

猪流行性腹泻病毒 S、N 和 ORF3 基因的遗传变异分析

王隆柏¹, 林裕胜^{1,2}, 车勇良¹, 吴学敏¹, 陈如敬¹, 邵良平², 周伦江^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013; 2. 福建农林大学动物学院, 福州 350002)

摘要: 为探明 2012—2013 年在福建省流行猪流行性腹泻病毒(PEDV)结构蛋白的遗传变异情况, 对 7 株 PEDV 流行毒株的 S、N 及 ORF3 基因进行克隆、测序及分析。结果表明: 7 株 PEDV S 基因之间的核苷酸相似性为 98.6%~99.4%, 与 attenuated DR13 弱毒株和 CV777 标准株的相似性分别为 93.7%~94.1% 和 93.8%~94.1%; 同 CV777 标准株比较, 存在 64 个氨基酸突变, 其中有 3 个氨基酸较以往国内外流行毒株的变异不一样, 为新变异氨基酸, 氨基酸的插入和缺失与 2008 年泰国 NPPED2008_2 株相似; 7 株 PEDV 毒株的 N 基因和 ORF3 基因之间核苷酸的相似性分别为 96.5%~99.7% 和 99.7%~100%, 与 CV777 标准株的相似性分别为 96.6%~98.0% 和 96.6%~96.9%。遗传进化树表明: 7 株 PEDV 毒株的 S 基因和 ORF3 基因与泰国流行毒株的亲缘关系较近, N 基因与 CV777 标准株亲缘关系较近。7 株 PEDV 毒株的 S 基因和 ORF3 基因变异程度较大, 可能源于泰国及韩国的变异株。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; S 基因; N 基因; ORF3 基因; 变异分析

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)11-1830-07

Genetic Variation Analysis of S, N and ORF3 Genes of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

WANG Long-bai¹, LIN Yu-sheng^{1,2}, CHE Yong-liang¹, WU Xue-min¹, CHEN Ru-jing¹,

SHAO Liang-ping², ZHOU Lun-jiang^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

2. College of Animal Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To investigate the variation in structure protein of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), S, N and ORF3 genes of 7 PEDV strains were cloned and sequenced from different farms in Fujian in 2012-2013. The results indicated that the nucleotide sequences of S gene shared 98.6%-99.4% identity within them, shared 93.7%-94.1% identity with attenuated DR13 strain, shared 93.8%-94.1% identity with CV777 strain. Compared with CV777 strain, there were 64 variant amino acids, and 3 amino acids different from other prevalent strains at home and abroad, and might be new variations, and 5 amino acids insertion, and 2 amino acids deletion. The amino acids insertion and deletion were similar to NPPED2008_2 strain isolated in Thailand. The nucleotide sequence of N and ORF3 genes shared 96.5%-99.7% and 99.7%-100% identity within them, and shared 96.6%-98.0% and 96.6%-96.9% identity with CV777 strain, respectively. Phylogenetic analysis indicated that S and ORF3 genes of the 7 PEDV strains had a closer relationship with the Thailand strain, and N gene had a closer relationship with the CV777 strain.

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 福建省公益性科研专项(2013R1025-7); 福建省农科院青年创新基金项目(2012DQB-3)

作者简介: 王隆柏(1977-), 男, 福建宁化人, 副研究员, 主要从事分子生物学与免疫学研究

* 通信作者: 周伦江(1973-), 男, 福建周宁人, 研究员, E-mail: lunjiang@163.com

The results showed that *S* and *ORF3* genes of the 7 PEDV strains varied greatly, and these strains might origin from Thailand and Korea strains.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; *S* gene; *N* gene; *ORF3* gene; genetic variation analysis

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) 引起的接触性肠道传染病, 各年龄段的猪群均能感染发病, 主要临床症状表现为腹泻、呕吐和脱水, 其中对哺乳仔猪危害最为严重。PEDV 属于尼多病毒目冠状病毒科冠状病毒属的成员, 病毒核酸为正义单链 RNA, 基因组全长约为 28 kb, 主要结构蛋白为纤突糖蛋白 (S 蛋白)、小膜蛋白 (E 蛋白)、膜蛋白 (M 蛋白) 和核衣壳蛋白 (N 蛋白)^[1]。自 1978 年英国首次报道该病后^[2], 随后世界各国均有 PED 的报道。中国于 1980 年首次报道该病^[3], 以后全国各地陆续有 PED 发生的报道。2010 年下半年, PED 在中国各地再次大规模暴发, 且临床症状比之前更为严重, 病死率高达 100%, 给养猪业造成了重大经济损失。有关研究显示, PEDV S 蛋白对于分析当地流行毒株的流行情况和遗传变异有重要价值^[4-5]; N 蛋白能形成核衣壳, 并在病毒基因组的转录复制中起到一定的作用, 能够诱发机体产生有效的免疫应答; ORF3 蛋白的多肽性与病毒毒力存在相关性, 因此, 研究 PEDV 的 *S*、*N* 和 *ORF3* 基因变异情况, 具有重要意义。

从 2012—2013 年采自福建省发生腹泻猪场的病料中挑取 7 份较有代表性 PEDV 阳性病料进行 PEDV 的 *S*、*N* 和 *ORF3* 基因克隆测序, 在此基础上进行流行毒株的基因变异和遗传演化分析, 以了解

福建省流行 PEDV 毒株基因变异特点, 为科学防控 PED 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织样品与毒株

2012—2013 年 PEDV 检测为阳性的病料, 从中选出具有代表性的 7 个毒株进行研究。

根据样品采集时间和地点对选取的 7 株克隆毒株分别命名为 FJ-FQ1 2012 (福清)、FJ-FQ2 2012 (福清)、FJ-LY 2013 (龙岩)、FJ-QZ 2013 (泉州)、FJ-PT 2013 (莆田)、FJ-YX 2013 (云霄)、FJ-ND 2012 (宁德)。

1.2 主要试剂

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒, PCR 扩增试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司, *Ex Taq* 酶、AMV 酶、Rnase Inhibition、dNTP 和 DNA Marker-2000 购自 TaKaRa 公司, pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司, Nuclease-Free Water 购自 Promega 公司, 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.3 引物设计与合成

参考标准 CV777 毒株的基因序列, 设计合成扩增 *S* 基因 (*S1* 和 *S2*)、*N* 基因的引物序列 (表 1), *ORF3* 基因片段的引物参照 D. S. Song 等^[6] 的报道。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 *S* 和 *N* 基因序列扩增引物情况表

Table 1 Amplification primers of *S*, *N* gene

片段 Segments	引物 Primers	引物序列 Sequence	退火温度 <i>T</i> _m /°C	片段长度/bp Length
<i>S1</i>	F1	5'-TTTGTGGCTTTTCTAATC-3'	50	20 600~22 705
	R1	5'-CACCACTAGTGACATTCTT-3'		
<i>S2</i>	F2	5'-ATTCTGGACAGTTGTTAGC-3'	48	22 663~24 844
	F2	5'-TTCGAGACATCTTTGACAAC-3'		
<i>N</i>	F3	5'-GAGTGCGGTTCTCACAGAT-3'	48	26 317~27 728
	R3	5'-TAGCCAGGATAAGCCGGTC-3'		

1.4 核酸提取及 RT-PCR 反应

提取核酸 RNA:按照 TransGen 病毒 RNA/DNA 提取试剂盒说明书进行。RT 反应参数:RNA 与随机引物在 70 °C 水浴 10 min,冰浴 2 min,42 °C 60 min,4 °C 保存;PCR 反应参数:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,48~50 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 2.5 min,35 个循环;72 °C 终延伸 10 min,4 °C 保存。

1.5 序列测定

回收 PCR 产物连接于 pMD18-T 载体中,转入 DH5 α 菌株,重组质粒经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,阳性质粒送至生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。

1.6 序列分析

使用 DNAMAN 软件将 S1 基因和 S2 基因进行序列拼接,对 S 基因、N 基因及 ORF3 基因的核苷酸及其推导的氨基酸序列分别与 1993—2013 年

在 GenBank 登录的具有代表性的 25 株参考毒株进行序列比对,分析其同源性,构建遗传进化树。

2 结果

2.1 PEDV S 基因序列分析

FJ-FQ1 2012(福清)、FJ-FQ2 2012(福清)、FJ-LY 2013(龙岩)、FJ-QZ 2013(泉州)、FJ-PT 2013(莆田)、FJ-YX 2013(云霄)、FJ-ND 2012(宁德)株的基因序列已提交到 GenBank,登录号分别为 KJ646581、KJ646582、KJ646584、KJ646589、KJ646587、KJ646590 和 KJ646585。通过软件比对分析,发现 7 株 PEDV 的 S 基因中除了 FJ-FQ2 2012 株是由 4 158 个核苷酸组成外,其它 6 株由 4 161 个核苷酸组成,他们分别编码 1 385 和 1 386 个氨基酸。经比对分析发现,与 CV777 标准毒株相比,7 株 PEDV 毒株存在多个氨基酸突变、插入和缺失现象。氨基酸突变情况详见表 2,其中出现 3

表 2 S 基因片段氨基酸变异情况

Table 2 Variant amino acids of S gene

突变位置 Mutation position	突变氨基酸 Mutated amino acids	突变位置 Mutation position	突变氨基酸 Mutated amino acids	突变位置 Mutation position	突变氨基酸 Mutated amino acids
5 aa	I→T	15 aa	L→S	27 aa	Q→S
28 aa	S→A	29 aa	T→N	55 aa	S→I
56 aa	M→G	57 aa	N→E	58 aa	S→N
64 aa	S→T	68 aa	G→A	69 aa	T→G
70 aa	G→Q	71 aa	I→H	72 aa	E→P
82 aa	L→V	84 aa	Y→H	86 aa	D→R
87 aa	S→G	89 aa	Q→H	120 aa	I→T
130 aa	D→S	131 aa	N→I	138 aa	V→A
160 aa	D→E	163 aa	K→H	164 aa	N→H
165 aa	I→S	179 aa	A→S	184 aa	H→Y
187 aa	I→F	197 aa	R→K	201 aa	K→S
202 aa	R→G	203 aa	S→G	211 aa	T→E
228 aa	Y→S	230 aa	E→Q	237 aa	S→I
247 aa	D→E	248 aa	S→P	271 aa	L→V
305 aa	M→I	361 aa	I→T	522 aa	A→S
554 aa	T→S	599 aa	G→S	729 aa	N→S
771 aa	D→S	964 aa	A→V	968 aa	I→F
970 aa	A→S	1 049 aa	S→A	1 167 aa	N→D
1 178 aa	G→D	1 198 aa	T→N	1 199 aa	Y→N
1 237 aa	S→R	1 267 aa	P→S	1 303 aa	R→Q
1 360 aa	C→R	1 364 aa	G→C	1 381 aa	A→V
1 382 aa	F→S				

个较以往国内外流行毒株不一样,为新的变异氨基酸,分别为 1 267 位由 P 变为 S、1 360 位由 C 变为 R 和 1 382 位由 F 变为 S。氨基酸的插入:FJ-FQ1 2012 株、FJ-FQ2 2012 株、FJ-QZ 2013 株、FJ-ND 2012 株、FJ-PT 2013 株、FJ-QZ 2013 株、FJ-YX 2013 株有 5 个氨基酸的插入,位置分别在 58—63 aa 和 140 aa 处,插入氨基酸为 QGVN 和 N,FJ-LY 2013 株有 4 个氨基酸的插入,位置在 58—63 aa 处,插入氨基酸为 QGVN;氨基酸的缺失:7 株毒株在 160—163 aa 处存在 GK 2 个氨基酸缺失。

2.2 PEDV S 基因核苷酸、推导的氨基酸同源性分析

7 株 PEDV 毒株 S 基因核苷酸和推导的氨基酸序列之间的相似性分别为 98.6%~99.4% 和 97.6%~99.5%;它们与中国(BJ2011 1、GD-B、LZC、SD-M、JS-2004-2) 株之间核苷酸和推导的氨

基酸序列的相似性分别为 93.3%~99.2% 和 92.3%~99.4%;与韩国(KNU-0901、SM98) 株的相似性分别为 93.5%~95.1% 和 92.2%~95.0%;与美国(IA1、MN) 株的相似性分别为 98.7%~99.4% 和 98.4%~99.4%;与日本(83P-5、NK) 株的相似性分别为 93.9%~94.9% 和 93.1%~94.2%;与泰国 NPPED2008_2 株的相似性分别为 95.6%~96.1% 和 94.4%~95.3%;与 attenuated DR13 弱毒株的相似性分别为 93.7%~94.1% 和 92.5%~93.4%;与 CV777 标准株的相似性分别为 93.8%~94.1% 和 92.8%~93.8%。

2.3 PEDV S 基因的遗传进化树分析

从遗传进化树可以看出 PEDV 分为 2 个群(G1、G2),7 株 PEDV 福建分离株分属于 G1 群,与 2008 年泰国流行 NPPED2008.2 株亲缘关系比较近(图 1)。

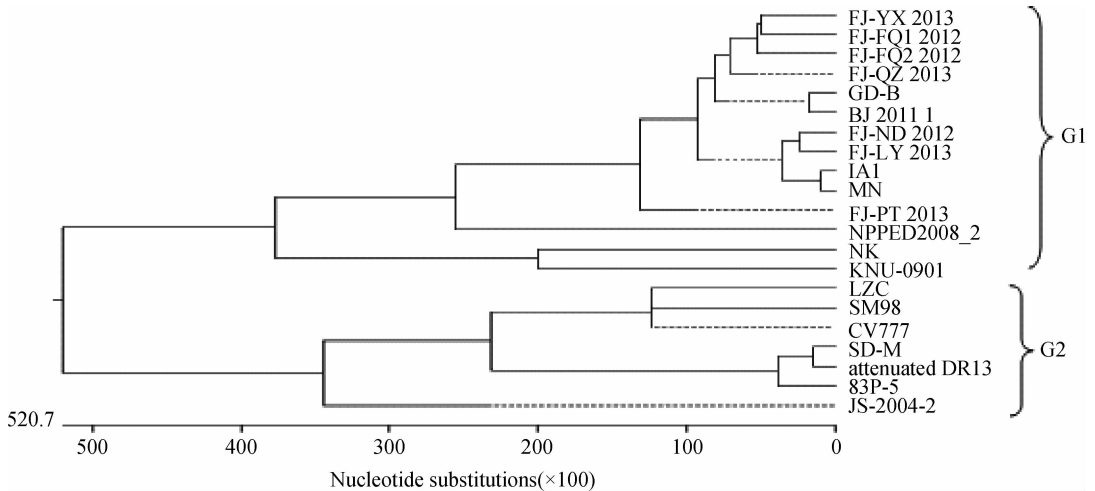


图 1 S 基因的遗传进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of S gene

2.4 PEDV S 基因的糖基化位点及抗原表位分析

登录 N-糖基化位点在线预测软件,提交 7 株 PEDV 毒株的 S 基因推导的氨基酸序列,进行糖基化位点预测,确定潜在的糖基化位点位置、类型和数目,通过分析得知,7 株 PEDV 的 S 基因糖基化位点数目在 26~28 个,分别位于 62(NST)、118(NAT)、216(NVT)、264(NDS)、300(NQT)、324(NDI)、344(NLS)、351(NSS)、381(NSI)、425(NFT)、514(NIT)、556(NVT)、667(NSS)、688(NVT)、726(NST)、743(NCT)、781(NIS)、787(NFS)、873(NFT)、1 009(NIT)、1 196(NHT)、1 232(NLT)、1 249(NKT)、1 261(NRT)、1 273(NAT)、1 278(NLT)、1 295(NTT)、1 308(NNT)位,与 2013 年美国(IA1、MN)株及 2012 年中国 GD-B 株的糖基化

位点基本一致。利用 DNASTar 中 Protein 分析软件对参考毒株和分离毒株 S 蛋白进行抗原表位预测,结果显示尽管 PEDV S 蛋白中存在氨基酸的插入、突变和缺失,但是抗原表位并没有明显差异(图 2)。

2.5 PEDV N 基因的核苷酸和推导的氨基酸序列的同源性分析

FJ-FQ1 2012(福清)、FJ-FQ2 2012(福清)、FJ-LY 2013(龙岩)、FJ-QZ 2013(泉州)、FJ-PT 2013(莆田)、FJ-YX 2013(云霄)和 FJ-ND 2012(宁德)毒株的 N 基因序列已提交到 GenBank,登录号分别为 KJ646612、KJ646613、KJ646617、KJ646621、KJ646619、KJ646624 和 KJ646618。7 株 PEDV 分离株 N 基因含有 1 326 个核苷酸,编码 442 个氨基酸,N 基因仅存在个别氨基酸的突变,不存在缺失

或插入情况。7 株 PEDV 毒株之间的核苷酸和推导氨基酸序列的相似性分别为 96.5%~99.7% 和 97.5%~100.0%；它们与中国 (AH2012、AJ1102、CH-S、GD-A、GD-B、LZC、SD-M、JS-2004-2、JS-HZ2012、JS2008) 株之间核苷酸和推导氨基酸序列的相似性分别为 95.4%~99.2% 和 95.9%~98.9%；与韩国 (Chinju99、SM98) 株的相似性分别为 94.7%~97.9% 和 95.3%~98.4%；与美国 (IA1、MN) 株的相似性分别为 96.2%~98.6% 和 96.6%~98.9%；与日本 83P-5 株的相似性分别为 96.2%~99.2% 和 96.8%~98.4%；与 attenuated DR13 弱毒株的相似性分别为 96.2%~99.2% 和 96.8%~98.4%；与 CV777 标准株的相似性分别为

96.6%~98.0% 和 97.7%~98.6%。

2.6 PEDV N 基因遗传进化树分析

从遗传进化树可以看出 PEDV 分为 3 个群 (G1、G2 和 G3)，7 株 PEDV 福建分离株分属于 G1、G2 群，FJ-FQ2 2012、FJ-YX 2013、FJ-QZ 2013、FJ-FQ1 2012、FJ-ND 2012、FJ-PT 2013 与中国 (JS-2004-2、GD-B、JS-HZ2012、AH2012、LZC) 株、美国 (IA1、MN) 株、CV777 标准株和韩国 SM98 株组成 G1 群，与 2006 年中国 LZC 株及 CV777 标准株亲缘关系比较近；FJ-LY 2013 与中国 (JS2008、SD-M、CH-S、AJ1102、GD-A) 株、韩国 Chinju99 株、attenuated DR13 弱毒株、日本 83P-5 株组成 G2 群，与 attenuated DR13 弱毒株亲缘关系比较近 (图 3)。

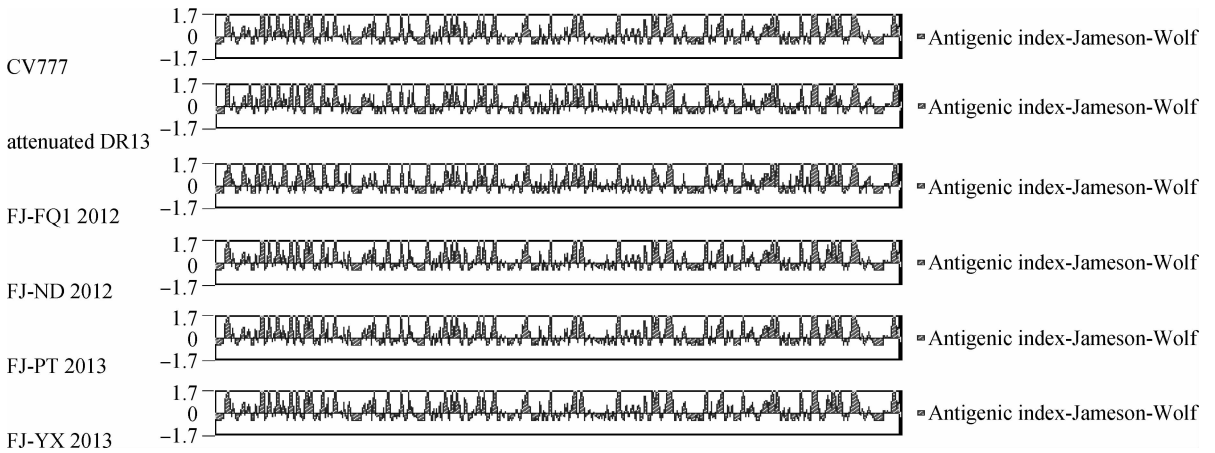


图 2 S 蛋白抗原位点预测比较
Fig. 2 The prediction of S protein antigenic index

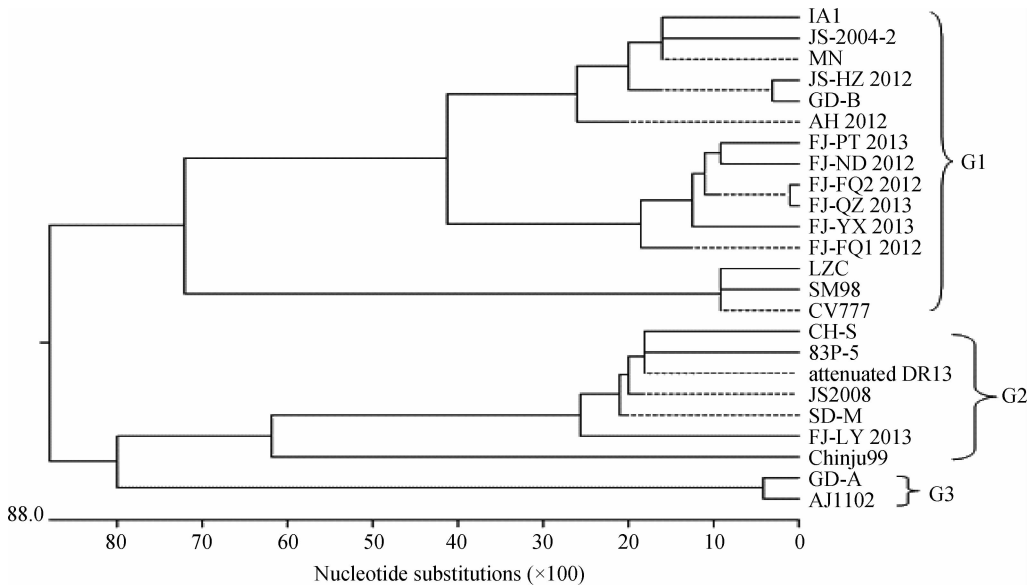


图 3 N 基因的遗传进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of N gene

2.7 PEDV ORF3 基因的核苷酸和推导的氨基酸序列的同源性分析

FJ-FQ1 2012 (福清)、FJ-FQ2 2012 (福清)、FJ-LY 2013 (龙岩)、FJ-QZ 2013 (泉州)、FJ-PT 2013 (莆田)、FJ-YX 2013 (云霄) 和 FJ-ND 2012 (宁德) 毒株的 ORF3 基因序列已提交到 GenBank, 登录号分别为 KJ646577、KJ646576、KJ646571、KJ646575、KJ646569、KJ646565 和 KJ646570。7 株 PEDV 毒株的 ORF3 基因仅存在个别氨基酸的突变, 不存在缺失或插入情况。它们的核苷酸和推导氨基酸序列之间的相似性分别为 99.7%~100% 和 99.6%~100.0%, 与中国 (BJ-2011-1、CH JL 06、GD-B、LZC、SD-M、SJZ 2011、TX2011) 株之间核苷酸和推导的氨基酸序列的相似性分别为 95.3%~100.0% 和 94.7%~100.0%; 与韩国 (BI976、BIF256、CPF

193、SM98) 株的相似性分别为 96.1%~99.6% 和 99.1%~100.0%; 与美国 (IA1、MN) 株的相似性分别为 99.4%~99.6% 和 99.6%~100.0%; 与泰国 (NPKPED0108、SBPED2011) 株的相似性分别为 99.3%~99.7% 和 99.6%~100.0%; 与 attenuated DR13 弱毒株的相似性分别为 98.4%~98.5% 和 98.7%~99.1%; 与 CV777 标准株的相似性分别为 96.6%~96.9% 和 96.0%~96.5%。

2.8 PEDV ORF3 基因遗传进化树分析

从遗传进化树分析 PEDV 分为 2 个群 (G1、G2), 7 株 PEDV 毒株与泰国 (SBPED0211、NPKPED0108) 株、韩国 CPF 193 株亲缘关系比较近; 与 attenuated DR13 弱毒株及 CV777 标准株亲缘关系比较远 (图 4)。

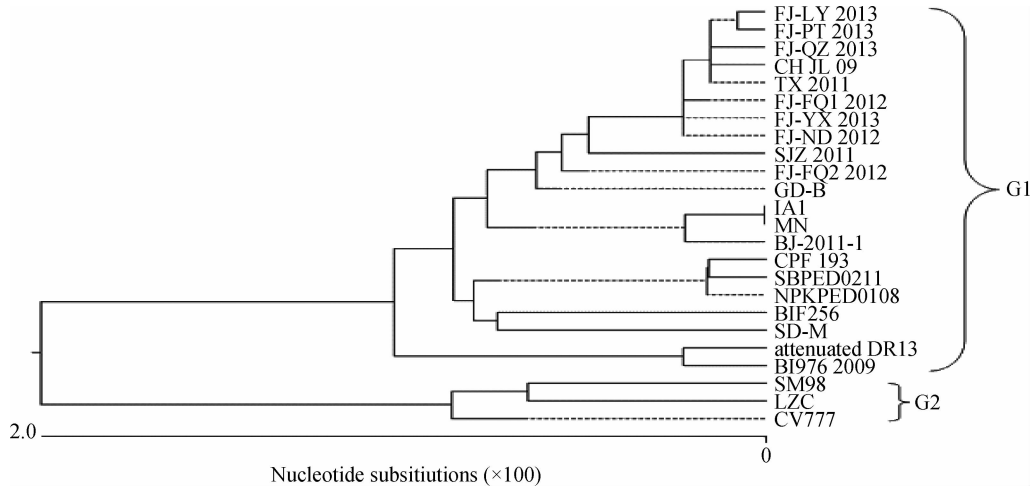


图 4 ORF3 基因的遗传进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of ORF3 gene

3 讨论

近年来,随着猪腹泻疾病的暴发与流行,从业人员再次掀起对 PEDV 的研究热潮。虽然部分规模猪场正常免疫接种了猪传染性胃肠炎-流行性腹泻-轮状病毒的“三联”疫苗,但还有许多猪场仍然暴发了腹泻疾病,经研究表明暴发腹泻疾病的主要原因是猪群感染了 PEDV,且调查发现 PEDV 的阳性率在 60% 以上。为什么在现代规模化养殖的环境下,能大规模暴发 PED,是不是 PEDV 自身发生了重组变异。鉴于有效防控 PEDV 已成为困扰养猪业发展的重大难题,因此,开展 PEDV 的结构蛋白序列分析,了解流行 PEDV 毒株的遗传进化规律,为今

后更好防控 PEDV 提供技术支撑,更为研制 PEDV 基因工程苗奠定理论基础。

PEDV 是具有感染性的线性单股正链 RNA 病毒,其构成病毒的核苷酸较 DNA 病毒易发生变异^[7]。本研究通过对福建省发生具有代表性的 7 个 PEDV 毒株进行 S、N 和 ORF3 基因克隆与测序分析,与 CV777 标准株比较,表明 7 个毒株均在 S 基因片段存在氨基酸的变异、插入和缺失,并出现新的变异氨基酸,但预测的糖基化位点及抗原表位与近年国内发生的比较一致,这与 S. G. Yeo 等^[8]、S. J. Park 等^[9]、李建强等^[10]、孙东波等^[11]、刘孝珍等^[12]分别对韩国毒株、致弱毒株 DR13 和国内毒株 S 基因进行克隆测序分析的结果较为相似。遗传进

化树表明,7株 PEDV 毒株的 S 和 ORF3 基因与 2008 年泰国流行株、2009 年韩国等地的毒株的亲缘关系比较近,N 基因与 CV777 标准株亲缘关系比较近,说明 S 基因和 ORF3 基因变异程度较大,可能源于泰国、韩国野毒株。

研究获得的 7 株 PEDV 的 S、N 和 ORF3 基因的变异情况,尤其在 S 基因片段,出现多个变异氨基酸,根据遗传进化树分析与东南亚其他国家流行毒株亲缘关系比较近,这是否能说明当前流行 PEDV 部分基因变异程度较大,导致现有疫苗对流行毒株的保护力不够,有待进一步研究。研究为今后科学防控 PED 提供了理论依据。

4 结 论

通过对福建流行 PEDV 毒株的 S、N 及 ORF3 基因进行变异分析,发现 7 株 PEDV 毒株的 N 基因变异程度较小,与 CV777 标准株亲缘关系较近,而 S 基因和 ORF3 基因变异程度较大,推测源于泰国及韩国的变异株。

参考文献:

- [1] 张强敏,郭福生,尹燕博,等. 猪流行性腹泻病毒分子生物学特征[J]. 中国病毒学报,2002,17(4):381-384.
- [2] PENZAERT M B,DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Arch Virol*,1978,58(3):243-247.
- [3] 李佑民,柳桂信,朱维正,等. 吉林省“猪传染性胃肠炎”疫情调查、人工感染传代和病毒分离试验[J]. 家畜传染病,1981(1):1-7.
- [4] SÁNCHEZ C M,IZETA A,SÁNCHEZ-MORGADO J M,et al. Targeted recombination demonstrates that

the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence[J]. *J Virol*,1999,73(9):7607-7618.

- [5] 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 Res*,2010,149(2):175-182.
- [6] SONG D S,YANG J S,OH J S,et al. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3[J]. *Vaccine*,2003,21(17-18):1833-1842.
- [7] 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.
- [8] YEO S G,HERNANDEZ M,KRELL P J,et al. Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99 [J]. *Virus Genes*,2003,26(3):239-246.
- [9] 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.
- [10] 李建强,柳纪省,兰 喜,等. 猪流行性腹泻病毒纤突蛋白基因克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报,2007,15(4):562-556.
- [11] 孙东波,冯 力,时洪艳,等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白中和表位区单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(11):887-890.
- [12] 刘孝珍,陈建飞,时洪艳,等. 2011 年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报,2012,34(3):180-183.

(编辑 白永平)