

卢清侠,李 伟,金前跃,等. 鹅星状病毒刺突蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):159-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.023

鹅星状病毒刺突蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

卢清侠¹,李 伟²,金前跃¹,郭振华¹,冯丽丽³,邢云瑞¹,柴书军¹,邢广旭¹,张改平¹

(1. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室,河南郑州 450002; 2. 河南农业大学生命科学学院,河南郑州 4500023;
3. 河南省农业科学院农业经济与信息研究所,河南郑州 450002)

摘要:为了制备鹅星状病毒(goose astrovirus, GAsV)刺突(Spike)蛋白的单克隆抗体,并对获得的单克隆抗体的生物学特性进行鉴定,将大肠杆菌表达的截短 Spike 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合和单克隆抗体的筛选来获得阳性杂交瘤细胞,并进一步利用免疫印迹和间接免疫荧光技术进行单抗的鉴定;采用 ELISA 技术进行单克隆抗体亚型、抗体效价的测定;同时根据 GAsV XX 株 Spike 蛋白序列合成重叠的多肽库进行单抗识别的抗原表位鉴定。共获得 3 株阳性杂交瘤细胞,分别命名为 1A5、2B4、12E6;免疫印迹和间接免疫荧光实验显示 3 株单克隆抗体均与 Spike 蛋白具有良好的免疫反应,其中 2B4、12E6 可与 GAsV 发生反应;亚型鉴定结果显示单抗 12E6、2B4 为 IgG2b 亚类,单抗 1A5 为 IgG2a 亚类;轻链均为 κ 链;敏感性结果显示,抗体效价都在 1:51 200 以上;抗原表位的鉴定结果表明单抗 1A5 识别的抗原表位为(EP16)ELRNRLNIADGDYVI,单抗 2B4 识别的抗原表位为(EP21)AGDSNPGETFQNFKM。本研究成功制备了针对 GAsV Spike 蛋白的单克隆抗体,并鉴定出 2 个新的抗原表位,为建立快速、简便的 GAsV 检测方法奠定了基础。

关键词:鹅星状病毒;刺突蛋白;单克隆抗体;抗原表位

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0159-06

2016 年以来,我国各地养鹅场相继暴发了一种雏鹅全身性痛风疫病,经病原分离鉴定,证实该疫病由鹅星状病毒(goose astrovirus, GAsV)感染引起^[1-2]。该病毒主要感染 5~20 日龄雏鹅,临床症状表现为关节肿胀,解剖后可见肾脏与关节腔内有大量的白色尿酸盐沉积^[3],发病率为 70%~80%,死亡率最高可达 50%,给我国养鹅业造成了重大经济损失^[4-5]。目前市场上缺乏有效的疫苗与药物,临床上主要通过控制饲料中的蛋白含量进行预防控制。快速准确诊断对于该病的临床防控具有重要的指导作用,目前主要通过 RT-PCR 和 ELISA 等检测方法来监控病毒感染^[6-8],尚缺少适合现场操作的快速检测技术。

GAsV 是一种无囊膜的单股正链 RNA 病毒,基因组长度为 6.8~7.9 kb,包括 5'端非编码区(5'-UTR),3'端非编码区(3'-UTR),多聚腺苷酸(Poly A)尾巴和 3 个开放阅读框(open reading frame, ORFs),分别是:ORF1a、ORF1b、ORF2^[9]。ORF1a 编码非结构蛋白,如核定位信号、丝氨酸蛋白酶等;ORF1b 编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp);ORF2 编码的衣壳蛋白其中包含 4 个功能域:S、P1、P2 和酸性 C 末端结构域(acidic C-terminal domain, ACTD),其中 P2 结构域编码的 Spike 蛋白,构成病毒表面的刺突结构,是 GAsV 的主要保护性抗原蛋白,可以诱导机体的免疫反应^[10-11]。本研究通过原核表达系统获得可溶性表达的截短 Spike 蛋白,制备出 3 株针对该蛋白的单克隆抗体,为建立有关 GAsV 诊断方法提供了材料支持。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和实验动物

pET-28a-Spike 重组质粒由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;GAsV XX 株(GenBank 登录号:MN337323)由河南省农业科学院

收稿日期:2022-07-05

基金项目:中原英才计划(育才系列)-中原青年拔尖人才(编号:ZYCYU202012148);河南省自然科学基金优秀青年科学基金(编号:222300420051);河南省农业科学院自主创新项目(编号:2022ZC67)。

作者简介:卢清侠(1982—),女,山西侯马人,博士,副研究员,研究方向为动物病毒与免疫学。E-mail:luqingxia82@163.com。

通信作者:张改平,博士,研究员,中国工程院院士,主要研究方向为动物免疫学。E-mail:zhanggaip@126.com。

动物免疫学重点实验室分离、鉴定和保存;鸡肝癌细胞系(LMH)由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存;BALB/c 雌鼠购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司。

1.2 主要试剂

质粒小量提取试剂盒购自北京天根生物公司;Ex - Taq 酶、DL2000 marker 购自北京宝日医生物公司;Ni - NTA 填料、His Trap excel 预装柱购自美国 GE 生物公司,HRP - His 单克隆抗体、羊抗鼠 IgG - HRP、山羊抗鼠 IgG Alexa Fluor 488、鼠源单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自武汉三鹰生物公司;ECL 显色液、胰蛋白酶、无血清细胞冻存液购自苏州新赛美公司;1 mol/L 的 Tris - HCl(pH 值 7.5)、IPTG、彩虹 180 广谱蛋白 marker、AEC 显色液、单组分 TMB 显色液、DMEM 培养基、RPMI1640 培养基购自北京索莱宝生物公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物公司;BL21(DE3)感受态细胞、澳洲胎牛血清购自北京全式金生物公司;HT、HAT、PEG - 1500、弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma - Aldrich 生物公司。

1.3 Spike 蛋白的表达与纯化

将构建好的 pET - 28a - Spike 质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落转至 1 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 振荡培养。当 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.6~0.8 时,分别加入终浓度为 0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG,16 ℃诱导表达 14~16 h 后,12 000 r/min 条件下离心 10 min 弃去培养基,重悬菌体沉淀,冰上超声破碎后再次离心,分别取上清与沉淀进行 SDS - PAGE 来检测蛋白的表达情况。将超声破碎后的菌液上清先用 0.45 μm 滤膜过滤,再用 0.22 μm 滤膜过滤,通过镍柱系统进行蛋白纯化,20 mmol/L 咪唑缓冲液除去杂蛋白,100 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱并收集。将洗脱液转入透析袋,置于 10 mmol/L Tris - HCl 缓冲液中,4 ℃条件下利用磁力搅拌器搅拌。每隔 30 min 换液,至少换 5 次后结束透析。

1.4 Spike 蛋白的鉴定

利用 SDS - PAGE、Western - blot 鉴定纯化后的蛋白,电泳结束后通过半干法转膜,然后用 5% 脱脂奶 37 ℃封闭 1 h,1:2 000 稀释的 HRP - His 单抗室温孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 次,每次 5~8 min,最后滴加 ECL 超敏显色液后凝胶成像仪显色。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度的测定,分

装后保存于 -80 ℃冰箱。

1.5 Spike 蛋白单克隆抗体的制备

1.5.1 小鼠免疫 按 1:1 的比例将 Spike 蛋白与弗氏完全佐剂乳化后,以 200 μL /只(蛋白含量 30 μg)剂量皮下多点注射 BALB/c 小鼠,同时对照组的小鼠注射等体积的无菌 PBS。2 周后,按相同的比例、剂量与弗氏不完全佐剂充分乳化后进行二次免疫,之后每隔 2 周免疫 1 次小鼠,共免 4 次。在四免 2 周后通过断尾采血法收集 10 μL 血液加到 190 μL 的 PBS 中,5 000 g 离心 8 min 左右,吸取血清,利用 ELISA 方法检测小鼠血清效价。在融合前 3 d,以 50 μg /只的蛋白剂量腹腔注射到小鼠体内。

1.5.2 间接 ELISA 方法 用 CBS 溶液将 Spike 蛋白稀释为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 转入酶标板(100 μL /孔)后 37 ℃ 包被 2 h,再用 5% 脱脂奶于 37 ℃ 封闭 1 h,小鼠的阴性、阳性血清倍比稀释后作为一抗,二抗为 1:2 000 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP,PBST 洗涤 3~4 次,经 TMB 显色后加入终止液,最后利用酶标仪读取各稀释度 $D_{450\text{ nm}}$ 值,当阳性血清 $D_{450\text{ nm}}$ /阴性血清 $D_{450\text{ nm}} > 2.1$ 所对应的最大稀释倍数为小鼠的抗体效价。

1.5.3 细胞融合与筛选 用 PEG - 1500 将对数生长期的骨髓瘤细胞与脾细胞按一定比例进行融合,待杂交瘤细胞密度达到孔底面积 1/3 左右时,吸取细胞上清通过 ELISA 进行初步筛选,并将相同载体的不同蛋白包板,利用 ELISA 进行反筛来排除针对 His 标签的假阳性杂交瘤细胞株。借助有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行 2 次亚克隆,通过 ELISA、IPMA 方法筛选出阳性单克隆细胞,置于液氮中冻存。

1.5.4 腹水制备 提前 2 周向 BALB/c 小鼠腹腔内注射 500 μL 灭菌石蜡致敏,将 PBS 重悬的 4×10^6 个阳性单克隆细胞注射到小鼠腹腔,7 d 左右观察到小鼠腹部明显膨胀,采集腹水,5 000 r/min 离心 10 min 吸取上清,-40 ℃ 保存。

1.6 单克隆抗体的鉴定

1.6.1 Western - blot 鉴定 Spike 蛋白进行 SDS - PAGE 后转膜进行分析,将按 1:500 稀释的小鼠腹水作为一抗,室温孵育 1 h,以 1:1 000 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP 作为二抗,室温孵育 1 h,最后滴加 ECL 显色液,并在凝胶成像仪中成像。

1.6.2 IFA 鉴定 将 LMH 细胞经胰酶消化后,以每孔 100 μL 细胞转入 96 孔板,待细胞密度达到

80% 左右时,用无血清 DMEM/F12(含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶)将 GAsV 稀释 100 倍后接种到 LMH 细胞上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后,更换 2% FBS - DMEM/F12 维持液(含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶)继续培养 36 h。用预冷的甲醇固定 20 min 后,5% 脱脂奶 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 1 h,一抗为 1 : 300 稀释的腹水,二抗为 1 : 500 稀释的山羊抗鼠 IgG Alexa Fluor 488,经 DAPI 染核后,在荧光显微镜下观察并拍照保存。

1.6.3 效价与亚类的测定 通过 ELISA 方法测定单克隆抗体的效价,CBS 溶液包被 Spike 蛋白,分别以 2 倍倍比稀释的腹水作为一抗,羊抗鼠 IgG - HRP 作为二抗,最后利用酶标仪读取各稀释度 $D_{450\text{ nm}}$ 值。按照亚型鉴定试剂盒说明书进行单抗的亚类测定。

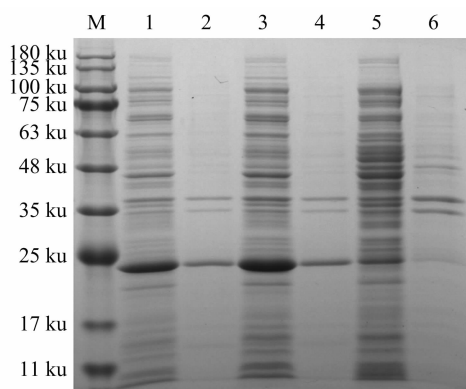
1.6.4 表位鉴定 利用肽扫描方式筛选单克隆抗体的抗原表位,根据 GAsV XX 株的截短 Spike 蛋白序列合成了 15 个氨基酸的 25 条重叠肽,重叠长度为 7 个氨基酸,所合成多肽的纯度均大于 95%。通过间接 ELISA 方法进行表位筛选,用 CBS 溶液将合成多肽稀释成为浓度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后转入酶标板(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$),每条多肽重复 3 个孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h,以 Spike 蛋白作为阳性对照,PBS 作为阴性对照,用 5% 脱脂奶 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 1 h,一抗为 1 : 500 稀释的 3 株单克隆抗体,1 : 2 000 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP 为二抗,根据酶标仪读取 $D_{450\text{ nm}}$ 值鉴定单抗的抗原表位。通过 Dot - blot 方法进行表位鉴定,将 1 μg 合成肽点至硝化纤维素膜上,Spike 蛋白为阳性对照,PBS 为阴性对照,室温干燥后 5% 脱脂奶 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h,将 1 : 500 稀释的阳性血清单克隆抗体作为一抗,1 : 2 000 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP 为二抗,PBST 洗涤 4 次,最后用 ECL 试剂显影。

2 结果与分析

2.1 Spike 蛋白的表达、纯化与鉴定

SDS - PAGE 结果显示:IPTG 诱导后,Spike 蛋白在菌液上清中大量表达,1 mmol/L IPTG 诱导表达的蛋白量比 0.5 mmol/L 诱导表达的蛋白量高,故选择 1 mmol/L IPTG 进行 Spike 蛋白的诱导表达(图 1)。

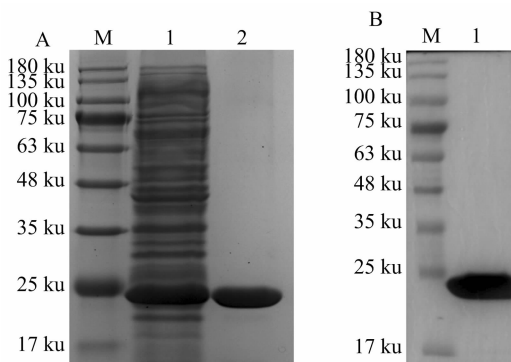
通过镍离子亲和层析纯化 Spike 蛋白,20 mmol/L 咪唑缓冲液洗杂,100 mmol/L 咪唑缓冲液洗脱目的蛋白。对纯化后的 Spike 蛋白进行 SDS - PAGE、Western - blot 鉴定,SDS - PAGE 结果



M—蛋白 marker; 1、2—16 $^{\circ}\text{C}$ 下 0.5 mmol/L IPTG 诱导菌液上清、沉淀; 3、4—16 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 mmol/L IPTG 诱导菌液上清、沉淀; 5、6—未诱导菌液上清、沉淀

图1 Spike 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

显示纯化的 Spike 蛋白大小正确,约为 23 ku,且纯度较高,大约为 95% (图 2 - A)。针对 His 标签的单克隆抗体免疫印迹分析显示,在大小为 23 ku 处出现了特异性的条带(图 2 - B)。进一步通过 BCA 蛋白定量试剂盒检测,确定了获得的纯化蛋白浓度为 1.5 mg/mL。



A 中: M—蛋白 marker, 1—诱导菌液, 2—洗脱液;

B 中: M—蛋白 marker, 1—洗脱液

图2 纯化 Spike 蛋白 SDS-PAGE 与 Western-blot 分析

2.2 单克隆抗体的筛选

2.2.1 小鼠免疫及血清效价的测定 Spike 蛋白与弗氏佐剂充分乳化后皮下多点注射 BALB/c 小鼠,四免后利用断尾采集小鼠血清,通过 ELISA 方法检测血清效价。因小鼠个体的差异,血清效价不同,与其他 3 只小鼠相比,1 号小鼠效价较高,达到 1 : 512 000,故选择 1 号小鼠进行超免与细胞融合(图 3)。

2.2.2 阳性单克隆杂交瘤细胞的筛选 先利用 ELISA 方法初步筛选融合后的细胞,得到 17 孔阳性杂交瘤细胞,再将它们转到 48 孔板,待细胞密度达 70% 左右,通过 ELISA、IPMA 方法进行复筛,得到 8

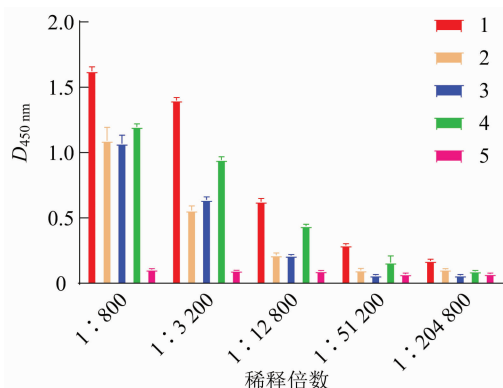
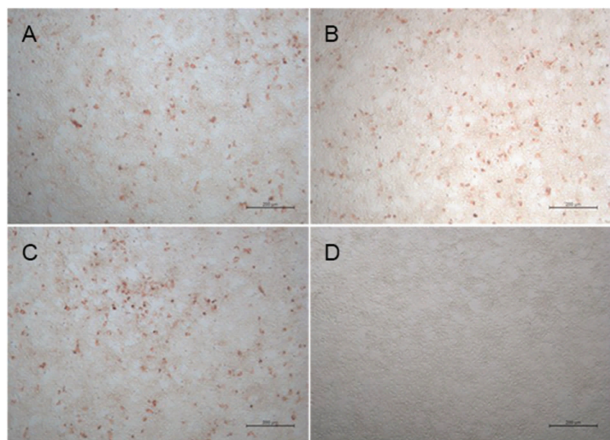


图3 ELISA 测定小鼠血清效价

株杂交瘤细胞,并对其进行亚克隆,最终利用 ELISA 方法筛选出 3 株阳性单克隆杂交瘤细胞,分别命名为 1A5、2B4 和 12E6。利用 IPMA 对 3 株阳性单克隆杂交瘤细胞进行进一步鉴定,以 3 株阳性单克隆杂交瘤细胞的上清分别作为一抗,二抗为 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP, AEC 显色后在倒置显微镜下观察显色结果,显示 2B4 和 12E6 单克隆杂交瘤细胞的上清可以与 GAstV 发生特异性反应(图 4)。



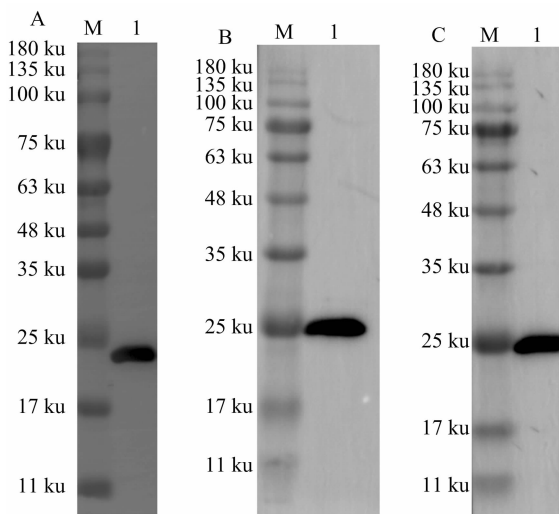
A—2B4 单抗; B—12E6 单抗; C—阳性对照; D—阴性对照

图4 IPMA 鉴定单克隆杂交瘤细胞

2.3 单克隆抗体的鉴定

2.3.1 Western - blot 鉴定 Spike 蛋白进行 SDS - PAGE 后转膜、封闭,再用 5% 脱脂奶将 3 株单克隆抗体(1:500)分别稀释后作为一抗,通过 Western - blot 鉴定其与 Spike 蛋白的反应性。3 株单克隆抗体均与 Spike 蛋白反应,且反应性较强(图 5)。

2.3.2 IFA 鉴定 利用间接免疫荧光实验(IFA)鉴定单克隆抗体与 GAstV 的反应性,预冷甲醇将接种 GAstV 的 LMH 细胞板固定,以 1:300 倍稀释的 3 株单抗分别作为一抗,以多少倍稀释的山羊抗鼠



A. 1A5 单抗; B. 2B4 单抗; C. 12E6 单抗

M—蛋白 marker; 1—Spike 蛋白

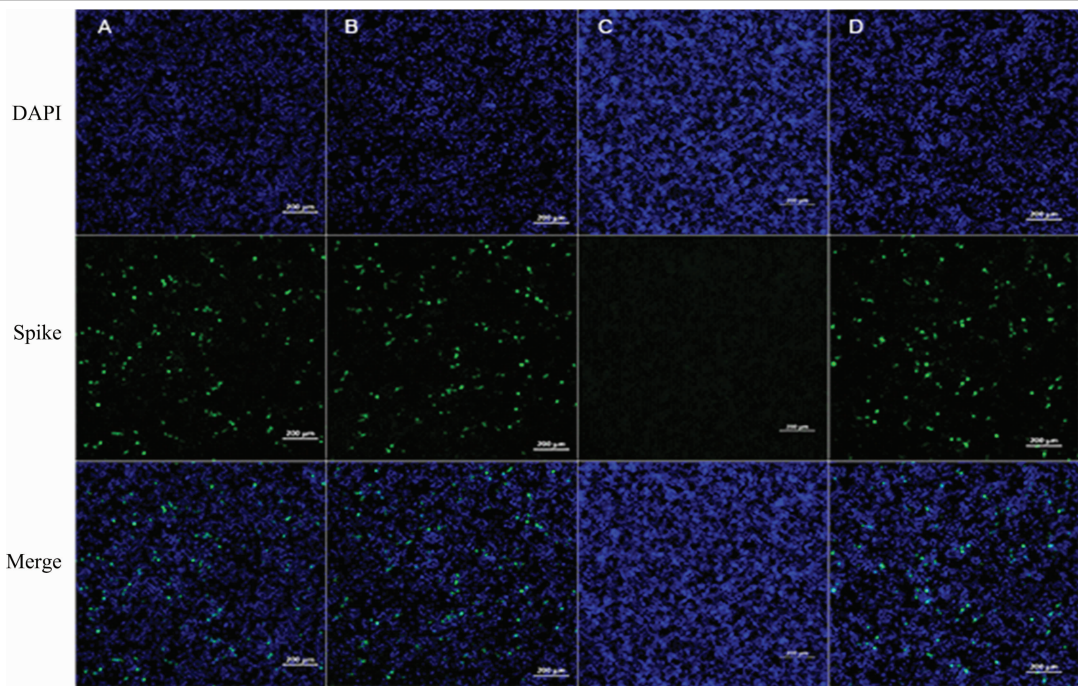
图5 Western-blot 鉴定单抗与 Spike 蛋白的反应性

IgG Alexa Fluor 488 作为二抗。结果显示,与阴性和阳性血清比较,2B4、12E6 与 GAstV 发生特异性反应(图 6)。

2.3.3 效价与亚型的鉴定 利用 ELISA 方法检测 3 株单克隆抗体的效价: CBS 溶液包被 Spike 蛋白,以 2 倍倍比稀释的腹水作为一抗,3 株单克隆抗体均与 Spike 蛋白反应性良好,并且效价均在 1:25 600 以上(图 7 - A)。利用亚型鉴定试剂盒测定 3 株单克隆抗体,根据 $D_{450 \text{ nm}}$ 值判定单抗亚型,结果显示 12E6、2B4 单抗为 IgG2b 亚类,1A5 单抗为 IgG2a 亚类;3 株单抗的轻链均为 κ 链(图 7 - B)。

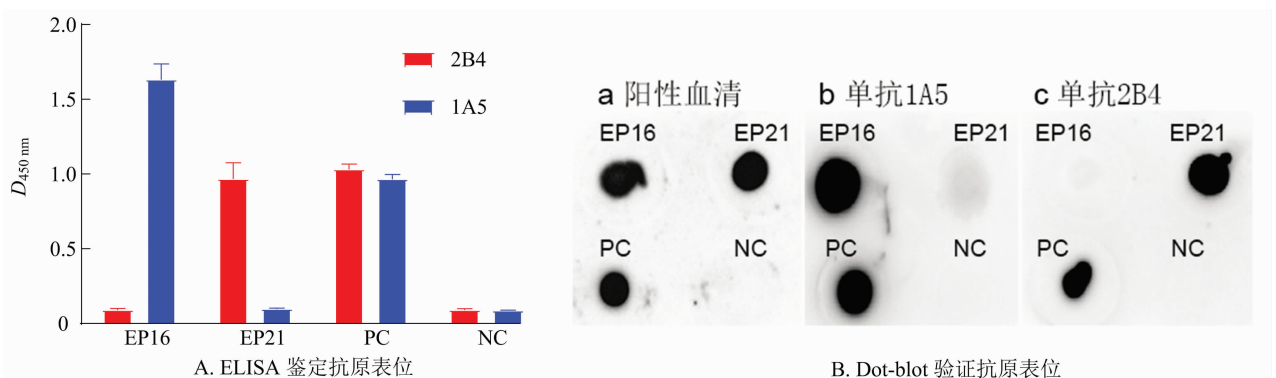
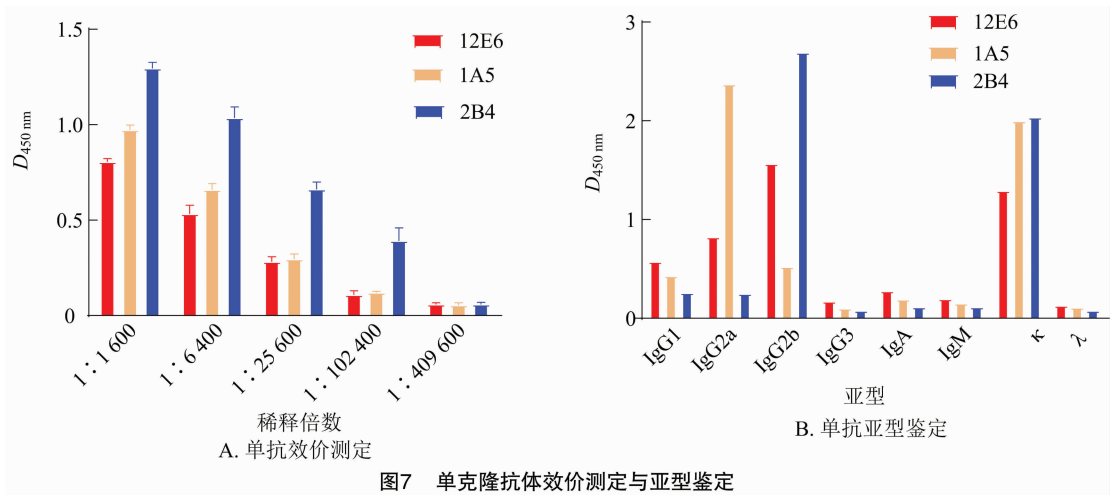
2.3.4 抗原表位的鉴定 利用多肽扫描方式筛选单克隆抗体的抗原表位,ELISA 筛选的结果表明,单克隆抗体 1A5 识别的表位为: (EP16) ELRNRLNIADGDYVI;单克隆抗体 2B4 和 12E6 识别的表位为: (EP21) AGDSNPGETFQNFKM;它们均为 Spike 蛋白上的线性 B 细胞表位(图 8 - A)。利用 Dot - blot 方法对单克隆抗体进行进一步的表位鉴定,结果表明,与阳性血清对比,单克隆抗体 1A5 和 2B4 分别识别 (EP16) ELRNRLNIADGDYVI 和 (EP21) AGDSNPGETFQNFKM,与 ELISA 鉴定结果一致(图 8 - B)。

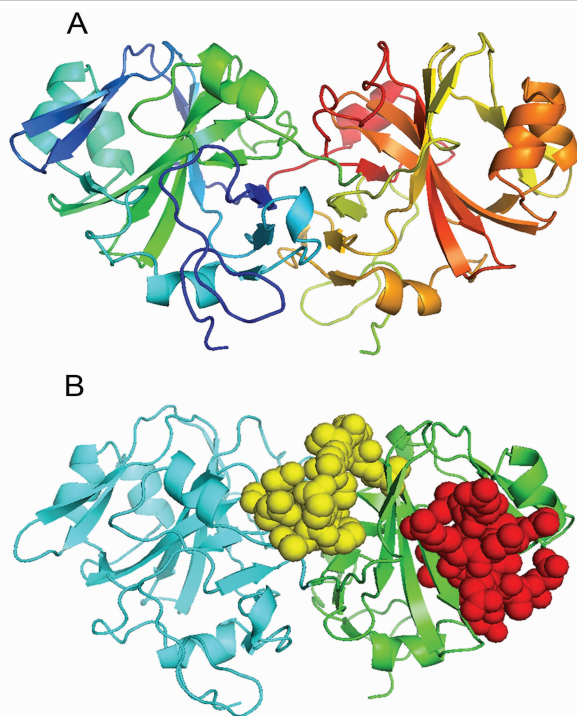
2.3.5 抗原表位的空间分布 利用 SWISS - MODEL 软件以 TAsV - 2 Spike 蛋白(PDB:3TS3)的晶体结构为模板进行同源建模,获得 Spike 蛋白的三维结构,其以同源二聚体形式存在(图 9 - A)。



A. 单抗 2B4; B. 单抗 12E6; C. 阴性对照; D. 阳性对照

图6 IFA 鉴定





A. Spike 蛋白 3D 结构; B. 抗原表位分布
图9 抗原表位的空间分布

之后使用 PYMOL 软件绘制 B 细胞表位 EP16, EP21 在 Spike 蛋白结构上的位置。由图 9-B 可见, 抗原表位 (EP16) ELRNRLNIADGDYVI 位于 Spike 蛋白结构的侧面 (红色), 而抗原表位 (EP21) AGDSNPGETFQNFKM 位于 Spike 蛋白单体的顶部 (黄色)。

3 讨论

鹅星状病毒主要感染雏鹅, 其特征为痛风、肾脏出血和肿胀, 发病率较高。据统计, 该病已经造成 12 亿~15 亿元的经济损失。常规的 PCR 检测方法受环境、技术的限制, 在养鹅企业很难得到应用, 因此建立快速、简便的 GAsV 抗原诊断技术对于该病的防控十分重要^[12]。而基于单克隆抗体的胶体金免疫层析检测技术具有快速、简便、不依赖任何设备的特点, 同时具有良好的特异性和敏感性, 非常适合疫病的现场即时检测^[13,14]。在本研究中, 我们制备了 3 株针对 Spike 蛋白的特异性单克隆抗体, 为后期研发针对 GAsV 的胶体金试纸条等抗原检测方法提供了材料。

线性 B 细胞表位可以为疫苗设计和诊断方法开发提供潜在候选位点^[15]。Ren 等制备了针对 His-P2-ACTD 蛋白的单克隆抗体, 并鉴定出 3 个线性表位, 首次开发了基于单抗的夹心 ELISA 方法

用于检测 GAsV。Xu 等利用水稻胚乳表达的猪瘟疫病毒 (CSFV) E2 蛋白免疫小鼠, 获得了相应的单克隆抗体, 发现其中 2 株具有中和活性, 鉴定出的表位 P33 能够区分猪瘟疫病毒抗体与牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 抗体, 并为新疫苗的设计和鉴别诊断提供了理想的候选肽^[16]。本研究鉴定出 2 条线性抗原表位, 为 GAsV 疫苗和诊断技术的开发奠定了基础。

4 结论

本研究通过小鼠免疫、融合, ELISA 筛选, 亚克隆以及 IPMA 验证成功制备了 3 株单克隆抗体, 其中 2 株可以与病毒发生反应; 并通过多肽扫描技术, 鉴定出 2 条分布于 Spike 蛋白的抗原表位; 为建立快速、简便的 GAsV 检测方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] Zhang X, Ren D, Li T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. *Emerging Microbes and Infects*, 2018, 7(1): 1-8.
- [2] Zhang Y, Wang F, Liu N, et al. Complete genome sequence of a novel avastrovirus in goose [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(7): 2135-2139.
- [3] 张清水. 新发肾致病型鹅星状病毒的分离鉴定及弱毒株选育 [D]. 中国农业大学, 2019.
- [4] Zhang Q, Cao Y, Wang J, et al. Isolation and characterization of an astrovirus causing fatal visceral gout in domestic goslings [J]. *Emerging Microbes and Infects*, 2018, 7(1): 71-82.
- [5] 姜晓宁, 田家军, 杨晶, 等. 导致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(5): 871-894.
- [6] Yuan X, Meng K, Zhang Y, et al. Establishment and application of rapid diagnosis for reverse transcription-quantitative PCR of newly emerging goose-origin nephrotic astrovirus in China [J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00380-18.
- [7] 孙敏. 新型鹅星状病毒的分离鉴定及其抗体竞争 ELISA 检测方法的建立 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [8] Ren D, Li T, Zhang W, et al. Identification of three novel B cell epitopes in ORF2 protein of the emerging goose astrovirus and their application [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(2): 855-863.
- [9] 田家军. 致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定及对雏鹅的致病性 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [10] Zhang M, Lv X, Wang B, et al. Development of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid spike protein VP27 of the novel goose astrovirus [J]. *Poultry Science*, 2022, 101(3): 101680.
- [11] Royuela E. Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form [J]. *Comparative Immunology*,

李永峰,王克华,窦套存,等. 蛋鸡资源群体的小肠质量全基因组关联分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):165-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.024

蛋鸡资源群体的小肠质量全基因组关联分析

李永峰,王克华,窦套存,胡玉萍,郭 军,王星果,马 猛,曲 亮

(江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225125)

摘要:小肠是鸡重要的营养消化吸收器官,在蛋鸡生长和生产发挥重要作用,小肠质量是反映肠道发育情况的重要生理指标,有必要对其遗传结构进行研究。利用白来航鸡与东乡绿壳蛋鸡杂交构建 F_2 代资源群体,采用 600K 鸡 SNP 芯片对 F_2 代 1 512 羽个体进行基因型检测,通过 PLINK 软件对小肠质量性状进行全基因组关联分析(GWAS)。结果显示,十二指肠、空肠和回肠的遗传力分别为 0.32、0.28、0.26,说明小肠质量表现出中等遗传力水平。GWAS 共鉴定出 185、201、36 个 SNP 分别与十二指肠、空肠、回肠质量显著相关(共 422 个 SNP),其中,421 个 SNP 位于 1 号染色体 166.6~173.2 Mb 区域,说明该区域与小肠质量关系密切。共有 28 个 SNP 与 3 段小肠质量均显著相关,其中,6 个 SNP 位于对应 4 个候选基因(*FOXO1*、*CKAP2*、*CAB39L* 和 *MRPS31*)的内含子区,它们可能与小肠质量密切相关。通过 GWAS 分析,初步筛选出与蛋鸡小肠质量性状相关的 6 个 SNP 和 4 个候选基因,可为性状的遗传机制解析和分子育种提供理论依据。

关键词:蛋鸡;小肠质量;GWAS;遗传结构

中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0165-06

饲料成本是蛋鸡饲养成本主要组成部分,通过提高饲料效率可有效降低饲养成本,优化饲料配方是提高饲料效率的重要手段。然而,随着生物技术的发展,基因选择成为一种更有效的方法^[1]。肠道发育是家禽饲料效率的重要影响因素之一,与消化酶的活性和营养吸收能力息息相关^[2]。肠道质量是反映肠道发育的重要指标。目前,关于鸡小肠质

量遗传背景的研究很少,有必要对其遗传结构进行解析。GWAS 通过对全基因组中的序列变异、表型和系谱信息进行关联分析,从而筛选出目标性状的调控基因或元件^[3]。与传统 QTL 定位作图方法相比,GWAS 检测变异的效果更好,定位的基因组区域更窄^[4]。在鸡的形态特征、生产性状、抗病等方面已有许多 GWAS 研究成果^[3],但与鸡小肠质量有关的 GWAS 研究鲜有报道。本研究选取 F_2 代资源群体母鸡 1 512 羽,采用 600K 鸡 SNP 芯片进行基因型检测和 GWAS 分析,以期对蛋鸡小肠质量性状的遗传机制解析提供参考,为分子育种提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 资源群体构建

由白来航(WL)纯系和东乡绿壳蛋鸡(DX)纯

Microbiology and Infectious Diseases,2008,33(1):1-14.

[12]Zhang M, Lv X, Wang B, et al. Development of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid spike protein VP27 of the novel goose astrovirus [J]. Poultry Science, 2022, 101(3):101680.

[13]Liu Y, Hao L, Li X, et al. Development and characterization of canine distemper virus monoclonal antibodies [J]. Monoclonal antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2017, 36(3): 119-123.

[14]Huang X, Shi T, Mo K, et al. Monoclonal antibody against

premembrane viral protein of avian tembusu virus [J]. Monoclonal antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2017, 36(2): 57-61.

[15]Jiang M, Guo J Q, Zhang G P, et al. Fine mapping of linear B cell epitopes on capsid protein of porcine circovirus 3 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6223-6234.

[16]Xu Q R, Guo J Q, Ma F S, et al. A novel linear epitope at the C-terminal region of the classical swine fever virus E2 protein elicits neutralizing activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189: 837-846.