

姬晶晶, 王彬, 何昭群, 等. 猫杯状病毒 VP1 蛋白原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 87-94.

JI J J, WANG B, HE Z Q, et al. Prokaryotic expression of VP1 protein and establishment of an indirect ELISA detection method for feline calicivirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 87-94.

## 猫杯状病毒 VP1 蛋白原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

姬晶晶, 王彬, 何昭群, 李嘉豪, 单衍可\*, 刘斐\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 旨在建立一种灵敏、准确、高通量检测猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 抗体的间接 ELISA 方法。本研究通过优化表达条件, 在大肠杆菌中表达 FCV 的 VP1 蛋白, 对重组蛋白进行镍离子亲和层析纯化和透析复性, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 验证重组蛋白; 以重组 VP1 蛋白为包被抗原建立检测 FCV 抗体的间接 ELISA 方法, 通过方阵滴定法确定抗原最佳包被浓度和抗体最佳稀释度, 优化抗原包被条件、样品孵育时间、封闭液种类等条件, 并对其性能进行验证。结果: 表达的目的蛋白条带清晰、大小正确, 与 FCV 阳性血清具有良好的反应性, 建立的间接 ELISA 方法检测 6 份 FCV 阴性血清, 猫细小病毒 (feline parvovirus, FPV) 阳性血清, 猫疱疹病毒 (feline herpesvirus, FHV) 阳性血清均为阴性, 对 FCV 阳性血清的最低检出效价可达 1 : 10 240, 组间与组内变异系数均小于 10%, 与商品化试剂盒相比符合率达 100%。综上, 本研究建立的间接 ELISA 方法具有良好的灵敏度、重复性和符合率, 与其他猫常见病毒阳性血清不发生交叉反应, 可以用于临床样品的检测, 为 FCV 感染的诊断、防控、疫苗免疫效力评价提供了技术手段。

**关键词:** 猫杯状病毒 VP1 蛋白; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0087-08

## Prokaryotic expression of VP1 protein and establishment of an indirect ELISA detection method for feline calicivirus

Ji Jingjing, Wang Bin, He Zhaoqun, Li Jiahao, Shan Yanke\*, Liu Fei\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The aim of this study was to establish an indirect ELISA method for the detection of feline calicivirus (FCV) antibody with good specificity, high sensitivity and high throughput. In this study, the FCV-VP1 was expressed in *Escherichia coli* by optimizing the expression conditions. The recombinant protein was purified by nickel ion affinity chromatography and was refolded by dialysis. Then, the recombinant protein was verified by SDS-PAGE and Western blot. The recombinant VP1 protein was used as the coating antigen to establish an indirect ELISA method for detecting FCV antibody. Next, the optimal coating concentration of antigen and the optimal dilution of the antibody were determined using the square titration method. Finally, the conditions of antigen coating, sample incubation time and blocking solution were optimized, and its performance was verified. The results showed that the expressed target protein bands were clear and correct in size, and it possessed a good reaction with FCV positive serum. The established indirect ELISA method was used to detect six FCV negative serum samples, feline parvovirus (FPV) positive serum sample, feline herpesvirus type 1 (FHV-1) positive serum sample; and they were all negative. The minimum detection titer of FCV positive serum was 1 : 10 240, and the coefficient of variation between and within groups was less than 10%. Compared with the commercial kit, the coincidence rate was 100%. The present results indicated that the indirect ELISA method had good sensitivity, repeatability and coincidence rate, but it had no cross-reaction with other cat common virus positive serum samples. The method could be used for the detection of clinical samples, which provided a technical means for the diagnosis, prevention and control of FCV and the evaluation of vaccine immune efficacy.

**Keywords:** VP1 protein of feline calicivirus; prokaryotic expression; indirect ELISA

收稿日期: 2024-03-29; 修回日期: 2025-02-02

基金项目: 南京农业大学新进博士科研启动费项目 (804006)

第一作者: 姬晶晶, 女, 博士研究生

\* 通信作者: 单衍可, 博士, 助理研究员, 从事基于单分子技术的核酸代谢机制及快速检测技术研究, E-mail: shanyk26@njau.edu.cn; 刘斐, 博士, 教授, 从事病毒感染宿主机制及动物源食品安全快速现场检测技术研究, E-mail: feiliu24@njau.edu.cn。

猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 属于嵌杯病毒科, 是一种重要的高度传染性病原体, 广泛分布于猫体内<sup>[1]</sup>。FCV 感染主要是引起急性或慢性口腔溃疡和上呼吸道疾病 (upper respiratory tract disease, URTD), 较不常见的症状是猝死、跛行、流产、黄疸和严重肺炎<sup>[2]</sup>。猫、老虎、猎豹和其他野生猫科动物都很容易感, 主要感染 6~84 d 的幼猫, 强毒株致死率高达 40%~60%<sup>[3]</sup>。感染后恢复的猫可能会传播数月甚至数年的病毒, 这些无症状携带猫是 FCV 感染和疾病流行的主要原因<sup>[4]</sup>。近些年来, FCV 强毒变异株的流行甚至会在疫苗免疫过的猫, 使猫的死亡率不断增加<sup>[5-6]</sup>。FCV 基因组为长度约 7 700 bp 的单股正链 RNA, 包含 3 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)<sup>[3, 7]</sup>, ORF1 编码一种多蛋白, 在翻译后分裂成非结构蛋白<sup>[8]</sup>, ORF2 编码一个多蛋白, 后期被加工为衣壳的先导蛋白和主要衣壳蛋白 VP1, ORF3 编码次要结构蛋白 VP2<sup>[9]</sup>。VP1 是 FCV 主要结构蛋白, 可与宿主细胞受体相互作用, 调控病毒生长<sup>[10]</sup>。VP1 结构蛋白上含有多处抗原位点<sup>[11-12]</sup>, 是开发 FCV 诊断试剂盒、研发疫苗的主要对象。

近年来, 随着人们生活水平的提高, 宠物猫越来越多, 猫感染病毒的风险增大。感染 FCV 的猫尚无有效的治疗方案, 最有效的预防手段就是接种疫苗<sup>[1, 13]</sup>。FCV 具有单一血清型和基因型, 各种不同毒株都是该单一血清型的变异株, 疫苗株的选择也正是基于其广泛的交叉反应血清能力<sup>[14-16]</sup>。世界小动物兽医协会将 FCV 的免疫接种列为核心工作<sup>[17-18]</sup>。血清学方法不仅可以评价疫苗的免疫保护效果, 也有助于疾病的诊断<sup>[19-20]</sup>。当前已有一些血清学方法应用于检测 FCV 抗体水平, 如抗体中和试验<sup>[21]</sup>、免疫荧光 (IFA) 试验<sup>[22]</sup>, 但上述试验需要操作人员具有熟练的操作技能; 传统的 ELISA 检测用纯化的病毒做抗原, 需要大量纯化病毒, 操作复杂且有排毒、散毒的风险<sup>[23]</sup>; 胶体金试纸条检测法虽操作快速简便且不需要专业人员, 但其敏感性及特异性相对较低。目前, 国内尚无检测 FCV 抗体的商品化试剂盒, 国外商品化猫抗体试剂盒价格昂贵, 不适合作为 FCV 抗体监控的常规检测方法。因此亟需建立灵敏、简便、准确的血清学检测方法。

本研究利用大肠杆菌原核表达系统对 FCV 的 VP1 蛋白进行表达, 以该重组蛋白为包被抗原, 通过优化反应条件, 成功建立了具有良好灵敏度与重复性的 FCV 抗体间接 ELISA 检测方法, 可为 FCV 感染的诊断、防控及疫苗的效果评价提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

FCV-VP1 重组质粒由本实验室保存; FCV 阳性血清、猫细小病毒 (FPV) 阴性血清、猫疱疹病毒 (FHV) 阳性血清、FHV 阳性血清经血清中和试验鉴定; BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京金全生物技术股份有限公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、His-tag Purification Resin (耐变性剂型)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$ )、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、单组分 TMB 显色液均购自上海碧云天生物技术有限公司; 180 kDa Prestained Protein Marker、增强型 ECL 化学发光检测试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 96 孔塑料酶标板购自广州洁特生物过滤股份有限公司; HRP-兔抗猫 IgG (H+L) 购自苏州博奥龙科技有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、咪唑购自北京索莱宝科技有限公司; 透析袋 (截留分子量 14 kDa) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 硫酸卡那霉素、尿素购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 氯化钾、磷酸二氢钾、氯化钠、碳酸氢钠、十二水合磷酸氢二钠购自国药集团化学试剂有限公司; 吐温-20 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他化学试剂均为分析纯购自寿德生物科技有限公司 (南京)。

### 1.2 VP1 重组蛋白表达纯化与复性

根据 GenBank 登录号为 KM111170.1 的毒株基因组序列, 将 VP1 蛋白其中 306 aa 对应基因序列经密码子优化后克隆至 pSUMO-Mut 载体中, 重组载体转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中保存。提取 FCV 的 VP1 质粒, 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 扩增培养菌液。将菌液 1:100 接种到卡那抗性 LB 培养基中培养, 当  $OD_{600}$  值为 0.6 时, 按照优化结果添加 0.5 mmol/L IPTG 在 18  $^{\circ}$ C 条件下过夜诱导。次日离心弃上清液, 菌体经超声裂解液 (0.01 mol/L HEPES, pH=7.4) 重悬后进行超声破碎, 超声 3 s, 暂停 6 s, 超声 20 min。超声破碎后离心分离上清液和包涵体沉淀, 包涵体沉淀当中加入包涵体裂解液 (含有 8 mol/L 尿素的超声裂解液) 搅拌溶解, 离心取上清液即为包涵体溶解液。

取包涵体裂解液预平衡后的镍填料装入层析柱中, 加入包涵体溶解液, 打开底部开关, 收集流穿液。随后依次使用包涵体裂解液、洗杂缓冲液 (含有 10 mmol/L 咪唑的包涵体裂解液) 洗脱杂蛋白, 洗脱缓冲液 (含有 200 mmol/L 咪唑的包涵体裂解液) 冲洗镍层析柱洗脱目的蛋白。收集各步骤溶液添加蛋白上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

选取目的蛋白纯度高、浓度高的样品依次放入含有 6、4、2、0 mol/L 尿素的超声裂解液当中透析，最终将蛋白透析到 PBS 溶液 (0.01 mol/L PBS, pH=7.4) 中。取纯化后包涵体蛋白和复性后蛋白添加蛋白上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析, 并按照 BCA 浓度测定试剂盒说明书对复性蛋白进行浓度测定。

### 1.3 VP1 重组蛋白 Western blot 鉴定

将复性后的目的蛋白经 SDS-PAGE 后转印至硝酸纤维素膜, 将膜放入 5% 脱脂奶中封闭 2 h, PBST (0.01 mol/L PBS, 0.1% Tween-20, pH=7.4) 清洗 3 次, 以猫 FCV 阳性血清作为一抗 4 °C 过夜孵育, PBST 清洗 3 次, 以 HRP 标记的兔抗猫 IgG (H+L) 为二抗室温孵育 1 h, PBST 清洗 3 次, 随后在膜上添加 ECL 发光液进行显色。

### 1.4 最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的确定

采用方阵滴定法确定抗原蛋白的最佳包被浓度和血清最佳稀释度。用包被液 (0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH=9.6) 将抗原蛋白作纵向倍比稀释, 浓度为 9.76、4.88、2.44、1.22、0.61、0.305、0.152 5、0.076 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  4 °C 孵育过夜; 次日弃去孔内溶液, PBST 洗板 3 次, 每次 3 min; 每孔加 200  $\mu\text{L}$  5% 脱脂乳 37 °C 温育 2 h; PBST 洗板 3 次, 每次 3 min; 在酶标板中分别加入倍比稀释的阳性和阴性血清, 稀释度为 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800, 每孔 100  $\mu\text{L}$  37 °C 温育 2 h; PBST 洗板 3 次, 每次 3 min; 加入 1 : 10 000 稀释的 HRP-兔抗猫 IgG (H+L), 每孔 100  $\mu\text{L}$  37 °C 温育 1 h; PBST 洗板 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液, 室温避光显色 15 min; 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液 (2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 终止显色, 20 min 内使用酶标仪读取  $OD_{450}$  值。选取阳性血清  $OD_{450}$  值  $\geq 1$  且接近 1, 阳性血清  $OD_{450}$  值/阴性血清  $OD_{450}$  值 (P/N)  $> 2.1$  的孔所对应的条件为最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度。

### 1.5 间接 ELISA 反应条件优化

在上述优化好的条件下, 抗原包被条件分别为 4 °C 过夜包被、37 °C 包被 1 h 和 37 °C 包被 1 h 后再放 4 °C 过夜, 筛选最佳抗原包被条件; 分别用 1% BSA、5% 脱脂乳、5% FBS 作为封闭液, 筛选最优稀释液; 加入封闭液后 37 °C 分别封闭 1、2、3 h 来确定最佳封闭时间; 样品分别用 PBS、PBST、5% 脱脂乳、1% BSA 稀释以确定最佳样品稀释液; 血清于 37 °C 下分别孵育 0.5、1、2、3 h 以确定最佳血清孵育时间; 酶标抗体稀释度分别为 1 : 5 000、1 : 10 000、1 : 20 000 来确定最佳酶标抗体稀释度; 酶标抗体孵育时间分别为 0.5、1、1.5 h 来确定最佳酶标抗体孵育

时间; 加入显色液后分别显色 10、15、20 min 来确定最佳显色时间。以上每组试验 3 个重复, 计算阴阳性平均值, 选取 P/N 最大值的孔对应的条件为最佳条件。

### 1.6 临界值确定

利用优化好的条件对 42 份阴性血清进行检测, 计算阴性样本的  $OD_{450}$  平均值 ( $\bar{x}$ ) 和标准差 ( $SD$ ), 计算  $\bar{x}+3SD$  设为临界值, 即当待测血清样品  $OD_{450}$  值  $\geq \bar{x}+3SD$  时判断为阳性,  $OD_{450}$  值  $< \bar{x}+3SD$  时判断为阴性。

### 1.7 交叉反应试验

利用建立的间接 ELISA 方法检测 6 份 FCV 阴性血清 (编号 1~6)、FCV 阳性血清 (编号 7)、FPV 阳性血清 (编号 8)、FHV 阳性血清 (编号 9), 每个样本 4 个重复, 计算  $\bar{x}$ , 以评估此方法是否对除 FCV 血清以外的其他猫的常见呼吸道病阳性血清发生非特异性交叉反应。

### 1.8 灵敏度试验

将 FCV 阳性血清分别按 1 : 320、1 : 640、1 : 1 280、1 : 2 560、1 : 5 120、1 : 10 240、1 : 20 480、1 : 40 960 进行稀释, 每个稀释度 6 个重复, 计算  $\bar{x}$ , 以阴阳性临界值标准判断该方法的最低检测下限, 评估间接 ELISA 方法的灵敏度。

### 1.9 重复性试验

用同批次和不同批次纯化的重组 VP1 蛋白包被酶标板, 分别检测 4 份 FCV 阳性血清和 4 份 FCV 阴性血清, 每份血清做 4 次重复, 测定每孔的  $OD_{450}$  值, 计算  $\bar{x}$ 、 $SD$  和变异系数, 验证间接 ELISA 方法的重复性。

### 1.10 符合率测定

用建立的间接 ELISA 方法和 BIOGAL 猫三联抗体检测试剂盒同时对 164 份血清样品进行检测, 对检测结果进行统计分析, 符合率 = (阳性样品数 + 阴性样品数) / 样品总数  $\times 100\%$ , 判断该方法的准确性。

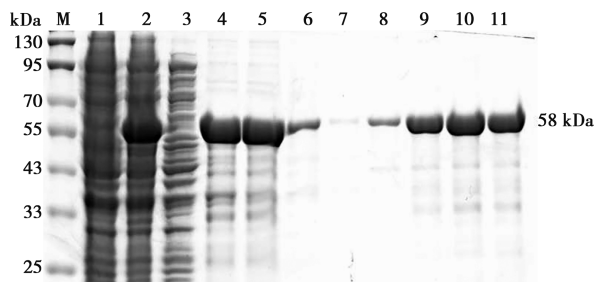
## 2 结果

### 2.1 重组蛋白纯化与复性

对表达菌株进行诱导表达, 表明诱导菌株在预期分子量 58 kDa 位置有明显的目的蛋白表达条带, 如图 1 所示。超声波法破碎菌体, 可以看出目的蛋白主要以包涵体形式表达。将包涵体沉淀溶解后进行镍离子亲和层析纯化, 纯化后的蛋白样品在预期分子量位置呈现明显的单一条带, 说明成功纯化出目的蛋白, 并具有较高纯度。

选取纯度高、浓度高的泳道对应的蛋白样品进行透析复性, 结果如图 2 所示, 复性后蛋白在正确位置

呈现清晰的单一条带，表明重组蛋白被成功复性。根据 BCA 试剂盒操作说明，测得复性后蛋白浓度为 0.70 mg/mL。



M. 蛋白标准；1. 阴性对照；2. 诱导表达；3. 超声后上清液；4. 超声后沉淀；5. 包涵体溶解液；6. 流穿液；7. 0 mmol/L 咪唑洗杂缓冲液；8. 10 mmol/L 咪唑洗杂缓冲液；9-11. 洗脱缓冲液。

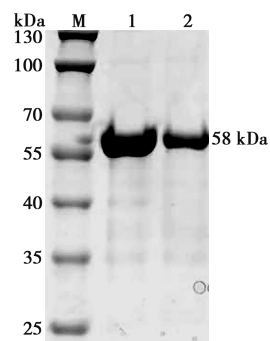
图 1 VP1 蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

### 2.2 重组蛋白 Western blot 鉴定

将复性后的目的蛋白以猫 FCV 阳性血清为一抗进行 Western blot 分析。结果如图 3 所示，在 58 kDa 处观察到与预期相符的特异性条带，表明目的蛋白可被 FCV 阳性血清特异性识别，具有良好的反应原性。

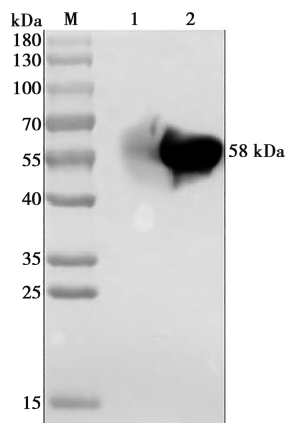
### 2.3 最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的确定

方阵滴定法结果详见表 1， $P \geq 1$  且接近 1， $P/N > 2.1$  对应的最佳抗原包被浓度为 1.22  $\mu\text{g/mL}$ ，最佳血清稀释度为 1 : 800。



M. 蛋白标准；1. 复性前蛋白样品；2. 复性后蛋白样品。

图 2 包涵体复性 SDS-PAGE 分析



M. 蛋白分子量标准；1. 阴性对照；2. VP1 重组蛋白。

图 3 重组蛋白 Western blot 分析

表 1 最佳抗原包被浓度和一抗血清稀释度的确定

抗原包被浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检测指标	血清稀释度				
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
9.76	P	2.688	2.522	2.212	1.711	1.238
	N	1.319	1.031	0.618	0.434	0.257
	P/N	2.038	2.445	3.582	3.941	4.807
4.88	P	2.628	2.438	2.101	1.561	1.074
	N	1.137	0.891	0.467	0.356	0.205
	P/N	2.311	2.735	4.494	4.379	5.244
2.44	P	2.450	2.471	2.071	1.553	1.049
	N	0.999	0.708	0.414	0.307	0.187
	P/N	2.452	3.489	4.997	5.051	5.617
1.22	P	2.216	2.352	1.922	1.517	1.008
	N	0.840	0.523	0.354	0.261	0.136
	P/N	2.637	4.500	5.425	5.817	7.420
0.61	P	2.166	2.097	1.727	1.248	0.829
	N	0.593	0.427	0.245	0.150	0.110
	P/N	3.650	4.915	7.056	8.291	7.512

续表1

抗原包被浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检测指标	血清稀释度				
		1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
0.305	P	1.625	1.598	1.189	0.901	0.578
	N	0.469	0.333	0.248	0.122	0.079
	P/N	3.466	4.790	4.791	7.377	7.290
0.152 5	P	1.283	0.812	0.757	0.570	0.409
	N	0.468	0.301	0.218	0.102	0.094
	P/N	2.739	2.699	3.470	5.601	4.335
0.076 25	P	0.661	0.641	0.440	0.344	0.190
	N	0.481	0.470	0.276	0.135	0.121
	P/N	1.376	1.363	1.595	2.558	1.579

### 2.4 间接 ELISA 反应条件优化

对间接 ELISA 各反应条件进行优化, 得出最优反应条件: 最优抗原孵育条件为 37 °C 孵育 1 h; 最优封闭条件为 1%BSA 封闭 1 h; 最优样品稀释液为 5% 脱脂乳, 孵育时间为 3 h; 最优二抗稀释度为 1 : 5 000, 孵育时间为 1.5 h; 最优显色时间为 20 min。

### 2.5 间接 ELISA 临界值确定

利用建立的间接 ELISA 方法对 42 份阴性血清进行检测, 得出的  $\bar{x}$  为 0.143,  $SD$  为 0.026, 计算  $\bar{x}+3SD$

为 0.221, 即当待测血清样品  $OD_{450}$  值  $\geq 0.221$  判断为阳性,  $OD_{450}$  值  $< 0.221$  判断为阴性。

### 2.6 交叉反应试验

交叉反应试验结果如表 2 所示, 间接 ELISA 检测 FPV 阳性血清、FHV 阳性血清、6 份 FCV 阴性血清均为阴性结果, 检测 FCV 阳性血清为阳性结果, 说明此方法对除了 FCV 血清以外的其他猫常见呼吸道病毒阳性血清无交叉反应。

表 2 交叉反应试验

项目	FCV 阴性血清						FCV 阳性血清	FPV 阳性血清	FHV 阳性血清
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$OD_{450}$ 值	0.106	0.103	0.113	0.103	0.109	0.111	1.483	0.103	0.116
结果判定	-	-	-	-	-	-	+	-	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。下同。

### 2.7 灵敏度试验

灵敏度试验结果如表 3 所示, 间接 ELISA 检测

1 : 10 240 稀释度的阳性血清时,  $OD_{450}$  值仍大于 0.221, 说明该检测方法具有较高的灵敏度。

表 3 灵敏度试验

项目	血清稀释度							
	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280	1 : 2 560	1 : 5 120	1 : 10 240	1 : 20 480	1 : 40 960
$OD_{450}$ 值	2.600	1.790	1.232	0.864	0.501	0.250	0.157	0.115
结果判定	+	+	+	+	+	+	-	-

### 2.8 重复性试验

重复性试验结果如表 4 和表 5 所示, 组内重复性试验的变异系数在 0.76% ~ 4.16% 之间, 小于 5%,

组间重复性试验的变异系数在 2.27% ~ 8.05% 之间, 小于 10%, 符合精密度标准的要求, 说明建立的间接 ELISA 方法具有良好的可重复性。

表 4 组内重复性试验

样品编号	重复次数				$\bar{x} \pm SD$	变异系数/%
	1	2	3	4		
1	1.700	1.757	1.692	1.698	1.712±0.030	1.76
2	0.672	0.668	0.665	0.622	0.657±0.024	3.60
3	2.467	2.459	2.503	2.279	2.427±0.101	4.16
4	1.564	1.587	1.588	1.588	1.582±0.012	0.76
5	0.191	0.189	0.190	0.193	0.191±0.002	0.84
6	0.134	0.130	0.133	0.127	0.131±0.003	2.50
7	0.122	0.121	0.122	0.119	0.121±0.001	1.03
8	0.192	0.194	0.199	0.200	0.196±0.004	1.92

表 5 组间重复性试验

样品编号	重复次数				$\bar{x} \pm SD$	变异系数/%
	1	2	3	4		
1	1.724	1.518	1.635	1.575	1.613±0.088	5.45
2	0.617	0.551	0.668	0.641	0.619±0.050	8.05
3	2.283	2.350	2.338	2.413	2.346±0.053	2.27
4	1.432	1.597	1.531	1.633	1.548±0.088	5.72
5	0.179	0.190	0.189	0.210	0.192±0.013	6.85
6	0.121	0.125	0.135	0.120	0.125±0.007	5.45
7	0.117	0.111	0.123	0.120	0.118±0.005	4.32
8	0.185	0.174	0.202	0.195	0.189±0.012	6.41

## 2.9 符合率测定

采用本研究建立的间接 ELISA 方法和商品化试剂盒同时检测 164 份血清样品, 检测结果如表 6 所示。经计算, 该间接 ELISA 方法与商品化抗体检测试剂盒的符合率为 100%。

表 6 符合率测定

项目	商品化试剂盒			
	阳性	阴性	总计	
间接 ELISA	阳性	112	0	112
	阴性	0	52	52
	总计	112	52	164

## 3 讨论

FCV 是家猫常见的一种病原体, 具有高度传染性和遗传变异性, FCV 感染可导致严重甚至致命的疾病。VP1 是主要的结构蛋白和衣壳蛋白, 表位多位于此结构蛋白上, 常用于临床诊断和疫苗开发。Tohya 等<sup>[24]</sup>在 FCV 毒株上共鉴定出 7 个中和表位, 其中 4 个存在于 VP1 上。Cubillos-Zapata 等<sup>[3]</sup>证明

VP1 蛋白中有一段高度保守序列为非中和抗原表位, 和一段高度变异序列为中和抗原表位。王延树等<sup>[25]</sup>表达了 FCV-VP1 的其中一段多抗原表位蛋白, 经 Western blot 检测具有良好的反应原性。

对于重组蛋白的大量生产, 最常用的是原核表达系统, 该系统可以在短时间内快速获得大量的高纯度蛋白, 并且成本低廉, 操作简单方便, 已广泛应用于实验室和工业规模上<sup>[26-27]</sup>。不同的物种, 不同的细胞在编码同一种氨基酸时具有各自的密码子偏向性, 蛋白质表达水平与密码子使用偏好高度相关, 稀有密码子往往会降低翻译率, 甚至导致翻译错误, 密码子优化是增加蛋白表达的关键因素<sup>[28]</sup>。重组蛋白在原核表达系统中有 2 种表达形式, 一种是表达在上清液中形成可溶性蛋白, 另一种是高水平表达时会导致表达的蛋白分子聚集到包涵体中。重组蛋白的包涵体表达形式虽会让目的蛋白无法正确折叠, 但可通过复性恢复其正确折叠形式。包涵体的形成使目的蛋白纯度高, 稳定性高, 可有效避免细胞内蛋白酶的降解, 更有利于蛋白的富集和纯化。刘秋艳<sup>[29]</sup>针对豹源 FCV 的 ORF2 构建了重组表达质粒, 以包涵体形式表达重组蛋白, 经证明具有良好的反应原性。王真真等<sup>[30]</sup>

通过对 FCV-VP1 蛋白进行表位串联表达,最终以包涵体形式表达目的蛋白,有良好的反应原性,可用于后续研究。

随着宠物产业不断发展,FCV 严重影响我国猫群健康。抗体检测可以评估猫接种疫苗后机体的免疫机能,明确疫苗的免疫效果,减少免疫失败的风险,同时也可以辅助疾病诊断。ELISA 具有操作简便、高灵敏度、高特异性、重复性好的优点,可对血清样品进行高通量检测。Lau 等<sup>[31]</sup>通过包被病毒的方式建立 ELISA 方法,用于检测 FCV 疫苗试验前 SPF 猫的抗体状态和 FCV 减毒疫苗的免疫原性,组内变异系数为 5.5%,组间变异系数为 12.0%。BIOGAL 商品化试剂盒采用的 ELISA 方法在一些调查研究中得到验证,与“金标准”血清中和试验相比用时短且具有较高诊断准确性,可作为检测 FCV 抗体的有用工具<sup>[32-35]</sup>。在本研究中,我们用建立的间接 ELISA 方法和商品化试剂盒同时对猫血清样品进行检测,符合率高达 100%,说明建立的方法具有良好的检测性能。

本研究对通过原核表达系统表达经密码子优化的 FCV-VP1 蛋白,重组蛋白以包涵体形式得到大量表达,蛋白经纯化、复性后,Western blot 验证其具有的良好反应原性。以重组蛋白为包被抗原建立了灵敏度高、重复性好的间接 ELISA 方法,该方法所测血清无漏检现象,具有良好的应用前景,可为猫杯状病毒病的预防、诊断、治疗和疫苗效力评估提供支持。

## 参考文献:

- [1] BATTILANI M, VACCARI F, CARELLE M S, et al. Virulent feline calicivirus disease in a shelter in Italy: a case description [J]. Res Vet Sci, 2013, 95 (1): 283-290.
- [2] GREENE C E. Infectious diseases of the dog and cat [M]. 3rd ed. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier, 2006: 1387.
- [3] CUBILLOS-ZAPATA C, ANGULO I, ALMANZA H, et al. Precise location of linear epitopes on the capsid surface of feline calicivirus recognized by neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies [J]. Vet Res, 2020, 51 (1): 59.
- [4] WILHELM S, TRUYEN U. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay to detect a broad range of feline calicivirus isolates [J]. J Virol Methods, 2006, 133 (1): 105-108.
- [5] 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]. J Feline Med Surg, 2003, 5 (4): 217-226.
- [6] SEAL B S. Analysis of capsid protein gene variation among divergent isolates of feline calicivirus [J]. Virus Res, 1994, 33 (1): 39-53.
- [7] DI MARTINO B, MARSILIO F, ROY P. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity [J]. Vet Microbiol, 2007, 120 (1/2): 173-178.
- [8] SOSNOVTSEV S V, GARFIELD M, GREEN K Y. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome [J]. J Virol, 2002, 76 (14): 7060-7072.
- [9] SOSNOVTSEV S V, BELLIO G, CHANG K, et al. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions [J]. J Virol, 2005, 79 (7): 4012-4024.
- [10] 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.
- [11] RADFORD A D, COYNE K P, DAWSON S, et al. Feline calicivirus [J]. Vet Res, 2007, 38 (2): 319-335.
- [12] AL-MOLAWI N, BEARDMORE V A, CARTER M J, et al. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein [J]. J Gen Virol, 2003, 84 (Pt 5): 1237-1244.
- [13] BORDICCHIA M, FUMIAN T M, VAN BRUSSEL K, et al. Feline calicivirus virulent systemic disease: clinical epidemiology, analysis of viral isolates and *in vitro* efficacy of novel antivirals in Australian outbreaks [J]. Viruses, 2021, 13 (10): 2040.
- [14] POVEY R C. Serological relationships among feline caliciviruses [J]. Infect Immun, 1974, 10 (6): 1307-1314.
- [15] AFONSO M M, PINCHBECK G L, SMITH S L, et al. A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity [J]. Vaccine, 2017, 35 (20): 2753-2760.
- [16] ABAYLI H, CAN-SAHNA K, OZBEK R, et al. Feline calicivirus prevalence among cats in Turkey's Kayseri province [J]. Isr J Vet Med, 2020, 75 (2): 94-99.
- [17] GAO J, LI Y, XIE Q, et al. Epidemiological investigation of feline upper respiratory tract infection encourages a geographically specific FCV vaccine [J]. Vet Sci, 2023, 10 (1): 46.
- [18] HOLST B S, HANAS S, BERNDTSSON L T, et al. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease: a case-control study [J]. J Feline Med Surg, 2010, 12 (10): 783-789.
- [19] AKASAKA T, SHIMIZU-ONDA Y, HAYAKAWA S, et al. The virucidal effects against murine norovirus and feline calicivirus F4 as surrogates for human norovirus by the different additive concentrations of ethanol-based sanitizers [J]. J Infect Chemother, 2016, 22 (3): 191-193.
- [20] BARRS V R. Feline panleukopenia: a re-emergent disease [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2019, 49 (4): 651-670.
- [21] DIGANGI B A, LEVY J K, GRIFFIN B, et al. Prevalence of serum antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter [J]. J Am Vet Med Assoc, 2012, 241 (10): 1320-1325.
- [22] 蒋虹, 时建东, 吴小闲. 猫病毒血清学检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9 (1): 43-45.
- [23] ZHOU L, FU N, DING L, et al. Molecular characterization and cross-reactivity of feline calicivirus circulating in southwestern China [J]. Viruses, 2021, 13 (9): 1812.
- [24] TOHYA Y, MASUOKA K, TAKAHASHI E, et al. Neutralizing epitopes of feline calicivirus [J]. Arch Virol, 1991, 117 (3/4):

- 173-181.
- [25] 王延树, 向华, 郑翠玲, 等. 猫杯状病毒衣壳蛋白多表位抗原的原核表达 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2007 (4): 32-35.
- [26] POROWIŃSKA D, WUJAK M, ROSZEK K, et al. Prokaryotic expression systems [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2013, 67: 119-129.
- [27] KESIDIS A, DEPPING P, LODÉ A, et al. Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts [J]. Methods, 2020, 180: 3-18.
- [28] JENKINS M C, PARKER C, O'BRIEN C, et al. Effects of codon optimization on expression in *Escherichia coli* of protein-coding DNA sequences from the protozoan *Eimeria* [J]. J Microbiol Meth, 2023, 211: 106750.
- [29] 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]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [30] 王真真, 汤傲星, 刘春草, 等. 猫杯状病毒 VP1 蛋白 B 细胞表位的串联表达及间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2021. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211126.007.
- [31] LAU R C, HALLIDAY A J, DAVIES H. Evaluation of the immunogenicity of attenuated feline calicivirus vaccines by ELISA [J]. Vet-Microbiol, 1992, 31 (2/3): 139-146.
- [32] DIGANGI B A, GRAY L K, LEVY J K, et al. Detection of protective antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus in shelter cats using a point-of-care ELISA [J]. J Feline Med Surg, 2011, 13 (12): 912-918.
- [33] MENDE K, STUETZER B, TRUYEN U, et al. Evaluation of an in-house dot enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against feline panleukopenia virus [J]. J Feline Med Surg, 2014, 16 (10): 805-811.
- [34] DAY M J, HORZINEK M C, SCHULTZ R D, et al. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats [J]. J Small Anim Pract, 2016, 57: E1-E45.
- [35] DALL ARA P, LABRIOLA C, SALA E, et al. Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy [J]. Prev Vet Med, 2019, 167: 32-38.

## · 信息 ·

## 倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术

## 欢迎订阅 2025 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊, 由原中央大学畜牧兽医系编辑出版, 著名兽医学家罗清生教授任主编, 至今已有 90 年的办刊历史。始终遵循“为社会服务, 为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合, 普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》, 先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、江苏省优秀科技期刊、全国高校优秀期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

**读者对象:** 畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

**主要内容:** 主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

**征订办法:** 本刊为月刊, 大 16 开, 定价: 28.00 元, 全年 12 期共 336.00 元。邮发代号: 28-42, 全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

**地址:** 江苏省南京市江北新区滨江大道 666 号南京农业大学行政楼 A320《畜牧与兽医》编辑部

**邮编:** 210031

**电话:** 025-84395701 (编辑部)

**E-mail:** muyizz@njau.edu.cn