

于雯, 孙慧敏, 方晨捷, 等. 猫杯状病毒反向遗传系统的建立及弱毒株的构建 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 107-112.

YU W, SUN H M, FANG C J, et al. Construction and application of reverse genetic system for feline calicivirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 107-112.

## 猫杯状病毒反向遗传系统的建立及弱毒株的构建

于雯<sup>1</sup>, 孙慧敏<sup>2</sup>, 方晨捷<sup>2</sup>, 宋家升<sup>2\*</sup>, 鲍恩东<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 浙江迪福润丝生物科技有限公司, 浙江 杭州 310000)

**摘要:** 为了构建猫杯状病毒 (FCV) 弱毒疫苗候选株, 从杭州流行的 FCV 毒株 FCV-HZ-DF-19 中提取基因组 RNA, 利用 RT-PCR 技术分 3 段扩增获得 FCV 全基因组, 通过同源重组的方法将全长基因组克隆至已插入榔头状核酶 (HamRz) 和丁型肝炎核酶 (HdvRz) 的 PCI 载体, 获得中间质粒 pPCI-FCV; 以 pPCI-FCV 为模板扩增获得含 HamRz、HdvRz 和 FCV 全基因组的产物 FCV-H, 并将其连接到 BAC 载体中获得含有 FCV 全基因组的克隆 pBAC-FCV。将 pBAC-FCV 转染猫肾细胞 F81 连续传代后收获病毒。针对 FCV 毒力相关的 LC 基因进行缺失, 获得感染性克隆 pBAC-FCV-ΔLC, 通过转染表达 FCV-VP1 蛋白的猫肾细胞系进行病毒拯救。结果显示, 拯救毒株 rBAC-FCV 和 LC 基因缺失毒株 rBAC-FCV-ΔLC 均可产生细胞病变; 测序结果表明, 拯救毒株的基因序列与亲本毒株 FCV-HZ-DF-19 一致, 且生长曲线与亲本毒株相似, 而基因缺失毒株的生长则慢于亲本毒株, 产生的噬斑大小也明显小于亲本毒株, 表明缺失 LC 基因后病毒毒力下降。结论: 本研究成功构建了 FCV 的反向遗传系统及基因缺失弱毒株, 为后续弱毒疫苗研发和 FCV 生物学特性研究奠定了基础。

**关键词:** 猫杯状病毒; 反向遗传学技术; 同源重组; 基因缺失

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0107-06

## Construction and application of reverse genetic system for feline calicivirus

YU Wen<sup>1</sup>, SUN Huimin<sup>2</sup>, FANG Chenjie<sup>2</sup>, SONG Jiasheng<sup>2\*</sup>, BAO Endong<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Zhejiang Difference Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

**Abstract:** In order to construct a candidate strain for attenuated feline calicivirus (FCV) vaccine, genomic RNA was extracted from the prevalent FCV strain FCV-HZ-DF-19 in Hangzhou. The entire FCV genome was amplified in three segments using RT-PCR technology. The full-length genome was cloned into a PCI vector containing hammerhead ribozyme (HamRz) and hepatitis D ribozyme (HdvRz) through homologous recombination, and the intermediate plasmid pPCI-FCV was obtained. Using pPCI-FCV as a template, the product FCV-H containing the entire genome of HamRz, HdvRz, and FCV was amplified, and connected to a BAC vector to obtain a cloned pBAC-FCV containing the entire genome of FCV. Then, pBAC-FCV was transfected into cat kidney cell F81 for continuous passage in order to harvest the virus. Deletion of LC genes related to FCV virulence, acquisition of infectious clone pBAC-FCV-ΔLC, and virus rescue were performed by transfecting cat kidney cell lines expressing the FCV-VP1 protein. The results showed that the rescued strain rBAC-FCV and the LC gene deficient strain rBAC-FCV-ΔLC could both cause cellular lesions. The sequencing results showed that the gene sequence of the rescued strain was indeed consistent with the parent strain FCV-HZ-DF-19, and its growth curve was similar to that of the parent strain. However, the growth of the gene deficient strain was slower than that of the parent strain, and the size of the generated plaque was significantly smaller than that of the parent strain, which indicated a decrease in virus virulence after the LC gene was deleted. The above results suggested that the reverse genetic system of FCV was successfully constructed in this study, and a gene deficient attenuated strain was constructed; which laid the foundation for the development of attenuated vaccines and the study of the biological characteristics of FCV in the future.

**Keywords:** FCV; reverse genetics technology; homologous recombination; gene deletion

收稿日期: 2023-09-11; 修回日期: 2024-03-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (22) 2016]; 南京农业大学校企合作项目 (技术服务类)

第一作者: 于雯, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 鲍恩东, 教授, 博导, 研究方向为免疫病理及新兽药研发, E-mail: b\_endong@njau.edu.cn.

猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 属于杯状病毒科、水疱疹病毒属的成员<sup>[1]</sup>, 几乎可感染所有的猫科动物, 感染后所表现的临床症状主要为口腔溃疡、结膜炎和肺炎等<sup>[2-3]</sup>。FCV 感染后的发病率很高, 但死亡率较低。不过, 最近报道出现了可引起全身性症状的强毒株<sup>[3]</sup>, 感染 FCV 强毒株后可导致出现全身性炎症反应、高热、弥散性血管内凝血和高死亡率<sup>[4-5]</sup>。

FCV 为单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约为 7.7 kb, 5' 端与病毒组连接蛋白 (VPg) 相连, 3' 端多聚腺苷酸化<sup>[6-7]</sup>。基因组有 3 个开放阅读框 (ORF), 分别为 ORF1、ORF2 和 ORF3, 其中 ORF1 编码主要的结构蛋白<sup>[8]</sup>; ORF2 编码衣壳蛋白, 经过水解后形成成熟的衣壳蛋白 (VP1) 和衣壳蛋白前体 (LC), LC 与病毒毒力相关<sup>[9-11]</sup>; ORF3 编码 FCV 所特有的 VP2 蛋白, VP2 蛋白与病毒的包装和成熟相关<sup>[12]</sup>。

目前 FCV 感染的预防主要依靠疫苗接种, 由于 FCV 作为 RNA 病毒, 其遗传进化速率较高, 仅靠单一的疫苗株很难对 FCV 产生全面而有效的保护, 此外感染 FCV 并康复后的动物也会持续带毒、排毒<sup>[13]</sup>, 这也给 FCV 感染的防控增加了难度, 因此有必要探索更为有效的疫苗产品以保护猫科动物的健康<sup>[14]</sup>。本研究利用反向遗传技术, 将 FCV 全基因组序列同源重组至 PCI 和 BAC 载体中, 构建 pPCI-FCV 和 pBAC-FCV 质粒, 转染 F81 细胞后拯救出病毒 rPCI-FCV 和 rBAC-FCV, 之后在 pBAC-FCV 的基础上对部分 LC 基因进行缺失, 并在 F81-VP1 细胞上获得 LC 基因缺失毒 rBAC-FCV- $\Delta$ LC, 观察分析该毒株的体外生长特性, 为进一步研究 FCV 的组织特异性、致病机制、基因组功能以及新型疫苗的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用细胞及试剂

FCV 杭州流行株 (FCV-HZ-DF-19), 猫肾细胞 (F81、F81-VP1 细胞), 载体质粒 PCI 和细菌人工染色体 (BAC), 均由浙江迪福润丝生物科技有限公司提供; Uniclone One Step Seamless Cloning Kit 重组酶、Efficom Stbl3 Chemically Competent Cell 感受态细胞, 购自金沙生物; PrimeSTAR HS 高保真 PCR 酶、2× Rapid Taq Master Mix、DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker、HiScript II One Step RT-PCR Kit, 均购自诺唯赞生物科技有限公司; 2×T8 High-Fidelity Master Mix 购自擎科生物科技股份有限公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公

司; Plassmid Maxi Kit 试剂盒购自 Qiagen; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; 核酸提取试剂盒 E. Z. N. A Viral RNA Kit 购自广州飞扬生物工程有限公司; 草酸铵结晶紫染色液购自上海麦克林生化科技有限公司; 4% 多聚甲醛固定液购自 Phygene Scientific。

### 1.2 引物设计与合成

参考 GenBank 中登录的 FCV 基因序列设计引物, 引物由擎科生物科技股份有限公司进行合成, 引物信息如表 1 所示。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
FCV-HZ-DF-19-F1	GTAAAAGAAATTGGAGACAATG
FCV-PD1-1-R	CGGCTCCACGCTTTGCAAGGCAG
FCV-PD1-2-F	CAAAGCGTGGAGCCGAGTGTG
FCV-PD1-2-R	GTGGTGTACGCCCTTTGGTTCCAC
FCV-PD2-F	AAAGGCCTACACCACAACATCTG
FCV-PD2-R	CCCTGGGTTAGCGCTAAAAGCC
PD-Ham-HDV-F	TGTTAAGCGTCTGATGAGTCCGTG
PD-Ham-HDV-R	TCATGTCTGCTGCCAAAAACCCCTCAAG
ZT-PCI-GZ-F	GGCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-TTTG
ZT-PCI-GZ-R	ATCAGACGCTTAACACCTATAGTGAGTCGTATT-AATTTCC
ZT-YJ-F	CGCCTAACCCAGGGGGTGGCATGGCATCTCC
ZT-YJ-R	TCCAATTTCTTTTACGACTATAGGAATTCCTTTC-CTATAG
ZT-BAC-F	GGCCGGCATGCTCCAGCCTCCTCG
ZT-BAC-R	CCCTATAGTGAGTCTGATTAATG
ZT- $\Delta$ LC-F	CGAAGTTTGAGCATGGCTGATGATGGCTCCATC-ACCAC
ZT- $\Delta$ LC-R	CATGCTCAAACCTCGAACACATCACAG
FCV-F1-R	TCAGCCATAACCAGCAAACCTG
FCV-F2-F	GTCTACTCAGTCTCACCCCTG
FCV-F2-R	CACCGGCTTCTATGACAAAATTG
FCV-F2-R	TCATAGAAGCCGGTGATAATTG
FCV-F3-F	CACCGGCTTCTATGACAAAATTG
FCV-F3-R	CAGGGGGTCTGTTAGGATG
FCV-F4-F	CCTGATGTCTACACTGGATG
FCV-F4-R	CGGCTCCACGCTTTGCAAGGCAG
YZ-LC-F	ATGCAAGTCAACATGCTGTG
YZ-LC-R	ATGCTCAAGGTAGGGGTTGAG

### 1.3 FCV 全基因组感染性克隆的构建

提取毒株 FCV-HZ-DF-19 的 RNA, 用引物

FCV-HZ-DF-F19-F1/FCV-PD1-1-R、FCV-PD1-2-F/FCV-PD1-2-R和FCV-PD2-F/FCV-PD2-R进行RT-PCR扩增,获得产物PD1-1、PD1-2和PD2。用引物PD-Ham-HDV-F/PD-Ham-HDV-R扩增含有HamRz和HdvRz片段的合成基因获得产物PD3,利用引物ZT-PCI-GZ-F/ZT-PCI-GZ-R扩增PCI载体,将产物PD3同源重组至载体PCI载体中,获得改造后的载体并将其命名为PCI'。

用引物ZT-YJ-F/ZT-YJ-R扩增载体PCI',将产物PD1-1、PD1-2和PD2同源重组至PCI'载体中,3个产物插入的位置在片段HamRz和HdvRz中间,获得中间质粒pPCI'-FCV。以pPCI'-FCV为模板,引物BAC-FCV-F/BAC-FCV-R进行PCR扩增获得产物FCV-H,FCV-H片段包含FCV全长基因组、HamRz和HdvRz片段,用引物ZT-BAC-FCV-F/ZT-BAC-FCV-R,扩增BAC载体使其线性化,用同源重组的方法将FCV-H和BAC载体进行连接,获得含有FCV全基因组感染性克隆质粒pBAC-FCV,引物序列详见表1。

#### 1.4 FCV毒力基因的敲除

选择与病毒毒力相关的LC基因进行缺失,以pBAC-FCV为模板,用引物ZT- $\Delta$ LC-F/ZT- $\Delta$ LC-R进行线性化扩增,上下游引物分别在缺失基因的两端,获得产物FCV- $\Delta$ LC,将线性化的FCV- $\Delta$ LC进行连接,得到LC基因缺失质粒pBAC-FCV- $\Delta$ LC。

#### 1.5 病毒拯救

按照Invitrogen Lipofectamine 2000转染试剂说明,将4  $\mu$ g pBAC-FCV转染到生长密度约为80%的F81细胞上,pBAC-FCV- $\Delta$ LC质粒则分别转染到F81和F81-VP1细胞中,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>环境中培养,之后进行细胞传代(每2 d传代1次),传代培养过程中随时利用显微镜观察有无细胞病变(CPE),当出现CPE时收获病毒。

#### 1.6 拯救病毒的鉴定

提取收获的病毒RNA,用表1中的引物FCV-HZ-DF-19-F1/FCV-F1-R、FCV-F2-F/FCV-F2-R、FCV-F3-F/FCV-F3-R和FCV-F4-F/FCV-F4-R对F81细胞上拯救出的rBAC-FCV进行RT-PCR扩增,验证是否拯救出含有FCV全基因组的病毒,引物YZ-LC-F/YZ-LC-R对基因缺失毒pBAC-FCV- $\Delta$ LC进行RT-PCR扩增以此验证病毒的LC段基因是否缺失,将RT-PCR产物送金唯智生物科技有限公司进行测序。

#### 1.7 FCV重组毒的生物学特性分析

##### 1.7.1 缺失毒与亲本毒生长动力学比较

将亲本毒和拯救病毒按照感染复数(MOI)为

0.01感染生长密度约为80%的F81细胞,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>环境中培养,分别在感染后24、48、72和96 h收获病毒,每个时间点重复测定3次,以病毒的感染时间为横坐标、病毒不同时间点组织半数感染量(TCID<sub>50</sub>)的数值为纵坐标,用GraphPad Prism软件绘制病毒生长曲线。

##### 1.7.2 缺失毒的传代稳定性验证

将缺失毒接种到生长良好的F81细胞上,48 h后观察细胞病变,当细胞出现完全病变后收获病毒并接种到新的F81细胞上。连续传代5次之后提取病毒RNA并用引物YZ-LC-F/YZ-LC-R进行RT-PCR验证。

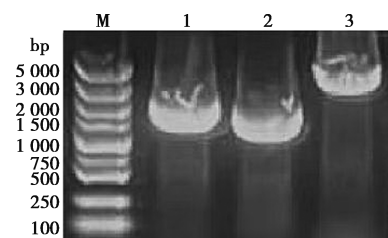
##### 1.7.3 缺失毒的噬斑染色试验

在铺有F81细胞的6孔细胞培养板中按照500 TCID<sub>50</sub>/mL的剂量分别接种亲本毒FCV-HZ-DF-19、拯救病毒rBAC-FCV和基因缺失病毒rBAC-FCV- $\Delta$ LC。5 h后弃去培养液并加入1.5 mL 1%低熔点琼脂糖,待琼脂糖冷却凝固后置于5% CO<sub>2</sub>环境中培养。之后每24 h在显微镜下观察噬斑大小,待其噬斑大小不再变化后,向接种病毒的孔中加入1 mL多聚甲醛进行固定,静置30 min后吸出,再加入1 mL草酸铵结晶紫染色液,静置20 min后小心去掉琼脂糖凝胶块,用水清洗至噬斑清晰后比较两种病毒噬斑的大小。

## 2 结果

### 2.1 FCV全基因组感染性克隆的构建

以pBAC-FCV质粒为模板,使用引物FCV-HZ-DF-19-F1/FCV-PD1-1-R、FCV-PD1-2-F/FCV-PD1-2-R和FCV-PD3-F/FCV-PD3-R进行PCR验证,分别获得1 925、1 630和4 162 bp大小条带,与预期结果相符。测序结果也显示与亲本毒株的基因序列一致,成功构建出包含有FCV全基因组的感染性单克隆pBAC-FCV(图1)。



M. DL5000 DNA Marker; 1. 引物对FCV-HZ-DF-19-F1/FCV-PD1-1-R的PCR产物; 2. 引物对FCV-PD1-2-F/FCV-PD1-2-R的PCR产物; 3. 引物对FCV-PD3-F/FCV-PD3-R的PCR产物。

图1 质粒pBAC-FCV的PCR验证

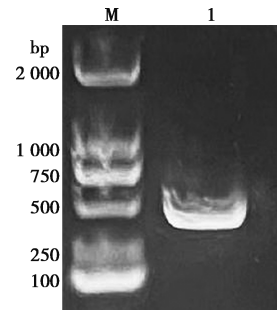
### 2.2 FCV 毒力基因的敲除

以 pBAC-FCV-ΔLC 质粒为模板, 用引物对 YZ-LC-F/YZ-LC-R 进行 PCR 验证, 获得与预期 451 bp 大小一致的条带, 测序结果也显示 LC 部分基因已经缺失, 成功构建出 FCV 的 LC 基因缺失的感染性克隆 pBAC-FCV-ΔLC (图 2)。

### 2.3 病毒的拯救

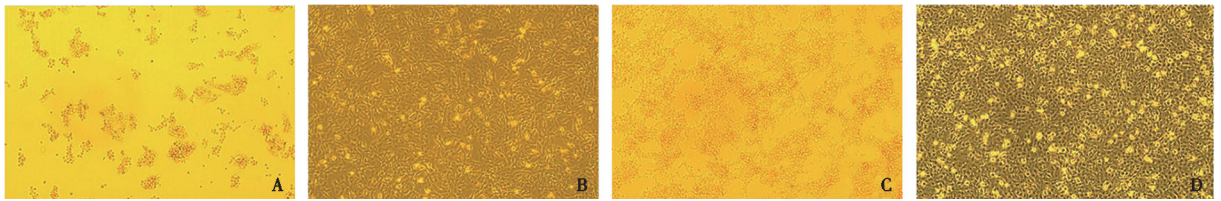
将构建的质粒 pBAC-FCV 转染 F81 细胞, 经传代后产生明显的 CPE, 主要表现为细胞脱落, 细胞变圆核固缩, 聚集成葡萄串状; 基因缺失的质粒 pBAC-FCV-ΔLC 同时转染 F81 和 F81-VP1 细胞系后, 连续传代, 转染至 F81-VP1 细胞系的细胞可观察到 CPE, 转染至 F81 连续传代 7 次后仍未观察到

CPE, 对照组均未产生 CPE (图 3)。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 引物对 YZ-LC-F/YZ-LC-R 的 PCR 产物。

图 2 质粒 pBAC-FCV-ΔLC 的 PCR 验证



A. pBAC-FCV 转染细胞; B. 正常 F81 细胞; C. pBAC-FCV-ΔLC 转染细胞; D. 正常 F81-VP1 细胞。

图 3 拯救病毒的细胞病变

### 2.4 拯救病毒的验证

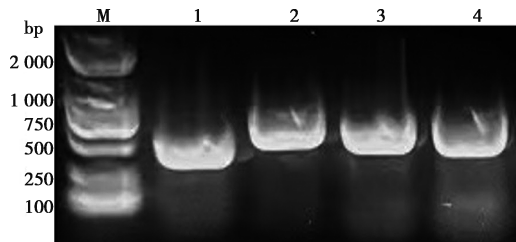
提取 rBAC-FCV 的 RNA 进行 RT-PCR 验证, rBAC-FCV 扩增后获得 435、581、547 和 549 bp 的条带, 与预期大小一致, 且 RT-PCR 产物的测序结果与亲本毒株序列一致, 成功拯救出含有 FCV 全基因组的病毒 rBAC-FCV。

### 2.5 病毒的生物学特性分析

#### 2.5.1 生长动力学比较

亲本毒 FCV-HZ-DF-19、拯救毒 rBAC-FCV 和

基因缺失毒 rBAC-FCV-ΔLC 在 F81 细胞中增殖特性如图 5 所示。不同时间点的病毒滴度生长曲线显示, 拯救出含有 FCV 全基因组的病毒 rBAC-FCV 的生长趋势与亲本毒株基本一致, 但病毒滴度比亲本病毒略低。基因缺失毒株 BAC-FCV-ΔLC 在培养的前 48 h 其生长较为缓慢, 亲本毒株、拯救毒和基因缺失毒的病毒滴度在培养至 72 h 之后趋于稳定。



M. DL2000 DNA Marker; 1. 引物对 FCV-HZ-DF-19-F1/FCV-F1-R 的 PCR 产物; 2. 引物对 FCV-F2-F/FCV-F2-R 的 PCR 产物; 3. 引物对 FCV-F3-F/FCV-F3-R; 4. 引物对 FCV-F4-F/FCV-F4-R 的 PCR 产物。

图 4 rBAC-FCV 的 RT-PCR 验证

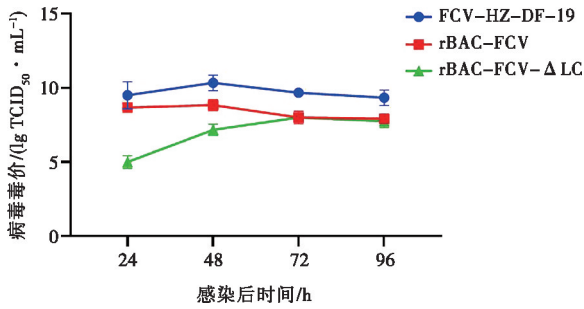


图5 FCV亲本毒株与拯救毒株生长动力学比较

### 2.5.2 缺失毒的传代稳定性验证

rBAC-FCV-ΔLC 缺失毒经连续传代, 提取每代病毒的 RNA 进行 RT-PCR 验证, 电泳结果显示获得与目标大小相符合的条带 (451 bp) (图 6), 测序结果也与预期一致, 说明本试验拯救出了相对稳定的 LC 基因缺失病毒。

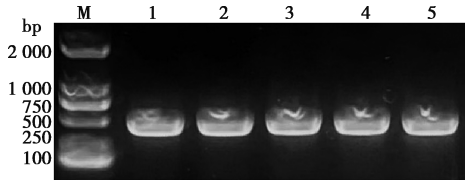


图6 rBAC-FCV-ΔLC 各代的 RT-PCR 验证  
M. DL2000 DNA Marker; 1. 第1代; 2. 第2代; 3. 第3代; 4. 第4代; 5. 第5代。

图6 rBAC-FCV-ΔLC 各代的 RT-PCR 验证

### 2.5.3 病毒的噬斑染色

将亲本毒株 FCV-HZ-DF-19、拯救毒 rBAC-FCV 和基因缺失毒 rBAC-FCV-ΔLC 进行噬斑染色, 结果显示 FCV-DF019 和 rBAC-FCV 产生的斑块大小基本相当, 但是基因缺失毒 rBAC-FCV-ΔLC 产生的噬斑大小明显小于亲本毒株和拯救毒株 (图 7), 表明 LC 基因的缺失影响了病毒的复制和侵袭。

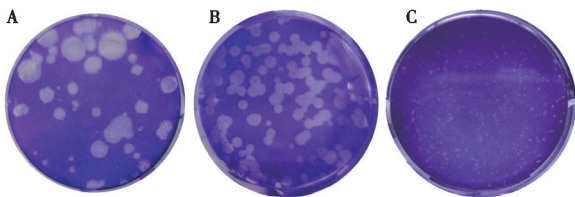


图7 亲本毒株与拯救毒株噬斑染色  
A. FCV-HZ-DF-19; B. rBAC-FCV; C. rBAC-FCV-ΔLC。

图7 亲本毒株与拯救毒株噬斑染色

## 3 讨论

目前, 疫苗接种仍是宠物猫主要传染性疾病预防

的核心策略, 疫苗多为灭活疫苗和减毒活疫苗, 多以联苗和多价苗的形式存在<sup>[15]</sup>, 这些疫苗毒株往往是通过大量筛选, 旨在得到具有更广泛交叉保护性的毒株<sup>[16]</sup>。然而, FCV 基因组序列具有高度的遗传变异性, 这就使得市场上的疫苗产品难以及时应对该病毒的变异。应用反向遗传学技术可以特定地对 FCV 的基因组进行突变、缺失或插入操作, 为开发具有更强免疫效果和安全性更高的新型 FCV 疫苗提供了可能。

本研究在拯救基因缺失毒 rBAC-FCV-ΔLC 的过程中, 在 F81 细胞上连续传代 7 次仍未观察到 CPE, 而在转染 F81-VP1 细胞上可以观察到 CPE, FCV-VP1 细胞系可以表达整个 ORF2 的基因序列, 证明在拯救 LC 基因缺失的病毒过程中, 通过细胞系反式补充可以协助拯救病毒, 拯救出的基因缺失毒 rBAC-FCV-ΔLC 感染 F81 细胞可观察到 CPE 的产生, 只是产生 CPE 的时间和程度均不及含有 FCV 全基因组的拯救毒和亲本毒, 说明即便形成具有侵袭力的病毒粒子, LC 的缺失也很大程度上影响了病毒的侵袭力和复制能力, 与报道的 LC 与产生细胞病变有关<sup>[17]</sup>相符合。FCV 作为无囊膜病毒需要借助细胞表面受体分子来完成病毒吸附和穿入, 病毒与受体发生相互作用的差异性会影响后续细胞信号的传导、内吞摄入和膜穿透等下游事件的发生。已有研究表明, 连接黏附分子 A (fJAM-A) 是 FCV 感染细胞所必备的, 而 VP1 表面的残基变化会影响病毒的组装和与 fJAM-A 的相互识别<sup>[18]</sup>, 推测 LC 序列的存在可能影响 VP1 残基的形态, 导致病毒侵袭力的变化。此外, LC 过度表达会对细胞产生毒性作用, 因此构建的细胞系表达整个 ORF2 序列, 可减轻对细胞的影响。即便如此 F81-VP1 细胞系在镜下观察也比普通 F81 细胞更为细长, 也更易产生死细胞。更有研究发现, LC 有利于同属杯状病毒科的诺如病毒在细胞中高效复制<sup>[19]</sup>。保留 LC 部分构建的嵌合兔出血热病毒可以在体外拯救<sup>[9]</sup>。进一步研究使用互补细胞系提供病毒复制和组装所需要的基因, 或利用 LC 协助其他杯状病毒科病毒在体外培养, 值得进一步探索。

## 参考文献:

- [1] OKA T, TAKAGI H, TOHYA Y. Development of a novel single step reverse genetics system for feline calicivirus [J]. J Virol Methods, 2014, 207: 178-181.
- [2] SPIRI A M. An update on feline calicivirus [J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2022, 164 (3): 225-241.
- [3] URBAN C, LUTTERMANN C. Major capsid protein synthesis from the genomic RNA of feline calicivirus [J]. J Virol, 2020, 94 (15): e00280-20.

- [4] HOWARD M J, COELEN R J, MACKENZIE J S. Detection of immobilised murray valley encephalitis virus RNA using oligonucleotide probes with varying degrees of mismatch [J]. J Virol Methods, 1991, 34 (3): 333-341.
- [5] RADFORD A D, DAWSON S, RYVAR R, et al. High genetic diversity of the immunodominant region of the feline calicivirus capsid gene in endemically infected cat colonies [J]. Virus Genes, 2003, 27 (2): 145-155.
- [6] RADFORD A D, COYNE K P, DAWSON S, et al. Feline calicivirus [J]. Vet Res, 2007, 38 (2): 319-335.
- [7] RONG S, LOWERY D, FLOYD-HAWKINS K, et al. Characterization of an avirulent FCV strain with a broad serum cross-neutralization profile and protection against challenge of a highly virulent vs feline calicivirus [J]. Virus Res, 2014, 188: 60-67.
- [8] MAO J, YE S, DENG J, et al. Feline calicivirus P39 inhibits innate immune responses by autophagic degradation of retinoic acid inducible gene I [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (6): 5254.
- [9] CHENG J, TANG A, CHEN J, et al. PseudoRHDV constructed with feline calicivirus genome as vector has the characteristics of well proliferation *in vitro* [J]. J Virol Methods, 2022, 307: 114572.
- [10] ABENTE E J, SOSNOVTSEV S V, SANDOVAL-JAIME C, et al. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect [J]. J Virol, 2013, 87 (6): 3003-3017.
- [11] PEÑAFLORES-TÉLLEZ Y, CHÁVEZ-MUNGUÍA B, LAGUNES-GUILLÉN A, et al. The feline calicivirus leader of the capsid protein has the functional characteristics of a viroporin [J]. Viruses, 2022, 14 (3): 635.
- [12] SOSNOVTSEV S V, BELLIO G, CHANG K O, et al. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions [J]. J Virol, 2005, 79 (7): 4012-4024.
- [13] 祖少坡, 田进, 吴红霞, 等. 猫杯状病毒 2280 株反向遗传系统的构建 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39 (1): 20-23.
- [14] 刘光清, 郭建宏, 刘在新, 等. 反向疫苗学及其应用前景 [J]. 中国生物制品学杂志, 2005 (2): 168-170.
- [15] 王一鸣. 5 株猫杯状病毒致病性及免疫原性的比较研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [16] YANG Y, LIU Z, CHEN M, et al. Classification of genotypes based on the VP1 gene of feline calicivirus and study of cross-protection between different genotypes [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1226877.
- [17] ABENTE E J, SOSNOVTSEV S V, SANDOVAL-JAIME C, et al. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect [J]. J Virol, 2013, 87 (6): 3003-3017.
- [18] LU Z, LEDGERWOOD E D, HINCHMAN M M, et al. Conserved surface residues on the feline calicivirus capsid are essential for interaction with its receptor feline junctional adhesion molecule A (fJAM-A) [J]. J Virol, 2018, 92 (8): e00035-18.
- [19] CHANG K O, GEORGE D W, PATTON J B, et al. Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of norwalk virus in cell culture [J]. J Virol, 2008, 82 (19): 9306-9317.