



安徽农业大学
Anhui Agricultural University

专业硕士学位论文

QX 型鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定及其 N 蛋白单克隆抗体研制

Isolation and identification of QX type avian infectious
bronchitis virus and development of its N protein monoclonal
antibody

姓 名	魏邓乐
导 师	王桂军教授
校外导师	梅梅副研究员
	江苏省农业科学院
学位类别	兽医硕士
领域名称	兽医
研究方向	动物传染病防控
学 院	动物科技学院

二零二四年六月

中图分类号: S855

单位代码: 10364

UDC: 636

密 级: 公开

安徽农业大学

专业硕士学位论文

QX 型鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定及其 N 蛋白单克隆抗体研制

**Isolation and identification of QX type avian infectious
bronchitis virus and development of its N protein monoclonal
antibody**

姓 名: 魏邓乐 学 号: 22721244

导 师: 王桂军教授 校 外 导 师: 梅梅副研究员

专业学位类别: 兽医专硕 江苏省农业科学院

领 域 名 称: 兽医 研 究 方 向: 动物传染病防控

学 院: 动物科技学院 答辩委员会主席:

论文评阅人: _____

二零二四年六月

摘 要

鸡传染性支气管炎（IB）是由鸡传染性支气管炎病毒（Infectious bronchitis virus, IBV）引起的一种呼吸道疾病，该病可感染不同日龄的鸡且具有高度传染性。本研究分离出一株 QX 型的 IBV，在对其进行了分子特性分析及致病性分析的基础上，进而建立了 ELISA 检测方法，制备了该株病毒 N 蛋白的单克隆抗体。

研究一（QX 型 IBV 流行株 CK/CH/WJ215 分子特性分析及致病性研究）：本研究将疑似感染 IBV 的病料通过鸡胚盲传增殖，RT-PCR 检测及序列测定，成功分离到 1 株 QX 型 IBV 毒株，命名为 CK/CH/WJ215。为掌握 QX 型 IBV 流行株 CK/CH/WJ215 的遗传进化情况，本研究设计 22 对引物对 CK/CH/WJ215 株进行全基因测序，结果显示 CK/CH/WJ215 株 IBV 基因组全长 27440bp；与 41 株参考毒株及疫苗株 S1 序列进行相似性比对发现，分离株与 GI-19（QX-like）型毒株的相似性在 84.6%~94.3% 之间，同属一群。同源重组分析发现 CK/CH/WJ215 分离株存在 3 个重组事件，表明 CK/CH/WJ215 株可能来源于 QX 型不同毒株的多次重组。为了评估 CK/CH/WJ215 株的致病性，对 7 日龄 SPF 雏鸡按照 10^6 EID₅₀/只的剂量接种 CK/CH/WJ215 株进行攻毒实验，结果显示雏鸡在攻毒后的第 2 天出现明显的临床症状，发病率为 100%，通过剖检病死鸡发现其肾脏有尿酸盐沉积且气管内部有大量粘液，均为 IBV 感染的典型症状。经 RT-PCR 检测病死鸡的肾脏器官 IBV 均为阳性，鸡群死亡率达 66.7%，表明 CK/CH/WJ215 株具有较强的致病力。

研究二（IBV 抗体 ELISA 检测方法的建立及抗 N 蛋白单克隆抗体的制备）：本研究通过分析不同基因型 IBV 毒株 N 基因序列后选取保守的序列，并将 N 蛋白序列克隆至原核表达载体 pET-32a（+）载体。然后利用原核表达系统对 N 蛋白进行表达并纯化后，建立 ELISA 方法。该方法可以与不同血清型 IBV 血清抗体反应，能够有效检测 IBV 感染及免疫鸡群抗体水平，特异性和敏感性强。同时，以杆状病毒表达系统表达并纯化了 N 蛋白作为免疫原，免疫六周龄的 Balb/c 小鼠，将免疫后小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，通过建立的 ELISA 方法筛选到能稳定分泌抗 CK/CH/WJ215 株 N 蛋白的单克隆抗体细胞株 6B3B2，亚类鉴定显示该单克隆抗体属于 IgG2b 重链、 κ 轻链型。该 IBV N 蛋白单克隆抗体的制备为建立广谱灵敏的 IBV 抗原检测方法奠定了基础。

综上，本研究完成了一株鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定并成功制备了该病毒 N 蛋白的单克隆抗体，为 IBV 的研究提供了生物材料。

关键词：鸡传染性支气管炎病毒；分离鉴定；原核表达；N 蛋白；单克隆抗体

ABSTRACT

Infectious bronchitis (IB) in chickens is a respiratory disease caused by the Infectious Bronchitis Virus (IBV), which can infect chickens of different ages and is highly contagious. This study isolated a QX type IBV strain, and based on molecular characterization and pathogenicity analysis, an ELISA detection method was established to prepare monoclonal antibodies against the N protein of the virus strain.

Study 1 (Molecular Characteristic Analysis and Pathogenicity Study of QX Type IBV Epidemic Strain CK/CH/WJ215): In this study, suspected IBV infected materials were blindly propagated through chicken embryos, and RT-PCR detection and sequencing were performed to successfully isolate a QX type IBV strain, named CK/CH/WJ215. To understand the genetic evolution of the QX type IBV epidemic strain CK/CH/WJ215, this study designed 22 pairs of primers to sequence the entire gene of CK/CH/WJ215 strain. The results showed that the total length of the IBV genome of CK/CH/WJ215 strain was 27440 bp; Comparing the S1 sequences of 41 reference and vaccine strains, it was found that the similarity between the isolated strains and the G I -19 (QX like) strain was between 84.6% and 94.3%, belonging to the same group. Homologous recombination analysis revealed three recombination events in the CK/CH/WJ215 isolate, indicating that the CK/CH/WJ215 strain may have originated from multiple recombinations of different QX strains. In order to evaluate the pathogenicity of CK/CH/WJ215 strain, seven day old SPF chickens were inoculated with CK/CH/WJ215 strain at the dose of 10^6 EID₅₀ per chicken for virus challenge test. The results showed that the chickens appeared obvious clinical symptoms on the second day after virus challenge, with a incidence rate of 100%. The dead chickens were found to have uric acid deposits in their kidneys and a large amount of mucus in their tracheas through autopsy, which were typical symptoms of IBV infection. The renal organs of dead chickens were tested positive for IBV by RT-PCR, and the mortality rate of the flock reached 66.7%, indicating that the CK/CH/WJ215 strain has strong pathogenicity.

Study 2 (Establishment of ELISA detection method for IBV antibodies and preparation of monoclonal antibodies against N protein): This study selected conserved sequences by analyzing the N gene sequences of different genotypes of IBV strains, and cloned the N protein sequence into the prokaryotic expression vector pET-32a (+) vector. Then, the N protein was expressed and purified using a prokaryotic expression system, and an ELISA

method was established. This method can react with serum antibodies of different serotypes of IBV, effectively detecting IBV infection and immune chicken antibody levels, with strong specificity and sensitivity. At the same time, N protein was expressed and purified as an immunogen using a rod-shaped virus expression system. Six week old Balb/c mice were immunized, and the spleen cells of the immunized mice were fused with myeloma cells. A monoclonal antibody cell line 6B3B2 was screened using an established ELISA method, which can stably secrete N protein against the CK/CH/WJ215 strain. Subclass identification showed that the monoclonal antibody belongs to the IgG2b heavy chain κ Light chain type. The preparation of monoclonal antibodies against IBV N protein lays the foundation for establishing a broad-spectrum and sensitive IBV antigen detection method.

In summary, this study has isolated and identified a strain of avian infectious bronchitis virus and successfully prepared a monoclonal antibody against its N protein, providing biomaterials for the study of IBV.

KEYWORDS: Infectious bronchitis virus; Separation and identification; Prokaryotic expression; N protein; monoclonal antibody

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景和意义.....	1
1.2 文献综述.....	1
1.2.1 IBV 感染临床症状及流行概况.....	1
1.2.2 IBV 病原学概述.....	2
1.2.3 IBV 结构蛋白及生物学功能.....	4
1.2.4 IBV 的诊断.....	5
1.2.5 IBV 单克隆抗体研究进展.....	6
第二章 材料与方法	7
2.1 试验材料.....	7
2.1.1 生物材料来源.....	7
2.1.2 试验仪器及设备.....	7
2.1.3 试验耗材及试剂.....	8
2.2 试验方法.....	9
2.2.1 CK/CH/WJ215 株的分离鉴定	9
2.2.2 N 蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化.....	17
2.2.3 ELISA 检测方法的建立	21
2.2.4 N 蛋白在昆虫细胞中的表达.....	23
2.2.5 N 蛋白单克隆抗体的制备.....	28
第三章 结果与分析	33
3.1 CK/CH/WJ215 株的分离鉴定.....	33
3.1.1 病原鉴定结果.....	33
3.1.2 CK/CH/WJ215 株全基因组结构.....	34
3.1.3 CK/CH/WJ215 株 S1 基因遗传进化分析.....	35
3.1.4 CK/CH/WJ215 株同源重组分析.....	36
3.1.5 致病性试验结果.....	37
3.2 N 蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化.....	38
3.2.1 p ET-32a(+)-N 的酶切鉴定结果.....	38
3.2.2 N 蛋白的可溶性分析.....	39
3.2.3 N 蛋白的纯化.....	40
3.2.4 N 蛋白的浓度测定.....	40
3.3 ELISA 检测方法的建立	41
3.3.1 最佳包被抗原浓度的确定.....	41
3.3.2 最佳封闭液的确定.....	41

3.3.3 最佳封闭时间的确定.....	41
3.3.4 最佳血清稀释度的确定.....	42
3.3.5 最佳一抗孵育时间的确定.....	42
3.3.6 最佳酶标二抗稀释度的确定.....	43
3.3.7 临界值的确定.....	43
3.4 N 蛋白在昆虫细胞中的表达.....	44
3.4.1 目的基因的扩增结果.....	44
3.4.2 重组转移质粒酶切鉴定结果.....	45
3.4.3 重组穿梭质粒的鉴定结果.....	45
3.4.4 重组杆状病毒的获得.....	46
3.4.5 PCR 鉴定重组杆状病毒	46
3.4.6 重组杆状病毒的滴度测定.....	47
3.4.7 间接免疫荧光法鉴定重组蛋白.....	47
3.4.8 Western blot 鉴定重组蛋白	47
3.5 N 蛋白单克隆抗体的制备.....	48
3.5.1 免疫 BALB/c 小鼠血清效价测定	48
3.5.2 细胞融合	49
3.5.3 杂交瘤细胞阳性孔筛选.....	49
3.5.4 杂交瘤细胞株的建立.....	51
3.5.5 单克隆抗体亚型鉴定.....	51
第四章 讨论.....	53
第五章 结论.....	55
参考文献.....	56
附录 A.....	64
附录 B.....	66
附录 C.....	67

插图清单

图 3-1	病原初步鉴定结果	33
图 3-2	CK/CH/WJ215 株接种鸡胚病变	33
图 3-3	最高代次尿囊液 N 基因特异性引物鉴定结果	34
图 3-4	分离株 S1 基因遗传进化树分析	35
图 3-5	分离株 CK/CH/WJ215 基因组 simplot (A) 与 Bootscan (B) 分析	36
图 3-6	分离株对 SPF 鸡致病性及 IBV 抗体产生水平	37
图 3-7	分离株感染鸡的器官病理变化	38
图 3-8	本试验分离株感染鸡肾脏组织病理学变化	38
图 3-9	pET-32a(+)-N 双酶切结果	39
图 3-10	N 蛋白 WB 验证	39
图 3-11	N 蛋白纯化 WB 结果	40
图 3-12	BSA 法测定 N 蛋白浓度的标准曲线	40
图 3-13	N 基因的 RT-PCR 结果	44
图 3-14	重组转移载体酶切结果	45
图 3-15	M13 引物扩增 pFastBac1-N 结果	45
图 3-16	SF9 扩增病毒病变图 (倍数: 200×)	46
图 3-17	特异性引物扩增 pFastBac1-N 结果	46
图 3-18	rBv-N 的间接免疫荧光结果 (倍数: 200×)	47
图 3-19	Western Blot 鉴定重组杆状病毒中 N 蛋白的表达	48
图 3-20	多抗血清效价图	48
图 3-21	单抗亚类鉴定结果	52

附表清单

表 2-1	试验所用主要仪器及设备	8
表 2-2	试验所用主要耗材及试剂	8
表 2-3	反转录反应体系	10
表 2-4	PCR 扩增体系	11
表 2-5	PCR 反应条件	11
表 2-6	WJ215 全基因组测序引物序列	12
表 2-7	TA 克隆连接反应体系	14
表 2-8	单酶切反应体系	16
表 2-9	原核表达特异性引物	17
表 2-10	原核表达连接反应体系	18
表 2-11	双酶切反应体系	24
表 2-12	BALB/c 小鼠免疫程序	29
表 3-1	IBV 分离株的全基因组结构	34
表 3-2	分离株 CK/CH/WJ215 基因组中检测重组事件信息	37
表 3-3	最佳包被抗原浓度的确定	41
表 3-4	最佳封闭液的确定	41
表 3-5	最佳封闭时间的确定	42
表 3-6	最佳血清稀释度的确定	42
表 3-7	最佳一抗孵育时间的确定	43
表 3-8	最佳酶标二抗稀释度的确定	43
表 3-9	临界值结果	44
表 3-11	板一 ELISA 检测结果	49
表 3-12	板二 ELISA 检测结果	50
表 3-13	板三 ELISA 检测结果	50
表 3-14	板四 ELISA 检测结果	50
表 3-15	板五 ELISA 检测结果	51
表 3-16	板六 ELISA 检测结果	51

第一章 绪论

1.1 研究背景和意义

鸡传染性支气管炎病毒（Infectious bronchitis virus, IBV）可引发鸡群产生严重的、具有传染性的呼吸道疾病^[1-2]，它给养殖行业造成巨大损失，包括鸡群死亡、养殖类肉鸡体重下降以及饲料的效率下降、蛋鸡的产蛋数量和质量下降等^[3-4]。该病毒主要影响鸡的泌尿道、消化道、生殖道等^[5]，雏鸡感染 IBV 会出现明显的呼吸道症状，还会引起继发性的细菌感染，甚至会导致死亡^[6]，有些毒株可以引起严重的肾脏病变^[7]，这类毒株往往毒力较强，发病率和死亡率都较高。IBV 能够在输卵管中复制，造成输卵管损伤，从而影响生殖系统导致生产力下降^[8]，养殖类产蛋鸡感染该病毒后不仅产蛋量会下降很多，产蛋品质也会下降，且感染 IBV 的鸡群产蛋率一般不能再恢复^[9]。IB 目前已经成为养殖业主要流行病之一，对 IBV 的研究以及找到防控手段具有重要的意义。

由于 IBV 独特的病毒结构使得该病毒易发生高度变异，因此 IBV 的防控一直比较困难。自世界范围内分离鉴定出多种基因型和血清型的 IBV 以来，QX 型毒株是 IBV 研究进展中的主要毒株^[10-11]，且通过接种市场上的疫苗无法对该血清型 IBV 带来完全的保护，甚至会存在一定的交叉保护作用，这给通过接种疫苗来控制 IB 带来了极大的挑战^[12-14]。因此 QX 型 IBV 的深入研究对养殖业意义重大。由于 N 蛋白的保守性^[15]，在研发对不同血清型 IBV 能够产生交叉保护性抗体的试验中，N 蛋白具有重要意义。同时 N 蛋白在机体对 IBV 的免疫识别中十分重要，作为免疫识别的靶位点，N 蛋白能够影响机体的细胞免疫和体液免疫水平。因此研制出 IBV N 蛋白的单克隆抗体对于 IBV 的实验室诊断以及流行情况研究有重要的意义。

1.2 文献综述

1.2.1 IBV 感染临床症状及流行概况

1.2.1.1 临床症状

IB 主要造成鸡的呼吸道感染。该病有很强的传染性且可感染不同日龄的鸡，然而，在野外普遍观察到 IBV 感染的三种临床表现，即呼吸道疾病、生殖障碍和肾炎^[1]，临床症状会根据雏鸡的年龄、病毒株的致病性和现有的免疫水平而有所不同。此外，一些强毒的 IBV 毒株可对肾脏造成很大的损害导致高死亡率^[12,16]。IB 可导致鸡的气管受损，感染 IBV 的鸡在气管组织受到损伤的基础上还容易引发继发性感染如细菌、

支原体或其他病原体，从而使得死亡率更高^[17]。雏鸡最容易感染 IBV 且感染较严重时可能直接导致死亡。IBV 在影响呼吸道的同时，还会损害消化系统和泌尿生殖系统，如前脑室、肾脏、卵巢和输卵管，导致呼吸道疾病、间质性肾炎和输卵管发育不良^[18-20]。打喷嚏、张口呼吸、气管啰音、甩头和饮水增多是雏鸡主要的临床症状，成年鸡患病初期与雏鸡有相似的症状，但呼吸症状有所减弱，主要症状为嗜睡、精神萎靡、拉稀粪。解剖病死鸡可见肾小管中有尿酸盐沉积，呈现“花斑肾”，这也是 IBV 感染的主要症状之一。除此之外还可观察到气管环有出血点且切开发现内侧有较多粘液。

1.2.1.2 流行概况

IBV 于 1930 年在美国首次被分离出来^[21]。从那时起，已经报道分离出了几种被确定为马萨诸塞州(Mass)型 IBV 的基因型^[22]。IBV 从 1991 年开始在中国广泛传播，自 1997 年以来，一种新的 IBV 突变体在中国流行，被确定为 QX 毒株^[23]。先前的一项研究表明，在过去的 20 年中，中国 QX 型 IBV 的分离率从 11.7%上升到 70%，而疫苗基因型 IBV 的流行率从 50.4%下降到 4.4%^[24]。不同 IBV 基因型之间缺乏交叉保护以及新 IBV 基因型的不断出现对 IB 的预防和控制构成了严重挑战^[25]。我国主要使用 Mass 和 Conn 血清型的减毒和灭活疫苗对 IBV 进行控制^[26-27]，这种方法只能一定程度的预防 IBV 的爆发但不能完全消除^[28]。陈良珂等在 2013~2017 年期间在 17 个省市疑似感染 IBV 的病料中检测出了 390 株 IBV 并对其 S1 基因进行遗传进化分析发现其中 QX 型占分离毒株的 55%（218 株）^[29]，苗中立于 2014~2016 年在山东地区收集疑似 IBV 感染的病料并对其进行 IBV 的分离鉴定结果发现 QX 型为最大的优势毒株，而 QX 型与当下普及常用的 H52（AF352315）和 H120（EU822341）两种弱毒疫苗的同源性仅为 77.41%~80.9%，这说明现在市场上使用的 Mass 型疫苗对 QX 型毒株的保护能力有限^[30]，李彬等在 2019~2021 年期间对我国 29 个省级行政区的病料进行 IBV 的分离鉴定，结果白羽鸡中 IBV 的阳性率最高为 28.9%。此次研究共分离鉴定到 5 种基因型，其中 QX 型占比最高为 66.5%^[31]。赵佳等在 2018-2021 年间从临床样品中共分离鉴定到 102 份 IBV 毒株，基于 S1 基因的遗传进化分析显示，有 69 株为 GI-19（QX）型，占毒株总数的 68.27%，依然是优势基因型^[32]。由此可知目前 QX 型毒株仍是 IBV 研究进展中的主要毒株，且目前疫苗对该血清型保护性差，若想获得突破性进展仍需努力。

1.2.2 IBV 病原学概述

1.2.2.1 IBV 的结构特征

IBV 目前被归入伽玛冠状病毒属冠状病毒科尼多病毒目^[33]。IBV 的形态大多数为椭圆形且对称。半径大约为 40~60nm^[34]。

IBV 表面具有较大的呈放射状的纤突，长度约为 20nm，参与病毒与宿主细胞的附着并诱导产生中和抗体。IBV 的结构组成主要有核衣壳和囊膜。核衣壳位于囊膜内部，是由病毒基因组与高度磷酸化的核衣壳 N 蛋白组成。囊膜结构为脂质双分子层，主要含有 S 蛋白和 M 蛋白，位于病毒外层^[35]。

1.2.2.2 IBV 的理化特性

IBV 对温度敏感；在热敏性方面可能存在一些菌株差异，但一般来说，大多数菌株在 56℃环境下 15 分钟至 45 分钟会完全失活^[36]。在室温下，病毒只能存活几天。在 4℃下储存会影响病毒的传染性，长期储存时，建议温度为-70℃。冷冻后的病毒可在 4℃下保存至少 21 个月^[37]。IBV 很容易被许多常见的消毒剂灭活，包括酒精、氯仿、1%苯酚、1%福尔马林和碘^[37]。病毒在低 pH 值下比在高 pH 值下更稳定。在 pH 值为 3.0 时，病毒可以稳定 14 天^[38]。有研究发现接种疫苗期间，IBV 的寿命还会受到水质和添加剂含量的影响^[39]。

1.2.2.3 IBV 的体外培养

IBV 的体外培养方式主要有活体鸡胚培养方法与气管环（TOC）培养方法^[40,41]。

活体鸡胚培养方法：可以将 IBV 病毒稀释到合适的浓度接种于 SPF 鸡胚中，通过收获其尿囊液完成 IBV 的增殖。期间也可观察胚体的变化，同时与未接种病毒的 SPF 鸡胚胚胎进行对照。与正常鸡胚相比，接种 IBV 的鸡胚胚体较小且身体呈蜷曲状。从自然界获得的野毒株可能由于病原体不纯需要在鸡胚尿囊腔中传代几次，当毒株适应后才会表现出上述特征^[41-42]。此方法可来鉴定 IBV，当病毒进行第六次传代时胚体还没有相关感染症状则可将该样品视为 IBV 阴性^[43]。

气管环培养方法：因为 IBV 感染主要表现为呼吸道症状，感染鸡的气管组织病变情况可作为 IBV 感染的鉴定依据^[44]。可根据气管环的纤毛摆动与停滞情况判断是否感染 IBV^[45]。对鸡胚的气管环接种病毒是病毒分离和血清分型最敏感的方法，特别的是该方法不需要病毒适应，短时间内就可在显微镜下观察纤毛运动的活跃情况并由此做出判断^[46]。此方法也存在一定问题，比如新城疫病毒也会导致纤毛停滞，使用此法鉴定 IBV 有出现假阳性的可能性^[47]。

1.2.2.4 IBV 基因组结构

IBV 基因组为单股正链 RNA，属于冠状 RNA 病毒^[48]。现有的资料显示冠状病毒的基因组是 RNA 病毒中最大的^[49]。IBV 的 RNA 分子在 5' 端有“帽子”结构，3' 端有聚腺苷酸化 Poly (A) 尾巴结构^[50]。基因组大小约 27.6 Kb，不同毒株的基因组大小各不相同^[51-52]。已知的基因组如下：5'UTR-1a-1b-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3'UTR^[53]。整个基因组至少包含 10 个开放阅读框（ORF），能够实现多蛋白的翻译与复制，其

编码区占据病毒基因组的 2/3。IBV 的两个非翻译区(UTR)能够与病毒复制酶和其他宿主蛋白相互作用，从而在病毒复制中发挥关键作用^[54]。编码四种结构蛋白（S、E、M 和 N）的基因约占基因组的 1/3，共同组装成 IBV 粒子^[55]。IBV 进入宿主细胞后会根据不连续转录机制转录出 6 条大小互不相同的亚基因组 mRNA(mRNA1~mRNA6)^[56]。这些 mRNA 都具有与正链 RNA 相同的结构，5' 端均有帽子结构，3' 端均为 Poly (A) 尾巴，并且都有一致的先导序列^[57]。

1.2.3 IBV 结构蛋白及生物学功能

IBV 由 S 蛋白、M 蛋白、N 蛋白和 E 蛋白构成。

1.2.3.1 S（纤突）蛋白

S 蛋白约有 1160 个氨基酸，是高度糖基化的跨膜蛋白，分子量大约为 150kDa~200 kDa^[54]。

有研究表明将缺乏 S1 蛋白的 IBV 作为免疫原进行动物试验，结果发现鸡的体内不会产生血凝抑制抗体和中和抗体^[58]。说明在 IBV 感染机体后其 S1 蛋白产生的抗体对 IBV 的复制有很大影响，并且能够使机体对 IBV 产生很强的免疫能力。但位于 S1 蛋白上的表位尚未明确，有研究表明 S1 蛋白上有 6 个抗原决定簇可能其中一个产生的抗体能够起到血凝抑制和抗体中和的作用^[59]。

S 蛋白主要由 S1 亚基和 S2 亚基构成，S1 亚基上有多个受体结合位点，所以 S1 蛋白能与宿主细胞进行结合，S2 蛋白则负责与膜进行融合^[60]。有研究显示将 M41 毒株的 S 蛋白基因替换 Beaudette 毒株的 S 蛋白基因，嵌合病毒同样具有与 M41 毒株相同的组织嗜性，失去了 Beaudette 毒株原本的嗜性^[61]。该研究说明了 IBV 的 S1 蛋白为主要变异区域，S1 蛋白决定了 IBV 的组织嗜性和毒力强弱。

IBV 的分型也主要是由 S1 蛋白所决定的。S1 基因的突变和重组等导致 IBV 具有不同的血清型，这说明 S1 蛋白是决定 IBV 血清型的主要结构蛋白。

1.2.3.2 M 蛋白

M 蛋白是一种跨膜蛋白，由 224~225 个氨基酸组成，分子量在 23 kDa~35 kDa。M 蛋白在同一种群属中相对保守，但是在不同种群属间差异很大。同时 M 基因也存在一定的替换、重组和缺失^[62]。在 IBV 的复制过程中，M 蛋白发挥了重要作用。虽然 M 蛋白的抗原性较弱且较为保守，但也有研究表明 M 蛋白上有抗原决定簇且能够刺激机体产生特异性抗体^[63]。

1.2.3.3 N 蛋白

N 蛋白是位于膜内部的结构蛋白，也是 IBV 核衣壳的重要组成部分约占病毒总蛋白的 40%。其由亚基因组 mRNA6 编码，N 蛋白磷酸化程度较高，分子量约为 51 kDa^[64]。N 基因在进化过程中相对保守，在其蛋白序列中有定位信号序列，可将蛋白定位到基因组 RNA 并与 RNA 组合形成核蛋白复合体^[65]，从而影响 IBV 的复制。N 蛋白具有良好的反应性，使用 IBV N 蛋白将小鼠致敏后若再将其感染 IBV 可发现小鼠的淋巴细胞能够对 IBV 的刺激产生反应。由于其存在能引起细胞毒性 T 淋巴细胞反应（CTL）的表位，因此 N 蛋白在诱导细胞毒性 T 淋巴细胞反应中能发挥一定作用^[66]。

1.2.3.4 E 蛋白

IBV 的 E 蛋白是在 1991 年被发现的^[67]，其在 IBV 病毒粒子中的含量较低。E 蛋白由 76~109 个氨基酸构成，分子量约 12.4 kDa。E 蛋白的跨膜结构使得其具有锚定作用，能够使其固定在 IBV 包膜上，C 端构成一个疏水性尾，能够与其它蛋白相互作用。E 蛋白与其他蛋白的相互作用共同影响病毒的增殖^[68]。另外有资料显示 E 蛋白在病毒囊膜的形成、组装和细胞凋亡上起到一定作用^[69]。

1.2.4 IBV 的诊断

IBV 易变异，在遗传进化中不断出现新的血清型，给 IBV 的防控带来挑战。随着科研水平的进步，各种检测方法层出不穷。常用的方法有病毒中和试验（VNT）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫荧光测定（IFA）、逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR）、荧光定量 PCR 等^[70]。

（1）病毒中和试验（VNT）

IBV 的血清型主要是通过 S1 蛋白的核苷酸序列确定的。一般通过气管环和细胞培养进行 IBV 抗体的中和试验，VNT 是检验 IBV 血清中特异性抗体的常用方法^[71]。可通过观察气管环纤毛摆动的程度来判断不同毒株和血清之间是否会产生反应，将病毒接种细胞并适应该细胞生长后，使用该细胞培养上清也可检测病毒的中和抗体。同时进行不同血清型 IBV 的分离鉴定，通过观察气管环的纤毛摆动程度来判断抗体中和结果更为准确、方便和直观^[72]。

（2）酶联免疫吸附试验（ELISA）

ELISA 检测技术在实验室诊断中较为常见，其不仅可以检测抗体，也可以检测抗原^[73-74]。该方法操作简单、灵敏度高且反应迅速。生物实验室常用该方法检测 IBV 阳性血清。1981 年，Mockett 等使用纯化后的 IBV 作为包被抗原建立了 ELISA 检测方法来进行 IBV 的检测，结果显示该方法灵敏度很高^[75]。大多数试验将 IBV 的 N 蛋

白通过原核或真核表达技术进行重组表达并用作包被原建立 ELISA 方法，从而研制 IBV 的 ELISA 诊断试剂盒^[76-77]。市面上有许多商用试剂盒可实现对 IB 的诊断。无论病毒的抗原类型或来源如何，它们都能检测血清^[78]。临床试验上，ELISA 方法也常被用来检测 SPF 鸡暴露在 IBV 中的抗体水平变化^[79-80]。

(3) 免疫荧光试验 (IFA)

Dewit 等采用 IFA 检测了 60 个呼吸道发生损伤的鸡群的气管，结果表明特异性 IFA 的敏感性大概是群特异性 IFA 的 70%^[81]。1990 年，Yagyu 等在 IFA 中应用了抗 IBV N 蛋白的单克隆抗体，结果显示多抗血清的效果较差而 IFA 能够使检测的特异性增强^[82]。刘思国等^[83]将感染了 IBV 的鸡的组织进行了 IFA 观察，结果证实该方法在检测抗原方面比较直观且准确。

(4) 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

研究中可以通过 RT-PCR 扩增到我们需要的目的基因，针对 IBV 的序列设计引物可以实现对不同血清型 IBV 的检测，此方法快速准确且直观^[84-85]。因为 IBV 的突变主要发生在 S1 基因上，S1 的序列从一定程度上决定了该株病毒的血清型^[86]。可以通过设计 S1 基因的引物进行 PCR 反应后实现对该基因的扩增，再通过克隆技术测定目的基因的序列，这样便可对病毒进行分型^[87]。针对 S1 基因设计特异引物用来检测 S1 的氨基酸序列即可迅速分析出毒株的血清型，对 IBV 的防治有一定作用^[88-89]。因为 N 片段较为保守，可根据 N 基因序列设计引物进行 RT-PCR，通过扩增结果判断病料中是否含有 IBV 核酸。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)是一种可靠且灵敏的检测方法，该检测方法适用于检测所有 IBV 毒株。然而，RT-PCR 操作复杂，需要一定程度的专业知识，诊断实验室可能无法做到这一点。

1.2.5 IBV 单克隆抗体研究进展

单克隆抗体技术于 20 世纪 70 年代由 Kohler 和 Milstein 建立起来^[90]，自单抗技术建立到如今，国内已有很多学者研制出了 IBV 的单抗。1987 年，Niesters 等研制出抗 M41 毒株 S 蛋白的单抗^[91]。1991 年，Ignjatovic 和 Mcwaters 也研制出了 10 株单克隆抗体，分别针对澳大利亚毒株的 3 种结构蛋白 S、M、N^[92]。

国内也有很多关于 IBV 单克隆抗体的相关报道，并将其应用在了 IBV 的免疫学诊断上^[93-95]。2009 年，邢俊吉等研制出针对 IBV M 蛋白的单克隆抗体^[96]；2011 年，李敏等研制出针对 IBV N 蛋白的单克隆抗体^[97]；2013 年王富妍等研制了针对 IBV M 蛋白的单克隆抗体^[98]。能特异结合 IBV 的单抗通过显色系统将结果客观展现，通过该方法研制出检测与诊断 IBV 的试剂盒提高了检测效率和准确率^[99]。且可以使用不同的单克隆抗体实现选择性检测某种血清型 IBV 或者不同种血清型的 IBV。单抗具有稳定性高、特异性强的特点，此技术已广泛应用于疾病的预防、检测和治疗。

第二章 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 生物材料来源

2.1.1.1 毒株来源

IBV 病料采集自 2021 年 5 月江苏某鸡场疑似感染 IBV 的白羽肉鸡肾脏。该鸡群 5 周龄左右出现呼吸道症状，剖检发现肾脏出现明显的红肿、出血和尿酸盐沉积，鸡群在 6 日龄免疫鸡新城疫、传染性支气管炎二联活疫苗（La Sota 株+H120 株），13 日龄免疫鸡新城疫、禽流感（H9 亚型）、传染性法氏囊病三联灭活疫苗，由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所保存。对照毒株 IBV DS10 株、禽流感病毒（AIV）115 株为江苏省农业科学院动物免疫工程研究所禽用疫苗抗原创制团队分离鉴定并保存在国家兽用生物制品工程中心，禽白血病病毒（ALV）AH10 株来自扬州大学兽医学院江苏省动物预防医学重点实验室，新城疫病毒（NDV）La Sota 株由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所在 SPF 鸡胚上增殖并保存。

2.1.1.2 细胞来源

SP2/0 细胞、SF9 昆虫细胞、High Five 昆虫细胞均由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所保存。

2.1.1.3 实验动物来源

SPF 鸡胚购自济南鑫盛达生物工程有限公司；SPF 雏鸡由 SPF 鸡胚孵化，在 SPF 鸡隔离器中饲养；Balb/c 小鼠及 ICR 雌鼠购自扬州大学；

2.1.1.4 多抗血清来源

抗 DS10 毒株多抗血清、抗 WJ215 毒株多抗血清、IBV 阴性血清均由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所保存；

2.1.1.5 载体来源

pET-32a（+）原核表达载体、pFastbac1 杆状病毒表达载体由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所保存。

2.1.2 试验仪器及设备

试验中主要用到的仪器及设备见表 2-1。

表 2-1 试验所用主要仪器及设备

Tab. 2-1 Main instruments and equipment used in the test

仪器及设备名称	生产厂家
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
台式高速离心机	艾本德公司
低温冷冻离心机	日立高新技术国际贸易有限公司
PCR 仪	艾本德公司
核酸电泳仪	上海天能生命科学有限公司
凝胶成像系统	上海天能生命科学有限公司
恒温振荡器	苏州捷美电子有限公司
金属浴	杭州佑宁仪器有限公司
NU 系列超纯水制备系统	南京优普环保设备有限公司
涡旋振荡仪	苏州捷美电子有限公司
低速离心机	大龙兴创实验仪器股份公司
电热恒温水浴锅	杭州佑宁仪器有限公司
生化培养箱	宁波海曙赛福实验仪器厂
紫外分光光度计	Thermo Fisher 公司
超声破碎仪	宁波宁波新芝生物科技股份有限公司
荧光显微镜	北京普瑞赛司仪器有限公司
光学显微镜	北京普瑞赛司仪器有限公司

2.1.3 试验耗材及试剂

试验中主要的耗材及试剂见表 2-2。

表 2-2 试验所用主要耗材及试剂

Tab. 2-2 Main consumables and reagents used in the test

实验耗材及试剂	生产厂家
GL DNA Marker 5000	艾科瑞生物公司
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega 公司
EcoRI 酶	TakaRa 公司
BamH I 酶	TakaRa 公司
核酸染料 (Gel Red)	南京斯博慕生物科技有限公司
DH5α Chemically Competent Cell	北京擎科生物科技股份有限公司
BL21(DE3) Chemically Competent Cell	北京擎科生物科技股份有限公司
高纯度低电渗琼脂糖	北京擎科生物科技股份有限公司
2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)	诺维赞生物科技股份有限公司
总 RNA 提取试剂盒	Axygen 公司

续表 2-2 试验所用主要耗材及试剂

Tab. 2-2 Main consumables and reagents used in the test(continued)

实验耗材及试剂	生产厂家
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
质粒小提试剂盒	南京擎科生物科技有限公司
青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液 (100×)	Solarbio 公司
ApexHF HS DNA 聚合酶预混液-FS	艾科瑞生物公司
Mouse anti His-Tag mAb	武汉爱博泰克生物科技有限公司
Grace's 培养基	Sigma 有限公司
胎牛血清	上海双洙生物科技有限公司
脂质体转染试剂 Lipofectamine3000	英杰公司
IB905 昆虫细胞全悬浮培养基	浙江壹生科有限公司
Bac DNA 提取试剂盒	Omega 生物科技有限公司
反转录试剂盒	南京擎科生物科技有限公司
50% PEG1500 solution	北京酷来搏科技有限公司
小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定用酶标二抗即用套装	博奥龙科技有限公司

2.2 试验方法

2.2.1 CK/CH/WJ215 株的分离鉴定

2.2.1.1 病毒的增殖与鉴定

将病料用无菌 PBS 按 1:6 比例混合,匀浆后,5000r/min 离心 30min,用 0.22 μ m 滤膜过滤上清液, -80℃保存备用。

按照美国 Axygen 公司的 AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒说明书提取 CK/CH/WJ215 总 RNA, 具体步骤如下:

(1) 200 μ L 的病料研磨后上清加入 1.5mL 离心管中 (试剂盒中提供), 然后加入 200 μ L Buffer R- I。

(2) 加入 150 μ L Buffer R- II, 涡旋振荡 20s, 低温高速离心机 4℃条件下 12000 $\times$ g 离心 5min。

(3) 提前在 1.5mL 离心管中加入 250 μ L 异丙醇, 离心结束后取上清至 1.5mL 离心管中, 用枪头吹打混合均匀。

(4) 将制备管置于试剂盒内提供的 2mL 离心管中, 转移步骤 3 中的混合液到制备管中, 4℃环境下 6000g 离心 1min。

(5) 弃掉 2mL 离心管中的滤液, 将制备管置回到 2mL 离心管中, 用 1mL 量程的移液枪吸取 500 μ L Buffer W1A 加入制备管, 12000 $\times$ g 离心 1min。

- (6) 弃滤液，将制备管置回到 2mL 离心管中，制备管中加入 700 μ L Buffer W2，12000 $\times$ g 离心 1min；以同样的方法再用 700 μ L Buffer W2 洗涤一次。
- (7) 弃滤液，将制备管置回到 2mL 离心管中，12000 $\times$ g 离心 1min。
- (8) 将制备管放入一干净的 1.5mL 离心管（试剂盒内提供）中，在制备管膜中央滴加 30 μ L Buffer TE。
- (9) 室温静置 1min，12000 $\times$ g 离心 1min，洗脱得 RNA。

按照擎科生物公司的 TSINGKE TSK302S Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2 试剂盒说明书，以提取的总 RNA 为模板，反转录合成 cDNA。

具体步骤如下：将所需试剂置于冰上直至溶解；按照表 2-3 配置反转录所需反应液，缓慢地混匀后瞬离，反转录反应程序为 55℃，40min；85℃，5min；反转录程序结束后 4℃ 降温，可暂时保存备用；

表 2-3 反转录反应体系

Tab. 2-3 Reverse transcription reaction system

组分	用量
5 $\times$ Goldenstar® Reaction Buffer	4 μ L
Goldenstar® RT6 (200U/ μ L)	1 μ L
Oligo (dT) ₁₇ (50 μ M)	1 μ L
dNTP Mix (10mM)	1 μ L
DTT	1 μ L
RNase-free Water	1 μ L
RNA 模板	10 μ L

参照已发表文献设计引物^[99]，引物序列为 S1Oligo-F：TGAAACTGAACAAAAGAC，S1Oligo-R：CATAACTAACATAAGGGCAA，由华大基因科技股份有限公司合成。将上述反转录的 cDNA 进行 RT-PCR。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 体系见表 2-4，反应条件见表 2-5。若扩增出目的条带则进行病毒的增殖。

表 2-4 PCR 扩增体系

Tab. 2-4 PCR amplification system

样品	体积
cDNA	2 μ L
2 $\times$ Tap Plus Master Mix II	25 μ L
引物 1	1 μ L
引物 2	1 μ L
ddH ₂ O	21 μ L

表 2-5 PCR 反应条件

Tab. 2-5 PCR reaction conditions

温度	时间
95 $^{\circ}$ C	1min
95 $^{\circ}$ C	15s
50 $^{\circ}$ C	15s
72 $^{\circ}$ C	30s
72 $^{\circ}$ C	5min
4 $^{\circ}$ C	∞

35cycles

检测结果为 IBV 阳性后将病毒进行增殖，具体步骤如下：

1) 将病料与无菌 PBS 按 1:6 比例混合，匀浆后，5000r/min 离心 30min，用 0.22 μ m 滤膜过滤上清液，加入青霉素和链霉素，使终浓度分别为 1000U/mL 和 1000 μ g/mL，按照 200 μ L/只经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚。

2) 将接种毒液的鸡胚置 37.5 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养，每 24h 照蛋一次，剔除 24h 内死亡的胚；培养 120h 后将鸡胚置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜，次日无菌条件下收集尿囊液。

3) 将尿囊液收集至 50mL 离心管中，高度离心机 4 $^{\circ}$ C6000rpm 离心 40min 后弃沉淀以及上层油脂，将收集的上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后接种鸡胚尿囊腔，一个鸡胚接种 0.2ml。重复操作，盲传至第五代，收获尿囊液，期间观察鸡胚病变情况。

提第五代尿囊液的 RNA 并反转录为 cDNA，参照 IBV 参考毒株 Sczy3 (GenBank 登录号：JF732903) N 基因序列设计扩增引物，其中上游引物为：ATGGCAAGCGGTAAAGCAAC，下游引物为：AAGTTCATTTTCACCAAGTG，由南京擎科生物科技股份有限公司合成，预计目的条带大小为 1226bp。采用该引物对鸡胚尿囊液提取的 RNA 以及 ALV、NDV、AIV 进行 RT-PCR 以确定病原。

2.2.1.2 IBV 基因组分段引物的设计与 PCR 扩增

为进一步分析新获得的 IBV 基因组结构，本试验设计了 22 对引物对该株 IBV 进行全基因组的扩增，引物序列如下表 2-6；

表 2-6 WJ215 全基因测序引物序列

Tab. 2-6 WJ215 whole gene sequencing primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')	碱基	位置	长度(bp)
P1 F	CAAAACGGACTTAAATACCTACAGCTG	27	62-1459	1398
P1 R	GCATGCCACGGACAACAAC	20		
P2 F	TGTGAGTGGATTGCCACAGCGT	22	1134-2318	1185
P2 R	AACCAAATTTTCATCGCCATCGTG	23		
P3 F	GGTGAGGGCATTTGGCATCT	20	2008-3422	1415
P3 R	GCAACAAGAACAACCTCGTCAACAT	25		
P4 F	AGCTGTTGTCGTGGAGCAGGAA	22	3294-4461	1168
P4 R	AGCAACAAAATCCGTAGGGTCTCC	24		
P5 F	CAGCAGATGATGTTGAGGACGAA	23	4172-5946	1775
P5 R	AAAATCACTTCCACAATAGCGTAAAA	26		
P6 F	CGCTGATAAAGTAGGCGATGGA	22	5586-7426	1841
P6 R	CCCATTGATAATAACCCAAACAACAC	26		
P7 F	TGGAAGAAGGCTGGTGGTGT	22	7307-8693	1387
P7 R	GCGTCAAATTTATCGCCTATCTCAT	25		
P8 F	GTAATTATGATCTTGCCGCGAAG	23	8596-9793	1198
P8 R	CAGAAGACTGTAACCTAACACCACC	25		
P9 F	GAGTTGATGTTTGTAACCTTCTTCGC	26	9644-11058	1415
P9 R	ATTGGCAGCTTTACGATACGC	21		
P10 F	CCTATGCGGAGTACGAAAGAGC	22	10949-1264	1696
P10 R	AAAGAAATCATGATCAGCCGTTAC	24	4	
P11 F	GATGGAAATCTTGAGTATCGTGAC	24	12520-1355	1036
P11 R	TATACCAGAAGCTAACGCACAGACAC	26	6	
P12 F	GCTACTTGTGGCTATCATTCTAAGG	25	13365-1484	1485
P12 R	GATGCGTGATGGGTCTGGAT	20	9	
P13 F	GGCCGATTCTAAGTGTGGGTTG	23	14720-1645	1734
P13 R	CACTTCGCAAGGAAAATGTCAGG	23	3	
P14 F	TCGTACTTTGCTTAATGGTTCCT	24	16358-1752	1169
P14 R	CAAAATAGCGCAAAGTGGTTAGTT	24	6	
P15 F	GACCAAGGATAGTTCAGATGTTAGC	25	17419-1878	1366
P15 R	CGATACAGTGGCGTTTGATTAGC	23	4	
P16 F	CAGGCGAAATACCCACAGTCAT	22	18553-2002	1469
P16 R	GGCAAAGCTACCACCCAGAG	20	1	

续表 2-6 WJ215 全基因测序引物序列

Tab. 2-6 WJ215 whole gene sequencing primer sequence(continued)

引物名称	引物序列 (5'→3')	碱基	位置	长度 (bp)
P17 F	GCAATAACTATAAAACAGAGCACAAG	26	19849-21482	1634
P17 R	AAAACAGATTGCTTACACCCTCC	23	19849-21482	1634
P18 F	GGCATGTAAAGGTGTTTATTCAG	23	21525-23281	1757
P18 R	CATACTGACTAGCATTAGCAGGC	23	21525-23281	1757
P19 F	GCACCTAATGGTATAGTGTTTATAC	25	23158-24375	1200
P19 R	CCGGGACTACTACCCATGTAT	21		
P20 F	TGTATTTTGTGGGTTTTTAGCACTTT	26	24287-25598	1312
P20 R	TCGTCCTAAACTAGACAACCATTTC	26		
P21 F	GTCTACTACGAAGGACAACCCATT	24	25423-26905	1483
P21 R	CATAATTATCAAAGTGCAGGTCAT	24		
P22 F	CGTATTACAAAGCAAAAGGCAGAT	24	26593-27694	1102
P22 R	TTTGCTCTAACTCTATACTAGCCT	25		

以第五代病毒尿囊液的 cDNA 为模板，分别使用上述 22 对引物对其进行分段基因的 RT-PCR。

2.2.1.3 PCR 产物胶回收和纯化

按照维诺赞生物公司的 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒说明书操作提取分段基因的 PCR 产物。具体步骤如下：

- 1) DNA 电泳结束后，在紫外灯下快速用刀分离出含目的 DNA 片段的凝胶，注意切除掉多余的凝胶只保留含有目的 DNA 的凝胶。
- 2) 加入等体积的 Buffer GDP。55℃金属浴 10min，确保凝胶完全溶解。金属浴期间颠倒混匀 2 次加速溶胶。
- 3) 待胶块彻底融化后瞬离收集管壁上的液滴。将 FastPure DNA Mini Columns-G 吸附柱置于 Collection Tubes 2mL 收集管中，把≤700μL 溶胶液转移至吸附柱中，12000rpm 离心 1min。若溶胶体积>700μL 则弃掉滤液后重复该步骤。
- 4) 弃滤液，把吸附柱置于收集管中。加入 300μL Buffer GDP 至吸附柱中，室温静置 1min 后 12000rpm 离心 1min。
- 5) 弃掉吸附柱外侧收集管中的滤液，把吸附柱置于收集管中。加入 700μL 已加入无水乙醇的 Buffer GW 至吸附柱中。12000rpm 离心 1min。
- 6) 重复步骤 5)。
- 7) 弃滤液，把吸附柱置回收集管中。12000rpm 离心 2min。

8) 将吸附柱置于新的 1.5mL 灭菌的离心管中，加入 30μL 预热至 55℃的 Elution Buffer 至吸附柱中央，放置 2min。12000rpm 离心 1min。弃去吸附柱，把 DNA 保存于-20℃。

2.2.1.4 PCR 产物的 TA 克隆

按照 Promega 公司的 pGEM®-T Easy Vector Systems 试剂盒进行分段基因与 T 载体的连接。

(1) 加入以下试剂：

表 2-7 TA 克隆连接反应体系
Tab. 2-7 TA clone connection reaction system

样品	体积
PCR 胶回收产物	3.5μL
2×Ligation Buffer	5.0μL
pGEM-T-easy vector	0.5μL
T4 连接酶	1μL

(2) 充分混匀后置 4℃冰箱过夜连接。

2.2.1.5 感受态细胞转化

按照擎科生物公司的 TSINGKE TSC-C01 Trelief® 5αChemically Competent Cell 使用说明，具体步骤如下：

- 1) 取 50μL 冰上融化的感受态细胞，加入 2.2.1.4 中的连接体系，轻轻混匀（轻柔吹打或轻弹管壁数下），冰上静置 30min。
- 2) 将转化体系置于 42℃金属浴热休克 90s。
- 3) 迅速转移至冰水浴中，静置 2min（期间注意不要震荡转化体系，否则会降低转化效率）。
- 4) 向离心管中加入约 0.8mL 预热至 37℃的不含抗生素的无菌液体培养基（LB），混匀后 37℃，150rpm 复苏 45min。
- 5) 将培养物以 5000rpm 离心 5min，在无菌条件下保留 200μL 上清，加入 IPTG 与 20mg/mL X-gal 各 20μL 后将沉淀菌体混匀，均匀涂布于氨苄抗性的 LB 琼脂平板上。
- 6) 将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养。

2.2.1.6 阳性克隆的筛选与鉴定

待 2.2.1.5 中平板菌落生长良好时挑取白斑，选择菌落明显且又未相互重叠的单菌落，将挑选出的白色单菌落使用 10 μ L 不含抗生素的 LB 液体培养基重悬，取 1 μ L 作为模板，使用 M13 引物（上游：TGTAACGACGCGCCAGT，下游：CAGGAAACAGCTATGACC；）进行 RT-PCR，将扩增出目的条带的阳性菌落接种到 5mL 氨苄抗性 LB 液体培养基中，在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 220rpm 转速震荡培养 12-16h。

A. 重组质粒的提取

按照维诺赞生物公司 FastPure Plasmid Mini Kit 试剂盒说明书提取阳性重组质粒，具体步骤如下：

- 1) 将 4mL 过夜培养（12-16h）的菌液加入 2mL 干净的无菌离心管中，12000rpm 离心 1min，此时菌体全部沉淀在管底。弃培养基，倒扣于吸水纸上吸尽残留培养基。
- 2) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L Buffer P1，使用移液器或涡旋振荡仪混匀。
- 3) 向步骤 2 中加入 250 μ L Buffer P2，温和的上下颠倒混匀 8-10 次，使菌体充分裂解。
- 4) 向步骤 3 中加入 350 μ L Buffer P3，立即温和地上下颠倒 8-10 次让溶液彻底中和 Buffer P2。此时应出现白色絮状沉淀。12000rpm 离心 10min。
- 5) 将 FastPure DNA Mini Columns 吸附柱置于 Collection Tube 2mL 收集管中。将步骤 4 上清用移液器小心转移至吸附柱中，注意不要吸到沉淀，12000rpm 离心 1min。倒掉收集管中的废液，把吸附柱重新放回收集管中。
- 6) 加入 500 μ L Buffer PW1 至吸附柱中。12000rpm 离心 1min。弃废液，把吸附柱重新放回收集管中。
- 7) 加入 600 μ L Buffer PW2 至吸附柱中。12000rpm 离心 1min。弃废液，把吸附柱重新放回收集管中。
- 8) 重复步骤 7)
- 9) 将吸附柱放回收集管中。12000rpm 离心 1min 干燥吸附柱，目的是将吸附柱中残留的漂洗液彻底去除。
- 10) 把吸附柱置于一个新的灭菌的 1.5mL 离心管中。加入 30 μ L 预热至 55 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer 至吸附柱的膜中央。室温静置 2min，12000rpm 离心 1min 洗脱 DNA。
- 11) 弃去吸附柱，DNA 产物保存于 -20 $^{\circ}$ C，以防止 DNA 降解。

B. 重组质粒的单酶切鉴定

选择 EcoR I 快切酶对重组质粒进行单酶切鉴定。反应条件为：在 37 $^{\circ}$ C 金属浴中酶切 15min。EcoR I 单酶切体系如下表 2-8：

表 2-8 单酶切反应体系

Tab. 2-8 Single enzyme cleavage reaction system

样品	体积
10×QuickCut Green Buffer	2μL
QuickCut EcoR I	2μL
质粒	1000ng

补 ddH₂O 至 20μL。

2.2.1.7 全基因序列比较分析

挑选的阳性重组质粒，送到北京擎科生物科技有限公司进行测序，每个样品挑选 3 个不同的阳性重组质粒进行测序。将测得的各片段序列，利用 DNASTar 软件进行测序结果的比对鉴定及剪辑拼接命名。从 GenBank 中下载 IBV 参考毒株全基因序列，利用 MEGA X 软件进行 S1 基因遗传进化树的绘制，利用 DNASTar Megalign 软件进行 S1 基因相似性比对。

2.2.1.8 致病性试验

(1) EID₅₀ 测定

收获第 5 代尿囊液，用无菌 PBS 进行 10 倍倍比稀释，使之依次为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释度的病毒悬液，按照 0.2mL/只经尿囊腔接种 10 日龄的 SPF 鸡胚，每个稀释度接种 5 个 SPF 鸡胚，同时设置 5 个接种 0.2mL/只无菌 PBS 的 SPF 鸡胚作为对照，37℃ 孵育 120h，去除 24h 死亡鸡胚，每 12h 照胚 1 次，记录 24~120h 鸡胚死亡情况，120h 取出所有鸡胚，4℃ 放置 12h 后取出胚体，观察病变情况，利用 Reed-Muench 方法计算第 5 代尿囊液的 EID₅₀。

(2) 雏鸡致病力的测定

将 30 只 7 日龄的 SPF 鸡随机分为试验组和对照组，每组 15 只，分别饲养在 SPF 鸡隔离器中，所有鸡均能自由饮水和采食。试验组鸡采用滴鼻、点眼的方式，按 10⁶EID₅₀/只接种分离病毒，对照组以相同的方式接种同体积的无菌 PBS。每日观察试验鸡的临床症状，记录死亡鸡气管和肾脏病理变化，并统计死亡情况。分别在接种病毒后第 2、4、6、8、10、12、14、18、21 天采集试验组鸡的咽拭子和肛拭子，采用 RT-PCR 测定感染鸡排毒情况；分别在接种病毒后第 0、7、14、21 天采集 5 只鸡的血清，应用江苏省农业科学院动物免疫工程研究所禽用疫苗抗原创制团队前期建立的 ELISA 方法测定 IBV 阳性抗体水平。

2.2.2 N 蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

2.2.2.1 构建原核表达质粒 pET-32a (+) -N

(1) 引物设计

设计 N 基因与载体的线性化引物。引物信息如表 2-9。

表 2-9 原核表达特异性引物

Tab. 2-9 Prokaryotic expression specific primers

引物名称	引物序列 (5' -3')		片段大小
	上游	下游	
WJ215 N	ggGGTACCATGGAGTTAaagaaGa aGGCAAGCGGTAAAGCAAC	cgGGATCCAAGTTCATTT TCACCAAGTG	1227bp
pET-32a (+)	GAATTCGAGCTCCGTCGACAA GC	GGATCCGATATCAGCCAT GGCC	5900bp

(2) N 基因的 RT-PCR 与回收

在 2.2.1.1 中已获得 CK/CH/WJ215 株的 cDNA, 以该 cDNA 为模板扩增 N 基因并进行胶回收;

(3) RT-PCR 线性化载体

1) 质粒转化: 将 pET-32a (+) 质粒转化至 DH5 α 感受态细胞中进行复制, 转化方法如下:

2) 取 50 μ L 冰上融化的 DH5 α 感受态细胞, 无菌条件下加入 5 μ L 载体质粒, 轻轻混匀 (轻柔吹打或轻弹管壁数下), 冰上静置 30min。

3) 将转化体系置于 42 $^{\circ}$ C 金属浴热休克 90s。

4) 迅速转移至冰水浴中, 静置 2min (期间注意不要震荡转化体系, 否则会降低转化效率)。

5) 向离心管中加入约 0.8mL 预热至 37 $^{\circ}$ C 的不含抗生素的无菌液体培养基 (LB), 混匀后 37 $^{\circ}$ C, 150rpm 复苏 45min。

6) 取 100 μ L 培养物, 均匀涂布于氨苄抗性的 LB 琼脂平板上。

7) 将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养。

8) 挑取生长状态好的单菌落, 接种到 5mL 有氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 220rpm 转速震荡培养 12-16h。

9) 第二天按照维诺赞生物公司的 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒说明书提取载体质粒。详细操作参考 2.2.1.6。

10) 线性化载体: 以载体质粒为模板, 使用高保真酶进行 RT-PCR 再通过胶回收获得线性化载体。

(4) 一步克隆

进行克隆时，pET-32a(+)和 N 的摩尔数比为 1:5。N 基因(Insert DNA)使用量的计算方法如下： $\text{Insert DNA}(\text{ng}) = \text{nmol 数} \times 660 \times \text{Insert DNA 的 bp 数}$ 。pET-32a(+)载体 1 μL (50ng)的摩尔数约为 0.03 μmol 。经计算于离心管当中加入如下体系：

表 2-10 原核表达连接反应体系

Tab. 2-10 Prokaryotic expression linkage reaction system

样品	体积
N(203.4ng)	4 μL
2 $\times$ Ligation Buffer	1.0 μL
pET-32a (+) (200ng)	1 μL
连接酶	1 μL
ddH ₂ O	3 μL

配置体系时，连接酶最后加入。25℃金属浴反应 2h。

(5) 转化

将上述连接体系转化 DH5 α 感受态，按照 2.2.1.5 操作。

(6) 筛选阳性克隆

过夜后挑取平板上面生长状态较好的单菌落于有氨苄抗性的 LB 液体培养基中，在 37℃恒温培养箱 220rpm 转速震荡培养 12-16h，以菌液为模板，使用表 2-9 中 N 的特异性引物进行 PCR 鉴定。提取阳性菌液的质粒使用 EcoR I 和 BamH I 快切酶进行双酶切鉴定。把初筛呈阳性的质粒送至北京擎科生物公司测序。测序正确的菌液保菌。

2.2.2.2 N 蛋白原核表达及可溶性分析

按照 2.2.2.1 中载体质粒转化 DH5 α 感受态的步骤转化上述测序成功的重组质粒到 BL21 (DE3) 感受态中，过夜培养后挑取平板上面生长状态较好的单菌落于有氨苄抗性的 LB 液体培养基中，在 37℃恒温培养箱 220rpm 转速震荡培养 12-16h，以菌液为模板使用 N 的特异性引物进行 RT-PCR，筛选出成功转化的单菌落。

通过 WB 验证 N 蛋白的原核表达情况，因为带 his 标签，蛋白能与 IBV 阳性血清以及 his 单抗同时有反应，即可说明获得了有效抗体。

样品制备步骤如下：

1) 将菌液验证为阳性的菌液以 1:200 接种于含有 Amp 抗性的 5mL LB 液体培养基内，37℃恒温培养箱 220rpm 转速震荡培养约 14h。

2) 第二天将上述菌液以 1:100 的比例转接种加入 5mL 含有 Amp 抗性的液体 LB 培养基，37℃恒温培养箱 220rpm 转速二次活化约 3h 或更长时间直至

OD_{600nm} 值为 0.5~0.7，并且最好接近 0.6。

3) 加入 IPTG，使其终浓度为 1mmol/L，37℃恒温培养箱 150rpm 转速继续诱导。

4) 取诱导后的菌液 2mL 于 2mLEP 管内，12000rpm 离心 1~2min，弃上清液，沉淀用 200μL PBS 重新悬浮，重悬后的菌液按照 1:100 的比例添加蛋白酶抑制剂，即 200μL 的重悬液添加 2μL 的蛋白酶抑制剂。

5) 使用超声破碎仪将样品放置在冰水混合物中进行超声破碎。

6) 破碎后使用离心机 4℃12000rpm 离心 10min。

7) 离心后收集上清加入 5×SDS Loading buffer 50μL，管底沉淀使用 100μL PBS 重悬，并加入 5×SDS Loading buffer 25μL。100℃金属浴煮沸 8~10min 后瞬离一下即获得了 N 蛋白原核表达的上清以及沉淀 WB 样品。

WB 步骤如下：

1) SDS-PAGE 凝胶的制备：参考雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书制备凝胶。

2) 蛋白电泳：将凝胶置于电泳槽内，倒入 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液，将样品按照每孔 20μL 的体积上样，蛋白 Marker 按照每孔 5μL 的体积上样。90V 恒压电泳约 30min 后，蛋白 Marker 完全电泳至浓缩胶和分离胶的分界面以下，调整为 130V 恒压电泳直至蛋白 Marker 的最小条带至分离胶的最底部则停止电泳。

3) 转膜：根据凝胶的大小裁剪 NC 膜，将转膜海绵和 NC 膜提前泡入转膜液中活化 5min，按照负极-海绵-凝胶-NC 膜-海绵-正极的顺序配置好“三明治结构”。将转膜液倒入电转槽中，按照正确方向放置配置好的“三明治结构”，90V 恒压转膜 80min。

4) 封闭：取出印迹膜后加入 2%BSA 溶液直至封闭液完全覆盖印迹膜，放置 4℃冰箱封闭过夜。

5) 第二天将膜取出置于 37℃恒温摇床内以 45 转速回温 1h。

6) 使用 PBST 摇动漂洗膜共 5 次，每次 5 分钟。

7) 孵育一抗：将膜上结合蛋白的一面朝上置于一抗溶液中，在室温下摇动孵育 1 小时，或在 4℃下孵育过夜。确保一抗溶液可完全覆盖印迹膜。

8) 使用 PBST 室温下摇动漂洗膜共 6 次，每次 5 分钟，以去除所有未结合的一抗。在这步操作中，是否对膜进行了充分的漂洗至关重要。

9) 孵育二抗：使用适量 PBST 按照 1:5000 稀释 HRP，37℃、45rpm 孵育 1h。弃去二抗，使用 PBST 洗涤 5 遍，每遍 5min。

10) 显影：使用 ECL 高敏化学发光液 A 液和 B 液按照体积 1:1 混匀，

将印迹膜放置在显影仪中，将发光液均匀滴加到印迹膜上，进行显影并拍照记录。

本试验一抗分别为 IBV DS10 株鸡多抗血清和鼠 his 单抗。

2.2.2.3 N 蛋白的纯化

样品制备：

(1)将诱导表达的 400mLpET-32a (+) -N 的菌液收集至 50mL 离心管中（四个 50mL 离心管配平），4℃12000rpm 离心 2min，弃上清，收集沉淀；

(2)用 30mL 裂解液重悬沉淀菌体并按照 1:100 加入蛋白酶抑制剂（pmsf），即 30mL 的菌体重悬液加入 300μL 的蛋白酶抑制剂；

(3)将盛有 30mL 重悬菌液的离心管置于冰水混合物中，使用超声破碎仪超声破碎，每次超声处理 8s，每次间隔 8s，通过菌液澄清程度改变超声时间长短；

(4)破碎至澄清后 4℃12000rpm 离心 10min，将上清使用 0.45μm 滤器过滤除菌后取 160μL 上清留样作后续检测用，余下上清至一无菌 50mL 离心管中。冰上放置备用；

按照翌圣生物科技有限公司的 HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column，1mL(His 标签蛋白纯化预装柱，1mL)对上述收集的上清进行蛋白的纯化，具体纯化步骤如下：

(1)装备纯化系统：架好柱子，折断下口；

(2)5 倍柱体积去离子水冲洗出存储缓冲液。

(3)5 倍柱体积的 Lysis Buffer 平衡柱子。

(4)将经过滤器过滤后的样品过柱。

(5)收集底部滤下的液体再次过柱三遍。

(6)使用洗涤液清洗 10 个柱体积。

(7)加入 5 倍柱体积洗脱液洗脱。

透析浓缩步骤如下：

(1)将透析袋和两端夹子以及镊子开水煮沸杀菌消毒。

(2)用镊子将透析袋一端夹紧封住以至液体不会漏出，从另一端加入纯化的样品后用夹子封住。

(3)在 5L 烧杯里加入 4L PBS，将装有纯化产物的透析袋放入 PBS 中，并将磁力搅拌棒置于烧杯底部正中间。

(4)将烧杯放置磁力搅拌器上，调节仪器至一个合适的转速，4℃透析过夜；

(5)第二天更换烧杯内 PBS 为新的 PBS 继续透析 5h。

(6)取出透析袋，使用 PEG8000 浓缩至适当体积。

(7)使用移液枪吸取浓缩后的蛋白测定浓度。

2.2.2.4 N 蛋白的浓度测定

通过碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对纯化后的 N 蛋白浓度进行测定，具体操作步骤如下：

(1)蛋白标准品的准备

a. 取 0.8mL 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准(20mg BSA)中，充分溶解后配制成 25mg/mL 的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可以-20℃长期保存。取 4μL 加入 PBS 稀释到 100μL，使最终浓度达到 0.2mg/mL；

b. 取适量 25mg/mL 蛋白标准，用 PBS 稀释至终浓度为 0.5mg/mL。例如取 10μl 25mg/mL 蛋白标准，加入 490μL 稀释液即可配制成 0.5mg/mL 蛋白标准。稀释后的 0.5mg/mL 蛋白标准可以-20℃长期保存。

(2)BCA 工作液配制

根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B(50:1)配制适量 BCA 工作液，充分混匀。例如 5mLBCA 试剂 A 加 100μLBCA 试剂 B，混匀，配制成 5.1mL BCA 工作液。BCA 工作液室温 24 小时内稳定。

(3)蛋白浓度测定

a. 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20μl 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20μL，相当于标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL。

b. 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中。如果样品不足 20μl，需加标准品稀释液补足到 20μL。同时记录样品体积。

c. 各孔加入 200μL BCA 工作液，37℃放置 15 分钟。

d. 用酶标仪测定 562nm 处的吸光度。

e. 根据标准曲线和使用的样品体积计算出 N 蛋白的浓度。

2.2.3 ELISA 检测方法的建立

2.2.3.1 间接 ELISA 检测方法的操作步骤

(1)抗原包被：将已纯化的抗原蛋白使用包被液稀释到需要的浓度，按 100μL/孔加入 96 孔板中，在 4℃的条件下包被过夜；

(2)洗板：将过夜包被后的 96 孔板取出并弃去板内液体，用 PBST (300μL/孔)洗 3 次，最后一次将孔内液体倒掉并拍干；

(3)封闭：取配制好的 2%的 BSA 按 300μL/孔加入 96 孔板，在 37℃的条件下封闭 3 h；

(4)洗板：将封闭 3h 后的 96 孔板取出并弃去板内液体，用 PBST（300 μ L/孔）洗 3 次，最后一次将孔内液体倒掉并拍干；

(5)一抗孵育：一抗若为血清，则按合适稀释度使用 2% BSA 稀释后按 100 μ L/孔加入 96 孔板，在 37 $^{\circ}$ C 的条件下孵育 1 h；

(6)洗板：将孵育一抗结束的 96 孔板取出并弃去板内液体，用 PBST（300 μ L/孔）洗 5 次，最后一次将孔内液体倒掉并拍干；

(7)二抗孵育：取二抗（HRP）使用 2% BSA 按合适比例稀释，配制好的二抗溶液按 100 μ L/孔加入 96 孔板，在 37 $^{\circ}$ C 的条件下孵育 1 h；

(8)洗板：将孵育二抗结束的 96 孔板取出并弃去板内液体，用 PBST（300 μ L/孔）洗 5 次，最后一次将孔内液体倒掉并拍干；

(9)显色：将购买的商品化 TMB 显色液按 100 μ L/孔加入酶标板，在避光条件下显色 5 min；

(10) 读数：将 2 M 硫酸终止液按 100 μ L/孔加入，使用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值，进行数据分析。

2.2.3.2 最佳包被抗原浓度的确定

将 N 蛋白 1-10 列依次用 3 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.01 μ g/mL、0.001 μ g/mL、五个不同浓度进行稀释，每个浓度设两个重复孔，最后 11-12 两列做空包被为空白对照。每个包被浓度设两个重复孔，分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清作为对照。剩余步骤按照 2.2.3.1 操作。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定最佳包被抗原浓度。

2.2.3.3 最佳封闭液的确定

在已优化好的条件下，使用可拆卸的酶标板进行两种封闭液的封闭效果比较。本试验选择 5% 脱脂乳和 2% BSA 进行封闭，设置阴阳对照分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清。剩余步骤与 2.2.3.1 相同。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定最佳封闭液。

2.2.3.4 最佳封闭时间的确定

在上述优化好的条件下，使用可拆卸的酶标板，设置 3 组封闭时间：2h、3h、4h。每组两个重复孔，并设置阴阳对照分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清，剩余步骤与 2.2.3.1 相同。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定最佳封闭时间。

2.2.3.5 最佳血清稀释度的确定

在上述优化好的条件下，使用可拆卸的酶标板，将一抗血清按 A-H 行用 1 : 50、1 : 100、1 : 200 三个比例进行稀释孵育，各做两个重复分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清，最后两排一抗孵育 PBS 作为空白对照。剩余步骤与 2.2.3.1 相同。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定最佳血清稀释度。

2.2.3.6 最佳一抗孵育时间的确定

在上述优化好的条件下，设置 4 组孵育时间：30 min、60 min、120 min。每组 4 个重复孔，两个孔孵育鸡阴性血清，另外两个孔孵育鸡阳性血清，剩余步骤与 2.2.3.1 相同。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定血清最佳孵育时间。

2.2.3.7 最佳酶标二抗稀释度的确定

根据优化好的条件，将二抗（HRP 标记羊抗鸡）按 A-H 行依次用 1 : 5000、1 : 10000、1 : 20000、1 : 40000 进行稀释孵育，每个浓度设两个重复孔，分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清作为对照。剩余步骤按照 2.2.3.1 操作。试验数据以 P/N 值作为衡量标准，若 P/N 值越大，则效果越佳。以此确定最佳包被抗原浓度及最佳酶标二抗稀释倍数。

2.2.3.8 临界值的确定

根据优化好的条件，选取 20 份 IBV 阴性血清，进行间接 ELISA 检测，使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值进行数据分析。根据统计学原理分析，计算出 20 组数据的平均值 ($\bar{X}$) 和标准差 (SD)，当 $OD_{450nm} \leq 3SD + (\bar{X})$ 时判定为阳性。

2.2.4 N 蛋白在昆虫细胞中的表达

2.2.4.1 N 的重组转移质粒构建

(1) N 基因的 RT-PCR 扩增及回收

设计 N 基因引物。上游:CCGGATCCATGAAATTCTTGGTCAACGTTGCCCTTGT; 下游 CCCTCGAGGTGATGGTGGTGGTGGTGAAGTTCATTTTCACCAAG; 以 IBV WJ215 株的 cDNA 为模板，利用特异性上下游引物，扩增出 N 基因。经 1% 琼脂糖核酸电泳后进行胶回收。

(2) 基因的酶切与连接

a. 将扩增出来的 N 基因和 pFastBac-1 载体进行 BamH I 和 Xho I 快切酶酶切并

进行 1%琼脂糖凝胶电泳，切胶进行胶回收。

b. 参考表 2-10 的连接体系将胶回收后的目的基因和载体连接，16℃连接过夜。

(3) 连接产物的转化

转化步骤同 2.2.1.5。

(4) 重组转移质粒的提取

重组转移质粒的提取步骤同 2.2.1.6。

(5) 重组转移质粒的酶切鉴定

将提取的 pFastBac1-N 重组转移质粒进行 BamH I和 Xho I快切酶酶切，双酶切体系参考 2-11。

(6) 重组转移质粒的测序

将重组转移质粒送至擎科生物公司测序，使用 DNASTAR 软件对测序结果对比序列分析。成功获得了含有目的基因的 pFastBac1-N 重组转移质粒。

表 2-11 双酶切反应体系

Tab. 2-11 Double enzyme cleavage reaction system

样品	体积
10×QuickCut Green Buffer	2μL
QuickCut EcoR I	1μL
QuickCut BamH I	1μL
质粒	1000ng

补 ddH₂O 至总体积为 20μL。

2.2.4.2 重组穿梭质粒的构建

A. 转座

- (1) 从超低温冰箱中取出 DH10Bac 感受态细胞 100 μL，置于冰上融化。
- (2) 将 1ug 鉴定正确的重组转移质粒 pFastBac1-HBM-N，加入 DH10Bac 感受态细胞内，轻弹混匀，静置冰水浴 30 min。
- (3) 将离心管置于 42℃热激活 45 s，冰水浴 2 min。
- (4) 向离心管内加入 900 μL LB 液体培养基，37 °C、225 rpm 振荡培养 4h。
- (5) 5000 rpm 离心 5 min，弃去 400 μL 上清，轻柔吹打重悬沉淀。
- (6) 用无抗 LB 液体培养基将菌液作 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 梯度稀释。
- (7) 取 X-gal 30 μL 涂布三抗 LB 固体平板（含 Kan/Tet/Gen/IPTG/X-Gal）。
- (8) 取 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 稀释度的菌液各 100μL 涂布至 LB 平板（含 Kan/Tet/Gen/IPTG/X-Gal），37 °C避光倒置培养 48 h。
- (9) 将出现蓝/白菌落的 LB 固体平板置于 4℃过夜，使菌落充分显色。

(10)挑取白色单菌落，接种于三抗 LB 液体培养基（含 Kan/Tet/Gen），37°C、220 rpm 振荡培养 12-16h。

(11)再取菌液划线接种至三抗 LB 平板（含 Kan/Tet/Gen/IPTG/X-Gal），37°C避光倒置培养 36-48 h。

(12)再次将出现蓝/白菌落的 LB 平板置于 4°C过夜，使菌落充分显色。

(13)挑取白色单菌落，接种于 LB 液体培养基（含 Kan/Tet/Gen），37 °C、220 rpm 振荡培养过夜。

(14)再取菌液划线接种至 LB 平板（含 Kan/Tet/Gen/IPTG/X-Gal），37°C避光倒置培养 36-48 h。

(15)将出现白色单菌落的 LB 平板置于 4°C过夜，使菌落充分显色。

B. 重组穿梭质粒的提取

挑取第三代白色单菌落，接种于三抗 LB 液体培养基（含 Kan/Tet/Gen），37°C、220 rpm 振荡培养 16h。利用 Bac DNA 提取试剂盒提取 DNA，具体步骤如下：

(1) 吸取 5 mL 菌液于离心管，室温下 13000×g 离心 3 min，弃掉上层培养基。

(2) 加入 200 μ L BufferT1 重悬菌液沉淀，涡旋混匀。

(3) 加入 200 μ L BufferT2，轻柔上下颠倒 10 次混匀，室温放置 5 min。

(4) 加入 200 μ L BufferT3，轻柔上下颠倒 20 次混匀，直至出现白色絮状沉淀，冰上放置 5 min。4°C条件下 13000×g 离心 10 min。

(5) 小心将上清液转移至 1.5 mL 离心管内，加入 200 μ L BAC Binding Buffer，上下颠倒至彻底混匀。

(6) 将吸附柱置于 2mL 收集管内，将(5)中混合液全部吸至吸附柱内，室温下 10000×g 离心 1min。

(7) 弃滤液，将吸附柱置于 2mL 收集管内，吸附柱内加入 750 μ L SPM Buffer，室温下 10000×g 离心 1min。

(8) 弃滤液，将吸附柱置于 2mL 收集管内，室温下 13000×g 空离 3 min。

(9) 将吸附柱置于新的无菌 1.5 mL 离心管内，吸附柱中央滴加 30 μ L Elution Buffer，室温放置 5 min，10000×g 离心 1min。弃去吸附柱，将提取的 DNA 使用紫外分光光度计测其浓度，并放置-20°C保存。

2.2.4.3 重组穿梭质粒的鉴定

使用特异性引物和 M13 引物对重组穿梭质粒进行 PCR 鉴定。反应结束后，产物经 1%琼脂糖核酸电泳鉴定。将鉴定正确的重组杆粒命名为 rBacmid -N。

2.2.4.4 细胞转染及重组杆状病毒的拯救

(1) 在 6 孔细胞板中，将 SF9 细胞按照 1.5×10^6 个/孔的密度进行铺板，轻轻摇匀后放置 27°C 恒温培养箱中培养 12h，当细胞密度约为 90% 时进行转染。

(2) 配制体系 1：取一个无菌的 1.5mL 离心管加入 300 μ L Opti-Mem 培养基；再加入 3 μ g 的 rBacmid -N 最后加入 6 μ L P3000，轻轻弹匀。

(3) 配制体系 2：取一个无菌的 1.5mL 离心管标记加入 300 μ L Opti-Mem 培养基和 9 μ L lipofectamine3000 转染试剂，轻轻弹匀。

(4) 将体系 1 中的离心管混匀后轻轻滴加到体系 2 中的离心管中，轻轻弹匀，室温孵育 15min。

(5) 将 6 孔细胞板中完全培养基更换成无血清的 Grace's 培养基。

(6) 将步骤（4）中的 DNA-lipofectamine3000 混合物轻轻滴加至 6 孔细胞板中，轻轻晃动 6 孔细胞板，使 DNA-lipofectamine3000 混合物均匀分散。

(7) 27°C 恒温培养箱培养 5 h 后吸出上清液，6 孔细胞板中每孔轻轻补加 3mL 含 10% 血清的 Grace's 培养基。

(8) 27°C 恒温培养箱培养 4-5 天，每 12 h 观察细胞形态的变化。

(9) 5 天后收获细胞上清液，即为 P1 代重组杆状病毒。命名为 P1-rBv-N。

2.2.4.5 重组杆状病毒 DNA 的提取及鉴定

将 P1 代重组杆状病毒感染 SF9 细胞，待细胞出现明显病变后（约 96h），收取细胞及其上清，提取重组杆状病毒 DNA。

(1) 取 500 μ L 细胞上清于 1.5 mL 离心管内，加入 260 μ L 含 RNaseA 的 Buffer T1，充分混匀。

(2) 加入 260 μ L Buffer T2，轻柔上下颠倒 5-10 次，室温静置 5min。

(3) 加入 260 μ L Buffer T3，轻柔上下颠倒 15-20 次，冰上静置 5min。

(4) 4°C 14000 $\times$ g 离心 10min。

(5) 将上清液转移到无菌的 1.5 mL 离心管中，加入 0.7 倍体积的异丙醇和 2 μ L linear polyacrylamides，混匀样品 15s。室温下 14000 $\times$ g 离心 10min。

(6) 弃上清，可见底部有少数 DNA 颗粒，向管中加入 500 μ L 70%乙醇，室温 14000 $\times$ g 离心 10min。

(7) 弃上清，将离心管倒置 15 分钟，使乙醇充分挥发，使 DNA 颗粒干燥。

(8) 管中滴加 35 μ L 无菌 ddw，室温过夜使 DNA 颗粒融解。

(9) 使用 M13 载体通用引物鉴定重组杆状病毒 DNA。

2.2.4.6 重组杆状病毒的滴度测定及其传代

(1) 在 96 孔细胞板中, 将 SF9 细胞按照 5×10^4 个/孔的密度进行铺板, 轻轻摇匀后, 27°C 恒温培养箱中培养 12h, 待细胞密度约为 90% 时吸去培养基, 每孔补加含 100 μ L 2% 血清的 Grace's 培养基。

(2) 将重组杆状病毒 P4-rBv-N 在无菌 1.5mL 离心管中进行 10 倍倍比稀释, 稀释液为含 2% 血清的 Grace's 培养基。

(3) 取稀释度 10^{-1} ~ 10^{-9} 的病毒稀释液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每个稀释度设置 8 个重复孔, 同时设置正常细胞作为阴性对照。

(4) 27°C 恒温培养箱培养 5 天, 待细胞出现明显病变, 使用间接免疫荧光法观察结果。

(5) 固定: 5 天后吸去细胞培养基, 每孔加 100 μ L 4% 多聚甲醛细胞固定液, 室温固定 20min。吸去固定液, PBS 清洗 3 遍, 拍干。

(6) 透膜: 每孔加 100 μ L 0.25% 曲拉通 (Triton X-100), 室温透膜 10min。吸去透膜液, PBS 清洗 3 遍, 拍干。

(7) 孵育一抗: 将 IBV WJ215 株鸡多抗血清 1:200 稀释, 每孔 100 μ L, 37°C 孵育 1h。吸去一抗, PBS 清洗 5 遍, 拍干。

(8) 孵育二抗: 避光将 FITC-IgY 羊抗鸡抗体 1:200 稀释, 每孔 100 μ L, 37°C 孵育 1h。吸去二抗, PBS 清洗 5 遍, 拍干。

(9) 每孔加入 50 μ L 50% 甘油, 荧光显微镜下观察荧光结果并记录, 使用 Reed-Muench 两氏法计算各重组杆状病毒的滴度。

(10) 待细胞密度约为 90% 时, 按照 MOI=0.1 的接毒量进行病毒传代, 传至 P6 代。

2.2.4.7 IFA 鉴定重组蛋白的表达

(1) 在 24 孔细胞板中将 SF9 细胞按照 2×10^5 个/孔的密度进行铺板, 轻轻摇匀后, 27°C 恒温培养箱中培养 12h, 待细胞密度约为 90% 时, 吸去培养基, 每孔补加含 200 μ L 2% 血清的 Grace's 培养基。

(2) 将 P6 代重组杆状病毒 rBv-N 按照 MOI=1 接种至 24 孔板中, 27°C 恒温培养箱中培养。同时设置正常 SF9 细胞对照。

(3) 120h 后细胞出现明显病变, 吸取细胞上清, 使用无菌 PBS 洗涤一遍。

(4) 固定: 每孔加 300 μ L 4% 多聚甲醛细胞固定液, 室温固定 20min。吸去固定液, PBS 清洗 3 遍, 拍干。

(5) 透膜: 每孔加 300 μ L 0.25% 曲拉通 (Triton X-100), 室温透膜 10min。吸去透膜液, PBS 清洗 3 遍, 拍干。

(6) 孵育一抗：将 IBV WJ215 株鸡多抗血清 1:200 稀释，每孔 300 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。吸去一抗，PBS 清洗 5 遍，拍干。

(7) 孵育二抗：避光将 FITC-IgY 羊抗鸡抗体 1:200 稀释，每孔 300 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。吸去二抗，PBS 清洗 5 遍，拍干。

(8) 每孔加入 200 μ l 50%甘油，荧光显微镜下观察荧光结果。

2.2.4.8 High Five 细胞表达重组蛋白

将活细胞密度 $>95\%$ 的 High Five 细胞接种至无菌锥形瓶中，接种体积为 50mL，接种密度为 2×10^6 cells/mL，将重组杆状病毒以 MOI=0.1 的接种量接种 High Five 细胞，27 $^{\circ}$ C、170 rpm 摇床恒温培养 4-5 天。培养期间每 24 h 将细胞混悬液与 0.04% 台盼蓝染色，计算死亡细胞比例。待死亡细胞数占比细胞总数 98%，此时收获细胞培养液。

2.2.4.9 Western blot 鉴定重组蛋白的表达

将 2.2.4.8 中收获的细胞培养液离心弃去上清，使用预冷的 PBS 重悬后在冰水浴中进行超声破碎，破碎至液体透明且不粘稠，将重组蛋白和 5 $\times$ 蛋白 Loading Buffer 按照体积比 4:1 的比例混合，100 $^{\circ}$ C 煮样 10min。本试验中一抗为 IBV DS10 鸡多抗血清，二抗为 HRP-IgY 羊抗鸡抗体，参考 2.2.2.2 中 WB 步骤鉴定重组蛋白。

2.2.5 N 蛋白单克隆抗体的制备

2.2.5.1 小鼠的免疫

将 2.2.1.1 中 6000rpm/min 离心 40min 所得的上清用 PEG8000 透析浓缩至适当体积，采用蔗糖密度梯度离心法 35000rpm/min 离心 2.5h 收集 30% 与 45% 中间的病毒带，适量 PBS 稀释后再次 35000r/min 离心 3h 去除蔗糖。沉淀再以适量 PBS 稀释，参考 2.2.2.3 中 BCA 法测定病毒蛋白的浓度。分装至无菌 EP 管中并做好标记保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。按照每只小鼠免疫 0.5mg 纯化后的 CK/CH/WJ215 株病毒量来对病毒做合理稀释，再向其中加入等体积的弗氏佐剂（初次免疫用弗氏完全佐剂，再次免疫用弗氏不完全佐剂），将其完全乳化后皮下注射 3 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，同时设立阴性对照为 PBS 与等体积的佐剂乳化，每两周免疫一次。免疫流程见表 2-12。

表 2-12 BALB/c 小鼠免疫程序

Tab. 2-12 The immune program for BALB/c mouse

免疫时间 (d)	抗原	免疫剂量/只	接种方法
1	CK/CH/WJ215+等量完全佐剂	0.5mg	腹腔注射
14	CK/CH/WJ215+等量不完全佐剂	0.5mg	腹腔注射
28	CK/CH/WJ215+等量不完全佐剂	0.5mg	腹腔注射
35	N 蛋白在昆虫细胞中的表达产物	0.5mg	腹腔注射

2.2.5.2 免疫 BALB/c 小鼠血清效价测定

为保证免疫的效果，在第三次免疫一周后测定小鼠血清中的抗体效价。将三只免疫后的 BALB/c 小鼠进行下颌窦采血，提取血清后采用间接 ELISA 法测定血清中的抗体效价。选取效价高的一只小鼠皮下注射 N 的真核蛋白，超强免疫 3 天后进行细胞融合。

采用 ELISA 检测方法测定免疫鼠的多抗血清的效价，其具体步骤如下：

(1)包被：将纯化后的 N 蛋白用包被液调整浓度至 $1\mu\text{g/mL}$ ；在 96 孔酶标板中每孔加入 $100\mu\text{L}$ ，同时设置空包被孔作为阴性对照。4℃过夜包被。

(2)第二天弃掉孔内溶液，每孔加入 $300\mu\text{L}$ PBST 后拍打震荡倒掉孔内洗涤液。重复操作洗板 3 次后在吸水纸上拍干。

(3)封闭： $300\mu\text{L/孔}$ ，加现配的 2%BSA，37℃孵育 3h。

(4)每孔加入 $300\mu\text{L}$ PBST 后拍打震荡倒掉孔内洗涤液。重复操作洗板 3 次后在吸水纸上拍干。

(5)加样： $100\mu\text{L/孔}$ ，用 2%BSA 按 1:200~1:409600 稀释小鼠阳性血清，同时设阴性血清对照（未免疫的小鼠血清），37℃孵育 1h 后用 PBST 洗板 5 次后拍干。

(6)加酶标抗体：用 2%BSA 将羊抗鼠 IgG-HRP 进行 1:20000 倍稀释， $100\mu\text{L/孔}$ ，37℃孵育 1h 后用 PBST 洗 5 次后拍干。

(7)显色：将商品化 TMB 反应液 $100\mu\text{L/孔}$ 加入需要显色的孔内，37℃反应 5~8min。

(8)终止： $100\mu\text{L/孔}$ ，加入 2M H_2SO_4 终止液。

(9)读数：加入终止液后迅速用酶标仪检测各待测孔的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值，记录数据。

(10) 结果判断：如果待测孔的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值大于临界值，即为阳性结果，

在阳性孔中最高稀释倍数即为效价。

2.2.5.3 SP2/0 细胞的制备

细胞融合前一周左右复苏 SP2/0 细胞，用含有 10%FBS 的 HT 培养基进行培养。融合前一天，把生长状态较好的 SP2/0 进行传代，保证融合时 SP2/0 在对数生长期。融合当天，把 SP2/0 细胞从培养瓶上缓缓吹打下来，转移到 50mL 离心管里，1000rpm 离心 10min，用少量 DMEM 完全培养基把细胞重悬进行细胞计数，把细胞密度稀释到 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL。

2.2.5.4 饲养细胞的制备

融合前一天，把一只健康的 ICR 雌鼠引颈处死，浸泡在 75% 的酒精中大约 5min，在超净台中取出将其腹部朝上固定于解剖板上。用无菌手术剪刀把小鼠腹部的表皮剪开，使其腹膜暴露并用酒精棉球擦拭消毒。无菌镊子轻轻夹起腹膜，用一次性 10mL 的注射器把 5mL HAT 培养基注射进腹腔，夹取酒精棉球缓缓按压拍打腹部 2~3min，然后用无菌 10mL 注射器吸取腹部内带有饲养细胞的培养基，转入灭菌培养皿中，进行细胞计数，把细胞密度稀释到 10^5 个/mL。转入 96 孔细胞培养板，放于 37°C、5%CO₂ 的细胞培养箱中。第二天观察细胞生长状态，细胞呈多形性、贴壁紧密、无污染时可用。

2.2.5.5 脾细胞的制备

取超强免疫 3 天后的小鼠，眼球采血，37°C 静置 2h 至血清析出，5000rpm 离心 10min，取血清 -20°C 储存备用，即为阳性对照。采血后将小鼠引颈处死，浸泡在 75% 酒精中大约 5min，在超净工作台内取出将其仰面固定在解剖盘上，无菌手术剪刀依次剪开腹部表皮以及小鼠左侧腹膜，尽量剥去脾脏周围的脂肪以及结缔组织，缓慢取出脾脏。用 10mL 左右有抗的 DMEM 清洗一次，转移到另一个装有 10mL 左右无抗的 DMEM 平板中，尽量将结缔组织去除干净后再转移到另一个干净的装有 10mL 无抗的 DMEM 平板中。取出 1mL 注射器折弯用来固定脾脏，然后取出另一支 1mL 注射器在脾脏上打孔，直到脾脏只剩下一层皮。将平皿中的脾细胞悬液转移到 15mL 离心管中，沉降 3min。期间将 SP2/0 细胞吹下来并收集到 50mL 离心管中。

2.2.5.6 细胞融合

把上述脾细胞以及 SP2/0 细胞按照 1:5~1:10 的比例加入 50mL 离心管中，1000rpm 离心 10min，倒掉上清液，轻轻把细胞团打散使其混合平铺在离心管管底。将该离心管管底握在手心，用巴氏管吸取 1mL 预热至 37°C 的 PEG1500，沿着离心管的管壁，一边轻轻转动管底一边缓慢滴加 PEG，时间控制在 1min 内滴加完（前面 3s 一滴，之

后 2s 一滴，最后 1s 一滴）。接着保持在 37℃水浴中缓慢晃动离心管 60s，立即向其中添加 10mL 预热至 37℃的 DMEM，稀释 PEG 终止融合，放置在 37℃培养箱中温育 10min。1000rpm 离心 10min 弃上清后补加预热至 37℃的含两倍氨苄青霉素和 10% FBS 的 HAT 培养基到 40mL，将细胞团打散。将其移至两块无菌平皿，一块平皿加入 20mL 的细胞重悬液后再补加 30mL 预热至 37℃的含两倍氨苄青霉素和 10%FBS 的 HAT 培养基，混匀后按照 150μL/孔加到提前一天制备好的饲养细胞内，平放在 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱里。培养七天后观察细胞的状态，若培养基蒸发则可选择补合适体积的含 10%FBS 的 HAT 培养基。

2.2.5.7 杂交瘤细胞阳性孔筛选

待杂交瘤细胞状态生长良好且细胞的集团密集时，使用移液枪将每个孔细胞吹散，两天后即可进行阳性孔筛选。将纯化后的 N 蛋白作为包被原，96 孔板内杂交瘤的上清作为一抗，使用 2.2.3 中建立好的 ELISA 筛选方法筛选出分泌抗体能力强的阳性孔，转移到 24 孔细胞培养板进行 1:1 扩大培养，至孔内细胞培养基变黄时，再次使用 ELISA 对抗体效价进行检测，选择阳性且效价高的细胞孔扩大到细胞瓶中冻存一部分并取一部分进行亚克隆。

2.2.5.8 杂交瘤细胞的亚克隆

选取效价高的阳性杂交瘤细胞采用有限稀释法亚克隆，具体步骤如下：

把待克隆的杂交瘤细胞采用台盼蓝活细胞计数，再用含 10%FBS 的 HT 培养基调整其细胞浓度为 4~5 个/mL。把细胞悬液按照 200μL/孔铺满 3 块 96 孔板。放于 37℃、5%CO₂ 培养箱里，6 天后观察每个孔内细胞集团，标记有单个细胞集团的孔，待细胞集团生长至出现打堆时使用移液枪将孔内细胞吹散，2-3 天后细胞培养上清变黄即可使用 ELISA 检测方法筛选出呈强阳性的单克隆细胞株，转移至 24 孔板扩大培养。重复亚克隆 2 轮，保证筛选的是单克隆细胞株且能够稳定分泌抗 IBV N 蛋白抗体。

2.2.5.9 单克隆抗体亚类鉴定

按照建立的 ELISA 检测方法将获得的单克隆上清作为一抗，按照博奥龙科技有限公司的小鼠单抗 Ig 类亚类鉴定用酶标二抗即用套装说明书操作进行 Mouse Ig (G1\G2a\G2b\G3\M\A\k\λ) 鉴定。

2.2.5.10 单克隆抗体的大量制备

用体内诱生腹水法对 IBV N 蛋白 mAb 进行大量制备。提前一周于 BALB/c 经产母鼠腹腔内接种 500μL 无菌的液体石蜡，将筛选到的单克隆细胞株转至细胞培养瓶内用含有 10%FBS 的 HT 培养基扩大培养。到对数增长状态，把细胞从培养瓶上缓缓

吹打下来，1000rpm 离心 10min，用 DMEM 培养基重悬计数。分别向石蜡致敏的两只母鼠腹腔内注射 0.5×10^6 个/mL~ 1×10^6 个/mL 细胞。每天查看小鼠的腹部情况，约一周后小鼠腹部肿胀较大而且表皮紧绷、行动不便。将小鼠引颈处死，浸泡在 75% 乙醇里大约 5min，仰面固定于解剖盘上，剪开小鼠腹部表皮，用一次性 10mL 注射器采集腹水，3000rpm 离心 10min，除去上层油脂。取上清，分装到无菌的 1.5mL 离心管放置于 -20℃ 备用。

第三章 结果与分析

3.1 CK/CH/WJ215 株的分离鉴定

3.1.1 病原鉴定结果

病料研磨后提取的 RNA 使用 S1 基因的特异性引物扩增出 1620 bp 左右的特异性条带，与 IBV 阳性对照扩增条带大小一致，符合预期（见图 3-1），说明样品中含有 IBV 核酸。

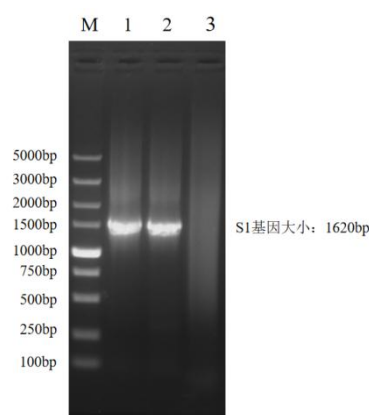


图 3-1 病原初步鉴定结果

Fig. 3-1 Preliminary identification results of pathogens

注：M. DL5000 DNA Marker；1. 病料扩增产物；2. IBV DS10 株扩增产物；3. 阴性对照。

在 SPF 鸡胚上连续盲传 5 代后，鸡胚表现为发育受阻，尿囊膜增厚等侏儒胚的典型症状，严重的可导致鸡胚死亡，“侏儒胚”病变（见图 3-2）。并且，IBV N 基因引物对尿囊液扩增出与预期大小相符的目的条带，而 ALV、AIV、NDV 和阴性尿囊液均未扩增出目的条带（见图 3-3）。确定分离病原为 IBV，命名为 CK/CH/WJ215。



图 3-2 CK/CH/WJ215 株接种鸡胚病变

Fig. 3-2 CK/CH/WJ215 strain inoculated with chicken embryo lesions

注：a. 含病毒的尿囊液接种鸡胚；b.健康对照鸡胚；

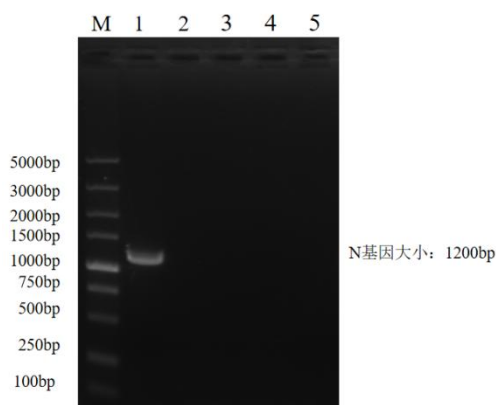


图 3-3 最高代次尿囊液 N 基因特异性引物鉴定结果

Fig. 3-3 Identification results of N-gene specific primers in the highest generation of urinary bladder fluid

注：M. DL5000 DNA Marker；1. 含病毒的尿囊液；2.AIV；3. NDV；4. ALV；5. 阴性对照。

3.1.2 CK/CH/WJ215 株全基因组结构

使用特异性引物对分离株进行分段 RT-PCR，阳性质粒送到北京擎科生物科技有限公司进行测序。将测得的各片段序列利用 DNASTAR 软件进行测序结果的比对鉴定及剪辑拼接命名。结果显示，CK/CH/WJ215 基因组全长 27440bp。各片段测序结果拼接完成，核苷酸序列已上传（GenBank 登录号：PP212853.1），经整理 CK/CH/WJ215 全基因组结构如表 3-1 所示。

表 3-1 IBV 分离株的全基因组结构

Tab. 3-1 The Whole Genome Structure of IBV Isolates

Gene		Gene1		Gene2		Gene3		Gene4		Gene5		Gene6
		1a	1b	S1	S2	3a	3b	E	M	5a	5b	
CK/CH/WJ215	Start	526	1246	2037	2200	2386	2403	2421	2451	2553	2573	25924
			2	1	0	5	8	3	1	9	3	
	End	1238	2042	2199	2387	2403	2422	2453	2518	2573	2598	27153
		7	0	9	7	8	6	9	8	6	1	
	Size (nt)	1186	7959	1629	1878	174	189	327	678	198	249	1230

3.1.3 CK/CH/WJ215 株 S1 基因遗传进化分析

结果显示，以本试验分离株（CK/CH/WJ215 株）第 5 代尿囊液获得的 cDNA 为模板，PCR 扩增 S1 基因结果显示出现 1620 bp 的目的条带，测序获得该分离株 S1 基因核苷酸序列。将其与附录 C 中参考毒株的 S1 序列进行比较。

同源性分析结果显示，CK/CH/WJ215 株 S1 氨基酸序列与 D1466（M21971）毒株同源性最低，仅为 51.9%，与 4/91、LDT3、M41、QX 等毒株的相似性分别为 78.2%、79.3%、75.9%、84.6%，与 GI-19（QX-like）型毒株同源性最高。进一步遗传进化分析显示，CK/CH/WJ215 株与 GI-19 基因型 IBV 毒株位于同一分支，核苷酸相似性为 94.3%，表明 CK/CH/WJ215 株属于 GI-19 基因型（见图 3-4）。

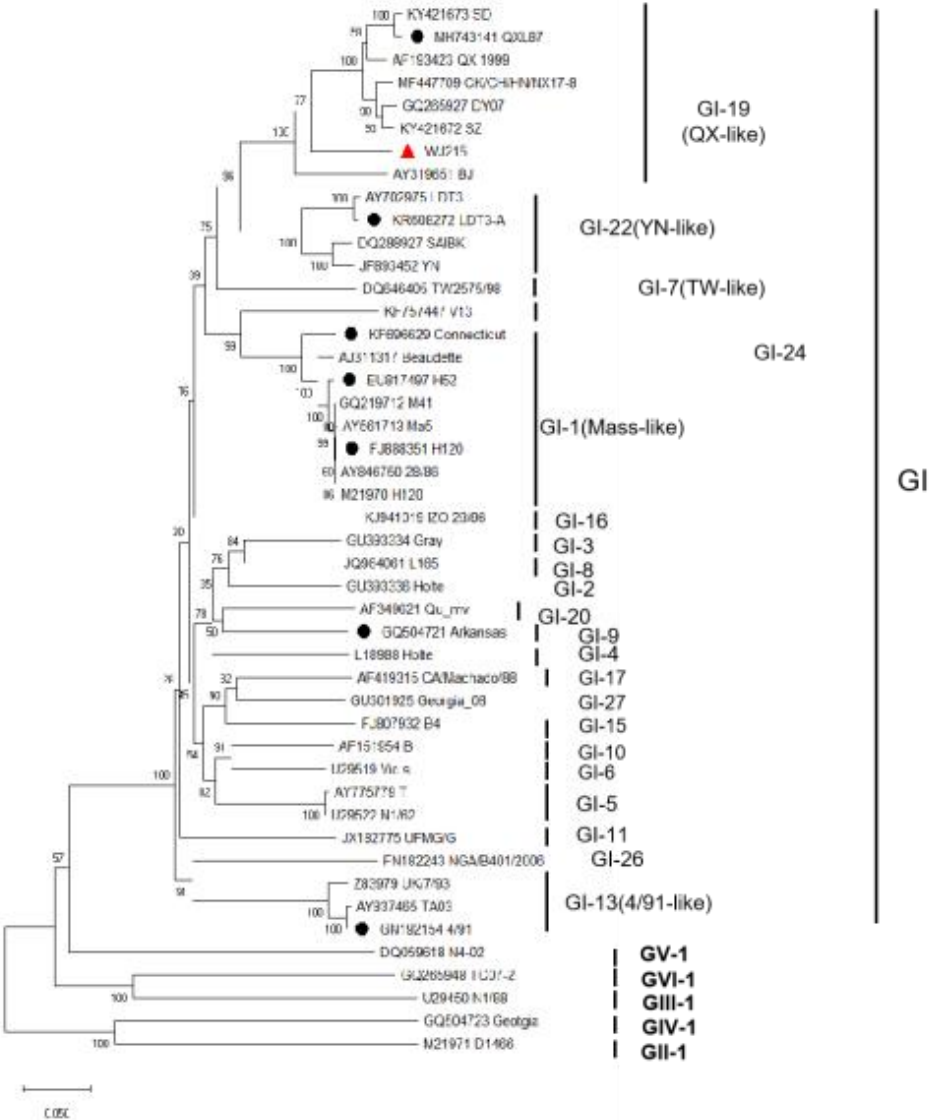


图 3-4 分离株 S1 基因遗传进化树分析

Fig. 3-4 Genetic Evolution Tree Analysis of S1 Gene in Isolates

3.1.4 CK/CH/WJ215 株同源重组分析

为了探究分离到的 CK/CH/WJ215 毒株的基因组特点，本研究通过 RDP4 生物信息软件，将分离毒株与 2 株同源较高的毒株（DY07 和 YX10 D90）进行重组事件分析，下图 3-5（A）中结果显示分离株 CK/CH/WJ215 与对比毒株相比其 S 基因发生了突变。通过同源重组分析发现 CK/CH/WJ215 分离株存在 3 个重组事件，为 CK/CH/WJ215 提供重组片段的主要和次要亲本株为 QX 型 YX10 D90 株和 DY07 株，表明 CK/CH/WJ215 株可能来源于 QX 型不同毒株的多次重组。

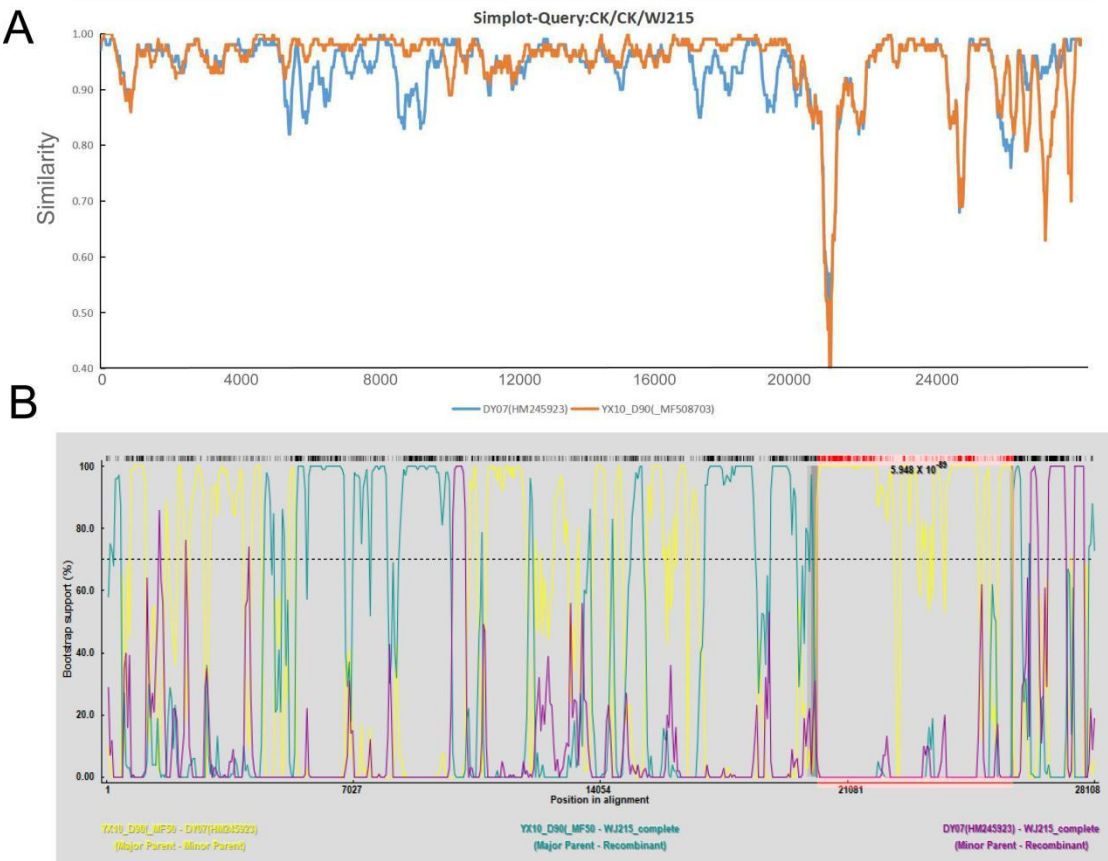


图 3-5 分离株 CK/CH/WJ215 基因组 simplot（A）与 Bootscan（B）分析

Fig. 3-5 Genomic Simplot (A) and Bootscan (B) Analysis of CK/CH/WJ215 Isolates

根据结果整理并分析了分离株 CK/CH/WJ215 基因组中检测重组事件信息如下表：

表 3-2 分离株 CK/CH/WJ215 基因组中检测重组事件信息

Tab. 3-2 Detection of recombinant event information in the genome of CK/CH/WJ215 isolated strains

重组事件	断点		相关基因	重组片段亲本株	主要亲本株
	起点	终点			
1	4312	5033	1a	YX10 D90	ck/CH/LSD/112
2	20086	25416	1b, S, 3a, 3b, E, M	unknown/DY07	YX10 D90
3	25530	26322	5a, 5b, N	CK/CH/LSD/0903	CH/CH/LJL1309

3.1.5 致病性试验结果

结果显示，在攻毒后的第 2 天，试验组 SPF 鸡开始出现临床症状，表现为精神沉郁，羽毛杂乱，甩鼻，有气管啰音，排白色稀粪，眼鼻部有黏性液体，在攻毒后第 4~5 天表现最为严重，发病率为 100%（15/15）；在攻毒后第 2 天开始死亡，至第 21 天共死亡 10 只，死亡率达 66.7%（10/15），死亡 SPF 鸡表现为脱水严重（见图 3-6A）。攻毒后 7 天能够产生 IBV 阳性抗体，抗体水平随着感染时间增加而逐渐升高（见图 3-6B）。试验组病死鸡可见肾脏肿胀、苍白，并伴有大量尿酸盐沉积（见图 3-7D），气管未见明显病变（见图 3-7B）。对照组 SPF 鸡肾脏（见图 3-7C）和气管（见图 3-7A）均未见异常。病理组织切片结果显示，试验组肾脏组织出现大量炎性细胞浸润，肾小管上皮细胞坏死、脱落，对照组肾脏组织未见异常（见图 3-8）。表明 CK/CH/ WJ215 株对 SPF 雏鸡具有较强的致病性，并且肾脏致病性明显。

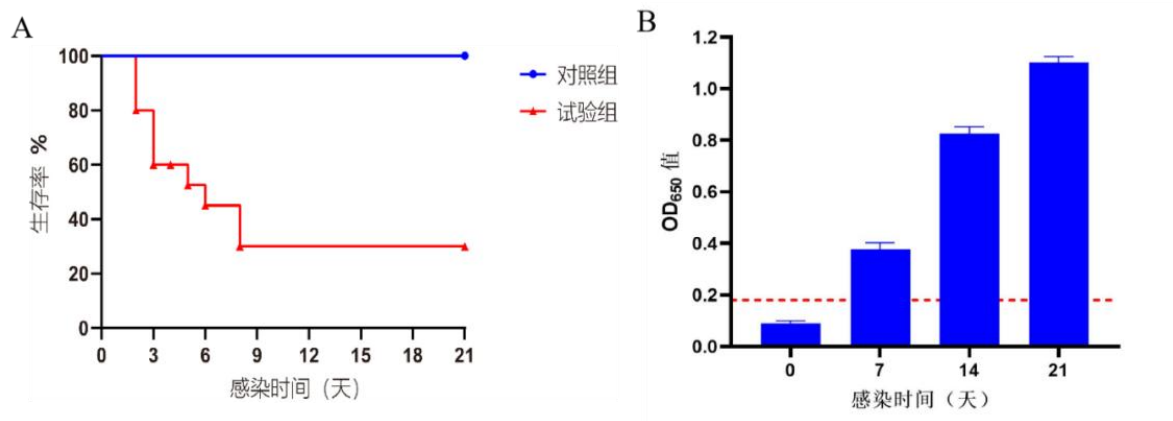


图 3-6 分离株对 SPF 鸡致病性及 IBV 抗体产生水平

Fig. 3-6 Pathogenicity and IBV antibody production levels of isolated strains in SPF chickens

注：A. 存活率；B. 抗体水平；

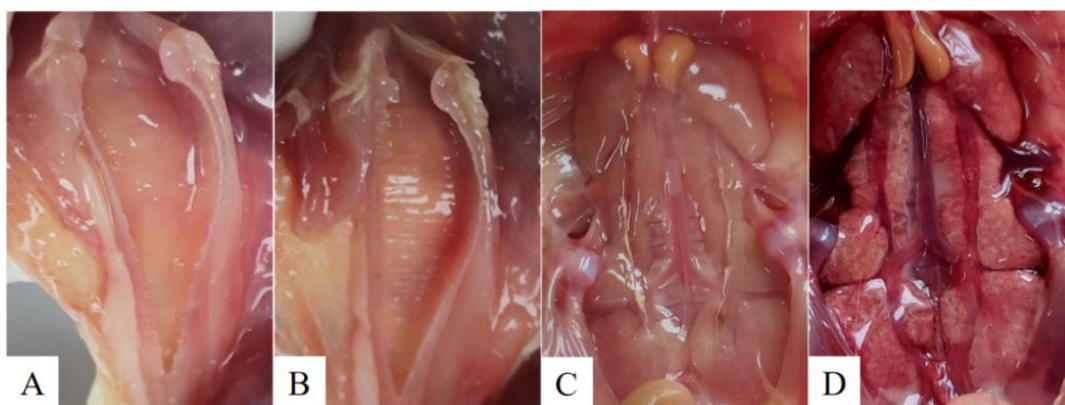


图 3-7 分离株感染鸡的器官病理变化

Fig. 3-7 Organ pathological changes in chickens infected with isolated strains

注：A. 对照组气管；B. 实验组气管；C. 对照组肾脏；D. 实验组肾脏

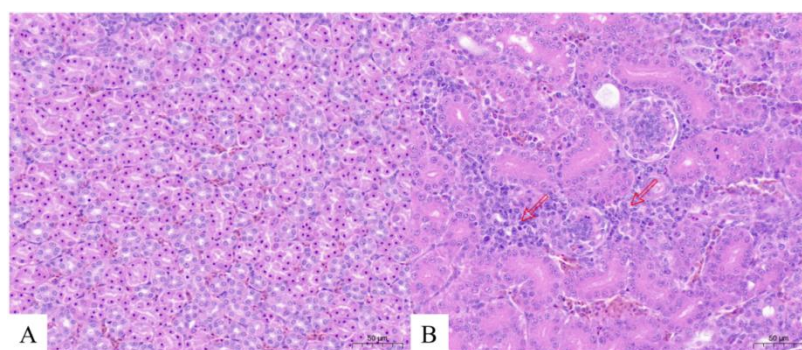


图 3-8 本试验分离株感染鸡肾脏组织病理学变化

Fig. 3-8 Pathological changes in kidney tissue of chickens infected with strains isolated in this experiment

注：A. 对照组肾脏；B. 实验组肾脏

3.2 N 蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

3.2.1 pET-32a (+) -N 的酶切鉴定结果

提取菌液鉴定有目的条带的菌液质粒，测定浓度后使用 EcoR I 和 BamH I 进行双酶切，37°C 金属浴酶切 15min 后取 10μL 进行凝胶电泳，电泳结果显示重组原核表达质粒酶切的载体以及 N 基因大小全部正确，证明载体与目的片段成功连接。将该菌液送往擎科生物公司进行测序，测序的结果显示该重组质粒无变异，到此完成原核表达质粒 pET-32a (+) -N 的构建。

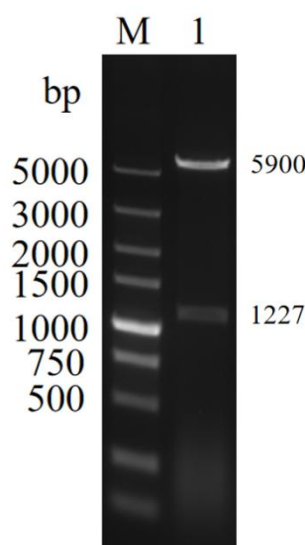


图 3-9 pET-32a(+)-N 双酶切结果

Fig. 3-9 PET-32a(+)-N dual enzyme digestion results

注：M. DL5000 DNA Marker； 1. pET-32a(+)-N 质粒

3.2.2 N 蛋白的可溶性分析

将 N 的原核表达菌液进行诱导，诱导后将菌体进行超声破碎。破碎后离心获得上清和沉淀，将上清和沉淀分别加蛋白 buffer 煮样。完成样品制备后进行 WB 验证，本试验中 pET-32a（+）载体带 His 标签，WB 一抗分别使用 IBV DS10 鸡多抗血清与鼠 His 单抗进行孵育。结果显示表达的蛋白与 IBV 阳性血清以及 His 单抗均能发生反应，到此成功表达了反应性较好的 N 蛋白。且可溶性分析显示 N 蛋白在上清和沉淀中均有表达，上清中表达量较沉淀多。后续可选择使用 N 蛋白上清进行纯化。

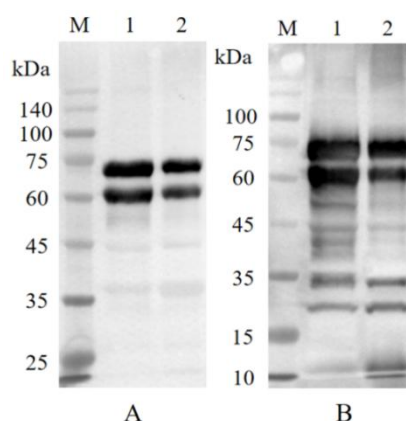


图 3-10 N 蛋白 WB 验证

Fig. 3-10 N-protein WB validation

注：M. 蛋白 Marker； 1. N 破碎后上清； 2. N 破碎后沉淀； A.一抗为鼠 his 单抗； B.一抗为 IBV DS10 鸡多抗血清；

3.2.3 N 蛋白的纯化

通过前期研究发现上清中蛋白量较沉淀中更多，考虑实验操作难度与复杂程度，上清纯化更为方便。因此本试验选择将 N 蛋白的上清使用翌圣生物科技有限公司的 HisSep Ni-NTA 6FF Chromatography Column, 1mL(His 标签蛋白纯化预装柱, 1mL) 进行纯化。并在纯化前收集一部分样品作为未纯化样品，与纯化后的 N 蛋白进行 WB 验证。由图 3-11 可见 N 蛋白纯化后杂带减少至几乎没有杂带，至此 N 蛋白纯化成功。

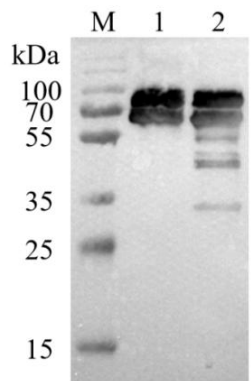


图 3-11 N 蛋白纯化 WB 结果

Fig. 3-11 N-protein purification WB results

注：M. 蛋白 Marker；1. 纯化后的 N 蛋白；2. 纯化前的 N 蛋白；

3.2.4 N 蛋白的浓度测定

取一部分纯化后的 N 蛋白，使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度。使用酶标仪测得不同浓度蛋白标准品与不同浓度 N 蛋白 570nm 处的 OD 值，通过蛋白标准品 OD 值随浓度变化来绘制标准曲线 $y=1.2034x - 0.1837$ ， $R^2=0.999$ ，说明该曲线准确率较高。代入得出纯化后的 N 蛋白浓度为 0.2085mg/mL。

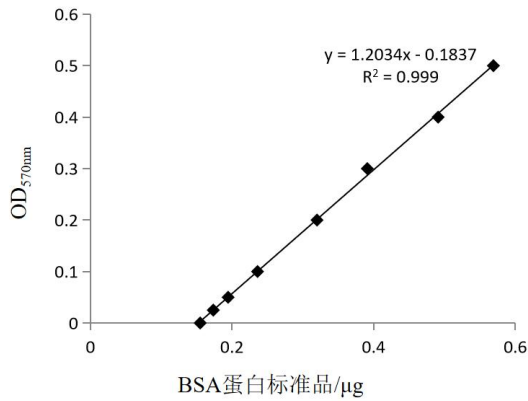


图 3-12 BSA 法测定 N 蛋白浓度的标准曲线

Fig. 3-12 Standard curve for measuring N protein concentration using BSA method

3.3 ELISA 检测方法的建立

3.3.1 最佳包被抗原浓度的确定

本试验对抗原包被浓度 3 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.01 μ g/mL、五个不同包被浓度进行对比；使用酶标仪读 OD_{450nm} 值，在表格中记录下 P/N 值，进行数据分析如下表 3-3。

表 3-3 最佳包被抗原浓度的确定

Tab. 3-3 Determination of optimal antigen concentration for encapsulation

	包被量				
	0.3 μ g	0.1 μ g	0.05 μ g	0.01 μ g	0.001 μ g
IBV 阳性血清	2.163	1.462	1.173	0.846	0.372
IBV 阴性血清	0.831	0.212	0.203	0.182	0.096
P/N 值	2.6029	6.8962	5.7783	4.6484	3.8750

结果显示当每孔包被 0.1 μ g 的 N 蛋白时 P/N 值最高为 6.8962，因此，N 蛋白作为包被抗原最合适的包被量为每孔 0.1 μ g。

3.3.2 最佳封闭液的确定

本试验在其他条件不变的情况下，对比了两种封闭液的封闭效果，使用酶标仪读 OD_{450nm} 值，在表格中记录下 P/N 值，进行数据分析如下表 3-4。

表 3-4 最佳封闭液的确定

Tab. 3-4 Determination of the optimal sealing solution

	封闭液	
	5%脱脂乳	2%BSA
IBV 阳性血清	1.721	1.452
IBV 阴性血清	0.513	0.221
P/N 值	3.3548	6.5701

结果显示封闭液为 2%BSA 时 P/N 值最高，经优化，选择 2%BSA 进行封闭效果最佳。

3.3.3 最佳封闭时间的确定

本试验选择在 37 $^{\circ}$ C 条件下封闭，封闭时间分别为 2h、3h、4h，使用酶标仪测得 450nm 处的读值，进行数据分析如表 3-5，计算出在 37 $^{\circ}$ C 封闭 3h 条件时，P/N 值最

大为 5.5498。因此确定封闭 3h 为最佳条件。

表 3-5 最佳封闭时间的确定

Tab. 3-5 Determination of optimal closure time

	封闭时间		
	2h	3h	4h
IBV 阳性血清	1.157	1.726	1.789
IBV 阴性血清	0.213	0.311	0.371
P/N 值	5.4319	5.5498	4.8221

3.3.4 最佳血清稀释度的确定

(1) 血清稀释倍数的确定

使用上述优化好的条件完成 ELISA 检测，将一抗（IBV DS10 鸡多抗血清）按 A-H 行用 1 : 50、1 : 100、1 : 200 三个比例进行稀释孵育，各做两个重复分别孵育 IBV DS10 鸡多抗血清和 SPF 鸡阴性血清，最后两排以 PBS 作为空白对照。实时计算每个条件下的 P/N 值，数值越大则效果越佳。以此确定最佳血清稀释度。进行数据分析如表 3-6。

表 3-6 最佳血清稀释度的确定

Tab. 3-6 Determination of optimal serum dilution

	血清稀释度			
	1 : 50	1 : 100	1 : 200	空白
IBV 阳性血清	2.421	1.973	1.785	0.030
IBV 阴性血清	0.927	0.625	0.325	0.027
P/N 值	2.6116	3.1568	5.4923	1.111

结果显示，在其他条件不变的情况下将一抗血清以 1:200 稀释孵育时 P/N 值最高，因此血清最佳稀释浓度为 1 : 200。

3.3.5 最佳一抗孵育时间的确定

本试验设置三组孵育时间：30 min、60 min、120 min。每组 4 个重复孔，两个孔孵育 SPF 鸡阴性血清，另外两个孔孵育 IBV DS10 鸡多抗血清，实时记录每种条件孵育的结果，计算 P/N 值，若越大，则效果越佳。以此确定血清最佳孵育时间。进行数据分析如表 3-7。

表 3-7 最佳一抗孵育时间的确定

Tab. 3-7 Determination of the optimal incubation time for primary antibodies

	血清孵育时间		
	30min	60min	120min
IBV 阳性血清	0.931	1.721	1.732
IBV 阴性血清	0.172	0.302	0.572
P/N 值	5.4128	5.6987	3.026

通过 P/N 值的计算结果，一抗血清孵育 1h 时比值最高，因此一抗血清孵育 1h 为最佳条件。

3.3.6 最佳酶标二抗稀释度的确定

本试验对酶标二抗四种稀释倍数 1：5000、1：10000、1：20000、1：40000 进行比较，使用酶标仪读 OD_{450nm} 值，在表格中记录下 P/N 值，进行数据分析如下表 3-8。

表 3-8 最佳酶标二抗稀释度的确定

Tab. 3-8 Determination of the optimal dilution of enzyme-linked immunosorbent assay secondary antibody

	二抗稀释倍数				空白
	1: 5000	1: 10000	1: 20000	1: 40000	
IBV 阳性血清	1.735	1.623	1.598	1.361	2.523
IBV 阴性血清	0.422	0.293	0.221	0.202	2.140
P/N 值	4.1114	5.5392	7.2308	6.7376	1.179

结果显示当酶标二抗以 1:20000 稀释时 P/N 值最高为 7.2308，因此酶标二抗以 1:20000 稀释为最佳条件。

3.3.7 临界值的确定

本试验选取 20 份 IBV 阴性血清进行 ELISA，通过不同阴性血清的 OD_{450nm} 值计算出本试验建立的 ELISA 方法临界值的多少。使用上述优化好的条件进行 ELISA 检测，实时记录下每个阴性血清的读值。根据统计学原理分析，计算出 20 组数据的平均值 ($\bar{X}$) 和标准差 (SD)，当 OD_{450nm} ≤ 3SD + ($\bar{X}$) 时判定为阳性。检测结果如下表 3-9。

表 3-9 临界值结果

Tab. 3-9 Critical Value Results

阴性血清			
0.231	0.125	0.179	0.283
0.172	0.231	0.242	0.164
0.165	0.122	0.286	0.221
0.194	0.253	0.176	0.169
0.176	0.184	0.251	0.236

结果计算得 20 份 IBV 阴性血清 OD_{450nm} 读值的平均值为 0.203，标准差（SD）为 0.0462，根据统计学原理计算出 3SD+ ($\bar{X}$) 值为 0.3416，因此确定建立的 ELISA 方法的临界值为 0.341，大于这个值时样品可判定为阳性，小于 0.3416 时，样品判定为阴性。

3.4 N 蛋白在昆虫细胞中的表达

3.4.1 目的基因的扩增结果

通过 RT-PCR，使用特异性引物对 IBV N 基因进行扩增。结果显示 PT-PCR 成功扩增出目的基因大小与预期条带相符的片段。

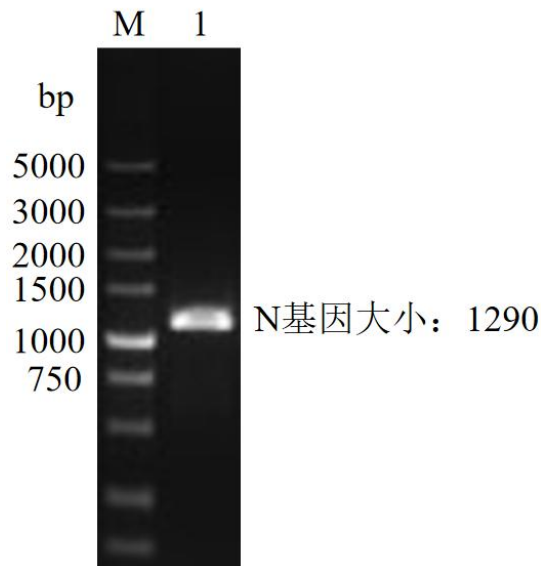


图 3-13 N 基因的 RT-PCR 结果

Fig. 3-13 RT-PCR results of N gene

注：M. DL5000 DNA Marker； 1. IBV-N 片段；

3.4.2 重组转移质粒酶切鉴定结果

将胶回收的目的基因 N 与经过酶切的 pFastBac1 载体连接，转化至 DH5α感受态细胞，菌落 PCR 筛选出阳性菌液。提取该阳性菌液的重组转移质粒，选择 BamH I 和 Xho I快切酶进行双酶切反应，酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果如下图：

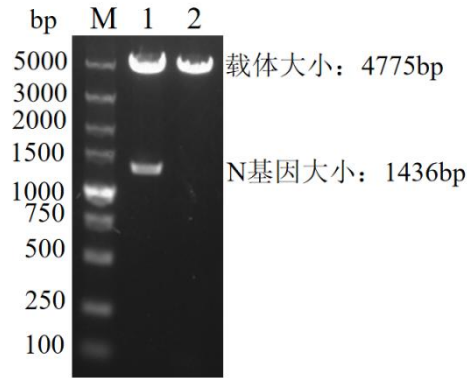


图 3-14 重组转移载体酶切结果

Fig. 3-14 Recombinant transfer vector enzyme digestion results

注：M. DL5000 DNA Marker；1. pFastbac1-N；2. pFastbac1 载体；

结果显示目的基因和 pFastBac1 载体序列大小与预期条带大小一致。测序结果表明重组转移质粒 pFastBac1-N 成功构建。

3.4.3 重组穿梭质粒的鉴定结果

将重组穿梭质粒使用 M13 载体通用引物进行 PCR 鉴定，扩增产物片段大小为 2300bp+插入片段长度，即为阳性产物，重组穿梭质粒 pFastBac1-N 扩增大小均与预期目的片段大小相符，说明穿梭质粒经鉴定正确，构建成功。

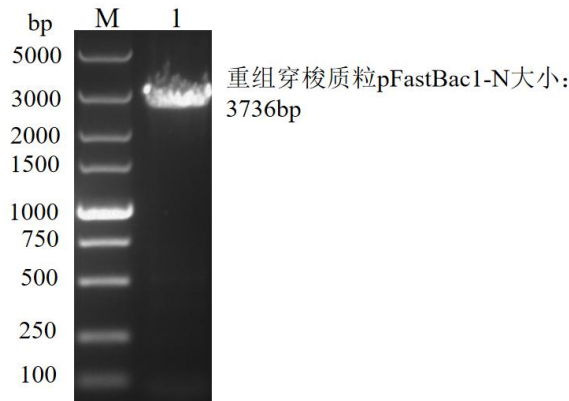


图 3-15 M13 引物扩增 pFastBac1-N 结果

Fig. 3-15 M13 primer amplification of pFastBac1-N results

注：M. DL5000 DNA Marker；1. rBacmid-N；

3.4.4 重组杆状病毒的获得

将获得的重组穿梭质粒 rBacmid-N 在转染试剂 lipofectamine3000 作用下转入 SF9 细胞。转染后，对照组 SF9 细胞生长状态良好，未发生变化；转染 2d 后，转染组的 SF9 细胞变大变圆，细胞内出现囊泡及包涵体颗粒，最后停止生长。

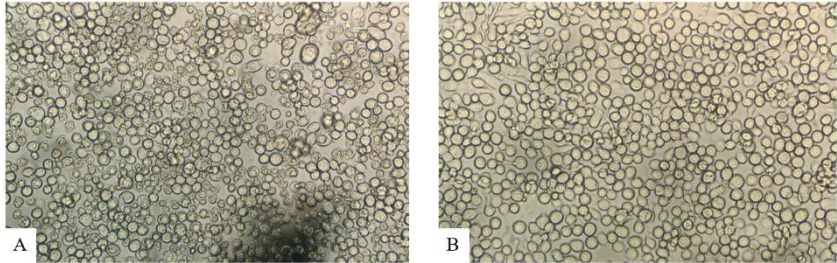


图 3-16 SF9 扩增病毒病变图（倍数：200×）

Fig. 3-16 SF9 amplification virus lesion map (fold: 200×)

注：A. SF9 病变图；B. SF9 阴性图；（放大倍数：200×）

结果表明，重组穿梭质粒成功转入了昆虫细胞（SF9 细胞）中，并在细胞内完成了组装获得了感染活性。至此本次试验获得了具有感染活性的 N 蛋白重组杆状病毒。

3.4.5 PCR 鉴定重组杆状病毒

将重组杆状病毒感染 SF9 细胞，120h 后待细胞完全病变，收获病变细胞提取 DNA。以该 DNA 为模板使用特异性引物进行 PCR 扩增，将 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳。电泳结果如下图 3-17：

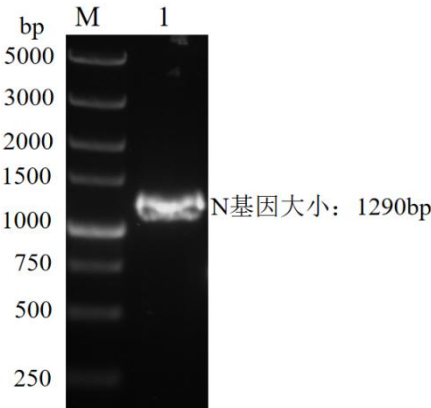


图 3-17 特异性引物扩增 pFastBac1-N 结果

Fig. 3-17 Specific primer amplification of pFastBac1-N results

注：M. DL5000 DNA Marker； 1. rBacmid-N；

PCR 结果显示有扩增到与预期片段大小一致的片段。试验结果验证了重组穿梭质粒 rBacmid-N 成功转染到了 SF9 细胞中，至此成功获得重组杆状病毒。

3.4.6 重组杆状病毒的滴度测定

使用间接免疫荧光方法来进行重组杆状病毒的滴度测定。将 P6 代重组杆状病毒感染 SF9 细胞 120h 后，能够在显微镜下观察到在低稀释度处出现明显病变。使用固定液将此时的 96 孔细胞板进行固定，以 IBV DS10 多抗血清为一抗孵育固定后的 96 孔板，使用 PBS 洗净后将 FITC-IgY 羊抗鸡抗体作为二抗孵育。在荧光显微镜下观察每个梯度中有特异性绿色荧光的孔数并作好记录，按照 Reed-Muench 两氏法计算每种病毒的滴度。重组杆状病毒 rBv-N 的病毒滴度为 $1 \times 10^{6.75} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

3.4.7 间接免疫荧光法鉴定重组蛋白

将 P6 代重组杆状病毒 rBv-N 按照 MOI=1 接种至 24 孔板中，27°C 恒温培养箱中培养。同时设置正常 SF9 细胞作为阴性对照。待细胞出现病变后固定细胞板，将 IBV DS10 多抗血清作为一抗孵育固定后的 24 孔板，使用 PBS 洗净后再将 FITC-IgY 羊抗鸡抗体作为二抗，使用间接免疫荧光方法鉴定重组蛋白表达。而正常 SF9 细胞未出现特异性绿色荧光。结果表明，N 的重组蛋白能在 SF9 细胞中成功表达。

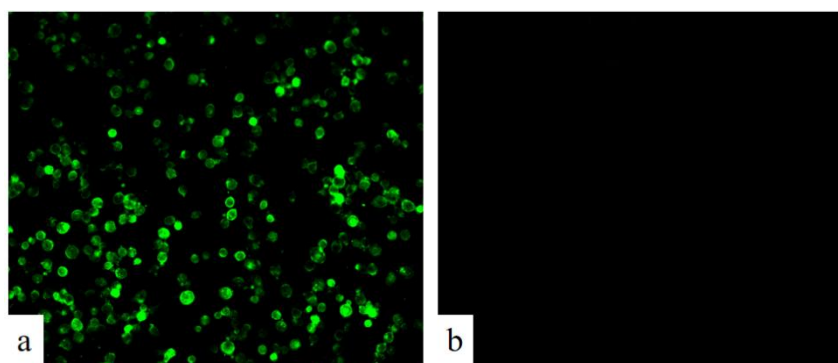


图 3-18 rBv-N 的间接免疫荧光结果（倍数：200×）

Fig. 3-18 Indirect immunofluorescence results of rBv-N (fold: 200×)

注：a. 接种 rBv-N 的孔；b. 阴性对照（正常 SF9）；

3.4.8 Western blot 鉴定重组蛋白

将重组杆状病毒以 MOI=0.1 的接种量接种 High Five 细胞，27°C、170 rpm 摇床恒温培养 4-5 天后收获细胞培养液，同时培养正常细胞作为阴性对照。将细胞培养液离心弃去上清，使用预冷的 PBS 重悬后细胞培后冰水浴中进行超声破碎，SDS-PAGE 对重组蛋白进行 Western blot 鉴定。结果表明，感染了 rBv-N 的细胞沉淀检测到大小

约为 56kDa 的蛋白条带。结果显示重组蛋白和 IBV DS10 鸡多抗血清反应，表明重组蛋白具有良好的抗原性。

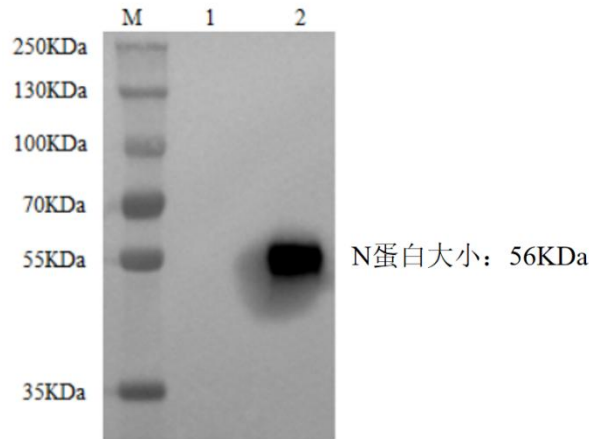


图 3-19 Western Blot 鉴定重组杆状病毒中 N 蛋白的表达

Fig. 3-19 Western blot identification of the expression of N protein in recombinant rod-shaped viruses

注：M. 蛋白 Marker；1. 阴性对照；2.rBv-N；

3.5 N 蛋白单克隆抗体的制备

3.5.1 免疫 BALB/c 小鼠血清效价测定

将三只免疫 BALB/c 小鼠的血清按 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400 稀释，使用建立的 ELISA 检测方法测定血清效价，结果见图 3-20。

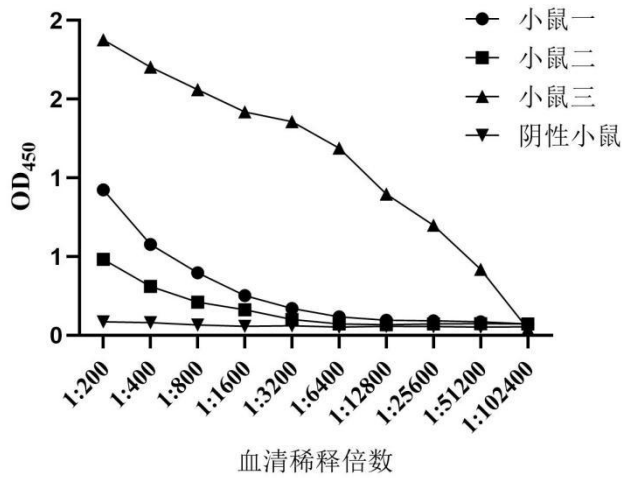


图 3-20 多抗血清效价图

Fig. 3-20 The titer of polyclonal serum

结果显示小鼠一的多抗血清效价为 $1:1.28 \times 10^4$ ，小鼠二的多抗血清效价为 $1:6.4 \times 10^3$ ，小鼠三的多抗血清效价为 $1:1.024 \times 10^5$ 。其中小鼠三的血清效价最高，因此本试验选择该只老鼠进行冲击免疫。

3.5.2 细胞融合

本试验一共铺了 6 块 96 孔细胞板，共计 576 孔。细胞融合后第 5 天观察每块 96 孔板，发现长出融合细胞的孔共有 535 个，融合率为 92.9%。待孔内细胞上清变黄后且用已建立的 ELISA 检测方法进行检测，结果显示阳性孔为 122 个，占融合细胞孔的 22.8%。结果见表 3-10。

表 3-10 细胞融合情况

Tab. 3-10 The results of cell fusion

总孔数	融合细胞孔数	阳性孔数	阴性孔数	融合率	阳性率
576	535	122	497	92.9%	22.8%

3.5.3 杂交瘤细胞阳性孔筛选

使用 ELISA 检测方法筛选出 OD 值最高的 2 个孔，读值分别为 2.635 和 2.928，均高于阴阳临界值 0.3416。同时设置的阴性小鼠血清对照读值为 0.159，说明两个原始孔内存在能与 N 蛋白发生特异性反应的抗体，将这两个初筛为阳性的原始孔一比一转移至 24 孔板进行扩大培养。

表 3-11 板一 ELISA 检测结果

Tab. 3-11 Plate 1 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.257	0.157	0.157	0.177	0.137	0.165	0.203	0.222	0.16	0.26	0.299	1.19
B	0.114	1.496	0.26	0.208	0.162	0.215	0.125	0.237	0.157	0.241	0.184	2.635
C	0.169	0.286	0.373	0.371	0.292	0.27	0.413	0.355	1.095	0.5	0.173	0.247
D	0.156	0.286	0.305	0.226	0.342	0.344	0.293	0.473	0.447	0.296	0.224	0.195
E	0.139	0.588	0.3	0.397	0.359	0.4	0.347	0.367	0.74	0.321	0.981	0.216
F	0.176	0.195	0.358	0.28	0.934	0.368	0.483	0.528	0.286	0.383	0.487	0.261
G	0.269	1.23	0.861	0.312	0.271	0.237	0.189	0.243	0.229	0.266	0.24	0.282
H	0.199	0.242	0.329	0.234	0.384	0.707	0.207	1.69	0.331	0.213	0.236	0.192

注：加粗孔为阳性孔，板一有 32 个阳性孔。

表 3-12 板二 ELISA 检测结果

Tab. 3-12 Plate 2 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.276	0.196	0.455	0.416	0.25	0.214	0.205	0.139	0.16	0.136	0.155	1.095
B	0.212	0.174	0.199	0.186	0.142	0.104	0.237	0.147	0.618	0.426	0.712	0.218
C	0.231	0.228	0.215	0.212	1.379	0.165	0.242	0.271	0.356	0.126	0.257	0.249
D	0.216	0.983	0.304	0.207	0.177	0.49	0.287	0.166	0.186	0.271	0.276	0.204
E	0.275	0.294	0.341	0.45	0.274	0.366	0.159	0.524	0.226	0.283	0.665	0.26
F	0.253	0.255	0.197	0.208	0.185	0.094	0.181	0.165	0.419	0.305	0.218	0.258
G	0.359	0.395	0.274	0.196	0.202	0.735	0.14	0.209	0.194	0.277	0.292	0.362
H	0.242	0.219	0.264	0.13	0.167	1.103	0.153	0.153	1.302	0.339	0.276	0.194

注：加粗孔为阳性孔，板二有 21 个阳性孔。

表 3-13 板三 ELISA 检测结果

Tab. 3-13 Plate 3 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.249	0.125	0.474	0.136	0.172	0.1	0.67	0.113	0.129	0.11	0.417	1.238
B	0.163	0.155	0.237	0.161	1.382	0.208	0.147	0.125	1.061	0.256	0.259	0.923
C	0.169	0.166	0.18	0.195	0.361	0.41	0.097	0.258	0.21	0.893	0.187	0.174
D	0.15	0.144	0.292	0.354	0.633	1.272	0.176	0.394	0.224	0.139	0.768	0.174
E	0.184	0.126	0.176	0.306	0.165	0.694	0.752	0.265	0.215	0.127	0.923	0.186
F	0.224	0.185	0.268	0.19	0.29	0.585	0.182	0.363	0.247	0.208	0.318	0.221
G	0.289	0.314	0.349	0.38	0.39	0.248	0.735	0.313	0.254	0.238	1.22	0.372
H	0.325	0.407	0.847	0.316	0.273	0.277	0.683	0.471	0.325	0.372	0.943	0.308

注：加粗孔为阳性孔，板三有 32 个阳性孔。

表 3-14 板四 ELISA 检测结果

Tab. 3-14 Plate 4 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.225	0.138	0.118	0.829	0.119	0.108	0.193	1.032	0.734	0.112	0.21
B	0.203	0.249	0.405	0.197	0.285	1.096	0.16	0.184	0.171	0.175	0.2
C	0.176	0.854	0.161	0.16	0.203	0.122	0.158	0.135	0.2	0.162	0.169
D	0.205	0.154	0.179	0.708	0.202	0.206	0.173	0.172	0.204	0.73	0.185
E	0.244	0.196	0.195	0.182	0.313	0.184	0.18	0.259	0.336	0.227	0.275
F	0.263	0.224	0.379	0.206	0.456	0.196	0.2	0.218	0.217	0.167	0.255
G	0.696	0.257	0.537	0.314	1.161	0.393	0.285	0.628	0.281	0.797	0.276

注：加粗孔为阳性孔，板四有 16 个阳性孔。

表 3-15 板五 ELISA 检测结果

Tab. 3-15 Plate 5 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.142	0.103	0.109	0.108	0.112	0.383	0.318	0.114	0.735	0.182	0.194	0.115
B	0.183	0.118	0.194	0.145	0.106	0.236	0.142	0.133	0.288	0.206	0.188	0.168
C	0.143	0.12	0.12	0.111	0.108	0.144	0.222	1.084	0.157	0.122	0.117	0.138
D	0.161	0.138	1.674	0.207	0.138	0.785	0.084	0.133	0.13	0.126	0.185	0.141
E	0.135	0.122	0.174	2.586	0.183	0.923	0.109	0.242	0.147	0.131	0.158	0.152
F	0.151	0.126	0.197	0.123	0.139	0.907	0.446	0.125	0.154	0.276	0.16	0.27
G	0.253	0.175	0.182	0.209	0.18	0.165	0.202	0.168	0.329	0.214	0.212	0.279
H	0.197	0.24	0.162	0.132	0.176	0.248	0.206	0.193	0.243	0.25	0.421	0.219

注：加粗孔为阳性孔，板五有 10 个阳性孔。

表 3-16 板六 ELISA 检测结果

Tab. 3-16 Plate 6 ELISA test results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.071	0.081	0.077	0.21	0.285	0.297	0.092	0.766	0.197	0.096	0.075	0.076
B	0.082	0.103	0.507	0.083	0.198	0.251	0.205	0.094	1.716	0.112	0.825	0.083
C	0.082	0.134	0.062	0.261	0.076	0.076	0.063	0.086	0.069	0.117	0.234	0.079
D	0.079	0.076	0.414	0.105	0.21	0.635	0.082	0.07	0.082	0.106	0.071	0.097
E	0.078	0.087	0.066	0.871	0.091	0.088	0.22	0.086	0.085	0.071	0.151	0.091
F	0.078	0.16	0.129	0.11	0.244	0.089	2.928	0.206	0.073	0.64	0.073	0.074
G	0.07	0.103	0.079	0.078	0.435	0.064	1.369	0.128	0.133	0.072	0.119	0.087
H	0.083	0.085	0.076	0.089	0.127	0.074	0.331	0.75	0.094	0.274	0.08	0.073

注：加粗孔为阳性孔，板六有 11 个阳性孔。

3.5.4 杂交瘤细胞株的建立

待 24 孔板上清变黄后用建立的 ELISA 检测方法测得上清 OD 值分别为 1.732 和 1.58。说明上清内均存在针对 N 蛋白的抗体，即在转孔后阳性杂交瘤没有丢失。将该 24 孔内杂交瘤进行亚克隆。本试验通过两轮亚克隆，获得了两株抗 N 蛋白单抗（2A12C5、6B3B2），选择 ELISA 检测结果中数值高的 6B3B2 杂交瘤细胞株通过体内诱生腹水法对其进行大量制备。

3.5.5 单克隆抗体亚型鉴定

采用小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒测定本试验筛到的单克隆细胞株 6B3B2 的亚型，在重链的鉴定孔中 IgG2b 孔的 OD_{450nm} 值最高，在轻链的鉴定孔中 kappa 孔的 OD_{450nm} 值最高，由此得出 6B3B2 单抗属于 IgG2b 重链、κ轻链型。

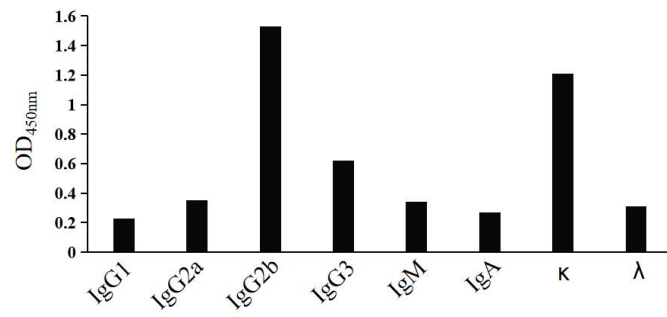


图 3-21 单抗亚类鉴定结果

Fig. 3-21 Identification results of monoclonal antibody subclasses

第四章 讨论

随着我国养禽业的迅速发展, IBV 已在全国广泛流行。目前, 尽管 IB 疫苗已被广泛使用, 但由于 IB 血清型变异复杂, 各地区的血清型与疫苗株无法完全匹配, 导致常用的疫苗无法起到理想的免疫效果, 甚至出现交叉感染的情况^[100-102]。掌握 IBV 的分子生物学特征以及遗传进化规律, 对 IB 的防控至关重要, 为 IB 的防治、免疫程序的制定及疫苗的研发提供科学依据^[102]。

QX 株是我国 1996 年首次分离鉴定的流行 IBV 毒株, 之后其分离率持续上升, 已经成为我国的主要基因型^[103-104]。Yuan 等^[37]2021-2022 年对我国南部地区进行 IB 流行病学调查, 发现此期间分离的 IBV 中 QX 基因型仍然占主要地位。目前, 我国广泛使用的疫苗株以 Mass 株为主, 如 H120、H52 和 M41 等^[105]。然而, 面对 QX 毒株及其变异株的流行, 由于不同血清型间的交叉保护效果有限, Mass 株的免疫保护作用显得不足^[106]。本研究在免疫 H120 疫苗的鸡群中分离到 CK/CH/WJ215 株, 遗传进化分析显示其属于 QX 基因型。说明目前广泛应用的 Mass 型疫苗无法对 QX 型野毒株提供有效的免疫保护。准确掌握本地区 IBV 流行情况及分子生物学特征, 是 IBV 防控的关键。为了解 IBV 的分子生物学特征以及遗传进化规律, 本研究对 CK/CH/WJ215 分离株进行了全基因测序, 结果显示 CK/CH/WJ215 株 IBV 基因组全长 27440bp; 与 40 株参考毒株及疫苗株 S1 序列进行相似性比对发现, 分离株与 QX 型毒株的相似性在 84.6%~94.3%之间, 同属一群。同源重组分析发现 CK/CH/WJ215 分离株存在 3 个重组事件, 为 CK/CH/WJ215 提供重组片段的主要和次要亲本株为 QX 型 YX10 D90 株和 DY07 株, 表明 CK/CH/WJ215 株可能来源于 QX 型不同毒株的多次重组。同时 CK/CH/WJ215 株与 H120、4/91 和 LDT-A 等疫苗株的同源性均较低, 有必要持续进行 IBV 流行病学监测, 进而合理选择疫苗和制定科学免疫程序。CK/CH/WJ215 在 SPF 鸡胚上连续盲传 5 代后, 鸡胚表现为发育受阻, 尿囊膜增厚等侏儒胚的典型症状, 严重的可导致鸡胚死亡, 表明 CK/CH/WJ215 株符合 IBV 感染鸡胚后的致病特征, SPF 鸡致病性试验显示, 7 日龄 SPF 鸡被 CK/CH/WJ215 株感染后, SPF 鸡表现为精神沉郁, 羽毛杂乱, 有气管啰音, 拉白色稀粪等典型的临床症状。死亡鸡肾脏呈现出典型花斑肾, 输尿管、泄殖腔均有大量尿酸盐沉积, 发病率为 100%, 死亡率为 66.7%, 表明 CK/CH/WJ215 株具有较强的致病力, 可用于后续的攻毒保护研究。

N 蛋白作为 IBV 最保守的结构蛋白质之一, 其在病毒粒子中的蛋白含量高, 常被作为 IBV 抗原和抗体检测的靶标^[107]。目前, 已有多个研究报道了基于原核或真核表达重组 N 蛋白、N 蛋白表位多肽检测 IBV 抗体的 ELISA 方法, 显示了不同的反应

性。N 蛋白在鸡群免疫或感染 IBV 时可诱导高水平的特异性抗体，且在激发细胞免疫过程中发挥着重要作用，故检测针对 N 蛋白特异性抗体水平也很重要。检测病毒感染鸡群或免疫鸡群体内针对不同抗原的抗体水平对进一步了解 IBV 的免疫保护机制具有指导作用。

本研究扩增了 CK/CH/WJ215 株的 N 蛋白序列，将其克隆到 PET-32a (+) 原核表达载体中，通过 IPTG 诱导，成功获得重组 N 蛋白。本试验将 N 蛋白作为样品进行 SDS-PAGE 鉴定时发现 N 蛋白在大肠杆菌系统中的表达产物出现两条带且这两条带都能同时与 IBV 阳性血清以及 his 单抗反应，一种片段较大且蛋白表达量较高，另一种片段较小且表达量较低。在杜恩岐^[78]、张淑霞^[108]、王宏俊^[109]的试验中也曾出现相同情况，这也许是目的蛋白的某一部位受电荷影响过大导致蛋白内部断裂造成的，也有可能是目的蛋白在表达的过程中基因编码错误导致出现两条带^[107,109]。将纯化的重组 N 蛋白作为包被抗原，建立 IBV 抗体检测 ELISA 方法。通过对 ELISA 检测抗体条件的优化，最终确定最佳的包被抗原量为每孔 0.1 μg ，最佳一抗血清稀释度为 1:200，最佳二抗 HRP 稀释度为 1:20000，最佳一抗孵育时间为 1 h，最佳封闭时间为 3 h。该方法具有很好的特异性，能够与 IBV 不同基因型血清抗体反应，同时不与其他病毒抗原 AIV、NDV、IBDV 和 FAdV 的阳性血清反应。

本试验使用真核表达技术实现了 N 蛋白的真核表达，将 N 的真核表达蛋白作为免疫原对小鼠进行加强免疫，进行 IBV N 蛋白单克隆抗体制备，增加了筛选到能分泌 N 蛋白特异性抗体的杂交瘤的可能性。细胞融合过程是制备单克隆过程中最重要的一步。为了获得更多融合成功的杂交瘤细胞，本试验滴加 PEG 后选择孵育 60s，增加了细胞融合的成功率，但同时也出现了三个细胞甚至更多细胞融合为一个细胞的错误融合。可考虑减少 PEG 孵育的时间，摸索最适合杂交瘤生成的条件从而增加单克隆制备的成功率。免疫程序以及融合步骤对获得融合成功的单克隆抗体也十分重要，在研制单抗前应做好充足准备与时间安排，在小鼠抗体水平最佳的时候进行细胞融合，这能够大大增加筛到我们想要的针对目的蛋白的单克隆抗体。本研究最终筛选获得一株 IBV N 蛋白抗体 6B3B2，与 IBV 具有较好的反应性。

第五章 结论

1.分离到一株 QX 型 IBV 毒株 CK/CH/WJ215, 该毒株对 SPF 雏鸡具有较强的致病性, 可导致 100%雏鸡发病, 66.7%雏鸡死亡, 可作为疫苗开发的攻毒模型。

2.利用 IBV N 重组蛋白建立了高效特异的 ELISA 检测方法, 以真核表达重组 N 蛋白作为免疫原制备了 1 株具有很好的反应性的 IBV N 蛋白单克隆抗体。

参考文献

- [1] ZHANG X, DENG T, LU J, et al. Molecular characterization of variant infectious bronchitis virus in China, 2019: implications for control programmes[J]. Transboundary and emerging diseases, 2020, 67 (3) : 1349-1355.
- [2] ZHANG X, GUO M, ZHAO J, et al. Avian infectious bronchitis in China: epidemiology, vaccination, and control[J]. Avian diseases, 2021, 65 (4) : 652-656.
- [3] LI N, HUANG C, CHEN W, et al. Nephropathogenic infectious bronchitis virus mediates kidney injury in chickens via the TLR7/NF-kappaB signaling axis[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2022, 12:865283.
- [4] YAN K, WANG X, LIU Z, et al. QX-type infectious bronchitis virus infection in roosters can seriously injure the reproductive system and cause sex hormone secretion disorder[J]. Virulence, 2023, 14(1):2185380.
- [5] ZHAO J, ZHAO Y, ZHANG G. Key aspects of coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Pathogens, 2023, 12 (5) : 698.
- [6] Acevedo A M, Arce H, Brandão P E, et al. First evidence of the emergence of novel putative infectious bronchitis virus genotypes in Cuba[J]. Res Vet Sci, 2012, 93:1046~1049.
- [7] WU Z, FANG H, XU Z, et al. Molecular characterization analysis of prevalent infectious bronchitis virus and pathogenicity assessment of recombination strain in China[J]. Frontiers in veterinary science, 2022, 9:842179.
- [8] JANG I, THAI T, LEE J, et al. Nationwide surveillance for infectious bronchitis virus in South Korea from 2020 to 2021[J]. Avian disease, 2022, 66 (2) : 135-140.
- [9] PROMKUNTOD N, EIJDHOVEN R, VRIEZE G, et al. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Virology, 2014, 448:26-32.
- [10] 张宁. 鸡传染性支气管炎病毒不同血清型交互免疫试验研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [11] Thor SW, Hilt DA, Kissinger JC, et al. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. Viruses[J]. 2011, 3(9): 1777-1799.
- [12] Montassier M, Brentano L, Montassier H J, et al. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene[J]. Pesqui Vete Brasil, 2008, 28(3):190~194.
- [13] 苗立中, 郭杨丽, 祖立闯, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 SYBR Green I Real-time RT-PCR 检测方法的

- 建立及应用[J].黑龙江畜牧兽医,2017,3:171~174.
- [14] 屈素洁,施开创,邹联斌,等.新城疫病毒和传染性支气管炎病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2014,36(11):867~871.
- [15] Raj G D, Jones R C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken[J]. Avian Pathology, 1997, 26(4):677-706.
- [16] Feng J, Hu Y, Ma Z, Yu Q, et al. Virulent avian infectious bronchitis virus, People's Republic of China[J]. Emerg. Infect, 2012, 18(6):1994-2001.
- [17] Chhabra R, Chantrey J, Ganapathy K. Immune responses to virulent and vaccine strains of infectious bronchitis viruses in chickens[J]. Viral Immunology, 2015, 28(9):478-488.
- [18] Raj G D, Jones R C. An in vitro comparison of the virulence of seven strains of infectious bronchitis virus using tracheal and oviduct organ cultures[J]. Avian Pathology Journal of the W.v.p.a, 1996, 25(4):649-662.
- [19] Zhong Q, Hu Y X, Jin J H, et al. Pathogenicity of virulent infectious bronchitis virus isolate YN on hen ovary and oviduct[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 193:100-105.
- [20] Benyeda Z. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions[J]. Avian Pathology, 2009, 38(6):449-456.
- [21] Schalk A F, Hawn M C. An apparently new respiratory disease of baby chicks[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1931, 78:413-422.
- [22] Mark, W, Jackwood. Review of infectious bronchitis virus around the world[J]. Avian Diseases, 2012, 56(1):634-641.
- [23] Zhao Y, Cheng J L, Liu X Y, et al. Safety and efficacy of an attenuated Chinese QX-like infectious bronchitis virus strain as a candidate vaccine[J]. Veterinary Microbiology, 2015(7):49-58.
- [24] Zhang, Guo-zhong, Zhao, et al. Evolution of infectious bronchitis virus in China over the past two decades[J]. Journal of General Virology A Federation of European Microbiological Societies Journal, 2016, 97(3):1566-1574.
- [25] Hu J Q, Li Y F, Guo J Q, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to (poly100)S1 protein of avian infectious bronchitis virus[J]. Zoonoses Public Health, 2007, 54(2):69~77.
- [26] De Wit J J, Cook J K A, van der Heijden, Harold M. J. F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures[J]. Avian Pathology Journal of the W.v.p.a, 2011, 40(3):223-235.
- [27] Thor S W, Hilt D A, Kissinger J C, et al. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus[J]. Viruses, 2011, 3(9):1777-1799.
- [28] Han Z, Sun C, Yan B, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious

- bronchitis coronavirus in China[J].*Infect Genet Evol*, 2011, 11:190~200.
- [29] 陈良珂,封柯宇,李鸿鑫等.2013~2017 年鸡传染性支气管炎病毒分子流行病学分析[J].*中国家禽*, 2018, 40(15):16-20.
- [30] 苗立中.鸡传染性支气管炎病毒山东株分离鉴定及其灭活疫苗制备与评价[D].山东:吉林大学,2018.
- [31] 李彬,韩晓青,刘红祥,等.2019—2021 年我国 29 个省级行政区鸡传染性支气管炎流行病学调查[J].*中国动物检疫*, 2022, (04):19-25.
- [32] 赵佳.2018~2021 年我国部分地区鸡传染性支气管炎病毒分子流行病学调查及其抗体检测 ELISA 方法的建立与应用[D].江苏:扬州大学, 2022.
- [33] Kusters J G, Niesters H G, Lenstra J A, et al. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV[J].*Virology*, 1989, 169(1):217~221.
- [34] Jackwood, M. and de Wit. Infectious bronchitis virus[J]. *Diseases of Poultry*, 2020, 14:167 – 188.
- [35] Cavanagh D. Structural Polypeptides of Coronavirus IBV[J]. *J Gen Viro*, 1981, 53(1):93~103.
- [36] Otsuki K., Yamamoto H. & Tsubokura M. - Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV). I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments[J]. *Arch. Virol*, 1979, 60(1):25-32.
- [37] YUAN W, LV T, JIANG W, et al. Antigenic characterization of infectious bronchitis virus in the South China during 2021-2022[J]. *Viruses*, 2023, 15(6):1273.
- [38] Wit J J, Jane K A, Harold M J F. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures[J]. *Avian Patho*, 2011, 40(3):223~235.
- [39] Jordan F.T.W. & Nassar T.J. - The survival of infectious bronchitis (IB) virus in an iodophor disinfectant and the influence of certain components [J]. *appl. Bacteriol*, 1973, 36(32):335-341.
- [40] 胡岚,陈佳静,李广兴.鸡传染性支气管炎实验室诊断方法的研究进展[J].*黑龙江畜牧兽医*, 2017(5):80~83.
- [41] 姜逸, 周生, 唐梦君, 等.鸡传染性支气管炎病毒在鸡肾上皮细胞中培养条件的优化研究[J].*中国家禽*, 2016, 38(10):16~20.
- [42] Najafi H, Langeroudi A G, Hashemzadeh M, et al. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015[J]. *Arch Virol*, 2016, 161:53~62.
- [43] 夏立业.鸡传染性支气管炎诊断方法的研究进展[J].*家禽科学*, 2023, 45(08):70-73.
- [44] 郑晓红.鸡传染性支气管炎的诊断与防治[J].*养殖与饲料*, 2022, 21(04):116-118.
- [45] 布畔畔.鸡传染性支气管炎的诊断方法与防控建议[J].*当代畜牧*, 2022, (03):85-86.
- [46] 王文彬,伏春燕,阎佩佩等.鸡传染性喉气管炎实验室诊断与序列分析[J].*家禽科学*, 2022, (01):6-11.
- [47] 蔡俊呈,任涛,陈礼斌等.鸡传染性支气管炎病毒研究进展[J].*广东畜牧兽医科*

技,2021,46(03):6-12.

- [48] 宋运福.鸡传染性支气管炎诊断及综合防治[J].畜牧兽医科学(电子版),2021,(05):75-76.
- [49] WU Q, LIN Z, QIAN K, et al. Peptides with 16R in S2 protein showed broad reactions with sera against different types of infectious bronchitis viruses[J]. Veterinary microbiology, 2019, 236:108391.
- [50] QIN Y, TU K, TENG Q, et al. Identification of novel T-cell epitopes on infectious bronchitis virus N protein and development of a multi-epitope vaccine[J]. Journal of virology, 2021, 95(17):e0066721.
- [51] BOUWMAN K, HABRAEKEN N, LACONI A, et al. Nglycosylation of infectious bronchitis virus M41 spike determines receptor specificity[J]. The journal of general virology, 2020, 101(6):599-608.
- [52] Liu X L, Su J L, Zhao J X, et al. Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus(IBV)strain in China[J].Virus Genes, 2009, 38(1):56~65.
- [53] Cottam E M, Maier H J, Manifava M, et al. Coronavirus nsp6 protein generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate[J].Autophagy, 2011, 7(11):1335~1347.
- [54] Lai M M, Cavanagh D.The molecular biology of coronaviruses[J].Adv Virus Res, 1997, 48(48):1~100.
- [55] WANG C, LUO Z, SHAO G, et al. Genetic and pathogenic characteristics of a novel infectious bronchitis virus strain in genogroup VI(CK/CH/FJ/202005)[J]. Veterinary microbiology, 2022, 266:109352.
- [56] 刘祥,刘金华,樊玉磊,等.鸡传染性支气管炎病毒分子生物学研究进展[J].动物医学进展,2004(5):1~4.
- [57] Hogue B, Machamer C.Coronavirus structural proteins and virus assembly[J].Nidoviruses, 2008, 13:179~200.
- [58] Mockett A P, Cavanagh D, Brown T D.Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41[J].J Gen Virol, 1984, 65(12):2281~2286.
- [59] Koch G, Hartog L, Kant A, et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus:correlation with biological functions[J].J Gen Virol, 1990, 71:1929~1935.
- [60] Belouzard S, Millet J K, Licitra B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein[J].Viruses, 2012, 4(6):1011~1033.
- [61] Casais R, Dove B, Cavanagh D, et al. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism[J].J

- Viol, 2003, 77:9084~9089.
- [62] Nie L, Zhang Q X, Han Z X, et al. Genetic variations of membrane gene of infectious bronchitis virus strains isolated in China between 1995 and 2004[J].Bing Du Xue Bao, 2007, 23(4):298~304.
- [63] Xing J, Liu S, Han Z, et al. Identification of a novel linear B-cell epitope in the M protein of avian infectious bronchitis coronaviruses[J].J Microbiol, 2009, 47(5):589~599.
- [64] Yu D, Han Z, Xu J, et al. A novel B-cell epitope of avian infectious bronchitis virus N protein[J].Viral Immunol, 2010, 23(2):189~199.
- [65] Zhou M, Williams A K, Chung S I, et al. The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome[J].Virology, 1996, 217(1):191~199.
- [66] Collisson E W, Pei J, Dzielawa J, et al. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry[J].Dev Comp Immunol, 2000, 24(3):187~200.
- [67] Liu D X, Inglis S C. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope [J]. Virology, 1991, 185(2): 911
- [68] Corse E, Machamer C E. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction[J].Virology, 2003, 312(1):25~34.
- [69] Wilson L, Gage P, Ewart G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication[J].Virology, 2006, 353(2):294~306.
- [70] 冯利霞,程亚辉,周威,等.鸡传染性支气管炎实验室诊断方法研究进展[J].河南畜牧兽医:综合版,2011,32(6):7~11.
- [71] Wit J J. Detection of infectious bronchitis virus[J].Avian Pathol, 2000, 29(2):71~93.
- [72] 秦卓明,赵继勋,陆友龙,等.用气管环交叉中和试验鉴定 IBV 山东分离株的血清型[J].畜牧与兽医,2000,3:8~10.
- [73] 窦文茂.检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的 HI 试验与 ELISA 相关性比较[D].江苏:扬州大学,2008.
- [74] 李新生,焦显芹,高文明,等.蛋鸡抗 IBV HI 抗体效价与攻毒后产蛋性能的相关性[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(1):26~30.
- [75] Mockett A P A, Darbyshire J H. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for antibodies to avian infectious bronchitis virus [J]. Avian Pathology Journal of the Wvpa, 1981, 10(1): 1-10
- [76] 亓丽红,黄兵,吴家强,等.鸡传染性支气管炎病毒 N 蛋白的表达及 ELISA 诊断试剂盒的研制与应用[J].浙江农业科学,2018,59(5):866~870.
- [77] 苗立中,祖立闯,王艳,等.鸡传染性支气管炎病毒 S1 蛋白截短表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用[J].中国兽医学报,2017,37(3):426~432.
- [78] 杜恩岐,刘胜旺,孔宪刚,等.鸡传染性支气管炎病毒核蛋白基因在大肠杆菌中的表达及抗原性

- 初步研究[J].病毒学报,2003,4:342~347.
- [79] 封文海, 陈德威. 应用间接酶联免疫吸附试验检测鸡传染性支气管炎抗体的研究 [J]. 中国兽医杂志, 1992, (10): 3-5
- [80] 王红宁, 吴全忠, 黄勇等. 鸡传染性支气管炎病原分离及防治研究 [J]. 中国预防兽医学报, 1996,(5): 1-6
- [81] Wit J J D, Koch G, Kant A, et al. Detection by immunofluorescent assay of serotype specific and group specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems [J]. Avian Pathology, 1995, 24(3): 65-74
- [82] Yagyu K, Ohta S. Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody [J]. Avian diseases, 1990, 34(2): 246
- [83] 刘思国,尹训南,李广兴,等.间接免疫荧光抗体法对鸡传染性支气管炎病毒进行抗原定位[J].中国预防兽医学报,2000,1:82~85.
- [84] 苏磊.鸡传染性支气管炎免疫胶体金诊断试纸研究[D].四川: 西南大学,2008.
- [85] 郑卫峰.IBV 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及免疫胶体金试纸条的研制[D].山西: 山西农业大学,2016.
- [86] Kwon H M, Jackwood M W, Jr G J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis [J]. Avian diseases, 1993, 37(1): 194-202
- [87] Mardani K, Noormohammadi A H, Ignatovic J, et al. Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3'7.5 kb of their genomes[J]. Avian Pathol, 2006, 35(1):63~69.
- [88] 鲜思美,杨钰,汪德生,等.RT-LAMP 检测鸡传染性支气管炎病毒方法的建立及应用[J].中国兽医杂志,2014,50(8):26~29.
- [89] 刘宇卓,韩凯凯,李银,等.鸡传染性支气管炎病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2013,29(4):818~821.
- [90] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature, 1975, 256:495~497.
- [91] Bleumink-Pluym N M C, Osterhaus A D M E, Horzinek M C, et al. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies [J]. Virology, 1987, 161(2): 511
- [92] Ignjatovic J, Mcwaters P G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains [J].

Journal of General Virology, 1991, 72 (Pt 12)(76): 2915

- [93] 朱建国, 焦新安. 抗传染性以气管炎病毒单克隆抗体的研究 [J]. 中国兽医杂志, 1996, (4): 3-6
- [94] 万洪全, 许益民, 王永坤,等. 鸡传染性支气管炎病毒单克隆抗体的研制与鉴定 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 1997, 18(2):7-53
- [95] 杨仕标, 常志顺, 许琳,等. 禽传染性支气管炎病毒单克隆抗体的研究 [J]. 云南畜牧兽医, 1998, (3): 7-9
- [96] 邢俊吉. 鸡传染性支气管炎病毒 M 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定 [D].北京: 中国农业科学院, 2009
- [97] 李敏. 鸡传染性支气管炎病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备及其鉴定 [D].四川:四川农业大学, 2011.
- [98] 王富妍, 任雅, 邹年莉,等. 鸡传染性支气管炎病毒 M 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 26(1): 6-1463
- [99] HOU Y, ZHANG L, REN M, et al. A highly pathogenic GI-19lineage infectious bronchitis virus originated from multiple re-combination events with broad tissue tropism[J]. Virus research, 2020, 285:1980.
- [100] ZHANG Y, XU Z, CAO Y. Host antiviral responses against avian infectious bronchitis virus(IBV):focus on innate immunity[J]. Viruses, 2021, 13(9):1698.
- [101] Hoffmann B, Beer M, Reid S M, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health [J]. Veterinary microbiology, 2009, 139(1): 1-23
- [102] Huang Y P, Wang C H. Sequence changes of infectious bronchitis virus isolates in the 3' 7.3 kb of the genome after attenuating passage in embryonated eggs [J]. Avian Pathology, 2007, 36(1): 59-67.
- [103] Frederic J. Hoerr .The Pathology of Infectious Bronchitis[J].Avian Diseases, 2021, 65(4):600-611.
- [104] Bande F, Arshad S S, Omar R A, et al.Global distributions and strain diversity of aviainfectious bronchitis virus:a review[J].Anim Health Res Rev, 2017, 18(1):70~83.
- [105] Wit J J, Hoogkamer A, Sande H, et al.Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388(genotype QX)by maternally derived antibodies and by early vaccination[J].Avian Pathol, 2011, 40:463~471.
- [106] Worthington K J, Currie R J W and Jones R C.A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006[J].Avian Pathol, 2008, 37:247~257.
- [107] BOUWMAN K, HABRAEKEN N, LACONI A, et al. Nglycosylation of infectious bronchitis virus M41 spike deter-mines receptor specificity[J]. The journal of general virology, 2020,

101(6):599-608.

- [108] 张淑霞, 贺秀媛, 崔保安等. 鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株 N 基因在大肠杆菌中的表达及产物免疫活性检测 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(4): 6-32
- [109] 王宏俊, 陈福勇. 利用 IBV 重组 N 蛋白建立 ELISA 抗体检测试剂盒的研究 [J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(9): 3-6

附录 A

本试验中部分试剂为自己配置，配方如下：

(1) LB 培养基：取胰蛋白胨(Trypton)5g、酵母提取物(Yeast Extraction)2.5g、氯化钠(NaCl)5g，加去离子水溶解使其终体积为 500mL，高压灭菌后即为液体培养基，配方中按 1.5% (W/V) 加入琼脂粉，高压灭菌后即为固体培养基。

(2) 50×TAE：称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)242g， $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2g，置于烧杯中。向烧杯中加入约 940mL 去离子水中，用醋酸调 pH 至 8.5（加入 57.1mL 的醋酸），滴加离子水使其终体积为 1L。

(3) 1%琼脂糖凝胶：称取 Agarous 0.6g，溶于 60mL 1×TAE 溶液，放置于微波炉，加热待其充分溶解后，加 6μL 核酸染料缓慢摇晃混合，稍加冷却在凝固前倒入安装好的模具中。

(4) PBS Buffer(PH7.4, 0.01mol/L)：取 Na_2HPO_4 1.42g，氯化钾(KCl)0.2g，氯化钠(NaCl)8g， KH_2PO_4 0.27g，加入约 950mL 的去离子水溶解，调节 pH 到 7.4，加入去离子水至其体积为 1L，常温下保存。

(5) 氨苄青霉素(Ampicillin)母液：称取 5 g 溶于 50 mL 灭菌水，配制成 100 mg/mL，0.22 μm 滤器过滤除菌分装，-20℃保存。

(6) 庆大霉素(Gentamicin)母液、四环素(Tetracycline)母液、卡那霉素(Kanamycin)母液：分别称取 0.5 g 溶于 50 mL 灭菌水，配制成 10 mg/mL，0.22 μm 滤器过滤除菌分装，-20℃保存。

(7) X-Gal 贮存液：称取 1g 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D 半乳糖苷(X-Gal)溶于 50 mL 的 DMSO，0.22 μm 滤器过滤除菌分装，-20℃避光保存。

(8) IPTG 贮存液：称取 1g 异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)溶于 50 mL 灭菌水，0.22 μm 滤器过滤除菌分装，-20℃避光保存。

(9) 5×Tris-Glycine Buffer (SDS-PAGE 电泳缓冲液)：称量 Tris15.1g，Glycine94g，SDS5.0g，加入约 800mL 去离子水，搅拌溶解后补加去离子水定容至 1L。

(10) 膜转移缓冲液 (Western 杂交用)：称量 Glycine2.9g，SDS0.37g，Tris5.8g 于广口瓶中，向广口瓶中加入约 600mL 的去离子水，充分搅拌溶解后加入 200mL 的甲醇。

(11) 考马斯亮蓝脱色液：用相应量程的量筒量取醋酸 100mL，乙醇 50mL， ddH_2O 850mL，倒入 1L 容积的干净广口瓶中充分混匀后使用。

(12) 纯化裂解液 (Lysis Buffer)：需要 50M NaH_2PO_4 、300 mM NaCl 和 10 mM imidazole。配制 1L 溶液需加入 7.8g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、17.54 g 的 NaCl 和 0.68 g 的 Imidazole，NaOH 调 pH 至 8.0，用 0.45 μm 滤器过滤除菌；

(13) 纯化洗涤液 (Wash Buffer): 需要 50 mM NaH_2PO_4 、300 mM NaCl 和 20 mM imidazole。配制 1L 溶液需加入 7.8 g 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、17.54 g 的 NaCl 和 1.36 g 的 Imidazole。NaOH 调 pH 至 8.0, 用 0.45 μm 滤器过滤除菌;

(14) 纯化洗脱液 (Elution Buffer): 需要 50 mM 的 NaH_2PO_4 、300 mM NaCl 和 250 mM imidazole。配制 1L 溶液需加入 7.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、17.54 g 的 NaCl 和 17.0 g 的 Imidazole。NaOH 调 pH 至 8.0, 使用 0.45 μm 滤器过滤除菌;

(15) IPTG 贮存液: 称量 IPTG 粉末 2.4g, 加去离子水使其终体积为 10mL, 并用 0.22 μm 滤器将该溶液过滤, 过滤后分装到 1.5 mL EP 管中, 放置于-20°C储存。

(16) 5%脱脂乳封闭液: 称取 2.5 g 脱脂奶粉溶于 50 mL PBST Buffer, 充分搅拌溶解, 配制成 5%脱脂乳, 现用现配。

附录 B

英文缩写	英文全称	中文全称
Abbreviation	English full name	Chinese full name
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
IB	Infectious bronchitis	传染性支气管炎
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核苷酸
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物
HT	hypoxantin-thymidin	次黄嘌呤-胸腺嘧啶
SPF	Specified pathogen free	无特定病原体
ELISA	Enzyme linked immun sorbent assay	酶联免疫吸附试验
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
IFA	Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
TAE	Tris-acetate EDTA	电缓冲液
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
IPTG	Isopropylthio-beta-galactoside	异丙基硫代-β-半乳糖
PBS	Phosphate-buffered sodium	磷酸盐缓冲液
LB	Luria-Bertani medium	营养肉汤培养基
μL	Microliter	微升
CO ₂	Carbon dioxide	二氧化碳

附录 C

毒株名称	GenBank 登录号	基因型	分离年份	分离国家	来源动物
SZ	KY421672	GI-19	2012	中国	鸡
DY07	GQ265927	GI-19	2007	中国	鸡
CK/CH/HN/NX17-8	MF447709	GI-19	2017	中国	鸡
QXIBV	AF193423	GI-19	1999	中国	鸡
SD	KY421673	GI-19	2013	中国	鸡
BJ	AY319651	GI-19	未知	中国	鸡
LDT3	AY702975	GI-22	2004	中国	鸭
YN	JF893452	GI-22	2005	中国	鸡
SAIBK	DQ288927	GI-22	未知	中国	鸡
TW2575/98	DQ646405	GI-7	2008	中国	鸡
IZO 28/86	KJ941019	GI-16	1986	意大利	鸡
V13	KF757447	GI-24	1998	印度	鸡
Beaudette	AJ311317	GI-1	1937	美国	鸡
M41	GQ219712	GI-1	1941	美国	鸡
Ma5	AY561713	GI-1	2004	美国	鸡
H120	M21970	GI-1	1960	荷兰	鸡
28/86	AY846750	GI-1	2004	中国	鸡
L165	JQ964061	GI-8	1965	美国	鸡
Gray	GU393334	GI-3	1960	美国	鸡
Holte	GU393336	GI-2	1954	美国	鸡
Qu_mv	AF349621	GI-20	1996	加拿大	鸡
Holte	L18988	GI-4	1962	美国	鸡
Georgia 08	GU301925	GI-27	2009	美国	鸡
CA/Machado/88	AF419315	GI-17	1988	美国	鸡
B4	FJ807932	GI-15	1986	韩国	鸡
N1/62	U29522	GI-5	1962	澳大利亚	鸡
T	AY775779	GI-5	2004	澳大利亚	鸡
Vic S	U29519	GI-6	1962	澳大利亚	鸡
B	AF151954	GI-10	1970s	新西兰	鸡
UFMG/G	JX182775	GI-11	1975	巴西	鸡

毒株名称	GenBank 登录号	基因型	分离年份	分离国家	来源动物
NGA/B401/2006	FN182243	GI-26	2006	尼日利亚	鸡
UK/7/93	Z83979	GI-13	1997	英国	鸡
4/91	GN192154	GI-13	2013	中国	鸡
TA03	AY837465	GI-13	2004	中国	鸡
N4/02	DQ059618	GI-1	2005	澳大利亚	鸡
N1/88	U29450	GI-1	1988	澳大利亚	鸡
TC07-2	GQ265948	GI-1	2007	中国	鸡
D1466	M21971	GI-1	1979	荷兰	鸡
Georgia 1998	GQ504723	GI-1	1998	美国	鸡
QXL87	MH743141	GI-19	2012	中国	鸡
LX4	AY189157	GI-19	2002	中国	鸡