

李东艳, 朱梦梦, 姜智文, 等. 猪 A 群轮状病毒 VP7 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 81-86.
LI D Y, ZHU M M, JIANG Z W, et al. Establishment of prokaryotic expression and indirect ELISA assay for VP7 protein of porcine group A rotaviruses [J].
Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 81-86.

猪 A 群轮状病毒 VP7 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

李东艳, 朱梦梦, 姜智文, 陈杰, 粟硕*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在建立猪 A 群轮状病毒 (rotavirus A, RVA) 抗体的间接 ELISA 检测方法, 以提供一种快速、灵敏且高效的猪 RVA 抗体检测手段。本研究以原核表达的猪 RVA VP7 蛋白作为包被抗原, 通过对反应条件的系统优化, 成功建立针对猪 RVA 抗体的间接 ELISA 检测方法。结果: VP7 蛋白以包涵体的形式表达, 主要形成 2 种大小的蛋白条带, 分别为 37 kDa 和 35.3 kDa。通过优化, 确定间接 ELISA 反应条件为: 蛋白包被量为 0.25 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 封闭液为 5% 脱脂乳, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h; 一抗 (待检血清样本) 为 1:100 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; 二抗 (HRP 标记羊抗猪 IgG) 为 1:10 000 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; 显色为 15 min。通过检测 40 份猪阴性血清样本, 确定本研究建立的间接 ELISA 检测方法阳性临界值 $OD_{450\text{nm}}$ 值为 0.274 7, 批内和批间重复变异系数均在 10% 的范围内, 具有较高的特异性和灵敏性。对 20 份临床血清样本的间接 ELISA 结果与中和试验结果进行比对, 二者的符合率为 95%。通过检测其他基因型毒株灭活疫苗免疫后的血清表明, VP7 蛋白基因型的差异对 ELISA 阴阳性判定结果没有显著影响。综上, 本研究建立的间接 ELISA 方法可用于监测猪群轮状病毒感染情况及其疫苗的免疫反应。

关键词: 猪 A 群轮状病毒; VP7 蛋白; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)09-0081-06

Establishment of prokaryotic expression and indirect ELISA assay for VP7 protein of porcine group A rotaviruses

LI Dongyan, ZHU Mengmeng, JIANG Zhiwen, CHEN Jie, SU Shuo*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to establish an indirect ELISA method for detecting porcine rotavirus A (RVA) antibodies, providing a fast, sensitive, and efficient tool for RVA antibody detection in pigs. In this study, the prokaryotically expressed Porcine RVA VP7 protein was selected as the coating antigen. Through systematic optimization of experimental conditions, an indirect ELISA method for detecting Porcine RVA antibodies was successfully developed. The experimental results showed that VP7 protein was expressed as inclusion bodies, mainly forming two sizes of protein bands, 37 kDa and 35.3 kDa, respectively. The optimized conditions for the indirect ELISA reaction were determined as follows: protein coating at 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$, overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$; blocking with 5% skim milk, 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$; primary antibody (test serum sample) diluted 1:100, 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$; secondary antibody (HRP-conjugated goat anti-pig IgG) diluted 1:10 000, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h; and color development for 15 minutes. The positive cutoff value for the indirect ELISA method was determined to be 0.274 7 $OD_{450\text{nm}}$ by testing 40 negative pig serum samples. The coefficients of variation of intra- and inter-group assay were both within 10%, which was of high specificity and sensitivity. The indirect ELISA results of 20 clinical serum samples were compared with the results of the neutralization test, and the rate of compliance between the two was 95%. Sera immunized with inactivated vaccines of other genotypes showed that the differences in VP7 protein genotypes did not have a significant effect on the negative and positive ELISA results. Therefore, the indirect ELISA method established in this study can be used to monitor the infection of and the immune response to rotavirus vaccine in swine herds.

Keywords: porcine rotavirus A; VP7 protein; prokaryotic expression; indirect ELISA

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠孤病毒科

轮状病毒属成员, 是一种分节段的双链 RNA (dsRNA) 病毒, 能够感染婴幼儿及幼龄动物并引起腹泻, 根据 VP6 蛋白抗原性差异, RV 被分为 (A~D, F~J) 9 个血清群, 其中 A 群是引起仔猪腹泻的主要病原。

A 群轮状病毒 (rotavirus A, RVA) 感染导致仔

收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2025-06-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2025YFE0101000)

第一作者: 李东艳, 女, 博士研究生

* 通信作者: 粟硕, 教授, 主要从事于动物病毒性疫病的流行病

学及致病机制的研究, E-mail: shuosu@njau.edu.cn。

猪死亡率增加和日增重下降,对养猪行业危害严重^[1]。RVA在我国猪场广泛存在,几乎各个生长阶段的猪都可能受到感染,但通常只有仔猪会表现出明显的临床症状和发病情况^[2]。感染后的仔猪会出现腹泻,表现为水样或糊状黄色粪便,此外还会伴有精神萎靡、食欲不振和呕吐等症状。严重感染时,仔猪可能因脱水或因其他并发症而死亡^[3]。由于目前尚无针对RVA感染的有效治疗药物,疫苗免疫依旧是防控RVA感染的主要手段^[4-5]。因此,建立RVA诊断方法对于及时监测RVA疫情并制定科学防控策略至关重要^[6-7]。

本研究以实验室分离毒株RVA/pig/CH/U945/2022/G9P [23]为模板,通过PCR扩增编码VP7蛋白的基因序列并进行原核表达,以该蛋白为包被抗原建立了用于临床诊断和疫苗免疫监测的RVA抗体间接ELISA检测方法。

1 材料与方法

1.1 载体、毒株及试剂

pET-32a表达载体、大肠杆菌DH5 α 和BL21 (DE3)购自擎科生物科技股份有限公司;EcoR I和Xho I内切酶购自TaKaRa公司;PCR酶购自诺唯赞

公司;同源重组酶,鼠抗His标签单抗购自ABclonal公司;HRP标记的羊抗鼠IgG购自Proteintech公司;HisSep Ni-NTA Agarose Resin购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;FITC标记羊抗猪二抗购自Solarbio;HRP标记羊抗猪IgG购自Proteintech公司;猪轮状病毒分离毒株RVA/pig/CH/U945/2022/G9P [23]由本实验室分离并保存;G5和G9基因型灭活疫苗由本实验室利用分离毒株RVA/pig/CH/U945/2022/G9P [23]和RVA/pig/CH/10.2-20/2022/G5P [23]进行制备并保存。RVA、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪细小病毒(PPV)、伪狂犬病病毒(PRV)和猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)阳性血清样本及MA104细胞由华派生物技术(集团)股份有限公司赠予。

1.2 重组原核表达质粒的构建

通过对分离毒株进行PCR扩增,获得了编码VP7蛋白的核苷酸序列,引物序列见表1。通过同源重组将编码VP7蛋白的核苷酸序列连接到pET-32a载体(EcoR I和Xho I双酶切),转化并提取质粒,进行PCR和测序鉴定。

表1 原核表达质粒引物的构建

引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
32a-VP7-EcoR I -F	GATATCGGATCCGAATTCATGTATGGTATTGAATATAACCACACT	1 062
32a-VP7-Xho I -R	GTGCTGCTGCTGCTCGAGRACTCTATARTARAAAGCTGCTGAATT	

1.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组蛋白原核表达质粒及空载体分别转化到BL21 (DE3)感受态细胞,37℃培养,IPTG诱导表达和超声破碎后,通过SDS-PAGE分析蛋白表达情况。用PBS重悬洗涤包涵体,加入适量8 mol/L尿素,4℃摇床过夜溶解。溶解后的包涵体通过Ni亲和层析柱纯化,并进行透析复性。复性后,获得的VP7蛋白用于包被抗原。SDS-PAGE用于分析纯化复性后的VP7蛋白纯度,同时使用BCA法测定其浓度。

1.4 Western blot 鉴定

VP7蛋白电泳后转膜。5%脱脂乳4℃封闭1h。一抗为鼠抗His-tag按1:1 000进行稀释,4℃孵育1h。二抗为HRP标记羊抗鼠IgG按1:10 000进行稀释,4℃孵育1h。PBST清洗二抗并进行蛋白鉴定。

1.5 基于VP7蛋白的间接ELISA建立

本研究通过优化间接ELISA反应条件,包括抗

原包被浓度、血清稀释度、HRP标记羊抗鼠IgG二抗的稀释度和二抗反应时间,在保持单一变量的情况下,测定其 $OD_{450\text{nm}}$ 值,并计算阳性血清 $OD_{450\text{nm}}$ 值(P)与阴性血清 $OD_{450\text{nm}}$ 值(N)的比值,P/N值最大时为最优反应条件,从而逐步确定ELISA的最佳反应条件。随后,采用建立的间接ELISA方法,检测40份中和试验为RVA阴性的血清样本,计算平均值(\bar{x})和标准差(S)。根据统计学原理,当 $OD_{450\text{nm}} > \bar{x} + 3S$ 时判定为RVA抗体阳性,反之则为阴性。

1.6 特异性试验

根据本试验确定的最佳反应条件,检测常见猪病毒如PEDV、TGEV、CSFV、PPV、PRV和PDCoV的阳性血清样本。同时以RVA的阴性血清样本和阳性血清样本作为对照。试验结果基于3次独立试验的重复数据。

1.7 灵敏性试验

从1:100开始,按2倍稀释梯度逐步稀释RVA

阳性血清样本至 1 : 6 400, 同时以 RVA 阴性血清样本作为对照。每个稀释梯度进行 3 次重复。

1.8 重复性试验

根据本试验确定的最佳反应条件, 使用 3 个临床猪血清样本评估间接 ELISA 方法的批内重复性和批间重复性。

1.9 符合率试验

选取 20 份临床猪血清样本分别进行间接 ELISA 检测和中和抗体检测。中和试验具体操作如下: 向 200 倍半数细胞感染剂量 (200 TCID₅₀) 病毒液中加入终浓度为 20 μg/mL 的胰酶, 37 °C 条件下作用 1 h。与等量 2 倍倍比稀释后的血清样本进行涡旋混合, 37 °C 条件下作用 1 h 后将其接入到生长在 96 孔细胞培养板的 MA104 细胞中, 100 μL/孔, 37 °C 条件下作用 1 h, 弃液, 加入 MEM 维持液 (含终浓度为 3.0 μg/mL 胰酶), 培养并观察细胞的病变情况, 分析 20 份血清样本的 OD_{450 nm} 值与中和试验结果的符合率。

1.10 间接 ELISA 检测方法的应用

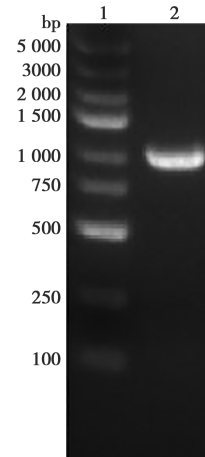
为探究基因型的差异是否影响间接 ELISA 的检测结果, 对接种 G5 或 G9 灭活疫苗的猪在免疫后 0、14、28 d 采集的血清样本 (每组 n = 5) 进行检测。在 14 d 进行加强免疫。采用 GraphPad Prism 9 软件对同一时间点不同组的数据进行双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 以 P < 0.05 表示差异显著。

2 结果

2.1 重组原核表达质粒的鉴定

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pET-32a 载体, 同源重组连接编码 VP7 蛋白的核苷酸序列, 转化后的重

组原核表达质粒通过 PCR 鉴定 (图 1) 和测序确认, 片段大小和核苷酸序列与目的基因一致, 证明成功获得阳性重组原核表达质粒。

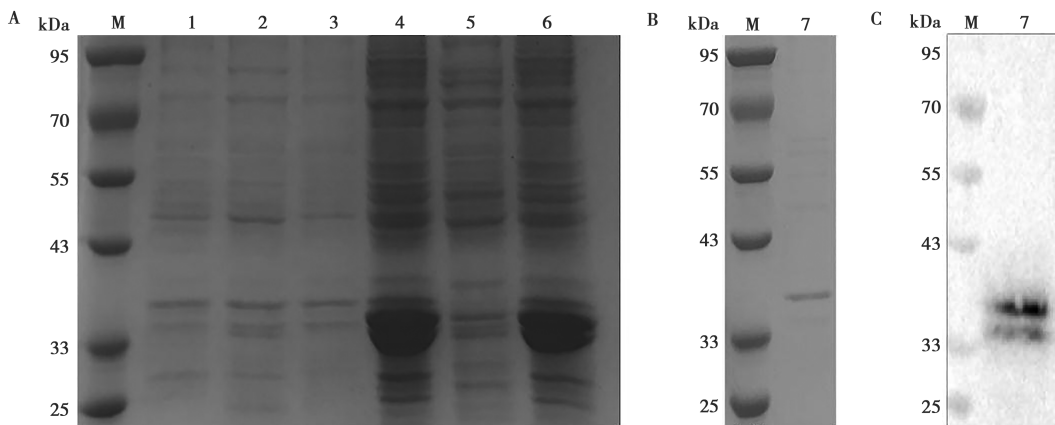


1. Marker; 2. 编码 VP7 蛋白的基因片段。

图 1 目的基因 PCR 鉴定

2.2 VP7 蛋白的诱导表达及 Western blot 鉴定

通过 SDS-PAGE 鉴定超声破碎后的蛋白样品, 如图 2 所示, VP7 蛋白在 37 kDa 和 35.3 kDa 处出现 2 条带。这是由于 VP7 蛋白由 2 个不同的起始密码子翻译, 分别产生 2 种不同分子大小的蛋白, 这些蛋白以包涵体的形式表达, 蛋白条带大小与预期结果一致。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对复性纯化后的蛋白进行鉴定, 在 37 kDa 和 35.3 kDa 处可以观察到明显的条带。VP7 蛋白纯化后浓度为 1.04 mg/mL。



M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导的 pET-32a 对照; 2. 诱导后的 pET-32a 对照; 3. 未诱导的 pET-32a-VP7 全菌; 4. 诱导后的 pET-32a-VP7 全菌; 5. 超声处理后的 pET-32a-VP7 上清液; 6. 超声处理后的 pET-32a-VP7 沉淀; 7. 纯化得到的 VP7 蛋白。

图 2 SDS-PAGE 分析 VP7 蛋白表达 (A)、纯化 (B) 和 Western blot 鉴定 (C)

2.3 抗原包被浓度及血清样本稀释度的确定

为了优化间接 ELISA 检测方法,本研究设置了不同抗原包被浓度和血清样本稀释度组合。在确保阴性血清样本 $OD_{450\text{ nm}} \leq 0.200$ 、 $P/N \geq 2$ 的条件下,所获得的最大值为最佳反应条件。由表 2 可知,血清样本的最佳稀释度为 1 : 100,抗原最佳包被浓度为每孔 $0.25 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, P/N 值为 7.390。

表 2 抗原包被浓度及血清样本稀释度的确定

抗原包被浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	项目	血清样本稀释度			
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400
10	P	1.695	1.484	0.835	0.778
	N	0.447	0.317	0.238	0.156
	P/N	3.790	4.677	3.504	5.003
5	P	1.517	1.302	0.800	0.624
	N	0.417	0.260	0.209	0.114
	P/N	3.642	5.006	3.824	5.476
2.5	P	1.408	1.289	0.708	0.609
	N	0.374	0.174	0.156	0.104
	P/N	3.768	7.390	4.555	5.888
1.25	P	1.241	1.077	0.604	0.503
	N	0.341	0.165	0.134	0.080
	P/N	3.639	6.521	4.526	6.295
0.625	P	0.901	0.888	0.597	0.361
	N	0.288	0.129	0.127	0.076
	P/N	3.127	6.908	4.704	4.738
0.3125	P	0.882	0.686	0.433	0.345
	N	0.241	0.102	0.114	0.074
	P/N	3.659	6.740	3.794	4.657

2.4 酶标二抗最佳反应条件的确定

为了优化间接 ELISA 酶标二抗稀释度及孵育时间,本研究设置了不同组合的酶标二抗稀释度和孵育

时间,以 P/N 最大值为最佳反应条件。结果表明,1 : 10 000 稀释酶标二抗,37 °C 孵育 1 h 条件最佳(表 3)。

表 3 酶标二抗最佳反应条件的确定

作用时 间/h	1 : 10 000			1 : 20 000		
	P	N	P/N	P	N	P/N
0.5	1.083	0.181	5.983	0.848	0.190	4.463
1	1.254	0.189	6.635	0.921	0.181	5.088
1.5	1.368	0.207	6.609	1.103	0.195	5.656

2.5 间接 ELISA 检测方法阳性临界值的确定

通过优化,确定本研究间接 ELISA 检测方法的反应条件:包被为 $0.25 \mu\text{g}/\text{孔}$,4 °C 过夜;封闭为 5%脱脂乳,37 °C 2 h;一抗(待检血清样本)为 1 : 100 稀释,37 °C 1 h;酶标二抗为 1 : 10 000 稀释,37 °C 1 h;显色为 15 min。通过检测 40 份阴性猪血清样本,确定该 ELISA 检测方法的阳性临界值。结果显示平均值 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 0.176 4,标准差为 0.032 8,阳性临界值 $OD_{450\text{ nm}}$ 值为 0.274 7。因此血清样本的 $OD_{450\text{ nm}} > 0.274 7$ 判为阳性,反之则为阴性。

2.6 特异性和灵敏性试验

如图 3A 所示,间接 ELISA 方法只与 RVA 阳性血清样本反应,与 RVA 的阳性样本相比,PEDV、TGEV、CSFV、PPV、PRV 和 PDCoV 阳性血清样本 $OD_{450\text{ nm}}$ 值低于判定值,表明该检测方法特异性良好。

通过检测二倍倍比稀释猪轮状病毒阳性猪血清样本,对本研究建立的间接 ELISA 方法的灵敏性进行评估。结果如图 3B 所示,本研究建立的间接 ELISA 方法, $OD_{450\text{ nm}} > 0.274 7$ 最高稀释度为 1 : 1 600,意味着该方法能够检测到抗体的最大稀释度为 1 : 1 600,表明该检测方法具有良好的灵敏性。

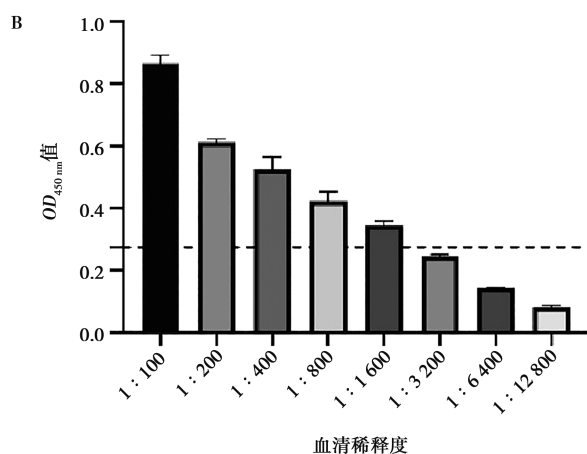
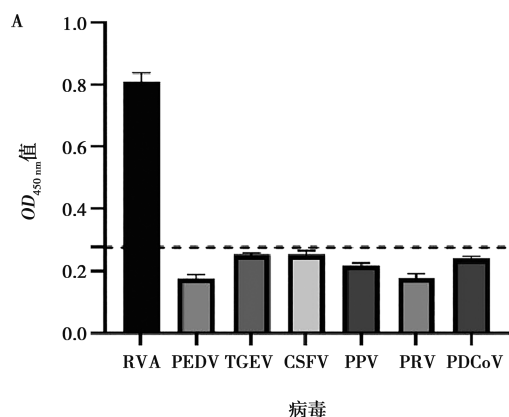


图 3 特异性 (A) 和灵敏性 (B) 试验结果

2.7 重复性试验

通过批内和批间试验评估间接 ELISA 检测方法的重复性, 结果表明, 批内变异系数在 2.22% 至

5.77% 之间, 批间变异系数在 4.53% 至 6.96% 之间 (表 4), 表明该检测方法具有良好的重复性。

表 4 批内和批间重复性试验

血清样本	批内重复性试验			批内差异 系数/%	批间重复性试验			批间差异 系数/%
	1	2	3		1	2	3	
1	0.653	0.662	0.688	2.22	0.683	0.622	0.738	6.96
2	0.543	0.597	0.527	5.39	0.656	0.623	0.587	4.53
3	0.352	0.405	0.387	5.77	0.337	0.355	0.383	5.28

2.8 间接 ELISA 与中和试验的符合率

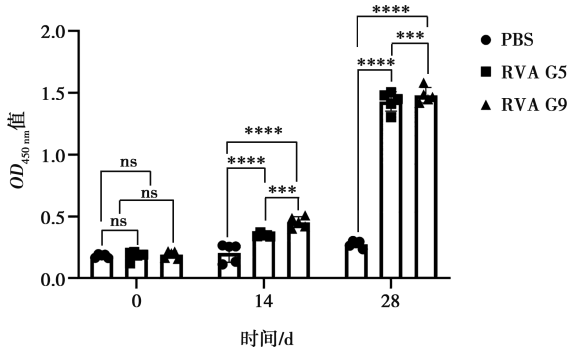
通过检测 20 份临床猪血清样本, 分析间接 ELISA 与中和试验的符合率, 结果显示 $OD_{450\text{nm}}$ 值越高, 通常对应较高的中和抗体滴度, 中和试验和间接 ELISA 方法分别检测到 11 份和 12 份阳性血清样本, 以及 9 份和 8 份阴性血清样本, 总符合率为 95% (表 5)。

表 5 间接 ELISA 与中和试验结果的符合率

中和试验	间接 ELISA 方法		合计	符合 率/%
	阳性血清样本	阴性血清样本		
阳性血清样本	11	0	11	100
阴性血清样本	1	8	9	88.89
合计	12	8	20	95

2.9 间接 ELISA 检测方法的应用

如图 4 所示, 灭活疫苗一免后 14 d, 体液免疫反应较弱; 一免后 28 d, 针对 VP7 蛋白的 IgG 抗体显著提高。结果表明, 本研究建立的间接 ELISA 方法能够有效检测其他 G 基因型血清样本中的 IgG 抗体, 且阴阳性的判定不受基因型差异的影响。



*** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$, ns 表示无显著差异。

图 4 不同时间点血清样本抗体水平

3 讨论

猪 RV 在我国广泛流行, 多个省份和地区已有相关报道。例如, 胡兴义等^[8]在贵州 27 个猪场采集的 203 份猪粪便样本中检测出 16 份 RVA 阳性, 阳性率为 7.88%; 周群等^[9]在四川 40 多个猪场采集的 303 份病料中检测出 98 份 RVA 阳性, 阳性率为 32.34%; 谷拉强等^[10]在江苏、江西、福建、山西和贵州 36 个猪场采集的 434 份腹泻样品中检测出 196 份 RVA 阳性, 阳性率为 45.16%。RV 的广泛传播给我国养猪行业造成了巨大经济损失^[11-13]。

RV 不仅在猪群中广泛传播, 而且具有显著的种间传播能力, 特别是在人与猪之间。家庭养殖、市场交易以及存在人与猪共同生活的环境, 这些情况促进了 RV 在人与猪之间的种间传播和基因重配^[11,14]。研究发现, 在人的腹泻样本中检测到与猪 RV 有基因重配特征的毒株^[15], 同时在猪的样本中也检测到与人 RV 有基因重配特征毒株^[16]。不同宿主来源的轮状病毒可能通过种间传播和基因重配形成新的毒株, 不仅提高了轮状病毒病的防控难度, 还对公共卫生构成潜在威胁。因此, 采用高效的 ELISA 抗体检测方法对于及时识别和监测 RV 的流行至关重要。

RV 抗体 ELISA 检测, 通常以 VP6 蛋白作为目标抗原。例如原霖^[17]通过杆状病毒表达 VP6 蛋白建立了猪 RV 血清 IgA 抗体的间接 ELISA 检测方法。高力国等^[18]通过原核表达 VP6 的截短片段 (VP6*, 149~332 aa) 建立了猪 RV 血清 IgG 抗体的间接 ELISA 检测方法。本研究建立的间接 ELISA 方法的包被抗原为原核表达的 VP7 蛋白, VP7 蛋白全长 1 078 bp, 由 326 个氨基酸组成, 分子量为 37 kDa。编码 VP7 蛋白的核苷酸序列差异决定 RV 的 G 基因型分型^[19-20]。作为 RV 的主要中和抗原, VP7 蛋白同样具有很强的免疫原性, 因此也成为 RV 免疫检测的另一个重要目标。尽管 RV 存在多种 G 基因型, 但本研究检测结果显示, 使用 G9 基因型 VP7 蛋白作为

目标抗原时,能够有效检测到针对 G5 基因型 RV 的抗体。为进一步验证不同 G 基因型的差异是否影响间接 ELISA 中血清样本阴阳性的判定,还尝试了以 G5 基因型 VP7 蛋白为包被抗原,检测了 G9 基因型灭活疫苗接种的血清样本。结果表明,不同 G 基因型的 VP7 蛋白对血清样本中 RV 抗体阴阳性判定无显著影响。此外,结果表明该检测方法具备良好的特异性、灵敏性和重复性,与中和试验的检测结果符合率达到 95%。

综上,本研究建立的间接 ELISA 方法可用于监测猪群中 RV 的感染情况,通过检测血清样本中与 RV 相关的抗体水平,为疾病防控提供科学依据,同时为猪 RV 的免疫学相关研究及疫苗评估提供可靠的抗体检测手段。

参考文献:

- [1] HOLLAND R E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1990, 3 (4): 345-375.
- [2] 王振玲,王金秋,王黎霞.北京地区腹泻仔猪轮状病毒感染的流行病学调查 [J]. *养猪*, 2013, (6): 103-104.
- [3] 王修武,邓可辉,马沐林,等.猪轮状病毒 G9P [7] 型云南株的分离鉴定及 VP4 和 VP7 基因测序分析 [J]. *动物医学进展*, 2024, 45 (8): 1-7.
- [4] SAIF L J, FERNANDEZ F M. Group A rotavirus veterinary vaccines [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174 (Suppl 1): S98-S106.
- [5] XUE R, TIAN Y, ZHANG Y, et al. Diversity of group A rotavirus of porcine rotavirus in Shandong Province China [J]. *Acta Virol*, 2018, 62 (3): 229-234.
- [6] FINGAS F, RÜCKNER A, HEENEMANN K, et al. Highly sensitive ELISA for the serological detection of murine rotavirus EDIM based on its major immunogen VP6 [J]. *J Virol Methods*, 2018, 262: 72-78.
- [7] KUMAR N, MALIK Y S, KUMAR S, et al. Peptide-recombinant VP6 protein based enzyme immunoassay for the detection of group A rotaviruses in multiple host species [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (7): e0159027.
- [8] 胡兴义,张双翔,冯旭芳,等.猪轮状病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及应用 [J]. *病毒学报*, 2016, 32 (6): 740-746.
- [9] 周群,陈小飞,阚蕊蕊,等.2017—2019 年四川地区猪 A 群轮状病毒的分子流行病学调查 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54 (5): 1063-1072.
- [10] 谷拉强,陶然,程曦,等.2022—2023 年我国部分地区猪 A 群轮状病毒分子流行病学调查分析 [J]. *南方农业学报*, 2023, 54 (10): 3083-3091.
- [11] QIAO M, LI M, LI Y, et al. Recent molecular characterization of porcine rotaviruses detected in China and their phylogenetic relationships with human rotaviruses [J]. *Viruses*, 2024, 16 (3): 453.
- [12] 乔成鹏.2015—2016 年中国部分地区猪轮状病毒感染检测及病毒分离与鉴定 [D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [13] 张家祺,甲呷格西,周群,等.宏基因组学技术分析四川省集约化猪场中仔猪腹泻粪便的病毒种群 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (6): 2478-2486.
- [14] GHONAIM A H, YI G, LEI M, et al. Isolation, characterization and whole-genome analysis of G9 group A rotaviruses in China: evidence for possible porcine-human interspecies transmission [J]. *Virology*, 2024, 597: 110129.
- [15] DO L P, KANEKO M, NAKAGOMI T, et al. Molecular epidemiology of rotavirus A, causing acute gastroenteritis hospitalizations among children in Nha Trang, Vietnam, 2007-2008: Identification of rare G9P [19] and G10P [14] strains [J]. *J Med Virol*, 2017, 89 (4): 621-631.
- [16] MIAO Q, PAN Y, GONG L, et al. Full genome characterization of a human-porcine reassortment G12P [7] rotavirus and its pathogenicity in piglets [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (6): 3506-3517.
- [17] 原霖.猪轮状病毒 G4P [6] 株的分离鉴定及新型检测方法的建立与应用 [D]. 北京:中国农业大学, 2018.
- [18] 高力国,申翰钦,陈谄全,等.猪轮状病毒重组 VP6 * 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55 (9): 4021-4028.
- [19] MAES P, MATTHIJNSSENS J, RAHMAN M, et al. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 238.
- [20] DESSELBERGER U. Rotaviruses [J]. *Virus Res*, 2014, 190: 75-96.