



分类号 S855.3

学 号 S20172294

山西農業大學

全 日 制 硕 士 学 位 论 文

抗 FCV 单克隆抗体阳性杂交瘤细胞株的建立

姓 名：刘 媛

指 导 教 师：闫 芳 教 授

学 科 专 业：预防兽医学

培 养 单 位：动物科技学院

中国·山西·太谷

二〇二〇年六月

Shanxi Agricultural University

**Full-time Master Degree
Dissertation**

**Establishment of Positive Hybridoma Cell Lines
secreting mAbs against FCV**

Name: Yuan Liu
Supervisor: Professor. Fang Yan
Major: Preventive veterinary medicine
Institution: College of Animal Science and
Veterinary Medicine

Taigu Shanxi China

June, 2020

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是在导师指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文研究做出过重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名（亲笔）：刘媛

2020年 6 月 8 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定。即学位论文的知识产权属山西农业大学；同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的原件、复印件和电子版；允许论文被查阅和借阅；本人授权山西农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

作者签名（亲笔）：刘媛

2020年 6 月 8 日

导师签名（亲笔）：[Signature]

2020年 6 月 8 日

本研究由国家重点研发计划子课题
(2016YFD0501000) 提供资助

**This research was supported by sub-topic of National key
research and development plan
(No. 2016YFD0501000)**

目 录

摘 要.....	1
前 言.....	2
1. 猫嵌杯病毒及其疾病概述.....	2
1.1 病原学.....	2
1.2 流行病学.....	3
1.3 临床症状.....	4
1.4 病理解剖变化.....	5
1.5 诊断、治疗与防控.....	5
1.6 单克隆抗体的研究进展.....	8
2. 研究目的及意义.....	8
材料与方法.....	10
1. 试验材料与主要试剂.....	10
2. 设备与仪器.....	10
3. 主要溶液配制.....	11
3.1 细胞培养相关试剂.....	11
3.2 SDS-PAGE 相关试剂.....	11
3.3 转化相关试剂.....	12
3.4 LIPS Buffer.....	12
3.5 单克隆抗体制备有关试剂.....	12
3.6 Western Blot 有关试剂.....	12
4. 试验方法.....	13
4.1 序列分析.....	13
4.2 病毒纯化.....	14
4.3 PVAX I-nano-VP1 重组质粒的构建.....	16
4.4 重组质粒转染真核细胞.....	18
4.5 建立 LIPS 检测方法对已知血清进行检测.....	19
4.6 动物免疫.....	19
4.7 小鼠血清效价的测定.....	20
4.8 阳性杂交瘤细胞株的建立.....	20
4.9 单克隆抗体的生物学特性分析.....	23
试验结果.....	25
1. FCV 遗传进化分析.....	25
2. FCV 全基因核苷酸及 ORF2 氨基酸序列分析.....	26
3. FCV 纯化.....	27
4. SDS-PAGE 蛋白测定.....	28
5. FCV TCID50 测定.....	29
6. 蛋白峰浓度测定.....	29
7. 重组质粒 PVAX I-nano-VP1 的构建.....	30
8. 重组蛋白 Nanoluc-VP1 表达的检测.....	30
9. 重组蛋白荧光活性检测.....	30

10. 重组蛋白热稳定性检测	31
11. 小鼠阳性血清和阴性血清的 LIPS 检测	32
12. 免疫小鼠血清抗体中和效价的测定	32
13. 杂交瘤细胞的筛选与建立	32
14. 单克隆抗体的生物学特性分析	33
14.1 单克隆抗体的 Western Blot 鉴定	33
14.2 腹水的效价测定	33
14.3 单克隆抗体的中和活性鉴定	33
14.4 单克隆抗体的亚型鉴定	35
分析讨论	36
1. 病毒株的选择	36
2. 纯化方法的选择	36
3. 检测抗原、表达系统和检测方法的选择	37
4. 荧光素酶的选择	37
5. LIPS 检测	38
6. 小鼠免疫	38
7. 阳性杂交瘤细胞株制备	39
8. 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆	39
结 论	41
参考文献	42
Abstract	46
攻读硕士期间科研情况	48
致 谢	49

抗 FCV 单克隆抗体阳性杂交瘤细胞株的建立

摘要

猫嵌杯病毒 (*Feline calicivirus*, FCV) 是引起猫科动物上呼吸道疾病的常见病原体之一, 20~53% 的猫上呼吸道疾病是由 FCV 感染引起。猫感染 FCV 的主要临床症状为发烧、结膜炎、鼻炎、口腔溃烂或慢性口腔炎, 偶尔也出现皮肤溃烂、跛行和肺炎。猫感染 FCV 后发病率较高, 但死亡率很低。近年来, 已有研究表明 FCV 强毒株可导致高致死率, 严重危害着猫科动物的健康。FCV 常与其他病毒混合感染猫科动物, 不利于诊断, 因此建立快速准确的检测方法至关重要。

本试验通过对本实验室分离的 2 株病毒株与其他国内外典型分离株进行序列比对, 结果显示与 FCV-SX1 株相比, FCV-SX2 株与疫苗株的同源性较低与流行株的同源性较高, 因此选择 FCV-SX2 株作为抗原, 并对其大量培养后进行分子筛纯化和 SDS-PAGE 鉴定。将纯化的病毒 10 倍倍比稀释接种于 F81 细胞, 测定其 TCID₅₀, 结果显示其 TCID₅₀ 为 $10^{-9.3}$, BCA 测定其蛋白浓度为 1.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。将 FCV 的 VP1 基因及 nano 荧光素酶基因连接至真核表达载体 PVAX I 中, 构建重组质粒 PVAX I-nano-VP1, 将其转染至 COS1 细胞进行 Nanoluc-VP1 重组蛋白的真核表达, 利用 ELISA 方法鉴定的阳性和阴性血清建立检测抗 FCV 抗体的 LIPS 检测方法。纯化好的病毒与弗氏佐剂乳化免疫小鼠, 免疫四次后, 利用中和试验测定小鼠中和抗体效价, 选择中和抗体效价在 1:3200 以上的免疫小鼠, 将免疫小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞融合。使用 LIPS 检测方法筛选分泌抗 FCV 单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞株。经过三次亚克隆, 共筛选到 5 株稳定分泌抗 FCV 单抗的阳性杂交瘤细胞株分别命名为 1E2, 4C3, 5F11, 6G9, 7D2, 其中有两株 (4C3, 5F11) 有中和活性。1E2, 4C3 和 6G9 的亚类鉴定为 IgG1 型, 5F11 和 7D2 为 IgM 型, 轻链均为 κ 链。以 FCV-SX2 病毒株作为抗原, 阳性杂交瘤细胞分泌的抗体作为一抗进行 Western Blot 鉴定, 结果显示 5 株单抗均可识别 FCV-SX2 病毒株, 有良好特异性。将杂交瘤细胞接至小鼠腹腔, 用 LIPS 检测方法检测腹水效价, 结果显示 1E2 和 6G9 的腹水效价为 1:12800, 4C3、5F11 和 7D2 的腹水效价为 1:25600。本试验对建立 FCV 快速准确的检测方法有重要价值。

关键词: 猫嵌杯病毒; LIPS; 杂交瘤细胞; 真核表达系统

前言

1. 猫嵌杯病毒及其疾病概述

FCV (*Feline calicivirus*, FCV) 是引起猫科动物上呼吸道疾病的常见病原体之一, 20~53%的猫上呼吸道疾病是由 FCV 感染引起。猫感染 FCV 的典型临床症状有发烧、结膜炎、鼻炎、口腔溃烂或慢性口腔炎, 偶尔也有皮肤溃烂、跛行和肺炎发生。

FCV 属于嵌杯病毒科水疱疹病毒属 (*Vesivirus*), 病毒基因组为单分子线状正链 RNA, 病毒颗粒无囊膜, 核衣壳呈 20 面体对称。嵌杯病毒科目前有 5 个属, 包括水疱疹病毒属 (*Vesivirus*)、兔病毒属 (*Lagovirus*)、诺如病毒属 (*Norovirus*)、沙波病毒属 (*Sapovirus*) 和纽伯病毒属 (*Nebovirus* 或 *Becovirus*)^[1]。其中, 诺如病毒属和沙波病毒属是引起人类非细菌性胃肠道疾病最常见的病原体^[2]。其他属则在多种动物中广泛传播, 具有高度传染性和致死性的特点, 如引起家兔和野兔感染的兔出血症病毒, 有些病毒可跨种传播, 即感染原始宿主以外物种, 例如圣米格尔海狮病毒 (*San Miguel Sealion*, SMSV)。许多研究者从分子水平上对动物源性嵌杯病毒进行了大量的研究, 结果表明了 FCV 作为猫呼吸道疾病病原体的重要性以及其作为嵌杯病毒实验室研究模型的可行性。

1.1 病原学

FCV 全长大约为 7.7kb, 含有 3 个开放阅读框 (ORF)^[2,3]。ORF1 编码的多聚蛋白大约由 1800 个氨基酸组成。病毒蛋白酶切割后形成的多个多肽段, 进一步形成病毒复制复合物^[4]。ORF2 和 ORF3 由大约 2.4kb 的亚基因组 mRNA 编码, 其中, ORF2 编码前衣壳蛋白 (VP1)^[5,6], ORF3 编码小衣壳蛋白 (VP2)^[7]。

国内外 FCV 分离株的基因组核苷酸序列的同源性约为 80%, 虽然同源性较低, 但 FCV 只能分为两种不同的基因型, 而 II 型中只有日本分离株^[8]。由于病毒复制中病毒聚合酶引起的错配和来自不同 FCV 毒株基因的重组导致了 FCV 基因序列的多样性^[9,10]。和其他 RNA 病毒类似, 由于 FCV 基因组的连续快速突变和较低修复率, 使得许多 FCV 的新毒株不断出现^[11]。最近 1 项纵向流行病学研究发现, 英国的 1 个收容所有 16 株不同 FCV 分离株在传播^[12]。FCV 基因序列的多样化和 FCV 快速进化的能力解释了 FCV 新毒株出现的原因。因此, 由于 FCV 毒株多样性的存在, 迫切需要研制出具有广泛交叉保护的疫苗, 以用于预防 FCV 疾病发生和感染。

FCV 的衣壳蛋白含有被宿主免疫系统识别的抗原决定簇, 在病毒的复制中有多种功

能。其在病毒复制中的作用包括病毒对宿主细胞的识别和基因组包装，即病毒与易感细胞的吸附、与受体的相互作用、传入细胞以及释放基因组到细胞质。此外，衣壳可保护病毒基因组，防止病毒在宿主细胞之间传播时受到细胞外环境的破坏。最近 1 项研究表明，FCV 的衣壳蛋白在外界环境中可稳定存在，有关 FCV 衣壳蛋白在各种环境中稳定性试验的研究表明，衣壳蛋白在 pH 4.0~8.5 之间相对稳定^[13]，可存活 2 周。

FCV 衣壳呈二十面体对称，其衣壳蛋白亚单位呈杯状（嵌杯病毒中的杯状起源于拉丁文的 *calyx*，意味着杯形）。最近 1 项研究揭示了 SMSV4 的衣壳蛋白结晶体的结构^[14]，由于 FCV 和 SMSV4 的衣壳蛋白的相似性（52%），此结构可作为预测 FCV 衣壳结构的重要模型。衣壳由 180 个 VP1 衣壳蛋白组成，呈 90 个拱形二聚体排列于二十面体晶格中。关于 SMSV4 衣壳的分析显示衣壳上的受体结合位点可能位于 VP1 二聚体之间的界面中。

FCV 常与水疱性疾病有关，但部分 FCV 分离株是从患有非水疱性症状的猫体内分离的。许多嵌杯病毒是肠道病原体，有从患腹泻症状的猫体内分离到 FCV 的报道，且分离株对胆盐和胰酶有抗性^[15]。FCV 在粪便样本中很难被分离到，但是有部分 FCV 强毒株可通过胃肠道传播，并在某些情况下在肠上皮细胞中复制。

1.2 流行病学

人们通常认为 FCV 是一种口腔和上呼吸道病原体，但是 FCV 最初是在新西兰发病的 1 只猫的胃肠道中分离到的^[16]。研究表明，FCV 在猫群中广泛流行。通过病毒分离或逆转录聚合酶链式反应（reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR）检测猫口腔分泌物中的病毒 RNA 可以反应猫群中 FCV 的流行情况。国外横向研究报道了 FCV 在猫群中的流行率（患病率）为 2%~40%^[17-20]。有研究调查了 5 个养猫基地在 15~46 个月内 FCV 的流行情况，结果表明，猫的患病率为 0%~91%，其中感染 FCV 的平均患病率为 6%~75%^[21]。

近年来，FCV 在国内也广泛流行，许楚楚^[22]对中国农业大学动物医院的 412 例病例进行 FCV 和疱疹病毒(FHV)流行病学调查，结果呈现有呼吸道症状的猫患中有 60.2% 患有 FCV 或 FHV，其中 FCV 占了 46.3%，混合感染为 11.8%；范泉水等从广西桂林某一野生动物养殖场的东北虎和华南虎体内分离了 1 株 FCV^[23]；农科院的刘永相在收集的东北虎粪便中分离出了 1 株 FCV，命名为 TFHLJ-8^[24]。

试验研究表明，猫感染单一毒株后，向外排毒时间可长达 75 天^[25]，在密集的猫群中 FCV 持续高度流行，可能是由于猫感染 FCV 后长期向外排毒和继发或再感染 FCV 病毒株引起的^[26]。猫可能会同时感染多种 FCV 的变异株，每种变异都是由原始毒株基

因突变、遗传漂变、选择压力导致^[27]。具有呼吸道症状的 FCV 感染恢复猫有可能会发展为持续的口咽感染，成为 FCV 的携带者，病毒会不断的从口咽部排出，但排毒程度会随时间和猫的个体差异而异^[28]，这些猫会成为 FCV 的传染源。多数 FCV 感染猫，病毒的排出会出现于感染后的几周到几个月内，但部分猫可能会终生排毒。FCV 病毒携带者的长期存在，使得健康猫感染 FCV 的概率非常高，感染率大约是 8%~24%^[29]。

猫感染 FCV 后发病率较高，死亡率较低，只有少数情况下会导致致死性疾病。然而，近年来，不断有关于高死亡率的致死性全身性 FCV 疾病的报道^[30-33]。1998 年，在加利福尼亚的北部首次报道了由 FCV 感染引起猫发热性出血性疾病^[31]，感染 FCV 的猫死亡率达 33%~50%，这次流行中从感染的猫体内分离到 1 株新的 FCV 毒株：FCV-ari，该毒株具有高度传染性，虽然采取了消毒措施，但仍然能通过污染的物品传播疾病。自此，宾夕法尼亚、马萨诸塞、田纳西、内华达和加利福尼亚南部均有疫情发生^[34]。

1.3 临床症状

猫是 FCV 的易感动物之一，感染后的潜伏期常为 2~3d，其中 1 岁以下的猫最为易感，许多猫感染或持续感染 FCV 不会有明显的临床症状。在自然或人工感染 FCV 并显现急性疾病经过的猫中，多数猫典型的临床症状为发烧和舌或口腔溃疡，也有部分猫表现为上呼吸道临床症状。典型的上呼吸道症状有浆液性或粘液性鼻眼分泌物、打喷嚏、结膜充血、睑痉挛和结膜水肿。此外，个别猫偶有抑郁、厌食和唾液分泌过多，有时还会出现伴随咳嗽和呼吸困难的肺炎。1 项流行病学研究表明，尽管在有上呼吸道临床症状的疫情中分离到 FCV，但是该疾病很有可能是 FCV 伴有其他病原体的混合感染^[18,19,35]，并且在试验研究中发现并不是所有的 FCV 分离株都能造成呼吸道疾病。研究表明，FCV 感染也可以引起其他不典型的临床症状，如黄疸、水肿、跛行、呕吐和腹泻等^[30,31,33,36-41]。

少数感染 FCV 的病猫可出现跛行症状。Terwee 与其团队^[40]和 Dawson 与其团队^[36]将 2280 和 F65 病毒株接种于 SPF 猫或幼猫重现了跛行症状。上述研究结果表明，直接将病毒接种至关节内，表现为急性、出血性和嗜中性滑膜炎的组织学病变，通过其他方式接种的猫并不一定出现滑膜炎或跛行。在自然或人工感染的猫中，与口腔或呼吸道疾病^[42]和恶性全身性疾病有关的毒株都会引起跛行这一临床症状。

能引起严重支气管间质性肺炎的 FCV 病毒株是最早发现的高毒力毒株^[43]，一项研究中，人工感染该毒株的猫经组织学和超微结构分析，显示该猫有严重的弥漫性肺泡损伤^[44]。恶性系统性嵌杯病毒（virulent-systemic FCV, VS-FCVs）^[30,32]可造成恶性系统性疾病（virulent-systemic disease,VSD）。VSD 的临床表现包括对抗生素无反应的发热和

口腔溃疡、水肿（如头部、耳廓和四肢或多肢）、皮肤溃疡（如耳廓，脚垫，下肢）、黄疸，该病的死亡率约为 50%。与其他病毒株相比较，VS-FCVs 在流行过程中，仅引起少数猫感染，接种疫苗的猫更容易感染^[25,30,31,33]。此外，也有老虎幼崽、成年非洲狮和东北虎感染 VS-FCVs 的报道^[45]。

FCV 感染偶尔会引起流产和神经症状（焦虑不安）^[38]，虽然能从感染组织中分离到 FCV，但并不能重现相关病征。在有关 FCV 感染的病例中出现了慢性牙龈炎或口腔炎的症状，有人提议 FCV 与慢性牙龈炎或口腔炎有关^[46,47]，但在用相应病毒株复制病例的试验^[41,48]中，并不能再现相应病症，这表明可能和其他因素有关。

1.4 病理解剖变化

感染的病猫眼观病变为口腔黏膜有红肿增生，甚至于造成溃疡，发生溃烂，肺部出现肺水肿和间质性肺炎，肠壁和肠道黏膜常出现充血和出血，回肠部位有大量纤维素性渗出物，肾脏、肝脏和脾脏等组织有不同程度的出血坏死。组织学病理变化为当形成溃疡灶时，大量的嗜中性粒细胞会聚集至溃疡灶附近，支气管有脱落的细胞和大量渗出液，肺部出现肺泡巨噬细胞积聚，肠上皮细胞变性坏死，在病变组织中可分离检测到 FCV 的存在^[49,50]。

1.5 诊断、治疗与防控

FCV 常见的检测方法主要有病毒分离、中和试验、荧光定量 RT-PCR、酶联免疫吸附反应（ELISA）、间接免疫荧光（IFA）等。

FCV 可在猫源细胞系上增殖，所以可以利用 F81 细胞或 CRFK 细胞对 FCV 进行分离培养。口咽拭子、鼻拭子等经初步处理将病料接种至细胞，观测其是否病变，盲传 3~5 代仍无病变则视为阴性。刘永相^[24]从收集的东北虎粪便中分离出了 1 株 FCV，命名为 TFHLJ-8，黄倩倩^[51]从家猫的鼻咽拭子中分离出 1 株 FCV，命名为 FB-NJ-13。虽然用病毒分离检测的结果直观，能扩大培养病毒，假阴性率较低，但是过于耗时，观察病变常需要数天，且有病变后还需要通过核酸检测等方法进一步鉴定。

通过电镜技术对处理后的病料或细胞培养物进行观察可以较为准确的观测病毒形态结构，但是不能鉴别不同毒株。此外，电镜技术较为复杂，所用仪器昂贵，检测周期长，不适用于大量样本检测。且电镜检测的样本应有一定量的病毒才能观察到病毒，所以电镜不作为常规检测。

FCV 也常通过核酸检测进行鉴定。Ohe^[52]等人针对 ORF2 序列设计引物建立了 RT-PCR 方法，并检测出免疫后的猫体内存在 FCV；王翀^[53]等人建立了能同时鉴别 FCV、FPV 以及 FHV-1 的多重 PCR 方法，研究结果显示其灵敏度较高；Marsilio^[54]等人建立了

套式 RT-PCR 方法诊断 FCV，检测出 18 份眼拭子和 23 份口腔拭子为阳性，同批样本经普通 RT-PCR 检测，5 份眼拭子和 12 份口腔拭子为阳性，经病毒分离，5 份眼拭子和 13 份口腔拭子为阳性；姜雪^[55]等用 TaqMan 探针建立了快速检测 FCV 的荧光定量 PCR 法，结果显示有良好的特异性、敏感性和重复性。RT-PCR 和套式敏感性高，所需样本量少且可同时检测多份样本，适用于初筛，其中套式 RT-PCR 耗时相对较高。Q-PCR 所用试剂相对昂贵，需要专用的仪器，但可实现实时监测定量检测，也省去了凝胶电泳的过程。

FCV 有较高敏感性和特异性的检测方法主要集中于血清学检测。Digangi^[56]等人利用中和试验检测了动物收容所猫血清中的抗体，抗 FCV 抗体滴度 ≥ 32 的猫有 127 只，占总数的 36.6%，中和试验可以用于定性定量，但是耗时较长，一般需要观察数天；Digangi^[57]等人建立了 ELISA 方法检测猫群中 FCV 的保护抗体滴度，发现对 FCV 的敏感性较好，ELISA 有高度敏感性和特异性，不需要特殊仪器就能检测大量样本，此外其检测成本较低，尤其是此方法与单抗结合后，被广泛应用于生物和医学等多领域。但是，ELISA 方法的缺点也很明显，其重复性较差，易出现假阳性，最终结果也易被温度和时间所干扰。

此外还可利用胶体金免疫检测技术和荧光素酶免疫共沉淀系统（Immunoprecipitation luciferase system, LIPS）对 FCV 进行检测。

胶体金免疫诊断技术是将胶体金作为载体吸附抗原后与相应抗体作用，以此来检测特异性抗原。氯金酸在还原剂如鞣酸、白磷等作用下聚合而成了一种胶体颗粒，这种胶体颗粒就是胶体金，其粒径在微米级以下，能够与蛋白质通过静电作用结合，而不影响蛋白质的生物特性。胶体金试纸条使用简便，用时短，不用特殊仪器就可进行检测，储存时间较长，而相较于 ELISA 最后一步与酶底物反应，胶体金本身就为红色，所以不需要加入显色剂，以此避免了致癌性酶底物对人体的损害，有众多学者将此技术用于多种抗原抗体的检测，目前还没有出现用于 FCV 的胶体金试纸条，本试验中制备的阳性杂交瘤细胞株可用于下一步胶体金试纸条的制备。

目前为止，没有任何研究将 LIPS 用于 FCV 的检测方面。荧光素酶免疫共沉淀系统是一种测定血清中未知抗体的检测技术，主要是通过哺乳动物细胞中将抗原和荧光素酶融合表达后来检测抗体。将荧光素酶基因插入抗原基因，在动物细胞中表达出附有荧光素酶的抗原蛋白，试验时抗原抗体先进行特异性结合，再利用大颗粒物质琼脂糖凝珠将抗体捕获，形成了琼脂糖凝珠-抗体-抗原复合物，检测荧光值，有抗体则有荧光值，反之则无。LIPS 检测系统利用真核细胞表达制备抗原，蛋白进行翻译后修饰，所以表达的蛋白在功能和空间构象方面会更接近于天然蛋白，检测特异性较高^[58]。因为荧光素酶有放大作用，所以检测标签蛋白使用荧光素酶能使检测的灵敏性更高^[58]，也不需要提

取纯化蛋白，避免了真核细胞表达的外源蛋白量少的缺点，在抗原制备上更为简单。此外，LIPS 是在液相-液相中进行，有利于受体配体结合，提高抗体检出率，相较于荧光免疫和 ELISA，这个方法更快速简便，能够用于快速检测^[59,60]。本试验旨在建立可用于检测 FCV 的 LIPS 检测方法。

目前已有几种能针对 FCV 引起的症状的药物。泛昔洛韦曾有临床上治愈 FCV 感染的案例^[61]，此药物主要作用于 DNA 或 RNA 链起始、延伸阶段，在病毒或细胞聚合酶参与下与生理核苷酸竞争；Kim 等人在 2015 年新合成了肽基化合物，能定向影响复制过程中必需的 3C 样蛋白，此化合物在感染 FCV 的细胞培养和小鼠模型中有广泛的抗病毒活性和安全性^[62]；除此以外，还有一种免疫调节化合物——重组猫干扰素- ω （rFeIFN- ω ），曾有携带 FCV 的慢性口腔炎患病猫口服 rFeIFN- ω 两月后痊愈^[63]。其余的药物治理主要是防止继发感染的发生。

以药物成功治愈 FCV 感染病猫的病例很少，所以，现在对于 FCV 引起的疾病还是以预防为主。预防以接种疫苗为主，但也主要针对家有少数猫的情况下较为明显，在饲养密度大，数量多的情况下则效果不佳，需要人为干预加强管理。现如今常用的疫苗是灭活苗和减毒活疫苗，在 8~9 周龄经皮下或肌肉注射初次免疫，在 12 周龄加强免疫。因为 FCV 的适应性和变异性，导致疫苗研制方面有很大困难。目前国内主要使用的疫苗是灭活苗和弱毒苗，在国外也有许多其他类型的疫苗投入使用，在美国通过滴鼻免疫活疫苗，在欧洲也有使用无佐剂灭活苗来进行免疫的案例。为了产生良好的保护力，疫苗株须与多种病毒株有较强的血清学反应。在世界范围内应用最广的是 FCV-255 和 FCV-F9 两株单价苗，但单价苗并不能够与所有的病毒株皆发生血清学反应，特别是 VS-FCV 病毒株。也有人曾提议，如果将合适的 VS-FCV 病毒株作为疫苗株，可能对包括 VS-FCV 株在内的大多数毒株都有交叉保护^[64]。所以，目前主要的疫苗研发方向就是尽可能的提高疫苗的免疫保护能力和交叉反应性，同时减少疫苗株致病的可能性，也要预防免疫动物成为能排毒的携带者。近年来欧洲投入使用一种由 FCV-431 和 FCV-G1 制成的新型二价苗，FCV 疫苗在野生动物保护中也有很强的效果，现如今老虎用的疫苗多为单价苗，但 Harrison 等提出，二价苗对老虎的保护力可能更强，能降低患 VSD 的风险，其研究结果显示，免疫了二价灭活苗的老虎的血清与 FCV-DD1（VS-FCV 毒株）的中和滴度更高^[65]。除了经传统技术制成的疫苗，基因工程等技术也运用到疫苗研究中，并已经有 FCV 新型疫苗免疫保护效果的报道。虽然新型疫苗能诱导局部黏膜免疫反应、降低 FCV 感染，但到目前为止，新型疫苗均未用于商业生产^[51]。

1.6 单克隆抗体的研究进展

单克隆抗体有高度的特异性，常被用于流行病学的研究、疾病的诊断与预防和疫苗的生产等方面。单克隆抗体就是人为将能产生特异性抗体的 B 细胞和能无限增殖的骨髓瘤细胞融合后，形成能分泌抗体又能无限增殖的杂交瘤细胞，由杂交瘤细胞产生的抗体就是单克隆抗体。其特点有：（1）有很强的特异性，能与抗原特异性结合；（2）产生的抗体在结构上高度均一；（3）易于保存，杂交瘤细胞在液氮中可保存几年，复苏后仍能产生抗体；（4）生物活性单一。根据其优点及制备单克隆技术已经很成熟，有许多病原体的单抗被用于病原诊断治疗中。单抗在 FCV 的深入研究中提供了重要的技术支持，如病原学、致病机理、诊断和治疗方面。基于单抗制作的胶体金检测试纸条也使得 FCV 的快速检测成为了现实，具有中和活性的单抗也能用于治疗，以此提高 FCV 患病猫的治愈率。因此制备 FCV 的单抗对 FCV 患病猫的临床诊断和治疗有很大的意义。

目前，艾纯旭^[66]等用纯化的 FCV 制备了三株可稳定分泌抗 FCV 单克隆抗体，在获得的单克隆抗体基础上建立了双抗夹心 ELISA 检测方法；程晨曦^[50]等将原核表达的纯化后的 VP1-B 和 VP1-E 蛋白作为免疫原免疫小鼠，制备了 4 株可识别 VP1-B 的单抗以及 2 株可识别 VP1-E 的单抗株，并进一步鉴定了 6 株单抗的抗原表位；Carolina 等人^[67]以 FCV 病毒样颗粒作为免疫原制备了 22 株可识别 FCV 的单抗株，其中 12 株有中和活性。

2. 研究目的及意义

近年来国内外相继有 FCV 感染猫引起的恶性系统性疾病爆发的报道，严重危害猫的健康，FCV 不仅感染猫还可以感染其他猫科动物，如虎和豹等。随着 FCV 变异株的出现，对宠物猫和野生猫科动物的健康均造成一定的威胁，为此，迫切需要加快对 FCV 的研究。对 FCV 的研究不仅要重视其病原学研究，而且也应加强对 FCV 检测和特异性治疗的研究。在检测方面，应该结合新技术建立适合于临床检测应用的方法，如 LIPS 检测、胶体金诊断试纸条等方法，治疗方面，可结合单克隆抗体技术研发特异性治疗药物。

本研究与实际相结合，对多年来本实验室中分离的两株 FCV 毒株：FCV-SX1 和 FCV-SX2 病毒株进行遗传进化、核苷酸和氨基酸的同源性分析，选择合适用于制备单克隆抗体的抗原，建立 LIPS 检测方法用于筛选 FCV 阳性杂交瘤细胞株，制备具有中和活性的 FCV 阳性杂交瘤细胞株。其意义在于建立的 LIPS 检测方法能为 FCV 检测提供新的思路和方法，并且相较于其他方法较为简便。制备的阳性杂交瘤细胞株也为下一步胶

体金试纸条的制备打好了基础，有中和活性的阳性杂交瘤细胞株也可进行下一步对动物的保护性试验。

材料与方法

1. 试验材料与主要试剂

F81 (Feline kidney cells) 细胞购买自中乔新舟公司; FCV-SX1 株和 FCV-SX2 株由本实验室保存; High pure viral RNA kit 购买自 Roche; PBS、DMEM、RPMI-1640、胎牛血清、胰蛋白酶均购买自 GIBCO; T25、T75 细胞培养瓶、96 孔、24 孔、12 孔、6 孔细胞培养板、细胞工厂均购买自 NEST; Sepharose 6 Fast Flow 购买自 GE; Penicillin-Streptomycin (100 ×) 购买自索莱宝公司; 预染低分子量蛋白 Marker 购买自全式金公司; PEG 6000 和透析袋购买自索莱宝公司; BCA 蛋白定量试剂盒购买自 Sigma; COS1 细胞由军事医学科学研究所惠赠; VP1 基因、nano 荧光素酶标签和 PUC-57 的重组质粒 PUC-57-nano-VP1 由生工合成; PVAX I 由军事医学科学研究所惠赠; *E.coli* DH5 α 感受态细胞购买自 TaKaRa 公司; FCV 病毒小鼠阳性血清和阴性血清来自山西农业大学动物科技学院微生物实验室保存; *Bam*H I 和 *Eco*R V 购买自 TaKaRa 公司; 小提质粒试剂盒购买自索莱宝公司; Nano-Glo 荧光素酶报告基因检测系统购买自 Promega 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购买自索莱宝公司; T4 DNA Ligase 购买自 TaKaRa 公司; Penicillin-Streptomycin (100 ×) 购买自索莱宝公司; 卡那和氨苄购买自 TaKaRa 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购买自 Invitrogen; 5 × Passive Lysis Buffer 购买自 Pierce 公司; Protein A/G Plus Agarose 购买自 Pierce 公司; SP2/0 骨髓瘤细胞购买自博奥龙公司; 二甲基亚砜购买自 Sigma 公司; 聚乙二醇细胞融合试剂盒购买自 GENNED 公司; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 购买自 Thermo Fisher 公司; HAT、HT. Media Supplement (50×) 购买自 Macgene 公司; 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂均购买自 Sigma 公司; TMB 显色液购买自 Abcam 公司; 羊抗鼠 IgG HRP 酶标二抗购买自 Sigma 公司; 单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购买自酶免公司; Clone easy 培养基购买自博奥龙公司; 10 × TBS 购买自索莱宝公司; 其它试剂均为国产试剂。

6~8 周龄及 8 周龄以上的雌性 Balb/c 小鼠购买自维通利华公司。

2. 设备与仪器

立式高压灭菌器 (ZEALWAY)、电子分析天平 (上海精密科仪器公司)、倒置显

显微镜（上海光学仪器厂）、二氧化碳培养箱（Thermo fisher scientific）、-80℃低温冰箱（Panasonic 有限公司）、高速冷冻离心机（Eppendorf）、AKTA 蛋白纯化系统（GE）、普通离心机（Eppendorf）、蠕动泵（保定兰格恒流泵有限公司）、再生纤维素超滤包（Sartorius）、聚砜外压式中空纤维超滤膜（杭州超滤膜技术有限公司）、玻璃层析柱（GE）、超高速离心管（Nalgene）、超高速离心机（日立/Hitachi）、蛋白电泳仪（北京市六一仪器厂）、生物安全柜（美国 Thermo）、多孔恒温水浴锅（上海跃进医疗器械厂）、磁力搅拌器（上海力辰科技）、电泳仪（北京市六一仪器厂）、台式酸度计（上海佑科仪器仪表有限公司）、恒温振荡器（太仓试验设备厂）、生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）、UVP 成像凝胶系统（美国思博明公司）、荧光信号检测仪器 Glomax 20/20 Luminometer（Promega 公司）、红外影像扫描仪（Odyssey）、湿电转膜仪（北京市六一仪器厂）。

3. 主要溶液配制

3.1 细胞培养相关试剂

（1）胎牛血清使用前 56℃ 30 min 灭活。

（2）完全培养液：DMEM+1%双抗+10% FBS（细胞培养用）；维持培养液：DMEM+1%双抗+2% FBS（中和试验用）；不完全培养液：DMEM+1%双抗（扩大培养病毒用）。

（3）胰酶配制：NaCl 4 g, KH_2PO_4 0.1 g, EDTA 0.1 g, KCl 0.1 g, Na_2HPO_4 1.44 g, 胰酶粉 0.25 g, 用 ddH₂O 定容至 500 mL, 磁力搅拌器在室温下搅拌 30 min 后, 将 pH 调至 7.4, 用 0.22 μm 的滤器过滤, 保存于 4℃。

3.2 SDS-PAGE 相关试剂

（1）电泳缓冲液：SDS 1 g, 甘氨酸（Glycine）18.87 g, Tris 3.03 g, 定容至 1 L, 常温备用。

（2）pH 8.8 的 1.5 mol/L 的 Tris-HCl: Tris 45.43 g, 溶于 200 mL 蒸馏水, 将 pH 调至 8.8, 定容到 250 mL, 常温备用。

（3）pH 6.8 的 1.0 mol/L 的 Tris-HCl: Tris 30.29 g, 溶于 200 mL 蒸馏水, 将 pH 调至 6.8, 定容到 250 mL, 常温备用。

（4）考马斯亮蓝染色液：考马斯亮蓝 0.5 g, 异丙醇 5 mL, 冰醋酸 50 mL, 蒸馏水 325 mL, 充分溶解后, 常温备用。

（5）脱色液：冰醋酸 50 mL, 乙醇 25 mL, 蒸馏水 425 mL, 混合均匀后常温备用。

(6) 5%浓缩胶: 蒸馏水 680 μL , 30%丙烯酰胺 170 μL , 1.0 mol/L Tris (pH6.8) 130 μL , 10% SDS 10 μL , 10% APS 10 μL , TEMED 5 μL 。

(7) 12%分离胶: 蒸馏水 1.6 mL, 30%丙烯酰胺 2 mL, 1.5 mol/L Tris (pH8.8) 1.3 mL, 10% SDS 50 μL , 10% APS 50 μL , TEMED 10 μL 。

3.3 转化相关试剂

(1) LB 培养液: 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母提取物 5 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 高压灭菌后, 保存于 4℃; 含卡那或氨苄抗性的 LB 培养液则现用现配, 在用时加入卡那或氨苄霉素, 其终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 卡那抗性 LB 固体培养基: 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水定容至 1 L 后, 高压灭菌, 当温度降至 55℃左右时, 加入终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素, 倒入平皿, 于 4℃保存。

以同样的方法制备氨苄抗性 LB 固体培养基。

3.4 LIPS Buffer

Tris 20 mM, NaCl 150 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, Triton-X-100 1%, 加入蒸馏水定容至 800 mL, 充分溶解后, 调节 pH 为 7.0, 加蒸馏水定容至 1000 mL, 4℃保存。

3.5 单克隆抗体制备有关试剂

(1) 用于培养 SP2/0 细胞的培养基: 加入 10% FBS 和 1%双抗的 1640 培养基。

(2) RPMI-1640 基础培养基: 不加血清, 加入 1%的双抗的 RPMI-1640 培养基。

(3) RPMI-1640 完全培养基: 加入 20% FBS 和 1%双抗的 1640 培养基。

(4) 选择培养基: 在 1640 完全培养基的基础上选择性的加入 2%的 $50 \times$ HAT 或 HT。

(5) Clone easy 培养液: 在 HT 选择培养基的基础上添加 10% Clone easy 培养基。

(6) 细胞冻存液: 90% FBS 加入 10%二甲基亚砷, 现配现用。

3.6 Western Blot 有关试剂

(1) 转膜缓冲液: 甘氨酸 2.9 g, Tris-HCl 5.8 g, SDS 0.37 g, 用蒸馏水定容至 800 mL 后加入 200 mL 甲醇, 充分溶解混匀后放置室温备用。

(2) TBST 缓冲液: 取 100 mL 的 $10 \times$ TBS 用蒸馏水稀释至 $1 \times$ TBS 后, 加入 1 mL 吐温-20, 放置常温备用。

(3) 封闭液: 称取 1 g BSA 加进 100 mL 的 TBST 中, 充分溶解后置于 4℃备用。

4. 试验方法

4.1 序列分析

4.1.1 病毒 RNA 的提取

- (1) 将 200 μL 实验室保存的病毒液和 400 μL Binding Buffer 混匀后加至吸附柱中。
- (2) 将吸附柱放至收集管中 12000 r/min, 离心 15 s。
- (3) 弃去收集管中液体, 向吸附柱中加 500 μL Inhibitor Removal Buffer, 12000 r/min 离心 1 min。
- (4) 弃去收集管中液体, 向吸附柱中加入 450 μL Wash Buffer, 12000 r/min 离心 1 min, 弃去废液, 并将此步骤重复一次。
- (5) 将吸附柱放至弃去废液的收集管中, 以最大转速离心 1 min。
- (6) 向吸附柱中加入 50 μL Elution Buffer 后, 将吸附柱放至 EP 管中, 12000 r/min 离心 1 min, 离心管中液体为 RNA, 将 RNA 送至公司做全基因测序。

4.1.2 FCV 进化树分析

应用软件 MEGA 6.0 对 FCV-SX1 和 FCV-SX2 与 GenBank 上收录的国内外 29 株 FCV 全基因序列进行进化树分析。选择的参考株包括了 3 株疫苗株及国内外部分分离株。详见表 1。

表 1 FCV 参考毒株

Table 1 FCV reference strains

毒株名称	来源	登录号	毒株名称	来源	登录号
Strains	Source	Accession number	Strains	Source	Accession number
Urbana	Urbana	L40021	UTCVM-H2	USA	AY560117
1874	USA	JX519214	GX01-13	Guangxi	KT970059
TFHLJ-8	Harbin	KJ944377	HRB-SS	Heilongjiang	KM016908
FCV-2280	USA	KC835209	GX2019	Guangxi	MK867378
F65	UK	AF109465	CH-JL4	Jilin	KT206207
UTCVM-NH2	USA	AY560114	12Q087-1	South Korea	KJ572400
3786	USA	JX519209	12Q087-5	South Korea	KJ572401
UTCVM-NH1	USA	AY560113	FCV-YH/16	China	KX815169
USDA	USA	AY560118	CH-JL1	Jilin	KJ495728
FCV-255	Vaccine strain	KM111171	HB-S4	Hubei	KT267162
FCV-2024	Vaccine strain	AF479590	FB-NL-13	China	KM111557
CH-JL2	Jilin	KJ495729	GD	Guangdong	GU214989
CH-JL3	Jilin	KJ495730	SH	China	KP987265
XH	China	KX371572	FCV-F9	Vaccine strain	M86379
FCV/DD/2006/G					
E	Germany	DQ424892			

4.1.3 FCV 全基因序列和 ORF2 氨基酸同源性分析

应用软件 DNAMAN 对 FCV-SX1 和 FCV-SX2 及 3 株疫苗株和同一分支的分离株进行全基因序列和 ORF2 氨基酸序列同源性分析。

4.2 病毒纯化

4.2.1 FCV 病毒培养

使用细胞工厂对 FCV-SX2 分离株进行大量培养，F81 细胞长至 80~90%时，用 PBS 洗涤两次以去除血清，加入无血清的含 1%双抗的 DMEM，以 1:300 的比例接毒。培养 24 h 后，待细胞全部病变，并有部分细胞脱落时，将细胞工厂反复冻融 3 次，收集病毒液，-80℃储存备用。

4.2.2 病毒纯化

(1) 将培养的病毒液反复冻融 3 次, 使细胞破碎充分释放病毒, 用离心机以 5000 r/min 的速度离心 30 min, 收取上清。

(2) 将离心后的上清以 4.0 mL/min 的速度经过 0.65 μm 的滤膜, 去除较大分子杂蛋白。将经过滤膜的样本收至一个 10 L 的容器内, 混匀。吸取 10 mL 样本留做质控。

(3) 本试验选择聚砜外压式中空纤维超滤膜作为病毒超滤的超滤膜, 具体操作过程如下: 将上述滤过后 10 L 样本以 4.0 mL/min 的速度经超滤浓缩管浓缩过滤, 以去除小分子杂蛋白, 当 10 L 样本过滤浓缩至 50 mL 时, 加入 1 L PBS 继续浓缩过滤, 当样本再次浓缩至 50 mL 时, 加入 1 L PBS, 充分去除小分子杂蛋白, 最后 10 L 样本超滤浓缩至 500 mL。分别吸取浓缩液 5 mL 和超滤后废液 5 mL 留做质控。

(4) 取 40 cm 左右长度的透析袋, 放至 3.5 L PBS 中做预处理, 夹子夹好透析袋后用 PBS 检漏, 无误后将 500 mL 样品放入透析袋, 置于磁力搅拌器上透析 2 h。透析完全后将透析袋放于 PEG 6000 上, 进行浓缩, 浓缩至 150 mL。吸取 5 mL 样本留做质控。

(5) 将浓缩后的样本进行凝胶过滤, 本试验选择 Sepharose 6 Fast Flow (6 FF) 进行凝胶过滤, 具体操作如下:

①将 1 L 6 FF 凝胶加至 2 L 烧杯中, 再加入 500 mL 的 20%酒精, 用移液管搅拌均匀, 自由沉降 1 h 后, 将悬浮有破碎凝胶的液体弃去, 再用 200 mL 的 20%酒精将凝胶搅拌均匀, 装入已用蒸馏水清理好的层析柱中, 让其自由沉降, 一般选择过夜沉降。

②沉降基本完全后, 将层析装置安装好, 通过纯化仪, 用 20%酒精以流速 10 mL/min 进一步压缩柱体积。

③柱子压缩完全后, 以 10 mL/min 的速度用蒸馏水冲洗 3 个柱体积, 再以 5 mL/min 的速度用 PBS 平衡 3 个柱体积。

④待装有凝胶的层析柱平衡完毕, 以 5 mL/min 的速度开始上样, 每次上样量为 75 mL, 上样后, 用 PBS 洗脱, 将不同蛋白峰分别收集。

⑤蛋白峰收集完毕, 用 PBS 冲洗 3 个柱体积, 再用蒸馏水冲洗 3 个柱体积, 最后用 20%酒精过 3 个柱体积后, 拆卸层析柱, 将凝胶冲出, 用 20%酒精浸泡, 放于 4℃储存。

⑥按上述方法处理透析袋, 将不同蛋白峰分别放入透析袋, 置于磁力搅拌器上透析 2 h。透析完全后将透析袋置于 PEG 6000, 进行浓缩。将浓缩后的每个峰吸取 2 mL, 留作质控。

(6) 将浓缩好的蛋白峰超速离心: 将样本加入超高速离心管中配平, 放入超高速离心机中, 31000 r/min, 4℃离心 3 h, 弃去上清, 沉淀用 3 mL PBS 重悬, 各取 100 μL 留作质控, 其余的蛋白存于 -80℃待用。

(7) 对每步留下的样本分别进行 TCID₅₀ 的测定, SDS-PAGE 蛋白测定和 BCA 蛋

白浓度测定。

①TCID₅₀ 测定: 将长满单层的 T25 瓶 F81 细胞消化后铺至 96 孔板, 待板中的细胞长至 80~90%, 弃去细胞液, 用 PBS 洗涤 2 次, 将留做质控的样本用 2% 的 DMEM 培养基 10 倍倍比稀释, 稀释 10 个滴度后加至 96 孔板, 每个梯度重复 8 孔, 留 2 排细胞做空白对照。24 h 后观察细胞病变, 用 Reed-Muench 两氏法计算 TCID₅₀。

②SDS-PAGE 蛋白测定: 将留做质控的样本与 6 × 上样缓冲液 5:1 混匀, 煮沸 10 min, 离心取上清。现用现配 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 加至已检漏的胶板中。待胶凝好后放入含缓冲液的电泳槽中, 将处理好的样本上样, 电压 80 V, 进行电泳, 约 30 min 后, 样本条带移至浓缩胶和分离胶的分界线处, 再以电压 120 V 电泳 1 h 左右, 条带移至凝胶底部, 终止电泳。将凝胶剥离, 置于考马斯亮蓝染液染色, 染色 1 h 左右, 取出放入脱色液, 洗脱 30 min 后换液, 换液 3 次, 过夜洗脱, 拍照。

③BCA 蛋白浓度测定: 制备工作液, 10 mL BCA 加 200 μ L 硫酸铜; 用 PBS 将 10 μ L BSA 稀释至 100 μ L, 使其终浓度为 0.5 mg/mL 作为标准品, 将标准品按 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 μ L 加到 96 孔板中, 加 PBS 补足至 20 μ L; 将样本做 2 倍倍比稀释, 每个稀释度加 20 μ L 到 96 孔板; 各孔加入 200 μ L 的 BCA 工作液, 37℃ 放置 15~30 min, 用酶标仪 A562 nm 读数。

4.3 PVAX I-nano-VP1 重组质粒的构建

(1) PUC-57-nano-VP1 质粒的转化

①从 -80℃ 冰箱取出 50 μ L 大肠杆菌感受态细胞, 置于冰上融化。

②吸取生工合成的 PUC-57-nano-VP1 质粒 2 μ L 加至刚刚融化的感受态细胞中混匀, 放在冰中孵育 30 min。

③将离心管放入 42℃ 水浴锅中热应激 90 s 后, 立即放到冰上孵育 3 min。

④吸取 450 μ L LB 培养基, 加至感受态细胞, 37℃, 180 r/min, 摇床孵育 45 min。

⑤将菌液吹吸混匀, 分别取 250 μ L 菌液涂在 2 个含有氨苄抗性的 LB 固体培养基中, 用涂布棒将菌液均匀涂布, 置于 37℃ 恒温培养箱孵育 12 h。

(2) PUC-57-nano-VP1 质粒提取

①取出 37℃ 孵育的平皿, 白枪头挑取单个菌落, 将枪头打入 30 mL 含有氨苄抗性的 LB 培养基中, 放于 37℃, 250 r/min 的摇床中过夜振荡培养。

②将过夜培养的菌液 12000 r/min 离心 10 min, 弃去上清。加入 250 μ L 的溶液 I, 用枪吹吸混匀后, 旋涡振荡器振荡 15 s, 彻底重悬菌体。

③向离心管中加 250 μ L 溶液 II, 轻柔上下翻转 10 次让其充分裂解, 室温放置 3 min。

④吸取 350 μL 溶液 III 加于离心管内，立刻轻柔上下翻转 10 次，使其充分混匀后出现白色絮状沉淀。将离心管 12000 r/min 离心 10 min，若上清还有沉淀则再次离心，将上清移至吸附柱中，尽量不要吸取沉淀。放置于室温 2 min 后，12000 r/min 离心 1 min。

⑤弃去收集管中液体，把吸附柱放回收集管，加入 700 μL 漂洗液，12000 r/min 离心 1 min，弃去废液后，再重复一次此步骤。

⑥弃去废液后，将吸附柱放入收集管，以最大转速离心 2 min。离心后打开吸附柱的盖子，放于室温挥发酒精 15 min。

⑦将吸附柱放入离心管中，在吸附膜中央悬空加 50 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗脱液，室温放置 5 min，12000 r/min 离心 1 min。将离心管中液体吸出，再加至吸附膜中央，室温放置 5 min，12000 r/min 离心 1 min。

⑧测定质粒浓度。

(3) PUC-57-nano-VP1 和 PVAX I 质粒双酶切：用 *Bam*H I 和 *Eco*R V 分别对 PUC-57-nano-VP1 和 PVAX I 质粒进行双酶切，具体操作如下：依次向 PCR 管内加入 6 μL 的 10 $\times$ K Buffer， $\leq 3 \mu\text{g}$ 的 DNA，3 μL 的 *Bam*H I 和 3 μL 的 *Eco*R V，最后加 ddH₂O 补足至 60 μL ，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅，反应 3 h。双酶切反应结束后，进行胶回收。

①在切胶前，提前开启水浴锅，温度设为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。取两个空离心管，并称重。

②将切下的目的片段装入空离心管后称重，通常凝胶密度为 1 g/mL，所以凝胶块的重量可看做其体积，向装有凝胶块的离心管中加入等体积的 Binding Buffer，把离心管放至 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅，每隔 2 min 上下颠倒离心管 5 次，直至凝胶完全融化。

③吸取 700 μL 溶液加进 HiBindTM DNA 柱子中，将柱子放入收集管，12000 r/min 离心 1 min，弃去收集管中废液。

④将柱子放回收集管，加 300 μL 的 Binding Buffer 到柱子里，12000 r/min 离心 1 min，弃去废液。

⑤将柱子放回收集管，加 700 μL SPW Wash buffer 到柱子里，12000 r/min 离心 1 min，弃去废液。

⑥重复一次上一步骤。

⑦弃去废液后，将柱子放回收集管中，12000 r/min 空离 1 min。打开盖子，室温放置 10 min，去除残留的乙醇。

⑧将柱子放入一个干净的离心管中，加 30 μL 洗脱液在柱膜中央，室温放置 2 min，12000 r/min 离心 1 min。将 30 μL 的液体再加至柱膜中央，静置 2 min，12000 r/min 离心 1 min，将 DNA 产物测浓度后放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(4) nano-VP1 和 PVAX I 的连接：将酶切回收的 nano-VP1 和 PVAX I 用 T4 连接

酶连接, 操作步骤如下: 依次向 PCR 管中加入 1 μL 10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer, 0.1 pmol 的 nano-VP1, 0.01 pmol 的 PVAX I, 0.5 μL T4 DNA Ligase, 加 ddH₂O 补足至 10 μL 。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

(5) 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 将菌液涂布至含卡那霉素的 LB 固体培养基, 12 h 后挑取单个菌落, 用卡那 LB 培养液扩菌后提取质粒, 取部分送去测序。

4.4 重组质粒转染真核细胞

(1) 将复苏的 COS1 细胞置于 T25 细胞瓶中培养, 待细胞长满单层后消化铺至 12 孔板, 板中的细胞长至 80~90%, 准备进行转染。

(2) 利用脂质体进行转染(下面以 12 孔板转染中 1 孔的剂量叙述):

①取 100 μL 的 Opti-MEM 培养液放入经高压灭菌的离心管中, 加入 4 μL Lipofectamine 2000, 轻轻混匀, 静置 5 min。

②取 100 μL Opti-MEM 培养液放入另一个经高压灭菌的离心管中, 加入重组质粒 PVAX I-nano-VP1 1.5 μg 。

③将上述两个步骤的溶液混匀, 静置 30 min。

④将 12 孔板取出, 弃去板中培养液, 轻柔地用 PBS 洗涤 2 次, 弃去洗液。

⑤将静置后的混合溶液加入细胞孔中, 补加 10% FBS 的 DMEM 至 1 mL。

⑥将 12 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。

(3) 重组蛋白 Nanoluc-VP1 表达的检测

①取出转染后 36 h 的 12 孔板, 选择贴壁良好、没有明显脱落的细胞孔, 做好标记。

②用 PBS 将 5 $\times$ Passive Lysis Buffer 稀释为 1 $\times$ Passive Lysis Buffer 的工作浓度, 待用。

③将标记好的细胞孔的上清液弃去, 用 PBS 轻轻洗涤 2 次后, 弃去洗液。

④将 300 μL 的 1 $\times$ Passive Lysis Buffer 加到细胞孔中, 用枪头仔细刮拭板底, 使细胞充分裂解。

⑤放置室温反应 30 min。

⑥将含有细胞的裂解液移至离心管中, 12000 r/min 离心 3 min, 取上清。

⑦上清即为重组抗原 Nanoluc-VP1。将 nano 荧光素酶底物和 buffer 以 1:50 的比例混匀待用, 取抗原液 10 μL 放入离心管。

⑧吸取 50 μL 底物加进离心管, 快速混匀后放进荧光信号检测仪, 将荧光检测持续时间设置为 10 s。检测的荧光信号可用于反应蛋白的表达量。将抗原存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

(4) 重组蛋白荧光活性的检测

将重组蛋白 10 倍倍比稀释,把 10 μL 的重组蛋白加至干净的离心管中,加 50 μL nano 荧光素酶底物混匀,迅速放进荧光信号检测仪,将荧光检测持续时间设置为 10 s,记录其荧光强度,将试验重复 3 次,取 3 次试验数据的平均值分析重组蛋白稀释后荧光强度 (Light Unit, LU) 的变化趋势。

(5) 重组蛋白热稳定性的检测

对重组蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下的稳定性进行检测。将重组蛋白置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 分别在 0 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h 时吸取 10 μL 重组蛋白,用荧光信号检测仪检测其信号,将试验重复 3 次,取数据平均值进行分析。

4.5 建立 LIPS 检测方法对已知血清进行检测

(1) 吸取 89 μL LIPS Buffer 加至干净的离心管。

(2) 将稀释好的荧光值为 10^6 LU 的抗原吸取 10 μL 和 1 μL 的血清样本加至有 LIPS Buffer 的离心管中混匀,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 30 min。

(3) 将 Protein A/G plus agarose 混匀后吸取 100 μL 放入干净的离心管中,用含有 1% FBS 的 PBS 洗涤 1 次,4000 r/min 离心 2 min 弃去洗液。

(4) 将孵育后的抗原抗体复合物加到洗涤后的 Protein A/G plus agarose 沉淀中,轻轻混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 30 min。

(5) 孵育后,4000 r/min 离心 2 min,弃去上清。

(6) 向含有复合物沉淀的离心管中加入 200 μL LIPS Buffer,室温震荡洗涤 2 min,4000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,洗涤 3 次。

(7) 向含有沉淀的离心管中加入 200 μL PBS,室温震荡洗涤 2 min,4000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,洗涤 2 次。

(8) 将 nano 荧光素酶底物和 buffer 以 1:50 的比例混匀 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

(9) 吸取 50 μL nano 荧光素酶底物加至含有沉淀的离心管后,迅速放进荧光信号检测仪中,将荧光检测持续时间设置为 10 s,检测其荧光强度。

将实验室经 ELISA 及中和试验鉴定的小鼠阳性和阴性血清用建立的 LIPS 方法进行验证,确定建立的 LIPS 方法是否可行。

利用软件 Graphpad Prism 5.0 中 Mann-Whitney test 对阳性血清和阴性血清两组进行差异性分析,当 p 值 < 0.05 时有统计学意义。将阴性血清的均值与 2 倍标准差之和作为阳性血清的判断值,高于判断值的为阳性,低于判断值的为阴性。

4.6 动物免疫

(1) 动物: 5 只 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。

(2) 免疫剂量: 每只分别为 16 μg /次, 8 μg /次, 4 μg /次, 2 μg /次和 1 μg /次, 并依次标号。

(3) 免疫程序:

第 0 天首免, 与完全弗氏佐剂 1:1 乳化后, 经小鼠颈部皮下注射。

第 14 天二免, 与不完全弗氏佐剂 1:1 乳化后, 经小鼠颈部皮下注射。

第 28 天三免, 纯化后的抗原直接经小鼠颈部皮下注射, 免疫一周后, 进行眼眶采血, 将血于室温放置 30 min, 4000 r/min, 20 min 离心后收集上清, 将上清再以 12000 r/min, 2 min 离心分离血清。用固定病毒稀释血清法来测定中和效价。

第 42 天四免, 纯化后抗原直接经小鼠腹腔注射, 三天后, 选择血清效价最高的小鼠进行融合。

4.7 小鼠血清效价的测定

(1) 将 FCV-SX2 病毒株接种至细胞长有 80~90% 的 T25 细胞瓶中, 24 h 后细胞全部病变, 并有部分脱落, 此时将细胞瓶反复冻融 3 次后收毒。

(2) 将长满的 T25 瓶细胞消化后铺至 96 孔板, 待板中的细胞长至 80~90%, 弃去细胞液, 用 PBS 洗涤 2 次。将冻融后的 FCV 病毒用 2% 的 DMEM 培养基 10 倍倍比稀释, 稀释 10 个滴度, 每个梯度重复 8 孔, 留 2 排细胞做空白对照。24 h 后观察细胞病变, 计算 TCID₅₀。

(3) 提前一天, 将长满 T25 瓶的 F81 消化之后, 铺至 96 孔板。

(4) 当 96 孔板内细胞长至 90% 或刚至单层时, 开始稀释血清。先将小鼠血清做 56℃ 灭活补体处理。将血清直接稀释 100 倍后, 再进行 2 倍倍比稀释。

(5) 将已测好 TCID₅₀ 的病毒稀释至 200 个 TCID₅₀, 与稀释好的不同稀释度的血清 1:1 混合。再把剩下的病毒分别稀释为 20 个 TCID₅₀、2 个 TCID₅₀、0.2 个 TCID₅₀ 和 0.02 个 TCID₅₀, 进行回滴。将稀释和混匀好的样本放置于 37℃ 温箱孵育 1 h。

(6) 弃去 96 孔板中培养基, 用 PBS 清洗两遍。将孵育好的样本加至 96 孔板, 每个样本重复 3 次, 留 2 排孔, 作为阴性对照。

24 h 后, 观察结果。

4.8 阳性杂交瘤细胞株的建立

4.8.1 SP2/0 细胞的培养

将存于液氮罐的 SP2/0 置于 37℃ 溶解, 1000 r/min, 10 min 后, 弃去上清, 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 1640 培养基将细胞重悬, 吸入 T25 细胞瓶中培养。12 h 换一次培养基, 24 h 后传代。当 SP2/0 扩增至至少 3 个 T75 细胞瓶后, 可以准备进行融合。

4.8.2 饲养层细胞的制备:

将空白小鼠做断颈处理,把小鼠泡至含有 75%酒精的容器中,5 min。用高压后的剪刀将小鼠腹部中央皮肤剪开,拿镊子将皮肤撕开后,换一把无菌镊子,将腹膜提起。用 5 mL 注射器吸取 5 mL 的含 20%胎牛血清 1%双抗和 2% HAT 的 1640 完全培养基,将针头小心沿镊子提起的地方插入,把培养基注入。在不抽出针头的情况下,用手指轻轻挤压按摩腹部 30 s,将培养基抽出,将其打入培养皿中,加入 35 mL 的完全培养基,每孔 100 μ L 铺至 96 孔板。平均一只小鼠可铺 4 块 96 孔板。

4.8.3 杂交瘤细胞的制备

(1) 用预冷的 1640 基础培养基将 3 瓶 80~90% T75 的 SP2/0 吹下计数备用,终体积为 30 mL,并移入 50 mL 离心管。

(2) 将中和效价 $\geq$ 6400 的小鼠摘眼球取血后,断颈处死。泡入含 75%酒精的容器中,大约 5 min。此时将 PEG 放入 37 $^{\circ}$ 温箱预热。

(3) 剪开腹部皮肤后换一套器械,将左侧腹膜剪开,用镊子将腹膜撕开暴露脾脏。剥离脾脏后将其置于一次性平皿中,用 1640 基础培养基冲洗,去除结缔组织和脂肪。

(4) 将脾脏放于 100 目细胞筛上,用高压后的玻璃注射器塞研磨,后用基础培养基冲洗细胞筛,对脾细胞进行计数,脾细胞与 SP2/0 的细胞数量比例为 1:10,将稀释好的终体积为 30 mL 的细胞液移入 50 mL 离心管。

(5) 配平后离心,1000 r/min,8 min。

(6) 离心后弃去上清,加 30 mL 基础培养基将脾细胞和 SP2/0 吹吸混匀后,离心,1000 r/min,8 min。

(7) 弃去上清后,加入基础培养基,再次清洗后,1000 r/min 离心 8 min。

(8) 将上清尽可能弃去,用手将细胞团块拍散。

(9) 取出预热的 PEG 吸取 800 μ L 在 90 s 内匀速边旋转边滴入,之后静置 1 min。

(10) 之后在 2 min 内加入 30 mL 基础培养基,匀速轻柔的将培养基边旋转边滴入后离心,800 r/min,8 min。

(11) 弃去上清,加入 30 mL 基础培养基,轻柔的将细胞吹吸混匀后,800 r/min 离心 8 min。

(12) 弃去上清,加入 40 mL 20%血清的 HAT 1640 选择培养基,轻柔混匀,用排枪每孔 100 μ L 加至前一天制备有饲养层细胞的 96 孔板中,放入温箱进行培养。

4.8.4 阳性杂交瘤细胞的筛选

放入温箱前 4 天尽量不要将融合细胞拿出,刚融合的细胞对温度和湿度敏感,4 天后换液,吸弃 100 μ L 上清,加入 100 μ L HT 选择培养液。7 天后开始观察计数,当孔内

细胞 > 200 时,吸出 $75\ \mu\text{L}$,1:1稀释后, $50\ \mu\text{L}$ 用于LIPS检测,将 $10\ \mu\text{L}$ 荧光值为 10^6 LU的抗原和 $1\ \mu\text{L}$ 的细胞上清与LIPS Buffer混匀后放入96孔板, 37°C 孵育 $30\ \text{min}$ 。将复合物加至处理好的有Protein A/G plus agarose的96孔板中 37°C 孵育 $30\ \text{min}$ 后,用LIPS Buffer洗涤3次,PBS洗涤2次。最后依次加入nano荧光素酶底物于荧光信号检测仪中检测荧光强度。

检测为阳性的,用剩余样本进行中和试验,鉴定其是否有中和效价。

4.8.5 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

将测定为阳性的细胞弃去上清后,再加入少量培养液轻轻吹吸混匀将阳性细胞悬浮,吸取少量细胞悬液移至离心管稀释后,计数。用Clone easy培养液将细胞尽可能稀释至1个/ $100\ \mu\text{L}$,混匀后移入96孔板,每孔 $100\ \mu\text{L}$,放入温箱培养,剩余的细胞及时冻存。亚克隆后第3天开始记录每孔细胞数量,当第1次亚克隆后7天左右,细胞培养基偏黄时,细胞大概长至孔底50%,吸取 $100\ \mu\text{L}$ 细胞液,进行LIPS检测,之前检测有中和活性的阳性孔的亚克隆细胞另外再进行中和检测。选择细胞活力好并只有1株细胞的孔进行第2次亚克隆,克隆方法和第1次亚克隆一致,同样细胞液偏黄时,对细胞液进行检测,再选取活力好并只有1株的孔进行第3次亚克隆,直到细胞上清在LIPS检测下阳性率达到100%,扩大培养筛选出的杂交瘤细胞,先将96孔板中的细胞传至24孔板,当细胞长至孔底60%,再将24孔板细胞传至12孔板,长至孔底60%时,再传至6孔板,最后传至T25细胞瓶中,大量扩增,并及时冷冻保存。

4.8.6 杂交瘤细胞的冻存与复苏

将LIPS检测出的阳性孔细胞扩大培养后冻存:将细胞瓶中液体去除,加入1640基础培养基将细胞瓶中细胞轻轻吹起,放至灭菌的离心管中, $1000\ \text{r/min}$ 离心 $5\ \text{min}$ 后弃去上清。用 $1\ \text{mL}$ 的冻存液将细胞重悬后,放入 $2\ \text{mL}$ 冻存管中。将冻存管放进冻存盒,直接冻于 -80°C 冰箱。1天后放入液氮罐中冻存。

1个月后复苏,将冻存管从液氮中取出,放入 37°C 水浴锅中融化, $1000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$ 后,弃去上清液,用适量Clone easy培养基重悬细胞,移至T25细胞瓶,用Clone easy培养基补液至 $5\ \text{mL}$ 。当细胞状态良好时弃去上清改为完全培养基,细胞长满后正常传代。

4.8.7 单克隆抗体的大量制备

(1)向8周龄以上的雌性Balb/c小鼠腹腔注射 $0.5\ \text{mL}$ 的液体石蜡,以此加速杂交瘤细胞生长。

(2)挑选生长状态良好的杂交瘤细胞,弃去培养上清,加入1640不完全培养基轻轻冲洗3遍,洗去已死亡脱落的细胞。接着用1640不完全培养基将细胞轻轻吹下,放

至无菌离心管中，1000 r/min 离心 5 min 后，弃去上清。将细胞重悬后，取少量细胞进行计数。

(3) 用酒精棉球将小鼠腹部消毒，将细胞稀释至 1×10^6 个细胞/mL 后，向小鼠腹部注射 1 mL 稀释后的杂交瘤细胞。

(4) 接种 7 天后可明显观察到小鼠腹部增大，15 天后采集腹水。

(5) 将小鼠做断颈处理后，用酒精喷壶对小鼠进行消毒。用高压后的剪刀将小鼠腹部中央皮肤剪开，拿镊子将皮肤撕开后，换一把无菌镊子，将腹膜提起。将 20 mL 注射器的针头小心沿镊子提起的地方插入，尽可能快的收集腹水，正常腹水呈淡黄色。

(6) 将收集的腹水 4000 r/min 离心 15 min。利用 10 mL 注射器将油脂和红细胞之间的腹水吸出，置于 -20°C 保存。

4.9 单克隆抗体的生物学特性分析

4.9.1 单克隆抗体的 Western Blot 鉴定

(1) 将 FCV-SX2 株感染 F81 细胞，完全病变后反复冻融 3 次，12000 r/min 离心 10 min，吸取上清与 $6 \times$ 上样缓冲液 5:1 混匀，煮沸 10 min，离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

(2) 电泳完成后将凝胶剥离，切去浓缩胶和部分无用分离胶。剪取和凝胶大小一致的 PVDF 膜和滤纸，用甲醇激活 PVDF 膜 3 min。将海绵置于夹子的白色面，上面依次放 4 层滤纸、凝胶、PVDF 膜、4 层滤纸和海绵，之后将夹子夹好，放进电泳槽，在放入 2~3 个冰袋后加入转膜液，将电泳槽用碎冰覆盖后，300 mA 转膜 1 h。

(3) 将转膜后的 PVDF 膜放于 1% BSA 的封闭液中，室温震荡 2 h 后，放入 4°C 过夜封闭。

(4) 用封闭液将本试验制备的单抗稀释 100 倍，将封闭好的 PVDF 膜用稀释后的单抗浸没后，置于摇床，室温孵育 1 h。

(5) 用 TBST 洗涤 10 min，洗涤 4 次。

(6) 用封闭液 1:4000 稀释 HPR 标记的鼠二抗，将孵有一抗的 PVDF 膜用稀释好的二抗浸没后，置于摇床，室温孵育 1 h。

(7) TBST 洗涤 10min，洗涤 5 次。

(8) 现配现用 DAB 显色液，将 A 液和 B 液 1:1 混合后，滴加至膜上，小心晃动，使显色液均匀覆盖于膜上，室温显色后拍照留图。

4.9.2 腹水的效价测定

将收集的腹水 1:100 稀释后，再进行 2 倍倍比稀释。将 $10 \mu\text{L}$ 荧光值为 10^6 LU 的抗

原和 1 μL 稀释后的腹水与 LIPS Buffer 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。将复合物加至处理好的 Protein A/G plus agarose 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用 LIPS Buffer 洗涤 3 次, PBS 洗涤 2 次, 最后依次加入 nano 荧光素酶底物于荧光信号检测仪中检测荧光强度。

4.9.3 单克隆抗体的中和活性鉴定

(1) TCID₅₀ 测定: 将长满的 T25 瓶细胞消化后铺至 96 孔板, 待板中的细胞长至 80~90%, 弃去细胞液, 用 PBS 洗涤 2 次。将留存的病毒株用 2% 的 DMEM 培养基 10 倍倍比稀释, 稀释 10 个滴度, 每个梯度重复 8 孔, 留 2 排细胞做空白对照。24 h 后观察细胞病变, 计算 TCID₅₀。

(2) 中和测定: 将 F81 细胞铺至 96 孔板, 待长至孔底 90% 或刚至单层时用于中和试验。

提前一天, 将长满 T25 瓶的 F81 消化之后, 铺至 96 孔板。将制备的腹水 1:10 稀释后, 再进行 2 倍倍比稀释, 每个稀释度 3 个重复。将 200TCID₅₀ 的 FCV 与稀释好的单抗 1:1 混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。将复合物加至 96 孔细胞培养板中, 24 h 后进行终判。

4.9.4 单克隆抗体的亚型鉴定

(1) 向样品孔中先加入样品稀释液 40 μL , 接着加入 10 μL 的腹水至酶标板孔底部, 轻轻摇晃混匀。

(2) 用封板膜将酶标板封住后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(3) 将试剂盒中配备的 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释至 1 倍备用。

(4) 将封板膜揭去, 甩去液体, 放于纸巾上拍干, 向每孔中加满稀释的洗涤液, 静置 2 min 后弃去, 重复 3 次。

(5) 向每孔中加入 50 μL 的酶标试剂, 用封板膜将酶标板封住后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(6) 将封板膜揭去, 甩去液体, 放于纸巾上拍干, 向每孔中加满稀释的洗涤液, 静置 2 min 后弃去, 重复 5 次。

(7) 向每孔中加入显色剂 A 50 μL , 之后加入显色剂 B 50 μL , 轻轻晃动混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min 避光显色。

(8) 向每孔中加入 50 μL 终止液, 终止显色。

(9) 终止显色后 15 min 内, 于 450 nm 波长处测定吸光值, 记录数据。

试验结果

1. FCV 遗传进化分析

用 MEGA 6.0 软件绘制 FCV-SX1 和 FCV-SX2 株与国内外一些代表毒株以及疫苗株的全基因的进化树，图中显示着 31 株分离株主要分为两大分支，FCV-HB-S4 株和 FCV-NJ-13 与本实验室分离出的 FCV-SX1 在同一分支上，说明 FCV-SX1 与 FCV-HB-S4 和 FCV-NJ-13 的亲缘关系较为接近，而 GD 株和 SH 株与本实验室分离出的 FCV-SX2 在同一分支上，说明 FCV-SX2 与 GD 和 SH 的亲缘关系较为接近，此外在进化树中可以看出，FCV-SX1 株和 FCV-SX2 株与 3 株疫苗株的亲缘关系最远，如图 1。

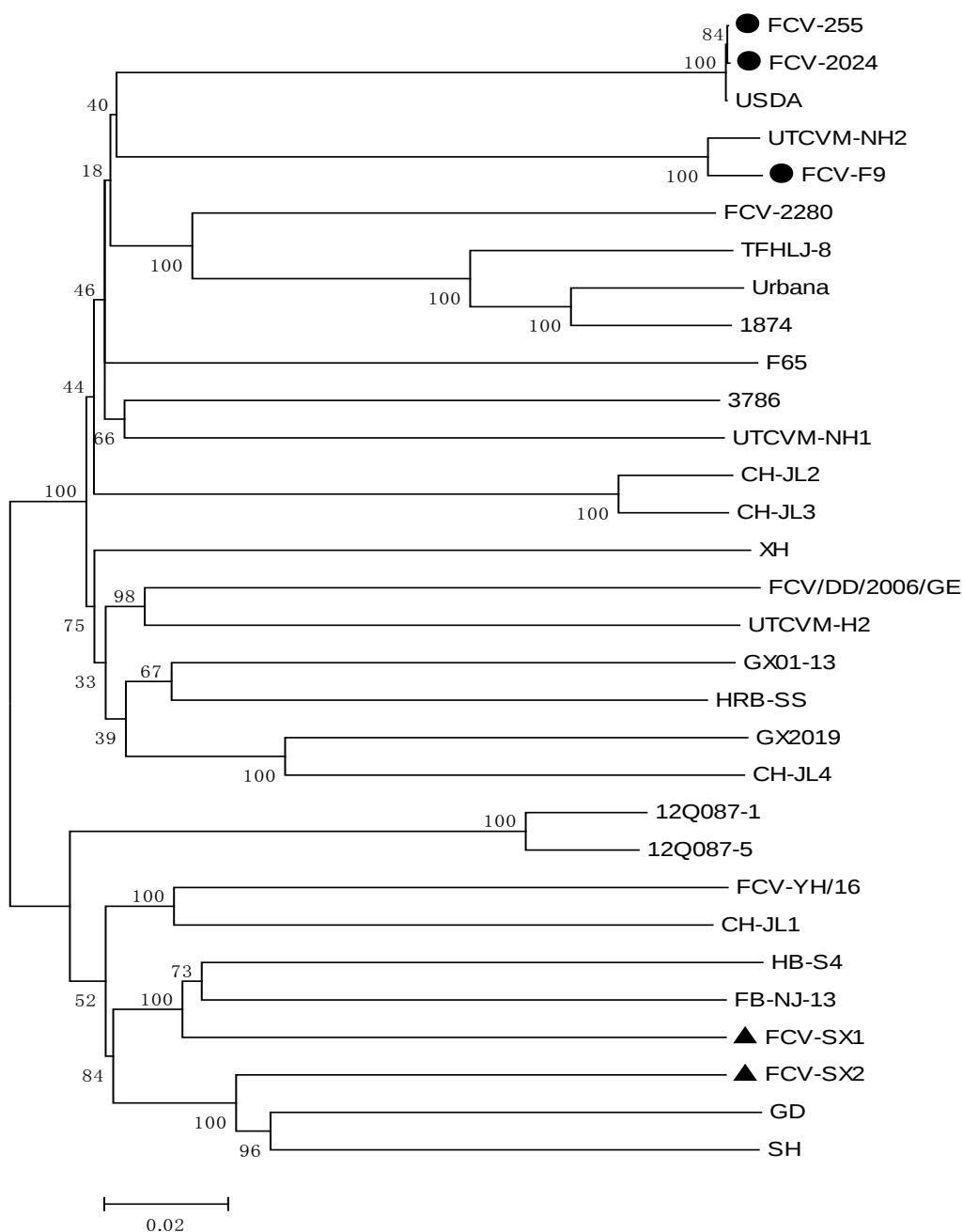


图 1 FCV 全基因进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of FCV

▲: 本实验室分离株 ●: 疫苗株

2. FCV 全基因核苷酸及 ORF2 氨基酸序列分析

利用 DNAMAN 对两株分离株的全基因和 ORF2 氨基酸序列做了同源性分析:
FCV-SX1 与 GenBank 上 29 株分离株全基因核苷酸序列的同源性大约在 75.74%~82.27%

之间，其中与 225 分离株同源性最低为 75.74%，与 NJ-13 分离株同源性最高为 82.27%；FCV-SX2 与 GenBank 上 29 株分离株全基因核苷酸序列的同源性大约在 76.13%~83.35% 之间，其中与 225 分离株同源性最低为 76.13%，与 SH 分离株同源性最高为 83.35%；将 SX1 分离株和 SX2 分离株单独进行对比，发现其全基因核苷酸序列同源性为 79.31%，两株病毒差距较大。FCV-SX1 株与疫苗株和亲缘关系最近的氨基酸序列的同源性在 81.4%~91.15%之间，其中与 225 分离株氨基酸序列的同源性最低为 81.4%，与 GD 分离株氨基酸序列的同源性最高为 91.15%，FCV-SX2 株与疫苗株和亲缘关系最近的氨基酸序列的同源性在 78.33%~85.39%之间，其中与 225 分离株氨基酸序列的同源性最低为 78.33%，与 GD 分离株氨基酸序列的同源性最高为 85.39%。SX1 和 SX2 分别与疫苗株和亲缘关系最近的分离株的核苷酸、ORF2 氨基酸序列同源性如下表 2。

表 2 FCV-SX1 和 FCV-SX2 分离株全基因核苷酸与 ORF2 氨基酸序列同源性分析

Table 2 Amino acid sequence of ORF2 and nucleotide identity between FCV-SX1, FCV-SX2 strain and other strains

		FCV-2024	FCV-F9	FCV-225	FB-NJ-13	HB-S4	GD	SH
Nucleotide sequence identity(%):	SX1	76.22	75.76	75.74	82.27	80.77	79.29	80.15
	SX2	76.49	76.54	76.13	79.32	79.09	82.94	83.35
Amino acid sequence identity(%):	SX1	84.71	83.03	81.40	82.84	84.76	91.15	91.00
	SX2	80.64	81.62	78.33	79.26	81.59	85.39	84.04

3. FCV 纯化

通过凝胶过滤两次上样后，可收集到 3 个蛋白峰，如图 2。

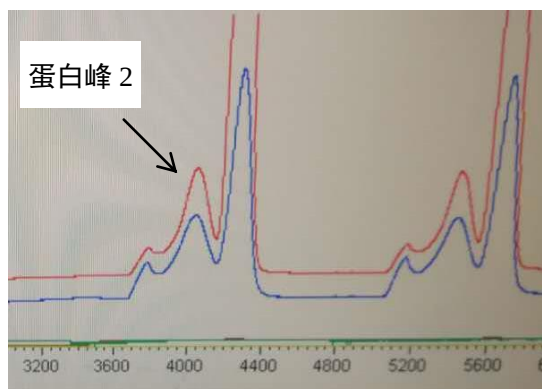


图 2. FCV 浓缩蛋白凝胶过滤层析图谱

Fig.2 The mapping of purified FCV with gel filtration chromatography

4. SDS-PAGE 蛋白测定

纯化浓缩后的抗原经 SDS-PAGE 电泳检测，在 60 KD 左右有明显条带，符合目的蛋白大小，相较于去细胞碎片上清，在超滤后可观察到蛋白纯度有所提高，峰 1 和峰 2 与浓缩后的蛋白对比可明显看出抗原浓度的大幅度提高和纯度的部分提高，峰 3 浓度远远低于峰 1 和峰 2，如图 3。

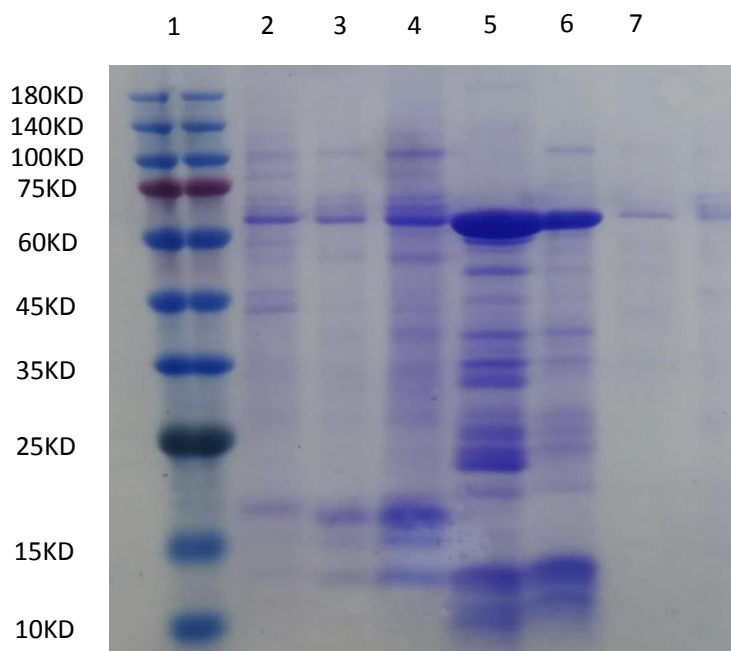


图 3. FCV SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 Results of the purified protein of FCV detected by SDS-PAGE

1: 低分子量蛋白 Marker; 2: 去细胞碎片蛋白; 3: 超滤液; 4: 浓缩蛋白; 5: 蛋白峰 1; 6: 蛋白峰 2;

7: 蛋白峰 3

1: Low molecular weight protein Marker; 2: Protein without debris of F81 cells; 3: Ultrafiltrate; 4: Purified protein; 5: Protein peak 1; 6: Protein peak 2; 7: Protein peak 3

5. FCV TCID₅₀ 测定

培养后的病毒经纯化后，对所有质控进行 TCID₅₀ 测定，结果显示：去除大分子蛋白样本病毒滴度为 $10^{-6.1}$ ，超滤浓缩样本病毒滴度为 $10^{-7.4}$ ，超滤废液样本病毒滴度为 0，蛋白峰 1 病毒滴度为 $10^{-8.6}$ ，蛋白峰 2 病毒滴度为 $10^{-9.3}$ ，蛋白峰 3 病毒滴度为 $10^{-1.4}$ 。

6. 蛋白峰浓度测定

用 BCA 法测定浓度，根据 BSA 绘制标准曲线图 4，利用标准曲线计算浓度，其中峰 1 浓度为 $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，峰 2 的浓度为 $1.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

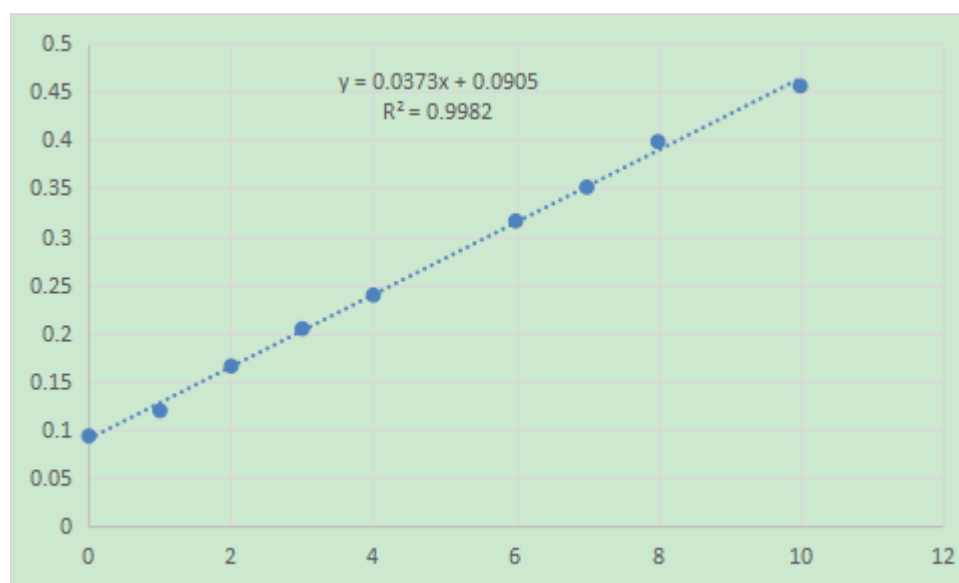


图 4 标准曲线

Fig. 4 Standard curve

7. 重组质粒 PVAX I-nano-VP1 的构建

将连接好的产物转化到感受态细胞后，挑取单个菌落扩增，提取质粒双酶切并送去测序，双酶切结果如图 5，测序结果正确。

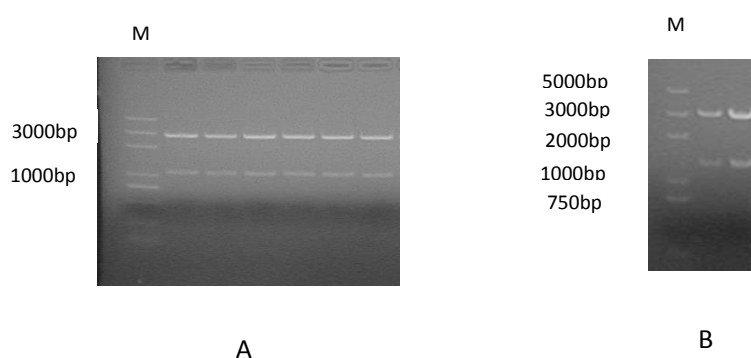


图 5 重组质粒 PUC-57-nano-VP1、PVAX I-nano-VP1 双酶切鉴定电泳图

A: 重组质粒 PUC-57-nano-VP1; B: 重组质粒 PVAX I-nano-VP1

Fig.5 Electrophoresis map of the recombinant plasmid PUC-57-nano-VP1 and PVAX I-nano-VP1

A: The recombinant plasmid PUC-57-nano-VP1; B: The recombinant plasmid PVAX I-nano-VP1

8. 重组蛋白 Nanoluc-VP1 表达的检测

重组质粒瞬时转染 COS1 细胞后，通过检测转染细胞裂解液中 nano 荧光素酶荧光强度，能够间接反应重组蛋白的表达量，将重组质粒 PVAX I-nano-VP1 转染 COS1 细胞 36 h 后，用裂解液裂解转染细胞，细胞裂解液经检测其荧光强度为 9.34×10^8 LU，说明重组质粒 PVAX I-nano-VP1 转染 COS1 细胞，重组蛋白 Nanoluc-VP1 成功表达。

9. 重组蛋白荧光活性检测

重组蛋白 10 倍倍比稀释后检测荧光强度，用 3 次试验得出数据的平均值作图，其显示荧光强度与稀释倍数呈线性关系如图 6，当荧光值为 10^6 LU 时，蛋白浓度约 10^{-13} mol。

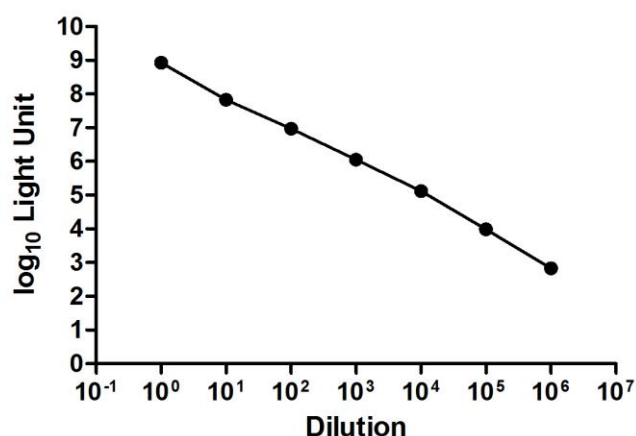


图 6 重组蛋白 Nanoluc-VP1 荧光强度随稀释倍数变化的趋势

Fig.6 The luciferase activity in the Nanoluc-VP1 recombinant protein

10. 重组蛋白热稳定性检测

将重组蛋白放置于 37℃，分别在 0 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h 时检测荧光强度，用 3 次试验数据的平均值作出随时间延长荧光强度变化的折线图 7。用软件 SPSS 进行单样本 T 检验做显著性差异分析， p 值 < 0.0001 ，表明重组蛋白在 37℃ 下荧光强度没有明显变化，说明 nano 荧光素酶在 37℃ 的热稳定性良好。

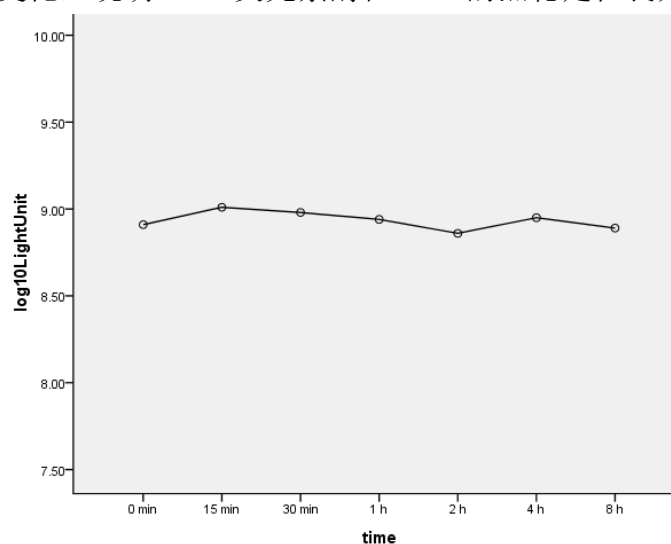


图 7 Nanoluc-VP1 在 37℃ 中的热稳定性

Fig.7 The stability of Nanoluc-VP1 at 37℃

11. 小鼠阳性血清和阴性血清的 LIPS 检测

以真核表达的重组蛋白作为检测抗原，检测 35 份阳性血清和 15 份阴性血清（血清均经 ELISA 及中和试验鉴定），检测结果如图 8。被检测的阳性血清和阴性血清有显著性差异（ $p < 0.0001$ ），说明了本试验所制备的重组蛋白能特异性结合血清中的抗体，可用于阳性血清的检测，其阳性血清的判断值为 3.57。

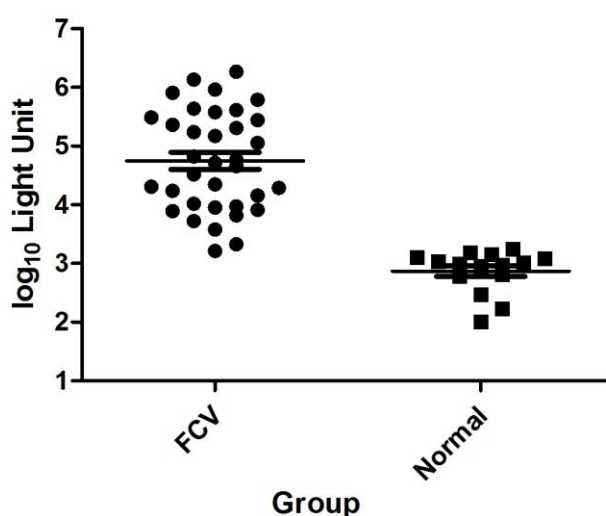


图 8 LIPS 方法检测小鼠阳性血清和阴性血清

Fig.8 Positive and negative serum of mice detected by LIPS method

12. 免疫小鼠血清抗体中和效价的测定

在第三次免疫后一周，经眼眶采血后，用固定病毒稀释血清法来测定的小鼠血清抗体中和效价按小鼠序号分别为 1:6400、1:12800、1:6400、1:3200 和 1:3200。

13. 杂交瘤细胞的筛选与建立

用纯化后抗原免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合，将其铺于 4 块 96 孔板，4 天后进行半量换液，7 天后仔细观察细胞。经计算，细胞融合率为 69%。通过已建立的 LIPS 检测方法检测，有 18 孔检测为阳性，能分泌抗体。经 3 次亚克隆筛选后，得到 5 株能稳定分泌抗体的阳性杂交瘤细胞系，分别命名为 1E2、4C3、5F11、6G9 和 7D2。

14. 单克隆抗体的生物学特性分析

14.1 单克隆抗体的 Western Blot 鉴定

将经 F81 细胞培养的 FCV-SX2 株病毒转印至 PVDF 膜，分别以 5 株阳性杂交瘤细胞上清作为一抗。结果如图 9 所示，在 60KD 大小处均有条带，表明 5 株单抗均可识别 FCV-SX2 病毒株，将 5 株阳性杂交瘤细胞株分别命名为 1E2、4C3、5F11、6G9 和 7D2。

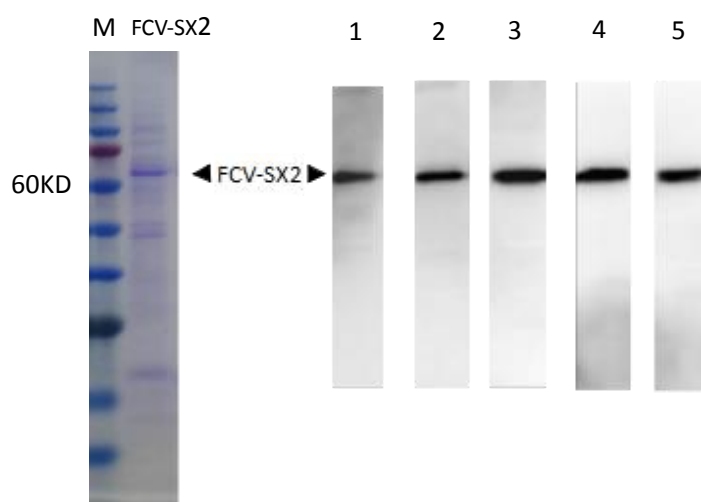


图 9 5 株单抗的 Western Blot 鉴定结果

Fig.9 Western Blotting analysis of hybridoma cell lines

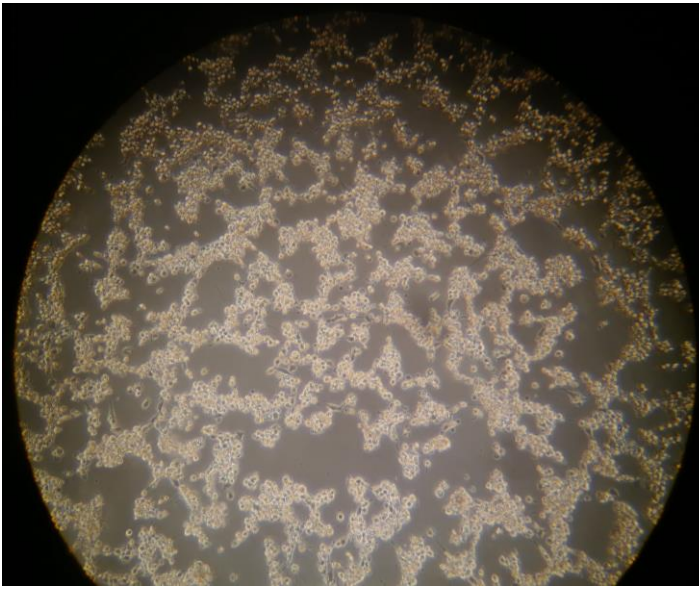
1: 1E2 2: 4C3 3: 5F11 4: 6G9 5: 7D2

14.2 腹水的效价测定

通过建立的 LIPS 检测方法测出 1E2 和 6G9 的腹水效价为 1:12800，4C3、5F11 和 7D2 的腹水效价为 1:25600。

14.3 单克隆抗体的中和活性鉴定

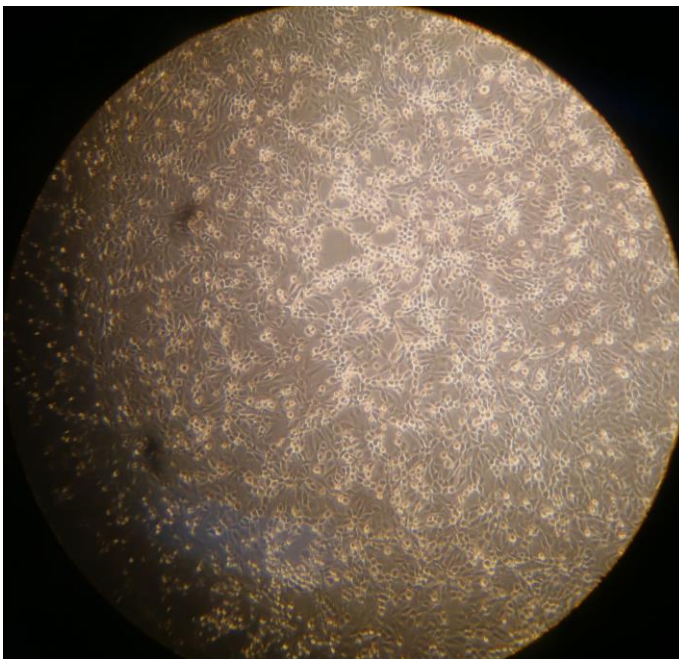
经过中和试验，分别将稀释后的 5 株细胞株制得的腹水与 200 TCID₅₀ 的 FCV-SX2 病毒株 1:1 混合孵育后接种至 F81 细胞 96 孔板，24 小时后，1E2、6G9 和 7D2 经 1:1 稀释后细胞全部病变，4C3 稀释 320 倍后细胞没有产生病变，说明 4C3 有中和活性，中和效价为 1:320，5F11 稀释 640 倍细胞没有产生病变，说明 5F11 有中和活性，中和效价为 1:640，如图 10。



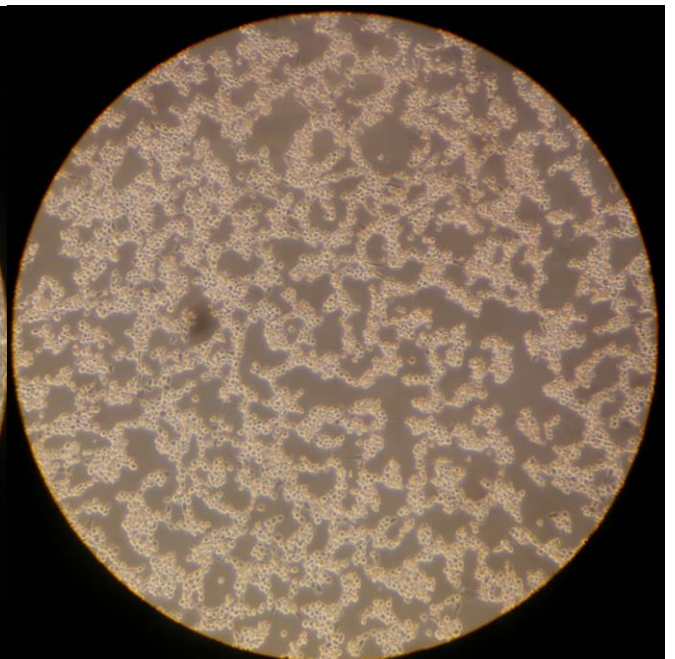
1



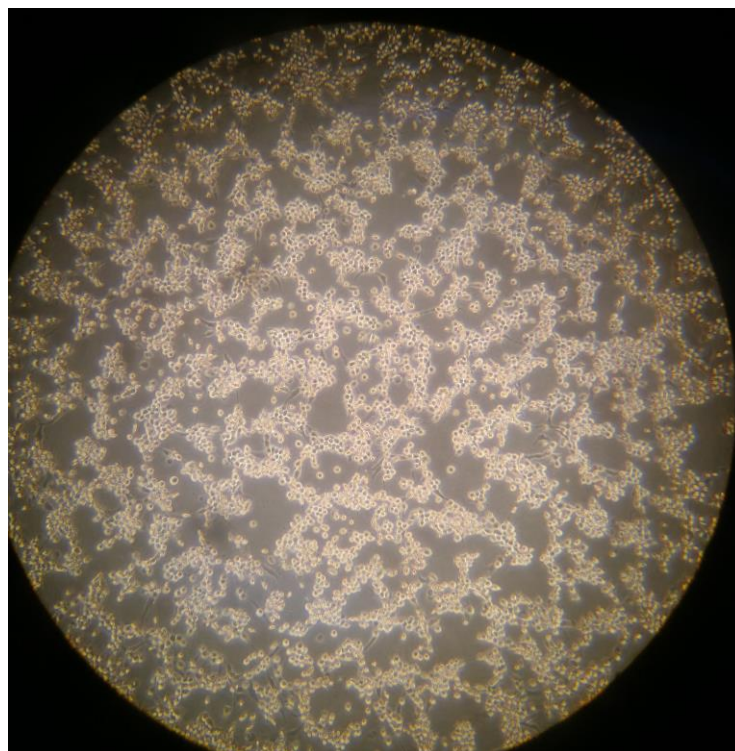
2



3



4



5

图 10 阳性杂交瘤细胞株中和试验 CPE 结果

Fig.10 Neutralization test result of CPE of hybridoma cell lines

1: 1E2, CPE in the titer 1:1 2: 4C3, Without CPE in the titer 1:320 3: 5F11, Without CPE in the titer 1:640
4: 6G9, CPE in the titer 1:1 5: 7D2, CPE in the titer 1:1

14.4 单克隆抗体的亚型鉴定

用亚类鉴定试剂盒对 1E2, 4C3, 5F11, 6G9, 7D2 五株阳性杂交瘤细胞株进行亚类鉴定, 1E2, 4C3 和 6G9 鉴定为 IgG₁ 型, 5F11 和 7D2 鉴定为 IgM 型, 5 株单抗轻链均为 κ 链。

分析讨论

1. 病毒株的选择

在试验中, 应用软件 MEGA 6.0 和 DNAMAN 对本实验室分离的两株 FCV 病毒株进行了序列分析, 数据显示, SX1 与 FB-NJ-13 和 HB-S4 的亲缘关系较近, 且同源性较高, SX2 与 GD 和 SH 的亲缘关系较近, 且同源性较高, 两株分离株与 F9、255、2024 疫苗株的同源性都很低, 说明 2 株分离株都与疫苗株差异较大, 将分离株作为单克隆抗体抗原能够减少产生针对疫苗株特异性单抗的概率。由于 ORF2 相比于 ORF1 和 ORF3 较不保守, 所以将 SX1 和 SX2 ORF2 的氨基酸序列分别与 3 株疫苗株和 4 株亲缘关系较近的病毒株进行同源性分析, 数据显示, 与 SX1 相比较, SX2 与疫苗株和亲缘关系较近的病毒株的同源性差距相较于 SX1 更低, 所以, 为了降低产生针对疫苗株特异性单抗的概率, 本试验选择 SX2 分离株作为制备单克隆抗体的抗原。

2. 纯化方法的选择

本试验选择了凝胶层析而不是在实验室中尝试的蔗糖密度梯度离心。虽然蔗糖密度梯度离心分离效果较好, 能得到较纯的有活性的病毒颗粒, 但是在试验过程中会损失大量的病毒颗粒, 且上样量较少。而病毒经凝胶层析纯化后的浓度较高, 损失程度较低, 用于填充的凝胶可重复使用, 也能处理大量样品, 除此以外在试验过程中如果出现失误, 其样品回收率几乎能达到 100%。

本次试验中也有不足, 由于凝胶层析是通过粒子直径的大小分离蛋白, 导致细胞裂解后产生的与病毒粒子大小相似的颗粒被分离出来, 所以病毒的纯化并不完全, 仍有较多的杂蛋白, 由于时间和试验耗材有限没有对蛋白峰进行离子交换进一步纯化, 可能影响后期对单抗的筛选。此外, 通过图谱可明显发现 3 个蛋白峰之间较为接近, 没能彻底区分, 可能是因为上样量过大或是流速过高, 之后改进可以从降低上样量和流速入手。此外, 通过 TCID₅₀ 测定, 其中峰 1 和峰 2 都有含有病毒, 但相较于峰 1, 峰 2 纯化效果更好, 含量更高, 所以下一步的动物免疫选择了峰 2 作为免疫原。

3. 检测抗原、表达系统和检测方法的选择

成功制备单抗的关键因素是检测抗原和免疫抗原的不同。VP1 作为 FCV 主要衣壳蛋白有着良好的免疫原性，在病毒与宿主细胞的相互作用中起着重要作用。由于 FCV 是 RNA 病毒，所以十分容易出现变异，有研究指出 VP1 的同源性可达 88%，虽然病毒株会出现明显的抗原性变异，但是病毒株之间存在广泛的交叉反应。所以在制备和纯化大量抗原太过繁琐并要避免和免疫抗原一致的情况下，选择了表达的 Nanoluc-VP1 重组蛋白作为之后单抗制备中用于筛选阳性孔的抗原。

虽然原核表达系统操作较为简便、蛋白产量较高，但是有部分天然缺陷。原核表达的抗原一般带有线性表位，而不带有空间构象，常在检测中出现漏检现象。刘秋艳等从豹源 FCV 中克隆出 VP1 基因连接至 pET-28a，以 IPTG 诱导后表达了包涵体形式的 VP1 重组蛋白，经阳性血清 Western Blot 鉴定后发现有一定的反应原性，虽然其表达量很高但是复性水平很低，而且繁琐。蒋艳妹^[68]等和程晨曦^[50]等则是将 FCV 病毒株 VP1 截短蛋白基因克隆至载体，成功表达了 VP1-F、VP1-B 和 VP1-E 截短蛋白，虽然其以可溶性蛋白的形式大量表达，并有良好的反应原性，但是作为以全毒免疫小鼠制备的单克隆抗体的筛选抗原来说有失偏颇。而真核表达系统表达的蛋白在功能和空间构象上更接近于天然蛋白，检测的特异性高，虽然真核表达的蛋白量少，但是以荧光素酶作为检测蛋白标签的高灵敏度弥补了蛋白表达量少的缺点。因此本次试验中选择了 LIPS 作为单抗筛选的方法。相较于 ELISA 和荧光免疫等方法进行检测，LIPS 由于以真核表达的蛋白作为检测抗原检测的特异性更高，由于其荧光素酶的高灵敏度，因此需要的蛋白量少。再加上不需要蛋白的纯化，所以抗原制备上也较为简便。此外，LIPS 检测中抗原和抗体是在液相-液相中混合反应，相较于 ELISA 等检测技术的固相-液相反应体系，其更接近自然状态。

4. 荧光素酶的选择

常用于 LIPS 的荧光素酶有萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶和 2012 年 Promega 公司新推出的小分子荧光素酶——nano 荧光素酶。nano 荧光素酶的分子量仅为 19 KD，但是其荧光强度是萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的 150 倍，是目前性能最好的生物发光报告基因^[69]。霍耐凡等将 Nanoluc 和 Rluc 的基因同时分别与蜚传脑炎病毒的 VE3 蛋白

基因融合,表达重组抗原,其结果显示 Nanoluc-VE3 的荧光强度明显高于 Rluc-VE3,当抗原使用量仍为 10^6 LU 时, Nanoluc-VE3 的相对产量要远高于 Rluc-VE3^[69]。此外, Rluc 在 37℃ 条件下半衰期为 10 min,热稳定性极差,而 Nanoluc 在 37℃ 下荧光活性随时间变化并无下降^[69]。所以,考虑到抗原制备和检测时间长短方面,本试验选择了 nano 荧光素酶作为 LIPS 检测的荧光素酶。

5. LIPS 检测

在本试验中,将 nano 荧光素酶基因与 FCV 的 VP1 蛋白基因融合后连于质粒 PVAX I,通过转染 COS1 细胞获得重组蛋白 Nanoluc-VP1,经检测,未经稀释的重组蛋白的荧光强度为 9.34×10^8 LU,稀释后的抗原荧光强度与稀释倍数线性相关。重组蛋白还体现出了良好的热稳定性,当重组蛋白处于 37℃ 下,荧光强度没有随时间的延长而降低。所以在试验中,没有采取在室温情况下长时间孵育,而是采取了抗原抗体反应的最佳温度 37℃ 作为孵育温度,孵育 30 min,大大缩短检测所需的时间。此结果说明能以 nano 荧光素酶作为检测标签用于 LIPS 检测。

将重组蛋白 Nanoluc-VP1 作为抗原,用 LIPS 检测方法检测 35 份实验室所存的已知的 FCV 阳性血清和 15 份阴性血清。结果如图 2-4,检测的荧光强度在 FCV 阳性血清和阴性血清中有显著性差异。此结果说明,重组蛋白 Nanoluc-VP1 有 VP1 的抗原性,能够用于检测 FCV 阳性血清。

6. 小鼠免疫

虽然免疫小鼠时,对免疫抗原不做要求,但是为了提高杂交瘤细胞的阳性率,此次试验还是选择了纯化后的病毒作为抗原。免疫小鼠时,其途径、次数和剂量都会对最终的免疫效果有影响。目前常用到的免疫方法主要是皮下注射、腹腔注射、肌肉注射足底免疫和皮内注射,其中皮下注射操作简单,所需操作人员少,缓释时间也较长,所以在试验中选择了皮下注射,免疫三次后选择了腹腔注射来加强免疫。在免疫剂量方面也进行了比较,用 1、2、4、8、16 μg /次不同的剂量来分别免疫 5 只小鼠,在三次免疫过后,对小鼠的血清做了中和试验后发现,并不是免疫剂量越高免疫效果越好,当免疫剂量达 8 μg /次时效果最好。

在免疫次数方面的选择还是倾向于免疫 3 次后加强免疫一次。在成功制备了 5 株单

抗之后,在已经免疫 5 次的两只初免小鼠中进行 1 次加强免疫后对这两只小鼠再次进行了融合,在融合后 4 天换液时,明显发现细胞碎片较多,七天后再次观察发现并没有杂交瘤细胞,十天终判时依然没有出现杂交瘤细胞,于是初步判断,多次免疫后不一定会加强融合的阳性率。

7. 阳性杂交瘤细胞株制备

在阳性杂交瘤细胞株制备过程中,细胞融合是其过程中最为关键的一步。在试验中,曾进行了 3 次融合,其中不乏失败经历。其中 SP2/0 细胞的选择对后期的融合有很大的影响。试验用的 SP2/0 细胞在使用前 1 周复苏,不应过早复苏,在传至 4~5 代时选择透亮、光滑且处于对数生长期的细胞用于融合。在试验的第 1 次融合中,因担心在使用 SP2/0 细胞时数量不够,而过早复苏细胞,在传至十几代后,细胞虽然在显微镜下仍然透亮光滑,但是在细胞传代时明显发觉细胞对培养瓶壁的附着性增强,不易吹下。由于后期时间并不充足,直接采用这批次的 SP2/0 细胞与免疫小鼠的脾细胞进行了融合,在 4 天后换液时观察细胞,发现大多为细胞碎片,7 天后再次观察细胞,发现没有出现杂交瘤细胞,等到融合后 10 天进行终判时,仍没有出现杂交瘤细胞,至此,第一次的融合试验宣告失败。

此外,对饲养层细胞的使用还是 Clone easy 培养基的使用也进行了对比。在试验中将融合后的细胞分为了两部分,一半铺于提前 1~2 天制备有饲养层细胞的 95 孔板中,另一半用含有 10% Clone easy 培养基的完全培养液悬浮,铺于干净的 96 孔细胞培养板中。4 天后正常换液,有饲养层细胞的 96 孔板用 HT 选择培养基进行半量换液,而无饲养层细胞的 96 孔板则用含有 10% Clone easy 培养基的 HT 选择培养基来进行半量换液。7 天后观察细胞情况时发现,无饲养层细胞的 96 孔板中的杂交瘤细胞数量和生长情况和有饲养层细胞的 96 孔板一致。所以,Clone easy 培养基基本上可以代替饲养层细胞,但是饲养层细胞除了维持融合细胞的生长以外,还能清除死亡的细胞,而 Clone easy 培养基在操作上更为简便。

8. 杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

利用建立的 LIPS 检测方法筛选阳性细胞孔,在筛选之前,用饲养层细胞上清液代替阴性血清对阳性和阴性值的界限进行校正。将上清液的荧光强度平均值+2 倍标准

差作为阳性判断标准。

为了能得到单一的细胞群，在预试验中用含有 10% Clone easy 培养基的 1640 完全培养基对 SP2/0 细胞进行有限稀释后培养。试验中采取了两种稀释的方法，一种是细胞重悬后计数，将细胞稀释至 10 个/mL；另一种则是细胞重悬后，将细胞吸至 96 孔板的 A1 孔，在第一列的孔中进行二倍倍比稀释，再用排枪横向进行第 2 次二倍倍比稀释。7 天后观察，计数稀释方案虽然容易得到单个细胞群，但是在稀释过程中容易损失细胞；二倍稀释方案虽然不会损失细胞，但是 96 孔板左上角几乎没有单个细胞群，而右下角几乎没有细胞，只有中间有部分单个细胞群。基于试验中需得到单个细胞群，正式试验中仍选择了计数稀释的方案。

在阳性杂交瘤细胞的第一次亚克隆中丢失了大部分的阳性细胞，在多次亚克隆后，阳性杂交瘤细胞慢慢稳定，最终得到了 5 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株，其中 2 株还具有中和活性。

结 论

1 通过超滤法和凝胶层析技术获得了较纯的 FCV-SX2 病毒株,用于 FCV 阳性杂交瘤细胞株制备。

2 建立了抗 FCV 抗体的 LIPS 检测方法,用于筛选抗 FCV 阳性杂交瘤细胞株。

3 获得到 5 株稳定分泌抗 FCV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 1E2、4C3、5F11、6G9 和 7D2,其中 4C3 和 5F11 有中和活性。1E2 和 6G9 的腹水效价为 1:12800,4C3、5F11 和 7D2 的腹水为 1:25600。1E2、4C3 和 6G9 的亚类鉴定为 IgG₁ 型,5F11 和 7D2 为 IgM 型,轻链均为 κ 链。

参考文献

- [1] 张忠信. ICTV 第九次报告对病毒分类系统的一些修改[J]. 病毒学报, 2012, 28(5):595-599.
- [2] Green KY. Caliciviridae: the noroviruses[M]. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2007. 949-979.
- [3] Carter M, Milton I, Meanger J, *et al.* The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus[J]. Virology, 1992, 190(1):443-448.
- [4] Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome[J]. J. Virol., 2002, 76(14):7060-7072.
- [5] Carter M. Feline calicivirus protein synthesis investigated by Western Blotting[J]. Arch. Virol., 1989, 108(1-2):69-79.
- [6] Sosnovtsev S, Sosnovtseva S, Green K. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase[J]. J. Virol., 1998, 72(4):3051-3059.
- [7] Sosnovtsev S, Belliot G, Chang K, *et al.* Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions[J]. J. Virol., 2005, 79(7):4012-4024.
- [8] Sato Y, Ohe K, Murakami M, *et al.* Phylogenetic analysis of field isolates of feline calicivirus (FCV) in Japan by sequencing part of its capsid gene[J]. Vet. Res. Commun., 2002, 26(3):205-219.
- [9] Jiang X, Espul C, Zhong W, *et al.* Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant[J]. Arch. Virol., 1999, 144(12):237723-237787.
- [10] Bull R, Hansman G, Clancy L, *et al.* Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap[J]. Emerg. Infect. Dis., 2005, 11(7):1079-1085.
- [11] Johnson RP. Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection[J]. Can. J. Vet. Res., 1992, 56(4):326-330.
- [12] Coyne K, Edwards D, Radford A, *et al.* Longitudinal molecular epidemiological analysis of feline calicivirus infection in an animal shelter: a model for investigating calicivirus transmission within high density, high-turnover populations[J]. J. Clin. Microbiol., 2007, 45(10):3239-3244.
- [13] Lee KM, Gillespie JH. Thermal and pH stability of feline calicivirus[J]. Infect. Immun., 1973, 7(4):678-679.
- [14] Chen R, Neill J, Estes M, *et al.* X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2006, 103(21):8048-8053.
- [15] Mochizuki M. Different stabilities to bile among feline calicivirus strains of respiratory and enteric origin[J]. Vet. Microbiol., 1992, 31(2-3):297-302.
- [16] Fastier L. New feline virus isolated in tissue culture[J]. Am. J. Vet. Res. April., 1957, 18(67):382-389.
- [17] Bannasch MJ, Foley JE. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters[J]. J. Feline Med. Surg., 2005, 7(2):109-119.
- [18] Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, *et al.* An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan[J]. J. Vet. Med. Sci., 2002, 64(3):215-219.
- [19] Helps CR, Lait P, Damhuis A, *et al.* Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Bordetella bronchiseptica in cats: experience from 218 European catteries[J]. Vet. Rec., 2005, 156(21):669-673.
- [20] Harbour DA, Howard PE, Gaskell RM. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989[J]. Vet. Rec., 1991, 128(4):77-80.
- [21] Coyne KP, Dawson S, Radford A, *et al.* Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral

- p shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats[J].
- Vet. Microbiol.*
- , 2006, 118(1-2):12-25.
- [22] 许楚楚, 胡士玲, 陈宋杰, 等. 北京地区猫杯状病毒和疱疹病毒流行病学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 65(11):23-26.
- [23] 范泉水, 夏咸柱. 老虎感染猫传染性鼻-结膜炎病毒的研究[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(4):373-378.
- [24] 刘永相. 东北虎源消化道病毒宏基因组学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [25] Hurley KE, Pesavento P, Pedersen N, *et al.* An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease[J]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004, 224(2):241-249.
- [26] Coyne K, Gaskell R, Dawson S, *et al.* Evolutionary mechanisms of persistence and diversification of a calicivirus within endemically infected natural host populations[J]. *J. Virol.*, 2007, 81(4):1961-1971.
- [27] Radford AD, Turner PC, Bennett M, *et al.* Quasispecies evolution of a hypervariable region of the feline calicivirus capsid gene in cell culture and in persistently infected cats[J]. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79(Pt 1):1-10.
- [28] Wardley RC. Feline calicivirus carrier state. A study of the host/virus relationship[J]. *Arch. Virol.*, 1976, 52(3):243-249.
- [29] Wardley RC, Gaskell RM, Povey RC. Feline respiratory viruses—their prevalence in clinically healthy cats[J]. *J. Small Anim. Pract.*, 1974, 15(9):579-586.
- [30] Coyne K, Jones B, Kipar A, *et al.* Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats[J]. *Vet. Rec.*, 2006, 158(16):544-550.
- [31] Pedersen N, Elliott J, Glasgow A, *et al.* An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus[J]. *Vet. Microbiol.*, 2000, 73(4):281-300.
- [32] Pesavento P, MacLachlan N, Dillard-Telm L, *et al.* Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats[J]. *Vet. Pathol.*, 2004, 41(3):257-263.
- [33] Schorr-Evans E, Poland A, Johnson W, *et al.* An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England[J]. *J. Feline Med. Surg.*, 2003, 5(4):217-226.
- [34] Hurley K, Sykes J. Update on feline calicivirus: new trends[J]. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2003, 33(4):759-772.
- [35] Binns SH, Dawson S, Speakman A, *et al.* A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus[J]. *J. Feline Med. Surg.*, 2000, 2(3):123-133.
- [36] Dawson S, Bennett D, Carter S, *et al.* Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection[J]. *Res. Vet. Sci.*, 1994, 56(2):133-143.
- [37] Love DN, Baker KD. Sudden death in kittens associated with a feline picornavirus[J]. *Aust. Vet. J.*, 1972, 48(11):643.
- [38] Sato Y, Ohe K, Fukuyama M, *et al.* Properties of a calicivirus isolated from cats dying in an agitated state[J]. *Vet. Rec.*, 2004, 155(25):800-805.
- [39] Dawson S, McArdle F, Bennett M, *et al.* Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests[J]. *Vet. Rec.*, 1993, 133(1):13-17.
- [40] TerWee J, Lauritzen A, Sabara M, *et al.* Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotropic or a ‘limping’ strain of feline calicivirus[J]. *Vet. Microbiol.*, 1997, 56(1-2):33-45.
- [41] Knowles JO, McArdle F, Dawson S, *et al.* Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis

- in cats[J]. *Vet. Microbiol.*, 1991, 27(3-4):205-219.
- [42] Poulet H, Brunet S, Soulier M, *et al.* Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies[J]. *Arch. Virol.*, 2000, 145(2):243-261.
- [43] Hoover E, Kahn D. Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions[J]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1975, 166(5):463-468.
- [44] Langloss J, Hoover E, Kahn D. Ultrastructural morphogenesis of acute viral pneumonia produced by feline calicivirus[J]. *Am. J. Vet. Res.*, 1978, 39(10):1577-1583.
- [45] Harrison TM, Sikarskie J, Kruger J, *et al.* Systemic calicivirus epidemic in captive exotic felids[J]. *J. Zoo. Wildl. Med.*, 2007, 38(2):292-299.
- [46] Tenorio A, Franti C, Madewell B, *et al.* Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses[J]. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1991, 29(1-2):1-14.
- [47] Lommer MJ, Verstraete FJ. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis[J]. *Oral Microbiol. Immunol.*, 2003, 18(2):131-134.
- [48] Truyen U, Geissler K, Hirschberger J. Tissue distribution of virus replication in cats experimentally infected with distinct feline calicivirus isolates[J]. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1999, 112(9):355-358.
- [49] 孟凯闻, 孟赓, 林德贵, 等. 猫杯状病毒研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(4):60-63.
- [50] 程晨曦. 猫杯状病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [51] 黄倩倩. 猫杯状病毒 FB-NJ-13 株的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [52] Ohe K, Sakai S, Sunaga F, *et al.* Detection of Feline Calicivirus (FCV) From Vaccinated Cats and Phylogenetic Analysis of Its Capsid Genes[J]. *Vet. Res. Commun.*, 2006, 30(3):293-305.
- [53] 王翀, 刘大飞, 刘春国, 等. 同时检测猫细小病毒、杯状病毒、疱疹病毒 1 型多重 PCR 方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(01):31-33.
- [54] Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, *et al.* A Novel Nested PCR for the Diagnosis of Calicivirus Infections in the Cat[J]. *Vet. Microbiol.*, 2005, 105(1):1-7.
- [55] 姜雪, 高玉伟, 胡桂学, 等. 猫杯状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *吉林大学学报(理学版)*, 2013, 51(05):973-977.
- [56] Digangi B A, Levy J K, Griffin B, *et al.* Prevalence of Serum Antibody Titers Against Feline Panleukopenia Virus, Feline Herpesvirus 1, and Feline Calicivirus in Cats Entering a Florida Animal Shelter[J]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2012, 241(10):1320-1325.
- [57] Digangi B A, Gray L K, Levy J K, *et al.* Detection of Protective Antibody Titers Against Feline Panleukopenia Virus, Feline herpesvirus-1, and Feline Calicivirus in Shelter Cats Using a Point-Of-Care ELISA[J]. *J. Feline Med. Surg.*, 2011, 13(12):912-918.
- [58] Ramanathan R, Burbelo P, Groot S, *et al.* A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of strongyloides stercoralis infection[J]. *J. Infect. Dis.*, 2008, 198(3):444-451.
- [59] Burbelo P, Ching K, Mattson T, *et al.* Rapid antibody quantification and generation of whole proteome antibody response profiles using LIPS (luciferase immunoprecipitation systems)[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 352(4):889-895.
- [60] Burbelo P, Ramanathan R, Klion A, *et al.* Rapid, novel, specific, high-throughput assay for diagnosis

- of *Loa loa* infection[J]. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46(7):2298-2304.
- [61] Cervone M, Bensignor E. Systemic calicivirus infection successfully treated with famciclovir in two cats[J]. *Revue Vétérinaire Clinique*, 2016, 51:83-88.
- [62] Kim Y, Shivanna V, Narayanan S, *et al.* Broad-Spectrum Inhibitors against 3C-Like Proteases of Feline Coronaviruses and Feline Caliciviruses[J]. *J. Virol.*, 2015, 89(9):4942-4950.
- [63] Leal R O, Gil S, Brito M T, *et al.* The use of oral recombinant feline interferon omega in two cats with type II diabetes mellitus and concurrent feline chronic gingivostomatitis syndrome[J]. *Irish Vet. J.*, 2013, 66 (1):1-4.
- [64] Rong S, Lowery D, Floyd-Hawkins K, *et al.* Characterization of an avirulent FCV strain with a broad serum cross-neutralization profile and protection against challenge of a highly virulent vs feline calicivirus[J]. *Virus Res.*, 2014, 188:60-67.
- [65] 孙雅鑫, 吴斌. 猫杯状病毒及疾病诊疗研究进展[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(11):97-101.
- [66] 艾纯旭. 抗猫杯状病毒单克隆抗体的制备以及双抗夹心 ELISA 检测方法的建立[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [67] Cubillos-Zapata C, Angulo I, Almanza H, *et al.* Precise location of linear epitopes on the capsid surface of feline calicivirus recognized by neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies[J]. *Virus Res.*, 2020, 51(1):775-786.
- [68] 蒋艳妹. 猫杯状病毒 VP1 抗原性分析及间接 ELISA 诊断方法的建立[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [69] 霍耐凡. 蜱传脑炎病毒诊断抗原的筛选及 LIPS 检测技术的优化[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.

Establishment of Positive Hybridoma Cell Lines secreting mAbs against FCV

Abstract

Feline calicivirus (FCV) is one common pathogen of feline upper respiratory tract disease (URTD). It accounts for 20% to 53% to URTD. When feline is infected by FCV, they always manifest fever, rhinitis, conjunctivitis, oral ulcerations, or chronic stomatitis. Sometimes, it also shows lameness, skin ulcerations, and pneumonia. FCV had high morbidity before, but low mortality. In the past decade, however, it was reported that there were FCVs with high mortality which severely endangered healthy of feline. Infected feline usually infect multiple other pathogens at same time. This condition makes diagnose so difficult. So, it is necessary that we need to develop an assay which can quickly and accurately detect serum.

In this research, two FCV strains isolated by our lab were compared with other FCV strains. Comparing with vaccine strains, the nucleotide identity of FCV-SX2 strain is lower than FCV-SX1. We chose FCV-SX2 strain as immunogen. The FCV-SX2 which was cultivated in F81 cell was purified by gel filtration chromatography. The viral titer of antigen which was determined by TCID₅₀ was $10^{-9.3}$. The concentration of antigen was 1.3 µg/µL. VP1 gene of FCV-SX2 and nano-luciferase gene were linked to eukaryotic expression vector PVAX I. With nano-luciferase fused antigen expressed in COS 1 cells, LIPS method was established by using positive and negative serum of mice, which could be used to detect the antibody of FCV. The purified virus mixed with Freund's adjuvant was used to immunize Balb/c mice. By the cell fusion technology, SP2/0 cells and the splenocyte of immune mice whose neutralizing titer was more than 1:3200 were fused. The mAb-secreting hybridoma strains were screened by LIPS method. After three subcloning, 5 hybridoma cells which could secret antibodies against FCV were screened out and named as 1E2, 4C3, 5F11, 6G9 and 7D2. Two of hybridoma cells had neutralizing activity. By using the LIPS method, the results suggest that 1E2, 4C3 and 6G9 were IgG₁ subtype with κ chain and 5F11 and 7D2 were IgM subtype with κ chain. By Western Blotting, all mAbs were reactive with FCV JL-2 and had great specificity. The hybridoma cells were inserted into the enterocoelia of mice. The titers of 1E2 and 6G9 were 1:12800. The titers of 4C3, 5F11 and 7D2 were 1:25600. This research is very significant to establish the method that can detect FCV quickly and precisely.

Keyword: Feline calicivirus, LIPS, hybridoma cells, eukaryotic expression system

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
FCV	<i>Feline calicivirus</i>	猫嵌杯病毒
FHV	<i>Feline herpesvirus</i>	猫疱疹病毒
FPV	<i>Feline panleukopenia virus</i>	猫泛白细胞减少症病毒
SMSV	<i>San miguel sealion virus</i>	圣米吉尔海狮病毒
VP	Viral protein	病毒蛋白
ORF	Open reading frame	开放阅读框
UPTD	Upper respiratory tract disease	上呼吸道疾病
VSD	Virulent-systemic disease	恶性系统性疾病
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
F81	Feline kidney cells	猫肾细胞
COS1	African green monkey kidney fibroblast cell line	非洲绿猴肾成纤维细胞
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光
LIPS	Luciferase immunoprecipitation system	荧光素酶免疫共沉淀系统
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
TCID ₅₀	50% tissue-culture infective dose	半数细胞培养物感染量
Nanoluc	Nano luciferase	nano 荧光素酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HT	Hypoxanthine-thymidine medium	HT 培养基
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium	HAT 培养基

攻读硕士期间科研情况

[1]刘媛,李敏,杨晓岚,范铁炯,李晓,张华捷,李靖,闫芳,赵忠鹏.马抗埃博拉病毒免疫球蛋白 F(ab')₂ 的制备及效果评价[J].中国兽医学报,2020,40(02):324-329.

致 谢

一转眼，研究生三年悄然而过，在这三年中我收获的不仅是知识与技能，还有众多的良师益友，有了你们的陪伴，这三年过得幸福而精彩。

首先，我要感谢我的导师闫芳教授，是闫老师帮我选定了课题，并一直关注我的进展，耐心指导，在得知我还要继续求学时，是闫老师给予了我莫大的鼓励，让我有信心向前迈步。除此以外，闫老师也是一位嘴硬心软的长辈，在鞭策我前进的同时，也十分关注我的身体健康，在某种程度上让我不会那么想念家。真的十分感谢您闫老师，感谢您在学业上的指导，和生活上的陪伴！

我也非常感谢我的另一位导师赵忠鹏副研究员，是赵老师在试验上给予了我莫大的帮助，帮我介绍其他擅长某一方面的老师和师兄让我学习，也帮我指出了我试验上和行为上的不足。谢谢您，是您的指导和陪伴让我在陌生的城市不再害怕，勇往前行！

我也要特别感谢赵玲娜师姐、程晋霞师姐和谷宏婧老师在试验中给予的指导和帮助以及刘卿老师在论文修改方面给我的帮助。

最后，我要对各位参与评审论文的老师 and 参与论文答辩的老师表示由衷的感谢！

刘 媛

2020 年 6 月