



安徽农业大学  
Anhui Agricultural University

# 专业硕士学位论文

## 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备 与鉴定

Preparation and identification of monoclonal antibody against  
Porcine Epidemic Diarrhea Virus N protein

姓 名 \_\_\_\_\_ 高扬 \_\_\_\_\_

导 师 \_\_\_\_\_ 王希春 教授 \_\_\_\_\_

校外导师 \_\_\_\_\_ 杨克礼 副研究员 \_\_\_\_\_

湖北省农业科学院畜牧兽医研究所

学位类别 \_\_\_\_\_ 兽医硕士 \_\_\_\_\_

领域名称 \_\_\_\_\_ 兽医学 \_\_\_\_\_

研究方向 \_\_\_\_\_ 动物疫病防控技术 \_\_\_\_\_

学 院 \_\_\_\_\_ 动物科技学院 \_\_\_\_\_

二〇二二年六月

中图分类号: 9855

单位代码: 10364

UDC: 578

密 级: \_\_\_\_\_

# 安徽农业大学

## 专业硕士学位论文

### 猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

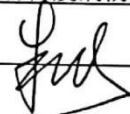
Preparation and identification of monoclonal antibody against  
Porcine Epidemic Diarrhea Virus N protein

姓 名: 高扬 学 号: 20721390

导 师: 王希春 校 外 导 师: 杨克礼 副研究员

专业学位类别: 兽医硕士 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所

学 院: 动物科技学院 研 究 方 向: 动物疫病防控

论文评阅人: \_\_\_\_\_ 答辩委员会主席: 

二〇二二年六月

A Dissertation Submitted to Anhui Agricultural University  
in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Master of Agriculture

Preparation and identification of monoclonal  
antibody against Porcine Epidemic Diarrhea  
Virus N protein

by

**GAO Yang**

Supervised by

Professor: WANG Xichun

Majored in

Clinical Veterinary Medicine

Jun, 2022

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural  
University, Hefei, Anhui, P.R.China

## 独创性声明

本人声明:所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。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成果,也不包含为获得安徽农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文成果做出贡献的个人和集体,本人已在论文中作了明确的说明,并表示谢意。

研究生签名: 高扬 时间: 2022 年 5 月 25 日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解安徽农业大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意安徽农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

本论文延迟\_\_\_\_年后公开,到期后适用本授权。

(限制级及涉密学位论文请在上方“”内划“√”,并填写延迟公开时限,限制级论文延迟公开时限最多不超过3年。不勾选此项,默认为立即公开)

研究生签名: 高扬 时间: 2022 年 5 月 25 日

第一导师签名: 王立 时间: 2022 年 5 月

# 致谢

不知不觉来到了结尾，意味我将与我的导师，同学，母校——安徽农业大学分别，此刻我的心情是比较沉闷的，难以言表的情绪，只能通过朴实的文字宣泄出来。记得刚入校园时，每一处都是那么的新鲜有趣，结束了紧张的初试复试，迎来了人生的另一个新起点，这一切都仍历历在目。在读研的两年中，给我最多的收获就是自强自立，向优秀的人学习，明白学习永无止境。在安徽农业大学的实验室时，王希春老师耐心的指导我，从最细节的内容给我全面的讲解，即使我有听不懂，哪里没有掌握的，王老师都是用最和蔼可亲的面容与我交流，我在这里向王老师说声谢谢。

除了王老师，还有一位导师，他也给我带了不一样的学习体验，在湖北省农业科学院畜牧兽医研究所做实验时，杨克礼老师注重言传身教，他很喜欢与学生共同探讨问题。到现在我还记得杨老师说“实践才能出结果”，这句话印在了我的心上，自此只要有一丝的想法，不管是学习还是日常生活中，我都会去实践，用实践去得出结果。谢谢您，杨老师。

除此之外，还要感谢学校实验室的吴金节老师、李锦春老师、李玉老师和冯士彬老师，以及畜牧兽医研究所的田永祥主任、周丹娜老师、刘威老师、高婷老师、刘泽文老师、陈文杰老师、郭锐老师、李畅老师给予我学习和实验的帮助，还有两个实验室里的师兄师姐们、同学们以及师弟师妹们给予我的关心。

我要特别感谢我的家人，一直默默的支持我，给予我无限的关爱，给我带来幸福和温暖。

最后，感谢论文评审以及参加答辩的所有老师们，对论文的点评和指导，让我的论文更加完善。

书山有路勤为径，学海无涯苦作舟。研究生学习生活只是我们人生中的一个阶段，是让我们接触社会的跳板，我们在这里吸收各种精华，磨练自己，提升能力。在离开母校后，我会时刻牢记学校的校训，走到哪里始终都会保持谦卑好学的心态，把安徽农业大学学子的精神发扬光大！

高扬

2022年6月1日

# 摘要

猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 是 RNA 病毒, 归属于冠状病毒属, 与感染人体的非典冠状病毒及猪胃肠炎病毒 (TGEV) 有着较高的相似性。猪首次感染 PEDV 时, 可能出现急性腹泻的情况, 粪便为含有腥臭气味的绿色或灰色的喷射状物, 一定比例的病猪会出现呕吐现象。哺乳仔猪病死率较高, 在出现严重脱水的情况下可能导致死亡; 成年后的猪病死率较低, 但发病率较高, 并且具有较强的传染性。母猪康复后自身会产生对应的抗体从而保护仔猪。在早期被 PEDV 感染的猪中, PEDV N 蛋白的抗体水平是产生最高的。并且, 基因中保守性最高的也是 N 基因, 因此 N 蛋白是建立 PEDV 分子诊断方法的优选目标蛋白。鉴于此, 本研究利用大肠杆菌表达 PEDV (HUB2018 株) 分离株 N 蛋白, 将表达成功并纯化好的 PEDV N 蛋白经三次皮下注射免疫 BALB/c 小鼠, 完成了单克隆抗体的制备, 获得的单克隆抗体可为更深层的研究 PEDV 的致病机理、建立快速高通量的诊断检测试剂盒, 如 ELISA、IFA 和胶体金试纸条等奠定基础。主要研究内容及结果如下:

## 1. PEDV (HUB2018 株) N 基因的克隆与原核表达

采用 RT-PCR 法对 PEDV HUB2018 毒株 N 基因进行扩增, 扩增出与预期长度 1326 bp 大小一致的目的条带。将 PEDV-N 基因克隆至质粒 PET-30a (+), 构建了重组质粒 PET-30a (+)-PEDV-N。重组质粒 PET-30a(+)-PEDV-N 在 BL-21 大肠杆菌表达菌株中经 1mM 的 IPTG 诱导后成功表达, 获得分子量与预期融合蛋白 58kDa 大小一致、并带 His 标签的融合蛋白。经蛋白纯化, 所得纯化的 PEDV N 蛋白浓度为 7.127mg/mL。Western blot 结果表明其也可分别与 His 标签抗体、PEDV 猪阳性血清发生特异性抗体反应。

## 2. PEDV N 蛋白间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的建立

将已纯化出来的 PEDV N 蛋白作为包被的抗原, 研究构建出了间接的特异性 ELISA 抗体反应的检测技术方法。各反应物浓度、环境温度及作用时间经优化后确定如下: 抗原的最佳包被浓度为 0.5 $\mu$ g/mL; 最佳的抗原包被时间为 4 $^{\circ}$ C 作用 9-12 h; 最佳封闭液为 1%BSA, 37 $^{\circ}$ C, 封闭时间为 2 h; 血清样品的最佳稀释度比例为 1:160, 37 $^{\circ}$ C 作用下 1 h; 羊抗猪酶标二抗的最佳稀释度之比为 1:9000, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h。

## 3. PEDV (HUB2018 株) N 蛋白单克隆抗体的制备

将纯化好且纯度高的 PEDV N 蛋白与弗氏完全佐剂 (第一次免疫) 和弗氏不完全佐剂 (第二次、第三次免疫) 一起进行乳化, 乳化后以其为免疫原皮下注射免疫小鼠, 选取免疫小鼠最佳的标准是 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。在一个月內, 经三次免疫后, 需对小鼠进行血清抗体水平的检测, 以确保免疫小鼠满足细胞融合实验的要求。

在实验室严格无菌环境条件下，将免疫三次小鼠的脾细胞取出并与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合。用前述 PEDV N 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法筛选阳性细胞株，经历 3 轮连续的有限稀释法筛选，获得 1 株有着较高特异性抗体水平的阳性细胞株，经 Western blot 验证后，获得 1 株杂交瘤细胞，该株杂交瘤细胞的特异性抗体水平高并且可以稳定地分泌，将其命名为 E5-E5。

#### 4. PEDV (HUB2018 株) N 蛋白单克隆抗体的鉴定

收集培养的杂交瘤细胞上清液，通过 Western blot 实验证实其上清液可与 PEDV N 蛋白结合发生特异性反应。间接免疫荧光 (IFA) 实验证实，PEDV N 蛋白单克隆抗体能与 PEDV 湖北分离株 (HUB2018) 全病毒发生特异性反应且特异性良好。对杂交瘤细胞进行了亚型鉴定和染色体计数。亚型鉴定结果显示其重链类型为 IgG1，轻链类型为 Kappa。该株杂交瘤细胞染色体数约 100-110 对。

#### 5. PEDV (HUB2018 株) N 蛋白单克隆抗体的大量制备

雌性 BALB/c 小鼠的腹腔内注射 E5-E5 杂交瘤细胞，用来进行腹水的大量制备，收集小鼠腹水样品后进行抗体效价的测定。结果表明该单抗的效价为 1:102400。

综上所述，本研究成功制备抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体，为后续 PEDV 致病机理研究、建立诊断检测试剂盒等奠定基础。

**关键词：**猪流行性腹泻病毒；原核表达；N 蛋白；单克隆抗体

# ABSTRACT

Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) is an RNA virus belonging to the genus Coronavirus and has a high similarity with SARS coronavirus and porcine gastroenteritis virus (TGEV). Acute diarrhea could be occurred in pigs while infected with PEDV for the first time, The feces are green or gray jets with a fishy smell, and some of sick pigs will vomit. Suckling piglets have a higher mortality rate, whereas adult pigs have a lower mortality rate but a higher morbidity and more contagious. After the sow recovers, it will produce corresponding antibodies to protect the piglets. In PEDV-infected pigs, antibody detection in vivo showed that the level of anti-PEDV N protein was the highest. In addition, the most conserved gene is also the N gene, so the N protein is the preferred target protein for establishing PEDV molecular diagnostic methods. In view of this, E. coli was used to express the N protein of PEDV HUB2018 isolated strain in this study, and the purified PEDV N protein was subcutaneously injected to immunize BALB/c mice three times to prepare monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies will lay the foundation for further research on the pathogenic mechanism of PEDV and the establishment of rapid and high-throughput diagnostic detection kits, such as ELISA, IFA and colloidal gold test strips. The main research contents and results are as follows:

## 1. Cloning and prokaryotic expression of N gene of PEDV HUB2018 isolated strain

The N gene of PEDV HUB2018 isolated strain was amplified by RT-PCR, and the length of 1 326 bp target band was amplified. The PEDV-N gene was cloned into the plasmid PET-30a(+), and the recombinant plasmid PET-30a(+)-PEDV-N was constructed. The recombinant plasmid PET-30a(+)-PEDV-N was successfully expressed in the BL-21 E. coli expression strain after induction with 1 mM IPTG. A fusion protein with the same molecular weight as the expected 58 kDa and a His-tag was obtained. After protein purification, the purified PEDV N protein concentration was 7.127mg/mL. The results of Western blot showed that it could also react specific antibody response with His-tag antibody and PEDV-positive sera respectively.

## 2. Establishment of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection method for PEDV N protein antibody

The purified and high-purity PEDV N protein was used as an antigen to coat an ELISA plate, and a highly specific indirect ELISA antibody detection method was established. The concentration of each reactant, ambient temperature and action time are optimized and determined as follows: the optimal coating concentration of antigen is 0.5 $\mu$ g/mL, the optimal



antigen coating time is 9-12 hours at 4°C; the optimal blocking solution is BSA, the optimal BSA concentration is 1%, and placed in a incubator at 37°C for 2 hours; the optimal dilution of the sample serum is 1:160, and placed in a incubator at 37°C for 1h; the optimal dilution of the enzyme-labeled secondary antibody is 1:9000 , and placed in a incubator at 37 °C for 1h.

### 3. Preparation of monoclonal antibody against N protein of PEDV HUB2018 isolated strain

The purified and high-purity PEDV N protein was emulsified with Freund's complete adjuvant (the first time) and Freund's incomplete adjuvant (the second and third time), and used as an immunogen after emulsification to immunize mice with subcutaneous injection. The best standard of immunized mice is 6-8 weeks female BALB/c mice Within a month, after three times immunizations, the serum antibody levels of the mice should be detected to ensure that the immunized mice meet the requirements of cell fusion experiments. Under strict sterile conditions in the laboratory, spleen cells were removed from mice immunized three times and subjected to cell fusion experiments with SP2/0 myeloma cells. The positive cell lines were screened by the PEDV N protein indirect ELISA antibody detection method, and after 3 rounds of continuous limiting dilution screening, a positive cell line with a high specific antibody level was obtained. After Western blot verification, a hybridization was obtained. The specific antibody level of this strain of hybridoma cells is high and can be stably secreted, and it is named E5-E5.

### 4. Identification of monoclonal antibody against N protein of PEDV HUB2018 isolated strain

The cultured hybridoma supernatant was collected, and Western blot results showed that the supernatant could specifically react with PEDV N protein. Hybridoma cells were subtyped and chromosomally counted. The isotype identification results showed that the heavy chain type was IgG1 and the light chain type was Kappa. The hybridoma cells of this strain have about 90-110 pairs of chromosomes.

### 5. Mass preparation of monoclonal antibody against N protein of PEDV HUB2018 isolated strain

Female BALB/ C mice were intraperitoneally injected with E5-E5 hybridoma cells to prepare ascites in large quantities, and antibody titers were determined after ascites samples were collected. The results showed that the titer of the monoclonal antibody was 1:102400.

In summary, monoclonal antibodies against PEDV N protein were successfully prepared, which laid the foundation for the research on the pathogenic mechanism of PEDV and the

establishment of diagnostic detection kits.

**KEYWORDS:** Porcine epidemic diarrhea virus; Prokaryotic expression; N protein; Monoclonal antibody

# 目录

致 谢 .....	I
摘 要 .....	II
ABSTRACT .....	IV
插图清单 .....	XI
表格清单 .....	XII
中英文缩略词 .....	XIII
文献综述 .....	1
1 PEDV 病原学特性、理化特性、传播方式及研究进展 .....	1
1.1 PEDV 病原学特征 .....	1
1.2 PEDV 理化特性 .....	1
1.3 传播途径 .....	2
1.3.1 直接传播和间接接触传播 .....	2
1.3.2 气溶胶（间接接触）传播 .....	2
1.3.3 养殖场间 PEDV 直接接触或气溶胶传播率的差异 .....	2
1.4 PEDV 分子生物学研究进展 .....	3
2 PEDV 与其它相似腹泻病的鉴别诊断 .....	3
2.1 临床诊断方法 .....	3
2.1.1 病毒分离鉴定 .....	3
2.1.2 电镜检测 .....	4
2.1.3 血清学诊断方法 .....	4
3 PEDV 的防控难点 .....	5
3.1 发病范围广 .....	5
3.2 病程持续时间长 .....	5
3.3 疫苗免疫效果不佳 .....	5
4 PEDV 的防控措施 .....	6
4.1 生物安全 .....	6
4.1.1 畜群和养殖场管理 .....	6
4.1.2 消毒剂的选择 .....	6
4.1.3 运输车辆的卫生 .....	6
4.2 免疫预防 .....	6
4.2.1 肠道-乳腺-sIgA 免疫轴的概述 .....	6

4.2.2 返饲+注射疫苗免疫 .....	7
5 单克隆抗体 .....	7
5.1 单克隆抗体的免疫学原理 .....	7
5.2 动物细胞融合技术 .....	7
5.3 单克隆抗体的应用 .....	8
5.3.1 诊断试剂 .....	8
5.3.2 治疗疾病和给药 .....	8
1 引言 .....	9
2 材料与方法 .....	10
2.1 试验细胞株 .....	10
2.2 试剂材料 .....	10
2.3 仪器 .....	12
2.4 溶液配制 .....	12
2.5 PEDV N 蛋白的原核表达与蛋白纯化 .....	13
2.5.1 PEDV N 基因组的提取 .....	13
2.5.2 PEDV N 基因的扩增 .....	13
2.5.3 PET-28a (+) -N 和 PET-30a (+) -N 原核表达载体的构建 .....	15
2.5.4 PEDV N 蛋白的原核表达 .....	16
2.5.5 PEDV N 蛋白表达形式的确定 .....	17
2.5.6 Western blot 鉴定 PEDV N 蛋白 .....	18
2.5.7 PEDV N 蛋白的浓度测定 .....	19
2.6 PEDV N 蛋白间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的建立 .....	19
2.6.1 PEDV N 最适包被浓度和待检血清稀释度的选择 .....	19
2.6.2 封闭液的选择 .....	20
2.6.3 二抗稀释度的选择 .....	20
2.6.4 二抗作用时间的选择 .....	20
2.7 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 .....	20
2.7.1 Balb/c 小鼠的免疫 .....	20
2.7.2 十字交叉法确定抗原最佳包被浓度 .....	20
2.7.3 sp2/0 骨髓瘤细胞的复苏活化与制备 .....	20
2.7.4 饲养细胞的制备 .....	21
2.7.5 免疫脾细胞的制备 .....	21
2.7.6 细胞融合 .....	21
2.7.7 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 筛选阳性细胞孔 .....	22

2.7.8 有限稀释法进行阳性细胞的克隆 .....	22
2.7.9 PEDV N 蛋白二次克隆和三次克隆 .....	23
2.7.10 Western blot 鉴定单克隆抗体 .....	23
2.7.11 单克隆抗体亚型的鉴定 .....	23
2.7.12 单克隆抗体的大量制备 .....	23
2.7.13 单克隆抗体的纯化与效价测定 .....	24
2.7.14 单克隆抗体细胞株染色体计数 .....	24
2.7.15 单克隆抗体的间接免疫荧光 (IFA) 验证 .....	25
3 结果与分析 .....	26
3.1 PEDV N 蛋白的原核表达与蛋白纯化结果 .....	26
3.1.1 目的基因的扩增及鉴定结果 .....	26
3.1.2 PET-28a(+)-PEDV-N 和 PET-30a(+)-PEDV-N 重组质粒的构建与鉴定 .....	26
3.1.3 PEDV-N 重组蛋白的表达与纯化 .....	27
3.1.4 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定 .....	31
3.2 PEDV N 蛋白间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的建立 .....	32
3.2.1 PEDV N 最适包被浓度和待检血清稀释度的选择 .....	32
3.2.2 封闭液的选择 .....	32
3.2.3 酶标抗体工作浓度的选择 .....	33
3.2.4 酶标抗体反应时间的选择 .....	33
3.3 单克隆抗体制备与鉴定 .....	33
3.3.1 检测阳性杂交瘤细胞间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法的建立 .....	33
3.3.2 免疫 BALB/c 小鼠血清效价的检测 .....	34
3.3.3 细胞融合及融合细胞筛选的结果 .....	35
3.3.4 Western blot 鉴定 PEDV N 蛋白单克隆抗体 .....	36
3.3.5 PEDV N 蛋白单克隆抗体亚型的鉴定 .....	37
3.3.6 PEDV N 蛋白单克隆抗体的大量制备与纯化 .....	37
3.3.7 腹水中单克隆抗体效价的测定 .....	38
3.3.8 PEDV N 蛋白单克隆抗体染色体计数 .....	38
3.3.9 间接免疫荧光 (IFA) 验证 PEDV N 蛋白单克隆抗体 .....	39
4 讨论 .....	40
4.1 PEDV N 蛋白的表达与纯化 .....	40
4.2 猪流行性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法的建立 .....	40
4.3 动物免疫 .....	41
4.4 细胞融合、筛选和亚克隆 .....	41

4.5 单克隆抗体的大量制备 .....	42
5 结论 .....	43
参考文献 .....	44
作者简介 .....	50

## 插图清单

图 3-1 PEDV N 基因的 RT-PCR 扩增 .....	26
图 3-2 重组质粒 PET-28a(+)-PEDV-N 的双酶切鉴定 .....	27
图 3-3 重组质粒 PET-30a(+)-PEDV-N 的双酶切鉴定 .....	27
图 3-4 PET-28a(+)-PEDV -N 在 37°C 时 SDS-PAGE 图.....	28
图 3-5 PET-28a(+)-PEDV -N 在 16°C 时 SDS-PAGE 图.....	28
图 3-6 PET-30a(+)-PEDV -N 在 16°C 和 37°C 时 SDS-PAGE 图.....	29
图 3-7 PET-30a(+)-PEDV -N 在不同时间上的诱导表达 SDS-PAGE 图.....	29
图 3-8 PET-30a(+)-PEDV -N 破碎后的表达产物 SDS-PAGE 图.....	30
图 3-9 PEDV-N 蛋白的纯化.....	30
图 3-10 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定结果 (猪阳性血清) .....	31
图 3-11 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定结果 (His 标签抗体) .....	31
图 3-12 不同封闭液、酶标抗体工作浓度和酶标抗体反应时间对比图.....	33
图 3-13 PEDV N 蛋白免疫小鼠血清 OD450 检测.....	35
图 3-14 细胞融合后杂交瘤细胞生长状况.....	36
图 3-15 单克隆抗体的鉴定 .....	36
图 3-16 单克隆抗体亚型鉴定结果.....	37
图 3-17 PEDV N 蛋白单克隆抗体纯化.....	37
图 3-18 E5-E5 杂交瘤细胞染色体计数图 .....	39
图 3-19 IFA 验证抗 PEDV N 蛋白单抗 .....	39

## 表格清单

表 2-1 主要耗材 .....	10
表 2-2 主要设备 .....	12
表 3-1 方阵滴定法确定 PEDV N 蛋白的最佳包被浓度（猪血清） .....	32
表 3-2 方阵滴定法确定 PEDV N 蛋白的最佳包被浓度（小鼠血清） .....	34
表 3-3 单克隆抗体效价的测定 .....	38



## 中英文缩略词

缩写	英文全称	中文名称
bp	Base pair	碱基对
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled H <sub>2</sub> O	双蒸水
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砜
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HT	Hypoxathine-thymidine(medium)	次黄嘌呤-胸苷
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	Isopropy-1-thio-galactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
KDa	Kilodalton	千道尔顿
ml	Milliliter	毫升
mg	Milligram	毫克
OD	Optical density	光密度
PED	Porcine epidemic diarrhea	猪流行性腹泻
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏氟乙烯
PEG4000	Polyethylene glycol 4000	聚乙二醇 4000
PAGE	Polyacrylamidegel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
r/min	Revolution per minute	每分钟转数
SDS	Sodium dodecylsulphate	十二烷基磺酸钠
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升

# 文献综述

## 1 PEDV 病原学特性、理化特性、传播方式及研究进展

### 1.1 PEDV 病原学特征

1978年,比利时研究人员首先分离出PEDV病毒,此后PEDV在全球范围内蔓延,在包括亚洲和北美在内的所有主要养猪产区造成重大经济损失<sup>[1]</sup>。作为一种冠状病毒类的病毒,PEDV具有一个多形性囊膜,病毒外壳呈现出一个圆形、椭圆形的外观,直径约为95-190 nm,在病毒外膜边缘上还存在着一些花瓣状的小突出,突出长度通常为18-23 nm之间,突出通过一极小的柄与病毒囊膜表面进行紧密连接,末端则呈现出球状,直径约为10 nm<sup>[2]</sup>。

从空间形态上来说,PEDV病毒可以分为三层,包括表面的双层囊膜、内核结构以及内核结构降解所形成的外衣壳<sup>[3]</sup>。在粒子的内部是直径为9到16 nm的核衣壳(N),表现出螺旋状的外部结构,由N蛋白与病毒RNA构成核蛋白的核芯部分。PEDV核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N蛋白)是一种具有磷酸化特征的蛋白,通过病毒粒子与基因组之间的结合,能够推动RNA的快速复制<sup>[4]</sup>。在猪染病的初期,体内出现的抗N蛋白的抗体水平是最高的<sup>[5]</sup>。通过相关的研究发现,在不同的PEDV分离株中,基因保守性最高的是N基因。

### 1.2 PEDV 理化特性

PEDV病毒在冷冻状态下稳定,在零下20°C的环境中,存放半年到一年半,肠组织中的病毒滴度没有发生变化,但是对于高温耐受力较差,经65°C,10 min或56°C,45 min的加热,病毒会全部灭活。在37°C环境下存放4 d,病毒本身会失去感染能力<sup>[6]</sup>。PEDV病毒对于胰酶表现出一定的抵抗能力,由于毒株不同,对于胰酶的敏感性也有所差异。毒株较弱或是野生毒株其敏感性是有差异的。细胞培养不同代次的毒株,敏感性也存在差异。

PEDV病毒对于实验室常用的消毒剂较为敏感,比如福尔马林及甲醛等,使用37%的甲醛溶液,作用病毒20 min,就能够使病毒快速失去活性。但PEDV病毒可在胆汁中长期存在,因此,对于胃肠环境中的酸碱条件具有较强的抵抗力<sup>[7]</sup>。

综上,PEDV病毒对于高温条件的适应性较差,而在冷冻条件下则表现稳定<sup>[8]</sup>。通过分析猪肠组织中的病毒存活情况可以看出,在温度条件为21°C、处于腐败的情况下,病毒不稳定。在37°C条件下,作用24 h后,病毒的滴度会降低一个 $\log^{10}$ 。PEDV对于光也表现出较强的敏感性,感染的猪粪便放置在阳光下,经过6 h

病毒就出现了灭活，而在阴暗处放置 7 d，其感染力仍然存在<sup>[9]</sup>。在实验室条件下将产生细胞病变的毒株进行紫外线照射，能够快速实现灭活的目的。

## 1.3 传播途径

### 1.3.1 直接传播和间接接触传播

PEDV 直接接触传播的主要途径是通过粪口途径传播，即通过直接接触感染猪的粪便或呕吐物而发生感染的现象<sup>[10]</sup>。在不同的养殖场之间，PEDV 常见的传播方式也有间接接触传播，特别常见于一些生物安全性较低的养殖场，通过接触 PEDV 的污染物进行传播，包括运输车、养殖场工作人员的手、靴子和衣服<sup>[11]</sup>、饲料，饲料原料添加剂等，例如喷雾干燥猪血浆蛋白粉<sup>[12]</sup>，以及用于运输散装饲料的搬运箱或饲料编织袋<sup>[13]</sup>。在室温条件下，PEDV 在编织袋上可保持长达 35 d 的传染性<sup>[13]</sup>。同时，在饲料原料的生产过程中，也会造成 PEDV 的交叉污染<sup>[14]</sup>。

### 1.3.2 气溶胶（间接接触）传播

PEDV 通过气溶胶传播是不同养殖场传染哺乳猪的另一条途径，这种传播途径主要通过粪便-鼻腔传播，传播途径最远可达 20 km<sup>[15]</sup>。研究发现，粪便持续排毒时间长达 28 d。在分娩母猪的产房中携带有 PEDV 气溶胶，对于新生仔猪以及刚断奶的仔猪都会造成危害，尤其是新生仔猪极易被病毒感染<sup>[16]</sup>。PEDV 气溶胶不仅会感染猪的肠道，还会感染鼻腔粘膜上皮细胞<sup>[17]</sup>。在 PEDV 的相关报道中，鼻腔黏膜、肠道固有层和肠系膜淋巴结的树突状细胞中均存在 PEDV，PEDV 会转移到 CD3+T 细胞中<sup>[17]</sup>。在血液循环过程中，携带有 PEDV 的 T 细胞通过高内皮微静脉到达肠道，通过细胞与细胞之间的接触来转移病毒，将其转移至肠上皮细胞，从而造成感染<sup>[17]</sup>。与新生仔猪相比，断奶仔猪与成年猪对 PEDV 气溶胶颗粒的抵抗力更强。有研究发现，28 日龄的断奶仔猪与 PEDV 气溶胶颗粒接触，可在鼻腔中检测出 PEDV 阳性基因，但这些猪并未发生感染<sup>[18]</sup>。

### 1.3.3 养殖场间 PEDV 直接接触或气溶胶传播率的差异

养殖场是否会发生 PEDV 感染，猪群患病的严重程度以及病毒的传播效力取决于猪群的免疫情况以及养殖场的生物安全水平<sup>[19]</sup>。然而，不同的 PEDV 毒株通过直接接触或气溶胶接触传播的能力也不同。与感染 S-INDEL 变异株(IL20697/2014)的猪群相比，感染 PEDV 标准分离株(IN19338/2013，NC35140/2013，和 NC49469/2013)的猪群不论是直接接触还是气溶胶接触，其传播率更加明显<sup>[20]</sup>。研究发现，猪群中存在 PEDV 的 S-INDEL 变异株的气溶胶，但未发生感染，而存在 PEDV 标准分离株的猪群皆发生感染<sup>[20]</sup>。

## 1.4 PEDV 分子生物学研究进展

PEDV 基因组中包含了多个不对称分段编码的单股 RNA<sup>[21]</sup>，其基因组大小约为 28 kb，分为 7 个区<sup>[22]</sup>，每个区中至少有一个开放的阅读框架（ORF），有些区会有多个 ORF，通过保守基因将对不同的基因组中 RNA 序列进行区分。

PEDV 作为冠状病毒属中的成员，包含四个最主要类型的病毒结构蛋白，包括 S 蛋白、sM 蛋白、M 蛋白以及 N 蛋白，其中含义分别为纤突糖蛋白、小膜蛋白、膜结合蛋白及核蛋白<sup>[23]</sup>。当前人们对于非结构蛋白认识较少，通过实验研究的方式，最近发现了由 ORF1a 和 ORF1b 组成的基因，占基因组全长的三分之二，通过体外翻译的方式形成 mRNA<sup>[24]</sup>。在 PEDV 感染细胞中，通过检测发现 ORF3 编码的非结构蛋白的大小是 25 kDa，该蛋白分子最后定位于细胞核<sup>[25]</sup>。

## 2 PEDV 与其它相似腹泻病的鉴别诊断

### 2.1 临床诊断方法

#### 2.1.1 病毒分离鉴定

腹泻病的诊断，一般通过对病原学、临床症状的初步判定，能够大致判定其病症的类型。对病毒进行分离鉴定是确诊具体感染病毒的有效方式，通常使用接种试验及细胞培养等方式<sup>[26]</sup>，而在实验室条件下多使用细胞培养来完成病毒的分离鉴定工作。

一是对于 PEDV 的分离与鉴定。对已经发现感染了 PEDV 的病猪，采集其粪便及其厂内有关物质可作为诊断病料。学者 Hofinan 于 1988 年，使用 Vero 细胞对病毒进行了培养并且取得了成功<sup>[27]</sup>。

二是对于 TGEV 的分离与鉴定。对感染猪，采集粪便及肠内物质作为病料，进行多种细胞的接种（包括 IBRS2、PK-15 及 ST 细胞等），通过细胞培养过程，在胰蛋白酶的作用下，能够增加病毒对于细胞的敏感程度，最终有利于提升 TGEV 的分离成功率<sup>[28]</sup>。经多代培养后可见细胞发生了重要的、显著的病变，表现为细胞出现了肿胀、形状更圆，进而出现皱缩和脱落。再结合免疫电镜进行外观形态等方面的观察，一般可以确诊病毒种类。

三是 PoRV 的分离与鉴定。采集感染猪小肠内容物，接种 Vero 细胞进行培育，借助于胰蛋白酶的作用，对轮状病毒进行处理，使 PoRV 可以更好地适应细胞，进而完成对细胞的吸附<sup>[29]</sup>。在这一过程中，细胞出现了一定程度的病变，比如肿胀和空泡，进而出现脱落。

### 2.1.2 电镜检测

使用电子显微镜，是较为常用的检测病毒的方法。在显微镜下，对粪便以及病毒颗粒进行收集和观察是判定病毒特征的重要方法。考虑到冠状病毒在形态和结构上具有较强的相似性，单纯使用电镜观察的方式难以对病毒进行准确的判断。因此，在此基础上，又出现了免疫电镜法<sup>[30]</sup>。与传统形式的电子显微镜相比，使用免疫电子显微镜可以对凝集反应及经过特异性标记的抗体做出更好的检测<sup>[31]</sup>。通过临床样品或是细胞培育的方式，实现更好的检测效果。在病毒血清学的检测中有着广泛应用，但是对于待检测病毒的数量有一定要求。使用这一方法，能够更好地定位抗原以及抗体，使相关研究达到更加深入、细致的水平。考虑到病毒会在这一过程中出现降解，可能会导致诊断的偏差，加之检测设备较为昂贵，操作流程复杂，操作人员需要具备专业的知识和技能，在临床诊断中的应用并不广泛<sup>[32]</sup>。

电镜检测在动物粪便中的检测出现时间较早，这一方法具有操作简便，容易对病毒颗粒直接进行观察、可靠性高等。使用电镜技术能够看到病毒的形状，PEDV多为圆形以及椭圆形<sup>[33]</sup>，在囊膜上存在有纤突；使用切片检测可以看出，病毒的核芯部分呈现出环状<sup>[34]</sup>，多数都在细胞浆空泡里或是微绒毛的间隙部位<sup>[35]</sup>。

固相免疫电镜技术则是通过血清与可疑排泄物之间的共同孵育，围绕病毒颗粒形成抗体分子，更有利于观察，在敏感性方面有着较好的表现。通过分析特异性血清以及葡萄球菌 A 蛋白包粪的检测，能够提升病毒检测的敏感性。通过比较该方法与传统电镜技术，可以看出，抗体在覆盖铜网膜方面具有一定的优越性，敏感性可以提升 100 倍以上<sup>[36]</sup>。

### 2.1.3 血清学诊断方法

血清学的诊断方法，包括荧光检测技术、酶联免疫吸附试验法等。

一是荧光检测技术<sup>[37]</sup>。免疫荧光法指的是在免疫荧光显微镜条件下对抗原、抗体等进行观察、判断其特异性。通过建立直观的检测方法，能够在细胞平台上实现快速检测。这一技术具有操作简便、直观性强等特点，在实验室得到了广泛的应用，其中间接免疫荧光法是最为常用的方法，使用荧光素的标记作用，能够很好地放大信号效果，同时有利于提升检测的灵敏度<sup>[38]</sup>。使用免疫荧光技术能够对猪的病毒性腹泻抗原进行检测，通过将病料进行冷冻切片以及压片操作，使用丙酮溶液固定，使用荧光抗体进行荧光染色处理<sup>[39]</sup>，置于荧光显微镜下进行观察，可见阳性反应的胞浆呈现苹果绿色。国外对于猪小肠上皮细胞的病毒抗原进行检测，通过检测病死猪的空肠以及回肠粘膜的涂片，经冷冻切片后，使用荧光检测方法，取得了较好的效果<sup>[40]</sup>。

二是酶联免疫吸附试验法（ELISA）。这一方法属于当前免疫学中使用较多的简

易方法，操作简单、价格低，具有较高的灵敏性以及特异性，不存在放射性污染、检测的准确度较高。常用的 ELISA 方法包括间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA、竞争 ELISA 及阻断 ELISA 等<sup>[41]</sup>。这些不同的检测方式能够适应不同的抗体。对于 PEDV 病毒抗原的检测，可以使用双抗体夹心 ELISA，区分不同肠道病原体的类型，比如轮状病毒、大肠杆菌等<sup>[42]</sup>。对于病毒抗体的检测，郭富生使用综合性的检测方法，对病毒血清抗体水平进行了测定，而邹勇则针对不同类型的猪病毒进行了检测和对比，比较了不同方法的适应性。Carman 使用 B-ELISA 的方式，对于病毒抗体进行了检测，并且对于 TGEV、PoRV 抗体等进行了对比研究，效果较好<sup>[43]</sup>。通过上述分析可以看出，该方法及其诊断试剂的结果可靠性表现突出，但其也存在稳定性差、非特异性强等不足，对于快速准确的检测提出了不小挑战。这一方法适用于样品核酸的检测，也是实验中较为常用的方法。借助于聚合酶链式反应（PCR），可以更好地发挥其作用，逐渐成为细胞培养、血清学等方法的替代方法。随着荧光定量技术的应用，PCR 技术也经常被称作是金标准，具有较强的可重复性及敏感性<sup>[44]</sup>。

### 3 PEDV 的防控难点

#### 3.1 发病范围广

国内外的文献报道表明，PEDV 是全球性的流行病，同时 PEDV 有很多变异株。在 2011-2017 年期间，PEDV 的阳性率很高，除此之外，国内省与省之间，国外洲与洲之间都存在有互相传播的报道，增加了仔猪的死亡率，造成了养殖业的损失<sup>[45]</sup>。

#### 3.2 病程持续时间长

研究表明，被 PEDV 感染的仔猪，通过每天检测粪便中 PEDV 的阳性值发现其排毒时间长达 28 d，并且肠道中 PEDV 的存活时间更长<sup>[46]</sup>。此外，另一项调查发现，PEDV 在养殖场内会循环感染，在猪群中采集粪便及血清，血清中 PEDV 抗体阳性率远远高于粪便中 PEDV 病原的阳性率<sup>[47]</sup>。

#### 3.3 疫苗免疫效果不佳

研究发现，母猪肌注 PEDV 弱毒疫苗和灭活疫苗所诱导的免疫应答是相似的，主要是使乳汁和血清中产生 IgG 抗体<sup>[48]</sup>，而这种免疫并不会使机体产生黏膜免疫，导致养殖场新生仔猪还会大概率感染 PEDV。

## 4 PEDV 的防控措施

### 4.1 生物安全

#### 4.1.1 畜群和养殖场管理

在畜群和养殖场管理中加强生物安全，如对运输进出的车辆、饲料外包装等一些潜在污染物进行去污和彻底消毒处理，饲料及饲料添加剂有安全的供应渠道<sup>[49]</sup>。对养殖场和工作人员制定严格卫生管理措施<sup>[50]</sup>，这对于防控 PEDV 的直接或间接接触传播至关重要。在 2013~2017 年疫情流行期间，调查发现，运输车辆和受污染的饲料是养殖场主要的污染物<sup>[49]</sup>。对于受 PEDV 感染的养殖场，应制定严格的检疫方式来控制病毒的传播，避免养殖场的病毒外溢到其它养殖场，控制措施应包括在腹泻得到有效缓解和疾病得到控制之前，不得移动患病猪<sup>[49]</sup>。2010~2011 年，在韩国的调查研究中发现，采取的 287 头野猪的粪便样本中，有 28 头野猪的粪便样本 PEDV 呈现阳性<sup>[51]</sup>。2013~2014 年，PEDV 流行期间，美国研究者研究发现，采集 7997 头美国野猪的血清样本中，8 头野猪的血清样本 PEDV 呈现阳性<sup>[52]</sup>。是否存在跨物种的传播还需要进一步的研究。

#### 4.1.2 消毒剂的选择

在研究中发现，使用 0.5% 的杜邦卫可和 2.06% 的高乐氏是杀灭粪便中 PEDV 最佳的消毒剂<sup>[53]</sup>。在室温下，超氧水在接触含有 PEDV 污染物 10~90 min，也可将其杀灭<sup>[54]</sup>。

#### 4.1.3 运输车辆的卫生

用高压清洗机清洗车辆，然后进行消毒和干燥处理，对其卫生安全和去污效果十分有效<sup>[55]</sup>。过氧化氢高效消毒剂在 20℃，30 min 后<sup>[56]</sup>，在 10℃，40~60 min 后，或在 -10℃~4℃，10~30 min 后<sup>[55]</sup>，均可有效杀灭受污染车辆表面的 PEDV，消毒后，未检测到传染性病毒。

## 4.2 免疫预防

### 4.2.1 肠道-乳腺-sIgA 免疫轴的概述

母猪初乳或常乳中 PEDV 特异性 sIgA 抗体水平是决定仔猪是否获得 PEDV 抗体被动免疫的关键因素<sup>[57][58]</sup>。sIgA 抗体可抵抗胰蛋白酶抑制剂，并能中和体内肠道粘膜中的 PEDV<sup>[57]</sup>。母猪的乳汁中含有由浆细胞产生的 PEDV 特异性 sIgA 抗体并迁移到乳腺中，这被定义为肠道-乳腺-sIgA 免疫轴，该免疫轴由 Saif 和 Bohl

在 TGEV 免疫研究中首次提出<sup>[58]</sup>。

#### 4.2.2 返饲+注射疫苗免疫

2017 年, Thomas Gillespie 等人研究发现返饲活病毒, 灭活疫苗加强接种, 这种方法不仅可以增强母猪初乳和常乳中 IgA 抗体含量, 而且还可以增强 IgG 抗体含量。口服活病毒对 IgA 抗体水平的提高有显著影响, 而注射灭活苗主要使 IgG 抗体水平提高, 两者结合使新生仔猪对 PEDV 的抵抗力更强。

## 5 单克隆抗体

### 5.1 单克隆抗体的免疫学原理

能真正引起动物机体内产生高度特异性的免疫刺激反应作用的重要物质一定是抗原, 有许多抗原决定簇存在于抗原表面<sup>[59]</sup>。与抗原特异性受体直接结合表达的免疫球蛋白是抗体, 抗体是通过抗原决定簇刺激机体 B 淋巴细胞产生的, B 淋巴细胞自身生长增殖及分化成熟后可以产生一系列相应抗体, 由效应 B 淋巴细胞(浆细胞)进行分泌<sup>[60]</sup>。

在早期人类制备抗体时, 最主要的是多克隆抗体的制备。动物的免疫需要用相应的抗原, 得到的抗体是一个针对多种抗原决定簇的混合抗体<sup>[61]</sup>。与单克隆抗体相比, 多克隆抗体最明显的优势则是有广泛的来源, 制备方便<sup>[62]</sup>。但其缺陷比较明显, 特异性不高, 易发生交叉反应(几种抗原决定簇的混合抗体), 如: 脾脏、淋巴结、B 细胞等<sup>[63]</sup>。

单克隆抗体是一种能够由识别抗原决定簇的 B 淋巴细胞所克隆产生的同源特异性抗体, B 淋巴细胞不能在体外进行无限增殖<sup>[64]</sup>。单克隆抗体技术研究的关键核心就在于如何通过将骨髓瘤细胞与体内已被其特定的抗原提供免疫活性刺激的 B 淋巴细胞融合来进一步获得杂交瘤细胞<sup>[65]</sup>。杂交瘤细胞不仅与骨髓瘤细胞一样可以在体外无限增殖, 还可产生特异性抗体, 这一点与 B 淋巴细胞一样<sup>[66]</sup>。

### 5.2 动物细胞融合技术

动物细胞融合也被叫做动物体细胞杂交, 是指将两个细胞或者有多个以上相同或不同类型的细胞, 通过外膜的融合而形成的单个细胞的过程<sup>[67]</sup>。在适当的条件下, 这些细胞融合在一起产生一个单核细胞, 称为杂交瘤。杂交瘤具有两个原始细胞的遗传信息<sup>[68]</sup>。细胞融合的诱导方法有很多, 包括物理方法, 如振荡、离心、电击等; 生物方法, 如灭活病毒; 化学方法, 如聚乙二醇等。

1975 年, 第一种单克隆抗体是由 Kohler 和 Milstein 制备的。将绵羊红细胞免疫



诱导小鼠骨髓瘤细胞与小鼠的 B 淋巴细胞进行融合，通过筛选技术得到杂交瘤细胞，随后，制备出一种具有单一抗原决定簇的单克隆抗体<sup>[69]</sup>。

## 5.3 单克隆抗体的应用

### 5.3.1 诊断试剂

对于单抗的诊断试剂有很多，在畜禽上有很多应用。在猪病病毒方向，例如猪传染性胃肠炎病毒，用 N 蛋白做单抗，建立了夹心 ELISA 方法<sup>[70]</sup>；非洲猪瘟病毒，用 E2 蛋白、P30 蛋白做单抗，建立了阻断 ELISA 检测方法<sup>[71][72]</sup>；其 P54 蛋白做单抗，建立了非洲猪瘟病毒抗原检测方法<sup>[73]</sup>；猪细小病毒，用 VP2 蛋白做单抗，建立了抗原捕捉 ELISA 方法<sup>[74]</sup>。在猪病细菌性疾病方向，例如猪肺炎支原体，用 P97 蛋白、P65 蛋白做单抗，建立了阻断 ELISA 抗体检测方法<sup>[75][76]</sup>。在寄生虫方向，例如猪旋毛虫病做单抗，建立了快速 ELISA 诊断试剂盒<sup>[77]</sup>。

### 5.3.2 治疗疾病和给药

随着新冠肺炎的不断反复，核酸检测普及到大众，单抗的研究与其一样，通过针对性的制造单抗，改造单抗来完成新冠主要的药物研发途径<sup>[78]</sup>。

另一种与单抗有关用于癌症治疗的药物是生物导弹，它是单克隆抗体和癌症治疗药物的组合，是一种针对癌细胞表面特定抗原的单克隆抗体，能够将杀死癌细胞的药物与单克隆抗体相连，对正常细胞无致死作用<sup>[79]</sup>。第一个单克隆抗体药物赫赛汀可以特异性结合癌细胞表面表达的 HER2 受体来治疗乳腺癌<sup>[80]</sup>。

# 1 引言

猪流行性腹泻(PED)是一种猪肠道内的病毒 PEDV 感染引发的高度传染性的病毒性疾病,新生仔猪有着极高的死亡率,高达 50~100%;临床症状上, PEDV 与 TGEV、PDCoV 高度类似。PEDV 对养猪业来说危害是很严重的,导致了重大的损失。尤其在新的变异流行毒株的出现后,对疾病的预防和控制迫在眉睫。

猪在 PEDV 感染早期,体内出现的抗 N 蛋白的抗体是最高水平的。通过相关的研究发现,在不同的 PEDV 的分离株中,基因保守性最高的便是 N 基因,因此 N 蛋白可作为建立 PEDV 分子诊断工具的优选蛋白。使用纯化的 PEDV N 蛋白免疫小鼠,将会获得针对 N 蛋白的单克隆抗体。这种抗体可用于建立检测试剂盒,例如 ELISA、IFA 和试纸条等。本研究拟使用纯化的 PEDV N 蛋白作为淋巴细胞杂交瘤技术实验中使用的特异性免疫原,制备针对 PEDV N 蛋白的单克隆抗体。本研究主要目的是制备 PEDV N 蛋白单克隆抗体,主要的研究过程有蛋白纯化、小鼠的免疫、细胞融合、筛选阳性细胞株、亚克隆等。

具体内容分别是 PEDV N 基因片段的克隆扩增、PET-28a(+)-PEDV-N 和 PET-30a(+)-PEDV-N 重组质粒的构建、PEDV N 蛋白原核表达及其纯化。以得到纯化的重组 PEDV N 蛋白,将其作为免疫原来免疫小鼠,最终筛选获得 1 株 PEDV N 杂交瘤细胞株,为后续 PEDV 致病机理研究、建立诊断检测试剂盒,如 ELISA、IFA 和试纸条等奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 试验细胞株

PEDV 湖北分离株 (HUB2018)、PET-28a (+) 载体、PET-30a (+) 载体、PEDV 猪阳性血清、PEDV 猪阴性血清、Vero 细胞均保存于湖北省农业科学院畜牧兽医研究所畜禽病原微生物学湖北省重点实验室。

### 2.2 试剂材料

表 2-1 主要耗材

Tab 2 - 1 Main consumables

试验材料	公司
质粒提取试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
反转录试剂盒	Thermo 公司
琼脂糖	北京索莱宝科技有限公司
2×Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
RNA 提取试剂盒	康宁生命科学 (吴江) 有限公司
PCR 产物纯化试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
T4 DNA 连接酶	宝生物工程(大连)有限公司
限制性内切酶 Bam HI/XhoI	宝生物工程(大连)有限公司
DL5000 DNA Marker	宝生物工程(大连)有限公司
DL2000 DNA Marker	宝生物工程(大连)有限公司
大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞	宝生物工程(大连)有限公司
大肠杆菌 BL21 感受态细胞	宝生物工程(大连)有限公司
LB 肉汤、LB 营养琼脂	青岛高科技工业园海博生物科技公司
卡那霉素	Solarbio 公司
IPTG 诱导剂	Solarbio 公司
5 × SDS 上样缓冲液	Solarbio 公司
SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒	上海威奥生物科技有限公司
蛋白质 Marker	Fremonts 公司
His 标签蛋白纯化试剂盒	碧云天生物科技
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	碧云天生物科技
6*His, His-Tag Mouse McAb	proteintech 公司

---

Affinipure Goat Anti-Swine IgG (H+L)	proteintech 公司
Affinipure Goat Anti-mouse IgG (H+L)	proteintech 公司
考马斯亮蓝超快染色液	Beyotime 公司
ELISA PLATES	BIOFIL 公司
ELISA 包被缓冲液 (1×)	雷根公司
磷酸盐缓冲溶液 (10×PBS)	雷根公司
吐温 20	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	国药集团化学试剂有限公司
BSA Albumin Fraction V	BIOFROXX 公司
Skim Milk	BD Difco 公司
可溶性 TMB 单组份 (HRP 底物)	北京博奥龙免疫技术有限公司
ELISA 终止液 (2M)	雷根公司
1640 培养基	cytiva 公司
胎牛血清 (FBS)	gibco 公司
青霉素-链霉素 (双抗)	gibco 公司
Polyethylene glycol solution	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
HT Media Supplement (50×) Hybri-Max™	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
HAT Media Supplement (50×) Hybri-Max™	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
小鼠 (6-8 周龄)	湖北省疾病预防控制中心
研磨器	大迈仪器 (上海) 有限公司
50 mL 离心管	CORNING 公司
96 孔细胞板	CORNING 公司
细胞培养瓶	CORNING 公司
单克隆抗体亚型快速鉴定试剂盒	proteintech 公司
Dimethyl sulfoxide	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司
秋水仙素	源叶生物有限公司
Giemsa 染液	biosharp 生物有限公司
4% 多聚甲醛通用型组织固定液	biosharp 生物有限公司
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
Fluorescein (FITC) -conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)	武汉三鹰公司
DAPI 染色剂	兰杰柯科技有限公司

---

## 2.3 仪器

表 2-2 主要设备

Tab 2-2 Main equipment

试验材料	公司
PCR 扩增仪	美国 BioRad 公司
琼脂糖凝胶成像系统	美国 BioRad 公司
L1 低温连接仪	珠海黑马公司
恒温振荡器	培英公司
分光光度计	eppendorf 公司
超声波细胞粉碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司
电泳仪	北京六一仪器厂
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
隔水式恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司
摇床	鼎盛生物技术公司
台式离心机 (TDL-5)	上海安亭科学仪器厂制造
高速冷冻离心机	艾本德中国有限公司
酶标仪	BIO-TEK
数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
负 80 度冰箱	Thermo Electron Corporation
负 20 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
磁力加热搅拌棒	常州国华公司
奥林巴斯生物显微镜 BX53	OLYMPUS
高压蒸汽灭菌锅	山东博科生物产业有限公司
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	赛默飞世尔科技有限公司

## 2.4 溶液配制

5×电泳缓冲液: 15.2 g Tris-base、94 g 甘氨酸、5 g SDS、1 L 水。

转膜缓冲液: 甘氨酸 1.45 g、Tris-Base 2.9 g、水 400 mL、甲醇 100 mL。

TBST: NaCl 4.4 g、Tris-HCl (7.5) 5 mL、定容 500 mL、吐温 2.5 mL。

有丝分裂抑制剂——100×浓缩的秋水仙素 (20μg/mL): 将 0.1 mg 的秋水仙素溶于 5 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 混匀, 充分溶解后分装冰冻保存。

低渗溶液: 0.075M KCl, 取 0.5588 g KCl 溶于 ddH<sub>2</sub>O 中并定容至 100 mL, 混匀后备用。

固定液：取甲醇 300 mL，冰乙酸 100 mL，充分混匀后备用。

## 2.5 PEDV N 蛋白的原核表达与蛋白纯化

### 2.5.1 PEDV N 基因组的提取

利用 AXYGEN 提取基因组试剂盒进行 PEDV RNA 的提取，操作方法如下：

- a. 取本实验室保存的 PEDV 病毒液 200  $\mu$ L 转入 1.5 mL 离心管中；
- b. 加入 200  $\mu$ L Buffer V-L，利用涡旋仪来漩涡振荡混合的液体至两者混合均匀，随后静置 5 min；
- c. 再加入 75  $\mu$ L Buffer V-N，利用涡旋仪来漩涡振荡混合的液体直至混合均匀，12 000r/min，5 min；
- d. 将试剂盒内提供的 2 mL 离心管中加入上述上清液，再加 300  $\mu$ L 异丙醇(1%冰乙酸)，6~8 次颠倒混匀；
- e. 将 2 mL 离心管内放入制备管，再将上述混合液倒进制备管，6 000r/min，离心 1 min；
- f. 滤液倒掉，再将 500  $\mu$ L 已添加无水乙醇的 Buffer W1 加入制备管中，1 min 静置。之后 12 000r/min，离心 1 min；
- g. 滤液倒掉，再将 800  $\mu$ L 已添加无水乙醇的 Buffer W2 加入制备管中，12 000r/min，离心 1 min；
- h. 再一次 12 000r/min，离心 1 min；
- i. 将试剂盒内提供的 1.5 mL 离心管中放入制备管，再将 50  $\mu$ L 的 Buffer TE(nuclease-free)加入其中，1 min 静置。之后 12 000r/min，离心 1 min。用来洗脱出 PEDV RNA。

将 PEDV RNA 按照 HiScript-II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录成 cDNA，反转录的体系及循环参数如下：

RNA 8  $\mu$ L 65°C 5 min，冰浴 2 min。加 5 $\times$ gDNA wiper Mix 2  $\mu$ L 42°C 2 min。加 10 $\times$ RTmix 2  $\mu$ L，HiScript-II Enzyme Mix 2  $\mu$ L，oligo dT20VN or Random 1  $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L，25°C 5 min，37°C 45 min，85°C 5 s，4°C 保存。以获得 PEDV cDNA 作为模板进行下一步 PEDV N 基因的扩增。

### 2.5.2 PEDV N 基因的扩增

#### (1) 引物的设计与合成

根据 PEDV (HUB2018 株) 分离株 N 基因的序列，利用 Primer 5.0 软件进行引物设计。引物序列如下：

PEDV-N-F : 5'-CGGGATCCATGGCTTCTGTCAGTTTTTCAGG-3'

PEDV-N-R : 5'-CCGCTCGAGATTTCTGTATCGAAGATCTCG-3'

分别将 *Bam*HI和 *Xho*I的酶切位点引入至上下游引物的 5'端(下划线部分)。并交由生物公司合成。

## (2) PEDV N 基因的 PCR 扩增

将反转录所得的 PEDVcDNA, 直接用于 PCR 扩增。

总体积为 50  $\mu$ L 的 PCR 扩增反应体系如下:

成分	用量
下游引物	2 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	16 $\mu$ L
cDNA PEDV 模板	5 $\mu$ L
2 $\times$ Phata Max Master Mix	25 $\mu$ L
上游引物	2 $\mu$ L

PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。

结束反应之后, 用凝胶电泳法进行 PCR 扩增产物的检测, 并进行胶回收, 具体操作步骤方法如下:

a. DNA 电泳结束后, 切割目的 DNA 片段的凝胶, 称重, 凝胶与体积比例为 1: 1;

b. 将上述的凝胶块中加入等倍体积 Buffer GDP。在 50 ~ 55 $^{\circ}$ C 的水浴温度下, 水浴 7 ~ 10 min, 具体操作时间根据实际切割得到的凝胶大小来调整, 以确保凝胶块达到完全溶解的状态。同时, 水浴期间还应将装有胶块混合物的管上下混合颠倒数次, 以加速溶解胶块;

c. 短暂时间离心, 试剂盒中 2 mL 收集管内放入吸附柱, 移入溶解后的溶胶液, 12 000r/min, 离心 30~60 s;

d. 弃滤液, 把吸附柱置于收集管中。加 300  $\mu$ L Buffer GDP, 1 min 静置, 之后 12 000r/min, 离心 30~60 s;

e. 弃滤液, 把吸附柱置于收集管中。加 700  $\mu$ L 已加入无水乙醇的 Buffer GW, 12 000r/min, 离心 30~60 s;

f. 重复步骤 e;

g. 倒掉滤液, 再次, 12 000r/min, 离心 2 min;

h. 将吸附柱放置于灭菌过的 1.5 mL 离心管里, 将吸附柱的中央位置加入 20~30  $\mu$ L Elution Bufer, 放置 2 min。12 000r/min, 离心 1 min。离心后弃去吸柱, 所得 DNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

### 2.5.3 PET-28a (+) -N 和 PET-30a (+) -N 原核表达载体的构建

将上述 PCR 胶回收产物和空载体 PET-28a (+)、PET-30a (+) 分别进行 BamH I 和 Xho I 双酶切。双酶切反应体系及反应条件分别为：

PCR 胶回收产物的酶切体系及反应条件：*BamH I* 1  $\mu\text{L}$ ，*Xho I* 1  $\mu\text{L}$ ，Custom Buffer 5  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 36  $\mu\text{L}$ ，胶回收后的 N 基因扩增产物 7  $\mu\text{L}$ ，37°C，2 h；

PET-28a (+) 载体的酶切体系及反应条件：*BamH I* 1  $\mu\text{L}$ ，*Xho I* 1  $\mu\text{L}$ ，Custom Buffer 5  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 28  $\mu\text{L}$ ，PET-28a (+) 载体 15  $\mu\text{L}$ ，37°C，2 h；

PET-30a (+) 载体的酶切体系及反应条件：*BamH I* 1  $\mu\text{L}$ ，*Xho I* 1  $\mu\text{L}$ ，Custom Buffer 5  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 28  $\mu\text{L}$ ，PET-30a (+) 载体 15  $\mu\text{L}$ ，37°C，2 h；

酶切反应结束后，进行回收纯化。

将酶切后的 PEDV N 基因的扩增片段与 PET-28a(+) 和 PET-30(a+) 载体利用 T4 DNA 连接酶连接。连接体系及反应条件为：

成分	用量
dd H <sub>2</sub> O	4 $\mu\text{L}$
T4 DNA ligase	1 $\mu\text{L}$
T4 DNA ligase Buffer	1 $\mu\text{L}$
PET-28a (+) / PET-30a (+)	3 $\mu\text{L}$
PEDV-N 基因	2 $\mu\text{L}$

16°C 过夜连接。

将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞，具体步骤如下：

a. 抗性平板的制备：将灭菌保存的 LB 营养琼脂加入终浓度为 25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素；

b. 加样：将 10  $\mu\text{L}$  连接产物加入 DH5 $\alpha$  感受态细胞，冰上放置，轻轻搅动即可混和均匀；

c. 冰浴：保持在冰上放置 30 min；

d. 热击：将感受态从冰上取出，与 42°C 水浴热击 60 s；

e. 冰浴：重新放回冰上放置 2~5 min；

f. 复苏：在感受态中加入 800  $\mu\text{L}$  的 SOC Medium 培养基，在振荡培养箱中，37°C，180r/min 培养 45~60 min；

g. 涂平皿：将上述混悬液离心，5 000r/min，3 min，吸弃离心后 600  $\mu\text{L}$  的混悬液的上清，将剩余的 200  $\mu\text{L}$  液体重悬菌体，并将菌体悬液均匀的涂布于含有卡那抗性的平皿表面，放置于 37°C 恒温培养箱中，先正面培养大约 15 min，等到平皿表面的液体干燥后，翻转倒置平皿并继续培养 12~18 h；

h. 挑菌：挑取单菌落，最佳状态是表面光滑完整且边缘圆润，将其放入带有卡那抗性的 LB 培养基内，37°C 220r/min 进行培养，培养时间为 8~12 h，之后将培养



好的菌液提取质粒，具体操作步骤如下：

a.取培养 12~16 h 的菌液 1~5 mL，放入 2 mL 的离心管中，10 000r/min，1 min 进行离心。离心过后，弃置培养基，倒扣于吸水的纸垫面上并尽可能吸尽其残留液；

b.向上述 2 mL 的离心管中加入 250  $\mu$ L 已添加 RNaseA 的 Buffer P1，用移液器吹散或涡旋振荡仪振荡将细菌重悬混匀，直至重悬后的菌液看不见细菌团块；

c.再加入 250  $\mu$ L Buffer P2，慢慢的上下颠倒 8~10 次；

d.再加入 350  $\mu$ L Buffer P3，慢慢的上下颠倒 8~10 次。之后 13 000r/min，离心 10 min；

e.将 2 mL 收集管放进吸附柱内。步骤 d 中的上清倒进去，13 000r/min，离心 30~60 s。之后，弃废液，将吸附柱重新放回至收集管中；

f.再加入 600  $\mu$ L 已经用无水乙醇稀释过的 Buffer PW2，13 000r/min，离心 30~60 s。弃废液，将吸附柱重新放回至收集管中；

g. 重复步骤 f；

h.再次将吸附柱放置于收集管内。13 000r/min，1 min 离心干燥吸附柱，彻底除去残留的漂洗液；

i.将吸附柱放置于一个新的 1.5 mL 灭菌过的离心管内。30~100  $\mu$ L Elution Buffer 加吸附膜内。2 min 静置，13 000r/min,离心 1 min 离心将 DNA 洗脱。扔掉吸附柱，将 DNA 放-20 $^{\circ}$ C保存。

利用双酶切法鉴定构建好的重组质粒，体系为：

成分	用量
<i>Bam</i> H I	0.5 $\mu$ L
<i>Xho</i> I	0.5 $\mu$ L
10x Buffer Custom	1 $\mu$ L
重组质粒	0.5 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	7.5 $\mu$ L

鉴定成功的重组质粒送至生物公司进行测序，将测序结果是正确的重组质粒分别命名为 PET-28a (+) -PEDV-N 和 PET-30a (+) -PEDV-N。质粒冻存于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

#### 2.5.4 PEDV N 蛋白的原核表达

将重组质粒 PET-28a (+) -PEDV-N 和 PET-30a (+) -PEDV-N 转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，具体操作步骤如下：

a.抗性平板的制备：将灭菌保存的 LB 营养琼脂加入终浓度为 25-50  $\mu$ g/mL 的卡

那霉素；

b.加样：将 1.5  $\mu\text{L}$  重组质粒加入 BL21 感受态细胞，冰上放置，轻轻搅动即可混和均匀；

c.冰浴：保持在冰上放置 30 min；

d.热击：将感受态从冰上取出，与 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热击 60 s；

e. 冰浴：重新放回冰上放置 2-5 min；

f.复苏：在感受态中加入 800  $\mu\text{L}$  的 SOC Medium 培养基，在振荡培养箱中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，180r/min 培养 45-60 min；

g.涂平皿：吸取 200  $\mu\text{L}$  菌体，并将菌体悬液均匀的涂布于含有卡那抗性的平皿表面，放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中，先正面培养大约 15 min，等到平皿表面的液体干燥后，翻转倒置平皿并继续培养 12-18 h；

h.挑菌：挑取单菌落，最佳状态是表面光滑完整且边缘圆润，将其放入带有卡那抗性的 LB 培养基内，37 $^{\circ}\text{C}$  220r/min 进行培养，培养时间为 8-12 h。

取 PET-28a (+) -PEDV-N 和 PET-30a (+) -PEDV-N 重组菌液 100  $\mu\text{L}$ ，加入到 10 mL 加有卡那抗性的液体 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、220r/min 下进行振荡培养，至菌液中的  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  值为 0.6-0.8 时，停止培养，此时，立即加入 IPTG。分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220r/min 诱导 4 h 和 16 $^{\circ}\text{C}$ 、180r/min 诱导 16 h，同时设置空载体作为对照。

### 2.5.5 PEDV N 蛋白表达形式的确定

#### (1) 重组 N 蛋白的诱导表达及可溶性分析

分别取诱导后的重组菌液 1 mL，10 000r/min 离心 10 min，沉淀加 500  $\mu\text{L}$  的 PBS 重悬，沸水浴 10 min，冰浴 5 min，以确定 PEDV-N 蛋白的表达形式。

#### (2) 重组 N 蛋白诱导时间的优化

在 LB 培养基中加入重组菌液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 的摇床上振荡培养，等到  $\text{OD}_{600}$  值达到 0.6-0.8 时，立即加入 IPTG，分别在诱导培养后每隔 1 h 取一次 1 mL 的诱导培养后的菌液，10 000r/min，离心 10 min，弃去上清液，用 80  $\mu\text{L}$  PBS 重悬混合留下的菌体。将重悬混合的菌液中加入 SDS-PAGE 4 $\times$ Loading Buffer 混合均匀后煮沸 10 min，冰上放置 10 min，之后进行 SDS-PAGE 电泳，观察电泳结果。

#### (3) 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取 10 mL 诱导后的重组悬液，10 000r/min，10 min，将 1 mL 的裂解液重悬于离心之后的沉淀中，在冰上超声破碎，10 000r/min，离心 5 min，分别收集破碎菌液的上清、沉淀和全菌，用 80  $\mu\text{L}$  的 PBS 重悬沉淀。将上述混合的菌液中加入 SDS-PAGE 4 $\times$ Loading Buffer 混合均匀后煮沸 10 min，冰上放置 10 min，之后进行 SDS-PAGE 电泳，观察电泳结果。

#### (4) PEDV N 蛋白的纯化

大量的表达上述成功表达的蛋白后，用 His 标签蛋白纯化试剂盒进行纯化处理，具体的操作步骤如下：

a.将菌液收集至离心管中，在 4°C条件下，12 000r/min，离心 15 min，倒掉上清，留沉淀。然后裂解，或者将菌体沉淀冷冻存放入-20°C或者-80°C。每克菌体沉淀加入非变性裂解液 4 mL，将两者充分混合；

b.加入试剂盒内提供的溶菌酶（配置成 100mg/mL）至在菌液中的终浓度变为 1 mg/mL，将其混合均匀，并在冰上放 30 min；

c.细菌进行超声裂解，这个过程皆在冰上进行。超声功率，时间以及间隔时间都根据超声仪的说明来进行；

d. 4°C，12 000r/min，离心 20-30 min，收集上清置冰上；

e.取 1 mL 的镍柱，4°C，1 000r/min，离心 10 s，倒掉储存液，用 0.5 mL 非变性裂解液平衡，重复 2 次，弃去残留液。将 4 mL 含有目的蛋白的裂解液上清加入凝胶内，4°C，摇晃 60 min；

f.混合物放入亲和层析柱空柱管中；

g.将亲和层析柱管底部的盖子打开，利用重力作用的原理，使柱内部的混合液体流出，收集液体；

i.每次用 1 mL 非变性洗涤液洗柱 5-8 次，将液体收集；

h.每次用 0.5 mL 非变性洗脱液洗脱目的蛋白 6-10 次。用不同的离心管收集每次洗脱下来的液体，此洗脱液便为纯化的带 His 标签的目的蛋白样品。

根据 SDS-PAGE 电泳来分析洗脱峰值在哪几个收集管中。

#### 2.5.6 Western blot 鉴定 PEDV N 蛋白

取纯化后的 PEDV N 进行蛋白的检测，具体步骤如下

a.在纯化好的 PEDV N 蛋白中加入 SDS-PAGE 4×Loading Buffer 混合均匀后在煮沸 10 min，冰上放置 10 min，之后进行 SDS-PAGE 电泳；

b.电泳：首先需要注入分离胶，胶的上方留出大约 2 cm 的空间来注入浓缩胶，用 300 μL 无水乙醇进行注入分离胶之后的封胶，30 min 左右后，倒掉无水乙醇，用滤纸吸干净，注入浓缩胶，插梳子，30 min，放入电泳槽中，加足量的电泳液后，拔梳子，然后开始准备加入样本，不要吸入气泡。80-100 V 的电压下进行电泳最好；

c.转膜：裁剪目的胶，然后剪取相同大小的 PVDF 膜和四张滤纸，甲醇活化 PVDF 膜 5 min，之后将 PVDF 膜、滤纸和胶放入转膜液中 20 min 浸泡。到达时间之后，将以上按照两张滤纸、PVDF 膜、胶、两张滤纸依次放入半干转仪中转膜；

d.封闭: PVDF 膜, 用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 将其放封闭液中, 4°C 封闭过夜;

e.孵育: 封闭结束后, 在孵育液中加入一抗 (1: 5000), 4°C 过夜孵育。再用 TBST 清洗 3 次, 每次清洗 10 min;

f.用二抗 (羊抗猪) 孵育 1 h, 用 TBST 清洗 3 遍, 每次清洗 10 min, 最后进行化学发光;

g.化学发光: 避光, 发光液 A: B=1: 1。

### 2.5.7 PEDV N 蛋白的浓度测定

a.配制蛋白标准品 (0.5 mg/mL);

b.按 50: 1 的比例配制 BCA 工作液, 混合均匀;

c.将标准品按 0、1、2、4、8、12、16 和 20  $\mu$ L 依次加入到对应孔中, 并用 PBS 缓冲液补足到 20  $\mu$ L, 加入 5  $\mu$ L 待测样品, 并用 PBS 补足;

d.各孔加入 200  $\mu$ L BCA 工作液, 37°C 放置 20-30 min, 在 A562 读取 OD 值;

e.计算标准曲线为  $y=1.8914x-0.1644$ , 根据样品 OD 值计算蛋白浓度。

## 2.6 PEDV N 蛋白间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的建立

### 2.6.1 PEDV N 最适包被浓度和待检血清稀释度的选择

按如下方案实施:

a.用包被液将 PEDV N 蛋白按照 4 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL、0.25 $\mu$ g/mL、0.125 $\mu$ g/mL 倍比稀释, 100  $\mu$ L/孔, 横向加入酶标板中, 4°C 过夜, 次日, 用 PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;

b.加入含有 1% (w/v) BSA 的 PBST 进行封闭, 200  $\mu$ L/孔, 37°C 放置 2 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;

c.将猪的阳性血清作为一抗, 按照 1: 20、1: 40、1: 80、1: 160、1: 320、1: 640、1: 1280 比例稀释, 将阴性血清也按此比例稀释, 100  $\mu$ L/孔, 纵向加入酶标板中, 37°C 放置 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;

d.加入 PBST 稀释的羊抗猪二抗 (1: 5000) 100  $\mu$ L/孔, 37°C 放置 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 3 min/次;

e.加入 50  $\mu$ L/孔的 HRP 显色液, 暗中放置 10 min;

f.加入 50  $\mu$ L/孔的终止液, 终止显色;

g.在 A450 测定吸光值, 记录 OD 值, 计算抗原最佳包被浓度。

## 2.6.2 封闭液的选择

按上一步确定条件包被抗原，然后将配制好的 1 % BSA 和 5 % 脱脂牛奶加入酶标板，每孔加 200  $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C，2 h，同上一反应条件，根据 P/N 选取最佳封闭液。

## 2.6.3 二抗稀释度的选择

将 HRP 标记的羊抗猪酶标抗体按照 1 : 1000、1 : 3000、1 : 5000、1 : 7000、1 : 9000、1 : 10000、1 : 15000 比例进行稀释，50  $\mu$ L/孔，按照上述确定的条件进行试验，根据 P/N 选取最合适酶标抗体浓度。

## 2.6.4 二抗作用时间的选择

分别设立酶标抗体的反应时间：45 min、60 min、90 min，按照上述确定的条件进行试验，根据 P/N 选取最合适反应时间。

## 2.7 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

### 2.7.1 Balb/c 小鼠的免疫

按以下方案实施：

- a. 取测好浓度的 PEDV N 蛋白，加入 PBS 稀释，在混合液中加入等量的弗氏完全佐剂，充分震荡，进行乳化（滴在液面不消散为好）；
- b. 将乳化后的样品在小鼠颈部至背部分两处注射，每处 200  $\mu$ L；
- c. 记录免疫时间，两周后二次免疫；
- d. 取测好浓度的 PEDV N 蛋白，加入 PBS 稀释，在混合液中加入等量的弗氏不完全佐剂，充分震荡，进行乳化；
- e. 将乳化后的样品在小鼠颈部至背部分两处注射，每处 200  $\mu$ L；
- f. 两周后二免，一周后三免，三免和二免相同；
- g. 细胞融合前 3-5 d，小鼠腹腔加强免疫，每只小鼠腹腔注射 200  $\mu$ L PEDV N 蛋白。

### 2.7.2 十字交叉法确定抗原最佳包被浓度

实验方法参考上述 2.6.1，将上述的猪阳性血清和阴性血清换成小鼠阳性血清和阴性血清，比例从 1 : 160 开始，二抗换为羊抗鼠。

### 2.7.3 sp2/0 骨髓瘤细胞的复苏活化与制备

具体实施方案如下：

- a. 复苏冻存的 sp2/0 细胞，与融合前 10 天，背部皮下注射健康未免疫的小鼠；
- b. 待瘤子长至约 1 cm×1 cm×0.6 cm 大小时处死并固定小鼠；
- c. 取瘤子，匀浆后用 15 mL 基础培养基对瘤细胞悬浮；
- d. 沿管壁轻轻的缓慢的加入到 50 mL 已事先加入 15 mL 淋巴细胞分离液的离心管中；
- e. 1 200r/min 离心 10 min，取中间层的 sp2/0 细胞，加入适量基础培养基；
- f. 1 200r/min 离心 5 min，洗 2 次；
- g. 用 5 mL 基础培养基悬浮瘤细胞后计数。

#### 2.7.4 饲养细胞的制备

按以下方案制备饲养细胞：

- a. 将未免疫的雌性 Balb/c 小鼠眼眶放血采阴性血清，之后断颈处死，将其放入 75% 的酒精中浸泡约 5 min；
- b. 将小鼠尸体固定于解剖板，无菌操作台中剪开外部皮肤，暴露腹膜，剪一小口在腹部中央；
- c. 用移液枪吸取出 1-2 mL 的 1640 基础培养液并注入小鼠的腹腔内，重复洗吹，反复 2 次，抽出来的液体中含有腹腔巨噬细胞；
- d. 侧向交叉固定小鼠，取出脾脏，用 4-5 mL 基础培养基匀浆；
- e. 静置后，吸取上清移入装有腹腔巨噬细胞的 50 mL 离心管；
- f. 1 200r/min 离心 10 min，倒掉上清液，加入 HAT 选择培养液重悬。

#### 2.7.5 免疫脾细胞的制备

脾细胞的制备方案如下：

- a. 将免疫过的雌性 Balb/c 小鼠眼眶放血采阳性血清，之后断颈处死，将其放入 75% 的酒精中浸泡约 5 min；
- b. 将小鼠尸体固定于解剖板，无菌条件下撕开外部皮肤，侧向交叉固定小鼠，取出脾脏，用 4-5 mL 基础培养基匀浆；
- c. 静置后，吸取上清移入装有腹腔巨噬细胞的 50 mL 离心管；
- d. 1 200r/min 离心 10 min，倒掉上清液，加入 HAT 选择培养液重悬。

#### 2.7.6 细胞融合

细胞融合按以下步骤进行：

- a. 提前将 HAT 培养液 40 mL、基础培养液 15 mL 和聚乙二醇 0.7 mL，一只盛水烧杯，在 37℃ 预温备用；

b.大约吸取骨髓瘤细胞  $3 \times 10^7$  个、脾淋巴细胞  $10^{7-8}$  个，将两者放入 50 mL 的离心管中，充分混合均匀后补充 1640 基础培养液至 40 mL;

c. 1 000r/min 离心 10 min，倒掉上清液，轻弹管底，让这两种细胞沉淀物混匀成糊状;

d.将离心管置于预温的烧杯中，吸取 0.7 mL 的 PEG-4000，加入沉淀中，用 1 min 的时间，边加边搅动;

e.水浴中静置 90 s，用预温基础培养液 15 mL 稀释 PEG-4 000，前 30 s 加 1 mL，后 30 s 加 3 mL，然后在 2 min 内加完剩余的 11 mL;

f.补加 1 640 基础培养液直至 40 mL，1 000r/min 离心 10 min，舍弃上清液留糊状细胞沉淀备用;

g.用 40 mL 含 20% 新生牛血清的 HAT 选择培养液轻轻重悬备用;

h.饲养细胞和融合细胞混匀，用排枪加入 96 孔板，每孔 200  $\mu$ L，37°C，5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，每天观察;

i.待细胞集落长到一个视野时进行检测。

### 2.7.7 间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 筛选阳性细胞孔

按上一步确定条件包被 PEDV-N 蛋白，吸取 96 孔板上清每孔 50  $\mu$ L，加入酶标板中，还需要加阴阳性对照，37°C 培养箱中 1 h，PBST 洗 3 次，每次 3 min; 再加入 1: 5000 的羊抗鼠二抗，每孔 100  $\mu$ L，37°C 培养箱中 1 h，PBST 洗 3 次，每次 3 min; 加 HRP 显色液，每孔 50  $\mu$ L，暗中 10 min 放置; 最后每孔 50  $\mu$ L 终止显色; 测 OD<sub>450</sub>，记录 OD 值，OD 值较高且细胞生长良好的孔进行保留，进行后续阳性克隆的筛选。

### 2.7.8 有限稀释法进行阳性细胞的克隆

阳性细胞的克隆方法如下:

a.根据检测结果，选取 OD<sub>450</sub> 值较高且细胞生长良好的孔进行阳性孔筛选，选取孔为上表所示;

b.用微量移液器将待克隆的孔内的细胞吹散，取 100  $\mu$ L 移入 EP 管，吸出适量计数;

c.在 EP 管中用 HT 培养基稀释到  $10^3$ /mL 个;

d.在三个 4 mL 离心管中分别装入 3.8 mL、2.4 mL 和 2.0 mL 培养液，用作稀释;

e.取 200  $\mu$ L 稀释到  $10^3$ /mL 个的细胞于第一个离心管中，充分混合均匀后，吸取 1.6 mL 混合液加入至第二个离心管中，再次混合均匀后，吸取 2 mL 混合液加入至

第三个离心管中；

f.将离心管中的细胞 100  $\mu\text{L}$ /孔分种于 96 孔板饲养细胞板中，第一个离心管铺一列，第二个离心管铺两列，第三个离心管铺五列，EP 管中多余的细胞移至 12 孔板中；

g.此后，每日观察克隆孔细胞状态。

### 2.7.9 PEDV N 蛋白二次克隆和三次克隆

筛选方法与以上方法相同，直至正板 80%-90%为阳性孔，视为挑选出单克隆细胞。

### 2.7.10 Western blot 鉴定单克隆抗体

Western blot 具体操作如下：

a-d：实验方法上述 2.5.6 中的 a-d 一致；

e.孵育：封闭结束后，在孵育液中加入一抗（杂交瘤细胞上清液），4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育，再用 TBST 清洗 3 遍，每次清洗 10 min；

f.用二抗（羊抗鼠）孵育 1-2 h，用 TBST 清洗 3 遍，每次清洗 10 min，最后进行化学发光；

g.化学发光：避光，发光液 A：B=1：1。

### 2.7.11 单克隆抗体亚型的鉴定

单克隆抗体亚型的鉴定按试剂盒说明书进行，具体如下：

a.将 50  $\mu\text{L}$  的待测样本（10  $\mu\text{L}$  杂交瘤细胞上清 + 990  $\mu\text{L}$  1 $\times$ PBST）加入板条样品孔中；

b.再加进 50  $\mu\text{L}$  1 $\times$ 羊抗鼠 IgA+IgM+IgG-HRP，混匀；

c.盖上封板膜，室温孵育 1 h；

d.倒掉液体，PBST 洗 3 次，拍干；

e.将现配的显色液（A 液：B 液=1:100）加入孔中，100  $\mu\text{L}$ /孔；

f.避光 10-20 min，之后加 100  $\mu\text{L}$ /孔终止液；

g.结果判读。结果可以肉眼判定，也可以通过酶标仪读取 OD450。最深的颜色或是最高的 OD 值孔对应的即为相应亚型。

注：重链的样本类型：对应 A-F 中的一个阳性孔；轻链的样本类型：对应 G 和 H 中的一个阳性孔。

### 2.7.12 单克隆抗体的大量制备

将 0.5 mL 的弗氏不完全佐剂（也可选用液体石蜡）注射入小鼠的腹腔内，杂交



瘤细胞 ( $5 \times 10^5$  个细胞) 在一周后进行腹腔注射, 7 天左右, 小鼠腹部会出现不同大小的膨大状态, 时刻关注小鼠的状况, 及时抽取体内的腹水, 抽取出的腹水 1 000r/min, 离心 10 min, 离心过后发现会分为三层, 我们需要的是中间层颜色为淡黄色的液体, 而上下层分别是脂肪和红细胞。待所有小鼠腹水取出后, 混匀, 分装, 以备后续使用。

### 2.7.13 单克隆抗体的纯化与效价测定

利用 Protein A+G Agarose 进行纯化, 具体操作如下:

- a. 过滤腹水;
- b. 用 TBS 对纯化柱进行平衡以及洗涤;
- c. 将纯化柱上注入过滤后的腹水样本, 待纯化的抗体过柱后, 用 TBS 完成洗涤;
- d. 完成洗涤后, 用 10 mL 50 mM glycine, pH2.7 的洗脱液, 洗脱结合到纯化柱上的抗体;
- e. 洗脱下来的抗体要分管收集起来, 并利用 Tris 来将抗体中和并到达中性的状态, 中和过后的洗脱液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒或者 SDS-PAGE 电泳来确定几个管里存在洗脱下来的抗体;
- f. 纯化柱用 TBS 洗涤, 使其达中性, 用 TBS 保存, 并在 4°C 放置;
- g. 纯化好的抗体用 ELISA 间接检测方法来进行抗体效价的测定, 从 1:50 倍开始做倍比稀释。

### 2.7.14 单克隆抗体细胞株染色体计数

单克隆抗体细胞株染色体计数具体操作如下:

- a. 细胞停止生长分裂: 将秋水仙素加入处于对数生长期的杂交瘤细胞中, 秋水仙素的终浓度是 0.4 $\mu$ g/mL, 37°C 的条件下, 培养 3 h。
- b. 细胞的收集: 弃掉含有秋水仙素的处理液, 将细胞用 1640 培养基吹下来, 1 600r/min 离心 10 min, 收集沉淀的细胞。
- c. 细胞肿胀: 将 0.075mol/L KCl 低渗溶液放置于 37°C 水浴中预热, 用 1 mL 来重悬沉淀的细胞, 混合均匀后放置于 37°C 的培养箱中, 温育 30 min。
- d. 固定: 将 1 mL 新配置的固定液于上述细胞悬液轻轻混合均匀, 1 600r/min 离心 10 min, 丢弃上清之后再次加入 1 mL 的固定液, 轻轻混合均匀, 在 37°C 温箱中, 静置 30 min, 1 600r/min 离心 10 min, 丢弃上清之后再次加入 1 mL 的固定液, 轻轻混合均匀, 在 37°C 温箱中, 静置 30 min 或者 4°C 过夜放置, 1 600r/min 离心 10 min, 丢弃上清。

e. 细胞悬浮与浓度检测：将上述得到的细胞沉淀中加 200  $\mu\text{L}$  固定液，混合均匀后吸出 50  $\mu\text{L}$  的细胞悬液于事先在 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷的干净载玻片上，使其细胞悬液完全铺展固定于载玻片平板上，室温的情况下进行干燥。在显微镜仔细观察，如果均匀铺好的细胞没有发生重叠的现象，则可以用同样的细胞浓度来制备细胞样品，否则仍需继续进一步的稀释以达到适合的样品铺片效果。

f. 染色：Giemsa 染液 A 液 30 s，Giemsa 染液 B 液滴加量为 A 液的 2-3 倍，1-5 min，流水冲洗干净后，使其自然干燥。

g. 观察计数：将载玻片放置于显微镜的油镜下进行观察并计数。

h. 细胞判断的标准：细胞结构完整，轮廓清晰，染色体分布排列在同一水平面上。染色体形态结构和分布状态较好，最佳的状态是没有重叠，即使染色体偶尔会有个别重叠，也能够互相比较明确的辨认，不会影响染色体的计数。所观察的细胞处于同一有丝分裂阶段，即各个细胞染色体螺旋化程度尽可能接近或者染色体长度尽可能相同，在所观察的细胞周围没有离散的单个或者多个染色体存在，以免影响计数。

#### 2.7.15 单克隆抗体的间接免疫荧光（IFA）验证

单克隆抗体的间接免疫荧光（IFA）验证具体操作如下：

- a. 在 24 孔板内铺爬片，接入消化好的 Vero 细胞；
- b. 接 PEDV 湖北分离株（HUB2018）；
- c. PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- d. 预冷的固定剂室温固定 15 min；
- e. 100% 甲醇室温穿孔 10 min；
- f. PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- g. 加入 5% BSA，在 4 $^{\circ}\text{C}$  的条件下过夜封闭；
- h. PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- i. 加入 PEDV N 蛋白单抗（用 PBS 做 100 倍稀释），37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- j. PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- k. 加入荧光二抗（用 PBS 做 200 倍稀释），37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h；
- l. DAPI 染核，室温 15 min；
- m. PBS 洗 3 次，每次 5 min；
- n. 封片，上镜观察。

### 3 结果与分析

#### 3.1 PEDV N 蛋白的原核表达与蛋白纯化结果

##### 3.1.1 目的基因的扩增及鉴定结果

以 PEDV 的 cDNA 为模板，利用 primer 5 软件设计的引物 PEDV-N-F 和 PEDV-N-R 扩增 PEDV 的 N 基因，结果显示，在 1000-1500 bp 之间扩增出了很明显的大小约 1326 bp 的条带，与预取的 PEDV-N 目的条带大小一致（图 3-1），对其进行胶回收和产物纯化。

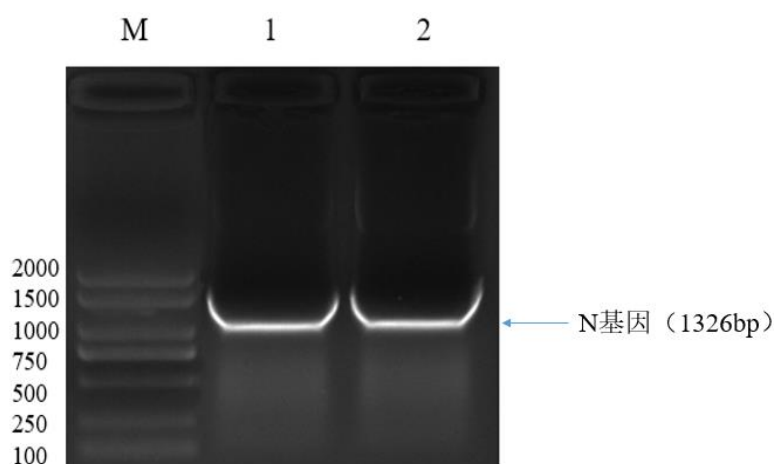


图 3-1 PEDV N 基因的 RT-PCR 扩增

Fig.3-1 Amplification of PEDV N gene by RT-PCR

M: DL2000; 1、2: PEDV-N 基因扩增产物

##### 3.1.2 PET-28a(+)-PEDV-N 和 PET-30a(+)-PEDV-N 重组质粒的构建与鉴定

利用 *Bam*HI 和 *Xho* I 两种限制性内切酶对目的基因 N 基因胶回收产物和原核表达载体 PET-28a(+)、PET-30a(+) 进行双酶切，之后再分别进行连接，并转化到 DH5  $\alpha$  感受态细胞中，最后，利用双酶切对 PET-28a(+)-PEDV-N 和 PET-30a(+)-PEDV-N 重组质粒进行鉴定。

酶切结果如图 3-2、图 3-3 所示，每个孔道分别有两条条带，分别是大小约 5000 bp 的载体条带，和大小为 1300~1400 bp 的目的片段，与预期相符。将酶切鉴定结果为阳性的重组质粒送至测序公司进行测序，测序结果利用 DNAMAN 进行对比，比对结果显示与目的序列一致。

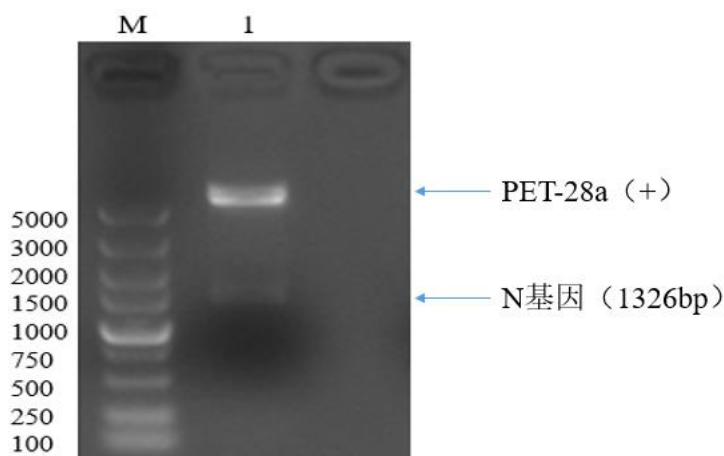


图 3-2 重组质粒 PET-28a(+)-PEDV-N 的双酶切鉴定

Fig. 3-2 Double-enzyme digestion identification of the recombinant plasmid PET-28a(+)-PEDV-N

M: DL5000; 1: PET-28a(+)-PEDV -N

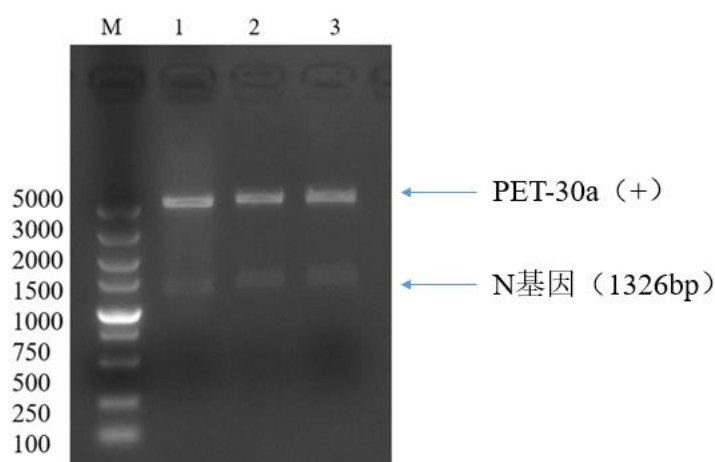


图 3-3 重组质粒 pET-30a(+)-PEDV-N 的双酶切鉴定

Fig. 3-3 Double digestion identification of recombinant plasmid PET-30a(+)-PEDV-N

M: DL5000; 1、2、3: PET-30a(+)-PEDV -N

### 3.1.3 PEDV-N 重组蛋白的表达与纯化

重组质粒 PET-28a(+)-PEDV-N 和 PET-30a (+) -PEDV-N 分别转化至 BL-21 大肠杆菌表达菌株中，经过扩大培养基培养，加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 诱导剂后进行诱导表达，诱导产物再经超声或蛋白破碎仪处理后，进行 SDS-PAGE 鉴定，结

果显示，重组 N 蛋白(PET-30a(+)-PEDV-N)主要是以上清蛋白的形式进行表达，在 55-70 KDa 之间出现目的条带，与预期表达蛋白的大小 58 KDa 一致（图 3-4、图 3-5、图 3-6、图 3-7、图 3-8、图 3-9）。

(1) 重组 N 蛋白的诱导温度优化

重组质粒 PET-28a(+)-PEDV -N 在 16°C和 37°C诱导表达均不明显，之后改为重组质粒 PET-30a(+)-PEDV -N，在 37°C时表达明显。

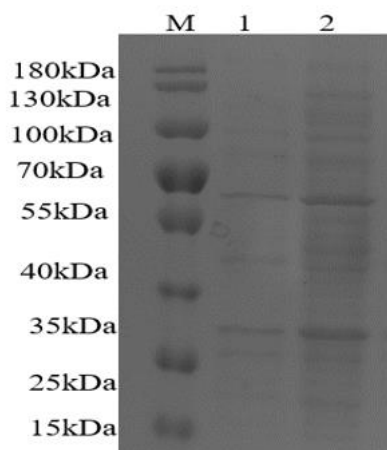


图 3-4 PET-28a(+)-PEDV -N 在 37°C时 SDS-PAGE 图

Fig. 3-4 SDS-PAGE of PET-28a(+)-PEDV-N at 37°C

M:蛋白 Marker 1:37°C PEDV 诱导前 2. 37°C PEDV 诱导后

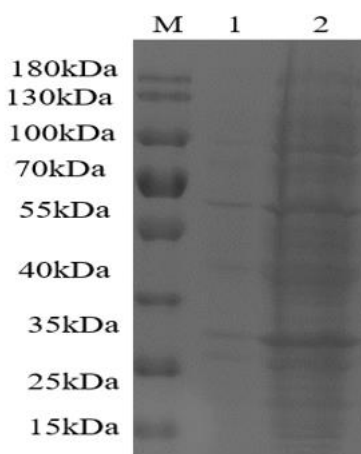


图 3-5 PET-28a(+)-PEDV -N 在 16°C时 SDS-PAGE 图

Fig. 3-5 SDS-PAGE of PET-28a(+)-PEDV-N at 16°C

M:蛋白 Marker 1:16°C PEDV 诱导前 2. 16°C PEDV 诱导后

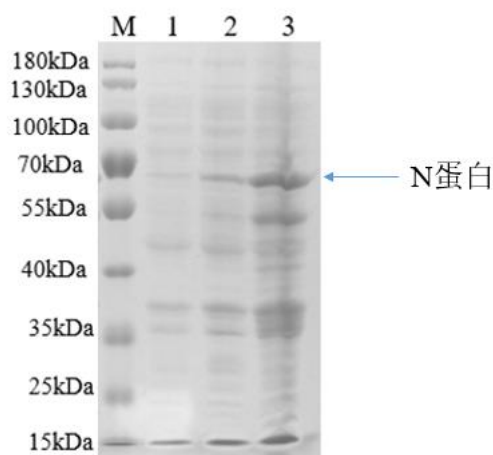


图 3-6 PET-30a(+)-PEDV -N 在 16°C和 37°C时 SDS-PAGE 图

Fig. 3-6 SDS-PAGE of PET-30a(+)-PEDV-N at 16°C and 37°C

M:蛋白 Marker 1:诱导前 2: 16°C诱导后 3: 37°C诱导后

### (2) 重组 N 蛋白诱导时间的优化

对重组蛋白分别诱导表达 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 和 7 h，分别取 7 个不同的时间点上的菌液样品同时进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果如图 3-7 显示重组蛋白在通过 IPTG 进行诱导表达的第 5 h 的时候，表达量最佳。

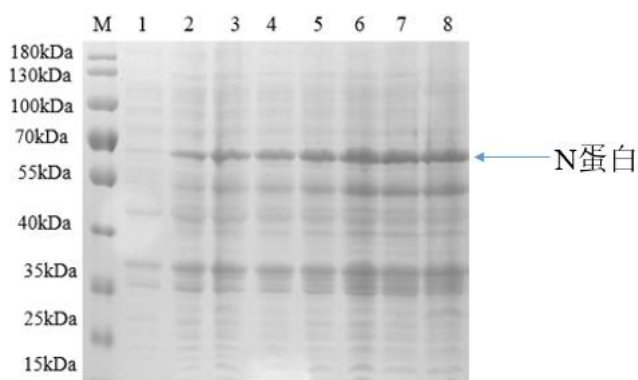


图 3-7 PET-30a(+)-PEDV -N 在不同时间上的诱导表达 SDS-PAGE 图

Fig. 3-7 SDS-PAGE chart of induced expression of PET-30a(+)-PEDV-N at different times

M:蛋白 Marker 1:诱导前 2: 诱导后 1h 3: 诱导后 2h 4: 诱导后 3h 5: 诱导后 4h 6: 诱导后 5h 7: 诱导后 6h 8: 诱导后 7h

### (3) 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取诱导培养后的重组菌液 10 mL，10 000r/min 离心 10 min，沉淀的菌体加入 1 mL 的裂解液进行重悬，并在冰浴的条件下进行超声波破碎，先取少量破碎后的全

菌，之后进行 10 000r/min 离心 5 min，将破碎离心后菌液的上清和沉淀分别收集起来，用 80  $\mu$ L 的 PBS 进行沉淀菌的重悬。将上述样品分别进行 SDS-PAGE 电泳，结果显示，重组蛋白在上清中明显表达。如图 3-8 所示。

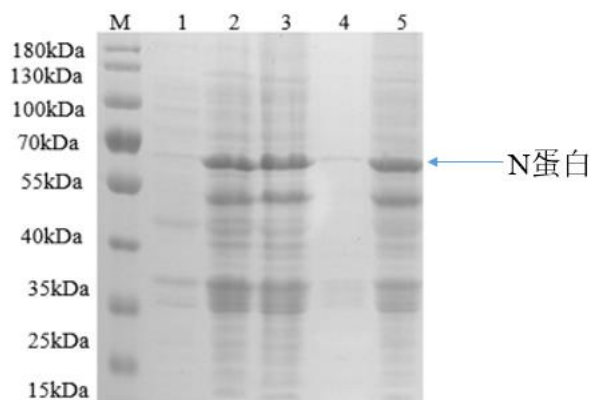


图 3-8 PET-30a(+)-PEDV -N 破碎后的表达产物 SDS-PAGE 图

Fig. 3-8 SDS-PAGE of the expression product after fragmentation of PET-30a(+)-PEDV-N

M:蛋白 Marker 1:诱导前 2: 诱导后 3: 破碎后全菌 4: 破碎后沉淀 5: 破碎后上清

#### (4) PEDV-N 重组蛋白的纯化

利用 His 标签蛋白纯化试剂盒（耐还原螯合型）纯化 PEDV N 蛋白，可进一步得到纯度要求较高的 N 蛋白，结果如图 3-9 所示。纯化后的 PEDV-N 蛋白在 58 kDa 处出现清晰条带，纯化后的 PEDV N 蛋白样品在其他位置均无其他蛋白的杂带，经测定，其浓度为 7.127mg/mL。

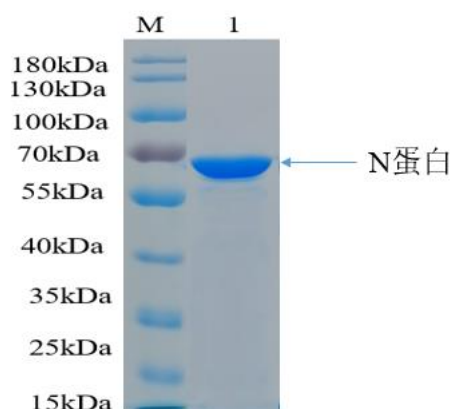


图 3-9 PEDV-N 蛋白的纯化

Fig. 3-9 Purification of PEDV-N protein

M:蛋白 Marker 1:纯化的 N 蛋白

### 3.1.4 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定

分别用 His 标签抗体、PEDV 猪阳性血清和纯化后的 PEDV-N 蛋白进行 Western Blot，结果如图 3-10、3-11 所示，在 58 kDa 处发生特异性反应，表明其可与 PEDV 猪阳性血清和 His 标签抗体发生特异性反应。

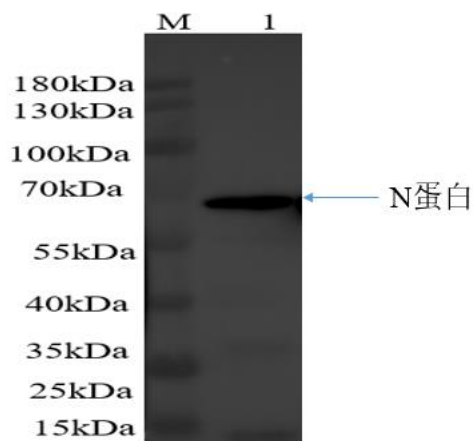


图 3-10 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定结果（猪阳性血清）

Fig. 3-10 Western Blot identification results of PEDV-N protein (pig positive serum)

M:蛋白 Marker 1:纯化的 PEDV-N 蛋白

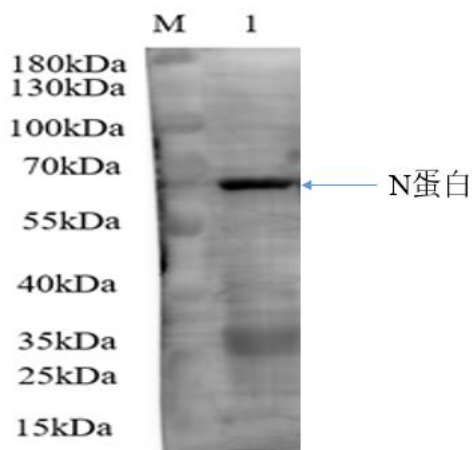


图 3-11 PEDV-N 蛋白 Western Blot 鉴定结果（His 标签抗体）

Fig. 3-11 Western Blot identification results of PEDV-N protein (His-tag antibody)

M:蛋白 Marker 1:纯化的 PEDV-N 蛋白



## 3.2 PEDV N 蛋白间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗体检测方法的建立

### 3.2.1 PEDV N 最适包被浓度和待检血清稀释度的选择

ELISA 检测结果的 P/N 值作为最佳抗原包被浓度和被检测血清的稀释度的参考值, 血清阳性抗体参考 OD<sub>450</sub> 值与血清阴性抗体的 OD<sub>450</sub> 比值最大的为最佳选用条件。依据 ELISA 的检测结果, 确定 0.5μg/mL 的 PEDV N 蛋白浓度是最佳的抗原包被浓度; 1: 160 倍稀释比是血清最佳稀释比。

表 3-1 方阵滴定法确定 PEDV N 蛋白的最佳包被浓度 (猪血清)

Tab 3-1 Determination of the optimal coating concentration of PEDV N protein by square titration (porcine serum)

血清稀释度	抗原稀释度 (μg/mL)							
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	
1: 20	阳性血清	1.8832	1.8260	1.5441	1.5307	1.2983	1.1737	1.0570
	阴性血清	1.1591	0.9352	0.8880	0.8585	0.7239	0.3838	0.3024
1: 40	阳性血清	1.8102	1.5640	1.4928	1.4785	1.2953	1.1057	0.8812
	阴性血清	1.1282	0.6015	0.5221	0.5001	0.4400	0.2387	0.1783
1: 80	阳性血清	1.8067	1.3724	1.3482	1.3467	1.1155	1.0514	0.7820
	阴性血清	0.5778	0.5394	0.4319	0.4255	0.3400	0.1650	0.1368
1: 160	阳性血清	1.5671	1.2908	1.2904	1.2815	0.8558	0.8239	0.7028
	阴性血清	0.3777	0.3523	0.2834	0.1705	0.1601	0.1541	0.1281
1: 320	阳性血清	1.2376	0.9646	0.9264	0.9205	0.7128	0.6709	0.5277
	阴性血清	0.3170	0.3099	0.2134	0.1619	0.1205	0.0989	0.0787
1: 640	阳性血清	0.9659	0.6584	0.5570	0.5095	0.4859	0.3779	0.3227
	阴性血清	0.1755	0.1735	0.1727	0.0978	0.0855	0.0811	0.0687
1: 1280	阳性血清	0.6620	0.3854	0.3636	0.3252	0.2793	0.2194	0.1706
	阴性血清	0.1136	0.1126	0.1116	0.0821	0.0799	0.0774	0.0634
1: 2560	阳性血清	0.5660	0.2428	0.2180	0.1923	0.1610	0.1387	0.1112
	阴性血清	0.1117	0.1026	0.1006	0.0694	0.0689	0.0659	0.0613

### 3.2.2 封闭液的选择

根据 P/N 值评价不同封闭液的封闭效果 (见图 3-12), 选择 1%BSA 作为封闭液。

### 3.2.3 酶标抗体工作浓度的选择

根据不同反应条件的 P/N 结果比较（见图 3-12），选择酶标抗体工作浓度为 1:9000。

### 3.2.4 酶标抗体反应时间的选择

根据不同反应条件的 P/N 结果比较（见图 3-12），选择酶标抗体反应时间为 60min。

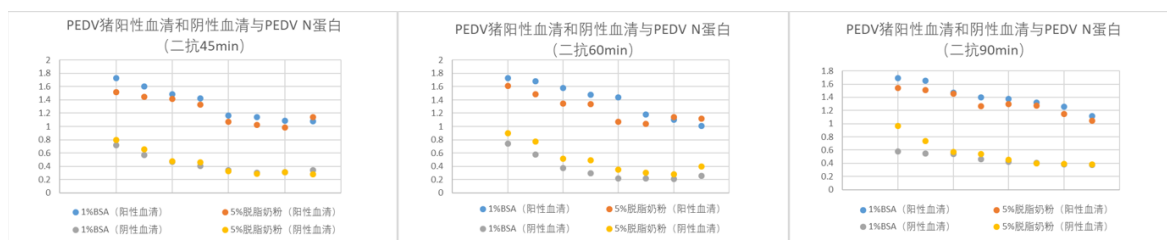


图 3-12 不同封闭液、酶标抗体工作浓度和酶标抗体反应时间对比图

Fig. 3-12 Comparison of different blocking solutions, working concentration of enzyme-labeled antibody and reaction time of enzyme-labeled antibody

## 3.3 单克隆抗体制备与鉴定

### 3.3.1 检测阳性杂交瘤细胞间接酶联免疫吸附试验（ELISA）方法的建立

ELISA 检测结果的 P/N 值作为最佳抗原包被浓度的参考值，血清阳性抗体参考 OD<sub>450</sub> 值与血清阴性抗体的 OD<sub>450</sub> 比值最大的为最佳选用条件。依据 ELISA 的检测结果，确定 0.5μg/mL 的 PEDV N 蛋白浓度是最佳的抗原包被浓度。

表 3-2 方阵滴定法确定 PEDV N 蛋白的最佳包被浓度 (小鼠血清)

Tab 3-2 Determination of the optimal coating concentration of PEDV N protein by square titration (mouse serum)

血清稀释度		抗原稀释度 ( $\mu\text{g/mL}$ )						
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
1: 160	阳性血清	2.2903	2.2391	2.0745	1.5492	0.9233	0.4498	0.2800
	阴性血清	0.2480	0.2128	0.1405	0.1266	0.1240	0.1002	0.0896
1: 320	阳性血清	2.2390	2.1898	1.7758	1.4438	0.7598	0.3836	0.2162
	阴性血清	0.1377	0.1114	0.1040	0.0905	0.0830	0.0718	0.0704
1: 640	阳性血清	2.2063	2.1496	1.7482	1.4073	0.7557	0.3301	0.1868
	阴性血清	0.1107	0.0894	0.0865	0.0821	0.0674	0.0616	0.0554
1: 1280	阳性血清	2.0961	2.0885	1.7080	1.4071	0.5757	0.2907	0.1424
	阴性血清	0.0894	0.0792	0.0615	0.0483	0.0480	0.0477	0.0474
1: 2560	阳性血清	2.0653	2.0048	1.3880	0.9881	0.5195	0.2190	0.1314
	阴性血清	0.0762	0.0615	0.0575	0.0480	0.0479	0.0476	0.0472
1: 5120	阳性血清	1.7737	1.6044	1.2889	0.8734	0.4163	0.1990	0.1098
	阴性血清	0.0673	0.0592	0.0550	0.0453	0.0438	0.0436	0.0444
1: 10240	阳性血清	1.6332	1.4541	1.0285	0.6226	0.3314	0.1559	0.0895
	阴性血清	0.0619	0.0583	0.0531	0.0426	0.0422	0.0414	0.0403
0	阳性血清	0.0694	0.0519	0.0473	0.0445	0.0424	0.0422	0.0418
	阴性血清	0.0607	0.0512	0.0477	0.0413	0.0420	0.0416	0.0412

### 3.3.2 免疫 BALB/c 小鼠血清效价的检测

选取 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，以纯化的 PEDV N 蛋白为抗原进行免疫。首免后 7 d 进行二免，二免后 14 d 进行三免，经过两次或三次的免疫之后的 7 d，采取 BLAB/c 雌性小鼠的下眼眶血，分离出血清，将免疫前的雌性 BLAB/c 小鼠的血清作为阴性对照，分别检测抗体水平。ELISA 结果显示，实验小鼠第二次免疫后的血清抗体水平显著低于第三次免疫后的抗体水平，在经过第三次免疫之后，所有小鼠皆达到细胞融合的条件。

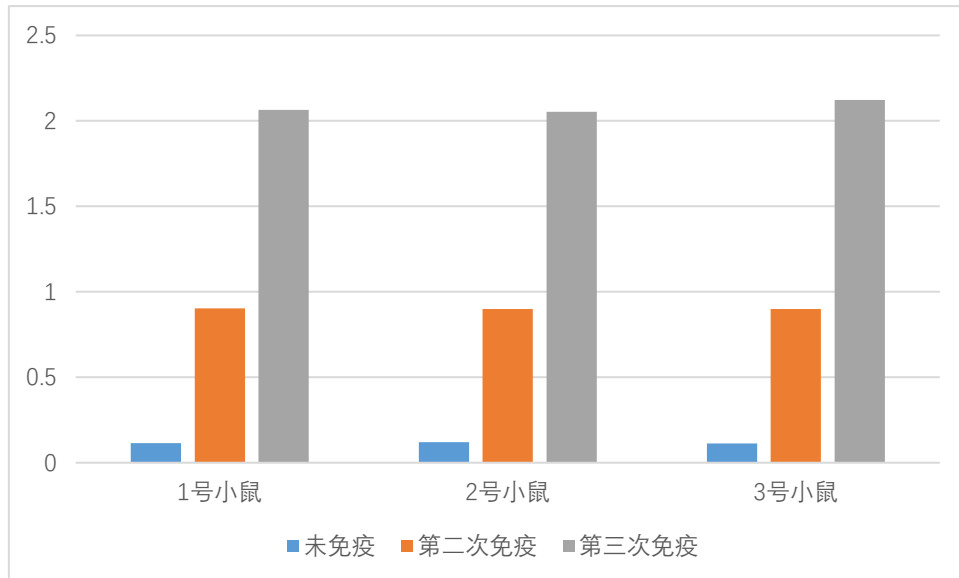


图 3-13 PEDV N 蛋白免疫小鼠血清 OD450 检测

Fig. 3-13 Detection of serum OD450 in mice immunized with PEDV N protein

### 3.3.3 细胞融合及融合细胞筛选的结果

在进行细胞融合之前的 3-5 d 内，对前期免疫的小鼠进行血清效价的检测。选最高效价的小鼠为实验小鼠。在进行细胞融合之前，将饲养细胞提前制备完成。提取免疫三次的小鼠脾细胞，与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合实验。待细胞集落长至 96 孔板中细胞孔的 1/3 左右时（见图 3-14），进行进一步阳性细胞株的筛选。筛选阳性细胞株需要用纯化好并且纯度高的 PEDV N 蛋白间接 ELISA 检测抗体的方法进行实验，阳性细胞株是有着较高的特异性抗体水平，并且需要经历 3 轮连续的有限稀释法完成筛选，经最终的确定得到了 1 株杂交瘤细胞，这株的特异性抗体水平高并且可以稳定的分泌，将其命名为：E5-E5。

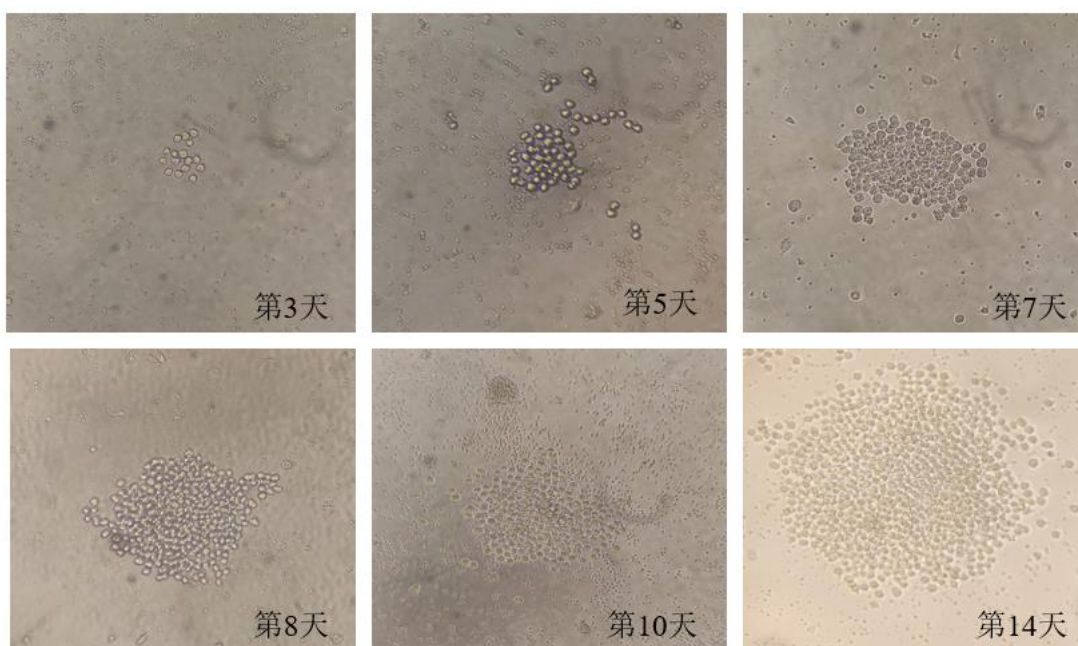


图 3-14 细胞融合后杂交瘤细胞生长状况

Fig. 3-14 Growth of hybridoma cells after cell fusion

### 3.3.4 Western blot 鉴定 PEDV N 蛋白单克隆抗体

PEDV N 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，一抗为制备出来的杂交瘤细胞上清，Western blot 结果表明，在 58 kDa 出表达明显。（图 3-15）

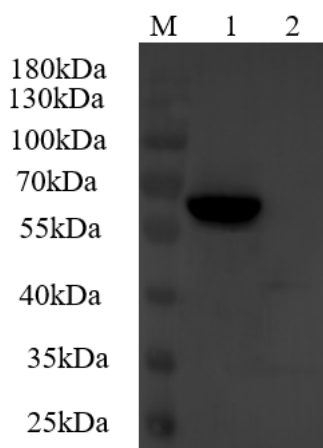


图 3-15 单克隆抗体的鉴定

Fig. 3-15 Identification of monoclonal antibodies

M:蛋白 Marker 1:PEDV-N 蛋白 2.PET-30a 蛋白

### 3.3.5 PEDV N 蛋白单克隆抗体亚型的鉴定

利用抗体亚型试剂盒，严格按其操作步骤对单克隆抗体水平的特异性和均一性进行评测，同时将制备的杂交瘤细胞上清进行亚型的鉴定。亚型鉴定的结果显示杂交瘤细胞上清的轻链均为 Kappa 亚型，重链为 IgG1 亚型（图 3-16）。

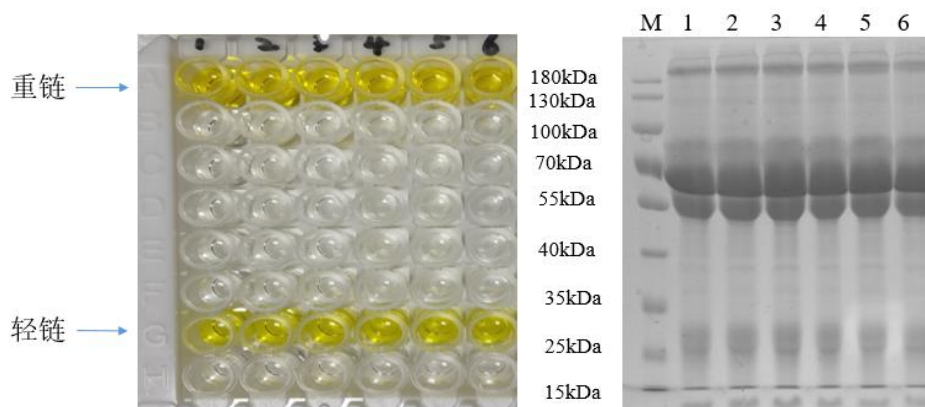


图 3-16 单克隆抗体亚型鉴定结果

Fig. 3-16 Identification results of monoclonal antibody subtypes

M:蛋白 Marker 1-3:E5-E5 杂交瘤细胞 4-6:E5-D6 杂交瘤细胞

### 3.3.6 PEDV N 蛋白单克隆抗体的大量制备与纯化

用 1×PBS 将培养扩大的杂交瘤细胞株 E5-E5 重悬后，注射到 5-7 d 前经弗氏不完全佐剂预刺激处理的 BALB/c 小鼠腹腔内，在 1-2 周之内每日观察小鼠的状况，发现腹腔变大时，及时抽取体内的腹水，抽取腹水的次数取决于小鼠的身体状况。利用 proteinA+G 法，纯化收集的腹水。抗体纯化结果见图 3-17。

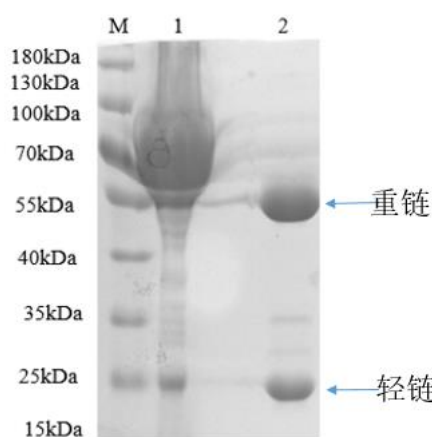


图 3-17 PEDV N 蛋白单克隆抗体纯化

Fig. 3-17 Purification of PEDV N protein monoclonal antibody

M:蛋白 Marker 1:纯化前 2:纯化后

### 3.3.7 腹水中单克隆抗体效价的测定

通过间接 ELISA 方法检测纯化抗体的效价，结果该株 PEDV-N 单克隆抗体的效价为 1: 102 400（见表 3-3）。

表 3-3 单克隆抗体效价的测定

Tab 3-3 Determination of monoclonal antibody titer

PEDV N 单抗稀释倍数	OD 值
1: 50	1.8822
1: 100	1.8377
1: 200	1.7711
1: 400	1.6896
1: 800	1.6677
1: 1600	1.6696
1: 3200	1.6684
1: 6400	1.6621
1: 12800	1.5281
1: 25600	1.3731
1: 51200	1.2228
1: 102400	1.0444
1: 204800	0.7696
1: 409600	0.4331
1: 819200	0.2966
1: 1638400	0.1642

### 3.3.8 PEDV N 蛋白单克隆抗体染色体计数

SP2/0 骨髓瘤细胞的染色体数量一般为 60-70 条，BALB/c 小鼠脾细胞的染色体数量一般为 40 条。通常来说，两者结合的杂交瘤细胞有 100-110 条的染色体个数。实验结果显示，制备获得的两株杂交瘤细胞的染色体有着正常且清晰的形态，数量也比较稳定。其数量为 100-110 个，符合前述杂交瘤细胞染色体的数量特征（见图 3-18）。

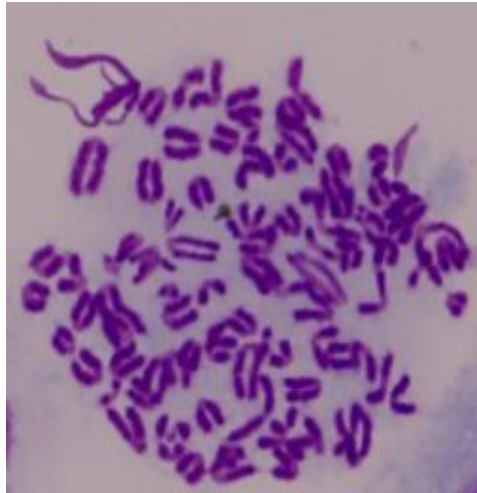


图 3-18 E5-E5 杂交瘤细胞染色体计数图

Fig. 3-18 E5-E5 hybridoma cell chromosome count result

### 3.3.9 间接免疫荧光（IFA）验证 PEDV N 蛋白单克隆抗体

将 PEDV 湖北分离株（HUB2018）接种到含有 Vero 细胞的 24 孔板中，待出现 50% 病变时，将 PEDV N 蛋白单克隆抗体作为一抗进行 IFA 验证。结果表明，PEDV N 蛋白单克隆抗体能与 PEDV 感染的细胞发生荧光反应（图 3-19），表明 PEDV N 蛋白单克隆抗体能与 PEDV 湖北分离株（HUB2018）全病毒发生特异性反应且特异性良好。

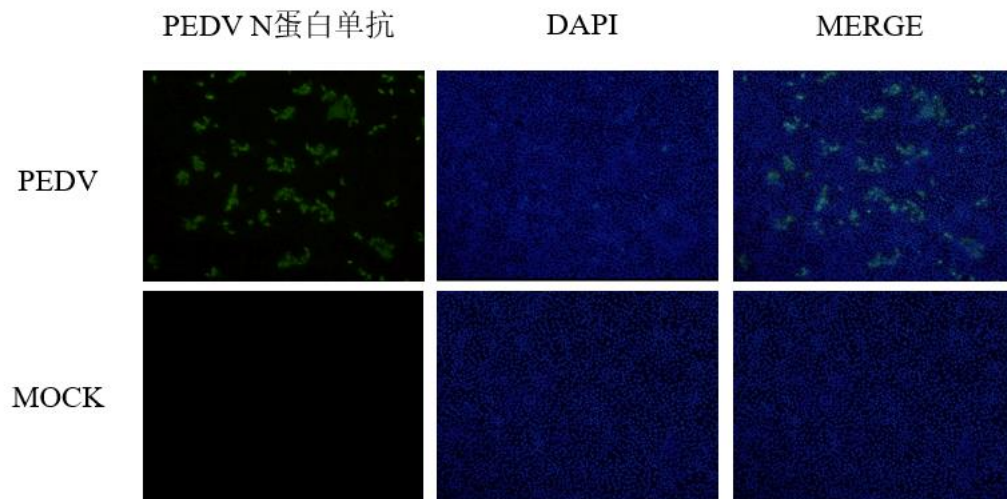


图 3-19 IFA 验证抗 PEDV N 蛋白单抗

Fig. 3-19 Verification of McAbs against PEDV N protein by IFA



## 4 讨论

### 4.1 PEDV N 蛋白的表达与纯化

采用 RT-PCR 法对 PEDV HUB2018 株 N 基因进行扩增, 扩增出与预期长度 1326 bp 大小一致的目的条带。将 PEDV-N 基因克隆至质粒 PET-28a (+) 和 PET-30a (+), 构建了重组质粒 PET-28a (+)-PEDV-N 和 PET-30a (+)-PEDV-N。关于 PEDV-N 蛋白的表达, 一是重组质粒 PET-28a (+)-PEDV-N 并不能成功的表达蛋白, 将其通过 BL-21 大肠杆菌表达菌株, 经 IPTG 诱导后, 分别在 16°C 和 37°C 两个温度下诱导表达, SDS-PAGE 结果表明表达皆不显著; 二是重组质粒 PET-30a (+)-PEDV-N 通过 BL-21 大肠杆菌表达菌株, 经 IPTG 诱导后, 在 37°C 下诱导表达, SDS-PAGE 结果表明在 55-70 KDa 之间出现了一条明显的条带, 大小与预期表达蛋白 58 KDa 的大小几乎一致且表达量多。关于 PEDV-N 蛋白的纯化, PEDV-N 蛋白在经过菌体破碎后, 通过上清的方式高效表达。蛋白在上清中表达在纯化的过程中以下几点是很重要的, 一是挂镍柱, 在挂镍柱之前需要将蛋白与镍柱结合 1 h, 以确保镍柱与目的蛋白的结合效率; 蛋白浓度过高的时候, 会发生聚集而沉淀, 有些不易溶解的蛋白随着镍柱的富集作用, 会有沉淀现象的发生; 二是目的蛋白的洗脱, 一种是利用试剂盒进行洗涤和洗脱, 另一种是配制不同梯度咪唑浓度的溶液进行洗涤和洗脱; 利用试剂盒纯化蛋白, 应严格按照说明书操作, 包括洗脱和洗涤次数, 收集每管洗脱液和洗涤液, 根据 SDS-PAGE 来确定最佳洗脱峰值; 另一种配制 buffer 的方法纯化蛋白, 需要配制不同咪唑浓度的 buffer, 一般情况下配制 20 mM、60 mM、80 mM、100 mM、150 mM、500 mM 等梯度咪唑浓度的 buffer, 收集每管洗脱下来的液体, 根据 SDS-PAGE 来确定最佳洗涤浓度和洗脱浓度, 之后纯化可直接配制此两种咪唑浓度的 buffer。三是目的蛋白的浓缩, 如果测定蛋白浓度低于 2 mg/mL 则需要将目的蛋白进行浓缩。浓缩方法有两种。一是超滤, 利用超滤管在 4°C, 4 000r/min, 水平离心 30 min。二是透析加浓缩, 在 4°C 条件下, 先利用透析膜将目的蛋白里的咪唑置换出来, 再用 PEG4 000 来浓缩以提高蛋白浓度。

### 4.2 猪流行性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法的建立

目前, 我国流行性腹泻疫情严重发生, 对养殖业的影响很大, 在这种情况下, 血清学的日常检测是十分重要的。血清抗体检测要求使用的试剂盒/检测方法敏感性高、特异性强, 操作方便。ELISA 方法操作简单, 有良好的敏感性和较高的特异性, 非常适用于疫情监测。本研究所用的 N 基因保守性好、同源性高, 且在早期感染中 N 蛋白的抗体水平是最高的, 是用于研发诊断方法的优选蛋白。原核表达蛋白

是通过大肠杆菌表达系统完成的，为降低大肠杆菌自身蛋白所带来的干扰，分别包被抗原和 PET-30a (+) 的 ELISA，选择两者最适的包被浓度，以降低大肠杆菌所带来的干扰，之后经过一系列的优化，获得了最佳的检测条件。

### 4.3 动物免疫

本研究选用了 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠，该年龄段的小鼠是用于免疫系统相关研究最佳的实验动物。在三次免疫后，小鼠依旧有着健康的状态；小于 6 周龄的小鼠，身体的一些器官尚未完全成熟，此时机体的免疫系统也未完善，免疫病毒蛋白会对小鼠造成伤害，严重者甚至可能会引起小鼠的死亡；大于 8 周龄的小鼠，会影响后续的实验。后期小鼠变成中老年鼠，机体免疫能力低，身体器官功能下降，对于后续脾细胞的制备非常不利。免疫小鼠时，采用三点注射法，注射在颈背部的皮下，每只小鼠注射 200  $\mu\text{g}$  免疫原，在之后的三天内及时观察小鼠的情况。

乳化蛋白时，要求在低温下进行，蛋白不易降解，否则容易造成免疫原不够，免疫效果差。蛋白与不完全佐剂或完全佐剂按 1: 1 的配比进行乳化，乳化一定要完全，判断标准是乳化后的液滴滴入水中不分散。小鼠在第三次免疫结束后 5-7 d，需进行抗体滴度的测定，若血清滴度过低，则需要再进行一次加强免疫。

### 4.4 细胞融合、筛选和亚克隆

单克隆抗体制备最关键的一个环节便是细胞融合，在细胞融合前一定要把各项准备工作做好。饲养细胞选择 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠，采取腹腔巨噬细胞时，先将小鼠腹腔剪个小口，使枪头可以进入腹腔，口子剪得过大或者过小都会影响操作，口子过大容易污染，口子过小则不易吸取腹腔巨噬细胞；sp2/0 瘤细胞需要在细胞融合前五天左右复苏，复苏时间需依照瘤细胞的状态而定，在瘤细胞扩大之后转移到中号细胞培养瓶中培养，确保达到细胞融合时所需要的细胞数量以及瘤细胞的最佳状态；在制备小鼠脾细胞之前的 3-5 d 进行腹腔注射免疫原，注射时，要确保注射到腹腔，如果不小心注射到皮下，则需要补充免疫原；实验过程中，研磨脾脏时，要研磨完全，直至脾脏呈现白色状态，静置 3 min，吸取脾细胞动作要轻柔，避免吸入其它组织。sp2/0 瘤细胞和免疫的脾细胞进行融合是关键，在融合之前，所用的试剂均需于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中放置一段时间，融合过程保持最佳的温度状态；细胞融合过程一定要严格的按照时间规定来，过快过慢都会影响融合的结果，融膜时所用的聚乙二醇，一定要小心，避免触碰到皮肤上。细胞融合时选用 HAT 培养基，在细胞生长成集落时，改用 HT 培养基，在之后的一个星期要每天观察细胞状态，正常生长情况下，三天时补液，七天时半换液，如果发现问题，及时采取补救措施。当 96 孔板中的细胞达到一定数量时，则需要进行检测，选取 OD 值较大的孔进行克

隆，同时，第一次筛选后的检测会将杂交瘤细胞存在假阳性上清去除掉。在进行阳性株的筛选之前，最佳包被浓度要选择好，否则会造成筛选不准确，包被的蛋白浓度过高时，ELISA 检测结果会出现一大片蓝色的现象，而包被的蛋白浓度过低时，ELISA 检测结果会出现一大片白色的现象，这都会对进一步筛选造成影响。

#### 4.5 单克隆抗体的大量制备

在制备单克隆抗体腹水时，尤其需要注意以下两点：第一，预刺激剂（石蜡油或弗氏不完全佐剂）的用量，第二是杂交瘤细胞的数量。杂交瘤数量过少会导致小鼠体内没有腹水产生，数量过多会导致小鼠体内产生过多的实体瘤。操作时一定要掌握腹腔注射要领，确保预刺激剂和杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔内。同时预刺激剂注射一周后再注射杂交瘤细胞，避免一些不确定因素，如腹腔注射手法生疏导致注射到皮下、杂交瘤细胞未扩大到需要的用量等对实验造成不良影响。一般情况下，每只小鼠可采集腹水超过 2 mL，是否需要二次采集腹水，需看小鼠状态以及产生腹水量而定，最多可采 3 次，收集腹水约 10 mL。

## 5 结论

5.1 纯化好的 PEDV N 蛋白经过 Western blot 鉴定, 结果表明可与 His 标签抗体、PEDV 猪阳性血清发生特异性反应。

5.2 用纯化好的 PEDV N 蛋白作包被抗原, 之后进行优化操作, 获得 ELISA 反应的最佳条件, 初步建立了 PEDV N 蛋白间接 ELISA 抗体检测的方法。

5.3 实验最终得到了 1 株杂交瘤细胞, 该株杂交瘤细胞可以稳定分泌 PEDV N 蛋白单克隆抗体。经单克隆的亚型鉴定, 其重链类型为 IgG1, 轻链类型为 Kappa; 在显微镜下显示出其染色体数在 100-110 对之间; 该株单抗的效价为: 1: 102400; Western blot 检测结果表明, 其杂交瘤细胞株可与 PEDV 有特异性反应。IFA 检测结果表明, PEDV N 蛋白单克隆抗体能与 PEDV 湖北分离株 (HUB2018) 全病毒发生特异性反应且特异性良好。

## 参考文献

- [1] Horie, Masayuki, Kabemura, et al. Isolation and molecular characterization of porcine epidemic diarrhea viruses collected in Japan in 2014[J]. Archives of virology, 2016,161(8):2189-2195.
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhea [J]. Efsa Journal,2016,14(2): 4375.
- [3] Li, W., Li, H., Liu, Y., et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. Emerg. Infect. Dis. 2012,18 (8), 1350–1353.
- [4] 许瑞胜, 何奇松, 李春英, 等. 广西部分地区猪群 PEDV N 基因克隆及序列分析[J]. 西南农业学报, 2018, 31(02): 409-414.
- [5] 杨巍, 李广兴, 孟凡丹, 等. 猪流行性腹泻病毒 N 基因的克隆及原核表达[J]. 东北农业大学学报. 2011, 42(06): 87-91, 115.
- [6] Lin, C.M., Gao, X., Oka, T., et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains [J]. J. Virol. 2015,89 (6), 3332–3342.
- [7] Lin, C.M., Saif, L.J., Marthaler, D., et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. Virus Res. 2016,226, 20–39.
- [8] Jung, K., Saif, L.J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. Vet. J. 2015,204 (2), 134–143.
- [9] Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany [J]. BMC Vet. Res. 2015,11, 142.
- [10] Jung, K., Saif, L.J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. Vet. J. 2015,204 (2), 134–143.
- [11] Kim, Y., Yang, M., Goyal, S.M., et al. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus [J]. BMC Vet. Res. 2017,13 (1), 89.
- [12] Perri, A.M., Poljak, Z., Dewey, C., et al. An epidemiological investigation of the early phase of the porcine epidemic diarrhea (PED) outbreak in Canadian swine herds in 2014: a case-control study [J]. Prev. Vet. Med. 2018,150,101–109.
- [13] Scott, A., McCluskey, B., Brown-Reid, M., et al. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: root cause investigation [J]. Prev. Vet. Med.2016,123, 192–201.
- [14] Schumacher, L.L., Cochrane, R.A., Huss, A.R., et al. Feed batch sequencing to decrease the risk of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) cross-contamination during feed manufacturing [J]. J. Anim. Sci. 2018,96 (11), 4562–4570.
- [15] Beam, A., Goede, D., Fox, A., et al. A porcine epidemic diarrhea virus outbreak in one geographic region of the United States: descriptive epidemiology and investigation of the

- possibility of airborne virus spread [J]. PLoS One, 2015 10 (12), e0144818.
- [16] Alonso, C., Raynor, P.C., Davies, P.R., et al. Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses [J]. PLoS One, 2015, 10(8), e0135675.
- [17] Li, Y., Wu, Q., Huang, L., et al. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine [J]. Nat. Commun. 2018, 9 (1), 3811.
- [18] Niederwerder, M.C., Nietfeld, J.C., Bai, J., et al. Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs [J]. J. Vet. Diagn. Invest. 2016, 28 (6), 671–678.
- [19] Pensaert, M.B., Martelli, P. Porcine epidemic diarrhea: a retrospect from Europe and matters of debate [J]. Virus Res. 2016, 226, 1–6.
- [20] Chen, Q., Gauger, P.C., Stafne, M.R., et al. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets [J]. J. Gen. Virol. 2016, 97 (5), 1107–1121.
- [21] Sueyoshi, M., Tsuda, T., Yamazaki, K., et al. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea [J]. J. Comp. Pathol. 1995, 113 (1), 59–67.
- [22] Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. J. Vet. Diagn. Invest. 2013, 25 (5), 649–654.
- [23] Wang, J., Zhao, P., Guo, L., et al. Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China [J]. Emerg. Infect. Dis. 2013, 19 (12), 2048–2049.
- [24] Wang, X., Ohnstad, M., Nelsen, A., et al. Porcine epidemic diarrhea virus does not replicate in porcine monocyte-derived dendritic cells, but activates the transcription of type I interferon and chemokine [J]. Vet. Microbiol. 2017, 208, 77–81.
- [25] Wang, K., Lu, W., Chen, J., et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production [J]. FEBS Lett. 2012, 586 (4), 384–391.
- [26] 康梓博, 吴昱, 葛俊伟. 猪流行性腹泻病毒的分离培养与鉴定 [J]. 畜牧兽医科技信息. 2014, (12): 28-29.
- [27] 郭振刚, 胡江锋, 王婷, 等. 猪流行性腹泻病毒分离鉴定及其灭活疫苗的研制 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(02): 26-33.
- [28] 刘矿. 猪传染性胃肠炎和流行性腹泻病毒的分离、鉴定及部分基因序列分析 [D]. 河南农业大学, 2008.
- [29] 杨娟, 赵振鹏, 杨振, 等. 一株猪轮状病毒的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(09): 32-37.
- [30] 王继科, 刘长明. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻病毒的免疫电镜诊断的研究 [J]. 中国畜禽

传染病, 1991, (2): 22-25.

- [31] Ducatelle R, Coussement W, Pensae R T M B, et al. In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777[J]. Arch Virol, 1981, 68( 1):35-44.
- [32] 毛雅元, 张桂红, 葛俊伟, 等. 猪流行性腹泻病毒地方株 LJB /03 分离及培养特性[J]. 病毒学报, 2010, 26( 6) : 483-489.
- [33] 施雯, 唐丽杰, 姜艳萍, 等.猪流行性腹泻病毒感染 Vero 细胞不同时间的超薄切片电镜观察[J].黑龙江畜牧兽医, 2014(17): 8-10+16.
- [34] 王继科, 马思奇, 王明, 等.猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎病毒的电镜和免疫电镜观察[J].中国预防兽医学报, 1999(03): 32+34-35.
- [35] 潘耀谦.猪流行性腹泻的病理学研究—人工感染乳猪的空肠上皮电镜组化研究[J].兽医大学学报, 1987(03): 286-292.
- [36] 张新生, 龙沛然, 曾子安, 等.具有标记靶作用的固相免疫电镜快速诊断法(SPA—G IEM)[J].电子显微学报, 1985(04): 14-18.
- [37] Mirasoli M, Michelini E. Analytical bioluminescence and chemiluminescence[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(23):5529-5530.
- [38] 杨峰, 杨猛超, 周宏超, 等.猪流行性腹泻病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J].动物医学进展, 2018, 39(07): 1-5.
- [39] 邝燕齐, 莫梅君, 何红玲, 等.PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备及间接免疫荧光检测方法的建立[J].华南农业大学学报, 2020, 41(05): 27-35.
- [40] 刘邓, 贾泽颖, 张丹.猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒和轮状病毒多重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医, 2019, 2(15): 45-50.
- [41] 毛慧, B.Wier. C.M.T. Dvorak, M.P. Murtagh.猪流行性腹泻病毒血清学监测和监视方法酶联免疫吸附测定(ELISA)的开发与验证[J].国外畜牧学(猪与禽), 2014, 34(01): 7-8.
- [42] Wang Z Y, Yin J Y, Chen S, et al. Development of an antigen—capture enzyme—linked immunosorbent assay for virus detection based on porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibodies[J]. Viral Immunology, 2015, 28 ( 3) :184-189.
- [43] 芮聪杰, 潘孝成, 沈学怀, 等. 猪流行性腹泻病毒 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48 ( 19) : 103—105.
- [44] 孙立旦, 陈立功, 周双海, 等. 猪流行性腹泻病毒血清 IgA 抗体间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(3): 381—386.
- [45] Beam, A., Goede, D., Fox, A., et al. A porcine epidemic diarrhea virus outbreak in one geographic region of the United States: descriptive epidemiology and investigation of the possibility of airborne virus spread [J]. PLoS One, 2015, 10 (12), e0144818.
- [46] Venkatramana.D, Krishna, Yonghyan, et al. Immune responses to porcine epidemic diarrhea virus

- (PEDV) in swine and protection against subsequent infection [J]. *PloS one*,2020,15(4):e0231723.
- [47] Guehwan, Jang, Jonghyun, et al. Successful Eradication of Porcine Epidemic Diarrhea in an Enzootically Infected Farm: A Two-Year Follow-Up Study [J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(7).
- [48] Prapassorn,Boonsoongnern,Orawan, et al. Correlation between antibody response against porcine epidemic diarrhea virus in sows and their off spring under field conditions [J]. *Veterinary world*, 2021,14(6):1689-1694.
- [49] Niederwerder, M.C., Hesse, R.A. Swine enteric coronavirus disease: a review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada [J]. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018,65 (3), 660–675.
- [50] Kim, Y., Yang, M., Goyal, S.M., et al. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *BMC Vet. Res.* 2017,13 (1), 89.
- [51] Lee, D.U., Kwon, T., Je, S.H., et al. Wild boars harboring porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) may play an important role as a PEDV reservoir [J]. *Vet. Microbiol.* 2016,192, 90–94.
- [52] Bevins, S.N., Lutman, M., Pedersen, K., et al. Spillover of swine coronaviruses, United States [J]. *Emerging Infect. Dis.* 2018,24 (7), 1390–1392.
- [53] Bowman, A.S., Nolting, J.M., Nelson, S.W.et al. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Vet. Microbiol.* 2015,179 (3–4), 213–218.
- [54] Chen, J., Zhang, C., Liu, Y., Liu, G. Super-oxidized water inactivates major viruses circulating in swine farms [J]. *Virol. Methods.*2017,242, 27–29.
- [55] Baker, K.L., Mowrer, C.L., Zhang, J.et al. Evaluation of a peroxygen-based disinfectant for inactivation of porcine epidemic diarrhea virus at low temperatures on metal surfaces [J]. *Vet. Microbiol.* 2018,214, 99–107.
- [56] Holtkamp, D.J., Myers, J., Thomas, P.R.et al. Efficacy of an accelerated hydrogen peroxide disinfectant to inactivate porcine epidemic diarrhea virus in swine feces on metal surfaces [J]. *Can. J. Vet. Res.* 2017,81 (2), 100–107.
- [57] Langel, S.N., Paim, F.C., Lager, K.M.et al. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): historical and current concepts [J]. *Virus Res.* 2016,226, 93–107.
- [58] Saif, L.J., Pensaert, M.P., Sestak, K., Yeo, S.G.et al. Coronaviruses. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, 10th ed [M]. Wiley-Blackwell, Iowa State University, pp. 2012,501–524.
- [59] 陈祥, 宦海霞, 万婷, 等.猪源大肠杆菌 F18 菌毛的体外表达和抗原特性[J].*微生物学报*, 2014, 54(02): 236-242.



- [60] 王福厚, 张进隆, 唐文雅, 等.猪 4 种主要传染病免疫抗体水平的检测与分析[J].国外畜牧学(猪与禽), 2021, 41(06): 57-59.
- [61] 边金妮, 黄诗婷, 许佳乐, 等.猪肠病毒 G 型部分 VP1 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J/OL].中国动物传染病学报: 1-6[2022-04-13].
- [62] 杜谦, 杨楠, 史腾飞, 等.3 种猪自然细胞毒性受体多克隆抗体制备与鉴定[J].中国兽医学报, 2021, 41 (11): 2141-2147 + 2154 .
- [63] 刘燕.绵羊 Gf1a1 基因的克隆和多克隆抗体的制备鉴定及应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2012.
- [64] 叶尔那扎尔, 努尔吐热, 邱丽芬, 等. DNA 免疫技术在单克隆抗体开发中的研究进展[J] 生物技术通报, 2019, 35(2): 204-211.
- [65] 张庆桥, 王一鹏, 魏艳秋, 等.猪流行性腹泻病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定[J].中国兽医杂志, 2019, 55(01):31-35+3.
- [66] An X, Kong N, Shan T, et al. Monoclonal antibody to protein of Porcine epidemic diarrhea virus[J]. Mono-lonal Antibodies Immunodiagnosis Immunotherapy, 2015,34(1): 51-54.
- [67] 林楚雯, 张春玉. 肿瘤微环境中细胞融合机制的研究进展[J].国际遗传学杂志, 2020(01): 40-45.
- [68] 方水琴, 刘程, 马俊飞, 等.小鼠杂交瘤单克隆抗体快速制备技术研究进展[J].生物工程学报, 2021, 37(07): 2293-2306.
- [69] Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. Nature,1975, 256(5517):495-497.
- [70] 王赛. 猪 TGEV N 蛋白单克隆抗体的研制及夹心 ELISA 方法的初步建立[D].湖南农业大学, 2018.
- [71] 赵少若, 郝丽影, 王同燕, 等.猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备及阻断 ELISA 抗体检测方法建立[J].畜牧与兽医, 2020, 52(11): 60-66.
- [72] 于浩洋, 王彩霞, 吴绍强, 等.非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体的制备及阻断 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学, 2022, 52(01): 48-55.
- [73] 张丽. 基于 p54 蛋白单克隆抗体的非洲猪瘟病毒抗原检测方法的建立[D].中国农业科学院, 2021.
- [74] 田莉莉, 李丽.猪细小病毒 VP2 蛋白单克隆抗体的制备及抗原捕捉 ELISA 方法的建立[J].畜牧与兽医, 2012, 44(07): 13-17.
- [75] 王宁. 猪肺炎支原体 P97 蛋白的单抗制备及阻断 ELISA 抗体检测方法的初步建立[D].中国农业科学院, 2020.
- [76] 张悦. 猪肺炎支原体 P65 蛋白的克隆表达、单克隆抗体制备及阻断 ELISA 抗体检测方法建立[D].南京农业大学, 2013.

- [77] 马增全.猪旋毛虫病单克隆抗体快速 ELISA 诊断试剂盒的研制及应用[J].畜牧兽医科技信息, 1997(09): 3-4.
- [78] 王璐丹. 单克隆抗体治疗新冠大有可为[N]. 河北日报, 2022-03-03(011).
- [79] 金慰鄂.生物“导弹”—单克隆抗体应用动态和市场预测[J].湖北医药导报, 1986(05): 1-2+15.
- [80] 王庆然.生物导弹—导向药物治疗[J].药物与人, 1999(01): 6.

# 作者简介

## 一、个人基本情况

高扬，女，汉族，1994年8月出生，辽宁省大石桥市人。

## 二、教育经历

2013.9-2017.7 山西农业大学动物医学专业，农学学士

2020.9-2022.7 安徽农业大学兽医学专业，兽医专业硕士

## 三、参加的科研项目

- 1.湖北省农业科技创新中心项目“家畜主要疫病综合防控技术研究”
- 2.湖北省重大科技项目“生猪主要疫病绿色防控产品研发”
- 3.国家动物疫病数据中心项目“动物疫病长期监测”