

网络出版时间:2012-05-21 15:24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120521.1524.003.html>

抗番鸭呼肠孤病毒(MDRV)单克隆抗体的 制备及应用

朱小丽^{1,2}, 陈少莺^{1,2}, 蔡羲^{1,2}, 程晓霞^{1,2},
林锋强^{1,2}, 陈仕龙^{1,2}, 王劭^{1,2}, 李兆龙^{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】制备抗番鸭呼肠孤病毒(MDRV)的单克隆抗体, 建立番鸭呼肠孤病毒病的间接免疫荧光(IFA)快速诊断方法。【方法】制备 MDRV 抗原, 用之免疫 Balb/c 小鼠, 取免疫小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合, 采用 IFA 和 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株, 体内诱生腹水法制备单克隆抗体, 检测其生物学特性, 应用制备的单克隆抗体建立 MDRV IFA 快速诊断方法。【结果】筛选到 237-11、45-12 和 3-H3 3 株特异性好并能稳定分泌抗 MDRV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 其中 45-12 株单抗为 IgM 亚型, 237-11 和 3-H3 株单抗为 IgG3 亚型。45-12 和 3-H3 2 株单抗具有 ELISA 特性, 效价分别为 10^4 和 10^5 ; 237-11 株单抗具有 IFA 特性, 效价达 10^3 。特异性测定结果显示, 3 株单抗仅与 MDRV 反应, 而与正常细胞培养物(MDEF)、番鸭细小病毒(MPV)、鹅细小病毒(GPV)、禽呼肠孤病毒(ARV)、鸭副黏病毒(PMV)和鸭肝炎病毒(DHV)均无交叉反应。应用抗 MDRV 单抗建立的 IFA 方法与病毒分离法(VI)的符合率为 91%。【结论】筛选到 2 株具有 ELISA 特性、1 株具有 IFA 特性且能分泌抗 MDRV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 建立了 MDRV IFA 快速诊断方法, 为番鸭呼肠孤病毒病的快速诊断奠定了基础。

[关键词] 番鸭呼肠孤病毒; 单克隆抗体; 间接免疫荧光

[中图分类号] S852.4⁺3; S834⁺.89 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2012)06-0041-06

Preparation and application of monoclonal antibody against muscovy duck reovirus

ZHU Xiao-li^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2}, CAI Xi^{1,2}, CHENG Xiao-xia^{1,2},
LIN Feng-qiang^{1,2}, CHEN Shi-long^{1,2}, WANG Shao^{1,2}, LI Zhao-long^{1,2}

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】The research was done to prepare anti-musovy duck reovirus(MDRV) monoclonal antibody(McAb) and build up immunological assay to detect MDRV. 【Method】After Balb/c mice were immunized with muscovy duck reovirus(MDRV) antigen, the spleen cells were fused with SP2/0 myeloma cell lines. Hybridoma cell lines secreting McAb against MDRV were screened by indirect ELISA and IFA and biological characteristic of these McAb were determined. Then IFA was built up. 【Result】Three hybridoma cell lines could steadily secrete specific monoclonal antibodies (McAbs) against MDRV, named 237-11, 45-12 and 3-H3. Isotyping analysis showed that 45-12 belonged to IgM, 237-11 and 3-H3 belonged

* [收稿日期] 2011-11-11

[基金项目] 福建省农业科学院创新团队资助项目(STIF-Y02); 福建省畜牧重大专项(2006NZ003-2); 福建省公益类项目(2011R1025-7); 福建省星火计划项目(2010S0015)

[作者简介] 朱小丽(1979—), 女, 江苏泰兴人, 助理研究员, 主要从事畜禽病毒性传染病及免疫学研究。

E-mail: zhuxiaoli0226@163.com

[通信作者] 陈少莺(1962—), 女, 福建长乐人, 研究员, 主要从事动物传染病病原与防治研究。E-mail: chensy58@163.com

to IgG3, 45-12 and 3-H3 had characteristic of ELISA but 237-11 had characteristic of IFA. These McAbs had high specificity with MDRV and had no cross-reactivity with muscovy duck embryo-fibroblast (MDEF), muscovy duck parpovirus (MPV), goose parpovirus (GPV), avian reovirus (ARV), duck paramyxovirus (PMV) and duck hepatitis virus (DHV). Indirect fluorescence assay could detect MDRV and was good coincidence (91%) with virus isolation. 【Conclusion】 Preparing monoclonal antibody against MDRV, two strains had characteristic of ELISA and one strain had characteristic of IFA. Detecting MDRV by IFA laid foundation for further research on rapidly clinical diagnosis.

Key words: muscovy duck reovirus (MDRV); monoclonal antibody; indirect fluorescence assay

番鸭呼肠孤病毒 (Muscovy duck reovirus, MDRV) 病, 俗称番鸭“肝白点病”、“花肝病”等, 是 1997 年以来在福建、广东、浙江等地番鸭饲养区新出现的一种传染病, 其病原是 MDRV, 发病时期为 7~45 日龄。临床上该病主要表现为病鸭软脚, 拉稀, 肝、脾表面和切面出现白色坏死点, 肾脏肿大、出血, 肾脏表面出现黄色条斑等, 发病率为 30%~90%, 死亡率达 60%~80%, 发病未死鸭耐过后成为僵鸭, 给养鸭业造成了严重经济损失^[1-4]。快速诊断是有效预防该病的前提, 而目前国内外对番鸭呼肠孤病毒病的病原学诊断主要采用经典的病毒分离和 RT-PCR 方法^[5], 但这两种方法均存在一定的不足。病毒分离法操作繁琐、费时, 不适于本病的快速诊断; 而 RT-PCR 方法由于敏感性高, 易出现假阳性。免疫荧光试验具有特异性好、方便快捷等优点, 已广泛应用于疫病的临床快速诊断。为此, 本研究利用杂交瘤技术筛选建立了能稳定分泌抗 MDRV 单克隆抗体 (McAb) 的杂交瘤细胞株, 制备了抗 MDRV 的 McAb, 并建立了 MDRV 间接免疫荧光 (IFA) 快速诊断方法, 以为 MDRV 病的快速诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和试验动物 福氏完全及不完全佐剂、DMEM(D777) 培养基、体积分数 50% 聚乙二醇 (PEG) 溶液、黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷培养基 (HAT)、黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷培养基 (HT)、羊抗鼠 IgG-HRP、兔抗羊 IgG-HRP 和单克隆抗体亚级份检测试剂盒, 均购自 Sigma 公司; 羊抗鼠 IgG-FITC, 购自博士德生物工程有限公司; 小牛血清, 购自杭州四季青公司。番鸭胚和健康番鸭, 购自非疫区; SPF 级 Balb/c 小鼠, 购自北京维通得华实验动物技术有限公司。

1.1.2 病毒和细胞 番鸭呼肠孤病毒 (MDRV) MW9710 株、番鸭细小病毒 (MPV)、鹅细小病毒

(GPV)、鸭副黏病毒 (PMV) 和鸭肝炎病毒 (DHV), 均由福建省农业科学院动物病毒室分离鉴定并保存; 禽呼肠孤病毒 (ARV), 购自中国兽药监察所。SP2/0 骨髓瘤细胞, 由福建省农业科学院动物病毒室保存; 番鸭成纤维 (MDEF) 细胞, 按常规方法制备。

1.2 MDRV 的培养和纯化抗原的制备

将 MDRV MW9710 株种毒经尿囊腔接种于 12 日龄番鸭胚, 每枚 0.1 mL, 37 °C 继续孵化, 每天观察 2 次, 弃去 24 h 死胚, 选接种后 48~120 h 的死亡胚, 收获尿囊液, 5 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 经 45 000 r/min 离心 90 min, 弃上清液。沉淀重悬于少量 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 磷酸盐缓冲液中, 即得 ELISA 包被用粗提 MDRV 抗原。将粗提抗原平铺于质量分数 25%~55% 蔗糖-PBS 的最上层, 27 000 r/min 离心 150 min, 收集病毒条带并重悬于 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液中, 40 000 r/min 离心 90 min, 洗脱蔗糖, 沉淀重悬于 PBS 中, 即得纯化 MDRV 抗原。Commassia R250 法测定蛋白浓度后, 于 -70 °C 冰柜保存, 供免疫 Balb/c 小鼠用。同法制备 MPV、GPV、PMV、DHV、ARV 和 MDEF 抗原, 备用。

1.3 免疫 Balb/c 小鼠

取 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 用纯化的 MDRV 抗原免疫 4 次, 免疫剂量为 50 μ g/(只·次), 每次间隔 2 周。第 1 次免疫抗原为纯化的 MDRV 抗原加等体积弗氏完全佐剂, 第 2 和 3 次免疫抗原为纯化的 MDRV 抗原加等体积弗氏不完全佐剂, 免疫途径均为颈背部多点皮下注射。第 3 次免疫后 14 d, 腹腔注射纯化 MDRV 抗原 50 μ g/只加强免疫 (第 4 次免疫), 3 d 后取脾, 进行细胞融合。

1.4 细胞融合与杂交瘤细胞的筛选

无菌条件下取免疫小鼠脾, 分散脾细胞, 与对数生长期的骨髓瘤细胞株 SP2/0 按照 5:1 混合, 用体积分数 50% 聚乙二醇 (PEG) 溶液进行 90 s 融合, 用 HAT 选择杂交瘤细胞, 12 d 时参考文献 [6-12] 的方

法,分别用 IFA 法和间接 ELISA 法检测细胞培养的上清液,并从阳性孔中挑选 OD₄₉₀ 值高或荧光强、细胞形态好、生长旺盛且不与正常 MDEF 细胞培养物交叉的阳性孔,经有限稀释法连续克隆 3 次,直至克隆孔阳性率为 100%。克隆过程中各阶段细胞同时扩大培养并冻存。

1.4.1 病毒感染细胞板的制备及间接免疫荧光试验(IFA) 将 MDEF 细胞培养于 96 孔细胞板,至细胞长成单层后,接种 MDRV MW9710 株(接种量为每孔 100 TCID₅₀),继续培养,当细胞病变达 30% 时,弃上清液;将细胞用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入冷甲醇(预置-20℃)100 μL,4℃ 固定 30 min,甩干, PBS 洗涤 1 次,-20℃ 冻存备用,此即为 IFA 试验用抗原。检测时于上述细胞板中,添加杂交瘤细胞培养上清液 30 μL/孔,37℃ 作用 30 min, PBS 洗涤 3 次;加羊抗鼠 IgG-FITC 30 μL/孔,37℃ 作用 30 min, PBS 洗涤 3 次,加体积分数 50% 甘油-PBS 30 μL/孔,于倒置荧光显微镜(OLYMPUS 型)下观察。

1.4.2 间接 ELISA 试验 分别将纯化的 MDRV 抗原按预先测定的最佳包被量(80 μg/mL, 50 mL/孔)包被聚苯乙烯平底微孔板(Costar 产品),4℃ 过夜或 37℃ 作用 2 h,洗涤并封闭后,加第 1 抗体(杂交瘤细胞培养上清液)后于 37℃ 作用 1 h,洗涤后加第 2 抗体(羊抗鼠 IgG-HRP),再于 37℃ 作用 1 h,洗涤后加底物联苯二胺(OPD)显色,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,置酶标仪(ELX800UV 型)上测定 OD₄₉₀。

1.5 抗 MDRV McAb 的制备及特性测定

1.5.1 McAb 的制备 采用体内诱生腹水法制备抗 MDRV McAb。选用 10~12 周龄 Balb/c 小鼠,腹腔注射液体石蜡 0.2 mL/只,10 d 后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞悬液 0.3 mL(约 50 万个细胞),待小鼠腹部明显膨大时,收集腹水,于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液即得单克隆抗体,分装后于-70℃ 保存,备用。

1.5.2 抗体亚类测定 按照单克隆抗体亚类检测试剂盒说明的方法,将纯化的 MDRV 抗原包被封闭后,加入阳性杂交瘤细胞株培养上清,37℃ 作用 1 h,洗涤后加入 1:1 000 倍稀释的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM,37℃ 作用 1 h,洗涤后再加入 1:10 000 倍稀释的兔抗羊 IgG-HRP,37℃ 作用 1 h 后,洗涤,用 OPD 避光反应 10 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测定 OD₄₉₀ 值。

1.5.3 McAb 特异性测定 参考 1.4.1 节的方法

制备 MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 细胞板及正常对照 MDEF 细胞板,应用 IFA 检测各株 McAb(1:100 倍稀释)与 MDRV、MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 细胞板及正常对照 MDEF 细胞板的免疫荧光反应,测定其 IFA 特性。参考 1.4.2 节的方法制备 MPV、GPV、ARV、PMV、DHV 及正常对照 MDEF 细胞抗原包被板,用 ELISA 法检测各株 McAb(1:100 倍稀释)与 MDRV、MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 抗原包被板的 OD₄₉₀ 值,同时设阳性血清对照(以阳性血清代替第 1 抗体),用 SP2/0 培养上清作阴性对照(用 SP2/0 培养上清代替第 1 抗体)。

1.5.4 McAb 效价测定 腹水经 10 倍梯度稀释后,分别测定其 IFA 和 ELISA 效价。

1.5.5 杂交瘤细胞稳定性测定 将单克隆抗体杂交瘤细胞分别冻存 3 和 6 个月后复苏,并在体外连续培养 2 个月,用 ELISA 法检测细胞上清液的效价。

1.5.6 McAb 保存期测定 将 McAb 于-20℃ 分别冻存 3,6,9,12,15 和 18 个月,应用 IFA 和 ELISA 方法检测各株 McAb 与 MDRV 的反应情况,评价其保存期。

1.6 抗 MDRV McAb 的应用

1.6.1 在 MDRV 病原检测中的应用 无菌采集 35 羽人工感染 MDRV 强毒株的发病濒死番鸭肝、脾组织,制作冰冻切片^[13-14],冷丙酮(预置-20℃)4℃ 固定 10 min;加 1:100 倍稀释的 MDRV McAb(50 μL)染片,37℃ 湿盒感作 30 min,生理盐水冲洗 5~6 次;加羊抗鼠 IgG-FITC 50 μL,37℃ 湿盒感作 30 min;用生理盐水冲洗 5~6 次,用滤纸吸去多余水分,加 50% PBS-甘油封片,于荧光显微镜(OLYMPUS)下观察。

1.6.2 IFA 与病毒分离(VI)符合率的比较 应用单抗 237-11 株建立临床快速诊断番鸭呼肠孤病毒病的 IFA 试验。无菌采集 35 羽人工感染 MDRV 强毒株的发病濒死番鸭和 10 羽发病耐过番鸭肝、脾组织,分成 2 份。其中 1 份制作冰冻切片,进行 IFA 方法检测,1 份用于 VI 检测。VI 检测时取供试病料用 Hank's 液研磨成 1:1 匀浆,置-20℃ 反复冻融 3 次,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 滤膜除菌后,经尿囊腔接种 12 日龄番鸭胚各 4 枚,接种剂量 0.2 mL/胚,37℃ 培养,每日观察 2 次,选接种后 48~120 h 死亡的胚收获胚液,并观察胚体病变;同时取死亡胚心脏制作冰冻切片进行 IFA 鉴定;对病原分离第 1 代未死亡番鸭胚或 IFA

阴性尿囊液盲传 3 代,若仍为阴性则判定病毒分离阴性,并比较 IFA 和 VI 的符合率。

2 结果与分析

2.1 杂交瘤细胞株的建立

用 MDRV 纯化抗原免疫小鼠,经细胞融合及克隆后筛选到 45-12、3-H3 和 237-11 3 株细胞形态好、

生长旺盛、不与正常细胞培养物交叉反应,并能稳定分泌抗 MDRV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

2.2 抗 MDRV McAb 的特性分析

2.2.1 Ig 亚类分析 亚类分析结果(表 1)显示,45-12、3-H3 和 237-11 3 株 McAb 中,3-H3 和 237-11 属于 IgG3 亚类,45-12 为 IgM 亚类。

表 1 3 株单克隆抗体的特性鉴定

Table 1 The immunologic characteristics of McAbs

单抗 McAb	效价 Titer		抗体类别 Sub-class
	ELISA	IFA	
45-12	10 ⁴	—	IgM
3-H3	10 ⁵	—	IgG3
237-11	—	10 ³	IgG3

2.2.2 特异性及效价测定 测定结果(表 1)显示,237-11 株 McAb 仅具有 IFA 特性,而无 ELISA 特性;45-12 和 3-H3 株 McAb 仅具有 ELISA 特性,而无 IFA 特性。IFA 结果(图 1)显示,237-11 株 McAb 只与感染 MDRV 的感染细胞出现特异性的亮绿色荧光病灶,且 IFA 效价达 10³,而与 MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 感染细胞及正常 MDEF

细胞均不出现荧光。ELISA 结果显示,阳性血清对照和 SP2/0 培养上清阴性对照均成立;45-12 和 3-H3 株 McAb 均仅能识别 MDRV 抗原包被孔,ELISA 效价分别为 10⁴ 和 10⁵(表 1),与 MPV、GPV、ARV、PMV、DHV 和 MDEF 抗原包被孔均不出现交叉反应。

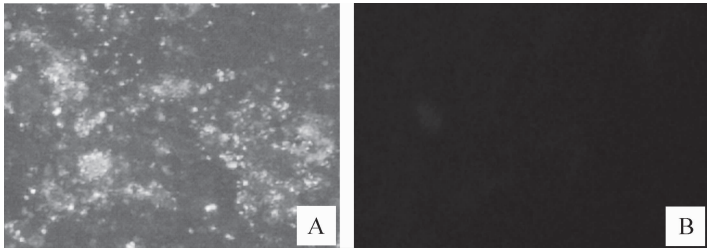


图 1 单克隆抗体 237-11 的 IFA 试验结果(200×)

A. MDRV 感染的 MDEF 与单抗 237-11 的 IFA 结果;B. MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 感染的 MDEF 及正常 MDEF 与单抗 237-11 的 IFA 结果

Fig. 1 IFA results of McAb 237-11(200×)

A. IFA result of the McAb 237-11 on MDRV-infected MDEF;B. IFA result of the McAb 237-11 on MPV,GPV,ARV,PMV,DHV in fected MDEF and normal MDEF

2.2.3 稳定性测定 测定结果表明,3 株抗 MDRV McAb 的杂交瘤细胞株经 3 和 6 个月冻存后复苏,均能稳定分泌抗体,细胞生长良好,且上清液 ELISA 效价无明显变化,表明建立的杂交瘤细胞株抗体分泌性能稳定。

2.2.4 保存期测定 测定结果表明,3 株 McAb 于-20℃分别冻存 3,6,9,12,15 和 18 个月后,237-11 株 McAb 的 IFA 效价及 45-12、3-H3 株 McAb 的 ELISA 效价均无明显变化,表明 McAb 于-20℃的保存期可达 18 个月。

2.3 McAb 在 MDRV 病原检测中的应用

图 2 显示,MDRV 强毒株人工感染番鸭的肝、脾冰冻切片经染色后,在荧光显微镜下均可观察到不同程度的亮绿色荧光病灶,检出率为 97%(34/35)。表明该方法特异性好,可用于临床上番鸭呼肠孤病毒病的快速诊断。

2.4 IFA 与 VI 符合率的比较

用 IFA 和 VI 同时对 35 羽人工感染 MDRV 发病鸭和 10 羽发病耐过鸭进行检测,结果显示,IFA 检测有 34 羽呈阳性,11 羽呈阴性;VI 检测有 38 羽呈阳性,有 7 羽呈阴性。其中 IFA 检测呈阳性的 VI

检测也呈阳性,2 种检测方法的符合率为 91%。

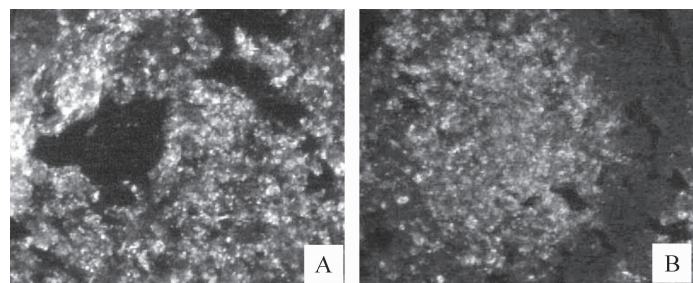


图 2 感染 MDRV 番鸭脾脏、肝脏的 IFA 试验结果

A. 脾脏;B. 肝脏

Fig. 2 IFA result in the spleen and liver of muscovy duck infected MDRV

A. Spleen;B. Liver

3 结论与讨论

本研究获得了 237-11,45-12 和 3-H3 3 株特性好并能稳定分泌抗番鸭呼肠孤病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其中 2 株单抗具有 ELISA 特性,1 株具有 IFA 特性;3 株单克隆抗体与 MPV、GPV、ARV、PMV 和 DHV 等均不发生交叉反应。

本研究应用抗 MDRV 单抗建立了 IFA 方法,应用该方法对人工感染 MDRV 番鸭进行检测,结果显示,35 例人工感染 MDRV MW9710 株番鸭的肝脾冰冻切片,经染色后在荧光显微镜下有 34 株可观察到亮绿色的特异性荧光,检出率达 97%。同时肝脾匀浆经尿囊腔途径接种 12 日龄番鸭胚,进行病毒分离后均为阳性,表明 IFA 可代替病毒分离用于快速检测番鸭呼肠孤病毒。

番鸭呼肠孤病毒病以肝脏和脾脏出现针头状灰白色坏死点为特征,在荧光显微镜下其病灶与此一致,也呈明显的局灶性。林锋强等^[15]应用 RT-PCR 方法检测了 MDRV 的分布,结果表明,病毒进入机体后在肝脏和脾脏内居留的时间最长。包汉勋等^[16]应用免疫组化法检测 MDRV 在番鸭体内的分布,结果表明,番鸭呼肠孤病毒的主要靶器官为肝脏、脾脏和盲肠。以上结果提示,肝脏和脾脏是检测番鸭呼肠孤病毒病的适宜材料。

[参考文献]

[1] 胡奇林,陈少莺,江斌,等. 一种新的番鸭疫病(暂名番鸭肝白点病)病原的发现[J]. 福建畜牧兽医,2000,22(6):1-3.
Hu Q L,Chen S Y,Jiang B,et al. Discovery of the pathogen of muscovy duck liver white spots disease[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2000,22(6):1-3. (in Chinese)

[2] 胡奇林,陈少莺,林锋强,等. 番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J]. 病毒

学报,2004,20(3):242-248.

Hu Q L,Chen S Y,Lin F Q,et al. The identification of muscovy duck reovirus [J]. Chinese Journal of Virology,2004,20(3):242-248. (in Chinese)

[3] Kuntz-Simon G,Le Gall-Recule G,de Boisseson C,et al. Muscovy duck reovirus sigma C protein is atypically encoded by the smallest genome segment [J]. J Gen Virol,2002,83(5):1189-1200.

[4] Kuntz-Simon G,Basdlklanchard P,Cherbonnel M,et al. Bachulovirus-expressed muscovy duck reovirus σ C protein induces serum neutralizing antibodies and protection against challenge [J]. Vaccine,2002,20:3113-3122.

[5] 胡奇林,林锋强,陈少莺,等. 应用 RT-PCR 技术检测番鸭呼肠孤病毒[J]. 中国兽医学报,2004,24(3):231-232.
Hu Q L,Lin F Q,Chen S Y,et al. Detection of muscovy duck reovirus by RT-PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2004,24(3):231-232. (in Chinese)

[6] 陈仕龙,林天龙,陈少莺,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒单克隆抗体的制备与特性分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(8):46-50,55.
Chen S L,Lin T L,Chen S Y,et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat Sci Ed,2008,36(8):46-50,55. (in Chinese)

[7] 程晓霞,朱小丽,陈少莺,等. 抗鸭副粘病毒单克隆抗体的制备及其特性鉴定[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(2):54-58.
Cheng X X,Zhu X L,Chen S Y,et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against duck paramyxovirus infection [J]. Journal of Northwest A&F University:Nat Sci Ed,2011,39(2):54-58. (in Chinese)

[8] 程晓霞,陈少莺,胡奇林,等. 鉴别伪狂犬病毒强、弱毒株单克隆抗体的制备[J]. 福建农业学报,2003,20(2):87-90,200.
Cheng X X,Chen S Y,Hu Q L,et al. Preparation of the monoclonal antibodies discriminating virulent and attenuated strains of psudorabbies virus (PRV) [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences,2003,20(2):87-90,200. (in Chinese)

- [9] 林天龙,陈 强,龚 晖,等. 欧洲鳗免疫球蛋白单克隆抗体的制备与特性 [J]. 水产学报,2001,25(6):532-537.
Lin T L, Chen Q, Gong H, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Anguilla anguilla* IgM [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 532-537. (in Chinese)
- [10] 陈万荣,付少才,刘树玲. 抗犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及初步应用 [J]. 中国兽医学报,2002,22(5):455-456.
Chen W R, Fu S C, Liu S I. Preparation and application of mouse anti-CDV monoclonal antibodies [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2002, 22(5): 455-456. (in Chinese)
- [11] Yan Y, Guo X, Ge X, et al. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome-virus [J]. Virus Res, 2007, 126(1/2): 207-215.
- [12] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determination [J]. J Gen Virol, 1997, 78(8): 1867-1873.
- [13] 周艳君,安同庆,薛 强,等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 CH2la 株 GP5 蛋白基因的表达及其单克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35(11): 859-864.
Zhou Y J, An T Q, Xue Q, et al. Expression of GP5 gene of PRRSV CH2la strain and development of monoclonal antibodies against GP5 [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2005, 35(11): 859-864. (in Chinese)
- [14] 鲁会军,金宁一,韩 松,等. O 型口蹄疫泛亚毒株单克隆抗体的制备及抗原表位差异分析 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 494-496.
Lu H J, Jin N Y, Han S, et al. The preparation of monoclonal antibody against FMDV type O/PanAsia and differential recognition of antigenic epitopes [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2005, 25(5): 494-496. (in Chinese)
- [15] 林锋强,胡奇林,陈少莺,等. 应用 RT-PCR 检测人工感染番鸭体内番鸭呼肠孤病毒的动态分布 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(3): 14-16.
Lin F Q, Hu Q L, Chen S Y, et al. Dynamic distribution of muscovy duck reovirus in the challenged ducks detected by RT-PCR [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 28(3): 14-16. (in Chinese)
- [16] 包汉勋,祁保民,尚映辉,等. 免疫组化法检测番鸭呼肠孤病毒在番鸭体内的分布 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 43-46.
Bao H X, Qi B M, Shang Y H, et al. Distribution of muscovy duck reovirus in muscovy ducks detected by immunohistochemical method [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(4): 43-46. (in Chinese)

(上接第 40 页)

- [13] 黄银花,徐公瑾,杜志强,等. 体细胞克隆牛和转基因体细胞克隆牛的遗传学分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(8): 699-704.
Huang Y H, Xu G J, Du Z Q, et al. Genetic analysis of cattle cloned from somatic cells and transferred somatic cells [J]. Biochemistry and Biophysics Progress, 2004, 31(8): 699-704. (in Chinese)
- [14] Zhang L, Wang S H, Dai Y P, et al. Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves [J]. Animal Reproduction Science 2009, 112: 182-189.
- [15] 易建明. 法国克隆牛研究进展: 克隆牛的畜牧性能与健康状况 [C]//中国畜牧兽医协会. 全国养牛科学研讨会暨中国畜牧兽医学会养牛学分会第六届会员代表大会论文集. 北京: 中国学术期刊电子出版社, 2004: 276-281.
Yi J M. Research progress of somatic cloned bovine in French: Performance and health status of cloned bovine [C]//China Animal Husbandry and Veterinary Association. Proceedings of the national cattle breeding seminar and the 6th member congress of cattle breeding branch of china animal husbandry and veterinary society. Beijing: China Academic Journal Electronic Publishing Company, 2004: 276-281. (in Chinese)
- [16] Li J, Svarcova O, Villemoes K, et al. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos [J]. Theriogenology, 2008, 70(5): 800-808.
- [17] 李世杰. 发育相关基因在新生死体细胞克隆牛中的表达 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
Li S J. Aberrant gene expression in cloned bovine of neonatal death [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [18] 王 超,安志兴,李向臣,等. 哺乳动物体细胞核移植中供体细胞的研究进展 [J]. 黄牛杂志, 2003, 29(3): 23-25.
Wang C, An Z X, Li X C, et al. Research progress of donor cell of mammal somatic cell nucleus transfer [J]. Journal of Yellow Cattle Science, 2003, 29(3): 23-25. (in Chinese)
- [19] 顾玉芳,李善姬,吴素清. 内蒙古首例体细胞克隆牛 2 日龄死亡后的病理学观察 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2007, 4(4): 30-32.
Gu Y F, Li S J, Wu S Q. Pathological observation of dead first somatic cloning cow in Inner Mongolia [J]. Journal of Yangtze University: Natural Science Edition, 2007, 4(4): 30-32. (in Chinese)
- [20] 王晓丽,蒋建荣,徐莉萍,等. 一例体细胞克隆水牛肺、脾脏的组织结构观察 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(6): 1417-1418.
Wang X L, Jiang J R, Xu L P, et al. Organizational structure observation of lung and spleen of somatic nuclear transfer buffalo [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2010, 49(6): 1417-1418. (in Chinese)