

密级:

论文编号:

# 中国农业科学院 学位论文

## 猫杯状病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位 鉴定

### Preparation of Monoclonal Antibodies against Feline Calicivirus and Epitope Mapping

硕 士 研 究 生: 程晨曦

指 导 教 师: 曲连东 研究员

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 兽医微生物学及其分子生物学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2018年6月

密级:

论文编号:

# 中国农业科学院 学位论文

## 猫杯状病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位 鉴定

### Preparation of Monoclonal Antibodies against Feline Calicivirus and Epitope Mapping

硕 士 研 究 生: 程晨曦

指 导 教 师: 曲连东 研究员

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 兽医微生物学及其分子生物学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2018年6月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation**

## **Preparation of Monoclonal Antibodies against Feline Calicivirus and Epitope Mapping**

**M.S. Candidate: Cheng Chen-xi**

**Supervisor: Prof. Qu Lian-dong**

**Major: Preventive Veterinary Medicine**

**Specialty: Veterinary Microbiology and Molecular  
biology**

**June 2018**

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：程晨曦

时间：2018年6月1日

# 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：程晨曦

时间：2018年6月1日

导师签名：



时间：2018年6月1日

# 中国农业科学院

## 硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		猫杯状病毒单克隆抗体的制备及其抗原表位鉴定				
论文作者		程晨曦	专业	预防兽医学	研究方向	兽医微生物及其分子生物学
指导教师		曲连东		培养单位(研究所)	哈尔滨兽医研究所	
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	师东方	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学 动物医学学院	预防兽医学	/
	刘家森	副研究员	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
答 辩 主 席	唐丽杰	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学 动物医学学院	预防兽医学	唐丽杰
答 辩 委 员	李广兴	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学 动物医学学院	基础兽医学	李广兴
	张俊峰	研究员	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	黑龙江省动物疫病预 防与控制中心	预防兽医学	张俊峰
	李海	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	李海
	刘平黄	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	刘平黄
	刘长军	研究员	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	刘长军
	安同庆	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	安同庆
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>		
会议记录(秘书)		胡晓亮				
论文答辩时间地点		2018年5月11日 中国农业科学院研究生院兽医学院十教				

## 摘 要

猫杯状病毒(Feline calicivirus, FCV)属于杯状病毒科(Caliciviridae)水疱疹病毒属(Vesivirus),是引起猫上呼吸道疾病的一种常见病原。FCV 感染后的主要症状是口腔溃疡、打喷嚏、结膜炎、慢性胃肠炎等。近几年出现一些强毒株可引起急性全身性疾病,造成很高的死亡率,严重危害猫的健康。FCV 感染宿主后,常常和其他的病原混合感染,这为其诊断带来了困难,因此建立快速高效的 FCV 检测方法已经迫在眉睫。

VP1 是 FCV 的衣壳蛋白,是主要的免疫保护性抗原,在诱导机体产生免疫应答过程中起着重要的作用。VP1 分为 A-F 六个区, B 区在 125-397aa 之间是保守区域,同时可诱导宿主产生非中和性单克隆抗体(MAb)。E 区在 427-524aa 之间,又分为高变区和保守区域,可诱导宿主产生中和性单克隆抗体。本实验首先将 FCV 毒株 FCV2280 株的 VP1 的 B、E 区序列的重组质粒 pET-B、pET-E 分别转化到 *E. coli* BL21 Star(DE3)表达菌,经 IPTG 诱导后均得到大量可溶性表达。纯化的 VP1-B、VP1-E 蛋白和 FCV2280 病毒粒子经 Western blot 检测,三者均具有良好的反应原性。将纯化的 VP1-B、VP1-E 蛋白分别与弗氏佐剂均匀混合免疫 BALB/c 小鼠,通过细胞融合技术将小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)与免疫后的小鼠脾细胞融合。纯化的 FCV2280 病毒粒子作为包被抗原,建立间接 ELISA 方法筛选分泌抗 VP1-B、VP1-E 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株系。经过 3 次亚克隆,共筛选到 6 株稳定分泌抗 VP1-B、VP1-E 蛋白的单抗株,其中有 4 株仅能识别 VP1-B 蛋白,分别命名为 4G2、B1E5、B4G4、B4G5; 2 株稳定分泌抗 VP1-E 蛋白的单抗株,分别命名为 E2F1、E2F6。IFA 和 Western blot 结果表明 4G2、B1E5、B4G4、B4G5、E2F1、E2F6 均识别 FCV2280、TIG-1、HRB-SS、F9,具有良好的反应性。6 株 MAbs 经过用亚型试剂盒鉴定,重链均为 IgG1,轻链均为 Kappa 链。将杂交瘤细胞接种至小鼠腹腔制备腹水,结果表明 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 单抗株腹水的效价约为 1:6553600; VP-E MAbs E2F1 和 E2F6 单抗株腹水的效价约为 1:25600 和 1:12800; 中和试验表明 6 MAbs 单抗均无中和活性。

为进一步鉴定 VP1-B 和 VP1-E MAbs 的抗原表位,分别将 VP1-B 逐步截短表达,Western blot 结果表明 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 识别的抗原表位均为  $^{126}\text{DDGSITA}^{132}$ ,同时对 VP1-E 进行截短原核表达和合成短肽进行 MAbs 抗原表位鉴定,结果表明 VP-E MAbs E2F1、E2F6 识别的抗原表位均为  $^{467}\text{YICGSLQRAWG}^{477}$ 。因此本研究制备的 VP1-B MAbs 属于同一株单抗,VP1-E MAbs 也属于同一株单抗。与 NCBI 其他毒株氨基酸序列比对分析的结果表明  $^{126}\text{DDGSITA}^{132}$  不保守,而  $^{467}\text{YICGSLQRAWG}^{477}$  相对保守。根据序列比对合成  $^{126}\text{DDGSITA}^{132}$  和  $^{467}\text{YICGSLQRAWG}^{477}$  突变氨基酸的表位密码子进行原核表达,鉴定表位突变的氨基酸位点是否与制备的单抗反应,结果表明表位  $^{126}\text{DDGSITA}^{132}$  中的 I130V 和 A132T 突变后不与制备的单抗反应,表位  $^{467}\text{YICGSLQRAWG}^{477}$  中的 S471A 突变后仍能与制备的单抗反应。

本研究制备的单抗对 FCV 的基础研究及流行病学调查具有重要的价值。

**关键词:** 猫杯状病毒, VP1 蛋白, 单克隆抗体, 抗原表位

## Abstract

Feline Caliciviral Disease (FCVD) is an oral and respiratory disease caused by Feline Calicivirus (FCV). FCV is a member of the genus *Vesivirus* of the family *Caliciviridae*. The infection of FCV cause seriously oral ulcers, sneezing, conjunctivitis and chronic gastroenteritis, Although there is only one serotype, sequence analysis of different FCV isolates suggest its mutation with high frequency. Infection can cause severely secondary infection. Therefore, the study on diagnosis and control of the FCV is very necessary.

The main structural protein VP1 is the capsid protein and main protective antigen of FCV. VP1 is divided into six regions from A to F based on sequence conservation. The B region which is located in the 125-397aa of VP1 is highly homologous among various FCV strains. What's more, non neutralizing monoclonal antibodies (MAbs) can be induced by B region. The E region is located between 427-524aa, which is further divided into hypervariable regions and conserved regions. Previous reporters have shown that neutralizing monoclonal antibodies can be induced by the E region. In this study, the truncated VP1, namely VP1-B and VP1-E, was expressed and purified. Next, the purified VP1-B and VP1-E protein were respectively mixed with Freund's adjuvant to immunize BALB/c mice. Then, the spleen of immune mice and SP2/0 cells were fused by cell fusion technology. The purified FCV2280 virus particles were used to screen mAb-secreting hybridoma lines by ELISA method. After three rounds of screening and subcloning, 4 hybridoma cells secreting antibodies against VP1-B were screened out and designated as 4G2, B1E5, B4G4 and B4G5. 2 strains of hybridoma clones against VP1-E protein were screened out and designated E2F1 and E2F6. To further analysis the characterization of these MAbs, positive clones were further confirmed by western blotting and IFA. All MAbs were reactive with four FCV strains including FCV2280, F9, TIG-1 and HRB-SS. What's more, the subtype, neutralizing activity of monoclonal antibody and the titer of the ascites were analyzed. The result suggest that all these MAbs were IgG1 subtype with  $\kappa$  chain, but had no neutralizing activity. Titers of VP1-B and VP1-E MAbs in the ascites were 1:6553600, 1:12800 and 1:25600 respectively.

To map the epitope of monoclonal antibodies (MAbs) to VP1-B and VP1-E protein, a panel of overlapping peptides representing VP1-B and VP1-E protein was expressed in prokaryotic expression system. A panel of peptides of VP1-E was synthesized. The results suggest that a B-cell linear epitope DDGSITA at amino acids 126–132 of B region was identified by western blotting. The minimal of the B-cell linear epitope recognized was DDGSITA. All VP1-B MAbs can recognize DDGSITA. A B-cell linear epitope YICGSLQRAWG at amino acids 467–477 of E region was identified. All VP1-E MAbs can recognize YICGSLQRAWG. Furthermore, alignment of the sequence suggested that the epitope recognized by VP1-B MAbs is not conserved among FCV strains. The epitope recognized by VP1-E MAbs is relatively conserved among FCV strains. The change of the epitope was induced by the substitutions and insertion of amino acids. To define the amino acids required for antibody binding, a series of mutational shorter peptides was expressed and evaluated for 4G2 and E2F1. The other mutational shorter peptides were identified except for I130V and A132T. The study suggested that <sup>130</sup>I

and <sup>132</sup>A of the epitope play a pivotal role in the antigenicity of VP1.

The monoclonal antibody prepared in this study has important value for basic and epidemiological investigation of FCV.

**Key words:** Feline Calicivirus, VP1 protein, Monoclonal antibody, Antigenic epitopes

# 目 录

第一章 引 言 .....	1
1.1 猫杯状病毒病概述 .....	1
1.1.1 流行病学 .....	1
1.1.2 临床症状 .....	1
1.1.3 病理解剖变化 .....	2
1.1.4 病原学特征 .....	2
1.1.5 FCV VP1 的研究进展 .....	2
1.1.6 FCV 诊断及防控 .....	3
1.2 FCV VP1 表位的研究进展 .....	5
1.3 研究目的和意义 .....	5
第二章 猫杯病毒 FCV2280 株及 VP1-B、VP1-E 蛋白的纯化和抗原性分析 .....	6
2.1 材料 .....	6
2.1.1 载体、毒株和感受态细胞 .....	6
2.1.2 主要试剂 .....	6
2.1.3 主要仪器 .....	6
2.1.4 主要溶液和培养液的配制 .....	6
2.2 方法 .....	7
2.2.1 FCV2280 的培养及纯化 .....	7
2.2.2 纯化的 FCV2280 电镜观察及 Western blot 鉴定 .....	7
2.2.3 纯化 FCV2280 浓度测定 .....	7
2.2.4 VP1-B、VP1-E 蛋白的表达及纯化 .....	7
2.2.5 VP1-B、VP1-E 蛋白 Western blot 鉴定 .....	8
2.2.6 VP1-B、VP1-E 蛋白浓度测定 .....	8
2.3 结果 .....	8
2.3.1 纯化的 FCV2280 病毒电镜观察和抗原性分析 .....	8
2.3.2 VP1-B、VP1-E 蛋白的抗原性分析 .....	9
2.3.3 纯化的 FCV2280、VP1-B 和 VP1-E 蛋白浓度测定 .....	9

2.4 讨论 .....	10
第三章 VP1-B、VP1-E 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 .....	11
3.1 材料 .....	11
3.1.1 细胞、毒株和抗原 .....	11
3.1.2 实验动物 .....	11
3.1.3 主要试剂 .....	11
3.1.4 主要仪器 .....	11
3.1.5 主要溶液和培养液的配制 .....	11
3.2 方法 .....	12
3.2.1 动物免疫 .....	12
3.2.2 小鼠免疫血清效价的测定 .....	12
3.2.3 细胞融合 .....	12
3.2.4 阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 筛选 .....	13
3.2.5 杂交瘤细胞的亚克隆、冻存和复苏 .....	14
3.2.6 杂交瘤细胞腹水的制备 .....	14
3.2.7 VP1-B、VP1-E MAbs 的生物学特性分析 .....	14
3.3 结果 .....	15
3.3.1 VP1-B、VP1-E MAbs 的 Western blot 鉴定 .....	16
3.3.2 VP1-B、VP1-E MAbs 的 IFA 鉴定 .....	16
3.3.3 VP1-B、VP1-E MAbs 特异性分析 .....	17
3.3.4 VP1-B、VP1-E MAbs 的亚型鉴定 .....	18
3.3.5 VP1-B、VP1-E MAbs 腹水效价的测定 .....	19
3.3.6 VP1-B、VP1-E MAbs 的中和活性鉴定 .....	19
3.4 讨论 .....	19
第四章 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位的鉴定 .....	21
4.1 材料 .....	21
4.1.1 载体、感受态细胞 .....	21
4.1.2 主要试剂 .....	21

4.1.3 主要仪器 .....	21
4.1.4 主要溶液和培养基的配制 .....	21
4.2 方法 .....	21
4.2.1 VP1-B MAbs 抗原表位鉴定 .....	21
4.2.2 VP1-E MAbs 抗原表位鉴定 .....	26
4.2.3 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位的保守性分析 .....	28
4.3 结果 .....	28
4.3.1 VP1-B MAbs 抗原表位鉴定 .....	29
4.3.2 VP1-E MAbs 抗原表位鉴定 .....	31
4.3.3 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位保守性分析 .....	32
4.4 讨论 .....	34
第五章 全文结论 .....	35
参考文献 .....	36
致 谢 .....	42
作者简历 .....	43

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
FCV	Feline Calicivirus	猫杯状病毒
FHV	Feline Herpes Virus	猫疱疹病毒
FPV	Feline Panleukopaenia Virus	猫细小病毒
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
CRFK	Crandel Feline Kidney Cells	猫肾细胞
VP	viral protein	结构蛋白
OD	Optical density	光密度
Bp	Base pair	碱基对
PCR	Ppolymerase chain reaction	聚合酶链式反应
SDS	Saium daecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
PAGE	Polyacrylamine gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
Ph	Hydrogenion concentration	氢离子浓度
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
Amp	Ampicillin	氨苄霉素
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PEG	Polyethylene glycol	聚乙二醇
IFA	Indirect Immunofluorescent Assay	间接免疫荧光
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
DAB	3,3'-diaminobenzidine hydrochloride	3,3'-二氨基联苯胺
TMB	3,3',5,5'-tetramethyl benzidine	四甲基联苯胺
NC	Nitrocellulose membrane	硝酸纤维素膜

# 第一章 引言

## 1.1 猫杯状病毒病概述

猫杯状病毒病 (Feline calicivirus disease FCVD) 又称为猫传染性鼻-结膜炎, 是猫杯状病毒 (Feline calicivirus FCV) 引起的一种高度传染性的呼吸道疾病, 猫感染 FCV 后会引发口腔溃疡、发热、打喷嚏、鼻炎、结膜炎、皮肤水肿、食欲不振、黄疸等症状(Reubel et al., 1992; Hoover and Kahn, 1975)。FCV 也能引起肠道疾病(Radford et al., 2007; Coyne et al., 2006)。虽然 FCV 主要引起上呼吸道症状, 但最初是在新西兰一只猫的胃肠道内分离。FCV 呈世界性分布, 1980 年 Pcolmer 报道有 40%-50% 的呼吸道症状的患病猫是被 FCV 感染。FCV 除了感染猫外还可感染其他的猫科类动物, 1992 年 Kadoi 等从非洲狮和东北虎的体内分离获得一株 FCV。还有报道称在猎豹体内分离出 FCV。这表明 FCV 不仅感染猫同时也可以感染其他的猫科类动物如: 狮子和老虎等, 这对野生动物的健康也必定形成了威胁(Martino et al., 2009; 刘秋艳等, 2015)。此外有报道称在具有腹泻症状的狗体内也能分离到杯状病毒。但是, 猫和狗之间 FCV 传染概率比较低(Battilani et al., 2013)。FCV 也广泛感染我国的猫科类动物, 1997 年范泉水等初次从我国广西某野生动物养殖场国家一级保护动物东北虎和华南虎体内分离获得强毒株 FCV; 2002 年高玉伟等从患口腔溃疡虎和猎豹的病料中分离获得两株 FCV。近几年越来越多的 FCV 变异株在国内外被分离, FCV 逐渐发生变异, 这给 FCV 的防控带来了严重的困难。虽然 FCV 感染通常不会危及生命, 但高毒力的 FCV 爆发导致高死亡率 (40%-60%) (Coyne et al., 2006a, b; Hurley et al., 2004; Pedersen et al., 2000), 由于其传染迅速, FCV 爆发时会对野生动物和宠物行业带来重要的经济损失。

### 1.1.1 流行病学

FCV 可以感染所有的猫科类动物, 自然条件下, 幼猫最易感染, 病死率可达 30%。感染 FCV 后, 猫常无临床症状, 但它们往往是处于带毒的状态能继续排毒, 十分容易通过宠物医院的兽医或测试仪器感染其他的猫。FCV 感染猫后, 主要在上呼吸道扁桃体和淋巴组织内增殖, 并可以经过病猫的口鼻、唾液分泌物或被 FCV 污染的食物等水平传播; 也可以通过胎盘垂直传播(艾纯旭, 2013)。目前流行病学研究已经证实 FCV 引起上呼吸道疾病时常常有不同的菌株混合感染如: 猫疱疹病毒(FHV)、猫细小病毒(FPV)、支气管败血波氏杆菌、支原体等, 但不是所有的菌株都可以引起呼吸道疾病。

### 1.1.2 临床症状

猫是 FCV 的易感动物, 一岁以下的猫最易感。本病毒潜伏期短, 一般为 2-3d, 感染后发烧 (39.5-41 °C)。许多猫感染 FCV 后, 并没有明显的临床症状, 这些猫会被 FCV 持续感染或者继发感染其他不容易被检测的疾病。FCV 感染的主要临床症状包括打喷嚏、结膜炎、发热和口腔溃疡,

大部分患者可自愈，发病率高，死亡率低(Addie et al., 2004; Coyne et al., 2006; Coutts et al., 1994; Coyne et al., 2006)。FCV也可能造成跛行主要见于6-12周龄的猫，常发生在免疫疫苗后的猫。Terwee等将FCV通过多种途径接种SPF猫，接种后的猫患有严重的出血和中性粒细胞滑膜炎，表现出跛行的临床症状(Terwee et al., 1997; Dawson et al., 1994)。在过去的几年，有报道表明FCV毒株可以引起系统性疾病，这种毒株可以造成很高的死亡率，这种症状在1998被公开承认，随后在这些症状的病料中分离出FCV，起初这种FCV引起的症状称为“出血性发热”，随后被称为病毒系统性疾病(virulent-systemic disease, VSD)，分离的FCV称为VS-FCV(Pesavento et al., 2004; Coyne et al., 2006)。目前，VS-FCV可导致较高的发病率和死亡率。免疫后的成年猫感染VS-FCV也不能幸存。不过目前疫苗对VSD并无保护性(Schulz et al., 2011)。有报道称FCV感染怀孕的猫后会引流产及一些神经性症状(Vuuren et al., 1999; Sato et al., 2004; Schorr-Evans et al., 2003)，但从此症状分离的FCV感染猫时并不能引起流产和神经症状，常常会出现口腔溃疡等症状，造成猫的流产和神经症状可能和其他的因素相关(Glenn et al., 1999; Gandon et al., 2001; Geissler et al., 1997)。

### 1.1.3 病理解剖变化

感染的病猫从外观上可见眼部和鼻部有大量的粘液。猫的舌头、口腔、腭部和胃部呈现水泡，然后造成溃疡，溃疡多发生在舌边缘和牙龈部，随着溃疡灶的形成，许多嗜中性粒白细胞会聚集在溃疡灶周围。支气管内含有大量的渗出液、单核细胞和脱落的上皮细胞。肺水肿、间质性肺炎和肺泡巨噬细胞积聚。肠壁和肠道粘膜充血和出血，回肠处有大量的纤维素性渗出物，肠上皮细胞发生变性、坏死，脾脏、肾脏和肝脏等组织都有不同程度的出血及坏死，并且在发生病变的组织中可检测到FCV(Addie et al., 2004)。

### 1.1.4 病原学特征

FCV病毒粒子呈二十面体对称，无囊膜，衣壳由32个空心颗粒组成，在氯化铯中的浮密度为1.37-1.42g/cm<sup>3</sup>。病毒的基因组为线性单股正链RNA，不分节段，基因组全长含7690个核苷酸，分为3个阅读框ORFs。ORF1全长5.3Kb，位于基因组5'末端，编码1800aa的非结构多聚蛋白，随后经水解酶水解为6种成熟非结构蛋白，分别为5.6kDa p5.6、32kDa p32、39kDa p39(NTPase)、30kDa p30、13kDa p13(VPg)以及76kDa p76(Pro-Pol)(谢守玉等, 2010)。2.4Kb的亚基因组分别为ORF2和ORF3，ORF2全长约为2Kb，编码大小为75kDa的衣壳蛋白VP1。ORF3位于基因的3'末端，编码长度为106aa的VP2。5'末端连接一个小的VPg(分子量为10-15Da)，VPg与病毒的感染关系很大，3'末端为polyA结构。猫杯状病毒只有一种血清型。由于RNA病毒易发生变异，即使同一猫群分离的两株FCV的基因也可能不相同，但抗原性广泛存在交叉。FCV不凝集动物的红细胞，可以在猫肾和胸腺的细胞系上生长，48h后细胞出现病变，细胞浆中呈分散及晶格状排列，不形成包涵体。此外FCV也可以在海豚、犬和猴的细胞系上生长。本病毒在干燥的环境中比较稳定可以存活数周，对热敏感，50℃ 30min即可灭活，2%NaOH可以有效的将其灭活。此外，FCV对乙醚、氯仿等温和的有机溶剂不敏感，这可能是FCV持续感染猫群的重要原因。

### 1.1.5 FCV VP1 的研究进展

VP1 是 FCV 的主要衣壳蛋白,由 ORF2 编码,最初合成为 75kDa 前体,经蛋白酶切割成 62kDa 的成熟的衣壳蛋白。FCV 衣壳蛋白在病毒生命周期中执行各种功能,因为含有抗原决定簇可以被宿主免疫系统辨别。衣壳蛋白的功能主要包括 FCV 基因组的包装、对易感宿主细胞的粘附、与特定宿主细胞受体的相互作用。此外,衣壳蛋白在 FCV 传播过程中保护其基因组免受环境的破坏。实验表明 FCV 的 VP1 蛋白构成的衣壳,在外界环境条件下是相对稳定的,尤其是 pH 值为 4-8.5 时,可以在体外存活两周。

由于为 RNA 病毒,FCV 极易发生变异,有报道表明 ORF2 基因的同源性为 80%,VP1 氨基酸的同源性为 88%,虽然 FCV 毒株表现出明显的抗原性变异,但它们广泛存在交叉反应 (Pesavento et al., 2008; Kreutz et al., 1998; Povey, 1974)。FCV 的衣壳蛋白是有 180 个 VP1 蛋白构成,有研究表明 FCV 的中和性表位主要集中在可变区,这可能和病毒产生逃逸有关。Carter 等对 FCV F9 株成熟的 VP1 进行了序列分析,结果表明蛋白酶对 VP1 的 N 端的 124aa 切割,使其成为成熟的 VP1。被除去的为 14kDa 的前导蛋白 (LC),在病毒的扩散中起着重要的作用。VP1 氨基酸含量在 668-671aa 之间,分为 A-F 六个区(Seal and Neill, 1995)。A、B、D、和 F 区为保守区,而 C 和 E 区展现了极高的变异性,有研究表明可变区每年的突变率在  $1.3 \times 10^{-2}$ - $2.6 \times 10^{-2}$ ,这是造成疫苗免疫失败的重要原因(Coyne et al.,2007b)。A 区位于蛋白的氨基末端,大约在 1-124aa 之间,序列高度保守,在病毒外壳蛋白的成熟过程中 A 区会被裂解掉;B 区在 125-397aa 形成病毒的核心;在 398-401aa 之间的 C 区高度变异;D 区是 402-426aa,高度保守;E 区大约在 427-524aa 之间,已被证明可以诱导猫产生中和性抗体,28 个保守碱基(conE)将 E 区分成 5'端(99bp)和 3'端(102bp)高变区(HRV)两个区域,有研究显示 FCV 不同毒株之间的交叉反应和 conE 相关 (Seal, 1994; Al-Molawi et al., 2003; Geissler et al.,2002b; Neill et al.,2000;Seal et al.,1993)。以往的流行病学研究表明,分离的 FCV 毒株 C 区和 E 区的同源性为 20%(Radford et al.,1997, 2000,2001,2003),此外 C 和 E 区是产生诱导产生中和性抗体的主要区域;F 区大约在 525-668aa 之间,在衣壳蛋白的羧基端,位于病毒的表面,已经被证明可以诱导猫产生非中和性抗体 (Milton et al.,1992)。卢正春等研究发现,衣壳蛋白 VP1 可以与宿主细胞受体相互作用,体外培养病毒时,VP1 调控病毒的生长,病毒入侵过程中 VP1 蛋白起着重要的作用。由于 VP1 极易变异造成病毒在体外的生长速度和毒力存在差异(Lu et al., 2018)。

### 1.1.6 FCV 诊断及防控

宠物行业发展迅速,越来越多的人将猫作为宠物,猫病也日益受重视。目前报道表明,FCV 可以感染所有的猫科类动物,这严重威胁猫和野生动物的健康。因此建立 FCV 有效的检测方法十分重要。目前临床引起的呼吸系统疾病,通常由许多病原混合感染如猫细小病毒 (FPV)、猫疱疹病毒 (FHV-1)、FCV、支气管败血型博代氏菌、鹦鹉热衣原体、支原体、链球菌等给其诊断带来了麻烦。目前 FCV 的检测方法主要包括病毒分离、酶联免疫吸附反应 (ELISA)、荧光定量 PCR (RQ-PCR)、夹心 ELISA 方法、间接免疫荧光技术(IFA)等。

目前 Abdeldaim 等建立了荧光定量 PCR 法检测 FCV,用此方法对 122 个样本进行检测,结果表明此方法具有较高的灵敏度和特异性,而且该方法用时较短,极大的提高了检测效率 (Abdeldaim et al., 2009)。Helps 等经过荧光染料建立了荧光定量 PCR 方法,用此方法对 FCV 检测

具有很高的特异性和灵敏性 (Helps et al., 2002)。最近的报道表明通过荧光定量 PCR 对 FCV 的流行性进行检测, FCV 的感染率为 2%-40%, 在不同的猫群中 FCV 患病率是 6%-75%, 其患病率波动性很大。在国内, 姜雪等建立了 FCV 的荧光定量 PCR 方法, 对 24 份疑似感染 FCV 猫的病料进行了检测, 检测结果具有很高的特异性和灵敏性(姜雪, 2013)。王翀等人建立了多重 PCR 方法, 可以同时检测 FPV、FCV、FHV-1 型, 用该方法对 120 份样品进行检测, FPV、FCV 和 FHV-1 的阳性率分别为 5%(6/120)、2.5%(3/120)和 4.1%(5/120), 该方法极大提高了检测效率(王翀等, 2014)。刘秋艳等人用 VP1 蛋白建立的 ELISA 检测方法, 对吉林省、上海和广西三个省份的猫血清进行检测, 结果表明血清的总阳性率 85.92% (244/288), 此方法纯化 VP1 蛋白是通过变性复性获得, 建立的 ELISA 方法具有一定的局限性(刘秋艳, 2015)。艾纯旭等人通过制备单克隆抗体建立的双夹心 ELISA 方法, 酶联免疫吸附反应和单克隆抗体技术结合, 在检测具有高度的特异性及敏感性并且可降低生产成本(艾纯旭, 2013), 但由于其筛选的单克隆抗体并未进行广谱性试验, 因此有些变异的 FCV 可能不能被检测到。蒋艳妹等将 VP1 截短表达, 建立的间接 ELISA 方法, 对 FHV 阳性血清、FPV 阳性血清、FHV-I 阳性血清、FHV-II 型阳性血清进行检测均无交叉反应, 特异性良好(蒋艳妹, 2016), 但本试验是检测猫体内的 FCV 抗体, 而免疫疫苗后的猫也可以产生抗体, 并不能有效的说明其是否感染 FCV, 目前在国内外仍缺乏快速高效的 FCV 检测方法。

目前针对 FCV 相关的疾病还没有特异性药物, 疫苗接种是防治本病的有效方法。疫苗已使用几十年, 当前广泛使用的活疫苗株为 FCV-F9、灭活苗株主要有 FCV-225、FCV-431、FCV-49、FCV-G1(Earl et al., 2013; Hou et al., 2016; Masubuchi et al., 2010; Wardley et al., 1974)。尽管疫苗广泛被使用, 但 FCV 仍在猫群中高度传染, 其原因是在不同的地区疫苗的免疫保护能力不同, 而接种的弱毒疫苗会产生变异, 从而在猫体内持续感染(Schneider and Truyen, 1998; Johnson, 1992)。目前市场上缺乏抵抗所有 FCV 的疫苗, 同时市场上的疫苗存在安全隐患, 除了在注射部位出现炎症反应和疫苗相关的肉瘤等症状外, 活疫苗用滴鼻的方式免疫猫后, 由于病毒在接种部位复制, 因此会产生一些相关的临床症状如: 打喷嚏(Radford et al., 2009)。但当 FCV 爆发时滴鼻免疫的活疫苗可以很快控制此病, 与其他的疫苗相比, 鼻内疫苗通常初次接种后即可诱导免疫(Huang and Hess, 2014; Audonnet et al., 2005)。目前市场上使用的疫苗大部分为单价苗, 最近有些国家制备了二价苗(Poulet and David, 2010)、FCV 弱毒苗、FCV 重组疫苗和 DNA 疫苗可以诱导粘膜免疫(Sommerville et al., 2002; Dawson et al., 1993; McCabe and Spibey, 2005; McCabe et al., 2002)。理想的抗 FCV 疫苗针对不同的 FCV 毒株应具有广泛交叉免疫保护, 减少抗原变异株的出现, 降低失败时病毒复制时间(Radford et al., 1997; Pedersen et al., 2000; Poulet et al., 2005; Vuuren et al., 1999)。目前有研究学者已经寻找到对多种毒株起保护作用的免疫原, 它已被证明能产生高水平的中和抗体(Masubuchi et al., 2010)。当前的疫苗一般免疫 8-9 周龄的猫, 但并不是所有免疫的猫都可以得到很好的免疫保护, 一些免疫后的猫感染 FCV 后可能仍出现一些临床症状(Povey and Ingersoll, 1975; Radford et al., 1997b; Radford et al., 2000; Radford et al., 2001)。有报道表明疫苗免疫后, 在四年之内均可以检测到中和性抗体, 7.5 年后, 滴度降至最低, 其保护率免疫后三周降至 85%, 7.5 年后保护率降至 65%(Berger et al., 2015; Radford et al., 2007)。目前 FCV 疫苗面临的最重要的问题是缺乏可以中和所有的 FCV 毒株的疫苗, 针对此问题一些二价疫苗和无佐剂疫苗已投入使用, 这有效的减慢此病的蔓延(Lappin et al., 2006; Dawson et al., 2001; Johnson et al., 1983; Kreutz et al., 1998; Orr et al., 1978)。

当 FCV 感染时,广谱性的抗生素被广泛使用,可以有效的减少 FCV 的继发性感染(Taira et al., 2005; Horzinek et al., 2013; Pedersen et al., 2000b)。同时良好的护理和定期清理其排泄物在治疗过程中也是必不可少的。若引起严重的感染时,需要输液治疗以减轻此病(Umehashi et al., 2003; Umehashi et al., 2002)。

## 1.2 FCV VP1 表位的研究进展

单克隆抗体是检测大分子物质的常用工具(Nelson et al., 2000)。Tohya Y 等证实 FCV F4 株存在 7 个中和表位,其中 4 个是在存在 VP1 中(Tohya et al., 1991b, 1991a)。Milton 等证实 VP1 在 422-458aa 存在中和性表位(Milton et al., 1992)。Shin 等证实 FCV 的构象表位有 3 个,线性表位有 4 个,其分别位于 VP1 蛋白的 381-454 的 74aa 之间(Shin et al., 1993)。Tohya 等证实,在 426-466aa 和 490-520aa 分别存在 4 个线性表位和 2 个构象表位(Tohya et al., 1997)。Radford AD 通过表达 VP1 的随机文库证实 B 细胞线性表位在 415-421aa、445-451aa、451-457aa 和 475-479aa,其中 475-479aa 的表位可与 FCV 感染猫的阳性血清产生反应(Radford et al., 1999)。VP1 的 B、D、F 区是保守区,这三个区可能会诱导宿主产生广谱性的单克隆抗体,但目前这三个区的抗原表位并未有人报道。

## 1.3 研究目的和意义

FCV 是引起猫疾病的三大病原之一,感染宿主后会引发口腔溃疡,上呼吸道疾病、慢性胃肠炎和急性关节炎等症状,严重危害猫的健康。作为 RNA 病毒,FCV 高度变异,传染迅速,高毒力 FCV 毒株的爆发会导致高死亡率。近年来出现的一种能导致急性、致死性全身性疾病(Virulent systemic disease, VSD)的变异株,不仅给野生动物和宠物行业带来极大的危害,也为 FCV 的防控增加困难。

VP1 作为 FCV 的主要衣壳蛋白,具有良好的免疫原性,且能诱导机体产生中和抗体,是 FCV 诊断试剂的首选抗原以及新型疫苗研发主要研究对象。本研究以筛选新的 VP1 蛋白单克隆抗体作为工具,采用截短表达、多肽图谱和氨基酸突变等手段从多肽和蛋白水平上对抗所识别的表位进行鉴定,补充和完善了 FCV VP1 蛋白的表位图谱,同时为深入了解 VP1 蛋白的结构、开发新型的标记疫苗和诊断方法奠定理论基础,也为进一步研究 FCV 分子生物学特性、免疫机制、致病机理等方面提供科学依据。

## 第二章 猫杯病毒 FCV2280 株及 VP1-B、VP1-E 蛋白的纯化和抗原性分析

### 2.1 材料

#### 2.1.1 载体、毒株和感受态细胞

含有 FCV2280 *vp1* 截短的基因的 *vp1-B* 和 *vp1-E* 重组质粒 pET-B、pET-E、CRFK 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所自然疫源性人兽共患病创新团队保存；BL21(DE3)感受态购自 TakaRa 公司；FCV2280 株（ATCC 编号 VR-2057）购自于 ATCC。

#### 2.1.2 主要试剂

预染蛋白 Marker 和硝酸纤维素膜(NC 膜)购自 Thermo Fisher 公司；异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自索莱宝公司；质粒小量提取试剂盒购自 Axygen 公司；二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司；胎牛血清(FBS)均购自 Excell 公司；DMEM 基础培养液和青链霉素混合液(双抗, 100×)购自 Hyclone 公司；猫杯状病毒阳性血清为本实验室制备及保存；Ni-NTA His 结合树脂购自 Novagen 公司；5×SDS-PAGE Sample Buffer 和 BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Fisher 公司；5×SDS-PAGE 电泳缓冲液购自于哈尔滨兽医研究所动物生物制品工程中心；考马斯亮兰蛋白快速染色液购自索莱宝有限公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗猫 IgG(H+L)购自 Jackson ImmunoResearch 公司；100kDa 超滤浓缩管购自 Millipore 公司，其他试剂均为国产试剂。

#### 2.1.3 主要仪器

电子天平(Mettler AE240)、DYY-6C 型稳压电泳仪(北京六一仪器厂)、台式高速离心机(上海力申科学仪器有限公司产品)、精密 PH 计(上海雷磁仪器厂)、电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、全温立式震荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、数字翻转摇匀仪(北京奥诺斯公司)、生物安全柜(哈尔滨东联仪器制造有限公司)、可编程半导体制冷温控金属浴(北京鼎昊源科技有限公司)、蛋白电泳系统(美国 Bio-rad 公司)、快速转膜仪(美国 Thermo 公司)、JY92-超声波破碎仪(上海新芝生物技术研究)、HF-212UV 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(Heal Force)、脱色摇床(常州华冠仪器制造有限公司)、Model 550 型酶标仪(美国 Bio-rad 公司)、立式超低温保存箱(Thermo Fisher)、红外影像扫描仪(Odyssey)

#### 2.1.4 主要溶液和培养基的配制

- (1) 常规配制 LB 液体培养基、LB 固体培养基、膜转移缓冲液和 IPTG 溶液、TBST 溶液。
- (2) CRFK 细胞完全培养液：1% 双抗(100×)+10%FBS+89%DMEM 基础培养液。
- (3) DAB 储存液的配制：称取 DAB 粉末 0.4g，溶于 10mL100mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl 溶液冲。充分溶解后 0.22μm 滤器过滤，200μL 分装，-20℃ 避光保存。
- (4) DAB 显色液的配制：10mL 100mmol/LpH7.5 的 Tris-HCl 溶液加入 200mL DAB、10μL30%

的  $H_2O_2$  混匀用于 Western blot 显色。

## 2.2 方法

### 2.2.1 FCV2280 的培养及纯化

首先培养 CRFK 细胞，待细胞铺满 90% 时；将培养基弃去，用 PBS 洗两次；加入无血清的培养基；按培养基 1:100 接毒；将细胞放置细胞培养箱培养，待细胞完全病变时收毒。病毒溶液放置在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ，然后冻融三次，8000r/min、6min 离心，取上清；将上清与等量的氯仿混合，并剧烈震荡，使病毒与氯仿充分混合， $4\text{ }^\circ\text{C}$  静置使其充分分层后取最上层溶液，此步骤重复 4-5 次；最后 12000r/min、20min 离心，离心后取最上层溶液；溶液用超滤浓缩管浓缩，然后用  $0.22\mu\text{m}$  的滤菌器过滤，分装并放置  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

### 2.2.2 纯化的 FCV2280 电镜观察及 Western blot 鉴定

将纯化的 FCV2280 送电镜观察，然后 FCV2280 经 SDS-PAGE 电泳后，将滤纸、NC 膜和具有相同的大小的胶放置在转膜缓冲液中，使滤纸浸润并按照从下到上的顺序依次排列，同时去除气泡。设置条件为 20V、20min 进行转膜；配制封闭液，量取 50mL TBST 缓冲液和 2.5g 脱脂乳加到小盒内，使其混合均匀。转膜结束后，将膜放入封闭液中进行封闭， $37\text{ }^\circ\text{C}$  封闭 2h；用 TBST 缓冲液按 1:200 稀释 FCV 猫阳性血清，室温孵育 1h；1h 后弃去一抗，用 TBST 洗涤 3 次；用 TBST 缓冲液按 1:8000 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗猫 IgG，室温作用 1h，同样用 TBST 洗涤 3 次；将膜置于 10mL DAB 显色液中进行显色，目的条带出现后，用蒸馏水终止反应，同时拍照留图。

### 2.2.3 纯化 FCV2280 浓度测定

使用 Thermo Fisher 公司的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定纯化 FCV2280 的浓度，BCA 工作液的浓度是现用现配，将 A 液和 B 液按 50:1 的体积比充分混合。其次 BSA 标准品的配制，将  $2000\mu\text{g/mL}$  的 BSA 标准品和等体积的 PBS 充分混匀，依次进行倍比稀释，标准蛋白的浓度最后稀释到  $15.625\mu\text{g/mL}$ 。最后进行样品浓度测定，将样品进行稀释分别吸取  $25\mu\text{L}$ ，加入 96 孔酶标板中，每组做三个重复，同时，在 96 孔酶标板中加入不同浓度的标准品，空白对照组加入  $25\mu\text{L}$  PBS，每组做三个重复。将  $200\mu\text{L}$  BCA 工作液添加到样品和标准品孔内，并放置在  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ，30min。最后在波长  $562\text{nm}$  处测定其吸光值，并绘制其标准曲线；参照标准曲线和蛋白稀释倍数计算纯化 FCV2280 的浓度。

### 2.2.4 VP1-B、VP1-E 蛋白的表达及纯化

转化程序：最初将 BL21(DE3)感受态细胞放于冰中，并在超净台内将 pET-B 和 pET-E 重组质粒  $0.5\mu\text{L}$  加入，冰浴 30min；将混合物置  $42\text{ }^\circ\text{C}$  热激 90s，而后放入冰中 2min；在超净台内向混合物中加入  $800\mu\text{L}$  无抗性的液体 LB，置  $37\text{ }^\circ\text{C}$  摇床中，180r/min、1h；1h 后，吸取  $200\mu\text{L}$  均匀涂布在 *Amp*<sup>+</sup> 的 LB 平板上，当液体被均匀吸收时，在恒温培养箱中倒置培养 12h，长出菌落后，单菌

落随机接种在 800 $\mu$ L 液体 LB (*Amp*<sup>+</sup>,100ng/ $\mu$ L) 中,并在 37 $^{\circ}$ C 摇床,180r/min 孵育过夜。将菌液依照 1:100 接种到 200mL LB(*Amp*<sup>+</sup>,100ng/ $\mu$ L)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,180r/min 孵育,当 OD<sub>600nm</sub> 约为 0.8-1.0 时,加入终浓度为 0.01mmol/L 的 IPTG,转到 22 $^{\circ}$ C 振荡培养 12h,12,000 $\times$ g 离心 1min,弃上清。沉淀用 Bing buffer 按菌液 1:10 重悬,重复三次,然后进行纯化。

在超声破碎仪的作用下进行破碎,每次运行 2s,暂停 5s,15min,共 3 次。整个过程均在冰浴中操作,12,000 $\times$ g 离心 30min,上清转移到另一个离心管中,-20 $^{\circ}$ C 保存。将 2mL Ni-NTA 树脂混合均匀加至纯化柱中,静置 5min,弃去在重力作用下析出的上清,将 6mL 的无菌蒸馏水加至柱子内,使树脂和蒸馏水充分混匀,静置 5min,弃去在重力作用下析出的上清,将 6mL 的 Native Binding Buffer 和树脂充分混匀,静置 5min,弃去在重力作用下析出的上清此步骤重复两次。最后进行蛋白纯化,将超声破碎的菌液上清加入纯化柱中使其在 4 $^{\circ}$ C 摇床上和树脂作用 8h,静置 5min,弃去在重力作用下析出的上清,加 8mL Native Wash Buffer 来洗树脂,4 $^{\circ}$ C 摇床上使其和树脂混匀 2min,静置 5min,弃去重力作用下析出上清,此步骤重复三次。加 8mL Native Elusion Buffer 来洗树脂,4 $^{\circ}$ C 摇床上使其和树脂混匀 2min,静置 5min,在重力作用下析出上清,并收集,上清即为纯化的蛋白,部分上清保存放在 4 $^{\circ}$ C 作 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,最后用红外影像扫描仪进行扫描,其余的放在-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 2.2.5 VP1-B、VP1-E蛋白Western blot鉴定

参照2.2.2进行Western blot鉴定。

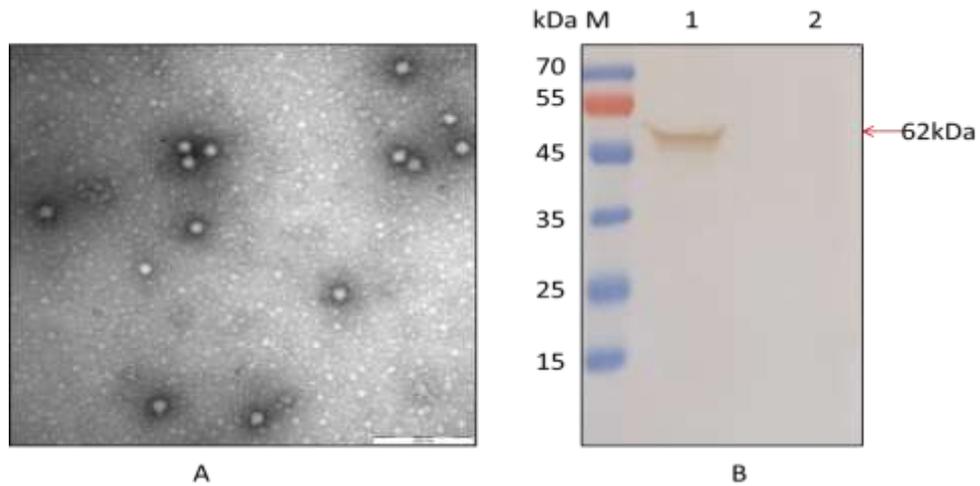
### 2.2.6 VP1-B、VP1-E蛋白浓度测定

参照 2.2.3 进行蛋白浓度测定。

## 2.3 结果

### 2.3.1 纯化的 FCV2280 病毒电镜观察和抗原性分析

电镜观察结果表明纯化的 FCV2280 较纯 (2.1A); 纯化 FCV-2280 经 Western blot 分析得到了单一的目的条带,大小越为为 62kDa,且具有良好的反应原性 (图 2.1B)。



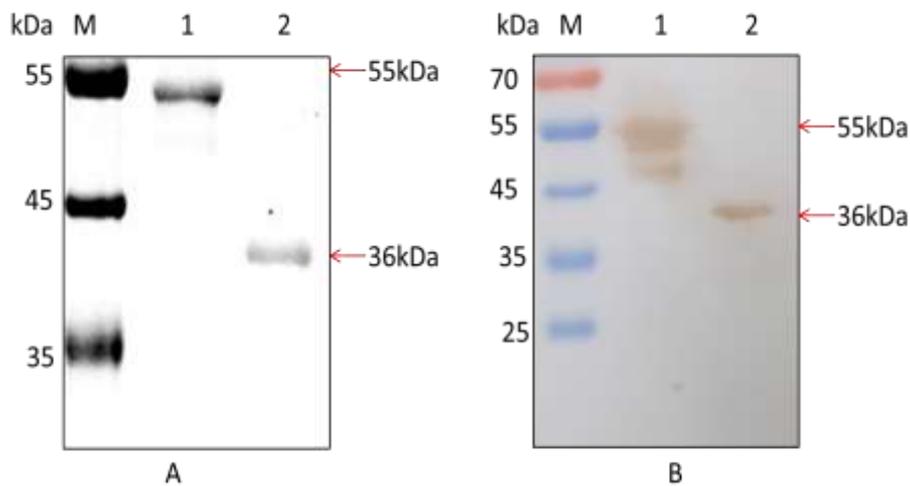
A: 纯化的 FCV2280 电镜分析; B: 纯化的 FCV2280 分析 Western blot 1: 纯化的 FCV2280; 2: CRFK 细胞

图 2.1 纯化的 FCV 电镜分析和 Western blot 分析

Fig 2.1 Purified FCV2280 was identified by Electron microscope and Western blot

### 2.3.2 VP1-B、VP1-E 蛋白的抗原性分析

纯化 VP1-B、VP1-E 蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测，得到了单一的目的条带（图 2.2A）。用猫 FCV 高免血清为一抗，经 Western blot 分析 VP1-B、VP1-E 蛋白得到正确表达，大小约为 55kDa 和 36kDa，且具有良好的反应原性（图 2.2B）。



A: 纯化的 VP1-B、VP1-E 蛋白经 SDS-PAGE 鉴定; B: 纯化的 VP1-B、VP1-E 蛋白经 Western blot 鉴定

M: Protein Marker ; 1: 纯化的 VP1-B 蛋白; 2: 纯化的 VP1-E 蛋白

图 2.2. 纯化的 VP1-B、VP1-E 蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

Fig2.2 Purified VP1-B and VP1-E protein were identified by SDS-PAGE and Western blot

### 2.3.3 纯化的 FCV2280、VP1-B 和 VP1-E 蛋白浓度测定

FCV2280、VP1-B 和 VP1-E 蛋白经纯化后，通过 BCA 法测定其浓度，结果表明其浓度分别为 3.63mg/mL、1.5mg/mL 和 2.3mg/mL。

## 2.4 讨论

VP1 是 FCV 主要衣壳蛋白，在病毒感染的免疫反应中起重要作用。通过原核表达系统可以快速高效的获得大量的目的蛋白。刘秋艳等从一株豹源的 FCV 中成功克隆出 *vp1* 基因，将其克隆至 pET-28a 中，IPTG 诱导后 VP1 重组蛋白以包涵体的形式表达，通过 FCV 阳性血清 Western blot 分析表达的 VP1 蛋白具有很好的反应原性，并以表达的 VP1 蛋白作为包被抗原建立了 ELISA 检测方法(刘秋艳, 2015)。尽管包涵体的表达量很高但包涵体的复性水平往往很低，而且需要经过变性复性等繁琐的步骤。蒋艳妹等将 FCV2280 株 *vp1* 截短蛋白基因克隆至 pET-32a 中，VP1 截短重组蛋白以可溶性的形式得到大量的表达，通过 FCV 猫阳性血清 Western blot 分析表达的 VP1 截短蛋白 VP1-F 具有良好的反应原性，同时以纯化的 VP1-F 蛋白为诊断抗原建立了检测 FCV 抗体的间接 ELISA 方法(蒋艳妹, 2016)。以上研究表明以原核系统表达的 VP1 重组蛋白以包涵体的形式表达，但仍具有一定的反应原性。通过截短表达可以获得可溶性表达的重组蛋白，并且具有良好的反应原性。本实验选用原核表达系统成功表达了 VP1 截短蛋白 VP1-B 和 VP1-E。通过用猫 FCV 高免血清 Western blot 分析重组蛋白 VP1-B 和 VP1-E，从结果可以看出重组蛋白得到了准确表达并具有良好的反应原性。为了避免单克隆抗体筛选时出现非特异反应，本实验又对 FCV2280 进行了纯化，FCV 无囊膜且对氯仿不敏感，纯化后通过电镜分析，结果表明纯化的病毒较纯。Western blot 分析表明纯化的 FCV2280 拥有良好的反应原性，这为单克隆抗体的制备奠定了基础。

## 第三章 VP1-B、VP1-E 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

### 3.1 材料

#### 3.1.1 细胞、毒株和抗原

SP2/0 骨髓瘤细胞、CRFK 细胞、FCV2280、F9 毒株购自于 ATCC、HRB-SS、TIG-1、猫冠状病毒 (FcoV)、猫疱疹病毒 (FHV)、猫细小病毒 (FPV) 毒株由本实验室保存、纯化的 FCV2280、VP1-B、VP1-E 蛋白均由本实验室保存。

#### 3.1.2 实验动物

7-9 周龄 BALB/c 雌鼠购自北京维通利华公司。

#### 3.1.3 主要试剂

RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司；FBS 购自 Excell 公司、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、50×HAT、50×HT、融合剂 PEGSOLUTION 50%、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(IgG-HRP)、红外荧光标记的山羊抗鼠 IgG、DMSO、羊抗小鼠 IgG-FITC 均购自 Sigma 公司；羊抗猫 IgG-FITC 购自、抗体亚类鉴定试剂盒购于 SouthernBiotech 公司；TMB 显色液购自 abcam 公司；Clone easy 培养基购自博奥龙公司；FcoV 猫阳性血清、FHV 猫阳性血清、FPV 猫阳性血清、FCV 猫阳性血清由本实验室制备保存。

#### 3.1.4 主要仪器

Nanovue 型超微量分光光度计(GE)、ELx808 型酶标仪(Bio Tek)、荧光倒置显微镜(AMG)，其它同 2.1.2。

#### 3.1.5 主要溶液和培养基的配制

- (1) 用于杂交瘤细胞培养的完全培养液：20%FBS+1%双抗(100×)+78%的 RPMI1640 培养基。
- (2) RPMI1640 基础培养基：1%双抗(100×)+ 99%的 RPMI1640 培养基。
- (3) HAT 培养液：2%50×HAT+80%杂交瘤细胞完全培养液。
- (4) HT 培养液：2%50×HA+80%杂交瘤细胞完全培养液。
- (5) 细胞冻存液：10%DMSO+90%FBS。
- (6) Clone easy 培养液：10%Clone easy 培养基+90%HT 培养液。

## 3.2 方法

### 3.2.1 动物免疫

将 15 只 7-9 周龄的 BALB/c 小鼠分 3 笼饲养；将纯化的 VP1-B、VP1-E 重组蛋白分别免疫 BALB/c 雌性小鼠，另外 5 只小鼠在相同条件下饲养用来做饲养层细胞和做阴性对照。具体步骤如下：

- (1) 首免，将纯化的 VP1-B 和 VP1-E 重组蛋白稀释至 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，取 1.5mL 和等体积的弗氏完全佐剂均匀混合，每只经皮下多点注射免疫 0.5mL。
- (2) 两周后，纯化的 VP1-B 和 VP1-E 重组蛋白稀释至 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，取 1.5mL 和等体积的弗氏不完全佐剂混合，采用相同的方法进行第 2 次免疫，第三次免疫以相同的方式在两周后进行。
- (3) 第 3 次免疫后一周对免疫鼠进行眼眶采血，37 $^{\circ}\text{C}$  放置 2h，4 $^{\circ}\text{C}$  静置过夜，4 $^{\circ}\text{C}$  离心 20min 分离血清，采用间接 ELISA 方法测定血清效价。
- (4) 选择血清效价最高的小鼠于融合前 3 天分别腹腔注射 100 $\mu\text{g}$  不加佐剂的 VP1-B 和 VP1-E 蛋白，进行加强免疫。

### 3.2.2 小鼠免疫血清效价的测定

纯化的 FCV2280 用 CBS 包被液稀释成 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，混合均匀后，分别按每孔 100 $\mu\text{L}$  加入 96 孔酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$  过夜包被；倒掉包被液，用 PBST 洗 3 次板，每次 3min；5% 的脱脂乳用 PBST 配制，250 $\mu\text{L}/\text{孔}$  加至酶标板中，置 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱 2h；用 PBST 洗涤 3 次板；用 PBS 稀释血清，加入 96 孔酶标板中，第一个孔按 1:200 稀释血清，然后按倍比稀释，稀释梯度分别为 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600，每份血清作 3 个重复，同时设立空白对照和阴性对照，放置 37 $^{\circ}\text{C}$  作用 1h。用 PBST 洗 3 次板，将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 按 1:8000 稀释，每孔 100 $\mu\text{L}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱作用 1h。用 PBST 洗 3 次板；加入 TMB 显色液，在避光的环境，首先添加 A 液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，然后加入 B 液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，室温反应 5min，最后加入 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应，50mL/孔，用酶标仪检测 OD<sub>450nm</sub> 的吸光度。

用 P/N 值判断其阳性值： $(\text{样品孔 OD}_{450\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450\text{nm}} \text{值}) / (\text{阴性对照孔 OD}_{450\text{nm}} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450\text{nm}} \text{值}) > 2.1$ 。当效价达到 16000 以上时即可进行融合。

### 3.2.3 细胞融合

#### 3.2.3.1 SP2/0 细胞的复苏与培养

从液氮槽中取出低温保存的 SP2/0 细胞冻存管，放入 37 $^{\circ}\text{C}$  使其完全融化；融化后，SP2/0 细胞被转移到含有 5mL RMPI1640 基础培养基离心管中，1000r/min，5min 离心。上清弃去，用 5mL 杂交瘤完全培养液将细胞沉淀吹散后加至细胞培养瓶中，置细胞培养箱中培养；当细胞完全贴壁

后，更换新鲜的培养基继续培养。

### 3.2.3.2 饲养层细胞的制备

细胞融合时，以一只未免疫健康状况良好的BALB/c小鼠制备饲养层细胞，首先眼眶放血，采集小鼠血清作为阴性血清，然后脱颈处死，用75%的酒精溶液中浸泡10min消毒；将小鼠的四肢固定后，在小鼠腹腔注入2mL RPMI1640基础液，上下移动小鼠，吸出小鼠腹腔的液体并置于50mL离心管，此操作重复三次，50mL离心管内的液体即为腹腔巨噬细胞；1000r/min，10min离心，弃掉上清液，然后用HAT培养基将细胞重悬，转到细胞培养瓶中，置于细胞培养箱中培养，用于细胞融合。

### 3.2.3.3 脾细胞的制备和细胞融合

融合前准备：

- (1) 材料：镊子 3 把、剪刀 3 把、高温灭菌处理匀浆器 1 个、50mL 无菌离心管 2 个、灭菌的泡沫板 1 个，融合前放入灭菌台，紫外照射 1h。无菌水提前 37℃ 预热、50% PEG(0.8mL)，37℃ 温箱预热。
- (2) 细胞：SP2/0 细胞、小鼠饲养层细胞。
- (3) 培养液：RPMI1640 基础培养基，HAT 培养基。

融合过程：

- (1) 将加强免疫的 BALB/c 小鼠经眼眶放血杀死，将小鼠置于 75%酒精中浸泡消毒。
- (2) 将消毒好的老鼠固定于解剖板上，取出脾细胞，并将其加入事先准备好的灭菌的匀浆器中。
- (3) 匀浆器中加入 5mL RPMI1640 基础液，进而分离脾细胞，滴加 10mL RPMI1640 基础液，静置 2min，将上清转移到另一个无菌的 50mL 离心管中，重复同样的步骤 3 次，取准备好的 SP2/0 细胞，弃培养基并用适量 RPMI1640 基础培养液冲洗 2 次，加入 5mL RPMI1640 基础培养基吹下 SP2/0 并计数，把  $1-2 \times 10^7$  个 SP2/0 细胞和脾细胞的充分混合，1000r/min，离心 8min。
- (4) 将上清弃去，将其置于 37℃ 水浴中。然后加入提前预热的 50%PEG 0.8mL，1min 内加完，加入时不停的搅拌。
- (5) 连续搅拌 30 秒，静置 30 秒，然后缓慢加入 37℃ 预热的 RMPI1640 终止液终止。
- (6) 1000r/min 离心 5min，弃上清，将含有腹腔巨噬细胞的 HAT 培养基与融合后的细胞混合，并添加适量的 HAT 培养基，铺到 96 孔细胞培养板中，约 250 $\mu$ L/孔，置于细胞培养箱中进行培养。

### 3.2.4 阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 筛选

在融合后第二天来观察是否污染，4 天左右将更换 HT 培养基。待融合细胞集落长密即可进行抗体的挑选；无菌条件下每孔取出 100 $\mu$ L 细胞培养上清，按照 3.2.2 的间接 ELISA 方法，以纯

化的 FCV2280 为包被抗原初步筛选出阳性杂交瘤细胞，同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。参照 3.2.2 方法进行计算 P/N 值，根据 ELISA 结果选择 OD<sub>450nm</sub> 值较高的融合细胞进行细胞亚克隆，同时，杂交瘤细胞进行扩大培养和冻存；经 3 次细胞亚克隆后，选择 OD<sub>450nm</sub> 值高的阳性细胞逐渐扩大培养。将收集的阳性杂交瘤细胞上清，分别以 FCV2280(400ng/孔)、VP1-B 蛋白（400ng/孔）和 VP1-E 蛋白（400ng/孔）为包被抗原进行交叉间接 ELISA 分析。

### 3.2.5 杂交瘤细胞的亚克隆、冻存和复苏

#### 3.2.5.1 杂交瘤细胞的亚克隆

在 OD<sub>450nm</sub> 测定值较高的细胞孔中加入适量的培养液轻轻吹起孔内细胞，取适量细胞液到离心管中，将细胞按十倍进行稀释，同时利用细胞计数板进行计数。第 1 次亚克隆用移液器吸取 100 个细胞，用 10mL Clone easy 培养液稀释，混匀后加至 96 孔细胞培养板中培养，每孔添加 100 $\mu$ L。其余的细胞应及时培养冻存；第一次亚克隆后，待细胞培养液变为黄色时，吸取孔内的培养液进行间接 ELISA 检测及第 2 次亚克隆。第 2 和第 3 次亚克隆和第 1 次亚克隆采用相同的方法，3 次亚克隆后，若所有细胞的 ELISA 结果均为阳性，即为能稳定分泌抗 VP1-B 和 VP1-E 蛋白的阳性杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞应及时扩增并冷冻保存。

#### 3.2.5.2 杂交瘤细胞的冻存和复苏

间接 ELISA 的方法筛选的阳性孔的杂交瘤细胞扩大培养后应及时对细胞进行冻存。具体步骤为：用 RPMI1640 基础培养液吹起生长状态良好的阳性杂交瘤细胞，转入离心管中，1000r/min，5min 离心，同时弃上清。用 1mL 细胞冻存液悬起细胞沉淀并分装到 2mL 细胞冻存管内。把冻存管放入冻存盒中，-80 $^{\circ}$ C 放置，24h 后转入到液氮罐中冻存。

杂交瘤细胞的复苏参照 3.2.3.1 进行，刚培养时加入含有 10%Clone easy 杂交瘤完全培养基，待杂交瘤细胞状态良好时更换杂交瘤完全培养基，当细胞长满时进行传代培养。

### 3.2.6 杂交瘤细胞腹水的制备

用灭菌的石蜡油腹腔注射 8-10 周龄的小鼠 0.5mL/只，将其致敏，一周后，将处于生长状态良好的杂交瘤细胞用 PBS 吹起，低速离心三次，用 PBS 将细胞沉淀悬起并稀释，通过腹腔注射每只接种 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 个杂交瘤细胞，一周后抽取小鼠腹水，腹水经 12000r/min,离心 1min 后，测定其效价，并置于-80 $^{\circ}$ C 保存。

### 3.2.7 VP1-B、VP1-E MAbs 的生物学特性分析

#### 3.2.7.1 VP1-B、VP1-E MAbs 的 Western blot 鉴定

FCV2280、F9、HRB-SS、TIG-1 感染 CRFK 细胞，细胞完全病变后，置于-80 $^{\circ}$ C 反复冻融三次，12000 $\times$ g 离心 5min，参照 2.2.2 进行 Western blot 鉴定。按 1:200 用 TBST 稀释阳性杂交瘤细

胞上清, 室温作用 1h, 用 TBST 洗涤 3 次, 以 1: 8000 稀释的荧光标记的羊抗鼠 IgG, 室温作用 1h, 用 TBST 洗涤 3 次, 最后用红外影像扫描仪扫描。

### 3.2.7.2 VP1-B、VP1-E MAbs 的 IFA 鉴定

FCV2280、F9、HRB-SS、TIG-1 毒株感染 CRFK 细胞, 12h 后弃去培养液, PBS 小心冲洗细胞 3 次, 甲醇事先在 -20℃ 预冷, 用其将细胞固定; 固定后用 PBS 缓慢洗涤 3 次, 并分别加入阳性杂交瘤细胞培养上清, SP2/0 细胞培养上清和 FCV 猫的阳性血清, 在 37℃ 作用 1h; 用 PBS 缓慢洗涤 3 次, 将 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 和 FITC 标记的山羊抗猫 IgG 按 1:500 稀释, 37℃ 避光作用 1h; 在暗室用 PBS 清洗 3 次, 3min/次, 清洗完之后置于荧光显微镜下观察并拍照。

### 3.2.7.3 VP1-B、VP1-E MAbs 的特异性鉴定

FcoV、FHV、FPV 毒株分别感染 CRFK 细胞, 36h 后参照 3.2.7.2 进行 IFA 试验, 同时设置阳性对照和阴性对照。阳性对照的一抗分别是 FcoV 猫阳性血清、FHV 猫阳性血清、FPV 猫阳性血清, 二抗为 FITC 标记的山羊抗猫 IgG。阴性对照的一抗为 SP2/0 细胞培养上清。

### 3.2.7.4 VP1-B、VP1-E MAbs 的亚型鉴定

将标本检测孔每孔先加入标本稀释液各 50 $\mu$ L。然后 50 $\mu$ L 细胞培养上清液加至酶标板中, 每个样品设置 6 个重复; 同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照, 根据 3.2.4 方法确定其亚型。

### 3.2.7.5 VP1-B、VP1-E MAbs 腹水的效价测定

腹水效价是参照 3.2.4 进行测定。

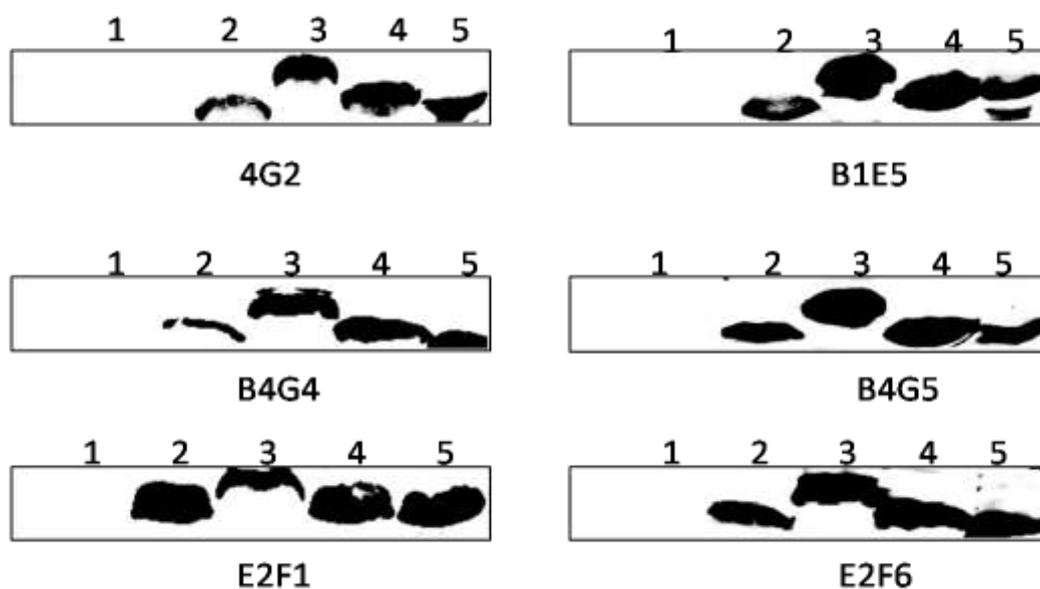
### 3.2.7.6 VP1-B、VP1-E MAbs 的中和活性鉴定

- (1) TCID<sub>50</sub>测定:待CRFK细胞于96孔细胞培养板中长至90%时, 将FCV2280细胞培养液进行 10<sup>-1</sup>-10<sup>-11</sup>十倍倍比稀释, 分别接种至96孔细胞培养板中, 接种量为100 $\mu$ L, 每个梯度做4个重复, 最后两列孔均加入等量的DMEM, 设为对照组, 置于细胞培养箱中培养, 48h 后观察细胞病变, 最后根据Reed—Muench法计算出FCV2280的TCID<sub>50</sub>。
- (2) 中和试验的测定:稀释单抗的腹水, 加入96孔微量细胞培养板里, 倍比稀释, 使其稀释至 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120, 每个稀释度作3个重复; 将FCV2280稀释至200TCID<sub>50</sub>与等量的单抗腹水充分混合, 于37℃, 1h; 单克隆抗体和病毒作用1h后, 将100 $\mu$ L混合物加入96孔细胞培养板CRFK细胞中。置细胞培养箱培养, 培养48h后, 逐日观察细胞病变效应, 72h为终判点。

### 3.3 结果

#### 3.3.1 VP1-B、VP1-E MAbs 的 Western blot 鉴定

FCV2280、F9、HRB-SS、TIG-1 病毒转印到 NC 膜，分别与 VP1-B、VP1-E MAbs 阳性杂交瘤细胞上清为一抗，荧光标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗。结果表明 VP1-B、VP1-E MAbs 均能识别这 4 株 FCV（图 3.1）。



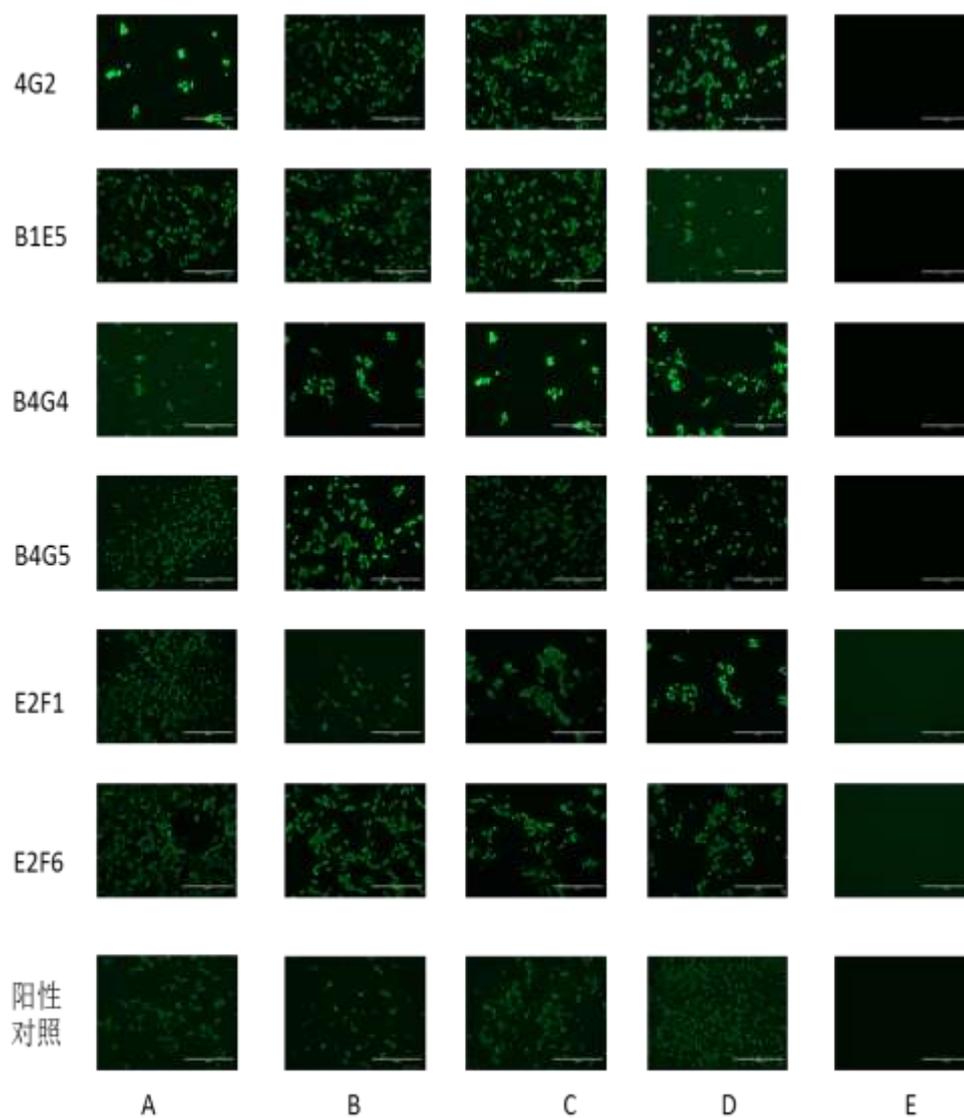
1: CRFK 细胞; 2: FCV-2280; 3: F9; 4: HRB-SS; 5: TIG-1

图 3.1 6 株单抗与 4 种 FCV 毒株的 Western blot 分析

Fig3.1 Western blot analysis of 4 different FCV strains

#### 3.3.2 VP1-B、VP1-E MAbs 的 IFA 鉴定

FCV2280、F9、HRB-SS、TIG-1 病毒感染 CRFK 细胞杂交瘤细胞的培养上清作 IFA 交叉分析，结果表明 VP1-B、VP1-E MAbs 均能与 4 株 FCV 反应（图 3.2）。



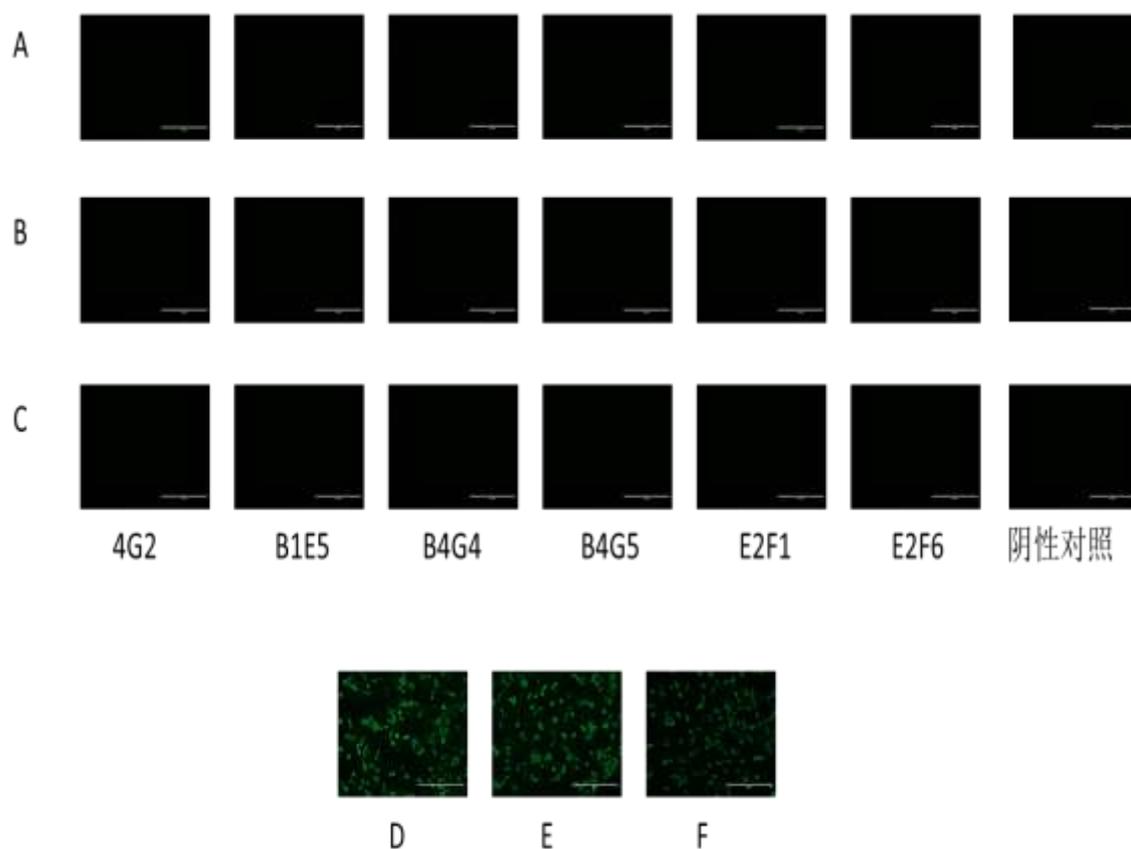
A: FCV-2280; B: F9; C: HRB-SS; D: TIG-1; E: 阴性对照; 阳性对照: 一抗为猫的 FCV 阳性血清

图 3.2 IFA 方法鉴定 VP1-B 和 VP1-E MAbs

Fig3.2 VP1-B and VP1-E MAbs were identified by IFA

### 3.3.3 VP1-B、VP1-E MAbs 特异性分析

FcoV、FHV、FPV 毒株分别感染 CRFK 细胞进行 IFA 分析, 结果表明 6 株单抗均不和 FcoV、FHV、FPV 毒株反应, 特异性良好(图 3.3)。



A: FcoV; B:FHV; C:FPV;D:FcoV、一抗为猫 FcoV 阳性血清; E: FHV、一抗为猫 FHV 阳性血清;F: FPV、一抗为猫 FPV 阳性血清

图 3.3 6 株单抗与 FcoV、FHV、FPV 毒株的 IFA 分析

Fig3.3 IFA analysis of FcoV,FHV and FPV strains

### 3.3.4 VP1-B、VP1-E MAbs 的亚型鉴定

根据 SouthernBiotech 公司的单抗亚型鉴定试剂盒鉴定 VP1-B、VP1-E MAbs 的亚型。结果如表 3.1, 结果表明 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 的重链是 IgG<sub>1</sub>; VP1-E MAbs E2F1 和 E2F6 的重链为 IgG<sub>1</sub>; 6 株 MAbs 的轻链均为 Kappa 链。

## 3.1 VP1-B、VP1-E MAbs 的亚型鉴定

## 3.1 Identification of subtypes of VP1-B and VP1-E MAbs

Name	heavy chain	Light chain
4G2	IgG <sub>1</sub>	Kappa
B1E5	IgG <sub>1</sub>	Kappa
B4G4	IgG <sub>1</sub>	Kappa
B4G5	IgG <sub>1</sub>	Kappa
E2F1	IgG <sub>1</sub>	Kappa
E2F6	IgG <sub>1</sub>	Kappa

## 3.3.5 VP1-B、VP1-E MAbs 腹水效价的测定

通过间接ELISA测得VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 单抗株腹水的效价约为 1:6553600；VP-E MAbs E2F1 和 E2F6 单抗株腹水效价约为 1:25600 和 1:12800。

## 3.3.6 VP1-B、VP1-E MAbs 的中和活性鉴定

通过中和试验,分别接种 VP1-B、VP1-E MAbs 腹水与 200TCID<sub>50</sub> 的 FCV2280 混合物的 CRFK 的细胞, 48h 后 CRFK 细胞全部病变, 证明 6 株 MAbs 均无中和活性。

## 3.4 讨论

在过去 40 多年, 单克隆抗体逐步由纯粹的科研工具变为高效的生物制药和诊断试剂用于许多疾病治疗和诊断。制备单克隆抗体的杂交瘤可以在体外存活并传代, 在细胞不发生细胞株的丢失和细胞发生基因突变的情况下, 就可以连续产生高特异性、高同质性和单一生物功能的抗体。因此单克隆抗体普遍用于 ELISA、流式细胞仪和放射免疫分析等技术。国外 Carter MJ 通过 FCV 的衣壳蛋白获得了两株不同表位的 MAbs(Carter et al., 1989); Tohya Y 等以纯化的 FCV 为免疫原共筛选出 18 株中和性单克隆抗体, 并检测了这些单克隆抗体和 20 株 FCV 毒株的中和活性, 其中一株单克隆抗体对所有的毒株都具有中和活性, 8 株单克隆抗体仅对 F4 毒株具有中和活性, 其他的单克隆抗体仅对部分毒株具有中和活性(Tohya et al., 1991b, 1991a; Tohya et al., 1997)。Milton 等以原核表达 FCV 的衣壳蛋白为免疫原制备了 2 株具有中和活性的单克隆抗体和 1 株非中和活性单克隆抗体(Milton et al., 1992)。Shin 通过以真核表达衣壳蛋白为免疫原制备的单克隆抗体与 FCV 具有良好的反应性(Shin et al., 1993)。Tajima 等通过以混合的 FCV 为免疫原筛选出一株广谱的单克隆抗体, 此单克隆抗体可以与 36 株 FCV 和 2 株实验室分离的 FCV 具有良好的反应性(Tajima et al., 1998)。Radford AD 通过制备 MAbs 及表达 VP1 的随机文库鉴定了 VP1 的抗原表位(Radford et al., 1999)。Geisser 等通过制备 MAbs 和 MVA/T7 疫苗表达系统构建重组嵌合病毒免

疫小鼠证实 E 区的 5' 高变区和 C 区可产生中和性单克隆抗体, B、D 和 F 区可以诱导产生非中和性单克隆抗体(Geissler et al., 2002)。国内艾纯旭等用纯化的 FCV 为免疫原制备了 3 株单克隆抗体并经过筛选的单克隆抗体建立了双夹心 ELISA 检测方法(艾纯旭, 2013)。以上研究表明, 无论以 FCV 全病毒为免疫原还是以 FCV 衣壳蛋白 VP1 为免疫原都能筛选到良好的单克隆抗体。

本研究纯化的 FCV2280、VP1-B 和 VP1-E 重组蛋白经 Western blot 鉴定具有良好的反应原性, 所以将纯化的 VP1-B 和 VP1-E 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 以 FCV2280 为包被抗原, 经过有限稀释法共筛选出 6 株能稳定分泌抗 FCV2280 的杂交瘤细胞株。与 FCV2280、F9、HRB-SS、TIG-1 Western blot 和 IFA 分析, 结果表明 6 株单克隆抗体与 FCV 有良好的反应原性。亚型鉴定结果表明, MAbs 的重链是 IgG1, 轻链为 Kappa 链, 且腹水效价很高。这 6 株单克隆抗体不与 FCoV、FHV 和 FPV 反应, 特异性良好。但经中和试验表明, 6 株单克隆抗体并无中和活性, 在实验中我们同时用 VP1-B、VP1-E 蛋白免疫小鼠的血清进行了中和试验, VP1-B 蛋白免疫小鼠的血清不具有中和活性, VP1-E 免疫小鼠的血清具有中和活性, 但中和效价比较低, 而在筛选单克隆抗体时并未筛选到具有中和活性的单抗, 可能是产生中和性单克隆抗体的浆细胞比较少或者是在杂交瘤在传代时会有染色体丢失等原因造成的。本实验成功筛选到了 VP1-B 和 VP1-E 重组蛋白的单克隆抗体, 为 FCV 的基础研究和建立诊断方法奠定了基础。

## 第四章 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位的鉴定

### 4.1 材料

#### 4.1.1 载体、感受态细胞

原核表达载体 pET-32a、DH5 $\alpha$  感受态细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所自然疫源性人兽共患病创新团队保存，其他的参照 2.1。

#### 4.1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNAMarker、限制性内切酶 *Xho*I、*Bam*HI 购自 Thermo scientific 公司，其他参照 2.1。

#### 4.1.3 主要仪器

参照 2.1。

#### 4.1.4 主要溶液和培养基的配制

参照 2.1。

### 4.2 方法

#### 4.2.1 VP1-B MAbs 抗原表位鉴定

通过逐步截短表达 Western blot 分析的方法鉴定 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 的抗原表位。首先通过 ([http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html))网站对 VP1-B 的抗原表位进行了预测，根据预测结果将 VP1-B 首先分为 3 段，以 pET-B 为模板，设计引物扩增目的片段，并与 pET-32a 表达载体连接，进行蛋白的分段表达。分段表达的蛋白与 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 进行 Western blot 分析，根据 Western blot 鉴定的结果进行进一步的截短，直到 N 端或 C 段减少 1 个氨基酸残基不能和单抗株反应，对单克隆抗体的表位进行精确的定位。

##### 4.2.1.1 引物设计

根据 Genbank 中 FCV2280 株 *vp1* 基因序列，利用 Oligo7 软件选取其 5'端和 3'端分别设计上

下游引物，引物是在哈尔滨库美生物技术有限公司来合成的，一部分 *vp1-B* 截短的基因由库美生物技术有限公司合成，下划线部分为酶切位点，上游酶切位点为 *XhoI*，下游酶切位点为 *BamHI*，相对应的引物和合成的基因序列如表 4.1 和 4.2。

表 4.1 VP1-B 截短表达引物序列

Table 4.1 truncated VP1-B primer sequences

Name	Primer sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Position	Vector
B1	CGC <u>GGATCC</u> ATGGCTGATGATGGTTCTATCACG	125-220aa	pET-32a
	CCGCTCGAGTTAAGAGAACCTAACATCAATAGA		
B2	CGC <u>GGATCC</u> ATGGCTTGGTCTGGATCTATTGAT	210-300aa	pET-32a
	CCGCTCGAGTTAAGCATAAGGGTTAATGAGATC		
B3	CGC <u>GGATCC</u> ATGATGGTGTATAATGATCTCATT	290-397aa	pET-32a
	CCGCTCGAGTTATTCACCTAACTGTAACAGTTAT		
B1.1	CGC <u>GGATCC</u> ATGGCTGATGATGGTTCTATCACG	125-184aa	pET-32a
	CCGCTCGAGTTATTGAGTTTCTGTGGTACTCCA		
B1.2	CGC <u>GGATCC</u> ATGTCTGAGTGGGAGGCATTCTTT	164-220aa	pET-32a
	CCGCTCGAGTTAAGAGAACCTAACATCAATAGA		

注: a:下划线为引入的酶切位点; 上游为 *XhoI*; 下游为 *BamHI*

表 4.2 VP1-B 截短表达合成序列

Table 4.2 Truncated VP1-B synthetic gene sequences

Name	Synthetic sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Position	Vector
B1.1.1	<u>GATCC</u> ATGGCTGATGATGGTTCTATCACG GCCCCTGAGCAAGGAACGGTTGTT <u>C</u> <u>TCGAG</u> AACAACCGTTCCTTGCTCAGGGG CCGTGATAGAACCATCATCAGCCAT <u>G</u>	125-139aa	pET-32a
B1.1.2	<u>GATCC</u> ATGGAGCAAGGAACGGTTGTTGG TGGGGTCATTGCCGAGCCTAGTGCACAAC <u>C</u> <u>TCGAG</u> TTGTGCACTAGGCTCGGCAATGAC CCCACCAACAACCGTTCCTTGCTCCAT <u>G</u>	134-149aa	pET-32a
B1.1.3	<u>GATCC</u> ATGGCCGAGCCTAGTGCACAAATGTCAACAG CTGCTGATATGGCCACAGGGAAAAGCGTTGACTCT <u>C</u> <u>TCGAG</u> AGAGTCAACGCTTTTCCCTGTGGCCATATCA GCAGCTGTTGACATTTGTGCACTAGGCTCGGCCAT <u>G</u>	144-184aa	pET-32a
B1.1.1.1	<u>GATCC</u> ATGGCTGATGATGGTTCTATCACGGCC <u>C</u> <u>TCGAG</u> GGCCGTGATAGAACCATCATCAGCCAT <u>G</u>	125-132aa	pET-32a
B1.1.1.2	<u>GATCC</u> ATG ATCACGGCCCTGAGCAAGGAACGGTTGTT <u>C</u> <u>TCGAG</u> AACAACCGTTCCTTGCTCAGGGGCCGTGATCAT <u>G</u>	130-139aa	pET-32a
B1.1.1.1.1	<u>GATCC</u> ATGGCTGATGATGGTTCTATCACG <u>C</u> <u>TCGAG</u> CGTGATAGAACCATCATCAGCCAT <u>G</u>	125-131aa	pET-32a
B1.1.1.1.2	<u>GATCC</u> ATG GCTGATGATGGTTCTATC <u>C</u> <u>TCGAG</u> GATAGAACCATCATCAGCCAT <u>G</u>	125-130aa	pET-32a
B1.1.1.1.3	<u>GATCC</u> ATG GCTGATGATGGTTCT <u>C</u> <u>TCGAG</u> AGAACCATCATCAGCCAT <u>G</u>	125-129aa	pET-32a
B1.1.1.1.4	<u>GATCC</u> ATG GATGATGGTTCTATCACGGCC <u>C</u> <u>TCGAG</u> GGCCGTGATAGAACCATCATCCAT <u>G</u>	126-132aa	pET-32a
B1.1.1.1.5	<u>GATCC</u> ATGGATGGTTCTATCACGGCC <u>C</u> <u>TCGAG</u> GGCCGTGATAGAACCATCCAT <u>G</u>	127-132aa	pET-32a
B1.1.1.1.6	<u>GATCC</u> ATGGGTTCTATCACGGCC <u>C</u> <u>TCGAG</u> GGCCGTGATAGAACCAT <u>G</u>	128-132aa	pET-32a

注：a:下划线为引入的酶切位点；上游为 *Xho*I；下游为 *Bam*HI

## 4.2.1.2 VP1-B 截短片段的扩增

以重组质粒 pET-B 为模板，利用上述的上下游引物 PCR 扩增截短的基因，PCR 扩增体系如下：

PCR 胶回收产物	15 $\mu$ L
<i>Bam</i> HI	1 $\mu$ L
<i>Xho</i> I	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	26 $\mu$ L
10 $\times$ FastDigest green buffer	5 $\mu$ L
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ L

截短的基因扩增反应条件：95  $^{\circ}$ C，5min、95  $^{\circ}$ C，30s、55  $^{\circ}$ C，30s、72  $^{\circ}$ C，1min、72  $^{\circ}$ C，10min 共 30 个循环。

## 4.2.1.3 VP1-B 截短片段蛋白原核表达载体的构建

PCR 产物与载体 pET-32a 双酶切和连接，PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶分析，同时 PCR 扩增正确的片段切下，然后通过胶回收和载体连接。胶回收得到的截短 *vp1-B* 基因的 PCR 产物和合成的截短 *vp1-B* 基因，分别用 *Xho*I、*Bam*HI 双酶切，酶切体系如下：

PCR 胶回收产物	15 $\mu$ L
<i>Bam</i> HI	1 $\mu$ L
<i>Xho</i> I	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	26 $\mu$ L
10 $\times$ FastDigest green buffer	5 $\mu$ L
<hr/>	
Total volume	50 $\mu$ L

原核表达载体 pET-32a 同样由 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切，反应体系如下：

pET-32a	15 $\mu$ L
<i>Bam</i> HI	1 $\mu$ L
<i>Xho</i> I	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	26 $\mu$ L
10 $\times$ FastDigest green buffer	5 $\mu$ L
Total volume	50 $\mu$ L

将酶反应体系混合后,置于 37 °C 水浴 1h。然后根据 PCR 纯化试剂盒将双酶切后的基因纯化,同时用胶回收试剂盒回收双酶切后的 pET-32a 载体。通过 T4 DNA 连接酶将酶切的基因片段和载体片段连接,连接体系充分混匀后于室温 2h。连接体系如下:

酶切 pET-32a 载体	1 $\mu$ L
酶切截短 <i>vp1-B</i> 基因	7 $\mu$ L
10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer	1 $\mu$ L
T4 DNA 连接酶	1 $\mu$ L
Total volume	10 $\mu$ L

#### 4.2.1.4 转化、挑菌、菌液 PCR 鉴定

根据 2.2.4,产物转化至 DH5 $\alpha$  感受细胞,并在 37 °C 恒温培养箱培养,待平板长出单菌落后,在平板上随机挑取单个菌落,分别接种含有 800 $\mu$ L LB 培养基(100 $\mu$ g/mL *Amp*<sup>+</sup>)的离心管中,置于 37 °C 摇床中,培养 12h。将浑浊的菌液进行 PCR 鉴定,PCR 反应进程如 4.2.1.2。用 2%琼脂糖凝胶鉴定 PCR 产物,PCR 反应体系如下:

菌液	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ L
2 $\times$ Taq PCR StarMix	10 $\mu$ L
上游引物(10pM)	1 $\mu$ L
下游引物(10pM)	1 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L

#### 4.2.1.5 重组质粒的提取、鉴定与测序

鉴定为阳性细菌液质粒通过试剂盒提取，重组质粒保存于-20℃。同时对提取的质粒通过双酶切进行鉴定，酶切反应体系充分混匀后于37℃反应1h，然后用2%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定其阳性。同时取10μL阳性质粒，通过哈尔滨库美生物技术有限公司测序，测序结果经DNASTAR软件比对鉴定。双酶切体系如下：

重组质粒	8μL
<i>Bam</i> HI	1μL
<i>Xho</i> I	1μL
ddH <sub>2</sub> O	8μL
10×FastDigest green buffer	2μL
<hr/>	
Total volume	20μL

#### 4.2.1.6 截短蛋白 Western blot 分析

参照2.2.4进行诱导表达，表达的截短蛋白通过Western blot进行分析，结果表明VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5的抗原表位初步确定在B1.1.1.1(8aa)，对这8个氨基酸残基从N端和C端进行逐个氨基酸截短表达，对VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5的识别表位进行精确定位。

#### 4.2.2 VP1-E MAbs 抗原表位鉴定

VP1-E MAbs 抗原表位鉴定经([http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html))网站首先对FCV2280 VP1-E的抗原表位进行了预测，根据预测结果VP-E首先分为2段，以pET-E为模板，设计引物扩增目的片段，与pET-32a重组进行分段表达。截短表达的蛋白和VP1-E MAbs E2F1、E2F6通过Western blot鉴定，相应的引物和合成的基因如表4.3和4.4。

表 4.3 VP1-E 截短表达引物序列

Table 4.3 Amplification of truncated VP1-E primer sequences

Name	Primer sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Position	Vector
E1	CGCGGATCCATGCCTGAAAAGCTTACCCCTGCA CCGCTCGAGTTATCCACAGATGTACATACTTTT	426-470aa	pET-32a
E2	CGCGGATCCATGAACACAAACTTTAAAAGTATG CCGCTCGAGTTAATCGGAAGTTTGCACATCATT	460-524aa	pET-32a
E2.1	CGCGGATCCATGAACACAAACTTTAAAAGTATG CCGCTCGAGTTACGGTGTGATGCTGTTACCTTC	460-499aa	pET-32a
E2.2	CGCGGATCCATGAAGAAGATATCTAATACTGCT CCGCTCGAGTTAATCGGAAGTTTGCACATCATT	479-524aa	pET-32a

注：a:下划线为引入的酶切位点：上游为 *Xho*I；下游为 *Bam*HI

表 4.4 VP1-E 截短合成基因序列

Table 4.4 Truncated VP1-E synthetic gene sequences

Name	Synthetic sequences (5'-3') <sup>a</sup>	Position	Vector
E2.1.1	GATCCATGAACACAAACTTTAAAAGTATGTACA TCTGTGGATCAC TCGAGTGATCCACAGATGTACATACTTTTAAAGT TTGTGTTTCATG	460-471aa	pET-32a
E2.1.2	GATCCATGTACATCTGTGGATCATTGCAAAGAGC TTGGGGTGACAAGC TCGAGCTTGTACCCCAAGCTCTTTGCAATGATC CACAGATGTACATG	467-499aa	pET-32a
E2.1.2.1	GATCCATGTACATCTGTGGATCATTGCAAAGAGC TCGAGTCTTTGCAATGATCCACAGATGTACATG	467-479aa	pET-32a
E2.1.2.2	GATCCATGTTGCAAAGAGCTTGGGGTGACAAGC TCGAGCTTGTACCCCAAGCTCTTTGCAACATG	475-499aa	pET-32a

注：a:下划线为引入的酶切位点：上游为 *Xho*I；下游为 *Bam*HI

参照 4.2.1 对 VP1-E 进行截短表达和 Western blot 分析，VP1-E MAbs E2F1、E2F6 的抗原表位初步确定在短肽 E2.1.2.1(<sup>467</sup>YICGSLQRAWGDK<sup>479</sup> 这 13 个氨基酸残基)，对这 13 个氨基酸残基做从 N 端和 C 端进行逐个截短合成短肽，对 VP1-E MAbs E2F1、E2F6 的抗原表位进行精确定位，合成的短肽如表 4.5，用 ELISA 鉴定合成的短肽。方法参照 3.2.2，以合成的短肽为包被抗原，用 VP1-E MAbs E2F1、E2F6 进行检测。

表 4.5 VP1-E 截短合成的短肽序列

Table 4.5 Short peptide sequence of VP1-E truncated synthesis

Name	Amino acid sequence	Position	Name	Amino acid sequence	Position
1	ICGSLQRAWGDK	468-479aa	9	WGDK	476-479aa
2	CGSLQRAWGDK	469-479aa	10	YICGSLQRAWGD	467-478aa
3	GSLQRAWGDK	470-479aa	11	YICGSLQRAWG	467-477aa
4	SLQRAWGDK	471-479aa	12	YICGSLQRAW	467-476aa
5	LQRAWGDK	472-479aa	13	YICGSLQRA	467-475aa
6	QRAWGDK	473-479aa	14	YICGSLQR	467-474aa
7	RAWGDK	474-479aa	15	YICGSLQ	467-473aa
8	AWGDK	475-479aa			

#### 4.2.3 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位的保守性分析

应用 MEGA6.0 软件比对 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中已经发布的 FCV 序列, 分析 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位的保守性。为了进一步确定 VP1-B、VP1-E MAbs 的抗原表位序列比对中突变的氨基酸是否影响制备的抗体和鉴定的表位结合, 根据表位序列比对, 合成含有突变氨基酸密码子的表位基因序列并进行原核表达, 含有突变氨基酸密码子的表位基因氨基酸序列如表 4.6 和 4.7。合成含有突变氨基酸密码子的表位基因序列与载体 pET-32a 连接, 构建重组质粒并参照 4.2.1 进行鉴定。

表 4.6 VP1-B MAb 表位突变氨基酸的短肽序列

Table 4.6 Short peptide sequence of epitope mutant amino acids of VP1-B MAb

Name	Amino acid sequence	Position	Name	Amino acid sequence	Position
BT1	D <b>G</b> DGSITA	126-132aa	BT5	DDGS <b>V</b> TA	126-132aa
BT2	D <b>S</b> DGSITA	126-132aa	BT6	DDGS <b>I</b> VA	126-132aa
BT3	DD <b>S</b> SITA	126-132aa	BT7	DDGS <b>I</b> TS	126-132aa
BT4	DD <b>A</b> SITA	126-132aa	BT8	DDGS <b>I</b> TT	126-132aa

注: 红色字体表示突变的氨基酸

表 4.7 VP1-E MAb 表位突变氨基酸的短肽序列

Table 4.7 Short peptide sequences of epitope mutant amino acids of VP1-E MAb

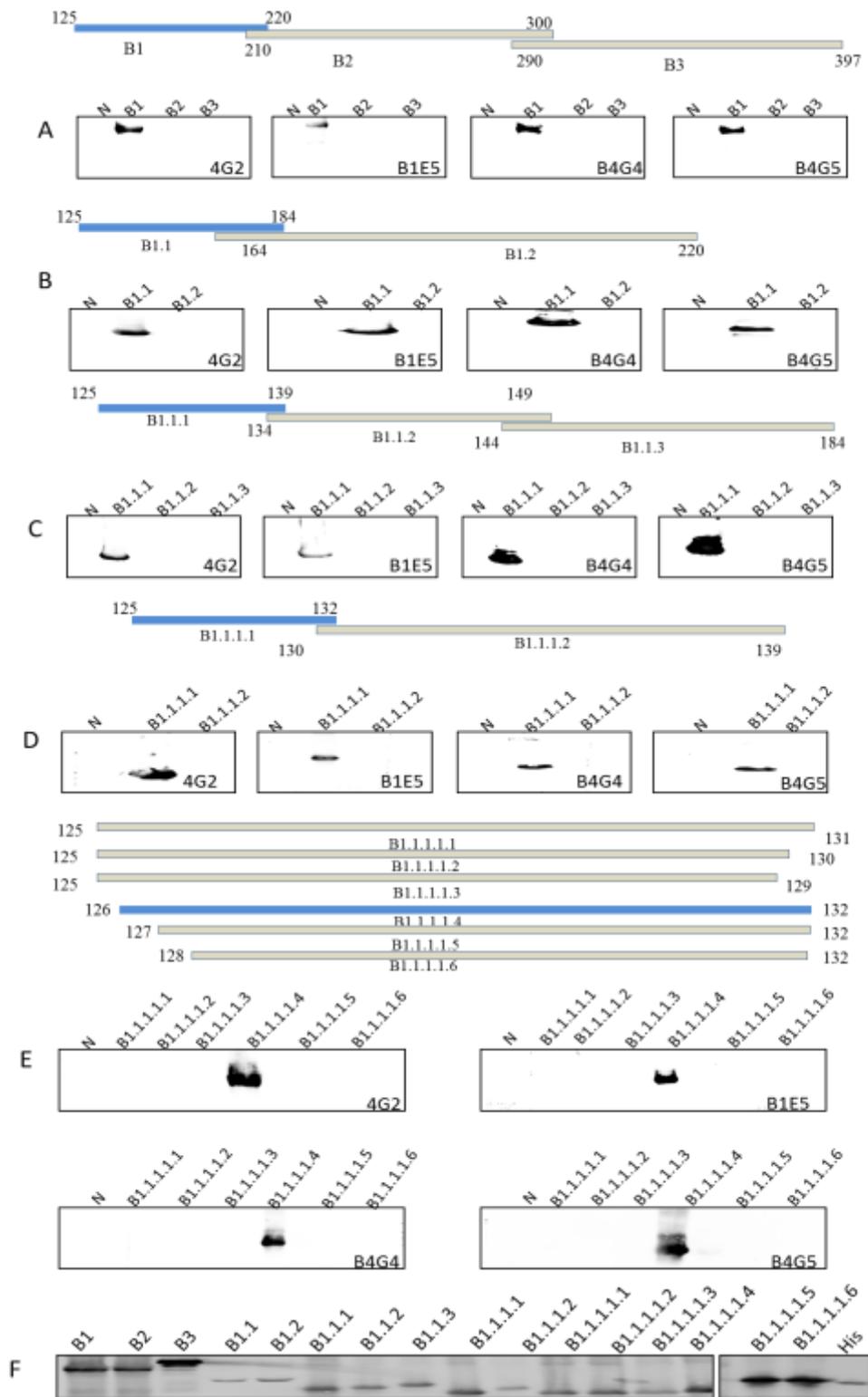
Name	Amino acid sequence	Position
E-T	YICG <b>A</b> LQ <b>R</b> AWG	467-477aa

注: 红色字体表示突变的氨基酸

## 4.3 结果

### 4.3.1 VP1-B MAbs 抗原表位鉴定

截短表达的蛋白通过 Western blot 进行鉴定, 结果表明 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 与短肽 B1 特异性反应, 结果表明, MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 所识别的抗原表位位于 125-220aa 之间。然后将 B1 进一步截短表达及 Western blot 分析, 如此进行重复的操作, 第四次截短表达表位定位在 125-132aa, 对此氨基酸序列的 N 端和 C 端进行逐个截短表达, 以对 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 的抗原表位进行精确定位 (图 4.1)。最终将 VP1-B MAbs 4G2、B1E5、B4G4、B4G5 的抗原表位精确至  $^{126}\text{DDGSITA}^{132}$ 。



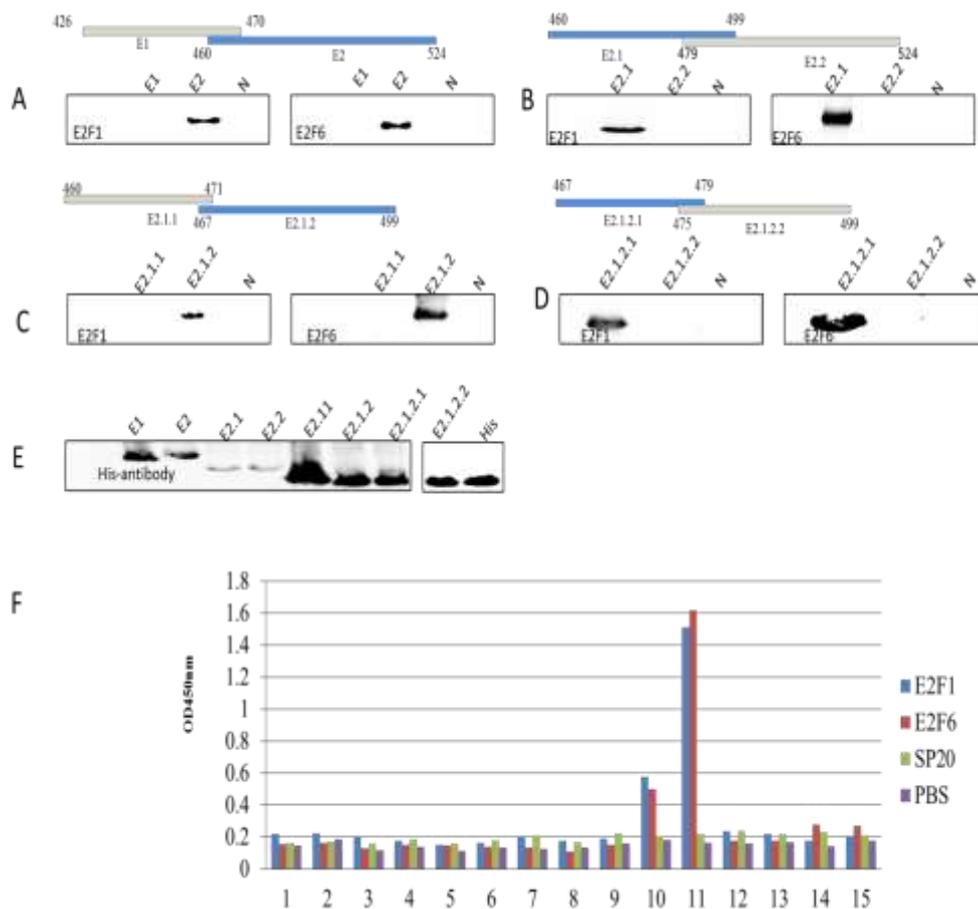
N:His 标签的蛋白；A：B1~B3 表达蛋白被 VP1-B MAbs 鉴定；B：B1.1~B1.2 表达蛋白被 VP1-B MAbs 鉴定；C：B1.1.1~B1.1.3 表达蛋白被 VP1-B MAbs 鉴定；D：B1.1.1.1~B1.1.1.2 表达蛋白被 VP1-B MAbs 鉴定；E：B1.1.1.1.1~B1.1.1.1.6 表达蛋白被 VP1-B MAbs 鉴定；F：所有截短的表达的蛋白被 anti-His antibody 鉴定

图 4.1 通过 Western blot 鉴定 VP1-B MAbs 的抗原表位

Fig 4.1 VP1-B MAbs epitope mapping by Western blot analysis

## 4.3.2 VP1-E MAbs 抗原表位鉴定

对 VP1-E 初步截短表达和 Western blot 分析表明, MAbs E2F1、E2F6 与短肽 E2 呈特异性反应, 表明, MAbs E2F1、E2F6 所识别的抗原表位位于 460-524aa 之间。然后将 E2 进一步截短表达并通过 Western blot 分析, 如此进行相同的操作, 第四次截短表达表位定位在 467-479aa, 对此氨基酸序列的 N 端和 C 端进行逐个截短合成短肽, 以对 MAbs E2F1、E2F6 的抗原表位进行精确定位 (图 4.2)。ELISA 分析结果表明, 当 N 端<sup>467</sup>Y 缺失后 MAbs E2F1、E2F6 不予其反应; 当 C 端<sup>477</sup>G 缺失后 MAbs E2F1、E2F6 不与短肽反应, 最终将 MAbs E2F1、E2F6 的抗原表位精确到<sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup>。



N:His 标签的蛋白; A: E1~E2 表达蛋白被 VP1-E MAbs 鉴定; B: E2.1~E2.2 表达蛋白被 VP1-E MAbs 鉴定; C: E2.1.1~E2.1.2 表达蛋白被 VP1-E MAbs 鉴定; D: E2.1.2.1~E2.1.2.2 表达蛋白被 VP1-E MAbs 鉴定; E:所有截短的表达的蛋白通过 anti-His antibody 鉴定; F: 467-479aa 逐步截短合成短肽通过 ELISA 方法鉴定

图 4.2 通过 Western blot 和 ELISA 方法鉴定 VP1-E MAbs 的抗原表位

Fig 4.2 VP1-E MAbs epitope mapping by Western blot and ELISA analysis

### 4.3.3 VP1-B、VP1-E MAbs 抗原表位保守性分析

为分析识别 VP1-B 和 VP1-E MAbs 抗原表位的保守性，将鉴定的抗原表位与 NCBI 公布的 FCV VP1 的氨基酸序列进行了比对分析（图 4.3 和图 4.4）。比对结果表明 <sup>126</sup>DDGSITA<sup>132</sup> 的抗原表位与所有毒株之间比较，此表位不保守。与 FCV2280 毒株相比 G 和 S 插入在 <sup>126</sup>D 和 <sup>127</sup>D 之间、<sup>128</sup>G 突变为 <sup>128</sup>S 和 <sup>128</sup>A、<sup>130</sup>I 突变为 <sup>130</sup>V、<sup>131</sup>T 突变为 <sup>131</sup>V、<sup>132</sup>A 突变为 <sup>132</sup>S 和 <sup>132</sup>T；<sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup> 抗原表位与所有毒株之间比较，此表位相对保守。与 FCV2280 毒株相比 <sup>471</sup>S 突变为 <sup>471</sup>A，表位中的其他氨基酸是保守的。

Name	Group	D	-	D	G	S	I	T	A	Name	Group	D	-	D	G	S	I	T	A	
1. 2280-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	35. 3786-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
2. F9-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	36. 21749-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
3. HRBSS-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	37. CFI68-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
4. TIG-1-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	38. Cranleigh-VP1.		.	.	.	.	.	.	.	.	T
5. FCV-U2-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	39. F4-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
6. 5789-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	40. FCV-5-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
7. URbana-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	41. FCV21-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
8. URbana1-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	42. FCV-131-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
9. UTCVM-NH6-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	43. FCV-Kaos-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
10. FCV-YH16-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	44. FCV-George Walder-VP		.	.	.	.	.	.	.	.	T
11. UTCVM-NH2-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	45. HB-S4-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
12. GD-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	46. FCV-Jengo-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
13. UTCVM-NH12-VP1		.	.	S	.	.	.	.	.	47. ITO2002JP-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
14. UTCVM-NH4-VP1		.	.	.	.	V	.	.	.	48. NACD-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
15. UTCVM-NH5-VP1		.	.	.	.	V	.	.	.	49. UTCVM-NH3-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
16. CH-JL3-VP1		.	.	.	.	V	.	.	.	50. UTCVM-NH7-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
17. FCV-2024		.	.	.	.	.	.	S	.	51. UTCVM-NH9-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
18. ym32001JP-VP1		.	.	.	.	.	.	S	.	52. UTCVM-NH10-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
19. USDA-VP1		.	.	.	.	.	.	S	.	53. UTCVMH2-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
20. CH-JL-2-VP1		.	.	.	.	V	.	.	.	54. UTCVM-NH1-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
21. GX01-13-VP1		.	.	S	.	V	.	T	.	55. V77-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
22. WZ-1-VP1		.	.	.	.	V	.	T	.	56. V83-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
23. V276-VP1		.	.	.	.	V	.	T	.	57. XH-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
24. V274-VP1		.	.	.	.	V	.	T	.	58. VS-FCV-Ari-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
25. 4b-VP1		.	.	.	A	V	V	T	.	59. FCV-Georgie-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
26. LS012-VP1		.	G	.	.	.	.	T	.	60. SH2014-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
27. 21395-VP1		.	G	.	.	.	.	T	.	61. F65-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
28. CH-JL4-VP1		.	G	.	S	.	.	T	.	62. CH-JL1-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
29. A4-VP1		.	G	.	.	.	.	T	.	63. FCV-Deuce-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
30. UTCVM-NH8-VP1		.	.	.	S	.	.	T	.	64. FCV-127-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
31. 12Q087-1-VP1		.	.	.	.	.	.	T	.	65. CH-JL-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
32. 12Q087-5-VP1		.	.	.	.	.	.	T	.	66. LS015-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
33. 20879-VP1		.	.	.	.	.	.	T	.	67. FB-NJ-13-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T
34. 1874-VP1		.	.	.	.	.	.	T	.	68. Gon2003JP-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	T

图 4.3VP1-B MAb 抗原表位序列比对

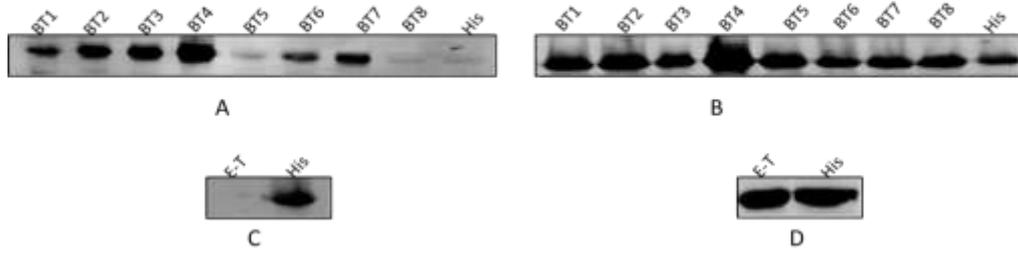
Fig 4.3Sequence Alignment of VP1-B MAb epitope

Name	Group	S	M	Y	I	C	G	S	L	Q	R	A	W	G	Name	Group	S	M	Y	I	C	G	S	L	Q	R	A	W	G
1. 2280-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	35. FCV-Kaos-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
2. F9-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	36. FCV-George Walder-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
3. HRBSS-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37. V276-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
4. TIG-1-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38. HB-S4-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
5. FCV-U2-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	39. FCV-Jengo-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
6. 5789-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40. ITO2002JP-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
7. Urbana-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	41. NACD-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
8. Urbana1-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	42. UTCVM-NH3-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
9. UTCVM-NH6-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	43. UTCVM-NH7-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
10. UTCVM-NH2-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44. UTCVM-NH9-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
11. UTCVM-NH12-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	45. UTCVM-NH10-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
12. CH-JL3-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	46. UTCVMH2-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
13. FCV-2024	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	47. UTCVM-NH1-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
14. USDA-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	48. V77-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
15. CH-JL-2-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	49. V83-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
16. WZ-1-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	50. XH-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
17. 21395-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	51. VS-FCV-Ari-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
18. CH-JL4-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	52. UTCVM-NH5-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
19. A4-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	53. GD-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
20. V274-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	54. GX01-13-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
21. 4b-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	55. FCV-YH16-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
22. UTCVM-NH8-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	56. LS012-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
23. 12Q087-1-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	57. UTCVM-NH4-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
24. 12Q087-5-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	58. ym32001JP-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
25. 20879-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	59. FCV-George-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	A			
26. 1874-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	60. SH2014-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
27. 3786-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	61. F65-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
28. 21749-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	62. CH-JL1-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
29. CF168-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	63. FCV-Deuce-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
30. Cranleigh-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	64. FCV-127-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
31. F4-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	65. CH-JL-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
32. FCV-5-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	66. LS015-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
33. FCV21-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	67. FB-NJ-13-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		
34. FCV-131-VP1	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	68. Gon2003JP-VP1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A		

图 4.4 VP1-E MAb 的抗原表位序列比对

Fig 4.4 Sequence Alignment of VP1-E MAb epitope

为了进一步分析 VP1-B、VP1-E MAbs 的抗原表位中的突变的氨基酸是否和表位突变的氨基酸结合，根据 NCBI 中序列比对的结果，合成含有突变氨基酸密码子的表位基因序列并进行原核表达，将表达的蛋白与 VP1-B MAb 进行 Western blot 分析如图 4.5(A 和 B)，结果表明 <sup>129</sup>I 突变为 <sup>129</sup>V 将失去反应能力，<sup>132</sup>A 突变为 <sup>132</sup>T 将失去反应能力。由此推测序列比对中的毒株 I130V 和 A132T 发生突变后可能和本研究制备的 VP1-B MAb 失去反应能力。将表达的蛋白与 VP1-E MAb 进行 Western blot 分析如图 4.5(C 和 D)，结果表明 G471A 突变后仍与 VP1-E MAb 发生反应。由此推测序列比对中的毒株 G471A 发生突变后可能和本研究制备的 VP1-E MAb 发生反应。



A: VP1-B MAb 表位突变表达的短肽通过 4G2 鉴定; B: VP1-B MAb 表位突变的表达的短肽通过 anti-His antibody 鉴定; C: VP1-E MAb 表位突变表达的短肽通过 E2F1 鉴定; D: VP1-E MAb 表位突变表达的短肽通过 anti-His antibody

图 4.5 通过 Western blot 鉴定 VP1-B、VP1-E MAbs 突变的抗原表位

Fig 4.5 VP1-B、VP1-E MAbs the mutated epitopes by Western blot analysis

## 4.4 讨论

目前, 鉴定抗原表位的方法主要有噬菌体展示法、肽探针法以及合成重叠短肽用相应单克隆抗体的鉴定, 阳性片段即为单克隆抗体的抗原表位。VP1为FCV的衣壳蛋白, VP1-B位于125-397aa, 目前VP1-B的表位并无报道, VP1-E区大约在426-524aa之间, 含有FCV的中和抗原表位; E区被28个保守碱基(conE)分成5'端(99bp)和3'端(102bp)高变区(HRV), 有人认为FCV不同菌株的交叉反应性与其conE有关。Milton等通过制备单克隆抗体和构建重组质粒原核表达证实VP1在422-458aa存在中和性表位(Milton et al., 1992)。Shin等通过制备单克隆抗体和构建VP1的cDNA文库证实FCV有3个中和性表位为构象表位, 有4个为线性表位, 它们分别位于VP1的381-454的74aa之间(Shin et al., 1993)。Radford AD等通过制备单克隆抗体和表达VP1的随机文库证实在415-421aa、445-451aa、451-457aa和475-479aa存在B细胞线性表位 (Radford et al., 1999)。Tohya首次发现VP1含有7个中和表位, 同时有2个构象表位存在426-460aa, 4个线性表位存在490-520aa。Geisser等通过制备MAb和MVA/T7疫苗表达系统构建重组嵌合病毒免疫小鼠证实E区的5'高变区和C区存在中和性单克隆抗体的表位。

本研究进一步鉴定了制备的单克隆抗体的抗原表位, 将VP1-B进行截短原核表达、VP1-E进行截短表达及合成短肽, 最后通过Western blot和ELISA鉴定, 结果表明4G2、B1E5、B4G4、B4G5识别的抗原表位均为<sup>126</sup>DDGSITA<sup>132</sup>、E2F1和E2F6识别表位<sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup>, 本研究鉴定的这两个表位均为线性表位且这两个表位都是首次发现并未有报道。通过序列比对结果表明, 抗原表位<sup>125</sup>DDGSITA<sup>131</sup>不保守, 而抗原表位<sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup>相对保守。根据序列比对, 将突变表位的基因表达, 通过Western blot鉴定, 结果表明I129V突变后将失去反应能力, A132T突变后将失去反应能力; <sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup>的G471S突变后仍与VP1-E MAb发生反应。但这两个表位发生突变的毒株是否与本研究制备的单抗发生反应仍需要进一步去鉴定。本研究鉴定的表位可为了解VP1的抗原性变异和建立有效的FCV检测方法奠定基础。

## 第五章 全文结论

1. 本实验成功纯化了 FCV2280 病毒粒子和原核表达的 VP1-B、VP1-E 重组蛋白,且 VP1-B、VP1-E 重组蛋白和 FCV2280 具有良好的反应原性。
2. 本实验成功制备了 1 株针对 VP1-B MAb, 1 株针对 VP1-E 蛋 MAb, 这 2 株 MAbs 和 FCV2280、TIG-1、HRB-SS、F9 具有良好的反应性; 重链均为 IgG<sub>1</sub>, 轻链均为 Kappa 链; 中和试验表明无中和活性。
3. VP1-B MAb 识别的抗原表位为 <sup>126</sup>DDGSITA<sup>132</sup>, VP1-E MAb 识别抗原表位为 <sup>467</sup>YICGSLQRAWG<sup>477</sup>。

## 参考文献

1. 艾纯旭. 抗猫杯状病毒单克隆抗体的制备及双抗夹心ELISA检测方法的建立[D].吉林: 吉林大学, 2013.
2. 范泉水,夏咸柱, 邱薇等. 老虎感染猫传染性鼻-结膜炎病毒的研究[J]. 中国病毒学,2000, 15: 373-378.
3. 高玉伟,夏咸柱,扈荣良等. 猎豹与虎猫杯状病毒的分离及其超变区基因比较研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25: 179-182.
4. 姜雪,高玉伟,胡桂学,等. 猫杯状病毒荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 吉林大学学报(理学版), 2013, 51(5): 973-977.
5. 蒋艳妹. 猫杯状病毒VP1抗原性分析及间接ELISA诊断方法的建立[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
6. 刘秋艳. 基于ORF2基因表达产物的猫杯状病毒间接ELISA方法的建立及其初步应用[D].吉林: 吉林农业大学, 2015.
7. 刘秋艳, 应瑛, 王一鸣等. 豹源猫杯状病毒ORF2基因的扩增、克隆及原核表达[J]. 现代畜牧兽医, 2015,1-4.
8. 刘晔, 冯誉龄, 张守峰等. 猫杯状病毒自然弱毒株的分离鉴定及对猫的免疫试验[J]. 中国兽医学报, 2009, 29: 426-429.
9. 王翀, 刘大飞, 刘春国等. 同时检测猫细小病毒、杯状病毒、疱疹病毒1型多重PCR方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36:31-33.
10. 谢守玉, 张健骅, 吴健敏等. 猫杯状病毒分子生物学特征及研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18:79-83.
11. Abdeldaim M M, Wilkes R P, Thomas K V, et al. Development and validation of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection of feline calicivirus[J]. Archives of Virology, 2009, 154(4):555-560.
12. Aboubakr HA., El-Banna AA., Youssef MM., et al., Antiviral Effects of Lactococcus lactis on Feline Calicivirus, A Human Norovirus Surrogate[J]. Food & Environmental Virology, 2014, 6:282-289.
13. Addie DD., Kennedy LJ., Ryvar R. et al., Feline leucocyte antigen class II polymorphism and susceptibility to feline infectious peritonitis[J]. Journal of Feline Medicine & Surgery, 2004, 6:59.
14. Almolawi N, Beardmore V A, Carter M J, et al. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein.[J]. Journal of General Virology, 2003, 84(5):1237.
- 15 Audonnet, J.C.F., Baudu, P.G.N., Brunet, S.C. Feline calicivirus genes and Vaccines in particular recombinant Vaccines (US)[P],2015.
16. Ballin A C, Schulz B, Helps C, et al. Limited efficacy of topical recombinant feline interferon-omega for treatment of cats with acute upper respiratory viral disease[J]. Veterinary Journal, 2014, 202(3):466-470.

17. Battilani M, Vaccari F, Carelle M S, et al. Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: a case description.[J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(1):283-90.
18. Carter M.J., Routledge E.G., Toms G.L., Monoclonal antibodies to feline calicivirus [J]. *Journal of General Virology*, 1989, 70 (8): 2197-2200.
19. Coutts, A.J., Dawson, S., Willoughby, K., et al., Isolation of feline respiratory viruses from clinically healthy cats at UK cat shows [J]. *Research in Veterinary Science*, 1994, 135:555-556.
20. Coyne, K.P., Dawson, S., Radford, A.D., et al., Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 118: 12-25.
21. Coyne, K.P., Reed, F.C., Porter, C.J., et al., Recombination of Feline calicivirus within an endemically infected cat colony [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87:921-926.
22. Coyne K.P., Jones B.R., Kipar A., et al., Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats [J]. *Research in Veterinary Science*, 2006a, 158:544-550.
23. Dawson, S., Mcardle, F., Bennett, D., et al., Investigation of Vaccine reactions and breakdowns after feline calicivirus vaccination [J]. *Research in Veterinary Science*, 1993, 132:346.
24. Dawson, S., Willoughby, K., Gaskell, R.M., et al. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens [J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2001, 3:17.
25. Earl L D, Mcallister T C, Jack N T, et al. Methods of Vaccine administration, new feline caliciviruses, and treatments for immunizing animals against feline paraovirus and feline herpes virus[J]. 2013.
26. Friedl Y., Schulz B., Knebl A., et al., Efficacy of passively transferred antibodies in cats with acute viral upper respiratory tract infection[J]. *Veterinary Journal*, 2014, 201: 316-321.
27. Gandon, S., Mackinnon, M.J., Nee, S., et al. Imperfect Vaccines and the evolution of pathogen virulence [J]. *Nature*, 2001, 414: 751-756.
28. Geissler K, Schneider K, Platzer G, et al. Genetic and antigenic heterogeneity among feline calicivirus isolates from distinct disease manifestations[J]. *Virus Research*, 1997, 48(2):193-206.
29. Geissler K., Schneider K., TRUYEN U., Mapping Neutralizing and Non-Neutralizing Epitopes on the Capsid Protein of Feline Calicivirus [J]. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases & Veterinary Public Health*, 2002a, 49:55-60.
30. Geissler K., Schneider K., Truyen U., Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes on the capsid protein of feline calicivirus [J]. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases & Veterinary Public Health*, 2002b, 49: 55-60.
31. Glenn, M., Radford, A.D., Turner, P.C., et al., Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCV[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 67:175-193.
32. Harrison T.M., Harrison S.H., Sikarskie J.G., et al., Humoral response to calicivirus in captive tigers given a dual-strain vaccine [J]. *J Zoo Wildl Med*, 2014, 45:23-28.

33. Hoover EA., Kahn DE., Experimentally induced feline calicivirus infection: clinical signs and lesions [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1975, 166:463-468.
34. Hou, J., Sánchezvizca ño, F., Mcgahie, D., et al. European molecular epidemiology and strain diversity of feline calicivirus [J]. *Research in Veterinary Science*, 2016, 178:114.
35. Horzinek, M.C., Addie, D., Bel ák, S., et al. ABCD: Update of the 2009 guidelines on prevention and management of feline infectious diseases [J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2013, 15:530-539.
36. Huang C, Hess J. Hemorrhagic feline calicivirus, calicivirus Vaccine and method for preventing development of calicivirus disease: US, US8685412 [P], 2014.
37. Hurley KE., Pesavento PA., Pedersen NC., et al., An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease[J].*Journal of the American Veterinary Medical Association*,2004,224:241-249.
38. Johnson R P, Povey R C. Transfer and decline of maternal antibody to feline calicivirus [J]. *Canadian Veterinary Journal La Revue V é érinaire Canadienne*, 1983, 24(1):6.
39. Johnson R P. Antigenic change in feline calicivirus during persistent infection [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research-revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 1992, 56(4):326-330.
40. Kreutz, L.C., Johnson, R.P., Seal, B.S., Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection of cats [J]. *Veterinary Microbiology*, 1998, 59:229-236.
41. Lappin, M.R., Sebring, R.W., Porter, M., et al., Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia Vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1[J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2006, 8:158-163.
42. Lu Z, Ledgerwood ED, Hinchman MM, et al. Conserved surface residues on the feline calicivirus (FCV) capsid are essential for interaction with its receptor feline junctional adhesion molecule A (fJAM-A)[J]. *Journal of Virology*, 2018:JVI.00035-18.
43. Martino BD., Rocco CD., Ceci C., et al., Characterization of a strain of feline calicivirus isolated from a dog faecal sample [J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 139:52-57.
44. Masubuchi K, Wakatsuki A, Iwamoto K, et al. Immunological and genetic characterization of feline caliciviruses used in the development of a new trivalent inactivated vaccine in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72(9):1189.
45. McCabe, V.J., Spibey, N., Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 5380-5388.
46. McCabe, V.J., Tarpey, I., Spibey, N., Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein [J]. *Vaccine*, 2002, 20:2454.
47. McDonagh P., Sheehy PA., Fawcett A., et al., In vitro inhibition of field isolates of feline calicivirus with short interfering RNAs (siRNAs) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015a, 177:78-86.
48. McDonagh P., Sheehy PA., Fawcett, A., et al. Antiviral effect of mefloquine on feline calicivirus in vitro [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015b, 176:370-377.

49. Milton, I.D., Turner, J., Teelan, A., et al. Location of monoclonal antibody binding sites in the capsid protein of feline calicivirus [J]. *Journal of General Virology*, 1992, 73 (9): 2435-2439.
50. Neill J D, Sosnovtsev S V, Green K Y. Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus [J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(3):1079-84.
51. Nelson P N, Reynolds G M, Waldron E E, et al. Monoclonal antibodies.[J]. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 1987, 21(3):232.
52. Orr, C.M., Gaskell, C.J., Gaskell, R.M., Interaction of a combined feline viral rhinotracheitis-feline calicivirus Vaccine and the FVR carrier state [J]. *Research in Veterinary Science*, 1978, 103:200.
53. Povey C, Ingersoll J. Cross-protection among feline caliciviruses [J]. *Infection & Immunity*, 1975, 11(5):877-885.
54. Pedersen, N.C., Elliott, J.B., Glasgow, A., et al. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000a, 73:281.
55. Pedersen, N.C., Elliott, J.B., Glasgow, A., et al. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000b, 73:281.
56. Poulet H, Brunet S, Leroy V, et al. Immunisation with a combination of two complementary feline calicivirus strains induces a broad cross-protection against heterologous challenges [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 106(1-2):17.
57. Radford, A.D., Bennett, M., Mcardle, F., et al. The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and Vaccine failures [J]. *Vaccine*, 1997a, 15:1451-1458.
58. Radford, A.D., Bennett, M., Mcardle, F., et al. The use of sequence analysis of a feline calicivirus (FCV) hypervariable region in the epidemiological investigation of FCV related disease and Vaccine failures [J]. *Vaccine*, 1997b, 15:1451-1458.
59. Radford, A.D., Coyne, K.P., Dawson, S., et al. Feline calicivirus [J]. *VET RES*, 2007, 38: 319-335.
60. Radford, A.D., Dawson, S., Coyne, K.P., et al. The challenge for the next generation of feline calicivirus Vaccines [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 117: 14-18.
61. Radford A D, Willoughby K, Dawson S, et al. The Capsid Gene of Feline Calicivirus Contains Linear B-Cell Epitopes in both Variable and Conserved Regions [J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(10):8496.
62. Radford, A.D., Addie, D., Belák, S., et al. Feline calicivirus infection. ABCD: guidelines on prevention and management [J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2009, 11:556-564.
63. Reubel G H, Hoffmann D E, Pedersen N C. Acute and chronic faucitis of domestic cats. A feline calicivirus-induced disease[J]. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 1992, 22(6):1347.
64. Rong, S., Lowery, D., Floyd-Hawkins, K., et al. Characterization of an avirulent FCV strain with a

- broad serum cross-neutralization profile and protection against challenge of a highly virulent vs feline calicivirus[J]. *Virus Research*, 2014, 188: 60-67
65. Schulz B S, Hartmann K, Unterer S, et al. Two outbreaks of virulent systemic feline calicivirus infection in cats in German[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2011, 124(5-6):186-193.
66. Schneider K, Truyen U. Antigenic variation among feline caliciviruses [J]. *Revue De Medecine Veterinaire*, 1998, 149(11):1007-1011.
67. Schorr-Evans, E.M., Poland, A., Johnson, W.E., et al. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England [J]. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 2003, 5: 217.
68. Seal, B.S., Analysis of capsid protein gene variation among divergent isolates of feline calicivirus [J]. *Virus Research*, 1994, 33:39.
69. Seal B S, Neill J D. Capsid protein gene sequence of feline calicivirus isolates 255 and LLK: Further evidence for capsid protein configuration among feline caliciviruses [J]. *Virus Genes*, 1995, 9(2):183-187.
70. Seal, B.S., Ridpath, J.F., Mengeling, W.L., Analysis of feline calicivirus capsid protein genes: identification of variable antigenic determinant regions of the protein [J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74 (11):2519-2524.
71. Shin, Y.S., Tohya, Y., Oshikamo, R., et al. Antigenic analysis of feline calicivirus capsid precursor protein and its deleted polypeptides produced in a mammalian cDNA expression system [J]. *Virus Research*, 1993, 30: 17-26.
72. Sommerville L M, Radford A D, Glenn M, et al. DNA vaccination against feline calicivirus infection using a plasmid encoding the mature capsid protein.[J]. *Vaccine*, 2002, 20(13-14):1787.
73. Taira O, Suzuki M, Takeuchi Y, et al. Expression of feline interferon-alpha subtypes in *Escherichia coli*, and their antiviral activity and animal species specificity[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2005, 67(5):543-545.
74. Tajima T, Yoshizaki S, Nakata E, et al. Production of a monoclonal antibody reacted broadly with feline calicivirus field isolates [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60(2):155.
75. Tian, J., Liu, D., Liu, Y., et al. Molecular characterization of a feline calicivirus isolated from tiger and its pathogenesis in cats [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 192, 110-117.
76. Tohya, Y., Masuoka, K., Takahashi, E., et al. Neutralizing epitopes of feline calicivirus [J]. *Archives of Virology*, 1991a, 117:173-181.
77. Tohya, Y., Masuoka, K., Takahashi, E., et al. Neutralizing epitopes of feline calicivirus [J]. *Archives of Virology*, 1991b, 117:173-181.
78. Tohya, Y., Yokoyama, N., Maeda, K., et al. Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus [J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78 (2): 303-305.
79. Umehashi M, Imamura T, Akiyama S, et al. Post-exposure treatment of cats with mouse-cat chimeric antibodies against feline herpesvirus type 1 and feline calicivirus[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2002, 64(11):1017.

80. Umehashi M, Imamura T, Akiyama S, et al. Pre-exposure treatment of cats with anti-FHV-1 and anti-FCV mouse-cat chimeric antibodies[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2003, 65(5):563.
81. Vuuren M V, Geissler K, Gerber D, et al. Characterisation of a potentially abortigenic strain of feline calicivirus isolated from a domestic cat [J]. *Veterinary Record*, 1999, 144(23):636.
82. Wardley R C, Gaskell R M, Povey R C. Feline respiratory viruses-their prevalence in clinically healthy cats [J]. *Journal of Small Animal Practice*, 1974, 15(9):579-586.

## 致 谢

仿佛昨天我还坐在河南农业大学的图书馆里，仿佛我刚来哈尔滨不久，但是马上我就要毕业了。三年的硕士生涯给了我很多很多收获和成长。在这里我不仅收获了丰厚的专业知识，更结识了一众良师益友，是你们，陪伴、帮助我度过了这艰难又幸福的求学生涯。就像歌曲里唱的一样，遇到你们，我很幸运。

首先，特别感谢我的导师曲连东研究员。在学业上，曲老师帮我选定课题，一直关注我的实验进度，及时地给予指导。没有您，我不敢想象自己可以完成这篇硕士论文。曲老师，我想很真诚地对您说，谢谢您，老师！在生活上，曲老师是一位特别有亲和力的导师，有时候感觉您就像我的父亲一样关心我。

非常感谢我的指导老师刘家森副研究员。这三年里，我和刘老师相处时间其实是蛮久的。学生有时候会反驳您，但您从来都是一副和善的模样。感谢您包容我的坏脾气，也非常感谢您对我的毕业论文的知道。生活中的点点滴滴，学生都将铭记。

还有，我要特别感谢胡晓亮师兄、刘永相师兄、刘晓晓师妹在实验中给予的指导和帮助。我会永远记得三年的实验室里我们的打打闹闹、哄哄笑笑。

分别让人无比感伤，也让我想起了所有给予我帮助的人们。借此良机，我想向哈尔滨兽医研究所自然疫源性人兽共患病创新团队的田进老师、郭东春老师、姜骞老师、李志杰老师、刘大飞老师、吴红霞师姐、杨鸣发师兄、刘明老师给我的帮助给予感谢。而且，我要特别感谢田进老师和吴红霞师姐在课题思路和实施上给予的启发和帮助。

感谢师兄张继凯博士、贾文亮硕士、祖少坡硕士、师姐曹培丽博士、陈思博士、蒋艳妹硕士、焦美会硕士、孙雪硕士、同窗许腾林硕士、薛雨佳硕士、邢桂玲硕士、师妹赵爽硕士、黄佳培硕士等的帮助。希望以后的岁月里，我们能继续互帮互助，一起奋斗。

特别感谢徐海峰在学习、生活和实验上给予的照顾支持和帮助。虽然三年来，争吵也不少，但我还是要感谢你的一路陪伴！

“能陪我走一程的人有多少，愿意走完一生的更是寥寥。”、“幸福来得好不容易，才会让人更加珍惜。”感谢中国农业科学院15级12班班主任和全班同学，谢谢大家的陪伴！

我还要感谢支持我读研的父母和弟弟，我爱你们！

最后，我要向百忙之中参与审阅、评议本论文各位老师、向参与本人论文答辩的各位老师表示由衷的感谢！

想说的话有很多，汇成一句话，感谢你们。希望以后的岁月里，我们都能幸福！

## 作者简介

程晨曦，女，1990年4月，汉族，河南开封人。2011-2015年就读于河南农业大学牧医工程学院药物制剂专业，获得医学学士学位。2015年进入中国农业科学院攻读硕士学位，预防兽医专业，研究方向为兽医微生物学及分子生物学。课题为：猫杯状病毒病毒单克隆抗体的制备及抗原表位鉴定。在课题完成期间荣获“中期考核优秀奖”。

发表文章：

1:程晨曦，刘家森，胡晓亮，等.猫杯状病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原表位的鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2017,12:1017-1021。

待发表文章

2: Identification of a Novel Feline Calicivirus VP1 Protein B-Cell Epitope (Under Preparation)