

基于 S 蛋白检测猪流行性腹泻抗体 间接 ELISA 方法的建立

邓祖丽颖

(郑州幼儿师范高等专科学校, 河南 郑州 450000)

摘要: 为建立检测猪流行性腹泻病毒(PEDV)S 蛋白抗体的间接 ELISA 方法,应用 RT-PCR 方法扩增 PEDV 河南流行毒株 S 基因 794 bp 片段,将其克隆至原核表达载体 pET-32a(+),构建 pET-32a-S 重组质粒并转化至宿主菌 BL21,在 37 ℃ 条件下加入 IPTG 进行诱导表达,经 SDS-PAGE 分析显示,该蛋白以融合蛋白形式高效表达,分子量约为 46.9 kD;Western-blot 分析表明,所表达的重组蛋白具有良好的反应原性。以纯化的 S 蛋白为包被抗原建立检测 PED 抗体的间接 ELISA 方法,试验确定抗原最佳包被量为 0.04 μg/孔,血清最佳稀释度为 1:100,HRP-IgG 二抗最佳稀释度为 1:2 000,阳性判定标准为 OD₄₅₀ 值 ≥ 0.24。应用该方法对采自河南省不同地区 23 个养猪场的 279 份血清样本进行检测,结果显示,母猪血清样本 PED 抗体阳性率为 97.42% (227/233);育肥和保育猪血清样本阳性率为 71.74% (33/46)。试验结果表明,所建立的间接 ELISA 方法特异性、灵敏性和可重复性良好,可以用于猪群 PED 抗体水平监测和流行病学调查。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; S 蛋白; 原核表达; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)08-0119-05

Prokaryotic Expression of PEDV S Protein and Development of Indirect ELISA for Detection of Its Antibody

DENGZU Li-ying

(Zhengzhou Infant Normal School, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: A spike (S) protein-based ELISA was developed to detect the antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The 794-bp fragment of S gene from PEDV Henan isolate was amplified by RT-PCR and inserted into the expression vector pET-32a(+). The recombinant plasmid was named as pET-32a-S. A fusion protein was expressed in BL21 that transfected by pET-32a-S and induced by IPTG. The molecular weight of the recombinant protein was about 46.9 kD analyzed by SDS-PAGE, and the immunoreaction activity of the recombinant protein was confirmed by Western-blot, in which positive serum against PEDV was used. An indirect ELISA for detecting antibodies against PEDV was developed by using expressed S protein as coating antigen. The results showed that the optimal coating concentration for S protein was 0.04 μg/well, the serum dilution was 1:100, and the HRP-IgG dilution fold was 1:2 000. The positive criterion for this ELISA assay was OD₄₅₀ ≥ 0.24. For a total of 279 field samples tested, the positive rates of sow serum, nursery and fattening pig serum were 97.42% (227/233) and 71.74% (33/46), respectively. The results indicate that this assay is specific, sensitive and reproducible, which might be suitable for detecting anti-PEDV antibody.

Key words: PEDV; S protein; prokaryotic expression; ELISA

收稿日期: 2013-02-28

作者简介: 邓祖丽颖(1969-), 女, 河南郑州人, 高级讲师, 硕士, 主要从事生物技术教学及研究工作。

E-mail: 13938289841@139.com

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由冠状病毒科的猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起, 可导致未断乳仔猪大量死亡, 给养猪业带来巨大损失^[1-7]。因此, 需要建立可靠的 PED 抗体检测方法, 用于 PED 流行病学的监测以及猪群免疫 PED 疫苗后抗体水平的检测。对于 PED 抗体检测的间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法来说, 抗原主要包括纯化的病毒、猪细胞系培养的病毒^[8-12], 或者是从受 PEDV 感染的细胞内提取的 PEDV S、E 和 N 蛋白^[13], 但采用以上方法获取抗原困难, 难以建立实用的抗体诊断技术。随着分子生物学的发展, 使用原核或真核表达系统直接对目的蛋白进行表达, 进而将所表达蛋白作为包被抗原建立间接 ELISA 方法变得简单可行^[14]。

PEDV 纤突 (spike, S) 蛋白位于病毒粒子的表面, 能诱导机体产生中和抗体, 并在抗病毒感染中起重要作用^[15-16]。中和试验测定 PEDV 中和抗体技术难度大, 且耗时费力, 不利于推广应用, 而 ELISA 则操作简便, 易于标准化。以全病毒为包被抗原建立间接 ELISA 方法所测定的 PED 抗体成分复杂, 不能区分抗体类型。为了建立检测抗 PEDV S 蛋白中和抗体的间接 ELISA 方法, 将从 PEDV 河南流行毒株 CH/ZMDZY/11 株中扩增的 S 基因片段重组至表达载体 pET-32a(+), 并进行诱导表达、纯化与鉴定, 以表达的 S 蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 方法, 以期 PED 抗体诊断试剂盒的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 PEDV 来源

2011 年从河南省正阳县某猪场收集腹泻仔猪粪便样本, 经 RT-PCR 方法检测为 PEDV 阳性, 并命名为 CH/ZMDZY/11 株。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、鼠源反转录酶 (M-MLV)、RNA 酶抑制剂 (RNase Inhibitor)、dNTP、pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司, QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司, 琼脂糖购自 Sigma 公司, Bradford 蛋白质定量试剂盒和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 TIANGEN 公司, Ni- Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自康为世纪公司。

1.3 PCR 引物的设计

参考 GenBank 已公布的 PEDV CV777 株全基因

组序列 (AF353511) 设计 1 对特异性引物, 上游引物为: 5'-CGGATCCGTACCCTACTATTGCTT-3', 加入酶切位点 *Bam*H I; 下游引物为 5'-CCTC-GAGAATCAACTCACCTT-3', 加入酶切位点为 *Xho*I。扩增的目的片段长 794 bp, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 样本处理及 RNA 的提取

取病猪粪便组织, 用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 进行 5 倍稀释后, 8 000 r/min 离心 10 min 取上清备用。参照说明书使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 进行 RNA 提取, 所提取的 RNA 置于 -20 °C 保存。

1.5 反转录与 PEDV S 基因片段的扩增、克隆

反转录体系为 20 μ L: RNA 模板 13 μ L, 5 \times Buffer 4 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, 随机引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L, 反转录酶 M-MLV (200 U/ μ L) 0.5 μ L。反应条件为: 42 °C 1.5 h, 95 °C 5 min。PCR 扩增体系为: 10 \times Buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μ L, 反转录产物 (cDNA) 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, 补加灭菌双蒸水至 50 μ L。反应程序: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段并连接至 pMD18-T 载体, 阳性重组质粒命名为 pMD18-T-S。

1.6 pET-32a-S 重组质粒的构建及表达

使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho*I 对 pET-32a(+) 空质粒和 pMD18-T-S 进行双酶切, 回收相应目的片段, 使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 将重组质粒命名为 pET-32a-S。将重组质粒转化至宿主菌 BL21 中, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 进行诱导, 每隔 1 h 取样 1 次, 共 6 次。将收集到的菌液 1 mL 于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 用 20 μ L 的 PBS 重悬后加入等量的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用于 SDS-PAGE 电泳分析。

1.7 表达 S 蛋白的纯化、定量及 Western-blot 分析

使用 Ni- Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化表达的 S 蛋白, 使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒进行定量分析。然后将纯化的 S 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到硝酸纤维素膜上, 与 PED 阳性鼠血清进行反应, 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (HRP-IgG 二抗), 采用 DAB 显色。

1.8 间接ELISA方法的建立

1.8.1 间接ELISA检测试验步骤 用抗原包被ELISA反应板,每孔100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,取出后使用PBST洗涤3次,每次静置3 min;再用含5%脱脂奶粉的PBS于37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,洗涤方法同前;加待检血清后于37 $^{\circ}\text{C}$ 放置1 h,洗涤;每孔加入100 μL 1:2 000稀释的HRP-IgG二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用1 h,洗涤;继而向每孔中加入100 μL 底物,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用15 min,加入50 μL 2 mol/L的 H_2SO_4 终止反应,在酶标仪上检测 OD_{450} 值。

1.8.2 间接ELISA中包被抗原、抗体最佳工作浓度的确定 采用方阵滴定法确定S蛋白包被浓度和待检血清的稀释度。用包被缓冲液将S蛋白稀释为0.006 4、0.003 2、0.001 6、0.000 8、0.000 4、0.000 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 共6个梯度进行包被,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$;PEDV阳性血清和阴性血清分别以1:25、1:50、1:100和1:200共4个稀释度进行测定,确定抗原和血清的最佳工作浓度。在确定S蛋白包被量和待检血清稀释倍数后,分别对二抗作1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000和1:5 000稀释,确定二抗最佳稀释倍数。

1.8.3 抗原包被条件和封闭液的确定 以测定的最适抗原浓度包被酶标板,采用方阵滴定法确定包被条件和封闭液。包被条件分为3组,第1组37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被;第2组37 $^{\circ}\text{C}$ 包被2 h;第3组4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。封闭液分为4组,第1组为1%的牛血清白蛋白;第2组为1%的明胶;第3组为5%的脱脂奶粉;第4组为10%的胎牛血清。用不同条件下包被好的酶标板以及不同的封闭液进行ELISA试验。比较各组阴、阳性血清的 OD_{450} 值和P/N值,以确定最佳包被条件和封闭液。

1.8.4 阳性临界值的确定 用已建立的间接ELISA方法检测30份背景清晰的PEDV阴性血清,为减小误差,每份样品重复2次,依据统计学原理,当 $\text{OD}_{450} > \bar{X} + 3SD$ 时,可以在99.9%的水平上判定为阳性。

1.8.5 重复性试验 取10份血清,用同批包被的酶标板在不同时间点进行3次检测,根据 OD_{450} 值判定批内重复性;再用不同批包被的酶标板进行3次检测,根据 OD_{450} 值判定批间重复性。

1.8.6 特异性试验 以PED阴、阳性血清作对照,应用建立的ELISA方法对猪瘟(CSF)、猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)、猪圆环病毒病(PCVD)、猪传染性胃肠炎(TGE)和乙型脑炎(JE)阳性血清进行检测,确定其特异性。

1.8.7 比较试验 应用建立的间接ELISA方法和深圳芬德生物技术有限公司生产的猪流行性腹泻抗体诊断试剂盒,同时对46份临床血清样本进行检测,分析两者的符合率;另外,应用该方法及本校生物工程实验室已经建立并成功应用的N蛋白包被的ELISA方法(N-ELISA)同时检测279份临床血清样本,分析两者的符合率。

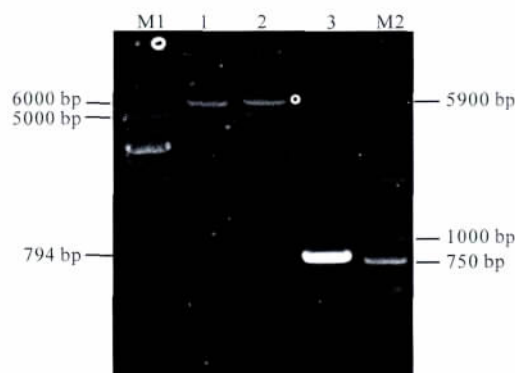
1.9 间接ELISA的临床初步应用

对采集于河南省不同地区23个养猪场的279份血清样本(母猪样本233份,育肥和保育猪样本46份)使用建立的ELISA方法进行检测,统计PED抗体阳性率。

2 结果与分析

2.1 PEDV S基因的PCR扩增及pET-32a-S重组质粒构建

通过RT-PCR方法扩增出794 bp的S基因片段,连接至pET-32a原核表达质粒。对重组质粒pET-32a-S进行双酶切鉴定和PCR鉴定,双酶切后在5 900 bp和794 bp处有2条带,PCR鉴定发现在794 bp处有1条带(图1),表明重组质粒构建成功。



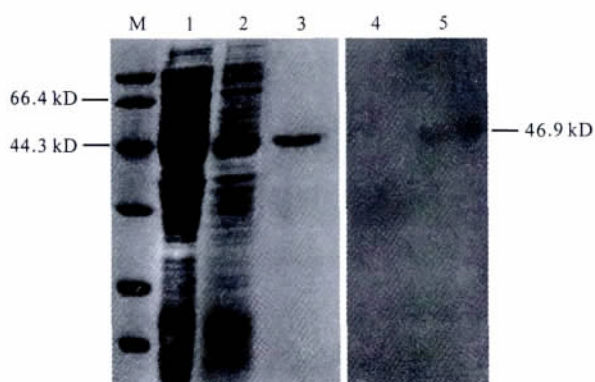
M1. Wide Range DNA Marker (500—12 000); M2. DL2000 DNA Marker; 1. pET-32a (+)空质粒对照; 2. pET-32a-S重组质粒双酶切鉴定(*Bam*H I/*Xho* I); 3. pET-32a-S重组质粒的PCR鉴定

图1 重组质粒pET-32a-S的酶切鉴定和PCR鉴定

2.2 表达产物SDS-PAGE及Western-blot分析

经SDS-PAGE电泳分析,重组质粒在*E. coli* BL21中通过融合蛋白的形式表达,其相对分子质量约为46.9 kD,与预测大小相符。对最佳诱导时间进行摸索,确定最佳诱导时间为4 h。使用Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒纯化目的蛋白,SDS-PAGE显示纯化后蛋白在46.9 kD处有单一一条带;使用Bradford蛋白质定量试剂盒对重组S蛋白进行定量,蛋白质量浓度为64 $\mu\text{g}/\text{mL}$;Western-

blot 分析显示,所表达蛋白与抗 PEDV 小鼠阳性血清反应良好(图 2)。



M. 低分子量蛋白 Marker; 1. 未经诱导的含重组质粒 BL21 菌; 2. 经诱导含重组质粒 BL21 菌; 3. 经 Ni 柱纯化的 S 重组蛋白; 4. Western - blot 空白对照; 5. 重组 S 蛋白纯化后 Western - blot 分析

图 2 PEDV S 蛋白的表达、纯化及 Western - blot 分析

2.3 间接 ELISA 反应条件的优化

方阵滴定结果显示,当 S 蛋白的包被量为 0.04 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 、待检血清的稀释倍数为 1 : 100 时,阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0,且 P/N 值最大(表 1)。在确定 S 蛋白包被浓度和待检血清稀释倍数后,对二抗浓度进行摸索,确定二抗的最佳稀释倍数为 1 : 2 000。确定上述条件后,使用方阵滴定法对包被条件和封闭液进行确定,选择 P/N 值高的一组作为最佳包被条件和封闭液,故包被条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h 后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,封闭液选择 5% 的脱脂奶粉。

2.4 间接 ELISA 阳性临界值的确定

计算 30 份阴性血清 OD_{450} 的平均值(\bar{X}) = 0.138 7,标准方差(SD) = 0.030 0。根据公式,阴性血清临界值 = $\bar{X} + 3SD$,得出临界值为 0.228 7。为了便于判定结果,确定样本 $\text{OD}_{450} \geq 0.24$ 时,判为阳性,否则判为阴性。

表 1 方阵滴定法确定间接 ELISA 最佳抗原包被浓度及待检血清稀释倍数检测结果

抗原包被量/ ($\mu\text{g}/\text{孔}$)	阳性血清稀释倍数				阴性血清稀释倍数			
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200
0.64	3.620 2	3.166 7	1.535 9	0.901 8	0.197 5	0.161 9	0.146 3	0.132 3
0.32	3.482 2	2.921 6	1.533 4	0.899 1	0.148 0	0.176 0	0.155 9	0.136 1
0.16	3.141 3	2.867 2	1.384 8	0.817 9	0.172 5	0.133 9	0.142 9	0.131 1
0.08	3.320 8	2.940 9	1.108 7	0.851 9	0.164 7	0.132 8	0.161 8	0.121 8
0.04	3.177 5	2.781 4	1.088 2	0.780 2	0.141 8	0.128 4	0.133 7	0.129 1
0.02	3.085 7	2.719 3	1.052 1	0.636 8	0.171 3	0.138 1	0.144 4	0.138 1

2.5 重复性试验结果

用同一批包被的酶标板,在不同时间对 10 份血清样本进行 3 次检测取平均值,结果显示,批内重复试验变异系数为 0.68%~3.65%;用在不同时间 3 次包被的酶标板,同时检测 10 份血清样本取平均值,结果显示,批间重复试验变异系数为 1.24%~7.37%。

2.6 特异性试验结果

应用本研究建立的间接 ELISA 方法,仅在检测 PED 阳性血清时呈阳性反应,而与 CSF、PRRS、PCVD、TGE 和 JE 阳性血清呈阴性反应,表明建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的特异性。

2.7 比较试验结果

分别用本试验建立的间接 ELISA 方法和商品化猪流行性腹泻抗体诊断试剂盒对 46 份临床血清样品进行检测发现,2 种方法同时检测为 PEDV 抗体阳性样本 43 份,同时为 PEDV 抗体阴性样本 2 份,两者的符合度为 97.8%[(43+2)/46];另外,使用本试验建立的间接 ELISA 方法和本实验室已建立并成功应用的 N - ELISA 方法对 279 份临床血清样本进行检测发现,2 种方法同时检测为 PEDV

抗体阳性样本 251 份,同时为 PEDV 抗体阴性样本 19 份,两者的符合度为 96.8%[(251+19)/279]。

2.8 临床血清样本检测结果

根据试验确定的 ELISA 最佳工作条件,对采自河南省不同地区 23 个猪场的 279 份血清样本进行检测,结果显示,母猪血清样本 PED 抗体阳性率为 97.42%(227/233);育肥和保育猪血清样本阳性率为 71.74%(33/46)。

3 讨论

Chang 等^[17]报道,PEDV S 蛋白存在中和抗原表位(COE),Brl/87 株的 COE 基因为 S 基因序列的 1 495—1 914 bp;而韩国 PEDV 株的 COE 基因为 S 基因序列的 1 504—1 923 bp^[18]。本试验对 CH/ZM-DZY/11 株 S 基因全长进行了 B 细胞抗原位点预测,结合上述文献报道的 S 基因 S - COE 区所处位置,成功扩增了 PEDV 河南流行毒株 CH/ZMDZY/11 株 S 基因的 1 105—1 884 bp 片段(包括 COE 区的大部分区域),构建了 pET - 32a - S 重组表达质粒并进行诱导表达。纯化后的 S 蛋白具有良好的反应原性,可以

作为诊断抗原用于 PED 抗体的检测。

本试验以纯化的 PEDV S 重组蛋白作为包被抗原,建立了检测 PED 抗体的间接 ELISA 方法,同时使用商品化猪流行性腹泻抗体诊断试剂盒,检测 46 份临床血清样品,两者阳性符合度为 97.8%。另外,使用本试验建立的间接 ELISA 方法和本实验室已建立并成功应用的 N-ELISA 方法的符合度为 96.8%。以上结果表明,本试验所建立的方法准确性较高,且与本实验室建立的 N-ELISA 相比具有更好的灵敏性。特异性试验结果显示,所建立的方法仅在检测 PED 阳性血清时呈阳性反应,而不与其他常见的猪病毒性疾病阳性血清反应,表明所建立的 ELISA 方法特异性良好;重复性试验结果显示,批内重复试验变异系数为 0.68%~3.65%,批间重复试验变异系数为 1.24%~7.37%,表明所建立的 ELISA 方法重复性良好。

另外,为了解河南省猪群中 PED 抗体水平,应用该方法对采自河南省不同地区 23 个养猪场的 279 份血清样本进行检测,结果显示,母猪血清样本 PED 抗体阳性率为 97.42%;育肥和保育猪血清样本阳性率为 71.74%,说明在河南省不同年龄段猪群中普遍存在 PED 抗体。

本试验建立了间接 ELISA 方法测定抗 S 蛋白抗体效价,以期用于评价疫苗效力及免疫效果,为猪流行性腹泻疫苗研制及免疫程序制定与优化提供参考。

参考文献:

- [1] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777[J]. Am J Vet Res, 1980, 41(2): 219-223.
- [2] Pensaert M B, DeBouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Arch Virol, 1978, 58(3): 243-247.
- [3] Pritchard G C, Paton D J, Wibberley G, et al. Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain[J]. Vet Rec, 1999, 144(22): 616-618.
- [4] Takahashi K, Okada K, Oshima K. An outbreak of swine diarrhea of a new type associated with coronavirus-like particles in Japan[J]. Jpn J Vet Sci, 1983, 45(6): 829-832.
- [5] Park S J, Kim H K, Song D S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea[J]. Arch Virol, 2011, 156(4): 577-585.
- [6] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(1): 161-163.
- [7] Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(7): 1112-1115.
- [8] Hofmann M, Wyler R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2235-2239.
- [9] Hofmann M, Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera[J]. Vet Microbiol, 1990, 21(3): 263-273.
- [10] Callbaut P, DeBouck P, Pensaert M. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea[J]. Vet Microbiol, 1982, 7(4): 295-306.
- [11] Carvajal A, Diego R, Lanza I, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies[J]. J Vet Diagn Invest, 1995, 7(1): 60-64.
- [12] Kweon C H, Kwon B J, Kang Y B, et al. Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea[J]. Kor J Vet Res, 1994, 33: 249-254.
- [13] Knuchel M, Ackermann M, Muler H K, et al. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein[J]. Vet Microbiol, 1992, 32(2): 117-134.
- [14] Hou X L, Yu L Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies[J]. Vet Microbiol, 2007, 123(1/3): 86-92.
- [15] 韦显凯, 侯继波, 姜平. 表达猪流行性腹泻病毒 S 基因片段重组腺病毒的构建与免疫特性[J]. 中国兽医学报, 2008, 10(28): 1128-1132.
- [16] 董丽娜, 高凤山, 许崇波, 等. 表达猪流行性腹泻病毒 COE 基因的重组乳酸菌的构建与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(12): 1743-1747.
- [17] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 295-299.
- [18] Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(2): 378-383.