

检测鸡 TRIM25 蛋白的免疫组化方法

褚颖, 马文杰, 胡卫国, 陈茹, 邱建华, 郭慧君*, 李宏梅*

(山东农业大学动物科技学院, 山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室,

山东省畜禽疫病防控工程技术研究中心, 泰安 271018)

摘要: 为建立检测鸡 TRIM25 蛋白表达的免疫组化方法, 根据发表的鸡 TRIM25 基因序列, 设计引物, 从海兰褐鸡脾中扩增 TRIM25 基因, 构建重组原核表达质粒, 通过诱导表达获得重组 TRIM25 蛋白, 经纯化后免疫接种兔和小鼠, 获得高效价血清抗体, 用该抗体建立免疫组化方法, 对鸡肺、脾、肝组织中 TRIM25 蛋白进行检测。结果显示, 克隆的鸡 TRIM25 抗原基因大小为 1 012 bp, 构建的重组表达质粒能够在大肠杆菌中稳定表达, 经纯化后的重组蛋白质能够诱导兔和小鼠产生效价为 $1:10^6$ 以上的血清抗体, 该血清抗体免疫组化检测发现鸡肺、脾和肝组织中均有不同程度的 TRIM25 蛋白表达, 在肺组织中主要存在肺泡周围的内皮细胞、淋巴细胞等的细胞质内; 脾组织主要出现在脾淋巴细胞和血管内皮细胞等的细胞质中; 肝组织中主要出现在肝小叶肝细胞、淋巴细胞以及血管内皮细胞细胞质中。该研究为深入研究鸡 TRIM25 蛋白的组织分布、动态表达和生物学活性提供物质基础和方法依据。

关键词: 鸡; TRIM25; 多克隆抗体; 免疫组化

中图分类号: S852

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0865-06

Immunohistochemistry Assay for Detecting Chicken TRIM25 in Different Tissues

CHU Ying, MA Wen-jie, HU Wei-guo, CHEN Ru,

QIU Jian-hua, GUO Hui-jun*, LI Hong-mei*

(Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention,

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University,

Tai'an 271018, China)

Abstract: The experiment was conducted to set up the immunohistochemistry assay to detect chicken TRIM25 expression in the chicken's tissues. Chicken TRIM25 gene was amplified from chicken's spleen and the gene was cloned into a prokaryotic expression vector pEASY-Blunt E1 to construct recombinant plasmid named as pEASY-Blunt E1-TRIM25. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* and then identified by SDS-PAGE and Western blot. After being purified, the fusion protein was inoculated to rabbits and BALB/c mice as antigen for preparing polyclonal antibody. The titer of the antibody was detected by ELISA, and the sera antibodies were used to setup immunohistochemistry assay; the tissue sections of chicken's lung and spleen and liver were assayed. The results showed that TRIM25 was expressed as fusion protein with 48 kD. The titers of the antibody in rabbits' and mice's sera were above $1:10^6$. The results of immunohisto-

收稿日期: 2017-10-20

基金项目: 国家重点研发计划专项(2016YFD0500800); 山东省重点研发计划项目(2016CYJS05A02; 2017CXGC0308); 山东省“双一流”奖补资金

作者简介: 褚颖(1990-), 女, 山东东平人, 硕士生, 主要从事家禽免疫调控研究; 马文杰(1992-), 男, 山东青岛人, 硕士生, 主要从事动物发育调节研究。二人共为第一作者

* 通信作者: 郭慧君, 博士, 副教授, 主要从事动物感染免疫的研究, E-mail: hjguo@sdau.edu.cn; 李宏梅, 博士, 副教授, 主要从事动物感染分子免疫学的研究, E-mail: lihm@sdau.edu.cn

chemistry assay indicated that TRIM25 mainly exists in the cytoplasm of lymphocytes, hepatocyte, and epithelial cells in chicken's lung, spleen and liver. In conclusion, the immunohistochemistry assay mediated with polyclonal antibody against chicken TRIM25 were successfully set up in this study and TRIM25 distribution in some tissues of chickens was firstly reported.

Key words: chicken; TRIM25; polyclonal antibody; immunohistochemistry assay

TRIM25 是 TRIM(Tripartite motif) 蛋白家族中的成员, 从属于 C-IV 亚家族^[1]。该蛋白 N 端具有 TRIM 蛋白家族典型的 RING、B-box、Coiled-coil (RBBC) 结构域, C 端还有一个 PRY/SPRY 结构域。该蛋白质的 RING 结构域是一个富含半胱氨酸的保守结构域, 具有泛素连接酶的特性, 可以把线性化或多聚化的泛素分子转移到靶蛋白上, 调节靶蛋白的生物活性^[2]; C 端的 PRY/SPRY 结构域是一段具有很大柔性的结构域, 可以与靶蛋白结合, 并使之发生泛素化^[3]。

TRIM25 蛋白有两个重要的作用备受关注, 一是通过泛素化细胞生长抑制因子 14-3-3 δ 使其降解而促进细胞增殖, 促进肿瘤的发生^[4]; 二是参与机体的先天性抗 RNA 病毒反应^[1]。一些研究表明, TRIM25 的过表达能抑制人艾滋病毒(HIV-1)、鼠白血病病毒(MLV)、禽白血病病毒(ALV)和 B 型乙肝病毒等 RNA 病毒在细胞内的复制^[5-6]。另外, 一些 RNA 病毒利用 TRIM25 蛋白可以抑制抗病毒因子的产生, 进而产生免疫逃避, 如 A 型禽流感病毒(AIV)利用其自身的非结构蛋白(NS1)可以结合 TRIM25, 并抑制视黄酸诱导基因蛋白(RIG-I)依赖的 I 型抗病毒因子的产生, 为 AIV-A 宿主细胞内复制和宿主间传播感染提供了条件^[7-8]。更值得关注的是, 已有研究报道以 TRIM25 为靶点对 I 型干扰素抗病毒反应进行人工控制, 用于一些 RNA 病毒的防治^[9]。

Z. Q. Feng 等 2015 年首次报道了鸡 TRIM25 全基因, 比较发现与人和小鼠的 TRIM25 相似性分别仅为在 47.6% 和 45.7%, 荧光定量检测发现在鸡免疫组织(如胸腺、法氏囊)和肺等含量较高^[10]。然而, 对于鸡 TRIM25 蛋白的组织分布、生物学功能及作用机制了解还很少。本研究旨在克隆鸡 TRIM25 抗原基因, 构建重组原核表达质粒, 获得鸡 TRIM25 蛋白, 制备抗鸡 TRIM25 的多克隆抗体, 建立检测其表达的免疫组化方法, 为研究鸡 TRIM25 蛋白生物学特性、组织分布和抗病毒机制提供物质基础和方法依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和其他实验材料

BALB/c 小鼠购自山东大学实验动物中心; 兔购自泰安市岱岳区范镇贵合畜禽养殖场。Trans-1、BL21、pEASY-Blunt E1 表达载体购自全式金有限公司。HRP 酶标二抗购自博奥森生物有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、超纯 RNA 提取试剂盒和 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; TME 单组份底物显色液购自北京索莱宝生物科技有限公司; 质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 OMEGA 公司; 弗氏佐剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据已发表的 TRIM25 基因序列(GenBank: KM879874. 1) 设计引物, 对保守序列的 TRIM25 的 RBBC 基因进行扩增。上游引物: 5'-CGCGGATCCCATCTGCCTCAG-CATCTT-3'; 下游引物: 5'-CCGGAATTCATCCACA-GACACATTCCT-3'引物由华大基因有限公司合成。

1.2.2 鸡 TRIM25 基因的获取 2 周龄海兰褐雏鸡脾, 剪碎, 研磨, 按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。按 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒说明书逆转录, 得到 cDNA。利用设计合成的引物, 以 cDNA 为模板, 按 50 μ L 的扩增体系 PCR 扩增 TRIM25 基因。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 20 s; 60 $^{\circ}$ C, 20s; 72 $^{\circ}$ C, 15 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.2.3 克隆载体的构建与鉴定 PCR 产物经胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T simple 载体连接, 得到重组连接载体, 命名为: pMD18-T-TRIM25; 并转化至 Trans1-T1 感受态细胞, 挑取菌落, 接种于 LB 液体培养基(50 μ g \cdot mL⁻¹ Amp+), 37 $^{\circ}$ C 振荡 12 h, 用 DNA 质粒试剂盒提取重组质粒, BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定重组质粒, 并测序比对基因序列。

用 pEASY-Blunt E1 表达质粒与目的基因构建

重组表达质粒,命名为 pEASY-Blunt E1-TRIM25,按说明用目的基因正向引物和 T7 Terminator 引物 PCR 扩增鉴定阳性克隆。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,并测序分析。

1.2.4 鸡 TRIM25 蛋白的表达、纯化及鉴定

将含目的基因的阳性菌接种于含氨苄的 LB 固体培养基上,37 °C 培养 8~10 h;次日挑取单菌落接种于含氨苄的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡过夜培养;按 1:100 比例转种于 500 mL 液体培养基;培养至 OD_{600 nm} 约为 0.6,加入 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,振荡培养 4 h,取培养液 SDS 蛋白电泳分析蛋白表达结果。用抗 His 标签蛋白的单克隆抗体通过 Western blot 方法鉴定目的蛋白质。

按照说明,用蛋白质纯化柱纯化 His-TRIM25 重组蛋白,通过 SDS 蛋白电泳分析纯化效果;用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定纯化后的 TRIM25 蛋白的浓度。

1.2.5 血清抗体的制备

4 只 2 月龄新西兰兔和 16 只 6 周龄 BALB/c 小鼠,取血清保存作为阴性对照。将纯化的重组 TRIM25 蛋白与弗氏佐剂乳化后背部皮下多点注射兔(兔每只 200 μg 蛋白抗原;鼠每只 100 μg 蛋白抗原),间隔 2 周加强免疫 2 次,最后一次免疫 2 周采集抗血清。以间接 ELISA 方法检测抗体效价。

1.2.6 血清抗体效价检测

参考发表的间接 ELISA 法^[11]测定抗体效价。用纯化的 TRIM25 重组蛋白质作包被抗原,封闭,加入稀释的兔、鼠血清孵育,分别加入相应的酶标羊抗兔和羊抗鼠的二抗,显色。用酶标仪在 OD_{450 nm} 时检测吸光度值。判定标准:阳性对照、阳性血清 OD_{450 nm} 值 > 1.0,阴性血清与阴性对照的 OD_{450 nm} 值 < 0.2,检测样品 OD_{450 nm} 值 > 0.2, S/N > 2.1 时,达到此标准的血清的最大稀释倍数为其抗体效价。

1.2.7 鸡 TRIM25 蛋白抗体介导的免疫组化方法建立

将青年海兰褐鸡肺、脾和肝样品进行常规石蜡包埋,制作连续切片厚度为 5 μm,相邻切片分为 2 套,贴于玻片上。按常规步骤建立检测组织 TRIM25 表达的免疫组化方法,阴性对照用未免疫兔血清代替一抗,显微镜观察并拍照。

2 结 果

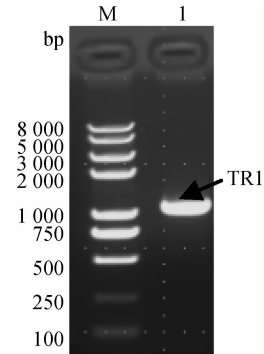
2.1 TRIM25 基因的克隆与表达

利用设计的引物对 TRIM25 基因进行扩增,凝

胶电泳结果显示(图 1)所提取的基因大小 1 012 bp 左右,这与 TRIM25 的功能结构域 RING、B-box 和 Coiled-coil 包含的基因序列大小基本一致,测序结果显示该基因与发表的鸡 TRIM25 基因相应序列是一致的,表明目的基因克隆成功。

2.2 重组质粒的构建与鉴定

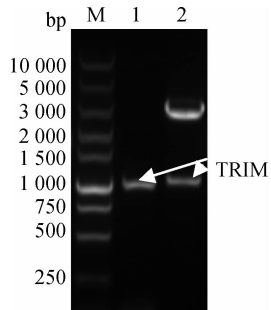
利用 BamH I 和 EcoR I 酶对构建的重组 pMD18-T-TRIM25 质粒进行鉴定,核酸电泳得到预期大小的两条电泳条带,其中含 TRIM25 目的基因条带(图 2)。用 TRIM25 目的基因正向引物和 T7 Terminator 引物对构建的表达质粒 pEASY-Blunt E1-TRIM25 进行 PCR 扩增鉴定,核酸电泳获得预期基因片段,结果见图 3,其中包含 TRIM25 目的基因片段。测序结果显示,重组质粒中插入片段的序列与上述所克隆测序的基因序列完全一致。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 目的基因 PCR 产物
M. DNA marker; 1. Chicken TRIM25 gene

图 1 鸡 TRIM25 基因的克隆鉴定

Fig. 1 Identification of cloned chicken TRIM25 gene



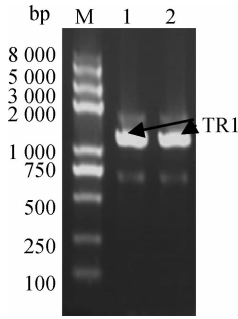
M. DNA 相对分子质量标准; 1. 目的基因; 2. 双酶切结果
M. DNA marker; 1. Chicken TRIM25 gene; 2. Gene fragments after being digested

图 2 重组 pMD18-T-TRIM25 质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-TRIM25

2.3 TRIM25 蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

将重组表达质粒转化入表达菌 BL21 内,



M. DNA 相对分子质量标准；1 和 2. 目的基因引物和 T7 Terminator 引物的 PCR 产物

M. DNA marker; 1 and 2. PCR amplified products with the primers of chicken *TRIM25* and T7 Terminator

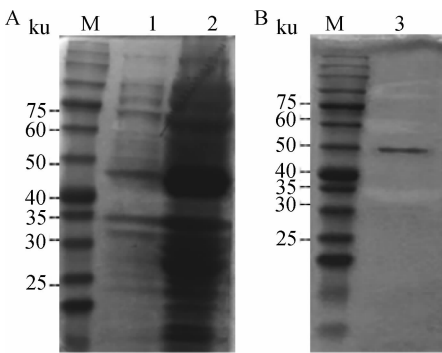
图 3 表达质粒 pEASY-Blunt E1-TRIM25 的鉴定

Fig. 3 Identification of the expressed plasmid pEASY-Blunt E1-TRIM25

1.0 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 37 °C 诱导蛋白表达, 将表达的蛋白质经 SDS-PAGE 分析, 结果见图 4A。图 4A 中泳道 2 显示目的蛋白获得大量表达, 蛋白大小约 48 ku, 而未经 IPTG 诱导的菌体未表达或表达极少的目的蛋白质(泳道 1)。对表达的蛋白指标利用 His 标签蛋白进行纯化, 经 SDS-PAGE 分析可见获得纯化的蛋白质条带, 结果见图 4B 第 3 泳道蛋白质条带。

2.4 TRIM25 蛋白的鉴定

将纯化的蛋白质, 以 His 标签单克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western blot 分析, 结果见图 5。结果显示, 所表达的蛋白质可与 His 标签单抗发生特异性反应, 表明所诱导的蛋白质包含预期的 TRIM25 目的蛋白。

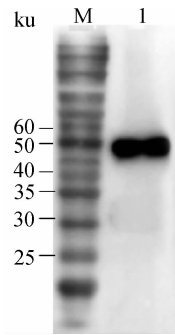


M. 蛋白质相对分子质量标准；1. 未经 IPTG 诱导的菌体裂解物；2. 经 IPTG 诱导后菌体裂解物；3. 纯化后的 TRIM25 蛋白

M. Protein marker; 1. The expressed products without induction of IPTG; 2. The expressed products with induction of IPTG; 3. The purified products of recombinant chicken TRIM25

图 4 鸡 TRIM25 重组蛋白的表达及纯化

Fig. 4 The expressed and purified products of recombinant chicken TRIM25



M. 蛋白质相对分子质量标准；1. His 标签单抗介导的 Western blot 结果

M. Protein marker; 1. Western blot mediated by MAb against His marked protein

图 5 鸡 TRIM25 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant chicken TRIM25 with Western blot mediated by His-MAB

2.5 血清抗体效价的测定

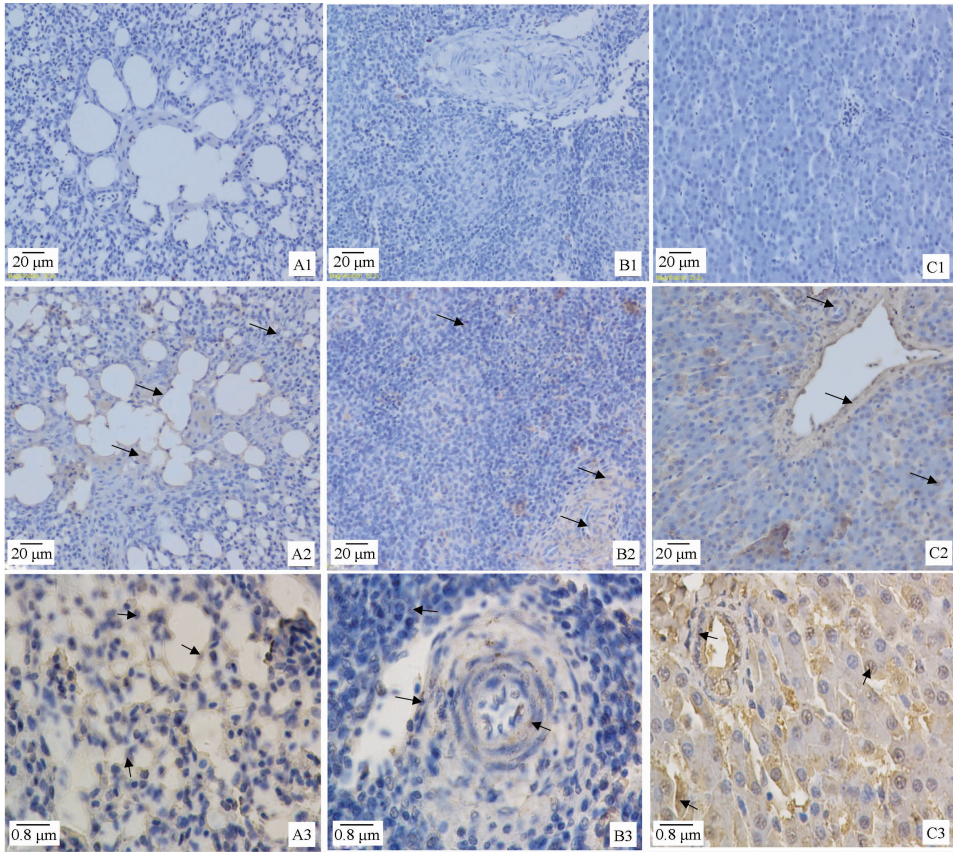
将纯化后的 TRIM25 重组蛋白为免疫原接种兔和 BLAB/c 小鼠, 经三次免疫后, 对兔和小鼠血清抗体效价进行检测, 结果显示, 兔血清中抗体效价达到 1 : 10⁶ 以上, 鼠血清中抗体效价达到 1 : 10⁷ 以上。

2.6 鸡肺、脾和肝组织中 TRIM25 蛋白的分布检测

使用制备的多克隆抗体建立免疫组化方法, 对青年海兰褐鸡肺、脾、肝组织中 TRIM25 蛋白进行检测。图 6 结果显示, 在鸡肺、脾和肝中细胞内均存在不同程度 TRIM25 的表达, 肺组织中主要出现在三级支气管和肺房以及血管相应组织内(图 6A2), 高倍镜下显示阳性细胞主要为鸡肺房内皮细胞、周围的淋巴细胞、巨噬细胞以及血管内皮细胞、淋巴细胞的细胞质内(图 6A3)。脾组织主要出现在脾髓生发中心脾淋巴细胞和血管内皮细胞、淋巴细胞的细胞质中(图 6B2 和 6B3)。肝组织中肝小叶肝细胞和淋巴细胞以及血管内皮细胞胞质均出现较多表达(图 6C2 和 6C3)。

3 讨论

TRIM25 蛋白是近些年来新发现的一种机体先天性蛋白分子, 具有广泛的生物学活性, 该蛋白质通过泛素化靶蛋白而参与机体一系列生物反应^[12]。比较发现, 不同动物的 TRIM25 蛋白在结构上存在差异, 鸡 TRIM25 蛋白与人和小鼠的同源性相对较低^[10], 很难用人和鼠的 TRIM25 蛋白抗体用于鸡 TRIM25 蛋白的研究。由于缺乏识别鸡 TRIM25 蛋白的抗体试剂, 限制了对鸡 TRIM25 蛋白进行深



A1, B1, C1 分别为无抗体血清处理的肺、脾、肝; A2-A3, B2-B3, C2-C3 分别为 TRIM25 抗体处理的肺、脾、肝; 箭头为鸡 TRIM25 阳性细胞

A1, B1, and C1 are the slices of chickens' lungs, spleens and livers treated by control sera; A2-A3, B2-B3 and C2-C3 are the slices of chickens' lungs, spleens and livers treated by TRIM25-antibody sera, respectively; Arrows of line, positive cells to chicken TRIM25

图 6 兔源鸡 TRIM25 抗体介导的免疫组化方法对鸡肺、脾、肝组织中 TRIM25 表达的检测

Fig. 6 Detection for TRIM25 expression in chicken's lungs, spleens and livers with Immunohistochemistry method mediated by the prepared rabbit's antibody

人研究。本研究根据已发表的鸡 TRIM25 蛋白的基因序列,对其抗原指数分析发现在鸡 TRIM25 的相对保守的功能结构域 RING、B-box 和 Coiled-coil (RBBC 结构),大小为 1 012 bp 的基因片段上具有较高的抗原指数(结果未列出)。根据该结果,设计基因引物从海兰褐鸡脾组织中扩增出目的基因,用该基因构建重组表达质粒,获得鸡 TRIM25 的蛋白抗原。

先前大量报道用 pET 表达载体构建重组表达质粒对目的基因进行诱导表达^[13],本研究利用经 pET 改造的表达质粒 pEASY-Blunt E1 对目的基因进行连接,构建 pEASY-Blunt E1-TRIM25 重组表达质粒。由于该质粒利用 T7lac 启动子严谨调控, N 端含有 His 蛋白纯化标签和氨苄青霉素筛选标记,能够简单、快速、高效地对目的基因进行连接、表

达和筛选,同时根据提供的 T7 Promoter 物或 Terminator 引物,方便地对构建的重组表达质粒进行验证(通过 PCR 扩增即可)。另外,该质粒在感受态细胞克隆效率高,筛选效率也大大提高。

对构建的重组表达质粒 pEASY-Blunt E1-TRIM25 转化至表达菌体内,借鉴我们先前的表达条件^[13],用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 进行诱导,对目的基因获得较大量的表达。由于该表达的目的蛋白质存在于菌体的包涵体内,利用超声波破碎法获得游离态的重组蛋白质经 His 标签蛋白的 Ni-纯化层析柱纯化,获得纯度达到 95% 以上的目的蛋白。蛋白质浓度检测发现能够达到抗原接种要求。

利用该抗原分别接种兔和 BALB/c 小鼠,目的是能够制备出用于不同研究的识别抗体。由于获得兔源血清抗体数量较多,可用于免疫组化、ELISA

包被和免疫印迹分析等,而鼠源的抗体具有效价高、特异性较强,可用于免疫组化和免疫印迹分析。从我们接种后检测血清抗体效价来看,小鼠的血清抗体效价要比兔血清抗体效价高很多,在特异性上几乎没有差异(结果未展示)。

利用制备的兔源血清抗体,建立免疫组化方法,发现制备的血清抗体经 1:200 倍稀释、与组织 4℃ 过夜孵育效果获得较好的免疫组化显色反应。肺、脾、肝三种组织中检测比较发现,在三种组织均检测出一定数量的阳性细胞,这与 Z. Q. Feng 等利用荧光定量检测到的结果^[10]基本一致。而在本研究中发现这些阳性细胞主要为肺内三级支气管、肺房的上皮细胞、淋巴细胞和血管内皮细胞、淋巴细胞内;脾生发中心的脾淋巴细胞、血管内皮细胞和颗粒细胞;肝小叶的内皮细胞、肝细胞和血管内皮细胞等,统计发现这些阳性细胞多为免疫细胞(如淋巴细胞、颗粒细胞、巨噬细胞等)以及增殖旺盛的细胞(如上皮细胞和内皮细胞等),这可能与 TRIM25 的抗感染和介导细胞增殖等作用密切相关。

4 结 论

本研究从海兰褐鸡脾中扩增 TRIM25 基因,构建重组原核表达质粒,诱导表达鸡 TRIM25 蛋白,然后获得能够识别鸡 TRIM25 蛋白,且具有较高效价的兔源和鼠源血清抗体,建立定性检测 TRIM25 表达的免疫组化方法,初步检测了鸡 TRIM25 在肺、脾和肝组织中的分布,为深入研究 TRIM25 蛋白的功能提供了物质基础和方法依据。

参考文献(References):

- [1] OZATO K, SHIN D M, CHANG T H, et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 849-860.
- [2] DESHAIES R J, JOAZEIRO C A P. RING domain E3 ubiquitin ligases[J]. *Ann Rev Biochem*, 2009, 78: 399-434.
- [3] SONG B, GOLD B, O'HUIGIN C, et al. The B30.2 (SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5 α exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates[J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 6111-6121.
- [4] URANO T, SAITO T, TSUKUI T, et al. Efp targets 14-3-3 σ for proteolysis and promotes breast

tumour growth[J]. *Nature*, 2002, 417(6891): 871-875.

- [5] UCHIL P D, QUINLAN B D, CHAN W T, et al. Trim E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle[J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e16.
- [6] ZHANG S J, GUO J T, WU J Z, et al. Identification and characterization of multiple TRIM proteins that inhibit hepatitis B virus transcription[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70001.
- [7] GACK M U, ALBRECHT R A, URANO T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I[J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(5): 439-449.
- [8] RAJSBAUM R, ALBRECHT R A, WANG M K, et al. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1003059.
- [9] INN K S, GACK M U, TOKUNAGA F, et al. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction[J]. *Mol Cell*, 2011, 41(3): 354-365.
- [10] FENG Z Q, CHENG Y, YANG H L, et al. Molecular characterization, tissue distribution and expression analysis of TRIM25 in *Gallus gallus domesticus*[J]. *Gene*, 2015, 561(1): 138-147.
- [11] ZHANG D D, LI H M, ZHANG Z S, et al. Antibody responses induced by recombinant ALV-A gp85 protein vaccine combining with CpG-ODN adjuvant in breeder hens and the protection for their offspring against early infection[J]. *Antiviral Res*, 2015, 116: 20-26.
- [12] 刘庆祥. TRIM 家族蛋白对 I 型干扰素信号通路的调控作用[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2015, 36(4): 42-52.
- LIU Q X. Functions of TRIM family proteins in type I interferon signaling pathway[J]. *Journal of the Graduates Sun Yat-Sen University: Natural Sciences, Medicine*, 2015, 36(4): 42-52. (in Chinese)
- [13] 刘海港, 李宏梅, 王树迎, 等. 山羊 β 雌激素受体多克隆抗体的制备及免疫组化方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 302-308.
- LIU H G, LI H M, WANG S Y, et al. Preparation of polyclonal antibody against goat estrogen receptor β and its application in immunohistochemistry assay[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(2): 302-308. (in Chinese)