

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202004054

猪流行性腹泻病毒 S 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立*

姜睿姣^{1#}, 蒋子睿^{1#}, 王 印^{1,2**}, 姚学萍^{1,2}, 杨泽晓^{1,2}, 罗 燕^{1,2}

(1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】建立快速准确检测猪流行性腹泻病毒(PEDV)的方法。【方法】以原核表达的 PEDV S 蛋白为包被抗原, 建立高效特异的间接 ELISA 抗体检测方法。PCR 扩增 PEDV S 基因并命名为 SJ, 纯化鉴定后克隆至表达载体 pET-32a(+), 构建重组质粒 pET-32a(+)-SJ。重组蛋白经诱导表达、纯化鉴定后, 测定蛋白质量浓度, 以其为抗原包被于板。优化 ELISA 反应条件, 对建立方法的特异性、重复性、符合性及临床应用进行评估。【结果】原核表达的 PEDV S 蛋白约为 35 ku, 质量浓度为 1.145 mg/mL。Western-blot 鉴定其具有良好的反应原性, 以其作为包被抗原建立的 PEDV 间接 ELISA 抗体检测方法仅对 PEDV 血清检测为阳性, 具有良好的特异性。批内和批间重复性试验的变异系数均小于 6%, 利用该方法对临床样品检测的结果与市售检测结果符合率为 96.67%。【结论】该方法特异性良好, 重复性高, 成本低, 可用于临床 PEDV 血清抗体检测以及 PEDV 流行病学的监测, 对本病的预防具有重要意义。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; S 蛋白; 免疫印迹; 间接 ELISA

中图分类号: S 855.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 02-0235-06

Establishment of an Indirect ELISA Method for Porcine Epidemic Diarrhea Virus S Protein

JIANG Ruijiao¹, JIANG Zirui¹, WANG Yin^{1,2}, YAO Xueping^{1,2}, YANG Zexiao^{1,2}, LUO Yan^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

Abstract: [Purpose] To establish a rapid and accurate method for the detection of *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV). [Method] We established an efficient and specific indirect ELISA method based on the PEDV S protein. The PEDV S gene was amplified by PCR and designated as SJ. After purification and identification, it was cloned into the expression vector pET-32a(+) to construct the recombinant plasmid pET-32a(+)-SJ. After the recombinant protein was induced, purified and identified, the protein concentration was determined. Then the antigen was coated on the plate to optimize the ELISA reaction conditions. At last, specificity, repeatability, conformity and clinical application of the established method were evaluated. [Results] The S protein expressed in prokaryotes was about 35 ku, and the concentration was 1.145 mg/mL. It was identified by Western-blot as hav-

收稿日期: 2020-04-27

修回日期: 2020-05-27

网络首发时间: 2021-03-11 17:20:47

*基金项目: 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。姜睿姣(1996—), 女, 四川雅安人, 在读硕士研究生, 主要从事动物传染病病原微生物研究。E-mail: wn2jjj@163.com; 蒋子睿(1993—), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。E-mail: 506296716@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 王印(1968—), 男, 四川成都人, 博士, 教授, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。E-mail: yaanwangyin@tom.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210310.1136.001.html>



ing good reactivity. The PEDV indirect ELISA method used S protein as the coated antigen and only detected positive PEDV serum, showing good specificity. The variation coefficients of both intra-batch and inter-batch repeatability tests were less than 6%. The coincidence rate between the test results of clinical samples and the commercial test results was 96.67%. [**Conclusion**] This method has good specificity, high repeatability and low cost, and can be used for clinical PEDV serum antibody detection and PEDV epidemiological monitoring, which is of great significance for the prevention of this disease.

Keywords: porcine epidemic diarrhea; S protein; Western-blot; indirect ELISA

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) 引起的一种具有高度传播性的消化系统疾病, 临床上主要表现为急性肠炎、呕吐和水样腹泻等症状^[1]。该病可感染各年龄的猪, 秋冬季节为疾病的高发期^[2-3], 常引起仔猪高病死率^[4]。临床上, PEDV 可与猪轮状病毒 (*Porcine rotavirus*, PRV)、猪圆环病毒 (*Porcine circovirus*, PCV) 等其他病毒混合感染^[5], 流行范围极广。猪在潜伏期与发病期排泄的粪便、乳汁中都携带大量病毒, 对周围环境造成严重污染, 给各国养猪业造成了巨大的经济损失^[6-8]。

S 基因是 PEDV 主要的抗原决定基因, 由 4 152 nt 构成。编码形成的 S 蛋白属于 I 型糖蛋白, 由 1 383 个氨基酸组成^[9][S1 区 (1~789 aa) 和 S2 区 (790~1 383 aa)], 是 PEDV 主要致病蛋白。具有促进病毒膜融合、与细胞受体互作、信号传导、固定支撑、诱导自然宿主产生中和抗体等作用^[10-11]。S1 区含多个抗原表位和受体结合域, 是 S 蛋白主要的功能区; S2 区为跨膜区域, 该区域促进病毒与宿主细胞膜融合且相对较保守, 影响了病毒的侵染能力^[12]。本研究前期已对 PEDV 分离株做了全基因组测序 (GenBank 登录号: MK 702008), 发现 S1 区碱基发生了多次插入与缺失, 这可能会大大影响与受体结合的效率。通过对 S 蛋白进行分析, 截取 S 蛋白抗原决定簇和免疫优势区 2 个抗原性较高的片段进行蛋白表达, 并以之为包被抗原, 建立特异性强、重复性高、结果准确的间接 ELISA 抗体检测方法, 成功解决了抗原制备的问题同时丰富了 PEDV 诊断方法。

1 材料与方法

1.1 毒株、质粒及血清

PEDV 毒株、克隆载体 pMD-19T (simple)、

表达载体 pET-32a (+)、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 均由四川农业大学动检实验室保存; 猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪细小病毒 (PPV)、猪圆环病毒 (PCV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV)、猪伪狂犬病毒 (PRV) 和 PEDV 阳性血清均由四川农业大学动检实验室保存。

1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit 购自 Omega 公司; DNA Marker、反转录试剂盒、蛋白质 Marker (20~120 ku)、T4 DNA 连接酶和 IPTG 均购自大连宝生物工程有限公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司; Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司; HRP (辣根过氧化物酶) 标记的羊抗猪 IgG 和小牛血清购自上海生工生物工程有限公司; 猪流行性腹泻快速检测试剂盒购自深圳市绿诗源生物技术有限公司。

1.3 引物设计及合成

截取 S1 与 S2 区之间抗原决定簇区域进行载体构建。设计 1 对分别插入限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物并引入保护碱基, 送至上海生工生物工程有限公司合成, 引物信息见表 1。

1.4 目的基因 SJ 的扩增鉴定及重组质粒 pET-32a (+)-SJ 的构建

提取分离株 SNJ-P 的 RNA, 转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板使用引物 (SNJ-F 和 SNJ-R) 进行 PCR 扩增, 获得 SJ 基因。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、57 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物回收纯化后与 pMD-19T (simple) 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中。提取质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴

表 1 引物序列
Tab. 1 The primer sequences

引物 primer	引物序列 (5'→3') sequence (5'→3')	产物大小/bp products size
SNJ-F	CGGGATCCGTTTATTCTGTACACCCA	315
SNJ-R	CCGGTCGAGCTGTAAATATTCTGTCTAATACTC	

注: 下划线为酶切位点。
Note: The underlines represent the restriction sites.

定后, 取 50 μL 酶切产物添加至 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳分离, 纯化得到 SJ 目的基因片段, 克隆至表达载体 pET-32a (+), 构建重组质粒 pET-32a (+)-SJ。

1.5 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

将鉴定正确的重组表达质粒 pET-32a (+)-SJ 与 pET-32a (+) 空载分别转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 培养至菌液 OD_{600 nm} 值在 0.6~0.8 左右时, 添加终浓度为 0.4~1.2 mmol/L 的 IPTG, 继续诱导表达 2~7 h (所有变量按棋盘法进行优化)。目的蛋白 SJ 用 Ni-Agarose-Resin 层析柱纯化, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转印至 NC 膜, 以猪 PEDV 阳性血清为一抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗猪抗体为二抗, 进行 Western-blot 分析鉴定。使用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定纯化的重组蛋白质量浓度。

1.6 间接 ELISA 抗体检测方法的建立及反应条件的优化

采用棋盘法进行测定。将纯化的 PEDV SJ 蛋白、阴阳性血清按梯度倍比稀释, 确定最佳抗原包被质量浓度、最佳血清稀释度和最佳酶标抗体稀释度。纯化的 PEDV SJ 蛋白分别作 1 : 1000、1 : 500、1 : 250、1 : 125 和 1 : 62.5 稀释; PEDV 阳性血清和阴性血清分别作 1 : 100、1 : 80、1 : 40、1 : 20 和 1 : 10 稀释, 酶标抗体按 1 : 4000、1 : 3000、1 : 2000 和 1 : 1000 稀释。按常规 ELISA 方法操作, 测定记录 OD_{450 nm} 值, 计算 P/N 值, 选定最佳稀释度, 并且对包被条件、封闭液及时间、显色时间进行逐一优化, 确定最优反应条件。

1.7 标准临界值的确定

按已建立的 ELISA 方法检测 20 份 PEDV 阴性血清, 计算出平均值 (\bar{X}) 与标准方差 (SD)。根据统计学原理分析, OD_{450 nm} 值 $\geq \bar{X} + 3SD$ 时, 在 99.9% 的统计学水平上即可判定为阳性; 反之, 当 OD_{450 nm} 值 $< \bar{X} + 3SD$ 时, 可判定为阴性。

1.8 特异性试验、重复性试验和符合率试验

用已建立的间接 ELISA 抗体检测方法, 检

测实验室保存的 PPV、PRV、TGEV、PRRSV、PCV 和 CSFV 阳性血清。每份血清做 3 个重复, 并设立 PEDV 阴性血清和阳性血清作为对照。测定 OD_{450 nm} 值, 计算平均值, 判定血清阴阳性用以确定方法的特异性。

批内重复: 选取 3 份 PEDV 不同抗体水平的猪血清, 在同一时间进行间接 ELISA 抗体检测试验, 每份血清重复 3 次, 测定 OD_{450 nm} 值, 分别计算 3 份血清 OD_{450 nm} 值的平均值、标准方差及变异系数; 批间重复: 选取 3 个不同时间包被的酶标板, 3 份 PEDV 不同抗体水平的猪血清, 在不同时间测定 OD_{450 nm} 值, 分别计算 3 份血清平均值、标准方差及变异系数。

随机选取 30 份血清, 分别用建立的 ELISA 方法与绿诗源猪流行性腹泻快速检测试剂盒同时进行检测, 比较两者符合率。

1.9 临床应用

为评价该方法在临床上的应用价值, 采集四川 6 个猪场 120 份血清进行检测, 测定 OD_{450 nm} 值, 统计阳性检出率。

2 结果与分析

2.1 SJ 基因的扩增及重组表达质粒的鉴定

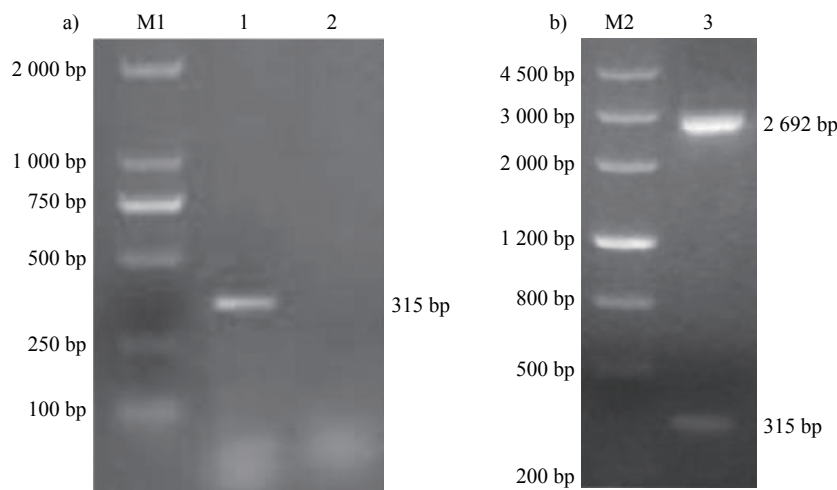
以分离株 SNJ-P 的 cDNA 作为模板扩增获得目的基因 SJ, 片段大小为 315 bp (图 1a)。回收目的条带, 构建重组质粒 pMD-19T-SJ, 使用快切酶 BamH I 和 Hind III 进行酶切鉴定 (图 1b) 得到 2 692 与 315 bp 2 条片段, 与预期相符。将酶切产物克隆至表达载体构建重组质粒 pET-32a (+)-SJ, 用相同 2 种快切酶鉴定得到 6 196 和 315 bp 2 条条带与预期结果相符。重组质粒送上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果分析表明重组质粒成功构建。

2.2 重组蛋白的鉴定及表达纯化

pMD-19T-SJ 和空载菌经 IPTG 诱导表达后, 用 SDS-PAGE 进行鉴定, 结果显示: 重组菌和空载菌分别在 35 和 24.8 ku 出现了特异性蛋白条带

(图 2a), 与预期相符, 表明成功表达 *SJ* 基因。采用 Ni-Agarose-Resin 层析柱纯化蛋白, Western-blot 结果显示: 诱导表达的重组蛋白可以与 PEDV

阳性血清发生特异性反应, 表明重组蛋白具有良好的反应原性 (图 2b), 并测得重组蛋白质量浓度为 1.145 mg/mL。

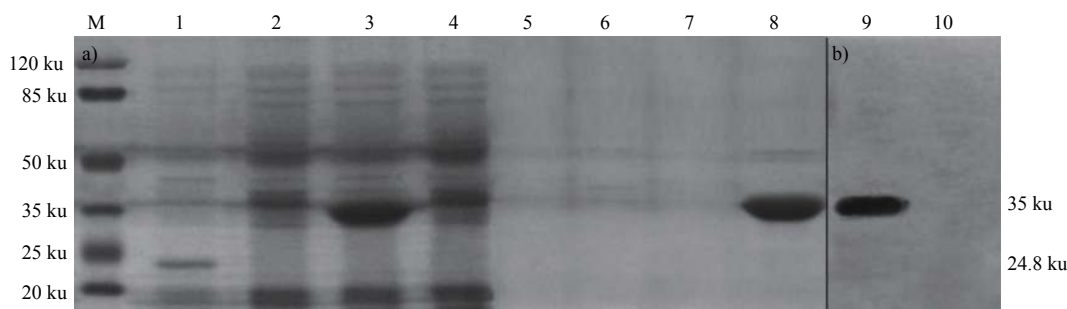


注: M1. Marker DL 2000; 1. *SJ* 基因扩增片段; 2. 阴性对照; M2. Marker DL4500; 3. 重组质粒双酶切鉴定。

Note: M1. Marker DL 2000; 1. the amplification fragment of *SJ* gene; 2. negative control; M2. Marker DL 4500; 3. double enzyme digestion of recombinant plasmid.

图 1 *SJ* 基因片段扩增及 pMD-19T-*SJ* 双酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Amplification of *SJ* gene fragment and pMD-19T-*SJ* double enzyme digestion identification



注: a) SDS-PAGE: M. 预染蛋白 Marker (20~120 ku); 1. 空载诱导; 2. 空载未诱导; 3. 重组蛋白诱导; 4. 重组蛋白未诱导; 5、6. 蛋白穿液; 7. 蛋白洗涤液; 8. 纯化蛋白; b) Western-blot: 9. 重组蛋白诱导; 10. 空载诱导。

Note: a). SDS-PAGE: M. protein molecular weight Marker (20-120 ku); 1. the induced empty vector; 2. the uninduced empty vector; 3. the induced connection vector; 4. the uninduced connection vector; 5, 6. protein in fluid flow; 7. protein washing liquid; 8. protein elution; b) Western-blot: 9. the induced target protein; 10. the induced empty vector.

图 2 重组 *SJ* 蛋白 SDS-PAGE 检测及 Western-blot 分析

Fig. 2 Expression of the target protein and Western-blot

2.3 PEDVS 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

2.3.1 最佳反应条件确定

采用棋盘法优化各参数后, 确定了最佳反应条件: 抗原稀释倍数为 1 : 125 (9.16 $\mu\text{g/mL}$), 每孔 100 μL 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 进行包被, 用 5% BSA 加 0.1% 的吐温-20 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 75 min, 最佳血清稀释倍数为 1 : 40, 1 : 1000 酶标抗体孵育 45 min, 底物显色时间为 10 min, 能有最优反应结果。

2.3.2 间接 ELISA 抗体检测方法临界值的确定

按已建立的间接 ELISA 抗体检测方法检测 20 份阴性血清, 计算其 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 平均值 (\bar{x}) 为 0.2011, 标准方差 (SD) 为 0.041。根据 $\bar{x}+3\text{SD}$ 计算出临界值为 0.3241, 记为 0.324。当样本 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.324$ 时判定为阳性, 否则判为阴性。

2.3.3 特异性试验

用建立的间接 ELISA 抗体检测方法, 检测试验室保存的 PPV、PRV、TGEV、PRRSV、PCV

和 CSFV 阳性血清, 并设立 PEDV 阴性血清和阳性血清作为对照。试验结果如表 2 所示: 除 PEDV 阳性血清外, OD_{450 nm} 值均小于 0.324, 判定为阴性。试验证明建立的间接 ELISA 抗体检测方法特异性良好。

2.3.4 重复性试验

选取 3 份 PEDV 不同抗体水平的猪血清, 进行重复试验, 批内与批间重复试验变异系数在 1.23%~5.84% 之间 (表 3)。试验证明建立的间接 ELISA 抗体检测方法重复性良好。

表 2 特异性试验结果
Tab. 2 Specificity of indirect ELISA

项目 item	PPV	PRV	TGEV	PRRSV	PCV	CSFV	阳性 positive control	阴性 negative control
OD _{450 nm}	0.013	0.125	0.21	0.147	0.16	0.147	1.317	0.144
判定结果 result	-	-	-	-	-	-	+	-

表 3 批内重复性试验结果
Tab. 3 The results of intra-assay repeat tests

项目名称 item	批内重复 intra-batch repeat			批间重复 inter-batch repeat		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
平均值 average value	1.867	0.137	0.557	1.822	0.140	0.565
标准方差 standard deviation	0.023	0.005	0.028	0.106	0.008	0.033
变异系数/% coefficient of variation	1.23	3.65	5.03	5.81	5.71	5.84

2.3.5 符合性试验

随机选取 30 份血清, 分别用建立的 ELISA 方法与市售 PEDV 抗体检测试剂盒同时进行检测, 计算符合率为 96.67%, 试验证明建立的间接 ELISA 抗体检测方法结果可靠。

2.3.6 临床血清检测结果

采集四川 6 个猪场 120 份血清进行检测, 测定 OD_{450 nm} 值, 结果显示哺乳仔猪血清阳性率为 72% (36/50), 妊娠母猪血清阳性率为 87.14% (61/70), 试验证明有较好的利用范围和检测效率。

3 讨论

PED 主要在欧洲和亚洲大规模暴发^[13-15], 给全球养猪业造成了巨大的损失。国内外研发了许多预防该病的疫苗, 大多以灭活苗与活疫苗为主^[16], 如马思奇等^[17-18]首先报道了氢氧化铝组织灭活苗, 使用后免疫效果达 85% 以上; 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研发的“猪传染性胃肠炎—猪流行性腹泻—猪轮状病毒”三联活疫苗^[19], 虽然使用后能在一定时间内降低猪群 PED 的感染率, 但预防效果都在疫苗接种一段时间后降低, 这可能是由 PEDV 变异导致疫苗无法起到很好的保护作用, 使得疫情难以控制^[20]。对免疫猪群抗体水平的检测是 PED 有效防控的关

键, 建立一种快捷、方便和准确的 PEDV 检测方法十分迫切。现已有很多关于 PEDV 的 ELISA 检测方法, 但大多以双抗夹心 ELISA 为主^[21-23], 单克隆抗体制备花费时间长、效率低且对技术要求高, 不是特别适用于规模化生产及检测。目前市场上只有少量 PEDV 抗体检测试剂盒售卖, 抗原大都包被的是全病毒^[24-26], 易出现假阳性, 间接 ELISA 抗体检测方法相比较而言, 操作更简便、成本更低、特异性更强以及具有更高的利用价值。此外还有许多检测手段, RT-qPCR^[27]虽然特异性好、灵敏性高, 但依赖于仪器设备; 胶体金^[28]虽然成本低、检测快速, 但只能对病毒定性不能定量; PEDV 相比于其他冠状病毒分离培养的难度大很多, 且存在病毒传代的过程中丢失毒株的风险, 导致很难大量制备抗原。以具有抗原性的重组蛋白作为 ELISA 包被抗原, 可以很好地解决这一难题。

早期, 大多是以疫苗株 CV777 序列为基础建立的 PEDV 抗体检测方法^[29-30]。但是由于 PEDV 不断变异, 检测结果易受到影响。本研究通过分析分离得到的强毒株 SNJ-P 的 S 基因, 截取抗原性高的序列, 成功构建重组质粒, 表达纯化获得的 SJ 蛋白。以该蛋白作为包被抗原, 通过棋盘滴定法, 优化各反应条件, 建立 PEDV S 蛋

白的间接 ELISA 抗体检测方法。通过对 20 份阴性血清 OD_{450 nm} 值的测定, 计算出阴阳性临界值 $\bar{x}+SD=0.3241$ 。该方法检测 PPV、PRV、TGEV、PRRSV、PCV 和 CSFV 阳性血清均为阴性, 证明建立的间接 ELISA 抗体检测方法具有良好的特异性。3 份抗体水平不同的血清进行批内与批间重复试验, 计算变异系数在 1.23%~5.84% 之间, 证明建立的间接 ELISA 抗体检测方法具有良好的重复性。分别使用建立的间接 ELISA 方法与市售 PEDV 抗体检测试剂盒对 30 份血清进行检测, 计算符合率为 96.67%, 证明该方法结果可靠。再使用该方法对采自 6 个猪场不同种类猪的 120 份血清进行 PED 抗体检测, 最终的抗体阳性率为 80.83%; 其中, 妊娠母猪血清阳性率为 87.14%, 哺乳仔猪的血清阳性率为 72%。母猪在免疫之后机体能否产生抗体直接关系到哺乳仔猪能否通过乳汁获得抗体。该试验结果证明: 哺乳仔猪可以通过乳汁获得一定的免疫保护。获得的免疫保护力大小可能与乳汁中抗体水平的高低有关系^[31]。

4 结论

近年来, 流行毒株的不断变异导致现有疫苗不能提供足够保护, 加之更多的猪源性传染病可以与该病混合感染导致 PED 疫情更加复杂, 难以防控治疗。因此高效精确地诊断 PEDV 对有效实施疾病的控制措施至关重要, 这些措施有助于降低病毒进一步传播的风险^[32], 也为后续治疗争取宝贵的时间。本研究对 PEDV 强度株 SNJ-P 的部分 S 基因进行原核表达, 初步建立了 PEDV 抗体间接 ELISA 抗体检测方法。该诊断方法具有快捷、方便、准确等优点, 可以成为临床上对 PEDV 抗体水平的监控方法, 为以后诊断试剂盒的研制提供理论指导。

[参考文献]

- [1] SUN P, FAHD Q, LI Y Z, et al. Transcriptomic analysis of small intestinal mucosa from porcine epidemic diarrhea virus infected piglets[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132(7): 73. DOI: [10.1016/j.micpath.2019.04.033](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.033).
- [2] LIU J, LI L M, HAN J Q, et al. A TaqMan probe-based real-time PCR to differentiate porcine epidemic diarrhea virus virulent strains from attenuated vaccine strains[J]. Molecular and Cellular Probes, 2019, 45(6): 37. DOI: [10.1016/j.mcp.2019.04.003](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.04.003).
- [3] SUN D, WANG X, WEI S H, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2016, 78(3): 355. DOI: [10.1292/jvms.15-0446](https://doi.org/10.1292/jvms.15-0446).
- [4] FAN J H, ZUO Y Z. Progress in research of genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus and diagnostic methods for porcine epidemic diarrhea[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2013, 21(1): 54. DOI: [10.11569/wcjd.v21.i1.54](https://doi.org/10.11569/wcjd.v21.i1.54).
- [5] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. Virus Genes, 2012, 44(2): 167. DOI: [10.1007/s11262-012-0713-1](https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1).
- [6] 王艳丰, 张丁华, 李爱心, 等. PEDV、TGEV、PoRV 3 种猪病毒性腹泻病毒的流行现状及控制策略[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(2): 518. DOI: [10.16431/j.cnki.1671-7236.2018.02.029](https://doi.org/10.16431/j.cnki.1671-7236.2018.02.029).
- [7] TEMEEYASEN G, SINHA A, GIMENEZ-LIROLA L G, et al. Differential gene modulation of pattern-recognition receptor TLR and RIG-I-like and downstream mediators on intestinal mucosa of pigs infected with PEDV non S-INDEL and PEDV S-INDEL strains[J]. Virology, 2018, 517(4): 188. DOI: [10.1016/j.virol.2017.11.024](https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.024).
- [8] LI Z H, CHEN F Z, YE S Y, et al. Comparative proteome analysis of porcine jejunum tissues in response to a virulent strain of porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated strain[J]. Viruses, 2016, 8(12): 323. DOI: [10.3390/v8120323](https://doi.org/10.3390/v8120323).
- [9] SPAAN W, CAVANAGH D, HORZINEK M C. Coronaviruses: structure and genome expression[J]. Journal of General Virology, 1988, 69(6): 2939. DOI: [10.1099/0022-1317-69-12-2939](https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-12-2939).
- [10] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. Virology Journal, 2015, 12(1): 193. DOI: [10.1186/s12985-015-0421-2](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2).
- [11] DIEP N V, NORIMINE J, SUEYOSHI M, et al. Novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) variants with large deletions in the spike (S) gene coexist with PEDV strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: a new disease situation[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170126. DOI: [10.1371/journal.pone.01-70126](https://doi.org/10.1371/journal.pone.01-70126).
- [12] 孙东波, 冯力, 时洪艳, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白中和表位区单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(11): 887.
- [13] WANG X Y, XU X, HU W, et al. Visual detection of porcine epidemic diarrhea virus using a novel reverse transcription polymerase spiral reaction method[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 116. DOI: [10.1186/s12-917-019-1851-7](https://doi.org/10.1186/s12-917-019-1851-7).
- [14] YANG W T, CHEN W W, HUANG J L, et al. Generation, identification, and functional analysis of monoclonal antibodies against porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2019, 103(5): 3705. DOI: [10.1007/s00253-019-09702-5](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09702-5).

(下转第 267 页)