



朱 俊, 高又文, 张 杰, 等. 猪流行性腹泻病毒 GD-A 株的分离鉴定及 S 基因序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(4): 21-25.

猪流行性腹泻病毒 GD-A 株的分离鉴定及 S 基因序列分析

朱 俊, 高又文, 张 杰, 叶 昱, 廖 明, 樊惠英

(华南农业大学 兽医学院/农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】在广东省某疑似发生猪流行性腹泻的猪场中,采集病猪的粪便样品,经 RT-PCR 检测阳性的样品接种于 Vero 细胞,以分离猪流行性腹泻病毒.【方法】通过在细胞上的连续传代,直至能稳定增殖.并通过 RT-PCR 对细胞培养物进行特异性片段的检测,观察细胞病变(CPE)的发生情况,以及间接免疫荧光(IFA)检测猪流行性腹泻病毒的 M 蛋白,对病毒进行分离与鉴定.【结果和结论】病毒在盲传 5 代时能观察到典型病变,传至 20 代时能在 Vero 细胞上增殖稳定. RT-PCR、CPE 与 IFA 的结果证明,所分离到的病毒为 PEDV,并命名为 GD-A 株.

关键词:猪流行性腹泻病毒; 分离; 鉴定; M 蛋白; S 基因; 间接免疫荧光; 细胞传代培养
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)04-0021-05

Isolation and identification of GD-A strain of porcine epidemic diarrhea virus and phylogenetic tree analyses based on S gene

ZHU Jun, GAO Youwen, ZHANG Jie, YE Yu, LIAO Ming, FAN Huiying
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of
Veterinary Vaccine Development, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】The fecal samples were collected from a pig farm with similar clinical symptoms of porcine epidemic diarrhea in Guangdong Province. In order to isolate a virus strain, the samples with positive RT-PCR for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) were inoculated in Vero cell lines. 【Method】The isolated virus strain was serially passaged until it was proliferated stably in Vero cells. During the process, observation of the typical cytopathic effect (CPE) at different time points, indirect fluorescent antibody (IFA) assay detected for M protein of virus, and RT-PCR method applied for specific gene detection of PEDV were used to isolate and identify the PEDV proliferated in Vero cells. 【Result and conclusion】The typical CPE was observed at the 5th blind passage, and the isolated virus strains proliferated stably in Vero cells at the 20th passage. According to the results of RT-PCR, CPE and IFA, the isolated virus strain is determined to be PEDV, which is named GD-A strain.

Key words:porcine epidemic diarrhea virus; isolation; identification; M protein; S gene; indirect fluorescent antibody assay; cell-adapted culture

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea vi-

收稿日期:2014-06-27 优先出版时间:2015-06-10
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150610.1624.013.html>
作者简介:朱 俊(1991—),男,硕士研究生,E-mail:zhujun-anhui@sohu.com;通信作者:樊惠英(1977—),女,教授,博士,
E-mail:fanhy@scau.edu.cn
基金项目:973 计划项目(2011CB504701);广州市“珠江科技新星专项”项目(2012J2200086);863 计划项目
(2011AA10A209);公益性行业(农业)项目(201303034)

rus, PEDV)引起的急性、接触性胃肠道疾病,感染仔猪临床表现为呕吐、腹泻,最终因严重脱水而死亡;而成年猪感染只表现轻微的临床症状,如精神抑郁、食欲下降,一段时间后恢复正常^[1]. PEDV 虽首次在欧洲报道^[2],但近年在亚洲和北美的流行对养猪业造成的经济损失远大于欧洲. 亚洲如泰国^[3]、韩国^[4]、日本^[5]、越南与中国^[6]等国家,因近年 PEDV 的流行,对养猪业影响尤为严重. 2013 年 5 月此病毒在美国^[7]首次发现,并在之后迅速传播至美各个州和周边的加拿大与墨西哥,目前仍无有效的控制措施. 虽然采取疫苗接种方式来控制此病流行,但疫苗不能对整个猪群提供完全的保护效果,据报道接种过疫苗的猪场仍然有此病的流行^[8-9]. PEDV 属于套式病毒目冠状病毒科冠状病毒属,与猪传染性胃肠炎病毒同属,生物学特性及致病性都相似^[10]. PEDV 基因组大小约 28 kb,由 7 个 ORFs 组成. ORF1a 和 ORF1b 占病毒基因组 2/3,编码病毒 RNA 复制酶;ORF3 为辅助性基因,编码一多态性的辅助性蛋白;其余基因分别编码病毒 4 个结构蛋白:纤突糖(S)蛋白,小囊膜(E)蛋白,膜(M)蛋白和核(N)蛋白^[11]. S 蛋白由 S1 和 S2 两部分组成,S1 介导病毒与宿主细胞的吸附,S2 诱导构象改变使病毒易于进入宿主细胞^[11]. 中国于 1979 年发现 PEDV,一直呈散发状态. 自 2012 年 10 月呈大规模流行趋势,对哺乳仔猪的危害最为严重,感染后死亡率高达 100%,对养猪业造成重大经济损失^[8-9]. 此病毒在发现 10 年之后, Hofmann 等^[11]在 Vero 细胞中添加胰酶的方式终于成功培养. 本试验参考其他分离病毒的方法^[12-15],将猪流行性腹泻病毒疑似病料处理后,接种 Vero 细胞以分离病毒. 通过 RT-PCR 特异性片段的检测、典型病变的观察和间接免疫荧光(IFA)试验,鉴定所分离到的毒株为 PEDV,并对 S 基因进行遗传进化分析. PEDV 在细胞上的成功分离及 S 基因的遗传进化分析,为以后生物学、疫苗开发等研究提供了基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

血清(BI 公司);DEME 细胞培养液、胰蛋白酶(GIBCO 公司);RNA 抽提试剂盒、M-MLV 反转录酶、RNA 抑制酶、dNTP、T 载体、*Taq* DNA 复制酶、胶回收试剂盒(TaKaRa 公司);PEDV M 蛋白单克隆抗体(Median Diagnostic 公司);荧光倒置显微镜(Leica 公司);Vero 细胞由华南农业大学兽医学院保存.

1.2 病料采集与处理

样品来自广东某猪场疑似猪流行性腹泻感染的病例,采集的粪便样品于 -80 ℃ 条件保存备用. 采样

<http://xuebao.scau.edu.cn>

猪场感染仔猪临床表现为水样腹泻,呕吐;死亡仔猪小肠充满黄色液体,肠壁变薄呈透明状.

采集的样品与预冷 PBS 液 1:5 稀释,反复冻融 3 次,最后于 4 ℃ 以 5 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集上清液, -80 ℃ 条件保存备用.

1.3 RT-PCR 检测

参考 NCBI 的 CV777 基因序列,使用软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对检测 PEDV 的特异性引物. 上游引物序列为:5'-TCGCTTTCAGCATCCTTAT-3',下游引物序列为:5'-CTTGGCGACTGTGACGAAA-3',由金唯智公司合成. 依据 RNA 抽提试剂盒操作手册抽提病毒 RNA,最后以 40 μL ddH₂O 洗脱,取 10 μL 作为模板进行反转录. 反转录体系为:10 μL RNA 模板,2 μL 随机引物,70 ℃ 变性 10 min;随后分别加入 1 μL RNA 抑制剂,1 μL M-MLV 反转录酶,2 μL dNTP,4 μL 5 × Reverse Transcriptase M-MLV Buffer,反转录 1.5 h;最后 72 ℃ 15 min 以终止反应. 25 μL PCR 体系为:12.5 μL *Taq* DNA 复制酶,0.5 μL 上(下)游引物(10 pmol),1.5 μL cDNA 模板,10 μL ddH₂O;反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s(30 个循环);72 ℃ 延伸 10 min. 反应样品在 0.01 g · mL⁻¹ 琼脂糖凝胶进行检测. 当结果出现与预期大小相似条带时,进行切胶回收,连接 T 载体并进行大肠埃希菌转化、克隆及抽提质粒,具体步骤参照试剂盒说明书. 抽提的质粒由金唯智公司测序.

1.4 病毒的分离

经 RT-PCR 检测为 PEDV 阳性的样品,进行病毒的分离与培养. 以 12 000 r · min⁻¹ 离心样品液 15 min,将上清液以 0.22 μm 针式滤器过滤除菌. 取长满 70% ~ 80% 的 Vero 单层细胞(25 cm² 细胞培养瓶),加入 1 mL 的过滤上清液孵育 1.5 h,孵育液中加入胰酶至终质量浓度为 8 × 10⁻⁶ g · mL⁻¹;吸除病毒孵育液,加入含 4 × 10⁻⁶ g · mL⁻¹ 的胰酶不含血清的维持液,放置于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养,逐日观察病变情况,盲传 3 代. 当细胞产生特征性病变时,接毒液减少至 100 μL,并在病变 85% 左右收集病毒细胞培养液. 收集细胞培养液时反复冻融 3 次,4 ℃ 4 500 r · min⁻¹ 离心 15 min 除去细胞碎片,取上清液 -80 ℃ 条件保存备用.

1.5 病毒的鉴定

1.5.1 细胞培养物 RT-PCR 检测 将细胞培养物在 -80 ℃ 冻融 3 次. 4 ℃ 4 500 r · min⁻¹ 离心 15 min 去除细胞碎片. 上清液保存在 -80 ℃ 条件下,取其中一部分抽提 RNA 进行 RT-PCR 检测,方法如“1.3”.

1.5.2 细胞病变的观察 病毒在盲传几代之后,能在显微镜下看到明显的细胞病变(CPE). 用倒置显

显微镜观察并记录下 PEDV 在 Vero 细胞上的 CPE 形成情况。

1.5.3 间接免疫荧光检测 M 蛋白 将胰酶消化的细胞接种 6 孔培养板,当 Vero 细胞铺满至 70% ~ 80% 时弃掉原培养液,用孵育液(含 8×10^{-6} g · mL⁻¹胰酶的 DMEM 培养液)清洗 2 次.每孔接种病毒液 10 μL,加入 990 μL 孵育液于 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中孵育 1.5 h,留 1 孔作为对照,直接加入 1 mL 孵育液.孵育完成之后弃掉孵育液,每孔再加入 2 mL 维持液(含有 4×10^{-6} g · mL⁻¹的胰酶、无血清的 DMEM 培养液).在 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,进行间接免疫荧光试验,检测 PEDV 的 M 蛋白.然后进行 DAPI 染色,观察细胞核的变化,主要步骤为:用预冷 PBS 清洗 3 次,以体积分数为 4 % 的多聚甲醛常温固定 20 min;清洗后孵育抗 PEDV M 蛋白的鼠源单克隆抗体,4 ℃ 过夜;PBS 清洗一抗后孵育羊抗鼠 FITC 标记二抗,避光作用 1 h;PBS 清洗 3 次后在倒置荧光显微镜下观察.如需核染,用 DAPI 染液作用 5 min,PBS 清洗 3 次后再观察。

1.6 病毒基因组核苷酸序列分析

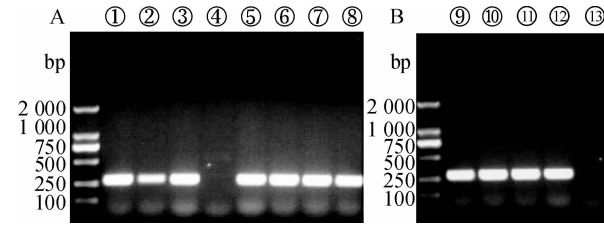
病毒全基因组测序完成并上传至 GenBank 数据库[16].利用 DNASTar7.1 基因分析软件对分离株的 S 基因核苷酸序列与国内外各参考毒株相同区域核苷酸序列进行相似性分析,并使用 MEGA6.0 绘制分离株与各参考毒株的 S 基因序列的系统进化图谱.以下参考株序列均来自 GenBank 数据库,参考毒株分别为:HB-2012-1 (JX435302),BJ-2012-1 (JX435299),BJ-2012-2 (JX825706),SH (JQ771751),SD-M (JX560761),JS2008 (KC109141),CH/S (JN547228),AJ1102 (JX188454),LC (JX489155),VN/KCHY-3110113 (KJ960180),VN/JFP1013-1 (KJ960178),VN/VAP113-1 (KJ960179),USA/Texas128/2014 (KJ645697),USA-Iowa107-2013 (KJ645696),USA-Minnesota100-2013 (KJ645691),USA-Colorado-2013 (KF272920),USA-Kansas125-2014 (KJ645701),YS (JQ771751),attenuated DR13 (JQ023162),SM98 (GU937797),virulent_DR13 (JQ023161),CV777 (JN599150)。

2 结果

2.1 粪便和细胞培养物的 RT-PCR 检测结果

对采集的粪便样品进行 RT-PCR 检测,结果出现 1 条约 285 bp 的 DNA 片段,其大小与预计片段相似(图 1A).同时,将细胞培养物进行 RT-PCR 检测,扩增出大小相似的 DNA 片段(图 1B).分别将 2 次测序的结果在 NCBI 上进行 BLAST,发现与 PEDV 序列

相似性最高.由此可初步断定分离的毒株为 PEDV.

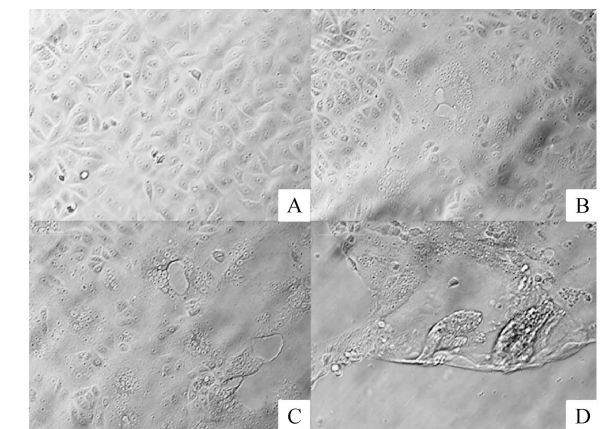


A:采集粪便样品,B:细胞培养物;①~⑧为采集粪样的 8 个样品,除样品④检测为阴性外,其余为阳性;⑨~⑫分别是培养 2、4、10、20 代的细胞培养物检测结果,⑬为阴性对照.

图 1 采集粪便样品和细胞培养物 RT-PCR 鉴定结果
Fig. 1 Identification results of RT-PCR of fecal samples and cell culture supernatant

2.2 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖情况

病毒传至第 5 代时能观察到典型病变,传至第 20 代时能在 Vero 上增殖稳定.随着传代代次的增加,出现 CPE 的时间变短.稳定增殖后,细胞在 18 h 可观察到明显的病变,24 h 病变接近 50%,36 h 时细胞几乎完全病变,并有成片细胞脱落(图 2).与刚开始出现病变的低代次 PEDV 相比,完全病变时间缩短近一半.开始病变时几个细胞边界分辨不清,与周围的正常细胞形态差异明显(图 2B);随时间推移只有少量细胞形态完整,大量细胞皱缩融合(图 2C),最终成片脱落(图 2D).DAPI 染色结果显示,感染病毒的 Vero 细胞确有核聚集(图 3B),而对照组(图 3D)没有,细胞核均一分布,与 Hofmann 等[11]描述的病变结果一致.由此可进一步断定分离的毒株是 PEDV.



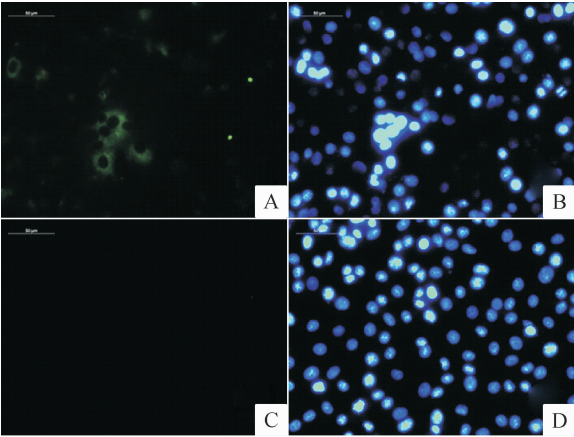
A 为正常细胞对照组;B、C、D 分别是接毒后 18、24、36 h 时细胞发生病变的情况.

图 2 感染病毒 Vero 细胞不同时间的细胞病变 (400 ×)
Fig. 2 Cytopathic effect in infected-Vero cells at different time point (400 ×)

2.3 间接免疫荧光试验检测 PEDV M 蛋白

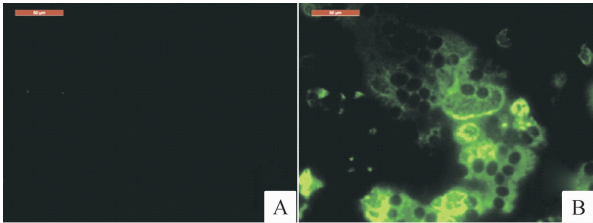
使用抗 PEDV M 蛋白的单克隆抗体对传 12 代的 PEDV 细胞培养毒进行间接免疫荧光鉴定,接种

病毒 24 h 进行一抗孵育,结果显示感染的 Vero 细胞有明显的荧光信号,而对照组没有荧光显现(图 3、4)。此结果表明分离的毒株即是 PEDV。



A、B 分别为感染病毒细胞的 IFA 及 DAPI 染色结果;C、D 分别为对照组细胞的 IFA 及 DAPI 染色结果;标尺:50 μm.

图 3 间接免疫荧光(IFA)检测 M 蛋白与 DAPI 核染结果
Fig. 3 The results of detecting M protein by indirect fluorescent antibody (IFA) assay and nuclear staining by DAPI



A 为阴性对照,未检测到任何荧光信号;B 为感染细胞组,可检测到明显的绿色荧光信号,并可看到多个细胞融合;标尺:50 μm.

图 4 间接免疫荧光检测 PEDV M 蛋白结果
Fig. 4 The results of detecting M protein of PEDV by indirect fluorescence antibody assay

2.4 分离株病毒核苷酸序列分析比较

分离株 GD-A 与不同 PEDV 毒株间 S 基因相似性比较发现(图 5),与毒株 LC 和 AJ1102 相似性最高,都为 99.2%;与毒株 SM98 和 CH/S 相似性最低,分别为 92.5%与 93.2%。与经典毒株 CV777 相比较,相似性较低,为 93.3%。与越南分离株 VN-KCHY-310113 和 VN-JFP1013_1 相似性较高,分别为 98.7%和 98.5%;与美国分离株相似性变化较大,如与毒株 USA-Iowa107-2013 和 USA-Minnesota100-2013 的相似性分别为 94.7%和 98.0%。各参考毒株的 S 基因系统进化树显示,GD-A 与 2 个国内分离株 LC、AJ1102 和 3 个越南分离株位于同一个进化分支上,与近年国内的分离株及大部分美国分离株位于同一个大的分支上;但与韩国株 SM98、virulent_DR13,国内早期分离株 CH/S、JS2008,经典毒株 CV777 等位于不同的分支上。从该分析结果来看,所分离的毒株与疫苗株如 attenuated_DR13 和 CV777 在不同分支,提示该分离株不是疫苗株。

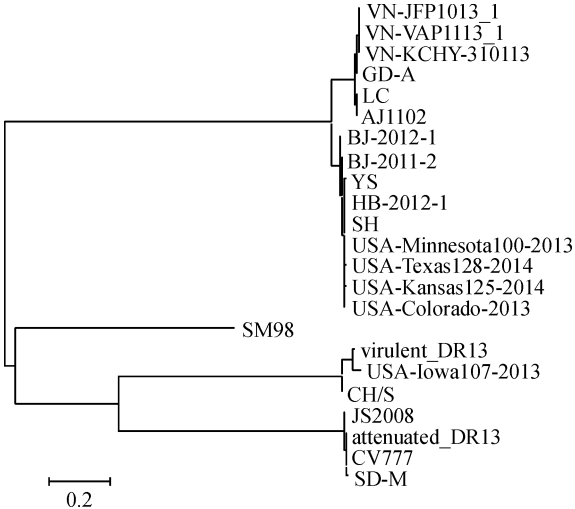


图 5 GD-A 与不同猪流行性腹泻病毒参考株间 S 基因遗传进化树关系

Fig. 5 Phylogenetic tree based on S gene for GD-A and other reference strains of porcine epidemic diarrhea virus from GenBank database

3 讨论

3.1 近年 PEDV 的流行情况及 S 基因变异分析

PEDV 在欧洲首次发现时,产生与猪传染性胃肠炎相似的临床症状^[17]。此病在欧洲流行时,对母猪和仔猪致病力相似,但整体死亡率表现不高。与近年在亚洲和北美洲的情况有很大的差异性。从国内外报道 PEDV 的结果可知,感染母猪表现轻微临床症状,食欲下降,精神抑郁,最终恢复;而感染仔猪主要表现呕吐腹泻,肠道解剖发现肿大透明,内有未消化的乳凝块,最终严重脱水而死,死亡率较高可达 100%^[3,8-9,18]。此外,此病在猪场反复流行,传播速度快,而对该病毒的生物学特性了解很少,对于如何预防和控制该病毒的流行,仍是一个很大的挑战。

S 基因编码的纤突蛋白位于病毒粒子的表面,能诱导宿主产生特异性中和抗体。与经典毒株 CV777 相比,分离株 GD-A 的 S 基因在 487 ~ 492 位点有 6 个碱基缺失;在 167 位点有 1 个碱基插入,在 428 ~ 430 位点有 3 个位点插入,在 175 ~ 185 位点连续插入 11 个碱基,另外其他位点存在多个点突变^[16]。GD-A 与其他参考毒株相比较,与 3 个越南毒株、近年国内分离株及大部分美国分离株具有相同的碱基缺失、插入与突变情况,遗传进化分析也同属于一个大分支,提示这些病毒可能有共同的祖先;而与 CV777 基因变化相似的韩国毒株 attenuated-DR13、SM98,美国分离株 USA-Iowa107-2013 及国内早期分离株 JS2008、CH/S 在遗传进化分析属于另一分支,这提示近年的流行毒株与疫苗株(CV777)关系较远。同时,分离株不同位置出现的碱基突变、缺失与插入对病毒的生物学特性影响有待进一步的研究。

从前人对近年 PEDV 的分子流行病学研究结果发现,亚洲各国 PEDV 流行毒株与欧洲及疫苗株之间关系较远,而这些国家之间分离的流行毒株关系相对较近^[3,19-20].同时,近期分离的毒株与几年前分离的毒株差异较大^[21-22].这说明 PEDV 基因组在环境压力下一直处于变异的状态.这可能是导致近年 PEDV 的大规模爆发,而不能以疫苗接种等措施控制此病流行的主要原因.目前,对此病没有有效的治疗措施,商品化的疫苗在当前不能为猪群提供有效的保护,所以在发生疾病的猪场中隔离感染、发病猪只,做好生物安全措施是目前最好的方法^[23].

3.2 PEDV 在细胞的培养

PEDV 具有在体外难以培养的特性.到目前为止,Vero 细胞是分离 PEDV 最敏感的细胞系,连续传代后能在此细胞系上稳定地生长与增殖,但在培养时需要培养液中添加适量的胰酶^[11,15,23].本试验采用 $8 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的孵育液和 $4 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的维持液在 Vero 细胞中分离病毒,在前代次并未观察到病变,自第 5 代后产生典型的细胞病变,连续传代至 20 代后,病毒可在细胞上稳定增殖.该试验结果与其他人的研究结果^[11]相似.但也有报道称在初次接种细胞时即可产生明显的病变^[23],只是每次产生病变的时间差异很大,这说明毒株间生物学特性的差异影响其在 Vero 细胞增殖的适应过程.本试验分离 PEDV 病毒的成功,为后续的病毒生物学特性,疫苗的研发都提供了试验与理论基础.

参考文献:

- [1] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2):167-175.
- [2] WOOD E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea[J]. *Vet Rec*, 1977, 100(12):243-244.
- [3] PURANAVEJA S, POOLPERM P, LERTWATCHA-RASARAKUL P, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(7):1112-1115.
- [4] CHAE C C, KIM O O, CHOI C C, et al. Prevalence of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs[J]. *Vet Rec*, 2000, 147(21):606-608.
- [5] SUEYOSHI M, TSUDA T, YAMAZAKI K, et al. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea[J]. *J Comp Pathol*, 1995, 113(1):59-67.
- [6] CHEN J F, WANG C B, SHI H Y, et al. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain[J]. *J Virol*, 2011, 85(21):11538-11539.
- [7] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5):917-919.
- [8] 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.
- [9] LI W T, LI H, LIU Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(8):1350-1353.
- [10] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1996:688-690.
- [11] HOFMANN M, WYLER R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture[J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(11):2235-2239.
- [12] 张志,李岚,王赛赛,等. 猪流行性腹泻新毒株的分离与鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(10):1423-1428.
- [13] 庄金秋,王金良,梅建国,等. 猪流行性腹泻病毒 SDbz 株的分离与鉴定[J]. *动物医学进展*, 2013, 33(5):650-653.
- [14] 张桂红. 猪流行性腹泻病毒地方株 LJB/03 株分离鉴定[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.
- [15] 付梦瑾,朱玲,吴云飞,等. 猪流行性腹泻病毒的分离鉴定及增值规律[J]. *中国兽医科学*, 2013, 43(11):1133-1139.
- [16] FAN H Y, ZHANG J, YE Y, et al. Complete genome sequence of a novel porcine epidemic diarrhea virus in south China [J]. *J Virol*, 2012, 86(18):10248-10249.
- [17] PENSART M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1994, 58(3):243-247.
- [18] JUNG K, WANG Q H, KELLY A, et al. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(4):661-665.
- [19] FAN J H, LI Y J. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03[J]. *Virus Genes*, 2005, 30(1):69-73.
- [20] KMLG T J, SEO J E, KHN 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 Expr Purif*, 2009, 39(7):602-607.
- [21] PARK S J, KIM H K, SONG D S, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field isolates in Korea [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(4):577-585.
- [22] PARK S J, MOON H J, YANG J S, et al. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea [J]. *Virus Genes*, 2007, 35(2):321-332.
- [23] CHEN Q, LI G W, STASKO J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak in US swine[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1):234-243.

【责任编辑 柴 焰】

<http://xuebao.scau.edu.cn>