

吕 炫, 张 森, 胡增金, 等. 鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(2): 412-417.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.02.018

鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的制备和鉴定

吕 炫^{1,2}, 张 森¹, 胡增金¹, 李佳明¹, 张 冲¹, 朱英奇¹, 魏娟文¹, 吴 琮¹,
张瑞辰¹, 夏伦志³, 王桂军^{1,2}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036;
3. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽 合肥 230036)

摘要: 采用 RT-PCR 扩增获得鹅星状病毒(Goose astrovirus)的衣壳纤突蛋白基因 *vp27*, 并将其克隆至 pCold-SUMO 原核表达载体。重组表达载体 pCold-*vp27* 经过测序和双酶切验证正确后, 转化到感受态细胞 Rosetta。挑取阳性克隆子, 利用异丙基硫代半乳糖苷诱导表达鹅星状病毒衣壳纤突重组蛋白, 使用镍柱纯化衣壳纤突蛋白 VP27, 将定量的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠。利用 ELISA、Western blot 和 IFA 鉴定鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体。结果显示, 鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的效价大于 1 : 64 000, Western blot 试验结果证明了鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的特异性, IFA 试验结果证明鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体能够识别天然的鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27。

关键词: 鹅星状病毒; 衣壳纤突蛋白 VP27; 多克隆抗体

中图分类号: S858.332.65⁺9.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2021)02-0412-06

Preparation and identification of polyclonal antibody against the capsid spike protein VP27 of goose astrovirus

LYU Xuan^{1,2}, ZHANG Miao¹, HU Zeng-jin¹, LI Jia-ming¹, ZHANG Chong¹, ZHU Ying-qi¹,
WEI Juan-wen¹, WU Qiong¹, ZHANG Rui-chen¹, XIA Lun-zhi³, WANG Gui-jun^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Veterinary Pathology and Disease Control, Hefei 230036, China; 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230036, China)

Abstract: The *vp27* gene of capsid spike protein of goose astrovirus was amplified by RT-PCR and cloned into prokaryotic expression vector pCold-SUMO. The recombinant expression vector pCold-*vp27* was transformed into competent cell Rosetta after verified to be correct by sequencing and double enzyme digestion. The positive clones were selected, and the capsid spike recombinant protein of goose astrovirus was induced to express by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). The capsid spike protein VP27 was purified by nickel column and quantitative recombinant protein was used to immune

收稿日期: 2020-09-12

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目(2018YFD0500100、2016YFD0500805); 安徽省家禽产业技术体系项目(2019-2020)

作者简介: 吕 炫(1996-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为畜禽传染病防治。(Tel) 18788842820; (E-mail) 961579879@qq.com

通讯作者: 王桂军, (E-mail) wgj@ahau.edu.cn

BALB/c mice. The polyclonal antibody against capsid spike protein VP27 in mice was identified by ELISA, Western blot and IFA. The results showed that the titer of polyclonal antibody against capsid spike protein VP27 in mice was higher than 1 : 64 000. The specificity of polyclonal antibody against capsid spike protein VP27 in mice was proved by the testing results of Western blot. Results of IFA test proved that the polyclonal antibody against cap-

sid spike protein VP27 in mice could recognize natural goose astrovirus capsid spike protein VP27.

Key words: goose astrovirus; capsid spike protein VP27; polyclonal antibody

星状病毒 (Astrovirus) 是一种单股正链无囊膜的 RNA 病毒, 可以感染哺乳动物和禽类。在哺乳动物中, 星状病毒通常感染人、猪^[1]、狗^[2]和牛^[3]等, 主要引起胃肠炎和腹泻, 在极个别条件下会引起脑炎^[4]。在禽类动物中, 星状病毒感染主要发生在鸡、鸭、鹅和火鸡中, 引起鸡肾炎^[5]、鸭致死性肝炎^[6]、火鸡肠炎^[7]等临床常见疾病。近年来, 在安徽、江苏、福建等省份流行一种由鹅星状病毒 (Goose astrovirus) 感染引起雏鹅痛风为主要特征的疾病^[8]。鹅星状病毒主要感染 21 日龄左右的雏鹅, 死亡率可达 30%, 给养鹅产业带来极大的经济损失。

目前鹅星状病毒的检测主要依赖于 RT-PCR 方法, 没有商品化的试剂盒^[9]。衣壳纤突蛋白 VP27 作为存在于鹅星状病毒表面的衣壳纤突蛋白, 含有中和抗原表位, 介导鹅星状病毒粒子与细胞表面受体结合^[10]。相关研究结果表明, 衣壳纤突蛋白 VP27 是鹅星状病毒主要的抗原决定蛋白^[11]。本研究以本实验室分离的鹅星状病毒 DY-19 株为基础, 构建鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 原核表达载体, 利用 IPTG 诱导表达和亲和层析柱纯化方法获得衣壳纤突蛋白 VP27, 免疫小鼠获得多抗血清, 利用制备的多克隆抗体对感染新型鹅星状病毒的鸡肝癌细胞 (Chicken liver hepatocellular carcinoma cell line, LMH) 进行间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 检测, 为鹅星状病毒早期检测方法的建立和应用以及后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DH5 α 和 Rosetta 大肠杆菌感受态细胞采购于通用公司, Solution I、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 采购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 2 \times tap PCR Mix、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根公司, 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Solarbio 公司, 异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside,

IPTG) 购自 biosharp 公司, DMEM-F12 培养基购自 HyClone 公司。LMH 细胞系、pCold-SUMO 载体、鹅星状病毒 DY-19 株 (GenBank: MT708902) 由本实验室分离和保存。BALB/c 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 的 RT-PCR 扩增
根据鹅星状病毒 DY-19 株全基因序列 (GenBank: MT708902), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 扩增鹅星状病毒衣壳纤突蛋白基因 *vp27*, 扩增的衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 片段大小为 723 bp。同时在上、下游引物 5' 端分别添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。*vp27* 基因的引物序列如表 1 所示。

表 1 *vp27* 基因的引物

Table 1 Primers of *vp27* gene

引物	序列 (5'→3')
<i>vp27</i> -F	CGGGATCCCAGGTTACTCCCTCGCTTGTG
<i>vp27</i> -R	CCCAAGCTTTCAAGAGGTCCTTGAGCGAGACTGCTA

单下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点, 双下划线部分为 *Hind* III 酶切位点。

1.2.2 重组质粒 pCold-*vp27* 的构建 将胶回收的衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 目的片段和 pCold-SUMO 质粒利用 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶分别进行双酶切。反应总体积 50 μ l, 其中 10 \times K buffer 5 μ l, *Bam*H I 2 μ l, *Hind* III 2 μ l, 利用无菌去离子水补足。于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅酶切 3 h, 衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 片段、pCold-SUMO 质粒的酶切产物电泳后利用胶回收试剂盒分别进行回收。

将衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 片段、pCold-SUMO 质粒的胶回收产物进行连接, 反应总体积 10 μ l; 衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 片段 4 μ l, pCold-SUMO 质粒胶回收产物 1 μ l, Solution I 5 μ l。于 16 $^{\circ}$ C 条件下连接 4 h。吸取连接产物 10 μ l 转化到感受态细胞 Rosetta。利用 pCold-SUMO 载体的氨苄抗性进行筛选。在氨苄琼脂平板上挑取单个菌落进行 PCR 鉴定。对于 PCR 鉴定阳性的单个菌落摇菌提取质粒, 利用 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶进行双酶切鉴定, 同时将质粒进行测序。鉴定正确后将重组质粒

命名为 pCold-*vp27*。

1.2.3 重组衣壳纤突蛋白 VP27 的诱导表达和纯化

将鉴定正确的重组质粒 pCold-*vp27* 转化到大肠杆菌 Rosetta,挑取阳性菌落,进行 IPTG 浓度优化(终浓度 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L),16 ℃、120 r/min 诱导 24 h。收集菌体后,利用超声波细胞粉碎机破碎细菌,细菌破碎后 8 000 r/min 离心 10 min,分别保存重组星状病毒衣壳纤突蛋白上清液和沉淀。取星状病毒重组衣壳纤突蛋白上清液和沉淀分别加入蛋白质上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 衣壳纤突蛋白 VP27 免疫及多克隆抗体制备

按照上述方法大量制备衣壳纤突蛋白 VP27,以纯化定量后的衣壳纤突蛋白 VP27 为抗原免疫 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠。免疫程序如下:第 1 次免疫,100 μ l 衣壳纤突蛋白 VP27(100 μ g)和 100 μ l 的等体积弗氏完全佐剂完全混合后,皮下注射;14 d 后进行第 2 次免疫,100 μ l 衣壳纤突蛋白 VP27(100 μ g)和 100 μ l 的等体积弗氏不完全佐剂完全混合,皮下注射;第 1 次免疫后 28 d 进行第 3 次免疫,免疫方法与第 2 次免疫相同。第 3 次免疫后 7 d,腹腔注射衣壳纤突蛋白 VP27 加强免疫,1 只 100 μ g。应用 ELISA 方法测定其效价。

1.2.5 ELISA 检测多克隆抗体的效价 用碳酸盐缓冲液包被纯化后的衣壳纤突蛋白 VP27(10 μ g/ml),将包被好的衣壳纤突蛋白 VP27 加入 96 孔板,1 孔 100 μ l,4 ℃包被过夜。第 2 d 早晨,弃掉 96 孔板中的衣壳纤突蛋白 VP27 包被液,用配制好的 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,在室温条件下,用 5%的脱脂奶粉溶液(50 g/L,PBST 配制)封闭 1 h,甩掉 5%脱脂奶粉溶液,用 PBST 洗涤 4 次,在微量振荡器上振荡 5 min,最后拍干确保孔内无 PBST 残留,然后用 5%脱脂奶粉溶液稀释免疫小鼠的血清样品(1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000),8 个稀释度,每孔 100 μ l 稀释好的样品,对照组为未经免疫的小鼠血清,于 37 ℃培养箱孵育 2 h,甩掉稀释的血清样品,用 PBST 洗涤 4 次,在微量振荡器上振荡 5 min,最后拍干确保孔内无 PBST 残留,然后将羊抗小鼠 IgG-HRP 按照 1:2 000 进行稀释(稀释液为 5%脱脂奶粉溶液),每孔加入 100 μ l,于 37 ℃培养箱孵育 1 h,甩掉孔内液体,用 PBST 洗涤 4 次,在微量振荡器上振荡

5 min,最后拍干确保孔内无 PBST 残留,在室温条件下每孔加入 100 μ l TMB 显色液,避光反应 15 min,最后每孔加入 100 μ l 硫酸溶液(2 mol/L)终止反应。使用酶标仪检测各孔样品吸光值 A_{450} 。

1.2.6 Western blot 鉴定衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体 将利用 IPTG 诱导的 pCold-SUMO 空载体和纯化浓缩后的衣壳纤突蛋白 VP27 经 SDS-PAGE 分离后转到 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉溶液(PBS 配制)37 ℃培养箱封闭 1 h,用配制的 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,一抗为 1:200 稀释的鼠血清(PBS 稀释),于 37 ℃培养箱孵育 1 h,然后用配制的 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;二抗为 1:2 000 稀释的带 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(PBS 稀释),然后用配制的 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,最后用 DAB 试剂盒显色观察。

1.2.7 IFA 鉴定衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体

将处理好的 LMH 细胞均匀铺到 6 孔板,待其密度达到 80%以上,3 孔接种鹅星状病毒 DY-19,剩余 3 孔为对照组,使用 DMEM-F12 培养基代替鹅星状病毒。鹅星状病毒感染 LMH 细胞 72 h 后,用移液枪弃掉维持液,然后沿着侧壁加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,每孔加入 2 ml 5%脱脂奶粉溶液(PBS 配制)封闭液,37 ℃培养箱封闭 1 h,然后沿着侧壁加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。一抗为 1:200 稀释的制备的抗鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体(PBS 配制),37 ℃培养箱孵育 1 h,然后沿着侧壁加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;二抗为 1:1 000 稀释的带 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,37 ℃培养箱孵育 1 h,然后沿着侧壁加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 1 ml 1:1 000 稀释的 DAPI(PBS 配制)溶液,37 ℃培养箱孵育 10 min,然后沿着侧壁加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,最后加入 600 μ l PBS,置于荧光倒置显微镜下进行观察。

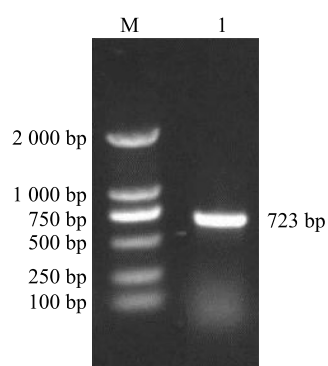
2 结果

2.1 衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 的 RT-PCR 扩增

以制备的鹅星状病毒 DY-19 的 cDNA 为模板,进行衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 扩增。衣壳纤突蛋白基因 *vp27* 扩增目的条带大小在 723 bp 左右,与预期结果相符(图 1)。

2.2 重组质粒 pCold-*vp27* 鉴定

构建的重组质粒 pCold-*vp27* 经 *Bam*H I 和

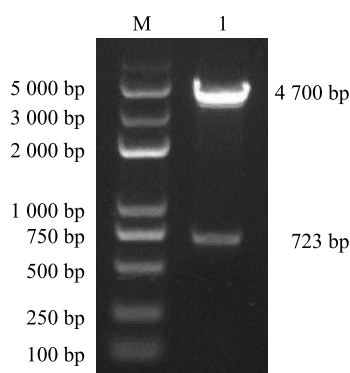


M:DL 2 000 bp DNA marker;1:*vp27* 基因 PCR 扩增产物。

图1 衣壳纤突蛋白基因 *vp27* PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis diagram of PCR amplified products of *vp27* gene which encodes capsid spike protein

Hind III 限制性内切酶双酶切,得到了 723 bp 的目的基因片段和 4.7 kb 的 pCold-SUMO 载体片段,与预期大小相符(图 2)。



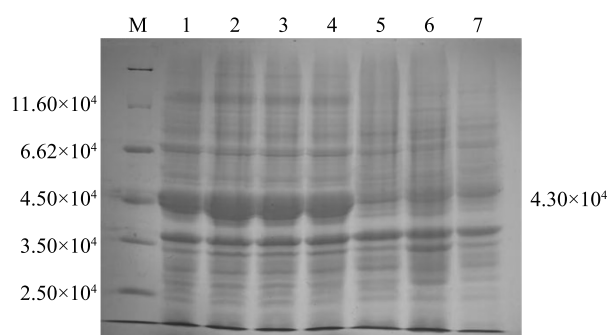
M:DL 5 000 bp DNA marker;1:pCold-VP27 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物。

图2 pCold-*vp27* 载体的双酶切鉴定

Fig.2 Double enzyme digestion identification of pCold-*vp27* vector

2.3 衣壳纤突蛋白 VP27 的表达、鉴定和纯化

将转入重组质粒 pCold-*vp27* 的表达菌 Rosetta 培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 用 4 个不同浓度 (0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L) 的 IPTG 诱导, 16 °C、120 r/min 诱导表达 24 h。SDS-PAGE 结果显示, 在相对分子质量约为 43 000 处出现特异性条带(图 3), 选择终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 进行蛋白质表达。未经诱导的 pCold-*vp27* 无目的条带。可溶性分析结果表明衣壳纤突蛋白 VP27 在沉淀和上清液中均可表达。收集破碎离心后上清液利用亲和层析法纯化衣壳纤突蛋白 VP27。



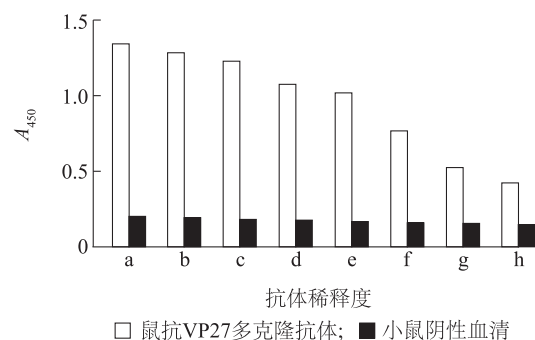
M:Marker;1:0.5 mmol/L IPTG 诱导的 pCold-*vp27*;2:1.0 mmol/L IPTG 诱导的 pCold-*vp27*;3:1.5 mmol/L IPTG 诱导的 pCold-*vp27*;4:2.0 mmol/L IPTG 诱导的 pCold-*vp27*;5:未诱导的 pCold-*vp27*;6:1.0 mmol/L IPTG 诱导的 pCold;7:未诱导的 pCold。

图3 衣壳纤突蛋白 VP27 原核表达

Fig.3 Prokaryotic expression of capsid spike protein VP27

2.4 衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的效价

第 4 次加强免疫后 7 d, 采集并分离小鼠血清, 用 ELISA 方法检测血清中衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的效价。结果表明制备的鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 血清效价大于 1 : 64 000 (图 4), 衣壳纤突蛋白 VP27 经 4 次免疫小鼠后诱导机体产生了抗衣壳纤突蛋白 VP27 特异性多克隆抗体。



a:1 : 500;b:1 : 1 000;c:1 : 2 000;d:1 : 4 000;e:1 : 8 000;f:1 : 16 000;g:1 : 32 000;h:1 : 64 000。

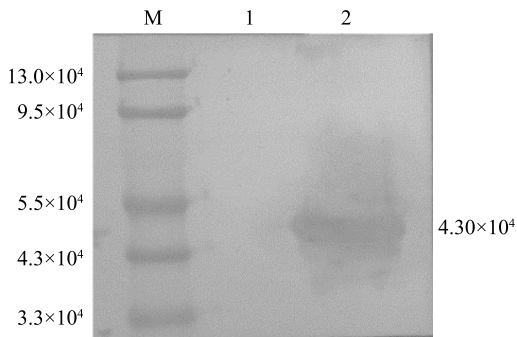
图4 ELISA 方法测定的衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体效价

Fig.4 Determination of polyclonal antibody titer of capsid spike protein VP27 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

2.5 衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的 Western blot 法鉴定

以经 IPTG 诱导的 pCold-SUMO 空载体和纯化后的衣壳纤突蛋白 VP27 为抗原, 免疫小鼠后获得的血清为一抗, 二抗为带 HRP 标记的羊抗小鼠

IgG。结果显示,经 IPTG 诱导的 pCold-SUMO 空载体组无明显条带,衣壳纤突蛋白 VP27 在相对分子质量 $43\ 000$ 处有一条明显的条带(图 5)。证明制备的衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体特异性良好。



M:Marker;1:经 IPTG 诱导的 pCold-SUMO 空载体;2:纯化后的衣壳纤突蛋白 VP27。

图 5 Western blot 法检测衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体

Fig.5 Detection of capsid spike protein VP27 polyclonal antibody by Western blot

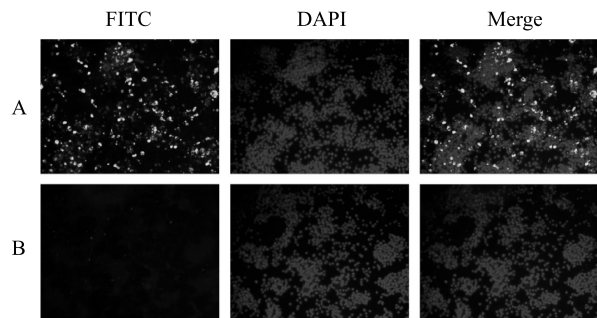
2.6 衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的 IFA 鉴定

将衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体应用于病毒的 IFA 检测,结果表明制备的衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体可以识别天然的衣壳纤突蛋白 VP27,感染鹅星状病毒的 LMH 细胞质中检测到明显的荧光信号,未感染鹅星状病毒的 LMH 细胞中未检测到荧光信号(图 6)。表明制备的衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体可以应用于病毒的 IFA 检测。

3 讨论

1975 年,星状病毒首次在婴儿粪便中被发现,因其在透射电子显微镜下具有特征性的五角星结构,故将其命名为星状病毒^[12]。随着现代分子生物学和病原检测技术的发展,越来越多的星状病毒在哺乳动物和鸟类动物中被发现^[13-15]。导致动物腹泻的主要病原体之一就是星状病毒,同时星状病毒还会感染机体的其他组织脏器,导致雏鸭致死性肝炎、鸡肾炎和哺乳动物脑炎等^[16]。鹅星状病毒感染雏鹅,主要引起雏鹅的内脏器官、腿部关节乃至腿部肌肉出现尿酸盐沉积,给养鹅产业造成巨大的经济损失^[17-18]。

目前,鹅星状病毒的检测方法主要是 RT-PCR 方法^[19],包括鹅星状病毒 SYBR Green I 荧光定量检测^[20]和鹅星状病毒 TaqMan 荧光定量检测^[21]。RT-



A:感染鹅星状病毒的 LMH 细胞;B:未感染鹅星状病毒的 LMH 细胞。FITC:异硫氰酸荧光素;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶;Merge:融合。

图 6 间接免疫荧光细胞化学染色法检测 LMH 细胞 VP27 蛋白表达

Fig.6 Detection of VP27 protein expression in LMH cells by indirect immunofluorescence cytochemical staining

PCR 方法主要采集发病或者病死雏鹅的部分组织器官,提取核酸进行检测,不适合在临床上进行大规模检测。建立一种基于衣壳纤突蛋白 VP27 的 ELISA 检测方法,应用于临床上大规模检测尤为迫切。

衣壳纤突蛋白 VP27 为存在于鹅星状病毒粒子表面的蛋白质。相关研究结果表明,鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 是鹅星状病毒的主要抗原决定蛋白,参加鹅星状病毒粒子与细胞内外受体的结合。因此,衣壳纤突蛋白 VP27 可以作为疾病检测和疫苗研制的靶点^[22]。本研究通过构建 pCold-*vp27* 原核质粒,利用大肠杆菌 Rosetta 表达系统,优化蛋白质表达条件(IPTG 浓度),获得高效表达的衣壳纤突蛋白 VP27。将衣壳纤突蛋白 VP27 纯化定量后与弗氏佐剂混合,免疫小鼠,经 Western blot 法检测证明抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体血清的特异性良好,与对照组无特异性反应。同时应用间接 ELISA 方法检测制备的鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体效价大于 $1:64\ 000$ 。使用感染鹅星状病毒 DY-19 的 LMH 细胞对多克隆抗体使用 IFA 法进行鉴定,感染鹅星状病毒的 LMH 细胞中有明显的绿色荧光,而未感染鹅星状病毒的 LMH 细胞无荧光,证明制备的抗体特异性非常好,可以特异性识别天然的衣壳纤突蛋白 VP27。综上所述,制备的鼠抗衣壳纤突蛋白 VP27 可以用于临床鹅星状病毒的检测和实验室中鹅星状病毒特性研究以及致病机制研

究。

参考文献:

- [1] FANG Q, WANG C, LIU H, et al. Pathogenic characteristics of a porcine astrovirus strain isolated in China [J]. *Viruses*, 2019, 11(12): 1156.
- [2] TAKANO T, TAKASHINA M, DOKI T, et al. Detection of canine astrovirus in dogs with diarrhea in Japan [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(6): 1549-1553.
- [3] BOUJON C L, KOCH M C, KAUER R V, et al. Novel encephalomyelitis-associated astrovirus in a muskox (*Ovibos moschatus*): a surprise from the archives [J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2019, 61(1): 31.
- [4] KOUKOU G, NIENDORF S, HORNEI B, et al. Human astrovirus infection associated with encephalitis in an immunocompetent child: a case report [J]. *Journal of Medical Case Reports*, 2019, 13(1): 960-964.
- [5] IMADA T, YAMAGUCHI S, MASE M, et al. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family *Astroviridae* and construction of infectious ANV cDNA [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(18): 8487-8493.
- [6] LIU N, WANG F, SHI J, et al. Molecular characterization of a duck hepatitis virus 3-like astrovirus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 170(1/2): 39-47.
- [7] JINDAL N, PATNAYAK D P, CHANDER Y, et al. Comparison of capsid gene sequences of turkey astrovirus-2 from poult-enteritis-syndrome-affected and apparently healthy turkeys [J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(6): 969-977.
- [8] CHEN Q, XU X, YU Z, et al. Characterization and genomic analysis of emerging astroviruses causing fatal gout in goslings [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(2): 865-876.
- [9] WAN C, CHEN C, CHENG L, et al. Specific detection of the novel goose astrovirus using a TaqMan real-time RT-PCR technology [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137: 103766.
- [10] AGUILAR-HERNANDEZ N, LOPEZ S, ARIAS C F. Minimal capsid composition of infectious human astrovirus [J]. *Virology*, 2018, 521: 58-61.
- [11] 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]. 北京: 中国农业大学, 2019.
- [12] LOMBARDI G H, ROSETO A M, STAMBOULIAN D, et al. Letter: Virus of infantile gastroenteritis in argentina [J]. *The Lancet*, 1975, 2(7948): 1311.
- [13] PANKOVICS P, BOROS A, KISS T, et al. Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*) [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 34: 114-121.
- [14] ZHANG H H, QIU Q G, LIU S J, et al. Genomic characterization of a novel astrovirus identified in Amur tigers from a zoo in China [J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(12): 3151-3155.
- [15] 章丽娇, 黄欣梅, 刘 飞, 等. 新型鹅星状病毒 AHQ18 株的分离鉴定 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(5): 1262-1264.
- [16] OLOTEGUI M P, ROUHANI S, YORI P P, et al. Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries [J]. *Pediatrics*, 2018, 141(1): e20171326.
- [17] WANG Y, BAI C, ZHANG D, et al. Genomic and phylogenetic characteristics of a novel goose astrovirus in Anhui province, Central-Eastern China [J]. *Gene*, 2020, 756: 144898.
- [18] ZHANG X, REN D, LI T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. *Emerging Microbes & Infection*, 2018, 7(1): 1-8.
- [19] 司振书, 殷国政, 路建彪, 等. H9N2 亚型 AIV 双重 RT-PcR 检测方法的建立 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(7): 35-37.
- [20] 白彩霞, 张 达, 赵 靓, 等. 鹅星状病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立 [J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(3): 634-638.
- [21] YIN D, YANG J, TIAN J, et al. Establishment and application of a TaqMan-based one-step real-time RT-PCR for the detection of novel goose-origin astrovirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 275: 113757.
- [22] ROYUELA E. Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 33(1): 1-14.

(责任编辑:张震林)