

分类号:

学校代号: 11847

UDC:

密级:

学 号: 2112159116

佛山科学技术学院

硕士学位论文

(兽医硕士)



猪流行性腹泻病毒 S 蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 方法的建立

作者姓名: 常传哲

学科专业: 兽 医

导师姓名: 覃丽梅 副教授 肖书奇 教授

完成时间: 二〇二四年五月

Foshan University

A dissertation for master's degree
(Master of Veterinary Medicine)



Preparation of monoclonal antibody to S protein of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of sandwich ELISA method for bispecific antibody

Author: Chang Chuanzhe

Speciality: Veterinary Medicine

Supervisors: Associate Professor Qin Limei
and Professor Xiao Shuqi

Finished time: May 2024

摘 要

猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarrhea, PED）是由猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）感染猪所引起一种肠道传染性疫病，以呕吐、腹泻、脱水和死亡为主要临床特征。近年来该病使我国养猪业损失惨重。目前，商品化疫苗不能对流行毒株产生完全保护，使得该病防控效果欠佳。准确快速的诊断对该病的防控至关重要。酶联免疫吸附实验（ELISA）检测方法操作简单、特异性强、准确和快速等特性被广泛用于病毒诊断中。因此，本研究首先以原核系统表达 PEDV S1 蛋白；随后将 S1 蛋白免疫小鼠并通过杂交瘤技术筛选出针对 S1 蛋白的特异性单克隆抗体；最后基于该单克隆抗体建立准确性高且快速的 PEDV 双抗体夹心 ELISA（Double-antibody sandwich ELISA, DAS-ELISA）检测方法，为诊断 PEDV 提供有力工具从而更好的防控 PED。具体的研究内容和结果如下：

1. PEDV S1 蛋白的表达

首先以优化后的 pGEX-6p-2-S1 为模板，扩增出 PEDV S1 基因，将扩增片段与原核表达载体 pET-28a 通过同源重组技术进行连接，获得了重组质粒 pET-28a-S1。将测序正确的重组质粒转化至 *E.Coli* BL21（DE3）感受态细胞中进行诱导表达，通过 SDS-PAGE 进行鉴定。经鉴定成功表达 S1 蛋白且该蛋白以包涵体为主，随后对该蛋白进行变性、纯化、复性及浓缩，最终获得纯度较高的 PEDV S1 蛋白。

2. PEDV S1 蛋白单克隆抗体的制备

首先，将制备的 PEDV S1 蛋白免疫小鼠，经三次免疫后，测得针对 PEDV S1 蛋白的血清效价达到 1:64000。通过细胞融合与三次亚克隆，成功获得 1 株能够稳定分泌针对 PEDV S1 的抗体的阳性细胞株 C1A。其次，将筛选的阳性细胞株注射小鼠腹部制备腹水并对腹水通过纯化、透析及浓缩后。最终获得浓度为 2 mg/mL 的单克隆抗体 C1A。随后通过蛋白免疫印迹（Western Blot）和间接免疫荧光试验（IFA）方法对 C1A 进行活性及抗原表位进行鉴定。结果显示 C1A 具有良好的活性，其识别表位位于 S 蛋白的 221-262 aa。另外还通过套式

PCR 获得了抗体可变区的序列。

3. 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及优化

以上述筛选的单克隆抗体 C1A 作为捕获抗体进行包被，HRP 标记的抗 PEDV M 蛋白单克隆抗体 5F2 为检测抗体建立一种双抗体夹心 ELISA 方法检测 PEDV。通过对各反应条件的摸索与优化，最终确定将 C1A 以 250 ng/孔进行包被 2 h 后洗涤，用 5%BSA 进行封闭 2 h 后洗涤，随后加入样品孵育 2 h 后洗涤，按照 1:500 加入 HRP-5F2 孵育 30 min，最后加入 TMB 进行显色，所有孵育均在 37°C 下进行。经验证，该方法与 TGEV、PRRSV、PoRV 和 PCV2 均不存在交叉反应，且具有良好的特异性，并且灵敏性和重复性良好。与 RT-PCR 检测结果对比阳性符合率为 95%。能用于临床样品检测。

综上所述，本研究成功表达 PEDV S1 蛋白且筛选出针对该蛋白的特异性单克隆抗体 C1A，并基于 C1A 建立了特异性强、快速且准确用于检测 PEDV 的双抗体夹心 ELISA 方法，为临床检测 PEDV 提供了可靠的工具。

关键词：猪流行性腹泻病毒；单克隆抗体；双抗体夹心 ELISA；S1 蛋白

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea (PED) is an intestinal infectious disease caused by Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in pigs, characterized by vomiting, diarrhea, dehydration, and death. In recent years, this disease has caused heavy losses to China's pig farming industry. At present, commercial vaccines cannot provide complete protection against epidemic strains, resulting in poor disease prevention and control effects. Accurate and rapid diagnosis is crucial for the prevention and control of this disease. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection method is widely used in virus diagnosis due to its simple operation, strong specificity, accuracy, and speed. Therefore, this study first expressed PEDV S1 protein in the prokaryotic system; Subsequently, S1 protein was immunized in mice and specific monoclonal antibodies targeting S1 protein were screened using hybridoma technology; Finally, based on this monoclonal antibody, a highly accurate and rapid PEDV double antibody sandwich ELISA (DAS ELISA) detection method was established, providing a powerful tool for diagnosing PEDV and better preventing and controlling PED. The specific research content and results are as follows:

1. Expression of PEDV S1 protein

Firstly, using the optimized pGEX-6p-2-S1 as a template, the PEDV S1 gene was amplified. The amplified fragment was connected to the prokaryotic expression vector pET-28a through homologous recombination technology to obtain the recombinant plasmid pET-28a-S1. Transform the correctly sequenced recombinant plasmid into *E.Coli* BL21 (DE3) was induced and expressed in receptive cells, and identified by SDS-PAGE. After identification, the S1 protein was successfully expressed and mainly composed of inclusion bodies. Subsequently, the protein was denatured, purified, refolded, and concentrated to obtain a high purity PEDV S1 protein.

2. Preparation of monoclonal antibody to PEDV S1 protein

Firstly, the prepared PEDV S1 protein was immunized in mice, and after three immunizations, the serum titer against PEDV S1 protein was measured to reach 1:64000. Through cell fusion and three rounds of subcloning, a positive cell line C1A capable of stably secreting antibodies against PEDV S1 was successfully obtained. Secondly, the screened positive cell lines were injected into the abdomen of mice to prepare ascites, which were purified, dialyzed, and concentrated. Finally, a monoclonal antibody C1A with a concentration of 2 mg/mL was obtained. Subsequently, Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to identify the activity and antigenic epitopes of C1A. The results showed that C1A has good activity, with its recognition epitope located at 221-262 aa of the S protein. In addition, the sequence of the antibody variable region was obtained through nested PCR.

3. Establishment and optimization of dual-antibody sandwich ELISA detection methods

A dual antibody sandwich ELISA method was established to detect PEDV using the screened monoclonal antibody C1A as the capture antibody and HRP labeled monoclonal antibody 5F2 as the detection antibody; Through exploration and optimization of various reaction conditions, it was ultimately determined to coat C1A at 250 ng/well for 2 hours before washing, seal it with 5% BSA for 2 hours before washing, then incubate the sample for 2 hours before washing, incubate with HRP-5F2 at a ratio of 1:500 for 30 minutes, and finally add TMB for color development. All incubation was carried out at 37 °C. After verification, this method has no cross reactivity with TGEV, PRRSV, PoRV, and PCV2, and has good specificity, sensitivity, and repeatability. The positive coincidence rate with RT-PCR detection results is 95%. Can be used for clinical sample testing.

In summary, this study successfully expressed the PEDV S1 protein and screened for a specific monoclonal antibody C1A against it. Based on C1A, a highly specific, rapid, and accurate double antibody sandwich ELISA method was established for detecting PEDV, providing a reliable tool for clinical detection of

PEDV.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus; Monoclonal antibody; DAS ELISA; S1 protein

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 PEDV 的流行病学	1
1.2 PEDV 的病原特征	3
1.2.1 PEDV 的形态结构	3
1.2.2 PEDV 的理化性质	3
1.2.3 PEDV 的蛋白及功能	4
1.3 PED 的防控	9
1.3.1 建立安全的生活环境	9
1.3.2 合理的免疫	10
1.3.3 及时的检测	10
1.4 PED 的临床症状与病理变化	11
1.5 PEDV 的诊断方法研究进展	11
1.5.1 酶联免疫吸附实验	11
1.5.2 逆转录 PCR 和实时荧光定量 PCR	12
1.5.3 环介导等温扩增实验	13
1.5.4 CRISPR-Cas 技术	13
1.5.5 多重平面免疫分析法	14
1.5.6 免疫层析法	14
1.6 单克隆抗体在检测 PEDV 中的应用	15
1.7 研究的目的是和意义	16
第二章 PEDV S1 蛋白的原核表达与纯化	17
2.1 试验材料	17
2.1.1 细菌和载体	17
2.1.2 主要试剂与仪器	17
2.2 试验方法	18
2.2.1 重组质粒构建	18
2.2.2 S1 蛋白诱导表达	19
2.2.3 PEDV S1 蛋白纯化	19
2.2.4 PEDV S1 蛋白浓缩与蛋白浓度测定	20
2.3 结果	20
2.3.1 pET-28a-S1 质粒的构建和菌液 PCR 鉴定	20
2.3.2 PEDV S1 蛋白诱导表达 SDS-PAGE 分析	21
2.3.3 PEDV S1 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析	22
2.3.4 蛋白浓缩和蛋白浓度曲线	23

2.4 讨论.....	24
2.5 本章小结.....	24
第三章 抗 PEDV S1 蛋白单克隆抗体的制备.....	25
3.1 试验材料.....	25
3.1.1 试验动物、细胞和病毒.....	25
3.1.2 主要试剂与仪器.....	25
3.2 实验方法.....	26
3.2.1 免疫小鼠与血清效价测定.....	26
3.2.2 细胞融合.....	26
3.2.3 融合细胞亚克隆及细胞冻存.....	28
3.2.4 腹水制备及单克隆抗体纯化.....	29
3.2.5 单克隆抗体活性的验证.....	29
3.2.6 单克隆抗体识别 PEDV S1 蛋白表位初步鉴定.....	30
3.2.7 单克隆抗体可变区测定.....	31
3.2.8 单克隆抗体 C1A 亚型鉴定.....	33
3.3 结果.....	33
3.3.1 小鼠血清效价检测.....	33
3.3.2 细胞融合与亚克隆.....	33
3.3.3 单克隆抗体 C1A 抗体纯化.....	34
3.3.4 Western blot 验证单克隆抗体 C1A 的特异性.....	35
3.3.5 IFA 验证单克隆抗体 C1A 的反应性.....	35
3.3.6 单克隆抗体 C1A 识别 PEDV S1 蛋白表位初步鉴定.....	36
3.3.7 单克隆抗体可变区的测定.....	38
3.3.8 单克隆抗体 C1A 亚型鉴定结果.....	39
3.4 讨论.....	40
3.5 本章小结.....	41
第四章 双抗夹心 ELISA 方法的建立及优化.....	42
4.1 试验材料.....	42
4.1.1 主要试剂.....	42
4.1.2 主要仪器.....	42
4.2 试验方法.....	43
4.2.1 HRP 标记抗体.....	43
4.2.2 双抗夹心 ELISA 方法的优化.....	43
4.3 结果.....	46
4.3.1 DAS-ELISA 各反应条件的优化结果.....	46
4.3.2 DAS-ELISA 临界值的确定.....	49
4.3.3 DAS-ELISA 的灵敏性测定.....	49
4.3.4 DAS-ELISA 的特异性.....	49

4.3.5 DAS-ELISA 的重复性	50
4.3.6 DAS-ELISA 临床样品的检测	51
4.4 讨论	51
4.5 本章小结	53
全文总结	54
参考文献	55

第一章 文献综述

猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarrhea, PED）是由猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）感染引起的严重的肠道消耗性疾病^[1]。猪只感染 PEDV 后出现以呕吐、腹泻及仔猪高致死率为主要临床特征，给世界的养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。商品化疫苗不能对流行毒株产生完全保护，使得该病防控效果欠佳，急需尽快研制出安全有效的疫苗进行该病毒防控。而第一时间快速诊断出疫病的感染，对于及时防控该病，降低经济损失至关重要。但 PED 所引起的临床症状与其它消化道腹泻疫病很难区分，所以设计出能够方便、快捷和特异的病原检测方法有重要意义。而对该病流行病学，病原特征，临床症状，预防与控制以及检测方法等研究进展的全面总结，有助于“采长补短”，设计出满足市场需求的 PED 诊断方法。

1.1 PEDV 的流行病学

猪流行性腹泻病毒于 20 世纪 70 年代末首次出现在英国，多发生在秋冬季节，呈局部流行模式^[3]。并被命名为冠状病毒 CV777^[4]，该病毒主要感染哺乳期仔猪，具有高发病率和高死亡率的特点^[5]。从那时起，经典毒株 CV777 持续在欧洲和亚洲国家爆发流行。自 1973 年以来，PED 相似报道在中国接连出现。这些报道描述了与（Porcine transmissible gastroenteritis, TGE）TGE 相似的临床症状，但没有见鉴定出病原体，直到 1984 年 Xuan 等人利用荧光标记抗体和血清中和试验证实了该病原为 PEDV。在 2009 年到 2010 年从多个省采集的 197 份仔猪腹泻样本进行检测猪轮状病毒（PoRV）阳性率为 7.61%（15/197），猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）阳性率为 0.51%（1/197），PEDV 阳性率为 29.44%（58/197）^[7]。上述结果表明，PEDV 曾经是中国仔猪腹泻的主要病原体之一，PEDV 毒株为 G1a 亚型，使用 CV777 疫苗可以较好地控制疫情的发展^[6]。尽管 PEDV 处于流行状态，但 PEDV 灭活疫苗和细长疫苗的使用有效地解决了全国 PED 的流行问题。

然而，2010 年 10 月，在中国南方的一个养猪场发现了一种高致病性 G2b 亚型变异毒株，导致了高致病性 PED 疫情爆发，并迅速扩散到全国各地。至少有 29 个省（区、市）报告了 PED 大流行^[8]。在 2013 年，高致病性 PEDV 在美国引起大流行，并传播到加拿大、墨西哥等主要的生猪产区^[9]。2010 和 2011 这 2 年中，在华中、华东和华南 9 个省共采集了 600 多份猪组织样品和粪便样本，其中 PEDV 阳性率为 58.32%^[10]。2012 年，在全国 12 个省份采集仔猪小肠组织和粪便样本，采用胶体金检测和 RT-PCR，发现 PEDV 发病率显著高于 TGEV 和 PoRV^[11]。2011 年~2014 年，在全国 29 个省份采样，PEDV 阳性率为 70%左右，现场阳性率为 80%左右^[12]。2016 年，在全国 17 个省份采集样本 1272 份进行检测，PEDV 阳性率为 28.93%^[13]。2015~2019 年河南省采集的 575 份猪腹泻标本 PEDV 阳性率为 51.65%，2015 年（40.68%）~2017 年（39.29%）相对稳定，2018 年大幅上升（74.19%）^[14]，2019 年文献报道，采用 ELISA 检测试剂盒对 2014~2015 年采集的 364 份藏猪血清进行 PED 抗体检测，结果显示，藏猪血清中 PED 的阳性检出率为 39.56%^[15]。2019 年，Chen 等统计了 Pub Med、Google Scholar、Cochrane Library、Clinical Trials、China Knowledge Network 和 Wipe 数据库中 1988 年 1 月至 2018 年 8 月 45 篇关于中国大陆 PEDV 发病率的文章，发现 PEDV 的平均发病率为 44%，其中北部地区为 37%，低于其他地区^[16]。2020 年，Tan 等人分析总结了 2010 年以来中国 PED 感染的报道，发现 2010 年以来中国几乎所有省份都有 PED 爆发^[17]。以往的研究结果表明，2010 年以来，高致病性 G2b 亚型变异株在中国和世界范围内广泛流行，持续危害养猪业。PEDV 是导致仔猪腹泻的主要疾病，变异株与 G1a 亚型疫苗株之间存在巨大的抗原性差异，乏针对新型变异株的有效疫苗^[18]。因此，开展 PEDV 毒株在中国的流行病学调查，了解病毒结构组成及各部分功能，建立快速特性的诊断方法，针对性的防控策略的制定和疫病的有效控制至关重要。

1.2 PEDV 的病原特征

1.2.1 PEDV 的形态结构

如图 1 所示, PEDV 其表面具有特征性的“冠状”结构, 病毒粒子成不规则的圆形或者椭圆形, 在病毒粒子的中心区域电子的形态是不透明的, PEDV 病毒粒子的直径长度约为 95~190 nm, 在病毒的表面有类似于花瓣状的纤突, 纤突的长度在 18~23 nm 之间^[19]。

PEDV 全基因组长约 28 kb^[20] (图 1)。包括 16 种非结构蛋白 (Non-structural proteins, nsp)。这些 nsp 蛋白功能包括基因组复制、非结构蛋白的转录和病毒蛋白的加工^[21]。4 种结构蛋白, 包括纤突蛋白 (S)、包膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 以及核衣壳蛋白 (N)^[22], 这些结构蛋白在 PEDV 的入侵、复制、组装和释放中发挥重要作用, 并调控 PEDV 复制和逃逸宿主免疫应答中发挥重要作用^[23]。PEDV 的辅助性蛋白 ORF3 基因的缺失可导致毒力降^[24]。

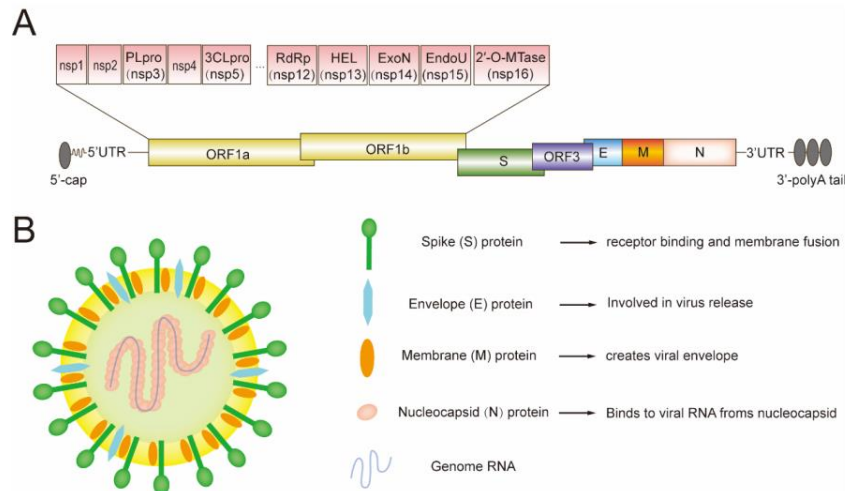


图 1.1 (A) PEDV 基因组结构; (B) PEDV 病毒粒子结构示意图^[25]

Fig 1.1 (A) PEDV genome structure, (B) Schematic diagram of PEDV virion structure

1.2.2 PEDV 的理化性质

PEDV 在蔗糖中的浮力密度为 1.18 g/mL^[26]。PEDV 的生存温度为 4~40°C, 随着温度的上升, PEDV 的感染能力会随之下降, 当温度超过 60°C 以上时, 病毒会失去感染的能力, 所以在北方的冬季猪场的发病率会高于炎热的夏季。PEDV 在 pH 值高于 9 或者低于 4 时, 在短时间内就会完全失活。

PEDV 在体外传播时,对体外的生存环境要求较高,抵抗力较弱,很容易就会被灭活,比如过氧乙酸等氧化消毒剂,紫外线照射等,由于 PEDV 表面存在脂囊膜,因此对很多有机类消毒剂消杀,例如乙醚氯仿等^[27],因为感染仔猪的主要排毒方式为粪便传播,对排泄物及外界环境使用苯酚、季铵等消毒剂可以有效地减少排泄物中 PEDV 病毒的数量^[28]。猪流行性腹泻病毒没有血凝性,不与人以及其它动物的红细胞发生凝集反应^[29]。

1.2.3 PEDV 的蛋白及功能

1.2.3.1 S 蛋白

S 蛋白位于 PEDV 颗粒表面,是一种 I 型跨膜糖蛋白。它负责形成不同的纤突,并在病毒附着于靶细胞和产生中和抗体中发挥重要作用^[30]。在病毒入侵过程中,S 蛋白附着在细胞膜上的宿主受体上,介导病毒与宿主膜融合^[31]。它也是 PEDV 中最大的结构蛋白,分子量在 150~220 kDa 之间。S 基因是不同 PEDV 毒株之间的高变区。因此,S 蛋白的遗传变异可以作为评估 PEDV 遗传多样性的标准^[32]。根据 S 基因的遗传多样性,PEDV 可分为 G1 型 PEDV 和 G2 型 PEDV 两个基因组,再细分为 G1a、G1b、G2a、G2b 和 G2c 五个亚群^[33]。其中,G1a 型 PEDV 包括在比利时发现的原型毒株 CV777,所有毒株都与 CV777 具有较高的遗传同源性^[34]。G2 毒株毒力较强,G1b 和 G2c 的出现是由于 G1a 和 G2 毒株之间进一步发生同源重组。在天然宿主中,S 蛋白具有诱导产生中和性抗体的能力,因此可以作为产生中和性单克隆抗体的靶点^[35]。Song 等人通过在 Ad5 载体中表达免疫原性 PEDV S 生成了一种 PED 候选疫苗,可诱导有效的体液免疫^[36]。PEDV S 蛋白被胰蛋白酶样蛋白酶水解产生 S1 和 S2 亚基^[37]。S1 亚基由两个结构域组成,包括附着于细胞碳水化合物的 N 端结构域(S1 NTD,基于 PEDV CV777 的 21~324 aa)和与宿主结合的 C 端结构域(S1 CTD,253~638 aa)^[38]。最近的一项研究表明,当 PEDV 的 S1 区被删除时,PEDV 的毒力降低,抗体的病毒中和能力受到影响^[39]。

S1 蛋白由于其含有多个抗原表位,常被作为制备疫苗的目标位点,一方面其免疫原性强,另一方面 S1 蛋白位于细胞的表面,使游离的蛋白与完整的

病毒粒子都能被有效检测，也是建立检测方法的优势蛋白。因此本实验着重研究 S1 蛋白，为研究 PEDV 病毒的致病机制提供一定的材料。

研究表明，PEDV S 可以识别猪氨肽酶 N (pAPN)^[40]，外源 pAPN 过表达会增加 PEDV 感染细胞的敏感性^[41]。但试验证明 PEDV 能够感染敲除 pAPN 的猪^[42]。进一步的证据表明，猪感染 PEDV 不需要功能受体 APN^[43]。已经发现许多冠状病毒通过其 S1 结构域与唾液酸聚糖结合，PEDV 也同样存在这种情况^[44]。此外，宿主蛋白 ATP1A1 可能作为 PEDV 的功能性受体，在感染的初始阶段与 PEDV S1 蛋白在 PEDV 附着和共定位中发挥作用^[45]。PEDV S 可能是 PEDV 诱导细胞凋亡的关键基因^[46]。

S2 亚基与病毒与宿主细胞膜融合有关，其在 C 端包含一个融合肽 (FP, 891~908 aa)、两个七肽重复区 HR1 (978~1117 aa) 和 HR2 (1274~1313 aa)、一个跨膜区 (TM, 1328~1350 aa) 和一个胞质结构域 (CP, 1351~1386 aa)^[47]。研究发现，S2 蛋白具有中和表位，表位的核心序列位于第 1261 和第 1337 氨基酸之间^[48]。现有证据表明，PEDV DR13att 毒株的 S 蛋白发生了 3 个氨基酸突变，即 A605E、E633Q 和 R891G，使减毒的 PEDV 毒株 DR13 (DR13att) 与亲本毒株 DR13 (DR13par) 相比，能够更高效地感染 Vero 细胞。并且能通过影响 S2 的裂解位点和 RBD 结构来改变 PEDV 的嗜性^[49]。Tan 等通过比较两株 PEDV，即胰蛋白酶增强株 YN200 和不依赖胰蛋白酶的株 DR13，验证了 S 蛋白的依赖特性。与 DR13 相比，YN200 的 S 蛋白具有更强的诱导合胞体形成和被胰蛋白酶切割的能力^[50]。

此外，PEDV 与宿主的相互作用很大程度上受 PEDV S 的影响。Zhou 等人 在研究中发现，宿主膜蛋白 HSPA5 能够通过其 N 端结构域与 PEDV S 蛋白相互作用，从而控制 PEDV 的附着，并在 PEDV 的内化过程中发挥作用^[51]。PEDV S 在其细胞质尾部 (CT) 包含两个邻近的基序：一个基于酪氨酸的基序 YxxΦ (x 是任何残基，Φ 是一个庞大的疏水残基：F, M, I, L 或 V)，以及一个内质网 (ers) 的 ER 检索信号 KVHVQ，它可能调节内质网 (ER)-高尔基中间区室 (ERGIC) 或细胞表面上 PEDV S 的数量^[52]。YxxØ 基序和 ERRS 可以帮助 S 蛋白迁移到内质网和高尔基体组装成熟的病毒颗粒^[53]。

综上所述，S 蛋白的功能十分的丰富，且是病毒变异的多发生区域，通过

反向遗传技术寻找好的位点进行突变，是研究疫苗的好方向，制备出具有中和效果的单抗对于抗病毒药物的研制也是很好选择。

1.2.3.2 E 蛋白

包膜蛋白 E 蛋白在 PEDV 的结构蛋白中属于最小的结构蛋白，大小在 7 kDa 左右，且高度保守，分布在病毒囊膜的表面^[54]，具有很强的疏水性。E 蛋白的结构包括三个部分：一个短的 N 端亲水性区、一个长度约为 25 氨基酸的 α 螺旋结构的疏水跨膜区和长 C 端结构域^[55]。在 E 蛋白和 M 蛋白的相互作用下，使 S 蛋白顺利到达病毒组装位点，并诱导 S 蛋白 N-糖基化的特异性成熟，保证了病毒组装的顺利进行^[56]。

同时，E 蛋白还可以影响病毒的毒力。Li 等人发现 E 蛋白为 PEDV 的毒力因子^[57]。在 E 蛋白(E Δ aa23~aa29)中缺失一个 7 个氨基酸区域可能是开发 PED 减毒活疫苗的一种方法。E 蛋白还可以作为一种诊断标记物，从而帮助新的血清学检测方法的建^[58]。

1.2.3.3 M 蛋白

膜蛋白 M 蛋白由 227 个氨基酸组成，是一种分布于 PEDV 病毒囊膜中的必需膜糖蛋白，含量非常丰富^[59]。在不同 PEDV 毒株中通过观察发现 M 基因高度保守，这使其作为 PEDV 检测方法的应用方面提供了可行性，例如 ELISA，RT-qPCR 和 RT-PCR^[60]。M 蛋白是病毒感染、复制和组装过程中必不可少的结构蛋白。M 蛋白可以激活宿主免疫反应，虽然这些功能背后的确切机制以及 M 蛋白是否为毒力基因仍未完全了解。PEDV M 蛋白被认为是一种干扰素拮抗剂^[61]。此外，M 蛋白直接与 HSP70 相互作用，从而促进 PEDV 复制^[62]。

1.2.3.4 N 蛋白

N 蛋白是高度保守的衣壳蛋白，相对分子量约为 56 kDa^[63]。N 蛋白可以控制病毒 RNA 合成，将病毒 RNA 包装到核衣壳中，以及组装病毒颗粒。

PEDV 的 N 蛋白有三个保守的结构域：N 端结构域（NTD）、连接子区（LKR）和 C 端结构域（CTD），另外还在两端存在一个内在无序区（IDR）^[64]。N 蛋白在 PEDV 感染的所有阶段都高度表达。因此，鉴定 N 蛋白可以评估 PEDV 的复制，从而有助于早期发现 PEDV 感染。然而，N 蛋白可以与 NPM1 相互作用，抑制其蛋白水解裂解，提高细胞存活率，最终促进 PEDV 复制^[65]。它还可以与 M 蛋白结合，促进病毒颗粒的组装^[66]。

1.2.3.5 辅助蛋白

PEDV 的辅助蛋白 ORF3 位于 S 蛋白和 E 蛋白之间，它由 224 个氨基酸组成，其不存在与成熟的 PEDV 病毒粒子中^[67]。研究显示 ORF3 截短后的重组 PEDV 对致病性强弱影响不明显，表明 ORF3 也许并不是 PEDV 体外繁殖所必需的蛋白^[68]。除了影响 PEDV 毒力外，ORF3 蛋白在细胞过程中也具有多种功能，在病毒感染期间，全长和自然截短的 ORF3 蛋白与 S 蛋白之间存在潜在的相互作用，表明 ORF3 蛋白可能潜在地支持 S 蛋白与细胞受体结合，从而增强病毒在细胞中的感染^[69]。ORF3 蛋白参与 PEDV 免疫逃避策略，可促炎因子 (IL-6) 的产生，对凋亡没有作用^[70]，使 PEDV 能够逃避先天免疫应答^[71]。

1.2.3.6 非结构蛋白

Nsp1 蛋白包含 110 个氨基酸，保守的疏水氨基酸序列在保持蛋白质结构中起着至关重要的作用，同时作为 IFN 拮抗剂，促进病毒复制，抑制促炎细胞因子的产生，抑制 NF- κ B 活性^[72]。

Nsp2 蛋白主要的作用是促进 PEDV 的复制^[73]。非结构蛋白参与许多细胞功能，包括细胞的迁移和分化以及细胞的凋亡，这也预示了 nsp2 可能参与这些细胞进程^[74]。

Nsp3 蛋白是 PEDV 编码的最大的跨膜蛋白，也是 PEDV 在复制的过程中出现的多结构域蛋白^[75]。PLP2 可以调节 RIG-I 的去泛素化，从而抑制 I 型 IFN 的表达^[76]。nsp3 因为是支架蛋白可以与自身或其它病毒以及宿主蛋白结合 (nsp3、nsp4 和 nsp6)^[77]。

Nsp4 蛋白可以与 nsp3 和 nsp6 蛋白共同诱导 DMV 的形成^[78], 促进 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2、CCL5 和 CXCL8 等促炎细胞因子和趋化因子的表达^[79]。

Nsp5 蛋白也被称为 3C 样蛋白酶(3CLpro), 负责多聚蛋白的切割^[80], 将原蛋白切割成 nsp5 和 nsp16, 导致其成熟并随后参与病毒复制的多个阶段^[81], 同时还具有抑制宿主先天性免疫反应。

Nsp6 蛋白可以通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导自噬^[82], 其他对于病毒毒力等方面的研究仍有很大探索空间。

Nsp7 大约由 83 个氨基酸组成, 它在冠状病毒科中相对比较保守, nsp7 与 nsp8 和 nsp12 结合, 形成病毒复制和转录复合体, 对病毒复制非常的重要^[83]。除了作为稳定 nsp7 和 nsp8 复合结构的作用^[84]。nsp7 具有选择性结合 MDA5 的能力, 导致 MDA5 S828 去磷酸化受到抑制, 随后抑制 I 型 IFN 信号通路^[85]。

Nsp8 可以通过体外降低 IRF1 启动子活性来抑制 I 型和 III 型 IFN 活性免疫抑制因子的功能。然而, nsp8 引起先天免疫抑制的确切机制尚不清楚^[86]。

Nsp9 是冠状病毒复制过程中必不可少的 RNA 结合蛋白。其特征是 7 条平行的 β 链和 1 条 α 螺旋链^[87]。Liu 等人发现 nsp9 具有激活猪免疫系统的能力, 导致体液免疫的发展, 所得抗体对 PEDV 在 VERO 细胞中的增殖具有抑制作用^[88]。

Nsp10 如果发生了变异, 会使 PEDV 的复制性降低以及影响病毒的保真度^[89], 这种功能离不开 nsp10 与 nsp14 之间的相互作用^[90]。研究表明, nsp10 可上调 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 的表达, 抑制 PEDV 复制^[91]。

Nsp12 是病毒复制的关键复制酶^[92]。朱等发现 CMPK2 通过抑制 nsp12 的 RdRp 活性, 从而抑制了多种冠状病毒的复制^[93]。

Nsp13 具有结合双链 RNA (dsRNA)和双链 DNA 的能力, 对起始病毒基因的复制以及翻译非常重要^[94]。

Nsp14 具有 3'-5'外核糖核酸酶(ExoN)活性^[95], 这对冠状病毒 RNA 基因组复制的保真度至关重要, 还具有 N7-甲基转移酶(N7-MTase)活性^[96], 这对病毒转录和翻译也至关重要。Niu 等人在 nsp14-ExoN 内的关键功能位点(E191A)突

变 PEDV 后会表现出遗传不稳定性^[97]。Nsp14 可以抑制 GRP78 启动子的活性,表明 PEDV 具有通过 nsp14 拮抗内质网应激的潜力^[98]。此外,还能够抑制促炎细胞因子的表达,并阻碍 TNF- α 诱导的 p65 的磷酸化^[99]。

Nsp15 的功能是核糖核酸内切酶(EndoU),是病毒复制和逃避宿主抗病毒防御机制所必需的^[100]。Nsp15 不仅抑制 IFN- β 和 IRF3 启动子的活性,还抑制 III 型 IFN 的活性^[101]。Nsp15 可以通过破坏 IFN 应答,从而促进 PEDV 的复制^[102]。近期研究发现,nsp15 可抑制 CCL5、STAT1、IRF9 等参与免疫反应和炎症反应的基因^[103]。

Nsp16 通过逃避先天性的免疫以及确保了病毒的有效复制^[104]。nsp10 被发现可以增强 nsp16 对 IFN- β 产生的抑制作用^[105]。并且灭活 nsp16 是研发猪流行性腹泻病减毒活疫苗的一种可以尝试的方法^[106]。

1.3 PED 的防控

1.3.1 建立安全的生活环境

严格的生物安全措施对于预防和控制 PEDV 至关重要,特别是对于可能与猪接触的任何事物和人,还包括饲料的安全性以及对运输车和其他可能受污染的设备进行消毒^[107]。据报道,在 2013~2017 年期间,大多数受污染的饲料或者运输车成为了导致美国养猪场引发疫情的主要污染物^[108]。在模拟的条件下,通过被污染的个人防护设备间接传播 PEDV 的速度很快,此外,清洗暴露的皮肤区域和更换个人防护装备等生物安全措施可有效降低 PEDV 在猪群中传播的风险^[109]。粪口传播是养殖猪感染 PEDV 的主要途径。一旦 PEDV 入侵一个新的养猪场,就会发生永久的循环,会导致各种基础设置的污染。因此,尤其对于 PEDV 阳性猪场,应特别注意粪便处理,如粪便堆积、发酵或消毒,禁止人员在不同猪舍内互动和交叉使用工具。虽然我国一些大型养猪场已经实施了粪便处理和消毒的基本准则,但许多小型养猪场缺乏生物安全保障,粪便经常被忽视为主要感染源。此外,猪舍应配备空气净化设备,因为目前的研究证实,雾化的 PEDV 颗粒可以通过气溶胶传播^[110]。

1.3.2 合理的免疫

母猪乳汁中 PEDV 特异性 sIgA 抗体的水平是决定其后代是否能够通过被动免疫避免 PEDV 感染的关键因素^[111]。sIgA 抗体能高效中和肠黏膜中的 PEDV，且对蛋白水解酶具有抗性^[112]。因此，减少易感仔猪死亡和控制 PED 疫情的关键是对妊娠母猪进行合理免疫接种^[113]。研究表明，基于 PEDV CV777 株的 PEDV 灭活疫苗在预防中国流行的 PEDV 变异体感染方面效果较差^[114]。由于接种过 PEDV 灭活疫苗的仔猪产生的抗体不足，因此初免和加强免时肌肉接种 PEDV 疫苗只能部分保护仔猪免受 PEDV 感染^[115]。目前，由于中国没有基于 PEDV GII 毒株获得许可的减毒疫苗，因此只能使用 GII 灭活疫苗进行疫苗接种。

反饲喂养是将感染 PEDV 的仔猪肠道或粪便研磨等处理后喂给妊娠母猪，通过肠道-乳腺-sIgA 这一系列反应来刺激母猪的乳原免疫，为仔猪提供被动免疫以抵抗 PEDV 感染。美国在 PEDV 入侵的早期阶段，在没有 PEDV 疫苗的情况下，通过反饲喂养对母猪进行了全群免疫，在一定程度上控制了 PEDV 传播，仔猪存活率提高了 33%，腹泻率降低了 57%。目前，我国的一些养猪场也实施了反饲喂养，作为降低 PEDV 患病率的一种方法。首先，PEDV 在养猪场持续存在，随着母源抗体水平的下降，PEDV 将会不间断复发，并可能传播到其他地区或邻近的猪场。其次，存在将其他病原体引入猪场的风险，例如非洲猪瘟病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒。因此，从安全的角度来看，在我国使用灭活疫苗比使用反饲喂养更实际，小型养猪场和养殖户缺乏足够的生物安全性，反饲喂养更会大大增加了 PEDV 传播的风险。

1.3.3 及时的检测

目前中国 PED 的病原体比较复杂，临床上无法区分 TGEV、PoRV、PDCoV、SADS-CoV 或 PEDV 的感染或合并感染。一旦猪场爆发 PED，准确的病原体检测对于控制病情传播的措施至关重要。对 PEDV 阳性猪场，应对产前母猪、产房、饲料、水、设备等进行检测，一旦发现 PEDV 阳性母猪，应进行隔离和紧急免疫，并及时对阳性污染物进行消毒^[116]。此外，抗体水平的监

测也非常关键，特别是及时检测抗体水平，包括疫苗接种后血清中 PEDV 特异性 sIgA 和中和抗体。虽然这些工作很耗时，但对疫苗免疫效果的评价和疫苗接种计划的制定非常重要。

1.4 PED 的临床症状与病理变化

不同日龄的猪均可感染猪流行性腹泻病毒，但是病情的轻重与日龄的大小为负相关，即日龄越大症状越轻，日龄越小的猪症状会更严重。猪只感染 PEDV 后总体的症状为持续性腹泻，厌食呕吐和脱水，3 日龄内的猪感染后，可发生食欲废绝，不吃奶，死亡率可达 100%，即使没有死亡，也会变成僵猪，需及时淘汰。3-7 日龄仔猪感染后死亡率虽然降低，但是恢复后大多数会表现出生长发育不良。育肥猪只在感染一周后会逐渐恢复，死亡率很低，同时也会引起发育缓慢的问题。但是母猪感染后，一般会出现厌食，反应迟钝，精神萎靡不振等，一般不会出现腹泻。

对于病理变化方面，患病仔猪剖检后发现肠壁薄而透明，腔内聚集大量黄色液体，感染仔猪的胃部膨大且充满凝乳，对肠道组织进行切片观察，发现小肠绒毛萎缩和脱落^[117]。

1.5 PEDV 的诊断方法研究进展

1.5.1 酶联免疫吸附实验

在售的商业化 PEDV 酶联免疫吸附法（ELISA），用于检测血清、乳汁、粪便等。现在，间接 ELISA 使用重组表达和纯化的 PEDV 蛋白进行抗原的包被，缺点是制备的蛋白可能不会发生正确的蛋白质折叠，这会降低 ELISA 诊断的敏感性和特异性。抗原的精确折叠对血清学检测至关重要。因此，哺乳动物蛋白表达系统最近被用于生产具有适当构象结构的 PEDV 蛋白^[118]。在阻断 ELISA 检测时，血清中存在的抗体与特异性多克隆或单克隆抗体竞争，阻止它们与固定在板上的抗原结合，导致所测的信号与样品中抗体的数量成反比。这种 ELISA 检测方法已被证实比间接检测更具特异性^[119]。双抗

夹心 ELISA 检测方法用于早期检测粪便样本中的 PEDV 抗原^[120]，所采用三明治夹心方法克服了与交叉反应性相关的大多数问题，因为它采用了两种抗体，每种抗体针对不同的表位区域。在这种 ELISA 检测方法中，ELISA 板被 PEDV S、M 或 N 蛋白特异性的捕获抗体包被，在与样品孵育后，病毒抗原与捕获抗体结合，再加上一个识别不同区域的酶标抗体再进行显色，有颜色表示抗原存在，没有颜色表示不含有抗原。使用粪便样本比使用血液样本的优点，包括容易收集不需要伤害动物。另一方面，缺点包括低病毒浓度和非特异性反应的发生，粪便样本在猪流行性腹泻过程中并不能持续监测，在 PEDV 感染的急性期可以用于检测抗原，但在潜伏期和恢复期可能会很难检测到。因此，在出现临床症状后应立即采集标本进行检测^[121]。

1.5.2 逆转录 PCR 和实时荧光定量 PCR

聚合酶链反应是分子生物学最伟大的进步之一。基于 PCR 的方法的一个实际优势是可以检测不同的生物样本，如直肠拭子、粪便、口腔液和肠道样本，并在所有这些样本中保持合理的灵敏度和特异性^[122]。链式反应利用多个逐步温度循环和耐热性 DNA 聚合酶来扩增特定的 DNA 片段；因此，对于病毒 RNA 的检测，需要一个初步步骤，即使用逆转录酶将 RNA 转化为 cDNA。多重 RT-PCR 可以在一个反应管中使用多个特定的引物扩增多个目标片段。多重 RT-PCR 是兽医诊断实验室常用的鉴别检测相关的多种病原体，特别是引起症状相似疾病的病原体的方法。多重 RT-PCR 已经被开发出来，用于将 PEDV 与其他猪病毒区分开来^[123]。在 RT-PCR 中，DNA 产物通过琼脂糖凝胶电泳，显示预期 DNA 条带的存在。使用这种技术，只能获得半定量的结果。此外，当样品含有低浓度的 DNA 时，这种方法可能会失败。RT-qPCR 检测目前受到青睐，因为它们比标准 RT-PCR 更敏感、更快、更容易执行，并且可以提供定量检测。在使用临床样本或实验感染猪的样本对其敏感性和特异性进行了满意的评估后，世界各地的研究人员发表了许多 RT-qPCR 检测方案，用于 PEDV 的特异性检测^[124]。RT-qPCR 方法的主要优点是高灵敏度、高通量和过程自动化、病毒载量的定量以及同时识别和区分不同猪病原体。多重 PCR 检测中存在多个引物对可能导致非特异性产物的形成。因此，需要特别注意设计特异性

的引物和探针^[125]。特别要注意的是，引物对不能互补。为了阻断非特异性引物，一种新型的双引物寡核苷酸(DPO)系统最近被用于多重 RT-PCR^[126]。由于冠状病毒进化迅速，选择最合适的引物对至关重要。在实验设计时需要更新 PEDV 序列信息，以确定在设计时为病毒序列设计的引物和探针是否适合检测新的病毒株。

1.5.3 环介导等温扩增实验

近年来，各种等温核酸扩增技术被开发出来，以改进传统的 PCR 方法。LAMP 是一种简单、有效和快速的检测方法，可以替代传统的或实时的 PCR。该方法不需要昂贵的设备，只需水浴锅或金属浴，整个过程可在 60 min 内完成，LAMP 检测的应用可能会降低冠状病毒检测的成本，这种检测方法的另一个推荐原因是，与标准 PCR 测定法相比，它们扩增的 DNA 量更高。许多基于 LAMP 的检测方法已被开发并应用于 PEDV 的检测。这些试验的扩增产物可以作为焦磷酸镁或荧光染料的沉淀来检测，并且肉眼可见，提供快速的定性结果。LAMP 溶液中 Mg^{2+} 浓度的降低导致 HNB 溶液的颜色从紫色变为天蓝色，从而提供了直接视觉检测的手段。该方法有望在现场的常规应用中得到应用。该方法的缺点是当被测样品中模板含量较低时，难以区分阳性和阴性样品的颜色变化^[127]。

1.5.4 CRISPR-Cas 技术

CRISPR-Cas 是一种核酸检测技术，它允许使用 Cas12 和 cas13 蛋白添加、删除或修饰基因组中的特定序列，通过将 Cas 蛋白与 PCR、RPA 或 LAMP 等前扩增步骤和单链 DNA 荧光猝灭(ssDNA-FQ)报告基因相结合，各种生物传感平台已经开发出来。该系统在整合新型、准确、快速、便捷的分子诊断方法方面显示出巨大的潜力^[128]。Yang 等人首先将 RT-ERA 技术与 Cas12a 结合^[129]。该试验的总检测时间约为 30 分钟，结果在蓝色 LED 灯下可见。该方法灵敏，能够检测基因组 DNA 的两个拷贝，并且具有特异性，与其他猪病毒没有交叉反应。Liu 等建立了基于 CRISPR-Cas12a 和多重 RT-LAMP 的多重核酸检测方法，用于检测 PEDV、TGEV、PDCoV 四种猪腹泻冠状病毒和

SADS-CoV。这种新开发的检测方法实现了单拷贝灵敏度，没有交叉反应性。使用 ROX 标记的 ssDNA-FQ 报告基因，结果肉眼可见^[130]。

1.5.5 多重平面免疫分析法

这是一种类似 ELISA 的多重平面免疫分析法(AgroDiag PorCoV)，该方法将 PEDV 特异性重组 S1 蛋白打印在微孔板底部的一系列斑点上，用于同时检测和鉴别单个样品中的 PEDV、TGEV 和 PDCoV，该技术和工作原理与酶联免疫吸附试验相似。反应可见为蓝色斑点，其强度与阵列中特定病毒抗原目标的抗体水平成正相关，PEDV 的总诊断灵敏度为 92%，TGEV 为 100%，PDCoV 为 98%，而每个抗原靶点的诊断特异性为 100%，表明该方法是 PEDV、TGEV 和 PDCoV 鉴别检测和血清诊断的有效可靠的方法^[131]。

1.5.6 免疫层析法

免疫层析(IC)试验，也称为侧流试验，是一种使用简单、快速的免疫测定方法，无需专业设备或合格人员，几分钟内即可读取结果。IC 测定法也非常稳定，生产成本相对较低。因此，该方法目前被广泛用于现场监测 PEDV 感染的筛选试验。两种最常见的 IC 检测形式是双抗体夹心检测和竞争性检测。竞争性分析最适合检测低分子量样品，如抗体，而双抗体夹心分析更适合检测高分子量病原体和病毒等目标分析物^[132]。因此，用于猪粪便中 PEDV 抗原检测的 IC 方法采用双抗体夹心格式^[133]。IC 也称为胶体金，金纳米颗粒是目前 IC 分析中最广泛使用的标签，因为它们价格低廉，易于制备，具有强烈的颜色，并且可以通过肉眼感知。然而，利用胶体金的 IC 法检测 PEDV N 蛋白的灵敏度比实时 RT-PCR 或 rRT-PCR 法低 10 倍。最近，一种新的基于纸张的横向流动免疫测定方法，利用色彩丰富的乳胶珠作为标签，用于检测猪粪便样本中的 PEDV^[134]，与其他相关猪病毒无交叉反应，特异性为 100%。此外，该检测结果与 RT-PCR 结果吻合良好（92.59%），比先前报道的荧光和胶体金 IC 检测更准确。IC 检测的缺点是不定量的，不适合大规模筛选。

1.6 单克隆抗体在检测 PEDV 中的应用

单克隆抗体是由 B 细胞分泌的只针对一种特定抗原表位的抗体。含有这种特性的单个杂交瘤细胞扩繁起来的细胞群落，即可分泌较多的针对于一种特定的抗原表位的特异性单克隆抗体。

用于 PEDV 抗体检测的 ELISA 主要以结构蛋白（S、M、N 和 E）为抗原。市售 ELISA 主要使用核衣壳蛋白，因为它是表达最丰富的蛋白，是早期诊断 PEDV 最合适的抗原^[135]。在大肠杆菌表达系统中，N 蛋白的表达量也高于 S 蛋白的表达量。但是，N 蛋白和 M 蛋白与其他猪冠状病毒如猪传染性胃肠炎病毒和猪呼吸道冠状病毒产生的抗体发生非特异性反应^[136]。为了解决这个问题，开发了截短表达 PEDV N 蛋白和 PEDV M 蛋白的方法^[137]。在检测中使用截短的蛋白抗原，PEDV 和 TGEV 之间未观察到交叉反应，这表明它们可以用于制备特异性检测 PEDV 实验方法。S 蛋白的免疫原性明显高于 N 蛋白，因此基于刺突的 ELISA 比核衣壳蛋白的 ELISA 检测方法更具有敏感性和特异性^[138]。

与 N 蛋白相反，S 蛋白是检测抗体的好选择^[139]。刺突蛋白被认为是抗原性最强的 PEDV 蛋白。PEDV S 蛋白上的许多中和性表位已被鉴定，包括 S1A-3（252~263 aa）^[140]，E（499~638 aa）^[141]、S1D（636~789 aa）^[142]和 2C10（1368~1374 aa）^[143]，刺突蛋白羧基末端的 S10、S1B 亚区以及 1368GPRLQPY1374 氨基酸序列也被认为具有中和性表位^[144]。其他 B 细胞表位 592TSLLASACTIDLFGYP607、SS2（748YSNIGVCK755）^[145]和 SE16（722SSTFNSTREL731）^[146]、被鉴定为线性表位，可用于开发 PEDV 检测方法。大多数中和性表位位于 S1 区，因此，该区域是构建 PEDV 诊断的主要目标^[147]。然而，全长的 S 蛋白很难重组表达出来，因此，研究者倾向于只使用 S1 蛋白而不使用全长 S 糖蛋白^[148]。此外，Chang 等人的研究表明，基于 S1 蛋白的 ELISA 比基于全长 S 蛋白的 ELISA 具有更高的灵敏度和特异性^[149]。使用该区域的缺点是，与本身具有多样性的全长 S 蛋白相比，它具有特别高的遗传多样性。因此，使用 S1 蛋白的 ELISA 试验，不一定会检测到针对所有 PEDV 毒株的抗体反应。

PEDV M 蛋白是一种定位于病毒表面的结构膜糖蛋白，是病毒包膜中含量

最丰富的成分。到目前为止，一个线性 b 细胞表位 195WAFYVR200 已经通过杂交瘤技术筛选出来。实现全长 M 蛋白的表达非常困难，M 蛋白的低水平表达会限制其作为 ELISA 诊断抗原的潜力^[150]。上述方法利用传统的 PEDV 制备的单克隆抗体，往往会表现出不稳定性，这会降低产品产量，制备这些抗体的另一个缺点是它们的成本比较高^[151]，所以需要引用新兴技术改变这些难题来制备出更好的蛋白与抗体。

1.7 研究的目的是和意义

自 2010 年 PEDV 变异以来，一直危害我国养殖业的发展，且危害的严重性可以和非洲猪瘟及蓝耳一起称为危害养猪业的三座大山。PEDV 的 G1 型毒株有针对 CV777 毒株的疫苗可以起到预防的作用，但是在我国普遍流行的是 G2 型毒株，使得疫苗保护效果欠佳，需要养殖场做好预防是重中之重，当 PED 发生后，初生仔猪发生严重的腹泻，不断地通过粪便散毒，死亡率极高。即使没有死亡也会成为僵猪，生长速度十分缓慢应及时淘汰。一般养殖场很难做到净化 PED，大多数养殖场会存在始终带毒的情况，因此，养殖场需要遵循更加科学的方式进行该病的防控。快速准确的诊断是防控 PED 的重要手段之一，

目前，关于检测 PEDV 的方法有多种，如 RT-PCR 和 RT-qPCR 等需要精密的仪器及专业人员，且成本高。市面上有关于 PEDV 抗体 ELISA 检测试剂盒，但猪体内抗体的产生需要一定时间，有可能错过最佳防控时间，因此，建立快速且准确的 PEDV 诊断方法势在必行。本研究利用筛选的 PEDV S1 蛋白单克隆抗体 C1A 建立了一种特异性强、重复性好、可信度高且快速的双抗体夹心 ELISA 检测方法，用于检测 PEDV，以期为临床诊断提供便利。

第二章 PEDV S1 蛋白的原核表达与纯化

S 蛋白是 PEDV 表面的纤突蛋白，在 PEDV 入侵时与细胞受体互相作用，使动物产生免疫反应，是检测病毒和研发疫苗的关键靶点。此外，PEDV S 的蛋白位于病毒表面，可以更好的同抗体结合，以此蛋白为基础建立的 ELISA 方法既可以检测游离蛋白也可以检测完整的病毒粒子。本研究选择 PEDV S1 蛋白作为靶点进行原核表达。通过基因合成、PCR 扩增和双酶切技术，成功构建了含 S1 基因的载体，经转化诱导表达，获得了能表达 PEDV S1 蛋白的菌株，对表达的蛋白进行纯化、透析和浓缩后，成功获得了纯度较高的 PEDV S1 蛋白。为后续单克隆抗体的制备提供了试验原材料。

2.1 试验材料

2.1.1 细菌和载体

E.Coli DH5 α 感受态细胞购自擎科生物科技股份有限公司，*E.Coli* BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司。pET-28a 空载菌液由本实验室保存，pGEX-6p-2-S1 优化由苏州鸿讯生物科技股份有限公司合成。

2.1.2 主要试剂与仪器

ClonExpress II One Step Cloning Kit 和 2 $\times$ Phanta Flash Master Mix 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，内切酶 *Xho* I 和 *Nco* I 均购自 Takara 公司，核酸 Marker、蛋白 Marker 均购自擎科生物科技股份有限公司，蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司，Ni-NTA 购自北京全式金生物科技股份有限公司，SDS、APS、Tris、尿素 (Urea) 和甘氨酸购自北京索莱宝科技有限公司，蛋白电泳仪和凝胶成像仪均购自 Bio-Rad 公司。

2.2 试验方法

2.2.1 重组质粒构建

2.2.1.1 PEDV S1 基因的扩增与 pET-28a 载体酶切

(1) 根据鸿讯生物公司优化的 S1 基因设计引物，如表 2.1 所示，引物序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表 2.1 PCR 引物
Table 2.1 PCR primers

基因名称	引物名称	引物序列	酶切位点
PEDV S1	S1-F	TAAGAAGGAGATATACCATGGCGCCGCAA GACGTTACCCGTTGTAGCG	<i>Nco</i> I
PEDV S1	S1-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAGGCCG GTAAAGTTAATGGTAACCGCG	<i>Xho</i> I

注：下划线部分为酶切位点。

(2) 而后使用引物扩增 pGEX-6P-2-S1 优化质粒扩增出 PEDV S1 片段，PCR 扩增体系和扩增程序如下（见表 2.2 和表 2.3）

表 2.2 PCR 扩增体系
Table 2.2 PCR amplification system

试剂	体积
2xPhanta Max Master Mix	25 μ L
S1-F	1.5 μ L
S1-R	1.5 μ L
质粒	2 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

表 2.3 PCR 扩增程序
Table 2.3 PCR amplification procedures

	温度	时间	循环
预变性	95°C	3 min	1X
变性	95°C	15 s	
退火	56°C	15 s	30X
延伸	72°C	1 min	
终延伸	72°C	5 min	1X

(3) pET-28a 载体进行双酶切，体系如表 2.4 所示。

表 2.4 双酶切体系

Table 2.4 Double digestion system

试剂	体积
pET-28a	1000 ng
<i>Nco</i> I	1 μ L
<i>Xho</i> I	1 μ L
10 $\times$ k Buffer	5 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

2.2.1.2 pET-28a-S1 重组表达载体的构建

将回收的产物通过同源重组酶进行连接，反应条件为 37°C，30 min，而后 4°C 保存。连接体系如表 2.5 所示。

表 2.5 同源重组体系

Table 2.5 Homologous recombination system

试剂	体积
酶切 pET-28a	100 ng
S1 片段	50 ng
5 $\times$ CE II Buffer	4 μ L
Exnase II	2 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L

接着将连接好的载体按照转化说明书转化至 *E.Coli* DH5 α 感受态细胞中。

长菌后，挑取 5 个单菌落进行扩大培养，浑浊后通过 S1 扩增引物进行确认是否连接成功，将鉴定正确的菌液送擎科生物科技有限公司进行测序。

2.2.2 S1 蛋白诱导表达

将测序正确的 pET-28a-S1 质粒按照说明书阳转到 *E.Coli* BL21 (DE3) 中。长菌后挑取单菌落与 1.5 mL 离心管中摇菌，浑浊后按照 1:100 接入 10 mL 卡纳抗性培养基中摇菌，约 3 h 后，当 OD_{600nm} 值在 0.6~0.8 之间时，加入 10 μ L 的 IPTG 进行诱导。结束后，进行超声处理，收集上清和沉淀，沉淀使用 10 mL 的 8 M Urea 室温溶解 3 h，之后处理样品，进行 SDS-PAGE 鉴定是否表达成功及可溶性情况。

2.2.3 PEDV S1 蛋白纯化

按照上述方法大量诱导，取超声后细菌沉淀与 8 M Urea 在 4°C 条件下溶解过夜，次日对变性的蛋白使用 0.45 μ m 的滤膜进行过滤，过滤后与 Ni-NTA 在

4°C条件下进行孵育 8 h，之后进行镍柱纯化。具体操作步骤如下：

a.装柱：在纯化管中加入柱体积为 2 mL 的 Ni-NTA 树脂，首先使用 10 mL 蒸馏水清洗柱子一次，然后再用 10 mL 平衡液（8M Urea，10mM NaH₂PO₄，10mM Tris base，pH=8.6）对柱子进行平衡两次；

b.上样：蛋白样品在上样时需要用 0.45 μm 的滤器进行过滤，而后与镍柱混匀，装至 50 mL 离心管 4°C孵育过夜，8 h 后进行纯化，收集样品各梯度的洗脱液，最后使用 10 mL 平衡液冲洗柱子 2 次，再向镍柱中加入 20%乙醇 8 mL，4°C保存；

c.洗脱蛋白：使用上述的平衡液配置不同浓度咪唑（10 mM，50 mM，100 mM，250 mM，500 mM，1 M 和 2 M）对蛋白样品进行洗脱，每次洗脱的量为 10 mL，收集好洗脱液；

d.SDS-PAGE 鉴定：将洗脱样品处理后跑 SDS-PAGE，确定蛋白的最佳洗脱浓度。

e.蛋白透析：将洗脱后条带单一的蛋白进行梯度透析，设置平衡缓冲液的透析梯度为（6 M Urea，5 M Urea，4 M Urea，3.5 M Urea），每种透析平衡缓冲液的透析条件为 4°C，6 h。

2.2.4 PEDV S1 蛋白浓缩与蛋白浓度测定

由于透析结束后蛋白的浓度可能会偏低，免疫小鼠需要蛋白浓度高一些，以避免对小鼠的刺激过强，这时需要对蛋白浓度进行测定，并根据蛋白浓度进行浓缩，浓缩时使用蛋白浓缩柱，条件为 4°C，4000rpm，当从 10mL 浓缩至 2mL 时，按照蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。

2.3 结果

2.3.1 pET-28a-S1 质粒的构建和菌液 PCR 鉴定

PCR 扩增 S1 基因经过 1%琼脂糖凝胶电泳，与预期大小相符（图 2.1A 所示）。将 pET-28a 载体双酶切后，经过 1%琼脂糖凝胶电泳，与预期大小相符（图 2.1B 所示）。

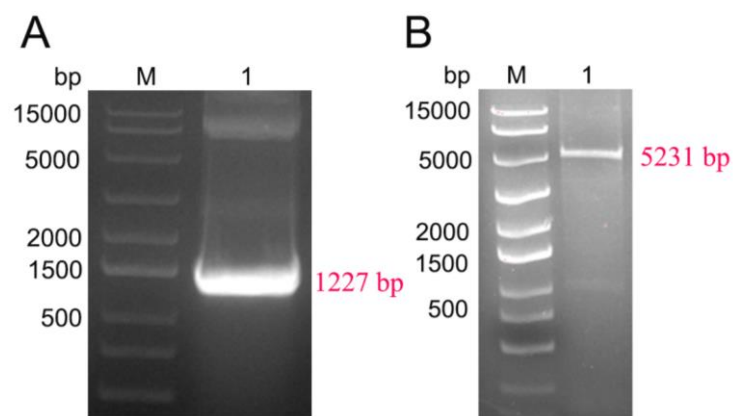


图 2.1 PEDV S1 基因扩增结果和 pET-28a 载体双酶切结果

Figure 2.1 The result of Amplification of PEDV S1 gene and the result of double digestion of pET-28a vector

A.PEDV S1 PCR 扩增结果：（M.250 bp DNA Ladder 相对分子质量标准；1. PEDV S1）

B.pET-28a 双酶切结果：（M.250 bp DNA Ladder 相对分子质量标准；1. pET-28a 双酶切）

A.PEDV S1 PCR amplification results: (M.250 bp DNA Ladder relative molecular mass standard; 1. PEDV S1) B.pET-28a double digestion results: (M.250 bp DNA Ladder relative molecular mass standard;1. pET-28a double digestion)

所扩增的 5 个单菌落全部为阳性（如图 2.2 所示，其中 1~5 号为挑取的单菌落，6 号为阴性对照，7 号为阳性对照），送擎科科技有限公司测序同样正确。

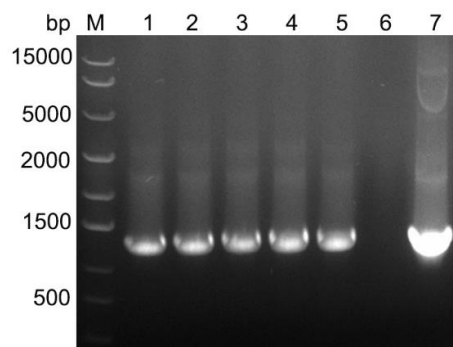


图 2.2 菌液 PCR 鉴定

Figure 2.2 Bacterial solution was identified by PCR

M.250 bp DNA Ladder 相对分子质量标准；1~5.挑取的单菌落；6.阴性对照；7.阳性对照。

M.250 bp DNA Ladder relative molecular mass standard;1~5.Single colony picked;6.Negative control;7.Positive control.

2.3.2 PEDV S1 蛋白诱导表达 SDS-PAGE 分析

将 pET-28a-S1 质粒转化表达感受态中。通过诱导表达，SDS-PAGE 鉴

定,如图 2.3 所示,在 43 kDa 处可见表达的 S1 蛋白,与预期蛋白大小相一致。超声后上清中无蛋白表达。用尿素溶解超声后沉淀,SDS-PAGE 鉴定结果表明 S1 蛋白存在沉淀中。这些结果表明,PEDV S1 蛋白成功表达,并以包涵体的形式存在。

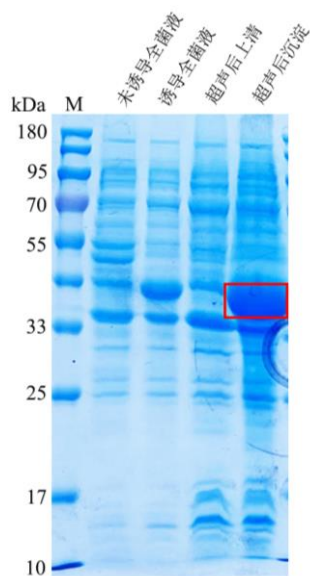


图 2.3 SDS-PAGE 分析 PEDV S1 诱导表达结果

Figure 2.3 The result of analysis of PEDV S1-induced expression by SDS-PAGE

2.3.3 PEDV S1 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析

上述试验表明 PEDV S1 成功表达,但以包涵体形式存在,且杂蛋白较多。为获得较纯蛋白,用镍柱对表达的蛋白进行纯,如图 2.4 所示,其中 1~9 分别代表了流出液、洗杂液、10 mM 咪唑、50 mM 咪唑、100 mM 咪唑、250 mM 咪唑、500 mM 咪唑、1 M 咪唑和 2 M 咪唑。不同浓度的咪唑洗脱液均有条带,但在 100 mM 与 250 mM 条件下条带较粗,表明洗脱 S1 蛋白的最佳洗脱浓度为 100 mM 与 250 mM 的平衡缓冲液,为节约试剂和降低成本,后续纯化用 100 mM 的咪唑。

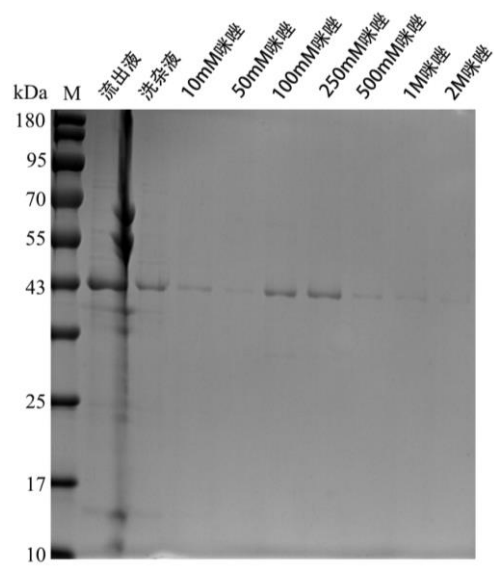


图 2.4 PEDV S1 蛋白纯化

Figure 2.4 PEDV S1 protein purification

2.3.4 蛋白浓缩和蛋白浓度曲线

通过上一步骤获得了纯度较高的 PEDV S1 蛋白，但蛋白浓度较低。为获得浓度较高的蛋白，使用超速离心管进行浓缩，通过蛋白浓度试剂盒绘制蛋白浓度的标准曲（图 2.5 B），根据曲线拟合的公式计算 PEDV S1 蛋白的浓度。如图 2.4 所示，获得纯度良好的 PEDV S1 蛋白（图 2.5 A），测得蛋白浓度为 0.5 mg/mL，可进行后续免疫小鼠试验。

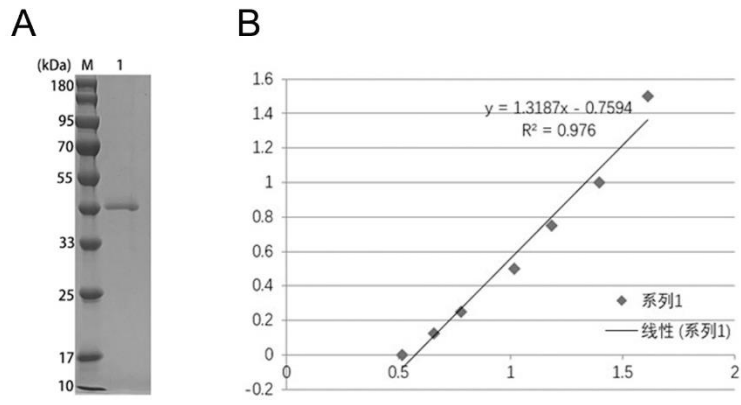


图 2.5 PEDV S1 蛋白浓缩结果及浓度测定标准曲

Figure 2.5 The result of concentration of PEDV S1 protein and the standard curve of the determination of protein concentration

A: PEDV S1 蛋白浓缩结果; B: 蛋白浓度测定标准曲

A: The result of concentration of PEDV S1 protein; B: The standard curve of the determination of protein concentration

2.4 讨论

PEDV S 蛋白是 I 类跨膜蛋白。S1 蛋白（499~638 aa）是产生中和抗体的关键抗原表位^[152]；S1 蛋白的（697~771 aa）含有 3 个线性抗原表位^[153]，S1 蛋白具有多个抗原表位^[154]，免疫原性强，是生产疫苗和建立方法的理想蛋白。但是 PEDV S1 蛋白很难表达。使用哺乳动物虽然能成功表达 PEDV S1 蛋白^[155]，但表达量低。大肠杆菌表达系统由于其高效表达的潜力、遗传操作的简易性和快速繁殖等特性，可在短时间内大量表达蛋白、操作简单、周期短等，已成为外源蛋白表达的首选。但原核表达系统更难直接表达出感染真核动物细胞的病毒蛋白，PEDV S1 蛋白很难应用原核表达系统表达。

为使用原核表达系统表达 PEDV S1 蛋白。本研究首先对 S1 基因进行了优化，成功将该蛋白表达。接着进行一系列条件的优化，包括温度、诱导时间、IPTG 浓度等，发现蛋白表达量并没有很大的区别，所以我认为蛋白表达最重要的一步是目的片段的选择与优化以及载体的筛选，条件优化对病毒蛋白表达量的影响可能具有蛋白特异性。

如果一次产生过多的蛋白,蛋白就会聚集，从而形成包涵体。这时需要对蛋白进行变性，使蛋白从菌体中变性出来，但是这样破坏了其构象，成为了线性表位，影响了抗原的空间结构，要对其进行复性，尽可能地使蛋白恢复空间结构，同时复性蛋白时条件的摸索有时是十分复杂的，既要尽可能的恢复蛋白的构象结构，又要避免蛋白的析出。在本研究中，利用尿素对包涵体形式的 PEDV S1 蛋白进行复性，使蛋白从线性状态恢复一定的空间结构，通过多次的尝试，最终发现，蛋白最多透析到 3.5 M Urea，更低的尿素浓度会有蛋白的析出，影响蛋白的纯化，通多低温、长时间、小梯度的透析，更有利于确保良好的抗原性。

2.5 本章小结

本章利用原核表达系统成功表达出 PEDV S1 蛋白。经过纯化、透析复性和浓缩后，获得了了纯度和浓度良好的 PEDV S1 蛋白。为后续单克隆抗体制备准备了抗原材料。

第三章 抗 PEDV S1 蛋白单克隆抗体的制备

PEDV 在 2010 年之前，通过免疫接种，可以起到很好的保护作用，但是变异毒株在中国的爆发对养猪业造成巨大的经济损失，由于没有有效疫苗的生产，疫病防控与场内监测净化是对抗病毒的有效手段，所以灵敏、特异和迅速的检测方法建立是十分必要的。

为了给这一检测方法提供原材料，本实验通过自己制备的 S1 蛋白作为抗原免疫小鼠，再通过细胞融合和亚克隆技术，获得了单克隆抗体，该单克隆抗体能够特异性识别 G1 型 PEDV 和 G2 型 PEDV。为制备 ELISA 检测试剂盒提供了原材料。

3.1 试验材料

3.1.1 试验动物、细胞和病毒

SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞、G1 型 PEDV 毒株 CH/SX/2015 (GenBank: MT783684.1)、G2 型 PEDV GX-2023 毒株 (本实验室分离)、PCV2、PRRSV、PoRV、PRV 和 VERO 细胞由本实验室保存，BALB/c 小鼠购自兰州兽医研究所实验动物中心。

3.1.2 主要试剂与仪器

三抗 (100×) 购自索莱宝生物科技有限公司；1×PBS 缓冲溶液、RPMI 1640 培养基购自上海源培生物科技股份有限公司；RNAiso Plus 和 T4 连接酶购自 Takara 公司；Protein G 纯化柱购自北京全式金生物有限公司；细胞融合剂 PEG、HTA 和 HT 均购自 Sigma 公司；5 周标准鼠单抗制备佐剂、Hybridoma Feeder 添加因子和腹水制备专用佐剂购自苏州博奥龙科技有限公司；胎牛血清 (FBS) 购自上海诺娃医药科技有限公司；生物安全柜购自苏州安泰空气技术有限公司；超微量分光光度计与超低温冰箱购自赛默飞苏州仪器有限公司；高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司。

3.2 实验方法

3.2.1 免疫小鼠与血清效价测定

将博奥龙 5 周制备抗体水佐剂与 PEDV S1 蛋白等体积混匀，无菌操作，共免疫 3 只小鼠。免疫的蛋白量为 50 μg ，选取皮下两点注射，间隔 21 d 后，进行第二次免疫。二免后 14 d 进行第三次免疫，三免后 14 d，对小鼠进行眼眶采血，方法为左手保定小鼠并控制其头部，右手使用毛细针管从后眼眶斜 45 度角刺入，轻微旋转，流血时将血液导流至 1.5 mL 离心管中，37°C 30 min，然后 3000 g/min，离心 5 min，收集上层血清，冻-20°C 冰箱备用。

通过间接 ELISA 方法测小鼠血清效价，待测血清进行倍比稀释（1:1000、1:2000，1:4000，1:8000，1:16000，1:32000，1:64000 和 1:128000）共 8 个梯度，最后置酶标仪上读取 OD_{450nm} 值。

3.2.2 细胞融合

3.2.2.1 复苏 SP2/0 骨髓瘤细胞

从液氮中取出骨髓瘤细胞后，迅速放入 37°C 水浴锅中进行解冻，然后加入 T25 细胞培养瓶。加入含有 20% FBS 的 RPMI 164 置细胞培养箱培养，过程需轻柔，因为骨髓瘤细胞贴壁不牢固，当细胞长至瓶子底部 80% 时进行轻拍瓶底，细胞脱落后进行传代，在细胞融合前需要两瓶长满的 T75 进行细胞融合，多余的骨髓瘤细胞进行冻存。

3.2.2.2 小鼠脾细胞的准备

将加强免疫小鼠进行处死，放 75% 酒精中浸泡 5 min。然后将小鼠转移至生物安全柜中，用针头将其四肢固定在已消毒的泡沫板上，使用手术刀在小鼠的腹部下方开一个口，接着将创口向两侧延伸至胸腔下方；再用灭菌的镊子将小鼠皮肤直接扒开，这时可看到小鼠的脾脏，比正常小鼠脾脏将近要大两倍；使用灭菌的剪刀镊子将脾脏取出，放到含有 RPMI 1640 培养基的平皿中，尽

可能地剔除脾脏外周的结缔组织；去除干净后，再将其放入一个新的含有 RPMI 1640 培养基的平皿中冲洗两遍，再将脾脏放在研磨筛上使用研磨棒进行轻柔的研磨，期间不停的用 20 mL RPMI 1640 培养基将分离出来的脾细胞冲洗到 50 mL 离心管中备用。

3.2.2.3 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合

在融合开始之前，需要以下准备：a. 准备大约 30 mL 的 RPMI 1640 培养基，将其和 PEG 溶液提前放于细胞培养箱中预热备用。b. 将 SP20 拍打下来，收集于 50 mL 离心管中，1000 rpm，离心 5 min，再使用 RPMI 1640 培养基进行重悬，再进行离心，重复两遍备用。c 配置细胞融合使用的培养基，配比为 20%胎牛血清、10%添加因子、1×HAT、抗生素、RPMI 1640，铺 8 块细胞板，大概需要 200 mL 的融合用培养基。d. 高压一个 1L 地烧杯和一瓶 1L 的 ddH₂O 备用，目的是进行融合时能持续的保持温度，大大的提高了融合的效率。

细胞融合的过程为：

- a. 将脾细胞和 SP2/0 在离心管中混匀，1000 rpm 离心 5 min；
- b. 轻拍管底处沉淀的细胞，充分的使细胞散开，将离心管放入含有 37°C 左右温水的烧杯中，把预热的 PEG 缓慢加入，期间使用枪头轻柔搅拌，在 1 min 内加完，然后持续搅拌 2 min；
- c. 接着加入 37°C RPMI 1640 培养基 1 mL，1 min 内加完，过程中枪头搅拌混匀，然后再加入 37°C RPMI 1640 培养基 3 mL，3 min 内加完；过程中用枪头搅拌混匀；
- d. 加入 37°C RPMI 1640 培养基 10 mL 后，置细胞培养箱 5 min，再将细胞进行上述方法离心，弃上清；
- e. 将细胞使用 20 mL 融合用的培养基轻柔吹打，再将其与剩余的培养基一起混匀，再用排枪按照每孔 200 μ L 将融合细胞加到细胞板中，放细胞培养箱；
- f. 8 d 后进行半换液，将细胞板中吸出一半含 HAT 的培养基，补加含有 HT 的融合培养基，HT 培养基和 HAT 培养基的配置一样，只是更改了 HAT，

融合后 10 d 在显微镜下挑选单克隆, 在第 14 d 左右观察单克隆细胞占 96 孔细胞板孔底 50%左右即可进行检测。

3.2.3 融合细胞亚克隆及细胞冻存

当融合细胞的生长占孔一半左右时, 先对融合细胞进行换液, 2 d 后选取融合细胞数量较多的孔, 吸出 100 μL 进行检测, 细胞上清进行 1:40 稀释后, 进行间接 ELISA 实验, 方法同 3.2.1, 确定阳性孔后。再通过 IFA 试验再次确认阳性孔分泌的抗体为目标抗体, 具体步骤为: 将培养好的 VERO 细胞铺 96 孔细胞板; 然后对铺好的细胞板接入 PEDV 病毒, 待细胞出现 CPE 后; 使用 PBS 洗两遍, 再每孔加入 4%的甲醛固定液 100 μL , 室温固定 10 min, 结束后弃上清; PBS 洗两遍后进行破膜, 洗涤后 37°C封闭半小时; 洗涤后再每孔加入 100 μL 稀释的细胞上清 (细胞上清用 5%脱脂奶粉进行 1:5 稀释), 同时设置好阴阳性对照, 37°C, 1 h; 洗涤后每孔加入 100 μL 按照 1:500 稀释的 FITC 标签的山羊抗小鼠 IgG, 37°C孵育 1 h; 洗涤后加入 DAPI 进行细胞核染色。荧光显微镜下观测结果。

进行亚克隆时, 将一块 96 孔细胞板每孔加入 100 μL 20%胎牛血清的 RPMI 1640。再将上述 ELISA 和 IFA 共同鉴定为 PEDV 阳性的细胞孔使用移液器吹打混匀, 吸取 100 μL 准备的 96 孔细胞版的第一个孔中, 使用同样的方法, 继续选取 11 个阳性孔。然后使用排枪从第一排向下进行倍比稀释, 每次吹打 20 下, 结束后在显微镜下观察细胞数, 选择每孔大约有 50 到 100 个细胞的孔吸出到 6 mL 的亚克隆培养基中 (亚克隆培养基配制为 20%胎牛血清、10%添加因子、1 $\times$ HT、抗生素和 RPMI 1640)。吹打混匀后, 使用排枪加入到 96 孔细胞板前 6 排, 每孔 120 μL , 其余的 11 个孔也是按照同样的方法进行铺板。7 d 后进行补液。12 d 后换液, 14 d 按照 ELISA 和 IFA 方法继续筛选阳性孔, 亚克隆一共需要重复 3 次, 这样能够保证所筛选的杂交瘤细胞为单克隆的杂交瘤细胞。

当三次亚克隆后, 将挑选出来的阳性孔命名好, 并进行扩大培养。其中一部分准备免疫小鼠制备腹水, 其余部分进行细胞的冻存, 步骤如下: 将细胞拍落, 然后转入 15 mL 无菌离心管中, 1000 rpm 离心 5 min, 然后每瓶 T75 细胞

使用 3 mL 冻存液进行重悬，细胞冻存液的配制为：30%胎牛血清、10%DMSO 和 60%RPMI 1640，再分装至细胞冻存管，每管 1 mL，细胞冻存一段时间后要要进行复苏测试是否分泌抗体，保证细胞活性，再继续进行冻存。

3.2.4 腹水制备及单克隆抗体纯化

腹水纯化：选 4 只 10 周龄以上的 BALB/c 雌性小鼠，致敏后 12 d，使用 PBS 洗一遍；在进行离心去上清，1 mL PBS 进行重悬计数，调整稀释比例，约 1×10^6 个细胞/mL；每只小鼠腹腔注射 0.5 mL，注射时以小鼠的左侧下腹部位置进针，避开肝脏和膀胱，进针大约针尖的 1/3 左右，有刺空感，然后进行注射。前 5 d 每天观察一次小鼠状态；5 d 后，每天早晚各观察一次小鼠状态；当小鼠毛发粗糙，精神状态差，腹腔变的很大，且行动迟缓时，进行腹水的采集。采集步骤如下：对将要采集腹水的小鼠在小鼠腹部右下方斜一定角度进针，有刺空感，然后缓慢抽取腹水，打到 15 mL 离心管中，重复以上步骤，腹水采集完毕后，使用离心机 3000 rpm，离心 15 min，吸取中间层腹水，不要吸取到上层的油状物和下层的血细胞。

单克隆抗体纯化：将 Protein G 加入到纯化管中，使柱体积为约 2 mL；使用 10 倍柱体积的 PB 平衡缓冲液进行平衡柱子；将 4 mL 腹水与 16 mL PB 平衡缓冲液混匀后，再使用 0.45 μ m 的滤膜进行过滤；将过滤后的腹水稀释液在 G 柱中过两遍，每次控制流速，滴落速度为 5 s 每滴，收集流出液；再使用 PB 缓冲液洗杂；加入 9 mL 洗脱液（20 mM 柠檬酸）进行洗脱；再加入 1 mL 的中和液（1 M Tris-HCl, pH=9）；然后再纯化结束后，测量 pH 值，确保 pH 在 7~8 之间；在 PBS 中进行透析，每次 8 h，重复两次；最后测定抗体浓度，浓缩至 2 mg/mL 后分装，放-20℃冰箱保存。

3.2.5 单克隆抗体活性的验证

3.2.5.1 Western blot 验证抗体反应性

为检测所制备的抗体是否特异性结合 PEDV，将实验室保存的 PCV2、

PRRSV、PoRV、PRV、G1 型 PEDV、G2 型 PEDV 和 DMEM 一起进行处理，100 μ L 的上清中加入 25 μ L 的 5 $\times$ sample buffer，100 $^{\circ}$ C煮沸 10 min，然后等其冷却后进行 Western blot，具体操作如下：将样品加入到蛋白胶的点样孔上，每孔加样 10 μ L；先用 100 V，当 marker 的条带出现分层后，将电压转为 200 V，直到最下面的条带跑到底部，将电源关闭；将 SDS-PAGE 胶转至 PVDF 膜，再将转膜槽置冰水中降温，然后 100 V 工作 120 min；完成后进行室温封闭 1 h，然后使用 C1A 单克隆抗体室温孵育 1 h；结束后，将膜使用 PBS'T 洗四遍，每次 5 min，室温山羊抗鼠二抗孵育 1 h；洗膜后进行曝光，根据结果分析其特异性。

3.2.5.2 间接免疫荧光验证抗体反应性

将 G1 型 PEDV 和 G2 型 PEDV 接毒到 VERO，当出现 CPE 后，用 3.2.3 中的 IFA 检测方法验证抗体的活性。

3.2.6 单克隆抗体识别 PEDV S1 蛋白表位初步鉴定

将所制备的 PEDV S1 基因共进行了两次的截短，第 1 次分成了三段，第 2 次截短是将第 1 次截短确定的抗体识别区截短成四段，每次扩增出来的片段都按照 2.2.1 同源重组构建载体的方法与 pMAL-C2X 载体相连接，进行诱导表达，通过 Western blot 确定抗体的识别区域，引物序列如表 3.1 所示：

表 3.1 截短表达引物

Table 3.1 Truncated expression primers

引物名称	引物序列
L1-F	GAGGGAAGGATTTTCAGAATTCCTCCGCAAGACGTTACCCGTTGTAG
L1-R	ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAACGCTATGTTTCGCTCATATGTGC
L2-F	TCGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCATCCCGGCACATATGAGCGAAC
L2-R	AAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAAACTGGCCCAGACCGTAGATTT
L3-F	CGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCATCCCGAAAATCTACGGTCTGGG
L3-R	AACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCGGTAAAGTTAATGGTAACCGC
L2.1-F	ATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCATCCCGGCACATATGAGCGAACA
L2.1-R	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCAATTTGGTAGCGACACGGCTCC
L2.2-F	ATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCACCGACTGGAGCCGTGTCGCTA
L2.2-R	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTACGGTTGATAAGAAATACCGTCTTCG
L2.3-F	ATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCGGCGAAGACGGTATTTCTTATCAACC
L2.3-R	AAAACGACGGCCATGCCAAGCTTGCTCAGCAGAAACCAGTTGTTGAAGC
L2.4-F	ATCGAGGGAAGGATTTTCAGAATTCCTTCAGCTTCAACAACCTGGTTTCTGCT
L2.4-R	AAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTAAACTGGCCCAGACCGTAGAT

3.2.7 单克隆抗体可变区测定

从液氮中取出冻存的杂交瘤细胞，解冻后离心弃上清，根据 RNAiso Plus 说明书提取细胞 RNA，再反转录为 cDNA。

根据参考文献设计抗体可变区引物^[156]，通过套式 PCR 共进行两轮扩增，以 cDNA 为模板，扩增产物跑胶回收后；以回收产物为模板，再进行扩增第二轮，结束后跑胶回收，将回收产物与 pMD19-T 连接，转化后挑菌测序，根据测序结果进行可变区的鉴定。扩增第一轮的重链可变区引物如表 3.2 所示，扩增第一轮轻链可变区的引物如表 3.3 所示，扩增第二轮的重链和轻链可变区的引物序列如表 3.4 所示：

表 3.2 第一轮轻链可变区引物

Table 3.2 First round of light chain variable region primers

引物	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
1L-1	RGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCT	
1L-2	TGGACATGAGGGCYCCTGCTCAGT	
1L-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTGAYGGA	
1L-4	GTTGCTGCTGCTGTGGCTTACA	
1L-5	GTATCTGGTACCTGTGG	ACTGAGGCACCTCCAGATGTT
1L-6	TGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	
1L-7	GCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGC	
1L-8	TGGGTGCTGCTGCTCTGGGT	
1L-9	CAGTTCCTGTTTCTGTTARTGCTCTGG	
1L-10	TGCTCTGGTTATATGGTGCTGATGGG	

表 3.3 第一轮重链可变区引物

Table 3.3 Primers in the variable region of the first round of heavy chains

引物	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
1H-1	AGGAACTGCAGGTGTCC	
1H-2	CAGCTACAGGTGTCCACTCC	
1H-3	TGGCAGCARCAGCTACAGG	
1H-4	CTGCCTGGTGACATTCCCA	
1H-5	CCAAGCTGTGTCCTGTC	
1H-6	TTTTAAAAGGTGTCCAGKGT	AGAAGGTGTGCACACCGCTGGAC
1H-7	CCTGTCAGTAACTRCAGGTGTCC	
1H-8	TTTTAAAAGGGGTCCAGTGT	
1H-9	CGTTCCTGGTATCCTGTCT	
1H-10	ATGAAGTTGTGGYTRAACTGG	
1H-11	TGTTGGGGCTKAAGTGGG	

表 3.4 第二轮轻链重链扩增引物

Table 3.4 The second round of light chain and heavy chain amplification primers

引物	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
2-L	GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA	TGGGAAGATGGATACAGTT
2-H	GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG	GCTCAGGGAARTAGCCCTTGAC

3.2.8 单克隆抗体 C1A 亚型鉴定

使用抗体亚型检测试剂盒根据说明书对单克隆抗体进行亚型验证。

3.3 结果

3.3.1 小鼠血清效价检测

小鼠三免后 14 d 采血，血清效价利用间接 ELISA 进行检测，结果如图 3.1 所示，PEDV S 蛋白特异性抗体效价为 1:64000 以上，对 3 号小鼠在细胞融合前 3 d 进行加强免疫。

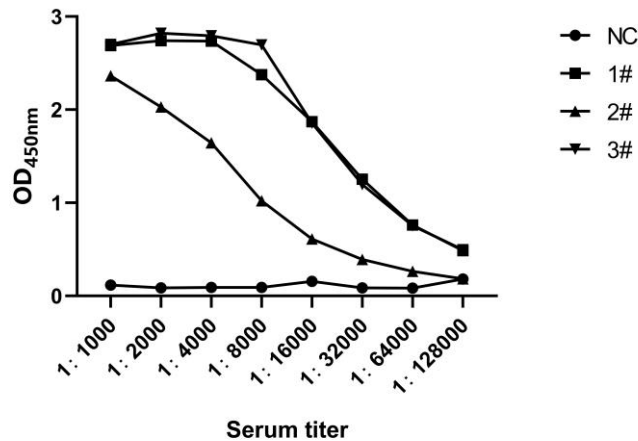


图 3.1 ELISA 检测小鼠血清效价

Figure 3.1 ELISA detection of serum titers in mouse

3.3.2 细胞融合与亚克隆

通过细胞融合，ELISA 和 IFA 共同筛选阳性孔，通过三次亚克隆，成功筛选出来了一株分泌抗 PEDV S1 蛋白抗体的细胞株，命名为 C1A。

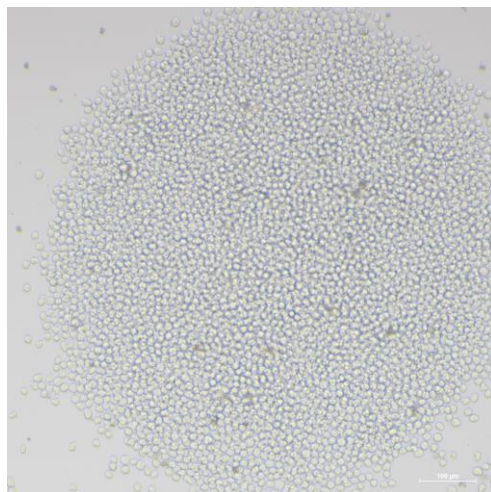


图 3.2 细胞融合第 14 d

Figure 3.2 On the 14th day of cell fusion

3.3.3 单克隆抗体 C1A 抗体纯化

采集小鼠腹水后，对采集的腹水、纯化时流出液、洗脱液以及浓缩后的 C1A 进行 SDS-PAGE 鉴定，50 kDa 为抗体的重链，25 kDa 为。结果如图 3.3 所示，其中 1~4 分别是腹水、流出液、洗涤液和洗脱液。小鼠腹水中有大量抗体，且部分 Protein G 结合，结合的抗体经洗脱后进行浓缩，得到纯度较好的 C1A 抗体，用于后续的实验所用。

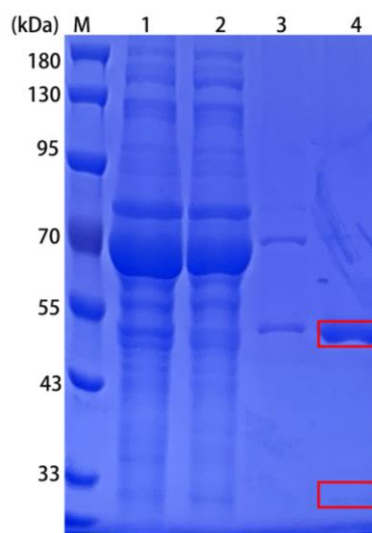


图 3.3 单克隆抗体 C1A 的纯化结果

Fig.3.3 Purification of monoclonal antibody C1A

3.3.4 Western blot 验证单克隆抗体 C1A 的特异性

为进一步确定纯化的单克隆抗体 C1A 针对 PEDV S 蛋白，而不与其他病毒蛋白反应，进行 Western blot 验证，结果 C1A 只与 PEDV 发生特异性反应，且与 G1 型 PEDV 和 G2 型 PEDV 均反应，条带为 S 蛋白的大小，而与 PCV2、PRRSV、PoRV、PRV 以及 DMEM 培养基不发生反应，表明抗体 C1A 具有良好的特异性，如图 3.4 所示。

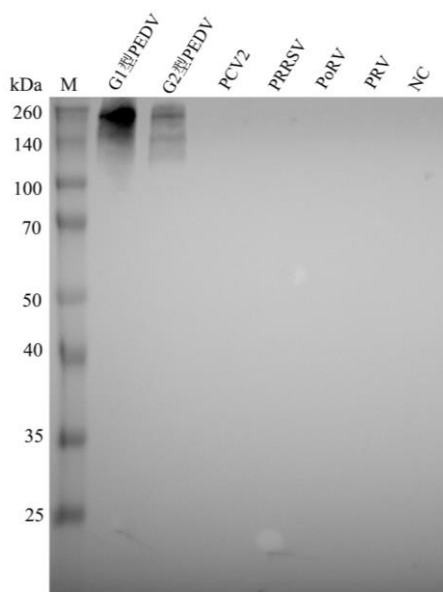


图 3.4 单克隆抗体 C1A 的特异性结果

Figure 3.4 The specificity of monoclonal antibody C1A

3.3.5 IFA 验证单克隆抗体 C1A 的反应性

为了进一步明确纯化的单克隆抗体的 C1A 的活性，通过 IFA 明确 C1A 与 G1 型 PEDV 和 G2 型 PEDV 的反应性，结果如 3.5 所示，与 NC 相比，CIA 能够与 VERO 细胞中的 G1 型和 G2 型均发生反应，呈绿色，表明单克隆抗体 CIA 具有良好的反应性。

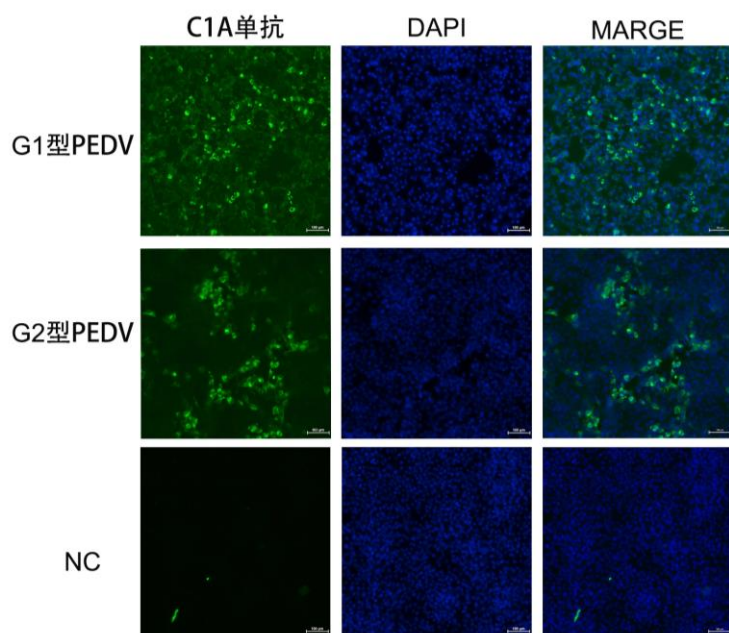


图 3.5 IFA 验证单克隆抗体的反应性

Figure 3.5 IFA validation of monoclonal antibody reactivity

3.3.6 单克隆抗体 C1A 识别 PEDV S1 蛋白表位初步鉴定

首先对 PEDV S1 蛋白进行截短后诱导表达，截短的示意图如图 3.6A，共分为 3 段，分别是（20~163 aa、154~296 aa 和 287~428 aa）。诱导表达后进行 SDS-PAGE，结果如图 3.6B 所示，3 个截短体均成功表达；最后，通过 Western blot 明确 C1A 与这 3 个截短体蛋白的反应性，结果如图 3.6C 所示 C1A 抗体的识别区 PEDV S 蛋白的位于截短体 154~296 aa。

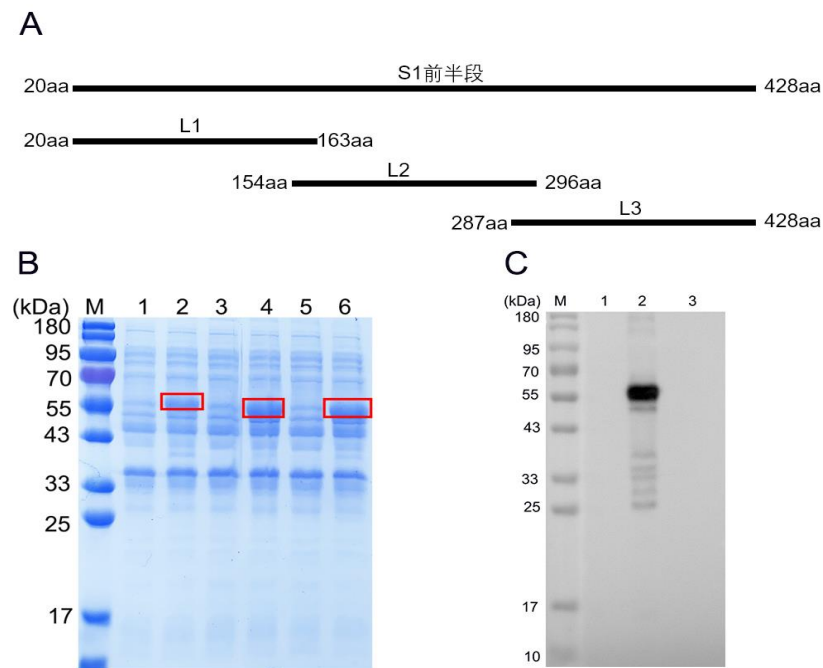


图 3.6 初次确定单克隆抗体 C1A 的识别区域

Figure 3.6 Initial identified the C1A recognition region

A: PEDV S1 蛋白截短示意图; B: SDS-PAGE 鉴定截短体表达情况 C: Western blot 鉴定 C1A 识别区

A: Schematic diagram of the truncation of PEDV S1; B: SDS-PAGE identification of truncated proteins expression; C: Western blot identifies the C1A recognition region

上述以鉴定单克隆抗体 C1A 识别的表位为 154~296 aa，为确定缩小 C1A 识别区域，在 154~296 aa 的基础上进行进一步截短，分为 4 个截短体，具体如图 3.7A 所示。对 4 个截短体诱导表达后进行 SDS-PAGE，结果如图 3.7B 所示，4 个截短体均成功表达；最后，通过 Western blot 明确 C1A 与这 4 个截短体蛋白的反应性，结果如图 3.7C 所示 C1A 抗体的识别区 PEDV S 蛋白的位于截短体 221~262 aa，具体的识别的氨基酸序列为：

GEDGISYQPCTANCIGYAANVFATEPNGHIPEGFSFNNWFL。

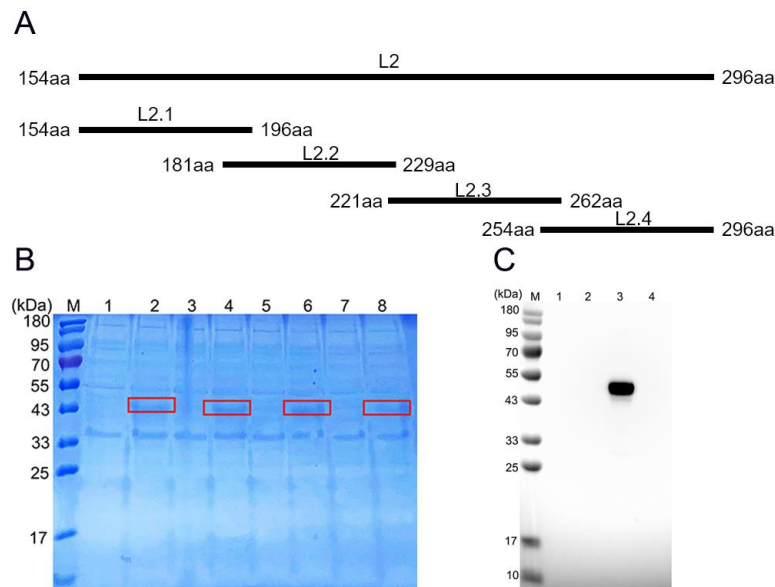


图 3.7 单克隆抗体 C1A 的识别区域

Figure 3.7 Identifies the C1A recognition region

A: PEDV S1 蛋白截短示意图; B: SDS-PAGE 鉴定截短体表达情况 C: Western blot 鉴定 C1A 识别区

A: Schematic diagram of the truncation of PEDV S1; B: SDS-PAGE identification of truncated proteins expression; C: Western blot identifies the C1A recognition region

3.3.7 单克隆抗体可变区的测定

为进一步明确单克隆抗体 C1A 的可变区，通过套式 PRC 以分泌 C1A 杂交瘤细胞的 cDNA 为模板进行 C1A 抗体轻链和重链区域进行扩增。结果如图 3.8 所示，成功扩增出轻链和重链条带，大小与预期一致。

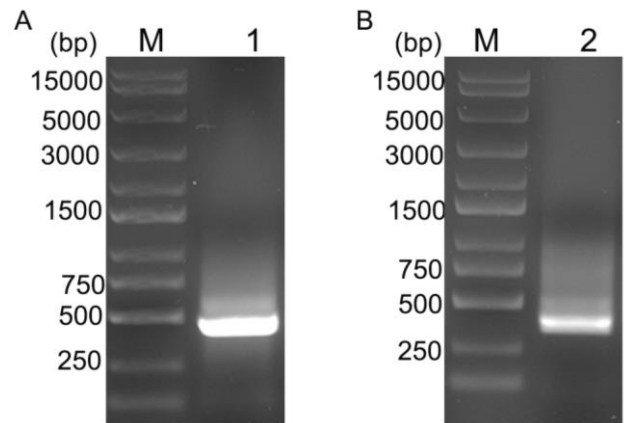


图 3.8 RT-PCR 扩增单克隆抗体 C1A 的轻链重链

Figure 3.8 RT-PCR amplification of the light and heavy chains of monoclonal antibody C1A

A: 重链可变区; B: 轻链可变区

A: Variable area of heavy chain; B: Light chain variable area

对上述扩增的C1A的重链和轻链的条带进行回收，再与pMD19-T载体进行连接转化后，挑单菌落送至擎科生物科技股份有限公司进行测序，根据测序结果，确定单克隆抗体C1A重链可变区的氨基酸序列和轻链可变区的氨基酸序列分别为：

GEYCGRRLGFEVQLQESGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSH
AKSLEWIGVISPYHGYTSYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAI
YFCARGWVDYWGQGTTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV
KGYFPEQSLEDPRVPSSNS；

单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列为：
MTMITNSSSVPGDPLEIDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSY
MHWNQKPGQPPELLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAA
TYYCQHIRELTRSEGGPSWK。

进一步将 C1A 的序列与抗体基因库(IMGJ)进行对比分析，其重链和轻链可变区的互补决定簇(CDR)序列如表 3.5 所示。

表 3.5 抗体可变区序列

Table 3.5 Antibody variable region sequences			
	CDR1	CDR2	CDR3
重链可变区	DYAMH	VISPYHGYTSYNQKFKG	GWVDYWGQG
轻链可变区	HMYSYGSTSVSKSAR	SELNSVL	LVIDIELPD

3.3.8 单克隆抗体 C1A 亚型鉴定结果

根据抗体亚型鉴定试剂盒测得单克隆抗体 C1A 重链为 IgG1 型，轻链为 κ 链，如图 3.9 所示。

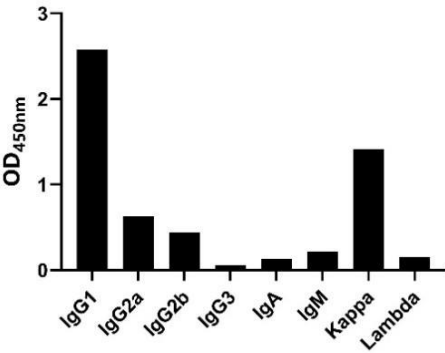


图 3.9 单克隆抗体 C1A 亚型鉴定

Figure 3.9 Identification of C1A isoform of monoclonal antibody

3.4 讨论

单克隆抗体的大量制备源自于 1975 年细胞融合技术的出现^[157]，杂交瘤细胞的无限增值特性并且不断产生特异性抗体给生活带来了巨大的便利，特别是单克隆抗体运用于疾病的治疗以及诊断等方面^[158]。单克隆抗体的制备，这一流程看似简单，但是时间跨度很长，且具有连续性，中间的每一个环节都不能出现问题，特别是细胞融合与亚克隆时，在这些操作的过程中十分注意细胞污染的发生，应该在实验前的准备，以及操作过程中都要十分的规范。

在进行第一次亚克隆时，如果不在 ELISA 和 IFA 实验之前对融合细胞进行换液，则会出现很高的阳性率，但是这种结果往往是错误的，原因是所添加的 HAT 并不能杀死脾细胞，但脾细胞不是永生化细胞，大概一周左右就会自己死亡，在这之前，脾细胞仍会分泌抗体，所以会造成假阳性的出现，因此细胞换液很重要。同时在进行亚克隆的过程中，可以初步的实验，所选择的阳性孔是否能够建立阻断 ELISA 方法，在初期筛选时就进行了筛选有阻断效果的细胞株，可以极大的提高了所想要建立方法的成功率。当然，此法也可以用于筛选具有能够分泌中和抗体的细胞株，可以为实验提供更高的成功率，相对的就是工作强度比较大，要合理的规划时间。在制备腹水时，要及时观察小鼠的状态，因为小鼠可能会突然死亡，要有一个准确的判断，对腹水准确及时采集很有必要。所制备的 C1A 抗体纯化后，对抗体的生物学特性检测发现抗体的特异性良好，可以为后续制备双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒提供生物原材料。在对单克隆抗体进行截短表达测抗体识别区的结果中发现^[159]，与现阶段所报道的 PEDV 序列对比，单克隆抗体识别的区域在所有的序列中都是变异较少发生的点，目前与本实验室保存的各种亚型的毒株都有反应，需要对抗体识别区域进一步的缩短，以最终测得单克隆抗体的抗原表位，看是否与报道的表位重复，由于时间原因，进行表位截短的工作时间比较长，有时不容易表达出来，所以只能先完成毕业论文，再进行截短，并为检测试剂盒的研发提供依据。

3.5 本章小结

本章研究成功获得了一株抗 PEDV S1 蛋白的单克隆抗体 (C1A)，鉴定出其抗体重链可变区和轻链可变区的序列，并鉴定出了 C1A 识别的抗原区域为 PEDV S1 蛋白的 221-262 aa。

第四章 双抗夹心 ELISA 方法的建立及优化

ELISA 检测方法是一种常见的检测方法，其操作简单、灵敏度高以及特异性好常被开发应用于各种病原或抗体的检测。其中 DAS-ELIAS 常被应用于样品中抗原的检测，其主要操作步骤是：添加待检样品与酶标孔，让抗原被抗体捕获，再加入不同结合表位的抗体进行检测，最终形成了捕获抗体-抗原-检测抗体复合物，当检测抗体标记了 HRP 后，就可以加入 TMB 进行显色，来确定是否有抗原的存在。本试验以 C1A 进行包被，以标记 HRP 的 5F2 进行检测，建立了 DAS-ELISA 检测方法。该方法特异性良好，灵敏度高，有望可以用于临床诊断。

4.1 试验材料

4.1.1 主要试剂

高糖 DMEM 和 PBS 购自上海源培生物科技股份有限公司；TMB 显色液购自苏州博奥龙科技公司；吐温 20 和 ELISA 终止液均购自北京索莱宝科技有限公司；HRP 标记抗体试剂盒购自武汉三鹰生物技术有限公司；抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体命名为 5F2 由本实验室制备储存。

4.1.2 主要仪器

超净工作台购自苏净安泰；-40℃冰箱购自冰山松洋生物科技有限公司；37℃恒温培养箱与-20℃冰箱均购自赛默飞世尔仪器有限公司；旋涡混匀仪购自上海珂淮仪器有限公司；各规格单通道移液器购自德国 Eppendorf 公司，12 孔排枪购自梅特勒托利多国际有限公司。

4.2 试验方法

4.2.1 HRP 标记抗体

对建立 DAS-ELISA 方法所用的针对 PEDV M 蛋白的单克隆抗体 5F2 进行 HRP (HRP-5F2) 后作为检测抗体, 具体操作方法为: 首先将 HRP 标记试剂盒在冰箱取出恢复至室温。室温平衡 30 min 后, 充分混匀试剂盒中的反应液和终止液。然后取出要标记的抗体, 一般来说抗体初始的最佳浓度为 2 mg/mL。抗体解冻后, 在每 10 μ L 抗体中加入 1 μ L 启动液, 充分混匀, 再将其加入到 HRP 的管中吹打混匀, 室温放置 3 h。结束后以同样体积启动液的量加入终止液, 室温放置 1 h, 结束后加入等体积的甘油保护液, 再进行分装到 PCR 管中, 每管 10 μ L, 最后放置 -20°C 冰箱长期保存。

4.2.2 双抗夹心 ELISA 方法的优化

4.2.2.1 最适包被抗体与检测抗体浓度的确定

利用棋盘滴定法确定 DAS-ELISA 的最适的捕获抗体 C1A 包被浓度与检测抗体 HRP-5F2 稀释度。包被抗体 C1A 初始浓度为 2 mg/mL, 将其按照 1:500, 1:1000, 1:2000 和 1:4000 梯度稀释后, 于 96 孔 ELISA 板中每孔加入 100 μ L 进行包被, 37°C 孵育 2 h; 使用 PBS'T 清洗 3 遍, 每孔 200 μ L, 拍干后加入 5% 的脱脂奶粉 100 μ L/孔, 37°C 封闭 2 h; 上述洗涤方法, 再每孔加入 PEDV 病毒液 100 μ L 的 PEDV 病毒液, 对照孔加入 DMEM 培养基, 37°C 反应 1 h; 洗涤后, 每个包被梯度分别加入 100、200、400、800 和 1600 倍稀释的 HRP-5F2 抗体, 100 μ L/孔, 37°C 反应 1 h; 上述洗涤方法, 再加入 TMB 显色液 50 μ L/孔, 37°C 避光 12 min; 加入等体积的终止液, 酶标仪上读 OD_{450nm} 值, 确定最佳包被抗体 C1A 与 HRP-5F2 检测抗体稀释度。

4.2.2.2 抗体最佳包被时间的优化

共设置五个试验组, 分别为 C1A 抗体 37°C 包被 2 h 后 4°C 过夜、37°C 包被 1 h 后 4°C 过夜、4°C 包被过夜、37°C 包被 1 h 和 37°C 包被 2 h。包被结束后, DAS-ELISA 步骤参照 4.2.2.1 方法, 根据最终的 P/N 值确定最佳的封闭液

与封闭的时间。

4.2.2.3 最佳封闭液的选择和封闭时间的优化

为选择最佳的封闭液以及确定最佳封闭时间，将捕获抗体 C1A 按照上述最佳包被条件进行包被后，设置以下几组变量：（1.5%、3%及 5%）BSA、（1.5%、3%和 5%）脱脂奶粉；在此基础上设置以下时间梯度：37℃封闭 1 h 后 4℃过夜、4℃封闭过夜、37℃封闭 2 h、37℃封闭 1 h。随后 DAS-ELISA 步骤参照 4.2.2.1 方法，根据最终的 P/N 值确定最佳的封闭液与封闭的时间。

4.2.2.4 样品作用时间的优化

按照上述优化后的反应条件，进一步对检测样品孵育时间进行优化。共设置五个梯度：分别于 37℃孵育 150 min、120 min、90 min、60 min 和 30 min。其余 DAS-ELISA 方法的步骤与 4.2.2.1 方法一致，显色后根据 P/N 值确定待测样品最佳的作用时间。

4.2.2.5 检测抗体 HRP-5F2 孵育时间的优化

依据上述优化后的反应条件，进一步检测抗体 HRP-5F2 孵育时间进行优化。检测抗体 HRP-5F2 按照以下时间梯度进行孵育：分别于 37℃条件下孵育 120 min、90 min、60 min 和 30 min。后续步骤与 4.2.2.1 方法一致，显色后根据 P/N 值确定检测抗体 HRP-5F2 的最佳作用时间。

4.2.2.6 DSA-ELISA 临界值的确定

采集 32 份经 RT-PCR 检测为 PEDV 阴性的仔猪肛拭子，每份加入 1 mL 的 PBS 进行稀释。随后使用涡旋仪充分混匀，静置 10 min 后，每管吸取 300 μ L 液体，3000 rpm 离心 10 min，吸取上清液作为待检样品。利用上述优化后的 DAS-ELISA 反应条件，对 40 份肛拭子样品进行检测，测定其 OD_{450nm}，计算出所检阴性肛拭子的平均值 ($\bar{x}$) 和标准差 (SD)，临界值= $\bar{x}+3\times SD$ ，当所测样品的 OD_{450nm}≥ 临界值时，判断为 PEDV 抗原阳性，反之则为 PEDV 抗原阴性。

4.2.2.7 DSA-ELISA 灵敏性实验

使用无血清的 DMEM 对 PEDV 病毒液从 1:2 依次倍比稀释至 1:2048 倍，

同时以 DMEM 培养基作为阴性对照。依据上述优化的 DAS-ELISA 对不同稀释度的病毒液进行检测。

4.2.2.8 DSA-ELISA 特异性实验

利用上述建立的 DAS-ELISA 方法分别对 PCV2、PRRSV、PoRV、PRV、PEDV 以及 DMEM，从而确定 DAS-ELISA 方法的特异性。

4.2.2.9 DSA-ELISA 重复性实验

测试板内变异系数的试验：使用 4 个不同批次扩繁的 PEDV 培养物作为检测样品，DMEM 培养基为阴性对照，每组设计 3 个重复，按照上述建立的 DAS-ELISA 进行检测，计算变异系数。

测试板间变异系数的试验：使用同一批的病毒液作为检测样品，DMEM 培养基为阴性对照，每个样品做 3 个重复，用 6 个不同批次的酶标版进行试验，按照上述建立的 DAS-ELISA 进行检测计算变异系数。

4.2.2.10 DSA-ELISA 对临床样品的检测

对由本实验室保存的 PEDV 攻毒实验所采集的包含对照组与攻毒组的共 64 份肛拭子样品，每份样品加入 1 mL 无血清 DMEM 充分震荡溶解，随后每管样品吸取 400 μ L 悬液，3000 rpm 条件下离心 5 min，吸取 300 μ L 上清提取 RNA。提取 RNA 后，对样品进行反转录，通过使用国标引物进行 PCR 检测，判断样品的阴阳性。同时，对上述溶解后的肛拭子样，每管吸出 200 μ L 样品悬液，同样的离心方法，再吸取 100 μ L 上清作为待检样品。最后，使用上述建立的 DAS-ELISA 方法对待检样品进行检测，判断阴阳性，并与 RT-PCR 结果进行对比，验证其符合率。

4.3 结果

4.3.1 DAS-ELISA 各反应条件的优化结果

4.3.1.1 最适包被抗体与检测抗体浓度的确定

利用棋盘滴定法确定 DAS-ELISA 的最适的捕获抗体 C1A 包被浓度与检测抗体 HRP-5F2。根据检测结果，选择 P/N 值相对比较大的且阴性样品的 OD_{450nm} 相对较小的作为本试验捕获抗体 C1A 包被浓度与检测抗体 HRP-5F2 的最佳条件。结果如表 4.1 和图 4.1 所示，C1A 单克隆抗体最佳包被浓度为 1:800，250 ng/孔，HRP-5F2 的最佳稀释浓度为 1:500（浓度为 2.5 μg/mL）。

表 4.1 C1A 抗体最佳包被浓度与 HRP-5F2 标记抗体稀释度

Table 4.1 Optimal C1A antibody coating concentration and HRP-5F2 antibody dilution

HRP-5F2	C1A单抗稀释度					
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
阳性1:500	1.403	1.665	1.678	1.72	1.27	1.799
阳性1:1000	0.693	0.823	0.823	0.797	0.968	0.877
阳性1:2000	0.566	0.472	0.472	0.475	0.493	0.551
阳性1:4000	0.367	0.285	0.285	0.281	0.427	0.31
阴性1:500	0.436	0.272	0.272	0.283	0.226	0.266
阴性1:1000	0.205	0.2	0.2	0.173	0.188	0.164
阴性1:2000	0.224	0.122	0.122	0.112	0.116	0.099
阴性1:5000	0.111	0.101	0.101	0.106	0.089	0.069

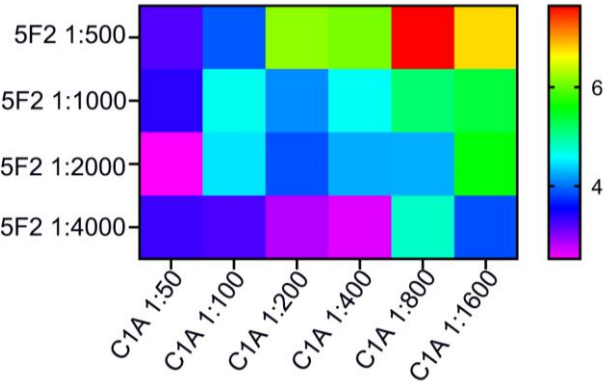


图 4.1 C1A 抗体最佳包被浓度与 HRP-5F2 标记抗体稀释度

Figure 4.1 Optimal C1A antibody coating concentration and HRP-5F2 antibody dilution

4.3.1.2 捕获抗体 C1A 最佳包被时间的优化

将捕获抗体 C1A 按照不同的包被时间进行包被, 如表 4.2 所示, 当 P/N 最大时, 所对应的包被时间为 37°C 包被 1 h, 然后 4°C 封闭过夜, 选此条件进行后续试验。

表 4.2 最佳包被时间的优化
Table 4.2 Optimization of optimal coating time

包被时间	37°C 2h 4°C过夜	37°C 1h 4°C过夜	4°C过夜	37°C 1 h	37°C 2 h
阳性对照	0.869	0.839	0.806	0.857	0.946
阴性对照	0.287	0.106	0.123	0.115	0.137
P/N	3.03	7.92	6.55	7.45	6.91

4.3.1.3 最佳封闭液的选择和封闭时间的优化

在分别使用 BSA 和脱脂奶粉作为封闭液并封闭不同时间的结果如表 4.3 所示和图 4.2 所示, 使用 5%BSA, 37°C 封闭 2 h 分别为最佳封闭液的选择和封闭时间。

表 4.3 封闭条件的优化结果
Table 4.3 Optimization results for closed conditions

封闭时间	封闭液					
	1.5% BSA	3% BSA	5% BSA	1.5%脱脂奶粉	3%脱脂奶粉	5%脱脂奶粉
37°C 1 h+4°C过夜阳性	1.17	1.11	1.05	1.01	0.95	0.90
4°C过夜阳性	1.05	1.08	1.15	0.91	0.91	0.92
37°C 2 h阳性	1.14	1.29	1.32	0.99	0.78	0.74
37°C 1 h阳性	1.22	1.16	1.32	0.86	0.77	0.93
37°C 1 h+4°C过夜阴性	0.21	0.2	0.19	0.19	0.17	0.19
4°C过夜阴性	0.19	0.27	0.23	0.26	0.33	0.37
37°C 2 h阴性	0.19	0.14	0.15	0.38	0.33	0.29
37°C 1 h阴性	0.16	0.25	0.32	0.35	0.36	0.23

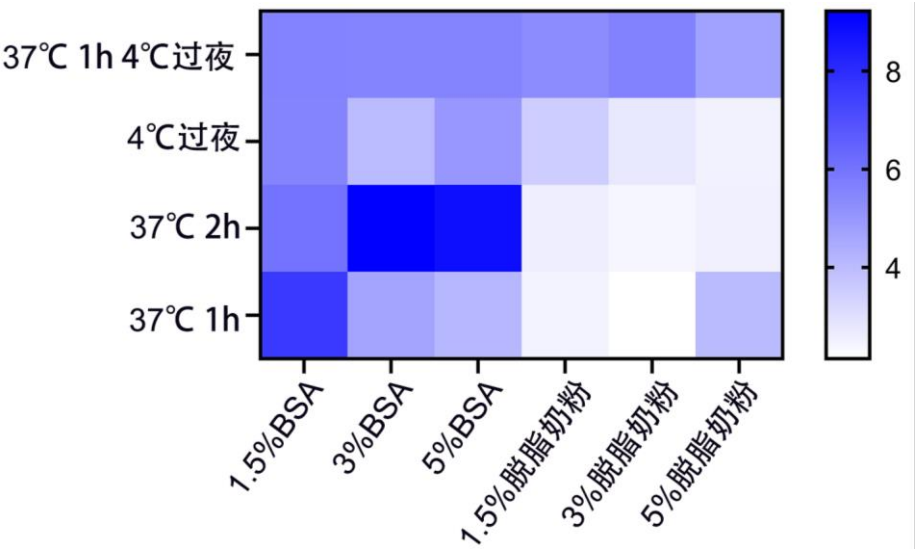


图 4.2 最适封闭条件的确定

Fig 4.2 Determination of the most suitable Closed conditions

4.3.1.4 样品最佳孵育时间的确定

在上述 DAS-ELISA 优化条件的基础上，进行待检样品孵育时间的优化，结果如表 4.4 所示，当 P/N 最大时，所对应的反应时间为 37°C孵育 120 min。因此，37°C孵育 120 min 为样品最佳孵育时间。

表 4.4 样品孵育时间的确定

Table 4.4 Determination of sample incubation time

样品作用时间	150 min	120 min	90 min	60 min	30 min
阳性对照	1.48	1.31	1.18	1.06	0.91
阴性对照	0.12	0.10	0.10	0.12	0.13
P/N	11.9	13.1	11	8.57	6.79

4.3.1.5 HRP-5F2 孵育时间的确定

在以上条件的基础上，进行 HRP-5F2 作用时间的优化，结果如表 4.5 所示，当 P/N 最大时，为 37°C孵育 30 min，此为 HRP-5F2 孵育的最佳时间。

表 4.5 HRP-5F2 标记抗体作用时间的确定

Table 4.5 The identification of reaction time about HRP-5F2

HRP-5F2 作用时间	120 min	90 min	60 min	30 min
阳性对照	3.14	3.01	3.07	2.81
阳性对照	0.47	0.45	0.32	0.22
P/N	6.71	6.67	9.62	12.66

4.3.2 DAS-ELISA 临界值的确定

使用经 RT-PCR 鉴定为阴性的猪肛拭子共 32 份，使用优化后的双抗体夹心 ELISA 方法进行检测，根据结果计算出 OD_{450nm} 的平均值平均值 ($\bar{x}$) 为 0.202，标准差(SD)为 0.074，临界值的结果为 $\bar{x}+3\times SD=0.424$ 。即当 $P/N\geq 2.1$ ，且样本 $OD_{450nm}\geq 0.424$ 时，判断为阳性，反之则为阴性。

4.3.3 DAS-ELISA 的灵敏性测定

进一步对所建立的 DAS-ELISA 的灵敏性进行测定，样品为 PEDV 病毒液 (1×10^6 TCID₅₀/mL)。结果如图 4.3 所示，当 PEDV 病毒液以 1:512 稀释时， OD_{450nm} 值为 0.491，大于 0.424，且 P/N 值 ≥ 2.1 ，在进行 1:1024 稀释时检测结果为阴性。因此，所以本方法最低病毒检测量为 1.953×10^3 TCID₅₀/mL。

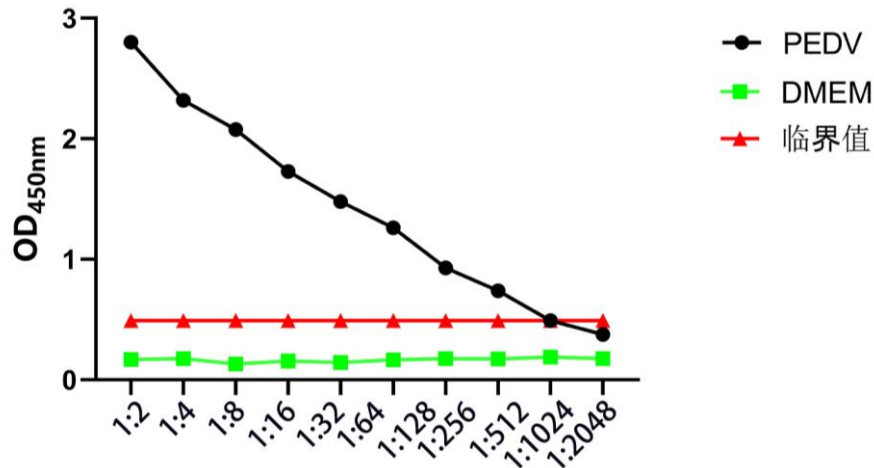


图 4.3 DAS-ELISA 的灵敏性
Figure 4.3 Sensitivity of DAS-ELISA

4.3.4 DAS-ELISA 的特异性

进一步对所建立的 DAS-ELISA 的特异性进行测定，对 PEDV、PCV2、PRRS、PoRV、PRV 和 DMEM 培养基进行检测，结果如图 4.4 所示，对于 PCV2、PRRS、PoRV 和 PRV 病毒液的检测结果大于 0.424，且 P/N 值 ≥ 2.1 ，结果为阴性。而 PEDV 病毒液检测为阳性，表明 DAS-ELISA 的特异性良好。

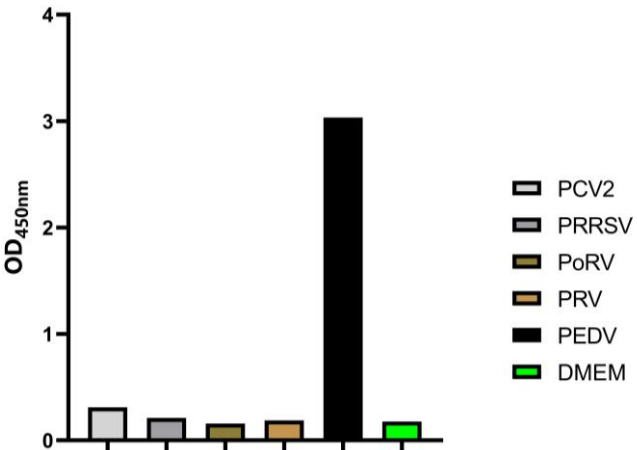


图 4.4 DAS-ELISA 的特异性
Figure 4.4 Specificity of DAS-ELISA

4.3.5 DAS-ELISA 的重复性

板内重复性：使用同一批的包被板检测不同批次的 PEDV 毒株和 DMEM 培养基各 4 份，每份样品做 3 次重复，结果显示批内变异系数为 0.2%～12.2%，说明批内重复性良好（见表 4.8）

表 4.8 板内重复性试验结果
Table 4.8 Results of intraplate repeatability

样品	OD _{450nm}			$\bar{x}$	SD	CV(%)
阳性 1	3.225	3.059	3.045	3.11	0.0818	2.6%
阳性 2	3.236	3.10	3.091	3.14	0.0663	2.1%
阳性 3	3.092	2.882	3.065	3.01	0.0933	3.1%
阳性 4	3.067	3.046	3.062	3.06	0.0089	0.2%
阴性 1	0.224	0.220	0.250	0.23	0.0133	5.7%
阴性 2	0.209	0.207	0.267	0.23	0.0278	12.2%
阴性 3	0.213	0.216	0.237	0.22	0.0107	4.8%
阴性 4	0.213	0.222	0.246	0.23	0.2220	6.1%

板间重复性：使用不同包被批次的抗体包被板检测同一批 PEDV 病毒液，分别在 4 个板子上进行双抗体夹心 ELISA 检测，结果板间变异系数为 0.7%～5.2%（见表 4.9），表明板间重复性良好。以上结果表明该方法具有良好的重复性。

表 4.9 板间重复性试验结果
Table 4.9 Results of inter-plate repeatability experiments

样品	板1	板2	板3	板4	$\bar{x}$	SD	CV(%)
阳性1	3.196	3.205	3.096	3.082	3.145	0.056	1.8%
阳性2	3.006	3.039	2.901	2.995	2.986	0.051	1.7%
阳性3	3.031	3.058	3.038	2.998	3.031	0.022	0.7%
阳性4	3.104	3.043	3.045	2.977	3.042	0.045	1.5%
阴性1	0.215	0.222	0.247	0.226	0.228	0.012	5.2%
阴性2	0.226	0.213	0.216	0.219	0.219	0.005	2.2%
阴性3	0.222	0.211	0.213	0.218	0.216	0.004	2.0%
阴性4	0.251	0.268	0.237	0.236	0.258	0.013	5.2%

4.3.6 DAS-ELISA 临床样品的检测

用所建立的 DAS-ELISA 共检测临床肛拭子样品 64 份，结果如表 4.10 所示，利用 RT-PCR 检测，其中阳性样品 40 份，其余为阴性；通过使用 DAS-ELISA 检测，阳性样品 38 份，阴性样品数 26 份。与 RT-PCR 进行对比，阳性符合率为 95%。

表 4.10 DAS-ELISA 和 RT-PCR 检测结果比较
Table 4.10 Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR results

DAS-ELISA	RT-PCR		总数	符合率（%）
	阳性样品数	阴性样品数		
阳性样品数	38	0	38	95%
阴性样品数	2	24	26	
总共	40	24	64	

4.4 讨论

PEDV 在临床表现上主要以仔猪腹泻为主，但是与其它肠道性疾病，如 TGEV 和 PRoV 的临床症状十分相似，通过症状难以在临床上直接进行鉴别诊

断。可使用 RT-PCR 方法进行诊断，且灵敏度很高，但是缺陷是不能现场诊断，而且还需要操作人员有一定的实验基础以及对设备有较高的要求^[160]，所以很难进行普及。而 ELISA 检测方法是适用于推广的检测方法，它操作简单，不需要专业人员，并可在简短的时间内对大批量的样品进行检测，ELISA 检测方法的种类直接 ELISA、间接 ELISA^[162]、双抗体夹心 ELISA 和竞争 ELISA^[161]。但目前市面上用于检测 PEDV 抗原的双抗夹心 ELISA 试剂盒较少，且多是用同一抗原的抗体用作捕获抗体和检测抗，且抗原检测通常为 N 蛋白，N 蛋白作为病毒核衣壳蛋白被包围在病毒囊膜内部^[63]，这使得 N 蛋白抗体无法直接与结合，只有暴露出来的 N 蛋白或者游离的 N 蛋白能被检测到而完整病毒粒子很大程度无法被此种类型试剂盒检测到，对结果的诊断有一定程度偏差。本实验建立的 DAS-ELISA 使用了抗 PEDV M 蛋白和抗 PEDV S 蛋白的单克隆抗体，S 蛋白是病毒纤突蛋白是诱导机体产生中和抗体的主要蛋白，其存在多个抗原表位，一方面其免疫原性强，可以更好的同抗体结合；另一方面因为 S 和 M 蛋白都位于细胞表面，这有利于其直接与相应抗体结合，游离蛋白和完整病毒粒子都能被有效检测，结果更有可信度。此方法操作简单常温孵育亦可进行检测，而后使用 HRP 标记的抗体作用一段时间后，进行显色，即使没有酶标仪，也可通过肉眼观察进行初步的判断，这也降低了工作的成本。本实验与 RT-PCR 方法进行比较的原因是因为 RT-PCR 符合国际标准，为国际中规定可以使用的标准鉴定方法，具有权威性。本研究提供的检测方法操作简单、检测时间短以及结果可靠为临床中提供了 PEDV 抗原诊断的有效手段。

本试验建立的 ELISA 方法还有很大的提升空间，对于临床样品的检测，需要继续优化检测温度、检测时间，同时也需要加大样本量，以尽一步提高方法的准确性和权威性。在建立 ELISA 检测方法时，很多细节需要格外注意，比如在洗板时，为了避免交叉污染，所用的枪头尽可能悬空加入 PBS'T，加完后在平面上用手轻微震动一段时间。为了洗涤更加充分，要尽可能将洗涤液拍干吸水纸要及时更换，以避免样品在吸水纸上拍打时造成污染。在进行 TMB 显色的过程中，要避光进行，且要对 TMB 显色液进行分装，避免造成大批量的污染，而使结果不可信和大量浪费。对制备好的 ELISA 板进行抽真空处理

后，同实验室的做过试验，发现可在 4℃保存一年以上，不仅保证产品研发的效率，同时也能让同时间制备的原材料的利用率提高。

4.5 本章小结

本章基于 PEDV S1 蛋白单克隆抗体 C1A 建立了一种特异性强、重复性好且准确率高的用于检测 PEDV 抗原的 DAS-ELISA 方法，为临床检测 PEDV 感染提供了有力工具。

全文总结

1、PEDV S1 蛋白的表达与纯化。

首先构建 pET-28a-S1 载体，通过原核表达系统表达 PEDV S1 蛋白，对蛋白进行纯化、透析、浓缩，最终获得纯度良好浓度为 0.5 mg/mL PEDV S1 蛋白。

2、抗 PEDV S1 蛋白单克隆抗体的制备。

将制备的 PEDV S1 蛋白免疫小鼠，通过细胞融合、亚克隆技术成功获得了能分泌抗 PEDV S 蛋白单克隆抗体的单克隆细胞株，经腹水纯化，验证了该单克隆抗体的生物学活性良好，并初步判断了该单克隆抗体的识别区域为 221~262 aa。

3、双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立。

基于单克隆抗体 C1A 所建立了一种特异性强、重复性好且准确率高的 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法，可用于临床 PEDV 抗原检测。

参 考 文 献

- [1] Park J E. Porcine Epidemic Diarrhea: Insights and Progress on Vaccines[J]. Vaccines, 2024, 12(2): 212.
- [2] Pensaert M B, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of virology, 1978, 58: 243-247.
- [3] Sun D, Wang X, Wei S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(3): 355-363.
- [4] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777[J]. American journal of veterinary research, 1980, 41(2): 219-223.
- [5] Shibata I, Tsuda T, Mori M, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages[J]. Veterinary microbiology, 2000, 72(3-4): 173-182.
- [6] Huang Y W, Dickerman A W, Piñeyro P, et al. Origin, evolution, and genoty of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J]. MBio, 2013, 4(5): 10.1128/mbio.00737-13.
- [7] 张坤. 猪病毒性腹泻多重 RT-PCR 诊断方法的建立和应用及猪轮状病毒的分离[D].华中农业大学,2011.
- [8] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging infectious diseases, 2012, 18(1): 161.
- [9] Wang X, Niu B, Yan H, et al. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010[J]. Archives of virology, 2013, 158: 2487-2494.
- [10] Wang D, Fang L, Lao S. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. Virus research, 2016, 226: 7-13.
- [11] 刘孝珍. 2011 年中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学初步调查[D].东北农业大学,2013.
- [12] 张志,董雅琴,刘爽等.我国部分省份猪流行性腹泻的流行病学监测[J].中国动物检疫,2014,31(10):47-51.
- [13] Yu J, Chai X, Cheng Y, et al. Molecular characteristics of the spike gene of porcine epidemic diarrhoea virus strains in Eastern China in 2016[J]. Virus research, 2018, 247: 47-54.
- [14] Zhang H, Han F, Yan X, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in Henan province, China in 2015–2019[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2021, 88: 104709.
- [15] Gao X, Zhang L, Jiang X, et al. Porcine epidemic diarrhea: an emerging disease in Tibetan pigs in Tibet, China[J]. Tropical animal health and production, 2019, 51: 491-494.
- [16] Chen X, Zhang XX, Li C, et al. Epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus among Chinese pig populations: A meta-analysis. Microb Pathog. 2019;129:43-49.

- [17] Tan L, Li Y, He J, et al. Epidemic and genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in the regions around Hunan, China, during 2017-2018[J]. Archives of Virology, 2020, 165: 877-889.
- [18] Tian Y, Yang X, Li H, et al. Molecular characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with outbreaks in southwest China during 2014–2018[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(6): 3482-3497.
- [19] Jung K, Saif L J, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control[J]. Virus research, 2020, 286: 198045.
- [20] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. Virus genes, 2001, 23: 137-144.
- [21] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication[J]. Coronavirus replication and reverse genetics, 2005: 1-30.
- [22] Cheng L, Li S, Yin J, et al. Genome-wide analysis of differentially expressed genes relevant to rhizome formation in lotus root (*Nelumbo nucifera* Gaertn)[J]. PloS one, 2013, 8(6): e67116.
- [23] Zhang Y, Chen Y, Zhou J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: An updated overview of virus epidemiology, virulence variation patterns and virus–host interactions[J]. Viruses, 2022, 14(11): 2434.
- [24] Si F, Hu X, Wang C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ORF3 enhances viral proliferation by inhibiting apoptosis of infected cells[J]. Viruses, 2020, 12(2): 214.
- [25] Li X, Wu Y, Yan Z, et al. A Comprehensive View on the Protein Functions of Porcine Epidemic Diarrhea Virus[J]. Genes, 2024, 15(2): 165.
- [26] Wesley R D, Woods R D, Cheung A K. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus[J]. Journal of virology, 1990, 64(10): 4761-4766.
- [27] 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究[J]. 兽医大学学报, 1984(03): 202-208.
- [28] Bowman A S, Nolting J M, Nelson S W, et al. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Veterinary microbiology, 2015, 179(3-4): 213-218.
- [29] Spaan W, Cavanagh D, Horzinek M C. Coronaviruses: structure and genome expression[J]. Journal of General Virology, 1988, 69(12): 2939-2952.
- [30] Li W, van Kuppeveld F J M, He Q, et al. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virus research, 2016, 226: 117-127.
- [31] Tang T, Bidon M, Jaimes J A, et al. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development[J]. Antiviral research, 2020, 178: 104792.
- [32] Chen J, Liu X, Shi D, et al. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Viruses, 2013, 5(10): 2601-2613.
- [33] Guo J, Fang L, Ye X, et al. Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic

- diarrhea virus strains[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2019, 66(1): 111-118.
- [34] Chen P, Wang K, Hou Y, et al. Genetic evolution analysis and pathogenicity assessment of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in part of China during 2011–2017[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 69: 153-165.
- [35] Li C, Li W, Lucio de Esesarte E, et al. Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of virology*, 2017, 91(12): 10.1128/jvi. 00273-17.
- [36] Song X, Zhou Q, Zhang J, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant adenovirus expressing a novel genotype G2b PEDV spike protein in protecting newborn piglets against PEDV[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(1): e02403-23.
- [37] Wicht O, Li W, Willems L, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture[J]. *Journal of virology*, 2014, 88(14): 7952-7961.
- [38] Kirchdoerfer R N, Bhandari M, Martini O, et al. Structure and immune recognition of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Structure*, 2021, 29(4): 385-392. e5.
- [39] Tsai K-J, Deng M-C, Wang F-I, Tsai S-H, Chang C, Chang C-Y, Huang Y-L. Deletion in the S1 Region of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Reduces the Virulence and Influences the Virus-Neutralizing Activity of the Antibody Induced. *Viruses* 2020, 12, 1378.
- [40] Li B X, Ge J W, Li Y J. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus[J]. *Virology*, 2007, 365(1): 166-172.
- [41] Nam E, Lee C. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection[J]. *Veterinary microbiology*, 2010, 144(1-2): 41-50.
- [42] Zhang J, Wu Z, Yang H. Aminopeptidase N knockout pigs are not resistant to porcine epidemic diarrhea virus infection[J]. *Virologica Sinica*, 2019, 34: 592-595.
- [43] Ji C M, Wang B, Zhou J, et al. Aminopeptidase-N-independent entry of porcine epidemic diarrhea virus into Vero or porcine small intestine epithelial cells[J]. *Virology*, 2018, 517: 16-23.
- [44] Desmarests L M B, Theuns S, Roukaerts I D M, et al. Role of sialic acids in feline enteric coronavirus infections[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(9): 1911-1918.
- [45] Xiong M, Liu X, Liang T, et al. The Alpha-1 Subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase (ATP1A1) Is a Host Factor Involved in the Attachment of Porcine Epidemic Diarrhea Virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4000.
- [46] Chen Y, Zhang Z, Li J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus S1 protein is the critical inducer of apoptosis[J]. *Virology journal*, 2018, 15: 1-11.
- [47] Li Z, Ma Z, Li Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines[J]. *Microbial pathogenesis*, 2020, 149: 104553.
- [48] Liu J, Shi H, Chen J, et al. A New Neutralization Epitope in the Spike Protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 9674.

- [49] Chen B, Dong S, Yu L, et al. Three Amino Acid Substitutions in the Spike Protein Enable the Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus To Infect Vero Cells[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e03872-22.
- [50] Tan Y, Sun L, Wang G, et al. Trypsin-enhanced infection with porcine epidemic diarrhea virus is determined by the S2 subunit of the spike glycoprotein[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(11): 10.1128/jvi.02453-20.
- [51] Zhou C, Liu Y, Wei Q, et al. HSPA5 Promotes Attachment and Internalization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus through Interaction with the Spike Protein and the Endo-/Lysosomal Pathway[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(6): e00549-23.
- [52] Zhou X, Cong Y, Veenendaal T, et al. Ultrastructural characterization of membrane rearrangements induced by porcine epidemic diarrhea virus infection[J]. *Viruses*, 2017, 9(9): 251.
- [53] Hou Y, Meulia T, Gao X, et al. Deletion of both the tyrosine-based endocytosis signal and the endoplasmic reticulum retrieval signal in the cytoplasmic tail of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in pigs[J]. *Journal of virology*, 2019, 93(2): 10.1128/jvi.01758-18.
- [54] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus genes*, 2001, 23: 137-144.
- [55] Torres J, Maheswari U, Parthasarathy K, et al. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein[J]. *Protein science*, 2007, 16(9): 2065-2071.
- [56] Boson B, Legros V, Zhou B, et al. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296.
- [57] Li Z, Ma Z, Han W, et al. Deletion of a 7-amino-acid region in the porcine epidemic diarrhea virus envelope protein induces higher type I and III interferon responses and results in attenuation in vivo[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(9): e00847-23.
- [58] Lei X M, Yang Y L, He Y Q, et al. Specific recombinant proteins of porcine epidemic diarrhea virus are immunogenic, revealing their potential use as diagnostic markers[J]. *Veterinary microbiology*, 2019, 236: 108387.
- [59] Xu X G, Zhang H L, Zhang Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells[J]. *Acta virologica*, 2015, 59(3): 265-275.
- [60] Zhou X, Zhang T, Song D, et al. Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Molecular and cellular probes*, 2017, 33: 36-41.
- [61] Zhang Q, Shi K, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1[J]. *Virology*, 2016, 489:

- 252-268.
- [62] Park J Y, Ryu J, Park J E, et al. Heat shock protein 70 could enhance porcine epidemic diarrhoea virus replication by interacting with membrane proteins[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52: 1-12.
- [63] Chen H, Gill A, Dove B K, et al. Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance[J]. *Journal of virology*, 2005, 79(2): 1164-1179.
- [64] Narayanan K, Maeda A, Maeda J, et al. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(17): 8127-8134.
- [65] Shi D, Shi H, Sun D, et al. Nucleocapsid interacts with NPM1 and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival, and is involved in PEDV growth[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 39700.
- [66] Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex[J]. *Journal of virology*, 2013, 87(16): 9159-9172.
- [67] Si F, Chen B, Hu X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein is transported through the exocytic pathway[J]. *Journal of virology*, 2020, 94(17): 10.1128/jvi. 00808-20.
- [68] Kristen-Burmann C, Rogger P, Veiga I B, et al. Reverse Genetic Assessment of the Roles Played by the Spike Protein and ORF3 in Porcine Epidemic Diarrhea Virus Pathogenicity[J]. *Journal of virology*, 2023, 97(7): e01964-22.
- [69] Kaewborisuth C, He Q, Jongkaewwattana A. The accessory protein ORF3 contributes to porcine epidemic diarrhea virus replication by direct binding to the spike protein[J]. *Viruses*, 2018, 10(8): 399.
- [70] Zou D, Xu J, Duan X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic reticulum stress to facilitate autophagy[J]. *Veterinary microbiology*, 2019, 235: 209-219.
- [71] Wu Z, Cheng L, Xu J, et al. The accessory protein ORF3 of porcine epidemic diarrhea virus inhibits cellular interleukin-6 and interleukin-8 productions by blocking the nuclear factor- κ B p65 activation[J]. *Veterinary microbiology*, 2020, 251: 108892.
- [72] Zhang Q, Ke H, Blikslager A, et al. Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF1 signaling[J]. *Journal of virology*, 2018, 92(4): 10.1128/jvi. 01677-17.
- [73] Li M, Wu Y, Chen J, et al. Innate immune evasion of porcine epidemic diarrhea virus through degradation of the FBXW7 protein via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(5): e00889-21.
- [74] Justo Arevalo S, Zapata Sifuentes D, Huallpa C J, et al. Global geographic and temporal analysis of SARS-CoV-2 haplotypes normalized by COVID-19 cases during the pandemic[J].

- Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 612432.
- [75] Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein[J]. Antiviral research, 2018, 149: 58-74.
- [76] Xing Y, Chen J, Tu J, et al. The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(7): 1554-1567.
- [77] Ji M, Li M, Sun L, et al. DMV biogenesis during β -coronavirus infection requires autophagy proteins VMP1 and TMEM41B[J]. Autophagy, 2023, 19(2): 737-738.
- [78] 袁桢,张福海,丁彬彬.病原体与宿主核外细胞器[J].中国细胞生物学学报,2024,46(01):179-192.
- [79] Yu L, Dong J, Wang Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nsp4 induces pro-inflammatory cytokine and chemokine expression inhibiting viral replication in vitro[J]. Archives of virology, 2019, 164: 1147-1157.
- [80] Lee J, Kenward C, Worrall L J, et al. X-ray crystallographic characterization of the SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 5196.
- [81] Tomar S, Johnston M L, John S E S, et al. Ligand-induced dimerization of Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus nsp5 protease (3CLpro): implications for nsp5 regulation and the development of antivirals[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(32): 19403-19422.
- [82] Lin H, Li B, Liu M, et al. Nonstructural protein 6 of porcine epidemic diarrhea virus induces autophagy to promote viral replication via the PI3K/Akt/mTOR axis[J]. Veterinary microbiology, 2020, 244: 108684.
- [83] Peti W, Johnson M A, Herrmann T, et al. Structural genomics of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: nuclear magnetic resonance structure of the protein nsP7[J]. Journal of virology, 2005, 79(20): 12905-12913.
- [84] Zhai Y, Sun F, Li X, et al. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7–nsp8 hexadecamer[J]. Nature structural & molecular biology, 2005, 12(11): 980-986.
- [85] Jiang H, Wang T, Kong L, et al. Reverse Genetics Systems for Emerging and Re-Emerging Swine Coronaviruses and Applications[J]. Viruses, 2023, 15(10): 2003.
- [86] Zhang Q, Shi K, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1[J]. Virology, 2016, 489: 252-268.
- [87] Sutton G, Fry E, Carter L, et al. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights[J]. Structure, 2004, 12(2): 341-353.
- [88] Liu S, Yu Q, Li S, et al. Expression and immunogenicity of recombinant porcine epidemic diarrhea virus Nsp9[J]. Virology, 2023, 587: 109861.

- [89] Smith E C, Case J B, Blanc H, et al. Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(12): 6418-6426.
- [90] Chinthapatla R, Sotoudegan M, Srivastava P, et al. Interfering with nucleotide excision by the coronavirus 3'-to-5' exoribonuclease[J]. *Nucleic acids research*, 2023, 51(1): 315-336.
- [91] Zhu L, Liu S, Zhuo Z, et al. Expression and immunogenicity of nsp10 protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Research in Veterinary Science*, 2022, 144: 34-43.
- [92] Sexton N R, Smith E C, Blanc H, et al. Homology-based identification of a mutation in the coronavirus RNA-dependent RNA polymerase that confers resistance to multiple mutagens[J]. *Journal of virology*, 2016, 90(16): 7415-7428.
- [93] Zhu M, Lv J, Wang W, et al. CMPK2 is a host restriction factor that inhibits infection of multiple coronaviruses in a cell-intrinsic manner[J]. *PLoS biology*, 2023, 21(3): e3002039.
- [94] Ren J, Ding Z, Fang P, et al. ATPase and helicase activities of porcine epidemic diarrhea virus nsp13[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 257: 109074.
- [95] Denison M R, Graham R L, Donaldson E F, et al. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity[J]. *RNA biology*, 2011, 8(2): 270-279.
- [96] hen Y, Cai H, Pan J, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(9): 3484-3489.
- [97] Niu X, Kong F, Hou Y J, et al. Crucial mutation in the exoribonuclease domain of nsp14 of PEDV leads to high genetic instability during viral replication[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 106.
- [98] Zeng W, Ren J, Yang G, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Its nsp14 Suppress ER Stress Induced GRP78[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4936.
- [99] Li S, Yang F, Ma C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nsp14 inhibits NF- κ B pathway activation by targeting the IKK complex and p65[J]. *Animal Diseases*, 2021, 1: 1-11.
- [100] Kindler E, Gil-Cruz C, Spanier J, et al. Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication[J]. *PLoS pathogens*, 2017, 13(2): e1006195.
- [101] Zhang Q, Ke H, Blikslager A, et al. Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF1 signaling[J]. *Journal of virology*, 2018, 92(4): 10.1128/jvi. 01677-17.
- [102] Wu Y, Zhang H, Shi Z, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nsp15 antagonizes interferon signaling by RNA degradation of TBK1 and IRF3[J]. *Viruses*, 2020, 12(6): 599.
- [103] 马雪萍,姚华,王雪等.滨蒿总黄酮对 H1N1 流感病毒感染的 A549 细胞先天免疫信号通路的影响[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2021,23(12):4724-4734.
- [104] Park G J, Osinski A, Hernandez G, et al. The mechanism of RNA cap by SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2022, 609(7928): 793-800.
- [105] Shi P, Su Y, Li R, et al. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation[J]. *Virus Research*, 2019, 265: 57-66.

- [106] Deng X, Buckley A C, Pillatzki A, et al. Inactivating three interferon antagonists attenuates pathogenesis of an enteric coronavirus[J]. *Journal of virology*, 2020, 94(17): 10.1128/jvi.00565-20.
- [107] Gordon R K, Kotowski I K, Coulson K F, et al. The role of non-animal origin feed ingredients in transmission of viral pathogens of swine: A review of scientific literature[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2019, 6: 273.
- [108] 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]. *Transboundary and emerging diseases*, 2018, 65(3): 660-675.
- [109] Kim Y, Yang M, Goyal S M, et al. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *BMC veterinary research*, 2017, 13: 1-9.
- [110] Jung K, Saif L J, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control[J]. *Virus research*, 2020, 286: 198045.
- [111] Langel S N, Paim F C, Alhamo M A, et al. Stage of gestation at porcine epidemic diarrhea virus infection of pregnant swine impacts maternal immunity and lactogenic immune protection of neonatal suckling piglets[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 426868.
- [112] 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 research*, 2016, 226: 93-107.
- [113] Langel S N, Wang Q, Vlasova A N, et al. Host factors affecting generation of immunity against porcine epidemic diarrhea virus in pregnant and lactating swine and passive protection of neonates[J]. *Pathogens*, 2020, 9(2): 130.
- [114] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(8): 1350.
- [115] Gerdts V, Zakhartchouk A. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses[J]. *Veterinary microbiology*, 2017, 206: 45-51.
- [116] 姜鑫,范学伟,王鉴波,等.猪群 PEDV、TGEV、GARV 感染状况调查与防控策略[J].*猪业科学*,2022,39(10):70-72+8.
- [117] 张备,薛沾枚,金振华,等.猪流行性腹泻的研究进展[J].*现代畜牧科技*,2022,(01):29-31+39.
- [118] Chang C Y, Peng J Y, Cheng Y H, et al. Development and comparison of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant trimeric full-length and truncated spike proteins for detecting antibodies against porcine epidemic diarrhea virus[J]. *BMC veterinary research*, 2019, 15: 1-13.
- [119] Sozzi E, Moreno A, Lelli D, et al. Development and validation of a monoclonal antibody-based competitive ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV)[J]. *Research in veterinary science*, 2018, 121: 106-110.
- [120] Fan B, Sun J, Zhu L, et al. Development of a novel double antibody sandwich quantitative

- enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2020, 7: 540248.
- [121] Wang Z, Jiyuan Y, Su C, 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.
- [122] Wang Q, Vlasova A N, Kenney S P, et al. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs[J]. *Current opinion in virology*, 2019, 34: 39-49.
- [123] Ding G, Fu Y, Li B, et al. Development of a multiplex RT-PCR for the detection of major diarrhoeal viruses in pig herds in China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2020, 67(2): 678-685.
- [124] Bigault L, Brown P, Bernard C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Viral RNA detection and quantification using a validated one-step real time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 283: 113906.
- [125] Zhu J H, Rawal G, Aljets E, et al. Development and clinical applications of a 5-Plex real-time RT-PCR for swine enteric coronaviruses[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1536.
- [126] Si G, Niu J, Zhou X, et al. Use of dual priming oligonucleotide system-based multiplex RT-PCR assay to detect five diarrhea viruses in pig herds in South China[J]. *Amb Express*, 2021, 11: 1-10.
- [127] Kim J K, Kim H R, Kim D Y, et al. A simple colorimetric detection of porcine epidemic diarrhea virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay using hydroxynaphthol blue metal indicator[J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 298: 114289.
- [128] Cassedy A, Parle-McDermott A, O’Kennedy R. Virus detection: a review of the current and emerging molecular and immunological methods[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 637559.
- [129] Yang K, Liang Y, Li Y, et al. Reverse transcription–enzymatic recombinase amplification coupled with CRISPR-Cas12a for rapid detection and differentiation of PEDV wild-type strains and attenuated vaccine strains[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2021, 413: 7521-7529.
- [130] Liu J, Tao D, Chen X, et al. Detection of four porcine enteric coronaviruses using CRISPR-Cas12a combined with multiplex reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 833.
- [131] Malbec R, Kimpston-Burkgren K, Vandenkoornhuyse E, et al. Agrodiag PorCoV: A multiplex immunoassay for the differential diagnosis of porcine enteric coronaviruses[J]. *Journal of immunological methods*, 2020, 483: 112808.
- [132] Kim Y K, Lim S I, Cho I S, et al. A novel diagnostic approach to detecting porcine epidemic diarrhea virus: The lateral immunochromatography assay[J]. *Journal of virological methods*, 2015, 225: 4-8.
- [133] Xu F, Jin Z, Zou S, et al. EuNPs-mAb fluorescent probe based immunochromatographic

- strip for rapid and sensitive detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Talanta*, 2020, 214: 120865.
- [134] Zou S, Wu L, Li G, et al. Development of an accurate lateral flow immunoassay for PEDV detection in swine fecal samples with a filter pad design[J]. *Animal diseases*, 2021, 1: 1-12.
- [135] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus genes*, 2012, 44: 167-175.
- [136] Gimenez-Lirola L G, Zhang J, Carrillo-Avila J A, et al. Reactivity of porcine epidemic diarrhea virus structural proteins to antibodies against porcine enteric coronaviruses: diagnostic implications[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2017, 55(5): 1426-1436.
- [137] Lin C M, Gao X, Oka T, et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains[J]. *Journal of virology*, 2015, 89(6): 3332-3342.
- [138] Srijangwad A, Tripipat T, Saeng-Chuto K, et al. Development and validation of indirect ELISA for antibody detection against different protein antigens of porcine epidemic diarrhea virus in the colostrum and milk of sows[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2021, 494: 113045.
- [139] Gerber P F, Gong Q, Huang Y W, et al. Detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in serum and colostrum by indirect ELISA[J]. *The Veterinary Journal*, 2014, 202(1): 33-36.
- [140] Thavorasak T, Chulanetra M, Glab-Ampai K, et al. Novel neutralizing epitope of PEDV S1 protein identified by IgM monoclonal antibody[J]. *Viruses*, 2022, 14(1): 125.
- [141] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Molecules and cells*, 2002, 14(2): 295-299.
- [142] Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Spike protein region (aa 636789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies[J]. *Acta virologica*, 2007, 51(3): 149-156.
- [143] Cruz D J M, Kim C J, Shin H J. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus research*, 2008, 132(1-2): 192-196.
- [144] Okda F A, Lawson S, Singrey A, et al. The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2017, 509: 185-194.
- [145] Sun D, Feng L, Shi H, et al. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Veterinary microbiology*, 2008, 131(1-2): 73-81.
- [146] Kong N, Meng Q, Jiao Y, et al. Identification of a novel B-cell epitope in the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virology journal*, 2020, 17: 1-9.
- [147] Li C, Li W, Lucio de Esarte E, et al. Cell attachment domains of the porcine epidemic

- diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of virology*, 2017, 91(12): 10.1128/jvi. 00273-17.
- [148] Oh J, Lee K W, Choi H W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Archives of virology*, 2014, 159: 2977-2987.
- [149] hang C Y, Hsu W T, Chao Y C, et al. Display of porcine epidemic diarrhea virus spike protein on baculovirus to improve immunogenicity and protective efficacy[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 346.
- [150] Zhang Z, Chen J, Shi H, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virology journal*, 2012, 9: 1-9.
- [151] Hefle S L, Jeanniton E, Taylor S L. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods[J]. *Journal of Food Protection*, 2001, 64(11): 1812-1816.
- [152] 梁雨萱,庞胜美,刘梅等.猪流行性腹泻疫苗研究进展[J].*河南农业科学*,2023,52(08):1-10.
- [153] 刘阳坤,王国川,韩雪英等.猪流行性腹泻病毒纤突蛋白 S1 抗原表位的串联表达及免疫原性分析[J].*黑龙江畜牧兽医*,2023,(15):1-7+129.
- [154] 王鹤儒,吴业红,何鹏等.糖基化对疫苗免疫原性影响的研究进展[J].*中国新药杂志*,2024,33(03):241-246.
- [155] 贺笋,季春辉,张慧敏等.稳定表达猪流行性腹泻病毒 S 蛋白的 CHO 细胞系的构建.*中国动物传染病学报*,1-11[2024-03-20].
- [156] Von Boehmer L, Liu C, Ackerman S, et al. Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells[J]. *Nature protocols*, 2016, 11(10): 1908-1923.
- [157] 吴芷静.单克隆抗体技术在畜禽疾病诊断中的应用[J].*中国畜禽种业*,2022,18(03):58-60.
- [158] 曾弘烨,宁文静,罗文新.ADC 药物的抗体组成及其作用靶点研究进展[J].*中国生物工程杂志*,2022,42(05):69-80.
- [159] 张志榜,彭维祺.猪流行性腹泻病毒单克隆抗体及其抗原表位的研究进展[J].*病毒学报*,2022,38(01):235-245.
- [160] 王翠,许宗丽,黄溢泓等.非洲猪瘟病原学检测技术研究进展[J].*中国动物检疫*,2022,39(02):74-81.
- [161] Olech M. Current state of molecular and serological methods for detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Pathogens*, 2022, 11(10): 1074.
- [162] 程满荣,徐葛林,李庆亮等.大鼠血清中抗轮状病毒 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及验证[J].*中国生物制品学杂志*,2020,33(01):61-65.