

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

猫细小病毒抗体荧光微球检测试纸条制备

硕 士 研 究 生: 商金源

学 号: 82101215582

指 导 教 师: 罗国良 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 特产研究所

研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Preparation of Fluorescent Microsphere Test Strips for Feline Parvovirus Antibodies

Candidate: SHANG Jinyuan

Student ID: 82101215582

Supervisor: Associate Prof. LUO Guoliang

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Institute of Special Animal and
Plant Sciences**

Graduate School

June 2024

摘 要

猫细小病毒 (*Feline parvovirus*, FPV) 是一种可以导致猫泛白细胞减少综合征的细小病毒科 (*Parvoviridae*) 病毒。FPV 感染后的猫会出现典型的临床症状, 包括高热、腹泻、白细胞减少等。泛白细胞减少症使猫的免疫力降低, 容易合并继发性感染。对于幼龄猫和未接种疫苗的猫, FPV 感染的风险更高, 且病情可能更加严重。及时接种疫苗是控制预防该病的重要手段, 与此同时及时的抗体检测是有效免疫的保障。

本研究开发了一种新型检测方法, 荧光微球免疫层析试纸条 (Fluorescent microsphere immunochromatographic test strips, FM-ICTS), 来检测猫血清中 FPV 抗体。研究中使用 FPV 衣壳蛋白 VP2 作为特异性结合 FPV 抗体的抗原蛋白。本研究成功表达并纯化了 VP2 蛋白。将纯化后的 VP2 蛋白包被于检测线 (Test, T), 并将荧光微球偶联的兔抗猫抗体包被于结合垫、山羊抗兔抗体包被于质控线 (Control, C) 组装 FM-ICTS。通过优化条件, 确定了 FM-ICTS 最佳检测时间为 20 min; Tris 缓冲液为最适偶联缓冲液; 6 μg 兔抗猫抗体/100 μg 荧光微球为最佳偶联比; T 线和 C 线的最佳包被量分别为 0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 和 0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

通过测定一系列已知浓度的猫细小病毒抗体样品的 T/C 比值, 建立血清血凝抑制效价与 T/C 比值的标准曲线。通过检测猫疱疹病毒和猫杯状病毒抗体阳性的血清样本, 结果证明 FM-ICTS 具有良好的特异性。重复性试验中 CV 值均低于 11%。对来自吉林省长春市的 84 个临床样本进行 FM-ICTS 检测, 阳性检出率为 78.57% (66/84), 各样品所测得血凝抑制 (Haemagglutination inhibition, HI) 效价与 HI 试验结果符合率为 87.98%。此外, FM-ICTS 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放三个月后保持了其检测性能。综上所述, 本研究构建了检测 FPV 抗体的 FM-ICTS, 该 FM-ICTS 为 FPV 抗体检测与疫苗接种计划安排提供了新途径, 有望在兽医领域发挥重要作用。

关键词: 猫细小病毒, 抗体检测, 荧光微球试纸条

Abstract

Feline parvovirus (FPV) is a member of the *Parvoviridae* family that can cause feline panleukopenia syndrome. Infected cats typically exhibit typical clinical symptoms including high fever, diarrhea, and leukopenia. The panleukopenia syndrome reduces the cat's immunity, increasing susceptibility to secondary infections. Kittens and unvaccinated cats are particularly vulnerable to FPV, often experiencing severe symptoms. Vaccination is essential for disease control and prevention, while timely antibody testing is crucial for effective immunization strategies.

This study developed a novel detection method, Fluorescent Microsphere Immunochromatographic Test Strips (FM-ICTS), for FPV antibody detection in cat serum. The method utilizes the FPV capsid protein VP2 as the antigen, which specifically binds to FPV antibodies. The VP2 protein was successfully expressed and purified. The purified VP2 protein was immobilized on the test line T, and rabbit anti-cat antibody conjugated with fluorescent microspheres was immobilized on the binding pad. Goat anti-rabbit antibody was immobilized on the control line C to assemble the FM-ICTS. Optimization determined the ideal detection time to be 20 minutes, Tris buffer as the optimal coupling buffer, and a coupling ratio of 6 μg rabbit anti-cat antibody per 100 μg fluorescent microspheres. The optimal coating amounts for T and C lines were established at 0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}$ and 0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}$, respectively.

A standard curve correlating serum hemagglutination inhibition (HI) titers with T/C ratios was created using known concentrations of FPV antibody samples. Specificity tests using serum samples positive for feline herpesvirus and feline calicivirus antibodies confirmed FM-ICTS's specificity. Repeated experiments yielded a coefficient of variation (CV) consistently below 11%. Clinical sample testing in Changchun, Jilin Province, revealed a 78.57% positive detection rate (66/84 samples), with an 87.98% concordance rate between measured HI titers and HI test results. Additionally, FM-ICTS retained its detection capabilities after three months of storage at 25°C.

In summary, the FM-ICTS offers a new method for detecting FPV antibodies, facilitating vaccine scheduling and potentially contributing significantly to veterinary medicine.

Keywords: Feline parvovirus, Antibody assay, Fluorescent microsphere immunochromatographic test strips

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 猫细小病毒概述.....	1
1.1.2 猫细小病毒感染机制.....	2
1.1.3 猫细小病毒疫苗接种与抗体检测.....	4
1.2 表达系统选择与荧光微球免疫层析试纸条	5
1.2.1 大肠杆菌表达系统与 pCold 表达载体.....	5
1.2.2 荧光微球简介.....	5
1.2.3 荧光微球免疫层析试纸条的前景与优势	6
1.3 研究目标和意义.....	7
第二章 猫细小病毒 VP2 蛋白的制备	8
2.1 实验材料.....	8
2.1.1 病毒、载体、菌株.....	8
2.1.2 主要实验材料与试剂.....	8
2.1.3 主要实验设备.....	9
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 pCold-FPV-VP2 表达载体的构建	9
2.2.2 表达、纯化和鉴定猫细小病毒 VP2 蛋白	11
2.3 实验结果.....	12
2.3.1 构建 VP2 蛋白表达载体 pCold-FPV-VP2.....	12
2.3.2 VP2 蛋白表达条件的优化.....	13
2.3.3 VP2 蛋白的纯化与鉴定.....	14
2.4 讨论.....	15
第三章 荧光微球试纸条的优化	16
3.1 实验材料.....	16
3.1.1 病毒和临床样本来源.....	16
3.1.2 主要实验材料与试剂.....	16
3.1.3 主要实验设备.....	16
3.2 实验方法.....	16
3.2.1 荧光微球试纸条的组装条件优化.....	16
3.2.2 猫血清中 FPV 抗体血凝抑制效价检测	19
3.2.3 荧光微球试纸条性能评估.....	20
3.3 荧光微球试纸条组装优化结果	21
3.3.1 荧光微球荧光值变化趋势.....	21

3.3.2 荧光微球与兔抗猫抗体偶联缓冲液优化	22
3.3.3 荧光微球与兔抗猫抗体最佳偶联量.....	22
3.3.4 试纸条 T 和 C 线最佳包被量	23
3.4 荧光微球试纸条性能评估结果	24
3.4.1 敏感性试验并建立标准曲线.....	24
3.4.2 特异性试验.....	25
3.4.3 重复性试验.....	26
3.4.4 临床试验.....	27
3.4.5 稳定性试验.....	28
3.5 讨论.....	29
3.5.1 即时定量检测 FPV 抗体的市场价值	29
3.5.2 荧光微球免疫层析试纸条制备条件优化	30
3.5.3 FPV 抗体荧光微球免疫层析试纸条性能测试	30
第四章 结论.....	32
参考文献.....	33

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	大肠杆菌
Eu	Europium	铕
FPV	Feline parvovirus	猫细小病毒
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
LFIA	Lateral flow immunoassay	侧向层析免疫分析法
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid	2-（N-吗啉）乙磺酸一水合物
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt	N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐
NLS	Nuclear localization sequence	核定位基序
NS	Non-structural protein	非结构蛋白
PLA A2	Phospholipase A2	磷脂酶 A2
VP	Capsid viral protein	衣壳蛋白
WB	WesternBlot	蛋白免疫印记试验

第一章 绪论

1.1 研究背景

1.1.1 猫细小病毒概述

猫细小病毒（*Feline parvovirus*，FPV）属于细小病毒科（*Parvoviridae*）细小病毒亚科（*Parvovirinae*）原细小病毒属（*Protoparvovirus*），又因为该病毒可以引起猫泛白细胞减少综合征（FPL）被称为猫泛白细胞减少综合征病毒，在 1928 年首次被发现，感染宠物（猫）、经济动物（水貂）以及野生动物（虎、狮、豹等）并引起急性、致命的高度传染性疾病（Minh et al., 2023）。FPV 的环境稳定性和生存能力很强，具有通过直接和间接接触感染动物以及通过环境传播的能力（Jenkins E et al., 2020）。由于 FPV 基因组的编码能力有限且复制过程以及结构亚基和衣壳组装的核易位都与宿主细胞的细胞周期紧密耦合（Gil-Ranedo J et al., 2015），所以 FPV 更容易在分裂旺盛的细胞中进行复制（如肠隐窝、心肌细胞和骨髓前体细胞）。

FPV 具有直径约 18~26nm 的无包膜蛋白衣壳，该衣壳呈 T=1 二十面体对称结构。该衣壳由 60 个亚基组成，其中 VP1 和 VP2 组成比例近似 1:10。FPV 基因组为约 5kb 单链 DNA，DNA 的 5'端发夹端粒约为 120nt，呈 T 型结构；而 3'端右端发夹约为 250nt，呈 Y 型结构（图 1-1）。FPV 基因组有两个主要的开放阅读框（Open reading frame，ORF），分别在 p4 和 p38 启动子的控制下编码复制所必需的非结构蛋白（Non-structural protein，NS）和结构蛋白—衣壳蛋白（Capsid viral protein，VP）（图 1-1）（Mietzsch M et al., 2019）。

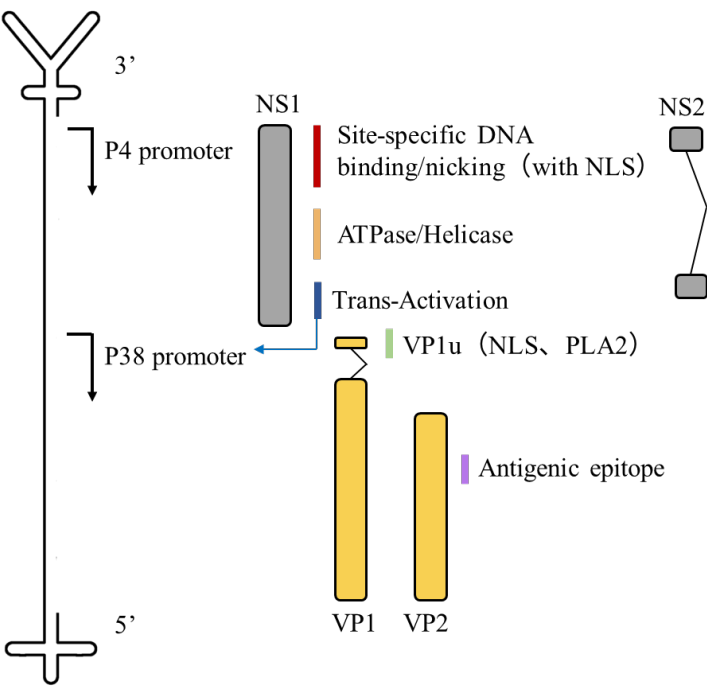


图 1-1 FPV 基因组及编码蛋白（商金源 等, 2023）

Fig. 1-1 FPV genome and encoded proteins

NS 蛋白是细小病毒复制过程中不可或缺的。NS1 是一种 80 kD 左右的核磷蛋白、复制起始蛋白, 含有 N 端起源结合结构域、解旋酶结构域和 C 末端交互结构域, 具有特异性 DNA 结合位点以及 ATP 酶、切口酶和解旋酶活性 (Mattola S et al., 2022), 参与调节病毒基因表达、切割病毒 DNA 基因组, 也是细胞毒性的主要介质, 在细胞增殖、细胞周期控制、细胞凋亡、线粒体呼吸和糖酵解相关通路中参与调节 (Lezhnin et al., 2015; Mäntylä E et al., 2017)。而 NS2 (25 kDa) 的作用未被清晰的确定, 其可能在病毒复制、病毒 mRNA 转录、衣壳的组装与核出口等过程中发挥作用 (Mattola S et al., 2021)。FPV 的 NS2 C 末端以及卷曲螺旋区域被证明可以抑制干扰素的产生 (Interferon, IFN), 其通过靶向丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Threonine-protein kinase, TBK1) 并阻止其被干扰素基因刺激物 (Stimulator of interferon genes, STING) 蛋白募集, 从而破坏下游蛋白 IFN 调节因子 3 (IFN regulatory factors3, IRF3) 的磷酸化, 达到抑制 IFN 的目的以减弱先天免疫反应实现免疫逃避 (Kang H et al., 2017)。NS1 和 NS2 在病毒 DNA 复制中都有作用, 但 NS1 是细胞毒性的主要介质, 单纯的 NS1 表达足以杀死癌细胞。

VP 蛋白 ORF 编码两种结构蛋白 VP1 和 VP2。VP1 蛋白大约 80 kDa, 在 FPV 衣壳中占比很少, 含有独特的 N 端延伸, 一个 143 个残基的 N 末端序列, 称为 VP1u, 该序列含有参与核定位的碱性氨基酸基序 (Nuclear localization sequence, NLS) 以及会影响磷脂酶 A2 (Phospholipase A2, PLA2) 酶活性 (Vihinen-Ranta M et al., 2002) (图 1-1); VP2 蛋白大约 64 kDa, 是 FPV 主要的衣壳成分, VP2 蛋白由一个核心的八链 β -桶基序组成, 其中一些 β -链通过相互连接的表面环连接, VP2 蛋白与受体识别和核转位有关 (Tu M et al., 2015), 且含有刺激产生中和抗体的主要表位, VP2 蛋白关键氨基酸位点的突变会影响其受体结合、抗原特征和宿主范围 (Fei-fei et al., 2017)。2018 年在中国成都, 从一只大熊猫中分离出的 FPV 具有独特的 G299E 突变 (Yi S et al., 2022), 该独特的突变 G299E (Gly $\rightarrow$ Glu) 位于 VP2 环 3 (Loop 3) 的表面暴露部分 (299-300-301), 位于衣壳三倍尖峰的肩部, 这是宿主范围和抗原性的关键决定因素之一 (Allison A B et al., 2015; Lee D W et al., 2016; Hoang M et al., 2020)。综上所述, 因为 VP 蛋白的高免疫原性以及其对于细小病毒的感染具有决定性作用, 所以衣壳蛋白, 特别是 VP2 蛋白, 便一直是 FPV 等细小病毒研究的热点。而对于该属的一些成员, 例如猪细小病毒 (*Porcine parvovirus*, PPV), 会在基因组包装后通过水解切割 VP2 的 N 末端 15~18 个氨基酸产生 VP3 (Mietzsch M et al., 2019; Farr G A et al., 2006)。

1.1.2 猫细小病毒感染机制

衣壳在 FPV 感染中介导病毒附着在靶细胞的转铁蛋白受体 (Transferrin Receptor, TfR), 结合位点位于病毒衣壳的三倍轴区域 (图 1-2) (Parker et al., 2001; Fei-fei et al., 2017)。但体外血凝试验显示 CPV 和 FPV 可以通过唾液酸 (Sialic acid, SA) 与红细胞结合, 同时也有研究证明改变或消除 TfR 的内化信号并不能预防其感染 (Ros C et al., 2017)。FPV 仅在弱酸性 (pH=6.2) 条件下具有血凝活性, 并且都受到溶液中钙离子浓度影响 (Simpson et al., 2000)。FPV 结合 SA 的能力也使得其可以与肠粘液、组织碎片和食物中的 SA 结合, 使其在环境中存在时间更久也更容易传播。FPV 在与功能受体结合后被宿主细胞的内吞作用内化 (Ros C et al., 2017), 一般是通过网格蛋白介导的内吞 (Clathrin-mediated endocytosis, CME)。当病毒衣壳与一定数量的 TfR 结合

后在细胞膜上横向扩散,一些病毒到形成网格蛋白包被的区域被捕获,而另一些病毒则在结合部位诱导网格蛋白组装(图 1-2)(Cureton D K et al., 2012)。虽然 CME 是细小病毒主要的内吞途径,但也存在其他内吞途径,例如 MVM 就确定了还有至少 3 种不同的机制:小窝蛋白(Caveolin)、脂筏(Lipid-raft)和网格蛋白非依赖性载体介导的内吞途径(Garcin et al., 2015)。

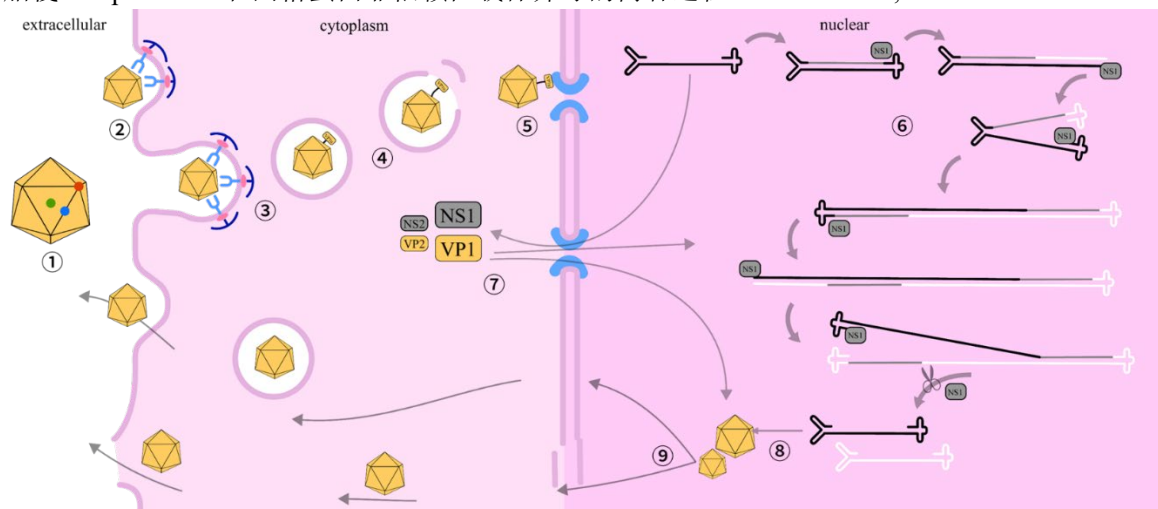


图 1-2 FPV 感染与复制机制示意图(商金源 等, 2023)

Fig. 1-2 Illustration of the infection and replication mechanism of FPV

注: (1) FPV 颗粒二十面体结构, 红: 五倍轴, 绿: 三倍轴, 蓝: 二倍轴; (2) FPV 衣壳与细胞膜表面一种或多种特定受体结合; (3) FPV 衣壳通过网格蛋白介导的内吞作用内化; (4) 病毒通过磷脂酶裂解内体膜从内体逃逸; (5) FPV 通过核孔复合体入核; (6) 病毒基因组复制机制; (7) 表达 NS1 蛋白并入核参与复制和衣壳组装; (8) 衣壳包装基因组; (9) 后代病毒通过胞吐或裂解扩散。

Note: (1)FPV particle has an icosahedral structure, red-colored point: pentameric axis, green-colored point: trimeric axis, blue-colored point: dimeric axis; (2)FPV capsids bind to one or more special receptors exposed on the host cell membrane; (3)FPV capsids are internalized via clathrin-mediated endocytosis; (4)Escape from the endosome by cleaving the endosomal membrane with a phospholipase; (5)FPV entry into the nucleus through the nuclear pore complex; (6)Replication of the viral genome; (7)Expression of the NS1, which enter the nucleus and participate in replication and capsid assembly; (8)The new capsids package the new genome; (9)Release of progeny virus through cell lysis or vesicular diffusion.

FPV 在细胞质中的运输过程被认为是缓慢的, pH 不断降低的内体微环境导致 FPV 衣壳结构发生变化, 导致 VP1u 序列暴露并发挥磷脂酶活性, 从而分解内体膜并逃逸(图 1-2 4)。因此, 一些药物如巴佛洛霉素 A1(Bafilomycin A1)和弱碱二磷酸氯喹(Weak base chloroquine diphosphate)可以提高内体 pH 值, 从而阻止 FPV 的感染(Ros C et al., 2017)。从内体逃逸后, FPV 会利用细胞骨架, 如微管(Microtubules, MTs)、中间纤维(Intermediate filament, IF), 以及相关运动蛋白, 如肌动蛋白(Actin), 转运到细胞核。FPV 入核过程则需要暴露在外的 VP1u 序列中的 NLS 引导, NLS 是一种核定位信号, 有助于将病毒导航到细胞核, 从而导致进一步的核易位。对于 FPV 的入核机制目前有两种解释, 一是通过衣壳蛋白 VP1 的 NLS 与核转运受体输入蛋白 β (Importin- β) 相互作用(Mäntylä E et al., 2020), 结合核孔复合物并通过核孔进入; 二是病毒与核孔的直接作用或者与 importin- β 间接作用导致核包膜的局部解体使病毒进入细胞核(Mäntylä E et al., 2017, 2020; Mattola S et al., 2021)。在核输入的经典途径中, importin- β 通过 importin- α 连接到暴露在

病毒表面的 NLS，病毒随之结合核孔复合物并通过核孔进入核篮（Nuclear basket），importin- β 与病毒解离回到细胞质（Mäntylä E et al., 2020）。

FPV 复制依赖于宿主细胞有丝分裂，且严格依赖于 S 期细胞因子。在转录因子的作用下，p4 启动子被激活，并开始表达 NS1。FPV 基因组通过滚动发夹复制（Rolling hairpin replication, RHR）复制（图 1-2），这是一种由 NS1 启动的单向、链置换形式的 DNA 复制（Christensen J et al., 2002），该机制依赖于发夹末端的顺序展开和重新折叠（Cotmore S F et al., 2022），单向链置换合成产生连续的双链中间体，具有核酸内切酶活性的 NS1 会周期性地从中切下后代单链（Cotmore S F et al., 2013）。同时 NS1 激活 P38 启动子，诱导 VP 蛋白的表达，并指导衣壳组装过程。新合成的衣壳蛋白在细胞质中形成三聚体（ $1 \times \text{VP1} + 2 \times \text{VP2}$ ），并仅在 S 期通过结构依赖的运输基序转运到细胞核中，且该易位依赖于细胞 Raf-1 激酶的三聚体磷酸化。之后衣壳蛋白三聚体在细胞核中组装为病毒衣壳。FPV 后代病毒粒子在细胞核中积累，直到通过细胞裂解释放。

1.1.3 猫细小病毒疫苗接种与抗体检测

有效的疫苗接种依旧是预防 FPV 感染的重要手段，FPV 疫苗也被认为是猫必须接种的疫苗之一（Egberink H et al., 2022）。疫苗通过诱导体液免疫和细胞免疫来保护猫免受严重疾病的侵害，对于 FPV 感染，抗体滴度与保护效果相关。而一些 FPV 疫苗接种的实验和现场研究结果表明，抗体的持续时间远远超过 3 年，甚至在一些动物中抗体终生持续存在（Scott F W et al., 1999）。FPV 的保护性抗体水平可以在诊断实验室中通过病毒中和试验（VN）或血凝抑制试验（Hemagglutination inhibition (HI) test）来确定，反应性抗体可以通过酶联免疫吸附法（ELISA）、琼脂扩散试验等检测。根据欧洲猫病咨询委员会（European Advisory Board on Cat Diseases, ABCD）发表的《猫的疫苗接种和抗体检测指南》，这些试验被认为是确定血清中保护性抗体滴度的金标准方法（Egberink H et al., 2022）。而免疫持续时间（Duration of immunity, DOI）也是评价疫苗的指标之一，但影响该指标的因素，很难适用于每个个体，只能作为参考（Roth J A et al., 2010）。

血清 FPV 抗体滴度的测量对 FPV 的诊断没有帮助，因为许多猫由于疫苗接种或以前的亚临床感染而产生抗体。患有泛白细胞减少症的猫通常具有阴性或低抗体滴度，因为体液免疫提供了对 FPV 感染的良好保护。抗体检测一般用于疫苗效果评价，另外抗体检测还被用于确定幼猫接种疫苗的最佳年龄，因为它们从母猫那里获得的母源抗体（MDA）不仅保护其免受感染，也会干扰疫苗免疫效果。但抗体滴度只能一定程度上代表疫苗免疫效果或者机体抵抗病毒能力，因为在不能检测到抗体后，机体内记忆 B 细胞依旧存在，再次接种引起抗体滴度的快速上升则被认为是记忆细胞仍然存在的迹象，因此一些血清学研究试图通过度量再接种的反应程度来将记忆 B 细胞也纳入疫苗反应的评估中（Roth J A et al., 2010）。

虽然 HI 试验被认为是 FPV 抗体检测的金标准，但 HI 试验的保护判定标准比较模糊，一般来说 FPV 保护性 HI 抗体滴度阈值为 1:20~1:40，而大于等于 1:40 被认为可预防 FPV，而 FPV 保护性的血清中和试验（Serum neutralizing (SN) test）抗体滴度阈值为 1:10~1:32（Soma T et al., 2019）。其中有学者认为 SN 试验可能比 HI 试验更适合评估 FPV 疫苗的效果，尤其适合评估 HI 抗体滴度低的猫（Soma T et al., 2019）。目前临床上还使用 ELISA 来检测 FPV 抗体。尽管 ELISA 方法灵敏度高、特异性好且可以得到定量结果，但仍存在一些不便和不足，如操作过程复杂、相对昂贵

和操作时间长,也不能代表抗体的保护效价。血清抗体效价高于阈值的猫没有必要再次接种疫苗。因此,研发出一种简单、快速、定量的 FPV 抗体检测方法对于临床疫苗接种选择就显得尤为重要。

1.2 表达系统选择与荧光微球免疫层析试纸条

1.2.1 大肠杆菌表达系统与 pCold 表达载体

在实验室和工业生产中,最常用的蛋白质过表达生产系统之一是原核系统,这种系统主要以大肠杆菌为基础,大肠杆菌系统可在短时间内获得大量重组蛋白质。细菌细胞的培养简单、成本低廉、转录和翻译机制研究透彻,这些都有利于原核表达系统的发展。原核表达系统的另一个优势是易于进行基因修饰,从而获得许多细菌突变体(Porowińska et al., 2013)。20 世纪 70 年代,随着 DNA 重组技术的出现,人们发现大肠杆菌可以以一种高效且经济可行的方式生产蛋白质,与其他重组微生物相比,大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是最有吸引力的菌种,因为大肠杆菌易于分离和培养、能在多种不同的碳基质上快速生长、无致病性、具有良好的遗传学特性且几乎可以从任何常见动物内分离出来,目前大肠杆菌已成功用于表达多种不同的蛋白质。

用于重组蛋白表达的大肠杆菌表达宿主可细分为两类,一类是 K-12 菌株,另一类是 B 衍生物菌株。大肠杆菌 K-12 菌株及其衍生物 DH1、DH5α、MG1655、RV308 和 W3110 历来是生物行业最广泛使用的菌株;大肠杆菌 B 菌株最早由 Studier 和 Moffatt 设计和改造,一直是研究细菌遗传学、进化和重组蛋白表达的模式菌株,随后 B 菌株又被改造成包括 BL21、C41 和 C43 在内的新菌株(Mcelwain et al., 2022)。随着时间的推移,BL21(DE3)菌株因其几大优势而成为重组表达的首选。BL21(DE3)缺乏 Lon 和 OmpT 蛋白酶,这使得折叠错误的蛋白质有机会避免蛋白水解降解。BL21(DE3)与基于强 T7 启动子的 T7 表达系统结合,与大肠杆菌原生的聚合酶相比,T7 启动子速度更快,极大提高了转录率。因此,T7 RNA 聚合酶在诱导型启动子(如 Lac 或 Ara)控制下的大肠杆菌表达系统具有成熟的快速生长动力学、较短的生成时间以及快速的蛋白质合成能力,可生成具有经济吸引力的高产量且稳定的蛋白质产品。

然而,由大肠杆菌表达的重组蛋白容易形成包涵体(蛋白不溶)。为了解决这个问题,冷休克蛋白表达系统应运而生。pCold 表达载体具有独特的冷休克基因 *cspA* 启动子,可在低温条件下在大肠杆菌中表达蛋白质(Ren L et al., 2024)。在该系统中,稳定、可溶的重组蛋白的表达量增加,而其他非目标蛋白的表达量则会减少,这也有利于重组蛋白的分离和纯化。

1.2.2 荧光微球简介

几十年来,某些镧系元素(Lanthanides),主要是铕(Europium, Eu)、铽(Terbium)、钐(Samarium)和镝(Dysprosium),已成为免疫测定和其他配体结合测定中优良、成熟以及商业化的荧光标记(Wu S Y et al., 2019; Bian L et al., 2022a)。镧系离子本身的吸收能力较差,因此需要特定的螯合物结构:螯合物必须具有有机发色团,用于吸收激发能量,并将能量转移到由金属结合基团(螯合剂)固定的镧系离子上(Cho U et al., 2020)。螯合物还含有一个活性基团,可用于标签的生物共轭(Chen R et al., 2013)。与传统的有机荧光团相比,镧系元素螯合物具有不可否认的优势:

螯合物的斯托克斯偏移 (Stokes shift) 非常大, 最佳激发波长和发射波长相差数百纳米 (Jin B et al., 2022), 因此激发光散射不会影响对发射光的检测。每种镧系元素螯合物的激发光谱都很宽, 但发射光谱很窄, 它们之间也有明显的分隔, 可以通过多标记不同镧系元素进行多重检测 (Yang X et al., 2018; Li L et al., 2024)。与传统的有机荧光团相比, 镧系元素螯合物产生的荧光寿命更长, 从而得以实现时间分辨荧光免疫分析, 有效避免了生物材料寿命短、自发荧光等造成的影响 (Kokko L et al., 2007)。此外, 镧系元素螯合物还具有荧光发射光尖锐、光稳定性好等优点 (Li H et al., 2020; Wang D et al., 2015), 适合作为痕量分析的免疫测定标记物, 从而提高分析的灵敏度和准确性 (Liu J et al., 2021)。

镧系元素螯合物可以装在纳米级的聚苯乙烯外壳中, 形成荧光微球。市售的 Eu (III)-螯合物染色纳米粒子中, 单个聚苯乙烯外壳内含有数千个 Eu (III)- β -diketone 螯合物, 此外还有铈 (III)、钐 (III) 和铕 (III) 螯合物染色粒子, 并在免疫测定中作为标签。外壳产生疏水环境, 保护螯合物免受水而淬灭。颗粒表面的羧酸基团可与抗体或适配体等蛋白质共价结合, 荧光微球与抗体结合后不会改变其本身的光学特性 (Zhang C et al., 2020)。螯合 Eu (III) 染色纳米粒子已被成功地用作异质和均质免疫测定的标签。在研究临床或食品样品等异质检测中, 已证明使用纳米粒子标签可提高免疫测定的灵敏度。在基于荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的均相免疫测定中, Eu (III)-螯合物染色纳米粒子被用作供体标签, 短寿命的近红外荧光团被用作受体标签。当供体和受体靠近时, 供体标签的发射光可以激发受体标签, 从而产生敏化发射光。由于供体标签的荧光衰减较慢, 因此也可以使用时间分辨检测法测量敏化发射光。使用纳米颗粒作为供体的检测包括针对蛋白质的三明治式非竞争检测和针对触媒的竞争检测 (Chen H et al., 2016), 它们都已被应用于不同目标分析物的快速筛选检测, 如蛋白质生物标记物、微生物、抗生素、违禁药物、核酸、环境有害物质和生物毒素等 (Syamchand S S et al., 2015; Valtonen S et al., 2020; Su Z et al., 2022; MAJDINASAB et al., 2022)。

1.2.3 荧光微球免疫层析试纸条的前景与优势

近年来, 侧向层析免疫分析法 (Lateral flow immunoassay, LFIA) 作为一种成熟且广泛应用的即时检测 (Point-of-care testing, POCT) 技术 (Manassis G et al., 2022), 是一种流行且广泛应用于医疗点的检测方法 (Tsuboi I et al., 2021; Bahadır E B et al., 2016), 也已通过结合相关标记物质包括胶体金、荧光染料、量子点和镧系元素螯合物来开发试纸条 (CHEN et al., 2021; He X et al., 2023; Mirica A C et al., 2022)。LFIA 的主要特点是操作简便、结果迅速、保存期长, 简便的检测程序使低频检测也方便没有经过实验室培训的人员使用, 同时也不需要专业的实验室设备, LFIA 有望成为日常监测食品和水的安全性、平民医疗保健的未来 (Li F et al., 2020; Ashuo A et al., 2020)。最常见的 LFIA 类型是基于金纳米粒子的 LFIA, 它已被广泛应用于各个领域。然而, 这种传统的 LFIA 只能提供定性的结果, 基于胶体金的 LFIA 检测灵敏度也比较低 (Kavosi B et al., 2014)。近年来, 通过将基于荧光的 LFIA 与便携式条带检测器相结合, LFIA 可以满足定量检测的要求 (Bian L et al., 2021; Kim K et al., 2021; Wang L et al., 2021)。相关实验室已报道了多种基于聚苯乙烯 Eu (III) 螯合微粒等微球的 LFIA 方法, 例如同时检测三类抗生素 (四环素类、氟喹诺酮类和磺胺类) 残留 (Wang Y et al., 2021)、可用于甲胎蛋白和肌酸激酶 MB 的定量检测 (LIANG et

al., 2017)、快速定量检测血清中胱抑素 C (cystatin C) 用来实时监测肾功能衰竭 (Bian L et al., 2022b)、定量检测血清中的 S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium binding protein A8, S100A8) 和富亮氨酸 α -2-糖蛋白 1 (Leucine-rich α -2-glycoprotein 1, LRG1) 来筛查急性/慢性淋巴细胞白血血病等 (ZHANG et al., 2022)。

1.3 研究目标和意义

接种疫苗被公认是一种降低 FPV 传染率和发生率的安全、有效的方法。自身免疫状态、母源抗体 (MDA) 干扰是影响疫苗接种效果主要原因。HI 试验是确定猫对 FPV 的免疫状态的金标准, 但 HI 试验有几个缺点, 如需要新鲜猪血、设备齐全的实验室和较长的潜伏期。综合而言, 为了达到更好的疫苗接种效果, 需要根据每只猫的特定情况进行个性化评估, 以便全面考虑个体接种疫苗的风险与收益 (Salmanli et al., 2024)。

在现代诊断和生物医学研究领域, 准确测量生物样本中的特定生物大分子是一个基础部分 (Natarajan S et al., 2023)。目前, 传统的检测方法可能存在操作繁琐、耗时较长的问题, 而且需要在实验室环境中进行, 限制了对 FPV 抗体的及时监测和控制。为了解决这一问题, 在这项研究中, 我们将通过大肠杆菌表达系统表达 FPV 的 VP2 蛋白, 将其作为检测线特异性结合 FPV 抗体, 建立一种简单且定量检测猫血清中 FPV 抗体滴度的荧光微球测层析试纸条 (Fluorescent microsphere immunochromatographic test strips, FM-ICTS)。与传统的 LFIA 方法不同的是, 该方法利用 Eu (III) 螯合微粒作为荧光报告物, 克服了传统荧光标记物稳定性差、光漂白、灵敏度低等缺陷 (Bian L et al., 2022b)。

荧光微球试纸条不仅在评估猫的 FPV 抗体效价以确定是否接种疫苗和评估新疫苗免疫效果等方面发挥关键作用, 还具备其他多种功能。其疾病筛查能力使其成为检测猫是否感染 FPV 的辅助工具, 在接种疫苗后也能提供重要信息。此外, 定期的抗体水平检测有助于监测猫群中 FPV 的传播趋势, 进行病毒监测和疫情调查。该试纸条还可用于帮助优化疫苗接种策略, 并为兽医提供辅助诊断信息, 将成为维护猫群健康的重要工具。

第二章 猫细小病毒 VP2 蛋白的制备

2.1 实验材料

2.1.1 病毒、载体、菌株

猫细小病毒由本实验室于长春市采样分离并保存于-80℃冰箱（该毒株 VP2 测序结果与 OR264206.1 株同源性为 99.78%）。BL21（DE3）感受态细胞购自全式金生物（TransGen Biotech）生物技术有限公司。pCold 载体购自宝日医生物技术有限公司（TAKARA）。

2.1.2 主要实验材料与试剂

2.1.2.1 实验耗材

250 mL 聚丙烯宽口离心瓶（Beckman）；15、50 mL 离心管（NEST）；1.5 mL 离心管（Axygen）；0.22 μm 滤器（Millipore）。

2.1.2.2 实验试剂

表达载体构建所需试剂：PrimeSTAR Max DNA Polymerase 高保真酶（TAKARA）；*Bam*H I 和 *Xba* I 限制性内切酶（TAKARA）；核酸提取试剂盒（全式金生物技术有限公司，EasyPure® Viral DNA/RNA Kit）；胶回收试剂盒（OMEGA，D2500-02）；质粒小量提取试剂盒（OMEGA，D6943-02）；

目的蛋白表达纯化与鉴定所需试剂：溶菌酶（北京索莱宝科技有限公司）；组氨酸标签蛋白亲和纯化试剂盒（天地人和生物科技有限公司，HisPur Ni NTA Kit）；连接酶 T4 DNA Ligase（TAKARA）；蛋白上样缓冲液（上海雅酶生物医药科技有限公司）；极超敏 ECL 化学发光试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；考马斯亮蓝染色液、脱色液（上海雅酶生物医药科技有限公司）；

2.1.2.3 主要实验试剂配置

LB 培养基：10 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，10 g/L 氯化钠，用氢氧化钠（NaOH）溶液调节该培养基的 pH 至 7.4，121℃ 30 min 高压灭菌；

SOC 培养基：20 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，0.5 g/L 氯化钠，2.5 mmol/L 氯化钾，10 mmol/L 氯化镁，20 mmol/L 葡萄糖，用 NaOH 溶液调节该培养基的 pH 至 7.4，121℃ 30 min 高压灭菌；

SOB 培养基：20 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，0.5 g/L 氯化钠，2.5 mmol/L 氯化钾，10 mmol/L 氯化镁，用 NaOH 溶液调节该培养基的 pH 至 7.4，121℃ 30 min 高压灭菌；

IPTG（异丙基-β-D-硫代半乳糖苷）溶液：1 mol/L IPTG，溶解后使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌；

组氨酸标签蛋白亲和纯化试剂盒相关试剂-平衡缓冲液：50 mmol/L 磷酸二氢钠，300 mmol/L

氯化钠, 10 mmol/L 咪唑, 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 洗杂缓冲液: 50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑, 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 洗脱缓冲液: 50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 250 mmol/L 咪唑, 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8.0, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌;

TBST 缓冲液: 10 $\times$ TBST 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)稀释成 1 $\times$ 工作液后使用, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

磷酸缓冲液 (PBS): 磷酸缓冲液 (10 mmol/L PBS) 粉末(莫纳生物科技有限公司), 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

2.1.3 主要实验设备

PCR 仪(鼎昊源生物科技有限公司, DHS); 恒温振荡器(HRYSTAL); 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司, AIRTECH); -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司, Haier); 培养箱(德国美墨尔特有限公司, Memmert); 凝胶成像系统(Syngene G:BOX); Legend Micro 17 微量离心机(Thermo); 台式离心机(eppendorf, 5810 R); 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 移液器(eppendorf); 微量紫外分光光度计(Thermo, NanoDrop™ One); 落地式高速冷冻实验室离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); 独立超纯水系统(宝杰罗生物科技有限公司); 干式荧光免疫分析仪(蓝勃, AFS-1000); 蛋白成像系统(DNR 生物影像系统有限公司); 恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 pCold-FPV-VP2 表达载体的构建

2.2.1.1 扩增 FPV-VP2 基因片段

将状态良好的 F81 细胞传代, 贴壁后更换培养为 2%胎牛血清的 MEM 培养基, 加入之前冻存的 FPV 病毒液, 放置于 33 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。细胞病变达到 80%后,将接种 FPV 的细胞瓶放置-80 $^{\circ}\text{C}$, 反复冻融 2~3 次后分装置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按核酸提取试剂盒说明书提取病毒液中 FPV 基因, 设计带有 *Bam*HI和 *Xba*I限制性酶切位点与 His 标签序列的特异性引物(表 2-1)。

表 2-1 扩增 VP2 序列引物

Table 2-1 Amplification primers for the VP2 gene

引物名称	引物序列 (3'→5')
FPV-VP2-Primer-F	CGCGGATCCATGAGTGATGGAGCAGTTCAAC
FPV-VP2-Primer-R	GCTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGATATAATTTTCTAGGTGCTAGTTGAG

以试剂盒所提病毒 DNA 为模版, 用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 高保真酶扩增 VP2 基因片段, 目的片段大小约 1755 bp, PCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 循环步骤为 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 2-2 PCR 反应体系

Table 2-2 PCR reaction system

反应体系成分	体积
上游引物 (10 μ M)	2 μ L
下游引物 (10 μ M)	2 μ L
模板	2 μ L
高保真酶	25 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

2.2.1.2 FPV-VP2 与 pCold 载体的连接

PCR 产物全部进行琼脂糖凝胶电泳, 切取阳性片段胶块按照胶回收试剂盒进行胶回收。使用 *Bam*HI 和 *Xba*I 限制性快切酶对胶回收产物与 pCold 载体进行双酶切, 37°C 反应 10 min (表 2-3)。

表 2-3 限制性内切酶切反应体系

Table 2-3 Restriction endonuclease reaction system

反应体系成分	体积
<i>Bam</i> HI 快切酶	1 μ L
<i>Xba</i> I 快切酶	1 μ L
回收片段或载体	5 μ L
10X QuickCut Green	2 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L

酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 将回收得到的 5'端连接有 His 标签序列的 VP2 蛋白编码序列与断开的 pCold 载体进行过夜连接, 连接反应体系见表 2-4。pCold 载体是一种基于冷休克基因 *cspA* 启动子的表达载体, 能够在低温环境中有效地可溶性表达蛋白质。该载体在 *cspA* 启动子的下游插入了乳糖操纵子 (Lac operator)。

表 2-4 T4 连接酶反应体系

Table 2-4 T4 ligase reaction system

反应体系成分	体积
VP2 基因片段	8 μ L
pCold 载体	1 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
Solution I	10 μ L

2.2.1.3 质粒 pCold-FPV-VP2 的鉴定

使用 *Bam*HI 和 *Xba*I 限制性快切酶对构建的 pCold-FPV-VP2 表达载体进行双酶切, 37°C 反应 10 min (表 2-3), 随后进行琼脂糖凝胶电泳验证重组载体是否构建完成。同时将 pCold-FPV-VP2 质粒送公司测序, 验证 VP2 基因序列的正确性。

2.2.2 表达、纯化和鉴定猫细小病毒 VP2 蛋白

2.2.2.1 大肠杆菌表达 VP2 蛋白

将构建好的表达载体转化到宿主细胞 (BL21.DE3)。接种转化子到含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养。当培养基的 OD600 达到 0.5 时, 冷却培养基到 15°C, 放置 30 min。后以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 终浓度 (0、1.0 mmol/L)、培养环境 (15°C 振荡 30 h、37°C 振荡 16 h) 为变量探究温度与 IPTG 对 pCold 载体表达的影响, 8000 rpm 离心 20 min 收集菌体。以收集菌液 1/10 体积的 PBS 缓冲液重悬细菌, 添加溶菌酶至终浓度 1 mg/mL, 混匀后冰浴 30 min。随后超声波破碎 (200 W, 30 min), 10000 rpm 离心 30 min 收集上清和沉淀。上清以及 PBS 缓冲液重悬后的沉淀样品与蛋白上样缓冲液 4:1 混合后于沸水中水浴 10 min, -20°C 保存。用 His 标签一抗做 WesternBlot (WB) 鉴定。

WB 步骤如下:

按照凝胶制备试剂盒配置 12 % PAGE 胶, 将各样品上样至 SDS-PAGE 凝胶孔中。在 80V 下跑胶 20 min, 后调节电压至 120V 跑胶 1 h。用甲醇活化 PVDF 膜 1 min, 并与转膜海绵垫一起在转膜缓冲液中浸泡。将海绵垫、PVDF 膜、SDS-PAGE 胶、海绵垫依次叠放至半干式转膜槽, 轻柔挤压去除气泡, 15V 转膜 20 min。随后取出 PVDF 膜, 用封闭缓冲液在室温下封闭 1 h。将封闭结束的膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再用稀释后的小鼠抗 His 标签抗体孵育 2 h。将一抗回收, 孵育结束的膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再用稀释后的二抗体孵育 1 h。将二抗回收, 孵育结束的膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。用吸水纸吸去多于液体, 将 ECL 化学发光显色液的 A 液和 B 液按照 1:1 的比例避光稀释, 混匀后滴加到膜上, 使显色液均匀覆盖整张膜, 放置 2 min, 用蛋白成像系统成像分析。

2.2.2.2 表达条件优化

探究不同 IPTG 诱导表达对 VP2 蛋白表达的影响。接种转化子到含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养。当培养基的 OD600 达到 0.5 时, 冷却培养基到 15°C, 放置 30 min。向培养基中添加 IPTG 至不同终浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mM), 诱导表达载体上的启动子, 使其启动 VP2 蛋白的合成。15°C, 150 rpm 振荡 16 h 后, 8000 rpm 离心 20 min 收集细菌, 超声波破碎 (200 W, 30 min), 10000 rpm 离心 30 min 收集上清和沉淀。上清以及 PBS 缓冲液重悬后的沉淀样品与蛋白上样缓冲液 4:1 混合后于沸水中水浴 10 min, -20°C 保存。进行 SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色分析。

SDS-PAGE:

按照按照凝胶制备试剂盒配置 12 % PAGE 胶, 将各样品上样至 SDS-PAGE 凝胶孔中。在 80V 下跑胶 20 min, 后调节电压至 120V 跑胶 1 h。电泳结束后, 将凝胶置于纯水中漂洗数分钟。弃去纯水, 加入适量考马斯亮蓝染料覆盖凝胶, 室温下于水平摇床上染色 2~3 h。最后回收染料, 用纯水清洗几次, 再用考马斯亮蓝脱色液脱色至蛋白条带清晰。

2.2.2.3 VP2 蛋白纯化

将组氨酸标签蛋白纯化柱 (HisPur Ni NTA Column) 固定在铁架台上, 取下上端塞与下端塞, 使其保护液流尽; 向纯化柱中加入 5 mL 平衡缓冲液, 平衡缓冲液流尽后, 再加入 5 mL 平衡缓冲液, 重复 2 次; 将收集到的超声破碎后的上清液过 0.22 μm 滤膜, 再加到纯化柱中, 收集流出液; 在纯化管中加入 5 mL 洗杂缓冲液, 进行洗杂, 去除非特异性结合的杂蛋白, 洗杂缓冲液流尽后, 再加 5 mL 洗杂缓冲液, 重复 5 次, 收集洗杂流出液; 使用 30 mL 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 每 3 mL 收集一管; 然后依次用 5 mL 平衡缓冲液和 5 mL 纯水交替平衡纯化柱, 重复 2 次, 最后用 20% 乙醇平衡纯化柱, 留 5 mL 20% 乙醇于纯化柱, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将饱和硫酸铵溶液滴加进洗脱液中, 并同时涡旋, 加至硫酸铵终溶解度为 30%, 静置 2 h, VP2 蛋白析出, 6000 rpm 10 min 离心取沉淀, 用洗脱液等体积 PBS 缓冲液复溶, VP2 蛋白 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存, -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存 (夏霖亚, 2022)。

将纯化过程中收集的流出液、洗杂液、各阶段洗脱液与蛋白上样缓冲液 4:1 混合后于沸水中水浴 10 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。进行 SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色分析, 并用 FPV 抗体阳性血清做 WB 鉴定纯化结果。

2.3 实验结果

2.3.1 构建 VP2 蛋白表达载体 pCold-FPV-VP2

以 FPV 基因为模版, 用特异性引物与高保真酶扩增 VP2 基因片段, 目的片段大小约 1755 bp, 扩增产物大小合适 (图 2-1)。

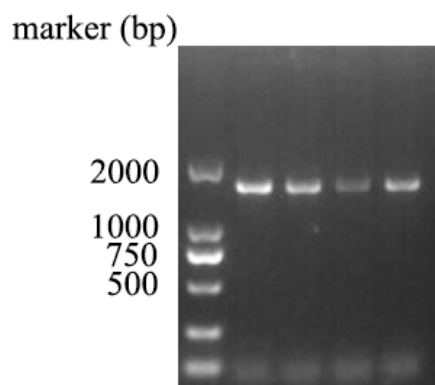


图 2-1 FPV VP2 基因片段 PCR 扩增结果

Fig. 2-1 PCR amplification results of FPV VP2 gene

后续 *Bam*HI 和 *Xba*I 限制性快切酶酶切所构建的 pCold-FPV-VP2 载体, 验证目的片段已经与表达载体连接 (图 2-2)。pCold 载体全长: 4407 bp, VP2+His 长度: 1791 bp, 与琼脂糖凝胶电泳扩散结果匹配。测序结果表明 VP2 片段无错义突变无缺失, 获得完整且正确的 pCold-FPV-VP2 载体。

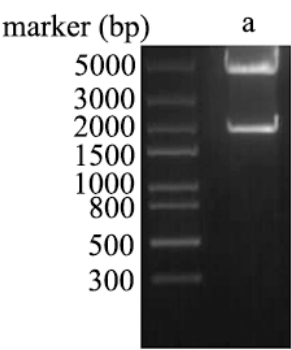


图 2-2 pCold-FPV-VP2 载体双酶切鉴定结果

Fig. 2-2 pCold-FPV-VP2 vector identification results after digestion with two restriction enzymes

2.3.2 VP2 蛋白表达条件的优化

温度与 IPTG 对 pCold-FPV-VP2 表达载体在大肠杆菌表达系统即 BL21（DE3）中表达效率的影响进行整体预试验。如图 2-3 A 所示，低温（15℃）与 IPTG 均能促进 pCold-FPV-VP2 表达载体在大肠杆菌表达系统中的表达（图 2-3 A）。并使用 SDS-PAGE 估计 pCold-FPV-VP2 表达载体所表达蛋白大小，与 VP2 蛋白大小（65 kDa）相符合（图 2-3 B）。后续也对所表达 VP2 蛋白进行特异性鉴定（图 2-4 B）。随后探究促进 pCold-FPV-VP2 表达载体表达的最适 IPTG 浓度，结果显示 IPTG 终浓度为 0.4 mM 时，VP2 蛋白表达量较多，但并不显著（图 2-3 CD）。

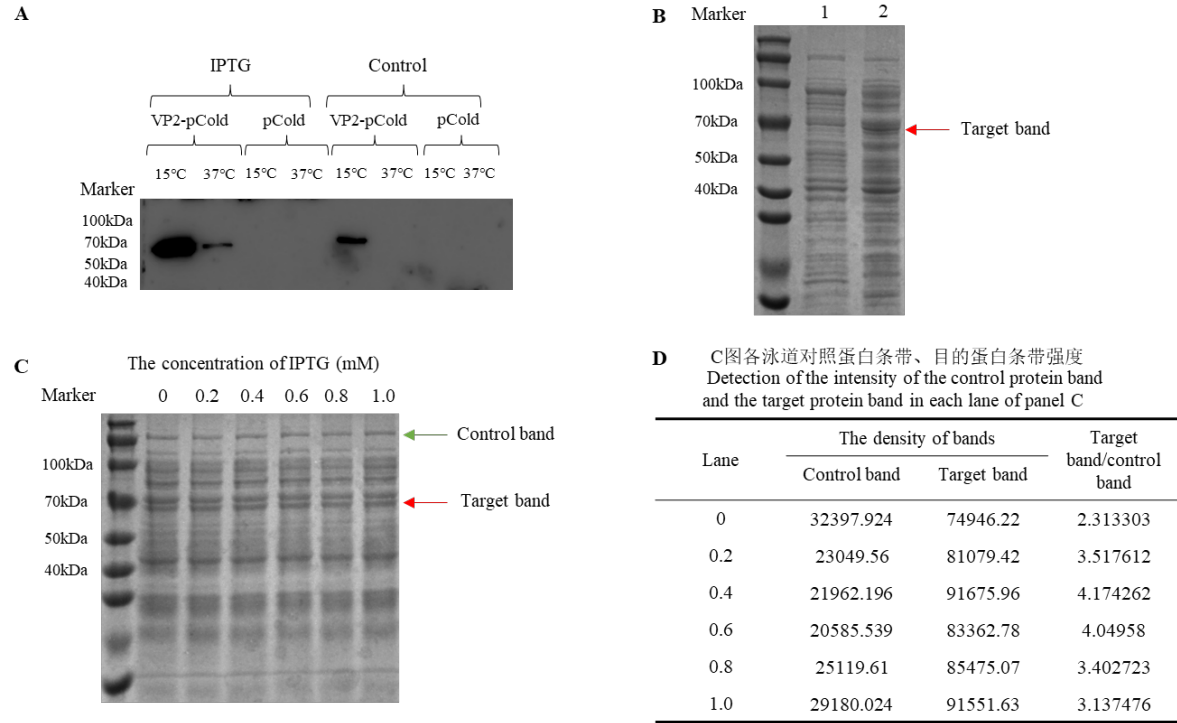


图 2-3 VP2 蛋白表达条件的优化

Fig. 2-3 Optimization of VP2 protein expression conditions

注：（A）温度（15℃、37℃）与是否添加 IPTG 对目的蛋白可溶部分表达量的影响；（B） 1，含有空载体的 BL21（DE3）超声后的可溶成分；2，含有 pCold-FPV-VP2 表达载体的 BL21（DE3）超声后的可溶成分，红色箭头所指为目的蛋白条带；（C）

IPTG 浓度（终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L）对目的蛋白可溶部分表达量的影响，红色箭头所指为目的蛋白条带，绿色箭头所指为对照蛋白条带。mM=mol/L；(D) 通过 ImageJ 检测 C 图各泳道对照蛋白条带、目的蛋白条带强度。

Note: (A) The effect of temperature (15°C, 37°C) and the presence of IPTG on the soluble fraction expression level of the target protein; (B) 1. Soluble fractions of BL21(DE3) after sonication containing empty vector; 2. Soluble fractions of BL21(DE3) after sonication containing pCold-FPV-VP2 expression vector, with the target protein band indicated by the red arrow; (C) The effect of IPTG concentration (final concentrations of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L) on the expression level of the soluble fraction of the target protein, with the target protein band indicated by the red arrow and the control protein band indicated by the green arrow. mM=mol/L; (D) Detection of the intensity of the control protein band and the target protein band in each lane of panel C using ImageJ.

2.3.3 VP2 蛋白的纯化与鉴定

添加 IPTG 至终浓度 0.4 mM 的 1 L 菌液 15°C 150rpm 培养 16 h 后，离心收集菌体，并超声波破碎（200W，30 min），并离心取上清。按照组氨酸标签蛋白亲和纯化试剂盒说明书进行纯化，随后使用硫酸铵沉淀法对洗脱液进一步提纯（图 2-4 A）。Image-J 软件分析 SDS-PAGE，目的蛋白 VP2 蛋白含量为 69.96%，并通过微量紫外可见分光光度计检测总蛋白浓度为 1.885 mg/mL，根据计算得到 VP2 蛋白浓度为 1.319 mg/mL，即 1 L 菌液诱导表达后得到 VP2 蛋白 1.319 mg。

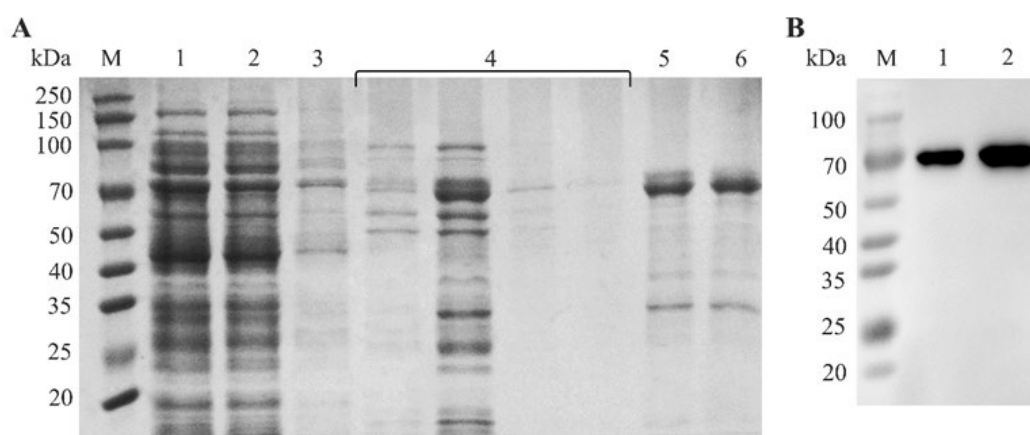


图 2-4 重组 FPV VP2 蛋白的纯化与鉴定

Fig. 2-4 Expression and characterization of recombinant FPV VP2 protein from *E. coli*.

注：融合蛋白由 pCold-VP2-His/BL21（DE3）表达。（A）FPV VP2 蛋白表达和纯化的 SDS-PAGE 分析。M：蛋白标记物；1：表达 VP2 蛋白的 BL21（DE3）细胞超声后获得的上清液；2：上清液通过 His-Tag Ni²⁺亲和柱后的液体；3：洗杂缓冲液；4：洗脱缓冲液；5：经过硫酸铵第一次纯化的洗脱液；6：经过硫酸铵第二次纯化的洗脱液。（B）FPV VP2 蛋白的 WB 分析。M：蛋白标记物；1：使用 FPV 阳性血清免疫印迹的未纯化 VP2 蛋白；2：使 FPV 阳性血清免疫印迹的纯化 VP2 蛋白。

Note: The fusion protein was expressed from pCold-VP2-His/BL21(DE3). (A) SDS-PAGE analysis of FPV VP2 protein expression and purification. M: protein marker; lane 1: the supernatant obtained after sonication of BL21 (DE3) cells expressing VP2 protein; lane 2: the liquid after passing through the His-Tag Ni²⁺ affinity column of the supernatant; lane 3: wash buffer; lane 4: elution buffer; lane 5: the eluate after first purification with ammonium sulfate; lane 6: the eluate after second purification with ammonium sulfate. (B) Western blot analysis of FPV VP2 proteins. M: protein marker; lane 1: unpurified VP2 protein immunoblotted using feline FPV-positive sera; lane 2: purified VP2 proteins immunoblotted using feline FPV-positive sera.

2.4 讨论

本荧光微球试纸条的特异性取决于在 T 线包被的 FPV VP2 蛋白。在本研究中, 我们构建了 pCold-FPV-VP2 原核表达质粒。通过在 VP2 片段 C 端添加了 6 个组氨酸序列, 便于蛋白质的检测和纯化, 但未对编码序列进行了优化, 减低目的蛋白的合成效率来减少包涵体的出现。利用 pCold 载体的冷休克系统促进 VP2 蛋白以可溶性形式表达。低温诱导有利于蛋白质的正确折叠, 减少包涵体的形成。通过优化培养条件, 发现在 15°C 温度下, 0.4 mM IPTG 诱导 16 h, 可溶性 VP2 蛋白表达量最高。但仍有大量 VP2 蛋白以不溶性包涵体形式表达, 异源蛋白的积累也是以大肠杆菌为宿主生产生物制药的一个主要问题, 主要是以包涵体 (Inclusion bodies, IB) 形式的不溶性聚集, 蛋白质正常折叠、聚集和降解之间不平衡是造成大肠杆菌细胞中蛋白质 IB 形成的核心原因。IB 的形成可由蛋白质的过量表达引起, 而过量表达通常是由于带有强启动子 (如 T7 和 Lac 启动子) 的表达载体、使用高拷贝数的质粒、优化密码子或改造大肠杆菌宿主菌株使其快速生长。当重组蛋白的表达速度超过宿主细胞对其后续修饰和正确折叠的能力时, 目标蛋白就会出现更多的错误折叠, 这些错误折叠的蛋白质会暴露出原生蛋白表面的疏水残基, 并最终聚集成 IB。此外, 高水平的蛋白质表达会导致能量需求增加从而对细胞造成压力和代谢负担, 宿主细胞无法长时间维持过量表达状态 (Zeng et al., 2019)。减少大肠杆菌中包涵体形成的策略则需要深入了解表宿主细胞的新陈代谢、蛋白质合成和修饰机制、目标蛋白质的特性以及环境条件、适当调整表达载体以及使用生物信息学工具预测蛋白质的聚集趋势。

Bhatwa 等详细讨论了这些策略, 其中可能的方法包括: (1) 降低蛋白质合成效率; (2) 诱导产生内源分子伴侣; (3) 向培养基中添加化学分子伴侣, 来辅助蛋白质折叠和修饰; (4) 通过去除导致 IB 形成的结构元素, 将目标蛋白质与可溶性蛋白质或肽标签重组 (Bhatwa A et al., 2021)。其中使用分子伴侣是提高大肠杆菌中蛋白质溶解度的一种重要策略。在蛋白质合成过程中, 分子伴侣与新生多肽链相互作用, 以防止折叠过程中的聚集。分子伴侣不仅能促进目标蛋白的正确折叠, 还能对其进行运输、限制其聚集、溶解聚集体并解决折叠错误的状态。大肠杆菌中使用最广泛、最重要的细胞质伴侣包括 DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL、GroES 等 (Macošek J et al., 2021)。国内有研究使用其他分子伴侣 pG-KJE8、pGro7、pG-Tf2、pTf16 提高大肠杆菌中 FPV VP2 蛋白的可溶性表达 (夏霖亚, 2022)。本研究也曾使用分子伴侣 pTf16 促进蛋白可溶性表达, 但在实验中发现由于分子伴侣蛋白的高效表达, 目的蛋白即 VP2 蛋白的表达量甚至有所下降, 这可能是因为本研究未考虑到宿主的密码子偏好来优化 VP2 基因序列, 因此导致宿主细胞中的蛋白质合成被 pTf16 蛋白的表达所主导。

在纯化过程中, 为保持重组蛋白的可溶性和活性状态, 应尽量避免蛋白聚集、变性和失活。结合缓冲液和洗脱缓冲液的 pH 值对保持重组蛋白的可溶性和稳定性至关重要。通常, 蛋白质在 pH 值接近其等电点 (pI) 的溶液中溶解度最低。根据重组蛋白的氨基酸序列计算出 VP2 蛋白的 pI 值 (pI=5.44), 所以选择 pH=8.0 的结合缓冲液和洗脱缓冲液进行分离和纯化。除了 VP2, 一些非目标蛋白也被 Ni 柱吸附, 这可能是由于非特异性结合。在优化培养和纯化条件下, 通过 Ni-NTA 亲和层析法分离出 VP2 蛋白, 并利用在 30%硫酸铵溶液中 VP2 蛋白与其他蛋白质溶解度的差异对 VP2 蛋白进一步提纯。最后通过 UV 法检测, 每升细菌培养液中 VP2 的总产量约为 1.319 mg。

第三章 荧光微球试纸条的优化

3.1 实验材料

3.1.1 病毒和临床样本来源

本研究所用猫血清均由本实验室于长春市采集并于-20℃以下保存，所涉及的动物试验步骤均严格践行动物福利标准，并经过特产所实验动物管理及福利伦理委员会审核批准。

3.1.2 主要实验材料与试剂

3.1.2.1 实验耗材

荧光微球（FCEU002，PS-COOH Europium Chelate Microspheres，铕螯合物微球，激发光：340 nm；释放光：620 nm）；试纸条所用材料：PVC 底板、样品垫（玻璃纤维膜）、硝酸纤维素（NC）膜、结合垫（聚酯纤维膜）和吸水垫均为国产。

3.1.2.2 实验试剂

试纸条的制作所需试剂：兔抗猫抗体（生工生物工程（上海）股份有限公司）；山羊抗兔抗体（苏州博奥龙科技有限公司）；2-（N-吗啉）乙磺酸一水合物（MES）（西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司）；1-乙基-3-（3-二甲氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐（EDS）（Thermo）；N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐（NHS）（北京沃凯生物科技有限公司）；

3.1.3 主要实验设备

Legend Micro 17 微量离心机（Thermo）；台式离心机（eppendorf，5810 R）；超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技有限公司）；移液器（eppendorf）；微量紫外分光光度计（Thermo，NanoDrop™ One）；落地式高速冷冻实验室离心机（湖南赫西仪器装备有限公司）；独立超纯水系统（宝杰罗生物科技有限公司）；干式荧光免疫分析仪（蓝勃，AFS-1000）；蛋白成像系统（DNR 生物影像系统有限公司）；恒温水浴锅（国华电器有限公司）；连续点膜机（杭州格伦坤科技有限公司）；切条机（杭州峰航科技有限公司）；连续式封口机（温州市瑞利包装机械有限公司）。

3.2 实验方法

3.2.1 荧光微球试纸条的组装条件优化

3.2.1.1 荧光微球与抗体偶联

（1）荧光微球的清洗：取 100 μL 微球（1 mg）加入到 900 μL 纯水中，14000 rpm，9℃，离心 25 min，清洗第一遍。去掉上清，用 1000 μL 纯水重悬微球，14000 rpm，9℃，离心 25 min，清洗第二遍。去掉上清，用 1000 μL 2-（N-吗啉）乙磺酸一水合物（2-（N-morpholino）-ethanesulfonic

acid, MES) 标记缓冲液 (20 mM MES, pH=5.3) 重悬微球。离心后微球若有聚集, 以超声分散 5 min。

(2) 荧光微球的活化: 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC) 溶液与 N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐 (N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS) 溶液现用现配。取 25 μ L EDC (10 mg/ml) 加入到清洗后的微球中, 快速混匀; 然后取 25 μ L NHS (10 mg/ml) 加入到微球中, 快速混匀, 20 W 超声, 5 min; 37°C 振荡孵育 30 min。14000 rpm, 9°C, 离心 25 min, 去掉上清, 用 1000 μ L 偶联缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH=8.0) 重悬微球。离心后微球若有聚集, 以超声分散 5 min。

(3) 荧光微球与蛋白偶联: 取 20 μ g 兔抗猫抗体, 加入活化后的 1000 μ g 微球, 快速混匀后, 37°C 振荡孵育 2 h。加入牛血清白蛋白 (BSA) 至终浓度 1%, 快速混匀后, 37°C 振荡孵育 1 h。将封闭完的微球抗体混合物 14000 rpm, 9°C, 离心 25 min。去掉上清, 用 1000 μ L 重悬液 (Tris, 0.12 g; 蔗糖, 5 g; 海藻糖, 2.5 g; BSA, 1.5 g; 水, 40.88 g, pH=8.5) 重悬微球, 4°C 放置备用。离心后微球若有聚集, 以超声分散 5 min。

3.2.1.2 荧光微球试纸条组装和检测时间的确定

(1) 准备: 样品垫和偶联垫分别用 Tris-HCl 缓冲液 1 (20mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.3% BSA, pH 8.0) 和 Tris-HCl 缓冲液 2 (20mM Tris-HCl, 0.3% BSA 和 0.2% 吐温-20, pH 8.0) 饱和, 风干 2 h, 置于密封袋, 加入干燥剂密封, 做好标记后, 于室温干燥条件下保存。

(2) 喷金: 设置喷膜仪的参数 (10 μ L/cm), 将荧光微球-兔抗猫抗体复合物喷于结合垫上, 置于干燥箱中干燥 1~2 h。干燥后的结合垫放封闭袋中, 做好标记, 常温干燥保存备用。

(3) 硝酸纤维素 (NC) 膜划线: 设置喷膜仪的参数 (1 μ L/cm), 分别将 VP2 蛋白、山羊抗兔抗体喷涂在 NC 膜上作为检测线 (T) 和质控线 (C), 两带间隔 3.5 mm; 将划完线的 NC 膜放于温箱干燥 30 min。干燥后的结合垫放封闭袋中, 做好标记, 常温干燥保存备用。

(4) 试纸条组装与裁切: 试纸条是由 PVC 底板、样品垫、NC 膜、结合垫和吸水垫组成 (图 3-1)。组装试纸条具体操作步骤如下: 先将 NC 膜贴在 PVC 板中间, 吸水垫贴在 PVC 底板的 C 线端, 在 NC 膜上并与 NC 膜重叠 2 mm, 将喷有荧光微球-兔抗猫抗体复合物的结合垫分别粘贴在 T 线端, 与 NC 膜重叠 2 mm, 最后贴上样品垫, 与结合垫重叠 2 mm。将贴好的 PVC 底板用裁条机切成 3.9 mm 宽的试纸条, 置于密封袋, 加入干燥剂密封, 做好标记后, 于室温干燥条件下保存。

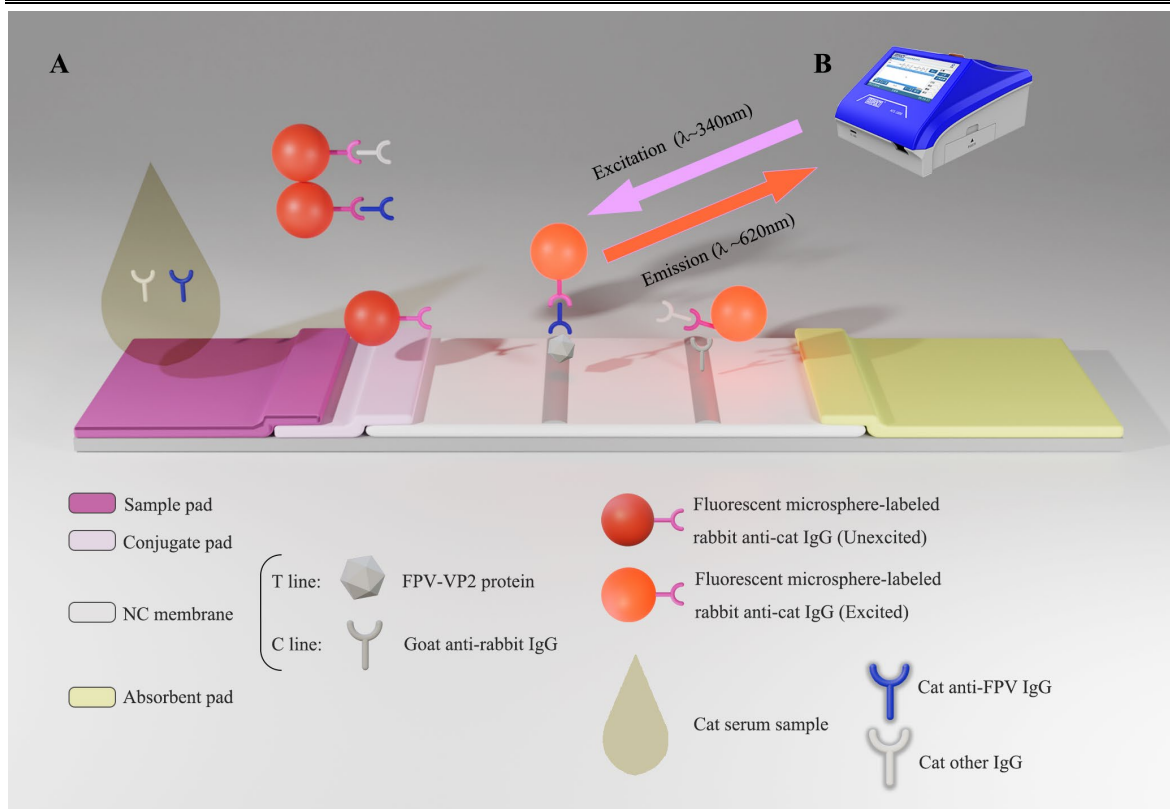


图 3-1 荧光微球试纸条原理示意图

Fig.3-1 The schematic diagram of the principle of fluorescent microsphere test strips

注：(A) 荧光微球试纸条原理示意图。对于阳性样本，荧光微球-抗猫 IgG（来源：兔）与 FPV 抗体特异性结合，形成免疫复合物（荧光微球-兔抗猫 IgG-FPV 抗体），进而被 T 线上的 VP2 捕获并产生荧光信号，过量的荧光微球-兔抗猫 IgG 继续迁移并被固定在 C 线上的抗兔 IgG 捕获并产生荧光信号。对于阴性样本，荧光微球-兔抗猫 IgG 只能通过固定在 C 线上的山羊抗兔 IgG 捕获，过量的荧光微球-兔抗猫 IgG 迁移到吸收垫。(B) 干式荧光免疫分析仪 AFS-1000 (LABSIM, 中国)。

Note: (A) Schematic illustration of the principle of FM-ICTS. For positive samples, FM-anti-cat IgG (source: rabbit) binds specifically to the FPV antibody and forms an immune complex (FM-anti-cat IgG-FPV antibody), which in turn is captured by the VP2 on the T-line and produces a fluorescent signal, and excess FM-anti-cat IgG continues to migrate and is captured by the anti-rabbit IgG immobilized on the C-line and produces a fluorescent signal. For negative samples, FM-anti-cat IgG can only be captured by anti-rabbit IgG immobilized on the C-wire, and excess FM-anti-cat IgG migrates to the absorbent pad. (B) Dry immuno-fluorescence analyser AFS-1000 (LABSIM, China).

荧光值随时间变化的一般趋势描述。起始阶段：在试纸条上添加待检测样品或试剂后，荧光值可能会在起始阶段呈现较低或较高的水平。这是因为荧光物质需要与样品中的目标分子进行特异性结合才能产生荧光信号；上升阶段：随着试纸条与目标分子的结合反应进行，荧光值通常会逐渐上升。这是由于荧光物质与目标分子结合后形成的复合物产生了荧光信号，其荧光强度逐渐增加；平稳阶段：一旦试纸条与目标分子的结合达到饱和或稳定状态，荧光值可能会趋于稳定。在这个阶段，荧光值的变化较小，可能在一个相对稳定的范围内波动；衰减阶段：如果试纸条与目标分子的结合不稳定或荧光物质的性质导致荧光信号衰减，荧光值可能会随时间逐渐下降。

滴加 100 μL 用 10 mmol/L PBS 缓冲液稀释 100 倍的血清样本于 5 个试纸条样品垫上，通过每分钟对每个试纸条荧光值进行检测，得到荧光微球试纸条荧光值随时间变化的趋势、T/C 比值到达平稳阶段所需时间以及持续时间。

3.2.1.3 偶联缓冲液的选择

使用不同偶联缓冲液, Tris 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0) 和 HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸) 缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH=8.0), 偶联兔抗猫抗体 (2 μ g/100 μ g 荧光微球) 并制作成试纸条, 滴加 100 μ L 用 10 mmol/L PBS 缓冲液稀释 100 倍的阳性血清样本 (已测得稀释前 HI 效价为 1:1024) 于这两种荧光微球试纸条, 20 min 后分别检测其 T、C 线荧光值。荧光值越高则证明偶联效果好。

3.2.1.4 荧光微球与抗体偶联量的优化

在荧光微球与兔抗猫抗体偶联步骤 (3) 荧光微球与蛋白偶联中, 分别取 20、40、60、80 μ g 兔抗猫抗体加入活化后的 1000 μ g 微球 (即 2、4、6、8 μ g/100 μ g 荧光微球) 进行偶联。用 10 mM PBS 缓冲液稀释 100 倍的阳性血清样本 (已测得稀释前 HI 效价为 1:1024), 分别滴加 100 μ L 于不同偶联量 (2、4、6、8 μ g/100 μ g 荧光微球) 的各 2 个荧光微球试纸条, 根据 20 min 检测得到的荧光值选择最佳偶联比。

3.2.1.5 T 线包被量优化

使用不同浓度 VP2 蛋白 (0.9、1.1、1.3 mg/mL) 包被于 T 线, 山羊抗兔抗体 (0.2 mg/mL) 包被于 C 线, 包被时划线速度设为 1 μ L/cm。每种试纸条取 8 个, 分为 4 组, 用 10 mM PBS 缓冲液稀释 100、1000、10000 倍的阳性血清样本 (已测得稀释前 HI 效价为 1:1024) 以及阴性血清, 分别取 100 μ L 分别滴加于各试纸条上, 20 min 后检测其 T、C 线荧光值。选择合适的 T 线浓度使得 T/C 比值与血凝抑制效价相关性较好。

3.2.1.6 C 线包被量优化

使用不同浓度山羊抗兔抗体 (0.02、0.06、0.1 mg/mL) 包被于 C 线, 包被时划线速度设为 1 μ L/cm。每种试纸条取 8 个, 分为 4 组, 用 10 mmol/L PBS 缓冲液稀释 100、1000、10000 倍的阳性血清样本 (已测得稀释前 HI 效价为 1:1024) 以及阴性血清, 分别取 100 μ L 滴加于各试纸条上, 20 min 后检测其 T、C 线荧光值。在 T/C 比值与血凝抑制效价相关性较好的前提下, 选择合适的 C 线浓度使得阳性 T/C 比值大于 1 且阴性 T/C 比值小于 0.5。

3.2.2 猫血清中 FPV 抗体血凝抑制效价检测

3.2.2.1 血凝试验

参考中华人民共和国国家标准 (GB/T 14926.53)

(1) 制备红细胞悬液: 采集猪血, 一般将血液保存于阿氏液内, 使用前用 pH=6.3 的 PBS 缓冲液离心并洗涤三次, 在重悬于 pH=6.3 的 PBS 缓冲液中配置为 1% 红细胞悬液;

(2) 在血凝板上加入待测样品 (FPV 病毒液), 然后对样品依次进行二倍梯度稀释, 得到一系列不同浓度的待测样品, 每稀释度留存 25 μ L 于微量血凝板的孔中;

(3) 在待测孔中加入 25 μL pH=6.3 的 PBS 缓冲液, 再加入之前配置好的红细胞悬液并混合均匀, 同时设立只加 PBS 与红细胞悬液的对照组;

(4) 静置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 50 min;

(5) 结果判定: 判读结果时, 将血凝板倾斜 45 $^{\circ}$, 进行观察。使红细胞完全凝集时的抗原最高稀释度, 作为该抗原的血凝效价, 单位为 1 个血凝单位 HAU。

3.2.2.2 血凝抑制试验

参考中华人民共和国国家标准 (GB/T 14926.54)

(1) 将待检血清置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。有的血清含有非特异性凝集素, 可按血清体积加入 100% 红细胞置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 16 h, 然后离心去除红细胞;

(2) 配置 4 HAU 的血凝素工作液: 根据上一步获得的最高稀释倍数, 配置 4 倍上述浓度的血凝素溶液;

(3) 在微量血凝板中加入一系列二倍稀释浓度的待检血清, 每稀释度留存 25 μL 于微量血凝板的孔中;

(4) 滴加 25 μL 4 HAU 血凝素, 设置对照, 摇匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;

(5) 同时将 4 HAU 血凝素稀释为 4 HAU、2 HAU、1 HAU、0.5 HAU, 每孔 25 μL , 摇匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 50 min;

(6) 加入以及 50 μL 红细胞悬液, 摇匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 50 min。当红细胞凝集现象被完全抑制的时候, 该组血清稀释度为判定终点。

3.2.3 荧光微球试纸条性能评估

3.2.3.1 敏感性试验

利用连续二倍稀释的 FPV 阳性血清 (确定 HI 效价为 1: 2¹⁰), 即稀释样本 HI 效价分别至 1:2¹、1:2⁰、1:2⁻¹、1:2⁻²、1:2⁻³、1:2⁻⁴、1:2⁻⁵, 评估荧光微球试纸条的敏感性, 每个检测五次。

3.2.3.2 建立血清血凝抑制效价—T/C 比值标准曲线

通过方程: $\log(\text{agonist})$ vs. response —采用可变斜率 (四参数) 拟合数据, 以更准确地描述每个样品 T/C 比值与其血凝抑制效价之间的关系, 构建血清血凝抑制效价—T/C 比值校准曲线。

3.2.3.3 特异性试验

通过制备的荧光微球试纸条检测含有密切相关的猫科动物病毒 (如猫疱疹病毒、猫杯状病毒) 抗体中和效价阳性的血清样本来评估荧光微球试纸条的特异性。通过中和试验确定血清中猫疱疹病毒、猫杯状病毒抗体效价。

3.2.3.4 重复性试验

为了评估荧光微球试纸条的批内和批间重现性，分别制作三批荧光微球试纸条，并用这些试纸条测定不同 HI 效价的血清样品的 T/C 比值。对每个血清样品进行五次重复测定。

3.2.3.5 临床样本检测

分析来自中国吉林省长春市的 84 份临床样本。使用 10 mmol/L PBS 缓冲液将临床血清样品稀释 100 倍。随后，将 100 μ L 稀释的样品滴加到荧光微球试纸条样品垫上。20 min 后，使用干式免疫荧光分析仪测量试纸 T 线和 C 线处的荧光强度进行定量分析。同时这些样本进行 HI 测试以进行比较评估。

3.2.3.6 稳定性试验

此外，通过将组装好的荧光微球试纸条与干燥剂密封于铝箔袋中，置于 25 $^{\circ}$ C 下储存 1、3 个月并通过检测已知效价血清的 T/C 比值，对荧光微球试纸条进行稳定性评估。

3.3 荧光微球试纸条组装优化结果

3.3.1 荧光微球荧光值变化趋势

滴加 100 μ L 用 10 mM PBS 缓冲液稀释 100 倍的血清样本于 5 个试纸条样品垫上，每分钟检测每个试纸条 T/C 比值，得到该荧光微球试纸条 T/C 比值到达平稳阶段所需时间以及持续时间（图 3-2）。20 min 前 T/C 比值波动起伏大，20~25 min 阶段 T/C 比值较稳定，25 min 后部分试纸条的 T/C 比值有所下降，根据以上结果，选择在滴加样本 20~25 min 内测定其 T/C 比值。

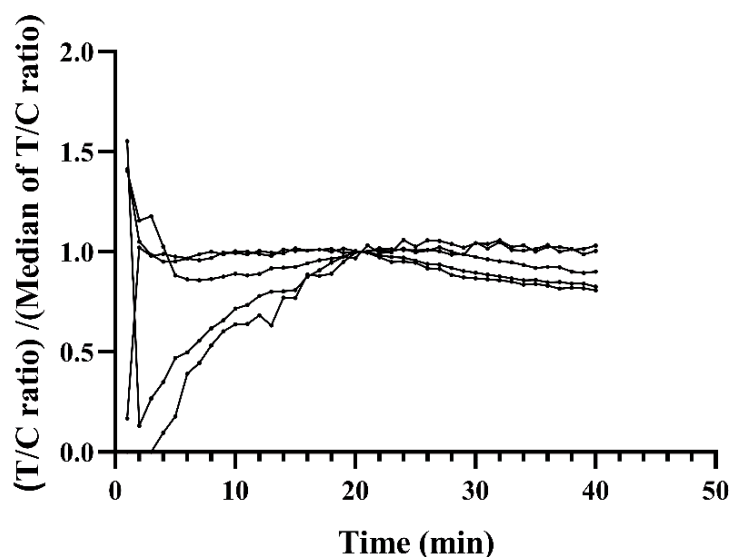


图 3-2 荧光微球试纸条荧光值随时间变化趋势

Fig. 3-2 The fluorescence trend of fluorescent microsphere test strips over time

3.3.2 荧光微球与兔抗猫抗体偶联缓冲液优化

使用不同偶联缓冲液, Tris 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0) 和 HEPES 缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH=8.0), 偶联兔抗猫抗体 (2 μ g/100 μ g 荧光微球) 并制作成试纸条, 分别滴加 100 μ L 用 PBS 缓冲液稀释 100 倍的血清样本于这两种荧光微球试纸条上, 20 min 后检测试纸条上的荧光值。如图 3-3 所示, Tris 组 C 线荧光值弱于 HEPES 组, 但其 T 线与 T/C 比值均高于 HEPES 组, 故选择 Tris 缓冲液优于 HEPES 缓冲液。

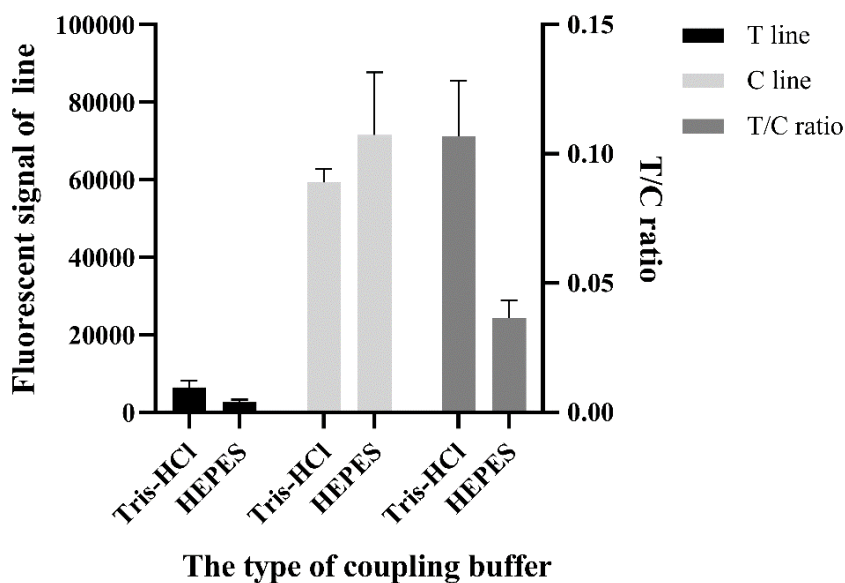


图 3-3 最适偶联缓冲液选择

Fig. 3-3 Optimal coupling buffer selection

3.3.3 荧光微球与兔抗猫抗体最佳偶联量

滴加 100 μ L 用 PBS 缓冲液稀释 100 倍的血清样本于不同偶联量 (2、4、6、8 μ g/100 μ g 荧光微球) 的荧光微球试纸条, 根据 20 min 荧光值 (图 3-4), 6 μ g 兔抗猫抗体/100 μ g 荧光微球为最佳偶联比。

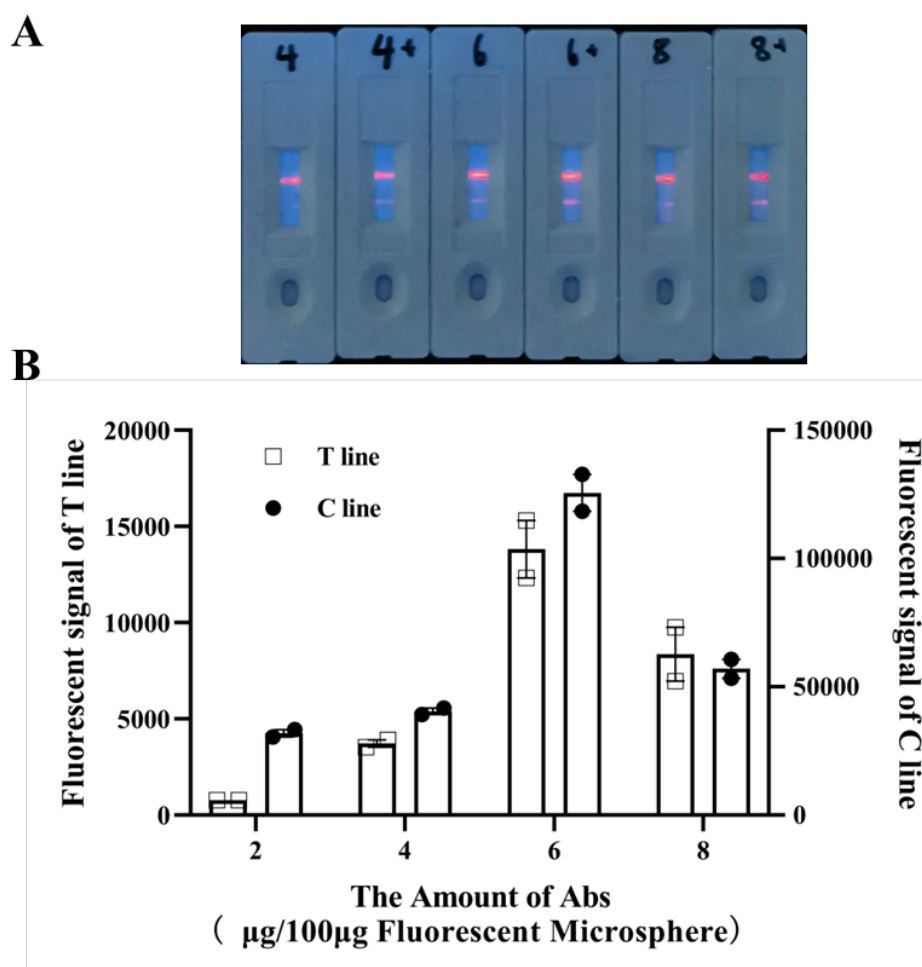


图 3-4 抗体与荧光微球最佳偶联量

Fig. 3-4 Optimal coupling quantity of antibodies with fluorescent microspheres

注：（A）抗体与荧光微球最佳偶联量试验中荧光微球试纸条滴加样品 20min 后于紫外灯下照片，4、6、8 分别代表 4、6、8 μg/100 μg 荧光微球偶联。（B）抗体与荧光微球最佳偶联量的确定。

Note: A) In the optimal coupling test of antibodies with fluorescent microspheres, photographs were taken under a UV lamp 20 minutes after the addition of sample to the fluorescent microsphere test strips. The numbers 4, 6, 8 respectively represent the coupling of 4, 6, 8 μg/100 μg of fluorescent microspheres. (B) Determination of the optimal coupling amount of antibodies with fluorescent microspheres.

3.3.4 试纸条 T 和 C 线最佳包被量

使用不同浓度 VP2 蛋白（0.9、1.1、1.3 mg/mL）包被于 T 线，山羊抗兔抗体（0.2 mg/mL）包被于 C 线，包被时划线速度设为 1 μL/cm。制备组装试纸条后，检测终 HI 效价分别为 1:128、1:16、1:2 以及阴性样本，20 min 后检测 T/C 比值，现当 T 线包被量为 0.9 mg/mL 时即 0.9 μg/cm，T/C 比值与血清血凝抑制效价相关性较好。但发现 T/C 比值偏小，不利于低效价检测，故需要减少 C 线包被量。同时，之所以选择 T/C 比值大小来定量抗体浓度，一方面 T 线的荧光强度与样品中的抗体浓度之间存在正比关系，另一方面作为确认样品是否迁移到检测线并正确反应的内部对照，无论样品中的抗体浓度如何，C 线的荧光强度相对来说几乎保持不变。

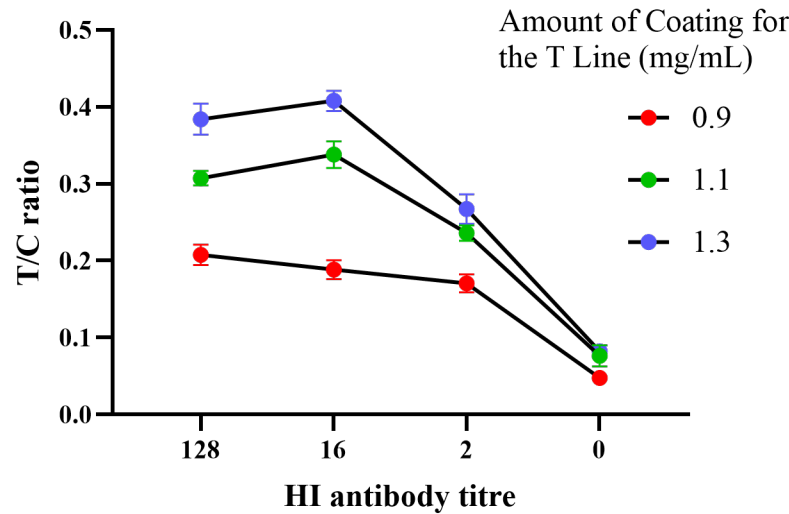


图 3-5 T 线最佳包被量

Fig. 3-5 Optimal coating amount for the T line

后续使用 VP2 蛋白（0.9 mg/mL）包被于 T 线，山羊抗兔抗体（0.02、0.06、0.1 mg/mL）包被于 C 线，包被时划线速度设为 1 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。制备组装试纸条后，检测终 HI 效价分别为 1:128、1:16、1:2 以及阴性样本，20 min 后检测 T/C 比值，当调整 C 线包被量为 0.06 mg/ml 山羊抗兔抗体时即 0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}$ ，试纸条检测与血清血凝抑制效价相关性较好，同时阳性 T/C 比值大于 1 且阴性小于 0.5（图 3-6）。

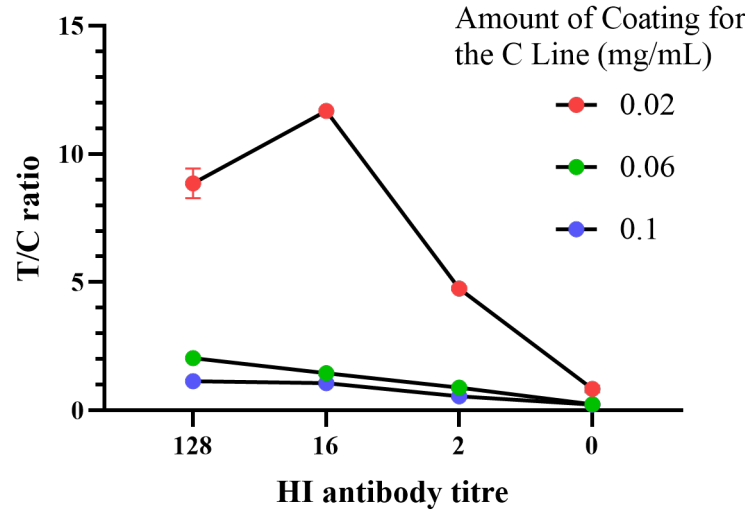


图 3-6 C 线最佳包被量

Fig. 3-6 Optimal coating amount for the C line

3.4 荧光微球试纸条性能评估结果

3.4.1 敏感性试验并建立标准曲线

用荧光微球试纸条检测连续二倍稀释的 FPV 阳性血清（HI 效价分别为 1:2¹、1:2⁰、1:2⁻¹、1:2⁻²

²、1:2⁻³、1:2⁻⁴、1:2⁻⁵) 以及阴性血清样品, 每个 HI 效价样本和阴性样本检测五次, 得到其对应 T/C 值 (表 3-1)。并如图 3-7 所示, 使用 log (agonist) vs. response 采用可变斜率 (四参数) 模型确定抗体滴度的标准曲线 ($Y=Bottom + (Top-Bottom) / (1+10^{((LogEC50-X) *HillSlope)})$), $R^2 = 0.9733$, Bottom = -2.354, Top = 1.311, LogEC50 = -0.3265, HillSlope = 1.000)。该荧光微球试纸条对猫 FPV 抗体的 HI 效价最低检测浓度为 1:2⁻⁵, 而该荧光微球试纸条 HI 抗体有效检测范围为 1:2⁻⁵~1:2⁰。HI 抗体最低检测浓度的阳性样本检测值不低于 0.16, 初步将 T/C 值=0.16 设为区分阳性与阴性的临界值。

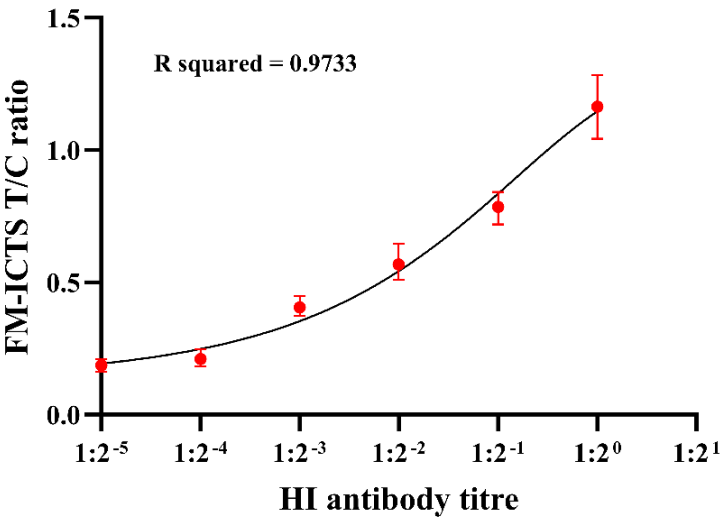


图 3-7 血清血凝抑制效价—T/C 荧光值标准曲线

Fig. 3-7 The standard curve of HI titres – T/C ratio

表 3-1 敏感性试验数据

Table 3-1 The data of sensitivity test

HI 效价		T/C 比值				CV 值
1:2 ¹	1.262	0.7103	1.252	1.169	1.02	18.97%
1:2 ⁰	1.172	1.043	1.173	1.148	1.284	6.592%
1:2 ⁻¹	0.8149	0.7188	0.7823	0.7679	0.8413	5.327%
1:2 ⁻²	0.565	0.5776	0.6465	0.5106	0.5411	7.981%
1:2 ⁻³	0.4291	0.4488	0.3736	0.3968	0.3781	7.215%
1:2 ⁻⁴	0.2464	0.1985	0.213	0.2103	0.1827	10.01%
1:2 ⁻⁵	0.1969	0.1962	0.1623	0.1663	0.2106	10.11%
阴性	0.1217	0.1175	0.1236	0.1202	0.1127	3.179%

3.4.2 特异性试验

使用猫疱疹病毒和猫杯状病毒抗体阳性血清进行荧光微球试纸条的特异性实验, 猫疱疹病毒抗体效价大于 1:2⁴, 猫杯状病毒抗体效价大于 1:2⁵, 结果表明, 荧光微球试纸条与其他血清没有交叉反应性, 其他病毒抗体阳性血清检测结果 T/C 比值与阴性相似。结合敏感性实验中阴性样本

检测数值，经计算阴性样本的 T/C 值平均值 X 为 0.1149，标准方差 SD 为 0.02375，临界值设为 $X+3SD=0.1861$ ，即 T/C 值大于 0.1861 为阳性，T/C 值低于 0.1861 为阴性。

表 3-2 特异性试验数据

Table 3-2 The data of specificity test

血清种类	T/C 比值					CV 值
FHV antibody +	0.1559	0.1419	0.1404	0.1377	0.1208	8.05%
FCV antibody +	0.0836	0.0979	0.0887	0.0942	0.0669	12.55%

3.4.3 重复性试验

采用三批荧光微球试纸条对 3 种不同 HI 效价血清样品（ $1:2^{-1}$ ， $1:2^{-2}$ ， $1:2^{-3}$ ）的 T/C 比值进行检测（图 3-8）。对每个样品进行五次重复，变异系数（CV）计算为 $SD/X \times 100\%$ 。批内和批间 CV 值均低于 11%，满足精度要求（表 3-3）。

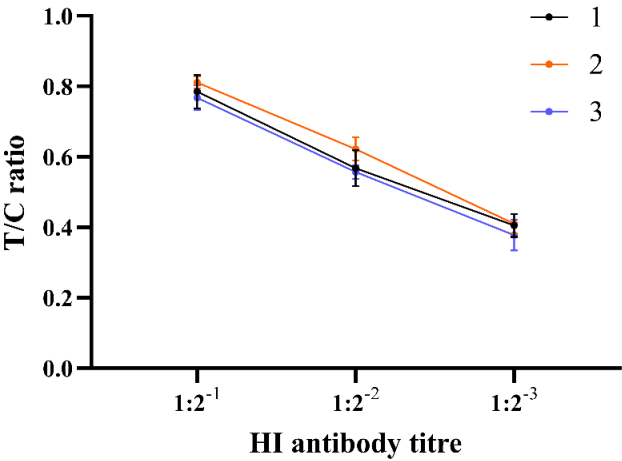


图 3-8 重复性试验

Fig. 3-8 Reproducibility experiments

表 3-3 重复性试验数据

Table 3-3 The data of reproducibility experiments

批次	T/C 比值		
	1:2 ⁻¹	1:2 ⁻²	1:2 ⁻³
1	0.8149	0.565	0.4291
	0.7188	0.5776	0.4488
	0.7823	0.6465	0.3736
	0.7679	0.5106	0.3968
	0.8413	0.5411	0.3781
	0.8087	0.5957	0.3878
2	0.7943	0.6267	0.4568
	0.7981	0.6484	0.4058
	0.8378	0.6586	0.4104
	0.8177	0.5824	0.3906
	0.7541	0.5433	0.3348
3	0.8087	0.5423	0.4479
	0.7319	0.5894	0.3624
	0.7423	0.559	0.387
	0.8025	0.5531	0.358
CV 值	4.604%	7.440%	8.669%

3.4.4 临床试验

如图 3-9 所示，在测试的 84 个临床样本中，66 个被鉴定为 FPV 抗体阳性，18 个样本被确定为阴性。血凝抑制试验共检测到 66 个 FPV 抗体阳性样本和 18 个阴性样本（表 3-4）。R 平方值为 0.8798。

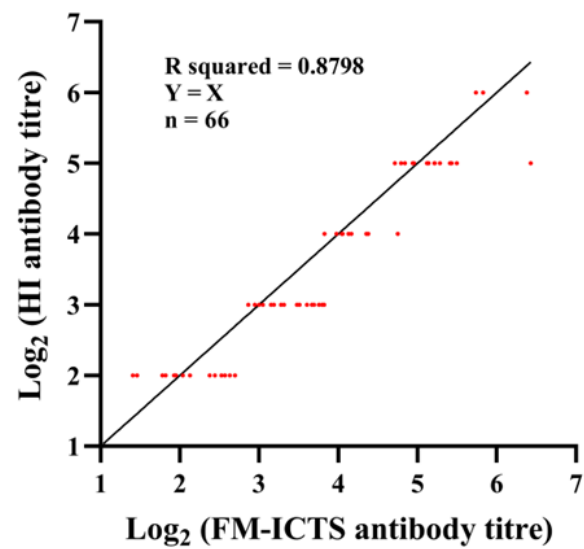


图 3-9 临床试验

Fig. 3-9 Clinical evaluation

表 3-4 荧光微球试纸条与 HI 试验在区分猫血清 FPV 抗体阴阳性的比较

Table 3-4 Comparison of the FM-ICTS assay and HI Test in differentiating positive and negative FPV antibodies in cat serum

Assays		FM-ICTS		Total
		Positive	Negative	
HI test	Positive	66	0	66
	Negative	0	18	18
	Total	66	18	84

表 3-5 荧光微球试纸条与 HI 试验在判断猫血清 FPV 抗体是否高于 1:32 的比较

Table 3-5 Comparison of the FM-ICTS assay and HI Test in determining whether cat serum FPV antibodies exceed 1:32

Assays		FM-ICTS		Total
		HI titre ≥ 1:32	HI titre < 1:32	
HI test	HI titre ≥ 1:32	12	5	17
	HI titre < 1:32	0	67	67
	Total	12	72	84

3.4.5 稳定性试验

此外，通过将铝箔袋包装的荧光微球试纸条置于在 25℃ 下储存 0、1、3 个月并使用经稀释的已知 HI 效价血清（1:2⁰、1:2⁻¹、1:2⁻²、1:2⁻³、1:2⁻⁴）评估 T/C 比值，对荧光微球试纸条进行了稳定性测试，得出 CV 值小于 12%（图 3-10）。在 25℃ 储存 3 个月的试纸条上观察到较好的灵敏度，

证实了其良好的稳定性。因时间原因，其更长期限的稳定性试验未能开展。

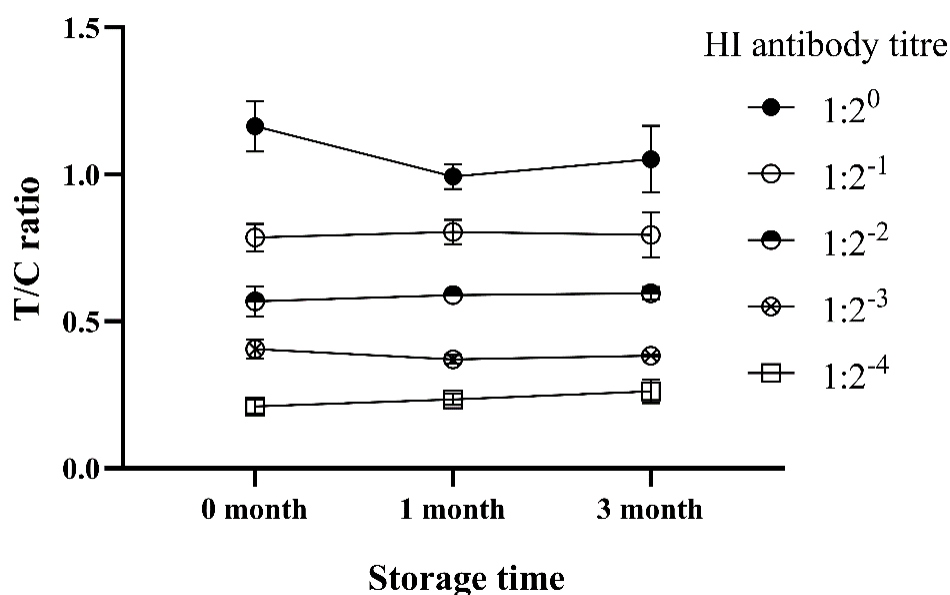


图 3-10 稳定性试验

Fig. 3-10 The test of stability

3.5 讨论

3.5.1 即时定量检测 FPV 抗体的市场价值

FPV 于 1928 年首次被发现，并于 1964 年在组织培养中分离出来。FPV 自发现以来变异缓慢，目前只发现一种亚型，但缓慢的变异速度并不影响其对猫的高度致病性以及高度流行（Barrs V R, 2019; Li S et al., 2022）。该病毒主要感染猫的消化道、骨髓和淋巴组织，导致猫的白细胞数量急剧下降（Isaya R et al., 2021），从而降低猫的免疫力，使其容易感染其他细菌或病毒。FPV 的预防措施主要是注射疫苗，刺激猫的免疫系统产生抗体，从而抵抗病毒的侵袭。FPV 疫苗的免疫效果需要及时检测来评估猫的抗体水平与免疫效果。FPV 的抗体检测可以帮助兽医确定猫是否需要再次接种疫苗，或者是否需要采取其他治疗措施。

《艾媒咨询 | 2022-2023 年中国宠物产业发展及消费者调研研究报告》的数据显示，中国宠物经济产业规模预计在 2023 年将达到 4936 亿元，同比增长 25.2%，到 2025 年预计市场规模将达到 8114 亿元。未来 5 年犬猫数量预期将从 2023 年 1.9 亿只增至 2.1 亿只，其中猫数量将随着养宠偏好的变化预期超过 1.1 亿只（黎竹 等, 2023）。《2023 宠物用品场景趋势白皮书》指出 2023 年中国宠物猫狗数量已达到 1.0085 亿只，其中家猫占比约为 43%，相关市场为 884 亿元。2024 年涉及宠物猫的消费规模占比提升，达 1060 亿元，同比 2023 年增长 19.8%。全球宠物产品零售市场规模增至 1844 亿美元，家猫产业将为市场增长做出更多贡献。同时中国宠物饲主很注重宠物健康，因此，为了促进家猫产业的持续发展，需要通过给猫进行疫苗免疫接种来预防传染病，同时需要定期进行抗体检测来监测猫的免疫状况，以保障猫的健康和安全。

在本研究中，我们基于荧光微球和侧向免疫层析试纸条等技术开发了一种针对 FPV 抗体的

快速、灵敏和定量的检测方法。该检测方法操作较为简单，只需将待检血清用 PBS 缓冲液稀释，随后滴加在荧光微球试纸条的样品垫上等待 20 min，最后插入干式免疫荧光分析仪即可得到 T/C 比值和对应抗体效价。该荧光微球试纸条具有良好的稳定性，在 25℃和铝箔密封包装的条件下可储存超过 3 个月，同时检测涉及的设备仅需要配套的干式免疫荧光分析仪。

3.5.2 荧光微球免疫层析试纸条制备条件优化

该方法基于 LFIA 方法，兔抗猫抗体与 Eu (III) 螯合微粒（即荧光微球）相结合，在结合垫与猫血清样本中 FPV 抗体结合形成 FPV 抗体-兔抗猫抗体-复合物，同时 VP2 蛋白通过与 FPV 抗体的特异性结合对上述复合物进行捕获，根据试纸条承受能力范围内结合的抗体越多，其螯合的荧光微球越多，通过仪器能检测到的荧光值越高，从而实现对猫血清中 FPV 抗体的快速定量检测。试验中使用 T 线与 C 线的荧光值比值作为检测结果，可以抵消侧向层析试纸条和样品基质的内在异质性，比只用 T 线进行信号定量更可靠，更具有可重复性 (Bian L et al., 2021)。首先本研究通过在滴加血清样本后的一段时间内，检测并观察荧光微球试纸条的 T/C 比值随时间的变化，发现 20~25 min 时 T/C 比值较为稳定，因此选择该时间段作为检测时间。这说明荧光微球试纸条具有较快的反应速度和较高的灵敏度，能够在短时间内检测出 FPV VP2 抗体的存在。

其次，本研究比较了两种不同的偶联缓冲液，Tris 和 HEPES 缓冲液，对荧光微球与兔抗猫抗体的偶联效果的影响。比较后发现 Tris 缓冲液能够提高 T 线的荧光值和 T/C 比值，而 HEPES 缓冲液则降低了 T 线荧光值和 T/C 比值，但提高了 C 线的荧光值。这可能是由于 Tris 缓冲液更能维持荧光微球的稳定性和活性，而 HEPES 缓冲液则较不适合荧光微球与兔抗猫抗体的结合，导致在使用 HEPES 缓冲液偶联的情况下，理应结合更多荧光微球的 T 线荧光值与 T/C 比值并未达到使用 Tris 缓冲液时的高度。因此，我们选择 Tris 缓冲液作为最佳的偶联缓冲液。

试验中还探究了不同的偶联量对荧光微球试纸条的影响 (Hou S et al., 2020)，发现当 6 µg 兔抗猫抗体与 100 µg 荧光微球偶联时，T 线荧光值和 T/C 比值达到最高，而当偶联量过高或过低时，T 线荧光值和 T/C 比值均下降。一方面由于兔抗猫抗体过少时，荧光微球上的兔抗猫抗体不足，不能有效地与 FPV VP2 抗原结合，而偶联量过高时，荧光微球上的兔抗猫抗体过多，影响仪器对荧光微球的荧光的检测，或是导致了荧光微球的凝集，影响了荧光信号的输出。因此，我们选择 6 µg 兔抗猫抗体/100 µg 荧光微球作为最佳的偶联量。

最后优化了试纸条 T 和 C 线的包被量，发现当 T 线包被量为 0.9 µg/cm VP2 蛋白，C 线包埋量为 0.06 µg/cm 山羊抗兔抗体时，试纸条的 T/C 比值与血清 HI 效价呈较好的相关性，且阳性 T/C 比值大于 1，阴性 T/C 比值小于 0.5，具有较好的判读效果。这可能是由于 T 线和 C 线的包被量影响了荧光微球的捕获效率和背景信号的强度，过高或过低的包被量都会降低试纸条的灵敏度 (Zhang G gang et al., 2019)。因此，我们选择 0.9 mg/mL (0.9 µg/cm) VP2 蛋白和 0.06 mg/mL (0.06 µg/cm) 山羊抗兔抗体作为最佳的包被量。

3.5.3 FPV 抗体荧光微球免疫层析试纸条性能测试

在本研究中，为了评估所开发的荧光微球试纸条的实际应用能力，使用所开发的方法测定了不同 HI 效价的 FPV 抗体阳性样本，不同 HI 效价的 FPV 抗体阳性样本通过已知 HI 效价的阳性

血清稀释而成，并将检测结果与 HI 试验结果进行了比较，进一步用于绘制标准曲线（图 3-11），结果显示反应数据与四参数模型拟合效果很好，得到了较高的相关系数（ $R^2 = 0.9733$ ）（Peng C et al., 2022）。该试纸条对样本中 HI 抗体滴度的检测范围为 $1:2^{-5}$ ~ $1:2^0$ ，通过对待检血清的稀释，试纸条能够覆盖 FPV 抗体的主要检测范围。该方法具有良好的信噪比、较低的检出限和较宽的线性范围，该结果与其他使用 Eu（III）荧光微球的研究报告类似（Wang Q et al., 2022）。作为参照，Salmanli 等研制的重组 VP2 抗原检测 CPV-2 总抗体的新型侧流免疫层析检测法对标准抗体的 LOD 被确定为 375 ng/mL（Salmanli et al., 2024）。

另外我们对不同 HI 效价的血清样品进行了重复性试验，分别在 3 批试纸条上进行了 5 次检测，结果表明各批次之间的变异系数（CV）均低于 11%，满足要求。我们还进行了特异性试验，使用猫疱疹病毒和猫杯状病毒血清作为干扰物，结果表明试纸条只能检测 FPV 阳性血清，而与其他血清没有交叉反应性，证明试纸条具有较高的特异性。

用 PBS 缓冲液将 84 份临床血清样本稀释 100 倍检测，将得到的 T/C 比值引入标准曲线以计算浓度，与对应 HI 试验结果比较（图 3-12）， R^2 为 87.98%，意味着自变量在解释因变量的方差方面非常有效，达到了 87.98%，即模型所包含的自变量能够很好地解释因变量的变化，而剩余的 12.02% 方差可能由其他未考虑的因素导致，或是回归模型存在改进空间，如果样本数量足够多可以考虑到其他变量或调整模型结构。但这也足够表明回归模型中的 T/C 比值与 FPV 抗体滴度之间存在较强的相关性。两种方法检测到的浓度之间呈可接受的线性关系，表明所开发的荧光微球试纸条具备良好的检测分析性能，可有效地定量检测猫血清中 FPV 抗体滴度。最后，我们对试纸条进行了稳定性试验，将试纸条在 25℃ 下储存 0、1、3 个月，并使用不同 HI 效价的血清进行检测，结果表明试纸条的 CV 值均小于 12%，说明试纸条在储存过程中没有明显的性能下降，保持了良好的稳定性。

该荧光微球试纸条检测方法表现出良好的诊断特异性、敏感性、准确性、重复性和稳定性，表明所开发的荧光微球试纸条检测方法与临床方法无明显差异，符合临床使用要求。所有这些结果都证明了所开发的荧光微球试纸条检测方法具有很好的临床应用前景。

第四章 结论

本研究利用表达的 FPV VP2 蛋白建立了基于 Eu(III)螯合微粒的荧光微球试纸条检测方法,可定量测定猫血清中的 FPV 抗体效价。

(1)根据 FPV 的 VP2 基因原核表达并纯化获得 FPV VP2 蛋白,总蛋白浓度为 1.885 mg/mL,其中 VP2 蛋白纯度为 69.96%, VP2 蛋白浓度为 1.319 mg/mL,最终 1 L 菌液诱导表达后得到 VP2 蛋白 1.319 mg。

(2)优化荧光微球试纸条组装条件,确定以 6 μg 兔抗猫抗体/100 μg 荧光微球的偶联比将兔抗猫抗体与荧光微球偶联、0.9 mg/mL (0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}$) VP2 蛋白包被 T 线和 0.06 mg/mL (0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}$) 山羊抗兔抗体包被 C 线。

(3) 对该荧光微球试纸条性能进行测试。该方法对猫血清稀释样本中抗 FPV 的 HI 效价检出范围为 $1:2^{-5}$ ~ $1:2^0$,临界值 T/C 比值设为 0.1861。试纸条在重复性和稳定性试验中 CV 值均小于 12%。临床实验结果表明,荧光微球试纸条的检测结果与 HI 试验结果基本一致,证明了其在现场检测猫血清中 FPV 抗体方面的可靠性和有效性。

参考文献

- 黎竹, 刘旺, 2023. 宠物主粮赛道火热 品牌角逐提速. 中国经营报, 2023-05-15 (D03). DOI: 10.38300/n.cnki.nzgjy.2023.001110.
- 商金源, 闫曼平, 叶京飞, 程悦宁, 王振军, 冯二凯, 王春霞, 赵艳, 朱先鹏, 廖远军, 罗国良, 2023. 原细小病毒属病毒感染及其抗肿瘤机制研究进展. 畜牧兽医学报, 54 (11): 4551-4559.
- 夏霖亚, 2022. 四种分子伴侣促进猫细小病毒样颗粒可溶性表达的研究. 长春工业大学. DOI: 10.27805/d.cnki.gccgy.2021.000745.
- ALLISON A B, ORGANTINI L J, ZHANG S, HAFENSTEIN S L, HOLMES E C, PARRISH C R, 2015. Single Mutations in the VP2 300 Loop Region of the Three-Fold Spike of the Carnivore Parvovirus Capsid Can Determine Host Range. *Journal of Virology*, 90 (2): 753-767. DOI: 10.1128/JVI.02636-15.
- ASHUO A, ZOU W, FU J, YANG T, YU L, LIU W, YANG L, MARI G M, JIANG H, 2020. High throughput detection of antibiotic residues in milk by time-resolved fluorescence immunochromatography based on QR code. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37 (9): 1481-1490. DOI: 10.1080/19440049.2020.1778192.
- BAHADIR E B, SEZGINTÜRK M K, 2016. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82: 286-306. DOI: 10.1016/j.trac.2016.06.006.
- BARRS V R, 2019. Feline Panleukopenia: A Re-emergent Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 49 (4): 651-670. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.02.006.
- BHATWA A, WANG W, HASSAN Y I, ABRAHAM N, LI X Z, ZHOU T, 2021. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- BIAN L, LI Z, HE A, WU B, YANG H, WU Y, HU F, LIN G, ZHANG D, 2022a. Ultrabright nanoparticle-labeled lateral flow immunoassay for detection of anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in human serum. *Biomaterials*, 288: 121694. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2022.121694.
- BIAN L, LIANG J, ZHAO H, YE K, LI Z, LIU T, PENG J, WU Y, LIN G, 2021. Rapid Monitoring of Vancomycin Concentration in Serum Using Europium (III) Chelate Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay. *Frontiers in Chemistry*, 9: 763686. DOI: 10.3389/fchem.2021.763686.
- BIAN L, XIONG Y, ZHAO H, GUO H, LI Z, YE K, ZHANG Z, LIU T, WU Y, LIN G, 2022b. Europium (III) chelate nanoparticle-based lateral flow immunoassay strips for rapid and quantitative detection of cystatin C in serum. *Journal of Chromatography B*, 1194: 123133. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123133.
- CHEN C, LIANG H, HU B, NING B, LAI H, HE Y, GUO G, ZHONG S, LI L, 2021. Determination of parvovirus antigen in the vaccine using time-resolved fluorescence immunoassay. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68 (3): 597-602. DOI: 10.1002/bab.1967.
- CHEN H, HAGSTRÖM A E V, KIM J, GARVEY G, PATERSON A, RUIZ-RUIZ F, RAJA B, STRYCH

- U, RITO-PALOMARES M, KOURENTZI K, CONRAD J C, ATMAR R L, WILLSON R C, 2016. Flotation Immunoassay: Masking the Signal from Free Reporters in Sandwich Immunoassays. *Scientific Reports*, 6: 24297. DOI: 10.1038/srep24297.
- CHEN R, YAN Z, ZHAO Y, CAI X C, 2013. Simulating 3D Flows Passing Wind Turbine Rotors with a Domain Decomposition Method on a Moving Domain. *Procedia Engineering*, 61: 405. DOI: 10.1016/j.proeng.2013.08.038.
- CHO U, CHEN J K, 2020. Lanthanide-Based Optical Probes of Biological Systems. *Cell chemical biology*, 27 (8) : 921-936. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.07.009.
- CHRISTENSEN J, TATTERSALL P, 2002. Parvovirus Initiator Protein NS1 and RPA Coordinate Replication Fork Progression in a Reconstituted DNA Replication System. *Journal of Virology*, 76 (13) : 6518-6531. DOI: 10.1128/JVI.76.13.6518-6531.2002.
- COTMORE S F, AGBANDJE-MCKENNA M, CANUTI M, CHIORINI J A, EIS-HUBINGER A M, HUGHES J, MIETZSCH M, MODHA S, OGLIASTRO M, PÉNZES J J, PINTEL D J, QIU J, SODERLUND-VENERMO M, TATTERSALL P, TIJSSEN P, ICTV REPORT CONSORTIUM MYR 2019, [2022]. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology*, 100 (3) : 367-368. DOI: 10.1099/jgv.0.001212.
- COTMORE S F, TATTERSALL P, 2013. Parvovirus Diversity and DNA Damage Responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (2) : a012989. DOI: 10.1101/cshperspect.a012989.
- CURETON D K, HARBISON C E, COCUCCI E, PARRISH C R, KIRCHHAUSEN T, 2012. Limited Transferrin Receptor Clustering Allows Rapid Diffusion of Canine Parvovirus into Clathrin Endocytic Structures. *Journal of Virology*, 86 (9) : 5330-5340. DOI: 10.1128/JVI.07194-11.
- EGBERINK H, FRYMUS T, HARTMANN K, MÖSTL K, ADDIE D D, BELÁK S, BOUCRAUT-BARALON C, HOFMANN-LEHMANN R, LLORET A, MARSILIO F, PENNISI M G, TASKER S, THIRY E, TRUYEN U, HOSIE M J, 2022. Vaccination and Antibody Testing in Cats. *Viruses*, 14 (8) : 1602. DOI: 10.3390/v14081602.
- FARR G A, COTMORE S F, TATTERSALL P, 2006. VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control pH-Dependent Externalization of both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice. *Journal of Virology*, 80 (1) : 161-171. DOI: 10.1128/JVI.80.1.161-171.2006.
- FEI-FEI D, YONG-FENG Z, JIAN-LI W, XUE-HUA W, KAI C, CHUAN-YI L, SHOU-YU G, JIANG S, ZHI-JING X, 2017. Molecular characterization of feline panleukopenia virus isolated from mink and its pathogenesis in mink. *Veterinary Microbiology*, 205: 92-98. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.05.017.
- GARCIN P O, PANTÉ N, 2015. The minute virus of mice exploits different endocytic pathways for cellular uptake. *Virology*, 482: 157-166. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.054.
- GIL-RANEDO J, HERNANDO E, RIOLOBOS L, DOMÍNGUEZ C, KANN M, ALMENDRAL J M, 2015. The Mammalian Cell Cycle Regulates Parvovirus Nuclear Capsid Assembly. *PLoS Pathogens*, 11 (6) : e1004920. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004920.
- HE X, HAO T, GENG H, LI S, RAN C, HUO M, SHEN Y, 2023. Sensitization Strategies of Lateral Flow

- Immunochromatography for Gold Modified Nanomaterials in Biosensor Development. *International Journal of Nanomedicine*, 18: 7847-7863. DOI: 10.2147/IJN.S436379.
- HOANG M, WU C N, LIN C F, NGUYEN H T T, LE V P, CHIOU M T, LIN C N, 2020. Genetic characterization of feline panleukopenia virus from dogs in Vietnam reveals a unique Thr101 mutation in VP2. *PeerJ*, 8: e9752. DOI: 10.7717/peerj.9752.
- HOU S, MA J, CHENG Y, WANG H, SUN J, YAN Y, 2020. Quantum dot nanobead-based fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of fumonisin B1, dextrovalenol, and zearalenone in grains. *Food Control*, 117: 107331. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107331.
- ISAYA R, CICCARELLI S, ENACHE D, SPECCHI S, PESARESI M, FERRI F, PORPORATO F, AURIEMMA E, CONTIERO B, COPPOLA L M, ZINI E, 2021. Correction to: Gastrointestinal ultrasonographic findings in cats with Feline panleukopenia: a case series. *BMC Veterinary Research*, 17: 143. DOI: 10.1186/s12917-021-02856-3.
- JENKINS E, DAVIS C, CARRAI M, WARD M P, O'KEEFFE S, VAN BOEIJEN M, BEVERIDGE L, DESARIO C, BUONAVOGlia C, BEATTY J A, DECARO N, BARRS V R, 2020. Feline Parvovirus Seroprevalence Is High in Domestic Cats from Disease Outbreak and Non-Outbreak Regions in Australia. *Viruses*, 12 (3) : 320. DOI: 10.3390/v12030320.
- JIN B, DU Z, ZHANG C, YU Z, WANG X, HU J, LI Z, 2022. Eu-Chelate Polystyrene Microsphere-Based Lateral Flow Immunoassay Platform for hs-CRP Detection. *Biosensors*, 12 (11) : 977. DOI: 10.3390/bios12110977.
- KANG H, LIU D, TIAN J, HU X, ZHANG X, YIN H, WU H, LIU C, GUO D, LI Z, JIANG Q, LIU J, QU L, 2017. Feline Panleukopenia Virus NS2 Suppresses the Host IFN- β Induction by Disrupting the Interaction between TBK1 and STING. *Viruses*, 9 (1) : 23. DOI: 10.3390/v9010023.
- KAVOSI B, HALLAJ R, TEYMOURIAN H, SALIMI A, 2014. Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethylenediamine-viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive α -fetoprotein electrochemical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 59: 389-396. DOI: 10.1016/j.bios.2014.03.049.
- KIM K, HAN D K, CHOI N, KIM S H, JOUNG Y, KIM K, HO N T, JOO S W, CHOO J, 2021. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Dual-Flow Lateral Flow Assay Sensor for the Ultrasensitive Detection of the Thyroid-Stimulating Hormone. *Analytical Chemistry*, 93 (17) : 6673-6681. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c05336.
- KOKKO L, LÖVGREN T, SOUKKA T, 2007. Europium (III) -chelates embedded in nanoparticles are protected from interfering compounds present in assay media. *Analytica Chimica Acta*, 585 (1) : 17-23. DOI: 10.1016/j.aca.2006.12.006.
- LEE D W, ALLISON A B, BACON K B, PARRISH C R, DANIEL S, 2016. Single-Particle Tracking Shows that a Point Mutation in the Carnivore Parvovirus Capsid Switches Binding between Host-Specific Transferrin Receptors. *Journal of Virology*, 90 (9) : 4849-4853. DOI: 10.1128/JVI.03204-15.
- LEZHNIN Y N, KRAVCHENKO Y E, FROLOVA E I, CHUMAKOV P M, CHUMAKOV S P, 2015.

- Oncotoxic proteins in cancer therapy: Mechanisms of action. *Molecular Biology*, 49 (2) : 231-243. DOI: 10.1134/S0026893315020077.
- LI F, YOU M, LI S, HU J, LIU C, GONG Y, YANG H, XU F, 2020. Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends. *Biotechnology Advances*, 39: 107442. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107442.
- LI H, WANG D, TANG X, ZHANG W, ZHANG Q, LI P, 2020. Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay (TRFICA) for Aflatoxin: Aiming at Increasing Strip Method Sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 11: 676. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00676.
- LI L, CHEN C, LIANG H, DONG W, LEONTIEV V N, VOYTOV I V, 2024. Development of a time-resolved fluorescence immunoassay kit for detecting canine coronavirus and parvovirus through double labeling. *Virology Journal*, 21: 64. DOI: 10.1186/s12985-024-02302-4.
- LI S, CHEN X, HAO Y, ZHANG G, LYU Y, WANG J, LIU W, QIN T, 2022. Characterization of the VP2 and NS1 genes from canine parvovirus type 2 (CPV-2) and feline panleukopenia virus (FPV) in Northern China. *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 934849. DOI: 10.3389/fvets.2022.934849.
- LIANG R L, DENG Q T, CHEN Z H, XU X P, ZHOU J W, LIANG J Y, DONG Z N, LIU T C, WU Y S, 2017. Europium (III) chelate microparticle-based lateral flow immunoassay strips for rapid and quantitative detection of antibody to hepatitis B core antigen. *Scientific Reports*, 7 (1) : 14093. DOI: 10.1038/s41598-017-14427-4.
- LIU J, WANG Q, SANG X, HU H, LI S, ZHANG D, LIU C, WANG Q, ZHANG B, WANG W, SONG F, 2021. Modulated Luminescence of Lanthanide Materials by Local Surface Plasmon Resonance Effect. *Nanomaterials*, 11 (4) : 1037. DOI: 10.3390/nano11041037.
- MACOŠEK J, MAS G, HILLER S, 2021. Redefining Molecular Chaperones as Chaotropes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8: 683132. DOI: 10.3389/fmolb.2021.683132.
- MAJDINASAB M, BADEA M, MARTY J L, 2022. Aptamer-Based Lateral Flow Assays: Current Trends in Clinical Diagnostic Rapid Tests. *Pharmaceuticals*, 15 (1) : 90. DOI: 10.3390/ph15010090.
- MANESSIS G, GELASAKIS A I, BOSSIS I, 2022. Point-of-Care Diagnostics for Farm Animal Diseases: From Biosensors to Integrated Lab-on-Chip Devices. *Biosensors*, 12 (7) : 455. DOI: 10.3390/bios12070455.
- MÄNTYLÄ E, AHO V, KANN M, VIHINEN-RANTA M, 2020. Cytoplasmic Parvovirus Capsids Recruit Importin Beta for Nuclear Delivery. *Journal of Virology*, 94 (4) : e01532-19. DOI: 10.1128/JVI.01532-19.
- MÄNTYLÄ E, KANN M, VIHINEN-RANTA M, 2017. Protoparvovirus Knocking at the Nuclear Door. *Viruses*, 9 (10) : 286. DOI: 10.3390/v9100286.
- MATTOLA S, HAKANEN S, SALMINEN S, AHO V, MÄNTYLÄ E, IHALAINEN T O, KANN M, VIHINEN-RANTA M, 2021. Concepts to Reveal Parvovirus–Nucleus Interactions. *Viruses*, 13 (7) : 1306. DOI: 10.3390/v13071306.
- MATTOLA S, SALOKAS K, AHO V, MÄNTYLÄ E, SALMINEN S, HAKANEN S, NISKANEN E A, SVIRSKAITE J, IHALAINEN T O, AIRENNE K J, KAIKKONEN-MÄÄTTÄ M, PARRISH C R,

- VARJOSALO M, VIHINEN-RANTA M, 2022. Parvovirus nonstructural protein 2 interacts with chromatin-regulating cellular proteins. *PLoS Pathogens*, 18 (4) : e1010353. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010353.
- MCELWAIN L, PHAIR K, KEALEY C, BRADY D, 2022. Current trends in biopharmaceuticals production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 44 (8) : 917-931. DOI: 10.1007/s10529-022-03276-5.
- MIETZSCH M, PÉNZES J J, AGBANDJE-MCKENNA M, 2019. Twenty-Five Years of Structural Parvovirology. *Viruses*, 11 (4) : 362. DOI: 10.3390/v11040362.
- MINH H, SON N V, DUC H M, LIN C N, TYAN Y C, CHUANG K P, 2023. Genetic diversity and relatedness of feline parvovirus in Vietnam and its potential implications for canine-feline transmission. *Archives of Virology*, 169 (1) : 11. DOI: 10.1007/s00705-023-05946-9.
- MIRICA A C, STAN D, CHELCEA I C, MIHAILESCU C M, OFITERU A, BOCANCIA-MATEESCU L A, 2022. Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 922772. DOI: 10.3389/fbioe.2022.922772.
- NATARAJAN S, PRIYE A, 2023. Enhancing the Sensitivity of Lateral Flow Assay with Europium Nanoparticles for Accurate Human IgG Quantification. *Micromachines*, 14 (11) : 1993. DOI: 10.3390/mi14111993.
- PARKER J S L, MURPHY W J, WANG D, O'BRIEN S J, PARRISH C R, 2001. Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells. *Journal of Virology*, 75 (8) : 3896. DOI: 10.1128/JVI.75.8.3896-3902.2001.
- PENG C, LIANG J F, JIANG L F, DENG H Y, LIANG K, ZHANG B B, LIN J J, YI Y T, CHEN P Y, CHEN Y M, CAI W Y, CHEN G Y, YE Q X, CHEN Z, CHEN X, 2022. Carboxylated fluorescent microsphere based immunochromatographic test strip enabled sensitive and quantitative on-site detection for florfenicol in eggs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 219: 114946. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.114946.
- POROWIŃSKA D, WUJAK M, ROSZEK K, KOMOSZYŃSKI M, 2013. Prokaryotic expression systems. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67: 119-129. DOI: 10.5604/17322693.1038351.
- REN L, MENG X, SUN J, SHAO X, SHAO M, WANG S, LI Z, CHEN Y, 2024. Prokaryotic expression of soluble IFN- λ 1 recombinant protein with cold-shock system. *Protein Expression and Purification*, 215: 106413. DOI: 10.1016/j.pep.2023.106413.
- ROS C, BAYAT N, WOLFISBERG R, ALMENDRAL J M, 2017. Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses*, 9 (11) : 313. DOI: 10.3390/v9110313.
- ROTH J A, SPICKLER A R, 2010. Duration of immunity induced by companion animal vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 11 (2) : 165-190. DOI: 10.1017/S1466252310000150.
- SALMANLI E, TEZCAN T, KARAOGLU T, 2024. A novel lateral flow immunochromatographic assay using a recombinant VP2 antigen for total antibody detection of canine parvovirus-2. *Analytical Methods*, 16 (4) : 551-557. DOI: 10.1039/D3AY01870A.
- SCOTT F W, GEISSINGER C M, 1999. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated

- trivalent vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, 60 (5) : 652-658.
- SIMPSON A A, CHANDRASEKAR V, HÉBERT B, SULLIVAN G M, ROSSMANN M G, PARRISH C R, 2000. Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses 11 Edited by I. A. Wilson. *Journal of Molecular Biology*, 300 (3) : 597-610. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3868.
- SOMA T, OHTA K, YAMASHITA R, SASAI K, 2019. Anti-feline panleukopenia virus serum neutralizing antibody titer in domestic cats with the negative or low hemagglutination inhibition antibody titer. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 81 (2) : 252-255. DOI: 10.1292/jvms.18-0472.
- SU Z, DOU W, LIU X, PING J, LI D, YING Y, XIE L, 2022. Nano-labeled materials as detection tags for signal amplification in immunochromatographic assay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 154: 116673. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116673.
- SYAMCHAND S S, SONY G, 2015. Europium enabled luminescent nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Luminescence*, 165: 190-215. DOI: 10.1016/j.jlumin.2015.04.042.
- TSUBOI I, IINUMA K, 2021. Immunochromatography—Application Example and POCT Type Genetic Testing. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 69 (10) : 984-988. DOI: 10.1248/cpb.c21-00164.
- TU M, LIU F, CHEN S, WANG M, CHENG A, 2015. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology Journal*, 12: 114. DOI: 10.1186/s12985-015-0344-y.
- VALTONEN S, VUORINEN E, KARINIEMI T, ESKONEN V, LE QUESNE J, BUSHELL M, HÄRMÄ H, KOPRA K, 2020. Nanomolar Protein–Protein Interaction Monitoring with a Label-Free Protein-Probe Technique. *Analytical Chemistry*, 92 (24) : 15781-15788. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02823.
- VIHINEN-RANTA M, WANG D, WEICHERT W S, PARRISH C R, 2002. The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection. *Journal of Virology*, 76 (4) : 1884-1891. DOI: 10.1128/JVI.76.4.1884-1891.2002.
- WANG D, ZHANG Z, LI P, ZHANG Q, DING X, ZHANG W, 2015. Europium Nanospheres-Based Time-Resolved Fluorescence for Rapid and Ultrasensitive Determination of Total Aflatoxin in Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (47) : 10313-10318. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03746.
- WANG L, WANG X, CHENG L, DING S, WANG G, CHOO J, CHEN L, 2021. SERS-based test strips: Principles, designs and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 189: 113360. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113360.
- WANG Q, WANG J, XIAO Z, SHEN Z, WANG Y, ZHANG Y, PAN T, XIAO J, SUN X, 2022. A fluorescent microsphere-based immunochromatographic strip is effective for quantitative fecal blood testing in colorectal cancer screening. *American Journal of Translational Research*, 14 (3) : 2123-2132.
- WANG Y, MA B, LIU M, CHEN E, XU Y, ZHANG M, 2021. Europium Fluorescent Nanoparticles-Based Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Simultaneous Detection of Three Antibiotic Families Residue. *Frontiers in Chemistry*, 9: 793355. DOI: 10.3389/fchem.2021.793355.
- WU S Y, GUO X Q, ZHOU L P, SUN Q F, 2019. Fine-Tuned Visible and Near-Infrared Luminescence on Self-Assembled Lanthanide-Organic Tetrahedral Cages with Triazole-Based Chelates. *Inorganic Chemistry*, 58 (10) : 7091-7098. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b00756.

- YANG X, YE Y, WANG T, LI M, YU L, XIA M, QIAN J, HU Z, 2018. Eu³⁺/Sm³⁺ dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for measurement of hepatitis C virus antibodies. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33 (2) : e22659. DOI: 10.1002/jcla.22659.
- YI S, LIU S, MENG X, HUANG P, CAO Z, JIN H, WANG J, HU G, LAN J, ZHANG D, GAO Y, WANG H, LI N, FENG N, HOU R, YANG S, XIA X, 2022. Feline Panleukopenia Virus With G299E Substitution in the VP2 Protein First Identified From a Captive Giant Panda in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 820144. DOI: 10.3389/fcimb.2021.820144.
- ZENG H, YANG A, 2019. Quantification of proteomic and metabolic burdens predicts growth retardation and overflow metabolism in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 116 (6) : 1484-1495. DOI: 10.1002/bit.26943.
- ZHANG C, ZHOU L, DU K, ZHANG Y, WANG J, CHEN L, LYU Y, LI J, LIU H, HUO J, LI F, WANG J, SANG P, LIN S, XIAO Y, ZHANG K, HE K, 2020. Foundation and Clinical Evaluation of a New Method for Detecting SARS-CoV-2 Antigen by Fluorescent Microsphere Immunochromatography. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 553837. DOI: 10.3389/fcimb.2020.553837.
- ZHANG G gang, XU S lan, XIONG Y hua, DUAN H, CHEN W yao, LI X min, YUAN M fang, LAI W hua, 2019. Ultrabright fluorescent microsphere and its novel application for improving the sensitivity of immunochromatographic assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 135: 173-180. DOI: 10.1016/j.bios.2019.04.023.
- ZHANG Z, ZHANG J, DAI S, XU H, 2022. A new method for screening acute/chronic lymphocytic leukemia: dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *BMC Biotechnology*, 22. DOI: 10.1186/s12896-022-00758-2