

研究报告



动物病毒学专栏

猪流行性腹泻病毒流行株 S 蛋白高变区 B 细胞线性表位肽的鉴定

刘英杰¹ 李凤平^{2,4} 董世娟^{2,3} 王瑞阳^{2,4} 于瑞嵩^{*2,3} 王燕^{*1} 李震^{2,3}

1 齐鲁工业大学生物工程学院(山东省科学院) 山东 济南 250353

2 上海种猪工程技术研究中心 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

3 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106

4 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

摘要:【背景】对猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)经典毒株与流行毒株 S 蛋白氨基酸序列比对显示, 变异位点主要集中在 S 蛋白的 N 端。【目的】鉴定 PEDV 流行毒株 S 蛋白高变区(S_{10A}, 1–496 aa)的 B 细胞线性表位肽, 特别是流行毒株特异性 B 细胞表位肽。【方法】以 SDS-PAGE 割胶纯化大肠杆菌表达的 PEDV 流行株 SD2014 S 蛋白高变区片段(S_{10A}^{SD2014}), 免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体; 在 *E. coli* 中谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GST)融合表达覆盖 S_{10A}^{SD2014} 序列全长且彼此重叠 8 个氨基酸残基的系列 16 肽。以制备的抗 S_{10A}^{SD2014} 多抗为一抗, 通过 Western blot 筛选系列 16 肽中的阳性反应性 16 肽, 鉴定 S_{10A}^{SD2014} 上的 B 细胞线性表位肽; 利用抗 PEDV 经典毒株(CV777) S 蛋白高变区片段(S_{10A}^{CV777})多抗血清鉴定 S_{10A}^{SD2014} 上的保守性 B 细胞线性表位肽。【结果】重组表达的 S_{10A}^{SD2014} 相对分子质量约为 72 kD; 纯化的 S_{10A}^{SD2014} 表位肽能被 PEDV 阳性血清识别。制备的抗 S_{10A}^{SD2014} 多抗可以识别 PEDV DR13 弱毒株。利用抗 S_{10A}^{SD2014} 血清和抗 S_{10A}^{CV777} 血清从 61 个 GST 融合表达的 16 肽中鉴定到 28 个阳性反应 16 肽, 其中 13 个为 2 种血清共同识别 16 肽。对 24 株 PEDV 不同亚群代表毒株的对应区域进行同源性分析表明 2 个阳性 16 肽为保守性表位肽。【结论】确定了 PEDV 流行株 SD2014 S 蛋白高变区的 B 细胞线性表位肽, B 细胞线性表位肽, 特别是流行毒株特异性表位肽的确定有助于了解 S 蛋白的结构与功能, 为建立以表位为基础的 PEDV 感染检测方法打下良好基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, 纤突蛋白高变区, 多克隆抗体, B 细胞线性表位

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (31402219, 31572519); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9)

***Corresponding authors:** YU Rui-Song; Tel: 86-21-62200389; E-mail: yursong@163.com

WANG Yan; Tel: 86-531-89631192; Email: qingyuanwangyan@163.com

Received: 15-02-2019; **Accepted:** 20-05-2019; **Published online:** 29-05-2019

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0500101); 国家自然科学基金(31402219, 31572519); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第 6-1-9 号)

***通信作者:** 于瑞嵩; Tel: 021-62200389; E-mail: yursong@163.com

王燕; Tel: 0531-89631192; Email: qingyuanwangyan@163.com

收稿日期: 2019-02-15; **接受日期:** 2019-05-20; **网络首发日期:** 2019-05-29

Identification of B cell linear epitopes containing peptides on the hypervariable region of porcine epidemic diarrhea virus S protein

LIU Ying-Jie¹ LI Feng-Ping^{2,4} DONG Shi-Juan^{2,3} WANG Rui-Yang^{2,4} YU Rui-Song^{*2,3}
WANG Yan^{*1} LI Zhen^{2,3}

1 School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan, Shandong 250353, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

4 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: **[Background]** Amino acid sequences alignment of the spike (S) proteins of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) classical and prevalent strains indicates that most of the variation maps to N-terminal region of the S protein. **[Objective]** The objective of this study is to identify linear B cell epitopes (BCE) containing peptides, especially prevalent strain specific linear BCE containing peptides, on the hypervariable region (S1_{0A}, 1–496 aa) of the S protein of PEDV prevalent strain. **[Methods]** The N-terminal hypervariable part of prevalent PEDV SD2014 S protein (S1_{0A}^{SD2014}) was recombinantly expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). Polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand white rabbits with S1_{0A}^{SD2014} purified by cutting out the aimed band from the SDS-PAGE. Serial Glutathione S-transferase (GST)-fusion expressed 16-mers with an overlap of 8 amino acids (aa) covering the entire S1_{0A}^{SD2014} sequence was produced in *E. coli*, and from which linear BCE containing 16-mers were identified by using western blot with prepared anti-S1_{0A}^{SD2014} serum as the primary antibody. The conserved linear BCE containing 16-mers on S1_{0A}^{SD2014} were identified with polyclonal serum against the counterpart of the S protein of PEDV CV777 vaccine strain (S1_{0A}^{CV777}). **[Results]** The relative molecular mass of the expressed S1_{0A}^{SD2014} was about 72 kD. The purified S1_{0A}^{SD2014} could be recognized by clinical porcine anti-PEDV serum. The polyclonal serum prepared by immunizing the rabbits with the purified S1_{0A}^{SD2014} could react with PEDV DR13 in Vero cells. From 61 16-mers, twenty-eight linear BCE containing 16-mers were identified by western blot using the prepared anti-S1_{0A}^{SD2014} and anti-S1_{0A}^{CV777} serum. Thirteen out of the 28 linear BCE containing 16-mers could be recognized by both of the 2 serum. Homology analysis of the corresponding region of 24 typical strains from different PEDV subgroups showed that 2 positive 16-mers were conserved. **[Conclusion]** The identification of linear BCE containing peptides, especially the prevalent PEDV S protein-specific 16-mers laid a foundation for the understanding the S protein structure and function, as well as for developing epitope-based diagnostic methods.

Keywords: PEDV, Hyper variable region of spike protein, Polyclonal antibodies, B cell linear epitope

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)所引起的一种猪急性、高传染性肠道疾病^[1]。虽然各种年龄阶段的猪对 PEDV 都易感,但 PEDV 对低于 2 周龄新生仔猪的致死率最高,可达 100%^[2]。自 20 世纪 70 年代初 PED 首次在欧洲报道以来, PED 流行已经给包括欧洲、亚洲和南美洲国家在内的世界养猪业造成了巨大的经济

损失^[3]。虽然 PED 弱毒/灭活疫苗在临床上被广泛使用,但 PEDV 在养猪国家的大规模流行仍没有得到有效的控制, PED 在我国(世界猪肉产量的 50%)已经成为仅次于猪繁殖与呼吸综合征之后的第二大猪疫病^[4]。

PEDV 的单股正链 RNA 基因组的长度约为 28 kb, 编码 4 个结构蛋白纤突蛋白(S)、膜蛋白(M)、囊膜蛋白(E)和核衣壳蛋白(N)^[5]。PEDV S 蛋白在病

毒表面形成棒状的三聚体,使得病毒在电子显微镜下呈现皇冠状形态。作为 I 型跨膜糖蛋白, S 蛋白介导病毒与宿主细胞表面受体结合(通过 S1 亚基),以及病毒膜与细胞膜的融合(通过 S2 亚基)^[6];同时 S 蛋白具有良好的免疫原性,是刺激宿主产生保护性中和抗体的主要抗原蛋白^[7-8],因此研究者常将 S 蛋白作为研制 PEDV 疫苗和诊断试剂的首选靶蛋白^[9-11]。已获得的抗 PEDV 单/多克隆抗体也大都针对 S 蛋白^[12-15],可能是由于 S1 亚基表面的多糖密度比 S2 亚基表面低,获得的中和性抗体大部分为识别 PEDV S 蛋白的可及性更强的 S1 亚基的抗体^[16-17]。利用制备的单克隆抗体或抗 PEDV 多抗血清已经在 S 蛋白上鉴定到 5 个表位区: S1 亚基 N 端结构域区(S1₀, 20-220 aa)^[12]、S1 亚基 A 结构域区(S1_A, 221-510 aa)^[12]、Collagenase equivalent (COE) 抗原区(499-638 aa)^[18]、S1/S2 连接区(636-789 aa)^[13]和 C 端抗原区(1 371-1 377 aa)^[14,19];这些表位区主要集中在 PEDV S 蛋白的 S1 亚基区。

抗原变异是导致 PEDV 经典株弱毒/灭活疫苗对目前流行毒株免疫失败的主要原因之一。根据最近解析的同为 α 冠状病毒属的 HCoV-NL63 的 S 蛋白三聚体结构,与受体结合的 PEDV S 蛋白的 S1 亚基包含 5 个结构域: S1₀、S1_A、S1_B、S1_C 和 S1_D^[12,16]。对临床腹泻样品中的 PEDV 新流行株的 S 蛋白序列分析显示,同经典毒株如 CV777 S 蛋白相比,目前流行毒株 S 蛋白的变异主要在其 S1 亚基,尤其是在 S1 亚基的 N 端 S1₀、S1_A 结构域更加集中(S 蛋白高变区, S1_{0A})^[20-24]。虽然研究者对 PEDV 的细胞受体目前仍不清楚^[25-26],但已有的研究结果显示, PEDV S1₀ 可以与唾液酸结合进而促进病毒的复制^[27-28]。最近, Li 等的研究发现 PEDV S1₀ 和 S1_B 结构域一个氨基酸残基的变异就可以导致突变病毒对中和性单克隆抗体的免疫逃逸^[12],显示 S1 亚基的抗原位点变异可能与 PEDV 新流行毒株免疫逃逸有关。最近,国内外研究者获得了多个识别 PEDV S1 亚基或抑制 PEDV 在细胞表面吸附的中和性单

克隆抗体^[12,15],并将这些抗体识别的表位限定到 S1 亚基的 5 个结构域^[12]。但对于 S1 亚基,特别是其高变区的表位详细信息的解析仍需要进一步的研究。

为了进一步明确 PEDV S 蛋白高变区(S1_{0A})抗原表位分布,本研究原核表达了 PEDV 流行株 SD2014 S 蛋白的高变区(1-496 aa; S1_{0A}^{SD2014})并制备了其多克隆抗体,利用制备抗 S1_{0A}^{SD2014} 多抗和抗 PEDV 经典弱毒疫苗株 CV777 S 蛋白的高变区(1-496 aa; S1_{0A}^{CV777})的多抗分别对覆盖 S1_{0A}^{SD2014} 全长且彼此重叠 8 个氨基酸残基的系列谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GST)融合 16 肽进行筛选,鉴定了 S1_{0A}^{SD2014} 上的 B 细胞线性表位肽和流行毒株特异性表位肽,研究结果为将来 PEDV 的免疫、净化以及 S 蛋白功能性研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞、菌株和质粒

PEDV DR13 弱毒株、Vero 细胞均为本实验保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) TOP 10 和 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司;原核表达载体 pET-32a、pXXGST-1 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶,上海皓嘉科技发展有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,上海前尘生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒, Axygen 生物技术(杭州)有限公司;抗 S1_{0A}^{CV777} 多抗,本实验制备;抗 PEDV 猪血清,采自临床 PEDV 感染康复母猪;Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG,上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜,上海鼎国生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG、常用生化试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司。

凝胶电泳仪、半干转膜仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PEDV SD2014 S 蛋白高变区片段(S1_{0A}^{SD2014}) 的表达及纯化

PEDV S1_{0A}^{SD2014} 的表达及纯化参照文献[29]中的方法进行。简述如下: 将经密码子优化的 PEDV SD2014 S 蛋白高变区(1-496 aa, AND76936.1)编码 DNA 片段插入至 pET-32a 的 *Hind* III/*Eco*R I 位点得到 pET-32a-S1_{0A}^{SD2014}。将测序验证正确的 pET-32a-S1_{0A}^{SD2014} 转化至 *E. coli* BL21, 以 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 的表达。

采用 SDS-PAGE 凝胶纯化表达的 PEDV S1_{0A}^{SD2014}: 收集 37 °C 诱导 6 h 的重组 *E. coli* BL21 (pET-32a-S1_{0A}^{SD2014}), 冰上超声破碎 20 min (150 W, 超声 4 s, 停 4 s); 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集包涵体, 包涵体以上样缓冲液溶解后进行 SDS-PAGE 电泳, 凝胶以 0.25 mol/L 的 KCl 染色 10 min, 用手术刀片将目的蛋白条带切下、装入透析袋, 60 V 电泳洗脱 120 min、反向电泳 15 min 回收 PEDV S1_{0A}^{SD2014}, -80 °C 保存备用。

1.2.2 抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 多抗血清的制备

将纯化的 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 与等体积的弗氏完全佐剂混合, 以 0.5 mg 蛋白/只的剂量经大腿内侧多点注射免疫 3 只新西兰大白兔, 同时以 PBS 免疫 1 只大白兔作为对照。每隔 14 d 加强免疫一次, 共免疫 4 次。分别于第一次免疫后的第 14、28、42、56 天耳部静脉取血, 间接 ELISA 检测抗体水平, 第 58 天颈动脉采血并收集血清。

1.2.3 ELISA 法检测血清的效价

(1) 免疫后兔血清抗体水平检测。以纯化的 PEDV S1_{0A}^{SD2014} (1 μg/mL) 包被酶标板, 4 °C 过夜, 以 PBST 洗板 3 次; 加入 5% 的脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h, 以 PBST 洗涤 3 次; 加入 1:1 000 倍稀释后的血清(不同时间点采集的兔血清), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入 1:10 000 倍稀释的辣根过氧化酶标记的山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次; 加入 TMB 底物显色液, 暗处显色 15 min, 加入 2 mol/L 的硫酸终止液, 酶标仪读取

OD₄₅₀ 值。

(2) 抗体滴度检测。除了一抗采用倍比稀释的免疫后 58 d 采集兔血清外, 其它操作同抗体水平检测。

1.2.4 抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清与 PEDV DR13 弱毒株的反应性

抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清与弱毒株 PEDV DR13 的反应性通过免疫组化和间接免疫荧光检测。

(1) 免疫组化。将 Vero 细胞接种至预先放置盖玻片的 24 孔板中, 待盖玻片上的细胞生长至 80% 时, 接入 100 TCID₅₀ PEDV DR13。待 60%–80% 细胞出现病变(约 18 h), PBST 漂洗 3 次, 细胞以 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 以含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 透化 15 min, 5% 羊血清室温封闭 1 h, 加入抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清(1:100)于 37 °C 孵育 1 h, 再加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:200)于 37 °C 孵育 1 h, DAB 显色并用显微镜观察并拍照。

(2) 免疫荧光。将 Vero 细胞接种至预先放置盖玻片的 24 孔板中, 待盖玻片上的细胞生长至 80% 后, 接入 100 TCID₅₀ 病毒。待 60%–80% 细胞出现病变(约 18 h), PBST 漂洗 3 次, 细胞以 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 以含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液透化 15 min, 5% 羊血清室温封闭 1 h, 加入 1% BSA 稀释的抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清(1:2 000)于 37 °C 孵育 1 h, 再加入 1% BSA 稀释的二抗(1:200)于 37 °C 孵育 1 h, DAPI (1:1 000) 37 °C 孵育 15 min 染细胞核, 显微镜观察并拍照。

1.2.5 系列 GST 融合 16 肽的表达

覆盖 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 截短肽序列全长且彼此重叠 8 个氨基酸残基的系列 16 肽的 GST 融合表达参照以前报道的方法^[30]进行。将外送合成并体外退火各个 16 肽的编码 DNA 片段插入到原核表达载体 pXXGST-1 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点; 测序验证正确后转化 *E. coli* BL21 并温度诱导融合 16 肽的表达; SDS-PAGE 分析正确表达融合蛋白的菌体 -20 °C 保存, 备用于 Western blot 筛选阳性反应性融合 16 肽。

1.2.6 SDS-PAGE 及 Western blot

SDS-PAGE 及 Western blot 参照以前报道的方法 [30] 进行。SDS-PAGE 结束后凝胶考马斯亮蓝 G-250 染色或将蛋白以 12 V 恒压半干转移 30 min 至 PVDF 膜上,转印膜以 10% 的脱脂奶粉封闭 5 h, 加入一抗(抗 His 单抗、抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 兔血清、抗 PEDV S1_{0A}^{CV777} 兔血清或 PEDV 阳性猪血清, 1:5 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗 (IgG-HRP, 1:20 000) 室温孵育 1 h, 以 TBST 洗涤 4 次, ECL 显色、暗室显影和定影。

1.2.7 PEDV S1_{0A} 序列分析和 B 细胞线性表位预测

为了分析 PEDV 流行株 SD2014 与经典疫苗株 CV777 的 S 蛋白高变区差异, 采用 ClustalX 2 比对 PEDV S1_{0A}^{SD2014} (AND76936.1) 与 PEDV S1_{0A}^{CV777} (ALS35469.1) 的氨基酸序列。

在网络服务器 (<http://tools.iedb.org/bcell/>) 采用 Bepipred 2.0、Chou & Fasman、Emini、Karplus &Schulz、Kolaskar &Tongaonkar 和 Parker 6 种方法对 PEDV S1_{0A} 进行 B 细胞线性表位预测。

1.2.8 阳性 16 肽的保守性分析

将获得阳性 16 肽的氨基酸序列分别与 24 株 2010 年以后报道的 PEDV 毒株的相应区域进行保守性比较分析。

2 结果与分析

2.1 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 氨基酸序列分析和 B 细胞线性表位预测

与 PEDV 经典弱毒疫苗株 CV777 S 蛋白高变区(S1_{0A}^{CV777}) 的氨基酸序列比对显示, PEDV 新流行毒株 SD2014 S 蛋白高变区(S1_{0A}^{SD2014}) 的氨基酸序列具有流行毒株典型的氨基酸残基插入/缺失, 即 ⁵⁹QGVN⁶² 和 ¹⁴⁰N 的插入和 ¹⁶⁰G 的缺失(图 1)。S1_{0A}^{SD2014} 与 S1_{0A}^{CV777} 的氨基酸序列一致性为 86%。

综合考虑 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 包含氨基酸残基的亲水性(Hydrophobicity)、柔性(Flexibility)、表面可及性(Surface accessibility)、抗原倾向性(Antigen propensity) 等特点, 采用 6 种方法对 B 细胞线性表位进行了预测。表 1 列出了 3 种以上方法预测一致的 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 上的抗原表位(氨基酸数目不小 7), 共 15 个。

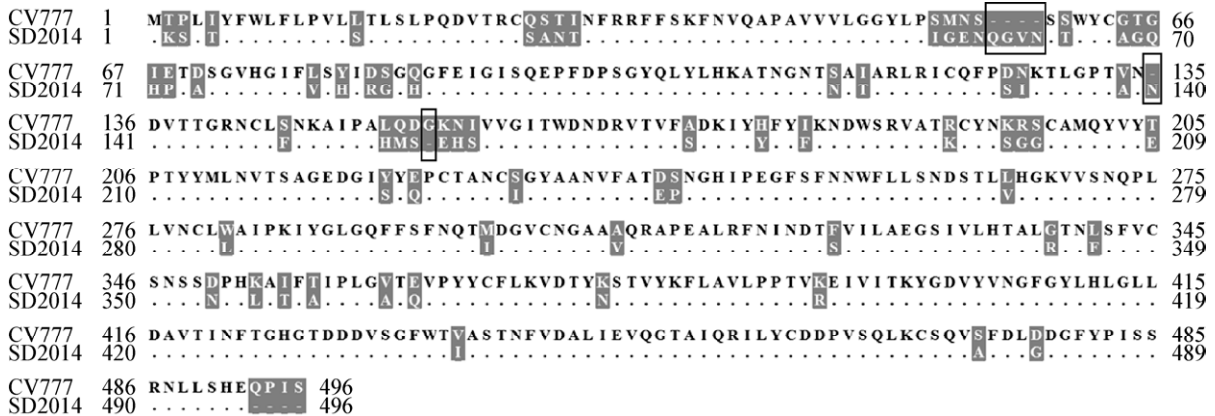


图 1 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 与 S1_{0A}^{CV777} 氨基酸序列比对
Figure 1 Amino acid sequence alignment of PEDV S1_{0A}^{SD2014} and S1_{0A}^{CV777}

注: 差异的氨基酸位点以灰色阴影标出; S1_{0A}^{SD2014} 中相同的位点以“.”代替; 插入/缺失的氨基酸位点以方框标出。
Note: Differential amino acids were shaded with grey; The identical amino acid in the sequence of S1_{0A}^{SD2014} was substituted with a “.”; The amino acid in rectangle was the insertion/deletion site.

表 1 预测的 PEDV S_{10A}^{SD2014} 的 B 细胞线性表位Table 1 Predicted B cell linear epitopes of PEDV S_{10A}^{SD2014}

编号 No.	起始位置 Start site	终止位置 End site	序列 Sequences (5'→3')
E1	14	44	LSTLSLPQDVTRCSANTNFRFFSKFNVQAP
E2	55	78	IGENQGVNSTWYCAGQHPTASGVH
E3	85	106	IRGGHGFEEIGISQEPFDPSPGYQ
E4	106	123	QLYLHKATNGNTNATARL
E5	132	150	KTLGPTANNDVTTGRNCLF
E6	154	176	IPAHMSEHSVVGITWDNDRVTVF
E7	183	213	FYFKNDWSRVATKCYNSGGCAMQVVEPTYY
E8	212	253	YYMLNVTSAGEDGISYQPCTANCIGYAANVFATEPNGHIPEG
E9	253	280	GFSFNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLL
E10	295	360	QFFSFNQITIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALRTNFSFVCSNSSNPHLATF
E11	378	384	DTYNSTV
E12	402	412	KYGDVYVNGFG
E13	423	458	TINFTGHGTDDDDVSGFWTIASSTNFVDALIEVQGTAI
E14	463	481	YCDPVSQKCSQVAFDLG
E15	480	493	LGDGFYPISSRNLL

2.2 PEDV S_{10A}^{SD2014} 的表达、纯化和 Western blot 检测

转化 pET-32a-S_{10A}^{SD2014} 的重组 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析显示出现了一条约 72 kD 的蛋白条带, 与预期大小一致(图 2A, 泳道 3)。表达的重组 S_{10A}^{SD2014} 可以被抗重组蛋白所带的 His 标签单抗特异性识别(图 2B), 表明 PEDV S_{10A}^{SD2014} 得到有效表达。S_{10A}^{SD2014} 在大肠杆菌细胞内均形成包涵体, 破碎上清液中几乎无目标蛋白出现(图 2A、2B, 泳道 4、5)。

采用 SDS-PAGE 割胶和电洗脱方法纯化包涵体蛋白, 如图 2A (泳道 6、7)所示, 得到了高纯度的 PEDV S_{10A}^{SD2014}。Western blot 分析纯化的重组 S_{10A}^{SD2014}, 结果显示得到的重组 S_{10A}^{SD2014} 不仅可以与抗 His 标签单抗特异性反应(图 2B), 还可以被猪抗 PEDV 阳性血清阳性识别(图 2D)。

2.3 抗 PEDV S_{10A}^{SD2014} 多克隆抗体的制备

以纯化的 PEDV S_{10A}^{SD2014} 包被 ELISA 板检测免疫的新西兰大白兔的抗体产生情况。结果如图 3 所示, 3 只兔子在首次免疫后 14 d 即产生了较高的抗 S_{10A}^{SD2014} 抗体, 之后缓慢增加。第 4 次免疫后

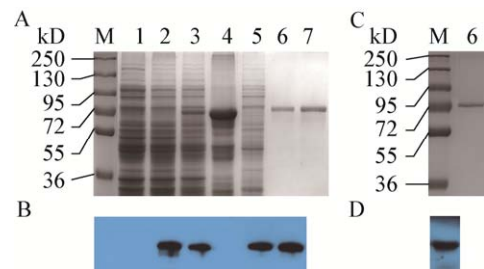


图 2 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表达、纯化的 PEDV S_{10A}^{SD2014}

Figure 2 SDS-PAGE and western blot analysis of expressed and purified PEDV S_{10A}^{SD2014}

注: A: SDS-PAGE 分析表达和纯化的 S_{10A}^{SD2014}; B: 以抗-His 标签单抗为一抗 Western blot 分析表达和纯化的 S_{10A}^{SD2014}; C: SDS-PAGE 分析纯化的 S_{10A}^{SD2014}; D: 以 PEDV 阳性猪血清为一抗 Western blot 分析纯化的 S_{10A}^{SD2014}; M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 *E. coli* 诱导前; 2: 未诱导的菌体对照; 3: 诱导 6 h 的菌体; 4、5: 分别为诱导 6 h 的重组 *E. coli* (pET-32a-S_{10A}^{SD2014}) 超声破碎离心沉淀和上清; 6: 纯化的 S_{10A}^{SD2014}; 7: 纯化的 S_{10A}^{SD2014} 浓缩后。

Note: A: SDS-PAGE analysis of the expressed and purified S_{10A}^{SD2014}, respectively; B: Western blot analysis of the expressed and purified S_{10A}^{SD2014} using anti-His mAb as the primary antibody; C: SDS-PAGE analysis of purified S_{10A}^{SD2014}; D: Western blot analysis of purified S_{10A}^{SD2014} using porcine anti-PEDV serum as the primary antibody; M: Protein marker; 1: Recombinant *E. coli* before induction; 2: Un-induced recombinant *E. coli*; 3: Recombinant *E. coli* (pET-32a-S_{10A}^{SD2014}) induced for 6 h; 4, 5: Centrifugal precipitate and supernatant of ultrasonic crushed recombinant *E. coli* (pET-32a-S_{10A}^{SD2014}) induced for 6 h, respectively; 6: Purified S_{10A}^{SD2014}; 7: Concentrated aliquot of purified S_{10A}^{SD2014}.

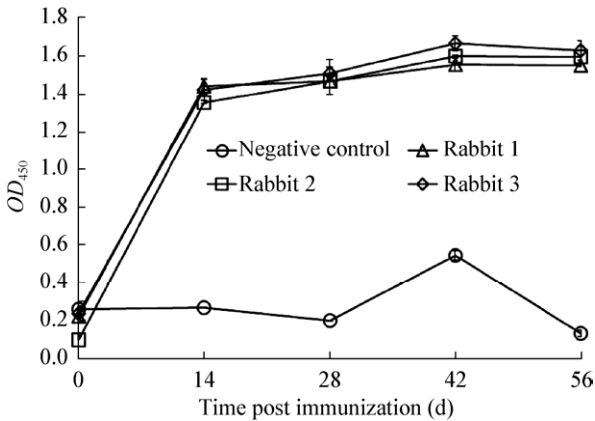


图3 不同免疫时间的血清抗体水平

Figure 3 Time course of sera antibody level

所收获的多克隆抗体的滴度, 1号兔子最高, 大于 $1:6.5 \times 10^6$; 2、3号兔子抗体滴度达到 $1:3276800$ (图4), 表明获得多抗兔血清具有很好的敏感性。

利用免疫组化和间接免疫荧光检测获得的抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清与 PEDV 经典弱毒株 DR13 的反应性, 结果表明获得的兔多抗血清能识别 Vero 细胞中的 PEDV DR13 (图 5A、5D、6A、6D), 而阴性血清不能染色 PEDV DR13 (图 5B) 或没有观察到荧光 (图 6B)。虽然免疫组化结果显示抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清和抗 S1_{0A}^{CV777} 血清与弱毒株 PEDV DR13 的反应性没有明显差异 (图 5C、5D), 但以抗 S1_{0A}^{CV777} 血清为一抗的间接免疫荧光强度明显强于以抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 血清为一抗的结果 (图 6C、

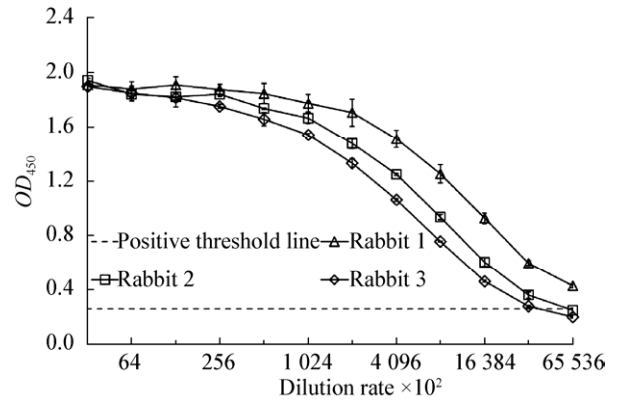


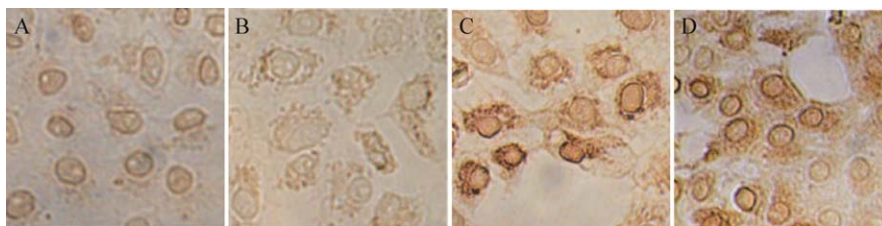
图4 血清抗体滴度的检测

Figure 4 Determination of the titers of the anti-sera

6D), 表明抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 多抗与弱毒株 PEDV DR13 的反应性弱于抗 S1_{0A}^{CV777} 多抗。

2.4 PEDV S1_{0A}^{SD2014} B 细胞线性表位区筛选

为了研究 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 上 B 细胞线性表位分布及其与抗 PEDV 经典弱毒疫苗株 S 蛋白高变区 (S1_{0A}^{CV777}) 多抗血清的交叉反应性, 分别以抗 S1_{0A}^{CV777} 多抗血清和抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 多抗血清为一抗, 通过 Western blot 筛选表达的系列 16 肽中的阳性反应性 16 肽。利用抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清从 61 个 GST 融合表达 16 肽中筛选到 25 个阳性反应性 16 肽 (即包含 B 细胞线性表位的 16 肽), 它们分别是 P4-P5、P13-P14、P17-P19、P22、P26-P28、P30-P33、P35-P38、P40、P45、P50-P51 和 P60-P61 (图 7B)。而抗 S1_{0A}^{CV777} 血清只与 61 个融合 16 肽中的 16 个

图5 免疫组化分析抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清和抗 S1_{0A}^{CV777} 血清与 PEDV DR13 弱毒株的反应性Figure 5 Cross-reactivity of anti-S1_{0A}^{SD2014} serum and anti-S1_{0A}^{CV777} serum with attenuated PEDV DR13 detected by immunohistochemical analysis

注: A: Vero 细胞对照; B、C、D: 感染弱毒株 PEDV DR13 的 Vero 细胞; A、D: 一抗为抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清; B: 一抗为阴性兔血清; C: 一抗为抗 S1_{0A}^{CV777} 血清; 放大倍数: $\times 400$ 倍。

Note: A: Vero cell control; B, C and D: Vero cell infected with attenuated PEDV DR13; A, D: Using anti-S1_{0A}^{SD2014} serum as the primary antibody; B: Using negative serum as the primary antibody; C: Using anti-S1_{0A}^{CV777} serum as the primary antibody; Magnification: $\times 400$.

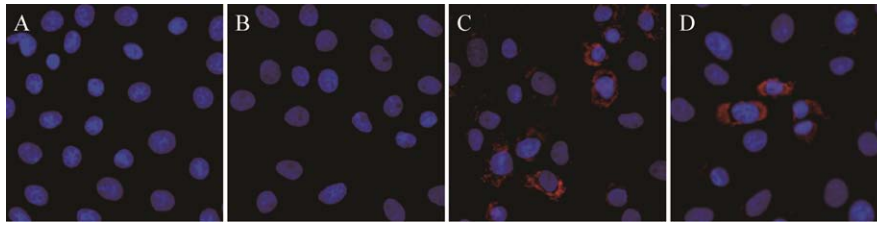


图 6 间接免疫荧光分析抗 $S10A^{SD2014}$ 血清和抗 $S10A^{CV777}$ 血清与 PEDV DR13 弱毒株的反应性

Figure 6 Cross-reactivity of anti- $S10A^{SD2014}$ serum and anti- $S10A^{CV777}$ serum with attenuated PEDV DR13 in Vero cell detected by indirect immunofluorescence assay

注: A: Vero 细胞对照; B、C、D: 感染弱毒株 PEDV DR13 的 Vero 细胞; A、D: 一抗为抗 $S10A^{SD2014}$ 血清; B: 一抗为阴性兔血清; C: 一抗为抗 $S10A^{CV777}$ 血清. 放大倍数: $\times 400$ 倍.

Note: A: Vero cell control; B, C and D: Vero cell infected with attenuated PEDV DR13; A, D: Using anti- $S10A^{SD2014}$ serum as the primary antibody; B: Using negative serum as the primary antibody; C: Using anti- $S10A^{CV777}$ serum as the primary antibody. Magnification: $\times 400$.

发生了特异性反应, 其中 13 个(P4-P5、P13-P14、P17-P18、P22、P26-P28、P33 和 P60-P61)是与抗 $S10A^{SD2014}$ 血清共同识别 16 肽, 另外 3 个(P34、P54 和 P56)为抗 $S10A^{CV777}$ 血清特异性识别的 16 肽(图 7B)。以阴性兔血清为一抗的 Western blot 结果显示, 筛选到的 28 个阳性反应性融合 16 肽均不与阴性兔血清反应(图 7C)。28 个包含 B 细胞线性表位 16 肽的序列及其在 PEDV $S10A^{SD2014}$ 上的分布如图 8 所

示, 在 $S10A^{SD2014}$ 的中部(201-328 aa)存在一个表位集中的区域, 包含了 28 个阳性反应性 16 肽中的 13 个; S 蛋白的信号肽区(SP)没有鉴定到阳性 16 肽。12 个抗 $S10A^{SD2014}$ 血清特异性识别的 16 肽分别位于 145-160 aa (P19)、233-264 aa (P30-P32)和 273-416 aa (P35-P38、P40、P45、P50-P51)区域。3 个抗 $S10A^{CV777}$ 血清特异性识别 16 肽分别位于 265-280 aa (P34)和 425-456 aa (P54、P56)区域(图 8)。

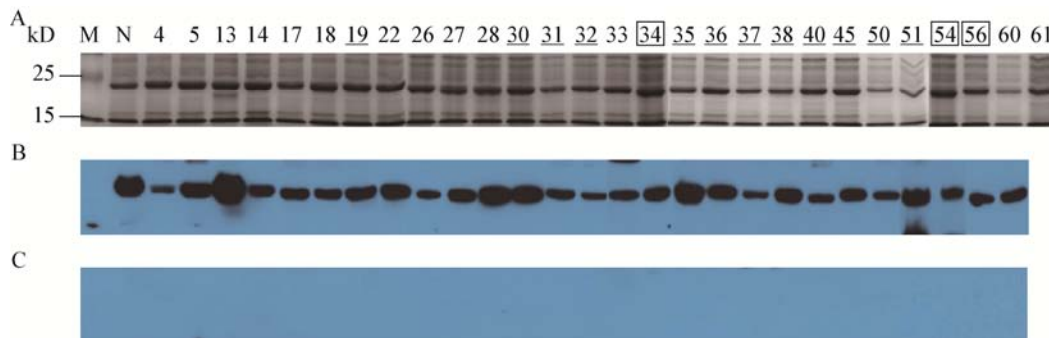


图 7 Western blot 验证获得的 PEDV $S10A^{SD2014}$ B 细胞线性表位肽

Figure 7 Western blot analysis of identified positive B cell linear epitopes of PEDV $S10A^{SD2014}$

注: A: SDS-PAGE 分析获得的阳性 16 肽; B: 以抗 $S10A^{SD2014}$ 血清或抗 $S10A^{CV777}$ 血清(34、54、56)为一抗 Western blot 验证获得的阳性 16 肽; C: 以阴性兔血清为一抗 Western blot 验证获得的阳性 16 肽; M: 蛋白质分子量标准; N: 阴性 16 肽; 4-5、13-14、17-19、22、26-28、30-38、40、45、50-51、54、56、60-61: 分别为 28 个 GST 融合表达的阳性 16 肽; 带下划线的编号为抗 $S10A^{SD2014}$ 血清特异性识别的 16 肽; 方框中的编号为抗 $S10A^{CV777}$ 血清特异性识别的 16 肽.

Note: A: SDS-PAGE analysis of positive 16-mers; B: Analysis of positive 16-mers by western blot using anti- $S10A^{SD2014}$ serum or anti- $S10A^{CV777}$ serum (for 34, 54 and 56) as primary antibody; C: Analysis of positive 16-mer by western blot using negative rabbit serum as primary antibody; M: Protein marker; N: Negative 16-mers; 4-5, 13-14, 17-19, 22, 26-28, 30-38, 40, 45, 50-51, 54, 56 and 60-61: Twenty-eight GST fusion expressed positive 16-mers, respectively; Numbers with a underline were 16-mers specially recognized by anti- $S10A^{SD2014}$ serum; Numbers in square were 16-mers specially recognized by anti- $S10A^{CV777}$ serum.

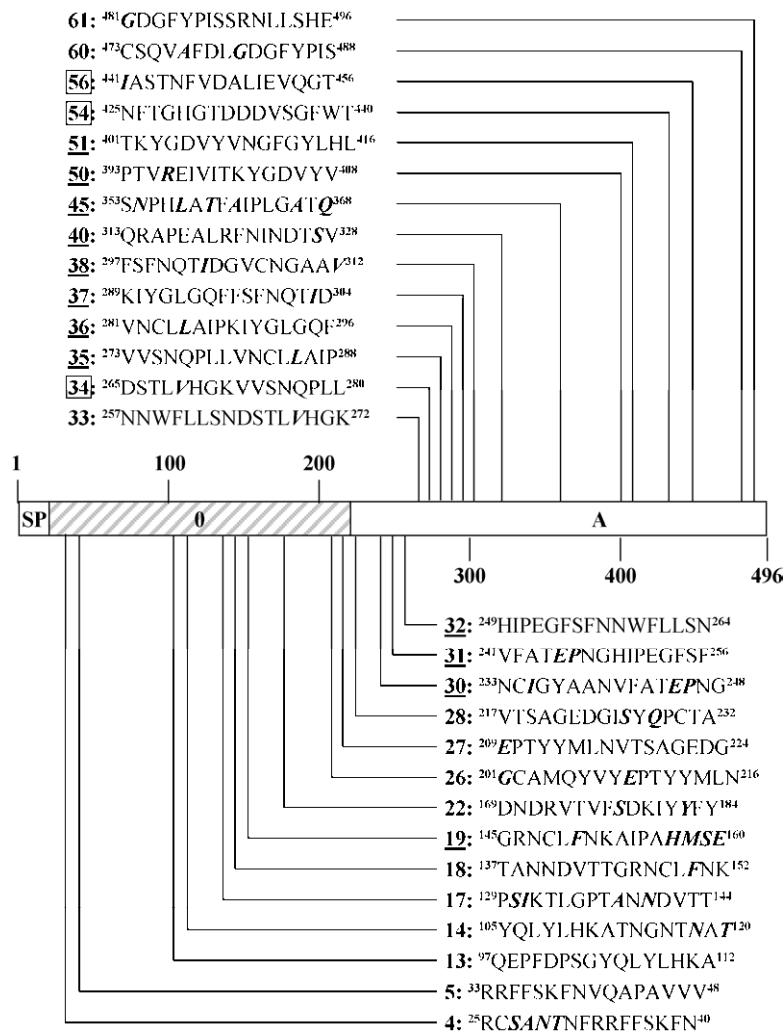


图 8 阳性反应性 16 肽在 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 上的分布示意图

Figure 8 Schematic diagram of positive 16-mers on PEDV S1_{0A}^{SD2014}

注: 长方框上/下面的数字代表 S1_{0A}^{SD2014} 的氨基酸残基位置; SP: 信号肽; 0、A: 分别为 S1 亚基 S1₀、S1_A 结构域; 28 个阳性反应性 16 肽的编号同图 7, 其起始和结束位置以上标出, 与 S1_{0A}^{CV777} 序列不同的氨基酸残基以黑斜体标出; 带下划线的编号为抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清特异性识别的 16 肽; 方框中的编号为抗 S1_{0A}^{CV777} 血清特异性识别的 16 肽。

Note: Numbers up/down the long fragment denoted the initial and terminal amino acids of S1_{0A}^{SD2014}; SP: Signal peptide; 0 and A: Domain S1₀ and S1_A of S1 subunit, respectively; Twenty-eight positive 16-mers were numbered as in Figure 7, whose initial and terminal sites were denoted in superscript and amino acids different from that of S1_{0A}^{CV777} were marked in black italics; Numbers with a underline were 16-mers specially recognized by anti-S1_{0A}^{SD2014} serum; Numbers in square were 16-mers specially recognized by anti-S1_{0A}^{CV777} serum.

2.5 阳性反应性 16 肽的保守性分析

选取 24 株 2010 年以后报道的不同亚型 PEDV 代表毒株, 对 24 株 PEDV S 蛋白序列与阳性反应性 16 肽相对应区域进行分析, 结果如图 9 所示。除了

2 个阳性反应性 16 肽在 24 株不同亚型的 PEDV 中完全保守外, 在其他 26 个阳性 16 肽对应的位置, 不同亚型或不同毒株间至少存在 1 个氨基酸残基的变异。

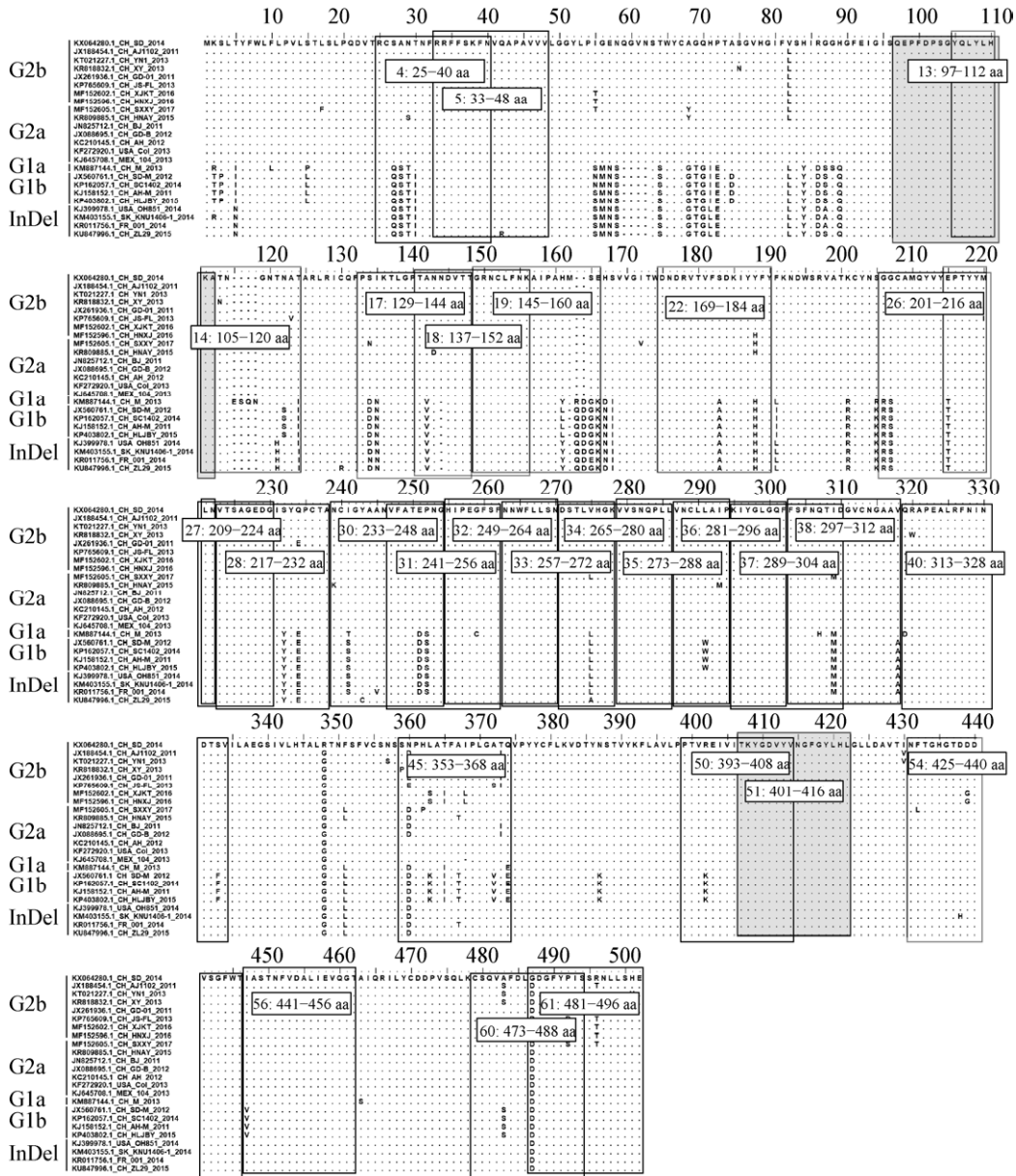


图 9 阳性反应性 16 肽在不同亚型 PEDV 毒株间的保守性分析

Figure 9 Sequence alignment analysis of positive 16-mers among different subtype PEDV strains

注: 28 个阳性 16 肽位置以实线或虚线方框标出, 其编号及其起始氨基酸位置标注同图 8; 保守性阳性 16 肽以灰色标出。

Note: The position of 28 positive 16-mers were marked in solid or dashed box, and 16-mers and their start and end sites were denoted as in Figure 8; The conserved positive 16-mers were marked in grey.

3 讨论与结论

2010 年以来, PEDV 新流行株的出现给全球养猪业带来了新的挑战, 特别是 PED 传入美洲地区后 PEDV 再次受到广泛的关注。虽然人们尝试通

过疫苗免疫来控制疫情的蔓延, 但是基于 PEDV 经典毒株的弱毒或灭活疫苗免疫母猪常常不能使仔猪获得对 PEDV 新流行毒株的有效保护, 因此 PEDV 依然是造成仔猪成活率低的重要致病原之

一,如何有效防控PED是养猪业面临的迫切问题^[5]。同其他冠状病毒一样, PEDV S蛋白在病毒进入细胞过程中起关键作用,因此也是中和抗体的主要作用靶点,针对S蛋白的中和抗体在预防PEDV感染保护中发挥关键作用^[8]。同经典疫苗株PEDV CV777相比,新流行毒株的典型特征是在其S蛋白的N端结构域(S_{10A},高变区)发生了氨基酸残基的插入、缺失或替代,虽然目前已经对PEDV S蛋白上的表位区有了初步的鉴定,发现了一些单抗的结合位点或抗原性区域^[12-15,18],然而PEDV流行株S_{10A}的氨基酸残基的插入、缺失或替代引起抗原表位的变化仍缺乏深入的了解。为了揭示PEDV流行株S_{10A}片段上的B细胞线性表位分布,本研究在流行株PEDV SD2014 S蛋白高变区(S_{10A}^{SD2014})上预测到15个B细胞线性表位区,利用抗S_{10A}^{SD2014}兔血清和抗PEDV经典弱毒疫苗株CV777 S蛋白的高变区(S_{10A}^{CV777})兔血清在S_{10A}^{SD2014}上共鉴定到28个包含B细胞线性表位的阳性反应性16肽,包括2个保守性16肽。

为了增加表位预测的可靠性,综合考虑氨基酸残基的亲水性、表面可及性、抗原倾向性等多种因素,采用6种不同的方法分别预测S_{10A}^{SD2014}上的B细胞线性表位。在3种以上方法均预测到的15个表位区中(表1),除了2预测到的表位区(E2和E3)没有鉴定到阳性16肽外,在其余13个预测的B细胞线性表位区中均鉴定到阳性16肽,而且鉴定到的28个16肽全部位于这13个预测的B细胞线性表位区内,即得到了表位预测的佐证,这表明两种方法在确定蛋白B细胞线性表位上是一致的。孙东波通过噬菌体肽库筛选在PEDV的S_{10A}上鉴定到2个B细胞线性表位区S1P1(248-280 aa)和S1P2(442-499 aa)^[31]。在本研究也预测到存在B细胞线性表位(表1, E9)的S1P1区,鉴定到5个阳性16肽(P31-P35),而在S2P2区鉴定到3个阳性16肽(P56和P60-P61),表明这两个表位区都存在多个B细胞线性表位。

对PEDV经典株和流行株的序列比对显示,S

蛋白N端(S_{10A})在不同PEDV毒株间表现出高度的遗传多样性,区分流行株和经典株PEDV的插入/缺失突变也位于该区域内^[20,22-23]。间接免疫荧光结果显示,本研究制备的抗PEDV流行毒株S蛋白S_{10A}^{SD2014}多抗与经典PEDV DR13的反应性明显低于该毒株与抗经典毒株S_{10A}^{CV777}多抗的反应性;利用单克隆抗体的研究也发现,与识别受体结合域(S_{1B})的单抗对PEDV流行株和经典株均具有较强的反应性和中和活性不同^[12,15],识别流行株S_{10A}区域表位的单抗对PEDV经典株的反应性和中和活性显著降低或丧失中和活性^[12]。PEDV S_{10A}区域的遗传多样性可能已经引起了其抗原性的差异。S_{10A}^{SD2014}与S_{10A}^{CV777}的氨基酸序列比对发现,除了⁵⁹QGVN⁶²和¹⁴⁰N的插入和¹⁶⁰G的缺失外,二者还存在67个氨基酸的替换(图1)。其中18个氨基酸替换和¹⁴⁰N的插入位于抗S_{10A}^{SD2014}血清特异识别的16肽(P19、P30-P31、P35-P38、P40、P45和P50)上;2个氨基酸替换分别位于2个抗S_{10A}^{CV777}血清特异识别的16肽P34和P56上;14个氨基酸的替换位于两种血清共同识别的16肽(P4、P17-P18、P22、P26和P28)上,但引起了S_{10A}^{SD2014}抗原性的变化,因为他们与抗S_{10A}^{CV777}血清反应性降低。我们推测这34个氨基酸的替换以及⁵⁹QGVN⁶²和¹⁴⁰N的插入引起了流行毒株S_{10A}^{SD2014}抗原性的变化,从而导致抗S_{10A}^{SD2014}血清不能识别PEDV DR13弱毒株S蛋白的对应多肽片段或与这些多肽片段结合能力显著减弱;而另外33个位于两种血清共同识别的16肽(P14、P27、P33和P60-P61)或阴性反应性16肽上的氨基酸替换可能没有对S_{10A}^{SD2014}的抗原性产生明显影响。

本研究鉴定到的28个阳性反应性16肽中有13个为2种血清共同识别的16肽(图7),然而两种血清与共同识别的表位肽的反应强度存在显著差异,抗S_{10A}^{CV777}血清与抗S_{10A}^{SD2014}血清鉴定到的6个强阳性表位肽(P4、P17-P18、P22、P26和P28)的反应性明显减弱,P4、P22几乎不能被抗S_{10A}^{CV777}血清识别。S_{10A}^{CV777}与S_{10A}^{SD2014}氨基酸序列比对显示,

在这些表位肽的中部存在一个或多个差异的氨基酸残基(P17-P18、P22、P26 和 P28), 或是在其末端存在 4 个连续差异的氨基酸残基(P4 和 P19) (图 8), 这些差异的氨基酸残基可能位于抗体识别表位的中心, 从而导致其与抗 S1_{0A}^{CV777} 血清的结合能力降低, 甚至不被识别。而 2 种血清反应性没有明显差异的表位肽 P5、P13、P14、P27、P33 和 P61 所在位置的 S1_{0A}^{CV777} 和 S1_{0A}^{SD2014} 氨基酸序列分别只在表位肽的末端存在 0、0、2 和 1 氨基酸残基的差异(图 8), 这些差异的氨基酸残基可能没有参与抗体与表位的识别或不起关键作用。虽然同 S1_A^{CV777} 相比, S1_A^{SD2014} 的 P60 序列中部存在 2 个氨基酸残基的变异(图 8), 但 2 种血清与 P61 的反应强度相当, 我们推测 P60 和 P61 可能共享一个表位基序, 且该表位基序位于 P60 与 P61 重叠的 8 个氨基酸中。由于本研究没有进行最小表位基序的鉴定, 这些差异的氨基酸残基是否位于最小表位基序中, 以及他们在交叉反应中的功能需要进一步验证。

在 S1_{0A}^{SD2014} 上鉴定到的 15 个抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清或抗 S1_{0A}^{CV777} 血清特异性识别的表位肽可以分为两种类型: 第一种类型表位肽序列的内部(P19、P30、P31、P34-P36、P38、P40、P45 和 P50)和/或末端(P19、P38 和 P56)在 S1_{0A}^{CV777} 和 S1_{0A}^{SD2014} 上存在氨基酸基序的差异; 第二种类型表位肽(P32、P37、P51 和 P54)的氨基酸序列在两种类型的 S1_{0A} 上是相同的。我们目前还很难准确解释为何相同的 16 肽只能被一种抗血清识别, 对这一现象可能的解释为: 2 种 S1_{0A} 中这 4 个表位肽相邻或相近的氨基酸残基的差异使两种 S1_{0A} 形成的二级或高级结构发生了变化, 从而影响了这 4 个表位肽在 S₀₁ 的表面展示, 即引起了免疫原性的差异。虽然我们以原核表达、SDS-PAGE 割胶回收的变性蛋白免疫兔子, 这种变性蛋白可能还保留或部分保留二级结构的差异, 从而在 S1_{0A}^{CV777} 中暴露的表位可能在 S1_{0A}^{SD2014} 中被隐藏, 即免疫原性的差异; 同样, 所收集到的抗 S1_{0A}^{CV777} 血清和抗 S1_{0A}^{SD2014} 血清的抗体成分也存在差异, 分别识别包含各自免疫原性基

序的不同的 16 肽。

总之, 本研究利用抗 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 多抗和抗 S1_{0A}^{CV777} 多抗在 PEDV S1_{0A}^{SD2014} 上鉴定到 28 个包含 B 细胞线性表位的 16 肽, 其中包括 12 个抗 PEDV 流行毒株 S1_{0A}^{SD2014} 血清特异性识别的表位肽和 3 个抗 S1_{0A}^{CV777} 血清特异性识别的表位肽。后续我们将进一步鉴定 S 蛋白其它区域的表位肽以及它们的最小表位基序, 以绘制出 PEDV S 蛋白的 B 细胞线性表位精细图谱, 为后续对 PEDV S 蛋白的功能研究、多表位肽疫苗的开发以及科学诊断方法的建立提供理论依据和实验基础。

REFERENCES

- [1] Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of Virology, 1978, 58(3): 243-247
- [2] Madson DM, Magstadt DR, Arruda PHE, et al. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 174(1/2): 60-68
- [3] Diel DG, Lawson S, Okda F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: an overview of current virological and serological diagnostic methods[J]. Virus Research, 2016, 226: 60-70
- [4] Wang QH, Vlasova AN, Kenney SP, et al. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs[J]. Current Opinion in Virology, 2019, 34: 39-49
- [5] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. Virology Journal, 2015, 12: 193
- [6] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. Annual Review of Virology, 2016, 3: 237-261
- [7] Yu RS, Dong SJ, Si FS, et al. Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(2): 205-216 (in Chinese)
于瑞嵩, 董世娟, 司伏生, 等. 猪流行性腹泻病毒反向遗传操作技术及其应用[J]. 生物工程学报, 2017, 33(2): 205-216
- [8] Song QY, Stone S, Drebes D, et al. Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions[J]. Virus Research, 2016, 226: 85-92
- [9] Hain KS, Joshi LR, Okda F, et al. Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of General Virology, 2016, 97(10): 2719-2731
- [10] Makadiya N, Brownlie R, van den Hurk J, et al. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen[J]. Virology Journal, 2016, 13: 57
- [11] Oh J, Lee KW, Choi HW, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. Archives of Virology, 2014, 159(11): 2977-2987

- [12] Li CH, Li WT, 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): e00273-17
- [13] Sun DB, Feng L, Shi HY, 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
- [14] Okda FA, 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
- [15] Gong L, Lin Y, Qin JR, et al. Neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus block virus attachment and internalization[J]. *Virology Journal*, 2018, 15: 133
- [16] Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, et al. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(10): 899-905
- [17] Xiong XL, Tortorici MA, Snijder J, et al. Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(4): e01628-17
- [18] Chang SH, Bae JL, Kang TJ, 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
- [19] Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2006, 354(1): 28-34
- [20] Temeeyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, et al. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 21: 205-213
- [21] Lara-Romero R, Gómez-Núñez L, Cerriteño-Sánchez JL, et al. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013-2016[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 215-224
- [22] Yu J, Chai XL, 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
- [23] Wang XM. Genetic properties of Chinese endemic porcine epidemic diarrhea virus strains and expression of high variant region of S gene[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2014 (in Chinese)
王晓梦. 猪流行性腹泻病毒中国流行株的遗传变异分析与 S 基因高变区的表达[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2014
- [24] Chen PF, Wang K, Hou YX, 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
- [25] Shirato K, Maejima M, Islam MT, et al. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(10): 2528-2539
- [26] Zhang QL, Liu XS, Fang YZ, et al. Detection and phylogenetic analyses of spike genes in porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in China in 2016-2017[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 194
- [27] Su YF, Hou YX, Wang QH. The enhanced replication of an S-intact PEDV during coinfection with an S1 NTD-del PEDV in piglets[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 228: 202-212
- [28] Su YF, Liu YC, Chen YM, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus in central China based on the ORF3 gene and the S1 gene[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 192
- [29] Yu RS, Gao WX, Li FP, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of peste des petits ruminants virus H protein[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2183-2190 (in Chinese)
于瑞嵩, 高位相, 李凤平, 等. 西藏株小反刍兽疫病毒 H 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2183-2190
- [30] Yu RS, Fan XM, Xu WX, et al. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus nucleoprotein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(1): 132-138
- [31] Sun DB. Identification of antigenic epitopes and screening receptor binding domain on the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008 (in Chinese)
孙东波. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白抗原表位鉴定及受体结合域的初步筛选[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所博士学位论文, 2008