



HUA ZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

猫疱疹病毒I型 gD 蛋白单克隆抗体及荧光微球试纸条的研制
DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY TO FELINE
HERPESVIRUS TYPE I GD PROTEIN AND FLUORESCENT
MICROSPHERE TEST STRIPS

研究生：甘雅琴

CANDIDATE: GAN YAQIN

学 号：2022302120127

STUDENT NO.:

学位类别：兽医硕士

DEGREE TYPE: MASTER OF VETERINARY
MEDICINE

导 师：韩丽 副教授

SUPERVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR HAN LI

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

华中农业大学硕士学位论文

猫疱疹病毒I型 gD 蛋白单克隆抗体及荧光微球试 纸条的研制

**Development of monoclonal antibody to feline herpesvirus
type I gD protein and fluorescent microsphere test strips**

研 究 生：甘雅琴

学 号：2022302120127

指导教师：韩丽 副教授

学位类型：兽医硕士

领 域：动物医学

华中农业大学动物医学院

中国 武汉

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University

Wuhan, China

目 录

1.文献综述.....	1
1.1 猫疱疹病毒病.....	1
1.1.1 病原学及流行病学.....	1
1.1.2 临床症状.....	2
1.2 猫疱疹病毒 I 型基因结构及功能	2
1.2.1 gD 蛋白.....	3
1.2.2 gB 蛋白.....	3
1.2.3 gE、gI 蛋白.....	4
1.2.4 gC 蛋白、gG 蛋白.....	4
1.3 猫疱疹病毒 I 型感染的检测技术	5
1.3.1 病毒分离与鉴定.....	5
1.3.2 聚合酶链式反应.....	5
1.3.3 重组酶聚合酶扩增.....	6
1.3.4 环介导等温扩增.....	7
1.3.5 病毒中和实验.....	7
1.3.6 酶联免疫吸附实验.....	7
1.4 猫鼻气管炎的预防与治疗	8
1.5 猫疱疹病毒 I 型的单克隆抗体研究进展	8
1.6 时间分辨荧光微球免疫层析试技术	10
2 研究目的及意义	11
3 材料与方法.....	11
3.1 试验材料.....	11
3.1.1 实验动物、实验菌株、质粒、毒种及细胞	11
3.1.2 主要试剂、耗材与仪器设备.....	12
3.1.3 主要培养基及试剂配制.....	14
3.2 试验方法.....	17
3.2.1 FHV-gD 蛋白高密度表达.....	17
3.2.2 FHV-gD 蛋白纯化.....	18
3.2.3 纯化蛋白反应性检测.....	18
3.2.4 动物免疫.....	19
3.2.5 间接 ELISA 筛选方法的建立	19
3.2.6 免疫鼠血清抗体效价检测.....	20
3.2.7 免疫脾细胞的制备.....	21
3.2.8 饲养细胞的制备.....	21

3.2.9 细胞融合	22
3.2.10 阳性细胞的亚克隆	22
3.2.11 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定	23
3.2.12 杂交瘤细胞株染色体计数	23
3.2.13 杂交瘤细胞株分泌抗体特异性分析	24
3.2.14 杂交瘤细胞株分泌抗体结合表位交叉性验证	24
3.2.15 杂交瘤细胞株分泌抗体中和试验	25
3.2.16 腹水的制备	25
3.2.17 腹水抗体效价的测定	26
3.2.18 腹水抗体纯化	26
3.2.19 纯化后腹水抗体的检验	27
3.2.20 5E-6 单抗中和效价测定	27
3.2.21 单克隆抗体的反应性分析	28
3.2.22 FHV-gD 截短重组蛋白构建策略	28
3.2.23 引物设计	29
3.2.24 目的片段扩增	31
3.2.25 载体片段扩增	32
3.2.26 PCR 产物的纯化	33
3.2.27 载体片段线性化	34
3.2.28 融合质粒载体和插入片段	35
3.2.29 融合产物的转化	36
3.2.30 质粒转化子的 PCR 鉴定	36
3.2.31 质粒转化子的提取	37
3.2.32 截短重组质粒转化至 Rosetta 菌株	38
3.2.33 FHV-gD 截短蛋白表达	38
3.2.34 FHV-gD 截短蛋白 Western Blot 验证	38
3.2.35 时间分辨荧光微球标记 FHV-gD 蛋白	39
3.2.36 FHV-gD 蛋白和荧光微球偶联最佳浓度选择	39
3.2.37 检测线 FHV-gD 蛋白最佳包被浓度的确定	40
3.2.38 控制线包被单克隆抗体 5E-6 的最适浓度	40
3.2.39 试纸条的组装与制备	40
3.2.40 反应时间优化	41
3.2.41 试纸条敏感性检验	41
3.2.42 试纸条特异性检验	41
3.2.43 试纸条重复性检验	41
3.2.44 试纸条稳定性检验	41
3.2.45 临床样品符合率检测	41
4 实验结果分析	42

4.1 单克隆抗体的研制.....	42
4.1.1 FHV-gD 蛋白的纯化.....	42
4.1.2 FHV-gD 蛋白的反应性检测.....	42
4.1.3 FHV-gD 蛋白的浓度测定.....	43
4.1.4 间接 ELISA 筛选方法的建立.....	43
4.1.5 免疫鼠血清抗体效价检测.....	44
4.1.6 杂交瘤细胞的筛选.....	45
4.1.7 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定.....	46
4.1.8 杂交瘤细胞株染色体计数.....	46
4.1.9 单克隆抗体的特异性鉴定.....	47
4.1.10 杂交瘤细胞株分泌抗体中和试验.....	48
4.1.11 杂交瘤细胞株分泌抗体结合表位交叉性验证.....	48
4.1.12 腹水抗体效价检测.....	49
4.1.13 腹水抗体纯化.....	50
4.2 5E-6 中和抗体识别表位鉴定.....	51
4.2.1 5E-6 腹水中和抗体效价测定.....	51
4.2.2 单克隆抗体的反应性鉴定.....	51
4.2.3 FHV-gD 截短质粒的构建.....	52
4.2.4 FHV-gD 截短蛋白 Western Blot 鉴定.....	53
4.2.5 5E-6 单抗识别表位的空间模拟定位.....	54
4.2.6 5E-6 单抗识别表位保守性分析.....	55
4.3 时间分辨荧光微球试纸条抗体检测方法的建立.....	55
4.3.1 FHV-gD 蛋白和荧光微球偶联最佳浓度选择.....	55
4.3.2 检测线 FHV-gD 蛋白最佳包被浓度的确定.....	56
4.3.3 控制线 5E-6 单抗包被的最适浓度.....	56
4.3.4 最佳反应时间的确定.....	56
4.3.5 试纸条敏感性检验.....	57
4.3.6 试纸条特异性检验.....	57
4.3.7 试纸条重复性检验.....	58
4.3.8 试纸条稳定性检测.....	58
4.3.9 临床样品符合率检测.....	59
5 讨论.....	61
5.1 单克隆抗体的研制.....	61
5.2 5E-6 抗体识别表位的鉴定.....	62
5.3 时间分辨荧光微球试纸条抗体检测方法的建立.....	63
6 结论.....	64
参考文献.....	65

摘 要

猫疱疹病毒 I 型 (Feline herpesvirus-1, FHV-1)可以引起猫科动物急性、高度接触性上呼吸道疾病,是导致猫上呼吸道疾病的最严重病原。目前, FHV-1 已呈世界性流行,发病率可达 100%,病死率 20%~50%,约 80% 的猫感染该病毒后终身带毒,严重影响着宠物猫及野生猫科动物的健康。国内主要使用灭活疫苗免疫以保护动物机体免受 FHV-1 感染,然而目前尚无获批兽药证书的抗体检测试剂盒,也无特异性治疗药物。因此,研制中和抗体和更加方便、快捷的检测方法,对于预防和治疗 FHV-1 感染具有重要意义。

因此,本研究以实验室前期构建的 FHV-gD 中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary Cell,CHO)细胞系表达 FHV-gD 蛋白,免疫 BALB/c 小鼠后,利用传统杂交瘤细胞技术制备单克隆抗体,并筛选中和单克隆抗体,通过鉴定中和抗体识别的表位分析其保守性,评估其作为 FHV-1 特异性治疗药物的潜力。同时将 FHV-gD 蛋白进行荧光微球标记和包被在检测线、以单克隆抗体作为质控线划线抗体,建立双抗原夹心时间分辨荧光微球试纸条,以检测 FHV-1 抗体。本研究的主要研究结果如下:

1、FHV-gD 单克隆抗体的研制

以实验室前期构建的 FHV-gD CHO 细胞系分泌表达 FHV-gD 蛋白,纯化浓缩后浓度可达 3.374 mg/mL,纯度达 98%。通过蛋白与猫 FHV-1 阳性血清的 Western blot 实验,说明 FHV-gD 具有良好的免疫反应性。将 FHV-gD 蛋白作为免疫原免疫小鼠,免疫鼠血清抗体效价达到 1:10000 后进行细胞融合,分别采用蛋白与病毒包被的 ELISA 板对阳性细胞进行双重筛选,最终获得 5 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,命名为 2D-1、5E-6、2E-11、2A-12、7C-13。染色体计数实验结果显示 5 株单克隆抗体染色体数目分别为: 89 条、102 条、99 条、100 条、99 条,为融合细胞。亚类鉴定结果显示 5E-6、2A-12 的重链为 IgG1,2D-1、2E-11、7C-13 的重链为 IgG2a,5 株单抗轻链均为 kappa 链; ELISA 检测 5 株单抗腹水效价为 $10^6\sim 10^8$; 间接免疫荧光结果显示,研制的单克隆抗体与猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV)、猫细小病毒 (Feline parvovirus, FPV)不反应,能够特异性识别 FHV-1。

2、FHV-gD 中和单克隆抗体识别表位的鉴定

本研究 Western blot 结果显示,5 株单抗均能与 FHV-gD 蛋白特异性结合,证明

5 株单抗识别的表位均为线性表位；利用中和试验检测 5 株单抗，发现 5E-6 具有中和效果，其腹水中和效价为 10^{-3} ；将 FHV-gD 全长氨基酸序列截短后进行重组蛋白表达，其中截短蛋白 f1、f6 与 5E-6 单抗的 Western blot 均呈阳性反应，证明 5E-6 单抗识别的表位位于这两个片段的交叠区域，即 $^{308}\text{PIIISDDDVP}^{318}$ ；将鉴定的表位序列与报导的 FHV-gD 氨基酸序列进行比对，结果显示 5E-6 单抗表位高度保守。

3、FHV-1 时间分辨荧光微球试纸条抗体检测方法的建立

为检测 FHV-1 疫苗免疫后的抗体水平，本研究建立了双抗原夹心荧光微球试纸条。将 FHV-gD 蛋白与荧光微球偶联，以 FHV-gD 蛋白作为检测线包被抗原，5E-6 单抗作为质控线划线抗体，建立时间分辨荧光微球试纸条。以研制的试纸条检测猫 FCV、FPV、FHV-1 阳性血清，结果显示试纸条仅与猫 FHV-1 阳性血清反应，具有良好特异性；将猫 FHV-1 阳性血清进行梯度稀释，以本研究制备的试纸条检测不同稀释度，结果显示其敏感性为 1: 256；以研制的试纸条和间接免疫荧光试验两种方法检测 34 份猫临床血清，结果显示试纸条与间接免疫荧光实验试验的检测结果符合率为 95%。本研究建立的试纸条检测方法具有良好的特异性和敏感性，可用于 FHV-1 抗体的快速检测。

本研究以 FHV-gD 真核蛋白为免疫原，成功研制了 5 株单克隆抗体，其中 1 株具有中和效果，并成功鉴定其识别的中和表位，该中和表位高度保守。基于 FHV-gD 蛋白和研制的单克隆抗体成功建立双抗原夹心荧光微球试纸条以检测 FHV-1 抗体。

关键词：猫疱疹病毒 I 型；gD 蛋白；单克隆抗体；表位分析；检测方法

Abstract

Feline herpesvirus-1 (FHV-1) can cause acute and highly contagious upper respiratory tract disease in felines, and is the most serious pathogen causing upper respiratory tract disease in cats. At present, FHV-1 has been a worldwide epidemic, the incidence rate can reach 100%, the case fatality rate is 20% ~ 50%, about 80% of cats infected with the virus carry the virus for life, seriously affecting the health of pet cats and wild cats. In China, inactivated vaccines are mainly used to protect animals from FHV-1 infection, but there is no antibody detection kit approved for veterinary medicine certificate, nor specific therapeutic drugs. Therefore, the development of neutralizing antibodies and more convenient and rapid detection methods is of great significance for the prevention and treatment of FHV-1 infection.

Therefore, in this study, the FHV-gD Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line constructed in the laboratory was used to express FHV-gD protein, and after immunizing BALB/c mice, the traditional hybridoma cell technology was used to prepare monoclonal antibodies, and the neutralizing monoclonal antibodies were screened, and their conserved properties were analyzed by identifying the epitopes of the neutralizing antibodies. To evaluate its potential as a specific therapeutic agent for FHV-1. At the same time, FHV-gD protein was labeled with fluorescent microspheres and fixed on the detection line, and monoclonal antibody was used as the quality control line to line the antibody. A dual-antigen sandwich time-resolved fluorescent microsphere test strip was established to detect FHV-1 antibody. The main findings of this study are as follows:

1. Preparation of FHV-gD monoclonal antibody

The FHV-gD CHO cell line constructed in the laboratory was used to secrete and express FHV-gD protein. After purification and concentration, the concentration was up to 3.374 mg/mL and the purity was up to 98%. Western blot assay of FHV-gD protein and cat FHV-1 positive serum indicated that FHV-gD had good immune reactivity. The mice were immunized with FHV-gD protein as the immunogen, and the serum antibody titer of the immune mice reached 1:10000, and the cells were fused, and the positive cells were

double-screened by an ELISA plate coated with protein and virus respectively. Finally, 5 hybridoma cell lines that could secrete antibodies stably were obtained. They are designated 2D-1, 5E-6, 2E-11, 2A-12, and 7C-13. The results of chromosome counting experiment showed that the five monoclonal antibody strains had 89, 102, 99, 100 and 99 chromosomes, respectively, and were fused cells. The results of subclass identification showed that the heavy chain of 5E-6 and 2A-12 was IgG1, the heavy chain of 2D-1, 2E-11 and 7C-13 was IgG2a, and the light chain of the 5 strains was kappa chain. The titers of ascites of 5 strains by ELISA were $10^6\sim 10^8$. Indirect immunofluorescence results showed that the monoclonal antibody did not react with Feline calicivirus (FCV) and Feline parvovirus (FPV), and could specifically recognize FHV-1.

2. Identification of neutralizing monoclonal antibody recognition epitopes by FHV-gD

In this study, Western blot results showed that all five monoclonal antibodies could bind specifically to FHV-gD protein, proving that the epitopes recognized by all five monoclonal antibodies were linear epitopes. Using the neutralization assay to test the five monoclonal antibodies, it was found that 5E-6 had a neutralizing effect, with a neutralizing potency of 10^{-3} . The full-length amino acid sequences of FHV-gD were truncated and then recombinantly expressed in the recombinant proteins, in which the truncated protein f1, The truncated proteins f1 and f6 reacted positively with the Western blot of 5E-6 monoclonal antibody, which proved that the epitope recognized by 5E-6 monoclonal antibody was located in the overlapping region of the two fragments, and the epitope recognized by 5E-6 monoclonal antibody was $^{308}\text{PIIISDDDDVP}^{318}$. The results of the comparison of the identified epitope sequences and the amino acid sequences of the reported FHV-gD showed that the epitopes of the 5E-6 monoclonal antibody were highly conserved.

3. Establishment of antibody detection method for FHV-1 time-resolved fluorescent microsphere strip

In order to detect the antibody level after immunization with FHV-1 vaccine, a double-antigen sandwich fluorescent microsphere test strip was established. FHV-gD

protein was coupled with fluorescent microspheres, FHV-gD protein was used as the detection line coated antigen, 5E-6 monoclonal antibody was used as the quality control line marking antibody, and time-resolved fluorescent microspheres were established. The developed test strip was used to detect FCV, FPV and FHV-1 positive serum. The results showed that the test strip only reacted with FHV-1 positive serum and had good specificity. The cat FHV-1 positive serum was diluted by gradient, and the paper strip prepared in this study was used to detect different dilutions, and the sensitivity was 1:256. The results showed that the coincidence rate between the test strips and the indirect immunofluorescence test was 95%. The test strip method established in this study has good specificity and sensitivity, and can be used for the rapid detection of FHV-1 antibody.

Key words: Feline herpesvirus type I; gD protein; monoclonal antibody; Epitope analysis; Detection method

缩略语表(Abbreviation Table)

英文缩写	英文名称	中文名称
bp	Base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
Amp	Ampicillin	氨苄西林
ddH ₂ O	Double Distilled water	去离子水
DNA	Deoxyribonucleotide acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	脱氧三磷酸核苷
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FHV-1	Feline herpesvirus-1	猫疱疹病毒 I 型
FCV	Feline calici virus	猫杯状病毒
FPV	Feline parvo virus	猫细小病毒
BHV-1	Bovine herpesvirus-1	牛疱疹病毒 1 型
PRV	Pseudorabies virus	伪狂犬病毒
HSV	Herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
His	Histidine	组氨酸
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFN	Interferon	干扰素
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IL	Interleukin	白介素
IPTG	Isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基硫代半乳糖苷
kb	Kilo base pair	千碱基对
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LA	Luria Bertani Agar	LA 固体培养基
LB	Luria Bertani	LB 培养基
mL	Milliliter	毫升

猫疱疹病毒I型 gD 蛋白单克隆抗体及荧光微球试纸条的研制

英文缩写	英文名称	中文名称
mg	Microgram	毫克
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mol	mole	摩尔
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NC	Nitrocellulose filter	硝酸纤维素
OD	Optical density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Ploymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pH	Potential of hydrogen	氢离子浓度指数
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
SDS	Sodium dodecylsulphate	十二烷基磺酸钠
SLY	Suilysin	溶血素
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体
TAE	Tris-acetate-EDTA	TAE 缓冲液
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
Tris	tris-hydroxy-methy-laminomethane	三羟甲基氨基甲烷
TSA	Tryptic Soy Agar	胰蛋白大豆琼脂
TSB	Tryptic Soy Broth	胰蛋白大豆肉汤

1.文献综述

1.1 猫疱疹病毒病

1.1.1 病原学及流行病学

猫疱疹病毒I型属于疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科、水痘病毒属(Davison et al 2008), 是引起猫鼻气管炎的“罪魁祸首”, 被认为是可以引起猫呼吸系统疾病中最具临床意义的病原体(Woo 2012)。测量病毒直径处于 128~168 nm 之间, DNA 呈双链, 能在猫胚细胞、肾细胞、肺以及睾丸细胞内增殖和传代(殷震等 1992)。猫疱疹病毒I型主要通过猫的眼结膜、上呼吸道进行感染, 在全球猫科动物, 如猫、东北虎、华南虎、猎豹、狮子等中高度流行, 但近年也有研究发现, 在灰鼠中可以检测到 FHV -1, 表明灰鼠对 FHV - 1 易感, 并可能作为 FHV - 1 的临时储存库发挥作用(Shi et al 2022)。研究发现 FHV-1 只有一种血清型, 与 FCV、FPV、牛疱疹病毒I型(Bovineherpesvirus-1, BHV- 1)以及单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)等病毒均无交叉反应(Davison et al 2008)。

FHV-1 于 1958 年在美国首次被发现, 随后英国、加拿大、荷兰等多个国家也发现了 FHV-1 (Nakamura et al 1999, Henzel et al 2012), 我国也成功分离到 FHV-1 (陈晨 2015 吴培欣 2018)。如今, FHV-1 已在全世界范围内流行, 据统计, 其群体发病率可达 100%, 发病率极高(白艺兰等, 2022)。各个年龄段的猫均可感染此病, 其中 2~6 月龄的幼猫最易感染, 成年猫感染后经过治疗一般不会致死, 90%以上的猫血清可检出 FHV-1 抗体(赵洪进等 2020), 病死率为 20%~50%(王吉等 2020), 约 80%的猫体内潜伏感染(牛同飞等 2023, 许鹏程等 2023), 45%的猫感染后会终生带毒、排毒。

猫疱疹病毒对很多商品化的消毒剂及清洁剂都敏感, 尤其在酸性条件下及其不稳定。猫疱疹病毒在 37°C下, 3 h 内即可失活, 而 56°C下, 5 min 内即可失活, 但在 4°C温度下, 感染力可持续至少 5 个月, 25°C则可维持约一个月左右的感染力(陶伟杰等 2023)。感染之后的病猫可以通过分泌物大量排毒 2 周左右, 其他动物往往在

接触其分泌物或飞沫后快速感染(刘健等 2016)。大部分单纯猫传染性鼻气管炎对猫并不致命，对猫造成严重损害的是伴随的猫杯状病毒、猫瘟病毒、支原体、波士杆菌、衣原体葡萄球菌等病原继发或混合感染造成的多病原呼吸道综合征(Gaskell and Povey 1977, 许鑫燕等 2022)。FHV-1 感染之后，通常会潜伏在三叉神经节中，在猫免疫力降低时可能重新激活(Jin et al 2018)，很难彻底根治，这也是猫科动物群体中 FHV-1 的患病率高的原因之一(Richter et al 2009, 陶伟杰等 2023)。

近年来研究表明，我国 FHV-1 发病率越来越高，且 FHV-1 在虎，狮等野生猫科动物中的感染率也逐渐增加(肖建雄等 2013, 石龙艳等 2022)，如不加以控制，其造成的危害不可忽视。

1.1.2 临床症状

由于感染猫的免疫能力不同，猫鼻气管炎病程长短不一，潜伏期通常为 2~3 d，急性病例可持续 10~14 d(Maggs et al 1999)，该病在 6~9 周龄无被动免疫的猫中尤其严重(陶玉珍等 2023)。急性猫疱疹病毒感染的临床症状表现为患猫体温升高，精神不振、食欲下降，体重减轻(张先惠等 2023)。突然阵发性咳嗽，打喷嚏，流眼泪、流鼻涕，对光敏感，出现结膜、角膜炎，其中树枝状溃疡角膜炎是疱疹病毒感染的示病性症状(唐明瑞等 2023)。分泌物过多导致眼鼻周围被毛脱落，发生溃疡，眼、鼻分泌物变化发展为黏脓状。嘴部溃疡，导致饮食欲不佳。继发细菌感染时炎症加重，可能导致角膜穿孔，后期修复时角膜结膜黏连。感染严重时，发展为全眼球炎，造成永久性失明。典型情况下死亡是由于厌食、脱水及继发细菌感染所导致(程雅玲等 2023)。

幼猫感染时，鼻甲及粘膜发炎充血、溃疡及变形易继发细菌感染，发展为慢性鼻窦炎。孕猫感染时，上呼吸道症状不明显，但死胎或流产概率增加，产下的幼仔有呼吸道症状、体格衰弱、极易夭折。临床治愈的猫大部分也会转为潜伏带毒者，可能出现间歇性结膜炎或鼻炎，环境和气候改变时较易复发(唐明瑞等 2023)。

1.2 猫疱疹病毒 I 型基因结构及功能

FHV-1 病毒粒子通常呈二十面体对称的卵圆形至圆形，主要组成部分为核酸、

衣壳、壳体与囊膜。FHV-1 基因组长度约为 135797 bp, 总 G + C 含量为 45%(Stiles et al 2003, Maggs et al 2005, Gaskell et al 2007)。基因组被反向重复片段(IR)分为独特长(UL)区和独特短(US)区(Rota et al 1986, Grail et al 1991)。FHV-1 基因组拥有 78 个阅读框(Openreading frame, ORF), 其中 63 个 ORF 处于 UL 区, 其余 12 个处于 US 区, 编码 74 种复制酶、毒力蛋白、结构蛋白等 (Albà et al 2001)。目前, 已对疱疹病毒约 23 种病毒特异性蛋白和免疫原性糖蛋白进行深入研究(Fargeaud et al 1984)。经报导, 疱疹病毒的囊膜糖蛋白主要包括 gB、gC、gD、gE、gK、gL、gM、gN、gG、gI 蛋白。其中 gB、gC、gK、gL、gM、gN 蛋白由 UL 区编码, 其余囊膜糖蛋白由 US 区编码。目前, 科学家们对 FHV-1 的 gB、gC、gD、gE、gG、gI、gL、gH 8 种囊膜糖蛋白研究较为深入(Maeda et al 1998)。

1.2.1 gD 蛋白

由 US6 基因编码、全长包括 374 个氨基酸的 gD 蛋白是病毒囊膜的主要成分。gD 蛋白与宿主细胞上的受体识别后结合, 具有选择宿主细胞的功能、并可以诱导机体的体液免疫与细胞免疫。gD 蛋白高度保守, 在所有的糖蛋白中变异最小(石龙艳等 2022)。据报导, gD 蛋白上至少存在四个可与不同抗体特异性结合的抗原表位(Limcumpao et al 1990)。gD 具有特异血凝特性, 不同毒株凝集不同的宿主, 如 FHV-1 只能凝集猫红细胞, 说明 gD 蛋白可作为疱疹病毒的特异性蛋白(Maeda et al 1996)。此外, gD 蛋白具有良好的抗原性, 免疫兔和鼠的动物实验发现, gD 蛋白可以刺激机体产生高水平细胞免疫和体液免疫(张继一等 2009, 张晓明等 2014, 孙春艳等 2020)。给鼠和牛分别免疫 gD、gB、gC 蛋白, 试验结果显示, gD 蛋白引起的细胞免疫比 gB、gC 更强且更持久(Limcumpao et al 1990)。因此, gD 蛋白似乎是良好的亚单位疫苗的选择。

1.2.2 gB 蛋白

gB 蛋白由 UL27 基因编码, 948 个氨基酸折叠形成, 与其他蛋白组成疱疹病毒囊膜表面, 决定着病毒的感染过程。gB 蛋白是大部分疱疹病毒科最保守的蛋白质之一, 同时具有较高的免疫原性(Maeda et al 1995)。gB 蛋白具有促进病毒与宿主细胞

融合的作用，并可促进胞内多核体的形成，gB 与 gC 结合后可以识别宿主细胞肝素样受体。以 gB 蛋白免疫动物，还可以诱导机体产生高水平的体液免疫(张继一等 2013, 李娜等 2022)，因此，FHV-1 的 gB 蛋白也是抗 FHV-1 感染的亚单位疫苗的最重要候选者之一。

1.2.3 gE、gI 蛋白

糖蛋白 gI、gE 由 US 区基因编码，高度保守，为非必需糖蛋白(Spatz et al 1994)，在病毒毒力和嗜神经性方面起重要作用(张定姣等 2013)。gE 蛋白介导宿主细胞融合，并使病毒向神经系统转移(Van de Walle et al 2003)。研究表明，FHV-1 强毒株与弱毒株的 gE 蛋白序列存在一定差异，但 Lee 和 Sussman 等人将 gE 基因缺失经口鼻接种后动物后 FHV 仍有微弱毒力，并产生轻微的临床症状，这表明疱疹病毒的毒力是由除了 gE 基因之外的基因一起调控的，需综合评价病毒毒力(Sussman et al 1995, Lee et al 2021)。gI 蛋白可以促进细胞融合和病毒感染，并影响病毒的在体外的培养。单独表达 gI 或 gE 基因时，其蛋白均很难在细胞囊膜表面检测到，但当同时表达时，其转录复合物可以很容易在细胞囊膜表面表达(Mijnes and de Groot 1999)，这说明 gI 和 gE 在体内相互协作以在细胞囊膜表面表达。研究表明，gI、gE 基因缺失毒株可刺激接种动物产生高滴度的保护性抗体，同时潜伏在中枢神经系统中的 FHV-1 含量极低(Yang M et al 2023)。

1.2.4 gC 蛋白、gG 蛋白

gC 蛋白主要参与病毒吸附的过程，可以刺激机体产生细胞免疫，是 FHV-1 的主要毒力基因之一(牛江婷等 2017)，人类单纯疱疹病毒-1、马疱疹病毒-1 (EHV-1)和伪狂犬病毒等甲型疱疹病毒的 gC 蛋白已被证明与病毒的吸附和侵入有关(Lubinski et al 1999, Osterrieder et al 1999, Rue and Ryan 2002)。目前，对 FHV-1 病毒 gG 蛋白生物学功能还不够深入。但其他亚科病毒的研究证明，gG 是一种非必需的非糖基化蛋白，主要分泌到机体内发挥作用(Spatz et al 1994)。

1.3 猫疱疹病毒I型感染的检测技术

角膜炎和角膜溃疡是 FHV-I 感染的示症特征，但是 FHV-I 感染引起的其他呼吸道症状与其他病原引起的上呼吸道症状极其相似，不易辨别，因此不能仅从发病症状进行诊断(周光荣等 2022)，需要通过病毒分离鉴定、血清学实验检测或分子生物学检测等方法才能作出准确的诊断。针对 FHV-1 病毒抗原的检测，主要包括电子显微镜病毒颗粒检测、核酸等温扩增技术、聚合酶链式反应、酶联免疫吸附实验、胶体金免疫层析技术等；对于抗体的检测，除了免疫荧光试验、酶联免疫吸附实验、免疫层析技术之外，还有可以采用中和实验检测。可根据不同场景及需求选择合适的检测方法(周洁等 2022)。

1.3.1 病毒分离与鉴定

病毒分离是指采取感染动物的分泌物样品接种于易感细胞，出现典型细胞病变即可确诊，能准确检测出具有活性的病毒，检测准确性最高，敏感性较低，仅可以在初次或急性感染的动物鼻子、结膜或肺脏等的样本中分离到病毒，而慢性感染的猫和潜伏感染的猫，很难分离到病毒(林政毅等 2015)。所以病毒分离很少运用于临床诊疗，常用于科学研究。刘健等人 2016 年首次从临床病例中成功分离了 5 株猫疱疹病毒，经鉴定，5 株猫疱疹病毒分离株均为 I 型，TCID₅₀ 值为 10⁵ TCID₅₀/0.1mL，其病毒粒子形态、理化特性、基因序列等与已报导的文献一致(刘健等 2016)。

1.3.2 聚合酶链式反应

PCR 根据检测目的基因的高度保守片段设计引物(primer)，可以特异性检测到微量的目的基因，所以可以更准确、全面的检测目的病毒，在所有 FHV-1 检测方法中敏感性最高。目前传统 PCR 及实时荧光定量 PCR 已被纳为检测结膜、鼻、咽拭子、血液或其他组织病料中是否有猫疱疹病毒核酸的常规检测方法。传统 PCR 过于敏感，可以在临床病料中检测到非处于增殖阶段的病毒，这导致 PCR 检测结果可能与猫患病状态无关，因此它的诊断结果可信度不高。但实时荧光定量 PCR 可以定量检测样品中的病毒含量，根据病毒含量诊断当前动物的疾病状态，如果呈现高猫疱疹病毒

浓度时，提示病毒复制活跃，此呼吸道疾病是由于 FHV-1 感染产生的；浓度低时，则代表潜伏感染，该动物的疾病状态可能是由于其他病原感染产生的。多重荧光定量 PCR，可以同时检测引起猫呼吸道疾病的病原，从而达到快速鉴别诊断的目的。陈林文等人建立 FPV、FCV、FHV-1 三重荧光定量 RT-PCR 方法以快速鉴别诊断猫病毒病，该方法对 3 种病毒的最低检测限均约为 100^5 TCID₅₀/mL(陈林文等 2023)。周红蕾等人基于 FHV-1 TK 基因、FCV VP1 基因、支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)的皮肤坏死毒素基因(DNT1)序列保守区域设计荧光定量 PCR 引物和荧光探针，建立检测 FHV-1、FCV、Bb 多重荧光定量 PCR 方法区分猫上呼吸道病，结果表明该方法对 FHV-1、FCV、Bb 的最低检出限分别为 10、10 和 100 copies/ μ L，灵敏度较高(周红蕾等 2023)。

1.3.3 重组酶聚合酶扩增

重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)是较为新颖的一种核酸检测方法，其利用参与细胞 DNA 合成、重组和修复的蛋白实现在 37-42°C 条件下快速扩增核酸。RPA 可以通过结合电泳、荧光探针、侧流层析试纸条等技术，增强检测结果的可视化(Piepenburg et al 2006, Broughton et al 2020)。其除了兼具聚合酶链式反应的高特异性、高灵敏度、多重扩增和层析试纸条的便携(Li 2020)、反应简单快速等优点之外，还具备样本包容性高、可以恒温扩增等多重优势(Lobato and O'Sullivan 2018)。黄坚等人结合 RPA、Cas12a 反式酶切反应和侧流层析试纸条技术建立 FHV-1 TKRPA-Cas12a-LFD 快速可视化检测方法(黄坚 2022)。其建立的方法不仅特异性高，最低检测限达到 2.35×10^{-1} copies/ μ L⁻¹，灵敏度也极高。Wang J 等人设计了特异性靶向 FHV-1 胸苷激酶(TK)基因的引物建立 FHV-1 RPA 检测方法，可在 39°C 条件下进行反应，并在 20 min 内获得检测结果(Wang et al 2017)。然而，目前 RPA 技术在临床上的应用尚未成熟，面临着较多问题，更多还局限于科学研究。RPA 的引物与探针较 PCR 引物长，不适合较短靶序列样品的检测，且目前尚未有专门用于设计 RPA 引物的软件。使用 PCR 软件设计 RPA 引物和探针，有时可能无法达到最佳的扩增效果。且由于此技术出现时间较短，相应 RPA 试剂及试剂盒价格较为昂贵，反应成本较高。通过不断改进、优化 RPA 的反应条件，未来其可能替代 PCR 检测核酸。

1.3.4 环介导等温扩增

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)能够在恒温条件下高效且特异扩增 DNA 片段,在核酸检测方面应用前景较好(杨德全等 2022)。LAMP 可不经核酸提取步骤而直接进行反应,有效减少反应成本和检测时间(刘美慧等 2023),因此,在临床上应用 LAMP 检测方法十分适配。何力力等人靶向 FCV、FPV、FHV-1 设计(RT)-LAMP 的多重特异性引物与探针,并在其环引物标记不同的荧光基团,可同时对 FCV、FPV、FHV-1 三种病毒进行检测,最低检测限分别为 45.7 fg/ μ L、5.57 fg/ μ L、3.72 fg/ μ L(何力力等 2021)。冀中豪等人建立 FHV-1 LAMP 检测方法,该检测方法能够检测到最低的模版浓度为 101 copies/ μ L,灵敏度比 PCR 检测方法高 10 倍(冀中豪等 2018)。

1.3.5 病毒中和实验

病毒中和实验 (Virus Neutralization test,VNT)是一种将待检血清与病毒混合孵育后,再加入提前铺好的长满单层细胞的细胞板中,根据细胞病变情况判断血清中是否有相应抗体的血清学检测方法(周洁等 2022)。VNT 实验流程繁琐,耗时较长;且需要有细胞培养条件,对实验人员的实验操作技术水平要求较为严格。此外,由于血清中一些成分的本身可能会对细胞状态造成影响,即便设置对照组,部分肉眼观察的实验结果可能存在主观差异。由于动物感染 FHV-1 后中和抗体会在初次感染较长时间之后才可以检测到(赵洪进等 2020),而且 FHV-1 感染动物刺激机体产生的抗体滴度可能较低,所以血清学的检测在临床诊断上的意义不大,一般应用于科学研究而较少应用于临床快速检测(R.C. Povey et al 1969)。

1.3.6 酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附试验是固定已知抗原或抗体,使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行,用于检测待检样品中的抗原或抗体的血清学试验。常见的 ELISA 有间接 ELISA、双抗体或双抗原夹心 ELISA、竞争 ELISA。其中双抗原夹心 ELISA、间接 ELISA 和竞争 ELISA 常用于抗体的检测。猪传染性胃肠炎、猪伪狂犬病、蓝舌病等

疾病均采用 ELISA 作为标准诊断方法。对于感染 FHV-1 的动物，也可以使用 ELISA 来检测血清、眼房水中的 FHV-1 抗体(Dawson et al 1998, 王吉等 2014, 韩聪等 2023)。在使用 ELISA 试剂盒来进行检测时, 需先将待检样品于已包被抗原或抗体的板子中反应 45~60 min, 清洗后再加入 HRP 酶标抗抗体反应 45~60 min, 清洗后进行显色, 最后加入终止液终止读值, 整个实验流程耗时为 2~3 h, 时间成本较高且观察结果需要特定的仪器设备, 不大适合临床现场快速检测。

1.4 猫鼻气管炎的预防与治疗

提前预防、准确诊断和尽早治疗是防控 FHV-1 的主要手段。FHV-1 感染主要对群居猫造成较为严重的后果, 这与饲养管理不善和潜伏猫间歇性向外排毒有关(刘秋瑾等 2022)。因此, 可以从接种疫苗、饲养管理、筛查带毒猫、环境消毒、隔离患病猫和疑似患病猫等方面来防控 FHV-1 在群居猫间的传播(牛江婷等 2017)。目前国内大部分宠物医院都选择猫三联或猫四联灭活苗进行免疫(于得静等 2021), 在一定程度上降低了 FHV-1 的感染率。

临床上从抗病毒, 对症治疗, 支持疗法等几个方面治疗猫传染性鼻气管炎(魏弯弯等 2022)。首先可以通过皮下注射猫干扰素 IFN- ω , 口服泛昔洛韦等广谱抗病毒药物抑制猫疱疹病毒在体内的增殖(李海波等 2023)。其次对于继发细菌感染的病猫, 可适当使用阿莫西林、头孢曲松钠等抗菌药抑制炎症的发展(魏莲清等 2023)。此外, 对出现的其他临床症状应当对症治疗, 如有上呼吸道症状的病猫可以采用雾化治疗; 出现眼部症状可以滴加阿昔洛韦或利巴韦林等广谱抗疱疹病毒眼药水并清理患猫的眼鼻分泌物(唐明瑞等 2023); 对于饮食欲不佳的动物应当静脉输液, 补充营养, 适当补充赖氨酸可有效降低病毒复制的速度, 治疗效果更佳。除了治疗患病猫的症状, 还需改善患猫的住宿环境, 帮助患猫缓解症状(吴振华等 2017)。

1.5 猫疱疹病毒I型的单克隆抗体研究进展

1973 年, 杂交瘤细胞技术问世, 利用该技术可以永久制备产生针对特定免疫原的特异性抗体的细胞系(Leavy et al 2016)。杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体具有特异性好、纯度高、均一性好等优势, 通常被作为作疾病诊断试剂及治疗药物。随着科学技术的不断发展和进步, 如今的单克隆抗体已经广泛应用于医药治疗、食品安全检

测、疾病诊断等领域(顾光磊等 2022)。其通常结合 ELISA、免疫组织化学技术、放射免疫分析和流式细胞法等技术运用于疾病诊治和食品安全领域。同时利妥昔单抗、曲妥珠单抗、阿伦珠单抗等肿瘤单克隆抗体治疗药剂的出现使得单克隆抗体治疗药物的研发成为医药治疗热点(秦雨婷等 2024)。

单克隆抗体的出现,极大促进了 FHV-1 病毒或抗体检测试剂盒的研发,这些单抗不仅可以用于 FHV-1 的检测和诊断,还可作为特效药物治疗猫鼻气管炎(王吉等 2014, 黄坚等 2022, 刘迪等 2022, 韩聪等 2023)。国内针对 FHV-1 的单克隆抗体主要是由 FHV-1 灭活毒免疫制备的(王旭贞等 2023),靶向 FHV-1 其他蛋白的单克隆抗体的研究则较少。

特异性单克隆抗体可变区可结合抗原分子的特定区域,即抗体识别的抗原表位(Hopp T P et al 1981)。抗原表位可分为线性表位和构象性表位,线性表位识别并结合抗原一级结构连续的氨基酸序列(Parker JM et al 1986),而构象性表位结合抗原的是不连续的氨基酸序列,构象性表位的抗体在抗原结构瓦解之后与抗原不再具有结合能力(Karplus and Schulz 1985)。B 细胞的表面受体识别并结合抗原表位后(B-cell receptor, BCR),可以刺激机体产生体液免疫反应,合成并分泌抗体抵抗病毒的入侵。抗体与不同表位结合,可能抑制或激活某个信号,即抗原表位决定了单克隆抗体的功能,所以确定抗体的抗原表位是单克隆抗体鉴定的关键步骤(Pellequer J L et al 1991)。通过分析抗原表位,可以鉴定单克隆抗体的特异性和与其他抗原是否具有交叉反应性,也可用于鉴定该抗原表位是否是特异表位,然而,目前对于 FHV-gD 抗原表位的研究较为空白

随着计算机算法及结构生物学技术的发展,抗原表位鉴定(Epitope mapping)从传统的抗原表位鉴定方法:合成多肽技术、肽扫描技术、丙氨酸突变技术、噬菌体展示技术等发展到冷冻电镜单颗粒分析、氢氘交换质谱、核磁共振(Chen J et al 2007)、X-射线晶体学(Emini et al 1985)和生物信息学表位预测方法(程明俊等 2020)等技术,这些技术极大方便了对抗原-抗体相互作用的氨基酸残基的精确定位研究(马凡舒等 2016),可根据不同的表位类型选择合适的鉴定方法。

1.6 时间分辨荧光微球免疫层析试技术

免疫层析试纸快速检测技术的检测流程十分简单与迅速，通常在 5~20 min 即可得到检测结果，因此对检测人员的专业技能要求不高。仅需特定光线的仪器，如紫外光等，即可实现对抗原或抗体定性、半定量的快速检测(Beggs et al 1990)。适用于医院、兽医临床、检验检疫等领域，快速检测病原微生物、肿瘤、药物靶标、激素等，是理想的免疫学快速检测技术，具有广阔的应用前景(Liao 2016)。

层析试纸条由样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸和底板组成(图 1-1)，样品垫可迅速吸收样品液，样品随着毛细作用不断朝着吸附有标记抗原/抗体的方向运动，形成肉眼可见的带有标记的抗原抗体复合物，继续层析到达“检测线”(Test line)，带标记的复合物运动在此浓集显色，形成肉眼可见的检测结果；多余标记抗原/抗体继续流动到达“质控线”(Control line)，与 C 线上固定的抗体/抗原结合形成印迹。T 线显示印迹表明检测样品为阳性，C 线印迹有无提示该试纸条是否可信。该技术主要分为直接法和竞争法两种检测模式，前者既可用于抗原检测，也可用于抗体检测。后者主要用于抗原位点少或小分子化合物的检测。

免疫层析试纸条中所用到的标记材料通常具有放大效应，可以使检测的抗原或抗体含量更明显，进而达到定性或半定量检测的目的。所以，应慎重选择标记材料，因为这直接影响试纸检测敏感度。已报导的免疫标记材料主要包括胶体金、稀土纳米材料、胶体碳、量子点、超顺磁性纳米材料等。目前应用最广泛及最多的标记材料是胶体金，但是胶体金试纸条在灵敏度和准确度较为欠缺，不适用于高要求的检测。寻找新型有效的标记材料，提高试纸条的灵敏度和准确度一直是科学家想要攻克的难点。而近年来研究发现，镧系元素无放射性，半衰期长，可以消除基质的干扰从而提高准确性；且荧光比基质荧光物质淬灭时间长 5~6 个数量级，因此可以通过延长测量时间待基质物质的荧光衰减后减少非特异性反应，达到提高灵敏度的目的，现有研究表明，时间分辨荧光微球试纸条的敏感性比胶体金试纸条高 2~3 倍(卓训妮等 2021)。特别是铕离子荧光微球(Eu-CM)，微球可高效包裹大量荧光分子，从而有效提高灵敏度(方蓉等 2020)；同时纳米荧光微球与抗原或抗体偶联方式为共价结合，相较于其他标记材料其结合稳定更高，并可在 5 min 内观察其检测结果。

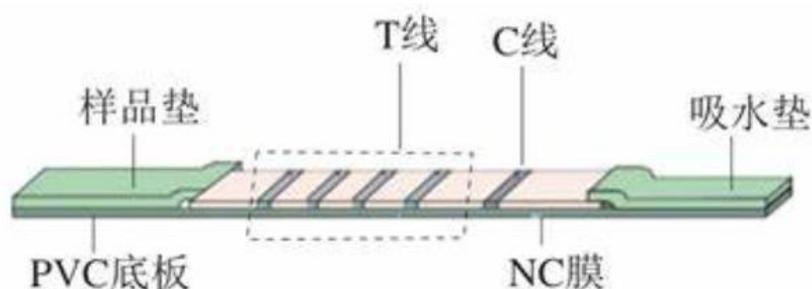


图 1-1 免疫层析试纸条结构组成

Fig.1-1 Immunochromatographic test strip structure composition

2 研究目的及意义

FHV-1 可以引起猫科动物上呼吸道疾病，其发病率及病死率较高，且可导致动物终身带毒，严重影响着宠物猫及野生猫科动物的健康。然而，目前我国尚无特效的药物治理猫鼻气管炎，亦无 FHV-1 抗体检测试剂盒以配合疫苗评估免疫效果，所以本研究拟以实验室前期构建的 FHV-gD CHO 细胞系表达 FHV-gD 蛋白，免疫小鼠后筛选中和单克隆抗体，鉴定中和抗体识别的表位，分析其保守性。同时将 FHV-gD 蛋白进行荧光微球标记和包被在检测线，以单克隆抗体作为控制线划线抗体，建立双抗原夹心时间分辨荧光微球试纸条，以检测 FHV-1 抗体。以期为 FHV-1 抗体检测方法的优化、治疗药物及深入研究提供生物原料，对猫鼻气管炎诊疗、以及野生猫科动物保护等方面有重要意义。

3 材料与amp;方法

3.1 试验材料

3.1.1 实验动物、实验菌株、质粒、毒种及细胞

实验动物：本试验中使用的小鼠均为 SPF 级 4~6 周龄 BALB/c 雌鼠，购自华中农业大学实验动物中心。

实验细胞与菌株：PXC17.4-FHV-gD CHO 细胞由本实验室构建并保存(图 3-1)，

SP2/0 骨髓瘤细胞、CRFK 细胞由本实验室保存，DH5 α 感受态、Rosetta 感受态菌株由本实验室制备并保存。

猫血清来源：猫疱疹病毒阳性血清、猫细小病毒阳性血清、猫杯状细小病毒阳性血清和阴性血清由本实验室收集并保存。

毒株：FHV、FPV、FCV 均由本实验室保存。

质粒：PXC17.4-FHV-gD 质粒、pET-23a-sfGFP-FHV-gD 质粒由本实验室构建并保存(图 3-1)。

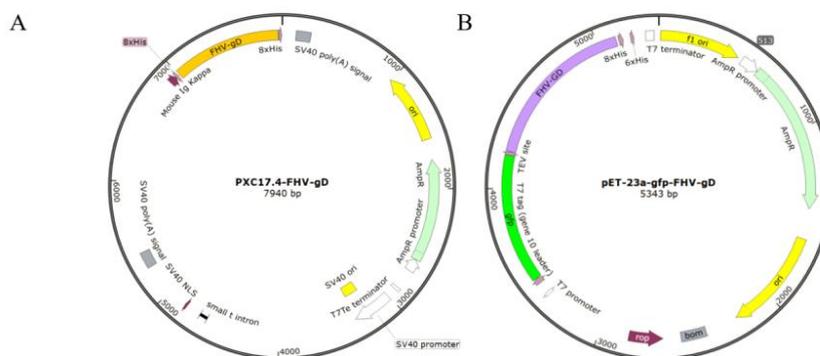


图 3-1 质粒图谱

Fig 3-1 Plasmid map

图 A: PXC17.4-FHV-gD 质粒图谱; 图 B: pET-23a-sfGFP-FHV-gD 质粒图谱

3.1.2 主要试剂、耗材与仪器设备

表 3-1 本研究所用的主要试剂、耗材与仪器设备

Table 3-1 Main reagents、 consumables and Instruments used in this study

试剂、仪器设备与耗材 (各种生理生化试剂均为国产分析纯)	购买公司
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	南京诺为赞生物科技股份有限公司
2 × KeyPo Master Mix (Dye Plus)	
In-Fusion HD Enzyme Premix	宝生物工程(大连)有限公司
Pvu 1	

猫疱疹病毒I型 gD 蛋白单克隆抗体及荧光微球试纸条的研制

试剂、仪器设备与耗材 (各种生理生化试剂均为国产分析纯)	购买公司
EasyTaq DNA Polymerase	北京全式金生物技术有限公司
High Pure dNTPs (2.5 mM)	
DL2000 DNA Marker	北京擎科新业生物技术有限公司
DL15000 DNA Marker	
酵母提取物(Yeast extract)	OXOID 公司
胰蛋白胨 (Tryptone)	
恒温生化培养箱	上海博讯实业有限责任公司
立式高压蒸汽灭菌锅	
大振幅恒温摇床	武汉中科科仪技术发展有限责任公司
DK-S22 型恒温水浴锅	上海精宏试验设备有限公司
FiveEasy Plus PE28 pH 计	梅特勒-托利多(上海)有限公司
DYH-III 稳压电泳仪	
5424R 型冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
移液器	
SPX-160B 生化培养箱	上海福玛实验设备有限公司
4°C、-20°C、-80°C冰箱	海尔公司
DL-CJ-2NDI 超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
CR-GIII 高速离心机	日立公司
Nanodrop 2000 微量分光光度计	赛默飞世尔(上海)仪器有限公司
蛋白质 Marker	Theromfish 公司
His 标签的鼠一抗	
HRP 标记的鼠二抗	Southern Biotechnology 生物公司
质粒小提试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Magen 公司
Ni-NTA 树脂	上海碧云天生物技术公司
免疫佐剂 (弗氏完全/不完全佐剂)	北京博奥龙免疫技术有限公司
EDC-810 型 PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司

试剂、仪器设备与耗材 (各种生理生化试剂均为国产分析纯)	购买公司
凝胶成像系统	美国 Alpha 公司
DH-II 旋转混合仪	宁波新芝公司
Nanodrop 2000 微量分光光度计	赛默飞世尔(上海)仪器有限公司
时间分辨荧光微球	南京微测有限公司
HAT 添加剂	
HT 添加剂	
50%PEG	Sigma 公司
MES	
EDC	
NHS	
甘氨酸	北京鼎国生物科技有限公司
硝酸纤维素膜	
底板	上海杰一有限公司
样品垫	
结合垫	上海杰一有限公司
吸水纸	
平板式喷膜机	美国 Imagen 公司
手持紫外灯	本实验室提供
PY-120 水平摇床	北京鼎国生物公司
切纸机	得力文具文化商店

3.1.3 主要培养基及试剂配制

3.1.3.1 蛋白表达及纯化相关试剂

浓盐酸、过硫酸胺、无水乙醇、咪唑、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2)、二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钠(NaCl)、Tris-Base粉剂、聚丙烯酰胺均为购自国药集团化学试剂有限公司。

纯化用PBS: 称量 Na_2HPO_4 7.16 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.12 g, NaCl 29.22 g 混

匀溶解后，加去离子水定容至1 L，0.22 μm 滤膜过滤，常温保存。

20%乙醇：200 mL无水乙醇，加入800 mL去离子水，混匀，现配现用。

3.1.3.2 SDS-PAGE 和 Western Blot 相关试剂

BSA(bovine serum albumin)购自 Biosharp 公司。溴酚蓝、DTT 粉剂、SDS 粉剂、甘氨酸购自美国 MP 公司、丙三醇、Tween-20、冰醋酸、无水乙醇、甲醇、浓盐酸购自国药集团化学试剂有限公司。

5 \times SDS Loading buffer: 称量 SDS 1.0 g、溴酚蓝 0.01 g, 加入 1M Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL, 甘油 5 mL, 定容至 10 mL, 室温保存, 备用。

10% DTT: 称量 1.0 g DTT 粉剂, 溶于 10 mL 三蒸水中, 分装到 1.5 mL EP 管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 备用。

SDS-PAGE 电泳缓冲液: 现用现配, 称量 1.5 g Tris-Base, 7.2 g 甘氨酸, 0.5 g SDS, 溶于 500 mL 三蒸水中, 搅拌溶解待用。

考马斯亮蓝染色液配制: 称量 1.0 g R-250 粉剂, 溶解于 1 L 混合液 (40%无水乙醇, 10%冰醋酸, 50%三蒸水)中, 搅拌均匀, 滤纸过滤除去颗粒物质后室温放置。

考马斯亮蓝脱色液配制: 量取 200 mL 无水乙醇, 50 mL 冰醋酸, 加到 250 mL 三蒸水中, 混合均匀即可使用。

30%聚丙烯酰胺溶液: 称量 290 g 聚丙烯酰胺, 10 g N, N-亚甲基双丙烯酰胺于 1 L 烧杯中, 加入三蒸水 600 mL, 充分搅拌溶解, 转移至容量瓶定容 1L, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 于棕色瓶中 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

10%过硫酸铵溶液: 称量 1.0 g 过硫酸铵粉末, 加入 10 mL 三蒸水后搅拌溶解, 于棕色瓶中 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.5 M Tris(pH 8.8)溶液: 称量 182 g Tris-Base, 溶于 800 mL 三蒸水中, 搅拌溶解均匀, 用浓 HCl 调 pH 值至 8.8, 转移到容量瓶定容 1 L, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1M Tris (pH 6.8)溶液: 称量 121 g Tris-Base, 溶于 800 mL 三蒸水中, 搅拌溶解均匀, 用浓 HCl 调 pH 值至 6.8, 转移到容量瓶定容 1L, 用 0.22 μm 滤膜过滤后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

Western Blot 电转缓冲溶液: 现用现配, 称量 1.5 g Tris-Base, 7.2 g 甘氨酸, 加

400 mL 三蒸水搅拌溶解，再加 100 mL 甲醇混匀待用。

封闭液：含 2% BSA、5%脱脂乳的 TBST。

10×TBST Buffer：称量 24.2 g Tris-Base、88 g NaCl，加入 800 mL 三蒸水搅拌溶解，加入 5 mL Tween-20，混匀后用浓 HCl 调节 pH 值至 7.5，转移至容量瓶定容 1 L。量取 50 mL 该溶液，加入 450 mL 单蒸水混匀后即为 1×TBST。

HRP 标记的鼠二抗：1:10000 稀释至含有 2% BSA 的 TBST。

HRP 标记的猪二抗：1:5000 稀释至含有 2% BSA 的 TBST。

3.1.3.3 单克隆抗体制备和细胞培养相关试剂

RPMI-1640 基础培养基、双抗 (青-链霉素)购于美国 Thermo 公司。胎牛血清购于 GBICO 公司。

RPMI-1640 完全培养基：RPMI-1640 基础培养基 79 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL。

HAT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HAT(50×)2 mL。

HT 培养基：RPMI-1640 基础培养基 77 mL，胎牛血清 20 mL，双抗 1 mL，HT(50×)2 mL。

50%PEG：用灭菌的 EP 管分装成 1 mL 每支，4℃保存，融合当天取一支于恒温水浴锅中温于至 37℃备用。

胎牛血清：-80℃保存的血清置于 4℃溶解后，56℃水浴灭活半小时后，上下颠倒混匀，4℃保存。

3.1.3.4 核酸试剂及培养基配制

LB 液体培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，NaCl 5.0 g，加入 900 mL 去离子水，搅拌均匀，定容至 1 L，121℃高压蒸汽灭菌 20 min，室温保存备用。

LB 固体培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，NaCl 5.0 g，加入 900 mL 去离子水，搅拌均匀，加 15 g 琼脂，定容至 1L，121℃高压蒸汽灭菌 20 min，室温保存备用。

1×PBS：称量 8 g 氯化钠，0.2 g 氯化钾，1.42 g 磷酸氢二钠，0.27 g 磷酸二氢钾，使用浓盐酸将 pH 值调节至 7.4，然后加入去离子水将溶液定容至 1 L，0.22 μm 滤器

过滤，121°C高压蒸汽灭菌 20 min，室温保存。

50×TAE 缓冲液：称量 242 g Tris，37.2 g Na₂EDTA·2H₂O，加 800 mL 去离子水充分搅拌溶解后，加入 57.1 mL 冰乙酸，定容至 1L，室温保存。

1×TAE 缓冲液：量取已配制的 50×TAE 缓冲液 10 mL，加入 490 mL 去离子水充分混匀后使用。

80%甘油溶液：量取 80 mL 丙三醇，加入 20 mL 去离子水，混匀后，121°C高压灭菌 20 min 后室温保存。

50 mg/mL 氨苄青霉素：称量 1 g 氨苄青霉素，用 20 mL 灭菌水溶解，然后分装储存于-20°C备用。

3.2.3.5 时间分辨荧光微球试剂配制

封闭液：用电子天平准确称取 0.1 g BSA 充分溶解于 10 mL 超纯水中。

磷酸缓冲盐溶液(PBS):准确称取 0.2 g 磷酸氢二钾、2.9 g 十二水合磷酸氢二钠、8.7 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，溶于超纯水中，调节 pH 至 7.4，最后定容至 1000 mL。

MES 缓冲液：称取 1.065 g 的 2-(N-吗啉)乙磺酸充分溶解于 90 mL 超纯水中，用氢氧化钠调节 pH 为 6.0，最后定容至 100 mL。

NHS 溶液：称取 5 mg NHS 充分溶解于 1mL MES 缓冲液中，现配现用。

EDC 溶液：称取 5 mg EDC 充分溶解于 1 mL MES 缓冲液中，现配现用。

0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液：准确称取 1.2 g Tris，溶于 100 mL 超纯水中，配制 0.05 mol/L Tris 溶液，再吸取 8.36 mL 的浓盐酸用超纯水定容至 100 mL，使用盐酸稀释液调节 Tris 溶液 pH 至 10.5。

3.2 试验方法

3.2.1 FHV-gD 蛋白高密度表达

将冻存的 FHV-gD CHO 细胞复苏后，连续传 2 代，待其细胞状态良好时，按照 1×10^6 细胞/mL 的密度，接种于 50 mL 15 μ M MSX 浓度的 CD04 培养基中，于 5% CO₂，

37°C, 120 rpm 摇床中培养。每天取样计算细胞密度, 并进行台盼蓝染色计存活率, 检测葡萄糖浓度, pH 值。在接种后第 1、3、5 天补加 5 % Feed A, 1 % Feed B 补料培养基, 第 7、9 天补加 7.5 % Feed A, 1% Feed B 补料培养基, 当葡萄糖浓度低于 3 g/L 时, 使用 200 g/L 的葡萄糖浓缩液补充葡萄糖浓度至 6 g/L。培养至细胞密度在 $1\sim 2\times 10^7$ 细胞/mL 左右, 细胞存活率 80%左右时收获上清。

3.2.2 FHV-gD 蛋白纯化

(1) 过滤: 将收获的细胞悬液按 1000 r/min 5 min 离心两次, 取上清, 将上清使用 0.45 μm 的滤膜进行过滤。

(2) 孵育: 滤液加入 500 mM 咪唑, 使滤液中所含咪唑的终浓度为 10 mM, 向滤液中加入适量已去乙醇及平衡的树脂, 在 4°C 冰箱中使用转子进行混合孵育 3 h。

(3) 纯化: 孵育完成后, 800 r/min 离心 5 min, 取树脂填入亲和层析柱中, 再使用不同浓度的咪唑(3~10%)进行杂蛋白洗杂和目的蛋白洗脱(30~50%)。可根据培养体积及表达量适当增加洗杂及洗脱的体积。

(4) 检测: 随后取样跑 SDS-PAGE 凝胶确定洗脱蛋白的纯度, 收集较纯的蛋白进行透析或脱盐。

(5) 透析: 将收集的蛋白洗脱液装至透析袋中, 密封后浸泡于 0.01 M PBS 缓冲液中, 4°C 静置 3~4 h 后换液, 重复 5~6 次, 去除咪唑。

(6) 浓缩: 将透析完成的蛋白样置于蔗糖上, 待蔗糖融化时更换新的蔗糖, 直到蛋白溶液体积浓缩至 2 mL 左右, 收集到 EP 管中进行冻存。

3.2.3 纯化蛋白反应性检测

制备 SDS-PAGE 凝胶, 制胶槽中灌入 2/3 的相应浓度的分离胶, 随后立即加入 ddH₂O 封胶。静置半小时, 待分离胶凝固后将 ddH₂O 倒出, 吸干 ddH₂O, 然后灌入 5% 的浓缩胶, 立即插入梳子, 静置 20 min, 待浓缩胶凝固后, 拔出梳子。然后上样电泳, 取 10 μL 样品, 直接上样到 SDS-PAGE 凝胶加样孔内。浓缩胶采用 80 V 恒压电泳 30 min, 分离胶采用 120 V 恒压电泳 1 h, 电泳至溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 2 h, 脱色液脱

色 2 h, ddH₂O 脱色 1 h 后分析结果。

Western Blot 电转步骤: 电转 Buffer 提前预冷, SDS-PAGE 凝胶切去浓缩胶, 电转夹板先铺一层海绵, 加两层滤纸 (均用预冷电转 Buffer 浸泡) 放上凝胶, 轻轻铺上硝酸纤维素(NC)膜, 再依次叠放上两层滤纸和海绵 (全程保证无气泡)。100 V 恒压电泳 1h (全程冰浴进行)。

加入脱脂乳封闭液摇床封闭 1 h, TBST 洗 3 遍, 一抗孵育 1 h, TBST 洗 3 遍, 二抗孵育 45 min, TBST 洗 5 遍, 显色。

3.2.4 动物免疫

将纯化的 FHV-gD 蛋白, 与弗氏佐剂等体积混合后, 使用乳化仪进行乳化, 按 100 μg/只的抗原量, 通过皮下或腹腔注射 6 周龄的 BALB/c 雌鼠 3 只, 具体免疫程如表 3-2 所示。尾部采血测定免疫鼠血清抗体效价, 当血清抗体效价达 1:5000~1:10000 时进行细胞融合。

表 3-2 小鼠免疫程序

Table 3-2 Immunization Schedule for Mice

免疫	佐剂	剂量	免疫途径
一免	弗氏完全佐剂	100 μg/只	皮下
二免	弗氏不完全佐剂	100 μg/只	腹腔+皮下
三免	弗氏不完全佐剂	100 μg/只	腹腔+皮下
加强免疫	无	50 μg/只	腹腔
加强免疫	无	50 μg/只	腹腔

3.2.5 间接 ELISA 筛选方法的建立

(一) FHV-gD 蛋白筛选条件摸索

将纯化的 CHO 表达的 FHV-gD 蛋白以及 CHO 杂蛋白流出液分别在碳酸盐包被缓冲液中稀释成不同浓度, 进行抗原包被浓度的摸索, 具体步骤如下:

(1) 设置不同梯度的抗原包被量, 蛋白和流出液以 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 进行包被。100 μL/孔, 4°C 包被过夜;

(2) 弃去 (1) 中板子内的包被液, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μL /孔, 吸水纸拍干, 以 5% 脱脂乳和 2% BSA 进行封闭, 100 μL /孔, 37°C 温育 1 h;

(3) 弃去 (2) 中的封闭液, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μL /孔, 吸水纸拍干, -20°C 保存备用或即用;

(4) 将采集的小鼠阳性血清用 2% BSA 以 1:1000 的稀释度进行稀释, 100 μL /孔, 37°C 温育 1 h;

(5) 将 (4) 中的一抗弃去, 用 PBST 清洗板子 3 次, 200 μL /孔, 吸水纸拍干, 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的 IgG 酶标羊抗鼠二抗, 100 μL /孔, 37°C 温育 45 min;

(6) 弃去 (5) 中的二抗, PBST 清洗板子 3 次, 吸水纸拍干, 加入配制好的 TMB 显色液, 100 μL /孔, 37°C 显色孵育 15 min;

(7) 显色结束后, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 每孔 50 μL /孔, 测定 OD_{450} 值, 进行数据分析确定抗原最佳工作浓度;

(8) 以 (7) 中摸索好的抗原包被浓度, 包被 15 块 96 孔酶标板, 按照 ELISA 常规操作步骤进行杂交瘤细胞筛选, 挑取 P 值高、且 P/N 值高的细胞孔, 扩大并进行亚克隆。

(二) FHV 病毒筛选条件摸索

将超离浓缩 FHV-1 病毒以及 CRFK 细胞裂解液分别在碳酸盐包被缓冲液中稀释成不同浓度, 进行抗原包被浓度的摸索, 具体步骤如下:

设置不同梯度的抗原包被量, FHV-1 超离病毒以 1: 50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 进行包被; CRFK 细胞裂解液以 1:10 进行包被, 100 μL /孔, 4°C 包被过夜; 其余步骤参照 3.2.5 中 (2) ~ (8)。

3.2.6 免疫鼠血清抗体效价检测

小鼠第 3 次免疫 14d 后剪尾采血, 分离血清。从 1:1000 开始将血清进行 2 倍比稀释, 用提前包被好 FHV-gD 蛋白的 ELISA 板测定免疫小鼠和 SPF 小鼠血清的效价。用间接 ELISA 方法检测小鼠腹水抗体效价, 操作程序为: 将小鼠血清作为一抗, 从 1:1000 开始依次 2 倍比稀释至 1: 10240, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞上清液作为阴性对照, 检测血清的最大效价, 效价达 5000-10000 时进行细胞融合。

3.2.7 免疫脾细胞的制备

(1) 将进行了冲击免疫的小鼠摘眼球放血后用颈椎脱臼法处死并收集血清为阳性血清，75%酒精浸泡 5 min，消毒皮毛；

(2) 在超净工作台中将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剪破脾脏外膜；

(3) 将脾脏置于 10 mm 细胞平皿中，加 3~5 mL RPMI-1640 基本培养基，止血钳拔出 5 mL 注射器内芯，用白色端挤压出脾脏细胞，之后用适量 1640 基本培养基将脾细胞重悬，再将脾细胞悬液通过 200 目的细胞筛，除掉脂肪或组织块。将收集的细胞悬液 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，该步骤重复 2 次，1640 基础培养基重悬细胞，计数后放 37°C、5% CO₂ 培养箱备用。

3.2.8 饲养细胞的制备

(1) 取一只未免疫的 BALB/c 鼠，摘眼球放血后颈椎脱臼法处死，收集血清为阴性血清；

(2) 75%酒精中浸泡 5 min，皮毛消毒。无菌状态下将小鼠固定于解剖板上，后肢交叉固定，用无菌镊子夹住下腹部皮肤，剪一小口，撕开皮肤露出腹膜，换一套镊子和剪刀，剪开腹膜，暴露出脾脏，再换一套剪刀镊子，用镊子夹住脾脏，用剪刀去掉粘连的脂肪组织，剥离脾脏，置于匀浆器中。加入 3 mL RPMI-1640 基本培养基充分研磨，再补加 RPMI-1640 基本培养基至 10 mL，静置 2 min，吸取上层的细胞悬液于 15 mL 离心管备用；该步骤重复两次；

(3) 1000 r/min 离心 10 min 后弃上清，RPMI-1640 基本培养基清洗两遍，之后用 RPMI-1640 完全培养基重悬，以 40%左右的密度铺 5 块 96 孔细胞培养板，100 μ L/孔，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中待用。

3.2.9 细胞融合

(1) 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞以 1:5 的比例在 50 mL 离心管中混匀，1000 r/min 离心 10 min，弃去上清，用灭菌滤纸吸干离心管侧壁液体，轻轻弹击离心管管底，使细胞沉淀略加松动，以细胞将要顺管壁下流为准；

(2) 将该离心管正置于 38°C 恒温水浴锅中，保证管底完全浸入水中，在 1 min 内缓慢滴入 1 mL 预温至 38°C 的 50% PEG，边加边轻轻用吸管搅拌。加完后继续搅拌 1 min，然后静置 45 s；

(3) 缓慢加入 38°C 预热的 RPMI-1640 基本培养基 40 mL。具体方案为：第 1 min 缓慢加入 1 mL，第 2 min 缓慢加入 1 mL，第 3~5 min 缓慢加入 3 mL，最后缓慢加入 35 mL 培养基，整个过程 20 min 左右。加培养基时需缓慢加入，并不断轻轻地搅拌；将融合后的细胞悬液正置于 37°C、5% CO₂ 培养箱放置 10 min，室温 1000 r/min 离心 10 min 后弃掉上清，用 HAT 培养基重悬融合细胞，用 1 mL 枪头均匀滴加入 5 块已经铺过饲养细胞的 96 孔细胞培养板中，约 100 μL/孔，置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养；

(4) 次日观察细胞有无污染，8~10 d 时将 HAT 培养基更换为 HT 培养基。待融合细胞集落长至培养孔 50% 时，即可通过间接 ELISA 对细胞上清进行抗体检测。

3.2.10 阳性细胞的亚克隆

采用有限稀释法对间接 ELISA 筛选的 FHV-gD 蛋白和 FHV-1 病毒均是阳性的杂交瘤细胞进行亚克隆，具体操作流程如下：

(1) 将初筛阳性的细胞孔内的培养基小心弃去，向孔中加入 200 μL 的 RPMI-1640 完全培养基，用移液器将孔内的细胞轻轻吹散，按照一定比例进行稀释，吸取 10 μL 于细胞计数板上，在显微镜下对细胞进行观察计数，计算出细胞的密度。

(2) 采用有限稀释法对杂交瘤细胞悬液进行逐步稀释，使最终细胞密度为 1000 个/mL，吸取 100 μL 稀释好的细胞悬液加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基中，充分混匀后，均匀滴加到 96 孔细胞培养板中，使每孔的细胞密度控制在 1 个/孔，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

(3) 3d~5d 后在显微镜下观察亚克隆的杂交瘤细胞的生长状况，将只含有单克隆的细胞孔做好标记。

(4) 待细胞板中细胞密度铺满 20~30% 时，再用间接 ELISA 筛选方法对单克隆细胞孔筛选。

(5) 将第一次亚克隆阳性的细胞进行第二次亚克隆，直至亚克隆的细胞阳性率达到 100%，即可筛选出稳定分泌抗体的单克隆细胞。

(6) 在每次亚克隆的同时将每次筛选为阳性的杂交瘤细胞进行扩大培养、冻存，以防止亚克隆过程中细胞的丢失及其他意外情况的出现。

3.2.11 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定

取杂交瘤细胞上清，使用 SBA Clonotyping System-HRP 试剂盒进行 ELISA 试验。具体操作如下：

(1) 将步骤 3.2.1.5 中包被好的抗原板从 -20℃ 取出解冻，将 100 μ L 杂交瘤上清添加到每个孔中，并置于 37℃ 作用 1 h；

(2) 弃上清，用 PBST 清洗 3 次，吸水纸拍干，加入 1:500 稀释的 HRP 标记的检测抗体，包括 Ig screening antibody、IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、kappa、Lambda，每孔 100 μ L/孔，37℃ 孵育 45 min；

(3) 弃去检测抗体，用 PBST 清洗板子 3 次，吸水纸拍干，加入配置好的 TMB 显色液，100 μ L/孔，37℃ 显色孵育 15 min；

(4) 显色结束后，以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应，测定 OD₄₅₀ 值。

3.2.12 杂交瘤细胞株染色体计数

(1) 秋水仙素处理：取目的代次的、处于对数生长期的细胞，加入使秋水仙素使其终浓度为 0.1 μ g/mL，继续培养 4~5 h。

(2) 获取细胞：重悬细胞，150 g 离心 5 min，去除秋水仙素。将细胞重悬于 5~7 mL 低渗 0.075% KCl 溶液中，37℃ 温育 15 min。

(3) 预固定：加入 1~2 mL 新鲜配制的固定液到低渗后的溶液中，轻轻混匀，150 g 离心 5 min，去上清。

(4) 一次固定：加入 5~7 mL 的新鲜固定液混匀室温下固定 15 min。150 g 离心 5 min，去除上清。

(5) 二次固定：加入 5~7 mL 的固定液，混匀室温下固定 15 min，150 g 离心 5 min，去除上清。

(6) 滴片：加入一定量的固定液(固定液的量视最后离心所得细胞的量而定)，轻轻混匀，制成悬液取出悬液从一米高处滴两滴于载玻片上，然后立即置于预热好的 72°C 烤箱中烤干。

(7) 染色：用吉姆萨染液染 10~15 min，流水冲洗，风干后镜检。

(9) 观察：显微镜下确定 5 个处于有丝分裂中期的细胞进行检查，观察并比较各代细胞的染色体标志，计算各代细胞的染色体模式数的差异，观察染色特征是否一致，且是否符合文献中该细胞的染色体特征。

3.2.13 杂交瘤细胞株分泌抗体特异性分析

(1) 病毒感染 48 孔板：待 48 孔板中 CRFK 细胞长满单层，用 FHV、FPV、FCV 分别接种细胞，待细胞大部分病变但未脱落时固定。

(2) 固定：PBS 洗 3 遍，4%多聚甲醛 200 μ L/孔，室温静置 20~30 min。

(3) 透化：PBS 洗 3 遍，0.2% Triton-100 200 μ L/孔，室温静置 20~30 min。

(4) 封闭：PBS 洗 3 遍，10%山羊血清，室温 1h 孵育。

(5) 一抗：PBS 洗 3 遍，单抗上清 (原倍)、阳性鼠血清、阴性鼠血清、SP2/0 细胞上清液、PBS，37°C 孵育 1 h。

(6) 二抗：PBS 洗 3 遍，FITC488 荧光鼠二抗 1:250 稀释，37°C 孵育 1 h。

(7) 染色：PBS 洗 3 遍，Dapi 染色液 1:2000 稀释，室温孵育 10 min。

3.2.14 杂交瘤细胞株分泌抗体结合表位交叉性验证

相加 ELISA 步骤参照文献(Woo 2012):

(1) 固定适当浓度的抗原 (使得在此固定抗原浓度下，抗体过饱和的 OD₄₅₀ 读值在 1~1.5 之间)。

(2) 将一株单抗上清标记为 A, 另一株记为 B, 分别将 A 和 B 加入不同的孔中, 同时做等体积的 A+B 为一抗, (同时做 2A 和 2B 以便确定加入的单抗上清是否过量)。孵育 1 h, PBST 洗 3 遍。

(3) 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 孵育 45 min, PBST 洗 5 遍。

(4) 加入 TMB 显色, 测定 OD₄₅₀ 值。

(5) 判定标准: 当 A+B>A 或 B 单独的读值时, 则表明 A 和 B 两株单克隆抗体识别的表位有区别; 当 A+B<A 或 B 单独的读值时, 则表明 A 和 B 两株单克隆抗体识别的表位相同或相近。

(6) 算出两株单抗的 $AI=[2 \times A_{(1+2)}-(A_1+A_2)]/A_{(1+2)} \times 100\%$ (徐正中等 2015)。

3.2.15 杂交瘤细胞株分泌抗体中和试验

根据实验室测定的 FHV-1 TCID₅₀ 值, 将 FHV-1 悬液稀释成 200 TCID₅₀/0.1mL。将收集的杂交瘤细胞上清液与病毒液体积 1: 1 (50 μL+50 μL)混合, 37℃孵育 1 h 后加入到长满单层的 CRFK 细胞中, 每孔 100 μL, 每个稀释度重复 4 个孔。同时设置细胞对照、病毒组对照、阴阳性血清对照、S/P20 细胞上清液。每天观察细胞病变情况, 显微镜下观察细胞病变 3~7 d。一半以上细胞出现 CPE 的孔视为中和阳性, 该血清稀释倍数即为血清抗体效价。

3.2.16 腹水的制备

选取健康状况良好的 15 周龄以上 BALB/c 雌鼠, 每株单克隆抗体分别注射 3 只小鼠, 将腹水制备佐剂以 0.5 mL/只的量进行腹腔注射。10 d 后, 将计数好的杂交瘤细胞注射入小鼠腹腔 (1~2×10⁵ 个/只)。每天观察小鼠腹部变化, 待小鼠腹部膨大后, 采集腹水。收集的腹水进行处理, 具体步骤如下:

(1) 4℃ 1000 r/min 离心 5 min (离心红细胞及其他杂质)。

(2) 离心后吸取上清, 4℃ 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清。

(3) 加入石英砂后在旋转混合仪上过夜孵育去除脂肪, 4℃ 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清, -80℃保存备用。

3.2.17 腹水抗体效价的测定

用间接 ELISA 方法检测小鼠腹水抗体效价，操作程序为：以 FHV-gD 蛋白作为包被抗原，将小鼠腹水作为一抗，从 1:10² 开始依次 10 倍比稀释至 1:10¹⁰，以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。同时 SP2/0 骨髓瘤细胞上清液作为阴性对照，检测单抗腹水的最大效价。

3.2.18 腹水抗体纯化

（一）辛酸-硫酸铵法初步纯化

辛酸-硫酸铵法提纯 IgG 的原理是(张凡 2023)：在酸性条件下(pH=4.5)非 IgG 的蛋白成份能被辛酸等短链脂肪酸沉淀，上清中剩余的蛋白主要为 IgG，再用硫酸铵沉淀上清，即可获得纯度较高的 IgG。但需要注意的是，辛酸沉淀与一些抗体的亲和性下降有关，并且不适用于纯化小鼠的 IgA 和 IgG3(Woo 2012)。

其具体操作步骤如下：

- （1）采集的腹水加入 4 倍体积的乙酸钠缓冲溶液(pH 4.8)。
- （2）室温条件下，逐滴加入辛酸并搅拌（每毫升腹水加入 33 μ L 辛酸），加入时注意，待前一滴完全溶解后再加入另一滴。加入辛酸后搅拌 30 min，4 $^{\circ}$ C 静置 2 h 以上使其充分沉淀。
- （3）在 4 $^{\circ}$ C 条件下，12000 r/min 离心 30 min，吸取上清。
- （4）上清液用 0.22 μ M 滤膜过滤进行过滤，加入 0.1 倍体积的 10 \times PBS (0.1 mol pH7.4)，用 2 M NaOH 调 pH 值至 7.4。上述混合液中加入等体积的饱和硫酸铵溶液，在冰上操作，逐滴缓慢加入并搅拌 30 min。
- （5）静置 2 h，在 4 $^{\circ}$ C 条件，12000 r/min 离心 30 min，弃上清。用 100 mM Tris 盐酸缓冲溶液重悬沉淀，用 50~100 倍体积的缓冲液透析，4 $^{\circ}$ C 透析过夜，每隔 12 h 换液一次。
- （6）4 $^{\circ}$ C 条件下，12000 r/min 离心 30 min，吸取上清。

（二）Protein G 柱再次纯化

- （1）结合缓冲液流过柱子，在流液状态下装柱子。
- （2）5 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子，1 mL/min。

(3) 按照 5~10 mg/mL 柱子的载量来准备样品, 调节样品的流速至 1 mL/min, 样品自循环排气。

(4) 打开上样阀, 开始上样, 循环上样 30~60 min, 样品冰浴。

(5) 用 5 倍柱体积的结合缓冲液洗涤柱子, 1 mL/min, 收集峰值时流出的杂蛋白。

(6) 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行洗脱, 1 mL/min, 峰值时流出液用含 60 μ L 中和缓冲液的 EP 管接收, 每支 1 mL 左右。

(7) 洗脱完毕, 立即用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子, 再用 20%的乙醇浸泡, 4 $^{\circ}$ C过夜保存。

3.2.19 纯化后腹水抗体的检验

使用 A280nm 紫外光吸收法测定腹水纯化后的抗体含量, 并采用 SDS-PAGE 检验纯化后单抗的纯度: 每株单抗分别取 40 μ L 样品, 加入 10 μ L 5 \times SDS-PAGE Loading buffer, 混匀后煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 5000 r/min 离心 5 min。将处理后蛋白样品点样 10 μ L 于蛋白胶孔, 并点样 5 μ L 蛋白 Marker 于相邻孔道, 上层浓缩胶于 80 V 电压下电泳 30 min, 而后调整电压到 120 V, 于分离胶电泳 60 min。待电泳结束, 小心剥离凝胶, 加入考马斯亮蓝 R-250 染色液(完全浸没凝胶), 置于摇床上染色 1 h。染色结束后, 将考马斯亮蓝 R-250 染色液回收, 将凝胶浸泡在考马斯亮蓝脱色液中, 置于摇床上, 每隔 30 min 换一次脱色液直至脱色完全。最后将凝胶放于凝胶成像系统观察并保存结果。将蛋白含量较高纯度较好的单抗混合后进行透析脱盐。透析后将单抗分装保存备用。

3.2.20 5E-6 单抗中和效价测定

根据实验室测定的 FHV-1 TCID₅₀ 值, 将 FHV-1 悬液稀释成 100 TCID₅₀/0.1mL。将纯化前 5E-6 的腹水从 1: 100 开始 10 倍比稀释, 稀释 10 个梯度, 每个梯度抗体悬液与病毒液体积 1:1 (50 μ L+50 μ L)混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后加入到长满单层的 CRFK 细胞中, 每孔 100 μ L, 每个稀释度重复 4 个孔。同时设置细胞对照, 病毒组对照, SPF 鼠血清对照。每天观察细胞病变情况, 显微镜下观察细胞病变 3~7 d。一半以上

细胞出现 CPE 的孔视为阳性，该血清稀释倍数即为血清效价。待检血清的中和指数大于 50，即可判为阳性，10~49 为可疑，小于 10 为阴性。

3.2.21 单克隆抗体的反应性分析

利用 Western Blot 试验对杂交瘤细胞培养上清进行反应性分析，具体步骤如下：

取 10 μ L FHV-gD 蛋白样品、10 μ L FHV-1 病毒样品，直接上样到 SDS-PAGE 凝胶加样孔内。浓缩胶采用 80 V 恒压电泳 30 min，分离胶采用 120 V 恒压电泳 1 h，电泳至溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。

Western Blot 电转步骤：电转 Buffer 提前预冷，SDS-PAGE 凝胶切去浓缩胶，电转夹板先铺一层海绵，放上凝胶，轻轻铺上硝酸纤维素(NC)膜，再叠放上海绵（全程保证无气泡）。100 V 恒压电泳 1 h (全程冰浴进行)。

加入脱脂乳封闭液摇床封闭 1 h，使用 1 \times TBST 洗 3 遍，每遍 5 min。分别加入 5E-6 细胞上清液和 His 标签抗体作为一抗，37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 1 h，孵育结束后用 TBST 洗 3 遍，每遍 5 min。二抗 37 $^{\circ}$ C 震荡孵育 45 min，TBST 洗 5 遍，每遍 5 min。使用显色液在化学发光仪进行显色。

3.2.22 FHV-gD 截短重组蛋白构建策略

对 FHV-gD 蛋白序列进行截短，与 sfGFP 蛋白串联后以原核表达系统表达蛋白，将 FHV-gD 基因序列截短成 17 个重叠片段，截短方案如下图 3-2、表 3-3 所示。

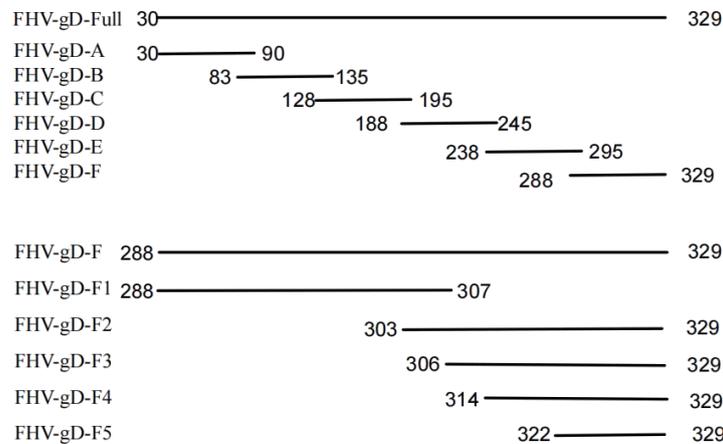


图 3-2 FHV-gD 截短蛋白构建示意图

Fig. 3-2 Construction diagram of FHV-gD truncated protein

表 3-3 FHV-gD 截短蛋白序列表

Table 3-3 FHV-gD truncated protein sequence list

序号	截短蛋白序列 (N 端~C 端)	区域
FHV-gD-f1	PIISDDDVPTAPPKGMNNQ	308~329aa
FHV-gD-f2	IISDDDVPTAPPKGMNNQ	310~329aa
FHV-gD-f3	SDDDVPTAPPKGMNNQ	312~329aa
FHV-gD-f4	NVPIISD	306~314aa
FHV-gD-f5	NVPIISDDD	306~316aa
FHV-gD-f6	NVPIISDDDV	306~318aa

3.2.23 引物设计

本研究参考 pET-23a-sfGFP-FHV-gD 质粒的基因组序列, 利用 primer premier5.0 生物软件设计引物, 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列见表 3-4。

表 3-4 本研究所用的 PCR 引物

Table 3-4 PCR primers used in this study

序号	引物	序列(5'~3')	用途
1	pET-23a-J D-F	ACTATAGGGAGACCACAACGGT	鉴定插入质粒 的不同片段
2	pET-23a-J D-R	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCG	
3	pET-23a- ZT-F	GGTGGTGGTGGTAGCCATCATCA	PCR 扩增 pET-23a-sfGFP 载体片段
4	pET-23a- ZT-R	ACCCTGGA AATACAGATTTTCTTTATACAGTTCATCCA	

续表

序号	引物	序列(5'~3')	用途
34	F5-R	TCGCTAATAATAATCGGCACATTACCCTGGAAATACAGATT TTCTTTATA	
35	f1-F	CCGATTATTATTAGCGATGATGATGTTCCGAC	
36	f1-R	GCTAATAATAATCGGACCCTGGAAATACAGATTTTC	
37	f2-F	ATTATTAGCGATGATGATGTTCCGACCGC	
38	f2-R	ATCATCGCTAATAATACCCTGGAAATACAGATTTTCTT TATAC	融合引物
39	f3-F	AGCGATGATGATGTTCCGACCG	
40	F3-R	AACATCATCATCGCTACCCTGGAAATACAGATTTTCTTTATA C	
41	f4-F	AATGTGCCGATTATTATTAGCGATGGTGGTGGTGGTAGCCA TCATCATC	
42	f4-R	ATCGCTAATAATAATCGGCACATTACCCTGGAAATACAGAT TTTCTTTATAC	
43	f5-F	GATGATGGTGGTGGTGGTAGCCATCATC	
44	f5-R	GATGGCTACCACCACCACCATCATCATCGCTAATAATAATC GGCAC	
45	f6-F	GATGATGTTCCGGGTGGTGGTGGTAGCCATCATCATC	
46	f6-R	CGGAACATCATCATCGCTAATAATAATCGGCACATTACCCT GG	

3.2.24 目的片段扩增

FHV-gD 截短片段的扩增，采用表 3-8 中第 5-46 条引物和 Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增，A、B、C、D、E、F 截短目的片段大小分别为 180 bp、159 bp、204 bp、174 bp、174 bp、126 bp，F1、F2、F3、F4、F5 目的片段大小分别为 4512 bp、4530 bp、4488 bp、4512 bp、4467 bp，f1、f2、f3、f4、f5、f6 目的片段大小分别为 4506 bp、4500 bp、4494 bp、4470 bp、4476 bp、4482 bp。Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增目的片段的 PCR 反应体系如表 3-5 所示，反应条件如表 3-6 所示。

表 3-5 PCR 扩增目的片段的反应体系

Table 3-5 The reaction system for PCR amplification of the target fragment

System composition	Reagent dosage
5×SF Buffer (with 10 mmol/L MgSO ₄)	10 μL
dNTP Mix (10mmol/L each)	1 μL
25 mmol/L MgSO ₄	2 μL
Forward Primer (10μmol/L)	2 μL
Reverse Primer (10μmol/L)	2 μL
Template	100 ng
Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
ddH ₂ O	up to 50 μL

表 3-6 PCR 扩增目的片段的反应条件

Table 3-6 The reaction conditions of PCR amplification of the target fragment

Temperature	Time	Cycles
95°C	5 min	} 33
95°C	10 sec	
60°C	10 sec	
72°C	15 sec/kb	
72°C	5 min	
25°C	1 min	

3.2.25 载体片段扩增

使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增 pET-23a-sfGFP 原核质粒载体, 用表 3-4 中的引物 pET-23a-ZT-F/R 和表 3-7 的 PCR 反应体系及表 3-8 的 PCR 反应条件进行载体扩增, 目的片段大小为 4446 bp。退火温度根据引物的最佳退火温度确定为 60°C, 延伸时间根据目的片段的大小设置为 2 min30 s。

表 3-7 PCR 扩增载体的反应体系

Table 3-7 The reaction systems for PCR amplification vectors

System composition	Reagent dosage
2 × Phanta Max Buffer	25 μL
dNTP Mix (10 mM each)	1 μL
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 μL
Forward Primer (10 μmol/L)	2 μL
Reverse Primer (10 μmol/L)	2 μL
Template	100 ng
ddH ₂ O	up to 50 μL

表 3-8 PCR 扩增载体的反应条件

Table 3-8 The reaction conditions for PCR amplification vectors

Temperature	Time	Cycles
95°C	3 min	} 32
95°C	15 sec	
60°C	15 sec	
72°C	30~60 sec/kb	
72°C	5 min	

3.2.26 PCR 产物的纯化

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，用 Magen 琼脂糖凝胶糖 DNA 回收试剂盒进行纯化。操作步骤参考试剂盒说明书，具体如下：

(1) 配制合适浓度的琼脂糖凝胶，电泳分离 DNA 片段。当 DNA 片段分离后，把凝胶放置于紫外灯下，快速切下含目的 DNA 片段的凝胶，并尽量去除多余的凝胶。

(2) 称量凝胶块的重量，并转移至 2 mL 离心管中。按 100 mg 凝胶块相当 100 μL 体积计算，加入 1~3 倍体积 Buffer GDP。55°C 水浴，让凝胶块完全溶解。水浴期

间,颠倒混匀3次加速溶胶。若凝胶块重量为200 mg,则加入200~600 μL Buffer GDP。凝胶浓度超过2.0%时,加入2~3倍体积的Buffer GDP。处理超过5 kb的片段,加3倍凝胶体积Buffer GDP溶胶后,再加入1倍凝胶体积异丙醇混匀后,再按第(3)步进行操作。

(3) 短暂离心收集管壁上的液滴。将HiPure DNA Mini Column套在2 mL离心管中。把溶胶液转移至柱子中,12000 r/min离心1 min。

(4) 倒弃滤液,把柱子套回2 mL离心管中。把剩余的溶胶液转移至柱子中,12000 r/min离心1 min

(5) 倒弃滤液,把柱子套回2 mL离心管中。加入300 μL Buffer GDP至柱子中。静置1 min,12000 r/min离心1 min。

(6) 倒弃滤液,把柱子套回2 mL离心管中。加入600 μL Buffer DW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中,12000 r/min离心1 min,重复此操作步骤一次。

(7) 倒弃滤液,把柱子套回2 mL离心管中。12000 r/min离心2 min,打开柱子的盖子,空气干燥5 min以彻底去除乙醇。

(8) 把柱子套在1.5 mL离心管中,加入15~30 μL Elution Buffer至柱子膜中央。室温放置2 min,12000 r/min离心2 min。

(9) 重复操作步骤(8),弃柱子,做好标记,把DNA保存于 -20°C 。

3.2.27 载体片段线性化

将纯化后的载体用DpnI酶进行线性化以便于下步目的片段与载体的融合,质粒线性化反应体系如3-9所示,配制体系后,涡旋混匀,在 37°C 水浴锅中反应30 min。

表 3-9 质粒线性化反应体系

Table 3-9 plasmid linearization reaction system

System composition	Reagent dosage
DpnI	1 μL
Template	10 μg
10 \times K Buffer	2 μL
ddH ₂ O	up to 20 μL

3.2.28 融合质粒载体和插入片段

利用融合 PCR 技术，将 FHV-gD 截短目的基因片段连接至 pET-23a-sfGFP 原核质粒载体上。融合 PCR 的原理是采用具有互补末端的引物，扩增出有重叠链的 PCR 产物，再通过融合酶的作用，将两个具有重叠链的不同 PCR 产物片段连接起来，若是目的片段与质粒载体片段融合成完整的质粒，其产物可直接转化到 DH5 α 感受态细胞中。融合 PCR 的反应体系中 DNA 片段与载体片段的摩尔比 3:1~10:1，插入片段添加量不超过 200 ng。融合体系如表 3-10 所示，反应条件如表 3-11 所示。

表 3-10 融合 PCR 的反应体系

Table3-10 The reaction system of fusion PCR

System composition	Reagent dosage
Purified PCR fragment	10~200 ng
Linearized vector	50~200 ng
5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix	4 μ L
ddH ₂ O	up to 20 μ L

表 3-11 融合 PCR 的反应条件

Table 3-11 The Reaction conditions of fusion PCR

Temperature	Time
37 $^{\circ}$ C	15 min
50 $^{\circ}$ C	8 min
52 $^{\circ}$ C	8 min
54 $^{\circ}$ C	8 min
58 $^{\circ}$ C	8 min
60 $^{\circ}$ C	8 min
25 $^{\circ}$ C	1 min

3.2.29 融合产物的转化

融合 PCR 结束后取 10 μL 产物直接转化至 DH5 α 感受态细胞中。转化步骤如下：

- (1) 取出在 -80°C 冰箱中保存的感受态细胞，置于冰上解冻。
- (2) 待感受态细胞解冻后，无菌环境下取 10 μL 融合 PCR 产物加入装有感受态细胞的离心管中，轻轻吹打，冰上静置 30 min。
- (3) 结束后，将感受态在 42°C 水浴锅中热激 90 s，热激结束后将离心管迅速置于冰上冷却 2 min，每管加 800 μL LB 培养基，置于 37°C 摇床，160 r/min 复苏 1 h。
- (4) 将复苏后的菌液取 200 μL 或者 5000 r/min 离心 5 min 后弃去培养基至仅剩 200 μL ，涂布含有氨苄的 LA 琼脂平板中。待平板表面无明显液滴后，将平板倒置于 37°C 恒温培养箱中培养过夜。

3.2.30 质粒转化子的 PCR 鉴定

在无菌环境下挑取转化子到含有 20 μL 灭菌水的 1.5 mL EP 管中，充分吹散菌体，无菌取出 15 μL 到外开的 1.5 mL EP 管中，加入含相应浓度抗生素的 LB 培养基中， 37°C 震荡培养 14~16 h。取 2 μL 至 PCR 管中用作鉴定 PCR 的模板。使用 Easy Taq DNA Polymerase，采用表 3-4 的引物 pET-23a-JD-F/R 进行 PCR 扩增鉴定。反应体系如表 3-12 所示，反应条件如表 3-13 所示。

表 3-12 鉴定 PCR 反应体系

Table 3-12 The reaction system of identification PCR

System composition	Reagent dosage
10×Easy Taq Buffer	2.5 μL
dNTP Mixture (2.5 mmol/L each)	1 μL
Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.5 μL
Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.5 μL
Template	2 μL
Easy Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.5 μL
ddH ₂ O	up to 25 μL

表 3-13 鉴定 PCR 的反应条件

Table 3-13 The reaction conditions of identification PCR

Temperature	Time	Cycles
98°C	10 min	
95°C	30 sec	} 32
59°C	30 sec	
72°C	30 sec/kb	
72°C	10 min	
25°C	1 min	

若鉴定的转化子疑似正确，将对应的菌液送测序。

3.2.31 质粒转化子的提取

(1) 柱平衡步骤:向吸附柱 CP3 中加入 500 μ L 的平衡液 BL，12000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(2) 取 1~5 mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，使用常规台式离心机，12000 r/min 离心 1 min，尽量吸除上清。

(3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L 溶液 P1。

(4) 向离心管中加入 250 μ L 溶液 P2，温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。

(5) 向离心管中加入 350 μ L 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6~8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12000 r/min 离心 10 min。

(6) 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中，注意尽量不要吸出沉淀。12000 r/min 离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。

(7) 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ L 漂洗液 PW，12000 r/min 离心 30~60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中，重复操作步骤 7。

(8) 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12000 r/min 离心 2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

(9) 将吸附柱 CP3 置于 EP 管中，向吸附膜的中间部位滴加 50~100 μL 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min，12000 r/min 离心 2 min 将质粒溶液收集到离心管中。

3.2.32 截短重组质粒转化至 Rosetta 菌株

取 2 μL 质粒直接转化至 Rosetta 感受态菌株中。转化步骤如下：

(1) 取出在 -80°C 冰箱中保存的感受态细胞，置于冰上解冻。

(2) 待感受态细胞解冻后，无菌环境下取 2 μL 融合 PCR 产物加入装有感受态细胞的离心管中，轻轻吹打，冰上静置 30 min。

(3) 静置结束后，将感受态在 42°C 水浴锅中热激 90 s，热激结束后将离心管迅速置于冰上冷却 2 min，每管加 800 μL LB 培养基，置于 37°C 摇床，160 r/min 复苏 1h。

(4) 将复苏后的菌液取 200 μL 或者 5000 r/min 离心 5 min 后弃去培养基至仅剩 200 μL ，涂布含有氨苄的 LA 琼脂平皿中。待平皿表面无明显液滴后，将平皿倒置于 37°C 恒温培养箱中培养过夜。

3.2.33 FHV-gD 截短蛋白表达

取菌液转接至 5 mL 含氨苄抗生素的 LB 培养基中， 37°C ，200 rpm，5% CO_2 震荡培养菌液 OD 值为 0.4~0.6 时，加入 50 μL 浓度为 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$ 的 IPTG，于 16°C ，160 r/min 中震荡培养 18 h-24 h。18 h 后，将菌液 12000 r/min 离心 1 min，用 500 μL PBS 重悬，进行超声破碎后，加入 5 \times SDS Loading 在开水中煮沸 10 min。

3.2.34 FHV-gD 截短蛋白 Western Blot 验证

取 10 μL 样品，直接上样到 SDS-PAGE 凝胶加样孔内。浓缩胶采用 80 V 恒压电泳 30 min，分离胶采用 120 V 恒压电泳 1 h，电泳至溴酚蓝到达胶的底端处附近停止电泳。

Western Blot 电转步骤：电转 Buffer 提前预冷，SDS-PAGE 凝胶切去浓缩胶，电转夹板先铺一层海绵，放上凝胶，轻轻铺上硝酸纤维素(NC)膜，再叠放上海绵 (全程保证无气泡)。100 V 恒压电泳 1 h (全程冰浴进行)。

加入脱脂乳封闭液摇床封闭 1 h, 使用 1×TBST 洗 3 遍, 每遍 5 min。分别加入 5E-6 细胞上清液和 His 标签抗体作为一抗, 37°C 震荡孵育 1 h, 孵育结束后 1×TBST 洗 3 遍, 每遍 5 min。二抗 37°C 震荡孵育 45 min, 1×TBST 洗 5 遍, 每遍 5 min。使用显色液在化学发光仪进行显色。

3.2.35 时间分辨荧光微球标记 FHV-gD 蛋白

本研究采用时间分辨荧光微球作为标记物, 利用 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)活化微球上的羧基, 通过两步法将活化后的羧基与蛋白上的氨基结合, 促使 Eu-CM 偶联上 FHV-gD 蛋白。

(1)取 1.5 mL 的离心管加入 50 μ L(固含量 1%)时间分辨荧光微球和 800 μ L 的 MES 缓冲液, 14500 r/min 条件下离心除上清, 重复以上步骤两次;

(2)加入 10 μ L 5 mg/mL 新鲜配制的 NHS 溶液, 混匀, 再加入 10 μ L 5 mg/mL 的 EDC 溶液, 超声 1 min 混匀, 室温孵育 30 min 活化荧光微球;

(3)活化结束后, 14500 r/min 离心 10 min, 去除过量的活化剂, 用 500 μ L 0.02 mol/L pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液重新复溶沉淀物, 超声 1 min 混匀, 再加入 10 μ g 的 AFM-FHV-gD 进行标记, 震荡偶联 3 h 后, 14500 r/min 离心 10 min, 弃上清;

(4)缓慢加入 100 μ L 的封闭液(1% BSA), 用移液器吹打混匀, 在紫外灯照射下无明显悬浮颗粒聚集, 室温震荡封闭 30 min, 离心弃上清, 除去未结合的蛋白, 再加入标记洗涤液重悬, 离心去上清;

(5)最后用 200 μ L 的荧光微球复溶液重新复溶, 4°C 避光保存备用。

3.2.36 FHV-gD 蛋白和荧光微球偶联最佳浓度选择

为确定荧光微球偶联的最佳蛋白量, 取荧光微球进行 10 倍比稀释后, 将 FHV-gD 蛋白不同浓度与荧光微球进行偶联, 将 FHV-gD 原浓度分别按照 2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL 进行 2 倍比稀释, 分别检测同一猫 FHV-1 阳性血清, 根据试纸条的显色情况来确定 FHV-gD 蛋白和荧光微球偶联的最佳浓度。

3.2.37 检测线 FHV-gD 蛋白最佳包被浓度的确定

根据最佳蛋白标记量，将荧光微球标记的蛋白溶液均匀涂布在结合垫上，用样品稀释液将 FHV-gD 蛋白进行 2 倍比稀释，浓度分别为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/mL，混合均匀后喷涂于 T 线上，烘干后分别检测同一猫 FHV-1 阳性血清，根据试纸条的显色情况来确定检测线 FHV-gD 蛋白的最佳浓度。

3.2.38 控制线包被单克隆抗体 5E-6 的最适浓度

用点膜仪以 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量将单克隆抗体 5E-6 喷到硝酸纤维膜上的 C 线上，C 线包被单克隆抗体 5E-6 的浓度为 4、2、1、0.5、0.25 mg/mL，与 T 线 FHV-gD 蛋白最佳浓度、FHV-gD 蛋白偶联荧光微球的最佳浓度组装试纸条，分别检测同一猫 FHV-1 阳性血清，根据试纸条质控线显色情况来确定其最适浓度。

3.2.39 试纸条的组装与制备

(1) 处理结合垫和样品垫，配制结合垫和样品垫处理液，完全浸泡裁剪好的垫子 30 min，于 37°C 烘箱中过夜烘干；

(2) 将荧光微球偶联 FHV-gD 蛋白涂布在用处理液处理过的结合垫上，干燥 3~7 h；

(3) 试纸条划线，用 PBS 溶液将 FHV-gD 蛋白和 5E-6 单克隆抗体稀释成最适工作浓度，包被在硝酸纤维素膜上，作为检测线和质控线，组装成试纸条，用 BIODOT 划线机划线，修改机器参数，检测线设置 $y=19.5\text{ mm}$ ，质控线设置 $y=14.5\text{ mm}$ ，两线间隔 5 mm，划线完成后于 37°C 烘箱烘干 20 min；

(4) 组装试纸条，将样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸依次裁剪为合适宽度，并依次粘贴到 PVC 底板上，每个原件重叠 1 mm 左右，保证样本液体流动。试纸条切条，使用切条机，将系统参数中试纸条宽度设置为 4 mm；

(5) 试纸条组装，将切割好的试纸条按照正确方向装于塑料卡套中，用于进行下一步实验。

3.2.40 反应时间优化

以上述摸索到的最优条件制备一批试纸条，用于反应条件的优化摸索。用所制备的试纸条检测同一个阳性样品，点样后观察 5 min、10 min、15 min，选择 T 线、C 线条带强度趋于稳定的最佳时间点为反应终点。

3.2.41 试纸条敏感性检验

用样品稀释液稀释抗体效价为 1: 512 猫 FHV-1 阳性血清，从 1:4 开始，1:4、1:16、1:64、1:256、1:1024、进行 4 倍比稀释，及用样品稀释液稀释猫阴性血清作为阴性对照，每个样品取 100 μ L 用同一批试纸条进行检测，判定试纸条的最低检测限。

3.2.42 试纸条特异性检验

用同一批试纸条，分别检测猫常见病毒 FCV、FPV、FHV 的阳性血清，并用稀释液 PBS 为空白对照，检测荧光微球试纸条特异性。

3.2.43 试纸条重复性检验

分别选择不同批次和同批次组装的试纸条，由两名实验人员检测已知的 FHV 阳性、阴性血清样品，并重复 3 次，观察 T 线显色结果。

3.2.44 试纸条稳定性检验

将试纸条于 42 $^{\circ}$ C 保存，分别在第 0 d、10 d、20 d、30 d 用制备的试纸条检测同一份阳性和阴性样品，进行试纸条稳定性分析，观察不同时间节点其结果的变化。

3.2.45 临床样品符合率检测

用荧光试纸条试纸条检 34 份临床样品，记录样品检测结果，与间接免疫荧光试验检测结果进行比较，计算符合率。

4 实验结果分析

4.1 单克隆抗体的研制

4.1.1 FHV-gD 蛋白的纯化

将高密度表达的 FHV-gD CHO 细胞上清制成原液样品，与镍柱孵育 3 h 后的样品制备为流出液样，目的蛋白洗脱样品分别制样。以 10 μ L 每孔上样，进行 SDS-PAGE 分析 FHV-gD 蛋白镍柱纯化效果，结果如图 4-1 所示，目的条带大小为 55 KDa (糖基化修饰)，与预测大小相符。纯度达 98%以上，且表达量较高。

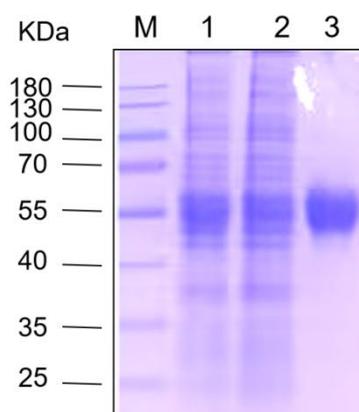


图 4-1 SDS-PAGE 检测 FHV-gD 蛋白纯化效果

Fig.4-1 SDS-PAGE assay for FHV-gD protein purification effect

M: Marker 1: 培养上清 2: 流出液 3: FHV-gD 纯化蛋白

4.1.2 FHV-gD 蛋白的反应性检测

电转结束后，将 NC 膜封闭 1 h，分别孵育猫 FHV-1 阳性血清 (血清按 1:200 稀释)、His 标签抗体。以 His 标签抗体检测 FHV-gD 真核蛋白是否正常表达，猫 FHV-1 阳性血清检测重组表达的 FHV-gD 真核蛋白是否能与 FHV-1 特异性抗体反应。Western Blot 结果如图 4-2 所示：CHO 表达的 FHV-gD 蛋白能够与猫 FHV-1 阳性血清发生反应，具有良好的免疫反应性。

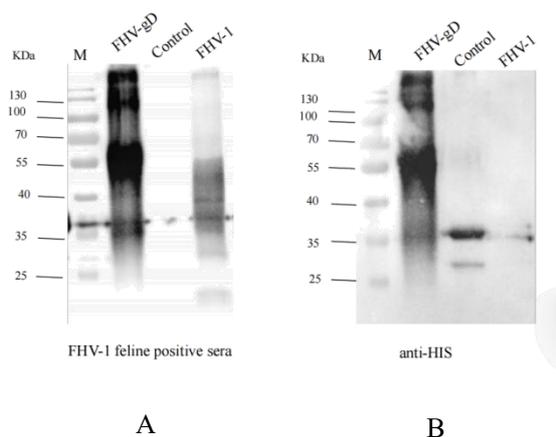


图 4-2 Western Blot 检测 FHV-gD 真核蛋白的反应性

Fig.4-2 Reactivity of FHV-gD eukaryotic proteins detected by Western Blot

图 A:FHV-1 猫阳性血清；图 B: His 标签抗体；M: Marker

4.1.3 FHV-gD 蛋白的浓度测定

将 SDS-PAGE 检测中条带清晰且杂带较少的对应咪唑洗脱液进行透析，去除咪唑，最后进行蔗糖浓缩，收集的蛋白使用 A280 (nm)紫外光吸收法检测蛋白浓度，结果见表 4-1。

表 4-1 FHV-gD 纯化蛋白浓度测定

Table4-1 Determination of FHV-gD purified protein concentration

蛋白	培养体积(mL)	预测大小(kDa)	消光系数	纯化浓度(mg/mL)
FHV-gD	50	35	66810	3.374

4.1.4 间接 ELISA 筛选方法的建立

固定抗体稀释抗原法以确定间接 ELISA 蛋白包被浓度结果如表 4-2 与表 4-3 所示：P/N=阳性样品 OD/阴性样品 OD。取 P/N 值最高的点作为间接 ELISA 筛选的工作浓度。因此根据结果，本实验用原始浓度为 2.500 mg/mL 的 FHV-gD 蛋白以 1:3200 的稀释比例即 0.781 ug/mL 终浓度的蛋白进行包被，FHV 超离毒以 1: 100 的稀释度进行包被。而抗原对照包被选取标准：按照 OD₄₅₀ 尽可能高且与阳性读值有区分的稀释度包被，可以更大程度的筛选到特异性单克隆抗体。

表 4-2 抗原最佳包被浓度摸索结果

Table 4-2 Results of the mapping of optimal antigen encapsulation concentration

抗原稀释度 血清抗体	200	400	800	1600	3200	6400	CHO 流出液
FHV 鼠阳性血清 1: 1000	2.809	2.788	2.730	2.748	2.648	2.099	0.211
SPF 血清	0.095	0.090	0.096	0.094	0.080	0.087	0.082
P/N	29.568	30.978	28.438	29.234	33.100	24.126	2.573

表 4-3 超离毒最佳包被浓度摸索结果

Table4-3 Results of the square titration of the optimal concentration of supertoxic coated

超离毒稀释度 血清抗体	50	100	200	400	800	1600	CRFK (1:10)
FHV 鼠阳性血清 1: 1000	1.223	1.201	1.099	0.947	0.608	0.331	0.153
SPF 血清	0.101	0.078	0.076	0.079	0.058	0.073	0.101
P/N	12.109	15.397	14.461	11.987	10.483	4.534	1.515

4.1.5 免疫鼠血清抗体效价检测

小鼠第三次免疫 14 d 后剪尾采血，分离血清。从 1:1000 开始将血清进行 2 倍比稀释，用步骤 3.2.5 中摸索的包被条件建立的间接 ELISA 方法分别测定免疫小鼠和 SPF 小鼠血清的效价。结果如图 4-3 所示，第三次免疫后小鼠免疫效价均大于 1:10000。选择免疫效价高且稳定的 3 号小鼠进行 2 次强化免疫，每次间隔 1 d，48 h 之后取其脾细胞进行细胞融合。

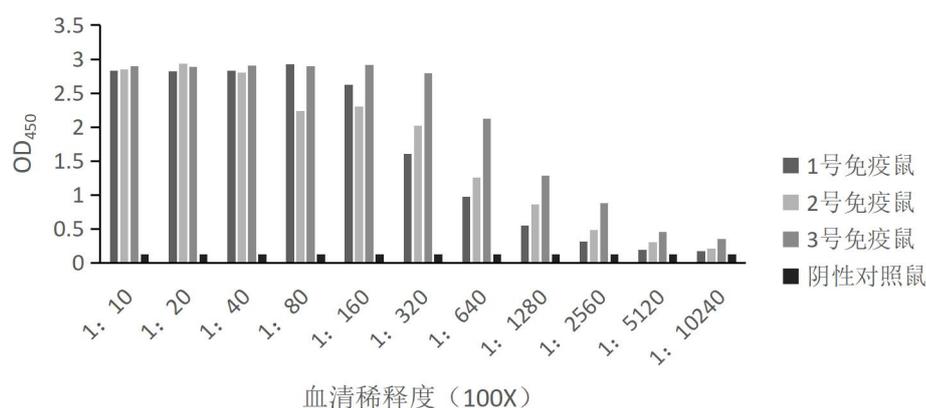


图 4-3 间接 ELISA 检测免疫血清效价

Fig. 4-3 The titer of immune serum was detected by indirect ELISA

4.1.6 杂交瘤细胞的筛选

融合后的前三天需观察细胞是否污染，融合后 7~10 d 统计融合率，并将 HAT 培养基全换成 HT 培养基。当融合孔内细胞密度为 50%左右时取上清液进行检测，并统计阳性率 (蛋白阳性率和病毒阳性率)。结果如表 4-4 所示。对筛选呈蛋白和病毒均为阳性的细胞孔扩大并进行两次亚克隆，成功筛选出 5 株与 FHV-1 反应的杂交瘤细胞，并将 5 株单抗命名为 2D-1、5E-6、2E-11、2A-12、7C-13。

表 4-4 融合筛选结果

Table4-4 Fusion screening results

细胞板号	成功融合孔数	融合率 (%)	蛋白反应阳性孔数	蛋白反应阳性率 (%)	病毒反应阳性孔数	病毒反应阳性率 (%)
1	85	88.54%	17	20.00%	5	5.88%
2	89	92.71%	18	20.22%	4	4.49%
3	86	89.58%	20	23.26%	5	5.81%
4	89	92.71%	24	26.97%	6	6.74%
5	83	86.46%	20	24.10%	9	10.84%
合计	432	90.00%	99	22.92%	29	6.71%

4.1.7 杂交瘤细胞株分泌抗体亚类鉴定

采用小鼠亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体的亚型进行鉴定，结果如图 4-4 所示，5 株单抗中，5E-6、2A-12 的重链为 IgG1，2D-1、2E-11、7C-13 的重链为 IgG2a，轻链均为 kappa 链。

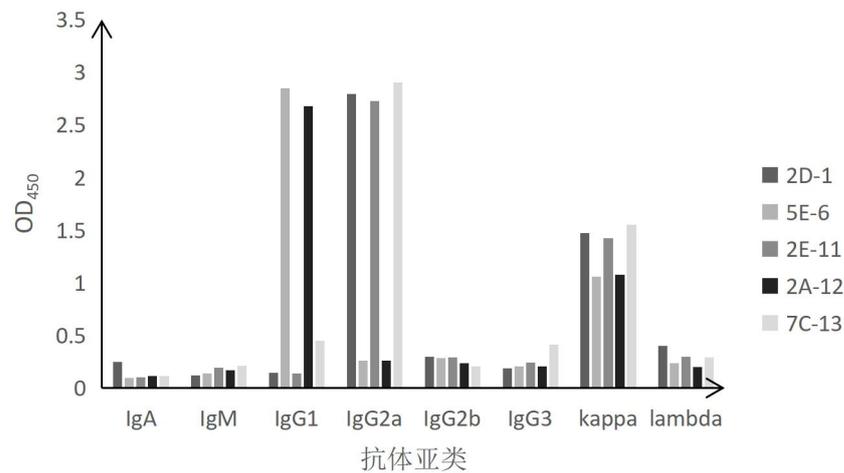


图 4-4 单克隆抗体的亚型鉴定结果

Fig 4-4 Results of subtype identification of monoclonal antibodies

4.1.8 杂交瘤细胞株染色体计数

对 5 株原代杂交瘤细胞进行染色体计数，结果如图 4-5 所示，单克隆杂交瘤细胞染色体数目分别为 2D-1: 89 条、5E-6: 102 条、2E-11: 99 条、2A-12: 100 条、7C-13: 99 条。杂交瘤细胞染色体条数在 88-108 条之间，证明本实验筛选的 5 株单克隆抗体为脾细胞和骨髓瘤细胞融合所得。

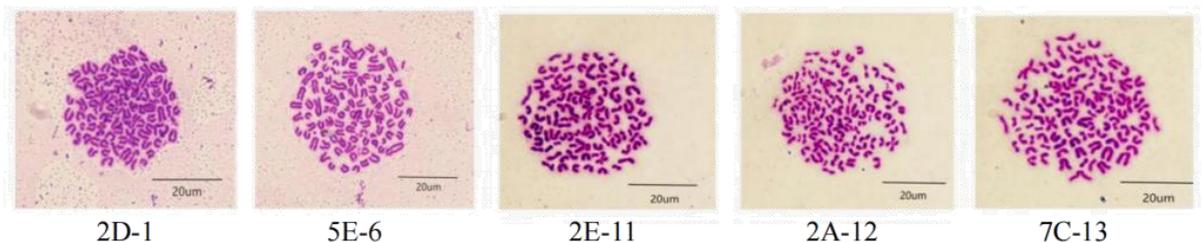


图 4-5 原代杂交瘤细胞染色体鉴定

Fig.4-5 Chromosome identification of primary hybridoma cells

4.1.9 单克隆抗体的特异性鉴定

将 FHV-1、FPV、FCV 三种病毒分别接种 CRFK 细胞，以单抗细胞培养上清液作为一抗，FITC488 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 IFA 鉴定。结果如图 4-6 所示，只有 FHV-1 阳性血清，5 株单抗上清与 FHV-1 的实验组有特异性的荧光，证明筛选的 5 株单克隆抗体只与 FHV-1 反应，而与 FPV、FCV 不发生反应，具有较好的特异性。

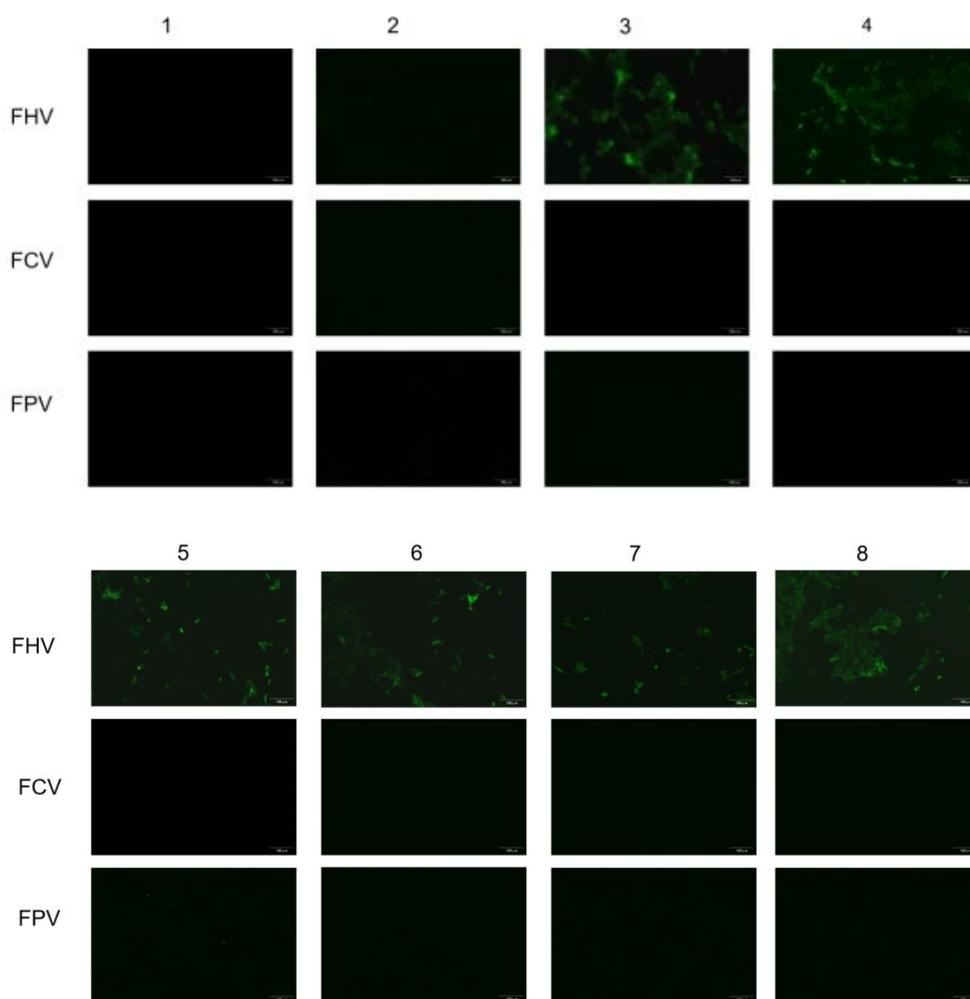


图 4-6 IFA 检测单克隆抗体特异性

Fig. 4-6 Detection of monoclonal antibodies specificity by IFA

1: PBS; 2: 鼠阴性血清+小鼠骨髓瘤细胞培养上清液; 3: FHV 阳性鼠血清; 4: 5E-6; 5: 2D-1; 6: 2E-11

7: 2A-12; 8: 7C-13

4.1.10 杂交瘤细胞株分泌抗体中和试验

分别收集 5 株单抗细胞培养上清液，将收集的杂交瘤细胞上清液与 200 TCID₅₀/0.1mL 病毒液体积 1: 1 (50 μL+50 μL)混合，37℃ 孵育 1 h 后加入到长满单层的 CRFK 细胞中，同时设置细胞对照、FHV-1 阴阳性血清对照组。显微镜下观察细胞病变 3~7 d，一半以上细胞出现 CPE 的孔视为阳性。结果如图 4-7 所示，在阴阳性对照组成立的条件下，2D-1、2E-11、2A-12、7C-13 实验组出现细胞病变，5E-6 组细胞没有发生病变，说明仅 5E-6 单抗具有中和效果。

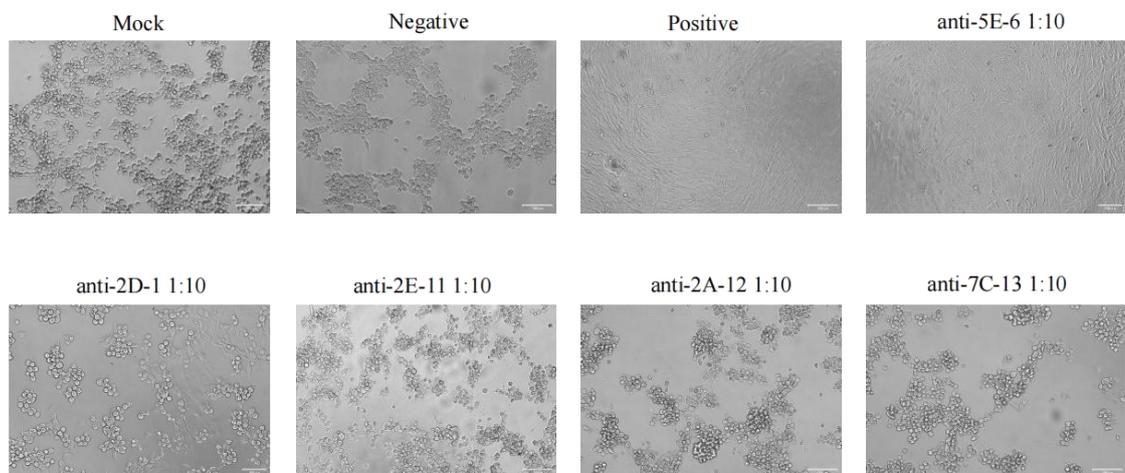


图 4-7 单抗中和试验

Fig .4-7 Monoclonal antibody neutralization test

4.1.11 杂交瘤细胞株分泌抗体结合表位交叉性验证

五株单抗中，5E-6 具有中和效果，确定为中和表位。其余四株单抗进行相加 ELISA 分析表位在抗原上的位置，按照 3.2.14 步骤进行相加表位鉴定，当 2.66 mg/mL 浓度的 FHV-gD 蛋白稀释 128000 倍后，即包被浓度为 0.2 μg/mL 时，单抗的饱和 OD₄₅₀ 处于 0.8~1.2 之间。因此，选用 0.2 μg/mL 的蛋白浓度包被酶标板，将两株单抗等体积混合加入后孵育酶标鼠二抗，由相加指数 AI 来计算， $AI = [2 \times A_{(1+2)} - (A_1 + A_2)] / A_{(1+2)} \times 100\%$ ，当 AI > 50% 时，两株抗体表位不相同；AI < 50% 时，则表位相同。由表 4-5 与表 4-6 中的数据分析可知：2D-1 与 2A-12，2D-1 与 7C-13 的 AI > 50%，2D-1 与 2A-12、7C-13 不处于同一表位。

表 4-5 相加 ELISA 包被抗原条件摸索

Table 4-5 Additive ELISA packages are fumbled by antigen conditions

FHV-gD	2D-1	2E-11	2A-12	7C-13
稀释度	(OD ₄₅₀)	(OD ₄₅₀)	(OD ₄₅₀)	(OD ₄₅₀)
1:1000	2.92	2.64	2.76	2.69
1:2000	2.39	2.22	2.43	2.41
1:4000	2.69	2.70	2.85	2.69
1:8000	2.86	2.60	3.00	2.68
1:16000	2.40	2.17	2.65	2.30
1:32000	2.18	1.94	2.44	1.96
1:64000	1.60	1.38	1.86	1.47
1:128000	1.15	0.94	1.30	0.93
1:256000	0.71	0.60	0.89	0.57

表 4-6 相加 ELISA 鉴定单抗识别表位

Table 4-6 combined ELISA identifying the single identification table

A (OD ₄₅₀)	B (OD ₄₅₀)	A+B (OD ₄₅₀)	AI (%)
	2E-11 (1.00)	0.97	6%
2D-1 (0.88)	2A-12 (1.37)	0.83	-71%
	7C-13 (0.97)	1.32	59.8%
2E-11 (1.00)	2A-12 (1.37)	1.21	37.2%
	7C-13 (0.97)	0.92	14%
2A-12 (1.37)	7C-13 (0.97)	1.04	-25%

4.1.12 腹水抗体效价检测

将 5 株单抗的腹水从 $1:10^3$ 稀释至 $1:10^{10}$ ，采用间接 ELISA 进行腹水效价测定。结果如图 4-8 所示，5 株单抗的效价在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 左右，说明 5 株杂交瘤细胞分泌特异性抗体能力较强。

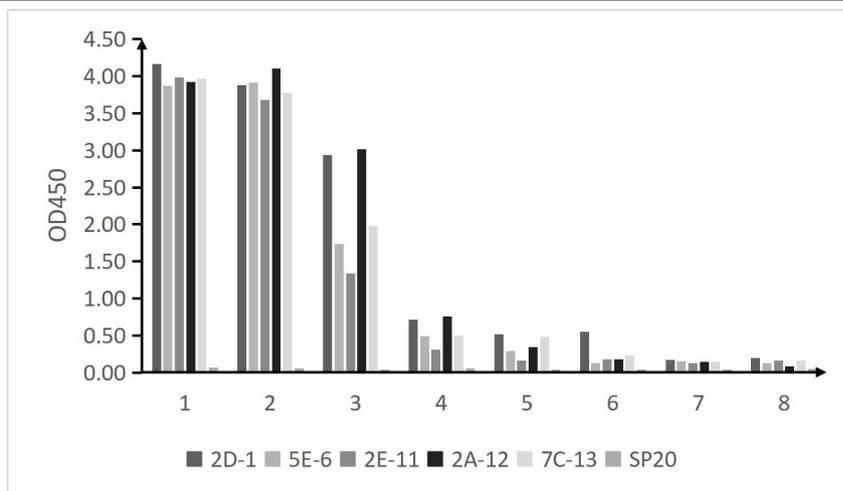


图 4-8 单克隆抗体腹水效价测定

Table 4-8 Determination of ascites titer

1: 10^{-3} ; 2: 10^{-4} ; 3: 10^{-5} ; 4: 10^{-6} ; 5: 10^{-7} ; 6: 10^{-8} ; 7: 10^{-9} ; 8: 10^{-10}

4.1.13 腹水抗体纯化

经辛酸硫酸铵粗纯后的抗体采用 Protein G 柱进行二次纯化，纯化后抗体经 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果如图 4-9 所示，重链大小为 55 KDa 左右，轻链大小为 25 KDa，纯度达 90%以上。

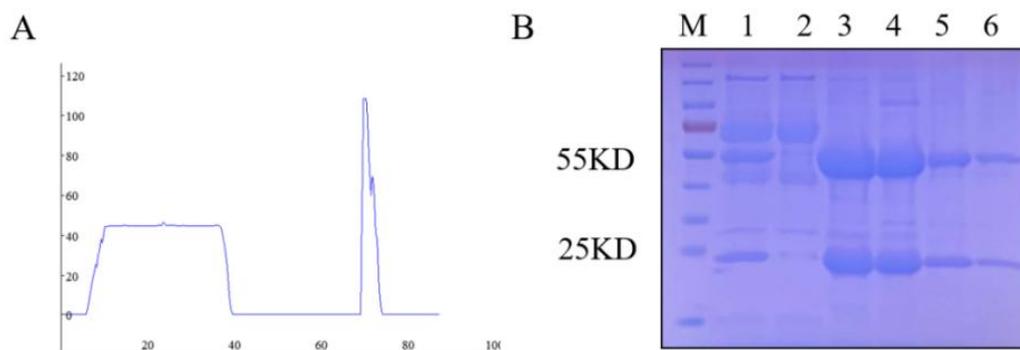


图 4-9 腹水纯化结果

Fig.4-9 Results of ascites purification

A:5E-6 Protein G 纯化峰图; B:5E-6 抗体纯化结果; M: Marker; 1: 原液; 2: 流出液; 3-6: 洗脱液

4.2 5E-6 中和抗体识别表位鉴定

4.2.1 5E-6 腹水中和抗体效价测定

将纯化前 5E-6 的腹水从 1: 100 开始 10 倍比稀释，与 200 TCID₅₀/0.1mL 病毒液混合孵育后加入到长满单层的 CRFK 细胞中，观察 3 d 后，由图 4-10 可知，5E-6 的腹水中和效价为 10⁻³。

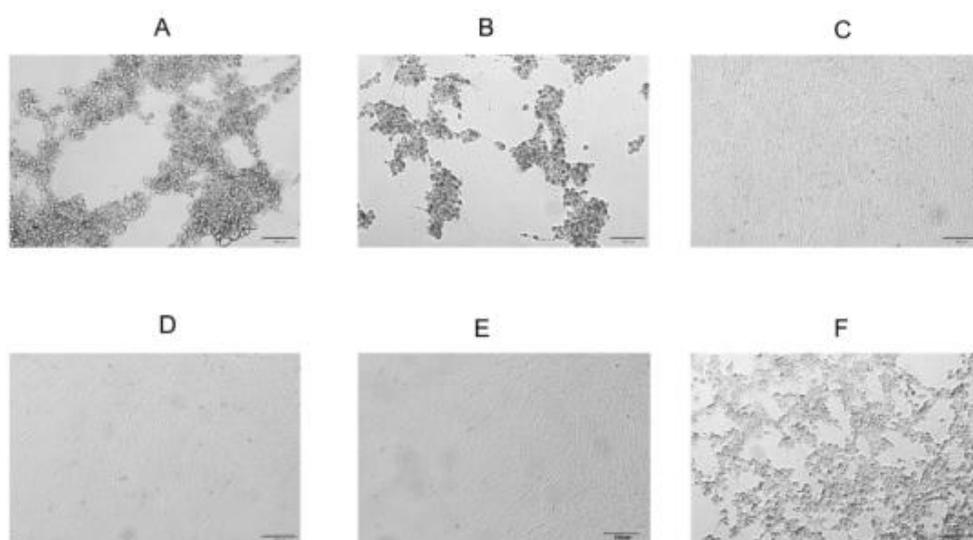


图 4-10 5E-6 中和抗体效价测定

Fig. 4-10 Titer determination of 5E-6 neutralizing antibody

A: FHV-1 病毒组对照; B:1:100 FHV-1 阴性血清; C:1:100 FHV-1 阳性血清 ; D 腹水 1: 100

E:腹水 1: 1000; F: 腹水 1: 10000

4.2.2 单克隆抗体的反应性鉴定

以单抗上清作为一抗，羊抗鼠二抗作为二抗，进行 Western Blot 分析。结果如图 4-11 所示，本实验筛选的 5 株单抗均与变性的 FHV-gD 蛋白结合，证明 5 株单抗与 FHV-gD 蛋白具有良好的反应性且 5 株单抗识别的表位为线性。

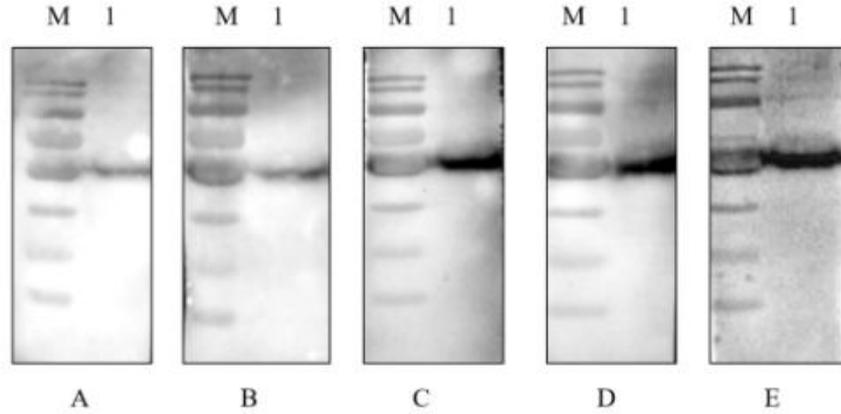


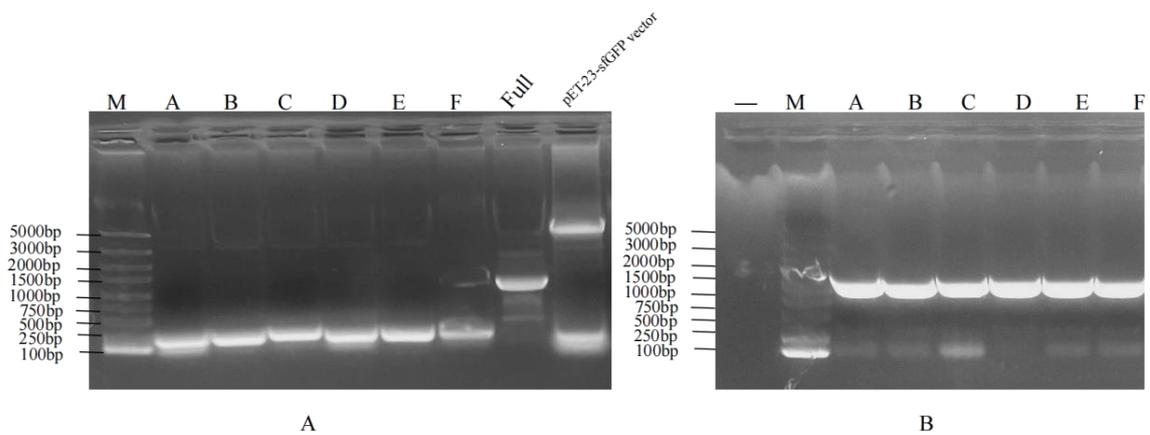
图 4-11 Western Blot 检测单克隆抗体与 FHV-gD 蛋白反应性

Fig.4-11 Western Blot detection of monoclonal antibody reactivity with FHV gD protein

A: 2D-1 单抗; B:5E-6 单抗; C: 2E-11 单抗; D: 2A-12 单抗 ;E: 7C-13 单抗; M: Marker ; 1: FHV-gD 蛋白

4.2.3 FHV-gD 截短质粒的构建

使用表 3-4 中的引物扩增目的片段与载体片段，结果如图 4-12 的 A 图、C 图、E 图所示，扩增 A、B、C、D、E、F 截短目的片段大小分别为 180 bp、159 bp、204 bp、174 bp、174 bp、126 bp，F1、F2、F3、F4、F5 目的片段大小分别为 4512 bp、4530 bp、4488 bp、4512 bp、4467 bp、f1、f2、f3、f4、f5、f6 目的片段大小分别为 4506 bp、4500 bp、4494 bp、4470 bp、4476 bp、4482 bp，条带大小正确。挑取重组质粒的单克隆菌落测序，结果如 4-12 的 B 图、D 图、F 图所示，截短蛋白重组质粒构建成功，提取质粒转化到 Rosetta 菌株中进行蛋白表达。



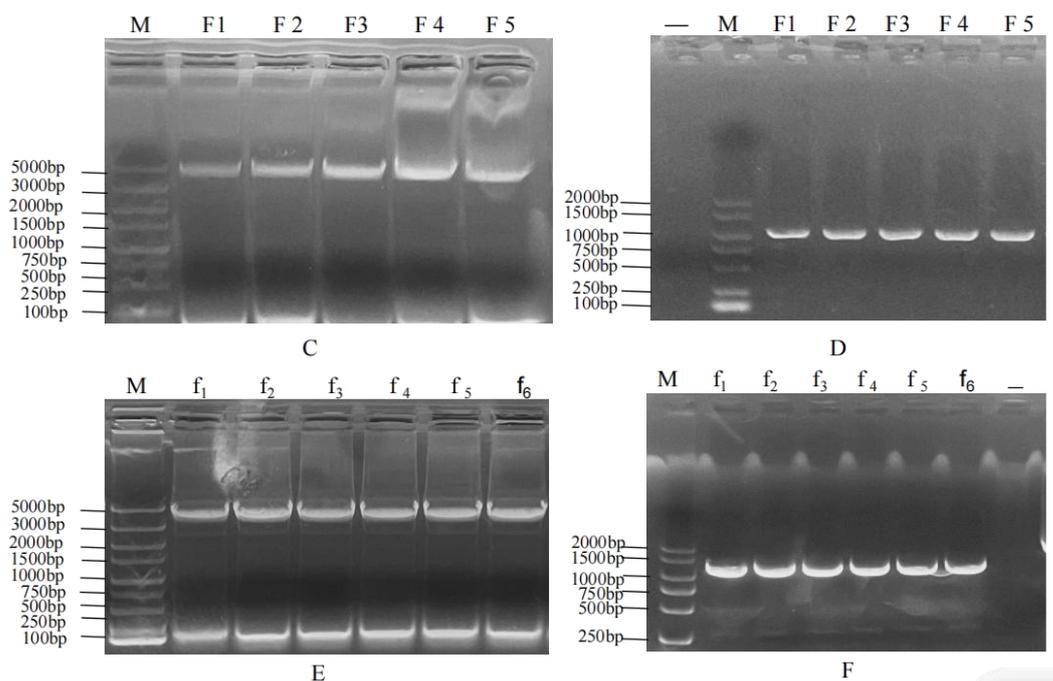


图 4-12 FHV-gD 截短质粒构建结果

Fig. 4-12 Construction results of FHV-gD truncated plasmid

A: 第一次截短目的片段与载体 PCR 扩增琼脂糖电泳 B:第一次截短重组质粒鉴定琼脂糖电泳 C:第二次截短目的片段 PCR 扩增琼脂糖电泳 D:第二次截短重组质粒鉴定琼脂糖电泳 E:第三次截短目的片段 PCR 扩增琼脂糖电泳 F:第三次截短重组质粒鉴定琼脂糖电泳

4.2.4 FHV-gD 截短蛋白 Western Blot 鉴定

将 FHV-gD 基因截短体重组质粒原核表达蛋白电转至 NC 膜上, 分别孵育 His 标签抗体和 5E-6 单抗, Western Blot 检测结果如图 4-13 所示, FHV-gD 全长蛋白大小约为 55 KDa, A、B、C、D、E、F 截短蛋白大小约为 37 KDa, F1、F2、F3、F4、F5 截短蛋白大小约为 36 KDa, f1、f2、f3、f4、f5、f6 截短蛋白大小约为 35 KDa, 对照组 sfGFP 蛋白串联其他蛋白大小约为 35 KDa, 与预测大小一致。His 标签抗体作为一抗时, FHV-gD 全长蛋白与各截短蛋白均有条带, 说明 FHV-gD 全长蛋白与各截短蛋白均正常表达。从 B 图结果可以得知, 5E-6 单克隆抗体识别并结合 F 序列区域, 对 F 段进一步截短, 从 D 图结果可以看出, 5E-6 单抗识别的是 F2 和 F3 段, 说明其识别表位范围为 306 NVPIIISDDDDVPTAPP 321 , 对此区域进一步截短,

结果如 F 图所示, 5E-6 单抗识别的是 308~329aa 区域以及 306~318aa 区域, 证明 5E-6 单克隆抗体识别的表位为 $^{308}\text{PIIISDDDDVP}^{318}$ 。

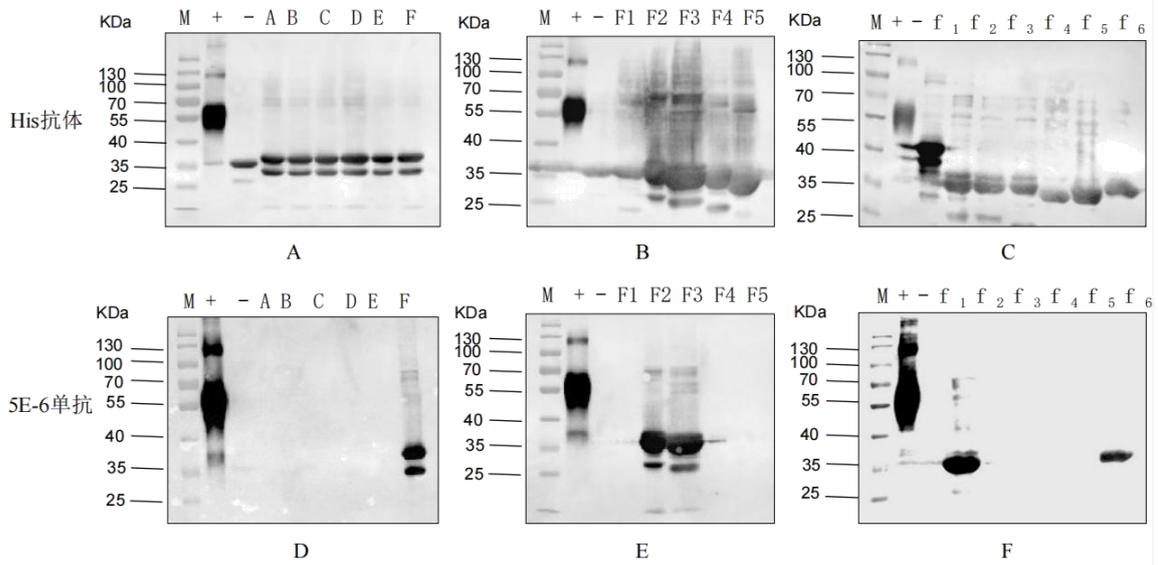


图 4-13 FHV-gD 截短蛋白 Western Blot 检测结果

Fig.4-13 Western Blot results of FHV-gD truncated protein

A: Western Blot 检测第一次截短重组蛋白与 HIS 标签抗体反应性; B:Western Blot 检测第二次截短重组蛋白与 HIS 标签抗体反应性; C:Western Blot 检测第三次截短重组蛋白与 HIS 标签抗体反应性; D:Western Blot 检测第一次截短重组蛋白与 5E-6 单抗反应性; E:Western Blot 检测第二次截短重组蛋白与 5E-6 单抗反应; F:Western Blot 检测第三次截短重组蛋白与 5E-6 单抗反应性; +: FHV-gD 全长蛋白; -: pET-23a-sfGFP 对照蛋白

4.2.5 5E-6 单抗识别表位的空间模拟定位

使用 AlphaFold 2 软件对 FHV-gD 蛋白进行空间结构模拟, 结果如图 4-14 所示, 5E-6 单抗识别的表位位于 FHV-gD 蛋白的外层, 便于与抗原的结合, 有抗体检测技术开发的潜力。

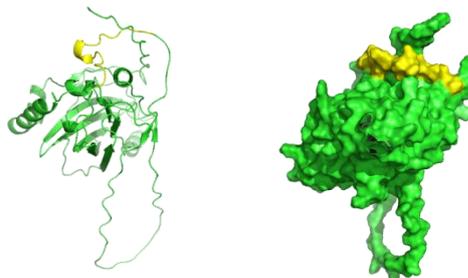


图 4-14 FHV-gD 蛋白空间结构的模拟及表位的定位

Fig. 4-14 Spatial structure simulation and epitope localization of FHV-gD protein

4.2.6 5E-6 单抗识别表位保守性分析

使用 MegAlign 软件分析氨基酸序列保守性，将 5E-6 单抗识别表位序列与目前已发布的 FHV-gD 氨基酸序列（截至 2024.3.19，共 63 条序列）进行比对，结果如图 4-15 所示，该表位在目前已发表的 FHV-gD 氨基酸序列中完全保守，保守性较高。



图 4-15 表位保守性比对

Fig. 4-15 Epitope conservative comparison

4.3 时间分辨荧光微球试纸条抗体检测方法的建立

4.3.1 FHV-gD 蛋白和荧光微球偶联最佳浓度选择

将 FHV-gD 蛋白稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL 的浓度，与荧光微球偶联后，检测同一份猫 FHV-1 阳性血清。结果如图 4-16，0.25 mg/mL、0.125 mg/mL 浓度的 FHV-gD 蛋白与荧光微球偶联后 T 线条带较弱，高于 0.5 mg/mL 偶联蛋白浓度有较明显的检测线，为了在不增加非特异性反应的基础上提高试纸条的灵敏度，本研究选择了偶联的 FHV-gD 蛋白浓度为 0.5 mg/mL。

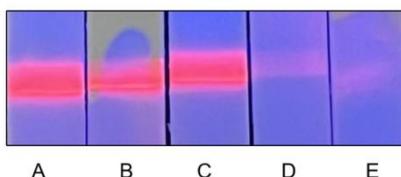


图 4-16 最佳标记量的确定

Fig. 4-16 Determination of the optimal amount of labeling

A:2 mg/mL ; B:1 mg/mL ; C:0.5 mg/mL ; D:0.25 mg/mL ; E:0.125 mg/mL

4.3.2 检测线 FHV-gD 蛋白最佳包被浓度的确定

为确定检测线 FHV-gD 蛋白最佳浓度，在 pH 固定为最佳值条件下，将蛋白进行 2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL，2 倍比稀释。结果如图 4-17 所示：因此检测线 FHV-gD 蛋白最佳浓度约为 1 mg/mL。

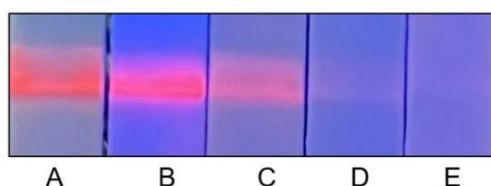


图 4-17 检测线 FHV-gD 蛋白最佳划线浓度

Fig.4-17 Test line FHV-gD protein optimum streaking concentration

A:2 mg/mL ; B:1 mg/mL ; C:0.5 mg/mL ; D:0.25 mg/mL ; E:0.125 mg/mL

4.3.3 控制线 5E-6 单抗包被的最适浓度

将 5E-6 单克隆抗体稀释成为 4、2、1、0.5、0.25 mg/mL 的浓度，与 FHV-gD 蛋白偶联荧光微球的最佳浓度组装试纸条，检测同一猫 FHV-1 阳性血清。如图 4-18 可知，C 线包被单抗浓度大于 0.5 mg/mL 都可以显色，但为了提高敏感度，所以 C 线选用 1 mg/mL 浓度的抗体划线。

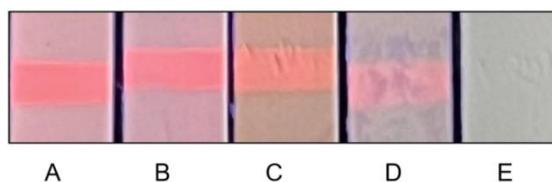


图 4-18 控制线单克隆抗体最佳划线浓度

Fig.4-18 Optimal scribing concentration of monoclonal antibody for control line

A:4 mg/mL ; B:2 mg/mL ; C:1 mg/mL ; D:0.5 mg/mL ; E:0.25 mg/mL

4.3.4 最佳反应时间的确定

将同一份猫 FHV-1 阳性血清用同一批试纸条检测，加样后分别反应 5 min、10 min、15 min，其结果如图 4-19 所示，反应 10 min 以后，C 线与 T 线荧光趋于稳定，因此判定 10 min 为最佳反应时间。

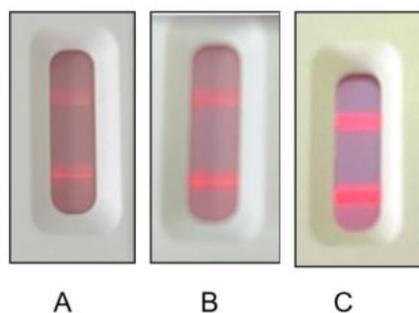


图 4-19 最佳反应时间的确定

Fig.4-19 Determination of the optimal reaction time

A: 5 min ; B: 10 min ; C: 15 min

4.3.5 试纸条敏感性检验

将抗体效价为 1: 512 (IFA 检测)的猫 FHV 阳性血清按照 1:2²、1:2⁴、1:2⁶、1:2⁸、1:2¹⁰ 比例进行 4 倍数稀释，使用本研究建立的荧光微球试纸条检测每个稀释度的血清，敏感度测试结果如图 4-20 所示，可检测最高稀释度血清 1:256。

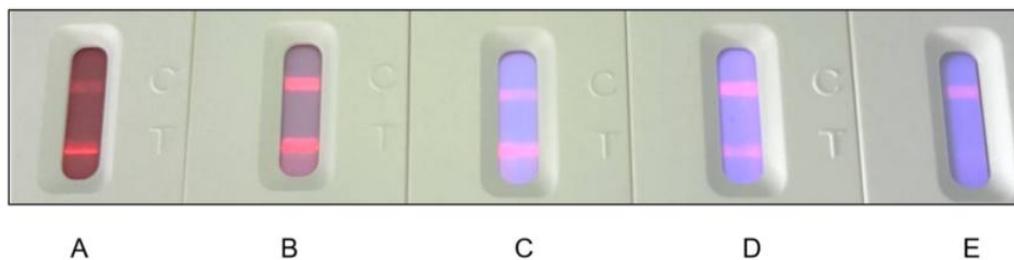


图 4-20 试纸条敏感性检测

Fig.4-20 The limit of detection of dipstick strips

A:1:4 B:1:16 C:1:64 D:1:256 E:1:1024

4.3.6 试纸条特异性检验

采用同一批研制的荧光微球试纸条分别检测 FHV-1 阳性血清、FCV 阳性血清、FPV 阳性血清，如图 4-21 所示，与 FHV-1 阳性血清检测呈阳性，其它猫阳性血清呈阴性，证明该试纸条特异性良好。

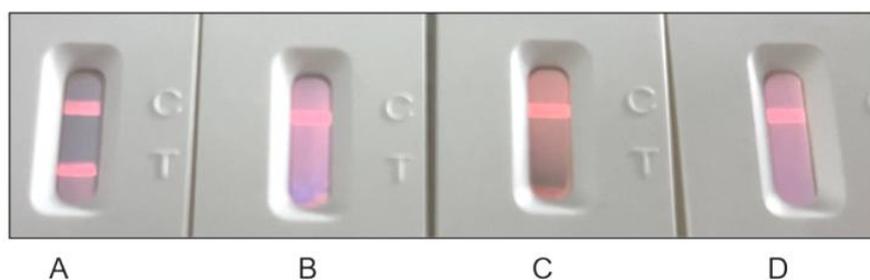


图 4-21 试纸条特异性检测

Fig.4-21 Specificity detection of dipstick strips

A: FHV 阳性血清 ; D: FCV 阳性血清 ; C: FPV 阳性血清 ; D: 猫阴性血清

4.3.7 试纸条重复性检验

选用同一批次和不同批次制备的试纸条，分别由两个实验人员检测同一份 FHV-1 阳、阴性血清，重复 3 次，检测结果如表 4-7 所示，检测结果无差别，此荧光微球试纸条的检测结果重复性良好。

表 4-7 试纸条重复性检验

Fig.4-7 Repeatability test of test strips

试纸条批次	1 批			2 批			3 批		
样品名	实验员 1								
FHV 阳性血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FHV 阴性血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-
试纸条批次	1 批			2 批			3 批		
样品名	实验员 2								
FHV 阳性血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FHV 阴性血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3.8 试纸条稳定性检测

研究表明试纸条存放于 42°C 1 个月等于室温保存 1 年。将自制的胶体金试纸条置于 42°C 进行加速破坏试验，于第 0 d、10 d、20 d、30 d 别分别进行血清抗体检测，

结果如图 4-22，30 d 时的试纸条检测线信号与 0 d 无明显差异，说明本研究建立的荧光微球试纸条稳定性较好。

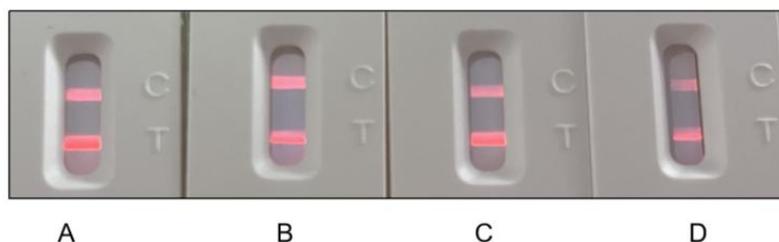


图 4-22 试纸条稳定性检测

Fig.4-22 Stability detection of test strips

A:0d B: 10d C:20d D:30d

4.3.9 临床样品符合率检测

将收集到的 34 份临床猫血清一分为二，一部分用本研究研制的双抗原夹心荧光微球试纸条进行检测，另一部分进行间接免疫荧光实验检测。最后比较二者的符合率。由表 4-8、图 4-27、图 4-28 可以看出，荧光微球试纸条检出 FHV-1 阳性血清 19 份，阳性率为 55.88 %；IFA 检出阳性血清 20 份，阳性率为 58.82%，二者检测符合率为 95%。

表 4-8 符合率试验结果

Table 4-8 Results of coincidence rate test

	自制荧光微球试纸条	IFA	符合率
阳性	19	20	
阴性	15	14	95%
总计	34	34	
阳性率	55.88%	58.82%	

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
试纸条	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
IFA	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-

编号	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	阳性	阴性
试纸条	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
IFA	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

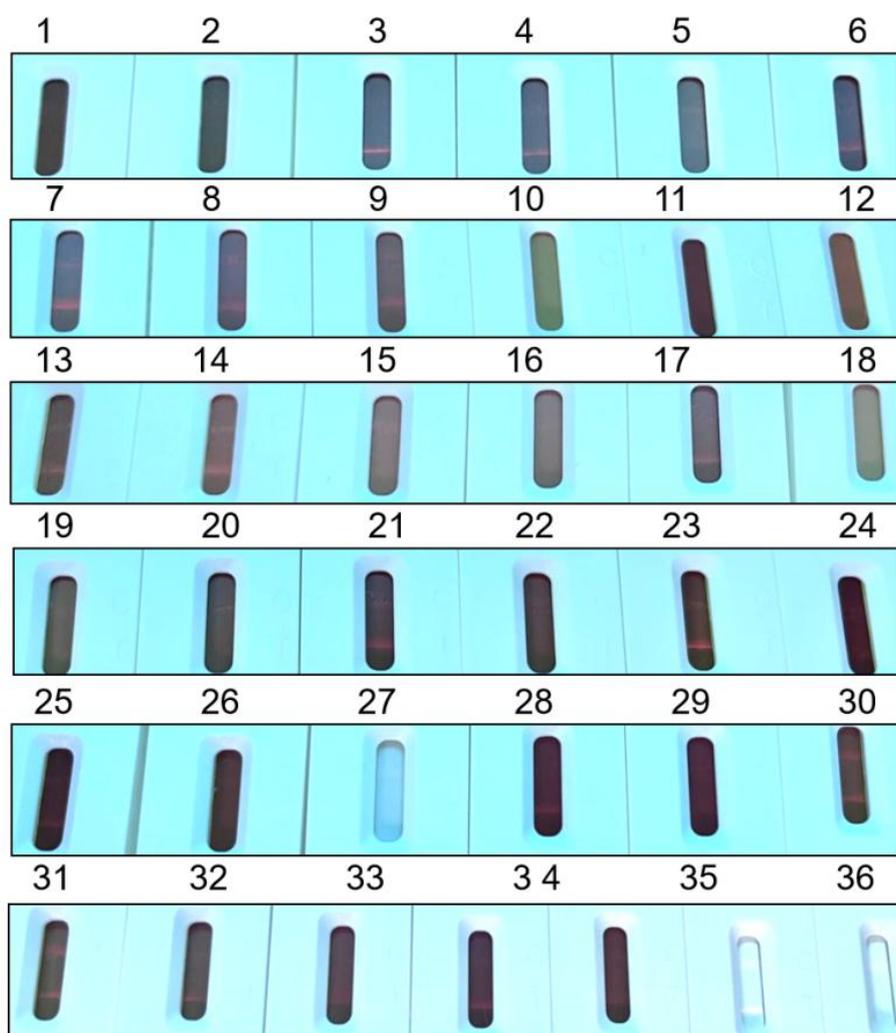


图 4-23 临床样品荧光微球试纸条检测结果

Fig.4-23 Results of fluorescent microsphere test strip in clinical samples

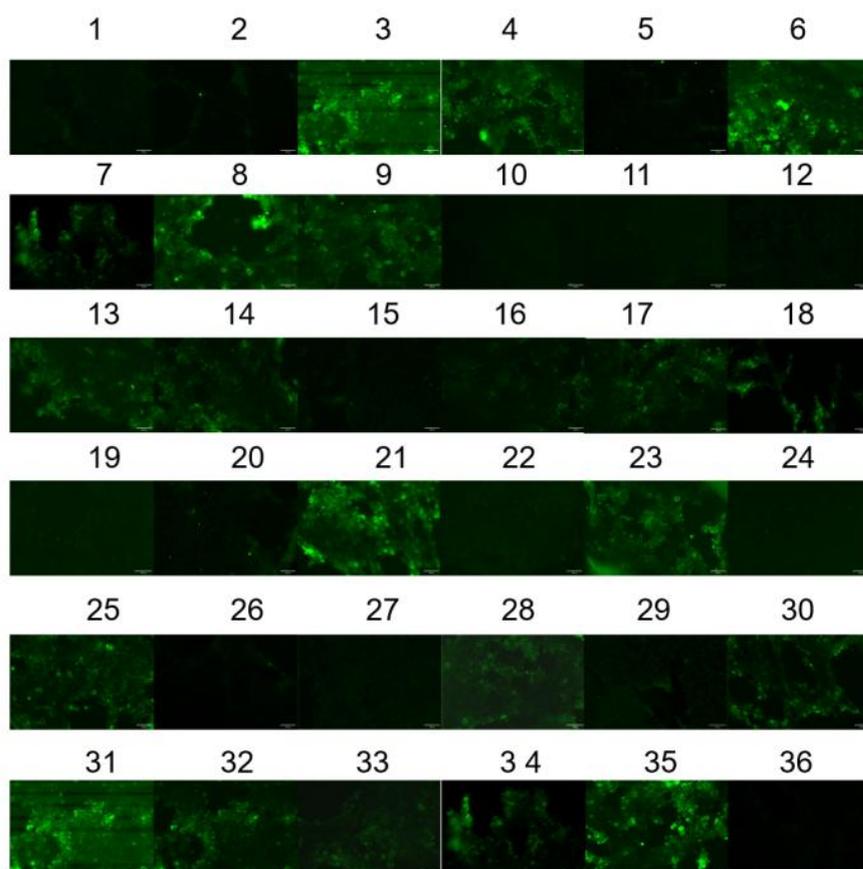


图 4-24 临床样品 IFA 检测结果

Fig.4-24 IFA test results of clinical samples

1-34: 猫临床血清样品; 35: 猫 FHV 阳性血清对照组; 36: 猫 FHV 阴性血清对照组

5 讨论

5.1 单克隆抗体的研制

FHV-1 单克隆抗体的研制, 不仅有助于开发抗体检测试剂盒以配合疫苗免疫的评估, 还可以进一步开发猫鼻气管炎单克隆抗体生物特效治疗药药。而本研究筛选到针对 FHV-gD 蛋白的 5 株特异性单克隆抗体, 其中 5E-6 为中和抗体。5 株单抗均能与 FHV-1 发生特异性反应, 与 FCV、FPV 无交叉反应, 并通过本章试验证明, 5

株单抗具有良好的特异性、稳定性。因此，本研究制备的单克隆抗体对 FHV-1 感染的预防与治疗具有一定积极意义。

本次实验原实验方案为：以 CHO 细胞表达的 FHV-gD、FHV-gE 蛋白混合免疫小鼠，筛选针对 FHV-gD、FHV-gE 的单克隆抗体。然而最终只筛选到 FHV-gD 单抗。对本次实验 FHV-gE 筛选失败原因及 FHV-gD 单抗筛选成功的原因进行分析总结，得到以下经验：1、免疫原选择：首先应选用具有良好免疫原性，浓度高且纯度较高的免疫原免疫小鼠，在 FHV-gD、FHV-gE 混合免疫过程中，由于纯化的 FHV-gE 蛋白浓度较低，免疫小鼠的 FHV-gE 血清抗体效价增长不明显，进行细胞融合时血清抗体效价仅达到 1: 2560，导致阳性杂交瘤细胞的筛选较为困难；2、实验动物选择：用于免疫的小鼠应选用 5~6 周龄，周龄小的小鼠免疫系统发育不完全，无法达到理想抗体水平，且对小鼠机体损害较大影响后续免疫。若实验鼠的周龄较大，免疫结束之后小鼠免疫系统可能已经开始退化，其机体刺激 B 细胞产生抗体的能力降低，可能导致融合后阳性率低下；3、免疫方案：选用合适的免疫佐剂，在进行乳化时应注意乳化时间以及免疫混合物的状态，例如弗氏佐剂与蛋白乳化时，混合物滴入水中不立刻溶解即可，如果入水立即溶解，说明乳化不充分，若入水长时间不溶解，则说明乳化过久，可能影响小鼠的吸收。此外，免疫的途径也可灵活搭配，皮下注射与腹腔注射交替使用。最后，应避免多次重复低剂量免疫，导致小鼠产生免疫耐受。实验后期提高 FHV-gE 蛋白免疫量，实验鼠的血清抗体水平始终不提升的原因可能是实验鼠已对 FHV-gE 蛋白产生免疫耐受。4、筛选方案：在进行阳性杂交瘤细胞筛选时，除了采用 FHV-gD 蛋白间接 ELISA 筛选，还可用辅以超离毒 ELISA 或间接免疫荧光实验进行同步筛选。以保证成功筛选到能与病毒反应的单抗。单抗制备过程中的每个步骤都十分关键，严格把握每一个细节，认真按照实验步骤来进行，才能保证实验的成功。

5.2 5E-6 抗体识别表位的鉴定

抗原表位是决定病毒结构蛋白的抗原性和诱导体液免疫应答的关键元素。对单克隆抗体进行 B 细胞表位定位，有助于深入研究病毒与宿主的作用机制，通过分析表位的保守性、覆盖性与特异性，对开发诊断试剂和治疗药物具有重要意义。

在本研究中，鉴定 5E-6 单克隆抗体识别的表位为 ³⁰⁸PIIISDDDDVP³¹⁸，与已发布

的 FHV-gD 氨基酸序列进行对比, 显示高度保守, 这表明 5E-6 中和抗体能够检测和中和大部分 FHV-1 毒株, 是良好的候选阻断抗体。但目前所公布的 FHV-gD 氨基酸序列较少, 其保守性待进一步评估。

这是 FHV- gD 蛋白线性中和表位的首次研究报道, 为 FHV-1 的基础研究和应用提供了生物学材料和分子基础, 为深入开发 FHV-1 单克隆抗体特异治疗药物和诊断试剂提供了理论依据。

5.3 时间分辨荧光微球试纸条抗体检测方法的建立

抗体诊断是用于检测 FHV-1 感染或免疫状态的主要手段, FHV-1 抗体的存在意味着有过感染或因疫苗免疫产生了体液免疫应答, 以此可以判断动物机体此时的身体状态, 决定是否治疗或加强免疫。因此, 需要一种灵敏、快速、准确的诊断方法, 以便能够有效检测出 FHV-1 抗体。而本研究的试验结果证明建立的荧光微球试纸条具有良好特异性, 敏感性以及可靠性, 可用于 FHV-1 抗体的快速检测。

对本次实验建立的荧光微球试纸条进行经验总结: 首先, 应明确检测的对象。在建立检测方法之前, 明确检测的对象为抗原或抗体, 若检测对象为抗原, 可采用双抗体夹心法组建试纸条, 检测抗体则可考虑阻断法等。其次是标记材料的选择, 标记材料对试纸条的敏感度至关重要, 可综合考虑检测现场条件选择理想的标记材料。最后是试纸条的材料及其他条件的优化, 其中 pH 值, 吸水垫、结合垫、样品稀释液等选择也会影响试纸条的效果。

本研究建立的双抗原夹心荧光微球试纸条敏感性为 1: 256, 而 IFA 实验检测的猫 FHV-1 阳性血清抗体效价为 1: 512, 敏感度相差 1 倍。使用研制的试纸条检测临床猫血清样品时, 由于溶血影响, 试纸条检测弱阳血清时的弱荧光带被遮盖, 导致试纸条与 IFA 检测结果不符, 此情况可通过更换样品点与结合垫的材质进行优化。本研究建立的荧光微球试纸条可借助 365 nm 的紫外照射仪实现定性检测, 借助专业的荧光试纸条读卡仪可实现半定量检测, 可根据需求选择不同的结果分析方式。

综上, 我们基于 FHV-1 单克隆抗体和 FHV-gD 蛋白开发了一种新型、快速、特异的荧光微球试纸条, 并可用于评估临床血清样本, 开发的荧光微球试纸条为临床检测 FHV-1 血清抗体提供了一种有理想的诊断方法。

6 结论

1.本研究通过杂交瘤细胞技术研制了 5 株针对 FHV-gD 蛋白的特异性单克隆抗体，命名为 2D-1、5E-6、2E-11、2A-12、7C-13，其中 5E-6 为中和抗体。

2.本研究鉴定 5E-6 中和抗体的线性 B 细胞表位为 308 PIIISDDDDVP 318 ，具有高度保守性。

3.本研究建立了基于 FHV-gD 蛋白与 5E-6 单抗的双抗原夹心荧光微球试纸条以检测 FHV-1 抗体。该试纸条特异性好、灵敏度与可靠性较高，可实现临床快速检测目的。

参考文献

1. 白艺兰, 刘健, 桂亚萍, 夏炉明, 龚国华, 朱晓英, 常晓静, 陈伟锋, 鞠厚斌, 王建, 赵洪进. 上海市宠物猫杯状病毒、疱疹病毒及流感病毒的分离与鉴定. 中国动物检疫, 2022, 39: 13-18
2. 陈晨, 李智华, 丁晨, 李亚东, 张辉, 宫悦, 刘彤云. 一株I型单纯疱疹病毒的分离鉴定及增殖特性. 中国病毒病杂志, 2015, 5: 306-312
3. 陈林文, 冀伟, 曹龙龙, 等. 猫泛白细胞减少症病毒、猫杯状病毒和猫疱疹病毒 1 型三重 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 中国预防兽医学报, 2023, 45(11): 1141-1147
4. 程明俊: 基于蛋白质序列和深度集成架构的 B 细胞表位预测研究. [硕士学位论文]. 吉林: 东北师范大学, 2020.
5. 程雅玲, 吴天龙, 刘英玉. 三例猫疱疹病毒I型的诊断与治疗. 新疆畜牧业, 2023, 39: 37-40
6. 方蓉, 张达, 王正祥. 稀土铈有机配合物的研究进展及其应用. 包装工程, 2020, 41: 91-102
7. 顾光磊, 方敏. 单克隆抗体的研究进展及上市药物分析. 生物工程学报, 1-25
8. 韩聪: 猫疱疹病毒兔源单克隆抗体的制备与双抗夹心 ELISA 的建立. [硕士学位论文]. 安徽: 安徽农业大学, 2023.
9. 何力力: 猫杯状病毒、细小病毒、疱疹病毒 I 型核酸免提取三重荧光 RT-LAMP 检测方法的建立及试剂盒研制. [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2021.
10. 黄坚, 刘韵佳, 杨晓农, 李妍. 猫疱疹病毒 1 型 RPA-Cas12a-LFD 检测方法的建立及初步应用. 畜牧兽医学报, 2022, 53: 1638-1643
11. 冀中豪, 任文陟, 郝杨, 张铭锦, 高巍. 猫疱疹病毒I型环介导等温扩增检测方法的建立. 微生物学杂志, 2018, 38: 71-76
12. 李海波. 猫疱疹病毒病的诊断及治疗. 北方牧业, 2023, 35-37

13. 李娜, 王真真, 杜汉宇, 贾楠楠, 宋若楠, 朱杰, 李传峰, 程松, 梁留存, 刘光清, 孟春春. I型猫疱疹病毒 gB 蛋白的截短表达及多克隆抗体的制备. 中国兽医科学, 2022, 52: 1531-1537
14. 刘迪, 许鑫燕, 郑亚婷, 杨育鹏, 康洪涛, 姜骞, 杨鸣发, 刘家森, 曲连东. 猫疱疹病毒 ERA-LFD 检测技术的建立与应用. 中国兽医科学, 2022, 52: 11-18
15. 刘健, 李鑫, 徐锋, 杨显超, 邓波, 杨德全, 鞠厚斌, 葛杰, 龚国华, 周锦萍. 猫传染性鼻气管炎病毒的分离与鉴定. 中国动物传染病学报, 2016, 24: 22-26
16. 刘美慧, 焦翠翠, 陈宪平, 余梦桃, 李海伦, 张海丽, 李媛媛, 黄培, 王化磊. 猫疱疹病毒 I 型核酸可视化检测方法的建立与评价. 中国兽医报, 2023, 43: 915-923
17. 刘秋瑾, 尹珺伊, 张军, 田秋丰, 王岩, 白长胜, 秦平伟, 王欢, 朱庆贺, 苗艳, 姚爽, 薛沾枚. 猫常见病毒性疾病的治疗及预防. 现代畜牧科技, 2022, 96-98
18. 刘文俊, 王仲兵, 郑明学, 齐守军, 古少鹏. 免疫层析快速诊断试纸条的制备及在动物疾病诊断中的应用. 畜牧兽医科技信息, 2009, 8-10
19. 马凡舒, 张蕾, 王洋, 孙彦刚, 闫喜军. B 细胞抗原表位预测方法的研究进展. 中国畜牧兽医, 2016, 43: 63-67
20. 牛江婷, 伊淑帅, 刘宏凯, 李登亮, 董国英, 胡桂学. 猫病毒性鼻气管炎治疗性药物研究进展. 中国兽药杂志, 2017, 51: 65-70
21. 牛江婷, 伊淑帅, 王开, 董浩, 胡桂学. 猫疱疹病毒 1 型分子生物学研究进展. 病毒学报, 2017, 33: 274-278
22. 牛同飞. 昆明市猫五种上呼吸道病原的流行病学调查与疾病诊治. [硕士学位论文]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2023.
23. 秦雨婷, 泮明珠, 张娟. 抗体药物在肿瘤治疗中的应用与进展. 药学进展, 2024, 48: 6-19
24. 石龙艳, 黄舒萍, 郭琳, 李祥, 王贤, 陆雨欣, 苏雨晴, 徐海涛, 周晓禹, 李大鹏, 宫明, 王亚君. 哈尔滨圈养东北虎 FHV-1 的巢式 PCR 检测及 gD 基因序列分析. 野生动物学报, 2022, 43: 810-815

25. 孙春艳, 钱鹏, 王洁, 曹玉娇, 崔宁宁, 霍宁宁, 黄柏成, 习向锋, 刘玉秀, 林德贵, 田克恭. 猫疱疹病毒 1 型的分离鉴定及 gD 基因序列分析. 动物医学进展, 2020, 41: 30-35
26. 唐明瑞, 谢光洪, 刘祥雨. 一例猫疱疹病毒感染慢性角膜炎治疗体会. 山东畜牧兽医, 2023, 44: 48-50
27. 陶伟杰, 刘雪娇, 宋晓莉, 程宝钰, 于永乐, 单虎, 张传美. 猫疱疹病毒 1 型的分离鉴定及生物学特性分析. 病毒学报, 2023, 39: 1053-1061
28. 陶玉珍, 刘燕霏, 杨建德. 郑州市某宠物医院猫疱疹病毒和杯状病毒流行病学调查. 天津农学院学报, 2023, 30: 59-62
29. 王吉, 卫礼, 付瑞, 李晓波, 王淑菁, 巩薇, 岳秉飞, 贺争鸣. 猫疱疹病毒 I 型(FHV-1)抗体 ELISA 检测方法的建立与初步应用. 实验动物科学, 2014, 31: 1-5
30. 王吉, 付瑞, 王莎莎, 冯育芳, 王淑菁, 李威, 秦骁, 黄宗文, 李晓波, 巩薇, 岳秉飞. 北京和河北部分地区猫疱疹病毒 I 型感染情况调查. 中国病毒病杂志, 2020, 10: 364-368
31. 王旭贞, 周登元, 曹龙龙, 彭佳佳, 李国红, 史开拓, 张燕. 一株猫疱疹病毒 I 型的分离鉴定及其单克隆抗体的制备与应用. 中国动物传染病学报, 1-11
32. 魏莲清, 郭忠奎, 刑晓, 赵晓雪, 张凯丽, 葛文霞. 1 例猫传染性鼻气管炎的诊断与治疗. 现代畜牧兽医, 2023, 52-54
33. 魏弯弯: 60 例慢性口炎患猫不同治疗方案的临床疗效及预后因素分析. [硕士学位论文]. 安徽: 安徽农业大学, 2022.
34. 吴培欣: 2016~2017 年广州地区 FHV-1 的分离鉴定及全基因组测序. [硕士学位论文]. 华南农业大学, 2017.
35. 吴振华, 宋立刚, 刘殿波. 猫上呼吸道感染的诊断与治疗. 山东畜牧兽医, 2017, 38: 26-27
36. 肖建雄, 单芬, 黄嘉欣, 陈武. 东北虎和华南虎源传染性鼻气管炎病毒的 PCR 检测和序列分析. 野生动物, 2013, 34: 146-151

37. 许鹏程: 沈阳市猫传染性鼻气管炎、杯状病毒病流行病学调查与治疗试验. [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
38. 许鑫燕: 猫呼吸道病毒混合感染病例中 FHV-1 的分离鉴定与致病性分析. [硕士学位论文]. 黑龙江: 东北农业大学, 2022.
39. 杨德全, 卢先东, 李鑫, 沈海潇, 杨显超, 葛菲菲, 刘艳红, 陶田谷晟, 王建, 王晓旭, 夏炉明, 龚国华, 鞠厚斌, 赵洪进. 猫科动物六种呼吸道病原 LAMP 微流控检测方法的建立及应用. 中国动物传染病学报, 1-10
40. 于得静: 猫疱疹病毒 I 型灭活疫苗的制备及宠物猫免疫效果评价. [硕士学位论文]. 吉林: 吉林农业大学, 2021.
41. 张定姣, 李坤, 韦克林. 伪狂犬病病毒分子生物学研究进展. 贵州畜牧兽医, 2013, 37: 17-19
42. 张凡, 张娟, 徐家馨, 吴玉龙, 波清, 乔媛媛. 信号肽类型对新布尼亚病毒 SFTSV Gn 蛋白靶向表达特征影响的研究. 中国病原生物学杂志, 2023, 18: 132-135
43. 张继一, 刘宝山, 赵玉军. 猫疱疹病毒 1 型 gD 基因的表达. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 89-90
44. 张继一, 王竹, 刘宝山. 猫疱疹病毒 1 型部分糖蛋白的研究进展. 养殖技术顾问, 2013, 212-213
45. 张先惠, 肖越峰, 刘超, 蒋倩汶, 张无为, 孙清, 杜洋. 2021 年成都市猫上呼吸道感染常见病原调查分析. 现代畜牧科技, 2023, 36-38
46. 张晓明, 胡俊, 彭仕明, 陈武. 虎源传染性鼻气管炎病毒 gD 基因重组真核表达载体的构建. 动物医学进展, 2014, 35: 70-73
47. 赵洪进, 白艺兰, 杨显超, 朱九超, 卢军, 陶田谷晟, 于玮茹, 葛杰, 刘健, 鞠厚斌, 王建. 上海市门诊宠物猫和动物园流浪猫的猫疱疹病毒 1 型中和抗体检测. 中国动物检疫, 2020, 37: 127-130
48. 周光荣: 猫角膜溃疡临床调查及分析. [硕士学位论文]. 山东: 山东农业大学, 2023.
49. 周红蕾, 程淑琴, 李佳鹏, 刘涵, 姚志兰, 张蕾. 猫疱疹病毒 I 型、猫杯状病毒、支气管败血波氏杆菌多重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用. 畜牧与兽医, 2023, 55: 130-138

50. 周洁: 实验用猫病毒检测技术研究与应用. [硕士毕业论文]. 上海: 上海实验动物研究中心, 2019.
51. 卓训妮. 侧流免疫层析技术在新冠肺炎诊断中的应用研究进展. 中国口岸科学技术, 2021, 3: 42-47
52. 毛静: 犬副流感病毒单克隆抗体的制备及其胶体金检测技术的建立. [硕士毕业论文]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
53. 刘思源: 非洲猪瘟病毒 CD2v 蛋白单克隆抗体的筛选鉴定与阻断 ELISA 检测方法建立. [硕士毕业论文]. 河南: 河南农业大学, 2023.
54. Albà, MM, R J Das, C A Orengo and P. Kellam. Genomewide function conservation and phylogeny in the herpesviridae. *Genome Research*, 2001, 11: 43-54
55. Beggs, M, M Novotny and S Sampedro. A self performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic gonadotrophin (HCG) in urine and serum. *Clinical Chemistry*, 1990, 36: 1084-1085
56. Broughton, J P, X D Deng, G X Yu, C L Fasching, V Servellita, J Singh, X Miao, J A Streithorst, A Granados, A Sotomayor-Gonzalez, K Zorn, A Gopez, E Hsu, W Gu, S. Miller, C Y Pan, H Guevara, D A Wadford, J S Chen and C Y Chiu. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 870-872
57. Davison, A J, R Eberle, B Ehlers, G S Hayward, D J McGeoch, A C Minson, P E Pellett, B Roizman, M J Studdert and E. Thiry. The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 2008, 154: 171-177
58. Dawson, D A, J Carman, J Collins, S Hill and M R. Lappin. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline herpesvirus 1 IgG in serum, aqueous humor, and cerebrospinal fluid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, 10: 315-319
59. Fargeaud, D, C B Jeannin, F Kato and G Chappuis. Biochemical-Study of the Feline Herpesvirus-1 Identification of Glycoproteins by Affinity. *Archives of Virology*, 1984, 80: 69-82

60. Fischer, S, R Handrick K Otte. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances*, 2015, 33:1878-1896
61. Gaskell, R, S Dawson, A Radford and E Thiry. Feline herpesvirus. *Veterinary Research*, 2007, 38:337-354
62. Gaskell, R M. R C Povey. Experimental Induction of Feline Viral Rhinotracheitis Virus Re-Excretion in Fvr-Recovered Cats . *Veterinary Record*, 1977, 100:128-133
63. Grail, A, D A Harbour and W Chia. Restriction Endonuclease Mapping of the Genome of Feline Herpesvirus Type-1. *Archives of Virology*, 1991,116:209-220
64. Henzel, A, M C. S Brum, C Lautert, M Martins, L T. Lovato R. Weiblen. Isolation and Identification of Feline Calicivirus and Feline Herpesvirus in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43:560-568
65. Jin, T, L. Yong-xiang L. Xiao-xiao. The mechanism by which feline herpesvirus escapes host innate immunity to establish latent infection. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40:769
66. Karplus, PA. G E. Schulz. Prediction of Chain Flexibility in Proteins - a Tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften*, 1985, 72:212-213
67. Leavy, O. The birth of monoclonal antibodies. *Nature Immunology*, 2016,17:S13-S13
68. Lee, Y, R K Maes, J M Kruger, M Kiupel, K S Giessler and G S Hussey. Safety and Efficacy of Felid Herpesvirus-1 Deletion Mutants in Cats. *Viruses-Basel*, 2021, 13:61-63
69. Li, J, J Macdonald , F von Stetten. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst* , 2020, 145:1950-1960
70. Liao, T, F Yuan, C Shi, CX He and Z Li. Lanthanide chelate-encapsulated polystyrene nanoparticles for rapid and quantitative immunochromatographic assay of procalcitonin. *RSC Advances*, 2016, 6:103463-103470
71. Limcumpao, JA, T Horimoto, E Takahashi and T Mikami. Intracellular-Localization and Epitope Mapping of Feline Herpesvirus Type-1 Glycoproteins. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 1990, 52:351-359

72. Limcumpao, J A, T Horimoto, X Xuan, E Takahashi and T Mikami. Immunological Relationship between Feline Herpesvirus Type-1 (Fhv-1) and Canine Herpesvirus (Chv) as Revealed by Polyvalent and Monoclonal-Antibodies. *Archives of Virology*, 1990, 111:165-176
73. Lobato, I M, C K, O'Sullivan. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 98:19-35
74. Lubinski, J, L Y Wang, D Mastellos, A Sahu, J D Lambris ,H M Friedman. In vivo role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *Journal of Experimental Medicine*, 1999, 190:1637-1646
75. Maeda, K, K Hirasawa, Y Kawaguchi, M Ono, T Mori, T Gemma, N Yokoyama, K Doi ,T Mikami. Expression and Identification of the Feline Herpesvirus Type-1 Glycoprotein-B (Gp143/108). *Virus Research*, 1995, 39:55-61
76. Maeda, K, T Horimoto, T Mikami. Properties and functions of feline herpesvirus type 1 glycoproteins. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60:881-888
77. Maeda, K, M Ono, Y Kawaguchi, M Niikura, K Okazaki, N Yokoyama, Y Tokiyoshi, Y Tohya ,T Mikami. Expression and properties of feline herpesvirus type 1 gD (hemagglutinin) by a recombinant baculovirus. *Virus Research*, 1996, 46:75-80
78. Maggs, D J. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of feline herpesvirus type 1. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 2005, 20:94-101
79. Maggs, D J, M R Lappin, J S Reif, J K Collins, J Carman, D A Dawson , C Bruns. Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpesvirus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 214:502-507
80. Mijnes, J D F and R J de Groot. Structure-function analysis of the feline herpesvirus virulence factors gE and gI. *Veterinary Microbiology*, 1999, 69:89-91
81. Nakamura, K, Y Ikeda, T Miyazawa, N T PNguyen, D D Duong, K H Le, S D Vo, L V Phan, T Mikami , E Takahashi. Comparison of prevalence of feline herpesvirus

- type 1, calicivirus and parvovirus infections in domestic and leopard cats in Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1999, 61:1313-1315
82. Omasa, T, M Onitsuka , W D Kim. Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11:233-240
83. Osterrieder. N Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Research*, 1999, 59:165-177
84. Piepenburg, O, C H Williams, D L Stemple and N A Armes. DNA detection using recombination proteins. *Plos Biology*, 2006, 4:1115-1121
85. Richter, M, L Schudel, K Tobler, F Matheis, A Vögtlin, A Vanderplasschen, B Costes, B Spiess, M Ackermann. Clinical, virological, and immunological parameters associated with superinfection of latently with FeHV-1 infected cats. *Veterinary Microbiology*, 2009, 138:205-216
86. Rota, P A, R K Maes and W T Ruyechan. Physical Characterization of the Genome of Feline Herpesvirus-1. *Virology*, 1986, 154:168-179
87. Rue, C A ,P Ryan. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparan sulfate proteoglycans. *Journal of General Virology*, 2002, 83:301-309
88. Shi, L, S Huang, Y Lu, Y Su, L Guo, L Guo, W Xie, X Li, Y Wang, S Yang, H Chai and Y Wang. Cross - species transmission of feline herpesvirus 1 (FHV - 1) to chinchillas. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8:2532-2537
89. Spatz, S J, P A. Rota and R K Maes. Identification of the Feline Herpesvirus Type-1 (Fhv-1) Genes Encoding Glycoprotein-G, Glycoprotein-D, Glycoprotein-I and Glycoprotein-E - Expression of Fhv-1 Glycoprotein-D in Vaccinia and Raccoon Poxviruses. *Journal of General Virology*, 1994, 75:1235-1244
90. Stiles, J.Feline herpesvirus. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 2003, 18:178-185
91. Sussman, M D, R K Maes, J M Kruger, S J Spatz , P J Venta. A Feline Herpesvirus-1 Recombinant with a Deletion in the Genes for Glycoproteins Gi and Ge Is Effective as a Vaccine for Feline Rhinotracheitis. *Virology*, 1995, 214:12-20

92. Van de Walle, G R, H W Favoreel, H J Nauwynck, M B Pensaert. Antibody-induced internalization of viral glycoproteins and gE-gI Fc receptor activity protect pseudorabies virus-infected monocytes from efficient complement-mediated l. ysis. *Journal of General Virology*, 2003, 84:939-947
93. Wang, J C, L B Liu, J F Wang, X X Sun ,W Z. Yuan. Recombinase Polymerase Amplification Assay-A Simple, Fast and Cost-Effective Alternative to Real Time PCR for Specific Detection of. *Plos One*, 2017, 12:52-54
94. Woo, P C, S K Lau, C S Lam, C C Lau, A K Tsang, J H Lau, R Bai, J L Teng, C C Tsang, M Wang, B J Zheng, K H Chan and K Y Yuen. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*,2012,86:3995-4008
95. Zhou, C, Z K Chen, L Zhang, D Y Yan, T T Mao, K L Tang, T Y Qiu and Z W Cao. SEPPA 3.0-enhanced spatial epitope prediction enabling glycoprotein antigens. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47:388-394