



牛疱疹病毒 I 型 (BHV-1) 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用*

王吉 付瑞 李晓波 王淑菁 王莎莎 李威
秦骁 黄宗文 巩薇 岳秉飞 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院 国家实验动物微生物遗传检测中心, 北京 100050)

摘要:目的 建立牛疱疹病毒 I 型 (BHV-1) 实时荧光定量 PCR 检测方法, 用于牛源性样本中 BHV-1 的快速检测。方法 根据已发表的 BHV-1 *gB* 基因设计特异引物和 TaqMan 探针, 建立 BHV-1 实时荧光定量 PCR 方法。并对方法的特异性、敏感性、重复性稳定性等进行测定。用建立的方法对 181 份牛源性样本进行检测。结果 建立的 BHV-1 荧光定量 PCR 检测方法与牛副流感病毒 III 型 (BPIV3)、牛病毒性腹泻病毒 1 型 (BVDV1)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1)、猫疱疹病毒 1 型 (FHV-1) 均无交叉反应; 检测灵敏度可达到 1×10^1 copies/ μ L; 批内变异系数均小于 5%。应用建立的方法检测 181 份牛源性样本, 有 6 份样本 BHV-1 核酸为阳性。结论 建立的 BHV-1 荧光定量 PCR 检测方法具有快速、特异、敏感及稳定的特点, 可用于牛源性样本中 BHV-1 污染的检测。

关键词:牛疱疹病毒 I 型; 实时荧光定量 PCR; 牛源性样本

中图分类号: R372 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)05-0035-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.007

牛疱疹病毒 I 型 (Bovine herpesvirus type 1, BHV-1) 主要引起牛传染性鼻气管炎, 又称牛传染性鼻气管炎病毒 (infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)。BHV-1 属疱疹病毒科, 甲型疱疹病毒亚科^[1-3]。BHV-1 感染又称红鼻病或牛传染性坏死性鼻炎, 是一种急性接触性传染病, 临床特征为呼吸困难和发热, 有鼻炎、鼻窦炎、喉炎和气管炎为特征^[4-7]。除能引起呼吸道疾病外, 还可引起结膜炎、流产、脑炎和全身性感染^[8-9]。OIE 将其列为 (通报疾病) B 类疫病, 在我国将其列为二类动物疫病, 是我国进出境动物和国际动物贸易中规定的重点检疫对象^[10-11]。病毒主要存在于鼻、眼、阴道分泌物和排泄物中^[12-13]。本病主要由飞沫经呼吸道传播, 吸血昆虫 (软壳蜱等) 也可传播本病。在自然条件下, 各种年龄和品种的牛均易感, 一般发病率为 20% ~ 100%, 死亡率为 1% ~ 12%^[2, 14-15]。在国内外的养牛场广泛流行, 大部分省份的奶牛、肉牛、牦牛等均有不同程度感染, 是一种严重危害养牛业的传

染病^[11, 16]。

随着牛源性生物制品开发利用的日益增多, 人们对牛源性制品是否潜在病毒污染, 对潜在病毒是否会通过直接或间接途径对人造成危害或者传染病的扩散也越来越关注^[17]。为保障人民用药的安全及避免传染病的扩散, 最大限度地降低使用牛源性生物制品而引起牛疱疹病毒 I 型传播的风险, 实验建立了特异、敏感, 操作快速、简便的 BHV-1 实时荧光定量 PCR 方法, 用于开展对牛及人用牛源性生物制品及原辅材料可能潜在的 BHV-1 的检测, 对保证牛源性材料及牛源性制品的使用安全性、保障人民的用药安全至关重要。

1 材料与方

1.1 病毒及样品

牛疱疹病毒 I 型 (Bovine herpesvirus type 1, BHV-1)、牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza

收稿日期: 2019-05-27

* 基金项目: 中国食品药品检定研究院 学科带头人基金项目 (No.2015X5)

作者简介: 王吉 (1974—), 女, 研究员, 从事微生物学和免疫学研究. E-mail: wj_nd_jds@ sina.com

通信作者: 岳秉飞 (1960—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学. E-mail: y6784@ 126.com



virus type3, BPIV3)、牛病毒性腹泻病毒 1 型 (Bovine viral diarrhea virus type 1, BVDV1)、猫疱疹病毒 I 型 (Feline herpesvirus 1, FHV-1) 购自美国 ATCC (编号分别为 VR-188、VR-281、VR-1422、VR-636); 猪伪狂犬病毒 (Porcine pseudorabies virus, PRV)、单纯疱疹病毒 I 型 (Herpes simplex virus 1, HSV-1): 本室保存; BHV-1 pGEM-T Easy-pol 质粒标准品: 委托宝生物工程 (大连) 有限公司合成; 145 份牛血浆样本 (编号分别为 X1~X145): 来自内蒙古自治区某奶牛养殖场和北京市某奶牛和肉牛饲养单位; 36 批次人用牛源样本 (编号: Ny1-Ny41): 国内 7 省市 11 个厂家和国外 2 个厂家提供。

1.2 主要试剂及主要仪器

RNA 快速提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶和

100 bp DNA marker 均购自 TaKaRa 公司; TaqMan Gene Expression Master Mix: 美国 ABI 公司; PCR 仪: 美国 Bio-RAD 公司; 核酸琼脂糖凝胶电泳仪: 美国 Bio-RAD 公司 PwerPac Basic; 凝胶成像分析仪: 美国 Kodak 公司 GL212Pro; 荧光定量 PCR 仪: 美国 Applied Biosystems 公司 7500fast Real-Time PCR System。

1.3 引物及探针的设计合成

分析已报道的 BHV-1 基因组序列, 将不同株进行比对, 根据 GenBank 中登陆的 BHV-1 *gB* 基因 (序列号: AJ004801.1), 采用 ABI PrimerExpress 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件, 设计合成 TaqMan 探针及引物。探针的荧光标记选择 FAM (5' 端) 作为报告发光基团, NFQ (3' 端) 为淬灭基团, 引物和探针由美国 ABI 公司合成。序列如下 (见表 1):

表 1 用于扩增 *gB* 基因的引物与 TaqMan 探针序列

Table 1 The sequences of primers and TaqMan probes to used for amplification *gB* gene

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	序列位置 Sequence site	扩增子大小 (bp) Amplicon site
BH-1F	CCGCGAGCGCTACAAC	56701~56716	58
BH-1R	CGCCAGGTACGTCTCCAA	56741~56758	
探针 Prope	FAM- CTGCCCGACAGCAGC -MGB	56725~56739	/

1.4 病毒 DNA/RNA 提取

按照 DNA/RNA 快速提取试剂盒操作方法, 对正常牛肾细胞 (Bovine kidney cells, MDBK 细胞)、BHV-1 感染 MDBK 细胞毒、BPIV3、BVDV1、PRV、FHV-1、HSV-1 进行 DNA/RNA 提取。提取的 DNA 样本冻存于 -70 °C 冰箱备用。提取的 RNA 样本立即进行 cDNA 合成。

1.5 实时荧光定量 PCR 扩增体系及标准曲线的建立

1.5.1 通过优化在荧光定量 PCR 反应体系中使用的探针和引物浓度, 确定最佳反应条件, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法^[18-20]。

在 96 孔板中按以下体系加样, 每个样品做 3 个重复:

Mix	10 μ L
灭菌水	8 μ L
探针+引物	1 μ L
DNA	1 μ L
总体积	20 μ L

反应条件为: 先 50 °C 保持 2 min; 然后 95 °C 预变性 10 min; 最后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个

循环, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

1.5.2 用含有目的片段的 BHV-1 质粒 pGEM-T Easy-pol 作为标准品, 根据公式 $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660)$, 算出 BHV-1 质粒标准品拷贝数。将其稀释为 $10^8 \sim 10^0$ copies/ μ L 冻存备用。取 $10^7 \sim 10^2$ copies/ μ L 作为模板按上述反应体系及反应条件进行实时荧光定量 PCR 反应, 建立标准曲线^[18-19]。

1.6 特异性试验

分别以 BHV-1 感染 MDBK 细胞毒、BPIV3、BVDV1、PRV、FHV-1、HSV-1 及正常 MDBK 细胞的 DNA/cDNA 为模板, 用建立的 Q-PCR 方法进行扩增, 检测方法的特异性。

1.7 敏感性试验

取 $10^8 \sim 10^0$ copies/ μ L 标准品用建立的荧光定量 PCR 进行检测, 每个浓度标准品各做 3 个复孔。所能检测的最小浓度梯度的循环阈值 (CT) ≤ 35 , 拷贝数 (copies) ≥ 10 时, 此浓度为方法的检测灵敏度^[17-18]。



1.8 重复性和稳定性试验

取 10^7 copies/ μ L、 10^6 copies/ μ L、 10^5 copies/ μ L 3 个不同浓度阳性标准品,用建立的方法分 3 个不同时间重复检测 3 次,计算批间变异系数,评价本方法的重复性和稳定性^[18-19]。

1.9 判断标准的制定

建立的标准曲线参数 Slope 在 $-3 \sim -3.5$ 之间、 R^2 大于或等于 0.99、Eff% 在 90%~110% 之间,实验成立可用于定量检测。

样品循环阈值 (CT) ≤ 35 ,同时拷贝数 (copies) ≥ 10 ,判定该样品检测结果为阳性;循环阈值 (CT) ≤ 35 、拷贝数 (copies) < 10 ,或者循环阈值 (CT) > 35 、拷贝数 (copies) ≥ 10 ,或者循环阈值 (CT) > 35 、拷贝

数 (copies) < 10 ,此样品超出检测限,不能确定被检样品是阳性样品,结果判为阴性^[18-19]。

1.10 应用

1.10.1 取 145 份牛血浆样本 (编号为 X1~X145) 按照 DNA 快速提取试剂盒操作方法提取样本 DNA,同时设 BHV-1、正常 MDBK 细胞对照。用建立的方法分 2 次对 10 倍稀释的 145 份血浆样本 DNA 进行检测。

1.10.2 取 36 批次人用牛源生物制品及人用牛源生物制品生产用原材料样本 (编号: Ny1~Ny36) 按 **1.10.1** 方法进行检测。36 批次牛源生物制品及原材料具体信息见表 2。

表 2 36 批次牛源样本信息

Table 2 The information of 36 bovine origin samples

单位 Manufacturer	样品名称 The name of sample	样品数量/批次 The sample quantity/batch	样品编号 Sample number
(1)	小牛血清去蛋白提取液 Deproteinised calf blood extract	5	Ny1~Ny5
(2)	小牛血清 Calf serum	6	Ny6~Ny11
(3)	小牛血清 Calf serum	2	Ny12~Ny13
(4)	小牛血清 Calf serum	1	Ny14
(5)	小牛血清 Calf serum	1	Ny15
(6)	脾多肽注射液 Lienal polypeptide injection	3	Ny16~Ny18
(7)	小牛血清去蛋白提取液 Deproteinised calf blood extract	1	Ny19
(8)	小牛血清 Calf serum	4	Ny20~Ny23
(9)	小牛血清 Calf serum	6	Ny24~Ny29
(10)	小牛血清 Calf serum	1	Ny30
(11)	小牛血清 Calf serum	1	Ny31
(12)	小牛血清 Calf serum	2	Ny32~Ny33
(13)	小牛血清 Calf serum	1	Ny34
(13)	小牛血清 Calf serum	2	Ny35~Ny36
合计 Total		36	



2 结果

2.1 标准阳性质控品的制备

经拷贝数计算公式 $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660)$ 计算, BHV-1 质粒标准品原浓度分别为 $1.12 \times 10^{11} \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的构建

用含有目的片段的质粒标准品, 分别设为 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 $1.0 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$, 作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应。扩增曲线各稀释梯度间距均匀, 线性范围和标准曲线各参数结果见图 1。

结果显示, 标准曲线参数 Slope (应在 $-3 \sim -3.5$ 之间)、 R^2 值 (应 ≥ 0.99), 扩增效率 Eff% (应在 $90\% \sim 110\%$ 之间) 均优于 Q-PCR 标准规定范围, 说明建立的方法相关性高, 定量结果有效, 可用于 BHV-1 的定量检测。

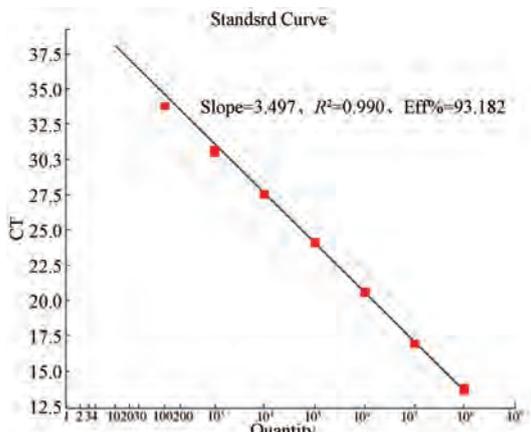


图 1 $10^7 \sim 10^1 \text{ copies}$ 标准品的扩增曲线

Fig.1 The amplification curve of $10^7 \sim 10^1 \text{ copies}$ standard

2.3 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性实验

结果如图 2 所示, BHV-1 感染 MDBK 细胞毒有明显扩增曲线, 在标准曲线参数符合要求的条件下, 其循环阈值 CT 值为 24.721, 拷贝数为 $2.42 \times 10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$, 检测结果为阳性。BPIV3、BVDV1、PRV、FHV-1、HSV-1 及正常 MDBK 细胞无曲线扩增, 检测结果均为阴性。说明所建方法特异性良好。

2.4 荧光定量 PCR 检测方法灵敏度检测

图 3、图 4 可知, 标准品稀释到 $1.0 \times 10^1 \text{ copies}$ 时有明显扩增曲线, CT 值为 32.139, 实际检测拷贝数为 13.234copies, 仍在可信范围之内; $1.0 \times 10^0 \text{ copies}$ 时有扩增曲线, CT 值为 35.539, 拷贝数为 0.772copies, 已超出可信范围。所以临界稀释度为 1.0×10^1 时, 其对应的拷贝数为 10, 因此最低检测限

度为 10 个 copies。说明建立的荧光定量 PCR 方法具有很高的灵敏度。

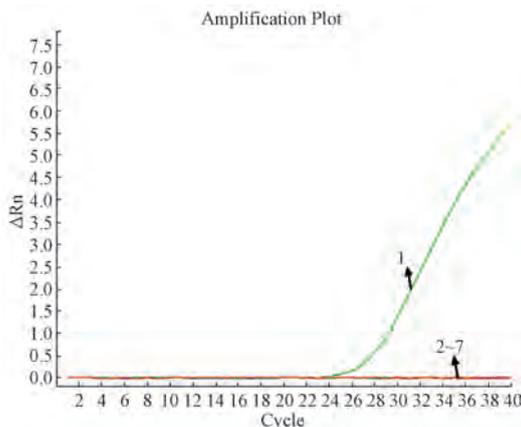


图 2 BHV-1Q-PCR 特异性检测结果

注: 1: BHV-1; 2-7: BPIV3、BVDV1、FHV-1、PRV、HSV-1、MDBK 细胞

Fig.2 Specific test results of BHV-1Q-PCR

Note: 1: BHV-1; 2-7: BPIV3、BVDV1、FHV-1、PRV、HSV-1、MDBK cell

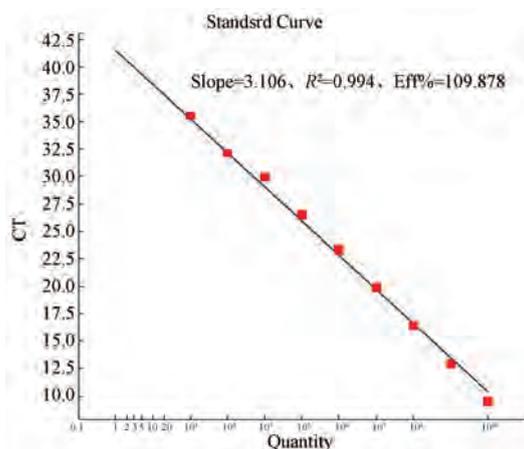


图 3 $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}$ 标准品的标准曲线

Fig.3 The standard curve of $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}$ standard

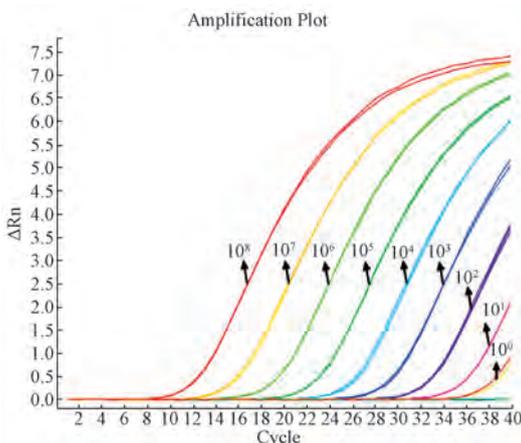


图 4 $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}$ 标准品的扩增曲线

Fig.4 The amplification curve of $10^8 \sim 10^0 \text{ copies}$ standard



2.5 实时荧光定量 PCR 方法重复性和稳定性实验

起始浓度分别为 1×10^6 copies/ μ L、 1×10^5 copies/ μ L、 1×10^4 copies/ μ L 的标准品的最终实测值的均值分别为 1.083×10^6 、 0.9248×10^5 、 0.9832×10^4

copies/ μ L,对应 CT_{SD} 值及 CV 值见表 3。3 个浓度梯度 3 次重复实验 Ct 值的变异系数(CV)均小于 5%,表明方法重复性、稳定性良好。

表 3 荧光定量 PCR 检测方法的重复性和稳定性试验结果
Table 3 The repeatability and stability testing results of Q-PCR

标准品 (copies/ μ L) standard (copies/ μ L)	实验次数 The number of experiment	每次检测 CT 均值 Every time to detect mean CT	3 次检测 CT 均值 Three times to detect mean CT	标准差 CT_{SD}	变异系数 CV (%) Coefficient of variation (%)
10^6	1	17.031	17.066	0.760	3.92
	2	17.753			
	3	16.415			
10^5	1	20.712	20.473	0.994	4.85
	2	21.326			
	3	19.381			
10^4	1	24.130	24.682	0.518	2.10
	2	24.757			
	3	25.158			

2.6 实时荧光定量 PCR 方法的应用

2.6.1 血浆样本检测结果

利用建立的方法,对 145 份牛血浆样本(编号分别为 X1~X145)分 2 次进行检测。第 1 次检测前 64 份血浆样本(编号 X1~X64),第 2 次检测后 81 份血浆样本(编号 X65~X145)。

在标准曲线参数符合要求、阴阳对照成立条件下,依据结果判定标准,结果显示有 6 份牛血浆样本(X9、X10、X121、X133、X135、X145) BHV-1 核酸阳性。其他 139 份样本均为阴性。145 份牛血浆样本检测结果阳性率为 4.14% (6/145)。

表 4 荧光定量 PCR 方法检测 145 份血浆样本阳性结果

Table 4 The positive results of Q-PCR to detect 145 plasma samples

样品编号 Sample number	CT	拷贝数 Copies	检测结果阳性率/% Positive rate
X9	31.419	47.981	4.14% (6/145)
X10	32.592	23.329	
X121	30.166	90.870	
X133	31.570	34.580	
X135	30.334	80.970	
X145	27.133	732.570	

样本 X1~X64 的扩增曲线见图 5,相应的标准品扩增曲线图见图 6;样本 X65~X145 的扩增曲线见图 7,相应的标准品扩增曲线图略。2 次检测标准曲线相关参数见表 5。

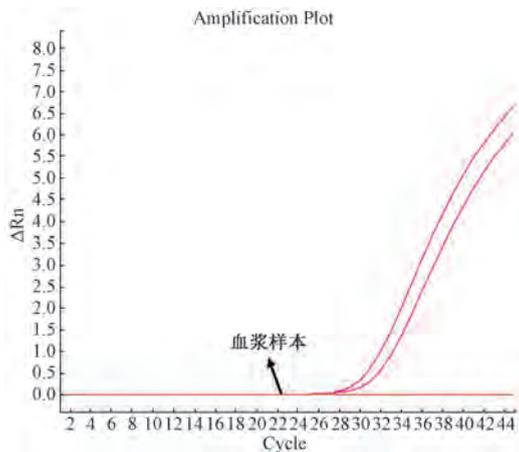


图 5 64 份 (X1~X64) 血浆样本扩增曲线

Fig.5 The amplification curve of 64 plasma samples

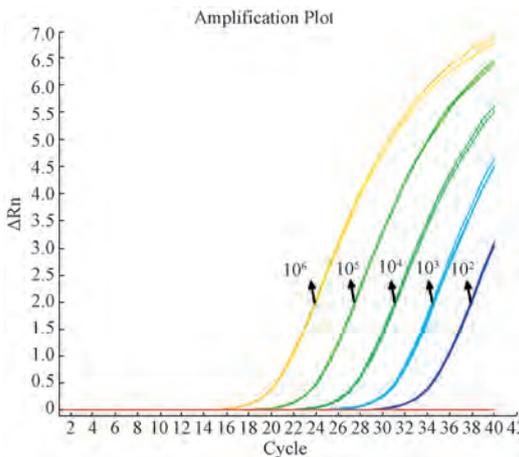


图 6 检测 64 份血浆样本的标准品扩增曲线

Fig.6 The standard amplification curve of detection 64 plasma samples

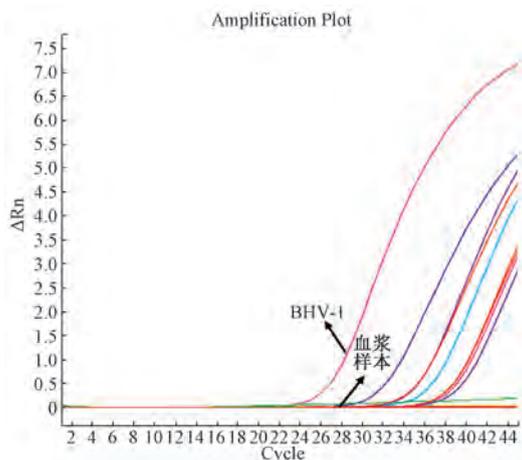


图 7 81 份 (X65~X145) 血浆样本扩增曲线

Fig.7 The amplification curve of 81 plasma samples

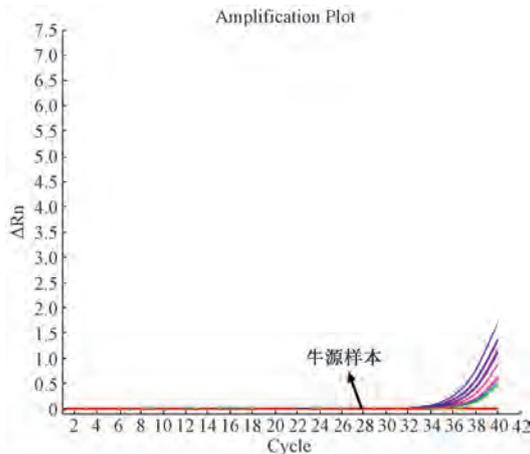


图 8 36 份牛源性样本扩增曲线

Fig.8 The standard amplification curve of 36 bovine origin samples

2.5.2 牛源性样本检测结果

在标准曲线参数符合要求、阴阳对照成立的条件下,结果显示 36 份牛源性样本均为阴性,扩增结

果见图 8,相应标准曲线扩增曲线图略。标准曲线参数见表 5。

表 5 3 次样本检测标准曲线参数

Table 5 The results of Q-PCR to detect positive samples

检测的样本 Detection of samples	构建标准曲线线性范围(拷贝/ μ L) The linear range of the constructed standard curve(Copies/ μ L)	标准曲线相关系数 Correlation coefficient of standard curve		
		Slope	R^2	Eff/%
X1~X64	$1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$	-3.396	0.999	96.979
X65~X145	$1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$	-3.359	0.998	98.464
Ny1~Ny36	$1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$	-3.346	0.999	99.013

从表 5 中可以看出 3 次样本检测标准曲线相关系数 Slope 均在 $-3 \sim -3.5$ 之间、 R^2 值均 ≥ 0.99 、扩增效率 Eff% 均在 $90\% \sim 110\%$ 之间,说明 3 次检测结果定量有效。

3 讨论

牛鼻气管炎病(疱疹病毒 I 型感染) OIE 将其列为(通报疾病) B 类疫病,我国将其列为二类动物疫病^[9-10],其传播范围广,危害大。目前国内外虽已建立了多种检测方法,包括血清学及 PCR 检测方法等^[5-6,9-11,17,21-23],但未见有针对牛源性制品及牛源制品原辅材料外源 BHV-1 检测的报道,中国药典亦没有关于牛源制品及原辅材料检测的规定^[24]。中国药典在“新生小牛血清检测”中虽然有关于新生牛血清用细胞接种法和免疫荧光法检测病毒的规定,但没有更为敏感特异的分子生物学检测方法,针对人用牛源性材料及人用牛源性生物制品的检测目前

在我国还几乎是空白^[17]。

实验室在建立 BHV-1 PCR 检测方法的基础上^[17],建立了操作更为简便、特异、敏感的 BHV-1 荧光定量 PCR 检测方法。其目的主要是用于牛及牛源性材料、人用牛源性生物制品潜在污染 BHV-1 的检测。如小牛血清去蛋白注射液、牛肉浸液、牛胆膏、牛骨粉、牛骨源性明胶,及其用于生产上述制品的原材料牛血浆、牛组织等,均可能携带外源 BHV-1。制品或原材料携带的病原体及其代谢产物可能直接感染人或动物引起人和动物本身的危害,或者通过制品或原材料污染传播疾病,导致传染性疾病的流行爆发,或病毒核酸或蛋白可能导致免疫抑制、退行性病变或癌基因的活化等潜在危害^[17]。

实验虽然没有从国内 11 个厂家和国外 2 个厂家的 36 份牛源性制品及生产制品的原材料血浆中检测出 BHV-1,但是通过对来自内蒙古某饲养场和北京某饲养单位的牛血浆进行检测,发现 2 家单位的牛均有 BHV-1 感染,而且实验室之前通过 PCR



方法也从 2 家单位的牛样本中检测到 BHV-1^[17]。我们不仅证明了建立的方法确实可以用于牛及牛源样本 BHV-1 感染的检测,同时也证明用于牛源制品生产的原材料血浆中确实存在 BHV-1 的污染可能,无疑会给人用药及传染病的传播带来潜在的风险。甚至有报道从 BHV-1 自然感染的牛的牛奶中检测到 BHV-1^[15],因此本实验室建立的方法不仅可以用于牛源生物制品及原辅材料的检测,还可用于牛奶等牛源性食品的检测,以保障牛源性食品的安全,防止牛鼻气管炎病的传播与扩散。

实验通过敏感性、特异性、重复性、稳定性方法学评价,证明建立的方法可用于牛及牛源性生物制品及其原辅材料携带外源病毒的检测,填补了我国在牛源生物制品检测技术方面的空白,为试剂盒的研发及检测技术的推广奠定了基础,为在全国范围内推动牛源制品及原辅材料外源 BHV-1 检测提供了技术支撑,同时也为制定牛源生物制品外源病毒检测技术操作规程和相关国家标准奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学 [M].2 版.北京:科学出版社,1997:988-1029.
- [2] 陈圣军,孔繁德,徐淑菲,等.牛传染性鼻气管炎检测方法的研究进展[J].经济动物学报,2013,17(1):37-40.
- [3] 乃德合.牛传染性鼻气管炎病毒 gD 蛋白主要抗原区域的高效表达、纯化与鉴定[J].中国畜牧兽医,2013,40(3):77-79.
- [4] 罗琼,李力施,陈茹,等.从进口种用奶牛中分离出传染性牛鼻气管炎病毒[J].中国兽医杂志,2005,41(9):45-46.
- [5] 王冰,张敏敏,邹新峰,等.奶牛传染性鼻气管炎病毒 gG 基因 PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2011,38(10):94-98.
- [6] 王冰,张敏敏,刘正飞,等.牛疱疹病毒 gD-PCR 鉴别检测方法的建立[J].中国奶牛,2010,12:3-6.
- [7] 杨有武.牛传染性鼻气管炎病毒的分离鉴定及 gD 基因序列分析[J].安徽农业科学,2013,41(6):2477-2479.
- [8] 宋文超,金业,吴文浩,等.传染性牛鼻气管炎病毒分离鉴定及特性分析[J].畜牧与兽医,2012,44(6):31-34.
- [9] Jefferson V A, Barber K A, El-Mayet F S, et al. Proteogenomic Identification of a Novel Protein-Encoding Gene in Bovine Herpesvirus 1 That Is Expressed during Productive Infection [J]. Viruses. 2018 Sep,10(9):499-516.
- [10] 董华兴,侯喜林,谢金鑫,等.牛传染性鼻气管炎病毒 DQ 株 gD 基因表达及其间接 ELISA 方法的建立和初步应用[J].中国兽医杂志,2011,47(2):3-5.
- [11] 王海军,王善辉,吕莉丽,等.牛传染性鼻气管炎病毒 gB 基因荧光定量 PCR 检测方法建立[J].中国动物传染病学报 2017,25(4):64-67.
- [12] 郭利,李家伟,姚庆,等.牛传染性鼻气管炎病毒 LAMP 方法的建立及与 PCR 方法的对比研究[J].中国奶牛,2017,11,奶牛保健:25-28.
- [13] 刘威,云涛.牛传染性鼻气管炎病毒内蒙古分离株 gG 基因的 PCR 扩增[J].畜牧与饲料科学,2011,32(6):8-10.
- [14] 邹世颖,何倩妮,刘蕾,等.中国北方六省市牛传染性鼻气管炎病流行病学分析[J].中国兽医杂志,2012,48(2):47-48.
- [15] Ferreira H C C, Campos M G, Vidigal P M P, et al. Latent bovine herpesvirus 1 and 5 in milk from naturally infected dairy cattle [J]. J Vet Med Sci. 2018 Oct 2. doi: 10.1292/jvms.17-0062.
- [16] 吴靖,许健,黄秀芬,等.抗牛传染性鼻气管炎病毒囊膜 gD 糖蛋白的单链抗体在昆虫细胞中表达及活性检测[J].中国畜牧兽医,2017,44(8):2475-2482.
- [17] 王吉,付瑞,李晓波,等.牛疱疹病毒 I 型病毒 PCR 检测方法的建立及在牛源样本检测中的应用[J].实验动物科学,2017,34(5):5-11.
- [18] 王吉,卫礼,付瑞,等.猫疱疹病毒 I 型实时荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J].中国比较医学杂志,2014,24(12):50-57.
- [19] 王吉,付瑞,李晓波,等.牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及在牛源样本检测中的应用[J].中国病毒病杂志,2018,8(5):393-399.
- [20] 邢进,冯育芳,岳秉飞,等.流感嗜血杆菌、溶血嗜血杆菌和多杀巴斯德杆菌多重荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用[J].实验动物科学,2017,34(3):38-42.
- [21] 宋爽,赵柏林,曲萍,等.牛病毒性腹泻病毒、牛传染性支气管炎病毒和口蹄疫病毒多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2017,39(2):133-136.
- [22] 蒋珊珊,赵莎莎,狄和双,等.牛传染性鼻气管炎病毒的荧光 PCR 检测方法[J].江苏农业科学,2013,41(1):45-47.
- [23] Pawar S S, Meshram C D, Singh N K, et al. EvaGreen-based Multiplex Real-time PCR Assay for Rapid Differentiation of Wild-Type and Glycoprotein E-Deleted Bovine Herpesvirus-1 Strains [J]. Anim Biotechnol. 2017, Jan 6:1-5.
- [24] 陈竺,邵明立,吴滨,等.《中华人民共和国药典》[S].2015 年版 三部(通则),新生牛血清检测要求,通则:144.



- [10] 陈辉,姜骊,王雁,等. 三种不同麻醉药对SD大鼠肝移植手术麻醉效果的比较和应用[J]. 实验动物科学, 2009, 26(4): 57-59.
- [11] 项华,查捷,孙建荣,等. 清洁级SD大鼠血液学与血液生化学指标正常参考值的观察[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 772-774.
- [12] 蒋中仁,徐薇,金伟,等. SD大鼠血液学指标、血生化指标及脏器比正常值范围探讨[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(10): 789-791.
- [13] 樊林花,李丹,刘茂林,等. 清洁级SD大鼠血液生理及生化指标正常参考值的观察[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(19): 33-34, 63.
- [14] Robinson K, Smith S Y, Viau A. Dog juvenile toxicity [M]// Hoberman AM. Pediatric Nonclinical Drug Testing: Principles, Requirements, and practices. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012, 183-212.

Study of Blood Index of Young SD Rats in Different Stages

SUN Chao¹, HUANG Weizhi², SNU Junmei¹, LI Xiaofei¹, TANG Liansheng¹

(1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan 250101, China)

2. Shandong College of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Yantai 264199, China)

Abstract: Objective The aim of this study is to collect physiological indicators of young SD rats at different developmental stages and establish relevant background data, to provide reference for the safety evaluation of pediatric drugs. **Method** The blood samples of about 200 young SD rats (3, 6, 8, 12 and 16 weeks) were collected, and the corresponding indexes were determined by automatic blood cell counting instrument, biochemical analyzer. **Result** From the result of each index parameter, the blood indexes of 6-week-old rats were different from those of 16-week-old rats in RBC, HGB, TP, BUN, etc. The blood indexes of 12-week-old rats had no difference from those of 16-week-old rats in WBC, HGB and BUN. **Conclusion** The result show that the blood indexes of young SD rats at different stages have a certain time correlation. Establishing background data of different stages has a certain guiding significance for statistical analysis and discussion of blood indexes of young SD rats.

Key words: young SD rats; hematology Index; blood biochemical index; background data

(上接第 41 页)

Establishment and Application of real-time fluorescent quantitative PCR Method for Detection of Bovine herpesvirus type 1

WANG Ji, FU Rui, LI Xiaobo, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao,
HUANG Zongwen, GONG Wei, YUE Bingfei, HE Zhengming

(National Institutes for food and drug Control, National Center for quality of Laboratory Animal, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in Bovine origin samples. **Method** The primers and TaqMan probe were designed and synthesized according to the published BHV-1 specific sequences of *gB* gene. Q-PCR method is established. Then carries on the specificity, sensitivity, repeatability and stability of this method were tested. The method is used to detect 181 Bovine origin samples. **Result** The developed Q-PCR method was no cross reaction with Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3), Bovine viral diarrhea virus type 1 (BVDV1), herpes virus type 1 (HSV-1), Felid herpesvirus 1 (FHV-1), and Pig pseudo rabies virus (PRV); sensitivity was 1×10^1 copies/ μ L; Coefficient of variation (CV) was less than 5%; There were 6 positive reaction detected in the 181 Bovine origin samples. **Conclusion** The developed PCR method is good in specificity, sensitivity, repeatability and stability and may be used for rapid quantitative detection the BHV-1 in Bovine origin samples.

Key words: Bovine herpesvirus type 1; Real-time fluorescent quantitative PCR; bovine Origin Sample