

分类号 _____
U D C _____

学 号 MZ120211591
密 级 _____



PDCoV 广西株的分离鉴定及其抗 S 蛋白 单克隆抗体的制备

学 院： 兽医学院

专 业 学 位 类 别： 兽医

专 业 学 位 领 域： 兽医

研 究 生： 程玥

校 内 指 导 教 师： 陈振海 教授

校 外 指 导 教 师： 周伦江 研究员 福建省农业科学院
畜牧兽医研究所

答 辩 委 员 会 主 席： 戴有理 研究员

答 辩 日 期： 2024 年 06 月 01 日

Isolation and Identification of PDCoV Guangxi Strains and Preparation of S Protein Monoclonal Antibodies

A thesis submitted to
Yangzhou University
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of
Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By
Yue Cheng
Supervisor: Prof. Zhenhai Chen
Co-supervisor: Researcher Lunjiang Zhou
Veterinary
June 2024

PDCoV 广西毒株的分离鉴定及其 S 蛋白单克隆抗体的制备

本论文研究受到广西重点研发计划（桂科 AB21238003）、江苏省农业科技自主创新资金项目（CX(21)2014）、扬州市市校合作专项（YZ2022187）资助。

目 录

文献综述.....	1
1 冠状病毒概述.....	1
2 猪德尔塔冠状病毒概述.....	3
2.1 猪 δ 冠状病毒的病原形态特征.....	3
2.2 猪 δ 冠状病毒的基因组结构.....	3
2.3 猪 δ 冠状病毒的流行与传播.....	4
2.4 猪 δ 冠状病毒的跨物种传播.....	6
2.5 猪 δ 冠状病毒的临床诊断检测.....	7
2.6 猪 δ 冠状病毒的防控策略.....	9
3 腺病毒载体概述.....	10
3.1 腺病毒的生物学特性.....	10
3.2 腺病毒载体表达系统的优点.....	11
3.3 腺病毒载体疫苗在猪病防控中的应用.....	12
4 研究目的和意义.....	13
第一章 广西 PDCoV 毒株的分离鉴定与序列分析	14
1 材料.....	14
1.1 病料来源.....	14
1.2 细胞、菌种及载体.....	14
1.3 主要试剂.....	14
1.4 主要溶液及相关试剂的配制.....	16
1.5 主要设备和仪器.....	18
2 方法.....	19
2.1 腹泻病料样品的处理.....	19
2.2 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成.....	19
2.3 样品 PCR 检测	20
2.4 阳性样品中 PDCoV 的分离.....	21
2.5 PDCoV 分离株的空斑纯化.....	21
2.6 PDCoV 分离株的 IFA 鉴定	22
2.7 PDCoV 分离株生长曲线的测定	22
2.8 PDCoV 分离株的全基因组序列测定	23
2.9 PDCoV 分离株的遗传进化分析.....	26
3 结果.....	28
3.1 腹泻病料的 RT-PCR 鉴定	28
3.2 PDCoV 毒株的分离培养	28

3.3 PDCoV 毒株的空斑纯化	29
3.4 PDCoV 毒株的 IFA 鉴定	30
3.5 PDCoV 毒株生长曲线的测定	30
3.6 PDCoV 毒株的全基因组测序	31
3.7 PDCoV 毒的同源性分析及系统发育分析	32
4 讨论	35
5 结论	36
第二章 抗 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定	37
1 材料	38
1.1 毒株及实验动物	38
1.2 细胞、菌株及载体	38
1.3 主要试剂	38
1.4 主要溶液及相关试剂的配置	38
1.5 主要设备和仪器	38
2 方法	38
2.1 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的构建	38
2.2 重组腺病毒的拯救及鉴定	41
2.3 重组蛋白的原核表达及纯化	42
2.4 小鼠免疫程序的制定	44
2.5 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选	44
2.6 单抗腹水的大量制备	46
2.7 单克隆抗体的生物学特性鉴定	46
2.8 单克隆抗体中和活性的测定	47
2.9 单克隆抗体与去 N-糖基化 S 蛋白的反应性鉴定	47
3 结果	47
3.1 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的构建及拯救	47
3.2 PDCoV S2 重组蛋白的表达及纯化	51
3.3 重组腺病毒免疫小鼠后的血清抗体效价测定	52
3.4 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选	53
3.5 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的 IFA 反应性鉴定	53
3.6 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的 Western blot 反应性鉴定	54
3.7 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的特异性鉴定	54
3.8 PDCoV S 蛋白单克隆抗体与天然病毒粒子的反应性鉴定	55
3.9 胰酶对 PDCoV 天然病毒粒子的切割作用	55
3.10 PDCoV S 蛋白单抗中和活性的测定	56
3.11 PDCoV S 蛋白糖基化位点的预测及其在蛋白三维结构中的分布	57
3.12 PDCoV S 蛋白单抗与去 N 糖基化后 S 蛋白的反应性鉴定	

.....	58
4 讨论.....	59
5 小结.....	61
全文总结.....	62
参考文献.....	63

摘要

猪 δ 冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是近些年各日龄猪群广泛出现胃肠道疾病、仔猪因腹泻症状加剧而大量死亡的重要新发病原之一。自 2012 年被中国香港首次检出并报道后, PDCoV 疫情相继在北美发达国家、东亚及东南亚地区的多个国家呈爆发性流行, 并常在临床上与其他病毒性腹泻病原体(如同一病毒科成员 PEDV、TGEV 及呼肠孤病毒科成员 PRoV 等) 造成混合感染, 无疑是猪场肠道病毒鉴别诊断及预防控制过程中需要面临的巨大挑战。以三聚体形式存在的 S 蛋白是位于冠状病毒表面的重要功能性结构蛋白及抗原性蛋白, 承担着结合受体、触发膜融合机制的重要责任, 从而帮助病毒完成入侵宿主细胞; 同时, S 蛋白还是诱导机体产生中和抗体的主要靶标蛋白。鉴于此, 本研究对来自中国广西地区的猪腹泻病料进行了分离鉴定及生物学进化分析, 同时利用重组腺病毒及原核表达的重组蛋白制备出了一组针对 PDCoV S 蛋白的单克隆抗体, 为今后掌握 PDCoV 的流行趋势及开展快速诊断检测试剂、有效抗病毒药物和商用疫苗的研发工作提供一定理论依据和崭新思路。

1. PDCoV 毒株的分离鉴定及全基因组序列分析

本研究于 2021-2022 年从广西多个猪场采集了腹泻性病猪及死猪的临床病料组织及粪便、肛拭子样本, 并针对 PDCoV M 基因的保守位点设计特异性引物, 利用 RT-PCR 的方法对收集的样本进行检测。结果显示, 有数份来自不同猪场的腹泻样本呈 PDCoV 阳性。将阳性样本初步除菌处理后, 以不同剂量接种于 LLC-PK1 细胞并进行病毒的盲传, 传至 3-5 代, 通过细胞病变观察及 IFA 鉴定, 最终成功分离得到 3 株 PDCoV。利用空斑实验对 PDCoV 广西分离株进行纯化培养, 将其分别命名为 PDCoV-GX2021-1、PDCoV-GX2022-1、PDCoV-GX2022-2。随后, 将这 3 株 PDCoV 在 LLC-PK1 细胞上进行连续传代, 测定病毒滴度及相应的生长曲线。结果显示, 其中 PDCoV-GX2021-1、PDCoV-GX2022-1 毒株的滴度在病毒感染后的 36 h 达到最高, 而 PDCoV-GX2022-2 毒株的滴度在 48 h 达到最高。紧接着, 采用分段扩增的方式得到这 3 株 PDCoV 广西分离株的全基因组序列, 并将其进行测序及系统发育分析。根据全基因组序列建立的系统发育进化树, 发现本研究的 3 株 PDCoV 分离株均属于以中国、美国、韩国、日本毒株为代表的 I 型分支。其中 PDCoV-GX2021-1 毒株与美国分离株 USA/Ohio137/2014 的相似性高达 99.21%, 而 PDCoV-GX2022-1 和 PDCoV-GX2022-2 毒株的亲缘性较近, 属

于同一小分支，二者与河北毒株 CHN-HB-2014 的相似率分别为 98.78%、99%。本研究为进一步了解广西地区 PDCoV 的演变及防控 PDCoV 疫情提供重要参考信息。

2. 抗 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

本研究为了获得更多针对 PDCoV S 蛋白天然结构的单克隆抗体，在进行抗原 PDCoV S 蛋白的表达时，选择了具有蛋白质加工、修饰功能的病毒表达系统，从而尽可能保留 S 蛋白关键的空间结构。首先，将 PDCoV S 蛋白的全长克隆至复制缺陷的腺病毒载体，利用拯救出的重组病毒 Ad5-PDCoV-S 作为主要免疫原，并结合原核表达的重组蛋白，通过滴鼻、肌肉注射及腹腔注射等方式对数只 BALB/c 小鼠分组免疫，利用杂交瘤技术进行细胞融合，最终获得了 7 株针对 PDCoV-S 蛋白的单克隆抗体。随后，进一步鉴定了这组单抗的生物学特性。通过间接免疫荧光实验，鉴定出所制备的 7 株 S 蛋白单克隆抗体对本实验室保存的三株 PDCoV 野毒株均由良好的反应性；通过蛋白免疫印迹实验，发现能通过变性胶与病毒感染细胞样发生反应的 2 株单克隆抗体（即 B11-2、A7-76 株）所针对的抗原表位是线性表位；而另外 5 株（C1-14、B23-4、A1-79、C5-13、C15-2 株）则靶向 S 蛋白的构象表位，仅能通过非变性胶进行鉴定。其中针对构象表位的 C1-14、B23-4 及 C15-2 株单抗具有一定的病毒中和作用。此外，这组单抗还能够识别病毒感染细胞样中去 N-糖基化后的 S 蛋白，表明 N-糖基化修饰并不影响本组单抗所识别的抗原表位。我们的研究旨在获得更多抗不同空间构象、抗不同抗原表位的 S 蛋白单克隆抗体，为控制 PDCoV 感染、研发 PDCoV 疫苗及深入后续基础研究创建有效的检测诊断技术。

关键词：PDCoV；纤突蛋白；腺病毒；单克隆抗体；中和抗体

Abstract

Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is one of the most important emerging pathogens in recent years, which causes a wide range of gastrointestinal diseases in pigs of all ages and a large number of deaths in piglets, due to the exacerbation of diarrhea symptoms. Since being first detected and reported in Hong Kong, China in 2012, the PDCoV epidemic has erupted in several countries in developed North America, East Asia, and Southeast Asia, often causing mixed infections with other viral diarrhea pathogens (such as PEDV, TGEV, and PRoV, members of the same family of viruses) in clinical practice. This undoubtedly poses a huge challenge in the differential diagnosis, prevention, and control of enteroviruses in pig farms. Spike protein in the form of trimer is an important functional structural protein and antigenic protein located on the surface of coronavirus, which is responsible for binding to receptor and triggering membrane fusion mechanism to achieve the primary task of virus invasion; it is also a major target protein for inducing the production of neutralizing antibodies. In view of this, this study isolated and identified the samples of porcine diarrhea from Guangxi, China, and analyzed their biological evolution. At the same time, a set of monoclonal antibody targeting PDCoV spike protein was prepared by using recombinant adenovirus and prokaryotic expression recombinant protein. This studies provides a theoretical basis and a new idea for understanding the epidemic trend of PDCoV, as well as developing efficient diagnostic and detection reagents, effective antiviral drugs, vaccines in the future.

1. Isolation, identification and genome sequence analysis of PDCoV strains

From 2021 to 2022, several clinical samples of intestinal tissues, fecal samples, intestinal contents and anal swabs were collected from diarrheal pigs and dead pigs in Guangxi. Specific primers were designed for the conserved sites of PDCoV M gene, and RT-PCR was used to detect the samples of diarrheal diseases. The test results showed that three diarrhea samples from different pig farms were positive for PDCoV. After preliminary sterilization treatment of the positive samples, they were inoculated into LLC-PK1 cells at different doses and subjected to blind transmission of the virus. Through cytopathic observation and IFA identification, it was confirmed that three PDCoV Guangxi strains were successfully isolated. Plaque purification test was used to purify and culture PDCoV Guangxi isolates, and they were named PDCoV-GX2021-1, PDCoV-GX2022-1 and PDCoV-GX2022-2 respectively. Subsequently, three PDCoV isolates were continuously passaged on LLC-PK1 cells, and the titers of the virus were measured and corresponding growth curves were plotted. It was found that the titers of PDCoV-GX2021-1 and PDCoV-GX2022-1 strains reached their highest at 36 hours after virus infection, while the titers of PDCoV-GX2022-2 strains reached highest at 48 hours. Then the whole genome sequences of these three PDCoV isolates in Guangxi were obtained by

segmented amplification, which were sequenced and analyzed by phylogenetic analysis. According to the genetic evolution tree analysis established based on the whole genome sequence, all three PDCoV isolates belong to the type I branch represented by strains from China, the United States, South Korea, and Japan. The similarity between the strain PDCoV-GX2021-1 and the strain USA/OHIO137/2014 was as high as 99.21% , while the strain of PDCoV-GX2022-1 and PDCoV-GX2022-2 belonged to the same small branch, their similarity rates about Hebei representative strain CHN-HB-2014 was 98.78% and 99% respectively. This study provides important information for further understanding of the evolution and prevention to PDCoV epidemic in Guangxi.

2. Preparation and identification of anti-PDCoV spike protein monoclonal antibody

In order to obtain more monoclonal antibody about the natural structure of PDCoV spike protein, we selected a virus expression system that can translate and modify the protein to express the antigen PDCoV S protein, thus, the key spatial structure of S protein can be preserved as much as possible. Firstly, the full length of PDCoV-S protein was cloned into replication-deficient adenovirus vector, and the rescued recombinant virus Ad5-PDCoV-S was used as the main immunogen, several BALB/c mice were immunized by intranasal and intramuscular injection. Hybridoma technology was used for cell fusion, and seven monoclonal antibodies against the PDCoV spike protein were obtained through subcellular screening. Subsequently, a series of biological characteristics of these monoclonal antibodies were identified. The results of indirect immunofluorescence assay showed that the seven spike protein monoclonal antibodies were highly reactive to the three wild-type PDCoV strains preserved in our laboratory. Through western blot test, it was found that two monoclonal antibodies (B11-2 and A7-76) could react with virus-infected cells through denatured gel, which are targeting linear epitopes. While the other five monoclonal antibodies (C1-14, B23-4, A1-79, C5-13, C15-2) are targeting conformational epitopes and can only react through non denatured gel. In addition, this group of monoclonal antibodies can also recognize the spike protein after N-deglycosylation in virus infected cell samples. Among them, the C1-14, C5-13, and B23-4 monoclonal antibodies also have a certain ability to neutralize the virus. Our research aims to obtain more monoclonal antibodies of S protein with different antigenic epitopes and spatial conformations, in order to control PDCoV infection and create effective detection or diagnostic techniques for controlling PDCoV infection, developing PDCoV vaccines, and conducting further basic research.

Key words: PDCoV; Spike protein; Adenovirus; Monoclonal antibody; Neutralizing antibodies

缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
aa	amino acid	氨基酸
bp	base pair	碱基对
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
CTD	C-terminal domain	C 末端结构域
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM 培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxy-ribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附法
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光实验
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G (IgG)
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
kb	kilo base pair	千碱基对
kDa	kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MEM	Minimum Essential Medium	MEM 培养基
MOI	multiplity of infection	感染复数
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
ng, μ g, mg	nanogram, microgram, milligram	纳克, 微克, 毫克
NTD	N-terminal domain	N 末端结构域
OD	optical delnsity	吸光度
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase Chain reaction	聚合酶链式反应

缩略词表

(续) 英文缩写	英文名称	中文名称
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RT-PCR	reverse transcript-Polymerase Chain reaction	反转录聚合酶链式反应
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
TPB	Tryptose Phosphate Broth	胰蛋白胨磷酸盐肉汤
UTR	Untranslated Region	非翻译区
VNT	Virus neutralization test	病毒中和实验
μL, mL, L	microliter, milliliter, liter	微升, 毫升, 升

文献综述

1 冠状病毒概述

2019 年 12 月,我国湖北省武汉市首次报道了突发性的肺炎疫情,具有高传染率、高致死率等特点^[1],随后,由新型冠状病毒-重症急性呼吸综合征冠状病毒 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)所引起的 2019 新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)迅速席卷全球,给世界各地人民的生命健康及社会稳定发展带来了巨大损失^[2]。SARS-CoV-2 疫情的出现是 21 世纪人类第三次冠状病毒大爆发,继最早爆发于 2003 年我国广东佛山地区的严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV, Severe acute respiratory syndrome coronavirus)和最早发现于 2012 年沙特阿拉伯地区的中东呼吸系统综合征冠状病毒(MERS-CoV, Middle East respiratory syndrome coronavirus)之后^[3],再一次造成全球性的突发公共卫生问题,同时也警示着冠状病毒是一种分布广泛、变异迅速、遗传多样、传播力强、中间宿主繁多且能够导致大量动物及人类患病的一类重要病原体^[4]。

冠状病毒(Coronavirus, CoV)是目前已知 RNA 病毒中遗传物质最大(基因组长 25-31 kb、粒子直径达 80-120 nm)的不分节段、单正链、有囊膜病毒家族,隶属于冠状病毒科(Coronaviridae)、巢式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒属(Coronavirus)^[5]。根据不同病毒成员的基因组结构成分及遗传特性分析,可以将冠状病毒亚科(如图 1 所示)分为 α -CoV、 β -CoV、 γ -CoV 以及近些年新出现而被假定的 δ 冠状病毒属,即 δ -CoV^[6]。随着对冠状病毒入侵机制及分子流行病学调查的深入了解,越来越多的研究表明冠状病毒能够感染多个物种,引起人类呼吸道相关疾病及动物腹泻性疾病的爆发^[7]。其中导致人类及大多数野生动物、家畜患病的冠状病毒主要来自于 α -CoV、 β -CoV,如属于 α 冠状病毒属成员的人 HCoV-229E、人 HCoV-NL63,以及属于 β 冠状病毒属成员的 SARS-CoV、SARS-CoV-2、人 HCoV-OC43、MERS-CoV,均能造成人类不同程度的呼吸道感染与呼吸系统疾病^[8];而 γ -CoV 属主要包括以鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)为代表的禽类冠状病毒,除此之外,近年来有学者在白鲸、海豚等水生哺乳动物样本中检测到了冠状病毒核酸序列,如白鲸冠状病毒 SW1(Beluga whale coronavirus SW1, BWCoV-SW1),根据基因组的系统发生分析也将其归为 γ 冠状病毒属^[9]; δ -CoV 属成员是基因组相对较小的一类群体,包括麻雀冠状病毒

(Sparrow Coronavirus, SPCoV)、鹅口疮冠状病毒 (Thrush coronavirus HKU, ThCoV, ThCoV HKU12)、黑水鸡冠状病毒 (Common Moorhen Coronavirus, CMCoV) 等禽类冠状病毒及亚洲豹猫冠状病毒 (Asian Leopard Cats Coronavirus, ALCCoV)、猪 δ 冠状病毒 (Porcine Delatcoronavirus, PDCoV) 等哺乳动物冠状病毒^[10]。

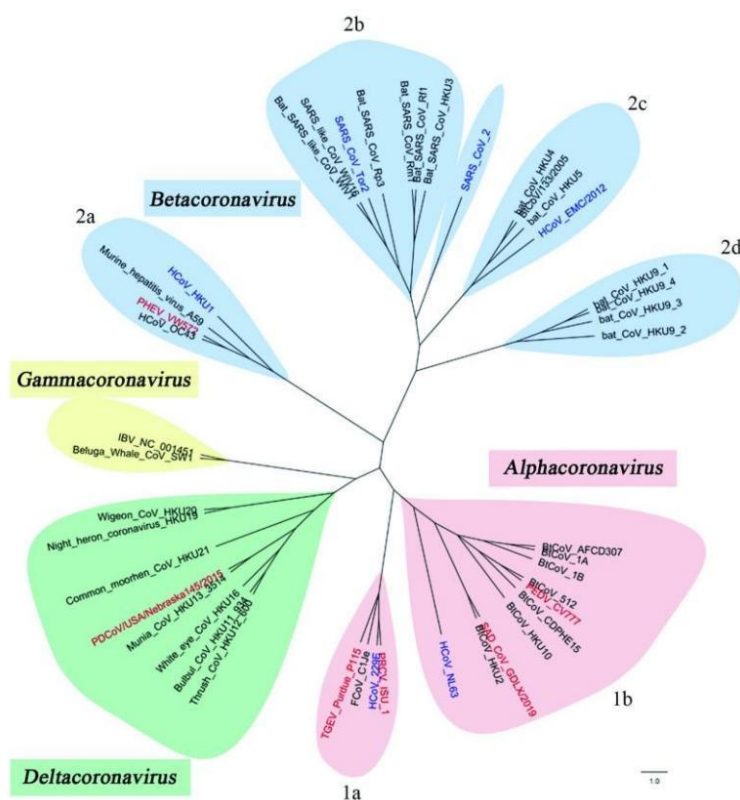


图 1 冠状病毒亚科的系统发育关系^[6]

Figure 1 Phylogenetic relationships of coronavirus subfamilies

冠状病毒是引起胃肠道疾病的常见致病因素之一，而病毒性腹泻是当前国内外生猪养殖行业以聚集性多发、病死率极高为特征的猪传染性肠道疾病^[11]。至今为止，已被报道发现能够感染猪群的冠状病毒有 6 种，其中属于 α -CoV 的猪流行性腹泻病毒 (PEDV, Porcine epidemic diarrhea virus)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV, Transmissible gastroenteritis virus)、猪急性腹泻综合征冠状病毒 (SADS-CoV, Swine acute diarrhea syndrome-coronavirus) 以及属于 δ -CoV 的 PDCoV 均主要靶向空肠、回肠等肠道器官，从而导致患病猪出现不同程度、却又极为相似的腹泻症状^[12]；另外 2 种猪冠状病毒分别是 α -CoV 属成员猪呼吸道冠状病毒 (PRCV, porcine respiratory coronavirus)、 β -CoV 属成员猪血凝性脑脊髓炎病毒 (PHEV, porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus)，前者主要导致猪群发生呼吸系统疾病，而后者主要引起病猪出现以中枢系统障碍为主要特征的神经症状^[13]。

2 猪德尔塔冠状病毒概述

2.1 猪 δ 冠状病毒的病原形态特征

PDCoV 是一种基因组长约 25.4 kb 的有囊膜、单正链 RNA 病毒，是已知冠状病毒中基因组长度最短的成员^[14]。冠状病毒的外膜被特殊放射状结构所包围，因在电子显微镜下呈日冕状或皇冠状而得名，PDCoV 病毒粒子的表面同样具有这种典型的皇冠装结构，其粒子直径长为 60-180 nm（如图 2 所示）。

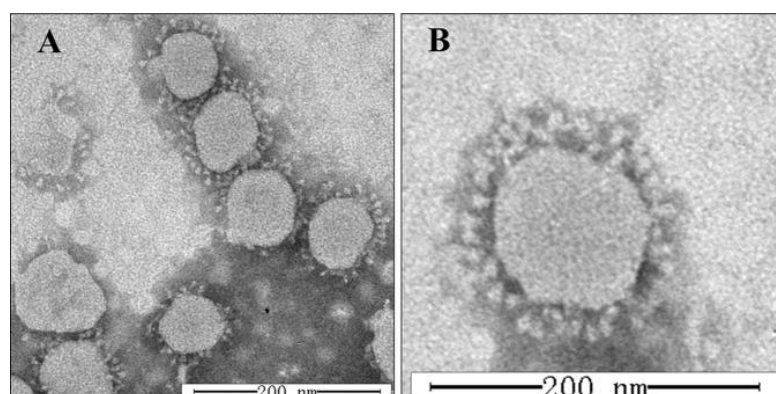


图 2 PDCoV 病毒粒子在电子显微镜下的形态^[14]

Figure 2 Morphology of PDCoV virions under electron microscope

2.2 猪 δ 冠状病毒的基因组结构

PDCoV 的基因组结构（如图 3 所示）与 α 冠状病毒属成员 TGEV、PEDV、SADS-CoV 的结构十分相似^[15]，在基因组的两端中都含有不编码蛋白质的区域，也被称为非编码区（untranslated region, UTR），在靠近首段的位置带有甲基化 cap “帽子”结构，负责参与病毒的转录过程；而靠近末端的位置与 poly (A) “尾巴”结构相连，在 mRNA 翻译中起着重要作用^[16]。编码病毒蛋白质的部分从 5'端至 3'端依次为 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-E-M-NS6-N-NS7-3'UTR^[17]。其中具有 7 个核苷酸重叠的开放阅读框（Open reading frame, ORF）ORF1a 及 ORF1b 编码了两大聚前体蛋白，即 pp1a、pp1b^[18]，二者能被自身编码的木瓜样蛋白酶 nsp3 及 3C 样蛋白酶 nsp5 水解成 15 个成熟非结构蛋白（相较于 α 及 β 冠状病毒属成员，PDCoV 的特殊之处在于不编码 nsp1 基因），其长度大于 18 kb，因此占据整个基因组 5'端前 2/3 区域^[19]。而位于 3'端的开放阅读框编码了 PDCoV 的结构蛋白基因，即 Spike-纤突蛋白、Envelope-囊膜蛋白、Membrane-包膜蛋白、Nucleocapsid-核衣壳蛋白及辅助蛋白（包括 NS6-非结构蛋白 6、NS7-非结构

蛋白 7 及 NS7a-非结构蛋白 7a, 其中 NS6 蛋白位于 M 蛋白和 N 蛋白之间, 而编码 NS7 基因及 NS7a 基因的 ORF 位于 N 蛋白的内部) [20]。

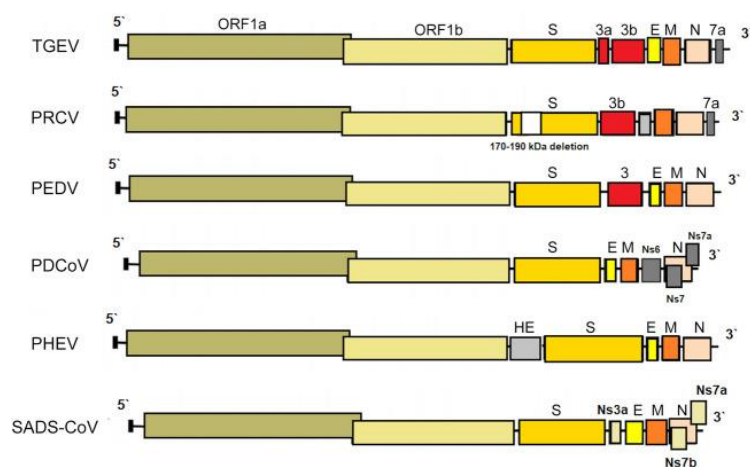


图 3 PDCoV 基因组结构示意图^[13]

Figure 3 Genome structure map of PDCoV

2.3 猪 δ 冠状病毒的流行与传播

2.3.1 PDCoV 的发现

德尔塔冠状病毒(δ -CoV)在哺乳动物中的首次发现源于 2006 年,由香港学者 Dong 等人对野生动物进行性相关病毒的抽样检测时,在中国白鼬獾和亚洲豹猫的肛拭子中发现了在同源分析上不同于已有 3 种冠状病毒属的新型冠状病毒^[21]。Woo 等香港学者于 2006-2007 年收集了全港 1548 份鸟类样品,并鉴定出了几种与上述亲缘关系相近的病毒,即夜莺冠状病毒(BuCoV)、鹅口疮冠状病毒(ThCoV)、文鸟冠状病毒(MunCoV),并将其假定为一类新的冠状病毒亚群^[22]。猪德尔塔冠状病毒由 Woo 等香港学者于 2012 年首次报道,相关研究人员在香港地区进行大规模畜禽流行病学调查时,从家猪粪便中检测到了该病毒,并首次完成了哺乳动物德尔塔冠状病毒的全基因组测序(PorCoV HKU15)^[23]。

2.3.2 PDCoV 的国际流行概况

2014 年, PDCoV 疫情在美国俄亥俄州的多个猪场呈爆发性流行,母猪及哺乳仔猪的死亡率高达 30%以上,随后各国研究学者才开始重视新发的猪德尔塔冠状病毒^[24]。此后 PDCoV 迅速蔓延至美国各州,至今已有超过 20 个州的 500 多个猪场均显示出现过 PDCoV 感染的情况,表明 PDCoV 自 2013 年即在美国的主要养猪地区普遍流行^[25]。此外,加拿大^[26]、韩国^[27]、中国^[28]也于 2014 年检测到了 PDCoV 阳性病例,给养猪业

的持续需发展带来了经济重创（如图 4）。泰国于 2015 年检测到了该病毒，通过序列分析发现泰国 PDCoVs 序列与来自中国的毒株（PDCoV-AH-2004）同源性最高^[29]。Tohru Suzuki 等日本学者于 2013-2014 年对 447 份粪便样本进行筛查时，发现在母猪中有 48.3% 的 PDCoV 阳性率，并且该研究分离出的 7 株日本毒株与来自美国、韩国的 PDCoV 毒株在遗传进化上十分相关^[30]。2016 年，来自老挝人民共和国的某猪场爆发了死亡率较 PEDV 疫情稍低的腹泻性疾病，经检测后确定该疫情由 PDCoV 引起^[31]。2019 年，秘鲁首次报道在猪群发现了与北美毒株密切相关的 PDCoV 毒株^[32]；同年，墨西哥也首次报道了 PDCoV 在该国的流行情况，研究人员利用荧光定量多重 PCR 方法对 885 份肛门拭子进行检测，结果显示 PDCoV 的阳性率为 9.6%（共计 85 份样品），且阳性病例中有 54.1% 的样品同时伴有 PEDV 的混合感染^[33]。

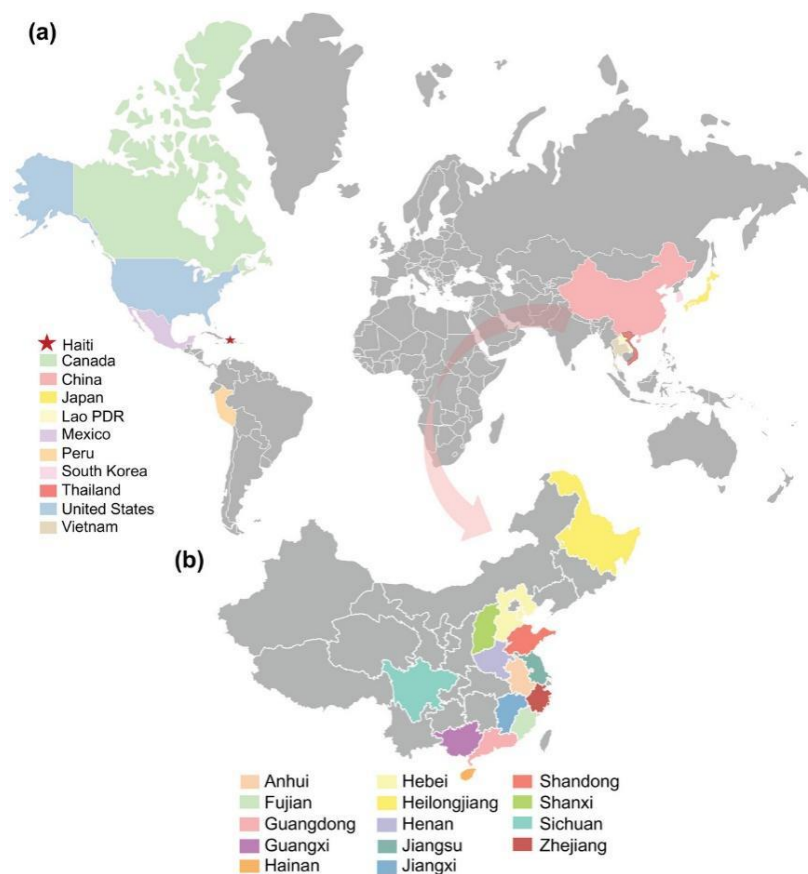


图 4 PDCoV 感染地理分布示意图^[35]

Figure 4 Geographical distribution of PDCoV infection

2.3.3 PDCoV 的国内流行概况

目前为止，已累计超过 25 个省份地区报道了有关 PDCoV 的腹泻疫情，说明该病毒在我国各地猪场的存在范围之广、传播速度之快。Zhang 等人正在进行 2012-2018 年间

中国华南地区（包括江西、湖南、浙江、广东、福建）168 个猪场病毒性腹泻的调查研究时，发现 PDCoV 是检测阳性率为第二高的重要病原，其中，在 2987 份腹泻样本中 PDCoV 的单感染率为 14.23%（425/2987），而 PEDV 与 PDCoV 的平均共感染率高达 12.72%（380/2987）^[34]。2016-2017 年，Xu 等人在进行中国台湾地区 PDCoV 流行病学调查及出现时间的追溯时，于 172 头腹泻仔猪的肛门拭子中首次检测到了 PDCoV，阳性率为 16.9%（29/172）；并利用 PDCoV 的 N 蛋白对收集于 2011-2015 年的 1039 份猪血清进行 ELISA 抗体检测，结果显示，台湾地区的猪场很可能在 2011 年就存在 PDCoV 的感染情况^[35]。Yu 等人对来自 2017-2019 年四川省的 634 份腹泻猪临床病料进行 RT-qPCR 检测，结果显示，有 84 份病料呈 PDCoV 阳性，阳性率为 13.25%，其中哺乳仔猪的感染率是母猪的 2.77 倍，并常伴有 PEDV 感染；通过基因组序列分析，发现该研究中 4 株 PDCoV 四川分离株的 S 基因均存在着 3-nt 的缺失，而非结构基因 ORF1ab 中存在 6-nt 的缺失，在系统进化树分析中表现出了一定的遗传差异性^[36]。为了解广西省 2020-2023 年间 PDCoV 的流行状况，Li 等人利用多重荧光定量 PCR 的方法对 4897 份腹泻样本进行检测，结果显示，PDCoV 的临床阳性率为 7.39%（362/4897），而采自 2023 年的样本阳性率（1.26%，14/1110）明显低于 2020 年（14.85%，30/202），随后基于 S 基因的序列分析，发现有两株广西分离株还存在着种间重组的可能性^[37]。

2.4 猪 δ 冠状病毒的跨物种传播

冠状病毒的基因组是 RNA 单链结构，易受到宿主细胞的影响，同时在病毒复制时被缺乏校准、纠错系统的 RNA 复制酶（RdRp）所调控，此过程不乏增加了碱基序列错误扩增、发生突变和缺失等基因修饰的概率，导致发生基因重组的风险明显升高，故这样的 RNA 病毒相较于 DNA 病毒缺乏稳定性，并容易出现高毒力、适应环境能力好的新变种^[38]。基于这种特殊且多样的病毒结构特征，大多数冠状病毒都具有传播范围广、传播速度迅猛，感染率、发病率在短时间内飙升，遗传变异及重组现象频繁等特点，德尔塔冠状病毒属成员 PDCoV 同样如此（如图 5）^[39]。除此之外，猪 δ 冠状病毒凭借其宿主受体的多样性，能够广泛感染多种鸟类与哺乳动物，并通过病毒粒子纤突蛋白的保守结构域与多种受体相互作用，来进一步打破物种屏障，从而实现跨远缘物种传播的可能性^[40]。

已有研究表明，PDCoV 能将包括猪、猫、人、鸡等在内的多种宿主^[41]APN 及同源 APN 作为功能性进入受体^[42]，有效地入侵易感猪细胞（如 ST、IPI-I2 细胞）及其他稳定表达 pAPN 的非敏感细胞（如 HeLa、Vero 及 BHK-21 细胞）^[43]；当易感细胞敲除

APN 受体后, PDCoV 仅表现为低水平的感染效果, 但并未完全阻断其入侵, 表明 APN 受体可作为 PDCoV 感染的非必须依赖性受体; 同时, 也存在 APN 之外的其他未知受体来帮助 PDCoV 的附着与进入^[44]。2019 年, Liang 等人将 PDCoV HNZK-20 毒株接种至不同品系的鸡胚及 4 日龄 SPF 级别的雏鸡, 证明了 PDCoV 能够在鸡胚上连续传代, 而感染雏鸡仅表现轻微的腹泻症状及临床剖检病变, 同时也能在粪便样本、肠道及肠道内容物样本中检测到一定拷贝数的病毒 RNA^[45]。Zhang 等人^[46]和 Liu 等人^[47]也通过小鼠攻毒实验证明 PDCoV 能够感染 C57BL/6J 小鼠及 BALB/c 小鼠, 并表现出一定的组织趋向性, 肠道组织及部分肺部组织出现明显病变。2021 年, 研究学者在调查海地儿童的患病情况时, 首次于患有热性病的人类血液样本中检测到了 PDCoV 的核酸序列, 通过病毒演化分析, 发现该毒株是由中国毒株重组而来。这项研究结果提示 PDCoV 是潜在的人畜共患病原体, 具有跨越物种屏障的能力, 极有可能演变为具有威胁性的公共卫生安全问题^[48]。

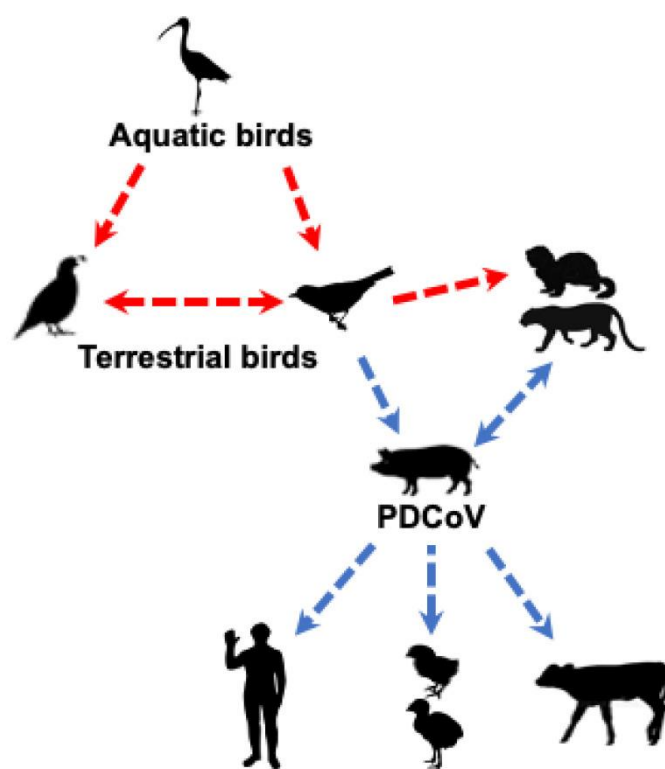


图 5 冠状病毒种间传播示意图 (Thakor, et al. 2022) ^[48]

Figure 5 Diagram of Interspecific Transmission of Coronavirus

2.5 猪 δ 冠状病毒的临床诊断检测

由于 PDCoV 与同一冠状病毒科成员 (SADS-CoV、TGEV、PEDV) 引起的腹泻症

状和病死猪的病理剖检变化具有高度的相似性，难以通过临床基础检查及流行特征进行鉴别诊断，因此，建立准确、快速的 PDCoV 实验室检测方法对于猪病毒性腹泻疾病的早期诊断及防控是具有重要意义的。目前，病原学（抗原）检测与免疫学（抗体）检测技术是 PDCoV 疾病确诊的 2 种主要手段。病原层面的诊断方法一般包括病毒粒子的电镜观察、病毒核酸的 PCR 检测和病毒的分离培养。

2015 年，Jung 等研究人员首次借助电子显微镜（EM）观察到了中央呈圆形、王冠状结构呈环形围绕的 PDCoV-OH-FD22 病毒粒子外观^[49]。电镜技术能将病毒粒子的超微形态结构、外观及直径大小可视化，但由于灵敏性较低，对被检样本的质量、浓度要求较高，需要专业技术人员利用昂贵的仪器设备对样本进行提纯及观察，故该技术常作为病原学研究的辅助工具，而并非临床检测。病毒分离是深入开展病原学调查和发病机理研究的基础，同样需要具备一定的知识技能的专业人士，并且通过辨别 PDCoV 的典型 CPE（细胞呈葡萄串状聚集、单个细胞变圆及脱落等）仅能做出初步判断，还需要配合其他分子生物学检测结果才能确诊，周期长、难度大，因此也不是首选的临床病原检测手段^[50]。

2.5.1 PDCoV 的核酸检测方法

核酸检测技术是当前病毒性疾病诊断中最为便捷、准确、有效的实验室诊断方法之一，除了传统 RT-PCR 技术，近年来一大批多重或新型病原核酸的检测方法不断问世，应用前景十分广泛^[51]。2015 年，Pang 等人利用 PDCoV 的 N 基因设计出用于华东地区 526 份临床样品检测的特异性引物，成功建立了一种有效应用于临床的 RT-PCR 方法^[52]。2016 年，Zhang 等人基于 PEDV 的 N 基因及 PDCoV 的 M 基因成功建立了一种能够同时检测两种猪腹泻病毒的 RT-iiPCR 方法^[53]。2017 年，Xiao 等人同样根据 N 基因的保守序列建立了一种基于 Taq Man 探针法的荧光定量 PCR 检测技术，对 2015-2016 年采集于新疆、江苏等地的 194 份临床样品进行检测，用此方法检出 PDCoV 的准确率及检出率明显高于常规 RT-PCR 检测^[54]。同年，Zhang 等人基于核衣壳基因首次开发出了一种用于 PDCoV 检测的单管一步 RT-LAMP 方法，该方法的灵敏性是传统 PCR 方法的 100 倍^[55]。2019 年，Dong 等人结合纳米技术，利用针对 PDCoV M 基因的引物建立了一种特异性更强、灵敏度更高的纳米 PCR 检测方法^[56]。2021 年，Zhao 等人基于 N 基因建立了一种反应时间短、操作简便的重组酶介导核酸等温扩增荧光法（RT-RAA），该方法能够检测拷贝数低至 10 copies/ μ L 的病毒样品，在 39°C 恒温条件下反应 30 min 即可快速得到结果^[57]。2022 年，Zeng 等人结合侧向层析试纸（LFD）技术，以 PDCoV ORF1b 基因序列中最为保守、长约 214 bp 的区域作为检测靶标，建立了一种能够用于

PDCoV 检测的视觉化方法, 即 RT-RAA-LFD, 为猪德尔塔冠状病毒疫情的临床现场检测提供了新型、快速、高效的技术手段^[58]。

2.5.2 PDCoV 的血清学检测方法

基于抗体的血清学检测方法主要包括免疫荧光技术 (IFA)、酶联免疫吸附技术 (ELISA)、病毒中和实验 (VNT)、及免疫层析技术。免疫荧光技术常作为 PDCoV 实验室定性检测及猪群抗体水平监测的常用技术手段。2016 年, Faten Okda 等人将肠道病料中的 PDCoV 接种于 ST 细胞, 随后, 利用针对 PDCoV 核衣壳蛋白的单克隆抗体对其进行荧光抗体检测, 但这种 IFA 检测方法并不利于 PDCoV 早期感染的临床样品检测^[59]。2023 年, Li 等人利用中和抗体实验进一步评估了 S 蛋白亚单位疫苗与 PDCoV 灭活苗对仔猪及母猪的保护力^[60]。通过病毒的中和实验能够检测畜禽体内具有保护性作用的中和抗体, 是疫苗研究过程中重要的效果评价指标, 但同样不适用于 PDCoV 的临床初筛。

研究人员利用酶联免疫吸附技术进行检测时, 能够实现同时检测大量临床样品, 因此是国际上用于病毒性疾病初步检测的重要方法之一。冠状病毒的 ELISA 诊断试剂大多基于全病毒或体外表达相对保守的结构蛋白, 从而建立检测血清抗体的间接 ELISA、竞争 ELISA 及夹心 ELISA 等方法, 对于大规模的临床诊断及免疫后抗体水平的监测有着重要意义。2017 年, Luo 等人为了研究我国河北省猪群 PDCoV 的流行情况, 建立了一种基于原核重组 M 蛋白的间接 ELISA 方法, 以此对来自河北省 40 个猪场的 871 份样本进行检测, 结果显示, 有 11% 的样本呈 PDCoV 阳性^[61]。2021 年, Wang 等人利用针对 PDCoV N 蛋白的鼠源单抗及兔源多抗, 开发了一种比间接 ELISA 特异性更强的双抗体夹心 ELISA 方法, 该方法能够检测病毒含量为 10^3 TCID₅₀/mL 的样本, 灵敏性极高^[62]。2022 年, Wang 等人以 IFA 检测方法为参照, 用 384 份猪血清样本来评价基于 PDCoV N 蛋白建立的阻断 ELISA 检测方法, 结果显示, 相较于荧光测定方法, 该方法的检测速度快、性价比高, 因此更易于商业化量产^[63]。

2.6 猪 δ 冠状病毒的防控策略

作为新发的猪病毒, PDCoV 在试剂诊断、药物治疗、疫苗防控方面均存在着短板, 因此同其他引起猪腹泻的冠状病毒一样, 都遵循着“预防为主, 防重于治”的原则。此外, 尤其应注重加强免疫系统尚未发育完全的仔猪和怀孕母猪的各个饲养管理环节, 提升易感猪群的免疫力及健康水平; 并及时切断传染源, 对确诊为 PDCoV 阳性的个体进行隔离, 重视消毒工作, 充分做好该病的防控、减少混合感染^[64]。

3 腺病毒载体概述

疫苗接种是当前保障畜禽安全生产、防御传染性疾病大规模爆发、控制疫情蔓延的重要措施，常规用于病毒性疾病的传统畜禽疫苗主要是以安全性高、稳定性好为特点的减毒活疫苗及全病毒灭活疫苗，应用十分广泛^[65]。随着以 DNA 重组和基因编辑为代表的基因工程技术不断发展进步，研究人员将相关疫苗研制的重点逐渐向基因工程疫苗过渡。目前，已在临床上得到应用的新型兽用疫苗包括亚单位疫苗、合成肽疫苗、核酸疫苗及重组活载体疫苗等，在保护效力、经济成本、安全性能、生产速度等方面均有着其独特的优势^[66]。病毒活载体疫苗是将病原基因组中具有保护作用或致病作用的特异性功能片段克隆至毒力较弱的病毒载体，是能够诱导机体产生保护性应答作用的活疫苗，主要可分为 DNA 病毒载体及 RNA 病毒载体。在众多 DNA 病毒载体中，腺病毒（adenovirus, AdV）因具有极好的安全性、优越的免疫原性及良好的外源基因容纳性，被视为是当前基因工程疫苗及基因靶向治疗研究中热度最高、前景最广的首选病毒载体之一^[67]。

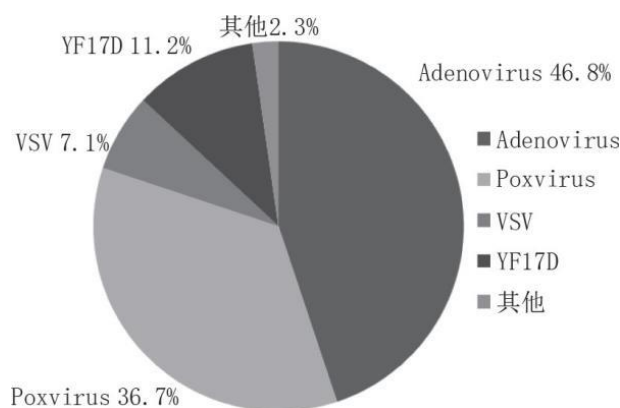


图 6 用于临床试验的病毒载体 (数据来源于 clinicaltrials.gov)^[67]

Figure 6 Virus vectors for clinical trial

3.1 腺病毒的生物学特性

腺病毒（AdV）于 1953 年被成功分离，是一种结构呈对称状、遗传物质为 DNA、基因组长 34-43 kb 的无包膜二十面体病毒（如图 7），由含有遗传物质的核心蛋白及呈 20 面体排列围绕于核心外部的衣壳蛋白组成粒子直径为 70-100 nm 的病毒颗粒^[68]。其基因组的两端含有触发病毒复制的反向末端重复序列（ITRs），核心区域的构成是负责调节转录的非结构蛋白和参与病毒粒子包装、成熟的结构蛋白，前者编码了控制病毒

入侵的早期表达基因（包含 4 个转录区：E1-E4），而后者编码了晚期表达基因（包含 5 个转录区：L1-L5）^[69]。

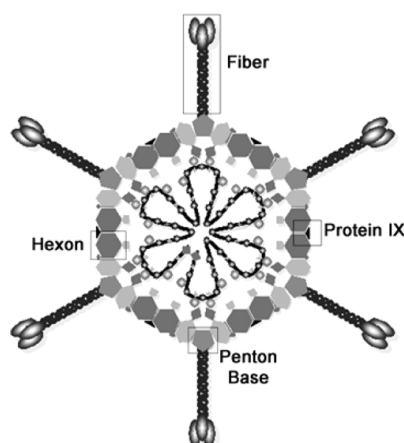


图 7 腺病毒形态结构示意图^[69]

Figure 7 Schematic diagram of adenovirus morphology and structure

AdV 在入核后第一个被激活转录的 E1A 基因编码了病毒基因组的转录调控物，负责启动病毒的复制及调节其余各基因的表达；早期基因在完成转录、翻译后，调控晚期启动子（MLP）才得以激活，随后晚期基因开始表达^[70]。当部分或完全缺失早期启动转录区域的腺病毒感染靶细胞时，难以在普通细胞完成病毒粒子的正常复制，但仍通过提供互补基因的包装细胞（如 HEK-293 细胞）来进行稳定增殖。利用这种方法制备出的复制缺陷型腺病毒（replication defective adenoviruses, RDAd）在作为疫苗载体使用时，能减弱病毒载体自身对机体的免疫副作用，安全性更高^[71]。根据其血凝特性的不同，将目前已发现的 100 多种腺病毒分为了 7 大亚群（A-G），而被广泛用于临床疫苗研究的腺病毒是 C 亚群的人血清型腺病毒 Ad Hu2 和 Ad Hu5。

3.2 腺病毒载体表达系统的优点

在多种基因递送载体中，腺病毒作为病毒载体在携带病原目标抗原或靶向功能性基因方面具有更为突出的优势，主要体现在以下几点：（1）相较于逆转录病毒、慢病毒等其他病毒载体，腺病毒庞大的基因组构成决定了其包装容量足够大、方便克隆操作等特点，因此能够有效携带基因组较大的目的片段，甚至能在同一细胞株表达两个以上的外源基因；（2）利用 AdMax、AdEasy 等腺病毒包装系统拯救出的重组病毒生长滴度高、增殖速度快，因此能在 GMP 条件下实现批量生产，同时快速投入临床应用^[72]；（3）由重组腺病毒表达的靶基因能够稳定转导至宿主细胞中，并且该基因整合至宿主

染色体中的概率近乎于零,不会因基因快速重排而发生突变、失活,因此大大降低了安全隐患,该载体的安全性更高、稳定性更好^[73]; (4) 腺病毒的宿主嗜性较为广泛,能够感染多种哺乳动物的各种细胞,包括增殖性细胞及原代非增殖性细胞^[74]; (5) 腺病毒作为载体疫苗使用时,除了能通过肌肉注射、皮下注射的方式使哺乳动物体内的免疫系统快速激活,在无佐剂辅佐的条件下,也可以通过滴鼻注射、口服免疫等方式进入呼吸道及消化道,以此来增强局部的黏膜免疫反应^[75]。

3.3 腺病毒载体疫苗在猪病防控中的应用

近年来,腺病毒载体在人畜肿瘤性疾病及传染性疾病中的应用备受青睐,于猪病防控中,在腹泻相关病毒、非洲猪瘟病毒、猪圆环病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒等多种病毒疫苗的研发种尤为常见。2007 年, Wang 等人发现表达 PCV-2 衣壳蛋的重组腺病毒 (rAd-Cap) 能够保护猪群免受 PMWS 的侵害^[76]。2017 年, Shehnaz Lokhandwala 等人构建了 6 种表达 ASFV 功能性抗原的重组腺病毒 (A151R、B119L、B602L、EP402R Δ PRR、B438L、K205R-A104R), 以评估 ASFV 重组腺病毒疫苗的免疫效果; ELISA 检测结果显示,除 Ad-EP402R Δ PRR 免疫组外,大多数商品猪在经过数次免疫后能够引发机体产生较高水平的 ASFV 抗原特异性 IgG^[77]。2018 年, Xia 等人证明了利用腺病毒载体表达 CD163 及 Sn 两种病毒可溶性受体对于感染 PRRSV 的猪只具有一定抗病毒保护作用,相比于对照组,接种疫苗的感染仔猪临床症状较轻、引起的病毒血症较弱^[78]。Zhang 等人将密码子优化后的 PDCoV S 及 S1 基因分别构建至重组 5 型腺病毒载体中,以制备 PDCoV 病毒载体疫苗,并比较不同的免疫方式对 BALB/c 小鼠疫苗免疫效果的影响。结果表明,通过肌肉注射 Ad-PD-tPA-Sopt 及 Ad-PD-oriSIP-S1opt 能够诱导小鼠分泌高滴度的特异性 IgG 抗体及中和抗体,血清细胞因子 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等的检测结果进一步说明了重组腺病毒能够诱导强烈的细胞免疫反应,而通过口服灌药的方式未能有效激活相应的黏膜免疫应答^[79]。2023 年, Song 等人构建了表达 PEDV 新型变异亚群 (G2b) S 基因的重组病毒 rAd5-PEDV-S, 将其作为免疫原对分娩前的怀孕母猪进行接种,结果显示,免疫母猪血清中的 IgG、初乳中的 IgA 含量明显升高,抗体滴度可达 10^4 ; 并且免疫母猪所产仔猪在受到 PEDV 感染后的肠道病理损伤明显减弱,因此临床腹泻症状也相较于对照组稍轻,这样的被动哺乳免疫有利于保护新生仔猪免受 PEDV 的侵害^[80]。

4 研究目的和意义

在全球规模化养殖猪场中，PDCoV 是当前呈上升趋势流行的的重要病原，猪群感染 PDCoV 后引起的腹泻症状、病理变化与 PEDV 所引起的临床表现十分相似。但由于腹泻型疾病常伴有多种腹泻病原的混合感染，并且 PDCoV 的发现时间略晚、研究也相对匮乏，同时尚未研制出能提供保护性作用的商用疫苗，无疑给 PDCoV 的检测诊断与预防控制增加了困难。因此，本研究采集了来自中国广西地区多个猪场的腹泻病料，并对检测结果呈阳性的 PDCoV 毒株进行了分离鉴定及全基因组演化分析，为丰富猪德尔塔冠状病毒的遗传变异情况及广西省 PDCoV 基因本底提供了流行病学信息。另一方面，本研究利用表达 PDCoV S 基因的重组腺病毒作为主要免疫原，结合原核重组蛋白制定不同的免疫程序，以制备更多针对 PDCoV S 蛋白天然构象的单克隆抗体，同时监测免疫过程中小鼠保护性抗体的产生水平，为进一步深入 PDCoV 相关基础研究并及时开展疫苗、诊断试剂的研发提供有力的工具及科学依据。

第一章 广西 PDCoV 毒株的分离鉴定与序列分析

PDCoV 是一种新发的接触性肠道病原,能感染各日龄猪群,导致严重腹泻型疾病,尤其侵害初生及哺乳期仔猪。三周龄内的新生仔猪在感染后会迅速发生急性、持续性水样腹泻,并伴有不同程度的嗜睡、低热、呕吐等症状,最后常因脱水而亡,死亡率约为 30-40%,较 PEDV 稍低^[81]。2012 年,来自中国香港的研究人员首次检测出了 PDCoV,并报道了其完整的基因组序列。此时,由于 PDCoV 在当地并没有导致猪群出现明显的患病症状,该病毒的危害性及致病性尚未成为研究人员的关注重点;自 2014 年在美国突然大规模爆发后,PDCoV 迅速蔓延至周围临近国家地区^[82],造成仔猪的死亡率、母猪及育肥猪的患病率急剧飞增,给各国生猪养殖产业的持续健康发展带来了巨大的经济损失。

因此,本研究在 2021-2022 年间不断从广西采集腹泻猪的临床病料,通过 RT-PCR 的方法对其进行检测,并对阳性样本进行临床分离及传代培养,采用分段扩增的方式以获得其全基因组序列。本研究为深入了解 PDCoV 在广西地区的演变及流行提供了有利的信息,帮助我们进一步掌握该地区 PDCoV 的传播及感染情况,也有助于制定防控猪病毒性胃肠疾病的全新策略。

1 材料

1.1 病料来源

2021-2022 年从广西某猪场采集腹泻猪及病死仔猪的肠道组织、肠道内容物、粪便样本、肛拭子等临床病料,于-80℃超低温冰箱保存,以供后续检测。

1.2 细胞、菌种及载体

细胞: LLC-PK1 (猪肾) 细胞、ST (猪睾丸) 细胞由本实验室保存。

菌种: 质粒构建所用的大肠杆菌 Top 10 感受态细胞由本实验室保存。

载体: pMD19-T 克隆载体购于 Takara 公司。

1.3 主要试剂

实验过程中涉及的主要试剂见表 1-1。

表 1-1 试剂与材料

Table 1-1 Reagents and materials

实验用途	试剂与材料	公司
分子克隆 相关实验	反转录试剂盒 (Hifair® AdvanceFast 1st Strand cDNA Synthesis Kit)	翌圣生物科技 (上海) 有限公司
	PCR 纯化试剂盒、胶回收纯化试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
	质粒 DNA 小提试剂盒	Omega Bio-Tek 公司
	病毒 RNA 提取试剂盒	天根生化科技 (北京) 有限公司
	DNA 高保真聚合酶	宝生物工程 (大连) 有限公司
	常规 PCR 酶 (<i>TaKaRa Ex Taq</i> ®)	宝生物工程 (大连) 有限公司
	相关限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、	宝生物工程 (大连) 有限公司
	DNA 分子标准	宝生物工程 (大连) 有限公司
	溴化乙锭核酸染料 (EB)	北京索莱宝公司
	氨苄青霉素钠粉末、IPTG 粉末	北京索莱宝公司
细胞培养 相关实验	胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)	苏州双洮生物科技有限公司
	DMEM、MEM 培养基粉末	Gibco 公司
	胰蛋白酶磷酸盐肉汤 TPB 粉末	Sigma 公司
	HAT (50X)、HT (50X) 培养基添加剂	北京博奥龙公司
	Lipofectamine 3000 转染试剂(L3000015)	赛默飞世尔科技有限公司
	青链霉素溶液	Solarbio 公司
其他实验	PEG1500 (Polyethylene Glycol 1500)	Sigma 公司
	超敏 ECL 化学发光试剂盒	苏州新赛美生物科技有限公司
	HRP 标记的山羊抗鼠 IgG	Abbkine 公司
	RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司
	Dylight 488 标记的山羊抗鼠 IgG	ABclonal 公司
	甲醇、无水乙醇、液体石蜡	国药集团

1.4 主要溶液及相关试剂的配制

实验过程中涉及的主要试剂见表 1-2。

表 1-2 溶液与试剂的配制

Table 1-2 Solution and reagent configuration

实验用途	试剂名称	试剂配制
分子克隆 相关实验	0.1 g/mL 氨苄青霉素溶液	称取 10 g 氨苄霉素粉末于烧杯，溶解于 80 mL 去离子水并定容至 1 L，用 0.22 μm 的滤器过滤，分装后于 -20°C 保存。
	LB 液体培养基	称取 NaCl 10 g, Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g 于 1 L 去离子水中，充分溶解后经高压蒸汽灭菌处理，于室温保存备用。
	LB 固体培养基	称取 NaCl 10 g, Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g 于 1 L 去离子水中，充分溶解混匀后加入 15 g 琼脂粉 Agar，经高压蒸汽灭菌后适当冷却，约 50°C 时加入所需抗生素，混匀后倒入干烤灭菌的玻璃平皿，凝固后倒置存放于 4°C 冰箱备用。
	1% 琼脂糖凝胶	于 30 mL 1×TAE 溶液中加入 0.3 g 琼脂糖粉末，置于微波炉融化，冷却后加入适量的 EB 溶液，混匀后倒入制胶板备用。
间接免疫 荧光实验	4% 多聚甲醛液	称取 4 g 多聚甲醛粉末于 100 mL PBS 缓冲液中，充分溶解后于 4°C 保存。
	4% BSA 封闭溶液	称取 4 g BSA 粉末于 100 mL PBS 缓冲液中，经 0.22 μm 滤器过滤后分装，置于 -20°C 保存备用。
	0.2% Triton X-100 溶液	取 200 μL Triton X-100 于 100 mL PBS 缓冲液中，待充分溶解后于 4°C 保存备用。
	1×TBST 缓冲液	称取 NaCl 8.8 g 于 800 mL 去离子水，加入 20 mL 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 及 1 mL Tween-20，混匀后定容至 1 L 备用。
蛋白免疫 印迹实验	5×Loading Buffer ⁴	称取 0.2 g BPB (溴酚蓝) 粉末，4 g SDS 于 20 mL 甘油中，加入 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 10 mL，待充分溶解后用去离子水定容至 40 mL，分装后于 -20°C 保存。
	1×SDS-PAGE 溶液	称取 Tris 3.02 g, Glycine 18.8 g, SDS 1 g，加入 800 mL 蒸馏水，充分溶解后用蒸馏水定容至 1 L，常温保存。
	5% 封闭液	称取 1 g skim milk 粉末于 20 mL TBST 缓冲液中，充分溶解。
	考马斯亮蓝染色液	称取考马斯亮蓝 R-250 于含有 100 mL 冰醋酸、250 mL、500 mL 蒸馏水的烧杯中，充分溶解后用蒸馏水定容至 1 L 备用。
	考马斯亮蓝脱色液	量取 50 mL 冰醋酸、25 mL 乙醇于烧杯中，并定容至 500 mL。

细胞培养 相关实验	2×DMEM 液体培养基	在超净工作台将 1 袋商品化的 DMEM 粉末（1 L 装/袋）充分溶于 400 mL 超纯水中，加入 3.7 g NaHCO ₃ 调节 pH，混匀后定容至 500 mL，利用滤膜过滤器过滤除菌，于 4℃ 保存。
	细胞生长液	含 10% 胎牛血清、1% 双抗（青霉素+链霉素）的 DMEM 基础培养基，混匀后于 4℃ 保存备用。
	冠状病毒生长专用培养基	含 10% TPB、1% 双抗（青霉素+链霉素）、2 μg/mL 胰酶的 DMEM 培养基，混匀后于 4℃ 保存备用。
	1×PBS 缓冲液	称取 NaCl 8 g，KCl 0.2 g，Na ₂ HPO ₄ 1.42 g，KH ₂ PO ₄ 0.27 g 于 800 mL 去离子水中，充分混匀后定容至 1 L，高压灭菌后于常温保存备用。
	2% 低熔点琼脂	称取 2 g 低熔点琼脂粉末充分溶于 100 mL 去离子水中，高压灭菌后于常温保存备用。

用于化学转化 Top 10 感受态细胞的制备（CaCl₂ 法）

① 将实验室保存的 Top 10 菌种以 1:100 的比例接种于 4 mL 未添加抗生素的 LB 培养基中，置于 37℃ 的细菌培养摇床震荡培养 12 h。

② 将上述活化好的菌液转接中至 80 mL LB 未添加抗生素的 LB 培养基中，37℃，220 r/min 条件下震荡培养至菌液呈云雾状（菌体浓度 OD 值约 0.4-0.6）。

③ 将菌液置于冰上进行预冷，15 min 后通过离心（4℃、5000 g）收集至 50 mL 无菌离心管中，弃去全部上清。

④ 在离心管中加入 20 mL 预冷的 CaCl₂ 溶液（0.12 mol/L），轻拍管壁使菌体沉淀重悬至 CaCl₂ 溶液，于冰上静置 10 min 后再次以相同条件离心，弃去全部上清。

⑤ 在离心管中加入 6.4 mL 预冷的 CaCl₂ 溶液及 1.6 mL 80% 甘油，轻拍混匀后分装至 1.5 mL 离心管（每管 0.1 mL），于 -80℃ 保存备用。

蛋白胶的配制：如 8% SDS-PAGE 分离胶。首先，在配胶管内加入去离子水 2.3 mL、1.5 mol/L Tris-HCl（pH 8.8）溶液 1.3 mL、30% Acrylamide 溶液 1.3 mL、10% SDS 溶液 0.05 mL、10% 过硫酸铵溶液 0.05 mL 及 TEMED 溶液 2 μL，移液器吹打混匀后，匀速加入至制胶架的玻璃板中央，并用乙醇将胶面压平，在室温下静置 10-30 min。

5% SDS-PAGE 浓缩胶：待下层分离胶凝固后，弃去乙醇溶液并配制浓缩胶。取去离子水 2.1 mL、1 mol/L Tris-HCl（pH 6.8）溶液 0.38 mL、30% Acrylamide 溶液 0.5 mL、10% SDS 溶液 0.03 mL、10% 过硫酸铵溶液 0.03 mol 及 TEMED 溶液 3 μL，移液器吹打混匀后匀速加入制胶板，最后插入排梳，静待凝固。

1.5 主要设备和仪器

实验过程中主要涉及的设备与仪器见表 1-3。

表 1-3 设备与仪器

Table 1-3 Equipment and instruments

设备及仪器名称	公司名称
-80℃超低温冰箱、冰箱	海尔集团股份有限公司
超净工作台、生物安全柜	北京东联哈尔仪器制造有限公司
匀浆仪	南京中科拜耳医学科技有限公司
生化培养箱	上海新苗医疗器械有限公司
PCR 仪	德国耶拿分析仪器股份公司
迷你混合仪器、微型离心机、金属浴仪器	杭州米欧仪器有限公司
恒温振荡培养箱、大型冷冻高速离心机	南京中科拜耳医学科技有限公司
高压蒸汽灭菌锅	驰通仪器有限公司
恒温振荡培养箱、大型高速离心机	上海知楚仪器有限公司
制冰机	常州雪科制冷设备有限公司
废液抽吸仪	美国 WELCH
超纯水仪	南京易普易达科技有限公司
电动移液器、移液枪	德国 Eppendorf 公司
普通光学显微镜、倒置荧光显微镜	德国 Leica 公司
垂直电泳系统、水平电泳系统	北京凯元信瑞仪器有限公司
恒温水浴锅	美国精骐有限公司
琼脂糖凝胶电泳仪、化学发光成像仪	上海天能科技有限公司
超声破碎仪	南京先欧仪器制造有限公司
核酸蛋白浓度检测仪	杭州遂真生物技术有限公司
高压蒸汽灭菌锅	驰通仪器有限公司
微波炉	美的集团股份有限公司
电子天平	奥豪斯仪器（上海）有限公司
微量高速离心机	南京中科科学器材有限公司

2 方法

2.1 腹泻病料样品的处理

将来自各猪场的临床腹泻病料做好样品记录,按照下述方式对不同样本进行处理,期间应注重器械的消毒灭菌以避免交叉污染,其余原始病料冻存于-80℃冰箱。吸取适量呈液状的肛拭子样品、肠道内容物及稀粪样本于组织研磨管中,用含有青霉素-链霉素溶液的 1×PBS 缓冲液(pH=7.4)以 1:10 的比例进行稀释;将灭菌后的手术剪及镊子经酒精灯火焰灼烧,取黄豆大小(1 cm×1 cm)、眼观病变明显部位的肠道组织,剪碎后置于组织研磨管,加入 3-5 倍体积含有青霉素-链霉素溶液的 1×PBS 缓冲液(pH=7.4)。在组织研磨管中加入 2-3 颗研磨珠,待配平后经组织匀浆仪进行充分研磨,制成均匀的匀浆样品,置于-80℃冰箱反复冻融 2-3 次。最后,将融化后的样品在冷冻离心机中以 4℃、12000 g 的条件离心 15 min(可弃去沉淀,多次离心至液体透亮),吸取上清至新的离心管。取部分液体用于 RT-PCR 鉴定,其余在超净工作台中经 0.22 μm 的除菌滤膜过滤,分装于高压灭菌的 1.5 mL 离心管,冻存于-80℃冰箱备用。

2.2 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成

参照购于天根生化科技(北京)有限公司的病毒 RNA 提取试剂盒(TIANamp Virus RNA Kit)说明书进行病毒 RNA 的提取,具体操作主要如下:

- ① 取 5.6 μL Carrier RNA 溶液(冰上溶解)于 560 μL 裂解液 RL 中,颠倒混匀。
- ② 取 140 μL 病毒液至上述配制好的裂解液,震荡 15 s 后于室温下静置 10 min。
- ③ 在微型离心机简短离心后加入 560 μL 预冷的无水乙醇,将混液于涡旋仪上震荡 15 s,并适当静置。
- ④ 将③中的混合溶液转移至 RNase-Free 吸附柱中,常温条件下 10000 g 离心 1 min,弃去收集管中的废液。
- ⑤ 在吸附柱中加入 500 μL 由无水乙醇稀释好的溶液 GD,常温条件下 10000 g 离心 1 min,弃去收集管中的废液。
- ⑥ 在吸附柱中加入 500 μL 由无水乙醇稀释好的溶液 RW,常温条件下 10000 g 离心 1 min,弃去收集管中的废液,并重复此操作。
- ⑦ 常温条件下 12000 g 离心 3 min,将含有核酸的吸附柱置于 RNase-Free 离心管,并开盖挥发酒精 1-3 min。

⑧ 在吸附柱吸附膜中央加入 45 μL 洗脱液，在室温条件下孵育 5 min。

⑨ 室温下 10000 g 离心 2 min，收集 RNA 样品并分装后保存于 -80°C 备用。

参照反转录试剂盒 Hifair® AdvanceFast 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书，以提取的病毒核酸为模板，在 RNase-free PCR 管中按照下表反转录体系进行配置。

表 1-4 RNA 反转录体系

Table 1-4 RNA reverse transcription system	
组分	使用量
4×Hifair® AdvanceFast SuperMix	5 μL
Oligo d(T)18 Primers (50 μM)	1 μL
Random Primers	1 μL
Total RNA	10 pg-500 ng
RNase-free Water	To 20 μL

将配好的反应体系用移液枪轻轻吹打混匀，简短离心收集管壁的液体，置于 PCR 仪中， 55°C 条件下孵育 5 min， 85°C 加热 5 s，完成后于 -20°C 保存备用。

2.3 样品 PCR 检测

综合分析 GenBank 中 PDCoV 毒株基因组的核酸序列，设计针对 PDCoV M 基因的特异性引物，作为腹泻病料中 PDCoV 的检测引物，引物信息如下表 1-5 所示。

表 1-5 PDCoV M 基因合成引物序列

Table 1-5 PDCoV M gene synthesis primer sequenc		
引物名称	引物序列	引物长度 (bp)
PDCoV-M-F	TGGGCGCTTGCGTCATCCTCCAA	24
PDCoV-M-R	CGACTGGTGTGAGAATTGGAGCCATGT	27

按照下表 1-6 所示的 PCR 反应体系配制，并将配好的反应体系用移液枪轻轻吹打混匀，简短离心后收集管壁的液体，置于 PCR 仪中。设置 PCR 反应程序： 98°C 3 min； 98°C 10 s， 55°C 10 s， 72°C 30 s，33 个循环； 72°C 延伸 5 min。反应结束后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳判断是否正确扩增目的条带。

表 1-6 M 基因的 PCR 反应体系

Table 1-6 PCR reaction system of the M gene

组分	使用量
ddH ₂ O	To 50 μ L
2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix	25 μ L
模板	300 ng
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L

2.4 阳性样品中 PDCoV 的分离

① 细胞复苏及传代培养：取一支本实验室冻存的 LLC-PK1 细胞并于 37°C 水浴锅中摇晃，使其快速融化；将冻存管内的细胞悬液转移至 10 mL 离心管，加入 2-3 mL 细胞培养基后于室温条件下 800 g 离心 5 min。弃去含有 DMSO 的上清，用培养基将细胞沉淀吹打至无团块状，将重悬后的细胞悬液转移至细胞培养瓶，于 37°C 细胞培养箱正常培养。待细胞密度达 90% 以上时进行细胞传代，弃去原有培养基，用高压灭菌处理的 1 $\times$ PBS 缓冲液（pH=7.2）清洗细胞两次，加入浓度为 0.05% 的胰酶以覆盖于细胞表面，于 37°C 静置 2 min，待细胞呈流沙状脱落时加入 3 mL 培养基，吹散后取适量细胞铺于 24 孔板，留 15% 的细胞于原 T25 培养瓶，摇晃均匀后放入细胞培养箱。

② 病毒的分离培养：待 24 孔板中的细胞密度达 70% 以上时进行病毒感染。弃去原有培养基，用高压灭菌的 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗细胞 2-3 次，加入适量含有 2 μ g/mL 胰酶的冠状病毒维持液。将先前冻存的临床样品提前置于冰上融化，并以一定的剂量梯度（10 μ L、50 μ L、250 μ L）感染细胞，于 37°C 培养箱孵育 2 h。随后进行换液，弃去全部上清，并用 PBS 清洗细胞一次，加入新的病毒维持液。置于 37°C 培养箱继续恒温培养，逐日观察是否有细胞病变产生。3 d 后收集病毒上清（将细胞板置于 -80°C 反复冻融后离心），作为 F1 代毒于 -80°C 保存。按照上述方法将 F1 代毒再次感染新的细胞，连续盲传至有明显细胞病变出现。

2.5 PDCoV 分离株的空斑纯化

将生长状态良好的 LLC-PK1 细胞均匀铺于 12 孔板中，待细胞生长至接近无空隙的状态时感染病毒。将已测定滴度的病毒液用病毒维持液进行 10 倍梯度稀释（至少 3 个稀释度，如 10⁴、10⁵、10⁶），并用高压灭菌后的 PBS 缓冲液清洗细胞 2-3 次，加入稀

释好的病毒液，于 37°C 培养箱孵育 1-2 h。在换液前的 30 min，将浓度为 2% 的低熔点琼脂（提前高压灭菌）于微波炉中融化，于室温下散热。待冷却至温度约 40°C 时，将 2% 低熔点琼脂与 2 倍比例的病毒维持液以 1:1 的体积混合均匀，并向细胞培养板中加入 2 mL 琼脂糖-培养基混合液，于室温下静置 1 h。待琼脂糖完全凝固后，将细胞培养板倒置于 37°C 培养箱持续培养，逐日观察细胞病变情况及空斑的形成。

当出现明显的细胞病变时，用 200 μ L 枪头挑取 3-5 个空斑位置所在的琼脂，分别接种于提前铺好的 24 孔板，逐日观察细胞病变情况。对未挑取空斑、拥有完整细胞单层的孔加入适量多聚甲醛-结晶紫混合液，于室温下过夜孵育，第二日弃去染液及覆盖在细胞表面的琼脂糖凝胶，待干燥后进行拍照记录。

2.6 PDCoV 分离株的 IFA 鉴定

① 细胞铺板及病毒感染：待 24 孔板中的 LLC-PK1 细胞铺单层密度达 70% 以上时，弃去原培养基，加入适量高压灭菌的 PBS 缓冲液清洗 2 次，加入适量含有胰酶的冠状病毒维持液，接入 100 μ L 病毒液，于 37°C 培养箱中持续培养 12-24 h。

② 固定细胞：约 40% 的细胞有明显变圆脱落的病变时，用 PBS 清洗细胞两次，加入 4°C 保存的 4% 多聚甲醛溶液，室温下固定 15 min。

③ 封闭及通透：弃去固定液，用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次。将浓度为 4% 的 BSA 与浓度为 0.2% 的 Triton X-100 溶液以体积 1:1 的比例混合（使混合液中二者的终浓度分别为 2%、0.1%），每孔加入 150 μ L，室温下孵育 30 min。

④ 一抗孵育：提前用 PBS 缓冲液将本实验室制备的 PDCoV-M 单克隆抗体以 1:2000 的比例进行稀释，作为一抗备用；弃去封闭-通透混合液，用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次，用稀释好的一抗进行 4°C 过夜孵育。

⑤ 二抗孵育：弃去一抗，用 PBS 缓冲液洗涤细胞两次，加入以 1:1500 倍稀释的 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗，于室温条件下避光孵育 1-2 h。

⑥ 弃去二抗并洗涤细胞两次，在倒置荧光显微镜下观察荧光分布及拍照记录。

2.7 PDCoV 分离株生长曲线的测定

待铺于 6 孔板中的 LLC-PK1 细胞单层的密度达 70% 以上时，以 $MOI=0.01$ 感染 PDCoV 毒株，于 37°C 细胞培养箱培养，并在感染后的 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 分别收取 100 μ L 病毒液上清，于 -80°C 保存备用，并在原孔中补加同体积的病毒维

持液。进行病毒 TCID₅₀ 的测定时, 将收集的病毒液进行 10 倍梯度稀释, 每个稀释度做 4 孔重复, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 按照稀释度顺序依次加入到 96 孔板中, 并设置不感染细胞的孔作为阴性对照, 置于 37℃ 细胞培养箱中持续培养, 逐日观察细胞状况并记录病变的细胞孔。根据 Reed-Muench 法计算不同时间点病毒的 TCID₅₀, 随后后绘制成病毒的生长曲线。

2.8 PDCoV 分离株的全基因组序列测定

2.8.1 PDCoV 全基因组测序引物的设计与合成

综合比对分析 GenBank 中经典的 PDCoV 毒株序列, 设计数对能够覆盖 PDCoV 全长基因组的测序引物 (为了正确扩增并拼接完整的病毒基因组序列, 在分段时注意相邻片段之间应存在 100-200 bp 大小的重叠序列), 具体信息如下表 1-7 所示。

表 1-7 用于 PDCoV 毒株测序的引物序列

Table 1-7 Primer sequences for sequencing of pdcov strains

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度 (bp)
PDCoV-A0F	GAGTCCGTGAGGACGAAACGG	21
PDCoV-3863R	GTAAGTGACTCTGTGGATCCTTC	23
PDCoV-3510F	GATTGACGACAGCGCGTCGGAA	22
PDCoV-5036R	CAGGCTGTAGTTGCTGAAAATGC	23
PDCoV-4949F	GTCGTGTTGGTGAGATGGGTTGTC	24
PDCoV-9071R	GATCCTGGTTGGAGCCTTTCAAAC	24
PDCoV-8789F	CAGTTAAGATGGTAGGAGCTCTCCTCCAG	29
PDCoV-12566R	CCCAAACCAATCTTCAGGGGTTC	23
PDCoV-12363F	CTTTATACTACTGATGATACATTTGG	26
PDCoV-16535R	TTAAGTGCGTGTGCTGAATCAG	22
PDCoV-16521F	GCACACGCACTTAACATGGC	20
PDCoV-20031R	GTCATAATCAATAGAGCTCTCTGCAT	26
PDCoV-19903F	GTAAGCTAAAAGCAACGCCT	20
PDCoV-23330R	GAGCCAGGGCAATGGCAAGCC	21
PDCoV-22885F	GCAGCCTCAACTTATACTCTACCAG	25
PDCoV-25931R	ACAAAAGTTGAGATTATGCTGT	22
PDCoV-S-F	GCCACCAGAATGCAGAGAGCTCTAT	26
PDCoV-S-R	TATAATAGGCCTAACAAGATATGCTG	26

2.8.2 PDCoV 全基因组的分段扩增

将阳性样品的cDNA作为模板，利用购于Takara公司的高保真酶PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase进行分段基因的扩增，PCR反应体系如下表所示。

表1-8 PDCoV全基因组测序的PCR反应体系

Table 1-8 The whole PDCoV genome sequencing PCR reaction system

组分	使用量
cDNA 模板	500 ng
上游引物 F	1 μ L
下游引物 R	1 μ L
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	25 μ L
5×PrimeSTAR GXL Buffer	10 μ L
dNTP Mixture	4 μ L
灭菌水	Up to 50 μ L

将配好的反应体系吹打混匀，置于 PCR 仪并设置相应的反应程序：98℃ 3 min；98℃ 10 s，60℃ 15 s，68℃ 2 min，30 个循环；68℃延伸 5 min。待反应结束后通过琼脂糖凝胶电泳的核酸成像结果判断是否正确扩增目的条带。

2.8.3 目的片段的 PCR 纯化

参照 Omega Bio-tek 公司的 PCR 纯化试剂盒（E.Z.N.A®Cycle Pure Kit）纯说明书将 PCR 产物进行纯化，具体操作如下。

- ① 将 PCR 管中剩余的产物完全转移至新的 1.5 mL EP 管中，并加入 4-6 倍 PCR 产物体积的 CP Buffer，轻轻吹打混匀。
- ② 将混合液移至试剂盒配制的吸附柱，在室温下 12000 g 离心 1 min。
- ③ 弃去吸附柱外部收集管中的废液，并向吸附柱内加入 700 μ L DNA Wash Buffer，以相同的条件再次离心，并重复此步骤一次。
- ④ 弃去收集管中的废液，在室温条件下 12000 g 离心 2 min。
- ⑤ 弃去收集管，将吸附柱置于新的 1.5 mL EP 管，开盖挥发酒精 2 min，向吸附柱底部的膜中央加入 33 μ L 提前预热的洗脱液，静置 5 min，离心收集所需片段。

2.8.4 PDCoV 全基因组分段连接至 T 载体

利用 Takara 公司的 rTaq 酶对目的片段进行末端加 A 处理（即在基因序列的 3'端附上碱基 A），配置如下反应体系，于 PCR 仪中 72℃反应 30 min。

表 1-9 片段末端加 A 反应体系

Table 1-9 Reaction System of adding A at the end of fragment

组分	使用量
纯化的目的片段	30 μL
rTaq酶	0.5 μL
10 $\times$ PCR Buffer	1 μL
dNTP Mixture	1 μL
灭菌水	Up to 50 μL

按照上述“第一章 2.8.3”的方法对加 A 后的目的片段再次纯化，参照 Takara 公司克隆用 T 载体 T-Vector pMDTM19 使用说明书，配置如下连接体系，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

表 1-10 连接体系

Table 1-10 Connection system

组分	使用量
加A后的目的片段	4.5 μL
T-Vector pMD19	0.5 μL
Solution 1	5 μL

2.8.5 连接产物的转化

- ① 取出保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的 Top 10 感受态细胞，并立即置于冰上。
- ② 待感受态细胞融化后加入 5 μL 的连接产物，于冰上静置 30 min。
- ③ 在金属浴 42 $^{\circ}\text{C}$ 条件下热应激 90 s，于冰上冷却 2-3 min。
- ④ 在超净工作台内向离心管加入 800 μL LB 液体培养基（不含任何抗性），置于恒温摇床，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，160 g 振荡培养 45 min。
- ⑤ 取出离心管，室温条件下 5000 g 离心 3 min。
- ⑥ 弃去大部分上清，用剩余培养基重悬细菌沉淀，并接种至含氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基，并用涂布棒使菌液均匀覆盖于平板。
- ⑦ 将细菌培养平板倒置放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱，持续培养 16-24 h，待菌落形成。

2.8.6 阳性克隆的质粒提取

在进行质粒提取前，挑选数个平板中形状规则、大小均一的单菌落进行菌落PCR鉴定。在超净工作台中用已灭菌的枪头挑取鉴定为阳性的克隆，置于含有相应抗生素的LB液体培养基中，再将试管置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床，以220 r/min的转速持续培养12-16 h。随后，

参照Omega Bio-tek公司的质粒提取(E.Z.N.A[®] Plasmid DNA Kit)试剂盒说明书,提取相应质粒,具体操作如下。

- ① 收集菌体:将培养好的菌液通过离心的方式收集至 1.5 mL 离心管(12000 g 离心 1 min),弃去上清,简短离心后用移液器吸去残余液体。
- ② 重悬菌体:加入 250 μ L Solution I,在涡旋振荡仪上使菌体重悬至无块状沉淀。
- ③ 裂解菌体:加入 250 μ L Solution II,温和地颠倒混匀数次,使离心管内形成透明且粘稠的液体。
- ④ 中和裂解:加入 350 μ L Solution III,温和地颠倒混匀数次,使管内出现乳白色蛋清状沉淀,适当静置后在室温条件 12000 g 离心 10 min。
- ⑤ 将混合液移至试剂盒配置的吸附柱中,在室温下 12000 g 离心 1 min。
- ⑥ 弃去吸附柱外部收集管中的废液,并向吸附柱内加入 500 μ L HBC Buffer,在室温条件下 12000 g 离心 1 min。
- ⑦ 弃去吸附柱外部收集管中的废液,并向吸附柱内加入 700 μ L DNA Wash Buffer,在室温条件下 12000 g 离心 1 min,并重复此步骤一次。
- ⑧ 弃去收集管中的废液,在室温条件下 12000 g 离心 2 min。
- ⑨ 弃去收集管,将吸附柱转移至新的 1.5 mL 离心管,开盖挥发酒精 2 min,向吸附柱底部的膜中央加入 50 μ L 提前预热的洗脱液,静置 5 min 后离心。

2.8.7 PDCoV 全基因组序列的测序及组装拼接

将提取好的重组质粒送往擎科生物有限公司测序。随后利用DNASTAR的SeqMan软件依次将基因片段拼接,以获得PDCoV的全长基因序列。在拼接的过程中重叠部分碱基不同或测序峰图出现多峰及乱峰的区域,应再次扩增、克隆至T载体后重新测序,确保测序及拼接结果的正确性。

2.9 PDCoV 分离株的遗传进化分析

将拼接完整的 PDCoV 全基因组序列通过 BLAST 进行比对分析,选择近些年国内外具有代表性的毒株及各亚型中新出现的毒株序列作为参考,利用 MEGA 软件对 PDCoV 毒株全基因组序列及 S 基因序列进行系统发育分析。参考毒株的相关信息如表 1-11 所示。

表 1-11 参考毒株序列

Table 1-11 Sequence of PDCoV reference strain

Strain	Accession	Origin	Collection
HKU15-44	JQ065042	China : Hong Kong	2009
PDCoV/USA/Illinois121/2014	KJ481931	USA : Illinois	2014
PDCoV/USA/Ohio137/2014	KJ601780	USA : Ohio	2014
KNU14-04	KM820765	South Korea	2014
CHN-AH-2004"	KP757890	China : An Hui	2004
CHN-HB-2014	KP757891	China : He Bei	2014
CHN-JS-2014	KP757892	China : Jiang Su	2014
PDCoV/CHJXNI2/2015	KR131621	China : Jiang Xi	2015
CH/Sichuan/S27/2012	KT266822	China : Sichuan	2012
CHN-HN-2014	KT336560	China : He Nan	2014
OH11846	KT381613	USA : Ohio	2014
PDCoV/Swine/Thailand/S501	KU051641	Thailand	2015
P1_16_BTL_0115/PDCoV/20	KX118627	Laos	2016
PDCoV/Swine/Vietnam/Binh2	KX834352	Vietnam	2015
GNM-2/JPN/2014	LC260040	Japan : Gunma	2014
HKD/JPN/2016	LC260045	Japan : Hokkaido	2016
CHN-GD-2016	MF280390	China : Guang Dong	2016
SD	MF431743	China : Shan Dong	2014
CHN-GX01-2018	MK359104	China : Guang Xi	2018
CHzmd2019	MN781985	China : He Nan	2019
CHN-TS1-2019	MT663769	China : He Bei	2019

3 结果

3.1 腹泻病料的 RT-PCR 鉴定

提取数份临床病料样本的 RNA 并将其反转录为 cDNA，利用常见猪腹泻病毒（PDCoV、PEDV、TGEV、PRoV 等）的特异性引物进行 PCR 扩增，通过核酸电泳对腹泻病料进行初步检测。结果显示（图 1-1），有三份病料样本能够利用 PDCoV 特异性引物扩增出大小约为 300 bp 的目的条带，符合预期片段大小，而其他腹泻病原的检测结果为阴性，说明这三份不同的病料组织中含有 PDCoV。随后将其分别命名为 PDCoV-GX2021-1、PDCoV-GX-2022-1、PDCoV-GX-2022-2。

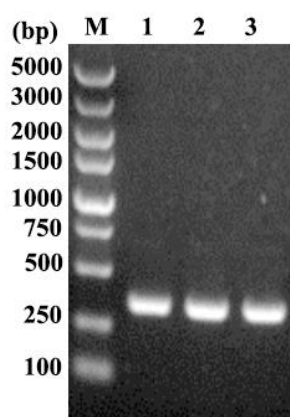


图 1-1 腹泻病料的 RT-PCR 检测

M. DL 5000 Marker; 1. 病料 1; 2. 病料 2; 3. 病料 3

Figure 1-1 Detection of diarrheal disease materials by RT-PCR

M. DL 5000 Marker; 1. Disease material 1; 2. Disease material 2; 3. Disease Material 3

3.2 PDCoV 毒株的分离培养

对 PDCoV 检测结果呈阳性的病料样本进行除菌处理，将上清液接种至 LLC-PK1 细胞，尝试对 PDCoV 毒株的分离及培养。由于在第一代并未观察到明显的 CPE 现象，我们将培养 3 d 的病毒上清反复冻融 3 次并进行病毒的盲传。在传至第 3 代时，细胞开始出现拉丝、变圆、脱落、死亡、聚集并悬浮在培养基中的细胞病变；而作为阴性对照的细胞生长无异常、且未发生病变（图 1-2）。

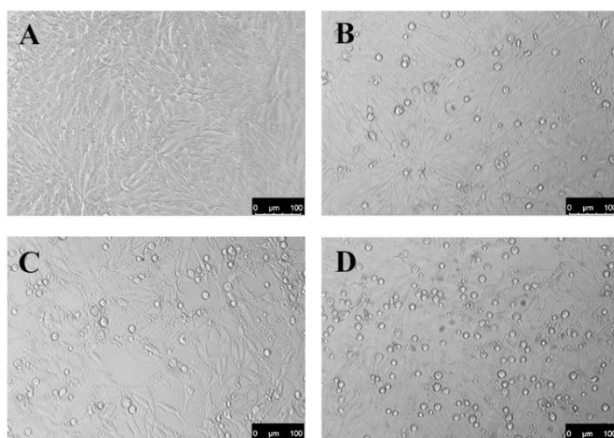


图 1-2 LLC-PK1 细胞感染第 3 代病毒产生的细胞病变 ($\times 20$)

A. 阴性对照细胞; B. PDCoV-GX2021-1 毒株感染组;

C. PDCoV-GX2022-1 毒株感染组; D. PDCoV-GX2022-2 毒株感染组

Figure 1-2 Cytopathological changes induced by third-generation virus infection in LLC-PK1 cells

A. Negative control cells; B. PDCoV-GX2021-1 strain infection group;

C. PDCoV-GX2022-1 strain infection group; D. PDCoV-GX2022-2 strain infection group

3.3 PDCoV 毒株的空斑纯化

利用低熔点琼脂覆盖法对分离的 3 株 PDCoV 野毒株进行纯化, 挑取单个空斑接种于新鲜的 LLC-PK1 细胞并进行培养, 即得到纯化后的 PDCoV 病毒液; 将其余的空斑进行固定、结晶紫染色, 并观察空斑的形态及大小。结果显示 (图 1-3), 空白对照细胞经结晶紫染色后呈大片的均匀紫色单层, 而接毒孔的细胞因病变形成了近乎圆形的无色空斑, 空斑大小约为 1-2 mm。

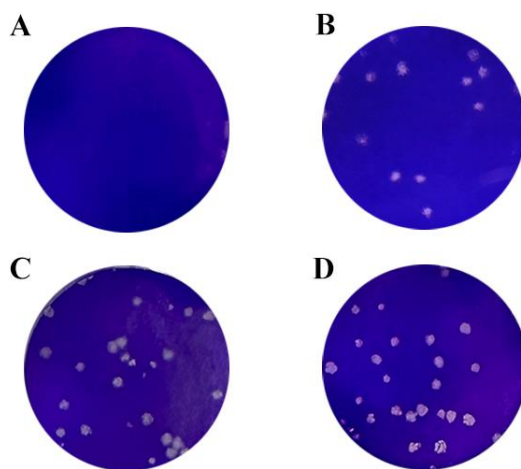


图 1-3 PDCoV 的空斑纯化结果

A. 阴性对照细胞; B. PDCoV-GX2021-1 感染 LLC-PK1 细胞;
C. PDCoV-GX2022-1 感染 LLC-PK1 细胞; D. PDCoV-GX2022-2 感染 LLC-PK1 细胞

Figure 1-3 Plaque purification of PDCoV

A. Negative control cells; B. PDCoV-GX2021-1 infected LLC-PK1 cells;
C. PDCoV-GX2022-1 infected LLC-PK1 cells; D. PDCoV-GX2022-2 infected LLC-PK1 cells

3.4 PDCoV 毒株的 IFA 鉴定

将纯化后的 3 株 PDCoV 野毒株分别接种至 LLC-PK1 细胞, 使用本实验室制备的 PDCoV-M 蛋白单克隆抗体作为一抗, 进行间接免疫荧光检测。结果显示 (图 2-4), 感染 PDCoV 分离株的 LLC-PK1 细胞能与抗 PDCoV-M 蛋白的单克隆抗体发生反应, 胞质呈现特异性的绿色荧光, 而未感染 PDCoV 的对照细胞未出现荧光。

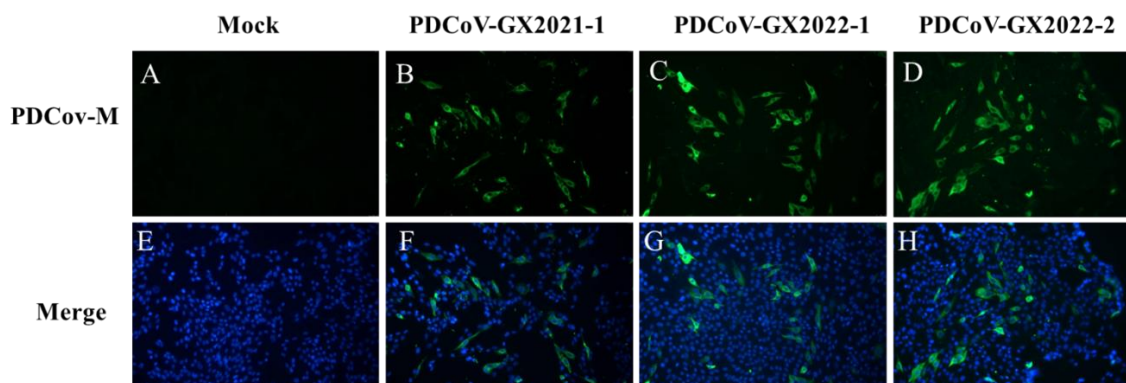


图 1-4 PDCoV 分离株在 LLC-PK1 细胞上的间接免疫荧光检测 ($\times 20$)

Figure 1-4 Indirect immunofluorescence assay of PDCoV isolate strain on LLC-PK1 cell

3.5 PDCoV 毒株生长曲线的测定

为进一步了解 PDCoV 广西分离株的生长特性, 采用 Reed-Muench 法在 LLC-PK1 细胞上分别测定 3 株 PDCoV 分离株 F3 代细胞毒的生长曲线。结果显示 (图 1-5), 当 PDCoV 感染细胞的时间达 6 h, 即可在上清中检测到一定含量的病毒, 并且病毒的 $TCID_{50}$ 伴随着感染时间的延长而逐渐升高。其中 PDCoV-GX2021-1 及 PDCoV-GX2022-1 两株病毒的滴度在感染后的 36 h 达到了最高, 分别为 10^5 $TCID_{50}/mL$ 、 $10^{6.25}$ $TCID_{50}/mL$, 随后开始下降, 表明这两株 PDCoV 分离株具有较为相似的体外生长曲线; 而 PDCoV-GX2022-2 毒株的病毒滴度在感染后的 48 h 达到了最高, 最高滴度为 10^7 $TCID_{50}/mL$ 。

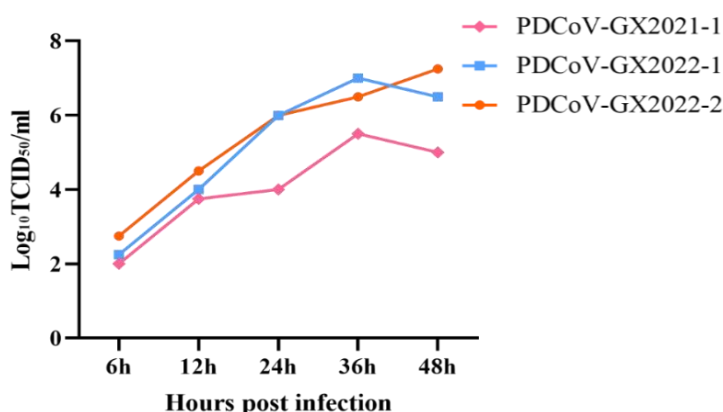


图1-5 PDCoV分离株的生长曲线

Figure 1-5 Growth curve of pdcov strain

3.6 PDCoV 毒株的全基因组测序

为进一步分析3株PDCoV广西分离株的基因序列特征，设计9对相对保守的特异性引物用于PDCoV全基因组的扩增。结果显示（图1-6），成功扩增出9个具有重叠序列的基因片段，条带大小与预期相符。将各片段分别连接至pMD19-T载体，并送往公司进行测序。使用SnapGene软件对测序结果进行序列拼接，得到PDCoV分离株的全基因组序列，将其提交至GenBank数据库，分离株所对应的的登录号分别为：PDCoV-GX2021-1（OQ547740）；PDCoV-GX2022-1（OQ736717）；PDCoV-GX2022-2（OQ736716）。

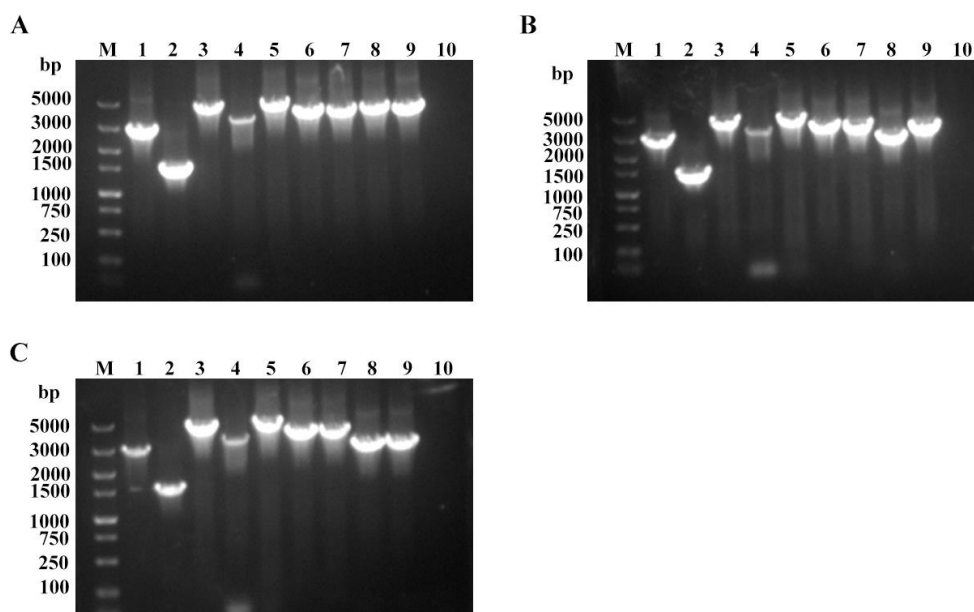


图 1-6 分段扩增 3 株 PDCoV 毒株的全基因组序列

Figure 1-6 The complete genomic sequences of 3 PDCoV strains were amplified by RT-PCR

M. DL5000; 1. PDCoV 基因片段 8789F-12566R; 2. PDCoV 基因片段 3510F-5036R;
3. PDCoV 基因片段 4949F-9071R; 4. PDCoV 基因片段 A0F-3863R;
5. PDCoV 基因片段 12363F-16535R; 6. PDCoV 基因片段 16521F-20031R; 7. PDCoV 基因片段
19903F-23330R; 8. PDCoV 基因片段 22885F-25931R; 9. PDCoV 基因片段-S 基因

3.7 PDCoV 毒的同源性分析及系统发育分析

为了对本实验室的3株PDCoV分离株进行深入分析,选择21株PDCoV国内外经典毒株序列,利用MEGA软件构建基于全基因组的系统发育树。结果显示(图1-7),PDCoV主要分为两大分支,其中I型分支是以国内各省代表毒株及美国、韩国、日本毒株组成,II型分支是以老挝、泰国等东南亚地区为代表的毒株组成,本实验室的测序毒株均属I型分支。其中PDCoV-GX2021-1毒株与美国分离株USA/Ohio137/2014的相似性可达99.21%,而PDCoV-GX2022-1毒株和PDCoV-GX2022-2毒株的亲缘关系较近,属于同一小分支,二者与河北代表毒株CHN-HB-2014的相似率分别为98.78%、99%。

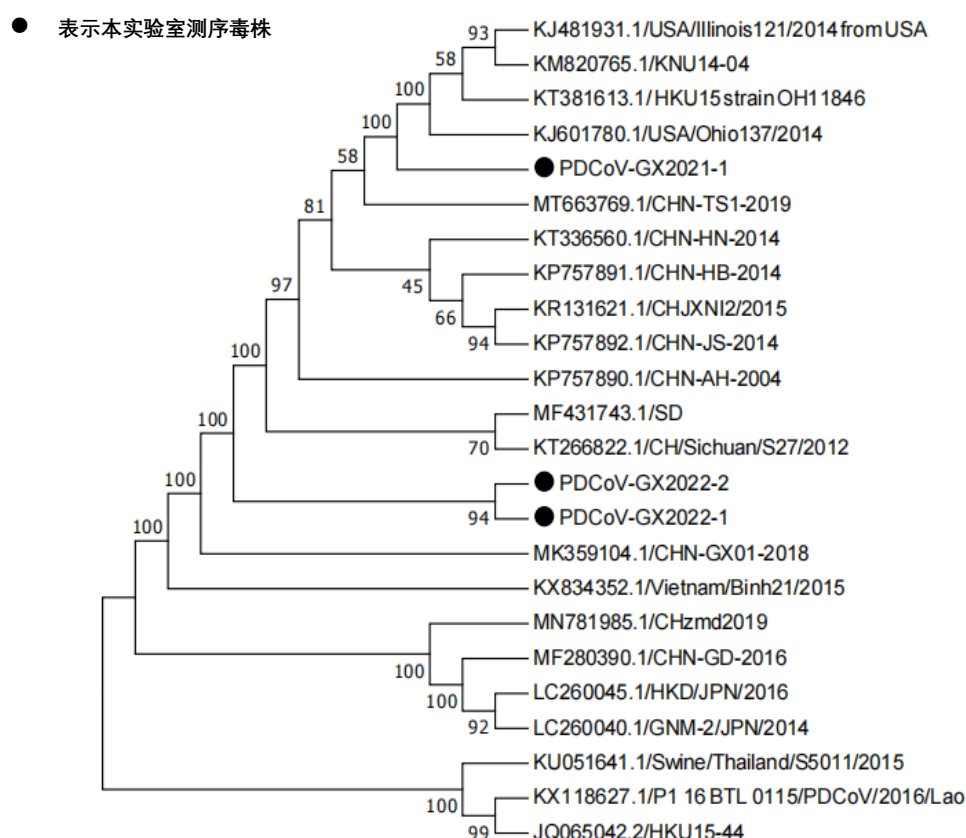


图 1-7 基于全基因组的 PDCoV 的系统发育进化树分析

Figure 1-7 Genetic evolution analysis of PDCoV based on whole genome

而通过基于S基因而建立的PDCoV系统发育进化树分析,发现PDCoV依旧主要分为两大分支,同基于全基因组而建立的进化树相似。其中PDCoV-GX2022-2毒株的S基因序列与东南亚国家的代表毒株更为相近,与越南代表毒株PDCoV/Swine/Vietnam/Binh21/2015的相似率高达99.11%,与泰国毒株PDCoV/Swine/Thailand/S5011/2015的相似率为96.9%。PDCoV-GX2022-1毒株的S基因与大多数中国四川分离株最为相近,其中与经典毒株CHN-SC2015的同源性高达98.74%,与2019年四川分离株CHN/Sichuan/2019的同源性为98.39%;而PDCoV-GX2021-1毒株与中国广东分离株CHN-GD16-05、河南驻马店分离株CHzmd2019更为相近,同源性分别为99.63%、99.51%

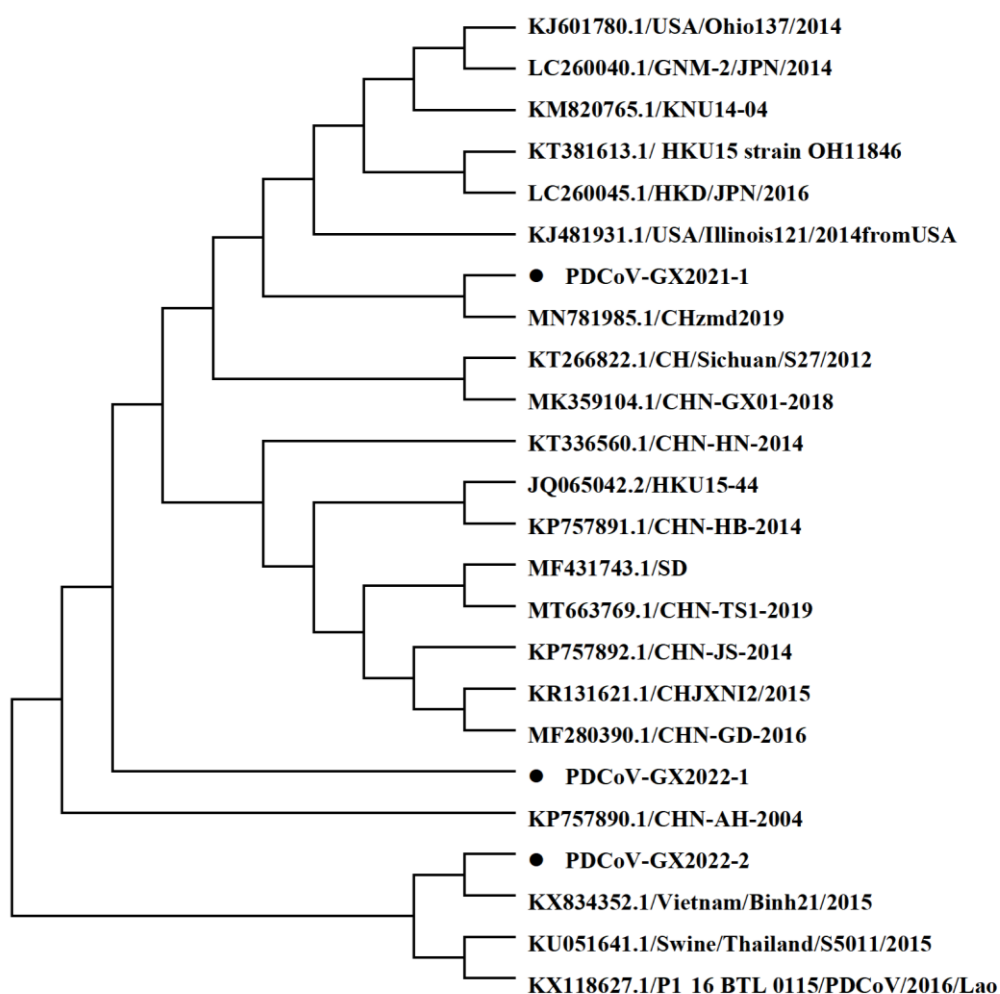


图 1-8 基于 S 基因的 PDCoV 的系统发育进化树分析

Figure 1-8 Genetic evolution analysis of PDCoV based on S gene



4 讨论

猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)是冠状病毒科的新兴成员,最早于2012年出现PDCoV被检出的报告,随后2014年美国俄亥俄州首次报告了严重的PDCoV腹泻疫情。此后,加拿大、日韩两国、东南亚地区(老挝、缅甸、泰国、越南)、墨西哥等地及中国各省份相继出现PDCoV单感染或混合其他腹泻病毒共感染的相关报道。至今,已有许多研究表明PDCoV可以感染除猪以外的多种哺乳动物及禽类。2021年,研究人员首次在人类血浆样本中检测到了PDCoV的基因组序列,提示PDCoV在田间不断进化重组,且该毒能够通过中间宿主实现跨物种传播,是潜在的人畜共患传染性疾病。因此,了解PDCoV的最新流行情况及传播特点对于预防PDCoV疫情的爆发有着至关重要的作用。

本研究在2021-2022年收集了大量来自广西地区的腹泻型病死猪临床病理样本,分批进行研磨处理,利用针对PDCoV M基因的特异性引物进行RT-PCR鉴定。结果显示,有3份来自不同猪场的病料cDNA扩增出了相应大小的目的条带。随后将这3份病料进行除菌处理,并以不同剂量去感染LLC-PK1细胞,观察相应的CPE现象。可能是由于样品中含毒量较低,我们并未在感染的第一代观察到明显的细胞病变;于是将3份病毒样品进行盲传及细胞带毒传代,传至第三至五代时,在显微镜下能够明显观察到PDCoV的经典CPE现象(细胞出现拉丝、变圆、逐渐聚集、脱落至上清等)。经过数次空斑纯化实验,我们得到了纯度较高的PDCoV病毒液,并且将纯化后的3株PDCoV广西分离株进行适应性传代培养,利用间接免疫荧光实验对其进行鉴定。通过对病毒生长曲线的测定,发现其中PDCoV-GX2021-1及PDCoV-GX2022-1两株病毒具有较为相似的体外生长曲线,病毒滴度最高分别为 10^5 TCID₅₀/mL、 $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL;而PDCoV-GX2022-2毒株的病毒的生长曲线较另外两株PDCoV分离株呈现滞后的现象,于感染的48 h达到了最高,其滴度约为 10^7 TCID₅₀/mL。

随后,我们将 PDCoV 的全基因组分为 9 个大片段,分别扩增后构建之 PMD19-T 载体,并送往擎科生物有限公司测序,并将测序结果拼接成完整的 PDCoV 全基因序列,利用 BLAST 及相关生物信息学软件对 3 株 PDCoV 广西分离株进行同源性比较及毒株演化分析。测序结果表明, PDCoV-GX2021-1 毒株的基因组全长为 25422 bp, BLAST 比较分析显示,该毒株的全基因组序列除了与 PDCoV 中国广东分离株 GHN-GD16-05 毒株的相似性达 99.94%,与许多来自 2014 年的美国分离株(如 USA/Michigan448/2014、HKU15-KY4813、USA/Minnesota454/2014、USA/Iowa459/2014 等毒株)相似性也高达 99%以上; PDCoV-GX2022-1 毒株的基因组全长为 25360 bp,该序列与 2012 年中国四

川分离株 CH/Sichuan/S27/2012 的相似性为 98.98%，与多数中国分离株更为相近，如河北代表毒株 CHN-HB-2014 (98.8%)、江苏代表毒株 CHN-JS-2014 (98.78%)、广东代表毒株 PDCoV/CHGD/2016 (98.69%)；而 PDCoV-GX2022-2 毒株全长为 25355 bp，与广东分离株 CHN-GD16-03 的相似率高达 99.96%，同样与中国经典分离株更为相近。基于全基因组的遗传进化分析，发现 PDCoV 分离株大致可分为两大分支，其中 G1 型是以北美、日韩、中国等分离株构成，而 G2 型主要分离自东南亚国家，如泰国、缅甸、老挝等。本实验室的三株 PDCoV 广西分离株均属于 G1 型，并且 PDCoV-GX2021-1 与美国经典毒株的亲缘性相近；而另外两株则属于同一小分支，与中国各省份代表毒株更为相近。

5 结论

- 1、本研究完成了3株PDCoV广西株的分离与鉴定，并获得了其全基因组序列。
- 2、基于全基因组序列的演化分析，发现3株PDCoV广西分离株均属于I型分支，该分支主要由美国、中国、日本、韩国等国家的分离株为代表。
- 3、其中PDCoV-GX2021-1毒株与美国分离毒株的亲缘关系相近，而PDCoV-GX2022-1毒株和PDCoV-GX2022-2毒株与中国分离株的亲缘关系更近。

第二章 抗 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

抗体是动物机体在受到抗原刺激后产生免疫应答反应的特异性糖蛋白产物，是具有特异性识别抗原、参与免疫调节的效应分子，由免疫细胞-浆细胞所分泌。1975年，科学家Köhler和Milstein通过体外细胞融合实验，开创了利用杂交瘤细胞生产单克隆抗体的先河，制备出由单一免疫细胞及其所有克隆产生的同源特异性抗体，这样的抗体均靶向同一抗原表位^[83]。伴随着近50年来生命科学及医疗行业的飞速进步，抗体工程技术的发展也在迭代更新，而单克隆抗体因具有高度的特异性、灵敏性及良好的生物活性，不仅是生物医学领域及相关基础研究的重要工具，还在疾病及病原微生物的体外诊断、疫苗及抗体类药物的研发制备中有着举足轻重的地位。

猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）是一种新型的猪肠道冠状病毒，能够引起各年龄猪群出现腹泻症状，目前尚未研发出具有良好免疫保护效果的商业化疫苗。而被高度糖基化修饰的S蛋白存在于冠状病毒表面，编码了多个中和表位，能够诱导机体产生具有保护作用的中和抗体，主要通过构象变化来介导病毒粒子侵染宿主细胞，以达到促进传播的目的，是冠状病毒重要的免疫原性结构蛋白^[84]。因此S蛋白成为了冠状病毒相关疫苗研发的理想免疫靶点。

病毒载体是近年来被广泛用于外源基因表达的高效表达系统，腺病毒是最具有潜力的基因递送工具之一。因此本研究将表达PDCoV S基因的重组腺病毒作为主要免疫原，结合大肠杆菌表达系统制备的重组蛋白对小鼠进行分组免疫，利用细胞融合实验制备靶向PDCoV S蛋白的单克隆抗体。我们的研究旨在获得更多抗不同空间构象表位的S蛋白单克隆抗体，为控制PDCoV感染、研发PDCoV疫苗及创建有效的检测诊断技术奠定基础。

1 材料

1.1 毒株及实验动物

PDCoV广西分离株：3株PDCoV野毒株（PDCoV-GX2021-1、PDCoV-GX2022-1、PDCoV-GX2022-2）均由本实验室保存。

4-6周龄SPF级雌性BALB/c小鼠（共9只）：购于扬州大学比较医学中心。

1.2 细胞、菌株及载体

细胞：SP2/0（小鼠骨髓瘤）细胞、LLC-PK1（猪肾）细胞、HEK-293A（人胚肾）细胞、ST（猪睾丸）细胞均由本实验室保存。

菌种：连接产物及质粒转化所用的大肠杆菌感受态细胞 Top 10 由本实验室保存。

载体：原核表达载体 pET-30(a)、真核表达载体 pCAGGS、腺病毒表达载体 pDC316 及改进后的重组腺病毒表达载体 pDC-hFerL 均由本实验室保存。

1.3 主要试剂

实验过程所用试剂见第一章“1.3”。

1.4 主要溶液及相关试剂的配置

实验过程所用溶液及相关试剂的配制见第一章“1.4”。

1.5 主要设备和仪器

实验过程所用设备及仪器见第一章“1.5”。

2 方法

2.1 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的构建

2.1.1 目的片段的引物设计与 PCR 扩增

以 PDCoV-GX2021-1 毒株的基因组序列为模板，设计 S 蛋白全长的特异性引物（引物由擎科生物有限公司合成，具体信息如下表 2-1 所示），在其上下游引物的前端分别加入酶切位点（*EcoRI*、*SalI*）及其对应的保护碱基序列，扩增长为 3483 bp 的目

的片段。按照下表 2-1 所示的 PCR 反应体系进行配置。

表 2-1 PDCoV S 基因全长扩增引物

Table 2-1 Primers for PDCoV S gene full-length amplification

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度
PDCoV-S-F	CCGGAATTCGCCACCATGCAGAGAGCTCTATTGATTATG	49 bp
PDCoV-S-R	ACGCGTCGACCTACCATTCCTTAAACTTAAAGGACGG	37 bp

表 2-2 目的片段 S 基因的 PCR 反应体系

Table 2-2 PCR reaction system for target fragment S gene

组分	使用量
cDNA 模板	500 ng
PrimeSTAR®Max DNA Polymerase	25 μ L
上游引物 PDCoV-S-F	1 μ L
下游引物 PDCoV-S-R	1 μ L
ddH ₂ O	To 50 μ L

设置 PCR 反应程序：98℃ 3 min；98℃ 10 s，55℃ 20 s，72℃ 30 s，33 个循环；72℃延伸 10 min。待反应结束后通过核酸电泳的结果判断是否正确扩增目的条带。

2.1.2 目的片段的 PCR 纯化

方法同第一章“2.8.3”。

2.1.3 酶切及胶回收纯化

待目的片段 S 基因经纯化处理后，使用 *EcoRI*、*SalI* 两个核酸内切酶对 PCR 产物及腺病毒载体 pDC-hFerL 在 37℃的条件下进行双酶切处理，酶切体系如下表 2-3 所示。

表 2-3 目的片段 S 基因的酶切体系

Table 2-3 Enzyme cleavage system of the target fragment S gene

组分	使用量
PCR纯化产物	30 μ L
<i>SalI</i>	1 μ L
<i>EcoRI</i>	1 μ L
10×M Buffer	5 μ L
H ₂ O	To 50 μ L

通过琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳，参照购于Omega Bio-tek公司的胶回收（E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit）试剂盒对酶切产物进行处理，具体操作如下。

- ① 在核酸凝胶成像仪中 UV 的照射下取出含有目的片段的条带，切碎后置于新的 1.5 mL EP 管，并使用微量电子秤称取凝胶的重量。
- ② 根据凝胶重量加入等体积比（100 mg=100 μ L）的 Binding Buffer，置于金属浴，在 60℃条件下加热至凝胶完全融化，并颠倒混匀。
- ③ 将混合液转移至试剂盒配置的吸附柱中，在室温条件 12000 g 离心 1 min。
- ④ 弃去吸附柱外部收集管中的废液，并向吸附柱内加入 300 μ L Binding Buffer，在室温条件下 12000 g 离心 1 min。
- ⑤ 弃去吸附柱外部收集管中的废液，并向吸附柱内加入 700 μ L SPW Wash Buffer，在室温条件下 12000 g 离心 1 min，并重复此步骤一次。
- ⑥ 弃去收集管中的废液，在室温条件下 12000 g 离心 2 min。
- ⑦ 弃去收集管，将吸附柱置于新的 1.5 mL EP 管，开盖挥发酒精（2 min），向吸附柱底部的膜中央加入 25 μ L 提前预热的洗脱液，静置 5 min，离心后即得到胶回收纯化后的 DNA 片段。

2.1.4 酶切产物的连接及转化

通过 T4 连接酶将目的片段 PDCoV-S 基因克隆至腺病毒表达载体 pDC-hFerL 中，连接体系的配置如下。

表 2-4 连接体系

Table 2-4 Connection system	
组分	使用量
目的片段 PDCoV-S	6.5 μ L
载体	2 μ L
10×T4 Buffer	1 μ L
T4连接酶	0.5 μ L

将配置好的连接体系轻轻吹打混匀，在4℃过夜连接。第二日进行连接产物的转化，具体操作步骤同第一章“2.8.5”。

2.1.5 重组质粒的提取及鉴定

重组质粒的提取步骤同第一章“2.8.6”。

重组质粒的鉴定：取适量质粒DNA进行酶切处理，反应体系具体如下。

表 2-5 重组质粒的酶切体系

Table 2-5 Enzyme digestion system of recombinant plasmids

组分	使用量
ddH ₂ O	14 μ L
10 $\times$ M Buffer	2 μ L
<i>EcoR</i> I	0.5 μ L
<i>Sal</i> I	0.5 μ L
重组质粒	质粒浓度 $\leq$ 1500 ng

将酶切体系轻轻吹打混匀后置于37℃水浴锅，1-2 h后通过琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行鉴定。

2.2 重组腺病毒的拯救及鉴定

2.2.1 重组腺病毒的拯救

利用Lipofectamine 3000转染试剂，将表达PDCoV S基因的重组腺病毒穿梭质粒与骨架质粒共同转染至HEK-293A细胞，进行重组腺病毒的包装，具体操作如下。

① 将 HEK-293A 细胞铺于 6 孔板，待细胞单层密度超过 60%时进行质粒转染。在一支含有 100 μ L Opti-MEM 的离心管（A 管）内加入一定比例的重组腺病毒穿梭质粒 pDC-hFerL-PDCoV-S 及骨架质粒 PBHGlox_E1,3Cre，随后加入 2.5 μ L P3000 试剂；在另一支含有 100 μ L Opti-MEM 的离心管（B 管）内加入 3.75 μ L Lipofectamine 3000 转染试剂；将两支离心管置于涡旋仪上轻柔混匀，简短离心后在室温下静置 5 min。

② 将 A、B 两支离心管中的液体混合到一支离心管并轻柔混匀，简短离心后于室温下静置 10-15 min。

③ 将含有转染复合物的液体全部转移至培养细胞的 6 孔板，适当前后晃动，使转染复合物均匀分布于培养基中，随后将培养板置于 37℃的细胞培养箱。

④ 在转染后的 6 h 更换新鲜培养基，并于相同条件下持续培养 2-3 d。

⑤ 第三天时收集 6 孔板中的培养基上清，12000 g 离心后保存备用；将单层细胞进行消化、传代后，置于 37℃的细胞培养箱中持续培养。

⑥ 逐日观察细胞病变情况，并设置正常细胞作为对照，当大部分单层出现明显细胞病变时，将细胞培养板于-80℃反复冻融 3 次，最后收集上清，离心后弃去沉淀，将病毒液上清转移至病毒冻存管保存备用，并将其记录为 F1 代毒。

2.2.2 重组腺病毒的鉴定

2.2.2.1 重组腺病毒的PCR鉴定

将拯救出的F1代毒接种于新鲜的293A细胞，扩培至足量病毒液；按照第一章“2.2”的方法提取病毒液上清的RNA，将其反转录为cDNA后，通过PCR鉴定的方式对拯救出的重组腺病毒进行鉴定。

2.2.2.2 重组腺病毒的IFA鉴定

测定 F2 代病毒液的滴度，将重组腺病毒 Ad5-PDCoV-S 以 MOI=0.01 的剂量感染新鲜的 293A 细胞，按照第一章“2.6”的方法对拯救的重组病毒进行鉴定。

2.3 重组蛋白的原核表达及纯化

2.3.1 PDCoV S2 片段的 PCR 扩增及纯化

以 PDCoV-GX2021-1 毒株的基因组序列为模板，设计针对 S2 基因的特异性引物。引物具体信息如下表所示。

表 2-6 PDCoV-S2 基因扩增引物

Table 2-6 The amplification primers of PDCoV-S2 gene

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度
PDCoV-S2-F	CCGGAATTCGTATGCAATGGCAACAGCC	28 bp
PDCoV-S2-R	ACGCGTCGACTGAGCAATTCAAGGTCAACTAG	32 bp

以 PDCoV-GX2021-1 毒株病毒液的 cDNA 为模板，扩增目的片段 S2 基因，并按照第一章“2.8.3”的方法进行 PCR 纯化。

2.3.2 酶切及胶回收纯化

利用 *EcoRI*、*SalI* 两个核酸内切酶对目的片段 PDCoV-S2 及载体 pET-30(a)于 37℃ 条件下进行双酶切处理，随后按照第三章“2.1.3”的方法对酶切产物进行回收。

2.3.3 酶切产物的连接及转化

方法同第一章“2.8.5”。

2.3.4 重组质粒的提取及鉴定

方法同第一章“2.8.6”。

2.3.5 重组蛋白的诱导表达

① 按照常规转化方法将重组质粒 pET-30a-S2 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞，挑取单菌落于含氨苄霉素抗性的 2YT 培养基，随后置于 37℃ 恒温摇床，以 220 r/min 的

转速持续培养 12 h。

② 将上述活化好的菌液以 1:100 的比例扩培至 250 mL，于相同条件下震荡培养。待观察到菌液呈均匀雾状，测得 OD 值达 0.5-0.8 时，在菌液中加入适量 IPTG，并置于 37℃ 恒温摇床，以 220 r/min 的转速持续培养 12-16 h。

③ 将全部菌液通过多次离心的方式收集至 1 支 50 mL 离心管。

④ 弃去上清，加入适量高压灭菌的 PBS，使菌体重悬于 PBS，在 4℃ 条件下 5000 g 离心 5 min，并重复此操作。

⑤ 弃去上清，使菌体完全重悬于 20 mL 高压灭菌的 PBS，于冰浴条件下进行超声破碎，10-15 min 后液体变得透亮，从中吸取 100 μ L 作为对照。随后将离心管置于大型高速离心机中，在 4℃ 条件下 10000 g 离心 10 min，将上清转移至新的离心管，加入适量 PBS 重悬沉淀。

⑥ 分别吸取 20 μ L 超声破碎后的全菌、上清及沉淀，以制备鉴定所用的蛋白样品，并加入 5 $\times$ Loading Buffer，待高温变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳。

⑦ 电泳结束后，将蛋白凝胶浸润于考马斯亮蓝染液于室温下染色，2-3 h 后将蛋白凝胶浸润于脱色液中，于室温下脱色 4-6 h，最后通过凝胶成像仪分析重组蛋白的表达情况。

⑧ 制备用于切胶纯化的重组蛋白样品：将上述收集的沉淀于冰上分装至于 1.5 mL 离心管，再加入适量 5 $\times$ Loading Buffer，颠倒混匀后于金属浴 100℃ 加热变性 10 min。

2.3.6 重组蛋白的纯化

① 首先配置浓度为 8% 的分离胶 50 mL，加入到大型电泳制胶架中，待凝固后加入浓度为 5% 的浓缩胶 20 mL（不插梳子），缓慢注入蒸馏水把上层胶压平，待上层胶凝固后弃去蒸馏水。

② 将凝固的蛋白胶置于含有 SDS-PAGE 电泳缓冲液的大型垂直蛋白电泳仪，并补充电泳缓冲液至电泳刻度线。从蛋白凝胶的玻璃板缝隙中缓缓加入制备好的蛋白样品（每侧约 4 mL），在 120 v 恒压下进行电泳。结束后取出蛋白凝胶，用 PBS 缓冲液冲洗后切去浓缩胶，将剩下的分离胶浸润于预冷的 0.25 M KCl 溶液中，在 4℃ 条件下静置 5 min，眼观蛋白胶有蛋白的区域呈白色条带状，而无蛋白的区域仍呈透明状。

③ 根据先前考马斯亮蓝染色后的凝胶成像图判断目的蛋白条带的位置及大小，从分离胶切下目的蛋白凝胶，将其切成块状后放于 MW3500 透析袋。随后，加入适量体积的 PBS 缓冲液，使胶块完全浸润于 PBS，并用封口夹封住开口处，防止液体漏出。将其置于充满电泳液的电泳槽中，在 120 v 恒压的条件下电泳 2-4 h。

④ 电泳结束后弃去透析袋中变成透明状的胶块，将含有目的蛋白的透析袋置于含有 PBS 缓冲液的烧杯，冰浴条件下在磁力搅拌器的作用中进行离子交换，间隔 2 h 更换一次烧杯内的 PBS 缓冲液（连续更换 3 次）。

⑤ 提前将用于蛋白浓缩的 PEG8000 研磨成细沙状，将透析袋置于其中，30 min 后测定蛋白浓度。当蛋白浓度达到要求时，收集透析袋中的液体，取其中 20 μ L 进行蛋白电泳，以鉴定是否获得正确的目的蛋白，其余蛋白液体冻存于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.4 小鼠免疫程序的制定

选择数只 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，将其分为 3 组并按照标准程序对小鼠进行免疫。A 组小鼠以免疫 DMEM 培养基作为阴性对照组；B 组将表达 PDCoV S 基因的重组腺病毒通过滴鼻及肌肉注射的方式对小鼠进行三次免疫，并在每次免疫后的第十天采集小鼠血清并进行 IFA 鉴定，选择血清中含有特异性抗体的阳性小鼠进行冲击免疫，并以 PDCoV 野毒株作为冲击免疫的免疫原。C 组小鼠以重组腺病毒作为首免及二免的免疫原，将原核表达的 PDCoV S2 重组蛋白作为第三次免疫及冲击免疫的免疫原。在冲击免疫后的 3-5 d 内，利用杂交瘤技术进行细胞融合实验。

表 2-7 小鼠免疫程序的制定

Table 2-7 Establishment of immunization program in mice

免疫次数	免疫时间	免疫原			免疫方式及剂量
		A组	B组	C组	
首免	Day 1	DMEM	Ad5-PDCoV-S	Ad5-PDCoV-S	重组腺病毒：100 μ L 肌肉注射+50 μ L 滴鼻注射
二免	Day 14	DMEM	Ad5-PDCoV-S	Ad5-PDCoV-S	重组蛋白S2：100 μ g 腹腔注射
三免	Day 28	DMEM	Ad5-PDCoV-S	重组蛋白S2	PDCoV 病毒液：100 μ L 腹腔注射
冲击免疫	融合前3-5 d	无	PDCoV 病毒液	重组蛋白S2	DMEM：100 μ L 肌肉注射

2.5 细胞融合及阳性杂交瘤细胞的筛选

2.5.1 小鼠腹腔巨噬细胞的制备

将 1 只 A 组（阴性对照）BALB/c 小鼠脱颈处死，浸泡于盛有 75% 乙醇的烧杯中，5 min 后用手术镊将小鼠取出，固定于超净工作台中的小鼠固定板，用手术剪从小鼠耻骨部剪开皮肤，通过钝性分离将小鼠被皮撕至胸腔，使腹膜层完全暴露。用一次性注射器吸取预热好的 HAT 培养基 7 mL，将注射器针头刺破腹膜层（注意避开腹腔脏器），

将培养基注入至小鼠腹腔，适当静置后将含有小鼠腹腔巨噬细胞的培养基回抽至注射器内，并转移至 50 mL 离心管。用 HAT 培养基将其补至 36 mL，均匀的分装于 3 块 24 孔板，置于 37°C 细胞培养箱备用。

2.5.2 小鼠骨髓瘤细胞的制备

在准备细胞融合实验的前一周，复苏本实验室冻存的 SP2/0 细胞，对其进行传代培养，待细胞状态趋于稳定时扩大培养。在进行细胞融合时，使用不含抗生素的 DMEM 培养基将处于对数生长期的 SP2/0 细胞收集至离心管，置于 37°C 培养箱备用。

2.5.3 小鼠脾细胞的制备

取一只已进行冲击免疫的小鼠，在处死前通过眼球摘除法收集小鼠的血液，静置后低速离心，其上清作为多抗血清保存备用，浸于 75%乙醇 5 min。用同样的方式固定小鼠、打开腹腔、暴露腹膜。将小鼠的右腿置于左侧固定，找到脾脏的位置。小心剪开腹膜，将脾脏完整取出后置于 60 mm 细胞培养皿，剔除脾脏外围粘连的脂肪及结缔组织，并用含有抗生素的 DMEM 冲洗。随后，将其转移至新的细胞培养皿，加入 DMEM 润湿，利用注射器冲洗、刮取脾脏，使脾细胞充分释放。通过细胞筛去除多余的脾脏被膜等结缔组织，用 DMEM 培养基将收获的脾细胞悬液补充至 20 mL。

2.5.4 细胞融合

首先，利用台盼蓝试剂对获取的 SP2/0 细胞及小鼠脾细胞进行计数，按照 1:5 的数量比混合于新的 50 mL 离心管，在室温条件下 1000 g 离心 10 min。弃尽上清，轻柔拍打离心管使分层的细胞沉淀均匀混合，并覆于离心管底部。随后将离心管置于盛有 37°C 温水的烧杯，用滴管吸取预热的 PEG1500，在 1 min 内逐滴加入到离心管的细胞上方，在此过程中将离心管缓慢旋转，结束后在 37°C 条件下静置 1 min；紧接着遵循前慢后快的原则，逐滴加入 DMEM，最后补加至 20 mL，以稀释 PEG1500 的毒性。将离心管在 37°C 条件下静置 10 min，1000 r/min 离心 10 min，弃去上清后轻拍管壁，用残液重悬细胞沉淀，随后补加预热好的 HAT 培养基至 36 mL，均匀的分装于 3 块含有饲养细胞的 24 孔板（500 μ L/孔），将其置于 37°C 细胞培养箱持续培养，逐日观察细胞状态及是否出现污染。

2.5.5 杂交瘤细胞的筛选及阳性细胞的亚克隆

在融合后的第五日弃去细胞培养板中半数原有的培养基，并加入等量新的 HAT 培养基，经过 2-3 次的半换液后将培养基完全更换为 HT 培养基，并持续培养 2-3 d。从每孔中吸取适量杂交瘤细胞上清作为一抗进行 IFA 鉴定，并设置对应的阴性孔作为对

照。通过荧光显微镜观察并记录出现特异性绿色荧光的细胞孔，对特异性强的阳性孔进行细胞计数，通过有限稀释法取 300 个细胞均匀的铺于一块 96 孔板，并添加适量的饲养细胞，置于 37℃细胞培养箱持续培养；将剩余的大部分杂交瘤细胞扩大培养，冻存备用。待 96 孔板中的细胞密度达 50%以上时再次进行 IFA 检测，对结果呈阳性的细胞再次进行亚克隆，至筛选到能够分泌特异性抗体的单个细胞克隆。最后，对筛选到的阳性单克隆细胞扩大培养，待细胞状态稳定后大批量冻存，于液氮中保存。

2.6 单抗腹水的大量制备

取数只 8-10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，将 500 μ L 液体石蜡注射至小鼠腹腔，7 d 后通过细胞计数取 2.5×10^6 个杂交瘤细胞，800 g 离心 5 min，使用 500 μ L DMEM 将沉淀重悬并注射至小鼠腹腔，逐日观察小鼠的精神变化及腹部状态。一周后可观察到小鼠腹部膨大、精神沉郁。此时，用注射器抽出其腹腔内的液体，4℃条件下 1500 g 离心 10 min，将腹水上清转移并分装至新的 1.5 mL 离心管，于 -80℃冰箱保存备用。

2.7 单克隆抗体的生物学特性鉴定

2.7.1 间接免疫荧光实验

方法见第一章“2.6”。

2.7.2 蛋白免疫印迹实验

① 将生长良好的 LLC-PK1 细胞铺于 6 孔板，待细胞量超过孔底面积的 80%以上时进行病毒感染。

② 弃去 6 孔板中原有的培养基，使用 PBS 洗涤细胞 2 次，并加入适量含有胰酶的冠状病毒专用培养基，以 MOI=0.1 的剂量感染 PDCoV 野毒株，设置未感染病毒的细胞孔作为阴性对照，于 37℃培养箱培养 2 h 后进行换液。

③ 24 h 后弃去培养上清，用 PBS 洗去死亡细胞及残余的培养基，加入适量 RIPA 裂解液，在冰上孵育 30 min 以裂解细胞蛋白。离心后将上清转移至新的离心管，加入 5×Loading Buffer 并于 100℃条件下进行变性处理。

④ 蛋白样品通过 SDS-PAGE 电泳分离（恒压 80 V 30 min，120 V 90 min），采用湿转的方式将蛋白转印至 PVDF 膜（恒流 200 mA，2 h）。

⑤ 将膜置于 5%脱脂奶中，于低速摇床进行封闭，2 h 后用 TBST 洗涤。

⑥ 然后将收获的单抗腹水（1:500 倍稀释）作为一抗，在 4℃过夜孵育。用 TBST

将膜完全清洗后, 将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 以 1:5000 的比例进行稀释, 作为二抗与一抗孵育 1 h。最后用 TBST 将膜洗净, 利用 ECL 试剂盒发光显影。

2.8 单克隆抗体中和活性的测定

利用固定病毒稀释血清法检测所制备的单克隆抗体是否有中和活性。首先, 将 ST 细胞铺于 96 孔板, 待细胞生长至单层密度达 80%-90%。测定中和效价前, 将适量单抗腹水置于 56°C 金属浴处理 30 min, 并使用 0.22 μm 的滤器将其过滤除菌。然后用含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶的病毒维持液对抗体进行 2 倍比稀释, 每稀释度做 4 孔重复, 并将稀释好的抗体与等体积 PDCoV 野毒株 (200 TCID₅₀) 混合, 在 37°C 下孵育 1 小时; 随后, 将 96 孔板中的培养基弃去, 用 PBS 清洗细胞两遍, 加入上述病毒-抗体混液, 于细胞培养箱孵育, 2 h 后更换为新鲜的病毒维持液, 于 37°C 持续培养并逐日观察, 2-3 日后统计病变孔数及未发生病变孔数, 并利用 Karber 法计算单抗腹水的中和抗体效价。

2.9 单克隆抗体与去 N-糖基化 S 蛋白的反应性鉴定

以非变性处理为例。首先, 同样用 RIPA 裂解液获取细胞蛋白, 并测定蛋白浓度; 在离心管中加入 18 μL 细胞蛋白及 2 μL Buffer 2, 制成体积为 20 μL 的混合液。随后, 加入 3-5 μL 的 PNGase F, 轻轻混匀后于 37°C 水浴锅中处理 12 h 左右, 加入适量不含 SDS 的 Loading Buffer, 进行 Native-PAGE 电泳。

3 结果

3.1 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的构建及拯救

3.1.1 腺病毒载体的改进及其表达效果的验证

为增强腺病毒载体的表达效果, 在本实验室现存 pDC316 载体的基础上, 插入了一段强启动子序列, 并将该重组质粒命名为 pDC-hFerL。为进一步检验改进后腺病毒载体的表达效果, 将编码绿色蛋白基因的 EGFP 分别克隆至改进后的腺病毒载体 pDC-hFerL 及原载体 pDC316。然后将其分别转染至 ST 细胞及 293A 细胞, 以 pEGFP-C3 作为对照, 在荧光显微镜下观察绿色荧光的分布及亮度。结果显示 (图 2-1), 在转染 pDC-hFerL-EGFP 的 ST 细胞及 293A 细胞中, 呈现绿色荧光的细胞明显多于转染 pDC316-EGFP 的细胞, 表明改进后的腺病毒载体其表达外源基因的能力明显得到提升。

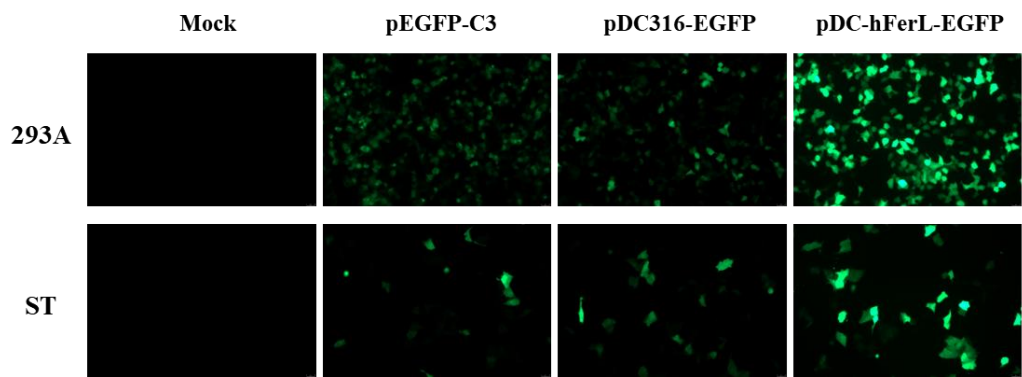


图 2-1 改进后腺病毒表达载体的效果验证 (×20)

Figure 2-1 Validation of the expression effect of the improved adenovirus vector

3.1.2 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的构建

以PDCoV-GX2021-1毒株病毒液的cDNA为模板，利用针对S蛋白的特异性引物扩增出S基因的全长片段。将目的片段克隆至改进后的腺病毒载体pDC-hFerL，构建重组质粒pDC-hFerL-PDCoV-S，并对得到的重组质粒进行酶切鉴定。核酸电泳结果显示（图2-2），重组质粒的条带大小明显高于原质粒，泳道3的酶切产物存在大小约3683 bp的特异性条带，说明重组质粒构建成功。

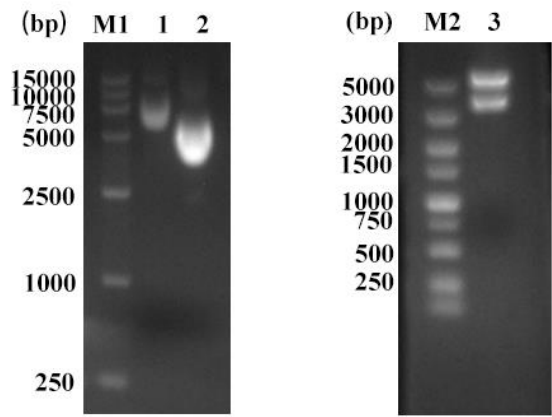


图 2-2 重组质粒的鉴定

M1. DL15000 Marker; 1. pDC-hFerL-PDCoV-S; 2. pDC-hFerL;

M2. DL15000 Marker; 3. 重组质粒的酶切鉴定

Figure 2-2 Identification of recombinant plasmid

M1. DL15000 Marker; 1. pDC hFerL PDCoV-S; 2. pDC hFerL;

M2. DL15000 Marker; 3. Enzyme digestion identification of recombinant plasmids

3.1.3 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的拯救

将构建好的重组质粒pDC-hFerLPDCoV-S同辅助质粒以共同转染至293A细胞，并设置阴性对照。3 d后将6孔板的细胞扩培至T25培养瓶中，2-3 d后收集病毒液上清，将其接种于新鲜的293A细胞，逐观察是否有细胞病变产生。结果显示（图2-3），接种重组腺病毒的293A细胞出现CPE现象，细胞明显变圆、脱落、死亡；对照细胞状态良好，无CPE出现。

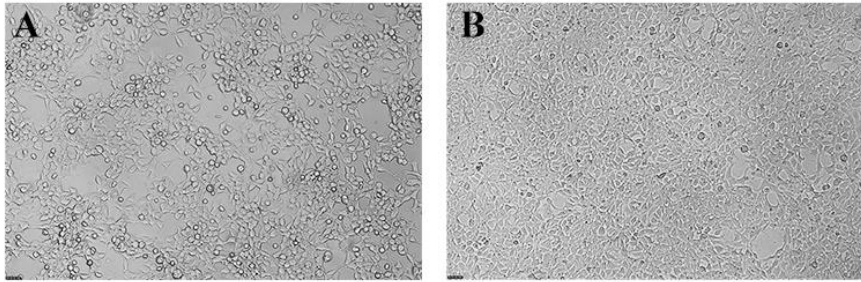


图 2-3 重组腺病毒在 293A 细胞上的拯救结果（×20）

A. 重组腺病毒 Ad5-PDCoV-S 感染的 293A 细胞；B. 阴性对照细胞

Figure 2-3 Rescue results of recombinant Adenovirus on 293A cells

A. 293A cells infected with recombinant adenovirus Ad5-PDCoV-S; B. Negative control cells

3.1.4 表达 PDCoV S 基因重组腺病毒的鉴定

3.1.4.1 重组腺病毒的 RT-PCR 鉴定

首先提取病毒液的RNA，利用RT-PCR的方法鉴定是否成功拯救出表达PDCoV S基因的重组腺病毒。结果显示（图2-4），与阴性对照相比，重组病毒感染组能够扩增出3683 bp左右的特异性条带。

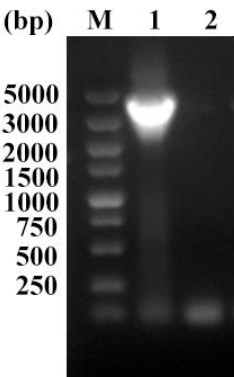


图 2-4 重组腺病毒的 RT-PCR 鉴定

A. 重组腺病毒 Ad5-PDCoV-S 病毒液（F2 代毒）；B. 阴性对照细胞上清

Figure 2-4 Identification of recombinant adenovirus by RT-PCR

A. Recombinant adenovirus Ad5 PDCoV-S virus solution; B. Negative control cell supernatant

3.1.4.2 重组腺病毒的 IFA 鉴定

利用本实验室先前制备的PDCoV S蛋白单克隆抗体对重组腺病毒Ad5-PDCoV-S感染的293A细胞进行IFA检测。结果显示（图2-5），感染重组病毒的293A细胞出现特异性绿色荧光，而对照细胞无荧光出现。以上结果表明插入PDCoV S基因的重组腺病毒被成功拯救。

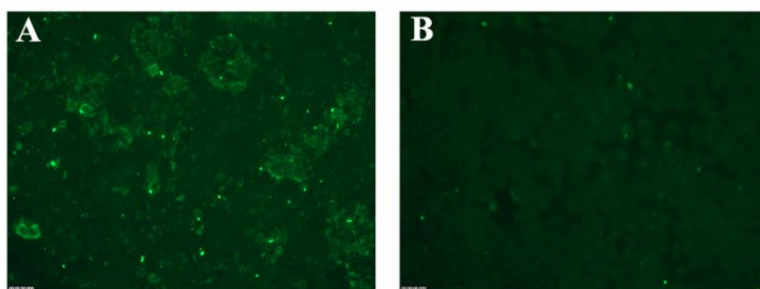


图 2-5 重组腺病毒的 IFA 鉴定（ $\times 20$ ）

A. 重组腺病毒 Ad5-PDCoV-S 感染的 293A 细胞；B. 阴性对照细胞

Figure 2-5 Identification of recombinant adenovirus by IFA

A. 293A cells infected with recombinant adenovirus Ad5-PDCoV-S; B. Negative control cells

3.1.5 重组腺病毒生长曲线的测定

将收获的F2代重组腺病毒以MOI=0.01的剂量感染HEK-293A细胞（Ad5-EGFP作为对照），每隔12 h收集适量病毒上清，测定病毒在不同时间点的滴度，绘制相应的体外生长曲线。结果显示（图2-6），在病毒感染细胞12 h后，两种重组腺病毒的滴度呈逐渐上升趋势，整体生长曲线的差异不显著。本研究拯救的Ad5-PDCoV-S其滴度略低于对照病毒Ad5-EGFP，于48 h达到最高（病毒滴度为 $10^{6.75}$ TCID₅₀/mL）。

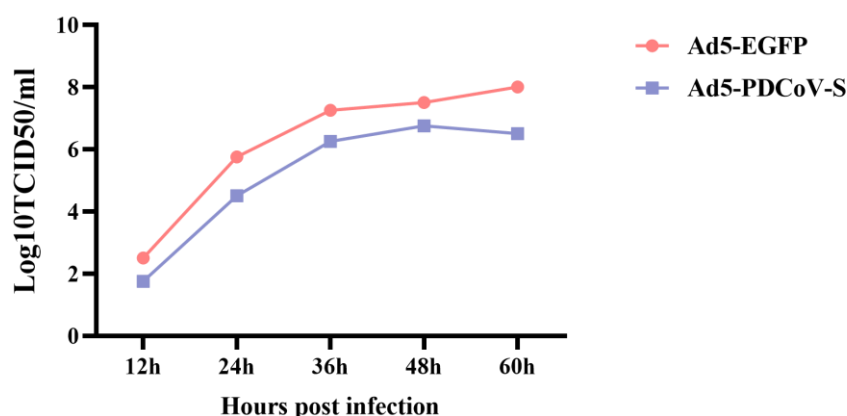


图 2-6 重组腺病毒 Ad5-PDCoV-S 的生长曲线

Figure 2-6 Growth curve of Ad5-PDCoV-S

3.2 PDCoV S2 重组蛋白的表达及纯化

3.2.1 PDCoV S2 基因原核表达重组质粒的构建

以PDCoV-GX2021-1毒株的cDNA为模板，对目的基因PDCoV-S2（601-1088 aa）进行扩增，并利用*Eco*RI、*Sal*I两个酶切位点将其克隆至原核表达载体pET-30(a)，随后对重组质粒进行鉴定。结果显示（图2-7），重组质粒的酶切产物能切下1465 bp左右的条带，证明成功构建表达PDCoV S2基因的原核表达质粒。

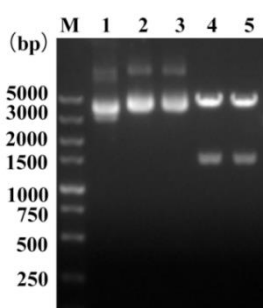


图 2-7 重组质粒及其酶切鉴定

M. DL5000 Marker; 1. pET-30(a); 2/3. 重组质粒 pET-PDCoV-S2; 4/5. 重组质粒的酶切产物

Figure 2-7 Identification of recombinant plasmid and its restriction enzyme digestion

M. DL5000 Marker; 1. pET-30 (a); 2/3 Recombinant plasmid pET-PDCoV-S2; 4/5 Enzymatic cleavage products of recombinant plasmids

3.2.2 PDCoV S2 蛋白的原核表达及纯化

将上述重组质粒转化至BL21（DE3）感受态细胞，在IPTG的作用下于37℃诱导目的蛋白S2的表达。鉴定结果显示（图2-8 A），成功表达携带His标签的S2重组蛋白，这种蛋白主要以包涵体形式存在于菌体沉淀，大小在50 kDa左右。随后，通过切胶纯化的方式对其进行纯化及浓缩，获取纯度及质量较高的重组目的蛋白（图2-8 B）。

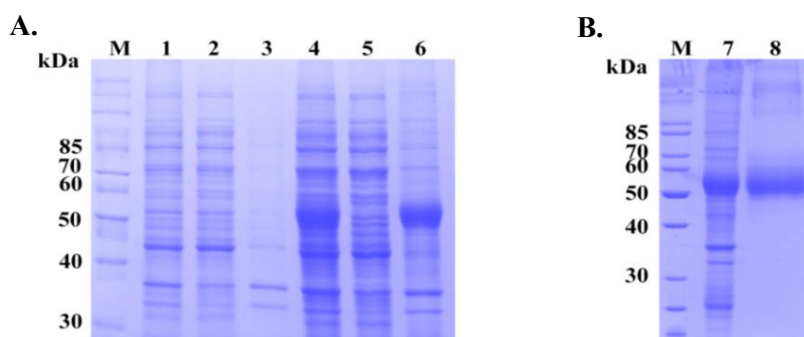


图 2-8 重组蛋白的原核表达及纯化

M. 26614 Protein Marker; 1. pET-30(a)全菌; 2. pET-30(a)上清;

3. pET-30(a)沉淀; 4. pET-PDCoV-S2 全菌; 5. pET-PDCoV-S2 上清; 6. pET-PDCoV-S2 沉淀;

7. pET-PDCoV-S2 沉淀（对照）；8. 纯化浓缩后的 pET-PDCoV-S2

Figure 2-8 Prokaryotic expression and purification of recombinant protein

M. 26614 Protein marker; 1. pET-30(a) whole bacteria; 2. pET-30(a) supernatant; 3. pET-30(a) precipitation; 4. pET-PDCoV-S2; 5. pET-PDCoV-S2 supernatant; 6. pET-PDCoV-S2 precipitation; 7. pET-PD CoV-S2 precipitation (control) ; 8. The purified and concentrated pET-PDCoV-S2

3.3 重组腺病毒免疫小鼠后的血清抗体效价测定

将BALB/c小鼠随机分为3组，以重组腺病毒AD5-PDCoV-S作为首要免疫原对B、C两组进行免疫（A组由DMEM免疫作为阴性对照组，B组为重组病毒免疫组，C组为重组病毒交叉蛋白免疫组）。于每次免疫后的第十天对小鼠进行眼眶采血，将血清作为一抗，利用IFA法对小鼠的血清抗体效价进行测定。结果显示（图2-9），大部分小鼠在经过重组腺病毒2次免疫后，多抗血清具有良好的IFA反应性，其IFA效价达到了1:8000。

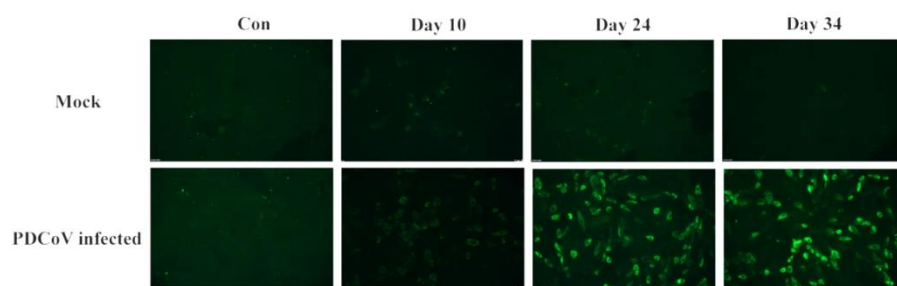


图 2-9 重组腺病毒免疫组的血清 IFA 鉴定（ $\times 20$ ）

Figure2-9 IFA identification of mouse serum immunized with recombinant adenovirus

同时利用固定病毒稀释血清法测定小鼠多抗血清中是否有中和抗体的产生。结果显示（图2-10），小鼠体内的中和抗体水平随着免疫次数的增多而逐渐升高，在第三次免疫后，中和抗体效价可达 $2^{3.48}$ ，该表明将表达PDCoV S基因的重组腺病毒注射至小鼠体内，能够很好的诱导小鼠的免疫应答反应，并且产生一定水平的中和抗体。

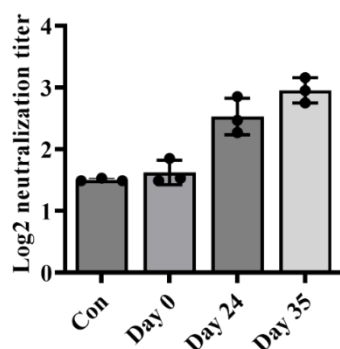


图 2-10 重组腺病毒免疫组的中和抗体效价测定

Figure 2-10 The titer of neutralizing antibody against recombinant adenovirus was determined

3.4 细胞融合及阳性杂交瘤细胞株的筛选

选择免疫效果良好的小鼠进行冲击免疫，之后3-5 d内分离小鼠的脾脏B淋巴细胞，通过PEG1500将其与SP2/0细胞融合。将已生长稳定的杂交瘤上清作为一抗，用IFA法筛选出能够分泌PDCoV特异性抗体的杂交瘤细胞。通过有限稀释法对阳性孔的杂交瘤进行亚克隆，最终成功获得7株分泌PDCoV-S蛋白抗体的杂交瘤细胞株，将其分别命名为C1-14、A1-79、B23-4、C15-2、B11-2、A7-76、C5-13。将这7株杂交瘤以 1×10^5 的细胞量注射至小鼠体内，制备出大量单抗腹水。

3.5 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的 IFA 反应性鉴定

以所制备的单克隆抗体腹水作为一抗，利用本实验室现存的3株PDCoV野毒株感染LLC-PK1细胞，进行IFA鉴定。结果显示（图2-11），7株单克隆抗体均能与本实验室现存的PDCoV野毒株发生反应。所有单抗与PDCoV感染的PK1细胞孵育后,在荧光显微镜下能够观察到绿色荧光，而未感染病毒的细胞中无荧光出现，说明7株单抗在病原IFA鉴定方面具有良好的特异性。

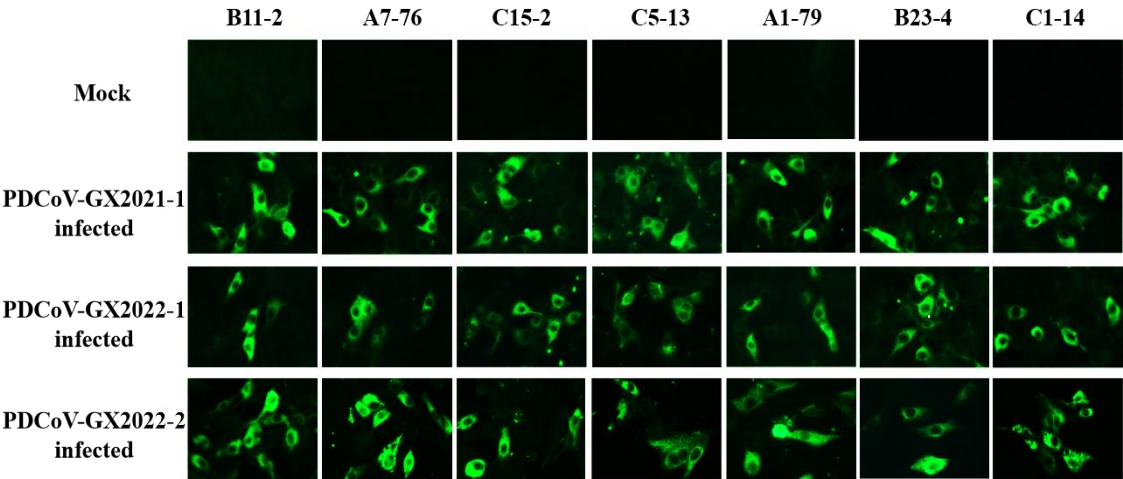


图 2-11 单克隆抗体的 IFA 检测（ $\times 20$ ）

Figure 2-11 IFA detection of monoclonal antibodies

3.6 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的 Western blot 反应性鉴定

将所制备的单克隆抗体作为一抗进行Western blot鉴定，首先通过常规变性凝胶进行SDS-PAGE电泳。结果显示（图2-12 A），仅B11-2及A7-76株单抗能够孵育出180 kDa左右的条带，其余各株单抗无法与变性后的病毒感染细胞发生样反应。随后，利用不含SDS的非变性凝胶进行电泳。结果显示（图2-12 B），C15-2、C1-14、B23-4、A1-79株单抗均能够识别细胞内未发生变性的S蛋白，检测到S蛋白相应大小的条带，而C5-13株则无法进行Western blot鉴定。

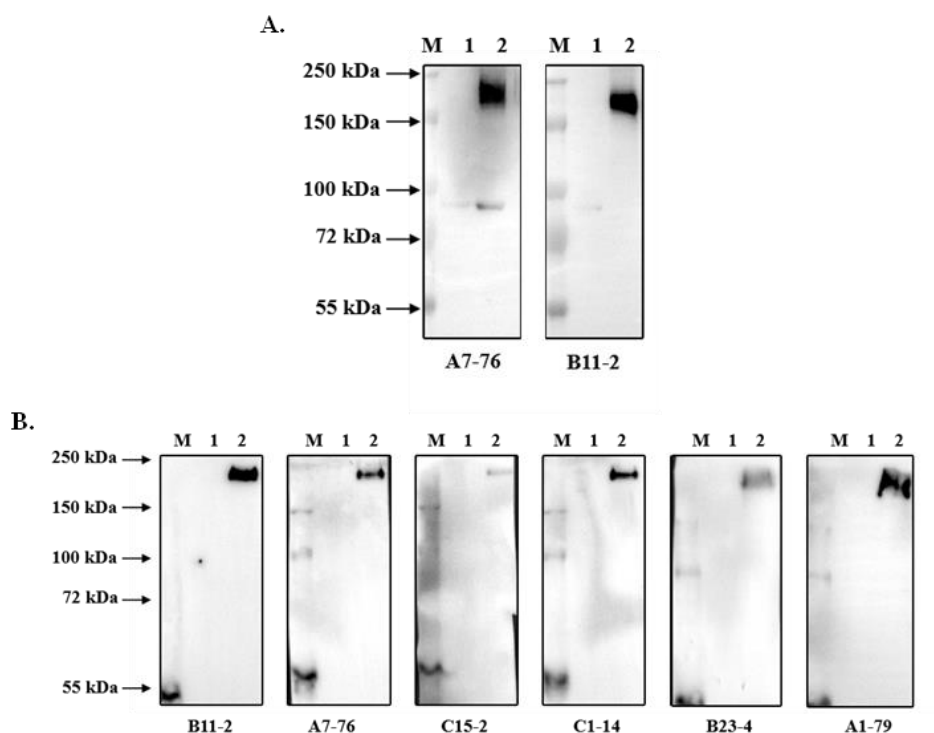


图 2-12 单克隆抗体的 Western blot 检测

M. 蛋白预染 Marker; 1. 阴性对照细胞; 2. 感染 PDCoV-GX2022-2 的 ST 细胞

Figure 2-12 Western blot detection of monoclonal antibodies

M. Protein marker; 1. Negative control cells 2. ST cells were infected with PDCoV-GX2022-2

3.7 PDCoV S 蛋白单克隆抗体的特异性鉴定

将本实验室保存的三种猪病毒（SADS-CoV、PEDV、GETV）作为检测源，分别感染 ST 细胞后进行 IFA 检测，并以本实验室制备的 SADS-N 蛋白、PEDV-S 蛋白及 GETV-E 蛋白的单克隆抗体作为阳性对照，以验证本研究所制备的 PDCoV S 蛋白单克隆抗体是否与其他病毒具有交叉反应性。结果显示（图 2-13），与阳性对照组相比，所制备的 7 株单克隆抗体仅能识别感染 PDCoV 的细胞，出现特异性荧光，而不与感染另外 3 种

病毒的细胞发生反应，证明本研究所制备的单克隆抗体具有良好的特异性。

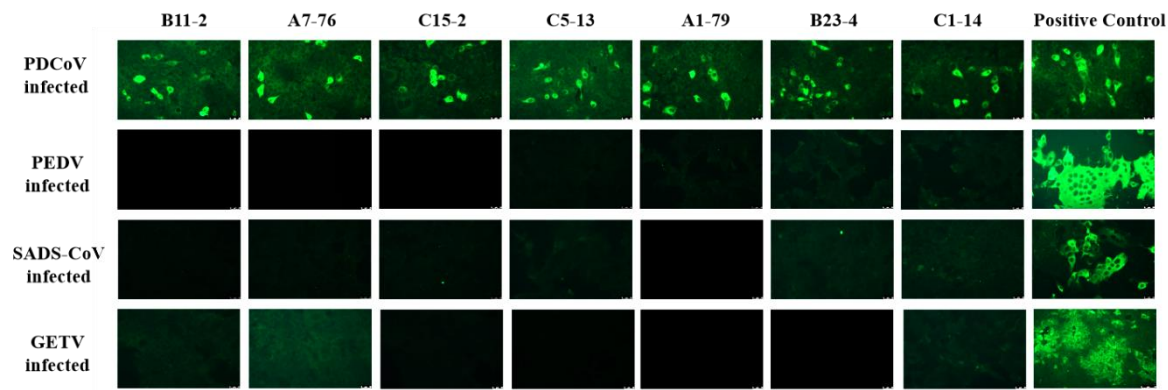


图 2-13 单克隆抗体的特异性鉴定（×20）

Figure 2-13 Specific identification of monoclonal antibodies

3.8 PDCoV S 蛋白单克隆抗体与天然病毒粒子的反应性鉴定

以 PDCoV-GX2022-2 毒株为例，探究所制备的 PDCoV-S 单抗是否能与天然病毒粒子中的 S 蛋白发生反应。将收获的病毒液经蔗糖梯度离心后，用少量 PBS 将其重悬，进行 Native-PAGE 电泳。结果显示（图 2-14），除 C5-13 株之外的所有单克隆抗体均可以识别天然病毒粒子中的 S 蛋白，能够检测到大小约为 180 kDa 的 S 蛋白条带。

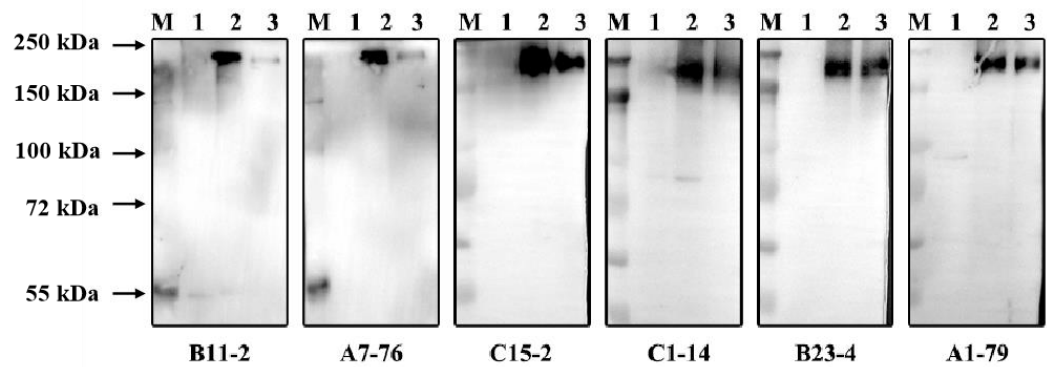


图 2-14 单克隆抗体与天然病毒粒子的 Western blot 反应性鉴定

M. 蛋白 Marker; 1. 阴性对照细胞; 2. 感染 PDCoV-GX2022-2 的 ST 细胞; 3. 浓缩后的病毒粒子

Figure 2-14 Identification of monoclonal antibody with natural virions by Western blot

M. Protein marker; 1. Negative control cells; 2. ST cells infected with PDCoV-GX2022-2;
3. Concentrated viral particles

3.9 胰酶对 PDCoV 天然病毒粒子的切割作用

以不同浓度的胰酶处理浓缩后的病毒粒子，分不同时间收样并进行 Western blot 鉴

定。结果显示（图 2-15），在低浓度胰酶的作用下，S 蛋白未发生切割，而胰酶浓度达 100 ng/ μ L 时，能够检测到一条小于 150 kDa 的条带。

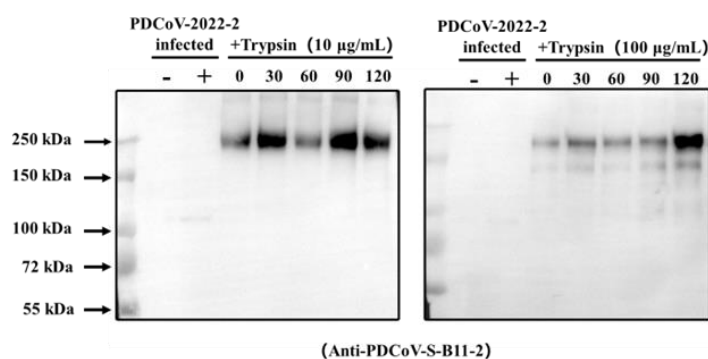


图 2-15 胰酶对 PDCoV 病毒粒子的切割验证

Figure 2-15 Cleavage of PDCoV virions by trypsin

3.10 PDCoV S 蛋白单抗中和活性的测定

为了鉴定所制备的单克隆抗体是否能够在体外中和 PDCoV 对细胞的感染能力，利用本实验室现存的 3 株 PDCoV 分离株进行中和抗体效价的测定。中和测定结果显示（图 2-16），对于 PDCoV-GX2021-1 及 PDCoV-GX2022-2 毒株，仅 C1-14 株、C15-2 株有一定中和作用；对于 PDCoV-GX2022-1 毒株，B23-4 及 C1-14 株具有一定中和活性。

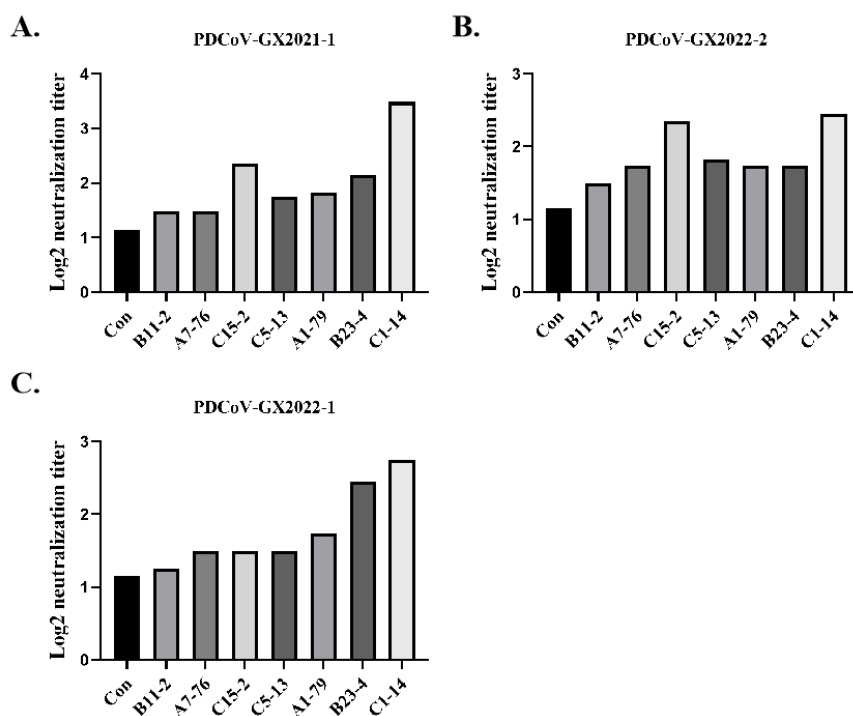
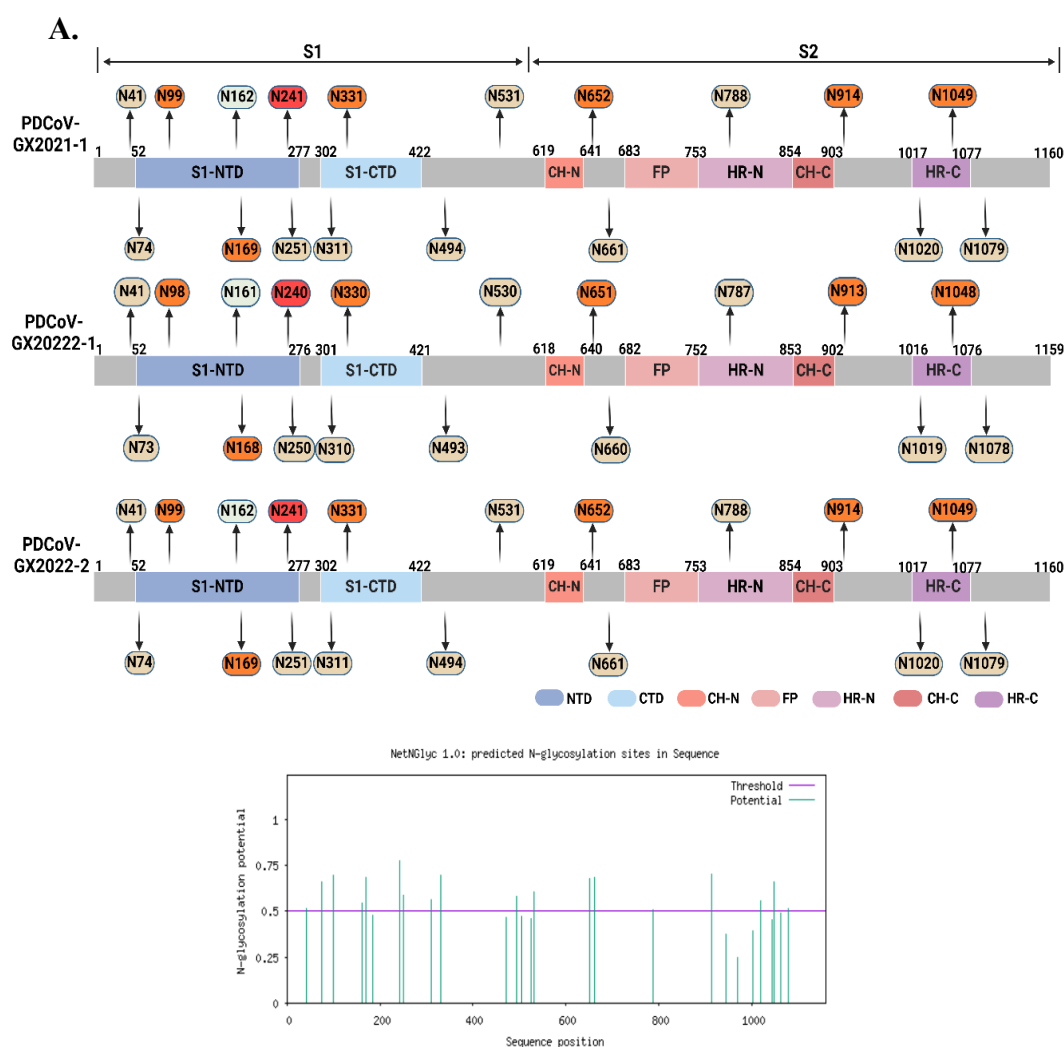


图 2-16 S 蛋白单克隆抗体的中和活性测定结果

Figure 2-16 Neutralization activity of S protein monoclonal antibodies

3.11 PDCoV S 蛋白糖基化位点的预测及其在蛋白三维结构中的分布

利用N-糖基化位点预测网站，分析3株PDCoV分离株潜在的N糖基化位点。预测结果显示（图2-17 A），PDCoV S蛋白至少存在18个潜在的N-糖基化位点，分别是N41、N74、N99、N162、N169、N241、N251、N311、N331、N494、N531、N652、N661、N788、N914、N1020、N1049、N1079位氨基酸。相较于另外两株PDCoV分离株，PDCoV-GX2022-1毒株因缺少第52位氨基酸（Asn），预测的N-糖基化位点在序列分布上略有不同，但同样较为保守。随后，利用SWISS-MODEL进行PDCoV S蛋白的三维结构预测。结果如图所示（图2-17 B），红色部分为预测的N-糖基化位点，且这些位点大部分均位于S蛋白的表面。



[Graphics in PostScript](#)

图 2-17 A PDCoV-S 蛋白 N-糖基化位点预测

Figure 2-17 A Prediction of glycosylation sites of PDCoV-S protein

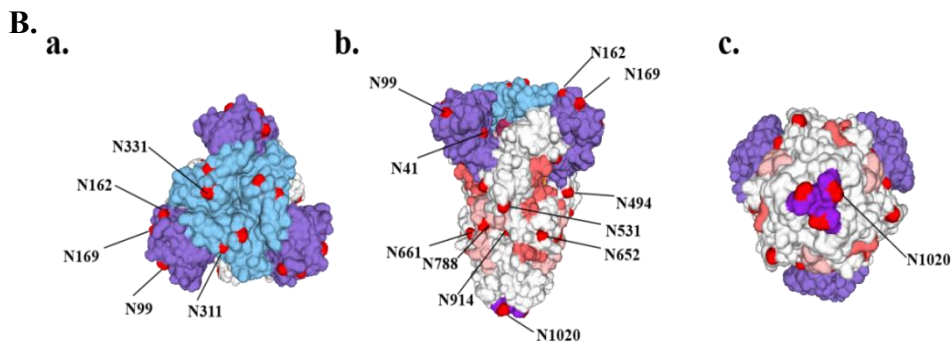


图 2-17 B PDCoV-S 蛋白 N-糖基化位点在蛋白三维结构种的分布

Figure 2-17 B Distribution of N-glycosylation sites in the three-dimensional structure of PDCoV-S protein

3.12 PDCoV S 蛋白单抗与去 N 糖基化后 S 蛋白的反应性鉴定

将PDCoV-GX2022-2感染ST细胞的样品经过PNGase F处理，以未经处理的样品作为对照，进行Western blot鉴定。结果显示（图2-18），去除N-糖基化的PDCoV-S蛋白仍能被我们制备的S蛋白单抗所识别。但由于去除了聚糖的修饰，相较于对照组其条带明显变小。本研究表明了S蛋白的N-糖基化对6株单抗所针对的抗原表位并无明显影响。

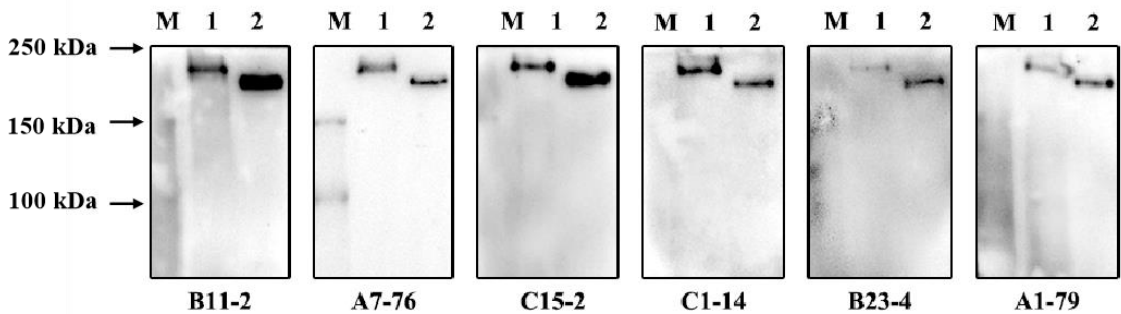


图 2-18 PDCoV-S 单抗对去 N-糖基化的 S 蛋白的反应性鉴定

- M. 蛋白预染 Marker; 1. 未经 PNGase F 处理的 PDCoV-GX2022-2 毒株感染细胞样;
2. 经 PNGase F 处理后的 PDCoV-GX2022-2 毒株感染细胞样

Figure 2-18 Identification of the reactivity of PDCoV-S monoclonal antibody to n-deglycosylated s protein

- M. Protein marker; 1. PDCOV-GX2022-2 strain without PNGase F treatment infected cells
2. PDCoV-GX2022-2 strain infected cells treated with PNGASE F

4 讨论

近年来,在众多猪腹泻性病原中,PDCoV愈发成为一种导致初生仔猪出现高发病率、高死亡率的重要病原体,且常与其他腹泻性病毒一起出现,造成混合感染。自2012年被中国香港首次发现后,PDCoV在全球范围内流行广泛。值得注意的是,PDCoV具有广泛的受体识别能力,因此能通过实现种间传播来感染多种哺乳动物、禽类,甚至人类,提示猪德尔塔冠状病毒病是一种具有潜在公共卫生风险的跨物种传播疾病,故对PDCoV疫情的防控不可掉以轻心,研发出有效的商业疫苗是当前最重要的目标之一。

在这项研究中,我们基于重组腺病毒制定了不同的免疫程序,利用细胞融合技术成功制备出7株抗PDCoV S蛋白的单克隆抗体。在进行抗原蛋白的表达时,首选了能够将蛋白质进行翻译后再加工修饰的病毒表达系统。由于利用大肠杆菌为代表的原核表达系统所制备的蛋白通常是没有修饰的线性化蛋白,并需要进行大量表达、纯化等工作,耗时较长。为了提高免疫原性,并尽可能保留S蛋白关键的空间结构,本研究将编码PDCoV S蛋白全长的基因序列克隆至5型腺病毒载体中,通过重组病毒的拯救来产生更接近于天然病毒粒子内部的S蛋白。并以这种携带S蛋白的重组腺病毒作为主要免疫原,结合原核表达的重组蛋白制定不同的免疫程序,分组对BALB/c小鼠进行免疫,在免疫过程中对小鼠的免疫效果进行监测。结果表明,在经过两次免疫后,小鼠体内能产生较高水的抗体,多抗血清的IFA效价可达1:8000;而中和抗体的水平也随着免疫次数的增多而逐渐升高,三次免疫后其效价可达 $2^{3.48}$ 。通过细胞融合及阳性细胞的亚克隆,最终成功制备出7株针对PDCoV S蛋白的单克隆抗体。

接下来,本研究对这组单抗进行相关生物学特性的鉴定。首先,利用本实验室分离的3株PDCoV野毒株对7株S蛋白单抗进行IFA鉴定。结果显示,所有单克隆抗体在病原检测方面均具有良好的IFA鉴定效果。随后,以PDCoV-GX2022-2毒株为例,对这组单克隆抗体进行Western blot检测。结果显示,由重组腺病毒结合原核表达蛋白免疫小鼠所制备的两株单克隆抗体(A7-76、B11-2株)能够通过传统SDS-PAGE检测到S蛋白的特异性条带,而C15-2、A1-79、B23-4、C1-14株仅能通过Native-PAGE识别病毒感染细胞样中的S蛋白。因此,推测A7-76、B11-2两株单克隆抗体识别PDCoV S蛋白的线性表位,而后者则识别S蛋白的天然构象表位。该结果说明以切胶方式纯化的原核重组蛋白在免疫过程中提供了呈线性多肽形式的抗原,帮助机体产生针对线性表位的抗体;而基于重组腺病毒的免疫,更有利于制备出靶向天然病毒蛋白构象表

位的单克隆抗体。除此之外，能够进行 Western blot 鉴定的 6 株单抗均可以识别 PDCoV 天然病毒粒子当中的 S 蛋白全长，但并未检测到 S1/S2 的切割条带，推测是由于被释放的成熟病毒颗粒仅含有完整的 S 蛋白结构。

S 蛋白是冠状病毒诱导机体产生中和抗体的主要靶蛋白，因此本研究基于 3 株 PDCoV 野毒株检测了这组单克隆抗体是否具有中和作用。结果表明，在 7 株单抗中，3 株靶向构象表位的单抗具有不同程度中和病毒感染的能力，其中 C15-2、C1-14 株单抗对 PDCoV-GX2021-1 毒株具有较高的中和效价，对于 PDCoV-GX2022-2 毒株的中和作用稍弱；而针对 PDCoV-GX2022-1 毒株，B23-4、C1-14 株具有一定中和作用。其次，病毒蛋白的翻译后修饰（PTMs）在病毒粒子完成自身生命周期及与宿主相互作用的过程中发挥了不可或缺的作用，其中糖基化修饰是大多数冠状病毒 S 蛋白最为突出的修饰之一。S 蛋白的三聚体表面被多种复杂的聚糖覆盖，在结构上帮助蛋白质的折叠，使 S 蛋白在构象动力学方面更具有灵活性；在功能上不仅影响与受体的结合能力，也使 S 蛋白的表位更具有多样性，并在很大程度上通过屏蔽相关抗原表位来帮助病毒完成免疫逃逸，从而增强病毒的感染性。于是，本研究利用软件预测了 3 株 PDCoV 毒株 S 蛋白的 N-糖基化位点，发现 S 蛋白具有 18 个较为保守的潜在 N-糖基化位点，且大部分均位于 S 蛋白的表面。为了验证本研究所制备的单克隆抗体能否识别去 N-糖基化后的 S 蛋白，我们利用去 N-糖基化酶（PNGase F）处理了 PDCoV-GX2022-2 毒株感染 ST 细胞的蛋白样品，随后进行 Western blot 检测。结果显示，所制备的单克隆抗体仍能识别去 N-糖基化后的 S 蛋白，但缺乏 N-糖基化修饰的 S 蛋白在分子量上明显减小。

综上所述，本研究基于重组腺病毒成功制备出一组针对 PDCoV S 蛋白的单克隆抗体，并且这 7 株单抗在 IFA 检测方面表现出了良好的特异性及反应性。其中 A7-76、B11-2 株单抗能够识别 PDCoV S 蛋白的线性表位，C15-2、A1-79、B23-4、C1-14 株则识别构象表位，并且针对构象表位的 C1-14、B23-4、C15-2 株单抗具有一定的病毒中和作用。其次，本研究制备的 7 株单抗所针对的抗原表位并非靶向 PDCoV S 蛋白 N-糖基化位点。

5 小结

- 1、本研究成功拯救出表达PDCoV S蛋白的重组腺病毒Ad5-PDCoV-S，该重组病毒具有较高的滴度，并在免疫原性方面具有较好的优势。
- 2、基于重组腺病毒的免疫，成功制备出7株抗PDCoV S蛋白的单克隆抗体，并且该组单抗适用于多种毒株的IFA检测。
- 3、在Western blot鉴定方面，2株针对线性表位的单克隆抗体能通过变性胶反应，而另外4株针对构象表位的单抗则能通过非变性胶反应；并且6株单抗均能识别PDCoV天然病毒粒子中的S蛋白。
- 4、其中靶向构象表位的C1-14、B23-4、C15-2株单抗具有一定的中和活性。
- 5、本研究制备的7株单克隆抗体所针对的抗原表位不受N-糖基化的影响。

全文总结

1、本研究成功分离了3株PDCoV广西流行毒株，并获得了其全基因组序列。通过系统发育树分析，发现3株PDCoV分离株均属于I型分支。其中PDCoV-GX2021-1毒株与美国代表毒株的亲缘关系相近，而PDCoV-GX2022-2及PDCoV-GX2022-1毒株与中国代表毒株的亲缘关系更为相近。

2、成功拯救出表达PDCoV S基因的重组腺病毒，该病毒具有良好的免疫原性。

3、基于重组腺病毒Ad5-PDCoV-S制定了不同的免疫程序，成功制备出7株抗PDCoV S蛋白的单克隆抗体，适用于大多数PDCoV毒株的IFA鉴定。其中2株单抗能够识别S蛋白的线性表位，4株识别构象表位。而针对构象表位的C15-2、B23-4、C1-14株单抗具有一定中和活性。

4、本研究制备的6株单克隆抗体能够识别PDCoV天然病毒粒子中的S蛋白；其次该组单抗所识别的抗原表位不受N-糖基化的影响。

参考文献

- [1] D Singh, SV Yi. On the origin and evolution of SARS-CoV-2[J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(4): 537-547.
- [2] M Yüce, E Filiztekin, KG Özkaya. COVID-19 diagnosis-A review of current methods[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112752.
- [3] Z Abdelrahman, MY Li, XS Wang. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 552909.
- [4] P V'kovski, A Kratzel, S Steiner, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 155-170.
- [5] B Hu, H Guo, P Zhou, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141-154.
- [6] Y Wu, MW Li, J Tian, et al. Broad antagonism of coronaviruses nsp5 to evade the host antiviral responses by cleaving POLDIP3[J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19(10): e1011702.
- [7] J Cui, F Li, ZL Shi. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [8] D Forni, R Cagliani, M Clerici, et al. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes[J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(1): 35-48.
- [9] LY Wang, C Maddox, K Terio, et al. Detection and Characterization of New Coronavirus in Bottlenose Dolphin, United States, 2019[J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(7): 1610-1612.
- [10] WT Zhu, J Yang, S Lu, et al. Beta- and Novel Delta-Coronaviruses Are Identified from Wild Animals in the Qinghai-Tibetan Plateau, China[J]. *Viol Sin*, 2021, 36(3): 402-411.
- [11] X Ye, YJ Chen, XY Zhu, et al. Cross-species transmission of deltacoronavirus and the origin of porcine deltacoronavirus[J]. *Evol Appl*, 2020, 13(9): 2246-2253.
- [12] LD Yin, X Liu, DM Hu, et al. Swine Enteric Coronaviruses (PEDV, TGEV, and PDCoV) Induce Divergent Interferon-Stimulated Gene Responses and Antigen Presentation in Porcine Intestinal Enteroids[J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 826882.

- [13] H Turlewicz-Podbielska, M Pomorska-Mól. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art[J]. *Virol Sin*, 2021, 36(5): 833-851.
- [14] N Dong, LR Fang, H Yang, et al. Isolation, genomic characterization, and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014[J]. *Vet Microbiol*, 2016, 196: 98-106.
- [15] YJ Xiang, CX Mou, LQ Zhu, et al. SADS-CoV nsp1 inhibits the STAT1 phosphorylation by promoting K11/K48-linked polyubiquitination of JAK1 and blocks the STAT1 acetylation by degrading CBP[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(3): 105779.
- [16] S Alonso, A Izeta, I Sola, et al. Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus[J]. *J Virol*, 2002, 76(3): 1293-308.
- [17] HG Wu, C Li, X Sun, et al. Identification of a Monoclonal Antibody against Porcine Deltacoronavirus Membrane Protein[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13934.
- [18] ZC Xu, HL Zhong, QF Zhou, et al. A Highly Pathogenic Strain of Porcine Deltacoronavirus Caused Watery Diarrhea in Newborn Piglets[J]. *Virol Sin*, 2018, 33(2): 131-141.
- [19] P Qin, WT Luo, Q Su, et al. The porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 is expressed in vivo and incorporated into virions[J]. *Virology*, 2021, 556: 1-8.
- [20] YJ Xiang, CX Mou, KC Shi, et al. SADS-CoV nsp1 inhibits the IFN- β production by preventing TBK1 phosphorylation and inducing CBP degradation[J]. *J Med Virol*, 2023, 95(9): e29104.
- [21] BQ Dong, W Liu, XH Fan, et al. Detection of a novel and highly divergent coronavirus from asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China[J]. *J Virol*, 2007, 81(13): 6920-6.
- [22] PC Woo, SK Lau, CS Lam, et al. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus[J]. *J Virol*, 2009, 83(2): 908-17.
- [23] PC Woo, SK Lau, CS Lam, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. *J Virol*, 2012, 86(7): 3995-4008.

-
- [24] YM Ma, Y Zhang, XY Liang, et al. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00064.
- [25] A Sinha, P Gauger, JQ Zhang, et al. PCR-based retrospective evaluation of diagnostic samples for emergence of porcine deltacoronavirus in US swine[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4): 296-8.
- [26] C Pérez-Rivera, H Ramírez-Mendoza, S Mendoza-Elvira, et al. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(4): 1436-1441.
- [27] S Lee, CH Lee. Complete Genome Characterization of Korean Porcine Deltacoronavirus Strain KOR/KNU14-04/2014[J]. *Genome Announc*, 2014, 2(6): e01191-14.
- [28] N Dong, LR Fang, SL Zeng, et al. Porcine Deltacoronavirus in Mainland China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(12): 2254-5.
- [29] T Janetanakit, M Lumyai, N Bunpapong, et al. Porcine Deltacoronavirus, Thailand, 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(4): 757-9.
- [30] T Suzuki, T Shibahara, N Imai, et al. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus[J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 61: 176-182.
- [31] A Lorsirigool, K Saeng-Chuto, G Temeeyasen, et al. The first detection and full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus isolated in Lao PDR[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(10): 2909-11.
- [32] J Vicente-Huaman, OE Gómez-Quispe. Evaluation of a Porcine deltacoronavirus eradication program in a full-cycle pig farm in Peru[J]. *J Adv Vet Anim Res*, 2021, 8(2): 300-306.
- [33] C Pérez-Rivera, H Ramírez-Mendoza, S Mendoza-Elvira, et al. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(4): 1436-1441.
- [34] FF Zhang, SX Luo, J Gu, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 470.

- [35] TH Hsu, HP Liu, CY Chin, et al. Detection, sequence analysis, and antibody prevalence of porcine deltacoronavirus in Taiwan[J]. Arch Virol, 2018, 163(11): 3113-3117.
- [36] Y Feng, ZW Xu, L Zhu. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Sichuan province, China[J]. Arch Virol, 2020, 165(12): 2883-2889.
- [37] B Li, YH Gao, Y Ma, et al. Genetic and Evolutionary Analysis of Porcine Deltacoronavirus in Guangxi Province, Southern China, from 2020 to 2023[J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 416.
- [38] M Peyambari, SX Guan, MJ Roossinck. RdRp or RT, That is the Question[J]. Mol Biol Evol, 2021, 38(11): 5082-5091.
- [39] MY Wang, R Zhao, LJ Gao, et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 587269.
- [40] C Duan, Y Liu, ZH Hao, et al. Ergosterol peroxide suppresses porcine deltacoronavirus (PDCoV)-induced autophagy to inhibit virus replication via p38 signaling pathway[J]. Vet Microbiol, 2021, 257: 109068.
- [41] WW Ji, Q Peng, XQ Fang, et al. Structures of a deltacoronavirus spike protein bound to porcine and human receptors[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1467.
- [42] B Wang, Y Liu, CM Ji, et al. Porcine Deltacoronavirus Engages the Transmissible Gastroenteritis Virus Functional Receptor Porcine Aminopeptidase N for Infectious Cellular Entry[J]. J Virol, 2018, 92(12): e00318-18.
- [43] XY Zhu, SD Liu, XL Wang, et al. Contribution of porcine aminopeptidase N to porcine deltacoronavirus infection[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 65.
- [44] WT Li, RJG Hulswit, SP Kenney, et al. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(22): E5135-E5143.
- [45] QQ Liang, HL Zhang, BX Li, et al. Susceptibility of Chickens to Porcine Deltacoronavirus Infection[J]. Viruses, 2019, 11(6): 573.
- [46] Y Liu, B Wang, QZ Liang, et al. Roles of Two Major Domains of the Porcine Deltacoronavirus S1 Subunit in Receptor Binding and Neutralization[J]. J Virol, 2021, 95(24): e0111821.
- [47] HL Zhang, QW Ding, J Yuan, et al. Susceptibility to mice and potential evolutionary characteristics of porcine deltacoronavirus[J]. J Med Virol, 2022, 94(12): 5723-5738.

- [48] F Kong, Q Wang, SP Kenney, et al. Porcine Deltacoronaviruses: Origin, Evolution, Cross-Species Transmission and Zoonotic Potential.[J]. Pathogens, 2022 Jan 9, 11(1):79.
- [49] K Jung, H Hu, B Eyerly, et al. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(4): 650-4.
- [50] Y Yan, L Chang, LN Wang. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures[J]. Rev Med Virol, 2020, 30(3): e2106.
- [51] 吴冰洁, 陆柔剑, 谭文杰. 病毒分离培养新技术及其应用[J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(02): 154-158.
- [52] 逢凤娇, 俞正玉, 何孔旺等. 猪 Deltacoronavirus RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(09): 683-686.
- [53] JQ Zhang, YL Tsai, PY Lee, et al. Evaluation of two singleplex reverse transcription-Insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PCR test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus[J]. J Virol Methods, 2016 Aug, 234: 34-42.
- [54] 肖帅, 刘新生, 方玉珍等. 猪德尔塔冠状病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(09): 1080-1086.
- [55] FF Zhang, Y Ye, DP Song, et al. A simple and rapid identification method for newly emerged porcine Deltacoronavirus with loop-mediated isothermal amplification[J]. Biol Res, 2017, 50(1): 30.
- [56] 董志珍, 张霞, 柴铭骏等. 猪德尔塔冠状病毒纳米 PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(08): 91-95.
- [57] 赵平, 秦毅斌, 何颖等. 猪德尔塔冠状病毒荧光 RT-RAA 快速检测方法的建立及初步应用[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(08): 85-89.
- [58] JY Zeng, WL Wang, L Zhou, et al. A nucleic acid detection assay combining reverse transcription recombinase-aided amplification with a lateral flow dipstick for the rapid visual detection of porcine deltacoronavirus[J]. Virulence, 2022, 13(1): 1471-1485.
- [59] F Okda, S Lawson, XD Liu, et al. Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus[J]. BMC Vet Res, 2016, 12: 95.

- [60] JZ Li, SQ Zhao, BT Zhang, et al. A novel recombinant S-based subunit vaccine induces protective immunity against porcine deltacoronavirus challenge in piglets[J]. *J Virol*, 2023, 97(11): e0095823.
- [61] SX Luo, JH Fan, T Opriessnig, et al. Development and application of a recombinant M protein-based indirect ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies[J]. *J Virol Methods*, 2017, 249: 76-78.
- [62] W Wang, JZ Li, BC Fan, et al. Development of a Novel Double Antibody Sandwich ELISA for Quantitative Detection of Porcine Deltacoronavirus Antigen[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2403.
- [63] WL Wang, YN Zhang, HC Yang. Development of a Nucleocapsid Protein-Based Blocking ELISA for the Detection of Porcine Deltacoronavirus Antibodies[J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1815.
- [64] K Jung, H Hu, B Eyerly, et al. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(4): 650-4.
- [65] V Kayser, I Ramzan. Vaccines and vaccination: history and emerging issues[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17(12): 5255-5268.
- [66] MC Li, H Wang, LL Tian, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 146.
- [67] SY Wang, WQ Liu, YQ Li, et al. A China-developed adenovirus vector-based COVID-19 vaccine: review of the development and application of Ad5-nCov[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2023, 22(1): 704-713.
- [68] M Romanenko, I Osipov, SV Netesov, et al. Adenovirus Type 6: Subtle Structural Distinctions from Adenovirus Type 5 Result in Essential Differences in Properties and Perspectives for Gene Therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(10): 1641.
- [69] SC Nouredini, DT Curiel. Genetic targeting strategies for adenovirus[J]. *Mol Pharm*, 2005, 2(5): 341-7.
- [70] N Arnberg. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(8): 442-8.
- [71] K Ewer, S Sebastian, AJ Spencer, et al. Chimpanzee adenoviral vectors as vaccines for outbreak pathogens[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(12): 3020-3032.

-
- [72] F Sakurai, M Tachibana, H Mizuguchi. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2022, 42: 100432.
- [73] S Khoshnood, R Ghanavati, M Shirani, et al. Viral vector and nucleic acid vaccines against COVID-19: A narrative review[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 984536.
- [74] FC Zhu, YH Li, XH Guan, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial[J]. *Lancet*, 2020, 395(10240): 1845-1854.
- [75] M Hasanpourghadi, M Novikov, HCJ Ertl. COVID-19 Vaccines Based on Adenovirus Vectors[J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(5): 429-430.
- [76] XW Wang, P Jiang, YF Li, et al. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 121(3-4): 215-24.
- [77] S Lokhandwala, SD Waghela, J Bray, et al. Adenovirus-vectored novel African Swine Fever Virus antigens elicit robust immune responses in swine[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177007.
- [78] WL Xia, Z Wu, CM Guo, et al. Recombinant adenovirus-delivered soluble CD163 and sialoadhesin receptors protected pigs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. *Vet Microbiol*, 2018, 219: 1-7.
- [79] X Miao, LP Zhang, P Zhou, et al. Adenovirus-vectored PDCoV vaccines induce potent humoral and cellular immune responses in mice[J]. *Vaccine*, 2023, 41(45): 6661-6671.
- [80] X Song, Q Zhou, JQ Zhang, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant adenovirus expressing a novel genotype G2b PEDV spike protein in protecting newborn piglets against PEDV[J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(1): e0240323.
- [81] JY Luo, LR Fang, N Dong, et al. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection suppresses RIG-I-mediated interferon- β production[J]. *Virology*, 2016, 495:10-7.
- [82] BZ Huang, Y Huang, LS Deng, et al. Intranasal administration with recombinant vaccine PRVXJ-delgE/gI/TK-S induces strong intestinal mucosal immune responses against PDCoV[J]. *BMC Vet Res*, 2023, 19(1):171.

- [83] WP Alejandra, JP Miriam Irene, GS Fabio Antonio, et al. Production of monoclonal antibodies for therapeutic purposes: A review[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 120:110376.
- [84] MM Rajah, A Bernier, J Buchrieser, et al. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation[J]. J Mol Biol, 2022, 434(6):167280.