



分类号 S855.3

学 号 S20192292

山西農業大學

全日制硕士学位论文

猫杯状病毒抗原检测胶体金免疫层析试纸 条的研制

姓 名： 李华斌

指导教师： 闫 芳 教授

学科专业： 兽医学

培养单位： 动物医学学院

中 国·山 西·太 谷

二〇二二年五月

Shanxi Agricultural University

**Full-time Master Degree
Dissertation**

**Development of colloidal gold immunochromatographic
strip for detection of Feline calicivirus antigen**

Name: Hua bin LI

Supervisor: Prof. Fang Yan

Major: Veterinary Medicine

Institute: College of Veterinary Medicine

Taigu Shanxi China

May, 2022

本研究由“宠物疾病诊疗与防控新技术研究”
(编号:2016YFD0501000) ,
山西省高等教育“1331 工程”重点创新团队提质
增效建设计划项目 (编号: 20211331-13)
提供资助

**This research was supported by Pet disease diagnosis and
treatment and prevention and control of new technologies (Grant
No.2016YFD0501000), the Fund for Shanxi “1331 Project”
(Grant No. 20211331-13).**

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）：李华斌

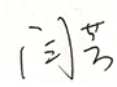
2022 年 5 月 30 日

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）：李华斌

2022 年 5 月 30 日

导师签名（亲笔）：

2022 年 5 月 30 日

目录

摘 要.....	1
前 言.....	3
1 FCV 概述.....	3
1.1 FCV 临床症状.....	3
1.2 FCV 流行病学.....	4
1.3 FCV VP1 基因的研究进展.....	5
1.4 FCV 诊断.....	5
1.5 疫苗.....	6
2 单克隆抗体研究进展.....	7
2.1 单克隆抗体.....	7
2.2 单克隆抗体的制备原理.....	8
2.3 单克隆抗体的应用前景.....	8
3 胶体金免疫层析技术研究进展.....	8
3.1 胶体金.....	8
3.2 金标抗体复合物的制备.....	9
3.3 胶体金试纸条的应用.....	9
4 研究目的及意义.....	10
试验内容.....	11
1 实验材料.....	11
1.1 菌株、质粒和病毒株.....	11
1.2 试验动物.....	11
1.3 主要试剂.....	11
1.4 主要器材.....	11
1.5 常用溶液的配制.....	12
2 试验方法.....	13
2.1 FCV VP1-B 蛋白的诱导表达及免疫原性分析.....	13
2.1.1 重组质粒 pET-22b(+)-B 的转化.....	13
2.1.2 转化产物的鉴定.....	13
2.1.3 VP1-B 蛋白的诱导表达.....	13
2.1.4 VP1-B 蛋白的纯化.....	13
2.1.5 VP1-B 蛋白浓度测定.....	14
2.2 抗 FCV VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定.....	15
2.2.1 动物免疫.....	15
2.2.2 小鼠免疫后血清抗体效价测定.....	16
2.2.3 阳性杂交瘤细胞的制备筛选与亚克隆.....	16
2.2.4 杂交瘤细胞腹水的制备.....	17
2.2.5 单克隆抗体的特性鉴定.....	17
2.2.6 单克隆抗体的纯化.....	18
2.3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备.....	18
2.3.1 胶体金溶液的准备.....	18
2.3.2 胶体金标记抗体的制备.....	18

2.3.3 胶体金标记抗体复合物的制备	19
2.3.4 胶体金试纸条的优化	19
2.3.5 胶体金试纸条的组装	19
2.3.6 胶体金试纸条的性能评价	20
结果与分析	21
1 FCV VP1-B 蛋白的诱导表达及免疫原性分析	21
1.1 VP1-B 重组质粒的提取和鉴定	21
1.2 VP1-B 蛋白纯化后浓度测定	21
1.3 VP1-B 蛋白纯化抗原性分析	22
2 VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定	22
2.1 单克隆抗体 Western-blot 鉴定	22
2.2 单克隆抗体的血清效价测定	23
2.3 单克隆抗体 Ig 亚型的鉴定	23
3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备	23
3.1 胶体金的制备	23
3.2 金标抗体 pH 值确定	24
3.3 金标抗体最佳标记蛋白浓度	24
3.4 金标抗体复合物工作浓度的鉴定	24
3.5 检测抗体和质控抗体工作浓度的测定	25
3.6 样品稀释的确定	25
3.7 胶体金试纸条特异性	25
3.8 试纸条的敏感性	25
3.9 试纸条的稳定性	26
3.10 试纸条临床试验应用	26
讨 论	27
1 VP1-B 蛋白构建表达与抗原性分析	27
2 VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定	27
3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备	28
结 论	30
参考文献	31
Abstract	36
附 录	38
致 谢	39

猫杯状病毒抗原检测胶体金免疫层析试纸条的研制

摘要

猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 是猫的一种重要传染性和地方性病原体, 可引起轻微自限性临床症状, 包括呼吸系统疾病、口腔炎和口腔炎症综合征; 极少数情况下, FCV 感染可能会导致急性关节炎、毒性全身性疾病(virulent-systemic disease, VSD)、严重肺炎、流产甚至猝死。目前在欧洲和美国的 VSD 发生率越来越高, 并且在中国也已经出现, FCV 感染时多伴随其它病原的感染, 诊断较困难, 因此建立快速高效检测方法是必要的。

FCV 是杯状病毒科无囊膜的 RNA 病毒, 基因组包含 3 个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), ORF2 编码 FCV 的衣壳蛋白 VP1, 在诱导机体产生免疫应答中起着重要的作用。VP1 蛋白分为六个区 (A~F), 其中 VP1-B 蛋白高度保守, 可以诱导机体产生广谱性抗 FCV 抗体, 适合作为免疫原制备抗 FCV 单克隆抗体。本试验将疫苗株 FCV-F9 的 VP1-B 区序列的重组质粒 pET22b(+)-B 转化到 BL21 (DE3) 表达菌中, 通过 IPTG 诱导进行表达, 表达产物经 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定, 结果表明该蛋白为可溶性抗原, 大小约为 55 kDa, 且有良好的反应原性。

将纯化后的 VP1-B 蛋白与弗氏佐剂混匀免疫 6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 选择血清效价较高小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合, 制备杂交瘤细胞; 纯化的 FCV-SX1 病毒粒子作为包被抗原, 建立间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞株系。经 3 次亚克隆筛选得到 3 株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为: 1E3、3A4 和 4F11; Western-blot 结果表明 1E3、3A4、4F11 均能识别 FCV-SX1、FCV-SX2、FCVCH-JL2, 具有良好的反应性; 间接 ELISA 方法对杂交瘤细胞上清及制备的腹水进行抗体效价检测, 结果表明 1E3、3A4 和 4F11 的细胞上清效价分别为 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:8.0 \times 10^3$, 腹水效价分别为 $1:1.28 \times 10^6$ 、 $1:2.56 \times 10^6$ 、 $1:1.28 \times 10^6$, 其中 1E3 和 3A4 为 IgG1, 4F11 为 IgM。

本试验中, 选用单抗 3A4 为金标抗体, 单抗 4F11 作为检测线抗体, 羊抗鼠二抗为质检抗体, 制备 FCV 抗原检测胶体金试纸条。用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 经检测 3A4 与胶体金颗粒结合的最适 pH 为 7.5; 进一步优化试验结果表明, 金标抗体的最适浓度为 $7.2 \mu\text{g/mL}$, 检测线包被浓度为 1.0 mg/mL , 质控线浓度为 0.5 mg/mL , 样品稀释液选择为 PBST。组装的试纸条对 4 种常见的猫病毒 FCV 毒株、猫细小病毒毒株

(Feline panleukopenia virus, FPV)、猫疱疹病毒毒株 (Feline Herpesvirus, FHV) 及猫传染性腹膜炎病毒 (Feline Infectious Peritonitis virus, FIPV) 毒株进行检测, 显示特异性良好, 与 FPV、FHV、FIPV 没有交叉反应; 试纸条的敏感度为 10^4 TCID₅₀/mL; 稳定性试验显示, 该试纸条在 4 °C 条件下可以保存 6 个月。用制备的胶体金试纸条与 RT-PCR 方法同时对 94 份猫鼻咽拭子进行检测, 符合率为 93.6%, 符合率在 90% 以上。综上所述试验结果表明, 本试验研制的胶体金试纸条可以用于猫杯状病毒临床检测。

关键词: 猫杯状病毒; VP1-B 蛋白; 单克隆抗体; 胶体金免疫层析技术; 试纸条

前言

1 FCV 概述

猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 属于杯状病毒科 (Caliciviridae) 杯状病毒属 (Pestivirus) 成员, 基因组为单股正链不分节段的 RNA, 无囊膜。FCV 主要感染猫, 其常见的临床症状多表现为上呼吸道疾病和口腔疾病, 例如: 口腔溃疡、流涎和牙龈炎-口炎等^[1], 此外该病毒还可以感染狮子、老虎、猎豹等猫科野生动物^[2-4]; 1957 年 Fastier 首次分离得到 FCV, 随后世界各地都分离得到了该病毒。近年来北美洲、欧洲、亚洲等地更是陆续分离到高毒且高致死率的 FCV-VSD (FCV- associated virulent systemic disease) 株^[5-9], 该病毒常引起成年猫多系统疾病, 致死率高达 30%~60%^[6, 10, 11], 并且疫苗不能阻止该病毒的传播和感染。目前 FCV 虽仅有 1 个血清型, 但 FCV 的高突变性及其高遗传可塑性使该病毒能够在猫科动物种群中长时间存活, 同时在免疫压力下该病毒的免疫逃避会引发疫苗免疫失败及加快病毒进一步变异, 其给 FCV 疾病的诊断、治疗和预防方面构成了挑战, 近年来国内外对 FCV 的研究热度逐步提高^[1]。

1.1 FCV 临床症状

FCV 不同的变异毒株会引起不同的临床症状, 口腔溃疡和上呼吸道为其经典症状; 随着免疫应激而形成的新毒株, 其影响的领域从口腔、上呼吸道逐渐发展到下呼吸道、四肢乃至多个脏器^[12]。首先最为常见的是急性口腔溃疡和轻微的急性上呼吸道疾病, 临床检查体征与猫疱疹病毒感染相似, 该症状多发于小猫, 多表现为发烧、打喷嚏、流鼻涕、食欲不振及口腔唾液增多^[13,14], 严重时会引起肺炎^[15], 但该情况下死亡率较低, 对症治疗几天后大多可以痊愈。其次少数猫感染 FCV 后呈现口腔和上呼吸道疾病后, 可能会出现短暂性跛行^[16,17]; TerWee 研究不同途径接种 FCV-255 疫苗株时, 发现约有 30% 的猫出现轻微的跛行^[16]。也有少部分人发现, 该病毒会引起手足口病, 症状为四肢及头部水肿和溃疡, 特殊情况下会出现黄疸症状, 与 VS-FCV (Virulent-systemic strains of Feline calicivirus) 感染初期症状相似, 但该疾病情况下未发现传播且死亡率低^[18-21]。1998 年首次报道 VSD, 当时称为出血性发热^[5], 随后研究人员发现该类病毒感染的猫很少出血^[6,22], 改名猫系统性疾病, 由其宿主分离的病毒称为 VS-FCV。目前 VS-FCV 在美国、欧洲及中国等国家已有相关报道并且其死亡率高达 30%~60%^[5,6,8,9,22]。2016 年瑞士曾爆发了一次大规模的 VS-FCV, 调查显示感染该种毒株的猫, 大约 80% 没有接种 FCV 疫苗^[19], 提示饲养猫时应注意疫苗的接种。VS-FCV 感染大多数猫最初症状为典型的口腔

及上呼吸道疾病,逐渐转变为特征性的四肢及头部水肿和溃疡^[23],但少数猫发病其症状并非如此,给该病毒感染早期的发现及对其及时做出相应的治疗设立了障碍^[19];严重时 VS-FCV 感染还会导致全身性炎症反应、弥散性血管内凝血及多器官衰竭等高死亡率全身性疾病^[22,24]。最近有人指出 FCV 可能与肉芽、膀胱炎、肠炎等疾病有关^[25,26],但缺乏相关证据,目前只有 Di Martione 在肠炎猫粪便中分离得到一株 FCV 毒株,发现该毒株可能有肠道嗜性并且提出其可能是肠道病原体^[27],但仍没有足够的证据证明其与肠炎有关。

1.2 FCV 流行病学

室温下,FCV 在干燥物体表面能够保持长达一个月的感染力,在潮湿的环境中持续时间更长,因此间接传播是其主要传播方式,发病猫和隐性感染猫的分泌物会污染环境、清洁工具及人员,良好的卫生和生物安全措施是减少 FCV 感染的重要措施,Spiri 等人发现该病毒可以以气溶胶的形式传播扩散^[28];大多数病猫在康复后 30 d 内仍会持续排毒,对该疾病的防控也带来了一定的挑战,该期间应该注意隔离,定时对地面和笼舍进行消毒。此外研究表明,流浪猫发病率高于家养猫,发病率与猫的数量呈正相关;调查显示数量多的猫群患病率是猫群数量少的 3~4 倍。该病毒多发于幼猫,并且日龄越小的猫感染死亡率越高。

国内外学者从不同的动物中分离得到了该病毒,主要以猫及猫科为主,但也有狗感染该病毒的报道^[29],目前该病已呈世界性分布。澳大利亚 2013~2015 年对猫上呼吸道疾病进行流行病学调查显示最常见的病毒为 FHV 和 FCV^[30];2016 年 JHou 通过调查欧洲的五个国家(法国、德国、希腊、葡萄牙和英国)具有淋巴浆质性牙龈炎的 426 只猫,发现 FCV 的患病率为 22.2%^[31],此外在 2017 年米兰大学通过对米兰流浪猫进行流行病学调查显示 FCV 相较于 FPV 和 FPV 有更高的发病率,其发病率高达 85.4%,并且 VS-FCV 在该地区流行^[8,32];在韩国发现本土的 FCV 和与出血性相关的 FCV 发生了重组的现象,给该病的防控带来了挑战^[33]。

在国内,许楚楚等人对北京市 2015~2017 年中国农业大学就诊的 412 例样本进行调查,显示 FCV 感染率为 46.11%,其中与猫疱疹病毒混合感染高达 11.8%^[34];郑梦杰对 2018~2020 年杭州地区疑似 FCV 临床症状的猫进行调查,发现该地区的 FCV 阳性率高达 43%^[35];杨玥晗等人通过对安徽省猫疱疹病毒 I 型和猫杯状病毒流行病学调查显示 FCV 的发病率高达 71.5%^[36];曲雪婷等人对山东部分地区流浪猫进行流行病学调查发现 FCV 的阳性率最高明显高于猫疱疹病毒和猫细小病毒^[37];Liu Caihong 等人对 2016~2019 年国内 16 个城市 6 种猫传染病血清学调查中发现,FCV 疫苗的血清学效力不足,并且

在未接种疫苗的猫中 FCV 的检出率最高^[38]；汤傲星等人对华东地区的 FCV 进行遗传进化分析发现，该地区的 FCV 基因与疫苗株的同源性较低，其导致传统疫苗免疫保护效果较差^[39]；通过检测中国西南地区动物收容所和宠物医院的猫身上采集的 162 个鼻拭子样本，发现 FCV 的阳性率约为 23.46%^[38]；此外，该病毒在野生猫科动物中也存在感染的情况^[4]，夏咸柱等人从患有眼结膜炎的病虎体内首次分离到 FCV，随后在猎豹中也分离得到了 FCV^[40, 41]，甚至有人发现该病毒对狗也有一定的感染作用；FCV 通过抑制宿主 I 型干扰素应答反应得其在天然免疫中具有了抵抗天然免疫的作用^[42, 43]，使得该病毒越来越易感动物，可能在不久的将来有大流行；鉴于 FCV 目前在全球范围内的影响，我们应加强对于 FCV 的监控和防控，并尽快研发相关的治疗手段与疫苗。

1.3 FCV VP1 基因的研究进展

FCV 基因组是一种正义单链 RNA，包含三个开放阅读框（ORF）。ORF1 位于基因组的 5'端，编码病毒非结构蛋白，ORF2 编码主要的衣壳蛋白 VP1，ORF3 编码一种假定的次要结构蛋白 VP2。与其他病毒相比，该病毒显著特征是 ORF2 的主要衣壳蛋白作为前体蛋白（73~78 kDa）的表达，其在翻译后被切割成 60 kDa，VP1 氨基酸含量在 668~671 aa 之间，分为 6 个区域（A-F），区域 A 对应于 LC 蛋白，FCV 分离株中 B、D 和 F 区域相对保守，而区域 C 和 E 则高度可变，其可能是造成免疫失败的主要原因^[44, 45]。A 区 124 aa，其高度保守；B 区 272 aa，形成病毒的核心其高度保守；C 区和 E 区较短，分别为 3 aa、24 aa，但是该区高度变异，可诱导机体产生中和抗体，所以该区的变异可能是免疫失败的主要原因，也给抗体治疗的方法带来了挑战。E 区的研究较多，E 区被认为与抗原决定簇有关，是重要的免疫学成分，存在线性 B 细胞表位^[44]，并且 E 区 5'高变异区（HVR）中的 Asn-Gly-Thr 序列具有很强的免疫原性^[46]，在线性 B 细胞表位区域和区域 E 的 5' HVR 中检测到的高序列变异性表明，使用单一疫苗株进行免疫接种对于预防 FCV 感染的效率应该很低^[47]。但对该区的氨基酸残基的分析发现其并不能明确区分 FCV-URTD 和 FCV-VSD 表型^[48]，在这种情况下我们选择了高度保守的 B 区，其可以激发机体产生非中和广谱性抗体，能够识别大多数 FCV，是作为免疫动物，制备单抗用于检测的合适蛋白。

1.4 FCV 诊断

随着宠物行业的快速发展，同时猫作为主要的宠物之一，猫的疾病也日益受到人们关注。目前显示所有的猫科动物都可能感染 FCV，并且针对 FCV 没有特异性药物，因此迫切需要建立快速有效检测 FCV 的方法。FCV 的检测方法主要有病毒分离鉴定、酶联免疫吸附实验（ELISA）、聚合酶链式反应（RT-PCR）、免疫荧光分析及胶体金免疫检

测技术。

病毒分离是通过猫肾细胞（F81）进行 FCV 的培养，临床样本中的 FCV 通过盲传数代后，细胞会呈现葡萄串状的细胞病变（Cytopathic effect, CPE），但是该方法从临床样本分离到最终鉴定最少需要 1~2 周的时间，不适用于临床的鉴定。ELISA 方法也是宠物医院常用检测方法，吉林大学艾纯旭等人通过制备单克隆抗体进而建立了 ELISA 的检测方法^[49]，之后，孟凯闻及王真真等人分别以构建表达 FCV 的 VP1 蛋白和截断的 VP1 蛋白为作为包被抗原，建立了间接 ELISA 的方法检测 FCV^[50,51]的方法，但其制备的单克隆抗体没有进行病毒广谱型分析，可能在面对检测变异毒株时效果较差，并且其操作较为繁琐且需要专业的设备。核酸检测中有常规、嵌套和实时 RT-PCR 检测，该方法的敏感性主要取决于设计的引物和检测的毒株本身有关。在设计引物时应应对大量毒株序列进行比对，减少假阴性结果，Meil 设计了两个完善的 FCV RT-PCR 系统，结果显示未能扩增全部的分离株^[52]；FCV 感染多伴随其他病原的感染，Sykes 研制了多重 PCR 检测用于检测 FCV 和 FHV，但此类检测方法敏感性可能会较低^[53]；实时 RT-PCR 用于检测病毒有更高的敏感性，如果可以的话优先选择定量测定法，其除提供阳性样品时还能提供病毒载量信息，近几年有很多定量 RT-PCR 的开发，中国农科院北京畜牧兽医研究所建立了纳米 PCR 技术，其最低检测量为 5.4×10^{-3} pg/ μ L，灵敏度是普通 PCR 的 10 倍^[54]；姜雪等人通过 ORF2 的保守序列，设计了一对引物及相关 TaqMan 探针，其检测的最低浓度为 2.26×10^1 拷贝/ μ L^[55]；李娅建立的 SYBR Green RT-qPCR 的检测灵敏度可达 42.4 拷贝/ μ L，敏感性高于常规 RT-PCR 方法 100 倍左右^[56]；韩国基于报道的 FCV 毒株的保守核苷酸序列，开发了一种新型逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）测定，该方法对其他猫科病原体的核酸没有交叉反应性，检测限计算为 10^0 TCID₅₀/mL^[57]。目前有团队开发了利用探针检测 FCV 的 qPCR 技术，其检出限为 50 个拷贝数^[58]，Liu 等人建立了 ERA-LFD 快速检测法，其通过酶促重组酶扩增（ERA）测定与侧流试纸（LFD）相结合用于检测 FCV，靶向 FCV-ORF1 的位置，该方法灵敏度高，检测限低至 3.2 TCID₅₀/mL^[59]，PCR 检测虽然灵敏度和准确度较高，但需要专业的技术人员及特殊的设备才能进行检测，此外 RT-PCR 结果呈阴性也不能证明没有感染 FCV，需要结合抗体检测和临床症状进一步确定，有一定的局限性。

目前研究 VS-FCV 的人越来越多，有试验表明 VS-FCV 的衣壳蛋白可以使病毒在体外增殖速度更快^[60]，Brunet 对 VP1 E 区蛋白进行分析，发现在 E 区的七个残基可能是导致毒力不同和临床症状不同的关键性因素^[11]。尽管如此，仍没有专门检测 VS-FCV 的方法，目前 VS-FCV 的诊断多由 RT-PCR 和临床表现结合进行判定。

1.5 疫苗

FCV 的疫苗主要以单价苗为主, 包括 FCV-F9 活疫苗、FCV-225、FCV-G1、FCV-431、FCV-M8 等灭活疫苗^[61], 但由于 FCV 的突变率较高, 特别是近几年 VS-FCV 的流行, 单价疫苗的免疫效果在部分地区的表现不佳。为获得更好的免疫效果, 美国通过改变疫苗接种方式进行免疫, 发现滴鼻接种活疫苗后, 机体能够产生强烈的细胞和体液免疫反应, 对异源 FCV 也有一定的作用, 猜测可能是由于该病毒本身为呼吸道病毒, 因此呼吸道相比于皮下病毒侵入细胞的受体表达量更高^[62], 并且通过滴鼻的方式免疫, 可能诱导机体获得细胞免疫和体液免疫外的黏膜免疫, 与目前报道的陈薇院士制备的新冠雾化疫苗有相似之处, 如果是这样, 其能够在减少疫苗用量的情况下, 使机体产生更强的免疫; 此外由于 FCV 的变异, 广谱抗病毒疫苗才是解决 FCVD (Feline calicivirus disease, FCVD) 的重要手段, 研发一个新的疫苗需要较长得时间和高昂的成本, 在欧洲地区, 使用 FCV-G1 和 FCV-431 的联合疫苗进行免疫, 结果表明联合免疫能够减轻临床症状并且减少病毒在各器官的定殖^[63]; 此外有团队对原有的疫苗进行改良, 发现改性活疫苗 FCV-F9 的接种能够更好的诱导猫产生细胞免疫, 降低各脏器的病毒载量^[64,65]。疫苗的接种时间对于预防该疾病也有很大的关系, 幼猫首次接种应在 9 周龄, 过早接种母源抗体可能会影响其接种效果。面对 FCV 的不断突变, 接种途径和联合免疫的效果会逐渐减弱, 现急需生产一种能够抗高毒力且有广谱免疫的新疫苗才是解决该问题的主要方法。

在药物治疗方面, 以抗生素为主, 病情较为严重时, 在临床上动物医院多采用支持治疗和抗生素或者抗体治疗以增强自身免疫力来缓减症状^[65], Kim 等在体外细胞实验中发现 Fexaramine 和 NPI52 的联合用药通过抑制病毒入侵细胞和影响病毒的复制来对抗 FCV 感染^[66]。在国内候选药物方面, 李登亮等人做了大量的试验, 天然化合物方面发现淫羊藿苷、芒柄花素和咖啡酸苯乙酯等在体外能够抑制 FCV 的复制, 且存在一定的广谱抗病毒作用, 在治疗 FCV 上是潜在的候选药物^[67]; 在化学合成药物方面, 李登亮等人发现氯化铜对于 FCV 有抗病毒作用, 其与利巴韦林联合用药效果更好^[68], 同时其发现硝唑尼特和咪唑立宾协同用药以及西奈芬净可以降低呼吸道病毒载量, 减少病毒的排出, 并且没有细胞毒性^[69], 这些化合物的研究为对抗 FCV 感染提供了基础。

2 单克隆抗体研究进展

2.1 单克隆抗体

抗体对疾病的诊断和防治有重要作用, 随着对抗体的需求的不断增加, 人工制备技术应运而生, 目前人工制备的抗体主要有多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体。多克隆抗体 (polyclonal antibody) 通过免疫动物相应抗原分离血清制备, 含有多株 B 细胞

分泌的抗体，该类抗血清用于抗原检测常发生免疫交叉反应，经免疫吸收处理后仍无法避免，更不适用于抗体结构、抗原表位鉴定和基因组成的研究；单克隆抗体是由通过单个淋巴 B 细胞和骨髓瘤细胞融合制备而得，表达的抗体之间均一性较高，并且可以根据需求制备功能专一的单克隆抗体，其在诊断方面取得了广泛的应用，同时治疗方面也取得了一定的进展，但由于制备单抗的宿主与应用抗体治疗的宿主之间存在种属差异，会产生细胞毒作用，导致了单抗在机体中的存活期缩短，药效下降，限制了单抗在治疗方面的使用。基因工程技术是针对细胞毒作用进行的改造，随着技术的提高，目前全人源抗体已成为该技术发展的趋势。

2.2 单克隆抗体的制备原理

杂交瘤细胞技术的发明是免疫领域具有里程碑的意义，单个抗原激活的 B 细胞能够分泌抗体，但是在体外一般只能存活 5~7 d，不能够持续分泌抗体；骨髓瘤细胞具有无限增殖的能力，两种细胞的融合形成的杂交瘤细胞使得其具备了分泌抗体和无限增殖的能力。在细胞融合过程中有很多种融合方式，筛选得到所需要的杂交瘤细胞是很关键的，在筛选中 HAT 选择培养基发挥了重要的作用，细胞合成 DNA 有两种途径：一种是利用叶酸合成 DNA 的初始途径，另一种是利用细胞合成的次黄嘌呤（Hypoxanthine, H）、胸腺嘧啶核苷（Thymidine, T）两种酶来合成 DNA 的中间途径；在 HAT 培养基中含有叶酸抑制剂，没有叶酸的参与初始途径无法合成 DNA，剩下只能通过中间途径来合成 DNA，骨髓瘤细胞由于自身不能合成 H、T 两种酶，需要 B 细胞提供这两种酶才能增殖，因此在 HAT 培养基的选择下存活的多为目标所需要的融合细胞。

2.3 单克隆抗体的应用前景

单克隆抗体已广泛地应用于医学生物学的各个邻域，例如：①诊断试剂广泛应用于 ELISA、免疫组化、流式细胞等技术，同时其促进了商品化试剂盒的研制，例如用于抗原、抗体、细胞因子检测试剂盒；②由于单抗具有导向性，其与药物偶联能够直接作用于靶细胞，在减少药物的用量的同时增强了药物作用；③在层析柱中其是主要的配体，能够用于蛋白质的分离纯化。

3 胶体金免疫层析技术研究进展

3.1 胶体金

胶体金是由氯金酸（ HAuCl_4 ）经还原剂聚合成一定大小的金颗粒，不同的还原剂和不同剂量的还原剂会形成粒径大小不同的胶体金颗粒，还原剂的用量和还原核的数量与

胶体金的数量成正比，与胶体金颗粒粒径大小成反比，其中胶体金的粒径大小每增加一倍，胶体金浓度会降低 8 倍；胶体金粒径的不同在肉眼观察时会呈现不同的颜色，因为其粒径的大小与光散性有关。胶体金颗粒质量通常可通过眼睛直接观察鉴定，溶液眼观澄清透亮不浑浊，颜色一般为橘色到紫红色，也可以通过紫外分光光度计分析可见光吸收光谱观察峰宽和峰形进行测定。

3.2 金标抗体复合物的制备

目前胶体金制备的还原试剂主要有柠檬酸钠、白磷、硼氢化钠、鞣酸等，在还原剂的作用下其会形成 AuCl^{2-} ，带负电，在溶液中由于粒子之间相互排斥会形成稳定溶液，该粒子对于蛋白质有强的结合能力，可以与葡萄球菌 A 蛋白、免疫球蛋白、毒素、糖蛋白、酶、抗生素、激素、牛血清白蛋白多肽等非共价结合，该复合物就是金标抗体，胶体金粒子对蛋白的吸附作用取决于溶液的 pH 值，当 pH 为等电点时，蛋白质为中性，在这种情况下，蛋白质的溶解度最低，容易吸附于胶体金颗粒的表面；但在实际操作中，通常将胶体金的 pH 值调节到 $\text{PI}+0.5$ ，此时蛋白带正电荷，与带负电的胶体金粒子能够更好的结合形成稳定的复合物^[70]。该复合物少量分布时肉眼观测不到，借助显微镜观察下其呈黑色，当该复合物大量聚集时，肉眼可以观察红色，胶体金免疫层析技术中的显色就是利用了这一特性，因此其在生物医学检测领域具有重要的应用价值。

3.3 胶体金试纸条的应用

1971 年 Faulk 和 Tattor 将胶体金引入免疫化学^[71]，此后免疫胶体金技术在生物医学多个领域得到了广泛的应用。在病毒病方面，吴海涛以抗 ASFV 的杂交瘤细胞 2D3 分泌的抗体为金标抗体，构建表达 ASFV P72 蛋白免疫兔制备的多克隆抗体为检测抗体制备了检测非洲猪瘟的胶体金试纸条，通过检测其构建表达的 ASFV P72 蛋白发现有较高的敏感性^[72]；在细菌检测方面，刘志科通过原核表达了沙门氏菌 InvA 蛋白制备了沙门氏菌抗体检测的胶体金试纸条，其具有良好的敏感性最低可检出的鸡沙门氏菌阳性血清为 1:125，与平板凝集试验结果符合率高达 96.41%^[73]；在寄生虫方面，刘维建选择了弓形虫表面抗原 SAG3，以 SAG3 为检测抗原，金黄色葡萄球菌为金标抗体，制备了见测弓形虫抗体的胶体金试纸条，其具有良好的敏感性约 1:640，与商品化的产品对比有较高的符合率^[74]；此外，在食品安全和药物残留方面，也有很多胶体金试纸条的研制，例如在检测猪肉中盐酸克伦特罗的残留，有团队利用胶体金试纸条和光学传感器结合制备了可半定量检测克伦特罗的试纸条，其灵敏度可以满足基层的快速筛查，有利于快速现场的检测^[75]；此外，也有对恩诺沙星、氟喹诺酮类抗生素等药物在食品和动物体内残留的检测试纸条^[76,77]，胶体金试纸条的出现使得动物疾病诊断和食品安全检测越来越便捷，

对动物的健康和人民的生活品质有很大的提高。

4 研究目的及意义

猫杯状病毒病（FCVD）是危害猫科动物的一大疾病，通常会引起急性的上呼吸道疾病，一些毒株还可以引起跛行，严重时可引起全身性疾病（VSD）并呈现高死亡率，这不仅对家猫的健康造成危害，而且还严重威胁野生猫科动物。本试验拟通过原核系统表达VP1 B区蛋白作为抗原免疫小鼠制备杂交瘤细胞，利用杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体制备FCV抗原检测胶体金试纸条，其操作便捷，检测更快速，且由于为干试纸条形式，无须低温保存，储运也方便，如果能将试纸条检测的方法广泛应用到动物医院、基层及个人手中，有利于感染流行病学的调查，预防和控制该疾病的传播。

试验内容

1 实验材料

1.1 菌株、质粒和病毒株

重组质粒 pET22b(+)-B 合成构建于通用生物有限公司；SP2/0 细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞由本实验室保存提供；FCV-SX1 病毒株、FCV-SX2 病毒株、FCV CH-JL2 病毒株、FCV 多克隆抗体由本实验室保存；猫细小病毒毒株 (Feline panleukopenia virus, FPV)、猫疱疹病毒毒株 (Feline Herpesvirus, FHV) 及猫传染性腹膜炎病毒 (Feline Infectious Peritonitis, FIP) 毒株由吉林农业大学动物科技学院提供。

1.2 试验动物

6~8 周龄 BALB/c 小鼠购自北京市维通利华。

1.3 主要试剂

酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、低分子量蛋白 Marker、BCA 试剂盒、包被液均购于索莱宝生物科技有限公司；ECL 发光 Marker 购自中科瑞泰；氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 50 mg 购于上海生工公司；2000 bp DNA Marker 购于大连 TakaRa 公司；琼脂糖购于西班牙 BOWEST 公司；核酸染料购于北京 GV-II 公司；5×上样缓冲液、IgM Purification Kit 均购于 Thermo Fisher 公司；ECL 超敏发光液购于北京华兴博创基因技术有限公司；HRP 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgM、HRP 标记羊抗兔 IgG、弗氏佐剂、DMSO 购于 Sigma；BioSci™ NewFlash Protein AnyKD PAGE 蛋白电泳凝胶试剂盒、NC 膜均购自达科为生物科技有限公司；DMEM 培养基、1×PBS 购于北京中生奥邦生物科技有限公司；RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司；无支原体胎牛血清 (FBS) 购自浙江杭州四季青生物科技有限公司；HiTrap™ rProtein A FF 购自 GE Healthcare；50×HAT 和 50×HT Media Supplement 购自 Macgene 公司；PEG 细胞融合剂购自 GENNED 公司；Clone Easy 培养基、单克隆抗体亚型鉴定试剂盒购自博奥龙公司；玻璃纤维膜 SB08、吸水纸 CH27、PVC 胶板、样品垫均购自上海良信科技有限公司；塑料卡槽购自北京市标驰泽慧生物科技有限公司。

1.4 主要器材

数显恒温水浴箱 (金坛市瑞华仪器有限公司)；Thermo 生物安全柜 (Scientific Visi

ons Inc); 天能 1600 凝胶成像系统 (北京赛智创业技术公司); Precision 生化培养箱 (上海一恒科技公司); HZ-931OK-B 恒温振荡培养箱 (苏州华利达公司); PEQSTAR 2×PCR 扩增仪 (德国 Peqlab 公司); Thermo 台式离心机 (德国 Thermo 公司); MilliPore 超纯水仪 (美国 BECKMAN 公司); 生物净化工作台 (北京伟达净化技术研究所); Allegra 64R 低温高速离心机 (BECKMAN 公司); Synergy H4 酶联仪 (美国 Bio-Tek); 核酸浓度检测仪 (美国 Pultton 公司); 细胞培养瓶 (NEST 公司); 细胞培养箱 (MSC 1.8) (德国 Thermo 公司); Allegra 64R 低温高速离心机 (BECKMAN 公司); 三维划膜喷金仪 (HM3030)、切纸机 (上海金标生物科技有限公司)。

1.5 常用溶液的配制

(1) 100 mg/mL 氨苄母液: 100 mg 氨苄溶于 1 mL 无菌蒸馏水中, -20 °C 保存备用;

(2) LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加入无菌蒸馏水定容至 1 L, 高压灭菌于 4 °C 保存备用;

(3) 含氨苄 LB 液体培养基: 于高压灭菌后的 LB 液体培养基中加入 1/1000 体积的 100 mg/mL 的氨苄母液, 摇匀于 4 °C 保存备用;

(4) 氨苄 LB 固体培养基: 向 1 L LB 液体培养基内加入 16 g 琼脂粉, 高压灭菌室温冷却至 56 °C, 于生物安全柜中加入 1/1000 体积的 100 mg/mL 的氨苄母液, 混匀倒入高压后的平皿, 凝固后于 4 °C 倒置保存备用;

(5) Binding buffer: 1 L 水中加入 20 mM 磷酸钠 7.6 g、0.5 M NaCl 29.2 g 和 40 mM 咪唑 2.72 g, 调节 pH 为 7.4;

(6) Elution buffer: 1L 水中加入 20 mM 磷酸钠 7.6 g、0.5 M NaCl 29.2 g 和 400 mM 咪唑 27.2 g, 调节 pH 为 7.4;

(7) 考马斯亮蓝染色液: 650 mL 蒸馏水中加入 1 g 考马斯亮蓝、100 mL 冰醋酸、10 mL 异丙醇, 混匀常温保存;

(8) 脱色液: 425 mL 蒸馏水中加入 50 mL 冰醋酸和 25 mL 乙醇, 混匀常温保存;

(9) HAT PRMI 1640 培养基: 在 RPMI 1640 培养基中加入 20% 血清、1% 双抗和 2% 的 50×HAT;

(10) HT PRMI 1640 培养基: 在 RPMI 1640 培养基中加入 20% 血清、1% 双抗、10% Clone Easy 培养基和 2% 的 50×HT;

(11) Clone sasy 培养液: 在 RPMI 1640 培养基中加入 20% 血清、1% 双抗、2% 的 50×HT 和 10% Clone Easy 培养基;

(12) 细胞冻存液：按照血清：二甲基亚砷：RPMI 1640 培养基=2:1:7 进行配置。

2 试验方法

2.1 FCV VP1-B 蛋白的诱导表达及免疫原性分析

2.1.1 重组质粒 pET-22b(+)-B 的转化

在 25 μL 的 BL21 (DE3) 感受态细胞中加入 1 μL 的重组质粒 pET22b(+)-B；冰浴 30 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s，4 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min；加入 500 μL 无抗 LB 液体培养基，混匀；37 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 振荡 1 h；吸取 200 μL 菌液在含氨苄霉素的 LB 固体培养基上用涂布棒均匀涂布；置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱倒置过夜培养。挑取固体培养基上的单个克隆菌群接种于含有氨苄霉素的 LB 液体培养基中，200 r/min，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。

2.1.2 转化产物的鉴定

取少量转化后得到的菌液，用特异性引物 F1：5'-ATTGAGCTCCGCTTAGAGGCTGATGATGGT-3'，R1：5'-ATACTCGAGTATTGGCCGGAATCTCGGCGT-3' 对其进行 PCR 扩增，扩增片段大约为 816 bp，25 μL 反应体系为，2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 12.5 μL 、上游引物 F1 (10 pmol/ μL)、下游引物 R1 (10 pmol/ μL) 及 cDNA 模板各 0.5 μL ，补加 ddH₂O 11 μL 。PCR 反应参数设置为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s，35 个循环，35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min，以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增效果。

称取 0.1 g 琼脂糖加入 10 mL 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中混匀；微波炉加热溶化后，将液体倒入模具中，插好梳子，排掉气泡；待 20 min 后，将凝固的琼脂糖胶块放入电泳槽中，加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液；PCR 产物 5 μL 及 Marker 分别与 2 μL 核酸染液吹吸混匀，加入凝胶孔，150 V 恒压电泳约 15 min；天能 1600 凝胶成像系统观察并拍照。将 PCR 鉴定结果正确的重组质粒的 PCR 产物与引物送至上海生工进行测序，使用 DNAMAN 对生工测序结果和 FCV-F9 疫苗株 VP1-B 区基因进行比对判断重组质粒是否转化成功。

2.1.3 VP1-B 蛋白的诱导表达

第 2 d 将转化的菌液以 1:100 接种于 10 mL 含氨苄霉素的 LB 液体培养基中，200 r/min，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至大肠杆菌对数生长期 (OD 约 0.6~0.8)，加入 IPTG 至终浓度为 1 mM，37 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养 18~24 h。

2.1.4 VP1-B 蛋白的纯化

(1) 将诱导表达得到的菌液，10000 r/min 离心 15 min，弃上清，菌体沉淀用 3

mL 的 Binding buffer 重悬（取上清 10 μ L 置于新的 1.5 mL 离心管，作为全菌样品待电泳）；

（2）超声破碎细菌，12000 r/min 离心 10 min（吸取上清置于新的 1.5 ml 离心管，沉淀用 100 μ L PBS 重悬；上清和沉淀各取 100 μ L 置于 1.5 ml 离心管，作为上清和沉淀样品检测表达的蛋白是否为可溶性蛋白，上清 SDS-PAGE 图中有目的条带为可溶性蛋白，反之为包涵体）；

（3）抽滤：对超声破碎蛋白、蒸馏水、Binding buffer 和 Elution buffer 进行抽滤，先用 0.45 μ m 的滤纸过滤，再用 0.22 μ m 滤纸过滤，防止后期镍柱堵塞；

（4）清洗镍柱：先用 4~5 个柱体积的 20%乙醇冲洗，再用 4~5 个柱体积的蒸馏水冲洗；

（5）平衡镍柱：使用 Binding buffer 平衡，约为 4~5 个柱体积；

（6）上样：将抽滤处理的蛋白以 1 mL/min 的速度通过镍柱；

（7）平衡镍柱：再次使用 4~5 个柱体积 Binding buffer 平衡；

（8）洗脱蛋白：以 1 mL/min 的速度用 8 个柱体积的 Elution buffer 洗脱蛋白，分 8 管收集蛋白，-20 $^{\circ}$ C 保存；

（9）清洗保存镍柱：首先使用 4~5 个柱体积的蒸馏水冲洗，再用 4~5 个柱体积 20%的乙醇冲洗后，浸泡于 20%的乙醇中 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.5 VP1-B 蛋白浓度测定

（1）制备工作液：将 BCA 试剂 A 和试剂 B 按照 50:1 的比例充分混匀；

（2）标准品制备：从-20 $^{\circ}$ C 中取出牛血清白蛋白（BSA）标准品，室温融化后，BSA 原浓度为 4000 μ g/mL，吸取 20 μ L 的 BSA 样品与 30 μ L PBS 混匀（BSA 浓度为 1600 μ g/mL），对其进行 2 倍倍比稀释，制备 800、400、200、100、50、25 μ g/mL 的标准品，将上述稀释的标准品加入 96 孔板，每孔 225 μ L，每个浓度 3 个复孔；

（3）选择 2、4、8 倍稀释待测样品，在 96 孔板中每孔加入 25 μ L 稀释的样品和 200 μ L BCA 工作液，做 3 个复孔；

（4）加样完成后，温箱孵育 20 min，检测各孔吸光度值，绘制标准曲线计算回归方程，代入检测样品 OD 值计算蛋白浓度。

2.1.6 VP1-B 蛋白抗原性分析

2.1.6.1 SDS-PAGE 蛋白质电泳

（1）对齐厚薄两块玻璃并卡紧，垂直放入卡槽，灌蒸馏水静等 20 min，观察无漏液后将水倒掉；

（2）参照达科的 BioSci™ NewFlash Protein AnyKD PAGE 蛋白电泳凝胶试剂盒

说明书制备预制胶，首先将分离胶 A 液和 B 液 1:1 混匀，配置 4 mL；浓缩胶 A 液和 B 液 1:1 混合，配置 2 mL；分别在分离胶和浓缩胶中加入 10% APS 溶液，混匀后按先分离胶后浓缩胶的顺序灌注至模具，插入梳子，静置 20 min，待凝胶凝固；

(3) 凝胶凝固后，小心拔出梳子，倒入电泳液冲洗加样孔，注入电泳液至凝胶高度的一半左右；

(4) 取 1 倍体积的 5×上样缓冲液加入到 4 倍体积的样品中混匀，加热（95 °C，5 min）；

(5) 胶浸泡在电泳液中，每个上样孔加入 15 μL 样品或 marker 蛋白，接通电源，跑浓缩胶（电压 80 V），待跑完浓缩胶切换电压跑分离胶（电压 120 V）；待样品跑至凝胶边缘，停止电泳；

(6) 将蛋白胶置于考马斯亮蓝染液染色 1 h；

(7) 用脱色液置于摇床上脱色 3 次，每次 10 min；

(8) 浸泡于脱色液中，过夜脱色拍照。

2.1.6.2 Western-blot 鉴定

(1) 在转膜前将滤纸、海绵和 NC 膜用转膜液浸泡；

(2) 将 2.1.6.1 (5) 中得到的蛋白胶放在 NC 膜上，从内向外依次用滤纸、海绵包裹，去除气泡并用转膜夹夹紧，切记胶放在靠近负极的一面；

(3) 垂直插入转膜夹，转膜（电流 300 mA，2 h），并用碎冰将电泳槽包裹；

(4) 转膜结束后；配制 5% BSA，用于浸泡 NC 膜，摇床封闭（室温，1 h）；

(5) 封闭结束，将膜浸泡在 1×TBST 缓冲液清洗 3 次，每次 5 min；

(6) 将 FCV 多克隆抗体以 1:1000 的比例用 5% BSA 稀释，用于 Western-blot 反应的第 1 抗体，NC 膜浸泡于其中，摇床孵育（4 °C，过夜）；

(7) 回收 1 抗，将 NC 膜浸泡在 1×TBST 缓冲液清洗 3 次，每次 10 min；

(8) 用 5% BSA 以 1:5000 的比例稀释羊抗兔二抗，NC 膜浸泡于 2 抗稀释液中，摇床孵育（常温，1 h），回收 2 抗稀释液，将膜浸泡在 1×TBST 缓冲液清洗 5 次，每次 5 min；

(9) 按照 ECL 超敏发光液说明书配制显色液工作液；

(10) 将 NC 膜平铺在显影盘中，显色工作液滴在膜一侧，并尽量排除气泡，避光孵育 1 min，暗室曝光显影。

2.2 抗 FCV VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

2.2.1 动物免疫

选用 5 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠，通过免疫纯化的 VP1-B 蛋白制备 FCV 抗体，共免疫 4 次，免疫剂量分别为 200 μ g、200 μ g、200 μ g、200 μ g；首免与完全弗氏佐剂 1:1 混合，免疫方式采用皮下多点注射；14 d 后，将纯化后的 VP1-B 蛋白与不完全弗氏佐剂混合，免疫方式同上；28 d 后进行 3 免，采用的仍是不完全弗氏佐剂混合，免疫方式同上，在 3 免后 1 周经小鼠眼眶采血，利用 ELISA 测定每只小鼠的抗体效价；42 d 后进行 4 免，纯化蛋白直接采用腹腔注射免疫；4 免 3 d 后，选择 3 免中小鼠血清效价高的进行细胞融合。

2.2.2 小鼠免疫后血清抗体效价测定

(1) 包被 取 200 mL FCV-SX1 细胞培养毒经 3000 r/min，15 min 去细胞碎片后，经超速离心及蔗糖密度梯度离心对其进行纯化，纯化后的 FCV-SX1 用包被液稀释至 5 μ g/mL 的浓度进行包被，37 $^{\circ}$ C 包被过夜。

(2) 封闭 每孔加入 300 μ L 5% 的 BSA 进行封闭，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。

(3) 孵一抗 每孔加入 300 μ L PBST 洗涤 3 次，用 PBS 对鼠血清进行 2 倍倍比稀释，首孔的稀释度为 1:100，共 10 个稀释梯度，以 100 μ L 的体积加入 96 孔酶标板，每个稀释度做 3 个重复，设空白对照和阴性对照；37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

(4) 孵二抗 每孔加入 300 μ L PBST 洗涤 3 次，用 5% BSA 对 HRP 标记羊抗鼠 IgG 进行 1:2000 稀释，每孔加 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

(5) 显色 每孔加入 300 μ L PBST 洗涤 5 次，加入 TMB 避光显色，10 min 后，加入 2% 的 H_2SO_4 终止显色。

(6) 读数 用酶标仪进行 OD 值的读取，血清阳性判定：P/N > 2.1 时，即为阳性。

2.2.3 阳性杂交瘤细胞的制备筛选与亚克隆

2.2.3.1 SP2/0 细胞的培养

从液氮罐中取出冻存的 SP2/0 细胞，37 $^{\circ}$ C 水浴锅融化，850 r/min 离心 5 min，弃去上清，将沉淀细胞先用 1 mL 10% 血清的 RMIP 1640 重悬，转移至含有 5 mL 10% 血清的 RMIP 1640 细胞瓶中，37 $^{\circ}$ C，5% CO_2 细胞培养箱中培养，待细胞约长至 80~90%，进行细胞传代，每只小鼠的脾需 3 瓶 T75 的 SP2/0 细胞进行融合。

2.2.3.2 脾细胞与 SP2/0 细胞的融合

4 免第 3 d 挑选血清效价高的小鼠，摘眼球处死小鼠后，用 75% 的酒精对小鼠全身消毒，在超净台中对小鼠解剖，剖取脾脏过程中要严格注意无菌，摘取的脾脏于 RMIP 1640 中去除其脂肪和结缔组织后，用高压的细胞筛和研磨棒对其进行研磨，对研磨得到的脾细胞计数，按脾细胞:SP2/0 细胞=1:10 进行混合，加入 30 mL RMIP 1640 培养基，1000 r/min，离心 8 min，弃上清，反复进行 3 次；弃去上清，沿离心管内壁缓慢加入 0.8

mL 预热的 PEG，静置 90 s；加入 30 mL 的 PMIP 1640 培养基轻轻混匀，1000 r/min 离心 5 min，加入 45 mL HAT PRMI 1640 培养基，混合均匀，倒入培养皿，用排枪以 200 μ L/孔铺于 2 块 96 孔板。

2.2.3.3 阳性杂交瘤细胞的筛选及亚克隆

上述融合细胞培养 4 d 后，每孔弃去 100 μ L 细胞上清，加入 100 μ L HT PRMI 1640 选择培养基，10 d 时选择细胞密度较高的孔，吸取细胞上清 100 μ L 进行抗体效价检测，以纯化的 FCV-SX1 为抗原进行间接 ELISA 检测，同时设空白对照、阴性对照，计算 P/N 值，选择阳性的杂交瘤细胞进行亚克隆。将阳性杂交瘤细胞孔的上清弃去，加入少量的 Clone easy 培养基将孔内细胞吹起，吸出细胞于培养皿，加入 Clone Easy 培养基进行稀释，稀释至每 200 μ L 一个细胞铺于 96 孔板，放入细胞培养箱培养，之后选择细胞增殖能力较好且抗体效价较高的孔进行再次亚克隆，一共进行 3 次克隆化，待第 3 次克隆时每孔细胞长至约 60% 左右时，经 24 孔板、12 孔板、6 孔板最后传至 T25，逐步扩大培养，对每次传代后的细胞上清进行抗体效价检测，以确定其稳定性，并对每次筛选的阳性杂交瘤细胞及时冻存。

2.2.3.4 杂交瘤细胞的冻存

将扩大培养的细胞冻存，首先将细胞瓶中的上清弃去，加入 RMIP 1640 培养基将细胞轻轻的吹起后，转移到离心管，850 r/min 离心 5 min 后弃去上清，加入 1 mL 的细胞冻存液吹打混匀，转移至冻存管，放入冻存盒，先于 -80 $^{\circ}$ C 冻存，1 d 后转移至液氮罐保存。在液氮中保存 1 个月后，用 Clone Easy 培养基对其进行复苏，吸取细胞上清检测抗体表达情况。

2.2.4 杂交瘤细胞腹水的制备

选择 8 周龄的 BALB/c 小鼠，经腹腔注入液体石蜡，0.5 mL/只，7 d 后，挑选生长状态良好杂交瘤细胞，850 r/min，离心 5 min，弃去上清，用 PBS 洗 3 次后重悬细胞， 10^6 个细胞/只腹腔注射，10 d 后，观察到小鼠的腹腔部明显变大；经摘眼球处死后，剪开腹部表皮，镊子提起腹膜，用注射器收集腹水，4000 r/min 离心 10 min，将收集的腹水保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

2.2.5 单克隆抗体的特性鉴定

2.2.5.1 单克隆抗体 Western-blot 鉴定

将 FCV-SX1、FCV-SX2 和 FCVCH-JL2 感染的 F81 细胞于 -80 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次，使细胞破碎释放病毒，12000 r/min 离心 10 min，具体方法同 2.1.6.2。用 TBST 将制备的单抗稀释 100 倍，室温摇床孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min；将羊抗鼠 IgG 和 IgM 抗体稀释 5000 倍，室温摇床孵育 1 h，TBST 洗涤 5 次，每次 10 min；将 ECL 超敏发光

液均匀的滴加于 NC 膜上, 孵育 1 min, 显影拍照。

2.2.5.2 单克隆抗体的效价测定

方法同 2.2.2。

2.2.5.3 单克隆抗体 IG 亚型鉴定

购买博奥龙小鼠单抗 Ig 类/亚型鉴定用 ELISA 试剂盒, 具体步骤参照说明书, 先在酶标板每孔加入 40 μL 样品稀释液, 再加入 10 μL 腹水, 振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 洗涤 3 次后, 加入 50 μL 酶标试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 洗涤 5 次后, 加入显色液, 避光静置 10 min, 加入 50 μL 终止液, 于 450 nm 波长测定吸光值。

2.2.6 单克隆抗体的纯化

用 0.45 μm 孔滤膜过滤腹水, 除去较大的凝块及脂肪滴, 10000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 留上清。取 1 份腹水与 2 份 0.06 mol/L 乙酸盐缓冲液混合。室温下, 按照每毫升腹水稀释液加入 25 μL 的正辛酸比例缓慢加入正辛酸 750 μL , 搅拌 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 15000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。上清液经 125 μm 尼龙筛过滤, 加入 1/10 体积的 0.1 mol/L 的 PBS, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.2。滤液加入饱和硫酸铵, 使其饱和度为 45%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜, 以 13000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 保留沉淀。沉淀溶于适量 0.01 mol/L PBS 中, 再将其装入透析袋, 用 50~100 倍体积 0.01 mol/L PBS 透析, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 30 min, 除去不溶性沉淀; 将得到的溶液用 0.45 μm 的滤膜过滤后, 按照 HiTrapTM rProtein A FF 和 IgM Purification Kit 试剂盒说明书对过滤得到的蛋白进行进一步的提纯, 最后使用葡萄糖凝胶 G25 脱盐柱脱盐, 收集蛋白溶液于 -20 保存。

2.3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备

2.3.1 胶体金溶液的准备

取 155.5 mL 的蒸馏水, 加热沸腾 1 min 后直接加入 4.95 mL 1% HAuCl_4 溶液, 加热至沸腾后, 边搅拌边加入 6.3 mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 煮沸 15 min, 待溶液稳定呈酒红色后冷却至室温, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.2 胶体金标记抗体的制备

2.3.2.1 胶体金标记抗体 pH 值确定

取 8 支 1.5 mL 离心管, 每支加入 1 mL 胶体金溶液, 通过滴加 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液来调节 pH, pH 的范围为 7~10; 再加入 FCV 单抗 3A4 15 μg , 静置 30 min, 加入 100 μL 10% 的 NaCl, 静置 1 h, 通过观察胶体金溶液来确定胶体金标记抗体的最佳 pH 值。

2.3.2.2 胶体金标记蛋白的最适浓度确定

取 8 支 1.5 mL 的离心管，每支加入 1 mL 的胶体金溶液，通过滴加 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液至最适 pH，每管依次加入 0、2、4、6、8、10、12、15 μg 的 FCV 单抗 3A4，静置 30 min，加入 100 μL 10% 的 NaCl，静置 1 h，通过观察胶体金溶液颜色来确定金标抗体的最适浓度。

2.3.3 胶体金标记抗体复合物的制备

取 1 mL 制备好的胶体金溶液，最适的 pH 的条件下，加入最适金标抗体 3A4，混匀后反应 30 min；加入 20% BSA 10 mL，混匀后反应 5 min，加入 20% PEG 20000 10 μL ，混匀后反应 30 min，10000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入 100 μL 复融液（20% 蔗糖、1% BSA、0.1 Triton $\times$ 100、0.1% 硼酸缓冲液），4 $^{\circ}C$ 备用。

2.3.4 胶体金试纸条的优化

2.3.4.1 胶体金标记抗体复合物工作浓度的测定

将玻璃纤维膜先于 Tris-HCL 缓冲液中漂洗，去除表面杂质，37 $^{\circ}C$ 真空干燥 30 min，Tris-HCL 缓冲液稀释金标单抗 1:0、1:1、1:2、1:3 充分混匀，喷于玻璃纤维膜上，吸附 1 h，37 $^{\circ}C$ 过夜干燥，通过检测 FCV 细胞培养毒，确定金标单抗最佳工作浓度。

2.3.4.2 检测抗体和质控抗体浓度的确定

用 0.01 M pH 7.6 的 PBS 分别将纯化的单抗 4F11 和羊抗鼠二抗稀释为以下浓度：0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL、2 mg/mL、2.5 mg/mL、3 mg/mL，喷涂于硝酸纤维素膜（NC）上，形成间距为 0.5 cm 的检测线和对照线，置室温自然干燥。通过检测 FCV 细胞培养毒，观察显色情况，确定两者最佳工作浓度。

2.3.4.3 样品稀释液的选择

分别用蒸馏水、PBS 和 PBST 处理实验室培养的 FCV 样品，每孔滴加相同的稀释样品，利用自制的 FCV 胶体金试纸条进行检测，通过观察条带颜色深浅及其出现的时间评价样品稀释液。

2.3.5 胶体金试纸条的组装

首先将 NC 膜（14 mm）固定到 PVC 底板上，NC 膜检测线一侧为金标垫（8 mm）和样品垫（20 mm），质控线一侧为吸水纸（32 mm），组装时彼此重叠 2 mm，用切纸机将组装的试纸板切成 4 mm 宽的试纸条，组装于试纸条卡壳即为成品。

胶体金试纸条检测原理：滴加检测样品后，样品在毛细管作用下向前移动，移动至金标垫处与金标抗体形成复合物，继续向前移动，移至 T 线时，复合物被 T 线的抗体抓取捕获，在 T 线呈线酒红色；没有捕捉的金标抗体继续向前，移至 C 线与 C 线抗体结合聚集，呈现酒红色。在 C 线呈现酒红色的情况下，T 线有颜色为阳性，否则为阴性；C 线如没有颜色，该试纸条结果不能使用。

2.3.6 胶体金试纸条的性能评价

2.3.6.1 特异性评价

对 FCV 毒株、猫细小病毒毒株 (Feline panleukopenia virus, FPV)、猫疱疹病毒毒株 (Feline Herpesvirus, FHV) 及猫传染性腹膜炎病毒 (Feline Infectious Peritonitis, FIP) 毒株进行检测, 确定试纸条特异性。

2.3.6.2 敏感性评价

将 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL 的 FCV 细胞培养毒进行 1:100~1:12800 系列稀释, 用制备的试纸条进行检测, 以评价试纸条的敏感性。

2.3.6.3 稳定性评价

分别用保存 1、2、3、4、5、6 个月 (4 °C 保存) 的试纸条检测 FCV 阳性样品, 以检测试纸条的稳定性。

2.3.6.4 临床试验应用

用制备的胶体金试纸条与 RT-PCR 方法同时对 94 份猫鼻咽拭子进行检测, 比较二者的符合率。

结果与分析

1 FCV VP1-B 蛋白的诱导表达及免疫原性分析

1.1 VP1-B 重组质粒的提取和鉴定

对提取的质粒进行 PCR 扩增，经核酸电泳后，试验结果显示，电泳片段大小约 816 bp，约预期的大小一致（见图 1）；将 PCR 产物送上海生工测序检测，测序结果与 FCV-F9 疫苗株 VP1 B 区序列比对显示重组质粒构建成功。

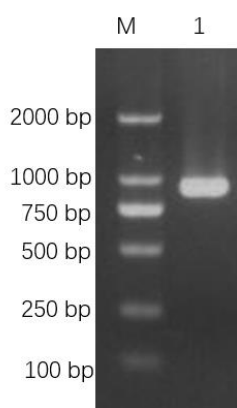


图 1 重组质粒 PCR 鉴定结果

M: DNA 标准 DL2000; 1: VP1-B 质粒 PCR

Figure 1 PCR identification results of recombinant plasmids

M: DNA Marker DL 1000; 1: The of VP1-B plasmids

1.2 VP1-B 蛋白纯化后浓度测定

根据 BSA 标准品测定的 OD 值绘制标准曲线（如图 2），测得的 VP1-B 蛋白浓度约为 1.5 mg/mL。

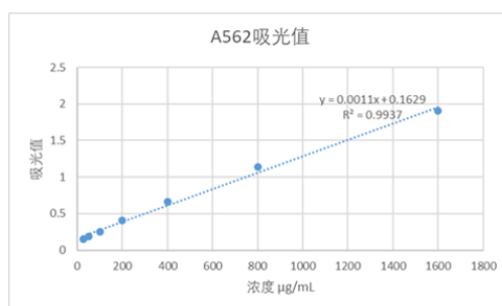


图 2 BSA 标准曲线

Figure 2 The standard curve of BSA

1.3 VP1-B 蛋白纯化抗原性分析

纯化后的 VP1-B 蛋白经 SDS-PAGE 鉴定, 结果显示表达的蛋白为可溶性蛋白, 大小约 55 kDa (见图 3A); 经 Western-blot 鉴定, 结果显示表达的 VP1-B 蛋白能够与 FCV 多克隆抗体结合 (见图 3B), 说明有很好的抗原性。

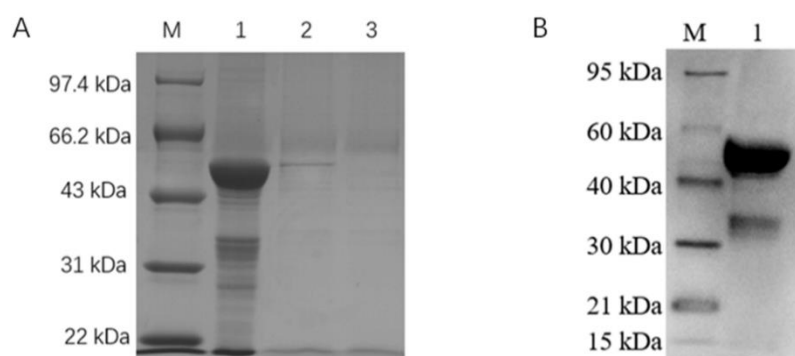


图 3 纯化的 VP1-B 蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定

A:VP1-B 蛋白 SDS-PAGE 图; B:VP1-B 蛋白 Western-blot 图

M: 低分子量 Marker; 1: 超声后上清; 2: 诱导表达全菌; 3: 超声后沉淀

B. M: ECL 发光 Marker; 1: VP1-B 蛋白

Figure 3 Purified VP1-B protein were identified by SDS-PAGE and Westren-blot

A :The SDS-PAGE of VP1-B protein; B:The Western-blot of VP1-B protein

M: Low molecular weight Marker; 1: Supernatant after ultrasonic treatment; 2: Induced expression of bacterial fluid; 3: Precipitate after ultrasonic treatment

M: ECL Glow Marker; 1: VP1-B protein

2 VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

2.1 单克隆抗体 Western-blot 鉴定

将 FCV-SX1、FCV-SX2、FCV CH-JL2 病毒蛋白转印至 NC 膜, 以亚克隆筛选得到的 3 株阳性杂交瘤细胞上清为一抗孵育, 经 Western-blot 鉴定结果如图 (见图 4), 3 株杂交瘤细胞分泌的抗体能识别不同的 FCV 毒株, 试验结果表明筛选得到 3 株能够分泌抗 FCV 抗体的杂交瘤细胞, 分别命名为: 1E3、3A4 和 4F11。

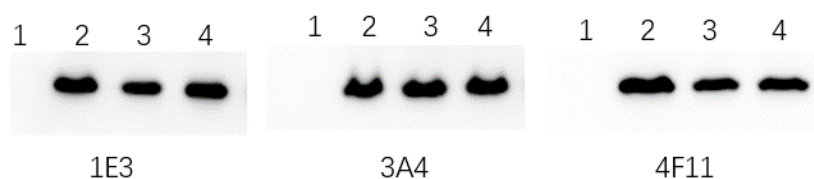


图 4 3 株单抗与 3 种 FCV 毒株的 Western-blot 分析

1: F81 细胞; 2: FCV-SX1; 3: FCV-SX2; 4: FCV CH-JL2

Figure 4 Western-blot analysis of 3 different FCV strain

1: F81 cell; 2: FCV-SX1; 3: FCV-SX2; 4: FCV CH-JL2

2.2 单克隆抗体的血清效价测定

通过 ELISA 检测单克隆抗体效价 (见表 3), 1E3、3A4 和 4F11 的细胞上清效价分别为 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:8.0 \times 10^3$, 腹水效价分别为 $1:1.28 \times 10^6$ 、 $1:2.56 \times 10^6$ 、 $1:1.28 \times 10^6$ 。

表 1 单克隆抗体的 ELISA 效价测定

Table 1 The ELISA titer determination of Mabs

杂交瘤细胞 Hybridoma cells	细胞上清 Cell supernatant	单克隆抗体 Monoclonal antibodies
1E3	$1:1.6 \times 10^3$	$1:1.28 \times 10^6$
3A4	$1:1.6 \times 10^3$	$1:2.56 \times 10^6$
4F11	$1:8.0 \times 10^3$	$1:1.28 \times 10^6$

2.3 单克隆抗体 Ig 亚型的鉴定

单克隆抗体亚型鉴定结果为: 1E3 和 3A4 为 IgG1, 4F11 为 IgM。

表 2 单克隆抗体 Ig 亚类和型

Table 2 The Ig subtypes and types of Mabs

单克隆抗体 Monoclonal antibodies	1E3	3A4	4F11
亚型 Subtype	IgG1	IgG1	IgM

3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备

3.1 胶体金的制备

胶体金颜色呈酒红色, 液体颜色澄清透亮, 没有沉淀, 说明胶体金制备成功。

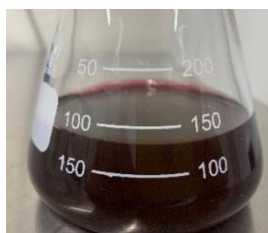


图 5 胶体金溶液图

Figure 5 The diagram of Colloidal gold solution

3.2 金标抗体 pH 值确定

通过 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液 pH 为 7~10, 通过颜色观察发现在 pH 在原液到 8.0 之间的溶液都能使用, 本试验选择 pH 为 7.5。

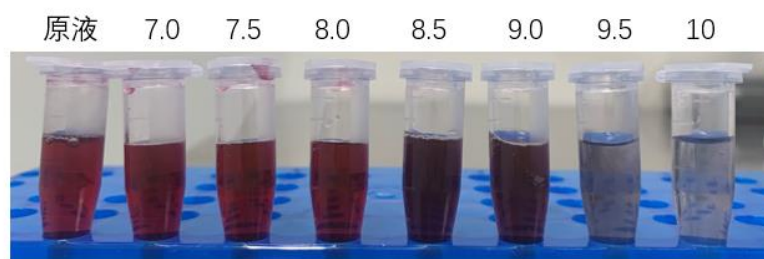


图 6 胶体金标记抗体最适 pH 值

Figure 6 The optimum pH value of colloidal gold labeling antibody

3.3 金标抗体最佳标记蛋白浓度

在最适 pH 7.5 的情况下, 分别加入 0、2、4、6、8、10、12、15 μg 的抗体, 观察胶体金溶液颜色发现在加入 6~15 μg 时, 肉眼观察溶液没有明显的变化, 在 6 μg 基础上增加 20% 的蛋白量, 最终确定蛋白浓度为 7.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

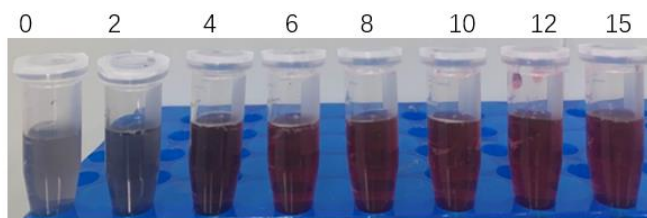


图 7 胶体金标记蛋白的最适浓度

Figure 7 The optimum concentration of colloidal gold labeled protein

3.4 金标抗体复合物工作浓度的鉴定

通过检测 FCV 细胞培养液发现, 在金标抗体 1:2 的浓度下, 肉眼可清晰观察到 T 线

和 C 线条带，在考虑成本的情况下选择金标抗体工作浓度为 1:2。

3.5 检测抗体和质控抗体工作浓度的测定

金标抗体 1:2 喷于玻璃纤维膜，T、C 线抗体浓度分别以 1.0 mg/mL、0.5 mg/mL 包被组装试纸条，检测 FCV 细胞培养毒，T、C 线均可清晰显色，且无较大差异。

3.6 样品稀释的确定

利用制备的胶体金试纸条分别对蒸馏水稀释样品、PBS 稀释样品和 PBST 稀释样品进行检测，试验结果显示，蒸馏水和 PBS 稀释样品条带出现的时间大致相同且略快于 PBST 稀释样品，但 PBST 呈现的条带最为清晰，并且结果较为一致，猜测可能是吐温的加入影响了其扩散速度，同时吐温为表面活性剂可增加样品的稳定性，检测结果更加稳定准确；综合考虑选择 PBST 为样品稀释液。

3.7 胶体金试纸条特异性

通过检测 FCV、FPV、FHV、FIPV 的细胞上清培养液，结果显示只有检测 FCV 时，T 线和 C 线同时显色，结果为阳性；其余的细胞上清培养液 T 线并无变化，说明制备的试纸条特异性良好。



图 8 试纸条特异性检测

Figure 8 The results of test strip specificity

3.8 试纸条的敏感性

将 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL 的 FCV 细胞上清培养液系列梯度稀释，结果显示在 1:6400 时，T 线条带稍有模糊，在 1:3200 时，T 线和 C 线条带颜色清晰，初步判定本试验制备的试纸条的灵敏度约为 10^4 TCID₅₀/mL。



图 9 试纸条敏感性测定

Figure 9 The results of test strip sensitivity

3.9 试纸条的稳定性

通过 4 °C 保存 1、2、3、4、5、6 个月的试纸条检测结果显示，保存 6 个月的试纸条仍能够良好的检测 FCV，检测结果目的条带清晰；说明制备的试纸条在 4 °C 的条件下至少能够保存 6 个月，后期试验会对其保存时间进行进一步的检测。

3.10 试纸条临床试验应用

用制备的胶体金试纸条与 RT-PCR 方法同时对 94 份猫鼻咽拭子进行检测，结果显示（表 3），RT-PCR 方法与所研制的试纸条的总体符合率为 $(61+27)/94=93.6\%$ ，二者符合率在 90% 以上。

表 3 胶体金试纸条检测与 RT-PCR 检测结果比较

Table 3 Comparison of colloidal gold test strip and RT-PCR test results

试纸条 Test strips	PCR		
	阳性	阴性	总数
阳性	61	1	62
阴性	5	27	32
总数	66	28	94

讨 论

1 VP1-B 蛋白构建表达与抗原性分析

FCV 基因组含有三个开放阅读框 (ORF)，其中 ORF2 编码的是衣壳蛋白 VP1，其在免疫反应中具有重要作用。在这之前蒋艳妹和程晨曦通过截取 FCV2280 VP1 基因序列构建了多个 VP1 小分子蛋白，其构建的 VP1-B 蛋白性质和大小与本试验构建一致，并且发现其都有很好的免疫原性^[78,79]；此外刘秋艳截取了豹源 FCV 的 ORF2 约 1734 bp 的序列，但通过原核表达该蛋白发现其为包涵体，同样发现有很好的反应原性^[80]；研究报道发现 VP1 中 B、D、F 区域较为保守，结合本试验目的是为了检测 FCV 抗原，为了避免 FCV 的变异引起漏检现象的发生，本试验选择了保守的 VP1-B 蛋白，其作为抗原制备的单抗更容易得到广谱性单抗。本试验通过截取 FCV-F9 疫苗株 VP1 的 B 区序列，构建了重组质粒 pET-B，转染至大肠杆菌 (DE3) 中经 IPTG 诱导表达得到了 VP1-B 蛋白，通过 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 鉴定发现，通过该方法构建的蛋白为可溶性蛋白，大小约 55 kDa 与前人的试验结果一致；同时作为抗原免疫动物，应保证蛋白的纯度，避免产生非特异性免疫，本试验经镍柱纯化，经 SDS-PAGE 检测显示蛋白条带较为单一，可以作为抗原免疫动物制备单抗。

2 VP1-B 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

自 1975 年 Kohler 首次制备出单克隆抗体，单克隆抗体在很多领域都得到了应用，目前在临床上多用于疾病的诊断，在猫传染性疾病诊断方面就有很广的应用，如王莹利用 FPV 临床分离株制备了 FPV 单克隆抗体胶体金试纸条，用于现场快速检测^[81]；杭州格朗瑞生物科技制备了抗猫传染性腹膜炎单克隆抗体用于胶体金、ELISA、Western-blot 等体外免疫诊断方面；艾纯旭以 FCV 全病毒为抗原免疫小鼠得到了单克隆抗体用于 ELISA 检测 FCV^[49]；单克隆抗体给疾病的诊断带来了一定的便捷；此外也可以作为生物药物用于治疗，其高度的特异性和疗效确切的特点在肿瘤治疗、代谢、自身免疫和病毒感染等领域有独特的优势，自 1986 年第一个单克隆抗体药物上市以来，目前全球获批的单抗药物以超过了 100 种；2022 年 1 月 13 号美国 FDA 批准了第一款用于动物的单克隆抗体新药 Solensia。此外，其也推动了生物研究方面的发展：例如用于蛋白纯化或作为探针检测特定的分子在组织和细胞中的分布。

在 FCV 单克隆抗体制备方面有很多的研究，Tohya Y 以 FCV 全病毒为抗原免疫动

物^[82], 制备得到 18 株具有中和活性的单抗, 并进一步检测了其对不同毒株的中和活性; Milton 和 Shin 分别通过原核系统和真核系统表达 VP1 蛋白制备得到了具有良好反应性的单克隆抗体^[83,84], 此外 Geissler 和程晨曦通过截取 VP1 部分序列构建表达蛋白为免疫原也筛选得到了反应性良好的单抗^[79,85], 综上表明, 完整病毒、完整 VP1 蛋白和截短的 VP1 蛋白都能作为免疫原制备单抗。

在制备杂交瘤细胞时, 应选择生长状态良好的 SP2/0 细胞, 选择细胞透亮能够轻易吹下脱离细胞瓶的细胞。当 SP2/0 细胞细胞状态不良时, 后期观察细胞融合状况时会发现大量的细胞碎片, 并且有复制能力的杂交瘤细胞, 在亚克隆时, 会出现生长缓慢和无法吹落的现象, 本试验第一次制备杂交瘤细胞就出现了这种情况; SP2/0 细胞在传达过程中需要定期用 8-氮鸟嘌呤处理, 以保证其对 HAT 的敏感性。本试验在重新复苏 SP2/0 细胞后成功得到 3 株能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。

在细胞融合后的 3~4 天, 尽量不要对细胞进行观察, 避免影响细胞的融合; 要提前制定检测抗体的试验, 避免贻误抗体检测, 因为在融合细胞中, 存在分泌抗体细胞和不分泌抗体的细胞, 两种细胞中不分泌抗体的细胞生长速度较快会影响到目标所需的杂交瘤细胞; 此外要定期对冻存的杂交瘤细胞再克隆, 因为杂交瘤细胞在培养的过程可能出现突变和染色体的突变引起抗体分泌异常, 因此在冻存的要多冻存几管, 并且要保留每次克隆的细胞株。

本试验通过原核表达 VP1-B 蛋白, 经鉴定其可以作为抗原免疫小鼠制备单克隆抗体, 免疫了 5 只 BALB/c 小鼠, 选择小鼠血清抗体效价较高小鼠的脾细胞进行细胞融合, 经 3 次亚克隆, 筛选得到 3 株杂交瘤细胞, 并能够稳定分泌抗 FCV 抗体, 分别命名为 1E3、3A4、4F11; 单克隆抗体亚型鉴定结果显示 1E3 和 3A4 为 IgG1, 4F11 为 IgM, 且腹水效价较高; 经 Western-blot 鉴定, 均能够特异性的识别 FCV。Geissler 和程晨曦通过试验发现^[79,85], B 区大多诱导机体产生的是非中和性抗体, 因此本试验未对制备的抗体进行中和性分析。本试验制备的单抗为 VP1-B 的免疫学特征和 FCV 诊断提供了生物材料。

3 FCV 抗原检测胶体金试纸条的制备

自从 1998 年加利福尼亚州报道了 FCV 强毒株引起猫的系统性全身性感染疾病 (FCV-associated virulent systemic disease, FCV-VSD) 以来^[5], 世界各地不断有高致死性变异 FCV 毒株报道, 其不仅危害家猫的健康^[6,84], 也严重威胁野生猫科动物, 如老虎、猎豹等的健康, 目前用于 FCV 常规检测方法有病毒分离鉴定、中和试验及 RT-PCR 等,

病毒分离及中和试验由于对专业技术及设备要求较高,而且试验周期较长不能满足基层人员的需求;而 RT-PCR 方法虽然灵敏,也由于其操作复杂而干扰因素较多;因此,建立快速检测 FCV 的方法对预防和控制 FCV 的流行具有重要的意义。

本试验通过构建表达 VP1-B 蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得了 3 株 FCV 单克隆抗体杂交瘤细胞株,亚型鉴定 1E3 和 3A4 为 IgG1,4F11 为 IgM,为了避免抗体配对失败,选择了不同的抗体类型,IgG1 选择了腹水效价较高的 3A4,其中选用 3A4 为金标抗体,4F11 为检测抗体。

制备胶体金试纸条中,首先,胶体金溶液颗粒的粒径大小对最终检测有很大的影响,粒径过大其可视性强,但是稳定性较差,粒径过小其可视性较差且需要标记的抗体量会增多^[86],本试验选用的胶体金颗粒约为 20 nm。其次,金标抗体的制备是另一个关键性技术,首先用于标记的单克隆抗体需要做除盐处理,如果用于标记的抗体经历了长时间的低温保存,需要离心去除其中的聚合物^[87];此外 pH 值对胶体金和蛋白的结合力也有很大的影响,其选用的 pH 多在标记蛋白的等电点附近,具体 pH 需要通过试验进行进一步确定,本试验通过观察不同 pH 下胶体金溶液,最终选定 pH 为 7.5。标记抗体的蛋白浓度的选择与制备成本和最终可视性相关,蛋白浓度过高,成本增加且在检测时可能会有拖带的现象,浓度过低时,捕捉的抗原减少,显现的条带可能颜色过浅,本试验最终选定蛋白浓度为 7.2 $\mu\text{g/mL}$,此外 T 线和 C 线抗体的包被要在确保检测结果准确的同时尽量避免抗体的浪费,因此进行了检测抗体和质控抗体包被浓度测定,最后确定 T 线包被浓度为 0.5 mg/mL ,C 线包被浓度为 1 mg/mL 。

本试验制备的 FCV 检测试纸条具有特异性强,灵敏度高的特点,除与 FCV 毒株呈阳性反应外和与引起猫常见临床疾病的其他病毒均不反应,灵敏度可达约 $10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$;用制备的胶体金试纸条与 RT-PCR 方法同时对 94 份猫鼻咽拭子进行检测,比较二者的符合率,符合率在 90%以上,其中 6 份检测样品胶体金试纸条与 RT-PCR 检测结果不相符,原因可能是当检测样本中病毒量较少时,由于胶体金敏感度低于 RT-PCR,胶体金试纸条呈阴性而 RT-PCR 阳性的检测结果;而 RT-PCR 检测结果为阴性胶体金试纸条为阳性时,分析原因可能是 RT-PCR 操作较为复杂,结果呈假阴性。

胶体金试纸条相对于其他的诊断手段,主要的优势在于其操作简单,实验结果简洁明了,适用于不同层次的群众,更容易推广。本试验制备的胶体金试纸条在上样后 5 min 就能对其结果进行判定,此外本试验利用的单克隆抗体由自己开发,在胶体金制备成本上有一定的优势;下一步,继续制备筛选新的单抗株,对制备的杂交瘤细胞株分泌的单抗进行配对试验,选择配对良好并且具有广谱病毒检测效果的抗体对制备胶体金试纸条,进一步提高检测试纸条的敏感性和特异性,以实现该检测品种的商品化。

结 论

1、本试验将疫苗株 FCV-F9 的 VP1-B 区序列的重组质粒 pET22b(+)-B 转化到 BL21 (DE3) 表达菌中, 成功构建表达了 VP1-B 蛋白, 且有良好的反应原性。

2、获得 3 株能稳定分泌 FCV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 1E3、3A4、4F11; Western-blot 结果表明 1E3、3A4、4F11 均能识别 FCV-SX1、FCV-SX2、FCV CH-JL2, 具有良好的反应性; 1E3、3A4 和 4F11 的细胞上清效价分别为 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:1.6 \times 10^3$ 、 $1:8.0 \times 10^3$, 腹水效价分别为 $1:1.28 \times 10^6$ 、 $1:2.56 \times 10^6$ 、 $1:1.28 \times 10^6$, 其中 1E3 和 3A4 为 IgG1, 4F11 为 IgM。

3、成功制备了 FCV 抗原检测胶体金试纸条, 经检测其具有良好的特异性, 敏感度为 10^4 TCID₅₀/mL, 4℃条件下可以保存 6 个月; 用制备的胶体金试纸条与 RT-PCR 方法同时对 94 份猫鼻咽拭子进行检测, 符合率为 93.6%, 本试验研制的胶体金试纸条具有操作简单、便于保存、成本低等特点, 可用于现场快速检测 FCV。

参考文献

- [1] Spiri A. An Update on Feline Calicivirus[J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2022, 164(3): 225-41.
- [2] 李海燕, 辛晓光, 田国斌, 等. 间接酶联免疫吸附试验检测禽流感抗体的最佳工作条件[J]. 中国畜禽传染病, 1998(04): 42-44.
- [3] Martella V, Pratelli A, Gentile M, et al. Analysis of the capsid protein gene of a feline-like calicivirus isolated from a dog[J]. Veterinary microbiology, 2002, 85(4): 315-22.
- [4] 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
- [5] Pedersen N C, Elliott J B, 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]. Veterinary microbiology, 2000, 73(4): 281-300.
- [6] Hurley K E, Pesavento P A, Pedersen N C, et al. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2004, 224(2): 241-9.
- [7] Deschamps J Y, Topie E, Roux F. Nosocomial feline calicivirus-associated virulent systemic disease in a veterinary emergency and critical care unit in France[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, 2015, 1(2): 2055116915621581.
- [8] Caringella F, Elia G, Decaro N, et al. Feline calicivirus infection in cats with virulent systemic disease, Italy[J]. Research in veterinary science, 2019, 124(1): 46-51.
- [9] Guo H, Miao Q, Zhu J, et al. Isolation and molecular characterization of a virulent systemic feline calicivirus isolated in China[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2018, 65(4): 425-429.
- [10] Coyne K, Jones B, Kipar A, et al. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats[J]. Veterinary Record, 2006, 158(16): 544-50.
- [11] Brunet S, Sigoillot C, Pialot D, et al. Multiple Correspondence Analysis on Amino Acid Properties within the Variable Region of the Capsid Protein Shows Differences between Classical and Virulent Systemic Feline Calicivirus Strains[J]. Viruses, 2019, 11(12): 1090.
- [12] 王洁, 廖均乐, 钱鹏, 等. 猫杯状病毒的进化与致病性研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(02): 62-65.
- [13] Ballin A C, Schulz B, Helps C, et al. Limited efficacy of topical recombinant feline interferon-omega for treatment of cats with acute upper respiratory viral disease[J]. Veterinary journal, 2014, 202(3): 466-70.
- [14] Berger A, Willi B, Meli M L, et al. Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland[J]. BMC veterinary research, 2015, 11: 282.
- [15] Friedl Y, Schulz B, Knebl A, et al. Efficacy of passively transferred antibodies in cats with acute viral upper respiratory tract infection[J]. Veterinary journal, 2014, 201(3): 316-21.
- [16] Terwee J, Lauritzen A Y, Sabara M, et al. Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a 'limping' strain of feline calicivirus[J]. Veterinary microbiology, 1997, 56(1-2): 33-45.
- [17] Dawson S, Bennett D, Carter S D, et al. Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection[J]. Research in veterinary science, 1994, 56(2): 133-43.
- [18] Cooper L M, Sabine M. Paw and mouth disease in a cat[J]. Australian veterinary journal, 1972, 48(11): 644.

- [19] Willi B, Spiri A M, Meli M L, et al. Molecular characterization and virus neutralization patterns of severe, non-epizootic forms of feline calicivirus infections resembling virulent systemic disease in cats in Switzerland and in Liechtenstein[J]. Veterinary microbiology, 2016, 182: 202-12.
- [20] Meyer A, Kershaw O, Klopffleisch R. Feline calicivirus-associated virulent systemic disease: not necessarily a local epizootic problem[J]. The Veterinary record, 2011, 168(22): 589.
- [21] Battilani M, Vaccari F, Carelle M S, et al. Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: a case description[J]. Research in veterinary science, 2013, 95(1): 283-90.
- [22] Schorr E M, Poland A, Johnson W E, et al. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England[J]. Journal of feline medicine and surgery, 2003, 5(4): 217-26.
- [23] Hurley K F, Sykes J E. Update on feline calicivirus: new trends[J]. The Veterinary clinics of North America Small animal practice, 2003, 33(4): 759-72.
- [24] Foley J, Hurley K, Pesavento P A, et al. Virulent systemic feline calicivirus infection: local cytokine modulation and contribution of viral mutants[J]. Journal of feline medicine and surgery, 2006, 8(1): 55-61.
- [25] Klose T C, Macphail C M, Schultheiss P C, et al. Prevalence of select infectious agents in inflammatory aural and nasopharyngeal polyps from client-owned cats[J]. Journal of feline medicine and surgery, 2010, 12(10): 769-74.
- [26] Larson J, Kruger J M, Wise A G, et al. Nested case-control study of feline calicivirus viruria, oral carriage, and serum neutralizing antibodies in cats with idiopathic cystitis[J]. Journal of veterinary internal medicine, 2011, 25(2): 199-205.
- [27] Di M B, Lanave G, Di P F, et al. Identification of feline calicivirus in cats with enteritis[J]. Transboundary and emerging diseases, 2020, 67(6): 2579-88.
- [28] Spiri A M, Meli M L, Riond B, et al. Environmental Contamination and Hygienic Measures After Feline Calicivirus Field Strain Infections of Cats in a Research Facility[J]. Viruses, 2019, 11(10): 958.
- [29] Martino B D, Rocco C D, Ceci C, et al. Characterization of a strain of feline calicivirus isolated from a dog faecal sample[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 139(1-2): 52-7.
- [30] Nguyen D, Barrs V R, Kelman M, et al. Feline upper respiratory tract infection and disease in Australia[J]. Journal of feline medicine and surgery, 2019, 21(10): 973-8.
- [31] Hou J, Sánchez V F, Mcgahie D, et al. European molecular epidemiology and strain diversity of feline calicivirus[J]. The Veterinary record, 2016, 178(5): 114-5.
- [32] Dall P, Labriola C, Sala E, et al. Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy[J]. Preventive veterinary medicine, 2019, 167: 32-8.
- [33] Lee S Y, Kim Y K, Kim Y S, et al. Intergenic recombination in feline calicivirus associated with a hemorrhagic-like disease in the Republic of Korea[J]. Acta virologica, 2021, 65(2): 232-6.
- [34] 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, 53(11): 23-26+29.
- [35] Zheng M, Li Z, Fu X, et al. Prevalence of feline calicivirus and the distribution of serum neutralizing antibody against isolate strains in cats of Hangzhou, China[J]. Journal of veterinary science, 2021, 22(5): 73.
- [36] 杨玥晗. 安徽省猫疱疹病毒I型和猫杯状病毒的流行病学调查与分析[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2020.
- [37] 曲雪婷, 王森, 原昆鹏, 等. 山东部分地区猫细小病毒疱疹病毒杯状病毒流行情况调查[J]. 中国

- 兽医杂志, 2020, 56(11): 81-84+124.
- [38] Liu C, Liu Y, Qian P, et al. Molecular and serological investigation of cat viral infectious diseases in China from 2016 to 2019[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2020, 67(6): 2329-35.
- [39] 汤傲星, 刘春草, 王元红, 等. 华东地区猫杯状病毒的分离鉴定及遗传进化分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(06): 667-671.
- [40] 范泉水, 夏咸柱, 邱薇, 等. 老虎感染猫传染性鼻-结膜炎病毒的研究[J]. *中国病毒学*, 2000(04): 62-67.
- [41] 高玉伟, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 猎豹与虎猫杯状病毒的分离及其超变区基因比较研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2003(03): 19-22.
- [42] 猫杯状病毒束缚宿主天然免疫促进持续感染的新机制[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(11): 1197.
- [43] Tian J, Kang H, Huang J, et al. Feline calicivirus strain 2280 p30 antagonizes type I interferon-mediated antiviral innate immunity through directly degrading IFNAR1 mRNA[J]. *PLOS pathogens*, 2020, 16(10): 1008944.
- [44] Radford A D, Willoughby K, Dawson S, et al. The capsid gene of feline calicivirus contains linear B-cell epitopes in both variable and conserved regions[J]. *Journal of virology*, 1999, 73(10): 8496-502.
- [45] Neill J D, Sosnovtsev S V, Green K Y. Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(3): 1079-84.
- [46] Seal B S. Analysis of capsid protein gene variation among divergent isolates of feline calicivirus[J]. *Virus research*, 1994, 33(1): 39-53.
- [47] Kim S J, Kim C, Chung H C, et al. Full-length ORF2 sequence-based genetic and phylogenetic characterization of Korean feline caliciviruses[J]. *Journal of veterinary science*, 2021, 22(3): 32.
- [48] Bordicchia M, Fumian T M, Van B K, et al. Feline Calicivirus Virulent Systemic Disease: Clinical Epidemiology, Analysis of Viral Isolates and In Vitro Efficacy of Novel Antivirals in Australian Outbreaks[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 2040.
- [49] 艾纯旭. 抗猫杯状病毒单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 检测方法的建立[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [50] 孟凯闻, 朱文壮, 张迪, 等. 猫杯状病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(05): 36-39.
- [51] 王真真, 汤傲星, 刘春草, 等. 猫杯状病毒 VP1 蛋白 B 细胞表位的串联表达及间接 ELISA 方法的建立[J/OL]. *中国动物传染病学报*: 2022, 1-9.
- [52] Meli M L, Berger A, Willi B, et al. Molecular detection of feline calicivirus in clinical samples: A study comparing its detection by RT-qPCR directly from swabs and after virus isolation[J]. *Journal of virological methods*, 2018, 251: 54-60.
- [53] Sykes J E, Allen J L, Studdert V P, et al. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR[J]. *Veterinary microbiology*, 2001, 81(2): 95-108.
- [54] 赛力克·巴合达吾列提, 刘存, 刘砚涵, 等. 猫杯状病毒纳米 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(06): 684-688.
- [55] 姜雪. 猫杯状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2013.
- [56] 李娅. 猫杯状病毒遗传进化分析及 SYBR GreenI 荧光定量检测方法的建立[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2020.
- [57] Kim S J, Park Y H, Park K T. Development of a novel reverse transcription PCR and its application to

- field sample testing for feline calicivirus prevalence in healthy stray cats in Korea[J]. *Journal of veterinary science*, 2020, 21(5): 71.
- [58] Cao N, Tang Z, Zhang X, et al. Development and Application of a Triplex TaqMan Quantitative Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Feline Calicivirus, Feline Parvovirus, and Feline Herpesvirus 1[J]. *Frontiers in veterinary science*, 2021, 8: 792322.
- [59] Liu D, Zheng Y, Yang Y, et al. Establishment and application of ERA-LFD method for rapid detection of feline calicivirus[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2022, 106(4): 1651-61.
- [60] Lu Z, Ledgerwood E D, Hinchman M M, et al. Conserved Surface Residues on the Feline Calicivirus Capsid Are Essential for Interaction with Its Receptor Feline Junctional Adhesion Molecule A (fJAM-A) [J]. *Journal of virology*, 2018, 92(8): 35-18.
- [61] Bergmann M, Speck S, Rieger A, et al. Antibody Response to Feline Calicivirus Vaccination in Healthy Adult Cats[J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 702.
- [62] Huang C H . Hemorrhagic feline calicivirus, calicivirus Vaccine and method for preventing development of calicivirus disease[J]. *Patent summary*, 2005, 16(9): 2443-50.
- [63] Poulet H, Jas D, Lemeter C, et al. Efficacy of a bivalent inactivated non-adjuvanted feline calicivirus vaccine: relation between in vitro cross-neutralization and heterologous protection in vivo[J]. *Vaccine*, 2008, 26(29-30): 3647-54.
- [64] Spiri A M, Novacco M, Meli m L, et al. Modified-Live Feline Calicivirus Vaccination Elicits Cellular Immunity against a Current Feline Calicivirus Field Strain in an Experimental Feline Challenge Study[J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1736.
- [65] Spiri A M, Riond B, Stirn M, et al. Modified-Live Feline Calicivirus Vaccination Reduces Viral RNA Loads, Duration of RNAemia, and the Severity of Clinical Signs after Heterologous Feline Calicivirus Challenge[J]. *Viruses*, 2021, 13(8): 1505.
- [66] Kim Y, Chang K O. Fexaramine as an entry blocker for feline caliciviruses[J]. *Antiviral research*, 2018, 152: 76-83.
- [67] Cui Z, Wang Q, Li D, et al. Icariin, Formononetin and Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibit Feline Calicivirus Replication In Vitro[J]. *Archives of virology*, 2021, 166(9): 2443-50.
- [68] Li D, Cui Z, Li G, et al. Antiviral effect of copper chloride on feline calicivirus and synergy with ribavirin in vitro[J]. *BMC veterinary research*, 2020, 16(1): 231.
- [69] Cui Z, Li D, Xie Y, et al. Nitazoxanide protects cats from feline calicivirus infection and acts synergistically with mizoribine in vitro[J]. *Antiviral research*, 2020, 182: 104827.
- [70] 郝俊虎, 王仙琴, 闫永利, 等. ELISA 方法测定鸡肝肾组织中氯霉素残留的探讨[J]. *山西农业大学学报*, 2005(03): 245-247.
- [71] Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloid method for the electron microscope[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(11): 1081-3.
- [72] 吴海涛. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 江苏: 扬州大学, 2015.
- [73] 刘志科. 鸡沙门氏菌病检测方法的建立及初步应用[D]. 新疆: 石河子大学, 2018.
- [74] 刘维建. 猫弓形虫感染ELISA和胶体金试纸检测方法建立与初步应用[D]. 吉林: 吉林大学, 2017.
- [75] 李超辉. 胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿以及猪肉中的克伦特罗残留[D]. 江西: 南昌大学, 2014.
- [76] 孙晓峥, 任柯潼, 胡叶军, 等. 肉鸡组织中氟喹诺酮类抗生素快速检测的胶体金技术研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, 19: 6.
- [77] 梅彬. 水产品中恩诺沙星胶体金快速检测试纸条的研制[D]. 福建: 集美大学, 2015.

- [78] 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]. 黑龙江: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [79] 程晨曦, 刘家森, 胡晓亮, 等. 猫杯状病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 039(012): 1017-21.
- [80] 刘秋艳. 基于 ORF2 基因表达产物的猫杯状病毒间接 ELISA 方法的建立及其初步应用 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2015.
- [81] 王莹, 白晶晶, 李玉芳, 等. 猫泛白细胞减少症病毒单克隆抗体的制备及其制备胶体金检测试纸条的应用[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(15): 5.
- [82] Cubillos Z 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]. Veterinary research, 2020, 51(1): 59.
- [83] Milton I D, Turner J, Teelan A, et al. Location of monoclonal antibody binding sites in the capsid protein of feline calicivirus[J]. The Journal of general virology, 1992, 73(9): 2435-9.
- [84] Shin Y S, Tohya Y, Oshikamo R, et al. Antigenic analysis of feline calicivirus capsid precursor protein and its deleted polypeptides produced in a mammalian cDNA expression system[J]. Virus research, 1993, 30(1): 17-26.
- [85] Geissler K, Schneider K, Truyen U. Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes on the capsid protein of feline calicivirus[J]. Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health, 2002, 49(1): 55-60.
- [86] 张雪梅. 鸭疫里默氏杆菌单克隆抗体的制备及免疫胶体金快速检测技术研究[D]. 安徽: 安徽农业大学, 2018.
- [87] 邵雨. H9 亚型禽流感病毒和鸡毒支原体抗体检测胶体金试纸条的研制与初步应用[D]. 湖北: 华中农业大学, 2019.

Development of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of Feline calicivirus antigen

Abstract

Feline calicivirus (FCV) is an important infectious and endemic pathogen in felines, which can cause mild self-limited clinical symptoms, including respiratory diseases, stomatitis and oral inflammatory syndrome. In rare cases, FCV infection may lead to acute arthritis, virulent-systemic disease (VSD), severe pneumonia, miscarriage and even sudden death. At present, the VSD is getting higher and higher in Europe and the United States, and it has also appeared in China. It is difficult to diagnose because FCV infection is often accompanied by other pathogens, Establishing a fast and effective detection method is urgent.

FCV is a non-enveloped RNA virus of the calicivirus family. The genome contains three open reading frames (ORF). ORF2 encodes the capsid protein VP1 of FCV, which plays an important role in inducing immune response. VP1 protein is divided into six regions, among which VP1-B protein is highly conserved and can induce the body to produce broad-spectrum anti-FCV antibodies, which is suitable to be used as immunogen to prepare anti-FCV monoclonal antibodies. In this experiment, the recombinant plasmid pET22b (+)-B of the FCV-F9 VP1-B protein of the vaccine strain was transformed into BL21 (DE3), and the expression product was induced by IPTG. The expression product was identified by SDS-PAGE and Western-blot. The results showed that the protein was soluble antigen, the size was about 55kDa, and had good reactivity.

The purified VP1-B protein was mixed with Freund's adjuvant to immunize 6-8-week-old BALB/c mice, and the spleen cells that mice with high serum titer were fused with myeloma cells to prepare hybridoma cells. Purified FCV-SX1 virus particles were used as the encapsulated antigen to establish an indirect ELISA method to screen hybridoma cell lines. Three hybridoma cell lines with stable monoclonal antibody secretion, named 1E3, 3A4 and 4F11, were obtained after three subclonal screens; Western-blot results showed that 1E3, 3A4 and 4F11 all recognized FCV-SX1, FCV-SX2 and FCV CH-JL2 with good reactivity. The ELISA results showed that the cell supernatant titers of 1E3, 3A4 and 4F11 were 1:1.6x10³, 1:1.6x10³, 1:8.0x10³ respectively, and the ascites titers were 1:1.28x10⁶, 1:2.56x10⁶, 1:1.28x10⁶, in which 1E3 and 3A4 were IgG1, 4F11 was IgM.

In this experiment, monoclonal antibody 3A4 was selected as gold standard antibody, monoclonal antibody 4F11 as detection line antibody and sheep anti-mouse antibody as quality detection antibody to prepare colloidal gold test strip. The colloidal gold particles were prepared by trisodium citrate reduction method, and the optimum pH for the binding of 3A4 to colloidal gold particles was 7.5. The results of further optimization showed that the optimum concentration of gold label antibody was 7.2 $\mu\text{g/mL}$, the detection line coating concentration was 1.0 mg/mL, the quality control line concentration was 0.5 mg/mL, and the sample diluent was PBST. The assembled test strip was used to detect four common feline virus strains FCV, Feline panleukopenia virus (FPV), Feline Herpesvirus (FHV) and Feline Infectious Peritonitis (FIP). The results showed that the specificity of the test strip was good. The sensitivity of the test strip was 104 TCID₅₀/mL, and the stability test showed that the strip could be preserved for 6 months at 4 °C. The prepared colloidal gold test strip and RT-PCR method were used to detect 94 feline nasopharyngeal swabs at the same time, the coincidence rate was 93.6%, and the coincidence rate was more than 90%. In summary, the test results show that the colloidal gold test strip developed in this experiment can be used for clinical detection of feline calicivirus.

Keywords: Feline calicivirus; VP1-B protein; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatography; test strip

附 录

硕士期间发表论文情况:

- 1、李华斌,王泽炜,杨逢清,等.山西部分地区 IBV 的分离鉴定及 S1 基因进化分析[J].黑龙江畜牧兽医,2021(21):86-91.
- 2、李华斌,田崇瑜,李欣昱,等.猫杯状病毒抗原检测胶体金试纸条的研制[J].中国兽医学报录用,待见刊。

致 谢

忽然三载，倏忽而逝，硕士寻亦近尾。临别之际，感恩不言，唯有简单数语可以寥表心情。

入学之初，非常幸运承蒙闫芳教授厚爱能够投于门下。在我整个研究生生涯中，闫教授给了我许多有价值的建议，从选题到开题报告，一直到论文的修订，闫教授都对我进行了热心的指导，让我的研究思路有了飞快的进步。闫教授严谨的治学态度，认真的工作作风，渊博的专业知识，敏锐的学术视野，勇于开拓的精神，对我的工作和学业都有很大的影响，促使我继续前进。

研二初始，在命运眷顾下，学于赵忠鹏老师门下。赵老师对于科研的态度对我影响很大，每次讨论课题时您眼中不同平时的“光”都让我深深感受着老师对于科研的热忱。实验中，您总能因材施教，循循善诱，一点点帮我树立了在科研道路上的信心。行文至此，您发给我得每一篇文献，写给我的实验设计，和您每一次讨论，发的每一条信息依然在眼前闪过。老师的心态也影响着我的生活态度，未来我会更加积极乐观的对待每一次挑战，从容的面对生活。离别在即，多希望能够继续跟随恩师学习，几多不舍，几多无奈。时虽易逝，未能得师之末。但我将时刻铭记师恩，尊尊教诲定不敢忘！

求学三年，需要感谢的太多。感谢“宠物疾病诊疗与防控新技术研究”及“山西省 1331 工程”项目的资助。感谢实验室杨鹏辉老师对我的悉心指导，实验的顺利进行与您的叮嘱和赐教不无关系；感谢孙芳师姐、程晋霞、杨逢清、王泽炜、刘媛等师兄师姐在工作学习以及课题完成期间对我的帮助与鼓励，每次一遇到困难首先想到的就是你们，你们就是我在实验室的“小老师”，你们刻苦积极的态度也对我影响深远，得此良友，甚是感激！感谢同门史伯昌、田崇瑜、李聪、邓卓雅、田昱莹在试验中的的帮助与支持；实验上的讨论，生活上的帮助、动物房的时光，都将成为我难以忘怀的回忆，同窗之情铭记于心。此外特别感谢我的父母，这么多年对我的支持与鼓励，你们是我强大的后盾。在未来的日子里，我会更加努力学习工作，不辜负父母对我的殷殷期望！最后，最后，感谢一路走来的舍友李涛、郭彪彪、李思辉、陈历生、赵婧，感谢你们的陪伴。

李华斌

2022 年 5 月