管50 μL进行分装，放于-80°C保存备用。

1.3 仪器设备

PCR仪购自Eppendorf公司；超低温冰箱、生物安全柜购自Thermo公司；孵化器购自山东科裕孵化设备公司；电泳槽、凝胶紫外成像仪购自Bio-Rad公司；纯水仪(MILLI-Q)购自Millipore公司。

1.4 样品采集

2017年在江苏省某发病鸡场采集病鸡肝脏组织，将样品存放于塑封袋中，24 h内低温状态运输回实验室无菌条件下分装于灭菌保种管中，保存在-80°C冰箱。

1.5 病毒鉴定

1.5.1 病毒分离

取适量肝脏组织放入 2 mL 离心管中, 加入 800 μL 左右无菌 PBS 和 3~5 粒无菌小钢珠。提前 30 min 预冷研磨仪样品放置盒, 研磨 20 min。12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 吸取上清至无菌离心管中, 加入 10 U/mL 双抗溶液, 混匀接种 9~11 日龄鸡胚, 每个样品重复接种两枚, 每枚接种 0.1~0.2 mL。石蜡封口后, 写上标记放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 48~72 h, 每间隔 12 h 观察一次, 剔除 24 h 内死亡的鸡胚。收集 24 h 之后死亡鸡胚, 放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 等待鉴定; 72 h 后, 取出所有鸡胚, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻过夜后, 收取尿囊液进行鉴定。

2.2.2 血凝试验

(1) 吸取 25 μL PBS 加到血凝板 1~12 排中;

(2) 吸取 25 μL 尿囊液加入第 1 列, 移液器混匀后吸取 25 μL 加入第 2 列, 依次倍比稀释到第 11 列, 混匀后弃 25 μL , 第 12 列为阴性对照;

(3) 每孔加入 1% 的鸡红细胞, 轻轻震荡混匀, 室温静置 30 min 后观察结果;

(4) 判定方式: 将血凝板垂直于桌面竖立并静置 5 s, 若红细胞呈泪状流下, 则结果为血凝阴性, 反之为血凝阳性。使红细胞凝集的最高稀释度为样品的血凝价, 记录血凝效价。

1.6 病毒 DNA 的提取

取尿囊液 200 μL , 按照病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 将所得到的 DNA 溶液置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或用于后续试验。

1.7 引物设计与合成

FAdV-4 鉴定引物为本实验室已有引物。以 GenBank 中的 FAdV-4 全基因组序列 (GenBank: No. KU558760) 为参考, 使用 Primer 5 软件, 设计覆盖 hexon 基因的引物 (见表 2-1), 扩增片段大小为 2814 bp。引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。

表 2-1 FAdV-4 鉴定引物以及 hexon 全长扩增引物序列

Table 2-1 Sequence of FAdV-4 identified primers and hexon full-length amplified primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
FAdV-4-F	ATACCAACACGAGCACCTC
FAdV-4-R	TTATCCCTGAACCCGATG
hexon-F	ATGGCGGCCCTCACGCCCG
hexon-R	TTACACGGCGTTGCCTGTGGCGAAA

1.8 FAdV-4 毒株的鉴定

以提取的病毒DNA为模板，加入FAdV-4鉴定引物进行PCR鉴定，反应体系如下。

表2-2 FAdV-4毒株PCR鉴定反应体系

Table 2-2 Polymerase chain reaction system of FAdV-4 identification

组分	体积
2×taq plus master mix	10μL
FAdV-4-F	1μL
FAdV-4-R	1μL
模板 DNA	1μL
ddH ₂ O	up to 20μL
总体系	20μL

反应程序为：95℃ 预变性 5 min；95℃ 变性 30 s，56℃ 复性 30 s，72℃ 延伸 15 s，循环 30 次；72℃ 总延伸 10 min。

1.9 hexon 基因的扩增

进一步对经鉴定为 FAdV-4 阳性的样品进行 hexon 基因序列的扩增，PCR 反应体系见表 2-3：

表 2-3 FAdV-4 hexon 基因扩增反应体系

Table 2-3 Reaction system for amplification of the hexon gene

组分	体积
ddH ₂ O	up to 50μL
2 × Phanta Max Buffer	25μL
dNTP Mix	1μL
hexon-F	2μL
hexon-R	2μL
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1μL
模板 DNA	1μL

反应体系配置完成后，按照 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书配置 50 μL PCR 体系进行 hexon 结构蛋白基因 DNA 的扩增。

1.10 琼脂糖凝胶电泳

PCR 结束后,用 1%琼脂糖凝胶电泳跑胶鉴定,切下目的条带,按照 AXYGEN 琼脂糖凝胶回收试剂盒操作说明进行 DNA 的回收。

1.11 pMD-18T-hexon 载体构建

- (1) 按照 Takara 说明书,将回收后的 hexon 片段连接到 pMD-18T 载体上;
- (2) 100 μL DH5 α 感受态中加入 10 μL 连接产物;
- (3) 冰上放置 30 min;
- (4) 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 90 s 后立刻冰上预冷 1 min;
- (5) 取混合物涂布在含有氨苄的平板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 8 h;
- (6) 挑出单个菌落,放入 500 μL 氨苄 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 2 h 后鉴定并扩大培养;
- (7) 将菌液送至上海生工生物公司测序,保存菌种命名 pMD-18T-hexon。

1.12 序列分析

使用Lasergene软件包下的SeqMan软件对测序结果进行拼接,并用MegAlign软件进行比对和计算同源性。利用MEGA 7.0软件将分离株的hexon基因核酸序列与GenBank收录的不同时期和地点的禽腺病毒的核酸序列(表2-4)进行遗传演化分析。

表2-4 参考毒株信息

Table 2-4 Information of the reference strains

毒株编号	毒株	血清型	基因型	GenBank 登录号	年份	国家
1	ON1	C	4	GU188428.1	2011	加拿大
2	JSJ13	C	4	KM096544.1	2013	中国
3	HB1510	C	4	KU587519.1	2016	中国湖北
4	HNJZ	C	4	KU558760	2015	中国河北
5	SCnj1601	C	4	KY927938.1	2018	中国四川
6	SDJN0105	C	4	MN102413	2019	中国山东
7	SCcz1501	C	4	KY927936	2017	中国四川
8	HNSQ	C	4	KX640910.1	2016	中国河南
9	PK-01	C	4	EU931693.1	2008	印度
10	KR5	C	4	HE608152.1	2012	澳大利亚
11	U26221.1	C	10	U26221.1	2000	美国

12	K181/10	A	1	JN181575.1	2012	韩国
13	CELO	A	1	U46933.1	1996	澳大利亚
14	340	B	5	KC493646.1	2013	澳大利亚
15	X11	D	11	AF339920.1	2001	比利时
16	764	D	9	AF508958.2	2004	比利时
17	685	D	2	AF508947.1	2004	比利时
18	CR119	E	6	AF508954.2	2016	比利时

2 结果

2.1 病毒分离与鉴定

提取肝组织样品处理液DNA，用FAdV-4鉴定引物对其DNA进行PCR扩增，核酸电泳结果显示：在400 bp处有一明显条带，与目的条带大小一致。进一步确定该肝脏组织感染FAdV-4病毒。电泳结果如图2-1所示。

将肝组织研磨液在SPF鸡胚上传代后收集尿囊液，即为稳定的FAdV-4病毒，命名为JS株。将收集的鸡胚尿囊液进行血凝试验，发现该病毒不具有凝集鸡红细胞的特性。

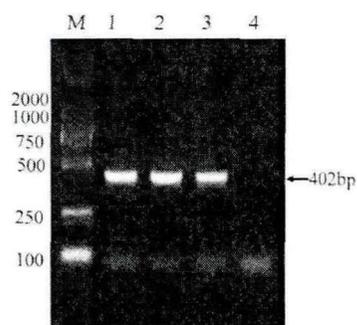


图2-1 FAdV-4分离鉴定

Fig. 2-1 Separation and identification of FAdV-4

注：M：2000marker；1：肝组织1；2：肝组织2；3：阴性对照

Note: M: 2000 marker; 1: liver tissue 1; 2: liver tissue 2; 3: negative control

2.2 hexon 基因全场扩增

用hexon基因扩增引物对分离出的FAdV-4 JS株进行hexon基因扩增，PCR扩增结

果显示, JS株在扩增后得到一条2814 bp的条带。

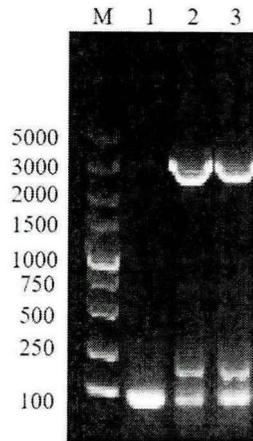


图2-2 hexon基因扩增

Fig.2-2 Full length amplification of the hexon gene

注: M: 5000marker; 1: 阴性对照; 2: JS株DNA; 3: 阳性对照

Note: M: 5000 marker; 1: negative control; 2: DNA ofFAdV-4 JS strain ;3: positive control

2.3 hexon 基因序列分析

2.3.1 hexon基因序列相似性分析

用MegAlign软件对分离的hexon基因进行分析, 其A、T、G、C 碱基数和含量分别为 654个 (23.24%) , 514 个 (18.27%) , 679 个 (24.13%) 和 967 个 (34.36%), A+T(41.51%)含量低于C+G(58.49%)。Hexon 基因编码蛋白的分子量为 109kDa, 共含有 937 个氨基酸, 其中碱性氨基酸 (K、R) 71个, 酸性氨基酸 (D、E) 87个。JS 株 Hexon 基因推导的氨基酸序列与FAdV-4 ON1 株相比, 有13个氨基酸位点存在突变 (表2-5) 。将其与其他国内流行株进行核苷酸和氨基酸相似性分析结果显示: 核苷酸相似性为98.7%~100%, 说明JS株与我国近年流行毒株一致 (表2-6) 。

表 2-5 hexon 基因氨基酸序列差异比较结果

Table 2-5 Comparison of amino acid sequence differences of hexon gene

N 毒株	氨基酸位点												
	164	188	193	195	238	240	243	263	264	410	574	797	842
JS	S	P	R	Q	D	T	N	I	V	A	I	P	A
ON1	T	S	Q	E	N	A	E	M	I	T	V	A	G
JSJ13	-	-	-	-	D	T	N	I	V	A	I	P	A
HNJZ	S	P	R	Q	D	T	N	I	V	A	I	P	A
SCnj	S	P	R	Q	D	T	N	I	V	A	I	P	A

表 2-6 分离株核苷酸与氨基酸相似关系表

Table 2-6 Nucleotide and amino acid similarity between FAdV-4 strains

	FAdV-4 JS	CH/HNJZ/2015	JSJ13	NIVD2	ON1	SCnj	SDJN0105
FAdV-4 JS	-	100.0	100.0	100.0	98.7	100.0	100.0
CH/HNJZ/2015	0.0	-	100.0	100.0	98.7	100.0	100.0
JSJ13	0.0	0.0	-	100.0	98.7	100.0	100.0
NIVD2	0.0	0.0	0.0	-	98.7	100.0	100.0
ON1	1.3	1.3	1.3	1.3	-	98.7	98.7
SCnj	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	-	100.0
SDJN0105	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	-

2.3.2 hexon 基因进化树及遗传进化距离分析

将分离获得的毒株序列与 GenBank 收录的不同时期和不同地点分离的 FAdV-4 hexon 的基因序列, 利用 MEGA7 软件基于 hexon 基因全长构建最大相似性进化树, 选用 Kimura 2-parameter model, 设置 Bootstrap 为 1000。进化树结果显示, JS 株为国内流行株且与 CH/HNJZ/2015 株核苷酸同源率为 99%。

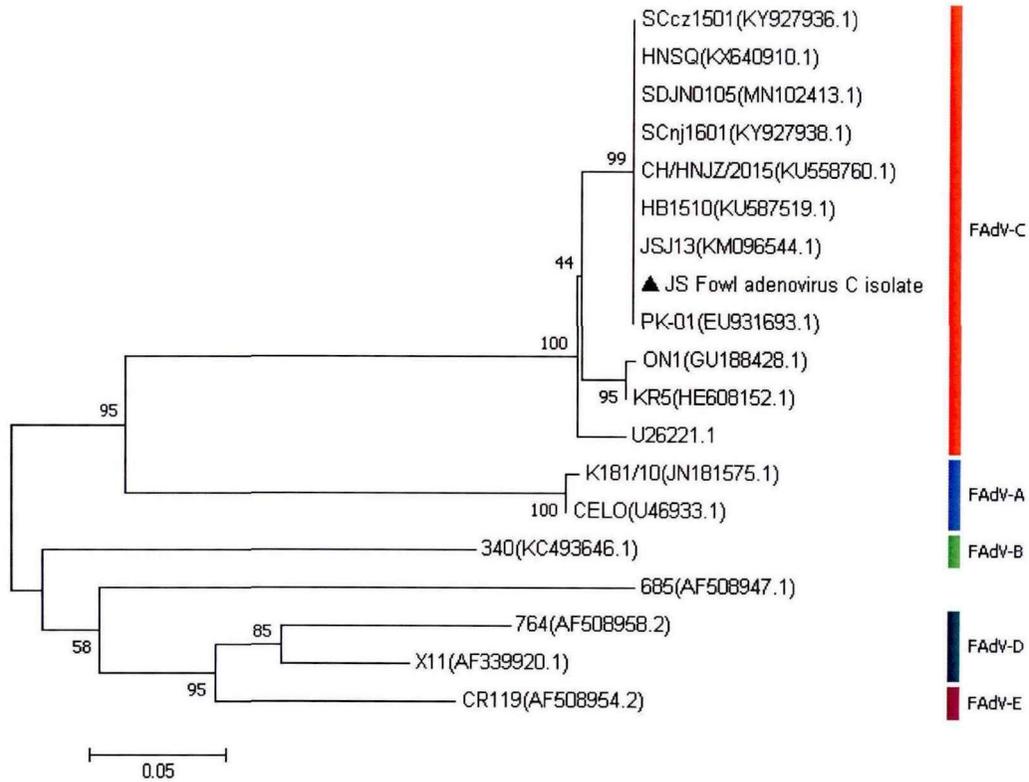


图2-4 FAdV-4 hexon基因进化树分析

Fig.2-4 Evolutionary tree analysis of FAdV-4 hexon gene

3 讨论

禽腺病毒是引起 IBH、HHS 等高冲击性疾病的主要病原，是国际上家禽养殖业关注的热点^[106]。1987 年，在巴基斯坦安加拉地区的养鸡场首次暴发引起人们关注的 HHS，并造成巨大的经济损失，这就是为什么该病毒也被称为“安加拉病毒^[107, 108]”。此后，FAdV-4 在许多国家流行起来，如澳大利亚^[109]、印度^[110, 111]、日本^[71, 112]、加拿大^[113]、韩国^[114, 115]。2014 年以前，FAdV 在中国家禽中偶有分离^[116-118]，分离株与 FAdV-4、FAdV-8a、FAdV-8b、FAdV-11 相关^[117, 119]。虽然在田间分离到多种血清型的 FAdV，但直到 2015 年中国养鸡场爆发 FAdV-4 才出现大面积疫情^[120-122]。由于新型 FAdV-4 的强传性和高致病性，许多养殖场在短时间内受到影响，造成了巨大的经济损失。

临床上，禽腺病毒常与其他病毒共同感染，已有文献对 2019 年山东省 36 个农场 678 例鸡鸭临床病例进行流行病学调查分析，发现 FAdV-4 的感染率为 65.2%(443/679)，其中种鸭的感染率几乎是鸡的两倍(68.57% vs 34.3%)。

值得注意的是在 443 例阳性病例中，H9N2 禽流感病毒、传染性法氏囊病病毒和鸡传染性贫血病毒的共同感染非常常见^[5]。当潜在致病性的禽腺病毒与其他病毒混合感染时，可以增加禽腺病毒的潜在致病性。

本研究成功分离获得一株可使鸡群产生 HHS 的病毒，通过特异性引物鉴定发现该病毒株为 FAdV-4，没有凝集鸡红细胞的特性，这与大部分 FAdV-4 一致。通过对该分离株 hexon 基因的测序分析后与其他禽腺病毒进行同源性分析比较，发现 FAdV-4 JS 株与我国现有流行株 CH/HNJZ/2015、SCnj 以及 JSJ13 同源性为 100%，序列遗传进化树也显示 JS 株与 CH/HNJZ/2015 等参考毒株位于同一分支；与加拿大分离株 ON1 同源性为 98.7%。通过对 hexon 基因氨基酸序列比对分析发现 JS 株没有发生突变，但与 ON1 毒株差异性较大。因此证明本研究分离株为 I 群禽腺病毒，血清型为 4 型。该分离株的分离鉴定为检测我国禽腺病毒的流行情况提供了一定的参考，也为本实验室后续研究奠定了基础。

4 本章小结

本章主要通过对发病鸡的肝脏组织进行研磨，提取 DNA 并进行 FAdV-4 病毒的鉴定，并扩增其主要结构蛋白 hexon 全基因序列并对其进行进化分析。结果显示，该分离株为我国近年流行毒株。

第三章 禽腺病毒分离株的适应性及致病性研究

摘要：自 2015 年以来，HHS 在我国部分地区暴发并造成大量肉鸡死亡，从而给养殖户带来巨大的经济损失。2017 年从江苏省某发病鸡场的患鸡肝组织中分离获得了 1 株 FAdV-4，将其命名为 JS 株。为了验证该毒株的适应性，分别通过鸡胚尿囊腔接种以及 CEK、LMH 进行病毒传代。结果发现，该毒株可以很好的在 LMH 上生长。为了验证该病毒株对鸡的致病性，将 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 的病毒用肌肉注射或口服的方式感染 3 周龄 SPF 鸡，连续观察 14 d。结果发现，肌注组动物在攻毒后 24 h 有精神沉郁的症状，在攻毒后第 2~3 天大批量死亡，死亡率达 90%；而口服组鸡一直没有观察到明显的精神症状且死亡率为 0。病死鸡剖检可见心包积液，肝脏肿大发黄，肾脏肿大出血，脾肿大等明显症状；荧光定量 PCR 检测结果显示，病毒在鸡体内多个组织器官均有分布。咽、肛拭子均检测到病毒，其中第 III 组拭子在攻毒后第 9 天转阴；由于第 II 组试验动物在攻毒后第 5 天仅存活 1 只，其排毒情况不具有代表性。本研究结果表明分离获得了 1 株对鸡有较强致病性的 FAdV-4 病毒株，为有效防控 FAdV-4 奠定基础。

关键词：FAdV-4；适应性；致病性；TCID₅₀

1 材料与方法

1.1 毒株与细胞

FAdV-4 JS 株由本实验室分离获得； LMH 为本实验室保存。

1.2 鸡胚与实验动物

SPF 鸡胚购自南京天邦生物科技有限公司，在本实验室自行孵化至 9~11 日龄备用。1 日龄 SPF 鸡由广西丽原生物有限公司提供，在负压隔离器中培养。

1.3 主要试剂

病毒基因组 DNA 提取试剂盒系上海生工生物科技有限公司产品；胎牛血清为美国 GIBCO 公司产品；WAYMOUTH MB 752/1 培养基为中科迈晨科技公司产品；

RPMI-1640培养基购自Hyclone公司；胰酶粉末为Amresco产品；细胞培养板均为博奥赛公司产品；荧光定量酶、2×taq plus master mix、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase购自Vazyme公司；pMD-18T载体购自Takara公司；氨苄青霉素干粉购自索莱宝公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒购自AXYGEN。

1.4 设备与仪器

PCR 仪购自 Eppendorf 公司；荧光定量 PCR 仪为罗氏 096 产品；超低温冰箱、细菌摇床、生物安全柜以及细胞培养箱购自 Thermo 公司；37℃恒温培养箱购自松下电器；孵化器购自山东科裕孵化设备公司；电泳槽、凝胶紫外成像仪购自 Bio-Rad 公司；纯水仪购自 Millipore 公司。

1.5 鸡胚尿囊腔接种

将-80℃保存的肝脏组织研磨液放置于冰上融化后，用注射器取 0.1~0.2 mL，然后接种 SPF 鸡胚尿囊腔，完成后，将鸡胚放 37℃培养箱孵育，每 12 h 进行一次照胚观察，弃 24 h 内的死亡胚，将 24~72 h 内死亡和 72 h 后仍存活鸡胚放 4℃过夜，之后无菌收集尿囊液。

1.6 LMH 细胞培养

从液氮罐中取出细胞，37℃快速融化后，800 rpm离心5 min后弃上清，将细胞用含10%胎牛血清的WAYMOUTH MB 752/1培养基轻轻悬起，37℃、5%CO₂温箱中培养。待细胞长满后，用培养基清洗细胞三次，胰酶消化8 min后用培养基吹散，按照1:2传代。

1.7 原代鸡胚肾细胞制备

取17~20日龄的SPF鸡胚，小心取出胚体，按仰卧姿势剖开腹腔，挑出肾脏组织分离包膜，将肾脏用无菌PBS洗三次。再将其剪成1 mm³的方块后，加入适量胰酶，37℃消化15 min，每隔5 min吹打一次使其消化充分，加入适量血清终止消化。用400目过滤筛过滤两次后，800 rpm离心5 min，弃上清，将细胞重悬计数，用RPMI-1640培养基稀释至100万/mL，加入10%胎牛血清，分装后于37℃、5% CO₂环境下培养。

1.8 细胞接毒

将长满的LMH细胞消化传代过夜，在细胞长至80%~90%时弃去培养基，用不含血清的培养基将病毒1:1000倍稀释，37℃孵育1 h后弃上清，补充含2%胎牛血清的培养基置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。每隔12 h观察细胞状态，直至80%细胞病变脱落。

1.9 DNA 提取

同第二章2.3。

1.10 PCR 扩增

同第二章2.5。

1.11 病毒的生长动力学测定

按MOI=0.01的病毒量接种长满单层LMH细胞的12孔板，置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养，1 h 后换成含2%FBS的DMEM培养液，分别在接种病毒后的不同时间点（12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h）收取细胞上清，37℃反复冻融3次，12000 rpm离心15 min，收取上清液，测定每个时间点收取上清的TCID₅₀，共重复3次。

1.12 TCID₅₀ 测定

将LMH细胞在96孔细胞培养板上培养至单层，将病毒用培养液作10倍倍比稀释，取原液、10⁻³~10⁻¹⁰个稀释度，接种96孔板，每个稀释度4孔，100 μL/孔，置37℃温箱，5%CO₂ 孵育1 h，然后每孔补加100 μL细胞维持液，培养3 d，记录细胞病变，按Reed-Muench法计算病毒TCID₅₀。

1.13 病毒对鸡的致病性试验

选用纯化后第3代细胞毒测定分离株对21日龄SPF鸡的致病力，分别选取SPF鸡30只，随机分成三组，每组10只，采取肌肉注射或口服方法分别用含有10^{6.0}个TCID₅₀的病毒液进行攻毒。观察14天，每两天收集一次鼻、咽拭子，将采集的拭子

放入 1 mL PBS 中，冻融一次后，充分振荡，4°C 12000 rpm 离心 15 min，取上清液提取 DNA，进行 qPCR 检测是否排毒。每天观察鸡的状态，并按照有无症状进行评分。试验结束后，随机挑选第 I 组与第 III 组的 3 只动物进行剖杀，采取脏器组织（心、肝、脾、肺、肾以及气管、法氏囊），进行荧光定量试验来检测病毒的组织分布；第 II 组随机挑选 3 只死亡的动物的脏器组织进行病毒组织分布检测。

表 3-1 动物实验分组

Table 3-1 Group of animal experiment

组别	毒种	毒量	接种方式
I	PBS	-	肌注 5 只，口服 5 只
II	F3	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}$	肌注
III	F3	$10^{6.0} \text{TCID}_{50}$	口服

1.14 标准质粒的构建

为了获得脏器组织分布检测所需的荧光定量标准曲线，首先构建标准质粒。根据文献^[123]，合成引物以扩增 FAdV-4 病毒的 ORF-14 片段。引物序列为 F: 5'-AGTGTGTATGTGCGTTGGGTAG-3' 和 R: 5'-CATTGTCATAACGATGGTGTAG-3'。以提取的病毒 DNA 为模板，根据 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书进行 PCR 扩增出 ORF-14 片段 150 bp，扩增产物按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行片段回收，将回收产物克隆到 pMD18-T 载体中。按照第二章 2.8 的方法将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，挑菌 PCR 鉴定为阳性后，扩大培养后提取质粒送上海生工生物有限公司测序。

1.15 标准曲线的绘制

将测序正确的菌液扩大培养并按照 QIAGEN 质粒中提试剂盒提取质粒。将提取的质粒在 Nanodrop 2000 上测定核酸浓度，将质粒进行 10 倍梯度稀释后计算拷贝数。以每个稀释度的标准质粒为模板，荧光定量 PCR 反应（为减少试验误差，每个浓度梯度 3 个平行）。反应体系按照说明书配置。反应条件为：95°C 预变性 10 min；95°C 变性 10 s，60°C 退火 1 min，40 个循环。以质粒标准品拷贝数的对数作为 X 轴，Ct 值（循环阈值）作为 Y 轴，建立质粒拷贝浓度与循环阈值对应的定量标准曲线。

1.16 病毒的组织分布检测

试验结束后每组随机挑选3只剖杀，对其心、肝、脾、肺、肾以及气管、法氏囊进行荧光定量试验。每个组织称取0.1 g，放入2 mL离心管中，加入1 mL无菌PBS和3~5粒无菌小钢珠。提前30 min预冷研磨仪样品放置盒，研磨20 min。12000 rpm，4°C离心10 min，吸取200 μ L上清至离心管中，按照说明书提取组织DNA，进行荧光定量检测。

2 结果

2.1 JS 株适应性检测

2.1.1 尿囊腔传代

病毒经过鸡胚尿囊腔连续传代后，收集不同代次的尿囊液并提取DNA，PCR扩增后发现病毒仅尿囊腔传代后，P3代没有检测到核酸（图3-1），说明病毒无法通过鸡胚尿囊液传代。FAdV-4 JS株不能适应鸡胚生长。



图3-1 JS株尿囊腔传代鉴定

Fig. 3-1 Passage identification of JS strain on allantoic cavity

注：M: marker; 1: 阳性对照；2~4: P1~P3代病毒；5: 阴性对照

Note: M: marker; 1: positive control; 2~4: P1 ~ P3 generation; 5: negative control.

2.1.2 CEK传代

制备好CEK细胞过夜，以1:1000比例感染细胞后观察5 d，收集细胞上清。提取DNA检测核酸。根据凝胶电泳结果显示：JS株在CEK上传代至第7代时无法检测到病毒核酸（图3-2），说明JS株在CEK上适应性差，不能连续传代。

2.1.3 LMH传代

LMH是可连续传代的细胞，在培养方式上优于原代CEK。将病毒液按照1:1000比例接种细胞5 d后，反复冻融三次，收集细胞上清，继续在LMH细胞上传代至P13代。提取DNA进行核酸检测，结果显示JS株可以很好的在LMH细胞上传代（图3-3）。在我们后续的实验中，JS株也可以继续传代，这说明JS株对LMH细胞有良好的适应性。

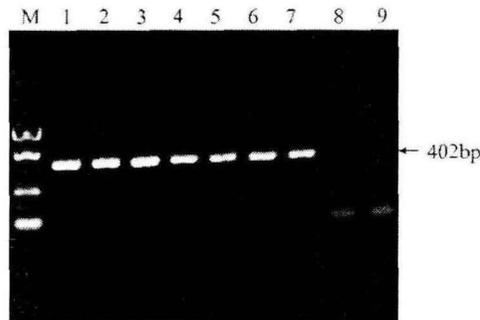


图3-2 JS株CEK传代鉴定

Fig. 3-2 Passage identification of JS strain on CEK

注：M:5000marker;1:阳性对照;2~8:P1~P7代;9:阴性对照。

Note: M: 5000 marker; 1: positive control; 2 ~ 8: P1 ~ P7 generation.; 9: negative control.

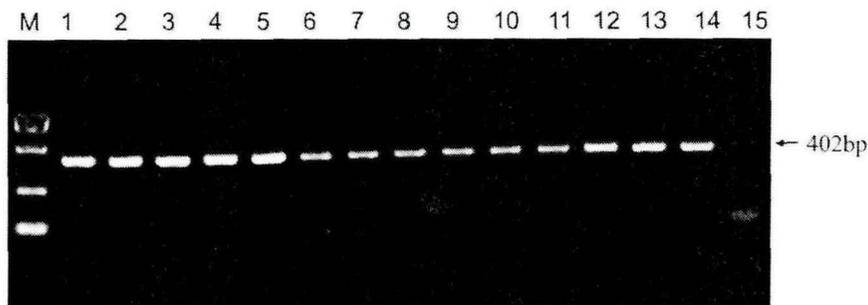


图3-3 JS株在LMH上传代鉴定

Fig. 3-3 Passage identification of JS strain on LMH

注：M:marker;1:阳性对照;2~14:P1~P13代毒;15: 阴性对照

Note: M: marker; 1: positive control; 2 ~ 14: P1 ~ P13 generation; 15: negative control

2.2 病毒生长曲线

按MOI=0.01的病毒量接种长满单层LMH细胞的12孔板，分别在接种病毒后的不同时间点（12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h）收取细胞上清，测定每个时

间点收取上清的TCID₅₀，共重复3次。结果如图3-4，FAdV-4 JS株在LMH细胞上生长良好，以0.01 MOI接种病毒72 h后病毒滴度为10^{7.0}TCID₅₀/0.1 mL，最高达到10^{8.0}TCID₅₀/0.1 mL。

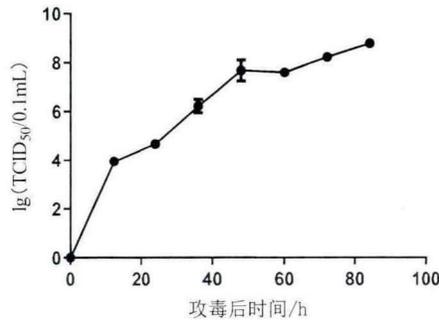


图3-4 JS株在LMH细胞上的生长曲线

Fig. 3-4 Growth curve of JS strain on LMH cells

2.3 JS 株在 LMH 上传代病毒滴度变化

将FAdV-4 JS株在LMH细胞上连续传代13次后，分别测定每一代次接毒后细胞上清的病毒滴度，见图3-5。病毒在LMH细胞上传代，病毒毒价均在10^{6.0}TCID₅₀/0.1mL之上，最高毒价可达到10^{8.0}TCID₅₀/0.1mL。这说明FAdV-4 JS株适应在LMH细胞上增殖并能稳定传代。

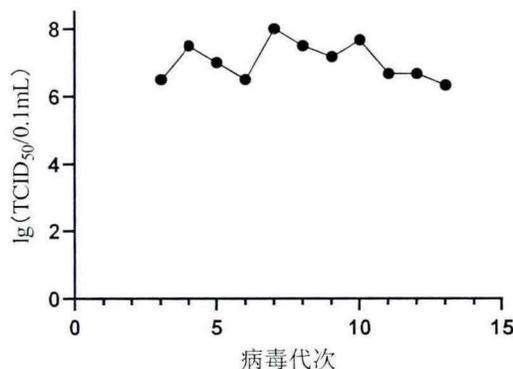


图3-5 JS株在LMH传代病毒滴度的变化

Fig. 3-5 Titer changes of JS strain on LMH

2.4 标准曲线的建立

成功构建ORF-14的片段到pMD-18T载体上并命名为T-ORF14，检测质粒浓度为149 ng/ μ L，根据公式
$$\text{拷贝数} = \frac{6.02 \times 10^{14} \times \text{质粒浓度}}{\text{DNA长度} \times 660}$$
 计算出质粒的初始拷贝数为 4.59×10^{10} copies/ μ L，将质粒十倍比梯度稀释后进行荧光定量PCR检测，以Ct值为Y轴，质粒浓度指数为X轴绘制标准曲线。结果显示，Ct 值与质粒标准品拷贝数的对数呈现出良好的线性关系（图 3-6），标准曲线方程为： $y = -3.4897x + 36.887$ ；相关系数 $R^2 = 0.997$ ，线性关系良好。

2.5 JS 株对 SPF 鸡的致病性

在LMH细胞上制备FAdV-4 JS株种毒一批，病毒滴度为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/0.1mL，置-70℃保存，攻毒时取出，用PBS稀释后进行肌肉注射或口服攻毒。检测结果表明该批毒对21日龄的SPF鸡有致病性。

其中第II组鸡从攻毒后第二天开始有鸡发病死亡，其中死亡两只，其他鸡均有不同程度的精神萎靡、沉郁等症状，攻毒后第三天又死亡7只，另一只有精神轻度沉郁，且随时间推移，该鸡恢复正常，死亡率为90%；第III组鸡没有出现任何症状，死亡率为0（图 3-7）。

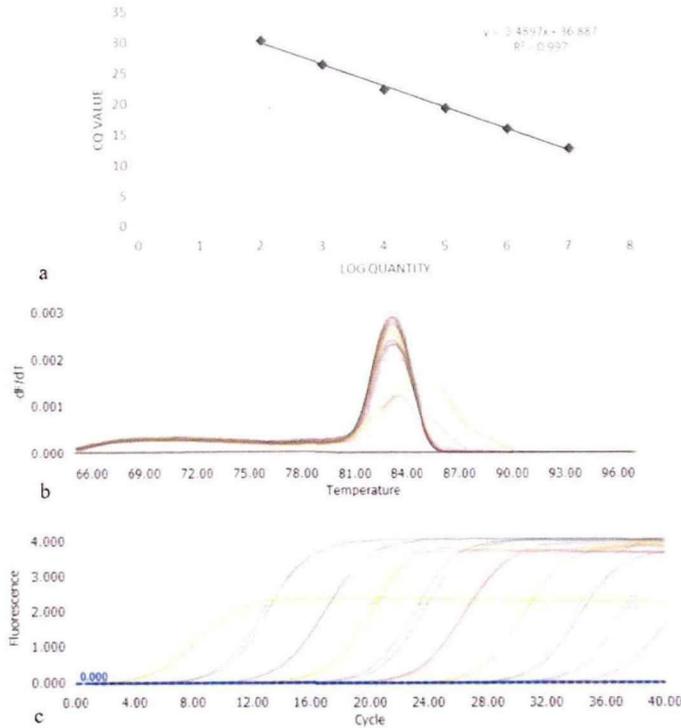


图3-6 SYBR Green I实时荧光定量PCR检测标准曲线的绘制

Fig.3-6 Standard curve of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR detection

注: a:SYBR Green I实时荧光定量PCR检测标准曲线; b: SYBR Green I实时荧光定量PCR检测的溶解曲线; c:

SYBR Green I实时荧光定量PCR扩增曲线

Note: a: SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR detection standard curve; B: SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR detection of dissolved curve: C: SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR amplification curve.

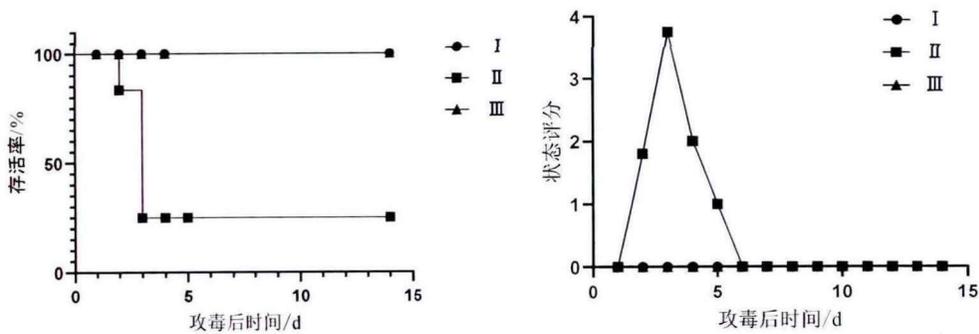


图3-7 SPF鸡存活率(左)及状态评分分析(右)

Fig.3-7 Survival rate (left) and status score analysis of SPF chickens (right)

剖检病死鸡，发现第II组鸡均有不同程度的心包积液，肝脏黄染肥大，肾肿大且有点状出血，脾脏出血肿大等明显症状，随机收集3只鸡的脏器组织备用。剖检第III组鸡，发现其肝脏黄染，但其他部位未见明显病变（图3-8）。

2.6 病毒组织分布

实验结束后第III组随机挑选三只剖杀，对其心、肝、脾、肺、肾以及气管、法氏囊进行荧光定量实验，结果显示：病毒主要靶器官为肝脏，且肌肉注射比口服感染效果更严重。（图3-9）



图3-8 感染死亡鸡主要病变

Fig.3-8 Main pathological changes of infected dead chickens

注：（a-c）为第 I -III组鸡剖检后心脏与肝脏组织肉眼观察图，可见第 I 组鸡心肝正常，无可见病变；第 II 组鸡有明显的心包积液及肝脏黄染肿大情况；第III组鸡肝脏略有黄染但并无明显心包积液。

Note: (a-c) is a macroscopic observation of the heart and liver tissues of the chickens in group I -III, which shows that the heart and liver of group I are normal and there are no visible lesions; the chickens of group II have obvious pericardial effusion and yellow liver swelling. The situation was large; group III chicken livers were slightly yellow stained but no obvious pericardial effusion.

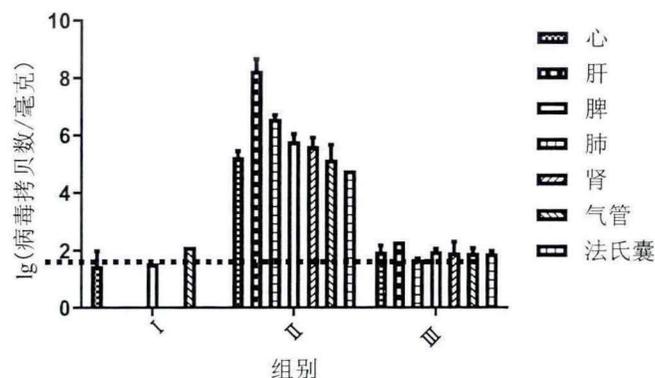


图3-9 病毒的组织分布情况

Fig. 3-9 Distribution of virus tissues

注：拷贝数低于100copies/mg算作阴性。

Note: copies less than 100copies/mg are considered negative.

在攻毒后第1、3、5、7、9、11、13天采集咽、肛拭子，进行荧光定量检测其排毒情况，结果显示攻毒后第II组与第III组鸡的咽、肛拭子均有排毒，其中第II组鸡的排毒情况在攻毒后第3~5天到达排毒高峰期，随后降低；第III组试验动物咽、肛拭子的排毒量在攻毒后第1~3天处于排毒高峰，随后递减直至攻毒后第9天转阴（表3-2）。

表3-2 攻毒后咽肛拭子排毒情况

Table 3-2 Detoxification status of pharyngeal anal swab after challenge

	第1天		第3天		第5天		第7天		第9天		第11天		第13天	
	咽	肛	咽	肛	咽	肛	咽	肛	咽	肛	咽	肛	咽	肛
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	+	+	+	++	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
III	++	++	++	+	+	+	±	±	±	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“/”表示第II组仅剩1只鸡，数据不具有代表性。“++”表示强阳性，荧光定量计算的拷贝数大于1000拷贝数/毫克；“+”表示阳性，荧光定量计算的拷贝数在100~1000拷贝数/毫克；“±”表示弱阳性，荧光定量计算的拷贝数在100~150拷贝数/毫克；“-”表示阴性，荧光定量计算的拷贝数小于150拷贝数/毫克。

3 讨论

2013年以来我国出现FAdV-4感染的疾病报告,且在2015年暴发HHS。本研究室2017年从江苏省某发病鸡场分离获得1株FAdV-4,命名为JS株。通过测定病毒的生长曲线,发现它的病毒滴度可以达到 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1mL,说明JS株可以很好地在LMH细胞上繁殖。其他文献中,毒株HNJZ在LMH上的毒价仅为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.1mL^[123]、SD0828在鸡胚成纤维细胞上的毒价为 $10^{5.3}$ TCID₅₀/0.1mL^[124]、SD1511在CEK上的毒价为 $10^{3.2}$ TCID₅₀/0.1mL^[125]以及SDJN0105株在鸡胚上的毒价为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1mL^[3],这些毒株均没有JS株毒价高。这说明本试验分离到1株在LMH细胞上生长良好的病毒株,有助于后续进行灭活疫苗的研究。将P4代病毒通过肌肉注射或口服感染的途径对21日龄SPF鸡进行攻毒,发现口服感染组的鸡群并没有产生精神沉郁或死亡症状,解剖后观察到鸡的肝脏黄染,并无其他变化;而肌注组的SPF鸡在攻毒后24h已出现轻度沉郁的症状,并在攻毒后3~5天达到死亡高峰,引起了90%的死亡率。剖检可看到很明显的心包积液症状。这与已报道的CH/HNJZ/2015株的致病力有所不同^[123]。尽管JS株与CH/HNJZ/2015株在hexon基因水平上同源性达99%,但口服感染后呈现出不同的致病力,其中CH/HNJZ/2015株口服感染0.2mL $10^{5.0}$ TCID₅₀的病毒后,在攻毒后第5天达到100%死亡,而JS株在口服感染0.2mL $10^{6.0}$ TCID₅₀的病毒后,鸡群没有死亡也没有明显的临床症状。两株病毒在hexon基因水平上同源性高却有不同致病力,可以考虑是其他基因水平上的差别导致了两株病毒毒力的不同。

已有数篇文献通过不同感染方式研究FAdV-4对鸡的致病力的情况,发现口服感染致病力低于肌肉感染,这是由于口服感染时消化道对病毒具有一定的消化作用,影响了病毒的活性及在机体内的吸附作用^[126,127]。我们在两种感染方式的鸡的咽拭子中都检测到了排毒,这也证实了该病毒可经空气-消化道传播^[127]。

腺病毒在鸡体内的分布情况我们也进行了研究,发现肝脏中的病毒含量最高,且各组织脏器中病毒均有分布,这与其他研究结果一致,这也可以理解为何FAdV-4可以在LMH细胞上更好的繁殖。口服感染组鸡没有死亡但咽拭子也有排毒情况,这说明不同的感染方式,对鸡的致病力不同,这一点与已有文献报道相同^[128,129]。本研究分离获得了1株在LMH细胞上具有较高病毒滴度和高致病力的FAdV-4,为后续研究JS株的致病机理及制备针对FAdV-4的灭活疫苗奠定基础。

4 本章小结

本章研究将分离获得的FAdV-4病毒分别在鸡胚、CEK以及LMH上进行连续传代培养，结果发现FAdV-4只可在LMH细胞上进行连续传代，在鸡胚中传代至第2代，在CEK细胞上传代至第7代就检测不到病毒核酸了。同时，本研究对该病毒进行致病力分析，通过肌肉注射和口服感染方式感染21日龄SPF鸡，并进行观察，发现肌肉注射组在攻毒后第2天开始出现死亡，最后死亡率为90%；口服感染组在感染后有精神沉郁的症状随后好转。试验结束后收集各脏器组织，并进行脏器组织分布试验，发现肝脏中的病毒含量最高，且各组织脏器中病毒均有分布；咽肛拭子均有排毒现象。

第四章 4 型禽腺病毒 hexon 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

摘要: 为制备 FAdV-4 hexon 蛋白, 设计引物扩增 FAdV-4 hexon 基因的前 1500 bp 片段, 酶切后克隆入 pCold I 载体中, 后转化入 *E.coli* DH5 α 中, 经过 PCR、酶切和测序鉴定正确的阳性重组质粒, 命名为 pCold I-hexon-1。将阳性质粒转化入 *E.coli* BL21 感受态中, 小量诱导表达, 通过 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的表达。本实验中大肠杆菌以包涵体形式表达了 FAdV-4 hexon-1 蛋白, 随后用纯化蛋白免疫 Balb/c 雌性小鼠, 用间接 ELISA 方法选择血清抗体效价高的小鼠进行细胞融合, 并筛选阳性杂交瘤细胞。最终得到 3 株能稳定分泌抗 hexon 单抗的杂交瘤细胞株, 命名为 4G9、6C6 和 6E10。上清效价分别为 2⁸、2¹²、2⁹; 4G9 和 6E10 的抗体腹水效价分别为 10⁵、10⁴; 三株抗体的亚型鉴定结果是均为 *kappa* 轻链, 其中 4G9 和 6C6 为 IgG1 亚类, 6E10 为 IgG2b。IFA 和 WB 实验均能证明这三株单抗可以较好的和病毒蛋白发生反应, 其中 6C6 和 6E10 有较好的特异性, 为供后续建立快速诊断 FAdV-4 奠定了基础。

关键词: FAdV-4; hexon 蛋白; 单克隆抗体

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物

SP 2/0 骨髓瘤细胞和 LMH 为本实验室保存; 6~8 周龄 Balb/c 雌鼠和 8~10 周龄 Balb/c 雌鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.2 菌株和毒株

pClod I 载体、克隆宿主菌 *E.coil* DH5 α 和表达宿主菌 *E.coil* BL21 (DE3) 均由本实验室保存; 4 型禽腺病毒为本实验室分离的 FAdV-4 JS 株。

1.3 主要试剂

RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清为 gibco 产品; 细胞冻存液为

cellbanker2 品牌；聚乙二醇融合剂 (PEG2000)、HAT(50×)、弗氏完全佐剂以及不完全佐剂均购自 Sigma 公司；6 孔、12 孔、24 孔、48 孔、96 孔等细胞培养瓶均购自博奥赛公司；单抗亚类鉴定酶即用试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司；硝酸纤维素膜 (NC) 购自 GE 公司；Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 和 HiScript II One Step qRT-PCR SYBR Green Kit 购自 Vazyme 公司；FITC 标记的羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 KPL 公司；DNA 快速回收纯化试剂盒购自 Omega 公司；限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 均购自 NEB；引物由南京金斯瑞生物科技公司合成。

主要溶液配制：

(1) 配置 0.2 M 醋酸缓冲液母液：

0.2 mM 乙酸 49.2 mL, 折合 566 μ L 的冰乙酸；

0.2 M 乙酸钠 10.8 mL (0.2 M 乙酸钠：2.72 g 三水合乙酸钠 (MW136.08)，溶解于 100 mL ddH₂O)。

(2) 60 mM 的醋酸缓冲液 (pH=4.0)：

取 0.2 M 醋酸缓冲液母液 60 mL, 加 ddH₂O 至 200 mL, 调 pH 为 4.04。

(4) 1 M Tris—HCl (pH=9.0) 100 mL

称取 12.11 g Tris-Base (MW121.1)，加水至 98 mL, 用 HCl 调至 9.0。

1.4 主要仪器

二氧化碳恒温培养箱以及 37°C 摇床购自赛默飞；细菌培养箱购自松下电器；常温离心机及 4°C 低温离心机购自艾本德公司；多功能酶标仪购自 Tecan；倒置荧光显微镜是 Olympus 公司产品；多功能成像仪为 GE 公司产品。

1.5 免疫原的制备

1.5.1 hexon-1 基因扩增

根据 JS 株 hexon 序列设计 hexon 基因前 1500 bp 片段引物，以分离获得的 JS 株 DNA 为模板，引物序列如下：

F: 5'-CATATGGAGCTCGGTACCCTCGAG-ATGGCGGCCCTCACGCCCCG-3'；

R: 5'-AGACTGCAGGTCGACAAGCTTTTA-GAAGGGGTTGACGTTGTCCA-3'。

用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真扩增酶按说明书配置反应体系扩增目的片段。循环参数：预变性 95°C 30 s；95°C 变性 30 s，56°C 退火 30 s，72°C 延伸 90 s，进行 35 个循环；72°C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.5.2 构建原核表达载体

利用 DNA 快速回收纯化试剂盒回收凝胶中的目的片段 hexon-1, 用 *Xho* I/*Hind* III 双酶切 hexon-1 以及 pCold I 载体; 按照 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒说明书将 hexon-1 片段利用同源臂链接的方法构建到 pCold I 载体上, 将菌株送测, 测序正确的命名为 pCold I-hexon-1。将菌株按 1:1 000 的并列加入到氨苄 LB 中, 37°C 过夜震荡培养。1:1 加入灭菌的 50% 甘油生理盐水, 将菌种保存于 -80°C。

1.5.3 FAdV-4 hexon-1 蛋白的表达与纯化

将 pCold I-hexon-1 提取质粒转化入 BL21(DE3)感受态中: 冰浴融化的感受态 BL21 (DE3) 后, 将质粒加入、混匀, 冰浴 30 min 后立刻放入 42°C 水浴锅中热激 90 s, 随后立刻取出冰浴 5 min, 加入 600 μ L 的 LB 并置于 37°C 摇床上培养 1 h。随后取出 4000 rpm 离心 5 min 并去除 500 μ L 的上清, 轻轻吹打重悬菌体。在氨苄抗性的平板上涂布, 将平板放在 37°C 培养箱倒置培养过夜。

挑去平板中的单个菌落加入 1 mL 含氨苄的液体 LB 中, 37°C 摇床培养过夜。第二天将活化的菌液按 1:100, 接种至 100 mL 的氨苄 LB 中, 37°C 摇床上振荡 2 h, 当 OD₆₀₀ 测得为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 继续 37°C 诱导表达 4 h。8000 rpm 离心 10 min 后弃上清。用 PBS 重悬菌体后再 8000 rpm 离心 10 min 后弃上清, 如此重复三次后保留菌体, 称重并按照每 0.1 g 加入 1 mL PBS 重悬菌体。

将重悬菌体置于冰上, 并利用超声波裂解至液体透明不见颗粒状物质, 4°C 12000 rpm 离心 10 min 后, 取少量上清与沉淀跑胶鉴定, 发现蛋白表达在包涵体中。将菌体沉淀用 8 M 的尿素重悬溶解, 室温溶解 30 min 后 4°C 12000 rpm 离心 10 min 后, 取上清。

加入 3 mL Ni 填料与菌体上清混匀 4°C 孵育过夜, 第二天将其填入纯化柱中, 收集流出液; 随后依次加入 pH=8.0、pH=6.5 的 washing buffer 洗去杂蛋白, 最后用 pH=4.5 的 elution buffer 洗脱蛋白并及时测量蛋白浓度, 当浓度低于 0.2 时停止洗脱。将纯化蛋白取样跑蛋白胶鉴定, 并存放于 -80°C。将 Ni 柱用 2 M NaOH 处理后用 10% 乙醇保存于 4°C。

将上述蛋白加入 4 \times loading buffer 混匀, 煮沸 15 min; 12000 rpm 离心 5 min; 取上清 10 μ L 加入蛋白胶中进行蛋白分离。经过 80 V 30 min, 120 V 60 min 后将蛋白胶放入考马斯蓝染液中染色 1 h 后放入脱色液中脱色, 扫描观察蛋白纯化效果。

1.6 动物免疫

将纯化蛋白与弗氏完全佐剂等体积乳化, 皮下免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠; 并在免疫后 14、28 天等体积混合蛋白与弗氏不完全佐剂, 皮下免疫小鼠; 在第三次免

疫后 7 天尾尖采血，分离血清进行 ELISA 检测，当血清效价大于 10^5 时进行加强免疫，腹腔注射 100 μg 纯化蛋白，免疫三天后进行细胞融合。

1.7 多克隆抗体效价检测

用碳酸盐缓冲液将纯化蛋白稀释到 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，按照 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜；第二天用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干，每孔加入 100 μL 5%脱脂奶溶液，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h；用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干。将分离的小鼠血清用 5%脱脂奶 10 倍比稀释后加入封闭后的酶标板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干，加入 1:5000 稀释的 HRP-YKS 二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干，避光，每孔加入等体积混合的 TMB 显色液，室温孵育 15 min 后加入 2M H_2SO_4 终止，并在 OD₄₅₀ 读值，判断血清效价是否达到 10^5 。

1.8 骨髓瘤细胞的培养

将小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 从液氮罐中取出并立刻放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速溶解，800 rpm 离心 5 min 后弃上清，将细胞沉淀用 1 mL RPMI-1640 培养基重悬后加入 T25 细胞瓶中，补充含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，放入细胞培养箱中培养。在当细胞处于生长期时按 1:3 比例传代，细胞复苏一周后，准备足够的细胞进行细胞融合步骤。

1.9 饲养层细胞的制备

取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，眼眶采血分离血清作为阴性血清。颈椎处死小鼠后泡入准备好的 75%酒精中 10 min，取出小鼠腹部朝上保定。无菌剪开小鼠腹部，用镊子提起腹膜，用 5 mL 注射器抽取 4 mL RPMI-1640 培养基，注入小鼠腹腔中，注意不要戳到内脏和血管防止污染，轻柔按摩腹部后吸出培养基；如此重复操作 5 次后，静置 10 min 显微镜观察吸出液体中是否含红细胞，若有则需重新制备。若没有，则用含 HAT 和 20%FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬饲养细胞并细胞计数稀释成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度，均匀铺在 5~6 块 96 孔板上，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。将 96 孔细胞板放在细培养箱中过夜培养，第二天进行细胞融合。

1.10 细胞融合

1.10.1 制备脾细胞

取一只血清效价高达 10^5 的免疫小鼠，眼眶采血分离阳性血清备用。颈椎处死小鼠后泡入准备好的 75% 酒精中 10 min，取出小鼠左侧卧保定。无菌剪开小鼠胸部皮肤，可看到脾脏；小心剪开腹膜，顿性分离脾脏周围组织；取出脾脏放入准备好的无菌平皿中，用 RPMI-1640 培养基冲洗几次，用注射器在脾脏表面无序戳一些孔。用 5 mL 注射器吸取 RPMI-1640 后注入脾脏中使脾细胞被冲洗出来，反复几次直到脾脏颜色变淡透明。将所有的液体收集，备用。

1.10.2 细胞融合

提前准备细胞融合所必须的各种试剂并将 PET、RPMI-1640 培养基、HAT、FBS 放于细胞培养箱中预热；

从细胞培养箱中取出处于对数生长期且复苏时间超过一周的 SP2/0 细胞，弃上清，轻轻吹散细胞收集于离心管中；

将脾细胞及 SP2/0 细胞 800 rpm 离心 10 min 后弃上清，重复两次；

弃上清，用 5 mL RPMI-1640 不完全培养基分别重悬脾细胞和 SP2/0 细胞并利用细胞计数仪计数，按照脾细胞：SP2/0=10~5:1 的比例混合，离心。

弃上清（尽量弃干净），用手掌摩擦离心管底部使细胞松散不成团（这一步很关键），将离心管放入 37°C 水浴中，用 1 mL 注射器取 1 mL 已温浴的 PEG 溶液，在 1 min 内匀速加入离心管中，随加随晃动离心管使 PEG 作用均匀；

静置 1 min 后加入含 20% RPMI-1640 的培养基，前 30 s 加 1 mL，后 30 s 加 3 mL，第二分钟内匀速加完 11 mL 后补齐培养基到 30 mL，然后在 37°C 水浴条件下静置 10 min；

800 rpm 离心 10 min，弃上清，沿管壁轻轻加入 30 mL RPMI-1640 不完全培养基（不吹散细胞），离心弃上清洗去残留的 PEG；

沿管壁加入 5 mL 已预热 HAT 培养基，轻轻重悬细胞。补加预热的 HAT 培养基，20% 胎牛血清，混匀分装至铺有饲养细胞的细胞板中，置于细胞培养箱中培养。

5 天后补充新鲜的 HAT 培养基，7~10 天当细胞长至孔底约 30% 时，可以吸出细胞上清检测抗体。

1.11 杂交瘤细胞的筛选

在细胞融合 7~10 天后观察细胞状态并吸取细胞上清进行 ELISA 检测，补齐培养基。具体步骤如下：

用碳酸盐缓冲液将纯化蛋白作为包被原稀释到 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板中，4°C 包被过夜；第二天用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干，每孔加入 100 μL 5% 脱

脂奶溶液, 37°C 封闭 1 h; 用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干。将分离的小鼠阴阳性血清用 5% 脱脂奶稀释后加入封闭后的酶标板上作为阴阳性对照, 同时将待检的融合细胞上清加到 ELISA 板上, 100 μL /孔, 37°C 作用 1 h 后用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干, 加入 1:5000 稀释的 HRP-YKS 二抗, 37°C 孵育 30 min 后用 300 μL PBST 洗板子 5 次后拍干, 避光, 每孔加入等体积混合的 TMB 显色液, 室温孵育 15 min 后加入 2M H_2SO_4 终止, 将 ELISA 板放入多功能酶标仪, 测量 OD_{450} 的大小, P 作为待检样品的值, N 作为阴性对照的值, 当 $P/N > 2.1$ 时待检样品被判定为阳性。

值得注意的是由于脾细胞的存在, 第一次 ELISA 检测大概率有假阳性的存在, 故在第一次检测 2~3 天后至少需要再检测一次。

记录 ELISA 结果, 挑选读值较高且细胞状态良好的细胞株进行亚克隆。

1.12 亚克隆杂交瘤细胞

按照 2.5 中步骤, 提前一天制备小鼠饲养层细胞。标记 ELISA 检测阳性的细胞孔, 弃上清用 RPMI-1640 不完全培养基将细胞重悬后用细胞计数仪计数, 利用有限稀释法 10 倍比稀释细胞, 最终达到 100 个细胞/10 mL, 补齐 20% FBS, 均匀分装到铺有饲养层细胞的 96 孔中, 放入细胞培养箱中培养, 5 天后补充完全培养基。7~10 天观察细胞状态并进行 ELISA 检测。对检测结果为阳性且是单克隆细胞的孔继续亚克隆, 直至所有克隆细胞孔检测均为阳性后, 挑选某一亚克隆孔进行扩大培养及保种。

1.13 单抗细胞保种

将处于对数生长期的细胞弃上清, 加入 RPMI-1640 培养基吹下细胞并使用细胞计数仪计数, 800 rpm 离心 5 min, 用 cellbanker2 冻存液将细胞重悬, 按 1 mL/管分装于细胞冻存管中, 冻于 -80°C 过夜后放于液氮中保存。

1.14 单克隆抗体腹水的制备

腹腔无菌注射 0.5 mL 不完全佐剂于 8~10 周龄 Balb/c 雌性小鼠, 1 周后将筛选出的单抗细胞用无血清的 RPMI-1640 培养基重悬并腹腔注射小鼠体内, 每只小鼠约 $10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞。7~10 天后观察小鼠腹部隆起情况, 收集腹水, 3000 rpm 离心 10 min 后, 取上清保存于 -40°C。

1.15 单克隆抗体鉴定

1.15.1 单克隆抗体亚型鉴定

参照单抗亚类鉴定酶试剂盒说明书, 收集细胞上清。以 ELISA 的方法测定单克隆抗体的重链和轻链。

1.15.2 单克隆抗体效价测定

ELISA 法检测收集的细胞上清和腹水抗体效价, 细胞上清 2 倍倍比稀释, 至 $1:2^{14}$, 腹水 10 倍倍比稀释, 至 $1:10^8$, 设立阳性对照和阴性对照。结果为阳性时, 最高稀释度就是单克隆抗体的效价。具体操作步骤同 2.7。

1.15.3 Western-blot 鉴定

取 30 μ L 感染 FAdV-4 JS 株的 LMH 细胞及纯化的 pCold I-hexon-1 蛋白, 加入 $4\times$ loading buffer 混匀, 煮沸 15 min, 12 000 rpm 离心 10 min。用 10% SDS 蛋白胶进行电泳, 而后转印至硝酸纤维 (NC) 膜。用 5% 脱脂奶在 37°C 摇床封闭 30 min, 用 PBST 洗涤 3 次后, 孵育杂交瘤细胞的上清原液, 在 37°C 摇床作用 1 h。洗涤 3 次后与二抗 HRP-YKS 在 37°C 摇床作用 30 min。PBST 再次洗 3 次后, 加入等比混合的化学发光液 A 和 B, 用多功能成像仪曝光显色。

1.15.4 间接免疫荧光实验

将 LMH 细胞均匀铺在 96 孔细胞板上, 再细胞培养箱中培养过夜; 待细胞长到 80% 时, 按照 1:1000 的比列接种 JS 株病毒, 同时设立阴性细胞对照。培养 48h 后观察细胞状态, 若有病变则弃去细胞上清, 加入 4% 多聚甲醛固定液室温固定 15 min。PBS 洗 3 次后加入单抗细胞上清, 37°C 作用 1 h 后再次洗涤 3 次, 避光按 1:400 加入二抗 FITC-YKS, 37°C 孵育 30 min。PBS 洗 3 次后加入少量 PBS, 用倒置荧光显微镜观察荧光。

1.15.5 抗体中和实验

为了验证制备的单抗是否有中和活性, 将细胞上清液按 1:2 倍比稀释, 与含 200 TCID₅₀ 病毒液等比混合均匀, 37°C 作用 2 h。将每个稀释的抗体与病毒混合液加至单层 LMH 细胞中。病毒液作为阳性对照, PBS 作为阴性对照。细胞放入 37°C 培养箱中培养, 并观察细胞病变, 48 h 后利用间接免疫荧光的方法观察。中和效价是可以完全中和细胞病变, 无荧光时抗体的最高稀释度。

1.16 单抗腹水的制备

1.16.1 制备腹水

选取 10~12 周龄雌性 Balb/c 小鼠 6 只, 并腹腔注射 0.5 mL 弗氏不完全佐剂刺激 10~14 天;

复苏单抗细胞并 ELISA 确定其有抗体效价;

将细胞稀释成 $(1\sim5) \times 10^6$ /只, 每种单抗分别注射三只小鼠;

接种细胞约 7 天后可观察到小鼠腹部涨大, 收集腹水;

腹水混合后 1500 rpm 离心 10 min 沉淀并移除腹水中的细胞;

48 h 后抽第二次腹水, 之后再 48 h 对小鼠实施安乐死并进行第三次抽腹水;

1.16.2 纯化腹水

首先利用辛酸-硫酸铵法 (CA-AS) 对小鼠腹水进行初步提成。其原理是在酸性条件下 (pH=4.5), 非 IgG 的蛋白成分能被辛酸等短链脂肪酸沉淀, 上清中剩余的蛋白主要是 IgG, 再用硫酸铵沉淀上清能获得纯度较高的 IgG。具体步骤如下:

腹水 4°C, 12000 rpm 离心 15 min, 去除大的聚集物;

腹水上清滤纸过滤去除脂质和大的颗粒沉淀, 滤液用 4 倍体积的 60mM 醋酸缓冲液 (pH=4.0) 稀释后, 用 1 M NaOH 调 pH 到 4.5 (一般刚好早 4.5, 可不再调);

逐滴加入辛酸 (终浓度为 25 μ L/mL 稀释腹水), 待溶解后再加另一滴, 室温搅拌 30 min, 然后 4°C 静置 2 h 以上, 使其充分沉淀;

12 000 rpm, 4°C, 30 min 收集上清;

上清液用普通滤纸过滤 1 次, 加入 1/10 体积的 10×PBS, 用 1M NaOH 调到 7.4, 冰浴到 4°C;

根据每 mL 上述混合液加 0.277g 固体硫酸铵 (0°C 条件下, 45% 饱和硫酸铵为 0.291g/mL), 冰浴条件下边搅拌边缓慢加硫酸铵, 不可一次全部加入, 而以小分量多次慢慢溶入, 并不时搅拌;

硫酸铵全部加入后, 再搅拌 10~30 min, 使溶液完全平衡, 然后离心。一般采取 4°C 搅拌 30 min 后, 继续静置至少 60 min (一般过夜)。再 13000 rpm 4°C 离心 30 min, 弃上清, 短暂离心后将沉淀溶解于少量 PBS 中。如果进行亲和层析可直接将沉淀溶解于 1.5 mL 结合缓冲液中。

待对抗体腹水进行初提后, 再利用 GE 公司的 protein-G 腹水抗体纯化柱子进行纯化。具体步骤如下:

用注射器填充柱子, 用鲁尔接口连接柱子 (移除顶盖) 和注射器, 使连接一滴一滴出水, 防止空气进入;

除去柱子出口的封盖;

冲去填料内的酒精, 速率 1 滴/秒;

用 3 mL binding buffer 平衡柱子;

1:1 用 binding buffer 与腹水混匀后加入柱子中;

用 10 mL binding buffer 冲洗后再用 3~5 mL elution buffer 洗脱, 并在下方用含 60~200 μL 的中和 buffer 及时收集腹水。

1.16.3 纯化效果检验

将纯化前后的腹水稀释后加入 4 \times 上样缓冲液, 煮沸 15 min 后 12000 rpm 离心 5 min, 取 10 μL 加入 SDS-PAGE 胶中。在电压 80 V 30 min, 120 V 60 min 后, 将蛋白胶放入考马斯蓝染液中染色 2 h, 然后脱色至没有背景。观察腹水纯化效果。

2 结果

2.1 hexon-1 基因的扩增

以 FAdV-4 JS 株提取病毒 DNA 为模板, 用设计的引物扩增 hexon 基因的前 1 500 bp 片段并命名为 hexon-1。扩增结果如下, 扩增出了 1 500 bp 左右的条带, 与预计条带大小相符。

2.2 原核表达载体的验证

2.2.1 载体构建

将 hexon-1 片段和载体 pCold I 进行酶切和连接, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态中。挑取单个菌落进行菌液 PCR, 经鉴定, 扩增出了 1500 bp 左右片段, 与目标片段大小一致 (图 4-2)。菌液送往擎科生物科技有限公司测序, 测序结果显示重组载体 pCold I-hexon-1 构建成功。



图 4-1 hexon-1 扩增

Fig.4-1 Amplification of hexon -1

M:2000marker;1~3:扩增 hexon-1 片段;4:阴性对照;5:阳性对照

Note: M: 2000 marker: 1-3: amplification of hexon 'fragment; 4: negative control; 5: positive control



图 4-2 pCold I-hexon-1 鉴定

Fig. 4-2 Identification of pCold I - hexon -1

注: M: 2000marker; 1~4: hexon-1 片段鉴定; 5: 阳性对照

Note: M: marker; 1~4: hexon-1 segment; 5: positive control

2.2.2 原核表达蛋白的纯化

将原核表达载体 pCold I-hexon-1 转化入表达载体 BL21(DE3)中后, 加入 IPTG 进行诱导表达, 超声波裂解后跑蛋白胶发现蛋白主要在菌体沉淀中表达(图 4-3)。蛋白大小在 70 kDa 左右, 这可能与蛋白结构相关。大量表达蛋白后用 Ni 柱纯化包涵体。最后经 SDS-PAGE 验证, hexon-1 蛋白成功表达并纯化(图 4-4)。

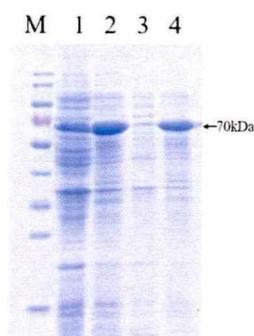


图 4-3 pCold I-hexon-1 蛋白表达

Fig.4-3 Expression of pColdI-hexon -1

注: M:蛋白 marker;1: pCold I-hexon-1 诱导前; 2: pCold I-hexon-1 诱导后全菌; 3: pCold I-hexon-1 上清; 4: pCold I-hexon-1 沉淀

Note: M: protein marker; 1: pCold I -hexon 'before induction; 2: whole bacteria after induction; 3: pCold I -hexon-1 superfine; 4: pCold I-hexon-1precipitation

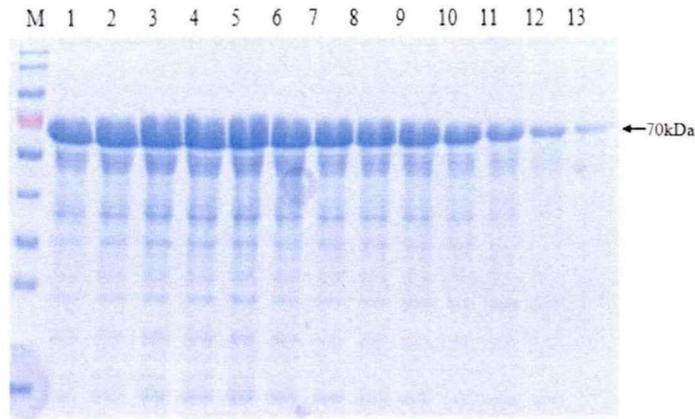


图 4-4 pColdI-hexon-1 纯化蛋白

Fig.4-4 Purified protein of pCold I – hexon-1

注: M:蛋白 marker;1~13: pColdI-hexon-1 纯化后蛋白

Note: M: protein marker; 1 ~ 13: pCold I – hexon-1 purified protein

2.2.3 多克隆抗体效价的检测

第三次免疫小鼠后一周, 尾尖采血分离血清, ELISA 法测定血清抗体效价。共免疫小鼠 3 只, 其抗体效价分别为 $1:10^6$ 、 $1:10^5$ 和 $1:10^5$, 选择效价较高的小鼠加强免疫, 准备细胞融合。

2.3 单克隆抗体的鉴定

经过四次亚克隆筛选出 3 株能够稳定分泌抗 4 型禽腺病毒 hexon 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 4G9、6C6 和 6E10。收集细胞上清并对其进行单抗亚型、抗体效价、WB 反应性以及病毒反应性、抗体中和活性的鉴定。

2.3.1 单克隆抗体亚型和抗体效价测定

表 4-1 3 株单抗的特征

Table4-1 Characterization of three monoclonal antibody

mAbs	ELISA Titers of supernatant	ELISA Titers of ascites	Isotype	Light chain
4G9	2^8	10^5	IgG1	Kappa
6C6	2^{12}	-	IgG1	Kappa
6E10	2^9	10^4	IgG2b	Kappa

2.3.2 Western-blot 鉴定

将重组菌 pCold I-hexon-1 在 BL21 诱导表达, LMH 细胞接种病毒 48 h 后收集细

胞并进行 SDS-PAGE, 验证与单克隆抗体的反应性。结果显示 (图 4-5), 4G9、6C6 和 6E10 的单抗上清都与蛋白和病毒发生特异性的反应且条带是单一的, 而与空载体表达的蛋白不发生反应, 说明 3 株单抗都可以特异性识别 hexon 蛋白。此处仅展示 6C6 与原核表达蛋白和病毒蛋白反应的图片, 另两株单抗结果同 6C6。其中原核表达蛋白 hexon-1 条带大小在 70kDa, 病毒 hexon 蛋白在 100 kDa 左右, 大小不一, 这是由于 hexon 蛋白常在病毒中以三聚体形式存在, 蛋白质的三级结构导致蛋白大小有所偏差。

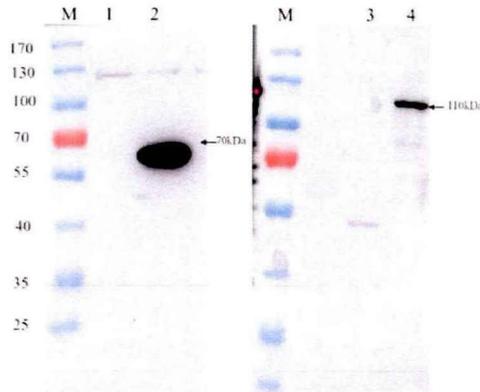


图 4-5 单抗上清与原核表达蛋白以及病毒蛋白 western-blot 反应

Fig. 4-5 western blot reaction of monoclonal antibody with prokaryotic expressed proteins and viral proteins

注: M:marker;1:pCold I空载体; 2: pCold I-hexon; 3:LMH 细胞; 4:FAdV-4 JS 株感染的 LMH 细胞

Note: M: marker; 1: pCold I; 2: pCold I - hexon; 3: LMH cells; 4: LMH cells infected by FAdV-4

2.3.3 间接免疫荧光实验

用间接免疫荧光检测单抗细胞上清与病毒感染过程形成的 hexon 蛋白的反应, 通过倒置显微镜观察荧光。结果发现如图 4-6, 6C6 和 6E10 细胞上清都与 FAdV-4 感染的 LMH 细胞发生反应, 出现了绿色荧光, 而与未接毒的细胞不发生反应, 无绿色荧光; 而 4G9 不仅与感染了病毒的细胞反应, 与未接毒的细胞也有轻微的非特异性反应。说明 3 株单抗能够与 FAdV-4 发生反应, 但 6C6 和 6E10 特异性更好。

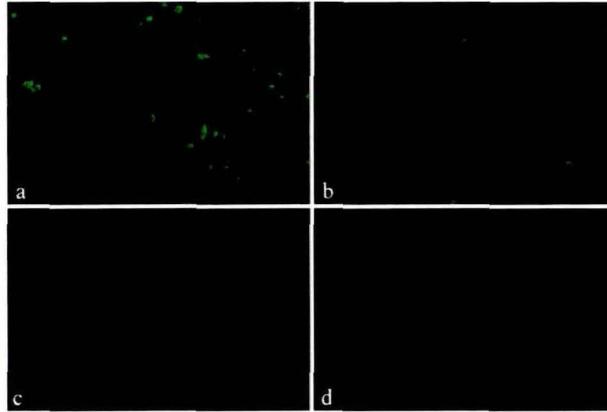


图 4-6 单抗上清和 FAAdV-4 感染及未感染的 LMH 细胞之间的反应

Fig.4-6 Reactivity of the mAbs with the FAAdV-4 infected LMH cells and the uninfected LMH cells was detected by IFA assay

注: a:4G9; b:6C6; c:6E10; d:阴性对照

Note:a:4G9; b:6C6; c:6E10; d: positive control

2.3.4 中和抗体检测

3 株单克隆抗体与病毒液作用后接种 LMH 细胞, 48h 后细胞发生病变, 说明这 3 株单抗均无中和活性。

2.4 纯化腹水的鉴定

首先通过辛酸-硫酸铵法对 4G9 和 6E10 小鼠腹水进行初步纯化, 得到纯化后的 4G9 腹水和 6E10 腹水, 通过 Nanodrop 2000 仪器测蛋白浓度为 3.27 mg/mL 和 11.55 mg/mL, 分别收集 1.5 mL 和 2 mL(见表 4-1)。通过间接 ELISA 法检测抗体纯化前后抗体效价有所提升, 这与纯化后腹水体积变小有关。将初纯后的样品跑蛋白胶后染色观察可看到已去除大量杂带, 在抗体轻链和重链处可看到抗体 (图 4-7)。

表 4-2 单抗腹水初步纯化效果

Table 4-2 Primary purification of ascites

抗体	纯化前			纯化后		
	ELISA 效价	蛋白浓度	体积	ELISA 效价	蛋白浓度	体积
4G9	10 ⁵	27.9 mg/mL	6.5 mL	10 ⁷	3.67 mg/mL	1.5 mL
6E10	10 ⁴	29.0 mg/mL	7.5 mL	10 ⁸	11.55 mg/mL	2.0 mL

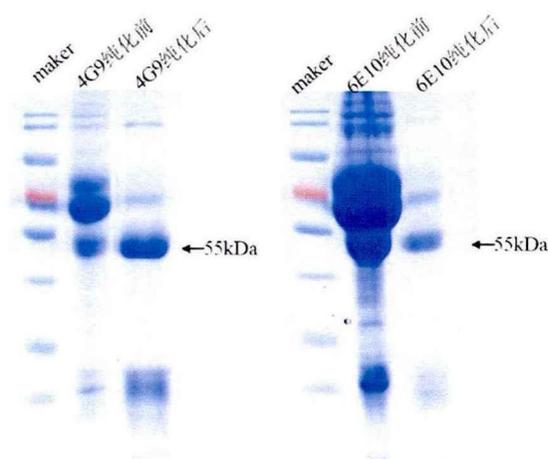


图 4-7 4G9 和 6E10 腹水初纯效果

Fig. 4-7 Primary purity effect of 4G9 and 6E10 ascites

由于 4G9 腹水经过初步纯化后仅收集到 1.5 mL 抗体, 合计抗体含量为 5.505 mg, 含量较少, 不适合进行进一步纯化。而初纯后的 6E10 抗体共收集 2 mL, 合计抗体含量为 23.1 mg, 适合使用 protein G 柱进一步纯化抗体。最终用 elution buffer 洗脱收集到 10.8 mL 抗体, 抗体浓度为 12.5 mg/mL。纯化效果如下图 4-8, 可见纯化后抗体轻链、重链明显, 几乎没有杂蛋白, 腹水纯化成功。

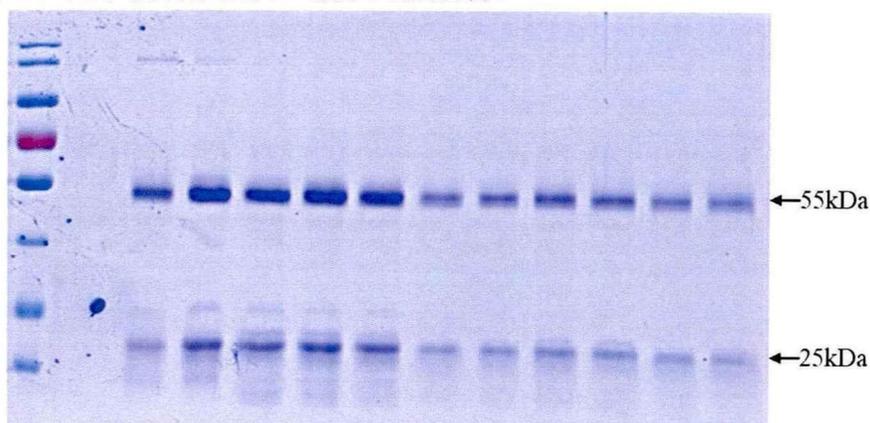


图 4-8 6E10 腹水二次纯化效果

Fig. 4-8 Secondary purification effect of 6E10 ascites

3 讨论

近几年来, 由禽腺病毒感染导致的 HHS 和 IBH 给养禽业带来了严重的经济损失。流行病学分析显示, 血清型 FAdV-4 是目前家禽中流行的主要致病性 FAdVs

之一^[115, 130, 131]。然而,高致病性 FAdV 的分子发病机制尚不清楚,为了更好地控制 IBH 和 HHS 疾病,需要确定开发高效疫苗或特异性诊断的重要抗原或抗原位点。多项研究表明, FAdV-4 hexon 在介导病毒感染和诱导感染机体的免疫反应中发挥重要作用^[132, 133]。

Hexon、penton 和 fiber 是 FAdV 编码的主要结构蛋白。虽然 hexon、penton 和纤维均含有显性抗原位点,但 hexon 和 penton 蛋白在 FAdV 的不同血清型中具有一定的保守性,而 fiber 在不同 FAdVs 中具有不同的保守性。因此,hexon 蛋白是开发 FAdV 诊断和疫苗的合适靶点^[132]。Hexon 蛋白约占腺病毒分子质量的 60%,具有广泛的保守区域和病毒家族特异性抗原决定簇^[134]。该区域氨基酸变异性小于 15%。Hexon 在被感染的细胞中只有 20%~30% 的蛋白被用来组装病毒颗粒,这样便于获得天然形式的 hexon,也使得抗 hexon 蛋白的单克隆抗体适用于各种腺病毒检测^[135]。现在关于血清 4 型禽腺病毒 hexon 蛋白单克隆抗体的报导较少^[20, 136]。

本研究将分离获得的 FAdV-4 JS 株的 hexon 基因截断体进行扩增并制备 pCold I-hexon-1 融合蛋白作为免疫原免疫小鼠,成功制备了 3 株能够稳定分泌 hexon 单克隆抗体的细胞株。根据间接 ELISA 方法检测 3 株单克隆抗体上清效价分别为 1:256、1:4096 和 1:512 (4G9、6C6 和 6E10); IFA 结果表明这 3 株抗体可以与完整的 FAdV-4 病毒相互作用; Western-blot 筛选结果发现他们也能与重组表达的蛋白相互作用。同时制备并纯化了 4G9 和 6E10 抗体的小鼠腹水,根据间接 ELISA 检测其效价为 1:10⁷ 和 1:10⁸,与细胞上清的抗体效价相比具有更高的抗体效价和纯度,有助于后续建立 FAdV 的诊断方法。这 3 株单克隆抗体的成功制备也为本实验室提供了研究禽腺病毒与宿主相互作用的有力工具。

4 本章小结

本研究成功制备了 3 株能够稳定分泌 hexon 单克隆抗体的细胞株,分别命名为 4G9, 6C6 和 6E10。根据间接 ELISA 方法检测 3 株单克隆抗体上清效价分别为 1:256、1:4096 和 1:512; IFA 与 Western-blot 结果表明这 3 株抗体可以与完整的 FAdV-4 病毒相互作用。本研究同时制备并纯化了 4G9 和 6E10 抗体的小鼠腹水,其效价为 1:10⁷ 和 1:10⁸,有助于后续建立 FAdV 的诊断方法。

全文总结

1. 从江苏省某发病鸡场成功分离获得一株血清 4 型禽腺病毒，通过扩增 hexon 基因并与我国流行株进行氨基酸序列比对，发现 100%一致，但与加拿大分离株 ON1 差异较大；同时对 hexon 基因进行同源进化分析发现 JS 株与我国近年流行株位于同一分支。

2. 将分离获得的 FAdV-4 JS 株进行适应性和致病性试验，发现该毒株可以很好的在 LMH 细胞上增殖传代，但在鸡胚及 CEK 细胞上传代次数有限。同时，将该毒株以 $10^{6.0}$ TCID₅₀/只的毒价通过肌注和口服方式感染 21 日龄 SPF 鸡，发现肌注感染鸡群在攻毒后 3~5 天全部发病，出现精神沉郁，被毛粗乱，蹲卧等症状，死亡率为 90%；而口服感染组鸡群没有死亡，但在感染后有精神沉郁的症状，随后恢复。

3. 成功纯化了高纯度的 hexon-1 蛋白作为免疫原，筛选了 3 株能稳定分泌抗 hexon 单抗的杂交瘤细胞株，分别命名为 4G9、6C6 和 6E10。这 3 株单抗均能与纯化的 hexon 蛋白以及 FAdV-4 感染的 LMH 细胞反应，具有良好的特异性。

参考文献

- [1] Stewart P L, Fuller S D, Burnett R M. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy [J]. *Embo Journal*, 1993, 12(7): 2589-2599.
- [2] El-Tholoth M, Abou El-Azm K I. Molecular detection and characterization of fowl adenovirus associated with inclusion body hepatitis from broiler chickens in Egypt[J]. *Tropical Animal Health & Production*, 2019, 51(5): 1065-1071.
- [3] Norfitriah M S, Mohd H B, Abdul R O, Aini Ideris , Nurulfiza Mat Isa. Molecular characterization of fowl adenovirus isolate of Malaysia attenuated in chicken embryo liver cells and its pathogenicity and immunogenicity in chickens[J]. *PloS one*, 2019, 14(12): e0225863.
- [4] Marek A, Ballmann M Z, Kosiol C, Balázs Harrach , Christian Schlötterer, Michael Hess. Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus Aviadenovirus[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt_1): 156-170.
- [5] Yu G, Lin Y, Dou Y, Tang Y, Diao Y X. Prevalence of Fowl Adenovirus Serotype 4 and Co-Infection by Immunosuppressive Viruses in Fowl with Hydropericardium Hepatitis Syndrome in Shandong Province, China[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 517.
- [6] Hess M, Marek A, Benkö M. Genetic diversity of species Fowl aviadenovirus D and Fowl aviadenovirus E[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(9): 2323-2332.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997.
Yin Z, Liu J H. *Animal Virology*[M]. Beijing: science press,1997 (in Chinese).
- [8] Keyvan A T Z, Popowich S, Knezacek T, Goodhope B, Willson P, Gomis S. Association of increased rate of condemnation of broiler carcasses due to hepatic abnormalities with immunosuppressive diseases in the broiler chicken industry in Saskatchewan[J]. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2015, 79(4): 261-267.
- [9] Harrison S C. Virology. Looking inside adenovirus[J]. *Science*, 2010, 329(5995): 1026-1027.
- [10] Pablo G-C, Antonio L L-S, Gavin C F, Langlois P, Mark J van Raaij. Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 long fiber[J]. *The Journal of general virology*, 2007, 88: 2407-2416.
- [11] 侯德云. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社:1990.
Hou D Y. *Molecular Virology*[M]. Beijing: Xueyuan Press:1990 (in Chinese).
- [12] Kyoko T, Fuminori S, Shunsuke I, Hemmi M, Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, Katayama K, Kamada H, Mizuguchi H. Antibodies against adenovirus fiber and penton base proteins inhibit adenovirus vector-mediated transduction in the liver following systemic administration[J]. *Scientific Reports*, 8(1): 12315.
- [13] Bradley R, Lynch D M, Iampietro M J, Borducchi E N, Barouch D H. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. J

- Virology* 86: 625-629[J]. *Journal of Virology*, 2011, 86(1): 625-629.
- [14] Davison J A. Genetic content and evolution of adenoviruses[J]. *Journal of General Virology*, 84(11): 2895-2908.
- [15] Henry L J, Xia D, Wilke M E. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(8): 5239-5246.
- [16] 陈雪蛟. I群禽腺病毒湖北株的分离鉴定及致病性研究[D]. 荆州: 长江大学, 2016.
Chen X J. Isolation and identification and study on pathogenicity of fowl adenovirus group I in Hu bei province[D]. Jinzhou: Yangtze University, 2016 (in Chinese).
- [17] 国纪垒, 刁有祥, 薛聪, 王蛟, 李建侠, 唐熠, 程彦丽. I 群禽腺病毒山东株的分离鉴定及 hexon 基因的克隆与分析[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(12): 1773-1777.
Guo J L, Diao Y X, Xue C, Wang C, Li J X, Tang Y, Cheng Y L. Isolation and identification of inclusion body hepatitis and hexon gene cloning and analysis[J]. *Chin J Vet Sci*, 2012, 32(12): 1773-1777 (in Chinese with English abstract).
- [18] 刘岳龙, 崔治中, 徐福洲, 孙怀昌, 秦爱建, 何良梅. 鹅源腺病毒 Y81G4 株基因组末端倒置重复序列(ITR) 的核酸鉴定和结构分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(4): 285-288.
Liu Y L, Cui Z Z, Xu F Z, Duan Y Y, Sun H C, Qin A J, He L M. Sequence Determination and Structural Analysis of Inverted Terminal Repeats (ITR) of Aviadenovirus Y81G4 Strain Isolated from Goose[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22(4): 285-288 (in Chinese with English abstract).
- [19] Lu J, Wang R, Huang Y, Yu Y Z, Zhou X W, Huang P T, Yang Z X. A novel human monoclonal antibody potently neutralizes human adenovirus serotype 7 by primarily targeting the adenovirus hexon protein[J]. *Virology*, 2019, 543: 20-26.
- [20] Rux J J, Kuser P R, Burnett R M. Structural and Phylogenetic Analysis of Adenovirus Hexons by Use of High-Resolution X-Ray Crystallographic, Molecular Modeling, and Sequence-Based Methods[J]. *Journal of Virology*, 77(17): 9553-9566.
- [21] Liu T, Wang M, Zhou Z, Fan Y, Xu Y, Tian X G, Zhou R. Infection and replication of human adenovirus type 3 possessing type 5 fiber protein in rodent cells[J]. *Virus research*, 2020, 279: 197886.
- [22] Athappilly F K, Murali R, Rux J J, Cai Z, Burnett R M. The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution[J]. *Journal of molecular biology*, 1994, 242(4): 430-455.
- [23] Ivanics É, Palya V, Markos B, Dán Adám, Ursu Krisztina, Balázs Harrach, Gyozo Kaján, Róbert Glávits. Hepatitis and hydropericardium syndrome associated with adenovirus infection in goslings[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2010, 58(1): 47-58.
- [24] Mazaheri A, Prusas C, Voss M, Hess M. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens[J]. *Avian Pathology*, 1998, 27(3): 269-276.
- [25] Stasiak A C, Stehle T. Human adenovirus binding to host cell receptors: a structural view[J]. *Medical microbiology and immunology*, 2020, 209(3): 325-333.
- [26] Zhao M, Guo Y, Qiu F, Wang L, Yang S, Feng Z S, Li G X. Molecular and clinical

- characterization of human adenovirus associated with acute respiratory tract infection in hospitalized children[J]. *Journal of clinical virology*, 2020, 123: 104254.
- [27] Abghour S, Zro K, Mouahid M, Tahiri F, Tarta M, Berrada J, Kichou F. Isolation and characterization of fowl aviadenovirus serotype 11 from chickens with inclusion body hepatitis in Morocco[J]. *PloS one*, 2019, 14(12): e0227004.
- [28] Bremner K H, Scherer J, Yi J, Vershinin M, Steven P G, Richard B V. Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit[J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(6): 523-535.
- [29] De La Torre D, Nunez LFN, Santander Parra S H, Claudete S Astolfi-Ferreira, Antonio J Piantino Ferreira. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil[J]. *Virusdisease*, 2018, 29(1): 83-88.
- [30] 张明明. I群禽腺病毒的分离鉴定和生物学特性研究及重组禽腺病毒的构建[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- Zhang M M. Isolation, identification and biological characterization of fowl adenovirus group I and the construction of recombinant fowl adenovirus[D]. Yangzhou University, 2008 (in Chinese).
- [31] Aziz F, Tufail S, Shah MA, Shah M S, Habib M, Osman M, Mazhar I, Moazur R. In silico epitope prediction and immunogenic analysis for penton base epitope-focused vaccine against hydropericardium syndrome in chicken[J]. *Virus research*, 2019, 273: 197750.
- [32] Chernyavska M, Schmid M, Freitag PC, V Palacio-Castañeda, Piruska A, Huck W T S, A Plückthun, Verdurmen W P R. Unravelling Receptor and RGD Motif Dependence of Retargeted Adenoviral Vectors using Advanced Tumor Model Systems[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 18568.
- [33] Chen C, Wan C, Shi S, Cheng L F, Chen Z, Fu G H, Liu R C, Zhu C H, Huang Y. Development and application of a fiber2 protein-based indirect ELISA for detection of duck adenovirus 3[J]. *Molecular and cellular probes*, 2019, 48: 101447.
- [34] Tian K Y, Guo H F, Li N, Zhang Y H, Zeng W, Wang B Y, Yang X, Li Y T, Zhao J. Protection of chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome and Newcastle disease with a recombinant Newcastle disease virus vaccine expressing the fowl adenovirus serotype 4 fiber-2 protein[J]. *Vaccine*, 2020, 38(8): 1989-1997.
- [35] Kyoko T, Fuminori S, Shunsuke I, Masahisa H, Mitsuhiro M, Masashi T, Kazufumi K, Haruhiko K, Hiroyuki M. Antibodies against adenovirus fiber and penton base proteins inhibit adenovirus vector-mediated transduction in the liver following systemic administration[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12315-12327.
- [36] Bradley R R, Lynch D M, Iampietro M J, Erica N B, Dan H B. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection[J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 625-629.
- [37] Schachner A, Marek A, Jaskulska B, Ivana B, Michael H. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS)[J]. *Vaccine*, 32(9): 1086-1092.
- [38] Costa R, Akkerman N, Graves D, Leandro C, Scott B, Peter P. Characterization of Adenovirus 5

- E1A Exon 1 Deletion Mutants in the Viral Replicative Cycle[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 213.
- [39] Hidalgo P, Ip W H, Dobner T, Ramón A Gonzalez. The biology of the adenovirus E1B 55K protein[J]. *FEBS Lett*, 2019, 593(24): 3504-3517.
- [40] Roman-Trufero M, Ito C M, Pedebos C, Conrado P, Indiana M, Wang F Y, Mohammad M K, Benjamin M, Zoe We, Aida di G, Veronique A, Syma K, Christian S, Tristan R, Niall D. Evolution of an amniote-specific mechanism for modulating ubiquitin signalling via phosphoregulation of the E2 enzyme UBE2D3[J]. *Molecular biology and evolution*, 2020, pii: msaa060.
- [41] Signas C, Akusjarvi G, Pettersson U. Region E3 of human adenoviruses; differences between the oncogenic adenovirus-3 and the non-oncogenic adenovirus-2[J]. *Gene*, 50(1-3): 173-184.
- [42] Dallaire F, Schreiner S, Blair G E, Thomas D, Philip E B, Paola B. The Human Adenovirus Type 5 E4orf6/E1B55K E3 Ubiquitin Ligase Complex Can Mimic E1A Effects on E2F[J]. *mSphere*, 2016, 1(1): e00014-15.
- [43] Feizy Z, Peddibhotla S, Khan S, Vijay H, Wang S, Nikhil V D. Nanoparticle-mediated in vitro delivery of E4orf1 to preadipocytes is a clinically relevant delivery system to improve glucose uptake[J]. *International journal of obesity*, 2020. doi:10.1038/s41366-020-0526-6.
- [44] Zhang W, Arcos R. Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery[J]. *Virology*, 2005, 334(2): 194-202.
- [45] 申秋平. 检测血清 4 型禽腺病毒非结构蛋白 22K、52K 抗体的 ELISA 方法建立及应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- Shen Q P. Establishment and application of ELISA for the detection of antibody to nonstructural protein 22K and 52K of serotype 4 fowl adenovirus[D]. Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese).
- [46] Hodges B L, Evans H K, Everett R S, Ding E Y, Serra D, Amalfitano A. Adenovirus Vectors with the 100K Gene Deleted and Their Potential for Multiple Gene Therapy Applications[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(13): 5913-5920.
- [47] Cepko C L, Sharp P A. Analysis of Ad5 hexon and 100K mutants using conformation-specific monoclonal antibodies[J]. 1983, 129(1): 137-154.
- [48] Philipson L. Adenovirus Assembly[M]. Springer US, 1984.
- [49] Morin N, Boulanger P. Hexon trimerization occurring in an assembly-defective, 100k temperature-sensitive mutant of adenovirus 2[J]. *Virology*, 1986, 152(1): 11-31.
- [50] Adam S A, Dreyfuss G. Adenovirus proteins associated with mRNA and hnRNA in infected HeLa cells[J]. *Journal of Virology*, 1987, 61(10): 3276-3283.
- [51] 陈卫国. 血清 4 型 I 亚群禽腺病毒的分离鉴定及其卵黄抗体的研制与应用[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2018.
- Chen W G. Isolation and identification of avian adenovirus type4 subgroup I and development and application of yolk antibody[D]. Xian: Noryhwest A&F University, 2018 (in Chinese) .
- [52] Chen H, Dou Y, Zheng X, Tang Y, Zhang M, Zhang Y, Wang Y, Diao Y. Hydropericardium Hepatitis Syndrome Emerged in Cherry Valley Ducks in China[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1262-1267.

- [53] 吕恒欣. 山东部分地区鸭胚中I群禽腺病毒的流行病学调查[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
Lv H X. Epidemiological investigation of group I fowl adenovirus of duck embryos in Shandong province[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [54] 马建山. 阜新地区I群禽腺病毒分子流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018: 138-140.
Ma J S. Fuxin region I adenovirus molecular epidemiological investigation group of birds[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018: 138-140 (in Chinese).
- [55] 姚克昌, 刘月月, 游国进, 李淑芸, 夏静, 何肖, 李雯雯, 杜莉静, 韩新锋, 黄勇. 西南部分地区I群禽腺病毒的分子流行病学调查及致病性研究[J]. 浙江农业学报, 2017, (11): 46-55.
Yao K C, Liu Y Y, You G J, Li S Y, Xia J, He X, Li W W, Du L J, Han X F, Huang Y. Pathogenicity and epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus subpopulation I infection in chickens in parts of southwestern China[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis 2017, (11): 46-55 (in Chinese with English abstract).
- [56] 庞笑语, 王建昌, 王金凤, 于芳, 刘聚祥, 孙继国, 袁万哲. 禽腺病毒 4 型垂直传播流行病学调查[C]. 中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会 2018 年学术年会禽病学分会第十九次学术研讨会论文集: 中国畜牧兽医学会, 2018: 80.
Pang X Y, Wang J C, Wang J F, Yu F, Liu J X, Sun J G, Yuan W Z. Epidemiological investigation of vertical transmission of avian adenovirus type 4[C]. 2018:80 (in Chinese).
- [57] 黄兵, 李玉峰, 王莉莉, 马秀丽, 田夫林. 禽腺病毒 QU 分离株的致病性及细胞适应性研究[J]. 家禽科学, 2011, (4): 13-16.
Huang B, Li Y F, Wang L L, Ma X L, Tian F L. The pathogenicity and cell tropism of fowl adenovirus Q U strain[J]. Poultry Science, 2011, (4): 13-16 (in Chinese with English abstract).
- [58] 魏燕, 龚文孝, 杨影, 等. 鸡源禽腺病毒的 LMH 细胞传代及细胞传代毒株对 SPF 鸡的致病性[J]. 华中农业大学学报, 2020: 1-7.
- [59] Chen L, Yin L, Zhou Q, Peng P, Du Y P, Liu L L, Zhang Y, Xue C Y, Cao Y C. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015–2018[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 271.
- [60] Xia J, Yao K C, Liu Y Y, You G J, Li S Y, Liu P, Qin Z, Wen Y P, Wu R, Huang X B, Cao S J, Han X F, Huang Y. Isolation and molecular characterization of prevalent Fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015–2016 for the development of a control strategy[J]. Emerging Microbes & Infections, 6(11), e103.
- [61] 窦砚国. 血清 4 型 I 群禽腺病毒的分离鉴定及流行病学调查[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
Dou Y G. Isolation, Identification and Epidemiological Investigation of Group I Fowl Adenovirus Serotype 4[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [62] 粟元文, 王怀禹, 魏玲. 鸭源 FAdV-4 的分离鉴定与致病性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, 568(04): 104-107.
Su Y W, Wang H Y, Wei L. Isolation identification and pathogenicity analysis of FAdV-4 from duck[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 568(04): 104-107 (in Chinese).
- [63] Radwan MM, El-Deeb AH, Mousa MR, Ahmed A El-Sanousi, Mohamed A Shalab. First report of fowl adenovirus 8a from commercial broiler chickens in Egypt: molecular characterization and

- pathogenicity[J]. *Poultry science*, 2019, 98(1): 97-104.
- [64] Reece RL, Barr DA, Grix DC, Forsyth W M, Condrón R J, Hindmarsh M. Observations on naturally occurring inclusion body hepatitis in Victorian chickens[J]. *Australian veterinary journal*, 1986, 63(6): 201-202.
- [65] Maartens LH, Joubert HW, Aitchison H, Venter EH. Inclusion body hepatitis associated with an outbreak of fowl adenovirus type 2 and type 8b in broiler flocks in South Africa[J]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2014, 85(1): 1-5.
- [66] Oliver-Ferrando S, Dolz R, Calderón C, Valle R, Rivas R, Pérez M, Biarnés M, Blanco A, Bertran K, Ramis A, Busquets N, Majó N. Epidemiological and pathological investigation of fowl aviadenovirus serotypes 8b and 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Spain (2011–2013)[J]. *Avian Pathology*, 46(2): 157-165.
- [67] Steer-Cope P, Sandy J, O'Rourke D, Scott P, Browning G, Noormohammadi A. Chronologic Analysis of Gross and Histologic Lesions Induced by Field Strains of FAdV-1, FAdV-8b, and FAdV-11 in Six-Week-Old Chickens[J]. *Avian diseases*, 2017, 61(4): 512-519.
- [68] Ren G, Wang H, Yan Y, Liu F, Huang M, Chen R. Pathogenicity of a fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens associated with hydropericardium-hepatitis syndrome in China[J]. *Poultry science*, 2019, 98(7): 2765-2771.
- [69] 牛玉娟, 张桂华, 孙伟, 王鹏飞, 屈亚锦, 刘思当. 鸡肝炎-心包积液综合征的病理学诊断[J]. *中国兽医学报*, 2017, 037(6): 1111-1114,1120.
Niu Y J, Zhang G H, Sun W, Wang P F, Qu Y J, Liu S D. Pathological diagnosis of chicken hepatitis - pericardial effusion syndrome[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 037(6): 1111-1114,1120 (in Chinese).
- [70] 魏凤, 张文通, 苗立中, 沈志强. 一起鸡心包积液病例的诊治[J]. *家禽科学*, 2017, (3): 26-27.
Wei F, Zhang W T, Miao L Z, Shen Z Q. Diagnosis and treatment of a case of pericardial effusion[J]. *Poultry Science*, 2017, (3): 26-27 (in Chinese).
- [71] Beatrice, Grafl, Dieter, Günes A, Patricia W, Franz A, Josef B, Michael H. Quantity of virulent fowl adenovirus serotype 1 correlates with clinical signs, macroscopical and pathohistological lesions in gizzards following experimental induction of gizzard erosion in broilers[J]. *Veterinary Research*, 2013,44: 38.
- [72] Mase M, NAKAMURA K. Phylogenetic Analysis of Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens with Gizzard Erosion in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(11): 1535-1538.
- [73] Thanasut K, Fujino K, Taharaguchi M, Satoshi T, Fumie S, Masaru M, Kozo T. Genome Sequence of Fowl Aviadenovirus A Strain JM1/1, Which Caused Gizzard Erosions in Japan[J]. *Genome Announcements*, 5(41): e00749-00717.
- [74] Kaboudi K. Virus-induced immunosuppression in turkeys (*Meleagris gallopavo*): A review[J]. *Open Vet J*, 2020, 9(4): 349-360.
- [75] Sharma J M, Kim I J, Rautenschlein S, Yeh H Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, 24(2): 223-235.
- [76] Singh R, Singh K P, Cherian S, Mani S, Sanjay K, Manjunatha R G B, Shibani P, Kuldeep D.

- Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review[J]. *Veterinary Quarterly*, 2017, 37(1): 212-251.
- [77] Schonewille E, Singh A, Gbel T W, Gerner W, Saalmüller A, Hess M. Fowl adenovirus (FAdV) serotype 4 causes depletion of B and T cells in lymphoid organs in specific pathogen-free chickens following experimental infection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 121(1-2): 0-139.
- [78] Shivachandra S B, Sah R L, Singh S D, Kataria J M, Manimaran K. Immunosuppression in Broiler Chicks Fed Aflatoxin and Inoculated with Fowl Adenovirus Serotype-4 (FAV-4) Associated with Hydropericardium Syndrome[J]. *Veterinary Research Communications*, 27(1): 39-51.
- [79] 马畅, 孟凡生. 家禽免疫抑制疾病致病因子的研究进展[J]. *家禽科学*, 2015, 11: 51-54.
Ma C, Meng F S. The Study Progress on Pathogenic Factor of Immunosuppressive Diseases in Poultry[J]. *Poultry Science*, 2015, 11: 51-54 (in Chinese with English abstract).
- [80] Rosenberger J K, Eckroade R J, Klopp S, Krauss W C. Characterization of Several Viruses Isolated from Chickens with Inclusion Body Hepatitis and Aplastic Anemia[J]. 1974, 18(3): 399-409.
- [81] Meng F, Dong G, Zhang Y. Co-infection of fowl adenovirus with different immunosuppressive viruses in a chicken flock[J]. *Poult Sci*, 2018, 97(5): 1699-1705.
- [82] 李增光. 包涵体肝炎:鸡免疫抑制病的一种病毒性继发病[J]. *中国家禽*, 2006, 28(5): 48-50.
Li Z G. Inclusion body hepatitis: viral secondary to chicken immunosuppressive disease[J]. *China Poultry*, 2006, 28(5): 48-50 (in Chinese).
- [83] 刘延珂, 万文妍, 王贝贝, 吴艳阳, 杨东东, 高冬生, 李永涛, 王新卫, 常洪涛, 陈陆, 王川庆, 赵军. 禽腺病毒 4 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(11): 902-906.
Liu Y K, Wan W Y, Wang B B, Wu Y Y, Yang D D, Gao D S, Li Y T, Wang X W, Chang H T, Chen L, Wang C Q, Zhao J. Establishment of indirect ELISA for detection of antibodies against fowl adenovirus serotype 4[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(11): 902-906 (in Chinese with English abstract).
- [84] Shao H, Lu Y, Wang W, Li T F, Zhang J J, Wan Z M, Liang G C, Gao W, Qin A J, Ye J Q. Two novel monoclonal antibodies against fiber-1 protein of FAdV-4 and their application in detection of FAdV-4/10[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 232.
- [85] Saifuddin M, Wilks C R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect and quantify adenovirus in chicken tissues[J]. *Avian diseases*, 1990, 34(2): 239-245.
- [86] Saifuddin M, Wilks C R, Birtles M J. Development of an immunocytochemical procedure to detect adenoviral antigens in chicken tissues[J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 1991, 3(4): 313-318.
- [87] 智海东, 解生亮, 杨志, 王云峰, 张宇辉, 王牟平, 孙建宏, 陈洪岩. 禽腺病 I 型琼脂扩散抗原的研制及应用[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(08): 718-722.
Zhi H D, Xie S L, Yang Z, Wang Y F, Zhang Y H, Wang M P, Sun J H, Chen H Y. Development and application of agar diffusion antigen of fowl adenovirus type[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39(08): 718-722 (in Chinese with English abstract).

- [88] 路浩, 张伟, 王伟康, 梁广成, 王萍, 张建军, 郑文铝, 邵红霞, 秦爱建, 邹海涛, 叶建强. 血清 8 型禽腺病毒纤突蛋白基因的克隆表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国家禽, 2018, 40(04): 16-20.
Lu H, Zhang W, Wang W K, Liang G C, Wang P, Zhang J J, Zheng W L, Shao H X, Qin A J, Ye J Q. Cloning and Expression of Fiber Gene of Serotype Type 8 Fowl Adenovirus and Its Preparation of Polyclonal Antibody[J]. China Poultry, 2018, 40(04): 16-20 (in Chinese with English abstract).
- [89] 江之遥, 王欣慧, 王守春, 栾庆东, 王建琳, 尹燕博. 禽腺病毒 I 群、新城疫病毒和传染性支气管炎病毒多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(08): 17-20.
Jiang Z Y, Wang X H, Wang S C, Luan Q D, Wang J L, Yin Y B. Avian adenovirus I group, of poison and infectious bronchitis virus multiple PCR detection method is established[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine 2019, 55(08): 17-20 (in Chinese).
- [90] Yao M, Zhang X, Gao Y, Song S Q, Xu D N, Yan L P. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks[J]. BMC Vet Res, 2019, 15(1): 103.
- [91] 宋玲玲, 于可响, 王友令, 马秀丽, 袁小远, 刘涛, 鞠艳, 亓丽红, 艾武. 禽腺病毒 4 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(08): 118-122.
Song L L, Yu K X, Wang Y L, Ma X L, Yuan X Y, Liu T, Ju Y, Qi L H, Ai W. Establishment of real time quantitative PCR assay for detection of avian adenovirus type 4[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(08): 118-122 (in Chinese with English abstract).
- [92] Khler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. biotechnology, 1975, 256(5517): 495-497.
- [93] Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies[M]. Springer International Publishing, 2015.
- [94] Wang P, Zhang J, Wang W, Li T F, Liang G C, Shao H X, Gao W, Qin A J, Ye J Q. A novel monoclonal antibody efficiently blocks the infection of serotype 4 fowl adenovirus by targeting fiber-2[J]. Vet Res, 2018, 49(1): 29.
- [95] Lu H, Shao H, Chen H, Zhang J J, Wang W, Li T F, Xie Q, Qin A J, Ye J Q. Identification of novel B cell epitopes in the fiber protein of serotype 8 Fowl adenovirus[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 172.
- [96] 武敏. I 群禽腺病毒 JS 株 IIIa 蛋白是原核表达及其单克隆抗体的研制[D]. 扬州: 扬州大学, 2009.
Wu M. Avian adenovirus I group JS III protein is a prokaryotic expression and its research and production of monoclonal antibodies[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009 (in Chinese).
- [97] Hafez H M. Avian Adenoviruses Infections with Special Attention to Inclusion Body Hepatitis/Hydropericardium Syndrome and Egg Drop Syndrome[J]. Pakistan Veterinary Journal, 2011, 31(2): 85-92.
- [98] Pan Q, Yang Y, Shi Z, Liu L L, Gao Y L, Qi X L, Liu C J, Zhang Y P, Cui H Y, Wang X M. Different Dynamic Distribution in Chickens and Ducks of the Hypervirulent, Novel Genotype Fowl Adenovirus Serotype 4 Recently Emerged in China[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1005.

- [99] Meng K, Yuan X, Yu J, Zhang Y X, Ai W, Wang Y L. Identification, Pathogenicity of Novel Fowl Adenovirus Serotype 4 SDJN0105 in Shandong, China and Immunoprotective Evaluation of the Newly Developed Inactivated Oil-emulsion FAdV-4 Vaccine[J]. *Viruses*, 2019, 11(7): 627.
- [100] Gupta A, Ahmed K A, Ayalew L E, Popowich S, Kurukulasuriya S, Goonewardene K, Gunawardana T, Ruwani K, Davor O, Suresh K T, Philip W, Susantha G. Immunogenicity and protective efficacy of virus-like particles and recombinant fiber proteins in broiler-breeder vaccination against fowl adenovirus (FAdV)-8b[J]. *Vaccine*, 2017, 35(20): 2716-2722.
- [101] Gupta A, Popowich S, Ojkic D, Shanika K, Betty C-L, Thushari G, Kalhari G, Ruwani K, Lisanewick E A, Khawaja A A, Suresh K T, Philip W, Susantha G. Inactivated and live bivalent fowl adenovirus (FAdV8b+FAdV11) breeder vaccines provide broad-spectrum protection in chicks against inclusion body hepatitis (IBH)[J]. *Vaccine*, 2018, 36(5): 744-750.
- [102] Sun J, Zhang Y, Gao S, Yang J, Tang Y, Diao Y X. Pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in chickens[J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 75: 104017.
- [103] 尹燕博. 我国I群禽腺病毒主要流行血清型及其防控[J]. *中国家禽*, 2018, 40(03): 1-5.
Yin Y B. Investigation on Dominant Circulating Serotypes of Group I Fowl Adenovirus in China and the Control[J]. *China Poultry*, 2018, 40(03): 1-5 (in Chinese with English abstract).
- [104] Li C, Li H, Wang D, Wang J J, Wang Y M, Wang S C, Li J D, Liu P, Wang J L, Xu S Z, Cui S J, Zhang Y, Yin Y B. Characterization of fowl adenoviruses isolated between 2007 and 2014 in China[J]. *Vet Microbiol*, 2016, 197: 62-67.
- [105] Ruan S, Zhao J, Ren Y, Feng J L, Zhang G Z. Phylogenetic Analyses of Fowl Adenoviruses (FAdV) Isolated in China and Pathogenicity of a FAdV-8 Isolate[J]. *Avian Dis*, 2017, 61(3): 353-357.
- [106] Ye J, Liang G, Zhang J, Wang W K, Song N, Wang P, Zheng W L, Xie Q, Shao H X, Wan Z M, Wang C M, Chen H J, Gao W, Qin A J. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5: e50.
- [107] Brown Jordan A, Blake L, Bisnath J, Chad R, Christine V C, Christopher A L O. Identification of Four Serotypes of Fowl Adenovirus in Clinically Affected Commercial Poultry Co-infected with Chicken Infectious Anemia Virus in Trinidad & Tobago[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(3): 1341-1348.
- [108] Piercy DW, West B. Experimental Escherichia coli infection in broiler chickens: course of the disease induced by inoculation via the air sac route[J]. *J Comp Pathol*. 1976;86(2):203-210.
- [109] Anjum A D, Sabri M A, Iqbal Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan[J]. *Veterinary Record*, 1989, 124(10): 247-248.
- [110] Saifuddin M, Wilks C R, Christensen N H, Fu Z F, Rice M. Isolation of a reovirus from a broiler chicken flock with high early mortality[J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 1989, 37(1): 12-14.
- [111] Gowthaman V, Singh S D, Dhama K, Barathidasan R, Asok K M, Desingu P A, Mahajan N K, Ramakrishnan M A. Fowl Adenovirus (FAdV) in India: Evidence for Emerging Role as Primary Respiratory Pathogen in Chickens[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15(18): 900-903.
- [112] Rahul S, Kataria J M, Senthilkumar N, Dhama K, Sylvester S A, Uma R. Association of fowl adenovirus serotype 12 with hydropericardium syndrome of poultry in India[J]. *Acta Virologica*,

- 2005, 49(2): 139-143.
- [113] Mase M, NAKAMURA K. Phylogenetic Analysis of Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens with Gizzard Erosion in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2014, 76(11): 1535-1538.
- [114] Mase M, Nakamura K, Minami F. Fowl adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan, 2009-2010[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2012, 74(8): 1087.
- [115] Helena G, Zvonimir P, Shayan S, Éva Nagy . Pathogenicity and Cytokine Gene Expression Pattern of a Serotype 4 Fowl Adenovirus Isolate[J]. *PloS one*, 2013, 8(10): e77601.
- [116] Choi K S, Kye S J, Kim J Y, Jeon W J, Lee E K, Park K Y, Sung H W. Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea[J]. *Poultry science*, 91(10): 2502-2506.
- [117] Kim J N, Byun S H, Kim M J, Jeom K, Sung H W, Mo I P. Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of korean fowl adenoviral isolates[J]. *Avian Diseases*, 2008, 52(3):526-530.
- [118] Sun J, Li Q, Li Y, Huang B, Song M X, Li X H. Identification of a Non-essential Region for Replication of Fowl Adenovirus QU Strain[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(7): 1263-1267.
- [119] Wang C J, Yu S, Ao-Ri-Ge-le, Jia D G, Yao H Q, Zhao H P, Lillehoj H S , S M J de, Andrew Cl P, Xu S R G . Regulation of T lymphocyte subpopulations in specific pathogen-free chickens following experimental fowl adenovirus-VIII/VIII infection[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(4): 1281-1290.
- [120] Xie Z, Luo S, Fan Q, Xie L J, Liu J B, Xie Z G, Pang Y S, Deng X W, Wang X Q. Detection of antibodies specific to the non-structural proteins of fowl adenoviruses in infected chickens but not in vaccinated chickens[J]. *Avian Pathology*, 2013, 42(5): 491-496.
- [121] Li C, Li H, Wang D, Wang J J, Wang Y M, Wang S C, Li J D, Liu P, Wang J L, Xu S Z, Cui S J, Zhang Y, Yin Y B. Characterization of fowl adenoviruses isolated between 2007 and 2014 in China[J]. *Veterinary microbiology*, 2016, 197: 62-67.
- [122] Niu Y, Sun Q, Zhu M, Zhao J, Zhang G, Liu X, Xiao Y, Liu S. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of fowl adenoviruses caused hydropericardium outbreak in China during 2015[J]. *Poultry science*, 2018, 97(3): 803-811.
- [123] Niu Y J, Xiao Y H, Zhang G H, Qu Y J, Wang P F, Sun H L, Xiao Y H, Liu S D. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(10): 2684.
- [124] Zhang T, Jin Q, Ding P, Wang Y B, Chai Y X, Li Y F, Liu X, Luo J, Zhang G P. Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 188.
- [125] Zhang Y, Liu R, Tian K, Zeng W, Xia Y, Gao D S, Zhang Y M, Jun U, Wang H L, Zhao J. Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 199.
- [126] Li R, Li G, Li J, Han S G, Hou X L, Weng H Y, Guo M J, Zhong L, Ning L, Shang Y L, Chai T

- J, Wei L M. Fowl Adenovirus Serotype 4 SD0828 Infections Causes High Mortality Rate and Cytokine Levels in Specific Pathogen-Free Chickens Compared to Ducks[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 49.
- [127] Meng K, Yuan X, Yu J, Zhang Y X , Ai W, Wang Y L. Identification, Pathogenicity of Novel Fowl Adenovirus Serotype 4 SDJN0105 in Shandong, China and Immunoprotective Evaluation of the Newly Developed Inactivated Oil-emulsion FAdV-4 Vaccine[J]. *Viruses*, 2019, 11(7): E627.
- [128] Mo K K, Lyu C F, Cao S S, Li X , Xing G, Yan Y, Zheng X J , Liao M , Zhou J Y. Pathogenicity of an FAdV-4 isolate to chickens and its genomic analysis[J]. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 2019, 20(9): 740-752.
- [129] Wei Z, Liu H, Diao Y, Li X D, Zhang S, Gao B, Tang Y, Hu J D , Diao Y X. Pathogenicity of Fowl Adenovirus (FAdV) Serotype 4 Strain SDJN in Taizhou Geese[J]. *Avian pathology*, 2019, 48(5): 477-485.
- [130] 于相龙, 牛晓宇, 陈浩, 杨晶, 王振忠, 刁有祥, 唐熠. I群禽腺病毒血清4型对番鸭致病性的研究[C].中国畜牧兽医学动物传染病学分会、解放军军事科学院军事医学研究院:中国畜牧兽医学学会,2017:143.
Yu X L, Niu X Y, Chen H, Yang J, Wang Z Z, Diao Y X, Tang Y. I group of fowl adenovirus type 4 serum for studies of the pathogenicity of Muscovy ducks[C]. *Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine*,2017:143 (in Chinese).
- [131] 赵玉杰, 陈田田, 刘建勋, 王赛楠, 何春辉, 刘琳, 陈盼盼, 李新生.不同途径感染4型禽腺病毒对SPF鸡的致病性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019, (9): 72-76.
Zhao Y J, Chen T T, Liu J X, Wang S N, He C H, Liu L, Chen P P, Li X S. Pathogenicity of serum type 4 avian adenovirus in chickens after challenging by different infection route[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2019, (9): 72-76 (in Chinese with English abstract).
- [132] Grgi H, Krell P J, Nagy é. Comparison of fiber gene sequences of inclusion body hepatitis (IBH) and non-IBH strains of serotype 8 and 11 fowl adenoviruses[J]. *Virus Genes*, 48(1): 74-80.
- [133] Schachner A, Matos M, Grafl B, Michael H. Fowl adenovirus (FAdV) induced diseases and strategies for their control-a review on the current global situation[J]. *Avian Pathology*, 2017, 47(2): 1-77.
- [134] Gao J, Zhao M, Duan X, Wang Y Q, Cao H, Li X Q, Zheng S J. Requirement of Cellular Protein CCT7 for the Replication of Fowl Adenovirus Serotype 4 (FAdV-4) in Leghorn Male Hepatocellular Cells Via Interaction with the Viral Hexon Protein[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 107.
- [135] Schultze-Florey RE, Tischer-Zimmermann S, Heuft HG, Christoph P, Britta L, Albert H, Martin S, Karl-Walter S, Rainer B, Britta Eiz-Vesper, Britta M-K. Transfer of Hexon- and Penton-selected adenovirus-specific T cells for refractory adenovirus infection after haploidentical stem cell transplantation[J]. *Transplant infectious disease an official journal of the Transplantation Society*, 2020, 22(1): e13201.
- [136] Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic and Clinical Implications[J]. *Journal of Virology*, 79(20): 12635-12642.
- [137] Timoshicheva T A, Zabrodskaya Y A, Ramsay E, Amosova I V. Use of hexon as an antigen for

the production of monoclonal antibodies capable of detecting multiple adenovirus types[J].
Biologicals, 2019, 58: 44-49.

- [138] 王雅玲. 血清 4 型禽腺病毒六邻体 Hexon 单克隆抗体研制[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
Wang Y L. Preparation of avian adenovirus serum type 4 Hexon monoclonal antibody[D].
Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).

致 谢

时光荏苒，日月如梭，转眼之间我的研究生学习生涯就要结束了，在此期间我收获了让我受益一生的知识，学到了很多实验技能，还结识了很多的老师和同学，拥有一个意义深刻的硕士时光。

本论文是在我的导师闫丽萍副研究员的悉心指导和大力支持下完成的，本论文从课题的选择、方案的设计、实验的开展及论文的撰写修改都凝聚着她的血汗，在此，向我的导师致以衷心的感谢和崇高的敬意！

感谢宋素泉老师在我日常学习和生活中对我的指导和帮助！

感谢禽病组的同学们对我的帮助！

感谢家人对我的支持与鼓励，感谢父母对我始终如一的关怀和照顾，你们无条件的资金支持和质朴的鼓励，是我前进路上最大的动力！

感谢舍友们三年的陪伴，让我们有一个学术氛围浓厚的生活环境，希望我们都有美好的未来！

最后我要向在百忙之中抽时间对本文进行审阅、评议和参加本人论文答辩的各位老师再次表达感谢！

攻读学位期间发表的学术论文目录

1. Lu Yao, **Yuqing Chen**, Xingbo Wang, Zhenwei Bi, Qian Xiao, Jing Lei, Yan Yan, Jiyong Zhou, Liping Yan. Identification of antigenic epitopes in the hemagglutinin protein of H7 avian influenza virus[J]. Avian Pathology, 2019(5796):1-36. (共同一作)
2. **陈雨晴**, 曹洁, 王玉峰, 宋素泉, 闫丽萍. 1 株禽 4 型腺病毒 JS 株的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(05):92-96.
3. Junli Liu, Lu Yao, Feifei Zhai, **Yuqing Chen**, Jing Lei, Zhenwei Bi, Jianhua Hu, Qian Xiao, Suquan Song, Liping Yana, Jiyong Zhou. Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9 [J]. Journal of virological methods, 2018, 252(49-56).
4. Liping Yan, Jianhua Hu, Jing Lei, Zhiyu Shi, Qian Xiao, Zhenwei Bi, Lu Yao, Yuan Li, **Yuqing Chen**, An Fang, Hui Li, Suquan Song, Min Liao and Jiyong Zhou. Novel protein chip for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus [J]. BMC veterinary research, 2018, 14(1):284.