

Contents lists available at ScienceDirect

Ι

Μ



journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

A 🖓 VP4 * IBDV * ,<u>Þ</u>, H 🖗 † L† [♭], Y ^{,b}, L† Y łW W W [,], J† Þ . Y M۴ L

Key Laboratory of Animal Epidemic Etiology & Immunological Prevention of Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, PR China ^b State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003, PR China

AR ICLE INFO

Article history: R t 15 F b R t t t 2009 . † . † 12 M 2009 A,.. A`†∳ 14 M 2009 † 9 A † 2009

Keywords: I J† b A tVP4 b Btt.t.

ABS RAC

(IBDV) 、 - , † ъ , 1 . 1 12 . 1 . . (IBD)† .L * , VP4 * 、, [†] b IBDV.C Þ VP4 ⁺, ÌBDV † , ↓† . H ĥ VP4 fi . IBDV ↑ ↓ ↑ . B IFA ↑ VP4 ↑ Esch t IBDV t ELISA, v VP4 * Escherichia coli ٦, fi * VP4 fi ۱. ₹ IBDV. † IBDV. * Ð . . . t IBDV. t 1 IBDV Ð VP4 ``p . J[™] VP3 , Đ ት ት , VP4 ,† Þ . . FΫ * * 2 t. . . t IBDV. T , fi , VP4 ,₽ ₹ IBDV * ,_† . . 2009 E 1 L. A 1

1. Introduction

I _t b∕ 1 † (IBDV), genus Avibirnavirus † family Birnaviridae, , † , † 1 I þ (IBD) (B t, 2004; M ., 2003; S Μ Jt. , t ., 2000), IBD † ., 1979). B t (D ♭ F 🖢 ት ት 📜 💪 IBDV (H⁺ ⁺ ., 1981; K W † , 1980; R b . ., 1994). IBDV ₹., † B (P † ., 1982; S , 1987; S ., 2000). T IBDV ۲, (A B), • (VP1 5).T . VP1. fi (R R) IBDV

Nt , , 1987; S. t t _t (M ____, 1988; M ., 1987; Ε^t ____, 2004; ., 2006). T

, **†** λA, , † ,

* С ÷ Р R , H ्यो 310029, PR C † .T .: +86 571 8697 1698;

. . .

: +86 571 8697 1821. E-mail address: @🛪 . . . (J.).

2009 E 👌 L. A 👌 🕽 0161 5890/\$

1:10.1016/i. 1 .2009.03.011

* VP243 VP5 ., 1995). VP243 (M **۲**ار ۲ , VP4. VP2 ł VP2, VP3, IBDV ., 1989), VP3 * ት ት ₩ ł (F , IBDV (B ., 1997), VP5 † ., 1988; Kb 2000; J VP5 ÷. JVP1 ł _₽ ., 1997); (M . . . VP4 IBDV ł t. ۴ ر ., 2006; Kb (B) ., 2000; F ., 1997; , 1999) Lei ., 2000; S R 1 t, <u>ኮ</u>ነት ት <u>ኒ</u>. ∐.ኑ (G ., 1997). E VP4 . . I ŧ., Þ. VP4. . * * VP3 , t ↑ IBDV ↑ __↑ . .

2. Materials and methods

2.1. Virus, cells and serum

 \uparrow IBDV NB , \uparrow (10^{6.2} BLD_{50}/0.1 , G B Τ, , ,

н.		G	D † ,†	N, A, , A
Р		VP3	F R .	5' CGTCGT <u>CATATG</u> GCATCAGAGTTCAAAGAGACC 3' 5' CGTCGT <u>GAATTC</u> TTACTCAAGGTCCTCATCAGAGACG 3'
		VP4	F R	5' CGTCGT <u>CCATGG</u> CCGACAAGGGGTACGAGGTAGTC 3' 5' CGTCGT <u>CTCGAG</u> CATGGCAAGGTGGTACTGGCGTCC 3'
E	A.,	VP3	F R .	5' CGTCGT <u>GAATTC</u> ATGGCATCAGAGTTCAAAGAGACC 3' 5' CGTCGT <u>GTCGAC</u> CTACTCAAGGTCCTCATCAGAGACG 3'
		VP4	F	5' CGTCGT <u>GCTAGC</u> ATGGCCGACAAGGGGTACGAGGTAGTC 3 5' CGTCGT <u>GAATTC</u> CTAAGCCATGGCAAGGTGGTACTGGCG 3'

U . The set of the set of the τ

2.2. Construction of expression plasmids of VP4 and VP3 gene

F. VP3 VP4 IBDV, , `fi、 , ł IBDV NB , † (G B , DNA , . A . EU595672) . †. † **⊺**∳ 1. T . . CEF * RNA † IBDV NB . ۴ ر t t **b** 1, PCR PCR. U * , 95°C 30,63°C 30 72°C 1. † 30、、 5. ↑,95°C た. fi _ た _ . 5. た , 72°C. T. _ . PCR . USA) ET 28 (N , M † , WI) , † .T ET 28 VP4, CI VP4, ET 28 VP3 . CI VP3 (P , †, † , † , † , † , † , **DNA** , fi t ET. 28. VP4 ET. 28. VP3 *t E*. , coli BL21 (DE3) , †.

2.3. Expression and purification of VP4 and VP3 proteins

、 ゆう *E. coli* BL21 (DE3) ノ う 、 うう Т ET 28. VP4 ET. 28. VP3 . 37°C ζ þ 4 3.A. Þ. † β. D. . . , . <u>,</u> † t (IPTG) t fi 1 M . 0.5 . 37 °C, Þ ∫ 5000 × g <u>,</u>† 10, † (, 🦯 ., 2005⁰). T SDS PAGE -, VP4 VP3 . * . F† .γ.W., , fi ÷. , UK). T A) 🤄 , B 、 † H١ VP3 ۱ fi VP4 ł. fit ł, , M . † , WI) 🔍 (N VP3 🤇 👌 † VP4 ti 🦻 SDS PAGE Т φ , W .T. 4 ŧÞ 4 В., , ъ Ъ ÷. (BSA)

2.4. Preparation of monoclonal antibodies to VP4 and VP3 proteins

(CFA, S[†] , A , [†], S, L [†], MO). T VP4 VP3 (50 μ) ۲fi .) 2 .~i . . (S† ,Α. fi . Т **1 جز** ال ۴, 100μ / VP4 †.T Ρ́ VP3 3 . . S. .H♭t SP2/0 Ъ ELISA VP3 IBDV. * VP4 Υfi _ CEF . . . Н У bł Ъ . T Ð (A₽) Þ SBA C /HRP(S / B . B* , AL). T ìfi VP4 VP3 IBDV.

2.5. In vitro transfection and immunofluorescent assay

fi \uparrow , \uparrow , $A \downarrow$ VP3 VP4. \uparrow , \downarrow , \uparrow tVP4 .₺ , [†], ,... V 1 96 IBDV. * . . 2 80 90% fl t. 0. . t 、.Α. , ۴, MEM (G^b, BRL), bj ł Lt 🚬 t CI VP4 CL VP3 2000 (I t .Е 2000 † 50 μ 0.2μ DNA 0.5μ L¹ .Tt.t.bt.tbtt.tVP3 VP4 Ab VP3 VP4 IBDV, CEF Ϋ́, VP4 VP3. . † 36 . , 2009; , , 2008; ___b + ., 2006). M 🚬 † 📿 . V CEF, A A CL. · · .

2.6. Animal inoculation and sampling

E۴ 25. . . . SPF t. . . t . T • 🗘 🖍 **†** (1. .) t IBDV. t ą. ł. . IBDV . 0.1 (100 BLD₅₀/0.1). T (20 t) t . . t IBDV t . . * t. . **1**. . . IBDV . 0.1 . . (5000 TCID₅₀/0.1), † (IBDV b . .) t IBDV . . .B ゆ た (BF) 、 1BDV た (SF) · · · · 24,48 72,96 /1 ۴ <u>,</u> ۴ (. .[†].) ノ、 ト IBDV .† .S , . . . 0, 4, 7, 10, 14, 17, 20,

1966	
------	--

Tab	le 2						
С		1,1		, ţ	VP3	VP4	IBDV.

A Ji	Ab .	I . † 👃 ELISA	4	IFA		
		VP3	VP4	IBDV. † 📿 🗸 CEF	VP3., V	VP4 V V
	1B1	+	_	+	+	-
	2B12	+	_	+	+	-
	2D6	+	_	+	+	-
	2D12	+	_	+	+	-
	3F12	+	_	+	+	-
VP3 *	9H1	+	_	+	+	-
	2A2	+	_	-	-	-
	2H12	+	_	-	-	-
	4C6	+	-	-	-	-
	4G11	+	-	-	-	-
	9B4	+	-	-	-	-
	4C3	_	+	+	_	+
	6A4	-	+	+	_	+
	6H8	_	+	+	_	+
VP4. *	1G7	_	+	_	_	_
	1H9	_	+	_	_	_
	4D11	-	+	-	-	-
	4E10	-	+	-	-	-

2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Τ. σ. σ. τ. τ. τ. ELISA - Đ VP3 , **1** VP4 ۴. יר_`, ff ELISA (S t - 100 μ ., 2009). B † fl , 96. b † → IBDV. VP3. → † IBDV VP4 . † . . . †. $(0.14 \text{ MN C}, 1 \text{ MN } 2\text{CO}_3, 1 \text{ MN } \text{HCO}_3, \text{H9.6}). \text{ A}$ ∠ 4°C . ↑ .,,,,,, , . , t, jb ۱ t. 200μ Þ) (5% t ł PBS) , 37 °C 1.A. D PBST 100× , † , Þ. 2, <code>₺ PBST</mark>♭</code> . 37°C 10 † .T ት ይ. ት .ት.ት. IG((HRP) 🦼 🛪 IG (KPL, G t Þ , , USA) , † 1 . 37 °C. Μ , 100μ Þ F **ት** ት TMB (S†) ...T 50 µ $2\,M\,H_2SO_4$ ţ,† . . Þ. Ъ . 450 . T ELISA , Þ Ъ , , , ,

2.8. Virus neutralizing antibodies

ر با ال ∠ 56°C A, *** *** . . 30. †, 20 ... (H . , ۰, ۲ , ., 2003). B † fl , J 2007; 4 1:2 MEM, 100 TCID₅₀ IBDV. A . <u>ኦ</u> ነ 1. J 37 °C, J ţ CEF . C J† 5 ∠ 37 °C. T ÷ر, ر Ъ . ł · · 4 . IBDV CEF ¥. . T , ,t ,t 4 ..

2.9. Histopathology and Immunohistochemistry (IHC)

fi 🦻 10% Ъ Tì ∳...†. fi.S 、 ↑ (HE).D . ↑ t, tt.Btfl 0.3% H₂O₂ † PBS . † . ۲ † PBS, 37 °Cb∕ 10 ↑ (. H 7.6, 0.1% C C ₂) 0.1% AÞ , . Ìfi VP4 VP3 2 ∠ 37 °C. T <u>۲</u>., t (HRP) b , **†** ΙG (KPL, G t, b, , M , USA). F Þ , . , † , ł,

3. Result

3.1. General characterization of mAbs to VP4 and VP3

ትት İŞ ₹ . E. coli BL21 (DE3) ر IPTG ET. 28. VP3 ET. 28. VP4 , 1 37 °C VP3 V. 4. . * , SDS. PAGE VP3. 4 Ъ VP4 . . . Þ .W . Þ, γþ . , 28 D JtHt A₽,t t , þ 32 D 、 ∖, îfi∖ VP4 VP3 † E. coli. . fi VP3 Т VP4 .Α, jbj ₹ Ъ ELISA , AÞ (T 🤄 2), A 6H8, 4C3, 1G7, 1H9, 4D11, 4E10 Ab 1B1, 2B12, 2D6, 2D12, 3F12, 2A2, VP4. 6A4 . ìfi 9H1 (*fi, VP3. T 2H12, 4C6, 4G11, 9B4 AP . , `fi t. .. * E. coli BL21 . , , **4** t. (DE3), E. coli BL21 . ET 28 (+) . . . I G b (DE3) Þ þ Ab þ к. †.

3.2. Binding ability of anti-VP3 and VP4 mAbs for native VP3 and VP4 proteins and intracellular distribution of VP4 protein of IBDV

The test of the Above Above CLVP3



h h VP3 Fig. 1. 1 fl . • • _ /IBDV * VP4 . E ۴., à , Ĕ v.↑ ,, , , CEF. , ,,↑ ₽ .A . . ₹ VP3. ÷. , tVP3. Ab⊱t IBDV.t ħ v t. ... CI VP3, t . F 1 , t ¥. . .

CEF CL VP4, 4 1. IBDV. I . . A∲ , VP3. 1B1, 2B12, 2D6, ł (T b Αþ 2), 2 9H1 、 , `ffi` ł 2D12, 3F12, t. VP3 , j ł Υ Y ۱. CL VP3. 、 *-*B, † A₽ VP4 † (T∳ 2),. A∲ (6H8, , , 6A4) 4C3 ∖ îfi∖ ł, VP4 、*·* . t. . CI VP4. C τ V ł þ, VP3 VP4 AÞ . ¥, AP VP3 VP4 Υfi. 4 Т AÞ ł , VP3 VP4 ł, ÷. IBDV. ł τ V VP3 VP4. CEF , ΑÞ Þ۴ 2, ł, . . , t VP3 VP4. ¥, IBDV. F , ł, Þ ٦, t VP3 VP4. <u>۴</u> ر Ъ , A∳.T VP3 (F¹.1A E), VP4 ¥. ъ . . , ` ¥ , (F[↑].1B F).

3.3. Anti-VP4 and anti-VP3 antibodies in chickens infected with IBDV

BELISA , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
þ.,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
IBDV (F ⁺ . 2A); ⁺ ,
IBDV (F ⁺ , 2B), , ⁺ VP3 , ^b
, t, t, t, , , , , , tVP4 , b, t, , , , , , , , , , , , , , , , ,
I fl , t VP3 , t
VP4 by the second time to the se
• • • • • • • • • • • • • • • • • • •
† V , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
. 、, た . 、 、 、 た
, , † , , , , , , , , , , , , , , , , ,
ti stiti, ti, ti i si t
IBDV: ↑ 、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、、
」 ゆーレー (*) , ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・
\uparrow . \uparrow VP3 \downarrow
」た「III」です。」たVP3 」を コール 1 IBDV. たくしょう
1, 18DV. † 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1,
IBDV.

3.4. Distribution of VP4 protein in Bursa of Fabriciusof chicken inoculated with IBDV

ţ ł ŧþ Τt VP4 FϷ ትት ्री à, ŧ. ł IBDV. I t IBDV. BF Þ ÷. 36 **ት** ት ł BF Н ą t IBDV t ¥. ۹, ÷, ł . I VP3 VP4 (F⁺ . 1I ¥, ł J) . . . , , t t t, VP4 AP * Jt VP3 BF

VP4. . * (fl Jt VP4) ÷, t V CI VP4, D CEF t VP3 JtVP4 A∳ .G . H V *、*-, à, Þ ्री VP3 १ JtVP4 A∳ ,,,† J . I ्रो 1 IBDV. 1 t VP3 5 ħ. tVP4 A₽ , ķ 5 . K 、 · t. .tVP3 A∳t t IBDV.t ą. Þ à, . L † s, t Ť, þ ħ. ,tVP4 A∳t , 2 Þ t IBDV t ą. N . Mt ...t.VP3 ł Þ t ş. TVP4 AP 1 , .† ì ķ Ť, . 、 · .



 Fig. 2. K⁺
 +
 +
 +
 YP3, +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +

4. Discussion

Τ、 VP1
 VP3
 1
 1
 ..., 2007). T
 VP3
 1
 1

 VP3
 1
 1
 ..., 2008). C
 ..., 1
 1
 1
 4

 VP3.
 .M , <u> ትትት ኮ</u> VP3 ELISA
 VP3 ELISA
 УР3 ELISA

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 †
 ,

 . Н , ę IBDV. * VP3 . IBDV IBDV * ∠ fi

A , VP4 † IBDV .I , † VP4 ELISA † ्रौ fl · · · · · · · t VP4 fi , t IBDV. t 2 tt . . VP4 ∖, ţĮĮ 1 IBDV ∠† VP4 Ъ , Đ ↑ IBDV ↑ 、 、 ↑ 、 T ↑ 、 VP4 、 ↑ IBDV ↑ ゆ↑

 VP4
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 t
 <lit
 <lit
 t
 <li t . fi . Н t IBDV ł,

. (1997) G t VP4 Ab † IBDV. † ... H † fl b † VP4 A _ † † IBDV. † 🔪 CEF. Ь ĥ. , , , , , , , VP4 IBDV. I <u>ት</u> ት . , † Ð 12 VP4. . * * . * **,**† tt IBDV.O. , 2006), B、 ΙMϷ 4 ł t (Wt IBDV , _, † (H† †) ., 1981), 5 、__b+t ł ÷. b ł 、 (M , 1986). , † IBDV. † Н 、t.t.tVP4 tVP3 A₽ 1 . , ... t ₹ BF (F[†] . 11 J). Þ Т . · · · 、 IBDV . t, tộ , t - t , IMb † B, ¥. . . . Ì ł.,

Acknowledgements

References

- 23.
- 3, 13. B⁺, C., M. ..., E., G⁺, A.E., 2000. A
- ATP ..., K., G. b. , A.E., 2000. A ..., t. ... С

- .,∳.†., j
- , A.R., L , J., D
- G . N., 2007. .P 、.
- , H, B⁺, C, M , , , TC, B , J, K , B, M , , E, 1997. A J. V1 . 71, 8879, 8885.
- . ्.† . ्. . † .† . ्.†
- J., H , P.J., A , A.A., 1988. B⁺ ⁺

- D., B., 2000. R S 652 L 692 b b ... b ... b VP4 ... b ... b fi ... b
- J.R., P
 F., R
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 +
 J. V† . 77, 6438, 6449.
- Μ
- † ... t., .A.,.. м . 87, 191 203.
- ÷. , H., I , M.R., R , R., 2003. R . † _. Μ .† b
- М

- 24, 223 235.

- 229 236.
- W1
- * . DNA C . B⁺ . 25, 646, 653.
- J.Y., S
 , S.B., G
 , H., C
 , Q.X., W
 , J.X., S
 , H.G., C
 , T.F., G
 , J.Q.,

 2005
 .1
 .5
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4

 118, 201.
 211.
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
 .4
- , H.G.,