



河北科技师范学院

硕士学位论文

PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体
夹心 ELISA 方法的建立

Preparation of monoclonal antibody against
M protein of PEDV and establishment of
double antibody sandwich ELISA method

一级学科: 兽医

二级学科: 兽医

研究生: 袁乐

指导教师: 潘素敏

合作教师: 肖书奇

河北科技师范学院

2024 年 5 月

分类号:

密 级:

UDC:

单位代码: 10798

PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体 夹心 ELISA 方法的建立

Preparation of monoclonal antibody against M protein of PEDV and establishment of double antibody sandwich ELISA method

二级学科: 兽医

研究方向: 动物疾病防控

研 究 生: 袁乐

指导教师: 潘素敏

合作导师: 肖书奇

所在院所: 动物科技学院

2024 年 5 月

缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
CPE	Cytopathic effect	细胞病变效应
DAS-ELISA	Double-antibody sandwich ELISA	双抗夹心 ELISA
E	Envelope	包膜蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
g	Gram	克
h	Hour	小时
I-ELISA	Indirect enzyme-linked immunosorbent assay	间接酶联免疫吸附试验
IF	Immunofluorescence test	免疫荧光法
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光
IFN	Interferon	干扰素
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化法
kDa	Kilo dalton	千道尔顿
L	Liter	升
mL	Millilitre	毫升
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
N	Nucleocapsid	核衣壳蛋白
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PCRV	Porcine respiratory coronavirus	猪呼吸道冠状病毒
PCV	Porcine circovirus	猪圆环病毒
PED	Porcine epidemic diarrhea	猪流行性腹泻
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus, Porcine hemagglutinating encephalomyelitis	猪流行性腹泻病毒 猪脑脊髓炎淋巴细胞凝集
PHEV	Virus	病毒

续表

英文缩写	英文全称	中文全称
PoRV	Porcine rotavirus	猪轮状病毒
	Porcine reproductive and respiratory	猪繁殖与呼吸障碍综合
PRRSV	Syndrome virus	征病
PRV	Pseudorabies virus	猪伪狂犬病毒
qPCR	Quantitative real-time PCR	荧光定量
	Reverse transcription-polymerase Chain	
RT-PCR	Reaction	逆转录聚合酶链式反应
S	Spike	纤突蛋白
	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide	十二烷基硫酸钠-聚丙烯
SDS-PAGE	Gel electrophoresis	酰胺凝胶电泳

摘要

猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是一种主要危害仔猪肠道的冠状病毒, 目前是猪场传染病的主要病原之一。为减少猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 造成的损失, 关键在于建立一种准确且快速的诊断方法, 及时控制该病的传播。本研究旨在原核表达 PEDV M 蛋白, 并通过杂交瘤技术将该蛋白作为免疫原免疫小鼠制备单克隆抗体, 基于抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体建立一种高效、灵敏且特异的双抗夹心 ELISA (Double-antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA) 方法, 为 PED 的防控和临床诊断提供重要的技术手段。具体研究内容及结果如下:

1. PEDV M 蛋白的表达与纯化

首先设计特异性 PCR 引物扩增优化后的 PEDV M 基因, 载体 pET-21(b) 用 EcoR I 和 Xho I 酶切后与扩增的 M 基因进行同源重组连接, 经菌液 PCR 和测序鉴定, 阳性重组质粒命名为 pET-21(b)-PEDV-M。将 pET-21(b)-PEDV-M 阳转至 BL21 (DE3) 感受态细胞中诱导表达, 采用镍柱纯化, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 以及蛋白质印迹 (Western Blot) 鉴定, 结果表明, 成功制备出浓度高且反应性良好的 PEDV M 蛋白。

2. 抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

将纯化的 PEDV M 蛋白免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 共免疫 4 次, 每次免疫前进行眼球采血, 通过间接酶联免疫吸附试验 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, I-ELISA) 检测血清效价, 第四次免疫后小鼠血清效价达到 1:32000。加强免疫后, 取小鼠脾脏与 SP2/0 进行融合, 采用三次有限稀释法亚克隆, 并通过 ELISA 和间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) 两者结合筛选出 2 株能够稳定分泌抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 5F2 和 7E1。小鼠致敏后于腹腔注射杂交瘤细胞, 制备腹水, 抗体纯化后, 使用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒鉴定单抗亚型。利用套式 PCR (Nested PCR) 扩增技术对单克隆抗体 7E1 可变区序列进行分析。通过对 PEDV M 蛋白两次截短, 并经 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测, 鉴定出单克

隆抗体 7E1 识别 PEDV M 蛋白区域为 92-129 aa。

3.DAS-ELISA 方法的建立

将单克隆抗体 7E1 作为捕获抗体，HRP-5F2 作为检测抗体，采用棋盘滴定法确定最佳包被浓度为 0.004 mg/mL 以及 HRP-5F2 稀释度为 1:1600，通过优化不同反应条件，筛选出最佳包被时间为 37°C 1 h，最佳封闭条件为 5% BSA 4°C 封闭过夜，最佳样品孵育时间为 37°C 2 h，HRP-5F2 最佳孵育时间为 37°C 1 h。该方法对病毒最低检测量为 1.56×10^5 TCID₅₀/mL，该方法与 PRRSV、PDCoV、PoRV、PCV 和 PRV 并不存在交叉反应，因此表明该方法具有较强的特异性；该方法检测样品变异系数为 6%-14%，表明重复性良好；RT-PCR 与本试验建立的方法进行对比，其符合率为 96%，表明该方法具有良好的可靠性。以上结果表明成功建立高效、灵敏且特异的 DAS-ELISA 方法。

综上所述，本试验通过原核表达成功制备出高纯度且反应性好的 PEDV M 蛋白且筛选出 2 株针对该蛋白的单克隆抗体 7E1 和 5F2，基于单抗 7E1 和 5F2 成功建立快速、灵敏且特异的 DAS-ELISA 方法。为 PEDV 的基础性和应用性研究奠定基础，为 PEDV 临床检测提供有力技术手段。

关键词：猪流行性腹泻病毒；M 蛋白；单克隆抗体；双抗体夹心 ELISA

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a coronavirus that mainly affects the intestinal tract of piglets and is currently one of the major pathogens of infectious diseases in swine farms. In order to reduce the losses caused by porcine epidemic diarrhea (PED), it is crucial to establish an accurate and rapid diagnostic method to control the spread of the disease in a timely manner. The aim of this study was to express PEDV M protein in prokaryotic nuclei and prepare monoclonal antibody by immunizing mice with the protein as an immunogen through the hybridoma technique, and to establish a highly efficient, sensitive and specific double-antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) based on the anti-PEDV M protein monoclonal antibody to provide an important diagnostic method for the prevention, control and clinical diagnosis of PED. It provides an important technical means for the prevention and control of PED and clinical diagnosis. The details and results of the study are as follows:

1. Expression and purification of PEDV M protein

Firstly, specific PCR primers were designed to amplify the optimized PEDV M gene, and the vector pET-21(b) was homologously recombinantly ligated with the amplified M gene after digestion with EcoR I and Xho I. The positive recombinant plasmid was identified by bacteriophage PCR and sequencing, and the positive recombinant plasmid was named as pET-21(b)-PEDV-M. pET-21(b)-PEDV-M was positively transferred to BL21 (DE3) receptor cells to induce expression, purified by nickel column, identified by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and protein blotting (Western Blot). The results showed that PEDV M protein with high concentration and good reactivity was successfully prepared.

2. Preparation and characterization of anti-PEDV M protein monoclonal antibody

Purified PEDV M protein was immunized in 6-week-old female BALB/c mice

for four times, and blood was collected from the eyeballs before each immunization, and the serum potency was detected by Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (I-ELISA), and after the fourth immunization, the serum potency of mice reached 1:32000. After the fourth immunization, the spleens of mice were fused with SP2/0, subcloned by three times limited dilution, and two hybridoma cell lines capable of stably secreting monoclonal antibodies against PEDV M protein were screened by a combination of ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), named 5F2 and 7E1 respectively, which were named 5F2 and 7E1, respectively. The mice were sensitized by intraperitoneal injection of the hybridoma cells, and ascites was prepared for antibody purification and identification of the monoclonal antibody subtypes using the mouse monoclonal antibody subtype identification kit. The sequence of the 7E1 variable region of the monoclonal antibody was analyzed by using Nested PCR (Nested PCR) amplification. The monoclonal antibody 7E1 recognized the PEDV M protein region of 92-129 aa was identified by truncating the PEDV M protein twice and detected by SDS-PAGE and Western Blot.

3. Establishment of DAS-ELISA method

The monoclonal antibody 7E1 was used as the capture antibody and HRP-5F2 was used as the detection antibody. The optimal encapsulation concentration was determined to be 0.004 mg/mL and the dilution of HRP-5F2 to be 1:1600 using checkerboard titration, and the optimal encapsulation time was screened out to be 37°C for 1 h, the optimal containment conditions were 5% BSA 4°C containment overnight, and the optimal incubation time for the samples was 37°C for 2 h, and the optimal incubation time for HRP-5F2 was 37°C for 1 h. The method was compatible with PRRSV, and the minimum detection amount of virus was 1.56×10^5 TCID₅₀/mL. The optimal incubation time for HRP-5F2 was 37°C for 1 h. The lowest detectable amount of virus was 1.56×10^5 TCID₅₀/mL, and the method did not cross-react with PRRSV, PDCoV, PoRV, PCV, and PRV, which indicated that the method had strong specificity; the coefficient of variation of the samples detected by the method was 6%-14%, which indicated good reproducibility; the RT-PRV method had good repeatability. The reproducibility of the method was good; the RT-PCR method was compared with the method established in this experiment, and the compliance rate

was 96%, which indicated that the method had good reliability. The above results showed that the DAS-ELISA method was successfully established with high efficiency, sensitivity and specificity.

In summary, this experiment successfully prepared a highly pure and reactive PEDV M protein by prokaryotic expression and screened two monoclonal antibodies 7E1 and 5F2 against this protein, and established a rapid, sensitive and specific DAS-ELISA method based on monoclonal antibodies 7E1 and 5F2. This method lays the foundation for the basic and applied research on PEDV and provides a powerful technical means for the clinical detection of PEDV.

Key words: Porcine epidemic diarrhea virus; M protein; Monoclonal antibody; Double antibody sandwich ELISA

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 PED 概述.....	1
1.2 PED 流行情况.....	1
1.3 PEDV 基本特征.....	2
1.3.1 PEDV 病原学.....	2
1.3.2 理化特性.....	2
1.3.3 培养特性及基因型.....	2
1.3.4 基因组结构.....	3
1.4 PEDV 病理特征及致病机理.....	6
1.4.1 病理特征.....	6
1.4.2 致病机理.....	6
1.5 PED 诊断方法.....	6
1.6 单克隆抗体的临床应用.....	8
1.7 抗原表位.....	9
1.8 PED 防控.....	9
1.9 研究目的和意义.....	10
第二章 PEDV M 蛋白表达及纯化.....	11
2.1 试验材料.....	11
2.1.1 病毒株及质粒质粒.....	11
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 主要仪器设备.....	12
2.1.4 主要试剂配制.....	12
2.2 试验方法.....	13
2.2.1 PEDV RNA 提取.....	13
2.2.2 PEDV M 基因克隆.....	14
2.2.3 PEDV M 蛋白诱导表达.....	15
2.2.4 PEDV M 蛋白超声及镍柱纯化.....	16
2.2.5 PEDV M 蛋白透析与浓缩.....	17
2.2.6 PEDV M 重组蛋白鉴定.....	17
2.3 试验结果.....	18
2.3.1 PEDV M 基因克隆.....	18
2.3.2 PEDV M 蛋白诱导表达.....	19
2.3.3 PEDV M 蛋白超声纯化.....	20
2.3.4 重组 M 蛋白鉴定.....	20

2.4 讨论.....	21
2.5 本章小结.....	22
第三章 抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定	23
3.1 试验材料.....	23
3.2 试验方法.....	24
3.2.1 PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备.....	24
3.2.2 PEDV M 蛋白单克隆抗体验证及抗体序列分析	28
3.2.3 单克隆抗体特异性结合 PEDV M 蛋白区域分析	30
3.3 试验结果.....	31
3.3.1 单克隆抗体制备结果.....	31
3.3.2 单克隆抗体活性验证及抗体序列分析结果	33
3.3.3 单克隆抗体特异性识别 M 蛋白区域鉴定	35
3.4 讨论.....	36
3.5 本章小结.....	38
第四章 DAS-ELISA 方法的建立.....	39
4.1 试验材料.....	39
4.1.1 主要试剂.....	39
4.1.2 主要仪器设备.....	39
4.2 试验方法.....	40
4.2.1 HRP 标记单克隆抗体.....	40
4.2.2 常规 DAS-ELISA 方法基本操作	40
4.2.3 捕获抗体和检测抗体最佳浓度的确定	40
4.2.4 DAS-ELISA 方法包被时间的优化	41
4.2.5 DAS-ELISA 方法封闭条件的优化	41
4.2.6 DAS-ELISA 方法样品孵育时间的优化.....	41
4.2.7 DAS-ELISA 方法 HRP-5F2 孵育条件优化.....	41
4.2.8 DAS-ELISA 方法临界值的测定	42
4.2.9 DAS-ELISA 方法灵敏性的测定	42
4.2.10 DAS-ELISA 方法特异性的测定	42
4.2.11 DAS-ELISA 方法重复性的测定	42
4.2.12 DAS-EISA 方法符合率的测定.....	43
4.3 试验结果.....	43
4.3.1 捕获抗体和检测抗体最佳浓度的确定	43
4.3.2 包被条件的确定.....	44
4.3.3 封闭条件的优化.....	45
4.3.4 样品孵育条件优化.....	46
4.3.5 HRP-5F2 反应时间	47
4.3.6 DAS-ELISA 方法临界值的确定	48

4.3.7 DAS-ELISA 方法灵敏性试验	48
4.3.8 DAS-ELISA 方法特异性试验	49
4.3.9 DAS-ELISA 方法重复性试验	50
4.3.10 DAS-ELISA 方法符合率试验	50
4.4 讨论	51
4.5 本章小结	52
全文总结	53
参考文献	54

第一章 绪论

1.1 PED 概述

冠状病毒感染全球人类及动物，生态链受到严重影响。PEDV 是由猪流行腹泻病毒引起的一种急性、仔猪高致死率肠道冠状病毒病^[1]。虽然各个年龄段的猪群均易感，但是发病率及死亡率有所不同，其中 7 日龄以内的仔猪感染 PEDV 后死亡率高达 100%，主要表现为水样腹泻、脱水消瘦、呕吐等临床症状^[2]。自 2010 年以来，PED 在全球大规模发生，现如今以关于 PED 的报道日益增加，全球养猪业经济下滑。由于 PED 的危害越来越严重，并且 PEDV 毒株在不断变异，疫苗保护力下降，致使 PED 的防控难度增加。临床上 PEDV 与其他病毒感染往往以混合感染形式引起猪腹泻，故实验室检测是诊断 PEDV 必不可少的技术手段。鉴于此，建立一种简便快捷的 PEDV 诊断方法有利于在发病早期控制 PEDV 在猪群中的传播以减少损失。

1.2 PED 流行情况

猪为 PEDV 的自然宿主，一般在冬季 12 月到 2 月是感染 PEDV 的高峰期，偶尔在夏季也有感染。PEDV 的传播途径主要有直接传播、间接传播以及气溶胶传播。PEDV 可以通过粪口直接或者间接传播，猪食用的饲料以及饲养员传播，初乳以及精液传播，还能通过粪鼻传播^[3-13]。1978 年，比利时科学家给从各种年龄猪的口服冠状病毒样本，而后从猪肠道和粪便中鉴定出冠状病毒颗粒，命名为 CV777，并发现该病毒在覆盖大肠绒毛以及小肠绒毛中的上皮细胞中复制^[14, 15]。1973 年，在中国上海首次记录了 PEDV 引起腹泻的案例，而后研究员开始展开调查，在 1984 年才核实该病毒为 PEDV^[16]。在 2010 年以前，PED 在中国属于散发或局部爆发，而在 2010 年 10 月以后中国南方大规模爆发，并成成百上千的猪发病死亡，尤其以仔猪死亡最严重，对该地区经济发展构成威胁^[17, 18]，并且调查研究发现毒株发生了突变^[19, 20]。

1.3 PEDV 基本特征

1.3.1 PEDV 病原学

根据国际病毒分类委员会公布的报告，将冠状病毒分为是个属，即 α 、 β 、 γ 、 δ ^[21]。PEDV 归属于套式病毒目、冠状病毒科、 α 冠状病毒属^[22]，除此之外，TGEV、猪呼吸道冠状病毒（Porcine respiratory coronavirus, PCRV）也属于 α 冠状病毒属的成员，而猪脑脊髓炎细胞凝集病毒（Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV）和 δ 冠状病毒分别属于 β 冠状病毒属和德尔塔冠状病毒属。在临床上又将猪冠状病毒分为肠致病性冠状病毒和呼吸道冠状病毒。

1.3.2 理化特性

PEDV 病毒粒子在自然环境下不能长期保存，而在零下 20℃环境中可稳定存活长达一年，在 60℃以上加热 30 min 后即可失活，另外在过酸或过碱条件下 PEDV 完全失活，并且温度越高病毒粒子越容易失活，故在高温条件下使用酸碱消毒剂消毒效果更好^[2]。有机脂溶剂可以破坏 PEDV 的囊膜结构从而使病毒粒子完全失活，例如甲醛，氢氧化钠、碳酸钠等。虽然 PEDV 对 RNA 酶敏感，但 C₉H₁₁N₂O₅ 对 PEDV 的复制没有抑制作用，并且超声波破碎和反复冻融不会影响 PEDV 的感染力^[23]。有研究表明，PEDV 由于没有血凝性，不能与动物以及人类的红细胞发生凝集反应，但 PEDV 经过神经氨酸酶和胰酶处理以后便能与红细胞发生凝血反应^[22, 24]。PEDV 的血清型只有一个，并且通过免疫荧光实验、免疫电镜实验和病毒中和实验可以得知 PEDV 与其他冠状病毒成员不仅没有相同抗原而且没有血清交叉反应^[25, 26]。

1.3.3 培养特性及基因型

PEDV 体外培养时受胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS）影响，PEDV 可以在经胰酶处理后的非洲绿猴肾细胞（VERO）培养液中正常增殖、稳定传代。有研究发，PEDV 可在猪原代肺泡巨噬细胞中复制并增殖，除此之外 PEDV 还能够其他传代细胞系中传代培养例如 MA-104、PK-15 等^[2, 27-29]。从而 PEDV 在分离、分子特性和理化性质的研究、疫苗的生产研发方面取得重大进展。

自 1970 年代 PEDV 出现以来，其传播过程发生了许多变化，导致存在许多具有不同毒力和传染性的毒株。许多科学家已经分析了 PEDV 的进化和基因型。该病毒通常分为经典株（GI）和突变株（GII），其中突变株（GII）可细分为非 S-INDEL 和 S-INDEL 两种。经典毒株包括在欧洲和比利时发现的早期 PEDV 菌株如毒力毒株 CV777，以及一些常见的毒株和通过连续体外传代获得的大多数细胞培养适应突变毒株，如减毒 CV777 和 DR13^[18]。经典毒株的毒性低于其他毒株，尽管它们已出现在欧洲和亚洲的大多数地区，但它们主要引起散发性暴发^[19]。在 2010 年，各猪场普遍进行疫苗接种，基本阻断了经典毒株的流行。目前在中国流行的主要毒株是 GI，它对中国养猪业构成极大地威胁。

1.3.4 基因组结构

PEDV 是一种包膜病毒，基因组为单股正链 RNA，属于冠状病毒科的甲冠状病毒属^[30, 31]。PEDV 是目前发现最大的 RNA 病毒之一，如图 1-1 所示，其基因组按以下顺序排列：5'-ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-N-3', ORF1a, ORF1b 编码两种非结构蛋白的 7 个开放阅读框（Open reading frame, ORF），经过加工可产生 16 种非结构蛋白（NSP1-NSP16），ORF3 编码辅助蛋白^[13, 32]。剩下的 4 个 ORF 编码 4 种结构蛋白，分别是纤突蛋白（Spike, S）、核衣壳蛋白（Nucleocapsid, N）、膜蛋白（Membrane, M）、包膜蛋白（Envelope, E）^[33-37]。

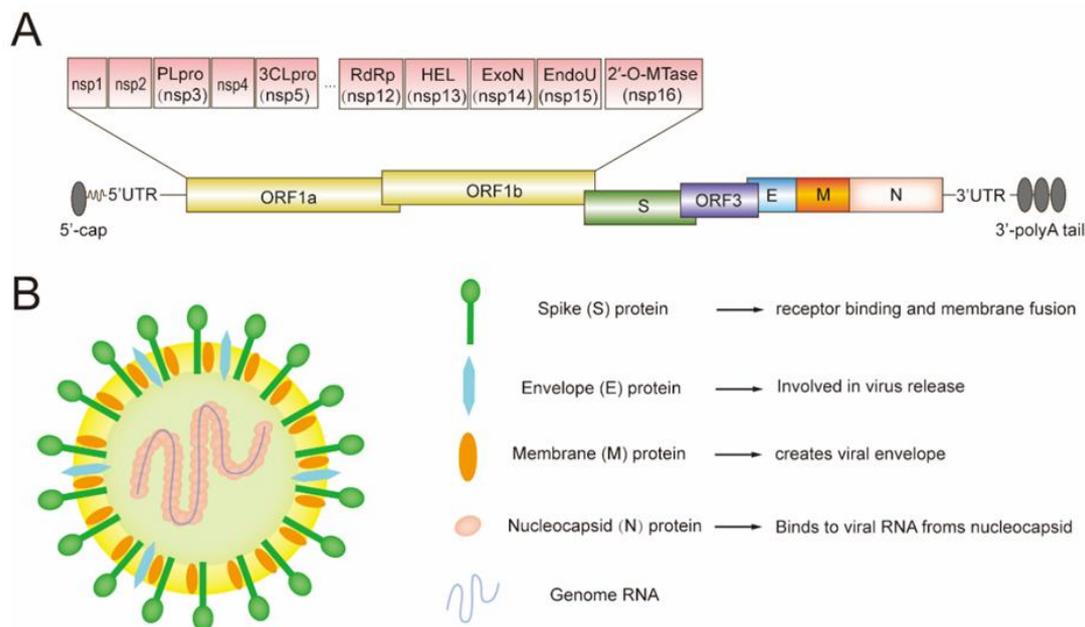
图 1-1 PEDV 基因组结构和病毒粒子结构示意图^[38]

Fig. 1-1 Schematic diagram of PEDV genome structure and virion structure

(1) S 蛋白

S 蛋白是一个大小为 150-220 kDa 的 I 型跨膜糖蛋白，是 PEDV 最大的结构蛋白。PEDV 生命周期始于 S 蛋白通过与其受体的相互作用与宿主细胞结合^[36, 39, 40]。S 蛋白对于病毒进入宿主细胞至关重要。在细胞进入过程中，S 蛋白与细胞上的受体结合，并介导病毒随后与细胞膜融合^[41, 42]。在正常情况下，细胞膜通过充当屏障来保护细胞免受病毒的危害。病毒不能进入细胞，除非它与宿主细胞膜表面的受体相匹配。病毒融合蛋白根据其结构相似性分为两类：I 型病毒融合蛋白和 II 型病毒融合蛋白。I 型病毒融合蛋白在 S2 亚基的 N 末端包含一个七重复序列（HR）区域和一个融合肽（FP），而 II 型病毒融合蛋白没有 HR 区域但具有内部 FP。冠状病毒 S 蛋白属于 I 型病毒融合蛋白家族；它包含一个具有两个疏水性 HR 区域的内部 FP，称为 HR1 和 HR2^[43]。S 蛋白是 PEDV 的主要毒力蛋白，可用于构建新型疫苗与诊断试剂研发。Shi 等^[44]以 PEDVS 蛋白作为免疫原免疫小鼠，使用传统方法研制出一种抗 PEDV S 蛋白单克隆抗体，该抗体能够中和 GI 和 GII 两种亚型，口服此抗体的新生仔猪能够抵抗 PEDV 感染，该抗体具有作为商业疫苗潜力，且构建的 HEK293 细胞系，使低成本生产抗体成为可能。

(2) M 蛋白

M 蛋白在冠状病毒囊膜中占比成分最高，它是一种由外部氨基酸末端和内部羧基末端结构域组成的跨膜糖蛋白。M 蛋白通过与其他病毒蛋白相互作用来执行其功能。M 蛋白在病毒组装过程中与刺突蛋白和核衣壳蛋白相互作用。M-M 相互作用构成了病毒包膜的整体支架^[45]。M 蛋白在病毒复制周期中发挥不可或缺的作用，M 基因与 S 基因相比，M 基因的遗传变异性较低^[46]。因此，PEDV M 蛋白可作为开发特定抗病毒药物和疫苗设计的靶点的首选蛋白。在 PDB 数据库中可以找到一些 PEDV 结晶蛋白的结构^[47-49]。M 蛋白可诱导猪的保护性抗体，并参与由 I 型和 III 型干扰素途径协调的细胞抗病毒系统的拮抗反应^[50]。PEDV M 蛋白的三维结构尚未报道。研究表明 M 蛋白具有保守的线性 B 细胞表位^{95WAFYVR²⁰⁰}，可以参与病毒粒子组装和出芽的过程，诱导机体 α 干扰素产生中和性抗体^[51]。M 基因全长的表达十分困难，可能与其出芽功能或毒性干扰作用有关^[52]。M 基因在 PEDV 毒株间高度保守。潘孝成^[53]等，通过分析安徽流行株 M 基因进行核苷酸序列分析，结果表明与 2011 年后 PEDV 的国内外主要分离株核苷酸序列同源率为 99.0%~100%。

(3) N 蛋白

N 蛋白缠绕病毒 RNA 形成螺旋状核衣壳结构，参与病毒的转录、复制过程。N 蛋白是病毒粒子的主要结构成分，在病毒感染中具有多种功能^[54-58]。它的主要作用是组织病毒基因组并提高病毒转录和组装的效率^[59]。除了在基因组管理中发挥作用外，PEDV N 蛋白似乎还可调节一些与病毒存活相关的细胞过程^[60]，保护宿主细胞免受诱导的细胞凋亡^[61, 62]，并通过与 TBK1 直接相互作用和抑制干扰素（Interferon, IFN）调节因子 3（IRF3）来拮抗 I 型 IFN 的产生^[63]。PEDV N 蛋白通过与 p53 直接相互作用而具有细胞周期调节功能^[64]。这些研究表明，N 蛋白在 PEDV 感染过程中参与多层复杂的功能作用。

(4) E 蛋白

PEDV 编码多种多功能蛋白，这些蛋白在病毒感染过程中抑制宿主先天免疫反应。E 蛋白基因组全长 232 bp 是分布于病毒囊膜上最小的蛋白，并且 E 蛋白具有高度保守性。PEDV E 蛋白在病毒生命周期中能阻断 I 型 IFN 的产生，但对 E 蛋白破坏宿主先天免疫的过程知之甚少。E 蛋白在病毒出芽过程中起关键作用^[65]。在进展到高尔基体装置之前，参与内质网-高尔基体中间区室（ERGIC）的形成，E 蛋白可以短暂地驻留在高尔基体前区室中，并在冠状病

毒感染期间诱导病毒包膜弯曲^[66]。E 蛋白缺失后将导致病毒在分泌途径的膜中运输被阻断，并阻止病毒完全成熟^[67]。据报道，小鼠肝炎病毒（MHV）M 和 E 蛋白的共同表达导致颗粒的形成和分泌无刺突冠状病毒样病毒粒子（VLP）^[68]，并且传染性支气管炎病毒（IBV）和 MHV E 蛋白亦可形成 VLP^[69, 71]。

1.4 PEDV 病理特征及致病机理

1.4.1 病理特征

对病死猪进行剖检，肠壁薄而透明并有出血点，肠系膜充血，肠系膜淋巴结肿大，严重的伴有出血。病理切片显示浅层绒毛肠细胞肿胀伴有轻度细胞质空泡化、散在肠细胞坏死后脱落，以及含有凋亡细胞的绒毛固有层收缩，肠道粘膜充血，淋巴结明显肿胀，胃黏膜有大小不一的出血点^[4, 18, 72]。绒毛缩短的程度与疾病的严重程度有关，而空肠中段和后段上皮细胞空泡化和大量细胞脱落可导致弥漫性萎缩性肠炎^[73-75]。

1.4.2 致病机理

PEDV 引起的腹泻是由于感染肠细胞后水分的大量丢失和功能障碍导致的结果，其次是刷缘膜结合消化酶减少^[76, 77]。血清素参与催吐，促炎细胞因子反应的增加部分导致食欲下降^[78]。仔猪感染 PEDV 后急性腹泻导致大量肠液丢失，心脏收缩力受损，在临床感染猪的小肠中，绒毛肠细胞的紧密或粘附连接被破坏^[79]。连接蛋白的表达，如带闭塞蛋白-1，也降低或改变，随后跨上皮抵抗力降低^[79, 80]。感染 PEDV 后小肠中杯状细胞和粘蛋白数量减少，增加了摄取食物时引起过敏反应和混合感染的几率。受损的肠道完整性或消化功能通常在存活猪感染后的第二周恢复^[81]。

1.5 PED 诊断方法

PED 的诊断方法可分为临床诊断和实验室诊断。临床诊断是疾病最基本的诊断方法，也是不可或缺的一部分。PED 的流行特征具有一定的季节性，通常

在冬季以及早春多发。PEDV潜伏期 1-8 天不等，感染周期可达 30 天左右^[82]。猪是 PED 的主要传染源，感染后主要表现为呕吐、腹泻和脱水等症状，7 日龄以内的仔猪感染后致死率高达 100%。与仔猪相比，母猪发病率有显著差异^[19]，被感染母猪一般不会出现腹泻症状，大多表现为精神萎靡和厌食的症状。

实验室诊断包括病原学诊断，分子生物诊断和血清学诊断。其中病原学诊断有病毒分离培养、免疫电镜法、免疫荧光法（Immunofluorescence test, IF）、免疫组化法（Immunohistochemistry, IHC）、胶体金免疫层析技术（Goldimmuno-chromatographic assay, GICA）。病毒的分离培养是临床医学界所公认的诊断 PEDV 最可靠的方法^[83, 84]。VERO 细胞是用于 PEDV 分离和繁殖的最广泛使用的细胞系，但必须将外源性胰蛋白酶添加到培养基中，以在细胞培养中分离 PEDV^[85-88]。IF 可用于检测 PEDV 抗原在细胞培养物中的分布^[37, 84]，或在肠道组织的冷冻切片中检测受感染肠细胞中的病毒抗原^[3, 89, 90]。IHC 已用于检测肠道组织中的 PEDV 抗原^[89]。此外，IHC 在福尔马林固定石蜡包埋的组织中进行，可以对存档的组织样本进行长期储存和回顾性测试^[91]。GICA 对操作人员无技术要求，不需要仪器辅助，并且反应敏捷、成本低、灵敏度高，因此该方法在临床检测上广泛应用。

分子生物诊断包括聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）、荧光定量 RCP（Quantitative real-time PCR, qPCR），环介导的等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）。PCR 是分子生物学领域最伟大的进步之一。PCR 方法的优势是可以检测不同的生物样本，如直肠拭子、粪便、口腔液和肠道样本，同时具有较好的灵敏性和特异性^[3, 37, 92, 93]。实时荧光定量 PCR（Real-time quantitative PCR, rRT-PCR）测定的主要优点是分析灵敏度和与扩增反应同时检测靶序列的能力^[94]。此外，rRT-PCR 检测可实现高通量检测和过程自动化。rRT-PCR 的另一个优点是多重检测能力，可以同时检测和区分不同的 PEDV 菌株^[95]例如其他猪的肠道病毒病原体，包括密切相关的冠状病毒 TGEV 和 PDCoV^[96, 97]。qRCP 检测目前受到青睐，因为它们比标准逆转录 PCR（Reverse transcription-polymerase chain ceaction, RT-PCR）更灵敏、更快、更容易执行，并且可以提供定量检测。世界各地的研究人员在使用临床样本或来自实验感染猪的样本对 PEDV 的敏感性和特异性进行评估，发表了许多 qPCR 检测方案，用于特异性检测 PEDV^[95]。环介导的等温扩增是一种简单且特异的核酸扩增方法，广泛应用于传染病诊断，包括 PEDV 的检测^[98-100]。迄今

为止，已经设计并评估了两种等温扩增测定法用于诊断 PEDV^[101]。rRT-LAMP 和 rRT-PCR 的检测限相同，而传统 RT-PCR 的检出限比其他两种测定方法高出 100 倍^[100]。

血清学诊断包括病毒中和试验（Virus neutralization assays, VNs）、酶联免疫吸附实验（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）、IFA。VNs 广泛用于检测 PEDV 特异性抗体。通过与病毒粒子结合，NAb 阻断病毒复制周期的一个或多个步骤引起病毒颗粒的聚集或裂解，从而中和或降低病毒感染性^[102]。PEDV 抗原可以使用抗原捕获 ELISA 在粪便中检测^[103-105]。PEDV 感染后采用 DAS-ELISA 检测方法其原理是用一种 PEDV 特异性抗体将病毒抗原捕获并用另一抗体进行检测，该方法灵敏可靠^[103-106]。DAS-ELISA 已被开发用于检测粪便样本中的 PEDV^[107]。应在感染的急性期，在临床症状出现后不久收集样本，及时运送到实验室，以减少感染带来的损失^[107]。IFA 测定已常规用于检测针对 PEDV 的抗体并评估受影响畜群的免疫状态^[82, 108]。

1.6 单克隆抗体的临床应用

抗体是一种异二聚体蛋白分子，由两条相同的轻链和两条相同的重链组成，每个链由不同的结构域组成。重链和轻链通过二硫键结合在一起，形成 Y 形结构。根据其重链序列，有五类抗体：IgM、IgD、IgG、IgE 和 IgA。每个类分为不同的子类型；例如，IgG 分为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。单克隆抗体已成为市场上的一类主要治疗剂。迄今为止，已有约 80 个 mAb 获得上市批准。2018 年，FDA 批准了 12 种新的单克隆抗体，占获批药物总数的 20%。大多数单克隆抗体疗法用于肿瘤和免疫/传染病，但这些疗法正在扩展到其他疾病领域。目前，单克隆抗体疗法对许多自身免疫性疾病和癌症有重大影响，可分为三类：免疫、肿瘤和抗感染。

重组单克隆抗体为疾病治疗提供了更多的解决方案。与多克隆相比，高效筛选、安全的药物生产与临床试验中的疗效以及生产大量产品的能力相结合，具有优势。单克隆抗体通常在疾病的诊断及治疗中应用。将单克隆抗体的表位定位，实现分子上关键抗原区域的可视化，为蛋白质以及其他具有临床相关性的分子的结构功能关系研究奠定基础。

1.7 抗原表位

当免疫原刺激机体产生体液免疫反应时，机体会产生大量针对该抗原表面的不同部位或区域的抗体，这些部位即为抗原决定簇或表位。通常表位包含六到八个氨基酸。大多数抗体识别三维形状并与之相互作用，该三维形状由分子折叠产生的“不连续”残基并列。抗体也可以识别氨基酸的线性延伸或“连续”表位。每个抗体分子对单个表位具有特异性，并且每个抗体都是单个 B 细胞克隆的产物。因此，来源于单个 B 细胞克隆的具有独特特异性的抗体称为单克隆抗体。抗原抗体识别和结合过程启动了宿主体内抗体的后续制造和产生，从而促进了体液免疫反应。鉴定 B 细胞表位具有至关重要的生物学意义，有利于增强我们对免疫反应和免疫疾病的了解。因此，全面了解抗原表位对于免疫干预治疗、疾病检测和无副作用有效疫苗的开发具有重要意义^[109, 110]。

1.8 PED 防控

PED 主要感染仔猪，发病迅速，死亡率高且无特殊治疗药物，因此接种疫苗是预防 PED 的最佳手段之一。在实际生产中，混合感染往往较为常见，因此养猪场不仅要做好 PEDV 的预防工作，同时要加强猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）、猪圆环病毒（Porcine circovirus, PCV）和猪伪狂犬病毒（Pseudorabies virus, PRV）等基础免疫。加强饲养管理，做好生物安全，是控制病毒性腹泻的唯一有效手段^[111-113]。

饲养管理方面提高饮食营养水平，在饲料中添加益生菌，改善肠道健康和抗病能力，并使用一些抗病毒草药进行预防。春秋两季昼夜温差差异大，应及时保持通风和保暖，以减轻猪的温度应激。遏制感染源，限制从疫区获取仔猪，引入病原体，防止狗和猫进入养猪场，做好养猪场的虫鼠防治工作，严格执行养猪场内外的消毒制度，提高环境控制水平对于防止该病的传入具有重要意义^[114, 115]。

选择适当的疫苗并制定合理有效的免疫计划。接种疫苗是控制和预防 PED 感染的主要手段。定期对猪的健康状况进行检查吗，并给健康的猪进行疫苗接

种，从而产生有效的抗体，提高保护力。接种疫苗后，应每年对猪进行抗体检测，并对母猪乳汁进行 IgA 水平检测，以制定合理的免疫计划，以应对抗体和 IgA 的变化。

1.9 研究目的和意义

PEDV 是目前影响中国养猪业健康发展的最主要病原体之一。PED 主要为地方性流行病，在各省份均流行。高致病性毒株和突变毒株的出现以及不同毒株之间抗原性的显著差异导致了感染仔猪腹泻的临床情况更加复杂。目前，临床上对于 PED 的感染发病仍未取得有效的控制，快速准确的诊断方法是疾病科学防治的前提条件。

PEDV 以仔猪腹泻为主要临床症状，感染初期即可通过粪便检测病毒粒子的存在，目前，实验室的检测方法较多，例如病原学诊断，分子生物诊断和血清学诊断。各个检测方法均有优点和缺点，根据不同的诊断材料和诊断条件选择合适的检测方法，提高对该病诊断的准确性。DAS-ELISA 方法不仅成本低，操作简单，并且适用于现场大批量样本检测，故建立该方法为快速诊断 PEDV 提供有力技术手段。

本试验将 PEDV M 基因克隆至载 pET-21(b)成功构建重组质粒 pET-21(b)-PEDV-M；利用原核表达系统，成功表达 PEDV M 蛋白。将 PEDV M 蛋白做为免疫原，制备出 2 株针对 PEDV 的单克隆抗体，并对单克隆抗体 7E1 可变区序列测序，通过截短表达 M 蛋白，筛选出单克隆抗体 7E1 能特异性识别 PEDV M 蛋白的区域为 92-129 aa。将 7E1 作为捕获抗体，HRP-5F2 作为检测抗体，建立一种特异性强且灵敏性高的 DAS-ELISA 方法。该方法的建立，为 PEDV 感染检测提供临床应用价值；为 PEDV 的流行病学调查提供有力工具；为 PEDV 的基础性和应用性研究提供重要的物质基础。

第二章 PEDV M 蛋白表达及纯化

M 蛋白属于 PEDV 囊膜中含量最丰的成分，其主要在病毒粒子组装和出芽的过程起着重要作用，M 蛋白可以刺激机体产生免疫反应，产生中抗体。M 蛋白在毒株之间相对保守，是检测病毒的首选靶点。本章主要采用原核表达系统表达 PEDV M 蛋白，通过 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切载体 pET-21(b)与扩增的 M 基因进行连接转化，成功构建重组质粒 pET-21(b)-PEDV-M，将质粒转入 BL21 (DE3) 中进行诱导表达，并通过镍柱纯化，蛋白透析浓缩后经 SDS-PAGE 以及 WB 鉴定，成功获得纯度高且反应性好的 PEDV M 蛋白。为后续 PEDV 单克隆抗体的制备奠定基础。

2.1 试验材料

2.1.1 病毒株及质粒质粒

感染 PEDV CH//SX//2016 株 (GenBank:MT787025.1) 的肠道组织和 pET-21(b)原核表达载体均由中国农业科学院兰州兽医研究所保存。

2.1.2 主要试剂

见表 2-1:

表 2-1 主要试剂
Table 2-1 main reagents

试剂名称	公司
RNAiso Puls、限制性内切酶	日本 Takara 公司
DH5 α 感受态细胞、250 bp DNA Ladder	北京擎科生物科技股份有限公司
BL21 (DE3) 感受态细胞、ProteinIso Ni-NTA Resin	北京全式金生物科技股份有限公司
反转录试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
质粒提取试剂盒	Magen 生物技术有限公司
蛋白 maker、核酸 maker	擎科生物有限公司
脱脂奶粉、吐温	Solarbio 公司

2.1.3 主要仪器设备

见下表 2-2:

表 2-2 主要设备
Table 2-2 main machine

设备名称	公司
恒温水浴锅、金属浴恒温器、涡旋震荡器	苏州捷美电子有限公司
生物安全柜	苏州安泰空气技术有限公司
脱色摇床	北京六一生物科技有限公司
蛋白电泳仪、核酸电泳仪	美国 Bio-Red 公司
超微量分光光度计	美国赛默飞世尔科技公司
荧光成像分析系统、微生物培养箱、4℃离心机	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
电子天平秤（万分之一）	华志（福建）电子科技有限公司

2.1.4 主要试剂配制

(1) 蛋白表达相关试剂

液体 LB: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, ddH₂O 定容至 1 L;

固体 LB: 胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 2.5 g, 氯化钠 5 g, ddH₂O 定容至 0.5 L;

1%琼脂糖凝胶: 琼脂糖 3 g, 1×TAE 30 mL, 煮沸后加入 10000×绿色荧光核酸染料;

IPTG: 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 5 g, ddH₂O 定容至 20 mL, 0.22 滤膜过滤;

(2) 超声及纯化相关试剂

平衡缓冲液: 尿素 480 g, NaH₂PO₄ 14.2 g, Tris 1.21 g, ddH₂O 定容至 1 L, 调 pH 值到 8.0;

2 M 咪唑: 咪唑 68 g, 平衡缓冲液定容至 500 mL;

洗脱液: 将 2 M 咪唑用平衡缓冲液按 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M, 1 M 浓度进行稀释;

(3) 蛋白鉴定相关试剂

10×Tris: Tris 90 g, 甘氨酸 432 g, ddH₂O 定容至 3 L;

Running buffer: 10×Tris 100 mL, 10% SDS 10 mL, ddH₂O 900 mL;

转膜液: 10×Tris 100 mL, ddH₂O 700 mL, 甲醇 200 mL;

12%浓缩胶: ddH₂O 4.1 mL, 30% Acrylamide 1mL, 1.0 M Tris PH=6.8 0.75

mL, 10% SDS 0.06 mL, 10%过硫酸铵 0.06 mL, TEMED 0.006 mL;

12%分离胶: ddH₂O 4.9 mL, 30% Acrylamide 6 mL, 1.0 M Tris PH=8.8 3.8 mL, 10% SDS 0.15 mL, 10%过硫酸铵 0.15 mL, TEMED 0.006 mL;

1×PBST: 10×PBS 100 mL, 吐温 1 mL。

2.2 试验方法

2.2.1 PEDV RNA 提取

采用 TRIZOL 法提取感染 PEDV CH/SX/2016 毒株的肠道组织 RNA, 具体操作步骤如下:

(1)研磨感染 PEDV CH/SX/2016 毒株的肠道组织, 加入等体积 PBS, 6000 r/min 离心 5 min, 取 400 μ L 上清加入 400 μ L RNAiso Plus, 裂解 5 min, 收取至离心管;

(2)加入 80 μ L 的氯仿 (RNAiso Plus1/5 体积的量), 震荡 15 s, 室温静置 5 min, 13000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 离心后溶液从下至上主要分为红色、白色和透明三层;

(3)将最上层透明液体转移到 1.5 mL 离心管中, 与转移液体体积 1:1 加入如异丙醇, 缓慢颠倒混匀, 常温静置 10 min 13000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;

(4)弃掉上清, 加入 75%乙醇 600 μ L, 13000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min;

(5)弃上清, 重复上述步骤(4);

(6)弃上清, 在通风橱内将 1.5 mL 离心管倒置于纸上 20 min 后, 待 1.5 mL 离心管内水分彻底干透后加入 30 μ L 的无菌无酶水, 轻弹混匀, 保存于 - 80 $^{\circ}$ C 冰箱。

将所提取的 RNA 反转录为 cDNA 做为基因克隆的模板。具体 RNA 反转录体系如下表 2-3:

表 2-3 反转录体系

Table 2-3 Reverse transcription system

成分	用量
5×Hiscript 11 qRT super Mix	2 μ L
无菌无酶水	3 μ L
PEDV RNA	5 μ L

反应程序为：50°C 15 min，85°C 5 s，16°C 4 min。反转的 cDNA 放于 -20°C 保存。

2.2.2 PEDV M 基因克隆

(1) 特异性引物设计

根据 PEDV 毒株 CH//SX//2016(GenBank:MT787025.1)的 M 基因序列，利用软件 Snapgene 选择基因序列中的酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I 设计特异性 PCR 扩增引物如下：

PEDV-M-F: GTCGGGATCCGAATTCGA ACTCCATCCGTCTGTGGC

PEDV-M-R: GGTGGTGGTGCTCGAGA ACCAGATGCAGGACTTTTTCGC

(2) PEDV M 基因扩增

将以上特异性 PCR 扩增引物送由西安擎科生物科技股份有限公司合成，合成特异性 PCR 扩增引物对 PEDV M 基因进行扩增，从而得到本试验所需要的目的片段 PEDV-M。具体 PCR 扩增体系见下表 2-4：

表 2-4 PCR 扩增体系

Table 2-4 Amplification system

成分	用量
PEDV cDNA 模板	2 μL
PEDV-M-F	1.5 μL
PEDV-M-R	1.5 μL
5×PS GXL Buffer	10 μL
dNTP Mix	4 μL
Prime STAR GXL	1 μL
ddH ₂ O	29 μL

反应程序见表 2-5。

表 2-5 PCR 反应程序

Table 2-5 PCR reaction procedure

	温度	时间
预变性	94°C	5 min
	98°C	10 s
35 个循环	60°C	15 s
	68°C	1 min
最后延伸	72°C	5 min

扩增结束后, PCR 产物电泳后于凝胶成像仪紫外鉴定并回收。凝胶回收方法根据胶回收试剂盒说明书进行操作。

(3) 重组质粒构建

EcoR I 和 *Xho* I 双酶切载体 pET-21(b), 酶切体系如下表 2-6:

表 2-6 酶切体系

Table 2-6 Digestion system

成分	用量
<i>EcoR</i> I	2 μ L
<i>Xho</i> I	2 μ L
10 \times QuickCut Green Buffer	5 μ L
载体 pET-21(b)	2 μ g
ddH ₂ O	to 50 μ L

将酶切混合物置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中进行酶切 3 h, 酶切产物电泳后于凝胶成像仪紫外鉴定并切胶回收。

将上述双酶切载体回收产物与 PCR 扩增产物进行连接, 连接体系如下表 2-7:

表 2-7 连接体系

Table 2-7 Connection system

成分	用量
5 \times CE II Buffer	4 μ L
Exnase II	2 μ L
PEDV-M 目的片段	150 ng
双酶切载体 pET-21(b)	150 ng
ddH ₂ O	to 20 μ L

反应程序为 37 $^{\circ}$ C 30 min。

2.2.3 PEDV M 蛋白诱导表达

将上述连接产物转入 DH5 α 感受态细胞。具体步骤为: DH5 α 感受态细胞置于冰上融化, 而后缓慢加入 1/10 感受态细胞体积的连接产物, 轻弹管壁, 于冰上静置 30 min, 之后将其置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 45 s, 迅速放回冰上, 此过程切勿剧烈晃动, 静置 2 min 后加入 500 μ L 的无抗 LB 培养基, 混匀后 37 $^{\circ}$ C, 置于恒温摇床 220 r/min 复苏 60 min, 在此期间将氨苄抗性的固体培养基放置 37 $^{\circ}$ C 微生物培养箱中进行预热。将复苏的菌液 4000 r/min 离心 5 min, 弃去 450 μ L 的上清, 用剩余的培养基将菌块重悬, 并将其涂布于氨苄抗性固体培养基中,

37°C微生物培养箱过夜培养。

于次日挑取单个菌落，将其接种于 1 mL 氨苄抗性的液体培养基中，37°C，220 r/min 活化菌液，而后将菌液进行 PCR 鉴定，并把 1%琼脂糖凝胶电泳结果鉴定为阳性的菌液送至西安擎科生物科技有限公司测序，挑选出测序正确的菌液进行质粒提取并将重组阳性质粒命名为 pET-21(b)-PEDV-M。将阳性菌液与 50%甘油按照 2:3 混合后放于 -20°C冰箱储存。

取阳性重组质粒 pET-21(b)-PEDV-M 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中，具体操作过程同上述转化操作一致，即冰浴、热激、复苏以及涂板后挑取单个菌落于 1.5 mL 离心管中进行活化，待细菌生长达到繁殖高峰期时进行扩大培养，同时将菌液和 50%甘油按照 2:3 混合后放于 -20°C冰箱储存。阳转菌液按 1:100 接种于 5 mL 氨苄抗性 LB 中，放置于 37°C，220 r/min 的恒温摇床进行培养，待 OD_{600nm} 在 0.6 时，吸取 1 mL 菌液作为未诱导组，而后加入 IPTG (终浓度为 0.001 M) 进行诱导，继续放置于 37°C，220 r/min 的恒温摇床培养 6 h。吸取 1 mL 菌液作为诱导组，而后 8000 r/min 离心 5 min 收集诱导以及未诱导菌液沉淀，加入 2×loading buffer，金属浴上 100°C加热 10 min 而后进行 SDS-PAGE 鉴定。

2.2.4 PEDV M 蛋白超声及镍柱纯化

待 SDS-PAGE 鉴定菌液表达后，将保存的菌液 1:100 接种于 300 mL 的氨苄抗性的液体培养基中，同上述操作方法进行诱导，用 50 mL 离心管收集菌体。将收集的菌体用 20 mL PBS 重悬后，与细胞超声破碎仪中超声 15 min (超 3s，间隔 3s)，超声后 4°C 12000 r/min 离心 10 min，分别收集上清和沉淀，各吸 1 ml 处理后通过 SDS-PAGE 进行可溶性分析。将沉淀用 8 M 尿素 20 mL 室温溶解 3 h 或者 4°C过夜溶解，用 *ProteinIso* Ni-NTA Resin 对 His 标签蛋白进行分离纯化。具体操作步骤如下：

装柱：将空柱架于铁架台上，加入镍柱混合物，静置，待保存液下降至柱体表面时镍柱量为 2 mL 时，用 5 倍柱体积平衡液对柱子进行平衡；

上样：为避免堵塞层析柱，蛋白样品在上样前需用 0.45 μm 的滤器进行过滤，而后与镍柱混匀后，转子 4°C 孵育过夜，次日进行纯化，将混合物放入亲和层析柱空柱管中。将亲和层析柱管底部的盖子打开，利用重力作用的原理，使柱内部的混合液体流出，收集液体；

蛋白洗脱：用平衡液配置不同浓度洗脱液对蛋白样品进行洗脱，每次 10 mL。根 SDS-PAGE 电泳来分析蛋白在哪个浓度被洗脱下来；

柱子清洗及保存：最后使用 5 倍柱体积的平衡液冲洗柱子 2 次，然后用蒸馏水冲洗一次，再将镍柱中加入 20%乙醇，4°C 保存。

2.2.5 PEDV M 蛋白透析与浓缩

配制不同浓度咪唑的透析液，主要为 6 M 尿素、4 M 尿和 2 M 尿素。选择透析袋截留分子量不超过蛋白大小 1/3 的透析袋，裁剪至合适大小，用纯水煮沸 10 min 后自然冷却，将纯化的蛋白装入透析袋中，在 4°C 环境中从高往低进行梯度透析，每个浓度透析 6 h。透析后的蛋白用浓缩管进行浓缩。通过 BCA；快速蛋白定量检测试剂盒测蛋白浓度，并将蛋白保存于 -80°C 冰箱。

2.2.6 PEDV M 重组蛋白鉴定

浓缩后的蛋白通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定。SDS-PAGE 具体操作步骤如下：

(1) 蛋白样品处理：将浓缩后的蛋白吸取 50 μ L 加入 50 μ L PBS 混匀而后加入 100 μ L 2 \times loading buffer 而后放置金属浴 100°C 加热 10 min，而后置于离心机顺离；

(2) 上样：将配制好的蛋白胶与电泳槽进行组装，电泳槽内加入 running buffer 至刻度线，蛋白胶每孔上样量为 10 μ L，蛋白 maker 上样量为 3 μ L；

(3) 电泳：上样后接通电源，先用 100 V 电压进行电泳，待 maker 分层后将电压调至 200 V，直至 maker 条带跑到目标位置后即可切断电源；

(4) 染色：电泳结束后，拆除胶板，将凝胶转移至考马斯亮蓝染色液中染色 3 h

(5) 脱色：将考马斯亮蓝染色液回收，加入自来水放入微波炉中加热 8 min 后换液继续加水加热直至凝胶变得透明，蛋白条带清晰可见。

Western Blot 鉴定操作步骤如下：

首先处理样品、上样、电泳操作步骤同上 SDS-PAGE 操作步骤，电泳结束后，拆除玻璃板，将 PVDF 膜浸泡以甲醇溶液中 30 s，而后按照从下至上，黑板、纤维垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、纤维垫和白板的顺序进行转膜“三

明治”的组装，并且在电泳槽内加入冰砖，整个电泳过程均在冰浴环境下进行。电泳结束后将转有蛋白的 PVDF 膜浸泡与 PBST 配制的 5%脱脂奶粉中进行封闭，室温摇床封闭 2 h；封闭结束后将纯化的单克隆抗体用 5%脱脂奶粉 1:2000 进行稀释，室温转子孵育 1 h，PBST 洗膜 4 次，5 min/次；将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 用 5%脱脂奶粉按 1:2500 进行稀释，于室温转子孵育 1 h，同上洗的方式洗膜；而后配制发光液，浸泡 1 min 后，置于化学发光分析仪中进行曝光。

2.3 试验结果

2.3.1 PEDV M 基因克隆

pET-21(b)载体用 *EcoR* I 与 *Xho* I 进行双酶切，结果如图 2-1 中(a)所示，双酶切产物在 5239 bp 处有条带与预期大小相符；以 PEDV cDNA 为模板，用设计的引物进行扩增，并将 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，如图 2-1 中(b)所示，成功扩增目的基因 PEDV M，大小为 387 bp，与预期大小相符合。

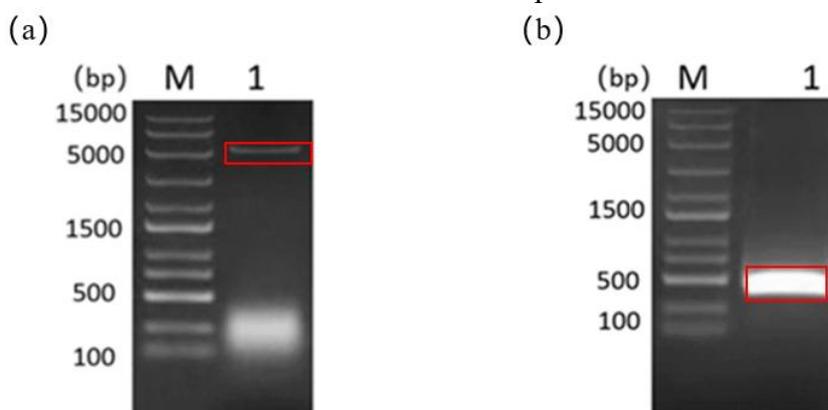


图 2-1 双酶切载体及 M 基因扩增结果

Fig. 2-1 Amplification results of double digestion vector and M gene

(a) 双酶切载体 pET-21(b)结果； (b) PEDV M 基因扩增结果

(a) Results of pET-21(b) of double digestion vector; (b) Amplification of PEDV M gene

M 基因 PCR 胶回收产物与 pET-21(b)载体双酶切产物，连接后转化至 DH5 α 感受态细胞。挑取单个菌落进行菌液 PCR 鉴定，结果如图 2-2 所示，将鉴定结果为阳性的菌液送北京擎科生物科技股份有限公司测序，并将序列对比无误的重组阳性质粒命名为 pET-21(b)-PEDV-M。

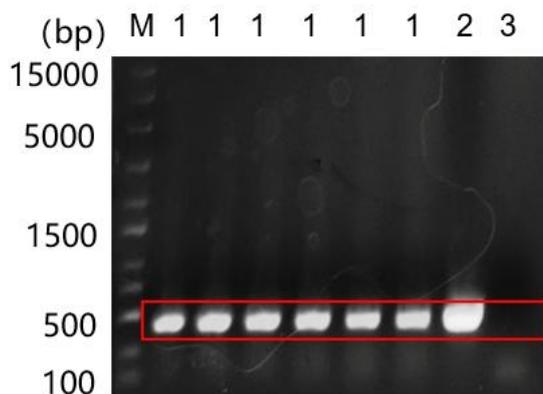


图 2-2 PEDV-M 菌液 PCR 鉴定

Fig. 2-2 PCR identification of PEDV-M bacterial solution

2.3.2 PEDV M 蛋白诱导表达

将重组质粒 pET-21(b)-PEDV-M 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 1:1000 加入 IPTG 进行诱导表达, 结果如图 2-3 中(a)所示, 泳道 1 为未诱导菌液, 泳道 2 为诱导菌液, 在泳道 2 中可见 16 kDa 大小处有相应条带, 表明 M 蛋白成功表达。将诱导产物超声处理后进行 SDS-PAGE 鉴定, 结果如图 2-3 中(b)所示, 泳道 1 为菌体裂解后上清, 泳道 2 为菌体裂解后沉淀, 在泳道 2 中 16kDa 处有一条与预期相符合的条带即 PEDV M 蛋白在沉淀中表达, 表明 M 蛋白表达形式为包涵体。

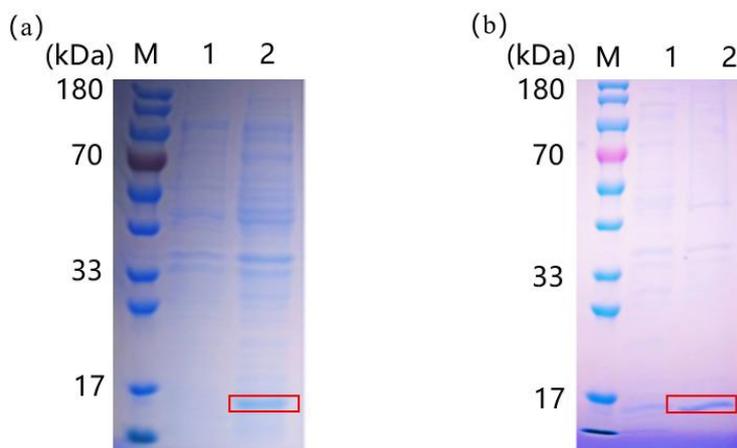


图 2-3 PEDV M 重组蛋白表达结果

Fig. 2-3 Expression of pET-21(b)M recombinant protein

(a) M 蛋白诱导结果; (b) 菌体裂解鉴定结果

(a) M protein induction results; (b) Identification results of cell lysis lake

2.3.3 PEDV M 蛋白超声纯化

将成功表达的 M 蛋白通过镍柱亲和层析法对蛋白进行纯化，使用梯度浓度咪唑对蛋白进行洗脱，结果如图 2-4，泳道 1-9 分别为流出液、0.01 M 咪唑、0.05 M 咪唑、0.1 M 咪唑、0.25 M 咪唑、0.5 M 咪唑、1 M 咪唑和 2 M 咪唑，PEDV M 蛋白在 0.1 M 咪唑以及 0.25 M 咪唑下被洗脱下来。

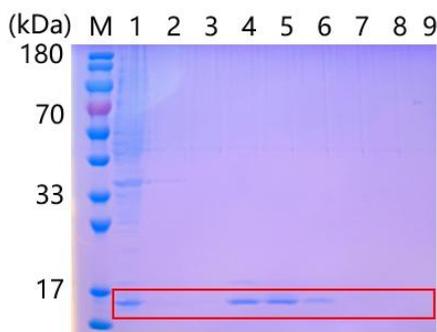


图 2-4 M 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析

Fig. 2-4 M protein purification SDS-PAGE analysis

2.3.4 重组 M 蛋白鉴定

采用镍柱亲和层析法对 M 蛋白进行纯化，经 SDS-PAGE 鉴定，结果如图 2-5 中(a)所示，在 16 kDa 处有相应条带，与预期大小相符合，说明成功获得了重组 PEDV M 蛋白。通过 His 标签抗体检测 M 蛋白，结果如图 2-5 中(b)所示，在 16 kDa 出有相应大小的条带，即成功制备出反应性良好的 PEDV M 蛋白。

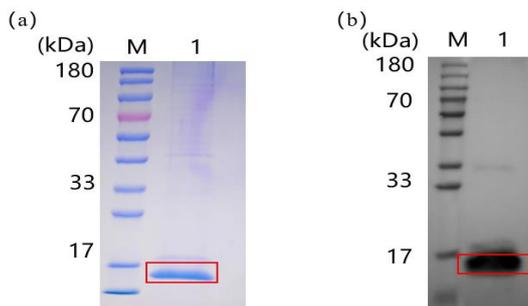


图 2-5 蛋白纯化 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定结果

Fig. 2-5 Identification results of protein purification SDS-PAGE and Western Blot

(a) PEDV M 蛋白 SDS-PAGE 鉴定；(b) PEDV M 蛋白 Western Blot 鉴定

(a) SDS-PAGE identification of PEDV M protein; (b) Western Blot identification of PEDV M protein

2.4 讨论

PED 是一种急性高度接触性肠道传染病，感染各年龄段猪，对仔猪致死率极高^[116]。近年来，PED 在我国广泛传播，由于 PEDV 毒株不断变异增强，导致 PEDV 相关疫苗免疫效果不理想。有研究表明^[117]，PEDV 变异毒株中 S 基因的大部分区域发生变异，导致变异毒株之间的免疫原性存在较大的差异，从而导致疫苗免疫效果不佳。因此建立一个快速且有效的检测方法有利于 PED 的预防和控制。M 蛋白在病毒的组装和出芽过程中是不可或缺的，同时也可以诱导机体产生具有病毒中和活性的保护性抗体。M 基因在 PEDV 毒株之间相对保守，这一特性使其作为常用靶基因广泛应用于各种诊断方法中。M 蛋白的成功表达，为 M 蛋白结构及功能的研究奠定基础。M 蛋白是检测 PEDV 靶蛋白的不二之选。M 蛋白在细胞中表达达到一定量时，可能会对细胞壁造成伤害，从而出现生长抑制现象，故在冠状病毒中，M 蛋白的体外表达较为困难，并且不稳定甚至不表达^[118-120]。早在 20 世纪，PEDV M 蛋白用真核表达系统进行表达，经评估发现其表达水平较低，从而影响 M 蛋白在诊断中的潜力^[121]。为提高表达水平，有研究者将 M 蛋白截短后克隆至 pGEX-6P-1，优化诱导条件后，其表达水平较高^[122]。本试验即通过原核表达系统将 PEDV M 基因转入载体 pET-21(b) 进行诱导表达，成功制备出 PEDV M 蛋白。

PEDV 结构蛋白中，M、S 和 N 蛋白是主要蛋白，但目前还没有关于 M 蛋白的血清学诊断试剂的报道。M 蛋白与 PEDV 的其他结构蛋白相比，M 蛋白相对保守，因此，将 M 蛋白作为诊断抗原优势更佳。M 蛋白是 PEDV 颗粒囊膜中含量最丰富的成分，在全病毒抗原提取过程中，M 包膜外部比 S 更加稳定，故在血清学诊断中将 M 蛋白作为诊断抗原更为可靠。为使抗原抗体充分结合，抗原必需将蛋白暴露于外部。而 M 蛋白的包膜外部最初暴露在外，与之相比，N 蛋白位于病毒颗粒的胞内，显然直接使用 M 蛋白做为检测抗原用于实际诊断中效率更高。

在本试验中，曾将 PEDV M 基因克隆于载体 pET-28a，但表达量较低并且纯化过程中蛋白不与镍柱结合。而后选用 pET-21(b) 载体，成功表达 M 蛋白，但表达的蛋白为不可溶性蛋白，虽然表达水平高，但复性较为困难。形成包涵体的原因目前暂不明确，是否可以通过优化诱导条件，例如诱导时长，细菌生

长温度来转化蛋白表达形式。

综上所述，M 蛋白在原核表达系统中的表达水平更高，并且 M 蛋白的成功表达使有利于相关诊断技术的研发，对该蛋白功能结构的研究具有重要的意义。

2.5 本章小结

成功构建原核表达载体pET-21(b)PEDV-M；通过诱导表达、纯化、透析和浓缩，成功获得纯度较好的重组PEDV M蛋白。

第三章 抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

PED 至今任危害着养猪业的发展, 对该病的防控以及对该病毒感染机制的研究成为焦点。单克隆抗体作为一种特异性强, 均质性好且效价高的理想靶向工具, 为病原学和血清学检测, 以及 PEDV 的免疫机制的研究提供有力工具。本试验将纯化后的 M 蛋白免疫小鼠, 采取小鼠脾细胞与 SP/20 细胞进行融合, 筛选出能 2 株能稳定分泌抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体 7E1 和 5F2, 通过 IFA 和 Western Blot 验证单克隆抗体的反应性。对单克隆抗体 7E1 可变区进行测序以及鉴定该抗体与 PEDV M 蛋白特异性识别的区域。为建立特异性强、灵敏性好的 DAS-ELISA 方法奠定基础。

3.1 试验材料

SP/20 细胞由本实验室储存, SPF 级 BALB/c 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心。

3.1.1 主要试剂

见下表 3-1。

表 3-1 主要试剂

Table 3-1 Main reagents

试剂名称	公司
弗氏完全 (不完全) 佐剂	美国西格玛公司
胎牛血清、Protein G 抗体纯化柱	北京全式金生物有限公司
HAT、HT	Sigma 公司
TMB 显色液、ELISA 终止液、腹水专用佐剂	Biodragon 公司
T4 DNA 连接酶	日本 Takara 公司

3.1.2 主要仪器设备

见表 3-2:

表 3-2 主要仪器

Table 3-2 Main instruments

设备名称	公司
ELISA 洗板机	北京六一生物科技有限公司
CO ₂ 细胞培养箱、恒温培养箱和生物安全柜	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
荧光显微镜	宁波永新光学股份有限公司
普通倒置显微镜	日本尼康株式会社
酶标仪	美国 BioTek 公司

3.1.3 主要试剂配制

平衡缓冲液：称取 PB 4.14 g，KCL 11.1 g 定容至 1L ddH₂O 中，调 PH=7；

中和液：称取 Tris-HCL 121 g 定容至 1L ddH₂O 中，调 PH=9；

洗脱液：称取柠檬酸 3.84 g，定容至 1L ddH₂O 中，调 PH=3。

3.2 试验方法

3.2.1 PEDV M 蛋白单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

挑选 3 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠，制订相应的免疫程序如下表 3-3：

表 3-3 小鼠免疫程序

Table 3-3 Mouse immunization program

免疫次数	免疫剂量 (只/ μ g)	乳化剂	免疫途径
首免	50	等体积完全复佐剂	背部皮下多点注射
二免	100	等体积不完全弗氏佐剂	背部皮下多点注射
三免	100	等体积不完全佛寺佐剂	背部皮下多点注射
加强免疫	50	无	腹腔注射

首次免疫为 50 μ g 的 PEDV M 蛋白与等体积完全弗氏佐剂利用三通器乳化，待其形成油包水状态后，于小鼠背部皮下多点注射。每隔 2 周进行一次免疫，免疫前进行眼球采血测定血清效价，共免疫四次，四免后 7 天眼部采血进行 ELISA 测定血清效价，抗体滴度在 1:10000-1:0000000 范围内即可免疫冲击后 3

天进行细胞融合，并采小鼠全血作为多克隆抗体。

(2) 小鼠血清效价测定

准备 ELSIA 板，将纯化后的 PEDV M 蛋白用 PBS 稀释后以每孔 200 ng 浓度包被于 ELISA 板上，置于 37°C 培养箱包被 2 h，而后使用 PBST 洗 4 遍，拍干水分，加入 5% 脱脂奶粉于 37°C 封闭 2 h，用 PBST 洗 4 遍，拍干水分，将免疫小鼠血清和未免疫小鼠血清用 PBST 倍比稀释，稀释梯度从 1:1000 至 1:128000，共稀释 8 个梯度，以每孔 100 μ L 加入，而后 37°C 作用 1 h，PBST 洗 4 遍，拍干水分，加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:10000 稀释)，PBST 洗 4 遍后，拍干水分，每孔加入 100 μ L 的 TMB 进行显色，15 min 后加入 ELISA 中终止液，置于酶标仪上测定 OD_{450nm}。

(3) 细胞融合

试验前准备：将水 1 L、镊子剪刀三套和一个 1 L 的烧杯提前一天高压。试验当天，提前将超净台的紫外照射灯打开，对整个台面以及固定小鼠的针头和泡沫板用 75% 乙醇消毒后进行紫外杀菌 30 min；提前将水浴锅调至 37°C，用于高压水保温，或将高压水放至 37°C 培养箱保温即可；PEG 也需要提前放 37°C，有利于促进融合，另外需要准备无血清 RPMI 1640 培养基、75% 乙醇、HAT、添加因子、2 个细胞培养皿、5 mL 注射器、研磨筛和烧杯。具体操作步骤如下：

1) 小鼠眼球采血，取小鼠全血，分离血清得到鼠多抗，将死亡后的小鼠放入装有 75% 乙醇的烧杯中，乙醇需淹没小鼠浸泡 5 min 及以上；

2) 将 RPMI 1640 培养基倒入 2 个培养皿中，准备 50 mL 离心管将研磨筛固定在 50 mL 离心管管口；

3) 将小鼠四肢固定在泡沫板上，沿两个大腿内侧剪开，分别向头和向头垂直方向剪开，然后用镊子挑起皮肤向上撕拉即可，找到脾脏，用另一把高压的剪刀将脾脏剪下，放入细胞培养皿中；

4) 取下的脾脏尽可能的去掉脂肪组织等，先在细胞培养皿中加入 RPMI 1640 培养基清洗一遍，再转移到另外一个装有 RPMI 1640 培养基的细胞培养皿中，用 5 mL 注射器吸入 RPMI 1640 培养基轻柔地灌入脾脏，反复吹打直至脾脏接近透明，而后将脾脏放入研磨筛中用注射器的活塞进行研磨，细胞培养皿内带有脾细胞的 RPMI 1640 培养液冲洗研磨筛；

5) 取 2 瓶事先培养好的 SP2/0 细胞，用无血清 RPMI 1640 培养基清洗两遍，往 T75 细胞培养瓶里加 10 mL 左右 RPMI 1640 培养基，轻轻拍下细胞，另一瓶

SP2/0 细胞亦是如此拍下，将两瓶细胞合并到一起，而后将细胞转移到洗有脾细胞的 50 mL 离心管中，轻轻颠倒混匀，500 r/min 离心 10 min；

6) 弃上清，加血清 RPMI 1640 培养基重悬，500 r/min 再次离心 10 min；

7) 弃上清，轻拍管底，使细胞松散；

8) 将高压的水倒入烧杯中，将 50 mL 离心管放入 37°C 水中；

9) 取预热的 PEG，加 1 mL PEG，缓慢加入时间控制在 1 min，边加边旋转 50 mL 离心管，可用枪头轻柔搅拌，于水中静置 1-2 min；

10) 将 RPMI 1640 培养基倒入加样槽，加 RPMI 1640 培养基终止，倒计时 5 min，每分钟分别加 1 mL、1 mL、3 mL、10 mL 与 10 mL RPMI 1640 培养基，旋转贴壁滴加，过程缓慢轻柔；

11) 静置 2 min，颠倒 2 次，再静置 7 min，全程于 37°C 高压水中进行；

12) 800 r/min 离心 8 min，弃上清加入适量含有 HAT 的培养基重悬细胞，分装到 96 孔板，每孔 100 μ L，置于 37°C 细胞培养箱培养。

(4) 杂交瘤细胞筛选

细胞融合后 24 h 进行补液，每孔加 50 μ L 含 HAT 的培养基；5-7 天进行换液，吸 120 μ L 上清弃掉，加入 150 μ L 含 HT 的培养基；24 h 后再次进行换液，24 h 后吸上清 40 μ L 用 5% 脱脂奶粉 40 倍稀释进行 ELISA 鉴定，操作步骤同(2)中 ELISA 步骤；读取 OD_{450nm} 值后，挑出 ELISA 阳性孔进行 IFA 鉴定，具体步骤为：PEDV 感染 VERO 细胞 24 h 后，在显微镜下观察细胞是否发生病变。将细胞从细胞间取出后倒掉培养液，加 100 μ L 的 PBS 洗 2 遍，由于 VERO 细胞的贴壁性较好，故可以直接弃液，整个操作过程需轻柔；细胞固定用 4% 多聚甲醛 50 μ L/孔，室温孵育 15 min，弃掉液体用 PBS 清洗 3 次；使用 0.25% 的 Triton-x-100 进行破膜，50 μ L/孔，室温反应 15 min，Triton-x-100 质地粘稠需要提前用 PBS 配制，PBS 洗三遍；用 5% 脱脂奶粉封闭，50 μ L/孔，37°C 温箱作用 30 min，PBS 洗 3 遍；用 5% 脱脂奶粉将杂交瘤细胞上清稀释 5 倍，100 μ L/孔，37°C 反应 1 h，PBS 洗 3 遍；1:100 稀释 FITC-山羊抗鼠，37°C 反应 1 h，PBS 洗 3 遍，最后加入 PBS 防止细胞干燥；而后将板子置于荧光显微镜下观察。

(5) 阳性杂交瘤细胞亚克隆

有限稀释法亚克隆，具体步骤如下：

1) 挑选出细胞融合后 ELISA 和 IFA 双重鉴定均为阳性的孔进行亚克隆；

2) 准备一个新的 96 孔细胞板，每孔加入 100 μ L 20% FBS 的 RPMI 1640 培

培养基;

3) 在挑选的阳性孔中加入 50 μL 含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基吹打混匀后, 吸出 100 μL 加到步骤(2)中的 96 孔细胞板中, 从第一个孔往下进行稀释, 再往阳性孔板内补加 100 μL RPMI 1640 培养基里继续培养;

4) 在显微镜下观察稀释后的 96 孔板内细胞数量, 选择细胞数量在 100-200 的孔, 吸 100 μL 加入 5.5 mL 的培养基里 (含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基、HT 和生长因子), 用排枪吹打混匀后加入新的 96 孔板中, 加满半个 96 孔细胞板;

5) 培养 5-6 天后观察细胞状态并进行补液, 补液后 5-7 天细胞长满 1/4 孔即可吸取上清进行 ELISA 和 IFA 鉴定。将细胞上清用 5% 脱脂奶粉 40 倍稀释后作为 ELISA 鉴定一抗, 稀释上清 5 倍稀释后作为 IFA 鉴定的一抗, 二抗均为 FITC-羊抗鼠;

6) 挑选 ELISA 和 IFA 鉴定结果均为阳性的孔进行第二次亚克隆, 第二次第三次亚克隆方法同第一次亚克隆;

7) 第三次亚克隆结束以后挑选阳性孔进行扩大培养到 T75 细胞培养瓶, 部分细胞用于冻存, 部分细胞用于小鼠腹腔注射。细胞冻存具体操作如下。

a. 将培养到 T75 细胞瓶中的细胞轻柔拍下, 转移至 15 mL 离心管中;

b. 将细胞置于离心机 1000 r/min 离心 5 min, 而后弃上清;

c. 预混冻存液: 总体积 10% 的细胞冻存液 (DMSO)、总体积 30% 的 FBS、总体积 60% 的无血清 RPMI 1640 培养基;

d. 向细胞沉淀中加 3 mL 冻存液重悬, 1 个 T75 细胞瓶分装为 3 个冻存管, 一个管里装 1 mL 细胞混合物。

(6) 腹水的制备

细胞复苏: 取出冻存于液氮罐的杂交瘤细胞, 迅速将细胞放于 37°C 水浴锅中, 融化后将细胞液吸到离心管, 加入 5 mL 无血清 RPMI 1640 培养基 1000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 重新加入 5 mL 无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞, 而后转移到细胞瓶内于 37°C 细胞培养箱培养。

取 10-12 周的 BALB/c 雌性小鼠, 每只小鼠于腹腔左侧或右侧下腹部注射博奥龙腹水制备专用佐剂 0.5 mL, 15 天后每只小鼠腹腔注射 5×10^5 个杂交瘤细胞 (0.5 mL), 7-10 天左右, 鼠体腹腔明显隆起, 行动不便, 食欲不佳毛色暗沉, 即可采集腹水, 用 2 mL 的注射器刺入下腹部缓慢抽取腹水, 13000 r/min

离心 10 min, 吸取上清, 于 -80°C 保存。

(7) 腹水纯化

将抽取的腹水离心处理后, 将上清进行纯化, 具体步骤如下:

- 1) 装柱: 将介质重悬后装入层析柱中, 待保存液流掉后剩余 2 mL 柱体积;
- 2) 平衡: 用 5 倍柱体积的平衡缓冲液平衡层析柱;
- 3) 上样: 样品每 4 mL 腹水加 16 mL 平衡缓冲液混匀后用 0.45 μm 滤器过滤, 过柱两遍;
- 4) 洗杂: 用 5 倍柱体积平衡缓冲液洗杂, 收集流出;
- 5) 洗脱: 准备 15 mL 离心管提前加入 1 mL 中和液, 往柱子里加 9 mL 洗脱液, 收集流出后立即用 NaOH 或浓 HCl 调 PH 至 7.0;
- 6) 柱子加水冲洗, 加入 20% 乙醇保存。

洗脱下来的腹水用 500 mL PBS 透析 2 次, 每 4 h 换一次透析液; 透析后用浓缩管 4000 r/min 离心, 直至单抗浓度为 2 mg/mL; 浓缩后的单抗用 PCR 管或者 1.5 mL 离心管分装保存。

3.2.2 PEDV M 蛋白单克隆抗体验证及抗体序列分析

(1) 单克隆抗体 ELISA 鉴定分析

将单克隆抗体从 1:1000 梯度稀释, 通过间接 ELISA 方法鉴定其效价, 未免疫小鼠血清为阴性对照。具体步骤如下:

- 1) 包被: 将 M 蛋白用 PBS 稀释, 以 400 ng/孔进行包被, 37°C 反应 2 h, 而后用 PBST 洗板 4 次, 每次 1 min, 拍干水分;
- 2) 封闭: 使用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉进行封闭, 100 μL /孔, 37°C 反应 2 h, 洗涤方式同上;
- 3) 一抗: 将所制备单克隆抗体用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉进行梯度稀释, 100 μL /孔, 37°C 反应 1 h, 洗涤方式同上;
- 4) 二抗: 使用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉对 HRP 标记的羊抗鼠二抗 1:2500 稀释, 100 μL /孔, 37°C 反应 1 h, 洗涤方式同上;
- 5) 显色: 将 ELISA 显色液 TMB 加入酶标孔, 100 μL /孔, 37°C 反应 15 min;
- 6) 终止: 显色结束后每孔加入 100 μL 的 ELISA 终止液终止反应;
- 7) 读值: 将酶标板置于酶标仪上进行 OD_{450nm} 读值。

(2) Western Blot 验证

病毒样品处理：将 12 孔板内接种 PEDV GI 型和 GII 型病毒的 VERO 细胞 1000 r/min 4℃离心，加入裂解液（RIP1 Buffer、PMSF 以 100:1 比例混合）插在冰上静置 30 min，每过 5 min 轻弹管壁使其充分裂解。而后 4℃ 13000 r/min 离心 10 min，转移上清加入 5×loading buffer，置于 100℃金属浴上加热 10 min。样品处理完之后其 Western Blot 操作步骤同 2.2.6 中 Western Blot 具体操作过程。

(3) IFA 验证

IFA 验证：将 GI 型 PEDV 和 GII 型 PEDV 分别感染 VERO 细胞，病毒感染后 24 h，显微镜下观察细胞出现细胞病变效应（cytopathic effect, CPE）时，弃掉培养基，用 4%多聚甲醛固定，而后具体 IFA 操作步骤见 3.2.1(4)中 IFA 操作步骤。

(4) 单克隆抗体亚型鉴定

按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒操作说明对所获得的单抗进行抗体亚类鉴定。首先将样本按照推荐稀释度进行稀释，以每孔 50 μL 加入反应板，而后加入商品化的羊抗鼠 IgA+IgM+IgM-HRP，50 μL/孔，混合后室温孵育，洗板后加入显色液进行显色，通过酶标仪读取 OD_{450nm}。

(5) 单克隆抗体序列分析

取出冻存于液氮罐的杂交瘤细胞，迅速放到 37℃水浴锅中，使其快速融化。将细胞悬液全部吸入无菌离心管内，1000 r/min 离心 5 min，收集细胞沉淀，提取单克隆抗体杂交瘤细胞 RNA，根据文献设计 PCR 引物^[123]，采用套式 PCR 扩增。首先以杂交瘤细胞 cDNA 为模板，进行第一轮抗体可变区基因扩增，然后以第一轮产物为模板，进行第二轮抗体可变区基因扩增。PCR 反应体系为见下表 3-4：

表 3-4 扩增体系
Table 3-4 Amplification system

成分	用量
2×Phanta Flash Master Mix	25 μL
F	1 μL
R	1 μL
cDNA	1 μL
ddH ₂ O	to 50 μL

反应程序见下表 3-5：

表 3-5 反应程序

Table 3-5 Reaction procedure

步骤	温度	时间
预变性	98°C	30 s
30 个循环	98°C	10 s
	55°C	5 s
	72°C	30 s
最后延伸	72°C	1 min

扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，重链、κ 轻链可变区基因大小为 300 bp，切胶回收目的片段。将回收的目的片段插入 pMD-19T 载体中，进行序列测定。

3.2.3 单克隆抗体特异性结合 PEDV M 蛋白区域分析

本试验将 M 蛋白进行截短表达，截短示意图如 3-1。分别为 A1、A2、A3、A4，利用 Snapgene 软件设计 PCR 扩增引物，并通过原核表达的方式表达截短的 M 蛋白，通过 SDS-PAGE 验证截短蛋白表达情况，并通过 Western Blot 验证单克隆抗体 7E1 与 PEDV 的 GI 型和 GII 型病毒的反应性，从而筛选出所制备的单克隆抗体 7E1 与 PEDV M 蛋白特异性结合的区域。

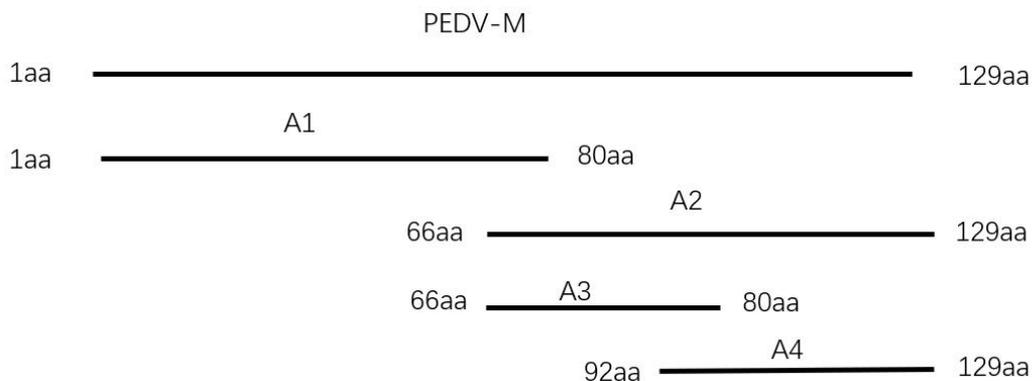


图 3-1 M 蛋白截短示意图

Fig. 3-1 Schematic diagram of M protein truncation

根据 M 基因截短示意图，先针对 M 基因 A1 和 A2 两端基因设计特异性引物，如下表 3-6:

表 3-6 引物序列

Table 3-6 Primer sequences

引物名称	序列
A1-F	GGGAAGGATTTTCAGAATTCAACTCCATCCGTCTGTGGC
A1-R	GACGGCCAGTGCCAAGCTTGGTGGTGGTTGCTTTTCGCA
A2-F	GGGAAGGATTTTCAGAATTCCAGCTGCCGAATTTTGTCCACC
A2-R	GACGGCCAGTGCCAAGCTTAACCAGATGCAGGACTTTTTTCGC

按照 2.2.2 和 2.2.3 操作方法构建质粒并进行诱导表达。表达后进行 SDS-PAGE 鉴定，并将单克隆抗体 7E1 作为一抗进行 Western Blot 鉴定；将于抗体反应的部分继续截短为 A3 和 A4，设计特异性引物如表 3-7：

表 3-7 引物序列

Table 3-7 Primer sequences

引物名称	序列
A3-F	GGGAAGGATTTTCAGAATTCCAGCTGCCGAATTTTGTCCACC
A3-R	GACGGCCAGTGCCAAGCTTCCAGCCGGTGCCACTAC
A4-F	GGGAAGGATTTTCAGAATTCGCAAGTAGTGCCACCGGC
A4-R	GACGGCCAGTGCCAAGCTTAACCAGATGCAGGACTTTTTTCGC

3.3 试验结果

3.3.1 单克隆抗体制备结果

(1) 小鼠血清效价结果

纯化的 M 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠，共免疫四次，随后进行抗体效价检测。用纯化后的 PEDV M 蛋白包被 ELISA 板，检测抗体效价，以未免疫小鼠血清作为阴性对照（NC），结果显示如图 3-2 所示，序号 1-4 分别为第一次免疫后效价、第二次免疫后效价、第三次免疫后效价和第四次免疫后效价。在第四次免疫后该抗体效价能达到 1:32000 以上，可进行下一步细胞融合。

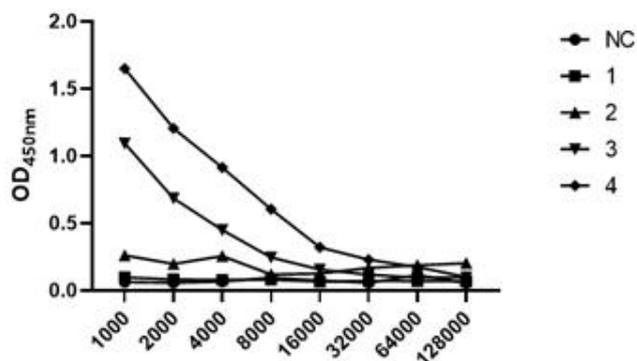


图 3-2 四次免疫小鼠血清效价检测

Fig. 3-2 Serum titer detection in four immunized mice

(2) 细胞亚克隆结果

细胞通过有限稀释法进行三次亚克隆，利用 ELISA 以及 IFA 结果筛选出 2 株分泌抗 PEDV M 蛋白抗体的细胞株，命名为 7E1 和 5F2。

(3) 腹水纯化结果

三次亚克隆以后挑选阳性孔杂交瘤细胞注入小鼠腹腔，待小鼠产生腹水后抽取腹水进行纯化，将纯化的腹水通过 SDS-PAGE 鉴定，结果如图 3-3 所示，图(a)中泳道 1-4 分别为腹水 7E1、流出液、洗杂、洗脱；图(b)中泳道 1-4 分别为腹水 5F2、流出液、洗杂、洗脱；在 54 kDa 以及 20 kDa 处有重链以及轻链相应大小的条带，表明成功纯化出抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体 7E1 和 5F2。

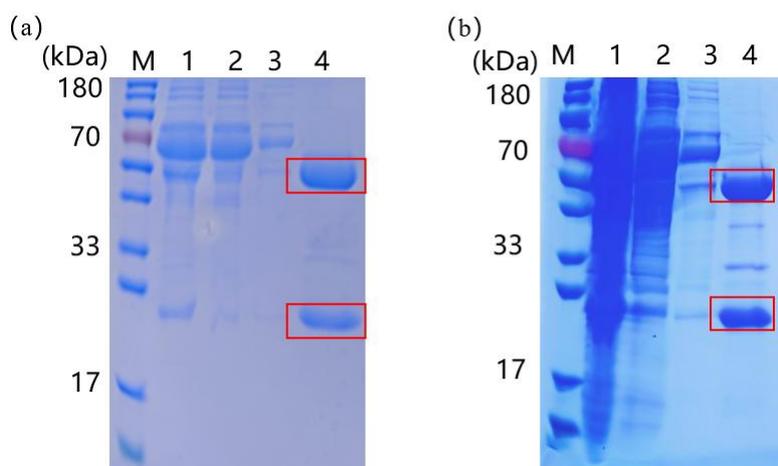


图 3-3 腹水纯化 SDS-PAGE 结果

Fig. 3-3 Results of ascites fluid purification by SDS-PAGE

(a) 腹水 7E1 纯化结果；(b) 腹水 5F2 纯化结果

(a)7E1 purification of ascites; (b)Ascites 5F2 purification results

3.3.2 单克隆抗体活性验证及抗体序列分析结果

(1) 单克隆抗体的活性验证

通过细胞融合技术，筛选得到 2 株抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体，分别命名为 7E1 和 5F2。对单克隆抗体 7E1 进行 IFA 鉴定，结果如图 3-4 所示 7E1 和 5F2 作用 GI 型 PEDV 和 GII 型 PEDV 感染的 VERO 细胞均能够检测到特异性的绿色荧光信号，而 SP2/0 细胞上清液作用 PEDV 感染细胞未见荧光信号。

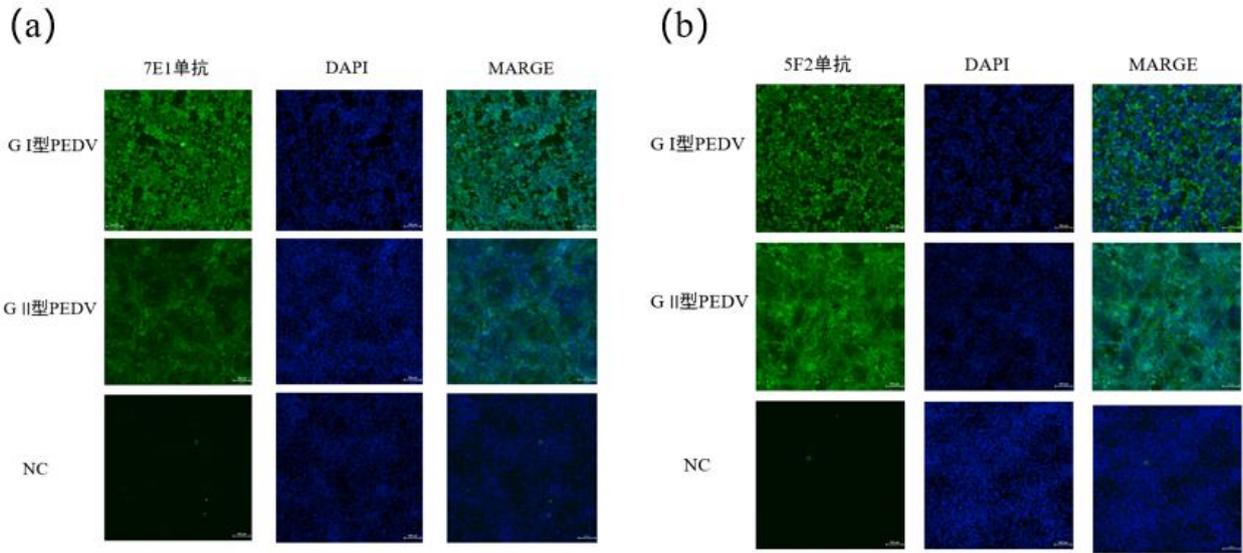


图 3-4 IFA 验证单克隆抗体 7E1 和 5F2 的反应性

Fig. 3-4 IFA verifies the reactivity of monoclonal antibody 7E1

进一步对 2 株单克隆抗体进行 Western Blot 鉴定图 3-5 所示，7E1 和 5F2 均能与 GI 型 PEDV 和 GII 型 PEDV 病毒蛋白反应，表明 7E1 和 5F2 具有良好活性。

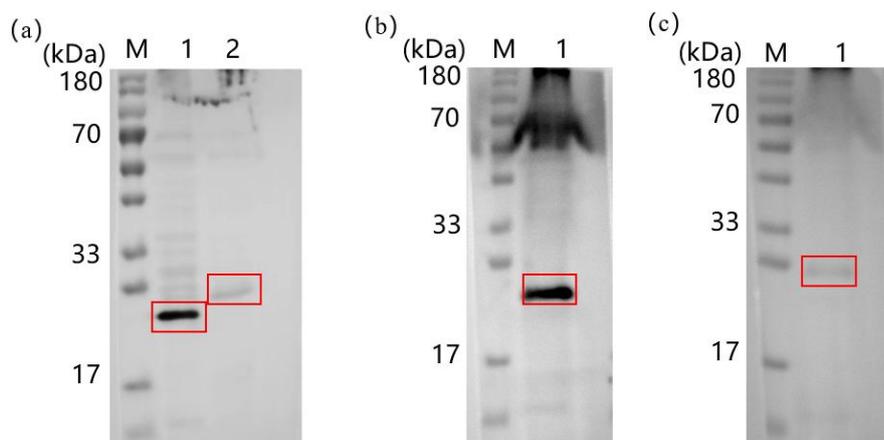


图 3-5 单克隆抗体 Western Blot 验证结果结果

Fig. 3-5 Western Blot validation results of monoclonal antibody

(a) 单克隆抗体 7E1 与病毒 GI 和 GII 型; (b) 单克隆抗体 5F2 与病毒 GI 型; (c) 单克隆抗体 5F2 与病毒 GII 型

(a) Monoclonal antibody 7E1 with viral GI and GII types; (b) Monoclonal antibody 5F2 versus viral GI type; (c) Monoclonal antibody 5F2 versus viral GII type

(2) 单克隆抗体亚型鉴定

按照小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒对单克隆抗体 7E1 进行亚型鉴定, 结果如图所示 3-6(a)所示单克隆抗体, 7E1 抗重链恒定区为 IgG2a 和 IgG2b 型, 轻链恒定区为 Kappa 型; 同样方法对单克隆抗体 5F2 进行鉴定, 结果如图所示 3-6(b)所示 5F2 单抗重链恒定区为 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 型, 轻链恒定区为 Kappa 型。

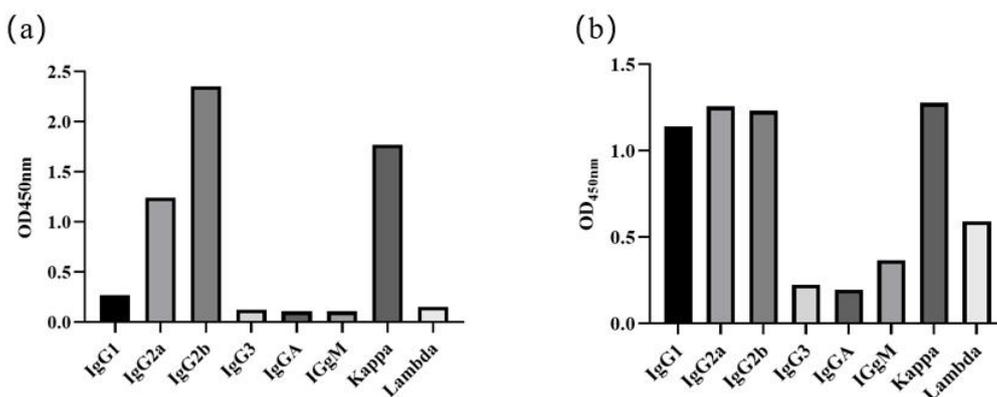


图 3-6 单克隆抗体亚型鉴定

Fig. 3-6 Identification of monoclonal antibody isoforms

(a) 单克隆抗体 7E1 亚型鉴定; (b) 单克隆抗体 5F2 亚型鉴定

(a) Identification of monoclonal antibody 7E1 isoform; (b) Identification of the 5F2 isoform of monoclonal antibodies

(3) 单克隆抗体可变区序列分析

从 7E1 杂交瘤细胞 cDNA 中扩增，结果如图 3-7 所示，得到大小为 300 bp 的 PCR 产物，与预期扩增产物大小一致。

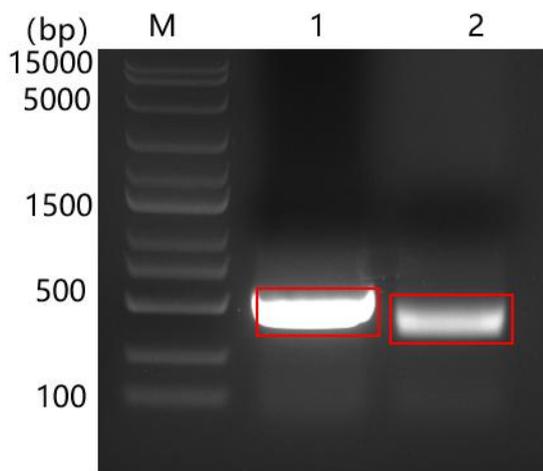


图 3-7 重链轻链可变区扩增结果

Fig. 3-7 Amplification results of variable regions of heavy chains and light chains

切胶回收后，克隆至 pMD19T 载体测序。将测序结果与抗体基因库 (IMGT) 进行比对分析，结果如表 3-8 所示，测序结果证实扩增得到的序列为单克隆抗体的重链可变区的 DNA 序列和轻链可变区的 DNA 序列。

表 3-8 重链和轻链可变区序列

Table 3-8 Variable region sequences of heavy and light chains

	CDR1	CDR2	CDR3
重链可变区	HMYSYGSTSVSKSAR	SELNSVLY	RTLRIHQ
轻链可变区	DYAMH	VISPYHGYTSYNQKFKG	YFCARGWVDYW

3.3.3 单克隆抗体特异性识别 M 蛋白区域鉴定

为进一步明确单克隆抗体 7E1 识别 M 蛋白的区域，将 M 蛋白截短两次。第一次将 M 蛋白截短为 A1 和 A2 两部分，通过 SDS-PAGE 鉴定其诱导表达情况，结果如图 3-8(a)所示，泳道 1-4 依次为：A1 段未诱导菌、A1 段诱导菌、A2 段未诱导菌、A2 段诱导菌，结果表明截短 M 蛋白 A1 和 A2 成功表达；通过 Western Blot 鉴定其与单抗反应情况，结果如图 3-8 中(b)所示，泳道 1 和 2 分别为 A1 段诱导菌，A2 段诱导菌，结果表明单克隆抗体与截短 M 蛋白 A2 部分发

生反应。将能 A2 部分继续截短为 A3 和 A4 并诱导表达，同样通过 SDS-PAGE 鉴定，结果如图 3-8(c)所示，泳道 1-4 依次为：A3 段未诱导菌、A3 段诱导菌、A4 段未诱导菌、A4 段诱导菌，结果表明 A3 和 A4 成功表达；Western Blot 鉴定，结果如图 3-8(d)所示，泳道 1 和 2 为 A3 段诱导菌和 A4 段诱导菌，结果表明单克隆抗体 7E1 能与 A4 部分反应，从而鉴定单克隆该抗体 7E1 能特异性识别并结合 M 蛋白的区域为 92-129 aa。

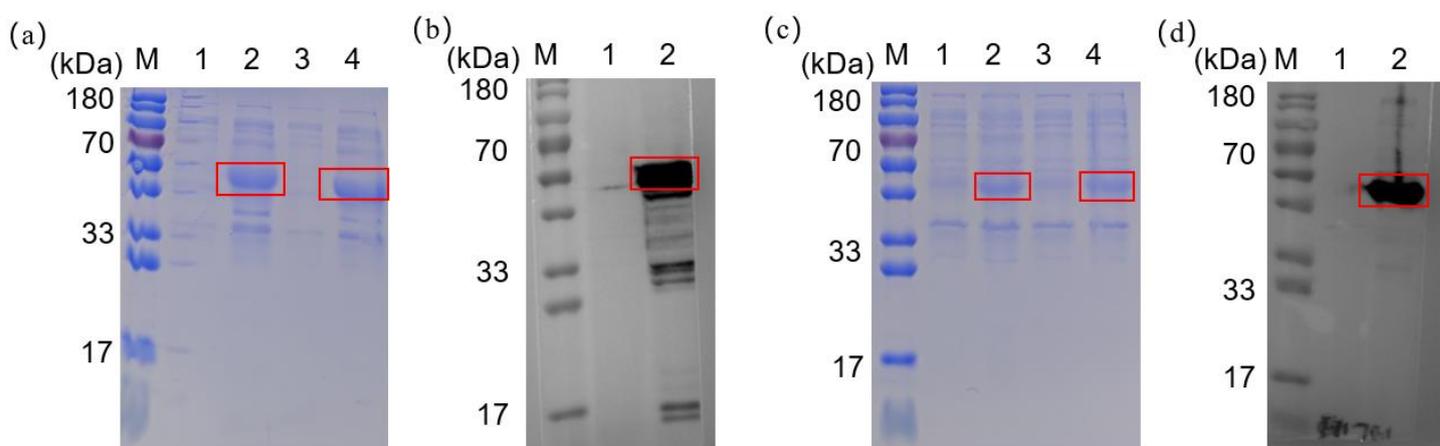


图 3-8 M 蛋白截短表达鉴定结果

Fig. 3-8 Identification of truncated expression of M protein

(a) A1、A2 段 SDS-PAGE 鉴定；(b) A1、A2 段 Western Blot 鉴定；(c) A3、A4 段 SDS-PAGE 鉴定；(d) A3、A4 段 Western Blot 鉴定

(a)SDS-PAGE identification of A1 and A2 segments; (b)Western Blot identification of A1 and A2 segments; (c)SDS-PAGE identification of A3 and A4 segments; (d)Western Blot identification of A3 and A4 segments

3.4 讨论

单克隆抗体是许多分子免疫学研究的重要工具，在诱导抗体产生免疫反应中起着重要作用^[124]。抗原表位的研究对于开发疫苗和诊断方法的建立至关重要。此外，单克隆抗体已成为大量临床实验室诊断测技术的关键组成部分，由于单克隆抗体具有高度特异性，广泛应用于检测和鉴定血清分析物、细胞标志物和病原体方面。显然，多克隆抗体和单克隆抗体在产生、成本和整体应用方面各有优缺点。单克隆抗体可以在常规病理学实验室中应用也可以帮助患者的临床诊断和治疗。

随着分子生物技术的发展,单克隆抗体的制备方法在不断进步。通常将纯化后的 PEDV 全病毒作为免疫原免疫小鼠制备单克隆抗体,但此方法存在一定缺陷,即 PEDV 分离比较困难,纯化过程复杂^[125]。而利用原核表达系统制备单克隆抗体成本低,耗时短,制备过程简单^[126]。

特异性识别 M 蛋白的单克隆抗体是不可缺少的诊断工具,在基础研究和应用开发中发挥着重要作用。鉴定单抗识别的抗原表位,有利于丰富完善病原的抗原表位图谱,揭示病原体抗原表位特征与变异规律。Ye 等人^[127]成功制备出 3 株针对 PEDV Nsp3 的单克隆抗体,并鉴定出这些单抗中不同的线性表位,这 3 中线性表位在 PEDV 基因中高度保守,为识别可能促进病毒感染的宿主蛋白提供了有力的检测工具。Li 等人^[128]针对 S 蛋白制备出 5 株单克隆抗体,并通过进一步鉴定单克隆抗体靶序列,⁵⁰⁷FNDHSF⁵¹²和⁵⁵³LFYNVTNSYG⁵⁶²首先被鉴定为 B 细胞线性表位,其中⁵⁵³LFYNVTNSYG⁵⁶²是一种中和表位。张志榜^[129]通过 RT-PCR 分别克隆了 PEDV CH/SHH/06 株的 M 蛋白和 N 蛋白的基因,利用原核表达成功获得重组蛋白 tM-His6 和 N-His6 并免疫小鼠,通过常规杂交瘤技术获得一株稳定分泌抗 M 蛋白抗体的杂交瘤细胞和三株稳定分泌抗 N 蛋白抗体的杂交瘤细胞,分别命名为 D4、4G1、4H7、2G3。并鉴定出 M 蛋白高度保守的表位“¹⁹⁵WAFYVR²⁰⁰”和 N 蛋白表位“⁶⁰RMRRGERIEQPS⁷¹”,为进一步阐明 M 蛋白和 N 蛋白的抗原结构及设计表位疫苗和鉴别诊断方法提供了有用信息。

生产高效特异的单克隆抗体的关键是获得高纯度和高免疫原性的抗原。本试验采用原核表达系统表达 PEDV M 蛋白,并将其作为免疫源免疫小鼠成功制备出 2 株单克隆抗体 7E1 和 5F2。使用小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒鉴定 2 株单抗亚型出现多个条带的原因可能是腹水中有杂抗体或者样本抗体浓度过高以及杂交瘤细胞中好友多个细胞系。对单克隆抗体 7E1 的可变区序列进行分析,采用截短表达 M 蛋白鉴定出能与单克隆抗体 7E1 特异性结合的区域为 92-129 aa,后续将进一步鉴定单克隆抗体 7E1 所识别 M 蛋白的具体表位。PEDV 单克隆抗体的制备在临床检测以及致病机制研究方面的应用前景较为广阔,为建立 PEDV 相关检测方法的建立奠定基础。

3.5 本章小结

采用杂交瘤技术成功制备出 2 株单克隆抗体 7E1 和 5F2；并获得单克隆抗体 7E1 的可变区序列以及与 M 蛋白特异性结合的区域为 92-129 aa。

第四章 DAS-ELISA 方法的建立

PEDV 的检测方法中，DAS-ELISA 方法操作简单快捷，具有特异性强、灵敏性好且可批量检测等优势，是临床上 PEDV 感染检测手段的不二之选。由于 DAS-ELISA 检测方法是利用两种抗体进行捕获和检测，故对目标抗原具有高特异性，并且与直接或间接 ELISA 相比，DAS-ELISA 方法灵敏性更高。本章主要基于第三章中所制备的 2 株单克隆抗体，建立一种高效、特异且灵敏的 DAS-ELISA 方法。

4.1 试验材料

4.1.1 主要试剂

主要试剂见表 4-1。

表 4-1 主要试剂
Table 4-1 Main reagents

试剂名称	公司
高糖 DMEM	上海源培生物科技股份有限公司
TMB 显色液	苏州博奥龙科技公司
吐温 20	北京索莱宝科技有限公司
HRP 标记抗体试剂盒	武汉三鹰生物技术有限公司

4.1.2 主要仪器设备

主要仪器见表 4-2:

表 4-2 主要仪器设备
Table 4-2 Main equipment

设备名称	公司
ELISA 洗板机	北京六一生物科技股份有限公司
漩涡混匀仪	上海珂淮仪器有限公司
各规格单通道移液器	德国 Eppendorf 公司
12 孔排枪	梅特勒托利多国际有限公司

4.2 试验方法

4.2.1 HRP 标记单克隆抗体

根据 HRP 标记抗体试剂盒操作方法对单克隆抗体 5F2 进行标记。取出试剂盒放于室温，按照说明加入启动液以及辣根过氧化物酶，室温静置 3 h 后加入终止液，而后加入抗体保护液分装后放于-20℃保存。

通过间接 ELISA 方法测定 HRP 标记单克隆抗体 5F2 效价，将单克隆抗体从 1:100 开始梯度稀释八个梯度。具体操作步骤同上 3.2.2(1)。

4.2.2 常规 DAS-ELISA 方法基本操作

将纯化后的抗 PED 病毒 M 蛋白的单克隆抗体 7E1 作为捕获抗原，HRP-5F2 作为检测抗原。常规 DAS-ELISA 方法的基本操作如下：

(1)抗原包被：使用 PBS 将捕获抗原进行稀释至合适浓度，每孔加入 100 μL ，37℃反应 2 h，PBST 洗板机洗 4 次，1 min/次，拍干 ELISA 板；

(2)封闭：使用 PBST 配制的 5%脱脂奶粉进行封闭，每孔 100 μL ，37℃反应 1 h，洗涤方式同上；

(3)捕获：在 ELISA 孔内加入阳性病毒液，每孔 100 μL ，并且设置相应的阴性对照，37℃反应 1 h，洗涤方式同上；

(4)二抗孵育：使用 PBST 配制的 5%脱脂奶粉稀释 HRP-5F2 至合适浓度，37℃反应 1 h，洗涤方式同上；

(5)显色：加入 TMB 显色液，每孔 100 μL ，37℃避光反应 10 min；

(6)终止：显色结束后每孔加入 100 μL ELISA 终止液；

(7)读值：终止结束后将酶标板置于酶标仪读取 OD_{450nm} 值。

4.2.3 捕获抗体和检测抗体最佳浓度的确定

采用方阵滴定确定法确定 DAS-ELISA 方法最佳工作浓度，用 PBS 对捕获抗原进行梯度稀释，每孔包被量设置为 100 ng/孔、200 ng/孔、400 ng/孔、800 ng/孔、1600 ng/孔，横向加入 ELISA 板，37℃作用 1 h 后 PBST 洗涤 ELISA 板 4 次，1 min/次，拍干 ELISA 板；用 PBST 配制的 5%脱脂奶粉每孔 100 μL ，

37°C封闭 1 h, PBST 洗涤 ELISA 板 4 次, 1 min/次, 拍干 ELISA 板; 将 PEDV 病毒原液作为待检抗原以每孔 100 μ L 加入 ELISA 板, 37°C作用 1 h, PBST 洗涤 ELISA 板 4 次, 1 min/次, 拍干 ELISA 板; 用 PBST 配制的 5%脱脂奶粉稀释 HRP-5F2, 从 1:100 倍比稀释 1:3200, 纵向加入 ELISA 板, 每孔 100 μ L, 37°C封闭 1 h, PBST 洗涤 ELISA 板 4 次, 1 min/次, 拍干 ELISA 板; 用 TMB 显色液进行显色, 每孔 100 μ L, 37°C作用 12 min 后, 每孔加入 100 μ L 终止液, 酶标仪 OD_{450nm} 读值。

4.2.4 DAS-ELISA 方法包被时间的优化

通过设置不同反应时间来确定 PEDV M 蛋白单克隆抗体 7E1 包被的最佳反应时间。试验设置 37°C 1 h、37°C 2 h、4°C过夜、37°C 1h 后 4°C过夜、37°C 2 h 后 4°C过夜 5 个不同的反应时间, 通过上述确定的最佳工作浓度以及 DAS-ELISA 方法的基本操作步骤进行试验。

4.2.5 DAS-ELISA 方法封闭条件的优化

为确定 DAS-ELISA 方法的最佳封闭条件, 设置脱脂奶粉和牛血清白蛋白两种不同的封闭液, 并且分别设置 1%、3%、5%三种不同的浓度梯度。在同一封闭液同一封闭浓度下设置不同的反应时间, 分别是 37°C 1 h、37°C 2 h、4°C过夜、37°C 1 h 后 4°C过夜、37°C 2 h 后 4°C过夜 5 个不同封闭时间。捕获抗原浓度以及检测抗体浓度参照最佳工作浓度结果, 包被时间参照最佳包被时间, 其他条件及操作同 DAS-ELISA 方法基本操作步骤。

4.2.6 DAS-ELISA 方法样品孵育时间的优化

为确定样品的最佳孵育时间, 设置 6 个不同反应时间, 37°C 30 min、37°C 60 min、37°C 90 min、37°C 120 min、37°C 150 min、37°C 180 min, 其他条件同优化结果以及 DAS-ELISA 方法的基本操作。

4.2.7 DAS-ELISA 方法 HRP-5F2 孵育条件优化

设置 5 个不同的反应时间来优化 HRP-5F2 的作用时间, 分别是 37°C 30

min、37°C 60 min、37°C 90 min、37°C 120 min、37°C 150 min。其他条件同优化结果，操作步骤同 DAS-ELISA 方法基本步骤。

4.2.8 DAS-ELISA 方法临界值的测定

为了判断待检样品是否属于阳性或者阴性，通过批量临床样本的数据统计分析得出具有临床意义的判断水平。本试验主要选取 60 份仔猪肛拭子且经 RT-PCR 鉴定为阴性的肛拭子，采用所建立的 DAS-ELISA 方法进行检测，每个肛拭子均用 DMEM 处理，离心后取上清 100 μ L 加入 ELISA 孔内，每个样品重复 3 次，阳性对照用 PEDV 病毒液，阴性对照用 DMEM，同样重复 3 次点样。读取 OD_{450nm}，计算阴性样品 OD_{450nm} 平均值，以及所有样品的标准差，依据统计学分析方法计算临界值即平均值加上 3 倍的标准差得出临界值。

4.2.9 DAS-ELISA 方法灵敏性的测定

为确定建立的 DAS-ELISA 方法灵敏性如何，将 PEDV 的病毒原液用无血清 DMEM 在稀释板中进行倍比稀释，从 1:2 开始稀释 12 个梯度后，每孔 100 μ L 转移至包被有捕获抗体 ELISA 板中，并用上述优化好的条件进行 DAS-ELISA 方法进行检测，同时用未接毒 VERO 细胞上清做相应的阴性对照。分析 OD_{450nm} 值，计算 P/N 值，将大于临界值并且 $P/N \geq 2$ 时的 OD_{450nm} 值认为是最低抗原检测量。

4.2.10 DAS-ELISA 方法特异性的测定

本试验 PRV、PRRSV、PCV、PORV、PEDV（CH/SX/2015 毒株）以及猪 PEDV 阳性肛拭子，设置 VERO 细胞上清为阴性对照进行 DAS-ELISA 特异性分析，每个样品设置 3 个重复，测定 OD_{450nm} 进行特异性分析。

4.2.11 DAS-ELISA 方法重复性的测定

为确定 ELISA 板与板之间，以及同一 ELISA 板中每个孔之间的变异系数。选择 5 个同批次 PEDV 细胞培养物作为 5 个样品，每个样品在同一个 ELISA 板上重复点样 5 次，同样将 5 个样品同时在 5 个不同批次的 ELISA 板重复点样 4

次设置 VERO 细胞为阴性对照。根据测定的 OD_{450nm} 分析重复性。

4.2.12 DAS-EISA 方法符合率的测定

临床上挑选 92 份肛拭子，加入 1 mL PBS 浸泡棉棒，于涡旋仪上震荡 10 s，而后放于离心机顺离，吸取上清进行 RT-PCR 鉴定，RT-PCR 鉴定引物为国标引物（上游引物 P1：5'-TATGGCTTGCATCATCTTA-3'；下游引物 P2：5'-TTGACTGAACGACCAACACG-3'）。同时将肛拭子用所建立的 DAS-ELISA 方法进行检测，将两者结果进行对比，通过数据统计法分析得出符合率。

4.3 试验结果

4.3.1 捕获抗体和检测抗体最佳浓度的确定

通过方阵滴定法确定 DAS-ELISA 方法的最佳工作浓度，经过 OD_{450nm} 值分析筛选出 P/N 值最高的反应孔，结果见下表 4-3 和图 4-1 所示，DAS-ELISA 方法的最佳单克隆抗体的包被浓度为 400 ng，HRP 标记抗体最佳稀释度为 1:1600。

表 4-3 捕获抗体和检测抗体最佳浓度的确定

Table 4-3 Determination of the optimal concentration of capture antibody and detection antibody

HRP 标记抗体稀释浓度		捕获抗体稀释浓度 (ng)				
		100	200	400	800	1600
阳性	1:100	3.5124	3.4849	3.4428	3.4639	3.5449
	1:200	3.4829	3.4405	3.3946	3.4337	3.4449
	1:400	3.3333	3.3282	3.2099	3.2639	3.2093
	1:800	2.8109	2.8488	2.8834	2.5416	2.6065
	1:1600	2.1391	1.8913	2.0869	1.6935	1.7555
	1:3200	1.2909	1.2736	1.3358	1.0753	1.043
阴性	1:100	0.4609	0.4866	0.5389	0.2682	1.2129
	1:200	0.3338	0.3587	0.3948	0.4155	0.6819
	1:400	0.196	0.2029	0.2401	0.2369	0.3263
	1:800	0.126	0.1368	0.1451	0.1796	0.3291
	1:1600	0.1045	0.1049	0.085	0.0989	0.201
	1:3200	0.0608	0.0662	0.0686	0.0681	0.1009

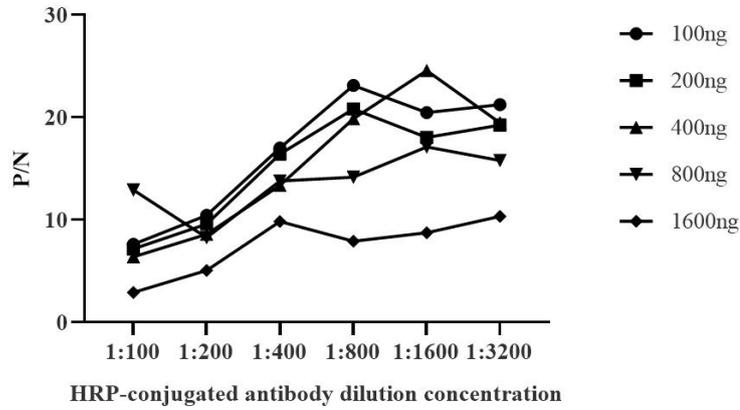


图 4-1 最佳工作浓度的确定

Fig. 4-1 Determination of the optimal working concentration

4.3.2 包被条件的确定

将纯化的后的单克隆抗体按照上述最佳包被浓度进行包被，设置 37°C 1 h、37°C 2 h、4°C 过夜、37°C 1 h 后 4°C 过夜、37°C 2 h 后 4°C 过夜 5 个不同的反应时间，其他条件保持不变，分析 P/N 比值，结果如表 4-4 和图 4-3 所示，37°C 包被 1 h 时效果最佳。

表 4-4 最佳包被时间优化结果

Table 4-4 Optimal coating time optimization results

包被时间	37°C 1 h	37°C 2 h	4°C 过夜	37°C 1 h 后 4°C 过夜	37°C 2 h 后 4°C 过夜
阳性	1.687	1.5703	1.516	1.586	1.616
	1.588	1.445	1.355	1.497	1.574
	1.476	1.427	1.383	1.546	1.662
阴性	0.069	0.092	0.065	0.123	0.077
	0.067	0.081	0.084	0.098	0.078
	0.068	0.070	0.097	0.099	0.101

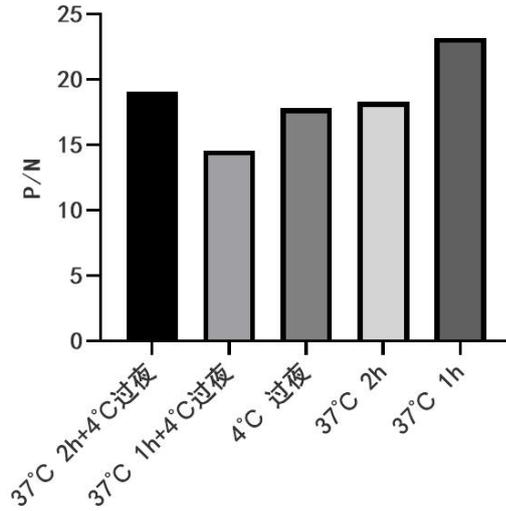


图 4-2 最佳包被时间优化
Fig. 4-2 Optimal coating time optimization

4.3.3 封闭条件的优化

确定包被条件后，设置不同浓度封闭液以及不同封闭时间，其他条件保持不变，通过 ELISA 测定 OD_{450nm} 值分析 P/N 比值，结果如表 4-5 和图 4-3 所示，采用 5% BSA 封闭 4°C 过夜效果最佳。

表 4-5 封闭条件的优化结果
Table 4-5 Optimization results of the closed conditions

封闭时间		BSA			脱脂乳		
		1%	3%	5%	1%	3%	5%
37°C 1h		0.906	0.954	1.051	0.879	0.827	0.81
37°C 2h		0.735	0.794	0.893	0.628	0.691	0.663
4°C 过夜	阳性	0.896	0.931	0.936	1.0445	0.896	0.886
37°C 1h 4°C 过夜		0.999	0.987	1.069	0.884	0.837	0.791
37°C 2h 4°C 过夜		0.971	0.972	0.951	0.958	0.789	0.862
37°C 1h		0.07	0.072	0.074	0.072	0.063	0.062
37°C 2h		0.068	0.063	0.068	0.051	0.06	0.056
4°C 过夜	阴性	0.064	0.062	0.059	0.077	0.081	0.062
37°C 1h 4°C 过夜		0.073	0.068	0.078	0.081	0.111	0.071
37°C 2h 4°C 过夜		0.076	0.077	0.073	0.096	0.108	0.074

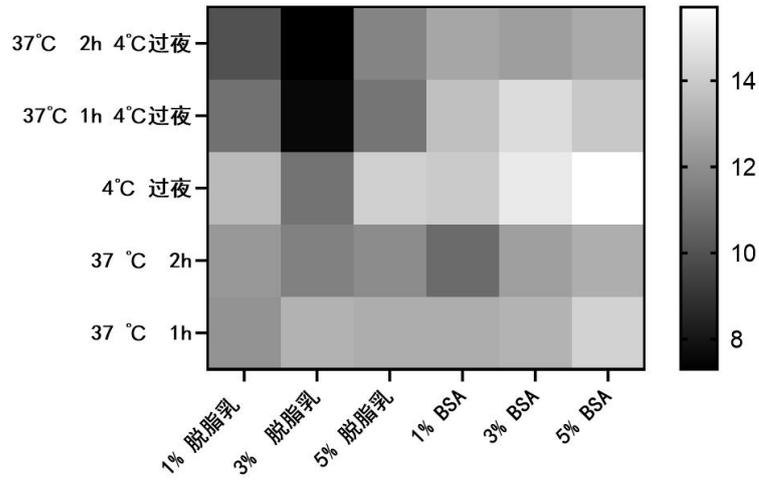


图 4-3 封闭条件的优化

Fig. 4-3 Optimization of the closure condition

4.3.4 样品孵育条件优化

在其他条件不变的条件下，设置样品不同反应时间，通过 OD_{450nm} 值分析比较 P/N 比值以及时间成本的考虑，结果表 4-6 和图 4-4 所示，在 37°C 条件下反应 120 min 最合适。

表 4-6 样品孵育时间优化结果

Table 4-6 Optimization results of sample incubation time

样品作用时间	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
阳性	0.719	1.016	1.228	1.411	1.641	1.885
	0.624	0.849	1.135	1.243	1.488	1.646
	0.575	0.837	1.032	1.254	1.386	1.611
阴性	0.096	0.108	0.094	0.107	0.122	0.148
	0.115	0.101	0.098	0.108	0.125	0.126
	0.125	0.142	0.16	0.140	0.157	0.186

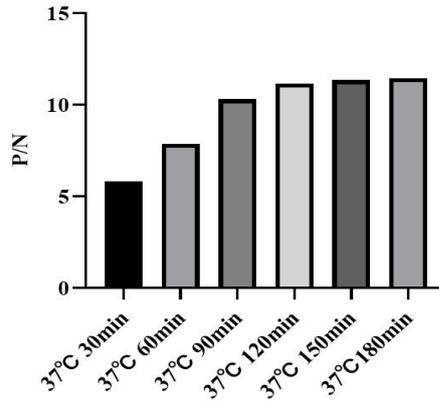


图 4-4 样品孵育时间优化

Fig. 4-4 Sample incubation time optimization

4.3.5 HRP-5F2 反应时间

在包被、封闭以及样品孵育时间保持不变的情况下，设置不同 HRP-5F2 反应时间，结果如表 4-7 和图 4-5 所示，在 37°C 条件下反应 60 min 时，P/N 比值最大，故 37°C 60 min 反应条件最佳。

表 4-7 HRP-5F2 作用时间优化结果

Table 4-7 Results of HRP-5F2 action time optimization

HRP-5F2 作用时间	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
阳性	1.2346	2.094	2.4829	2.8688	3.1569
阴性	1.1046	1.8021	2.3524	2.6357	2.9094
	1.0919	1.9064	1.768	2.5773	2.2981
	0.0657	0.1082	0.1533	0.2814	0.2998
	0.0665	0.0991	0.1474	0.2321	0.364
	0.07	0.1208	0.1665	0.2104	0.2663

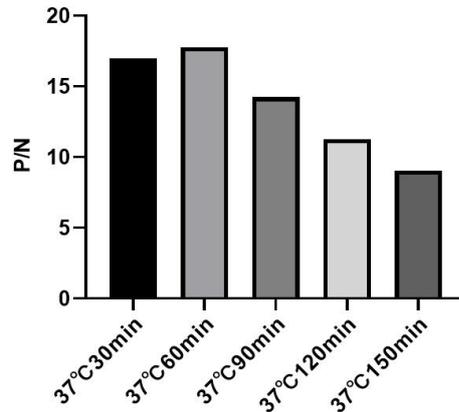


图 4-5 HRP-5F2 时间优化

Fig. 4-5 HRP-5F2 time optimization

4.3.6 DAS-ELISA 方法临界值的确定

采取临床肛拭子样品 60 份，并且进过 RT-PCR 鉴定为阴性，用优化好条件的 DAS-ELISA 方法进行临界值的判定。读取 60 份阴性粪便样本 OD_{450nm} 的平均值为 0.209，标准方差为 0.014。根据统计学原理，用平均值+3×标准差的方法确认该检测方法最终的临界值为 0.253，结果如图 4-6 所示，该 DAS-ELISA 判断标准为 OD_{450nm}≥2 倍阴性值且大于临界值 0.253，则判断为阳性。

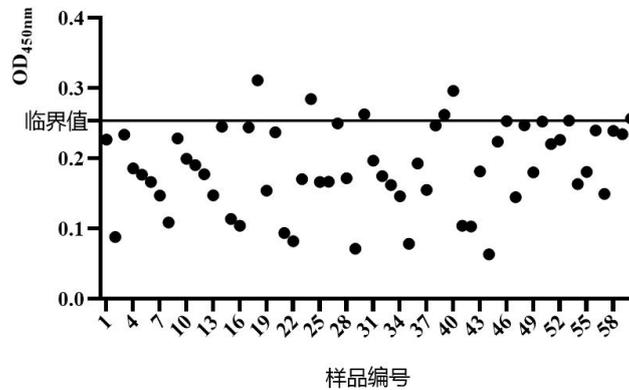


图 4-6 DAS-ELISA 判断标准

Fig. 4-6 DAS-ELISA Judgment Criteria

4.3.7 DAS-ELISA 方法灵敏性试验

TCID₅₀ 测定 PEDV 感染细胞后的繁殖滴定，将滴度为 10⁷TCID₅₀/mL 的病毒细胞上清进行梯度稀释，并且利用建立的 DAS-ELISA 方法检测该方法的灵

敏性。结果如图 4-7，当病毒以 1:64 稀释时，其 OD_{450nm} 为 0.248，大于临界值且 P/N≥2，当病毒以 1:128 稀释时不能检测出病毒。因此，本方法最低病毒检测量为 1.56×10⁵TCID₅₀/mL。

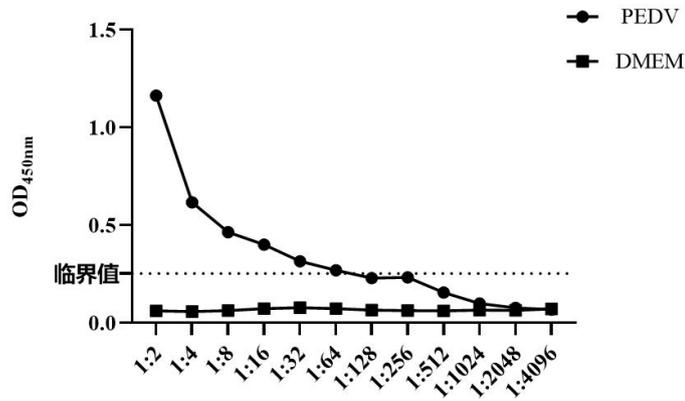


图 4-7 DAS-ELISA 灵敏性
Fig. 4-7 DAS-ELISA sensitivity

4.3.8 DAS-ELISA 方法特异性试验

选取 PRV、PRRSV、PCV、PORV、PEDV (CH/SX/2015 毒株) 以及猪 PEDV 阳性肛拭子，设置 VERO 细胞上清为阴性对照，每个样品做 3 个重复，对所建立的 DAS-ELISA 方法的特异性进行试验，结果如图 4-8 所示，PRV、PRRSV、PCV 和 PORV 的 OD_{450nm} 值远低于该方法临界值，而 PEDV (CH/SX/2015 毒株) 和猪 PEDV 阳性肛拭子明显大于该方法临界值，表明建立的本方法与其他感染猪的病毒并不存在交叉反应，因此本方法特异性较好。

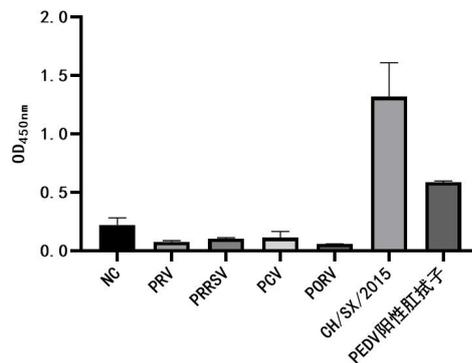


图 4-8 DAS-ELISA 特异性
Fig. 4-8 DAS-ELISA specificity

4.3.9 DAS-ELISA 方法重复性试验

经优化的双抗体夹心ELISA方法对批内、批间重复性进行验证，如表4-8和表4-9所示，批内变异系数为6%-9%，批间变异系数为7%-14%。表明所建立的双抗体夹心ELISA方法检测PEDV稳定可靠。

表 4-8 板间重复性试验结果

Table 4-8 Results of inter-plate repeatability test

样品	板 1	板 2	板 3	板 4	\bar{X}	S.D.	CV (%)
阳	0.846	0.7	0.849	0.692	0.772	0.087	11
阳	0.777	0.715	0.66	0.624	0.694	0.066	10
阳	0.645	0.753	0.692	0.625	0.674	0.049	7
阳	0.798	0.709	0.68	0.681	0.717	0.055	8
阳	1.289	1.293	1.236	1.479	1.324	0.1	8
阴	0.06	0.051	0.04	0.043	0.659	0.008	14
阴	0.0695	0.068	0.085	0.076	0.071	0.007	11
阴	0.081	0.078	0.075	0.07	0.069	0.004	7
阴	0.066	0.062	0.051	0.056	0.068	0.006	9
阴	0.091	0.097	0.085	0.083	0.083	0.006	8

表 4-9 板内重复性试验结果

Table 4-9 Results of intraplate repeatability

	样品 OD _{450nm}				\bar{X}	S.D.	CV (%)
阳	1.296	1.249	1.085	1.217	1.212	0.09	7
阳	0.844	0.842	0.948	0.921	0.889	0.005	6
阳	0.882	0.982	0.877	0.794	0.884	0.076	9
阳	0.784	0.709	0.693	0.711	0.724	0.04	6
阳	0.826	0.928	0.839	0.856	0.862	0.045	5
阴	0.053	0.055	0.043	0.052	0.061	0.005	9
阴	0.053	0.056	0.05	0.049	0.062	0.003	5
阴	0.053	0.055	0.046	0.05	0.064	0.003	6
阴	0.055	0.067	0.059	0.054	0.066	0.005	9
阴	0.084	0.079	0.074	0.079	0.068	0.003	6

4.3.10 DAS-ELISA 方法符合率试验

选取猪肛拭子样品共 92 份，使用国标引物进行 RT-PCR 鉴定与所建立的 DAS-ELISA 方法对样品进行检测，DAS-ELISA 方法检测结果如表 4-10 所示；RT-PCR 共检出 34 份阴性，而 DAS-ELISA 方法检测出 32 份阴性；通过统计学

分析，计算出 DAS-ELISA 方法与 RT-PCR 的检测阳性符合率为 96%。

表 4-10 DAS-ELISA 方法与 RT-PCR 检测结果
Table 4-10 DAS-ELISA method and RT-PCR results

RT-PCR	DAS-ELISA		合计	符合率 (%)
	阳性	阴性		
阳性	58	2	60	96
阴性	0	32	32	
合计	58	34	92	

4.4 讨论

PED 全球广泛流行，给养猪业造成巨大经济损失^[25]。而临床上缺乏快速简便的检测手段，现场无法根据腹泻症状进行确诊，因此容易延误病情，故现在急需一种快速检测手段来辅助检测人员诊断病情。DAS-ELISA 方法已经广泛运用于病原检测^[130]。有研究表明，通过使用 PEDV 经典菌株 CV777 的针对抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体建立了一种 DAS-ELISA^[105]。然而，近年来，高毒力 PEDV 变异株已成为猪腹泻病的主要病原体，与经典菌株，如 CV777 和 DR13 相比，表现出较大的遗传差异^[131]。快速识别病原体有助于实施有效的防控措施。与 RT-PCR 相比，DAS-ELISA 操作简单。

PED 主要经粪口感染，猪在感染 PEDV 初期便能在其粪便中检测到病毒粒子，随着病情加重粪便中的病毒粒子逐渐增多^[132]。关于 PEDV 的检测方法有很多，例如免疫电镜通过冠状病毒的典型特征观察判断，但在样品处理过程中病毒的纤突蛋白脱落影响观察结果，并且免疫电镜需要较为精密的设备，不利于现场检测；RT-PCR 检测方法较为快速灵敏，但容易出现假阳性，也不适用于现场诊断；ELISA 方法既可以检测抗体又可以检测病原^[133]，并且 ELISA 成本低，耗时短，操作简单，可以实现批量化检测，临床上以试剂盒的形式广泛运用，而 DAS-ELISA 方法是用两种不同表位的抗体进行检测，故与其他 ELISA 方法相比该检测方法特异性和灵敏更高。

Lyoo^[134]等建立一种检测粪便拭子中 PEDV 的免疫层析检测技术，敏感性和特异性分别为 95.0%和 98.6%，在感染 PEDV 的仔猪样本中，与 RT-PCR 测定的结果 100%一致。张清真^[135]等人，以体外表达的 PEDV S 蛋白作为抗原，商品化的 PEDV 单抗作为捕获抗体，生物素标记的 IgG 作为检测抗体，建立了

一种检测 PEDV 的生物素-亲和素系统的 DAS-EISA 方法，该方法稳定且灵敏，与 RT-PCR 共同检测临床样品符合率为 100%。本试验利用原核表达的 M 蛋白免疫小鼠后制备的 2 株单克隆抗体 7E1 和 5F2，使用试剂盒对单克隆抗体 5F2 进行辣根过氧化物酶标记，将 7E1 作为捕获抗体，HRP-5F2 作为检测抗体，优化各试验条件，并检测该方法的灵敏性，该方法最低检测病毒量为 1.56×10^5 TCID₅₀/mL，并且与 PRV、PRRSV、PCV、PoRV 没有交叉反应变异系数 6-14%，表明成功建立高效、特异且稳定可靠的 DAS-ELISA 方法。充分发挥该方法检测病原的应用价值，为临床检 PEDV 的测提供更简便的、可靠的检测手段。

4.5 本章小结

基于 PEDV M 蛋白单克隆抗体 7E1 和 5F2，成功建立一种效率高、特异性好、灵敏性高的 DAS-ELISA，该方法可用于诊断 PEDV 引起的疾病。

全文总结

- 1.成功构建原核表达载体 pET-21(b)-PEDV-M，通过诱导表达和镍柱纯化，成功获得纯度较好的重组 PEDV M 蛋白；
- 2.将重组 M 蛋白作为免疫原免疫小鼠，通过细胞融合技术成功获得 2 株活性较好的单克隆抗体 5F2 和 7E1，并对单克隆抗体的可变区进行序列分析，通过截短表达 M 蛋白筛选出单克隆 7E1 识别表位的区域为 92-129 aa；
- 3.基于所制备的 2 株抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体，并建立了一种特异性强、准确率高且稳定可靠的 DAS-ELISA 方法，可用于临床 PEDV 抗原检测。

参考文献

- [1]LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus [M]. *Virology*, 2015: 193.
- [2]SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 75-167
- [3]JUNG K, SAIF L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. *Vet J*, 2015, 204(2): 43-134.
- [4]PASICK J, BERHANE Y, OJKIC D, et al. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2014, 61(5): 397-410.
- [5]DEE S, CLEMENT T, SCHELKOPF A, et al. An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naive pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept [J]. *BMC Vet Res*, 2014, 10:176.
- [6]OPRIESSNIG T, XIAO C T, GERBER P F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naive pigs [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104766.
- [7]LOWE J, GAUGER P, HARMON K, et al. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5): 4-872.
- [8]JANG G, LEE D, SHIN S, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: an update overview of virus epidemiology, vaccines, and control strategies in South Korea [J]. *J Vet Sci*, 2023, 24(4): e58.
- [9]YUAN C, ZHANG P, LIU P, et al. A Novel Pathway for Porcine Epidemic Diarrhea Virus Transmission from Sows to Neonatal Piglets Mediated by Colostrum [J]. *J Virol*, 2022, 96(14): e0047722.
- [10]GALLIEN S, MORO A, LEDIGUERHER G, et al. Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars [J]. *Vet Res*, 2018, 49(1): 7.
- [11]GALLIEN S, MORO A, LEDIGUERHER G, et al. Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 228:5-20.
- [12]LI Y, WU Q, HUANG L, et al. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3811.
- [13]JUNG K, SAIF L J, WANG Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control [J]. *Virus Res*, 2020, 286:198045.

- [14]DEBOUCK P, PENSAERT M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777 [J]. *Am J Vet Res*, 1980, 41(2): 23-219.
- [15]PENSAERT M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Arch Virol*, 1978, 58(3): 7-243.
- [16]邢宣华, 王殿瀛, 朱维正, 赵凤玉, 巩怀俊, 费思阁. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究[J]. *兽医大学学报*, (1984, 03): 8-202.
- [17]WANG D, FANG L, XIAO S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus Res*, 2016, 226:7-13.
- [18]LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(8):3-1350.
- [19]WANG X M, NIU B B, YAN H, et al. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010 [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(12): 94-2487.
- [20]CHEN J, LIU X, SHI D, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant [J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 3408.
- [21]WOO P C, LAU S K, LAM C S, 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.
- [22]PARK J E, CRUZ D J, SHIN H J. Trypsin-induced hemagglutination activity of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(4): 9-595.
- [23]HOFMANN M, WYLER R. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) [J]. *Vet Microbiol*, 1989, 20(2): 42-131.
- [24]SPAAN W, DELIUS H, SKINNER M, et al. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences [J]. *EMBO J*, 1983, 2(10): 44-1839.
- [25]CHANG S H, BAE J L, KANG T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Mol Cells*, 2002, 14(2): 9-295.
- [26]SHIBATA I, TSUDA T, MORI M, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 72(3-4): 92-173.
- [27]KUSANAGI K, KUWAHARA H, KATO T, et al. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate [J]. *J Vet Med Sci*, 1992, 54(2): 8-313.
- [28]KADOI K, SUGIOKA H, SATOH T, et al. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines [J]. *New Microbiol*, 2002, 25(3): 90-285.

- [29]SONG D S, YANG J S, OH J S, et al. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3 [J]. *Vaccine*, 2003, 21(17-18): 42-1833.
- [30]GERDTS V, ZAKHARTCHOUK A. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206:45-51.
- [31]GONZALEZ J M, GOMEZ-PUERTAS P, CAVANAGH D, et al. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(11): 31-2207.
- [32]SHI P, SU Y, LI R, et al. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation [J]. *Virus Res*, 2019, 265:57-66.
- [33]RASMUSSEN T B, BONIOTTI M B, PAPETTI A, et al. Full-length genome sequences of porcine epidemic diarrhoea virus strain CV777; Use of NGS to analyse genomic and sub-genomic RNAs [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193682.
- [34]CHEN R, FU J, HU J, et al. Identification of the immunodominant neutralizing regions in the spike glycoprotein of porcine deltacoronavirus [J]. *Virus Res*, 2020, 276:197834.
- [35]QIN P, DU E Z, LUO W T, et al. Characteristics of the Life Cycle of Porcine Deltacoronavirus (PDCoV) In Vitro: Replication Kinetics, Cellular Ultrastructure and Virion Morphology, and Evidence of Inducing Autophagy [J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 455.
- [36]SU M, LI C, QI S, et al. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: Characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(3): 40-1129.
- [37]CHEN Q, LI G, STASKO J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1): 43-234.
- [38]LI X, WU Y, YAN Z, et al. A Comprehensive View on the Protein Functions of Porcine Epidemic Diarrhea Virus [J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(2): 165.
- [39]GONG L, LIN Y, QIN J, et al. Neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus block virus attachment and internalization [J]. *Virol J*, 2018, 15(1): 133.
- [40]WEISS S R, LEIBOWITZ J L. Coronavirus pathogenesis [J]. *Adv Virus Res*, 2011, 81(85-164).
- [41]BOSCH B J, VAN DER ZEE R, DE HAAN C A, et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex [J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 11-8801.
- [42]ASHRAF U M, ABOKOR A A, EDWARDS J M, et al. SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion [J]. *Physiol Genomics*, 2021, 53(2): 51-60.
- [43]LIN F, ZHANG H, LI L, et al. PEDV: Insights and Advances into Types, Function, Structure,

- and Receptor Recognition [J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 17744.
- [44]SHI W, HAO H, LI M, et al. Expression and Purification of a PEDV-Neutralizing Antibody and Its Functional Verification [J]. *Viruses*, 2021, 13(3):472.
- [45]ARNDT A L, LARSON B J, HOGUE B G. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly [J]. *J Virol*, 2010, 84(21): 28-11418.
- [46]SATO T, TAKEYAMA N, KATSUMATA A, et al. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo [J]. *Virus Genes*, 2011, 43(1): 8-72.
- [47]WRAPP D, MCLELLAN J S. The 3.1-Angstrom Cryo-electron Microscopy Structure of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein in the Prefusion Conformation [J]. *J Virol*, 2019, 93(23): e00923-19.
- [48]YE G, WANG X, TONG X, et al. Structural Basis for Inhibiting Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication with the 3C-Like Protease Inhibitor GC376 [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 240.
- [49]ZENG Z, DENG F, SHI K, et al. Dimerization of Coronavirus nsp9 with Diverse Modes Enhances Its Nucleic Acid Binding Affinity [J]. *J Virol*, 2018, 92(17): e00692-18.
- [50]RODRIGUEZ-ENRIQUEZ A, HERRERA-CAMACHO I, MILLAN-PEREZ-PENA L, et al. Predicted 3D model of the M protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus and analysis of its immunogenic potential [J]. *PLoS One*, 2022, 17(2): e0263582.
- [51]陈盼, 李莎莎, 朱紫祥, 等. PEDV M 蛋白对I型干扰素信号通路的抑制作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(07): 6-40.
- [52]WONG M L, LIU J J, CHANG Y, et al. Expression of the glycoprotein E2 of the classical swine fever virus in *Escherichia coli* [J]. *J Vet Med Sci*, 1998, 60(4): 4-541.
- [53]潘孝成, 沈学怀, 赵瑞宏, 等. 猪流行性腹泻病毒 5 株安徽流行株 M 基因的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(16): 8-116.
- [54]CHANG C K, HOU M H, CHANG C F, et al. The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions [J]. *Antiviral Res*, 2014, 103:39-50.
- [55]SAWICKI S G, SAWICKI D L, SIDDELL S G. A contemporary view of coronavirus transcription [J]. *J Virol*, 2007, 81(1): 9-20.
- [56]SURJIT M, LAL S K. The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities [J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8(4): 397-405.
- [57]WU C H, CHEN P J, YEH S H. Nucleocapsid phosphorylation and RNA helicase DDX1 recruitment enables coronavirus transition from discontinuous to continuous transcription [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(4): 57-462.
- [58]WU C H, YEH S H, TSAY Y G, et al. Glycogen synthase kinase-3 regulates the phosphorylation of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein and viral replication [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 39-5229.

- [59]DE HAAN C A, ROTTIER P J. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses [J]. *Adv Virus Res*, 2005, 64:165-230.
- [60]MCBRIDE R, VAN ZYL M, FIELDING B C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein [J]. *Viruses*, 2014, 6(8): 2991-3018.
- [61]SHI D, SHI H, SUN D, et al. Nucleocapsid Interacts with NPM1 and Protects it from Proteolytic Cleavage, Enhancing Cell Survival, and is Involved in PEDV Growth [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:39700.
- [62]XU X, ZHANG H, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 164(3-4): 21-212.
- [63]DING Z, FANG L, JING H, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1 [J]. *J Virol*, 2014, 88(16): 45-8936.
- [64]SU M, SHI D, XING X, et al. Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein Interacts with p53 To Induce Cell Cycle Arrest in S-Phase and Promotes Viral Replication [J]. *J Virol*, 2021, 95(16): e0018721.
- [65]RAAMSMAN M J, LOCKER J K, DE HOOGE A, et al. Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E [J]. *J Virol*, 2000, 74(5): 45-2333.
- [66]ARBELY E, KHATTARI Z, BROTONS G, et al. A highly unusual palindromic transmembrane helical hairpin formed by SARS coronavirus E protein [J]. *J Mol Biol*, 2004, 341(3): 79-769.
- [67]ORTEGO J, CERIANI J E, PATINO C, et al. Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway [J]. *Virology*, 2007, 368(2): 296-308.
- [68]BAUDOUX P, CARRAT C, BESNARDEAU L, et al. Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes [J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 43-8636.
- [69]CORSE E, MACHAMER C E. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles [J]. *J Virol*, 2000, 74(9): 26-4319.
- [70]MAEDA J, MAEDA A, MAKINO S. Release of coronavirus E protein in membrane vesicles from virus-infected cells and E protein-expressing cells [J]. *Virology*, 1999, 263(2): 72-265.
- [71]XU X, ZHANG H, ZHANG Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression [J]. *Virol J*, 2013, 10:26.
- [72]刘林青, 张淼洁, 陈慧娟, 等. 一例仔猪流行性腹泻的诊治及病因分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, (2019, 20): 79-81+176.

- [73]DUCATELLE R, COUSSEMENT W, PENSAERT M B, et al. In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777 [J]. Arch Virol, 1981, 68(1): 35-44.
- [74]HORVATH I, MOCSARI E. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease [J]. Arch Virol, 1981, 68(2): 13-103.
- [75]LEOWSKI J, TATON J, CZECH A, et al. [Comparison of the effects of chromatographically purified insulin TZF-Polfa and highly purified insulin Nordisk on insulin-induced lipotrophy] [J]. Pol Tyg Lek, 1987, 42(50): 80-1577.
- [76]COUSSEMENT W, DUCATELLE R, DEBOUCK P, et al. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study [J]. Vet Pathol, 1982, 19(1): 46-56.
- [77]JUNG K, AHN K, CHAE C. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus [J]. Res Vet Sci, 2006, 81(3): 5-310.
- [78]JUNG K, MIYAZAKI A, SAIF L J. Immunohistochemical detection of the vomiting-inducing monoamine neurotransmitter serotonin and enterochromaffin cells in the intestines of conventional or gnotobiotic (Gn) pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and serum cytokine responses of Gn pigs to acute PEDV infection [J]. Res Vet Sci, 2018, 119:99-108.
- [79]JUNG K, EYERLY B, ANNAMALAI T, et al. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus [J]. Vet Microbiol, 2015, 177(3-4): 8-373
- [80]LUO X, GUO L, ZHANG J, et al. Tight Junction Protein Occludin Is a Porcine Epidemic Diarrhea Virus Entry Factor [J]. J Virol, 2017, 91(10): e00202-17.
- [81]CURRY S M, SCHWARTZ K J, YOON K J, et al. Effects of porcine epidemic diarrhea virus infection on nursery pig intestinal function and barrier integrity [J]. Vet Microbiol, 2017, 211:58-66.
- [82]MADSON D M, MAGSTADT D R, ARRUDA P H, et al. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs [J]. Vet Microbiol, 2014, 174(1-2): 8-60.
- [83]LEE S, KIM Y, LEE C. Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112 [J]. Virus Res, 2015, 208:24-521.
- [84]OKA T, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene [J]. Vet Microbiol, 2014, 173(3-4): 69-258.

- [85]CHEN Q, GAUGER P, STAFNE M, et al. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets [J]. *Virology*, 2015, 482(51-9).
- [86]JUNG K, ANNAMALAI T, LU Z, et al. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 178(1-2): 31-40.
- [87]OLANRATMANEE E O, KUNAVONGKRIT A, TUMMARUK P. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows [J]. *Anim Reprod Sci*, 2010, 122(1-2): 42-51.
- [88]WICHT O, LI W, WILLEMS L, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture [J]. *J Virol*, 2014, 88(14): 61-7952.
- [89]GUSCETTI F, BERNASCONI C, TOBLER K, et al. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998, 5(3): 4-412.
- [90]JUNG K, WANG Q, SCHEUER K A, et al. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(4): i5-662.
- [91]MADSON D M, ARRUDA P H, MAGSTADT D R, et al. Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Isolate US/Iowa/18984/2013 Infection in 1-Day-Old Cesarean-Derived Colostrum-Deprived Piglets [J]. *Vet Pathol*, 2016, 53(1): 44-52.
- [92]DIEL D G, LAWSON S, OKDA F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods [J]. *Virus Res*, 2016, 226:60-70.
- [93]BJUSTROM-KRAFT J, WOODARD K, GIMENEZ-LIROLA L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) detection and antibody response in commercial growing pigs [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12:99.
- [94]ARYA M, SHERGILL I S, WILLIAMSON M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5(2): 19-209.
- [95]ZHAO P D, BAI J, JIANG P, et al. Development of a multiplex TaqMan probe-based real-time PCR for discrimination of variant and classical porcine epidemic diarrhea virus [J]. *J Virol Methods*, 2014, 206:5-150.
- [96]KIM S H, KIM I J, PYO H M, et al. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. *J Virol Methods*, 2007, 146(1-2): 7-172.
- [97]SONG D S, KANG B K, OH J S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2006, 18(3): 81-278.
- [98]NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP):

- principle, features, and future prospects [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1): 1-5.
- [99]REN X, LI P. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Virus Genes*, 2011, 42(2): 35-229.
- [100]YU X, SHI L, LV X, et al. Development of a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Virology*, 2015, 53(1): 76.
- [101]OURA C A, EDWARDS L, BATTEN C A. Virological diagnosis of African swine fever--comparative study of available tests [J]. *Virus Res*, 2013, 173(1): 8-150.
- [102]KLASSE P J. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives [J]. *Adv Biol*, 2014, 2014:157895.
- [103]CALLEBAUT P, DEBOUCK P, PENSAERT M. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea [J]. *Vet Microbiol*, 1982, 7(4): 295-306.
- [104]CARVAJAL A, LANZA I, DIEGO R, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1995, 7(1): 4-60.
- [105]RODAK L, VALICEK L, SMID B, et al. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces [J]. *Vet Microbiol*, 2005, 105(1): 9-17.
- [106]AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA [J]. *Peptides*, 2015, 72(4-15).
- [107]SOZZI E, LUPPI A, LELLI D, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Res Vet Sci*, 2010, 88(1): 8-166.
- [108]THOMAS J T, CHEN Q, GAUGER P C, et al. Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naive Conventional Neonatal and Weaned Pigs [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139266.
- [109]WANG M Y, ZHAO R, GAO L J, et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-based therapeutics development [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10(587269).
- [110]STERNBERG A, NAUJOKAT C. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: targets for vaccination [J]. *Life Sci*, 2020, 257(118056).
- [111]NIU X, WANG Q. Prevention and control of Porcine epidemic diarrhea: The development of recombination-resistant live attenuated vaccines [J]. *Viruses*, 2022, 14(6): 1317.
- [112]GORDON R K, KOTOWSKI I K, COULSON K F, et al. The role of non-animal origin feed ingredients in transmission of viral pathogens of swine: A review of scientific literature [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6:273.
- [113]NIEDERWERDER M C, HESSE R A. Swine enteric coronavirus disease: A review of 4

- years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(3): 75-660.
- [114]BOWMAN A S, NOLTING J M, NELSON S W, et al. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4): 8-213.
- [115]BAKER K L, MOWRER C L, ZHANG J, et al. Evaluation of a peroxygen-based disinfectant for inactivation of porcine epidemic diarrhea virus at low temperatures on metal surfaces [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 214:99-107.
- [116]甘振磊, 汤德元, 李春燕, 等. 猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究[J]. *猪业科学*, 2010, 27(12): 8-24.
- [117]郭春和, 黄毓茂, 项林盛, 等. 猪流行性腹泻病毒结构蛋白及疫苗的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2011, 43(12): 7-83.
- [118]KOPECKY S A, WILLINGHAM M C, LYLES D S. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus [J]. *J Virol*, 2001, 75(24): 81-12169.
- [119]KOPECKY S A, LYLES D S. Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression [J]. *J Virol*, 2003, 77(8): 69-4658.
- [120]WANG L F, GOULD A R, SELLECK P W. Expression of equine morbillivirus (EMV) matrix and fusion proteins and their evaluation as diagnostic reagents [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(11): 79-2269.
- [121]UTIGER A, TOBLER K, BRIDGEN A, et al. Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Virus Genes*, 1995, 10(2): 48-137.
- [122]SHENYANG G, ENHUI Z, BAOXIAN L, et al. High-level prokaryotic expression of envelope exterior of membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 123(1-3): 93-187.
- [123]VON BOEHMER L, LIU C, ACKERMAN S, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(10): 23-1908.
- [124]HUANG N, LANG Q, LI L, et al. Characterization of monoclonal antibodies against porcine epidemic diarrhea virus S1/S2 junction protein [J]. *AMB Express*, 2023, 13(1): 74.
- [125]丁壮 李. 抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及初步应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, (1989, 02): 6-11.
- [126]韩笑, 庞俊增, 李林岳, 等. 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(12): 4-10.
- [127]YE M, ZHU H, YANG Z, et al. Identification of Three Novel Linear B-Cell Epitopes in Non-Structural Protein 3 of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Using Monoclonal Antibodies

- [J]. *Viruses*, 2024, 16(3): 424.
- [128] LI M, WANG Y, WANG Y, et al. Accurate location of two conserved linear epitopes of PEDV utilizing monoclonal antibodies induced by S1 protein nanoparticles [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 6): 127276.
- [129] 张志榜. 猪流行性腹泻病毒膜蛋白和核蛋白抗原表位的鉴定 [D]. 2011.
- [130] 李月梅, 金雪梅, 张守发, 等. 猪附红细胞体双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立和应用 [J]. *中国动物传染病学报*, 2021, 29(03): 6-42.
- [131] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1): 3-161.
- [132] 马宇聪, 刘增素, 王书博, 等. PEDV 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(09): 9-1152.
- [133] 张琪, 徐丽美, 周宏超, 等. 基于 N 蛋白的 PEDV 间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(02): 54-148.
- [134] LYOO K S, YEOM M, KIM J, et al. Development of rapid immunochromatographic strip test for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Vet Rec*, 2017, 181(22): 596.
- [135] 张清真, 陶洁, 殷秀辰, 等. 猪流行性腹泻病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. *上海农业学报*, 2017, 33(01): 7-134.