

王婧,孙志雯,陈海峰,等. 3株猪流行性腹泻病毒SI基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):99-103.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.021

3 株猪流行性腹泻病毒SI基因的克隆及序列分析

王婧,孙志雯,陈海峰,陈晓兰
(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)可感染各阶段的猪,使患病动物出现水样腹泻、呕吐,并伴随厌食和精神沉郁等临床症状,对哺乳仔猪危害尤为严重。为了解河南某猪场 PEDV 流行毒株 SI 基因的变异情况,以江苏农牧科技职业学院动物药学院实验室保存的感染 PEDV 临床病料为样本,对其进行 SI 基因扩增、克隆以及序列分析。对 SI 基因的进化分析结果显示,该猪场 PEDV 分离株 SI 基因推导的氨基酸序列之间的同源性高达 99%,BLAST 搜索结果显示与 AHCZ-2 株的相似性最高,将获得序列与经典毒株 CV777 相比在第 57 位插入了 4 个氨基酸 NQGV,在第 134 位插入 1 个氨基酸 D,而在第 157、158 位缺失 2 个氨基酸,在中和表位区域共有 11 处氨基酸突变,与国内其他毒株均位于 G2-b 进化分支,研究结果为进一步掌握该地 PEDV 的流行毒株和毒力变异情况提供了理论依据。

关键词:猪流行性腹泻病毒;SI 基因;遗传进化

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0099-04

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)以急性肠炎为特征,在仔猪常由于致死性水样腹泻导致脱水死亡的高致死率疾病^[1]。病原为猪流行性腹泻病毒(PEDV),该病毒可感染各阶段的猪,使患病动物出现水样腹泻、呕吐,并伴随厌食和精神沉郁等临床症状。仔猪的感染率可达 100%,而母猪则不一定^[2]。腹泻时的排泄物可在 48 h 内检测到 PEDV 病毒,甚至有时可延长至 4 周。PEDV 可感染 1 周龄以内仔猪,引起严重水泄和 3~4 d 呕吐,随后出现严重脱水和电解质失衡而造成死亡,平均死亡率可达到 50%,在 1~3 日龄仔猪死亡率甚至可达到 100%,然后降低至 10%。虽年龄大一点的猪比 1 周龄以内的仔猪初发时发病更轻,然而 PEDV 影响育肥猪的生长。母猪可能不会腹泻,但是通常会显示抑郁和厌食^[3]。

PEDV 是一个大的有囊膜 RNA 病毒,属于尼多病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus)成员,其基因组共约 28 kb,拥有 5'端非翻译区和 3'端非翻译区,共编码至少 7 个开放阅读框(ORF1a, ORF1b, ORF2~6)其中 ORF1a 和 ORF1b 共占了整个基因组 5'端 2/3 用于编码非结构蛋白。剩余的 3'端的基因共编码 4 个结构蛋白,分别是纤突蛋白(S)、膜蛋白(M)、小膜蛋白(E)和核衣壳蛋白(N)。其中 S 蛋白是病毒子包膜主要的 envelope I 型糖蛋白,与病毒入侵以及刺激并诱导宿主产生中和性抗体密切相关。S 蛋白可划分为 S1(1~735 aa)和 S2

(736~1383 aa)2 个结构域,蛋白 S1 结构域对于识别 pAPN 受体至关重要。PEDV 进入细胞始于与 pAPN 结合,随后通过直接膜融合的方式与靶细胞完成内化的过程,随后并脱壳释放病毒基因组进入细胞内开始复制^[4-6]。

另有研究表明,冠状病毒 S 蛋白的变异将会导致其宿主范围、组织细胞培养基毒力发生改变。其中存在较高变异性的主要是 SI 基因,不同分离株 SI 基因间存在不同程度的核苷酸插入、突变和删减等现象,进而改变病毒原始抗原特性,因此常被用来研究不同时间和地区流行毒株的亲缘关系^[7]。

本研究于 2017 年 12 月至 2018 年 3 月在江苏农牧科技职业学院动物药学院实验室开展,主要对该实验室保存的猪流行性腹泻病料进行 SI 基因克隆,并运用 DNAMAN、MEGA 等基因分析软件进行序列分析,为进一步掌握 PEDV 的流行毒株和毒力变异情况提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

试验用病料为笔者所在实验室保存的感染流行性腹泻病毒仔猪肠道样品。

1.2 试剂

PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 一步法 RT-PCR 试剂盒、EX Taq 酶、Marker DL 2000、Marker DL 5000、pMD18-T 载体等,均购自 TaKaRa 宝日生物技术有限公司;Trizol 试剂,购自 Invitrogen 公司;普通质粒提取,购自天根生化科技有限公司;琼脂糖,购自西班牙 Biowest 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 样品处理及 RNA 提取

取保存病料的小肠组织加入适量液氮进行研磨稀释后,于 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min。吸取离心后上清液按照 Trizol 试剂提取 RNA 的操作步骤进行,最后将 RNA 溶解至 DEPC 水溶液中,于 -20℃ 保存。

收稿日期:2018-06-19

基金项目:江苏省农业三新工程项目(编号: SXGC[2017]249);江苏省泰州市科技支撑计划(农业)项目(编号: TN201711);江苏农牧科技职业学院院级项目(编号: NSF201504-2、NSF201606)。

作者简介:王婧(1985—),女,四川绵阳人,博士,讲师,主要从事兽药药理研究。E-mail: kenhtsjj@163.com。

通信作者:陈晓兰,博士,副教授,主要从事兽药药理研究。E-mail: cxl7972563@163.com。

1.4 引物的设计

根据 CV777 毒株 *S* 基因序列作为参考,采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,引物序列为:*SI* - F:5' - GCTTGTGAAGAA TGGTAAAGTTGC - 3';*SI* - R:5' - AGCCTGCTCTGAAAAAGAACA T - 3',送上海生工生物工程有限公司进行引物合成。

1.5 反转录及基因的 PCR 扩增

根据试剂盒操作说明,配制 RT-PCR 反应液,将一步法酶混合物、Buffer、引物、提取的 PEDV 总 RNA 及 RNase Free dH₂O 配制成 25 μL 反应体系,按照以下程序放入 PCR 仪进行反应,扩增条件为:50 °C 30 min,94 °C 2 min;94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 7 min,反应结束后吸取 5 μL 反应液进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.6 *SI* 基因的克隆

电泳检测条带和目的条带一致后,吸取 PCR 反应混合液 3 μL,pMD-18T 载体 1 μL,Buffer 5 μL,灭菌水 1 μL,混合均匀后置于 16 °C 连接 2 h,并转化至 JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,采用 PCR 法进行鉴定,鉴定成功后将阳性菌株送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.7 序列分析

将测序得到序列采用 DNA MAN 软件进行翻译。对翻译推导所得的蛋白质序列进行 BLASTp 分析、并与经典毒株 CV777 序列进行多序列比对,并分析其突变位点。最后与近年国内外流行的毒株进行多序列比对,采用 Mega 软件进行进化树构建,选择毒株信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 PEDV *SI* 基因的扩增及克隆

将提取的 PEDV RNA 样品进行反转录 PCR 扩增,结果显示目的条带约 2 188 bp,将 PCR 产物与 pMD-18T 载体进行连接,并转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中,采用 PCR 方法对重组质粒进行鉴定,将鉴定结果为阳性的克隆菌株送测序公司进行序列测定,PCR 扩增结果见图 1。

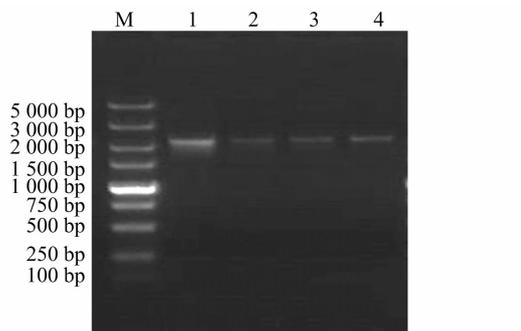
2.2 PEDV *SI* 基因的序列分析

通过测序得到 3 条 *SI* 序列,分别命名为 CH/HNZK1、CH/HNZK2、CH/HNZK3,长度均为 2 188 bp,共编码约 720 个氨基酸,3 株 PEDV 分离株 *SI* 基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列相似性为 99%。对 3 条 *SI* 基因核酸序列进行 BLAST 搜索,结果均与 AHCZ-2 株的相似性最高,高达 99%。

将推导氨基酸序列与经典毒株 CV777 相比,在第 57 位插入了 4 个氨基酸 NQGV,在第 134 位插入 1 个氨基酸 D,而在第 157、158 位缺失 2 个氨基酸,与王飞等报道的我国部分地区 PEDV *S* 基因的蛋白序列^[8]相似。进一步采用 Clustal Omega 在线软件对所得 3 个 *SI* 基因推导蛋白质序列和经典毒株 CV777 的序列进行多序列比对发现,在中和表位区域(499~638 aa)共有 11 处突变,分别是 517 位 A→S,521 位 L→R,523 位 S→G,527 位 V→I,542 位 D→G,549 位 T→S,594 位 G→S,605 位 A→E,619 位 F→S,621 位 K→T,635 位 I→V。而在预测的 2 处受体结合域(25~88aa,249~529 aa)分别有 10 处以上氨基酸突变或插入和缺失。具体突变氨基酸位点见表 2。

表 1 序列比对 PEDV 参考毒株信息

毒株名称	GenBank 登录号	来源	分离年份
CV777	AF353511	比利时	1977
Chinju99	AY167585	韩国	1999
LZC	EF185992	中国	2006
CHGD-01	JN980698	美国	2011
HuN	JQ517274	中国	2011
ISU13-22038-1A-passage3	KF650374	美国	2013
LJB	DQ985739	中国	2006
83P-5	AB548618		2011
CH/FJND-1	JN543367	中国	2013
CH/SDQD	JQ638919	中国	2011
CH/JLGZL	JQ638923	中国	2011
VN/JFP1013_1	KJ960178	越南	2013
CH8	JQ239436	中国	2011
CH/KF	JQ257005	中国	2011
KH	AB548622	日本	2011
Spk1	AF500215	韩国	2011
NJ02	KC879279	中国	2013
DR13	DQ862099	韩国	2006
JS-2004-2	AY653204	中国	2000
DR13 attenuated	DQ462404	韩国	2006
YS	JQ771753	中国	2012
HZXS-2	KF294255	中国	2013
KNU-0801	GU180142	韩国	2009
KNU-0802	GU180143	韩国	2009
MK	AB548624	日本	1993
USA/Colorado	KF272920	美国	2013
CNU-091222-01	JN184634	美国	2013
SH	JQ771751	中国	2011
Vaccine CV777	JN599150	中国	1994
CH/S	JN547228	中国	1986
Brl/87	Z25483	英国	1987
JS-HZ2012	KC201147	中国	2012
AHSZ-2	KU743296	中国	2014
CH-QTC-01-2015	KR296670	中国	2012
CH-SCAY-2014	KU975405.1	中国	2011
YC2014	KT428879.1.1	中国	2014
CH/GDZH02/1401	KR153325.1	中国	2015
CH-YYC-2025	KT388410.1	中国	2013
CH/HBSN/2012	JX018183.1	中国	2010
HBXY1	KY775040.1	中国	2011
MEX/PUE/01	KY829000.1	墨西哥	2016
MEX/JAL/03	KY828998.1	墨西哥	2016
ON/018	KM189367	加拿大	2014
SK/030	KM196109	加拿大	2014
VA/VAP1113-1	KJ960179	越南	2013
USA/Texas31	KJ645639	美国	2013
SKorea-KULDL-PED-2014-001	KJ588064	南韩	2014
Mexico-MEX-104-2013	KJ645708	墨西哥	2013
USA/Iowa23.57/2013	KJ645649	美国	2013
OH-OH851/2014	KJ399978	美国	2014
Minnesota52/2013	KJ645704	美国	2014



M—Marker DL 5 000; 1—阳性对照 CV777 株; 2-4—样品

图1 S1 基因检测电泳结果

表2 S1 基因片段氨基酸变异情况

突变位置	突变氨基酸	突变位置	突变氨基酸	突变位置	突变氨基酸
2	R→K	126	D→S	288	Y→F
5	I→T	127	N→I	298	H→Q
10	L→F	134	V→A	300	M→I
15	P→S	135	-→D	310	D→Q
17	L→P	152	Y→H	356	I→T
27	Q→S	154	R→S	358	A→T
28	S→A	155	D→G	365	E→Q
29	T→N	156	G→-	454	S→A
55	S→I	157	K→-	517	A→S
56	M→G	158	D→H	521	L→R
57	N→E	159	I→S	523	S→G
—	NQGV	174	A→S	527	V→I
58	S→V	182	L→F	542	D→D, G
60	S→T	192	R→K	549	T→S
64	G→A	196	R→S	594	G→S
65	T→G	197	R→G	605	A→E
66	G→L	198	S→G	619	F→FS
67	I→H	206	T→E	621	K→T
68	E→P	223	Y→E	635	I→V
78	L→V	225	E→Q	661	T→T, I
80	Y→H	232	T→I	667	I→F
82	D→R	242	D→E	686	V→I, V
83	S→G	243	S→P	707	N→D
85	Q→H	266	L→V	724	N→S
116	I→T	284	I→M	756	Y→S

2.3 PEDV S1 蛋白遗传进化分析

主要选择 PEDV 经典毒株 CV777, 中国周边各国的疫苗株、经典流行株, 及近年来在我国境内分离到的部分毒株与本试验克隆所得到的 3 株 PEDV 毒株 S1 基因推导氨基酸序列进行多序列比对, 并利用 MEGA 5 软件, N-J 法进行遗传进化树的构建, 结果见图 2。

利用筛选得到的共 50 株代表毒株及本研究获得的 S1 蛋白氨基酸序列构建遗传进化树, 可见进化树可分为 G1 和 G2 2 个大分支, 每分支可划分为 a、b 2 小分支, 本次试验所得 3 株 S1 蛋白均位于 G2 - b 分支, 位于同一分支的还有中国境内 YC2014、CH/GDZH02/1、CH - SCAY - 2014、HBXY - 1、CH - QTC - 01 - 2015 和美国流行株 USA/Colorado、CHGD -

01, 提示与本次分离毒株关系较近。韩国经典毒株 Chinju99、NJ02、KNU - 0801 和日本的 KH 野猪毒株均位于 G2 - a 分支。美国流行的经典株 CV777 以及 LZC、DR13、BtI/87 等均位于 G1 - a 分支, CH/JLGZL/2011、JS - 2004 - 2 位于 G1 - b 分支, 而与乔涵等报道的河南分离株均位于 G2^[9] 分支相似。

3 讨论

PEDV 于 1982 年日本首次报道后便在亚洲各国迅速流行。2000 年以后, PEDV 在菲律宾、泰国、越南和我国台湾等地报道日益增加^[10-11]。在 90 年代早期, 经典毒株 CV777 的灭活苗在中国广泛被应用, 直到 2010 年 PED 只有少数暴发^[12]。但是, 在 2010 后期 PED 的流行在养猪大省死灰复燃, 我国科学家对这段时间 PEDV 的分子流行病学进行了大量调查。从 2011 年 2 月至 2014 年 3 月, 我国进行了除西藏、海南和港、澳、台的 29 省的大规模调查。样品阳性率从 61.1% 到 78.49%, 猪场阳性率在 71.43% ~ 83.47%^[13]。

2017 年 3 月在河南周口某猪场出现大量哺乳仔猪腹泻, 通过对仔猪肠道样品进行 PCR 以及血清 ELISA 检测确定本次为 PEDV 感染。由于 RNA 聚合酶缺乏矫正功能, 所以 RNA 病毒容易发生变异^[3]。PEDV 的 S 基因为纤突蛋白基因, 是结构蛋白中最大的基因, 是主要的免疫蛋白基因, 能诱导机体产生抗体。而 S 基因可变区主要集中在 S1 区 (1 ~ 735 aa), 因此通常分析 S1 蛋白的序列变化情况来研究 PEDV 的遗传进化关系。本研究对采集的样品进行了 S1 基因的扩增和进化分析, 结果显示 3 份样品的 S 基因与疫苗株 CV777 相比相似性在 99%, 虽然表现出极高的相似性, 但是这 3 株新分离毒株相对经典疫苗株在中和表位区域 (499 ~ 638 aa)^[14] 共有 11 处氨基酸突变, 有研究报道在该结构域氨基酸突变易影响 S 蛋白的疏水性^[15]。尤其值得注意的是被检毒株 S1 蛋白中和表位区域的 549 位 T→S、594 位 G→S 突变现象, 549 位和 594 位为 S 蛋白的中和表位结构域, 这些位置的突变可能和免疫动物发病具有重要联系, 我国自 2011 年后分离的 PEDV 这 2 处均突变为丝氨酸, 而与 2002—2009 年期间分离到的 PEDV 毒株 2 处的突变情况差异较大^[16]。

在 2010 年后的这些年, 属于 G1 - b 基因群的新的变异毒株在中国被首次报道。另外, 免疫动物的 PED 暴发使 CV777 毒株疫苗的保护性产生了质疑。至此, PEDV 在中国的不同地区流行被陆续报道。目前, 中国 PED 暴发主要是由于 G1b 变异株和与 CV777 不同基因型的 G2 流行野毒^[17]。对此次分析的 3 株 PEDV 病毒进行遗传进化分析显示均属于 G2 - b 分支, 从亲缘关系看与在河南省附近其他省份分离到的 PEDV 毒株亲缘关系较近。这与周兵强等分析的 M 基因和 ORF3 基因结果^[18] 一致, 与经典毒株以及疫苗株均发生了变异, 而与 2010 年后国内流行的大多数毒株的同源性较高。本研究对进一步跟踪监测河南省 PEDV 分子流行特征, 以及制定综合防控措施和新疫苗的研发具有重要意义。

参考文献:

[1] Lee D K, Park C K, Kim S H, et al. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea [J]. Virus Research, 2010, 149 (2): 175 - 182.

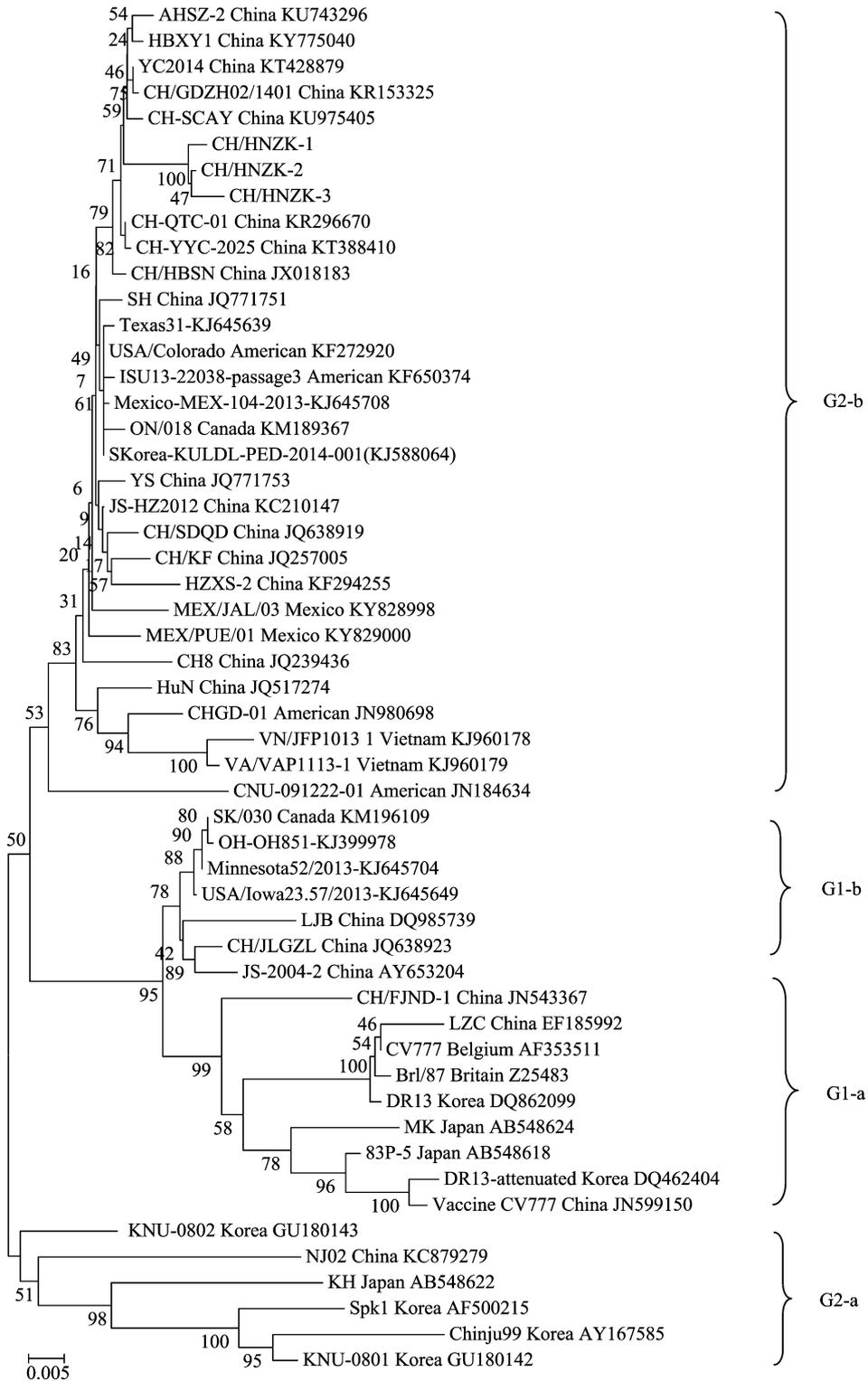


图2 PEDV 的 S1 蛋白氨基酸遗传进化分析

[2] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus; an emerging and re-emerging epizootic swine virus [J]. *Virology Journal*, 2015, 12 (1):193.

[3] Alvarez J, Sarradell J, Morrison R, et al. Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3):e0120532.

[4] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence [J]. *Virus Genes*, 2001, 23 (2):137-144.

[5] Bridgen A, Kocherhans R, Tobler K, et al. Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 1998, 440:781.

白蓓蓓,荆永琳,蔡秉宇,等. 芒果 *MinSPP* 基因的克隆及表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):103-107.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.022

芒果 *MinSPP* 基因的克隆及表达载体构建

白蓓蓓^{1,2},荆永琳^{1,2},蔡秉宇^{1,2},蓝丽¹,李倩²,赵志常²,陈业渊²

(1. 海南大学热带作物学院,海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所,海口 571101)

摘要:磷酸蔗糖磷酸酶(sucrose phosphate phosphatase)是合成蔗糖的关键酶,为了研究其在芒果果实中蔗糖合成的作用机制,从芒果果肉中克隆得到1个与蔗糖合成相关的基因,将其命名为 *MinSPP*,其 cDNA 全长序列为 1 561 bp,开放阅读框为 1 275 bp,编码 424 个氨基酸,蛋白质分子量为 48.46 ku,等电点为 5.34,对 *MinSPP* 基因编码的蛋白进行系统发育分析,发现其与克莱门柚具有较近的亲缘关系。采用 qRT-PCR 对该基因在后熟处理的贵妃芒果肉中的表达量进行分析,结果显示从青熟期到成熟期芒果果肉中该基因表达量逐渐上升,从成熟期到完熟期芒果果肉表达量逐渐降低,其中成熟期芒果果肉中表达量较高。本研究深入了解了芒果蔗糖合成的分子机制,进一步构建了 pBI121-*MinSPP* 过表达载体,为 *MinSPP* 的功能鉴定奠定了理论基础。

关键词:芒果;*MinSPP* 基因;分子机制;蔗糖合成;甜度;克隆;表达载体构建

中图分类号: S667.701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0103-05

在高等植物中蔗糖是光合作用的产物,在植物的生长、发育、储存、信号转导等方面具有运输糖的核心作用^[1-2]。蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,简称 SPS)和磷酸蔗糖磷酸酶(sucrose phosphate phosphatase,简称 SPP)是蔗糖合

成中的关键酶^[3],且2种酶都已定位于光合作用和储存细胞的胞质溶胶中^[4-6]。蔗糖合成途径是以二磷酸尿苷葡萄糖(UDP-Glc)和6-磷酸果糖(F6P)为底物,蔗糖磷酸合成酶(SPS)催化生成6-磷酸蔗糖(S6P),6-磷酸蔗糖(S6P)在磷酸蔗糖磷酸酶(SPP)催化下水解形成蔗糖和磷酸根离子^[7-8]。其中SPS的催化反应是可逆的,在最后一步中SPP的催化反应是不可逆的,而SPS和SPP又是以复合物的形式存在的,所以认为SPS和SPP共同催化蔗糖合成反应是不可逆的^[9-10]。

磷酸蔗糖磷酸酶(SPP)既是催化蔗糖合成途径的最后一步,也是光合碳同化途径中的最后一个酶^[11-12],与SPS相比有关SPP的研究报道相对比较少。相关研究表明,在植物体内SPS和SPP是以复合体的形式存在的,SPP催化生成

收稿日期:2018-07-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);中国热带农业科学院基本科研业务费专项(编号:1630032017005,1630032017004)。

作者简介:白蓓蓓(1992—),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向为分子生物学,E-mail:1967785775@qq.com;荆永琳(1992—),女,海南海口人,硕士研究生,研究方向为分子生物学,E-mail:jingyonglin1019@qq.com。

通信作者:赵志常,博士,副研究员,研究方向为热带果树遗传育种与分子生物学。E-mail:zhaozhichang2001@163.com。

[6] 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.

[7] 刘艳成, 芦婷, 刘丹丹, 等. 2010—2014年猪流行性腹泻病毒S基因遗传进化分析[J]. *动物医学进展*, 2015(8): 28-34.

[8] 王飞, 陈小芬, 苏丹萍, 等. 2014—2015年我国部分省份猪流行性腹泻病毒S基因的遗传变异分析[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(9): 1484-1488.

[9] 乔涵, 李辉, 赵丽, 等. 猪流行性腹泻病毒河南流行株S基因的克隆与遗传进化分析[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(5): 781-786.

[10] Fan B C, Jiao D, Zhao X N, et al. Characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel insertions and deletions in genome [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44209.

[11] Lin C M, Saif L J, Marthaler D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. *Virus Research*, 2016, 226(SI): 20-39.

[12] Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.

[13] Sun D, Wang X, Shan W, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(3): 355-363.

[14] 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]. *Molecules and Cells*, 2002, 14(2): 295-299.

[15] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161-163.

[16] Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines [J]. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2015, 4(2): 166-176.

[17] Li W T, Li H, Liu Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350-1353.

[18] 周兵强, 吴志明, 闫若潜, 等. 2012—2014年河南省猪流行性腹泻病毒M基因和ORF3基因的遗传变异分析[J]. *中国兽医学报*, 2014(12): 1236-1243.