



西北农林科技大学

硕士学位论文

抗猪传染性胃肠炎病毒流行毒株鹤鹑
卵黄抗体的研制

专业学位类型 兽医硕士

领域名称 兽 医

论文作者 孙 颖

指导教师 郭抗抗

论文提交时间 2021年5月

Thesis Submitted to Northwest A & F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Veterinary Medicine

Development of Quail Egg Yolk Antibody
Against Transmissible Gastroenteritis Virus
Prevalent Strains

Field: Veterinary Medicine

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Candidate: Ying Sun

Supervisor: Kang-Kang Guo

Date of submission: May 2021

College of Veterinary Medicine
Northwest A & F University

分类号：S855.3

学校代码：10712

U D C：591.2

研究生学号：2018055280

密 级：公开

西北农林科技大学硕士学位论文

抗猪传染性胃肠炎病毒流行毒株鹤鹑 卵黄抗体的研制

论文作者：孙 颖

指导教师：郭抗抗

答辩委员会：

西北农林科技大学动物医学院 赵光辉 教授

中国动物卫生与流行病学中心 郑增忍 研究员

西北大学生命科学学院 刘建玲 教授

西北农林科技大学动物医学院 林 青 教授

西北农林科技大学动物医学院 王承宝 副教授

西北农林科技大学动物医学院 姜艳芬 副教授（秘书）

答辩日期：2021年5月27日

本研究得到
杨凌示范区科技计划项目（编号：2018NY-22）
资助

This work was supported by a grant from
the Program of Science and Technology of YangLing
demonstration zone (No. 2018NY-22)

研究生学位论文的独创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究结果；论文中的研究数据及结果的获得完全符合学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，如果违反此规定，一切后果与法律责任均由本人承担。

尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究结果，也不包含其他人和自己本人已获得西北农林科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已在论文的致谢中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 孙颖

时间： 2021 年 6 月 2 日

导师指导研究生学位论文的承诺

本人承诺：我的研究生 孙颖 所呈交的学位论文是在我指导下独立开展研究工作及取得的研究结果，属于我现岗职务工作的结果，并严格按照学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》而获得的研究结果。如果违反学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，我愿接受按学校有关规定的处罚处理并承担相应导师连带责任。

导师签名： 郭抗抗

时间： 2021 年 6 月 2 日

摘 要

猪传染性胃肠炎 (Transmissible gastroenteritis, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 引起的一种急性、接触性传染病。TGEV 对仔猪的危害尤为严重, 导致小肠黏膜上皮细胞发生变性、坏死, 造成水和电解质代谢紊乱、营养吸收障碍, 引起仔猪严重腹泻、脱水和营养流失, 患猪死亡率极高。疫苗免疫接种是目前防控 TGE 的主要手段, 通过对怀孕母猪进行免疫接种, 初生仔猪吮吸初乳而获得被动保护, 但在生产中的实际效果并不十分理想; 加上毒株的不断变异, 造成疫苗免疫抗体不能给仔猪提供完全的免疫保护等, 生产中对 TGE 的防控变得更加困难, 使得本病在一些地区的猪场呈现暴发, 造成的损失巨大。对 TGE 的防控实践中, 通过注射或服用抗 TGEV 特异性抗体, 获得了较好效果, 其中卵黄抗体 (Immunoglobulin of yolk, IgY) 是一种重要的抗体产品。IgY 具有来源方便、制备较为简单、价格相对低廉和效果良好的优点, 在动物疫病防治中得到广泛使用。

本研究对 TGEV 分离株进行增殖后制备灭活疫苗, 免疫产蛋鹌鹑, 提取抗 TGEV IgY, 通过对获得的特异性 IgY 的抗 TGEV 作用、特异性效价、稳定性等进行研究, 获得了一种抗 TGEV 流行毒株的鹌鹑源卵黄抗体, 为进一步临床应用提供了基础材料。本研究获得了以下结果:

1. TGEV 分离株在 PK-15 细胞中 24 h 病毒滴度最高。将 TGEV 分离株接种 PK-15 细胞, 测定接毒后 96 h 内 TGEV 增殖曲线。结果显示, 细胞在接毒后 16 h 出现典型细胞病变作用 (Cytopathic effect, CPE), 24 h 病毒滴度达到峰值 (TCID₅₀ 为 10^{-7.3}/mL), 能满足制备疫苗的需要。

2. TGEV 分离株属流行毒株。克隆获得了 TGEV 分离株的 N 和 S 基因并进行序列分析, 结果显示 TGEV 分离株属于 Purdue like group 分支, 与国内雅安和哈尔滨的分离株 SY-C 和 HE-1 株亲缘关系最近, 属于流行毒株。

3. 建立了 TGEV 抗体间接 ELISA 检测方法。TGEV S 蛋白 C 抗原位点蛋白最佳包被浓度 1.5 μg/mL, 样品最佳稀释度 1:200, 酶标抗体稀释度 1:2000, 孵育时间为 20 min。当 OD₄₅₀ 值 ≥ 0.15 时, 判定结果为阳性。

4. 制备灭活免疫原接种鹌鹑获得高免蛋。制备了弗氏佐剂 TGEV 油包水型灭活苗。接种 80 只产蛋鹌鹑, 收集血清及高免蛋。利用 SDS-PAGE 电泳分离抗体蛋白, 结果显示 IgY 重链约为 70 kDa, 轻链约为 28 kDa。分离纯化了特异性的抗 TGEV 流行毒株 IgY。

5. 获得了纯度及效价高、制备简单、适于大量生产的抗 TGEV 流行毒株鹌鹑 IgY。检测 TGEV IgY 的效价及特异性, 结果显示第 3 次免疫后 1 周, 抗体水平达到峰值 (OD₄₅₀

为 2.219)。商品苗对照组抗体的消长趋势与试验组一致，至免疫后第 7 周达到峰值（OD₄₅₀ 为 2.100）。说明制备的 TGEV 流行毒株灭活疫苗具有良好的免疫原性。IgY 中和效价为 1:109，比血清 IgG 抗体效价峰值（1:120）的出现滞后 5~7 d。Western blot 阳性条带的最大抗体稀释度为 1:16000。IgY 在 70℃ 下及 pH 位于 4.0~10.0 区间时效价稳定；IgY 在 6 h 内对胃蛋白酶具有一定抵抗力。

关键词：猪传染性胃肠炎病毒；鹌鹑；卵黄抗体；中和抗体；抗体检测

ABSTRACT

Transmissible gastroenteritis (TGE) is an acute and contact infectious disease caused by transmissible gastroenteritis virus (TGEV). TGEV is especially harmful to piglets, which leads to degeneration and necrosis of intestinal mucosa epithelial cells, disorder of water and electrolyte metabolism and dystrophic absorption, serious diarrhea, dehydration and nutrition loss, and high mortality rate of piglets. Vaccination is the main means to prevent tge. Through the immunization of pregnant sows, the primary piglets suck colostrum and get passive protection, but the actual effect in production is not very ideal; With the continuous variation of the virus, the vaccine immune antibody can not provide complete immune protection for piglets, so it is more difficult to prevent and control tge in production, which makes the disease outbreak in some areas of pig farms, resulting in a huge loss. In the practice of tge prevention and control, the effect of anti TGEV specific antibody was obtained by injection or administration. Among them, the yolk antibody (IgY) is an important antibody product. IgY has the advantages of convenient source, simple preparation, relatively low price and good effect, and has been widely used in animal epidemic control.

In this study, the inactivated vaccine was prepared after the proliferation of TGEV epidemic strain. Egg producing quail was immunized and anti TGEV IgY was extracted. By studying the anti TGEV effect, specific titer and stability of the specific IgY, a quail derived yolk anti TGEV was obtained, which provided the basic material for further clinical application. The results of this study are as follows:

1. The TGEV strain had the highest viral titer at 24 h in PK-15 cells. The proliferation curve of TGEV was measured within 96 h after the virus was inoculated with PK-15 cells. The results showed that the cytopathic effect (CPE) appeared 16 h after the virus was exposed, and reached the peak of virus titer ($TCID_{50}=10^{-7.3}/ml$) 24 h after the virus was received, which could meet the needs of vaccine preparation.

2. TGEV isolate is a popular strain. The N and S gene sequences of TGEV isolate were obtained and analyzed. The results showed that TGEV isolate belonged to purgue like group branch, and was the most popular strain with the strains SY-C and HE-1 in Ya'an and Harbin.

3. The indirect ELISA method of TGEV antibody was established. The best concentration of TGEV S protein C anti-situ point protein is 1.5 $\mu g/mL$. The best dilution of the sample was 1:200, the dilution of enzyme antibody was 1:2000, and the incubation time

was 20 min. When $OD_{450} \geq 0.15$, the result is positive.

4. Prepare inactivated immunogen to inoculate quail to obtain high immunity egg. The inactivated seedling of TGEV oil in water was prepared. 80 egg producing quails were inoculated and serum and high immunity eggs were collected. The results showed that the heavy chain of IgY was about 70 kDa and the light chain was 28 kDa. The specific anti TGEV strain IgY was isolated and purified.

5. The anti TGEV epidemic strain, quail IgY, which has high purity and high potency, simple preparation and suitable for mass production, was obtained. The titer and specificity of TGEV IgY were detected. The results showed that the antibody level reached the peak value (OD_{450} was 2.219) 1 week after the third immunization. The trend of antibody growth in the control group of commercial vaccine was consistent with that of the experimental group, and reached the peak at the seventh week after immunization (OD_{450} was 2.100). It is suggested that the inactivated vaccine of TGEV epidemic strain has good immunogenicity. The neutralization titer of IgY was 1:109, which was 5-7 days later than the peak value of IgG antibody (1:120). The maximum antibody dilution of Western blot positive bands was 1:16000. IgY was stable at 70°C and pH was 4.0-10.0; IgY had a certain resistance to pepsin within 6 hours.

KEY WORDS: Transmissible gastroenteritis virus; Quail; Egg yolk antibody; Neutralizing antibody; Antibody detection

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
目 录.....	V
第一章 猪传染性胃肠炎防控及卵黄抗体研究进展.....	1
1.1 猪传染性胃肠炎的研究概况.....	1
1.1.1 猪传染性胃肠炎及猪传染性胃肠炎病毒.....	1
1.1.2 传染性胃肠炎的流行病学.....	3
1.1.3 猪传染性胃肠炎的防控.....	4
1.2 卵黄抗体及其应用.....	5
1.2.1 卵黄抗体的结构和功能.....	6
1.2.2 卵黄抗体的提取方法.....	7
1.2.3 卵黄抗体的应用.....	8
1.2.4 鹌鹑用于生产卵黄抗体的可行性.....	11
1.3 研究的目的与意义.....	12
第二章 猪传染性胃肠炎病毒分离株的分析及抗体检测 ELISA 方法的建立.....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 细胞、病毒.....	13
2.1.2 主要试剂.....	13
2.1.3 主要仪器设备.....	14
2.2 方法.....	14
2.2.1 TGEV 分离株生长曲线和病毒滴度测定.....	14
2.2.2 TGEV 分离株遗传变异分析.....	17
2.2.3 TGEV 抗体检测 ELISA 方法的建立.....	18
2.3 结果.....	21
2.3.1 TGEV 分离株的鉴定与滴度测定.....	21
2.3.2 TGEV 分离株的基因变异分析.....	24
2.3.3 建立 TGEV 抗体检测 ELISA 方法.....	29
2.4 讨论.....	33

2.5 小结.....	34
第三章 抗猪传染性胃肠炎病毒流行毒株鹤鹑源卵黄抗体的制备.....	36
3.1 材料.....	37
3.1.1 细胞、病毒和动物.....	37
3.1.2 主要试剂.....	37
3.1.3 主要仪器设备.....	37
3.2 方法.....	38
3.2.1 猪传染性胃肠炎病毒流行毒株灭活疫苗的制备及检验.....	38
3.2.2 产蛋鹤鹑免疫及高免蛋黄的初步收集.....	39
3.2.3 卵黄抗体的提取及纯化.....	40
3.2.4 卵黄抗体的理化特性及纯度检验.....	40
3.2.5 抗猪传染性胃肠炎卵黄抗体的效价测定.....	41
3.3 结果.....	43
3.3.1 TGEV 分离株灭活疫苗检验.....	43
3.3.2 卵黄抗体提取方法的优化.....	43
3.3.3 卵黄抗体抗 TGEV 效价的检测.....	45
3.3.4 卵黄抗体对 TGEV 的中和效价.....	47
3.3.5 卵黄抗体的理化特性及安全性检验.....	48
3.4 讨论.....	49
3.5 小结.....	50
结 论.....	51
参考文献.....	52
缩略词及中英文对照表.....	58
致 谢.....	60
个人简历.....	61

文献综述

第一章 猪传染性胃肠炎防控及卵黄抗体研究进展

由多种因素引起的腹泻是影响养猪业的重要问题，特别是对哺乳仔猪的危害更为严重，往往呈现高发病率和死亡率，即使存活下来的患猪常会出现生长迟缓、生产性能降低的问题(Katsuda et al. 2006)。病原性腹泻，特别是病毒感染导致的腹泻，由于发病急、死亡率高，更是受到广泛关注，常见的引起仔猪腹泻的病毒主要有猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪轮状病毒(Porcine rotavirus, PRoV)、猪传染性肠胃炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪德尔塔冠状病毒(Porcine delta coronavirus, PDCoV)等。TGEV可导致仔猪严重腹泻、呕吐和脱水，2周龄以内的发病仔猪死亡率可达到100%(Lu et al. 2018)。耐过6~8 d以上的仔猪一般不出现死亡，但通常导致发育不良，这些临床康复猪还可向外界持续排毒，并会持续数周，排出的病原污染环境或传播给其他猪，造成疾病的流行，应引起高度关注(Lawhorn 1999)。历史上，TGE的发生和流行给养猪业造成重大损失，截至目前也没有防治TGE特效药物，疫苗免疫接种是防控本病的基本策略。通过给怀孕母猪接种疫苗，产生保护性抗体后，初生仔猪从初乳中获得免疫抗体而抵抗TGEV的感染，但是这种作用并不能完全阻止病毒的感染和疾病的发生，加之TGEV感染后的肠道损伤严重，感染猪的发病和死亡率依然很高；另外，由于TGEV野毒株的变异，也降低了疫苗免疫抗体的保护作用。单一的依靠疫苗免疫来防控仔猪腹泻并不理想，需要采取综合防控措施来保护仔猪健康，特异性卵黄抗体是近些年来在防控仔猪病毒性腹泻实践中表现优秀的一种产品，具有显著的优势和良好效果。卵黄抗体(Egg yolk antibody, IgY)是从特定疫苗免疫禽蛋中提取的特异性抗体，用于特定疾病的治疗和预防，因具有制备简单、价格相对低廉、可大量生产等优势，广泛用于免疫诊断、免疫治疗、毒素中和、疫病防治，并作为功能性食品应用等。应用抗TGEV流行毒株的卵黄抗体防治TGE的发生成为一种具有良好前景的方法。

1.1 猪传染性胃肠炎的研究概况

1.1.1 猪传染性胃肠炎及猪传染性胃肠炎病毒

1933年冬，一种诱发仔猪致命的胃肠炎疫情在美国伊利诺伊州流行并引起高度关注，但对其病因却不甚明了。直到1946年，HuChings和Dayle等通过研究才确认引起

这场疫情的原因是一种病毒的感染，并将其命名为猪传染性胃肠炎病毒（Transmissible gastroenteritis virus, TGEV），引起的疾病称为猪传染性胃肠炎（Transmissible gastroenteritis, TGE），并成功通过细胞培养分离到了 TGE 病毒株(Doyle et al. 1946)。TGEV 可引起仔猪肠黏膜上皮细胞发生变性、坏死，造成小肠水、电解质代谢紊乱，营养吸收障碍，从而引起仔猪腹泻、脱水、营养流失，甚至死亡(马雪连 2020)。TGE 呈世界性流行，如比利时(Enjuanes et al. 1992)、英格兰(Pritchard et al. 1999)、法国(Rasschaert et al. 1990)、德国(Hess et al. 1980)和西班牙(Cubero et al. 1993)、日本(Takahashi et al. 1983)、南非(Williams et al. 1994)、乌干达(Thorsten Muley 2012)、巴西(Martins et al. 2013)等都有本病的报道。TGE 先后在我国多个地区流行，危害极为严重，直到 1975 年才分离到国内首个 TGEV 流行毒株(陈家庆等 1978)。世界动物卫生组织（World Organization for Animal Health; Office international des epizooties, OIE）将 TGE 列为必须报告的动物疫病之一。

TGEV 在分类学上属于冠状病毒科（*Coronaviridae*）、 α 冠状病毒属（*Coronacirus*）成员(Li W et al. 2018)。感染猪的发病和严重程度与猪的发育阶段关系密切，15 日龄以内的仔猪感染后的死亡率可达 100%(Lau SK et al. 2013)，死亡率随着感染猪日龄增长而逐渐递减，成年猪感染后极少有死亡(Li et al. 2018)。TGE 病毒粒子有囊膜，基因组为长度约为 28.6 kb 的单链正向 RNA，5'端具有帽子结构、3'端具有多聚腺苷酸化形成的尾巴结构(Lu et al. 2017)。基因组包括至少 9 个开放阅读框（Open reading frame, ORF），包括位于基因组 5'端三分之二位置的两个大 ORFs（ORF1a 和 ORF1b），负责编码病毒复制酶，余下三分之一的基因分别编码四种结构蛋白（S、M、N 和 E 蛋白）和三种辅助蛋白（3a、3b 和 7 蛋白）(Li et al. 2018)。在电子显微镜下，TGE 病毒粒子呈现出多种形态，病毒粒子直径为 60~160 nm；可见到病毒粒子外部的多形性囊膜（圆形、椭圆形或多边形），呈双层膜结构，膜上覆有长约 12~24 nm 的梨形或发散花瓣状的纤突；纤突通过其微小的柄连接囊膜的表面，向四周放射，呈现出典型的“皇冠”结构。但是在实际操作过程中，由于在电镜制片时 TGEV 的纤突易脱落，因此电镜观察病毒粒子结构时常常只可观察到 TGEV 囊膜的边界，但很难观察到纤突或只能在部分位置看到极少量纤突结构。

TGEV 对热较为敏感、-80℃下稳定并能长期存活。低温保存于肠组织中，TGE 病毒滴度在半年内不出现明显降低；粪便中的病毒在 4℃ 下存放 60 d 仍具有感染性。在 56℃、45 min 或 65℃、10 min 条件下，会使 TGEV 失去感染性 (Zhang et al. 2013)。TGEV 主要侵害肠道黏膜上皮组织，造成肠绒毛损害，一般可在患病仔猪的胃内见到未消化的凝乳块，小肠特别是空肠肠壁变薄、呈透明状、肠内充盈黄色的液体。组织病理学观察可见空肠和回肠绒毛萎缩、脱落，小肠绒毛上皮细胞出现不同程度的变性、坏死，但其他脏器并不出现明显的病理变化(马德英 2013)。TGEV 感染的耐过猪，即

使侥幸存活也会存在饲料转化率降低、抵抗力下降等问题,容易发生继发感染(Zheng et al. 2013)。

TGEV 代表毒株主要有英国分离株 FS772/70、日本分离株 TO14、韩国代表毒株 HK12,国内主要有灭活疫苗株 TB 华毒株、TH98 毒株及弱毒疫苗株 H165(Huang et al. 2013)。TGEV 主要分为两个大群:一是与 Purdue 毒株相类似,称 Purdue like group,另一个与 Miller 毒株相类似,称 Miller like group。中国经典疫苗毒株 H165 及其祖代强毒株 H16 的全基因组及各个结构基因和非结构基因均处在 Miller like group 分支中,属 Miller 样毒株。

1.1.2 传染性胃肠炎的流行病学

猪是 TGEV 的唯一自然宿主,各种年龄和品种的猪对 TGEV 均易感,感染猪发病与年龄关系密切,以哺乳仔猪症状最为严重,表现高发病率和高死亡率。出生不到 20 h 的仔猪如果感染 TGEV,引发胃肠炎症状后大约可存活 1~4 d。患病动物可通过乳汁、排泄物、体液等排出病毒而污染周围环境,在感染猪体内以肠系膜淋巴结和空肠及回肠黏膜中的含毒量最高(Guo et al. 2020)。TGE 患猪是主要传染源,TGEV 通过粪一口途径在猪群间传播,临床康复的 TGE 患猪会携带病毒、一些 TGEV 携带动物也是重要传染源;TGEV 也可由母猪的乳汁及呼吸道进行携带和传播(姚金水 2020);发病猪场的用具、污染的猪舍也会成为病毒传播的载体。马、羊、牛、鸡、兔和人等均不感染 TGEV,小鼠、仓鼠、豚鼠、犬、猫和狐狸等可携带 TGEV 但不致病,成为 TGEV 重要的病原携带者(Zhang et al. 2019)。

自然情况下,TGE 呈季节性暴发,呈现地方性流行和季节性流行。在初春和冬季(温度较低时)多发,1~2 月为发病高峰期(杨学贵 2015)。随着气温逐渐升高,发病率也下降。季节性流行与 TGEV 对热的敏感性、对寒冷环境有很强抵抗,并存活较长时间的特性相关。TGE 发病周期较短,在猪群内可导致快速传播,冬季传播速度更快,感染很快波及至全群,对新生仔猪的危害尤为严重,常常表现为极高的死亡率(Cheng et al. 2020)。哺乳仔猪感染后会相继出现厌食、呕吐、水样腹泻及脱水等一系列临床症状,严重时 15 日龄以下的仔猪出现 100%的死亡。成年患猪的死亡率较低,临床症状较轻,一般不引起死亡。哺乳母猪感染 TGEV 后轻者仅表现厌食、重者会出现泌乳缺乏甚至断乳(Ding et al. 2017),造成由于缺少母乳而导致的发病哺乳仔猪死亡率升高。

近些年来,随着生猪养殖规模化程度的提高、饲养管理的加强、疫苗免疫措施的普遍采用,TGE 在猪场出现大规模暴发的情况已很少见,但在一些地区和猪场仍有发生,甚至出现地方流行。Anna Valkó 等对匈牙利猪场的 908 份血清进行 TGEV 血清抗体检测,阳性率为 17.82%,而 TGEV 的变异株猪呼吸道冠状病毒(Porcine respiratory coronavirus, PRCV)检测几乎全为阳性(Anna Valkó et al. 2019)。TGE 的地方性流行多

见于发生过本病的疫区，存在有患病猪或环境中持续存在病毒。在生产中经常会见到 TGEV 与其他病原混合感染的现象，主要病原有猪流行性腹泻病毒（PEDV）、猪轮状病毒（PRoV）、大肠埃希菌（*Escherichia coli*, E.coil）、沙门菌等（*Salmonella*），在制定防控措施时应引起关注。

1.1.3 猪传染性胃肠炎的防控

目前还没有防治 TGEV 感染的特效药物，由于本病侵害仔猪发病急、病理损害严重，往往造成来不及治疗而大量死亡的现象。对母猪进行疫苗免疫接种是防控 TGE 的主要措施，另外良好的生物安全措施也是共同保障。

1.1.3.1 做好免疫预防

除坚持自繁自养、培育健康猪群，加强消毒管理、控制环境卫生，饲喂优质饲料、提升抗病体质等基础的生物安全措施之外，免疫接种是防控 TGE 的良好措施。对怀孕待产母猪进行免疫接种，一般在产前 20~30 d 通过肌肉注射或鼻内接种 TGEV 弱毒冻干疫苗，初生仔猪食用母乳而获得母源抗体的保护。一些研究表明，对发病猪可采用干扰素配合抗病毒制剂也有较好效果，如肌肉注射黄芪多糖(路秀梅 2018)，通过在饮水中加入口服补液盐防止脱水和酸中毒，添加维生素以防止细菌继发感染。制备疫苗的 TGEV 毒株是在原代胎猪肾细胞上经 165 次传代致弱，其间又经过 5 次克隆纯化筛选获得，该毒株生产的弱毒疫苗可通过口鼻黏膜和肌肉注射途径免疫接种。国外也培育了多个弱毒疫苗株，如德国的 BI-30 疫苗株、美国 TGE-Vac 株、匈牙利的 CKP 株、日本的 T0163 株等(Saif and Bohl, 1983)，欧美较多使用 TGEV 弱毒疫苗。弱毒苗存在毒力返强的可能性，安全性相对较低，但可以快速产生抗体且持续时间长，在生产中被广泛用于加强免疫。贾华强分离到 TGEV TB 强毒株，用低代次毒的细胞培养物经甲醛灭活后，制备了油包水乳化苗和氢氧化铝吸附苗，获得 80% 以上的保护率(Wang et al. 2016)。灭活苗使用相对安全，但对肠黏膜表层下的 IgA 浆膜细胞刺激较小，肠道局部产生 IgA 水平较低，在主动免疫的效果上不是很理想；另外，免疫接种灭活疫苗需要较长时间才能产生免疫抗体，通常被用于首次免疫。在腹泻暴发期，用活疫苗紧急免疫接种可产生较好的效果。有研究发现，在 TGE 流行期紧急肌肉接种鸡新城疫 I 系苗后同样能起到较好的作用(张海玲 2016)。原理是鸡新城疫 I 系苗可诱发机体产生干扰素，影响病毒复制合成，而发挥抗病毒的作用。

除灭活苗和弱毒苗外，新疫苗的研究也呈现良好前景，如基因工程疫苗(Gómez et al. 2000)、活载体疫苗(Curtis et al. 2002)、核酸疫苗(Di-Qiu et al. 2011)及纳米抗体(Nikaeen et al. 2020)等，由于成本及技术上的难度等原因，尚未有商品化产品上市。

1.1.3.2 加强饲养管理

生猪养殖场按照“全进全出”的原则进行生产，有条件的繁育场坚持“自繁自养”的生

产模式，尽量减少引入猪外来进场。如果必须从外引入猪，需要经过隔离两周观察，确定健康无疫病的猪才能进场混群饲养。对于进出场及引进猪进行严格检疫，对重大传染病进行重点监测。坚持对圈舍、活动场地、周围环境、用具等经常性清扫和消毒。对产房区域要格外注重消毒清洁。严禁外来无关人员进入养殖场地，注意防止流浪猫、流浪狗等野外动物进入养殖区(阚中岩 2019)。在日常的饲养管理过程中保障饲料营养全价，供应充足，提升猪抵抗能力。发现有异常情况要先行隔离处理，及时诊断和处置。TGE 多发生在寒冷的季节，在做好圈舍的通风同时，还要注意保证舍内温度、空气湿度，保证空气流通，提高空气质量，避免或减少各种应激因素对猪健康的影响，减少发病。必要时可采取全封闭式保育舍设计，以确保仔猪安全度过断奶期。

TGE 主要经消化道传播，除做好猪场环境卫生外还应注意母猪局部卫生清洁。采用定时定量式饲喂，不建议自由采食（防止粪便污染）。舍内环境每天带猪消毒一次，消毒剂可选择稀碘溶液、过硫酸氢钾溶液、戊二醛癸甲溴铵溶液等，以雾化消毒为主，产床、仔猪恒温箱是重点区域。产后用温 0.1% KMnO_4 水对母猪乳房进行清洗，尤其是靠近乳头部位的粪污、泥土等要清洗干净，之后再让仔猪吮乳。产床要经常清洗，尤其是漏粪板表面残留的粪污，一定要保持干净(李庆勇 2021)。

1.1.3.3 选择药物进行治疗

由于对 TGEV 没有特效的药物，对症治疗对减少患猪的伤亡和严重程度有一定的作用。一旦发生疫情，立即对病猪进行隔离、采取对症治疗。可采用“清、泻、消”三步法进行，即清理患猪肠和胃的内容物、洗胃健胃、同时辅助消炎止痛。通常消炎止痛药的给药途径选用肌肉注射，常用青霉素结合庆大霉素消炎止痛。治疗过程中病猪应禁食或者少食，仅供给少量的容易消化吸收的饲料或只提供充足的洁净饮水。对腹泻猪补充体液非常重要，可以通过腹腔注射补液盐，患猪能饮水时可在饲水中添加 0.5% 食盐和 5% 的白糖让其自由饮用。有研究报道，用中药合剂防治 TGE 也有良好表现，如白头翁、金银花、天冬各 100 g，连翘、龙胆草、大黄、豆根、苦刺尖各 50 g，苦参 25 g，加水煎服，用量 1 剂/d，连续服用 3 d(章德正 2020)。

卵黄免疫球蛋白是禽类经特异性抗原刺激后，B 淋巴细胞产生，血液流经卵巢时富集在卵黄中的特异性抗体。用卵黄免疫球蛋白治疗动物肠道疾病，获得有效的被动免疫效果具有十分广阔的应用前景。在 TGE 防治过程中，通过口服或注射给与特异性卵黄抗体能够产生良好的效果，因而使得利用特异性卵黄抗体防治 TGE 成为一个新的方向，也为该病防治带来新的希望。

1.2 卵黄抗体及其应用

动物机体在受到外界抗原物质刺激后，B 淋巴细胞转化为浆细胞而分泌的存在于

人和动物血液、组织液及其他外分泌液中的一类物质,即为免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)。依据化学结构和抗原性的差异, Ig 可分为 5 大类,即 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD。受胸腺和法氏囊的控制,禽类免疫系统包括细胞免疫和体液免疫,血液中主要含有 IgA、IgG、IgM 的 3 种免疫球蛋白。1934 年, Juke 证实禽类浆细胞分泌特异性抗体进入血液循环后,流经卵巢时在卵细胞中逐渐蓄积,形成的免疫球蛋白称为 IgY(贺维朝等 2021)。IgY 在禽胚孵化过程中逐渐进入禽胚血液,为刚出壳的幼雏提供被动免疫保护的母源抗体,使不受外界环境特定病原微生物的侵害。与哺乳动物血清免疫球蛋白 IgG 相比, IgY 在生产率、特异性方面具有显著的优势。

1.2.1 卵黄抗体的结构和功能

虽然 IgY 类似于存在于卵黄中的 IgG,但 IgY 的结构和生物特性与哺乳动物 IgG 存在一些不同。Clem 和 Leslie 提出将禽类卵黄中的免疫球蛋白(IgG)称为 IgY(Thirumalai et al. 2019)。IgY 分子量略大于哺乳动物 IgG,由 4 条肽链组成,包括 2 条分子量约为 67~70 kDa 的重链(Heavy chain, H)和 2 条分子量约为 22~30 kDa 的轻链(Light chain, L),链间二硫键连接这 4 条肽链,使整个分子单体呈现 Y 形(图 1-1)。IgY 的 H 链没有铰链区,由四个恒定区组成,IgY 的 CH3 和 CH4 结构域与 IgG 的 CH2 和 CH3 结构域密切相关(Warr et al. 1995)。卵黄抗体的等电点(pH5.7~7.6)低于哺乳动物抗体(pH6.1 和 pH8.5)(Dávalos-Pantoja et al. 2000)。IgY 不与葡萄球菌蛋白 A、链球菌蛋白 G 或类风湿因子反应(Kronvall et al. 1974),因此在免疫测定中,IgY 避免了与类风湿因子相互作用而导致假阳性结果的发生。IgY 对哺乳动物 IgG 不产生干扰作用,并且不激活哺乳动物补体。理论上,含有 IgG 的免疫复合物可能与哺乳动物胃肠道中的 Fc 和补体受体相互作用,但含有 IgY 的免疫复合物不能激活哺乳动物的补体系统,也不能与哺乳动物 Fc 和补体受体相互作用。因此 IgY 更加适合于口服免疫治疗(Carlander et al. 2000)。

2014 年, Grover 等报道了一种人支原体跨膜蛋白,该蛋白不仅可与所有类型的哺乳动物 IgG、IgA、IgD 和 IgM 结合(Thirumalai et al. 2019),也可以捕获禽类 IgY。禽类 IgY 和哺乳动物 IgG 之间的这种相似性是由于常规免疫球蛋白结合蛋白(IBPs)和该支原体蛋白之间存在差异;后者识别 Fab 区,而前者通过 Fc 结合域捕获抗体(Grover et al. 2014)。近年来,研究人员对蛋白质进行糖基化修饰,以改善其功能特性(如热稳定性、溶解度等)。参照这一方法研究了糖基化对 IgY 理化性质和功能的影响,研究数据表明,还原糖诱导的糖基化显著影响了 IgY 的结构和抗原结合能力,这可能会降低 IgY 在应用中的效用(Sheng et al. 2018)。

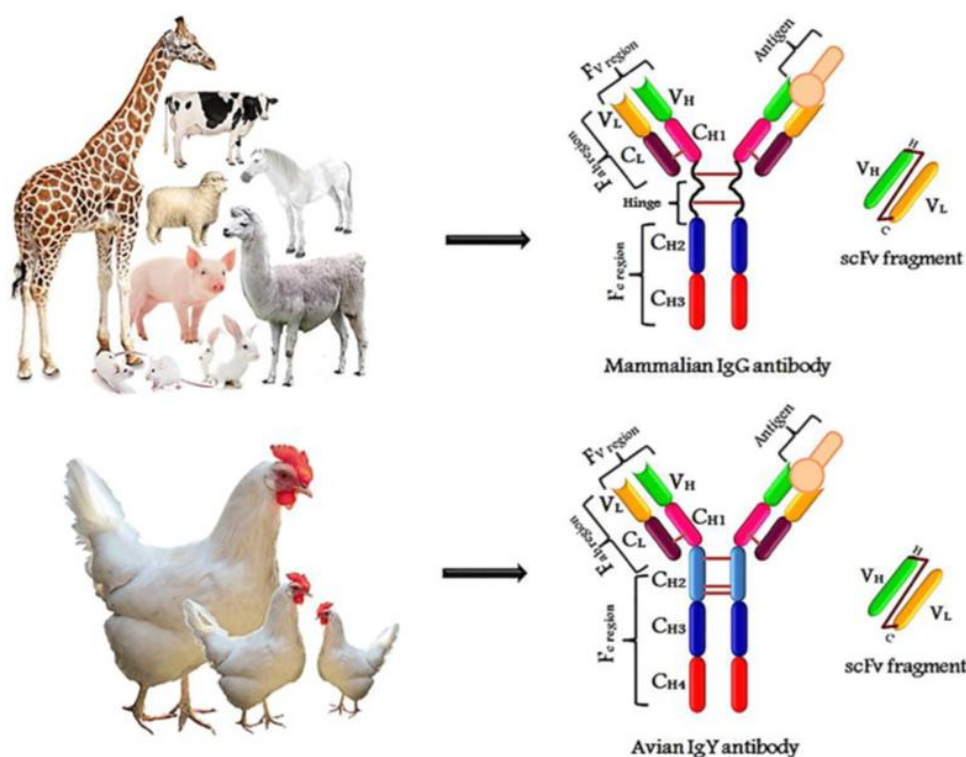


图 1-1 哺乳动物抗体(IgG)和卵黄抗体(IgY)结构比较(Rajeswari et al. 2020)

Fig.1-1 Structural comparison of mammalian antibody (IgG) and chicken egg yolk antibody (IgY) (Rajeswari et al. 2020)

1.2.2 卵黄抗体的提取和制备方法

有多种从蛋黄中提取 IgY 的方法，根据技术原理大体上可分为沉淀技术、除脂技术、色谱技术和超滤技术等 4 类(Tong et al. 2015)。每种方法提取 IgY 的产量、纯度、稳定性和活性都有所不同。在实践中，一个具体的分离纯化方法的选择通常要从含量、纯度、用途、成本和实验室条件等因素综合考虑，选择哪种纯化方法主要取决于 IgY 抗体的具体应用(Pauly et al. 2011)。

1.2.2.1 水稀释法

分离卵黄液中亲水性和疏水性部分。常用的有冷蒸馏水及去离子水，也可用弱酸性溶液，如柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、乙酸-乙酸钠缓冲液等。pH 值、温度、离子种类和浓度是影响水稀释法提取 IgY 的除脂效果的主要因素。水稀释法成本最低，化学试剂使用少，抗体回收率较高，绿色环保。

1.2.2.2 有机溶剂沉淀法

有机溶剂（如氯仿、乙醚等脂溶剂）可通过降低溶液的电解常数，增加蛋白质之间的引力，使溶解度下降；破坏蛋白质表面水膜而使蛋白质沉淀。有机溶剂易蒸发除

去，不残留；有机溶剂与沉淀物密度相差大，利于过滤或离心。但该方法全程须保持低温操作并不断搅拌（避免局部有机溶剂浓度过高或升温过大造成敏感型蛋白质失活）；有机溶剂使用后无法回收循环使用，导致大规模生产成本上升。

1.2.2.3 超滤法

超滤法是基于一种内含多孔纤维超滤膜的过滤装置。可常温操作，依靠一定的压力和流量及膜两侧的压力差，选择合适孔径的半透膜使溶剂和其他分子物质（小于 100 kDa）透过半透膜，截留所提取 IgY 蛋白质。流量受样品成分、操作压力、滤膜、黏度、流速以及超滤系统的选择等多种因素的影响，对超滤法提取卵黄抗体的提取效率及大规模工业生产中的浓缩来说，流量是至关重要的一个因素。

1.2.2.4 高效液相色谱法

高效液相色谱是基于普通液相色谱过程，利用特殊色谱柱来提高柱效的技术，引入了气相色谱，改良了传质慢，柱效低，分离效果差的短板。包括吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、凝胶色谱等类别。经过不断发展，高效液相色谱法在普通液相方法能常温下分离水溶性物质的功能的基础上，兼具了高压、高速、高灵敏度、适用范围广的优点。高效液相色谱法适用于多种高沸点，热稳定性差，或者不易挥发难分解的物质（如蛋白质、抗体、多肽、氨基酸及其衍生物等）的定性及定量分析，及上述物质的分离制备。在蛋白质等物质的分离测定上，应用非常广泛(丁一民 2015)。

1.2.2.5 辛酸除脂法

辛酸是一种短链脂肪酸，通过在蛋黄的酸性水稀释液中连续添加辛酸， $3800\times g$ 离心后收集沉淀，产生纯的活性 IgY。辛酸作为双重作用剂，确保 IgY 提取过程中的脱脂和纯化，避免了使用任何去脂剂和/或有害试剂。该方法提取的 IgY 纯度达 97%~99%。辛酸法具有提取过程简单、高效、快速、成本较低、设备要求简单的优势，但提取效率较低，约为 70%(Redwan et al. 2021)。

1.2.3 卵黄抗体的应用

禽类将血液中主要免疫球蛋白积聚在蛋黄中，使得非侵入性收获大量抗体成为可能。由于结构差异和系统发育距离的差异，IgY 不与人类免疫系统的某些成分反应，并且对哺乳动物保守蛋白显示出更强的亲和力，因此 IgY 比哺乳动物抗体更适合用于诊断。IgY 技术也被用于人类和动物的免疫诊断、免疫治疗、有毒动物毒素中和及细菌疾病的治疗，及作为功能性食品等多种用途(Rahman et al. 2013)。

1.2.3.1 卵黄抗体在家禽疫病防治中的应用

鸡感染空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)后引发肝脏肿大、腹泻和肠炎，Tsubokura 等人将 IgY 用于弯曲菌感染鸡的预防和治疗应用，发现口服特异性 IgY 会使弯曲菌定植减少 99%，在建立感染后再应用抗体，粪便中的细菌数量减少 80%~95%(Tsubokura et

al. 1997)。Wallach 等人制备了针对 H1N1、H3N2 和 H5N1 流感病毒株的 IgY，并对其在体外中和同源与异源株以及在体内预防感染的能力进行了测试。结果表明，IgY 在血清中和试验和血凝抑制试验中仅抑制同源毒株，但抗 H5N1 流感病毒 IgY 除抑制同源毒株外还对 H1N1 流感病毒有抑制作用。小鼠口服抗 H5N1 和 H1N1 IgY 后 1 h，通过鼻内攻毒，可显著降低小鼠感染率。抗流感病毒株的 IgY 可通过鼻腔、口腔或喷雾多种途径应用(Wallach et al. 2011)。鸭疫里默氏菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是鸭败血症和鸭传染性浆膜炎的致病菌，因为细菌对多种药物有广泛的耐药性而防治困难。研究人员发现特异性 IgY 能使细菌数量减少 80%，有效抑制 RA 的生长。雏鸭感染 RA 后 1~12 h 肌肉注射 10 mg 特异性 IgY，雏鸭成活率达到 100%。注射一次抗 RA IgY 的鸭子在第 1 周得到完全保护，但两周后这种保护效果几乎完全消失。结果表明特异性抗 RA IgY 提高了雏鸭对 RA 感染的保护程度和反应性(Yang et al. 2020)。

1.2.3.2 卵黄抗体在家畜及水生动物疫病防治中的应用

产肠毒素大肠埃希菌 K88 是断奶仔猪腹泻和死亡的主要原因。IgY 口服被动免疫治疗胃肠道感染因其特异性高而引起广泛关注。Wang 等将大肠埃希菌 K88 与特异性 IgY 孵育 24 h 后接种培养基，发现 IgY 浓度高于 5 mg/mL 时对大肠埃希菌 K88 的生长有显著抑制作用；50 mg/mL IgY 预处理可以显著降低大肠埃希菌 K88 对猪空肠和回肠黏膜的黏附能力及降低大肠埃希菌和肠毒素在结肠内容物中的表达；注射 IgY 成功地保护了仔猪免受大肠埃希菌 K88 感染引起的腹泻(Wang et al. 2019)。犊牛腹泻仍然是人工饲养下奶牛发病死亡的主要原因之一，Vega 等评估了一种基于抗轮状病毒、冠状病毒、产肠毒素大肠埃希菌和沙门菌的 IgY 产品，该产品命名为 IgY DNT。结果表明，与未治疗的犊牛相比，在出生后的前 2 周内口服 IgY DNT 可延迟犊牛腹泻的发生，并显著降低腹泻发生的严重程度和持续时间(Vega et al. 2020)。用抗 PEDV S1 蛋白的 IgY 发病仔猪口服，试验组仔猪腹泻和肠道病变的严重程度极大减轻，治疗猪全部存活(Lee et al., 2015)。

白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是一种致命的病原体，对养虾业造成重大经济损失。研究发现，WSSV 可以被针对 VP28 和 VP19 的截短融合蛋白产生的 IgY 中和(Kim et al. 2004)，具有预防虾 WSSV 感染的作用。分别用灭活 WSSV 和 DNA 疫苗免疫的鸡的特异性 IgY 对 WSSV 感染虾进行治疗，感染虾的存活率可达到 73.3%和 33.3%(Lu et al., 2008)。分别通过肌肉注射、口服和浸泡方法，用特异性 IgY 处理小龙虾，都能保护小龙虾免受 WSSV 的感染(Lu et al. 2009)。爱德华氏菌病是鳗鱼养殖业的一个严重问题，对日本鳗鲡口服抗爱德华氏菌 IgY，结果发现未接受治疗的感染鳗鱼在 15 d 内死亡，而应用 IgY 的鳗鱼存活下来，且未出现疾病表现，说明抗爱德华氏菌 IgY 具有有效性(Xu et al. 2011)。

1.2.3.3 卵黄抗体在寄生虫感染中的应用

艾美耳球虫对家禽危害严重, Lee 等人评价了混合球虫卵囊高免疫蛋黄获得的超免疫 IgY 对肉鸡艾美耳球虫感染的作用。在饲料中添加 0.02% 和 0.05% IgY, 显著降低了鸡的粪卵囊脱落率; 与对照组相比添加 20%超免疫卵黄粉的鸡增重显著增加, 粪卵囊脱落量减少。应用抗球虫抗体的蛋黄粉可显著减少了粪卵囊排出量, 减少了肠道病变。说明用卵黄超免疫抗体可为雏鸡提供抗艾美耳球虫感染的作用(Lee et al. 2009)。IgY 对伊万西锥虫感染也有保护作用, 与对照组相比, 预防性腹腔注射 30 mg/kg 的抗伊万氏锥虫 IgY 可对感染动物提供保护(Sampaio et al. 2014)。Grando 等也制备了抗克氏锥虫 IgY, 浓度为 10 mg/mL 的 IgY 能在维持细胞活力的同时不对细胞膜造成损伤(Grando et al. 2017)。Wang 等人将抗日本血吸虫 IgY 应用于疾病的早期诊断, 用纯化的抗日本血吸虫 IgY 作为包被抗原, 建立了夹心 ELISA 方法, 该方法可检测 2 ng/mL 的日本血吸虫可溶性卵抗原, 具有较高的灵敏性(Wang et al. 2007)。Junior 等人用弓形虫速殖子可溶性抗原 (Soluble tachyzoite antigen, STAg) 免疫蛋鸡, 获得抗弓形虫 IgY, 该抗体可以识别小鼠血清的弓形虫抗原物质, 可用于弓形虫感染的早期诊断(Ferreira Júnior et al. 2012)。

1.2.3.4 卵黄抗体在人医临床中的应用

已经发现, 特异性的 IgY 对多种人类病原体 and 疾病有效。最成功的临床应用是预防囊性纤维化患者呼吸道中铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 的定植。PA 是囊性纤维化患者发病和死亡的主要原因, 一旦确定为慢性感染将很难消除。持续给含纯化抗囊性纤维化 IgY 的漱口液可显著减少或防止 PA 定植, 减少对抗生素的需求(Nilsson et al. 2008)。IgY 在预防人幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP) 感染也有显著效果。HP 感染是胃炎和胃溃疡的常见原因, 耐药菌株的出现促进了对治疗方法的研究。研究发现, 抗幽门螺杆菌的 IgY 在模型动物中减少了细菌黏附、生长和脲酶活性, 并减少了 HP 诱导的胃黏膜损伤和炎症(Shin et al. 2003)。由于针对完整幽门螺杆菌产生的抗体也可能与人体正常菌群发生交叉反应, 用幽门螺杆菌蛋白质、多肽或 58 kDa 高反应性幽门螺杆菌抗原, 免疫蛋鸡制备 IgY, 制成含嗜酸乳杆菌和双歧杆菌的功能性酸奶, 加入 1%的抗脲酶 IgY, 给幽门螺杆菌阳性的志愿者食用 4 周后, 受试者尿素呼气试验值和粪便中的抗原检测值显著降低, 表明 IgY 能够抑制幽门螺杆菌感染(Kovacs-Nolan and Mine. 2012)。此外, IgY 在牙龈卟啉单胞菌诱发的牙周炎、变异链球菌导致的龋齿、大肠埃希菌感染、炎症性肠炎、白色念珠菌感染等疾病的防治中都表现出良好功效(Li et al. 2020)。

1.2.3.5 卵黄抗体的应用前景

哺乳动物后代通过胎盘或初乳获得来自母体的免疫抗体, 爬行动物、两栖动物和鸟类, 来自母体的免疫抗体则存在于蛋黄中, 使新生个体获得被动性免疫保护, 直到其自身的免疫系统发育完全, 产生主动免疫作用(Lee et al. 2017)。相比于哺乳动物的 IgG,

IgY 的获得从禽蛋中提取,避免了采血对动物的损伤。与哺乳动物血液抗体相比,蛋黄中含有的是单一类型的抗体“IgY”,可以用简单方法纯化和提取,具有获得方便的优势(He et al. 2016)。禽类与哺乳动物相比,触发有效免疫应答所需的抗原数量少得多(Larsson et al. 1998)。此外,由于哺乳动物和禽类的系统发育距离较远,因此保守的哺乳动物蛋白对禽类能表现出更强的免疫原性。这使得在禽类体内产生的针对保守哺乳动物蛋白的抗体通常比在其他哺乳动物体内产生的抗体更高效(Gassmann et al. 2002)。禽类 IgY 与哺乳动物 IgG 之间不发生交叉血清学反应。另一个重要的优势是 IgY 产量大,如一只鸡每年产约 300 个蛋,从单个蛋黄(15 mL)中可获得约 50~100 mg 的 IgY,其中 2%~10%是针对目标抗原的特异性 IgY(Xu et al. 2011)。从一只免疫鸡的蛋黄中共计可提取出 22 500 mg 的 IgY,相当于 4.3 只兔子所能产生的抗体量(Schade et al. 2005)。从环境保护的角度来说,IgY 的生产和使用不会产生耐药性和其他副作用(Ontiveros et al. 2016)。在抗生素耐药性不断加剧的情况下,找到新的产品防控致病微生物感染至关重要。

1.2.4 鹌鹑用于生产卵黄抗体的可行性

鹌鹑(*Quail*),属于鸡形目、雉科、鹌鹑属,在生物学、兽医学及医学研究中心作为实验动物应用广泛,仅次于鸡。鹌鹑体型小,产蛋率高,可以密集饲养,经济价值较高。1 只成年鹌鹑每天仅需要 25 g 饲料,一般情况下 1.3 kg 饲料可以获得 0.5 kg 蛋。鹌鹑蛋的孵化期仅 16~17 d,5~6 周龄即达到性成熟开始产蛋,日产蛋 1~2 枚,年产蛋量约 300 枚。国外科学家曾用“坚韧、容易处理、早熟、和伟大的产蛋能力!”来描述鹌鹑。鹌鹑敏感性好、抗病力强、世代间隔短(1 年约 4~5 代),已培育出实验用的“无菌鹌”、“近交系鹌”和“SPF 鹌鹑”(王丽莎等 2013)。鹌鹑已成为被广泛用于营养、胚胎学、遗传学、毒理学、生理学、免疫学、内分泌学、肿瘤学和老年学研究的实验动物。

1959 年,Padgett 和 Ivey 首次将鹌鹑作为实验动物,鸡和鹌鹑的早期发育非常相似,鹌鹑—雏鸡嵌合体是研究发育过程中细胞状态的良好模型(Huss et al. 2008)。鹌鹑胚和成年鹌鹑被用于脊椎动物生理学和影响人类健康的疾病的研究,如肌生成、血管生成、骨骼生成、伤口愈合、病毒学和畸形学等方面。此外,在化合物的生殖毒理学研究和环境内分泌干扰物的影响研究中,鹌鹑也发挥了很大的作用。研究人员曾利用鹌鹑的 16 d 发育期来研究短期太空飞行期间微重力对胚胎发育的影响。鹌鹑胚胎成纤维细胞可用于传染性喉气管炎病毒、马立克氏病病毒、麻疹病毒、马脑脊髓炎病毒及部分流感病毒等的细胞病变感染(Tolik et al. 2014)。鹌鹑已被成功培育成肌强直性营养不良、高尿酸血症、酸性麦芽糖酶缺乏症、动脉粥样硬化及高胆固醇血症模型,用作研究疾病病变和发生机制的模型(Minvielle et al. 2007)。Esmailnejad 等人用鹌鹑制备了抗伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)和肠炎沙门菌(*S. enteritidis*)的特异性 IgY,探讨了用鹌鹑

制备 IgY 的可行性。结果发现，鹌鹑抗沙门菌 IgY 对其对应的免疫原具有较高的特异性，对肠杆菌科其他细菌具有中等的交叉反应性。认为鹌鹑适用于生产大规模的特异性抗体，以用于免疫诊断和免疫治疗的目的(Esmailnejad et al. 2019)。

1.3 研究的目的是与意义

TGEV 是导致初生仔猪腹泻死亡的主要病原之一，由于毒株变异使目前应用的 TGEV—PEDV 二联灭活疫苗和弱毒疫苗产生的免疫作用难以对 TGEV 流行毒株产生良好的抵抗作用。TGEV 主要损害肠上皮细胞、破坏肠黏膜，应用的药物和抗体难以通过肠黏膜分泌到肠腔内，中和存在的 TGEV。口服特异性的抗 TGEV IgY，使其直接进入肠道内，达到对 TGEV 的中和，治疗和预防 TGE 的发生。IgY 具有制备简单、价格低、防治效果好等优势，已在多种疫病防治中得到应用，并具有良好效果。鹌鹑具有生长快、性成熟早、产蛋率高的优势，是生产特异性 IgY 的理想受体。另外，蛋鸡在饲养过程中会接种多种疫苗，使免疫细胞表面的抗原表位占用较多，再免疫接种 TGE 抗体后，产生的抗 TGEV 特异性抗体水平会受到影响；而鹌鹑由于生产周期短，疫苗免疫种类少（多个养殖场只免疫禽流感疫苗），免疫细胞抗原表位占用少，产生针对 TGEV 的抗体产量较高，也是将其作为生产特异性 IgY 的受体动物的一个原因。鹌鹑蛋蛋黄占比较大，有利于获得更多的 IgY。

基于以上分析，本研究拟用 TGEV 流行毒株制备灭活疫苗，免疫接种产蛋鹌鹑，制备抗 TGEV 的 IgY，在提取方法、纯化方法、特异性抗病毒作用等方面进行分析评价，为 TGE 防控提供可用的 IgY 产品。

试验研究

第二章 猪传染性胃肠炎病毒分离株的分析及抗体检测 ELISA 方法的建立

猪传染性胃肠炎是一种猪的急性、接触性肠道传染病，对仔猪的危害尤为严重，其病原为猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）。TGEV 造成感染猪肠黏膜上皮细胞发生变性、坏死，引起肠道代谢紊乱、营养吸收障碍，病猪出现腹泻、脱水、营养流失，甚至死亡。哺乳仔猪的发病急、症状严重、致死率极高，断奶仔猪有一定的抵抗力，死亡率较低，耐过存活猪也会出现饲料报酬率低、成为僵猪等问题。由于没有针对 TGE 的特效药物，对与本病的防控主要还是通过疫苗免疫预防、良好的生物安全措施和对症治疗。由于 TGEV 的变异，使得流行毒株和疫苗株在基因和蛋白方面存在一些差异，影响到了疫苗免疫防控效果，一般可根据基因方面的不同将 TGEV 毒株分为传统基因型和变异基因型(Cheng et al. 2020)。为更好预防 TGE 的发生，需要根据 TGEV 流行毒株的变异情况，选择优势毒株制备疫苗，以提高防控效果。抗体检测是评价疫苗免疫效果的常用指标，也是制定猪场免疫计划和疾病预防方案的直接依据。常用的 TGEV 抗体检测是酶联免疫吸附试验（ELISA），具有快速、结果可靠、敏感性高的优点。

本实验室前期从 TGE 患猪病料中分离得到 1 株 TGEV，本部分研究对其 S 基因和 N 基因进行克隆和遗传变异分析，以弄清楚该分离株的变异情况，未将其作为制备 TGEV 流行毒株疫苗提供基础材料；在此基础上，构建基于 TGEV 分离株 S 基因的原核表达载体，诱导表达后回收蛋白，建立检测 TGEV 抗体的 ELISA 方法，为后续抗体检测提供基础方法。

2.1 材料

2.1.1 细胞、病毒及血清

TGEV SX-YL 分离株由西北农林科技大学动物医学院兽医公共卫生与畜禽产品安全实验室（以下称本实验室）分离并保存；猪肾细胞（Porcine kidney-derived cell line, PK-15 cells）保存于本实验室；TGEV 阴性鹌鹑血清共 40 份，由本实验室采集并保存。

2.1.2 主要试剂

本试验所用主要试剂见表 2-1。

表 2-1 主要试剂
Table 2-1 Primary reagents

试剂/ Reagents	来源/Source
DH5 α 感受态细胞、BL21 感受态细胞、质粒小提试剂盒、无内毒素质粒小提中量试剂盒	北京天根生化科技有限公司
T4 连接酶	Thermo Scientific 公司
DNA Marker DL1000 和 DL2000、DNA Marker DL 2K Plus II	宝生物工程（大连）有限公司
Trizol 试剂 RNAiso Plus	宝生物工程（大连）有限公司
Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	宝生物工程（大连）有限公司
Prime Script TM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 限制性核酸内切酶(<i>EcoR</i> I、 <i>Hind</i> III、)PrimeSTAR [®] Max DNA Polymerase、PrimeScript TM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)	Takara 公司
2 \times Taq PCR MasterMix	北京康为世纪生物科技有限公司
普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	OMEGA 公司
Rabbit Anti-Chicken IgG Secondary Antibody (HRP)	北京义翘神州科技有限公司
5 \times qRT Super Mix 逆转录酶	南京诺唯赞生物科技有限公司
考马斯亮蓝	北京索莱宝科技有限公司
DMEM 高糖培养基	美国 HyClone 公司

2.1.3 主要仪器设备

本试验所用仪器设备见表 2-2。

表 2-2 主要仪器设备
Table 2-2 Main equipments

仪器设备 Equipments	厂家 Manufacturers
37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱	黑龙江东拓仪器制造有限公司
凝胶成像仪、蛋白电泳仪、蛋白半干转印槽	美国伯乐公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 公司
酶标仪	Thermo Fisher Scientific 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司
超纯水仪	美国密理博公司
超净工作台	哈尔滨东胶电子有限公司

2.2 方法

2.2.1 TGEV 分离株生长曲线和病毒滴度测定

2.2.1.1 PK-15 细胞的复苏及传代培养

迅速取出冻存在液氮罐中的细胞冻存管 (PK-15), 浸入水浴锅中 (水浴锅温度 37~42℃) 使细胞解冻融化, 细胞解冻过程应尽量在 3 min 内完成。解冻后室温下, 1 000 r/min 离心 3 min, 使细胞沉淀至冻存管底部。无菌条件下小心吸取上清液, 弃去。用 1 mL 细胞生长培养液 (含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基), 将细胞沉淀重悬为细胞悬液并转移至细胞培养皿, 补加 2 mL 生长培养基, 轻轻吹打使细胞铺匀。至 37℃、5% CO₂ 培养箱。

用显微镜观察细胞的状态, 当细胞均匀贴壁时 (约 6~7 h), 换 1 次液。具体操作为: 弃液, 清洗 3 遍以去除细胞代谢产物 (3 mL PBS), 加入 3 mL 细胞生长培养基后继续培养。定时用显微镜观察 PK-15 细胞生长的状态及数量, 隔 12 h 更换 1 次培养液。当观察到 PK-15 细胞融合度达 90% 时, 吸弃上清, 取 2 mL PBS 清洗细胞, 洗 3 遍之后加入 1 mL 细胞消化液 (2.5 g/L 胰蛋白酶), 细胞边缘开始收缩, 细胞形态变圆后结束消化。弃去消化液加入培养基, 轻轻吹打至细胞呈现单个散落存在。分出一半细胞悬液至另一个无菌培养皿, 并各补加 2 mL 细胞培养基。缓慢晃动培养皿, 使 PK-15 细胞在培养液中分布均匀, 继续培养, 传代。

2.2.1.2 TGEV 分离株的体外增殖

2.2.1.2.1 PK-15 细胞的 TGEV 感染

当在显微镜下观察到 PK-15 细胞的密度 (融合度) 80%~90% 时, 细胞悬液铺 6 孔细胞培养皿。次日观察, 6 孔板中的 PK-15 细胞融合度达 70%~80% (对数生长期) 时, 弃液, 清洗后加入适量空培养基 (不含 FBS 的 DMEM 培养基), 加入空培养基的量以刚好能覆盖皿底细胞为宜。感染 0.1 MOI 的 TGEV, 空白孔中不加病毒液。37℃、5% CO₂ 接毒培养箱中吸附 1 h, 每隔 15 min 轻轻摇动培养皿, 使病毒更易吸附。吸附结束后每孔 PK-15 细胞补加细胞维持培养液 (含 2% FBS 的 DMEM 培养基) 至 2 mL, 置于细胞接毒培养箱中培养, 定期观察细胞状态。

2.2.1.2.2 TGEV 病毒液的收获

定时在显微镜下观察接 TGEV 后 PK-15 细胞的状态及 CPE。当 PK-15 细胞开始出现 TGEV 感染典型 CPE (圆缩、拉网、脱落) 时收获病毒液。将 6 孔细胞培养板封口 (避免污染) 后反复冻融 3 次。细胞壁在冻融过程中破碎, 使 TGEV 病毒得以释放出细胞外。冻融后在 4℃ 预冷的离心机中离心 10 min (转速不低于 12 000 r/min), 离心后管底的沉淀即为细胞碎片。病毒粒子悬浮在上清液中, 吸取上清, 用 0.22 μm 针式滤器过滤进行进一步除菌, TGEV 病毒液保存在 -80℃。

2.2.1.2.3 TGEV 的 PCR 鉴定

于室温下使 TGEV 病毒液融化 (200 μL), 向管中加入 1 mL Trizol 后反复吹打振荡, 裂解完全 (室温裂解 10 min) 后加入预冷的氯仿 0.2 mL (Trizol 体积的 1/5), 涡旋振荡 0.5 min 后置于室温 5 min。4℃ 预冷离心机, 12 000 r/min 离心 (10 min) 后分为 3

层, RNA 存在于上层水相。小心吸出上层水相, 转移至无 RNA 酶离心管中。加入等体积预冷异丙醇, 缓慢轻柔颠倒 (混匀后略微浑浊), 4℃ 静置 10 min 后紧接着离心弃去上清液。用无水乙醇清洗 2 遍 RNA 沉淀。第 2 遍离心后倒掉无水乙醇, 待管内液体彻底蒸发, 用 20 μL DEPC 水溶解 RNA。

取无 RNA 酶的 PCR 管, 加反转体系: 5μL RNase-free ddH₂O、2μL 5×qRT Super Mix 逆转录酶、3μL RNA 模板。反转程序为: 50℃, 15 min; 85℃, 2 min。反转完的 cDNA 立即用于下一步试验或 -20℃ 保存。

根据 NCBI 检索已公布的 TGEV 完整序列 (登录号: AF494337.1), 利用 Primer5.0 软件在 TGEV 参考毒株的保守序列区段设计检测引物, 引物序列送北京擎科生物有限公司陕西分公司合成。

表 2-3 TGEV 检测引物
Table 2-3 Primers information of TGEV

基因 Genes	序列 Sequence (5' -3')
TGEV-F	CGGCCAACCAGGGACAA
TGEV-R	GTTTCGTTACCTCATCAAT

PCR 体系: 10 μL 2×Taq PCR MasterMix、上下游引物各 0.8 μL、cDNA 2 μL, 用 ddH₂O 补加至终体系 20 μL, 瞬离混匀。PCR 扩增程序: 95℃, 10 min; 94℃, 30 s; 55℃, 30 s; 72℃, 30 s, 35 个循环。

预先制备 15 g/L 琼脂糖凝胶, PCR 扩增结束后, 每孔加入 10 μL 病毒的 PCR 产物, 120 V, 电泳 15~20 min。用凝胶成像仪观察结果, 保存图像。

2.2.1.2.4 TGEV 病毒液半数细胞培养物感染量 (TCID₅₀) 的测定

显微镜下观察 PK-15 细胞的生长状态良好时, 消化吹散成 PK-15 细胞悬液, 铺至提前紫外杀菌过的 96 孔细胞培养板 (每孔 100 μL)。PK-15 细胞生长至接近单层时弃去旧培养液, 用 PBS 清洗 3 遍。用空 DMEM 培养基将 TGEV 病毒液梯度稀释 (10⁻¹~10⁻⁹), 需现用现稀释。96 孔板中每孔 PK-15 细胞加 0.1 mL 稀释的 TGEV 病毒液, 8 孔每稀释度。接毒培养箱中吸附 1 h 后每孔加入 100 μL 含 2% FBS 的 DMEM, 每天定时观察各孔 PK-15 细胞的 CPE 情况, 做好记录。按照 Reed-Muench 算法, 先计算出距离比例 (高于 50% 病变率的百分数 - 50% / 高于 50% 病变率的百分数 - 低于 50% 病变率的百分数); 用距离比例乘以 TGEV 稀释度对数之间的差, 加上高于 50% 病变率的稀释度的对数, 所得数值即为该 TGEV 病毒液的 TCID₅₀ 值的指数, 单位为毫升 (mL)。

2.2.1.3 TGEV 分离株细胞增殖曲线测定

将 PK-15 细胞悬液铺进 24 孔细胞培养板, 每孔 500 μL, PK-15 细胞应状态良好并均匀分布在培养孔中。待细胞生长至均匀铺满皿底, 弃去旧培养基, 清洗 3 遍 (1 mL PBS) 后加入适量空 DMEM 培养基 (盖住皿底细胞即可), 每孔加 TGE 病毒液 2 μL, 接毒细

胞培养箱吸附 1 h 后补加 2% FBS 的维持培养液 (0.5 mL)。接毒后定时观察细胞状态及是否出现 CPE, 分别在接毒后的 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 96 h 收获病毒液 (冻融后离心取上清)。做好标记, -80°C 保存。按 2.2.1.2.4 中的方法, 测定各个时间点收获的 TGEV 病毒液的 TCID_{50} 。

2.2.2 TGEV 分离株遗传变异分析

2.2.2.1 引物的设计与合成

根据 NCBI 检索已公布的 TGEV 完整序列 (登录号: AF494337.1), 利用软件 Primer 5.0 设计 TGEV N 基因 (1 段) 和 S 基因 (3 段) 引物进行全长扩增。将序列信息命名后发送至北京擎科生物有限公司陕西分公司进行引物合成。引物信息如表 2-4。

表 2-4 TGEV N 和 S 基因引物
Table 2-4 primers of TGEV N and S gene

基因 Genes	序列 Sequence (5' -3')
TGEV-N-F	GGAATTCTGCCACCATGGCCAGCCCGAGAACCA
TGEV-N-R	ATAAGAATGCGGCCCGCTACCAGTCCTGGTTGTCCAGCCCTCG
TGEV-S1-F	TGAAATGGTCATTGGATTACTAAG
TGEV-S1-R	CAACTTCACTTGAAGAAACAGG
TGEV-S2-F	AGGAGATTGCTATTAGTAAGTG
TGEV-S2-R	AGGGATGCTGTGTACATAGTC
TGEV-S3-F	GCCTAATATAGGTGGYTCTTGGCTA
TGEV-S3-R	AATGGATTTGACAATGTCCATACAG

2.2.2.2 基因克隆和序列分析

以 2.2.2.1 中反转录得到的 TGEV cDNA 作为模板, 用上述合成的 TGEV N 基因引物和 3 段 S 基因引物进行扩增, 获得目的片段。反应体系为: Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix 12.5 μL 、上下游引物各 1.25 μL 、cDNA 2 μL 、补加 Nuclease-Free Water 至 25 μL 。PCR 程序为: 98°C 、30 s; 98°C 、10 s; 52°C 30 s; 72°C 、1 min; 共循环 35 次; 72°C 、2 min。

经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增反应结束后的 PCR 产物, 150 V 电泳 15~20 min。电泳结束后, 尽快在紫外灯下将对应大小的目的条带切下。依据普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书的步骤进行操作, 将琼脂糖胶块中的目的片段回收。将回收纯化后的 DNA 产物进行分装, 送公司进行测序。

登录 GenBank 下载 TGEV 不同参考毒株 (表 2-5) 与 TGEV 分离株基因组序列构建遗传进化树, 对序列同源性进行比较分析。

表 2-5 参考 TGEV 毒株基因型及登录号

Table 2-5 Analysis of genotypes and accession numbers of TGEV reference strains

序号 No.	登录号 Accession no.	毒株 Virus	起源 Origin
1	AF302263.1	TO14	日本
2	AF494337.1	TH-98	中国哈尔滨
3	AJ271965.2	PUR46-MAD	西班牙
4	AY335548.1	TS	中国兰州
5	AY587882.1	HN2002	中国南京
6	DQ001167.1	TSX	中国杨凌
7	DQ201447.1	TS	中国兰州
8	DQ443743.1	SC-Y	中国雅安
9	EU074218.2	attenuated H	中国哈尔滨
10	HM776941.1	AYU	中国上海
11	HQ462571.1	WH-1	中国武汉
12	JN624756.1	HR/DN1	中国哈尔滨
13	JQ693051.1	KT2	韩国
14	JQ693052.1	KT3	韩国
15	KP202848.1	SHXB	中国南京
16	KT696544.1	JS2012	中国南京
17	KX900406.1	TGEV/USA/Illinois149/2013	美国
18	KX900410.1	TGEV/USA/Minnesota153/2014	美国
19	KX900411.1	TGEV/USA/SouthDakota154/2014	美国
20	MH167923.1	HQ2016	中国大庆
21	MK272773.1	FS-WS	中国哈尔滨
22	MN548093.1	TGEV/CH/HB-FP/2017	中国保定
23	NC_038861.1	PUR46-MAD	西班牙

2.2.3 检测 TGEV 抗体 ELISA 方法的建立

2.2.3.1 引物设计及合成

TGEV S 蛋白是诱导产生中和抗体的蛋白，其中 S 基因 C 抗原位点具有保守性高、抗原性好的特点。根据 NCBI 已公布的 TGEV S 基因序列（登陆号：AF494337.1），利用 Primer 5.0 设计含有特异性酶切位点的引物，用于扩增 TGEV S 基因。在上游引物的 5'端加入 *EcoR* I 酶切位点(AAGCTT)，下游引物 5'端加入 *Hind*III 酶切位点(GAATTC)。TGEV 特异性引物序由北京擎科生物有限公司陕西分公司合成，引物使用浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 。引物信息及酶切位点（下划线）见表 2-6。

表 2-6 TGEV S 基因 C 抗原位点的 PCR 引物
Table 2-6 PCR Primers for C Antigen Site of S Gene of TGEV

基因 Genes	序列 Sequence (5' -3')
TGEV-SC-F	CGAAGCTTAATTTTCCTTGTTCTAA
TGEV-SC-R	CCCGAATTCTCAAACAACTAATACGGTAAC

2.2.3.2 目的片段的克隆与纯化

以 2.2.2.4 中反转录得到的 TGEV cDNA 为模板, 用 PCR 扩增 TGEV S 基因目的片段。PCR 体系包括: 2×PrimeSTAR Max Premix 高保真酶 15 μL、引物各 0.5 μL、cDNA 5 μL、补加 ddH₂O 至终体系 30 μL。PCR 程序为: 98℃、10 s; 55℃、15 s; 72℃、1 min; 32 个循环, 72℃终延伸 10 min。扩增反应结束后, 在 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳 PCR 产物, 150 V 电泳 15~20 min。电泳结束后在紫外下切下目的片段对应的胶块, 参照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书的步骤, 将 TGEV S 基因目的片段纯化回收, -20℃储存。

2.2.3.3 重组原核表达载体的构建

2.2.3.3.1 目的片段和 pET-32a(+)载体的双酶切

将上述回收的目的片段与 pET-32a(+)载体进行双酶切。双酶切体系为: pET-32a(+)载体反应体系: pET-32a(+) 7 μL, 10× Cut Green buffer 3 μL, *EcoR* I 1.5 μL, *Hind*III 1.5 μL, dd H₂O 17 μL。TGEV S 基因 C 抗原位点基因酶切体系: TGEV-SC 7 μL, 10×Cut Green buffer 3 μL, *EcoR* I 1.5 μL, *Hind*III 1.5 μL, dd H₂O 17 μL。将上述体系配好后的混合液瞬时离心, 将管壁上的液体离心后置于 37℃反应 2~3 h。酶切完成后的产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 150 V 电泳 15~20 min。电泳结束后, 将酶切后的 TGEV 目的基因片段和载体按照纯化试剂盒说明回收。

2.2.3.3.2 目的基因和载体的连接与转化

将酶切后的目的基因和 pET-32a(+)载体进行连接。连接体系为: TGEV SC 6.6 μL, pET-32a(+) 2.2 μL, T4 Ligase 0.2 μL, T4 Ligase buffer 1 μL。瞬离混匀后, 置于 22℃, 反应时间为 2~3 h。

大肠埃希氏菌 DH5α感受态细胞置于冰上解冻后, 吸取约 35 μLDH5α感受态细胞, 向其中加入目的基因与载体的连接产物 10 μL。迅速转移至冰上反应 30 min (每隔 10 min 轻弹管壁混匀)。预先调水浴锅中水温为 42℃, 热激 90 s, 冰上放置 3~5 min (冷激)。加入 850 μL 不含任何抗性的 LB 液体培养基至反应 EP 管中, 轻吹混匀, 置于摇床慢摇 (37℃, 180 r/min) 培养 1 h。常温下 3 000 r/min 离心 4 min, 使菌体沉淀在管底, 吸弃 650 μL 上清液后重悬菌体。混匀后的菌液全部吸出并均匀涂布于 LB 培养板上, 静置吸收。倒置培养 12~16 h (37℃细菌培养箱), 观察菌落生长状况。

2.2.3.3.3 重组菌的鉴定

使用白枪头挑出 LB 平板上生长的单克隆菌落，投入含 1 mL LB 培养基（Amp 抗性）的无菌 EP 管中，37℃、180 r/min 摇床中震荡培养 6 h。用菌液做 PCR 模板进行鉴定。反应体系为：2×*Taq* PCR MasterMix 10 μL、表 2-6 中扩增 S 基因的上下游引物各 1 μL、菌液 2 μL、dd H₂O 6 μL，共 20 μL 体系。PCR 反应程序：95℃，10 min；95℃，30 s；60℃，30 s；72℃，1 min，35 个循环；72℃，10 min；16℃，2 min。

2.2.3.3.4 重组质粒的鉴定

无菌条件下，在 5 mL 的 LB 培养基（含 Amp 抗性）中加入经 PCR 鉴定结果呈阳性的菌液 0.1 mL，置于摇床摇晃过夜（37℃、180 r/min），进行扩大培养。用商品无内毒素质粒小提中量试剂盒，按照说明书进行操作，将重组质粒命名为 pET-SC。

对提取的 pET-SC 重组质粒进行双酶切鉴定。鉴定反应体系如下：pET-SC 重组质粒 7 μL，10×Cut Green buffer 3 μL，*Eco*R I 1.5 μL，*Hind*III 1.5 μL，dd H₂O 17 μL。

将上述配好的体系混合液瞬离，使管壁的液体离心到管底。置于 37℃ 金属浴中，反应时间为 2 h。琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切后的产物，150 V，15~20 min。鉴定结果符合预期后，将产物送生物公司进行测序、比对。

2.2.3.4 重组质粒的诱导表达和鉴定

（1）目的蛋白的诱导表达

将重组质粒（pET-SC）转化进诱导表达的 BL21 细胞中。超净台中挑取单个克隆菌落，将菌落加入 5 mL 的 LB 培养液中（含 Amp 抗性），置于摇床中震荡培养 16 h 左右。将 0.1 mL 菌液加入到 4.9 mL 的 LB 培养液（含 Amp 抗性）中，180 r/min 摇床培养，抽取 0.2 mL 菌液进 96 孔板中用酶标仪测定菌液 OD 值，直至菌液 OD 值达到 0.6~0.8，此时菌液的浓度适宜。无菌条件下向菌液中加入诱导剂（IPTG），IPTG 终浓度为 1.0 mm/L，置于摇床诱导（37℃、180 r/min）。13 000 r/min 离心 10 min 后，弃去培养液，收集菌体沉淀。

（2）诱导表达的蛋白鉴定

向菌体沉淀中加入 0.5 mL 含蛋白酶抑制剂（PMSF）的 PBS，使 PMSF 与 PBS 的体积比为 1:100（V/V）。涡旋混匀使菌体重悬。用超声破碎仪破碎细菌的过程需要在冰上进行，以降低超声过程中产生的热量。超声破碎仪设置为：功率 300 W、超声间隔 5 s、超声时长 5 s。超声破碎直至菌液澄清透亮后，4℃ 离心 10 min（12 000 r/min）。分别收取上清液及沉淀，沉淀用适量 PBS 混匀，加入 5×SDS-PAGE Loading buffer，沸水中煮 10 min。取适量样品加入 SDS 凝胶上样孔，电泳分离蛋白。电泳完成后将胶块转移至考马斯亮蓝染色液中染色，摇床缓慢摇晃染色 2 h。将胶块置于脱色液中脱色，每间隔 2 h 更换一次脱色液，直至蛋白条带清晰出现。

2.2.3.5 重组蛋白的纯化

用 SDS-PAGE 电泳分离诱导后经超声破碎获得的蛋白样品（上清样品、沉淀样品）。

电泳结束后,小心将薄板卸下,分离凝胶。用4℃预冷的蒸馏水清洗凝胶。凝胶块没入0.25 mol/L KCl 溶液(4℃预冷)中浸泡,直至出现清晰的白色条带。将与目的蛋白对应大小相符的白色凝胶块切下,放入研钵后充分研磨碎,放入适量预冷的PBS中。反复冻融以释放目的蛋白。4℃,10 000 r/min 离心10 min。将含有目的蛋白的上清液吸出装进透析袋,严密封口后放入复性液(4 mol/L 尿素溶液)中透析(4℃、2 h),更换1次复性液,再透析2 h。弃去复性液,放入TE缓冲液(Tris-EDTA buffer solution, TE)中4℃过夜。用PEG-8000浓缩目的蛋白,-80℃储存。

2.2.3.6 以表达蛋白为包被抗原的TGEV 抗体检测 ELISA 方法的建立

采用经典的间接ELISA 方阵滴定法摸索TGEV-pET-SC 蛋白的最佳抗原包被浓度、阴阳性对照血清最佳工作浓度、封闭液及封闭时间、酶标二抗稀释度及二抗孵育时间,确定最佳反应条件。用碳酸盐缓冲液(pH=9.6)将纯化的TGEV S 蛋白稀释成不同浓度,100 μL 每孔包被后用不同稀释度的血清孵育,试验后确定最佳稀释度。

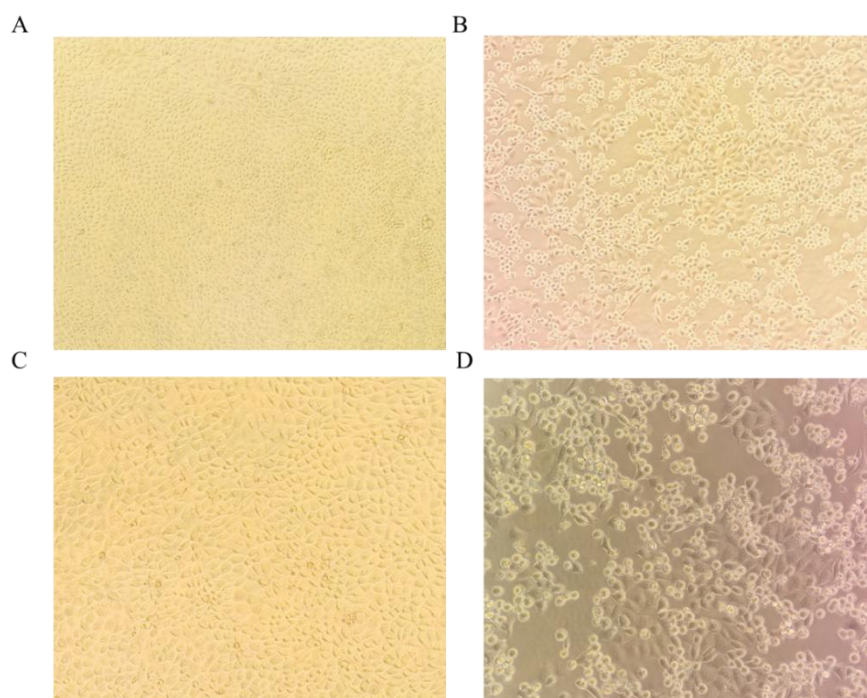
用间接ELISA 检测40份TGEV 阴性鹌鹑血清样品,并测定450 nm 处的OD 值。求出阴性血清OD₄₅₀ 值的平均值的标准差。确定阳性的临界值。标准阴阳性血清的差需高于某定值。

2.3 结果

2.3.1 TGEV 分离株的鉴定与滴度测定

2.3.1.1 TGEV 的细胞培养情况

将TGEV 分离株接种至呈对数生长期(细胞密度达70%~80%)的PK-15 细胞,吸附1~2 h 后补加含2% FBS 的维持培养液,置于37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,观察细胞的状态。结果发现PK-15 细胞接TGEV 后16 h 即出现了明显的CPE,48 h 时细胞开始脱落,至96 h 时几乎全部细胞都会脱落。TGEV 在PK-15 细胞上的CPE 主要表现为开始细胞出现圆缩,随后圆缩的细胞间拉网,最后细胞破碎,脱落(图2-1)。



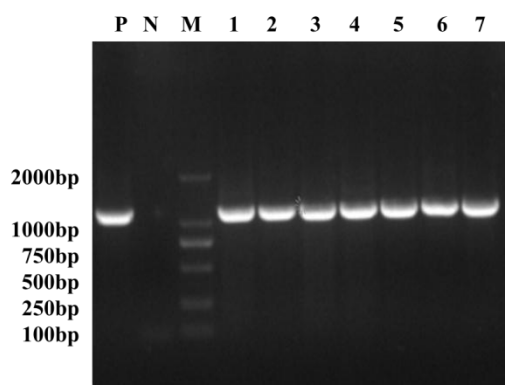
A. 正常 PK-15 细胞 (40X); B. TGEV 感染的 PK-15 细胞 (40X);
C. 正常 PK-15 细胞 (100X); D. TGEV 感染的 P-15 细胞 (100X)
A. Normal PK-15 cells (40X) ; B. PK-15 cells infected by TGEV (40X) ;
C. Normal PK-15 cells (100X) ; D. PK-15 cells infected by TGEV (100X)

图 2-1 TGEV SX-YL 株对 PK-15 细胞的病变作用

Fig. 2-1 The cytopathic effect of TGEV SX-YL strain on PK-15 cells

2.3.1.2 TGEV 分离株的鉴定

使用 Trizol 法提取反复冻融后收获的 TGEV 病毒液总 RNA 后, 反转为 cDNA, 用根据 TGEV 保守序列设计的引物进行特异性扩增。结果收获的 F1~F7 代 TGEV 病毒液均能扩增出大小为 1150 bp 的目的片段, 且条带单一, 大小和预期相符合 (图 2-2)。



M. DNA 标准 DL2000; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1-7. F1~F7 代 TGEV 病毒液
M. DNA Marker DL2000; P. Positive control; N. Negative control; 1-7. F1~F7 generation of TGEV

图 2-2 TGEV RT-PCR 扩增结果

Fig. 2-2 RT-PCR amplification of TGEV

2.3.1.3 TGEV 分离株的病毒滴度

将 TGEV 分离株病毒液用不含 FBS 的 DMEM 按 10 倍梯度稀释后, 接种至铺满 PK-15 细胞的 96 孔细胞培养板, 每个稀释度接种 8 孔, 最后两列细胞不接毒做对照。吸附 1 h 后补加 2% FBS 的维持液, 逐日观察记录结果 (表 2-7)。按照 Reed-Muench 法计算 TGEV SX-YL 株半数感染致死量为 $10^{-7.3}/\text{mL}$ 。

表 2-7 Reed-Muench 法测定 TGEV 半数感染致死量

Table 2-7 Determination of TGEV 50% infection lethal dose by Reed-Muench method

病毒液稀释度 Dilution degrees	CPE 孔数 CPE well	无 CPE 孔数 No CPE well	累计 Total		出现 CPE 孔占比% CPE positive well percentage
			CPE 孔 CPE well	无 CPE 孔 no CPE well	
10^{-2}	8	0	39	0	100
10^{-3}	8	0	31	0	100
10^{-4}	7	1	23	1	95.8
10^{-5}	5	3	15	4	79
10^{-6}	4	4	10	8	56
10^{-7}	4	4	6	12	33
10^{-8}	2	6	2	18	10
10^{-9}	0	8	0	26	0

2.3.1.4 TGEV 的增殖曲线测定

待 PK-15 细胞生长至均匀铺满皿底, 每孔感染 0.1 MOI 的 TGEV, 37°C 、5% CO_2 培养箱吸附 1 h 后补加 2% FBS 的维持培养液。接毒后定时观察细胞状态及是否出现 CPE,

分别在接毒后的 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 和 96 h 收获病毒液。通过 Reed-Muench 法计算每个时间点收获的 TGEV 分离株细胞培养物上清中的病毒滴度，绘制该病毒在 PK-15 细胞上的增殖曲线。结果如图 2-3 所示，PK-15 细胞感染 TGEV SX-YL 株后 16 h 左右病毒开始大量增殖，培养 24 h 活毒量即达到峰值。随着病毒培养时间的延长，TGEV 在 PK-15 细胞上清中的病毒滴度呈现逐渐下降的趋势。可能由于 TGEV 对温度敏感，低温稳定，长期在 37℃ 的环境下使得病毒逐渐失活。

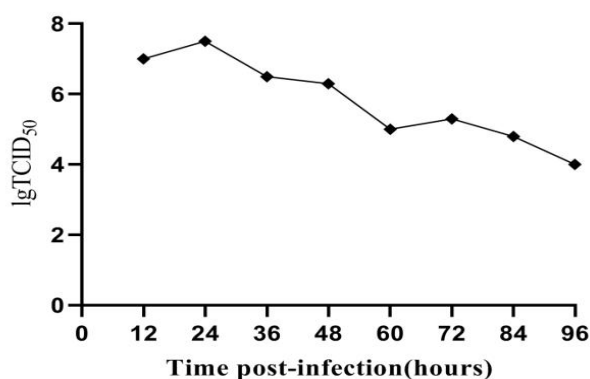
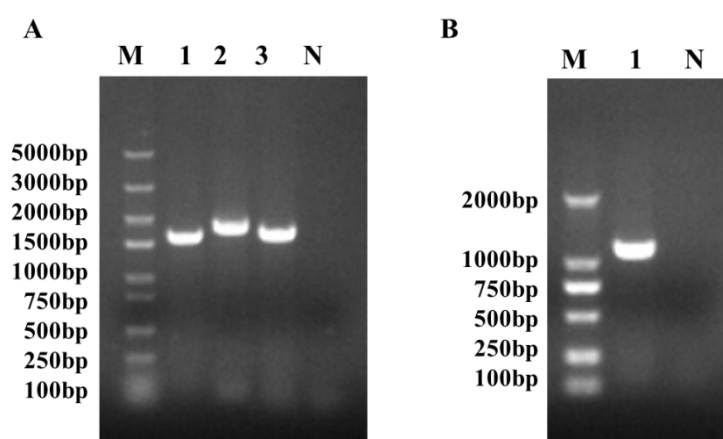


图 2-3 TGEV 在 PK - 15 细胞上的增殖曲线
Fig. 2-3 Proliferation curve of TGEV on PK-15

2.3.2 TGEV 分离株的基因变异分析

2.3.2.1 TGEV 分离株的 S 和 N 基因克隆

利用 NCBI 上公布的 TGEV 序列，设计了扩增 TGEV S 和 N 基因的全长引物。用 TGEV S 基因特异性引物进行 PCR 扩增，分三段扩增，产物送测序公司测序后拼接。TGEV S 基因 PCR 扩增见图 2-4A，N 基因的 PCR 扩增见图 2-4B。成功扩增出大小为 1629 bp、1803 bp、1690 bp 的 S 基因片段和 1149 bp 的 N 基因。



A. TGEV分离株S基因的PCR扩增结果； B. TGEV分离株N基因的PCR扩增结果

A. PCR amplification results of the TGEV S gene; B. PCR amplification results of the TGEV N gene

图 2-4 TGEV 分离株 S 和 N 基因的 PCR 扩增结果

Fig.2-4 PCR amplification results of the TGEV S and N gene

2.3.2.2 TGEV 分离株 S 基因相似性分析

用 STD 软件将 TGEV SX-YL 株 S 基因组序列与 NCBI 上公布的其他 TGEV 参考毒株进行序列核苷酸和氨基酸相似性的比较分析。S 基因核苷酸及氨基酸序列相似性分析的结果见图 2-5A 所示（左下方为氨基酸同源性，右上方为核苷酸同源性）。分析核苷酸同源性结果发现，TGEV SX-YL 分离株与序列号为 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、JN624756.1 的 HR/DN1 株、KP202848.1 的 SHXB 株和 MH167923.1 的 HQ2016 株相似性最高，达 99.9%。比较 S 基因组氨基酸同源性结果，分析得出与 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、JN624756.1 的 HR/DN1 株、KP202848.1 的 SHXB 株氨基酸相似性为 99.8%，与 MH167923.1 的 HQ2016 株相似性为 99.7%。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1		98.3	98.6	98.8	99.0	96.6	99.0	98.4	98.7	98.6	98.6	98.3	98.4	98.5	98.9	95.8	95.8	95.6	98.6	98.5	98.5	98.3	98.6	98.6
2	97.7		99.7	98.0	98.1	95.9	98.1	99.4	97.9	99.7	99.7	98.4	98.4	99.6	98.4	95.1	95.1	94.9	99.6	99.6	99.5	98.5	99.7	99.6
3	98.3	99.4		98.3	98.4	96.2	98.5	99.7	98.2	100.0	100.0	98.7	98.8	100.0	98.7	95.4	95.5	95.2	100.0	99.9	99.9	98.8	100.0	99.9
4	98.7	97.1	97.7		99.7	96.8	99.7	98.1	99.4	98.3	98.3	98.2	98.2	98.3	99.4	96.0	96.0	95.7	98.3	98.2	98.2	98.5	98.3	98.3
5	99.0	97.4	98.1	99.4		97.0	99.9	98.2	99.6	98.4	98.4	98.3	98.3	98.4	99.6	96.2	96.2	96.0	98.4	98.4	98.3	98.6	98.4	98.4
6	97.6	96.3	96.9	97.3	97.7		97.0	95.9	96.8	96.2	96.2	96.1	96.1	96.2	96.8	97.5	97.7	97.2	96.2	96.2	96.1	96.0	96.2	96.2
7	99.0	97.4	98.1	99.4	99.7	97.7		98.2	99.6	98.5	98.5	98.3	98.4	98.5	99.6	96.2	96.2	96.0	98.4	98.4	98.3	98.6	98.5	98.4
8	98.0	98.9	99.5	97.4	97.7	96.3	97.7		98.0	99.7	99.7	98.5	98.5	99.7	98.5	95.2	95.2	94.9	99.7	99.7	99.6	98.6	99.7	99.7
9	98.4	97.0	97.6	98.6	99.1	97.1	99.0	97.3		98.2	98.2	98.1	98.1	98.2	99.3	96.0	96.0	95.8	98.2	98.2	98.1	98.6	98.2	98.2
10	98.3	99.4	100.0	97.7	98.1	96.9	98.1	99.5	97.6		100.0	98.7	98.8	100.0	98.7	95.4	95.5	95.2	100.0	99.9	99.9	98.8	100.0	99.9
11	98.3	99.4	100.0	97.7	98.1	96.9	98.1	99.5	97.6	100.0		98.7	98.8	100.0	98.7	95.4	95.5	95.2	100.0	99.9	99.9	98.8	100.0	99.9
12	97.8	97.1	97.7	97.2	97.6	96.5	97.6	97.3	97.1	97.7	97.7		99.6	98.7	98.5	95.3	95.4	95.0	98.7	98.7	98.6	98.0	98.7	98.7
13	98.0	97.4	98.0	97.5	97.9	96.7	97.9	97.6	97.4	98.0	98.0	99.2		98.8	98.5	95.3	95.4	95.1	98.8	98.7	98.6	98.1	98.8	98.7
14	98.3	99.4	100.0	97.7	98.1	96.9	98.1	99.5	97.6	100.0	100.0	97.7	98.0		98.7	95.4	95.5	95.2	99.9	99.9	99.8	98.8	100.0	99.9
15	98.9	97.7	98.3	99.1	99.4	97.4	99.4	98.0	98.8	98.3	98.3	97.6	97.9	98.3		96.0	96.0	95.7	98.7	98.7	98.6	98.9	98.7	98.7
16	97.5	96.2	96.8	97.2	97.6	98.8	97.6	96.3	97.0	96.8	96.8	96.5	96.7	96.8	97.4		98.6	99.6	95.4	95.4	95.3	95.1	95.4	95.4
17	97.2	95.9	96.5	97.0	97.3	98.6	97.3	96.0	96.8	96.5	96.5	96.1	96.3	96.5	97.1	99.2		98.2	95.5	95.4	95.4	95.2	95.5	95.4
18	97.0	95.5	96.1	96.6	97.0	98.2	97.0	95.6	96.5	96.1	96.1	95.9	96.1	96.1	96.8	99.4	98.7		95.2	95.1	95.1	94.9	95.2	95.1
19	98.3	99.2	99.9	97.6	98.0	96.8	98.0	99.4	97.6	99.9	99.9	97.6	97.9	99.9	98.2	96.7	96.5	96.1		99.9	99.8	98.8	100.0	99.9
20	98.2	99.2	99.9	97.6	97.9	96.7	97.9	99.4	97.5	99.9	99.9	97.5	97.9	99.9	98.2	96.7	96.4	96.1	99.7		99.8	98.7	99.9	99.9
21	98.1	99.1	99.7	97.4	97.8	96.6	97.8	99.2	97.4	99.7	99.7	97.4	97.7	99.7	98.1	96.5	96.3	95.9	99.6	99.6		98.7	99.9	99.8
22	97.6	97.2	97.9	97.4	97.9	96.0	97.8	97.5	97.8	97.9	97.9	96.4	96.7	97.9	98.1	95.9	95.7	95.4	97.7	97.7	97.6		98.8	98.8
23	98.3	99.4	100.0	97.7	98.1	96.9	98.1	99.5	97.6	100.0	100.0	97.7	98.0	100.0	98.3	96.8	96.5	96.1	99.9	99.9	99.7	97.9		99.9
24	98.3	99.2	99.8	97.7	98.0	96.7	98.0	99.6	97.6	99.8	99.8	97.6	97.9	99.8	98.3	96.6	96.3	96.0	99.7	99.7	99.5	97.8	99.8	

毒株名. 1. TO14; 2. TH98; 3. Purdue; 4. TS; 5. HN2002; 6. TSX; 7. TS-S; 8. SCY; 9. attenuated-H; 10. WH1; 11. HR-DN1; 12. KT2; 13. KT3; 14. SHXB; 15. JS20; 16. SouthDakota154; 17. Minnesota153; 18. SouthDakota154-2014; 19. PUR46MAD-ST; 20. HQ2016; 21. FSWS; 22. CH-HBFP-2017; 23. PUR46MAD; 24. SX-YL-2020

Strains. 1. TO14; 2. TH98; 3. Purdue; 4. TS; 5. HN2002; 6. TSX; 7. TS-S; 8. SCY; 9. attenuated-H; 10. WH1; 11. HR-DN1; 12. KT2; 13. KT3; 14. SHXB; 15. JS20; 16. SouthDakota154; 17. Minnesota153; 18. SouthDakota154-2014; 19. PUR46MAD-ST; 20. HQ2016; 21. FSWS; 22. CH-HBFP-2017; 23. PUR46MAD; 24. SX-YL-2020

图 2-5A S 基因核苷酸及氨基酸同源性比对结果

Fig.2-5A S gene nucleotide and amino acid homology alignment results

用软件 Mega X 将 TGEV SX-YL 株 S 基因与 NCBI 上公布的其他 TGEV 参考毒株共同构建遗传进化树, 如图 2-5B。分析遗传进化树结果显示, TGEV SX-YL 株与 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、JN624756.1 的 HR/DN1 株、KP202848.1 的 SHXB 株和 MH167923.1 的 HQ2016 株属于同一分支, 遗传关系较近。说明 TGEV SX-YL 分离株 S 基因属于 Purdue like group 大群, 是流行毒株。遗传进化结果与序列同源性分析结果较为一致。

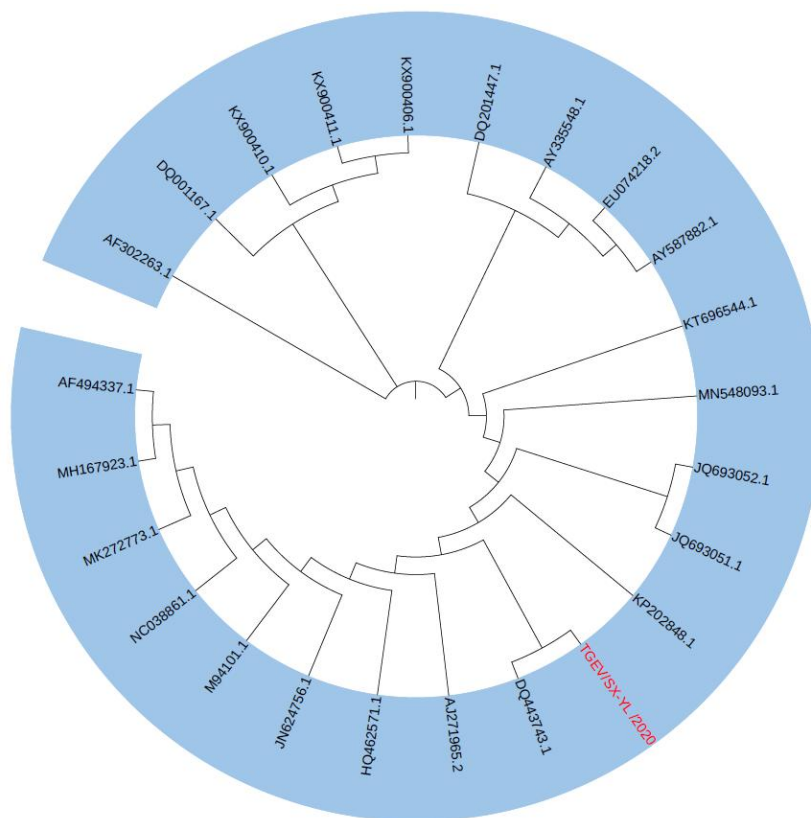


图 2-5B S 基因遗传进化树建立

Fig.2-5B S gene genetic evolution tree establishment

2.3.2.3 TGEV 分离株 N 基因相似性分析

用 STD 软件将 TGEV SX-YL 株 N 基因组序列与 NCBI 上公布的其他参考毒株进行序列核苷酸和氨基酸相似性的比较分析。N 基因核苷酸及氨基酸序列相似性分析的结果见图 2-6A 所示（左下方为氨基酸同源性，右上方为核苷酸同源性）。N 基因的核苷酸相似性分析结果显示，TGEV SX-YL 分离株 N 基因与序列号为 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、HM776941.1 的 AYU 株和 NC038861.1 的 Purdue-N 株相似性均高于 99.7%。氨基酸相似性比对结果与核苷酸结果一致，与序列号为 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、HM776941.1 的 AYU 株和 NC038861.1 的 Purdue-N 株相似性最高。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1		99.7	99.7	99.7	99.7	99.9	99.9	99.9	99.0	98.4	98.4	96.6	95.5	95.5	95.5	95.5	95.4	95.4	95.4	95.4	93.9	96.2	96.2	96.4	96.8	96.8	96.0	96.5	96.8	96.8	
2	99.4		100.0	100.0	100.0	99.6	99.6	99.6	98.7	98.1	98.1	96.5	95.4	95.4	95.4	95.4	95.3	95.3	95.3	95.3	93.8	96.1	96.1	96.3	96.7	96.7	95.9	96.4	96.7	96.7	
3	99.4	100.0		100.0	100.0	99.6	99.6	99.6	98.7	98.1	98.1	96.5	95.4	95.4	95.4	95.4	95.3	95.3	95.3	95.3	93.8	96.1	96.1	96.3	96.7	96.7	95.9	96.4	96.7	96.7	
4	99.4	100.0	100.0		100.0	99.6	99.6	99.6	98.7	98.1	98.1	96.5	95.4	95.4	95.4	95.4	95.3	95.3	95.3	95.3	93.8	96.1	96.1	96.3	96.7	96.7	95.9	96.4	96.7	96.7	
5	99.4	100.0	100.0	100.0		99.6	99.6	99.6	98.7	98.1	98.1	96.5	95.4	95.4	95.4	95.4	95.3	95.3	95.3	95.3	93.8	96.1	96.1	96.3	96.7	96.7	95.9	96.4	96.7	96.7	
6	99.7	99.1	99.1	99.1	99.1		100.0	100.0	99.1	98.5	98.5	96.7	95.6	95.6	95.6	95.6	95.5	95.5	95.5	95.5	94.0	96.3	96.3	96.5	96.9	96.9	96.1	96.6	96.9	96.9	
7	99.7	99.1	99.1	99.1	99.1	100.0		100.0	99.1	98.5	98.5	96.7	95.6	95.6	95.6	95.6	95.5	95.5	95.5	95.5	94.0	96.3	96.3	96.5	96.9	96.9	96.1	96.6	96.9	96.9	
8	99.7	99.1	99.1	99.1	99.1	100.0	100.0		99.1	98.5	98.5	96.7	95.6	95.6	95.6	95.6	95.5	95.5	95.5	95.5	94.0	96.3	96.3	96.5	96.9	96.9	96.1	96.6	96.9	96.9	
9	99.4	98.8	98.8	98.8	98.8	99.7	99.7	99.7		99.4	99.0	97.0	95.7	95.7	95.7	95.7	95.6	95.6	95.6	95.6	94.1	96.4	96.4	96.6	97.0	97.0	96.2	96.7	97.0	97.0	
10	99.1	98.5	98.5	98.5	98.5	99.4	99.4	99.4	99.7		98.4	96.4	95.1	95.1	95.1	95.1	95.0	95.0	95.0	95.0	93.5	96.0	96.0	96.0	96.4	96.4	95.6	96.1	96.4	96.4	
11	98.8	98.2	98.2	98.2	98.2	99.1	99.1	99.1	99.4	99.1		96.8	95.6	95.6	95.6	95.6	95.5	95.5	95.5	95.5	94.0	96.3	96.3	96.5	96.8	96.8	96.0	96.5	96.8	96.8	
12	98.5	97.9	97.9	97.9	97.9	98.8	98.8	98.8	99.1	98.8	98.5		98.4	98.4	98.4	98.4	98.3	98.3	98.3	98.3	96.8	98.9	98.9	98.9	99.3	99.3	98.5	99.0	99.3	99.3	
13	97.3	96.7	96.7	96.7	96.7	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8		100.0	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.9	98.4	98.5	98.5	97.9	98.3	98.3	97.6	98.0	98.3	98.3	
14	97.3	96.7	96.7	96.7	96.7	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8	100.0		100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	99.9	98.4	98.5	98.5	97.9	98.3	98.3	97.6	98.0	98.3	98.3	
15	97.3	96.7	96.7	96.7	96.7	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8	100.0	100.0		100.0	100.0	99.9	99.9	99.9	98.4	98.5	98.5	97.9	98.3	98.3	97.6	98.0	98.3	98.3	
16	97.3	96.7	96.7	96.7	96.7	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8	100.0	100.0	100.0		100.0	99.9	99.9	99.9	98.4	98.5	98.5	97.9	98.3	98.3	97.6	98.0	98.3	98.3	
17	97.3	96.7	96.7	96.7	96.7	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8	100.0	100.0	100.0	100.0		99.9	99.9	99.9	98.4	98.5	98.5	97.9	98.3	98.3	97.6	98.0	98.3	98.3	
18	97.0	96.4	96.4	96.4	96.4	97.3	97.3	97.3	97.6	97.3	97.0	98.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7		99.4	99.8	99.8	98.3	98.4	98.4	97.8	98.2	98.2	97.5	97.9	98.2	98.2
19	97.0	96.4	96.4	96.4	96.4	97.3	97.3	97.3	97.6	97.3	97.0	98.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4		99.8	99.8	98.3	98.4	98.4	97.8	98.2	98.2	97.5	97.9	98.2	98.2
20	97.0	96.4	96.4	96.4	96.4	97.3	97.3	97.3	97.6	97.3	97.0	98.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	99.4		99.8	98.3	98.4	98.4	97.8	98.2	98.2	97.5	97.9	98.2	98.2
21	97.0	96.4	96.4	96.4	96.4	97.3	97.3	97.3	97.6	97.3	97.0	98.5	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	99.4	99.4		98.5	98.4	98.4	97.8	98.2	98.2	97.5	97.9	98.2	98.2
22	93.1	92.5	92.5	92.5	92.5	93.4	93.4	93.4	93.7	93.4	93.1	94.6	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8	95.5	95.5	95.5	96.1		96.9	96.9	96.3	96.7	96.7	96.0	96.4	96.7	96.7
23	97.9	97.3	97.3	97.3	97.3	98.2	98.2	98.2	98.5	98.2	97.9	98.8	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	97.9	97.9	97.9	97.9	94.0		100.0	98.4	98.8	98.8	98.0	98.5	98.8	98.8
24	97.9	97.3	97.3	97.3	97.3	98.2	98.2	98.2	98.5	98.2	97.9	98.8	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	97.9	97.9	97.9	97.9	94.0	100.0		98.4	98.8	98.8	98.0	98.5	98.8	98.8
25	97.3	97.0	97.0	97.0	97.0	97.6	97.6	97.6	97.9	97.6	97.3	98.8	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.3	97.3	97.3	97.3	93.4	97.6	97.6		99.4	99.4	98.6	99.1	99.4	99.4
26	98.5	97.9	97.9	97.9	97.9	98.8	98.8	98.8	99.1	98.8	98.5	100.0	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.5	98.5	98.5	98.5	94.6	98.8	98.8	98.8		100.0	99.2	99.5	99.8	99.8
27	98.5	97.9	97.9	97.9	97.9	98.8	98.8	98.8	99.1	98.8	98.5	100.0	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.5	98.5	98.5	98.5	94.6	98.8	98.8	98.8	100.0		99.2	99.5	99.8	99.8
28	96.4	95.8	95.8	95.8	95.8	96.7	96.7	96.7	97.0	96.7	96.4	97.9	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	96.7	96.7	96.7	96.7	92.8	96.7	96.7	96.7	97.9	97.9		98.7	99.0	99.0
29	97.6	97.0	97.0	97.0	97.0	97.9	97.9	97.9	98.2	97.9	97.6	99.1	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.6	97.6	97.6	97.6	93.7	97.9	97.9	97.9	99.1	99.1	97.0		99.5	99.5
30	98.2	97.6	97.6	97.6	97.6	98.5	98.5	98.5	98.8	98.5	98.2	99.7	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.2	98.2	98.2	98.2	94.3	98.5	98.5	98.5	99.7	99.7	97.6	99.1		100.0
31	98.2	97.6	97.6	97.6	97.6	98.5	98.5	98.5	98.8	98.5	98.2	99.7	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.2	98.2	98.2	98.2	94.3	98.5	98.5	98.5	99.7	99.7	97.6	99.1	100.0	

毒株名. 1.CH-JLJ; 2.CH-HLJB; 3.CH-JLY; 4.CH-GSJ; 5.CH-HLJT; 6.CH-SH; 7.CH-HLJA; 8.CH-JSX; 9.CH-SDQ; 10.SouthDakota154; 11. Minnesota153; 12.TO14; 13.Purdue; 14.AYU; 15.WH1; 16.Purdue-N; 17.SX-YL-2020; 18.CH-LNX; 19. SHXB; 20. HE1; 21.SCY; 22. HYM091; 23. KT2; 24. KT3; 25. HYM092; 26. attenuated-H; 27. H155; 28. HYM09; 29. HN2002; 30.TSN; 31.TS

Strains. 1.CH-JLJ; 2.CH-HLJB; 3.CH-JLY; 4.CH-GSJ; 5.CH-HLJT; 6.CH-SH; 7.CH-HLJA; 8.CH-JSX; 9.CH-SDQ; 10.SouthDakota154; 11. Minnesota153; 12.TO14; 13.Purdue; 14.AYU; 15. WH1; 16. Purdue-N; 17. SX-YL-2020; 18.CH-LNX; 19. SHXB; 20. HE1; 21.SCY; 22. HYM091; 23. KT2; 24. KT3; 25. HYM092; 26. attenuated-H; 27. H155; 28. HYM09; 29. HN2002; 30.TSN; 31.TS

图 2-6A N 基因核苷酸及氨基酸同源性比对结果

Fig.2-6A N gene nucleotide and amino acid homology alignment results

用软件 Mega X 将 TGEV SX-YL 株 N 基因与 NCBI 上公布的其他 30 株 TGEV 参考毒株共同构建遗传进化树, 如图 2-6B, 结果与序列同源性分析结果较为一致。TGEV SX-YL 株与序列号为 AJ271965.2 的 Purdue 株、HQ462571.1 的 WH-1 株、KX083668.1 的 HE-1 株亲缘关系最近, 处在同一分支。说明 TGEV SX-YL 分离株 N 基因也属于 Purdue like group 分支, 是流行毒株。

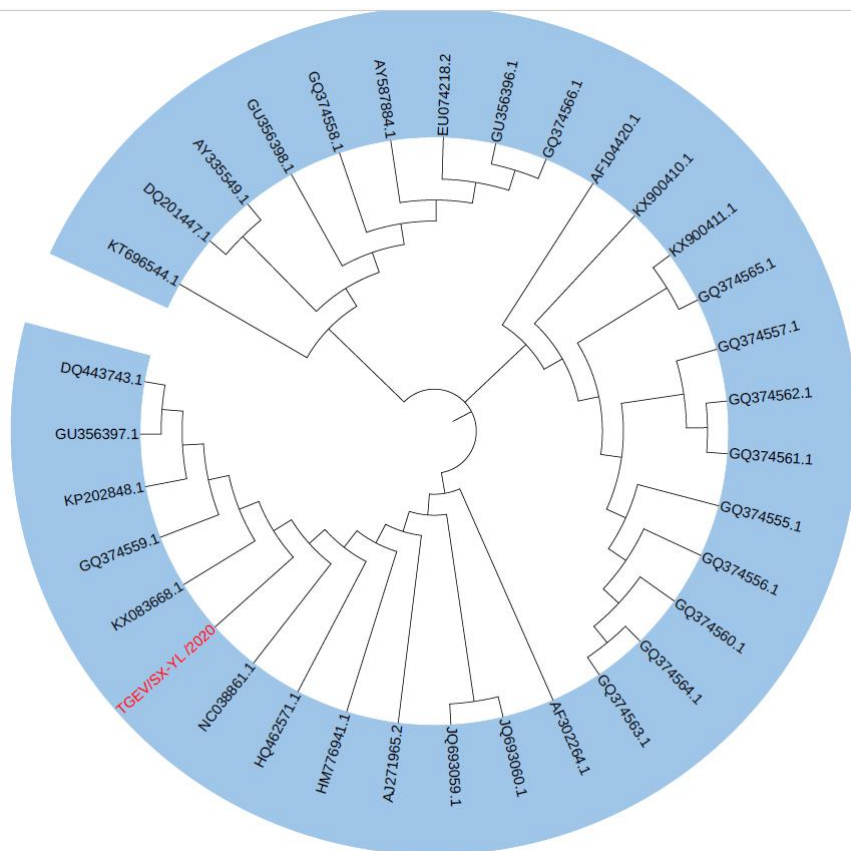


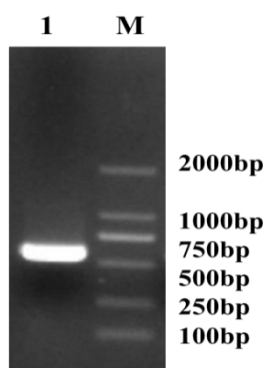
图 2-6B N 基因遗传进化树建立

Fig.2-6B N gene genetic evolution tree establishment

2.3.3 建立 TGEV 抗体检测 ELISA 方法

2.3.3.1 TGEV S 基因 C 抗原基因片段克隆

TGEV 病毒液加入 Trizol 后提取病毒 RNA 并反转为 cDNA，用 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 高保真酶扩增 TGEV S 基因的 C 抗原位点，取 30 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，由图 2-7 知成功扩增得到大小约为 550 bp 的条带，条带单一且大小和预期相符。



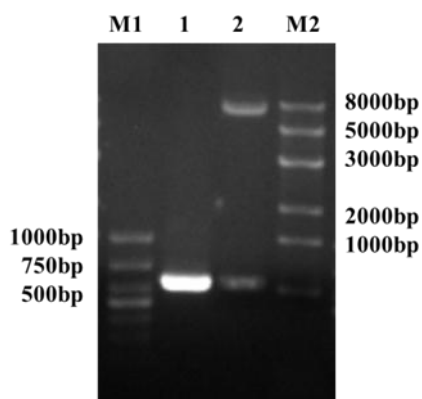
M. DNA 标准 DL2000; 1. TGEV S 基因 C 抗原位点的扩增产物

M. DNA Marker DL2000; 1. PCR amplification products of the C antigen site of the TGEV S gene

图 2-7 TGEV S 基因 C 抗原位点的 PCR 扩增

Fig. 2-7 PCR amplification of the C antigen site of the TGEV S gene

2.3.3.2 TGEV S 基因 C 抗原位点的双酶切鉴定



M1. DNA 标准 DL 1000; 1. TGEV-SC; 2. pET-SC 双酶切; M2. DNA 标准 DL 8000

M1. DNA Marker DL 1000; 1. TGEV-SC; 2. Double digestion of pET-SC; M2. DNA Marker DL 8000

图 2-8 pET-SC 双酶切鉴定结果

Fig. 2-8 The identification results of pET-SC by dual-enzyme digestion

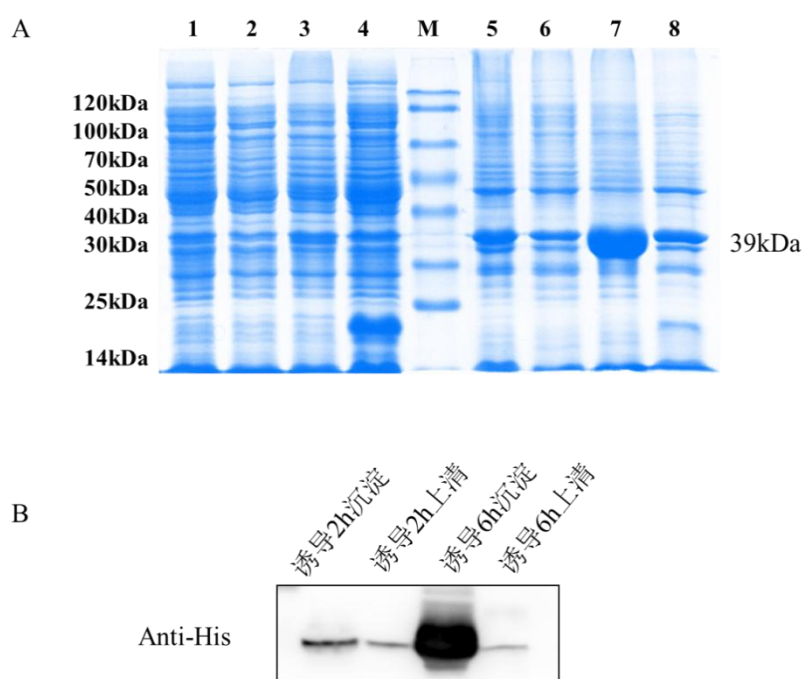
TGEV S 基因 C 抗原位点产物和 pET-32a (+) 载体双酶切后, 22℃连接 12 h, 转化至 DH5α大肠埃希菌, 将菌液 PCR 鉴定为阳性的菌液扩大培养, 提取质粒。ARFGAP1-CMV 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind*III 进行双酶切鉴定, 进行电泳分析。结果如图 2-8 所示, pET-SC 经双酶切后, 分别得到大小和预期一致的 pET-32a (+) 空载体条带和目的条带。经双酶切鉴定正确的 pET-SC 阳性质粒送公司测序后和目的基因的标准序列一致, 表明 pET-SC 重组质粒构建成功。

2.3.3.3 重组原核质粒的诱导表达及蛋白纯化

2.3.3.3.1 TGEV 重组原核质粒的诱导表达

将重组原核表达 pET-SC 质粒转化进诱导表达的大肠埃希菌 BL21 (DE3), 将

pET-32a (+) 空质粒同时转化进 BL21 (DE3) 感受细胞作为对照。用诱导剂 IPTG 诱导重组质粒的表达, IPTG 终浓度为 1.0 mm/L。诱导结束后离心收集菌体, 经超声破碎仪裂解后, 分别收集上清及沉淀。用 SDS-PAGE 及 Western blot 检测目的蛋白是否表达。结果显示, 转化了 pET-SC 的感受态细胞经 IPTG 诱导后成功表达了目的蛋白, 大小约为 39 kDa (图 2-9A)。结果发现, pET-SC 蛋白在条件为 37°C 下, 180 r/min 诱导 6 h, 在沉淀中以包涵体的形式表达的表量最高。在沉淀中的表量高于上清中的表量。用带 His 标签的鼠抗做 Western blot 检测 pET-SC 蛋白的表达, 结果也证明了 pET-SC 蛋白的成功表达 (图 2-9B)。



A. pET-SC 蛋白的诱导表达; M. 预染蛋白标准; 1. 16°C 诱导的 pET- SC 转化菌上清表达产物; 2. 16°C 诱导的 pET32a 上清; 3. 37°C 诱导的 pET- SC 转化菌上清; 4. 37°C 诱导的 pET32a 上清; 5. 16°C 诱导的 pET- SC 转化菌沉淀; 6. 16°C 诱导的 pET32a 沉淀; 7. 37°C 诱导的 pET- SC 转化菌沉淀; 8. 37°C 诱导的 pET32a 沉淀

B. Western blot 验证 pET-SC 成功表达

A. Induced expression of pET-SC protein; M. Prestained protein marker; 1. Supernatant expression products of pET-SC transformed bacteria induced at 16°C; 2. 16°C induced PET32a supernatant; 3. Supernatant of PET-SC transformed bacteria induced at 37°C; 4. PET32a supernatant induced at 37°C; 5. 16°C induced PET-SC transforming bacteria precipitation; 6. 16°C induced PET32A precipitation; 7. PET-SC transforming bacteria precipitation induced at 37°C; 8. PET32A precipitation induced at 37°C

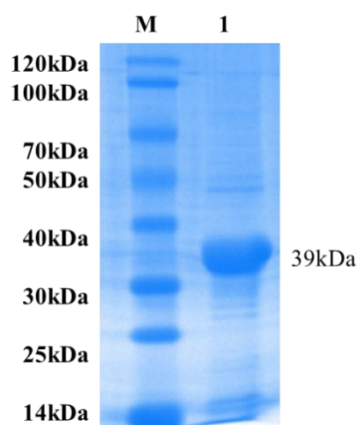
B. Western blot was used to verify the expression of pET-SC

图 2-9 pET-SC 蛋白的表达

Fig.2-9 Expression of pET-SC protein

2.3.3.3.2 pET-SC 蛋白的纯化

制备大量诱导后的蛋白样品,用 SDS-PAGE 进行分离。电泳结束后将凝胶放入 4℃ 预冷的 0.25 M KCl 溶液中浸泡,直至出现清晰的白色条带。将含有目的蛋白的白色条带反复冻融,目的蛋白释放后离心,上清液吸出。将重组蛋白装进处理好的透析袋中,复性结束后放入 TE 缓冲液中 4℃ 过夜。用 PEG-8000 浓缩目的蛋白后,取适量纯化后蛋白加入 5×SDS-PAGE Loading buffer,煮沸变性 10 min,进行电泳,染色。结果见图 2-10,纯化后的 pET-SC 蛋白条带单一,无杂带,证明纯化效果较好。



M. 预染蛋白标准; 1. 纯化后 pET-SC 蛋白
M. Prestained protein marker; 1. Purified pET-SC protein

图 2-10 pET-SC 蛋白的纯化

Fig.2-10 Purification of pET-SC protein

2.3.3.4 间接 ELISA 方法最佳工作条件及临界值的确定

用方阵滴定法,通过单因素试验,确定 TGEV-pET-SC 蛋白的最佳抗原包被浓度、阴阳性对照血清最佳工作浓度、封闭液浓度及不同封闭时间下抗体的捕获情况。酶标抗体稀释度及不同孵育时间下对检测结果的影响,确定 ELISA 的最佳反应条件见表 2-8。用间接 ELISA 检测随机阴性样品(TGEV 阴性鹌鹑血清共 40 份),并测定 450nm 处的 OD 值。求出阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均值的标准差。确定阳性结果的临界值,结果当样品的 OD₄₅₀ 值 ≥ 0.15 时,判定结果为阳性。

表 2-8 间接 ELISA 最佳反应条件
Table 2-8 Indirect ELISA was the best reaction condition

反应条件 Reaction conditions	最优值 Optimal value
抗原蛋白最佳包被浓度	1.5 µg/mL
样品最佳稀释度	1:200
样品最佳反应时间	60 min
封闭液	2%脱脂牛奶
封闭条件	37°C、90 min
酶标二抗最佳工作浓度	1:2000
酶标二抗孵育时长	37°C、20 min

2.4 讨论

猪传染性胃肠炎是引起初生仔猪死亡的主要原因之一，引起感染仔猪出现严重的消化道症状，包括呕吐、水样腹泻、脱水、死亡及耐过猪的生长发育停滞，对仔猪危害尤为严重。TGEV 常与其他腹泻病原发生混合感染，主要是 PEDV、PRoV、猪嗜病毒（PKV）和大肠埃希菌等肠道病原混合感染。由 TGEV 变异来的猪呼吸道冠状病毒（PRCV）主要定植在猪的肺部，引发咳嗽和食欲减退(Wang and Zhang. 2017)。毒株的不断变异使该病的诊断及防治难度加大，预防免疫是目前最有效的防控措施。分析 TGEV 的体外增殖曲线及细胞感染特性能够为疫苗生产、抗原物质的大量制备及 TGEV 的研究提供参考。本研究中 TGEV SX-YL 株在 PK-15 细胞中 16 h 左右病毒开始大量增殖，24 h 细胞培养物上清中的病毒滴度即达到峰值，病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-7.3}/mL。随着病毒培养时间的延长，TGEV 细胞培养物上清中的病毒毒力呈现逐渐下降的趋势，培养到 96 h 时，病毒滴度下降至 10^{-4.8}/mL。也有研究对 TGEV 在 PK-15 和 ST 两种细胞的增殖特性进行研究，通过测定感染后 16 h、24 h、40 h、48 h、64 h、72 h、88 h 及 96 h 的病毒滴度，发现在 16 h 时病毒滴度达到峰值，随后逐渐下降(魏凤等 2014)。TGEV 病毒效价会随着培养时间的延长而呈现出下降的趋势，这可能是由于 TGEV 对温度的敏感性，寒冷情况下稳定，高温失活。TGEV 在低血清培养的 PK-15 细胞中的增殖滴度较低，为 10^{-5.97}/mL，但也为低血清培养基替代 DMEM 的可行性提供了基础数据，为 TGEV 体外无血清培养提供了参考(杨雁婷等 2020)。

对病毒分离株进行遗传进化分析可以为毒株发生遗传变异的规律提供基础数据。秦越等人将 TGEV TH-98 株同 GenBank 中其他 13 株进行比较分析，发现 14 株分离株的 S、N 氨基酸序列同源性分别为 97.3%~99.8%、97.3%~100%，TGEV 的突变、缺失、插入主要发生在 ORF3b 和 S 基因中，TGEV TH-98 与 Purdue 株亲缘关系较近(秦越等

2017)。本研究克隆了 TGEV SX-YL 分离株的主要基因, 经过与近年来流行的 TGEV 毒株从基因、遗传、进化的角度进行比较分析, 结果显示 S 基因与其他 TGEV 毒株核苷酸的同源性为 95.1%~99.99%, 氨基酸同源性为 96.7%~99.8%, 与 Purdue 株亲缘关系最近。TGEV SX-YL 株 N 和 S 基因均属于 Purdue like group 分支, 与雅安和哈尔滨的分离株 SY-C 和 HE-1 株亲缘关系最近。中国经典疫苗毒株 H165 及其祖代强毒株 H16 的全基因组及各个结构基因和非结构基因均处在 Miller like group 分支中, 属 Miller 样毒株。说明 TGEV SX-YL 株属于流行毒株。TGEV 的突变和缺失主要发生在 S 基因中, 与秦越等人的研究结果相近。TGEV 毒株处在不断变异的动态过程中, 在生产中疫苗株可能不能提供完全保护。根据 TGEV 流行毒株的变异情况, 选择优势毒株制备疫苗, 能够更好预防 TGE 的发生, 提高防控效果。

对 TGEV 免疫抗体的检测和评价需要依靠一些实验室技术, 包括病毒的分离与鉴定、分子生物学和免疫学诊断技术等。ELISA 具有特异性高、敏感性高, 适用于大批量样品检测的优势, 已被广泛的应用到各领域。于飞天等人以原核表达系统串联表达的 TGEV S 重组蛋白为包被抗原建立 TGEV 血清抗体的 Dot-ELISA 检测方法, 具有良好的特异性, 该方法的最低检测限为 1:1280, 适用于 TGEV 的快速诊断(于飞天等 2018)。王赛将 TGEV N 蛋白多抗为检测抗体建立夹心 ELISA 方法, 该方法经过特异性、敏感性和重复性等检测, 能特异地捕获 TGEV 的抗原并和 PEDV、PRV 没有交叉反应。能检出的病毒最低浓度为 13.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 批内变异系数小于 5%, 批间变异系数小于 10% 且重复性良好(王赛等 2018)。本研究针对 TGEV 产生中和抗体的 S 基因 C 抗原位点建立了间接 ELISA 抗体检测方法, 为临床上 TGEV 的抗体检测和诊断提供方法。本方法确定了最佳抗原包被浓度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 待检血清最佳稀释度 1:200; 反应时间 60 min; 2%脱脂牛奶封闭 90 min; 酶标抗体最佳稀释度 1:2000, 反应 20 min; 当样品的 OD₄₅₀ 值 ≥ 0.15 时, 判定结果为阳性。TGEV 与 PRCV 高度同源, 但 PRCV S 蛋白中缺失了 TGEV S 基因的 B、C 位点, 因此检测 S 基因的 B、C 位点能够用于区别 TGEV 和 PRCV 以及其他猪病病原。本方法扩增的 S 基因的片段长度 550 bp, 包含 S 蛋白中 C 抗原的完整基因, 特异性强, 灵敏度较高, 结果更为可靠。

2.5 小结

(1) TGEV SX-YL 分离株接种 PK-15 细胞后 16 h 出现细胞病变, 24 h 时的 TCID₅₀ 为 $10^{-7.3}/\text{mL}$ 。

(2) TGEV SX-YL 株为 Purdue like group 分支, 与雅安和哈尔滨的分离株 SY-C 和 HE-1 株亲缘关系最近, 属于流行毒株。

(3) 建立了 TGEV 间接 ELISA 抗体检测方法。抗原包被浓度 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 血清样

品稀释度 1:200; 2% 脱脂牛奶封闭 90 min; 酶标二抗稀释度 1:2000, 反应 20 min; 阳性样品的临界值为 OD₄₅₀ 值 \geq 0.15。

第三章 抗猪传染性胃肠炎病毒流行毒株鹌鹑卵黄抗体的提取 和抗病毒活性检测

卵黄抗体因其成本低、工艺简单、产量高、性质稳定、安全无污染及动物福利等优势,已在多个领域有了广泛的应用。在传染病的防治方面,通过将特定病原免疫产蛋家禽(鸡、鹌鹑等),使其产生免疫抗体而在卵黄中大量存在,将其提取后作为预防和治疗型抗体产品,可较好地防控传染病的发生。目前,卵黄抗体技术及产品被大量用于畜、禽、水生动物传染病和寄生虫疾病的防治,在新城疫、禽流感、牛冠状病毒病、虾白斑综合征、日本血吸虫病及幽门螺旋杆菌病的防治中发挥重要作用(Yang et al. 2020),根据病原的感染和定植特性,可制成注射用、口服用等多种剂型(Abbas et al. 2019)。TGEV 感染引起的腹泻对养猪业危害较大,造成大量感染仔猪的死亡。由于没有特异性的药物,在生产中只能通过给怀孕母猪免疫接种 TGE 疫苗(弱毒疫苗和灭活疫苗),仔猪出生后及时吮吸母乳而获得特异性的母源抗体而得到保护,但是由于疫苗、母猪机体等原因,乳中的母源抗体量不足,不能为仔猪提供完全的免疫保护。另外,由于 TGEV 流行毒株的不断变异,用于生产疫苗的毒株的更新慢于病毒的变异,使得疫苗免疫抗体并不能完全消灭病毒或阻断病毒的感染,也是造成 TGE 难以有效防控的原因。加之,TGE 一般发病较急、来势凶猛,病毒感染后迅速造成肠道黏膜细胞的损害和肠黏膜的大量脱落(Li et al. 2018),使得注射方式进入患猪体内的抗体难以在肠腔内分泌出来,消灭和中和肠道内的病毒。基于以上分析,本研究拟以 TGEV 流行毒株为疫苗制备的基质,制成灭活疫苗免疫产蛋禽,获得特性卵黄抗体,研制成口服型抗 TGEV 卵黄抗体产品。

在卵黄抗体的生产中,一般选择产蛋鸡作为免疫动物,从所产蛋中提取卵黄抗体,具有产量较高、操作相对简单的优势。但是,产蛋鸡在饲养过程中一般都要注射多种疫苗,如禽流感、新城疫、鸡传染性法氏囊病、产蛋下降综合征等。这些抗原物质与免疫细胞表面的抗原表位相结合,可能会使免疫细胞对其他抗原物质的提呈、处理的能力下降。鹌鹑的开产期短、产蛋量大、卵黄占比较大,也是生产卵黄抗体的良好对象。另外,鹌鹑的饲养周期较短,存活期间不进行疫苗免疫接种,或者只接种禽流感疫苗,免疫细胞表面可为其他抗原物质提供更多的抗原表位,产生在更多的针对特定病原的抗体。基于以上分析,我们认为用鹌鹑作为卵黄抗体的生产动物,在理论上和

实践上都是可行的。为此，在获得 TGEV 流行毒株的基础上，我们以产蛋鹤鹑为对象，通过疫苗免疫接种，卵黄抗体的提取和特性研究，目的是生产一种可通过口服的防治 TGE 的卵黄抗体产品。

3.1 材料

3.1.1 细胞、病毒和动物

猪肾细胞 (PK-15)、山东黄羽开产鹤鹑 220 只 (河南省修武县乔合养殖合作社)、雌性昆明鼠 15 只 (购自成都达硕实验动物有限公司西安分公司)。

3.1.2 主要试剂

本研究所用主要试剂见表 3-1。

表 3-1 主要试剂
Table 3-1 Primary reagents

试剂 Reagents	来源 Source
DNA Marker DL1000 和 DL2000	TransGen Biotech 公司
2× <i>Taq</i> PCR MasterMix	北京康为世纪生物科技有限公司
胃蛋白酶 (猪源)	北京索莱宝科技有限公司
2×SYBR Green qPCR Master Mix	美国 Bimake 公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	西安晶彩生物科技有限公司
Rabbit Anti-Chicken IgG Secondary Antibody (HRP)	北京义翘神州科技有限公司
Trizol 试剂 RNAiso Plus	宝生物工程 (大连) 有限公司
弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
脱脂奶粉	美国 BD 公司
三羟甲基丙烷 (TMP)	上海源叶生物科技有限公司
考马斯亮蓝	北京索莱宝科技有限公司
TGEV-PEDV 二联灭活疫苗	---
FastKing RT kit	北京天根生化科技有限公司

3.1.3 主要仪器设备

本研究所用仪器设备见表 3-2。

表 3-2 主要仪器设备
Table 3-2 Main equipments

仪器设备 Equipments	厂家 Manufacturers
37℃恒温培养箱	黑龙江东拓仪器制造有限公司
凝胶成像仪、蛋白电泳仪、蛋白半干转印槽	美国伯乐公司
Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统	上海天能科技有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 公司
酶标仪	Thermo Fisher Scientific 公司
荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司
超纯水仪	美国密理博公司
超净工作台	哈尔滨东胶电子有限公司

3.2 方法

3.2.1 猪传染性胃肠炎病毒流行毒株灭活疫苗的制备及检验

3.2.1.1 病毒浓缩及灭活

将增殖后测定病毒滴度的 TGEV 毒液经 0.22 μm 针式过滤器过滤入容器中，加入甲醛溶液灭活，使甲醛溶液终浓度为 0.1%。置于 37℃ 180 r/min 摇床作用 2 h。然后 3000 r/min 离心 10 min，取上清液装入透析袋中。扎紧透析袋口，将透析袋没入 50%蔗糖溶液中，4℃包埋，待透析袋内病毒量浓缩至原来体积的 1/5~1/10 时（约 4 h），吸出浓缩后的病毒液作为免疫原，保存备用。

3.2.1.2 TGEV 灭活疫苗的制备

将灭活浓缩后的 TGEV 分离株病毒液与弗氏佐剂按 1:1 混合 (V:V)，低温 (4℃) 搅拌 2h，保证疫苗充分的乳化，4℃保存。用弗氏完全佐剂制备的疫苗与弗氏不完全佐剂制备的疫苗体积比为 1:3。

3.2.1.3 TGEV 灭活疫苗的检验

3.2.1.3.1 TGEV 灭活疫苗的物理性状检验

(1) 黏度检查：用洗耳球吸取灭活疫苗 1 mL，室温下使疫苗垂直自然流出，流出 0.4 mL 的时间大于 8 s 时，黏度合格，为较黏乳剂。

(2) 稳定性检查：取 1 mL 灭活疫苗，加入离心管内。室温，3500 r/min 离心 15 min，查看疫苗是否分层。当离心后析出的水相小于 50 μL 时即合格。

(3) 外观检查：肉眼观察灭活疫苗的颜色、澄明度及状态，正常应为淡粉色乳液。

(4) 剂型检验检查：吸取少量灭活疫苗滴于冷水中，观察是否扩散。若疫苗呈油滴状不扩散即合格。

3.2.1.3.2 TGEV 灭活疫苗的无菌检验

无菌条件下，取适量制备的灭活疫苗，接种于 TSA 平板。倒置于 37℃ 培养箱，培养 18 h 后，观察平板上是否有细菌、霉菌生长。

3.2.2 产蛋鹌鹑免疫及高免蛋黄的初步收集

控制鹌鹑舍温度在 28℃ 左右，湿度 60% 左右，保证鹌鹑舍内通风，定期清理卫生及消毒。选择 220 只处于产蛋高峰期的蛋鹌鹑（产蛋率高于 85%），随机分为 3 组，使鹌鹑自由采食和饮水。

试验组 A：TGEV 流行株灭活疫苗组，共 80 只；试验组 B：商品苗 TGEV 灭活疫苗组，共 80 只；试验组 C：阴性对照组，相同途径及部位注射同等剂量的生理盐水，共 60 只。

在产蛋鹌鹑胸部肌肉进行多点注射，每只产蛋鹌鹑免疫 0.2 mL（基础免疫），基础免疫后每隔 15 d，进行加强免疫 2 次，每次 0.2 mL。第 2 次加强免疫后，间隔 7 d 后维持免疫一次，胸部肌肉注射 0.2 mL。具体免疫方案见表 3-3。

表 3-3 免疫方案

Table 3-3 The immunization programme

免疫时间 Immune	免疫部位 Immune parts	时间间隔 (d) Time interval (d)	免疫剂量 (mL) Dose (mL)
首免（基础免疫）	胸部肌肉	--	0.2
二免（加强免疫）	胸部肌肉	15	0.2
三免（强化免疫）	胸部肌肉	15	0.2
维持免疫	胸部肌肉	7	0.2

第 1 次免疫后每隔 7 d 采集血清及收蛋，至强化免疫 1 周后开始每天收集高免蛋。固定时间、固定人员进行血清的采集及收蛋，避免鹌鹑受到惊吓发生应激，而影响产蛋率。采用翼下静脉采血的方式采血，常规方法分离血清。收集的蛋和血清做好标记后储存在 4℃ 冰箱。

将收获的鹌鹑蛋浸入 0.1% 的新洁尔灭中，消毒 10 min。取出后晾干蛋壳表面，打破蛋壳后小心去除蛋清、胚盘和系带，分离蛋黄，用无菌蒸馏水反复清洗蛋黄表面，尽量去除卵清蛋白后置于灭菌离心管中备用。

3.2.3 卵黄抗体的提取及纯化

分别采用酸化水提法、PEG 6000 法和辛酸法提取 IgY，对比分析 3 种提取方法获得的 IgY 的物理性状、提取效率、纯度、蛋白浓度和提取量等，确定最佳提取方法。

(1) 酸化水提法：用无菌针头刺破卵黄膜，测量卵黄体积。取 5 mL 卵黄并加入卵黄 8 倍体积的无菌蒸馏水，搅拌均匀。用 0.1 mol/L HCl 调节卵黄稀释液的 pH 至酸碱度位于 5.2~5.5 之间。4℃ 静置卵黄稀释液，直至溶液出现分层，分离上清液（水溶性组分），IgY 即存在于水溶性组分中。

(2) 聚乙二醇 PEG 6000 法：取 5 mL 的卵黄，加入卵黄液 2 倍体积的无菌蒸馏水，搅拌均匀。向卵黄溶液中加入 PEG-6000，使 PEG-6000 的终浓度为 3.5%，搅拌直至 PEG-6000 完全溶解，室温下作用 30 min。4℃，12 000 r/min 离心 30 min，溶液分层。黄色的半固体层为脂肪层，水相层为含有 IgY 的澄清透明层。分离上清液，用滤纸过滤。滤液中加入终浓度为 12% 的 PEG-6000，搅拌至充分溶解，室温下作用 30 min。4℃，12 000 r/min 离心 20 min，弃去上清液，用 PBS 溶解沉淀，4℃ 储存。

(3) 辛酸法：取 5 mL 卵黄液，加入 8 倍体积 pH5.0 的醋酸盐缓冲液，混合均匀后调节卵黄稀释液 pH 至 5.2~5.5，4℃ 静置过夜。分离上清液，加入终浓度为 2% 的辛酸，搅拌均匀后调节溶液的 pH 至 5.0。室温作用 2 h，10 000 r/min 离心 20 min，过滤除去沉淀，收集上清液。加入终浓度为 50% 的硫酸铵，搅拌溶解后调节 pH 至 7.0~7.4。室温作用 2 h 后，10 000 r/min 离心 20 min，收集上清液。加入终浓度为 33% 的硫酸铵，搅拌溶解，室温作用 2 h。4℃，10 000 r/min 离心 20 min，弃去上清液，用 PBS 溶解沉淀，4℃ 储存。

3.2.4 卵黄抗体的理化特性及纯度检验

3.2.4.1 温度、pH、胃蛋白酶作用时间对 IgY 的影响

(1) 取 IgY 分为 5 组，密封好后分别置于不同温度下，1~4 组分别在 56℃、60℃、70℃、80℃，作用 60 min，第 5 组置于 4℃ 冰箱内。结束后测定抗 TGEV 抗体效价，分析保存温度对抗体效价的影响。

(2) 取 IgY 分为 5 组，分别用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液，将 IgY 的 pH 调至 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0，分别作用 60 min。对照组不加酸碱作用，测定抗 TGEV 抗体效价，分析酸碱度对抗体效价的影响。

(3) 取 IgY 分为 5 组，分别加入 0.3 mL 浓度为 20.0 mg/L 的胃蛋白酶溶液

(3000~3500 N Fu/mg), 混合后置 37℃ 水浴中, 分别作用 4 h、6 h、8 h、10 h。作用结束后调节溶液 pH 至 7.0, 对照组不加胃蛋白酶。测定抗 TGEV 抗体效价, 分析胃蛋白酶对抗体效价的影响。

3.2.4.2 IgY 的安全性检测

(1) 无菌检验: 无菌条件下, 将提取纯化后的 TGEV IgY 涂布于 TSA 和血琼脂营养培养板上, 每个平板接种 80~100 μ L。放入 37℃ 恒温培养箱中, 倒置培养 12~14 h, 观察有无细菌和霉菌生长。

(2) 小白鼠安全性试验: 选择健康的体重 22 g 左右的小白鼠 15 只, 分为 3 组。随机选择 TGEV IgY 样品, 1 组每只小鼠口服 1 mL IgY, 2 组每只小鼠皮下注射 1 mL TGEV IgY, 3 组小鼠注射等体积生理盐水。观察 7~10 d, 记录各组小鼠健康状况、不良反应等情况。

3.2.4.3 IgY 浓度及纯度的检测

(1) 蛋白浓度测定: 利用试剂盒用 BCA 法测定样品中的蛋白浓度, 按照说明书进行操作, 用蛋白标准品的 OD 值绘制标准曲线。

(2) IgY 样品处理: 按照样品的蛋白浓度, 计算出含 50 μ g 蛋白的上样量, 吸取 TGEV IgY 样品至 EP 管中, 按比例加入 5 \times SDS PAGE Loading buffer, 吹打混匀后, 100℃ 沸水浴 10 min (注意防止高温下管盖崩开, 沸水进入管中), 使蛋白变性。

(3) SDS-PAGE 电泳: 按照目的蛋白的大小配置适宜浓度的 SDS-PAGE 胶, 电泳程序如下, 浓缩胶 75 V 30 min, 分离胶 120 V 90 min。电泳过程中需保持电压的稳定。

(4) 考马斯亮蓝染色: 电泳结束后, 小心分离胶块, 将胶块浸入 0.25% 的考马斯亮蓝染色液中, 染色 3~4 h。经脱色液脱色直至能看出清晰的蛋白条带后, 置于照胶仪白色背景板下拍照。

3.2.4.4 猪传染性胃肠炎卵黄抗体提取效率的测定

根据如下统计方法, 计算不同提取方法下 TGEV IgY 提取效率的差异:

提取效率 = (离心管重 + 沉淀重) / 所用卵黄液体积 (单位为 mg/mL)。

3.2.5 抗猪传染性胃肠炎卵黄抗体的效价测定

3.2.5.1 间接 ELISA 方法检测 IgY 抗 TGEV 效价

用建立的间接 ELISA 抗体检测方法进行 TGEV 抗体效价检测。试验组 A 为 TGEV 流行株灭活疫苗组; 试验组 B 为商品苗 TGEV 灭活疫苗组; 试验组 C 为生理盐水免疫组 (阴性对照组)。分别检测各试验组免疫后 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d、49 d、

56 d、63 d 及 70 d 的 IgY 抗 TGEV 效价。

3.2.5.2 Western blot 测定 IgY 中抗 TGEV 抗体

预先配置好 SDS-PAGE 胶，设定浓缩胶 80 V 30 min，分离胶 120 V 90 min 的程序电泳。电泳结束后，小心将胶块分离，去除边缘多余的胶，根据目的蛋白的大小，参照蛋白 Marker 将对应的胶块切开。采用湿转将目的蛋白转至 PVDF 膜上。转膜时设置 0.2 A 恒流，注意提前制冰，避免过热。用 TBST 配制 50 g/L 脱脂奶粉做封闭液，室温下将 PVDF 膜放入封闭液中慢摇封闭 2 h。TBST 洗涤 1 次，用 TBST 按比例稀释特异性一抗(IgY)，将封闭结束后的 PVDF 膜转移至一抗稀释液中，4℃过夜摇晃孵育。TBST 洗涤 5 次，放置在摇床上，每次洗 5 min。洗涤结束后将 PVDF 膜转移至用 TBST 稀释的 HRP 标记的兔抗鸡抗体中，37℃下孵育 1.5 h 后用 TBST 洗 5 次，每次洗涤 5 min。将清洗干净的 PVDF 膜取出，滴加化学发光液，置于 ECL 发光成像仪中显影观察，分析结果并拍照。

3.2.5.3 中和效价的测定

将采集的鹌鹑血清置于 56℃水浴锅中灭活 30 min。加热时为了避免蛋白质成分凝固，应提前用生理盐水适当稀释样品。

(1) 取 TGEV IgY 或已灭活处理的鹌鹑血清样品，用不含 FBS 的 DMEM 做 2 倍梯度稀释。稀释度分别为原样品的 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128...

(2) 将已知 TCID₅₀ 的 TGEV 病毒液按 200 TCID₅₀ 稀释，与等量鹌鹑血清或 IgY 混合后，即为 100 TCID₅₀。

(3) 按每孔加 50 μL 灭活的鹌鹑血清及 50 μL 病毒液，每个稀释度做 8 个重复，将 TGEV 病毒液与抗体按 1:1 混合后，放置在 37℃恒温箱中作用 1 h。

(4) PK-15 细胞消化后用维持培养液吹散，铺进 96 孔细胞培养板时，应注意细胞的密度以在 24h 内长满单层为宜。每孔加入 100 μL 鹌鹑血清病毒中和液，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5~7 d。每日观察记录 CPE。

(5) 配制每个接种量含有 0.2、2、20 和 200 倍 TCID₅₀ 浓度的 TGE 病毒液，加入等量低倍稀释的鹌鹑血清，充分混匀，此时的病毒浓度已经稀释到 0.1、1、10、100 个 TCID₅₀，然后分别接种 PK-15 细胞。试验成立时，0.1 TCID₅₀ 不引起 CPE，而 100 TCID₅₀ 的病毒液一定会使细胞发生 CPE。

(6) 用不接种病毒的 PK-15 细胞设置空白对照，空白对照细胞应生长状态良好，不产生 CPE。

(7) 采用 Reed-Mench 法进行抗体中和效价的计算。

3.3 结果

3.3.1 TGEV 分离株灭活疫苗检验

(1) TGEV SX-YL 株灭活疫苗物理性状

制备的 TGEV SX-YL 分离株灭活疫苗颜色呈淡粉色；为油包水型乳状液体；稳定性检验中未分层，无水相析出；黏度检验合格。物理性状检验结果见表 3-5。

表 3-5 TGEV 分离株灭活疫苗物理性状检验结果
Table 3-5 Physical properties of TGEV isolates inactivated vaccine

名称 Name	外观 Appearance	剂型 Dosage	稳定性 Stability	黏度 Viscosity
TGEV 灭活疫苗	淡粉色乳液	油包水型	未分层	较黏乳剂

(2) TGEV SX-YL 株灭活疫苗无菌性检验

TGEV 灭活疫苗接种于 TSA 平板，培养 18 h 后，未见有细菌、霉菌生长。

3.3.2 卵黄抗体提取方法的优化

3.3.2.1 不同提取方法 IgY 的物理性状比较

采用酸化水提法、PEG6000 法和辛酸法对同一批鹤鹑卵黄进行 IgY 的提取和纯化，从产物的颜色、气味、澄清度等物理性状进行对比，结果见表 3-6。

表 3-6 不同方法提取对 IgY 的物理性状的影响
Table 3-6 Effects of different extraction methods on physical properties of IgY

方法 Methods	颜色 Color	气味 Smell	澄清度 Transparency
酸化水提法	黄色	轻微酸味	不透明
PEG6000 法	淡黄色	无	澄清透明
辛酸法	白色	无	澄清透明

3.3.2.2 不同提取方法 IgY 的蛋白浓度测定

用 BCA 法测定 3 种方法提取 IgY 的蛋白浓度。梯度稀释蛋白标准品，绘制标准曲线（图 3-1），测量 450 nm 处的 OD 值。计算出不同提取方法下的 IgY 的蛋白浓度。酸化水提法提取的 IgY 蛋白浓度最高，高于 20 mg/mL；PEG-6000 法提取的 IgY 蛋白浓度在 10 mg/mL 左右浮动；辛酸法提取的 IgY 蛋白浓度平均值为 12.26 mg/mL。各方法下提取的 IgY 蛋白浓度的平均值见表 3-7。

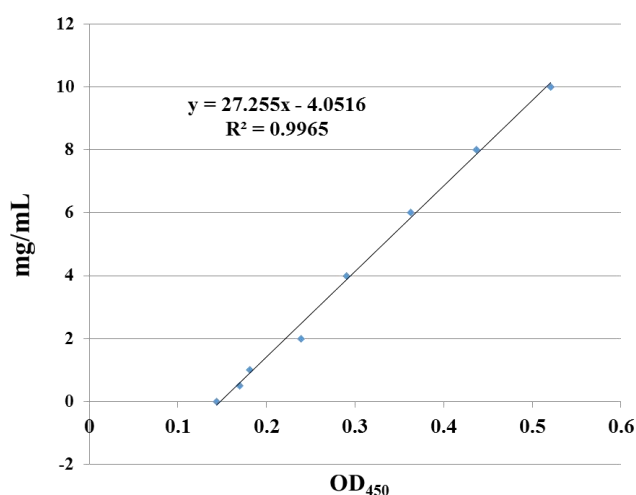


图 3-1 蛋白浓度测定标准曲线

Fig. 3-1 Standard curve for determination of protein concentration

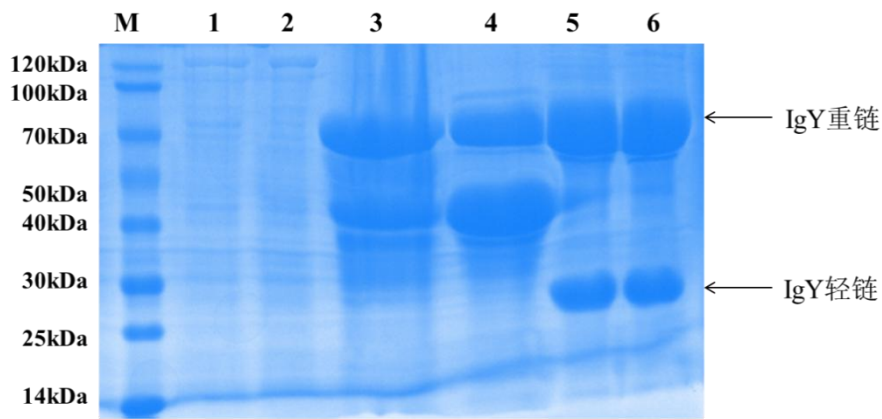
表 3-7 不同方法提取 IgY 的蛋白浓度

Table 3-7 Protein concentration of IgY was extracted by different methods

方法 Methods	酸化水提法 Acid water extraction	PEG6000 法 polyethylene glycol 6000	辛酸法 Octanoic acid
蛋白浓度 Protein concentration	21.19 mg/mL	10.55 mg/mL	12.26 mg/mL

3.3.2.3 不同提取方法 IgY 的纯度比较

用 PBS 将 3 种方法提取的 IgY 产物按 1:100 (V:V) 稀释后, 加入适量 5×SDS-PAGE Loading buffer, 煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后取下胶块用考马斯亮蓝染色, 脱色后拍照。SDS-PAGE 结果如图 3-2 所示。由图显示酸化水提法所提取的 IgY 抗体纯度低, 杂蛋白产生的条带较多, 轻链和重链均不明显。PEG6000 法提取的 IgY 重链很明显但轻链不明显, 中间有杂带 (40 kDa~55 kDa)。优化后的辛酸法提取的 IgY 重链 (约 70 kDa) 和轻链 (约 28 kDa) 均非常明显, 杂蛋白条带相对较少, 说明该方法下提取的 IgY 纯度较高。



M. 预染蛋白标准; 1、2.水稀释法; 3、4.PEG6000 法; 5、6.辛酸法
M. Prestained protein marker; 1,2. Water dilution method; 3,4. PEG6000 method; 5,6. Octanoic acid method

图 3-2 不同方法提取 IgY 纯度的检测

Fig. 3-2 Detection of purity of IgY extracted by different methods

3.3.2.4 不同提取方法 IgY 的提取量及提取效率

各取 5 mL 卵黄，按照 3 种方法提取 IgY，统计所提取 IgY 的量的差异。按照提取效率=（离心管重+沉淀重）/ 所用卵黄液体积，计算不同方法下 IgY 的提取效率。结果见表 3-8，5 mL 卵黄用酸化水提法粗提可得到大约 40 mL 的粗提 IgY 产物，平均提取效率为 88.91 mg/mL；用 PEG6000 法可提取出约 1 mL IgY，提取效率 48.00 mg/mL；辛酸法所提取的 IgY 提取量介于酸化水提法和 PEG6000 法之间，为 5 mL，提取效率高于另外两种方法，为 95.69 mg/mL。

表 3-8 不同方法提取 IgY 的提取量及提取效率

Table 3-8 Extraction quantity and extraction efficiency of IgY was extracted by different methods

方法 Methods	酸化水提法 Acid water extraction	PEG6000 法 polyethylene glycol 6000	辛酸法 Octanoic acid
提取量 Extraction quantity	约 40 mL	1 mL	5 mL
提取效率 Extraction efficiency	88.91 mg/mL	48.00 mg/mL	95.69 mg/mL

3.3.3 卵黄抗体抗 TGEV 效价的检测

3.3.3.1 间接 ELISA 方法检测抗体效价

间接 ELISA 抗体检测方法检测 IgY 的抗体效价，结果如图 3-3 所示。A 组免疫了

TGEV SX-YL 株灭活疫苗，免疫 21 d 前抗体水平没有显著变化，免疫第 3 周后抗体水平开始逐步升高，至第 3 次免疫后 1 周，抗体水平达到峰值。B 组为 TGEV-PEDV 二联灭活疫苗免疫组，对照组抗体的消长趋势与试验组一致，至免疫后第 7 周达到峰值，随后逐渐下降，回降的幅度大于试验组。说明制备的 TGEV 流行毒株灭活疫苗，与商品化疫苗都具有良好的免疫原性。C 组为生理盐水免疫空白组。

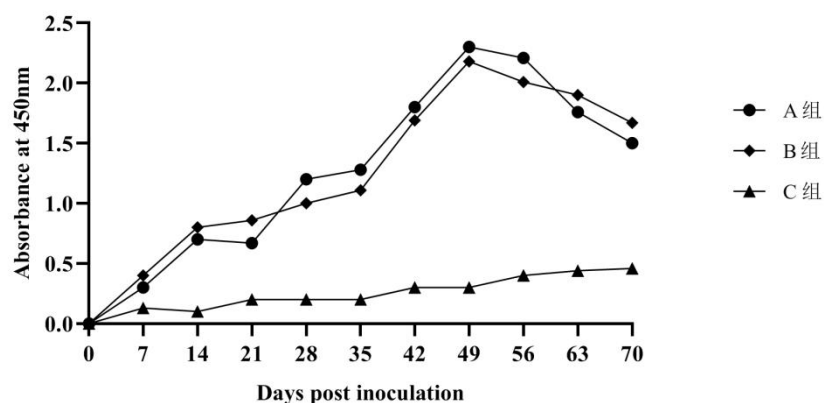


图 3-3 ELISA 检测不同免疫组 TGEV IgY

Fig. 3-3 Detection of TGEV IgY in different immune groups by ELISA

3.3.3.2 Western blot 检测卵黄抗体效价

以纯化的 TGEV S 蛋白作为抗原，采用 Western blot 方法检测卵黄抗体，以显色为阳性的条带的最高稀释倍数表示 IgY 的抗体滴度。TGEV S 蛋白样品加 5×SDS-PAGE Loading buffer 后煮沸进行蛋白凝胶电泳。电泳结束后将目的蛋白转印至 PVDF 膜，封闭后用不同稀释度的 IgY 孵育。一抗孵育后与 HRP 标记的抗体（兔抗鸡）结合，用化学发光液显色。结果显示，所提取的 IgY 免疫活性高，与 TGEV S 蛋白的反应性良好，IgY 稀释度从 1:100 开始 2 倍稀释，出现阳性条带的最大稀释度为 1:16 000（图 3-4）。

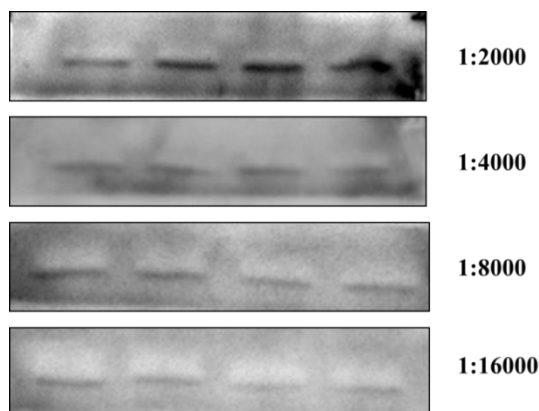


图 3-4 TGEV IgY 免疫活性与效价的检测

Fig. 3-4 Detection of immunoactivity and titer of TGEV IgY

3.3.4 卵黄抗体对 TGEV 的中和效价

采用固定病毒-稀释血清中和试验终点法测定 IgY 抗 TGEV 中和抗体效价(表 3-9)。结果显示,当 TGEV IgY 以 1:109 稀释时 (V:V),能保护 50%的细胞不被 TGEV 感染发生病变。收集了首次免疫后每隔 7d 的鹌鹑血清,测定了抗 TGEV 血清 IgG 的抗体中和效价。由图 3-5 分析可知,血清 IgG 抗体效价高于卵黄 IgY 效价,最高达到 1:120。IgY 中和效价的峰值产生于免疫后 56 d,滞后于血清 IgG 约 5~7 d,这可能是由于抗体先在血液中产生后,血液流经卵巢时富集产生 IgY 而导致。血清 IgG 和 IgY 的中和抗体消长规律基本一致,加强免疫后抗体效价都出现了明显的提升。补免以后出现小幅度的回落。

表 3-9 TGEV IgY 细胞中和效价的测定
Table 3-9 Determination of neutralization titer in TGEV IgY cells

稀释度 Dilution degrees	CPE 比例 CPE proportion	CPE 数 CPE well	非 CPE 数 No CPE well	累计 Total			
				CPE 数 CPE	非 CPE 数 No CPE	CPE 比例 proportion	保护率% Protection%
1:4 ($10^{-0.6}$)	0/8	0	8	0	25	0/25	100
1:16 ($10^{-1.2}$)	1/8	1	7	1	17	1/18	94
1:64 ($10^{-1.8}$)	2/8	2	6	3	10	3/13	77
1:256 ($10^{-2.4}$)	4/8	4	4	7	4	7/11	36
1:1024 ($10^{-3.0}$)	8/8	8	0	15	0	15/15	0

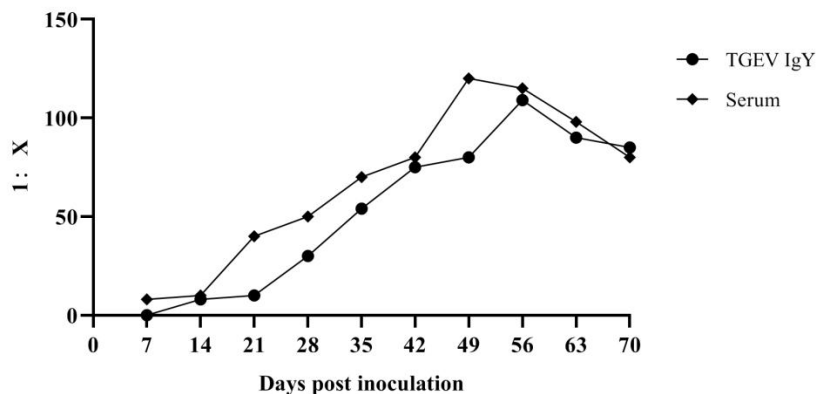


图 3-5 IgY 与 IgG 中和抗体消长曲线

Fig. 3-5 IgY and IgG neutralizing antibody rise and fall curve

3.3.5 卵黄抗体的理化特性及安全性检验

3.3.5.1 卵黄抗体的理化特性

单因素试验条件下检测了温度、pH、胃蛋白酶作用时间对 TGEV IgY 效价的影响, 结果如表 3-10。当温度低于 70℃ 时 IgY 对温度有一定的抵抗能力; 在 pH4.0~10.0 时相对稳定, 处于强酸强碱条件下的 IgY 检测不到抗体效价, 所以在 IgY 的生产储存过程中应该避免接触强酸、强碱性物质; IgY 在 6 h 内对胃蛋白酶具有一定抵抗力, 作用时间达到 8 h、10 h 时会效价降低; 提取纯化后的 IgY 经过 10 次反复冻融后, 未对抗体效价产生明显的影响。

表 3-10 TGEV IgY 的理化特性
Table 3-10 Physicochemical properties of TGEV IgY

影响因素 Affecting factors	稳定条件 Stability condition
温度 Temperature	<70℃
酸碱度 pH	4.0~10.0
胃蛋白酶作用时间 Pepsin action time	<6 h
冻融次数 Freezing and thawing time	无明显影响

3.3.5.2 卵黄抗体的安全性检验

(1) 无菌检验: 将提取纯化后的 TGEV IgY 涂布于 TSA 和血琼脂营养培养板上, 每个平板接种 80~100 μL。放入 37℃ 恒温培养箱中, 倒置培养 12~14 h 后观察均无细菌和霉菌生长, 证明了制备 TGEV IgY 的无菌状态良好, 结果如图 3-6。

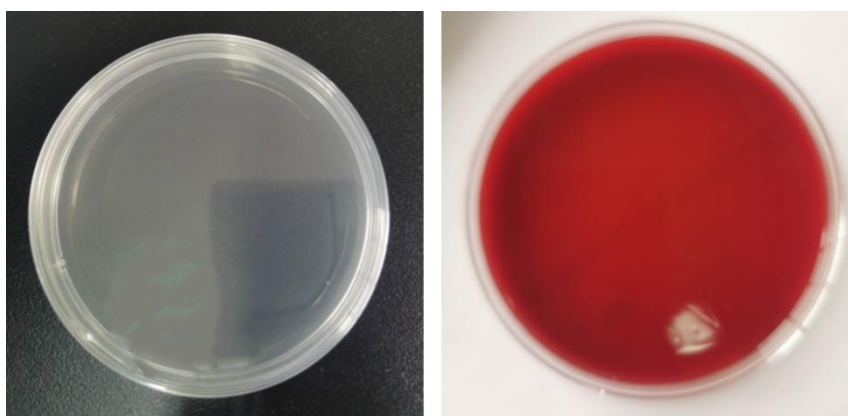


图 3-6 IgY 无菌性检验
Fig. 3-6 IgY sterility test

(2) 小鼠安全性试验: 观察结果显示 3 组小鼠均精神状态及食欲良好; 被毛有光泽; 正常排便; 抗体吸收良好。未出现注射局部及全身不良反应。试验表明 TGEV IgY

注射小白鼠安全性评价良好，性质安全稳定。

3.4 讨论

由于 IgY 具有成本低、制作工艺简单、产量高、性质稳定、安全无污染等优势，目前已广泛应用于疫病防控、寄生虫病防控、饲料添加等诸多领域，并取得了良好的效果。

本研究将制备的 TGEV 病毒液经甲醛灭活浓缩后与弗氏佐剂乳化，免疫产蛋鹌鹑后收集血清与卵黄。从 IgY 的纯度、提取效率、提取量和蛋白浓度等方面进行分析，对比了酸化水提法、聚乙二醇法和优化后的辛酸法提取 IgY 的优缺点。结果发现酸化水提法提取 IgY 的蛋白浓度最高，达 21.19 mg/mL，PEG 法为 10.55 mg/mL，辛酸法介于二者之间，为 12.26 mg/mL。经 SDS-PAGE 分析蛋白纯度，结果显示鹌鹑源抗 TGEV IgY 重链约 70 kDa，轻链约 28 kDa；辛酸法提取 IgY 的纯度最高，杂蛋白较少。辛酸法的提取量介于酸化水提法（40 mL）和 PEG6000 法（1 mL）之间，为 5 mL；提取效率为 95.69 mg/mL，高于另外两种方法（88.91 mg/mL，48.00 mg/mL）。证明了优化后的辛酸法提取 IgY 具有提取效率和纯度的明显优势。用间接 ELISA 抗体检测方法、Western blot 及终点法检测各组抗体的特异性、纯度及免疫后 70 d 的抗体效价消长曲线。ELISA 结果显示免疫 21 d 前抗体水平没有显著变化，第 3 周开始抗体水平逐步升高，至第 3 次免疫后 1 周，达到峰值（OD₄₅₀ 为 2.219）。商品苗对照组抗体的消长趋势与试验组一致，至免疫后第 7 周达到峰值（OD₄₅₀ 为 2.100），随后逐渐下降，回降的幅度大于试验组。说明制备的 TGEV 流行毒株灭活疫苗与商品化疫苗都具有良好的免疫原性。商品二联苗免疫产生的特异性抗体效价峰值略低于试验组，这可能是由于动物机体抗原表位占用的原因。终点法测定抗 TGEV IgY 的中和效价，结果发现中和效价峰值产生于免疫后 56d（1:109）；血清 IgG 的中和效价最高值在免疫后 49d 出现（1:120）。IgY 的出现滞后于血清 IgG 约 5~7 d，这可能是由于抗体先在血液中产生后，血液流经卵巢时富集产生 IgY 而导致。血清 IgG 和 IgY 的中和抗体消长规律基本一致，血清抗体滴度高于 IgY。Western blot 检测结果出现阳性条带的最大 IgY 稀释度为 1:16000。试验证明了用鹌鹑制备 IgY 的可行性，为 TGEV 的防控提供可供选择的方案。

丁雨善用分离的 PEDV 制备免疫原免疫蛋鸡，采用水稀释-饱和硫酸铵法提取的抗 PEDV IgY，浓度最高达 8.9 mg/mL，利用商品化试剂盒对 IgY 的效价进行测定，OD₄₅₀ 最高为 2.876。IgG 抗体在 1:1024 稀释度下具有中和作用，IgY 抗体在 1:512 稀释度下具有中和作用(丁雨善 2020)。高岭等人采用 PEDV-TGEV 二联苗免疫蛋鸡，用水稀释法和饱和硫酸铵盐法提纯 IgY。IgY 浓度最高为 9.5 mg/mL，ELISA 法监测抗体消长规律，2 种病毒 IgY OD₄₅₀ 值最高为 2.900，血清中效价最高达到 5000，高效价抗体维持

5周(高岭等 2013)。国外有学者用弗氏佐剂乳化灭活鼠伤寒沙门菌和肠炎沙门菌制备免疫原免疫产蛋鹌鹑。所制备的鹌鹑抗沙门菌 IgY 对其相应的免疫原表现出高度特异性,与肠杆菌科的其他成员具有中等交叉反应性。文章得出结论认为鹌鹑可被视为生产大规模特异性抗体的有价值且廉价的来源,所制备的抗体可用于免疫诊断和免疫治疗(Atefeh et al. 2019)。鹌鹑作为野生驯化的物种,抗病能力强,规模化养殖过程中接种疫苗种类少,因而机体抗原表位占用少;40日龄即可开产,年产蛋约270枚;鹌鹑蛋黄比重大,约33%~36%。本试验制备的鹌鹑源 IgY,经辛酸法纯化后,蛋白浓度为12.26 mg/mL,明显高于由鸡蛋中纯化的 IgY;用建立的 ELISA 方法测得抗体效价 OD₄₅₀ 为2.219, IgY 抗体在1:512稀释度下具有中和病毒的作用。由鹌鹑制备的 IgY 与蛋鸡相比抗体效价水平差别不明显,但相比于鸡源 IgY,鹌鹑源 IgY 的蛋白浓度及提取量具有明显的优势。

3.5 小结

(1) 制备了 TGEV SX-YL 株灭活疫苗,具有良好的物理性状和稳定性。

(2) 抗 TGEV IgY 重链约 70 kDa,轻链约 28 kDa,辛酸法提取 IgY 的纯度最高,杂蛋白较少;提取效率为 95.69 mg/mL;蛋白浓度 12.26 mg/mL。

(3) IgY 中和效价的峰值产生于免疫后 56 d (1:109);血清 IgG 的中和效价最高值在免疫后 49 d 出现 (1:120);Western blot 检测抗体效价为 1:16 000;ELISA 检测 IgY 的 OD₄₅₀ 最大值为 2.219。

(4) IgY 在 70℃ 下及 pH 位于 4.0~10.0 区间时效价稳定;IgY 在 6h 内对胃蛋白酶具有一定抵抗力;IgY 对环境温度的冷暖反复变化具有一定抵抗力。

结 论

(1) TGEV SX-YL 分离株属于 Purdue like group 大群, 是流行毒株。PK-15 细胞上增殖的病毒 TCID₅₀ 为 10^{-7.3}/mL。

(2) 建立了 TGEV 流行毒株间接 ELISA 抗体检测方法。抗原包被浓度 1.5 μg/mL; 样品稀释度 1:200; 2%脱脂牛奶封闭 90 min; 酶标二抗稀释度 1:2000。OD₄₅₀ 值≥0.15 时为阳性。

(3) 抗 TGEV IgY 重链约 70 kDa, 轻链约 28 kDa, 辛酸法提取 IgY 的纯度最高, 杂蛋白较少; 提取效率为 95.69 mg/mL; 蛋白浓度 12.26 mg/mL。

(4) IgY 抗 TGEV 中和效价的峰值产生于免疫后 56 d (1:109); 血清 IgG 的中和效价最高值在免疫后 49 d 出现 (1:120)。Western blot 阳性条带的最大 IgY 抗体稀释度为 1:16 000; ELISA 检测抗 TGEV 分离株 IgY 的 OD₄₅₀ 最大值为 2.219, 商品苗 OD₄₅₀ 为 2.100。获得了抗 TGEV 流行毒株鹌鹑 IgY。

本文的创新点

制备了鹌鹑源抗 TGEV 流行毒株卵黄抗体, 优化了卵黄抗体的提取工艺, 获得高纯度, 高滴度的中和抗体。

参考文献

- 陈家庆, G.C.Dulac, P.Boulanger. 1978. 用细胞培养分离猪传染性胃肠炎病毒并和美国两个参考毒株的比较. *兽医科技资料*, (4): 3.
- 丁雨善. 2020. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)卵黄抗体的研制. [硕士学位论文]. 河南南阳: 南阳师范学院.
- 方时杰. 1959. 猪的传染性胃肠炎. *中国兽医杂志*, (6): 184-185.
- 高岭, 刘聚祥, 杨娜娜, 高宝龙, 曹立辉. 2013. 猪传染性胃肠炎和流行性腹泻卵黄抗体水平的动态检测. *河北农业大学学报*, 36(6): 93-96.
- 贺维朝, 张会艳, 王浩, 赵青余, 汤超华, 张军民. 2021. 卵黄抗体提取方法及其在畜禽细菌性肠道疾病防治中的应用. *中国畜牧兽医*, 48(2): 640-649.
- 阚中岩. 2019. 猪冠状病毒性胃肠炎的流行与防控. *饲料博览*, 330(10): 61.
- 李庆勇. 2021. 猪传染性胃肠炎病的防控. *吉林畜牧兽医*, 42(3): 17-18.
- 路秀梅. 2018. 猪传染性胃肠炎的诊断与防控. *畜牧兽医科技信息*, (3): 106.
- 马德英. 2013. 猪传染性肠胃炎的诊断与防治. *湖北畜牧兽医*, 34(3): 62-63.
- 马雪连. 2020. CircEZH2 靶向 miR-22 抑制 TGEV 诱导的线粒体损伤作用与机制研究. [硕士学位论文]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学.
- 秦越, 张斯佳, 郝振业, 郭田田, 李文雪, 王亚楠, 孙黎, 姜艳平, 崔文, 王丽, 徐义刚, 唐丽杰, 李一经. 2017. 猪传染性胃肠炎病毒 TH-98 株的遗传变异分析. *畜牧与兽医*, (11): 52-60.
- 王丽莎, 庞有志. 2013. 鹌鹑的实验动物学价值. *生物学通报*, 48(5): 8-11.
- 王赛, 苏菲, 徐丽华, 李军星, 袁秀芳. 2018. 猪传染性胃肠炎病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立. *中国兽医科学*, 48(8): 946-952.
- 魏凤, 管宇, 肖跃强, 谢金文, 沈旭, 沈志强. 2014. Pk15, ST 细胞增殖猪传染性胃肠炎病毒的比较研究. *黑龙江畜牧兽医*, (1): 125-126.
- 杨学贵. 2015. 猪传染性胃肠炎临床诊断及防治. *兽医导刊*, (8): 90.
- 杨雁婷, 杨定勇, 龚双燕, 李小璟, 朱玲. 2020. 低血清培养 PK-15 细胞系对 TGEV 增殖规律的研究. *中国兽医科学*, (1): 98-104.
- 姚金水. 2020. 猪传染性胃肠炎的流行病学, 临床症状, 鉴别诊断及防控措施. *现代畜牧科技*, 72(12): 138-139.
- 于天飞, 董慧莹, 张喜文, 谢鹏宇, 孙婉姝, 王有祺. 2018. 猪传染性胃肠炎病毒血清抗体 Dot-ELISA 检测方法的建立. *中国预防兽医学报*, 40(10): 956-959.
- 张海玲. 2016. 猪传染性肠胃炎的免疫防治技术. *中国畜牧兽医文摘*, 32(1): 124.
- 章德正. 2020. 猪传染性胃肠炎的综合防控措施. *今日畜牧兽医*, 36(1): 31.
- 朱向东. 2017. TGEV 强弱毒株的反向遗传系统及报告病毒的构建. [博士学位论文]. 中国农业科学院.
- Abbas AT, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Azhar EIA. 2019. IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 15(1): 264-275.
- Aizenshtein E, Yosipovich R, Kvint M, Shadmon R, Krispel S, Shuster E, Eliyahu D, Finger A, Banet-Noach C, Shahar E, Pitcovski J. 2016. Practical aspects in the use of passive immunization as an alternative to attenuated viral vaccines. *Vaccine*, 34(22): 2513-2518.

- Purification and characterization studies. *Journal of immunological methods*, 449: 56-61.
- Grover R, Zhu X, Nieusma T, Jones T, Boreo I, MacLeod A, Mark A, Niessen S, Kim H, Kong L, Assad-Garcia N, Kwon K, Chesi M, Smider V, Salomon D, Jelinek D, Kyle R, Pyles R, Glass J, Ward A, Wilson I, Lerner R. 2014. A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6171): 656-661.
- Guo R, Fan B, Chang X, Zhou J, Zhao Y, Shi D, Yu Z, He K, Li B. 2020. Characterization and evaluation of the pathogenicity of a natural recombinant transmissible gastroenteritis virus in China. *Virology*, 545: 24-32.
- Gürtler M, Methner U, Kobilke H, Fehlhaber K. 2004. Effect of orally administered egg yolk antibodies on Salmonella enteritidis contamination of hen's eggs. *Journal of veterinary medicine. Infectious diseases and veterinary public health*. 51(3): 129-134.
- He Z, Tong C, Sheng L, Ma M, Cai Z. 2016. Monitoring glycation-induced structural and biofunctional changes in chicken immunoglobulin Y by different monosaccharides. *Poultry Science*, 95(11): 2715-2723.
- Hess R G, Bollwahn W, Pospischil A. 1980. Current aspects in the etiology of viral diarrheas of swine: occurrence of infections with the epizootic viral diarrhea (EVD) virus. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 93(22): 445-449.
- Hu X, Li N, Tian Z. 2015. Molecular characterization and phylogenetic analysis of transmissible gastroenteritis virus HX strain isolated from China. *BMC Veterinary Research*, 11(1): 72.
- Huang Y, Ding L, Li Z. 2013. Transmissible gastroenteritis virus infection induces cell apoptosis via activation of p53 signalling. *Journal of General Virology*, 94(Pt 8):1807-1817.
- Huss D, Poynter G, Lansford R. 2008. Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab animal*, 37(11): 513-519.
- Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. 2006. Frequency of enteric pathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(4):350-354.
- Kim D, K Jang I, K Seo, HC Shin, SO Yang, SY Kim, JW. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture*, 237(1-4): 21-30.
- Kovacs-Nolan J, Mine Y. 2012. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual review of food science and technology*, 3(1): 163-182.
- Kronvall G, Seal U, Svensson S, Williams R. 1974. Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. *Microbiology and immunology*, 82(1): 12-18.
- Larsson A, Carlander D, Wilhelmsson M. 1998. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food Agr Immunol*, 10(1): 29-36.
- Lau SK, Lau CC, Chan KH. 2013. Delayed induction of proinflammatory cytokines and suppression of innate antiviral response by the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus: implications for pathogenesis and treatment. *Journal of General Virology*, 94(Pt12): 2679-2690.
- Lee D, Jeon Y, Park C, Kim S, Lee D, Lee C. 2015. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Archives of virology*, 160(9): 2197-2207.
- Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, Sim JS. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY)

- against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, 81(5): 632-641.
- Lee S, Lillehoj H, Park D, Jang S, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj E. 2009. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. *Poultry Science*, 88(1): 562-566.
- Lee SB, Mine Y, Stevenson RMW. 2000. Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 110-115.
- Lee W, Syed Atif A, Tan S, Leow C. 2017. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, 447: 71-85.
- Li Ding, Jiawei Li, Weihao Li, Zhenhua Fang, Na Li, Shannan Wu, Jiangyue Li, Meiling Hong. 2018. p53- and ROS-mediated AIF pathway involved in TGEV-induced apoptosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(11): 1775-1781.
- Li Wang, Xin yuan, Qiao Si jia, Zhang. 2018. Porcine transmissible gastroenteritis virus nonstructural protein 2 contributes to inflammation via NF- κ B activation. *Virulence*, 9(1): 1685-1698.
- Li X, He P, Yu L, He Q, Jia C, Yang H, Lu M, Wei X, Zhao S. 2020. Production and characteristics of a novel chicken egg yolk antibody (IgY) against periodontitis-associated pathogens. *Journal of oral microbiology*, 12(1): 183.
- Lu X, Yunhan Y, Jialu W. 2018. Impact of TGEV infection on the pig small intestine. *Virology Journal*, 15(1): 102.
- Lu Xia, Lei Dai, Qing hua Yu, Qian Yang. 2017. Persistent Transmissible Gastroenteritis Virus Infection Enhances Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 Adhesion by Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 91(21): e01256-17.
- Lu YA, Liu JJ, Jin LJ, Li XY, Zhen YH, Xue HY, Lin QY, Xu YP. 2009. Passive Immunization of Crayfish (*Procambarus clarkia*) with Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Against White Spot Syndrome Virus (WSSV). *Appl Biochem Biotech*, 159(1): 750-758.
- Lu YN, Liu JJ, Jin LJ, Li XY, Zhen YH, Xue HY, You JS, Xu YP. 2008. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish Shellfish Immun*, 25(5): 604-610.
- Martins A, Bersano J G, Ogata R. 2013. Diagnosis to Detect Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) by Optical and Transmission Electron Microscopy Techniques. *International Journal of Morphology*, 31(2): 706-715.
- Minvielle F, Grossmann R, Gourichon D. 2007. Development and performances of a Japanese quail line homozygous for the diabetes insipidus (di) mutation. *Poultry Science*, 86(2): 249-254.
- Nikaeen G, Abbaszadeh S, Yousefinejad S. 2020. Application of nanomaterials in treatment, anti-infection and detection of coronaviruses. *Nanomedicine (London, England)*, 15(15): 1501-1512.
- Nilsson E, Larsson A, Olesen H, Wejåker P, Kollberg H. 2008. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*, 43(9): 892-899.
- Ontiveros N, Valdez-Meza E, Vergara-Jiménez M, Canizalez-Román A, Borzutzky A, Cabrera-Chávez F. 2016. Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study. *Allergologia et immunopathologia*, 44(6): 563-570.
- Pauly D, Chacana P, Calzado E, Brembs B, Schade R. 2011. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of visualized*

- experiments*, 1(51): 3084.
- Pritchard C, Paton DJ, Wibberley G. 1999. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain. *Veterinary Record*, 144(22): 616-618.
- Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo F, Umeda K, Kodama Y. 2013. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5): 1039-1048.
- Redwan E, Aljadawi A, Uversky V. 2021. Simple and efficient protocol for immunoglobulin Y purification from chicken egg yolk. *Poultry Science*, 100(3): 100956.
- Saif L, Bohl E. 1983. Passive immunity to transmissible gastroenteritis virus: intramammary viral inoculation of sows. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 409: 708-723.
- Sampaio L, Baldissera M, Grando T, Gressler L, Capeleto DM, deSa M, deJesus F, dos Santos A, Anciuati A, Colonetti K, Stainki D, Monteiro S. 2014. Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4): 96-103.
- Schade R, Calzado E, Sarmiento R, Chacana P, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo H. 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to laboratory animals*, 33(2): 129-154.
- Sheng L, He Z, Liu Y, Ma M, Cai Z. 2018. Mass spectrometry characterization for N-glycosylation of immunoglobulin Y from hen egg yolk. *International journal of biological macromolecules*, 8(6): 533-540.
- Shin J, Nam S, Kim J, Yoon J, Bang W, Roe I. 2003. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. *Journal of Medical Microbiology*, 52(Pt3): 217-222.
- Takahashi K, Okada K, Ohshima K I. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 45(6): 829-832.
- Thirumalai D, Visaga Ambi S, Vieira-Pires R, Xiaoying Z, Sekaran S, Krishnan U. 2019. Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections - A review. *International journal of biological macromolecules*, 136: 755-763.
- Thorsten Muley. 2012. The possible role of transmissible gastroenteritis virus (TGE) and porcine respiratory corona virus (PRCV) in the mortality of Ugandan back-yard piglets. *Biochemistry*, 36(44): 13677-13681.
- Tolik D, Poławska E, Charuta A, Nowaczewski S, Cooper R. 2014. Characteristics of egg parts, chemical composition and nutritive value of Japanese quail eggs-a review. *Folia biologica*, 62(4): 287-292.
- Tong C, Geng F, He Z, Cai Z, Ma M. 2015. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. *Poultry Science*, 94(1): 104-110.
- Tsubokura K, Berndtson E, Bogstedt A, Kaijser B, Kim M, Ozeki M, Hammarström L. 1997. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clinical and experimental immunology*, 108(3): 451-455.
- Vega CG, Bok M, Ebinger M, Rocha LA, Rivolta AA, González Thomas V, Muntadas P, D'Aloia R, Pinto V, Parreño V, Wigdorovitz A. 2020. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Veterinary Research*, 16(1): 264.

- Wallach M, Webby R, Islam F, Walkden-Brown S, Emmoth E, Feinstein R, Gronvik K. 2011. Cross-protection of chicken immunoglobulin Y antibodies against H5N1 and H1N1 viruses passively administered in mice. *Clinical and vaccine immunology*, 18(7): 1083-1090.
- Wang C, Mo H, Cheng Y, Wang L, Jiang Z, Liu W, Li Y. 2007. Production and identification of chicken egg yolk antibodies against soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum*. *Parasitic diseases*, 25(3): 193-197.
- Wang L, Zhang Y. 2017. Genomic Characterization of a New PRCV Variant, United States, 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(2): 672-674.
- Wang Z, Li J, Li J, Li Y, Wang L, Wang Q, Fang L, Ding X, Huang P, Yin J, Yin Y, Yang H. 2019. Protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 adhesion in weaned piglets. *BMC Veterinary Research*, 15(1): 234.
- Warr G, Magor K, Higgins D. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*, 16(8): 392-398.
- Wen J, Zhao S, He D, Yang Y, Li Y, Zhu S. 2012. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral research*, 93(1): 154-159.
- Williams R, Esterhuysen J J, Robinson J T R. 1994. Pseudorabies and transmissible gastroenteritis: a serological survey in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61(1): 67-70.
- Xu Y, Li X, Jin L, Zhen Y, Lu Y, Li S, You J, Wang L. 2011a. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. *Biotechnol Adv*, 29(6): 860-868.
- Yang D, Mai K, Zhou Q, Zhu Y, Xing J, Luo C, Liu S, Zhou Q, Huang W, Luo J, Liu J. 2020. The protective efficacy of specific egg yolk immunoglobulin Y(IgY) against *Riemerella Anatipestifer* infections. *Veterinary Microbiology*, 243: 108642.
- Zhang F, Luo S, Gu J, Li Z, Li K, Yuan W, Ye Y, Li H, Ding Z, Song D, Tang Y. 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018. *BMC veterinary research*, 15(1): 470.
- Zhang Q, Hu R, Tang X. 2013. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. *Archives of Virology*, 158(8): 1631-1 636.
- Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D. 2007. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis Virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, 358(2): 424-435.
- Zheng FM, Huo JY, Zhao J. 2013. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains in central China during 2010-2012 outbreaks. *Chinese journal of virology*, 29(2): 197-198.

附录 A

缩略词及中英文对照表

(Abbreviation Index)

英文缩写	英文全称	中文名
BCV	Bovine coronavirus	牛冠状病毒
bp	Base-pairs	碱基对
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
E.coil	Escherichia coli	大肠埃希菌
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate isomer	异硫氰酸荧光素
HP	Helicobacter pylori	幽门螺旋杆菌
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
H 链	Heavy chain	重链
IBDV	Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病病毒
IBPs	Immunoglobulin binding protein	免疫球蛋白结合蛋白质
IBV	Influenza B virus	乙型流感病毒
IgA	Immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgY	Egg yolk antibody	卵黄抗体
IV	Influenza virus	流行性感胃病毒
L 链	Light chain	轻链
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PA	Pseudomonas aeruginosa	铜绿假单胞菌
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
PDCoV	Porcine delta coronavirus	猪德尔塔冠状病毒
pH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度总数
PK-15	Porcine kidney cell	猪肾上皮细胞
PRCV	Porcine respiratory coronavirus	猪呼吸道冠状病毒
PRoV	Porcine rotavirus	猪轮状病毒
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
SPF	Specific pathogen free	无特定病原
STAg	Soluble tachyzoite antigen	速殖子可溶性抗原
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
TGE	Transmissible gastroenteritis	猪传染性胃肠炎

附录

英文缩写	英文全称	中文名
TGEV	Transmissible gastroenteritis virus	猪传染性胃肠炎病毒
TSA	Tryptic Soy Agar	胰酪大豆琼脂培养基
VN	Virus neutralization	病毒中和试验
WSSV	White spot syndrome virus	白斑综合症病毒

致 谢

时光如白驹过隙，三年的研究生生活转眼已接近尾声。一路走来，时至今日，静下心来回顾这三年间的学习、生活、实习经历，思绪万千间心存感激。求学不易，感谢成长进步的路上受到的所有帮助！

首先要感谢母校西北农林科技大学，在往后的人生道路中我将牢记“诚朴勇毅”的校训，不忘初心，砥砺前行！从初到实验室时的胆怯困惑到顺利完成学业，点点滴滴的进步和收获，都离不开导师郭抗抗老师的谆谆教诲。复试时初见郭老师，老师温和谦逊，耐心教导，令人印象深刻。还记得研一撰写第一篇文章时，郭老师不厌其烦的帮我修改，手把手的悉心指导，直至最终顺利投稿；这三年间郭老师言传身教，工作认真负责，遇事不愠不火，教会我很多。郭老师时刻站在学生的立场上考虑，眼光立足长远，为往后的发展做出规划。当试验中遇到困难，郭老师为我们分析原因，解决问题，给予我们很大的鼓励。郭老师教会我的必将伴随我终生，给我温暖和鼓励。衷心地感谢郭老师不辞辛苦的教导，祝老师工作顺利，生活美满。

能进入兽医公共卫生实验室是一件很幸运的事，感谢张彦明老师、王晶钰老师、齐雪峰老师、姜艳芬老师、贺花老师、王承宝老师，为我们搭建的试验平台。

特别感谢刘勇师兄在生产实习和试验期间在生活和工作上对我的帮助和指导，让我能顺利的完成生产实习和试验相关工作，让我开扩眼界的同时亲身体验，使实习生活充满乐趣，获益匪浅。

感谢实验室师兄张亮、王栋，师姐王涛、张秀萍，是他们教会了我试验技能，帮我解决遇到的难题，帮助我试验顺利完成；感谢同级的田昊伦、王凯、冯全文、宋梦昭、刘山川、史磊波、王浩然、李田美、马迎晖和李一鸣给予我的帮助和鼓励；感谢师妹刘静、祁佳丽，师弟李宁、郝峰，感谢实验室大家对我在试验和生活上的指导和帮助。还要感谢已经毕业的范志新师姐和靳明星师姐在我试验设计和日常生活中给予我指导和关心。感谢室友的陪伴和相互帮助，才使得我的科研生活充实而欢乐。

此外要特别感谢的是我的父母及家人朋友多年以来对我的理解与支持、关心与照顾。正是由于你们做我的港湾，才使我无所畏惧！

最后，感谢论文答辩委员会的老师们百忙之中来为我的论文指出不足与提出建议，致以我崇高的敬意。

孙颖

2021年4月于杨凌

