

分类号: S855.3

学校代码: 10410

密 级: \_\_\_\_\_

学 号: 0202016205

# 江西農業大學 碩 士 學 位 論 文



针对 PEDV N 蛋白和 PDCoV N 蛋白单  
克隆抗体的制备

**Production of monoclonal antibodies  
against PEDV N and PDCoV N Protein**

申 请 人: 罗素贤

指 导 教 师: 唐玉新

学 科 专 业: 预防兽医学

所 在 院 ( 所 ): 动物科学技术学院

论 文 提 交 日 期: 二〇一九年六月

---

## 研究课题来源

- 1、本研究由国家重点研发专项基金项目（No. 2017YFD0500600）
- 2、江西省自然科学基金（No. 2018ACB21027 和 No. 20161BAB214169）
- 3、江西省教育厅科技项目（No. GJJ150388）

1. The National Key Research and Development Program [grant number 2017YFD0500600];
2. The Natural Science Foundation of Jiangxi Province [grant number 2018ACB21027 and 20161BAB214169];
3. Science and Technology Project of Education Development of Jiangxi Province [grant number GJJ150388].

## 独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文，是在指导教师指导下，通过我的努力取得的成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已经作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果，也不包含在江西农业大学或其它教育机构获得学位或证书而使用过的材料。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意。如被查有严重侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位论文作者亲笔签名：罗素贤 日期：2019.6.1

## 论文使用授权的说明

本人完全了解江西农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即学校有权送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在\_\_\_\_年后解密可适用本授权书。

不保密，本学位论文属于不保密。

(请在方框内打“√”)

学位论文作者亲笔签名：罗素贤 日期：2019.6.1

指导教师亲笔签名：王玉新 日期：2019.6.1

目 录

摘 要.....	IV
Abstract.....	V
第一章 文献综述.....	1
1 PEDV 的概述.....	1
1.1 病原学.....	1
1.2 PEDV 理化性质和体外分离培养特性.....	2
1.3 PEDV 的复制周期.....	3
1.4 PEDV 致病机理.....	3
1.5 PEDV 分子流行病学.....	3
1.6 PEDV 诊断.....	4
2 PDCoV 的概述.....	4
2.1 病原学.....	4
2.2 PDCoV 体外分离培养特性.....	5
2.3 PDCoV 致病机理.....	5
2.4 PDCoV 分子流行病学.....	5
2.5 PDCoV 诊断.....	6
3 单克隆抗体研究进展.....	6
4 细胞表面荧光免疫吸附法.....	7
5 针对 PEDV 单克隆抗体研究进展.....	7
6 针对 PDCoV 单克隆抗体研究进展.....	8
7 研究目的及意义.....	8
第二章 针对 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备.....	9
1 材料.....	9
1.1 细胞及实验动物.....	9
1.2 主要试剂及仪器.....	9
1.3 主要试剂的配制.....	9
2 方法.....	11
2.1 抗原制备.....	11
2.2 实验动物的免疫及小鼠血清的收集.....	12
2.3 间接 ELISA 确定最佳抗原抗体稀释度.....	13

2.4 抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备 .....	13
2.5 Western blotting 鉴定单抗反应性 .....	16
2.6 IFA 鉴定单抗反应性 .....	16
2.7 单克隆抗体亚型鉴定 .....	17
3 结果 .....	17
3.1 重组 PEDV N 蛋白纯化结果 .....	17
3.2 最佳抗原抗体工作浓度的确定 .....	18
3.3 抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体制备结果 .....	18
3.4 Western blotting 鉴定单抗反应性结果 .....	19
3.5 IFA 鉴定单抗反应性结果 .....	20
3.6 单抗亚型鉴定结果 .....	20
4 讨论 .....	21
第三章 针对 PDCoV N 蛋白单克隆抗体的制备 .....	22
1 材料 .....	22
1.1 细胞及实验动物 .....	22
1.2 主要试剂及仪器 .....	22
1.3 主要试剂的配置 .....	22
2 方法 .....	22
2.1 抗原制备 .....	22
2.2 实验动物的免疫与小鼠血清的收集 .....	22
2.3 间接 ELISA 确定最佳抗原抗体稀释度 .....	22
2.4 抗 PDCoV N 蛋白单克隆抗体制备 .....	22
2.5 Western blotting 鉴定单抗反应性 .....	22
2.6 IFA 鉴定单抗反应性 .....	23
2.7 单抗亚型鉴定 .....	23
3 结果 .....	23
3.1 重组 PDCoV N 蛋白纯化结果 .....	23
3.2 最佳抗原抗体浓度的确定 .....	23
3.3 抗 PDCoV N 蛋白单克隆抗体制备结果 .....	23
3.4 Western blotting 鉴定单抗反应性结果 .....	24
3.5 IFA 鉴定单抗反应性结果 .....	24
3.6 单抗亚型鉴定结果 .....	25
4 讨论 .....	25
全文总结 .....	27

目录

---

参考文献.....	28
致 谢.....	35

## 摘 要

猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 和猪德尔塔冠状病毒 (Porcine deltacoronavirus, PDCoV) 是当前猪病毒性腹泻的重要病原, 感染后仔猪出现呕吐、腹泻等症状, 具有高致病性和高死亡率的特点。2010 年 PEDV 变异株在中国大规模流行, 至今仍未得到有效控制; 新现 PDCoV 在香港最先被发现, 2014 年美国首次从腹泻猪群中检出 PDCoV, 随后亚洲地区多个国家相继暴发疫情, 对于该病尚无良好的防控制剂, 上述两种猪腹泻冠状病毒使养猪业遭受巨大的经济损失。

冠状病毒 N 蛋白相对保守, 是病毒自身的优势抗原, 常作为感染早期精准诊断的最佳靶标。本研究通过 IPTG 低温诱导原核表达 PEDV N 蛋白和 PDCoV N 蛋白, 镍柱纯化的两种 N 蛋白分别免疫 BALB/c 小鼠, 经眼眶静脉丛采血并收集血清, 建立间接 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法; 待血清效价高于 1:10,000 时, 将脾细胞与 SP2/0 细胞融合获得杂交瘤细胞。采用间接 ELISA 方法和细胞表面荧光免疫吸附 (cell surface-fluorescence immunosorbent assay, CSFIA) 法进行筛选, 分别获得一株针对 PEDV N 蛋白的杂交瘤细胞株, 分泌的单克隆抗体 (Monoclonal antibody, MAbs) 命名为 3D3 和 1B1, 比较后发现, CSFIA 筛选的 1B1 比 3D3 抗体效价高 10 倍; 同时, 通过间接 ELISA 方法筛选获得两株针对 PDCoV N 蛋白的杂交瘤细胞株, 分泌的 MAbs 命名为 2G12 和 2E2。间接免疫荧光试验表明, 3D3 和 1B1 均能特异性结合 PEDV; 2G12 能与 PDCoV 发生特异性结合。Western blotting 试验也表明, 3D3 和 1B1 能与 PEDV 和重组表达 PEDV N 蛋白反应; 2G12 和 2E2 能与 PDCoV 和重组表达 PDCoV N 蛋白反应。

综上所述, 本试验制备具有良好反应性的抗 PEDV N 和抗 PDCoV N 蛋白的 MAbs, 能为后续 PEDV 和 PDCoV 诊断试剂盒开发提供技术支撑, 也可以在 PEDV N 和 PDCoV N 蛋白功能研究中发挥重要作用。

**关键词:** PEDV; PDCoV; 单克隆抗体; 细胞表面荧光免疫吸附; 酶联免疫吸附试验

## **Abstract**

PEDV (Porcine epidemic diarrhea virus) and PDCoV (Porcine deltacoronavirus) are important pathogens of swine viral diarrhea, which mainly cause vomiting and diarrhea of infected piglet characterized by high mobility and mortality. PEDV variant was prevalent in China in 2010 and to date has not been effectively controlled. The newly emerge PDCoV was first found in Hong Kong. In 2014, PDCoV was first detected from diarrhea pigs in the United States. Subsequently, PDCoV break out in many countries in asia and there are no good prevention measures for the disease. Above two diarrhea coronavirus make a enormous economiclosses to pigs industry.

The N protein of conoravirus are relatively conservative and are the dominant antigen of the virus, which makes them as the best target for early accurate diagnosis of infection. In this study, PEDV N protein and PDCoV N protein were induced and expressed with IPTG treatment in low temperature. The BALB/c mice were immunized with purified by nickel column PEDV N protein and PDCoV N protein, respectively. The serums were acquired for the establishment of indirect ELISA, and the spleen and SP2/0 were fused when the titers reaches 1:10,000. The indirect ELISA and cell surface-fluorescence immunosorbent assay (CSFIA) were utilized to screen the positive monoclonal hybridoma, secreted MAbs (Monoclonal antibodies) against PEDV N protein were named as 3D3 and 1B1, respectively. Through the detection of indirect ELISA, the titer of 1B1 is higher 10 times than 3D3. Two strain hybridomas has been screened by indirect ELISA, and the secreted MAbs against PDCoV N protein were named as 2G12 and 2E2. The IFA (Indirect immunofluorescent assay) indicate PEDV can react with 3D3/1B1 and PDCoV react with 2G12. The western blotting indicate PEDV or recombinant PEDV N protein can react with 3D3/1B1 and PDCoV or recombinant PDCoV N protein can react with 2G12/2E2.

Overview, the production of MAbs against PEDV N protein and PDCoV N protein in this study possess good reactivity, and can provide support for the followed development of diagnostic kit of PEDV or PDCoV, and play a important role in the functional research of PEDV N protein or PDCoV N protein.

**Key: PEDV; PDCoV; Monoclonal antibody; cell surface-fluorescence immunosorbent assay; ELISA**

## 第一章 文献综述

### 1 PEDV 的概述

#### 1.1 病原学

##### 1.1.1 猪流行性腹泻病毒

猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是属于尼多病毒目, 冠状病毒科, 冠状病毒亚科, *Alpha* 冠状病毒属的成员, 能感染各个年龄段猪只, 造成不同程度的呕吐、腹泻和脱水症状, 成年猪只感染 PEDV 症状较轻, 很少造成死亡; 仔猪感染 PEDV 会产生严重腹泻、脱水等症状, 死亡率高达 100%, 使养猪业遭受灾难性的经济损失<sup>[1]</sup>。1971 年英国首次报导 PEDV, PEDV 开始在全球蔓延, 1978 年 Pensaert and de Bouck 分离第一株 PEDV (CV777), 在 CV777 疫苗的保护下, PEDV 疫情才逐渐得以控制。近年来, 由于变异株的出现, CV777 疫苗已无法为猪群提供良好的免疫保护, PED 再次大规模流行。2010 年, 我国暴发 PEDV 变异毒株引发的腹泻<sup>[2]</sup>, 随后日本<sup>[3]</sup>、韩国<sup>[4]</sup>和越南<sup>[5]</sup>等国家也有该病的报道; 2013 年 PED 首次在美国暴发, 当年生猪存栏量减少 10%, 并陆续向周边的加拿大和墨西哥等国蔓延<sup>[6-8]</sup>。

##### 1.1.2 PEDV 基因组结构

PEDV 是一种具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 全基因组长度约为 28 knt, 5'端和 3'端分别形成甲基化的帽子结构和 Poly A 尾, 中间包含至少 7 个开放阅读框, 它们的排列顺序依次为 5'UTR-ORF1a/1b-S-ORF3-E-M-N-3'UTR<sup>[9]</sup>。PEDV 四个结构基因依次编码病毒的纤突蛋白 (Spike, S)、囊膜蛋白 (Envelope, E)、膜蛋白 (Membrane, M) 和核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, N), 另外三个开放阅读框分别编码多聚酶蛋白 ORF1a (Open reading frame 1a)、ORF1b (Open reading frame 1b) 和辅助蛋白 ORF3 (Open reading frame 3)。

位于 ORF1 的多聚酶基因可分为 ORF1a 和 ORF1b, 同时能被病毒自身的酶水解形成 16 个非结构蛋白 (Non-structural protein, nsp)<sup>[10]</sup>。研究表明, ORF1 中的非结构蛋白不仅是病毒的复制酶, 而且能够对宿主细胞进行调控, 如负反馈调节宿主先天免疫应答从而促进病毒增殖<sup>[10]</sup>。

S 蛋白是位于病毒囊膜表面的纤突蛋白, 棒状的 S 蛋白三聚体是 PEDV 冠状外形的结构基础, 在 PEDV 识别宿主细胞、膜融合和病毒进入过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。S 蛋白是一种 I 型跨膜糖蛋白, 由 4,158 个碱基编码而成, 根据其他冠状病毒的 S 蛋白可将 PEDV S 蛋白分为 5 个部分, 依次为信号多肽区域、S1 区域、S2 区域、跨膜区和胞质区<sup>[12]</sup>。S1 亚基相较于 S2 亚基保守, 能够进一步分为氨基端域 (NTD) 和羧基域 (CTD) 两个亚区, 参与病毒与细胞相互识别, 作为受体结合域发挥重要功能<sup>[13]</sup>。此外, S1 亚基能作为诱导剂促使细胞凋亡, 这为抗病毒感染的研究提供了一个新的

方向<sup>[14]</sup>。与所有冠状病毒的特征相似, PEDV S2 亚基有负责膜融合的 FP (Fusion peptide)、负责锚定于细胞表面的 TM (Transmembrane anchor) 和位于胞内的 IC (Intracellular tail), 负责介导病毒的进入和膜融合过程<sup>[13, 15]</sup>。S 蛋白与 PEDV 的毒力和体外适应性有关, 且具有多个中和表位, 能够诱导机体产生中和抗体, 因此 PEDV S 蛋白能作为亚单位疫苗的首选抗原<sup>[16]</sup>。

ORF3 是 PEDV 的辅助蛋白, 与病毒的致病力相关, 同时 ORF3 能作为离子通道, 促进病毒增殖<sup>[17]</sup>。对于冠状病毒来说, 即使感染的临床症状相似, 它们基因组的 ORF3 同源性也可能较低。有研究指出, ORF3 与 PEDV 的适应性呈负相关, 因此在体外培养的适应性 PEDV 中, ORF3 的表达较低, 毒力较弱<sup>[18]</sup>。

E 蛋白是病毒的囊膜蛋白, 在病毒中少量存在, 且不同冠状病毒的 E 蛋白间同源性较低<sup>[19, 20]</sup>。在病毒与细胞相互作用中, E 蛋白介导细胞应激、凋亡和炎症应答等, 其在跨膜区还具有离子通道的功能, 与病毒的成熟, 增殖和有效释放密切相关<sup>[21-23]</sup>。

M 蛋白是病毒的膜蛋白, 具有丰富的膜糖成分, 由三部分组成, 分别是处于病毒外的 N 端、跨膜区域和处于病毒内的 C 端。M 蛋白不仅负责病毒的装配, 在机体中还能诱导中和抗体<sup>[24]</sup>和  $\alpha$  干扰素的产生<sup>[25]</sup>; 此外, M 蛋白能延长细胞 S 期, 促进病毒的复制增殖<sup>[26]</sup>。

N 蛋白是 PEDV 的核衣壳蛋白, 能包裹 PEDV 的 RNA, 为病毒遗传物质提供结构基础。此外, N 蛋白具有多种功能<sup>[27]</sup>, 能够调节宿主细胞的细胞周期、转录抑制和免疫应答, 促进病毒装配等<sup>[28, 29]</sup>。PEDV N 蛋白十分保守, 占病毒总蛋白比重较大, 在 PEDV 感染早期能检测大量 N 蛋白, 因此常常作为早期诊断 PEDV 的理想靶蛋白<sup>[30]</sup>。

## 1.2 PEDV 理化性质和体外分离培养特性

PEDV 的浮力密度为 1.18, 在 4-50℃ 下相对稳定, 容易被乙醚或氯仿灭活。PEDV 在 4℃, pH 3-10 的培养基内孵育 6 h, 仍然能够保持中低的感染能力; 在 37℃ 的培养基内孵育 6 h, 当培养基 pH 在 5-8.5 范围内, PEDV 才具有感染能力, pH 大于 9 或小于 4, PEDV 将完全失活。因此在温度越高 (大于 37℃) 的情况下, 酸、碱消毒剂对于 PEDV 的灭活效果越好<sup>[31]</sup>。此外, PEDV 还能被其他的消毒剂灭活, 如氧化剂、漂白剂、2% 氢氧化钠、甲醛与戊二醛、碳酸钠、离子或非离子洗涤剂、1% 强磷酸碘和脂溶性物质等。

和其他冠状病毒特性相似, PEDV 最初通过识别 APN 进而吸附于细胞表面, 因此 APN 表达丰富的细胞具备感染 PEDV 的基本条件, 早前有报道称 PEDV 能够在永生化的鸭肠上皮细胞 (MK-DIEC)<sup>[32]</sup>和猪小肠上皮细胞 (IPEC)<sup>[33]</sup>内培养, 但体外分离、培养 PEDV 仍然具有较大的难度。胰蛋白酶能水解 PEDV S 蛋白, 形成 S1 亚基和 S2 亚基, 这对于 PEDV 进入细胞、细胞膜融合和病毒粒子释放起着重要的作用, 促进病毒感染和扩散至周围细胞<sup>[34, 35]</sup>。Vero 细胞能耐受较高浓度的胰酶, 因此目前对于 PEDV 的培养主要集中于 Vero 细胞 (非洲绿猴肾细胞), 除此之外, 另一种非洲绿猴肾细胞 MARC-145 是良好的用于分离后适应性 PEDV 传代的靶细胞<sup>[35, 36]</sup>。在

PEDV 感染 Vero 细胞后，能够产生明显的 CPE (Cytopathic effect, CPE)，主要特征为细胞膜融合形成空泡，同时细胞贴壁性逐渐减弱，最后细胞裂解脱离细胞培养瓶底部。

### 1.3 PEDV 的复制周期

PEDV 与靶细胞表面受体相互作用是病毒复制周期的第一步，也是因为这重要的一步，后续 PEDV 的遗传物质才能进入并感染细胞。在冠状病毒与受体相互作用的过程中，S 糖蛋白三聚体发挥重要功能，大量研究表明冠状病毒 S1 亚基能够与细胞表面氨基肽酶 N (APN, CD13) 相互作用进而吸附靶细胞表面<sup>[37-40]</sup>。研究人员利用 Vero 细胞系对 PEDV 进行传代和大量的研究，但 Vero 细胞系并不表达 APN<sup>[34]</sup>。因此，Li W<sup>[41]</sup>等的研究发现，某些情况下 PEDV 并不依赖细胞表面的 APN 吸附细胞，而是识别细胞表面的硫酸乙酰肝素<sup>[42]</sup>。

PEDV 吸附在细胞表面后，S 蛋白被胰蛋白酶裂解，S2 亚基介导的膜融合开始。起初，S2 亚基中的融合肽(FP)暴露并插入靶细胞膜，然后反向平行的 HR1(Heptad repeat region 1)和 HR2(Heptad repeat region 1)区域形成一个稳定的六螺旋束形结构，在此过程中，融合肽(FP)与跨膜区(TM)逐渐紧密靠近从而使病毒与细胞膜发生融合，PEDV 遗传物质得以进入目标细胞内<sup>[43]</sup>。

事实上，病毒的复制是产生病毒全基因组大小的 mRNA，同时发挥部分功能；病毒的转录则是产生多段 mRNA 亚基因的过程。冠状病毒的复制酶和转录酶是由基因组 RNA 的翻译介导的，它们由 ORF1a 和 ORF1b 编码，在 ORF1a 产生过程中，合成的 pp1ab 参与程序化核糖体框移位，在病毒自身合成的木瓜样蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的作用下，多聚蛋白酶被切割为 16 个非结构蛋白 (nsp)，nsp1-11 由 ORF1a 编码，nsp12-16 由 ORF1b 编码。随后，复制酶和转录酶、病毒蛋白，可能还有细胞蛋白共同形成膜结合复制转录复合体 (Replicase-transcriptase complexes, RTC)，这些复合体聚集在细胞核周围进而进行复制转录功能<sup>[44, 45]</sup>。

PEDV 完成复制转录过程后，S、E 和 M 基因开始翻译成结构蛋白并沿着分泌通道被运送入细胞内质网和高尔基体能进行加工。随后，含有病毒 RNA 的 N 蛋白被运送至囊泡内，与加工完成的 S、E 和 M 蛋白共同装配，形成 PEDV 病毒粒子，由细胞内囊泡以胞吐的形式释放至胞外<sup>[46, 47]</sup>。

### 1.4 PEDV 致病机理

PEDV 进入小肠，结合表达 APN 的上皮细胞，经过短时间孵育，PEDV 进入细胞并迅速繁殖。在 PEDV 繁殖期间，引起细胞膜电位和线粒体功能的异常，细胞无法进行正常生命活动，最终 PEDV 的繁殖会引起膜融合，并破坏、裂解小肠上皮细胞，导致小肠消化吸收障碍，从而使动物机体表现腹泻症状<sup>[48]</sup>。

### 1.5 PEDV 分子流行病学

PED 被发现于 1971 年，大量暴发于 1972 年，因为与 TGE 相似的症状，最初被称为 TGE2，但该病病感染率高、死亡率低，呈现一过性腹泻的临床症状，特别是哺

乳仔猪不发病，因此将其命名为 ED (Epidemic Diarrhea)。1977 年，第一株 PEDV 在比利时被分离并被纳入冠状病毒科<sup>[49]</sup>，随后的八十年代至九十年代，PEDV 成为困扰日本和韩国等国传染病病原<sup>[50, 51]</sup>，尽管疫苗已广泛应用，但 PEDV 仍然危害韩国的某些地区<sup>[52]</sup>。

上世纪八、九十年代，PED 在欧洲并不多见，而在猪群中形成地方性流行，血清学调查也表明 PEDV 低水平流行<sup>[53, 54]</sup>，呈现零星散发的状态，直到 2005-2006 年，意大利再次暴发典型的 PED<sup>[55]</sup>。在 2007-2008 年期间，PED 在泰国严重暴发，对该次疫情分离的 PEDV 测序分析发现，与中国大陆 JS-2004-2 位于同一支系<sup>[56]</sup>。2010 年以来，我国接种 CV777 灭活毒疫苗或相关疫苗的猪场大规模暴发 PED<sup>[57]</sup>，调查研究发现引起腹泻病原为变异 PEDV，CV777 疫苗对新现的变异株无法提供有效的免疫保护<sup>[58, 59]</sup>。

2013 年，PEDV 首次在美国暴发，回溯性调查发现分离的 PEDV 美国株与中国 AH-2012 基因型相近，而 2013 年在韩国猪群流行的 PEDV 基因型则与美国 PEDV 毒株相近。因此，目前对于 PEDV 传染路径尚有争议<sup>[60, 61]</sup>。

## 1.6 PEDV 诊断

PEDV 与 PDCoV、PCV (Porcine cirovirus)、TGEV 和轮状病毒在临床较为常见，经常造成巨大的经济损失。由于它们症状相似，都能导致猪的腹泻症状，根据临床经验及症状往往很难区分。因此，必须依赖实验室检测的方法对它们进行检测，过去常用的检测手段包括病毒的分离、病毒的中和试验和间接免疫荧光试验等。随着分子生物学的快速发展，RT-PCR、qPCR、LAMP 和 ELISA 等应用于病原诊断方面，相比之下它们具有快速简单的特点，能准确诊断疾病病原<sup>[62]</sup>。

## 2 PDCoV 的概述

### 2.1 病原学

#### 2.1.1 猪德尔塔冠状病毒

猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)是引起猪腹泻的病原之一，属于尼多目冠状病毒科、冠状病毒亚科。冠状病毒亚科包括 *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* 和 *Deltacoronavirus*，PEDV、TGEV 和 PRCV (Porcine respiratory coronavirus)属于 *Alphacoronavirus* 属，猪血凝性脑脊髓炎病毒(Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV)属于 *Betacoronavirus* 属，PDCoV 属于 *Deltacoronavirus* 属成员。PDCoV 导致的临床症状与 PEDV 和 TGEV 相似，包括新生小猪的腹泻和呕吐，严重时可引起死亡<sup>[63]</sup>。PDCoV 于 2012 年首次在香港被报道，2014 年美国从感染猪群中分离到 PDCoV，随后逐渐在全球多国流行，染病仔猪死亡率高达 40%，给养猪业造成了巨大损失<sup>[64]</sup>。

#### 2.1.2 PDCoV 基因组结构

PDCoV 是有囊膜的单链正股 RNA 病毒，除 Poly A 尾外的基因组全长约为 25.4 knt。PDCoV 基因组结构排列顺序为：5'非编码区、开放阅读框 1a/1b (ORF1a/b)、纤

突 (Spike, S)、囊膜 (Envelop, E)、膜 (Membrane, M)、NS6、核衣壳 (Nucleocapsid, N)、NS7 和 3'非编码区<sup>[65]</sup>。大部分冠状病毒的结构蛋白和非结构蛋白的一般特性和它们在病毒复制中的作用已被研究证实<sup>[7]</sup>, 但 PDCoV 的结构和非结构蛋白在宿主中的具体作用还知之甚少。

研究表明, PDCoV N 蛋白类似于其他冠状病毒, 是一种多功能蛋白, 病毒感染时存在于细胞质和细胞核内, 表明病毒 RNA 或蛋白的合成需要 N 蛋白与核糖体亚基或核蛋白相互作用<sup>[66]</sup>。肖少波老师团队研究发现, PDCoV nsp5 蛋白能够切割 NEMO 的 Q231 抑制 RIG-I 通路、切割 STAT2 的 Q685 和 Q758 两个位点抑制 ISGs, 从而拮抗 IFN- $\beta$ ; 此外, NS6 也能够抑制 RIG-I 和 MDA5 与病毒双链 RNA 的结合, 从而减少 RLR 介导的 IFN- $\beta$  产生, 证明了 PDCoV 非结构蛋白能调控宿主细胞天然免疫, 有利于 PDCoV 的繁殖<sup>[67-69]</sup>。

## 2.2 PDCoV 体外分离培养特性

在细胞培养基中添加外源胰蛋白酶或胰液素的条件下, PDCoV 能够在 LLC-PK 和猪睾丸 (Swine testicular, ST) 细胞内分离培养。胰蛋白酶对于 PDCoV 在 LCC-PK 细胞中连续传代具有显著的促进作用, 当 PDCoV 在缺乏外源胰蛋白酶的培养基中感染 LLC-PK 细胞, 能够顺利复制繁殖, 但不能产生 CPE, 且病毒滴度降低<sup>[70]</sup>。因此, 胰蛋白酶对于 PDCoV 的繁殖来是非必须的, 但能促进 PDCoV 的增殖。

研究表明外源胰蛋白酶的添加并不促进 PDCoV 在 ST 细胞的增殖, 但培养基中补充胰液素或无菌猪的小肠内容物能够加速 PDCoV 增殖<sup>[70]</sup>。PDCoV 正常传代过程中, CPE 表现为细胞将变大、变圆和形成密集的颗粒、单独或成簇存在, 最后细胞萎缩脱落, 因细胞凋亡而死亡<sup>[71]</sup>。

## 2.3 PDCoV 致病机理

像 PEDV 和 TGEV 一样, PDCoV 导致肠上皮细胞大量损失, 小肠吸收出现障碍, 最终造成腹泻。同时, 肠上皮细胞功能性紊乱也可能导致吸收不良性腹泻的发生<sup>[48]</sup>。PDCoV 感染的结肠上皮细胞可见轻微空泡形成, 可能严重阻碍了水和电解质在肠道的重吸收<sup>[72]</sup>。感染 PDCoV 猪只的肠细胞大量损失, 与刷状缘膜结合的消化酶在小肠内显著减少, 最终导致消化障碍性腹泻<sup>[71]</sup>。虽然 PDCoV 的很多症状相似于 PEDV 和 TGEV, 都能导致小猪腹泻和呕吐, 最终导致仔猪脱水死亡, 但对于 PDCoV 的了解还太少, 对于 PDCoV 是否与 PEDV 和 TGEV 急性感染一样, 导致仔猪代谢性酸中毒和高钾血症, 仍然需要研究<sup>[7]</sup>。

## 2.4 PDCoV 分子流行病学

2007 年至 2011 年, Woo 等研究人员进行了冠状病毒的监测研究, 在检测的各种家畜和野生动物样品中首次发现了家猪粪便样品中的 Delta 冠状病毒<sup>[64]</sup>。证实 PDCoV 已存在于我国内陆省份和香港地区, 且被检样品阳性率达到 10.1%, 测定两株 PDCoV 毒株分别为 HKU15-44 和 HKU15-155 的全基因组序列, 通过比较, 与从亚洲豹猫和中国白鼬獾分离的冠状病毒的解旋酶、S 和 N 基因序列十分相似, 核酸同源性高达

99.8%，表明 Delta 冠状病毒具有在小型野生哺乳动物和猪等物种之间传播的潜能<sup>[64]</sup>。

2014 年 2 月 11 日，美国农业部首次宣布在美国本土猪群中检出 PDCoV。2014 年 2 月初，美国农业部动物疾病诊断实验室收到 42 份腹泻母猪和仔猪的粪便或小肠样品，来源于俄亥俄州的 5 个农场，通过 RT-PCR 检测发现 PDCoV 的阳性率高达 92.9%<sup>[73]</sup>。将美国的 PDCoV 毒株 (HKU15-OH1987) 与中国 HKU15-44 和 HKU15-155 毒株进行全基因组比较发现，它们的核酸同源性高达 99%。与此同时，美国的其他州也相继暴发 PDCoV，测定上述毒株的基因同样与中国 HKU15-44 和 HKU15-155 毒株同源性高达 98-99%<sup>[74]</sup>。至此，PDCoV 已出现在中国、美国、加拿大<sup>[75]</sup>、日本<sup>[76]</sup>、韩国<sup>[77]</sup>、越南<sup>[78]</sup>和泰国<sup>[79]</sup>等。

## 2.5 PDCoV 诊断

PDCoV 诊断方法分为两种：病毒学检测和血清学检测。病毒学检测包括用电子显微镜对病毒粒子直接观察、RT-PCR 和原位杂交检测病毒核酸、免疫荧光和免疫组化检测病毒抗原以及病毒分离。血清学检测包括间接免疫荧光试验 (IFA)、病毒中和试验 (VN)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)<sup>[80]</sup>。

## 3 单克隆抗体研究进展

单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 是一种普遍存在的结合分子，能高度特异性地与目标分子结合，是研究、诊断和治疗中不可或缺的蛋白制剂。1975 年，George Köhler 和 Cesar Milstein 最先发明杂交瘤细胞技术，成为最经典的 MAb 制备方法<sup>[81]</sup>，并凭借该项开创性的技术获得 1984 年诺贝尔奖。骨髓瘤细胞不同于 B 细胞，它虽然不能分泌任何抗体，但是却具有永远生长的特点；通过融合免疫后小鼠 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞，产生长期存活且分泌抗体的细胞<sup>[82]</sup>。

制备单克隆杂交瘤细胞已是行业内公认的 MAb 产生标准方法，经过几十年的发展，筛选单克隆杂交瘤细胞的方法也十分多样。有限稀释法是杂交瘤细胞克隆的常用技术，通过细胞计数，将杂交瘤细胞按照每孔 1-3 个细胞铺入 96 孔板内，培养 10-15 天后，用间接 ELISA 检测细胞上清液抗体水平，筛选出阳性细胞孔。连续进行三次有限稀释和间接 ELISA 筛选，挑出阳性单克隆杂交瘤细胞；激光分析和处理 (Laser-Enabled Analysis and Processing, LEAP) 方法，也可以较好筛选杂交瘤细胞，通过将抗体捕获在分泌细胞周围，采用荧光标记抗原量化抗体分泌程度，LEAP 设备识别阳性细胞，杀灭阴性细胞从而获取分泌阳性抗体的杂交瘤细胞<sup>[83, 84]</sup>；同时，ClonePix FL (Molecular Devices: In Situ Screening and Selection) 也是一种用于筛选单克隆杂交瘤细胞的仪器，通过半固体培养基固定融合的杂交瘤细胞，半固体培养基内的荧光标记抗体或抗原能特异性结合在细胞表面，ClonePix FL 仪器通过形状、大小和荧光程度能挑选出最好的单克隆杂交瘤细胞<sup>[85]</sup>；其次，利用人造细胞表面标记物也可以筛选目标细胞，通过荧光标记的蛋白 A、G 或 L 结合在抗体 Fc 等，特异性标记于抗体分泌细胞表面，最后使用流式细胞仪分选阳性细胞<sup>[86]</sup>；此外，毒素与抗原偶合是一种简单、快速和高效的产生 MAb 的方法，将毒素与抗原偶合物加入融合细胞内，细胞表面特异性抗体与抗原结合导致毒素失效，不能与抗原结合的细胞在毒素作用下

死亡，从而快速区分分泌特异性抗体的细胞<sup>[87]</sup>。

最新研究发现，非杂交瘤细胞的方法也可以用于制备 MAb，通过分析成熟浆细胞抗体库基因，直接表达特异性抗体蛋白，但该方法所用成本较高，需要利用流式细胞仪分选和高通量测序等技术<sup>[88]</sup>。

#### 4 细胞表面荧光免疫吸附法

细胞膜是两亲性的磷脂双分子层结构，其中包含多种蛋白质和糖链，共同发挥受体、酶、离子通道等功能。因此，研究人员设法修饰细胞膜表面结构从而使其具备新的功能，基因转染和化学修饰是细胞膜中外源蛋白引入的常用方法。根据细胞类型的不同，转染或表达常常无法在细胞内正常进行，或者表达蛋白也不能有效展示在细胞膜表面，甚至因为表达蛋白的缘故致使细胞表面的正常结构受损。上述技术难题一直阻碍着相关研究的推进。后续的研究发现，通过聚乙二醇修饰的脂质体与脂锚连接，能够有效延长脂质体在机体内的循环寿命<sup>[89,90]</sup>。而且，利用脂锚修饰细胞膜表面的技术已相当成熟，如利用硬脂酰、胆固醇衍生物、糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定剂和螯合脂锚定剂等。但这些锚定剂都存在一定的缺陷，胆固醇衍生物常常作用于细胞膜的脂筏区域，引起细胞信号的干扰；硬脂酰、胆固醇衍生物和螯合脂锚定剂由于缺乏亲水链，易形成胶态离子，导致融入细胞过程缓慢，增加试验难度；GPI 锚定剂的方法需要 GPI 与重组目标蛋白共同孵育，并且依赖于重组蛋白载体构建和表达纯化技术等辅助作用，因此该方法需要耗费较多时间<sup>[91-94]</sup>。

最近，Koichi Kato<sup>[95]</sup>等人利用油烯基链作为脂锚，发明了一种简单、快速的方法，将蛋白等分子锚定于各种细胞的细胞膜。油烯基属于不饱和脂链锚，在细胞膜上不影响细胞膜脂筏和细胞膜信号功能，是一种十分良好的锚定剂材料。然而，油烯基不溶于水，无法应用于水介质，因此将油烯基与聚乙二醇结合，增加油烯基锚定链的溶性。油烯基与聚乙二醇结合后的衍生物能够作为脂锚，与细胞膜能够结合良好。

基于上述方法，暨南大学唐勇<sup>[96]</sup>教授团队开发了细胞表面荧光免疫吸附法（cell surface-fluorescence immunosorbent assay, CSFIA）进行杂交瘤细胞的筛选。利用 Oleyl-PEG4000-NHS 与抗原偶合，非特异性锚定于杂交瘤细胞膜表面。锚定于细胞膜表面的抗原能捕获杂交瘤细胞分泌的特异性抗体，通过加入荧光标记抗 Fc 抗体，使目标细胞表面激发出荧光。在荧光显微镜下标记针对目标蛋白的单克隆杂交瘤细胞，并在无菌环境中挑选标记的细胞继续培养，获得 MAb。

#### 5 针对 PEDV 单克隆抗体研究进展

单克隆抗体技术是 PEDV 研究、诊断和防治不可或缺的工具之一。1993 年 Utiger<sup>[97]</sup>等针对 PEDV（CV777）制备了一株单克隆抗体，为了探究该单克隆抗体所识别病毒的蛋白位置，真核表达 M 蛋白并验证该株单抗能够与 PEDV 的 M 蛋白结合。1998 年，孙智锋<sup>[98]</sup>等为了获得免疫抗原，将华株病毒饲喂给 4 日龄仔猪，24 h 后扑杀病猪并取小肠内容物及小肠粘膜；经蔗糖密度梯度离心纯化得到病毒粒子后，进行免疫并制备单克隆抗体，筛出的 15 株单克隆抗体分子类型均为 IgG，且有的具有中和作用，能够为 PEDV 防控提供很好的参考。2012 年张丽燕<sup>[99]</sup>等在 Vero 细胞系培养 PEDV，并利用 PEG 法浓缩粗体 PEDV 作为免疫原，制备单克隆抗体。随着人们对 PEDV 研

究的深入, 韩蓉<sup>[99]</sup>等人原核表达了 nsp2 蛋白并以此为免疫原制备单克隆抗体, 为研究 PEDV 非结构蛋白的功能打下基础。

由于 PEDV 的 S、N 和 M 蛋白能够诱导产生中和抗体, 因此大部分单克隆抗体靶点选取在这些蛋白上, 通常采用原核表达结构蛋白作为免疫原制备单克隆抗体, 以建立 ELISA 方法、研制胶体金等, 达到诊断疾病的目的。

## 6 针对 PDCoV 单克隆抗体研究进展

PDCoV 是新现的导致猪腹泻的冠状病毒之一, 其造成的危害在逐年上升, 而基于 PDCoV 单克隆抗体的诊断方法研制并不多见。Okda<sup>[100]</sup>等人基于 HKU15 原核表达 N 蛋白, 常规制备单克隆抗体可作为工具抗体运用在疾病的防控和基础研究上, 基于该抗体建立的 ELISA 方法用于检测临床样品具有 96.1% 的敏感性和 96.2% 的特异性, 为 PDCoV 的诊断奠定基础。2017 年张雨迪<sup>[101]</sup>等原核表达 S1 重组蛋白, 并通过免疫小鼠和杂交瘤细胞技术筛得单抗 4G12, 经鉴定该株单抗特异性良好, 与其他病毒无交叉反应, 能为 PDCoV 的诊断及防控提供技术支持。相比之下, PEDV 的研究已较为完备, 同属于冠状病毒的 PDCoV 能够较好地借鉴于 PEDV 的研究方法, 不但对于 PDCoV 单克隆抗体的研制、疾病诊断和防治提供参考, 还能为 PDCoV 基础性研究提供理论依据。

## 7 研究目的及意义

猪的腹泻病一直是猪群健康的主要威胁因素之一, PEDV 和 PDCoV 是当前导致猪病毒性腹泻的主要病原, 具有传染性强、死亡率高的特点, 给全球养猪业造成了巨大的经济损失。因此, 准确诊断对于防控上述两种病毒引起的腹泻显得尤为重要。目前, 对于 PEDV 和 PDCoV 的诊断手段主要包括 PCR、荧光定量 PCR 和血清学检测等, 相比较之下, 血清学检测抗原、抗体水平的方法更为简单和快速。N 蛋白在 PEDV 和 PDCoV 编码蛋白中相对保守, 不易在病毒的繁殖过程中产生突变, 十分适于作为检测病毒的靶蛋白。本研究针对 PEDV N 蛋白和 PDCoV N 蛋白制备 MAbs, 能为后续检测试剂盒的开发提供技术基础。

此外, MAbs 自 1975 年发明以来, 已成为医药领域重要的治疗药物和研究工具, 为改进传统 MAbs 生产方法时间周期长的缺点, 其制备技术和工艺不断推陈出新<sup>[102-104]</sup>。因此, 本研究采用 CSFIA 筛选细胞, 能高效率筛选单克隆杂交瘤细胞株, 具有直观和简单的特点, 能够节省大量筛选时间和精力, 快速制备 MAbs。

## 第二章 针对 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备

### 1 材料

#### 1.1 细胞及实验动物

小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 由本实验室保存。6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

#### 1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品; 融合剂 (polyethylene glycol 1450, PEG 1450)、HAT 培养基补充剂 (50×) 及 HT 培养基补充剂 (50×) 和 L-Glutamine 为 SIGMA 公司产品; 青链霉素混合液 (100×) 为 Solarbio 公司产品; 单组分 TMB 显色液为天根生化科技 (北京) 有限公司产品; SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒为湖南艾佳生物科技股份有限公司产品; 极超敏 ECL 化学发光试剂盒为碧云天生物技术有限公司产品; 酶标二抗 (ProteinFind Goat Anti-Mouse IgG(H+L), HRP Conjugate) 为北京全式金生物技术有限公司产品; IPTG 为生工生物工程 (上海) 股份有限公司产品; 台盼蓝染色液 (0.4%) 为北京雷根生物技术有限公司产品; 偶联剂 Oleyl-PEG4000-NHS、荧光标记羊抗鼠 IgG 和半固体培养基均为暨南大学唐勇教授馈赠; Ni 层析介质 (NTA) 重力预装柱套装和亚型鉴定试剂盒 (小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用套装) 为北京博奥龙免疫技术有限公司产品; 玻璃毛细管为成都华西医科大学仪器厂生产; 微量移液器为德国 Eppendorf 产品; 显微镜 (Axio Vert.A1) 为德国卡尔蔡司公司产品; 二氧化碳培养箱 (3111)、高速冷冻离心机 (Sorvall ST16R) 和多功能酶标仪 (Varioskan Flash) 为美国赛默飞世尔科技公司产品; 数显恒温水浴锅 (DK-8D) 为江苏金坛市医疗仪器厂产品。

#### 1.3 主要试剂的配制

##### 1) 10×PBS 缓冲液

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
NaCl	80 g
KCl	2 g

加双蒸水定容至 1L, 放 4℃ 保存备用。

##### 2) PBS 缓冲液

用双蒸水 10 倍稀释 10×PBS 缓冲液。

##### 3) PBST 洗涤液

##### 4) TBS 缓冲液

针对 PEDV N 蛋白和 PDCoV N 蛋白单克隆抗体的制备

	Tris·HCl (1mM, pH7.5)	10 ml
	氯化钠	8.8 g
	加双蒸水定容至 1 L。	
5) TBST 缓冲液		
	TBS 缓冲液	1,000 ml
	100% Tween-20	0.25 ml
6) 封闭液 (5%脱脂乳)		
	脱脂奶粉	5 g
	PBS 缓冲液	100 ml
7) 抗原包被液		
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.95g
	NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
	加双蒸水定容至 1 L, 将 pH 调整为 9.4。	
8) 终止液 (2M 硫酸溶液)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.2 ml
	双蒸水	77.8 ml
	硫酸具有强腐蚀性且配置过程会大量产热, 将硫酸缓慢加入双蒸水过程中应注意控制温度避免液体沸腾喷溅。	
9) 1640 不完全培养基		
	将 1 袋 RPMI-1640 成品粉末用 1 L 无菌双蒸水充分溶解, 经 0.22 μm 滤器过滤, 放 4℃ 保存备用。	
10) 1640 完全培养基		
	1640 不完全培养基	86 ml
	100×NaHCO <sub>3</sub>	1 ml
	100×HEPES	1 ml
	100×L-Glutamine	1 ml
	FBS	10 ml
	双抗	1 ml
11) HT 完全培养基		
	1640 不完全培养基	76 ml
	100×NaHCO <sub>3</sub>	1 ml
	100×HEPES	1 ml
	100×L-Glutamine	1 ml
	FBS	20 ml
	双抗	1 ml
	50×HT 添加剂	2 g
12) HAT 完全培养基		
	1640 不完全培养基	76 ml

- |  |                        |       |
|--|------------------------|-------|
|  | 100×NaHCO <sub>3</sub> | 1 ml  |
|  | 100×HEPES              | 1 ml  |
|  | 100×L-Glutamine        | 1 ml  |
|  | FBS                    | 20 ml |
|  | 双抗                     | 1 ml  |
|  | 50×HAT 添加剂             | 2 g   |
- 13) 100×7.5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液
- |  |                    |        |
|--|--------------------|--------|
|  | NaHCO <sub>3</sub> | 7.5 g  |
|  | 去离子水               | 100 ml |
- 混合均匀后, 用 0.22 μm 滤器除菌, -20℃ 保存。
- 14) 100×HEPES 缓冲液
- |  |                |         |
|--|----------------|---------|
|  | HEPES MW 238.3 | 23.83 g |
|  | 去离子水           | 100 ml  |
- 混合均匀后, 用 0.22 μm 滤器除菌, -20℃ 保存。
- 15) 100×L-Glutamine (L.G.) 溶液
- |  |                                   |        |
|--|-----------------------------------|--------|
|  | L-谷氨酰胺(L-glutamine,<br>MW 146.15) | 2.92 g |
|  | 去离子水                              | 100 ml |
- 混合均匀后, 用 0.22 μm 滤器除菌, -20℃ 保存。
- 16) LB 培养基和固体 LB 培养基  
参照本实验室郭楠楠师姐毕业论文配置<sup>[105]</sup>。
- 17) 2×蛋白加样缓冲液、考马斯亮蓝染色液、脱色液、甘氨酸缓冲液、转膜液  
参照本实验室郭楠楠师姐毕业论文配置<sup>[105]</sup>。

## 2 方法

### 2.1 抗原制备

#### 2.1.1 IPTG 诱导表达 PEDV N 蛋白

表达 PEDV N 蛋白的菌种由本实验保存。

1) 将冻存的菌液置于 37℃ 快速溶解, 以 1% 接菌量接入 10 ml 含氨苄的 LB 培养基内, 37℃ 恒温摇床 230 r/min 培养 18-20 h;

2) 将活化后菌液以 1% 的量接种至 250 ml 上述 LB 培养基中, 相同条件下进行震荡培养, 至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.4-0.6 时将其置于冰水中冰浴 30 min;

3) 冰浴结束后, 在菌液中加入终浓度为 1 mM 的 IPTG, 16℃ 恒温摇床低温诱导表达 20 h;

4) 诱导表达完成后, 将菌液置于 4℃ 预冷离心机 5,000 rpm 离心 10 min, 用预冷的 PBS 充分重悬, 继续以上述条件重悬及离心两遍, 用 20 ml 预冷的 Lysis Buffer 重悬菌体, 加工作浓度为 0.3 mg/ml 的溶菌酶和工作浓度为 1 mM 的 PMSF, 在冰水浴中进行超声破碎, 600 W×35% 功率超声 5 秒间隔 5 秒, 总时长 15 min。超声破碎结

束后，可见菌液变澄清且粘稠性增大。收集破碎液，4℃预冷离心机内 12,000 rpm 离心 30 min，收集上清在 0.22 μm 滤器过滤除杂。

### 2.1.2 镍柱纯化 PEDV N 蛋白

本试验表达的重组蛋白带有 his 标签，因此采用镍柱纯化的方法。将镍柱固定于铁架台上，调整为合适高度，依次打开镍柱下部塞子和上部塞子，将保护液全部流出。加入 5 ml Lysis Buffer 平衡镍柱，重复平衡两次，经过镍柱的平衡液弃去。在平衡好的镍柱中加入 2.1.1 中滤过的上清液，每次 1 ml 并依次收集过柱液，该过程中应使液体缓慢流出，确保带 his 标签的重组蛋白与 Ni<sup>2+</sup>充分结合。为了去除非特异性结合的杂质蛋白，在镍柱中加入 5 ml Lysis Buffer，并收集滤过液，重复除杂并收集滤过液 5 次。用 5 ml Elution Buffer 洗脱目的蛋白，共加入三次，依次收集洗脱的目的蛋白，每管收集 1 ml。纯化完成后，交替加入 5 ml Lysis Buffer 和去离子水平衡镍柱，共进行三次。最后加入 5 ml 20%乙醇平衡镍柱，重复一次，在镍柱内保留 5 ml 20%乙醇，至 4℃冰箱保存。

### 2.1.3 SDS-PAGE 检测纯化效果

1) 查漏 按照 Bio-Rad 蛋白电泳仪说明书将胶板固定，在胶槽中加满双蒸水，等待 15 min 后，查看液面下降程度判断是否漏液。若漏液则应重新调整并固定胶板进行查漏；待不漏液的情况下方可倒出胶槽内的双蒸水进行蛋白胶的配置。

2) 分离胶及浓缩胶 在小烧杯中按 SDS-PAGE 制胶说明进行 10%分离胶的配置，配置完成后沿胶槽的边缘加入分离胶（注意预留约 2 cm 加浓缩胶），用双蒸水封闭分离胶。待分离胶凝固，方可倒出双蒸水并滤干，最后配置 5%浓缩胶，按上述操作加入胶槽中并插入孔梳，至室温凝固后，放置于 4℃保存备用。

3) 蛋白样品处理 取样品蛋白液 2.5 μl 与等量蛋白上样 Buffer 混合，在 100℃中作用 10 min 后，用 12,000 rpm 离心 3 min。

4) 上样及电泳 夹好胶板放入电泳槽，使电泳液没过胶孔，在胶孔内加入 10 μl 处理好的蛋白样品。80 V 电泳 30 min，调整电压至 120 V 继续电泳，约 3-4 小时完成电泳后关闭蛋白电泳仪。

5) 染色 小心地打开制胶板，取出夹在中间的分离胶至染色液中，在摇床中常温染色 1 h。

6) 脱色 将蛋白胶放入脱色液中，每 30 min 更换一次脱色液，待蛋白条带明显而背景较淡时停止脱色。

## 2.2 实验动物的免疫及小鼠血清的收集

用结晶紫在小鼠皮毛进行染色，按照左前肢、右前肢、背部依次进行编号。用生理盐水稀释纯化的重组蛋白，等量弗氏佐剂与重组蛋白在乳化器内充分乳化。将乳化完成的抗原在 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠背部进行多点（3-4 点）注射，注射总体积为 200μl，免疫程序如下表 1.1。

表 1.1 免疫程序

Table 1.1 Immunization procedure

	首免（第一周） The first immunization	二免（第三周） The second immunization	三免（第五周） The third immunization	冲击免疫（三免 7 d 后） The fourth immunization
抗原量 Dose	200 $\mu\text{g}$ (CFA)	100 $\mu\text{g}$ (IFA)	100 $\mu\text{g}$ (IFA)	100 $\mu\text{g}$ (Normal saline)
免疫方式 Immunization route	皮内 Intracutaneous	皮下 Subcutaneous	皮下 Subcutaneous	腹腔 Intraperitoneal

准备开口为 0.1 mm 长度为 500 mm 的玻璃毛细管和 3 支 1.5 ml EP 管。将小鼠取出，左手大拇指和食指捏住小鼠耳根部，中指与大拇指根部捏住小鼠背部，同时小拇指拉住小鼠尾部。将小鼠轻轻按在平台边缘，使其眼球突出眼眶，水平插入毛细管至小鼠眼眶下部，轻轻旋转毛细管，使其转动至小鼠内眼睑部，待有血液进入毛细管即可松手，收集毛细管中流出的血液。（每只小鼠单次采血不得超过 350  $\mu\text{l}$ ）收集的血液置 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中 1.5 h，然后 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日吸出血清，至 2,000 rpm 离心 5 min，分装为 6  $\mu\text{l}$ /管置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 2.3 间接 ELISA 确定最佳抗原抗体稀释度

### 2.3.1 间接 ELISA 步骤

参照本实验室师姐郭楠楠师姐毕业论文间接 ELISA 步骤<sup>[105]</sup>。

### 2.3.2 最佳抗原抗体浓度的确定

以重组 PEDV N 蛋白作为抗原，采用方阵滴定法确定抗原抗体最佳浓度。用抗原包被液（pH 9.5）按 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  稀释抗原，分别过夜包被至 96 孔板底部。以免疫小鼠血清和未免疫小鼠血清作为阳性对照和阴性对照，按 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1,600、1:3,200、1:6,400、1:12,800、1:24,600 稀释血清，加入至不同抗原包被浓度的 96 孔板中。HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗稀释浓度为 1:2,000，孵育完成后，采用 TMB 显色系统避光显色 20 min，在 OD<sub>450 nm</sub> 下读取吸光度。

## 2.4 抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体的制备

### 2.4.1 SP2/0 细胞的复苏及计数

提前 15 天复苏 SP2/0 细胞，将冷冻细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中迅速回温。以 800 rpm 离心回温的 sp2/0 细胞 8 min，弃上清，加入 1640 完全培养基重悬细胞，至于 25T 细胞培养瓶，37 $^{\circ}\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

细胞计数：将血球计数板从无水乙醇中取出晾干备用。在 96 孔板中加入 90  $\mu\text{l}$  台盼蓝（0.4%）染液和 10  $\mu\text{l}$  待计数细胞（加入前充分重悬细胞）。充分混合染液和细胞后，吸取 10  $\mu\text{l}$  加入血球计数板内，在毛细作用下细胞将平铺于计数板和盖玻片

中间。最后计数细胞并根据每毫升细胞数=四个大方格细胞数 $\times 10^5/4$  算出细胞浓度。

#### 2.4.2 饲养细胞的准备

本试验使用的饲养细胞来自 BALB/c 小鼠腹腔。处死一只空白小鼠放入消毒酒精中浸泡 5 min，然后固定小鼠四肢，使腹部充分暴露。左手持镊子夹起小鼠下腹部皮肤，右手持外科剪水平剪开皮肤层约 1-2 mm 小口，将外科剪伸入小口并完全剪开其表皮，将表皮向两侧拉开固定，充分暴露腹膜。用 10 ml 注射器吸取 7 ml 不完全培养基，左手持镊子轻轻夹起腹膜，右手持注射器沿夹起的腹膜进针，注意避免刺穿内脏和肠管，将不完全培养基全部注入腹腔。右手固定注射器，左手持酒精棉球轻轻按摩腹部 1 min，吸出注入的培养基至 50 ml 离心管中。补加 32 ml 不完全培养基并充分混匀细胞，在 37℃ 预热离心机 1,000 rpm 离心 10 min，弃上清，用 40 ml 不完全培养基重悬底部细胞，按上述条件离心并反复洗涤 3 次，加 10 ml HAT 完全培养基充分重悬细胞。计数饲养细胞，用 HAT 完全培养基稀释细胞至  $2 \times 10^5$  个/ml。

通常每只小鼠可获得  $3-5 \times 10^6$  个细胞，在 96 孔板中每孔铺  $2 \times 10^4$  个细胞（48 孔板中每孔铺  $5 \times 10^4$  个细胞），每只小鼠可制备 2-2.5 个 96 孔板。

#### 2.4.3 脾细胞的准备

经间接 ELISA 测出小鼠血清效价，挑选效价最高对应的小鼠进行眼球采血，收集阳性血清备用。按 2.5.2 步骤打开小鼠表皮，换一套灭菌镊子和外科剪，左手持镊子轻轻夹住腹膜，右手持外科剪在腹膜剪开一小口，将外科剪伸进小口完全剪开腹膜，向左右拉开腹膜并固定，使腹腔充分暴露。小鼠紧贴胃的位置有一条狭长的红色组织即是脾脏，小心地分离脾脏，轻轻洗涤，尽可能除去脾脏上的结缔组织，将脾脏放入盛有 5 ml 不完全培养基的平皿中。

左手持镊子夹起脾脏，用 1 ml 注射器吸取培养基穿刺入脾脏内，一边穿刺一边将培养基注入脾脏，此时单细胞将沿穿刺孔流出。反复该步骤，将流出的单细胞吸入 50 ml 离心管，加不完全培养基至 40 ml，按 2.5.2 中操作进行脾细胞的洗涤，最后用 10 ml 不完全培养基重悬，进行细胞计数。

#### 2.4.4 SP2/0 与脾细胞融合

将  $2-5 \times 10^7$  个对数生长期的 SP2/0 细胞与  $1 \times 10^8$  个脾细胞混合于 50 ml 离心管，于 1,000 rpm 离心 10 min，用 40 ml 不完全培养基充分重悬并重复洗涤一次。离心完成后尽量吸去上清，在手掌上轻击管底使沉淀细胞松散均匀，置于 37℃ 水浴锅预热。在 1 min 内将 37℃ 预热的 PEG 加入预热的沉淀细胞内，共加 1 ml，边加边缓慢搅拌均匀。融合完成后，立刻缓慢加入 30 ml 预热的不完全培养基终止融合反应，在 90 S 内加完。在 20-37℃ 水浴下静置 10 min，1,000 rpm 离心 10 min，用 40 ml 含 20% FBS 的 HAT 选择培养基充分重悬细胞，将重悬细胞加入准备好的饲养细胞中培养。

#### 2.4.5 间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞并亚克隆

在 96 孔板内杂交瘤细胞的阳性孔筛选采用传统间接 ELISA 方法：融合后 6-7 天，在 96 孔板中小心吸取上清液至 ELISA 板（按最适抗原浓度包被），每孔吸 100  $\mu$ l，按 2.4.1 中操作进行间接 ELISA 检测，当孔内  $OD_{450\text{ nm}} \geq N+3SD$  即判定为阳性。在每

孔中补 100  $\mu$ l 含 20% FBS 的 HT 选择培养基，放入细胞培养箱培养。

杂交瘤细胞的亚克隆采用有限稀释法：在融合后的第 12-14 d 进行亚克隆，标记长势较好、OD<sub>450 nm</sub> 值较大的阳性孔，充分重悬标记孔的细胞，吸入 15 ml 管，加入完全培养基至 11 ml，以每孔 100  $\mu$ l 加入至已铺好饲养细胞的 96 孔板中，标记为 10<sup>1</sup>；在余下的 1 ml 培养基中加入 10 ml 完全培养基，按上一步操作继续铺板标记为 10<sup>2</sup>；直至稀释至 10<sup>4</sup> 后，放入细胞培养箱培养。亚克隆步骤至少进行 3-4 轮才能保证所挑选细胞为单克隆，每次亚克隆周期为 14-15 d。

#### 2.4.6 CSFIA 筛选阳性杂交瘤细胞

##### 2.4.6.1 偶联 PEDV N 蛋白与 Oleyl-PEG4000-NHS

将 1 mg 偶联剂 Oleyl-PEG4000-NHS (MW=4,000) 与 0.58 mg 重组 PEDV N 蛋白混合 (抗原：偶联剂的分子摩尔比保持在 1:25 左右)，在小玻璃瓶内用磁力搅拌器充分搅拌，在冰上搅拌 3-6 h，确保偶联剂与抗原充分结合。在 10 k 规格超滤管超内加入搅拌后的抗原偶联混合液，以 6,000 rpm 离心 10 min 去除多余偶联剂，吸取上清经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，即得“偶联剂-抗原”工作母液。月内短期保存可放 4℃ 冰箱，如长期保存应分装冷冻于 -20℃。

##### 2.4.6.2 荧光工作液制备

将 4.7 mL 不完全培养基加入 15 ml 离心管，同时加入 250  $\mu$ l 抗原工作母液和 50  $\mu$ l 荧光标记羊抗鼠 IgG，混匀即得荧光工作液。荧光工作液现配现用，只可短暂避光保存于 4℃。

##### 2.4.6.3 阳性杂交瘤细胞的标记及固定

在融合细胞第 7 天，待 48 孔板内融合细胞有明显的生长趋势即可开始标记阳性细胞。将 48 孔板内液体全部吸出，用不完全培养基清洗细胞三次 (清洗过程一定要缓慢，避免底部细胞被吸出)，尽量吸干孔内剩余的不完全培养基。在每孔中加入 100  $\mu$ l 荧光工作液铺满培养板底部，置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 培养 1 h。将培养好的细胞取出 (此时抗原已间接地非特异性吸附于细胞表面，经过 1 h 培养，阳性细胞分泌的特异性抗体与荧光二抗和细胞表面抗原结合)，弃上清，用 200  $\mu$ l 不完全培养基清洗一遍，去除未结合的抗原工作母液和荧光二抗，最后在每孔中加入 150  $\mu$ l 不完全培养基。

在荧光显微镜下观察细胞，根据有无荧光可区分细胞是否分泌特异性抗体，根据荧光强度可区分细胞分泌抗体是否丰富。在显微镜下，用记号笔标记标记长势较好、荧光较强且单一的阳性细胞团。标记完成后，去除上清，在每孔中加入 200  $\mu$ l 半固体培养基，固定的杂交瘤细胞即可开始进行挑选。

##### 2.4.6.4 阳性杂交瘤细胞的筛选

根据阳性标记，在无菌操作台中用移液枪缓慢吸取阳性细胞团块，将吸出的阳性细胞加入至已铺有饲养细胞的 48 孔板中，每孔为一个单克隆，放入细胞培养箱继续培养。

##### 2.4.6.5 杂交瘤细胞冻存与复苏

用培养基将阳性杂交瘤细胞充分重悬，1,000 rpm 离心 10 min，用新配置的细胞冻存液重悬细胞，分装入细胞冻存管中。分装完后，将细胞冻存管放入冻存盒中，放入-80℃冰箱冻存 24 h 以上，将细胞取出放入液氮保存。

#### 2.4.6.6 腹水制备及效价测定

腹水制备参照刘秀梵老师等人的单抗制备方案。在接种杂交瘤细胞前 7-10 天，将 0.5 ml 石蜡油分两点注射入背景空白的 BALB/c 小鼠腹腔，降低小鼠免疫力并刺激腹腔产生各种生长因子，利于后续接种的杂交瘤生长和腹水的生成。

用微量移液器将状态良好的杂交瘤细胞从培养瓶中悬起，用生理盐水洗涤细胞 3 遍，1,000 rpm 离心 10 min，最后重悬并进行细胞计数。用生理盐水按  $2.5 \times 10^6$ /ml 稀释细胞，每只小鼠腹腔注射 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  细胞)即可。

随时观察小鼠状态及腹部隆起情况，约 8-14 天可观察小鼠腹部明显隆起即可采集腹水，可分单次和多次采集，一般每只小鼠可收得 7-10 ml 腹水。收集的腹水在 12,000 rpm 离心 15 min，分装并放入-80℃备用。

按常规间接 ELISA 步骤测试腹水效价，按照 10 倍浓度梯度稀释腹水作为一抗，细胞上清作为阳性对照，阴性血清作为阴性对照，HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗稀释浓度为 1:2,000，孵育完成后，采用 TMB 显色系统避光显色 20 min，在 OD<sub>450 nm</sub> 下读取吸光度。

## 2.5 Western blotting 鉴定单抗反应性

1) 转膜 将电泳好的蛋白胶、夹板和海绵放入转膜缓冲液中浸泡。根据蛋白胶大小，裁剪出 1 张 PVDF 膜和 4 张吸水滤纸放入甲醇中浸泡 10 min。按照黑色最下，依次叠放海绵、两层滤纸、蛋白胶、PVDF 膜、两层滤纸、海绵和白色夹板，注意除去气泡，即可开始转膜。转膜条件为 0.33 A 转 1-2 h，转膜过程中会大量产热影响试验效果，应使用冰块降温。

2) 封闭 取出 PVDF 膜放入 5%脱脂乳中，在脱色摇床上缓慢震荡 2 h。封闭完成后，换 PBST 洗涤 PVDF 膜，在脱色摇床中继续震荡，每 10 min 更换一次 PBST，共洗涤三次。

3) 孵育一抗 将 PVDF 膜放入 1:3,000 稀释的抗体中，在常温下置于脱色摇床缓慢震荡，1 h 后换 PBST 洗涤 PVDF 膜，在脱色摇床中继续震荡，每 10 min 更换一次 PBST，共洗涤三次。

4) 孵育二抗 将 PVDF 膜放入 1:2,000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠二抗中，在常温下置于脱色摇床缓慢震荡，1 h 后换 PBST 洗涤 PVDF 膜，在脱色摇床中继续震荡，每 10 min 更换一次 PBST，共洗涤三次。

5) 显色 将洗涤三遍的 PVDF 膜夹出置于曝光仪内，依次将 ECL 发光液 A 液和 B 液加至 PVDF 膜上，短暂孵育 1 min 即可曝光显色。

## 2.6 IFA 鉴定单抗反应性

1) PEDV 感染 Vero81 提前一天铺 Vero81 至 6 孔板中，待单层细胞生长至 80-90%

时即可攻毒。用病毒维持液稀释病毒至合适浓度，以 MOI=0.1 将 200  $\mu$ l PEDV 病毒液接入 3 个孔，以等量维持液接入另外 3 个孔作为空白对照。孵育 2 h 后，用 2 ml 维持液替换 6 孔板内液体，放入细胞培养箱培养。

2) 细胞的固定 培养 18 h 后，用 PBS 洗涤细胞 3 遍，每次 10 min。将孔内液体吸干，加入 300  $\mu$ l 4%多聚甲醛在室温下固定细胞 15 min。

3) 封闭 洗涤同上，加入 500  $\mu$ l 封闭液（含 5% BSA 的 PBS）37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min。

4) 孵育一抗 洗涤操作同上，每孔加入 100  $\mu$ l 一抗（1:500 稀释），置于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

5) 孵育荧光二抗 洗涤操作同上，每孔加入 FITC 标记羊抗鼠二抗（1:300 稀释），置于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。

6) 观察 洗涤操作同上，在荧光显微镜下观察。

## 2.7 单克隆抗体亚型鉴定

参照 2.4.1 间接 ELISA 步骤和小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用套装说明书，以 5  $\mu$ g/ml 重组 PEDV N 蛋白包被抗原，按 1:1,000 稀释腹水作为一抗，以试剂盒内 Goat Anti-Mouse Ig(G1/G2a/G2b/G3/M/A/ $\kappa$ / $\lambda$ )-HRP 为二抗先后孵育抗原，用单组分 TMB 为显色剂避光显色 15 min，用 2 M 硫酸溶液终止反应后，肉眼观察或用多功能酶标仪读取 OD<sub>450 nm</sub>。

## 3 结果

### 3.1 重组 PEDV N 蛋白纯化结果

大量诱导表达重组 PEDV N 蛋白，经超声波破碎离心，经过镍柱纯化后，获得纯度较高的重组 PEDV N 蛋白。SDS-PAGE 电泳结果如图 2.1。

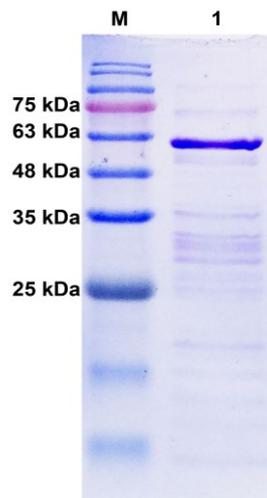


图 2.1 纯化 PEDV N 蛋白结果

M: Protein marker; 1: 纯化后的 PEDV N 蛋白

Fig 2.1 The purification results of PEDV N protein

M: Protein marker; 1: Purified PEDV N protein

### 3.2 最佳抗原抗体工作浓度的确定

选取 OD<sub>450 nm</sub> 接近 1.0, 阴性值<0.2, 以 P/N 最大的孔作为最佳抗原抗体反应浓度。确定最佳抗原包被浓度为 5 μg/ml, 抗体最佳稀释倍数为 1:400。

### 3.3 抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体制备结果

#### 3.3.1 CSFIA 筛选单克隆杂交瘤细胞结果

CSFIA 挑选阳性单克隆杂交瘤细胞原则上应挑选细胞长势较好、细胞团较为单一的细胞团。如图 2.2 所示, a、b、c 和 d 中均有阳性细胞, c 和 d 中均有两个细胞团且相距过近, 不能确保挑中单一细胞团细胞, 因此不进行挑选; a 和 b 中只有一个阳性细胞团且附近无其他细胞团, 但 b 细胞团生长趋势明显高于 a 细胞团, 因此挑选 b 细胞团块扩大培养, 命名为 1B1。

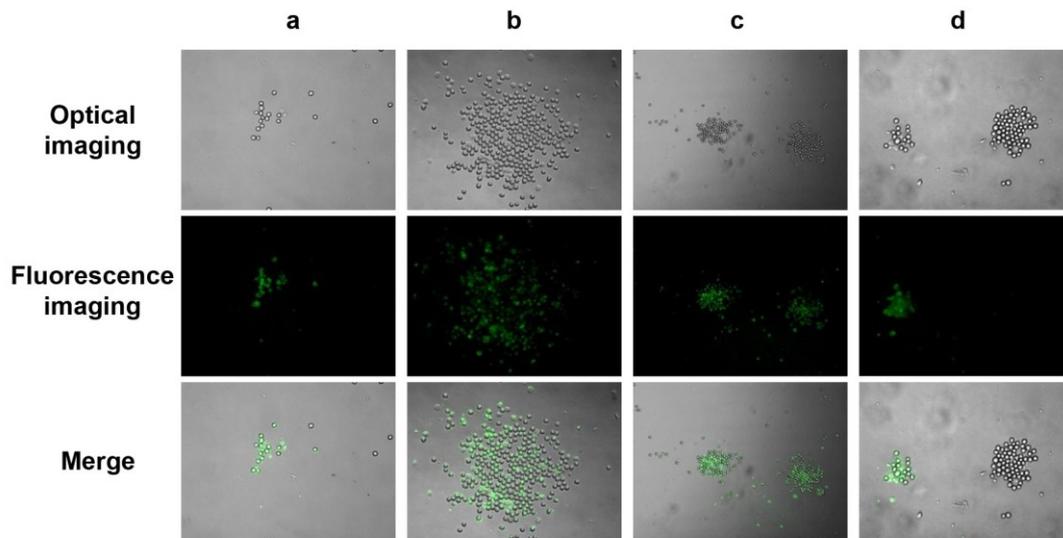


图 2.2 细胞表面荧光免疫吸附方法结果

Fig 2.2 The result of cell surface-fluorescence immunosorbent assay

#### 3.3.2 杂交瘤细胞株的建立

通过 CSFIA 筛选出一株稳定分泌抗 PEDV N 蛋白的杂交瘤细胞株命名为 1B1; 通过传统间接 ELISA 法和有限稀释法连续筛选 3 轮, 得到三株稳定分泌抗 PEDV N 蛋白的杂交瘤细胞株分别命名为 2D8、3D3、3E12。

#### 3.3.3 单抗效价测定

以 5 μg/ml 重组 PEDV N 蛋白包被 ELISA 板, 分别以腹水、细胞培养上清和阴性血清作为一抗, 从 1:10<sup>2</sup> 作 10 倍梯度稀释一抗至 10<sup>9</sup>。如图 2.3 所示, 1B1 培养上清抗体效价约为 1:10<sup>4</sup>, 用 1B1 细胞株制备的腹水效价高于 1:10<sup>6</sup>; 如图 2.4 所示, 3D3 培养上清抗体效价约为 1:10<sup>3</sup>, 用 3D3 细胞株制备的腹水效价高于 10<sup>5</sup>。

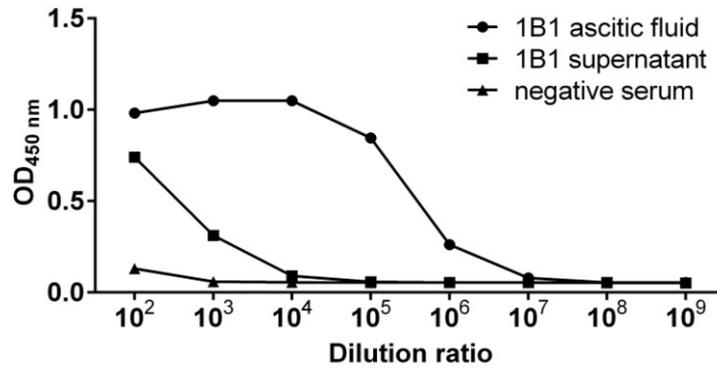


图 2.3 1B1 单克隆抗体效价的测定

Fig 2.3 Detection of 1B1 mAb titer

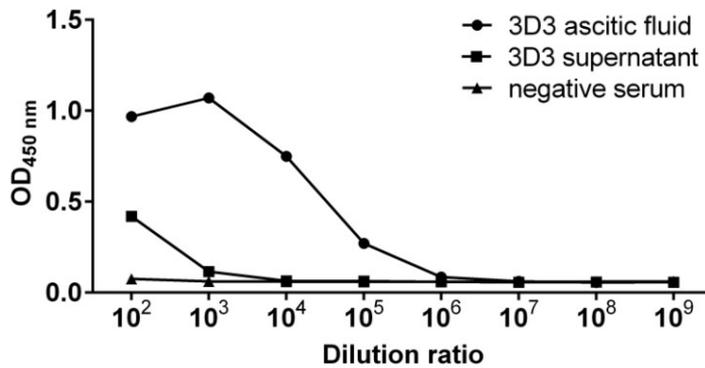


图 2.4 3D3 单克隆抗体效价的测定

Fig 2.4 Detection of 3D3 mAb titer

### 3.4 Western blotting 鉴定单抗反应性结果

杂交瘤细胞株 1B1、2D8、3D3 和 3E12 所分泌抗体与 PEDV 在 Western blotting 反应性结果如下图 2.5。四株杂交瘤细胞所分泌抗体与重组 PEDV N 蛋白能够反应，空白表达 pCold 质粒产物与其均不反应；且四株单抗能够与纯化的 PEDV 产生反应，Vero81 细胞与其均无反应。

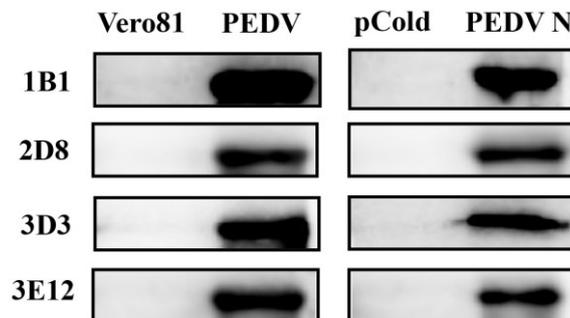


图 2.5 单克隆抗体与 PEDV 和重组蛋白作用的 Western Blotting 结果

Fig 2.5 The Western Blotting result of interactions between mAbs and PEDV or recombinant PEDV N protein

### 3.5 IFA 鉴定单抗反应性结果

Vero81 细胞感染 PEDV 后，用 1B1 和 3D3 杂交瘤细胞株所分泌抗体进行间接免疫荧光试验结果如图 2.6。1B1 和 3D3 所分泌抗体能用于的间接免疫荧光实验中，均能与感染的 PEDV 反应。

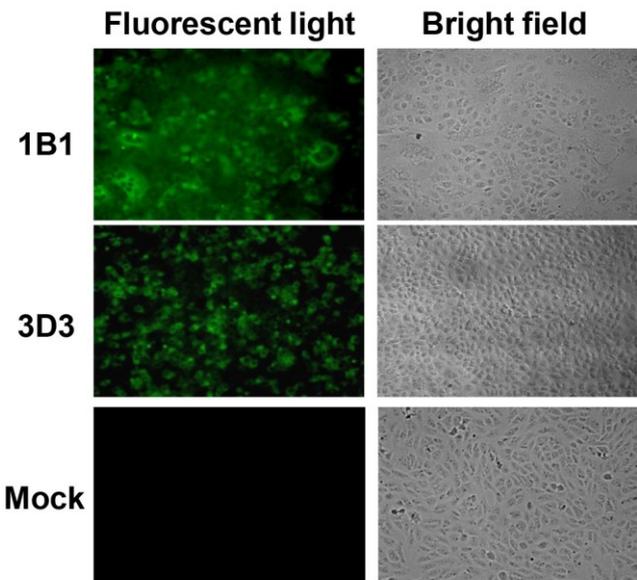


图 2.6 1B1 和 3D3 单克隆抗体与 PEDV 作用的间接免疫荧光试验结果

Fig 2.6 The IFA result of interaction between 1B1 or 3D3 mAb and PEDV

### 3.6 单抗亚型鉴定结果

经 ELISA 方法鉴定 1B1 和 3D3 分泌单抗亚型均为 IgG1/ $\kappa$ 。（如图 2.7）

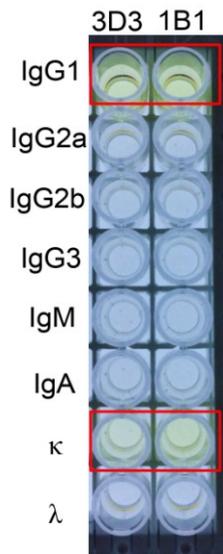


图 2.7 单克隆抗体的亚型鉴定

Fig 2.7 Identification of mAbs subtypes

## 4 讨论

由于中国经济的高速发展,中国养殖产业不断扩大,国内生猪产量已排名世界前列,但传染病的发生和传播仍然制约着我国养猪业的发展,使我国养猪业遭受巨大的损失。猪腹泻病是猪群中流行的严重传染病, PEDV 是导致猪腹泻的头号病原,预防和初期诊断是控制 PEDV 的有效手段。PEDV N 蛋白在不同 PEDV 毒株高度保守,因此, N 蛋白能够作为早期诊断 PEDV 感染的靶标蛋白,评估 PEDV 疫苗的免疫效价。此外,为了促进 PEDV 感染的相关研究,如免疫应答研究、PEDV 的 RNAi 研究和抗病毒药物研究等,本试验挑选了两株针对 PEDV N 蛋白的 MAbs。经过鉴定,这两株 MAbs 均能够进行 ELISA、间接免疫荧光和 Western blotting 试验。

MAb 技术已建立四十多年,ELISA 技术与有限稀释是应用最广泛的筛选方法。间接 ELISA 方法筛选阳性细胞,有限稀释对阳性细胞进行亚克隆选择,至少连续进行三次才能获得稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞,操作过程繁琐且费时<sup>[106]</sup>。利用标记抗原结合分泌在细胞表面的特异性抗体,流式细胞仪分选携带标记抗原的阳性细胞<sup>[107]</sup>,也可以实现短时间内获得分泌特异性抗体的细胞。此方法具有快速、大通量的特点,但前期细胞分选条件需优化,所得细胞量较低,后续还需进行测序和表达等工作<sup>[108]</sup>。此外,利用半固体培养基进行杂交瘤细胞筛选替代有限稀释法,虽省去稀释等繁琐步骤,但其无法准确挑出阳性单克隆细胞团,工作量也十分巨大。

2004 年 Koichi kato<sup>[95]</sup>等提出了哺乳动物细胞膜锚定方法,将大分子蛋白质非特异性锚定在细胞膜表面,即用油烯基衍生物与聚乙二醇 90 (PEG90) 制备成 Oleyl-PEG90 锚定子,油烯基与细胞膜表面脂质具有亲和性,PEG 则负责增加锚定子的亲水性及偶合目的蛋白,从而使目的蛋白锚定在细胞膜表面。在其基础上,暨南大学唐勇教授团队研发了 CSFIA 的方法,即利用 Oleyl-PEG4000 锚定子与抗原蛋白偶合后形成 Oleyl-PEG4000-Antigen, Oleyl 端非特异性亲和于细胞表面,当杂交瘤细胞分泌抗体时被细胞表面抗原捕获,同时被捕获的抗体能与加入的荧光标记二抗结合而发出荧光,最后采用半固体培养基固定并选择性挑取分泌特异性抗体的杂交瘤细胞<sup>[96, 109]</sup>。该方法能够一步挑选出目的细胞,根据荧光强度可选择分泌抗体亲和力最强的杂交瘤单细胞株,具有直观、简单、快速的优点,且制备的抗体效价高,无需流式等昂贵的仪器。除此之外,ELISA 检测细胞上清的 OD 值能反映抗体效价,但抗体效价与杂交瘤细胞数量有关。因此,采用 CSFIA 时,不必考虑细胞数量,通过荧光强弱对比,能直观筛选出细胞分泌抗体较强、生长趋势良好的细胞,两种方法过程中均挑选长势最好的细胞,发现 CSFIA 相比传统方法所制备抗体效价高 10 倍。

本研究中,间接 ELISA 方法连续三轮筛选单细胞株需要 45 d,使用 CSFIA 筛选过程只需 15 d,时间周期只有传统方法的 1/3;本研究将 CSFIA 筛选的分泌 1B1 的杂交瘤细胞扩大培养后,与间接 ELISA 法挑取的分泌 3D3 细胞株以相同量接种于小鼠腹腔,对比腹水中抗体效价得出,1B1 的效价明显高于 3D3。因此,这项技术可用于快速制备高效价 MAbs,这对于进一步研发检测试剂甚至治疗药物,在应对突发传染病疫情等方面都具有极高的应用价值和广阔的市场前景。

## 第三章 针对 PDCoV N 蛋白单克隆抗体的制备

### 1 材料

#### 1.1 细胞及实验动物

参照第一章 1.1。

#### 1.2 主要试剂及仪器

参照第一章 1.2。

#### 1.3 主要试剂的配置

参照第一章 1.3。

### 2 方法

#### 2.1 抗原制备

##### 2.1.1 IPTG 诱导表达 PDCoV N 蛋白

表达 PDCoV N 蛋白的菌种由本实验室保存。表达菌种的复苏、诱导表达步骤参照第二章 2.1.1。

##### 2.1.2 镍柱纯化 PDCoV N 蛋白

由于重组 PDCoV N 蛋白表达采用 pCold 冷载体，诱导表达产物大部分可溶，且携带 his 标签，因此纯化步骤参照第二章 2.1.2。

##### 2.1.3 SDS-PAGE 检测纯化效果

参照第二章 2.1.3。

#### 2.2 实验动物的免疫与小鼠血清的收集

参照第二章 2.2。

#### 2.3 间接 ELISA 确定最佳抗原抗体稀释度

间接 ELISA 步骤及最适抗原抗体浓度确定方法参照第二章 2.4.1 和 2.4.2，使用抗原为重组 PDCoV N 蛋白，使用抗体为重组 PDCoV N 蛋白免疫后的小鼠阳性血清。

#### 2.4 抗 PDCoV N 蛋白单克隆抗体制备

本试验仅使用间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞并进行亚克隆。具体步骤参照第二章 2.4。

#### 2.5 Western blotting 鉴定单抗反应性

使用一抗为制备的抗 PDCoV N 蛋白 MAbs，其他方法步骤参照第二章 2.5。

## 2.6 IFA 鉴定单抗反应性

PK1 细胞提前一天铺至 6 孔板中，待单层细胞长至 80-90%，即可攻毒。用病毒维持液稀释病毒至合适浓度，以 MOI=0.1 将 200  $\mu$ l PDCoV 病毒液接入 3 个孔，以等量维持液接入另外 3 个孔作为空白对照。在细胞培养箱中孵育 2 h，每 30 min 摇晃一次，使病毒粒子与细胞充分接触。孵育结束后，用 2 ml 维持液替换 6 孔板内液体，放入细胞培养箱培养。IFA 操作步骤参照第二章 2.6。

## 2.7 单抗亚型鉴定

参照第二章 2.7。

## 3 结果

### 3.1 重组 PDCoV N 蛋白纯化结果

大量诱导表达重组 PDCoV N 蛋白，用纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 结果如图 3.1 所示，蛋白纯度良好，在 Elution Buffer 滤出液中，第 2 和第 3 毫升内的蛋白浓度较高。

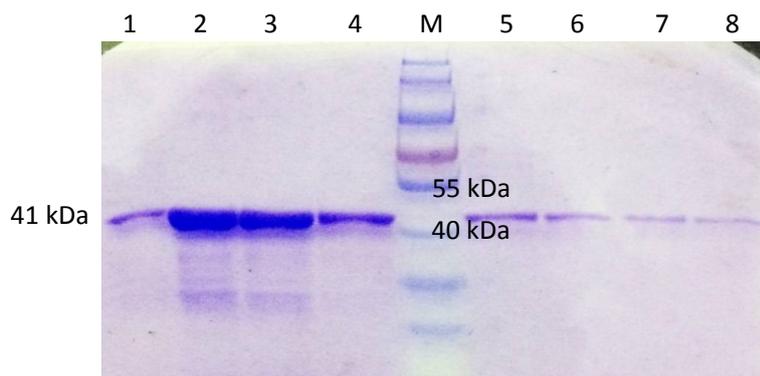


图 3.1 重组 PDCoV N 蛋白纯化结果

1-8: 纯化的蛋白; M: Protein marker

Fig 3.1 The purification results of recombinant PDCoV N protein

1-8: The purified protein; M: Protein marker

### 3.2 最佳抗原抗体浓度的确定

选取 OD<sub>450 nm</sub> 接近 1.0，阴性值 < 0.2，以 P/N 最大的孔作为最佳抗原抗体反应浓度。确定最佳抗原包被浓度为 5  $\mu$ g/ml，抗体最佳稀释倍数为 1:160。

### 3.3 抗 PDCoV N 蛋白单克隆抗体制备结果

#### 3.3.1 杂交瘤细胞株的建立

通过传统间接 ELISA 法和有限稀释法连续筛选 4 轮，得到两株稳定分泌抗 PDCoV N 蛋白抗体的杂交瘤细胞株分别命名为 2G12 和 2E2。

### 3.3.2 单抗效价测定

以 5  $\mu\text{g/ml}$  重组 PDCoV N 蛋白包被 ELISA 板，分别倍比稀释腹水、阳性血清和阴性血清作为一抗。如图 3.2 所示，按照  $P/N > 2.1$  计算效价，阳性血清效价为 1:409,600，用 2G12 细胞株制备的腹水效价为 1:1,638,400。

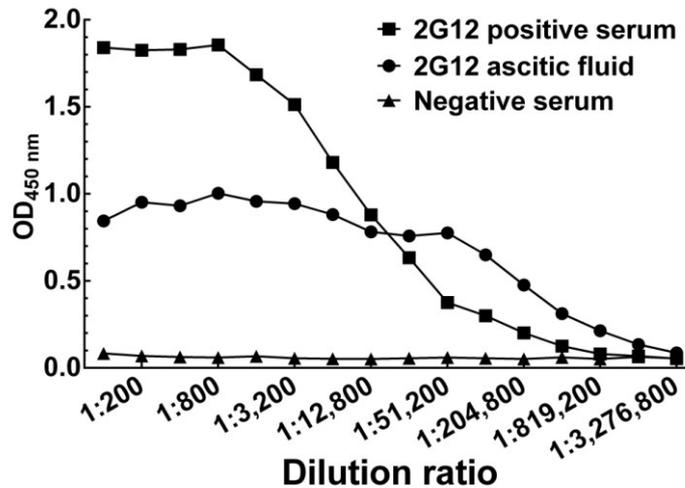


图 3.2 2G12 单克隆效价的测定

Fig 3.2 Detection of 2G12 mAb titer

### 3.4 Western blotting 鉴定单抗反应性结果

如图 3.3 所示，2G12 和 2E2 杂交瘤细胞株所分泌抗体能识别纯化的 PDCoV 和过表达的 PDCoV N 蛋白。



图 3.3 单克隆抗体与 PDCoV 和重组 PDCoV N 蛋白作用的 Western Blotting 结果

Fig 3.3 The Western Blotting result of interactions between mAbs and PDCoV or recombinant PDCoV N protein

### 3.5 IFA 鉴定单抗反应性结果

用 2G12 细胞株制备的腹水作为一抗，测试抗体与感染 PK-1 细胞中的 PDCoV 的反应性结果如图 3.4，在 PK-1 细胞的胞浆中发出大量荧光，说明 2G12 细胞株分泌抗体与感染细胞的 PDCoV 相互识别。

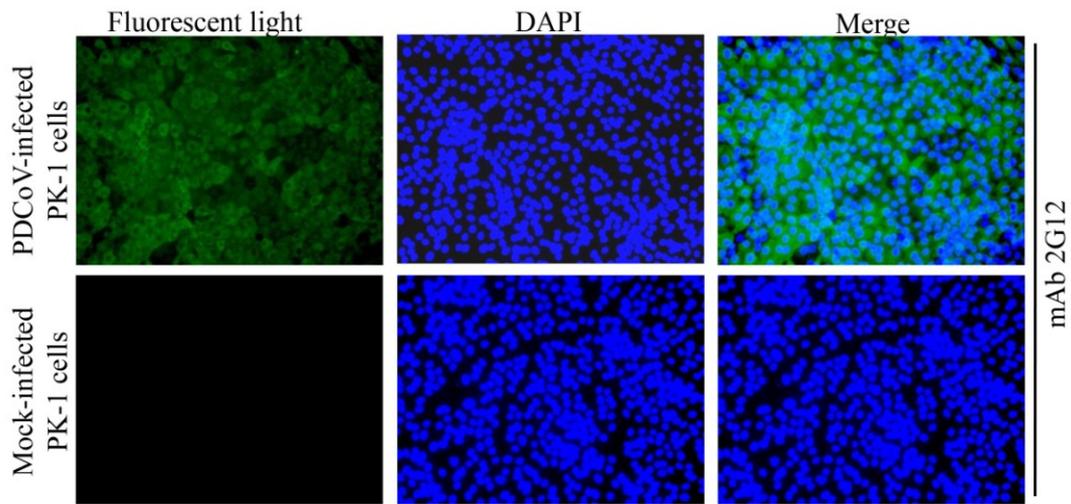


图 3.4 2G12 单克隆抗体与 PDCoV 作用的间接免疫荧光试验结果

Fig 3.4 The IFA result of interaction between 2G12 mAb and PDCoV

### 3.6 单抗亚型鉴定结果

如图 3.5 结果所示,通过间接 ELISA 方法鉴定 2G12 分泌单抗亚型为 IgG1/κ; 2E2 分泌单抗亚型为 IgG2a/κ。

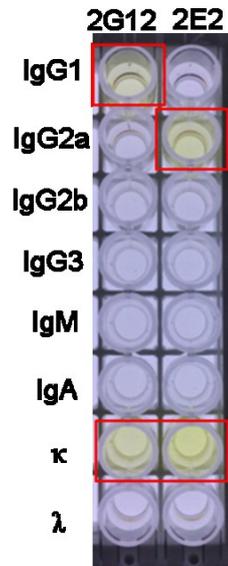


图 3.5 单克隆抗体的亚型鉴定

Fig 3.5 Identification of mAbs subtypes

## 4 讨论

猪腹泻病是危害我国养猪业的主要疾病之一, PDCoV 是引起猪腹泻的第二大病原。在 2012 年中国出现第一株新现猪 Delta 冠状病毒 HKU15 后, 2014 年初, 美国本土也鉴定出 HKU15 相似株, 随后几年, 研究人员才发现无其他病原存在的情况下, PDCoV 能导致猪的腹泻、呕吐和脱水等临床症状。由于 PDCoV 在全球的流行, 使全球养猪业遭受巨大损失, PDCoV 也成为严重程度仅次于 PEDV 的导致猪腹泻的病毒。

PDCoV 属于新现病毒,目前很少有针对 PDCoV 的特异性抗体为基础的检测试剂盒用于诊断 PDCoV<sup>[100]</sup>。

PDCoV N 蛋白具有保守、病毒内含量较高的特点,常常作为病毒早期诊断的靶蛋白,因此本研究针对 PDCoV N 蛋白作为抗原制备 MAbs,能够为后续 PDCoV 诊断试剂盒的开发提供抗体。

目前,对于 PDCoV 的研究还十分有限,需要大量的研究帮助人们了解 PDCoV 从而监测及控制它的暴发,针对 PDCoV 的抗体是研究 PDCoV 必不可少的工具之一,但市面上的 PDCoV 的抗体相当罕见。经鉴定,本试验制备的 MAbs 2G12 能够用于 PDCoV 和 PDCoV N 蛋白相关的 ELISA、间接免疫荧光和 Western blotting 试验,这为 PDCoV 的研究提供了十分有价值的工具,利于研究人员对 PDCoV 进行下一步的研究。

## 全文总结

- 1、成功制备针对 PEDV N 蛋白的 MAb，命名为 3D3 和 1B1；3D3 和 1B1 均能应用在 ELISA、间接免疫荧光和 Western blotting 试验中；经亚型鉴定 3D3 和 1B1 均为 IgG1/κ。
- 2、采用了 CSFIA 的方法筛选针对 PEDV N 蛋白的 MAb，相比常规间接 ELISA 方法，能够在筛选时间上节省至少 30 d 以上，且 CSFIA 的方法所筛选的单抗比间接 ELISA 方法筛选的单抗效价高 10 倍。
- 3、成功制备针对 PDCoV N 蛋白的 MAb，命名为 2G12 和 2E2；其中，2G12 能应用在 ELISA、间接免疫荧光和 Western blotting 试验中；经亚型鉴定 2G12 为 IgG1/κ，2E2 为 IgG2a/κ。

## 参考文献

- [1] Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus research*, 2016, 226:7-13.
- [2] Sun D, Wang X, Wei S, 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):355-363.
- [3] Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, et al. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks [J]. 2018, 14(1):96.
- [4] Chung H C, Lee J H, Nguyen V G, et al. New emergence pattern with variant porcine epidemic diarrhea viruses, South Korea, 2012-2015 [J]. *Virus research*, 2016, 226:14-19.
- [5] Diep N V, Sueyoshi M, Izzati U, et al. Appearance of US-like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDVs collected in Northern Vietnam during 2012-2015 [J]. 2018, 65(1):e83-e93.
- [6] 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.
- [7] Jung K, Saif L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. *Veterinary journal*, 2015, 204(2):134-143.
- [8] Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2013, 25(5):649-654.
- [9] Zhang L, Liu X, Zhang Q, et al. Biological characterization and pathogenicity of a newly isolated Chinese highly virulent genotype GIIa porcine epidemic diarrhea virus strain [J]. 2019.
- [10] Shi P, Su Y, Li R, et al. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation: Running title: PEDV nsp16 promotes viral proliferation [J]. *Virus research*, 2019.
- [11] Chang C Y, Cheng I C, Chang Y C, et al. Identification of Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting Novel Conformational Epitopes of the Porcine Epidemic Diarrhoea Virus Spike Protein [J]. 2019, 9(1):2529.
- [12] Choudhury B, Dastjerdi A, Doyle N, et al. From the field to the lab - An European view on the global spread of PEDV [J]. *Virus research*, 2016, 226:40-49.
- [13] Li F. Evidence for a common evolutionary origin of coronavirus spike protein receptor-binding subunits [J]. *Journal of virology*, 2012, 86(5):2856-2858.
- [14] Chen Y, Zhang Z, Li J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus S1 protein is the critical inducer of apoptosis [J]. 2018, 15(1):170.
- [15] Sung M H, Lin C N, Chiou M T, et al. Phylogeographic investigation of 2014 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) transmission in Taiwan [J]. 2019, 14(3):e0213153.
- [16] 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.
- [17] Wang K, Lu W, Chen J, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production [J]. *FEBS letters*, 2012, 586(4):384-391.
- [18] Jengarn J, Wongthida P, Wanasen N, et al. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea

- virus recovered from a full-length infectious cDNA clone [J]. *The Journal of general virology*, 2015, 96(8):2206-2218.
- [19] Boscarino J A, Logan H L, Lacny J J, et al. Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly [J]. *Journal of virology*, 2008, 82(6):2989-2999.
- [20] Sun M, Ma J, Yu Z, et al. Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways [J]. 2017, 48(1):44.
- [21] Dediego M L, Nieto-Torres J L, Jimenez-Guardeno J M, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis [J]. *PLoS pathogens*, 2011, 7(10):e1002315.
- [22] Nieto-Torres J L, Dediego M L, Verdia-Baguena C, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis [J]. *PLoS pathogens*, 2014, 10(5):e1004077.
- [23] Ye Y, Hogue B G. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly [J]. *Journal of virology*, 2007, 81(7):3597-3607.
- [24] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. *Virus genes*, 2012, 44(2):167-175.
- [25] Laude H, Gelfi J, Lavenant L, et al. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. *Journal of virology*, 1992, 66(2):743-749.
- [26] Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, et al. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus [J]. *Nature*, 1984, 308(5961):751-752.
- [27] McBride R, Van Zyl M, Fielding B C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein [J]. *Viruses*, 2014, 6(8):2991-3018.
- [28] Liwnaree B, Narkpuk J, Sungsuwan S, et al. Growth enhancement of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Vero E6 cells expressing PEDV nucleocapsid protein [J]. 2019, 14(3):e0212632.
- [29] De Haan C A, Rottier P J. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses [J]. *Advances in virus research*, 2005, 64:165-230.
- [30] Li R, Tian X, Yu Y, et al. Development of a rapid immunochromatographic assay for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Polish journal of veterinary sciences*, 2018, 21(1):139-147.
- [31] Hofmann M, Wyler R. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) [J]. *Veterinary microbiology*, 1989, 20(2):131-142.
- [32] Khatri M. Porcine epidemic diarrhea virus replication in duck intestinal cell line [J]. *Emerging infectious diseases*, 2015, 21(3):549-550.
- [33] Kadoi K, Sugioka H, Satoh T, et al. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines [J]. *The new microbiologica*, 2002, 25(3):285-290.
- [34] Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, et al. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells [J]. *Journal of virology*, 2011, 85(15):7872-7880.
- [35] 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.

- [36] Lawrence P K, Bumgardner E, Bey R F, et al. Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: in vivo and in vitro phenotypes [J]. *Genome announcements*, 2014, 2(3).
- [37] Gallagher T M, Buchmeier M J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis [J]. *Virology*, 2001, 279(2):371-374.
- [38] 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.
- [39] Oh J S, Song D S, Park B K. Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes [J]. *Journal of veterinary science*, 2003, 4(3):269-275.
- [40] 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.
- [41] Li W, Luo R, He Q, et al. Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry [J]. *Virus research*, 2017, 235:6-13.
- [42] Huan C C, Wang Y, Ni B, et al. Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor [J]. *Archives of virology*, 2015, 160(7):1621-1628.
- [43] Eckert D M, Kim P S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition [J]. *Annual review of biochemistry*, 2001, 70:777-810.
- [44] Guo X, Zhang M, Zhang X, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Induces Autophagy to Benefit Its Replication [J]. *Viruses*, 2017, 9(3).
- [45] Sawicki S G, Sawicki D L, Siddell S G. A contemporary view of coronavirus transcription [J]. *Journal of virology*, 2007, 81(1):20-29.
- [46] Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier P J, et al. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step [J]. *The Journal of cell biology*, 1994, 124(1-2):55-70.
- [47] Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. *Nature reviews Microbiology*, 2009, 7(6):439-450.
- [48] Ducatelle R, Coussement W, Debouck P, et al. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study [J]. *Veterinary pathology*, 1982, 19(1):57-66.
- [49] Pensaert M B, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Archives of virology*, 1978, 58(3):243-247.
- [50] Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan [J]. *Nihon juigaku zasshi The Japanese journal of veterinary science*, 1983, 45(6):829-832.
- [51] Chae C, Kim O, Choi C, et al. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs [J]. *The Veterinary record*, 2000, 147(21):606-608.
- [52] Park S J, Song D S, Park B K. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea [J]. *Archives of virology*, 2013, 158(7):1533-1541.
- [53] Van Reeth K, Pensaert M. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds [J]. *The Veterinary record*, 1994, 135(25):594-597.
- [54] Carvajal A, Lanza I, Diego R, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies [J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of*

- Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 1995, 7(1):60-64.
- [55] Martelli P, Lavazza A, Nigrelli A D, et al. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy [J]. *The Veterinary record*, 2008, 162(10):307-310.
- [56] Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus, Thailand [J]. *Emerging infectious diseases*, 2009, 15(7):1112-1115.
- [57] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhoea in suckling piglets, China [J]. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(1):161-163.
- [58] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhoea virus, China, 2011 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(8):1350-1353.
- [59] Wang J, Zhao P, Guo L, et al. Porcine epidemic diarrhoea virus variants with high pathogenicity, China [J]. *Emerging infectious diseases*, 2013, 19(12):2048-2049.
- [60] Cho Y Y, Lim S I, Kim Y K, et al. Complete Genome Sequence of K14JB01, a Novel Variant Strain of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in South Korea [J]. *Genome announcements*, 2014, 2(3).
- [61] Lin C N, Chung W B, Chang S W, et al. US-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014 [J]. *The Journal of veterinary medical science*, 2014, 76(9):1297-1299.
- [62] Wen D, Liu G, Opriessnig T, et al. Simultaneous detection of five pig viruses associated with enteric disease in pigs using EvaGreen real-time PCR combined with melting curve analysis [J]. *Journal of virological methods*, 2019, 268:1-8.
- [63] Hu H, Jung K, Vlasova A N, et al. Experimental infection of gnotobiotic pigs with the cell-culture-adapted porcine deltacoronavirus strain OH-FD22 [J]. *Archives of virology*, 2016, 161(12):3421-3434.
- [64] Woo P C, Lau S K, Lam C S, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus [J]. *Journal of virology*, 2012, 86(7):3995-4008.
- [65] Ma Y, Zhang Y, Liang X, et al. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States [J]. *mBio*, 2015, 6(2):e00064.
- [66] Lee S, Lee C. Functional characterization and proteomic analysis of the nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus [J]. *Virus research*, 2015, 208:136-145.
- [67] Luo J, Fang L, Dong N, et al. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection suppresses RIG-I-mediated interferon-beta production [J]. *Virology*, 2016, 495:10-17.
- [68] Fang P, Fang L. Porcine Deltacoronavirus Accessory Protein NS6 Antagonizes Interferon Beta Production by Interfering with the Binding of RIG-I/MDA5 to Double-Stranded RNA [J]. 2018, 92(15).
- [69] Zhu X, Fang L, Wang D, et al. Porcine deltacoronavirus nsp5 inhibits interferon-beta production through the cleavage of NEMO [J]. *Virology*, 2017, 502:33-38.
- [70] Hu H, Jung K, Vlasova A N, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhoea in the United States [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2015, 53(5):1537-1548.
- [71] Jung K, Hu H, Saif L J. Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines in vitro but not in infected intestinal enterocytes in vivo [J]. *Veterinary microbiology*, 2016, 182:57-63.

- [72] Jung K, Hu H, Eyerly B, et al. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs [J]. *Emerging infectious diseases*, 2015, 21(4):650-654.
- [73] Wang L, Byrum B, Zhang Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2014, 20(7):1227-1230.
- [74] Wang L, Byrum B, Zhang Y. Porcine coronavirus HKU15 detected in 9 US states, 2014 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2014, 20(9):1594-1595.
- [75] Ajayi T, Dara R. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada [J]. 2018, 65(5):1197-1207.
- [76] Suzuki T, Shibahara T, Imai N, et al. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus [J]. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 2018, 61:176-182.
- [77] Jang G, Kim S H, Lee Y J, et al. Isolation and characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KNU16-07 [J]. *Journal of veterinary science*, 2018, 19(4):577-581.
- [78] Le V P, Song S, An B H, et al. A novel strain of porcine deltacoronavirus in Vietnam [J]. *Archives of virology*, 2018, 163(1):203-207.
- [79] Saeng-Chuto K, Stott C J, Wegner M, et al. Retrospective investigation and evolutionary analysis of a novel porcine deltacoronavirus strain detected in Thailand from 2008 to 2015 [J]. 2017, 162(7):2103-2108.
- [80] Zhang J. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. *Virus research*, 2016, 226:71-84.
- [81] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517):495-497.
- [82] Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2016, 917:11-22.
- [83] Browne S M, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines [J]. *Trends in biotechnology*, 2007, 25(9):425-432.
- [84] Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting [J]. *Expert opinion on biological therapy*, 2004, 4(11):1821-1829.
- [85] Dharshanan S, Hung C S. Screening and subcloning of high producer transfectomas using semisolid media and automated colony picker [J]. *Methods in molecular biology*, 2014, 1131:105-112.
- [86] Holmes P, Al-Rubeai M. Improved cell line development by a high throughput affinity capture surface display technique to select for high secretors [J]. *Journal of immunological methods*, 1999, 230(1-2):141-147.
- [87] Messerschmidt K, Heilmann K. Toxin-antigen conjugates as selection tools for antibody producing cells [J]. *Journal of immunological methods*, 2013, 387(1-2):167-172.
- [88] Reddy S T, Ge X, Miklos A E, et al. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells [J]. *Nature biotechnology*, 2010, 28(9):965-969.
- [89] Bestman-Smith J, Gourde P, Desormeaux A, et al. Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1 [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2000, 1468(1-2):161-174.
- [90] Du H, Chandaroy P, Hui S W. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein

- adsorption and cell adhesion [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1997, 1326(2):236-248.
- [91] Baba T, Rauch C, Xue M, et al. Clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis are differentially sensitive to insertion of poly (ethylene glycol)-derivatized cholesterol in the plasma membrane [J]. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2001, 2(7):501-512.
- [92] Medof M E, Nagarajan S, Tykocinski M L. Cell-surface engineering with GPI-anchored proteins [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1996, 10(5):574-586.
- [93] Premkumar D R, Fukuoka Y, Sevlever D, et al. Properties of exogenously added GPI-anchored proteins following their incorporation into cells [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2001, 82(2):234-245.
- [94] Van Broekhoven C L, Altin J G. A novel approach for modifying tumor cell-derived plasma membrane vesicles to contain encapsulated IL-2 and engrafted costimulatory molecules for use in tumor immunotherapy [J]. *International journal of cancer*, 2002, 98(1):63-72.
- [95] Kato K, Itoh C, Yasukouchi T, et al. Rapid protein anchoring into the membranes of Mammalian cells using oleyl chain and poly(ethylene glycol) derivatives [J]. *Biotechnology progress*, 2004, 20(3):897-904.
- [96] Li X, Bian H, Yu S, et al. A Rapid Method for Antigen-Specific Hybridoma Clone Isolation [J]. 2018, 90(3):2224-2229.
- [97] Utiger A, Roskopf M, Guscetti F, et al. Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27 kD glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhoea virus infected cells [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 1993, 342:197-202.
- [98] 孙智锋,钱永清,闻人楚,等.抗猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的中和与被动保护试验[J].*中国兽医学报*, 1998(03):14-16.
- [99] 张丽燕.猪流行性腹泻病毒单克隆抗体的研制[D].四川农业大学, 2012.
- [100] Okda F, Lawson S, Liu X, et al. Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus [J]. *BMC veterinary research*, 2016, 12:95.
- [101] 张雨迪.猪 $\delta$  冠状病毒 (PDCoV) 的 S1 蛋白原核表达与单克隆抗体制备[D].四川农业大学, 2017.
- [102] Buss N A, Henderson S J, Mcfarlane M, et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future [J]. *Current opinion in pharmacology*, 2012, 12(5):615-622.
- [103] Zhang C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies [J]. *Methods in molecular biology*, 2012, 901:117-135.
- [104] Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(3):371-380.
- [105] 郭楠楠.PEDV 细胞适应株全基因组序列测定与分析和抗 N 蛋白高免血清的制备[D].江西农业大学, 2018.
- [106] Li J, Zhai X, Ding C, et al. Development of a Bacterial Macroarray for the Rapid Screening of Targeted Antibody-Secreted Hybridomas [J]. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 2019, 24(2):190-198.
- [107] Gao C, Zhong W X, Zheng S D, et al. [Preparation and characterization of a novel functional anti-human CD83 monoclonal antibody] [J]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 2009, 25(10):914-916.
- [108] Demaria C T, Cairns V, Schwarz C, et al. Accelerated clone selection for recombinant CHO

- CELLS using a FACS-based high-throughput screen [J]. *Biotechnology progress*, 2007, 23(2):465-472.
- [109] Dippong M, Carl P, Lenz C, et al. Hapten-Specific Single-Cell Selection of Hybridoma Clones by Fluorescence-Activated Cell Sorting for the Generation of Monoclonal Antibodies [J]. 2017, 89(7):4007-4012.

## 致 谢

本研究及学位论文是在我的导师唐玉新教授的亲切关怀和悉心指导下完成的，他严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。三年来，唐玉新教授不仅在实验上给我以精心指导，同时还在思想和生活上给我以无微不至的关怀，在此我谨向唐老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意！

感谢本课题组黄冬艳老师、叶昱老师、丁珍老师、宋德平老师对我生活无微不至的关心和实验的悉心指导，感谢吴琼老师在背后默默付出和对我们的支持。感谢预防兽医学教研室的何后军老师、王萍老师、邓舜洲老师、邬向东老师、张锦华老师、张文波老师和戴益民老师对我的帮助和教诲。

感谢李凯师兄和张帆帆师兄对我试验的指导和帮助；感谢同级的李昊、龚旺、雷丹、韩春生、王喆、吴松松和曹亮亮这三年来对我的关心和帮助；感谢师弟师妹，李指全、袁为峰、陈佳佳、毕箴、陈君、顾俊和张誉瀚对我试验上的帮助和支持。感谢已经毕业的师兄师姐，陈燕君、李安琪、周信荣、彭棋、郭楠楠和张敏带我学习各种实验技术，对我试验和生活上的指导；感谢实验室其他小伙伴和一路支持我的人。

最后我要感谢我的母亲和我的哥哥，感谢他们对我的理解和支持，感谢他们对我的不离不弃，在我最艰难的日子里是他们给予我鼓励，让我一路向前。

罗素贤

2019年4月