



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116042531 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 02

(21) 申请号 202211086715.4

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2022.09.06

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2022271 2022.08.18

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 牟春晓 谢思汉 陈振海

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

专利代理师 王艳

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

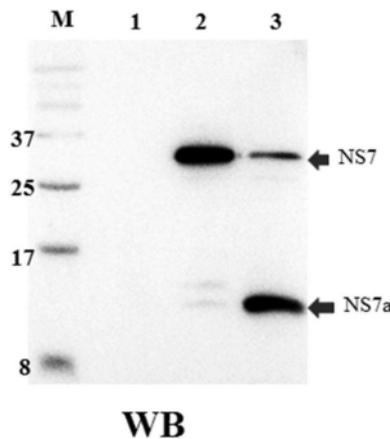
权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

抗猪δ冠状病毒NS7和NS7a蛋白的杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗猪δ冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株PDCoV-NS7-08A,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2022年8月18日,保藏编号为CCTCC NO:C2022271。本发明所涉及的杂交瘤细胞具有稳定的抗体分泌能力,所分泌的单克隆抗体与猪δ冠状病毒NS7和NS7a蛋白具有良好的反应特异性,其识别的抗原表位在猪δ冠状病毒NS7蛋白第111~117位氨基酸,其多肽序列为¹¹¹PSTLEED¹¹⁷,该表位尚未见报道。本发明为以后进行猪δ冠状病毒病原学及其致病机理的研究奠定了良好的物质基础。



1 : LLC-PK1阴性对照
2 : pCAGGS-NS7转染LLC-PK1
3 : PDCoV感染LLC-PK1

1. 一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株,其特征在于,所述杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株PDCoV-NS7-08A,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2022年8月18日,保藏编号为CCTCC NO:C2022271。
2. 一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体由权利要求1所述的杂交瘤细胞株分泌产生。
3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体针对的抗原表位位于NS7蛋白第111~117位氨基酸,其多肽序列为¹¹¹PSTLEED¹¹⁷。
4. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1~3所示;轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.4~6所示。
5. 根据权利要求4所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示。
6. 一种核酸分子,其编码权利要求2~5中任一项所述的单克隆抗体。
7. 根据权利要求6所述的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述核酸分子编码抗体的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。
8. 权利要求2~5任一项所述的单克隆抗体、权利要求6或7所述的核酸分子在制备检测或诊断猪 δ 冠状病毒的试剂、试纸条或试剂盒中的应用。
9. 一种猪 δ 冠状病毒的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒包括权利要求2~5任一项所述的单克隆抗体。
10. 根据权利要求9所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒还包括阳性对照和阴性对照。

抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白的杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白的杂交瘤细胞株、单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 猪 δ 冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新发的猪冠状病毒主要对新生仔猪有重要威胁,感染的新生仔猪具有较高的死亡率,临床症状与猪流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV)相似,主要表现为呕吐、急性水样腹泻、脱水甚至死亡。生长猪、成年猪及生产母猪发病轻微,可不治而愈。近年来全球各地养猪地区均报道了该病的发生,给全球养猪业造成了巨大的经济损失。2021年有报道称研究人员在三名患有急性发热疾病的海地儿童血浆样本中检测到了PDCoV,这提示了PDCoV有跨种传播感染人类的风险,因此我们必须对此病毒加以重视。

[0003] 猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)属于 δ 冠状病毒是一种新发现的猪肠道致病性冠状病毒,目前也是 δ 冠状病毒属的唯一成员。其全长基因组大小约为25.4kb,也是冠状病毒基因组中最小的冠状病毒。其基因组包括非编码区与编码区,其中非编码区为基因组的5端与3端的5~UTR、3~UTR,以及5末端与3末端的一个帽子结构和一个poly(A)结构。这些区域虽然不编码蛋白,但是对于该病毒的复制与转录具有重要的调控作用。病毒编码区为开放阅读框(open reading frame)ORF1a和ORF1b、棘突蛋白S、包膜蛋白E、膜蛋白M、辅助蛋白NS6、核衣壳蛋白N、以及位于N蛋白内部的两个辅助蛋白NS7和NS7a。PDCoV编码的三种辅助蛋白(NS6、NS7、NS7a)不参与病毒粒子的组成但是在病毒复制过程中承担着重要角色。NS7蛋白位于PDCoV N蛋白的内部,两者具有不同的氨基酸序列,在NS7蛋白的内部还有一个辅助蛋白NS7a,目前已知NS7a具有拮抗I型干扰素产生的功能,但是对于NS7蛋白功能的报道甚少。

[0004] 单克隆抗体是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体。通过单克隆抗体技术来获取杂交瘤细胞株,该技术已经应用到了兽医领域多个动物病毒的研究之中,如非洲猪瘟病毒、口蹄疫病毒、流感病毒等。因此为了进一步研究NS7与NS7a蛋白的功能,以及两者之间的关系,我们有必要制备特异性强的单克隆抗体。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株。

[0006] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种单克隆抗体,所述单克隆抗体由所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供了一种核酸分子,其编码所述的单克隆抗体。

[0008] 本发明还要解决的技术问题是提供了所述的单克隆抗体、所述的核酸分子在制备检测或诊断猪 δ 冠状病毒的试剂、试纸条或试剂盒中的应用。

[0009] 本发明最后要解决的技术问题是提供了一种猪 δ 冠状病毒的检测试剂盒。

[0010] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明提供了一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株PDCoV-NS7-08A,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国武汉·武汉大学,保藏日期为2022年8月18日,保藏编号为CCTCC NO:C2022271。

[0011] 本发明还提供了一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株的制备方法,包括以下步骤:原核表达的重组猪 δ 冠状病毒NS7蛋白与弗氏佐剂混合后注射BALB/C小鼠,并对IFA检测结果阳性的小鼠进行加强免疫;

[0012] 将加强免疫后的小鼠采集脾B淋巴细胞,并与杂交瘤细胞进行融合,挑选阳性克隆后进行亚克隆得到抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株。

[0013] 本发明还提供了一种抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株的制备方法,该方法具体包括以下步骤:

[0014] (1)原核表达的重组猪 δ 冠状病毒NS7蛋白与弗氏佐剂1:1混合后注射BALB/C小鼠,100ug/只,三次免疫后对IFA检测结果阳性的小鼠进行加强免疫,剂量50~100ug/只。

[0015] (2)IFA方法测定血清抗体稀释度在 $1:10^3$ 的小鼠采集脾B淋巴细胞与杂交瘤细胞进行融合,挑选阳性克隆后进行亚克隆得到抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白杂交瘤细胞株。

[0016] 本发明内容还包括一种单克隆抗体,所述单克隆抗体由所述的杂交瘤细胞株分泌产生。

[0017] 其中,所述单克隆抗体针对的抗原表位位于NS7蛋白第111~117位氨基酸,其多肽序列为¹¹¹PSTLEED¹¹⁷。

[0018] 其中,所述单克隆抗体的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1~3所示;轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO.4~6所示。

[0019] 其中,所述单克隆抗体的重链可变区与轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示。

[0020] 本发明内容还包括一种核酸分子,其编码所述的单克隆抗体。

[0021] 其中,所述核酸分子编码单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述核酸分子编码抗体的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0022] 本发明内容还包括所述的单克隆抗体、所述的核酸分子在制备检测或诊断猪 δ 冠状病毒的试剂、试纸条或试剂盒中的应用。

[0023] 本发明内容还包括一种猪 δ 冠状病毒的检测试剂盒,所述检测试剂盒包括所述的单克隆抗体。

[0024] 其中,所述检测试剂盒还包括阳性对照和阴性对照。

[0025] 本发明内容还包括一种非诊断用途的检测猪 δ 冠状病毒的方法,使用上述单克隆抗体或上述试剂、试纸条或试剂盒。

[0026] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有以下显著优势:

[0027] 1、本发明公开的杂交瘤细胞株PDCoV-NS7-08A,其所分泌的单克隆抗体与猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白具有良好的反应特异性。

[0028] 2、本发明首次明确了PDCoV的一个线性B细胞表位,表明分泌单克隆抗体的杂交瘤

细胞株可以识别大多数PDCoV毒株,为PDCoV新型诊断试剂的研究工作提供了有力的免疫学工具。

附图说明

- [0029] 图1是由杂交瘤细胞株分泌产生的单克隆抗体与PDCoV感染细胞的间接免疫荧光图;
- [0030] 图2是由杂交瘤细胞株分泌产生的单克隆抗体的Western blot结果;
- [0031] 图3是由杂交瘤细胞株分泌产生的单克隆抗体与PDCoV感染细胞的IP结果;
- [0032] 图4是单克隆抗体抗原表位的初步鉴定Western blot结果;
- [0033] 图5是单克隆抗体抗原表位的精确鉴定Western blot结果;
- [0034] 图6是单克隆抗体抗原表位序列在不同毒株间的保守性鉴定;
- [0035] 图7是单克隆抗体在PEDV之间的特异性鉴定。

具体实施方式

- [0036] 下面结合附图对本发明技术方案作进一步的说明。
- [0037] 实施例1单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立
- [0038] 1、实验材料
- [0039] 1.1.1主要试剂
- [0040] HAT、HT选择培养基购自北京博奥龙公司、HRP goat anti Mouse IgG购自Abcam生命科学有限公司、弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂,PEG1450购自Sigma公司、DMEM培养基购自Gibco公司、胎牛血清购自杭州四季青公司,羊抗鼠IgG荧光抗体购自Abbkine,ProteinA/G免疫沉淀磁珠购自Bimake公司,荧光显微镜购自德国LeiCa公司。
- [0041] 1.1.2细胞、实验动物、毒株与血清
- [0042] LLC-PK1细胞、SP2/0骨髓瘤细胞为本发明人实验室冻存。雌性BALB/C小鼠购于扬州大学比较医学中心。PDCoV CHN-GD16-05毒株(GenBank:KY363868.1)为本实验室保存。
- [0043] 1.1.3试剂配制
- [0044] 磷酸盐缓冲液(PBS):称取氯化钠8g、氯化钾0.2g、磷酸氢二钠1.42g和磷酸二氢钾0.27g,溶于800ml蒸馏水中,调PH至7.4,定容至1L。
- [0045] 4%多聚甲醛溶液:称取4g多聚甲醛粉末溶于100mLPBS中。
- [0046] 0.1%TritonX-100溶液:吸取10 μ L TritonX-100稀释于10mLPBS中。
- [0047] 2%BSA溶液:称取2gBSA粉末溶于100mL PBS中。
- [0048] LB培养基:称取Tryptone10g、Yeast Extract5g和NaCl10g,溶于800mL蒸馏水中,定容至1L。
- [0049] 2 \times YT培养基:称取Tryptone16g、YeastExtract 10g和NaCl 5g,溶于800mL蒸馏水中,定容至1L。
- [0050] HAT培养基:2%的50 \times HAT(北京博奥龙公司)、12%的胎牛血清(Sigma公司)、1%的100 \times 青链霉素(索莱宝公司)和85%的DMEM(Gibco公司)。
- [0051] HT培养基:2%的50 \times HT(博奥龙公司)、12%的胎牛血清、1%的100 \times 青链霉素和85%的DMEM。

[0052] LLC-PK I培养基:10%的胎牛血清、1%的1M HEPES溶液与100×青链霉素、88%的MEM。

[0053] 冠状病毒培养基:10%的胰蛋白胨磷酸盐肉汤(TPB)、0.0002%的胰酶、1%的100×青链霉素和89%的DMEM。

[0054] 2、重组猪 δ 冠状病毒NS7抗原的制备

[0055] (1) 重组质粒的构建:根据PDCoV CHN-GD16-05毒株NS7的亲水区域设计特异性引物,插入原核表达载体pCold TF (Honor Gene—长沙艾碧维生物科技有限公司,货号HG-VLT0553),经过酶切鉴定得到pCold-TF-NS7阳性重组质粒。

[0056] NS7亲水区核苷酸序列:

AGCTGCTACCTCTCCGATTCCCAACCGGAGATGGCCCAGCTCAAGGTTTCAG

AGTTGACCCCTTCAACGCTAGAGGAAGACCTCAGGAGCGTGGAAGTGGCCCAAG

[0057] ATCTCAATCTGTAACTCCAGAGGCACAGGCAATCAGCCCAGGAAACGCGACCAA

TCTGCACCAGCTGCGGTACGTCGTAAGACCCAGCATCAAGCTCCCAAGCGGACTT

TACCCAAGGGTAAAACCATTTCTC

[0058] NS7亲水区氨基酸序列:

SCYLSDSQPEMAQLKVSELTPSTLEEDLRVSEVAQDLNLLTPEAQAI SPGNATNL

[0059]

HQLRYVVRPSIKLPSGLYPRVKPFL

[0060] NS7亲水区上游引物:

[0061] GAGGGATCCAGCTGCTACCTCTCCGATTCC

[0062] NS7亲水区下游引物:

[0063] CTGCAGGTCGACGAGAAATGGTTTTACCCCTTGG

[0064] (2) 重组蛋白的表达与纯化:将阳性重组质粒转化BL21 (DE3) 得到重组菌株,然后进行蛋白的预表达。确认目的蛋白表达后,将重组菌种在2×YT液体培养基中大量培养、诱导表达,收集蛋白进行SDS-PAGE电泳,剥离分离胶并在预冷的18g/L KCl中染色10min,切下目的蛋白条带并切成小块。将胶块置入3500MW透析袋中,加入5mL PBS,120V电洗脱2h。弃去胶块,将透析袋置于含有200mL PBS的烧杯中,冰浴透析过夜。次日将透析袋包埋入PEG 8000粉末进行蛋白浓缩30min,待浓度达到1mg/mL,收集透析袋内的蛋白溶液,分装后于-80℃保存备用。

[0065] 3、获取杂交瘤细胞

[0066] (1) 小鼠免疫:利用纯化的重组蛋白为免疫原,免疫6~8周龄雌性BALB/C小鼠。

[0067] 第一次免疫:取等量的重组蛋白与弗氏完全佐剂1:1混合,以100 μ g/只的剂量皮下多点注射小鼠;

[0068] 第二次免疫:间隔两周后,取等量的重组蛋白与弗氏不完全佐剂1:1混合,以100 μ g/只的剂量腹腔注射小鼠;

[0069] 第三次免疫:再间隔两周后,取等量的重组蛋白与弗氏不完全佐剂1:1混合,以100 μ g/只的剂量腹腔注射小鼠;第三次免疫后7~10天,小鼠眼眶静脉丛采血用IFA方法测定血清抗体效价,选择血清效价达到500以上的小鼠在细胞融合前3天,腹腔注射50-100 μ g纯蛋白加强免疫。

[0070] (2) 免疫小鼠血清效价的测定：采用IFA方法检测免疫血清效价。将LLC-PK1细胞铺于24孔板中，以MOI=0.01接种PDCoV CHN-GD16-05的病毒液，同时以未感染的LLC-PK1细胞作为阴性对照。感染后约16-20h，弃去培养基，PBS洗3遍，加入4%多聚甲醛室温固定10min，弃固定液，PBS洗3遍，牛血清白蛋白(BSA)与Triton-X-1001:1混合封闭30min，PBS洗3遍，加入小鼠血清，37℃孵育1h，PBS洗3遍，再将Abbkine公司的DyLight488羊抗鼠二抗1:2000稀释37℃避光孵育1h，PBS洗3次，倒置荧光显微镜观察结果。

[0071] (3) 细胞融合：

[0072] (3.1) 小鼠脾细胞的准备：

[0073] 将冲击免疫的小鼠脱颈处死，浸泡于75%酒精5min，放置于平皿上，小心取出脾脏，转移到干净平皿中剔除多余组织，使用DMEM培养基冲洗；

[0074] 将脾转移到另一盛有DMEM培养基的干净平皿中，用针头扎脾多次，然后将脾转移到50mL离心管上的细胞筛上，加入2mLDMEM培养基润湿细胞筛，使用注射器推头部分研磨脾，使用DMEM培养基冲洗细胞筛，最后将脾细胞悬于10mLDMEM培养基中，取10 μ l悬液使用0.4%台盼蓝染色并计数。将离心管放置37℃培养箱备用。

[0075] (3.2) 小鼠饲养细胞的制备：

[0076] 将健康的小鼠脱颈处死，浸泡于75%酒精5min，放置于平皿上，小心剪开腹部被皮，暴露腹膜；

[0077] 使用10mL注射器吸取5mL含HAT的细胞培养基，一只手持镊子轻轻夹起腹膜，另一只手持注射器将HAT培养基推入腹腔，针头要避开器官尤其是肠；

[0078] 轻轻晃动腹腔中的液体，使饲养细胞悬于HAT培养基，然后回抽注射器。将取出的饲养细胞悬液加入10mL离心管里，放置37℃培养箱备用。

[0079] (3.3) SP2/0细胞准备：

[0080] SP2/0细胞需处于对数期，细胞密度较高，细胞圆润、透亮(融合前一天传一代)；使用10mLDMEM将培养皿的SP2/0吹下，取10 μ L悬液用0.4%台盼蓝染色并计数；按照脾细胞：SP2/0细胞数量比5:1的比例进行混合，制成总体积20mL的混合液。

[0081] (3.4) 细胞融合：

[0082] 将SP2/0-脾细胞混合液1000rpm离心5min，倒去上清，轻轻拍打离心管底部，使沉淀的细胞均匀悬浮于残液，且没有细胞团块；

[0083] 一边旋转离心管，一边沿壁滴加PEG1450，1min内加完，然后37℃水浴1min，最后在5min内补加DMEM培养基至20mL，遵循先快后慢原则。全部完成后，放置37℃培养箱10min。

[0084] 将融合细胞混合液1000rpm离心5min，倒去上清，轻轻拍打离心管，使沉淀的细胞均匀悬浮于残液，加入HAT培养基和(3.2)制备的饲养细胞悬液，使总体积为72mL，1mL/孔，铺于3个24孔板。

[0085] (4) 杂交瘤细胞筛选与克隆：间接IFA法筛选细胞培养上清，选择抗体效价达1:2000的阳性克隆杂交瘤细胞进行亚克隆，并用有限稀释法连续克隆化2~3次，直至100%阳性率，最后获得稳定分泌抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白单克隆抗体细胞株，标记为PDCoV-NS7-08A。将克隆化后阳性率达100%的细胞扩增培养后液氮冻存。将杂交瘤细胞株PDCoV-NS7-08A保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国武汉·武汉大学，保藏号为CCTCC NO:C2022271。

[0086] 4、杂交瘤细胞稳定性测定

[0087] 在连续传代过程中冻存和复苏细胞,检测复苏后的细胞可以稳定地分泌阳性抗体。

[0088] 5、腹水的制备

[0089] 选取8周龄的BALB/c小鼠4只,腹腔注射液体石蜡,500 μ L/只。7天后每只小鼠腹腔注射 10^6 个阳性单克隆杂交瘤细胞(用0.5mL的DMEM稀释)。观察小鼠生长状态,待腹部膨大时使用10mL注射器吸取腹水,5000rpm/min离心10min去除底部杂质,保留上清并于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0090] 实施例2单克隆抗体的特性鉴定

[0091] (1) 单抗与PDCoV的间接免疫荧光试验

[0092] 将LLC-PK1细胞铺于24孔板中,以MOI=0.01接种PDCoV病毒液,同时以未感染的LLC-PK1细胞作为阴性对照。感染后约16-20h,弃去培养基,PBS洗3遍,加入4%多聚甲醛室温固定10min,弃固定液,PBS洗3遍,牛血清白蛋白(BSA)与Triton-X-1001:1混合封闭30min,PBS洗3遍,加入100 μ L1:5000稀释的NS7单抗(实施例1制备的NS7单抗),37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBS洗3遍,再用Dylight488羊抗鼠二抗(1:2000)37 $^{\circ}$ C避光孵育1h,PBS洗3次,倒置荧光显微镜观察结果,从图1可以看出,本发明的单克隆抗体可特异性识别PDCoV,胞浆中出现绿色荧光,而未接毒细胞中未观察到荧光。

[0093] (2) Western blot鉴定单克隆抗体的反应性

[0094] 在6孔板中接种LLC-PK1细胞,待细胞生长状态良好并生长至80%满时,以PDCoV MOI=0.1感染细胞,当CPE达到50%时收样。进行SDS-PAGE,200mA恒流30min转印至PVDF膜。用含5%脱脂乳的TBST封闭2h,以1:1000稀释的腹水作为一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗涤3次后,与HRP标记羊抗鼠IgG二抗(1:1000)室温作用1h;TBST洗涤3次后,使用ECL发光试剂盒显色。同时设置未接毒的LLC-PK1细胞样品作为阴性对照。结果参见图2,结果显示,单克隆抗体可与PDCoV感染细胞样特异性结合,在25Kda(NS7)和11Kda(NS7a)处各有一条清晰条带,而未接毒细胞样中未观察到条带。

[0095] (3) Protein A/G IP试验鉴定单克隆抗体的反应性

[0096] 在6孔板中接种LLC-PK1细胞,待细胞生长状态良好并生长至80%满时,以PDCoV MOI=0.1感染细胞,37 $^{\circ}$ C感染2h后弃去上清,换成维持培养基。当CPE达到50%时收样,收集上清放置冰上备用。取磁珠20 μ L,结合缓冲液洗涤2次,加入1:500稀释的NS7单抗腹水200 μ L,吸打混匀后室温翻转离心管15min,使抗体吸附到磁珠上。之后按说明书标准程序制备磁珠-抗体-抗原复合物,加入5 \times Loading Buffer煮沸,分离上清,进行WB检测。同时设置未接毒的LLC-PK1细胞样品作为阴性对照,设置接种PDCoV的LLC-PK1细胞总蛋白作为阳性对照;图3可以看出,由杂交瘤细胞株分泌产生的单克隆抗体与PDCoV感染细胞的IP结果表明单克隆抗体能在IP试验中特异性结合PDCoV感染细胞样品中的NS7和NS7a蛋白。

[0097] 实施例3单克隆抗体抗原表位鉴定

[0098] (1) 单克隆抗体抗原表位的初步鉴定

[0099] 以构建的pCold-TF-NS7原核表达质粒为模板设计引物(见表1),从中扩增三段具有一定重叠序列的片段A(位于NS7蛋白的氨基酸的第91位~130位,简称NS7-A)、片段B(位于NS7蛋白的氨基酸的第110位~150位,简称NS7-B)、片段C(位于NS7蛋白的氨基酸的第131

位~170位,简称NS7-C),各个片段通过酶切位点插入pEGFP-C3载体中,构建得到的阳性质粒送去南京擎科测序部测序。参照Entranster-H4000说明书,将各重组质粒转染至HEK293A细胞中,36h后收集细胞总蛋白,以单克隆抗体(1:1000)作为一抗,HRP Goat Anti-Mouse IgG作为二抗,通过Western Blot初步定位抗原表位的区域范围位于片段A与片段B重合区域,氨基酸位置为110-130aa。同上所述,以NS7-A片段为模板设计引物将其分为2段部分重叠的基因片段NS7-AB-1(位于NS7蛋白的氨基酸的第110位~120位)、NS7-AB-2(位于NS7蛋白的氨基酸的第118位~130位),设计对应引物并构建至pEGFP-C3载体,如上所述进行第二轮Western Blot鉴定(见图4),抗原表位的区域范围位于NS7-AB-1片段上,氨基酸位置为110-120aa,其多肽序列为¹¹⁰TPSTLEEDLRS¹²⁰。

[0100] 表1

	F	NS7-A	CACCTCGAGagctgctacctctccgattcc
	R	NS7-A	CACAAGCTTtaacagattgagatcttgggc
	F	NS7-B	CACCTCGAGacccttcaacgctagaggaa
	R	NS7-B	CACAAGCTTgtaccgcagctggtgcag
	F	NS7-C	CACCTCGAGactccagaggcacaggcaatc
[0101]	R	NS7-C	CACAAGCTTgagaaatggtttacccttgg
	F	NS7-AB-1	CACCTCGAGacccttcaacgctagaggaa
	R	NS7-AB-1	CACAAGCTTgctcctgaggtcttcctc
	F	NS7-AB-2	CACCTCGAGctcaggagcgtggaagtg
	R	NS7-AB-2	CACAAGCTTtaacagattgagatcttgggc

[0102] (2)单克隆抗体抗原表位的精确鉴定

[0103] 为了精确的鉴定出单克隆抗体识别的区域,设计引物(见表2)对NS7-AB-1的氨基酸片段进行N端和C端逐个氨基酸缺失并将其克隆至pEGFP-c3真核质粒上。从N端端的第110位~112位氨基酸的片段依次开始设计上游引物NS7-AB-1-N110、NS7-AB-1-N111、NS7-AB-1-N112以及下游引物EGFP-c3-MluI,从而得到缺失第109位氨基酸的片段NS7-AB-1-N110、缺失第110位氨基酸的片段NS7-AB-1-N111、缺失第111位氨基酸的片段NS7-AB-1-N112。WB结果显示,当N端的第111位氨基酸缺失后(即NS7-AB-1-N112片段),单克隆抗体检测不到条带,因此N端的氨基酸位置最终被确定为第111位的氨基酸。

[0104] 以NS7-AB-N111为模板从C端第120位~111位氨基酸开始设计下游引物NS7-AB-1-

C120、NS7-AB-1-C119、NS7-AB-1-C118、NS7-AB-1-C117、NS7-AB-1-C116以及上游引物EGFP-c3-NheI,从而分别得到缺失第121位氨基酸、缺失第120位氨基酸、缺失第119位氨基酸、缺失第118位氨基酸、缺失第117位氨基酸的相应片段。WB结果显示当C端第117位氨基酸缺失后(即NS7-AB-1-C116片段)单克隆抗体检测不到条带,因此C端的氨基酸位置最终被确定为第117位的氨基酸。

[0105] 最终通过Western blot精确定位抗原表位的区域范围111-117aa,其多肽序列为¹¹¹PSTLEED¹¹⁷见图5。

[0106] 表2

F	NS7-AB-1-N110	CACCTCGAGacccttcaacgctagaggaa
F	NS7-AB-1-N111	CACCTCGAGccttcaacgctagaggaagac
F	NS7-AB-1-N112	CACCTCGAGtcaacgctagaggaagacctc
R	EGFP-c3-MluI	CACACGCGTtaagatacattgatg
R	NS7-AB-1-C120	CACAAGCTTgctcctgaggtcttctctag
R	NS7-AB-1-C119	CACAAGCTTcctgaggtcttctctagcgt
R	NS7-AB-1-C118	CACAAGCTTgaggtcttctctagcgttgaagg
R	NS7-AB-1-C117	CACAAGCTTgttcttctctagcgttgaagg
R	NS7-AB-1-C116	CACAAGCTTtctctctagcgttgaaggggt
F	EGFP-c3-NheI	CACGCTAGCgctaccggtcgc

[0107]

[0108] (3)单克隆抗体抗原表位的保守性分析

[0109] 将鉴定出的表位序列与Genbank上已公布的国内外各地区的PDCOV毒株NS7氨基酸序列进行比对,从图6结果显示表位¹¹¹PSTLEED¹¹⁷在PDCOV毒株上较为保守,没有突变位点,能够识别大部分PDCOV毒株,共比对168株PDCoV毒株,其中有8株在抗原表位区域有突变,说明该抗体适用性较广泛。

[0110] 实施例4单克隆抗体特异性鉴定

[0111] 为了鉴定单克隆抗体的特异性,使用实验室保存的两株猪流行性腹泻病毒(PEDV GX4和PEDV GX6)感染ST细胞制备免疫荧光板子和收集细胞裂解样品进行IFA和WB分析。用单克隆抗体PDCOV-NS7-08A作为一抗,Goat Anti-Mouse IgG488和HRP羊抗鼠单抗作为二

抗,并以PEDVN蛋白单克隆抗体MAb SD 6-29为阳性对照(Su et al.,2019),进行IFA和WB鉴定。参见图7,IFA实验结果表明:当PEDV GX4与PEDV GX6成功感染ST细胞时,使用PDCoV-NS7-08A单克隆抗体与底物反应,未检测出荧光,说明我们所制备的PDCoV-NS7-08A单克隆抗体与PEDV部分毒株的蛋白在空间表位上不发生反应。WB结果说明:当PEDV GX4与PEDV GX6成功感染ST细胞时,使用PDCoV-NS7-08A单克隆抗体与所制备的细胞样品反应,未检测出任何条带,说明我们所制备的PDCoV-NS7-08A单克隆抗体与PEDV毒株的蛋白在线性表位上不发生反应。从而证明本发明所制备的单克隆抗体特异性较强。

[0112] 实施例5抗猪 δ 冠状病毒NS7和NS7a蛋白抗体的基因鉴定

[0113] NS7氨基酸序列:

MEFRLTPPSNPLKTMATGCVTPDKSQVVLRLHPMPFIILAQVPEEILSMVNSLLMIPQ
 QPLVLLGLRVRELILLNLMLRNATPTILNISCYLSDSQPEMAQLKVSELTPTSTLEEDLR
 [0114] SVEVAQDLNLLTPEAQAISPGNATNLHQLRYVVRPSIKLPSGLYPRVKPFLRYLATGLA
LVPMSALQTLRRRVWLILASWL

[0115] NS7a氨基酸序列:

MAQLKVSELTPTSTLEEDLRSVEVAQDLNLLTPEAQAISPGNATNLHQLRYVVRPSIKLP
 [0116] SGLYPRVKPFLRYLATGLALVPMSALQTLRRRVWLILASWL

[0117] NS7a存在于NS7的内部,两者具有部分相同的氨基酸序列。

[0118] 通过RT-PCR法克隆Ig可变区基因。用Trizol法体取NS7-08A杂交瘤细胞株的总RNA,用反转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA文库。

[0119] 反应体系:RNA 2000ng、5 \times gDNA digester Mix 3 μ L、补足RNase Free ddH₂O至15 μ L

[0120] 反应程序:42 $^{\circ}$ C2min

[0121] 反应体系:上一步反应液、4 \times HifairIII SuperMix plus 5 μ L

[0122] 反应程序:25 $^{\circ}$ C5min、55 $^{\circ}$ C15min、85 $^{\circ}$ C5min

[0123] 通过以上反应得到cDNA文库。

[0124] 重链骨架区上游引物:

[0125] VH-F1:SAGGTGMAGCTKCASSARTCWGG

[0126] VH-F2:ATGGRATGSAGCTGKGMTATSCTCT

[0127] VH-F3:ATGRACCTCGGGYTGAGCTKGGTTTT

[0128] VH-F4:ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT

[0129] 重链可变区下游引物:

[0130] VH-R:TGGGGSTGTGTTTTGGCTGMRGAGACRGTGA

[0131] 轻链前导肽上游引物:

[0132] VL-F1:ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG

[0133] VL-F2:ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT

[0134] VL-F3:ArGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA

[0135] VL-F4:ATGKCCCWRCTCAGYTYCTKGT

[0136] VL-F5:ATGAAGTTGCTGTTAGGCTGTTG

- [0137] 轻链可变区下游引物:
- [0138] VL-R:GGATACAGTTGGTGCAGCATCAGCCCGTTT
- [0139] 配制PCR反应体系(50 μ l)如下:
- [0140] 反应体系:cDNA2 μ l;上游引物(10 μ M) 2 μ l;下游引物(10 μ M) 2 μ l;2 \times PrimerSTAR Max聚合酶25 μ l;ddH₂O补足至50 μ l。
- [0141] 反应条件:98 $^{\circ}$ C预变性3min;重复如下循环35次:98 $^{\circ}$ C30s,57 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C1min;最后,72 $^{\circ}$ C延伸5min。
- [0142] 琼脂糖凝胶电泳分离并回收VL、VH片段。将回收后的VL、VH片段分别与pMD19-T载体(Takara公司)进行连接,连接体系如下:
- [0143] VL PCR产物,7 μ l
- [0144] pMD19-T载体1 μ l,
- [0145] 10x T4 Ligase buffer 1 μ l
- [0146] 10 \times T4 Ligase 1 μ l
- [0147] 4 $^{\circ}$ C连接过夜,得到连接产物pMD19-T-VL。
- [0148] VH PCR产物7 μ l
- [0149] pMD19-T载体1 μ l,
- [0150] 10x T4 Ligase buffer 1 μ l
- [0151] 10 \times T4 Ligase 1 μ l
- [0152] 4 $^{\circ}$ C连接过夜,得到连接产物pMD19-T-VH。
- [0153] 将连接产物pMD19-T-VL、pMD19-T-VH分别转化入大肠杆菌TOP10感受态细胞中,37 $^{\circ}$ C过夜培养后,挑取单个菌落,37 $^{\circ}$ C震荡2小时后进行菌液PCR鉴定。
- [0154] 配制反应体系(10 μ l)如下:
- [0155] 菌液1 μ l
- [0156] 上游引物(10 μ M)0.5 μ l(重链骨架区上游引物或轻链前导肽上游引物)
- [0157] 下游引物(10 μ M)0.5 μ l(重链可变区下游引物或轻链可变区下游引物)
- [0158] 2xHieff Robust PCR Master Mix5 μ l
- [0159] ddH₂O 3 μ l
- [0160] 反应条件同前。
- [0161] 选取菌落PCR阳性的克隆扩大培养,用质粒提取试剂盒(Omega公司)提取阳性克隆质粒pMD19-T-VL、pMD19-T-VH,送检测序。每个抗体的每条链至少送检5个克隆样品,至少三个样品测序结果相同为止。
- [0162] 测序并通过验证后得到如下序列:
- [0163] 本发明的单克隆抗体轻链可变区核苷酸序列:

[0164] ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTT
CCACTGGTGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGG
CAGAGGGCCACCATCTCATAACAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAG
TTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATC
TTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTA
CTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAA

(SEQ ID NO.9)

[0165] 本发明的单克隆抗体轻链可变区氨基酸序列:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYS

[0166] YMHWNQKPGQPPELLIYLVSNLESGVPARFSGSGSDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ

HIRELTRSEGGPSWK (SEQ ID NO.8)

[0167] 本发明的单克隆抗体轻链可变区CDR区 (Ig blast/IMGT分析)

[0168] CDR1:KSVSTSGYSY (SEQ ID NO.4)

[0169] CDR2:LVS (SEQ ID NO.5)

[0170] CDR3:QHIREL (SEQ ID NO.6)

[0171] 本发明的单克隆抗体重链可变区核苷酸序列:

[0172] ATGGAATGCAGCTGGGTAATGCTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCA
ATTCAGAGGTTTCAGTTGCAGCAGTCTGGGGCGGAGGTTGTGAGGCCAGGGGCCGC
AGTCAAGTTGTCCTGCACTGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATATATTG
GGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCG
AATGGTAATACTAGATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCAATATAACAGCTGA
CACATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAGGTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACT
GCCGTCTATTACTGTGCTAGAGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC
CGTCTCTTCAGCCAAAACAACAGCCCAAATCTCTAG (SEQ ID NO.10)

[0173] 本发明的单克隆抗体重链可变区氨基酸序列:

MECSWVMLFLMAVVTGVNSEVQLQSGAEVVRPGA AVKLSCTASGFNIKDTYI

[0174] YWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTRYDPKFQGKANITADTSSNTVYLQVSSLTSEDTA

VYYCARGFDYWGQGTTLVSSAKTTAPNL (SEQ ID NO.7)

[0175] 本发明的单克隆抗体重链可变区CDR区 (Ig blast/IMGT分析)

[0176] CDR1:GFNIKDTY (SEQ ID NO.1)

[0177] CDR2:IDPANGNT (SEQ ID NO.2)

[0178] CDR3:ARGFDY (SEQ ID NO.3)。

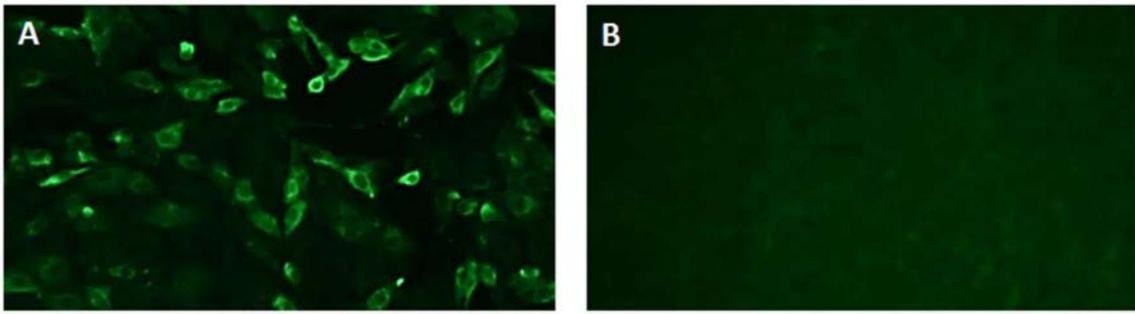
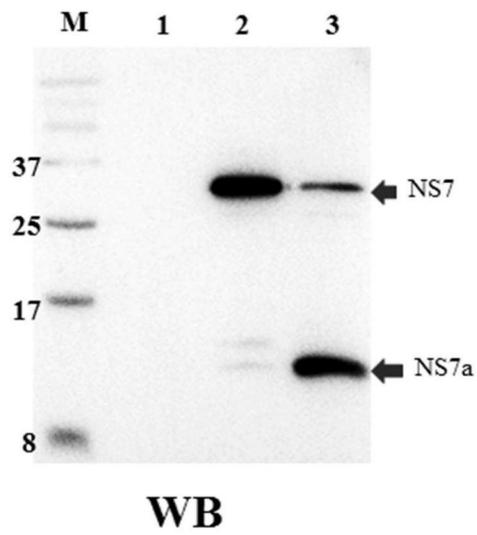


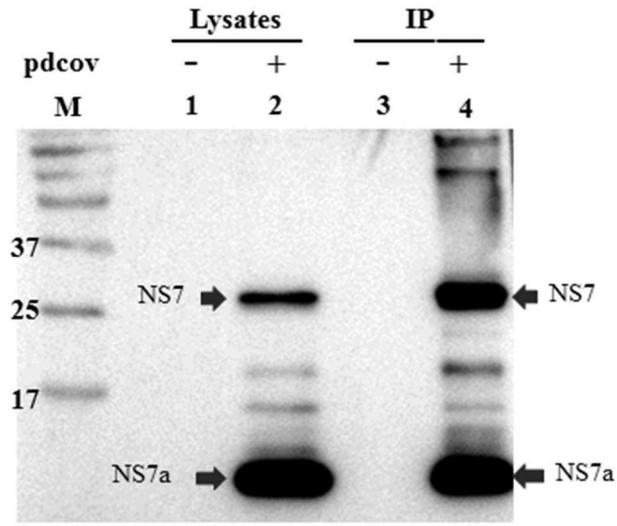
图1



WB

1 : LLC-PK1阴性对照
2 : pCAGGS-NS7转染 LLC-PK1
3 : PDCoV感染LLC-PK1

图2



IP

全细胞： 1：LLC-PK1阴性对照
 2：PDCoV感染
 免疫沉淀： 3：阴性细胞样
 4：PDCoV感染细胞样

图3

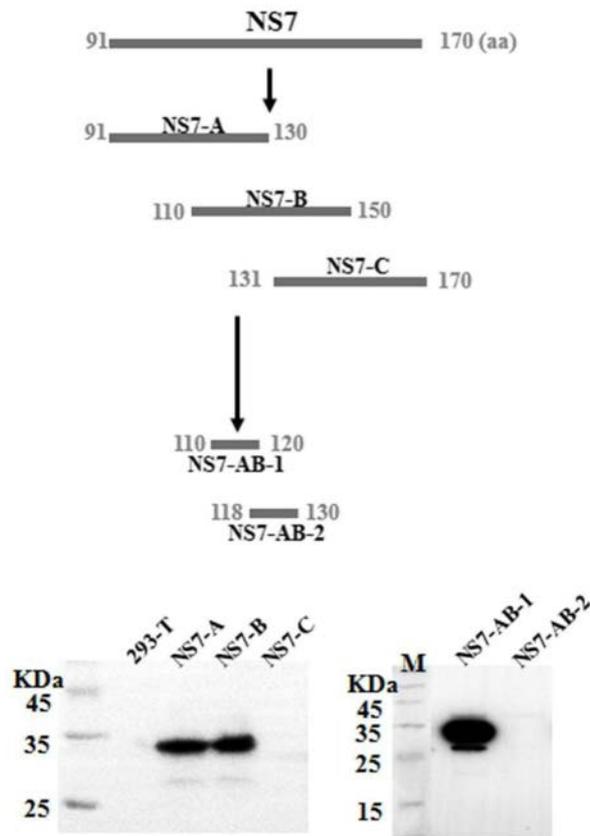


图4

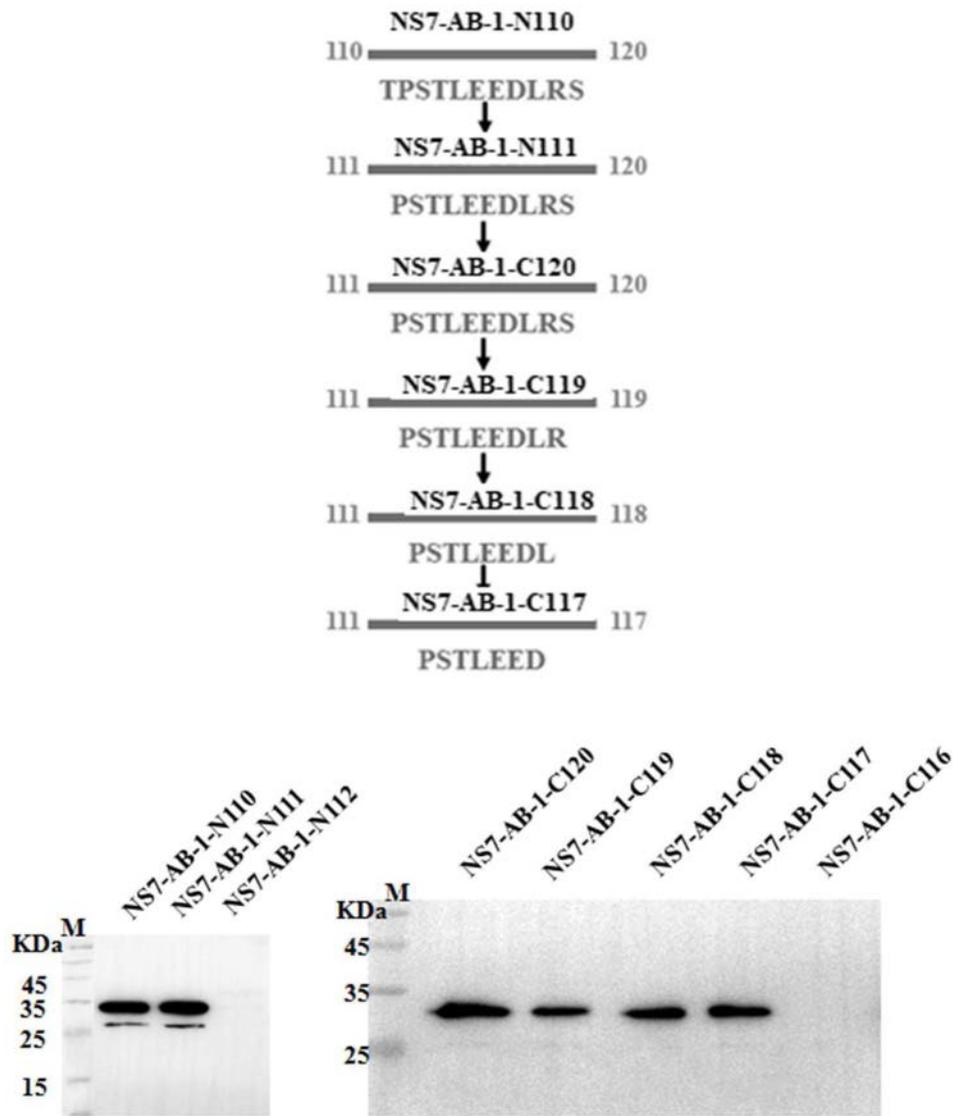


图5

	111 P S T L E E D 117
Porcine deltacoronavirus isolate HNZK-04-P5	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/Peru/isolate/2019	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain HNZK-04	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain HNZK-02	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain HNZK-06	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate HNZK-04-P15	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016	* * * * * *
Mutant Porcine deltacoronavirus strain USA/IL/2014/026PDV_P11	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate PDCoV/Haiti/Human/0256-1/2015	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate PDCoV/Haiti/Human/0081-4/2014	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate PDCoV/Haiti/Human/0329-4/2015	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate PDCoV/CHJXNI2/2015	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS02/2016	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P7	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P20	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain OH-FD22 P7	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CZ2020	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-JS-2017	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate GX2018-1	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus 8734/USA-IA/2014	* * * * * *
Porcine coronavirus HKU15 strain KY4813	* * * * * *
Porcine coronavirus HKU15 strain PA3148	* * * * * *
Porcine coronavirus HKU15 strain NE3579	* * * * * *
Porcine coronavirus HKU15 strain MI6148	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus KNU14-04	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/IL/2014/026PDV_P11	* * * * * *
Porcine coronavirus HKU15 strain OH11846	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate DH1	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate DH2	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate KNU16-07	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/Jiangsu/2014	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate KNU16-07-P5	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate KNU16-07-P10	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate GD2018-186	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate GD2018-1	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-AH-2004	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HB-2014	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-JS-2014	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HN-2014	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate HN2018-LH2	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/Tianjin/2016	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/Hunan/2014	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/Sichuan/2018	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate AH2019-H	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate JS2019-A1414	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate P1_16_VN_0116	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate P30_15_VN_1215	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GX81-2018	* * * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate JS2018-YC15	* * * * * *
Deltacoronavirus PDCoV/USA/Illinois121/2014 from USA	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate P24_15_NT1_1215/PDCoV/2015/Thailand	* * * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/Swine/Vietnam/HaNoi6/2015	* * * * * *

Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/Swine/Vietnam/Binh21/2015	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate P12_14_VN_0814	* * * * *
Sequence 11 from patent US 10251950	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GX01-2018	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GX11-2018	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain NH	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain NH isolate passage 0	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain NH isolate passage 5	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain NH isolate passage 10	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain GD	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/GS/2017/1	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/QH/2017/1	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate SD2018-10	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate HN2019-C115	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHzmd2019	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN-TS1-2019	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH7328	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/SXD1/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate KNU16-11	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HN-1601	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/CHGD/2016	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate ZJ2018-D	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate HN2019-C132	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate 104-553	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate AH2018-322	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate BN	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate P29_15_VN_1215	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain SD	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain SHJS/SL/2016	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HeB1-2017	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain Swine/CHN/SC/2018/1	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain SCNC201705	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CH-HLJ-20	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV-CH-SDLY52-2021	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN-GD-2016	* * * * *
Sequence 12 from patent US 10251950	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/Sichuan/2017	* * * * *
Sequence 12 from patent US 10953088	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota159/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Illinois272/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HG-2017	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Arkansas61/2015	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate AH2018-93	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota214/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Nebraska209/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GD16-03	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate CHN-HN-17	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota292/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota442/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GX12-2018	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GX09-2018	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate AH2018-81	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate JS2018-QF49	* * * * *
Sequence 11 from patent US 10953088	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/CBR-1/2016/Thailand	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/CBR-2/2016/Thailand	* * * * *

Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/CBR-3/2016/Thailand	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/NKP-1/2016/Thailand	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/VUT-1/2016/Vietnam	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/Swine/Thailand/S5011/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/Swine/Thailand/S5015L/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate P1_16_BTL_0115/PDCoV/2016/Lao	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate NT1_0416/2016	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate P20_16_VN_0416	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH/Sichuan/S27/2012	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Nebraska210/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CH-01	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate P19_16_VN_0416	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate SD2018-304	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate SD2018-306	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate SD2018-4	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate AH2018-94	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate TT_1115	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN-GD16-05	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN-SC2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Michigan448/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Indiana453/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Illinois449/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota/2013	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota454/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Minnesota455/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Illinois273/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/NorthCarolina452/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Ohio444/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Ohio445/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Iowa459/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/USA/Minnesota140/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain USA/Michigan447/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN/Sichuan/2017	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain NTU/C253/21	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/USA/Iowa136/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/USA/Nebraska137/2015	* * * * *
UNVERIFIED: Porcine deltacoronavirus isolate SD2019-426	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate CHN/Sichuan/2019	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN-LYG-2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus isolate PDcov HeN/swine/2015	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: AKT/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: GNM-1/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: GNM-2/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: IWT/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: MYZ/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: OKN/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: YMG/JPN/2014	* * * * *
Porcine deltacoronavirus genomic RNA , strain: HKD/JPN/2016	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain CHN-SCMY2021-02	* * * * *
Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/USA/Nebraska145/2015	* * * * *

登录号	毒株名称	P	S	T	L	E	E	D
KX361343	Porcine deltacoronavirus isolate P1_13_ST1_0213/PDCoV/0213/Thailand	**	K	*	*	*	*	*
KX361344	Porcine deltacoronavirus isolate P2_13_ST2_0313/PDCoV/0213/Thailand	**	K	*	*	*	*	*
MF642322	Porcine deltacoronavirus strain CHN/GS/2016/1	**	M	*	*	*	*	*
MF642323	Porcine deltacoronavirus strain CHN/GS/2016/2	**	M	*	*	*	*	*
MF948005	Porcine deltacoronavirus strain HB-BD	**	M	*	*	*	*	*
MH025764	Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P50	**	*	*	*	*	*	N
MK625640	Porcine deltacoronavirus isolate CH/JXJGS01/2016	**	*	*	*	*	*	N
MZ802777	Porcine deltacoronavirus strain PDCoV/RBR-1/2016/Thailand	**	K	*	*	*	*	*

图6

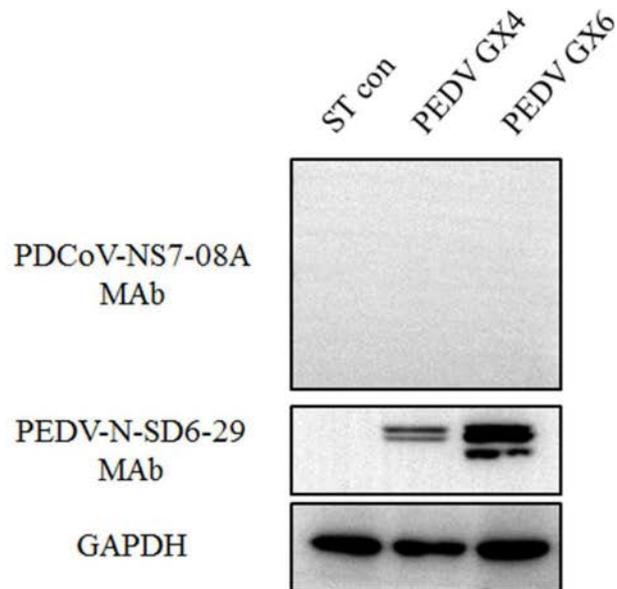
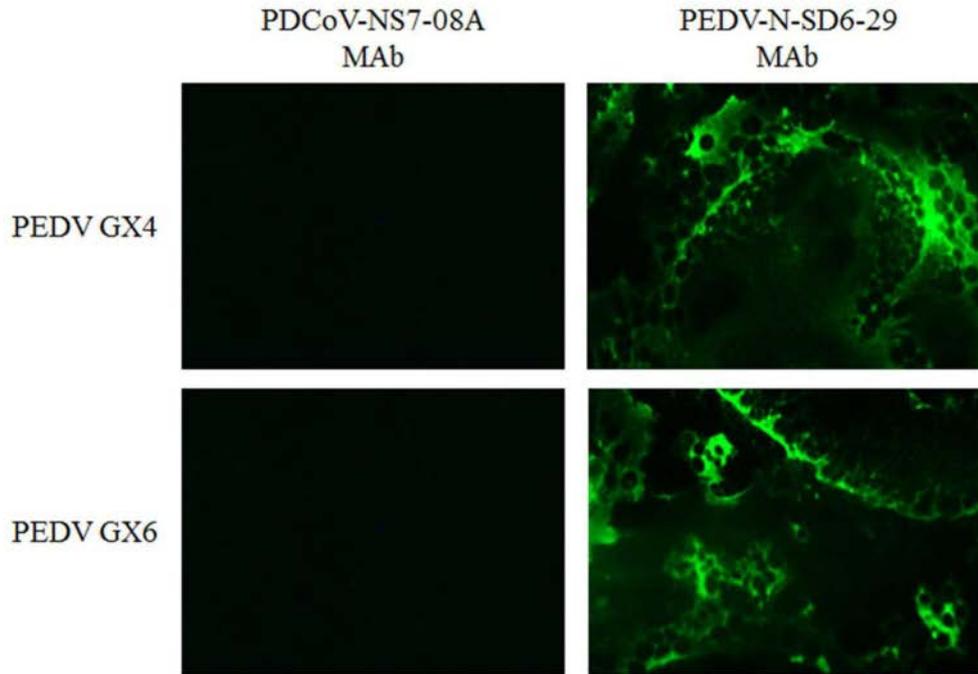


图7