

董慧, 王劲, 朱小丽, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 σB 蛋白的可溶性原核表达与纯化[J]. 福建农业学报, 2025, 40 (7): 656–661.
DONG H, WANG S, ZHU X L, et al. Prokaryotic Expression and Purification of σB of Novel Duck Reovirus[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2025, 40 (7): 656–661.



新型鸭呼肠孤病毒 σB 蛋白的可溶性原核表达与纯化

董慧^{1,2}, 王劲^{1,2}, 朱小丽^{1,2}, 郑欣¹, 陈少莺^{1,2*}, 陈仕龙^{1,2*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要:【目的】以新型鸭呼肠孤病毒 (novel duck reovirus, NDRV) NP03 株 σB 基因为研究对象, 通过原核表达体系优化, 获得可溶性表达的 NDRV σB 蛋白, 为该病毒的检测及防治提供参考。【方法】将双酶切鉴定后的重组质粒 pET-32a- σB 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 使用 IPTG 诱导表达重组 σB (σB) 蛋白。菌体超声破碎后, SDS-PAGE 分析 σB 蛋白的表达情况。进一步利用 His 标签蛋白纯化试剂盒对上清液中的 σB 蛋白进行亲和层析纯化, 并以纯化后的 σB 蛋白作为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法。【结果】在 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG、16 °C 条件下诱导 12 h 时, 超声破碎后的上清液中可检测到目的蛋白, σB 蛋白的可溶性表达水平显著提高。SDS-PAGE 分析显示纯化的 σB 蛋白纯度高于 90%, 分子量约为 60 kDa。Western blot 结果显示, 纯化的 σB 蛋白可与 His 标签单克隆抗体特异性反应; 基于该蛋白建立的间接 ELISA 检测方法显示, NDRV 阳性血清的 OD₄₅₀ 值为 1.75, 显著高于番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV) 和番鸭小鹅瘟病毒 (Muscovy duck-origin goose parvovirus, MDGPV) 等对照病毒阳性血清 (OD₄₅₀ 均小于 0.3)。Western blot 和 ELISA 结果表明, 纯化后的 σB 蛋白具有较好的特异性的反应原性。【结论】通过低温与低浓度 IPTG 诱导, 成功建立了 NDRV σB 蛋白的可溶性原核表达体系, 突破了该蛋白因包涵体形式表达导致的功能与应用研究瓶颈, 为开发 NDRV 血清抗体 ELISA 检测试剂盒奠定了物质基础。

关键词: 新型鸭呼肠孤病毒; σB 基因; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2025) 07-0656-06

Prokaryotic Expression and Purification of σB of Novel Duck Reovirus

DONG Hui^{1,2}, WANG Shao^{1,2}, ZHU Xiaoli^{1,2}, ZHENG Xin¹, CHEN Shaoying^{1,2*}, CHEN Shilong^{1,2*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】The soluble σB of novel duck reovirus (NDRV) was obtained with optimized prokaryotic expression for effective disease detection and control. 【Method】The recombinant plasmid pET-32a- σB identified by double digestion was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells. IPTG was used to induce the expression of recombinant σB (σB). After ultrasonic crushing, the supernatant and precipitate were analyzed by SDS-PAGE. The σB in the supernatant was then purified by a His-tag protein purification kit to establish an indirect ELISA for the viral detection. 【Result】Under the conditions of 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG and induction at 16 °C for 12 h, the σB was detected in the supernatant with significantly improved expression. The SDS-PAGE analysis showed the purity of σB to be higher than 90%, and the molecular weight approximately 60 kDa. The purified protein specifically reacted with His-tag monoclonal antibody as shown by western blot. The OD₄₅₀ of the NDRV positive serum tested by the indirect ELISA was 1.75, which was much higher than that of positive

收稿日期: 2025-05-28 修回日期: 2025-06-10

作者简介: 董慧 (1989—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事兽医免疫学研究, E-mail: donghui_12215084@126.com

共同第一作者: 王劲 (1979—), 男, 硕士, 研究员, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: 365415005@qq.com

* 通信作者: 陈少莺 (1962—), 女, 硕士, 研究员, 主要从事兽医传染病防控研究, E-mail: chensy58@163.com; 陈仕龙 (1979—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒病研究, E-mail: CSL6116@163.com

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2021R1026009、2024R1025003); 福建省农业科学院自由探索科技创新项目 (ZYTS202225); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021012、XTCXGC2021018); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD2021034)

sera from Muscovy duck reovirus and Muscovy duck goose parvovirus. The OD_{450} of MDRV and MDGPV positive sera were both less than 0.3. A strong specific reactivity of the purified σ B was confirmed by both western blot and ELISA.

【Conclusion】The optimized prokaryotic expression conditions of NDRV σ B protein established in this study applied low temperature and IPTG concentration to successfully induce the soluble NDRV σ B protein that overcame the previously existing bottleneck for the functional and application studies. The secured soluble σ B would lead to the future development of NDRV serum antibody ELISA kit.

Key words: novel duck reovirus; σ B gene; prokaryotic expression; protein purification

0 引言

【研究意义】新型鸭呼肠孤病毒（novel duck reovirus, NDRV）是危害我国水禽产业的重要病原之一，感染后主要引起雏鸭肝脏不规则出血或坏死以及脾脏肿大、出血或坏死。新型鸭呼肠孤病毒病于2005年在我国首次被发现，该病的发生无明显季节性^[1,2]。与番鸭呼肠孤病毒相比，NDRV的宿主范围更广，可感染番鸭、半番鸭、樱桃谷鸭、麻鸭和鹅等多个品种的水禽。对雏禽的危害尤其严重，发病日龄越小，死亡率越高^[3]。NDRV与其他禽呼肠孤病毒同属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*）正呼肠孤病毒属（*Orthoreovirus*），是一种无囊膜的双链RNA病毒，具有双层衣壳结构。NDRV基因组包含10个双链RNA片段，共编码10种结构蛋白和4种非结构蛋白^[4]。NDRV σ B蛋白作为病毒外衣壳的主要成分，在病毒入侵过程中扮演着关键角色；同时，因其携带群特异性中和抗原决定簇，在诱导机体产生群特异性中和抗体方面发挥重要作用^[5,6]。【前人研究进展】梅敏敏等^[7]将NDRV XX株 σ B蛋白编码基因克隆至pET-32a(+)原核表达载体后转化BL21(DE3)，37℃条件下诱导表达，发现IPTG终浓度为0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mmol·L⁻¹，重组 σ B蛋白均主要以包涵体形式存在；李文锋等^[8]之后对NDRV XX株 σ B蛋白编码基因的密码子进行了优化，并将优化后的基因重新克隆至pET-32a(+)载体中并转化BL21(DE3)进行原核表达，发现优化诱导时间、IPTG浓度和诱导温度后重组 σ B蛋白仍主要以包涵体形式表达。杨惠湖等^[9]将NDRV DH13株 σ B基因分别克隆至pET-32a(+)和pET-30a(+)载体中进行原核表达，发现IPTG终浓度为1 mmol·L⁻¹、37℃诱导5 h，两种 σ B蛋白均主要以包涵体形式存在。罗丹等^[10]将NDRV SD19/6201株的S3基因克隆至pET-32a(+)载体中，重组质粒转化BL21(DE3)进行原核表达，发现IPTG终浓度为1 mmol·L⁻¹、37℃诱导2、4、6、8 h，重组 σ B蛋白均主要以包涵体形式表达；之后，罗丹等^[4]又将S3基因克隆至pCold I载体中进行原核表达，发现

IPTG终浓度为0.5 mmol·L⁻¹时，无论是23℃诱导18 h，还是16℃诱导24 h，重组 σ B蛋白也均主要以包涵体的形式在BL21(DE3)中表达。华炯钢等^[11]将NDRV ZJ00M株 σ B基因克隆至pET-28-SUMO载体后转化BL21(DE3)进行原核表达，发现重组 σ B蛋白主要以包涵体形式表达。上述研究显示，目前的相关研究通过 σ B基因密码子优化、更换原核表达载体、原核表达系统中引入可提高重组蛋白可溶性的SUMO蛋白，以及优化IPTG浓度、诱导温度和诱导时间等方法均仍未能实现NDRV σ B蛋白的稳定可溶性表达，且获得的可溶性 σ B蛋白浓度极低。

【本研究切入点】目前NDRV σ B蛋白在大肠杆菌表达系统中均以包涵体的形式表达，关于 σ B蛋白在原核系统中的可溶性表达仍未见相关报道。【拟解决的关键问题】为实现NDRV NP03株 σ B蛋白的可溶性表达，通过优化诱导表达的关键参数（IPTG浓度、诱导温度和时间），确定 σ B蛋白可溶性表达的适宜诱导条件，获得可溶性表达的NDRV σ B蛋白，为研究 σ B蛋白与宿主的相互作用和建立NDRV血清学检测方法提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

NDRV NP03株和原核表达载体pET-32a-c(+)由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒研究中心保存；大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司；DL10 000 DNA Marker、限制性内切酶*Bam* H I和*Sal* I购自宝生物工程（大连）有限公司；氨苄青霉素钠和氯化钠购自生工生物工程（上海）股份有限公司；酵母提取物和胰蛋白胨购自赛默飞世尔科技公司；琼脂粉购自赛国生物科技有限公司；IPTG和His标签蛋白纯化试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；His标签单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；IRDye® 800CW山羊抗小鼠IgG购自LI-COR公司；NDRV阳性和阴性血清、番鸭呼肠孤病毒（muscovy duck reovirus, MDRV）、番鸭源鹅细小病毒（muscovy

duck-origin goose parvovirus, MDGPV)、番鸭细小病毒 (muscovy duck parvovirus, MDPV) 和鸭短喙矮小综合征病毒 (short beak and dwarfism syndrome virus, SBDSV) 的阳性血清均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒研究中心保存; 抗鸭 IgG 抗体 (HRP 标记) 购自 Kirkegaard & Perry Laboratories 公司。

1.2 重组质粒 pET-32a- σ B 的构建与酶切鉴定

根据 GenBank 登录的 NDRV NP03 株 *SIGMA B* (σ B) 基因序列 (GQ88710.1), 通过 Primer-BLAST 在线设计 1 对引物用于扩增 NDRV σ B 基因。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列为: 32a- σ B-F: 5'-CGGGATCCGAGGTGCGTGTGCCAACTT-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点), 32a- σ B-R: 5'-ACGCGTCGACTTACCACCTACTCCAGGAAGG-3' (下划线为 *Sal* I 酶切位点)。以病毒 RNA 为模板, RT-PCR 扩增 σ B 基因并克隆至 pET-32a-c (+) 原核表达载体中, 构建重组质粒 pET-32a- σ B, 并通过限制性内切酶 (*Bam*H I 和 *Sal* I) 双酶切和测序对重组质粒进行鉴定。

1.3 σ B 蛋白表达条件的优化与可溶性分析

将鉴定正确的重组质粒 pET-32a- σ B 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布氨苄抗性 LB 平板 37 °C 培养。挑取一个单菌落接种至氨苄抗性 LB 培养基, 37 °C 培养至菌液 OD₆₀₀ 值达 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度分别为 0.3、0.5、0.7 mmol·L⁻¹), 16 °C 诱导 12 h (或 37 °C 诱导 4 h)。诱导表达后的菌液 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 预冷 PBS 重悬菌体, 超声破碎后离心, 分离上清和沉淀。SDS-PAGE 分析上清与沉淀中 σ B 蛋白的表达情况。

1.4 σ B 蛋白的纯化与鉴定

用 His 标签蛋白纯化试剂盒对上清液中的 σ B 蛋白进行纯化。利用 SDS-PAGE 分析纯化后的 σ B 蛋白的纯度; 以小鼠抗 His 标签单克隆抗体 (1:5000) 为一抗, 以 IRDye[®] 800CW 山羊抗小鼠 IgG (1:10000) 为二抗, 通过 western blot 鉴定 σ B 蛋白的反应原性。

1.5 间接 ELISA 检测方法的建立

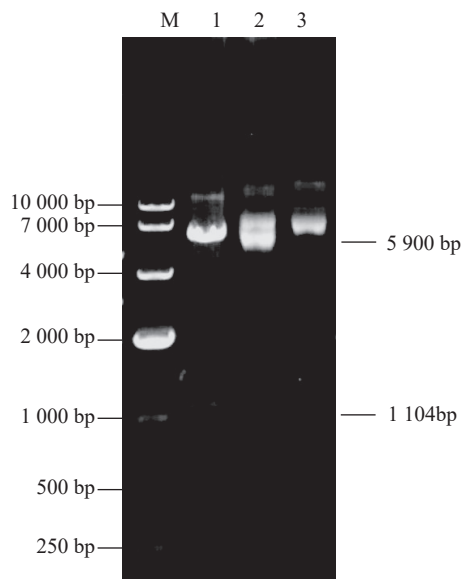
以纯化后的 σ B 蛋白作为包被抗原, 以 NDRV 阳性血清 (或 NDRV 阴性血清) 为一抗, 以 HRP 标记山羊抗鸭 IgG (1:5000) 为二抗, 采用方阵滴定法对 ELISA 反应体系中的抗原包被浓度 (4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g·mL⁻¹) 和血清稀释度 (1:200、1:400、1:800、1:1600) 进行优化, 以阳性血清 OD₄₅₀/阴性血清 OD₄₅₀ 的最大比值确定 σ B 蛋白的最佳包被浓度和血清的最适稀释度, 建立 NDRV 血清抗体间接

ELISA 检测方法。用建立的间接 ELISA 方法检测 MDRV、MDGPV、MDPV 和 SBDSV 阳性番鸭血清。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-32a- σ B 的鉴定

重组质粒 pET-32a- σ B 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定, 酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳分析。结果显示, 重组质粒酶切后有 2 个条带, 即 pET-32a 条带 (大小约 5900 bp) 和 σ B 基因片段条带 (1104 bp), 与预期片段的大小一致 (图 1)。重组质粒 pET-32a- σ B 测序鉴定结果显示, σ B 基因正确插入 pET-32a-c (+) 载体中。酶切和测序鉴定结果均表明, 成功构建重组质粒 pET-32a- σ B。



M: DNA 分子质量标准 DL10 000; 1: 重组质粒 pET-32a- σ B 的双酶切产物; 2: pET-32a (+) 空载体; 3: 重组质粒 pET-32a- σ B。

M: DL 10 000 DNA marker; 1: double digestion products of recombinant plasmid pET-32a- σ B; 2: pET-32a (+) vector; 3: recombinant plasmid pET-32a- σ B.

图 1 重组质粒 pET-32a- σ B 的双酶切鉴定

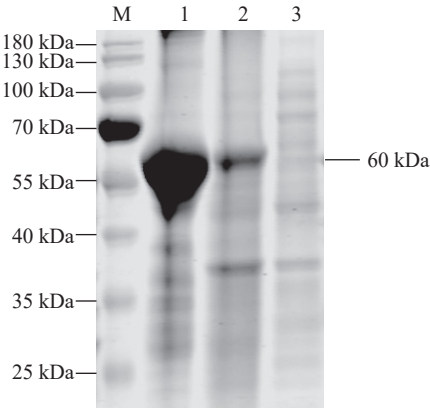
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-32a- σ B by double digestion

2.2 σ B 蛋白的原核表达及可溶性分析

将鉴定正确的重组质粒 pET-32a- σ B 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 加入 IPTG 对重组菌 pET-32a- σ B/BL21(DE3) 进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果显示, 当重组菌中加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG、16 °C 诱导 12 h 时, 超声后的上清液和沉淀样品均在 60 kDa 处出现目的条带, 与预期大小一致 (图 2), 表明在此条件下 σ B 蛋白能够实现部分可溶性表达。

2.3 σ B 蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

超声后上清液经 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化

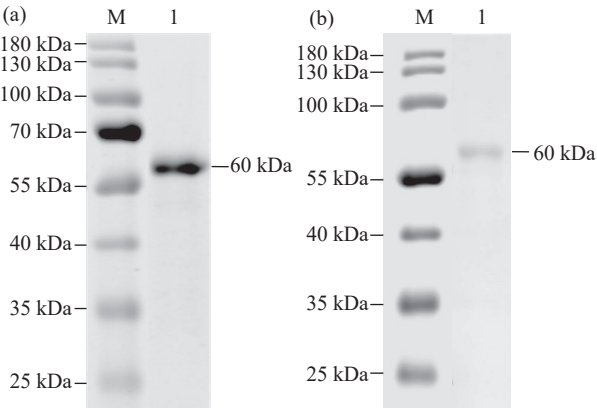


M: 蛋白质分子质量标准；1、2 分别为诱导后的 pET-32a- σ B/BL21(DE3) 沉淀和上清液；3: pET-32a- σ B/BL21(DE3) 裂解物。
M: protein marker; 1-2: precipitate and supernatant of induced pET-32a- σ B/BL21(DE3); 3: pET-32a- σ B/BL21(DE3) lysate.
图 2 σ B 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定
Fig. 2 Identification of σ B by SDS-PAGE

后，获得纯度较高且条带单一的目的蛋白（图 3a）。利用 western blot 鉴定纯化后的 σ B 蛋白，一抗为小鼠抗 His 标签单克隆抗体，二抗为 IRDye[®] 800CW 山羊抗小鼠 IgG。结果显示，在 60 kDa 处出现特异性条带（图 3b），表明纯化后的 σ B 蛋白具有较好的反应原性。

2.4 间接 ELISA 检测方法的建立

通过方阵滴定法确定，当 σ B 蛋白包被浓度为 $0.125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，血清稀释度为 1:400 时，阳性血清 OD₄₅₀/阴性血清 OD₄₅₀ 的比值最大，表明抗原的最佳



M: 蛋白质分子质量标准；1: 纯化的 σ B 蛋白。
M: protein marker; 1: purified σ B.
图 3 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析纯化的 σ B 蛋白
Fig. 3 Analysis of purified σ B protein by SDS-PAGE(a) and western blot(b)

包被浓度为 $0.125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，血清的最佳稀释度为 1:400（表 1），成功建立了检测番鸭血清中 NDRV 抗体的间接 ELISA 检测方法。用该方法对 NDRV、MDRV、MDGPV、MDPV 和 SBDSV 阳性番鸭血清进行检测，结果显示 NDRV 阳性血清 OD₄₅₀ 读数均值为 1.75，而 MDRV、MDGPV、MDPV 和 SBDSV 阳性血清 OD₄₅₀ 读数均值均小于 0.3（图 4），表明利用纯化的 σ B 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法具有较好的特异性。

表 1 最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数的优化
Table 1 Optimized concentration for coating antigen and dilution of serum

血清稀释倍数 Dilution times of serum		抗原包被浓度 Concentration of coating antigen/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
		4	2	1	0.5	0.25	0.125
1:200	阳性血清	1.717	1.783	1.697	1.699	1.478	1.778
	阴性血清	0.158	0.171	0.177	0.178	0.165	0.163
	P/N	10.867	10.427	9.588	9.545	8.958	10.908
1:400	阳性血清	1.15	1.129	1.152	1.157	1.019	1.473
	阴性血清	0.116	0.12	0.115	0.117	0.107	0.114
	P/N	9.914	9.408	10.017	9.889	9.523	12.921
1:800	阳性血清	0.737	0.774	0.745	0.684	0.615	0.809
	阴性血清	0.098	0.089	0.085	0.086	0.087	0.081
	P/N	7.520	8.697	8.765	7.953	7.069	9.988
1:1600	阳性血清	0.445	0.47	0.434	0.458	0.378	0.465
	阴性血清	0.086	0.08	0.074	0.074	0.066	0.073
	P/N	5.174	5.875	5.865	6.189	5.727	6.370

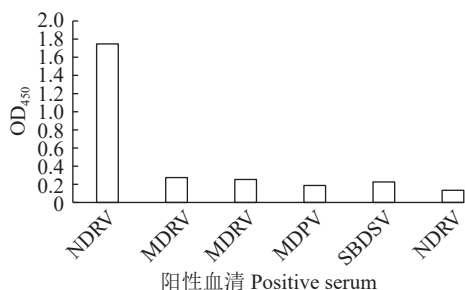


图 4 间接 ELISA 的特异性分析

Fig. 4 Specificity of the indirect ELISA

3 讨论与结论

2005 年,我国福建、浙江和广东等省份的鸭群中暴发了一种新疫病,该病剖检主要特征为肝脏不规则出血或坏死。2009 年,陈少莺等对其从患病鸭肝脾中分离到的 3 株病毒进行了初步鉴定,因其致病特点有别于 MDRV 和禽呼肠孤病毒 (avian reovirus, ARV),故将该病原归属为一种新的禽源呼肠孤病毒^[1]。2012 年,陈少莺等通过分子生物学方法,将上述病毒株同 ARV 和 MDRV 基因组以及 S3 基因进行了比对,进一步确定该病原为呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属新型鸭呼肠孤病毒^[2]。NDRV 通过侵害脾脏从而抑制免疫系统,感染后易继发其他病原感染。NDRV 感染会造成雏鸭发育迟缓,最终成为僵鸭,给水禽养殖业造成了重大经济损失。

大肠杆菌原核表达系统凭借成本低廉和易于大规模发酵等优点,成为表达重组病毒蛋白的首选系统。外源病毒蛋白因其结构复杂,多数情况下以包涵体形式在大肠杆菌中表达;然而,具有生物学活性的重组蛋白通常以可溶性形式存在,故而可溶性重组蛋白制备成为制约大肠杆菌表达系统应用的关键问题。目前研究表明,重组蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达涉及表达载体、宿主菌种类和诱导条件等多方面的技术融合。低温诱导策略在重组蛋白的可溶性表达中占据重要地位。低温环境下,核糖体的翻译速率减低,多肽链的折叠时间延长,疏水基团暴露引起的蛋白聚集减少;同时,宿主蛋白酶的活性被抑制,蛋白的降解减少,继而可溶性蛋白的得率增加^[12]。

NDRV σ B 蛋白是构成病毒外衣壳的主要蛋白,携带群特异性中和抗原表位,可作为血清学诊断的潜在靶蛋白。已有研究表明,大肠杆菌原核表达系统中 σ B 蛋白多以包涵体形式存在,一定程度上影响了其作为诊断抗原的应用前景。对比 37 °C 诱导时 σ B 蛋白以包涵体形式表达^[7,9,10],本研究采用 16 °C 低温诱导,显著增强了 σ B 蛋白的可溶性,突破了

37 °C 条件下 σ B 蛋白以包涵体形式表达的技术瓶颈。除低温诱导条件外,低浓度 IPTG 也是促进重组蛋白可溶性表达的关键因素。低浓度 IPTG 可维持蛋白合成与蛋白折叠二者间的动态平衡,进而提升重组蛋白的可溶性表达水平。以包涵体形式存在的蛋白通常纯化过程较复杂,且纯化后其反应原性易受影响。本研究使用可溶性 σ B 蛋白作为 ELISA 包被抗原,优点在于不仅纯化流程更简单,且其作为包被抗原的使用量也小于包涵体形式存在的蛋白^[4,13],在一定程度上降低了制备包被抗原的时间和经济成本。

综上所述,本研究成功构建了重组质粒 pET-32a- σ B,并通过低温和低浓度 IPTG 的诱导条件,首次实现了 NDRV σ B 蛋白在大肠杆菌原核表达系统中的可溶性表达;成功纯化了目的蛋白 σ B,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定,纯化后的 σ B 蛋白分子量约为 60 kDa,符合预期结果;以纯化后的 σ B 蛋白作为包被抗原建立了用于检测 NDRV 血清抗体的间接 ELISA 方法。本研究为 σ B 蛋白与宿主间的相互作用研究,以及建立 NDRV 血清学检测方法提供了物质基础。

参考文献:

- [1] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等.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 S Y, CHEN S L, LIN F Q, et al. 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,等.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 S Y, CHEN S L, LIN F Q, et al. The isolation and identification of novel duck reovirus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(3): 224-230. (in Chinese)
- [3] 李雪松.新型鸭呼肠孤病毒的生物学特性研究及弱毒疫苗株的培育[D].北京:中国农业大学,2021.
LI X S. Biological characterization of a novel duck reovirus and attenuated vaccine candidate development[D]. Beijing: China Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [4] 罗丹.新型鸭呼肠孤病毒流行株生物学特性研究及 ELISA 抗体检测方法的建立[D].北京:中国农业科学院,2021.
LUO D. Study of biological characteristics of novel duck reovirus and establishment of indirect ELISA method[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021. (in Chinese)
- [5] YUN T, YU B, NI Z, et al. Genomic characteristics of a novel reovirus from Muscovy duckling in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(2/3/4): 261-271.
- [6] NI Y, RAMIG R F. Characterization of avian reovirus-induced cell

- fusion: The role of viral structural proteins[J]. *Virology*, 1993, 194(2): 705–714.
- [7] 梅敏敏, 梁国智, 黄雯晶, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 σ B 蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(12): 3149–3155.
- MEI M M, LIANG G Z, HUANG W J, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of σ B protein of new-type duck reovirus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(12): 3149–3155. (in Chinese)
- [8] 李文锋, 梅敏敏, 黄兴国, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 σ B 蛋白基因密码子的优化及原核表达[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(10): 2700–2706.
- LI W F, MEI M M, HUANG X G, et al. Optimization and prokaryotic expression of the σ B protein gene codons of the new-type duck reovirus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 45(10): 2700–2706. (in Chinese)
- [9] 杨惠湖, 黄惠兰, 袁生, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 DH13 株结构蛋白 σ B 的原核表达及免疫原性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(11): 4204–4212.
- YANG H H, HUANG H L, YUAN S, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of the structural protein σ B of a novel duck reovirus DH13 strain[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(11): 4204–4212. (in Chinese)
- [10] 罗丹, 杨伏春, 高立, 等. 新型鸭呼肠孤病毒群特异性抗原蛋白的表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国家禽, 2020, 42(11): 27–32.
- LUO D, YANG F C, GAO L, et al. Expression and purification of a novel duck reovirus group-specific antigen protein and preparation of its polyclonal antibody[J]. *China Poultry*, 2020, 42(11): 27–32. (in Chinese)
- [11] 华炯钢, 叶伟成, 倪征, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 σ B 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(4): 428–434.
- HUA J G, YE W C, NI Z, et al. Preparation of the monoclonal antibodies against σ B protein of novel duck reovirus and identification of the antigenic epitope[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(4): 428–434. (in Chinese)
- [12] 张宇萌, 童梅, 陆小冬, 等. 提高大肠杆菌可溶性重组蛋白表达产率的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5): 118–124.
- ZHANG Y M, TONG M, LU X D, et al. Advances in promoting soluble expression of recombinant protein in *Escherichia coli*[J]. *China Biotechnology*, 2016, 36(5): 118–124. (in Chinese)
- [13] 王锦祥, 程晓霞, 陈少莺, 等. 新型鸭呼肠孤病毒 σ B 和 σ C 蛋白间接 ELISA 方法的建立[J]. 福建农业学报, 2016, 31(9): 903–907.
- WANG J X, CHENG X X, CHEN S Y, et al. Development of indirect ELISA for detecting novel duck reovirus using σ B and σ C proteins as coating antigens[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 31(9): 903–907. (in Chinese)

(责任编辑：张梅)