

范涛, 梁琳, 李嘉阳, 等. 减蛋综合征病毒在不同品系小鼠体内的组织分布[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 160-166.

Fan T, Liang L, Li JY, et al. Tissue distribution of the egg drop syndrome virus in different mouse strains [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 160-166.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.006

减蛋综合征病毒在不同品系小鼠体内的组织分布

范涛^{1,2}, 梁琳¹, 李嘉阳¹, 李刚^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 目的 通过人工感染减蛋综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDSV), 观察病毒在不同品系小鼠体内增殖情况以及动态变化规律, 为 EDSV 构建载体提供理论依据与数据支持。方法 选取免疫系统正常的BALB/c小鼠、T细胞免疫缺陷裸鼠(Nu)以及高度免疫缺陷小鼠(NSG)为研究对象, 每品系32只, 雌性, 5~6周龄, 经腹腔注射人工感染EDSV, 分别于攻毒后1、3、5、7、14、21、28、35 d采集血清, 应用间接ELISA方法进行抗体监测; 选择攻毒后1、7、14、21、28 d小鼠, 采集心脏、肺、肝、脾、肾、小肠、子宫、气管、食管、脑10种组织, 应用荧光定量PCR相对定量比较Ct法($\Delta\Delta CT$)进行各组织内病毒载量的检测。结果 BALB/c小鼠于攻毒后3 d即可在血清内检测到抗体的表达, 14 d抗体水平达到最高, 并一直维持至监测期内35 d; Nu小鼠也可于攻毒后3 d检测到抗体, 表达水平较BALB/c小鼠有所降低, 攻毒14 d后, Nu小鼠血清中抗体水平出现下降, 至35 d抗体一直维持在较低的水平; NSG小鼠在整个监测过程中, 抗体水平一直处于阴性状态。核酸相对定量结果显示, BALB/c小鼠感染后1 d, 肝组织中的病毒表达量最高, 达到5.45个数量级, 其次由高到低依次是脾、食管、子宫、小肠、肺、气管、肾、心脏, 脑组织中病毒含量最低, 随感染时间的延长, 各组织内病毒表达量较感染1 d均有所下降, 至攻毒后28 d, 肝、脾病毒表达量依然维持着较高的水平; Nu小鼠和NSG小鼠感染1 d表现为脾中病毒表达量最高, 分别为3.95和4.05个数量级, 其次为肝, 攻毒28 d, 两种小鼠体内各器官内仍可以检出阳性信号, 肝、脾病毒表达量较高。结论 EDSV可刺激小鼠产生免疫应答, 在免疫缺陷小鼠体内抗体水平表达量较低。该病毒在小鼠体内有肝、脾等组织嗜性, 为EDSV开发成为载体以及在实验动物模型上的进一步研究与应用提供了参考数据。

【关键词】 减蛋综合征病毒; 不同品系小鼠; 病毒组织分布

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)02-0160-07

Tissue distribution of the egg drop syndrome virus in different mouse strains

FAN Tao^{1,2}, LIANG Lin¹, LI Jiayang¹, LI Gang^{1*}

(1. Institute of Animal Sciences of CAAS, Beijing 100193, China. 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629)

Corresponding author: LI Gang. E-mail: ligang03@caas.cn

【Abstract】 Objective Through artificial infection with egg drop syndrome virus (EDSV), to observe the proliferation and dynamic changes of the distribution of EDSV *in vivo* in different mouse strains, and to provide a theoretical basis and data support for construction of the virus vectors. **Methods** Three mouse strains with different immune status, BALB/c (normal immunity), Nu (T-cell immunodeficiency) and NSG (high immunodeficiency) mice were used. Thirty-two 5-6 week old female mice per strain were grouped. The mice were infected by intraperitoneally injection of EDSV and serum samples were collected 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 35 days later. Antibodies were monitored by an indirect ELISA.

【基金项目】 十三五国家重点研发计划(2016YFD0501102); 国家自然科学基金(31472203)。

Funded by National Keyjoint Research and Invention Program of the 13th Five-year Plan (2016YFD0501102), National Natural Science Foundation of China (31472203).

【作者简介】 范涛(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 预防兽医学。Email: fantao@nifdc.org.cn

【通信作者】 李刚(1956—), 男, 教授, 研究方向: 动物传染病。Email: ligang03@caas.cn

Samples of the heart, lung, liver, spleen, kidney, small intestine, uterus, trachea, esophagus and brain were collected from the mice at 1, 7, 14, 21 and 28 days after infection. The viral load in each tissue was detected by quantitative fluorescence PCR and comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method. **Results** Antibodies were detected 3 days after infection in the sera of BALB/c mice, reached the highest level at 14 days, and this level was maintained until 35 days. Antibodies were detected in the Nu mice 3 days post-infection, (but at a lower level than that in BALB/c mice), the levels were reduced after 14 days of infection and maintained at a low level until 35 days post-infection. The antibody of NSG mice was negative during the whole process of infection monitoring. Relative quantification of nucleic acids showed that EDSV expression in the liver tissue of BALB/c mice reached 5.45 orders of magnitude at 1 day after infection, followed by the spleen, esophagus, uterus, small intestine, lung, trachea, kidney and heart. EDSV content in the brain tissue was the lowest. With the extension of infection period, EDSV expression in each tissue was lower than that on the first day of infection, and EDSV expression in the liver and spleen remained high 28 days after infection. Nu mice and NSG mice showed the highest EDSV expression in the spleen 1 day after infection (3.95 and 4.05 orders of magnitude, respectively), followed by that in the liver. Positive signals could be detected in the organs of Nu mice and NSG mice 28 days after infection. EDSV expression in the liver and spleen remained high. **Conclusions** EDSV can stimulate immune response in mice, and the level of antibody expression in immunodeficient mice is low. EDSV exhibits hepatic and splenic tropism in mice *in vivo*. The present study provides reference data for development of EDSV vectors, as well as for their further application in laboratory animals.

【Keywords】 egg drop syndrome virus; mouse strains; virus tissue distribution

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

减蛋综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDSV)属禽类腺病毒,2005 年国际病毒分类委员会(ICTV)新的腺病毒分类标准中将 EDSV 归为富 AT 腺病毒属^[1]。该病毒主要引起禽类(鸡、鸭、鹅等)产蛋量急剧下降,可在鸭胚细胞、鸭胚成纤维细胞中良好增殖,而在鸡胚成纤维细胞中增殖不良,以鸭为自然宿主^[2],也称为鸭腺病毒 A 型。

腺病毒具有宿主范围广,致病性低,外源基因承载量大等特点,可作为抗原基因载体制成疫苗,诱导固有免疫反应或在宿主细胞内表达承载基因产物,进而实现免疫预防或治疗目的。禽腺病毒凭借种属的差异,对哺乳动物来说有很好的安全性,已成为重要的疫苗载体并得到广泛的应用^[3-5],研究较早且具有代表性的毒种是鸡胚致死孤儿病毒(CELOV),而 EDSV 是否具备同样的效果仍需进行实验证实。本研究选用了 3 个品系小鼠模型作为对象,通过人工感染,观察 EDSV 在小鼠体内增殖情况以及动态变化规律,为该病毒构建载体提供理论依据与数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

免疫系统正常小鼠 BALB/c、T 细胞免疫缺陷小鼠 Nu、高度免疫缺陷小鼠 NSG,每个品系 32 只,SPF

级,雌性,5~6 周龄,体重为 14~16 g,由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所保存并提供【SCXK(京)2014-0013】。动物饲养在中国食品药品检定研究院动物实验室屏障环境隔离器中【SYXK(京)2016-0004】。饲养环境:温度 22~26℃,相对湿度 40%~70%,压差 ≥ 50 Pa,换气次数 ≥ 20 次/h,空气洁净度 5 级,明暗交替 12/12 h,噪声 ≤ 60 dB。同时本实验在中检院实验动物伦理委员会监督与指导下进行【中检动(福)第 2016(B)007 号】。

1.1.2 主要仪器

隔离器(苏州冯氏实验动物设备有限公司软包隔离器,中国),离心机(Beckman X-22R,德国),超速离心机(Hitachi CP100NX,日本);紫外分光光度仪(Thermo Nano Drop 2000,美国);酶标仪(Thermo Fisher Multiskan Go,美国);恒温培养箱(上海智城 ZXMP-A1230,中国);荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司 ABI 7500 Fast,美国);单通道(2~20 μ L、20~200 μ L)、八通道(50~300 μ L)微量移液器(Eppendorf,德国)。

1.1.3 主要试剂耗材

ELISA 96 孔可拆式(8 \times 12)聚苯乙烯酶标板(NUNC 公司,丹麦),0.1 mL 八联排管及八联排管超净光盖(BIO plastics BV,荷兰);TaKaRa Premix Ex Taq 试剂、蛋白酶 K、RNase A(宝生物工程(大

连)有限公司,中国),乙醇、饱和酚、氯仿、异丙醇等(北京化学工业集团有限公司,中国);蔗糖密度梯度溶液、1×PBS、抗原包被液、封闭液、PBST 洗液、抗体稀释液、酶结合物稀释液、TMB 显色剂、终止液等由实验室自行配制。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠攻毒与样本采集

将 EDSV 病毒液室温解冻,摇匀。3 个品系小鼠,品系内分为实验组 24 只,每只小鼠腹腔注射 0.1 mL 血凝效价为 2^{12} 的病毒液;对照组 8 只,每只腹腔注射同等剂量的 PBS。实验组与对照组分开放置于不同隔离器内饲养。分别于攻毒后 1、3、5、7、14、21、28、35 d,每日选取各品系 3 只实验组和 1 只对照组小鼠,CO₂ 麻醉,摘除眼球取全血约 1 mL,置于 1.5 mL 离心管中,4℃ 静置析出血清,用微量移液器吸取上层血清至新离心管中,编号,-20℃ 冻存备用。选择攻毒后 1、7、14、21、28 d 实验组与对照组小鼠,剖取心脏、肺、肝、脾、肾、小肠、子宫、气管、食管、脑 10 种组织,每种组织取一小块置于 1.5 mL 离心管中,用于 DNA 提取,-80℃ 冻存。

1.2.2 间接 ELISA 抗原包被浓度与抗体稀释度优化

30% ~ 50% (m/v) 5 个间隔相等浓度梯度的蔗糖溶液进行超速离心纯化抗原;用纯化的 EDSV 抗原包板,抗原稀释为 2、5、7、10 μg/mL 4 个浓度,取已知阳性血清、阴性血清各 1 份,分别做 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 倍的稀释,“方阵滴定法”确定抗原最佳包被浓度与血清工作稀释度,P/N 值最大时对应的抗原浓度与抗体稀释度为工作浓度。

1.2.3 间接 ELISA 方法小鼠血清抗体监测

用优化后浓度的抗原液包板,100 μL/孔,37℃

1 h 后 4℃ 过夜;设置阴性对照、阳性对照、空白对照各 2 个孔,分别加入工作浓度稀释后的 SPF 级小鼠血清、已知 EDSV 抗体阳性小鼠血清和 PBS,待检血清样本稀释后每份平行做 2 孔,每孔 100 μL,用封板膜封板,37℃ 反应 1 h;取出后洗板 5 次,叩干;山羊抗鼠辣根过氧化物酶 (goat anti-mouse IgG-HRP) 按 1:5000 稀释为工作浓度,每孔加入 100 μL,封板,37℃ 孵箱反应 1 h,取出后洗板 5 次并叩干;每孔加入 100 μL 底物溶液,放入铝箔袋,37℃ 避光显色 10 ~ 15 min;取出酶标板,每孔加入 50 μL 终止液 (2 mol/L 硫酸);酶标仪设定波长为 450 nm,读取板上各孔 OD 值。

1.2.4 TaqMan qPCR 检测 EDSV 体内组织分布

将各组织块解冻,剪碎,饱和酚/氯仿法提取总 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度。以 EDSV 六邻体蛋白编码区基因序列作为目的基因,文献获得探针引物^[6];NCBI 网站公布的小鼠 β-actin 蛋白 (Actb) 基因序列 (Gene ID: 11461) 为内参基因,设计探针引物,由宝生物工程 (大连) 有限公司设计合成。(表 1)

根据 TaKaRa Premix Ex Taq 试剂使用 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪推荐反应体系及条件进行扩增,qPCR 反应体系:Premix Ex Taq (2×buffer) 10 μL、Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL、Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL、Probe (5 μmol/L) 0.8 μL、ROX Reference Dye2 (50×) 0.2 μL、cDNA 2 μL、ddH₂O 6.2 μL,qPCR 反应程序:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环,60℃ 时收集荧光信号。用比较 CT 法 (ΔΔCT) 进行数据处理,得出相对定量 (RQ) 值,再将 RQ 值取 10 的对数 (LgRQ),转换为数量级的形式来判断变化量^[7]。

表 1 EDSV、Actb 荧光定量 PCR 引物及探针

Table 1 Primers and probes for EDSV, Actb TaqMan qPCR

引物名称 Primer names	序列 Sequences	产物长度/bp Products length/bp
EDS-taq-F	5'-GACCGGTCACAAAACTTCATCT-3'	
EDS-taq-R	5'-CACAACTCCTGTTATCACCCACATTT-3'	108
EDS-Probe	5'-(FAM)CGCATCGTCCCGATCCAAACAGA (BHQ)-3'	
Actb-DNA-F	5'-CTGGAGAAGAGCTATGAG-3'	
Actb-DNA-R	5'-CAGACTTAACTTGACTACTATGG-3'	170
Actb-Probe	5'-(FAM)CATCACTATTGGCAACGAGCGG (BHQ1)-3'	

2 结果

2.1 间接 ELISA 检测三种小鼠血清抗体变化规律

2.1.1 抗原包被浓度与抗体稀释度优化

“方阵滴定”结果显示,EDSV 抗原包被浓度为 2 μg/mL,阴性、阳性血清稀释度为 1:800 倍时,此时的 P/N 值最高,为 23.10,因此,确定使用该浓度的抗原及血清稀释度进行抗体检测。(表 2)

表 2 EDSV 抗原包被浓度及血清工作稀释度结果

Table 2 Results of EDSV coating concentration and serum working dilution

抗原包被浓度(μg/mL)		血清稀释度 Serum dilution				
Coating concentration of antigen(μg/mL)		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
10	+	2.565	2.753	3.224	3.548	1.644
	-	0.558	0.316	0.214	0.163	0.079
	P/N	4.60	8.71	15.07	21.77	20.81
7	+	2.561	3.060	3.082	3.022	1.182
	-	0.508	0.310	0.214	0.137	0.058
	P/N	5.04	9.87	14.40	22.06	20.38
5	+	2.382	2.846	3.134	3.124	1.538
	-	0.510	0.305	0.220	0.139	0.069
	P/N	4.67	9.33	14.25	22.47	22.29
2	+	2.266	2.521	3.023	3.165	1.393
	-	0.514	0.313	0.201	0.137	0.081
	P/N	4.41	8.05	15.04	23.10	17.20

2.1.2 间接 ELISA 监测三种小鼠血清抗体

ELISA 检测结果显示(表 3),BALB/c 小鼠攻毒 3 d 即可在血清内检测到抗体的表达,平均 OD 值为 0.901;至 14 d,抗体水平达到最高,至监测期内 35 d 一直维持高水平表达;Nu 小鼠也可于攻毒 3 d 检测到抗

体,但表达水平较 BALB/c 小鼠有所降低,平均 OD 值为 0.587,攻毒 14 d 后,Nu 小鼠血清中抗体水平出现下降,至 35 d 抗体一直维持在较低的水平;NSG 小鼠在整个监测过程中,抗体水平一直处于阴性状态。根据检测数据,绘制三品系小鼠血清抗体变化趋势图(图 1)。

表 3 三品系小鼠血清抗体 ELISA 检测结果

Table 3 ELISA test results of serum antibodies in the three mouse strains

时间点/d	BALB/c	阴性对照	Nu	阴性对照	NSG	阴性对照
Time/d	BALB/c	Control	Nu	Control	NSG	Control
1	0.162 ± 0.032	0.129	0.213 ± 0.050	0.150	0.094 ± 0.018	0.073
3	0.901 ± 0.043	0.166	0.587 ± 0.043	0.125	0.105 ± 0.029	0.085
5	3.507 ± 0.267	0.177	1.390 ± 0.155	0.179	0.146 ± 0.076	0.098
7	3.875 ± 0.149	0.134	2.204 ± 0.345	0.125	0.100 ± 0.022	0.084
14	3.947 ± 0.106	0.206	2.321 ± 0.197	0.274	0.089 ± 0.008	0.081
21	3.785 ± 0.295	0.190	0.761 ± 0.647	0.214	0.103 ± 0.025	0.073
28	3.932 ± 0.136	0.183	0.817 ± 0.184	0.141	0.088 ± 0.013	0.079
35	4.000 ± 0.000	0.143	0.963 ± 0.670	0.169	0.142 ± 0.018	0.069

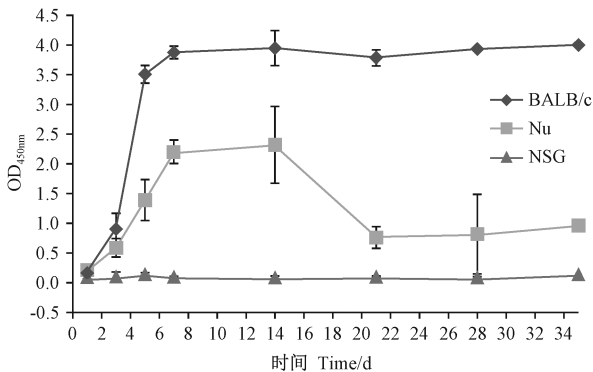


图 1 三品系小鼠血清抗体 ELISA 检测结果比较

Figure 1 Comparison of ELISA results of serum antibodies in the three mouse strains

2.2 TaqMan qPCR 检测 EDSV 组织分布结果

3 个品系小鼠的 10 种组织样本,除 NSG 小鼠 7

d 和 14 d 脑组织中未检测到病毒含量外,其他样本目的基因与内参基因均可计算出相对表达量(表 4)。同时,各品系对照组小鼠在实验期内,各组织中均未扩增出病毒核酸。

根据实验结果,BALB/c 小鼠感染后 1 d,肝组织中的病毒表达量最高,达到 5.45 个数量级,其次由高到低依次是脾、食管、子宫、小肠、肺、气管、肾、心脏,脑组织中病毒含量最低,随感染时间的延长,各组织内病毒表达量较感染 1 d 均有所下降;至攻毒后 28 d,肝、脾病毒表达量依然维持着较高的水平,脑组织中病毒相对含量降至最低,其他各脏器组织中仍可检测到病毒含量(图 2)。

Nu 小鼠和 NSG 小鼠略有差异,其感染 1 d 表现为脾组织中病毒表达量最高,分别为 3.95 和 4.05 个数量级,其次为肝,Nu 小鼠 1 d 肝病毒含量为

3.84 个数量级, NSG 小鼠为 3.82 个数量级。随后两品系小鼠各器官内的病毒表达量逐步降低, 以 Nu 小鼠最为明显, 于攻毒 28 d, 两种小鼠体内各器官内仍可以检出阳性信号, 肝、脾病毒表达量较高。结

果表明, 在监测期内, EDSV 可在部分小鼠组织器官内始终存在, 主要集中在肝、脾等组织中(图 3、图 4)。

表 4 三品系小鼠各组织病毒载量相对定量结果

Table 4 Relative quantitative results of viral load in tissues of the three mouse strains

品系 Strain	时间/d Time/d	心脏 Heart	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidneys	小肠 Small intestine	子宫 Uterus	气管 Trachea	食管 Esophagus	脑 Brain
BALB/c	1	2.43	3.28	5.45	4.01	2.89	3.49	3.72	3.04	3.81	1.01
	7	1.83	1.05	2.26	2.94	1.55	0.49	1.31	1.82	1.73	1.55
	14	2.33	2.48	3.28	3.15	2.67	1.85	2.07	2.25	2.67	0.82
	21	2.37	1.8	3.12	2.68	2.07	1.34	2.07	1.39	1.12	0.16
	28	2.03	1.99	2.89	3.29	2.61	2.15	0.6	1.99	0.41	0
Nu	1	2.88	2.24	3.84	3.95	3.2	3.03	3.45	2.37	2.28	2.36
	7	1.38	0.64	2.45	1.76	1.97	0.86	1.46	0.62	1.89	0.17
	14	1.35	0.42	2.66	1.43	1.93	0.64	1.34	0.72	0.19	0.67
	21	0.87	0.26	1.95	1.33	1.31	0.73	0.85	0.53	0.55	0.25
	28	0.24	0.05	2.23	1.09	1.22	0.44	0.14	0.12	0.52	0
NSG	1	2.45	2.64	3.82	4.05	1.57	1.59	2.45	2.39	2.91	0.7
	7	2.62	2.66	2.77	2.74	2.14	2.17	2.49	2.04	1.37	—
	14	1.56	1.3	1.82	0.87	1.16	1	0.7	0.86	0.95	—
	21	1.36	0.49	1.61	1.72	1.43	1.1	0.73	1.22	2.02	0.19
	28	2.31	1.41	2.49	2.1	1.43	1.45	1.15	1.55	1.24	0

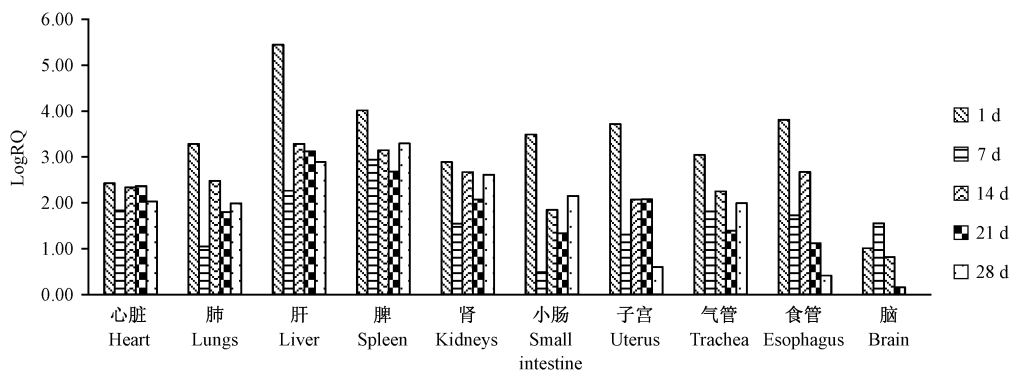


图 2 EDSV 在 BALB/c 小鼠体内组织分布

Figure 2 Organ distribution of EDSV in the BALB/c mice

3 讨论

EDSV 按原分类属于禽类腺病毒Ⅲ群, 由五邻体蛋白(penton)、六邻体蛋白(hexon)与纤维蛋白(fiber)共同构成病毒衣壳。试验证明, 三种结构性蛋白基因经过重组表达鉴定, 均具有免疫原性^[8-10]。在 EDSV 感染禽类的研究中, 种鸭可在攻毒 3 d 检测到血清抗体, HI 效价可达 8 Log₂, 并于攻毒后 12 d 达到最高^[11]; 王晓东^[12]对 3 月龄 SPF 鸭仅进行基础免疫后, 第 1 周即可检测出血清抗体, 平均 HI 效价 5.75 Log₂, 两周后达到最高 6.75 Log₂, 抗体水平

可维持 17 周在 5 Log₂ 以上。以上结果都指示出 EDSV 可快速刺激禽类机体产生免疫应答反应, 并产生持久性的抗体保护。鼠腺病毒(mouse adenovirus, Mad)以小鼠为天然宿主, 在实验鼠群中感染比例约为 8.3%^[13]。人工感染后 15 d ELISA 方法可检测出阳性血清抗体, 37 d 达到峰值^[14]。本实验是使用禽腺病毒人工感染小鼠, 结果显示, 该病毒株可使小鼠在短期内产生较高水平的抗体, 并且可维持 35 d 抗体持续检出, 相比鼠腺病毒, EDSV 能够较快地刺激小鼠机体产生免疫应答反应, 与禽类感染此病毒后的特性相一致。

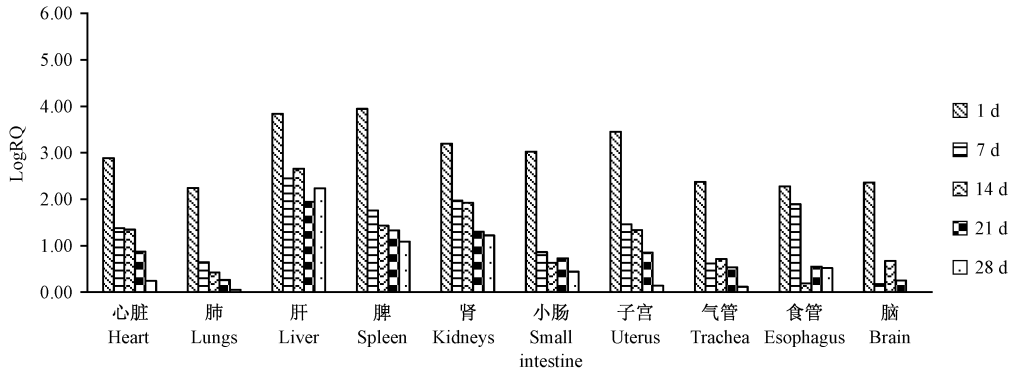


图 3 EDSV 在 Nu 小鼠体内组织分布

Figure 3 Organ distribution of EDSV in the nude mice

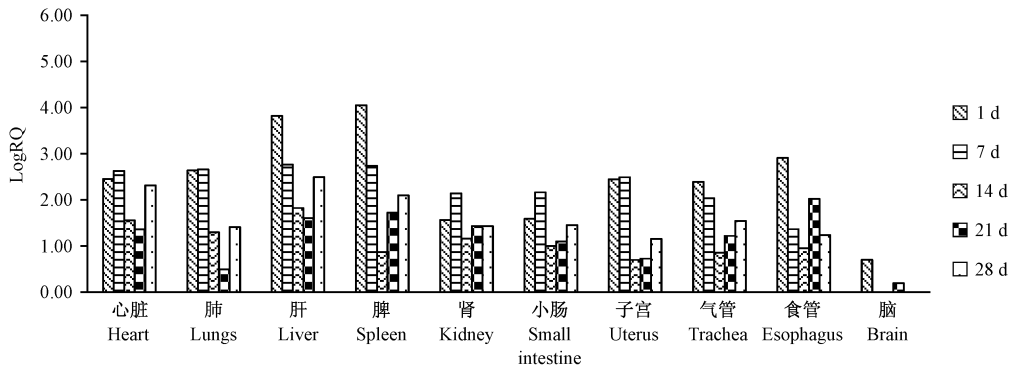


图 4 EDSV 在 NSG 小鼠体内组织分布

Figure 4 Organ distribution of EDSV in the NSG mice

通过实验结果可以看出,动物自身免疫机能对 EDSV 抗体的表达产生着影响。免疫机能正常的 BALB/c 小鼠,在抗原刺激后 3 d 即可检测出血清抗体,并随着感染时程延长,抗体水平逐渐增高,监测至 35 d,仍然保持着较高的抗体含量。裸小鼠较 BALB/c 而言,缺少胸腺,体内无成熟的 T 淋巴细胞,而 EDSV 像大多数微生物一样属胸腺依赖性抗原(TDAg),辅助性 T 细胞(Th)的缺陷,导致小鼠体内 B 细胞在免疫应答过程中产生的抗体有所减少,不能持续产生有效的体液免疫应答。因此,裸鼠的血清抗体产生初期,表达水平较 BALB/c 小鼠偏低,监测至 21 d 时,血清抗体水平下降明显。NSG 小鼠是在 NOD 小鼠背景基础上, DNA 修复复合蛋白 *Prkdc* 发生 *scid* 突变,致使小鼠 B、T 淋巴细胞缺失,同时 *IL2rg* 缺失突变,阻止了多重受体细胞因子信号传导,导致功能性 NK 细胞缺失^[15],动物机体无法产生细胞免疫应答与体液免疫应答,因此,在整个抗原刺激过程中,其抗体水平一直维持在阴性,符合该模型特点。

应用荧光定量 PCR 相对定量法检测病毒载量,

其优势在于去除了采样间的误差,结果用变化倍数来表示,用于指示病毒在体内含量的变化趋势。通过比较不同品系小鼠各组织脏器中病毒核酸相对表达量可以看出,三品系小鼠均可在腹腔注射病毒液后 1 d 于体内各主要脏器中检测到病毒,这可能与感染途径有关,病毒液随血液循环迅速扩散至全身各脏器中。BALB/c 小鼠感染后 1 d,肝为病毒相对表达量最高的组织器官,感染至 28 d,脾中病毒相对表达量最高,肝较脾中病毒水平略低,但依然显示有较高的表达量;Nu 和 NSG 两种免疫缺陷型小鼠表现出攻毒后 1 d 脾病毒含量最,其次是肝,这可能与它具有的免疫缺陷特性有关,两种小鼠的脾均小于免疫正常的小鼠,至 28 d 时,二者肝中病毒相对表达量是各组织间最高的,由此说明,EDSV 对小鼠肝与脾有一定的亲嗜性。通过三品系小鼠攻毒全程监测结果可以看出,28 d 时体内各组织的病毒含量较攻毒 1 周内(1 ~ 7 d)均有所降低,说明动物机体自身对 EDSV 有一定的清除作用。病毒在免疫系统正常与免疫缺陷小鼠的体内均没有引起明显的组织病变,除了动物机体的免疫系统发挥作用

以外还可能与组织细胞表面结合受体有关。腺病毒有严格的种属特异性,而 EDSV 又是介于禽类腺病毒与哺乳动物腺病毒的中间体^[16],推测该病毒在哺乳动物体内可以增殖表达,是否引起组织细胞发生病变需进一步进行实验观察。

综上所述,减蛋综合征病毒可刺激小鼠产生免疫应答,在免疫缺陷小鼠体内抗体水平表达量较低,该病毒在小鼠体内有肝、脾等组织嗜性特点,为 EDSV 构建新型载体以及在实验动物模型上的进一步研究与应用提供了理论基础与数据支持。

参 考 文 献(References)

- [1] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [R]. Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] 程安春,汪铭书,钟妮娜,等. 鸭腺病毒感染的研究—病毒分离鉴定及病原特性[J]. 中国兽医科技, 1996,26(10):3-5. Cheng AC, Wang MS, Zhong NN, et al. Studies of duck adenovirus infection— isolation, identification and pathogenic characteristics of virus [J]. Chin J Vet Sci Technol, 1996, 26(10):3-5.
- [3] 王玉泉,马立宾,于秋莲. 动物腺病毒载体的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2009, 24(2):180-183. Wang YQ, Ma LB, Yu QL. Construction of animal adenovirus vectors — A review [J]. J Inner Mongolia Univ for Natl, 2009, 24(2):180-183.
- [4] 柳云帆,吴小兵,阮力. 腺病毒载体在疫苗研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4):552-558. Liu YF, Wu XB, Ruan L. Application of adenovirus as vaccine vectors [J]. Lett Biotech, 2011, 22(4):552-558.
- [5] 赵莉,周洁,高诚. 禽腺病毒载体研究进展[J]. 动物医学进展, 2012,33(11):99-103. Zhao L, Zhou J, Gao C. Progress on fowl adenovirus vector [J]. Prog Vet Med, 2012,33(11):99-103.
- [6] 马震原,李刚,李文超,等. TaqMan 荧光定量 PCR 检测鸡产蛋下降综合征病毒方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(5):767-772. Ma ZY, Li G, Li WC, et al. Development and application of TaqMan fluorescent real-time quantitative PCR for the detection of egg drop syndrome virus [J]. Acta Vet Et Zootech Sin, 2012, 43(5):767-772.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [8] 肖妙,于志丹,马波,等. 减蛋综合征病毒五邻体重组蛋白的原核表达及抗原性鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(2):83-87. Xiao M, Yu ZD, Ma B, et al. Cloning and expression of recombinant of protein penton gene from egg drop syndrome virus and identification of expressed protein antigenicity [J]. J Northeast Agric Univ, 2009, 40(2):83-87.
- [9] 杜冬华. 鸡减蛋综合征病毒河北分离株六邻体蛋白基因的克隆表达及免疫原性研究[D]. 河北农业大学, 2007. Du DH. Cloning and expression of hexon gene from egg drop syndrome virus detected in Hebei and analysis of immunogenicity [D]. Agricultural University of Hebei, 2007.
- [10] 郭建军,范汉东,杨一兵. 减蛋综合征病毒纤维蛋白主要抗原结构域原核表达及抗原性鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(2):22-25. Guo JJ, Fan HD, Yang YB. Prokaryotic expression of structural domains of fiber protein of egg drop syndrome virus and antigenicity identification[J]. Anim Husbandry Vet Med, 2012, 44(2):22-25.
- [11] 冯柳柳,程冰花,刁有祥,等. 鸡源减蛋综合征病毒 SD01 株对种鸭的致病性的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(11):821-824. Feng LL, Cheng BH, Diao YX, et al. Pathogenicity of chicken-origin egg drop syndrome virus SD01 strain in laying ducks [J]. Chin J Prev Vet Med, 2015, 37(11):821-824.
- [12] 王晓东. EDSV 京 911 株五邻体优势抗原表位的筛选及鉴定[D]. 东北农业大学, 2012. Wang XD. Screening and identification the dominant epitopes on penton of EDSV [D]. Northeast Agricultural University, 2012.
- [13] 王翠娥,陈立超,周倩,等. 实验大鼠小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(2):20-24. Wang CE, Chen LC, Zhou Q, et al. Testing of multiple viral antibodies in laboratory rats and mice [J]. Lab Anim Sci, 2014, 31(2):20-24.
- [14] 罗银珠,张钰,潘金春,等. 广东小鼠腺病毒血清学调查及病毒和抗体在人工感染小鼠体内消长规律研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(1):43-48. Luo YZ, Zhang Y, Pan JC, et al. Serological survey of Mad infection among mice in Guangdong and distribution and serological studies in artificial infection[J]. Chin J Comp Med, 2017,27(1):43-48.
- [15] The Jackson Laboratory, NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. <http://www.jax.org/strain/005557>
- [16] Hess M, Blöcker H, Brandt P. The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses [J]. Virology, 1997, 238(1):145-156.

[收稿日期] 2018-10-11