



西北农林科技大学

硕士学位论文

PEDV 流行株的分离鉴定及鹤鹑源卵黄抗体的
研制

专业学位类型 兽医硕士

领域名称 兽医

论文作者 田昊伦

指导教师 郭抗抗 副教授

联合指导教师

论文提交时间 2021 年 5 月

Thesis Submitted to Northwest A & F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Veterinary Medicine

Isolation and Identification of PEDV Epidemic Strain and Preparation of Quail Yolk Antibody

Field: Veterinary Medicine

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Candidate: Tian Hao-lun

Supervisor: Prof. Guo Kang-kang

Co- Supervisor:

Date of submission: May, 2021

College

Northwest A & F University

分类号：S855.3
U D C：636.09
密 级：公开

学校代码：10712
研究生学号：2018055290

西北农林科技大学硕士学位论文

PEDV 流行株的分离鉴定及鹌鹑源 卵黄抗体的研制

论文作者：田昊伦

指导教师：郭抗抗 副教授

答辩委员会：

西北农林科技大学动物医学院

西北农林科技大学动物医学院

西北大学生命科学学院

中国动物卫生与流行病学中心

西北农林科技大学动物医学院

赵光辉 教授

王承宝 副教授

刘建玲 教授

郑增忍 研究员

林 青 教授

答辩日期：2021 年 5 月 27 日

本研究得到杨凌示范区科技计划项目（编号：2018NY-22）
资助

This work was supported by a grant from the Program of Science and
Technology of YangLing demonstration zone
(No. 2018NY-22)

研究生学位论文的独创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究结果；论文中的研究数据及结果的获得完全符合学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，如果违反此规定，一切后果与法律责任均由本人承担。

尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究结果，也不包含其他人和自己本人已获得西北农林科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已论文的致谢中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

田昊化

时间：2021年6月1日

导师指导研究生学位论文的承诺

本人承诺：我的研究生田昊化所呈交的学位论文是在我指导下独立开展研究工作及取得的研究结果，属于我现岗职务工作的结果，并严格按照学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》而获得的研究结果。如果违反学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，我愿接受按学校有关规定的处罚处理并承担相应导师连带责任。

导师签名：

郭抗抗

时间：2021年6月1日

摘 要

猪流行性腹泻病毒（PEDV）是引起猪流行腹泻（PED）的病原，20 世纪 70 年代 PEDV 在欧洲被首次发现，随后在世界范围流行。2010 年，我国由于 PED 造成近 100 万头仔猪死亡，使养猪业遭受严重损失。猪是 PEDV 的唯一自然宿主，各品种和年龄的猪均可感染，但以仔猪易感性高、症状最为严重，发病仔猪病程 7 d 左右，表现为腹泻、呕吐、严重脱水等症状，最终衰竭而死，哺乳仔猪病死率达 100%。对 PED 尚没有特异性的防治药物，生产中主要采取疫苗免疫接种，通过对怀孕母猪进行疫苗免疫接种，初生仔猪通过吸吮母乳获得母源抗体，抵抗 PEDV 的侵害。由于 PEDV 毒株的变异较快，流行毒株在基因和蛋白方面与疫苗株存在差异，可能是引起疫苗免疫失败的一个原因。另外，商品疫苗（灭活或减毒疫苗）通过注射方式接种母猪，使得妊娠母猪的黏膜免疫应答不能被有效激发，造成母乳中对 PEDV 起关键作用的 IgA 抗体分泌不足，不能提供给仔猪足够的保护效力。卵黄抗体（IgY）是通过外源抗原免疫禽类后，从蛋黄中提取的一种免疫球蛋白，IgY 进入机体能够和相应的抗原发生特异性结合。IgY 的理化性质稳定，对酸、碱和热具有一定的耐受力。近年来，特异性的 IgY 在防治动物疫病方面有较为广泛应用。

本研究通过分离培养 PEDV 流行毒株，制备 PEDV 弗氏佐剂灭活苗，免疫产蛋鹌鹑，然后通过比较不同的卵黄抗体提取方法，筛选优化 IgY 的最佳提取方法。对提纯的抗 PEDV 卵黄抗体进行体外中和试验，以及 IgY 理化性质的检验。获得以下研究结果：

（1）猪流行性腹泻病毒流行株的分离鉴定

取 PEDV 核酸阳性的患猪小肠组织，处理后接种 Vero 细胞，连续传代培养，观察细胞病变。传代培养的第 11 代出现典型合胞体病变，经 RT-PCR 扩增出 PEDV 特异性条带，测序结果表明为 PEDV 基因序列；IFA 鉴定结果显示，细胞中存在可与抗 PEDV 的 N 蛋白单克隆抗体结合的病毒。分离获得 1 株 PEDV 毒株。

（2）PEDV 分离株的遗传分析

对 PEDV 分离株的 S1 基因全长进行克隆、目的片段回收纯化，序列分析发现，分离株与 2015 年四川分离株 CH-SCNC-2-2015、广东分离株 GD-B 和安徽分离株 AH2012 的 S1 基因相似性较高，均在 99.1%以上，氨基酸相似性达 98.4%以上；与弱毒株 CV777 和弱毒苗株 DR13（韩国）的 S1 基因核苷酸相似性在 91.9%~92.0%，氨基酸相似性在 89.6%~89.8%。说明得到的 PEDV 分离株为流行毒株。

（3）PEDV 灭活疫苗的制备及鹌鹑的免疫

将 PEDV 分离株毒液经过滤除菌后，加入终浓度为 0.1%的 β -丙内酯灭活，分别

与等量的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂混匀，充分乳化后制成灭活疫苗，进行物理特性、无菌性和安全性检测。选取 130 只 65 日龄产蛋鹌鹑，每只胸肌多点注射 0.2 mL 疫苗，共免疫 3 次，每次免疫间隔 2 周。首免接种弗氏完全佐剂疫苗，之后加强免疫均接种弗氏不完全佐剂疫苗。首免后每隔 7 d 收集鹌鹑蛋，同时采集血液分离血清。将血清及收集的鹌鹑蛋于 4℃ 保存。

（4）高免鹌鹑蛋中卵黄抗体的提取

取三免后的鹌鹑蛋，分别用水稀释、硫酸铵法、PEG-6000 法提取卵黄抗体，纯度分析显示，硫酸铵法提取的卵黄抗体纯度较高，杂蛋白较少，水稀释和 PEG-6000 法提取的卵黄抗体在 30~48 kDa 之间杂蛋白较多。水稀释法和 PEG-6000 法提取的 IgY 蛋白含量分别 9.68 mg/mL 和 8.15 mg/mL，硫酸铵法提取为 7.56 mg/mL，但是硫酸铵法提取的 IgY 中抗 PEDV 抗体效价最高为 1:5120，故选取硫酸法提取 IgY。

（5）免疫鹌鹑抗 PEDV 血清抗体和卵黄抗体的消长规律分析

用建立的检测 PEDV 抗体检测 ELISA 方法对免疫鹌鹑血清和卵黄抗体中抗 PEDV 特异性抗体进行检测。结果显示，特异性卵黄抗体的产生要滞后于血清中抗体产生，血清抗体在首免后 1 周就为检测阳性，而卵黄抗体在首免后 2 周后才检测为阳性，两种抗体在三免后 2 周均达到最高，血清抗体高水平维持 10 d 左右，卵黄抗体高抗体水平维持 21 d 左右。

（6）抗 PEDV 卵黄抗体体外中和试验以及理化性质的检验

抗 PEDV 卵黄抗体中和效价为 1:111。经 37℃~56℃ 保存、pH 3.0~9.0 保存胃蛋白酶作用 0.5~2 h 等处理后，对 IgY 中和 PEDV 的能力无显著变化。

本研究通过分离得到 PEDV 流行毒株，制备 PEDV 灭活疫苗免疫产蛋鹌鹑，获得了鹌鹑源抗 PEDV 卵黄抗体。

关键词：猪流行性腹泻病毒；分离鉴定；基因克隆与分析；卵黄抗体；鹌鹑

ABSTRACT

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious, intestinal infectious disease caused by Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The first reported PED outbreak occurred in Europe in the 1970s and then spread worldwide. At the end of 2010, the disease had a death of over one million piglets in China, with devastating damage to the pig industry. PEDV infections can occur in pigs of all ages, and infections are most serious in piglets, with the morbidity and mortality often reaching 100%. Pig tolerates PEDV infections usually exhibit diarrhea, vomiting and severe dehydration, and the disease course of about 7 days. At present, there is no specific drug to the prevention and control of PED, mainly through vaccination of pregnant sows, and the newborn piglets obtain maternal antibodies to resist PEDV. In addition, commercial vaccines (inactivated or attenuated vaccines) were inoculated to sows by intramuscular injection, which caused the mucosal immune response of pregnant sows to not be effectively stimulated, resulting in insufficient secretion of IgA antibodies that play a key role in PEDV in breast milk and can not be provided to adequate protection of piglets. Egg yolk antibody (IgY) is an immunoglobulin extracted from egg yolk after immunizing poultry with foreign antigen, which can enter the body and specifically bind to the corresponding antigen. IgY has stable physical and chemical properties, and has certain resistance to acid, alkali and heat. In recent years, specific IgY has been widely used in the prevention and treatment of animal diseases. In this study, the PEDV epidemic strain was isolated and cultured, and the PEDV Freund's adjuvant inactivated vaccine was prepared to immunize egg-laying quails. Then, by comparing different methods of yolk antibody extraction, the best extraction method for IgY was screened and optimized. The purified anti-PEDV egg yolk antibody was subjected to in vitro neutralization test and IgY physical and chemical properties test. The results obtained were as follows:

(1) Isolation and identification of PEDV epidemic strains

After processing the small intestine tissues of pigs with positive PEDV nucleic acid, which were inoculated with Vero cells and subcultured continuously to observe the cytopathic changes. The 11th passage of subculture showed typical syncytial lesions, and the specific bands of PEDV were amplified by RT-PCR, and the sequencing results showed that they were PEDV gene sequences. The indirect immunofluorescence identification

results showed that there were viruses in the cells that could interact with anti-N protein monoclonal antibodies. These data shows that a PEDV strain was isolated successfully.

(2) Analysis of genetic variation of PEDV isolate

The full-length S1 gene of the PEDV isolate was cloned, and the target fragment was recovered and purified. The results of sequence analysis showed that the isolate was similar to the Sichuan isolate CH-SCNC-2-2015 that was isolated in 2015, Guangdong isolate GD-B, and Anhui isolate AH2012. The S1 gene of isolate had high similarity with 99.1%, and the amino acid similarity is above 98.4%, and the nucleotide similarity of the S1 gene with the standard attenuated strain CV777 and attenuated vaccine strain DR13 (South Korea) is 91.9%-92.0%, and the amino acid similarity is 91.9%-92.0%. The similarity ranges from 89.6% to 89.8%. These data shows that the obtained PEDV isolate is an epidemic strain.

(3) Preparation of PEDV inactivated vaccine and immunity of quail

After the venom of the PEDV isolate is filtered and sterilized, which is inactivated by adding 0.1% β -propiolactone, mixed with the same amount of Freund's complete adjuvant and Freund's incomplete adjuvant respectively, and fully emulsified to make an inactivated vaccine, Perform physical properties, sterility and safety tests. A total of 130 65-day-old egg-laying quails were selected, and each pectoral muscle was injected with 0.2 mL vaccine at multiple points. A total of 3 immunizations were performed, with an interval of 2 weeks between each immunization. Freund's complete adjuvant vaccine is the first immunization, and Freund's incomplete adjuvant vaccine is used for the subsequent booster immunizations. After the first immunization, quail eggs were collected every 7 days, and blood was collected to separate serum. The serum and the collected quail eggs were all stored at 4 °C.

(4) Extraction of yolk antibodies from highly immunity quail eggs

The quail eggs after three immunizations were diluted with water, ammonium sulfate method, and PEG-6000 method to extract the egg yolk antibody. Purity analysis results showed that the yolk antibody extracted by the ammonium sulfate method had higher purity and less impurity protein. It was diluted with water and PEG-6000. The egg yolk antibody extracted by the method has a lot of mixed protein between 30 kDa and 48 kDa. The content of IgY protein extracted by water dilution method and PEG-6000 method was 9.68 mg/mL and 8.15 mg/mL respectively, and the ammonium sulfate method was 7.56 mg/mL, but the highest anti-PEDV antibody titer in IgY extracted by ammonium sulfate method was 1 : 5120, so the sulfuric acid method was selected to extract IgY.

(5) Analysis on the growth and decline of anti-PEDV serum antibody and egg yolk antibody of immune quail

The established ELISA methods was used to detect the anti-PEDV specific antibody in the serum and egg yolk antibody of immunized quail. The results show that the production of specific yolk antibodies lags behind the production of antibodies in the serum. Serum antibodies are tested positive 1 week after the first immunization, while the yolk antibodies are tested positive only 2 weeks after the first immunization. Both antibodies are detected after the third immunization. It reached the highest level in 2 weeks, the high level of serum antibody was maintained for about 10 days, and the high level of yolk antibody was maintained for about 21 days.

(6) In vitro neutralization test and physical and chemical properties of anti-PEDV egg yolk antibody

The neutralization titer of the anti-PEDV egg yolk antibody was 1:111. After storage at 37~56°C, pH 3.0~9.0 storage with pepsin for 0.5~2 h, the neutralization ability of IgY on PEDV has no significant change.

In this study, an epidemic variant strain of PEDV was isolated and a PEDV inactivated vaccine was prepared to immunize egg-laying quails, and finally quail-derived anti-PEDV egg yolk antibodies were obtained.

KEY WORDS: Porcine epidemic diarrhea virus; Isolation and identification; Gene clone and analysis; Yolk antibody ; Quail

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	III
文献综述.....	1
第一章 猪流行性腹泻及卵黄抗体的研究进展	1
1.1 猪流行性腹泻的研究概况	1
1.1.1 猪流行性腹泻的流行概况	1
1.1.2 猪流行性腹泻病毒的基因组结构及功能	2
1.1.3 猪流行性腹泻病毒的传播与致病	3
1.1.4 猪流行性腹泻病毒的分离	4
1.1.5 猪流行性腹泻的防控	4
1.2 卵黄抗体的研究概况	5
1.2.1 卵黄抗体的来源	5
1.2.2 卵黄抗体的结构特征及理化特性	5
1.2.3 卵黄抗体的应用优势	6
1.2.4 卵黄抗体的提取方法	6
1.2.5 卵黄抗体在胃肠道疾病防治中的应用	7
1.3 研究的目的意义	8
试验研究	10
第二章 猪流行性腹泻病毒流行株的分离鉴定	10
2.1 材料	10
2.1.1 样品及细胞株的来源	10
2.1.2 主要试剂及器材	10
2.2 方法	11
2.2.1 病料的处理	11
2.2.2 引物的设计与合成	11
2.2.3 组织病料中 PEDV 的检测.....	12
2.2.4 PEDV 的分离.....	12
2.3 结果	14
2.3.1 病料中 PEDV 的检测和分离鉴定.....	14
2.4 讨论	16
2.5 小结	17
第三章 PEDV 分离株的遗传变异分析	18
3.1 材料	18

3.1.1 主要试剂及仪器设备	18
3.2 方法	19
3.2.1 PEDV 分离株 S1 基因全长克隆所用引物的设计	19
3.2.2 PEDV 分离株 S1 基因克隆与序列分析	19
3.3 结果	21
3.3.1 PEDV 分离株 S1 基因的克隆	21
3.3.2 PEDV S1 基因的序列分析	21
3.4 讨论	23
3.5 小结	24
第四章 抗 PEDV 流行毒株鹤鹑源卵黄抗体的研制	25
4.1 材料	25
4.1.1 动物	25
4.1.2 主要试剂及仪器	25
4.2 方法	26
4.2.1 PEDV 分离株灭活疫苗的制备及检验	26
4.2.2 制备的灭活疫苗免疫接种产蛋鹤鹑	27
4.2.3 卵黄抗体提取方法比较	27
4.2.4 抗 PEDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	29
4.2.5 卵黄抗体抗 PEDV 中和效价的测定	31
4.2.6 卵黄抗体基本特性检验	31
4.3 结果	32
4.3.1 PEDV 分离株灭活疫苗的检验	32
4.3.2 卵黄抗体的提取与检验	33
4.3.3 抗 PEDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	35
4.3.4 卵黄抗体抗 PEDV 特异性	37
4.3.5 卵黄抗体的敏感性试验结果	37
4.3.6 卵黄抗体抗 PEDV 作用	37
4.3.7 抗 PEDV 流行变异毒株卵黄抗体的理化性质	38
4.4 讨论	40
4.5 小结	41
结 论	42
参考文献	43
致 谢	50
作者简介	51

文献综述

第一章 猪流行性腹泻及卵黄抗体的研究进展

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的猪的一种肠道传染病, 成年猪感染后一般临床症状较轻, 而新生仔猪感染后常常表现为呕吐、重度腹泻、严重脱水, 最终衰竭而死, 病死率高达 100%(Lin et al. 2016)。由于初生仔猪发病迅速、病程短, 难以采取疫苗免疫方法预防, 加之 PEDV 流行毒株的变异和仔猪从母乳中获得的抗体有限, 不能提供足够保护力; 新生仔猪因为免疫力低下, 一旦感染后同窝仔猪通常无一幸免, 经济损失惨重, 严重阻碍养猪业的发展(周宏专 2018)。卵黄抗体 (Immunoglobulin of yolk, IgY) 是禽类蛋黄中主要的免疫球蛋白, 通过给产蛋禽类免疫外源性抗原, 获取特异性卵黄抗体 IgY, 用于中和体内或体外的病原, 进而使得宿主免受病原的感染。近年来, 卵黄抗体在人类健康和兽医领域中备受青睐(亓秀晔 2017)。

1.1 猪流行性腹泻的研究概况

1.1.1 猪流行性腹泻的流行概况

1971 年在英格兰的猪群中, 一名兽医发现在育肥猪中出现肠道疾病, 并将该病称为流行性病毒腹泻 (Epidemic viral diarrhea, EVD)。1976 年, 在欧洲部分地区猪也出现了类似的感染发病特征, 并将其称为流行性病毒腹泻 (EVD) II 型(Wood, 1977)。1978 年, 比利时根特大学的科研人员从收集的猪腹泻样本中, 通过电子显微镜观察到和冠状病毒形态相似的病毒粒子, 将其中一份样品中分离鉴定出的病毒命名为 CV777 株(Pensaert and de Bouck 1978)。1982 年, 该病被称为猪流行性腹泻(Pensaert et al. 1982)。

1973 年, 我国在上海首次报道了一种类似于 PED 的急性腹泻病, 直到 1984 年才确认引起腹泻的病原是 PEDV(宣华等 1984)。从 1984 年到 2010 年初, 尽管 PEDV 在我国养猪场内仍然存在感染发病的情况, 但流行特点主要是呈散发性和地方流行性, 未出现大规模流行暴发(Chen et al. 2008)。2010 年冬天, 在我国南方多地猪场出现急性仔猪腹泻, 导致约超过 100 万头仔猪的死亡, 很快 PED 便席卷进入全国各地(Wang et al. 2013)。初生仔猪感染 PEDV 后很快发病, 病死率可高达 80%~100%, 对我国养猪业造成严重损失(Tian et al. 2013)。流行病学调查结果显示, 2011~2014 年, 除了西藏和海南外, 全国共有 29 个省份都有 PED 疫情的报道, PEDV 的阳性样品检出率约为 61%~78%, 发生 PED 的阳性猪场约 71%~83%(张志等 2014)。徐丽华等通过调查 2011~2017 浙江省仔猪感染 PEDV 的情况, 发现在不同年份中, PEDV 阳性感染率均

达 50%以上(徐丽华等 2018)。2012~2016 年间,山东仔猪腹泻的主要病原还是以 PEDV 为主,每年平均检出率高达 72%(张月等 2018)。王璟然等通过对 2008~2018 年,我国 18 个省市地区 PED 的流行概况进行调查,结果显示 PEDV 阳性率达 48% (3345/6951),混合感染率达 19% (1325/6951) (王颢然等 2020)。通过调查华南地区 5 个省份 2012~2018 年 PED 的流行情况,在 168 个猪场收集的 2987 份腹泻样品中, PEDV 的检出率最高达 45.53% (1360/2987),阳性猪场占 96.43% (162/168) (Zhang et al. 2019)。

2013 年 4 月, PED 在美国首次出现,并在美国各个州迅速传播,一年的时间内共造成超过 800 万新生仔猪死亡,损失超过 9 亿美元(Stevenson et al. 2013); 2014 年损失近 18 亿美元(Schulz and Tonsor. 2015)。随后, PED 迅速从美国传播到墨西哥和加拿大,对当地养猪业构成巨大的威胁,经济损失惨重(Chen et al. 2014)。亚洲的韩国、日本等地区也相继暴发 PED 疫情(Lee et al. 2013; Lin et al. 2014)。从 2014 年以来, PED 在欧洲一些国家再次出现,如比利时(Theuns et al. 2015)、德国(Hanke et al. 2015)、法国以及奥地利等地(Grasland et al. 2015; Steinrigl et al. 2015),高毒力的 PEDV 变异株的出现,导致欧洲地区的养猪业经济损失惨重。近年来, PED 成为困扰全球养殖业的重要传染病之一,严重危害和阻碍养猪业的发展。

1.1.2 猪流行性腹泻病毒的基因组结构及功能

PEDV 是冠状病毒科 (*Coronaviridae*),冠状病毒属 (*Coronavirus*) 的成员,为单链正义的 RNA 病毒,具有包膜,病毒粒子直径约 95~190 nm。基因组大小 28 kb,其主要编码 4 个结构蛋白,包括有纤突蛋白 (Spike, S)、核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, N)、膜蛋白 (Membrane, M) 和小膜蛋白 (Envelope, E),以及 16 个非结构蛋白 (nsp1~nsp16) 和辅助蛋白 ORF3 (Li et al. 2016)。这些非结构蛋白和结构蛋白,在病毒入侵宿主细胞以及在抗病毒反应中发挥关键作用(Li et al. 2020)。PEDV 的非结构蛋白 nsp1 通过降解 CREB 结合蛋白 (CREB-binding protein, CBP),阻断干扰素调节因子 IRF3 和 CBP 的增强体装配,抑制 I 型干扰素的表达(Zhang et al. 2016)。此外, nsp1 能够阻断干扰素调节因子 IRF1 的核易位,减少过氧化物酶体的数量,抑制 IRF1 介导的 III 型干扰素 IFN- λ 的产生,拮抗宿主的抗病毒反应(Zhang et al. 2018)。

结构蛋白不仅是病毒骨架中的主要成分,而且在入侵细胞和抗病毒反应中发挥重要作用,如 N 蛋白除了可以将病毒的 RNA 包装成螺旋核衣壳外,还能延长细胞周期中的 S 期,诱导内质网应激,通过上调白细胞介素 8 (Interleukine-8) 的表达,进一步拮抗 I 型干扰素的产生(Xu et al. 2013; Ding et al. 2014)。在 PEDV 感染早期,机体可以产生较高水平的 N 蛋白抗体,因为 N 蛋白较为保守,所以常用作早期诊断试剂以及研发疫苗的最佳候选蛋白(Li et al. 2013)。M 蛋白和 E 蛋白主要和病毒粒子的组装

和释放等有关。辅助蛋白 ORF3 被认为和病毒的致病力相关,具有离子通道功能(Wang et al. 2012)。此外, ORF3 蛋白可以延长细胞周期中的 S 期,促进病毒的复制增殖(Ye et al. 2015)。

S 蛋白作为病毒粒子表面的纤突蛋白,在 PEDV 进入宿主细胞的过程中起着关键性作用, S 蛋白可以被宿主细胞内的蛋白酶加工为 S1 和 S2 亚基(Wicht et al. 2014),而 S1 亚基又包括 C 末端结构域和 N 末端结构域,其中 C 末端结构域主要和细胞受体相结合,引发一系列构象变化(Wrapp et al. 2019),然后 S2 亚基进一步诱导病毒包膜和宿主细胞膜融合, S2 亚基相比于 S1 亚基较为保守(Walls et al. 2017)。S1 亚基区域的核心抗原中和表位区被广泛应用于 PEDV 亚单位疫苗的研发。S 蛋白是研究冠状病毒减毒活疫苗和亚单位疫苗的主要目标(Reguera et al. 2012)。

1.1.3 猪流行性腹泻病毒的传播与致病

初生的哺乳仔猪对 PEDV 的易感性较强,主要通过接触腹泻仔猪的呕吐物和腹泻物,或者是受污染的饲料,或携带 PEDV 的螨虫而引起感染发病(Dee et al. 2014; Jung and Saif. 2015)。粪—口途径是 PEDV 的主要传播方式,一些发达国家的大型养猪场配置了良好的消毒和管理系统,猪场的卫生和饲料安全得到充分保障,使得通过粪便和饲料传播的问题大大降低,本病的发生也极大降低,但可能还存在其他途径感染的问题,需要研究(Ribbens et al. 2008)。在暴发 PED 的猪场空气中,在大小不同的气溶胶颗粒中均可检测出 PEDV,可达到 $1.3 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^8$ 的 RNA 拷贝数(Alonso et al. 2015)。5 日龄仔猪经鼻腔雾化接种 PEDV 后,可引起典型腹泻症状,这与通过口服接种 PEDV 后获得的粪便滴度相同,发现通过鼻腔进入的 PEDV 被鼻黏膜下的树突状细胞所捕获后,进一步转移至外周血单核细胞的 $CD3^+$ T 细胞中,然后经血液循环进入肠道引起发病,证明 PEDV 可以通过鼻腔黏膜途径引起发病(Li et al. 2018)。

PED 患猪的主要临床表现为呕吐、厌食和腹泻,仔猪症状要更为严重,一般病程 5~7 d,仔猪严重脱水和衰竭而死,病死率甚至可达 100%。PEDV 育肥猪后导致其生长性能下降,但死亡率不高(Hou et al. 2007; Alvarez et al. 2015)。病毒进入仔猪体内后主要感染小肠段组织,导致肠壁变的薄而透明,肠内常伴有积液积气。在 PEDV 急性感染仔猪的 12~24 h 期间,主要侵害小肠组织的空肠中段和回肠,而在十二指肠和空肠的近端感染程度则较低(Jung et al. 2018)。引起小肠绒毛上皮细胞发生急性坏死,然后从固有层剥落,从而引起绒毛严重萎缩或融合,导致绒毛高度/隐窝深度的比值从正常 7:1 降为 3:1,进而导致小肠的吸收不良引发水样腹泻(Kim and Lee, 2014)。Lee 等通过免疫组织化学试验发现,不仅在肠绒毛上皮细胞的胞质内可以检测到 PEDV,而且在固有层的巨噬细胞中也有 PEDV(Lee et al. 2000)。

1.1.4 猪流行性腹泻病毒的分离

PEDV 在体外分离培养较为困难, Hofmann 等人发现, 通过在培养液中加入胰酶后, 可使 PEDV 适应在 Vero 细胞中复制增殖, 诱导细胞产生大量合胞体, 有的甚至包含 100 多个细胞核。荧光抗体染色在感染 PEDV 细胞的胞质内可见有明显荧光信号 (Hofmann and Wyler. 1988)。Vero 细胞是 PEDV 体外分离培养最合适的细胞系, 随着新变异毒株的出现, 这些变异株很难在 Vero 细胞中分离培养。有人通过在培养液中添加胰酶, 以猪膀胱上皮细胞和肾脏上皮细胞为靶细胞, 成功分离 PEDV, 这是 PEDV 在猪源细胞系中成功分离的首次报道 (Shibata et al. 2000)。Shi 等人用猪小肠上皮细胞 (IEC) 从仔猪腹泻的样本中成功分离出 PEDV NJ 分离株, 为 PEDV 病毒的分离培养提供了新方法 (Shi et al. 2017)。研究发现, PEDV 流行毒株 LJX (G-II 型) 与 CV777 经典株 (G-I 型) 均可以在大鼠隐窝上皮细胞 (Rat crypt epithelial cells, IEC-6) 中复制增殖, 且病毒的复制能力与在 Vero 细胞中相似, $TCID_{50}$ 达 $10^{-7.0}/\text{mL}$, 但在猪空肠上皮细胞 (porcine epithelial cell-jejenum 2, IPEC-J2) 中的复制能力却较差, $TCID_{50}$ 仅为 $10^{-4.0}/\text{mL}$ (Chen et al. 2020)。

1.1.5 猪流行性腹泻的防控

疫苗接种是预防传染病的有效手段, 将 G-I 亚型的 PEDV 经典毒株在 Vero 细胞连续传代, 最后制备减毒活疫苗用于临床防控。冯力等人研发了 PEDV CV777 和猪传染性胃肠炎 H 株二联减毒活疫苗, 韩国研制成功以 PEDV KPEDV-9 株减毒疫苗 (Kweon et al. 1999), 2004 年, 减毒活疫苗 DR-13 株在韩国问世, 疫苗接种仔猪后未出现临床体征, 母猪接种后也没有出现流产、腹泻和发烧等体征, 作为候选疫苗来防控 PED。在 2010 年之前, 减毒活疫苗毒株主要有 CV777, 日本的 86P-5 毒株以及韩国的 DR-13 毒株, 对 PED 的防控起到了关键作用。

高毒力 PEDV 变异株在国内出现而导致疫情暴发, 随后迅速蔓延到亚洲各国 (Sun et al. 2012)。提示, 经典疫苗株不能有效阻断高毒力变异毒株的感染和致病, 使针对 PEDV 变异新毒株疫苗的研究成为迫切需要 (Li et al. 2012)。在二联苗的基础上, 冯力团队又研制出了包括猪流行性腹泻病毒 CV777 株、猪传染性胃肠炎病毒 H 株和猪流轮状病毒 NX 株的腹泻减毒三联苗, 2014 年 12 月获得农业部的批准 (Wang et al. 2016)。2015 年 11 月, 根据 TGEV HB08 株和 PEDV ZJ08 (G-I 亚型) 株研制的二联减毒疫苗正式投放入市场。考虑临床 PEDV 流行毒株 (G-II 型) 与商品疫苗 CV777 经典株 (G-I 亚型) 之间的差异, 应该针对目前田间 G-II 型开发下一代疫苗。2016 年 12 月, 研究人员针对田间 G-II 型 PEDV 流行株 (AJ1102), 研发成功 PEDV 和 TGEV 二联灭活疫苗, 相比于之前 G-I 型的商品苗, G-II 型的 PEDV 疫苗对仔猪的保护效力更高。尽管这些疫苗在 PED 防控中起到重要保护作用, 生产中使用灭活或减毒疫苗无法诱导

足够的黏膜免疫应答。分泌型抗 PEDV sIgA 能够中和肠道内的病毒，阻断 PEDV 对肠上皮细胞的黏附；母猪初乳中的抗 PEDV sIgA 在保护新生乳猪免受 PEDV 侵害方面起决定性作用，也是 PED 疫苗防控成败的主要因素。采用一定策略可以诱导黏膜免疫反应，通过选择合适的载体通过黏膜途径来运送疫苗到达靶细胞。研究发现，以肠溶性材料—羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(HPMCP)为载体，将表达纯化的 PEDV S1 蛋白与 HPMCP 结合制备口服疫苗，可有效诱导妊娠母猪的黏膜免疫应答，与接种 PEDV 灭活疫苗的试验组母猪相比，口服疫苗可以诱导母猪初乳和乳清样品中分泌高滴度的 sIgA (Choe et al. 2020)。另一项研究发现，用可生物降解的纳米颗粒包裹灭活 PEDV，给妊娠后期母猪经鼻内接种该疫苗，相比于接种灭活苗的母猪，发现经鼻腔接种疫苗的母猪血清 IgG 以及初乳中 sIgA 抗体效价均高，仔猪的存活率显著增加(Li et al. 2017)。

1.2 卵黄抗体的研究概况

1.2.1 卵黄抗体的来源

卵黄抗体 (IgY) 是存在于免疫禽类卵黄中，与哺乳动物的 IgG 功能相似的一种免疫球蛋白，可以和抗原特异性结合(余运等 2018)。禽类机体中的法氏囊受到外界免疫原刺激时，法氏囊中的 B 细胞活化后分化为浆细胞，分泌针对抗原的特异性抗体，主要是血液中的 IgG 抗体，随着血液循环至卵巢时，在卵细胞中慢慢蓄积成为卵黄抗体 (IgY)。目前 IgY 的生产主要还是通过免疫产蛋鸡获取，其它禽类如鹅和鹌鹑等也被用来制备针对特定免疫原的卵黄抗体。Najdi 等人通过给 7 周龄鹌鹑接种幽门螺旋杆菌抗原，可在卵黄中产生抗幽门螺旋杆菌 IgY，具有较高滴度和特异性(Najdi et al. 2016)。Fink 等人将登革热病毒抗原接种蛋鹅，从鹅蛋中提取纯化的抗登革热 IgY 能够在体外中和登革热病毒，用致死剂量感染小鼠 24 h 后，用抗登革热 IgY 进行治疗，小鼠的治愈率达 100%(Fink et al. 2017)。大量研究表明，IgY 可有效防治相关疫病。

1.2.2 卵黄抗体的结构特征及理化特性

尽管禽类的 IgY 和哺乳动物的 IgG 在功能上等同，但在结构上还是存在一定差异。卵黄抗体 IgY 包括两条重链和两条轻链，每条重链的分子量大小在 67~70 kDa，每条轻链的大小约为 25 kDa。轻链中包含有一个恒定区 (Constant region) 和一个可变区 (Variable region)，这与 IgG 的轻链结构组成相同。IgY 和 IgG 主要的不同在于重链，IgG 的重链中包含有 3 个恒定区(CH1-CH3)，IgY 的重链中含有 4 个恒定区(CH1-CH4)。相比于 IgG 的分子量 150 kDa，IgY 的分子量更大，约为 180 kDa(Pereira et al. 2019)。IgY 的铰链区相比于 IgG 也表现的不太灵活，柔韧性较差，这可能是由于重链恒定区中的 CH1-CH2 和 CH2-CH3 区域中甘氨酸和脯氨酸残基的存在，限制了 IgY 的灵活

性(Dávalos-Pantoja et al. 2000), 这种较高的链刚性也是一种优势, 可能与提高卵黄抗体抵抗蛋白酶水解和降解断裂的能力有关(Spillner et al. 2012)。此外, 卵黄抗体 IgY 的等电点为 pH 5.7~7.6, 而 IgG 的等电点为 pH 6.1~8.5(Sun et al. 2001)。

尽管卵黄抗体是蛋白质分子, 但 IgY 对热具有一定耐受力, 在 30~70℃ 范围内保持稳定, 当温度在 70℃ 或者更高温度下加热 15 min, IgY 的活性会下降, 在高于 75℃ 条件下处理时, IgY 会发生变性。经冻干后的卵黄抗体在 4℃ 下可保存 5~10 年, 抗体活性也不有显著下降, 并且这些卵黄抗体冻干剂在室温条件下也能保持至少 6 个月的活性, 在 37℃ 下保持 1 个月的活性(Larsson et al. 1993)。随着温度的升高, 卵黄抗体对抗原的亲合力会下降, 在应用中可通过添加麦芽糖、蔗糖、甘氨酸或者甘油来保护 IgY 免受热变性(Rahman et al. 2013), IgY 对酸和碱的稳定性结果发现, IgY 在 pH 为 3.5~11 范围内仍具有活性, 在强酸性条件下 (pH3.0), 通过添加山梨糖醇可以使 IgY 的稳定性增强(Lee et al. 2002)。

1.2.3 卵黄抗体的应用优势

用哺乳动物制备 IgG 抗体时, 通常需要牺牲动物以获取足够多的血液, 制备血清抗体。在卵黄抗体 IgY 的制备, 只需要用疫苗免疫接种产蛋禽, 收集高免蛋, 从蛋黄液中提取特异性 IgY。卵黄抗体的获得不需要动物的牺牲, 在动物福利方面具有很大优势(吕豪杰等 2019)。由于禽类与哺乳动物之间的系统发育距离较远, 相比于哺乳动物, 禽类通常能更有效地产生针对高度保守的哺乳动物蛋白的抗体, 需要更少的抗原就能诱导体液免疫反应(李明亮等 2018)。卵黄抗体对动物机体是无任何毒性、副作用以及不良反应等, 因为其也是人类饮食中的正常组成部分, 不存在安全性的问题(Rahman et al. 2013)。此外, IgY 既不会激活哺乳动物的补体系统, 也不能与哺乳动物体内的 Fc 受体相互结合, 不会介导炎症反应以及相关免疫反应。IgY 与不会与葡萄球菌蛋白 A 和蛋白 G, 以及类风湿因子等相互作用(Pereira et al. 2019)。总之, 这些独特的生物学特性使得卵黄抗体 IgY 近年来备受关注, 广泛应用于人医和兽医学领域, 如免疫诊断(Cai et al. 2012)、免疫疗法(Rahman et al. 2013)和食品工程等方面(Horie et al. 2004)。

1.2.4 卵黄抗体的提取方法

卵黄抗体的提取是指从免疫后收集的蛋黄液中, 通过各种方法将水溶性的卵黄抗体 (IgY) 从蛋黄液中分离出来。目前, 主要有水稀释法、盐析法、聚乙二醇沉淀法、有机溶剂沉淀法、超滤法等(向冬梅等 2020)。水稀释法通常用蒸馏水对蛋黄液进行 8 倍或 9 倍稀释, 调节 pH5.2, 过夜静置后使得卵黄中的脂蛋白充分沉淀, 上清液即为卵黄抗体 IgY。这种方法虽然操作简易、耗时短, 但提取的卵黄抗体纯度不高, 除脂不彻底时杂蛋白较多, 常用作 IgY 的粗提方法。盐析法主要包括硫酸铵法和硫酸钠法,

最常用的是硫酸铵法,将卵黄液经蒸馏水稀释后,调 pH 5.2,离心取上清液分别经 50% 和 33% 的饱和硫酸铵 2 次盐析沉淀后,白色半透明沉淀即为提取的卵黄抗体,经硫酸铵法提取的卵黄抗体纯度较高,是实验室常用的卵黄抗体的提取方法。聚乙二醇沉淀法也常用于实验室提取 IgY,卵黄液经适量 PBS 液稀释后,加入 3.5% PEG-6000 进行除脂,离心后的上清液经 8.5% 和 12% 的 PEG-6000 2 次沉淀后,用适量 PBS 液溶解沉淀即为卵黄抗体 IgY 溶液。有机溶剂法(氯仿法和乙醇法)是卵黄抗体比较传统的提取方法,主要通过向蛋黄稀释液中加入有机溶剂,静置离心后,透明上清液即是提取的卵黄抗体。虽然有机溶剂的除脂效果较好,提取方法省时高效,但由于试剂成本太高,也具有毒性,而且提取过程中有机溶剂容易造成蛋白质变性和残留等问题,这种方法提取的卵黄抗体可以用作分子诊断和检测试剂,一般不用于临床治疗。超滤法是使用超滤膜,在一定压力下将溶剂和小分子杂质滤掉,然后截留目的蛋白分子,主要用于蛋白的纯化,可以用于大批量卵黄抗体的提取纯化。为了满足卵黄抗体不同的需求,可根据 IgY 具体的用途选择合适的提取纯化方法。

1.2.5 卵黄抗体在胃肠道疾病防治中的应用

近年来,卵黄抗体(IgY)在人类健康和兽医领域的应用越来越多,IgY 可以有效抵抗多种肠道重要的致病病原体,如沙门菌、大肠埃希菌、冠状病毒和轮状病毒等。IgY 潜在的作用机制可能是:(1) IgY 能够和病原表面的抗原表位结合,进而阻断病原与胃肠道黏膜细胞相互作用,起到中和病原的效果(王业华等 2019)。(2) IgY 可以抑制细菌的活性,通过与细菌菌毛或者肠道黏膜受体作用,抑制病原菌对肠道黏膜的粘附,保护组织细胞免受感染。(3) IgY 可以中和细菌毒素,减轻毒素对机体造成的损伤(Wang et al. 2011)。

1.2.5.1 卵黄抗体在细菌性腹泻病防控中的应用

Malekshahi 等人通过对抗幽门螺旋杆菌 IgY 的治疗作用研究,表明口服抗幽门螺旋杆菌脲酶卵黄抗体后,在小鼠胃内抑制幽门螺旋杆菌的生长,减轻了胃部炎症,同时减少了组织中嗜中性粒细胞和淋巴细胞的聚集浸润,治疗动物体内的幽门螺旋杆菌的抗体水平显著降低(Malekshahi et al. 2011)。通过口服抗艰难梭菌 IgY 不仅可以延缓感染前治疗小鼠的腹泻,而且可以减少其在感染鼠复发腹泻。IgY 可用于预防艰难梭菌的感染,以及用于中和感染肠道组织中残留孢子的免疫疗法,减少腹泻的复发(Pizarro-Guajardo et al. 2017)。Li 等人评估了口服抗鼠伤寒沙门菌 IgY,对沙门菌感染小鼠的肠道黏膜免疫反应的影响,结果发现 IgY 显著降低了炎性细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 的表达,提高了抗炎性因子 IL-10 的表达,口服抗鼠伤寒沙门菌 IgY 的治疗组小鼠存活率达 80%,攻毒组小鼠存活率为 40%,说明 IgY 可以有效保护肠道免受沙门菌感染(Li et al. 2016)。产肠毒素大肠埃希菌是引起仔猪细菌性腹泻的主要诱因,抗大

肠埃希菌 K88 卵黄抗体在体外可以显著抑制细菌的生长, IgY 可以显著降低大肠埃希菌对空肠和回肠黏膜的粘附能力。仔猪治疗试验结果表明, 抗大肠埃希菌 IgY 可以有效保护仔猪免受大肠埃希菌引发的腹泻, 而用非特异性 IgY 治疗的仔猪在攻毒后 12h 出现了严重腹泻(Wang et al. 2019)。

1.2.5.2 卵黄抗体在病毒性腹泻病防控中的应用

Vega 等人对感染轮状病毒的新生犊牛, 口服抗牛 A 型轮状病毒 IgY 蛋黄粉, 结果发现口服 IgY 治疗组中, 犊牛腹泻的病程缩短, 腹泻症状减轻, 而在未接受 IgY 治疗的对照组中, 犊牛表现厌食、腹泻和脱水等症状, 说明口服抗牛 A 型轮状病毒 IgY 可以防治新生小牛因轮状病毒感染引起的腹泻(Vega et al. 2015)。Lee 等人针对抗猪流行性腹泻病毒的 S1 蛋白制备了卵黄抗体, 对 4~5 日龄新生仔猪口服 PEDV 流行毒株感染后, 用抗 PEDV S1 蛋白卵黄抗体口服治疗, IgY 治疗组仔猪在攻毒后 1~2 天均表现出轻度至中度腹泻, 治疗的第 4~5 天, 腹泻好转开始痊愈, 肠道轻微损伤; 攻毒对照组仔猪出现持续中度至重度腹泻脱水, 肠绒毛遭受严重萎缩和破坏(Lee et al. 2015)。Kweon 探究了抗 PEDV 卵黄抗体对感染仔猪的治疗效果, 结果发现 IgY 可以显著降低仔猪的死亡率, 临床治疗试验发现, 与对照组相比口服 IgY 的仔猪成活率明显提高, 说明口服抗 PEDV IgY 也是一种有效的治疗方法(Kweon et al. 2000)。来源于免疫鸡中的特异性免疫球蛋白 IgY, 其获取方便、适合大规模生产, 对动物安全有效。卵黄抗体 IgY 在禽类传染病如新城疫病毒、传染性法氏囊病以及流感的防控方面应用广泛, Aizenshtein 等人在 1 日龄的肉鸡中注射抗传染性法氏囊病病毒的卵黄抗体后, 发现在对该病原敏感的整个饲养期(3 天), 所有肉鸡均都获得了有效保护 (Aizenshtein et al. 2016)。近年来, 卵黄抗体在防控 PED 方面取得快速发展, 给新生未哺乳仔猪接种 PEDV 攻毒后, 口服抗 PEDV 卵黄抗体 IgY, 治疗组中 10 头仔猪死亡 7 头, 保护率为 30%, 而 IgY 预防组中 10 头仅死亡 1 头, 保护率达 90%, 而未进行治疗对照组中仔猪全部发病死亡, 说明 IgY 在 PED 的防治中有良好作用(贺娟娟 2018)。程志燕等对攻毒后的初生仔猪饲喂抗 PEDV 卵黄抗体, 对照组 6 头仔猪在攻毒后 2~3 d 内因腹泻重度脱水全部死亡, IgY 治疗组仔猪粪便从刚开始的黄色水样, 逐渐变为粘稠状, 最终试验组 6 头仔猪仅死亡 1 头, 证明口服抗 PEDV IgY 防控 PED 的有效性(程志燕 2017)。翟长友等在仔猪的人工感染试验中, 发现抗 PEDV 卵黄抗体试验组的治愈率为 75% (9/12), 而对照组仔猪无一幸免感染发病而死(翟长友 2018)。

1.3 研究的目的意义

近年来, PED 疫情严重威胁养猪业的健康发展, 猪腹泻减毒三联苗和猪腹泻二联苗的广泛应用, 在一定程度上减少了该病对仔猪的危害。但由于 PEDV 毒株不断变异, 与疫苗株存在一定差异, 导致疫苗接种防控失败。传统疫苗(灭活和减毒苗)都是通

过注射途径接种，不能有效诱导母猪产生良好的黏膜免疫应答，初乳中 sIgA 抗体的分泌不足，无法给初生仔猪提供有效被动免疫保护。疫苗接种作为防控 PED 的有效措施，然而现有疫苗的保护效力不足，基于 PEDV 流行毒株疫苗的开发迫在眉睫。卵黄抗体是禽类蛋黄中的一种免疫球蛋白，与哺乳动物的 IgG 功能相似。IgY 具有成本低、制备方便、安全性高等优势，在动物疫病的防控中应用较为广泛。

本研究通过分离 PEDV 流行毒株，制备弗氏佐剂灭活疫苗后免疫接种产蛋鹌鹑，从高免蛋中获得高水平的抗 PEDV 卵黄抗体，进一步对制备的 IgY 在体外中和病毒的效果，以及 IgY 的理化特性进行研究，为进一步临床应用做好准备。

试验研究

第二章 猪流行性腹泻病毒流行株的分离鉴定

猪流行性腹泻（PED）是由猪流行性腹泻病毒（PEDV）引起的肠道疾病，从 2010 年底开始，PED 在全国范围内养猪场流行，PEDV 感染 1 周龄内仔猪死亡率高达 80%~100%，严重损害养猪业的经济效益(宫晓华 2020)。目前，对 PED 的防控主要还是靠疫苗免疫，对 2011 年分离的 PEDV 变异株和 CV777 经典疫苗株的免疫效果比较发现，试验妊娠母猪群免疫接种 CV777 经典株的猪群中，血清中和抗体阳性率仅为 54%，而免疫 PEDV 变异株的猪群中血清中和抗体阳性率为 90%，所产仔猪存活率较高。进一步研究发现，试验猪场中分离得到的 PEDV 毒株与免疫的 PEDV 变异株同源性高达 99%，而与 CV777 经典株同源性仅 87%，说明商品疫苗株与流行毒株的差异较大，可能是导致猪场暴发 PED 的一个原因(朱记平和冯小婷 2017)。越来越多的研究证明，PEDV 新变异株的出现，可能是导致免疫失败的主要原因(Sun et al. 2016)。

目前，PEDV 毒株的不断变异造成 PED 的防控任务更加艰巨，为了解临床中 PEDV 毒株的流行和变异情况。本试验从河南某发生 PED 的规模化猪场中采集腹泻仔猪的小肠组织，通过 Vero 细胞分离传代培养进行 PEDV 流行毒株的分离鉴定，为 PED 防控研究提供基础材料。

2.1 材料

2.1.1 样品及细胞株的来源

病料：河南某规模化养猪场的腹泻仔猪小肠组织 3 份；Vero 细胞由西北农林科技大学兽医公共卫生实验室保存。

2.1.2 主要试剂及器材

研究所用主要试剂及仪器设备见表 2-1。

表 2-1 主要试剂及仪器

Table 2-1 Main reagents and instrument

名称 (Name)	公司 (Company)
RNA 提取试剂 RNAiso Plus	宝生物工程 (大连) 公司
5×qRT Super Mix 逆转录酶	南京诺唯赞生物公司
2×Taq Master Mix	北京康为世纪生物科技有限公司
DNA Marker	宝生物工程 (大连) 公司
DMEM 培养基	HyClone 公司
胎牛血清、胰酶	Gibco 公司
琼脂糖 Agarose	德国 BioFroxx 公司
FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体	天津三箭生物公司
微量移液器	Eppendorf 公司
电子天平	美国 Millipore 公司
梯度 PCR 仪、核酸电泳仪	Bio-Rad 公司
紫外凝胶成像仪	Bio-Rad 公司
高速冷冻台式离心机	Eppendorf 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific

2.2 方法

2.2.1 病料的处理

将腹泻仔猪的小肠段组织 (含内容物) 剪碎放入研钵内, 加液氮研磨, 吸取研磨好的组织匀浆液 2 mL, 加入 10 mL 的无菌 PBS 液稀释混匀。然后将组织液反复冻融 3 次, 取 6 个 2 mL EP 管, 每管加入适量冻融后的组织研磨液, 以 4℃ 10000 r/min 离心 20 min 后, 吸取上清液过滤除菌。收集滤液置于 -80℃ 保存。

2.2.2 引物的设计与合成

登录 NCBI 网站, 获取 PEDV 标准株 CV777 (登录号: AF353511.1) 的 N 基因序列, 用 Primer 5.0 软件进行引物设计, 用作 PEDV 的检测。引物由西安擎科生物公司合成, 使用浓度为 10 μmol/L。具体信息见表 2-2。

表 2-2 N 基因引物序列

Table 2-2 Primer sequence of N gene

引物名称 (Primer name)	序列 (Sequence, 5'-3')	产物 (Product)
PEDV-N-F	GCAAACGGGTGCCATTAT	647 bp
PEDV-N-R	GACAGCAGCCACCAGATC	

2.2.3 组织病料中 PEDV 的检测

2.2.3.1 病毒 RNA 的提取及反转录

用 Trizol 法提取病毒 RNA, 提取过程中所有离心操作均在 4℃ 下进行。取研磨好的病猪小肠组织匀浆液 100 μL 于离心管中, 加入 1 mL Trizol 裂解液, 室温静置 10 min; 加入 200 μL 氯仿, 充分涡旋混匀后静置 4 min, 12000 r/min 离心 15 min, 吸取透明上清液与等量异丙醇混合, 颠倒混匀静置 8 min 后 12000 r/min 离心 10 min; 弃掉离心管内液体, 加入适量无水乙醇洗涤沉淀, 8500 r/min 离心 6 min, 重复洗涤 1 次, 弃掉上清后将离心管倒置晾干后, 用适量无 RNA 酶双蒸灭菌水溶解 RNA 沉淀。测定 RNA 浓度后按照反转录试剂盒操作说明合成 cDNA, 反转录体系如表 2-3 所示。反应条件为: 50℃ 15 min, 85℃ 2 min, 合成的 cDNA 在 -20℃ 下保存。

表 2-3 反转录体系

Table 2-3 System of reverse transcription

组分 (Components)	体积 (Volume)
5×qRT SuperMix	2 μL
RNase free water	7 μL
Total RNA	1 μL (1 μg)

2.2.3.2 目的片段的 PCR 扩增

以合成的 cDNA 为模板, 用 PEDV N 基因特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系见表 2-4, 反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 98℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共循环 32 次; 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

表 2-4 PCR 反应体系

Table 2-4 System of PCR reaction

组分 (Components)	体积 (Volume)
2×Taq Master Mix	10 μL
Forward primer	1 μL
Reverse primer	1 μL
ddH ₂ O	6 μL
cDNA	2 μL

2.2.4 PEDV 的分离

2.2.4.1 Vero 细胞的复苏

将 Vero 细胞从液氮罐中取出, 放入 37℃ 水中快速解冻, 以 800 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入适量 10% FBS 的 DMEM 培养液, 吹打重悬 Vero 细胞, 然后吸取细胞悬液到 T25 培养瓶中, 补加培养液放入 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中, 次日换液。

2.2.4.2 病料接种与病毒分离

T25 培养瓶生长良好的 Vero 细胞,用无菌 PBS 洗涤 3 次,弃去 PBS 液后加 0.25% 胰酶处理细胞 1 min,弃掉胰酶,加入适量 DMEM 培养液,轻吹打重悬细胞。将细胞移至 6 孔细胞培养板中,加含 10% FBS 的 DMEM 培养液,待细胞 70%~80%铺满时,弃去细胞培养基。将处理好的 PEDV 阳性肠组织处理上清液,于每细胞孔滴加 500 μ L,补加 1.5 mL 的含 2% FBS 的 DMEM 维持培养基(胰酶浓度为 10 μ g/mL),将 6 孔细胞板放入培养箱培养 48~72 h 后收样,连续盲传 3 代。用 RT-PCR 检测细胞上清中的 PEDV 核酸,检测为阳性则继续传代培养,直至 PEDV 可以在 Vero 细胞中稳定增殖,细胞出现明显的细胞病变(CPE),说明 PEDV 分离成功。

2.2.4.3 细胞上清中病毒的检测

将收集的第 P3、P6、P9、P12 代细胞上清液,Trizol 法提取细胞上清液中的总 RNA,合成 cDNA,PCR 反应扩增 PEDV 的 N 基因片段,检测不同代次病毒液中 PEDV 的分离情况。

2.2.4.4 间接免疫荧光试验(IFA)检测 PEDV

将 Vero 细胞铺至 48 孔板中,待细胞长满 80%后接种 PEDV 病毒液,每日观察细胞病变,待出现典型 CPE 后,将接毒细胞用无菌 PBS 洗涤 3 遍,弃去洗涤液后用甲醇/丙酮(1:1)于-20℃固定细胞 25 min。用 PBS 液洗 3 遍后,加入穿透液(1% Triton),室温作用 15 min, PBS 液洗涤后加入 5%脱脂奶粉,37℃封闭 1 h。PBS 液清洗后,加入 1:1500 稀释的抗 PEDV N 蛋白单抗,室温作用 1 h, PBS 洗涤 3 遍,用羊抗鼠 IgG (二抗)室温孵育 1 h。加入二抗后所有操作步骤应避光进行, PBS 洗涤 3 次后用 DAPI 染核 8 min, PBS 洗涤 3 次后,将 48 孔板于倒置荧光显微镜下观察、拍照。

2.2.4.5 病毒 TCID₅₀ 的测定

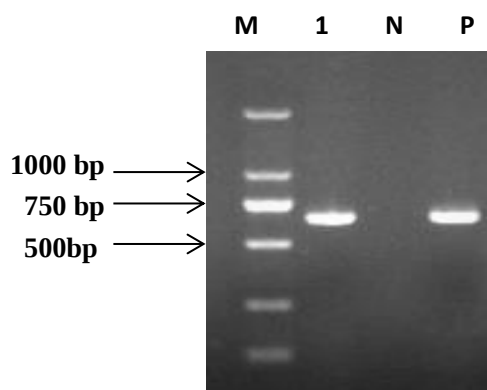
测定 PEDV P26 代的细胞半数感染量(TCID₅₀),将 T25 培养瓶状态良好的 Vero 细胞铺至 96 孔板中,待细胞长满 80%接种病毒液。操作如下:取 1.5 mL 离心管 10 个,每管加入 900 μ L DMEM 培养基,吸取 100 μ L 病毒液入离心管中,依次做 10 倍倍比稀释,共稀释 10 个梯度,每个稀释度接种 8 孔细胞,每孔加 100 μ L 病毒液,同时设立对照组。接毒后将 96 孔板放入培养箱孵育 1 h 后,弃掉病毒液,加入维持培养基继续培养 5~7 d,每天观察记录细胞病变孔数,根据 Reed-muench 法计算病毒的 TCID₅₀,具体算法如下:距离比例=(高于 50%病变率-50%)/(高于 50%病变率-低于 50%病变率); IgTCID₅₀=距离比例 $\times$ 稀释度对数之间的差+高于 50%病变率稀释度对数。

2.3 结果

2.3.1 病料中 PEDV 的检测和分离鉴定

2.3.1.1 组织病料中 PEDV 核酸的检测

RT-PCR 方法检测组织样品中 PEDV，PCR 扩增产物电泳结果显示，产物条带大约是 647 bp（见图 2-1），与阳性对照条带大小相一致，说明组织病料为 PEDV 阳性。



M. DNA 标准 DL 2000; 1.腹泻样品; N. 阴性对照; P. PEDV 阳性对照

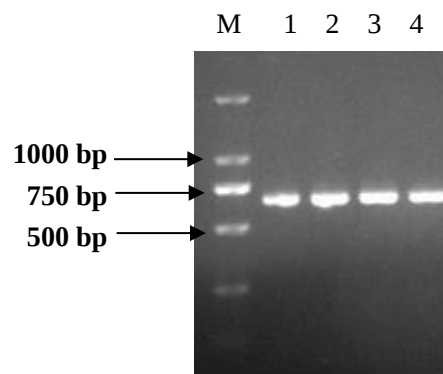
M. DNA marker DL 2000; 1. Sample; N. Negative control; P. Positive control

图 2-1 病料中 PEDV N 基因的 PCR 扩增检测

Fig.2-1 Detection of PEDV N gene by PCR in clinical samples

2.3.1.2 细胞培养上清中病毒的检测

提取 P3、P6、P9、P12 代的病毒细胞培养液的总 RNA，合成 cDNA，RT-PCR 检测 PEDV N 基因。PCR 产物电泳结果（图 2-2）显示，在 647 bp 处均出现了目的条带，和预期结果一致，提示 PEDV 在 Vero 细胞得到分离。



M. DNA 标准 DL 2000; 1-4. P3、P6、P9、P12 代细胞上清中 PEDV 的检测结果

M. DNA marker DL 2000; 1-4. Results of PCR for the virus of P3、P6、P9 and P12

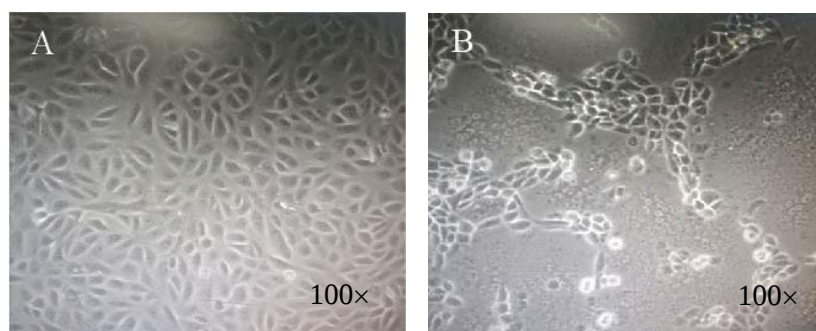
图 2-2 细胞上清中 PEDV N 基因的 PCR 扩增检测

Fig.2-2 Detection of PEDV N gene by PCR in cell supernatant

2.3.1.3 PEDV 感染 Vero 细胞

将 PEDV 阳性病料上清液接种 Vero 细胞后，第 11 代接毒细胞培养 60 h，细胞出

现皱缩变圆、细胞膜相互融合成合胞体、液泡化最终导致细胞脱落，与 PEDV 在培养细胞中的致细胞病变作用（CPE）一致（图 2-3）。



A. 正常 Vero 细胞

B. 接毒的 Vero 细胞

A. control Vero cells

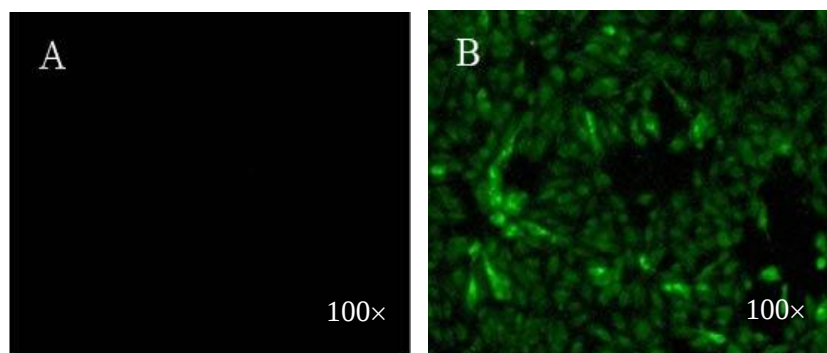
B. Virus infected Vero cells

图 2-3 分离毒株接种 Vero 细胞后的病变

Fig.2-3 Cytopathic of vero cell inoculated with PEDV isolate

2.3.1.4 接毒细胞的间接免疫荧光（IFA）结果

用 PEDV N 蛋白单克隆抗体建立 IFA 方法，检测 Vero 细胞中的 PEDV。结果显示，在接有 PEDV 阳性病料的细胞中，可见大量绿色的荧光，对照组细胞中则未见荧光信号，表明分离得到 PEDV，将其命名为 PEDV HN-LY-2018 毒株（图 2-4）。



A. Vero 细胞对照

B. 抗 PEDV N 蛋白抗体与接毒组 Vero 细胞作用

A. control Vero cells

B. The results of anti-PEDV N protein antibody on Vero cells

图 2-4 PEDV 分离毒株的间接免疫荧光检测

Fig.2-4 Detection of PEDV isolate by IFA

2.3.1.5 分离病毒 TCID₅₀ 的测定

PEDV 感染 Vero 细胞后，每天观察并记录 96 孔板中细胞病变孔数（表 2-5），连续观察 5-7 d，根据 Reed-muench 法计算病毒的 TCID₅₀，最终计算出病毒的 TCID₅₀ 为 $10^{-6.2}/0.1\text{mL}$ 。具体算法如下：

距离比例 = $(58.3 - 50) / (58.3 - 21.4) = 0.2$ ，所以 $\lg\text{TCID}_{50} = (-1) \times 0.2 + (-6) = -6.2$ ， $\text{TCID}_{50} = 10^{-6.2}/0.1\text{ mL}$

表 2-5 PEDV 分离株 TCID₅₀ 的测定
Table 2-5 Detection of TCID₅₀ of PEDV isolate

病毒稀释度 Dilution	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计 (Total)		病变孔数占比 (CPE %)
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
10 ⁻¹	8	0	46	0	100 (46/46)
10 ⁻²	8	0	38	0	100 (38/38)
10 ⁻³	8	0	30	0	100 (30/30)
10 ⁻⁴	8	0	22	0	100 (22/22)
10 ⁻⁵	7	1	14	1	93.3 (14/15)
10 ⁻⁶	4	4	7	5	58.3 (7/12)
10 ⁻⁷	2	6	3	11	21.4 (3/14)
10 ⁻⁸	1	7	1	18	5.3 (1/19)
10 ⁻⁹	0	8	0	26	0 (0/26)

2.4 讨论

猪流行性腹泻病毒(PEDV)作为引起新生仔猪病毒性腹泻的主要原因之一, 严重阻碍养猪业的健康发展, 对哺乳仔猪的成活率造成严重影响(毛治安 2020)。对 PEDV 流行毒株的分离是研究其遗传变异、流行病学、致病机制、疫苗研究等的基础, 但 PEDV 野毒株的体外分离培养较为困难, 需要在培养基中加入一些外源性蛋白酶, 如胰蛋白酶才能发挥 S 蛋白的融合功能, 如果没有外源性蛋白酶, 病毒则不能有效在细胞内生长和增殖(Kusanagi et al. 1992), 并且感染 PEDV 的细胞仅在用胰蛋白酶处理后才能使细胞产生合胞体样病变。在培养液中补加有胰酶的情况下, PEDV 的感染性增强, 可以从细胞中释放到培养液中; 研究发现, PEDV 感染 Vero 细胞培养 3 天后, 补加胰酶瞬时处理细胞, 发现大量病毒粒子从感染细胞中释放, 说明胰蛋白酶的存在, 对于 PEDV 的分离培养起着重要作用, 原因可能与 PEDV 在自然感染条件下主要感染小肠段组织, 可能与小肠组织中富含各种蛋白酶有关(Shirato et al. 2011; Wicht et al. 2014)。

本研究通过在接毒后的 Vero 细胞培养液中补加胰蛋白酶, 分离传代培养, 直至传代至第 11 代细胞 60 h 时, 才观察到有较明显的 CPE 细胞病变。之后继续传代培养, 在传代过程中, 发现病毒对细胞的适应性逐渐增强, 传代至第 21 代时, Vero 细胞接毒 24 h, 在显微镜下就可以观察到典型的细胞病变。在 PEDV 分离培养的过程中, 发现在病毒感染 Vero 细胞出现典型 CPE 病变之前, 感染组细胞和对照组细胞无明显差异, 随着连续传代培养, PEDV 对 Vero 细胞的适应性逐渐增强, 当传至第 11 代时, 病毒开始适应细胞, 感染 Vero 细胞导致邻近细胞的胞膜相互融合, 边界分界不清, 形成一个大的合胞体, 里面包有大量的细胞核, 即为典型的 CPE 病变。这与张莉萍分离的 HBXT/2018 毒株感染 Vero 细胞后, 出现的合胞体病变相似(张莉萍 2019)。在

分离 PEDV 的过程中, 胰酶的添加对于成功分离病毒十分关键, 起着举足轻重的作用, 胰酶负责切割 PEDV 的 S 蛋白, 促进其和细胞受体结合, 可以有效提高病毒分离的成功率。

将分离传代的 P3、P6、P9、P12 代细胞上清, 经 RT-PCR 方法成功扩增出 PEDV 的目的基因, 说明病毒能够在细胞中复制增殖, 并成功释放到细胞上清中。间接免疫荧光 (IFA) 试验结果中, 用 N 蛋白单克隆抗体追踪病毒粒子, 发现接毒组 Vero 细胞中有大量绿色荧光, 而对照组中没有荧光信号, 说明病毒粒子适应 Vero 细胞, 在细胞中稳定增殖生长, 进一步证明本研究成功分离到 1 株 PEDV 病毒, 并将其命名为 PEDV HN-LY 株, 测定病毒的半数感染量 $TCID_{50}$ 达 $10^{-6.2}/0.1\text{mL}$, 说明经过分离传代培养后, PEDV 能够很好的适应细胞, 可以在 Vero 上稳定增殖。

2.5 小结

- (1) 从经 RT-PCR 和 IFA 鉴定均为 PEDV 阳性腹泻病料中成功分离得到 1 株 PEDV。
- (2) PEDV 分离株在 Vero 细胞中的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-6.2}/0.1\text{ mL}$ 。

第三章 PEDV 分离株的遗传变异分析

S 蛋白是 PEDV 最重要的糖蛋白之一，包含多个抗原中和表位以诱导机体产生针对抗原的中和抗体。S 蛋白分为 S1 结构域(1-789 aa)和 S2 结构域(790-1383 aa)(Follis et al. 2006)。S1 结构域中包含多个病毒中和表位和受体结构域，而 S2 结构域不能诱导中和抗体产生(de Haan et al. 2006)。S 蛋白由 S 基因编码，分为 S1 和 S2 基因。S1 亚基被认为是决定 PEDV 毒力的重要基因，S1 亚基的 N 末端结构域缺失 197 个氨基酸后会显著减弱 PEDV 的致病力(Hou et al. 2017)。根据 S1 基因的突变情况，可将 PEDV 分为 2 种基因型，即 G-I 型（流行株）和 G-II 型（经典株），研究发现，G-I 型和 G-II 型毒株的 S1 基因存在较大差异(Su et al. 2016)。

本团队从腹泻仔猪病料中分离得到 1 个 PEDV 分离株，对其基因型、遗传变异分析，是了解本次仔猪腹泻疫情的基础，如果属于流行变异毒株，也能为疫苗研究提供基本材料。

3.1 材料

3.1.1 主要试剂及仪器设备

研究所用主要试剂及仪器设备见表 3-1。

表 3-1 主要试剂及仪器

Table 3-1 Main reagents and instrument

名称 (Name)	公司 (Company)
大肠埃希菌 DH5 α 感受态	天根生物科技（北京）有限公司
pMD19-T 载体	宝生物工程（大连）公司
Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒	OMEGA 生物公司
恒温摇床培养箱	上海福玛实验设备有限公司
制冰机	Scotsman 公司
数显恒温水箱	常州信科实验仪器公司
干式恒温器	上海枫岭生物技术有限公司
超净工作台	哈尔滨东胶电子有限公司

3.2 方法

3.2.1 PEDV 分离株 S1 基因全长克隆所用引物的设计

根据文献报道,设计合成克隆 S1 基因的引物序列(Su et al. 2016)。S1 基因全长分为 2 段进行扩增,分别设计合成 2 对引物,克隆片段大小分别是 1461bp 和 1117bp。引物使用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,具体信息见表 3-2,引物由西安擎科生物公司合成。

表 3-2 PEDV S1 基因克隆引物序列
Table 3-2 Primer sequence for PEDV S1 gene clone

引物名称 (Primer name)	序列 (Sequence, 5'-3')	产物大小 (Product)
S1M1-F	GGTAAGTTGCTAGTGCGTAA	1461 bp
S1M1-R	CAGGATCATCACAATAAAGAA	
S1M2-F	TTTCTGGACCATAGCATC	1117 bp
S1M2-R	AGCACAATCAACACTAAC	

3.2.2 PEDV 分离株 S1 基因克隆与序列分析

3.2.2.1 PEDV 分离株 S1 基因的克隆

按 2.2.3.1 中的方法提取 PEDV RNA、合成 cDNA。用设计合成的 2 对引物 S1M1 (F/R) 和 S1M2 (F/R),分别通过 PCR 方法克隆 S1 基因片段。PCR 体系见表 3-3。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 1 min,57℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 33 次循环,然后 72℃延伸 10 min。PCR 结束后,用 1×TAE 电泳缓冲液配制 10 g/L 的琼脂糖凝胶,对 PCR 产物进行凝胶电泳,在紫外灯下将目的基因的条带切下,通过胶回收获得目的基因片段。

表 3-3 PEDV S1 基因 PCR 克隆体系
Table 3-3 Components of PCR for PEDV S1 gene clone

组分 (Components)	体积 (Volume)
2×Taq Master Mix	25 μL
Forward primer	1 μL
Reverse primer	1 μL
ddH ₂ O	11 μL
cDNA	2 μL

3.2.2.2 S1 基因片段的连接、转化

将胶回收的 S1M1 和 S1M2 基因片段,分别与 pMD19-T 克隆载体进行连接,连接体系成分(10 μL)见表 3-4,16℃连接 5 h。然后,将连接产物转化感受态大肠埃

希菌 DH5 α 细胞, 经冰浴、热激和冷却等步骤后, 加入 500 μ L LB 培养液, 放置于 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡活化 1 h, 然后 1000 r/min 离心 5 min。吸取 300 μ L 上清培养液并弃掉, 用剩余培养液重悬感受态细胞, 然后均匀涂布至固体平板 (含氨苄青霉素)。将平板倒置放于 37 $^{\circ}$ C 培养 15~20 h。

表 3-4 目的基因与载体的连接体系

Table 3-4 Components for target gene and vector connection

成分 (Components)	体积 (Volume)
pMD19-T Vector	1 μ L
DNA	3 μ L
ddH ₂ O	1 μ L
Solution I	5 μ L

3.2.2.3 连接产物的鉴定和序列分析

胶回收纯化的目的片段连接转化后, 无菌挑取固体平板上的单克隆菌落, 然后接种到 1.5 mL LB 培养液 (含氨苄青霉素) 中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌培养 4~6 h。以培养的菌液作为 PCR 的模板, 用 PEDV 的检测引物进行 PCR 扩增, 然后将 PCR 鉴定为阳性的菌液, 无菌吸取 400 μ L 菌液送公司进行测序。用 SeqMan 软件功能拼接 S1 基因的全长序列, 得到 S1 基因全长序列在 NCBI 库中进行 BLAST 比对, 并下载 22 株国内外具有代表性的 PEDV 毒株序列, 与分离毒株的 S1 基因序列进行同源性分析, 参考株信息见表 3-5。对 PEDV 分离株的 S1 基因序列, 与上述 22 株 PEDV 参考毒株, 用 MEGA 软件分析构建遗传进化树, 进一步分析国内 PEDV 的流行和变异情况。

表 3-5 22 株 PEDV 参考毒株信息

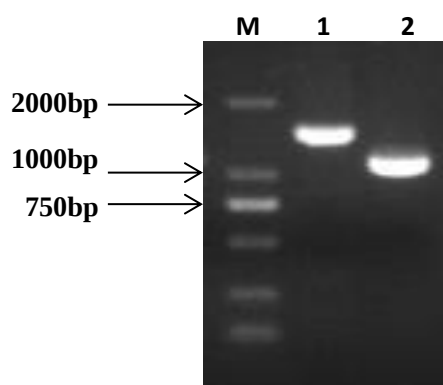
Table 3-5 Information of 22 PEDV reference isolates

毒株 Strains	登录号 Accession no.	毒株 Strains	登录号 Accession
CV777	AF353511.1	CH-GX-2015-750A	KY793536.1
CV777 attenuated	KT323979.1	CH-GDGZ-2012	KF384500.1
AH2012	KC210145.1	CH-hubei-2016	KY928065.1
DR13 attenuated	JQ023162.1	AJ1102	JX188454.1
SM98	GU937797.1	CH-SCNC-2-2015	KU975415.1
PC177	KR078300.1	AOM-1-JPN-2014	MF152603.1
CH-JX-1-2013	KF760557.2	OKY-1-JPN-2014	LC063847.1
HNLB-2017	MF152603.1	YC2014	KU252649.1
CH-HNZZ47-2016	KX981440.1	GD-1	JX647847.1
CH-HNAY-2015	KR809885.1	GD-B	JX088695.1
ZL29	KU847996.1	CH-HNYF-14	KP890336.1

3.3 结果

3.3.1 PEDV 分离株 S1 基因的克隆

通过 PCR 方法，克隆获得 PEDV 分离株 S1 基因的 2 个片段，大小与预期片段大小一致，约 1461bp 和 1117bp（图 3-1）。经菌液 PCR 鉴定，获得了插入 S1M1 和 S1M2 基因的重组质粒，将鉴定为阳性的菌液送生物公司进行测序。



M. DNA 标准 DL2000; 1. S1 基因 M1 片段克隆; 2. S1 基因 M2 片段克隆

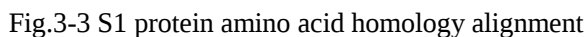
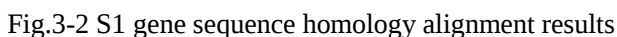
M. DNA marker DL2000; 1. S1 gene M1 fragment clone; 2. S1 gene M2 fragment clone

图 3-1 PEDV 分离株 S1 基因的克隆

Fig.3-1 S1 gene clone of PEDV isolate

3.3.2 PEDV S1 基因的序列分析

将阳性克隆送测序完成后，使用 SeqMan 软件对 S1 基因的 S1M1 和 S1M2 片段的测序结果进行拼接。序列信息显示，该分离毒株的 S1 基因全长为 2376 bp，共编码 792 个氨基酸。用分析软件 DNASTAR 中的 MegAlign 程序功能，对该分离株的 S1 基因与 GenBank 中已发布的 22 株参考毒株进行核苷酸、氨基酸同源性的比对，比对结果见图 3-2 和图 3-3。分离毒株的 S1 基因与 22 株国内外参考毒株的核苷酸相似性为 91.6%~99.2%，氨基酸相似性为 89.6%~98.9%，提示本次分离到的 PEDV 毒株为流行变异毒株。进一步的分析发现，该分离株和 CV7777 标准株（AF353511.1）核苷酸相似性为 92.5%，氨基酸相似性为 90.6%；与弱毒疫苗株 CV777（KT323979.1）相比较，具有 91.9%的核苷酸相似性以及 89.6%的氨基酸相似性；与韩国弱毒株 DR13(JQ0316.1)的 S1 基因核苷酸相似性为 92%，氨基酸相似性为 89.8%；与 2015 年四川分离株 CH-SCNC-2-2015（KU975415.1）、广东分离株 GD-B（JX088695.1）和安徽分离株 AH2012(KC210145.1)的核苷酸相似性均在 99.1%以上，氨基酸相似性在 98.4%以上。



22

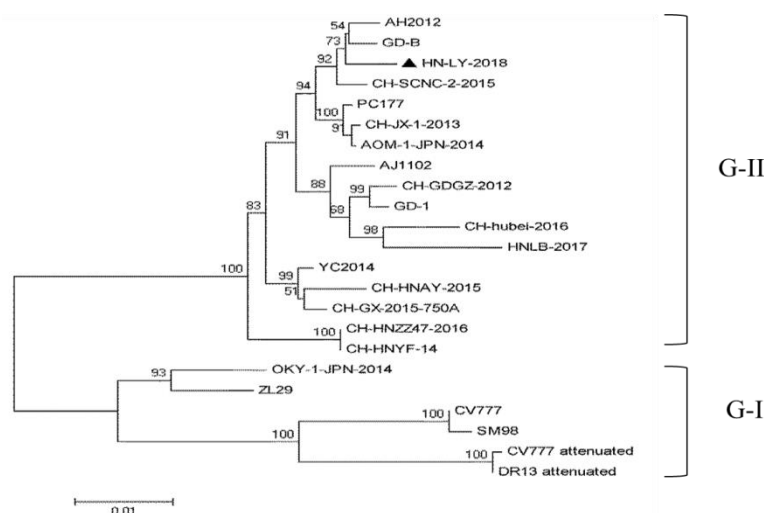


图 3-4 分离株 S1 基因的系统进化树

Fig.3-4 Phylogenetic tree of S1 gene

3.4 讨论

PEDV 的 S 蛋白在介导病毒进入细胞过程中起着重要作用，特别是 S1 亚基，主要充当受体结合结构域(Li 2016)。S 蛋白的 S1 受体结合亚基还可以诱导宿主产生中和抗体，是疫苗研发的主要关键靶标蛋白(Li et al. 2017; Sun et al. 2007)。近年来，S 基因已经被广泛的用于 PEDV 遗传进化和多样性分析(Chen et al. 2013; Zhang et al. 2017)。根据 S 基因的遗传变异分析，可将 PEDV 毒株分为 G-I 亚型和 G-II 亚型，G-I 亚型中的代表性毒株为 CV777 经典株，而 G-II 亚型中 PEDV 毒株多为变异株(Wang et al. 2016)。

由于 S1 基因片段较长，所以本研究将 PEDV 分离株的 S1 基因分为 2 个片段进行克隆，鉴定测序和遗传变异分析。结果发现该分离株的 S1 基因全长为 2376 bp，编码 792 个氨基酸，基于 S1 基因的系统发育分析显示，该分离株属于 G-II 亚型，与 2015 年四川分离株 CH-SCNC-2015、安徽分离株 AH01 和广东分离毒株 GD-B 属于同一分支，S1 基因的核苷酸和氨基酸同源性均在 98%以上，说明该分离株属于流行毒株。目前在 PEDV 疫苗接种方面，使用的 CV777 经典株、减毒疫苗株 ZJ08 以及 CV777 弱毒疫苗株都属于 G-I 亚型，可能对 G-II 亚型基因组中新出现的 PEDV 变异株不能提供足够保护(Li et al. 2020)。国内和国外的研究人员证实，现用的商品化疫苗(G-I 亚型)针对当前流行的毒株(G-II 亚型)无法提供足够保护(Lin et al. 2016; Opriessnig et al. 2017)。临床中 PEDV 流行毒株的变异可能是导致免疫失败的主要因素。

考虑到市面上疫苗(G-I 亚型)和临床流行株(G-II 亚型)之间的差异，本研究从河南省暴发 PED 疫情的某规模化养猪场中，成功分离得到一株 PEDV 流行毒株(G-II 亚型)，进一步针对该猪场中的 PEDV 流行株，制备抗 PEDV 卵黄抗体，为该猪场中 PED 的

防控提供基础产品。分离得到的 PEDV 流行毒株可为今后疫苗的研发提供基础材料。

3.5 小结

(1) 克隆获得 PEDV 分离株的 S1 基因，其核苷酸和氨基酸序列与经典毒株 CV777 同源性较低，与流行株 CH-SCNC-2015、AH01 和 GD-B 等同源性较高。

(2) 基于 S1 基因的遗传发育进化分析发现，该 PEDV 分离株为 G-II 亚型。

第四章 抗 PEDV 流行毒株鹌鹑源卵黄抗体的研制

不同年龄段的猪对 PEDV 均易感,但对仔猪的危害最大,病死率也最高,严重危害仔猪的生长存活(梅小强 2019)。对 PED 的防控没有特效药或治疗方法,生产中主要还是通过接种疫苗防控本病,但由于 PEDV 流行变异毒株的不断出现,并与疫苗毒株在基因和蛋白水平差异较大,不能对免疫猪特别是通过母乳获得保护性抗体的哺乳仔猪得到有效保护;另外,生产中所用疫苗一般经肌肉注射,刺激机体的黏膜免疫反应有限,母猪初乳中的 sIgA 分泌不足,给仔猪提供有效被动免疫保护较弱,不能阻止 PED 的发生。IgY 是蛋黄中唯一的免疫球蛋白,能够与对应抗原特异性结合,安全性较高。多项研究证实,研制的抗 PEDV 卵黄抗体经口服饲喂初生仔猪,均有较好的临床防治 PED 的作用。李桂珍等人通过表达纯化 PEDV 的 S1 蛋白,将重组蛋白免疫蛋鸡后制备抗 S1 蛋白卵黄抗体,给初生仔猪口服卵黄抗体治疗 PED,结果发现口服 IgY 液的试验组猪的治愈率达 78% (54/69),而口服 IgY 粉试验组仔猪治愈率为 74% (56/75) (李桂珍等 2018)。

目前,抗 PEDV 卵黄抗体在临床中成功应用的案例越来越多,需要大力推广应用。但由于不同养殖场中 PEDV 毒株在毒力基因上存在一定差异,在制备特异性 IgY 时应针对当地的流行性毒株,这样获取的卵黄抗体的专一性和针对性才会更强,在临床治疗中发挥更好的作用。所以,本研究针对河南省某规模化养猪场中的 PEDV 流行毒株,获得鹌鹑源抗 PEDV 卵黄抗体,为该猪场中 PED 的预防和治疗提供基础产品,同时为日后鹌鹑源卵黄抗体的制备提供理依据。

4.1 材料

4.1.1 动物

130 只 65 日龄产蛋鹌鹑,来源于河南省焦作修武胜鑫畜禽养殖场。鹌鹑的饮水为自动化装置,每天早上定时将料槽内饲料添满,一天喂一次,饲料来源于河南焦作玖邦饲料有限公司。

4.1.2 主要试剂及仪器

试验所用主要试剂和仪器设备见表 4-1。

表 4-1 试剂和仪器设备
Table 4-1 Reagents and instrument

名称 (Name)	生产商 (Company)
完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂	北京博奥龙免疫技术有限公司
辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY(H+L)二抗	武汉三鹰生物公司
TMB 显色液	北京天根生物公司
脱脂奶粉	Sigma 公司
PEG-6000	广州金华大化学试剂有限公司
硫酸铵、吐温-20	天津致远化学试剂有限公司
正辛酸	天津科密欧化学试剂有限公司
考马斯亮蓝染色液	北京索莱宝科技公司
β -丙内酯	上海麦克林生化科技有限公司
Protein Marker(10-180kDa)	GenStar 公司
Glycine、Tris	德国 BioFroxx 公司
EDTA Na ₂	北京索莱宝科技公司
6×Protein loading Buffer	北京全式金生物科技有限公司
BCA 蛋白检测试剂盒	西安晶彩生物公司
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
高速离心机	日本 HITACHI 公司
酶标仪	Thermo Fisher Scientific
恒温培养箱	和呈仪器制造有限公司 (上海)
96 孔板	无锡耐思生物科技有限公司
酸度计	德国 Sartorius 生物公司

4.2 方法

4.2.1 PEDV 分离株灭活疫苗的制备及检验

4.2.1.1 PEDV 分离株灭活疫苗的制备

将 PEDV 分离株感染后出现显著 CPE 的 Vero 细胞反复冻融 3 次后, 4℃ 12000 r/min 离心 30 min, 取上清部分经 0.22 μ m 孔径滤器过滤除菌后, 放入容器中。加入终浓度为 0.1% 的 β -丙内酯, 4℃ 作用 24 h 后以使 PEDV 灭活, 放置于 37℃ 水浴锅中 2 h 使得 β -丙内酯水解完全, 病毒灭活参考文献中的研究方法(姜立民等 2014), 将灭活的 PEDV 抗原分别和弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等体积混合, 然后用乳化器分别将 PEDV 弗氏完全佐剂和 PEDV 弗氏不完全佐剂充分乳化, 乳化完全后置于 4℃ 冰箱保存。

4.2.1.2 灭活疫苗的检验

(1) 无菌检验

将灭活的 PEDV 抗原, 无菌操作吸取 0.1 mL 分别接种入 5 mL 的 TSB 培养基和 LB 液体培养基, 放于 37℃ 培养 24 h 后, 观察培养液是否有浑浊现象, 有无细菌生长。

(2) 物理性状检验疫苗

黏度测定: 在室温下用移液器吸取 0.4 mL 疫苗, 计录垂直放完所需要的时间, 2~6 s 视为合格, 不能超过 10~15 s。

稳定性测定: 注射器吸取 10 mL 疫苗于离心管中, 3000 r/min 离心 10~15 min 不分层, 相当于可保存 1 年以上不破乳。疫苗的物理性状检验参考《兽医生物制品制备技术》(王宪文 2007)。

(3) 安全性检验

参考文献中的方法对制备的灭活疫苗进行安全性检验(刘政龙 2016)。选取 7~8 周龄昆明小白鼠 10 只, 分为试验组和对照组, 每组各 5 只, 试验组小鼠每只皮下接种弗氏佐剂灭活疫苗 200 μ L, 对照组注射无菌生理盐水, 每天记录观察试验组小鼠其饮水、采食和活动状况有无异常临床表现。

4.2.2 制备的灭活疫苗免疫接种产蛋鹌鹑

将 130 只 65 日龄产蛋鹌鹑分为两组(试验组和对照组), 试验组共有 90 只鹌鹑分 2 笼饲养, 每笼 45 只; 其余 40 只鹌鹑作为对照组。将制备的 PEDV 流行变异株灭活疫苗分 3 次免疫试验组鹌鹑, 每次免疫间隔 14 d, 试验组鹌鹑首免注射弗氏完全佐剂疫苗, 第二、三次免疫弗氏不完全佐剂疫苗, 对照组鹌鹑注射无菌生理盐水。采取胸肌多点注射的方式, 每只鹌鹑每次接种 0.3 mL 免疫抗原。免疫后每隔 7 天收集试验组和对照组的鹌鹑蛋, 并且试验组从三免后开始每天收集鹌鹑蛋, 标记好放于 4℃ 保存。免疫后每隔 7 天采集试验组和对照组鹌鹑血液, 随机抽取各组饲养笼中 10 只鹌鹑, 用 1 mL 注射器心脏采血 0.8~1.0 mL 血液, 室温静置析出血清后于 -20℃ 保存, 用于后续血清抗体效价的测定。

4.2.3 卵黄抗体提取方法比较

分别用水稀释法、改良硫酸铵法和 PEG-6000 3 种方法对收集的鹌鹑蛋中的卵黄抗体进行提取, 评估并筛选出最佳提取方法。

4.2.3.1 卵黄抗体不同提取方法具体操作过程

(1) 水稀释法: 将收集的鹌鹑蛋放入稀释后的新洁尔灭消毒水中, 浸泡 10~15 min。再用酒精棉球将鹌鹑蛋的表面反复擦拭消毒后, 打碎鹌鹑蛋分离蛋黄, 用超纯水多次缓慢清洗蛋黄表面, 彻底清洗掉蛋黄表面的蛋清液。用注射器吸取 20 mL 卵黄液, 然后加入 160 mL 的超纯水, 玻璃棒搅拌混匀后, 调节溶液 pH5.2, 于 4℃ 条件下过夜静

置，直到溶液分层，将上清液在 4℃ 条件下 11000 r/min 离心 15~20 min，即获得粗提的卵黄抗体液。

(2) 硫酸铵法：根据 Yang 等人的硫酸铵提取卵黄抗体方法(Yang et al. 2020)，进行卵黄抗体的提取。将 8 倍超纯水稀释的蛋黄液 4℃ 过夜静置后，取分层后的上清液，在 4℃ 下 11000 r/min 离心 20 min，分离上清液，然后加入终浓度为 1% 的辛酸，室温下作用 30 min，尽量除去多余的脂蛋白。4℃ 下 11000 r/min 离心 10 min，取上清液如容器中，给其中加入等体积的 PBS 缓冲溶液，并调节溶液的 pH 为 7.0，加入终浓度为 50% 的饱和硫酸铵溶液。加硫酸铵溶液的过程一定要缓慢，防止盐浓度太高导致蛋白变性。室温静置 2~3 h 后，4℃ 条件下 11000 r/min 离心 25 min，弃掉上清液，将管底的沉淀用适量 PBS 溶液溶解，继续加入饱和硫酸铵溶液，使终浓度至 33%，室温静置 2 h，11000 r/min 离心 20 min，弃上清后，用与卵黄液等量的 PBS 将沉淀溶解。将提取的 IgY 液装入透析袋中，置于装有 PBS 液的烧杯中，放于磁力搅拌器上过夜透析，最后将透析完成的 IgY 液放于 4℃ 保存。

(3) PEG-6000 法：参考文献中的聚乙二醇沉淀法进行卵黄抗体的提取(Amro et al. 2018)。鹌鹑蛋经消毒水浸泡和酒精棉球擦拭消毒后，分离蛋黄，用超纯水多次缓慢清洗卵黄表面，直至蛋清液被清洗掉，然后加入 2 倍蛋黄液体积的 PBS 溶液，用玻璃棒搅拌均匀，加入 PEG-6000 粉末，至终浓度为 3.5%，室温下静置 45 min 后，于 4℃ 下 11000 r/min 离心 20 min，将上清液转入另一个离心管中，添加相当于新体积 8.5% 的 PEG-6000 粉末，室温作用 30 min，4℃ 下 11000 r/min 离心 25 min，将上清液弃掉，沉淀用 10 mL 的 PBS 液溶解，加入终浓度为 12% 的 PEG-6000 粉末。静置离心弃上清后，用与卵黄液等体积的 PBS 液溶解沉淀，将提取的 IgY 溶液装入透析袋中，放到装有 PBS 液的烧杯中，于磁力搅拌器上过夜透析，将透析完成的 IgY 液于 4℃ 保存。

4.2.3.2 卵黄抗体的检验

(1) 卵黄抗体蛋白浓度的测定

对不同方法提取的卵黄抗体测定蛋白浓度，按照西安中晖赫彩生物公司的试剂盒说明书操作。将 BSA（标准品）按说明书稀释为 0.5 mg/mL，取 7 个离心管，将稀释好的蛋白标准品，用 PBS 液稀释为 7 个梯度，使其终浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 (mg/mL)，每个稀释度蛋白样品总体积为 20 μ L。待检测样品（卵黄抗体）用 PBS 作 10 倍稀释，稀释后的总体积为 40 μ L。将稀释好的标准品、样品加到 96 孔板中，20 μ L/孔，每个样品作 2 个重复，加入 BCA 工作液，200 μ L/孔，将稀释板于 37℃ 作用 30 min，测定 OD₅₆₂ 值。根据测定结果绘制标准曲线，计算样品的蛋白浓度。

(2) 卵黄抗体纯度检测

对不同方法提取的卵黄抗体进行 SDS-PAGE 电泳，根据条带情况分析抗体纯度。IgY 的分子量为 180 kDa，重链为 60~70 kDa，轻链为 20~30 kDa。按照以下方法和步

骤开展检测：

①样品处理：取适量提取的卵黄抗体，加入样品 1/6 体积的 6×蛋白上样缓冲液，涡旋混匀之后，100℃水煮 8~10 min，取出后移入 4℃冷却 5~8 min，上样电泳。

②分离胶和浓度胶的配制：取 50 mL 烧杯，将 10%分离胶需要的所有组分加入到烧杯内，并用移液器吹打混匀，然后缓慢装入到之前装配好的胶槽内，加完分离胶后，补加异丙醇（消除分离胶液面的气泡），室温下放置 40~50 min。分离胶凝固后，用滤纸吸干胶槽内异丙醇，然后加入配制好的 5%浓缩胶，插入梳子，静置 30 min 待浓缩胶凝固。10%分离胶和 5%浓缩胶具体的配制方法见表 4-2。

表 4-2 分离胶和浓缩胶配制

Table 4-2 Preparation of separating gel and concentrated gel

组分 (components)	10%分离胶 (10 mL)	5%浓缩胶 (4 mL)
去离子水	4 mL	2.7 mL
30% Acr-Bis	3.3 mL	0.67 mL
1.5M Tris-HCl, pH8.8	2.5 mL	0
1M Tris-HCl, pH6.8	0	0.5 mL
10%SDS	0.1 mL	0.04 mL
10%过硫酸铵	0.1 mL	0.04 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL

③上样电泳：将配制好的蛋白胶放入 1×SDS-PAGE 电泳液中，轻轻拔掉梳子。取出处理好的蛋白样品和待测样品 15 μL 加入上样孔内，取 4 μL 蛋白 Marker 标准作为参照，浓缩胶为 70 V 电泳 35 min，分离胶 110 V 电泳 85 min，待溴酚蓝跑到胶底，结束反应。

④考马斯亮蓝染色：电泳结束后，将蛋白胶从电泳装置中取出后，用超纯水缓慢冲洗 3 次，然后将胶块浸泡于装有考马斯染色液中，放置于摇床上染色 2~3 h。

⑤脱色：染色完成后，将蛋白胶置于配制好的脱色液中，室温下摇床脱色，隔 30 min 换一次脱色液，直至出现清晰的条带结束洗脱。然后，将胶块置于 Bio-Rad 成像仪下拍照并保存结果。

4.2.4 抗 PEDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

4.2.4.1 抗原的最佳包被和一抗的稀释

(1)包被抗原：将用 Vero 细胞增殖的 PEDV 细胞上清液，反复冻融 3 次，4℃ 12000 r/min 离心 15 min，去除细胞碎片后，加入 β-丙内酯灭活病毒。灭活后将病毒液在 100000×g 超速离心 4 h，然后轻轻将离心管内上清倒掉，用适量 PBS 液重悬管底沉淀，即得到浓缩的 PEDV。将灭活浓缩的 PEDV 作为 ELISA 板的包被抗原，用之前配好

的包被液（碳酸盐缓冲液）将浓缩毒依次作 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 稀释，每个稀释度包被 8 孔，100 μL /孔，4℃过夜。

（2）封闭：将过夜包被的 96 孔板取出，弃掉孔内液体，用 PBST 洗液加满包被孔，洗脱 3 遍后，将 ELISA 板内液体拍干。将配制好的 5% 的脱脂奶粉，每孔加 300 μL ，37℃封闭 1 h。

（3）一抗孵育：将封闭好的 ELISA 板，PBST 液洗板 3 次并拍干，将提取纯化后的卵黄抗体（一抗）从 4℃冰箱取出，用 PBST 洗液按照 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 的稀释比例，加入到包被好的 ELISA 板中，每孔加 100 μL 稀释的卵黄抗体，37℃孵育 1 h。

（4）酶标二抗的孵育：弃掉 ELISA 板中一抗，PBST 洗板 3 次，拍干孔内液体。用 PBST 将 HRP 标记的兔抗鸡酶标抗体（二抗）作 1:5000 稀释。每孔加入 100 μL 稀释的二抗，37℃孵育 1 h。

（5）显色：将 ELISA 板从取出，PBST 洗液洗板 3 遍，拍干后每孔加入 100 μL 显色液，置 37℃显色 20~30 min。

（6）终止显色：显色完成后，每孔加 100 μL 的 H_2SO_4 终止液，用酶标仪选取波长 450nm 测定 OD 值。

判定条件：阳性孔的 OD_{450} 值接近 1.0，阴性孔 OD_{450} 值小于 0.2，且阳性孔/阴性孔(P/N)的值最大时，所对应酶标孔的抗原包被浓度以及抗体的稀释比例，作为 ELISA 的最佳包板条件和抗体最佳工作浓度。

4.2.4.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定

首先确定包板抗原浓度以及卵黄抗体的最佳稀释比例，然后确定酶标二抗的最佳工作浓度。将酶标二抗做 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000 稀释，每个稀释度作 3 个重复，按照 4.2.4.1 方法进行 ELISA 试验，计算阳性孔/阴性孔(P/N)的值，选出(P/N)值最大，所对应的酶标抗体的稀释度作为最佳工作浓度。

4.2.4.3 封闭条件的确定

酶标板按最佳抗原浓度过夜包被后，弃掉孔内液体，PBS 液洗 3 遍，然后分别用 5%脱脂奶粉、1% BSA 和 2% BSA 液 37℃封闭 1 h，按最佳比例稀释好的阴性和阳性卵黄抗体加入酶标孔，在每种封闭条件下，阴阳性卵黄抗体各作 3 个重复，按照 4.2.4.1 方法进行 ELISA 试验，选择(P/N)值最大时所对应的封闭液为最佳封闭条件。

4.2.4.4 ELISA 方法阴阳临界值的确定

取 40 份提纯后的阴性卵黄抗体样品，用建立的间接 ELISA 方法测定其 OD_{450} 值。然后根据统计学原理，计算 40 份样的平均值 ($\bar{X}$) 以及标准差 (SD)，如果 $\text{OD}_{450} > \bar{X} + 3\text{SD}$ ，判为阳性；当 $\text{OD}_{450} < \bar{X} + 2\text{SD}$ ，判为阴性；介于二者判为可疑，判定标准参考文献(陈海超 2015)。

4.2.4.5 卵黄抗体抗 PEDV 的特异性检测

将猪伪狂犬病病毒、猪瘟病毒和猪传染性胃肠炎病毒按照 1:25 比例稀释后包被 ELISA 板, 将提纯的 PEDV 阳性卵黄抗体, 按照 1:80 比例稀释后, 每孔加 100 μ L 和包被抗原反应, 确定 PEDV 阳性卵黄抗体是否与其它抗原发生交叉反应。

4.2.4.6 卵黄抗体的敏感性试验

将 PEDV 阳性卵黄抗体以 1:70, 1:140, 1:280, 1:560, 1:1120, 1:2240, 1:4480, 1:8960 的比例进行稀释, 每个稀释度做 3 个重复, 最后计算 OD₄₅₀ 平均值, 用上述建立好的 ELISA 方法检测抗体的 OD₄₅₀ 值。

4.2.4.7 免疫鹌鹑血清和卵黄抗体中 PEDV 特异性抗体检测

将免疫后每隔一周采集的鹌鹑血清以及卵黄抗体, 用建立好的 ELISA 方法检测抗体的 OD₄₅₀ 值, 探究免疫后血清和卵黄中的抗 PEDV 抗体的消长规律, 将抗 PEDV 卵黄抗体水平较高一段时间内的鹌鹑蛋集中收集, 对特异性卵黄抗体大量提纯, 作为后续病毒中和试验, 以及卵黄抗体基本特性检验的基础材料。

4.2.5 卵黄抗体抗 PEDV 中和效价的测定

采用固定病毒稀释抗体法测定抗体的中和效价, 根据卵黄抗体的 ELISA 检测结果, 选取三免后 ELISA 效价较高的抗 PEDV 卵黄抗体, 经 0.22 μ m 滤器过滤, 取 9 个灭菌的离心管, 每管加入 500 μ L 灭菌 PBS 液, 然后加入等量卵黄抗体液倍比稀释至第 9 管, 再将稀释好的 PED 病毒液 (200 TCID₅₀), 与等量稀释好的卵黄抗体液混合, 放 37℃ 培养箱孵育 1 h, 同时设立阴性 IgY 对照组、病毒对照组和正常细胞对照组。将 96 孔板培养的 Vero 用 PBS 洗 3 遍后, 加入 37℃ 中和 1 h 的卵黄抗体和病毒的混合液, 每个稀释度加 8 孔, 100 μ L/孔, 阴性卵黄抗体组和病毒组各作 8 个重复孔, 然后将 96 板放于培养箱, 每天记数细胞病变孔, 连续观察 5~7 d, 通过 Reed-Muench 法公式计算卵黄抗体的 PD₅₀, 具体算法如下: 距离比例=(高于 50%保护率-50%)/(高于 50%保护率-低于 50%保护率); IgPD₅₀=距离比例 $\times$ 稀释度对数之间的差+高于 50%保护率的稀释度对数。

4.2.6 卵黄抗体基本特性检验

4.2.6.1 温度对卵黄抗体效价的影响

取提纯的抗 PEDV 卵黄抗体 4 份 (200 μ L), 分别放置在 37℃、46℃、56℃、65℃ 等 4 个温度环境中, 30 min、60 min, 对照组 IgY 放于 4℃ 下。结束后通过 ELISA 方法测定各组抗 PEDV IgY 的 OD₄₅₀ 值。

4.2.6.2 pH 对卵黄抗体效价的影响

取提纯的抗 PEDV 卵黄抗体 4 份 (200 μ L), 分别置于 pH 为 2.0、3.0、4.0、6.0、7.0、9.0、11.0 的溶液中, 37℃ 作用 1 h 后, 将各组溶液 pH 调至 7.0, 对照组不处理。

结束后用 ELISA 方法测定各组抗 PEDV IgY 的 OD₄₅₀ 值。

4.2.6.3 胃蛋白酶对卵黄抗体效价的影响

取提纯的抗 PEDV 卵黄抗体 4 份(200 μ L),与等体积胃蛋白酶(3000~3500 NFU)溶液混匀,放置在 37℃作用 0.5 h、1 h 和 1.5 h,对照组不做处理。结束后用 ELISA 方法测定各组抗 PEDV IgY 的 OD₄₅₀ 值。

4.3 结果

4.3.1 PEDV 分离株灭活疫苗的检验

4.3.1.1 无菌检验

制备的 PEDV 分离株灭活疫苗的无菌检验,结果见表 4-3,在 TSB 培养基和 LB 液体培养基中 24 h 后,培养基澄清、无浑浊现象,说明 PEDV 灭活抗原无菌检验合格。

表 4-3 灭活疫苗的无菌检验结果
Table 4-3 Sterility test results of inactivated vaccines

培养基	温度 (°C)	检验结果
TSB 培养基	37	-
LB 液体培养基	37	-

注:“-”表示无细菌生长

Note: “-”indicates no bacterial growth

4.3.1.2 物理性状检验

用移液器取 0.4 mL 疫苗,其垂直放出的时间为 6 s,符合疫苗的黏度标准要求。将制备的 2 种弗氏佐剂灭活疫苗分别取 10 mL 至离心管中,在 3000 r/min 条件下离心 15 min 后,水相析出均不超过 0.1 mL,说明制备的疫苗稳定性较好。

4.3.1.3 灭活疫苗安全性检验

实验组小鼠在接种 PEDV 灭活疫苗一周内,其饮水、采食以及精神状况与对照组小鼠无明显差异(图 4-1)。在接种 PEDV 疫苗 7 d 后,将其脱颈处死,剖检胸腔及腹腔各脏器,结果未发现有异常,说明制备的 PEDV 灭活疫苗较为安全(图 4-2)。



图 4-1 试验组小鼠

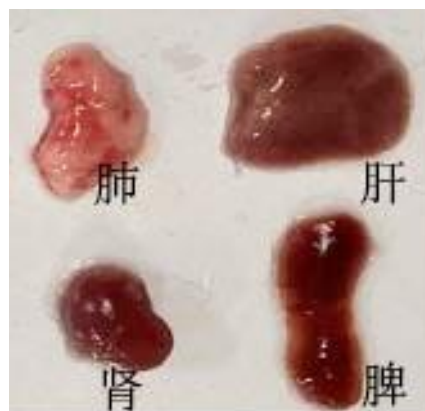


图 4-2 试验组小鼠脏器剖检结果

Fig. 4-1 Experimental group of mouse Fig. 4-2 Results of autopsy of organs in mouse

4.3.2 卵黄抗体的提取与检验

4.3.2.1 卵黄抗体的粗提与纯化

将收集的高免鹌鹑蛋黄，经过水稀释法后，粗提的卵黄抗体上清液，眼观为淡黄色、半浑浊的液体（图 4-3）。将水稀释法粗提后卵黄抗体上清液，通过硫酸铵法两次沉淀盐析后，管底可见呈乳白色、半透明的卵黄抗体 IgY（图 4-4）。



图 4-3 卵黄抗体粗提上清液



图 4-4 卵黄抗体经硫酸铵法盐析沉淀

Fig. 4-3 IgY extraction supernatant Fig. 4-4 IgY is extracted by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ method

4.3.2.2 卵黄抗体的提取含量测定

对经水稀释、硫酸铵法和 PEG-6000 法提取后的卵黄抗体，用 BCA 方法测定蛋白浓度，根据蛋白标准品的浓度和 OD_{562} 检测值，绘制标准曲线（图 4-5），标准曲线的方程是 $y=0.8811x+0.1072$ ， $R^2=0.997$ ，根据曲线方程，计算各方法提取的 IgY 蛋白浓度。3 种方法提取的卵黄抗体蛋白含量以及抗体效价检测结果（表 4-4）所示，结果显示水稀释法提取的卵黄抗体蛋白含量最高，可能与提取方法除脂不完全，杂蛋白含量较多有关，硫酸铵法虽然提纯的卵黄抗体蛋白浓度最低为 7.56 mg/mL ，但是其抗体效价最高，所以，本试验最终选取硫酸铵法进行 IgY 提纯用于后续试验。

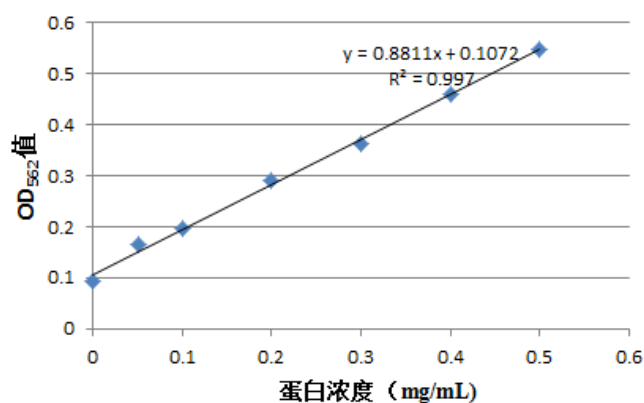


图 4-5 BSA 标准曲线

Fig.4-5 BSA standard curve

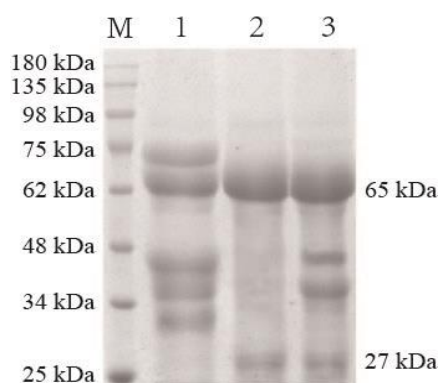
表 4-4 不同方法提取卵黄抗体的效果

Table 4-4 The effect of different methods to extract yolk antibody

方法 Methods	卵黄液体积 Volume/mL	颜色 Color	透明度 Transparency	蛋白浓度 mg/mL	ELISA 效价 Antibody titer
水稀释	10	浅黄色	半透明	9.68 mg/mL	1:640
硫酸铵法	10	澄清	透明	7.56 mg/mL	1:5120
PEG-6000	10	浅黄色	半透明	8.15 mg/mL	1:2560

4.3.2.3 卵黄抗体的纯度

卵黄抗体的 SDS-PAGE 纯度检验结果显示 (图 4-6), IgY 重链在 65 kDa 左右, 轻链约为 27 kDa, 通过水稀释法和 PEG-6000 法提取的卵黄抗体杂蛋白较多, 可能与提取方法除脂不充分有关, 而硫酸铵法提取的卵黄抗体杂蛋白条带较少, 说明硫酸铵法提取的卵黄抗体纯度更高。



M.蛋白标准品; 1.水稀释法; 2.硫酸铵法; 3.PEG-6000 法

M. Protein standard; 1. Water dilution methods; 2. Ammonium Sulfate Methods; 3. PEG-6000 methods

图 4-6 卵黄抗体的纯度分析

Fig.4-6 Analysis of the purity of yolk antibody

4.3.3 抗 PEDV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

4.3.3.1 抗原的最佳包被浓度及一抗的最佳稀释的的确定

用 PEDV 阴性、阳性卵黄抗体进行棋盘滴定试验, 结果见表 4-5。由表可知, 随着包被抗原和卵黄抗体稀释倍数的增加, OD_{450} 值均出现下降的趋势。当包被抗原 1:200 稀释, 卵黄抗体作 80 倍稀释时, 阳性卵黄抗体的 OD_{450} 值接近 1.0, 同时 P/N 值最大。因此, 将浓缩抗原 1:200 稀释后每孔加 100 μ L 作为最佳包被条件, 卵黄抗体按 1:80 比例稀释作为最佳稀释条件。

表 4-5 抗原的包被浓度和一抗最佳稀释度的测定结果

Table 4-5 The results of antigen coating concentration and optimal dilution of IgY

稀释度 dilution	抗原不同稀释度的 OD_{450} 值 The OD_{450} of different dilutions of antigen					
		1:50	1:100	1:200	1:300	1:400
1:40	P	1.408 $\pm$ 0.012	1.275 $\pm$ 0.021	1.117 $\pm$ 0.015	0.912 $\pm$ 0.031	0.764 $\pm$ 0.018
	N	0.178 $\pm$ 0.008	0.153 $\pm$ 0.014	0.131 $\pm$ 0.025	0.097 $\pm$ 0.006	0.080 $\pm$ 0.015
	P/N	7.91	8.33	8.53	9.40	9.55
1:80	P	1.246 $\pm$ 0.027	1.119 $\pm$ 0.022	1.098 $\pm$ 0.007	0.825 $\pm$ 0.026	0.634 $\pm$ 0.011
	N	0.141 $\pm$ 0.013	0.123 $\pm$ 0.018	0.095 $\pm$ 0.012	0.089 $\pm$ 0.032	0.070 $\pm$ 0.014
	P/N	8.84	9.10	11.56	9.27	9.06
1:160	P	1.025 $\pm$ 0.012	0.908 $\pm$ 0.019	0.726 $\pm$ 0.021	0.656 $\pm$ 0.026	0.523 $\pm$ 0.008
	N	0.113 $\pm$ 0.008	0.102 $\pm$ 0.015	0.090 $\pm$ 0.012	0.079 $\pm$ 0.014	0.061 $\pm$ 0.023
	P/N	9.07	8.90	8.07	8.30	8.57
1:320	P	0.849 $\pm$ 0.022	0.756 $\pm$ 0.027	0.618 $\pm$ 0.016	0.543 $\pm$ 0.010	0.408 $\pm$ 0.018
	N	0.092 $\pm$ 0.009	0.085 $\pm$ 0.010	0.071 $\pm$ 0.015	0.063 $\pm$ 0.024	0.056 $\pm$ 0.026
	P/N	9.23	8.89	8.70	8.62	7.29

4.3.3.2 酶标抗体最佳稀释度的筛选优化

将酶标二抗按不同比例稀释后进行 ELISA 试验, 结果见表 4-6。当酶标二抗稀释 4000 倍时, 其 P/N 值最大, 因此选择 1:4000 作为酶标二抗的最佳稀释度。

表 4-6 酶标抗体的最佳工作浓度测定结果

Table 4-6 The result of the best dilution of enzyme labeled antibody

项目 Items	酶标抗体的不同稀释度的 OD ₄₅₀ 值 The OD ₄₅₀ of different dilutions of enzyme labeled antibody			
	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
阳性抗体	1.479±0.017	1.248±0.022	1.139±0.020	0.982±0.027
阴性抗体	0.109±0.011	0.086±0.016	0.063±0.012	0.067±0.009
P/N	13.57	14.51	18.08	14.66

4.3.3.3 封闭条件的确定

由表 4-7 所示, 用以下 3 种封闭液封闭酶标板, 5%脱脂奶粉封闭时其阳性孔/阴性孔 (P/N) 值最大, 封闭效果最好, 因此本试验选取 5%脱脂奶粉作为最佳封闭液。

表 4-7 最佳封闭液的筛选

Table 4-7 Selection of the best blocking solution

	5% 脱脂奶粉	1% BSA	2% BSA
阳性抗体	1.086±0.015	1.217±0.024	1.114±0.013
阴性抗体	0.074±0.008	0.097±0.010	0.102±0.06
P/N	14.68	12.55	10.92

4.3.3.4 阴阳性判定标准的确定

依据统计学的原理, 当 $OD_{450} > \text{平均值}(\bar{X}) + 3 \text{ 标准差(SD)}$ 时, 即可判定为阳性; 当 $OD_{450} < \text{平均值}(\bar{X}) + 2 \text{ 标准差(SD)}$ 时, 判定为阴性。用本试验建立的 ELISA 方法, 测定 40 份阴性卵黄抗体样品的 OD_{450} 值, 结果见表 4-8。通过计算出 40 份阴性样品的平均值是 0.106, 标准差是 0.03。根据判定标准, 得出当 OD_{450} 值大于 0.19 时, 判定为阳性; OD_{450} 值小于 0.16, 判定为阴性; 介于二者则判为可疑。

表 4-8 阴性卵黄抗体的 OD₄₅₀ 值Table 4-8 OD₄₅₀ value of negative yolk antibody

序号	OD ₄₅₀ 值							
1~8	0.151	0.079	0.098	0.118	0.111	0.108	0.083	0.096
9~16	0.085	0.105	0.088	0.101	0.122	0.094	0.131	0.091
17~24	0.078	0.155	0.147	0.115	0.093	0.162	0.113	0.125
25~32	0.064	0.068	0.087	0.105	0.074	0.089	0.139	0.160
33~40	0.071	0.120	0.135	0.057	0.128	0.141	0.097	0.061

4.3.4 卵黄抗体抗 PEDV 特异性

将不同的抗原包被酶标板，用建立的 ELISA 方法检测 PEDV 阳性卵黄抗体，结果见表 4-9，除了包被 PEDV 抗原孔呈阳性外，其余孔均为阴性，OD₄₅₀ 值均低于 0.1，说明制备的抗 PEDV 卵黄抗体具备良好的特异性，无交叉反应。

表 4-9 卵黄抗体的特异性试验结果
Table 4-9 Specificity test results of yolk antibody

序号 Sample number	包被抗原 (Coating antigen)			
	PRV	CSFV	TGEV	PEDV
1	0.079	0.083	0.075	1.237
2	0.089	0.067	0.071	0.932
3	0.064	0.085	0.098	1.108

4.3.5 卵黄抗体的敏感性试验结果

PEDV 阳性卵黄抗体经不同比例稀释后，按照上述 ELISA 方法进行试验，结果如表 4-10 所示，当 PEDV 阳性卵黄抗体稀释至 4480 倍时，ELISA 检测仍为阳性 (OD₄₅₀ 值>0.19)，说明建立的 ELISA 方法敏感性较好。

表 4-10 卵黄抗体的敏感性试验结果
Table 4-10 Sensitivity test results of yolk antibody

样品 Sample	稀释倍数							
	1:70	1:140	1:280	1:560	1:1120	1:2240	1:4480	1:8960
OD ₄₅₀ 值	1.034	0.957	0.804	0.642	0.447	0.327	0.231	0.158

4.3.6 卵黄抗体抗 PEDV 作用

4.3.6.1 卵黄和血清中抗 PEDV 抗体消长规律分析

将免疫后采集的血清和卵黄抗体，用建立好的 ELISA 方法进行抗体检测，结果如图 4-7 所示，血清中的抗 PEDV 抗体从免疫第 7 天到第 14 天，呈现直线上升的趋势，而卵黄中抗 PEDV 抗体直至免疫第 14 天开始，抗体水平才出现大幅度上升。随着免疫天数的增加，血清抗体和卵黄抗体水平逐渐升高，直至三免后 2 周左右，血清抗体及卵黄抗体水平均达到最高，血清抗体水平可以维持 10d 左右，而卵黄抗体水平可维持将近 3 周。随后血清抗体水平从免疫第 49 天开始出现直线下跌，而卵黄抗体直至免疫第 63 天，抗体水平才开始出现下降。从总体上看，卵黄抗体的产生要滞后于血清抗体，而血清抗体水平的消退要早于卵黄抗体。

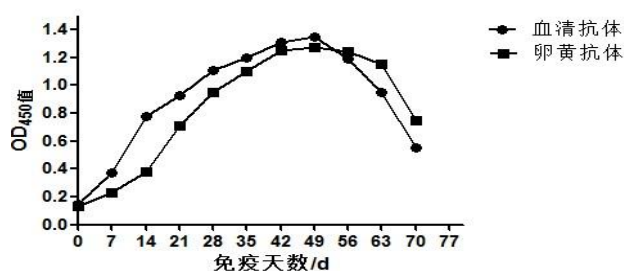


图 4-7 卵黄抗体和血清抗体的 ELISA 检测结果

Fig.4-7 ELISA results of IgY and Serum antibody

4.3.6.2 卵黄抗体对 PEDV 中和效价

将三免后经 ELISA 方法检测为抗体水平较高的 PEDV 卵黄抗体, 进行病毒中和试验, 结果如表 4-11 所示。根据 Reed-Muench 法计算抗体中和效价, 具体算法如下: 距离比例=80-50/80-42.86=0.81; $IgPD_{50} = -1.8 + 0.81 \times (-0.3) = -2.043$, $PD_{50} = 10^{-2.043} = 0.009$ 。抗 PEDV 卵黄抗体中和效价为 1:111, 即将卵黄抗体按 1:111 稀释, 能够保护半数 Vero 细胞免受 PEDV 的感染。

表 4-11 卵黄抗体的中和试验结果

Table 4-11 Neutralization test results of volk antibody

IgY 稀释度	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计		保护率
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
1:2	0	8	0	51	100 (51/51)
1:4	0	8	0	43	100 (43/43)
1:8	0	8	0	35	100 (35/35)
1:16	0	8	0	27	100 (27/27)
1:32	1	7	1	19	95 (19/20)
1:64	2	6	3	12	80 (12/15)
1:128	5	3	8	6	42.86 (6/14)
1:256	5	3	13	3	18.75 (3/16)
1:512	8	0	21	0	0 (0/21)

4.3.7 抗 PEDV 流行变异毒株卵黄抗体的理化性质

4.3.7.1 温度对抗 PEDV 卵黄抗体的影响

抗 PEDV 卵黄抗体的热稳定性试验结果如表 4-1 所示, IgY 在 37℃~56℃水浴中作用 30 min、60 min 后, 其活性几乎不受影响, ELISA 方法检测的 OD₄₅₀ 值无明显变化, 说明 IgY 在此温度范围内热稳定性较好; 当 IgY 在 65℃条件下作用 30 min 后, 抗体的 OD₄₅₀ 值显著下降, 随着作用时间增加到 60 min, IgY 的 OD₄₅₀ 值继续降低, IgY 的活性受到严重影响, 急剧下降。

表 4-12 温度对 PEDV IgY 效价的影响

Table 4-12 The effect of temperature on the titer of PEDV IgY

温度 (°C)	时间 (min)	抗体效价 OD ₄₅₀ 值 (Antibody titer of OD ₄₅₀ value)			
		01	02	03	04
37	30	1.041	1.216	1.102	0.974
	60	1.029	1.203	1.005	0.953
46	30	1.022	1.179	1.063	0.965
	60	1.035	1.139	1.058	0.951
56	30	0.987	1.128	0.992	0.875
	60	0.932	1.181	0.983	0.843
65	30	0.725	0.905	0.731	0.654
	60	0.619	0.813	0.611	0.589
对照组 (OD ₄₅₀)		1.037	1.225	1.087	0.962

4.3.7.2 pH 对抗 PEDV 卵黄抗体的影响

抗 PEDV 卵黄抗体经不同 pH 条件处理后, ELISA 检测抗体 OD₄₅₀ 值结果如表 4-13 所示, 可见当 pH 在 3.0~9.0 之间, 卵黄抗体的活性受 pH 影响较小, 抗体 OD₄₅₀ 值与对照组相差不大, 具有较好的活性; 当 pH 为 2.0 或 11.0 时, 卵黄抗体活性明显受到影响, 与对照组相比, IgY 的 OD₄₅₀ 值显著降低, 活性急剧下降。说明 IgY 在弱酸、弱碱、中性环境下具有较好的稳定性。

表 4-13 pH 对 PEDV IgY 效价的影响

Table 4-13 The effect of pH on the titer of PEDV IgY

pH	抗体效价 OD ₄₅₀ 值 (Antibody titer of OD ₄₅₀ value)			
	01	02	03	04
2	0.813	0.716	0.785	0.517
3	1.032	0.914	0.998	0.670
4	1.106	0.997	1.108	0.769
6	1.253	1.078	1.182	0.846
7	1.286	1.110	1.209	0.890
9	1.056	1.005	1.132	0.778
11	0.747	0.693	0.725	0.534
对照组 (OD ₄₅₀)	1.278	1.103	1.214	0.875

4.3.7.3 胃蛋白酶对抗 PEDV 卵黄抗体的影响

抗 PEDV 卵黄抗体经胃蛋白酶处理后, ELISA 检测抗体 OD₄₅₀ 值结果如表 4-14 所示, IgY 经胃蛋白酶作用 0.5、1、2 h 后, 抗体的活性受胃蛋白酶影响较小, 抗体

OD₄₅₀ 值与对照组相比,无明显变化。说明 IgY 对胃蛋白酶具有一定的抵抗力。

表 4-14 胃蛋白酶对 PEDV IgY 效价的影响

Table 4-14 The effect of pepsin PEDV IgY titer

作用时间 (h)	抗体效价 OD ₄₅₀ 值 (Antibody titer of OD ₄₅₀ value)			
	01	02	03	04
0.5	1.107	0.910	1.165	1.013
1	1.056	0.872	1.132	0.984
2	1.014	0.857	1.105	0.973
对照组 (OD ₄₅₀)	1.135	0.946	1.258	1.007

4.4 讨论

卵黄抗体 IgY 由于获取方便,产量高,可规模化生产和安全性高等优势,近年来,被广泛应用于畜禽疾病的预防和治疗。鹌鹑作为一种较古老的家禽,养殖量仅次于鸡,其个体较小,对养殖空间的要求较低。其次,鹌鹑抵抗力强、饲养成本低、产蛋率高。鹌鹑的性成熟早,大约在 6 至 7 周龄时即可开始产蛋 (张巍等 2012)。鉴于上述诸多优势,近年来,用鹌鹑制备特异性卵黄抗体的研究越来越多。Esmailnejad 等人将鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌抗原经 10%福尔马林灭活后,制备弗氏佐剂疫苗分别免疫日本鹌鹑,通过硫酸铵沉淀法提取高免抗沙门氏菌 IgY,发现卵黄抗体 IgY 与相对应的免疫原具有高度特异性 (Esmailnejad et al. 2019)。

本研究将制备的 PEDV 弗氏佐剂灭活疫苗免疫鹌鹑,连续 11 周进行免疫监测,最后分析获得了血清和卵黄中抗 PEDV 抗体水平的消长规律,发现血清中的抗体产生相对较早,在首次免疫后一周即可检测到,随着免疫次数的增加,抗体水平持续上升,三免后 2 周血清抗体水平达到最高。与血清抗体相比,卵黄中特异性抗体的出现要推迟一周左右,同期相比要低于血清中的抗体水平,但卵黄中的抗体水平维持时间较长,消退延迟。Sui 等人通过将李斯特菌免疫鸡制备特异性 IgY,同样在首免后 2 周才检测到 IgY,说明血液中的 IgG 抗体转移到卵黄中形成 IgY 大概需要 2 周时间(Sui et al. 2011)。

本研究中卵黄抗体的中和试验结果显示,抗 PEDV IgY 的中和效价可以达到 1:11,说明制备的卵黄抗体具有一定中和病毒的能力。胡青松用 PEDV 白油佐剂灭活疫苗免疫产蛋鸡(胡青松 2014),获得的抗 PEDV 卵黄抗体效价达 1:120;刘政龙将制备的 PEDV 蜂胶佐剂灭活疫苗免疫蛋鸡(刘政龙 2016),最后提纯的卵黄抗体测定中和效价达 1:125.9,造成免疫后卵黄抗体的中和效价略有差异,这可能与制备疫苗所用的佐剂、免疫程序和试验动物不同等有关。

近年来,卵黄抗体的临床应用广泛,但是其作为口服剂治疗应用,仍存在一些问题。虽然 IgY 对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶具有较强的抵抗力,IgY 也是蛋白质,在胃蛋白酶作用下也会降解失活,IgY 对胃蛋白酶的稳定性高度依赖于 pH 值,在 pH5 或更高的 pH 值下,对胃蛋白酶具有一定的抵抗力。IgY 在 pH4.0 条件下分别作用 1 h 和 4 h 后,最终分别保留 91%和 63%的活性(Rahman et al. 2013)。为了保护 IgY 免受胃蛋白酶和酸性条件水解,研究发现将 IgY 溶解在碳酸钠缓冲液中,然后用鸡蛋卵磷脂/胆固醇脂质体包裹 IgY,发现可以有效减少 IgY 在胃内环境的活性损失,增强对胃蛋白酶的抵抗力(Shimizu et al. 1993)。Li 等人通过对 40 日龄仔猪人工感染大肠埃希菌致腹泻,然后用特异性 IgY 经口服治疗,结果发现与未包裹微胶囊的 IgY 相比,用壳聚糖-海藻酸盐微胶囊包裹的特异性 IgY 饲喂仔猪,在感染后 24 h 后显著降低仔猪腹泻,而未包裹的 IgY 直至感染后 72 h,才发挥出减轻腹泻的效果,说明壳聚糖-海藻酸盐微胶囊可以有效保护 IgY,免受胃内失活(Li et al. 2009)。

本研究针对 PEDV 变异株制备的鹌鹑源卵黄抗体,日后可以考虑用微胶囊或脂质体等材料进行包裹,制备卵黄抗体口服剂,为出现 PED 疫情的猪场提供预防和治疗产品。

4.5 小结

(1) 建立了卵黄抗体的 ELISA 检测方法,将抗 PEDV 卵黄抗体 1:4480 稀释后,检测仍为阳性。

(2) 提纯后的抗 PEDV 卵黄抗体的中和效价可达 1:111。

(3) IgY 的热稳定性较好,在弱酸、弱碱和中性环境中抗体仍具有活性,对胃蛋白酶具有一定抵抗力。

结 论

(1) 从病料中分离得到 1 株 PEDV 毒株, 基于 S1 基因的遗传变异分析, 鉴定该毒株为 G-II 亚型 (流行株)。

(2) 用 3 种不同方法提取卵黄抗体, 发现虽然硫酸铵法提取的 IgY 含量较低为 7.56 mg/mL, 但提取的 IgY 纯度较高, 抗体效价最高达 1:5120。

(3) 抗 PEDV 鹌鹑源卵黄抗体中和效价为 1:111。

(4) 卵黄抗体 IgY 的理化性质稳定, 当温度在 37℃~56℃之间, pH 为 3.0~9.0 范围内, 以及经胃蛋白酶在 37℃下作用 0.5~2 h, IgY 仍具有活性, 抗体效价无明显变化。

本论文的创新点

本研究选用鹌鹑作为卵黄抗体制备的供体, 制备的抗 PEDV 卵黄抗体中和效价达 1:111, 具有一定中和病毒的能力。

参考文献

- 陈海超. 2015. 抗猪伪狂犬病毒卵黄抗体的制备及其保护效力的研究[硕士学位论文] 江苏南京: 南京农业大学
- 程志燕. 2017. 抗猪流行性腹泻病毒卵黄抗体治疗效果研究. 农业与技术, 37(22): 96
- 宫晓华. 2020. 猪流行性腹泻的流行特点、临床症状、剖检变化及其防控. 现代畜牧科技, 71(11): 128-129
- 贺娟娟. 2018. 抗猪流行性腹泻病毒高免卵黄抗体的制备及临床应用研究. 当代畜禽养殖业, (03):10-11
- 胡青松. 2014. 抗猪腹泻卵黄抗体添加剂的初步研究[硕士学位论文] 安徽合肥: 安徽农业大学
- 姜立民, 林晓波, 高磊, 李永学, 黄海鹰, 毛子安. 2014. β -丙内酯对狂犬病病毒的灭活效果. 国际流行病学传染病学杂志, 41(2): 137-139
- 李桂珍, 王爱富, 李舜, 马春全, 付强. 2018. 抗猪流行性腹泻病毒卵黄抗体制剂的研究进展以及临床应用. 54(11): 3-9
- 李明亮, 冷超粮, 宋安东, 秦鑫鑫, 阚云超. 2018. 卵黄抗体的应用及纯化研究进展. 黑龙江畜牧兽医, (15): 34-38
- 刘政龙. 2016. 猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白间接 ELISA 方法的建立与应用及卵黄抗体的制备[硕士学位论文] 山东泰安: 山东农业大学
- 吕豪杰, 严昌国, 崔莲花. 2019. 鸡卵黄抗体及其在动物疾病防治中的应用. 延边大学农学学报, 41(04): 104-110
- 毛治安, 刘海杰. 2020. 猪流行性腹泻病的流行现状及防治. 畜禽业, 31(07): 81-83
- 梅小强, 曾忠花, 徐函, 赵鹏伟, 刘永贵, 李卫芬. 2019. 猪流行性腹泻病毒及其卵黄抗体研究进展. 畜牧与兽医, 51(07): 127-131
- 元秀晔, 宋翔, 王业华, 程福亮, 徐海燕. 2017. 卵黄抗体在疾病防治中的应用. 中国动物传染病学报, 25(005): 80-86
- 王颢然, 高利, 高翔, 肖建华. 2020. 2008-2018 年我国猪流行性腹泻病毒混合感染分析. 中国动物传染病学报, 135(03): 101-107
- 王宪文, 王新卫. 2007. 兽医生物制品制备技术. [M] 北京: 中国农业科学技术出版社
- 王业华, 单春乔, 冯柳柳, 陆继爽, 李娟, 刘艳. 2019. 卵黄抗体在病毒性疾病防治中的应用. 动物医学进展, 40(007): 120-124
- 向冬梅, 易思宇, 唐青海, 吴思雯, 王姝姝, 李彦等. 2020. 卵黄抗体五种提取工艺比较及初步应用. 湖北农业科学, 59(15): 108-113
- 徐丽华, 李军星, 苏菲, 余斌, 王赛, 田瑞雨等. 2018. 2011-2017 年浙江省猪病毒性腹泻病的流行病学调查. 中国兽医科学, 48(05): 625-630
- 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 朱维正, 赵凤玉, 巩怀俊, 费思阁. 1984. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究. 中国人民解放军兽医大学学报, 4(3): 202-208
- 余运运, 孙丽娜, 孙万邦. 2018. 卵黄抗体的结构与功能其在人及动物疾病中应用进展. 中国人兽共患病学报, 34(1): 67-72

- 翟长友. 2018. 抗猪流行性腹泻病毒卵黄抗体治疗效果研究. 中国畜牧兽医文摘, 34(6): 445
- 张莉萍. 2019. 猪流行性腹泻病毒流行毒株感染性克隆的构建及应用.[博士学位论文] 甘肃兰州: 兰州兽医研究所
- 张巍, 李绍章, 杜金平. 2012. 中国鹌鹑研究概况. 湖北农业科学, 51(24): 33-36
- 张月, 田夫林, 李玉杰, 马慧玲, 王贵升, 蔺晓月. 2018. 山东省 2012 年~2016 年猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及对其 orf3 基因分析. 中国预防兽医学报, 40(05): 447-450
- 张志, 董雅琴, 刘爽, 吴发兴, 邵卫星, 李晓成. 2014. 我国部分省份猪流行性腹泻的流行病学监测. 中国动物检疫. (10): 47-51
- 周宏专. 2018. 猪流行性腹泻研究概况. 动物医学进展, 039(007): 102-107
- 朱记平, 冯小婷. 2017. 不同 PED 疫苗防控猪流行性腹泻的临床效果. 黑龙江畜牧兽医, 534(18): 178-180
- Aizenshtein E, Yosipovich R, Kvint M, Shadmon R, Krispel S, Shuster E, Eliyahu D, Finger A, Banet-Noach C, Shahar E, Pitcovski J. 2016. Practical aspects in the use of passive immunization as an alternative to attenuated viral vaccines. *Vaccine*, 34(22): 2513-2518
- Alonso C, Raynor PC, Davies PR, Torremorell M. 2015. Concentration, Size Distribution, and Infectivity of Airborne Particles Carrying Swine Viruses. *PLoS One*, 10(8): e0135675
- Alvarez J, Sarradell J, Morrison R, Perez A. 2015. Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs. *PLoS One*, 10(3): e0120532
- Amro WA, Al-Qaisi W, Al-Razem F. 2018. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal genetic engineering & biotechnology*, 16(1): 99-103
- Chen J, Cui Y, Wang Z, Liu G. 2020. Identification and characterization of PEDV infection in rat crypt epithelial cells. *Veterinary microbiology*, 249: 108848
- Chen JF, Sun DB, Wang CB, Shi HY, Cui XC, Liu SW, Qiu HJ, Feng L. 2008. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus genes*, 36(2): 355-364
- Chen Q, Li G, Stasko J, Thomas JT, Stensland WR, Pillatzki AE, Gauger PC, Schwartz KJ, Madson D, Yoon KJ, Stevenson GW, Burrough ER, Harmon KM, Main RG, Zhang J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *Journal of clinical microbiology*, 52(1): 234-243
- Choe S, Song S, Piao D, Park GN, Shin J, Choi YJ, Kang SK, Cha RM, Hyun BH, Park BK, An DJ. 2020. Efficacy of orally administered porcine epidemic diarrhea vaccine-loaded hydroxypropyl methylcellulose phthalate microspheres and RANKL-secreting *L. lactis*. *Veterinary microbiology*, 242: 108604
- de Haan CA, Te Lintelo E, Li Z, Raaben M, Wurdinger T, Bosch BJ, Rottier PJ. 2006. Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *Journal of virology*, 80(22): 10909-10918
- Dee S, Clement T, Schelkopf A, Nerem J, Knudsen D, Christopher-Hennings J, Nelson E. 2014. An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMC*

- veterinary research*, 10: 176
- Ding Z, Fang L, Jing H, Zeng S, Wang D, Liu L, Zhang H, Luo R, Chen H, Xiao S. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *Journal of virology*, 88(16): 8936-8945
- Esmailnejad A, Abdi-Hachesoo B, Hosseini Nasab E, Shakoori M. 2019. Production, purification, and evaluation of quail immunoglobulin Y against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Molecular immunology*, 107: 79-83
- Fink AL, Williams KL, Harris E, Alvine TD, Henderson T, Schiltz J, Nilles ML, Bradley DS. 2017. Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement. *PLoS Neglected Tropical diseases*, 11(7): e0005721
- Follis KE, York J, Nunberg JH. 2006. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology*, 350(2): 358-369
- Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F, Blanchard Y. 2015. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome announcements*, 3(3): e00535-15
- Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, Blome S, Pohlmann A, Schirrmeier H, Beer M, Höper D. 2015. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging infectious diseases*, 21(3): 493-496
- Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *Journal of clinical microbiology*, 26(11): 2235-2239
- Hou XL, Yu LY, Liu J. 2007. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Veterinary microbiology*, 123(1-3): 86-92
- Jung K, Miyazaki A, Saif LJ. 2018. Immunohistochemical detection of the vomiting-inducing monoamine neurotransmitter serotonin and enterochromaffin cells in the intestines of conventional or gnotobiotic (Gn) pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and serum cytokine responses of Gn pigs to acute PEDV infection. *Research in veterinary science*, 119: 99-108
- Jung K, Saif LJ. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary journal*, 204(2): 134-143
- Kai Wang, Wei Lu, Jianfei Chen, Shiqi Xie, Hongyan Shi, Haojen Hsu, Wenjing Yu, Ke Xu, Chao Bian, Wolfgang B. Fischer, Wolfgang Schwarz, Li Feng, Bing Sun. 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Letters*, 586(4): 384-391
- Kim Y, Lee C. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*, 460-461: 180-193
- Kusanagi K, Kuwahara H, Katoh T, Nunoya T, Ishikawa Y, Samejima T, Tajima M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *The journal of veterinary medical science*, 54(2): 313-318
- Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine*, 17(20-21): 2546-2553

- Lee HM, Lee BJ, Tae JH, Kweon CH, Lee YS, Park JH. 2000. Detection of porcine epidemic diarrhea virus by immunohistochemistry with recombinant antibody produced in phages. *The journal of veterinary medical science*, 62(3): 333-337
- Lee KA, Chang SK, Lee YJ, Lee JH, Koo NS. 2002. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(5): 488-493
- Lee S, Lee C. 2014. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(7): 1223-1226
- Li B, Du L, Yu Z, Sun B, Xu X, Fan B, Guo R, Yuan W, He K. 2017. Poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticle-entrapped vaccine induces a protective immune response against porcine epidemic diarrhea virus infection in piglets. *Vaccine*, 35(50): 7010-7017
- Li F, Zeng Y, Zhang R, Peng K, Jiang C, Xu Z, Zhu L. 2020. Genetic variations in S gene of porcine epidemic diarrhoea virus from 2018 in Sichuan Province, China. *Veterinary and medicine science*, 6(4): 910-918
- Li R, Qiao S, Yang Y, Guo J, Xie S, Zhou E, Zhang G. 2016. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China. *Virus genes*, 52(1): 91-98
- Li S, Yang J, Zhu Z, Zheng H. 2020. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Host Innate Immune Response. *Pathogens*, 9(5): 367
- Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q. 2012. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging infectious diseases*, 18(8): 1350-1353
- Li XY, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, Li HQ, Lu YN, Zhen YH, Xu YP. 2009. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): in vivo evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Veterinary immunology and Immunopathology*, 129(1-2): 132-136
- Li Y, Wu Q, Huang L, Yuan C, Wang J, Yang Q. 2018. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. *Nature communications*, 9(1): 3811
- Li Z, Chen F, Yuan Y, Zeng X, Wei Z, Zhu L, Sun B, Xie Q, Cao Y, Xue C, Ma J, Bee Y. 2013. Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China. *Archives of virology*, 158(6): 1267-1273
- Li Z, Ma Z, Li Y, Gao S, Xiao S. 2020. Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines. *Microbial pathogenesis*, 149: 104553
- Lin CM, Saif LJ, Marthaler D, Wang Q. 2016. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus research*, 226: 20-39
- Lin CN, Chung WB, Chang SW, Wen CC, Liu H, Chien CH, Chiou MT. 2014. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *The journal of veterinary medical science*, 76(9): 1297-1299
- Lin H, Chen L, Gao L, Yuan X, Ma Z, Fan H. 2016. Epidemic strain YC2014 of porcine epidemic diarrhea virus could provide piglets against homologous challenge. *Virology journal*, 13: 68
- Najdi S, Nikbakht Brujeni G, Sheikhi N, Chakhkar S. 2016. Development of anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulins Y (IgYs) in quail. *Iranian journal of veterinary research*, 17(2): 106-110

- Opriessnig T, Gerber PF, Shen H, de Castro AMMG, Zhang J, Chen Q, Halbur P. 2017. Evaluation of the efficacy of a commercial inactivated genogroup 2b-based porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine and experimental live genogroup 1b exposure against 2b challenge. *Veterinary research*, 48(1): 69
- Pensaert M.B., Callebaut P., DeBouck P. 1982. Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by a coronavirus: present knowledge. *Proc. Congr. Int. Pig. Vet. Soc*, 7: 52
- Pensaert MB, de Bouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of virology*, 58(3): 243-247
- Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr, Umeda K, Kodama Y. 2013. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(5): 1039-1048
- Reguera J, Santiago C, Mudgal G, Ordoño D, Enjuanes L, Casasnovas JM. 2012. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathogens*, 8(8): e1002859
- Ribbens S, Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, De Sadeleer L, de Kruif A, Maes D. 2008. A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. *Preventive veterinary medicine*, 83(3-4): 228-241
- Schulz LL, Tonsor GT. 2015. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *Journal of animal science*, 93(11): 5111-5118
- Shi W, Jia S, Zhao H, Yin J, Wang X, Yu M, Ma S, Wu Y, Chen Y, Fan W, Xu Y, Li Y. 2017. Novel Approach for Isolation and Identification of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Strain NJ Using Porcine Intestinal Epithelial Cells. *Viruses*, 9(1): 19
- Shibata I, Tsuda T, Mori M, Ono M, Sueyoshi M, Uruno K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Veterinary microbiology*, 72(3-4): 173-182
- Shimizu M, Miwa Y, Hashimoto K, Goto A. 1993. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1445-1449
- Steinrigl A, Fernández SR, Stoiber F, Pikalo J, Sattler T, Schmoll F. 2015. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Veterinary research*, 11: 310
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*, 25(5): 649-654
- Su Y, Liu Y, Chen Y, Zhao B, Ji P, Xing G, Jiang D, Liu C, Song Y, Wang G, Li D, Deng R, Zhang G. 2016. Detection and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus in central China based on the ORF3 gene and the S1 gene. *Virology journal*, 13(1): 192
- Sui J, Cao L, Lin H. 2011. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(11): 1946-1950

- Sun D, Wang X, Wei S, Chen J, Feng L. 2016. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review. *The journal of veterinary medical science*, 78(3): 355-363
- Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging infectious diseases*, 18(1): 161-163
- Theuns S, Conceição-Neto N, Christiaens I, Zeller M, Desmarests LM, Roukaerts ID, Acar DD, Heylen E, Matthijnsens J, Nauwynck HJ. 2015. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome announcements*, 3(3): e00506-15
- Tian PF, Jin YL, Xing G, Qv LL, Huang YW, Zhou JY. 2014. Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(10): 1735-1738
- Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch BJ, Rey FA, Veasler D. 2017. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(42): 11157-11162
- Wang D, Fang L, Xiao S. 2016. Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus research*, 226: 7-13
- Wang X, Chen J, Shi D, Shi H, Zhang X, Yuan J, Jiang S, Feng L. 2016. Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2. *Archives of virology*, 161(3): 537-547
- Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Yang X, Chen L, Chang HT, Zhao J, Wang CQ. 2013. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. *Archives of virology*, 158(12): 2487-2494
- Wicht O, Li W, Willems L, Meuleman TJ, Wubbolts RW, van Kuppeveld FJ, Rottier PJ, Bosch BJ. 2014. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *Journal of virology*, 88(14): 7952-7961
- Wood EN. 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *The veterinary record*, 100(12): 243-244
- Wrapp D, McLellan JS. 2019. The 3.1-Angstrom Cryo-electron Microscopy Structure of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein in the Prefusion Conformation. *Journal of virology*, 93(23): e00923-19
- Xu X, Zhang H, Zhang Q, Huang Y, Dong J, Liang Y, Liu HJ, Tong D. 2013. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. *Veterinary microbiology*, 164(3-4): 212-221
- Yang D, Mai K, Zhou Q, Zhu Y, Xing J, Luo C, Liu S, Zhou Q, Huang W, Luo J, Liu J. 2020. The protective efficacy of specific egg yolk immunoglobulin Y(IgY) against *Riemerella anatipestifer* infections. *Veterinary microbiology*, 243: 108642
- Ye S, Li Z, Chen F, Li W, Guo X, Hu H, He Q. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 gene prolongs S-phase, facilitates formation of vesicles and promotes the proliferation of attenuated PEDV. *Virus genes*, 51(3): 385-392
- Zhang F, Luo S, Gu J, Li Z, Li K, Yuan W, Ye Y, Li H, Ding Z, Song D, Tang Y. 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018. *BMC Veterinary research*, 15(1): 470
- Zhang Q, Ke H, Blikslager A, Fujita T, Yoo D. 2018. Type III Interferon Restriction by Porcine

Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling. *Journal of virology*, 92(4): e01677-17

Zhang Q, Shi K, Yoo D. 2016. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology*, 489: 252-268

致 谢

又是六月的毕业季，仿佛大学毕业典礼还在昨天，转眼回眸，三年的研究生生活已经步入尾声。回首过去的三年，那些曾经激励和帮助过我的人，现在回想起来心中的这份感激溢于言表。在此，我想借此机会向我的老师、同学、朋友以及家人们说声感谢、感恩有你们的陪伴和帮助。

首先我要感谢我的导师郭抗抗副教授，从论文的选题、研究内容和论文写作过程都倾注了您大量的心血和精力。三年的硕士学习期间，从最基础的试验设计、以及试验技术应用方面，您都悉心、耐心的指导和帮助我。在文章的撰写方面，您不厌其烦、多次反复修改和耐心指导，在修改文章的过程中，我不仅仅学到了写作方法和技巧，更学到了您身上对待科研认真、严谨的态度，这也是我一生学习的榜样。您教会我的不仅仅是科研知识，在为人处事方面，更是深深影响着我，能够成为您的学生倍感荣幸。

感谢实验室张彦明教授对我论文研究提出的宝贵意见，让我受益匪浅。感谢王晶钰教授、齐雪峰教授、姜艳芬副教授、王承宝副教授为兽医公共卫生实验室的管理和付出。

感谢郑红青师姐给我的帮助，不论是对待科研认真求实的态度，还是为人热心耿直、积极向上的心态都感染着我，在此祝师姐工作顺利，家庭幸福。感谢在四川大学攻读博士学位的邵勇师兄，感谢师兄从本科到硕士阶段一直给我莫大的帮助，祝学业有成，前程似锦。感谢我的同学杨睿在实验技术和方法上给我的帮助，使得我的试验进展顺利，少走很多弯路，她对科研执着认真的态度，深深感染着我，是我学习的榜样。

感谢实验室张亮、刘勇、王栋、姜智文和高辉等师兄，以及赵娣、王涛、范志新、张秀萍、靳明星、冯茹、罗丽华、候玉凤等师姐对我试验上的指导和帮助，教会我试验中遇到很多问题的解决办法。感谢我的同门冯全文、孙颖和王凯对我的帮助，感谢宋梦昭、刘山川、王浩然、史磊波和李一鸣对我试验上的帮助，感谢祁佳丽、刘静、郝峰、李宁和张梦婷等师弟师妹的帮助。

感谢我的父母对我求学多年一如既往的支持，理解和关心，祝我的家人永远健康幸福。感谢我的挚友李巴仑、乔梁、何文来、马应晖、王启艳、张芬芳和朱海鹏等，正是你们科研生活才变得充实而有乐趣。

最后，感谢答辩委员会各位老师为评阅本论文付出的宝贵时间和精力，以及对论文提出的宝贵意见。

田昊伦

2021年4月于杨凌

