

方铁辉, 董慧, 肖世峰, 等. 鸭 IFN- β mRNA SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (10): 1139–1144.
FANG T F, DONG H, XIAO S F, et al. SYBR Green I-based RT-PCR Assay for Detecting *IFN- β* mRNA in Duck [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (10): 1139–1144.

鸭 IFN- β mRNA SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

方铁辉¹, 董慧^{1,2}, 肖世峰^{1,2}, 王劭^{1,2}, 程晓霞^{1,2}, 林锋强^{1,2},
朱小丽^{1,2}, 陈秀琴^{1,2}, 郑敏^{1,2}, 陈仕龙^{1,2*}, 陈少莺^{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】建立一种检测鸭 IFN- β mRNA 转录水平的 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法。【方法】根据 GenBank 中鸭 IFN- β (KT428159) 核苷酸序列设计并合成特异性引物, 将鸭 IFN- β 基因克隆至 pET-30a 载体, 以此构建的 pET-30a-IFN- β 阳性重组质粒作为阳性标准品, 采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测, 构建标准曲线, 并进行引物特异性、灵敏度及重复性试验。【结果】该扩增特异性强, 无引物二聚体及非特异性产物, 熔解曲线单峰 ($T_m=87.94\pm0.16$ °C); Ct 值在 8.9~34.0 线性拟合程度高, 相关系数 $R^2>99.5\%$; 灵敏度高, 最低检测限为 2.84 copies· μ L⁻¹; 重复性好, 对来自临床的 3 种组织样品检测的组内变异系数小于 0.13%, 组间变异系数不超过 1%。【结论】该方法特异性强、灵敏度高、重复性好, 为鸭 IFN- β mRNA 表达水平的定量分析提供了技术手段。

关键词: 鸭; IFN- β ; 荧光定量 RT-PCR; SYBR Green I; mRNA

中图分类号: S 852

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2021) 10-1139-06

SYBR Green I-based RT-PCR Assay for Detecting *IFN- β* mRNA in Duck

FANG Tiehui¹, DONG Hui^{1,2}, XIAO Shifeng^{1,2}, WANG Shao^{1,2}, CHENG Xiaoxia^{1,2}, LIN Fengqiang^{1,2},
ZHU Xiaoli^{1,2}, CHEN Xiuqin^{1,2}, ZHENG Min^{1,2}, CHEN Shilong^{1,2*}, CHEN Shaoying^{1,2*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013,
China; 2. Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】A method for detecting *IFN- β* in duck using SYBR Green I-based RT-PCR was developed.

【Methods】A pair of specific primers was designed according to the GenBank nucleotide sequence on *IFN- β* of duck (KT428159). The gene was cloned into a pET-30a vector, and the recombinant plasmid pET-30a-IFN- β served to establish a standard curve. The specificity, sensitivity, and repeatability of the new methodology were determined. 【Result】The melting curves of measurement showed a sharp single peak at $T_m=87.94\pm0.16$ °C without non-specific amplification and primer dimers, indicating high specificity of the methodology. The Ct value ranged from 8.9 to 34.0 with a standard curve showing a linearity with $R^2>99.5\%$. The detection limit on *IFN- β* was 2.84 copies/ μ L. The repeatability on the Ct data for the intra- and inter-groups had coefficients of variation below 0.13% and 1%, respectively. 【Conclusion】The newly developed assay was specific, sensitive, repeatable, and suitable for the quantitative detection of *IFN- β* mRNA in ducks.

Key words: Duck; *IFN- β* ; qRT-PCR; SYBR Green I; mRNA

收稿日期: 2021-08-09 初稿; 2021-09-18 修改稿

作者简介: 方铁辉 (1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究 (E-mail: 1032523346@qq.com)

共同第一作者: 董慧 (1989-), 女, 博士, 主要从事动物病毒病研究 (E-mail: donghui_12215084@126.com)

* 通信作者: 陈仕龙 (1979-), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒病研究 (E-mail: CSL6116@163.com); 陈少莺 (1962-), 女, 硕士, 研究员, 主要从事动物传染病病原与防治研究 (E-mail: chensy58@163.com)

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2019R1026-11); 福建省农业科学院国基培育项目 (AGP2018-1); 福建省农业科学院创新团队建设项目 (CXTD2021034); 福建省农业科学院“5511”协同创新工程 (XTCXGC2021018)

0 引言

【研究意义】干扰素(Interferon, IFN)是宿主细胞分泌的一类广谱的抗病毒细胞因子,在抗病毒感染的天然免疫反应中发挥重要作用。IFN根据其结合的受体不同分为I、II、III型3种基本类型,其中I、III型干扰素与天然免疫密切相关,I型干扰素来源广泛,几乎所有的细胞均能产生,主要包括IFN- α 和IFN- β ^[1]。宿主为了抵御病毒的入侵,上调表达IFN- β 等I型、III型干扰素,迅速启动抗病毒天然免疫应答;而病毒为了能够持续感染和致病,往往进化出拮抗或逃逸宿主天然免疫的功能^[2]。检测宿主细胞干扰素的表达水平能反应宿主的天然免疫状态,为评价宿主的抗病毒水平及研究病毒拮抗宿主天然免疫的功能提供依据。**【前人研究进展】**国内外对鸭IFN- α 的克隆、表达、检测及功能研究有较多报道^[3-5],而鸭IFN- β 的克隆、表达及抗病毒活性研究较少。高全新等^[6]建立了基于荧光素酶双报告基因系统测定鸭IFN- β 的表达水平的检测方法,一些学者用qPCR检测了禽坦布苏病毒等水禽病毒感染宿主后IFN- β 及天然免疫相关基因mRNA相对转录水平^[7-8]。**【本研究切入点】**实时荧光定量RT-PCR常用于基因的mRNA表达水平的检测,不仅能够准确对表达量进行定量,而且操作简便、快速^[9-10]。准确定量测定鸭IFN- β mRNA表达水平的荧光定量PCR方法目前仍少有报道。**【拟解决的关键问题】**本研究旨在建立一种用于检测鸭IFN- β mRNA表达水平的SYBR Green I实时荧光定量RT-PCR方法,为检测鸭体内和细胞中IFN- β mRNA转录水平提

供一种有效的检测手段,也为研究病毒感染与宿主天然免疫应答的互作研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

无菌采集7日龄健康樱桃谷鸭脾脏、肝脏及胰腺,无菌Hank's液研磨成匀浆,-70℃保存备用;原核表达载体pET-30a由本实验室保存;DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司(全式金);鸭胚成纤维细胞传代细胞系(DEFs)购自美国ATCC细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

CFX 96 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)、梯度 PCR 仪(Bio-Rad), RT-PCR 反转录试剂盒、SYBR Green I qPCR MIX、RNA 提取试剂盒及 RNA 纯化试剂盒(全式金), DNAase(TIANGEN)、Bam H I 和 Hind III 限制性内切酶(Takara), Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、胶回收试剂盒(诺维赞), T4 DNA 连接酶(NEB), 质粒小提试剂盒(QIAGEN)。2×Dream Taq Green PCR Master Mix(Thermo Scientific)。

1.3 引物合成

据 GenBank 公布的鸭 IFN- β (KT428159)的 cDNA 序列,采用 Oligo 7 软件合成鸭 IFN- β 全长引物,并在其上、下游分别引入 Bam H I、Hind III 酶切位点,在其保守序列区设计荧光定量 PCR 特异性引物,将扩增的 IFN- β 全长片段用于构建重组表达质粒,并作为荧光定量 PCR 阳性标准品;设计一条能特异扩增鸭 IFN- β 的 qPCR 引物,以上引物均由白鲸生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物核苷酸序列及扩增片段大小
Table 1 Primer sequences and amplified fragment sizes

引物 Primers	核苷酸序列 Nucleotide sequence (5'-3')	扩增片段大小 Amplified fragment size/bp
Full-IFN- β -F	CGCG <u>GATCC</u> ATGCCTGGGCCATCAGC	
Full-IFN- β -R	CCCA <u>AAGCTT</u> CACGCCGTGGCTTG	729
qIFN- β -F	GGGCTCCGAACCTTCACC	
qIFN- β -R	TGCTTGCTCTTCATCCGCCGTA	165

注:下划线区域为酶切位点序列。

Note: The underlined parts are the sequences of restriction sites.

1.4 组织 RNA 提取及 cDNA 合成

用总 RNA 提取试剂盒按操作说明书分别提取鸭脾脏、肝脏、胰腺及 DEFs 细胞的总 RNA, 提取的 RNA 经 DNAase 消化后, 用 RNA 纯化试剂盒纯化, 溶于 35 μL DEPC 水, 用于合成 cDNA。按 20 μL 反应

体系: 总 RNA 1 μg, 5×Super Mix 4 μL, gDNA Remove 1 μL, 加水补至 20 μL, 按说明书反应程序 50 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s 合成 cDNA。合成的 cDNA 于 -20 ℃ 保存备用, 用于常规 PCR 扩增 IFN- β 全长及荧光定量 PCR 检测。

1.5 鸭 IFN- β 重组表达质粒的制备

用表1的Full-IFN- β -F、Full-IFN- β -R为上下游引物，脾脏组织获得cDNA作为模板，用高保真酶做常规PCR扩增目的基因。反应体系50 μ L：cDNA 1 μ L，上、下游引物各2 μ L，2×Phanta Max Buffer 25 μ L，dNTP MIX 1 μ L，DNA Polymerase 1 μ L，加DEPC水补至50 μ L；反应程序：95 °C 预变性3 min，95 °C 变性40 s，61.5 °C 退火40 s，72 °C 延伸40 s，72 °C 终延伸5 min，共进行33个循环。用凝胶回收试剂盒回收目的条带。对回收的PCR产物及表达载体pET-30a分别用Bam H I和Hind III限制性内切酶进行双酶切，回收纯化的双酶切产物，并用T4 DNA连接酶将目的基因同表达载体pET-30a进行重组连接。将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞，卡那抗性的LB培养基上涂板，挑单菌落摇菌扩大培养，提取质粒。提取的质粒用于PCR和测序验证，将测序验证阳性的重组克隆质粒作为阳性标准品，用核酸浓度测定仪测定DNA浓度后，按公式copies=6.02×10²³×(质量/分子质量)，计算重组质粒的拷贝数，并以10倍比稀释至下限为10⁻¹ copies· μ L⁻¹。

1.6 常规 PCR 及荧光定量 PCR

以表1所设计的qIFN β -F、qIFN β -R作为引物，常规PCR反应体系：2×PCR Mix 10 μ L，上、下游各1 μ L，模板cDNA 1 μ L，DEPC水7 μ L，反应程序：95 °C 预变性3 min，95 °C 变性30 s，61 °C 退火30 s，72 °C 延伸30 s，72 °C 终延伸5 min，共进行33个循环。qPCR反应体系20 μ L：上、下游各0.5 μ L，2×qPCR Super Mix 10 μ L，模板cDNA 1 μ L，DNA/RNA free水8 μ L，反应程序：94 °C 预变性30 s，94 °C

变性5 s，60 °C 30 s进行退火和延伸，共进行40个循环，而后进行荧光信号采集。

1.7 标准曲线的建立

以倍比稀释的阳性标准质粒1×10¹~1×10⁸ copies· μ L⁻¹作为模板，以qIFN- β -F、qIFN- β -R作为qPCR上下游引物，在荧光定量PCR仪上进行扩增及分析，并计算Ct值用于绘制标准曲线。

1.8 特异性及敏感性试验

分别用常规PCR和荧光定量PCR验证所设计的IFN- β qPCR引物的特异性，分析产物的熔解曲线及对产物进行核酸凝胶电泳分析，将10⁻¹~10³ copies· μ L⁻¹的阳性标准质粒作为模板，用于检测qPCR反应的检出下限。

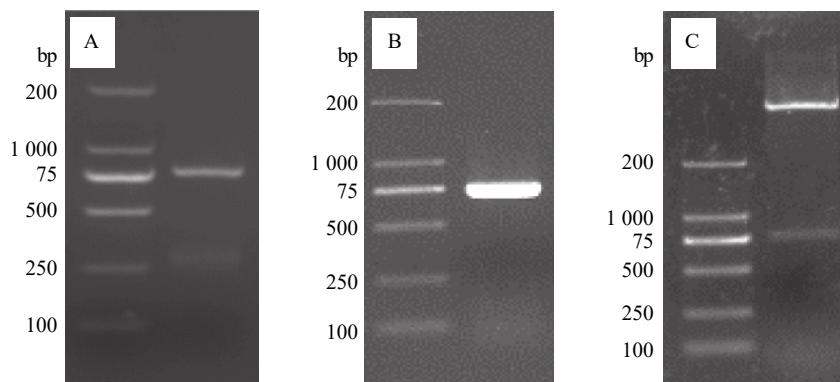
1.9 重复性试验

分别用所建立的qPCR检测方法检测鸭脾脏、肝脏、胰腺3种不同的组织样品mRNA表达水平，组间组内各进行3次重复性试验，并计算变异系数。

2 结果与分析

2.1 鸭 IFN- β 重组质粒的构建

用Full-IFN- β -F、Full-IFN- β -R引物从鸭脾脏组织样品中扩增出732 bp 鸭IFN- β 的完整基因片段（图1-A）。构建的pET-30a-IFN- β 重组表达质粒也能扩增出732 bp的目的条带（图1-B），重组质粒经Bam H I和Hind III双酶切后出现732 bp的目的片段和5.4 kb左右的载体条带（图1-C）；将阳性克隆质粒送生工测序，测序结果与GenBank中的鸭IFN- β （KM035791）和（KT428159）核苷酸同源性分别为100%和99.77%，表明鸭IFN- β 成功导入pET-30a。



注：A：鸭脾脏 IFN- β 基因的扩增；B：重组质粒的 IFN- β 基因扩增；C：重组质粒的双酶切鉴定。

Note: A: amplification of IFN- β from duck spleen; B: IFN- β amplification from recombinant plasmid; C: identification of recombinant plasmid by double restriction enzyme digestion.

图1 鸭 IFN- β 全基因的 PCR 扩增及重组质粒的构建

Fig. 1 PCR amplification of duck IFN- β and construction of recombinant plasmid

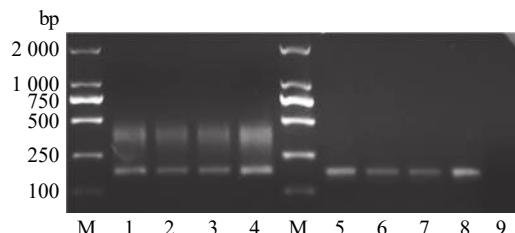
2.2 荧光定量 PCR 检测

以qIFN- β -F、qIFN- β -R为引物，不同组织来源的

cDNA作为模板（肝、脾、胰和DEFs），分别进行qPCR和常规PCR检测。结果显示，qPCR和常规PCR

均能扩增出特异的 165 bp 预期目的片段(图 2), 且 qPCR 产物熔解曲线单峰, 熔解温度为 87.94 ± 0.16 °C

(图 3), PCR 产物序列与鸭 IFN- β 序列一致, 证明所设计的 qPCR 引物特异性强, 无引物二聚体及非特异扩增。



注: 1~4 分别为脾脏、肝脏、胰腺及 DEFs 细胞的常规 PCR 扩增; M 为 DL 2000 DNA Marker; 5~8 分别为脾脏、肝脏、胰腺及 DEFs 细胞的 qPCR 扩增; 9、DEPC 水。

Note: 1~4: conventional PCR amplification of IFN- β in spleen, liver, pancreas, and DEFs cells, respectively; M: DL 2000 DNA marker; 5~8: qPCR amplification of IFN- β in spleen, liver, pancreas, and DEFs cells, respectively; 9: DEPC water.

图 2 不同组织 IFN- β 的常规 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR

Fig. 2 Conventional RT-PCR and qRT-PCR amplification of IFN- β in different tissues

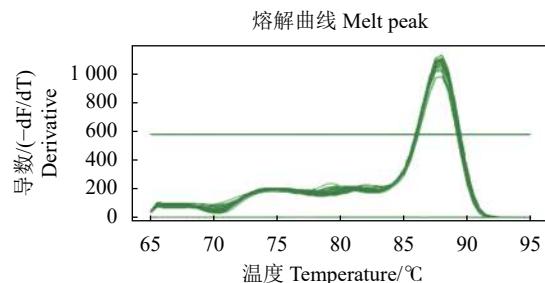


图 3 鸭 4 种组织(肝、脾、胰和 DEFs) IFN- β 荧光定量 RT-PCR 熔解曲线

Fig. 3 qRT-PCR melting curve of duck IFN- β

2.3 标准曲线的建立

将所构建的 pET-30a-IFN- β 重组质粒按 10 倍梯度稀释, 取 8 个梯度的 ($2.84 \times 10^1 \sim 2.84 \times 10^8$ copies· μL^{-1}) 的重组质粒作为阳性标准品进行 qPCR 检测, 计算 C_t 值并建立标准曲线。由图 4 可见, C_t 值与标准质粒浓度间呈现良好的线性关系, 相关系数 $R^2=0.9951$, 鸭 IFN- β 标准曲线方程为 $y=-3.5444x+38.195$ 。

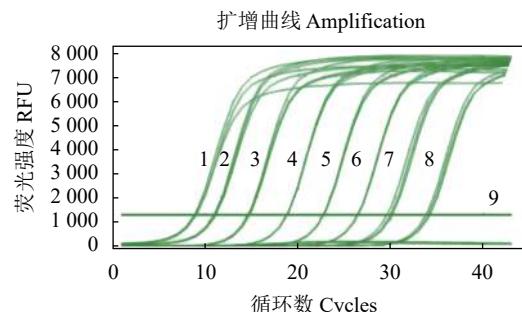
表 2 实时荧光定量 RT-PCR 敏感性检测
Table 2 Sensitivity of qRT-PCR assay

质粒拷贝数/Copy number/(Copies· μL^{-1})	2.84×10^3	2.84×10^2	2.84×10^1	2.84×10^0	2.84×10^{-1}
C_t 值(平均值±标准差) C_t (Means±SD)	26.38 ± 0.03	29.87 ± 0.10	33.98 ± 0.05	36.13 ± 1.12	-
变异系数 CV/%	0.11%	0.33%	0.15%	3.10%	-

2.5 重复性检验

将所采集自雏鸭的肝、脾、胰 3 种不同组织样

品, 以所建立的 IFN- β 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法分别进行 3 次重复, 进行组间及组内重复性检



注: 1~8 分别为 2.84×10^8 、 2.84×10^7 、 2.84×10^6 、 2.84×10^5 、 2.84×10^4 、 2.84×10^3 、 2.84×10^2 、 2.84×10^1 copies· μL^{-1} ; 9: DEPC 水。

Note: 1~8: 2.84×10^8 , 2.84×10^7 , 2.84×10^6 , 2.84×10^5 , 2.84×10^4 , 2.84×10^3 , 2.84×10^2 , and 2.84×10^1 copies· μL^{-1} , respectively. 9: DEPC water.

图 4 IFN- β 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线

Fig. 4 Amplification curve of qRT-PCR for IFN- β

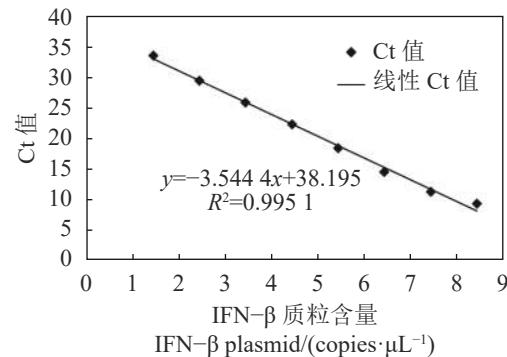


图 5 IFN- β 荧光定量 RT-PCR 扩增的标准曲线

Fig. 5 Standard curve of qRT-PCR for IFN- β

2.4 灵敏度检验

取含量为 $2.84 \times 10^{-1} \sim 2.84 \times 10^3$ copies· μL^{-1} 阳性标准重组质粒作为模板, 每个样品组内重复 3 次, 进行 qPCR 检测, 各不同浓度样品的 C_t 值 ($X \pm SD$) 见表 2。所建立鸭 IFN- β SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法可检出下限为 2.84 copies· μL^{-1} , 且在 28.4 copies· μL^{-1} 以上的模板含量有良好的重复性。

品, 以所建立的 IFN- β 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法分别进行 3 次重复, 进行组间及组内重复性检

测。结果显示，3种不同组织样品检测的组内 C_t 值变异系数为 0.11%~0.13%，组间 C_t 值变异系数均不

超过 1%（表 3）。表明所建立的检测方法重复性良好。

表 3 实时荧光定量 PCR 方法的批内与批间重复性评价结果
Table 3 Reproducibility of intra- and inter-qRT-PCR assays

组织 Tissue	组内重复性试验 C_t 值 The C_t values of intra-assay			组间重复性试验 C_t 值 The C_t values of inter-assay		
	平均值±标准差 Means±SD		变异系数 $CV\%$	平均值±标准差 Means±SD		
	平均值 Means	±标准差 ±SD		平均值 Means	±标准差 ±SD	
脾 Spleen	26.13±0.03		0.11	26.37±0.21		0.80
肝 Liver	32.63±0.04		0.12	32.41±0.20		0.62
胰 Pancreas	31.51±0.04		0.13	31.54±0.30		0.95

3 讨论与结论

宿主体内的多种细胞能够分泌 IFN-β，如淋巴细胞、成纤维细胞、内皮细胞等。当病毒感染后，宿主细胞分泌的 IFN-β 等干扰素并不直接杀伤或抑制病毒，而是与细胞表面的干扰素受体结合，通过 JAK-STAT 途径激活下游多种干扰素刺激基因（ISGs）的表达，这些 ISGs 分泌的抗病毒蛋白发挥抗病毒、抗肿瘤和抗炎等免疫调节反应^[11-12]。Li Ning 等^[13]发现鸭 MAVS 蛋白能够激活鸭 IFN-β 表达，进而抑制感染早期时病毒的复制；Zhang Huihui 等^[14]、Li Ning 等^[15]发现宿主过表达鸭 DDX1 和 DDX3X 基因能够激活鸭 IFN-β 等天然免疫信号通路，抑制病毒的复制；He Tianqiong 等^[16]发现鸭病毒性肠炎病毒的 pUL47 蛋白能够抑制体内 IFN-β 及下游抗病毒蛋白的表达；DTMUV NS2A 蛋白通过与 dsSTING 结合，抑制鸭 IFN-β 转录，破坏 STING 介导的抗病毒天然免疫^[17]。因此，IFN-β 等 I 型干扰素的转录水平是机体天然免疫的重要评价指标。

SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术无需设计探针、灵敏度高、操作方便，自动化程度高，减少了常规 PCR 的上样电泳步骤，有效缩短了检测时间，但对引物的设计要求较高。本研究设计的 IFN-β 引物，常规 PCR 扩增出现 165 bp 目的片段，荧光定量 PCR 扩增产物为单峰，均具有良好的特异性，适合用于建立鸭 IFN-β SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法。

本研究构建了 pET-30a-IFN-β 重组质粒作为阳性标准品，通过绘制的标准曲线， $y=3.5444x+38.195$ ，相关系数 $R^2>99.5\%$ ，表明线性拟合程度好，该方法灵敏度高，检测下限为 $2.84 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，重复性良好，不同组织样品的组内变异系数为 0.11%~0.13%，组间变异系数不超过 1%，可以直接用于样品 IFN-β mRNA 表达量的准确定量检测。本研究建立的 SYBR

Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法还可以利用 GAPDH 或 β-Actin 等管家基因作为内参，荧光定量 PCR 仪上同时进行 IFN-β 和管家基因的检测，得到 IFN-β mRNA 表达水平的相对定量，明确 IFN-β mRNA 在不同组织和细胞中的表达差异，为从 mRNA 水平上研究鸭应答病原微生物感染的免疫调控机制奠定基础。

参考文献：

- WALTER M R. The role of structure in the biology of interferon signaling [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 606489.
- RAI K R, SHRESTHA P, YANG B C, et al. Acute infection of viral pathogens and their innate immune escape [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 672026.
- 万春和, 朱海侠, 陈红梅, 等. 番鸭 IFN-α mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (4): 63~68.
- WAN C H, ZHU H X, CHEN H M, et al. Development of a quantitative real-time PCR for detection of IFN-α mRNA of Muscovy ducks [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2012, 20 (4): 63~68. (in Chinese)
- 刘澜澜, 庄艳娜, 于晓红, 等. 绿头鸭 IFN-α 的可溶性表达及其活性分析 [J]. 生物技术通报, 2014 (11): 142~146.
- LIU L L, ZHUANG Y N, YU X H, et al. Soluble expression and activity analysis of mallard IFN-α [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014 (11): 142~146. (in Chinese)
- 杨发龙, 谢秀兰, 汤承, 等. 鸭瘟病毒疫苗株与强毒株诱导雏鸭 IFN-α mRNA 在肝脏中表达的动态定量研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30 (8): 647~650.
- YANG F L, XIE X L, TANG C, et al. Dynamics of IFN-α mRNA expression in liver of ducks infected with duck plague virus of different virulence [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30 (8): 647~650. (in Chinese)
- 高全新, 刘云霞, 程玉强, 等. 鸭 IFN-β 启动子双荧光素酶报告基因系统的构建及活性检测 [J]. 上海农业学报, 2018, 34 (3): 66~71.
- GAO Q X, LIU Y X, CHENG Y Q, et al. Construction and activity

- detection of dual luciferase reporter gene system for duck IFN- β promoter [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2018, 34 (3) : 66–71. (in Chinese)
- [7] CHEN Z L, LUO G F, WANG Q X, et al. Muscovy duck reovirus infection rapidly activates host innate immune signaling and induces an effective antiviral immune response involving critical interferons [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175 (2/3/4) : 232–243.
- [8] LI N, WANG Y, LI R, et al. Immune responses of ducks infected with duck Tembusu virus [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 425.
- [9] 张盼涛, 曾显营, 杨婧, 等. 鸭IFN- γ , IL-2 mRNA荧光定量RT-PCR方法的建立及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35 (6) : 472–476. ZHANG P T, ZENG X Y, YANG J, et al. Establishment and application of a real-time assay for detecting of IFN- γ and IL-2 mRNA in ducks [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35 (6) : 472–476. (in Chinese)
- [10] PIZZATO M, ERLWEIN O, BONSALL D, et al. A one-step SYBR Green I-based product-enhanced reverse transcriptase assay for the quantitation of retroviruses in cell culture supernatants [J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156 (1/2) : 1–7.
- [11] TAKEUCHI O, AKIRA S. Innate immunity to virus infection [J]. *Immunological Reviews*, 2009, 227 (1) : 75–86.
- [12] 陈超, 池晓娟, 白庆玲, 等. 甲型流感病毒感染过程中干扰素介导的天然免疫应答机制 [J]. 生物工程学报, 2015, 31 (12) : 1671–1681.
- CHEN C, CHI X J, BAI Q L, et al. Mechanisms underlying interferon-mediated host innate immunity during influenza A virus infection [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31 (12) : 1671–1681. (in Chinese)
- [13] LI N, HONG T Q, LI R, et al. Cherry valley ducks mitochondrial antiviral-signaling protein-mediated signaling pathway and antiviral activity research [J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 377.
- [14] ZHANG H H, SONG X D, LI T X, et al. DDX1 from Cherry valley duck mediates signaling pathways and anti-NDRV activity [J]. *Veterinary Research*, 2021, 52 (1) : 9.
- [15] LI N, JIANG S N, ZHAO J, et al. Molecular identification of duck DDX3X and its potential role in response to Tembusu virus [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 106: 103599.
- [16] HE T Q, WANG M S, CHENG A C, et al. Duck enteritis virus pUL47, as a late structural protein localized in the nucleus, mainly depends on residues 40 to 50 and 768 to 777 and inhibits IFN- β signalling by interacting with STAT1 [J]. *Veterinary Research*, 2020, 51 (1) : 1–12.
- [17] ZHANG W, JIANG B W, ZENG M, et al. Binding of duck tembusu virus nonstructural protein 2A to duck STING disrupts induction of its signal transduction cascade to inhibit beta interferon induction[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(9). DOI: [10.1128/jvi.01850-19](https://doi.org/10.1128/jvi.01850-19).

(责任编辑: 张梅)