

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

猫冠状病毒 TaqMan qPCR 和胶体金检测方法的建立

硕 士 研 究 生: 刘哲

学 号: 82101215629

指 导 教 师: 刘家森 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Establishment of Detection Methods of TaqMan qPCR and colloidal gold for Feline Coronavirus

Candidate: LIU Zhe

Student ID: 82101215629

Supervisor: Associate Prof. LIU Jiasen

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

Major: Veterinary Medicine

Institution: Harbin Veterinary Research Institute

Graduate School

June 2024

摘 要

猫冠状病毒 (Feline coronavirus, FCoV) 包括猫肠道冠状病毒 (Feline enteric coronavirus, FECV) 和猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus, FIPV)。FECV 主要影响猫的胃肠道系统, 引起轻微的、可自愈的胃肠道症状。而 FIPV 感染则导致严重的免疫介导性疾病, 病程迅猛且病死率极高。猫传染性腹膜炎 (Feline infectious peritonitis, FIP) 的发生与 FECV 感染期间病毒基因组的突变相关, 检测 FECV 是预防 FIP 发生的有效手段。FECV 和猫细小病毒 (Feline parvovirus, FPV) 可在猫中引起相似的腹泻症状, 且经常发生混合交叉感染, 根据临床症状难以鉴别诊断。本实验研究从检测方法的精准性入手, 建立快速高效的检测方法, 为疾病的预防和治疗提供可靠的诊断工具。

(1) 建立一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法, 可同时鉴别和检测 FCoV 和 FPV。根据 GenBank 中已有的 FCoV 和 FPV 全基因组序列, 在基因组保守区设计特异性引物和探针, 经过筛选确定了最佳的引物和探针对组合。通过优化反应体系, 确定了检测方法的最佳反应条件。以构建的 FCoV 和 FPV 标准品作为模板, 对该方法的特异性、灵敏性、重复性进行评价。结果显示, 检测方法特异性良好, 不与猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 和猫疱疹病毒 (Feline herpesvirus, FHV) 发生交叉反应; 本方法对 FCoV 和 FPV 的检出极限均为 50 copies/ μ L, 灵敏性较常规 PCR 提高 20 倍; 批内和批间重复性试验的变异系数 (CV) 均 <2%, 证明检测方法稳定性良好; 本方法可检测到根据公开的 FCoV 毒株序列构建的 12 株重组质粒 (涵盖了特异性引物和探针靶位点的所有突变情况), 验证了检测方法的通用性; 本方法与常规 PCR 对比检测了 75 份肛拭子样本, FCoV 和 FPV 阳性检出率均提升 5.34%。

(2) 建立检测 FCoV 的胶体金免疫层析试纸条。本研究构建 FIPV-DF-2 病毒 N 蛋白的重组质粒 pCold I-FIPV-DF-2-N, 原核表达并纯化, 免疫 BALB/c 小鼠, 成功制备了特异性强且稳定的两株单克隆抗体 mAb 2G7 和 mAb 3H5。mAb 2G7 识别 N 蛋白上 ¹⁸RGRSNSRGRKN²⁸ 的氨基酸序列, mAb 3H5 识别 ²⁹⁵GDQVKVTLTHTYYLPKDDAKTSQFLEQID³²³ 的氨基酸序列。这两段序列在 FCoV 毒株间分别展现出高达 97.78% 和 98.62% 的同源性。本研究基于双抗体夹心法, 以 mAb 3H5 作为捕获抗体, mAb 2G7 作为检测抗体, 成功制备了检测 FCoV 的胶体金免疫层析试纸条。实验结果表明, 该胶体金免疫层析试纸条对重组 pCold I-FIPV-DF-2-N 蛋白的极限检测浓度可达 209.8 ng/mL; 对 10 份常规 PCR 检测为 FCoV 阳性的腹水样本检测总符合率为 70%; 且不与 FPV、FCV 和 FHV 发生交叉反应。

综上所述, 本研究成功建立了检测 FCoV 的两种检测方法: 一是建立了基于核酸检测的一步法双重 TaqMan qPCR 方法, 同时检测 FCoV 和 FPV。该方法可重复性强、灵敏性高和特异性好, 可为科研机构、动物医院等提供精确可靠的检测手段。二是制备了基于抗原检测的胶体金免疫层析试纸条, 检测 FCoV。该检测方法可实现现场快速检测, 为宠物诊所、动物收容所等提供便捷的检测方法。

关键词: 猫冠状病毒, qPCR, 胶体金, 单克隆抗体, 抗原表位

Abstract

Feline coronavirus (FCoV) includes Feline enteric coronavirus (FECV) and Feline infectious peritonitis virus (FIPV). FECV primarily affects the gastrointestinal system of cats, causing mild and self-limiting gastrointestinal symptoms. In contrast, FIPV infection leads to severe immune-mediated disease with rapid progression and a very high mortality rate. The occurrence of feline infectious peritonitis (FIP) is associated with mutations in the viral genome during FECV infection, which makes diagnosing FECV an effective measure for preventing FIP. Both FECV and feline parvovirus (FPV) can cause similar diarrhea symptoms in cats, and mixed infections frequently occur, making clinical diagnosis challenging. This study aims to establish rapid and efficient detection methods to provide reliable diagnostic tools for disease prevention and treatment.

(1) A one-step duplex TaqMan qPCR assay was developed to identify and detect FCoV and FPV simultaneously. Specific primers and probes were designed based on the conserved regions of FCoV and FPV genomes available in GenBank. After screening, the optimal combinations of primers and probes were determined. By optimizing the reaction system, the best reaction conditions for the detection method were established. The specificity, sensitivity, and repeatability of this method were evaluated using constructed FCoV and FPV standards as templates. The results showed that the detection method had good specificity, with no cross-reaction with feline calicivirus (FCV) and feline herpesvirus (FHV); the detection limits for both FCoV and FPV were 50 copies/ μ L, making the sensitivity 20 times higher than that of conventional PCR; The coefficients of variation (CVs) for the intra- and interbatch coefficients of variation were less than 2%, which proved that the detection method was stable; This method could detect 12 recombinant plasmids constructed from published FCoV strain sequences (covering all mutations at the target sites of the specific primers and probes), verifying the method's versatility; After 75 clinical samples were tested, the percentage of FCoV- and FPV-positive samples was 5.34% greater than that of conventional PCR methods.

(2) Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for detecting FCoV. In this study, the recombinant plasmid pCold I-FIPV-DF-2-N of the FIPV-DF-2 virus N protein was constructed. It was then expressed prokaryotically and purified. Using this plasmid, BALB/c mice were immunized, and two highly specific and stable monoclonal antibodies, mAb 2G7 and mAb 3H5, were successfully prepared. mAb 2G7 recognizes the amino acid sequence ¹⁸RGRSNSRGRKN²⁸ on the N protein, and mAb 3H5 recognizes the amino acid sequence ²⁹⁵GDQVKVTLTHTYYLPKDDAKTSQFL EQID³²³. These sequences exhibit homologies of 97.78% and 98.62%, respectively, among FCoV strains. Using a double-antibody sandwich method, mAb 3H5 was used as the capture antibody and mAb 2G7 as the detection antibody, successfully creating the colloidal gold immunochromatographic test strip for FCoV detection. Experimental results showed that this test strip had a detection limit of 209.8 ng/mL for the recombinant pCold I-FIPV-DF-2-N protein; the overall agreement rate for detecting FCoV in 10 ascites samples, which tested positive by conventional PCR, was 70%; and there

was no cross-reaction with FPV, FCoV, and FHV.

In conclusion, this study successfully established two methods for detecting FCoV: a one-step dual TaqMan qPCR method for simultaneous detection of FCoV and FPV, which is highly sensitive, specific, and reproducible, providing accurate and reliable detection tools for research institutions and animal hospitals; and a colloidal gold immunochromatographic test strip for FCoV detection, which allows for rapid on-site testing, providing a convenient detection method for pet clinics and animal shelters.

Keywords: Feline coronavirus, TaqMan qPCR, Colloidal gold, Monoclonal antibody, Antigen epitope

目 录

第一章 绪论	1
1.1 猫腹泻相关病毒	1
1.1.1 猫冠状病毒	1
1.1.2 猫细小病毒	1
1.2 猫冠状病毒的研究进展	2
1.2.1 病原学研究	2
1.2.2 流行病学	2
1.2.3 临床症状和病理变化	3
1.3 猫细小病毒的研究进展	3
1.3.1 病原学研究	3
1.3.2 流行病学	3
1.3.3 临床症状和病理变化	4
1.4 病毒常用检测方法及其研究进展	4
1.4.1 病毒分离鉴定	4
1.4.2 血清学检测方法	5
1.4.3 分子生物学检测	6
1.5 目的和意义	7
第二章 FCoV 和 FPV 一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法的建立	8
2.1 材料与试剂	8
2.1.1 质粒、菌种、毒株和细胞	8
2.1.2 主要仪器设备	8
2.1.3 主要试剂及耗材	9
2.2 实验方法	9
2.2.1 特异性引物和探针的设计	9
2.2.2 FCoV RNA 标准品和 FPV 质粒标准品的制备	11
2.2.3 反应条件的优化	12
2.2.4 标准曲线的建立	12

2.2.5 特异性试验	12
2.2.6 敏感性试验	12
2.2.7 重复性试验	13
2.2.8 通用性试验	13
2.2.9 临床样品检测	14
2.3 结果	16
2.3.1 重组质粒 pMD TM 18-T-FCoV 和 pMD TM 18-T-FPV 的鉴定结果	16
2.3.2 引物和探针的筛选结果	16
2.3.3 反应条件的优化	17
2.3.4 反应体系及反应条件的确定	19
2.3.5 标准曲线的建立	19
2.3.6 特异性试验	20
2.3.7 敏感性试验	21
2.3.8 重复性试验	22
2.3.9 检测结果的判定标准	23
2.3.10 通用性试验	23
2.3.11 临床样品检测	23
2.4 讨论	23
第三章 FCoV 胶体金免疫层析试纸条检测方法的建立	26
3.1 材料与试剂	26
3.1.1 质粒、菌种、毒株、细胞和动物	26
3.1.2 主要仪器设备	26
3.1.3 主要实验试剂	27
3.2 实验方法	27
3.2.1 FIPV-DF-2 N 蛋白重组原核表达载体的构建	27
3.2.2 重组 FIPV-DF-2 N 蛋白的诱导表达和纯化	28
3.2.3 单克隆抗体的制备和纯化	29
3.2.4 单克隆抗体的功能验证	31

3.2.5 抗原表位的测定	31
3.2.6 抗原表位保守性分析	31
3.2.7 免疫层析试纸条的研制与评价	33
3.3 实验结果	34
3.3.1 FIPV-DF-2 N 基因的扩增及其重组质粒的构建	34
3.3.2 FIPV-DF-2 N 蛋白的表达与纯化	35
3.3.3 免疫小鼠血清效价检测	35
3.3.4 单克隆抗体的制备与鉴定	36
3.3.5 单克隆抗体的特异性和反应原性测定	36
3.3.6 鉴定单克隆抗体识别的抗原表位	38
3.3.7 抗原表位的保守性分析	39
3.3.8 免疫层析试纸条的研制与评价	40
3.4 讨论	42
第四章 结论	44
参考文献	45
致谢	53
作者简历	54

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino acid	氨基酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
BLAST	Basic local alignment search tool	生物大分子序列比对搜索工具
CPV	Canine parvovirus	犬细小病毒
CRFK	Crandel Feline Kidney Cells	猫肾细胞
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	DMEM 培养基
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
E. coli	Escherichia.coli	大肠杆菌
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FCV	Feline calicivirus	猫杯状病毒
FHV	Feline herpesvirus	猫疱疹病毒
FCoV	Feline coronavirus	猫冠状病毒
FPV	Feline parvovirus	猫细小病毒
FRV	Feline rotavirus	猫轮状病毒
FIPV	Feline infectious peritonitis virus	猫传染性腹膜炎病毒
FBOV	Feline bocavirus	猫博卡病毒
FeKoV	Feline Kovirus	猫嗜病毒
FIV	Feline immunodeficiency virus	猫免疫缺陷病病毒
FeLV	Feline leukemia virus	猫白血病病毒
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay	间接免疫荧光法
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MEV	Mink enteritis parvovirus	水貂肠炎病毒
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
OD	Optical Density	光密度
ORFs	Open reading frames	开放阅读框
PBST	Phosphate buffer saline with Tween 20	加入吐温 20 的磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
VP	Viral protein	结构蛋白
WB	Western blot	蛋白印迹

第一章 绪论

1.1 猫腹泻相关病毒

猫作为人们广泛饲养的宠物，其健康状况一直受到广泛关注。特别是与腹泻相关的病毒，由于其对猫健康构成的严重威胁，已经引起了兽医界和宠物饲养者的高度重视。在猫肠道中发现的病毒主要包括：猫冠状病毒（Feline coronavirus, FCoV）、猫细小病毒（Feline parvovirus, FPV）、猫腺病毒（Feline adeno virus）、猫呼肠孤病毒（Feline reovirus）、猫白血病病毒（Feline leukemia virus, FeLV）、犬细小病毒（Canine parvovirus, CPV）、猫星状病毒（Feline astrovirus, FeAstV）、诺如病毒（Norovirus, NoV）、猫博卡病毒（Feline bocavirus, FBoV）以及猫嶙病毒（Feline Kovirus, FeKoV）等（DI MARTINO et al., 2019; 伊淑帅, 2019）。其中，FECV 和 FPV 是引发猫肠道疾病的最重要的两种病原，两者可引起相似的临床症状，如厌食、腹泻、呕吐和脱水等典型症状（AWAD et al., 2018; KIPAR et al., 1998），仅根据临床表现来区分 FECV 和 FPV 是具有挑战性的。在临床实践中，FECV 和 FPV 的混合感染往往同时出现或连续发生（CAVE et al., 2002; DI PROFIO et al., 2023），病情的恶化或病程的延长可能不可预测地增加 FECV 突变导致猫传染性腹膜炎（Feline infectious peritonitis, FIP）的风险（POLAND et al., 1996; ROHRBACH et al., 2001），严重情况下可能导致整个猫群的死亡。为了准确鉴别和确诊这些病原，通常需要借助实验室的分子生物学方法。这些方法能够提供更为精确和可靠的诊断结果，有助于兽医和宠物饲养者更好地了解和管理猫肠道病毒疾病，从而保障猫的健康和福利。

1.1.1 猫冠状病毒

FCoV 是一种正链 RNA 病毒，属于冠状病毒科， α 冠状病毒属（ADDIE et al., 2022）。其主要在猫科动物和野生猫科动物中传播（HOFMANN-LEHMANN et al., 1996），是一种广泛存在的病原。根据临床症状和病理特征的差异，FCoV 可分猫传染性腹膜炎病毒（Feline infectious peritonitis virus, FIPV）和猫肠道冠状病毒（Feline enteric coronavirus, FECV）两种生物型（GAO et al., 2023）。FECV 在猫肠道中高度流行，受感染的猫通常表现出轻微的胃肠道症状，且多数可自愈，死亡率相对较低。然而，FIPV 感染则会导致一种严重的免疫介导性疾病，以纤维蛋白或肉芽肿性浆膜炎为特征，病程进展迅猛，病死率极高（MALBON et al., 2019）。已有研究表明，FIP 的发生是由 FECV 感染期间病毒基因组内发生的突变引起的（DESMARETS et al., 2016）。尽管 FIP 在 FECV 感染的猫中发病率相对较低，但 FIP 仍然是导致猫死亡的一个重要因素，对猫的健康构成了严重威胁（ADDIE et al., 1995）。由于 FIP 缺乏准确可靠的诊断，目前 FIP 的诊断主要依靠回顾性病史调查、常见的血液学实验等辅助诊断方法（TASKER, 2018）。

1.1.2 猫细小病毒

FPV 属于细小病毒属，是一种无包膜单链 DNA 病毒（KOLANGATH et al., 2023）。猫及猫科动物感染 FPV 后，常表现为泛白细胞减少症，这是一种以高热、持续性呕吐、腹泻、脱水和重度白细胞减少为特征的严重疾病（AWAD et al., 2018）。该病毒对各个年龄段的猫均具有感染性，但

尤以 3~6 月龄未接种疫苗的幼猫最易感，其感染率可高达 70%，且死亡率在 50%~60%之间，最高可达 80%~90%，对猫的健康构成了极大的威胁（张梦薇 等, 2019）。

1.2 猫冠状病毒的研究进展

1.2.1 病原学研究

根据血清学和遗传学特性，FCoV 被分为 I 型和 II 型。其中，I 型 FCoV 在猫群中的感染率最高，并在全球范围内分布（BENETKA et al., 2004; SHIBA et al., 2007）。

FCoV 的基因组长度约为 29 kb，包含了多个开放阅读框（ORFs）和非翻译区（UTRs）等关键区域。在这些 ORFs 中，ORF1a 和 ORF1b 尤为重要，它们负责编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶及其他非结构蛋白，包含了重要的调控序列，用于启动病毒基因的转录和翻译（BREDENBEEK et al., 1990）。ORF3 位于 S 和 E 基因之间，编码蛋白质 3a、3b 和 3c，参与病毒的组装和释放（BáLINT et al., 2014; TUANTHAP et al., 2021; 高文欣 等, 2022）。ORF7 位于 N 基因下游，编码蛋白质 7a 和 7b，这些蛋白可能与病毒与宿主相互作用以及致病机制相关（HAIJEMA et al., 2004; TAKANO et al., 2011; TEKES and THIEL, 2016）。FCoV 基因组中编码四种关键结构蛋白，包括刺突（S）蛋白、包膜（E）蛋白、膜（M）蛋白和核衣壳（N）蛋白（TEKES and THIEL, 2016）。其中，S 蛋白作为病毒结合和进入宿主细胞的关键因子，不仅影响 FCoV 的趋向性和毒力特性，更在疾病的发展过程中扮演着关键角色，参与了一个从轻微的肠道疾病逐渐发展为严重的 FIP 的复杂转变过程（JAIMES and WHITTAKER, 2018）。尽管 S 蛋白是 FCoV 中和抗体的关键靶点，能够诱导产生具有中和活性的抗体，但其高度的变异性和 ADE 表位的存在使得其在检测应用中受到一定限制（CORAPI et al., 1995; HOHDATSU et al., 1991; KIDA et al., 1999）。相比之下，N 蛋白作为冠状病毒的主要结构蛋白，在病毒复制、组装中发挥着关键作用（ALMAZÁN et al., 2004; CUBUK et al., 2021）。大量研究表明，N 蛋白具有很强的免疫原性，能够诱导强大的细胞和体液免疫（DUTTA et al., 2020; LEUNG et al., 2004; LU et al., 2023; SAIF, 1993; WASMOEN et al., 1995）。更重要的是，与刺突蛋白相比，N 基因在冠状病毒中表现出显著的保守性，使其成为抗原和抗体检测的理想候选基因（BAI et al., 2021）。在 FCoV 感染的早期阶段，猫体内即可产生高水平的抗 N 蛋白抗体（MA et al., 2019; YU et al., 2012）。因此，N 蛋白的检测不仅快速可靠，还可作为早期诊断 FCoV 感染的重要指标，为疾病的防控和治疗提供有力支持。

1.2.2 流行病学

FCoV 包括 FECV 和 FIPV。FCoV 是一种在全球范围内广泛存在于猫科动物中的病毒，其中 FECV 感染能够引发良性肠道疾病，而 FIPV 感染则能够引发致命的全身性疾病（JAIMES and WHITTAKER, 2018）。FIPV 首次于 1960 年代初被报道（HOLZWORTH, 1963），但直到 1966 年才确定了病毒作为病因（WOLFE and GRIESEMER, 1966），并在 1968 年得到证实（WARD et al., 1968）。在 FIPV 感染案例中，幼猫是最易感染的群体，并且在 10 岁以上的老年猫中同样呈现出较高的患病率，形成 FIPV 感染的第二高峰（WORTHING et al., 2012）。尽管所有品种的猫都可能感染 FIPV，但纯种猫更易受到影响，尤其是一些特定品种如英国短毛猫、德文莱克斯猫和阿比

西尼亚猫等 (WORTHING et al., 2012)。此外,雄性和未绝育的猫对 FIP 更具感染性 (ROHRBACH et al., 2001)。

在多猫环境中,如猫舍、宠物店和庇护所, FECV 的感染率尤为显著 (ADDIE, 2000; FOLEY et al., 1997b),有时高达 90% 的猫体内存在 FECV 特异性抗体 (DRECHSLER et al., 2011; HOHDATSU et al., 1992)。然而,尽管感染率如此之高,但仅有不到 5% 的猫患 FIP,特别是年幼的小猫更易发展为致命性的 FIP (ADDIE et al., 1995)。

在传播途径方面, FECV 主要通过粪口途径进行传播,主要感染猫的肠细胞,导致肠道疾病的发生 (PEDERSEN, 2014)。一些研究表明,具有高抗体滴度的猫更有可能成为病毒的携带者,并可能持续释放更多的病毒,从而增加了病毒在猫群中的传播风险 (HARTMANN, 2005)。FECV 感染的猫中常见混合感染,即同时感染两种或多种不同的病毒株 (DI PROFIO et al., 2023)。

1.2.3 临床症状和病理变化

大多数 FECV 感染的猫表现为轻微的胃肠道症状 (KIPAR et al., 1998)。然而,对于一小部分感染的猫来说,特别是在特定的环境条件下,病毒可能引发更严重的疾病进程 (ADDIE, 2000)。特别是当 FECV 发生变异后引发 FIP 时,猫的病情将急剧恶化。FIP 可分为干性和湿性两种类型,湿性 FIP 主要由渗出液的积聚引起的腹膜炎和胸膜炎,而干性 FIP 则主要表现为器官内的肉芽肿和炎症反应 (OSBORNE et al., 2022)。大多数 FIP 病例表现为积液,通常为腹部或胸膜积液,偶尔为心包积液或阴囊积液,伴有发热、厌食和体重减轻 (BAEK et al., 2017; YIN et al., 2021)。也有腹部淋巴结肿大的报道 (LEWIS and O'BRIEN, 2010),尤其是无积液的 FIP 病例中 (KATAYAMA and UEMURA, 2023)。

1.3 猫细小病毒的研究进展

1.3.1 病原学研究

FPV 的病毒结构呈现为独特的二十面体形态,其核心由衣壳蛋白紧密构成,直径大约在 20~24 nm 之间,显著特征在于其无囊膜结构 (MIETZSCH et al., 2019)。在病毒基因组中,存在两个关键的开放阅读框 (ORFs),即 ORF1 和 ORF2。其中,ORF1 负责编码非结构蛋白 NS1 和 NS2,而 ORF2 则负责编码衣壳蛋白 VP1 和 VP2 (LIN et al., 2019)。其中,VP2 蛋白是病毒粒子中含量最高的结构蛋白,约占所有结构蛋白的 90% (HUEFFER et al., 2003)。VP2 裸露于衣壳蛋白表面,不仅影响着 FPV 对宿主范围的选择,还直接关联到其在宿主体内凝集红细胞的能力,以及诱导机体产生免疫反应和致病性的过程。另一方面,VP1 蛋白通过调控磷脂酶 A2 酶的活性,决定了病毒是否能够对宿主细胞进行入侵和感染 (CHAPMAN and ROSSMANN, 1993; TULLIS et al., 1993)。FPV 的基因组 DNA 在结构上也具有显著特点,其 5'端和 3'端均包含末端反向重复序列,形成了反转回文结构。这种结构中的基因组末端反转互补的回折部分,实际上扮演着 FPV DNA 复制的引物角色,极大地降低了病毒在复制过程中的突变风险,从而使得 FPV 的遗传稳定性得以增强 (CHRISTENSEN and TATTERSALL, 2002; 饶家辉 等, 2009)。

1.3.2 流行病学

FPV 主要感染猫科动物，引起猫泛白细胞减少症（Feline Panleukopenia），具有较高的传染性和致死率（STUETZER and HARTMANN, 2014）。近年来，随着养猫业的快速发展和宠物猫数量的不断增加，FPV 的流行情况也日益严峻。FPV 最早于 1928 年被发现（邢建民, 2010），随后在 1957 年由 Bolin 成功分离（BOLIN, 1957）。中国于 20 世纪 50 年代发现了 FPV，并在 1985 年分离获得该病毒（许树林 等, 1996）。

目前，FPV 已呈全球范围流行，其不断发生变异，导致宿主范围不断扩大，除了常见的家猫外，还可以感染大型猫科动物如老虎、豹子，以及小熊猫、浣熊、犬等非猫科动物（ALLISON et al., 2012; STEINEL et al., 2001; 杨松涛 等, 2007）。FPV 的传播途径多样，主要通过感染猫与易感猫之间的直接接触进行传播，如共享食物、水源、猫砂盆等日常用品。此外，母猫在怀孕期间感染 FPV 后，还可通过胎盘将病毒垂直传播给胎儿（SCOTT et al., 1970）。幼猫和免疫系统较弱的猫由于抵抗力较弱，更易感染 FPV，且感染后病情通常较为严重（FOLEY et al., 1999）。

1.3.3 临床症状和病理变化

FPV 是一种急性病毒性传染病，其临床特征显著，常表现为高热、呕吐、腹泻和脱水等症状，同时伴随白细胞数量的大幅减少以及肠炎等典型病理表现（STUETZER and HARTMANN, 2014）。FPV 感染扩散迅速，特别是在具有高有丝分裂活性的细胞中，例如骨髓、淋巴组织和肠隐窝细胞（PARRISH, 1995）。

在感染初期，FPV 首先在口咽部复制，这个过程发生在感染后的 18~24 小时内，期间病毒处于潜伏状态，不会立即引发明显的临床症状（STUETZER and HARTMANN, 2014）。然而，随着感染的深入，病毒在感染后的 2~7 天内进入血液循环，迅速感染各个器官，特别是淋巴、骨髓和肠黏膜，此时病毒滴度达到峰值（STUETZER and HARTMANN, 2014）。在病程的进展中，患病猫可能表现出双向热、脱水、呼吸困难和肌肉震颤等多种症状。在病情严重的病例中，可能出现出血性肠炎，导致排泄物带有血迹。此外，值得注意的是，如果猫在产前晚期或新生儿早期感染 FPV，可能会导致小脑发育不全并引发小脑损伤，这对猫的神经系统发育产生严重不良影响（PFANKUCHE et al., 2018）。对于新生幼猫，FPV 感染可能引发中枢神经系统损伤，表现为运动功能障碍、共济失调等典型症状（CSIZA et al., 1971）。

在病死猫的剖检中，消化道是病理变化的主要集中区域，可见肠道黏膜充血、出血、水肿、溃疡和肠绒毛损伤等显著病变。

1.4 病毒常用检测方法及其研究进展

1.4.1 病毒分离鉴定

病毒的分离鉴定作为一种经典而可靠的检测方法，在病毒性疾病的诊断中发挥着关键作用。该方法通过模拟病毒的自然生长环境，在细胞、组织、鸡胚或动物中培养病毒，并观察其引发的特异性病变，从而验证病毒的存在与增殖。随后，结合分子生物学技术和透射电镜等先进手段，对病毒进行形态学和分子学的深入鉴定，全面揭示其特性。1976 年从小猫腹膜渗出液中首次分离出 FIPV 病毒，并在猫肾细胞（CRFK）中进行细胞培养（PEDERSEN, 1976）。1987 年分离出的

WSU 79-1146 和 WSU 79-1683 毒株（后来分别被称为 FECV II 79-1683 和 FIPV II 79-1146），已成为体外研究 FCoV 的标准毒株（MCKEIRNAN et al., 1987）。尽管病毒分离鉴定准确性和敏感性具有优势，但由于其操作过程耗时较长，且对专业技术人员和成本的要求较高，这使得病毒分离鉴定在快速检测方面存在局限性。因此，需要继续探索更为高效、简便的诊断方法，以满足临床对快速检测的需求。

1.4.2 血清学检测方法

1.4.2.1 免疫荧光技术

免疫荧光技术是一种基于抗原抗体特异性结合原理的检测方法（张玉琼, 2020），通过荧光素标记的抗体与靶分子结合，并利用荧光或共聚焦显微镜观察其在细胞或组织中的表达丰度和定位。该技术具有高度的特异性和敏感性，因此在科学研究中得到广泛应用。Pratelli 等人采用免疫荧光技术等方法评估了猫舍、社区收容所或家庭猫血清中 FCoV 特异性抗体的流行率，发现在猫舍或多猫家庭中 FCoV 抗体的阳性率高达 80%~90%，然而这些血清阳性的猫中只有 1%~5%最终会发展为 FIP（PRATELLI, 2008）。尽管免疫荧光技术具有诸多优点，但其操作相对复杂、耗时较长，且依赖于特异性抗体的制备，因此目前在临床检测中的应用范围相对有限，更多地应用于实验室环境以进行深入的科研分析。

1.4.2.2 酶联免疫吸附实验

酶联免疫吸附试验（Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA），是一种常用于检测特定生物分子的定量或定性方法。该技术利用酶标记的抗体或抗原与待检测样品中的目标分子特异性结合，通过酶的催化作用产生可视化的信号，通常是颜色变化。ELISA 技术因操作简单、高度敏感且可并行检测多个样品而备受青睐，在养殖场传染病检测等领域得到了广泛应用。Dong 等成功地建立了基于刺突蛋白的间接 ELISA 方法，该方法在测量血清 FCoV 抗体方面展现出较高的重复性、灵敏性和特异性，为相关研究提供了可靠的检测手段（DONG et al., 2021）。另外，Pratelli 等也建立了 ELISA 方法，用于检测来自土耳其布尔萨的猫血清中的冠状病毒抗体，为深入了解该地区的猫冠状病毒感染情况提供了有力支持（PRATELLI et al., 2009）。尽管 ELISA 技术在检测抗原和抗体方面表现出色，但也可能受到反应条件或异嗜性抗体的干扰，导致假阳性结果的出现。因此，在使用 ELISA 技术时，需要严格控制实验条件，选择合适的对照，并进行必要的验证以确保结果的准确性。尽管存在一定的局限性，但 ELISA 技术仍然是生物学和医学研究中不可或缺的重要工具。

1.4.2.3 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术，作为一种基于免疫学原理的快速检测方法，具有显著的优势。该技术巧妙利用胶体金颗粒作为标记，通过抗原与抗体的特异性结合，在免疫层析膜上形成可视化的色带，从而实现目标物的定性或定量检测。由于其高灵敏性、快速简便、成本低廉、稳定性良好以及结果直观等特点，胶体金免疫层析技术不仅在实验室环境中表现出色，而且在资源有限的野外

环境中也能实现高效、准确的疾病筛查和疫情监测。例如, Takano 等便成功运用免疫层析法对 FCoV 感染进行了血清学诊断, 充分展现了该技术的实际应用价值 (TAKANO and HOHDATSU, 2015)。

1.4.3 分子生物学检测

1.4.3.1 普通 PCR 检测

1983 年, Kary Mullis 发明了聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR), 被视为分子生物学领域的重大突破, 这一突破使其在 1993 年获得诺贝尔化学奖。PCR 技术是一种体外 DNA 复制方法, 通过 DNA 聚合酶和双链 DNA 的半保留性复制原理, 通过特定温度和反应条件实现目标 DNA 的高效扩增。随着 PCR 技术的发展, 巢式 PCR、锚定 PCR、逆转录 PCR 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 等方法不断涌现, 各具优势, 适用于不同实验场景。例如, 巢式 PCR 可有效避免非特异性扩增产物的污染; 锚定 PCR 适用于检测特定区域的变异; 逆转录 PCR 则用于 RNA 的转录后扩增; 而 qPCR 能够实现对扩增产物的实时定量检测。多重 PCR 技术的引入进一步提高了 PCR 技术的应用效率。多重 PCR 技术的出现, 进一步提升了 PCR 技术的应用效率, 允许同时检测多个目标序列, 从而在一次实验中完成对多个病原体或基因的检测, 极大地节省了实验时间和成本。Xiao 等成功建立了两种多重 PCR 方法, 用于检测与猫呼吸道和肠道相关的多种病原体 (XIAO et al., 2022), 这为相关病原体的诊断和监测提供了强有力的工具。

1.4.3.2 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种新型的核酸扩增技术, 能够在等温条件下高效、特异地扩增目标 DNA 序列。该技术于 2000 年由日本学者在 Nature Medicine 上首次报道, 其操作简便、高效快速、成本低廉。LAMP 技术利用特定的 DNA 聚合酶和一组四个特异性引物, 在恒温条件下 (通常为 60°C~65°C) 连续进行退火、扩增和合成反应, 实现对目标 DNA 序列的高效扩增。LAMP 技术相较于常规 PCR 具备多重优势, 其操作简单、扩增速度快、特异性高。最后, LAMP 反应所需的试剂成本低廉, 且无需昂贵的 PCR 仪器, 适用于资源匮乏地区的实验室。Rapichai 等成功建立了 LAMP 检测方法, 用于检测 FCoV (RAPICHA I et al., 2022)。

1.4.3.3 qPCR 检测

qPCR 是一种高效且敏感分子生物学技术, 广泛应用于 DNA 或 RNA 分子的检测和定量分析。该技术通过实时监测 PCR 反应过程中荧光信号的累积, 实现对反应产物数量的精确测定。qPCR 主要分为染料法和探针法两种。染料法利用荧光染料与 PCR 反应产物结合产生荧光信号, 操作简便且成本较低, 适用于初步筛查和快速定量分析。探针法则通过设计特异性荧光探针与目标序列结合, 以释放荧光信号, 具有高度的特异性和准确性。其中, TaqMan 探针等被广泛应用于 qPCR 中, 能够实时监测目标序列的扩增情况, 且避免了非特异性信号的干扰。相较于染料法, 探针法展现出更强的特异性。此外, 通过利用不同的荧光通道, 探针法还能实现对多种基因的同

步检测,进而构建出多重 qPCR 检测方法。Sun 等成功建立了基于染料法的双重 qPCR 检测方法,用于检测 FCoV 和 FPV (SUN et al., 2021)。Wang 等则构建了基于 TaqMan 探针的一步多重检测方法,有效鉴别诊断了四种引起犬腹泻的病毒 (WANG et al., 2020)。这些研究不仅丰富了 qPCR 技术的应用领域,也为其在病毒检测中的进一步应用提供了有力支持。

1.5 目的和意义

根据《宠物行业蓝皮书:2023 中国宠物行业发展报告》显示,我国宠物猫的数量正在逐年增长,已经超越宠物犬的数量,成为第一大宠物群体。这一趋势对猫的健康管理提出了新的挑战。随着猫数量的增加,疾病的传播风险也相应提高,猫群中发生各种传染病的风险与日俱增。特别是 FECV 和 FPV 等常见病原体的感染率呈上升趋势,这些病毒可引起 FIP 和猫泛白细胞减少症等严重疾病,对猫的健康和生命安全构成了严重威胁。

为了有效应对这一挑战,建立高效、特异、便捷的检测方法至关重要。因此,本研究致力于建立 FCoV 和 FPV 一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法,实现同时、快速、准确地检测两种病毒,提高诊断效率与特异性,并为疾病发展和治疗效果的监测提供精确数据。此外,还开发了基于双抗体夹心法的抗原检测胶体金免疫层析试纸条检测 FCoV,以满足快速、便携、直观的现场检测需求。这种试纸条无需复杂仪器,通过颜色变化即可直观显示检测结果,适用于大规模快速检测和筛查。

第二章 FCoV 和 FPV 一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法的建立

目前，FCoV 和 FPV 在我国的流行日益严重，这些病毒可引起 FIP 和猫泛白细胞减少症等严重疾病，对猫的健康和生命安全构成了严重威胁。FECV 和 FPV 可在猫中引起相似的腹泻症状，且经常发生混合交叉感染，根据临床症状难以鉴别诊断。常规 PCR 检测方法耗时长，容易受气溶胶污染影响造成假阳性结果，且不具备对病原定量检测的能力，检测下限也远低于 qPCR。因此建立一种能够对 FCoV 和 FPV 具有敏感性高、特异性强的鉴别检测方法，对预防和治疗猫腹泻相关疾病具有重要的技术支持作用。早期发现和干预，能够更有效地控制病毒的传播和流行，从而保护猫科动物的健康与安全。

2.1 材料与试剂

2.1.1 质粒、菌种、毒株和细胞

FIPV 参考毒株 DF-2 (GenBank 登录号: JQ408981.1); FPV 参考毒株 XJ-1 (GenBank 登录号: EF988660.1); 猫疱疹病毒 (Feline herpesvirus, FHV) 参考毒株 HRB2019 (GenBank 登录号: PP034747); 猫杯状病毒 (Feline calicivirus, FCV) 参考毒株 FCV-2280 (GenBank 登录号: KC835209.1)。DH5 α 感受态细胞和 pMDTM18-T 载体分别购买于天根生化科技有限公司和 TaKaRa 公司。疑似感染 FCoV 和 FPV 的猫肛拭子由哈尔滨某宠物诊所提供。

2.1.2 主要仪器设备

主要仪器设备见表 2-1。

表 2-1 主要仪器设备

Table 2-1 Main instruments and equipment	
仪器设备	生产厂家
QuantStudio TM 3 & 5 Real-Time PCR 仪	Applied Biosystems, 美国
超微量分光光度计	Implen, 德国
PCR 仪	Bio-Rad, 美国
细菌培养摇床	Thermo Fisher 公司
水浴锅	上海恒一科技有限公司
凝胶成像系统	Bio-Rad, 美国
称量天平	Denver, 美国
核酸电泳槽	Bio-Rad, 美国
核酸电泳所用电源	北京六一生物科技有限公司
-80℃超低温冰箱	美菱公司
离心机	湖南湘仪有限公司

2.1.3 主要试剂及耗材

主要试剂及耗材见表 2-2。

表 2-2 主要试剂及耗材

Table 2-2 Main reagents and consumables

试剂及耗材	生产厂家
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG	TaKaRa 公司
DNA Marker	TaKaRa 公司
Fine Quick 快速病毒 DNA/RNA 柱式提取试剂盒	济凡生物科技有限公司
DNA 凝胶回收试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Taq Master Mix (Dye Plus)	TaKaRa 公司
HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
体外转录试剂盒 in vitro Transcription T7 Kit	TaKaRa 公司
RNA Clean & Concentrator-25 试剂盒	美国 ZYMO RESEARCH
Plasmid Mini Kit I	OMEGA 公司

2.2 实验方法

2.2.1 特异性引物和探针的设计

利用 MegAlign 软件对从 GenBank 检索到的 FCoV（包括 FCoV I型和 FCoV II型）和 FPV 全基因组序列进行了详细的分析和比较，确定这些序列中的保守区域。NCBI 检索到的 FCoV 和 FPV 毒株序列的 GenBank 登录号见表 2-3。根据保守区域，利用 Oligo 7 设计 5 条 TaqMan 探针和 5 对特异性引物，用于 TaqMan qPCR 方法引物和探针的筛选。针对 FCoV 和 FPV 的检测，选择在 FCoV 探针的 5'端标记 FAM 荧光报告基团，FPV 探针的 5'端标记 VIC 荧光报告基团，以便在 PCR 反应中对两种病毒进行差异化检测。而在探针的 3'端标记 BHQ1 荧光淬灭基团，其独特的淬灭性能有助于在 PCR 反应过程中提高检测的准确性和可靠性。

鉴于 FCoV 基因组序列的高度变异性，进一步优化该方法以提高其灵敏性。利用 MegAlign 软件对 NCBI 检索到的 FCoV 毒株基因组序列进行了变异分析，针对变异显著的毒株基因组序列，设计了另外一条 FCoV 下游引物 (FCoV-Ra)，并与确定的最佳特异性引物和探针配合使用，以增强检测的敏感性，进一步完善了检测方法。

为确保引物和探针的特异性，使用 Primer-BLAST 进行了验证。每组引物和探针都专门设计用于检测单一目标病原体，以确保检测结果的准确性和可靠性。本实验设计的特异性引物和探针序列均交由吉林省库美生物科技有限公司进行合成。详细的引物和探针序列见表 2-4。

表 2-3 从 NCBI 中检索到 FCoV 和 FPV 病毒株序列的 GenBank 登录号

Table 2-3 The GenBank accession numbers of FCoV and FPV virus strain sequences were retrieved from NCBI

毒株名称	GenBank 登录号
FCoV 毒株	MN165107, KY566211, KY566210, KY566209, KY292377, KX722529, KF530123, JN183883, JN183882, HQ392472, HQ392471, HQ392470, HQ392469, HQ012372, HQ012371, HQ012370, HQ012369, HQ012368, HQ012367, GU553362, GU553361, FJ938062, FJ938061, FJ938060, FJ938059, FJ938058, FJ938057, FJ938056, FJ938055, FJ938054, FJ938053, FJ938052, FJ938051, DQ010921, DQ286389, NC_002306.3, MW030109, MT239439, KC461236, KC461235, JN634064, AY994055, JQ408981, JQ408980, GQ152141
	MN908257, MH559110, MG924893, KX685354, KX900570, KP280068, MZ712026, OM640096, MT178243, MW331496, MW811187, MW650831, MN862748, MN862747, MN862746, MN862745, MN862744, MN862743, MN127781, MN127779, MN451692, MN451652, MG764511, MG764510, MF069447, MF069446, MF069445, KP769859, OK384314, OK384313, OK384312, OK384311, OK384310, OK384309, MW659466, MW091487, KX434461, MH165482, MH165481, EU659115, EU659114, EU659112, EU659113, EU659111, KT899746, KT899745, OK384320, OK384319, OK384318, OK384317, OK384316, OK384315, MK333230, MH006576, KP008112, KC713592, HQ694567, MZ362883, OK128325, MZ913316, MZ913315, MZ913314, MW926316, MZ913317, MW926314, KP019621, M38246

表 2-4 TaqMan qPCR 引物和特异性探针

Table 2-4 TaqMan qPCR primers and specific probes

引物/探针	引物序列 (5'-3')	产物长度	靶向区间
FCoV-F1	TCCCTGTTTGGTAAGTCGTCTAGT	169 bp	207-375 bp
FCoV-R1	GGAAGGCTCGGAACGTTGAC		
FCoV-Ra	GGGAAGCTAGACACGTTGATT		
FCoV-P1	FAM-TCTCCCTCGCCGGCCGCCA-BHQ1	146 bp	12337-12482 bp
FCoV-F2	CTGGCTTACTAATGGTTGTATGTGTGA		
FCoV-R2	AAAGCTCTACTAACATGGTCTGGATC		
FCoV-P2	FAM-AGTGCGGGGTTCTAGTGCAGCTCGAC-BHQ1	147 bp	2515-2661 bp
FPV-F1	ATGAGTGATGGAGCAGTTCAACC		
FPV-R1	CGTCTGATTATTGAAAGTACCCGTAGA		
FPV-P1	VIC-AGGATCTGGGAACGGGTCTGGAGGC-BHQ1	175 bp	2131-2305 bp
FPV-F2	GGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAA		
FPV-R2	CGTCCTTAGTTTGATCTATAAAGCGTTG		
FPV-P2	VIC-ACGCCGCTGCAAAAAGAACACGACGAAG-BHQ1	176 bp	775-950 bp
FPV-F3	CCAGAAACCGTTGAAACCACAG		
FPV-R3	TGTGCCATCATTTCAATATAACTATCTGG		
FPV-P3	VIC-CAGCACAGGAAACAAAGCGCGGGAGAAT-BHQ1		

2.2.2 FCoV RNA 标准品和 FPV 质粒标准品的制备

为了制备 FCoV RNA 标准品和 FPV 重组质粒标准品, 本实验设计了特异性引物 (表 2-5)。在 FCoV RNA 标准引物的设计中, 在 5'端引入了 T7 启动子 (斜体和下划线标出)。这一设计使扩增的双链 DNA 片段能够在 T7 RNA 聚合酶的作用下, 在体外转录为单链 RNA。随后, 对此 RNA 进行了纯化, 以作为标准 RNA 使用。

使用 FineQuick 病毒 DNA/RNA 柱式提取试剂盒, 按照制造商说明书提取 FCoV 的 RNA 和 FPV 的 DNA。使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)反转录 FCoV 的 RNA 为 cDNA。以 FCoV 的 cDNA 和 FPV 的 DNA 为模板, 分别以引物 FCoV-T7-BZP-F1/R1 和 FPV-BZP-F3/R3 进行 PCR 扩增目的片段, 反应体系和反应程序分别见表 2-6 和 2-7。使用 DNA Gel Extraction Kit 回收 PCR 产物。使用 pMD™18-T Vector Cloning Kit, 将回收纯化的目的基因与 pMD™18-T 载体连接, 得到重组质粒 pMD™18-T-FCoV 和 pMD™18-T-FPV。转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布 LB 平板培养, 挑取单菌落摇菌后进行菌液 PCR 鉴定。阳性菌液经吉林省库美生物科技有限公司测序确认后大量培养, 使用 OMEGA Plasmid Mini Kit I 提取重组质粒。按照体外转录试剂盒 in vitro Transcription T7 Kit 说明书, 以纯化的 pMD™18-T-FCoV 质粒为模板进行体外转录。使用 RNA Clean & Concentrator-25 试剂盒进一步纯化转录的 RNA, 获得 FCoV RNA 标准品。使用超微量分光光度计测量 FCoV RNA 标准品和 pMD™18-T-FPV 质粒标准品浓度, 并分别计算质粒拷贝数。

表 2-5 目的基因 PCR 扩增引物

Table 2-5 Target gene PCR amplification primer

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度	靶向区间
FCoV-T7-BZP-F1	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGGGTTCCGTCCTGTTT	562 bp	201-762 bp
	GGTAAGTC		
FCoV-T7-BZP-R1	<u>TAATACGACTCACTATAG</u> GGGGCACAATGGTACTCC	929 bp	553-1461 bp
	TCTCCTTC		
FPV-BZP-F3	TTGCAGAAGATAGTGAATGGGTGAC	929 bp	553-1461 bp
FPV-BZP-R3	ATTAGTTGTCATAATTACTGGAGTTGGTTC		

注: T7 启动子序列用斜体和下划线标出

表 2-6 PCR 体系

Table 2-6 PCR system

成分	体积
2×Taq Master Mix	25 μ L
Primer F	2 μ L
Primer R	2 μ L
DNA/cDNA	2 μ L
RNase free ddH ₂ O	19 μ L
总量	50 μ L

表 2-7 PCR 反应程序

Table 2-7 PCR amplification procedure

温度	时间	循环数 (cycles)
95°C	5 min	1×
95°C	30 s	34×
55°C	30 s	34×
72°C	60 sec/kb	34×
72°C	5 min	1×

2.2.3 反应条件的优化

本研究以提取的 FCoV 和 FPV 核酸为模板，参考 One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix 说明书中推荐的反应条件，利用 D-optimal 算法对双重 qPCR 方法的反应条件进行了系统优化。在优化过程中，使用 Design-Expert 13.0.5.0 软件进行了 D-optimal 设计，以最大程度地优化 PCR 反应条件。通过 D-optimal 设计生成了三维响应曲面图，直观地展示了不同引物浓度、探针浓度和退火温度下目标响应变量的变化趋势。通过分析这些曲面图，能够确定最低点的横坐标和纵坐标，从而得出最优的反应条件。利用 Design-Expert 软件还生成了 4D 图，以更直观地展示引物浓度、探针浓度和退火温度之间的复杂交互作用。

本研究以最低的循环阈值 (Ct) 和较高的 ΔRn 作为评价指标，确定了最佳的反应条件。基于上述试验结果，最终确定了双重 qPCR 的反应体系，旨在实现目标基因检测中的高灵敏性和稳定性。

2.2.4 标准曲线的建立

本研究对 FCoV RNA 标准品和重组 FPV 质粒标准品进行了 10 倍系列稀释，并以此为模板，在每个浓度梯度设置了 3 个重复样本。利用已建立的双重 TaqMan qPCR 检测方法对这些样本进行检测，在每个 PCR 周期结束时采集荧光信号。并运用 QuantStudio™ Design & Analysis Software 软件分析试验结果，绘制 FCoV 和 FPV 的标准曲线。

2.2.5 特异性试验

本研究采用已建立的 qPCR 检测方法，以 FIPV-DF-2、FPV、FHV 和 FCV 的核酸为模板进行特异性试验。同时使用了 DNase/RNase-free 去离子水作为阴性对照。

2.2.6 敏感性试验

将 FCoV RNA 标准品和 pMD™18-T-FPV 质粒标准品按 10 倍梯度稀释 (1×10^{10} copies/ μL – 1×10^0 copies/ μL)，以及稀释至 50 copies/ μL ，利用本研究建立的 qPCR 方法进行检测。同时，使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 对稀释好的 FCoV RNA 标准品进行逆转录反应，以得到的 cDNA 为模板，按 Xiao 等建立的检测方法进行常规 PCR 的灵敏性分析 (XIAO et al.,

2022)。通过比较 qPCR 与常规 PCR 的灵敏性,以评价建立方法的敏感性。

2.2.7 重复性试验

为评价已建立的 qPCR 检测方法的重复性,将 FCoV RNA 标准品和 pMD™18-T-FPV 质粒标准品进行稀释。在确保每次实验的环境、试剂、仪器和操作人员均一致的情况下,取不同浓度梯度 (10^7 copies/ μ L、 10^6 copies/ μ L、 10^5 copies/ μ L) 的标准品作为模板,利用本研究建立的 qPCR 方法进行检测。在进行批内重复性试验时,选择使用相同批次的模板稀释样品进行 3 次重复试验。在进行批间重复性试验时,选择使用相同浓度但来自不同批次的模板进行 3 次重复试验。然后分别计算组内变异系数和组间变异系数。通过变异系数评价本研究建立的双重 qPCR 方法的重复性。

2.2.8 通用性试验

基于 NCBI 检索到的 FCoV 和 FPV 毒株序列 (表 2-3),使用 MegAlign 软件对特异性引物和探针 (F1/R1/P1、F3/R3/P3) 在已知靶向结合区域的碱基突变进行比较分析 (图 2-1),以确保检测方法的准确性和可靠性。为了覆盖 FCoV 毒株特异性引物结合位点碱基的变异情况,合成了 12 段核苷酸序列 (表 2-8),并构建到 pUC57 载体中,以上核苷酸序列的合成及载体构建交由金斯瑞生物科技有限公司。这些重组质粒涵盖了引物结合靶位点的各种碱基变异情况,为检测方法的通用性提供了理论依据。采用本研究建立的 qPCR 检测方法,通过检测本实验室保存的 FIPV-DF-2 和 FPV 毒株,以及构建的重组质粒和 DNase/RNase-free 去离子水为阴性对照,评价该方法的通用性。

表 2-8 根据 FCoV 毒株特异性引物靶位点碱基突变情况,合成的核苷酸序列

Table 2-8 Synthesized nucleotide sequences based on base mutations in the binding sites of FCoV strain specific primers

GenBank 登录号	核苷酸序列 (5'-3')
FJ938054.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccggc cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactatcaagtcaacgtgcctagccttctttcc
HQ392471.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccggc cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactatcaagtcaacgtgcctagccttctttcc
FJ938056.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccggc cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgtctagccttctttcc
FJ938058.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccggc cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaaatcaacgtgtctagccttctttcc
MN165107.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccgg cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactatcaagtcaacgtgcctagccttctttcc
FJ938051.1	cgccctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccgg cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgcctagccttctttcc
HQ012367.1	tcgtctgtttgtaagtcgtctagtagctgcgggtggtccgccgctgtagtgggtagaccgggtccgctctgtgatctccctcgccggc cgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactatcaagtcaacgtgcctagccttctttcc

表 2-8 (续)

GenBank 登录号	核苷酸序列 (5'-3')
HQ392470.1	ccgtccttgtttgtaagtcgtctagtagttagctgcggcggtccgcccgtcgtagttgggttagaccgggtccgtcctgtgatccctcgccgg ccgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactatcaagtcaacgtgcctagccttcttcc
HQ012370.1	ccgtccttgtttgtaagtcgtctagtagttagctgcggcggtccgcccgtcgtagttgggttagaccgggtccgtcctgtgatccctcgccgg ccgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgcctagccttcttcc
DQ010921.1	ccgtccttgtttgtaagtcgtctagtagttagctgcggcggtccgcccgtcgtagttgggttagaccgggtccgtcctgtgatccctcgccgg ccgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgcctagccttcttcc
FJ938052.1	ccgtccttgtttgtaagtcgtctagtagttagctgcggcggtccgcccgtcgtagttgggttagaccgggtccgtcctgtgatccctcgccgg ccgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgcctagccttcttcc
FJ938061.1	ccgtccttgtttgtaagtcgtctagtagttagctgcggcggtccgcccgtcgtagttgggttagaccgggtccgtcctgtgatccctcgccgg ccgccaggagaatgagttccaacaatttaagatcctcgtaataaggactaccaagtcaacgtgcctagccttcttcc

2.2.9 临床样品检测

为验证本研究建立的双重 qPCR 检测方法的实用性,从哈尔滨市某宠物诊所收集了 75 份肛拭子样本进行检测。首先提取样本中的核酸,随后运用已建立的双重 qPCR 方法进行检测,以进行临床分析。为确保研究结果的准确性和可靠性,同步采用常规 PCR 作为验证手段。在 FPV 检测中,直接以核酸为模板;而 FCoV 检测则先通过逆转录获得 cDNA,再以其为模板进行 PCR 扩增。常规 PCR 的反应体系和条件均严格参照 Xiao 等人建立的检测方法 (XIAO et al., 2022)。为了进一步验证双重 qPCR 检测方法的准确性,对荧光定量检测结果阳性而常规 PCR 结果阴性的样本进行测序鉴定。

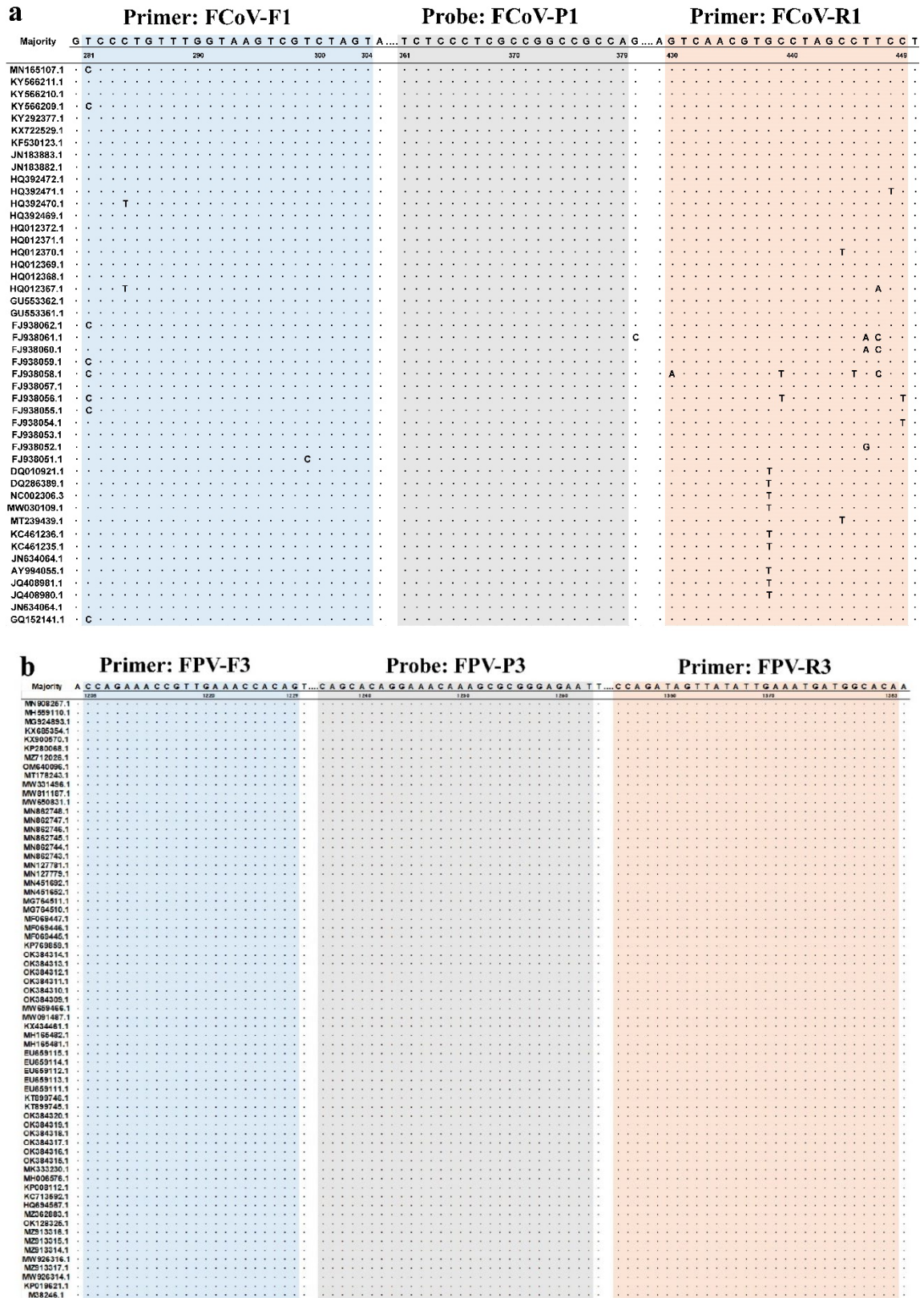


图 2-1 引物和探针 FCoV-F1/R1/P1 和 FPV-F3/R3/P3 在 FCoV (a) 和 FPV (b) 靶向结合区域内的碱基变异情况

Fig. 2-1 The base variation of primers and probes FCoV-F1/R1/P1 and FPV-F3/R3/P3 in the targeted binding regions of

FCoV (a) and FPV (b)

2.3 结果

2.3.1 重组质粒 pMDTM18-T-FCoV 和 pMDTM18-T-FPV 的鉴定结果

对构建的 pMDTM18-T-FCoV 和 pMDTM18-T-FPV 标准品质粒进行 PCR 扩增, 分别获得 562 bp、929 bp 大小的目的片段 (图 2-2), 与预期相符。测序结果进一步证实目的基因与 pMDTM18-T 载体相连接, 表明重组质粒构建成功。

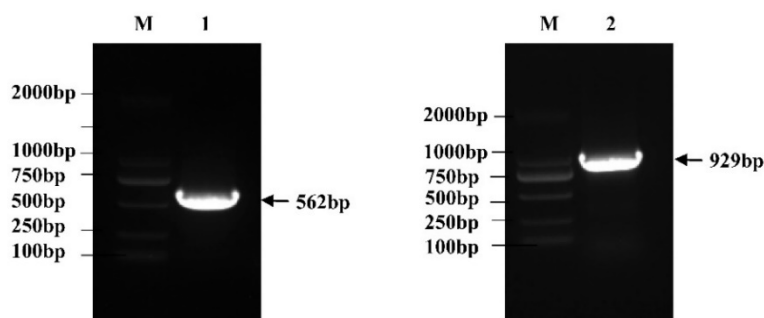


图 2-2 重组质粒的 PCR 结果

M: DL2000 DNA Marker; 1: FCoV 目的基因片段; 2: FPV 目的基因片段

Fig. 2-2 PCR results of recombinant plasmid

M: DL2000 DNA Marker; 1: Target gene fragments of FCoV; 2: Target gene fragments of FPV

2.3.2 引物和探针的筛选结果

通过单重 qPCR 方法验证引物和探针组合的有效性, FCoV 和 FPV 特异性引物和探针的筛选结果见表 2-9, 选择 Ct 值最低和 ΔR_n 较高的引物/探针组合用于建立双重 qPCR 检测方法。

鉴于 FCoV 基因组序列的高度变异性, 进一步优化该方法以提高其灵敏性。利用 MegAlign 软件对 NCBI 检索到的 FCoV 毒株基因组序列进行了变异分析, 发现 FCoV UU16 毒株 (GenBank 登录号: FJ938058.1) 的变异情况最为显著 (图 2-3)。基于这一发现, 设计了另外一条 FCoV 下游引物 (FCoV-Ra), 以增强检测的敏感性, 并与确定的最佳特异性引物和探针配合使用, 进一步完善了检测方法。

因此, FCoV 和 FPV 引物和探针组合的序列如下:

FCoV-F1: TCCCTGTTTGGTAAGTCGTCTAGT

FCoV-R1: GGAAGGCTCGGAACGTTGAC

FCoV-Ra: GGGAAGCTAGACACGTTGATT

FCoV-P1: FAM-TCTCCCTCGCCGGCCGCCA-BHQ1

FPV-F3: CCAGAAACCGTTGAAACCACAG

FPV-R3: TGTGCCATCATTTCAATATAACTATCTGG

FPV-P3: VIC-CAGCACAGGAAACAAAGCGCGGGAGAAT-BHQ1

表 2-9 FCoV 和 FPV 特异性引物和探针的筛选结果

Table 2-9 Results of specific primers and probes for FCoV and FPV

引物/探针	Ct 值
FCoV-F1/R1/P1	13.496
FCoV-F2/R2/P2	15.309
FPV-F1/R1/P1	18.729
FPV-F2/R2/P2	15.927
FPV-F3/R3/P3	15.434

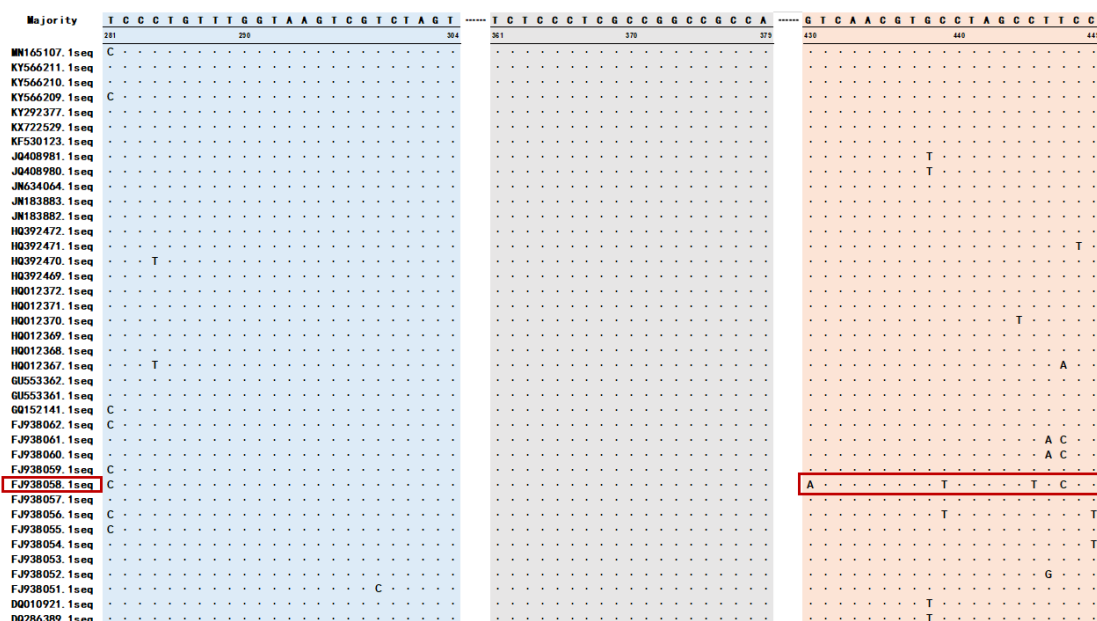


图 2-3 引物和探针 (FCoV-F1/R1/P1) 在 FCoV 毒株的靶向结合区域中碱基变异情况

Fig. 2-3 Base variation of primer and probe (FCoV-F1/R1/P1) in the targeted binding region of FCoV strain

2.3.3 反应条件的优化

以提取的 FCoV 和 FPV 核酸为模板，参考 One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix 说明书中推荐的反应条件，利用 D-optimal 对双重 qPCR 方法反应条件进行了优化，在一个随机批次中进行了 17 次检测（重复测量）（表 2-10）。以 FCoV 为例，其三维响应曲面曲线图如图 2-4a 所示。红色区域代表较低 Ct 值，蓝色区域代表较高 Ct 值。最低点的横坐标和纵坐标是最优条件。同样，4D 图表示了三个因素之间的交互作用（图 2-4b）。在本实验中，如果认为某一因子为临界因子，则以该因子 Ct 值最低的水平作为最终实验方案。如果结果存在冲突，则根据获得的最小响应参数数量及其经济适用性确定因子的有利水平（ZHANG et al., 2020）。结果表明：FCoV 和 FPV 的引物浓度分别为 0.3 μM 和 0.2 μM ，探针浓度分别为 0.2 μM 和 0.3 μM ，退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

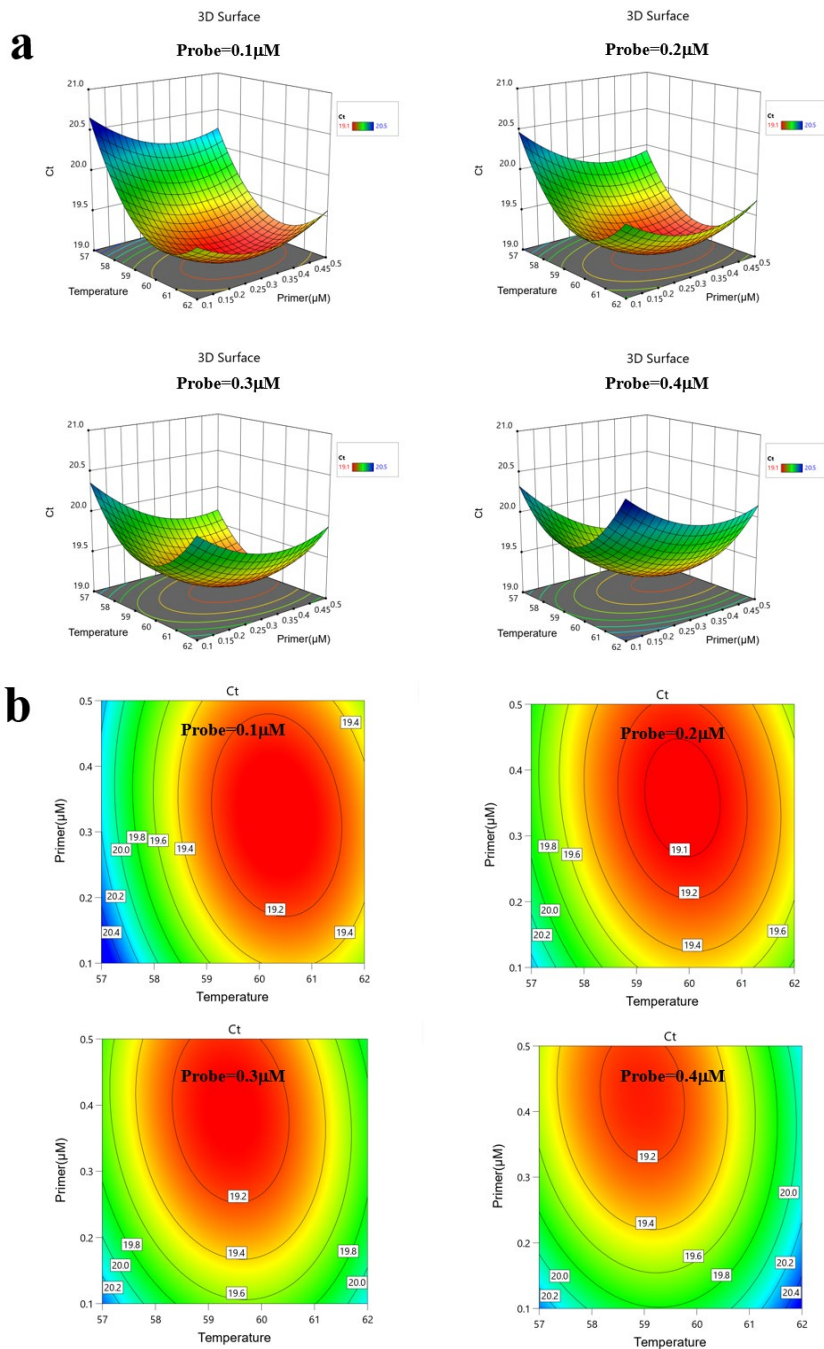


图 2-4 FCoV 的响应面图

(a) 计算机辅助交换程序生成的基于不同引物浓度、探针浓度和退火温度组合的三维响应图

(b) 不同探针浓度下引物浓度和退火温度的 4D 图

Fig. 2-4 Response surface plots for FCoV

(a) Response surface plots based on different combinations of primer concentration, probe concentration, and annealing temperature generated by computer-aided exchange procedure

(b) 4D plots of primer concentration and annealing temperature at different probe concentrations

表 2-10 qPCR 数据

Table 2-10 The quantitative qPCR data

序号	退火温度 (°C)	引物浓度 (μM)	探针浓度 (μM)	Ct 值
1	62	0.1	0.25	20.2
2	59.5	0.3	0.25	19.1
3	62	0.3	0.1	19.2
4	62	0.5	0.25	19.4
5	59.5	0.5	0.4	19.3
6	59.5	0.3	0.25	19.1
7	59.5	0.3	0.25	19.1
8	57	0.5	0.25	19.6
9	59.5	0.1	0.4	19.3
10	59.5	0.5	0.1	19.8
11	59.5	0.1	0.1	19.4
12	57	0.3	0.4	19.8
13	57	0.1	0.25	20.8
14	59.5	0.3	0.25	19.1
15	59.5	0.3	0.25	19.1
16	57	0.3	0.1	19.9
17	62	0.3	0.4	20.4

2.3.4 反应体系及反应条件的确定

根据上述实验结果确定 FCoV 和 FPV 双重 qPCR 的反应体系。总体积为 20 μL 的具体反应体系见表 2-11。反应条件见表 2-12。

2.3.5 标准曲线的建立

测定 FCoV RNA 标准品的浓度为 95 ng/ μL ，pMDTM18-T-FPV 质粒标准品的浓度为 274.59 ng/ μL ；通过公式计算 FCoV RNA 标准品的拷贝数为 2.89×10^{11} copies/ μL ，pMDTM18-T-FPV 质粒标准品的拷贝数为 6.9×10^{10} copies/ μL 。将 FCoV RNA 标准品和 pMDTM18-T-FPV 质粒标准品从 10^{10} copies/ μL 连续 10 倍稀梯度释至 10^3 copies/ μL 。使用梯度稀释的标准品为模板进行双重 qPCR 扩增，获得标准曲线（如图 2-5）；结果显示标准曲线线性关系良好，标准曲线方程为：FCoV：y = -3.385x + 39.098， $R^2=0.999$ ；FPV：y = -3.275x + 40.639， $R^2=0.999$ 。FCoV 和 FPV 的扩增效率分别为 97.426%和 101.988%。

表 2-11 qPCR 反应体系

Table 2-11 qPCR reaction system		
试剂	剂量	终浓度
One Step Prime Script III RT-qPCR, with UNG (2×)	10 μL	1×
FCoV-F1 (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
FCoV-R1 (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
FCoV-P1 (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
FCoV-Ra (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
FPV-F3 (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
FPV-R3 (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
FPV-P3 (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
Nucleic acid	2 μL	
ROX Reference Dye II (50×)	0.4 μL	1×
ddH ₂ O	4.6 μL	
总量	20 μL	

表 2-12 qPCR 反应条件

Table 2-12 Reaction conditions of qPCR			
步骤	温度	时间	循环数
反转录	25°C	10 min	1
	52°C	5 min	1
	95°C	10 s	1
PCR 反应	95°C	5 s	40
	60°C	30 s	40

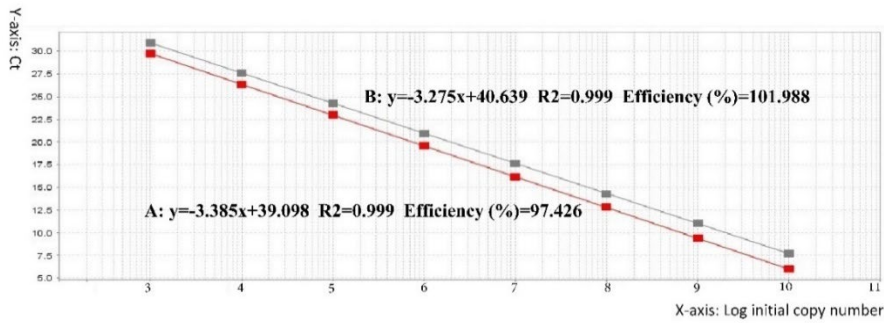


图 2-5 标准曲线的测定结果

红线：FCoV 标准曲线；灰线：FPV 标准曲线

Fig. 2-5 Standard curves measurement results

Red line: FCoV standard curve; Gray line: FPV standard curve

2.3.6 特异性试验

本研究利用已建立的双重 qPCR 方法，分别以实验室保存的 FCoV、FHV、FIPV-DF-2、FPV

提取的核酸为模板进行检测。结果显示，FIPV-DF-2、FPV 有明显的扩增曲线，FCV、FHV 和阴性对照（DNase/RNase-free 去离子水）无明显扩增曲线，如图 2-6 所示。实验结果表明，该方法具有良好的特异性。

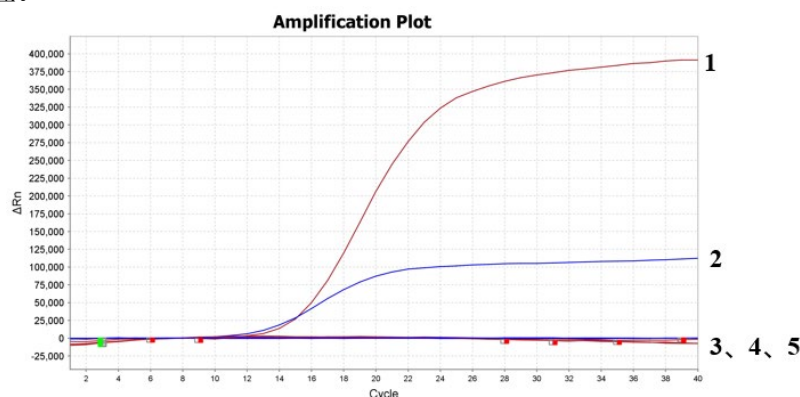


图 2-6 特异性实验结果

1: FIPV-DF-2; 2: FPV; 3: FCV; 4: FHV; 5: 阴性对照

Fig. 2-6 Specific test results

1: FIPV-DF-2; 2: FPV; 3: FCV; 4: FHV; 5: Negative control

2.3.7 敏感性试验

FCoV RNA 标准品和 pMDTM18-T-FPV 质粒标准品，用超微量分光光度计测定其浓度，计算其拷贝数，稀释后取 1×10^{10} copies/ μ L- 1×10^0 copies/ μ L 和 50 copies/ μ L 的质粒为模板进行敏感性试验，利用本研究建立的 FCoV 和 FPV 双重 qPCR 进行扩增，得到 FCoV 和 FPV qPCR 的动力学扩增曲线（图 2-7），在 Ct<40 范围内可以检出的最低 FCoV RNA 标准品和 pMDTM18-T-FPV 质粒标准品拷贝数均为 50 copies/ μ L，而 Xiao 等建立的常规 PCR 方法（Xiao et al. 2022）可以检测到的最低拷贝数为 10^3 copies/ μ L（图 2-8），表明该方法比常规 PCR 的敏感性高 20 倍。

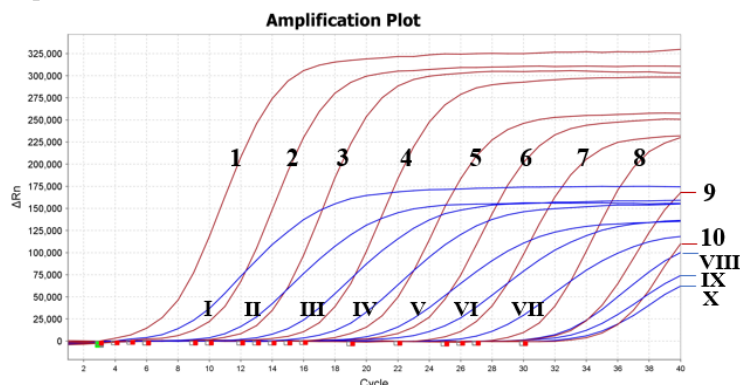


图 2-7 敏感性试验结果

红线：FCoV qPCR 反应的扩增曲线；蓝线：FPV qPCR 反应的扩增曲线

1-9 (I-IX): 1×10^{10} - 1×10^2 copies/ μ L; 10 (X): 50 copies/ μ L

Fig. 2-7 Results of sensitivity test

Red line: Amplification curves of FCoV qPCR reactions; Blue line: Amplification curves of FPV qPCR reactions

1-9 (I-IX): 1×10^{10} - 1×10^2 copies/ μ L; 10 (X): 50 copies/ μ L

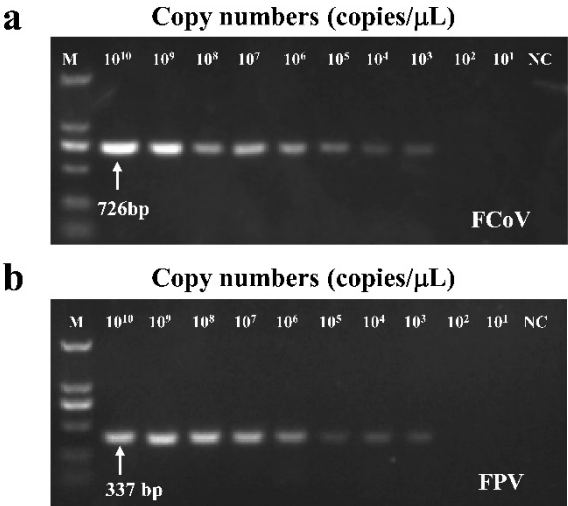


图 2-8 常规 PCR 检测极限

FCoV cDNA (a) 和 pMDTM18-T-FPV 质粒标准品 (b) 的常规 PCR 检测结果。模板的浓度范围为 1×10¹⁰-1×10¹ copies/μL。在 PCR 反应中, FCoV 的 cDNA 和 FPV 的 DNA 分别作为各自模板, 其中 cDNA 由 FCoV RNA 标准品逆转录得到; M: DL2000 DNA Marker; NC: 阴性对照

Fig. 2-8 Limits of conventional PCR detection

The results of conventional PCR for FCoV cDNA (a) and pMDTM18-T-FPV plasmid standard (b). The template concentration ranges from 1×10¹⁰-1×10¹ copies/μL. In the PCR reactions, cDNA derived from the FCoV RNA standard and FPV DNA served as templates for their respective targets, with the cDNA obtained through reverse transcription of the FCoV RNA standard; M: DL2000 DNA Marker; NC: Negative control

2.3.8 重复性试验

重复性结果见表 2-13, 变异系数 (CV) 是标准差与均值的比值, 通常以百分比表示。CV 越低, 表示数据的离散程度越小, 表明数据稳定性越好。结果显示批内重复性和批间重复性试验的变异系数均低于 2%, 表明该方法具有良好的重复性和稳定性。

表 2-13 重复性实验结果

Table 2-13 The result of repeatability testing

检测毒株	标准品浓度 (copies/μL)	批内重复实验		批间重复实验	
		Ct 值 ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数 CV (%)	Ct 值 ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数 CV (%)
FCoV	1×10 ⁷	15.7±0.3056	1.95	15.57±0.1325	0.85
	1×10 ⁶	18.60±0.0832	0.45	18.54±0.2048	1.1
	1×10 ⁵	22.23±0.2762	1.24	22.11±0.3155	1.43
	1×10 ⁷	16.77±0.2563	1.53	16.58±0.0735	0.44
FPV	1×10 ⁶	20.16±0.1641	0.81	19.80±0.3142	1.59
	1×10 ⁵	23.66±0.2493	1.05	23.41±0.1858	0.79

注: Ct 值: 三个独立的双重 qPCR 反应的循环阈值 (Ct) 的平均数, 并使用 CV (变异系数) 和 SD (标准差) 作为修正量

2.3.9 检测结果的判定标准

在本次实验中，阴性对照的检测结果均呈现为未检出（Undetection），这证明了实验过程中不存在非特异性扩增或污染，从而确保了实验结果的准确性和可靠性。阳性对照在 $Ct \leq 30$ 时，呈现出典型的 S 型扩增曲线，验证了 PCR 反应的有效性和实验条件的适宜性。运用本实验建立的标准曲线方程和极限检出拷贝数，计算出了本实验的极限检出 Ct 值，制定了判定标准：当 $Ct \leq 35$ 时，判定为阳性结果；而当 $Ct > 35$ 时，则判定为阴性结果，说明样本中目标序列的含量低于检测限。

2.3.10 通用性试验

通用分析结果显示（图 2-9），本实验室保存的 FIPV-DF-2 和 FPV 毒株以及构建的重组质粒均呈现出明显的扩增曲线，表明所选择的特异引物和探针具有较好的通用性。

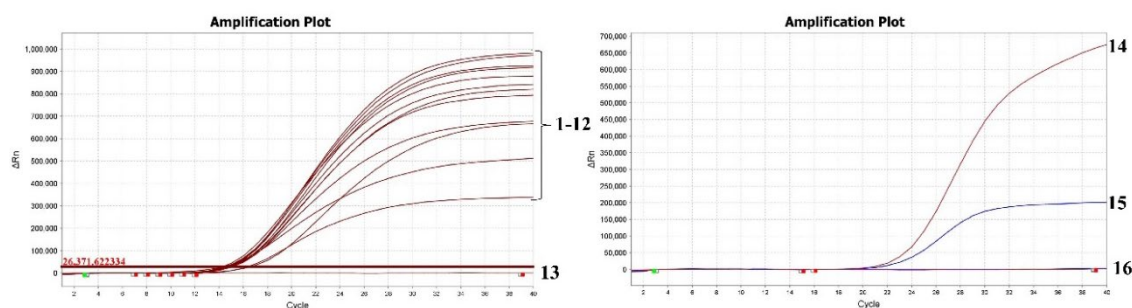


图 2-9 FCoV 和 FPV 的 qPCR 通用性检测结果

1-12: 10^7 copies/ μ L 的重组质粒；13: 阴性对照；14: FIPV-DF-2；15: FPV；16: 阴性对照

Fig. 2-9 General detection results of qPCR for FCoV and FPV

1-12: 10^7 copies/ μ L of recombinant plasmid; 13: Negative control; 14: FIPV-DF-2; 15: FPV; 16: Negative control

2.3.11 临床样品检测

采用本研究建立的 TaqMan 双重 qPCR 检测方法对哈尔滨市某宠物诊所 75 份疑似感染 FCoV 和 FPV 的猫肛拭子进行检测。结果显示，双重 qPCR 方法检出 FCoV 阳性 65 例，FPV 阳性 23 例，FCoV 和 FPV 共感染率为 28%。常规 PCR 检出 FCoV 阳性 61 例，FPV 阳性 19 例，FCoV 和 FPV 共感染率为 24%。对 qPCR 检测结果为阳性而常规 PCR 检测结果为阴性的临床样本进行测序验证。测序结果与 qPCR 结果一致，进一步验证了 qPCR 检测方法的准确性，证明了其在临床应用中的有效性和可靠性。经计算，双重 qPCR 与常规 PCR 检测 FCoV 和 FPV 的阳性符合率均为 100%，阴性符合率分别为 71.43% 和 92.86%。FCoV 和 FPV 的总体符合率均为 94.67%，表明本研究建立的双重 qPCR 检测方法可用于临床检测，且灵敏性高于常规 PCR。

2.4 讨论

近年来，宠物已经成为人们生活中不可缺少的一部分。作为伴侣动物，宠物猫在国内家庭中的饲养数量逐年增加，据《2023 年度宠物白皮书》报道，我国宠物猫的数量达到 6500 万只以上。

因此,对于传染性疾病的防治变得越来越重要。

在临床实践中,FECV 和 FPV 的首发症状均与消化道有关,如呕吐、腹泻等(SUN et al., 2021)。临床上又常见这两种病毒混合感染(DI PROFIO et al., 2023; SETYO et al., 2019),加剧了疾病发展,导致多器官衰竭,甚至死亡。通过检测猫体内排出的 FECV 情况,可有效实施治疗,降低冠状病毒载量,进一步防止 FECV 感染演化成 FIPV 的风险(FOLEY et al., 1997)。基于这些特点,本研究建立了一种同时鉴别检测 FCoV 和 FPV 的方法,对 FECV 和 FIPV 均能有效识别。该检测方法适用于肛拭子样本的检测,不仅提高了诊断的便捷性和效率,也为预防和治疗提供了更有力的保障和技术支持。

一步法双重 TaqMan qPCR 方法,与现有的分子检测方法相比,具有明显优势:1、检测速度快,TaqMan qPCR 检测速度明显快于常规 PCR;2、防污染,闭管反应消除了 PCR 反应后,二次开盖造成的核酸污染;3、准确性高,与 SYBR Green qPCR 方法相比,其优点是不受引物二聚体的荧光信号干扰(ZENG et al., 2020),提高了检测的准确性;4、检测多个项目,与单重 qPCR 方法相比,双重 qPCR 方法增加了检测项目,避免了漏检。此外,一步法可以直接进行 RNA 类核酸的检测,而不需要 RNA 逆转录过程,从而提高了效率和成本效益。

引物和探针的设计是成功构建双重 qPCR 的关键步骤。为确保检测的特异性,本研究针对两种毒株设计了多套引物和探针,并筛选出最敏感的引物对和探针对进行组合。在设计过程中,要注重控制探针的长度在 20~30 个碱基之间,以保证其特异性;同时,确保两对引物的退火温度相近,以提高 PCR 反应的稳定性和效率。此外,探针的 GC 含量被控制在 40%~60%之间,旨在减少发卡结构和错配的可能性,进而提升 PCR 扩增的特异性和稳定性。在反应体系中,特别引入了两条 FCoV 特异性下游引物,旨在提高检测灵敏性,并经过验证确认不同引物对和探针对之间不存在相互干扰。已知退火温度、引物和探针的浓度对 PCR 的特异性和扩增效率有着显著影响(RAND et al., 2005)。因此,本研究采用 D-optimal(ZHANG et al., 2020)来研究这三个因素(退火温度、引物和探针浓度)对双重 qPCR 的影响,并最终确定了本方法的反应体系和反应程序。

为进一步验证本方法的广谱性,本研究采用 MegAlign 软件对 NCBI 数据库中所有 FCoV 和 FPV 毒株序列进行综合分析,核实本方法所使用的特异性引物和探针靶点的变异度。通过合成包含引物靶位点核苷酸突变的重组质粒,作为待检病毒的模拟物,填补了实验室相关分离毒株的空白。实验结果表明,本方法具有较高的广谱有效性,不仅能检测出实验室储存的天然毒株还能检测出合成的重组质粒,进一步证实了本方法在病毒检测中的可靠性和实用性。

本方法在特异性方面展现出了良好的性能。由于实验室目前保存的其他种类毒株仅限于 FCoV 和 FHV,本研究在现有条件下主要针对这两种病毒进行特异性验证。通过严格的实验设计和操作,确保了本方法对 FCoV 和 FHV 特异性检测的准确性和可靠性。受制于肠道病毒的毒株类型和数量,随着实验室资源的不断丰富,在未来本方法将对更多病毒毒株进行特异性检测,以便对本方法进行更广泛、更全面的特异性评估。

在现地样本的检测应用中,对来自哈尔滨市宠物医院的 75 份疑似感染 FCoV 和 FPV 的肛拭子进行了检测,并与常规 PCR 方法进行了比较分析。结果显示,qPCR 方法在检测阳性样本方面表现优异,阳性符合率达到了 100%。同时,对于 qPCR 检测结果为阳性而常规 PCR 检测结果为阴性的临床样本,进行了测序验证,结果证实了 qPCR 的准确性,进一步凸显了其在临床应用中的有效性和可靠性。本方法显示出了较高的灵敏性、特异性和准确性。本方法不仅为宠物医院的

病毒感染检测和诊断提供了坚实的技术支撑，而且更重要的是，它能够精确地区分 FCoV 和 FPV 的感染，从而为宠物医疗领域的病毒诊断和防控工作提供了关键性的工具和手段。

此外，本研究还统计了 FCoV 和 FPV 在猫只体内的感染情况。结果显示，FCoV 的阳性率为 86.6%，FPV 的阳性率为 30.7%，且二者的共感染率为 28%。这些数据反映了 FCoV 和 FPV 在猫群中具有较高感染率，且混合感染比例较高，提示着这两种病毒对于当地猫群健康的潜在威胁，在预防和治疗方案中，需要多加留心；避免就单一病原用药，出现“按下葫芦起了瓢”的误诊和漏诊。

综上所述，本研究所建立的 TaqMan 双重 qPCR 方法在临床诊断和流行病学调查中具有重要的应用价值。它不仅能够准确、快速地检测 FCoV 和 FPV 的感染，还能够为疫情监测和控制提供重要的数据支持，有助于保障宠物健康并维护公共卫生安全。

第三章 FCoV 胶体金免疫层析试纸条检测方法的建立

第二章节成功建立了 FCoV 和 FPV 一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法。尽管 qPCR 技术具有高灵敏性和特异性，但其需要专业的仪器和检测人员，且成本高，因此在现场直接应用时存在局限性。为了实现现场快速检测，本研究进一步建立了基于抗原检测的胶体金免疫层析试纸条。该方法成本低廉、操作简便，适用于现场快速检测，提升猫科动物疾病的诊断效率，有效控制疾病的传播和流行。

3.1 材料与试剂

3.1.1 质粒、菌种、毒株、细胞和动物

FIPV 参考毒株 DF-2 (GenBank 登录号: JQ408981.1); FPV 参考毒株 XJ-1 (GenBank 登录号: EF988660.1); FHV 参考毒株 HRB2019 (GenBank 登录号: PP034747); FCV 参考毒株 FCV-2280 (GenBank 登录号: KC835209.1)。293T 细胞、骨髓瘤细胞 (SP2/0 细胞) 均由哈尔滨兽医研究所宠物疫病创新团队保存。DH5 α 感受态细胞和 BL21 (DE3) 感受态细胞均购买于天根生化科技有限公司。pCold I 载体和 pCMV-HA-DsRed 载体均由哈尔滨兽医研究所宠物疫病创新团队保存。BALB/c 雌性小鼠购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究的动物实验于哈尔滨兽医研究所进行, 动物实验已通过伦理审查委员会批准(动物实验批准号: 230602-01-GR)。

3.1.2 主要仪器设备

主要仪器设备见表 3-1。

表 3-1 主要仪器设备

Table 3-1 Main instruments and equipments	
仪器设备	生产厂家
PCR 仪	Bio-Rad, 美国
超微量分光光度计	Implen, 德国
凝胶成像系统	Bio-Rad, 美国
涡旋振荡器	SCILOGEX 公司
核酸电泳槽	Bio-Rad, 美国
超净工作台	Thermo Fisher 公司
细菌培养摇床	Thermo Fisher 公司
4℃离心机	湖南湘仪有限公司
SDS-PAGE 垂直电泳槽	Bio-Rad, 美国
Optima XPN-100 超速离心机	BeckmanCoulter, 美国
倒置荧光显微镜	Life, 美国
流式细胞分选系统	Sony, 日本
-80℃超低温冰箱	美菱公司

3.1.3 主要实验试剂

主要试剂及耗材见表 3-2。

表 3-2 主要试剂及耗材

Table 3-2 Main reagents and consumables

试剂及耗材	生产厂家
2×Taq Master Mix (Dye Plus)	TaKaRa 公司
<i>Bam</i> H I和 <i>Hind</i> III 限制性内切酶	TaKaRa 公司
DNA Marker	TaKaRa 公司
蛋白质 Marker	TaKaRa 公司
ClonExpress II One Step Cloning Kit	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Fine Quick 快速病毒 DNA/RNA 柱式提取试剂盒	济凡生物科技有限公司
Quick Antibody-Mouse5W 免疫佐剂	博奥龙免疫技术有限公司
聚乙二醇 (PEG)	Sigma Aldrich 公司
HAT	Sigma Aldrich 公司
HT	Sigma Aldrich 公司
DNA 凝胶回收试剂盒	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
Plasmid DNA Mini Kit I	Omega 公司
Hybridoma 杂交瘤添加因子	博奥龙科技有限公司
腹水专用佐剂	博奥龙科技有限公司
DMEM 培养基	Gibco
线性 PEI MAX 40K	上海起发实验试剂有限公司
封闭液	碧云天
IPTG	德国 Qiagen 公司
质粒小提试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂	翌圣生物
FITC 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)	翌圣生物

3.2 实验方法

3.2.1 FIPV-DF-2 N 蛋白重组原核表达载体的构建

根据 NCBI 上已发表的 FIPV-DF-2 (GenBank 登录号: JQ408981.1) N 蛋白的核苷酸序列和 pCold I 原核表达载体的多克隆位点, 选择 *Bam*H I 和 *Hind* III 作为载体构建的双酶切位点。设计上游引物 FIPV-DF-2-N-*Bam*H I-F 序列为 5'-ctcgggtaccctcgaggatccATGGCCACACAGGGACAACG-3' (下划线加斜体的碱基为酶切位点识别序列, 下同), 下游引物 FIPV-DF-2-N-*Hind* III-R 序列为 5'-agactgcaggtcgacaagcttTTAGTTCGTAACCTCATCAATCATCTC-3', 并送库美生物科技有限公司合成。使用 FineQuick 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取 FIPV-DF-2 的 RNA。使用 HiScript III 1st

Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录反应，合成 FIPV-DF-2 的第一链 cDNA。以获得的 cDNA 为模板，PCR 扩增 FIPV-DF-2 N 基因片段。使用 DNA 凝胶提取试剂盒对 PCR 产物进行纯化和回收。将 PCR 产物克隆到原核表达载体 pCold I 中，载体 pCold I 用内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切，酶切体系如下表 3-3：

表 3-3 质粒酶切体系

Table 3-3 The plasmid digestion system	
试剂名	体系
<i>Bam</i> H I	2 μL
<i>Hind</i> III	2 μL
Universal Buffer	4 μL
pCold I 载体	5 μL
ddH ₂ O	27 μL
总量	40 μL

将以上酶切反应体系轻轻吹打混匀后，放置 37℃ 水浴锅中静置 2 h 后，使用 DNA 凝胶提取试剂盒对反应产物进行纯化和回收。

将纯化的 PCR 产物与双酶切后的 pCold I 线性化克隆载体进行重组反应，在 37℃ 水浴锅中静置 30 min 后立即置于冰上冷却。然后转化 DH5α 感受态细胞，并涂布于含氨苄抗性的 LB 琼脂平板上，挑取单个菌落，菌液培养，提取质粒，重组质粒命名为 pCold I-FIPV-DF-2-N，经 DNA 测序鉴定。重组反应体系（表 3-4）如下：

表 3-4 重组反应体系

Table 3-4 Recombinant reaction system	
各组分	体系
酶切 pCold I 线性化载体	1 μL
酶切 FIPV-DF-2 N 基因	2 μL
5×CE II Buffer	4 μL
Exnase II	2 μL
ddH ₂ O	11 μL
总量	20 μL

3.2.2 重组 FIPV-DF-2 N 蛋白的诱导表达和纯化

3.2.2.1 蛋白的表达

将 pCold I-FIPV-DF-2-N 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21（DE3）。将挑取的单菌落在含氨苄抗性的 LB 培养基扩大培养，当菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.4~0.6 时，添加 0.5 mM 的 IPTG 诱导剂，并在低温（16℃）环境下以 150 rpm/min 振荡培养 18 h 诱导蛋白表达。诱导后收集菌体，用 PBS 重悬，并超声破碎细菌至菌液透亮，随后在 4℃、12 000 rpm/min 条件下离心 10 min。上清弃去，菌体沉淀放置于 -20℃ 或 -80℃ 冰箱中保存。

3.2.2.2 蛋白的纯化

按照 HisSep Ni-NTA Agarose Resin (His 标签蛋白琼脂糖纯化树脂) 说明书进行操作, 得到 FIPV-DF-2 N 蛋白的纯化产物。

3.2.2.3 纯化蛋白 Western Blot 分析

- (1) 将纯化后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离蛋白。
- (2) 使用 eBlot™ L1 快速湿转仪将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上。
- (3) 将 NC 膜放入 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液中, 在室温水平摇床上孵育 1 h。
- (4) 取出 NC 膜, 用 PBST 缓冲液洗涤, 然后在 4℃ 冰箱中使用稀释好的一抗 (1:10 000 倍稀释的鼠源 His 标签抗体) 过夜。
- (5) 再次洗涤膜, 然后加入稀释好的二抗 (1:10 000 倍稀释的羊抗鼠二抗), 在室温避光条件下水平摇床上孵育 1 h。
- (6) 使用 Odyssey CLx 近红外双色荧光成像系统捕获蛋白带的图像, 以及膜上的其他信号。

3.2.3 单克隆抗体的制备和纯化

3.2.3.1 小鼠免疫程序

将纯化后的重组 N 蛋白作为免疫抗原, 并将其与 Quick Antibody-Mouse 5W 免疫佐剂按 1:1 等体积混合, 用 PBS 稀释后注射到 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠的小腿肌肉中, 每只小鼠注射 20 μ g 的剂量。在接种后的第 21 d 进行一次加强免疫, 共进行两次免疫。

3.2.3.2 小鼠血清测定

在免疫第 35 d, 从小鼠眼眶取血, 将分离到的血清 2 倍比稀释至 1:2、1:4、1:8.....1:640、1:1280 倍数, 采用间接免疫荧光法 (IFA) 测定小鼠血清效价。

具体步骤如下:

- (1) 使用 CRFK 细胞接种 FIPV-DF-2 病毒。
- (2) 在显微镜下观察到细胞出现明显病变后, 加入冰甲醇覆盖住细胞, -20℃ 固定 15 min。
- (3) 弃去固定液, 用 PBST 洗涤细胞。加入碧云天商品封闭液进行封闭, 室温封闭 30 min。
- (4) 弃去封闭液, 洗涤同上, 将稀释好的小鼠血清作为一抗, 于室温环境中孵育 2 h。
- (5) 弃去一抗溶液, 洗涤同上, 将商品化的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗, 于 37℃ 的恒温培养箱避光孵育 45 min。
- (6) 弃去二抗溶液, 洗涤同上, 最后加入 200 μ L 的 PBS, 于避光条件下在倒置显微镜下进行观察、拍照。

3.2.3.3 细胞融合

1、准备骨髓瘤细胞

骨髓瘤细胞 (SP2/0) 细胞在含 20% FBS 的 DMEM 培养基中培养。选择生长旺盛并且呈对数生长期的细胞, 收集并离心于 50 mL 管中 (1 000 rpm/min, 10 min)。弃去上清, 用 DMEM 不完全培养液重新悬浮并计数备用。

2、免疫脾细胞的制备

(1) 收集小鼠心脏终末血液, 分离血清, 获得阳性血清。

(2) 将无菌小鼠转入超净台中, 然后固定小鼠并剥离腹部皮肤和腹膜, 分离脾脏。

(3) 将脾脏放入含有 DMEM 基础培养基的培养皿中, 用 DMEM 冲洗并去除结缔组织。

(4) 将脾脏转移到新的无菌培养皿中, 用镊子夹起脾脏上端边缘处, 用 5 mL 无菌注射器换上 1 mL 无菌注射器的针头, 在脾脏下端边缘处扎出几个小孔, 吸取少量 DMEM 基础培养液插入脾脏上端, 用 DMEM 洗涤直至脾脏变白透明, 收集吹洗液。

3、融合

(1) 将准备好的 SP2/0 细胞和脾细胞分别收集到 50 mL 离心管中, 2 000 rpm 离心 10 min。

(2) 用 10 mL DMEM 培养基将 SP2/0 细胞和脾细胞重悬。

(3) 将 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:10 的比例混合, 在 50 mL 离心管中用 DMEM 基础培养液洗 1 次, 2 000 rpm/min、离心 10 min, 尽弃上清, 轻轻弹击离心管底, 使细胞沉淀完全松动。

(4) 将 50 mL 离心管置入盛有 40°C 灭菌水的锥形瓶中, 使用移液枪在 45 s 内加预热至 40°C 的 50% PEG (PH 8.0) 1 mL (边转动离心管边加), 再继续搅拌 1 min。

(5) 在第 3 min 加入 1 mL 预热到 37°C 的 DMEM 基础培养液终止反应 (由慢到快, 贴壁), 轻轻混匀后, 在第 4 min 加入 2 mL 预热到 37°C 的 DMEM 基础培养液, 在第 5 min 加入 3 mL 预热到 37°C 的 DMEM 基础培养液, 第 6 min 加入预热到 37°C 的 DMEM 基础培养液 4 mL。

(6) 放置 37°C 恒温培养箱 15 min 后, 400×g, 水平离心 8 min, 弃去上清。

(7) 用 (约 43 mL) HAT 培养液 (加入 Hybridoma 杂交瘤添加因子, 1:10 直接使用) 将细胞沉淀重悬, 然后分装到准备好的 96 孔细胞板中 (4 块板), 100 μ L/孔, 放置于 5% CO₂, 37°C 恒温细胞培养箱中进行培养。

(8) 在细胞融合实验的关键阶段, 即第 3 d 和第 8 d, 应使用特定的 HT 培养液进行半换液操作。

3.2.3.4 细胞筛选

在细胞融合后的培养过程中, HAT 选择培养基起到了至关重要的作用。HAT 是次黄嘌呤(H)、氨基蝶呤(A)和胸腺嘧啶核苷(T)的简称, 这种培养基利用了未杂交的瘤细胞以及自身融合的骨髓瘤细胞缺乏合成 DNA 所必需的酶的特点, 在特定的培养条件下, 这些细胞因无法增殖而逐渐死亡。细胞融合 10 d 后, 在 HAT 的作用下, 非杂交瘤细胞死亡。杂交瘤细胞逐渐铺满培养板的底部三分之二时, 无菌条件下每孔取出 100 μ L 细胞上清作为一抗, 以感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞作为抗原, 通过 IFA 鉴定, 初筛出阳性杂交瘤细胞。IFA 具体步骤如 3.2.3.2 所示。

3.2.3.5 细胞亚克隆

本实验采用流式细胞分选技术对效价最高的几株细胞进行两次亚克隆。步骤如下:

(1) 在 96 孔细胞培养板中加含 10% Hybridoma 杂交瘤添加因子、20% FBS 的 DMEM 完全培养基, 200 μ L/孔, 备用。

(2) 将在 96 孔细胞培养板中的阳性杂交瘤细胞吹打下来收集至 5 mL 的流式细胞管中, 使用基础培养基定容至 500 μ L, 使用流式细胞分选系统在准备好的 96 孔细胞培养板的每个细胞孔中打入一个细胞。放置于 5% CO₂, 37°C 培养箱中继续培养。

(3) 细胞逐渐铺满培养板的底部三分之二时, 取上清进行 IFA 鉴定, IFA 具体步骤如 3.2.3.2 所示。选取鉴定结果为阳性且抗体效价最高的细胞孔, 重复第一次亚克隆步骤, 选择效价最高且只有一个细胞群落的细胞扩大培养并进行细胞冻存。

3.2.3.6 单克隆抗体的大量制备

本实验是在小鼠腹腔注射杂交瘤细胞。具体步骤如下:

(1) 向每只经产母鼠腹腔注射 500 μ L 的腹水专用佐剂, 在注射佐剂一周后, 向小鼠腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。

(2) 一般 10~14 d 后, 可清晰观察到小鼠腹部明显隆起。用注射器从腹腔内吸取腹水, 这些腹水样品经 4°C 离心处理, 上层为小鼠腹腔内的脂肪, 而中间层则富含腹水中的抗体, 收集中间层的抗体并分装于 1 mL 离心管中, -20°C 保存。

3.2.4 单克隆抗体的功能验证

将蔗糖密度梯度离心纯化的全病毒颗粒(实验室保存)使用 Western blot 方法对该单克隆抗体进行反应原性和特异性鉴定, Western blot 具体步骤如 3.2.2.3 所示。用 IFA 法评价单克隆抗体能否特异性结合自然感染的病毒, IFA 具体步骤如 3.2.3.2 所示。

3.2.5 抗原表位的测定

在本研究中, FIPV-DF-2 N 蛋白全长 377 个氨基酸, 通过表达一系列重叠的截短 N 蛋白片段(图 3-1), 表位范围逐渐缩小, 从而能够精确定位单克隆抗体识别的最小表位。利用 Oligo 7 设计引物(表 3-5), 并且在上下游引物中设置限制性核酸内切酶 *Sfi* I 和 *Eco*R I 的酶切位点, 引物由库美生物科技有限公司合成。截短的基因片段连接到 pCMV-HA-DsRed 载体, 并作为带有 DsRed 标签的融合蛋白表达。为了进一步验证该表位的长度, 将含有截短基因片段的 pCMV-HA-DsRed 重组质粒转染 293T 细胞(转染操作步骤按照线性 PEI MAX 40K 转染说明书), 并将其真核表达为 DsRed 标记蛋白。用获得的单克隆抗体对重组蛋白进行 IFA 鉴定和 Western blot 验证。IFA 具体步骤如 3.2.3.2 所示。Western blot 具体步骤如 3.2.2.3 所示。

3.2.6 抗原表位保守性分析

用 MegAlign 软件和 WebLogo 在线工具比对 NCBI 数据库中已发布的 FCoV 序列(表 2-3), 分别将单克隆抗体的抗原表位与 45 株 FCoV 病毒相应的靶区域进行比较, 使用 DNAMAN 软件分析单克隆抗体抗原表位的保守性。

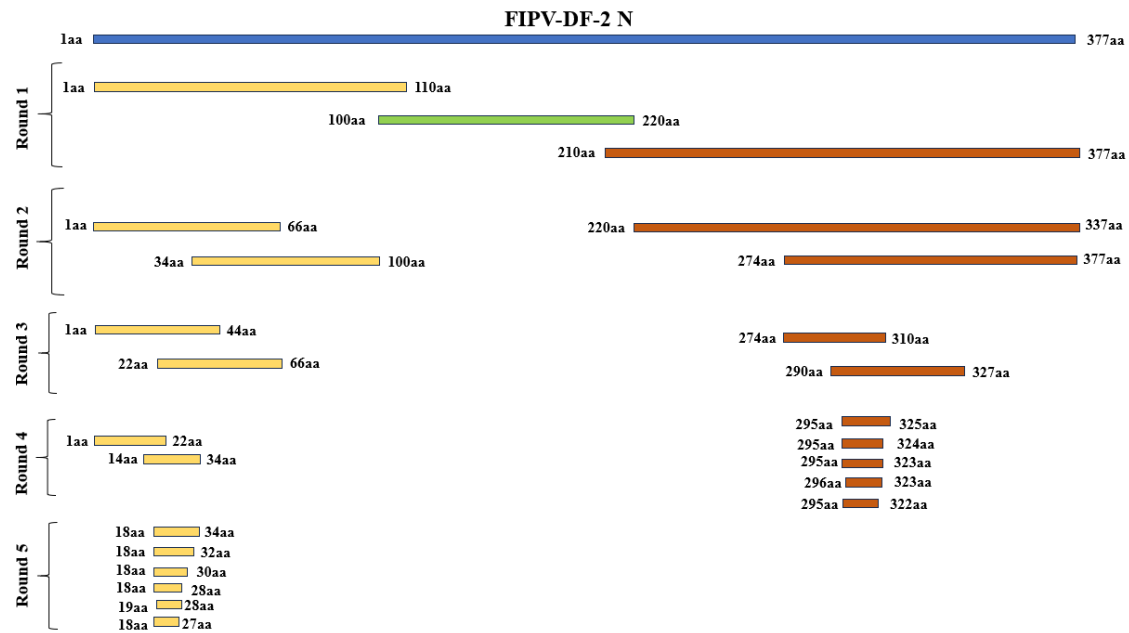


图 3-1 表位鉴定的截短表达策略

Fig. 3-1 Truncated expression for Mab epitope mapping

表 3-5 FIPV-DF-2 N 的截短表达引物序列

Table 3-5 Primers used for truncation expression of FIPV-DF-2 N

引物 名称	引物序列 (5'-3')	位置 (aa)	长度 (bp)
N1-F	agattacgctcttatggccatggaggccGCCACCATGGCCACACAGGGACAAC	1-377	1131
N1-R	agatctcggtcgaccgaattcgGTTTCGTAACCTCATCAATCATCTCAAC		
N2-F	agattacgctcttatggccatggaggccGCCACCATGGCCACACAGGGACAAC	1-110	330
N2-R	agatctcggtcgaccgaattcgATCAATCTTGTCTTTGAATTTAGCATCAGCATG		
N3-F	agattacgctcttatggccatggaggccGCCACCATGGATGCTGATGCTAAATTCAA	100-220	363
N3-R	agatctcggtcgaccgaattcgAGGTTTGAATCACTACGTTCTCTAGGT		
N4-F	agattacgctcttatggccatggaggccGCCACCATGGCTAAACCTAGAGAACGTAG	210-377	504
N4-R	agatctcggtcgaccgaattcgGTTTCGTAACCTCATCAATCATCTCAAC		
N5-F	agattacgctcttatggccatggaggccATGGCCACACAGGGACAAC	1-66	198
N5-R	agatctcggtcgaccgaattcgTTGTTGATCCTTATTACCTATTCCTTT		
N6-F	agattacgctcttatggccatggaggccTCATTCTACAACCCCATACCCT	34-100	201
N6-R	agatctcggtcgaccgaattcgATGAGGTCCTGTACCTAAGAAGT		
N7-F	agattacgctcttatggccatggaggccATGGCCACACAGGGACAAC	1-44	132
N7-R	agatctcggtcgaccgaattcgTCCTTGTTTCGAGGGTAATGGG		
N8-F	agattacgctcttatggccatggaggccAACTCTCGTGGTCGGAAGA	22-66	135
N8-R	agatctcggtcgaccgaattcgTTGTTGATCCTTATTACCTATTCCTTT		
N9-F	agattacgctcttatggccatggaggccATGGCCACACAGGGACAAC	1-22	66
N9-R	agatctcggtcgaccgaattcgGTTAGAACGACCACGTCTTTT		

表 3-5 (续)

引物 名称	引物序列 (5'-3')	位置 (aa)	长度 (bp)
N10-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CCTTCCAAAAGACGTGGT	14-34	63
N10-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> CAAAGGTATATCATTATT		
N11-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CGTGGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	18-34	51
N11-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> CAAAGGTATATCATTATT		
N12-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CGTGGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	18-32	45
N12-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> GTAATTAATTCCTGCAG		
N13-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CGTGGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	18-30	39
N13-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> AATTCCTGCAGTGC		
N14-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CGTGGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	18-28	33
N14-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> ATTCTTCCGACCACGAGA		
N15-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	19-28	30
N15-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> ATTCTTCCGACCACGAGA		
N16-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CGTGGTCGTTCTAACTCTCGTGGTC	18-27	30
N16-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> CTTCCGACCACGAGAGTTAGAACG		
N17-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> CCTAGGGACACAACACCTAAGA	220-327	324
N17-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> TCGCTTGTAAGCGTCAATCTGT		
N18-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GCTGAATGTGTTCCATCAGTGTCT	274-377	312
N18-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> GTTTCGTAACCTCATCAATCATCTCAA		
N19-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GCTGAATGTGTTCCATCAGTGTCTA	274-310	111
N19-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> CTTTGGCAGGTAGTAGGTGTGAG		
N20-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> TCTGCTGAAGAAGCTGGTGA	290-327	114
N20-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> TCGCTTGTAAGCGTCAATC		
N21-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GGTGATCAAGTGAAAGTC	295-325	93
N21-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> GTAAGCGTCAATCTGTTC		
N22-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GGTGATCAAGTGAAAGTC	295-323	87
N22-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> GTCAATCTGTTCTAGGAA		
N23-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GATCAAGTGAAAGTCACG	296-323	84
N23-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> GTCAATCTGTTCTAGGAA		
N24-F	agattacgctcttat <u>ggccatggaggcc</u> GGTGATCAAGTGAAAGTC	295-322	84
N24-R	agatctcggtcgacc <u>gaattcg</u> AATCTGTTCTAGGAATTGACTAGT		

注：小写字母为 pCMV-HA-DsRed 载体的同源臂和酶切位点识别序列（下划线加斜体的碱基为酶切位点识别序列），大写字母为各截短基因片段的引物序列。

3.2.7 免疫层析试纸条的研制与评价

3.2.7.1 免疫层析试纸条的制备

为了保证胶体金免疫层析试纸条的质量和效率,选择了深圳市真瑞生物技术有限公司承担制备工作。采用双抗体夹心法制备胶体金试纸条。将 mAb 3H5 与金纳米颗粒偶联,用特异性抗体 mAb 2G7 包被检测线。质控线用特异性山羊抗小鼠 IgG 抗体包被。如果样品中有待检测物质,首先与胶体金标记抗体结合,再通过毛细管作用迁移到检测线,与检测线抗体结合,形成胶体金标记抗体-检测物-检测线抗体的双抗体夹心结构。

3.2.7.2 胶体金免疫层析试纸条的灵敏性检测

为评价该免疫层析试纸条的灵敏性,将重组 pCold I-FIPV-DF-2-N 蛋白经过 2 倍比稀释,浓度梯度设置为 6715.0 ng/mL、3357.5 ng/mL、1678.8 ng/mL、839.4 ng/mL、419.7 ng/mL、209.8 ng/mL、104.9 ng/mL 和 52.5 ng/mL,用免疫层析试纸条对这些不同浓度的蛋白样本进行检测。可检测的最低浓度被定义为试纸的灵敏性。

3.2.7.3 胶体金免疫层析试纸条的特异性检测

为评价该免疫层析试纸条的特异性,对 FIPV、FHV、FCV 和 FIPV-DF-2 的病毒颗粒分别使用免疫层析试纸条进行检测。

3.2.7.4 胶体金免疫层析试纸条的临床样品检测

利用本研究建立的胶体金免疫层析试纸条,成功检测了收集的 10 只猫腹水样品。为了进一步验证试纸的结果,还采用了 Xiao 等建立的常规 PCR 作为验证方法(XIAO et al., 2022)。通过比较免疫层析试纸条和 PCR 的结果,可以保证结果的准确性和可靠性。

3.3 实验结果

3.3.1 FIPV-DF-2 N 基因的扩增及其重组质粒的构建

如图 3-2 所示, FIPV-DF-2 N 基因引物扩增的产物大小为 1131 bp,无多余条带。将纯化产物连接到表达载体 pCold I 上,经测序鉴定质粒构建成功。

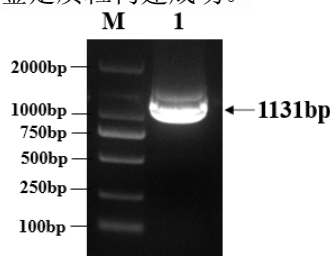


图 3-2 扩增产物的鉴定

1: FIPV-DF-2 N 基因扩增产物; M: DL2000 DNA Marker

Fig. 3-2 Identification of the amplified products

1: amplified products of FIPV-DF-2 N gene; M: DL2000 DNA Marker

3.3.2 FIPV-DF-2 N 蛋白的表达与纯化

构建的重组质粒 pCold I-FIPV-DF-2-N 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达, 预期蛋白分子量约为 45.6 KDa。上清中表达的产物经镍柱亲和层析纯化, SDS-PAGE 鉴定 (图 3-3a)。通过抗 His 单抗介导的 Western blot 验证纯化蛋白的反应性 (图 3-3b)。

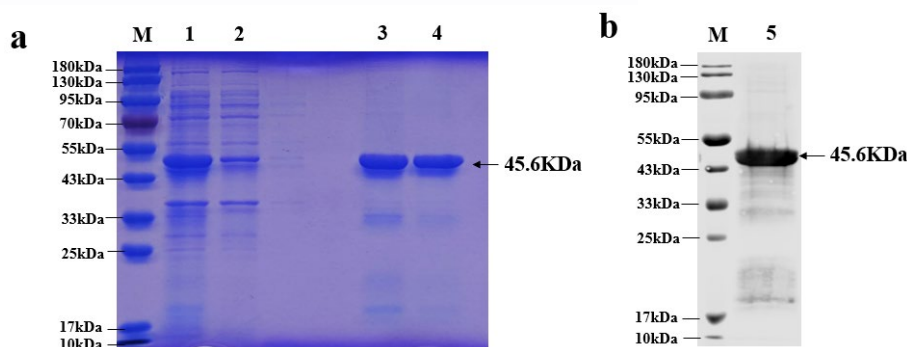


图 3-3 SDS-PAGE 分析结果和 Western blot 检测结果

(a) SDS-PAGE 鉴定 (M: 蛋白 Marker; 1: 诱导后菌体上清; 2: 诱导后菌体沉淀; 3: 未诱导菌体上清; 4: 未诱导菌体沉淀; 5: FIPV-DF-2 N 表达和纯化产物)

(b) Western blot 鉴定 (M: 蛋白 Marker; 1: FIPV-DF-2 N 的表达和纯化产物)

Fig. 3-3 Results of SDS-PAGE and Western blot analysis

(a) SDS-PAGE (M: Protein Marker; 1: Induced bacterial supernatant; 2: Induced bacterial precipitation; 3: Uninduced bacterial supernatant; 4: Uninduced bacterial precipitation; 5: Expression and purified products of FIPV-DF-2 N)

(b) Western blot: (M: Protein Marker; 1: Expression and purified products of FIPV-DF-2 N)

3.3.3 免疫小鼠血清效价检测

使用 IFA 检测方法对免疫两次后的小鼠血清进行抗体效价检测。血清 1:1280 倍比稀释后仍可见清晰荧光, 证明其免疫效果较好 (图 3-4)。

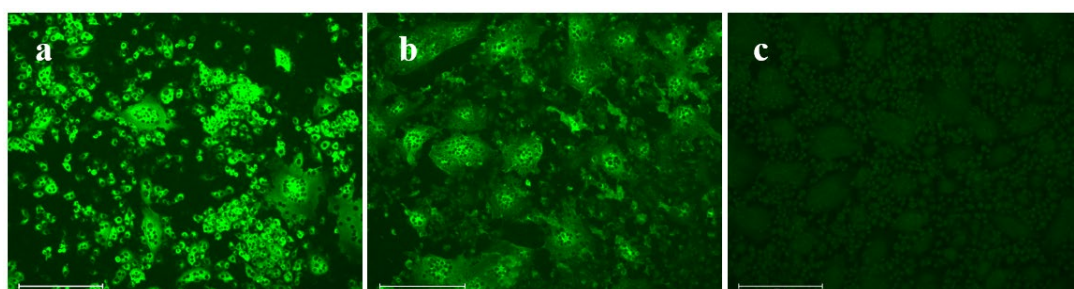


图 3-4 抗体效价检测结果 (标尺: 275 μ m)

(a) 小鼠阳性血清 (1:64 倍稀释) 在感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果; (b) 小鼠阳性血清 (1:1280 倍稀释) 在感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果; (c) 小鼠阴性血清在感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果

Fig. 3-4 Antibody titer test results (Scale bars: 275 μ m)

(a) IFA results of mouse positive serum (diluted 1:64) in CRFK cells infected with FIPV-DF-2; (b) IFA results of mouse positive serum (diluted 1:1280) in CRFK cells infected with FIPV-DF-2; (c) IFA results of mouse negative serum in CRFK cells infected with FIPV-DF-2

3.3.4 单克隆抗体的制备与鉴定

利用细胞融合技术获得具有体外无限增殖能力的杂交瘤细胞，当融合细胞的培养上清液出现变黄迹象时，收集上清液，将其作为一抗使用。以感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞作为抗原，进行初步的筛选工作。通过流式细胞仪分选和 IFA 技术，成功获得特异性靶向 FIPV-DF-2 的 mAb 2G7 和 mAb 3H5（图 3-5）。

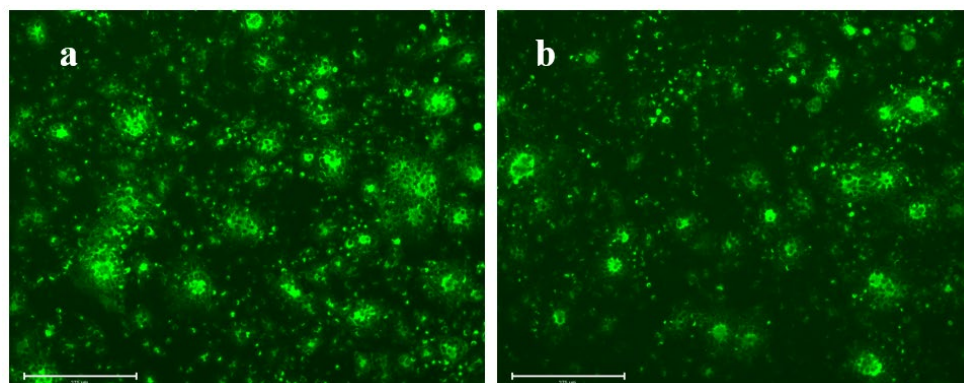


图 3-5 IFA 鉴定结果（标尺：275 μ m）

（a）mAb 2G7 在感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果；（b）mAb 3H5 在感染 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果

Fig. 3-5 The results of IFA identification (Scale bars: 275 μ m)

(a) IFA results of mAb 2G7 in CRFK cells infected with FIPV-DF-2; (b) IFA results of mAb 3H5 in CRFK cells infected with FIPV-DF-2

3.3.5 单克隆抗体的特异性和反应原性测定

本研究采用了 Western blot 方法和 IFA 技术对 mAb 2G7 和 mAb 3H5 的特异性和反应原性进行检测。

Western blot 方法可以准确地揭示这两种单克隆抗体与目标抗原的结合情况，从而验证它们的特异性。使用本实验室保存的通过蔗糖梯度密度离心法纯化获得的 FIPV-DF-2、FPV、FCV 和 FHV 的完整病毒颗粒，并用 mAb 2G7 和 mAb 3H5 进行 Western blot 分析。如图 3-6 所示，mAb 2G7 和 mAb 3H5 对 FIPV-DF-2 全病毒蛋白（45.6 KDa）显示出显著反应性，而与其他病毒如 FPV、FCV 和 FHV 的全病毒蛋白则无反应性。

为进一步分析 mAb 2G7 和 3H5 与 FIPV-DF-2 的反应性，对制备的单克隆抗体进行 IFA 结果分析。结果显示，在接种 FIPV-DF-2 的 CRFK 细胞中观察到明显的绿色荧光（图 3-7a, f）。阴性对照以及 FPV、FCV、FHV 感染的 CRFK 细胞均未检测到绿色荧光（图 3-7b, c, d, e, g, h, i, j）。这些结果表明，mAb 2G7 和 mAb 3H5 能特异性地靶向 FIPV-DF-2 抗原，并具有显著的反应原性。

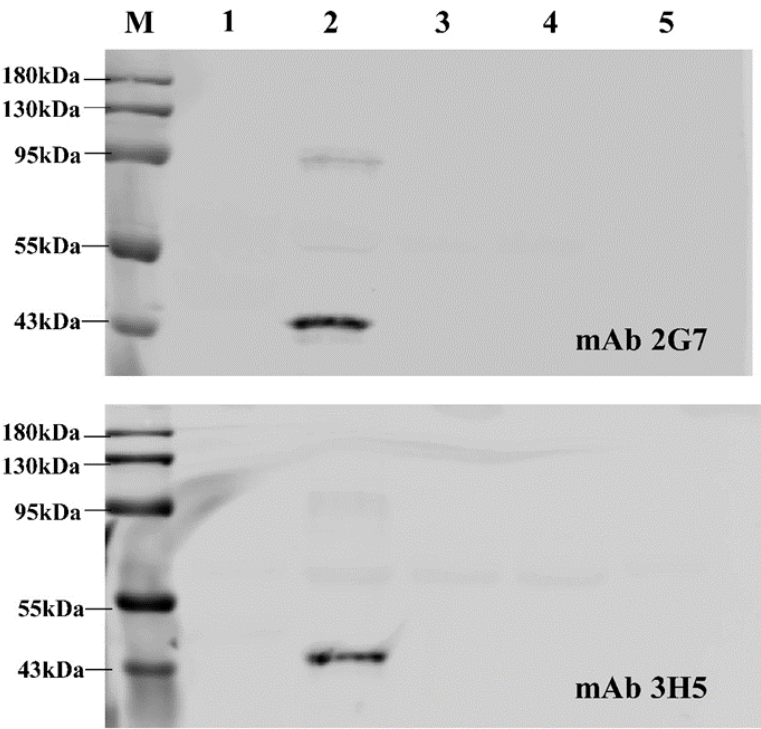


图 3-6 Western blot 检测 mAb 2G7 和 mAb 3H5 抗 FIPV-DF-2 的特异性和反应原性。

M: Protein Marker; 1: CRFK 细胞裂解液; 2: FIPV-DF-2; 3: FPV; 4: FCV; 5: FHV

Fig. 3-6 Western blot analysis of the specificity and reactogenicity of mAb 2G7 and 3H5 against FIPV-DF-2

M: Protein Marker; 1: CRFK cell lysates; 2: FIPV-DF-2; 3: FPV; 4: FCV; 5: FHV

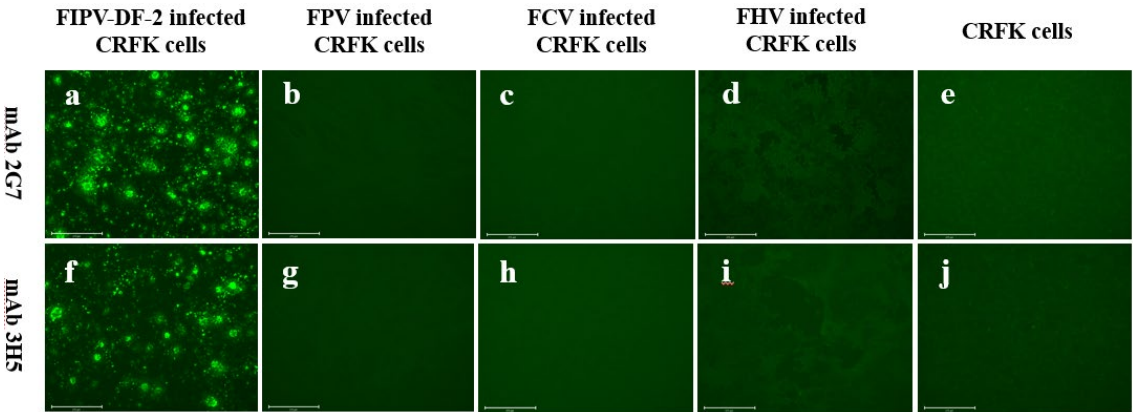


图 3-7 IFA 检测 mAb 2G7 和 mAb 3H5 抗 FIPV-DF-2 的特异性和反应原性（标尺：275μm）

(a-d) mAb 2G7 在感染 FIPV-DF-2、FPV、FCV 和 FHV 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果；(e) mAb 2G7 在未感染病毒的 CRFK 细胞中的 IFA 结果；(f-i) mAb 3H5 在感染 FIPV-DF-2、FPV、FCV 和 FHV 的 CRFK 细胞中的 IFA 结果；(j) mAb 3H5 在未感染病毒的 CRFK 细胞中的 IFA 结果

Fig. 3-7 Specificity and reactogenicity of mAb 2G7 and 3H5 against FIPV-DF-2 detected by IFA (Scale bars: 275μm)
(a-d) IFA results of mAb 2G7 in CRFK cells infected with FIPV-DF-2, FPV, FCV and FHV; (e) IFA results of mAb 2G7 in virus-free CRFK cells; (f-i) IFA results of mAb 3H5 in CRFK cells infected with FIPV-DF-2, FPV, FCV and FHV; (j) IFA results of mAb 3H5 in virus-free CRFK cells

3.3.6 鉴定单克隆抗体识别的抗原表位

为了确定 mAb 2G7 和 mAb 3H5 的抗原表位，首先将 3 个重叠的截短片段 N (1-110 aa)、N (100-220 aa)和 N(210-377 aa)克隆到 pCMV-HA-DsRed 载体中，在 293T 细胞中表达带有 DsRed 标签的融合蛋白。以 N (1-377 aa) 蛋白全长作为对照。IFA 分析结果显示，mAb 2G7 能够识别 N (1-110 aa) 和整个 N 蛋白，而 N (100-220 aa) 或 N (210-377 aa) 则不能识别。相反，片段 N (210-377 aa) 和整个 N 蛋白可以被 mAb 3H5 识别，而 N (1-110 aa) 或 N (100-220 aa) 则不能。表明 mAb 2G7 和 mAb 3H5 的抗原表位分别初步确定在 N (1-110 aa) 和 N (210-377 aa)。根据图 4-1，逐步将基因片段 N (1-110 aa) 和 N (210-377 aa) 截短表达，将各截短的基因片段与克隆到 pCMV-HA-DsRed 载体中，得到重组质粒转染 293T 细胞并表达为 DsRed 标记蛋白，并用 IFA 方法进行鉴定，IFA 分析显示，¹⁸RGRSNSRGRKN²⁸ 是 mAb 2G7 最小的线性表位（图 3-8a），²⁹⁵GDQVKVTLTHTYYLPKDDAKTSQFLEQID³²³ mAb 3H5 最小的线性表位（图 3-8b）。对上述获得的一系列重组蛋白进行 Western blot 分析，也证实了相同的结果（图 3-9）。

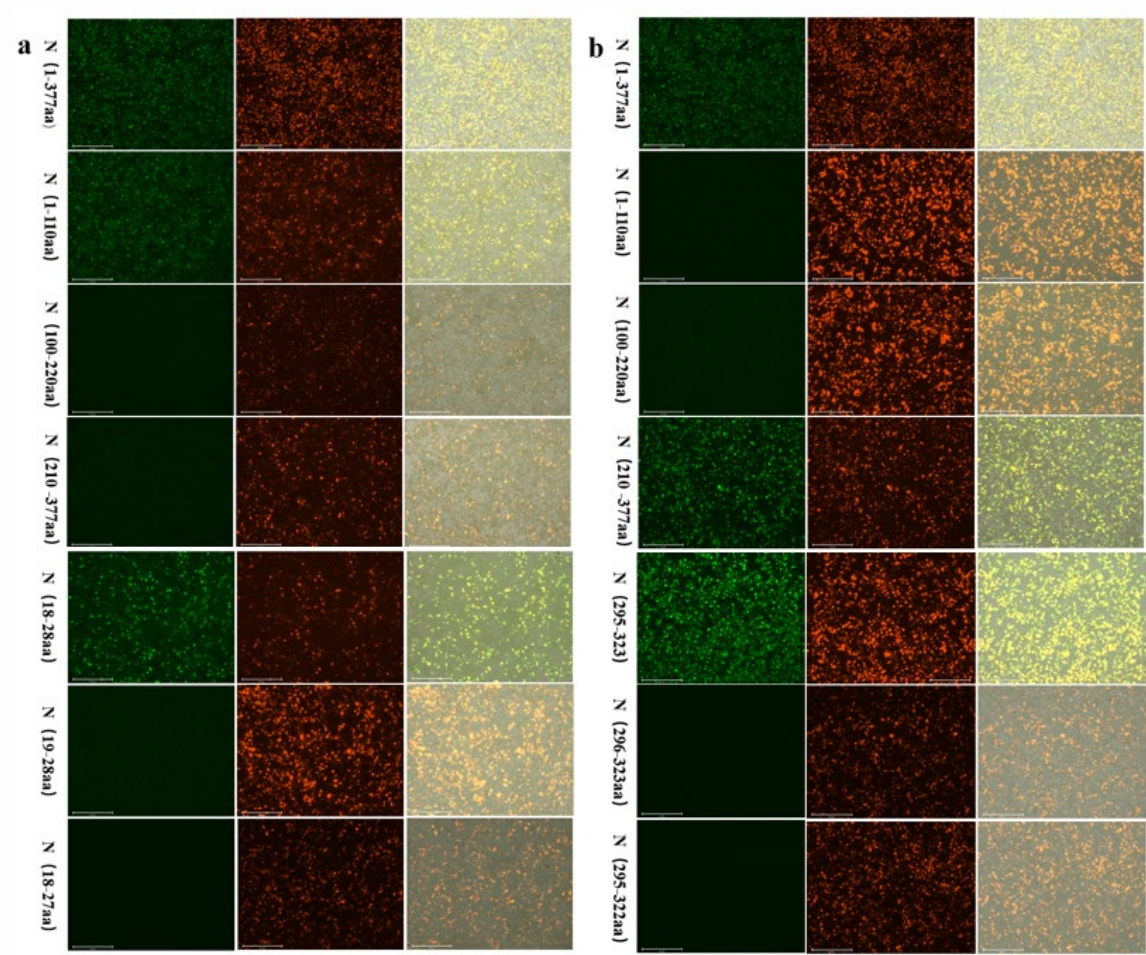


图 3-8 IFA 方法鉴定 mAb 2G7 和 mAb 3H5 抗原表位（标尺：275μm）

(a) mAb 2G7 抗原表位的 IFA 鉴定结果；(b) mAb 3H5 抗原表位的 IFA 鉴定结果

Fig. 3-8 Identification of mAb 2G7 and mAb 3H5 epitopes by IFA (Scale bars: 275μm)

(a) IFA identification of mAb 2G7 epitopes; (b) IFA identification of mAb 3H5 epitopes

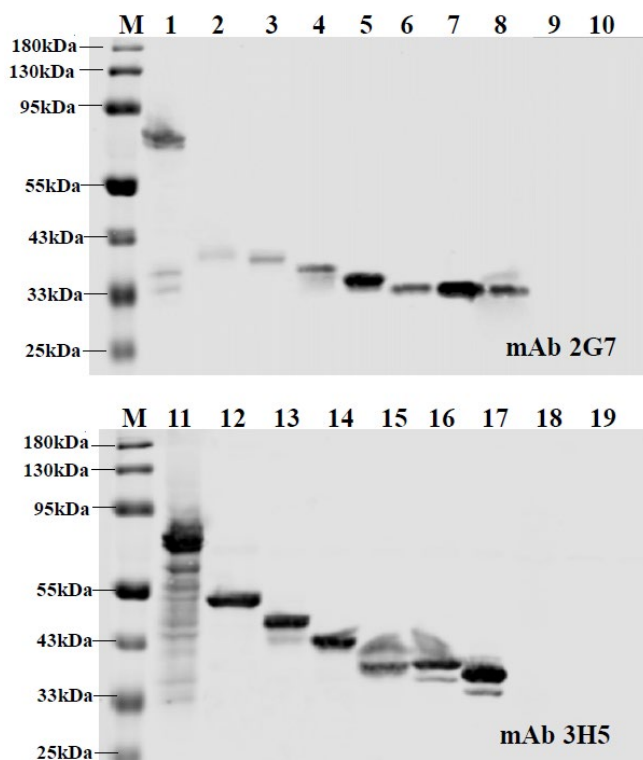


图 3-9 Western blot 方法鉴定 mAb 2G7 和 mAb 3H5 的抗原表位

M: Protein Marker; 1: N 蛋白 (1-377 aa); 2: 短肽 (1-110 aa); 3: 短肽 (1-66 aa); 4: 短肽 (1-44 aa); 5: 短肽 (14-34 aa); 6: 短肽 (18-32 aa); 7: 短肽 (18-30 aa); 8: 短肽 (18-28 aa); 9: 短肽 (19-28 aa); 10: 短肽 (18-27 aa); 11: N 蛋白 (1-377 aa); 12: 短肽 (210-377 aa); 13: 短肽 (220-337 aa); 14: 短肽 (274-377 aa); 15: 短肽 (295-325 aa); 16: 短肽 (295-324 aa); 17: 短肽 (295-323 aa); 18: 短肽 (296-323 aa); 19: 短肽 (295-322 aa)

Fig. 3-9 The epitopes of mAb 2G7 and mAb 3H5 were identified by Western blot

M: Protein Marker; 1: N protein (1-377 aa); 2: peptide (1-110 aa); 3: peptide (1-66 aa); 4: peptide (1-44 aa); 5: peptide (14-34 aa); 6: peptide (18-32 aa); 7: peptide (18-30 aa); 8: peptide (18-28 aa); 9: peptide (19-28 aa); 10: peptide (18-27 aa); 11: N protein (1-377 aa); 12: peptide (210-377 aa); 13: peptide (220-337 aa); 14: peptide (274-377 aa); 15: peptide (295-325 aa); 16: peptide (295-324 aa); 17: peptide (295-323 aa); 18: peptide (296-323 aa); 19: peptide (295-322 aa)

3.3.7 抗原表位的保守性分析

为了确定 mAb 2G7 和 3H5 所识别的线性表位的保守性, 对 45 株 FCoV 全基因组序列进行比对分析后, 确定抗原表位特异性识别的表位氨基酸序列的具体位置 (图 3-10), 然后将 45 株 FCoV 对应的抗原表位氨基酸序列分别导入到 DNAMAN 软件进行分析, 得到的结果显示, mAb 2G7 抗原表位与毒株序列同源性为 97.78%, mAb 3H5 抗原表位与毒株序列同源性为 98.62%。同源性结果表明, 这两株单克隆抗体不仅具有强大的特异性, 而且具有广泛的适用性, 能够广泛识别 FCoV 毒株。

在 45 株 FCoV 全基因组序列中, mAb 2G7 的抗原表位仅有 6 株 FCoV 发生单碱基突变, 2 株为双碱基突变。在相同的 45 株毒株序列中, mAb 3H5 的抗原表位有 8 株 FCoV 发生单碱基突

变，3 株为双碱基突变。较少的突变通常意味着表位更为保守。

因此 mAb 2G7 和 mAb 3H5 能够广泛而有效识别 FCoV，为其在实际应用中的稳定性和可靠性提供了有力保障。

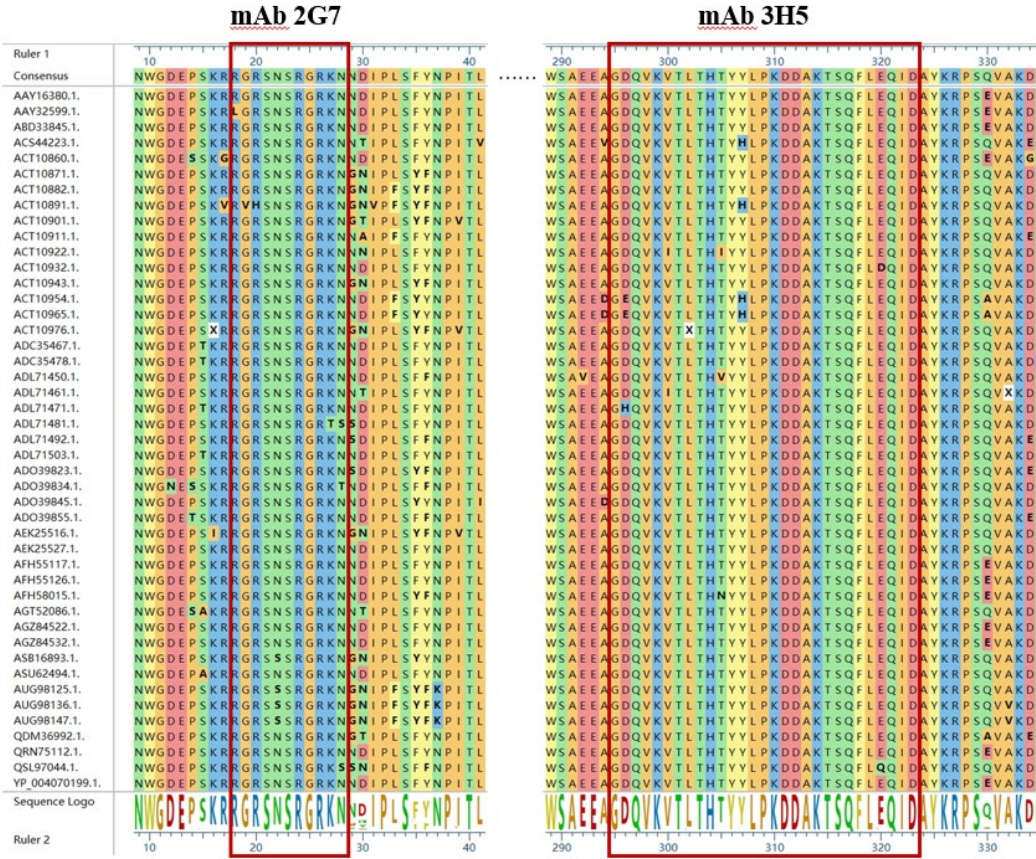


图 3-10 mAb 2G7 和 mAb 3H5 抗原表位保守性分析

Fig. 3-10 Epitope conservation analysis of mAb 2G7 and mAb 3H5

3.3.8 免疫层析试纸条的研制与评价

3.3.8.1 免疫层析条的制备

深圳市真瑞生物技术有限公司成功制备了胶体金免疫层析试纸条，检测原理图如图 3-11 所示。

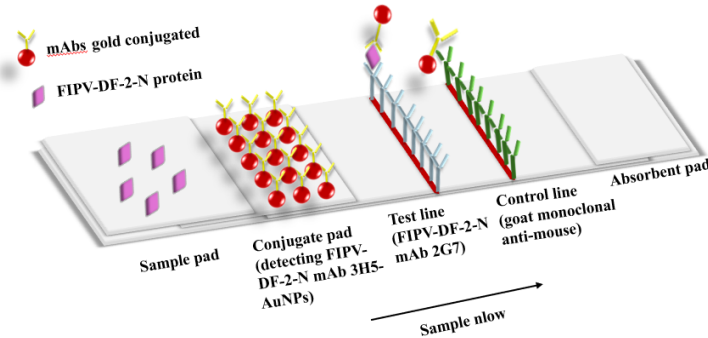


图 3-11 双抗体夹心法胶体金免疫层析条检测示意图

Fig. 3-11 Schematic Diagram of Double Antibody Sandwich Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for Detection.

3.3.8.2 免疫层析条的灵敏性评价

重组 pCold I-FIPV-DF-2-N 蛋白经过 2 倍比稀释, 浓度梯度设置为 6715.0 ng/mL、3357.5 ng/mL、1678.8 ng/mL、839.4 ng/mL、419.7 ng/mL、209.8 ng/mL、104.9 ng/mL 和 52.5 ng/mL, 用免疫层析试纸条对这些不同浓度的蛋白样本进行检测。当检测浓度为 209.8 ng/mL 时, 免疫层析试纸条中仍可见相对清晰的检测线 (图 3-12)。表明本研究制备的试纸具有良好的灵敏性。



图 3-12 免疫层析条的灵敏性评价

Fig. 3-12 Sensitivity evaluation of immunochromatographic strips

3.3.8.3 免疫层析条的特异性评价

特异性试验检测结果显示, 使用免疫层析试纸条检测 FPV、FCV 和 FHV 时无交叉反应, 显示出良好的特异性 (图 3-13)。免疫层析试纸条检测 FCoV 具有良好的反应性和特异性。

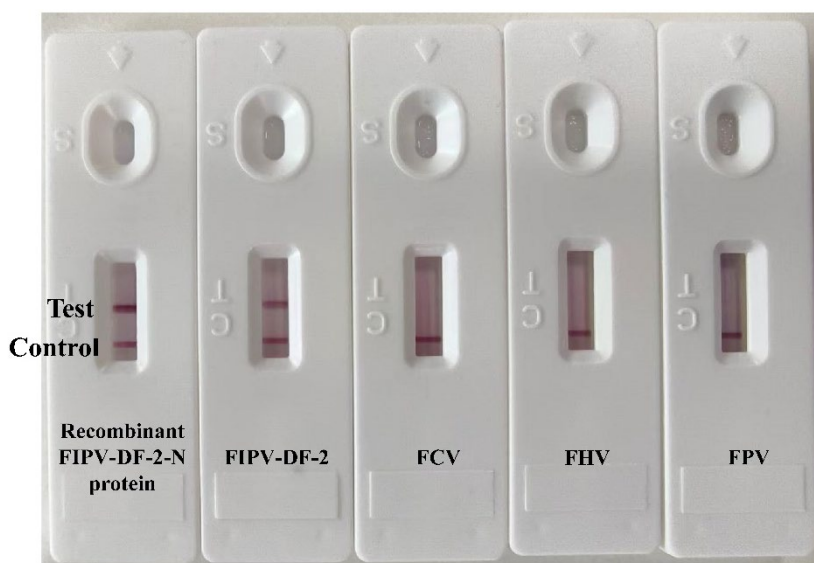


图 3-13 免疫层析条的特异性评价

Fig. 3-13 Specificity evaluation of immunochromatographic strips

3.3.8.4 免疫层析条的临床样品检测

本研究采用胶体金免疫层析试纸条对 10 份猫腹水临床样本进行了检测，并通过 Xiao 等建立的常规 PCR 方法 (XIAO et al., 2022) 进一步验证了检测结果。检测结果如图 3-14 所示，有 7 份样品呈阳性反应 (样品 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8)，在检测线上呈现明显的红色变化，表明目标抗原的存在。其余 3 份呈阴性反应 (样品 3, 9, 10)，未见明显颜色变化，提示缺乏靶抗原。虽然试纸条提供了初步的判断依据。PCR 验证结果显示 10 份腹水样本均为阳性。免疫层析试纸条与 PCR 检测结果的总符合率为 70%，进一步验证了试纸条检测结果的可靠性。

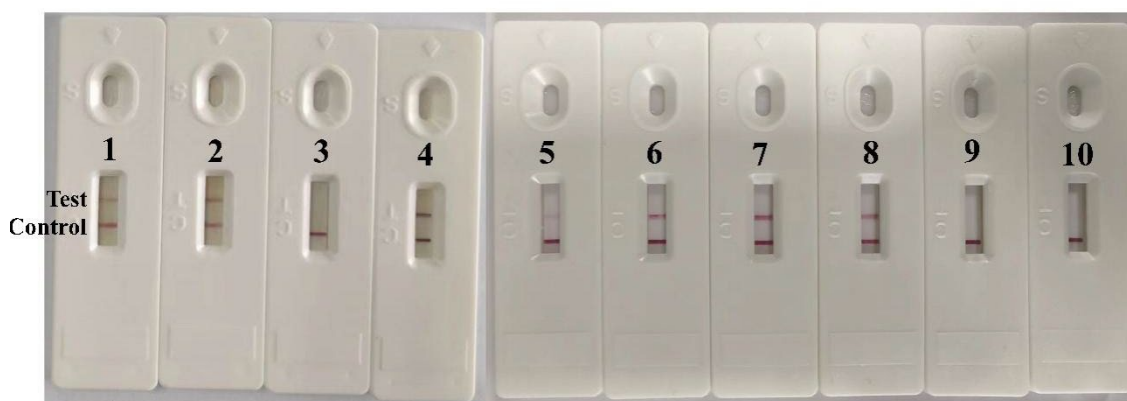


图 3-14 临床样品检测结果

1-10: 10 份猫腹水临床样品

Fig. 3-14 The results of the clinical samples

1-10: 10 clinical samples of cat ascites

3.4 讨论

FCoV 根据其临床症状可分为 FECV 和 FIPV，在猫科动物中广泛存在，其感染与猫的健康状况紧密相关。虽然大部分感染 FECV 的猫不会出现明显的临床症状，但由于其潜在的基因组突变能力可转变为 FIPV，进而引发致命的 FIP (BROWN et al., 2009)。因此，针对 FECV 的早期快速检测对于疾病的预防和控制至关重要。

目前，市场上针对 FCoV 的快速检测产品相对匮乏。虽然 RT-PCR 可进行快速检测，但普通宠物医院并没有相应的检测设备，这极大地影响了病情的发现及治疗。为解决这一问题，本研究建立了检测 FCoV 的胶体金免疫层析试纸条，可同时检测 FECV 和 FIPV。通过检测猫体内排出的 FECV 情况，可有效实施治疗，降低病毒载量，进一步防止 FECV 感染演化成 FIPV 的风险。同时，一旦检测到 FIPV，兽医也能迅速介入，及时治疗，极大地提高了治愈率，降低了猫只的死亡率。

本研究选择 FCoV-N 蛋白抗体作为胶体金试纸条的识别靶标具有多重优势。首先，N 蛋白在 FCoV 中具有高度保守性 (高雅 等, 2023)，能够有效识别多种 FCoV 毒株，从而确保试纸条对不同 FCoV 毒株的准确识别。其次，N 蛋白是整个病毒感染过程中产生的最丰富的病毒蛋白之一 (SONG et al., 2023)，因此在样本中检测到的 N 蛋白数量也相对较高，有利于提高检测的灵敏性。此外，N 蛋白在感染早期即可检测到其存在 (牛铮 等, 2021)，这有利于对冠状病毒感染的早期

诊断和干预，从而及时采取措施控制疾病的传播和治疗。并且，N 蛋白的结构相对较简单，制备和纯化相对容易，有助于降低试剂盒的生产成本，使得其在大规模生产和推广应用中更具有经济性和可行性。因此，选择 N 蛋白抗体作为胶体金试纸条的识别靶标是一种可靠、灵敏且经济有效的选择，为猫冠状病毒感染的快速检测提供了重要工具。

本研究基于 FIPV-N 蛋白的高度保守性和优良的免疫原性，利用原核表达系统成功地表达了 N 蛋白，并成功制备了两株不同抗原表位的单克隆抗体 mAb 2G7 和 mAb 3H5。这两株单克隆抗体的抗原表位与在 NCBI 上检索到的 45 株 FCoV 的同源性分别为 97.78%和 98.62%，表明这两株单克隆抗体能够广泛识别 FCoV（包括 FECV 和 FIPV）毒株，检测广谱性高。此外，抗原表位序列的高度同源性还进一步验证了 N 蛋白在 FCoV 中的高度保守性。N 蛋白作为病毒的关键结构蛋白，其保守性不仅有助于理解病毒的生物学特性，还为疫苗和药物的开发提供了重要靶点。本研究制备的两株单克隆抗体不仅为 FCoV 感染的快速检测提供了有效工具，还为 FCoV 疫苗和药物的研发提供了有力支持。

本研究利用两株高同源性的单克隆抗体 mAb 2G7 和 mAb 3H5 成功构建了双抗体夹心结构的胶体金检测试纸条。相较于多克隆抗体检测方法，具有显著的优势。单克隆抗体以其高度的特异性，在检测过程中不易与非目标分子结合，从而有效避免了假阳性结果的出现。这种高度的特异性源于单克隆抗体能够精准地识别并结合抗原上的特定表位，这使得试纸条在复杂样本中能够准确地检测 FCoV 抗原，大大提高了检测的准确性。此外，双单克隆抗体构建的双抗体夹心结构使得每个抗体的性能和特异性更易控制。在这种结构中，两株单克隆抗体分别用于捕获和检测目标抗原，从而形成了更为紧密的抗原-抗体复合物。这种结构不仅提高了检测的灵敏性，还使得试纸条的性能更加稳定可控。

本研究制备的胶体金免疫层析试纸条在临床样品检测中显示出良好的应用前景。其阳性检出率与 PCR 验证结果的总符合率为 70%，这验证了试纸条的有效性。胶体金方法受限于抗原表达的敏感性和特异性，而 PCR 方法直接检测核酸，具有更高的灵敏性和准确性。因此，在病毒载量较低或抗原表达不足时，胶体金方法可能难以准确检测，导致总符合率较低。然而，30%的不一致率也提示试纸条的性能需要进一步优化。针对这一问题，未来本研究将聚焦于裂解液配方的优化，目标是寻找更为有效的 N 蛋白释放剂，以稳定 N 蛋白的抗原性。N 蛋白作为病毒的关键结构蛋白，位于病毒内部，其成功释放对于试纸条的性能至关重要。未来通过优化裂解液配方，有望提高 N 蛋白的释放效率，进而增强试纸条对 FCoV 的检测能力。

综上所述，本研究所制备的试纸条在 FCoV 感染的快速诊断和疾病防控中展现出显著优势，为相关领域的研究和应用提供了可靠的工具，对于促进猫科动物健康、减少疾病传播具有重要意义。

第四章 结论

1. 本研究建立了一步法双重 TaqMan qPCR 检测方法，可同时对 FCoV 和 FPV 的鉴别检测。该方法通用性强、特异性强、灵敏性高、重复性好。该检测方法提升了实验室检测的灵敏性和特异性，满足了科研机构 and 动物医院对精准检测的需求。

2. 本研究制备了两株不同抗原表位的抗 FIPV-N 蛋白的单克隆抗体，并利用这两株单克隆抗体，基于双抗体夹心法制备了胶体金免疫层析试纸条，用于对 FCoV 的检测。该方法特异性强、灵敏性高。该检测方法实现了现场的快速检测，为宠物诊所、动物收容所等场景提供了便捷的检测手段。

参考文献

- 高文欣, 李希琳, 傅煜轩, 2022. 新型冠状病毒辅助蛋白 ORF3a、ORF3b 的致病机制研究. 实用临床医药杂志, 26(11): 1-5.
- 高雅, 黄金田, 冯心如, 付胜, 高娃, 王文龙, 丁玉林, 王金玲, 2023. 猫传染性腹膜炎病毒的检测及 ORF 7ab、N 和 S 基因遗传进化分析. 动物医学进展. 44(12): 60-65.
- 牛铮, 徐沙沙, 张静怡, 张依玲, 阚子斐, 张淑娟, 邹宏, 邹卓岚, 冉玲, 宋振辉, 2021. 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白的原核表达及多抗制备. 西南大学学报(自然科学版). 43(12): 1-9.
- 饶家辉, 王玉平, 雷连成, 2009. 猫细小病毒、犬细小病毒、貂细小病毒的特征比较. 中国畜牧兽医. 36(07): 166-168.
- 邢建民, 2010. 猫细小病毒病的病原分离鉴定及其病理形态学的初步观察. 吉林大学.
- 许树林, 沈秀丽, 1996. 细小病毒在肉食动物中的感染流行. 黑龙江畜牧兽医. (10): 40-43.
- 伊淑帅, 2019. 东北地区宠物猫肠道病毒组学分析及腹泻相关病毒的分子检测与进化研究. 吉林农业大学.
- 张梦薇, 陈艳, 李妍, 杨晓农, 黄坚, 2019. 成都市猫泛白细胞减少症病毒、星状病毒和肠道冠状病毒的分子流行病学调查. 中国畜牧兽医. 46(05): 1447-1455.
- 杨松涛, 王立刚, 戈锐, 刘丹, 邹啸环, 王玮, 王铁成, 周明, 冯娜, 黄耕, 华育平, 夏咸柱, 2007. 虎源猫泛白细胞减少症病毒的分离鉴定. 兽类学报. (02): 170-174.
- 张玉琼, 2020. 免疫荧光技术在临床检验中的应用. 中国实用医药. 15(29): 125-127.
- ADDIE D D, 2000. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. Vet J (London, England: 1997), 159(1): 8-9. DOI: 10.1053/tvj.1999.0429.
- ADDIE D D, SILVEIRA C, ASTON C, BRAUCKMANN P, COVELL-RITCHIE J, FELSTEAD C, FOSBERY M, GIBBINS C, MACAULAY K, MCMURROUGH J, PATTISON E, ROBERTSON E, 2022. Alpha-1 acid glycoprotein reduction differentiated recovery from remission in a small cohort of cats treated for feline infectious peritonitis. Viruses, 14(4). DOI: 10.3390/v14040744.
- ADDIE D D, TOTH S, MURRAY G D, JARRETT O, 1995. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. Am J Vet Res, 56(4): 429-434.
- ALLISON A B, HARBISON C E, PAGAN I, STUCKER K M, KAELEBER J T, BROWN J D, RUDER M G, KEEL M K, DUBOVI E J, HOLMES E C, PARRISH C R, 2012. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic parvovirus. J Virol, 86(2): 865-872. DOI: 10.1128/jvi.06187-11.
- ALMAZÁN F, GALÁN C, ENJUANES L, 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. J Virol, 78(22): 12683-12688. DOI: 10.1128/jvi.78.22.12683-12688.2004.
- AWAD R A, KHALIL W K B, ATTALLAH A G, 2018. Feline panleukopenia viral infection in cats: Application of some molecular methods used for its diagnosis. J Genet Eng Biotechnol, 16(2): 491-497. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.08.001.

- BAEK S-Y, JO J-G, SONG K-H, SEO K-W, 2017. Recurrent pericardial effusion with feline infectious peritonitis in a cat. *J Vet Clin*, 34(6): 437-440. DOI: 10.17555/jvc.2017.12.34.6.437.
- BAI Z, CAO Y, LIU W, LI J, 2021. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses*, 13(6). DOI: 10.3390/v13061115.
- BÁLINT Á, FARSANG A, ZádORI Z, BELÁK S, 2014. Comparative in vivo analysis of recombinant type II feline coronaviruses with truncated and completed ORF3 region. *PloS one*, 9(2): e88758. DOI: 10.1371/journal.pone.0088758.
- BENETKA V, KÜBBER-HEISS A, KOŁODZIEJEK J, NOWOTNY N, HOFMANN-PARISOT M, MöSTL K, 2004. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 99(1): 31-42. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.010.
- BOLIN V S, 1957. The cultivation of panleucopenia virus in tissue culture. *Virology*, 4(2): 389-390. DOI: 10.1016/0042-6822(57)90073-9.
- BREDENBEEK P J, PACHUK C J, NOTEN A F, CHARITÉ J, LUYTJES W, WEISS S R, SPAAN W J, 1990. The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59; a highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshifting mechanism. *Nucleic Acids Res*, 18(7): 1825-1832. DOI: 10.1093/nar/18.7.1825.
- BROWN M A, TROYER J L, PECON-SLATTERY J, ROELKE M E, O'BRIEN S J, 2009. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis*, 15(9):1445-1452. DOI: 10.3201/eid1509.081573.
- CAVE T A, THOMPSON H, REID S W, HODGSON D R, ADDIE D D, 2002. Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Vet Rec*, 151(17): 497-501. DOI: 10.1136/vr.151.17.497.
- CHAPMAN M S, ROSSMANN M G, 1993. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology*, 194(2): 491-508. DOI: 10.1006/viro.1993.1288.
- CHRISTENSEN J, TATTERSALL P, 2002. Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J Virol*, 76(13): 6518-6531. DOI: 10.1128/jvi.76.13.6518-6531.2002.
- CORAPI W V, DARTEIL R J, AUDONNET J C, CHAPPUIS G E, 1995. Localization of antigenic sites of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus involved in neutralization and antibody-dependent enhancement. *J Virol*, 69(5): 2858-2862. DOI: 10.1128/jvi.69.5.2858-2862.1995.
- CSIZA C K, SCOTT F W, DE LAHUNTA A, GILLESPIE J H, 1971. Pathogenesis of feline panleukopenia virus in susceptible newborn kittens I. Clinical signs, hematology, serology, and virology. *Infect Immun*, 3(6): 833-837. DOI: 10.1128/iai.3.6.833-837.1971.
- CUBUK J, ALSTON J J, INCICCO J J, SINGH S, STUCHELL-BRERETON M D, WARD M D,

- ZIMMERMAN M I, VITHANI N, GRIFFITH D, WAGONER J A, BOWMAN G R, HALL K B, SORANNO A, HOLEHOUSE A S, 2021. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat Commun*, 12(1): 1936.
DOI: 10.1038/s41467-021-21953-3.
- DESMARETS L M, VERMEULEN B L, THEUNS S, CONCEIÇÃO-NETO N, ZELLER M, ROUKAERTS I D, ACAR D D, OLYSLAEGERS D A, VAN RANST M, MATTHIJNSSENS J, NAUWYNCK H J, 2016. Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Sci Rep*, 6: 20022.
DOI: 10.1038/srep20022.
- DI MARTINO B, DI PROFIO F, MELEGARI I, MARSILIO F, 2019. Feline virome-A review of novel enteric viruses detected in cats. *Viruses*, 11(10). DOI: 10.3390/v11100908.
- DI PROFIO F, SARCHESI V, FRUCI P, ASTE G, MARTELLA V, PALOMBIERI A, DI MARTINO B, 2023. Exploring the enteric virome of cats with acute gastroenteritis. *Vet Sci*, 10(5). DOI: 10.3390/vetsci10050362.
- DONG B, ZHANG G, ZHANG X, CHEN X, ZHANG M, LI L, LIN W, 2021. Development of an indirect ELISA based on spike protein to detect antibodies against feline coronavirus. *Viruses*, 13(12). DOI: 10.3390/v13122496.
- DRECHSLER Y, ALCARAZ A, BOSSONG F J, COLLISSE E W, DINIZ P P, 2011. Feline coronavirus in multicat environments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 41(6): 1133-1169. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.08.004.
- DUTTA N K, MAZUMDAR K, GORDY J T, 2020. The nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: a target for vaccine development. *J Virol*, 94(13). DOI: 10.1128/jvi.00647-20.
- FOLEY J E, ORGAD U, HIRSH D C, POLAND A, PEDERSEN N C, 1999. Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc*, 214(1): 67-70, 43-64.
- FOLEY J E, POLAND A, CARLSON J, PEDERSEN N C, 1997a. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J Am Vet Med Assoc*, 210(9): 1307-1312.
- FOLEY J E, POLAND A, CARLSON J, PEDERSEN N C, 1997b. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc*, 210(9): 1313-1318.
- GAO Y Y, WANG Q, LIANG X Y, ZHANG S, BAO D, ZHAO H, LI S B, WANG K, HU G X, GAO F S, 2023. An updated review of feline coronavirus: mind the two biotypes. *Virus Res*, 326: 199059. DOI: 10.1016/j.virusres.2023.199059.
- HAIJEMA B J, VOLDERS H, ROTTIER P J, 2004. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol*, 78(8): 3863-3871. DOI: 10.1128/jvi.78.8.3863-3871.2004.

- HARTMANN K, 2005. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 35(1): 39-79, vi. DOI: 10.1016/j.cvsm.2004.10.011.
- HOFMANN-LEHMANN R, FEHR D, GROB M, ELGIZOLI M, PACKER C, MARTENSON J S, O'BRIEN S J, LUTZ H, 1996. Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(5): 554-562. DOI: 10.1128/cdli.3.5.554-562.1996.
- HOHDATSU T, NAKAMURA M, ISHIZUKA Y, YAMADA H, KOYAMA H, 1991. A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 120(3-4): 207-217. DOI: 10.1007/bf01310476.
- HOHDATSU T, OKADA S, ISHIZUKA Y, YAMADA H, KOYAMA H, 1992. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci*, 54(3): 557-562. DOI: 10.1292/jvms.54.557.
- HOLZWORTH J, 1963. Some important disorders of cats. *Cornell Vet*, 53: 157-160.
- HUEFFER K, PARKER J S, WEICHERT W S, GEISEL R E, SGRO J Y, PARRISH C R, 2003. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol*, 77(3): 1718-1726. DOI: 10.1128/jvi.77.3.1718-1726.2003.
- JAIMES J A, WHITTAKER G R, 2018. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology*, 517: 108-121. DOI: 10.1016/j.virol.2017.12.027.
- KATAYAMA M, UEMURA Y, 2023. Prognostic prediction for therapeutic effects of mutian on 324 client-owned cats with feline infectious peritonitis based on clinical laboratory indicators and physical signs. *Vet Sci*, 10(2). DOI: 10.3390/vetsci10020136.
- KIDA K, HOHDATSU T, FUJII K, KOYAMA H, 1999. Selection of antigenic variants of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus and analysis of antigenic sites involved in neutralization. *J Vet Med Sci*, 61(8): 935-938. DOI: 10.1292/jvms.61.935.
- KIPAR A, KREMENDAHL J, ADDIE D D, LEUKERT W, GRANT C K, REINACHER M, 1998. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *J Comp Pathol*, 119(1): 1-14. DOI: 10.1016/s0021-9975(98)80067-4.
- KOLANGATH S M, UPADHYE S V, DHOOT V M, PAWSHE M D, BHADANE B K, GAWANDE A P, KOLANGATH R M, 2023. Molecular investigation of Feline Panleukopenia in an endangered leopard (*Panthera pardus*) - a case report. *BMC Vet Res*, 19(1): 56. DOI: 10.1186/s12917-023-03612-5.
- LEUNG D T, TAM F C, MA C H, CHAN P K, CHEUNG J L, NIU H, TAM J S, LIM P L, 2004. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis*, 190(2): 379-386. DOI: 10.1086/422040.
- LEWIS K M, O'BRIEN R T, 2010. Abdominal ultrasonographic findings associated with feline

- infectious peritonitis: a retrospective review of 16 cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 46(3): 152-160. DOI: 10.5326/0460152.
- LIN P, CHENG Y, SONG S, QIU J, YI L, CAO Z, LI J, CHENG S, WANG J, 2019. Viral Nonstructural Protein 1 Induces Mitochondrion-Mediated Apoptosis in Mink Enteritis Virus Infection. *J Virol*, 93(22). DOI: 10.1128/jvi.01249-19.
- LU Y, YE Z, LIU X, ZHOU L, DING X, HOU Y, 2023. Role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in affecting immune cells and insights on its molecular mechanisms. *Exp Ther Med*, 26(5): 504. DOI: 10.3892/etm.2023.12203.
- MA Z, WANG T, LI Z, GUO X, TIAN Y, LI Y, XIAO S, 2019. A novel biotinylated nanobody-based blocking ELISA for the rapid and sensitive clinical detection of porcine epidemic diarrhea virus. *J Nanobiotechnology*, 17(1): 96. DOI: 10.1186/s12951-019-0531-x.
- MALBON A J, FONFARA S, MELI M L, HAHN S, EGBERINK H, KIPAR A, 2019. Feline infectious peritonitis as a systemic inflammatory disease: contribution of liver and heart to the pathogenesis. *Viruses*, 11(12). DOI: 10.3390/v11121144.
- MCKEIRNAN A J, EVERMANN J F, DAVIS E V, OTT R L, 1987. Comparative properties of feline coronaviruses in vitro. *Can J Vet Res*, 51(2): 212-216.
- MIETZSCH M, PÉNZES J J, AGBANDJE-MCKENNA M, 2019. Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses*, 11(4). DOI: 10.3390/v11040362.
- OSBORNE A J, HUSSAIN S S, HELMAN E E, FOOTE J B, KIUPEL M, ROWE S M, COLLINS D E, 2022. Ferret systemic coronavirus in Alpha-1 antitrypsin knockout ferrets. *Comp Med*, 72(6): 410-415. DOI: 10.30802/aalas-cm-22-000035.
- PARRISH C R, 1995. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin Haematol*, 8(1): 57-71. DOI: 10.1016/s0950-3536(05)80232-x.
- PEDERSEN N C, 1976. Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures. *Am J Vet Res*, 37(5): 567-572.
- PEDERSEN N C, 2014. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J (London, England: 1997)*, 201(2): 133-141. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.04.016.
- PFANKUCHE V M, JO W K, VAN DER VRIES E, JUNGWIRTH N, LORENZEN S, OSTERHAUS A, BAUMGÄRTNER W, PUFF C, 2018. Neuronal vacuolization in feline panleukopenia virus infection. *Vet Pathol*, 55(2): 294-297. DOI: 10.1177/0300985817738096.
- POLAND A M, VENNEMA H, FOLEY J E, PEDERSEN N C, 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol*, 34(12): 3180-3184. DOI: 10.1128/jcm.34.12.3180-3184.1996.
- PRATELLI A, 2008. Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *Vet Diagn Invest*, 20(1): 45-50. DOI: 10.1177/104063870802000108.
- PRATELLI A, YESILBAG K, SINISCALCHI M, YALÇM E, YILMAZ Z, 2009. Prevalence of feline coronavirus antibodies in cats in Bursa province, Turkey, by an enzyme-linked immunosorbent assay.

- J Feline Med Surg, 11(10): 881-884. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.02.008.
- RAND K N, HO T, QU W, MITCHELL S M, WHITE R, CLARK S J, MOLLOY P L, 2005. Headloop suppression PCR and its application to selective amplification of methylated DNA sequences. Nucleic Acids Res, 33(14): e127. DOI: 10.1093/nar/gni120.
- RAPICHA W, SAEJUNG W, KHUMTONG K, BOONKAEWWAN C, TUANTHAP S, LIEBERZEIT P A, CHOOWONGKOMON K, RATTANASRISOMPORN J, 2022. Development of colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detecting feline coronavirus. Animals (Basel), 12(16). DOI: 10.3390/ani12162075.
- ROHRBACH B W, LEGENDRE A M, BALDWIN C A, LEIN D H, REED W M, WILSON R B, 2001. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. J Am Vet Med Assoc, 218(7): 1111-1115. DOI: 10.2460/javma.2001.218.1111.
- SAIF L J, 1993. Coronavirus immunogens. Vet Microbiol, 37(3-4): 285-297. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90030-b.
- SCOTT F W, CSIZA C K, GILLESPIE J H, 1970. Maternally derived immunity to feline panleukopenia. J Am Vet Med Assoc, 156(4): 439-453.
- SETYO L, DONAHOE S L, ŠLAPETA J, 2019. Fulminant Tritrichomonas foetus 'feline genotype' infection in a 3-month old kitten associated with viral co-infection. Vet Parasitol, 267:17-20. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.12.007.
- SHIBA N, MAEDA K, KATO H, MOCHIZUKI M, IWATA H, 2007. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. Vet Microbiol, 124(3-4): 348-352. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.04.031.
- SONG X L, LI W F, SHAN H, YANG H Y, ZHANG C M, 2023. Prevalence and genetic variation of the M, N, and S2 genes of feline coronavirus in Shandong Province, China. Arch Virol, 168(9): 227. DOI: 10.1007/s00705-023-05816-4.
- STEINEL A, PARRISH C R, BLOOM M E, TRUYEN U, 2001. Parvovirus infections in wild carnivores. J Wildl Dis, 37(3): 594-607. DOI: 10.7589/0090-3558-37.3.594.
- STUETZER B, HARTMANN K, 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. Vet J (London, England: 1997), 201(2): 150-155. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.05.027.
- SUN L, XU Z, WU J, CUI Y, GUO X, XU F, LI Y, WANG Y, 2021. A duplex SYBR green I-based real-time polymerase chain reaction assay for concurrent detection of feline parvovirus and feline coronavirus. J Virol Methods, 298: 114294. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114294.
- TAKANO T, HOHDATSU T, 2015. Serological diagnosis of feline coronavirus infection by immunochromatographic test. Methods Mol Biol (Clifton, N.J.), 1282: 33-39. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_3.
- TAKANO T, TOMIYAMA Y, KATOH Y, NAKAMURA M, SATOH R, HOHDATSU T, 2011. Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats. Virus Res, 156(1-2): 72-80. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.12.020.

- TASKER S, 2018. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *J Feline Med Surg*, 20(3): 228-243. DOI: 10.1177/1098612x18758592.
- TEKES G, THIEL H J, 2016. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *Adv Virus Res*, 96: 193-218. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.002.
- TUANTHAP S, CHITEAFEA N, RATTANASRISOMPORN J, CHOOWONGKOMON K, 2021. Comparative sequence analysis of the accessory and nucleocapsid genes of feline coronavirus strains isolated from cats diagnosed with effusive feline infectious peritonitis. *Arch Virol*, 166(10): 2779-2787. DOI: 10.1007/s00705-021-05188-7.
- TULLIS G E, BURGER L R, PINTEL D J, 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol*, 67(1): 131-141. DOI: 10.1128/jvi.67.1.131-141.1993.
- WANG R, ZHANG W, YE R, PAN Z, LI G, SU S, 2020. One-step multiplex TaqMan probe-based method for real-time PCR detection of four canine diarrhea viruses. *Mol Cell Probes*, 53: 101618. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101618.
- WARD J M, MUNN R J, GRIBBLE D H, DUNGWORTH D L, 1968. An observation of feline infectious peritonitis. *Vet Rec*, 83(16): 416-417. DOI: 10.1136/vr.83.16.416.
- WASMOEN T L, KADAKIA N P, UNFER R C, FICKBOHM B L, COOK C P, CHU H J, ACREE W M, 1995. Protection of cats from infectious peritonitis by vaccination with a recombinant raccoon poxvirus expressing the nucleocapsid gene of feline infectious peritonitis virus. *Adv Exp Med Biol*, 380: 221-228. DOI: 10.1007/978-1-4615-1899-0_36.
- WOLFE L G, GRIESEMER R A, 1966. Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet*, 3(3): 255-270. DOI: 10.1177/030098586600300309.
- WORTHING K A, WIGNEY D I, DHAND N K, FAWCETT A, MCDONAGH P, MALIK R, NORRIS J M, 2012. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *J Feline Med Surg*, 14(6): 405-412. DOI: 10.1177/1098612x12441875.
- XIAO X, HAO X, CHEN B, ZHOU P, LI S, 2022. Two multiplex PCR methods for detecting several pathogens associated with feline respiratory and intestinal tracts. *Vet Sci*, 10(1). DOI: 10.3390/vetsci10010014.
- YIN Y, LI T, WANG C, LIU X, OUYANG H, JI W, LIU J, LIAO X, LI J, HU C, 2021. A retrospective study of clinical and laboratory features and treatment on cats highly suspected of feline infectious peritonitis in Wuhan, China. *Sci Rep*, 11(1): 5208. DOI: 10.1038/s41598-021-84754-0.
- YU L, ZHANG L, SUN L, LU J, WU W, LI C, ZHANG Q, ZHANG F, JIN C, WANG X, BI Z, LI D, LIANG M, 2012. Critical epitopes in the nucleocapsid protein of SFTS virus recognized by a panel of SFTS patients derived human monoclonal antibodies. *PloS one*, 7(6): e38291. DOI: 10.1371/journal.pone.0038291.
- ZENG Y F, CHEN C M, LI X Y, CHEN J J, WANG Y G, OUYANG S, JI T X, XIA Y, GUO X G, 2020. Development of a droplet digital PCR method for detection of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Microbiol*, 20(1): 179. DOI: 10.1186/s12866-020-01857-w.

ZHANG X, YAO M, TANG Z, XU D, LUO Y, GAO Y, YAN L, 2020. Development and application of a triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, and duck Tembusu virus. BMC Vet Res, 16(1): 203. DOI: 10.1186/s12917-020-02399-z.