

一种基于截短 N 蛋白的猪丁型冠状病毒抗体 ELISA 检测方法的建立

王东升¹, 于瑞明¹, 张莉萍², 白英杰², 刘霞¹, 王永录², 杜晓华^{1*},
 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

王东升, 于瑞明, 张莉萍, 白英杰, 刘霞, 王永录, 杜晓华, 刘新生. 一种基于截短 N 蛋白的猪丁型冠状病毒抗体 ELISA 检测方法的建立[J]. 生物工程学报, 2025, 41(7): 2760-2773.

WANG Dongsheng, YU Ruiming, ZHANG Liping, BAI Yingjie, LIU Xia, WANG Yonglu, DU Xiaohua, LIU Xinsheng. A truncated N protein-based ELISA method for the detection of antibodies against porcine deltacoronavirus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(7): 2760-2773.

摘要: 为了建立一种猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)抗体检测方法, 将 PDCoV CH/XJYN/2016 毒株 N 基因序列插入原核表达质粒载体 pColdII 中, 表达重组蛋白 PDCoV-N1 和 PDCoV-N2, 经 SDS-PAGE 分析和 Ni⁺-NTA 纯化后, 检测重组原核蛋白 PDCoV-N1 和 PDCoV-N2 与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)阳性血清的反应原性和特异性。同时对重组真核蛋白 PDCoV-N1 和 PDCoV-N2 进行 Western blotting 和间接免疫荧光实验验证分析。最后使用重组原核蛋白 PDCoV-N2 建立间接 ELISA 方法, 优化反应条件, 检测敏感性、特异性及重复性, 并对 102 份临床血清进行了检测。重组原核蛋白 PDCoV-N2 与 PEDV 抗血清交叉反应较低。以 PDCoV-N2 蛋白制备的间接 ELISA 方法的最优条件为: 抗原包被浓度 1.25 μg/mL, 37 °C 包被 1 h, BSA 封闭液 4 °C 过夜, 血清最佳稀释浓度 1:50, 37 °C 孵育 1 h, 酶标二抗最佳稀释比例为 1:80 000, 37 °C 孵育 1 h, 加入四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色液 37 °C 反应 10 min。待检样品的 S/P 值(样本值-阴性对照值)/(阳性对照值-阴性对照值)≥0.45 为阳性, S/P 值≤0.38 为阴性, S/P 值介于 0.45 和 0.38 之间, 则为可疑。检测猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis of swine, TGEV)、口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)、非洲猪瘟病毒(african swine fever virus, ASFV)阳性血清, 结果显示, 其他冠状病毒的 S/P 值均小于 0.38, 表明其具有良好的特异性; PDCoV 抗血清 800 倍稀释后仍为阳性; 批间和批内重复性实验结果显示, 本方法变异系数均小于 10%; 临床血清样本检测结果显示, 该方法与中和实验的符合率为 94.12%。本研究基于截短的 PDCoV N 蛋白, 建立了能够检测抗 PDCoV 特异性 IgG

资助项目: 甘肃省科技重大专项(23ZDNA007)

This work was supported by the Gansu Provincial Science and Technology Major Project (23ZDNA007).

*Corresponding authors. E-mail: DU Xiaohua, duxh@gasu.edu.cn; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2024-11-02; Accepted: 2025-02-25; Published online: 2025-02-26

抗体的 ELISA 方法，且该方法敏感、特异、稳定、重复性好，为 PDCoV 的临床诊断提供了新的方法。

关键词：猪 δ 冠状病毒；截短 N 蛋白；IgG 抗体；间接 ELISA

A truncated N protein-based ELISA method for the detection of antibodies against porcine deltacoronavirus

WANG Dongsheng¹, YU Ruiming¹, ZHANG Liping², BAI Yingjie², LIU Xia¹, WANG Yonglu², DU Xiaohua^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: This study aims to establish an antibody detection method for porcine deltacoronavirus (PDCoV). The recombinant proteins PDCoV-N1 and PDCoV-N2 were expressed via the prokaryotic plasmid pColdII harboring the N gene sequence of the PDCoV strain CH/XJYN/2016. The reactivity and specificity of PDCoV-N1 and PDCoV-N2 with anti-PEDV sera were analyzed after the recombinant proteins were analyzed by SDS-PAGE and purified by the Ni-NTA Superflow Cartridge. Meanwhile, Western blotting and indirect immunofluorescence assay were carried out separately to validate the recombinant proteins PDCoV-N1 and PDCoV-N2. Finally, we established an indirect ELISA method based on the recombinant protein PDCoV-N2 after optimizing the conditions and tested the sensitivity, specificity, and reproducibility of the method. Then, the established method was employed to examine 102 clinical serum samples. The recombinant protein PDCoV-N2 showed low cross-reactivity with anti-PEDV sera. The optimal conditions of the indirect ELISA method based on PDCoV-N2 were as follows: the antigen coating concentration of 1.25 μg/mL and coating at 37 °C for 1 h; blocking by BSA overnight at 4 °C; serum sample dilution at 1:50 and incubation at 37 °C for 1 h; secondary antibody dilution at 1:80 000 and incubation at 37 °C for 1 h; color development with TMB chromogenic solution at 37 °C for 10 min. The S/P value ≥ 0.45, ≤ 0.38, and between 0.45 and 0.38 indicated that the test sample was positive, negative, and suspicious, respectively. The testing results of the antisera against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine circovirus 2 (PCV2), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), foot-and-mouth disease virus (FMDV), and African swine fever virus (ASFV) showed that the S/P values were all less than 0.38. The testing results of the 800-fold diluted anti-PDCoV sera were still positive. The results of the inter- and intra-batch tests showed that the coefficients of variation of this method were less than 10%. Clinical serum sample test results showed the coincidence rate between this method and neutralization test was 94.12%. In this study, an ELISA method for the detection of anti-PDCoV antibodies was successfully established based on the truncated N protein of PDCoV. This method is sensitive, specific, stable, and reproducible, serving as a new method for the clinical diagnosis of PDCoV.

Keywords: porcine deltacoronavirus; truncated N protein; IgG antibodies; indirect ELISA

猪丁型冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新发猪肠道冠状病毒,其临床特征与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)相似。生长猪、成年猪以及生产母猪感染 PDCoV 后发病较轻,而哺乳仔猪(尤其是 7 日龄内的哺乳仔猪)感染后,会出现呕吐、腹泻等严重的临床症状直至脱水死亡^[1-2]。2012 年 Woo 等^[3]在中国香港特别行政区首次发现了 PDCoV,随后 PDCoV 于 2014 年在美国多个州的猪场暴发^[4-6],研究者首次在腹泻仔猪肠道内容物和猪肾上皮细胞(lilly laboratories cell-porcine kidney 1, LLC-PK1)细胞中分离出 PDCoV OH-FD22 株^[7]。此后,又有许多国家包括老挝、越南、日本、加拿大、韩国、泰国等都相继报道了 PDCoV 的感染病例^[8-13]。近年来,我国多个省份均出现 PDCoV 的病例并呈逐年增长的趋势,并且 PDCoV 与其他猪肠道病原共感染的现象普遍发生^[14],给我国养猪业造成了严重的经济损失^[15]。此外,PDCoV 还可以感染犊牛和家禽,并且能够在鸡、火鸡中引起腹泻症状^[16-18]。体外实验证实,PDCoV 也可感染人源细胞^[19]。2021 年,研究人员在 3 名急性发热疾病儿童的血液中检测出来源于北美和中国的 PDCoV 核酸序列^[20]。综上所述,PDCoV 是一种高风险新型猪冠状病毒,且对人类的健康和公共卫生安全具有潜在的威胁性。

PDCoV 是冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(*Coronavirus*)成员^[21-23],为单股正链 RNA 病毒,病毒粒子呈球形,大小约 100 nm^[24]。PDCoV 基因组全长约为 25.4 kb^[3],编码 4 种结构蛋白:纤突蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)、小包膜蛋白(envelope, E)以及衣壳蛋白(nucleocapsid, N)^[25]。基因组构成为:5'非翻译区(untranslated region, UTR)-2 个重叠的开放阅读框(open reading frame, ORF) ORF1a 和 ORF1b-S-E-M-非结构蛋白 6 (nonstructural protein 6, NS6)-N-NS7-3'UTR^[26,14]。其中,ORF1a/1b 编码的 2 个多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 被蛋白酶切割成

14-16 种非结构蛋白,参与转录和复制^[27]。S 蛋白负责病毒与细胞受体结合,介导病毒入侵和感染,同时,由于 S 蛋白能够诱导机体产生中和性抗体,可作为研制 PDCoV 疫苗的重要靶标^[28-30]。M 蛋白可用于 PDCoV 的检测诊断^[31],M 基因和 N 基因之间的 NS6 基因与病毒的复制和毒力相关^[32],并具有拮抗干扰素的功能^[33]。核衣壳蛋白是由 N 基因编码的一个约 42 kDa 的蛋白,是一种磷酸化蛋白,主要定位于细胞核,通过自身非共价交联形成寡聚体,与病毒的组装、复制以及感染后的细胞应激反应密切相关^[34]。N 基因序列在不同 PDCoV 毒株中十分保守,并且具有较强的免疫原性,是重要的病毒粒子组成成分^[35-36],在病毒入侵宿主细胞后,N 蛋白大量表达,引起宿主强烈的免疫反应并产生大量的 N 蛋白抗体,因此,N 蛋白可作为 PDCoV 免疫学诊断的重要靶标。但有研究表明,N 蛋白在不同猪冠状病毒之间存在血清学交叉反应^[37],这使得以全长 N 蛋白建立的检测方法容易出现假阳性。目前猪场中主要的猪腹泻病毒是 PEDV (19.6%–56.1%)、PDCoV (2.1%–36.2%)、猪轮状病毒感染 (porcine rotavirus infection, PoRVA) (8.2%–17.6%)、猪传染性肠胃炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGEV) (2.3%–5.8%)^[38-39],虽然引起猪腹泻死亡的大多数是单一病毒,但近年来的研究发现,混合病毒感染导致猪腹泻也越来越常见,尤其是 PEDV 和 PDCoV 的混合感染导致猪的腹泻死亡率为 69.23%^[40]。因此建立一种能够避免 PDCoV 假阳性的检测方法至关重要。

本研究以前期分离的 PDCoV 国内强毒株为亲本,通过 PDCoV 和 PEDV 的 N 蛋白二维结构预测并按照 IEBD 抗原表位在线分析软件将 N 基因截短为 *PDCoV-N1* (1–496 nt) 和 *PDCoV-N2* (495–1 029 nt) 并进行真核和原核表达及 Ni⁺-NTA 纯化分析,通过 SDS-PAGE、Western blotting 和间接免疫荧光(immunofluorescence assay, IFA) 检测,以截短后的重组

pColdII-PDCoV-N2 蛋白建立一种能够检测 PDCoV 抗体的间接 ELISA 方法。

1 材料与方法

1.1 毒株、细胞、质粒

PDCoV CH/XJYN/2016 毒株(GenBank 登录号: WIM33511)由本实验室分离保存, LLC-PK1 细胞(CL-101)购自 ATCC, 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 由金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态均购自宝日医药技术有限公司; 反转录酶 AMV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶、BamH I 和 Hind III 限制性内切酶购自 NEB 公司; 质粒小提试剂盒购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司; 琼脂糖 DNA 纯化回收试剂盒购自 Omega 生物技术有限公司; MEM 培养基、胎牛血清购自英潍捷基贸易有限公司; 小鼠抗 His 标签抗体购自 Abmart 公司。

1.3 重组原核质粒 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 的构建及验证

1.3.1 引物的设计与合成

参照 NCBI 中 CH/XJYN/2016 毒株 N 基因序列(GenBank 登录号: OQ185376.1), 将 N 基因序列截短为 PDCoV-N1 (1~496 nt) 和 PDCoV-N2 (495~1 029 nt)。利用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增 PDCoV-N1 的引物。pdNC-F496: ATGGATCCACAGGCAATCAGGCCAGGAAA CGC (BamH I 酶切位点用下划线标示) 以及 pdNC-R: ATAAGCTTCGCTGCTGATTCTGCT TTATCTC (Hind III 酶切位点用下划线标示); 扩增 PDCoV-N2 基因的引物, pdN495-NN: ATGGATCCATGGCCGCACCAGTAGTCCCTA CT (BamH I 酶切位点用下划线标示) 以及 pdNN-R: ATAAGCTTCTAGCCTCTGGAGTTA ACAGATTGAGATC (Hind III 酶切位点用下划

线标示), 引物由生工生物科技有限公司合成。

1.3.2 重组质粒的构建

提取病毒 RNA, 以反转录获得的 cDNA 为模板, 使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 进行 PCR 扩增获得 PDCoV-N1 和 PDCoV-N2 基因。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收。将回收产物用 BamH I 和 Hind III 双酶切处理并插入 pColdII 载体中, 经转化、涂布后挑取单克隆菌落摇菌, 提取重组质粒, 质粒经酶切验证后, 送至生工生物科技有限公司测序。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 获得重组表达菌株, 以 1:100 比例扩大摇菌 4 h, $OD_{600}=0.4\text{--}0.6$ 时加入浓度为 1 mmol/L 的 IPTG。16 °C、170 r/min 诱导 24 h 收集菌体并超声破碎。利用 Ni⁺-NTA 亲和层析纯化 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 重组蛋白。

1.3.4 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

将纯化的 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 随后转印到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上进行 Western blotting, 分别以背景清晰的猪抗 PDCoV 血清(1:500)和猪抗 PEDV 血清(1:500)为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗猪 IgG (1:10 000)为二抗, 鉴定重组蛋白的反应原性和特异性。

1.3.5 间接免疫荧光实验

利用 Lipo8000TM 转染试剂(Beyotime)将 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 重组质粒转染到细胞密度为 70%~80% 的 LLC-PK1 细胞中, 24 h 后一部分细胞收取细胞样品进行 Western blotting, 另一部分进行细胞固定, 分别以猪 PDCoV 的阴、阳性血清(1:1 000)以及猪 PEDV 的阴、阳性血清为一抗, 以荧光标记的山羊抗猪 IgG (1:10 000)为二抗分析鉴定

重组蛋白的反应原性和特异性。

1.4 ELISA 方法的建立

1.4.1 ELISA 条件的优化

采用棋盘滴定法筛选 ELISA 方法的最优条件, 对抗原包被浓度(5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.10625、0.05 和 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阴性血清稀释比例(1:50、1:100、1:150、1:200、1:400、1:800)、猪 IgG 抗体稀释比例(1:10 000、1:20 000、1:40 000、1:80 000)、抗原包被条件(37°C 1 h、 37°C 2 h、 4°C 12 h)、封闭液(5%脱脂奶粉、BSA 封闭液、酶标板稳定剂)、封闭时间(37°C 1 h、 37°C 2 h、 4°C 12 h)、血清反应时间(37°C 分别反应 30、60、120 min)、血清稀释液(PBST+5% FBS+0.1% Triton X-100, PBS+5% FBS+0.1% Triton X-100, PBS+5% FBS)、酶标抗体稀释液(PBST+5% FBS+0.1% Triton X-100, PBS+5% FBS+0.1% Triton X-100, PBS+5% FBS)和二抗反应时间(37°C 分别反应 30、60、120 min)等条件进行优化, 选定阴阳比值较大且在合理范围内的最佳反应条件为 ELISA 方法的最优条件。

1.4.2 ELISA 临界值的确定

以确定好的 ELISA 方法最优条件对 20 份 PDCoV 猪阴性血清进行检测, 每份样品重复 2 次。测定血清的 OD_{450} 读值, 计算 S/P 值, $S/P = (\text{样品血清 } OD_{450} \text{ 值} - \text{阴性对照血清 } OD_{450} \text{ 值}) / (\text{阳性对照血清 } OD_{450} \text{ 值} - \text{阴性对照血清 } OD_{450} \text{ 值})$ 。计算 20 份血清 S/P 值的平均值(mean)及标准差(SD)。当 S/P 值 $\geq mean + 3SD$ 时为阳性, 当 S/P 值 $\leq mean + 2SD$ 时为阴性。

1.4.3 特异性实验

以确定好的 ELISA 方法的最优条件对猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)、非洲猪瘟病毒(african swine fever virus, ASFV)阳性血清进行特异性检测。

1.4.4 敏感性实验

利用建立的间接 ELISA 方法进行敏感性实验, 将抗 PDCoV 血清从 1:50 稀释到 1:2 000,

测定 OD_{450} , 分析敏感性。

1.4.5 重复性实验

批内重复性实验: 使用 pColdII-PDCoV-N2 蛋白进行包被, 选取中和反应检测和依据 PDCoV S1 蛋白建立的间接 ELISA 方法检测的背景清晰的 PDCoV 的 3 份阳性血清和 3 份阴性血清进行 ELISA 检测, 读取 OD_{450} , 计算批内变异系数。

批间重复性实验: 在不同时间使用 pColdII-PDCoV-N2 蛋白进行包被, 对 6 份血清进行检测, 计算批间变异系数。

1.4.6 符合性实验

利用建立的间接 ELISA 方法对 PDCoV N、pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 间接 ELISA 方法对通过中和反应检测和依据 PDCoV S1 蛋白建立的间接 ELISA 方法检测的 80 份背景清晰的猪 PDCoV 阳性血清和 64 份背景清晰的猪 PDCoV 阴性血清进行检测对比。

1.5 pColdII-PDCoV-N2 ELISA 检测方法的应用

利用建立的 ELISA 方法对从猪场采集的 102 份猪血清进行检测, 并通过中和实验和基于 PDCoV S1 蛋白建立的间接 ELISA 方法检测, 比较检测结果。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建及验证

PCR 扩增出 PDCoV-N1 和 PDCoV-N2 基因, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在约 496 bp 和 534 bp 处可见条带, 与预期大小一致。重组质粒 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后在 1%琼脂糖凝胶中分离得到 496、534、5 422 bp 大小的条带, 表明重组质粒 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 构建成功。

2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示, 重组 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 蛋白在上清中表达, 大小分别约为 20 kDa 和 25 kDa, 与预期大小一致。

(图 1A)。使用 $\text{Ni}^{+}\text{-NTA}$ 纯化获得重组蛋白 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2(图 1B)。

2.3 重组蛋白的 Western blotting 分析

Western blotting 结果表明重组 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 原核蛋白表达成功, 其大小分别约为 20 kDa 和 25 kDa(图 2A)。使用 PEDV 的阳性血清检测重组

pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 原核蛋白, 其结果如图 2 所示, pColdII-PDCoV-N1 和抗 PEDV 阳性血清能够特异性识别, 而 pColdII-PDCoV-N2 不能被特异性识别(图 2B)。

利用 HA 标签抗体检测重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 真核蛋白能够在 LLC-PK1 细胞中表达, 大小分别约为

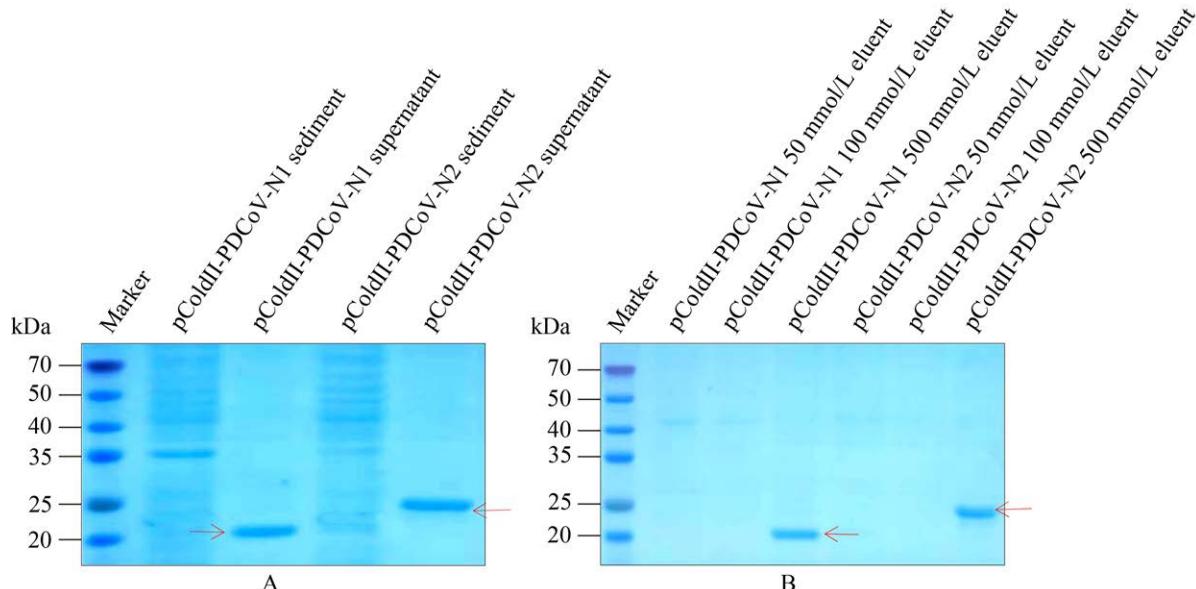


图 1 SDS-PAGE 鉴定 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 重组蛋白

Figure 1 SDS-PAGE identification of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2 recombinant proteins. A: Prokaryotic expression of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2 recombinant proteins. B: pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2 expression purification.

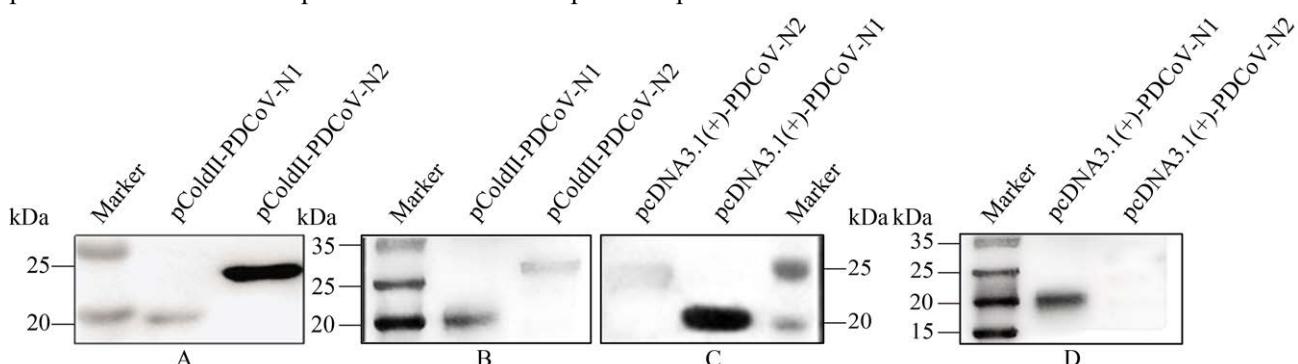


图 2 Western blotting 鉴定 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 的表达以及与 PEDV 阳性血清的交叉反应

Figure 2 Western blotting to characterize the expression of pCold II-PDCoV-N1 and pCold II-PDCoV-N2 and cross-reactivity with PEDV-positive sera. A: Validation of prokaryotic expression of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2. B: Characterization of cross-reactivity of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2 prokaryotic proteins with PEDV. C: Validation of eukaryotic expression of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2. D: Characterization of the cross-reactivity of pColdII-PDCoV-N1 and pColdII-PDCoV-N2 eukaryotic proteins with PEDV.

20 kDa 和 25 kDa (图 2C)。通过 PEDV 的阳性血清检测重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 真核蛋白的交叉反应，结果与原核蛋白一致，pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 PEDV 阳性血清能够被特异性识别，pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 不能被特异性识别(图 2D)。

2.4 重组蛋白的 IFA 分析

IFA 分析结果表明，重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N、pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 蛋白均能被抗 PDCoV 血清识别，但重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 蛋白基本不识别抗 PEDV 阳性血清。PEDV 和 PDCoV 的阴性血清均不能被重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N、pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 真核蛋白识别(图 3)。

对重组原核蛋白 pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 的 Western blotting 验证结果表明，pColdII-PDCoV-N2 重组蛋白和抗 PEDV 阳性血清的交叉反应低于 pColdII-PDCoV-N1 重组蛋白。进一步在 LLC-PK1 细胞中进行真核重组蛋白 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 和 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 的表达，IFA 和 Western blotting 验

证表明真核蛋白与原核蛋白结果一致，即 pColdII-PDCoV-N2 和 PEDV 交叉反应性低。因此，可以利用重组 pColdII-PDCoV-N2 蛋白建立间接 ELISA 方法。

2.5 ELISA 反应条件优化

利用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)包被重组 pColdII-PDCoV-N2 蛋白，将抗 PDCoV 阴性血清 1:100 稀释，其阳性血清 OD_{450} 值为 P，阴性血清 OD_{450} 值为 N，通过比较其 P/N 值，可得最佳包被浓度为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最佳包被时间为 37 °C 1 h；最佳封闭液配比为：6 g/L BSA+40 g/L 蔗糖+10 g/L 胰蛋白胨；最佳封闭时间为 4 °C 孵育过夜(15–18 h)；最佳血清稀释液为 PBS+5% FBS+0.1% Triton X-100。通过棋盘法确定血清稀释度为 1:50，最佳血清孵育时间为 37 °C 60 min，猪 IgG 二抗稀释度为 1:80 000，最佳酶标抗体稀释液为：PBS+5% FBS+0.1% Triton X-100+抗体，最佳酶标抗体孵育时间为 37 °C 60 min，最佳显色时间为 37 °C 10 min。

2.6 间接 ELISA 的临界值

计算 20 份血清 S/P 值的平均值(mean)及标准差(SD)。阴性血清的平均值为 mean=0.242 942 5，

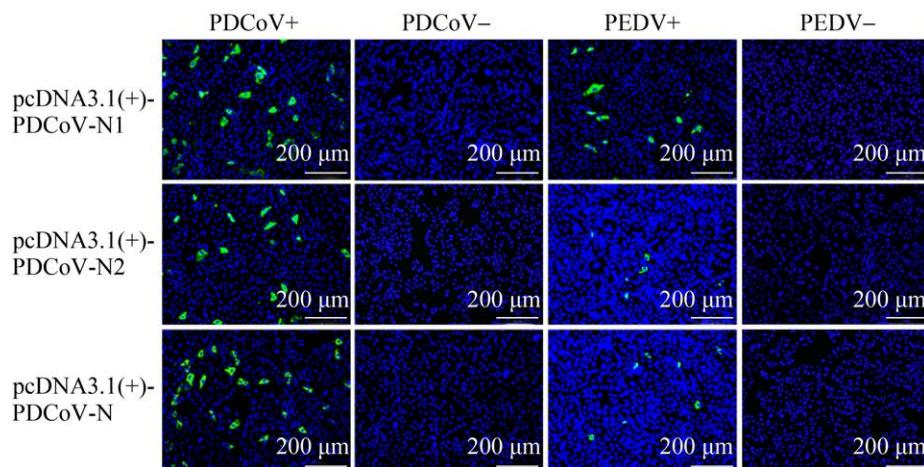


图3 IFA 鉴定 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N 蛋白和重组 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 以及 pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 真核蛋白的特异性和反应原性

Figure 3 IFA identification of specificity and reactogenicity of pcDNA3.1(+)-PDCoV-N protein and recombinant pcDNA3.1(+)-PDCoV-N1 and pcDNA3.1(+)-PDCoV-N2 eukaryotic proteins. PDCoV+: Anti-PDCoV sera; PDCoV-: Negative sera; PEDV+: Anti-PEDV sera; PEDV-: Negative sera.

标准方差为 $SD=0.069\ 276\ 527$, 则 $mean+3SD=0.45$, $mean+2SD=0.38$, 即当 S/P 值 $\geq 0.450\ 772\ 081$ 时, 血清为阳性, 当 S/P 值 $\leq 0.381\ 495\ 554$ 时血清为阴性。当 S/P 值介于 0.45 和 0.38 之间, 则为可疑, 需重新检测(图 4)。

2.7 间接 ELISA 的特异性

对 FMDV、PCV2、PDCoV、PEDV、ASFV 和 TGEV 这 6 种阳性血清进行间接 ELISA 抗体检测, 除了 PDCoV 血清检测结果为阳性外, 其他结果均为阴性(表 1), 说明重组 pColdII-PDCoV-N2 蛋白的间接 ELISA 具有良好的特异性(图 5)。

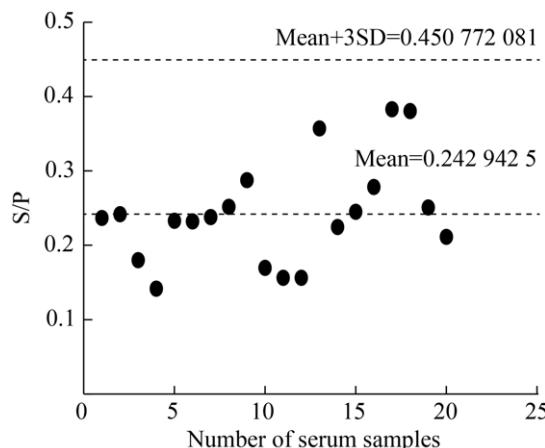


图 4 临界值的确定

Figure 4 Determination of critical values.

表 1 pColdII-PDCoV-N2 蛋白的特异性实验

Table 1 Specificity test for pCold II-PDCoV-N2 protein

Positive serum	OD_{450}	OD_{450}	OD_{450}	OD_{450}	S/P average
PDCoV	2.938	2.933	2.945	2.933	3.617
PEDV	0.222	0.212	0.233	0.222	0.007
PCV	0.242	0.226	0.239	0.236	0.025
TGEV	0.232	0.230	0.237	0.233	0.021
FMD	0.200	0.213	0.223	0.212	-0.007
ASF	0.229	0.212	0.227	0.223	0.008
Negative control	0.213	0.216	0.222	0.217	/
Positive control	0.961	0.987	0.957	0.968	/

2.8 间接 ELISA 的敏感性

将 3 份 PDCoV 阳性血清从 1:50 稀释到 1:2 000, 测定 OD_{450} , 当稀释度为 1:800 时, OD_{450} 的值低于临界值($S/P \geq 0.45$), 说明本研究建立的间接 ELISA 方法具有较高的敏感性(图 6)。

2.9 间接 ELISA 的重复性

统计学分析结果显示, 批间(表 2)和批内(表 3)的变异系数均小于 10%, 表明本研究建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的重复性。

2.10 PDCoV N、pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 间接 ELISA 方法对比

利用 PDCoV N、pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2 间接 ELISA 方法对实验室

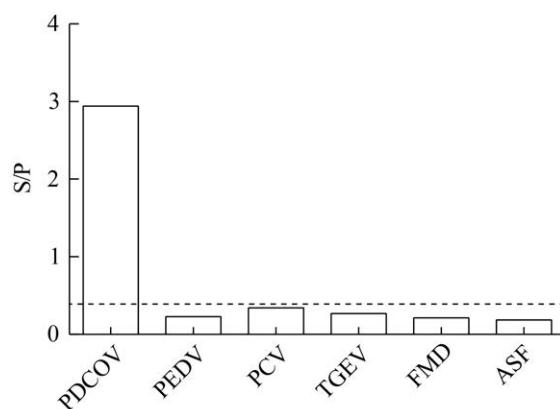


图 5 特异性检测

Figure 5 Specificity detection.

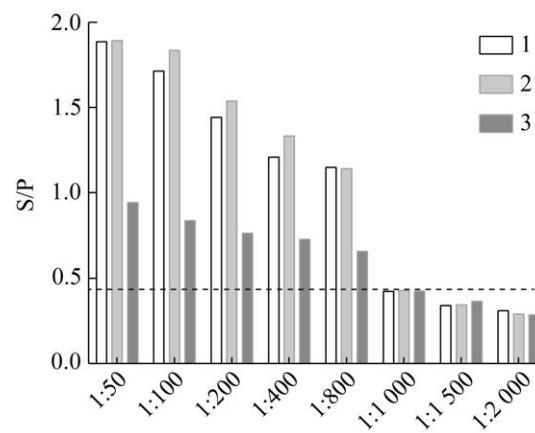


图 6 灵敏性实验

Figure 6 Sensitivity experiment.

保存的 80 份背景清晰的猪 PDCoV 阳性血清和 64 份背景清晰的猪 PDCoV 阴性血清进行检测, 结果表明, PDCoV N 蛋白的检出率为 72.97%, pColdII-PDCoV-N1 的检出率为 66.57%, pColdII-PDCoV-N2 的检出率为 92.35%。 pColdII-PDCoV-N2 间接 ELISA 的符合率比 PDCoV N 蛋白间接 ELISA 高 18.59%、假阳率低 26.6% (表 4)。

表 2 批间变异系数

Table 2 Coefficients of variation between inter-batches

	1	2	3	Average value	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
1	0.344	0.335	0.313	0.331	0.015 989 684	4.83
2	2.682	2.682	2.602	2.655	0.046 679 439	1.76
3	1.730	1.808	1.887	1.809	0.078 200 767	4.32
4	1.106	1.120	1.136	1.121	0.014 709 181	1.31
5	0.376	0.385	0.376	0.379	0.005 441 813	1.43
6	2.723	2.809	2.787	2.773	0.044 731 533	1.61
7	0.303	0.319	0.322	0.315	0.010 025 468	3.19
8	0.217	0.224	0.233	0.225	0.007 559 321	3.36

表 3 批内变异系数

Table 3 Coefficients of variation within intra-batches

	1	2	3	Average value	Standard deviation	Coefficient of variation (%)						
1	0.398	0.34	0.369	0.344	0.354	0.349	0.328	0.303	0.315	0.344	0.027	8.00
2	1.379	1.257	1.318	1.108	1.133	1.121	1.216	1.293	1.255	1.231	0.101	8.18
3	1.581	1.539	1.56	1.451	1.468	1.459	1.391	1.341	1.366	1.462	0.097	6.63
4	1.897	1.941	1.919	1.733	1.813	1.773	1.631	1.692	1.662	1.785	0.129	7.24
5	0.279	0.263	0.271	0.284	0.278	0.281	0.227	0.254	0.241	0.264	0.021	7.97
6	3.077	3.09	3.083	2.815	2.801	2.808	2.586	2.559	2.572	2.821	0.256	9.07
7	0.209	0.227	0.218	0.234	0.289	0.261	0.212	0.292	0.252	0.244	0.023	9.33
8	0.303	0.317	0.311	0.299	0.291	0.295	0.26	0.275	0.268	0.291	0.022	7.50

表 4 ELISA 检测方法的对比

Table 4 Application of the ELISA detection method

Item		+	-	Summation
PDCoV-N Indirect ELISA	+	58	17	75
	-	22	47	70
Summation		80	64	144
Coincidence		72.50%	73.44%	72.97%
pColdII-PDCoV-N1 Indirect ELISA	+	54	22	76
	-	26	42	68
Summation		80	64	144
Coincidence		67.50%	65.63%	66.57%
pColdII-PDCoV-N2 Indirect ELISA	+	74	5	79
	-	6	59	65
Summation		80	64	144
Coincidence		92.50%	92.19%	92.35%

2.11 ELISA 检测方法的应用

利用建立的 ELISA 方法对 102 份含有 PDCoV 的临床血清进行检测, 检测结果为: 阳性血清符合率为 95.83%, 阴性血清符合率为 92.59%, 总符合率为 94.12% (表 5)。相较于中和实验和依据 PDCoV S1 的间接 ELISA 方法, 本方法具有耗时短、敏感性强、特异性好且变异性较小的优点。

表 5 ELISA 检测方法的应用

Item	+	-	Summation
Indirect ELISA	46	4	58
	2	50	44
Summation	48	54	102
Coincidence%	95.83	92.59	94.12

3 讨论

PDCoV 是近年来新发的猪肠道冠状病毒, 临床特征与 TGEV^[41]、PEDV^[42]、重组 TGEV/PEDV 冠状病毒^[43]和猪急性腹泻综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SADS-CoV)^[44]等至少 4 种肠道致病性猪冠状病毒(porcine coronavirus, PoCoV)相似^[45]。上述猪肠道冠状病毒均可感染哺乳猪(尤其是 7 日龄内的哺乳仔猪), 通过感染绒毛肠细胞, 引起机体的萎缩性肠炎, 导致哺乳仔猪吸收不良、腹泻和死亡, 从而呈现出呕吐、腹泻等严重的临床症状, 甚至脱水死亡, 而生长猪、成年猪和生产母猪感染后的临床特征较轻^[1-2]。近年来, 越来越多的研究表明, PDCoV 和 PEDV 的共感染比单独感染的临床症状严重^[46-49], 且在肠道抗病毒免疫反应和炎性细胞因子表达的调节方面具有协同作用^[50]。2021–2023 年, 对我国南方 5 个省份的 213 个养猪场采集的 1 791 份腹泻样本进行分析表明, PDCoV 感染率较低, 为 8.77% (157/1791), PEDV 感染率较高, 为 38.86% (696/1791), 在 157 份 PDCoV 阳性样本中, 41 份(26.11%)同时感染了 PEDV^[51]。因此, 区分 PDCoV 和 PEDV 从而采取相对应的治疗成为现如今的研究重点之一。

N 蛋白在 PDCoV 毒株中高度保守, 其保守率约为 97.1%–100%^[18], PDCoV 感染宿主后, N 蛋白在宿主细胞中的表达量较多, 是最早刺激机体产生抗体的抗原蛋白^[32]。目前, 关于 PDCoV N 蛋白的检测方法较多。例如, 张帆帆等针对 PDCoV N 基因建立了 RT-PCR 和间接 ELISA 方法^[52-53]。闫瑞杰等对 PDCoV N 蛋白进

行原核表达并通过制备的多克隆抗体建立了 PDCoV 间接 ELISA 检测方法, 对河南省不同地区的 165 份血清进行检测, 发现各地样本中 PDCoV 的抗体阳性率平均为 53.94%, 表明 PDCoV 在猪场中广泛存在^[54]。付嘉钰等制备了关于 PDCoV N 蛋白的单克隆抗体, 并且将该单克隆抗体运用了免疫组化分析和流式细胞荧光分选技术检测^[55]。总之, 以 PDCoV N 蛋白作为靶标, 已经建立多个免疫组织化学分析和间接 ELISA 检测方法^[36,56-57]。相较于以上方法, 本研究通过对 PDCoV N 蛋白进行截短, 用 PEDV 阳性血清进行交叉验证, 从而确定具有较好特异性的截短蛋白, 并在此基础上建立了 ELISA 方法。

PDCoV 的 N 蛋白虽然是病毒早期就能够产生的高度保守的蛋白, 但正由于高度保守, 其和 PEDV 具有相似的结构域和交叉抗原表位^[58]。因此, 利用 PDCoV N 蛋白建立的间接 ELISA 方法对检测 PDCoV 和 PEDV 交叉血清的准确率具有一定的局限性。本研究为了提高其 ELISA 的检测符合率, 将 PDCoV 的 N 蛋白进行截短表达(pColdII-PDCoV-N1 和 pColdII-PDCoV-N2), 并利用免疫印迹和 IFA 鉴定分析发现, pColdII-PDCoV-N2 具有良好的反应原性和特异性, 因此本研究利用截短后的 pColdII-PDCoV-N2 蛋白建立了间接 ELISA 方法, 并检测了本实验室保存的 102 份猪血清样本, 总符合率为 92.35%, 而利用 PDCoV N 蛋白包被的 ELISA 方法进行检测, 符合率仅为 72.97%, 证明本研究建立的 ELISA 方法具有较好的可靠性和更高的符合率。在批间和批内重复性实验中, 本研究建立的 ELISA 方法的变异系数均小于 10%。

4 结论

本研究成功以和 PEDV 的交叉反应较低的 pColdII-PDCoV-N2 原核蛋白为基础, 建立了能够检测抗 PDCoV 特异性 IgG 抗体的间接 ELISA

检测方法，并进一步对该方法进行了优化，结果显示，该方法敏感、特异，能够为PDCoV的临床诊断提供新的支撑。本方法具有更好的稳定性、保守性，简单省时，且在病毒感染初期即可进行检测。

作者贡献声明

王东升：实验操作、数据收集与分析、初稿写作并修订；于瑞明：实验设计和实验操作、稿件润色修改；张莉萍：数据处理与结果分析、资料整理；白英杰：模型验证及验证实验结果的可靠性；刘霞：稿件修订、技术支持；王永录：协助撰写讨论部分和提供文献综述；杜晓华：监督指导、稿件润色修改、提供材料；刘新生：方案设计、提供经费。

作者利益冲突公开声明

所有作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 王先松, 郭世洪, 赵瑶, 张德志, 李前勇. 猪Delta冠状病毒病的诊断与防控研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(3): 79-82.
WANG XS, GUO SH, ZHAO Y, ZHANG DZ, LI QY. Research progress on diagnosis, prevention and control of Delta coronavirus disease in pigs[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(3): 79-82(in Chinese).
- [2] 刘德清, 王艳午, 孙思扬, 冯建远, 薛蓓蕾, 熊伟. 猪德尔塔冠状病毒实时荧光PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国动物传染病学报, 2022, 30(3): 127-132.
LIU DQ, WANG YW, SUN SY, FENG JY, XUE BL, XIONG W. Establishment and preliminary application of fluorescent PCR for detection of porcine delta coronavirus[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2022, 30(3): 127-132 (in Chinese).
- [3] WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. 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.
- [4] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. Porcine coronavirus HKU15 detected in 9 US states, 2014[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(9): 1594-1595.
- [5] HOMWONG N, JARVIS MC, LAM HC, DIAZ A, ROVIRA A, NELSON M, MARTHALER D. Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2016, 123: 168-174.
- [6] SINHA A, GAUGER P, ZHANG JQ, YOON KJ, HARMON K. PCR-based retrospective evaluation of diagnostic samples for emergence of porcine deltacoronavirus in US swine[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 179(3/4): 296-298.
- [7] HU H, JUNG K, VLASOVA AN, CHEPNGENO J, LU ZY, WANG QH, SAIF LJ. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(5): 1537-1548.
- [8] NIEDERWERDER MC, HESSE RA. 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.
- [9] ZHANG Y, CHENG Y, XING G, YU J, LIAO A, DU LY, LEI J, LIAN X, ZHOU JY, GU JY. Detection and spike gene characterization in porcine deltacoronavirus in China during 2016-2018[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 73: 151-158.
- [10] JANETANAKIT T, LUMYAI M, BUNPAPONG N, BOONYAPISITSOPA S, CHAIYAWONG S, NONTABENJAWAN N, KESDAENGSAKONWUT S, AMONSIN A. Porcine deltacoronavirus, Thailand, 2015[J]. Emerging Infectious Diseases, 2016, 22(4): 757-759.
- [11] LORSIRIGOOL A, SAENG-CHUTO K, TEMEEYASEN G, MADAPONG A, TRIPAT T, WEGNER M, TUNTITUVANONT A, INTRAKAMHAENG M, NILUBOL D. The first detection and full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus isolated in Lao PDR[J]. Archives of Virology, 2016, 161(10): 2909-2911.
- [12] SAENG-CHUTO K, LORSIRIGOOL A, TEMEEYASEN G, VUI DT, STOTT CJ, MADAPONG A, TRIPAT T, WEGNER M, INTRAKAMHAENG M, CHONGCHAROEN W, TANTITUVANONT A, KAEWPROMMAL P, PIRIYAPONGSA J, NILUBOL D. Different lineage of porcine deltacoronavirus in Thailand, Vietnam and Lao PDR in 2015[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(1): 3-10.
- [13] SUZUKI T, SHIBAHARA T, IMAI N, YAMAMOTO T, OHASHI S. Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2018, 61: 176-182.
- [14] MA YM, ZHANG Y, LIANG XY, LOU FF, OGLESBEE M, KRAKOWKA S, LI JR. Origin,

- evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00064.
- [15] 贺东生, 陈小芬, 王飞, 苏丹萍, 陈瑞爱, 尤刘阳. 我国集约化猪场新发猪丁型冠状病毒病的诊断[J]. 猪业科学, 2015, 32(10): 76-77.
- HE DS, CHEN XF, WANG F, SU DP, CHEN RA, YOU LY. Diagnosis of new swine D coronavirus disease in intensive pig farms in China[J]. *Swine Industry Science*, 2015, 32(10): 76-77 (in Chinese).
- [16] JUNG K, HU H, SAIF LJ. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357-2362.
- [17] BOLEY PA, ALHAMO MA, LOSSIE G, YADAV KK, VASQUEZ-LEE M, SAIF LJ, KENNEY SP. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry, United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255-265.
- [18] LEDNICKY JA, TAGLIAMONTE MS, WHITE SK, ELBADRY MA, ALAM MM, STEPHENSON CJ, BONNY TS, LOEB JC, TELISMA T, CHAVANNES S, OSTROV DA, MAVIAN C, BEAU de ROCHARS VM, SALEMI M, MORRIS JG Jr. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution[J/OL]. *medRxiv*, 2021. DOI:10.1101/2021.03.19.21253391.
- [19] LIANG QQ, ZHANG HL, LI BX, DING QW, WANG YB, GAO WM, GUO DH, WEI ZY, HU H. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573.
- [20] LI WT, HULSWIT RJJ, KENNEY SP, WIDJAJA I, JUNG K, ALHAMO MA, van DIEREN B, van KUPPEVELD FJM, SAIF LJ, BOSCH BJ. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5135-E5143.
- [21] HE B, ZHANG YZ, XU L, YANG WH, YANG FL, FENG Y, XIA LL, ZHOU JH, ZHEN WB, FENG Y, GUO HC, ZHANG HL, TU CC. Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(12): 7070-7082.
- [22] CHEN Q, LI GW, 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 JQ. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 234-243.
- [23] LAU SKP, WOO PCY, YIP CCY, FAN RYY, HUANG Y, WANG M, GUO RT, LAM CSF, TSANG AKL, LAI KKY, CHAN KH, CHE XY, ZHENG BJ, YUEN KY. Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(10): 5481-5496.
- [24] JUNG K, HU H, SAIF LJ. Porcine deltacoronavirus infection: etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 50-59.
- [25] 李任峰, 卢晓辉, 姜金庆, 王自良. 猪新发冠状病毒研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(10): 2359-2366.
- LI RF, LU XH, JIANG JQ, WANG ZL. Research advances on porcine emerging coronaviruses[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(10): 2359-2366 (in Chinese).
- [26] ZHANG JQ. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 71-84.
- [27] WANG QH, VLASOVA AN, KENNEY SP, SAIF LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs[J]. *Current Opinion in Virology*, 2019, 34: 39-49.
- [28] SHANG J, ZHENG Y, YANG Y, LIU C, GENG QB, TAI WB, DU LY, ZHOU YS, ZHANG W, LI F. Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus spike protein in the prefusion state[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(4): e01556-17.
- [29] 李成, 张雨迪, 黄小波, 刘浩宇, 刘志鹏, 赵玉佳, 曹三杰, 文心田, 文翼平, 赵勤, 伍锐. 猪丁型冠状病毒 S1 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体制备[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1256-1264.
- LI C, ZHANG YD, HUANG XB, LIU HY, LIU ZP, ZHAO YJ, CAO SJ, WEN XT, WEN YP, ZHAO Q, WU R. Cloning and prokaryotic expression of porcine deltacoronavirus S1 gene and preparation of polyclonal antibody[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018, 49(6): 1256-1264 (in Chinese).
- [30] LEE S, LEE C. Functional characterization and proteomic analysis of the nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus[J]. *Virus Research*, 2015, 208: 136-145.
- [31] WANG LY, HAYES J, SARVER C, BYRUM B, ZHANG Y. Porcine deltacoronavirus: histological lesions and genetic characterization[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(1): 171-175.
- [32] ZHANG MJ, LI W, ZHOU P, LIU DJ, LUO R, JONGKAEWWATTANA A, HE QG. Genetic manipulation of porcine deltacoronavirus reveals insights into NS6 and NS7 functions: a novel strategy for vaccine design[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 9(1): 20-31.
- [33] FANG PX, FANG LR, REN J, HONG YY, LIU XR, ZHAO YY, WANG D, PENG GQ, XIAO SB. Porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 antagonizes interferon beta production by interfering with the

- binding of RIG-I/MDA5 to double-stranded RNA[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(15): e00712-18.
- [34] OKDA F, LAWSON S, LIU XD, SINGREY A, CLEMENT T, HAIN K, NELSON J, CHRISTOPHER-HENNINGS J, NELSON EA. 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.
- [35] ZHAO YJ, QU H, HU JF, FU JY, CHEN R, LI C, CAO SJ, WEN YP, WU R, ZHAO Q, YAN QG, WEN XT, HUANG XB. Characterization and pathogenicity of the porcine deltacoronavirus isolated in southwest China[J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 1074.
- [36] 黄海鑫, 宋心玥, 汪伟, 李笨, 王茂鹏, 肖朋朋, 郑敏, 金宁一, 孙文超, 鲁会军. PDCoV 和 PEAV 二重 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2020, 50(2): 141-146.
HUANG HX, SONG XY, WANG W, LI B, WANG MP, XIAO PP, ZHENG M, JIN NY, SUN WC, LU HJ. Establishment and preliminary application of double RT-PCR for detection of PDCoV and PEAV[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2020, 50(2): 141-146 (in Chinese).
- [37] LIN CM, SAIF LJ, MARTHALER D, WANG QH. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 20-39.
- [38] LI C, LU HY, GENG C, YANG KL, LIU W, LIU ZW, YUAN FY, GAO T, WANG SS, WEN P, SONG HF, TIAN YX, ZHOU DN. Epidemic and evolutionary characteristics of swine enteric viruses in south-central China from 2018 to 2021[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1420.
- [39] 王颤然, 高利, 高翔, 肖建华. 2008–2018 年我国猪流行性腹泻病毒混合感染分析[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 97-103.
WANG HR, GAO L, GAO X, XIAO JH. Analysis of mixed infections of porcine epidemic diarrhea virus with other pathogens from 2008 to 2018 in China[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2020, 28(3): 97-103 (in Chinese).
- [40] SU MJ, LI CQ, QI SS, YANG D, JIANG N, YIN BS, GUO DH, KONG FZ, YUAN DW, FENG L, SUN DB. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1129-1140.
- [41] JUNG K, HU H, EYERLY B, LU ZY, CHEPNGENO J, SAIF LJ. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 650-654.
- [42] WOOD EN. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. *Veterinary Record*, 1977, 100(12): 243-244.
- [43] AKIMKIN V, BEER M, BLOME S, HANKE D, HÖPER D, JENCKEL M, POHLMANN A. New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(7): 1314-1315.
- [44] ZHOU P, FAN H, LAN T, YANG XL, SHI WF, ZHANG W, ZHU Y, ZHANG YW, XIE QM, MANI S, ZHENG XS, LI B, LI JM, GUO H, PEI GQ, AN XP, CHEN JW, ZHOU L, MAI KJ, WU ZX, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin[J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 255-258.
- [45] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230.
- [46] SAENG-CHUTO K, MADAPONG A, KAEOKET K, PIÑEYRO PE, TANTITUVANONT A, NILUBOL D. Coinfection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus increases disease severity, cell tropism and earlier upregulation of IFN- α and IL12[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 3040.
- [47] LIANG JX, LI Y, YAN ZS, JIAO Z, PENG DP, ZHANG WP. Study of the effect of intestinal immunity in neonatal piglets coinfecte with porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(8): 1649-1657.
- [48] ZHANG HL, HAN FF, SHU XL, LI QQ, DING QW, HAO CL, YAN XG, XU ML, HU H. Co-infection of porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus enhances the disease severity in piglets[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): 1715-1726.
- [49] SAENG-CHUTO K, MADAPONG A, KAEOKET K, PIÑEYRO PE, TANTITUVANONT A, NILUBOL D. Co-infection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus induces early TRAF6-mediated NF- κ B and IRF7 signaling pathways through TLRs[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 19443.
- [50] FENG Y, XU ZW, ZHU L. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Sichuan province, China[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(12): 2883-2889.
- [51] ZHANG FF, LUO YY, LIN C, TAN MF, WAN PW, XIE BB, XIONG LG, JI HY. Epidemiological monitoring and genetic variation analysis of pathogens associated with porcine viral diarrhea in Southern China from 2021 to 2023[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1303915.
- [52] 张帆帆, 宋德平, 周信荣, 黄冬艳, 李安琪, 彭棋, 陈燕君, 吴琼, 何后军, 唐玉新. 新现猪 Delta 冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7): 1408-1416.
ZHANG FF, SONG DP, ZHOU XR, HUANG DY, LI AQ, PENG Q, CHEN YJ, WU Q, HE HJ, TANG YX. Establishment and application of a RT-PCR assay for

- detection of newly emerged porcine deltacoronavirus[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(7): 1408-1416 (in Chinese).
- [53] 张帆帆, 宋德平, 郭楠楠, 叶昱, 周信荣, 李安琪, 张敏, 彭棋, 陈燕君, 黄冬艳, 唐玉新. 以原核表达的猪δ冠状病毒N蛋白为包被抗原的间接ELISA方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(10): 795-799.
ZHANG FF, SONG DP, GUO NN, YE Y, ZHOU XR, LI AQ, ZHANG M, PENG Q, CHEN YJ, HUANG DY, TANG YX. Establishment of a recombinant nucleoprotein-based ELISA for detection of antibodies against newly emerged porcine deltacoronavirus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(10): 795-799 (in Chinese).
- [54] 闫瑞杰, 张云飞, 刘玲玲, 张红垒, 王亚宾, 胡慧. 猪δ冠状病毒N蛋白的原核表达和间接ELISA检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(10): 1-8, 17.
YAN RJ, ZHANG YF, LIU LL, ZHANG HL, WANG YB, HU H. Prokaryotic expression of N protein and establishment of an indirect ELISA for antibody detection of porcine deltacoronavirus[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(10): 1-8, 17 (in Chinese).
- [55] 付嘉钰, 陈汭, 黄小波, 曹三杰, 文心田, 文翼平, 赵勤, 伍锐. 1株猪δ冠状病毒N蛋白单克隆抗体制备与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1847-1856.
FU JY, CHEN R, HUANG XB, CAO SJ, WEN XT, WEN YP, ZHAO Q, WU R. Preparation and identification of a monoclonal antibody against N protein of porcine deltacoronavirus[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1847-1856 (in Chinese).
- [56] 逢凤娇, 俞正玉, 何孔旺, 徐向伟, 张柏猛, 郭容利, 温立斌, 袁万哲, 姜平, 李彬. 猪丁型冠状病毒重组N蛋白间接ELISA抗体检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(6): 461-465.
PANG FJ, YU ZY, HE KW, XU XW, ZHANG BM, GUO RL, WEN LB, YUAN WZ, JIANG P, LI B. Development of an indirect ELISA for detection antibody to porcine deltacoronavirus using recombinant N protein[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(6): 461-465 (in Chinese).
- [57] 方谱县, 方六荣, 董楠, 肖少波. 猪δ冠状病毒的研究进展[J]. 病毒学报, 2016, 32(2): 243-248.
FANG PX, FANG LR, DONG N, XIAO SB. Research advances in the porcine deltacoronavirus[J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(2): 243-248 (in Chinese).
- [58] MA YM, ZHANG Y, LIANG XY, OGLESBEE M, KRAKOWKA S, NIEHAUS A, WANG GP, JIA AQ, SONG HH, LI JR. Two-way antigenic cross-reactivity between porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 186: 90-96.