

天津科技大学研究生学位论文

(申请硕士学位)

抗诺如病毒 P 蛋白基因工程抗体制备及其夹心 ELISA 的建立

THE PREPARATION OF ANTI-NOROVIRUS P PROTEIN GENE ENGINEERED ANTIBODIES AND ESTABLISHMENT OF SANDWICH ELISA

专业学位类别(领域): 制药工程

校内指导教师: 谢燕燕 副教授

企业指导教师: 刘春龙 正高级工程师

研究生姓名: 李恩杰

申请学位级别: 全日制生物与医药硕士

论文提交日期: 2024 年 6 月

分类号: R446.6

学校代码: 10057

密级: 公开

研究生学号: 21816812

抗诺如病毒 P 蛋白基因工程抗体制备及其夹心 ELISA 的建立

The Preparation of Anti-Norovirus P Protein Gene Engineered Antibodies and Establishment of Sandwich ELISA

专业学位类别(领域): 制药工程

校内指导教师: 谢燕燕 副教授

企业指导教师: 刘春龙 正高级工程师

研究生姓名: 李恩杰

申请学位级别: 全日制生物与医药硕士

论文提交日期: 2024 年 6 月

论文课题来源: 横向课题

学位授予单位: 天津科技大学

摘要

诺如病毒是导致全球急性胃肠炎爆发的主要原因，不仅对人类健康造成严重威胁，也给社会带来巨大的经济损失。诺如病毒的快速、准确检测对感染性腹泻的诊治及随后的预防性控制具有重要意义。在众多基因型中，GII.4 基因型仍占据主导地位。因此，本论文针对 GII.4 基因型，通过动物免疫制备高质量杂交瘤细胞，利用抗体基因重组技术制备基因工程抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测方法。主要内容如下：

（1）对诺如病毒 P 蛋白的氨基酸多序列进行比对，结果表明，诺如病毒 P 蛋白在 GII.4 序列表现出相对的保守性，与 GII.4-ALQ43928-2015 毒株进化关系最近。构建重组 P 蛋白的真核表达载体，在 293F 细胞中表达。

（2）以 P 蛋白作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠，获得最优效价为 32000 的动物血清抗体。利用杂交瘤技术，通过间接 ELISA 法和多轮克隆、亚克隆的筛选，获得 12 株能稳定分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。通过体内诱生法制备腹水，纯化后利用间接 ELISA 测定亲和力，获得 6 株 EC_{50} 值小于 50 ng/mL 的单克隆抗体。进一步，通过竞争 ELISA 法筛选配对，获得一对表现为明显不竞争关系的抗体 8-F1 和 9-F8，对其测序，获得抗体可变区的基因序列，并构建抗体真核表达载体，在 293F 细胞中表达、纯化后获得 2 个目标抗体：8-F1 抗体，轻链 20~25 kDa，重链 50~55 kDa、 EC_{50} 为 7.375 ng/mL；9-F8 抗体，轻链 20~25 kDa，重链 50~55 kDa、 EC_{50} 为 29.98 ng/mL。

（3）构建以双基因工程抗体为基础的 ELISA 方法，确定包被抗体（8-F1）和检测抗体（9-F8）的最佳工作浓度分别为 1000 ng/mL 与 1600 ng/mL，从而建立线性回归方程 $y=0.0266x+0.3075$ ， $R^2=0.9918$ 。该检测方法空白限（LoB）和检出限（LoD）分别为 0.24 ng/mL 与 0.33 ng/mL。

综上所述，通过一系列实验和研究，成功地获得了针对诺如病毒 P 蛋白的基因工程抗体，并构建了一种兼具高灵敏度和特异性的 ELISA 检测方法，基本达到体外诊断领域（In Vitro Diagnostic, IVD）的检测标准。相关工作可为诺如病毒的快速、准确检测提供指导，为进一步开发并研制诺如病毒快速检测试剂盒提供理论与物质基础。

关键词：诺如病毒；P 蛋白；单克隆抗体；ELISA

ABSTRACT

Norovirus is the main cause of global outbreaks of acute gastroenteritis, posing a serious threat to human health and causing huge economic losses to society. Rapid and accurate detection of Norovirus is important for the diagnosis and treatment of infectious diarrhea and subsequent preventive control. Among the many genotypes, the GII.4 genotype still dominates. Therefore, this paper focuses on the GII.4 genotype, obtains high-quality hybridoma cells through animal immunization, prepares genetically engineered antibodies using antibody gene recombinant technology, and establishes a double antibody sandwich ELISA detection method. The main contents are as follows:

(1) The amino acid multiple sequences of norovirus P protein were compared. The results showed that the norovirus P protein was highly conserved in the GII.4 sequence and had the closest evolutionary relationship with the GII.4-ALQ43928-2015 strain. The eukaryotic expression vector of recombinant P protein was constructed and expressed in 293F cells, and the antigenic concentration of purified P protein was 1.465 mg/mL.

(2) The P protein was used as an immunogen to immunise BALB/c mouse, and an animal serum antibody with an optimal potency of 32,000 was obtained. Using hybridoma technology, 12 hybridoma cell lines capable of stably secreting specific monoclonal antibodies were obtained by indirect ELISA and multiple rounds of clonal and subclonal screening. Ascites was prepared by *in vivo* induction, purified and affinity was determined using indirect ELISA to obtain 6 monoclonal antibody strains with EC_{50} values less than 50 ng/mL. Further, a pair of antibodies 8-F1 and 9-F8, which showed obvious non-competitive relationship, were obtained by competitive ELISA. The 8-F1 and 9-F8 monoclonal antibodies were sequenced to obtain the gene sequences of the variable regions of the antibodies, and the eukaryotic expression vectors of the antibodies were constructed, and the 2 target antibodies were obtained after expression and purification in 293F cells: the 8-F1 antibody has light and heavy chains weighing 20-25 kDa and 50-55 kDa, respectively, with an EC_{50} of 7.375 ng/mL. Similarly, the 9-F8 antibody has chains in the same molecular weight, but its EC_{50} is 29.98 ng/mL.

(3) The ELISA method based on dual genetically engineered antibodies was constructed, determining the optimal working concentrations of the capture antibody (8-F1) and detection antibody (9-F8) to be 1000 ng/mL and 1600 ng/mL respectively. This resulted in the establishment of a linear regression equation $y=0.0266x+0.3075$, with an R^2 value of 0.9918. The limit of blank (LoB) and limit of detection (LoD) of this detection method are 0.24 ng/mL and 0.33 ng/mL respectively.

In summary, through a series of experiments and research, we have successfully

obtained genetically engineered antibodies targeting the norovirus P protein and developed an ELISA detection method with high sensitivity and specificity, which basically meets the detection standards in the field of in vitro diagnostics (IVD). This work provides guidance for the rapid and accurate detection of norovirus and lays a theoretical and material foundation for the further development and production of rapid detection kits for norovirus.

Key words: Norovirus, P protein, Monoclonal antibody, ELISA

目 录

1 前言.....	1
1.1 诺如病毒研究概述.....	1
1.2 诺如病毒的分子生物学特征	1
1.2.1 诺如病毒基因组结构.....	1
1.2.2 诺如病毒基因组分型.....	3
1.3 诺如病毒流行性特征.....	3
1.4 抗原与抗体.....	4
1.4.1 抗原的类型.....	4
1.4.2 抗体的制备.....	4
1.4.3 抗体的结构.....	5
1.5 感染诺如病毒后的免疫应答	6
1.6 诺如病毒的检测.....	7
1.6.1 电镜方法.....	7
1.6.2 分子生物学方法.....	7
1.6.3 免疫学方法.....	8
1.7 本课题研究的内容与意义	11
1.8 本课题研究的主要技术路线	11
2 材料与方法.....	13
2.1 试验材料与仪器.....	13
2.1.1 毒株样本及载体来源.....	13
2.1.2 试验动物来源.....	13
2.1.3 主要试剂和材料.....	13
2.1.4 主要仪器和设备.....	14
2.1.5 主要溶液配制.....	15
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 诺如病毒 P 蛋白生物信息学分析	16
2.2.2 重组诺如病毒 P 蛋白表达载体的构建	16
2.2.3 重组诺如病毒 P 蛋白的表达和纯化	20
2.2.4 抗诺如病毒 P 蛋白单克隆抗体的制备	22
2.2.5 抗诺如病毒 P 蛋白基因工程抗体的制备与纯化	27
2.2.6 双抗夹心 ELISA 方法的建立与优化	29
3 结果与讨论.....	31
3.1 诺如病毒 P 蛋白序列比对结果与保守分析	31
3.2 氨基酸序列进化树.....	34

3.3 诺如病毒 P 蛋白基因的扩增	35
3.4 诺如病毒 P 蛋白基因的菌落 PCR 鉴定.....	35
3.5 诺如病毒重组 P 蛋白的表达与鉴定	36
3.6 单克隆抗体的制备与鉴定	36
3.6.1 抗诺如病毒 P 蛋白血清效价分析	36
3.6.2 杂交瘤阳性细胞的筛选和扩增.....	37
3.6.3 腹水抗体的鉴定与分析.....	38
3.6.4 单克隆抗体亲和力分析.....	38
3.6.5 竞争 ELISA 筛选配对单克隆抗体	39
3.7 基因工程抗体的重组表达	40
3.7.1 抗体轻重链基因表达载体的构建.....	40
3.7.2 抗体基因的表达、纯化与鉴定.....	42
3.7.3 抗体的亲和力分析.....	43
3.8 双抗夹心 ELISA 方法的建立与优化	44
3.8.1 包被抗体和标记抗体最佳工作浓度的确定	44
3.8.2 标准曲线的建立.....	45
3.8.3 分析灵敏度.....	46
4 结论.....	53
4.1 全文总结.....	53
4.2 论文的创新点.....	53
4.3 论文的不足之处.....	54
5 展望.....	55
6 参考文献.....	57

1 前言

1.1 诺如病毒研究概述

诺瓦克病毒（Norwalk Virus）最初源自美国俄亥俄州的诺瓦克镇，起源于1968年，直到1972年，美国科学家利用免疫电镜揭示其结构特征，随后，将发现的一系列诺瓦克病毒统称为诺如病毒（Norovirus, NoVs）^[1,2]。1992年，诺瓦克病毒的全基因组序列被解析，根据基因组结构和系统发生特征显示，诺瓦克病毒归属于杯状病毒科（Caliciviridae Family）^[3]。为了进一步规范命名，2002年8月，第八届国际病毒命名委员会统一将诺瓦克样病毒改名为诺如病毒，并将其定为杯状病毒科下的一个独立属，即诺如病毒属^[4]。

诺如病毒是全球范围内非细菌性胃肠炎的重要病原体之一^[5,6]，据研究数据表明，大约有20%的急性胃肠炎病例由该病毒引起，通常是病毒性胃肠炎爆发的最常见诱因^[7-10]。根据流行病学分析显示，全球每年有6亿诺如病毒感染病例，其中超过20万名5岁以下儿童因此死亡^[11]。诺如病毒具有极高的传染性，即使少至18个病毒颗粒也能在环境中轻松传播^[12]。通过诺如病毒检测，可以及时发现感染者，并采取相应的隔离措施，从而有效阻断病毒的传播链条，减少疫情扩散的风险。诺如病毒感染途径包括食用受到诺如病毒污染的鱼、农产品或水，接触遭受污染的表面或物品，接着将污染的手指放入口中等方式。此外，还存在少见的气溶胶传播途径等^[15-17]。大部分感染诺如病毒的患者通常会出现不同程度的恶心、呕吐、腹泻和腹痛等不适症状，这种感染状态较为轻微，可以依靠自身免疫力在2~3天内自行康复^[18]。然而，对于老年人和儿童等免疫功能较弱的个体而言，康复时间可能会延长甚至危及生命，这为社会带来了巨大的负担，也带来了经济上的损失^[12,13]。在当前阶段，无论是国内还是国外，都尚未研发出能够治疗诺如病毒的有效药物或疫苗^[19]。这主要是由于诺如病毒株展现出了广泛的遗传和抗原多样性，这成为发展治疗性或预防性疫苗的一大障碍^[20]。此外，我们还面临着另一个挑战，那就是缺乏能够在体外培养诺如病毒的模型，这也极大地制约了我们对该病毒的深入研究和治疗策略的开发^[21]。

综上所述，在当前阶段，诺如病毒检测的重要性不容忽视。它是我们应对诺如病毒感染的重要工具之一，对于控制疫情传播、指导临床治疗以及推动疫苗和药物的研发都具有重要意义。

1.2 诺如病毒的分子生物学特征

1.2.1 诺如病毒基因组结构

诺如病毒是一种无包膜、单股正链RNA病毒，其大小约为30 nm，该病毒的基因组全长约7.5~7.7 kb，包含三个开放阅读框（Open Reading Frame, ORF）。其中，ORF1占据了病毒基因组的2/3，编码一个约180 kDa的前体蛋白。这个前体蛋白在蛋

白酶NS6的作用下，会分解为六个非结构性蛋白，它们分别是N末端蛋白（p48）、核苷三磷酸酶（NTPase）、3A样蛋白（p22）、病毒基因组连接蛋白（Viral genome linker Protein, VPg）、3C样蛋白酶（3C-like Protease）以及RNA聚合酶（RNA dependent RNA polymerase, RdRp）。在病毒复制过程中，这些非结构蛋白起着至关重要的作用。此外，ORF2编码主要衣壳蛋白（Major Capsid Protein, VP1），其大小为58 kDa，而ORF3则编码次要衣壳蛋白（Minor Capsid Protein, VP2），大小为29 kDa。这些衣壳蛋白对于病毒的结构和感染过程至关重要^[22,23]。

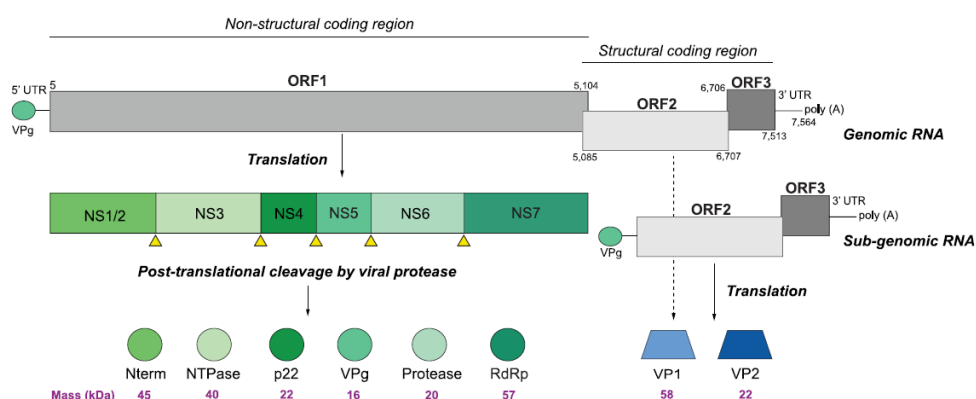


图1-1 诺如病毒基因组结构图^[24]

Figure 1-1 Genome structure of norovirus

在诺如病毒基因组中，RNA聚合酶区域的序列相对保守，而VP1区域则呈现出较大的变异性。这种高度的变异使得VP1成为重组和突变最为频繁的区域之一，有助于病毒适应环境压力并逃逸宿主免疫系统的攻击^[25]。主要衣壳蛋白VP1的结构可分为内部壳（Shell, S）和突出的结构域（Protruding, P），其中，两个P域形成二聚体，紧密地包绕在S核心周围^[26]。P域与S核心之间通过一段包含8个氨基酸的柔性铰链相连，这种结构使得衣壳蛋白具有一定的灵活性和适应性^[27]。P域进一步分为P1子域和P2子域，其中，P2子域位于衣壳蛋白的最外层，是VP1区域中变异最为显著的部分。这个区域包含了抗原表位和中和抗体结合位点，能够与组织血型抗原（Histo-Blood Group Antigens, HBGAs）结合，并可能在此过程中介导病毒的感染^[28]。因此，P2子域在构成病毒的免疫原性方面扮演着至关重要的角色^[29]。抗原表位决定了抗原的特异性，能够刺激人体产生特异性的抗体^[30]。P2子域在病毒表面上的位置并不是固定的，而是可以根据环境变化通过铰链的摆动在病毒表面上移动，以便更好地感染宿主组织细胞或受体，该区域上关键氨基酸的分布和改变与诺如病毒的流行有一定的相关性^[31]。次衣壳蛋白VP2是诺如病毒基因组上编码的主要易变蛋白之一，它能够与主衣壳蛋白VP1相互作用，进而稳定整个衣壳蛋白，同时对病毒RNA聚合酶活性

和宿主免疫系统抑制也有重要影响^[32]。

1.2.2 诺如病毒基因组分型

2019年, Chhabra等^[33]依据2S标准分型方法, 对GenBank收录的诺如病毒VP1区和聚合酶区序列进行了重新计算和分型。结果显示, 诺如病毒VP1区基因组共分为12组, 包括10组明确分类的基因组(G-GX)和2组新暂定基因组(GNA1、GNA2), 共确定了48种基因型及5种新暂定基因型^[34]。此外, 基于ORF1的聚合酶区(RdRp)基因组分为10组, 其中8组为明确分类的P组(GI.P-GX.P), 另有2组为新暂定P组(GNA1.P、GNA2.P)。这些P组共包含60种确定基因型及16种新暂定基因型^[35]。近年来, 由于诺如病毒基因变异的频繁性, 且变异主要发生在ORF1和ORF2的连接区域, 因此自2013年起, 基于ORF1的RdRp基因(P-Type)和ORF2的VP1基因(Genotype)的双基因分型方法被广泛接受并应用于诺如病毒的型别鉴定中^[33,36]。这种分型方法不仅提高了分型的准确性, 也为研究诺如病毒的流行病学特征和防控策略提供了有力工具。

1.3 诺如病毒流行性特征

感染人类的诺如病毒基因组主要包括GI、GII、GIV、GVIII和GX, 其中GI和GII基因群是感染人类的主要类型。尤为值得关注的是, GII基因群所引发的急性胃肠炎病例占据了全球人源诺如病毒病例的75%以上, 其具有极高的致病性。在GII基因群中, GII.4型是最常见的基因型, 过去二十多年间, 每2~3年便会有新的变异株出现, 这些变异株在全球范围内的人源诺如病毒感染事件中占据主导地位, 频繁引发急性胃肠炎的暴发流行^[37,38]。最近, 新出现的GII.P17-GII.17基因型也在亚洲某些地区崭露头角, 成为当地的主要流行毒株^[39]。这些发现表明, 诺如病毒的变异性和流行趋势值得我们持续关注和深入研究。

GII.4诺如病毒之所以具有显著优势, 与其变异的出现时间紧密相关。自20世纪80年代以来, 已陆续出现了六种主要的GII.4型病毒变异株, 它们在全球范围内引发了大规模爆发, 包括GII.4-1995/96 US Grimsby、GII.4-2002/Farmington Hills、Hunter 2004、Den Haag 2006b、GII.4-2009/New Orleans和GII.4-2012 Sydney。其中, 第一次全球范围内的NoVs暴发与GII.4-1995/96 US Grimsby紧密相关, 它迅速在五个大洲流行开来^[40]。随后的第二次大流行始于2002年, 正值GII.4-2002/Farmington Hills取代95/96 US Grimsby成为新的流行株^[41]。而第三次大流行则是由GII.4-2004/Hunter引发, 但很快被GII.4-2006a/Yerseke和GII.4-2006b/Den Haag两种新的大流行毒株所取代^[42]。到了2009年, GII.4-2009/New Orleans新毒株的出现与2006年的变异株共同流行了近三年, 直到2012年GII.4-2012 Sydney毒株开始崛起^[43]。相比其他基因型, GII.4在人群中可能具有更高的病毒适应性^[44]。生物信息学技术和体外试验均表明, GII.4毒株拥有较高的突变率和进化速率, 特别是其P2亚结构域, 这有助于促进抗原多样性毒株的出现^[45]。这种高度的变异性和进化能力使得GII.4病毒能够迅速适应宿主环境,

从而在全球范围内频繁引发疫情。

1.4 抗原与抗体

1.4.1 抗原的类型

免疫的抗原形式多样，包括天然的蛋白质、合成的多抗原与抗体肽、通过克隆表达获得的重组蛋白质，以及活的细胞、核酸或碳水化合物等。这些抗原的类型直接决定了免疫接种所需的剂量和接种途径。本论文利用重组蛋白表达技术，制备具有免疫原性的重组蛋白。

1.4.2 抗体的制备

目前，人工制备特异性抗体主要依赖三大技术：多克隆抗体技术、基于杂交瘤细胞研发的单克隆抗体技术，以及基因工程抗体技术。这些技术的不断进步与发展，极大地推动了抗体药物的研发进程，为 IVD 领域带来了更多的可能性。

(1) 多克隆抗体 (Polyclonal Antibody, pAb)，即由多种抗原表位刺激机体产生的多种单克隆抗体混合而成的抗体类型，通过使用具有免疫原性的抗原免疫试验动物来制备的。事实上，我们人体或动物体内自然产生的抗体就是多克隆抗体^[46]。早在 1890 年，Behring 和 Kitasatode 等人^[47]便通过免疫实验动物获得抗白喉杆菌外毒素的多克隆抗体，并成功治愈了一名白喉患者。然而，多克隆抗体因其成分复杂、质量难以控制等问题，其应用受到了一定的限制。

(2) 1975 年，Kohler 和 Milstein^[48]首次成功运用仙台病毒实现了小鼠骨髓瘤细胞与经绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞的相互融合，进而获得杂交瘤细胞，并据此制备出单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, mAb)。杂交瘤技术的发现以及随后开发单克隆抗体的能力，极大地推动了抗体研究及其在临床领域的发展。单克隆抗体具备高度的特异性，能够识别并与单一的抗原表位结合，其结合灵敏度极高，能有效阻断抗原与正常底物或相互作用因子之间的结合，使抗原失活，从而消除或阻止抗原的功能^[49]。因此，单克隆抗体在生物医药和临床诊断治疗等领域得到了广泛应用。

单克隆抗体是由一个具有分泌抗体能力的 B 细胞与具有无限增殖能力的骨髓瘤细胞融合而形成的杂交瘤细胞，杂交瘤细胞的产生涉及针对特定抗原表位的 B-淋巴细胞的获取，这些 B 细胞通常从动物免疫的脾脏中获取^[50]。这些杂交瘤细胞在选择性培养基中进行体外培养，通过筛选不同细胞孔中的抗体，可以筛选出具有所需活性特异性抗体的阳性孔^[51]。获得单克隆抗体的主要步骤包括：① 通过免疫试验动物，如 BALB/c 鼠、家兔等，获取免疫脾细胞，并与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞；② 筛选杂交瘤细胞，以获取能够分泌目标抗体的阳性杂交瘤细胞；③ 多轮克隆、亚克隆后获得单克隆细胞，然后扩大培养，定株保存于液氮；④ 通过体外培养或体内诱生法生产大量的单克隆抗体。这一系列的步骤确保了单克隆抗体的高效、特异性制备，为生物医药和临床诊断治疗等领域提供了重要的工具。

(3) 基因工程抗体 (Gene Engineered Antibody, GEA)，也被称为重组抗体

(Recombinant Antibody, RA), 是通过人为手段对编码抗体的基因进行改造或重新装配, 并使其在适当的受体细胞中表达的抗体分子^[52]。其制备原理主要基于基因重组技术, 首先从杂交瘤细胞、免疫脾细胞或外周血淋巴细胞中提取 mRNA, 进而逆转录为 cDNA, 通过 PCR 技术, 分别扩增抗体的重链和轻链可变区编码基因, 随后在特定的表达系统中表达并折叠成具备功能的抗体分子^[53]。这些抗体分子再被转染至高表达的细胞株中, 最终通过亲和层析法进行分离提纯, 获得目标抗体。在亲和层析法中, 天然蛋白 protein A/G 作为一种代表性的工具, 广泛应用于抗体的分离纯化过程。它能与抗体分子的结晶区 (Fc) 特异性结合, 不仅简化了纯化步骤, 还缩短了纯化时间^[54,55]。目前, 基因工程抗体的种类繁多, 包括人源化抗体、全人源抗体、嵌合抗体、双特异性抗体以及单链抗体 (ScFv) ^[56,57]等。这些抗体的生产依赖于成熟的基因工程技术, 使得抗体的改造、生产流程的规范化和大规模标准化生产成为可能。

1.4.3 抗体的结构

抗体, 也称为免疫球蛋白 (Immunoglobulins, Igs), 它们在适应性免疫反应中发挥着至关重要的作用。抗体是由 B 细胞产生的异二聚体糖蛋白, 具有识别和中和多种抗原的能力。这种多样性的抗体反应是通过一组基因的重组和体细胞超突变 (SHM) 来实现的。基因的重组允许 B 细胞产生大量不同的抗体, 而 SHM 则进一步增加了抗体的多样性, 使其能够更精确地识别和结合各种抗原^[58,59]。

在哺乳动物体内, 抗体的基本结构独特, 由呈 “Y” 形的两条相同重链和两条相同轻链构成。轻链分为 kappa(κ) 或 lambda(λ) 型, 而重链则包括 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 亚型。基于重链恒定结构域的序列和长度差异, 抗体被划分为 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 五种类型。每种抗体在免疫过程中展现其独特的结构和功能。特别是 IgG, 因其在人血清中的高含量、对免疫反应的关键作用及卓越的特异性, 成为免疫治疗中的主导类型。

在 IgG 类别中, 每个重链包含三个恒定结构域 (CH1、CH2 和 CH3) 以及一个可变结构域 (VH), 而轻链则由单个恒定结构域 (CL) 和一个可变结构域 (VL) (图 1-2a) 组成^[60]。抗原结合片段 (Fab) 主要由位于抗体 N 末端的可变结构域, 以及 CL 和 CH1 区域 (图 1-2b) 构成。这些结构域间的二硫键和高度保守的域内键共同维持抗体的稳定。可变结构域通过三个关键的高变区, 即互补决定区 (CDR), 赋予抗体对抗原的特异性和亲和力^[61]。轻链和重链的 CDR 区共同形成了六个高变区结构 (H1、H2、H3、L1、L2 和 L3), 这些结构域周围有四个相对保守的 β -折叠链, 作为支撑 CDR 环的框架。另一方面, Fc 仅由恒定结构域 CH2 与 CH3 组成, 其决定了抗体的抗原结合特异性, 并通过抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 以及抗体依赖的细胞吞噬作用 (ADCP) 在介导抗体效应子功能中发挥主要作用, 其重链亚型决定了抗体的种类^[62,63]。

ScFv 仅包含可变区，其中一部分来自重链（VH），另一部分来自轻链（VL）。这两个可变区通过灵活的 Gly-Ser 连接在一起。值得注意的是，骆驼和鲨鱼的免疫球蛋白具有独特的特点，它们仅由重链组成，并不呈现轻链。这些特殊的免疫球蛋白通过单独的 V 结构域与它们的靶标结合。特别是骆驼科动物，它们的重链抗体由一个可变结构域（VHH）和两个恒定结构域（CH）组成的同二聚体构成。而鲨鱼的新抗原受体抗体（IgNar）则由一个可变结构域（V-NAR）和五个恒定结构域（CH）组成^[64]。这些特殊的抗体结构使得它们在免疫系统中具有独特的识别和结合能力。

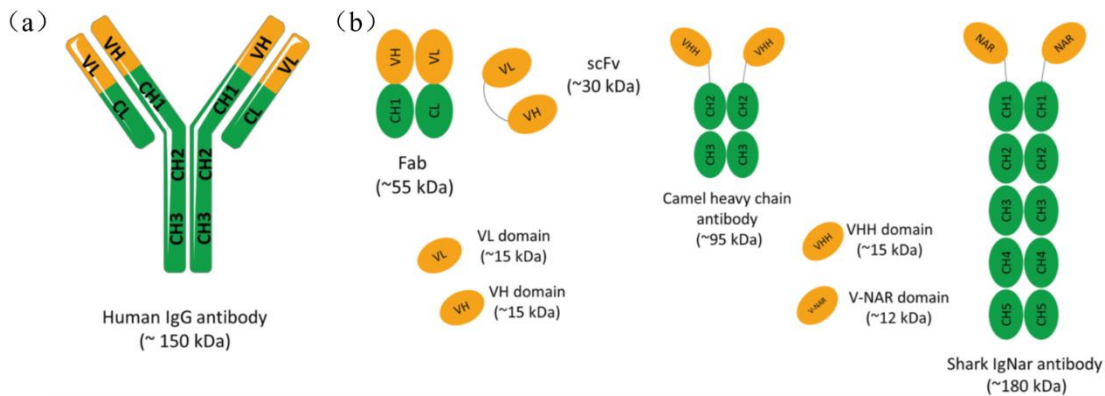


图 1-2 (a) IgG 抗体的示意图；(b) 不同抗体片段示意图^[64]

Figure 1-2 (a) A schematic representation of IgG antibody; (b) A schematic representation of different antibody fragments

1.5 感染诺如病毒后的免疫应答

免疫应答是免疫系统的重要组成部分，它包括先天性免疫应答与适应性免疫应答，在人感染诺如病毒后，这两种免疫应答都会迅速产生免疫反应，以抵抗病毒的侵袭作用^[65]。适应性免疫应答包括细胞免疫和体液免疫，在体液免疫方面，当人感染诺如病毒后，体内的 IgA、IgG 和 IgM 抗体水平会相应提升^[66]。诺如病毒感染后，体内抗体的水平会发生变化。具体来说，感染初期，IgA 抗体是最早出现的，通常在感染后第 5 天，血清中的 IgA 抗体水平会显著上升。而在感染后的第 2 天，唾液中的 IgA 抗体水平也会显著增加。相比之下，IgG 抗体的产生则稍晚一些。IgG 抗体通常在感染后的第 7 天开始产生，并逐渐在血清中积累。到感染后的第 14 天，几乎所有感染个体都会产生血清 IgG 免疫应答^[67]。

研究表明，诺如病毒特异性血清抗体 IgG 与诺如病毒衍生的病毒样颗粒（virus-like particle, VLP）结合，并阻断 VLP 与宿主细胞附着因子/受体、HBGA 的结合^[68]。尽管部分抗体能够预防相同或相关毒株的再次感染，但考虑到交叉反应模式和基因组的多样性，单个诺如病毒感染所产生的保护效果可能无法覆盖整个基因群，特别是 GII 型。因此，在成人血清中发现预先存在的基因特异性 IgG 抗体，但这些抗体对诺如病毒感染并不具备保护作用^[69]。

相反，有研究表明，唾液中存在的针对诺如病毒的特异性 IgA 以及针对诺如病毒

的特异性记忆 IgG 细胞与预防胃肠炎的发生有关^[70]。这些 IgG 记忆 B 细胞在感染后的 180 天内仍持续存在，暗示它们可能具有长期的潜在保护作用^[71]。据报道，感染某一特定基因型后的几周内，再次使用相同基因型的毒株攻击通常不会导致感染，但在 2~6 年后再次攻击时，可能会引发新的感染^[72-74]。诺如病毒的易感性因个体和基因型而异，这种获得性免疫的交叉保护的持续时间和程度尚不清楚。因此，目前对于诺如病毒感染保护作用的持续时间尚无确切定论^[75]。抗体应答在 IVD 领域具有广泛的应用价值。例如，在免疫学检测中，可利用抗原抗体反应的特异性可以检测出生物样本中的特定抗原或抗体，实现对疾病的诊断、病情监测和预后评估。

1.6 诺如病毒的检测

诺如病毒传播力强，在特效药和疫苗缺乏的情况下，迅速且准确的检测和诊断对于控制其传播至关重要。尽管在人 B 细胞和肠上皮细胞中培养诺如病毒的试验已有进展，但尚未开发出适用于临床检测的体外培养方法^[74,76]。因此，目前主要依赖电镜检测、免疫学检测和分子生物学检测等手段来检测诺如病毒^[77]。此外，基因芯片和生物传感器技术虽然近年来有所发展，但仍面临诸多挑战，需要进一步深入研究。

1.6.1 电镜方法

电镜法包括直接电镜法（EM）和免疫电镜法（IEM），它可以直接观察到病毒的形态学特征，在 20 世纪 90 年代之前，一直是诺如病毒的主要检测手段。我国最早由方肇寅等^[78]通过直接电镜观察到了诺如病毒颗粒。但是使用电子显微镜的方法检测诺如病毒，对粪便样本中的病毒载量有一定要求，而且灵敏度较低，设备费用较高，操作复杂，因此不适合作为临床诊断诺如病感染的常规方法。

1.6.2 分子生物学方法

1990 年，通过克隆和测序技术，首条诺如病毒基因组序列被成功获取^[79]。随后，基于诺如病毒基因组的分子生物学检测方法逐渐崭露头角，逐步取代了传统的电子显微镜检测方法，成为诺如病毒检测的主流手段。随着核酸检测技术的不断进步，尤其是聚合酶链式反应（RT-PCR）和实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）技术的广泛应用，该方法已成为诺如病毒检测的“金标准”^[80]，这为病毒检测提供了一种更为准确、高效的方法。

PCR 技术，尽管已在诺如病毒检测中得到广泛应用，但仍受限于较长的反应时间、对专业 PCR 实验室的需求以及对昂贵 PCR 扩增仪的依赖。这些因素限制了其在基层实验室或疫情现场等设备不足环境下的应用。然而，随着科学技术的进步，依赖核酸序列的扩增技术（Nuclear Acid Sequence-Based Amplification, NASBA）、环介导等温核酸扩增技术（Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP）以及重组聚合酶扩增技术（Recombinase Polymerase Amplification, RPA）等新型检测方法在 PCR 技术的基础上取得了显著进展。这些新技术有望克服传统 PCR 技术的局限，为

诺如病毒的快速、准确检测提供新的解决方案。宋克云等^[81]采用 RT-LAMP 法进行样品检测,并与 RT-PCR 法进行了对比分析,研究结果显示,RT-LAMP 法与 RT-PCR 法的特异性符合率高达 100%,且两种方法对诺如病毒 GII 型的检出限均为 15.6 pg/管。这一发现表明,LAMP 法作为一种新型检测技术,具有快速且准确的特性。此外,随着科技的不断进步,基于基因测序技术、基因芯片技术以及 CRISPR 分子检测技术等新型检测方法也相继涌现。Lei Duan^[82]等基于 CRISPR/Cas13a 与 RPA 技术开发了一种快速高效的 GII.4 诺如病毒等温检测方法,不仅能够显著提高检测的灵敏度和特异性,还能实现对 GII.4 型诺如病毒的有效检测。

另外,在市场上,已有多个品牌的诺如病毒核酸检测试剂盒得到广泛应用,如广州达安基因股份有限公司、湖北朗德医疗科技有限公司以及上海伯杰医疗科技股份有限公司生产的 PCR-荧光探针法试剂盒。这些试剂盒利用先进的荧光 PCR 技术,能够实现对诺如病毒的快速、准确检测,为疫情防控和临床诊断提供了有力支持。

1.6.3 免疫学方法

免疫分析方法是以前抗原与抗体间的特异性反应为核心机制,旨在实现特定抗原或抗体的精准检测。主要包括免疫吸附血凝试验 (Immune Adherence Hemagglutination Assay, IAHA)、放射免疫测定法 (Radioimmunoassay, RIA)、免疫层析技术 (Immuno-Chromatography, ICG)、生物传感器 (Biosensors)、酶联免疫吸附测定等这些免疫学方法已成为多个领域普遍使用的免疫学检测技术^[83]。

1.6.3.1 免疫吸附血凝试验 (IAHA)

在 1966 年,IAHA 成功地应用于测量某些动物病毒(如单纯疱疹病毒、猿猴病毒 40、腺病毒和肠道病毒)及其抗体的检测^[84]。此后,这一方法经过深入研究,逐渐扩展至其他病毒及其抗体反应的检测。例如,Kapikian 等人^[85]利用 IAHA 试验,通过采用来自粪便的纯化病毒作为抗原,成功检测了急性流行性非细菌性胃肠炎的诺瓦克病毒抗体。大约到了 20 世纪 70 年代末,IAHA 检测开始逐渐取代 EM 和 IEM 在临床样本中对诺如病毒的检测。IAHA 利用人红细胞与抗原-抗体复合物的凝集作用来研究人类诺如病毒 (HuNoVs) 的血清阳性率,这种方法不仅快速、简单、便宜,而且具有一定的灵敏度和特异性。然而,IAHA 也存在一些局限性。首先,它不能有效区分免疫球蛋白的亚类,这在一定程度上影响了检测结果的精确性。其次,病毒凝集红细胞的问题也阻碍了其更广泛的应用^[83]。此外,由于该方法不适合直接检测粪便样本中的诺如病毒,因此在某些情况下,可能需要结合其他检测方法以获得更准确的诊断结果^[86]。

1.6.3.2 放射免疫测定法 (RIA)

RIA 是一种基于抗原与抗体间特异性反应的高灵敏度检测技术,其核心在于利用未标记抗体(或抗原)与放射性同位素(如 ^{125}I)标记的相应抗体(或抗原)之间的竞争性结合来检测病毒抗原(或抗体)。这一方法通常以微孔板的形式进行,能够实

现对病毒抗原或抗体的精准定量。在病毒学领域，RIA 的应用尤为广泛。1978 年，Greenberg 等^[87]便成功运用微量滴定固相 RIA 技术检测了 Norwalk Virus（来自粪便样本）及其抗体，其灵敏度显著优于传统的 IAHA 测定方法。具体来说，在检测粪便样品中的诺如病毒抗原时，研究者们从诺如病毒感染患者的康复期血清中纯化出 IgG 抗体，并进行放射性标记。随后，这些放射性标记的 IgG 与未标记的 IgG 一同加入样本，与诺如病毒抗原发生竞争性结合。当放射性信号降低 50%或更多时，即可证明样本中存在诺如病毒抗原。相较于 IAHA，RIA 在检测诺如病毒抗体方面展现出更高的灵敏度，通常高出 10~200 倍，且所需抗原量大幅减少^[88]。然而，值得注意的是，尽管 RIA 具有诸多优势，但也有研究发现，在某些情况下，RIA 可能无法检测到某些诺如病毒株系^[89]。这可能与病毒的变异、抗体的特异性以及实验条件等多种因素有关。此外，无论是 IAHA 还是 RIA，它们在实际应用中均受到一定限制。这两种方法均依赖于人类志愿者提供的材料，这在一定程度上限制了它们的应用范围。

1.6.3.3 免疫层析技术（ICG）

ICG通过将特异性抗原或抗体固定在层析膜表面，利用液体介质的毛细作用，实现对待测物的快速检测。胶体金作为标记物，在免疫层析中发挥着重要作用，其简便、高效的特点使得该技术成为病毒检测的优选方案之一。虽然胶体金层析技术无法精确测定病毒载量，但其快速检测病毒感染的能力仍具有显著价值。此外，该技术操作简单，结果直观，无需复杂设备辅助，使得其在基层医疗机构和现场检测中具有广泛的应用前景。

国外产品ICG试剂盒，包括Ridaquick和SD Bioline等两种常用的试剂盒，性能差异很大，具体而言，其灵敏度范围分别为17.0~83.0%和23.0~92.0%，特异性范围分别为87.5~100.0%和99.7~100%^[90]。相比之下，国内诺如病毒试剂盒研究处于起步阶段，如北京新兴四囊生物技术有限公司的诺如病毒核酸检测试剂盒（胶体金法）、北京英诺特生物技术有限公司A群轮状病毒、腺病毒、诺如病毒抗原检测试剂盒（乳胶层析法）等，已在国内完成注册，这些试剂盒均通过对患者粪便样本中诺如病毒RNA进行定性检测，但缺乏相关的灵敏度和特异性数据，仍需进一步验证。

1.6.3.4 生物传感器

生物传感器是根据抗原与抗体之间的特异性互补结构制定特定的传感器，检测技术首先在生物感受器表面进行抗原与抗体的特异性结合反应，而后进行信号的转化过程，即对抗原与抗体特异性结合产生的光信号或电信号进行实时监测，以此实现对待测物中特定抗原或抗体进行定量或半定量的分析。根据使用的信号，生物传感器主要分为光学、电化学、压电、热、磁和微机械生物传感器^[91]。

基于光学的生物传感器包括表面增强拉曼散射（Surface Enhanced Raman Scattering, SERS）和表面等离子体共振（Surface Plasmon Resonance, SPR）等。该项检测技术由于具备的高效便捷性、高灵敏度、高特异性以及检测所需样品量较少

等优势逐渐在病原微生物检测领域中受到青睐。通过监测抗原与抗体结合后产生的光信号变化,光学生物传感器能够实现对病原体的快速、准确检测,为疾病的早期诊断和防控提供了有力支持。此外,电化学生物传感器也以其独特的优势在病原微生物检测中发挥着重要作用。通过电极将生物敏感物质固定,并实时监测生物反应过程中的电信号变化,电化学生物传感器能够实现对病原体的高灵敏度检测。然而,尽管生物传感器在病原微生物检测中取得了显著进展,但仍存在一些挑战和问题需要解决。

1.6.3.5 酶联免疫吸附技术(ELISA)

ELISA是一种高效且经济的检测方法,广泛应用于病毒抗体或抗原的筛查中。该技术通过将特异性抗原或抗体固定在酶标板上,随后加入待检样本及底物进行孵育,最终通过酶标仪在特定波长下的显色反应进行测读,从而实现对病毒抗体或抗原的准确检测。ELISA技术具有显著优势,具有特异性强、灵敏度高、诊断迅速以及经济实用等特点,因此成为当前广泛应用的检测方法之一。在诺如病毒的检测中,ELISA作为辅助检测技术,已成功应用于实际场景中,为病毒的快速筛查和诊断提供了有力支持。综上,酶联免疫吸附技术凭借其出色的性能和应用广泛性,在病原微生物检测领域发挥着重要作用,并为疫情防控和医学诊断提供了重要的技术手段。1992年,Jiang^[92]等成功利用重组杆状病毒表达了诺如病毒衣壳蛋白,并基于此建立了快速、灵敏且经济的诺如病毒酶联免疫检测方法。然而,这种方法具有显著的局限性,即其免疫反应的病毒型别特异性过强,这在一定程度上限制了其在实际应用中的广泛性和通用性。

目前市面上已有多种用于检测诺如病毒的商品化试剂盒,然而,根据以往的研究,使用ELISA方法检测诺如病毒时存在灵敏度较低的缺点。因此,在实际应用中,ELISA方法通常仅作为辅助手段,而不是主要的检测方法。为了确保检测结果的准确性,应当适度使用ELISA,并结合分子生物学或病原学诊断技术进行综合分析。值得一提的是,近年来,通过利用具有特定靶标功能的单克隆抗体技术来构建ELISA检测方法,其特异性和灵敏度得到了一定的提高。这种改进后的ELISA方法不仅操作简便,而且具有一定的应用范围,为诺如病毒的检测提供了新的可能性和选择^[93]。快速检测盒的出现,标志着诺如病毒检测技术取得了重大进展,它使得诺如病毒的检测不再局限于专业的大型实验室,而是能够实现快速且准确的现场检测。这一创新显著降低了诺如病毒的检测成本,提高了检测效率^[94]。尽管国外已有多种商品化试剂盒用于诺如病毒的检测,如英国的IDEIA、德国的RIDASCREEN以及日本的SRSV(II)-AD等,但这些试剂盒在灵敏度和特异度方面仍有待提升。研究显示,它们的灵敏度波动在36~80%,而特异度则在47~100%,这样的结果并不理想^[95]。即便是经过美国FDA认证的RIDASCREEN诺如病毒第三代ELISA试剂盒,在实际应用中也未能得到广泛的采纳和使用。因此,尽管商品化试剂盒为诺如病毒的检测提供了一定的便利,但其性能上的不足仍限制了其在实际应用中的推广和普及。未来,我们

仍需努力改进和提高诺如病毒检测技术的灵敏度和特异性，以满足实际检测需求。

1.7 本课题研究的内容与意义

本课题旨在利用哺乳细胞系统表达诺如病毒P蛋白，通过免疫动物制备特异性单克隆抗体。在此基础上，建立一种用于检测诺如病毒的双抗夹心ELISA方法，为研制适用于诺如病毒疫情暴发现场的快速检测试剂盒奠定技术基础。通过这一研究，能够快速识别出潜在的诺如病毒感染者，从而为诺如病毒的防控提供有力的技术支持。

主要研究内容包括：

(1) 通过生物信息学分析，揭示诺如病毒不同序列之间的保守性和差异性，并构建氨基酸序列进化树，分析序列间的进化关系。我们成功构建诺如病毒P蛋白的克隆表达载体，获得了具有高免疫原性的病毒衣壳P蛋白。

(2) 将诺如病毒P蛋白作为免疫原，免疫BLAB/c小鼠后，利用杂交瘤技术制备单克隆抗体并结合间接ELISA、竞争ELISA等技术筛选，最终获得了两株符合要求的杂交瘤细胞株。然后对该杂交瘤细胞株进行测序，获得抗体可变区的基因序列，构建了单克隆抗体全长基因的表达载体，最终获得稳定的目标抗体IgG。

(3) 综上，对筛选出的抗体进行工作浓度等参数的优化，建立双抗夹心ELISA检测体系。然后对该方法的空白限（LoB）和检出限（LoD）进行了严格的评估，以确保方法的可靠性和稳定性。

1.8 本课题研究的主要技术路线

本研究的主要技术路线图如下（图 1-3）：

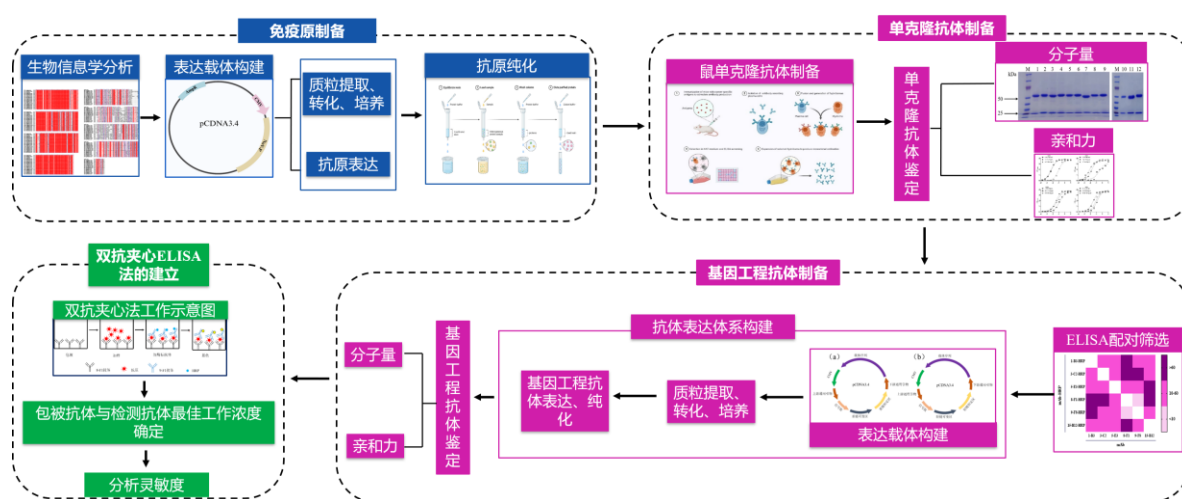


图 1-3 课题主要技术研究路线图

Figure 1-3 Main technology research roadmap of the subject

2 材料与方法

2.1 试验材料与仪器

2.1.1 毒株样本及载体来源

诺如病毒核酸样本（GII.4 型）由丹娜（天津）生物科技有限公司赠送，该核酸样本保存并储存在-80℃冰箱中。pCDNA3.4 通用载体、293F 细胞由本实验室保存。

2.1.2 试验动物来源

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，购自于北京维通利华实验动物技术有限公司，本实验遵循《实验动物保护条例》，在实验动物房中饲养并观察 1 周，确认健康后用于免疫。骨髓瘤细胞（SP2/0）由本实验室保存。

2.1.3 主要试剂和材料

表 2-1 实验主要试剂和材料

Table 2-1 The experimental main reagents and materials

名称	纯度	生产厂家
酵母粉	分析纯	OXOID 公司
蛋白胨	分析纯	OXOID 公司
琼脂粉	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
氨苄青霉素钠	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
琼脂糖	分析纯	上海翊圣生物科技有限公司
无内毒素质粒大提试剂盒	生化试剂	天根生化科技（北京）有限公司
OMEGA 凝胶回收试剂盒	生物试剂	OMEGA 公司
DNA Marker	生化试剂	南京诺唯赞生物科技有限公司
彩色预染蛋白 Marker	生化试剂	北京康润诚业生物科技有限公司
Gly	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
Tris	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
D-生物素	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
盐酸	分析纯	天津市康科德科技有限公司
硫酸	分析纯	天津市康科德科技有限公司
TRIzol	生物级	上海碧云天生物有限公司
DMSO	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
Transpro CD 01 培养基	生物级	上海多宁生物科技股份有限公司
Transpro feed 1 培养基	生物级	上海多宁生物科技股份有限公司
PEI40000	生物级	翌圣生物科技股份有限公司
谷氨酰胺	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
双抗（青链霉素混合液 100 ×）	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
RPMI-1640 培养基	生物级	Sigma 公司
HT 培养基补充物 50 ×	生物级	Sigma 公司

表 2-1 (续)

名称	纯度	生产厂家
HAT 培养基补充物 50 ×	生物级	Sigma 公司
protein G	生物级	天地人和生物科技有限公司
STarm Streptactin Beads 4FF	生物级	天地人和生物科技有限公司
NaCl	分析纯	Aladdin 公司
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	分析纯	Aladdin 公司
胎牛血清	生物级	Sigma 公司
新生牛血清	生物级	四季青
Hybridoma Feeder 添加因子	生物级	北京博奥龙免疫技术有限公司
腹水专用佐剂	生物级	北京博奥龙科技有限公司
无水乙醇	分析纯	天津市康科德科技有限公司
弗氏完全佐剂	分析纯	北京浩赛科技有限公司
弗氏不完全佐剂	分析纯	北京浩赛科技有限公司
KCl	分析纯	Aladdin 公司
KH ₂ PO ₄	分析纯	Aladdin 公司
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	分析纯	Aladdin 公司
BSA	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
HRP 标记羊抗鼠 IgG	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
胎牛血清	生物级	浙江天杭生物科技有限公司
四甲基联苯胺 (TMB)	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
考马斯亮蓝 R-250	分析纯	北京索莱宝生物科技有限公司
生物素	生物级	北京索莱宝生物科技有限公司
辣根过氧化物酶标记试剂盒	生化试剂	湖州英创生物科技有限公司

2.1.4 主要仪器和设备

表 2-2 实验仪器及基本信息表

Table 2-2 The experimental instruments and basic information sheet

仪器	公司
磁力搅拌器	上海力辰邦西仪器有限公司
台式高速冷冻离心机	湖南湘仪离心机有限公司
恒温金属浴	丹娜(天津)生物科技股份有限公司
天平(万分之一)	日本岛津公司
二氧化碳培养箱	上海知楚仪器有限公司
生物安全柜	海尔生物医疗
水浴锅	天津欧诺仪器仪表有限公司
灭菌锅	江阴滨江医疗设备有限公司

表 2-2 (续)

仪器	公司
圆周振荡器	尚科/天津英爱商贸有限公司
Molecular Devices 酶标仪	美谷分子仪器(上海)有限公司
HBS-1101 酶标分析仪	南京德铁生物科技有限公司
电热恒温培养箱	上海一恒科学仪器有限公司
电泳槽	北京六一生物科技有限公司
DYY-12 电泳仪	北京六一生物科技有限公司
Bio-Rad 凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司
细胞计数仪	艾力特生命科学有限公司
全自动凝胶成像系统	广州光仪生物科技有限公司
超微量紫外分光光度计	普睿博仪器(杭州)有限公司
倒置生物显微镜	舜宇光学科技(集团)有限公司
pH 计	上海仪电科学仪器股份有限公司

2.1.5 主要溶液配制

(1) LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 800 mL 蒸馏水溶解后, 蒸馏水定容至 1000 mL, 121°C 高压灭菌 20 min。

(2) 固体培养基: 向 LB 液体的培养基内加入 2% (w/v) 的琼脂粉即可。

(3) 平衡缓冲液 (0.01 M PB+0.15 M NaCl): 准确称取 1.1856 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.4392 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 8.775 g NaCl, 用 800 mL 蒸馏水溶解, 定容至 1 L, pH=7.0。

(4) PBS 缓冲液: 准确称取 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.27 g KH_2PO_4 , 用 800 mL 蒸馏水溶解, 定容至 1 L, pH 调至 7.4。

(5) 洗脱液 (0.1 M Gly-HCl): 准确称取 7.507 g Gly, 用 800 mL 蒸馏水溶解, 用 HCl 调 pH 至 3.0, 并定容至 1 L。

(6) 洗脱液 (生物素): 平衡液中加入 5 mM D-生物素。

(7) 中和液 (1 M Tris-HCl): 准确称取 Tris 121.14 g, 用 800 mL 蒸馏水溶解, 用浓 HCl 调 pH 至 8.5, 并定容至 1 L。以上用到的缓冲液均使用 0.22 μm 滤膜过滤。

(8) PBST 缓冲液: PBS 添加 Tween 20 至终浓度为 0.05%。

(9) 封闭液: PBS+2% BSA+2% 新生牛血清, 现用现配。

(10) 抗体稀释液: PBST+1% BSA, 稀释一抗与二抗。

(11) Transpro CD 01 培养基: 1 L 培养基中加入 6% (v/v) 谷氨酰胺, 混匀备用。

(12) RPMI-1640 完全培养基: 1640 基础培养液, 850 mL, 胎牛血清 (FBS), 150 mL, 1% 双抗 (青霉素链霉素), 混匀备用。

(13) HAT 培养基: 在 RPMI-1640 完全培养基中加入 10% (v/v) 的 Hybridoma

添加因子和 2% HAT，定容至 200 mL。

(14) HT 培养基：在 RPMI-1640 完全培养基中加入 10% (v/v) 的 Hybridoma 添加因子和 2% HT，定容至 200 mL。

2.2 实验方法

2.2.1 诺如病毒 P 蛋白生物信息学分析

2.2.1.1 诺如病毒 P 蛋白氨基酸多序列比对

本部分内容为探究 P 片段氨基酸序列的保守位点，GII.4 是当前诺如病毒的流行毒株，因此本序列比对研究重点在 GI.4 序列上，此外，为更好完成序列保守位点分析，故将感染人的其它毒株 GI 型和 GII 型毒株也纳入比对范围之内。第一组以提供的样本（GII.4 型）为模板，将送测结果上传到 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站进行 BLAST 比对，搜索该片段基因的同源序列，然后从 Genbank 数据库下载诺如病毒 GI.4 型流行毒株序列 17 条，在 MEGA-X 生物分析软件中采用 ClustalW 方法进行氨基酸序列比对，下载相应氨基酸序列 FASTA 格式，探究各序列的保守位点。第二组序列比对，通过 NCBI 网站数据库搜索不同国家和地区具有代表性的 GII 型序列 9 条，GI 型 7 条，比对方式同第一组相同。

2.2.1.2 氨基酸序列进化树

在 2.2.1.1 中，我们已完成多重序列比对，并将 MEGA 文件作为输入，选用 MEGA-X 中的 PHYLOGENY 模块进行后续分析。在构建系统发育树时，采用了 Neighbor-Joining 方法。完成建树后，为确保进化树中每个分支的可信度，我们设定自展值 Bootstrap 为 1000 进行检验。自展值的大小直接反映了分支的可信度，数值越大，表示可信度越高。

2.2.2 重组诺如病毒 P 蛋白表达载体的构建

2.2.2.1 实验引物

实验中用到的引物如下：

表 2-3 引物序列

Table 2-3 Primer Sequences

引物	引物序列 (5'-3')
NoV-F	ATGAGACCCAAGCTGAATTCATGTCAAGAACTAAACCATTC
NoV-R	GCGTAGACGTGCATTATCTAGATAAACCCGCTG
CMV-F	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
CMV-R	5'-GTTACGGTGCCCTCC-3'

2.2.2.2 cDNA 的合成

按下表配制反转录体系，配置好后，用移液器轻吹吸混合均匀，至于离心机上

瞬时离心，然后置于 PCR 仪上合成 cDNA。反应条件为 42°C 10 min（孵育反应），85°C 5 s（反应失活），反应结束后将生成的 cDNA 作为模板用于扩增。

表 2-4 反转录体系

Table 2-4 Reverse transcription system

名称	体积 μL
0.1M DTT	1
Rnase out	1
Random Hexamers (50 μM)	6
SuperScript IV Reverse Transcriptase	3
RNase Free ddH ₂ O	11
dNTPs	4
Template RNA	10
10 $\times$ buffer	4
总体系	40

2.2.2.3 获取目的基因片段

根据基因序列设计上下游引物并以病毒基因组的 cDNA 为模板扩增，引物由安升达（天津）生物科技有限公司合成，在上下游引物并在上、下游引物两端分别加入 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切位点（下划线部分）和合适保护碱基。

表 2-5 PCR 扩增体系

Table 2-5 PCR amplification system

名称	体积 μL
cDNA 模板	5
10 $\times$ buffer	5
MgCl ₂	1
NoV-F	1
NoV-F	1
dNTP	1
Hotter Tag Plus (Qiagen)	0.4
ddH ₂ O	35.6
总体系	50

2.2.2.4 切胶回收

1%凝胶电泳 DNA 目的片段使用 OMEGA 公司胶回收试剂盒回收，具体步骤如下：

（1）称取 EP 管内凝胶块的重量，按照 100 mg=100 μL 体积计算，加入 3 倍体的

XP2 Binding Buffer 溶解液, 55°C 水浴 10 min, 让凝胶块完全溶解, 水浴期间, 多次振荡混匀加速溶胶。

(2) 瞬时离心收集管壁上的液滴, 然后将溶胶液转移至套有收集管的吸附柱中, 12000 rpm, 离心 1 min, 弃掉滤液。

(3) 加入 700 μ L 的洗涤缓冲液 SPW Buffer 至吸附柱中, 12000 rpm, 离心 1 min, 弃掉滤液。重复一次, 提高回收 DNA 纯度。

(4) 把柱子套回收集管中, 12000 rpm, 空转 5 min, 开盖在烘箱中静置 10 min, 待吸附膜干掉。

(5) 将吸附柱放到一个新的收集管中, 在吸附膜中间加入已预热适量的 ddH₂O, 室温静置 2 min, 12000 rpm 离心 5 min, 收集纯化后的产物测定浓度, 取少量进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 其余置于 -20°C 冰箱中保存。

2.2.2.5 质粒提取

(1) 大肠杆菌的培养

从 -80°C 冰箱中取出保存的 pCDNA3.4 载体的 *E. coli* DH5 α , 在 LB 固体培养基平板上三区划线, 将平板倒置于 37°C 培养箱中培养 12~18 h, 挑取单菌落于 LB 液体培养基, 在 37°C, 180 rpm 摇床中培养 12~18 h。

(2) 质粒采用天根生化科技(北京)有限公司无内毒素质粒大提试剂盒, 具体操作如下:

① 柱平衡: 首先, 将吸附柱 CP6 放入收集管中, 并加入 2.5 mL 的平衡液 BL。随后, 以 8000 rpm 离心 2 min。倒掉废液后, 将吸附柱重新放回收集管中。

② 收集菌体: 取 100 mL 过夜培养的菌液, 放入离心管中, 以 8000 rpm 离心 3 min。尽量吸除上清液, 若菌液较多, 可通过多次离心将菌体收集到一个离心管中。

③ 悬浮菌体: 向含有菌体沉淀的离心管中加入 8 mL 已加入 RNase A 的溶液 P1。使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

④ 裂解菌体: 向离心管中加入 8 mL 溶液 P2, 轻轻地上下翻转 6~8 次, 确保菌体充分裂解, 室温放置 5 min。

⑤ 中和并沉淀: 再加入 8 mL 溶液 P4, 立即轻轻地上下翻转 6~8 次, 充分混匀, 此时将出现白色絮状沉淀。室温放置 10 min。然后, 以 8000 rpm 离心 10 min。

⑥ 转移上清液: 将全部溶液小心倒入过滤器 CS1 中, 慢慢推动推柄过滤, 滤液收集在干净的离心管中。

⑦ 向滤液中加入 0.3 倍体积的异丙醇, 上下颠倒后转移到套有收集管的吸附柱 CP6 中。8000 rpm 离心 2 min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱 CP6 重新放回收集管中。

⑧ 漂洗: 向吸附柱 CP6 中加入 10 mL 已加入无水乙醇的漂洗液 PW, 以 8000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液。重复此步骤一次。

⑨ 去除残余漂洗液: 将吸附柱放回收集管中, 向吸附柱 CP6 中加入 3 mL 无水乙醇, 以 8000 rpm 离心 2 min。

⑩ 洗脱：将吸附柱置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 1 mL 洗脱缓冲液 TB。室温静置 5 min 后，以 8000 rpm 离心 2 min，将质粒溶液收集到离心管中，超微量分光光度计测定浓度，保存-20℃。

2.2.2.6 质粒的酶切

用快速限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切，于薄壁 PCR 管中混匀，置于 37℃ PCR 仪中酶切反应 30 min，获得线性化的克隆表达载体 pCDNA3.4，对酶切产物采用 OMEGA 公司胶回收试剂盒纯化回收，具体步骤同 2.2.2.4。

表 2-6 质粒酶切体系

Table 2-6 Plasmid enzyme digestion system

名称	体系
10×QuickCut buffer	2.5 μL
载体片段	100 ng
<i>EcoRI</i>	1 μL
<i>XbaI</i>	1 μL
ddH ₂ O	加至 25 μL

2.2.2.7 目的片段与载体 pCDNA3.4 的连接

使用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 将目的片段连接到载体，步骤如下：

ClonExpress MultiS 重组反应体系中克隆载体和插入片段的推荐使用量均为 0.03 pmol，可由以下公式进行粗略计算：

每个片段最适使用量=[0.02×片段碱基对数] ng

根据公式计算重组反应所需要的量，配制表 2-7 反应体系，其中 X/Y 根据公式计算得到载体用量和各插入片段用量，如果浓度太高，在配制重组体系前可将线性化载体与插入片段做适当稀释，各组分加样量不低于 1 μL。

表 2-7 重组反应体系

Table 2-7 Components of recombination reaction

名称	体积 μL
线性化载体	X
插入片段	Y
5×CE MultiS Buffer	2
Exnase MultiS	1
ddH ₂ O	加至 10

重组反应条件：配制好重组反应体系后，用移液枪轻轻吸打混匀，短暂离心收集管壁液体，37℃ 在 PCR 仪中连接 30 min，反应结束后，立即置于冰上冷却，可直

接用于转化或置于-20℃冰箱保存。

2.2.2.8 pCDNA3.4 质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞

(1) 取出-80℃冰箱中保存的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，加入连接产物，混匀后冰中放置 30 min。

(2) 取出 EP 管，放入 42℃ 恒温金属浴中热激 90 s（不要振荡），取出后迅速在冰中放置 1~2 min。

(3) 添加 900 μ L 无抗性的 LB 培养基复苏质粒，至终体积 1 mL，37℃ 振荡培养 1 h（100 rpm）。

(4) 在超净工作台中，取出适量菌液涂布到含氨苄的 LB 平板上，待菌液被吸收后放入 37℃ 恒温培养箱过夜 12~16 h。

2.2.2.9 菌落 PCR 验证

用 10 μ L 灭菌的枪头挑取 2.2.2.8 转化后的生长良好的白色单菌落 10 个于含 20 μ L 体系的 PCR 管中，使用引物 CMV-F 和 CMV-R 进行菌落 PCR。

表 2-8 菌落 PCR 体系

Table 2-8 Colony PCR system

名称	体积 μ L
2 $\times$ Rapid Taq Master Mix	7.5
CMV-F	0.5
CMV-R	0.5
ddH ₂ O	加至 15

PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min（高温下可直接裂解细胞释放质粒）；95℃ 变性 15 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 60 s，共 30 个循环；最后 72℃ 彻底延伸 5 min。将菌落 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，取 5 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳验证，选择预期大小的目的条带的阳性菌落接种于含氨苄的 LB 培养基中培养，次日取 1 mL 菌液送至安升达（天津）生物科技有限公司测序，测序结果正确的菌液于甘油中-80℃ 保存，为提取质粒做准备。

2.2.3 重组诺如病毒 P 蛋白的表达和纯化

2.2.3.1 293F 细胞复苏、传代、冻存

(1) 将冻存细胞从液氮中取出后，在 37℃ 水浴锅内水浴促进其融化。

(2) 移入 15 mL 离心管中，加入 10 mL 预热的 Transpro CD 01 培养基轻轻吹匀，离心，800 rpm 离心 2 min，弃上清液。

(3) 加入 3 mL 培养基，轻轻吹打，补充 27 mL 培养基到细胞摇瓶中，在 37℃，120 rpm，8% CO₂ 条件下的细胞培养箱中培养。

(4) 细胞复苏 3 d 后，从培养箱取出，先用 75% 的酒精喷洒于瓶表面，在生物

安全柜中取 20 μL 细胞培养液，用细胞计数仪计数。

(5) 待细胞密度增长至 3×10^6 个/mL 时，取 3 mL 细胞培养液加入到装有 27 mL 新鲜的 Transpro CD 01 培养基的细胞摇瓶中，在 37°C ，120 rpm，8% CO_2 条件下的细胞培养箱中继续培养。

(6) 按照上述步骤继续传代多次后，细胞密度长至 3×10^6 个/mL 时，可以进行细胞瞬时转染。

(7) 细胞复苏 3 d 后，从培养箱取出，先用 75% 的酒精喷洒于瓶表面，在生物安全柜中取 20 μL 细胞培养液，用细胞计数仪计数。

(8) 待细胞密度增长至 3×10^6 个/mL 时，取 3 mL 细胞培养液加入到装有 27 mL 新鲜的 Transpro CD 01 培养基的细胞摇瓶中，在 37°C ，120 rpm，8% CO_2 条件下的细胞培养箱中继续培养，800 rpm 离心 2 min，弃上清液。

(9) 加入 1 mL 冻存液（10% DMSO）重悬，放入冻存盒内，立刻放入 -80°C 过夜，第二天放入液氮中。

2.2.3.2 细胞瞬时转染

从 CO_2 细胞培养摇床中取出细胞种子液，使用细胞计数仪对细胞进行计数，倒置显微镜观察细胞状态并记录，待细胞生长状态良好，种子细胞浓度 3×10^6 个/mL，即可通过线性转染试剂 PEI40000 进行转染。每 1L 细胞需要 1.6 mg 质粒与 5.12 mg PEI，分别用 Transpro CD 01 培养基稀释，然后将配制好的转染试剂 PEI 缓慢滴入到稀释后的质粒中，边滴入边轻轻混匀，静置 10 min 后将上述混合物缓慢加入待转染的细胞摇瓶中，将细胞摇瓶密封好，做好标记， 37°C ，120 rpm，8% CO_2 的条件下继续培养，培养 16~24 h 之间添加 5% 细胞体积的 Transpro feed 1 培养基。之后，每天通过显微镜观察细胞状态，并用细胞计数仪计数，观察细胞活率。

2.2.3.3 诺如病毒 P 蛋白纯化

pCDNA3.4 载体在其多酶切位点的 C 端有 strep tag (II) 标签，因此选用 STarm Streptactin Beads 4FF 柱料纯化，具体操作步骤如下：

(1) 收集细胞

当细胞活率降到 60%，收集细胞上清， 4°C ，8000 rpm，离心 20 min 收集上清液，然后将上清液转移至新的容器内。

(2) 蛋白纯化

将装填好的 Strep 重力柱用 5 倍体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。将收集的细胞上清液加到平衡好的重力柱中，保证细胞上清和填料充分接触，收集流穿液，上样 2 次。然后用 15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。再使用 5 倍柱体积的生物素洗脱，洗脱液 1 mL 分装于 EP 管中备用。最后使用 5 倍体积的平衡液平衡填料，保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4°C 冰箱保存。

(3) 浓度的测定

利用超微量紫外可见分光光度计检测，波长设置为 280 nm，计算出蛋白浓度。使用超滤管浓缩，转速设置为 6000 rpm，离心力 4000 g，10 min，浓缩到需要的终浓度和体积，再加入 PBS，浓缩到相同的体积，连续 5 次，期间轻轻吹打，混匀蛋白液。最后一次，从超滤管中吸取样品，测量样品浓度。

2.2.3.4 SDS-PAGE 电泳

(1) 验漏：组装制胶槽，用 1 mL 枪加超纯水，静置 10 min，验证是否漏液。

(2) 配制分离胶：取出凝胶试剂盒中预混合的分离胶溶液 5 mL，加入 1% 的过硫酸铵，再加入 1% 的 TEMED，混合均匀。迅速将配好的分离胶加入制胶槽中，注意应沿着边缘缓慢加入，以免气泡进入。加好分离胶后，轻轻在分离胶溶液上覆盖一层乙醇封胶，使凝胶表面变得平整。放在水平桌面上，静置 40~60 min，使凝胶聚合，聚合完成后，弃掉上层乙醇，随后使用滤纸吸去残余液体。

(3) 配制浓缩胶：取出凝胶试剂盒中预混合的浓缩胶溶液 2 mL，加入 1% 的过硫酸铵，再加入 1% 的 TEMED，混合均匀。迅速将已配好的浓缩胶加入制胶槽中，紧接着将梳子插入凝胶内，确保梳子齿底与前玻璃板顶端平齐，操作过程需谨防气泡混入。随后，静置 40~60 min，使凝胶充分聚合。

(4) 加样孔制备：将胶板置入电泳槽内，并加入电泳缓冲液，确保凝胶上下两端均充分浸润于缓冲液中，缓慢匀速拔出梳子。

(5) 样品处理：将 4×Loading buffer 缓冲液与样品混匀，置于 1.5 mL EP 管中，然后将 EP 管置于金属浴中，温度设置为 100℃，时间为 10 min。待冷却至室温后，4℃ 离心 12000 rpm，4 min。

(6) 加样及电泳：吸取上清分别加至电泳槽的加样孔底部，调节电压至 80 V，20 min。待溴酚蓝前沿进入分离胶时或处于同一水平线时，增加电压至 120 V，溴酚蓝指示剂跑至底部或距离边缘 1 cm，即可停止电泳。

(7) 染色及脱色：将凝胶放入染色液（考马斯亮蓝）中缓慢摇动，转速设置 55 rpm，微波炉加热 20 s 至底部微烫，染色 40 min。凝胶经染色后取出，用水漂洗干净，随后置于脱色液中脱色 2 h，直至背景蓝色消退，条带显现。

(8) 照胶：将褪去颜色的凝胶置于凝胶成像仪中拍照，鉴定蛋白条带的大小。

2.2.4 抗诺如病毒 P 蛋白单克隆抗体的制备

取 6~8 周适龄的 BALB/c 雌性小鼠，共免疫 5 只，注射诺如病毒 P 蛋白抗原溶液，免疫方式为小鼠背部皮下多点注射。初次免疫与等体积的弗氏完全佐剂（Complete Freund's Adjuvant, CFA）完全混合并充分乳化，免疫剂量为 50 µg/只。加强免疫使用与初次免疫相同剂量抗原与弗氏不完全佐剂（Incomplete Freund's Adjuvant, IFA）完全混合并充分乳化，加强免疫共三次，每次间隔时间为两周。在免疫之前，保留 1 只小鼠血清作为空白对照。细胞融合前 3 天，以 50 µg/只剂量将抗原直接注射到小鼠腹

腔内冲击免疫，不使用佐剂，免疫方案如表2-9所示。

表2-9 免疫方案

Table 2-9 Immunization scheme

免疫周期	免疫原	免疫剂量 ($\mu\text{g}/\text{只}$)	免疫位置
1	抗原+CFA	50	背部皮下多点注射
3	抗原+IFA	50	背部皮下多点注射
5	抗原+IFA	50	背部皮下多点注射
7	抗原+IFA	50	背部皮下多点注射
9	抗原	50	小鼠腹腔内注射

具体步骤:

第一周，初次免疫，将诺如病毒P蛋白抗原溶液与等体积的CFA按照1:1完全乳化至油包水状态，然后进行背部皮下多点注射，免疫量50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。

第三周，加强免疫，使用相同的方式将IFA与抗原充分乳化均匀后，以相同途径和剂量免疫，继续免疫小鼠。

第五周：加强免疫，按以上方式进行免疫，佐剂为IFA，注射体积、免疫量、注射途径不变。

第七周：加强免疫，按以上方式进行免疫，佐剂为IFA，注射体积、免疫量、注射途径不变。

第九周：细胞融合前三天，以每只小鼠50 μg 的剂量，直接将抗原注射至四次免疫后血清效价较高的小鼠腹腔内，无需佐剂辅助，连续免疫三天。通过断尾方式采集少量血液，随后在37°C下以10000 rpm离心5 min，分离出血清，用于抗体效价的测定。若短期内不使用，则将血清分装并存放于-80°C冰箱中保存。

2.2.4.1 间接 ELISA 检测小鼠免疫血清效价

(1) 以P蛋白作为包被抗原，包被量为200 ng/well，4°C过夜，次日用PBST缓冲液洗涤3次，轻微震荡后甩掉洗液，清洗后每孔加入200 μL 封闭液，37°C封闭90 min。封闭结束后用PBST缓冲液清洗3次，轻微震荡后甩掉洗液，4°C冰箱备用。

(2) 向每孔中加入100 μL 经PBS溶液2倍梯度稀释的1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000的小鼠免疫血清，免疫前血清作为对照，经同样方式处理。37°C孵育60 min，PBST洗涤3次，轻微震荡后甩掉洗液。

(3) 每孔加入100 μL 的1:5000倍稀释羊抗鼠IgG-HRP，37°C孵育30 min，PBST洗涤3次，轻微震荡后甩掉洗液。

(4) 孵育结束后，每孔中加入100 μL TMB显色液，室温避光静置15 min，结束后加入50 μL 的2 M H_2SO_4 终止反应，于酶标仪读取OD₄₅₀值。

(5) 取OD₄₅₀等于0.5的最大稀释倍数作为小鼠免疫血清效价。

2.2.4.2 杂交瘤细胞的制备

(1) 骨髓瘤细胞的复苏

① 从液氮中取出冻存的骨髓瘤细胞，迅速转移至提前备好的 37℃ 恒温水浴锅中，1 min 内摇晃震荡冻存管，使细胞快速融化。将溶解后的细胞转移至 15 mL 离心管中，添加 3 mL 含 RPMI-1640 完全培养基，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，再添加 3 mL RPMI-1640 完全培养基，轻轻吹打混匀，将细胞悬液转移至培养皿内，镜下观察细胞复苏状态，置 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

② 待培养瓶中的培养基略变为黄色，镜下观察细胞数量较多，呈圆形透亮，则进行细胞换液步骤。待细胞长至培养皿面积 80%，即可扩大培养，用弯头滴管将贴壁的细胞完全吹打下来，转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min，弃上清，添加 2~3 mL RPMI-1640 全培养基吹打混匀，转移至 2~3 个培养皿中，补加 RPMI-1640 完全培养基至 10 mL，倒置显微镜下观察细胞状态，置 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。细胞培养期间，需每天观察细胞生长状态。到融合前一天，骨髓瘤细胞须处于对数生长期，此时细胞形态规则，机能活跃，并计数 1×10^7 个细胞用于细胞融合。

(2) 免疫脾细胞的制备

① 从 5 只 BALB/c 小鼠里选择免疫血清效价最高的小鼠拉颈处死后，浸泡于 75% 乙醇中，浸泡 5 min，随即放入超净工作台解剖。

② 在无菌条件下，使用手术剪轻轻剖开腹腔，小心取出脾脏，并将其迅速放入含有 10 mL RPMI-1640 完全培养基的平皿中。随后，使用小弯镊子仔细剥离脾脏表面附着的脂肪和结缔组织，确保脾脏的纯净。接着，将处理后的脾脏置于圆形不锈钢筛网上，用无菌剪刀轻柔地将其破碎成小块，使用注射器针芯轻压筛网上的脾脏碎片，使脾细胞能够通过筛网的网眼而滤出。静置 3~5 min，使细胞沉降，随后使用移液器小心吸取上层 2/3 的悬液，避免吸到底部的杂质和碎片。将所取悬液转移至 15 mL 的无菌离心管中，以备后续实验使用。

③ 将脾细胞悬液加入 50 mL 离心管中，加入 RPMI-1640 完全培养基，室温下 800 rpm 离心 5 min，弃去上清液。然后加入 5 mL 生理盐水重悬细胞，并在室温下静置 5 分钟，以确保红细胞充分溶解。

④ 加入 40 mL RPMI-1640 基础培养液，800 rpm 室温离心 5 min，弃上清，洗涤两次。

⑤ 用 10 mL RPMI-1640 完全培养基重悬脾细胞，用台盼蓝染色，细胞计数器计算细胞活率。

(3) 细胞融合

① 骨髓瘤细胞和免疫脾细胞按照 1:10 的比例混匀，添加 RPMI-1640 培养基至 30 mL，1200 rpm 离心 8 min，倒尽上清，用吸管吸净管中残留的液体。用手轻敲离心管底部，使两种细胞混匀。

② 将离心管置于 37℃ 水浴中，在 1 min 内缓慢滴加 0.5 mL 预热的 50% PEG 溶

液，吸管尖端深入离心管底部，边轻搅沉淀细胞。再静置 1 min 后，立即滴加 20 mL 预热 RPMI-1640 培养基，随后添加 RPMI-1640 培养基 25 mL，1200 rpm 离心 6 min，弃上清。

③ 加入 180 mL HT 完全培养基重悬，轻轻吹打，使细胞悬浮，接种于 96 孔细胞培养板中，200 μ L/well，孔板边缘不加，共铺板 15 块。

④ 融合板置于在 37°C、5% CO₂ 培养箱中静置培养，融合后次日观察细胞是否污染，每孔加入 100 μ L HAT 培养基，至第 4 天弃去 HAT 培养基，并重新加入 200 μ L HAT 培养基，待疑似融合细胞集落长至整个培养孔的 1/4，从外观看，培养基略变黄，即可吸取上清进行抗体阳性筛选。

(4) 间接 ELISA 筛选杂交瘤细胞

融合 96 孔板置于 5% CO₂、37°C 培养箱中培养 5~6 天，采用间接 ELISA 对杂交瘤细胞上清进行检测，筛选能产生抗诺如病毒 P 蛋白抗体的杂交瘤细胞，对杂交瘤细胞进行下一步的亚克隆筛选。

(5) 有限稀释法筛选单克隆抗体

① 首先，我们对待克隆化的阳性孔中的细胞进行稀释，并计算细胞悬液的细胞数量。随后，我们利用 HAT 培养基将细胞稀释至大约 5 个/mL 的浓度，并将其均匀铺入 96 孔细胞板中（注意边缘孔不加入细胞悬液），每孔加入 200 μ L。接着，将培养板置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中进行静置培养，持续 7~10 天，期间需进行换液操作。在换液前，我们仔细观察细胞的生长状态，并标记出具有单克隆细胞集群的生长孔。待克隆细胞生长至孔底面积的 1/4~1/3 时，我们采用间接 ELISA 方法对其上清液进行单克隆细胞筛选。为确保细胞的纯度和稳定性，整个筛选过程需重复 3 次。只有当细胞经过多次传代后，阳性率达到 100% 时，方可定株。

② 一旦获得了强阳性的单克隆细胞，我们立即进行扩增培养。首先，将细胞接种至 24 孔板中，待细胞长满后，使用 RPMI-1640 培养基将孔中的细胞轻轻吹下。随后，将细胞扩增至 50 mL 的细胞瓶中，并置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养。取出一部分细胞进行液氮冻存，同时，另一部分细胞则继续培养，用于后续的小鼠腹水生产单克隆抗体。

2.2.4.3 腹水制备及单克隆抗体纯化

(1) 选择若干只适龄的 BALB/c 雌性小鼠，用生理盐水悬浮，每 1 mL 的生理盐水悬浮 $1\sim5\times10^6$ 个细胞，然后每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 的细胞悬液，并向小鼠腹腔内注射腹水专用佐剂约 10 天左右明显产生腹水后，将小鼠拉颈处死，剪开腹腔，吸取腹水，3000 rpm，离心 10 min 收集小鼠腹腔腹水。

(2) 预处理：小鼠腹水上柱子前，需用 PB 缓冲液稀释，再经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤。

(3) 上样：将装填好的重力柱 protein G 重力柱用 5 倍体积平衡液进行平衡，使

填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2~3 次。将收集的小鼠腹水加到平衡好的重力柱中，保证腹水和填料充分接触，收集流穿液，上样 2 次。

(4) 洗杂：用 15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。

(5) 洗脱：再使用 5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，洗脱液 1 mL 分装于 EP 管中，立即用 Tris-HCl 调节至中性。最后使用 5 倍体积的平衡液平衡填料，保存在等体积的 20% 的乙醇中，置于 4℃ 冰箱保存。纯化后的抗体进行采用超微量紫外分光光度计测定浓度，超滤浓缩换液后保存。

(6) 将纯化后的小鼠单克隆抗体进行 SDS-PAGE 电泳，鉴定其大小条带，具体步骤同 2.2.3.4。

2.2.4.4 单克隆抗体亲和力检测

(1) 抗原包被：以诺如病毒 P 蛋白作为包被抗原，包被量为 200 ng/well，4℃ 包被过夜。

(2) 封闭：然后用 0.1 M PBST 洗涤 3 次，轻微震荡后甩掉洗液，清洗后每孔加入 200 μ L 含有 2% BSA 的封闭液，37℃ 封闭 90 min。

(3) 孵育一抗：封闭结束后用 PBST 清洗 3 次，轻微震荡后甩掉洗液，4℃ 冰箱备用，然后将纯化后的抗诺如病毒单克隆抗体的起始浓度稀释为 10 ng/ μ L，再进行 3 倍梯度稀释，依次加入到孔中，每个孔加入 100 μ L，37℃ 孵育 60 min，然后用 PBST 洗涤 3 次，轻微震荡后甩掉洗液，扣干。

(4) 孵育二抗：然后以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为酶标抗体，1: 5000 倍稀释，每孔加入 100 μ L，37℃ 孵育 1 h，然后用 PBST 洗涤 3 次，轻微震荡后甩掉洗液，扣干。

(5) 显色：每孔加入 100 μ L TMB 显色液，避光放置，37℃ 孵育 15 min；

(6) 终止反应：每孔加入 50 μ L 的 2 M H_2SO_4 终止液终止反应，于酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

(7) 数据分析：利用软件进行数据分析和作图，软件 GraphPad Prism 8 拟合曲线，获得 EC₅₀。

2.2.4.5 HRP 标记抗体的制备

(1) 将需要标记的抗体，用 PBS 稀释至浓度为 2 μ g/ μ L，4℃ 备用。

(2) 取抗体稀释液 100 μ L，向其中加入 10 μ L 的反应启动液，混匀后置于室温下 2 h。

(3) 1 h 后，向反应终止剂管内加 1 mL 去离子水溶解终止剂，现配现用。

(4) 立即向辣根过氧化酶反应瓶中加入溶解的终止剂 10 μ L，混匀后置于室温下 1 h，即可使用。标记过的酶标物保存在 4℃，备用。长时间不用，保存在 -20℃。

2.2.4.6 竞争 ELISA 筛选配对抗体

(1) 包被：用 PBS 稀释液将诺如病毒 P 蛋白抗原稀释至 2 ng/ μ L，100 μ L/well，

4°C 包被过夜, 然后用 0.1 M PBST 洗涤 3 次, 轻微震荡后甩掉洗液, 拍干。

(2) 封闭: 清洗后每孔加入 200 μL 含有 2%BSA 的封闭液, 37°C 封闭 90 min。封闭结束后用 PBST 清洗 3 次, 轻微震荡后甩掉洗液, 4°C 冰箱备用。

(3) 孵育 mAb: 封闭结束后用 PBST 清洗 3 次, 轻微震荡后甩掉洗液, 4°C 冰箱备用, 然后将纯化后的抗诺如病毒单克隆抗体的浓度稀释为 10 ng/ μL , 再进行 2 倍梯度稀释, 依次加入到孔中, 每个孔加入 100 μL , 做三个平行, 并设置阴性对照, 37°C 孵育 60 min。

(4) 加酶标记抗体: 直接加入 HRP 标记的诺如病毒标记抗体, 依据抗体的 EC_{50} 值选择合适的标记抗体浓度 (30~200 ng/mL)。每孔加入 50 μL , 37°C 孵育 30 min, 然后用 PBST 洗涤 3 次, 轻微震荡后甩掉洗液, 拍干。

(5) 显色: 每孔加入 100 μL TMB 显色液, 避光放置, 37°C 孵育 15 min。

(6) 终止反应: 孵育结束后直接加入 50 μL 的 2 M H_2SO_4 终止液终止反应, 于酶标仪读取 OD_{450} 值。

(7) 数据分析: 求均值, 计算竞争比例 (%)。公式如下:

$$\text{竞争比例}(\%) = \left(\frac{A_8 - A_1}{A_8} \right) \times 100\% \quad \text{式 (2-1)}$$

式中 A_1 至 A_8 均为不同浓度 mAb 时, 加入相同量 HRP 标记的 mAb 所测定的 OD_{450} 均值; A_1 为 mAb 浓度最高时所测定的 OD_{450} 均值, A_8 为 mAb 浓度最低时所测定的 OD_{450} 均值。

2.2.5 抗诺如病毒 P 蛋白基因工程抗体的制备与纯化

2.2.5.1 轻重链可变区基因序列表达载体的构建

(1) 取出液氮中保存的已通过抗体配对的杂交瘤细胞, 将杂交瘤细胞全部匀浆化后, 加入 TRIzol 试剂, 室温放置 5 min, 使样品充分裂解, 混匀后加入氯仿, 室温放置 2~3 min 后, 12000 rpm, 4°C 离心 10 min, 然后吸取无色透明的上清液置于新的离心管中, 再加入等体积的异丙醇, 于 -20°C 放置 5 min, 12000 rpm, 4°C 离心 10 min, 弃上清, 再加入 70% 乙醇漂洗, 重复两次, 使乙醇挥发干净后, 于 RNase-Free 水中溶解备用。

(2) 以提取的总 RNA 为模板, 经过反转录合成 cDNA 链, 步骤同 2.2.2.2, 使用鼠抗体可变区扩增通用引物 (见表 2-10), 基于 cDNA 末端快速扩增技术 (5'RACE) 扩增轻重链可变区基因, 将扩增产物通过凝胶电泳分离与切胶回收。

(3) 将抗体轻重链基因片段分别连接至载体 pCDNA3.4, 其载体 pCDNA3.4 已经与鼠抗 IgG1 轻链恒定区和重链恒定区拼接好, 构建成完整表达鼠抗 IgG 抗体的重组质粒载体。

(4) 将重组质粒转入到 *E. coli* DH5 α , 进行菌落 PCR 鉴定, 将验证成功的阳性克隆菌转接到 LB 培养基中扩大培养, 提取质粒, 进行 *Eco*RI 和 *Hind*-III 双酶切鉴定, 送

往安升达（天津）生物科技有限公司测序。实验中用到的引物如表2-10所示，引物由安升达（天津）生物科技有限公司合成。

表 2-10 鼠源抗体可变区通用扩增引物

Table 2-10 The universal amplification primers for the variable region of mice-derived antibodies

引物	序列 (5'-3')
5' MsVHE	GGGAATTCGAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG
3' C μ	AGGGGGAAGACATTTGGGAAGGAC
3' C γ 1	GCTCAGGGAAATAGCCCTTGAC
VH 引物 3' C γ 2c	GCTCAGGGAAATAACCCTTGAC
3' C γ 2b	ACTCAGGGAAAGTAGCCCTTGAC
3' C γ 3	GCTCAGGGAAAGTAGCCTTTGAC
3' C α	TGCCGAAAGGGAAGTAATCGTGAAT
VL 引物 5' mVkappa	GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
3' mCk	GATGGTGGGAAGATGGATACAGTT

2.2.5.2 重组单克隆抗体基因表达与纯化

(1) 制备种子液：从 CO₂ 细胞培养摇床中取出细胞种子液，在生物安全柜中取出 20 μ L 细胞培养液，使用细胞计数仪计数，用 Transpro CD 01 培养基将细胞密度稀释至 3×10^6 个/mL，分装 600 mL 到 2 L 无菌的细胞摇瓶中，以备细胞转染。

(2) 配制质粒溶液：将提取的 pCDNA3.4-8-F1-VH、pCDNA3.4-8-F1-VL 与 pCDNA3.4-9-F8-VH、pCDNA3.4-9-F8-VL 两对质粒在 4°C 冰箱缓慢融化，在生物安全柜中和 PEI4000 分别用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。随后，取 2 只无菌离心管，分别加入 0.48 mg 质粒 pCDNA3.4-8-F1-VH 与 0.48 mg 质粒 pCDNA3.4-8-F1-VL，各补足培养基至 36 mL。另一对 9-F8 质粒同样操作。

(3) 配制 PEI 溶液：取取 2 只无菌离心管，在生物安全柜中，分别加入 1.536 mL 的 1 mg/mL PEI，分别补足 Transpro CD 01 培养基至 36 mL。

(4) 混匀：将配制好的线性转染试剂 PEI40000 加入到稀释的质粒溶液里面，混匀之后，静置 10 min。将分别缓慢加入待转染的细胞种子液中，边加入边轻轻摇晃混匀，将细胞摇瓶密封后，做好标记，37°C，120 rpm，8% CO₂ 的条件下继续培养，培养 16~24 h 添加 Transpro CD feed 1 培养基。之后，每天通过显微镜观察细胞状态，并用细胞计数仪计数，观察细胞活率。

2.2.5.3 基因工程抗体纯化

基因工程抗体纯化选用亲和层析介质 protein G 柱料纯化，具体纯化步骤同 2.2.4.3。

2.2.5.4 基因工程抗体 SDS-PAGE 鉴定

对基因工程抗体进行 SDS-PAGE 鉴定，具体步骤同上 2.2.3.4。

2.2.5.5 基因工程抗体亲和力检测

对基因工程抗体8-F1和9-F8采用间接ELISA方法测定亲和力大小,以抗体的浓度为横坐标,OD₄₅₀为纵坐标,绘制曲线,通过软件GraphPad Prism 8作图,获得配对抗体的EC₅₀值,具体步骤同2.2.4.4。

2.2.6 双抗夹心 ELISA 方法的建立与优化

2.2.6.1 包被抗体及检测抗体最佳工作浓度的确定

采用棋盘滴定法确定最佳的包被抗体和检测抗体工作浓度,具体步骤如下:

(1) 包被:用 PBS 磷酸缓冲盐溶液将包被抗体稀释为 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1600 ng/mL,然后以横排添加的方式加入到酶标板中进行包被,每孔 100 μ L, 4°C 包被过夜;

(2) 封闭:用 0.1 M PBST 缓冲液洗涤酶标板 3 次,轻微震荡后甩掉洗液,清洗后每孔加入 200 μ L 含有 2% BSA 的封闭液,37°C 封闭 90 min。封闭结束后用 PBST 清洗 3 次,轻微震荡后甩掉洗液,在滤纸上拍干板内水分,4°C 备用;

(3) 加样:将制备的诺如病毒 P 蛋白溶液用 PBS 稀释至 2 ng/ μ L,同时设立 PBS 作为阴性对照,然后以竖排添加的方式加入到酶标板中,每个孔加入 100 μ L, 37°C 孵育 60 min,然后用 PBST 洗涤 3 次,轻微震荡后甩掉洗液,在滤纸上拍干板内水分;

(4) 加入酶标记抗体:用 PBS 溶液将检测抗体(HRP 标记)稀释至 200 ng/mL、400 ng/mL、800 ng/mL、1600 ng/mL、3200 ng/mL,然后以竖排添加的方式加入到酶标板中,每孔加入 100 μ L, 37°C 孵育 30 min,然后用 PBST 洗涤 3 次,轻微震荡后甩掉洗液,在滤纸上拍干板内水分;

(5) 显色:每孔加入 100 μ L TMB 显色液,避光放置,37°C 孵育 15 min;

(6) 终止反应:孵育结束后直接加入 50 μ L 的 2 M H₂SO₄ 终止液终止反应;

(7) 数据分析:在酶标仪中读取 OD₄₅₀ 值, P/N 值最大,即可确定最佳的包被抗体和检测抗体的工作浓度。

2.2.6.2 建立标准曲线

将制备的诺如病毒抗原用样本稀释液稀释成 6 个标准品的浓度,分别稀释为 0.5 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 等,再利用上述经过优化的体系,以 OD₄₅₀ 值为纵坐标,以抗原稀释浓度作为横坐标建立标准曲线。使用 GraphPad Prism8 软件进行拟合直线回归分析。

2.2.6.3 分析灵敏度

参考 CLSI: EP17-A2 文件对分析灵敏度进行评估。

(1) LoB 的评估:准备 5 份空白参考品(LoB-1~LoB-5),用建立的双抗夹心法检测,分别用 2 个批次试剂检测 3 天,每天 2 种机型每个样本各做 2 个重复,则测量总次数为 5 个空白参考品 $\times$ 2 种仪器 $\times$ 3 天 $\times$ 2 个重复/天,每个批次共 60 个结果。空白样本检测结果不呈现正态分布,所以应该采用非参数方法进行统计。检测结果按从

小到大排序, 分别标记为 $X_1 \sim X_i$, 预设检测结果超过 LoB 的概率为 5%, 则 5% 概率对应的排名位置及 LoB 计算公式如下, LoB 取两批结果的最大值。

$$\text{等级位置} = 0.5 + 60 \times (1 - 5\%) \quad \text{式 (2-2)}$$

$$LoB = 0.5 \times (X_{58} + X_{57}) \quad \text{式 (2-3)}$$

式2-3中, X_{58} 为排名58位置的数值, X_{57} 排名57位置的数值。

(2) LoB的验证: 取2份空白限参考品 (LoB-6、LoB-7, 0.9%氯化钠溶液), 用2个批次试剂和1种机型检测3天, 每个样本做4个重复, 则测量总次数为2个空白参考品 $\times$ 3天 $\times$ 4个重复/天=24个结果/批。计算检测值小于等于LoB评估结果所占的比例, 如果计算比例大于等于85%, 则验证通过; 如果计算比例小于85%, 则验证失败。回顾试验结果, 检查可能引起失败的原因, 根据试验结果, 选择重复验证或重新评估LoB。

(3) LoD的评估: 准备5份低水平参考品 (LoD-1~LoD-5, 浓度分别为0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL), 分别用2个批次试剂检测3天, 每个样本各做4个重复, 每个批次共60个检测结果。公式如下:

$$LoD = LoB + Cp \times SD_L \quad \text{式 (2-4)}$$

① 计算5份低水平样品的 SD_L :

$$SD_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^J (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^J (n_i - 1)}} \quad \text{式 (2-5)}$$

式中 L 为每个批次检测结果总数, SD_i 为第 i 个低水平样本的SD, n_i 为第 i 个低水平样本的检测结果数, J 为低水平样本数, $J=5$ 。

② 设定LoD评估中出现检测结果低于LoB的概率为5%, 则:

$$Cp = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{4L - 4J}} \quad \text{式 (2-6)}$$

式中, 数值1.645代表 $\alpha=0.05$ 时, 正态分布的第95个百分点。

③ 按照上述步骤计算每个批次试剂的LoD, 取两批试剂结果的最大值。

(4) LoD的验证: 2个检出限参考品 (LoD-6、LoD-7, 添加浓度分别为0.3 ng/mL), 用2个批次试剂和1种机型检测3天, 每个样本做4个重复, 则测量总次数为2个检出限参考品 $\times$ 3天 $\times$ 4个重复/天=24个结果/批。计算检测值大于等于LoB评估结果所占的比例, 如果计算比例大于等于85%, 则验证通过; 如果计算比例小于85%, 则验证失败。回顾试验结果, 检查可能引起失败的原因, 根据试验结果, 选择重复验证或重新评估LoD。

3 结果与讨论

3.1 诺如病毒 P 蛋白序列比对结果与保守分析

从 Genbank 数据库下载的 33 条序列信息经过整理后如表 3-1 所示。编号 1~17 为 GII.4 基因型诺如病毒的 VP1 蛋白氨基酸序列信息，总共来自 7 个国家不同的地区，年份跨度在 2002 年至 2021 年间，包含 11 个不同的年份。编号 18~26 为整理的 GII 基因型诺如病毒的 VP1 氨基酸序列信息，包含 10 个不同年份的信息，年份跨度在 2010 年至 2023 年之间。编号 27~33 为整理的 GI 基因组的 VP1 氨基酸序列信息，包含了 7 个不同的年份，年份跨度在 2008 年至 2020 年之间。

表 3-1 诺如病毒的 VP1 序列信息

Table 3-1 The VP1 sequence information of the NoVs

编号	基因型	登录号	年份	国家
1	GI.4	ANC28073	2002	TUN
2	GI.4	AAZ31396	-	AUS
3	GI.4	ALX87342	2009	ZAF
4	GI.4	AFN70960	2003	USA
5	GI.4	AFJ04708	2004	USA
6	GI.4	ABY27560	2002	USA
7	GI.4	ADR78944	2004	CHN
8	GI.4	BAI49928	2008	JPN
9	GI.4	AFQ00527	2010	CHN
10	GI.4	BAW34730	2012	VNM
11	GI.4	AJZ77015	2009	CHN
12	GI.4	ALM96645	2012	CHN
13	GI.4	AKE07106	2011	ZAF
14	GI.4	AOW71961	2016	AUS
15	GI.4	BDG75428	2021	JPN
16	GI.4	AQT25659	2015	CHN
17	GI.4	ALQ43928	2015	CHN
18	GI.3	QXI66871	2021	RUS
19	GI.6	WHW95054	2013	USA
20	GI.8	WMY97785	2023	TH
21	GI.P2	QBS54663	2016	USA
22	GI.P4	QIO15992	2010	BR
23	GI.P7	QCY50843	2017	USA
24	GI.P15	QBX91166	2013	BT
25	GI.P22	AUD54984	2012	BD
26	GI.P26	AUY62554	2015	DE
27	GI.1	QUF08422	2020	KR
28	GI.3	QRQ46993	2017	CA
29	GI.4	QUF08407	2019	KR
30	GI.6	ATD10735	2016	RUS
31	GI.7	QVJ79527	2014	USA
32	GI.9	QVJ79530	2013	USA
33	GI.P8	AKM20815	2008	CHN

以 GII.4-Sample-Seq 为模板, 利用 MEGA-X 生物分析软件分析表 3-1 中诺如病毒 VP1 序列之间的保守性。对 GII.4 基因型诺如病毒的序列 (第一组) 以及 GI 基因型、GII 基因型诺如病毒的序列 (第二组) 分别进行多序列比对, 分析其中 P 蛋白 (230~540) 氨基酸序列的保守性特征, 该序列片段不包括 P 蛋白与 S 蛋白之间的柔性铰链区域 (约 8 个氨基酸) 和 S 蛋白区域 (1~217)。由图 3-1 可知, 不同年份、国家的 GII.4 基因型毒株的 P 蛋白氨基酸序列具有高度保守性, P 蛋白在序列区间的保守氨基酸位点一共有 235 个, 表在 GII.4 基因型诺如病毒的进化变异过程中, 这些氨基酸的保守性特征并未受干扰。

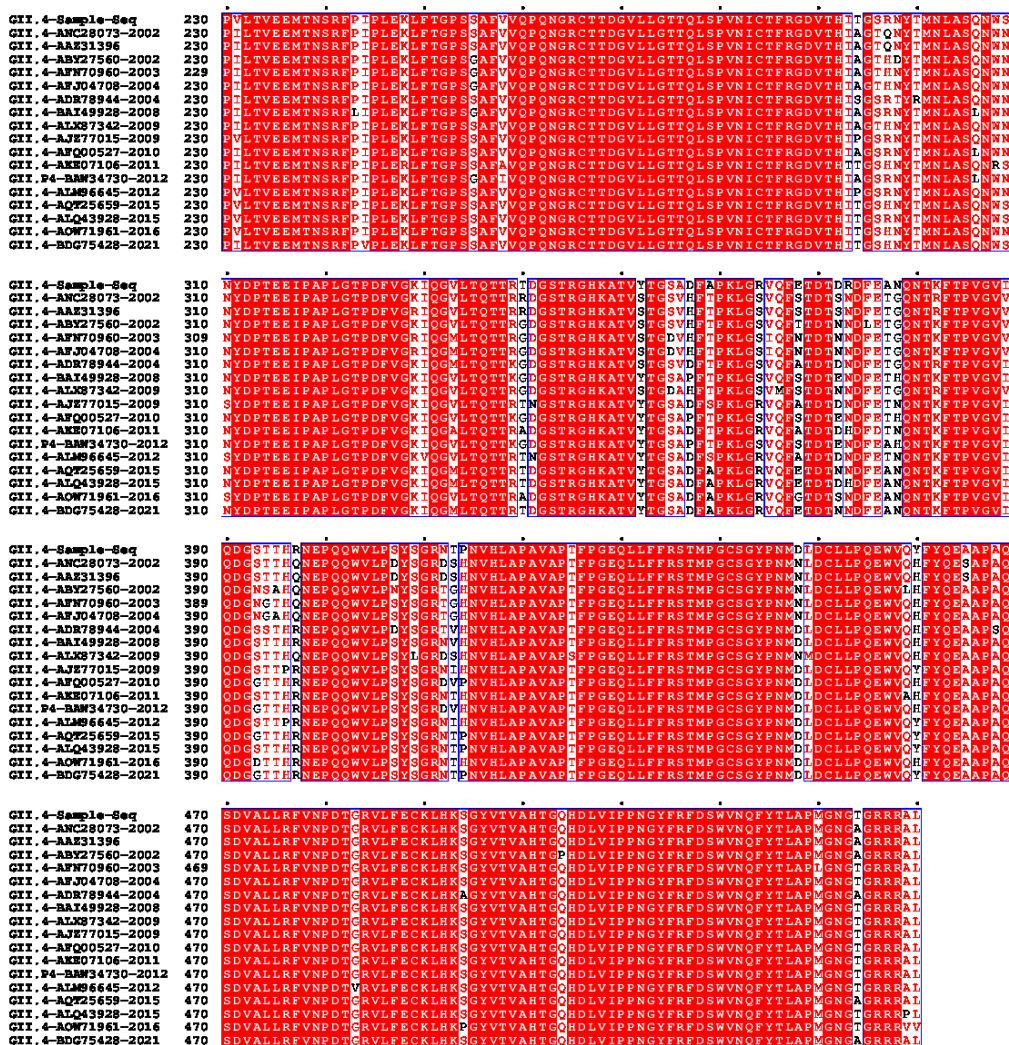


图 3-1 不同时间和地区 GII.4 型诺如病毒 P 蛋白氨基酸多序列比对图

注: 氨基酸保守序列用蓝色框标出; 深红色背景表示同一位点氨基酸残基, 序列高度保守

Figure 3-1 The multiple alignment of the P-domain amino acid sequences of GII.4 genotypes norovirus at different time and region

Note: Amino acid conserved sequences are marked with blue boxes; dark red background indicates amino acid residues at the same site with highly conserved sequences

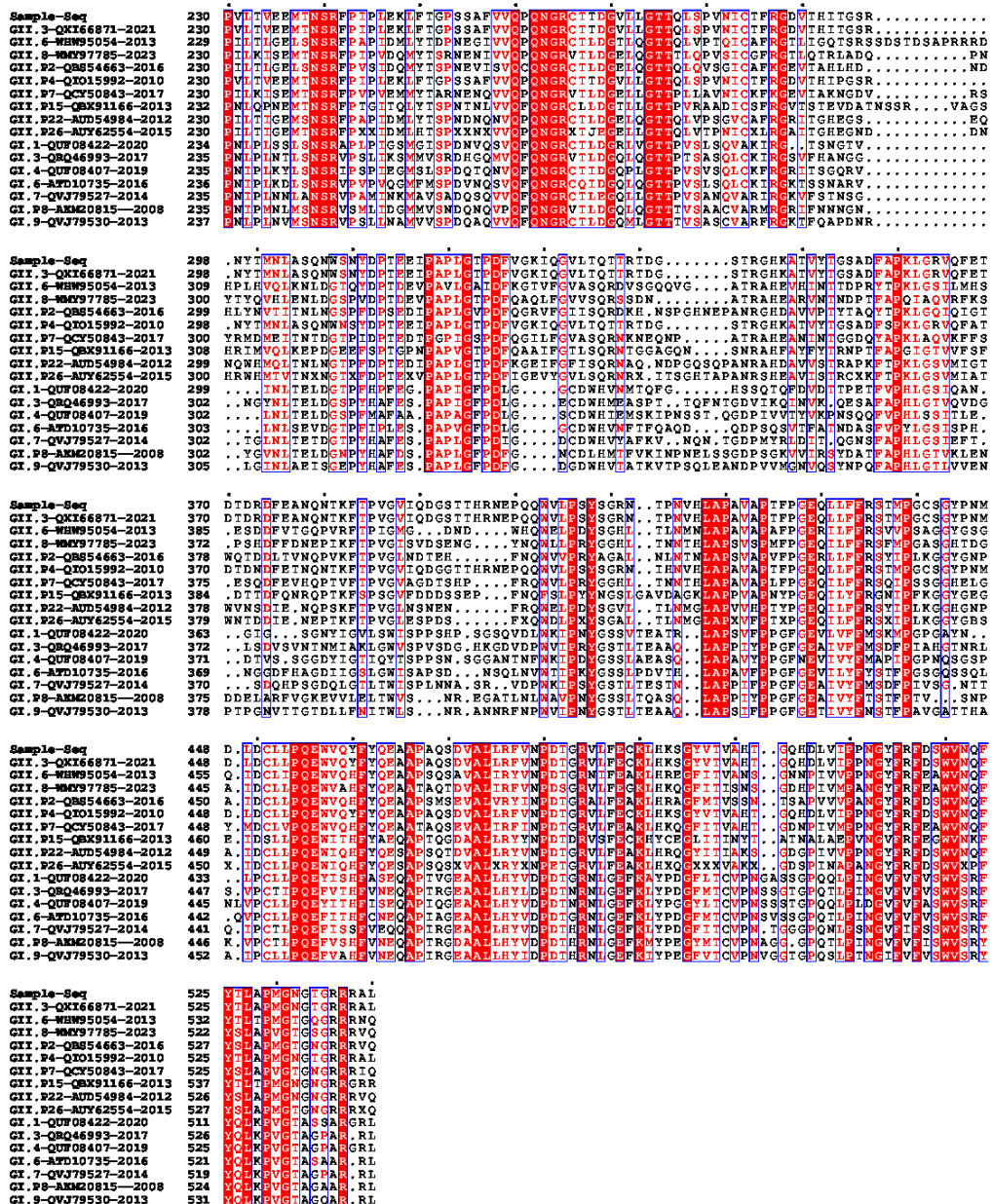


图 3-2 GI 型、GII 型诺如病毒 P 蛋白氨基酸多序列比对图

注：氨基酸保守序列用蓝色框标出；深红色背景表示同一位点氨基酸残基，序列高度保守

Figure 3-2 The multiple alignment of the P-domain amino acid sequences of GI and GII genotypes norovirus

Note: Amino acid conserved sequences are marked with blue boxes; dark red background indicates amino acid residues at the same site with highly conserved sequences

图3-2是GI基因型与GII基因型诺如病毒的序列比对结果。这2种基因型毒株的P蛋白（230~540）氨基酸的保守度相较于第一组显著降低，在P蛋白中，仅有48个氨基酸位点保守，且这些位点在第一组的序列比对中同样表现出高度保守性，表明它们在人源诺如病毒的GI、GII基因组中也具有高度保守性。在这48个氨基酸位点中，存

在数量相对多的脯氨酸位点（230P、328P、370P、416P、430P、434P、449P、464P、490P、520P、529P）和甘氨酸（264G、270G、274G、287G、332G、505G）位点，从氨基酸二级结构分析，是脯氨酸和甘氨酸更容易形成 β 转角，容易暴露在病毒衣壳蛋白的表面，这可能与形成P颗粒的空间结构有关。另外，在P蛋白的突出区有5个公认的高度变异的抗原表位（A、B、C、D、E），这5个表位的变异是病毒进化的原因，也是氨基酸与宿主细胞表面HBGA的结合位点，可能与产生逃逸宿主的免疫功能有关^[96-98]。此外，通过在线ExPasy工具分析GII.4型样本的P蛋白，预测该蛋白的理论分子质量为35418.69 Da。

3.2 氨基酸序列进化树

为了获得诺如病毒的进化信息，以P蛋白氨基酸的序列信息为对象构建进化树，结果如图3-3所示。2.2.1中诺如病毒毒株与GII.4-ALQ43928-2015毒株氨基酸序列相似度最高，进化关系最近，在进化树上同属于一个分支，同源性值为83%，与其它GII.4型氨基酸序列进化关系相对较近，与GII和GI型氨基酸序列进化关系相对较远。

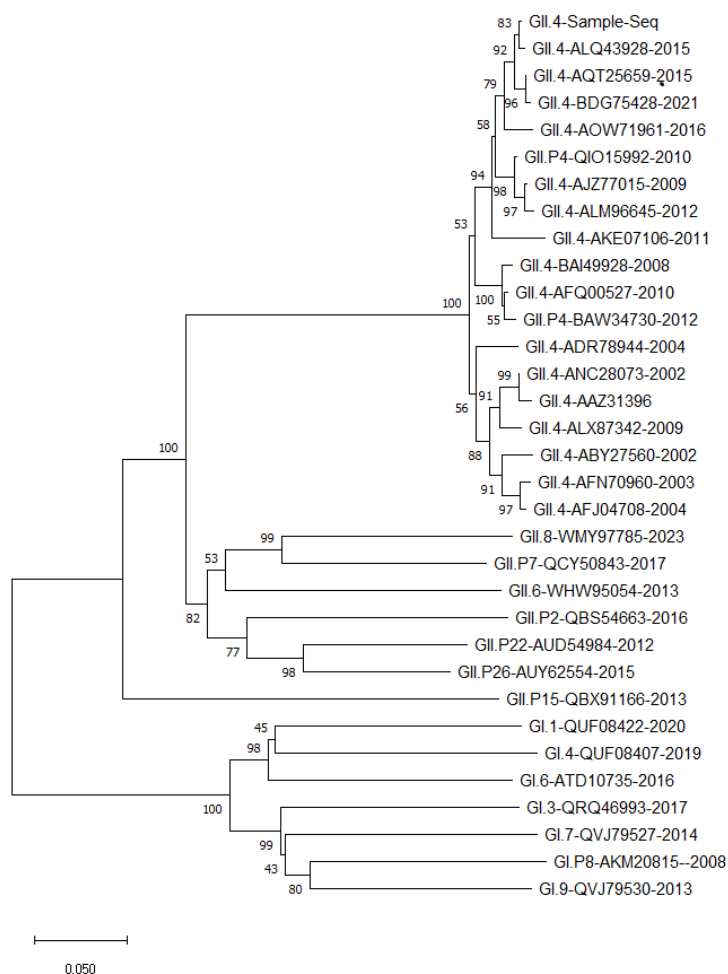


图 3-3 诺如病毒衣壳蛋白 P 区域氨基酸序列进化树

Figure 3-3 Evolutionary tree of the P-domain amino acid sequences of the NoVs capsid protein

3.3 诺如病毒 P 蛋白基因的扩增

以 2.2.1 中诺如病毒毒株序列为模板，逆转录后合成 cDNA，然后使用合成的特异性引物扩增 P 蛋白基因片段。PCR 结果如图 3-1 所示，在 1000 bp 处出现清晰可见的目的条带，与理论值 970 bp 结果相符。将验证成功的质粒命名为 pCDNA3.4-NoV-P。

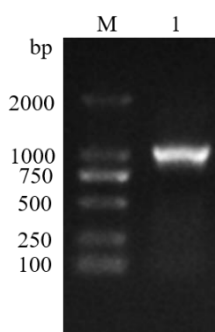


图 3-4 诺如病毒 P 蛋白基因片段的 PCR 扩增产物

注：M：marker，DNA 标准分子量；1：pCDNA3.4-NoV-P

Figure 3-4 The PCR amplification products of P-protein gene fragment of NoVs

Note: M: DNA marker; 1: pCDNA3.4-NoV-P

3.4 诺如病毒 P 蛋白基因的菌落 PCR 鉴定

将纯化回收后的 P 基因片段与 pCDNA3.4 空载同时用限制酶 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切，连接、化转后，在 LB 固体培养基板上进行氨苄抗性筛选，挑取 5 个生长良好的转化子进行菌落 PCR 鉴定，结果如图 3-5 所示。在 1000 bp 附近产生清晰条带，与预期条带大小 970 bp 结果一致，表明化转成功。随后，进行细菌培养并提取质粒，送往安升达（天津）生物科技有限公司测序，结果显示，插入的 P 片段基因序列与，测序结果一致。

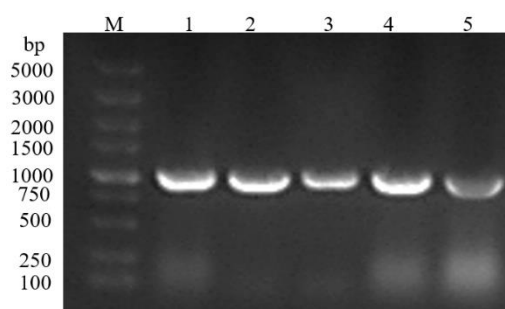


图 3-5 菌落 PCR 结果

注：M，DNA 标准分子量；挑转化平板菌落 5 个，经菌落 PCR 验证，条带大小与理论值相符

Figure 3-5 The colony PCR results

Note: DNA marker; The five colonies were selected from the transformation plate and verified through colony PCR to confirm that their gene band sizes were consistent with the theoretical values

3.5 诺如病毒重组 P 蛋白的表达与鉴定

在 P 蛋白 N 端引入带有 Strep 标签的短肽 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)。该短肽含有 8 个氨基酸, 标签小, 无需去除, 是链霉亲和素特异性识别的序列, 链霉亲和素可作为配体与琼脂糖凝胶介质结合, 进行亲和层析法纯化, 可用生物素竞争洗脱目的蛋白。与其它种类标签表达的重组蛋白相比, 表达条件更加温和, 特异性高, 能保持其蛋白的天然生物活性, 并且该蛋白 C 末端还加入了 SUMO 促融标签, 用于促进 P 蛋白可溶性表达。293F 哺乳细胞表达系统具有转染效率高, 表达效率高的特点, 因此在 293F 细胞中表达 P 蛋白。发酵后, 运用 Strep 标签亲和层析介质对发酵产物进行纯化, 获得纯化后的重组 P 蛋白, 检测浓度为 1.465 mg/mL。将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳进行验证, 鉴定其条带大小, 结果如图 3-6 所示。诺如病毒 P 蛋白条带大小在 35 kDa 左右, 与预期大小一致。

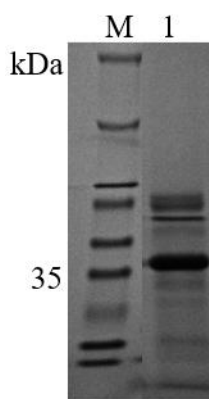


图 3-6 诺如病毒重组 P 蛋白的 SDS-PAGE 结果

注: M: 预染蛋白 marker, 15~150 kDa; 1: P 蛋白

Figure 3-6 The SDS-PAGE results of Norovirus recombinant P protein

Note: M: marker, 15~150 kDa; 1: P protein

3.6 单克隆抗体的制备与鉴定

3.6.1 抗诺如病毒 P 蛋白血清效价分析

利用制备得到的诺如病毒 P 蛋白抗原多轮免疫 5 只 BALB/c 雌性小鼠, 观察发现, 这 5 只小鼠的免疫效价随着次数的增加而增大, 在第四次免疫时达到最大, 此时进行冲击免疫后取血, 运用间接 ELISA 方法测定其血清抗体效价。如图 3-7 所示, 第 1 只小鼠 (M1) 血清效价为 1:8000, 第 2 只小鼠 (M2) 血清效价为 1:32000, 第 3 只小鼠 (M3) 血清效价为 1:16000, 第 4 只小鼠 (M4) 血清效价为 1:8000, 第 5 只小鼠 (M5) 血清效价为 1:8000。从小鼠血清效价可知, 第 2 只小鼠的免疫效果最好, 故选择第 2 只小鼠进行下一步单克隆抗体的制备。

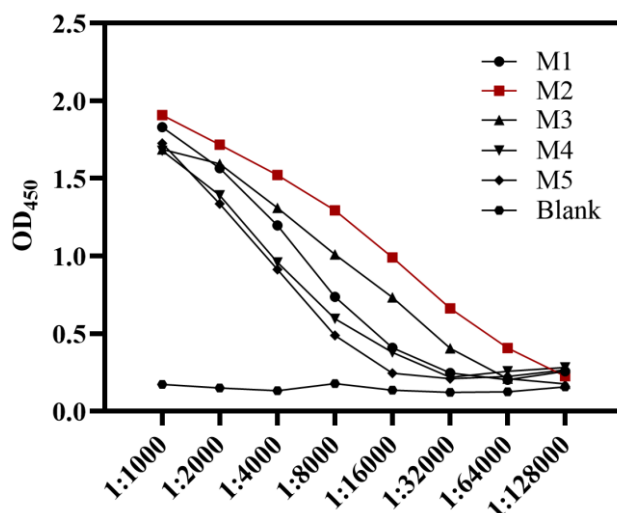


图 3-7 小鼠免疫血清的抗体效价测定

Figure 3-7 The determination of the antibody potency in the immunization mice sera

3.6.2 杂交瘤阳性细胞的筛选和扩增

只有融合成功的细胞才兼有 SP2/0 细胞的无限增殖能力以及获取 B 淋巴细胞黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶的利用外源性合成途径合成 DNA 的能力, 才能在 HAT 培养基中存活^[9]。通过 HAT/HT 培养基筛选到可以生长的杂交瘤细胞, 包被诺如病毒 P 蛋白抗原进一步筛选能产生特异性阳性抗体杂交瘤细胞, 有限稀释法梯度稀释最终筛选到单个杂交瘤细胞。经过多轮筛选和亚克隆后, 通过间接 ELISA 检测细胞上清, 最终确定 OD₄₅₀ 值大于 1.0 以上的细胞扩大培养并作为生产单克隆抗体候选细胞株, 结果如图 3-8 所示。OD₄₅₀ 值越大, 表示好抗体的可能性越大。从 15 块 96 孔板, 共挑出 OD₄₅₀ 值在 1.0 以上的分泌特异性阳性抗体的杂交瘤细胞株共 12 株, 分别命名为 1-B3、3-C2、4-C12、5-E3、7-D6、8-F1、9-F8、10-G4、13-H1、13-A2、14-B9、15-B12。

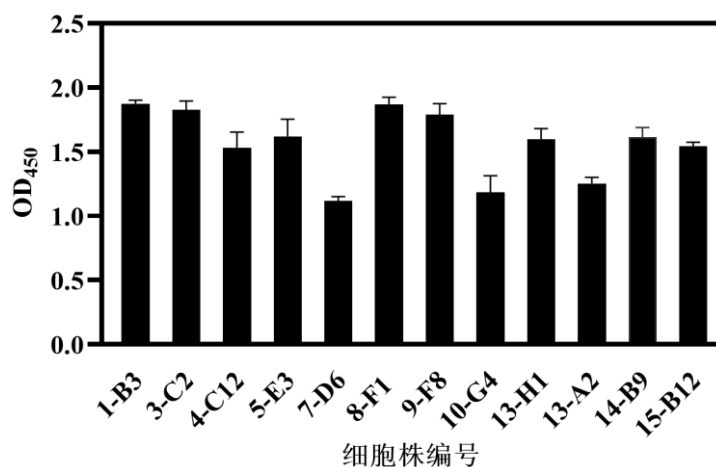


图 3-8 杂交瘤细胞株 ELISA 细胞上清检测结果

Figure 3-8 The ELISA detection results of hybridoma cell lines supernatant

3.6.3 腹水抗体的鉴定与分析

将定株的杂交瘤细胞从液氮中取出，细胞复苏以及扩大培养后接种到 BALB/c 小鼠内，收集腹水。过滤后，采用 protein G 重力柱纯化，经过上样、洗杂、洗脱、超滤等步骤获得纯化的单克隆抗体。纯化后的 12 株单克隆抗体产量在 1~2 mg/mL，产量出现差异的原因可能是杂交瘤细胞株之间的差异以及小鼠个体之间的差异造成的。此外，对纯化后的 12 株抗体进行还原性 SDS-PAGE 电泳鉴定分析，结果如图 3-9 所示。12 株单克隆抗体均具有两条电泳条带，并且这两条电泳条带对应的分子量与其各自的轻链（20~25 kDa）、重链（50~55 kDa）大小一致。这些结果表明，这 12 株单克隆抗体被准确表达。另外，所有抗体条带边缘清晰，杂带少，表明纯化的单克隆抗体纯度较高，可应用于下一步的实验。

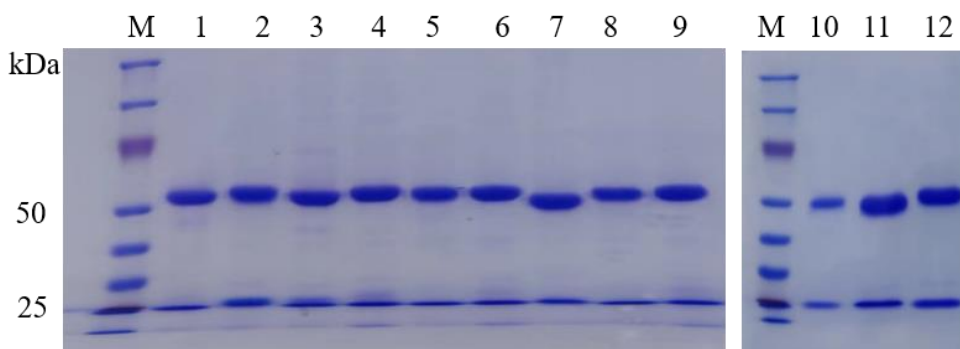


图 3-9 小鼠腹水纯化 SDS-PAGE 鉴定

注：预染蛋白 Marker，15~150 kDa，1：1-B3、2：3-C2、3：4-C12、4：5-E3、5：7-D6、6：8-F1、7：9-F8、8：10-G4、9：13-H1、10：13-A2、11：14-B9、12：15-B12

Figure 3-9 The SDS-PAGE identification of mice ascites purification

Note: Marker, 15~150 kDa, 1: 1-B3, 2: 3-C2, 3: 4-C12, 4: 5-E3, 5: 7-D6, 6: 8-F1, 7: 9-F8, 8: 10-G4, 9: 13-H1, 10: 13-A2, 11: 14-B9, 12: 15-B12

3.6.4 单克隆抗体亲和力分析

通过间接 ELISA 法鉴定抗原与抗体之间的亲和力大小，其结果可采用 EC_{50} （Half maximal effective concentration）表示。 EC_{50} 值越小，抗体与目标抗原之间的亲和力越强，可用于目标单克隆抗体的筛选。诺如病毒 P 蛋白与单克隆抗体之间的亲和力大小如图 3-10 所示，1-B3、3-C2、5-E3、8-F1、9-F8、14-B9 等 6 株单克隆抗体的 EC_{50} 均小于 50 ng/mL，表明纯化后的诺如病毒 P 蛋白与 6 株单克隆抗体之间有好的抗原-抗体亲和力。此外，4-C12、13-H1、15-B12 等 3 株单克隆抗体的 EC_{50} 值在 50~100 ng/mL 之间，表明其亲和力一般；7-D6、10-G4、13-A2 等 3 株单克隆抗体的 EC_{50} 值在 100~300 ng/mL 之间，亲和力较差。综合考虑，选择 1-B3、3-C2、5-E3、8-

F1、9-F8、14-B9 等 6 株高亲和力单克隆抗体进行后续竞争 ELISA 配对实验。

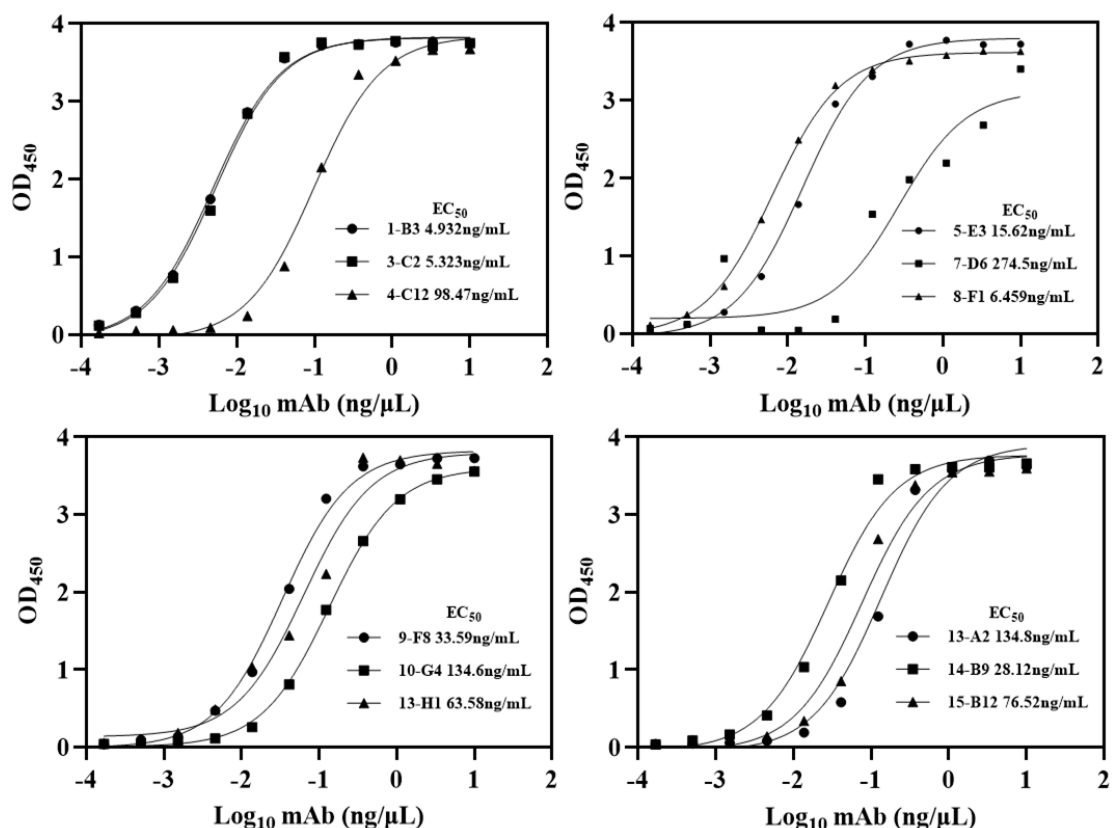


图 3-10 单克隆抗体的 EC_{50} 值测定

Figure 3-10 The EC_{50} values determination of monoclonal antibody

3.6.5 竞争 ELISA 筛选配对单克隆抗体

为了筛选出具有不竞争关系的包被抗体和标记抗体, 采用竞争 ELISA 法对小鼠腹水纯化的 6 株亲和力好的单克隆抗体 (mAb) 1-B3、3-C2、5-E3、8-F1、9-F8 与 14-B9 进行配对筛选, 从而确定最佳的配对组合。其中, 一部分进行 HRP 标记, 另一部分不做处理。竞争 ELISA 结果如图 3-11 所示, 在与诺如病毒 P 蛋白的竞争结合中, 14-B9 单抗与 5-E3 单抗之间表现的竞争比例分别为 57.9% 与 88%, 说明两单抗识别诺如病毒 P 蛋白的抗原表位相关性大, 竞争关系最为明显。8-F1 单抗与 9-F8 单抗之间竞争比例为 -3.4% 与 5.4%, 说明两株单抗之间可能识别诺如病毒 P 蛋白的不同抗原表位, 从而表现为不竞争关系, 适用于双抗体夹心法的建立。

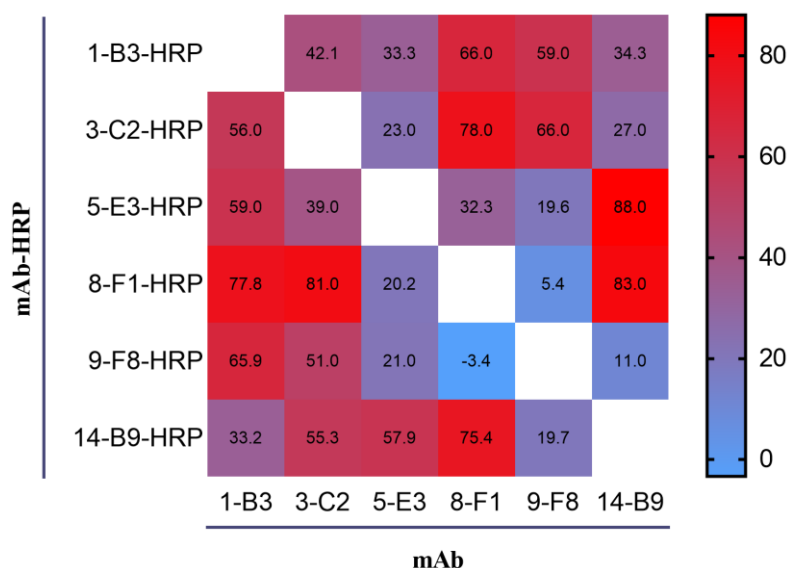


图 3-11 包被抗体与标记抗体最佳组合对的确定

Figure 3-11 The determination of optimal combination pairs of encapsulated and labeled antibodies

3.7 基因工程抗体的重组表达

3.7.1 抗体轻重链基因表达载体的构建

杂交瘤细胞具有不稳定性，从冻存到复苏的过程中随着传代的次数增多，可能会发生抗体丢失的情况，从抗体分泌阳性转为阴性。因此为了完整的保留抗体，用于下游应用，故对定株后的杂交瘤细胞进行测序。将筛选出的配对抗体对应的 8-F1、9-F8 杂交瘤细胞扩大培养后，采用 TRIzol 一步提取法提取总 RNA，经过反转录获得 cDNA 链，根据设计的引物，利用 5' Race 技术快速扩增轻链（VL）与重链（VH）基因片段，分别得到 350 bp 与 400 bp 左右的扩增产物，PCR 电泳结果如图 3-12 所示。图中条带大小与预期结果相符，说明 VH 和 VL 链初步扩增成功。

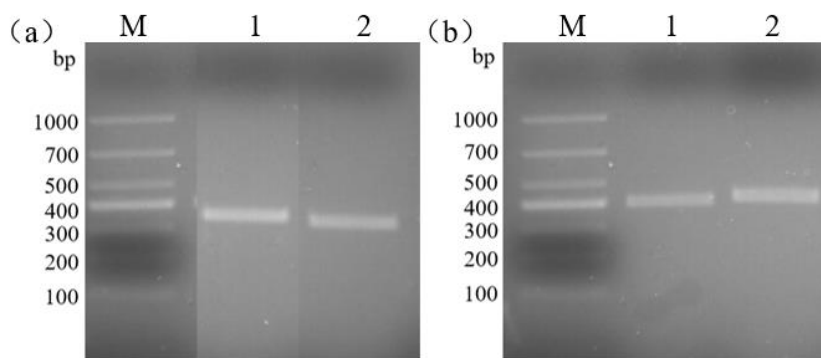


图 3-12 (a) 诺如病毒单克隆抗体 8-F1 及 9-F8 抗体轻链可变区基因 PCR 扩增结果；(b) 诺如病毒 8-F1 及 9-F8 抗体重链可变区基因 PCR 扩增结果

Note: M: marker, DNA 标准分子量；(a) 1: 8-F1 轻链基因片段，2: 9-F8 轻链基因片段；(b) 1: 8-F1 重链基因片段，2: 9-F8 重链基因片段

Figure 3-12 (a) PCR amplification results of the light chain variable region gene of norovirus monoclonal antibodies 8-F1 and 9-F8; (b) PCR amplification results of the heavy chain variable region gene of norovirus monoclonal antibodies 8-F1 and 9-F8

Note: M: DNA marker; (a) 1: 8-F1 light chain gene fragment, 2: 9-F8 light chain gene fragment; (b) 1: 8-F1 heavy chain gene fragment, 2: 9-F8 heavy chain gene fragment

将扩增的轻重链单克隆抗体基因经琼脂糖凝胶电泳、切胶、纯化回收等过程后，经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Hind-III* 双酶切，连接至载体 pCDNA3.4 上，构建 4 个全长抗体的表达载体，如图 3-13 所示。

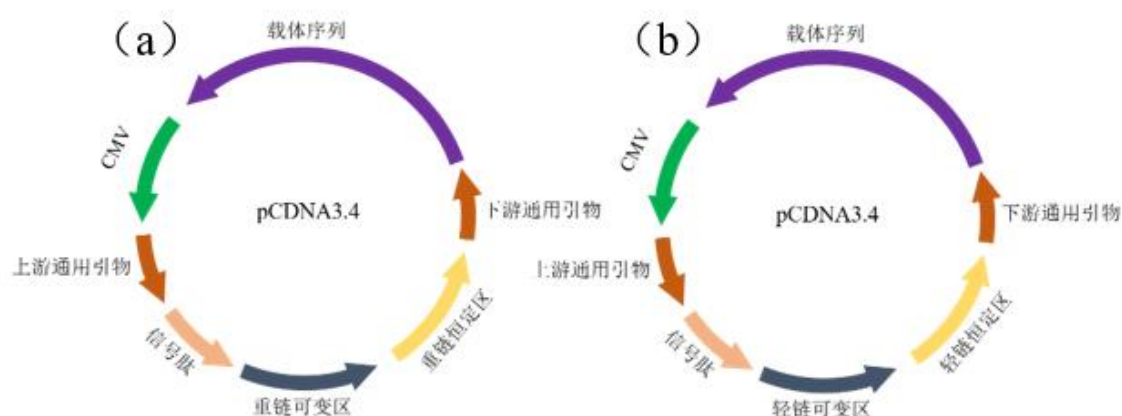


图 3-13 抗体表达质粒示意图

(a) 抗体重链表达质粒; (b) 抗体轻链表达质粒

Figure 3-13 Schematic diagram of the antibody expression plasmid

(a) Antibody heavy chain expression plasmid; (b) Antibody light chain expression plasmid

重组载体转化至 *E. coli* DH5 α ，涂 LB 氨苄抗性板培养后挑取转化子并提取质粒，质粒进行 *EcoRI* 和 *Hind-III* 双酶切鉴定，结果如图 3-14 所示。可观察到轻链质粒酶切后的片段在 700 bp 与 5000 bp 左右出现条带，重链质粒酶切后的片段在 1300 bp 与 5000 bp 左右出现条带，与预期条带大小结果一致。将质粒送往安升达（天津）生物科技有限公司测序，结果表明，抗体的轻链和重链均已成功地插入至 pCDNA3.4 载体中，无碱基突变。将验证成功的质粒命名为 pCDNA3.4-8-F1-VH、pCDNA3.4-8-F1-VL 与 pCDNA3.4-9-F8-VH、pCDNA3.4-9-F8-VL。测序结果与 IMGT 数据库 (<http://www.imgt.org/IMGTvquest/vquest>) 进行比对，确定单克隆抗体 8-F1 和 9-F8 的 FR 与 CDR 区域，两者均含有 4 个 FR 区与 3 个 CDR 区，表明该序列结构完整。

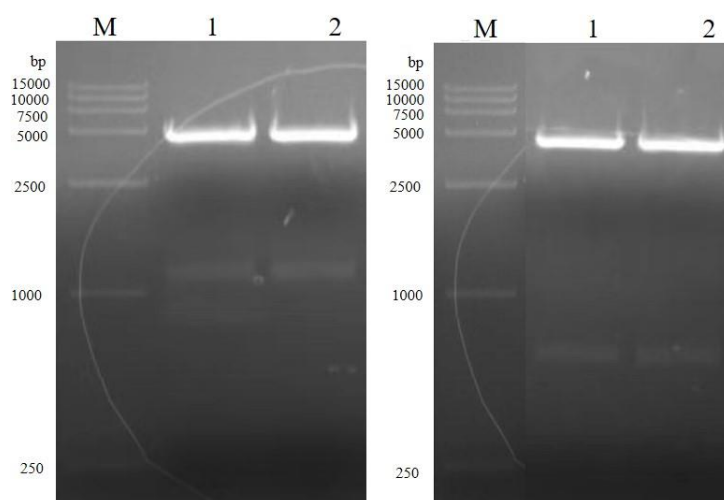


图3-14 质粒双酶切验证结果

注：M：DNA 标准分子量；(a) 1：pCDNA3.4-8-F1-H，2：pCDNA3.4-9-F8-H；(b) 1：pCDNA3.4-8-F1-L，2：pCDNA3.4-9-F8-L

Figure 3-14 The validation results of plasmid double enzyme digestion

Note: M: DNA marker; (a) 1: pCDNA3.4-8-F1-H, 2: pCDNA3.4-9-F8-H; (b) 1: pCDNA3.4-8-F1-L, 2: pCDNA3.4-9-F8-L

3.7.2 抗体基因的表达、纯化与鉴定

将验证成功的 pCDNA3.4-8-F1-VH、pCDNA3.4-8-F1-VL 和 pCDNA3.4-9-F8-VH、pCDNA3.4-9-F8-VL 抗体基因表达载体瞬时转染至 293F 细胞中，获得 8-F1 抗体和 9-F8 抗体产量分别为 103 mg/L 与 88 mg/L，该抗体的成功表达解决了小鼠腹水抗体产量低、抗体性质不稳定等问题。然后将基抗体进行 SDS-PAGE 鉴定，结果如图 3-15 所示。这 2 株单克隆抗体均具有两条电泳条带，并且这两条电泳条带的对应分子量与其各自的轻链（20~25 kDa）、重链（50~55 kDa）大小一致。另外，抗体条带边缘清晰，无杂带，说明抗体纯度较高。初步判断，基因工程抗体 8-F1 和 9-F8 能够在 293F 细胞中被准确表达。

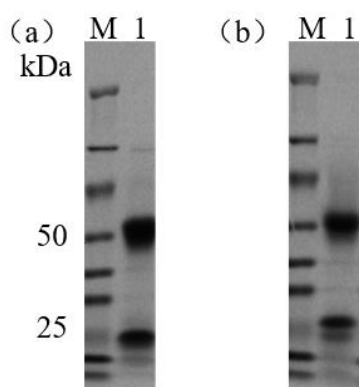


图 3-15 基因工程抗体 SDS-PAGE 鉴定

注: M: 预染蛋白 Marker, 15~150 kDa; (a) 1: 8-F1 基因工程抗体; (b): 1: 9-F8 基因工程抗体

Figure 3-15 The SDS-PAGE identification of genetically engineered antibodies

Note: M: Marker, 15~150 kDa; (a) 1: 8-F1 genetically engineered antibody; (b) 1: 9-F8 genetically engineered antibody

3.7.3 抗体的亲和力分析

为了进一步检测细胞瞬时转染获得的 8-F1 与 9-F8 基因工程抗体性能, 采用间接 ELISA 法对抗体的亲和力进行检测, 并使用软件 GraphPad Prism 8 绘制 EC_{50} 曲线, 结果如图 3-16 所示。8-F1 抗体的 EC_{50} 值为 7.375 ng/mL, 9-F8 抗体的 EC_{50} 值为 29.98 ng/mL, 这表明 2 株抗体对诺如病毒 P 蛋白具有较好的亲和力, 与小鼠腹水产生的抗体无明显差异。

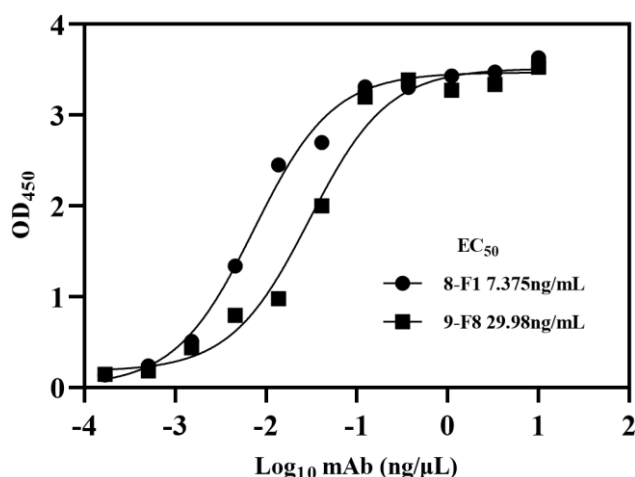
图 3-16 基因工程抗体 EC_{50} 值测定

Figure 3-16 The determination of genetically engineered antibodies EC_{50} values

3.8 双抗夹心 ELISA 方法的建立与优化

根据前几轮筛选的基因工程抗体8-F1和9-F8建立双抗体夹心ELISA方法，首先采用物理吸附法将抗体8-F1固定在酶标板表面，加入待检的样本（经过处理后的腹泻病人的粪便上清液），再加入检测抗体9-F8-HRP，待检样本的目标分子会同时与包被抗体以及检测抗体结合，形成包被抗体-抗原-检测抗体的“三明治”夹心，最终，加入TMB显色液后，在酶的催化作用下底物发生显色反应。通过观测显色反应的强弱，可以进行定性及定量检测。微孔板中颜色的深浅与待测物的浓度呈正相关关系，具体检测工作流程如图3-17所示。

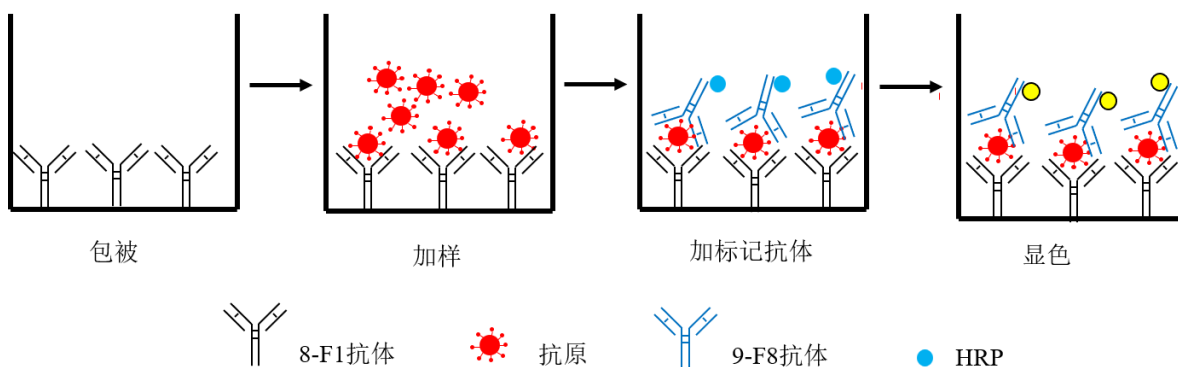


图 3-17 双抗夹心 ELISA 方法的工作流程图

Figure 3-17 The workflow diagram of the double antibody sandwich ELISA method

3.8.1 包被抗体和标记抗体最佳工作浓度的确定

本实验前期已经筛选出不具有竞争关系的抗体对，分别为 8-F1 和 9-F8，且已经通过构建抗体基因表达载体的方法，在 293F 细胞中成功获得这对抗体。本部分内容主要确立包被抗体与标记抗体的最佳工作浓度，建立并优化双抗体夹心 ELISA 检测体系。首先，根据棋盘滴定法将包被抗体用 PBS 缓冲液稀释为 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL 等 5 个梯度浓度，并使用标有 HRP 的酶标记抗体 200 ng/mL、400 ng/mL、800 ng/mL、1600 ng/mL、3200 ng/mL 为检测抗体，然后在酶标仪上读取 OD_{450} 值，计算阳性抗原 (P) 与阴性抗原 (N) 的比值，即 P/N，P/N 值最大，即确定为包被抗体和标记抗体的最佳工作浓度，结果如表 3-2 所示。当包被抗体 8-F1 的浓度为 1000 ng/mL 时，检测抗体 9-F8 浓度为 1600 ng/mL 时，此时 P/N 值最大，即为包被抗体和标记抗体最佳工作浓度。

表 3-2 包被抗体与标记抗体最佳工作浓度结果

Table 3-2 The results of the optimal working concentration of the encapsulated and labelled antibodies

编号	包被抗体 8-F1 (ng/mL)		标记抗体 9-F8 (ng/mL)				
			200	400	800	1600	3200
1	100	P	0.045	0.043	0.039	0.034	0.022
		N	0.014	0.013	0.042	0.031	0.028
		P/N	3.214	3.308	0.929	1.097	0.786
2	200	P	0.049	0.039	0.032	0.077	0.544
		N	0.048	0.039	0.034	0.026	0.054
		P/N	1.021	1.000	0.941	2.962	10.074
3	500	P	0.093	0.077	0.105	0.499	0.452
		N	0.045	0.024	0.020	0.067	0.086
		P/N	2.067	3.208	5.250	7.448	5.256
4	1000	P	0.950	1.040	1.700	1.790	2.030
		N	0.134	0.136	0.148	0.123	0.158
		P/N	7.090	7.647	11.486	14.553	12.848
5	2000	P	1.120	1.730	2.322	2.589	2.875
		N	0.106	0.158	0.219	0.227	0.203
		P/N	10.566	10.949	10.603	11.405	14.163

3.8.2 标准曲线的建立

根据建立的双抗夹心 ELSIA 方法工作示意图, 将浓度为 1000 ng/mL 的 8-F1 包被酶标板, 加入的抗原样本为诺如病毒 P 蛋白溶液, 浓度分别稀释为 0.5 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 等 6 个梯度浓度, 按顺序加入到酶标板中, 每个孔重复两次, 同时设立空白对照, 洗涤三次后拍干。再加入 HRP 酶标记抗体 9-F8 浓度为 1600 ng/mL, 洗涤三次拍干, 加入 TMB 溶液显色, 终止液终止反应, 在 OD₄₅₀ 读取数值, 结果如图 3-18 所示。诺如病毒 P 蛋白抗原的浓度在 0.5~50 ng/mL 之间, 抗体对之间有较好的线性关系。故在此浓度范围内, 建立的标准方程为 $y=0.0266x+0.3075$, $R^2=0.9918$ 。

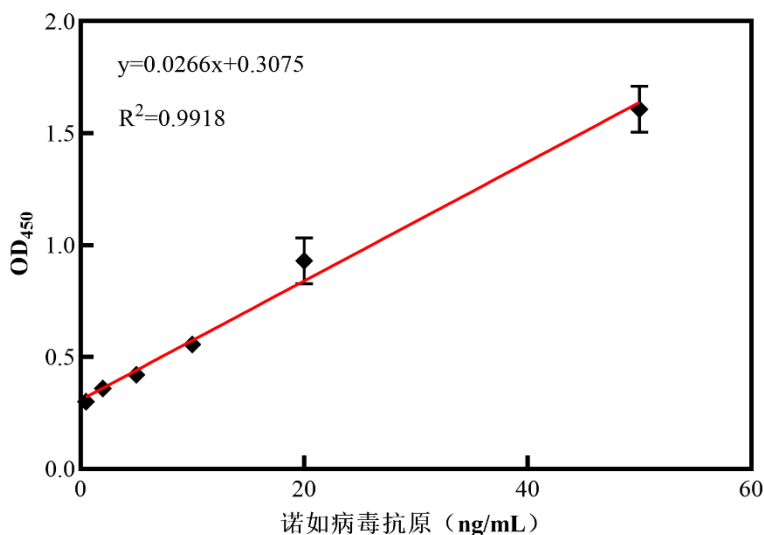


图 3-18 浓度标准曲线

Figure 3-18 Concentration standard curves

3.8.3 分析灵敏度

3.8.3.1 LoB 的评估结果及验证

按照 2.2.6.3 方法, 将获得的 60 个检测结果按照从大到小的顺序排列, 由公式 2-2 计算可得, 等级位置为 57.5。由式 2-3 计算可得, LoB 取值为排名位置第 57 位检测结果和排名第 58 位的检测结果的中间值。由表 3-3 可知, 第一批试剂的 LoB 值为 0.1878 ng/mL, 第二批试剂的 LoB 值为 0.2374 ng/mL, 取最大的 LoB 值作为最终计算结果。由表 3-4 结果可知, 空白参考品结果小于等于 LoB (评估结果, LoB=0.24 ng/mL) 的比例均大于 85%。综合考虑, 结果保留两位数, LoB 最终确定为 0.24 ng/mL。

表 3-3 LoB 的评估结果

Table 3-3 The evaluation result of LoB

试剂 批次	检测日	机型	重复	检测结果 (ng/mL)				
				LoB-1	LoB-2	LoB-3	LoB-4	LoB-5
01	1	1	1	0.2353	0.2433	0.2478	0.2450	0.2438
			2	0.2290	0.2408	0.2410	0.2263	0.2388
		2	1	0.2403	0.2443	0.2460	0.2420	0.2400
			2	0.2460	0.2385	0.2258	0.2154	0.2460
	2	1	1	0.2279	0.2080	0.2194	0.2710	0.2203
			2	0.2193	0.2395	0.2106	0.2431	0.2245

表 3-3 (续)

试剂 批次	检测日	机型	重复	检测结果（ng/mL）				
				LoB-1	LoB-2	LoB-3	LoB-4	LoB-5
01	2	2	1	0.2103	0.1562	0.2401	0.2431	0.2189
			2	0.2031	0.1858	0.1860	0.2148	0.2025
	3	1	1	0.2752	0.1896	0.2035	0.2331	0.2346
			2	0.3128	0.2260	0.2142	0.2313	0.2333
		2	1	0.2435	0.2374	0.2430	0.2322	0.2418
			2	0.2370	0.2398	0.2438	0.2488	0.2428
	LoB-01（X _{57.5} ）			0.1878				
	1	1	1	0.2355	0.2433	0.2268	0.2363	0.2440
			2	0.2378	0.2445	0.2358	0.2440	0.2388
		2	1	0.2363	0.2360	0.2355	0.2280	0.2393
2			0.2435	0.2435	0.2360	0.2358	0.2418	
02	2	1	1	0.1749	0.2848	0.2373	0.2482	0.2381
			2	0.2110	0.2410	0.2424	0.2409	0.1990
		2	1	0.2267	0.2088	0.2442	0.2696	0.2606
			2	0.2151	0.2207	0.1631	0.2333	0.2420
	3	1	1	0.2456	0.1988	0.2625	0.2424	0.2357
			2	0.2375	0.2469	0.2436	0.1928	0.2019
		2	1	0.2343	0.2450	0.0343	0.2448	0.2390
			2	0.2358	0.2360	0.2448	0.2378	0.2453
	LoB-02（X _{57.5} ）			0.2374				
	Max LoB			0.2374				

*所有数据结果保留 4 位小数。

表 3-4 LoB 的验证结果

Table 3-4 The validation result of LoB

试剂 批次	检测日	重复	LoB-6	LoB-7
01	1	1	0.2247	0.1618
		2	0.2297	0.2018
		3	0.2256	0.1993
		4	0.2255	0.2401
	2	1	0.1429	0.1618
		2	0.2251	0.1618
		3	0.2197	0.2187
		4	0.1791	0.2083
	3	1	0.1565	0.2170
		2	0.1668	0.2208
		3	0.1911	0.1818
		4	0.1525	0.2231
	小于等于 LoB 评估值结果数 N		23	
	N 在总结果数所占比例		96%	
	临界比例		85%	
	1	1	0.2349	0.2239
		2	0.2339	0.1815
		3	0.2093	0.2169
		4	0.2278	0.2187
	2	1	0.1400	0.1736
		2	0.1720	0.1272
		3	0.2124	0.1618
		4	0.2111	0.2084
	3	1	0.1757	0.1857
		2	0.1400	0.2436
		3	0.2325	0.2194
		4	0.2297	0.2052
	小于等于 LoB 评估值结果数 N		23	
	N 在总结果数所占比例		96%	
	临界比例		85%	

*所有数据结果保留 4 位小数。

3.8.3.2 LoD 的评估结果及验证

经软件 SPSS 分析, 检出限的检测结果样本符合正态分布, 故采用参数法评估 LoD。按照 2.2.6.3 方法, 5 份低水平样品 (0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL) 的 SD_L 值根据式 2-5 计算, 第一批试剂 $SD_L=0.053$, 第二批试剂 $SD_L=0.047$ 。假设检测结果低于空白限的概率为 5%, 根据式 2-6 计算, 两批试剂的 C_p 值为 1.653。LoB 值为上述步骤中已经评估的结果, 数值为 0.24 ng/mL。由表 3-5 结果可知, 第一批试剂的 LoD 结果为 0.327 ng/mL, 第二批试剂的 LoD 为 0.318 ng/mL, 取最大的 LoD 值作为最终计算结果。由表 3-6 结果可知, 检出限参考品结果大于等于 LoB (评估结果, $LoB=0.24$ ng/mL) 的比例均为 100%, 符合大于 85% 的标准。综合考虑, 结果保留两位小数, 故 LoD 的最终检测结果确定为 0.33 ng/mL。

表 3-5 LoD 的评估结果

Table 3-5 The evaluation result of LoD

试剂 批次	检测日	机型	重复	检测结果（ng/mL）				
				LoD-1	LoD-2	LoD-3	LoD-4	LoD-5
01	1	1	1	0.2416	0.368	0.4313	0.5038	0.9598
			2	0.1890	0.2948	0.4476	0.5287	0.9810
		2	1	0.1916	0.3421	0.3648	0.5365	1.0245
			2	0.163	0.2838	0.3855	0.5060	1.0789
	2	1	1	0.1955	0.3479	0.3678	0.5116	1.1645
			2	0.2379	0.3201	0.4144	0.5221	1.0644
		2	1	0.2660	0.3413	0.3784	0.4307	0.8406
			2	0.1843	0.2586	0.4300	0.4997	1.0745
	3	1	1	0.2205	0.3417	0.4009	0.4227	1.0496
			2	0.2416	0.2368	0.4134	0.5038	0.9598
		2	1	0.2890	0.2948	0.3476	0.5287	1.1081
			2	0.2916	0.3421	0.3648	0.5565	1.1245
	SD			0.0420	0.0400	0.0320	0.0400	0.0890
	SD _L						0.0530	
	LoD-01						0.3270	

表 3-5 (续)

试剂 批次	检测日	机型	重复	检测结果（ng/mL）				
				LoD-1	LoD-2	LoD-3	LoD-4	LoD-5
02	1	1	1	0.2614	0.3337	0.3625	0.4571	0.9930
			2	0.2202	0.3288	0.4194	0.5140	0.8260
		2	1	0.2388	0.3651	0.4320	0.4969	1.0787
			2	0.1813	0.3407	0.3996	0.4658	1.0952
	2	1	1	0.1707	0.2780	0.3582	0.5151	0.9130
			2	0.2104	0.3788	0.3843	0.4883	1.0698
		2	1	0.2307	0.3637	0.3840	0.4128	0.9374
			2	0.1511	0.2308	0.3728	0.4937	1.0216
	3	1	1	0.2498	0.2667	0.3735	0.4646	1.0276
			2	0.1735	0.3132	0.3731	0.4362	1.0515
		2	1	0.2443	0.3171	0.4262	0.504	0.9800
			2	0.2271	0.3287	0.4119	0.5281	1.0451
	SD			0.0430	0.0360	0.0260	0.0350	0.0790
	SD _L					0.0470		
	LoD-02					0.3180		
	Max LoD					0.3270		

*所有数据结果保留 4 位小数。

表 3-6 LoD 的验证结果

Table 3-6 The validation result of LoD

试剂 批次	检测日	重复	LoD-6	LoD-7
01	1	1	0.3199	0.3409
		2	0.3598	0.3395
		3	0.3551	0.3358
		4	0.3312	0.3333

表 3-6 (续)

试剂 批次	检测日	重复	LoD-6	LoD-7
01	2	1	0.3345	0.3261
		2	0.3470	0.3453
		3	0.3021	0.3392
		4	0.3720	0.3322
	3	1	0.3295	0.3363
		2	0.3512	0.3517
		3	0.3627	0.3247
		4	0.3351	0.3458
	大于等于 LoB 评估值结果数 N		24	
	N 在总结果数所占比例		100%	
	临界比例		85%	
	02	1	1	0.3432
2			0.3208	0.3433
3			0.3700	0.3581
4			0.3288	0.3210
2		1	0.3569	0.3072
		2	0.3316	0.3132
		3	0.3032	0.3544
		4	0.3599	0.3366
3		1	0.3550	0.3358
		2	0.3502	0.3364
		3	0.3380	0.3518
		4	0.3361	0.3482
大于等于 LoB 评估值结果数 N		24		
N 在总结果数所占比例		100%		
临界比例		85%		

*所有数据结果保留 4 位小数。

综上所述，建立的 ELISA 方法的 LoB 和 LoD 分别为 0.24 ng/mL 与 0.33 ng/mL。

4 结 论

4.1 全文总结

目前, 诺如病毒的检测手段呈现多样化, 其中酶联免疫吸附法与分子检测方法尤为常用。酶联免疫吸附法因其操作快速简便、具有较高的灵敏度, 在病毒检测领域受到广泛认可。然而, 该方法由于抗体的生产质量, 容易产生假阴性和假阳性问题, 一直是其应用中的一大挑战。为了提升检测的灵敏度和准确性, 抗体的质量成为了关键因素。本论文针对 GII.4 基因型, 通过动物免疫制备高质量杂交瘤细胞, 利用抗体基因重组技术制备基因工程抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 检测方法检测抗原。主要结论如下:

(1) 以核酸样本为模板, 逆转录合成 cDNA 链, 构建表达诺如病毒 P 蛋白的真核表达载体, 转染 293F 细胞、基于链霉亲和素与生物素纯化抗原, 最终获得纯化后的诺如病毒 P 蛋白。

(2) 诺如病毒 P 蛋白作为免疫原免疫小鼠, 断尾取血, 获取动物血清, 间接 ELISA 法检测动物血清效价, 确定血清抗体最优效价为 1:32000 的小鼠制备单克隆抗体。通过间接 ELISA 法筛选出能稳定分泌单克隆抗体的 12 株杂交瘤细胞株定株, 一部分细胞液氮低温保存, 另一部分定株扩大培养后的杂交瘤细胞注入小鼠腹腔, 制备腹水, 经过分离纯化获得 12 株特异性单克隆抗体, 通过 SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白条带大小为轻链 20~25 kDa 与重链 50~55 kDa。亲和力检测筛选出 1-B3、3-C2、5-E3、8-F1、9-F8、14-B9 等 6 株 EC_{50} 值小于 50 ng/mL 的单克隆抗体, 这 6 株抗体与诺如病毒蛋白之间的具有较高亲和力。通过竞争 ELISA 对 6 株抗体进行配对筛选, 确定 8-F1 和 9-F8 抗体, 其竞争比例为小于 10%, 具有明显不竞争关系。对筛选出的 8-F1 和 9-F8 单克隆抗体进行测序, 获得抗体可变区的基因序列, 构建抗体轻重链基因可变区序列的真核表达载体, 转染 293F 细胞表达, 经 protein G 层析介质分离纯化等步骤获得目标抗体。

(3) 构建以双抗体为基础的 ELISA 方法, 优化并建立 ELISA 检测方法, 从而确定包被抗体 8-F1 和 9-F8 检测抗体的最佳工作浓度分别为 1000 ng/mL 与 1600 ng/mL, 据优化后的浓度条件建立标准曲线, 线性回归拟合, $y=0.0266x+0.3075$, 相关系数 $R^2=0.99118$, 对建立的 ELISA 方法进行灵敏度评估, 空白限 (LoB) 和检出限 (LoD) 分别为 0.24 ng/mL 与 0.33 ng/mL。

综上所述, 制备的诺如病毒基因工程抗体与诺如病毒 P 蛋白抗原之间的亲和力较好, 特异性强, 纯度高, 为进一步开发并研制诺如病毒快速检测试剂盒奠定了基础。

4.2 论文的创新点

(1) 通过表达诺如病毒的 P 蛋白, 免疫 BLAB/c 小鼠, 成功获得 2 株单克隆抗体 8-F1 和 9-F8。这两株抗体对诺如病毒 P 蛋白具有良好的特异性和亲和力, 对于后

续病毒检测、免疫治疗等方面具有极高的应用价值。

(2) 通过对 8-F1 和 9-F8 单克隆抗体测序, 获得了该抗体的轻重链可变区的基因序列, 构建了基因工程全长抗体的表达载体, 可以实现在体外持续、稳定地分泌抗体, 且产生的抗体质量均一、活性高。这为大量制备高质量、高特异性的抗体提供了可能, 有利于抗体在临床和科研中的广泛应用。

4.3 论文的不足之处

(1) 本研究只选择诺如病毒单一基因型免疫动物, 制备的单克隆抗体存在广谱性较弱的问题, 这可能限制了该方法检出诺如病毒其它基因型。

(2) 由于科研时间的限制, 对建立的 ELISA 检测方法的其它条件还没有优化完成, 比如封闭液的种类、缓冲液种类、包被抗体、检测抗体时间、显色液显色时间等等。还缺少对建立方法的线性范围、准确度、重复性、特异性以及试剂稳定性的评估。

5 展望

诺如病毒检测技术的进展为疫情的快速诊断提供了有力支持。未来，随着技术的不断进步，我们还应关注多种胃肠道病原体混合感染（如轮状病毒、星状病毒）的问题。在实际应用中，患者可能同时感染多种肠道病原体，因此，开发能够同时检测多种病原体的分子快速检测平台具有重要意义。这种平台不仅可以提高检测效率，还可以为临床诊断和治疗提供更加全面的信息。此外，随着诺如病毒的不断变异和新型肠道病原体的出现，对检测技术的要求也越来越高。因此，未来的研究应致力于开发更加灵敏、特异、简便的诺如病毒检测方法，以满足不同场景下的检测需求。

最后，成本也是选择检测方法时需要考虑的重要因素，未来的研究还应关注降低检测成本的问题，以便让更多的人能够享受到高质量的诺如病毒检测服务。

6 参考文献

- [1] Green KY , Kaufman SS , Nagata BM , et al . Human norovirus targets enteroendocrine epithelial cells in the small intestine[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1.
- [2] Pogan R, Dülfer J, Uetrecht C. Norovirus assembly and stability[J]. Current Opinion in Virology, 2018, 31: 59-65.
- [3] Tofani S, Ianiro G, De Sabato L, et al. Detection and whole genome sequencing of murine norovirus in animal facility in Italy[J]. Animal Biotechnology, 2021, 33, 1142-1149.
- [4] Huang CC, Tang CY. Protein-protein interactions inferred from domain-domain interactions in genogroup II Genotype 4 norovirus sequences[J]. International Journal of Genomics, 2013, 2013: 456356.
- [5] Patel MM, Widdowson M, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(8): 1224-1231.
- [6] Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis[J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 361: 1776-1785.
- [7] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(8): 725-730.
- [8] Payne DC, Vinje J, Szilagyi PG, et al. Norovirus and medically attended gastroenteritis in US children[J]. The New England Journal, 2013, 368: 1121-1130.
- [9] Patel MM, Hall AJ, Vinje J, et al. Noroviruses: a comprehensive review[J]. Journal of Clinical Virology, 2009, 44(1): 1-8.
- [10] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like Viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States[J]. Journal of Infectious Diseases, 2002, 186(1): 1-7.
- [11] Guarines KM, Mendes RPG, Cordeiro MT, et al. Absence of norovirus contamination in shellfish harvested and commercialized in the northeast coast of Brazil[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2020, 53(11): e9529.
- [12] Teunis PFM, Moe CL, Liu P, et al. Norwalk virus: how infectious is it?[J]. Journal of Medical Virology, 2008, 80(8): 1468-1476.

- [13] Lysén M, Thorhagen M, Brytting M, et al. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(8): 2411-2418.
- [14] Wikswø ME. Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact United States, 2009-2010[J]. *American Journal of Public Health*, 2014, 104(11): e13-14.
- [15] Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, et al. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 592-599.
- [16] Green KY. Norovirus infection in immunocompromised hosts[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20(8): 717-723.
- [17] Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD, et al. The vast and varied global burden of norovirus: Prospects for prevention and control[J]. *Plos Medicine*, 2016, 13(4).
- [18] Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, et al. Global economic burden of norovirus gastroenteritis[J]. *Plos One*, 2016, 11(4): e0151219.
- [19] Ruoff K, Devant JM, Hansman G. Natural extracts, honey, and propolis as human norovirus inhibitors[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 8116.
- [20] Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, et al. Static and evolving norovirus genotypes: Implications for epidemiology and immunity[J]. *Plos Pathogens*, 2017, 13(1): e1006136.
- [21] Bartnicki E, Cunha JB, Kolawole AO, et al. Recent advances in understanding noroviruses[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 79.
- [22] Li J, Zhang L, Zou W, et al. Epidemiology and genetic diversity of norovirus GII genogroups among children in Hubei, China, 2017-2019[J]. *Virologica Sinica*, 2023, 38(3): 351-362.
- [23] De Graaf M, Van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(7): 421-433.
- [24] Netzler NE, Envois Tuipulotu D, White PA. Norovirus antivirals: Where are we now?[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2019, 39(3): 860-886.
- [25] Niendorf S, Faber M, Tröger A, et al. Diversity of noroviruses throughout outbreaks in Germany 2018[J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1157.
- [26] Weerasekara S, Prior AM, Hua DH. Current tools for norovirus drug discovery[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2016, 11(6), 529-541.

- [27] Alvarado G, Ettayebi K, Atmar RL, et al. Human monoclonal antibodies that neutralize pandemic GII.4 noroviruses[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1898-1907.
- [28] Yu JM, Liang ZY, Guo K, et al. Intra-host evolution of norovirus GII.4 in a chronic infected patient with hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 375.
- [29] Carmona-Vicente N, Vila-Vicent S, Allen D, et al. Characterization of a novel conformational GII.4 norovirus epitope : Implications for norovirus-host interactions[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(17): 7703-7714.
- [30] Hey A. History and practice: antibodies in infectious diseases[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): AID-0026-2014.
- [31] Vongpunsawad S, Prasad BVV, Estes MK. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(9): 4818-4825.
- [32] Subba-Reddy CV, Goodfellow I, Kao CC. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(24): 13027-13037.
- [33] Chhabra P, De Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406.
- [34] Cannon JL, Barclay L, Collins NR, et al. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(7): 2208-2221.
- [35] 沈玲羽, 姜博, 严寒秋, 等. 诺如病毒基因分型研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(11): 1927-1932.
- [36] Kroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(10): 2059-2068.
- [37] Hall AJ, Glass RI, Parashar UD. New insights into the global burden of noroviruses and opportunities for prevention[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2016, 15(8), 949-951.
- [38] Gao ZY, Liu BW, Yan HQ, et al. Norovirus outbreaks in Beijing, China, from 2014 to 2017[J]. *Journal of Infection*, 2019, 79(2): 159-166.
- [39] De Graaf M, Van Beek J, Vennema H, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus — end of the GII.4 era?[J]. *Eurosurveillance*, 2015, 20(26): 21178.

- [40] Lindesmith LC, Donaldson E, Leon J, et al. Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 1800-1815.
- [41] Chan M, Lee N, Hung TN, et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 10061.
- [42] Parra GI. Emergence of norovirus strains: a tale of two genes[J]. *Virus Evolution*, 2019, 5(2): vez048.
- [43] Gavilondo JV, Larrick JW. Antibody engineering at the millennium[J]. *Biotechniques*, 2000, 29(1): 128-145.
- [44] Fu J, Ai J, Bao C, et al. Evolution of the GII.3[P12] norovirus from 2010 to 2019 in Jiangsu, China[J]. *Gut Pathogens*, 2021, 13: 34.
- [45] Stegmaier T, Oellingrath E, Himmel M, et al. Differences in epidemic spread patterns of norovirus and influenza seasons of Germany: an application of optical flow analysis in epidemiology[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 14125.
- [46] Zhu K, Dietrich R, Didier A, et al. Recent developments in antibody-based assays for the detection of bacterial toxins[J]. *Toxins*, 2014, 6(4): 1325-1348.
- [47] Gavilondo JV, Larrick JW. Antibody engineering at the millennium[J]. *Biotechniques*, 2000, 29(1): 128-145.
- [48] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
- [49] Kapingidza AB, Kowalk, Chruszcz M. Antigen-antibody complexes[J]. *Subcellular Biochemistry*, 2020, 94: 465-497.
- [50] Fan D, Cao Y, Cao M, et al. Nanomedicine in cancer therapy[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 293.
- [51] Liu J K. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations[J]. *Annals of Medicine & Surgery*, 2014, 3(4): 113-116.
- [52] Hust M, Jostock M, Menzel C, et al. Single chain Fab (scFab) fragment[J]. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 14.
- [53] Hemmer C, Djennane S, Ackerer L, et al. Nanobody-mediated resistance to grapevine fanleaf virus in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 660-671.
- [54] Zarrineh M, Mashhadi IS, Farhadpour M, et al. Mechanism of antibodies purification by protein A[J]. *Analytical Biochemistry*, 2020, 609: 113909.

- [55] 刘家玮, 唐长伟, 夏一然, 等. 色谱技术在抗体分离纯化中的应用进展[J]. 色谱, 2024, 2: 1-11.
- [56] Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plückthet, et al. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments[J]. Biochemistry, 1990, 29(6): 1362-1367.
- [57] Plückthun A, Pack P. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments[J]. Immunotechnology, 1997, 3(2): 83-105.
- [58] Aires da Silva F, Corte-Real S, Goncalves J. Recombinant antibodies as therapeutic agents: pathways for modeling new biodrugs[J]. BioDrugs, 2008, 22(5): 301-314.
- [59] Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation[J]. Immunology, 2020, 160: 233-247.
- [60] Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification[J]. Methods, 2017, 116: 84-94.
- [61] Akbar R, Robert PA, Pavlović M, et al. A compact vocabulary of paratope-epitope interactions enables predictability of antibody-antigen binding[J]. Cell Reports, 2021, 34(11): 108856.
- [62] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models[J]. Blood, 2012, 119(24): 5640-5649.
- [63] Stewart R, Hammond SA, Michael O, et al. The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2014, 2(1): 1-10.
- [64] André AS, Moutinho I, Dias JNR, et al. In vivo phage display: a promising selection strategy for the improvement of antibody targeting and drug delivery properties[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 962124.
- [65] Sarvestani ST, Cotton B, Fritzlar S, et al. Norovirus infection: replication, manipulation of host, and interaction with the host immune response[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2016, 36(4): 215-225.
- [66] Ramani S, Neill FH, Opekun AR, et al. Mucosal and cellular immune responses to Norwalk virus [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2015, 212(3): 397-405.
- [67] 左月婷, 薛亮, 吴清平, 等. 诺如病毒感染宿主免疫应答机制及疫苗研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2391-2398.
- [68] Malm M, Tamminen K, Blazevic V. Assessment of functional norovirus antibody responses by blocking assay in mice[J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1403: 259-268.

- [69] Malm M, Hyöty H, Knip M, et al. Development of T cell immunity to norovirus and rotavirus in children under five years of age[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 3199.
- [70] Ramani S, Neill FH, Opekun AR, et al. Mucosal and cellular immune responses to Norwalk virus[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2015, 212(3): 397-405.
- [71] Kocher J, Yuan L. Norovirus vaccines and potential anti-norovirus drugs: recent advances and future perspectives[J]. Future Virology, 2015, 10(7): 899-913.
- [72] Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent[J]. The New England Journal of Medicine, 1977, 297(2): 86-89.
- [73] Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice[J]. Journal of Virology, 2002, 76(23): 12335-12343.
- [74] Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus GII.4 strain antigenic variation[J]. Journal of Virology, 2011, 85(1): 231-242.
- [75] Mattison CP, Cardemil CV, Hall AJ. Progress on norovirus vaccine research: public health considerations and future directions[J]. Expert Review of Vaccines, 2018, 17(9): 773-784.
- [76] 薛亮. 诺如病毒 GII 型流行株基因组特征分析及进化机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [77] Kim D, Lee HM, Oh KS, et al. Exploration of the metal coordination region of concanavalin a for its interaction with Human Norovirus[J]. Biomaterials, 2017, 128: 33-43.
- [78] 方肇寅, 温乐英, 晋圣瑾, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感感染[J]. 病毒学报, 1995, (3): 215-219.
- [79] Desdoutis M, De Graaf M, Strubbia S, et al. Novel opportunities for NGS-based one health surveillance of foodborne viruses[J]. One Health Outlook, 2020, 2: 14.
- [80] 曹芳芳, 徐德顺. 单管多重荧光定量 RT-PCR 方法鉴别 A 组轮状病毒及诺如病毒 GI 型和 GII 型[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 823-826.
- [81] 宋克云, 张如胜, 欧新华, 等. RT-LAMP 快速检测 Norwalk 病毒 GII 型[J]. 病毒学报, 2009, 25(4): 291-294.
- [82] Duan L, Yang X, Zhan W, et al. Development of a rapid and accurate CRISPR/Cas13-based diagnostic test for GII.4 norovirus infection[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 912315.

- [83] Liu L, Moore MD. A survey of analytical techniques for noroviruses[J]. Foods, 2020, 9(3): 318.
- [84] Ito M, Tggaya I. Immune adherence hemagglutination test as a new sensitive method for titration of animal virus antigens and antibodies[J]. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 1966, 19(3): 109-126.
- [85] Kapikian AZ, Greenberg HB, Cline WL, et al. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay[J]. Journal of Medical Virology, 1978, 2(4): 281-294.
- [86] Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(1): 15-37.
- [87] Greenberg HB, Wyatt RG, Valdesuso J, et al. Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies[J]. Journal of Medical Virology, 1978, 2(2): 97-108.
- [88] O'Farrell B. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems[A]. In: R Wong, H Tse. In Lateral Flow Immunoassay[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 1-33.
- [89] Rackoff LA, Bok K, Green KY, et al. Epidemiology and evolution of rotaviruses and noroviruses from an archival WHO global study in children (1976-79) with implications for vaccine design[J]. Plos One, 2013, 8(3): e59394.
- [90] Robilotti E, Deresinski S, Pinsky B A. Norovirus[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2015, 28(1): 134-164.
- [91] Saylan Y, Erdem Ö, Ünal S, et al. An alternative medical diagnosis method: biosensors for virus detection[J]. Biosensors, 2019, 9(2): 65.
- [92] Jiang X, Wang M, Graham DY, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein[J]. Journal of Virology, 1992, 66(11): 6527-6532.
- [93] Qiu S, Zheng L, Qin C, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against GII.6 norovirus virus-like particles[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 142: 104100.
- [94] 林健东, 杨北兵, 陈静浓. 诺如病毒感染国内外研究进展[J]. 预防医学论坛, 2010, 16(08): 732-734+747.
- [95] Burton-Macleod JA, Kane EM, Beard RS, et al. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(6): 2587-2595.

- [96] Lindesmith LC , Beltramello M , Donaldson EF , et al . Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation[J]. Plos Pathogens, 2012, 8(5): e1002705.
- [97] Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, et al. Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity[J]. The Journal of Infectious Diseases. 2013, 208(11): 1877-1887.
- [98] Donaldson EF , Lindesmith LC , Lobue AD , et al . Norovirus pathogenesis : mechanisms of persistence and immune evasion in human populations[J]. Immunological Reviews. 2008, 225(1): 190-211.
- [99] Jantscheff P , Winkler L , Karawajew L , et al . Hybrid hybridomas producing bispecific antibodies to CEA and peroxidase isolated by a combination of HAT medium selection and fluorescence activated cell sorting[J] . Journal of Immunological Methods, 1993, 163(1): 91.