

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

鸭呼肠孤病毒的分离鉴定及基于 p18 蛋白单克隆抗体制备及 ELISA 检测方法的建立

硕 士 研 究 生: 黄聪

学 号: 82101196239

指 导 教 师: 陈宗艳 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 上海兽医研究所
研究生院

2022 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Isolation, Identification of Duck Reovirus and Preparation of Monoclonal Antibody and Establishment of ELISA Detection Method Based on p18 Protein

Candidate: HUANG Cong

Student ID: 82101196239

Supervisor: Associate Prof. CHEN Zongyan

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Shanghai Veterinary Research
Institution**

Graduate School

June 2022

摘 要

鸭呼肠孤病毒 (Duck reovirus, DRV) 是呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 正呼肠孤病毒属 (Orthoreovirus) 的成员之一。近些年来, 鸭呼肠孤病毒病不断被报道, 导致鸭肝脏、脾脏出血或者坏死, 发病率高, 且能致死鸭, 现已成为影响鸭健康养殖的重要病原因子之一。

为确诊广西省玉林市某鸭场发生一起成年鸭死亡疫情的病原, 我们首先通过 RT-PCR 对常见病原检测, 发现引起该疫情的病原因子可能是鸭呼肠孤病毒。我们将病死鸭的实质性脏器研磨制备成组织匀浆液, 差速离心后取上清液通过接种 10 日龄鸭胚和 BHK-21 细胞系进行病毒分离鉴定及动物回归试验。经鸭胚和 BHK-21 细胞分离培养获得一株病毒, 鸭胚感染该病毒后 72~96 h 死亡; 在感染 BHK-21 细胞系传代至第 7 代时, 细胞病变明显, 细胞脱落并且出现明显的合胞体, 经测定该分离株的 TCID₅₀ 为 $10^{5.74}/0.1$ mL。通过 RT-PCR、间接免疫荧光、Western Blot 实验以及电镜观察, 证实该病原是鸭呼肠孤病毒, 命名为鸭呼肠孤病毒 GL18 株 (DRV-GL18)。对获取的 σ C 基因序列进行遗传进化分析, 结果表明该病毒与我国近几年流行的鸭呼肠孤病毒分支同源性高达 99%, 与鸡呼肠孤病毒分支和番鸭呼肠孤病毒分支亲缘关系较远。动物感染性试验表明, 感染 1 日龄 SPF 鸭感染率 100%, 死亡率达 50%, 雏鸭肝脏出血, 脾脏出血、坏死。为了解该分离株的分子遗传信息, 对该分离株进行全基因组扩增, 并进行 σ C 核苷酸同源性分析和全基因组重组分析。结果显示 DRV-GL18 株病毒基因组全长 23419 bp, 与国内流行株同源性高达 99%, RDP 和 SimPlot 软件预测结果为 GL18 株 M2 节段存在潜在重组事件。

以 DRV-GL18 毒株为模板, 构建原核表达重组质粒 pCold-I-p18, 成功表达和纯化了重组 p18 蛋白, 浓度为 1.375 mg/mL。将纯化的 p18 蛋白作为免疫原对 6 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫, 通过间接 ELISA 检测方法对免疫小鼠血清效价为 1:102400 的小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合, 使用间接 ELISA 方法对融合后的杂交瘤细胞进行筛选和亚克隆, 最终获得 4 株杂交瘤细胞株, 分别命名为 1E3、2C4、4A2 和 4D4。单克隆抗体亚类的鉴定 1E3 和 4D4 重链为 IgG1 型, 2C4 重链为 IgM 型, 4A2 重链为 IgG2b 型, 轻链均为 κ 型。Western blot 和 IFA 鉴定结果表明 4 株细胞分泌的抗体均对接种 DRV 的 BHK-21 具有较好的反应原性。选取 4D4 杂交瘤细胞株进行腹水制备, 收集的腹水 ELISA 方法检测的效价达 1:409600 以上, Western blot 检测效价达 1:102400 以上, IFA 检测效价为 1:51200, 可用于后续 DRV 病原检测及其 p18 蛋白的生物学功能及分子机制的研究。

以纯化的重组 p18 蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法, 最终确定了最佳抗原包被浓度为 16 μ g/mL (100 μ L/孔), 包被条件为 4℃包被过夜, 最佳血清稀释度为 1:100, 最佳封闭条件为 5%脱脂乳 37℃封闭 2 h, 血清最佳孵育时间为 60 min, 酶标二抗的最佳稀释度为 1:400, TMB 显色条件为 37℃条件下作用 20 min。利用初步建立的检测方法测定阴鸭阴性血清的 OD₄₅₀ 确定临界值, 结果表明当 OD₄₅₀ $\geq$ 0.4245 时, 判定为阳性。特异性实验和重复性实验表明该方法对 DAdV-3、DAdV-4、MDRV 和 RA 阳性血清没有交叉反应, 批间重复实验和批内重复实验的变异系数均小于 10%, 表明该方法具有较好的特异性和重复性。临床样本检测结果与实验室建立的 DRV σ C 阻断 ELISA 方法检测结果的符合率为 96%, 表明本研究建立的检测方法具有应用价值。

综上所述, 本研究成功分离并鉴定了一株鸭呼肠孤病毒, 命名为 DRV-GL18 株, 为了解鸭呼

肠孤病毒的生物学特性和疫苗研发提供基础生物材料；基于原核表达的重组 DRV p18 蛋白制备单克隆抗体，为后续研究 p18 蛋白的生物学功能和 ELISA 试剂盒研发提供材料支持；并利用重组 p18 蛋白建立间接 ELISA 检测方法，为 DRV 早期诊断和流行病学调查提供有效的检测手段。

关键词：鸭呼肠孤病毒，p18 蛋白，单克隆抗体，ELISA

Abstract

Duck reovirus (DRV) is a member of the genus Orthoreovirus in the family Reoviridae. In recent years, the epidemic situation of duck reovirus has been reported continuously, resulting in hemorrhage or necrosis of duck liver and spleen, with high incidence and death of ducks. DRV has become one of the most important pathogenic factors of poultry diseases affecting the healthy breeding of ducks.

In order to diagnose the pathogen of the epidemic which cause duck death occurred in a duck factory in Yulin City, Guangxi Province. Firstly, we detected common pathogens by RT-PCR, and found that the cause of the epidemic may be DRV. To confirm the pathogen, we ground the solid organs of dead ducks to prepare tissue homogenate. After differential centrifugation, we took the supernatant and inoculated 10-day-old duck embryos and BHK-21 cell lines for virus isolation and identification and animal regression experiments. A strain of virus was obtained by separating and culturing duck embryos and BHK-21 cells. The duck embryos died 72~96 h after infection with the virus. When the infected BHK-21 cell line was passaged to the seventh passage, the cytopathic changes were obvious, the cells fell off, and there were obvious Syncytia, the TCID₅₀ of this isolate was determined to be 10^{5.74}/0.1 mL. It was confirmed that the pathogen was duck reovirus by RT-PCR, indirect immunofluorescence, Western Blot test and electron microscope observation, named duck reovirus GL18 strain (DRV-GL18). The genetic evolution analysis of the obtained σC gene sequence shows that the virus has a homology of up to 99% with the duck reovirus branch that has been popular in my country in recent years, and is similar to the chicken reovirus branch and the Muscovy duck reovirus branch. Relatives are far away. Animal regression experiments showed that the infection rate of one-day-old SPF ducklings was 100%, and the mortality rate was 50%. The ducklings had liver hemorrhage, spleen hemorrhage and necrosis. To understand the molecular genetic information of this isolate, whole-genome amplification of this isolate was performed to obtain the gene sequence of 10 segments of the DRV-GL18 isolate. The results showed that the viral genome was 23419 bp in length, the homology of DRV-GL18 σC gene with the domestic epidemic strain was as high as 99%, and the RDP and SimPlot software predicted that there was a potential recombination event in the M2 segments of GL18 strain.

Using the DRV-GL18 strain as a template, prokaryotic expression recombinant plasmid pCold-I-p18 was constructed, and the recombinant p18 protein was successfully expressed and purified at a concentration of 1.375 mg/mL. The purified p18 protein was used as the immunogen to immunize 6-week-old BALB/c mice, and the mouse splenocytes with a serum titer of 1:102400 in immune mice were fused with SP2/0 cells by indirect ELISA detection method, and the fusion hybridoma cells were screened and subcloned by indirect ELISA method, and 4 hybridoma cell lines were obtained, named 1E3, 2C4, 4A2 and 4D4, respectively. The identification of monoclonal antibody subclasses 1E3 and 4D4 heavy chains is IgG1 type, 2C4 heavy chain is IgM type, 4A2 heavy chain is IgG2b type, and light chain is κ type. The western blot and IFA identification results showed that the antibodies secreted by the four strains of cells all had good reactivity to the DRV-inoculated BHK-21. The ascitic fluids were prepared by the 4D4 hybridoma cell line, and the ascitic fluid ELISA method was collected with a titer

of more than 1:409600, the Western blot detection titer was more than 1:102400, and the IFA detection titer was 1:51200, which can be used for the subsequent DRV pathogen detection and the biological function and molecular mechanism of the p18 protein.

An indirect ELISA detection method was established with purified recombinant p18 protein as the coated antigen, and the optimal antigen coating concentration was 16 µg/mL (100 µL/well), the coating condition was 4 °C overnight, the optimal serum dilution was 1:100, the optimal blocking condition was 5% skim milk 37 °C blocked for 2 h, the optimal serum incubation time was 60 min, the optimal dilution of the enzyme-scale secondary antibody was 1:400, and the TMB color rendering condition was 37 °C for 20 min. The OD₄₅₀ of the negative serum of the yin duck was determined by the preliminary established detection method, and the results showed that when the OD₄₅₀ ≥ 0.4245, it was determined to be positive. Specific experiments and repeatable experiments showed that the method did not cross-react to DAdV-3, DAdV-4, MDRV and RA-positive serum, and the coefficient of variation of the batch-to-batch and intra-batch repeat tests was less than 10%, indicating that the method had good specificity and reproducibility. The coincidence rate between clinical samples and DRV σC blocking ELISA was 96%, indicating that the established test method has application value.

A duck reovirus strain named DRV-GL18 was successfully isolated and identified in this study, providing basic biological materials for understanding the biological characteristics of duck reovirus and vaccine development. Monoclonal antibody was prepared based on prokaryotic expression of recombinant DRV p18 protein, providing material support for subsequent research on biological function of p18 protein and development of ELISA kit. In addition, an indirect ELISA method was established using recombinant p18 protein to provide an effective detection method for early diagnosis and epidemiological investigation of DRV.

Keywords: Duck reovirus, p18 protein, monoclonal antibody, ELISA

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 禽呼肠孤病毒的概述.....	1
1.2 鸭呼肠孤病毒的病原学.....	2
1.3 鸭呼肠孤病毒的流行病学	3
1.3.1 DRV 的流行.....	3
1.3.2 DRV 的流行现状.....	3
1.4 鸭呼肠孤病毒的致病性.....	4
1.4.1 DRV 的临床症状及病理变化	4
1.4.2 DRV 对细胞和鸭胚的致病性	4
1.5 鸭呼肠孤病毒的诊断方法	4
1.5.1 病毒分离法.....	5
1.5.2 分子生物学诊断方法.....	5
1.5.3 免疫学诊断方法.....	6
1.6 本研究的目的及意义.....	7
第二章 鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定	8
2.1 材料.....	8
2.1.1 病料.....	8
2.1.2 细胞、鸭胚及实验动物.....	8
2.1.3 主要试剂和仪器.....	8
2.2 方法.....	9
2.2.1 引物设计与合成.....	9
2.2.2 临床样品检测.....	10
2.2.3 DRV 的分离鉴定.....	12
2.2.4 动物感染性试验.....	14
2.2.5 DRV 分离株全基因组序列的扩增及基因分析	14
2.3 结果.....	15
2.3.1 DRV 临床样品的检测结果	15
2.3.2 DRV 的分离鉴定结果.....	15
2.3.3 动物感染性试验结果.....	20
2.3.4 分离株全基因组序列及分析.....	22
2.4 讨论.....	24
第三章 DRV p18 蛋白单克隆抗体的制备	26
3.1 材料.....	26
3.1.1 实验动物、质粒、细胞株和毒株.....	26

3.1.2 主要材料及仪器.....	26
3.2 方法.....	26
3.2.1 DRV p18 重组表达质粒构建与鉴定	26
3.2.2 p18 重组蛋白诱导表达及诱导条件优化	27
3.2.3 p18 重组蛋白大量表达、纯化及鉴定	28
3.2.4 动物免疫.....	28
3.2.5 免疫血清效价检测.....	28
3.2.6 细胞融合	28
3.2.7 杂交瘤细胞的筛选与亚克隆.....	29
3.2.8 单克隆抗体的鉴定	29
3.2.9 单克隆抗体腹水的制备及效价的测定	30
3.3 结果.....	30
3.3.1 DRV p18 重组表达质粒构建与鉴定	30
3.3.2 p18 重组蛋白诱导表达及诱导条件优化	31
3.3.3 p18 重组蛋白大量表达、纯化及鉴定	33
3.3.4 间接 ELISA 测定免疫小鼠血清效价	34
3.3.5 单克隆抗体的测定	34
3.3.6 单克隆抗体腹水的制备及效价的测定	36
3.4 讨论.....	36
第四章 DRV P18 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立.....	38
4.1 材料.....	38
4.1.1 血清	38
4.1.2 主要实验试剂和仪器.....	38
4.2 方法.....	38
4.2.1 DRV p18 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立	38
4.2.2 临界值的确定.....	39
4.2.3 间接 ELISA 方法的敏感性实验	39
4.2.4 间接 ELISA 方法的特异性实验	39
4.2.5 间接 ELISA 方法的重复性实验	40
4.2.6 间接 ELISA 方法的临床应用	40
4.3 结果.....	40
4.3.1 间接 ELISA 方法的建立	40
4.3.2 临界值的确定.....	42
4.3.3 间接 ELISA 方法的敏感性实验结果	43
4.3.4 间接 ELISA 方法的特异性实验结果	43
4.3.5 间接 ELISA 方法的重复性实验结果	44
4.3.6 间接 ELISA 方法对临床样品的检测	44
4.4 讨论.....	45

第五章 全文结论	46
参考文献.....	47

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
ARV	Avian reovirus	禽呼肠孤病毒
BHK-21	Baby hamster kidney	幼仓鼠肾细胞
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CEF	Chick embryo fibroblast	鸡胚成纤维细胞
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DRV	Duck reovirus	鸭呼肠孤病毒
dsRNA	Double-stranded RNA	双链 RNA
ELISA	Enzyme linked immnosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FCA	Freund complete adjuvant	弗氏完全佐剂
FIA	Freund incomplete adjuvant	弗氏不完全佐剂
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基-β-硫代半乳糖苷
MDRV	Muscovy duck reovirus	番鸭呼肠孤病毒
ORF	Open reading frame	开放读码框
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	逆转录-聚合酶链式反应
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SPF	Specific pathogen Free	无特定病原体

第一章 绪论

呼肠孤病毒 (Reovirus) 最初是分离自儿童的粪便, 因来源自呼吸道 (Respiratory tract)、肠道 (Enteric canal), 所以将其命名为呼吸道 (R)、肠道 (E)、孤儿 (O) 病毒, 即呼肠孤病毒。呼肠孤病毒分布广泛, 宿主种类多样, 可以感染真菌, 植物 (甘蔗、玉米、水稻等), 昆虫、虾蟹等非脊椎动物, 还可以感染脊椎动物, 如鱼类、禽类以及哺乳动物类, 包括人类。禽呼肠孤病毒 (Avian orthoreovirus, ARVs) 是呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 正呼肠孤病毒属 (Orthoreovirus) 的主要成员之一, ARVs 是家禽养殖业的重要传染病病原, 可以感染包括常见的鸡、鸭、鹅等家禽在内的多种禽类动物, 给家禽养殖业造成了严重的经济损失。

1.1 禽呼肠孤病毒的概述

ARVs 主要包括鸡呼肠孤病毒 (Avian reovirus, ARV)、番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV)、鸭呼肠孤病毒 (Duck reovirus, DRV) 以及鹅呼肠孤病毒 (Goose reovirus, GRV) 等。1954 年, Fahey 和 Crawley 从患有呼吸道疾病的肉鸡中分离得到一株新病毒, 当时命名为 Fahey-Crawley 病毒; 1955 年, Olson 从患有关节炎的鸡中分离出一种病原 (OLSON et al., 1957), 1972 年, 有学者通过电子显微镜观察证实了引起该鸡关节炎的病原是 ARV (WALKER et al., 1972); 随后陆续报道了从蛋鸡、火鸡、野鸭和其他鸟类中分离到该病毒 (JONES, 2000; MOR et al., 2013; MOR et al., 2015; SHARAFELDIN et al., 2014)。有学者利用琼脂扩散技术在血清学上证明了我国数个鸡场的血清样本中存在病毒性关节炎病毒的抗体, 首次报道了我国存在有 ARV (王锡堃 等, 1985); 陈立宽等 (1991) 从关节肿胀的病鸡中成功分离到 ARV, 从病原学上首次证实了我国存在该病原; 吴宝成等 (2001) 从福建、广东、浙江等地以肝脏出现白点为主要病变的患病番鸭组织中成功分离出呼肠孤病毒, 因其最初分离自番鸭, 称为番鸭呼肠孤病毒 (MDRV); 前人的研究表明, MDRV 对我国以北京鸭为主的部分鸭不具有感染性和致病性 (陈仕龙 等, 2010), 但随着禽类养殖业的发展, 呼肠孤病毒在禽上的宿主谱逐渐广泛, 我国各地相继有报道北京鸭在内的多品种鸭感染呼肠孤病毒的疫情, 后被证实该呼肠孤病毒是不同于经典的 MDRV 的鸭呼肠孤病毒, 也称为新型鸭呼肠孤病毒 (Novel duck reovirus, NDRV) (LIU et al., 2011; WANG et al., 2019; WANG et al., 2020a; 黄瑜 等, 2004; 陈宗艳 等, 2012; 袁远华等, 2013a); 此外, 也有学者报道从鹅上成功分离出呼肠孤病毒 (王晨, 2013; 路晓 等, 2021)。ARVs 疫情的频发使之在我国流行, 给我国养禽业带来了严重的经济损失。

ARVs 是无囊膜、呈正二十面体对称、具有双层蛋白质衣壳 (外衣壳和内衣壳) 结构的线性双链 RNA (dsRNA) 病毒, 病毒粒子大小直径约为 60~80 nm, 基因组具有 10 个基因片段, 根据不同大小的 RNA 在琼脂糖凝胶电泳的迁移率不同, 分为 L (L1、L2、L3) 节段、M (M1、M2、M3) 节段和 S (S1、S2、S3、S4) 节段。其每个基因节段均存在着 5'-GCUUUUU 和 3'-UCAUC 的保守序列, 这些保守序列是病毒翻译和转录时的特定目标信号 (BENAVENTE et al., 2007)。整个基因组至少编码 8 个结构蛋白 (λ A、 λ B、 λ C、 μ A、 μ B、 σ A、 σ B、 σ C) 和 4 个非结构蛋白 (μ NS、p10、p17/p18、 σ NS)。ARV 和 DRV 的基因结构较为相似, MDRV 与 ARV 和 DRV 的基因结构差异较大。除了 ARV 和 DRV 的 S1 基因节段和 MDRV 的 S4 基因节段外, 其余每个基因节段都是

只有单个顺反子，即含有 1 个开放读码框（Open reading frame, ORF）对应编码 1 种蛋白；ARV 和 DRV 均含有 3 个顺反子，ARV 编码 p10、p17 和 σ C 蛋白，DRV 编码 p10、p18 和 σ C 蛋白，而 MDRV S4 节段仅含有 2 个顺反子，编码 p10 和 σ C 蛋白，不编码 p17 或 p18 蛋白（吴巧梅 等，2017b；DU et al., 2020）（见表 1-1）。

表 1-1 ARVs 各基因片段及编码蛋白
Tab.1-1 Gene segments and proteins of ARVs

基因节段	ARV	MDRV	DRV
	编码的蛋白		
L1	λ A	λ A	λ A
L2	λ B	λ B	λ B
L3	λ C	λ C	λ C
M1	μ A	μ A	μ A
M2	μ B	μ B	μ B
M3	μ NS	μ NS	μ NS
	σ C		σ C
S1	p10	σ A	p10
	p17		p18
S2	σ A	σ B	σ A
S3	σ B	σ NS	σ B
S4	σ NS	σ C	σ NS
		p10	

1.2 鸭呼肠孤病毒的病原学

鸭呼肠孤病毒是 ARVs 的一个分支，DRV 与 ARV 具有类似的形态特征和理化性质。电镜下，DRV 与 ARV 的形态结构相似，病毒粒子呈近球形的二十面体对称结构，无囊膜且具有双层蛋白质衣壳。通过透射电镜观察，DRV 在细胞胞浆中增殖，呈大量散在或成堆的晶格状排列，病毒粒子大约为 70 nm（陈少莺 等，2009）。

DRV 由 81.3%的蛋白质和 18.7%的 RNA 组成。完整的 DRV 对部分有机溶剂具有较强抵抗力，对 4.8%的氯仿、FUDR（Floxuridine，氟尿苷）不敏感，对 2%来苏尔和 DNA 代谢抑制物具有抵抗力；对热也有较强的抵抗力，能够在 60℃环境中耐受 8~10 h，56℃环境中耐受可达 24 h，在 37℃中存活数月，22℃中存活 48 周左右；对酸性环境也具有一定的耐受能力；在氯化铯梯度浓度中，DRV 病毒粒子的密度约为 1.29~1.30 g/mL，病毒粒子芯髓的密度约为 1.44 g/mL；70%的乙醇、2~3%的氢氧化钠溶液以及 3%甲醛能够将 DRV 灭活(GRANDE et al., 2002; 刘文兴 等，2004; 陈少莺 等，2012)。此外，DRV 对 1%鸡红细胞无血凝活性，对鸭、鹅、鼠、兔等动物的红细胞也无血凝活性(陈少莺 等，2009; 朱英奇，2013; 李雪松 等，2021)。

1.3 鸭呼肠孤病毒的流行病学

1.3.1 DRV 的流行

DRV 与 ARV 和 MDRV 相比, DRV 的宿主谱更为广泛。DRV 能够自然感染北京鸭、樱桃谷鸭、麻鸭、番鸭、半番鸭以及我国各地的多品种鸭, 还可以人工感染鸡、鹅等禽类动物。感染鸭的发病日龄约为 3~25 日龄, 主要以 5~10 日龄雏鸭为主, 耐过的雏鸭生长迟缓, 雏鸭日龄越小, 感染病毒后雏鸭的发病率和死亡率越高。不同地区的发病情况和死亡率不一, 根据 DRV 发病情况表明 DRV 无明显的季节偏好性, 但在寒冷的季节感染 DRV 的致死性更高(朱旭, 2018)。

1.3.2 DRV 的流行现状

1997 年, 我国在福建、浙江等地报道了在番鸭上以肝脏、脾脏表面出现大量白点、肾脏肿大伴随出血为主要病理特征的传染病, 俗称番鸭“肝白点病”或“花肝病”, 后经吴宝成等(2001)确认了此次疫情的病原为呼肠孤病毒, 我国首次报道番鸭呼肠孤病毒的疫情。随后, 王劲等(2005)对分离的番鸭源呼肠孤病毒(DRV-YH 和 DRV-YJL)进行 S1 基因的扩增, 经序列分析存在 3 个 ORF, 与 ARV 的 S1 基因节段相似, 证实其是不同于经典的 MDRV 的呼肠孤病毒。此前我国多个省份报道关于鸭呼肠孤病毒的疫情, 主要感染的是番鸭, 1998 年至 2003 年期间, 川渝云贵等省份出现以腹泻、鸭头部肿大、全身皮肤出血、眼结膜和消化道及呼吸道黏膜出血、肺出血、肝脏肿大呈土黄色并伴随出血点等为特征的急性传染病, 通过试验结果符合“Koch 假说”, 将其暂定“鸭病毒性肿头出血症”(Duck virus swollenhead haemorrhagic disease), 主要侵害天府鸭、北京鸭、樱桃谷鸭以及番鸭在内的多品种鸭(程安春 等, 2003); 2007 年广东出现一种以头肿大、软脚、肝脏出血和坏死呈煮熟样、腹泻、食道和泄殖腔存在明显的溃疡和结痂为主要病变的鸭病, 雏鸭的死亡率高达 50~100%, 随后成功从患病的北京鸭组织中分离出一株鸭呼肠孤病毒(DRV-GZ 株)(刘红 等, 2008), 可见 DRV 的宿主范围逐渐扩大, 致病性也逐渐增强; 陈少莺等(2009)从福建省临床病死的鸭肝脏和脾脏中成功分离到鸭呼肠孤病毒(DRV-NP03)该病毒主要引起雏番鸭、雏半番鸭和雏麻鸭出血性坏死性肝炎、心肌出血、脾脏肿大伴随斑块状坏死、肾脏和法氏囊出现等病理变化, 通过 S3 基因节段的系统进化分析发现该毒株与 MDRV 和 ARV 处在不同的进化分支上。LIU 等(2011)从北京雏鸭中成功分离了一株鸭呼肠孤病毒(DRV-HC 株), 经致病性试验表明该毒株不能引起感染的雏鸭死亡, 主要病变是脾脏坏死并充满坏死灶, 但对 SPF 雏鸡具有致死性。2011 年, 我国安徽省太湖流域附近的鸭养殖场暴发了一种严重的持续性的鸭病毒性传染病, 主要临床表现为雏鸭软脚、粪便稀白、肝脏出血、脾脏肿大出血伴随大小不一的坏死灶, 并从病变组织中分离得到鸭呼肠孤病毒(DRV-TH11), 经致病性研究, 该毒株能够感染并致死麻鸭、樱桃谷鸭、北京鸭以及雏鸡等, 具有更强的致病性(CHEN et al., 2012; 陈宗艳等, 2012)。随后, 几乎每年都有鸭呼肠孤病毒的疫情报道, 给我国禽养殖业造成了严重的经济损失(宁康 等, 2015; 于新友 等, 2016; 张秉乾 等, 2017; 高绪慧 等, 2018; 高斌, 2019; ZHENG et al., 2016; WANG et al., 2020b)。

1.4 鸭呼肠孤病毒的致病性

1.4.1 DRV 的临床症状及病理变化

DRV 引起的临床症状主要分为以下四种（黄瑜 等，2009）：一是 1997 年来在我国广东、福建、浙江等省份暴发的番鸭呼肠孤病毒病，又称鸭出血性坏死性肝炎，俗称为番鸭“肝白点病”或“花肝病”，其发病率为 5~20%，死亡率约为 2~15%，主要引起雏番鸭、雏半番鸭以及雏麻鸭的肝脏表现为不同程度的点状或斑块状出血，伴有黄白色的坏死灶，肝脏肿大并伴有坏死灶，部分病死鸭的心、肾和法氏囊可见出血点。组织切片观察可见肝细胞变性、坏死崩解，大量炎症细胞浸润，脾脏出血，淋巴细胞减少、崩解等病理变化（陈少莺 等，2012）。二是 1998~2003 年川渝地区暴发的鸭病毒性肿头出血症，发病率在 50~90%，病死率高达 40~80%，病理变化主要病鸭病鸭皮肤全身性出血，眼结膜、消化道及呼吸道黏膜出血，心、肝、脾、肺、肾出血、产蛋鸭卵巢出血。病理组织学变化为心肌纤维断裂、坏死，肝细胞脂肪变性、颗粒变性，排列松散，炎症细胞浸润等（程安春 等，2003）。三是 2001 年以来，我国福建浙江等地流行的以肝脏、脾脏、胰脏和肾脏出现大量针点状大小的白色坏死点、心肌和法氏囊出血为特征的鸭肝坏死症（黄瑜 等，2004）四是 2006 年以来，我国多个省份以特征性病变为脾脏肿大、出血、坏死和萎缩的鸭呼肠孤病毒病，因而称为“鸭脾脏坏死病”（Duck spleen necrosis disease, DSND）。主要组织病理变化为脾脏淋巴细胞减少，炎症细胞浸润以及红细胞大量聚集等（赵赫 等，2015）。DRV 自然感染鸭后，在鸭体内各组织器官均能检测到病原的存在，其主要侵袭脾脏、胸腺以及法氏囊中的淋巴细胞，造成免疫器官的损伤，继而引起免疫抑制，使鸭机体更容易继发感染其他病原。DRV 能够水平和垂直传播，造成养殖场鸭苗较高的发病率（林锋强 等，2008）。

1.4.2 DRV 对细胞和鸭胚的致病性

DRV 能够在 CEF、DEF、MDEF、DF-1 和 LMH 等禽类细胞上增殖，此外还能在 AD293、Marc145、Vero、ST、MDCK 以及 BHK-21 等哺乳动物细胞上增殖，但有研究表明，DRV 在 BHK-21 细胞中的增殖效果最好，病毒滴度最高。DRV 能够引起细胞发生巨融合的典型 CPE，伴随细胞肿胀、脱落等病变（陈少莺 等，2012；丁明洋 等，2015）。DRV 能够在鸡胚、樱桃谷鸭胚、麻鸭胚上增殖传代，其接种途径为经卵黄囊（YS）、尿囊腔（AC）和绒毛尿囊膜（CAM）接种。将 DRV 接种于 9~11 日龄的鸡胚或鸭胚上，死亡率达 100%，致死的胚体全身分布散在出血点，脾脏肿大出血、充血（朱英奇，2013）。

1.5 鸭呼肠孤病毒的诊断方法

在临床上，发病早期可以结合鸭呼肠孤病毒病的流行病学、临床症状以及解剖病理变化，作出初步诊断。随着病程的延长，感染 DRV 的雏鸭逐渐耐过后，肝脏和脾脏的坏死点逐渐模糊，特征性病变开始不明显，不易于确诊该病。感染早期，鸭群尚未有明显的特征性临床症状，因而及时确诊该病并采取防治措施有赖于实验室诊断来确诊该病。常见的实验室诊断方法有病毒分离法、分子生物学检测法和免疫学检测法。分子学检测方法主要包括聚合链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）、等温扩增技术（Isothermal amplification techniques）、CRISPR/Cas 系统等检测方法；

免疫学检测法主要有免疫琼脂扩散试验(AGP)、间接免疫荧光试验(IFA)、免疫印迹试验(Western blot)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫层析试纸等免疫学检测方法。

1.5.1 病毒分离法

病毒分离法鉴定 DRV 一般是将采集的病鸭脾脏或肝脏组织研磨,经梯度离心后制备成病毒悬液接种于鸭胚或细胞中进行培养。初代病毒一般通过接种 9~11 日龄的鸡胚或鸭胚卵黄囊或者尿囊腔进行病毒的培养,经传代培养的 DRV 能够使鸡胚或鸭胚出现规律性死亡,胚体表面出血、充血,体表弥散分布出血点,剖检肝脏脾脏肿大等病理变化。DRV 早期分离培养可以在原代细胞上培养,如 CEF、DEF 和 MDEF;也可以在传代细胞系上培养,如 DF-1、LMH 和 BHK-21。其中,研究表明 LMH 对 DRV 最敏感,连续传代几代后可以使细胞融合形成巨细胞等典型细胞病变(高斌,2019)。病毒在鸭胚上增殖后收取病死胚的胚体和尿囊液或者在细胞上增殖收集的细胞病毒培养物,经 40000 r/min 4℃超速离心,取沉淀溶于 PBS,经过磷钨酸负染后透射电镜下观察病毒粒子的形态结构(陈少莺等,2009;陈宗艳等,2012;周丽等,2009)。病毒培养分离鉴定的方法具有准确可靠的特点,但实验操作复杂、病毒培养周期长,大约需要 2 周时间,临床上不能及时采取防治措施。

1.5.2 分子生物学诊断方法

DRV 病毒基因组全长约 23419 bp,共十个基因节段,具有 12 个 ORF,不同毒株之间的基因组全长存在差异,进行分子生物学检测需要选中基因组中保守性强和特异性高的病毒基因序列。目前针对 DRV 建立的分子生物学检测方法主要有 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR 和 RT-LAMP 等核酸检测技术。

1.5.2.1 RT-PCR

RT-PCR 是常用的 DRV 实验室检测方法,是具有高特异性、高灵敏度等优点的实验室常用诊断方法之一。胡奇林等(2004)通过 MDRV 的 S1 节段设计了一对特异性引物,扩增子长度为 300 bp,利用该对引物用 RT-PCR 对 MDRV 的 S1 基因节段进行特异性扩增,能够对所检测的多株 MDRV 特异性扩增出目的片段,具备有剪特异性强、重复性好等优点;王劭等(2011)根据 DRV S3 基因序列设计了一对扩增子长度为 586 bp 的特异性引物,建立了检测 DRV 的 RT-PCR 方法,该方法灵敏度可达 2 pg;孔丰等(2014)对 DRV 的 S3 基因片段中的保守序列设计特异性引物,建立了 DRV 的 RT-PCR 检测方法;卿柯香等(2014)通过分别对 DRV 和 MDRV 的 S3 基因片段设计特异性引物,扩增片段分别 298 bp 和 189 bp,建立了 DRV 和 MDRV 的双重 RT-PCR 检测方法;王永娟等(2016)根据 DRV S1 节段的 σC 基因序列设计了特异性引物,建立了 DRV 特异性 RT-PCR 检测方法。

1.5.2.2 实时荧光定量 RT-PCR

实时荧光定量 RT-PCR 是指通过实时检测 PCR 扩增反应过程中每一个循环产物荧光信号的

PCR 技术,从而实现对模板定量的分析。具有比 RT-PCR 更高的灵敏度和特异性。主要分为探针法和染料法。目前,袁远华等(2013)以 DRV S3 基因的保守序列设计特异性引物,建立了检测 DRV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法,其最小检出量为 29 copies/ μ L;韩宏宇等(2014)根据 DRV S1 基因序列设计了 1 对特异性引物,建立了检测 DRV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,丁明洋等(2016)以 DRV S1 基因为模板建立了基于 SYBR Green II 荧光定量 PCR 检测方法;张博等(2020)根据 DRV S3 节段的 σ B 基因保守区设计了特异性引物和 TaqMan 探针,建立了 DRV 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,该方法检测的最低下限为 10 copies/ μ L。云涛等(2020)用 S3 基因保守序列为模板,建立了一步法 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 定量检测 DRV 的方法。沈丽雅等(2021)将 DRV 特有的 p18 基因保守序列为模板设计特异性引物,建立了 DRV 荧光定量 RT-PCR 检测方法,该方法能够将 DRV 和其他禽呼肠孤病毒成员区分开来,适用于 DRV 的早期诊断。

1.5.2.3 RT-LAMP

RT-LAMP 技术是一种等温扩增技术,具有用时短、灵敏度高、特异性高,对仪器设备要求低等特点,能够实现临床现场的快速诊断。于可响等(2014)建立了 RT-LAMP 检测 DRV S3 基因的方法,该方法的 RNA 最低检测量为 0.1 pg,是常规 PCR 的 100 倍;王永娟等(2017)建立了 RT-LAMP 检测 MDRV σ c 基因的方法;蔡跃佳等(2019)根据 DRV σ B 的保守区为模板,将 RT-LAMP 技术和荧光染料钙黄绿素结合,成功建立了 DRV 可视化 RT-LAMP 可视化检测方法,该方法不仅快速便捷,通过颜色变化,结果直接肉眼即可读取,Li 等(2018)也建立了 RT-LAMP 检测 DRV 的方法。

1.5.3 免疫学诊断方法

免疫学诊断方法可分为抗原检测和抗体检测,目前我国建立的检测 DRV 的免疫学诊断方法如要主要是免疫组化试验、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验。

包汉勋(2008)利用兔抗 MDRV-IgG 建立了检测 MDRV 的间接免疫组织化学方法,该方法能够用于 MDRV 感染的诊断和病毒在各组织中的分布研究。张舍郁等(2008)通过兔抗鸭龟头出血症病毒(DRV 早期命名)建立了间接免疫荧光方法检测石蜡切片中该病毒的方法,该方法可用于实验室诊断和病毒在感染组织中的亚细胞定位和动态研究;高春亮等(2012)利用制备的 MDRV 单克隆抗体建立了检测 MDRV 的间接免疫荧光方法,可用于冰冻组织切片中的 MDRV,实现快速诊断。

ELISA 是目前应用最为广泛的诊断手段之一,其原理是利用酶分子共价结合标记的抗体与吸附在固相聚苯乙烯表面的抗原或抗体发生特异性反应,通过底物显色液将酶标分子发生颜色反应。具有高灵敏性、高特异性的特点。孙陈莉(2014)通过原核表达系统表达了 DRV σ B 蛋白作为包被抗原,建立了检测 DRV 抗体的间接 ELISA 方法;同时还建立了以兔抗 DRV σ B 蛋白的多抗作为捕获抗体、DRV 单克隆抗体作为检测抗体的检测 DRV 抗原的双抗体夹心 ELISA 方法。陈海鹏等(2014)通过重组 DRV σ C 蛋白作为包被抗原,建立了检测 DRV σ C 蛋白抗体的间接 ELISA 方法。王锦祥等(2015)也通过纯化的 DRV σ C 蛋白,建立了间接 ELISA 检测方法。罗丹(2021)

将 DRV σ B 重组蛋白作为包被抗原,建立了间接 ELISA 检测方法;王锦祥等(2016)将 DRV σ B 蛋白和 σ C 蛋白同时作为包被抗原,建立了间接 ELISA 检测方法,从而提高了抗体检测的符合率。武华等(2022)根据大肠杆菌的密码子偏嗜性将 DRV σ C 基因进行优化,通过 σ C 蛋白作为包被抗原建立了间接 ELISA 检测方法。

1.6 本研究的目的及意义

2018 年广西某鸭养殖场暴发了一场疑似鸭呼肠孤病毒的疫情,不同以往报道的是本次疫情主要侵害的是成年鸭,其临床症状主要为脾脏出血、坏死,肝脏出血。本研究通过对病死鸭的组织病料进行处理、实验室病原检测、病原的分离培养和鉴定,确定了造成该鸭养殖场此次的疫情的病原为鸭呼肠孤病毒,随后通过对该病毒进行动物感染性试验、全基因组测定和基因序列分析,研究 DRV 流行株的生物学特性,为 DRV 的疫情防控和疫苗研发提供基础生物材料;制备 DRV p18 单克隆抗体,为研究 p18 蛋白在病毒生命周期中的生物学功能研究以及为后续 ELISA 检测试剂盒开发提供提供工具和材料支撑;建立 DRV p18 蛋白间接 ELISA 检测方法,为鸭呼肠孤病毒早期诊断以及开展流行病学调查提供有效的检测手段。

第二章 鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定

鸭呼肠孤病毒病是以肝脏出血、坏死和脾脏肿大、坏死为主要特征的鸭传染病，DRV 感染鸭后能够引起机体免疫器官萎缩、坏死，甚至引起死亡，耐过的雏鸭生长发育受阻，是我国目前水禽养殖业中重要的防控传染病病原之一。近年来，DRV 的发病率逐年上升，宿主逐渐变广，给我我国水禽养殖业造成了严重的经济损失。

2018 年，广西省玉林市某鸭养殖场暴发了一起能够引起成鸭死亡的疫情，其主要临床症状表现为肝脏不规则出血、坏死，脾脏肿大并伴有多个坏死灶，怀疑引起该养殖场疫情的病原是鸭呼肠孤病毒。为确诊该病病原，本研究通过对患病鸭组织病料进行处理、经实验室检测初步确定为 DRV，随后进行了病毒的分离与培养、IFA 检测、Western blot 检测、全基因组序列分析以及动物回归实验，结果显示成功分离出一株 DRV 分离株，与我国 DRV 流行株属于同一分支，并将其命名为 DRV-GL18 株。本研究丰富了我国 DRV 流行株基因信息库，为防控鸭呼肠孤病毒病和研发疫苗提供了实验基础和依据。

2.1 材料

2.1.1 病料

广西玉林某鸭养殖场患病鸭。

2.1.2 细胞、鸭胚及实验动物

BHK-21 细胞系，由本实验室保存；麻鸭胚，购自浙江省农业科学院良种家禽孵化基地；实验动物由 SPF 绍兴麻鸭胚孵化，购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

2.1.3 主要试剂和仪器

2×Taq PCR MasterMix、胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，Premix Taq™ (LA Taq™ Version 2.0)、pMD™ 19-T Vector Cloning Kit、DNA Maker (DL2000) 购自大连 Takara 公司，TRIzol Reagent 试剂、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor™ Plus 488 购自美国 Invitrogen 公司，M-MLV Reverse transcriptase 购自美国 Promega 公司，DMEM 细胞培养基购自美国 Gibco 公司，胎牛血清购自美国 BI 公司，兔抗 DRV σ C 多克隆抗体由本实验室制备并保存，羊抗兔 HRP-IgG 购自北京索莱宝科技有限公司，Pierce™ ECL Western 化学发光液购自德国 Thermo Fisher 公司，DAPI 染色液购于上海碧云天生物技术有限公司。

表 2-1 主要仪器

Tab. 2-1 Primary instruments

仪器名称	生产厂家
超净工作台	苏州净化设备有限公司
恒温细胞培养箱	德国 Thermo Fisher 公司

续表

PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像分析系统	上海天能科技有限公司
全自动化学发光图像分析系统	上海天能科技有限公司
自动翻转孵化机	德州市科裕孵化设备有限公司
台式低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
倒置荧光显微镜	日本 Nikon 公司
组织快速研磨仪	上海净信实业发展有限公司
漩涡混合仪	上海沪西分析仪器厂
半干转印槽转膜仪	美国 Bio-Rad 公司

2.2 方法

2.2.1 引物设计与合成

设计鸭腺病毒 (Duck adenovirus, DAdV)、番鸭细小病毒 (Muscovy duck parvovirus, MDPV)、鸭圆环病毒 (Duck circovirus, DuCV)、鸭瘟病毒 (Duck plague virus, DPV)、新城疫病毒 (Newcastle virus)、禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV)、鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV) 和鸭呼肠孤病毒 (Duck reovirus, DRV) 等常见的水禽病毒特异性引物 (表 2-2), 根据 GenBank 数据库中 DRV 流行株的全基因组序列, 设计 DRV 全基因组十个基因节段全长的特异性扩增引物 (表 2-3), 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 2-2 常见水禽病毒引物

Tab. 2-2 Primers sequence for Waterfowl viruses

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
DAdV-F	CACCTCAACAAGGAGCACAA	614
DAdV-R	CATTCCCTTTAGCTCCGACT	
MDPV-F	ACTCTGACTGAGACTCGATAGTG	659
MDPV-R	GATCTTCTGTCCACTTGCTTCT	
DPV-F	TGCAACGAGGAGAGTTATTG	516
DPV-R	GTGCATGAGGCATTTAGAAC	
DuCV-F	TTGAGGAGTCGCTGGGAGGA	410
DuCV-R	GACGACTACGTCATTTCCCG	
NDV-F	CTTGCACTGCAGGGATTGT	460
NDV-R	GCATCTTCCCAACTGCCACT	
AIV-F	TTCTAACCGAGGTCGAAAC	220
AIV-R	AAGCGTCTACGCTGCAGTCC	
DHV-F	GGTGATTCTAACCAGTTAGG	715

续表

DHV-R	TTCAATTTCCAGATTGAGTTC	
DRV-F	ATGGATCGCAACGAGGTGATAC	320
DRV-R	GAGGATAGCTCGGACCGGACAT	
σ C-F	ATGGATCGCAACGAGGTGATACG	966
σ C-R	CTAGCCCGTGGCGACGGTGAA	
σ C-qPCR-F	GGAGTCGTCTCACTCCAAGC	196
σ C-qPCR-R	TTTGCGAAGACATGAGCAAC	

表 2-3 DRV 全基因组序列扩增引物

Tab. 2-3 Primers for amplification of complete genome sequences

基因	引物名称	引物序列 (5'→3')
S1	S1-F	GCTTTTTTCTTCTCTGCCCATG
	S1-R	GATGAATAGCTCTTCTCATCG
S2	S2-F	GCTTTTTTCTCCACGATGGCGC
	S2-R	GATGAGTACGTCCACGTGCTG
S3	S3-F	GCTTTTTGAGTCCTCAGCGTG
	S3-R	GATGAATAGGCGAGTCCCGC
S4	S4-F	GCTTTTTGAGTCCTTGTGC
	S4-R	GATGAATAAGAGTCCAAG
M1	M1-F	GCTTTTCTCGACATGGCCTATC
	M1-R	GATGAGTAACCGAGTCCGCCG
M2	M2-F	GCTTTTTGAGTGCTAACCTTTC
	M2-R	GATGAGTAACGTGCTAACCCAG
M3	M3-F	GCTTTTTGAGTCCTAGCGTGG
	M3-R	GATGAGTAACCGAGTCCGCCG
L1	L1-F	GCTTTTTTCTCCGAACGCCGAAATG
	L1-R	GATGAGTAACCTCCAACGAGAG
L2	L2-F	GCTTTTTCTCACCATGCATG
	L2-R	GATGAGTAACACCCTTCTAC
L3	L3-F	GCTTTTCACCCATGGCTCAG
	L3-R	GATGAGTAACACCCTTCTACTGG

2.2.2 临床样品检测

2.2.2.1 病料处理

用灭过菌的剪刀剪取病死鸭的脾脏、肝脏、肾脏等实质性器官 0.2 g，加入与组织病料 1: 3

（质量体积比）无菌 PBS 缓冲液于组织研磨管中，加入研磨钢珠后，在组织快速研磨仪中研磨，频率为 60 Hz，每 2 min 暂停 30 s 至成匀浆，随后放进-80℃冰箱中，反复冻融 2~3 次。在冰上融化完全后梯度离心制备病毒组织悬液，离心条件分别为：在 4℃条件下。3000 r 离心 10 min，吸取上清液于新的离心管中，6000 r 离心 10 min，吸取上清后 9000 r 离心 10 min，上清液即为病毒悬液。吸取上清液进行备用。

2.2.2.2 核酸提取及 cDNA 合成

吸取 2.2.2.1 获取的病毒悬液各 200 μL，分别用于 DNA 提取和 RNA 提取。根据 OMEGA DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。

（1）采用 TRIzol 法提取总 RNA，方法如下：

- A.取 200 μL 病毒悬液于 1.5 mL 的 Free-RNase EP 管中,加入 800 μL 的 TRIzol Reagent 试剂,漩涡充分混匀,在室温中静置作用 5 min;
- B.瞬时离心将管盖上的液体甩入管中,加入 200 μL 的氯仿,涡旋振荡充分混匀后,在室温下静置作用 3 min, 4℃离心机 12000 r 离心 10 min;
- C.取上层水相转移至新的 Free-RNase 的 EP 管中,加入 500 μL 异丙醇,室温沉淀 10 min, 4℃低温 12000 r 离心 10 min;
- D.弃掉上清,加入 700 μL 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀,4℃低温 10000 r 离心 5 min, 弃掉上清,倒扣于纸上以去除上清;
- E.室温干燥 RNA 沉淀,最后用 50 μL DEPC 水溶解,利用核酸蛋白浓度测定仪测定浓度。

（2）反转录合成 cDNA

将上述获取的 RNA 作为模板进行反转录合成 cDNA，具体操作见表 2-4。

表 2-4 反转录反应

Tab. 2-4 RT reaction	
反应试剂	体积
RNA 模板	2 μg
Random Primer	1 μL
DEPC 水	up to 12 μL
75℃孵育 5 min, 冰上 5 min	
M-MLV Reverse transcriptase	1 μL
5× M-MLV Buffer	5 μL
RRI	1 μL
dNTP	1 μL
DEPC 水	5 μL
42℃孵育 1 h, 72℃孵育 10 min, -20℃保存	

2.2.2.3 PCR 检测

以 2.2.2.2 提取的 DNA 和合成的 cDNA 作为模板分别与 DAdV、MDPV、DPV、DuCV、AIV、DHV 和 DRV 常见水禽病毒特异性引物进行 PCR 鉴定, PCR 配制体系如下:

表 2-5 PCR 反应体系

Tab. 2-5 PCR reaction system

反应试剂	体积
2×Taq PCR Master Mix	10 μ L
DNA 或 cDNA 模板	2 μ L
上游引物 (F)	1 μ L
下游引物 (R)	1 μ L
ddH ₂ O	up to 20 μ L

PCR 反应程序如下: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 sec, 55°C 退火 30 sec, 72°C 延伸 30~60 sec (根据扩增片段的长短进行调整, 一般 1 kb/min), 33 个循环; 72°C 再延伸 5 min。PCR 产物在 1.5% (w/s) 的琼脂糖凝胶中进行电泳。

2.2.3 DRV 的分离鉴定

2.2.3.1 DRV 的分离培养与传代

将 2.2.2.1 制备的病毒悬液经 0.45 μ m 滤器过滤除菌后经尿囊腔接种于 9 日龄的麻鸭胚, 接种量为 0.2 mL/枚。接种后的麻鸭胚放置于 37°C 孵化箱中培养, 观察鸭胚存活情况, 弃去 24 h 内死亡的鸭胚, 收取 24~120 h 内死亡的鸭胚胚体及尿囊液, 将收取的尿囊液按上述方法继续接种于鸭胚, 直至传代稳定出现规律性死亡。

将过滤除菌的病毒悬液接种于 BHK-21 细胞, 37°C 孵育 1.5 h, 弃掉病毒悬液后加入含 2% FBS 的 DMEM 维持培养基, 置于 5% CO₂、37°C 培养箱培养, 同时设立未接种病毒悬液的 BHK-21 细胞作为阴性对照, 每天观察细胞形态。5 d 后收取病毒细胞培养物, 反复冻融 3 次后接种于 BHK-21 细胞, 如有病变则将收取病毒细胞培养物进行 PCR 检测、Western Blot 检测和 IFA 检测。如未有病变则如此连续盲传直至细胞 CPE, 收取病毒细胞培养物进行检测。稳定传代后进行病毒滴度测定。

2.2.3.2 DRV 分离株其他病原排除

将在收取的尿囊液和病毒细胞培养物进行 DNA 和 RNA 的提取, 以 DNA 作为模板, 对 DAdV、MDPV、DPV、DuCV 进行 PCR 检测; 以提取的 RNA 模板, 对 AIV、NDV、DHV 和 DRV 进行 RT-PCR 检测, 步骤同 2.2.2.2 和 2.2.2.3。

2.2.3.3 DRV 分离株的电镜观察

将 2.2.3.1 中收取的病毒细胞培养物或者尿囊液进行梯度离心, 同 2.2.2.1 步骤, 取离心后的上清液以 15000 r 低温高速离心 30 min, 取上清液再以 30000 r 低温超速离心 4 h, 弃上清, 用少量预冷的 PBS 缓冲液重悬沉淀, 通过磷钨酸负染后在投射电子显微镜下观察病毒粒子的形态大小。

2.2.3.4 DRV 分离株的间接免疫荧光检测

实验前一天将 BHK-21 细胞铺于 12 孔板，培养过夜后取 2.2.3.1 中收取的病毒细胞培养液接种于 12 孔板，并设置正常细胞作为对照，培养 24 h 后进行 IFA 实验：弃去培养基后用 PBS 洗 3 次，用预冷的甲醇置于 -20℃ 固定 10 min，随后用 PBS 洗涤 3~5 次；5% 脱脂乳室温封闭 2 h，洗涤 5 次；加入兔抗 DRV σ C 蛋白血清作为一抗，37℃ 孵育 1 h，PBST 洗涤 5 次；避光条件下加入 FITC 标记的羊抗兔荧光二抗（1: 2000 稀释），37℃ 孵育 1 h，PBST 洗涤 5 次；洗涤后用 DAPI 染色液（1: 5000 稀释），室温孵育 5 min 后用 PBST 洗涤 3 次，置于倒置荧光显微镜下观察结果。

2.2.3.5 DRV 分离株的 Western Blot 检测

前期步骤同 2.2.3.4，接毒培养 24 h 后进行 Western blot 实验：

（1）制备蛋白样：弃去培养基后 PBS 洗涤，弃去 PBS 后用 100 μ L RIPA 裂解液，置于冰上裂解 10 min，收取细胞裂解液于 EP 管中，加入 25 μ L 的 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液，置于 100℃ 金属浴上加热 10 min，即为蛋白样。

（2）蛋白凝胶电泳：将收取的蛋白样通过 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳，电泳程序为：80 V，30 min；120 V，65 min。

（3）转印：电泳结束后，将加厚滤纸和 NC 膜浸泡在转膜液中浸湿，按照滤纸-NC 膜-聚丙烯酰胺凝胶-滤纸的顺序从下到上（“转印三明治”法）放置于半干转印槽转膜仪上，用滚轴赶走 NC 膜与凝胶中的气泡，0.15 A 恒流转印 25 min。

（4）蛋白抗体特异性结合：将转印好的 NC 膜用 TBST 洗涤后使用 5% 脱脂乳 37℃ 封闭 2 h，洗涤 3 次；用稀释好的兔抗 DRV σ C 蛋白血清作为一抗，室温孵育 2 h，洗涤 5 次；羊抗兔 HRP-IgG（1: 10000）作为二抗，室温孵育 45 min，洗涤 5 次。

（5）曝光显色：将 NC 膜放置于全自动化学发光图像分析系统中，滴加 ECL 化学发光液进行暗室曝光检测。

2.2.3.6 σ C 基因扩增及遗传进化分析

以 2.2.3.2 中的 cDNA 为模板，用 DRV σ C 基因设计扩增全长引物 σ C-F 和 σ C-R（见表 2-3）进行 PCR 扩增，扩增体系见表 2-6。

表 2-6 PCR 反应体系

Tab. 2-6 PCR reaction system

反应试剂	体积
2 $\times$ Premix LA Taq	25 μ L
DNA 或 cDNA 模板	3 μ L
上游引物（F）	2 μ L
下游引物（R）	2 μ L
ddH ₂ O	up to 50 μ L

反应程序：

95°C	3 min	} 33 cycles
95°C	30 s	
58°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

PCR 产物预期大小为 966 bp。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后目的条带切下进行纯化回收。将纯化产物连接在 pMD19-T 载体上, 连接条件为: 16°C 连接过夜。并将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 在 37°C 培养箱培养 12~16 h。挑取 3 个单克隆菌落, 进行 PCR 鉴定, 阳性克隆菌进行质粒提取, 并送至北京擎科生物技术有限公司进行序列测定。

将获取的 σ C 基因序列用 Mega7.0.26 软件进行系统进化树的构建。

2.2.4 动物感染性试验

将 13 只 1 日龄的 SPF 麻鸭分成 2 组, 接毒组 8 只, 对照组 5 只, 皮下注射病毒液 0.5 mL, 对照组不作处理。在负压隔离器中饲养, 饲料和水供应充足。攻毒后每日观察和记录鸭子的精神状态、进食情况和发病的临床状态, 如有死亡的鸭子立即进行剖检, 观察和记录各个脏器的病变情况, 将各个组织取一部分固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 剩余组织收集冻存于 -80°C 冰箱。持续观察和记录 2 周。

2.2.4.1 组织病毒载量测定

对收集的各个组织病料进行 RNA 提取和反转录, 参考步骤 2.2.2.2, 利用实验室建立的荧光定量 PCR 对各个组织进行病毒载量的测定, 所得数据利用 GraphPad Prism 8.2.1 进行数据分析和处理。

2.2.4.2 病理组织学变化

病料组织切片制备的具体步骤参考 (吴巧梅, 2017), 采集新鲜组织固定于 4% 多聚甲醛; 水洗去多聚甲醛后经梯度脱水、浸蜡、石蜡包埋; 修块切片、展片、捞片; 烘干后利用二甲苯脱蜡、水化后即可 HE 染色, 染色后脱水、透明, 自然晾干后用中性树胶封片, 正置显微镜下观察拍照。

2.2.4.3 免疫组化检测

根据步骤 2.2.4.3 水化后, 使用柠檬酸钠缓冲液进行热抗原修复, 用 3% H₂O₂ 溶液去除内源性 H₂O₂ 酶; 经 5% BSA 封闭后, 孵育抗 DRV σ C 兔多抗, 清洗, 用 HRP 标记的羊抗兔为二抗进行孵育, 随后用 DAB 显色试剂盒进行显色, 显色完毕后苏木素复染、脱水、透明、封片, 显微镜下观察并拍照。

2.2.5 DRV 分离株全基因组序列的扩增及基因分析

2.2.5.1 DRV 分离株的全基因组序列扩增

使用表 2-3 中设计的 DRV 全基因组的 10 个基因节段扩增引物，以 2.2.3.2 的 cDNA 为模板，根据 2.2.3.6 的实验方法进行分离株各基因节段特异性扩增和重组质粒的克隆与构建。构建的重组质粒送至北京擎科生物技术有限公司进行基因序列测定。

将获取的 10 个节段的基因序列上传至 GenBank，使用 MEGA7.0.26 软件将分离株的各基因节段与 GenBank 中的参考株各基因序列进行系统进化树构建。

2.2.5.2 DRV 分离株基因重组分析

通过 RDP (Recombination Detection Program) V.4.46 软件将获取的 DRV 全基因组基因序列进行重组事件的预测，根据 RDP 软件中的 7 种不同的算法(RDP、GENECONV、Bootscan、MaxChi、Chimera、SiScan 和 3Seq) 得出的潜在的重组事件，再在 Simplot 3.5.1 软件中进行进一步验证。

2.3 结果

2.3.1 DRV 临床样品的检测结果

取病鸭肝脏、脾脏等组织的匀浆液提取总 DNA 和总 RNA 进行 PCR 鉴定，结果显示用 DAdV、MDPV、DPV、DuCV、NDV、AIV 和 DHV 特异性引物均未有对应大小的条带，而 DRV 特异性引物扩增出 320bp 大小的目的片段(见图 2-1)。

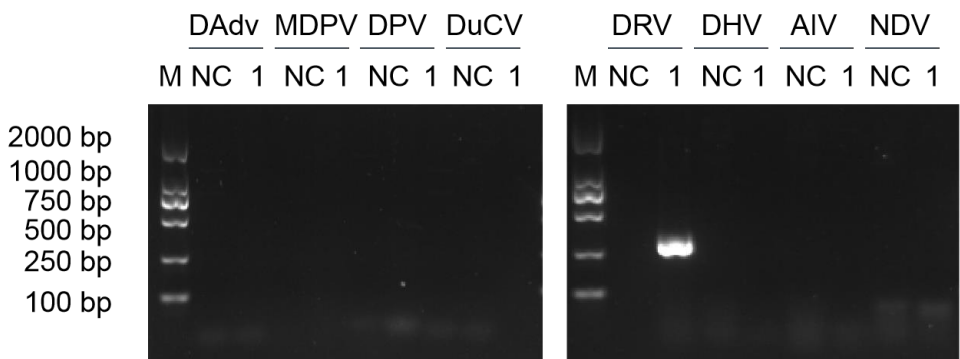


图 2-1 病料 PCR 检测结果

Fig. 2-1 PCR results of clinical sample

M: DL200; NC: 阴性对照; 1: 检测样品

M: DL2000; NC: Negative control; 1: Sample

2.3.2 DRV 的分离鉴定结果

2.3.2.1 分离株鸭胚传代及细胞病变观察

将 2.2.2.1 制备的病毒悬液过滤除菌后经尿囊腔接种于 9 日龄的麻鸭胚，结果显示，在麻鸭胚上连续传 5 代，均能将麻鸭胚致死，死亡时间集中在 48~72 h 之间，致死的麻鸭胚胚体蜷缩、胚体水肿、出血并伴有散在性针尖大小的出血点（图 2-2）。

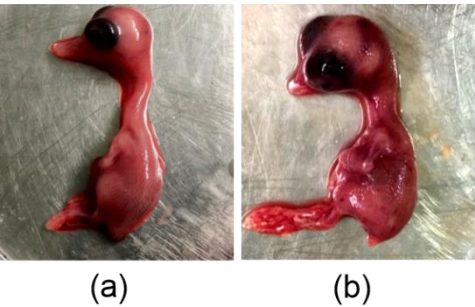


图 2-2.病料接种鸭胚的病变

Fig.2-2 Lesion of duck embryo inoculated with the sample

(a): 正常鸭胚; (b): 接种病料的鸭胚

(a): Negative control; (b): Infected duck embryo

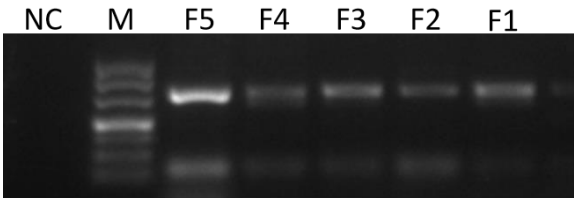


图 2-3 传代细胞毒的 PCR 检测结果

Fig.2-3 PCR results of virus passages on cell

NC: 阴性对照; M: DL500; F1 至 F5: 病料在 BHK-21 细胞上培养第 1 代至第 5 代

NC: Negative control; M: DL500; F1 to F5: virus passage 1 to 5 on cell

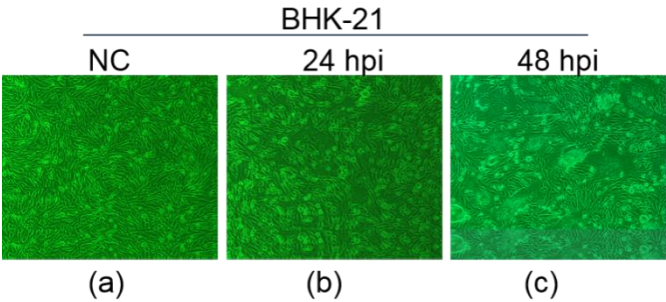


图 2-4 DRV 分离株感染 BHK-21 细胞的细胞病变 (100×)

Fig.2-4 The observation of CPE by the isolated DRV(100×)

(a): 正常 BHK-21 细胞; (b): 接毒 24 h 的 BHK-21 细胞; (c): 接毒 48 h 的 BHK-21 细胞

(a): Non-infected BHK-21; (b): The isolate infected BHK-21 for 24 h; (c): The isolate infected BHK-21 for 48 h

将过滤除菌的病毒悬液接种于 BHK-21 细胞, 观察其细胞病变。结果显示, 病毒在 BHK-21 细胞传代的前 5 代病变不明显, 仅出现了少量较小的合胞体, 提取 RNA 进行 RT-PCR, 结果表明 DRV 有在 BHK-21 细胞中增殖(如图 2-3)。待传代至第 7 代时, BHK-21 细胞出现较为明显的病变: 接毒后培养 24 h 开始出现细胞病变: 部分细胞脱落, 出现大量合胞体 (见图 2-4); 72 h 后大部分细胞脱落。病毒滴度测定 $TCID_{50}$ 为 $10^{5.74}/0.1\text{ mL}$ 。

2.3.2.2 分离株的电镜观察

将收取的细胞病毒培养液进行超速离心后的沉淀，用少量 PBS 重悬，磷钨酸负染后在投射电子显微镜下的观察结果显示，病毒粒子外表呈现车轮状的近圆形，直径大小约为 70 nm 左右，与文献报道的鸭呼肠孤病毒粒子形态相似(Wang et al, 2019)，如图 2-5 所示，结果表明该毒株分离成功，并将其命名为 GL18 株。

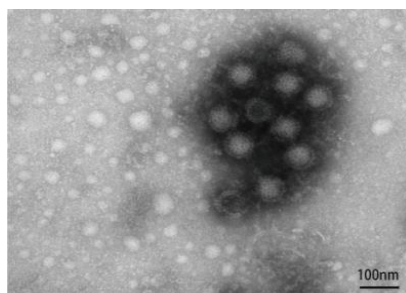


图 2-5 分离株的电镜观察

Fig. 2-5 Electron microscopy of the isolate

2.3.2.3 分离株其他病原排除检测

将在 BHK-21 细胞中传代至第 10 代的细胞毒和在鸭胚上传代至第 6 代的尿囊液进行 RNA 提取，并通过 RT-PCR 鉴定是否其他病原存在。结果表明 PCR 鉴定结果 DAdV、MDPV、DPV、DuCV、NDV、AIV 和 DHV 均为阴性，从而表明该分离株纯净性良好。

2.3.2.4 分离株的 IFA 鉴定结果

间接免疫荧光检测结果显示，该分离株感染 BHK-21 细胞 24h 后可以被本实验室制备的 DRV σ C 单克隆抗体特异性识别，在荧光显微镜的 FITC 荧光通道检测到特异性的绿色荧光信号，而阴性对照无特异性绿色荧光信号，表明该分离株属于 DRV，并且能在 BHK-21 细胞中检测到 DRV σ C 蛋白的存在，主要分布在细胞质中，进而表明该分离株能够在 BHK-21 中增殖。

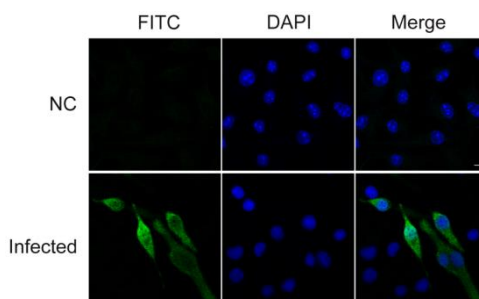


图 2-6 IFA 检测 DRV σ C 蛋白在 BHK-21 细胞中的表达

Fig.2-6 Detection of DRV- σ C expression in BHK-21 cells by IFA

NC: 正常 BHK-21; Infected: GL18 感染的 BHK-21

NC: Non-infected BHK-21; Infected: GL18 infected BHK-21

2.3.2.5 分离株的 Western Blot 鉴定结果

对该分离株的细胞毒进行 Western blot 检测，结果显示在细胞毒中能够检测到 DRV σ C 蛋白的存在，条带大小为在 35~40 kDa 左右，符合 σ C 蛋白 37 kDa 的大小。而阴性对照细胞未检测特异性条带（见图 2-6），表明该分离株能够在 BHK-21 细胞中增殖。

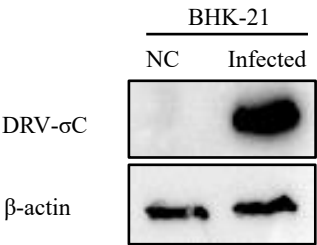


图 2-7 Western blot 检测 DRV σ C 蛋白在 BHK-21 细胞中的表达

Fig. 2-7 Detection of DRV- σ C expression in BHK-21 cells by Western Blot

M: 蛋白标准分子量; NC: 正常的 BHK-21 细胞; Infected: GL18 感染的 BHK-21 细胞

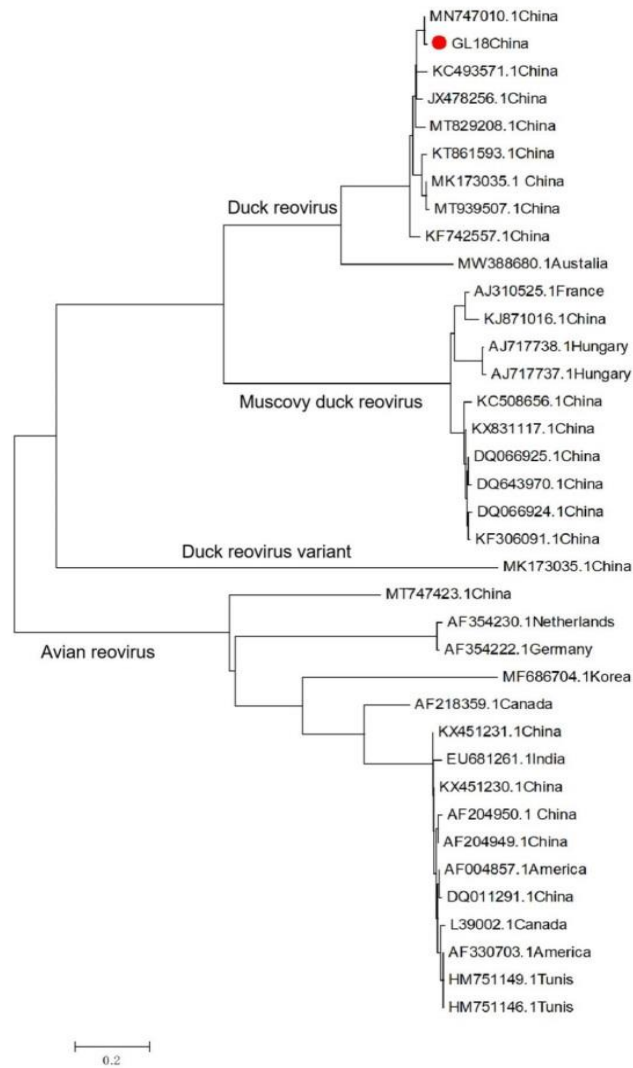
M: Protein maker; NC: Non-infected BHK-21; Infected: GL18 infected BHK-2

2.3.2.6 分离株的 σ C 基因扩增及遗传进化分析

利用 MEGA7.0.26 将获取的 σ C 基因序列与 GenBank 中的 36 株参考株进行系统进化树的构建。结果表明， 禽呼肠孤病毒主要分为两个主要分支，即为鸡源分支和水禽源分支，其中水禽源分支又分为两个小分支，即为 MDRV 分支和 DRV 分支。本研究分离的 GL18 毒株与我国近年来主要流行的鸭呼肠孤病毒属于同一个 DRV 分支，是鸭呼肠孤病毒（见图 2-8b）。

利用 MEGA7.0.26 将获取的 σ C 基因序列与当前国内的流行株 GX-Y7、QY、SD19/6201、SD19/6202、TH11、YL 和 DE130 进行氨基酸序列的比对，经比对发现，GL18 与 GX Y7 具有很高的相似性，氨基酸序列仅有 2 个氨基酸残基不同。

(a)



(b)

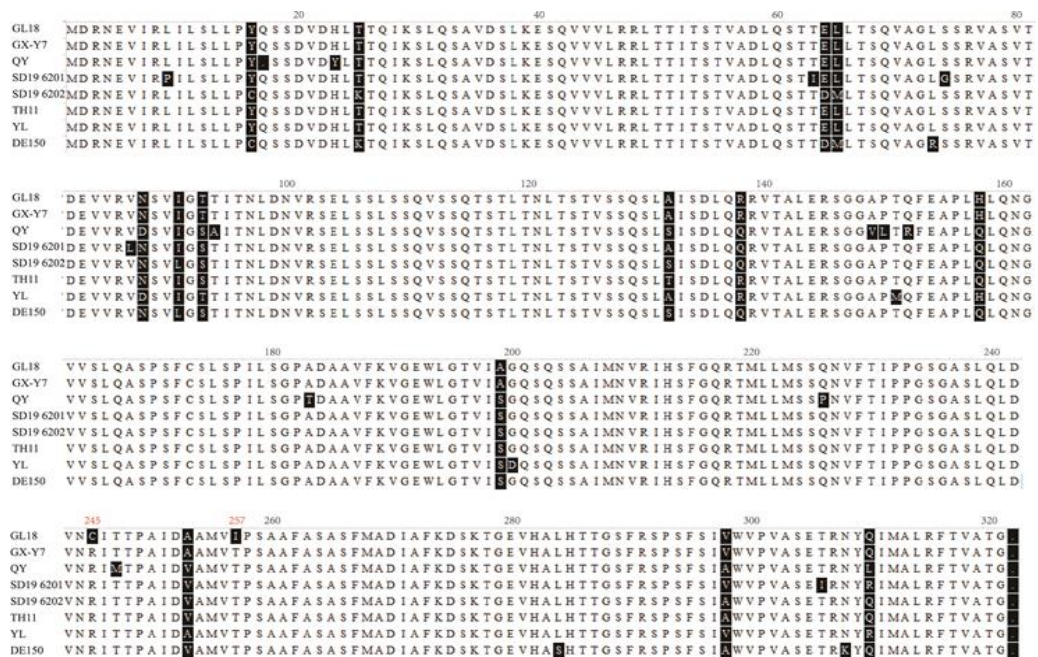


图 2-8 σ C 基因分析

Fig. 2-8 Analysis of σ C gene

(a) ARVs 分离株 σ C 基因核苷酸遗传进化树分析; (b) GL18 与 DRV 流行株 σ C 氨基酸序列对比
(a) Phylogenetic analysis of σ C gene sequences of ARVs isolates; (b) Amino acid sequence alignment of the σ C protein of GL18 with Chinese DRV isolate

2.3.3 动物感染性试验结果

2.3.3.1 解剖病变结果

将 DRV-GL18 在鸭胚上传至第 3 代的尿囊液进行雏鸭致病性试验,同时设了空白对照组。结果攻毒第 2 天开始,感染组部分鸭食欲减退,第 3 天感染组症状加重,精神沉郁、食欲消退,出现死亡情况,攻毒第 5 天开始部分鸭精神状态和食欲稍有恢复,第 7 天后临床症状基本消失,感染雏鸭的精神和食欲恢复正常,共观察 2 周,统计死亡情况并绘制生存曲线(见图 2-9),感染组死亡率为 50%,对照组无死亡情况。与对照组比较,耐过鸭生长发育明显受阻。对发病死亡的进行剖检,发现重者肝脏不规则出血、红黄相间,轻者肝脏仅出血肿大;脾脏肿大、出血严重,甚至萎缩变硬(见图 2-10)。

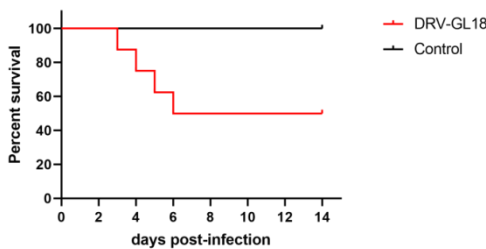


图 2-9 致病性试验的生存曲线

Fig. 2-9 Survival curve of Pathogenic trial

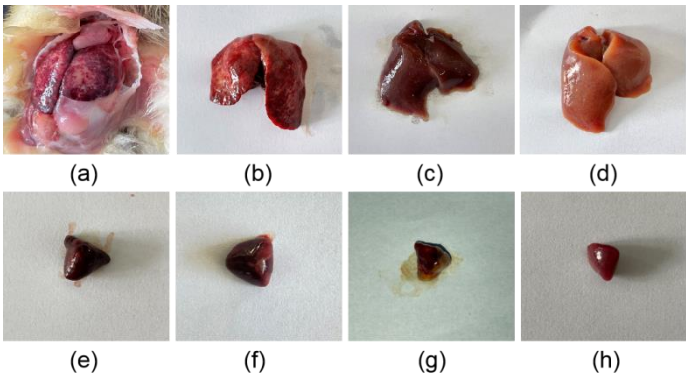


图 2-10 DRV-GL18 致病性试验

Fig. 2-10 Pathogenic trial for DRV-GL18

(a)~(c): 感染组肝脏; (d): 对照组肝脏; (e)~(g): 感染组脾脏; (h): 对照组脾脏
(a)~(c): liver of infected group; (d): liver of non-infected group; (e)~(g): spleen of infected group; (h): spleen of non-infected group

2.3.3.2 组织病毒载量测定

通过荧光定量 PCR 对感染 DRV-GL18 的雏鸭各组织的病毒载量进行测定，结果显示：所有采集的组织中均能检测到 DRV，其中脾脏中的病毒载量显著高于其他组织；肺、胰脏和胸腺组织中的病毒含量也相对较高，消化道中病毒载量相对较少（图 2-11）。

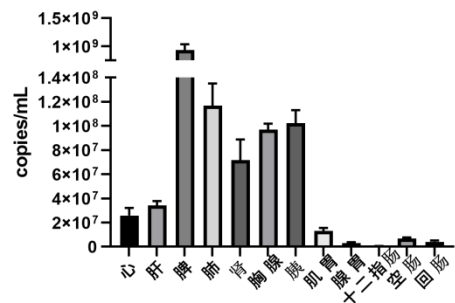


图 2-11 DRV 感染雏鸭各组织病毒载量检测

Fig. 2-11 Viral loads in tissues of DRV infected ducklings.

2.3.3.3 HE 染色和 IHC 结果

HE 染色结果显示，感染 DRV-GL18 的鸭脾脏组织结构紊乱，被膜崩解，脾脏白髓结构不明显，淋巴细胞坏死，呈局灶性坏死；红髓淤血，大量含铁血黄素沉着，有肉芽肿；肝脏中肝细胞排列紊乱、崩解，细胞发生空泡化，细胞肿胀，炎性细胞浸润；肺脏细胞同样结构崩解，肺小叶间界限不分明，嗜碱性细胞增多（如图 2-12 所示）。

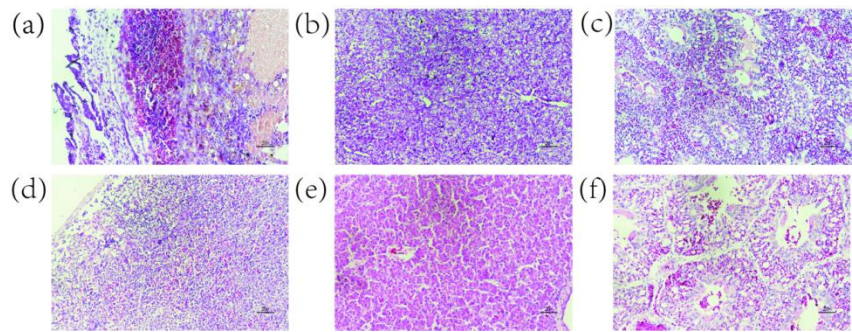


图 2-12 DRV-GL18 感染雏鸭病理组织切片结果

Fig.2-12 Results of Histopathological section of DRV-GL18 infected ducklings

a~c: 感染组脾、肝、肺组织切片；d~f: 对照组脾、肝、肺组织切片

a~c:Section of spleen, liver, lung of infected group; e~f: Section of spleen, liver, lung of negative group

IHC 实验结果表明，在感染组的脾脏、肝脏、肺脏中均能观察到棕黄色颗粒物的存在，则说明能在感染组的脾脏、肝脏和肺脏中检测到病毒的分布，对照组未见异常组织病变（见图 2-13）。

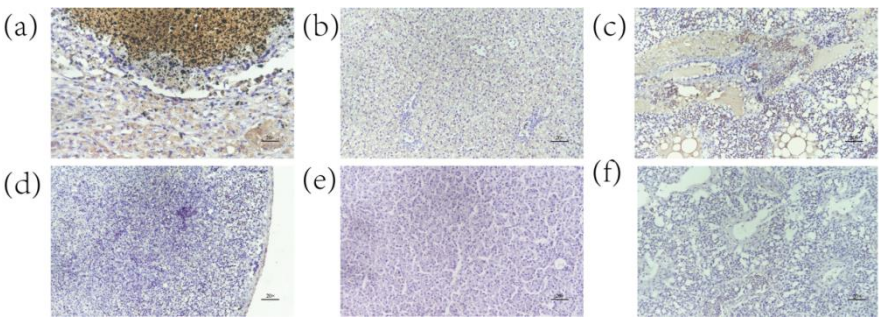


图 2-13 IHC 检测 σ C 蛋白在脾、肝、肺中的分布

Fig.2-13 σ C protein expression visualized by IHC in spleen, liver, lung

a~c: 感染组脾、肝、肺组织切片; d~f: 对照组脾、肝、肺组织切片

a~c:Section of spleen, liver, lung of infected group; e~f: Section of spleen, liver, lung of negative

2.3.4 分离株全基因组序列及分析

2.3.4.1 分离株全基因序列

以 cDNA 为模板，对病毒基因组的十个基因节段进行扩增、克隆，经过测序获得基因序列，并上传至 GenBank，获得登录号，如表 2-7 所示。

表 2-7 DRV-GL18 株基因组登录号

Tab. 2-7 GenBank accession numbers of DRV-GL18 strain

Genome segments	GenBank accession numbers
S1	MW924628
S2	MW924629
S3	MW924630
S4	MW924631
M1	MW924632
M2	MW924633
M3	MW924634
L1	MW924635
L2	MW924636
L3	MW924637

2.3.4.2 同源性分析

将获取的 10 个基因节段序列分别在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对，结果表明 DRV-GL18 株与 DRV 具有高达 99%的相似性，其中 DRV-GL18 株与 DRV-GX-Y7 株关系最为密切，同源性最高。

表 2-8 基因核苷酸相似性最高的病毒株

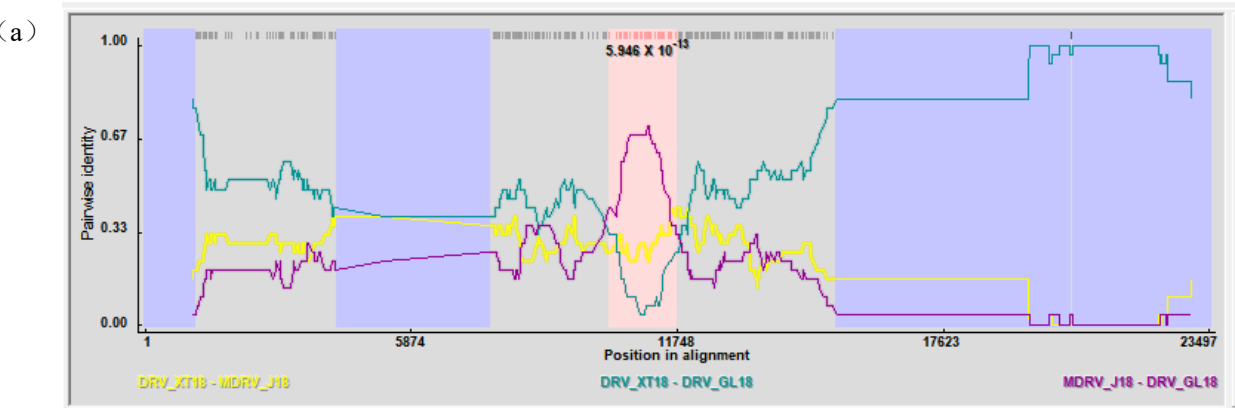
Tab. 2-8 The virus strains with the most similarity of nucleotide sequences

Genes	Nucleotide sequence compared	Virus with most genic similarity	Similarity	Accession numbers
S1	1-1568	DRV-GX-Y7	99%	MN747010.1
S2	1-1324	DRV-GX-Y7	99%	MN747011.1
		DRV-XT18	99%	MK749404.1
S3	1-1202	DRV-GX-Y7	99%	MN747012.1
S4	1-1192	DRV-GX-Y7	99%	MN747013.1
M1	1-2284	DRV-GX-Y7	99%	MN747007.1
		DRV-XT18	99%	MK749401.1
M2	1-2158	DRV-GX-Y7	99%	MN747008.1
		DRV-SY	99%	MK955822.1
M3	1-1996	DRV-TH11	99%	JX440512.1
		DRV-091	99%	JX478255.1
L1	1-3359	DRV-GX-Y7	99%	MN747004.1
		DRV-SH12	99%	MH510245.1
L2	1-3830	DRV-TH11	99%	KC493573.1
		DRV-HN5d	99%	KT861588.1
L3	1-3906	DRV-GX-Y7	99%	MN747006.1

2.3.4.3 DRV 分离株基因重组分析

利用 RDP 软件对 DRV GL18 全基因进行基因重组分析，根据结果显示 DRV GL18 的 M2 和 M3 节段可能发生重组事件，其主要的父本为 DRV XT18，次要副本为 MDRV J18（见图 2-14a 所示）。

将 DRV GL18、DRV XT18 以及 MDRV J18 的 M 节段基因序列利用 Simplot 软件进行进一步验证，其结果表明 DRV GL18 于 DRV XT18 和 MDRV J18 在 M2 节段位置存在潜在的重组事件（见图 2-14b）。



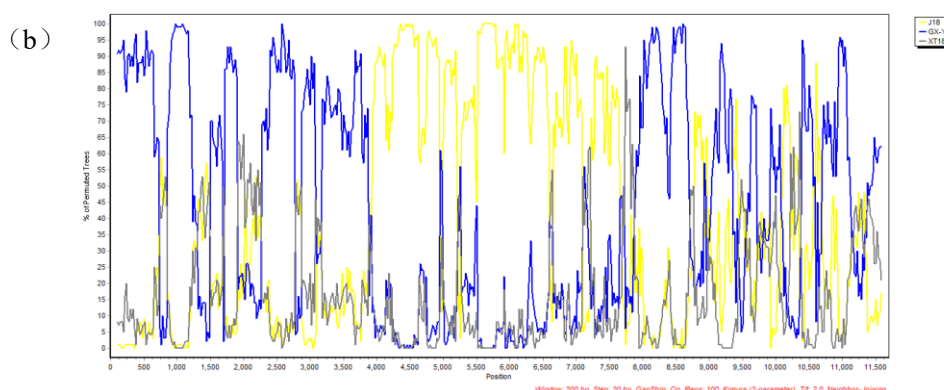


图 2-14 DRV 分离株的基因重组分析

Fig. 2-14 Gene recombination analysis of DRV

(a)利用 RDP 软件进行基因重组事件预测；(b) 基因重组事件验证

(a)Gene recombination event prediction by RDP; (b) Verification of gene recombination by Simplot

2.4 讨论

本研究通过实验室病原检测、对病料处理后在鸭胚和细胞上进行病毒分离，利用电镜观察、IFA 和 Western blot 鉴定，成功从临床病料中分离出一株鸭呼肠孤病毒。经过 σC 基因系统发育进化树分析，该分离株与我国近几年的流行株的同源性较高，处于禽呼肠孤病毒中的鸭呼肠孤病毒分支，并将其命名为 DRV-GL18 分离株。该毒株的病料来源于病死的成年鸭从而引起我们的关注，我们通过动物感染性试验探索其致病性，结果表明感染 1 日龄的雏鸭能够引起 100% 的发病率，致死率达 50%；能够引起雏鸭脾脏肿大、淤血、并伴随多个坏死灶，严重者脾脏萎缩变硬；肝脏不规则出血且出血严重，呈现“花斑肝”状，与近年来的报道的鸭呼肠孤病毒疫情的临床症状相似。随后，通过扩增其全基因组，并通过基因组分析发现，与 DRV-GL18 σC 基因具有高达 99.6% 同源性的 DRV-GX-Y7 株，其十个基因节段中有多个节段与 DRV-GL18 同源性高，两株毒均分离自广西，但致病性研究表明，DRV-GX-Y7 株对鸭的毒力较低，单独感染不能致死雏鸭，发病率仅 40% 与沙门氏菌混合感染时死亡率达 100% (WANG et al., 2020b)。经序列比对发现 GL18 株 σC 基因序列与 DRV-GX-Y7 株仅有三个碱基不同，分别在第 773、770 和 858 位碱基上，翻译成氨基酸发现两毒株的 856-858 位的碱基是同义密码子，即第 286 位氨基酸残基均为 T，而第 773 位碱基(第 245 位残基)和第 770 位碱基(第 257 位残基)，对应的密码子不是同义密码子，DRV-GL18 第 245 位氨基酸残基是 C，第 256 位氨基酸残基是 I，DRV-GX-Y7 与其对应的是 245R 和 256T。 σC 蛋白作为病毒吸附蛋白(JUNG et al., 2014)，这两个氨基酸位点是否为病毒毒力的关键位点，有待进一步研究。

感染性试验中将 DRV-GL18 株感染成年鸭后未表现出明显的临床症状，结合其他鸭呼肠孤病毒株引起的鸭呼肠孤病毒病的报道，该病的流行病学特征为一年四季均可发生，不同日龄的各品种鸭均易感，发病以 20 日龄内的雏鸭为主，故而本研究的感染性试验用所分离的 GL18 毒株感染雏鸭。

禽呼肠孤病毒在水禽上最初仅感染番鸭，不感染鸭科鸭属的鸭。直到近些年来，禽呼肠孤病毒在北京鸭、樱桃谷鸭、麻鸭等不同品种鸭感染即 DRV,其宿主谱扩大，还可感染鸡、鹅等禽类，

致病力增强。ARVs 其基因组为双链 RNA，因而病毒容易发生基因交换重组(WANG et al., 2019; WANG et al., 2020b; ZHENG et al., 2016)，本研究对 DRV-GL18 株基因进行基因重组分析，经 RDP 软件预测和 Simplot 软件推算表明 DRV-GL18 的 M 节段可能存在潜在的基因重组事件。这提示我们，研发具备较好的免疫保护率的疫苗是当前为防控 ARVs 的当务之急，应当引起我们的高度重视；同时加大加深对 ARVs 的致病机制研究，为预防和治疗呼肠孤病毒病提供有力的理论基础。此外，开发和研制 ARVs 有效的诊断试剂盒也需加快进程，为快速诊断和临床治疗提供有效的技术支撑，减少疫病带来的经济损失。

第三章 DRV p18 蛋白单克隆抗体的制备

目前对 DRV p18 蛋白的研究较少, p18 蛋白作为 DRV 的非结构蛋白, 并且是 DRV 入侵宿主细胞后早期表达的蛋白之一, 其在病毒的生命周期中具体行使的功能尚不清楚。p18 蛋白是 DRV 独有的蛋白, 可作为鉴别 DRV 的诊断靶标。为此, 本研究旨在利用原核表达的重组 p18 蛋白制备 DRV p18 蛋白单克隆抗体, 为建立 ELISA 诊断试剂盒的开发及 p18 蛋白的功能研究提供材料支持。

3.1 材料

3.1.1 实验动物、质粒、细胞株和毒株

原核表达质粒 pCold-I 由本实验室保存; DRV-GL18 分离株由本实验室分离鉴定并保存; 6 周龄 BAL B/c 小鼠购自上海杰斯捷实验动物有限公司。SP2/0 骨髓瘤细胞、BHK-21 细胞均由本实验室保存。DRV-GL18 毒株由本研究分离保存。

3.1.2 主要材料及仪器

EcoR I 和 *Sac I* 限制性核酸内切酶均购自美国 NEB 公司; DNA 相对分子质量标准购自大连宝生物 (TaKaRa) 有限公司; Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase、2×Taq PCR Master Mix、ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit、大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自南京诺唯赞生物技术股份有限公司; HRP 标记的羊抗鸭二抗购自 KPL 公司; His-tag Purification Resin (耐螯合还原型)、抗 His-Tag 小鼠单克隆抗体、BCA 蛋白测定试剂盒、购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, HRP-山羊抗鼠 IgG 和 FITC-山羊抗鼠 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司, HT、HAT、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司, 小鼠单抗 Ig 亚类鉴定试剂盒购于北京博奥龙免疫技术有限公司。

水浴锅购自湖南力辰仪器科技有限公司, 离心机购自德国 Thermo Fisher 公司。

3.2 方法

3.2.1 DRV p18 重组表达质粒构建与鉴定

3.2.1.1 引物设计与合成

根据 DRV GL18 的 p18 基因序列, 设计一对具有 pCold-I 载体同源臂的特异性引物 (见表 3-1), 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 3-1 引物序列

Tab. 3-1 The sequence of primers

引物名称	引物序列 5'→3'
pCold-I-p18-F	ggtaggcatatggagctcATGTCGCTCCTGCCAACCC

续表

pCold-I- p18-R	gtcgacaagcttgaattcTCAGTTGTTGATTGTAGATCTGCC
----------------	--

注：小写英文字母为载体的基因序列，大写英文字母为 p18 基因序列

3.2.1.2 p18 基因的扩增及重组载体的构建

以步骤 2.2.2.2 扩增的 cDNA 为模板，引物为 pCold-I- p18-F 和 pCold-I- p18-R 进行 PCR 扩增，扩增片段预计为 525 bp。

将空载质粒 pCold-I 用限制性核酸内切酶 *EcoR I* 和 *Sac I* 进行双酶切。

目的基因扩增产物和酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后，切胶纯化。通过 *Exnase II* 酶，将线性化的载体和 p18 目的基因片段进行连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中，重组菌进行菌液 PCR 鉴定后，提取质粒获取重组质粒，经酶切鉴定阳性的质粒送至生物公司测序，序列正确后将构建的重组质粒命名为 pCold-I -p18。

3.2.1.3 重组表达菌株的鉴定

将重组质粒 pCold-I-p18 转化至大肠杆菌 BL21 感受态中，37℃ 培养 12~14 h，随后挑取菌落进行 PCR 鉴定，将鉴定阳性的重组菌继续在含有氨苄西林的 LB 液体培养基中培养。

3.2.2 p18 重组蛋白诱导表达及诱导条件优化

3.2.2.1 p18 重组蛋白诱导表达

将步骤 3.2.1.3 中的菌培养至 10-12 h 左右，将菌液以 1: 100 的比例接种于 5 mL 含氨苄抗性的 LB 液体培养基中，震荡培养，菌液 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 时，加入 IPTG 使之终浓度为 1 mmol/L，在 16℃、200 rpm 的摇床中震荡培养，诱导 24 h 收集菌液，离心后加入 100 μ L PBS，加入 25 μ L 5% SDS 蛋白上样缓冲液混匀，100℃ 煮沸 10 min，同时设置 pCold-I 空载诱导和 pCold-I-p18 重组未诱导的对照组。通过 SDS-PAGE 确定重组蛋白是否表达。

3.2.2.2 温度的优化

具体步骤方法参照步骤 3.2.2.1，将培养至 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 的菌液，加入 IPTG 之后分别放在 16℃ 和 25℃ 的摇床中诱导培养 24 h，SDS-PAGE 凝胶电泳观察结果。

3.2.2.3 IPTG 浓度的优化

步骤参照 3.2.2.1，将培养至 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 的菌液，分别加入终浓度至 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 IPTG，诱导表达 24 h 后，收取菌液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳观察结果。

3.2.2.4 p18 重组蛋白表达形式的鉴定

将 IPTG 诱导后的菌液离心收集菌体，PBS 洗涤之后重悬菌体，放置于冰上，超声破碎完全

后，12000 r 离心 10 min，将上清移至新管，沉淀用与上清等体积的 PBS 重悬，分别取适量体积加入蛋白上样缓冲液，100℃煮沸 10 min，通过 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达形式。

3.2.3 p18 重组蛋白大量表达、纯化及鉴定

通过上述试验筛选出的最佳诱导条件，对重组菌进行大量诱导表达。将培养过夜的 pCold-I-p18 重组菌以 1:100 的比例接种至 300mL 含有氨苄西林的 LB 液体培养基中，放置于 37℃ 摇床震荡培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8，加入 IPTG 后诱导 24 h 后 12000 r 离心 10 min，弃上清后，用 PBS 洗涤 3 次，30 mL PBS 重悬后，超声破碎 20 min，12000 r 离心 10 min，收集上清。

收取的上清与 His-tag 的凝胶进行结合，具体操作按照碧云天 His-tag 凝胶蛋白纯化试剂盒说明书进行。从凝胶洗脱下来的溶液即为纯化的蛋白溶液，通过 BCA 蛋白浓度测定对纯化的重组 p18 蛋白溶液进行浓度测定。

将纯化的重组 p18 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，随后进行转印，具体方法见步骤 2.3.2.5。一抗为鼠抗 His-tag。

3.2.4 动物免疫

将步骤 3.2.3 纯化的重组 p18 蛋白与佐剂（1:1）乳化充分后，对 6 周龄的 BALB/小鼠进行免疫，经小鼠背部皮下多点注射，具体免疫程序见表 3-2。

表 3-2 小鼠免疫程序

Tab. 3-2 Immunity procedure of mice

免疫程序	免疫途径	佐剂	免疫剂量（μg/只）	与上次免疫时间间隔
首次免疫	背部皮下	FCA	50~100	0
第一次加强免疫	背部皮下	FIA	50~100	2 周
第二次加强免疫	背部皮下	FIA	50~100	2 周
第三次加强免疫	背部皮下	FIA	50~100	2 周
冲击免疫	腹腔	--	50	融合前 3 天

3.2.5 免疫血清效价检测

第三次免疫后 3 d 对小鼠进行断尾采血，分离血清后通过间接 ELISA 方法检测小鼠的免疫效价。将纯化的 p18 蛋白用碳酸盐缓冲液（pH=9.6）包被于聚苯乙烯酶标板，包被浓度为 1 μg/mL，100 μL/孔，5%脱脂奶粉封闭，小鼠血清作为一抗，浓度从 1:1000 开始 2 倍倍比稀释至 1:1024000，HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1: 5000）作为二抗，未免疫的小鼠血清作为阴性对照，具体操作参考 2.3.2.5。

3.2.6 细胞融合

3.2.6.1 SP2/0 细胞的准备

细胞融合前 1 周将冻存在液氮中的 SP2/0 细胞取出进行复苏，置于细胞培养箱进行培养。进行细胞融合的时候保证细胞状态良好并且处在细胞对数生长期。

3.2.6.2 饲养层细胞的制备

细胞融合的前一天取未经免疫过的 BAL B/c 小鼠制备饲养层细胞：摘除小鼠眼球，采血致死并收集血清。将致死的小鼠浸泡在 75%乙醇中进行消毒 5~10 min，取出后将小鼠的四肢固定在 75%乙醇消毒和紫外线杀菌过的泡沫板上。用眼剪将小鼠腹部右侧皮肤剪开一个小口，确保腹膜完全未被剪破，用镊子固定住小鼠右腿，另一只手持镊子夹住剪开的腹部皮肤向小鼠左上方牵拉，充分暴露小鼠腹腔。用酒精棉球擦拭小鼠腹膜，注射器吸取 5 mL 左右的无血清培养基向小鼠腹腔内注射，夹取酒精棉球对小鼠腹部进行按摩，将与腹部内容物充分混合的培养基抽取出来，800 r 离心 5 min，用 12%FBS 的 HAT 培养基重悬，平铺于 4 个 96 孔板中，放进细胞培养箱培养。

3.2.6.3 脾细胞的制备

将 ELISA 检测血清效价最高的小鼠经眼球采血致死，收集并保存血清，浸泡在 75%乙醇中 5~10 min，将小鼠固定与泡沫板，无菌操作取出脾脏，将脾脏放置在细胞筛网上，用注射器推塞将其研磨至脾脏呈灰白色，用基础 DMEM 培养基将细胞筛网上的细胞冲洗下来并移至离心管，800 r 离心 5 min，弃上清备用。

3.2.6.4 细胞融合

将生长处在对数生长期的 SP2/0 细胞与脾细胞 1: 10~1: 5 的比例混匀，800 r 离心 5 min，弃去上清，将沉淀在离心管底部的细胞团块弹至松散状态，将事先预热的 1 mL PEG 逐滴缓慢加入混合细胞中，边加边转动离心管，1 min 内将 PEG 加完。静置 90 s 后加入预热的 DMEM 培养基终止 PEG 作用：第 1 min 滴加 1 mL 培养基，第 2 min 滴加 2 mL 培养基，第 3 min 滴加 3 mL 培养基，直至加至 15 mL 培养基；随后放置于培养箱中温浴 15 min，800 r 离心 5 min，12%FBS 的 HAT 培养基重悬，均匀平铺在饲养层细胞中，放置于培养箱培养。

3.2.7 杂交瘤细胞的筛选与亚克隆

细胞融合后第 4 d 进行半换液：弃去 100 μ L/孔的培养基，加入 100 μ L/孔的 HT 培养基；第 6d 进行全换液，将细胞培养上清全部吸尽之后，更换为 200 μ L/孔的 HT 培养基，换液满 24 h 后收集上清进行间接 ELISA 法检测和筛选，将检测结果阳性的杂交瘤细胞转孔扩大培养，同时进行亚克隆，扩大培养的细胞进行冻存。亚克隆：用 DMEM 基础培养基将杂交瘤细胞吹打下来，800 r 离心 5 min，离心后弃上清，用 1 mL 基础培养基重悬，经细胞计数后计算出大约 100~200 个细胞于 12%FBS 的 HT 培养基，混合均匀后平铺于 96 孔板，置于细胞培养箱培养，6~8 d 后，当单个细胞长成单克隆细胞团块，收取上清进行鉴定，阳性孔继续扩大培养和亚克隆。

3.2.8 单克隆抗体的鉴定

3.2.8.1 单克隆抗体的亚类鉴定

经 3 次亚克隆纯化后,将纯化后的杂交瘤细胞上清根据小鼠单抗 Ig 亚类鉴定试剂盒的说明书进行 MAbs 的亚类鉴定。

3.2.8.2 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

将 DRV-GL18 接种 BHK-21 细胞收取的蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳后转印至 NC 膜上,杂交瘤细胞培养上清为一抗,羊抗鼠 HRP-IgG1: 10000 稀释作为二抗,进行 Western blot 鉴定,同时设 SP2/0 细胞培养上清为阴性对照。

3.2.8.3 单克隆抗体的 IFA 鉴定

将 DRV-GL18 感染 BHK-21 细胞,感染 12 h,用预冷的甲醇固定感染的细胞。以杂交瘤细胞培养上清作为一抗,羊抗鼠 FITC-IgG 为二抗,SP2/0 细胞培养上清为阴性对照,对杂交瘤细胞培养上清液进行间接免疫荧光实验 (IFA)。

3.2.9 单克隆抗体腹水的制备及效价的测定

选取 Western blot 和 IFA 反应性较好的杂交瘤细胞制备腹水:取 10 只未经免疫、生长状态健康的 12 周龄雌性小鼠,在注射杂交瘤细胞前一周,给小鼠腹腔注射 0.5 mL/只经高压灭菌的石蜡油,7 d 后阳性杂交瘤细胞按 1×10^5 个/只的细胞数量给小鼠腹腔注射。每天观察小鼠腹腔大小是否变大,大约 7~9 d 后小鼠腹部明显肿大,将无菌的注射器针头插入小鼠腹腔,使其腹腔内流出,并收集腹水,2000~3000 r 离心 10 min。保存于 -80°C 冰箱。采用间接 ELISA、Western blot 和 IFA 的方法检测制备的腹水效价。

3.3 结果

3.3.1 DRV p18 重组表达质粒构建与鉴定

3.3.1.1 p18 基因的扩增及重组载体的构建

将 p18 基因的 PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳 (见图 3-1a),结果显示目的条带于与预期目的片段大小相符合,约 525 bp 大小。胶回收纯化后与线性化 pCold-I 载体进行同源重组,获得的重组质粒经双酶切鉴定 (见图 3-1b) 与测序结果表明, pCold-I p18 重组载体构建成功。

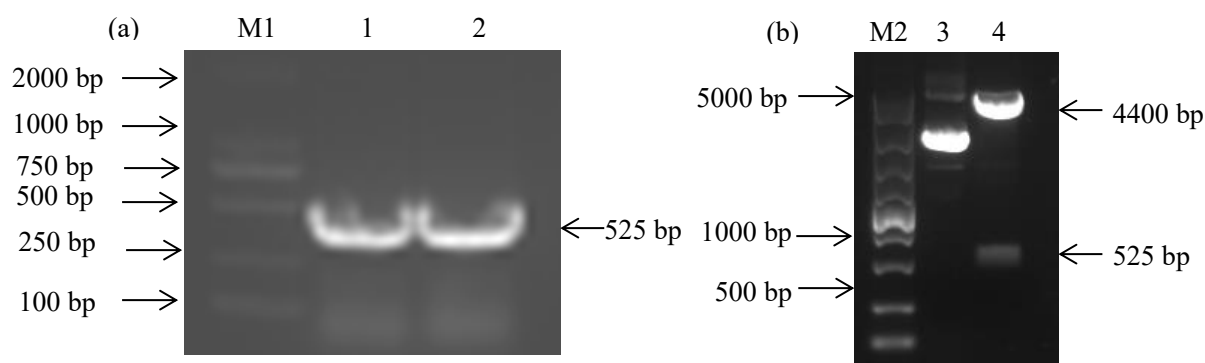


图 3-1 重组 pCold-I-p18 质粒的构建与鉴定

Fig. 3-1 Construction and Identification of recombination pCold-I-DRV-p18 plasmid

(a) p18 基因扩增; (b) 重组质粒双酶切鉴定

M1: DL2000; M2: DL5000; 1~2: p18 基因; 3: pCold-p18; 4: pCold-I- p18 酶切

M1: DL2000; M2: DL5000; 1~2: p18 gene; 3: pCold-I- p18; 4: Digestion of pCold-I- -p18

3.3.1.2 重组表达菌株的鉴定

将重组质粒 pCold-I-p18 转化至 BL21 感受态细胞中, 培养 12~14 h 后挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定 (见图 3-2), 阳性者用于后续实验。

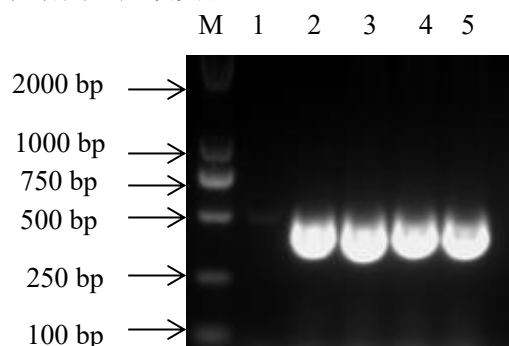


图 3-2 菌液 PCR 鉴定

Fig. 3-2 Results of PCR

M: DL2000; 1: 阴性对照; 2~5: 4 个单菌落

M: DL2000; 1: Negative control; 2~5: Four single colonies

3.3.2 p18 重组蛋白诱导表达及诱导条件优化

3.3.2.1 p18 重组蛋白诱导表达

将诱导表达的菌液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果表明 16°C 诱导 24 h 后, 重组菌能够表达重组 p18 蛋白, 大小约为 18 kDa (见图 3-3)。

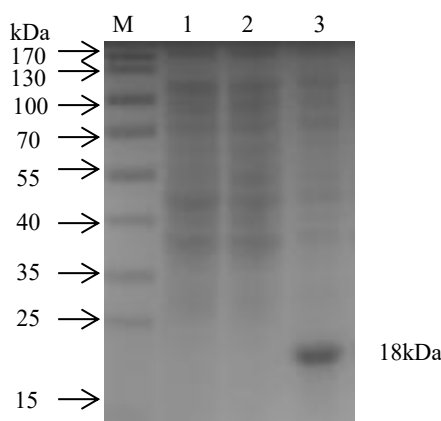


图 3-3 重组 p18 蛋白表达结果

Fig.3-3 Results of recombination p18 protein induced expression

M: 蛋白 maker; 1: pCold-I-空载菌诱导; 2 pCold-I- p18 重组菌未诱导; 3: pCold-I- p18 重组菌诱导

M: Protein maker; 1: pCold-I without induced; 2: pCold-I- p18 without induced 3: pCold-I- p18 induced with 1 mmol/L

3.3.2.2 温度的优化

对在 16°C 和 25°C 条件下诱导的菌液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳（见图 3-4），结果表明 16°C 条件下诱导表达的重组 p18 蛋白的表达量更高，因而后续实验将诱导条件确定为 16°C。

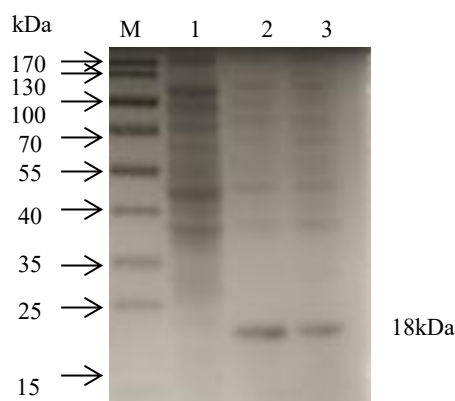


图 3-4 重组 p18 蛋白在不同温度的表达结果

Fig.3-4 Results of recombination p18 protein induced expression at different temperature

M: 蛋白 maker; 1: pCold-I- p18 重组菌未诱导; 2 pCold-I-p18 重组菌 16°C 诱导; 3: pCold-I- p18 重组菌 25°C 诱导

M: Protein maker; 1: pCold-I- p18 without IPTG; 2: pCold-I-p18 induced at 16°C; 3: pCold-I-p18 induced at 25°C

3.3.2.3 IPTG 浓度的优化

重组菌 pCold-I- p18 在不同终浓度的 IPTG 条件下（0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L），16°C 诱导 24 h 后，收集菌体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定，结果如图 4-5 所示，未添加 IPTG 诱导剂的重组 p18 蛋白未表达，不同终浓度的 IPTG 诱导的重组 p18 蛋白表达量存在差异，SDS-PAGE 结果分析表明 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 时，pCold-I-p18 重组菌诱导表达的重组蛋白的表达量最高。

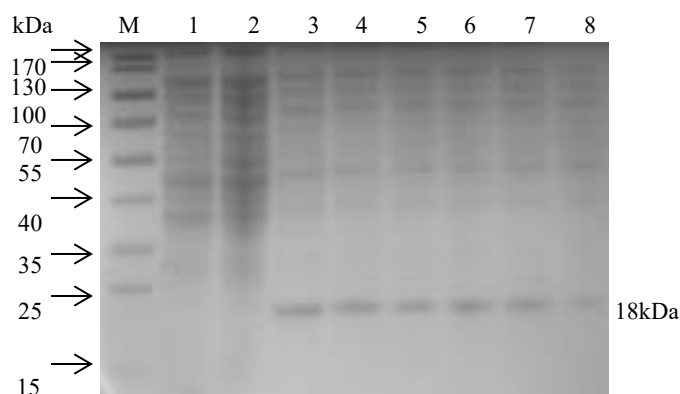


图 3-5 重组 p18 蛋白在不同 IPTG 浓度的诱导结果

Fig. 3-5 Results of recombination p18 protein induced with different concentrations

M: 蛋白 maker; 1: pCold-I 空载; 2~8: IPTG 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L

M: Protein maker; 1: pCold-I; 2~8: IPTG concentration: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mmol/L

3.3.2.4 p18 重组蛋白表达形式的鉴定

对诱导表达后的菌液进行超声破碎处理，通过对沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 分析，确定重组 p18 蛋白的表达形式。结果表明，重组 p18 蛋白在沉淀和上清中均存在（见图 3-6），即表明重组 p18 蛋白既可以包涵体表达也可以可溶性表达。

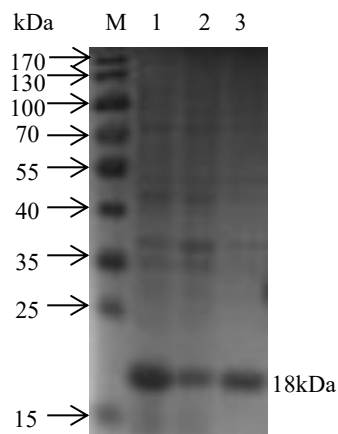


图 3-6 蛋白的表达形式分析

Fig. 3-6 Analysis of expression form of recombination protein

M: 蛋白 maker; 1: pCold-I-p18 超声前; 2: 超声后上清; 3: 超声后沉淀

M: Protein maker; 1: pCold-I- p18 without sonication; 2: Supernatant after soication; 3: Sedimentation after sonication

3.3.3 p18 重组蛋白大量表达、纯化及鉴定

将重组菌经诱导表达、超声破碎处理后，离心收集上清液。将收集的上清液进行凝胶结合、洗涤，最后从凝胶镍柱上洗脱下来，收集洗脱下来的溶液，即获得纯化的蛋白溶液。经纯化过后的重组蛋白进行蛋白浓度测定，测得蛋白浓度为 1.375 mg/mL。

将纯化的重组 p18 蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析（一抗为 His-tag 单克隆抗体），结果表明重组 p18 蛋白纯度高，且免疫活性良好，能够特异性结合 His-tag 单克隆抗体（如图 3-7）。

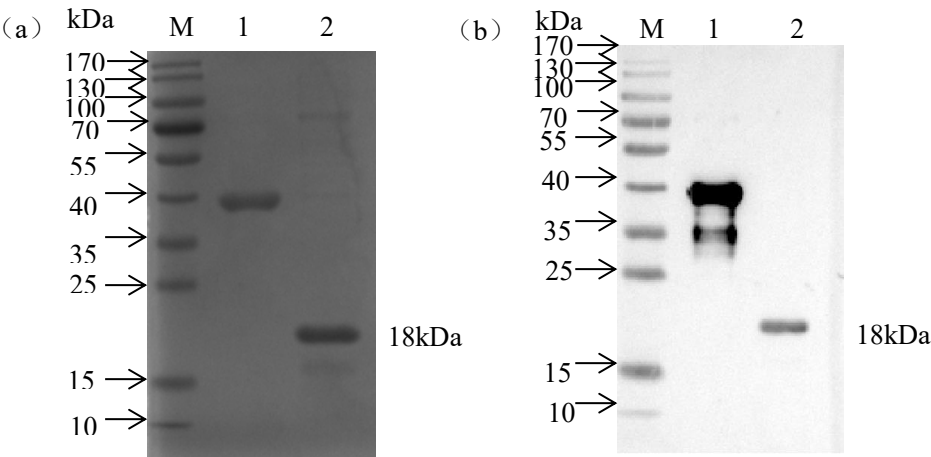


图 3-7 重组蛋白的纯化和鉴定

Fig. 3-7 Purification and identification of recombination protein

(a): SDS-PAGE; (b): Western blot

M: 蛋白 maker; 1: 阳性对照; 2: 纯化的 p18 蛋白

M: Protein maker; 1: Positive control; 2: Purified protein

3.3.4 间接 ELISA 测定免疫小鼠血清效价

纯化后的重组 p18 蛋白作为免疫原免疫小鼠，经三次免疫后采血分离免疫小鼠的血清，间接 ELISA 法检测血清中抗体效价，结果显示：小鼠第 3 次免疫后，小鼠血清抗体效价可达 1: 102400 以上，说明重组 p18 蛋白具有良好的免疫原性使小鼠能产生较强的免疫反应，可以进行单克隆抗体的制备。

3.3.5 单克隆抗体的测定

3.3.5.1 单克隆抗体亚类的鉴定

通过杂交瘤细胞融合技术进行细胞融合，全换液后通过间接 ELISA 法进行检测和筛选，经过亚克隆后获得 4 株杂交瘤细胞株（1E3、2C4、4A2 和 4D4）。4 株 MAbs 的细胞培养上清通过 Ig 亚类鉴定试剂盒进行亚类鉴定，结果显示，1E3 和 4D4 重链为 IgG1 型，2C4 重链为 IgM 型，4A2 重链为 IgG2b 型，其轻链均为 κ 型（见图 3-8）。

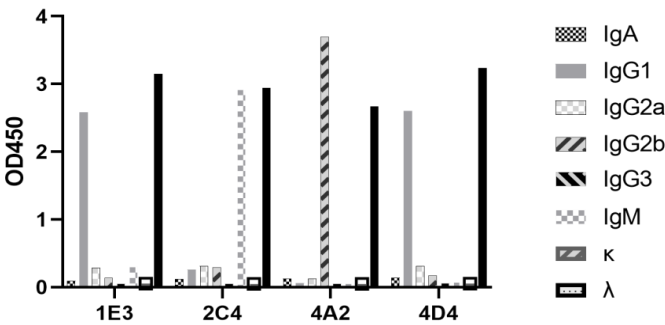


图 3-8 单克隆抗体的亚类鉴定

Fig. 3-8 Subtype identification of anti-p18 MAbs

3.3.2.2 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Western blot 鉴定结果显示, 4 株杂交瘤细胞培养上清均能与 DRV-GL18 细胞蛋白样品反应, 在 18 kDa 处出现特异性反应条带, 如图 3-9 所示, 表明 4 株杂交瘤细胞对 p18 蛋白的反应性良好。

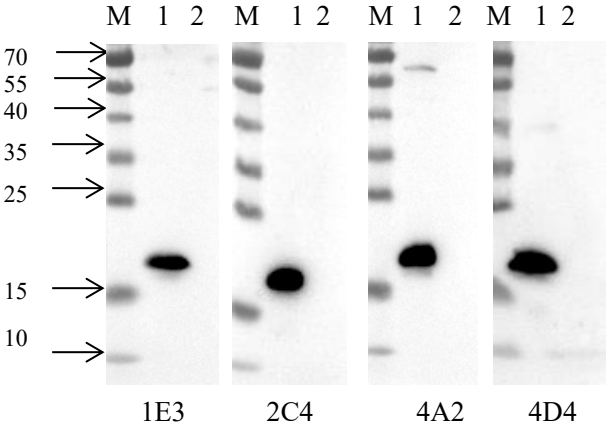


图 3-9 单克隆抗体的 Western blot 鉴定

Fig. 3-9 Identification of the MAbs by Western blot

M: 蛋白分子量标准; 1: BHK-21 细胞; 2: DRV 感染的 BHK-21 细胞
M: Protein maker; 1: BHK-21 cell; 2: BHK-21 cell infected by DRV

3.3.2.3 单克隆抗体的 IFA 鉴定

IFA 试验结果显示, 4 株 MAbs 均能够与感染 DRV 的 BHK-21 细胞产生特异性的绿色荧光(图 3-10), 而 SP2/0 细胞培养上清与感染 DRV 的 BHK-21 细胞无特异性绿色荧光, 表明本实验获得的 MAbs 具有较好的反应性。

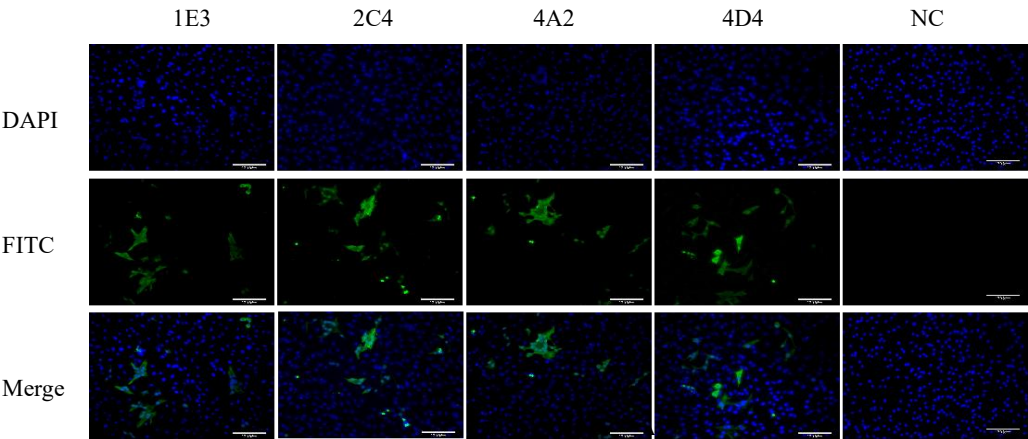


Fig. 3-10 Identification of MAbs by IFA assay

1E3、2C4、4A2、4D4: MAbs 细胞培养上清; NC: SP2/0 培养上清
1E3, 2C4, 4A2, 4D4: MAbs culture supernatant; NC: SP2/0 culture supernatant

3.3.6 单克隆抗体腹水的制备及效价的测定

选取间接 ELISA 值最高、Western blot 和 IFA 反应性良好的 MAbs 4D4 细胞株通过腹腔注射提前 7 d 致敏的小鼠，待小鼠腹腔膨大时进行腹水的收集，2000 r 离心 10 min 后，离心后呈三层，中间层淡黄色、清亮的液体即为腹水。通过间接 ELISA、Western blot 和 IFA 进行效价的测定。结果表明，间接 ELISA 法检测的效价达 1: 409600 以上，Western blot 检测效价达 1: 102400 以上，IFA 检测效价为 1: 51200。

3.4 讨论

与其他蛋白表达系统（真核表达系统、杆状病毒-昆虫细胞表达系统、酵母表达系统等）相比，原核表达是一种操作简单、实验周期短、经济实惠，容易达到量产的蛋白操作系统。本实验室曾构建过 DRV p18 的原核表达质粒 pCold-TF-S1-P18(吴巧梅, 2017)，虽然该重组质粒再 BL21(DE3) 中表达量高，但 pCold-TF 质粒自带的 TF (Trigger Factor, TF) 标签蛋白比较大，从而影响了 p18 的天然结构，造成免疫原性差。本研究通过 PCR 扩增获得了 p18 蛋白全长序列，通过同源重组的方法将目的片段连接在目的载体 pCold-I 中，该载体的标签仅 6 个组氨酸，成功构建了重组表达质粒 pCold-I-p18。通过温度、IPTG 浓度等条件的优化，确定了诱导条件，重组表达质粒的表达形式为可溶性表达和包涵体表达，但表达量较低。可溶性表达的蛋白更接近蛋白本身的天然构象，因为本研究将可溶性表达的重组 p18 蛋白进行 Hig-tag 凝胶柱纯化，获得了纯度较高和浓度稍高的目的蛋白，Western blot 结果表明重组 p18 蛋白具有较好的免疫活性。

ARV 的 p17 蛋白在靠近 C 端具有核定位信号，能够在细胞核和细胞质之间的来回穿梭 (Li et al, 2015)，并且 p17 蛋白干扰宿主细胞中 CDK1 催化的磷酸化，介导了通过激活 Tpr/p53 和 ATM/Chk1/PP2A 通路影响 Plk1 的表达，以及通过泛素-蛋白酶体途径介导 Cdc25C 降解，从而导致细胞周期 G2/M 期阻滞以利于病毒复制 (CHIU et al., 2016)。最新的研究表明，p17 蛋白能够保护其不被泛素-蛋白酶体酶解，与其调控的 Hsp90/Cdc37 复合体来增强病毒的稳定性、促进病毒成熟和产生以及调控病毒结构蛋白在病毒工厂的累积控制病毒的复制 (HUANG et al., 2022)。目前对 DRV 致病机制的研究较少，本实验室前期的研究表明 DRV p18 蛋白也存在于细胞质和细胞核中，p18 蛋白是病毒入侵宿主细胞的早期蛋白，在病毒感染宿主细胞的初期便开始参与病毒的复制。目前国内的 DRV 流行株编码 p18 蛋白的基因具有高度保守性，p18 蛋白在病毒复制、翻译等过程中行使的具体功能是否具有与 ARV p17 蛋白同样的功能，有待进一步研究。而本实验制备的抗 DRV p18 蛋白的单克隆抗体具有良好的反应性，为后续研究 p18 蛋白的生物学功能提供了材料支撑。

单克隆抗体在实验室研究中被广泛应用于酶联免疫吸附试验、免疫组化、流式细胞术、间接免疫荧光、胶体金免疫层析技术等临床诊断技术中，在现代分子生物学和制药领域占据了重要地位。目前实验室水平制备单克隆抗体的方法主要有杂交瘤技术和基因工程技术 (徐梦蔚 et al., 2022)，杂交瘤细胞产生的单克隆抗体具备特异性高且易于大量生产的特点；而基因工程技术制备单克隆抗体是将具有抗体轻链和重链基因的重组质粒转染进细胞使其分泌相应的单克隆抗体，具有特异性高生产速度快的特点，主要应用于人源化的单克隆抗体制备，其优势在于采用哺乳动物表达系统获得的重组抗体具备有与人体相似的糖蛋白结构 (ARICESCU et al, 2013; 陈观平等，

2021)。但目前杂交瘤技术仍是实验室制备单克隆抗体的首选方法。p18 蛋白作为病毒复制的早期蛋白，以及 p18 蛋白是 DRV 独有的编码蛋白，其可以作为临床早期诊断和鉴别诊断靶标。本研究用获得的重组 p18 蛋白免疫小鼠，保留了其原有的抗原性，以此为抗原制备获得 4 株可同时引起 WB 和 IFA 反应的杂交瘤细胞株，所制备的单克隆抗体可后续可用于 DRV 诊断方法的建立及生物学功能的研究。

综上所述，本研究制备的抗鸭呼肠孤病毒 p18 蛋白单克隆抗体能够为后续研究 DRV 感染的临床诊断及检测方法奠定基础，也能够为研究 DRV 的致病机理提供有用的工具。

第四章 DRV p18 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

DRV S1 基因编码 p18 蛋白, ARV S1 基因编码 p17 蛋白, 而 MDRV 不编码 p17 或 p18 蛋白, 因此 p18 蛋白可以作为鉴别 DRV 的诊断靶标。目前对 DRV p18 蛋白的功能解析尚未有研究报道, p18 蛋白作为 DRV 的非结构蛋白, 在病毒感染的早期就开始表达, 参与病毒的复制(吴巧梅, 2017)。因此 p18 蛋白可以作为鸭呼肠孤病毒病早期诊断的靶标。ELISA 检测方法具有易于操作、灵敏度高、特异性强、快速且稳定等特点, 是当前临床检测病原及其抗体应用最为广泛的诊断方法之一。当前, 国内外均无商品化的 DRV 抗原或抗体 ELISA 检测试剂盒, 故而, 本研究通过原核表达的重组 p18 蛋白为包被抗原, 建立了 DRV p18 抗体的间接 ELISA 检测方法, 旨在为 DRV 的早期诊断提供有力的技术手段。

4.1 材料

4.1.1 血清

DRV 鸭阳性血清、SPF 鸭阴性血清、DAdV-3 鸭阳性血清、FAdV-4 鸭阳性血清、MDRV 鸭阳性血清均由本实验室制备并保存, 鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, Ra) 鸭阳性血清由胡青海研究员惠赠。

4.1.2 主要实验试剂和仪器

TMB 底物显色液购自上海碧云天生物技术有限公司; HRP 标记羊抗鼠二抗购自北京索莱宝科技有限公司; 全自动酶联免疫检测仪、ECL 显色试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司、ELISA 酶标板购自美国 Corning Costar 公司。

4.2 方法

4.2.1 DRV p18 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

4.2.1.1 蛋白最佳包被浓度和血清稀释度的确定

采用“棋盘法”确定蛋白最佳蛋白浓度和血清稀释度, 用碳酸盐缓冲液作为蛋白包被液, 将纯化好的重组 p18 蛋白 2 倍倍比稀释为: 0.5、1、2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$, 共 6 个浓度, 100 μL /孔加入聚丙烯酶标板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜; 以 PBST 为清洗液清洗 3 次, 每次 5 min, 5%脱脂乳 200 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h; 清洗 3 次, 将 SPF 鸭阴性血清和 DRV 阳性血清分别倍比稀释成 1: 100、1: 200、1: 400 和 1: 800, 100 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 清洗 5 次, HRP 标记的羊抗鸭为二抗, 1: 500 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 清洗 5 次, 拍干酶标板加入 100 μL /孔的 TMB 底物显色液, 室温条件下避光显色 15 min, 接着接入 50 μL /孔的 2M H_2SO_4 终止显色反应; 利用酶标仪测定 OD_{450} 值。每组设立 3 个重组。计算阳性血清 OD_{450} 值 (P) 与阴性血清 OD_{450} 值 (N) 的比值, 即为 P/N 值, 取 P/N 值最大判断为最优条件, 具体试验操作参考罗思思等 (2012)。

4.2.1.2 蛋白最佳包被条件的确定

用包被液将蛋白稀释成筛选的最优包被浓度，加入酶标板后，将包被条件设为：4℃包被过夜；25℃包被 1 h 后 4℃包被过夜；25℃包被 2 h 后 4℃包被过夜；37℃包被 1 h 后 4℃包被过夜；37℃包被 2 h 后 4℃包被过夜；设立阴性组和阳性组，以筛选的最佳血清稀释度来稀释阴性血清和阳性血清，每组设立 3 个重复，测定 OD₄₅₀ 值，选取 P/N 值最大的条件。

4.2.1.3 最佳封闭条件的确定

以蛋白最佳包被浓度和最佳包被条件包被酶标板，分别以 5%脱脂乳、10%脱脂乳、5%明胶、10%明胶、5%BSA 和 10%BSA 作为封闭液，200 μL/孔，37℃封闭 2 h，设立阴性和阳性组，每组重复 3 次，以 P/N 值最大为判定标准判定最佳封闭液。

以上述确定封闭液对封闭时间进行筛选，设置封闭时间为 30、60、90 和 120 min，设立阴性和阳性组，每组重复 3 次，以 P/N 值最大为判定标准。

4.2.1.4 最佳血清孵育时间的确定

血清孵育条件为 37℃反应 30、60、90 和 120 min，每组 3 个重复，选取 P/N 值最大的孵育时间。

4.2.1.5 最佳酶标二抗稀释度的确定

以 1: 300、1: 400、1: 500 和 1: 600 稀释酶标二抗，100 μL/孔，37℃孵育 1 h，每组设立 3 个重复，选取 P/N 值最大的条件作为最优条件。

4.2.1.5 最佳底物反应条件的确定

TMB 底物显色液避光条件下分别以室温作用 10、15 和 20 min，37℃作用 10、15 和 20 min，每组设立 3 个重复，以 P/N 值最大为判定标准。

4.2.2 临界值的确定

按上述初步建立好的 ELISA 检测方法，对本实验室保存的 23 份 SPF 鸭阴性血清进行检测，每个样品重复 3 次，测定 OD₄₅₀ 值，计算 23 份阴性血清的 OD₄₅₀ 值平均数 ($\bar{X}$) 和标准差 (SD)，当 OD₄₅₀ 值 > $\bar{X}+3SD$ ，判定为阳性，OD₄₅₀ 值 ≤ $\bar{X}+3SD$ ，判断为阴性。

4.2.3 间接 ELISA 方法的敏感性实验

将 DRV 鸭阳性血清按 1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、1: 1600、1: 3200、1: 6400、1: 12800 进行稀释，以检测上述建立的 ELISA 方法的敏感性。

4.2.4 间接 ELISA 方法的特异性实验

对 Ra、DAdV-3、DAdV-4 和 MDRV 4 份鸭阳性血清进行检测，每份血清设立 3 个重复，以检验该检测方法的特异性。

4.2.5 间接 ELISA 方法的重复性实验

根据建立的间接 ELISA 抗体检测方法，用相同一批和不同批次纯化的重组 p18 蛋白进行包被，对 7 份阳性血清和 1 份阴性血清进行检测，每份血清重复 5 次，进行批内和批间的重复性实验。

4.2.6 间接 ELISA 方法的临床应用

利用上述建立好的 ELISA 检测方法对实验室保存的 48 份鸭血清进行检测，每组重复 3 次。同时利用本实验建立的 DRV 通过 ELISA 检测的结果进行符合率计算。

4.3 结果

4.3.1 间接 ELISA 方法的建立

4.3.1.1 最佳包被浓度和血清稀释度的确定

根据酶标仪测定的 OD₄₅₀ 值计算 P/N 值，当重组 p18 蛋白最佳的包被浓度为 16 μg/mL，待检血清稀释度为 1: 100 时，P/N 值最大且 P 值大于 1，为 4.37。

表 4-1 最佳抗原包被浓度及血清稀释度的确定

Tab. 4-1 Determination of optimal antigen coating concentration and serum dilution							
血清稀释度	OD ₄₅₀ 值	抗原浓度 (μg/mL)					
		0.5	1	2	4	8	16
1: 100	P	0.174	0.314	0.377	0.441	1.02	1.281
	N	0.092	0.114	0.127	0.140	0.246	0.293
	P/N	1.89	2.75	2.97	3.15	4.15	4.37
1: 200	P	0.130	0.194	0.237	0.281	0.596	0.827
	N	0.078	0.083	0.087	0.092	0.162	0.180
	P/N	1.67	2.34	2.71	3.05	3.68	4.59
1:400	P	0.102	0.121	0.145	0.169	0.338	0.496
	N	0.074	0.077	0.080	0.084	0.118	0.133
	P/N	1.38	1.57	1.80	2.01	2.86	3.73
1:800	P	0.09	0.092	0.105	0.119	0.219	0.276
	N	0.076	0.078	0.080	0.082	0.099	0.100
	P/N	1.18	1.18	1.31	1.44	2.21	2.76

4.3.1.2 蛋白最佳包被条件的确定

结果显示，蛋白 4℃包被过夜时，P/N 值最大，为 6.0，如表 3-2 所示。

表 4-2 最佳包被条件的确定

Tab. 4-2 Determination of optimal coating condition

OD ₄₅₀ 值	包被条件				
	4℃过夜	室温 1 h 后	室温 2h 后 4℃	37℃1 h 后	37℃2 h 后
		4℃过夜	过夜	4℃过夜	4℃过夜
P/N	6.0	4.64	4.92	4.83	4.89

4.3.1.3 最佳封闭条件的确定

结果显示，在 37℃封闭条件下，将含有 5%脱脂乳的 PBST 作为封闭液时，P/N 值最大，为 5.73（见表 4-3）；将含有 5%脱脂乳的 PBST 作为封闭液，封闭时间为 120 min，P/N 值最大，为 4.72（见表 4-4）。

表 4-3 最佳封闭液的确定

Tab. 4-3 Determination of optimal blocking solution

OD ₄₅₀ 值	封闭液					
	5%脱脂乳	10%脱脂乳	5%明胶	10%明胶	5%BSA	10%BSA
P/N	5.73	4.54	3.84	4.04	5.14	5.61

表 4-4 最佳封闭时间的确定

Tab. 4-4 Determination of optimal blocking time

OD ₄₅₀ 值	封闭时间		
	37℃ 60 min	37℃ 90 min	37℃ 120 min
P/N	4.42	4.50	4.72

4.3.1.4 待检血清最佳孵育时间的确定

结果显示，待检血清孵育时间为 60 min 时，P/N 值最大，为 4.68(见表 4-5)。

表 4-5 待检血清最佳孵育时间的确定

Tab. 4-5 Determination of optimal sample incubating time

OD ₄₅₀ 值	孵育时间			
	37℃ 30 min	37℃ 60 min	37℃ 90 min	37℃ 120 min
P/N	4.46	4.68	4.61	4.60

4.3.1.5 酶标二抗最佳稀释度的确定

结果显示，当酶标二抗的稀释度为 1: 400 的时候，P/N 值达到最大，为 4.67（见表 4-6）。

表 4-6 酶标二抗最佳稀释度的确定

Tab. 4-6 Determination of optimal emzy-labeled secondary antibody dilution

OD ₄₅₀ 值	稀释度			
	1: 300	1: 400	1: 500	1: 600
P/N	4.59	4.67	4.46	4.34

4.3.1.6 最佳底物反应条件的确定

结果显示，当 TMB 底物显色液在 37℃条件下孵育 20 min 时，P/N 值达到最大，为 5.14（见表 4-7）。

表 4-7 最佳底物反应条件的确定

Tab. 4-7 Determination of optimal substrate teaction conditins

显色温度	显色时间		
	10 min	15 min	20 min
室温	4.14	4.42	4.69
37℃	4.81	5.06	5.14

4.3.1.7 间接 ELISA 检测方法的确定

根据上述试验的筛选，确定了 DRV p18 抗体间接 ELISA 检测的基本方法：用碳酸盐缓冲作为包被液，对重组 p18 蛋白稀释，包被浓度确定为 16 μg/mL，100 μL/孔，4℃包被过夜，随后使用 PBST 洗板 3 次；用含有 5%脱脂乳的 PBST 溶液作为封闭液，200 μL/孔封闭 120 min，洗板 3 次；将待检血清 1: 100 稀释，100μL/孔，37℃孵育 60 min，洗板 5 次；1: 400 稀释酶标二抗，100μL/孔，37℃孵育 60 min，之后洗板 5 次；TMB 底物显色液 100 μL/孔，避光 37℃条件下作用 20 min，2M H₂SO₄ 50 μL/孔，终止显色，酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

4.3.2 临界值的确定

根据 3.3.4.7 建立好的 DRV p18 抗体间接 ELISA 检测方法测定 23 份 SPF 鸭血清的 OD₄₅₀ 值（见表 4-8），计算出 23 份 SPF 鸭血清的平均值（ $\bar{X}$ ）为 0.2925，SD 为 0.0440，根据公式计算出 $\bar{X}+3SD=0.2925+3\times0.0440=0.4245$ ，因此，当样品的 OD₄₅₀ 值 ≥0.4245 时，判断为阳性，反之则判定为阴性。

表 4-8 临界值的确定

Tab. 4-8 Determination of cut-off value

SPF 阴性血清 OD ₄₅₀ 值				平均数 ($\bar{X}$)	标准差 (SD)
0.292	0.221	0.278	0.274		
0.299	0.212	0.309	0.276		
0.219	0.257	0.298	0.371	0.2925	0.044
0.317	0.358	0.326	0.275		
0.246	0.267	0.306	0.280		
0.349	0.354	0.343			

4.3.3 间接 ELISA 方法的敏感性实验结果

将已知的 DRV 鸭阳性血清按不同倍数进行稀释，通过初步建立的 DRV p18 间接 ELISA 检测方法进行检测，以确定其敏感性。结果显示当鸭血清稀释至 1: 800 时,OD₄₅₀ 为 0.427, 大于 0.4245, 判定为阳性；稀释至 1: 1600 时, OD₄₅₀ 为 0.266, 小于 0.4245, 判断为阴性，即该检测方法的见最高稀释倍数为 1: 800（见表 4-9）。

表 4-9 敏感性实验结果

Tab. 4-9 Results of the sensitivity assay

血清稀释倍数	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 12800
OD ₄₅₀	1.564	1.105	0.713	0.427	0.266	0.188	0.156	0.171
结果判断	+	+	+	+	-	-	-	-

4.3.4 间接 ELISA 方法的特异性实验结果

利用本研究建立的 DRV p18 抗体间接 ELISA 检测方法对 DAdV-3、DAdV-4、MDRV 和 RA 鸭阳性血清进行特异性试验，结果表明，上述四份血清的 OD₄₅₀ 值均小于 0.4245，结果判断为阴性，DRV 阳性血清作为阳性对照，检测结果判断为阳性，阴性血清作为阴性对照，检测结果判断为阴性，从而表示已重组 p18 蛋白作为包被抗原建立的间接 ELISA 方法具有良好的特异性（见图 4-1）。

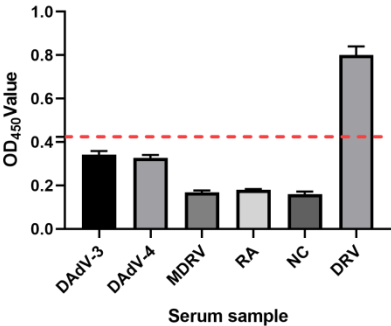


图 4-1 特异性试验结果

Fig. 4-1 Result of ELISA specificity assay

4.3.5 间接 ELISA 方法的重复性实验结果

将同一批次和不同批次纯化的重组 p18 蛋白按 16 μg/mL 的浓度进行包被，对 7 份阳性血清和 1 份阴性血清进行检测，以确定本研究建立的 ELISA 检测方法的重复性，每组重复 5 次。结果表明：批内重复实验的变异系数为 3.363%（如表 4-10 所示），批间重复实验的变异系数为 7.030%（如表 4-11 所示），重复性良好。综上结果表明，本研究建立的 DRV p18 蛋白 ELISA 检测抗体的方法具有良好的重复性。

表 4-10 批内重复实验

Tab. 4-10 Results of intra-assay repetitive experiment									
血清样品编号	重复次数					平均数	标准差	变异系数	平均变异
	1	2	3	4	5	AV	SD	CV (%)	系数 (%)
1	1.430	1.432	1.387	1.357	1.457	1.520	0.0373	2.455	
2	1.517	1.576	1.545	1.586	1.505	1.585	0.0405	2.559	
3	1.786	1.739	1.700	1.609	1.705	1.550	0.0910	3.685	
4	0.542	0.532	0.532	0.532	0.523	0.625	0.0903	1.130	3.363
5	1.182	1.189	1.186	1.246	1.249	1.226	0.0527	2.511	
6	0.707	0.739	0.714	0.755	0.829	0.764	0.0304	5.829	
7	0.811	0.805	0.773	0.806	0.853	0.905	0.124	3.154	
8	0.218	0.236	0.224	0.235	0.268	0.242	0.0215	7.315	

表 4-11 批间重复实验

Tab. 4-11 Results of inter-assay repetitive experiment							
血清样本编号	不同批次			平均数	标准差	变异系数	平均变异
	1	2	3	AV	SD	CV (%)	系数 (%)
1	1.477	1.515	1.568	1.520	0.0373	2.455	
2	1.551	1.562	1.642	1.585	0.0405	2.559	
3	1.561	1.655	1.433	1.550	0.0910	5.871	
4	0.540	0.585	0.750	0.625	0.0903	14.444	7.030
5	1.157	1.235	1.285	1.226	0.0527	4.297	
6	0.756	0.805	0.732	0.764	0.0304	3.974	
7	0.818	0.816	1.081	0.905	0.124	13.752	
8	0.218	0.237	0.270	0.242	0.0215	8.890	

4.3.6 间接 ELISA 方法对临床样品的检测

利用建立的 p18 抗体间接 ELISA 检测方法对 48 份血清的检测结果是 23 份阳性，25 份阴性。而与 σC 抗体阻断 ELISA 的检测结果是 25 份阳性，23 份阴性，其中阳性符合率为 92%，阴性符合率为 100%，总符合率是 96%(如表 4-12 所示)。

表 4-12 临床样品的检测

Tab. 4-12 Detection of clinical samples

		σC 抗体阻断 ELISA 检测方法		
		P	N	Total
p18 抗体间接	P	23	0	23
ELISA 检测	N	2	23	25
方法	Total	25	23	48
符合率		92%	100%	96%

4.4 讨论

禽呼肠孤病毒属于呼肠孤病毒科（Reoviridae）正呼肠孤病毒属（Orthoreovirus）的家族成员之一，禽呼肠孤病毒主要包括 MDRV、ARV 和 DRV，近年来也有研究报道了从鹅中分离到了呼肠孤病毒(陈红梅 et al., 2015; 吴巧梅 et al., 2017a)。ARVs 都有一个基因节段是存在多顺反子，其中，经典的 MDRV 是最早发现并分离的禽呼肠孤病毒，其多顺反子基因位于 S4 节段，含有两个 ORF，分别编码 p10 和 σC 两个蛋白；而 ARV 和 DRV 的多顺反子基因位于 S1 节段，共编码三个蛋白：p10、p17/p18 和 σC，ARV 编码 p17 蛋白，DRV 编码 p18 蛋白。

目前，因 DRV 引起的疫情给水禽养殖业带来了巨大的经济损失，临床上 DRV 感染雏鸭的早期特异性症状不明显，目前国内外尚无商品化的 DRV 抗原或抗体检测试剂盒，因此，建立快速、特异的检测方法为尽早确诊、及时防控该病具有重要意义。DRV 的 p18 蛋白是 ARVs 中 DRV 特有的非结构蛋白，也是病毒感染早期就表达的蛋白，因此本研究选取 p18 作为包被抗原，以此展开建立 ELISA 方法的建立。通过对 ELISA 包被浓度、包被时间、封闭条件、血清稀释度、二抗稀释度以及 TMB 底物显色条件的确定，初步建立了 DRV p18 蛋白间接 ELISA 检测抗体的方法，通过对本实验室保存的临床血清检测，利用实验室建立的 DRV σC 蛋白的抗体阻断 ELISA 检测方法与本实验建立的针对 p18 蛋白抗体间接 ELISA 进行符合性实验,结果表明该方法具有良好的特异性和符合率，其中符合率为 96%，从而说明本实验利用重组 p18 蛋白建立的间接 ELISA 方法检测 p18 蛋白抗体，具有较好的临应用价值，可以作为临床早期诊断。这但 p18 间接 ELISA 检测方法检测血清样本的阳性率较 σC 阻断 ELISA 的阳性率偏低，其可能原因是 p18 蛋白为病毒的早期合成的蛋白，并且是非结构蛋白，而 σC 蛋白是病毒的结构蛋白，并且是病毒的主要衣壳蛋白，能够引起机体产生较强的免疫应答反应。

第五章 全文结论

(1) 成功分离出一株鸭呼肠孤病毒，命名为 DRV-GL18 株，为后续 DRV 致病机制研究和疫苗研发提供生物材料支持。

(2) 筛选到 4 株对 IFA 和 Western blot 反应性、特异性较好的抗 DRV p18 杂交瘤细胞株，命名为 1E3、2C4、4A2 和 4D4，为 DRV p18 蛋白功能研究提供有用的工具。

(3) 成功构建原核表达质粒 pCold-I-DRV-p18，表达并纯化 p18 蛋白，初步建立了 DRV p18 蛋白间接 ELISA 检测抗体的方法。

参考文献

- 包汉勋. 免疫组化检测番鸭呼肠孤病毒在番鸭体内的分布. 硕士. [D]福建农林大学, 2008.
- 蔡跃佳, 梁国智, 梅敏敏, 黄雯晶, 李晓文, 李文锋, 黄淑坚, 李智丽, 2019. 新型鸭呼肠孤病毒可视化检测方法的建立与应用. 黑龙江畜牧兽医 (07): 71-74+168-169. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2018.01.0195.
- 陈观平, 汪一帆, 应栩华, 2021. 重组抗 her2 人源化单克隆抗体大规模制备及活性鉴定方法学建立. 中国药理学通报, 37(06): 884-888.
- 陈海鹏, 新型番鸭呼肠孤病毒 σ C 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用. [D]. 山东农业大学, 2014.
- 陈红梅, 万春和, 程龙飞, 傅光华, 施少华, 傅秋玲, 张丹青, 黄瑜, 2015. 一株雏鹅呼肠孤病毒的分离与鉴定. 中国动物传染病学报, 23(01): 47-50.
- 陈立宽, 辛朝安, 黄伟明, 王恒栋, 卓金换, 庄琰, 朱广勤, 李建全, 1991. 鸡病毒性关节炎病毒的分离与鉴定. 病毒学报(04): 346-350+388.
- 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 江斌, 王劭, 程晓霞, 朱小丽, 张世忠, 李兆龙, 程由铨, 2009. 一种新的鸭病(暂名鸭出血性坏死性肝炎)病原学研究初报. 中国农学通报, 25(16): 28-31.
- 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 王劭, 江斌, 程晓霞, 朱小丽, 李兆龙, 2012. 新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定. 病毒学报, 28(03): 224-230. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002270.
- 陈仕龙, 陈少莺, 程晓霞, 林锋强, 江斌, 王劭, 朱小丽, 张世忠, 李兆龙, 2010. 新型鸭呼肠孤病毒分离株的致病性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(04): 14-18. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2010.04.029.
- 陈宗艳, 朱英奇, 李传峰, 李露, 付玉志, 王超, 刘光清. 2012. 新发鸭源呼肠孤病毒(TH11株)的分离与鉴定. In: 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会第三次学术研讨会, 中国广东广州, 449-453.
- 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 周毅, 刘菲, 宋涌, 郭宇飞, 韩晓英, 袁桂萍, 徐超, 廖永洪, 方鹏飞, 刘兆宇, 2003. 一种新发现的鸭病毒性肿头出血症的研究. 中国兽医科技(10): 16-22+11+78. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2003.10.003.
- 丁明洋, 毕庄莉, 朱英奇, 戚伟强, 朱杰, 宋凯杰, 陈宗艳, 李传峰, 吴润, 刘光清, 2015. 新型鸭呼肠孤病毒 TH11 株在 BHK-21 细胞系中的增殖特性. 中国兽医科学, 45(09): 918-922. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2015.09.007.
- 丁明洋, 戚伟强, 陈宗艳, 朱杰, 吴巧梅, 缪秋红, 李传峰, 吴润, 刘光清, 2016. 一种新型鸭呼肠孤病毒 SYBR Green II 荧光定量 pcr 方法的建立. 中国动物传染病学报, 24(01): 7-14.
- 高斌. 新型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定及致病性研究. [D] 山东农业大学, 2019.
- 高春亮, 蔡羲, 朱小丽, 陈少莺, 2012. 间接免疫荧光方法快速检测番鸭呼肠孤病毒病. 畜牧兽医杂志, 31(04): 8-9+13.
- 高绪慧, 吴海洋, 孙吉谦, 魏笑笑, 李志中, 孙伟, 王晓茹, 徐腾飞, 刁秀国, 马芹, 武梅, 韩姗姗, 张民霞, 党喜唯, 段欣强, 张秀美, 秦立廷, 2018. 山东地区新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴

- 定. 中国家禽, 40(20): 61-63. DOI: 10.16372/j.issn.1004-6364.2018.20.013.
- 韩宏宇, 马秀丽, 黄兵, 李建亮, 张玉瑶, 于可响, 崔言顺. 2014. 新型鸭呼肠孤病毒 SYBR Green I 实时荧光定量检测方法的建立. In: 中国畜牧兽医学会 2014 年学术年会, 中国广东广州, 178.
- 胡奇林, 林锋强, 陈少莺, 朱小丽, 程晓霞, 陈仕龙, 林天龙, 江斌, 李怡英, 程由铨, 2004. 应用 RT-PCR 技术检测番鸭呼肠孤病毒. 中国兽医学报 (03): 231-232. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2004.03.008.
- 黄瑜, 程龙飞, 李文杨, 施少华, 2004. 雏半番鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定. 中国兽医学报 (01): 14-15. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545. 2004.01.007.
- 黄瑜, 傅光华, 施少华, 万春和, 程龙飞, 江斌, 陈红梅, 林芳, 林建生, 张大丙, 2009. 新致病型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定. 中国兽医杂志, 45(12): 29-31.
- 孔丰, 袁远华, 肖成谋, 黄淑坚, 2014. 新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测方法建立与初步应用. 广东畜牧兽医科技, 39(01): 24-27.
- 李雪松, 孙悦, 石晓娜, 宿鑫, 闫大为, 王思琪, 刘金华, 李泽君, 2021. 一株新型鸭呼肠孤病毒山东分离株的分离鉴定与遗传进化分析. 中国动物传染病学报, 29(05): 19-23. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2021.05.013.
- 林锋强, 陈仕龙, 胡奇林, 程晓霞, 王劲, 朱小丽, 欧阳岁东, 陈少莺, 2008. 番鸭呼肠孤病毒弱毒株在免疫番鸭体内的分布及排毒规律. 中国兽医学报 (11): 1259-1261. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2008.11.005.
- 刘红, 郁宏伟, 朱朝辉, 吴志新, 李苏芝, 廖明, 2008. 鸭源呼肠孤病毒 DRV-GZ 株 S2 基因的序列分析及其表达. 中国兽医科学 (03): 224-228. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2008.03.013.
- 刘红, 朱朝辉, 2008. 禽呼肠孤病毒检测方法的研究进展. 养禽与禽病防治 (05): 5-6.
- 刘文兴, 王劲, 吴宝成, 2004. 禽类呼肠孤病毒的分子生物学. 福建畜牧兽医 (S1): 10-12.
- 路晓, 杨晶晶, 丛雁方, 王林, 刘丽萍, 高月花, 亓丽红, 于可响. 鹅源番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定[J/OL]. 中国动物传染病学报: 1-6[2022-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20210430.301.012.html>
- 罗丹. 新型鸭呼肠孤病毒流行株生物学特性研究及 ELISA 抗体检测方法的建立. [D]. 中国农业科学院, 2021.
- 罗思思, 谢芝勋, 刘加波, 庞耀珊, 邓显文, 谢志勤, 谢丽基, 范晴, 彭宜, 2012. I 群禽腺病毒抗体间接 Hexon-ELISA 检测方法的建立. 中国兽医科学, 42(07): 701-707. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2012.07.010.
- 宁康, 张大丙. 2015. 鸭呼肠孤病毒的分子流行病学研究. In: 第三届水禽疫病防控研讨会, 中国四川成都, 91.
- 卿柯香, 袁远华, 周飞, 郭霄峰, 黄淑坚, 2014. NDRV 和 MDRV 双重 RT-PCR 检测方法的建立. 中国兽医杂志, 50(04): 12-15.
- 沈丽雅, 潘群兴, 卢凤英, 董永毅, 张敬峰, 吴坤, 刘青涛, 姜平, 张小飞, 2021. 基于 p18 蛋白基因的新型鸭呼肠孤病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 江苏农业学报, 37(06): 1481-1487.

- 孙陈莉, 杨瑞, 王义敏, 赵娜, 张小荣, 彭大新, 吴艳涛, 2014. 检测鸭呼肠孤病毒抗体间接 ELISA 方法的建立. 中国兽医学报, 34(01):26-29+38. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2014.01.005.
- 王晨, 2013. 鹅呼肠孤病毒分离鉴定和 σ C 基因克隆、原核表达及抗血清的制备. 硕士. 扬州大学,
- 王锦祥, 程晓霞, 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 王劭, 2015. 新型鸭呼肠孤病毒 σ C 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 37(09):687-690.
- 王锦祥, 程晓霞, 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 王劭, 朱小丽, 肖世峰, 2016. 新型鸭呼肠孤病毒 σ B 和 σ C 蛋白间接 ELISA 方法的建立. 福建农业学报, 31(09): 903-907. DOI: 10.19303/j.issn.1008-0384.2016.09.001.
- 王劭, 陈少莺, 陈仕龙, 程晓霞, 林锋强, 朱小丽, 江斌, 李兆龙, 2011. 新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 方法的建立与应用. 农业生物技术学报, 19(02): 388-392.
- 王劭, 邓国华, 吴异健, 吴宝成, 陈化兰. 中国禽(番鸭)呼肠孤病毒分离株 S1 基因全序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2005(02): 27-33.
- 王锡堃, 唐秀英, 刘庆祥, 鞠复帮, 王立楠, 1985. 应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎. 家畜传染病(03): 26-27+20.
- 王永娟, 崔平福, 朱善元, 夏文龙, 孟婷, 2017. 番鸭呼肠孤病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立. 江苏农业学报, 33(06): 1321-1326.
- 王永娟, 左伟勇, 朱善元, 王安平, 吴双, 洪伟鸣, 陆辉, 2016. 鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 检测方法的建立. 江苏农业学报, 32(05): 1107-1110.
- 吴宝成, 番鸭呼肠孤病毒的分离和鉴定.
- 吴巧梅, 2017. 水禽呼肠孤病毒 p18 蛋白鉴定及其反向遗传操作平台的建立. 硕士. 中国农业科学院,
- 吴巧梅, 李传峰, 丁明洋, 朱杰, 谭永贵, 李琦, 刘光清, 陈宗艳, 2017a. 鹅呼肠孤病毒 GRV-LA16 株的分离鉴定. 中国动物传染病学报, 25(03): 1-6.
- 吴巧梅, 刘光清, 陈宗艳, 2017b. 禽源呼肠孤病毒 S1 基因节段分子生物学研究进展. 中国动物传染病学报, 25(04): 74-81.
- 武华, 林伟东, 孟利佳, 阴雅洁, 乔思娜, 倪维玲, 侯绍华, 徐倩倩, 董世山, 基于重构 NDRV σ C 蛋白的间接 elisa 抗体检测方法的建立. 中国兽医学报: 1-7.
- 徐梦蔚, 宋武琦, 付治美, 张凤民, 2022. 实验室水平单克隆抗体制备方法及其相应纯化策略的研究进展. 中国生物制品学杂志, 35(02): 228-232+238. DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003536.
- 于可响, 韩宏宇, 庞运倩, 张玉瑶, 马秀丽, 黄兵. 2014. 新型鸭呼肠孤病毒一步反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法的建立. In: 中国畜牧兽医学会 2014 年学术年会, 中国广东广州, 179.
- 于新友, 李天芝, 魏凤, 王金良, 2016. 1 株新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定. 养禽与禽病防治(08):10-13.
- 袁远华, 王俊峰, 吴志新, 黄兴国, 贺东生, 黄淑坚, 2013a. 1 株番鸭源新型鸭呼肠孤病毒(QY 株)生物学鉴定. 中国兽医学报, 33(08): 1174-1178. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2013.08.004.
- 袁远华, 吴志新, 王俊峰, 黄兴国, 贺东生, 黄淑坚, 2013b. 新型鸭呼肠孤病毒 SYBR Green I 实时

- 荧光定量 *rt-pcr* 检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 35(09):738-741.
- 云涛, 华炯钢, 叶伟成, 倪征, 陈柳, 张存, 2020. 新型鸭呼肠孤病毒一步法 TaqMan-MGB 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 浙江农业学报, 32(04): 571-576.
- 张秉乾, 刁有祥, 于相龙, 张欣, 窦砚国, 2017. 一株鹅源呼肠孤病毒的分离鉴定及致病性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 45(08): 15-22. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.08.003.
- 张博, 陈立功, 武华, 阴雅洁, 孟利佳, 郭康康, 侯绍华, 董世山, 2020. 新型鸭呼肠孤病毒 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 河北农业大学学报, 43(05): 80-84. DOI: 10.13320/j.cnki.jauh.2020.0098.
- 张舍郁, 程安春, 汪铭书, 沈婵娟, 李传峰, 2008. 间接免疫荧光检测石蜡切片中鸭肿头出血症病毒及抗原定位方法的初步建立. 中国农业科学(03): 868-874.
- 赵赫, 李爽, 谷长勤, 张万坡, 程国富, 刘晓丽, 胡薛英, 2015. 鸭呼肠孤病毒自然感染肉鸭的病毒分布与病理学观察. 畜牧兽医学报, 46(01): 119-123.
- 周丽, 宋永峰, 周全, 黎敏, 高恒, 管凤霞, 温纳相, 2009. 番鸭呼肠孤病毒 YF 株的分离鉴定及细胞培养特性研究. 山东畜牧兽医, 30(10):10-11.
- 朱旭. 新型鸭呼肠孤病毒基因组序列解析及其对雏鸭致病性差异的病理学研究. [D]. 华中农业大学, 2018.
- 朱英奇. 新型鸭呼肠孤病毒的鉴定及其全基因组序列解析. [D]. 安徽农业大学, 2013.
- ARICESCU A R, OWENS R J, 2013. Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: Towards an integrative approach to structural biology. *Curr Opin Struct Biol*, 23(3):345-356. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.04.003.
- BENAVENTE J, MARTÍNEZ-COSTAS J, 2007. Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res*, 123(2):105-119. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.09.005.
- CHEN Z, ZHU Y, LI C, LIU G, 2012. Outbreak-associated novel duck reovirus, china, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18(7):1209-1211. DOI: 10.3201/eid1807.120190.
- CHIU H C, HUANG W R, LIAO T L, WU H Y, MUNIR M, SHIH W L, LIU H J, 2016. Suppression of vimentin phosphorylation by the avian reovirus p17 through inhibition of cdk1 and plk1 impacting the G2/M phase of the cell cycle. *PLoS One*, 11(9):e0162356. DOI: 10.1371/journal.pone.0162356.
- DU X, DING M, WU Q, LI C H, GUO H, LIU G, CHEN Z, 2020. Characterization of a p18 protein in the s1 segment of the novel duck reovirus genome. *Acta Virol*, 64(1):59-66. DOI: 10.4149/av_2020_108.
- GRANDE A, COSTAS C, BENAVENTE J, 2002. Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *J Gen Virol*, 83(Pt 1):131-139. DOI: 10.1099/0022-1317-83-1-131.
- HUANG W R, LI J Y, WU Y Y, LIAO T L, NIELSEN B L, LIU H J, 2022. P17-modulated hsp90/cdc37 complex governs oncolytic avian reovirus replication by chaperoning p17, which promotes viral protein synthesis and accumulation of viral proteins sigmaC and sigmaA in viral factories. *J Virol*,

- 96(6):e0007422. DOI: 10.1128/jvi.00074-22.
- JONES R C, 2000. Avian reovirus infections. *Rev Sci Tech*, 19(2):614-625. DOI: 10.20506/rst.19.2.1237.
- JUNG K M, BAE E H, JUNG Y T, KIM J W, 2014. Use of igy antibody to recombinant avian reovirus σ c protein in the virus diagnostics. *Acta Virol*, 58(2):108-113. DOI: 10.4149/av_2014_02_108.
- Li C, Wei H, Yu L, et al. Nuclear localization of the p17 protein of avian reovirus is correlated with autophagy induction and an increase in viral replication. *Arch Virol*. 2015 Dec; 160(12): 3001-10.
- LI Z, CAI Y, LIANG G, EL-ASHRAM S, MEI M, HUANG W, LI X, LI W, HE C, HUANG S, 2018. Detection of novel duck reovirus (ndrv) using visual reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp). *Sci Rep*, 8(1):14039. DOI: 10.1038/s41598-018-32473-4.
- LIU Q, ZHANG G, HUANG Y, REN G, CHEN L, GAO J, ZHANG D, HAN B, SU W, ZHAO J, HU X, SU J, 2011. Isolation and characterization of a reovirus causing spleen necrosis in pekin ducklings. *Vet Microbiol*, 148(2-4):200-206. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.09.016.
- MOR S K, SHARAFELDIN T A, PORTER R E, ZIEGLER A, PATNAYAK D P, GOYAL S M, 2013. Isolation and characterization of a turkey arthritis reovirus. *Avian Dis*, 57(1):97-103. DOI: 10.1637/10353-090712-Reg.1.
- MOR S K, VERMA H, SHARAFELDIN T A, PORTER R E, ZIEGLER A F, NOLL S L, GOYAL S M, 2015. Survival of turkey arthritis reovirus in poultry litter and drinking water. *Poult Sci*, 94(4):639-642. DOI: 10.3382/ps/pev025.
- OLSON N O, SHELTON D C, MUNRO D A, 1957. Infectious synovitis control by medication; effect of strain differences and pleuropneumonia-like organisms. *Am J Vet Res*, 18(69):735-739.
- SHARAFELDIN T A, MOR S K, BEKELE A Z, VERMA H, GOYAL S M, PORTER R E, 2014. The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthritis. *Avian Pathol*, 43(4):371-378. DOI: 10.1080/03079457.2014.940496.
- WALKER E R, FRIEDMAN M H, OLSON N O, 1972. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res*, 41(1):67-79. DOI: 10.1016/s0022-5320(72)90039-1.
- WANG H, GAO B, CHEN H, DIAO Y, TANG Y, 2019. Isolation and characterization of a variant duck orthoreovirus causing spleen necrosis in peking ducks, china. *Transbound Emerg Dis*, 66(5):2033-2044. DOI: 10.1111/tbed.13252.
- WANG H, GAO B, LIU X, ZHANG S, DIAO Y, TANG Y, 2020a. Pathogenicity of a variant duck orthoreovirus strain in cherry valley ducklings. *Vet Microbiol*, 242: 108546. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.108546.
- WANG W, LIANG J, SHI M, CHEN G, HUANG Y, ZHANG Y, ZHAO Z, WANG M, LI M, MO M, WEI T, HUANG T, HE X, WEI P, 2020b. The diagnosis and successful replication of a clinical case of duck spleen necrosis disease: An experimental co-infection of an emerging unique reovirus and salmonella indiana reveals the roles of each of the pathogens. *Vet Microbiol*, 246:108723. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108723.

ZHENG X, WANG D, NING K, LIANG T, WANG M, JIANG M, ZHANG D, 2016. A duck reovirus variant with a unique deletion in the sigma c gene exhibiting high pathogenicity in pekin ducklings. *Virus Res*, 215:37-41. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.01.020.