

研究报告

新型鸭呼肠孤病毒 p18 蛋白多克隆抗体区分强弱毒株的研究

徐鑫^{#1,2}, 游广炬^{#1,3}, 郑欣^{1,2}, 程晓霞^{1,3}, 王劭^{1,3}, 曾丽^{1,3}, 肖世峰^{1,3}, 郑敏^{1,3}, 陈少莺^{*1,3}, 陈仕龙^{*1,3}

1 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013

2 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002

3 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013

徐鑫, 游广炬, 郑欣, 程晓霞, 王劭, 曾丽, 肖世峰, 郑敏, 陈少莺, 陈仕龙. 新型鸭呼肠孤病毒 p18 蛋白多克隆抗体区分强弱毒株的研究[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 749-756.

XU Xin, YOU Guangju, ZHENG Xin, CHENG Xiaoxia, WANG Shao, ZENG Li, XIAO Shifeng, ZHENG Min, CHEN Shaoying, CHEN Shilong. Differentiation of virulent and attenuated strains of novel duck reovirus by anti-p18 polyclonal antibodies[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 749-756.

摘要:【背景】我们前期将新型鸭呼肠孤病毒(novel duck reovirus, NDRV)强毒株 NP03 在番鸭胚成纤维细胞(muscovy duck embryo fibroblast, MDEF)上进行传代, 选育出 NDRV 弱毒株 S, 将强弱毒株 p18 蛋白进行比对发现弱毒 p18 蛋白 C 端缺失 35 个氨基酸。【目的】制备 p18 蛋白的多克隆抗体并鉴定 NDRV 强弱毒株 p18 蛋白的差异。【方法】采用 RT-PCR 方法扩增 NDRV 强弱毒株 p18 基因编码序列, 克隆至原核表达载体 pET-28a 中诱导表达, 用镍柱纯化目的蛋白, 通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 对纯化蛋白进行鉴定。进一步用纯化的蛋白免疫小鼠制备 p18 蛋白多克隆抗体, 通过间接 ELISA、Western Blot 和间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)对制备的多克隆抗体进行检测鉴定 NDRV 强弱毒株。【结果】对目的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定结果表明, 分别获得了 NDRV 强弱毒株 p18 重组蛋白。对多克隆抗体进行间接 ELISA 检测, 效价达 1:51 200。Western Blot 鉴定显示, 制备的 p18 蛋白多克隆抗体能特异性检测 NDRV 强、弱

资助项目: 福建省农业科学院“5511”协同创新工程(XTCXGC2021012, XTCXGC2021018); 福建省农业科学院创新团队项目(CXTD2021034); 国家自然科学基金(32402885); 福建省自然科学基金(2024J08091); 福建省公益类科研院所专项(2024R1025003, 2021R1026009)

This work was supported by the Fujian Academy of Agricultural Sciences “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021012, XTCXGC2021018), the Innovation Team Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (CXTD2021034), the National Natural Science Foundation of China (32402885), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2024J08091), and the Public Welfare Projects of Fujian Province (2024R1025003, 2021R1026009).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: CHEN Shaoying, chensy58@163.com; CHEN Shilong, csl6116@163.com

Received: 2024-09-02; Accepted: 2025-01-13; Published online: 2025-01-20

毒株感染细胞后表达的 p18 蛋白, 结果表明, 强、弱毒株 p18 蛋白的分子量有明显差异, 分别约为 18 kDa 和 14 kDa。IFA 结果表明, 制备的 p18 蛋白多克隆抗体可以特异性识别 NDRV 强、弱毒复制时表达的 p18 蛋白。【结论】本研究制备的 p18 蛋白多克隆抗体可用于 NDRV 强弱毒株 p18 蛋白检测, 并发现 NDRV 强、弱毒株 p18 蛋白存在明显差异, 为深入研究 NDRV p18 蛋白生物学功能及致病机理奠定了基础。

关键词: 新型鸭呼肠孤病毒; p18 蛋白; 多克隆抗体; 毒力

Differentiation of virulent and attenuated strains of novel duck reovirus by anti-p18 polyclonal antibodies

XU Xin^{#1,2}, YOU Guangju^{#1,3}, ZHENG Xin^{1,2}, CHENG Xiaoxia^{1,3}, WANG Shao^{1,3}, ZENG Li^{1,3}, XIAO Shifeng^{1,3}, ZHENG Min^{1,3}, CHEN Shaoying^{*1,3}, CHEN Shilong^{*1,3}

1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China

2 College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, Fujian, China

Abstract: [Background] In our previous study, we passaged the virulent strain NP03 of novel duck reovirus (NDRV) on muscovy duck embryo fibroblast (MDEF) cells and obtained an attenuated strain NDRV S. Compared with that of the virulent strain, the p18 protein of NDRV S misses 35 residues at the C-terminus. **[Objective]** To prepare anti-p18 polyclonal antibodies and identify the differences in p18 between the virulent and attenuated strains of NDRV. **[Methods]** RT-PCR was employed to amplify the p18 gene sequences of the virulent and attenuated strains of NDRV. The obtained sequences were then cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a for induced expression. The target proteins were purified by nickel columns and identified by SDS-PAGE and Western Blot. The polyclonal antibodies were prepared by immunizing the BALB/c mice with the purified proteins, and the antibodies were detected and identified by indirect ELISA, Western Blot, and indirect immunofluorescence assay (IFA). **[Results]** The SDS-PAGE and Western Blot results showed that the recombinant p18 proteins of the virulent and attenuated strains of NDRV were obtained. The indirect ELISA result showed that the serum titer of the polyclonal antibodies was 1:51 200. The result of Western Blot demonstrated that the prepared polyclonal antibodies could specifically detect the p18 proteins expressed by cells infected with virulent and attenuated strains. The molecular weights of the p18 proteins of virulent and attenuated strains varied, being 18 kDa and 14 kDa, respectively. The IFA results confirmed that the prepared polyclonal antibodies could recognize p18 proteins expressed in cells infected with virulent and attenuated strains. **[Conclusion]** We successfully prepared the anti-p18 polyclonal antibodies and identified the significant differences in its composition between virulent and attenuated strains of NDRV. The findings lay a solid foundation for investigating the biological function of p18 as well as the pathogenic mechanism of NDRV.

Keywords: novel duck reovirus; p18 protein; polyclonal antibodies; virulence

水禽呼肠孤病毒(waterfowl reovirus, WRV)是可感染番鸭、樱桃谷鸭、麻鸭、北京鸭和鹅等水禽的重要水禽病毒, WRV 主要分为番鸭呼肠孤病毒(muscovy duck reovirus, MDRV)和新型鸭呼肠孤病毒(novel duck reovirus, NDRV)^[1-2]。MDRV 主要感染雏番鸭和雏鹅, 导致感染雏鸭和鹅肝脏、脾脏出现大量白色坏死点, 俗称番鸭“白点病”或“花肝病”, NDRV 可以感染雏番鸭、樱桃谷鸭、麻鸭、雏鹅等多种水禽, 主要病理特征是脾脏、肝脏大面积肿大出血、坏死(俗称“出血性坏死性肝炎”)^[1-2]。自 2005 年以来, NDRV 在我国山东、江苏、福建、广州等沿海地区暴发流行, 致使鸭成活率降低, 给养鸭业造成较大的经济损失^[1]。

NDRV 属于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属的成员, 是禽呼肠孤病毒(avian reovirus, ARV)的一种^[3]。NDRV 基因组由 10 段双链 RNA 组成, 分别为 *L1-L3*、*M1-M3* 和 *S1-S4*, 编码 8 个结构蛋白和 4 个非结构蛋白^[3]。其中 *S1* 片段是 NDRV 与其他水禽呼肠孤病毒、鸡源禽呼肠孤病毒差异较大的片段^[3]。NDRV 的 *S1* 片段编码 σ C、p10 和 p18 蛋白, 鸡源禽呼肠孤病毒的 *S1* 编码 σ C、p10 和 p17 蛋白, 而 MDRV 与鸡源 ARV、NDRV *S1* 片段对应的 *S4* 基因片段仅编码 σ C 和 p10 这 2 种蛋白, 缺少 p18/p17 蛋白^[3]。据报道, NDRV 特有的 p18 蛋白是由 162 个氨基酸组成的非结构蛋白^[3], 然而, 目前对 NDRV 的 p18 蛋白研究仍较少, 尚不清楚 p18 蛋白在病毒复制及致病中发挥的功能。但是, 对 NDRV p18 蛋白的同源蛋白鸡源 ARV p17 蛋白功能的研究已有较大进展, 鸡源 ARV p17 蛋白具有核定位信号, 在病毒感染早期进入到细胞核中, 干扰细胞周期和蛋白的翻译, p17 蛋白能够诱导感染细胞 G2/M 期停止、宿主蛋白翻译关闭以及细胞自噬, 从而有利于病毒自身复制^[4-6]。NDRV p18 蛋白是否有与 ARV p17 蛋白相似的功能, 还是

p18 蛋白有独特的功能, 还需进一步深入研究。

本团队前期将 NDRV 强毒株 NP03 在番鸭胚成纤维细胞(muscovy duck embryo fibroblast, MDEF)上连续传代, 选育出 NDRV 弱毒株 S^[7], 强弱毒株基因组比对发现弱毒株的 *p18* 基因第 382 位核苷酸发生了 C→U 突变(CAA→UAA), 导致 *p18* 基因中间产生一个终止密码子, 造成弱毒 p18 蛋白 C 端缺失 35 个氨基酸。然而, 弱毒株 p18 蛋白 C 端的缺失是否与病毒的毒力密切相关, 以及在病毒复制中发挥的功能尚不清楚。因此, 本研究克隆 NDRV 强弱毒株的 *p18* 基因, 利用原核表达系统表达强弱毒株 p18 蛋白, 制备高效的鼠抗 p18 蛋白多克隆抗体, 并鉴定 NDRV 强弱毒株 p18 蛋白, 以期为深入研究 p18 蛋白生物学功能及强弱毒株 p18 蛋白差异在病毒毒力中的作用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

BALB/c 雌性小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。NDRV 强毒株 NP03 和 NDRV 弱毒株 S 均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒实验室提供; MDEF 细胞由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒实验室制备; 载体 pET-28a 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所病毒实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司。动物实验设计方案通过福建省农业科学院畜牧兽医研究所实验动物伦理委员会的伦理审查(202402GJ004)。

1.2 主要试剂和仪器

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和同源重组试剂盒(C116-01), 南京诺唯赞科技有限公司; 胶回收提取试剂盒、质粒 DNA 小提试剂盒, 北京擎科生物科技股份有限公司; 抗

His 标签鼠单克隆抗体,北京百奥创新科技有限公司; FITC 和 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗,武汉博士德生物工程有限公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。一体式化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司; 荧光显微镜,尼康公司。

1.3 引物设计及合成

根据 NDRV 强毒株 NP03 的 p18 基因序列(GenBank 登录号 KC312699.1)和弱毒株 S 第 30 代(NDRV S-C30) p18 基因序列(GenBank 登录号 OR208190.1),应用 Oligo 7.0 软件设计与 pET-28a 载体同源重组连接的 PCR 引物:强毒株和弱毒株上游引物 28a-BamH I-p18-F (5'-agcaaatgggtcgcggatcTCGCTCCCGCCAACCCCGAT-3'),强毒下游引物 28a-Xho I-p18-R 强(5'-tggtggtggtggtgctcgagGTTGTTGATTGTAGATCTGC-3'),弱毒下游引物 28a-Xho I-p18-R 弱(5'-tggtggtggtggtgctcgagTTCTGTGTCGTCAAATGATC-3'),小写字母为 pET-28a 同源片段,大写字母为 p18 片段。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.4 病毒 RNA 的提取及 p18 基因扩增

取 NDRV NP03 及 NDRV S 第 30 代(NDRV-S-C30)病毒液各 200 μ L,按说明书操作步骤提取病毒核酸,参照反转录试剂盒说明书将所提取的病毒核酸反转录为 cDNA,以 1.3 设计的引物用于 PCR 扩增,PCR 反应体系:2 \times Taq Master Mix 25 μ L,上游引物 28a-BamH I-p18-F、下游引物 28a-Xho I-p18-R 强/弱(10 μ mol/L)各 2 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,按照琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒步骤回收目的片段。

1.5 重组表达质粒的构建与鉴定

将 pET-28a 用 BamH I、Xho I 双酶切,然

后按照同源重组试剂盒说明书与纯化的 p18 片段连接,构建 p18 原核表达质粒,由北京擎科生物科技股份有限公司测序验证。

1.6 p18 蛋白诱导表达

将重组质粒 pET-28a-p18 (强毒和弱毒)转化到 BL21(DE3)感受态细胞中,经 IPTG 诱导后,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心收集沉淀菌体,超声裂解功率 300 W,超声裂解 10 s,停 10 s,共超声 30 min,离心后收集超声产物的上清和沉淀。

1.7 重组蛋白的纯化及鉴定

采用 His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂填料柱,按照说明书纯化 His-p18 重组蛋白。将纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色,以抗 His 鼠单克隆抗体作为一抗进行 Western Blot 鉴定。

1.8 p18 多克隆抗体的制备

将强毒株重组 p18 蛋白以 50 μ g/只与弗氏完全佐剂 1:1 乳化,采用背部多点皮下免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠。首免后的第二周和第四周,用 p18 蛋白按照 50 μ g/只与弗氏不完全佐剂 1:1 混合乳化后对小鼠免疫。第 3 次免疫后 7 d,采集小鼠血清。将纯化的强毒株的 p18 重组蛋白作为包被抗原,用常规间接 ELISA 方法对收取的 p18 小鼠多克隆抗体效价进行测定。

1.9 p18 蛋白多克隆抗体 Western Blot 鉴定 NDRV 强弱毒株

将 NDRV 强毒株 NP03 和弱毒株 NDRV S-C30 分别以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1 接种于 12 孔板 MDEF 细胞,培养 24 h 后弃去培养液,收取细胞蛋白,以上述制备的鼠 p18 多克隆抗体为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗,进行 Western Blot 鉴定。

1.10 p18 蛋白多克隆抗体间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测 NDRV 强弱毒株

将 NDRV 强毒株 NP03 和弱毒株 S-C30 分

别以 MOI 为 0.1 接种于 MDEF 细胞, 培养 12 h 后弃去培养液, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞, 以上述制备的鼠 p18 多克隆抗体为一抗, FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 同时设置正常细胞对照, 进行 IFA 鉴定。

2 结果与分析

2.1 p18 重组蛋白的诱导表达及纯化

构建了 NDRV 强弱毒株 p18 重组表达质粒, 表达菌经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 鉴定, 结果显示, 诱导表达的强毒和弱毒 His-p18 重组蛋白大小分别约为 19 kDa 和 16 kDa (包含载体的标签序列) (图 1A、1B), 与预测蛋白大小一致, 在裂解菌体沉淀和上清中均能够检测

到重组蛋白, 收集上清纯化获得纯化的强弱毒株 His-p18 重组蛋白(图 1A、1B)。

2.2 p18 重组蛋白的 Western Blot 鉴定

对诱导表达及纯化的 p18 重组蛋白进行 Western Blot 分析, 如图 2A、2B 所示, NDRV 强弱毒 His-p18 重组蛋白分别在约 19 kDa 和 16 kDa 处出现特异性条带, 大小与预期的重组蛋白大小一致(包含载体的标签序列), 而空载体诱导菌没有出现任何条带, 结果表明, 强弱毒 His-p18 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达并获得了纯化的 His-p18 重组蛋白。

2.3 p18 蛋白多克隆抗体效价的检测

应用间接 ELISA 方法, 以纯化的强毒株重组 p18 蛋白为抗原进行包被, 测定制备的 p18

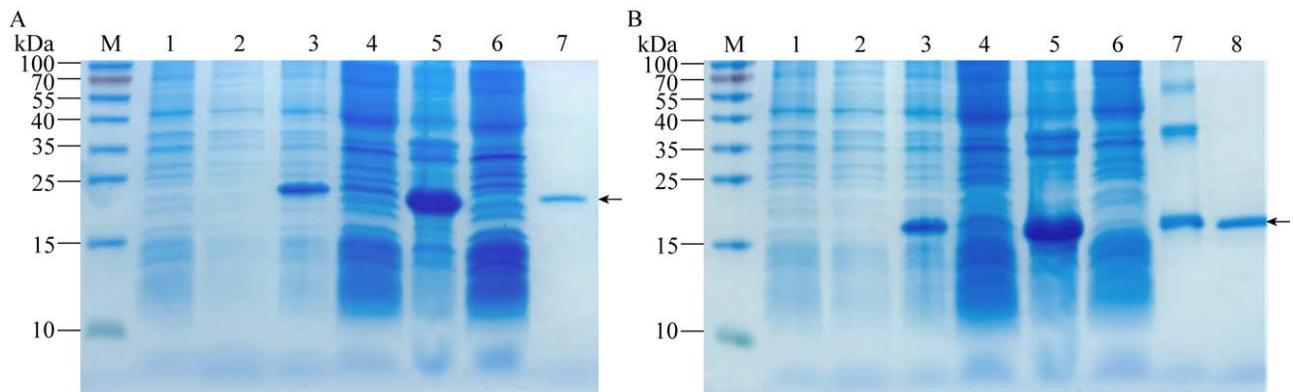


图 1 NDRV 强弱毒 p18 蛋白诱导表达及纯化的 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白质分子量 marker; 1: 空载体; 2: 蛋白诱导前; 3: 蛋白诱导后; 4: 表达产物超声破碎上清; 5: 表达产物超声破碎沉淀; 6: 表达产物经 Ni-NTA 柱吸附后流出液。A 中 7: 洗脱得到的强毒 His-p18 重组蛋白。B 中 7: 洗脱得到的弱毒 His-p18 蛋白(收集的第一管洗脱液); 8: 洗脱得到的弱毒 His-p18 蛋白(收集的第三管洗脱液)。箭头: NDRV 强毒或弱毒 His-p18 重组蛋白。

Figure 1 SDS-PAGE analysis of induced expression and purification of p18 protein of virulent and attenuated strains of NDRV. M: Protein molecular marker; 1: Empty plasmid; 2: Before IPTG induction; 3: After IPTG induction; 4: The supernatant product after ultrasonic crushing; 5: The precipitated product after ultrasonic crushing; 6: The flow liquid of the expression product after adsorbed by Ni-NTA column. 7 in A: Purified His-p18 protein of virulent strain. 7 in B: Purified His-p18 protein of attenuated strain (The first tube of eluent); 8: Purified His-p18 protein of attenuated strain (The third tube of eluent). Arrow: The His-p18 protein of the virulent or attenuated strains of NDRV.

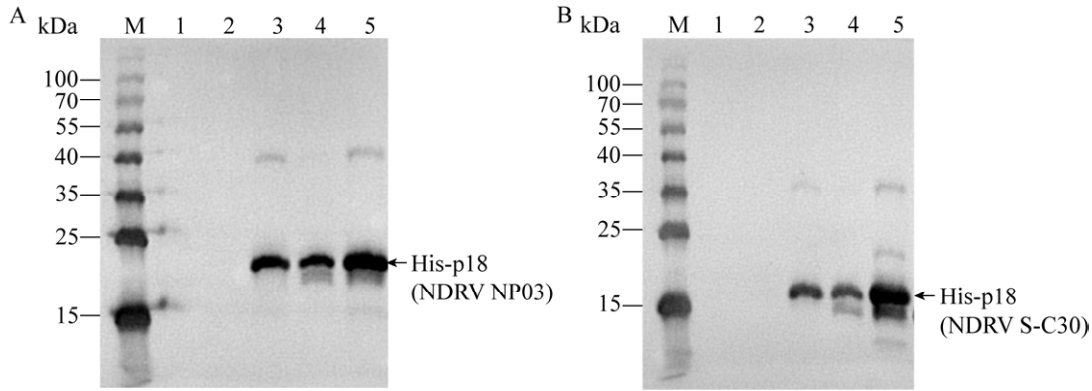


图2 强弱毒 His-p18 重组蛋白的 Western Blot 鉴定 M: 蛋白质分子 marker; 1: 空载体; 2: 蛋白诱导前; 3: 蛋白诱导后; 4: 表达产物超声破碎上清。A 中 5: 纯化的强毒 His-p18 蛋白。B 中 5: 纯化的弱毒 His-p18 蛋白。

Figure 2 Identification of His-p18 recombinant protein of virulent and attenuated strains by Western Blot. M: Protein molecular marker; 1: Empty plasmid; 2: Before IPTG induction; 3: After IPTG induction; 4: The supernatant expression product after ultrasonic crushing. 5 in A: Purified His-p18 protein of virulent strain. 5 in B: Purified His-p18 protein of attenuated strain.

蛋白多克隆抗体效价。检测制备的多克隆抗体效价达 1:51 200, 表明本研究制备的 p18 蛋白多克隆抗体有较高的效价。

2.4 p18 蛋白多克隆抗体可用于鉴定 NDRV 强弱毒株

将 NDRV 强弱毒分别感染 MDEF 细胞 24 h 后的细胞蛋白作为抗原, 以制备的强毒株 p18 蛋白多克隆抗体为一抗, 进行 Western Blot 鉴定。如图 3 所示, NDRV 强毒 p18 蛋白和弱毒 p18 蛋白分别在 18 kDa 和 14 kDa 处有目的条带, 与预期结果相符, 说明制备的 p18 多克隆抗体可以特异性识别 NDRV 强弱毒株感染细胞的 p18 蛋白, 也证实 NDRV 弱毒株的 p18 基因在第 382 位核苷酸的突变造成蛋白的截短表达, 导致弱毒株的 p18 蛋白 C 端缺失。

2.5 p18 蛋白多克隆抗体可用于 NDRV 强弱毒株 IFA 检测

将 NDRV 强弱毒感染的 MDEF 细胞固定, 以上述制备的 p18 蛋白多克隆抗体为一抗, 进行 IFA 试验, 如图 4 结果所示, p18 蛋白高免

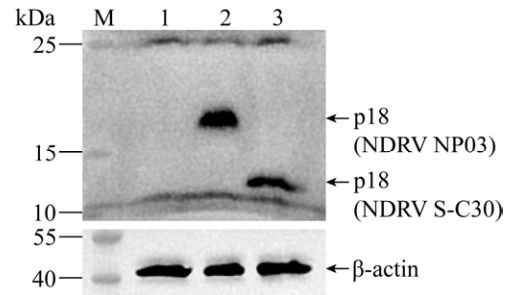


图3 p18 蛋白多克隆抗体 Western Blot 鉴定 NDRV 强弱毒株 M: 蛋白质分子量 marker; 1: 未感染的 MDEF 细胞; 2: 感染强毒 MDEF 细胞; 3: 感染弱毒 MDEF 细胞。

Figure 3 Identification of virulent and attenuated strains of novel duck reovirus using anti-p18 polyclonal antibody by Western Blot. M: Protein molecular marker; 1: Normal MDEF cells; 2: NDRV virulent strain-infected MDEF cells; 3: NDRV attenuated strain-infected MDEF cells.

血清与 NDRV 强毒株和 NDRV 弱毒株感染的 MDEF 细胞呈现较强的绿色荧光, 而未感染的阴性对照细胞则未检测到荧光, 说明制备的多克隆抗体可以特异性检测 NDRV 强弱毒株感染细胞时表达的 p18 蛋白。

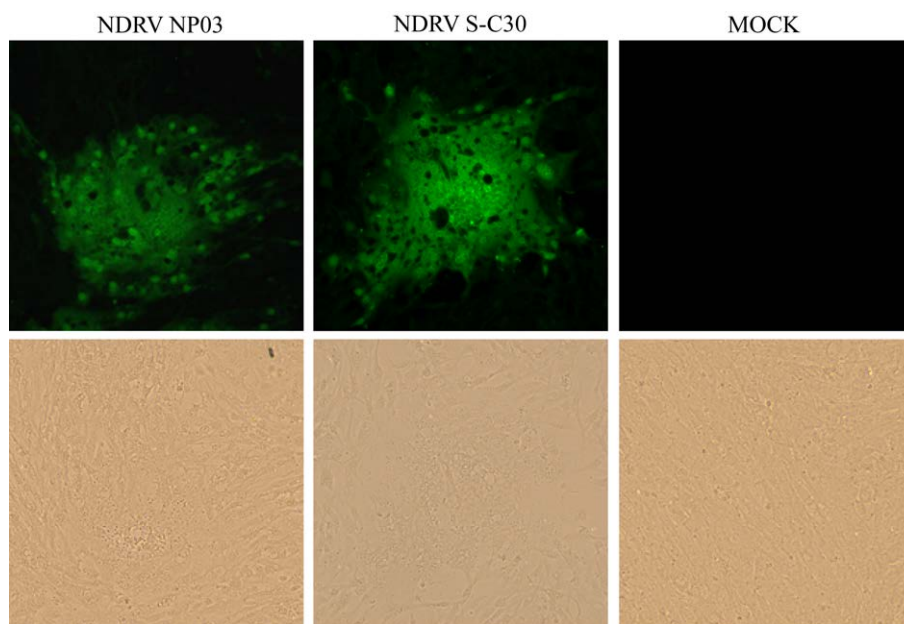


图 4 p18 蛋白多克隆抗体 IFA 检测 NDRV 强弱毒株(100×)

Figure 4 Examination of virulent and attenuated strains of novel duck reovirus using anti-p18 polyclonal antibody by IFA (100×).

3 讨论

NDRV 是近年来严重危害我国水禽健康的新发鸭源病毒, NDRV 感染宿主后引起脾脏、肝脏、法氏囊出血病变, 导致免疫抑制和生长障碍, 进而容易继发其他病原的感染^[8-9]。然而, 目前尚无防控 NDRV 的有效疫苗和药物, 使得 NDRV 仍在我国许多鸭场中流行^[10-12]。

本研究团队前期分离到 NDRV 强毒株 NP03, 并对病毒的全基因组进行了测序^[2]。为获得 NDRV 弱毒疫苗株, 我们将 NP03 在 MDEF 细胞上连续传代, 选育到 1 株 NDRV 弱毒株 S^[7]。前期通过基因组比对发现, NDRV 弱毒株的 p18 基因发生突变, 导致 p18 蛋白比强毒株缺失了 C 端的 35 个氨基酸。为了鉴定 NDRV 强弱毒株 p18 蛋白差异, 本研究制备了 p18 蛋白小鼠多克隆抗体, 并通过 Western Blot 鉴定 NDRV 强弱毒株 p18 蛋白确实存在明显的分子量差异, 验证了弱毒株 p18 蛋白缺失了蛋白 C 端的 35 个氨基酸。

将分离到的强毒株在细胞、胚蛋或者动物体内进行传代致弱是选育天然弱毒疫苗株的有效措施, 病毒在连续传代过程中会产生基因突变, 进而减弱病毒的致病性。鸭坦布苏病毒在 BHK-21 细胞上传 310 代后减弱了对鸭子的致病性, 研究发现强毒株的 E 蛋白第 367 位苏氨酸突变为弱毒株的赖氨酸是病毒致弱的关键氨基酸位点^[13]。鸡传染性支气管炎病毒在鸡胚连续传代的弱毒株的 S 基因 3'端突变产生一个终止密码子, 使 S2 亚基 C 端的胞质尾结构域(cytoplasmic tail, CT)截短 9 个氨基酸, 改变了 S 蛋白的定位, 是病毒致弱的关键原因^[14]。本研究的 NDRV 弱毒株在 p18 基因的突变产生的终止密码子造成了 35 个氨基酸的截短表达, 然而还不清楚该突变与病毒致弱的关系, 并且对 NDRV p18 蛋白的功能也知之甚少。NDRV 的 p18 蛋白与鸡源禽呼肠孤病毒的 p17 蛋白是同源蛋白, 对 ARV 的 p17 蛋白功能的研究已有了较大的进展。p17 蛋白是一个核质穿梭蛋白, 其中 p17 蛋白 C 端

具有核定位信号的功能, p17 蛋白的核定位能够调控细胞周期、诱导细胞自噬, 在病毒复制中发挥重要作用^[4-6]。本研究的 NDRV p18 蛋白 C 端是否同样含有核定位信号, 弱毒株的 p18 蛋白 C 端缺失是否会改变蛋白的定位功能, 以及 p18 蛋白 C 端缺失是否是病毒毒力减弱的关键原因等都是需要回答的科学问题。这些科学问题的阐明将对 NDRV 及其他禽呼肠孤病毒弱毒疫苗的研发提供理论支撑。本研究的结果将为深入研究 NDRV p18 蛋白在病毒致弱中的作用及机理奠定基础。

4 结论

本研究表达并纯化获得了 NDRV 强弱毒株的 p18 重组蛋白, 制备了强毒株的 p18 蛋白小鼠多克隆抗体, 进一步在病毒感染细胞水平验证了 NDRV 弱毒株的 p18 蛋白 C 端天然缺失 35 个氨基酸, 为深入研究 NDRV p18 蛋白生物学功能及病毒致弱机理奠定了基础, 将为 NDRV 新型疫苗的研发提供理论支撑。

REFERENCES

- [1] 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 江斌, 王劭, 程晓霞, 朱小丽, 张世忠, 李兆龙, 程由铨. 一种新的鸭病(暂名鸭出血性坏死性肝炎)病原学研究初报[J]. 中国农学通报, 2009, 25(16): 28-31.
CHEN SY, CHEN SL, LIN FQ, JIANG B, WANG S, CHENG XX, ZHU XL, ZHANG SZ, LI ZL, CHENG YQ. The primary study of pathogen of duck hemorrhagic-necrotic hepatitis[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(16): 28-31 (in Chinese).
- [2] 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 王劭, 江斌, 程晓霞, 朱小丽, 李兆龙. 新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 224-230.
CHEN SY, CHEN SL, LIN FQ, WANG S, JIANG B, CHENG XX, ZHU XL, LI ZL. The isolation and identification of novel duck reovirus[J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(3): 224-230 (in Chinese).
- [3] DU X, DING M, WU Q, LI CH, GUO H, LIU G, CHEN Z. Characterization of a P18 protein in the S1 segment of the novel duck reovirus genome[J]. Acta Virologica, 2020, 64(1): 59-66.
- [4] LI CX, WEI HC, YU LP, DUAN SP, CHENG JH, YAN WG, ZHANG XR, WU YT. Nuclear localization of the p17 protein of avian reovirus is correlated with autophagy induction and an increase in viral replication[J]. Archives of Virology, 2015, 160(12): 3001-3010.
- [5] CHIU HC, HUANG WR, LIAO TL, WU HY, MUNIR M, SHIH WL, LIU HJ. Suppression of vimentin phosphorylation by the avian reovirus p17 through inhibition of CDK1 and Plk1 impacting the G2/M phase of the cell cycle[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162356.
- [6] HUANG WR, LI JY, WU YY, LIAO TL, NIELSEN BL, LIU HJ. p17-modulated Hsp90/Cdc37 complex governs oncolytic avian reovirus replication by chaperoning p17, which promotes viral protein synthesis and accumulation of viral proteins σ C and σ A in viral factories[J]. Journal of Virology, 2022, 96(6): e0007422.
- [7] 胥焯然, 程晓霞, 郑敏, 朱小丽, 董慧, 肖世峰, 刘鸿威, 曾显成, 陈少莺, 陈仕龙. 新型鸭呼肠孤病毒弱毒 S 株在雏番鸭体内的增殖规律[J]. 福建农业学报, 2023, 38(9): 1011-1016.
XU ZR, CHENG XX, ZHENG M, ZHU XL, DONG H, XIAO SF, LIU HW, ZENG XC, CHEN SY, CHEN SL. Replication of attenuated strain S of novel duck reovirus in Muscovy ducklings[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(9): 1011-1016 (in Chinese).
- [8] LUO D, LIU R, WENG LX, LI K, QI XL, GAO YL, LIU CJ, ZHANG YP, CUI HY, PAN Q, GAO L, WANG XM. Genomic sequences and pathogenic characteristics of two variant duck reoviruses associated with spleen necrosis[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2021, 92: 104847.
- [9] WANG HZ, GAO B, LIU XD, ZHANG S, DIAO YX, TANG Y. Pathogenicity of a variant duck orthoreovirus strain in Cherry Valley Ducklings[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 242: 108546.
- [10] KONG J, SHAO GM, ZHANG YK, WANG JF, XIE Z, FENG KY, ZHANG XH, XIE QM. Molecular characterization, complete genome sequencing, and pathogenicity of novel duck reovirus from South Coastal Area in China[J]. Poultry Science, 2023, 102(8): 102776.
- [11] PENG ZF, ZHANG H, ZHANG XZ, WANG HY, LIU ZH, QIAO HX, LV YJ, BIAN CZ. Identification and molecular characterization of novel duck reoviruses in Henan Province, China[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10: 1137967.
- [12] ZHANG TT, WANG XY, JIANG WS, FAN XL, LIU N, MIAO RC, ZHAI XY, WEI LM, JIAO PR, JIANG SJ. Research note: genetic characterization of novel duck reoviruses from Shandong Province, China in 2022[J]. Poultry Science, 2023, 102(10): 102969.
- [13] SUN MX, ZHANG LJ, CAO YX, WANG J, YU ZD, SUN X, LIU FL, LI ZL, LIU PH, SU JL. Basic amino acid substitution at residue 367 of the envelope protein of tembusu virus plays a critical role in pathogenesis[J]. Journal of Virology, 2020, 94(8): e02011-19.
- [14] LIANG R, LIU K, LI YF, ZHANG XH, DUAN LQ, HUANG M, SUN L, YUAN F, ZHAO J, ZHAO Y, ZHANG GZ. Adaptive truncation of the S gene in IBV during chicken embryo passaging plays a crucial role in its attenuation[J]. PLoS Pathogens, 2024, 20(7): e1012415.