



猪流行性腹泻病毒 S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位最小基序鉴定

张政中^{1,2} 董世娟^{2,3} 司伏生^{2,3} 陈冰清^{2,3} 谢春芳^{2,3} 李震^{2,3} 李家奎^{*1} 于瑞嵩^{*2,3}

1 西藏农牧学院动物科学学院 西藏 林芝 860000

2 上海种猪工程技术研究中心 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

3 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106

摘要:【背景】S 蛋白是猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)的主要结构蛋白和免疫原性蛋白,在前期的研究中,本课题组在 S 蛋白的胞内区鉴定到 2 个包含线性 B 细胞表位的短肽。【目的】鉴定 PEDV S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位的最小基序。【方法】原核表达 2 个短肽的每次后移 1 个氨基酸的系列 8 肽,以免抗 S 蛋白血清为一抗,通过 Western Blot 筛选阳性反应 8 肽,鉴定 S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位的最小基序。【结果】S 蛋白胞内区的 2 个包含线性 B 细胞表位的短肽共享一个表位,该表位的最小基序为 ¹³⁷¹QPYE¹³⁷⁴。同源性分析显示该 B 细胞表位基序为保守性表位。【结论】确定了 S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位的最小基序为 ¹³⁷¹QPYE¹³⁷⁴; S 蛋白抗原表位的鉴定有助于提高对其结构和功能的理解。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, S 蛋白, 胞内区, 线性 B 细胞表位, 最小基序鉴定

Identification of minimal motif of linear B cell epitope on the cytoplasmic domain of porcine epidemic diarrhea virus S protein

ZHANG Zhengzhong^{1,2} DONG Shijuan^{2,3} SI Fusheng^{2,3} CHEN Bingqing^{2,3}
XIE Chunfang^{2,3} LI Zhen^{2,3} LI Jiakui^{*1} YU Ruisong^{*2,3}

1 Department of Animal Science, Tibet Agricultural & Animal Husbandry University, Linzhi, Tibet 860000, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: [Background] S protein is the main structural and immunogenic protein of PEDV. In our

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); National Natural Science Foundation of China (32072838); Key Project of Shanghai Science and Technology Agricultural Development (2020-02-08-0012-F01478)

***Corresponding authors:** LI Jiakui: Tel: 86-27-87281303; E-mail: lij210@mail.hzau.edu.cn
YU Ruisong: Tel: 86-21-62200389; E-mail: yursong@163.com

Received: 12-04-2021; **Accepted:** 31-07-2021; **Published online:** 16-11-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500101); 国家自然科学基金(32072838); 上海市科技兴农重点攻关项目(2020-02-08-0012-F01478)

***通信作者:** 李家奎: Tel: 027-87281303; E-mail: lij210@mail.hzau.edu.cn
于瑞嵩: Tel: 021-62200389; E-mail: yursong@163.com

收稿日期: 2021-04-12; **接受日期:** 2021-07-31; **网络首发日期:** 2021-11-16

previous work, two linear B cell epitopes (BCE) containing short peptides were identified in the cytoplasmic domain of S protein. **[Objective]** To identify the minimal motif of the linear BCE were identified in the cytoplasmic domain of PEDV S protein. **[Methods]** Serial 8-mers, advancing one aa once on the short peptide, were prokaryotically expressed. Positive 8-mers were identified by Western Blot using rabbit anti-S serum as the primary antibody and the minimal motif of the linear BCE was identified within the cytoplasmic domain of S protein. **[Results]** The two short peptides within the cytoplasmic domain of S protein contained the same epitope, and the minimum motif of the epitope was ¹³⁷¹QPYE¹³⁷⁴. Homologous analysis showed that the BCE motif was conserved. **[Conclusion]** The minimum motif of the BCE within the cytoplasmic domain of S protein was determined as ¹³⁷¹QPYE¹³⁷⁴. Identification of antigen epitope on S protein helps to improve the understanding of its structure and function.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus, S protein, cytoplasmic domain, linear B cell epitope, minimal motif identification

猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)是仅次于非洲猪瘟和蓝耳病的严重影响养猪业的传染性疫病。作为主要通过粪口传播的肠道传染病, PED 常导致大规模的 7 日龄内仔猪的严重腹泻、消瘦直至死亡^[1]。1971 年英国首次报道了 PED 零星暴发, 随后扩散至亚洲和欧洲的其他国家^[1-2]。2013 年美国首次暴发了 PED 疫情, 给其养猪业造成了重创^[3]。目前, 猪场的腹泻率依然居高不下, 疫病情况也更加复杂, 混合感染广泛存在^[4]。因此, PED 的临床诊断及疫苗开发越来越受到研究者的重视。

猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)属于冠状病毒科 α 冠状病毒属, 其约 28 kb 的正链 RNA 基因组编码的 4 个结构蛋白(S、M、E、N)中, S 蛋白在病毒粒子的表面形成冠状结构, 是诱导宿主产生中和抗体的主要结构蛋白^[5-6]。诱导宿主产生足够的中和性抗体是保护宿主抵御 PEDV 感染的关键, S 蛋白包含主要的诱导宿主产生中和抗体的抗原表位, 因此, S 蛋白在基因工程 PED 疫苗的研究中颇受关注。S 蛋白的 S1 亚基包含受体结合域, 通过与细胞受体的特异性结合决定病毒的宿主特异性; S2 亚基在病毒基因组释放所必需的膜融合过程中发挥重要作用^[7]。截至目前, 已经在 S1 亚基上鉴定到 5 个线性表位区(592-607、685-688、722-731、748-755 和

764-771 aa)^[4,8-12]和 2 个可诱导中和抗体产生的空间表位区(499-638 aa 和 636-789 aa)^[13-14]。S2 亚基的 1 368-1 374 aa 也是一个中和性线性 B 细胞表位区^[12,15]。一个蛋白抗原的长表位肽可能与其他蛋白抗原的抗体起交叉反应, 因此鉴定蛋白抗原表位的最小基序可提高检测的特异度; 将多个蛋白抗原表位的最小基序组成嵌合肽则可提高检测的灵敏度。然而, 对于 PEDV S 蛋白上线性 B 细胞表位的最小基序鉴定鲜有报道。

本课题组在前期研究中发现 PEDV CV777 S 蛋白的胞内区存在 2 个彼此重叠 8 aa 的包含线性 B 细胞表位短肽(P1: 1 361-1 376 aa; P2: 1 369-1 382 aa)^[16]。本研究利用抗 PEDV S 蛋白多抗筛选 P1、P2 短肽的每次前移 1 个氨基酸的系列 8 肽[含 Glutathione S-Transferase (GST)标签]中的阳性反应性 8 肽, 确定了 P1、P2 包含表位的最小基序, 以期将来 PEDV 的检测、多表位肽疫苗开发提供候选表位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和表达载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*), 本实验室保存; 质粒 pXXGST-1, 上海计划生育研究所徐万祥研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器

常用分子生物学试剂, 上海皓嘉科技发展有限

公司;质粒提取、DNA 胶回收试剂盒, Axygen 生物技术(杭州)有限公司;兔抗 PEDV (疫苗株 CV777 和流行毒株 SD2014) S 蛋白多抗血清,本实验室制备;猪抗 PEDV 血清,采自临床 PEDV IgG 阳性母猪;HRP 标记的山羊抗兔 IgG,生工生物工程(上海)股份有限公司;PVDF 膜,上海鼎国生物技术有限公司。

恒温振荡培养箱,上海旻泉仪器有限公司;凝胶电泳仪、半干转模仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 P1、P2 对应系列 8 肽的 GST 融合表达

P1、P2 对应 8 肽的表达参考文献[17]。将 8 肽的编码 DNA 片段体外退火,与经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切、割胶回收的 pXXGST-1 载体连接;重组载体送测序公司测序;SDS-PAGE 筛选温度诱导表达的 GST 融合 8 肽,立即使用或 -80°C 保存。

1.2.2 SDS-PAGE 及 Western Blot

SDS-PAGE 及 Western Blot 参考文献[17]。电泳结束后凝胶染色或进行 Western Blot;转印膜以脱脂奶粉封闭、Tris Buffered Saline with Tween-20 (TBST)漂洗;兔抗 S 蛋白血清或 PEDV 阳性猪血清(以 TBST 1:5 000 稀释) 4°C 孵育过夜;漂洗后的转印膜以 IgG-HRP (以 TBST 1:20 000 稀释)室温孵育 1 h,转印膜漂洗后利用化学发光试剂盒进行显色并拍照。

1.2.3 PEDV S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位预测

将 PEDV CV777 疫苗株 S 蛋白胞内区氨基酸序列(1 347-1 382 aa, ALS35469.1)提交在线软件 Immune Epitope Database (IEDB) (<http://tools.iedb.org/bcell/>)预测其所包含的线性 B 细胞表位,仅选择 3 种以上算法均预测到的表位。

1.2.4 最小表位基序的保守性分析

利用 MEGA X 比对 GenBank 中不同亚型 PEDV 代表性毒株的 S 蛋白序列,分析获得最小表位基序的保守性。

2 结果与分析

2.1 S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位预测

综合考虑 S 蛋白胞内区片段包含氨基酸残基的亲水性、柔性、表面可及性、抗原倾向性等特点,采用 6 种不同的算法预测线性 B 细胞表位,预测结果如图 1 所示,在 S 蛋白的胞内区预测到一个线性 B 细胞表位 $^{1365}\text{CRGPRLQPYEAFEK}^{1378}$ 。

2.2 S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位最小基序鉴定

SDS-PAGE 分析显示,S 蛋白胞内区 2 个包含 B 细胞表位短肽(P1, P2)的系列 8 肽都成功表达,重组 GST 融合 8 肽在凝胶上显示为约 21 kD 的条带(图 2A、2B)。利用抗 S 蛋白多抗、通过 Western Blot 筛选系列 8 肽中的阳性反应性 8 肽,结果显示 P1-7、P1-8、P1-9 和 P2-1、P2-2、P2-3 可以被兔抗 S 蛋白血清识别(图 2C、2D);这表明 2 个包含 B 细胞表位的短肽 P1、P2 包含的是同一个表位。对阳性反应性 8 肽氨基酸序列的分析显示,该表位的最小基序为 $^{1371}\text{QPYE}^{1374}$ (表 1)。

分别以抗 PEDV 流行毒株 SD2014 的 S 蛋白兔血清和 PEDV 康复母猪血清为一抗,Western Blot 验证鉴定到的阳性反应性 8 肽与抗 PEDV 流行毒株 S 蛋白多抗和猪抗 PEDV 血清的反应性,结果如图 3 所示,鉴定到的 5 个阳性反应性 8 肽(由于 P1-9 与 P2-1 序列完全相同,因此只选择 P2-1)均不与抗 PEDV 流行毒株 SD2014 的 S 蛋白兔血清发生反应(图 3B)。虽然反应强度相对较弱,但是猪抗 PEDV 血清可以识别 5 个阳性反应性 8 肽中的 2 个(P1-7 和 P2-2, 图 3C)。

2.3 PEDV S 蛋白胞内区线性 B 细胞表位最小基序保守性分析

为了分析鉴定最小表位基序的保守性,选取 GenBank 中代表性 S 蛋白序列进行比对分析。对应本研究得到的最小基序位置,24 株不同亚型 S 蛋白的序列完全相同(图 4),显示鉴定到的表位基序为保守性表位。

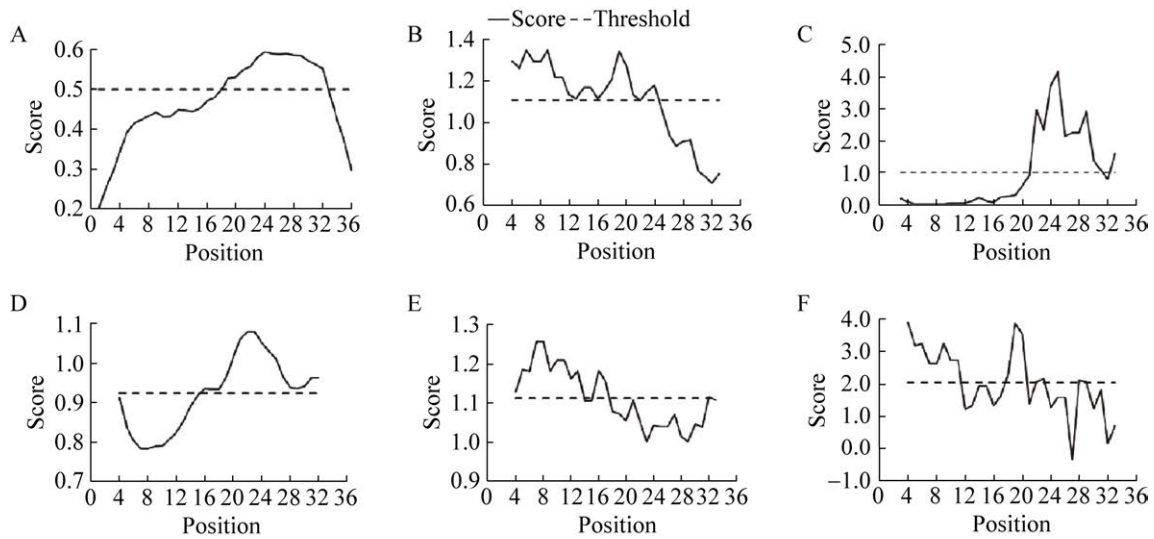


图 1 利用在线软件 IEDB 预测 PEDV S 蛋白胞内区的抗原决定簇

Figure 1 Prediction of antigenic determinant on the cytoplasmic domain of PEDV S protein using online software IEDB

注: A: 以 BepiPred 2.0 预测线性 B 细胞表位; B: 以 Chou 和 Fasman β 转角预测法预测 β 转角; C: 以 Emini 表面可及性表分析表面可及性; D: 以 Karplus 和 Schulz 柔韧性表分析柔韧性; E: 以 Kolaskar 和 Tongaonkar 抗原性表预测抗原决定簇; F: 以 Parker 亲水性表预测亲水性

Note: A: Prediction of linear B cell epitope using BepiPred 2.0; B: Beta turns analysis using Chou and Fasman beta turn prediction; C: Surface accessibility analysis using Emini surface accessibility scale; D: Flexibility analysis using Karplus and Schulz flexibility scale; E: Prediction of antigenic determinant using Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale; F: Hydrophilicity prediction using Parker hydrophilicity scale

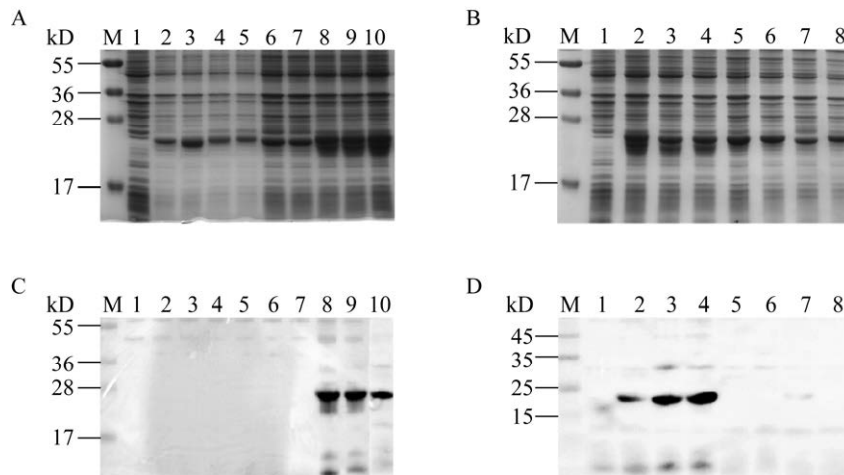


图 2 Western Blot 筛选 PEDV S 蛋白胞内区包含线性 BCE 的 8 肽

Figure 2 Screen of linear BCE containing 8-mers on the cytoplasmic domain of PEDV S protein using Western Blot

注: A、B: SDS-PAGE 分析表达的系列 8 肽; C、D: Western Blot 筛选阳性反应性 8 肽。M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导菌体; A、C: 2-10 分别为覆盖 P1 序列全长的系列 8 肽, P1-1-P1-9; B、D: 2-8 分别为覆盖 P2 序列全长的系列 8 肽, P2-1-P2-7

Note: A, B: SDS-PAGE analysis of the expressed serial 8-mers; C, D: Screening of positive 8-mers using Western Blot. M: Protein marker; 1: Precipitate of recombinant *E. coli* before induction; A, C: 2-10: Serial 8-mers covering P1, P1-1-P1-9, respectively; B, D: 2-8: Serial 8-mers covering P2, P2-1-P2-7, respectively

表 1 线性 B 细胞表位最小基序鉴定

Table 1 Mapping of minimal motif of the linear BCE

编号 No.	序列 Sequences (5'→3')
P1-1	FSGCCRG
P1-2	SGCCRGPR
P1-3	GCCRGPR
P1-4	CCRGPR
P1-5	CRGPR
P1-6	RGPR
P1-7	GPRLQPYE
P1-8	PRLQPYEA
P1-9	RLQPYEAF
P2-1	RLQPYEAF
P2-2	LQPYEAFE
P2-3	QPYEAFEK
P2-4	PYEAFEKV
P2-5	YEAFEKVH
P2-6	EAFEKVHV
P2-7	AFEKVHVQ

注：阳性反应性 8 肽和最小表位基序以黑体标出

Note: Positive 8-mers and aa of the minimal motif were indicated in black

3 讨论与结论

B 细胞表位又称抗原决定簇,是与特异性抗体相互作用的氨基酸簇^[18]。B 细胞表位既可以是连续的 3-10 个氨基酸基序(线性表位),也可以为一级结构上不连续但高级结构上相邻的氨基酸簇(构象性表位)^[19]。虽然大部分的抗原表位是构象性

表位,但是由于构象性表位的鉴定比较困难,所以线性表位的鉴定更受关注,其应用也更加广泛。线性表位和构象性表位与特异性抗体的结合取决于表位的关键氨基酸残基,病毒进化过程中的一个氨基酸突变可导致抗原表位的丢失或改变^[20]。作为 PEDV 表面的主要结构蛋白, S 蛋白特异性抗体的滴度与免疫或感染康复动物产生的抗体的中和活性显著相关^[21]。因此,鉴定 S 蛋白上的表位(特别是中和表位)对于 PEDV 检测方法的建立和多表位肽疫苗的开发具有重要意义。

在线软件 IEDB 预测显示, PEDV S 蛋白的胞内区存在一个线性 B 细胞表位¹³⁶⁵CRGPRRLQPYEAFEK¹³⁷⁸。Cruz 等利用中和性单抗和噬菌体展示技术也在 PEDV S 蛋白胞内区鉴定到一个中和性表位¹³⁶⁸GPRLQPY¹³⁷⁴^[15]。他们进一步的研究证实,包含此表位的 S 蛋白 C 末端 24 肽具有良好的免疫原性,可诱导小鼠产生 PEDV 中和抗体^[22]。最近,Okda 等也发现,中和性单抗 SD125-1 可以特异性地结合 GPRLQPY 多肽^[12],但对该表位的最小基序至今未见报道。本课题组前期利用抗 PEDV S 蛋白多抗也在 S 蛋白的胞内区发现了 2 个包含 B 细胞表位的阳性反应性短肽^[16]。本研究利用抗 PEDV S 蛋白多抗,通过 Western Blot 筛选覆盖这 2 个短肽全长且彼此重叠 7 个氨基酸

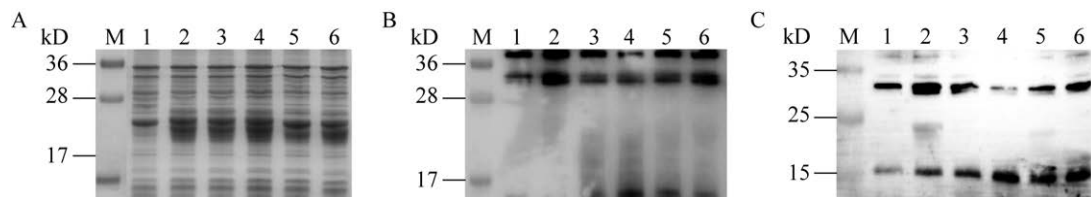


图 3 阳性 8 肽与抗 PEDV 流行毒株 S 蛋白兔血清及猪抗 PEDV 血清的反应性

Figure 3 Reactivity of positive 8-mers with rabbit serum against S protein of PEDV epidemic strain and porcine anti-PEDV serum

注: A: SDS-PAGE 分析阳性 8 肽; B: 以抗 PEDV 流行毒株 S 蛋白兔血清 Western Blot 分析筛选到阳性 8 肽; C: 以猪抗 PEDV 血清 Western Blot 分析筛选到的阳性 8 肽。M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导后的转化 pXXGST-1 载体的 *E. coli* 菌体; 2-6: 分别筛选到的阳性 8 肽, P1-7、P1-8、P2-1、P2-2、P2-3

Note: A: SDS-PAGE analysis of positive 8-mers; B: Analysis of positive 8-mers by Western Blot with rabbit serum against S protein of PEDV epidemic strain; C: Analysis of positive 8-mers by Western Blot with porcine anti-PEDV serum. M: Protein marker; 1: Precipitate of induced recombinant *E. coli* (pXXGST-1); 2-6: Positive 8-mers, P1-7, P1-8, P2-1, P2-2 and P2-3, respectively

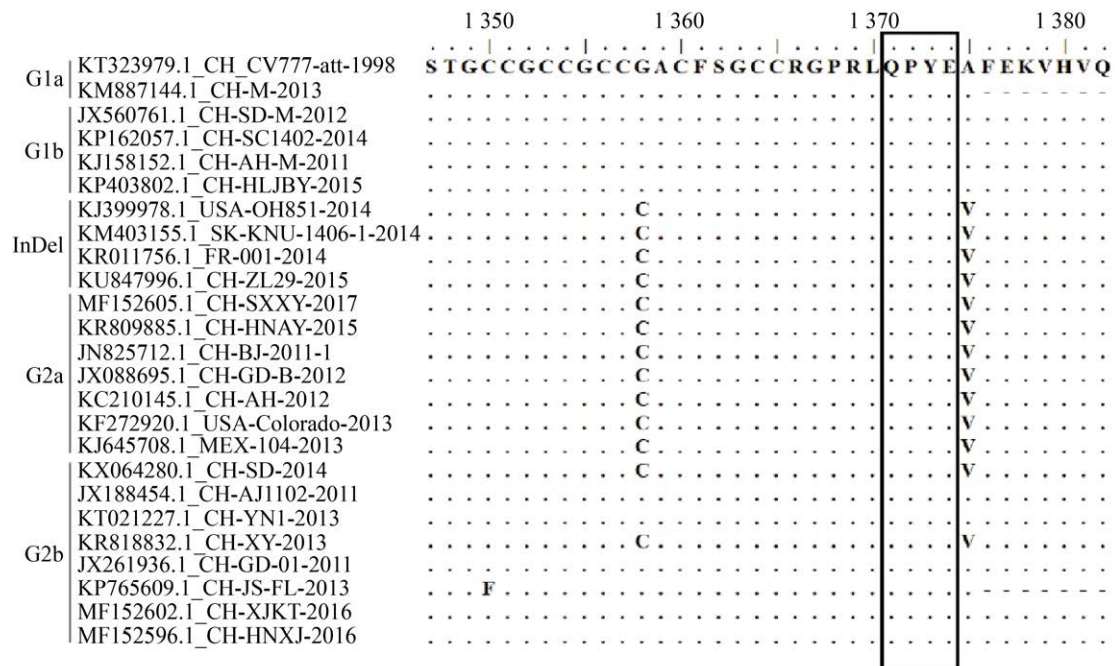


图 4 S 蛋白胞内区线性 BCE 在不同亚型 PEDV 毒株间保守性分析

Figure 4 Conservation analysis of linear BCE on the cytoplasmic domain of S protein among different subtype PEDV strains

注: 方框内为 S 蛋白胞内区线性 BCE 的最小基序

Note: The minimal motif of the linear BCE on the cytoplasmic domain of S protein is in the box

的系列 8 肽中的阳性反应性 8 肽, 确定了该表位的最小基序为 1371 QPYE 1374 。需要指出的是, 该最小表位基序的最后一个氨基酸残基 1374 E 并不在报道的表位肽 1368 GPRLQPY 1374 中, 本课题组的研究还发现, 包含此 7 肽的 8 肽 P1-6 (RGPR 1368 LQPY) 也不能被抗 S 蛋白多抗血清识别, 其原因可能是采用的表位鉴定方法不同。本课题组采用 Western Blot 鉴定表位的最小基序, 该方法利用抗重组蛋白多抗血清筛选彼此重叠 7 个氨基酸的系列 8 肽中的阳性反应性 8 肽, 通过比对阳性 8 肽中共有氨基酸序列确定表位的最小基序。其不仅敏感性强, 而且是可以精确定位表位的最小基序。Cruz 等利用随机 7 肽的噬菌体展示技术通过同源比对预测该表位序列为 1368 GPRLQPY 1374 , 而验证实验中使用的包含该 7 肽序列的 C 末端 24 肽, 该 24 肽包含了本研究鉴定到的最小表位基序^[15]。因此, 该研

究并未验证其预测的 7 肽表位能否被其所使用的单抗识别。Okda 等通过 ELISA 证明低稀释度(1:20)的单抗 SD125-1 可以与 7 肽 GPRLQPY 结合, 但信号强度较低, 其原因也可能与缺少 1374 E 有关^[12]。

虽然已有研究表明, 冠状病毒 S 蛋白的胞内区通过与 M 蛋白相互作用在病毒的装配过程中发挥重要作用, 但对于该结构域在病毒入侵过程中的作用以及识别该结构域的抗体如何降低病毒的感染性目前仍不清楚。然而, 在其他病毒的表面糖蛋白的胞内区中也发现了抗原表位, 如在 HIV 包膜糖蛋白 GP41 的 746 ERDRD 750 ^[23]。虽然 GP41 在膜上的拓扑结构目前仍存在争议, 但一种解释是发现识别 GP41 上该表位的抗体与 HIV P17 蛋白胞外结构域的一个抗原性相似的中和性表位存在交叉反应性^[24]。PEDV S 蛋白的胞内区是否确实具有中和表位, 或者抗 PEDV S 蛋白单抗或多抗是否识别

PEDV 上其他包含¹³⁷¹QPYE¹³⁷⁴基序的不连续表位还需要进一步的实验验证。

序列保守性分析显示,本研究鉴定到的表位基序在选择 的 24 株 PEDV 中高度保守,但 5 个包含该表位基序的 8 肽均不能被抗流行毒株 SD2014 的 S 蛋白血清识别。本课题组前期研究也发现,与利用抗 PEDV CV777 疫苗株 S 蛋白多抗血清在其胞内区鉴定到 2 个包含 B 细胞表位的短肽(¹³⁶¹FSGCCRGPR¹³⁷⁶LQPYEAF¹³⁷⁶和¹³⁶⁹RLQPYEAF¹³⁸⁴EKVHVQ¹³⁸²)不同^[16],流行毒株 SD2014 S 蛋白的胞内区并无与抗流行毒株 SD2014 S 蛋白血清阳性反应的短肽。抗流行毒株 S 蛋白血清也不能识别疫苗株 S 蛋白上 2 个阳性反应性短肽,而疫苗株 S 蛋白多抗可以识别流行毒株 S 蛋白上包含 QPYE 基序的短肽(¹³⁶⁹CRGPR¹³⁷⁶LQPYE¹³⁸⁴VFEKVH¹³⁸⁴)。因此,推测流行毒株 S 蛋白该区域相邻或相近的氨基酸残基的差异引起了免疫原性的改变或丧失,因此,免疫动物得到的抗流行毒株 S 蛋白血清由于缺乏相应的抗体成分而不能识别包含 QPYE 基序的短肽。

总之,本研究利用抗 PEDV CV777 疫苗株 S 蛋白多抗鉴定了 S 蛋白胞内区中和性线性 B 细胞表位的最小基序。S 蛋白抗原表位最小基序的鉴定为研究 S 蛋白的致病机制和功能奠定了基础,也为 PED 多表位肽疫苗的开发以及鉴别诊断方法的建立提供了理论依据和实验基础。

REFERENCES

- [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] Pensaert MB, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Archives of Virology*, 1978, 58(3): 243-247
- [3] Mole B. Deadly pig virus slips through US borders[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 388
- [4] Gong L, Gong Y, Lin Y, Qin J, Liu Y, Qian X, Xue C, Cao Y. Identification and characterization of a novel linear epitope in the spike protein of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Acta Virologica*, 2019, 63(1): 88-95
- [5] Yu RS, Dong SJ, Si FS, Jiang FY, Xie CF, Chen BQ, Yu L, Li Z. Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(2): 205-216 (in Chinese)
于瑞嵩,董世娟,司伏生,蒋凤英,谢春芳,陈冰清,喻利,李震.猪流行性腹泻病毒反向遗传操作技术及其应用[J].*生物工程学报*, 2017, 33(2): 205-216
- [6] Li WT, Van Kuppeveld FJM, He QG, Rottier PJM, Bosch BJ. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 117-127
- [7] Wang D, Fang LR, Xiao SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13
- [8] Sun YG, Li R, Xie S, Qiao SL, Li QM, Chen XX, Deng RG, Zhang GP. Identification of a novel linear B-cell epitope within the collagenase equivalent domain of porcine epidemic diarrhea virus spike glycoprotein[J]. *Virus Research*, 2019, 266: 34-42
- [9] Kong N, Meng Q, Jiao YJ, Wu YG, Zuo YW, Wang H, Sun DG, Dong SJ, Zhai HJ, Tong W, et al. Identification of a novel B-cell epitope in the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 46
- [10] Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Cui XC, Chen HY, Liu SW, Tong YE, Wang YF, Tong GZ. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(1-2): 73-81
- [11] Cao LY, Ge XY, Gao Y, Zarlenga DS, Wang KX, Li XL, Qin ZH, Yin XP, Liu JS, Ren XF, et al. Putative phage-display epitopes of the porcine epidemic diarrhea virus S1 protein and their anti-viral activity[J]. *Virus Genes*, 2015, 51(2): 217-224
- [12] Okda FA, Lawson S, Singrey A, Nelson J, Hain KS, Joshi LR, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Diel DG. The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2017, 509: 185-194
- [13] Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Liu SW, Chen HY, Wang YF. Spike protein region (aa 636-789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies[J]. *Acta Virologica*, 2007, 51(3): 149-156
- [14] Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. 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] Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes[J]. *Virology*, 2006, 354(1): 28-34
- [16] Li FP, Liu YJ, Dong SJ, Wang RY, Wang J, Yu RS, Li Z. Prokaryotic expression of truncated S2 subunit of porcine

- epidemic diarrhea virus and identification of its linear B cell epitopes containing regions[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1785-1795 (in Chinese)
- 李凤平, 刘英杰, 董世娟, 王瑞阳, 王剑, 于瑞嵩, 李震. 猪流行性腹泻病毒 S2 截短肽的原核表达及其线性 B 细胞表位区鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1785-1795
- [17] Yu RS, Zhu R, Gao WX, Zhang M, Dong SJ, Chen BQ, Yu L, Xie CF, Jiang FY, Li Z. Fine mapping and conservation analysis of linear B-cell epitopes of peste des petits ruminants virus hemagglutinin protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 208: 110-117
- [18] Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An introduction to B-cell epitope mapping and in silico epitope prediction[J]. *Journal of Immunology Research*, 2016, 2016: 6760830
- [19] Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(9): 706-713
- [20] Li CH, Li WT, Lucio De Esarte E, Guo HB, Van Den Elzen P, Aarts E, Van Den Born E, Rottier PJM, Bosch BJ. Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00273-17
- [21] Song QY, Stone S, Drebes D, Greiner LL, Dvorak CMT, Murtaugh MP. Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 85-92
- [22] Cruz DJM, Kim CJ, Shin HJ. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Research*, 2008, 132(1-2): 192-196
- [23] Broliden PA, Von Gegerfelt A, Clapham P, Rosen J, Fenyo EM, Wahren B, Broliden K. Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(2): 461-465
- [24] Cleveland SM, McLain L, Cheung L, Jones TD, Hollier M, Dimmock NJ. A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion[J]. *Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 3): 591-602