

分类号

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

猪德尔塔冠状病毒 N 蛋白单抗研制及胶体金检测
技术建立

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES
AND COLLOIDAL GOLD DETECTION
TECHNOLOGY FOR PORCINE
DELTACORONAVIRUS N PROTEIN

研究生: 张铃娟
CANDIDATE: ZHANG LINGJUAN

学号: 2021302120285
STUDENT NO.:

学位类别: 兽医硕士
DEGREE TYPE: MASTER OF PROFESSIONAL DEGREE
IN VETERINARY MEDICINE

导师: 张安定 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR ZHANG ANDING

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

June, 2024

分类号

密级:

华中农业大学硕士学位论文

猪德尔塔冠状病毒 N 蛋白单抗研制及胶体金检测
技术建立

**Development of Monoclonal Antibodies and Colloidal
Gold Detection Technology for Porcine
Deltacoronavirus N Protein**

研 究 生: 张铃娟

学 号: 2021302120285

指导教师: 张安定 教授

学位类型: 兽医硕士

华中农业大学动物医学院
中国 武汉

**College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University
Wuhan, China**

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 猪德尔塔冠状病毒流行概况	1
1.2 猪德尔塔冠状病毒临床症状及病理变化	2
1.3 猪德尔塔冠状病毒蛋白结构及功能	3
1.3.1 棘突蛋白(S).....	4
1.3.2 包膜蛋白(E).....	4
1.3.3 膜蛋白(M).....	5
1.3.4 核衣壳蛋白(N)	5
1.4 PDCoV 感染检测及诊断技术.....	5
1.4.1 病毒分离与鉴定.....	6
1.4.2 电子显微镜技术.....	6
1.4.3 聚合酶链式反应.....	7
1.4.4 重组酶聚合酶扩增反应.....	7
1.4.5 病毒中和实验.....	7
1.4.6 酶联免疫吸附实验.....	8
1.4.7 胶体金免疫层析技术.....	8
1.5 研究目的及意义.....	9
第二章 CHO 稳转细胞系的构建	10
2.1 引言.....	10
2.2 试验材料.....	11
2.3 试验方法.....	15
2.4 实验结果分析.....	25
2.4.1 重组质粒的构建及鉴定.....	25
2.4.2 PDCoV-N 蛋白 CHO 稳转细胞系筛选.....	27
2.4.3 重组蛋白表达.....	28
2.5 讨论.....	29
2.6 结论.....	30
第三章 PDCoV-N 单克隆抗体的制备	31
3.1 引言.....	31
3.2 实验材料.....	31
3.3 实验方法.....	32
3.4 实验结果分析.....	43
3.4.1 确定间接 ELISA 筛选包被浓度	43
3.4.2 免疫鼠血清效价检测.....	44

3.4.3 杂交瘤细胞的筛选.....	45
3.4.4 杂交瘤细胞株稳定性分析.....	46
3.4.5 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定.....	47
3.4.6 杂交瘤细胞株分泌抗体病毒反应性鉴定	47
3.4.7 杂交瘤细胞株分泌抗体特异性鉴定.....	48
3.4.8 杂交瘤细胞株表位相关性分析.....	49
3.4.9 杂交瘤细胞株分泌抗体稳定性鉴定.....	50
3.4.10 腹水纯化前效价检测.....	51
3.4.11 腹水纯化鉴定	51
3.4.12 腹水纯化后反应性鉴定.....	52
3.4.13 腹水纯化后亲和力鉴定.....	53
3.5 讨论.....	54
3.6 结论.....	55
第四章 PDCoV 胶体金检测方法的建立.....	56
4.1 引言.....	56
4.2 实验材料.....	57
4.3 实验方法.....	57
4.4 实验结果分析.....	61
4.4.1 胶体金纳米粒子的鉴定.....	61
4.4.2 金标记抗体与检测抗体确定.....	61
4.4.3 最佳金标记 pH 的确定.....	62
4.4.4 单克隆抗体最佳添加量的确定.....	63
4.4.5 胶体金标记单克隆抗体鉴定结果.....	64
4.4.6 最佳反应时间的确定.....	64
4.4.7 试纸条敏感性检验.....	65
4.4.8 试纸条特异性检验.....	65
4.4.9 试纸条稳定性检测.....	66
4.4.10 临床样品符合率检测.....	66
4.5 讨论.....	69
4.6 结论.....	70
参考文献.....	71

摘要

猪德尔塔冠状病毒是一种猪新型肠道冠状病毒，在 2012 年中国香港猪腹泻临床样本检测中被发现。可引起仔猪腹泻、呕吐、脱水等临床症状，哺乳仔猪感染后死亡率可达 30%~40%。2014 年美国俄亥俄州等地暴发了大规模的疫情。此后，PDCoV 在泰国、韩国和加拿大等多个国家陆续被检出呈现全球流行的态势，给全球养猪业造成巨大的损失。此外，研究报道称 PDCoV 在人类、小牛和其他家禽中也有种间传播存在跨物种传播的风险。目前市面上暂无可用的商品化疫苗预防 PDCoV 感染。综上所述，研制出更加方便、快捷的 PDCoV 感染诊断方法，对于提早预防和精准控制 PDCoV 感染具有重要意义。

本研究选定病毒结构蛋白中高度保守且占比最高的 N 蛋白为靶标抗原，随后比对我国 PDCoV 流行毒株 N 蛋白序列，选取保守序列进行基因合成，以其为模板构建 N 蛋白 CHO 真核表达质粒。再进行 N 蛋白 CHO 稳转细胞系筛选，实现了 N 蛋白在培养上清中稳定表达，并将培养上清纯化后作为免疫原免疫小鼠。经过四轮免疫，检测免疫鼠血清效价当效价达到 1:10000 左右时进行细胞融合。经过 3 轮阳性杂交瘤细胞亚克隆，最终筛选到 5 株能够与 PDCoV 病毒呈现特异性反应的单克隆抗体并以此为基础建立 PDCoV 胶体金检测方法。主要研究结果如下：

1、PDCoV-N CHO 稳转细胞系的构建

选择使用 CMV 启动子和小鼠 IgK 信号肽进行 PDCoV-N 蛋白 CHO 真核表达质粒构建；将真核质粒进行电转化后利用谷氨酰胺合成酶抑制剂(L-Methionine-DL-sulfoximine, MSX)压力筛选稳定表达的细胞株。实现 N 蛋白在培养上清中稳定表达，得到纯化后的 N 蛋白浓度可达 2mg/mL 以上。

2、PDCoV-N 单克隆抗体的制备

将纯化的 N 蛋白免疫小鼠，当免疫鼠血清效价达 1:10000 以上进行细胞融合。在单抗筛选过程中，采用 N 蛋白和病毒分别包被 ELISA 板同步筛选，间接免疫荧光辅助验证的方式进行单抗筛选。据统计：本次实验细胞融合率为 77%，其中融合孔与 N 蛋白反应的阳性率为 47%，与病毒反应的阳性率为 8%。对蛋白和病毒反应双阳性孔进行亚克隆，经过 3 轮阳性杂交瘤细胞亚克隆，筛选到 5 株能与 PDCoV 特异性反应的单克隆抗体。将筛选到的 5 株单克隆抗体进行腹水制备，最终成功纯

化到 3 株单抗腹水：3-6F、4-9A 和 5-6E 经 BSA 蛋白浓度试剂盒检测其浓度分别为 3.48 mg/mL、3.85mg/mL、3.22mg/mL。

3、PDCoV 胶体金检测技术的建立

参考相加 ELISA 结果，将 3 株纯化的腹水分别作为金标记抗体和检测抗体进行组合比较其检测效果。最终选择 4-9A 为金标记抗体，3-6F 和 5-6E 为两株单抗均为检测抗体。验证得知：试制胶体金试纸条对 PDCoV 最低检测限为 $10^{1.67}$ TCTD₅₀ 的病毒（Ct 值为 29 及以下）。用试制试纸条对收集的 31 份临床样品进行检测并与荧光定量 PCR 检测结果进行对比。结果显示：两种检测方法的阴性临床样品符合率 100%，阳性临床样品符合率可达 94.6%，且试制试纸条与其他猪腹泻病毒（PEDV、TGEV、PoRV）临床样品不发生交叉反应，证明试制 PDCoV 胶体金试纸条具有良好的灵敏性和特异性。

关键词：猪德尔塔冠状病毒；N 蛋白；CHO；单克隆抗体；胶体金

Abstract

Porcine deltacoronavirus is a novel porcine enteric coronavirus first identified in clinical samples from piglets with diarrhea in Hong Kong, China, in 2012. PDCoV infection can cause clinical symptoms such as diarrhea, vomiting, and dehydration in piglets, with a mortality rate of 30% to 40% in suckling piglets. In 2014, a large-scale outbreak occurred in Ohio, USA, and since then, PDCoV has been detected in several countries including Thailand, South Korea, and Canada, indicating a global spread and posing significant economic losses to the swine industry worldwide. Furthermore, studies have reported interspecies transmission risks, with PDCoV potentially spreading to humans, calves, and other poultry. Currently, there are no commercially available vaccines to prevent PDCoV infection. Therefore, developing a rapid and convenient diagnostic method for PDCoV infection is crucial for early prevention and precise control of the disease.

This study selected the highly conserved and predominant N protein from the viral structural proteins as the target antigen. The N protein sequences of PDCoV epidemic strains in China were compared, and a conserved sequence was chosen for gene synthesis. This sequence was used as a template to construct the N protein CHO (Chinese Hamster Ovary) eukaryotic expression plasmid. Stable N protein-expressing CHO cell lines were then screened, achieving stable expression of the N protein in the culture supernatant. The purified culture supernatant was used as an immunogen to immunize mice. After four rounds of immunization, mouse serum titers were tested, and cell fusion was performed when the serum titer reached approximately 1:10,000. After three rounds of positive hybridoma cell subcloning, five monoclonal antibodies that specifically reacted with PDCoV were screened and used to establish a PDCoV colloidal gold detection method. The main research results are as follows:

1. Construction of PDCoV-N CHO Stable Cell Line

The PDCoV-N protein CHO eukaryotic expression plasmid was constructed using the CMV promoter and mouse IgK signal peptide. The eukaryotic plasmid was electroporated, and stable expressing cell clones were selected using glutamine synthetase inhibitor (L-Methionine-DL-sulfoximine, MSX) pressure screening. The N protein was stably expressed in the culture supernatant, with a purified N protein concentration exceeding 2 mg/mL.

2. Preparation of PDCoV-N Monoclonal Antibodies

The purified N protein was used to immunize mice. Cell fusion was performed when the immune mouse serum titer exceeded 1:10,000. During monoclonal antibody screening, both N protein and virus-coated ELISA plates were used for synchronous screening, with indirect immunofluorescence verification. The cell fusion rate in this experiment was 77%, with a 47% positive rate for N protein reaction and an 8% positive rate for virus reaction. Double-positive wells for protein and virus reactions were subcloned, and after three rounds of positive hybridoma cell subcloning, five monoclonal antibodies that specifically reacted with PDCoV were screened. Ascites preparations of the selected five monoclonal antibodies were made, and three monoclonal antibodies were successfully purified: 3-6F, 4-9A, and 5-6E, with BSA protein concentration assay kit results showing concentrations of 3.48 mg/mL, 3.85 mg/mL, and 3.22 mg/mL, respectively.

3. Establishment of PDCoV Colloidal Gold Detection Technology

Referring to ELISA results, the three purified ascites were compared in combination as gold-labeled antibodies and detection antibodies to determine the detection effect. Ultimately, 4-9A was selected as the gold-labeled antibody, and both 3-6F and 5-6E were used as detection antibodies. Validation showed that the prototype colloidal gold test strip could detect PDCoV at a minimum detection limit of $10^{1.67}$ TCID₅₀ of the virus (Ct value of 29 or below). The prototype test strip was used to detect 31 collected clinical samples, and the results were compared with quantitative PCR detection results. The results showed that the negative clinical sample agreement rate was 100%, and the positive clinical sample agreement rate was 94.6%. The prototype test strip did not cross-react with other porcine diarrhea viruses (PEDV, TGEV, PoRV) clinical samples, demonstrating that the prototype PDCoV colloidal gold test strip has good sensitivity and specificity.

Key words: porcine deltacoronavirus; N protein, CHO; monoclonal antibody; colloidal gold

缩略语表(Abbreviation Table)

缩写名称	英文名称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
CHO	Chinese Hamster Ovary	中国仓鼠卵巢细胞
ddH ₂ O	Double distilled water	去离子水
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
g	Gram	克
His	Histidine	组氨酸
HAT	Hypoxantin- aminopterin- thymidin	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷
HT	Hypoxantin- thymidin	次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
kb	Kilobase	千碱基
KDa	Kilo Dalton	千道尔顿
LB	Luria Bertani	LB 培养基
LA	Luria Bertani Agar	LA 固体培养基
McAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MSX	L-Methionine-DL-sulfoximine	L-氨基亚砷蛋氨酸
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
NC	Nitrocellulose filter	硝酸纤维素
NSP	Non-structural protein	非结构蛋白
ORF	open reading frame	开放阅读框
OD	Optical density	光密度
PDCoV	Porcine deltacoronavirus	猪德尔塔冠状病毒
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PK-15	Porcine Kidney-15	猪肾细胞
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
r/min	Rotations per minute	转速每分钟
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	RPMI-1640 培养基
SDS	Sodium dodecylsulphate	十二烷基磺酸钠
ST	swine testis	猪睾丸细胞
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升
V	Voltage	伏特

第一章文献综述

1.1 猪德尔塔冠状病毒流行概况

冠状病毒属于套式病毒目，冠状病毒科。2011 年国际病毒学分类委员会 (The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 正式将冠状病毒分为 4 个属类分别为： α 冠状病毒(Alphacoronavirus)、 β 冠状病毒(Betacoronavirus)、 γ 冠状病毒(Gammacoronavirus)和 δ 冠状病毒 (deltacoronavirus) (Woo et al 2012)。其中， α 和 β 冠状病毒的自然宿主要是哺乳动物，而 γ 和 δ 病毒属则主要引起鸟类感染，某些哺乳动物也可感染。研究发现：蝙蝠和鸟类等热血飞行动物是冠状病毒的自然宿主，促进冠状病毒的传播和进化（李任峰等 2020）。

2012 年 Woo 等首次报道在中国香港地区猪粪便中发现了一种不同于以往的猪腹泻冠状病毒并将其命名为 HKU15。该研究证实早在 2007 至 2011 年我国已存在 PDCoV，而后 Woo 等通过对分离株 KU15-44 和 HKU15-155 进行测序得到了完整的基因组序列(Wang et al 2015)。但由于当时没有分离到活病毒，并没有进行 PDCoV 致病机制和生物遗传特性的研究。2014 年初，美国俄亥俄州及其他周边地区爆发大规模的 PDCoV 感染。对分离到的病毒进行全基因组测序和系统发育分析证实，该病毒与 2012 年在香港报告的 δ 冠状病毒 HKU15 密切相关，将其命名为 OH1987(Wang et al 2014)。最近的研究报告称，在 2014 年初美国首次爆发 PDCoV 感染之前，与美国 PDCoV 毒株基因相关的 CH-AH-2004 和 CH/四川/S27/2012(Wang et al 2015)毒株分别于 2004 年和 2012 年在中国的腹泻仔猪中检出，表明存在 PDCoV 从中国跨地域传播到美国的可能(Wang et al 2014)。此后不久，在韩国(Lee et al 2016)、泰国(Janetanakit et al 2015)和日本(Suzuki et al 2017)、加拿大(Marthaler et al 2014)等诸多国家相继报道 PDCoV 感染，相比之下东南亚毒株的致病力较强。可见 PDCoV 正呈现全球流行趋势。近期又有文献报道表示：PDCoV 可跨物种感染人。2021 年 11 月 Lednicky 等人在患有发热疾病的海地儿童血液样本检测到 PDCoV 病原(Lednicky et al 2021)。这是首次人类感染 PDCoV 的报道(Boley et al 2020, Masters et al 2013)。该结果表明：研究 PDCoV 的流行病学及其致病机制具有重大的公共卫生学意义，开展 PDCoV 感染诊断工作也迫在眉睫。

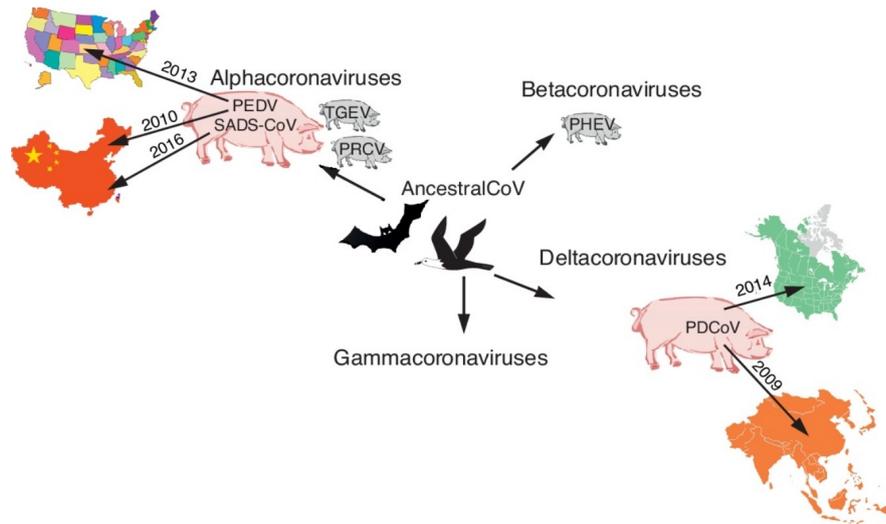


图 1-1 猪冠状病毒的演化(Wang et al 2019)

Fig. 1-1 Evolution of swine coronavirus

1.2 猪德尔塔冠状病毒临床症状及病理变化

PDCoV 对酸性环境敏感，当 $\text{pH}=3$ 时病毒容易失活。然而冠状病毒对脂溶性溶剂（乙醚溶液和氯仿溶液）等不敏感（成温玉等 2020）。对环境温度的适应性强：在 40°C 环境下放置 60min，病毒感染性稍有下降，在 50°C 下放置 60min 其感染性完全丧失。冠状病毒在低温环境中十分稳定，因此实验室保存通常可选择在 -80°C 冻存或冻干后放置在 4°C 中，保存时限可长达数年（张建武等 2004）。

PDCoV 可感染各日龄的猪，对处于哺乳期的仔猪尤为易感，表现为呕吐、腹泻、脱水等临床症状，哺乳仔猪感染后死亡率可达 30%~40%；母猪感染后只出现短期腹泻，但会长期带毒排毒，个别康复猪会出现生长迟缓，食欲下降等后遗症（Wang et al 2015）。PDCoV 主要感染肠道，此外还可以从脾、肾、肺等组织中检测到。感染的主要病理变化发生在肠道内。病毒易在肠道内快速增殖主要引起空肠，回肠发生急性、弥漫性、萎缩性肠炎等组织的病理损伤（Yang et al 2020, Yang et al 2021）。对病死猪进行剖检，可发现胃肠道中有未消化的凝乳块，肠壁变薄呈透明状，小肠壁及肠系膜充血、出血，腔内有大量淡黄色液体等病理现象（Pan et al 2017）。

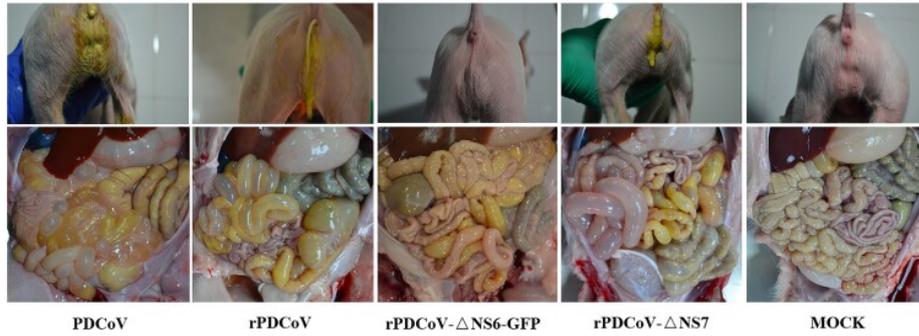


图 1-2 PDCoV 感染的病理变化(Zhang et al 2019)

Fig. 1-2 Pathological changes in PDCoV infection

1.3 猪德尔塔冠状病毒蛋白结构及功能

“冠状病毒”的名称来源于希腊语 $\kappa\omicron\rho\acute{\omega}\nu\alpha$ ，意为“王冠”。是直径为 120~160nm 的冠状外观的包膜病毒。且在所有已知的 RNA 病毒中，冠状病毒拥有最大的基因组(25.4 ~ 31.7 kb)，G/C 含量在 32%到 43%不等。在编码区，所有冠状病毒的基因组组成相似，均为单股正链 RNA 病毒(Woo et al 2010)。PDCoV 是已知的冠状病毒中最小的，基因组大小为 25.4kb。基因组编码顺序如图 1-3 所示：靠近 5'非编码区(5' untranslated region, 5'UTR)的开放阅读框 1a/1b (Open reading frame, ORF1a/1b)占基因组全长的 2/3，其编码复制酶前体多聚蛋白 1a 和 1b (段聪等 2023)。这两种多聚蛋白在病毒的作用下发生自我水解，最终形成 15 个非结构蛋白(Non-structural protein, NSP)，参与病毒的转录和复制过程(Choi et al 2019)。靠近 3'非编码区(3' untranslated region, 3'UTR)的 1/3 处编码 PDCoV 的 4 种结构蛋白分别为：棘突蛋白 (spike, S)、包膜蛋白 (envelope, E)、膜蛋白(membrane, M)、核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, N)及和 3 种辅助蛋白：非结构蛋白 6 (NS6)、非结构蛋白 7 (NS7)、NS7a 非结构蛋白 7a (NS7a)，这三种辅助蛋白均具有种属特异性并且能够在诱导细胞死亡、调节病毒致病性等方面发挥作用，共同组成了 PDCoV 病毒粒子的不同成分 (Zhang et al 2016 ,Qin et al 20 21)。

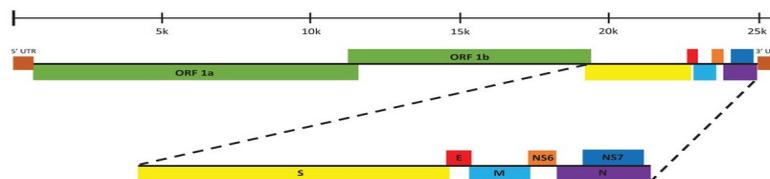


图 1-3 PDCoV 全基因组结构图(More-Bayona et al 2020)

Fig. 1-3 Whole genome structure of PDCoV

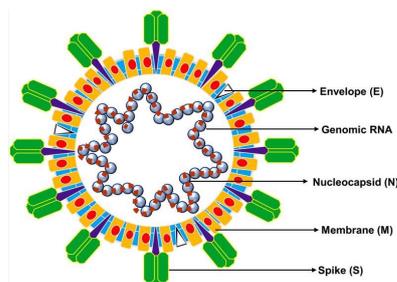


图 1-4 冠状病毒粒子结构图(Kirtipal et al 2020)

Fig. 1-4 Coronavirus particle structure diagram

1.3.1 棘突蛋白(S)

刺突蛋白位于病毒粒子表面，全长约为 1160 个氨基酸，属于 I 型跨膜糖蛋白。由信号肽、膜内区、跨膜区、膜外区 4 部分组成。其致病机制在于 S 蛋白通过与宿主表面的特异性受体结合介导病毒黏附入侵促进膜融合。从而在感染宿主的过程中发挥重要作用 (张爽 2022)。根据 S 蛋白的功能不同又将其分为 S1 和 S2 两部分。S1 位于氨基末端，负责识别受体、协助病毒入侵宿主细胞，并能够介导膜融合。目前研究的主要关注点多在 S 蛋白的受体结合结构域(receptor-binding domain, RBD)，已知 RBD 是 S1 区域高度保守的一段序列，位于 318~510 氨基酸范围处可诱导中和抗体产生 (Wang et al 2004)。而位于羧基末端的 S2 结构域的功能则主要参与病毒与宿主细胞膜融合过程 (Li et al 2016)。综上所述，S 蛋白是临床建立诊断方法的潜在靶蛋白和开发新型亚单位疫苗的首选蛋白 (Jung et al 2020)。

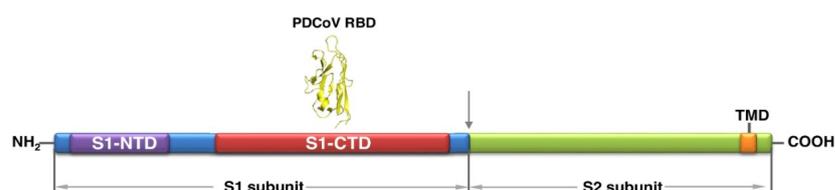


图 1-5 PDCoV S 蛋白基因组结构(Wang et al 2019)

Fig. 1-5 Genome structure of PDCoV S protein

1.3.2 包膜蛋白(E)

包膜蛋白是由 74~109 个氨基酸组成的疏水性蛋白，作为 PDCoV 囊膜的组成成分，它参与病毒粒子的组装和出芽的同时能有效诱导机体产生免疫反应 (余玲玲 2021)。目前关于 E 蛋白的功能报道较少，但有研究表明 E 蛋白和 M 蛋白共同作用

促进病毒样颗粒(Virus Like Particle , VLP)的组装和释放 (Bos et al 1996)。

1.3.3 膜蛋白(M)

膜蛋白与包膜形成和病毒颗粒释放有关 (逢凤娇等 2017)。在负责营养物质的运输的同时,又在病毒的装配和出芽过程中起至关重要的作用,并且能够诱导机体产生中和抗体 (Arndt et al 2010, Fan et al 2012, Zhang et al 2012)。M 基因高度保守,研究表明在不同毒株中 M 基因同源性高达 99% (Chen et al 2015)。因此 M 蛋白可作为特异性抗体检测的理想候选蛋白。

1.3.4 核衣壳蛋白(N)

核衣壳蛋白全长为 342 个氨基酸是四种结构蛋白中最保守的。其保守区由 N 末端域(N-terminal domain , NTD)和 C 末端域(C-terminal domain , CTD)构成并由柔性连接区连接 (徐双媛 2023)。其中 NTD 一端与病毒 RNA 呈螺旋状缠绕,位于病毒核心区域。CTD 区和柔性连接区互相作用,共同负责 N 蛋白的磷酸化(Malik et al 2020, Kang et al 2020)。研究表明:冠状病毒的复制通常在细胞质中进行。但对复制过程进行监测时发现:N 蛋白不仅出现在细胞质中,还可定位于细胞核仁内,表明 N 蛋白参与病毒复制过程(Hiscox et al 2001)。此外,N 蛋白是病毒粒子中表达量最多的结构蛋白,在 PDCoV 感染过程中最早产生高水平抗体 (张钧彦 2020),且具有种属特异性(Papageorgiou et al 2016)。因此 N 蛋白成为诊断抗原的首选靶标蛋白 (王睿 2018),常应用于病毒学检测和血清学诊断工具的开发(Liu et al 2012)。

1.4 PDCoV 感染检测及诊断技术

PDCoV 感染后的临床症状及病理变化与 PEDV、TGEV 和 PoRV 感染难以区分,所以对于 PDCoV 感染的确诊需要借助实验室手段。实验室诊断方法又可细分为核酸检测和抗体检测 (胡湘云等 2022)。核酸检测方法:电子显微镜病毒颗粒检测、病毒分离鉴定、聚合酶链式反应、重组酶聚合酶扩增反应等;抗体检测方法:酶联免疫吸附试验、中和试验和胶体金免疫层析技术等。

1.4.1 病毒分离与鉴定

病毒分离鉴定是诊断 PDCoV 感染的“金标准”。2012 年 Woo 等首次检测到 PDCoV 时，由于无法分离到活的病毒，致使无法进行 PDCoV 致病机制和生物遗传特性的研究。如今，大多数的病毒分离仍是采用将发病猪的肠管等易感部位进行匀浆取其上清过滤后接种于病毒适应的细胞系的方法。因此适应的细胞系选择就十分重要。据文献报道适合 PDCoV 增殖的细胞有很多例如：猪肾和猪睾丸细胞等。除此之外，在病毒分离培养过程中需要添加不同的试剂。例如 PDCoV 分离过程中不需要血清且需要添加适量浓度的胰蛋白酶。否则无法出现细胞病变(Cytopathic Effect, CPE)，且病毒增殖产生的滴度较低。

虽然病毒分离是诊断 PDCoV 感染的常用方法之一，但是影响病毒分离结果的不确定因素有很多，如临床样品中病毒含量低、病变初期不明显不易观察、病毒扩增所需的细胞系不适应等，都会造成病毒分离失败。且病毒分离实验操作复杂、得到结果所需时间长，在实际的检测中难以大面积推广。

1.4.2 电子显微镜技术

电子显微镜技术(Electron Microscope, EM)主要分为超薄切片电镜、负染电镜两种。在兽医学诊断过程中的应用主要在于：通过对病毒颗粒的形态特征和大小的观察，按现有的病毒分类将其归结到相应的病毒类别中 (Ma et al 2015)。虽然电镜观察法快速简便，但对样品的要求较高，适用于被检样本中含有足够量的病毒粒子，并且无法区分同一种属的病毒。如 PEDV 和 PDCoV 就无法通过电镜进行区分(Xu et al 2018)，但是通过电子显微技术可以初步判定种属，为下一步的鉴别指引方向。

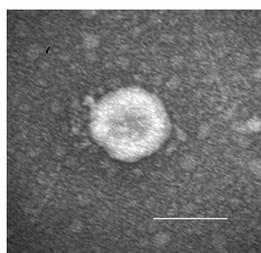


图 1-6 PDCoV 电镜示意图(Jung et al 2015)

Fig. 1-6 Electron microscope diagram of PDCoV

1.4.3 聚合酶链式反应

在 PDCoV 感染诊断中 RT-PCR 仍是首选方法。目前检测冠状病毒的大多数 PCR 引物的是根据基因组中较为保守的 N 或 M 基因设计。Ma L.等根据 PDCoV 的 N 基因保守区设计一对 RT-PCR 引物，建立的 RT-PCR 方法最低可检测 20 拷贝 RNA 的临床样品具有较高的灵敏度 (Ma et al 2018)。RT-PCR 优点很多例如：操作简便，适用范围广等，但是同时存在假阳性的误判且在配置体系时需注意操作，容易污染造成结果不准确等不足。

近几年，实时荧光定量 PCR 在各兽医诊疗实验室逐步兴起，并因其具有更好的敏感性和特异性而倍受青睐。Huang 等建立了引入多条探针的多重 RT-qPCR 检测方法，可同时检测 PEDV、PDCoV、TGEV、PEAV 这四种猪病毒性腹泻病毒，通过对 2015~2018 年收集的 384 份临床样品进行检测，结果表明 PDCoV 阳性率最高，且存在多种病毒混合感染的现象 (Huang et al 2019)。虽然荧光定量 PCR 具有诸多优势，但是实验仪器使用场地限制和检测成本较大，影响该方法在基层的推广使用。

1.4.4 重组酶聚合酶扩增反应

与常规 PCR 实验相比，重组酶聚合酶扩增反应(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)能在恒定温度下进行全程实验，没有复杂的操作，并且能够通过结合特异性探针或试纸条，实现快速检测临床样本，通过肉眼便可直接观察到检测结果，更适合基层或现场快速诊断。因此 RPA 被称为是能够取代 PCR 的核酸扩增技术。刘正奎利用 RPA 原理建立了能够区分 6 种猪病毒性腹泻的检测方法，具有较好的灵敏性和特异性 (刘正奎 2019)。虽然 RPA 技术具有取代 PCR 技术的潜力，但其还存在技术上的困难还未完全突破，因此其在基层推广还需时日。

1.4.5 病毒中和实验

研究证实：PDCoV 可以通过蛋白质氨基肽酶 N(Aminopeptidases, APN)基因的一个保守区域感染来自多个物种的细胞系 (Li et al 2018)。因此本实验尝试在用于接毒的 Vero 细胞中过表达 APN 基因，从而促进病毒感染细胞，以便后续观察病变。

传统的病毒中和实验 (neutralization test VNT), 是将灭活的免疫血清或临床感染血清进行被比稀释后, 加入含 50~100 TCID₅₀/mL 的培养基中混合孵育 1-2h 后, 加入提前铺好的细胞板中, 在 37℃ 中静置培养。每日定点观察病变, 并用 Reed-Muench 两氏法计算结果。这个过程一般持续 3~10 天, 耗时较长。且由于血清的影响, 即便设置有对照组, 仅凭肉眼观察结果仍可能存在误差。

1.4.6 酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附实验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 有多种类型, 常见的有间接 ELISA、夹心 ELISA 和竞争 ELISA。可根据不同需求选择进行抗原或抗体检测。间接 ELISA 和竞争 ELISA 常用于抗体的检测。Thachil 利用真核表达 PDCoV 的 S1 蛋白, 并建立了间接 ELISA 法 (Thachil et al 2015)。但后续研究表明 S1 蛋白高突变, 导致该方法易出现假阳性结果。因此高度保守的 N 蛋白得到了广泛关注, Su M 利用大肠杆菌表达 PDCoV 的 N 蛋白, 并建立间接 ELISA 检测方法, 并与 Western blot 结果相比, 较好的敏感性和特异性 (Su et al 2016)。夹心 ELISA 又可细分为: 双抗体夹心 ELISA 检抗原和双抗原夹心 ELISA 检抗体。其中最常见且应用较为广泛的是双抗体夹心 ELISA 用于检测抗原。钱炳旭对 PDCoV 的 N 蛋白进行原核表达, 并制备单克隆抗体初步建立了双抗体夹心 ELISA 的方法 (钱炳旭 2020)。该方法可定性和定量检测 PDCoV 感染且具有良好的特异性及敏感性。为快速诊断 PDCoV 感染特异性抗原检测提供了新方法。

1.4.7 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术 (gold immunochromatography assay, GICA) 诞生于 20 世纪 90 年代, 以其简单快速, 成本低廉和结果易于观察等优势 (刘文俊等 2009)。在动植物检疫, 食品安全残留检测, 以及动物疾病诊断等方面得到广泛应用 (祖立闯等 2010)。

严昊等利用三羟甲基氨基甲烷辅助法制备胶体金, 以此作为标记材料研制纸条用于 PEDV 的现场检测。所建立的胶体金试纸条最低检测 1×10^2 TCID₅₀/mL 的临床样品, 并可在 15min 内迅速出结果, 与其他常见的猪腹泻病毒 (TGEV、PDCoV、

PoRV)等无交叉反应(严昊等 2022)。相较于传统的实验室检测方法,胶体金试纸条更适用于现场大规模样本的快速检测。

1.5 研究目的及意义

猪德尔塔冠状病毒自 2012 年首次发现以来,在我国四川、天津、河南等地均有检出,其他国家也相继报道 PDCoV 感染呈现出全球流行趋势给全球养猪业造成巨大经济损失。且有研究表明 PDCoV 可感染人存在跨物种传播的风险。因此开展 PDCoV 感染快速诊断工具研发工作具有重大的公共卫生学意义。

本实验选定 PDCoV 病毒结构蛋白中高度保守且占比最高的 N 蛋白为靶标抗原,随后比对我国 PDCoV 流行毒株的 N 蛋白序列,选取保守的序列进行基因合成,以其为模板构建 N 蛋白 CHO 真核表达质粒。再进行 N 蛋白 CHO 稳定表达细胞系筛选,从而获得 N 蛋白将其纯化后免疫小鼠。当小鼠血清效价达 1:10000 以上进行单克隆抗体的制备。最终筛选能够与 PDCoV 病毒特异性反应的单克隆抗体,以此为基础建立 PDCoV 胶体金检测方法。以期研制出更加方便、快捷、适用于大规模 PDCoV 感染的临床样品的现场检测方法。为 PDCoV 感染的临床快速检测提供技术支持,对于预防和控制 PDCoV 传播具有重要意义。

第二章 CHO 稳转细胞系的构建

2.1 引言

1958年 Tjio 等在科罗拉多大学丹佛医学中心，在中国仓鼠卵巢中首次分离到第一株上皮样细胞并将它命名为 CHO-K1(Tjio et al 1958)。自 1986 年美国 Genentech 生物公司利用 CHO 研发的首个从哺乳动物细胞中提取的治疗性蛋白被批准上市以来，哺乳动物细胞表达系统逐步成为生物制药生产的主力。尽管存在各种替代表达系统，但数据表明在 2006 年至 2010 年批准的 58 种生物药品中有 32 种是用哺乳动物细胞生产的(Walsh et al 2010)。其中近 70%是在中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞中制造的(Jayapal et al 2007)。由此可见 CHO 真核表达系统在生产应用中的地位举足轻重。

总结 CHO 表达系统的优势如下(Kim et al 2012): 1、CHO 真核表达系统具有发达的基因扩增系统。最常见的有两种: 谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)介导基因扩增和二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)介导的基因扩增, 能够克服真核表达系统低产率的问题; 2、CHO 真核表达系统能够精准的实现糖基化、磷酸化等一系列翻译后修饰功能, 使表达的蛋白具有和天然抗体一样的生物学活性, 既可识别抗原又可激活补体系统(郭俊伟 2008); 3、可在无血清培养基中实现快速高密度生长, 表达的产物易于分泌到上清中, 节约成本的同时便于纯化; 4、易于形成可稳定表达目的蛋白工程细胞系, 有利于进行大规模工业化生产; 5、在过去的二十年中, CHO 真核表达系统已被证实为安全可靠的宿主, 由它生产的治疗性蛋白更容易被 FDA 等机构批准上市(杨瑞 2020)。基于以上种种优势, 本研究最终采用 CHO 真核表达系统进行靶标蛋白的表达(Rajendra et al 2017)。研究表明: 外源基因的表达受到启动子和信号肽的影响, 采用合适的启动子和信号肽有助于外源目的基因表达(张明明等 2010)。常见的启动子有 T7 启动子和 CMV 启动子, 其中 CMV 启动子是真核表达中应用最广泛的强启动子之一(张华韵 et al 2023)。而信号肽通常位于羧基(N)末端的氨基酸序列(一般为 5-30 个氨基酸), 是膜蛋白、分泌蛋白和溶酶体蛋白的定位标签(张凡等 2023)。最终选择 CMV 启动子和小鼠信号肽 IgK 来构建 PDCoV-N 真核表达质粒, 用 CHO 真核表达系统进行

PDCoV-N 目的蛋白表达，实现蛋白在上清中快速、大量表达。借助 CHO 真核表达系统具有与天然形式相同的磷酸化修饰功能提高 PDCoV-N 蛋白的免疫原性。

2.2 试验材料

2.2.1 试验菌株、质粒

CHO-K1 细胞、PXC17.4 真核载体质粒（均由本实验室保存）；DH5 α 感受态（由本实验室制备并保存）。

2.2.2 主要试剂、耗材与仪器设备

表 2-1 本研究所用的主要试剂、耗材与仪器设备

Table 2-1 Main reagents, consumables and Instruments used in this study

试剂、仪器设备与耗材 (各种生理生化试剂均为国产分析纯)	购买公司
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	南京诺为赞生物科技股份有限公司
2 × KeyPo Master Mix (Dye Plus)	
In-Fusion HD Enzyme Premix	宝生物工程（大连）有限公司
Pvu 1	
EasyTaq DNA Polymerase	北京全式金生物技术有限公司
High Pure dNTPs (2.5 mM)	
DL2000 DNA Marker	北京擎科新业生物技术有限公司
DL15000 DNA Marker	
无内毒素质粒小提试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Magen 公司
酵母提取物(Yeast extract)	OXOID 公司
胰蛋白胨 (Tryptone)	
琼脂粉 Agar	Biosharp 公司
恒温生化培养箱	上海博讯实业有限责任公司

续表 2-1

立式高压蒸汽灭菌锅	上海博讯实业有限责任公司
大振幅恒温摇床	武汉中科科仪技术发展有限责任公司
DK-S22 型恒温水浴锅	上海精宏试验设备有限公司
JY502 电子天平	上海精平电子仪器有限公司
FiveEasy Plus PE28 pH 计	梅特勒-托利多（上海）有限公司
DYH-III 稳压电泳仪	
5424R 型冷冻离心机	德国 EppendORF 公司
移液器	
EDC-810 型 PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司
SPX-160B 生化培养箱	上海福玛实验设备有限公司
凝胶成像系统	美国 Alpha 公司
DH-II 旋转混合仪	宁波新芝公司
4℃、-20℃、-80℃冰箱	海尔公司
DL-CJ-2NDI 超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
CR-GIII 高速离心机	日立公司
Nanodrop 2000 微量分光光度计	赛默飞世尔（上海）仪器有限公司

2.2.3 主要培养基及试剂配制

2.2.3.1 核酸试剂及培养基配制

LB 液体培养基：酵母提取物 5.0g，NaCl 5.0g，加入 900mL 去离子水，搅拌均匀，定容至 1L，121℃高压蒸汽灭菌 20min，室温保存备用。

LA 固体培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，NaCl 5.0 g，加入 900mL 去离子水，加 15g 琼脂，定容至 1L，121℃高压蒸汽灭菌 20min，室温保存备用。

1×PBS：称量 8g 氯化钠，0.2g 氯化钾，1.42g 磷酸氢二钠，0.27g 磷酸二氢钾，使用浓盐酸将 pH 值调节至 7.4，然后加入去离子水将溶液定容至 1L，0.22μm 滤器过滤，121℃高压蒸汽灭菌 20min，室温保存。

50×TAE 缓冲液：称量 242g Tris，37.2g Na₂EDTA·2H₂O，加 800mL 去离子水充分搅拌溶解后，加入 57.1mL 冰乙酸，定容至 1L，室温保存。

1×TAE 缓冲液：量取已配制的 50×TAE 缓冲液 10mL，加入 490mL 去离子水充分混匀后使用。

80%甘油溶液：量取 80mL 丙三醇，加入 20mL 去离子水，混匀后，121℃高压灭菌 20min 后室温保存。

50mg/mL 氨苄青霉素：称量 1g 氨苄青霉素，用 20mL 灭菌水溶解，然后分装储存于-20℃备用。

2.2.3.2 蛋白表达及纯化相关试剂

纯化 His 标签蛋白的 Ni-NTA 树脂购自上海碧云天生物技术公司。浓盐酸(HCl)、过硫酸胺、无水乙醇、咪唑、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2)、二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钠(NaCl)、Tris-Base 粉剂、聚丙烯酰胺均为购自国药集团化学试剂有限公司。

纯化用 PBS：称量 Na_2HPO_4 7.16g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.12g, NaCl 29.22g 加去离子水 1L，混匀溶解后，0.22 μm 滤膜过滤，常温保存。

20%乙醇：200mL 无水乙醇，加入 800mL 去离子水，混匀，现配现用。

2.2.3.3 SDS-PAGE 和 Western Blot 相关抗体、试剂

抗体：PDCoV 感染的临床阴性血清、阳性血清（均由本实验室保存）。His 标签的鼠一抗、HRP 标记的鼠二抗，购自 Southern Biotechnology 生物公司。

试剂：BSA(bovine serum albumin)购自 Biosharp 公司。溴酚蓝、DTT 粉剂、SDS 粉剂、甘氨酸（美国 MP 公司）、丙三醇、吐温 20、冰醋酸、无水乙醇、甲醇、浓盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。蛋白质 Marker 购自 Theromfish 公司。

5×SDS Loading buffer：称量 SDS 1.0g、溴酚蓝 0.01g，加入 1M Tris-HCl (pH 6.8)2.5mL，甘油 5mL，定容 10mL，室温保存备用。

10% DTT：称量 1.0g DTT 粉剂，溶于 10mL 三蒸水中，分装到 1.5mL EP 管中，-20℃冻存备用。

SDS-PAGE 电泳缓冲液：现用现配，称量 1.5g Tris-Base，7.2g 甘氨酸，0.5g SDS 粉末，溶于 500mL 三蒸水中，搅拌溶解待用。

考马斯亮蓝染色液配制：称量 1.0g R-250 粉剂，溶解于 1L 混合液（40%无水乙醇，10%冰醋酸，50%三蒸水）中，搅拌均匀，滤纸过滤除去颗粒物质后室温放置。

考马斯亮蓝脱色液配制：量取 200 mL 无水乙醇，50mL 冰醋酸，加到 250mL 三蒸水中，混合均匀即可使用。30%聚丙烯酰胺溶液：称量 290g 聚丙烯酰胺，10g N,N-亚甲基双丙烯酰胺于 1L 烧杯中，加入三蒸水 600mL，充分搅拌溶解，转移至容量瓶定容 1L，用 0.22 μ m 滤膜过滤，于棕色瓶中 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

10%过硫酸铵溶液：称量 1.0g 过硫酸铵粉末，加入 10mL 三蒸水后搅拌溶解，于棕色瓶中 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.5M Tris(pH 8.8)溶液：称量 182g Tris-Base，溶于 800mL 三蒸水中，搅拌溶解均匀，用浓 HCl 调 pH 值至 8.8，转移到容量瓶定容 1L，用 0.22 μ m 滤膜过滤后，于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1M Tris (pH 6.8)溶液：称量 121g Tris-Base，溶于 800mL 三蒸水中，搅拌溶解均匀，用浓 HCl 调 pH 值至 6.8，转移到容量瓶定容 1L，用 0.22 μ m 滤膜过滤后，于 4 $^{\circ}$ C 保存。

Western Blot 电转缓冲溶液：现用现配，称量 1.5g Tris-Base，7.2g 甘氨酸，加 400mL 三蒸水搅拌溶解，再加 100mL 甲醇混匀待用。

封闭液：含 2%BSA、5%脱脂乳的 TBST。

10 \times TBST Buffer：称量 24.2g Tris-Base、88g NaCl，加入 800mL 三蒸水搅拌溶解，加入 5mL Tween-20，混匀后用浓 HCl 调节 pH 值至 7.5，转移至容量瓶定容 1L。量取 50mL 该溶液，加入 450mL 单蒸水混匀后即为 1 \times TBST。

HRP 标记的鼠二抗：1:10000 稀释至含有 2%BSA 的 TBST。

HRP 标记的猪二抗：1:5000 稀释至含有 2%BSA 的 TBST。

2.3 试验方法

2.3.1 真核表达质粒构建

2.3.1.1 引物设计

为了扩增目的片段和载体，以及目的片段与载体融合后转化子的鉴定。本研究参考 GenBank 中公布的 PDCoV 基因组序列，利用 primer premier5.0 生物软件设计引物。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列见表 2-2。

表 2-2 本研究所用的 PCR 引物

Table 2-2 PCR primers used in this study

Primers	Sequences(5'~3')	Used for	Products(bp)
PDCOV-N-F	ATGGCCGCACCAGTAGTCCCTACT A	PCR amplification of PDCoV-N gene fragment	
PDCOV-N-R	CGCTGCTGATTCTGCTTTATCTCA		
PXC17.4-ZT-F	GGCAGTCACCATCATCACCATCAC CA	PCR amplification of PXC17.4 vector fragment	7040
PXC17.4-ZT-R	ATCTCCAGTTGATCCAGGTACCCAT AACAGCA		
PXC17.4-JD-F	TAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTC	Identification the insertion of different fragments in plasmid	1690
PXC17.4-JD-R	CCGAGAGCCGACGACGACTG		
PDCOV-N-RH-F	TGGTGGAGGCGGAAGCATGGCCG CACCAGTAGTCCCTACTA	Fusion primer	1057
PDCOV-N-RH-R	ATGATGGTGACTGCCCGCTGCTGA TTCCTGCTTTATCTCA		

2.3.1.2 目的片段扩增

通过比对我国流行 PDCoV 的 N 蛋白序列，选择保守序列并进行仓鼠源密码子偏好性密码子优化后，由北京擎科生物科技有限公司进行模板合成。质粒构建方案见图 2-1。

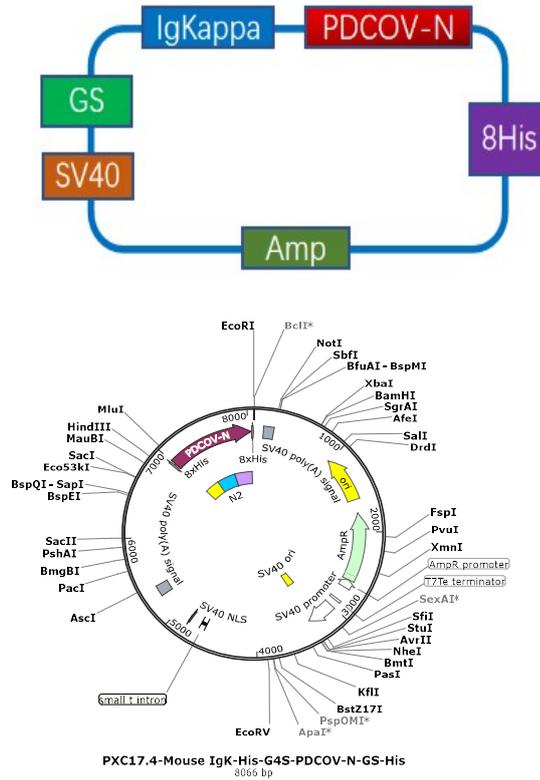


图 2-1 PDCoV-N 真核表达质粒构建方案

Fig. 2-1 Protocol for PDCoV-N eukaryotic expression plasmid construction

PDCoV-N 片段的扩增：采用表 2-2 中 PDCoV-N-F/R 引物和 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增，目的片段大小为 1026bp。Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增目的片段的 PCR 反应体系如表 2-3 所示，反应条件如表 2-4 所示。

表 2-3 PCR 扩增目的片段的反应体系

Table 2-3 The reaction system for PCR amplification of the target fragment

System composition	Reagent dosage
5×SF Buffer (with 10 mmol/L MgSO ₄)	10μL
dNTP Mix (10mmol/L each)	1μL
25 mmol/L MgSO ₄	2μL
Forward Primer (10μmol/L)	2μL
Reverse Primer (10μmol/L)	2μL
Template	100ng
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1μL
ddH ₂ O	up to 50 μL

表 2-4 PCR 扩增目的片段的反应条件

Table 2-4 The reaction conditions of PCR amplification of the target fragment

Temperature	Time	Cycles
95°C	5min	
95°C	10sec	} 35
60°C	10sec	
72°C	15sec/kb	
72°C	5min	
25°C	1min	

2.3.1.3 载体片段扩增

同理使用 2×KeyPo Master Mix(Dye Plus)扩增 PXC17.4 真核质粒载体,用表 2-2 中的引物 PXC17.4-ZT-F/R 和表 2-5 的 PCR 反应体系及表 2-6 的 PCR 反应条件进行载体扩增, 目片段大小为 7040bp。退火温度根据引物的最佳退火温度确定为 63°C, 延伸时间根据目的片段的大小设置为 2min。

表 2-5 PCR 扩增目的片段的反应体系

Table 2-5 The reaction system for PCR amplification of the target fragment

System composition	Reagent dosage
2 × KeyPo Master Mix (Dye Plus)	25μL
Forward Primer (10μmol/L)	2μL
Reverse Primer (10μmol/L)	2μL
Template	100ng
ddH ₂ O	up to 50 μL

表 2-6 PCR 扩增目的片段的反应条件

Table 2-6 The reaction conditions of PCR amplification of the target fragment

Temperature	Time	Cycles
98°C	10sec	} 32
63°C	5 sec	
72°C	40 sec	

2.3.1.4 PCR 产物的纯化

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，用 Magen 琼脂糖凝胶糖 DNA 回收试剂盒进行纯化。操作步骤参考试剂盒说明书具体如下：

(1) 配制合适浓度的琼脂糖凝胶，电泳分离 DNA 片段。当 DNA 片段分离后，把凝胶放置于紫外灯下，快速切下含目的条带的 DNA 片段的凝胶，并尽量去除多余的凝胶。

(2) 称量凝胶块的重量，并转移至 2.0mL 离心管中。按 100mg 凝胶块相当 100 μ L 体积计算，加入 1~3 倍体积 Buffer GDP。55 $^{\circ}$ C 水浴，让凝胶块完全溶解。水浴期间，颠倒混匀 3 次加速溶胶。若凝胶块重量为 200mg，则加入 200~600 μ L Buffer GDP。凝胶浓度超过 2.0% 时，加入 2~3 倍体积的 Buffer GDP。处理超过 5kb 的片段，加 3 倍凝胶体积 Buffer GDP 溶胶后，再加入 1 倍凝胶体积异丙醇混匀后，再按第 (3) 步进行操作。

(3) 短暂离心收集管壁上的液滴。将 HiPure DNA Mini Column 套在 2mL 离心管中。把溶胶液转移至柱子中，12000r/min 离心 1min。

(4) 倒弃滤液，把柱子套回 2ml 离心管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中，12000r/min 离心 1min

(5) 倒弃滤液，把柱子套回 2mL 离心管中。加入 300 μ l Buffer GDP 至柱子中。静置 1min，12000r/min 离心 1min。

(6) 倒弃滤液，把柱子套回 2mL 离心管中。加入 600 μ L Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中，12000r/min 离心 1min。

(7) 重复操作步骤 (6)。

(8) 倒弃滤液，把柱子套回 2mL 离心管中。12000r/min 离心 2min，打开柱子的盖子，空气干燥 5min 以彻底去除乙醇。

(9) 把柱子套在 1.5mL 离心管中，加入 15~30 μ L Elution Buffer 至柱子膜中央。室温放置 2min，12000r/min 离心 2min。

(10) 重复操作步骤 (9)，弃柱子，做好标记，把 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

2.3.1.5 融合质粒载体和插入片段

利用融合 PCR 技术，将 PDCoV-N 目的片段构建至 PXC17.4 真核质粒载体上。融合 PCR 的原理是采用具有互补末端的引物，扩增出有重叠链的 PCR 产物，再通过融合酶的作用，将两个具有重叠链的不同 PCR 产物片段连接起来，若是目的片段与质粒载体片段融合成完整的质粒，其产物可直接转化到 DH5 α 感受态细胞中。

融合 PCR 的反应体系中 DNA 片段与载体片段的摩尔比 3:1~10:1，插入片段添加量不超过 200ng，采用表 2-2 的引物 PDCoV-N-RH-F/R 进行融合扩增。融合体系如表 2-7 所示，反应条件如表 2-8 所示。

表 2-7 融合 PCR 的反应体系

Table 2-7 The reaction system of fusion PCR

System composition	Reagent dosage
Purified PCR fragment	10~200ng
Linearized vector	50~200ng
5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix	4 μ L
ddH ₂ O	up to 20 μ L

表 2-8 融合 PCR 的反应条件

Table 2-8 The Reaction conditions of fusion PCR

Temperature	Time
37 $^{\circ}$ C	15min
50 $^{\circ}$ C	8min
52 $^{\circ}$ C	8min
54 $^{\circ}$ C	8min
58 $^{\circ}$ C	8min
60 $^{\circ}$ C	8min
25 $^{\circ}$ C	1min

2.3.1.6 CaCl₂ 处理法制备感受态

(1) 菌种复苏：取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 DH5 α 菌种划线接种于 LA 平皿上，做好标记，于 37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜。挑取单菌落接种于 1mL LB 液体培养基中，置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中，200r/min 震荡培养 10h。

(2) 菌液扩大培养：次日将活化的菌液按 1:1000 转接到 50mL LB 培养基中，置于 37℃ 摇床，160r/min 震荡培养 3~4h。

(3) 当 OD_{600nm}≈0.5 时，取出培养物，冰上静置 30min。

(4) 4℃ 条件下，5000r/min 离心 10min，在无菌超净台中弃去上清，收集菌体，将管倒置于干滤纸上 1min，吸干残留的培养液，加入 25~30mL 预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌体，冰浴 15min。

(5) 4℃ 条件下，5000r/min 离心 10min，超净台中弃去上清，收集菌体，加入 1mL 预冷的含有 15%甘油的 0.1mol/L CaCl₂，轻轻吹散重悬菌体，冰浴 10min。

(6) 取感受态细胞悬 100μL 每管分装于 1.5mL 预冷的灭菌离心管中。

2.3.1.7 融合产物的转化

融合 PCR 结束后取 10μL 产物直接转化至 DH5α 感受态细胞中。转化步骤如下：

(1) 取出在 -80℃ 冰箱中保存的感受态细胞，置于冰上解冻。

(2) 待感受态细胞解冻后，无菌环境下取 10μL 融合 PCR 产物加入装有感受态细胞的离心管中，轻轻吹打，冰上静置 30min。

(3) 静置结束后，将感受态在 42℃ 水浴锅中热激 90sec，热激结束后将离心管迅速置于冰上冷却 2min，每管加 800μL LB 培养基，置于 37℃ 摇床，160r/min 复苏 1h。

(4) 将复苏后的菌液取 200μL 或者 5000r/min 离心 5min 后弃去培养基至仅剩 200μL，涂布含有氨苄的 LA 琼脂平板中。待平板表面无明显液滴后，将平板倒置于 37℃ 恒温培养箱中培养过夜。

2.3.1.8 质粒转化子的 PCR 鉴定

在无菌环境下挑取转化子到含有 10μL 灭菌水的 1.5mL EP 管中，充分吹散菌体，无菌取出 7μL 到外开的 1.5mL EP 管中，加入含相应浓度抗生素的 LB 培养基中，37℃ 震荡培养 14~16h。取 3μL 至 PCR 管中用作鉴定 PCR 的模板。使用 Easy Taq DNA Polymerase，采用表 2-2 的引物 PXC17.4-JD-F/R 进行 PCR 扩增鉴定。反应体系如表 2-9 所示，反应条件如表 2-10 所示。若鉴定的转化子疑似正确，将对应

的菌液送测序。

表 2-9 鉴定 PCR 反应体系

Table 2-9 The reaction system of identification PCR

System composition	Reagent dosage
10×Easy Taq Buffer	2.5μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	1μL
Forward Primer (10μmol/L)	1.5μL
Reverse Primer (10μmol/L)	1.5μL
Template	3μL
Easy Taq DNA Polymerase (5U /μL)	0.5μL
ddH ₂ O	up to 25μL

表 2-10 鉴定 PCR 的反应条件

Table 2-10 The reaction conditions of identification PCR

Temperature	Time	Cycles
98°C	10min	
95°C	30sec	} 32
59°C	30sec	
72°C	30sec/kb	
72°C	10min	
25°C	1min	

2.3.2 CHO 稳转细胞系构建

2.3.2.1 无内毒素质粒的提取

本实验用 TIANGEN 无内毒素质粒小提试剂盒提取质粒，操作步骤参考试剂盒说明书具体如下：

(1) 柱平衡步骤：向吸附柱 CP4 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 的平衡液 BL，12000r/min 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(2) 取 1~5mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，12000r/min 离心 1min，尽量吸除上清。

(3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μ L 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNase A），彻底悬浮细菌沉淀（注意：如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低）。

(4) 向离心管中加入 500 μ L 溶液 P2，温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。

(5) 向离心管中加入 500 μ L 溶液 P4，立即温和地上下翻转 6~8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。室温静置 10min，12000r/min 离心 10min。此时离心管底形成沉淀。

(6) 将上一步收集的上清液用移液器加入过滤柱 CS（吸附柱放入收集管中），尽量不要吸出沉淀。12000r/min 离心 2min，滤液收集在干净的 2mL 离心管。

(7) 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 CP4 中（吸附柱放入收集管中）。

(8) 室温 12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

(9) 向吸附柱 CP4 中加入 500 μ L 去蛋白液 PD，12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

(10) 向吸附柱 CP4 中加入 600 μ L 漂洗液 PW（检查是否加入无水乙醇），12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。

(11) 重复步骤（10）。

(12) 将吸附柱 CP4 重新放回收集管中，12000 r/min 离心 2 min，目的是将吸附柱中残留的漂洗液除去。

(11) 将吸附柱 CP3 置于一个新的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 50~100 μ L 预热的双蒸水，室温放置 2min，12000r/min 离心 2min 将质粒溶液收集到离心管中。洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ L，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。

(12) 将得到的溶液重新加入吸附柱中，室温放置 2min，12000r/min 离心 2min，将质粒溶液收集到离心管中，做好标记，冻于-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.3.2.2 质粒线性化

质粒线性化方法如下：将无内毒提取的质粒用 PvuI 酶进行线性化，目的在于使目的基因稳定高拷贝表达。质粒线性化反应体系如 2-11 所示，然后在 37℃ 水浴锅中反应 3h。

表 2-11 质粒线性化反应体系

Table 2-11 plasmid linearization reaction system

System composition	Reagent dosage
PvuI	2 μ L
Template	2 μ g
10 \times K Buffer	4 μ L
0.1%BSA	4 μ L
ddH ₂ O	up to 40 μ L

2.3.2.3 异丙醇沉淀 DNA

向线性化的产物中加入等体积的异丙醇进行 DNA 的沉淀，其原理是：加入异丙醇，能够夺取 RNA/DNA 周围的水分，因此 RNA/DNA 能够聚集而发生沉淀（唐雪明等 2002）。其沉淀 DNA 的反应体系如 2-12 所示。

表 2-12 异丙醇沉淀 DNA 反应体系

Table 2-12 isopropyl alcohol precipitated DNA reaction system

System composition	Reagent dosage
Linearized product	40 μ L
isopropanol	40 μ L
5M NaCl	0.8 μ L
GlyCoBlue	0.4 μ L

具体步骤如下：

- (1) 按表 2-10 中体系沉淀 DNA；
- (2) -20℃ 过夜沉淀；
- (3) 室温 15000g 离心 15min, 弃上清；
- (4) 80%乙醇洗两次，4℃离心去上清；
- (5) 37℃烘干，加 10 μ L ddH₂O 溶解，内开取 1 μ L 测浓度，备用。

2.3.2.4 目的质粒电转化

取 2 μ g 线性化质粒，使用电转化的方式，将其电转入处于对数生长期的 2 \times 10⁶ CHO 细胞中。

2.3.2.5 L-氨基亚砷蛋氨酸（MSX）加压筛选

将质粒电转化进 CHO 细胞后，待细胞状态恢复(24~48h)，进行 L-氨基亚砷蛋氨酸(MSX)制剂加压筛选。筛选时先从低浓度药物浓度开始一般为 15 μ mol 起始，然后根据表达量逐步增加药物浓度。在 96 孔板中进行压药筛选，保证每个孔初始细胞量为 2000 个左右，用 15 μ mol MSX 进行药筛，待细胞集落长至 1/2 时，进行斑点杂交检测。将表达量高的克隆再次进行一轮电转或进行高密度表达。

2.3.2.6 高密度表达

按照 1 \times 10⁶ 细胞/mL 的密度接种于 50mL 含有 50 μ mol MSX 的 CD04 培养基的 250ml 细胞摇瓶中，于 5% CO₂，37 $^{\circ}$ C，120 r/min 摇床中培养，可按蛋白表达需求以 50mL 培养体积为单位扩大培养。每天取样计数细胞密度，台盼蓝染色计存活率，检测葡萄糖浓度，PH 值，第 1、3、5 天补加 5 % Feed A，1 % Feed B 补料培养基，第 7、9 天补加 7.5 % Feed A，1% Feed B 补料培养基，当葡萄糖浓度低于 3 g/L 时，使用 200 g/L 的葡萄糖浓缩液补充葡萄糖浓度至 6 g/L。培养至细胞密度在 1~2 \times 10⁷ 细胞/mL 左右，细胞存活率 80%左右时收获上清。

2.3.2.7 目的蛋白纯化

(1) 过滤：将收获的细胞悬液按 1000 r/min 5min 离心两次，取上清，将上清使用 0.45 μ m 的滤膜进行过滤。

(2) 孵育：往滤液里加 500 mmol 咪唑，使滤液中所含咪唑的终浓度为 10mmol，向滤液中加入适量已去乙醇及平衡的树脂，在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中使用转子进行混合孵育 3h。

(3) 纯化：孵育完成后，800 r/min 离心 5min，取树脂填入亲和层析柱中，再使用不同浓度的咪唑(3-10%)进行杂蛋白洗杂和目的蛋白洗脱(30~50%)。可根据培

养体积及蛋白表达量适当增加洗杂蛋白及洗脱目的蛋白的体积。

(4) 检测：随后取样跑 SDS-PAGE 凝胶确定洗脱蛋白的纯度，收集较纯的蛋白进行后续的透析或脱盐去咪唑。

2.3.2.8 纯化蛋白鉴定

制备 SDS-PAGE 凝胶，制胶槽中灌入 2/3 的相应浓度的分离胶，随后立即加入 ddH₂O 封胶。静置半小时，待分离胶凝固后将 ddH₂O 倒出，吸干 ddH₂O，然后灌入 5% 的浓缩胶，立即插入梳子，静置 20 min，待浓缩胶凝固后，拔出梳子。然后上样电泳，取 10 μL 样品，直接上样到 SDS-PAGE 凝胶加样孔内。浓缩胶采用 80 V 恒压电泳 30 min，分离胶采用 120 V 恒压电泳 1h，电泳至溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后，考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2 h，脱色液脱色 2 h，ddH₂O 脱色 1 h 后分析结果。

Western Blot 电转步骤：电转 Buffer 提前预冷，SDS-PAGE 凝胶切去浓缩胶，电转夹板先铺一层海绵，加两层滤纸（均用预冷电转 Buffer 浸泡）放上凝胶，轻轻铺上硝酸纤维素(NC)膜，再依次叠放上两层滤纸和海绵（全程保证无气泡）。100V 恒压电泳 1h（全程冰浴进行）。

加入脱脂乳封闭液摇床封闭 1h，1×TBST 洗 3 遍，一抗 1h，1×TBST 洗 3 遍；二抗 45min，1×TBST 洗 5 遍；显色。

2.4 实验结果分析

2.4.1 重组质粒的构建及鉴定

2.4.1.1 PDCoV-N 融合蛋白表达质粒相关片段的扩增与融合

为了获得 PDCoV N 蛋白目的片段，构建真核表达质粒。使用表 2-2 中的 PDCoV-N-F/R 引物扩增 N 蛋白目的片段。结果如图 2-2 所示：扩增与预期大小相符的目的条带约为 1026bp。

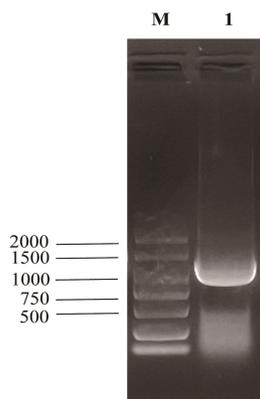


图 2-2 PDCoV-N 目的片段扩增

Fig. 2-2 Amplification of PDCoV-N target fragments

M: DL2000 DNA marker 1: PDCoV-N 目的片段

为了获得 CHO 真核质粒 PXC17.4 表达载体，本实验使用表 2-2 中的引物 PXC17.4-ZT-F/R 进行载体片段扩增。结果如图 2-2 所示：扩增与预期大小相符的目的条带约为 7040 bp。

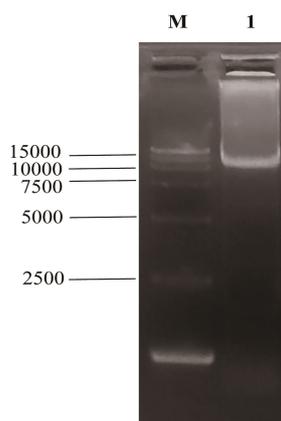


图 2-3 PXC17.4 真核载体 PCR 扩增

Fig. 2-3 PCR Amplification of the PXC17.4 Eukaryotic Vector

M: DL15000 DNA marker 1: PXC17.4 质粒载体

为了将 N 蛋白目的片段与真核表达载体进行串联，将扩增正确的 PDCoV-N 将目的基因片段和载体片段回收后进行融合并转化入 DH5 α 感受态菌株，于 37°C 的温箱培养至长出单菌落后。采用表 2-2 中 PXC17.4-JD-F/R 鉴定引物，进行 PCR 挑菌鉴定。鉴定结果如图 2-4 所示。扩增出约 1690bp 的条带，与预期大小符合。选取与预测大小一致菌液送至北京擎科生物科技有限公司测序，测序结果表明重组表达质粒构建成功。

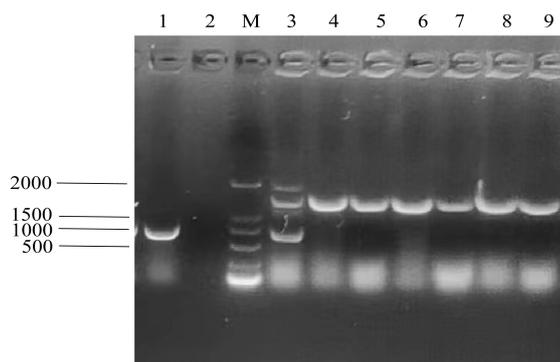


图 2-4 PDCoV-N 重组菌 PCR 鉴定结果

Fig.2-4 PCR Identification Results of PDCoV-N Recombinant Bacteria

1: 阳性对照 2: ddH₂O M: DL2000 DNA marker 3~9: 待鉴定的重组菌

2.4.2 PDCoV-N 蛋白 CHO 稳转细胞系筛选

为了构建 PDCoV N 蛋白 CHO 稳转细胞系，用电转化的方式将 N 蛋白外源基因整合至 CHO 细胞中。用 MSX 抑制剂加压筛选并同时进行克隆化。随后用斑点杂交进行表达量检测。将检测结果中表达较强的克隆株再次进行电转外源质粒并提高 MSX 药物筛选浓度来筛选稳转细胞系。本实验一共进行三轮电转和 MSX 筛选。筛选结果见图 2-5。最终选择 MSX 抑制剂浓度在 70 μ mol 条件下的 1 号高表达克隆株进行后续 N 蛋白高密度表达。

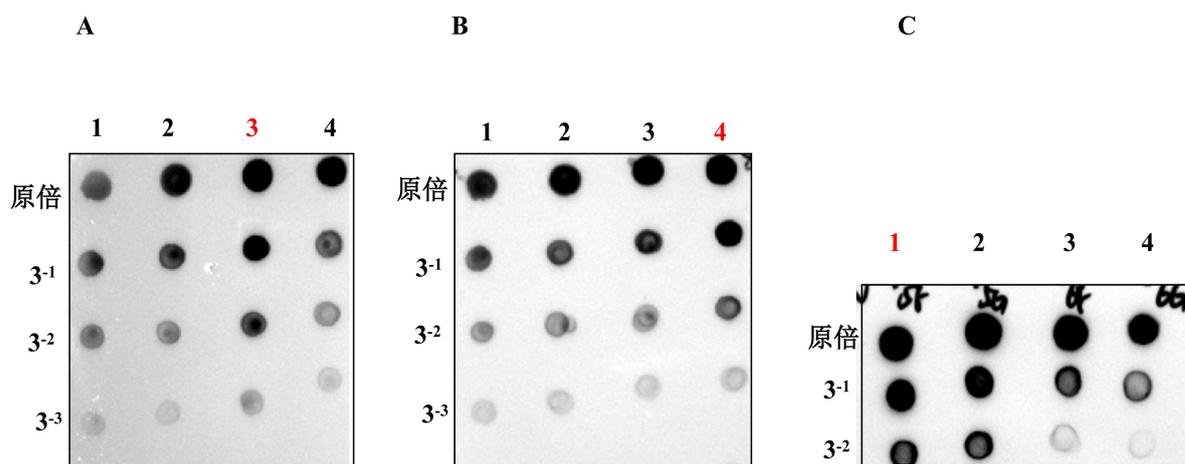


图 2-5 斑点杂交检测 N 蛋白表达

Fig. 2-5 The expression of the N protein was detected by dot blot hybridization

A: 一轮电转后 15 μ mol MSX 抑制剂筛选

B: 二轮电转后 50 μ mol MSX 抑制剂筛选

C: 三轮电转后 70 μ mol MSX 抑制剂筛选

2.4.3 重组蛋白表达

2.4.3.1 PDCoV-N 融合蛋白的纯化

为了检测 PDCoV-N 高密度表达蛋白的镍柱纯化效果，采用 SDS-PAGE 进行验证。将高密度表达的上清制成原液样品，连同与镍柱孵育 3h 后的样品制成流出液样品，最后将不同浓度咪唑杂蛋白洗杂、目的蛋白洗脱样品分别制成样做好标记，以 10 μ L 每孔上样。PDCoV-N 融合蛋白镍柱纯化 SDS-PAGE 效果分析见图 2-6，目的条带大小为 40KD 左右，与预测大小相符。

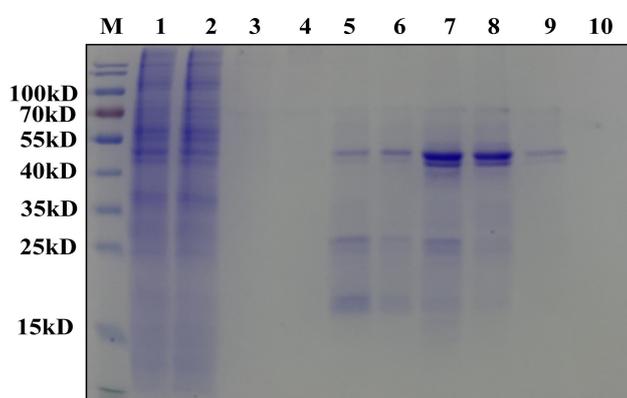


图 2-6 SDS-PAGE 检测 CHO 细胞表达 PDCoV-N 蛋白纯化

Fig. 2-6 SDS-PAGE detection CHO cells express PDCoV-N protein purification

M: Marker 1: 培养上清 2: 流出液 3-4: 洗杂液 5-10: 不同浓度咪唑洗脱液

2.4.3.2 PDCoV-N 融合蛋白的活性鉴定

为了验证 CHO 表达的 N 蛋白活性，采用 Western Blot 的方式进行检测。A 图为 PDCoV 临床阳性血清，B 图为 PDCoV 临床阴性血清（血清均按 1:40 稀释）。由 Western Blot 分析图可知：CHO 表达的 PDCoV-N 蛋白能够与 PDCoV 感染的临床血清发生特异性反应，具有良好的生物学活性。

将 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测中条带清晰且杂带较少的对应咪唑洗脱液进行透析去除咪唑。得到的 N 蛋白浓度可达 2mg/mL 以上，每毫升培养上清可纯化到 40 μ g 的 N 蛋白。

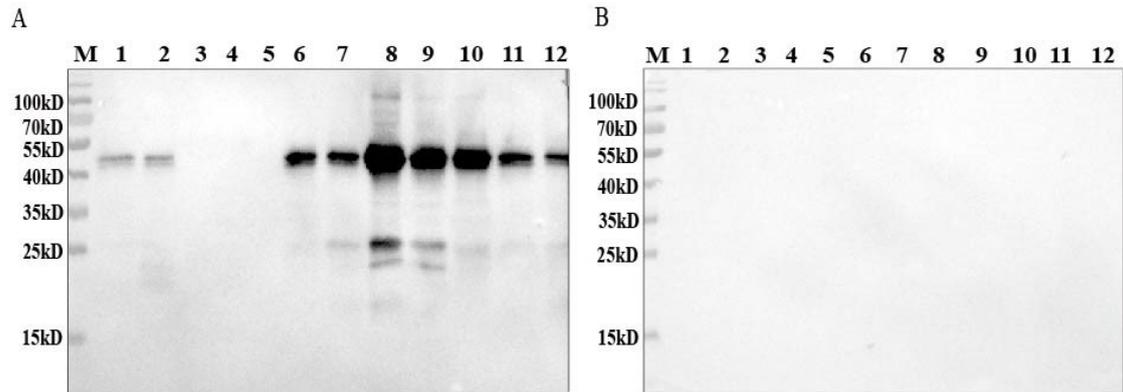


图 2-7 Western Blot 检测 CHO 细胞表达 PDCoV-N 蛋白活性

Fig. 2-7 Western Blot was used to detect the activity of PDCoV-N protein expressed in CHO cells

抗体: A: PDCoV 临床猪阳性血清 B: PDCoV 临床猪阴性血清

M: Marker 1: 培养上清 2: 流出液 3-4: 洗杂液 5-12: 不同浓度咪唑洗脱液

2.5 讨论

PDCoV 是近些年新发的能引起仔猪腹泻的肠道冠状病毒，目前无可用的预防 PDCoV 感染的商品化疫苗（张蕙畅等 2023）。在这种情形下，及时检测 PDCoV 感染，迅速的采取有效的治疗手段和生物防控策略，是最大程度的降低损失的关键。

因常见的以浓缩病毒作为免疫原免疫小鼠的方式存在以下不足：1、存在散毒的风险；2、需要对病毒进行浓缩、纯化等众多繁琐程序；3、对于血清型、基因型众多的病毒而言，采用单一毒株进行免疫，制备的单抗建立的检测方法可能会出现只能识别单一毒株感染广谱性较差的问题。所以本研究选择采用表达重组蛋白作为免疫原进行单抗制备的方案。在 PDCoV 众多结构蛋白中，N 蛋白是 PDCoV 病毒粒子中含量最多的结构蛋白，并且 N 蛋白十分保守在不同毒株间同源性可达 98% 以上。同时可在病毒感染早期检测到高水平的 N 蛋白抗体。综合上述优势，本实验选定 N 蛋白为靶标抗原。经调研发现：采用原核表达系统进行外源蛋白表达时，经常出现因表达条件不适，从而使得外源目的蛋白无法在菌体内正确折叠形成包涵体(李航等 2021)。Okda 等利用 pET-28a(+)载体进行 PDCoV N 蛋白表达，结果 N 蛋白以包涵体的形式出现(Okda et al 2016)。苏红等通过对 PDCoV N 蛋白原核表达不同条件的摸索，最终表达的 N 蛋白也还是以包涵体的形式出现在菌体裂解后的沉淀中(苏红等 2020)。包涵体的纯化比较麻烦，即使复性成功的包涵体蛋白也不

再具有生物活性。

针对上述可能出现的问题本研究做了如下改进：1、选择 CHO 真核表达系统来进行 PDCoV-N 蛋白的表达，以克服外源蛋白易形成包涵体，复性后无生物活性等缺陷。2、选择 CMV 强启动子和鼠 IgK 信号肽进行 PDCoV-N 蛋白 CHO 真核表达质粒的构建，并筛选可稳定表达的 CHO 细胞系使 N 蛋白能够稳定表达。

2.6 结论

- (1) 构建了能稳定高表达 PDCoV N 蛋白 CHO 稳转细胞系；
- (2) N 蛋白经纯化浓缩后浓度可达 2mg/mL 以上，每毫升培养上清可纯化到 40 μ g 的 N 蛋白。

第三章 PDCoV-N 单克隆抗体的制备

3.1 引言

1973 年 Milstein 在 Nature 上发表了一篇讲述能够永久产生针对特定免疫原的特异性抗体的细胞系的文章(Köhler and Milstein 1973), 标志着杂交瘤细胞技术的问世, 该项技术开创了抗体生产和使用的新纪元。随着半个世纪的发展(Leavy 2016), 单克隆抗体已经广泛应用于酶联免疫吸附试验(Caixia et al 2022)、免疫组化(Kim et al 1999)、放射免疫分析(Stuart et al 1982)和流式细胞仪(Dato et al 1990)等常见实验技术中。此外, 又因其具有超强的特异性、超高的抗体浓度、稳定的均一性等诸多优势应用于食品安全检测(Jiang et al 2018)、医药治疗(王丽等 2016)、疾病诊断(李嘉琛 2018)等日常生活的方方面面。

因此本实验通过表达 PDCoV-N 蛋白纯化后作为免疫原免疫小鼠并制备单克隆抗体, 为建立 PDCoV 双抗体夹心胶体金检测方法提供材料基础。

3.2 实验材料

3.2.1 实验动物、毒种及细胞

实验动物: 本试验中使用的小鼠均为 SPF 级 4~6 周龄 BALB/c 雌鼠, 购自华中农业大学实验动物中心。

实验细胞: Vero、PK-15、Ma104 细胞均由本实验室保存。SP2/0 骨髓瘤细胞(中国典型培养物保藏中心提供, 本实验室保存)。

毒种: 猪德尔塔冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒均由本实验室保存。

3.2.2 主要试剂及培养基配制

腹水制备佐剂购于北京博奥龙免疫技术有限公司, RPMI-1640 基础培养基、双抗(青-链霉素)均购于美国 Thermo 公司。免疫佐剂(弗氏完全/不完全佐剂)、

HAT 添加剂、HT 添加剂、50%PEG 均购于美国 Sigma 公司。胎牛血清购于 Gbico 公司。

RPMI-1640 完全培养基：RPMI-1640 基础培养基 79 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL。

HAT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HAT(50×)2 mL。

HT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HT(50×)2 mL。

50%PEG: 用灭菌的 EP 管分装成 1 mL 每支，4℃保存，融合当天取一支于恒温水浴锅中温于至 37℃备用。

胎牛血清：-80℃保存的血清放在 4℃溶解后，56℃水浴灭活半小时后，上下颠倒混匀，4℃保存。

3.3 实验方法

3.3.1 动物免疫

将纯化的 PDCoV-N 蛋白与弗氏佐剂佐剂等体积混合。按 100 μL/只的抗原量按照表 3-1 中免疫方式免疫 5 周龄的 BALB/c 雌鼠 3 只，共进行四轮免疫和 3 次加强免疫。测定免疫鼠血清效价，当血清效价达 1:5000~1:10000 时进行细胞融合，具体免疫程序如下：

表 3-1 小鼠免疫程序

Table 3-1 Immunization Schedule for Mice

免疫	佐剂	剂量	免疫途径
首免	弗氏完全佐剂	100μg/只	皮下
二免（14d）	弗氏不完全佐剂	100μg/只	腹腔+皮下
三免（21d）	弗氏不完全佐剂	100μg/只	腹腔+皮下
四免（30d）	弗氏不完全佐剂	100μg/只	腹腔+皮下
加强免疫	无	50-100μg/只	腹腔
加强免疫	无	50-100μg/只	腹腔
加强免疫	无	50-100μg/只	腹腔

3.3.2 SP2/0 骨髓瘤细胞的制备

(1) 将实验室冻存的 SP2/0 骨髓瘤细胞从液氮罐中取出，复苏于 T25 细胞瓶中，置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养。待细胞长满单层后弃掉培养基，用 RPMI-1640 基础培养基将细胞轻轻吹下，2000 r/min 离心 5 min，弃上清，RPMI-1640 基础培养基重复洗一遍，最后用 1.5 mL RPMI-1640 基础培养基重悬细胞，分三点注射 BALB/c 小鼠背部皮下每点 500 μL，约 10~14 d 可见小鼠背部形成明显肿瘤；

(2) 小鼠摘眼球放血后用颈椎脱臼法处死，75%酒精浸泡 5 min，消毒皮毛。小鼠固定于解剖盘中，无菌状态下将肿瘤块剪下置于匀浆器中，用 3mL 1640 基本培养基充分研磨，再补加 RPMI-1640 基本培养基至 10 mL，静置 2 min，吸取上层的细胞悬液于 15 mL 离心管备用；该步骤重复两次；

(3) 将细胞悬液以 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 12~18 mL 1640 基础培养基重悬细胞。在 2~3 个 15 mL 离心管中先加入 6 mL 小鼠淋巴细胞分离液，将等量 SP2/0 骨髓瘤细胞悬液轻轻地加在分离液之上，500 g/min 离心 20 min，吸取位于分界面致密的白色细胞层，取得的细胞用 1640 基本培养基洗 2 遍，将所得细胞用 RPMI-1640 完全培养基重悬，于细胞瓶中培养扩大直至细胞数量达到 1×10^8 。

3.3.3 免疫脾细胞的制备

(1) 将进行了 4 次冲击免疫的小鼠摘眼球放血后用颈椎脱臼法处死（收集血清为阳性血清），75%酒精浸泡 5 min，消毒皮毛；

(2) 无菌状态下将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剪破脾脏外膜；

(3) 将脾脏置于匀浆管中，加 3~5mL RPMI-1640 基本培养基，用匀浆器轻轻匀出脾脏细胞，之后用适量 1640 基本培养基将脾细胞重悬，再将脾细胞悬液通过 200 目的细胞筛，除掉脂肪或组织块。将收集的细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，该步骤重复 2 次，RPMI-1640 基础培养基重悬细胞，计数后放 37°C、5%CO₂ 培养箱备用。

3.3.4 饲养细胞的制备

(1) 取一只未免疫的 BALB/c 鼠，摘眼球放血后颈椎脱臼法处死，收集血清为阴性血清，于-20℃保存备用；

(2) 75%酒精中浸泡 5 min，皮毛消毒。无菌状态下将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剥离脾脏，置于匀浆器中。加入 3 mL RPMI-1640 基本培养基充分研磨，再补加 RPMI-1640 基本培养基至 10 mL，静置 2min，吸取上层的细胞悬液于 15 mL 离心管备用；该步骤重复两次；

(3) 1000 r/min 离心 10 min 后弃上清，RPMI-1640 基本培养基清洗两遍，之后用 RPMI-1640 完全培养基重悬，以 40%左右的密度铺 5 块 96 孔细胞培养板，100 μ L/孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中待用。

3.3.5 细胞融合

(1) 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞以 1:5 的比例在 50 mL 离心管中混匀，1000 r/min 离心 10min，弃去上清，用灭菌滤纸吸干离心管侧壁液体，轻轻弹击离心管管底，使细胞沉淀略加松动，以细胞将要顺管壁下流为准；

(2) 将该离心管正置于 38℃恒温水浴锅中，保证管底完全浸入水中，在 1min 内缓慢滴入 1 mL 预温至 38℃的 50% PEG，边加边轻轻用吸管搅拌。加完后继续搅拌 1 min，然后静置 45 s；

(3) 缓慢加入 38℃预热的 RPMI-1640 基本培养基 40 mL。具体方案为：第 1 min 缓慢加入 1 mL，第 2 min 缓慢加入 1 mL，第 3~5 min 缓慢加入 3 mL，最后缓慢加入 35 mL 培养基，整个过程 20 min 左右。加培养基时需缓慢加入，并不断轻轻地搅拌；将融合后的细胞悬液正置于 37℃、5%CO₂ 培养箱放置 10 min，室温 1000 r/min 离心 10 min 后弃掉上清，用 HAT 培养基重悬融合细胞，用 1 mL 枪头均匀滴加入 5 块已经铺过饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，约 100 μ L/孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养；

(4) 次日观察细胞有无污染, 8~10 d 时将 HAT 培养基更换为 HT 培养基。待融合细胞集落长至培养孔 1/3 时, 即可通过间接 ELISA 对细胞上清进行抗体检测。

3.3.6 间接 ELISA 筛选方法的建立

3.3.6.1 PDCoV-N 蛋白筛选条件摸索

将纯化的 N 蛋白以及 CHO 杂蛋白流出液分别用碳酸盐包被缓冲液稀释成不同浓度, 进行抗原包被浓度的摸索, 具体步骤如下:

(1) 设置不同梯度的抗原包被量, N 蛋白以 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 梯度稀释进行包被; 流出液以 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 进行梯度稀释, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜;

(2) 弃去 (1) 中板子内的包被液, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μ L/孔, 吸水纸拍干, 以 5% 脱脂乳和 2% BSA 进行封闭, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;

(3) 弃去 (2) 中的封闭液, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μ L/孔, 吸水纸拍干, -20 $^{\circ}$ C 保存备用或即用;

(4) 将采集的小鼠阳性血清和 SPF 小鼠血清用 2% BSA 以 1:100 稀释作为一抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;

(5) 将 (4) 中的一抗弃去, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μ L/孔, 吸水纸拍干, 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的 IgG 酶标羊抗鼠二抗, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 45 min;

(6) 弃去 (5) 中的二抗, PBST 清洗板子 3 次, 吸水纸拍干, 加入配制好的 TMB 显色液, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 显色孵育 15 min;

(7) 显色结束后以 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 每孔 50 μ L/孔, 测定 OD_{450nm} 值, 进行数据分析确定抗原最佳工作浓度;

(8) 以 (7) 中摸索好的抗原包被浓度, 包被 15 块 96 孔酶标板, 按照 ELISA 常规操作步骤进行杂交瘤细胞筛选, 挑取 P 值高、且 P/N 值高的细胞孔, 扩大并进行亚克隆。

3.3.6.2 PDCoV 病毒筛选条件摸索

将 PDCoV 以及 PK-15 细胞裂解液分别在碳酸盐包被缓冲液中稀释成不同浓度，进行抗原包被浓度的摸索，具体步骤如下：

（1）设置不同梯度的抗原包被量，PDCoV 原毒和 PK-15 细胞裂解液以 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 进行包被；100 μL /孔，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜；

其余步骤参照 3.3.6.1 中（2）~（8）。

3.3.7 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

采用有限稀释法对间接 ELISA 筛选 N 蛋白和 PDCoV 均是阳性的杂交瘤细胞进行亚克隆，具体操作流程如下：

（1）将初筛阳性的细胞孔内的培养基小心弃去，向孔中加入 200 μL 的 RPMI-1640 完全培养基，用移液器将孔内的细胞轻轻吹散，按照一定比例进行稀释，吸取 10 μL 于细胞计数板上，在显微镜下对细胞进行观察计数，计算出细胞的密度。

（2）采用有限稀释法对杂交瘤细胞悬液进行逐步稀释，使最终细胞密度为 1000 个/mL，吸取 100 μL 稀释好的细胞悬液加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基中，充分混匀后，均匀滴加到 96 孔细胞培养板中，使每孔的细胞密度控制在 1 个/孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中进行培养。

（3）3d~5d 后在显微镜下观察亚克隆的杂交瘤细胞的生长状况，将只含有单克隆的细胞孔做好标记。

（4）待细胞板中细胞密度铺满 20~30% 时，再用间接 ELISA 筛选方法对单克隆细胞孔筛选。

（5）将第一次亚克隆阳性的细胞进行第二次亚克隆，直至亚克隆的细胞阳性率达到 100%，即可筛选出稳定分泌抗体的单克隆细胞。

（6）在每次亚克隆的同时将每次筛选为阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存，以防止亚克隆过程中细胞的丢失及其他意外情况的出现。

3.3.8 杂交瘤细胞的冻存与复苏

细胞冻存：将经过多次亚克隆已经建立好细胞系的杂交瘤细胞进行扩大培养，将生长状态良好且处于对数生长期的细胞进行冻存。具体步骤如下：

(1) 用 RPMI-1640 培养基将细胞板中的杂交瘤细胞轻轻吹下，1000 r/min 离心 5 min，弃去培养基。

(2) 提前配置的含 10% DMSO 的细胞冻存液，将细胞沉淀进行重悬，分装于冻存管，置于冻存盒，-80℃保存过夜。≥24h 即可将细胞转移至液氮罐中进行保存。

细胞复苏：取出液氮中冻存的杂交瘤细胞，在 37℃水浴锅中快速晃动直至冻存液完全融化，1000 r/min 离心 5 min，弃去冻存液，用 RPMI-1640 完全培养基将细胞沉淀完全重悬，转移至细胞板中置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。24 h 后细胞大部分贴壁后进行换液，并每日观察复苏后的细胞生长状态。

3.3.9 杂交瘤细胞株染色体计数

(1) 秋水仙素处理：取目的代次的、处于对数生长期的细胞，加入使秋水仙素使其终浓度为 0.1μg/mL，继续培养 4~5h。

(2) 获取细胞：重悬细胞，150 g 离心 5 min，去除秋水仙素。将细胞重悬于 5~7 mL 低渗 0.075% KCl 溶液中，37℃孵育 15 分钟。

(3) 预固定：加入 1~2 mL 新鲜配制的固定液到低渗后的溶液中，轻轻混匀，150g 离心 5 分钟，去上清。

(4) 一次固定：加入 5~7 mL 的新鲜固定液混匀室温下固定 15 min。150 g 离心 5min，去除上清。

(5) 二次固定：加入 5~7 mL 的固定液，混匀室温下固定 15 min，150 g 离心 5min，去除上清。

(6) 滴片：加入一定量的固定液（固定液的量视最后离心所得细胞的量而定），轻轻混匀，制成悬液取出悬液从一米高处滴两滴于载玻片上，然后立即置于预热好的 72℃烤箱中烤干。

(7) 染色：用吉姆萨染液染 10~15 min，流水冲洗，风干后镜检。

(9) 观察：显微镜下确定 5 个处于有丝分裂中期的细胞进行检查，观察并比较各代细胞的染色体标志，计算各代细胞的染色体模式数的差异，观察染色体特征是否一致，是否符合文献中该细胞的染色体特征。

3.3.10 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定

取杂交瘤细胞上清，使用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒进行亚类鉴定试验。具体操作如下：

(1) 将 3.3.6.1 中包被好的抗原板从-20℃取出解冻，将 100 μ L 杂交瘤上清添加到每个孔中，并置于 37℃作用 1 h；

(2) 弃上清，用 PBST 清洗 3 次，吸水纸拍干，加入 1:500 稀释的 HRP 标记的检测抗体，包括 Ig screening antibody、IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、kappa、Lambda，每孔 100 μ L/孔，37℃孵育 45 min；

(3) 弃去检测抗体，用 PBST 清洗板子 5 次，吸水纸拍干，加入配置好的 TMB 显色液，100 μ L/孔，37℃显色孵育 15 min；

(4) 显色结束后，以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应，测定 OD_{450nm} 值。

3.3.11 杂交瘤细胞株分泌抗体的反应性分析

用间接免疫荧光试验对杂交瘤细胞培养上清进行反应性分析，具体步骤如下：

(1) 将 PK-15 细胞提前铺于 24 孔细胞板，待细胞长至单层，接种 PDCoV 病毒液；

(2) 待病毒入侵细胞后，弃去孔里培养基，PBS 清洗 3 次，加入 4%的多聚甲醛，200 μ L/孔，室温固定 25 min；

(3) 弃去中的固定液，PBS 清洗 3 遍，加入 0.2%TritonX -100，200 μ L/孔，室温透化 20 min；

(4) 弃透化液，PBS 清洗 3 遍，加入 10%的山羊血清进行封闭，200 μ L/孔，37℃封闭 1h；

(5) 弃去封闭液，PBS 清洗 3 遍，分别加入杂交瘤细胞上清、免疫鼠血清、空白鼠血清、SP2/0 细胞上清以及 PBS，200 μ L/孔，4℃过夜；

(6) 弃去一抗, PBS 清洗 3 遍, 避光加入 1: 250 稀释的 FITC 488 羊抗鼠二抗, 200 μ L/孔, 37°C 作用 1h;

(7) 弃去二抗, PBS 清洗 5 遍, 避光加入 1: 3000 稀释的 DAPI, 200 μ L/孔, 4°C 染色 10 min;

(8) 弃去 DAPI, 向细胞孔加入 PBS, 200 μ L/孔, 荧光显微镜下观察结果。

3.3.12 杂交瘤细胞株分泌抗体特异性分析

3.3.12.1 PDCOV-N 单克隆抗体抗特异性分析——间接 ELISA

将本实验室保存的 PEDV、TGEV、PoRV 分别按 1:10 包被, 此外将扩毒对应的空白对照细胞 Vero、PK-15、Ma104 分别收取, 反复冻融 2 次后按 1:10 包被。包被流程同 3.3.6。

3.3.12.2 PDCOV-N 单克隆抗体抗特异性分析——Western Blot

(1) 铺板: 将 Vero、PK-15、Ma104 等细胞分别铺进 6 孔板中, 当细胞密度达 70~80% 时, 用 DMEM 洗 3 遍。

(2) 接毒 (按实验室摸索过的接毒比例): PDCoV、TGEV 按 1:100 接入 PK-15 细胞中, PEDV 按 1:50 接入 Vero 中、PoRV 按 1:100 接入 Ma104 细胞中。分别接 4 个孔, 另留两个孔作为接毒细胞对照。

(3) 收样: 当接毒细胞刚开始出现病变且大部分细胞正常时即可收样。收样方式为: 弃去上清, 加入强细胞裂解液 (含 PMSF), 冰上裂解 10~15min。

(4) 加入 5 \times loading, 水浴锅煮样 10min, 加入 10%DDT。

(5) 离心上样。

(6) SDS-PAGE 和 Western Blot 操作步骤见第二章 2.3.2.8。

3.3.13 杂交瘤细胞株表位相关性分析

相加 ELISA 步骤参照文献中原理稍作调整(Woo et al 2012):

(1) 固定适当浓度的抗原 (使得在此固定抗原浓度下, 抗体过饱和的条件下 OD450nm 读值在 1~1.5 之间)。

(2) 将一株单抗上清标记为 A，另一株记为 B，分别将 A 和 B 加入不同的孔中，同时做等体积的 A+B 为一抗，（同时做 2A 和 2B 以便确定加入的单抗上清是否过量）。孵育 1h，PBST 洗 3 遍。

(3) 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗，孵育 45min，PBST 洗 5 遍。

(4) 加入 TMB 显色，读 OD450nm。

(5) 判定标准：当 $A+B > A$ 或 B 单独的 OD450nm 读值时，则表明 A 和 B 两株单克隆抗体识别的表位有区别；当 $A+B < A$ 或 B 单独的 OD450nm 读值时，则表明 A 和 B 两株单克隆抗体识别的表位相同或相近。

(6) 算出两株单抗的 $AI\% = [2(A+B)/A+B-1] \times 100\%$ （徐正中等 2015）

3.3.14 腹水的制备

选取健康状况良好的 15 周龄以上 BALB/c 雌鼠，每株单克隆抗体分别注射 3 只小鼠，将腹水制备佐剂以 0.5 mL/只进行腹腔注射。10 d 后，将计数好的杂交瘤细胞注射入小鼠腹腔（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/只）。注意小鼠腹部变化，待小鼠腹部膨大（大约 10 d）后，采集腹水。收集的腹水进行处理具体步骤如下：

(1) 4°C 1000 r/min 离心 5min（离心红细胞及其他杂质）。

(2) 吸取离心后上清 4°C 12000 r/min 离心 5 min，吸取上清。

(3) 加入石英砂后在旋转混合仪上过夜孵育去除脂肪，4°C 12000 r/min 离心 5 min，吸取上清，-80°C 保存备用。

3.3.15 腹水效价的测定

用间接 ELISA 方法检测小鼠腹水抗体效价，操作程序为：以 PDCoV-N 蛋白作为包被抗原，将小鼠腹水作为一抗，从 1:100 开始依次 10 倍比稀释至 1:10⁸，以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞上清液作为阴性对照，检测腹水的最大效价，效价达 1:10⁵ 以上进行纯化。

3.3.16 腹水的纯化

3.3.16.1 辛酸-硫酸铵法初步纯化

辛酸-硫酸铵法提纯 IgG 的原理是：在酸性条件下（ $\text{pH}=4.5$ ）非 IgG 的蛋白成份能被辛酸等短链脂肪酸沉淀，上清中剩余的蛋白主要为 IgG，再用硫酸铵沉淀上清，即可获得纯度较高的 IgG(张凡 等 2023)。但需要注意的是，辛酸沉淀与一些抗体的亲和性下降有关，并且不适用于纯化小鼠的 IgA 和 IgG3(Woo et al 2012)。

具体操作步骤如下：

- (1) 采集的腹水加入 4 倍体积的乙酸钠缓冲溶液（ $\text{pH}=4.8$ ）；
- (2) 室温条件下，逐滴加入辛酸并搅拌（每毫升腹水加入 $33\ \mu\text{L}$ 辛酸），加入时注意，待前一滴完全溶解后再加入另一滴。加入辛酸后搅拌 30 min， 4°C 静置 2h 以上使其充分沉淀；
- (3) 在 4°C 条件下，12000 r/min 离心 30 min，吸取上清；
- (4) 上清液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤，加入 0.1 倍体积的 $1\times\text{PBS}$ (0.1mol/L $\text{pH}=7.4$)，用 2mmol NaOH 调 pH 值至 7.4。上述混合液中加入等体积的饱和硫酸铵溶液，在冰上操作，逐滴缓慢加入并搅拌 30min；
- (5) 静置 2h，在 4°C 条件，12000 r/min 离心 30 min，弃上清。用 $100\ \text{mmol Tris}$ 盐酸缓冲溶液重悬沉淀，用 50~100 倍体积的缓冲液透析， 4°C 透析过夜，每隔 12h 换液一次；
- (6) 4°C 条件下，12000 r/min 离心 30 min，吸取上清。

3.3.16.2 Protein G 柱再次纯化

- (1) 结合缓冲液流过柱子，在流液状态下装柱子；
- (2) 5 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子， $1\ \text{mL}/\text{min}$.；
- (3) 按照 $5\sim 10\ \text{mg}/\text{mL}$ 柱子的载量来准备样品，调节样品的流速至 $1\ \text{mL}/\text{min}$ ，样品自循环排气；
- (4) 打开上样阀，开始上样，循环上样 30~60 min。样品冰浴；
- (5) 用 5 倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子， $1\ \text{mL}/\text{min}$ 。收集峰值时流出的杂蛋白；

(6) 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱, 1 mL/min, 峰值时流出液用 60 μ L 中和缓冲液的 EP 管接收。每支 1mL 左右;

(7) 洗脱完毕, 立即用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子, 再用 20%的乙醇浸泡, 4~8 $^{\circ}$ C过夜保存。

3.3.17 纯化后腹水的检验

使用 BSA 蛋白含量测定试剂盒按照说明书测定纯化后单抗的蛋白含量。采用 SDS-PAGE 检验纯化后单抗的纯度: 每株单抗分别取 40 μ L 样品, 加入 10 μ L 5 \times SDS-PAGE Loading buffer, 混匀后煮沸 10 min, 冰浴 5min, 5000 r/min 离心 5 min。将处理后蛋白样品点样 10 μ L 于蛋白胶孔, 并点样 5 μ L 蛋白 Marker 于相邻孔道, 上层浓缩胶于 80V 电压下电泳 30 min, 而后调整电压到 120 V, 于分离胶电泳 60 min。待电泳结束, 小心剥离凝胶, 加入考马斯亮蓝 R-250 染色液(完全浸没凝胶), 置于摇床上染色 1 h。染色结束后, 将考马斯亮蓝 R-250 染色液回收, 将凝胶浸泡在考马斯亮蓝脱色液中, 置于摇床上, 每隔 30 min 换一次脱色液直至脱色完全。最后将凝胶放于凝胶成像系统观察并照相保存结果。将蛋白含量较高纯度较好的单抗混合后进行透析脱盐, 透析后单抗分装保存备用。

3.3.18 纯化后腹水的亲和力鉴定

单克隆抗体的亲和常数鉴定参考文献具体步骤如下(Beatty et al 1987 ,Loomans et al 1995):

(1) 确定 N 蛋白最佳包被浓度: 将 N 蛋白用包被液梯度稀释 20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL、0.32 μ g/mL、0.16 μ g/mL、0.08 μ g/mL。分别包板, 步骤见本章 2.2.6.1, 根据试验数据选择 OD450nm 值在 0.15~2.5 之间呈线性关系的抗原浓度。

(2) 腹水从 1:100 开始, 按 2 倍比稀释, 100 μ L/孔, 做 3 个重复, 孵育 1 h。

(3) PBST 洗 3 遍, 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 孵育 45 min。

(4) 加入 TMB 显色液, 10min 后读取 OD450mn。

(5) 以单克隆抗体的不同浓度为横坐标, 以其相应的 OD_{450nm} 值为纵坐标, 绘制测定曲线, 以各线上部趋于平坦的 OD_{450 nm} (平均值) 为 100%, 在曲线上找到 50% OD_{450nm} 值处相对应的抗体浓度 [Ab]_t(ng/ml) 单位 (mol/L)。

(6) 亲和常数 (K_{aff} , M^{-1})。在计算过程中, 单抗质量浓度 (ng/ml), 需按 IgG 的分子量 150000 (150kD), 即 $[Ab]_t / 150000$ 换算成克分子浓度 (mol/L)。

3.4 实验结果分析

3.4.1 确定间接 ELISA 筛选包被浓度

为了后续进行单抗筛选, 本实验通过间接 ELISA 的方式确定筛选所用的 N 蛋白和 PDCoV 最佳 ELISA 包被浓度。

N 蛋白及其对照杂蛋白包被条件摸索: 将浓度为 0.8mg/mL 的 CHO 表达的 PDCoV-N 蛋白从 1:400 开始, 以 2 倍比进行稀释, 杂蛋白对照 (CHO 表达的其他蛋白流出液) 按尽可能高的原则进行包被, 即从 1:10 开始以 2 倍比稀释进行包被条件摸索。结果如表 3-2、3-3 所示: N 蛋白最佳包被浓度为 1:1600 稀释即 0.5 μ g/mL 包被, CHO 流出液按 1:10 包被。

PDCoV 及其对照扩毒细胞裂解液包被条件摸索: 固定免疫鼠和 SPF 鼠血清稀释度为 1:100。因 PDCoV 毒价较低, 所以原毒和 PK-15 细胞裂解液均以 1:10 开始进行 2 倍比稀释摸索最佳包被浓度。结果如表 3-4 所示: 选择 PDCoV 及 PK-15 细胞裂解液均以 1:10 包被的条件为后续筛选间接 ELISA 最佳工作浓度。

表 3-2 N 蛋白间接 ELISA 最佳包被条件摸索

		抗原稀释度							
		400	800	1600	3200	6400	12800	26400	51200
免疫鼠血清	血清稀释度								
	1:100	N 蛋白	3.480	3.345	3.278	2.671	1.956	0.946	0.931
SPF 鼠血清	血清稀释度								
	1:100	N 蛋白	0.091	0.090	0.090	0.065	0.064	0.063	0.073

表 3-3 CHO 流出液间接 ELISA 最佳包被条件摸索

Table 3-3 Optimal enveloping conditions for CHO efflux indirect ELISA

		抗原稀释度								
		10	20	40	80	160	320	640	1280	
血清稀释度										
免疫鼠血清	CHO									
1:100	流出液	1.226	1.212	1.361	1.119	0.816	0.849	0.717	0.207	
SPF 鼠血清	CHO									
1:100	流出液	0.084	0.076	0.081	0.071	0.070	0.070	0.064	0.058	

表 3-4 PDCoV 间接 ELISA 最佳包被条件摸索

Table 3-4 Optimal enveloping conditions for PDCoV indirect ELISA were explored

		抗原稀释度								
		10	20	40	80	160	320	640	1280	
血清稀释度										
免疫鼠血清	PDCoV 原毒	2.101	1.414	1.353	0.665	0.204	0.141	0.116	0.096	
1:100	PK-15 裂解液	0.210	0.145	0.146	0.134	0.136	0.109	0.076	0.073	
SPF 鼠血清	PDCoV 原毒	0.069	0.064	0.078	0.059	0.050	0.057	0.056	0.050	
1:100	PK-15 裂解液	0.165	0.147	0.129	0.136	0.123	0.105	0.086	0.090	

注：上述表中数值均为对应的 OD450nm 读值

3.4.2 免疫鼠血清效价检测

为了确定免疫鼠的血清效价，在小鼠第四次免疫 7 d 后，剪尾采血分离血清进行效价检测。将血清从 1:1000 开始进行 2 倍比稀释，同时设置阴性对照。利用 3.4.1 中摸索的最佳蛋白包被条件进行间接 ELISA 确定血清效价。结果如图 3-1 所示：第四次免疫后小鼠免疫效价均大于 1:10000。选择免疫效价高且稳定的 2 号小鼠进行三次强化免疫每次间隔 1d，72~96 h 之间进行融合。

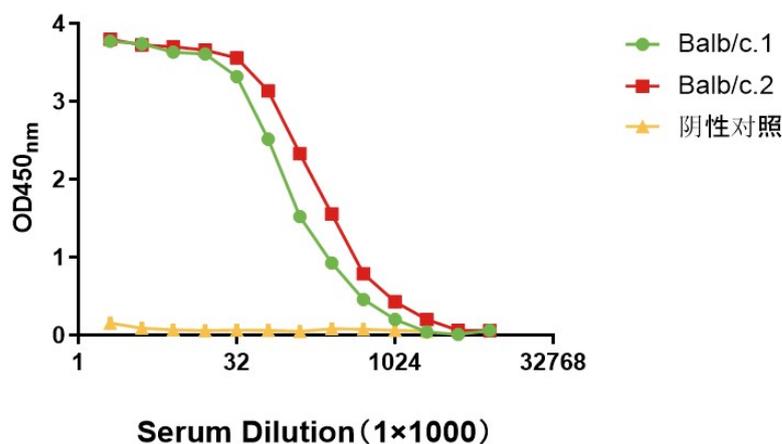


图 3-1 间接 ELISA 检测免疫血清效价

Fig. 3-1 The titer of immune serum was detected by indirect ELISA

3.4.3 杂交瘤细胞的筛选

为了确定细胞融合效率并准备后续阳性孔检测，在融合后 7~10 天统计有融合细胞出现的孔并计算融合率。当融合孔内细胞密度为 30%左右时进行取样检测。结果如表 3-5 所示：本次融合实验使用 5 块 96 孔板进行筛选，其中 362 孔在融合后有细胞生长，计算总融合率为 77%。对有细胞生长的孔用 3.4.1 中摸索的 N 蛋白和病毒浓度包被 ELISA 板进行同时筛选。最终与 N 蛋白特异性反应的有 77 孔，与病毒反应的 28 孔，蛋白病毒阳性率分别为：47%、8%。对筛选到的蛋白和病毒均为阳性的细胞孔扩大并进行三次亚克隆，成功筛选出 5 株与病毒反应的杂交瘤细胞。并将 3 株单抗命名为 1-5D、3-6F、4-5D、4-9A、5-6E。

表 3-5: 融合筛选结果

Table 3-5: Fusion screening results

细胞板号	融合孔数	蛋白阳性孔数	病毒阳性孔数	融合率 (%)	与蛋白反应阳性率 (%)	与病毒反应阳性率 (%)
1	81	38	4	84	34	4.9
2	71	34	4	74	47	5.6
3	75	28	5	78	37	6.6
4	68	24	6	70	35	8.8
5	67	46	9	69	66	13.4
合计	362	170	28	77	47	8

3.4.4 杂交瘤细胞株稳定性分析

为了对筛选到的5株杂交瘤细胞的遗传稳定性分析，本实验分别对原代杂交瘤细胞和传代（30代）杂交瘤细胞进行染色体计数。

原代杂交瘤细胞株计数结果见图3-2：杂交瘤细胞染色体数目分别为1-5D: 89条、3-6F: 102条、4-5D: 99条、4-9A: 100条、5-6E: 99条。一般杂交瘤细胞染色体条数在88~108条之间。证明本实验筛选的五株单克隆抗体为免疫脾细胞和骨髓瘤细胞融合所得。30代杂交瘤细胞染色体计数：结果见图3-3：杂交瘤细胞染色体数目分别为1-5D:102条、3-6F:92条、4-5D:94条、4-9A:92条、5-6E:94条。与原代细胞相比，经连续传代的杂交瘤细胞染色体数目正常，证明本实验筛选的5株单抗稳定性好。

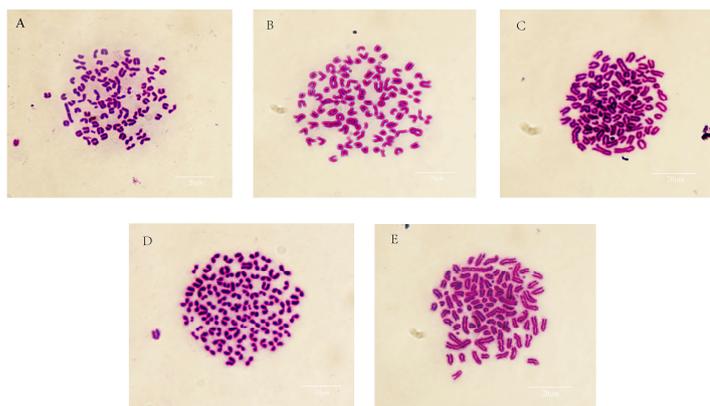


图 3-2：原代杂交瘤细胞染色体鉴定

Fig. 3-2: Chromosome identification of primary hybridoma cells

A: 1-5D B: 4-5D C: 3-6F D: 4-9A E: 5-6E

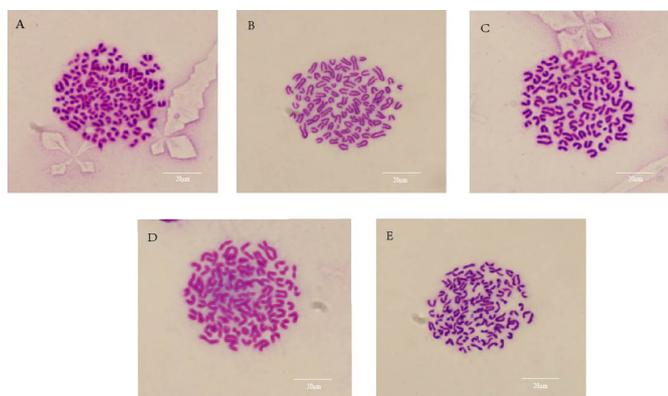


图 3-3：传代（30代）杂交瘤细胞染色体鉴定

Fig. 3-3: Chromosome identification of hybridoma cells in passage (30 passages)

A: 1-5D B: 4-5D C: 3-6F D: 4-9A E: 5-6E

3.4.5 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定

本研究使用SBA Clonotyping System-HRP试剂盒进行单抗的亚类鉴定。结果如表3-6所示：5株单抗轻链均为kappa链，其中1-5D、3-6F、4-9A、5-6E 4株分泌IgG1型抗体，4-5D分泌的抗体亚型为IgG2a。

表 3-6: 杂交瘤细胞分泌抗体亚型鉴定

Table 3-6: Identification of Antibody Subtypes Secreted by Hybridoma Cells

编号 [↵]	Ig [↵]	IgA [↵]	IgM [↵]	IgG1 [↵]	IgG2a [↵]	IgG2b [↵]	IgG3 [↵]	lambda [↵]	kappa [↵]
1-5D [↵]	3.55 [↵]	0.22 [↵]	0.31 [↵]	3.37 [↵]	0.24 [↵]	0.17 [↵]	0.16 [↵]	0.27 [↵]	1.02 [↵]
3-6F [↵]	3.71 [↵]	0.20 [↵]	0.32 [↵]	3.78 [↵]	0.29 [↵]	0.21 [↵]	0.22 [↵]	0.27 [↵]	1.62 [↵]
4-5D [↵]	3.71 [↵]	0.24 [↵]	0.42 [↵]	0.37 [↵]	3.80 [↵]	0.25 [↵]	0.21 [↵]	0.33 [↵]	1.26 [↵]
4-9A [↵]	3.72 [↵]	0.26 [↵]	0.31 [↵]	3.79 [↵]	0.36 [↵]	0.20 [↵]	0.18 [↵]	0.28 [↵]	1.34 [↵]
5-6E [↵]	3.63 [↵]	0.19 [↵]	0.39 [↵]	3.68 [↵]	0.36 [↵]	0.26 [↵]	0.17 [↵]	0.29 [↵]	1.24 [↵]

注：表中数值均为对应的 OD450nm 读值

3.4.6 杂交瘤细胞株分泌抗体病毒反应性鉴定

为了鉴定筛选到的 5 株单抗与病毒具有良好的反应性，本研究采用间接免疫荧光方法来进行验证。结果如图 3-4 所示：在阴、阳性对照成立的条件下，有 4 株单抗 (1-5D、3-6F、4-9A、5-6E)与病毒感染细胞间免呈现特异性反应，其中有 1 株单抗 4-5D 间免无特异性绿色荧光。综上所述：表明本研究制备的 4 株单抗与 PDCoV 感染的细胞间免的反应性良好。

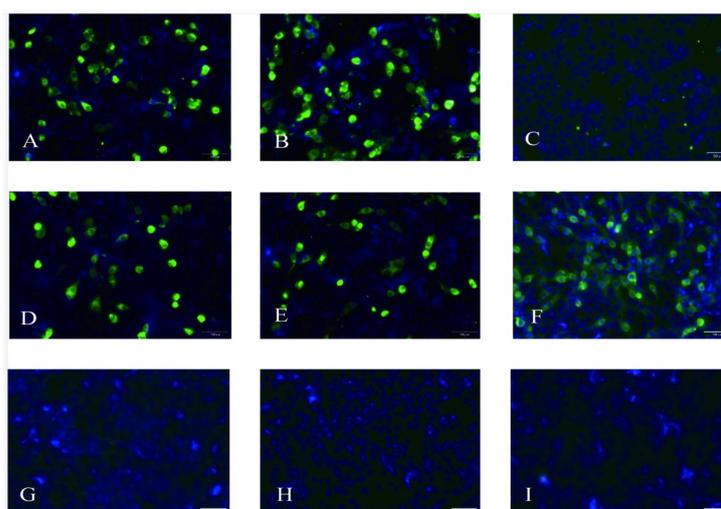


图 3-4: 杂交瘤细胞分泌抗体与病毒反应性鉴定

Fig. 3-4: Identification of Antibody Secretion and Virus Reactivity by Hybridoma Cells

A: 1-5D B: 3-6F C: 4-5D D: 4-9A E: 5-6E
F: 免疫鼠血清 G: SPF 鼠血清 H: PBS I: SP2/0 上清

3.4.7 杂交瘤细胞株分泌抗体特异性鉴定

为了确定筛选到的 5 株单抗具有良好的特异性，本实验采用间接 ELISA 和 Western Blot 两种实验方法来验证。

间接 ELISA 鉴定单抗特异性：用 PDCoV、PEDV、TGEV、PoRV 包被的 ELISA 板进单抗行特异性验证。间接 ELISA 结果如表 3-7 所示：本实验筛到的 5 株单抗均与 PDCoV 呈现特异性反应，不与猪腹泻类其它病原（PEDV、TGEV、PoRV）反应。Western Blot 鉴定单抗特异性：用本实验室保存的 PDCoV、PEDV、TGEV、PoRV 分别接毒。Western Blot 结果如图 3-5 所示：本实验筛选的 5 株单抗均与 PDCoV 感染的细胞呈现特异性反应反应，不与猪腹泻类其它病毒感染细胞发生反应。上述两种实验结果均表明：筛选到的单抗具有较好的特异性。

表 3-7 间接 ELISA 验证单克隆抗体特异性

Table 3-7 Indirect ELISA Verification of Monoclonal Antibody Specificity

	PDCoV	PEDV	TGEV	RV	PK-15	Vero	MA104
1-5D	0.60	0.09	0.09	0.09	0.11	0.10	0.10
3-6F	3.67	0.05	0.06	0.08	0.09	0.08	0.07
4-5D	1.86	0.05	0.06	0.06	0.10	0.09	0.07
4-9A	2.23	0.06	0.06	0.07	0.08	0.08	0.07
5-6E	2.49	0.07	0.06	0.08	0.09	0.07	0.08
免疫鼠血清	3.87	0.12	0.11	0.14	0.12	0.10	0.08
SPF 鼠血清	0.06	0.05	0.06	0.06	0.10	0.09	0.11
SP2/0 上清	0.12	0.10	0.10	0.11	0.12	0.12	0.12
PEDV 阳性血清	0.09	0.90	0.10	0.12	0.07	0.09	0.08
TGEV 阳性血清	0.07	0.13	0.90	0.13	0.10	0.09	0.08
PoRV 阳性血清	0.1	0.12	0.03	0.80	0.11	0.13	0.06

注：表中数值均为对应的 OD450nm 读值

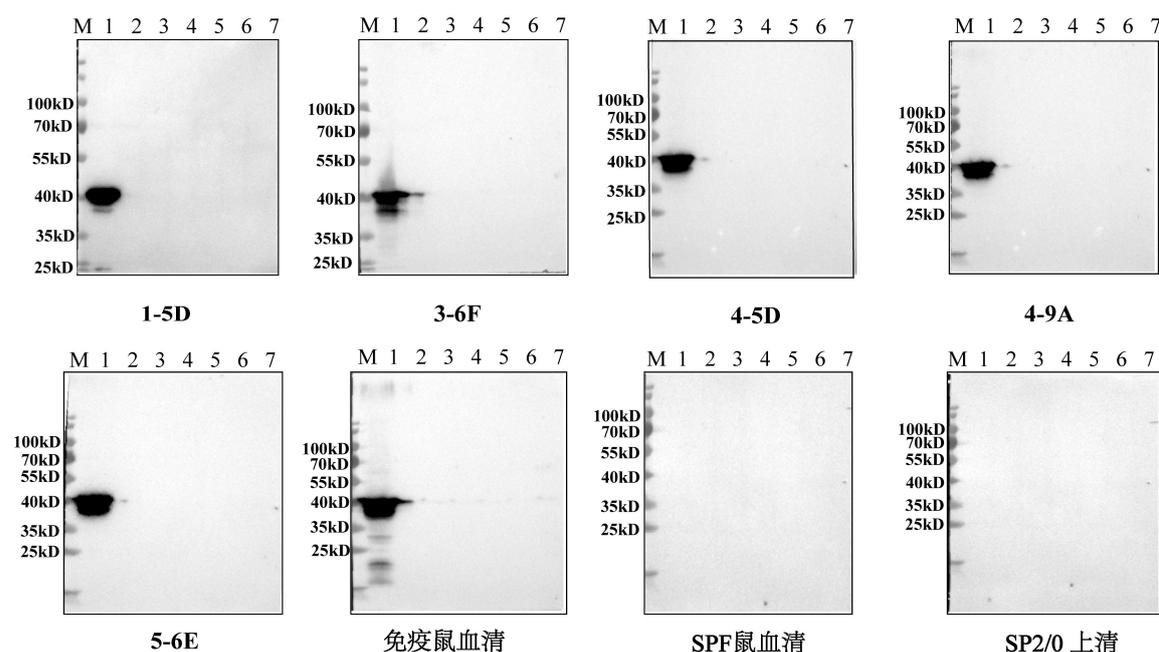


图 3-5: Western Blot 验证单克隆抗体特异性

Fig. 3-5: Western Blot Verification of Monoclonal Antibody Specificity

M: Marker 1: PDCoV 感染细胞 2: PEDV 感染细胞 3: PoRV 感染细胞 4: TGEV 感染细胞
5: PK-15 6: Vero 7: MA104

3.4.8 杂交瘤细胞株表位相关性分析

为了分析筛选到的 5 株单克隆抗体的表位的相关性，本研究对 5 株单抗按照本章中 3.3.13 步骤进行相加表位相关性分析。结果见表 3-8 和表 3-9。

由表 3-8 中的数据分析可知：当确定抗原包被浓度时，分别加入 5 种抗体过量的单抗上清，由结果可看出：1-5D、3-6F 这两株单抗与其它 3 株单抗的 OD450nm 存在显著差异，表明 1-5D、3-6F 与其它 3 株单抗识别不同表位。

将 OD450nm 读值相近的 3 株单抗，在相同抗原包被条件下，进行相加 ELISA 实验。结果见表 3-9：两株单抗等体积混合加入后其 OD450nm 读值均大于一种单抗单独作用，并计算相应的 AI (%)。由 AI 数值可知 4-5D、4-9A、5-6E 这 3 株单抗均识别不同表位。综上所述：本实验筛选到的 5 株单抗均识别不同表位。

表 3-8 相加 ELISA 包被抗原条件摸索

Table 3-8 Additive ELISA envelope antigen conditions

编号	A (50 μ L)	2A (100 μ L)
1-5D	0.31	0.40
3-6F	2.48	2.34
4-5D	1.09	1.21
4-9A	1.26	1.29
5-6E	1.27	1.45

表 3-9 相加 ELISA 鉴定单抗识别表位

Table 3-9 Combined ELISA identifying the single identification table

A (50 μ L)	B (50 μ L)	A+B (100 μ L)	AI (%)
4-5D (1.09)	4-9A (1.26)	1.68	42.9
	5-6E (1.27)	1.90	61.1
4-9A (1.26)	5-6E (1.27)	1.73	36.7

注：上述表中数值均为对应的 OD450nm 读值

3.4.9 杂交瘤细胞株分泌抗体稳定性鉴定

为了验证筛选到的 5 株杂交瘤细胞能够稳定分泌抗体，分别收集原代和不同代次的单抗上清进行杂交瘤细胞株分泌抗体的稳定性分析。结果如图 3-6 所示：原代杂交瘤细胞和 30 代杂交瘤细胞分泌的抗体水平无差异，表明筛选到的 5 株单抗均能稳定分泌抗体。

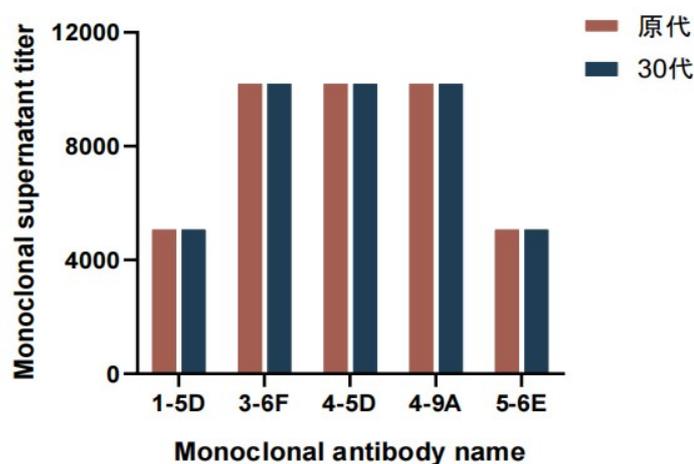


图 3-6 单抗分泌抗体稳定性分析

Fig 3-6 Stability analysis of Tuzumab secreted antibody

3.4.10 腹水纯化前效价检测

为了测定采集腹水的抗体水平，本实验采用间接 ELISA 进行腹水效价测定。将 5 株单抗的腹水从 $1:10^{-2}$ 稀释至 $1:10^{-8}$ ，同时并设置阴性对照。结果见图 3-7 所示：5 株腹水效价在 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 左右，说明 5 株杂交瘤细胞生产特异性抗体能力较强。

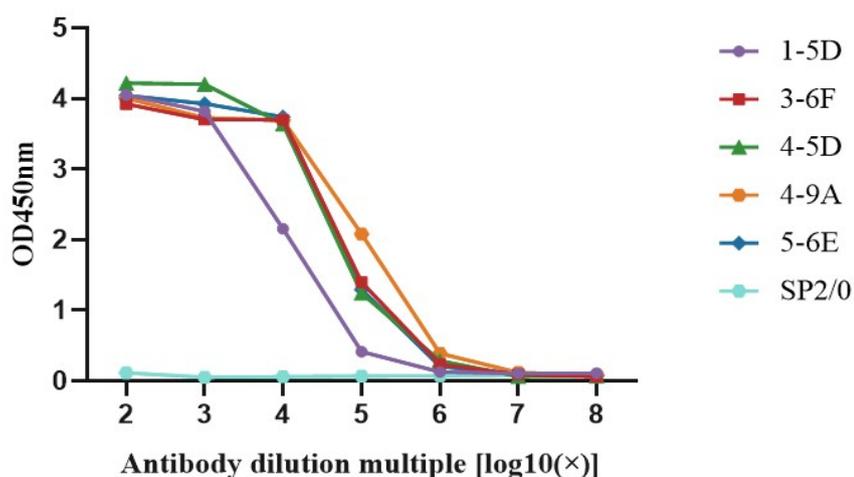


图 3-7 腹水效价测定

Table 3-7 Determination of ascites titer

3.4.11 腹水纯化鉴定

为了后续建立胶体金检测方法，本研究采用辛酸-硫酸铵沉淀初步抗体后，用 Protein G 柱纯化的方式对 5 株腹水做进一步纯化。

在硫酸铵沉淀抗体时，其中 2 株单抗 1-5D、4-5D 没有沉淀析出表明硫酸铵初纯失败；将抗体沉淀正常的 3 株单抗 3-6F、4-9A、5-6E 用 Protein G 柱精细纯化，SDS-PAGE 检测结果如图 3-8 所示：腹水纯化样品分别在 55 KDa 和 25 KDa 左出现重链和轻链。表明腹水纯化成功。纯化后的抗体经透析后用 BSA 蛋白含量测定试剂盒测定抗体浓度分别为：3-6F：3.48 mg/mL、4-9A：3.85mg/mL、5-6E：3.22mg/mL。

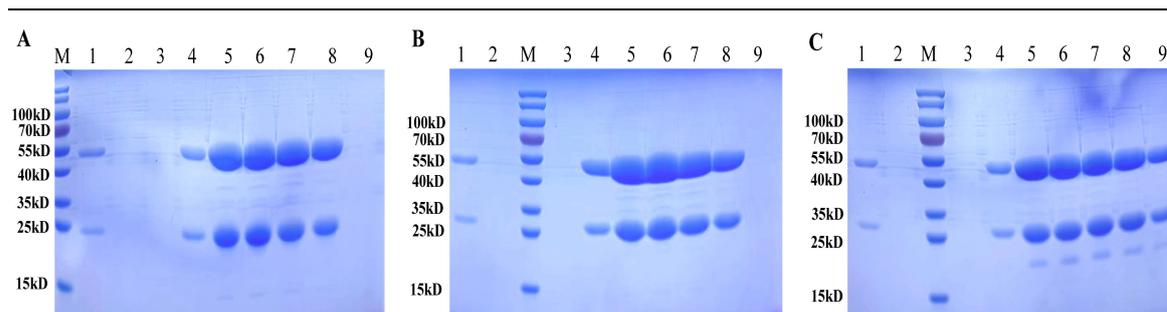


图 3-8 腹水纯化结果

Fig 3-8. Results of ascites purification

A: 3-6F B: 4-9A C: 5-6E

M: Marker 1: 原液 2: 流出液 3-9: 洗脱液

3.4.12 腹水纯化后反应性鉴定

为了验证纯化后的腹水与病毒的反应性，本实验将腹水从 1:100 开始进行 10 倍比稀释并采用间接免疫荧光的方式进行检验。

结果如图 3-9 所示：在阴、阳性对照成立的条件下，3-6F 和 5-6E 纯化后的腹水在稀释 $1:10^{-4}$ 时间免可见微弱的绿色荧光；4-9A 腹水纯化后的在稀释 $1:10^{-6}$ 时仍能与间免呈现特异性反应。上述结果表明纯化后的 3 株单抗腹水均与病毒感染的细胞有较好的反应性，其中 4-9A 与病毒的亲和力最高，3-6F 次之，5-6E 最低。

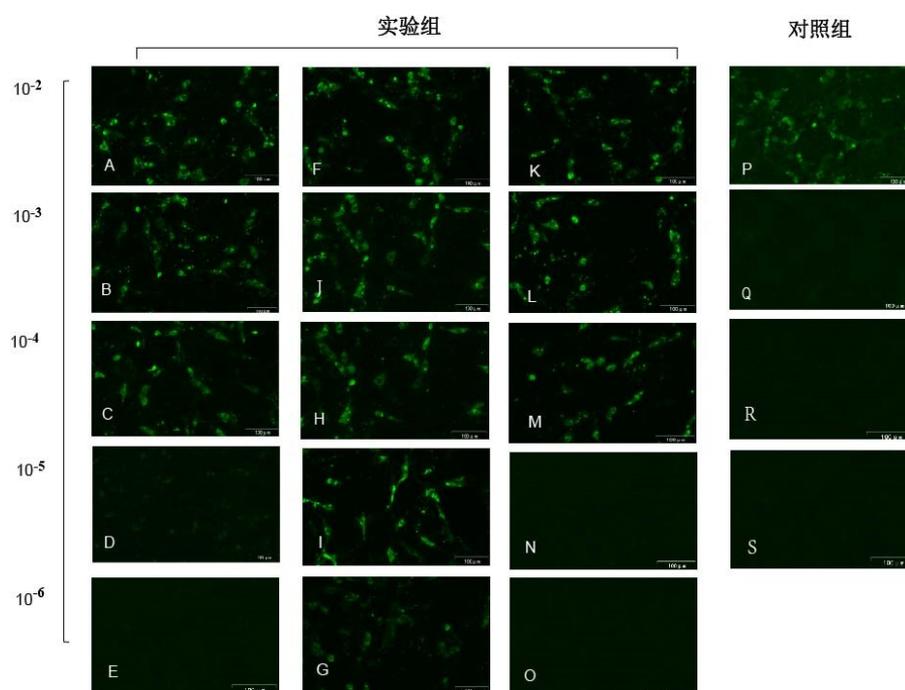


图 3-9 纯化腹水与病毒反应性鉴定

Fig 3-9 Purification of Ascitic Fluid and Virus Reactivity Assessment

A-E: 3-6F 腹水稀释 F-G: 4-9A 腹水稀释 K-O: 5-6E 腹水稀释

P: 免疫血清 Q: SPF 血清 R: PBS S: SP2/0

3.4.13 腹水纯化后亲和力鉴定

为了验证 3 株纯化腹水的亲和力，本实验采用间接 ELISA 进行腹水亲和力检测。首先将 PDCoV-N 蛋白梯度稀释 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行最佳包被浓度摸索。由图 3-10 可见：在 0.625~0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被时呈良好的线性关系且 OD450nm 值在 0.15~2.5 之间，因此确定用 0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白浓度包被。将腹水从 1:100 开始按两倍比稀释进行检测并读取 OD450nm。选择 50% OD450nm 时，对应单抗腹水的浓度为该株腹水的亲和力。经过计算可知：3-6F[Ab]_t=4.88ng/mL $K_{\text{aff}}(3-6\text{F})=3.2\times 10^{-11}\text{mol}/\text{L}$ 、4-9A[Ab]_t=9.73ng/mL $K_{\text{aff}}(4-9\text{A})=6.4\times 10^{-11}\text{mol}/\text{L}$ 、5-6E[Ab]_t=8.44ng/mL $K_{\text{aff}}(5-6\text{E})=5.6\times 10^{-11}\text{mol}/\text{L}$ 。结果表明 3-6F 亲和力最高，5-6E 次之。4-9A 的亲和力最低。结果如图 3-11。

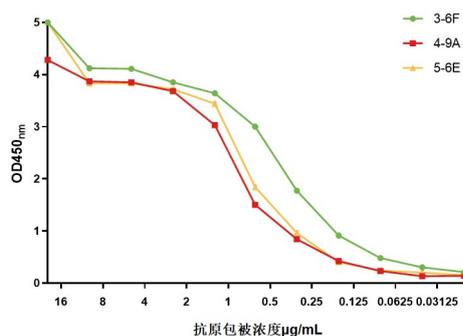


图 3-10 PDCoV-N 最佳包被浓度-抗体反应曲线

Fig.3-10 Optimal coated concentration of PDCoV-N - antibody response curve

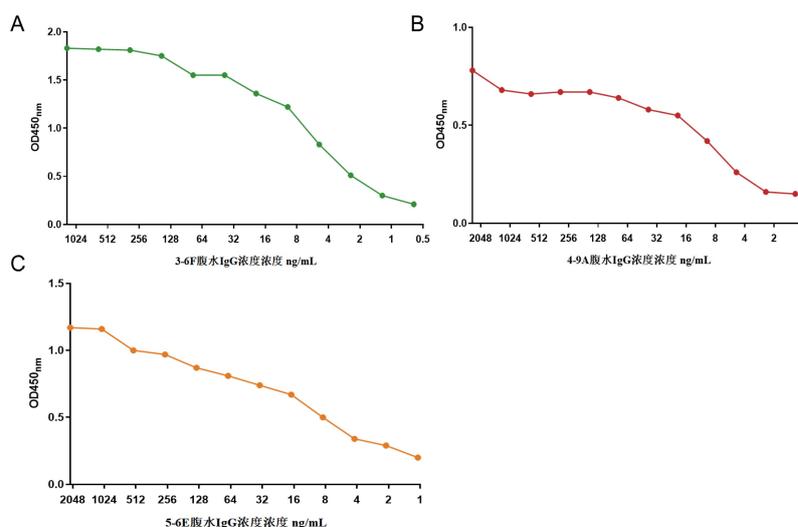


图 3-11 腹水亲和力测定曲线

Fig. 3-11 Ascites affinity constant measurement curve

A: 3-6F 腹水亲和力测定曲线 B: 4-9A 腹水亲和力测定曲线 C: 5-6E 腹水亲和力测定曲线

3.5 讨论

在单抗筛选过程中，采用 N 蛋白和 PDCoV 病毒包被 ELISA 板同步进行筛选，并用间接免疫荧光法作为辅助验证的单抗筛选方案。最终筛选到 5 株单克隆抗体(1-5D、3-6F、4-5D、4-9A、5-6E)均能与病毒包被的 ELISA 板和 PDCoV 感染的细胞呈现特异性反应；其中 4 株单抗(1-5D、3-6F、4-9A、5-6E)能够与 PDCoV 感染的细胞间免产生特异性绿色荧光反应。实验结果表明：用病毒和蛋白同时筛选的方案是十分合理并具有一定的可行性，能最大程度的保证筛选到的单抗能与病毒反应。

在进行融合后一轮阳性检测的过程中，通过实验数据发现：本次融合实验的融合率可达 77%，融合孔与 N 蛋白的反应阳性率为 47%，其中与 PDCoV 反应的阳性率仅为 8%。从数值上可以发现与融合孔与病毒的阳性率远远低于与 N 蛋白反应的阳性率。推测上述实验结果出现的原因可归结出以下两点：1、本研究采用 CHO 表达的 N 蛋白免疫和筛选的方式制备单抗，由于表达的 N 蛋白在纯化后仍会存在一定的杂蛋白，所以用同种蛋白筛选可能会存在蛋白阳性率高于病毒阳性率的可能。2、该研究结果也暗示了即使 CHO 真核表达系统具有一定的翻译后修饰功能，但其表达的蛋白与天然形式的蛋白仍存在一定的差异。

为确保筛选到的 5 株单克隆抗体具有稳定分泌特异性高亲和力抗体的能力，本研究对其稳定性、特异性、亲和力进行检测。首先，将筛选到的 5 株单抗进行原代和传代（30 代）杂交瘤细胞染色体计数，同时收集不同代次的单抗上清用来检测抗体分泌的稳定性，染色体计数结果显示：原代和 30 代杂交瘤细胞的染色体条数均在 88~110 条之间。证明筛选到的杂交瘤细胞是脾细胞和瘤细胞融合的产物且 5 株杂交瘤细胞在传代过程中遗传特性仍能保持稳定；同时对不同代次的单抗上清进行效价检测结果均无差别；表明单抗在传代过程中仍能稳定分泌抗体。其次，对筛选到的单抗的特异性进行鉴定，将单抗上清分别与引起猪腹泻的其他常见病原 (PEDV、TGEV、PoRV)用 Western Blot 和间接 ELISA 等实验进行分析。结果显示筛选到的 5 株单抗均不与猪腹泻其它病毒反应具有良好的特异性。最后，利用纯化成功的 3 株腹水进行单抗的亲和力验证，数据显示，3-6F: $K_{aff}(3-6F) = 3.2 \times 10^{-11} \text{mol/L}$ 、4-9A: $K_{aff}(4-9A) = 6.4 \times 10^{-11} \text{mol/L}$ 、5-6E: $K_{aff}(5-6E) = 5.6 \times 10^{-11} \text{mol/L}$ 。已知高亲和力一般来说是指亲和常数大于 $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 。可见本实验筛选到的 3 株单抗亲和力都在 10^{11}M^{-1} ，因此本研究筛选到的 3 株单抗均具有高亲和力。同时，本研究利

用相加 ELISA 对 5 株单抗的表位相关性进行了分析。结果表明 5 株单抗均处于不同表位, AI%数值在 36~61%之间。为了后续研制胶体金检测方法过程中提供实验方向。

通过上述实验结果可证明本研究筛选到的 5 株单克隆抗体具有良好的稳定性、特异性和高亲和力。具有临床应用的价值和建立检测方法的可行性, 为后续胶体金试纸条的研发提供原材料。

3.6 结论

(1) 筛选到 5 株 (1-5D、3-6F、4-5D、4-9A 和 5-6E)能与 PDCoV 病毒包被的 ELISA 板和病毒感染的细胞 Western Blot 呈现特异性反应的单克隆抗体, 其中 4 株(1-5D、3-6F、4-9A、5-6E)能与病毒感染的细胞间免发生特异性绿色荧光反应。

(2) 成功纯化到 3 株单抗腹水 (3-6F、4-9A 和 5-6E)经测定抗体浓度分别为: 3-6F: 3.48 mg/mL、4-9A: 3.85mg/mL、5-6E: 3.22mg/mL。

第四章 PDCoV 胶体金检测方法的建立

4.1 引言

胶体金标记技术(Gold Immunochromatographic Assay, GICA)与免疫酶标技术(Nzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫荧光技术(Immunofluorescence, IF)和放射免疫技术(Radioimmunoassay, RIA)并称四大免疫标记技术(樊淑华等 2014)。在胶体金标记技术(GICA)中最常用的是：斑点金免疫渗滤法和胶体金免疫层析法两种。

其中胶体金免疫层析法以纤维素膜为载体，胶体金标记抗原或抗体作为显色剂的免疫层析技术，由免疫层析技术和胶体金技术共同发展而来(Li et al 2011)。根据用途的不同又可分为：双抗体夹心法、双抗原夹心法、竞争法、间接法（张玲 2007）和捕捉法等。其中双抗体夹心法与竞争法(Mahmoudi et al 2019)用于检测抗原；双抗原夹心法、间接法和捕捉法用于检测抗体。但使用间接法和捕捉法检测抗体在生产应用中很少使用（鞠莹等 2009，吕海峰 2021）。胶体金免疫层析技术具有良好的敏感性、特异性、稳定性及操作简单不受场地限制和价格低廉等诸多优势。被广泛地应用于不同行业的生物样品快速检测(Koczula et al 2016)。据研究表明：目前，胶体金检测方法已被广泛应用于动物病毒感染的临床快速检测中(Yang et al 2010)。

基于上述优势，本实验将筛选到的能与 PDCoV 病毒特异性反应的单克隆抗体进行腹水制备并进行纯化。从而建立双抗体夹心胶体金试纸条，用于猪 δ 冠状病毒感染后的临床快速检测，为 PDCoV 感染诊断提供了技术支持。

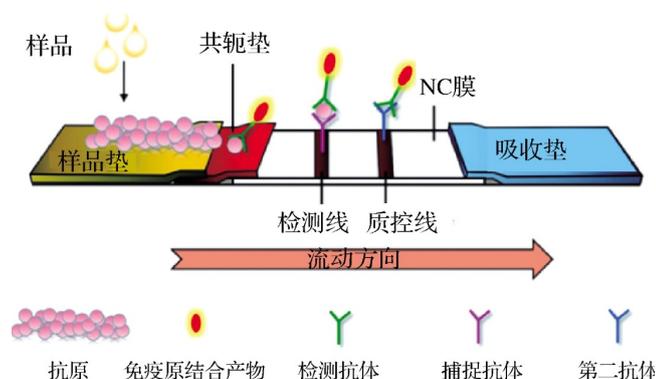


图 4-1 胶体金试纸条结构示意图

Fig.4-1 Structural Diagram of the Colloidal Gold Test Strip

4.2 实验材料

4.2.1 主要试剂、耗材与仪器设备

氯金酸、柠檬酸三钠、碳酸钾、氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾（均购自国药集团化学试剂有限公司）、BSA 购自 Biosharp 公司；金标垫、样品垫、NC 膜、吸水纸、PV 底板；磁力加热搅拌器、紫外-可见光分光光度计、BIODOT 划线机、切条机等。

4.2.2 主要试剂配制

(1) 1%氯金酸溶液：称量 10g 氯金酸加 100mL 超纯水，溶解后用 0.45 μ m 滤膜过滤，常温保存。

(2) 1%柠檬酸三钠溶液：称量 10g 柠檬酸钠加 100mL 超纯水，用 0.45 μ m 滤膜过滤，注意现配现用。

(3) 0.2mmol K₂CO₃ 溶液：称量 2.76g K₂CO₃ 加 100mL 超纯水溶解，用 0.45 μ m 滤膜过滤，常温保存。

(4) 1%BSA 溶液：1g 的 BSA 粉末加 100mL 1 \times PBS 溶解，用 0.45 μ m 滤膜过滤，4 $^{\circ}$ C 保存备用

(5) 1 \times PBS 溶液：称量 NaCl: 8g、KCl: 0.2g、Na₂HPO₄: 3.6g、KH₂PO₄: 0.24g 加入 1L 超纯水溶解，用 0.45 μ m 滤膜过滤，常温保存。

4.3 实验方法

4.3.1 胶体金纳米粒子制备

(1) 玻璃容器的清洁：玻璃容器在使用之前先用洗涤剂清洗，放入烘干箱内干燥，再浸泡于加入硫酸-重铬酸钾的酸缸中两天，室温干燥后蒸馏水冲洗，再放入烘干箱内烘干备用。

(2) 取 100 mL 超纯水中加入预先配制的 1.0 mL 1%氯金酸溶液，在磁力加热搅拌器上加热至沸腾。

(3) 迅速向其中加入 1%柠檬酸三钠溶液（现配现用）1.2 mL，并充分混匀，继续加热沸腾 10 min。冷却至室温后，加入超纯水定容至 100 mL。冷却至室温后于 4°C保存。

(4) 用肉眼观察法和紫外-可见光分光光度计扫描法对胶体金颗粒进行鉴定。

4.3.2 金标抗体和检测抗体的选择

将单克隆抗体 3-6F、4-9A、5-6E 分别作为金标记抗体和检测抗体，参考第三章 3.4.8 中表位识别鉴定的结果为依据。制备试纸条，用 PDCoV 为阳性对照进行检测，观察不同单克隆抗体分别作为金标记抗体和检测抗体的检测结果。

4.3.3 最佳金标 pH 摸索

- (1) 取 5 mL EP 管，每管加入 3 mL 胶体金溶液；
- (2) 分别加入体积为 3、5、7、9、11、13 μL 的 0.2 mmol K_2CO_3 溶液；
- (3) 分别加入 90 μg 单克隆抗体，颠倒混匀，室温静置 30 min，使用紫外-可见分光光度计进行扫描，选取出现最大吸收峰时对应的胶体金 pH 值为最佳标记 pH 值。该 pH 值对应的 0.2 mmol K_2CO_3 溶液添加体积为最佳添加体积。

4.3.4 最佳标记蛋白量摸索

- (1) 取 5 mL EP 管，每管加入 2 mL 胶体金溶液；
- (2) 用 0.2 mmol K_2CO_3 溶液调节胶体金 pH；
- (3) 分别加入 1mg/mL 不同体积的单克隆抗体使之浓度为 0、2、4、6、8、10、12、14、16 μg 单抗每毫升胶体金，颠倒混匀，室温静置 15 min；
- (4) 每管再加入 200 μL 10% NaCl 溶液，混匀并室温下静置 15 min；
- (5) 眼观胶体金溶液颜色变化并使用紫外-可见光分光光度计进行扫描，依据胶体金溶液由蓝变红时的单克隆抗体量再加 20%，并选取出现最大吸收峰时对应的抗体量，即为单克隆抗体的最佳标记量。

4.3.5 金标单克隆抗体的制备

(1) 将胶体金溶液用 0.2mmol K_2CO_3 溶液调至最佳 pH 值，用磁力搅拌器混匀 20~30 min。

(2) 将单克隆抗体按最佳标记量加入到胶体金溶液中，混匀 30 min。加入 BSA 至终浓度为 1%，搅拌 30 min。4°C 8500 r/min 离心 40 min，收集沉淀。

(3) 加入金标保存液复溶至原体积，再以 4°C 9000 r/min 离心 40 min，收集沉淀。沉淀用 1/10 初始胶体金体积的金标保存液重悬，即为金标记抗体。

(4) 使用紫外-可见分光光度计在 400 nm~600 nm 范围内进行扫描，测定最大吸收波长和吸光值，获得胶体金标记抗体的吸收光谱。

当单克隆抗体结合到胶体金颗粒表面后，会使得胶体金颗粒增大，扫描图谱的最大吸收峰发生红移，吸收峰峰宽增加，吸收 OD 值变大。即证明单克隆抗体成功标记到胶体金颗粒表面。

4.4.6 试纸条的组装与制备:

(1) 处理金标垫和样品垫，配制金标垫和样品垫处理液，完全浸泡裁剪好的垫子 30 min，于 37°C 烘箱中过夜烘干；

(2) 将金标抗 PDCoV 单抗涂布在用金标垫处理液处理过的金标垫上，干燥 3~7 h；

(3) 试纸条划线，用 PBS 溶液将金标单抗和羊抗鼠抗体稀释成最适工作浓度，包被在硝酸纤维素膜上，作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线)，组装成试纸条，用 BIODOT 划线机划线，修改机器参数，检测线设置 $y=19.5$ mm，质控线设置 $y=14.5$ mm，两线间隔 5 mm，划线完成后于 37°C 烘箱烘干 20 min；

(4) 组装试纸条，将样品垫、金标垫、NC 膜、吸水纸依次裁剪为合适宽度，并依次粘贴到 PVC 底板上，每个原件重叠 1 mm 左右，保证样本液体流动。试纸条切条，使用切条机，将系统参数中试纸条宽度设置为 4 mm；

(5) 试纸条组装，将切割好的试纸条按照正确方向装于塑料卡套中，用于进行下一步实验。

4.3.7 反应时间优化

用上述摸索到的最优条件制备一批试纸条，用于反应条件的优化摸索。用所制备的试纸条检测同一个阳性样品，点样后观察 10 min、15 min、20 min，选择 T 线、C 线条带强度趋于稳定的最佳时间点为反应终点。

4.3.8 试纸条敏感性检验

分别用 CHO 表达的蛋白和本实验室保存的病毒液进行本试纸条的敏感性检验。

(1) 用 PBS 溶液稀释蛋白浓度为 0.8mg/mL 的 N 蛋白，从 1:100 开始，进行 2 倍比稀释，即 1:100~1:409600 稀释 13 个蛋白梯度及一个 PBS 稀释液为阴性对照，每个样品取 100 μ L 用同一批试纸条进行检测，判定试纸条的最低检测限；

(2) 用 PBS 溶液稀释病毒含量为 $10^{-3.88}$ TCID₅₀/0.1mL 的 PDCoV 样品，从 1:10 开始，进行 2 倍比稀释。即 1:10~1:640 稀释 8 个病毒梯度及 PBS 稀释液为阴性对照，每个样品取 100 μ L 用同一批试纸条进行检测，判定试纸条的最低检测限。

4.3.9 试纸条特异性检验

用同一批试纸条，分别检测猪常见的腹泻病毒 PEDV、TGEV、PoRV、PRRSV 等，并用 PK-15 细胞裂解液为阴性对照，检测胶体金试纸条特异性。

4.3.10 试纸条稳定性检验

试纸条于 42°C 保存进行加速破坏试验。分别在 0 d、10 d、20 d、30 d 用制备的试纸条检测同一份阳性进行试纸条稳定性分析。观察不同时间节点其结果的变化。

4.3.11 临床样品符合率检测

用自制胶体金试纸条检 31 份临床样品，记录样品检测结果，与荧光定量 PCR 检测结果进行比较，计算符合率。

4.4 实验结果分析

4.4.1 胶体金纳米粒子的鉴定

为了确定胶体金粒子制备成功，本实验通过肉眼观察和紫外-可见光分光光度计扫描两种方法来进行检验。首先通过肉眼观察胶体金溶液呈紫红色纯净透明液体。接着对胶体金溶液进行扫描鉴定由扫描图可知：胶体金溶液最大吸收峰值出现在 526 nm 处并呈现较窄的倒钟形单波峰。以上数据表明制备的胶体金溶液质量好。

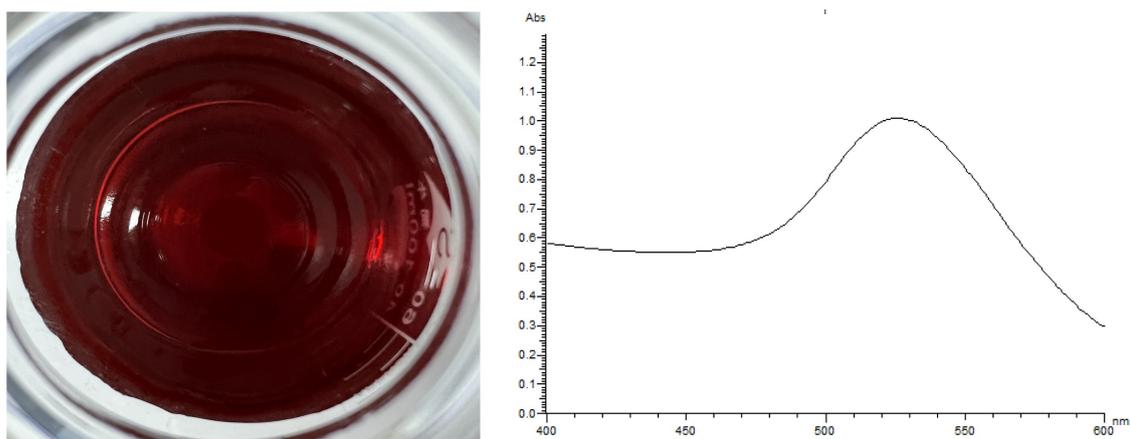


图 4-2 胶体金纳米粒子鉴定结果

Fig.4-2 Identification Results of Colloidal Gold Nanoparticles

4.4.2 金标记抗体与检测抗体确定

本实验参考相加 ELISA 的结果。将 3 株单抗腹水 3-6F、4-9A、5-6E 分别作为金标抗体和检测抗体进两两配对比较。结果如图 4-3 所示：图(A)为 3-6F 做检测抗体、4-9A 和 5-6E 分别为金标抗体；图(B)为 4-9A 为检测抗体、3-6F 和 5-6E 分别为金标抗体；图(C)为 5-6E 做检测抗体、3-6F 和 4-9A 分别做金标抗体。N 蛋白为阳性对照，PBS 稀释液作为阴性对照。

在同等条件下，6种组合方式都出现了特异性的条带，其中3-6F做检测抗体4-9A做金标抗体时：检测线更加清晰明艳，并且条带最粗，因此最后选择3-6F做检测抗体4-9A做金标抗体。

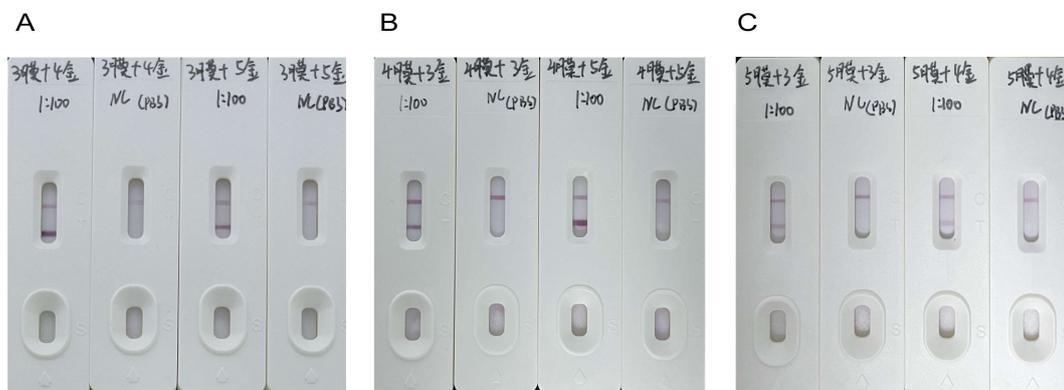


图 4-3 金标记抗体与检测抗体选择结果图

Fig.4-3 Results of Gold-Labeled Antibody and Detection Antibody Selection

A: 3-6F 做检测抗体 4-9A 和 5-6E 分别为金标抗体

B: 4-9A 为检测抗体 3-6F 和 5-6E 分别为金标抗体

C: 5-6E 做检测抗体 3-6F 和 4-9A 分别做金标抗体

4.4.3 最佳金标记 pH 的确定

为了确定金标记抗体最佳的 pH 值，本实验向胶体金溶液中添加不同体积的 0.2mmol K_2CO_3 溶液。结果如图 4-4 所示：向每毫升胶体金溶液逐渐提高 0.2mmol K_2CO_3 溶液添加量时扫描图最大吸收峰逐渐降低。在添加 3 μL 0.2 mmol K_2CO_3 时扫描图出现最大吸收峰。故本研究单抗腹水最佳标记 pH 值是：向每毫升胶体金溶液中添加 3 μL 0.2 mmol K_2CO_3 。

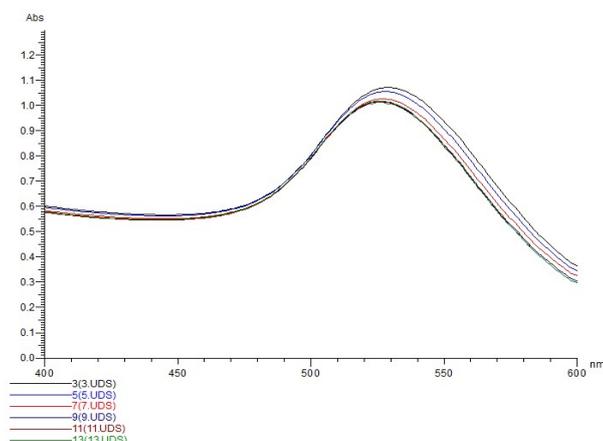


图 4-4 最佳 pH 的确定

Fig.4-4 Effects of pH on the Synthesis of Gold-labeled Probes

4.4.4 单克隆抗体最佳添加量的确定

为了确定金标记最佳单抗添加量。在最佳 pH 条件下，将不同浓度的 4-9A 抗体与金标探针进行偶联。结果如图 4-5 所示，肉眼观察可见：当向每毫升胶体金溶液添加 2 μg 抗体时，金标抗体溶液呈现紫红色且有明显颗粒聚沉。当添加 4 μg 抗体之后金标溶液眼观均为正常红色。紫外可见光分光光度计扫描图结果可知：当抗体添加量为 12 μg 时出现最高吸收峰，此后再增加抗体浓度，曲线峰值不再升高。因此金标抗体的最佳标记量为：向每毫升胶体金溶液中添加约 12 μg 的抗体。

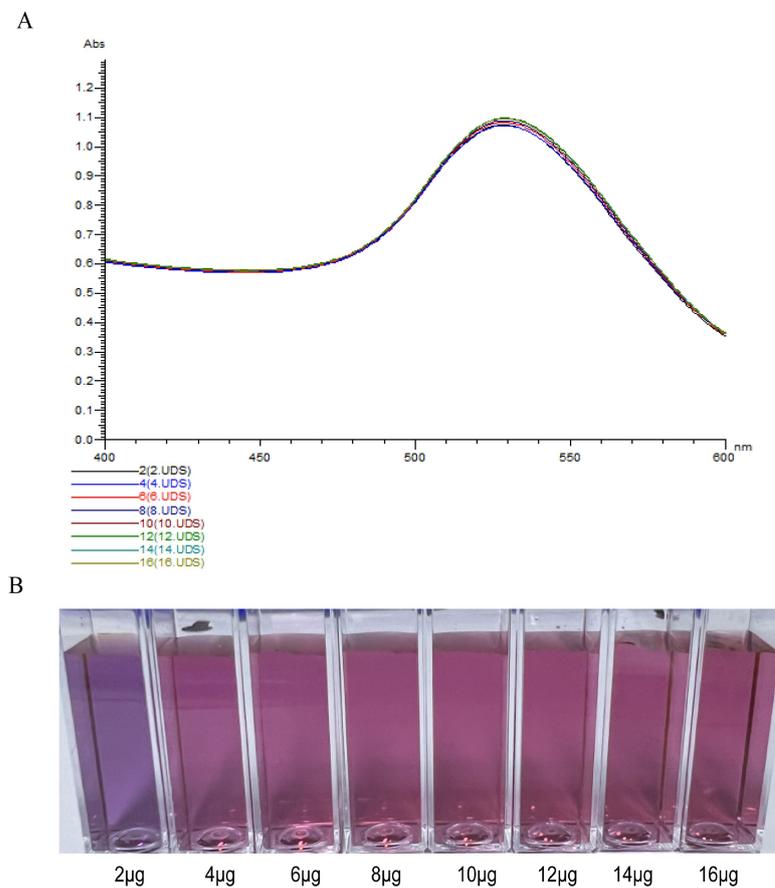


图 4-5 最佳标记量的确定

Fig. 4-5 Determination of the optimal amount of labeling

A: 紫外可见光分光光度计扫描图 B: 眼观结果图

4.4.5 胶体金标记单克隆抗体鉴定结果

为了确定胶体金标记单抗成功，本实验采用紫外-可见分光光度计对金标记抗体进行扫描的方法进行验证。由图 4-6 可见：金标抗体 4-9A 扫描图呈现为倒钟形单波峰最大吸收峰值在 531 nm 处，与胶体金纳米粒子溶液相比最大吸收峰值发生偏移且 OD 值也增大。证明 4-9A 单克隆抗体金标记成功。

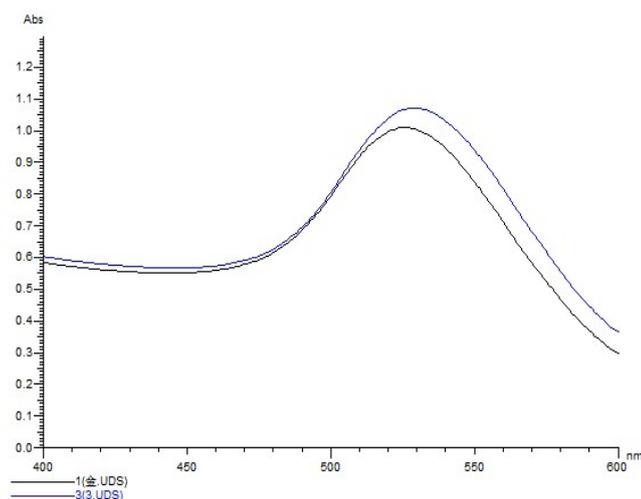


图 4-6 金标探针鉴定结果图

Fig.4-6 Identification Results of the Gold Probe

4.4.6 最佳反应时间的确定

为了确定自制试纸条检测临床样品的最佳反应时间，本研究用同一份病毒液 (TCID₅₀ 为 10^{-3.88}/0.1mL) 为阳性对照进行检测，结果如图 4-7 所示：反应 10 min 以后检测结果稳定且用时最短。确定最佳反应时间为 10 min。

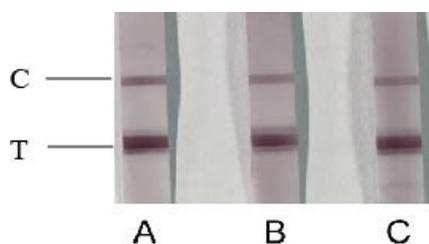


图 4-7 最佳反应时间的确定

Fig.4-7 Determination of the optimal reaction time

A: 10 min B: 15 min C: 20 min

4.4.7 试纸条敏感性检验

为了确定自制试纸条的敏感性，本实验分别从蛋白和病毒两个层面进行验证。将浓度为 0.8mg/mL 的 PDCoV-N 蛋白从 1:100 开始，以两倍比稀释 13 个蛋白梯度 (1:100~1:409600) 同时设置 PBS 稀释液为阴性对照。结果由 4-8 中图(A)所示：在 1:102400 稀释时，可见 T 线处有淡淡的检测线出现，因此本试纸条最低检测 0.8ng 的 N 蛋白。

将 TCID₅₀ 为 10^{-3.88}/0.1mL (Ct 值为 19.64) 的病毒液从 1:10 开始，以 2 倍比稀释 8 个病毒梯度(1:10~1:640)，同时设置 PBS 稀释液为阴性对照。结果由 4-8 中图 (B)所示：在 1:160 稀释时，可见 T 线处有淡淡的检测线出现，因此本试纸条对该病毒的最低检测限为 10^{1.67} TCID₅₀ 的病毒 (Ct 值为 29 及以下)。

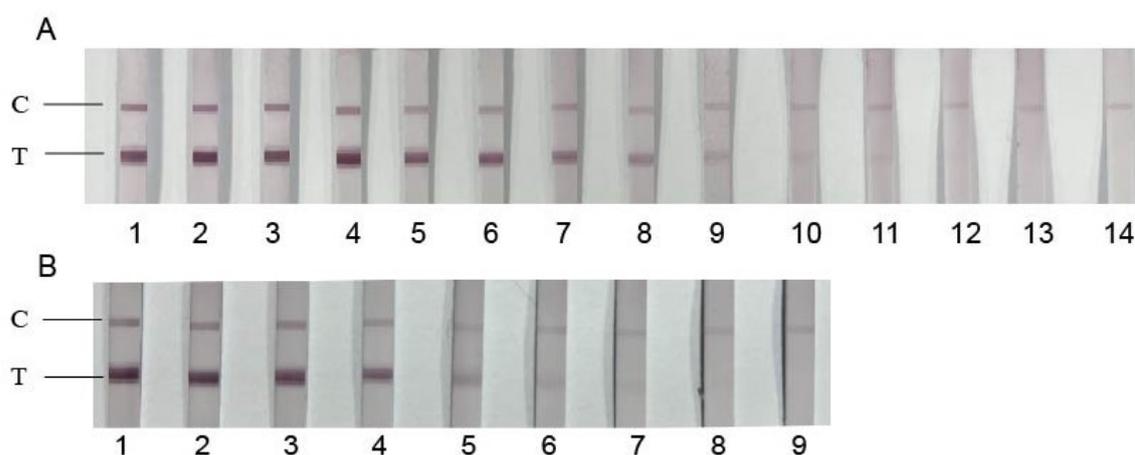


图 4-8 试纸条敏感性检测

Fig.4-8 The limit of detection of dipstick strips

A 图 1-13: 蛋白稀释度(1:100~1:409600) 14: PBS 稀释液

B 图 1-8: 病毒液稀释度(1:10~1:640) 9: PBS 稀释液

4.4.8 试纸条特异性检验

为了验证本研究研制的 PDCoV 胶体金试纸条的特异性，本实验利用同一批试纸条分别检测：PDCoV、PEDV、TGEV、PoRV、PRRSV 以及 PK-15 细胞裂解液。结果如图 4-9 所示：本研究研制的胶体金试纸条仅与 PDCoV 反应，与其它猪病毒性腹泻病毒无交叉反应，证明该试纸条特异性良好。

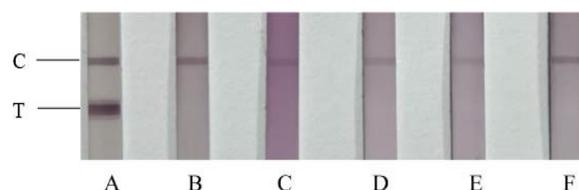


图 4-9 试纸条特异性检测

Fig.4-9 Specificity detection of dipstick strips

A: PDCoV B: PEDV C: TGEV D: PoRV E: PRRSV F: PK-15 细胞裂解液

4.4.9 试纸条稳定性检测

为了确定研制的 PDCoV 胶体金试纸条的稳定性利用加速破坏实验进行验证（42℃保存 1 个月相当于常温保存 1 年）。结果如图 4-10 所示：经检测在 42℃存放 30 d 的试纸条 T 线检测信号与 0 d 无明显差异，表明试制试纸条稳定性较好。

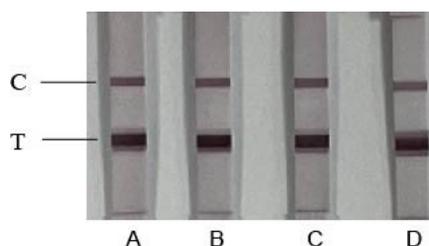


图 4-10 试纸条稳定性检测

Fig. 4-10 Stability detection of test strips

A: 0 d B: 10 d C:20 d D:30 d

4.4.10 临床样品符合率检测

为了对比本研究研制的 PDCoV 胶体金试纸条和荧光定量 PCR 对临床样品检测结果的符合率。将收集到的 31 份临床病料（粪便）一分为二，一部分用本研究制备的 PDCoV 胶体金试纸条进行检测，另一部分提取 RNA 后进行反转录，用本实验室建立的猪腹泻病毒(PEDV、TGEV、PDCoV、PoRV)四重荧光定量引物进行检测，最后比较二者检测结果的符合率。结果见表 4-1。

荧光定量 PCR 结果见表 4-2：其中 PDCoV 感染的样品有 4 份，PoRV 感染的临床样品 9 份，PEDV 感染的样品 1 份，其余样品均为猪常见腹泻病毒阴性。研制试纸条结果见图 4-11：其中 PDCoV 感染样品有 3 份，其余样品均为阴性。将 31 份临床样品的研制的 PDCoV 胶体金试纸条检测结果与猪腹泻四重荧光定量检测结果进

行符合率分析：两种检测方法的阴性临床样品检测符合率为 100%；对 PDCoV 感染阳性样品检测符合率为 96.4%。

表 4-1：符合率试验结果

Table 4-1: Results of coincidence rate test

自制胶体金试纸条	阳性	荧光定量 PCR		总符合率
		阴性	总计	
阳性	3	0	3	100%
阴性	1	27	28	96.4%
总计	4	27	31	-

表 4-2 临床样品 Q-PCR 检测结果

Table. 4-2 Results of Q-PCR of clinical samples

临床样品编号	q-PCR 结果 (Ct 值)				自制 PDCoV 试纸条
	PEDV	PDCoV	PoRV	TGEV	
1	-	-	-	-	-
2	-	-	14.23	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	26.47	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	26.03	19.64	-	-	+
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	29.74	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	19.34	-	-	+
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	18.63	-	-	+
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
21	-	-	25.70	-	-

续表 4-2

22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	36.20	-	-	-
25	-	-	14.23	-	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	16.08	-	-
28	-	-	24.29	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	17.77	-	-
31	-	-	-	-	-
32 (阴性对照)	-	-	-	-	-

注：表中数值均为对应的荧光定量 Ct 值

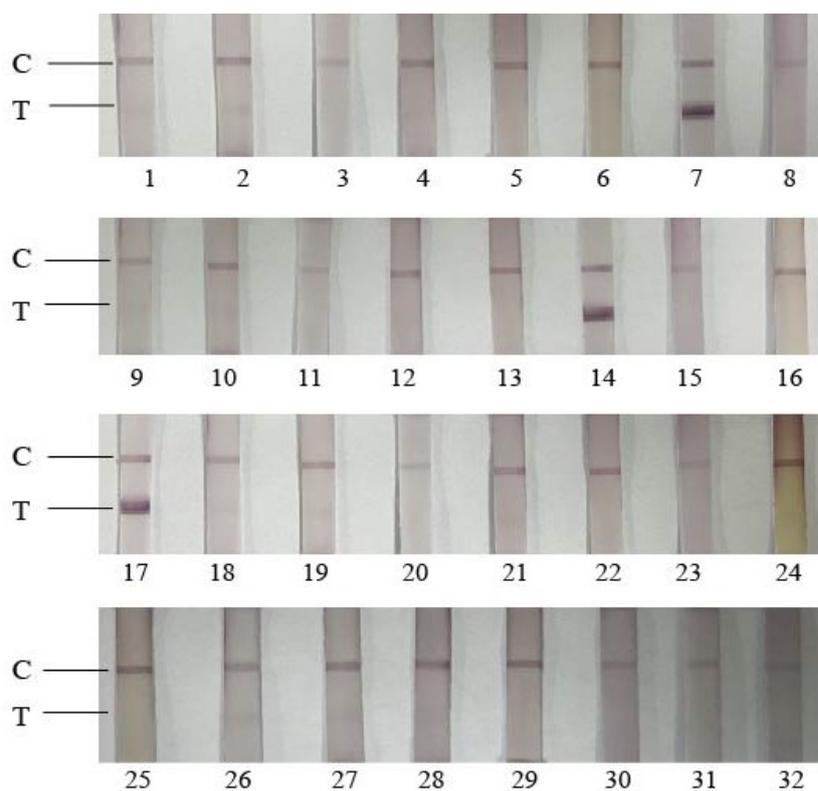


图 4-11 临床样品胶体金试纸条检测结果

Fig.4-11 Results of colloidal gold dipstick assay of clinical samples

1-31: 猪腹泻临床样品（粪便） 32: PBS 稀释液

4.5 讨论

金溶液的质量是决定胶体金免疫层析检测技术的决定性因素之一。如果金颗粒的直径变化范围太大会影响试条的稳定性。同时，金颗粒的大小不均匀会导致金标记的探针容易沉淀出现假阳性。因此，制备颗粒均匀、分散良好的胶体金溶液对后续实验尤为重要。据 Wang 等实验研究表明：如果最大吸收峰及其对应的 OD_{450nm} 读值在 0.8~1.2 之间，可以初步认为金溶液满足该条件(Wang et al 2004)。因此本实验在金溶液制备过程中选择 OD_{450nm} 读值 1 左右的胶体金溶液为后续实验材料。除此之外，本研究对后续抗体的金标记最佳 pH 和最佳标记量都进行了细致的摸索。结果显示金标抗体 4-9A 在 pH=3 时金标记的效果最佳。并选定了 12 μg/mL 为最佳添加量来进行后续的胶体金试纸条制备。

在日常应用中判定优质的胶体金试纸条标准应具备以下两点：较高的灵敏性和良好的特异性，可以检测较低限度的病毒含量的同时减少误检和假阳性。

因此本实验试制胶体金试纸条在敏感性的提高上做了以下几点优化：1、研究表明：N 蛋白免疫反应性最强的表位位于该蛋白的 C 端(Rota et al 2003, Wang et al 2003)。即使本实验在构建时表达 N 蛋白全长，仍有很大几率造成筛选到的单克隆抗体识别的表位相近。因此在选择金标抗体和检测抗体时，本实验根据 4.4.2 中不同金标抗体和检测抗体组合配对效果，并结合 3.4.13 中腹水与病毒亲和力验证的结果，最终选定用间免实验中与病毒反应最好的 4-9A 为金标抗体，同时用剩下的两株单抗为检测抗体。这样做的目的在于增加捕获表位从而提高试纸条的敏感性。2、由于本实验利用的 PDCoV 的 N 蛋白为靶标抗原，N 蛋白属于核衣壳蛋白位于病毒粒子的内部。虽然病毒在增殖过程中也会有一些 N 蛋白释放但是含量有限。为使 N 蛋白充分的暴露出来，本实验在临床样品的处理上进行了一些改进。在 PBS 稀释液中加入了 1% TritonX-100 (张小荣等 2019) 并煮沸 3-5min, 12000r/min 离心取上清 (杨喆等 2008)。去污剂 TritonX-100 作用在于破坏脂质双分子层溶解细胞或病毒的膜结构，同时破坏分子间微弱的作用力，究其根本还是致力于破坏病毒粒子的膜结构。但是 N 蛋白在病毒的复制过程中会形成折叠将一些表位遮蔽，单纯的破坏膜结构不足以使其表位充分暴露，因此采取高温煮沸彻底破坏 N 蛋白的空间结构，使其线性表位充分打开。从而提升试纸条检测的敏感性。

将经过条件优化的试纸条进行敏感性、特异性、稳定性检验，最后将研制的猪 δ 冠状病毒胶体金试纸条与荧光定量 PCR 同时检测相同的猪腹泻临床样品，进行符合率分析。本研究从 N 蛋白和 PDCoV 两个方面来验证试纸条的敏感性。结果显示：将 0.8mg/mL 的 N 蛋白从 1:100 开始进行 2 倍比稀释，在稀释到 1:10000 时隐约可见微弱的检测线，因此该试纸条最低能检测到 0.8ng N 蛋白；将 TCID₅₀ 为 $10^{-3.88}/0.1\text{mL}$ (Ct 值为 19.64) 的病毒液从 1:10 开始以 2 倍比稀释，当稀释到 160 倍时仅可见微弱的检测线。因此本试纸条对该病毒的最低检测限为 $10^{1.67}$ TCID₅₀ 的病毒 (Ct 值为 29 及以下)。随后，将试制的胶体金试纸条和本实验室建立的猪腹泻 (PEDV/PDCoV/TGEV/ PoRV) 四重荧光定量分别检测 31 份临床样品。结果显示：PDCoV 阴性样品检测符合率为 100%，PDCoV 阳性样品检测符合率为 96.4%。其中四重荧光定量检测到 PDCoV 感染阳性样品 4 份，试纸条检测到 3 份 PDCoV 感染阳性样品。分析原因可能是因为，其中有一份阳性样品荧光定量检测 Ct 为 36.2 的弱阳性样品，所含病毒量较少导致试纸条检测为阴性。

本实验还存在一些可以改进的地方例如：1、在灵敏性优化中，可以选择灵敏性更高的荧光微球来代替胶体金作为标记物来进行检测，2、在符合率判定中，由于本实验收集到的临床阳性样品较少可能计算所得的符合率有所偏差。因此还需收集大量的临床样品来进行检测尤其是弱阳性的样品。进一步精确的符合率和界定最低检测临界值。

4.6 结论

- (1) 本研究以 4-9A 为金标抗体，3-6F 和 5-6E 为检测抗体建立了 PDCoV 双抗体夹心胶体金试纸条检测方法；
- (2) 试制的猪德尔塔胶体金试纸条对病毒的最低检测限为 $10^{1.67}$ TCID₅₀ 的病毒 (Ct 值为 29 及以下)。
- (3) 试制胶体金试纸条具有良好的特异性 (100%)、灵敏性 (100%) 和稳定性。该试纸条与荧光定量 PCR 阳性临床样品符合率为 96.4%，阴性临床样品符合率为 100%。

参考文献

1. 成温玉, 赵鸿远, 权群学. 猪 δ 冠状病毒病原学研究进展. 中国预防兽医学报, 2020, 42(09): 966-973.
2. 段聪, 汪霞. 猪 δ 冠状病毒蛋白功能研究进展. 中国兽医杂志. 2023, 59(05): 9599.
3. 樊淑华, 王永立. 胶体金免疫层析技术应用研究进展. 动物医学进展. 2014, 35(10): 99-103.
4. 郭俊伟. CHO 工程宿主细胞的重构. [硕士学位论文]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院图书馆, 2008.
5. 胡湘云, 潘鹏丞, 吴倍仪, 陈宝剑, 覃兆鲜, 谢炳坤. 猪德尔塔冠状病毒致病机理及防治研究进展. 中国畜牧兽医. 2022, 49(10): 3994-4003.
6. 鞠莹, 曹远银. 胶体金免疫层析快速诊断技术. 现代生物医学进展. 2009, (11): 2191-2193.
7. 焦艳, 高克谨, 朱庆宣等. 不同周龄 BALB/c 小鼠制备单抗的产量比较. 中国生物制品学杂志. 2006, (03): 271.
8. 李任峰, 卢晓辉, 姜金庆等. 猪新发冠状病毒研究进展. 畜牧兽医学报, 2020, 51(10): 2359-2366.
9. 刘文俊, 王仲兵, 郑明学等. 免疫层析快速诊断试纸条的制备及在动物疾病诊断中的应用. 畜牧兽医科技信息. 2009, (11): 8-10.
10. 李航, 戚睿斌, 陈宗艳等. 外源蛋白表达系统及其应用的研究进展. 黑龙江畜牧兽医. 2021, 7: 34-37+47.
11. 吕海峰. 犬冠状病毒 M 蛋白单克隆抗体的制备及其在胶体金检测试纸条上的应用. [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学图书馆, 2021.
12. 刘正奎. 猪病毒性腹泻疾病病原核酸检测技术的研究. [硕士学位论文]. 浙江: 浙江农林大学图书馆, 2019.
13. 李嘉琛. 猪传染性胃肠炎病毒 ELISA 抗体检测方法的建立及胶体金免疫层析试纸条的研制. [硕士学位论文]. 北京: 中国兽医药品监察所图书馆, 2018.
14. 逢凤娇, 俞正玉, 何孔旺等. 猪丁型冠状病毒重组 N 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立. 中国预防兽医学报, 2017, 39(06):461-465.

15. 钱炳旭. 猪德尔塔冠状病毒抗原及抗体检测方法的建立. [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学图书馆, 2020.
16. 苏红, 尹峥, 王理想等. 陕西某猪场猪德尔塔冠状病毒 N 基因的序列分析与原核表达. 动物医学进展. 2020, 41(11): 29-32.
17. 唐雪明, 沈微, 方惠英, 王正祥, 诸葛健. 用异丙醇沉淀法快速提取质粒 DNA. 生物学通报. 2002, 1: 55.
18. 王睿. 抗 PEDV 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立. [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院图书馆, 2018.
19. 王丽, 游丽娜, 皮婷等. 2011—2017 年 FDA 批准上市的单克隆抗体抗肿瘤药物的解析. 现代药物与临床. 2018, 33(10): 2758-2762.
20. 徐正中, 单法, 单锋丽, 孟闯等. 牛结核 γ 干扰素 ELISPOT 检测方法的建立. 生物工程学报, 2015, 31(2): 183-194.
21. 肖增鸿, 黄昭亮, 林月霞等. 腹水型单克隆抗体纯化方法的研究. 中国医药生物技术, 2013, 8 (06): 425-428.
22. 徐双媛. 新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的研制及竞争 ELISA 方法的建立和应用. [硕士学位论文]. 扬州: 扬州大学图书馆, 2023.
23. 杨瑞. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白稳转 CHO 细胞系的建立及免疫增强剂的开发. [硕士学位论文]. 浙江: 浙江理工大学图书馆, 2020.
24. 严昊, 郭旋, 冯建远等. 基于新型胶体金猪流行性腹泻病毒免疫层析试纸条研究. 饲料研究. 2022, 45(11): 61-66.
25. 杨喆, 刘红岩, 马波等. 流感裂解疫苗纯化及裂解工艺的优化. 中国生物制品学杂志, 2008, (01): 36-39.
26. 余玲玲. 猪 δ 冠状病毒 E 蛋白和 NS7 蛋白单克隆抗体的制备及初步应用. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2021.
27. 张建武, 陈燕军, 吉荣等. 犬冠状病毒分子生物学研究进展. 动物医学进展, 2004, 2: 54-57.
28. 张华韵, 蔡欢嫦, 任静强. 基于巨细胞病毒启动子的三独立表达系统载体的构建和应用. 中国兽医学报. 2023, 43: 1257-1262.

29. 张蕙畅, 方谱县, 方六荣等. 猪 δ 冠状病毒辅助蛋白研究进展. 中国动物传染病学报. 2023, 31(01):213-221.
30. 祖立闯, 王金良, 李娇等. 胶体金免疫层析技术在动物疫病诊断上的应用. 动物医学进展, 2010, 31(08): 101-105.
31. 周玉, 李岩松, 潘风光等. 小鼠腹水 IgG 类单克隆抗体纯化方法的研究. 黑龙江畜牧兽医, 2006, 10:14-16.
32. 张小荣, 钱炳旭, 吴艳涛等. 猪德尔塔冠状病毒 N 蛋白的双抗体夹心 ELISA 抗原检测试剂盒. 中国, 技术发明专利, 201910674711 .X .2019-10-22.
33. 张明明, 秦爱建, 庄骁颖, 王小辉. CAG 和 MLP 启动子控制的重组禽腺病毒构建. 畜牧与兽医. 2010, 42: 23-27.
34. 张凡, 张娟, 徐家馨, 吴玉龙, 李波清, 乔媛媛. 信号肽类型对新布尼亚病毒 SFTSV Gn 蛋白靶向表达特征影响的研究. 中国病原生物学杂志. 2023, 18: 132-135+140.
35. 张玲, 白斑综合征病毒 (WSSV) 胶体金免疫半定量快速检测试纸条的研制 与应用. [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学图书馆, 2007.
36. 张爽. 猪 δ 冠状病毒受体结合区蛋白的表达及其免疫原性分析. [硕士学位论文]. 吉林: 延边大学图书馆, 2022.
37. 张钧彦. 猪 δ 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体制备与互作蛋白初步鉴定. [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2020.
38. Arndt AL, Larson BJ, Hogue BG. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J Virol.* 2010, 84(21): 11418-28.
39. Boley P.A, Alhamo M.A., Lossie G., Yadav K.K., Vasquez-Lee M., Saif L.J., Kenney S.P. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in Poultry, United States1. *Emerg. Infect. Dis.* 2020, 26(2): 255–265.
40. Beatty J D, Beatty B G, Vlahos W G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods* 1987, 100: 173–179.
41. Bos EC, Luytjes W, van der Meulen HV, Koerten HK, Spaan WJ. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology.* 1996, 1: 218(1): 52-60.

42. Choi S, Lee C. Functional Characterization and Proteomic Analysis of Porcine Deltacoronavirus Accessory Protein NS7. *J Microbiol Biotechnol.* 2019, 28: 29(11): 1817-1829.
43. Cotton RG, Milstein C. Letter. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature.* 1973, 6: 244(5410): 42-3.
44. Caixia W, Songyin Q, Ying X, Haoyang Y, Haoxuan L, Shaoqiang W, Chunyan F, Xiangmei L. Development of a Blocking ELISA Kit for Detection of ASFV Antibody Based on a Monoclonal Antibody Against Full-Length p72. *AOAC Int.* 2022, 6: 105(5): 1428-1436.
45. Chen F, Zhu Y, Wu M, Ku X, Yao L, He Q. Full-Length Genome Characterization of Chinese Porcine Deltacoronavirus Strain CH/SXD1/2015. *Genome Announc.* 2015, 29: 3(5): 01284-15.
46. Dato ME, Kim YB. Characterization and utilization of a monoclonal antibody inhibiting porcine natural killer cell activity for isolation of natural killer and killer cells. *Immunol.* 1990, 1:144(11): 4452-62.
47. Friguet B, Djavadi-Ohanian L, Pages J, Bussard A, Goldberg M. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the beta 2-subunit of Escherichia coli tryptophan synthase. *J Immunol Methods.* 1983, 10: 60(3): 351-8.
48. Fan JH, Zuo YZ, Li JH, Pei LH. Heterogeneity in membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in China. *Virus Genes.* 2012, 45(1): 113-7.
49. Huang X, Chen J, Yao G, Guo Q, Wang J, Liu G. A TaqMan-probe-based multiplex real-time RT-qPCR for simultaneous detection of porcine enteric coronaviruses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019, 103(12): 4943-4952.
50. Hiscox J A, Wurm T, Wilson L, et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *Virol.* 2001, 75(1): 506-12.
51. Jiang X, Fuller D, Hsieh YP, Rao Q. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of porcine hemoglobin in meat products. *Food Chem.* 2018, 1: 250: 170-179.
52. Jung K, Hu H, Eyerly B, Lu Z, Chepngeno J, Saif LJ. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerg Infect Dis.* 2015, 21(4): 650-4.

53. Janetanakit T, Lumyai M, Bunpapong N, Boonyapisitsopa S, Chaiyawong S, Nonthabenjawan N, Kesdaengsakonwut S, Amonsin A. Porcine Deltacoronavirus, Thailand, 2015, *Emerg Infect Dis.* 2016, 22(4):757-9.
54. Jung K, Saif LJ, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Res.* 2020, 286: 198045.
55. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MG Recombinant protein therapeutics from CHO cells—20 years and counting. *Chem Eng Prog* 2007, 103: 40–47.
56. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol.* 2020, 85: 104502.
57. Kim O, Chae C, Kweon CH. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. *Vet Diagn Invest.* 1999, 11(5): 458-62.
58. Koczula K, Gallotta AA. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016, 60: 111–120.
59. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012, 93(3): 917-30.
60. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, He S, Zhou Z, Zhou Z, Chen Q, Yan Y, Zhang C, Shan H, Chen S. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B.* 2020, 10(7): 1228-1238.
61. Lee JH, Chung HC, Nguyen VG, Moon HJ, Kim HK, Park SJ, Lee CH, Lee GE, Park BK. Detection and Phylogenetic Analysis of Porcine Deltacoronavirus in Korean Swine Farms, 2015. *Transbound Emerg Dis.* 2016, 63(3): 248-52.
62. Li X, Chen H, Wei J, et al. The evaluation of colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) for rapid diagnosis of influenza A disease. *Clinical chemistry and laboratory medicine,* 2011, 49(9):1533-1537.
63. Loomans E E M G, Roelen A J M , Van Damme HS et al .Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay .*J Immunol Methods,* 1995, 184:207.

64. Li W, Hulswit RJG, Kenney SP, Widjaja I, Jung K, Alhamo MA, et al. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018, 115: E5135–43.
65. Li F, Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 2016, 29: 3(1): 237-261.
66. Leavy, O. The birth of monoclonal antibodies. *Nat Immunol* 17 (Suppl 1), 2016.
67. Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, Elbadry MA, Alam MM, Stephenson CJ, Bonny TS, Loeb JC, Telisma T, Chavannes S, Ostrov DA, Mavian C, Beau De Rochars VM, Salemi M, Morris JG Jr. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children. *Nature*. 2021, 600(7887): 133-137.
68. Liu DQ, Ge JW, Qiao XY, Jiang YP, Liu SM, Li YJ. High-level mucosal and systemic immune responses induced by oral administration with Lactobacillus-expressed porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) S1 region combined with Lactobacillus-expressed N protein. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012, 93(6): 2437-46.
69. Mahmoudi T, Guardia MDL, Shirde L B. Recent advancements in structural improvements of Lateral flow assays towards point-of-care testing. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, 116: 13-30.
70. Masters PS, Perlman S. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, 6th ed. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*. 2013, 825–58.
71. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*. 2020, 42(1): 3-11.
72. More-Bayona JA, Ramirez-Velasquez M, Hause B, Nelson E, Rivera-Geronimo H. First isolation and whole genome characterization of porcine deltacoronavirus from pigs in Peru. *Transbound Emerg Dis*. 2022, 69(5): 1561-e1573.
73. Marthaler D, Raymond L, Jiang Y, Collins J, Rossow K, Rovira A. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2014, 20(8):1347-50.
74. Ma L, Zeng F, Huang B, Cong F, Huang R, Ma J, Guo P. Development of a Conventional RT-PCR Assay for Rapid Detection of Porcine Deltacoronavirus with the Same Detection Limit as a SYBR Green-Based Real-Time RT-PCR Assay. *Biomed Res Int*. 2018, 6: 2018: 5035139.

75. Ma Y, Zhang Y, Liang X, Lou F, Oglesbee M, Krakowka S, Li J. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. *Mbio*. 2015, 6:00064.
76. Okda F, Lawson S, Liu X. Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 95.
77. Pan Y, Tian X, Qin P, Wang B, Zhao P, Yang YL, Wang L, Wang D, Song Y, Zhang X, Huang YW. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet. Microbiol*. 2017, 211:15–21.
78. Papageorgiou N, Lichièrè J, Baklouti A, Ferron F, Sévajol M, Canard B, Coutard B. Structural characterization of the N-terminal part of the MERS-CoV nucleocapsid by X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2016, 72(Pt 2): 192-202.
79. Qin P, Luo WT, Su Q, Zhao P, Zhang Y, Wang B, Yang YL, Huang YW. The porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 is expressed in vivo and incorporated into virions. *Virology*. 2021, 556: 1-8.
80. Reik LM, Maines SL, Ryan DE, Levin W, Bandiera S, Thomas PE. A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J Immunol Methods*. 1987, 26: 100(1-2): 123-30.
81. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Peñaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Günther S, Osterhaus AD, Drostén C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*. 2003, 30: 300(5624):1394-9.
82. Rajendra Y, Peery RB, Hougland MD, Barnard GC, Wu X, Fitchett JR, Bacica M, Demarest SJ. Transient and stable CHO expression, purification and characterization of novel hetero-dimeric bispecific IgG antibodies. *Biotechnol Prog*. 2017, 33(2): 469-477.

83. Sastre P, Dijkman R, Camuñas A, Ruiz T, Jebbink MF, van der Hoek L, Vela C, Rueda P. Differentiation between human coronaviruses NL63 and 229E using a novel double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay based on specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2011, 18(1):113-8.
84. Suzuki T, Hayakawa J, Ohashi S. Complete Genome Characterization of the Porcine Deltacoronavirus HKD/JPN/2016, Isolated in Japan, 2016. *Genome Announc*. 2017, 24: 5(34): 00795-17.
85. Su M, Li C, Guo D, Wei S, Wang X, Geng Y, Yao S, Gao J, Wang E, Zhao X, Wang Z, Stuart MC, Underwood PA, Boscatto L. A monoclonal antibody suitable for the radioimmunoassay of prolactin in human serum. *Clin Endocrinol Metab*. 1982, 54(5): 881-4.
86. Thachil A, Gerber PF, Xiao CT, Huang YW, Opriessnig T. Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies. *PLoS One*. 2015, 16:10(4): e0124363.
87. Tjio JH, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med*. 1958, 1:108(2): 259-68.
88. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol* 2018, 36: 1136–1145.
89. Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014, 20(7): 1227-30.
90. Wang L, Hayes J, Sarver C, Byrum B, Zhang Y. Porcine deltacoronavirus: histological lesions and genetic characterization. *Arch Virol*. 2016, 161(1): 171-5.
91. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010, 2: 1804–1820.
92. Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. 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 Virol*, 2012, 86: 3995-4008.
93. Wang Q, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr Opin Virol*. 2019, 34:39-49.

94. Wang J, Wen J, Li J, Yin J, Zhu Q, Wang H, Yang Y, Qin E, You B, Li W, Li X, Huang S, Yang R, Zhang X, Yang L, Zhang T, Yin Y, Cui X, Tang X, Wang L, He B, Ma L, Lei T, Zeng C, Fang J, Yu J, Wang J, Yang H, West MB, Bhatnagar A, Lu Y, Xu N, Liu S. Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin Chem.* 2003, 49(12):1989-96.
95. Wang J, Wu R, Feng L, Sun D. A recombinant nucleocapsid protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against porcine deltacoronavirus. *J Vet Med Sci.* 2016, 3: 78(4): 601-6.
96. Wang ZL, Song XH, Chen XZ, Chen GS. The research of gold immunochromatography for CPV diagnostic. *Chin J Prev Vet Med.* 2004, 26: 62-66.
97. Wang YW, Yue H, Fang W, Huang YW. Complete Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain CH/Sichuan/S27/2012 from Mainland China. *Genome Announc.* 2015, 3(5): 00945-15.
98. Xu Z, Zhong H, Zhou Q, Du Y, Chen L, Zhang Y, Xue C, Cao Y. A Highly Pathogenic Strain of Porcine Deltacoronavirus Caused Watery Diarrhea in Newborn Piglets. *Virol Sin.* 2018, 33(2): 131-141.
99. Yang S, Yang J, Zhang G, Wang X, Qiao S, Zhao D, Zhi Y, Li X, Xing G, Luo J. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O-ScienceDirect. *Virol. Methods.* 2010, 165: 139–144.
100. Yang D, Su M, Li C, Zhang B, Qi S, Sun D, Yin B. Isolation and characterization of a variant subgroup GII-a porcine epidemic diarrhea virus strain in China. *Microb Pathog.* 2020, 140.
101. Yuan D, Yan Z, Li M, Wang Y, Su M, Sun D. Isolation and characterization of a porcine transmissible gastroenteritis coronavirus in northeast China. *Front. Vet. Sci.* 2021, 8 .
102. Zhang M, Li W, Zhou P, Liu D, Luo R, Jongkaewwattana A, He Q. Genetic manipulation of porcine deltacoronavirus reveals insights into NS6 and NS7 functions: a novel strategy for vaccine design. *Emerg Microbes Infect.* 2019, 20: 9(1): 20-31.
103. Zhang Q, Yoo D. Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Res.* 2016, 2: 226: 128-141.

104. Zhang Z, Chen J, Shi H, Chen X, Shi D, Feng L, Yang B. Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Virology* . 2012, 1: 9: 225.