

动物及兽医生物技术

传染性法氏囊病病毒 VP4 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

柳亚楠, 李夏莹, 李忠华, 王永强, 李晓齐, 曹红, 郑世军

中国农业大学动物医学院 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

柳亚楠, 李夏莹, 李忠华, 等. 传染性法氏囊病病毒 VP4 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1660-1668.

Liu YN, Li XY, Li ZH, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP4. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1660-1668.

摘要: 传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 蛋白 VP4 在抑制宿主免疫应答中起重要作用, 为制备 IBDV VP4 的单克隆抗体, 以实验室保存的融合蛋白 His-VP4 免疫 BALB/c 小鼠, 经过细胞融合、筛选、亚克隆后获得 4 株能稳定分泌抗 VP4 的单抗杂交瘤细胞株, 分别命名为 3B3、3H11、4C8 和 4G6, 经间接 ELISA 测定 4 株单抗的亲合力解离常数分别为 4.61×10^{-11} 、 1.71×10^{-10} 、 4.26×10^{-11} 和 5.02×10^{-11} , 均为高亲和力抗体。4 株单抗的重链类型分别为 IgG1、IgG1、IgG2b 和 IgG1。进一步以 Western blotting 鉴定, 该 4 株单抗均能特异地识别 IBDV 的 VP4 蛋白, 间接免疫荧光和 Western blotting 试验表明 4 株单抗均能识别 IBDV 感染 DF-1 细胞后产生的 VP4 蛋白。该单抗为检测 IBDV 以及研究 IBDV VP4 的生物学作用奠定了基础。

关键词: 传染性法氏囊病病毒, VP4 蛋白, 原核表达, 单克隆抗体

Preparation and identification of monoclonal antibodies against Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) VP4

Ya'nan Liu, Xiaying Li, Zhonghua Li, Yongqiang Wang, Xiaoqi Li, Hong Cao, and Shijun J. Zheng

State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Infectious bursal disease virus (IBDV) VP4 plays an important role in immunosuppression of host. In order to

Received: February 24, 2014; **Accepted:** May 12, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31272543), Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. NYCYT-X-41).

Corresponding author: Shijun J. Zheng. Tel/Fax: +86-10-62734861; E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31272543), 现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. NYCYT-X-41) 资助。

网络出版时间: 2014-05-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140106.html>

develop monoclonal antibodies (McAbs) against VP4, we vaccinated BALB/c mice with His-VP4, screened and subcloned positive clones. We established 4 hybridoma cell lines that stably secreted McAbs against VP4 and named these cell lines 3B3, 3H11, 4C8 and 4G6, respectively. We tested the dissociation constant (K_d) of these McAbs, and found that their K_d s were 4.61×10^{-11} , 1.71×10^{-10} , 4.26×10^{-11} , 5.02×10^{-11} , respectively. The isotypes of these McAbs were determined to be IgG1, IgG1, IgG2b and IgG1. These McAbs specifically bound to VP4 in IBDV infected DF-1 cells as demonstrated by Western blotting analysis and fluorescence antibody assay. These McAbs would help to detect IBDV infection and to analyze the biological activities of IBDV VP4.

Keywords: Infectious Bursal Disease Virus, VP4, prokaryotic expression, monoclonal antibody

传染性法氏囊病 (IBD), 最早报道于 1962 年^[1], 又称为“甘保罗病”, 是一种危害雏鸡的急性高度传染性的病毒病, 在全球范围内广泛发生^[2]。1979 年, 我国于北京上海等地发现此病, 并于上世纪 90 年代流行超强毒株^[3]。其病原体为传染性法氏囊病病毒 (IBDV), 能够损伤靶细胞 (B 淋巴细胞前体), 从而引起患病鸡严重的免疫抑制, 进而增加对其他病原的易感性^[4]。

IBDV 属于双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属, 具有单层衣壳, 为正 20 面体结构^[5], 直径为 55–65 nm^[6], 电镜下病毒粒子呈晶格状分布于细胞浆中^[7]。病毒基因组由 2 个片段 (A 和 B) 的双股 RNA 组成, 无囊膜^[8]。B 片段编码 VP1, 是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶^[9-10]; A 片段由 2 个部分重叠的开放阅读框组成^[11]。第 1 个开放阅读框编码病毒的非结构蛋白 VP5, 第 2 个编码 110 kDa 的 pVP2-VP4-VP3 前体, 后被 VP4 蛋白水解为病毒蛋白 VP2、VP3 和 VP4^[12-15]。VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白, 分别占病毒粒子的 51% 和 40%^[16]。

VP4 是病毒的蛋白酶, 能够水解多聚蛋白 pVP2-VP4-VP3 前体为 pVP2、VP4 和 VP3。VP4 还可以促进病毒蛋白的成熟, 在病毒组装过程中不断修饰 VP2 蛋白的 C 端, 使其成为成熟的衣壳蛋白^[17]。VP4 还可发生自组装, 形成直径

为 25 nm 的管状结构^[18], 大肠杆菌表达的 VP4 蛋白也可发生自组装发挥同样的生物学功能^[19]。同时, VP4 蛋白能够激活 VP1 蛋白合成^[20]。最新研究表明 VP4 蛋白可以抑制 I 型干扰素的表达和 NF- κ B 的活化, 在 IBDV 引起的免疫抑制中发挥着重要作用^[21], 其 652 位的丝氨酸和 692 位的赖氨酸是其发挥蛋白酶活性和引起免疫抑制的关键氨基酸位点^[22]。本研究成功表达 VP4 重组蛋白并制备出针对它的单克隆抗体, 为进一步研究 VP4 蛋白致病的分子机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、病毒、细胞与实验动物

传染性法氏囊病病毒 (IBDV) Lx 毒株由北京市农林科学院刘爵研究员惠赠。SP2/0 细胞、DF-1 细胞、DH5 α 、BL21、质粒 pGEX-6P-1; IBDV His-VP4、CAV His-VP2、ALV His-GP85、REV His-GP90 蛋白、IBDV 阳性血清均由中国农业大学免疫生物学研究室保存。标准鸡 SPF 血清 (IBDV 阴性血清) 购自于格林思宝公司。6–8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购于中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 仪器及主要试剂

HAT、HT、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐

剂和 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 均购自 Sigma 公司。胎牛血清购自 HyClone 公司。DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司。PEG 4000 购自 Merck 公司。HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, HRP 标记马抗山羊 IgG, FITC 标记兔抗小鼠 IgG 购自北京鼎国昌盛生物技术公司。限制性内切酶购自 NEB 公司。LA *Taq* 酶和 DNA 快速连接试剂盒购自 TaKaRa 公司。dNTPs 购自 CNS 公司。胶回收试剂盒购自 ZYMO RESEARCH 公司。高纯度质粒小量快速提取试剂盒购自北京艾德莱公司。离心机购自 Sigma 公司。96 孔板酶标仪购自 TECAN 公司。

1.3 *vp4* 基因克隆与重组表达载体 pGEX-6P-1-*vp4* 的构建

根据 IBDV Lx 株 *vp4* 基因序列和载体 pGEX-6P-1 多克隆位点设计引物

(P1: 5'-GGAATTCATGGCCGACAAGGGG TACGAGGTAG-3', P2: 5'-CCGCTCGAGCTAA GCCATGGCAAGGTGGTACT-3'), 其中下划线部分分别为 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点。引物由上海生工生物技术公司合成。根据上述特异性引物扩增 *vp4* 基因, PCR 产物和载体经双酶切回收后进行连接, 将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞中, 经菌落 PCR 和酶切鉴定选择阳性单克隆进行测序, 选择测序未突变且读码框正确的重组原核表达载体 pGEX-6P-1-*vp4*。

1.4 融合蛋白 GST-VP4 的表达、可溶性分析及纯化

将重组载体 pGEX-6P-1-*vp4* 和空载体 pGEX-6P-1 分别转入到 BL21 表达菌中, 挑取单菌落加入到 5 mL 含有氨苄青霉素的液体 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜, 取其中 1 mL 菌液

接入 50 mL 含有氨苄青霉素的液体 LB 培养液中, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导 5 h, 离心收集菌体。菌体经超声裂解后 12 000 r/min 离心 20 min, 收取上清。上清进行亲和层析纯化, 得到重组蛋白 GST-VP4。

1.5 小鼠免疫

以本实验室保存的 His-VP4 蛋白作为抗原, 免疫 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫, 抗原与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化, 颈背部皮下多点注射, 50 μ g/只。首免 3 周后进行二免, 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化, 免疫剂量与途径同首次免疫。之后, 每隔 2 周按照二免方法免疫, 免疫 2 次。在四免完成后 1 周, 断尾采血以 GST-VP4 包被酶标板用间接 ELISA 方法对免疫小鼠血清进行效价测定。效价达到要求后, 在融合前 3 d 进行加强免疫, 抗原直接注射小鼠腹腔, 50 μ g/只。

1.6 抗 VP4 单克隆抗体的制备

按照 Current Protocol in Immunology^[23]上的方法进行细胞融合, 将 SP2/0 细胞与无菌免疫脾细胞按照 1 : 10 进行混合, 在盛有 37 °C 水的烧杯中, 以预热的 50% (M/V) PEG 4 000 为融合剂逐滴加入细胞泥中, 缓慢加入 DMEM 后离心, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 进行重悬至每毫升 1.2×10^6 个细胞, 以 200 μ L/孔加入到 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养。融合后 2、3、4、5、7、9、11 d 用含 HAT 的 20% DMEM 进行半换液, 第 14 天用含 HT 的 20% DMEM 进行半换液, 第 15 天后换成 20% DMEM。当杂交瘤细胞长至孔底的 10%–25% 时, 在换液 2 d 后取 100 μ L 上清液以 GST-VP4 包被酶标板用间

接 ELISA 方法进行筛选, 选取 2 次筛选阳性值高的孔用有限稀释法进行亚克隆, 亚克隆 3 次直至所有单克隆细胞孔阳性率为 100%。

1.7 腹水制备及纯化

给经产的 BALB/c 小鼠腹腔注射灭菌液体石蜡 0.5 mL/只, 1 周后腹腔注射生长状态良好的杂交瘤细胞 2×10^6 个/只, 待小鼠腹腔膨大后, 采集腹水离心后保存于 -80°C 。

采集的腹水按照硫酸铵沉淀法^[24]进行纯化, 透析后分装保存于 -80°C 。

1.8 抗 VP4 单抗的特性鉴定

1.8.1 单抗亚类鉴定

采用 SIGMA 公司的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 试剂盒进行测定, 按照说明书进行操作。

1.8.2 单抗亲和力测定

应用间接 ELISA 方法测定单抗亲和力。用 $1\ \mu\text{g/mL}$ GST-VP4 包被酶标板, 封闭后向其中加入倍比稀释的单抗, 初始浓度为 $1\ \mu\text{g/mL}$, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行测定。ELISA 结果中以连续读数不再增加时定为抗原 100% 结合, 以 OD_{450} 吸光度值为纵坐标, 抗体浓度为横坐标做散点图, 生成对数趋势线及公式。以吸光度最大值一半 (视为抗原与抗体结合率 50%) 代入公式, 求出抗体浓度, 即抗体亲和力解离常数 (K_d)。

1.8.3 单抗特异性鉴定

用表达 IBVDV VP4、ALV GP85、REV GP90、CAV VP2 蛋白的大肠杆菌全菌进行 SDS-PAGE, 以制备的单抗为一抗, 进行 Western blotting 鉴定。

1.8.4 间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定单抗

将 DF-1 细胞接种于 24 孔板, 1×10^5 cells/孔,

待细胞密度达到 50%–70% 时, 将 IBVDV 接种于细胞中, 并设置相应的阴性对照。待细胞出现明显病变时, 停止培养, 用 4% 多聚甲醛固定和 0.2% Triton X-100 透化, 用 1% BSA 封闭后加入制备的单抗作为一抗, 以 FITC 标记的 IgG 为二抗, 于荧光显微镜下判定结果。

1.8.5 Western blotting 鉴定单抗

按 1.8.4 方法进行病毒接种, 收取相应细胞裂解物, 以制备的单抗为一抗进行 Western blotting 鉴定。

2 结果

2.1 vp4 基因克隆与重组表达载体 pGEX-6P-1-vp4 的构建

如图 1A 中显示, 通过 PCR 方法, 获得大小为 732 bp 的目的片段, 质粒 pGEX-6P-1-vp4 经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切鉴定, 出现大小与 PCR 结果一致的条带 (图 1B)。基因测序结果正确。

2.2 融合蛋白 GST-VP4 的纯化

对含质粒 pGEX-6P-1-vp4 的重组菌进行诱导表达, 在 54 kDa 处诱导表达出目的蛋白, 超声裂解后在上清和沉淀中均含有目的蛋白。取诱导表达上清进行纯化, 在 54 kDa 处纯化出 GST-VP4 (图 2A), 测定蛋白浓度为 $0.4\ \text{mg/mL}$ 。

2.3 抗 VP4 单抗的制备及特异性鉴定

小鼠 4 次免疫后, 经 ELISA 测定血清中抗体的效价均高于 $1\ 10\ 000$ 。经过融合后得到 14 个阳性克隆, 选取其中 6 个进行 3 次亚克隆, 得到 4 株能稳定分泌单抗的杂交瘤细胞株, 分别命名为 3B3、3H11、4C8 和 4G6。将杂交瘤细胞注射到经产母鼠体内制备腹水, 并进行纯化, 测定并稀释蛋白浓度至 $2\ \text{mg/mL}$ 。

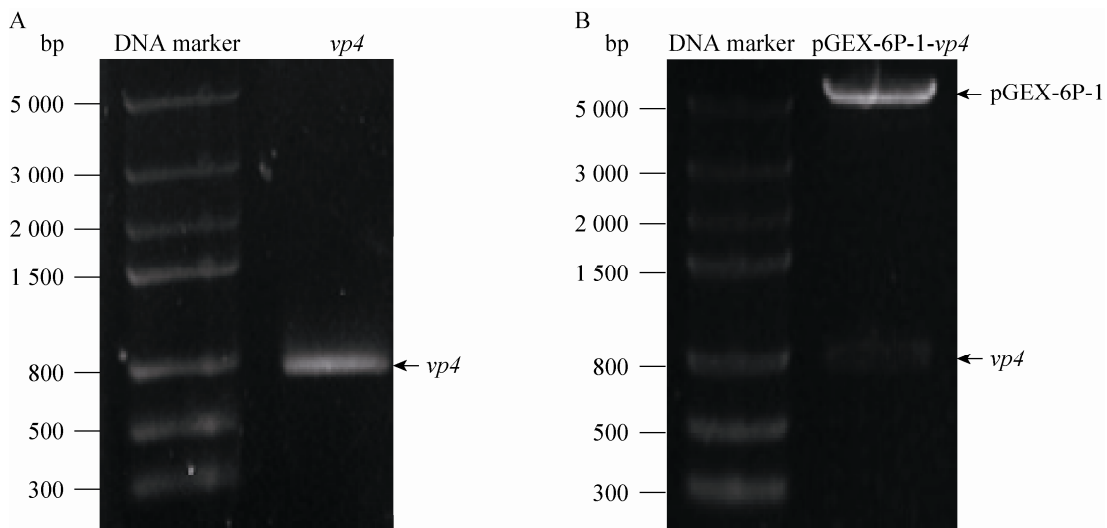


图 1 *vp4* 基因克隆与重组表达载体 pGEX-6P-1-*vp4* 的构建

Fig. 1 Cloning of *vp4* gene and construction of its recombinant expression vector pGEX-6P-1-*vp4*. (A) Cloning of *vp4* gene. (B) Digestion of pGEX-6P-1-*vp4* plasmid with restriction enzyme *Eco*R I and *Xho* I.

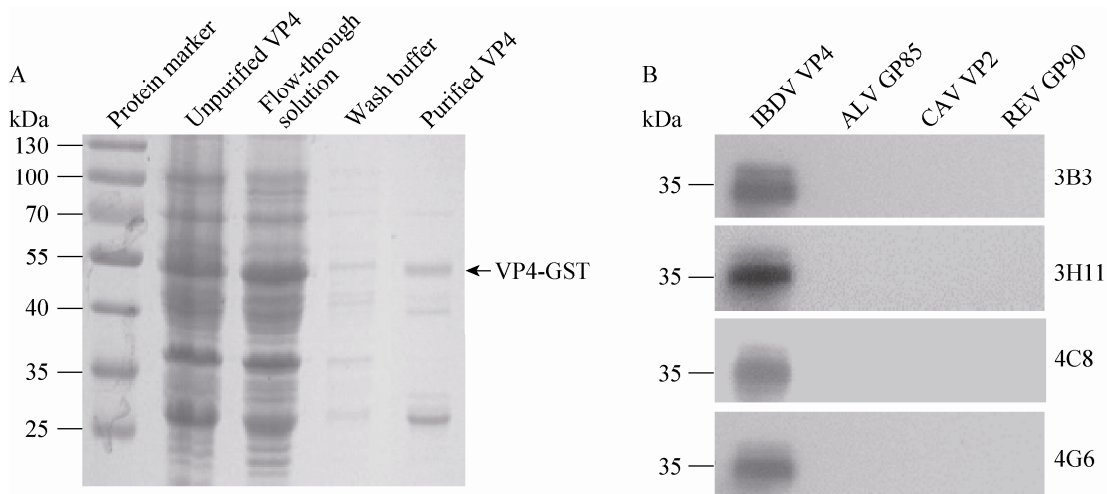


图 2 GST-VP4 蛋白的纯化与单抗特异性鉴定

Fig. 2 Purification of recombinant protein VP4 and identification of specificity of anti-VP4 McAbs. (A) Purification of recombinant protein GST-VP4. (B) Analysis of the specificity of anti-VP4 McAbs.

用 Western blotting 方法检测原核表达传染性法氏囊病病毒 (IBDV) His-VP4 (33 kDa)、鸡

传染性贫血病毒 (CAV) His-VP2 (34 kDa)、禽白血病毒 (ALV) His-GP85 (34 kDa)、禽网状内

皮组织增生症病毒 (REV) His-GP90 (36 kDa)。结果表明 4 株单抗均能识别原核表达的 VP4 蛋白, 而不识别对照组的其他病毒蛋白 (图 2B), 因此制备的单抗识别 VP4 具有良好的特异性。

2.4 抗 VP4 单抗亚类鉴定

按小鼠单抗亚类鉴定试剂盒说明书(Sigma)鉴定单抗的重链类型, 结果 3B3、3H11 和 4G6 株的重链类型为 IgG1, 4C8 株的重链类型为 IgG2b。

2.5 抗 VP4 单抗亲和力测定

应用间接 ELISA 测定 4 株单抗的亲和力, 结果如图 3 显示, 4 株单抗的亲和力解离常数

(K_d) 分别: 3B3 株: 4.61×10^{-11} , 3H11 株: 5.02×10^{-11} , 4C8 株: 1.71×10^{-10} , 4G6 株: 4.26×10^{-11} , 表明 4 株单抗均为高亲和力抗体。

2.6 单抗识别 IBDV 感染 DF-1 细胞产生的 VP4 蛋白

间接免疫荧光试验结果如图 4A 所示, 表明 4 株单抗均能识别 IBDV 感染 DF-1 细胞后产生的 VP4 蛋白。同样, 用 Western blotting 方法检测, 如图 4B 所示: 4 株单抗均能很好地识别 VP4, 而不识别未感染的阴性对照。该结果表明获得的 McAbs 均能识别天然 IBDV 病毒蛋白 VP4 的抗原表位。

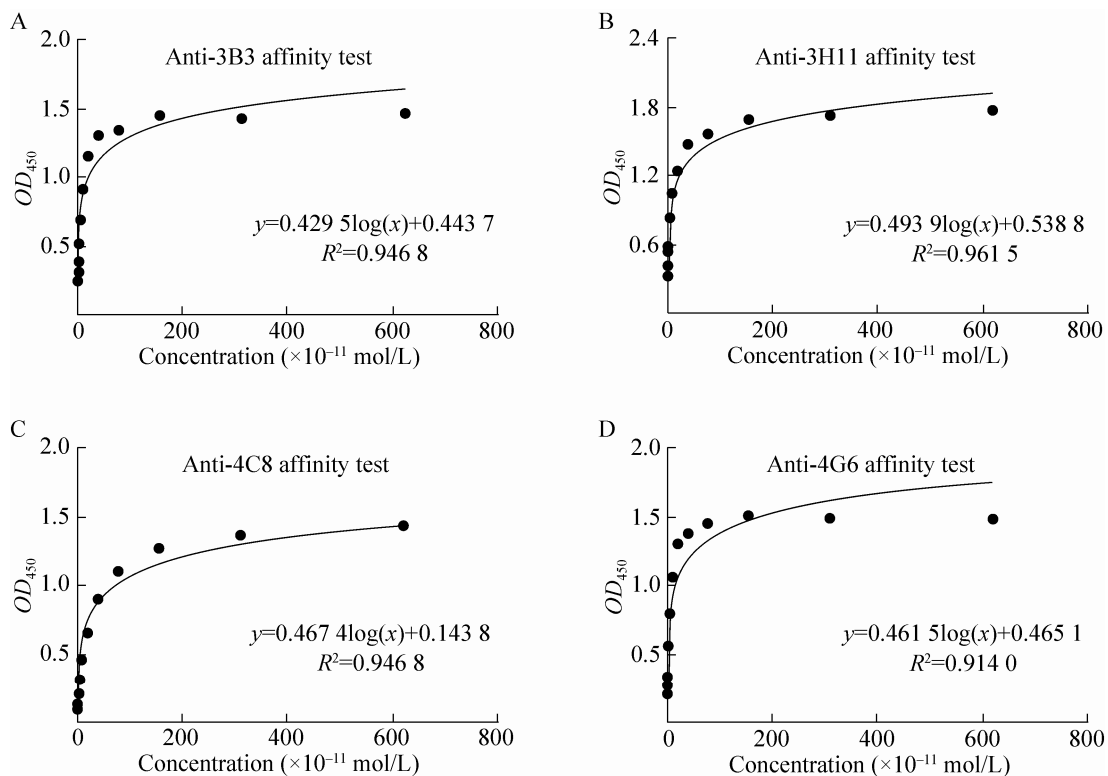


图 3 抗 VP4 单克隆抗体亲和力测定

Fig. 3 Affinity test of anti-VP4 McAbs. (A–D) Affinity test of 3B3, 3H11, 4C8 and 4G6.

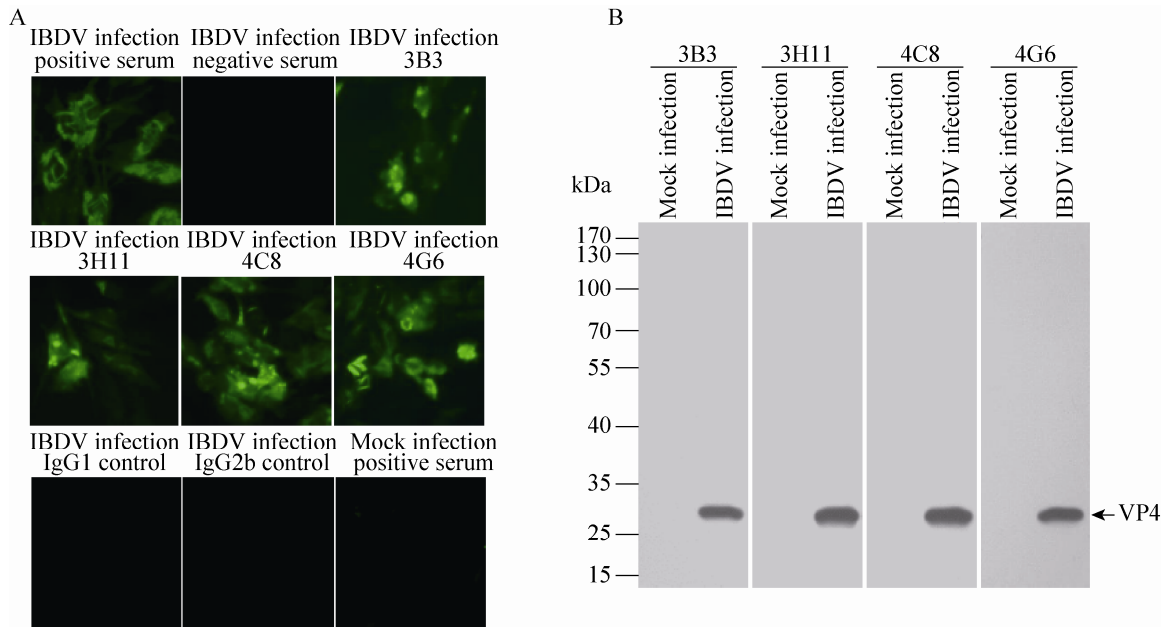


图 4 单抗识别病毒感染产生的 VP4 蛋白

Fig. 4 Anti-VP4 McAbs recognize VP4 in IBDV-infected cells. (A) Detection of IBDV VP4 by IFA using indicated McAbs. (B) Detection of IBDV VP4 by Western blotting using indicated McAbs.

3 讨论

传染性法氏囊病是由 IBDV 感染后引起的一种危害雏鸡的急性、烈性和高度接触传染性疾病。发病鸡存活后出现严重的免疫抑制，从而导致混合感染和继发感染，使死淘率增加，给养禽业造成了巨大的经济损失。目前认为 IBDV 基因组编码 5 种病毒蛋白。VP4 蛋白是由多聚蛋白 VP2-4-3 自剪切产生的一种病毒蛋白酶^[25]。

近来又有研究表明：在致病性 IBDV 感染鸡体内存在 VP4 特异性抗体，但是在弱毒 IBDV 免疫的鸡体内几乎不存在抗 VP4 蛋白抗体。这个结果提示我们，IBDV VP4 蛋白特异性抗体可以作为区分致病性与非致病性 IBDV 的标志物，为 IBDV 的流行病学研究提供一种新方

法。因此，对鸡群 VP4 抗体水平检测具有流行病学意义，可以用来区分疫苗免疫和野毒感染，还可以分析不同病毒的毒力^[26]。

在本研究中，利用实验室保存的 His-VP4 蛋白免疫 BALB/c 小鼠，常规方法进行细胞融合，用本研究表达纯化的 GST-VP4 作为 ELISA 包被抗原进行筛选，获得 4 株能分泌抗体的杂交瘤细胞株。这些单抗不仅识别用原核表达的 VP4 蛋白，也识别 IBDV 感染细胞中的 VP4 蛋白，说明 4 株单抗均具有识别天然病毒蛋白 VP4 的能力。许多研究者利用可以分泌 IL-6 的饲养层细胞来增强杂交瘤细胞的生长活性，但可能会有污染细胞的情况发生，本研究中利用无菌过滤的胸腺培养上清液来培养杂交瘤细胞，能达到同样的效果并能避免污染。我们选择生长状态良好的杂交瘤细胞株进行大量扩繁冻存保

种。实验结果证明以重组 VP4 蛋白制备特异性单克隆抗体效果良好,为深入研究 IBDV 致病机理提供了重要的工具,也为建立本病的新型诊断方法提供了生物材料。

REFERENCES

- [1] Cosgrove AS. An apparently new disease of chickens: avian nephrosis. *Avian Diseases*, 1962, 6(3): 385–389.
- [2] Pitcovski J, Gutter B, Gallili G, et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 2003, 21(32): 4736–4743.
- [3] Li CW, Li YL, Zhou XR. Research progress on infectious bursal disease virus. *Heilongjiang J Anim Sci Vet Med*, 2002(2): 47–49 (in Chinese). 李成洪, 李英伦, 周晓容. 鸡传染性法氏囊病研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2002(2): 47–49.
- [4] Stricker RL, Behrens SE, Mundt E. Nuclear factor NF45 interacts with viral proteins of infectious bursal disease virus and inhibits viral replication. *J Virol*, 2010, 84(20): 10592–10605.
- [5] Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, et al. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*, 1997, 71(1): 325–330.
- [6] Hirai K, Shimakura S. Structure of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 1974, 14(4): 957–964.
- [7] Käufer I, Weiss E. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. *Avian Diseases*, 1975, 20(3): 483–495.
- [8] Azad AA, Barrett SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 1985, 143(1): 35–44.
- [9] von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirmer H, et al. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 8): 2221–2229.
- [10] Pan J, Lin L, Tao YJ. Self-guanylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology*, 2009, 395(1): 87–96.
- [11] Kibenge FS, McKenna PK, Dybing JK. Genome cloning and analysis of the large RNA segment (segment A) of a naturally avirulent serotype 2 infectious bursal disease virus. *Virology*, 1991, 184(1): 437–440.
- [12] Hudson PJ, McKern NM, Power BE, et al. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14(12): 5001–5012.
- [13] Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, et al. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol*, 1988, 62(3): 1084–1087.
- [14] Azad AA, Barrett SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 1985, 143(1): 35–44.
- [15] Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, et al. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol*, 1988, 62(3): 1084–1087.
- [16] Dobos P, Hill BJ, Hallett R, et al. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, 1979, 32(2): 593–605.
- [17] Da CB, Chevalier C, Henry C, et al. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol*, 2002, 76(5): 2393–2402.
- [18] Granzow H, Birghan C, Mettenleiter TC, et al. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*, 1997, 71(11): 8879–8885.
- [19] Chang GR, Wang MY, Liao JH, et al. Endopeptidase activity characterization of *E. coli*-derived infectious bursal disease virus protein

- 4 tubules. *Protein Eng Des Sel*, 2012, 25(11): 789–795.
- [20] Birghan C, Mundt E, Gorbalenya AE. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J*, 2000, 19(1): 114–123.
- [21] Li Z, Wang Y, Li X, et al. Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I Interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *J Virol*, 2013, 87(2): 1221–1231.
- [22] Lejal N, Da CB, Huet JC, et al. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 4): 983–992.
- [23] Yokoyama WM. *Current Protocols in Immunology*. Hoboken: John Wiley & Sonc, Inc, 1995.
- [24] Li SJ. Development and application of monoclonal antibodies against the IBDV VP2 and VP5 protein[D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese).
李善吉. 传染性法氏囊病毒 VP2 和 VP5 单克隆抗体的制备鉴定及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [25] Lombardo E, Maraver A, Caston JR, et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol*, 1999, 73(8): 6973–6983.
- [26] Wang Y, Wu X, Li H, et al. Antibody to VP4 protein is an indicator discriminating pathogenic and nonpathogenic IBDV infection. *Mol Immunol*, 2009, 46(10): 1964–1969.

(本文责编 郝丽芳)