

猫疱疹病毒 I 型实时荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用

王 吉, 卫 礼, 付 瑞, 李晓波, 王淑菁, 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 建立猫疱疹病毒 I 型(FHV-1)实时荧光定量 PCR 检测方法,应用于实验用猫及临床患猫 FHV-1 的快速检测。**方法** 根据已发表的 FHV-1 TK 基因序列设计特异引物和 TaqMan 探针,使用分子生物学方法制备质粒标准品,建立 FHV-1 实时荧光定量 PCR 方法,并对方法的线性、特异性、敏感性、及稳定性等进行测定。用建立的方法对 48 份猫临床样品进行检测。**结果** 成功建立 FHV-1 实时荧光定量 PCR 方法;该方法的线性范围为($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$) copies/ μ L,与单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)、犬疱疹病毒(CHV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猫细小病毒(FPV)均无交叉反应,检测灵敏度可达到 10 copies/ μ L。批内变异系数均小于 5%。应用该方法从 48 份猫临床样本中检测出 33 份 FHV-1 核酸阳性。**结论** 建立的 FHV-1PCR 检测方法具有特异、敏感及稳定的特点,适合于临床 FHV-1 的快速定量检测。

【关键词】 猫疱疹病毒 I 型;实时荧光定量 PCR;猫

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0047-08

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 012. 010

Establishment and preliminary application of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of feline herpesvirus 1

WANG Ji, FU Rui, LI Wei, LI Xiao-bo, WANG Shu-jing, GONG Wei, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming,
(National Institutes for Food and Drug Control, National Center for Quality of Laboratory Animals, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a real-time fluorescent quantitative PCR (Q-PCR) method for detection of feline herpesvirus 1 (FHV-1) in experiment cats and clinical sick cats. **Methods** Primers and TaqMan probes were designed and synthesized according to the published FHV-1 specific sequences of TK gene. FHV DNA standards were prepared using molecular biological techniques. The linearity, specificity, sensitivity, stability of the established Q-PCR method were tested. The method was used to detect 48 samples of cats. **Results** The linear range was 10^2 copies/ μ L to 10^9 copies/ μ L. The developed Q-PCR method showed no cross reaction with herpes virus type 1 (HSV-1), canine herpesvirus (CHV), pig pseudo rabies virus (PRV) and cat parvovirus (FPV). The sensitivity was 10 copies/ μ L. The coefficient of variation (CV) was less than 5%. There were 33 positive cases detected in the 48 samples of cats. **Conclusions** The developed Q-PCR method is good in linearity, specificity, sensitivity, stability, and may be used for rapid quantitative detection of FHV-1 in cats.

【Key words】 Feline herpesvirus 1; Real-time fluorescent quantitative PCR; Cat

[基金项目] 实验动物质量检测关键技术研究(国家科技支撑计划项目:2013BAK11B01)。

[作者简介] 王吉(1974-),女,副研究员,研究方向:微生物学和免疫学。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

猫疱疹病毒 I 型(feline herpesvirus 1, FHV-1)又叫猫鼻气管炎病毒(feline rhinotracheitis virus),属疱疹病毒科,是有囊膜的双链 DNA 病毒。病毒直径约为 128 nm ~ 168 nm,能在猫胚肾、肺以及睾丸细胞培养物内良好增值和传代。该病毒能致发猫鼻气管炎病,猫是本病唯一的自然宿主,病猫是主要传染源,通过直接接触传播^[1-2]。主要侵害仔猫,感染猫症状严重时,出现体温升高,明显的上呼吸道感染^[1-4]。猫鼻气管炎发病率可达 100%,死亡率可达 50%。病毒在病猫的鼻、咽喉、气管和支气管以及舌、结膜等的部位增殖。该病最早从美国发现,随后在拿大、英国、荷兰、瑞士、匈牙利、越南等地发现和流行,我国已多次发现可疑病例,并分离到病毒^[3-6]。

猫作为实验动物在医学、生物学等研究领域的应用越来越广泛,在某些试验中,如降压实验、作为弱视动物模型及高血压动物模型等具有不可替代的作用^[7-9],目前在实验动物国家标准及地方标准中,均没有对实验用猫的检测要求及相关规定^[10]。

本实验旨在建立特异、敏感、快速、定量准确的 FHV-1 实时荧光定量 PCR 检测方法,通过分子生物学手段,开展对猫携带 FHV-1 核酸的检测。对今后开展实验用猫的检测工作及实验猫标准化研究具有积极的促进作用,同时通过对猫疱疹病毒携带情况的检测,为猫质量控制标准的制定提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 病毒及样品

猫疱疹病毒 I 型(FHV-1)、猫细小病毒(又称猫泛白细胞减少症)(feline panleukopenia virus, FPV):购自美国 ATCC 公司,编号分别为(VR-636、VR-652);单纯疱疹病毒 I 型(herpes simplex virus 1, HSV-1)、犬疱疹病毒(canine herpesvirus, CHV)、猪伪狂犬病毒(porcine pseudorabies virus, PRV):由中国食品药品检定研究院 实验动物质量检测室提供;pGEM-T Easy-pol 质粒标准品:委托宝生物工程(大

连)有限公司合成;pGEM T Easy 质粒(Promega 公司):宝生物工程(大连)有限公司;33 只猫的 48 份样品(眼分泌物、鼻分泌物、眼和鼻分泌物)来源于国内 7 个单位。

1.2 主要试剂

DNA 快速提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;Taq HS 酶、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、10 × PCR buffer、100 bp DNA marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;pGEM-T Easy-pol 质粒标准品:委托宝生物工程(大连)有限公司合成;pGEM T Easy 质粒(Promega 公司):宝生物工程(大连)有限公司;10 × Q-PCR MIX:美国 ABI 公司。PCR 仪:美国 Bio-Rad 公司 MyCycler;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 ABI 公司 7500 Fast Real-Time PCR System。

1.3 标准阳性质控品的制备

设计 1 对扩增 TK 基因保守区域的引物:P-1F: ATACTGTCCGCATTTACATAGA; P-1R: CGGTTCTTGAGCGTCCC。扩增片段长 531 bp (66442 ~ 66972 nt)。该片段包含了探针及其引物所要扩增和检测的片段。将该产物纯化后连接到 pGEM-T Easy 载体,并进行克隆。阳性克隆通过测序进行鉴定。培养阳性克隆菌并提取质粒,用核酸蛋白分析仪测定 A₂₆₀ nm 和 A₂₈₀ nm,并计算提取的质粒含量,质粒置 -20℃ 保存备用^[11,12]。

1.4 TaqMan 探针及引物的设计

将不同株 FHV-1 病毒序列进行比对,选择 TK 基因(序列号:FJ478159)保守区域^[6,11],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,探针和引物由美国 ABI 公司合成。序列如下(表 1):

表 1 用于扩增 TK 基因的引物与 TaqMan 探针序列
Tab.1 The sequences of primers and TaqMan probes used for amplification of TK 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 size
FHV-1F	CAGGATATCAGAAAGTTGTATGTGAGGAA	66733 ~ 66761	71
FHV-1R	GGCGAGAGGCTGTCTATCTATGATT	66803 ~ 66779	
探针 Prope	(FAM)CACCCCGACGTGACCC(NFQ)	66762 ~ 66777	/

1.5 实时荧光定量 PCR 扩增体系及标准曲线的建立

通过优化在荧光定量 PCR 反应体系中使用的探针、引物、10 × Q-PCR MIX 浓度,确定最佳反应体系为 10 × Q-PCR MIX 10 μL,探针 + 引物 1 μL, DNA 1 μL,补水至 20 μL。确定最佳反应条件为:50℃ 保持 2 min;然后 95℃ 预变性 10 min;最后 95℃ 15 s, 60℃ 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。在 96 孔板中按以下体系加样,每个样品做三个重复。

用含有目的片段的质粒 pGEM-T Easy-pol 作为标准品,根据公式 $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9})/(\text{DNA length} \times 660)$,算出质粒标准品拷贝数。将其稀释为 10^9 copies ~ 10^0 copies,作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,建立标准曲线^[12,13]。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性、重复性和稳定性检测

设定 FHV-1、FPV、HSV-1、CHV、PRV 及 CRFK 阴性对照,检测 FHV-1 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性;用实时荧光定量 PCR 检测方法对 10^5 copies/μL、 10^4 copies/μL、 10^3 copies/μL 3 个不同浓度阳性标准品,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。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测方法灵敏性检测

取 10^9 ~ 10^0 copies 标准品,进行实时荧光定量 PCR 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。

1.8 实时荧光定量 PCR 方法的应用

实时荧光定量 PCR 检测,48 份样品分 2 次检测,第 1 次检测 b1 ~ b15,第 2 次检测 y1 ~ y15、yb56、yb64、yb65、x16、x18、x19、x24、x28、x29、x38、x40、x41、x44、x46、x47、x56、x57、x63。每次设 10^7 ~ 10^3 copies 标准品和 CRFK 细胞阴性对照。标准品、阴性对照及样品均做 3 个重复。

判断标准的制定:建立的标准曲线参数 Slope 在 -3 ~ -3.5 之间、 R^2 大于 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^[12,13]。

2 实验结果

2.1 标准阳性质控品的制备

阳性克隆经测序进行鉴定,测序结果与 GenBank 中 FHV-1 标准株核苷酸序列进行比对,其同源性均为 100%,见图 1。说明成功制备了阳性质粒标准品,可作为荧光定量 PCR 检测的标准对照品。

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,质粒标准品原浓度为 2.55×10^{11} copies/μL。

2.2 实时荧光定量 PCR 扩增体系及标准曲线的建立

Feline herpesvirus 1 strain C-27, complete genome						
Sequence ID: gb FJ478159.2 Length: 135797 Number of Matches: 1						
Range 1: 66442 to 66972		GenBank	Graphics	▼ Next Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
981 bits(531)	0.0	531/531(100%)	0/531(0%)	Plus/Plus		
Query 56	ATACTGTCGCGATTACATAGATGGTGCCTATGGAATAGGTAAAGTTTAAACGGCGAAGT				115	
Sbjct 66442	ATACTGTCGCGATTACATAGATGGTGCCTATGGAATAGGTAAAGTTTAAACGGCGAAGT				66501	
Query 116	ACCTGGTCAGAGCGGATGAAATCGACCCGGGATATACTTACTACTTCCCAACCAATGC				175	
Sbjct 66502	ACCTGGTCAGAGCGGATGAAATCGACCCGGGATATACTTACTACTTCCCAACCAATGC				66561	
Query 176	TATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTGCGTGGTATCTATGCCGTCAGGACC				235	
Sbjct 66562	TATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTGCGTGGTATCTATGCCGTCAGGACC				66621	
Query 236	GGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGGCCACTATCAAG				295	
Sbjct 66622	GGAAACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGGCCACTATCAAG				66681	
Query 296	CAAGATTTCGCGACCATACCTCTCTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATC				355	
Sbjct 66682	CAAGATTTCGCGACCATACCTCTCTTTACATTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATC				66741	
Query 356	AGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCCTAATCATAGATAGACACCCCTCG				415	
Sbjct 66742	AGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCCTAATCATAGATAGACACCCCTCG				66801	
Query 416	CCTCTCTGGTCTGTTTCCGACTCGCAAGATATTTGTGGGTGATGACTCTTGGGCTCG				475	
Sbjct 66802	CCTCTCTGGTCTGTTTCCGACTCGCAAGATATTTGTGGGTGATGACTCTTGGGCTCG				66861	
Query 476	TACTTAGTCTAATGGCAACACTTCGACGAGAACCTCTGGTGGAAATCTAGTTGTAAACA				535	
Sbjct 66862	TACTTAGTCTAATGGCAACACTTCGACGAGAACCTCTGGTGGAAATCTAGTTGTAAACA				66921	
Query 536	CCTTGAATATCGAGGAACATTGAAGCGTCTCAGGGGACGCTCAAGAACCG				596	
Sbjct 66922	CCTTGAATATCGAGGAACATTGAAGCGTCTCAGGGGACGCTCAAGAACCG				66972	

Query: 测序结果;sbjct: FHV-1 文献序列

图 1 阳性克隆与 GenBank 中 FHV-1 序列比对结果

Query: The sequencing results;sbjct: Literature FHV-1 sequence

Fig. 1 Results of comparison of positive clones with FHV-1 in GenBank

对引物及探针浓度进行优化后,得到 FHV-1 扩增曲线结果如图 2。FHV-1 的循环阈值 CT 值为 14.023,拷贝数为 2.597×10^7 copies/ μ L。

用含有目的片段的质粒标准品,分别设为 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 copies/ μ L,作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,扩增曲线如图 3。扩增曲线各稀释梯度间距均匀,线性范围 1 个 log ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$ 拷贝),标准曲线相关系数 Slope 为 3.23 (在 $-3 \sim -3.5$ 之间), R^2 值为 0.997 (> 0.99) 说明相关性高,定量结果有效,扩增效率 Eff 为 103.418% (90% ~ 110% 之间)。标准品及待测样本三个重复的标准差 (CT_{SD} 值) 均小于 0.232,说明定量结果精密度高,具有很好的重复性。建立的标准曲线参数远优于标准的规定范围,可用于定量检测。

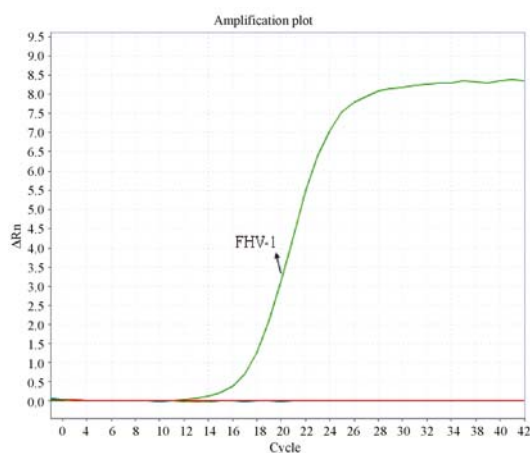


图 2 FHV-1Q-PCR 扩增曲线

Fig. 2 The Q-PCR amplification curve of FHV-1

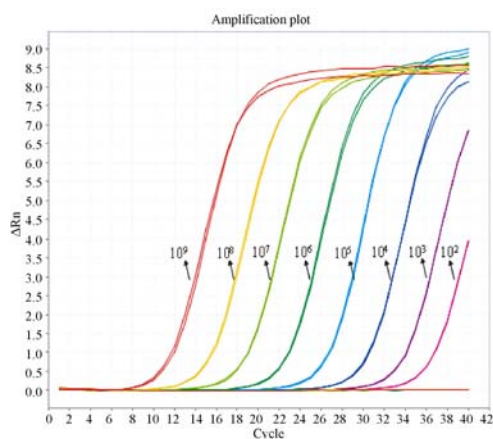


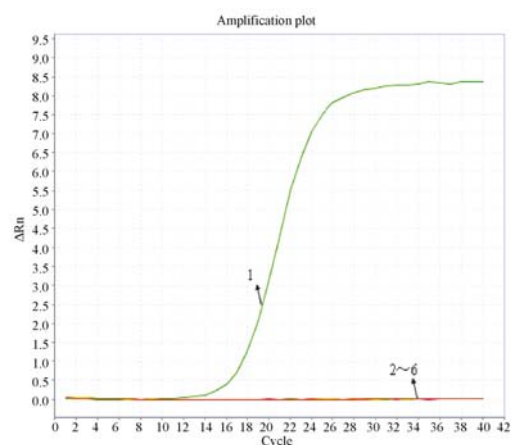
图 3 $10^9 \sim 10^2$ copies 标准品扩增曲线

Fig. 3 The amplification curves of $10^9 \sim 10^2$ copies standard

2.3 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性、准确性和稳定性检测结果

2.3.1 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性检测: 分别以 FHV-1、FPV、HSV-1、CHV、PRV 及 CRFK 细胞为模板进行检测,结果如图 4 所示,可以看出以 FPV、HSV-1、CHV、PRV 为模板,扩增曲线均为直线无扩增,阴性对照 CRFK 细胞也为直线无扩增,而以 FHV-1 为模板扩增曲线明显。说明建立的荧光定量 PCR 检测方法具有良好的特异性。

2.3.2 实时荧光定量 PCR 方法重复性和稳定性检测结果: 起始浓度分别为 1×10^5 copies/ μ L、 1×10^4 copies/ μ L、 1×10^3 copies/ μ L 的标准品的最终实测值的均值分别为 0.991×10^3 、 1.060×10^4 、 1.005×10^5 copies/ μ L,对应 CT_{SD} 值及 CV 值分别为见表 2。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。



1: FHV-1; 2-6: FPV、HSV-1、CHV、PRV、CRFK

图 4 FHV-1Q-PCR 特异性检测结果

1: FHV-1; 2-6: FPV、HSV-1、CHV、PRV、CRFK

Fig. 4 Results of specificity test of FHV-1Q-PCR

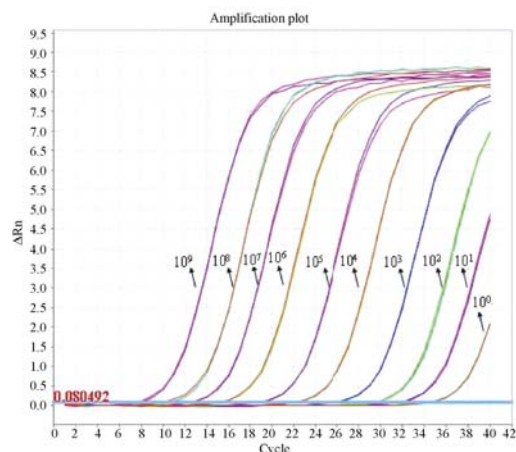


图 5 $10^9 \sim 10^0$ copies 标准品的扩增曲线

Fig. 5 Amplification curves of $10^9 \sim 10^0$ copies standard

表 2 荧光定量 PCR 检测方法的重复性和稳定性试验结果
Tab.2 The results of repeatability and stability test of the 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 Mean CT value of every time detection	3 次检测 CT 均值 Mean CT value of three times detection	标准差 CT _{SD}	变异系数 CV (%) Coefficient of variation (%)
10 ⁵	1	18.694	18.052	0.726	4.0
	2	17.264			
	3	18.197			
10 ⁴	1	22.354	22.291	0.536	2.4
	2	21.726			
	3	22.793			
10 ³	1	25.957	25.876	0.817	3.2
	2	25.021			
	3	26.649			

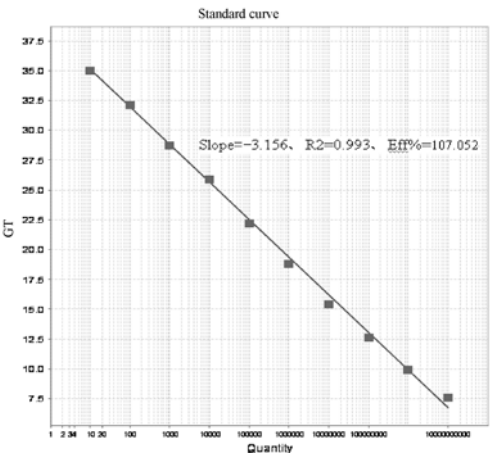


图 6 10⁹ ~ 10⁰ copies 标准品的标准曲线
Fig.6 The standard curve of 10⁹ to 10⁰ copies standard

2.4 荧光定量 PCR 检测方法灵敏度检测

如图 5、图 6 可知,扩增曲线各稀释梯度间距均匀,线性范围 (1 × 10⁰ ~ 1 × 10⁹ copies/ μ L),良好。标准曲线斜率 Slope 为 -3.156、相关系数 R² 值为 0.993 (>0.99),扩增效率 Eff% 为 107.052% (90% - 110% 之间)。标准品稀释到 1.0 × 10¹ copies/ μ L 时有明显扩增曲线,CT 值为 31.856,拷贝数为 10.23 copies,仍在可信范围之内;1.0 × 10⁰ copies/ μ L 时有扩增曲线,CT 值为 34.705,拷贝数为 1.121 copies,已超出可信范围。所以临界稀释度为 1.0 × 10¹ 时,其对应的拷贝数为 10,因此最低检测限度为 10 个拷贝/ μ L。说明建立的荧光定量 PCR 方法有很高的灵敏度。

2.5 实时荧光定量 PCR 方法的应用

将所建立的实时荧光定量 PCR 方法用于 33 只猫的 48 份样品检测,得到扩增曲线如图 3 - 7 为 b1 ~ b15 扩增曲线;图 8 为 y1 ~ y15 扩增曲线;图 9 为

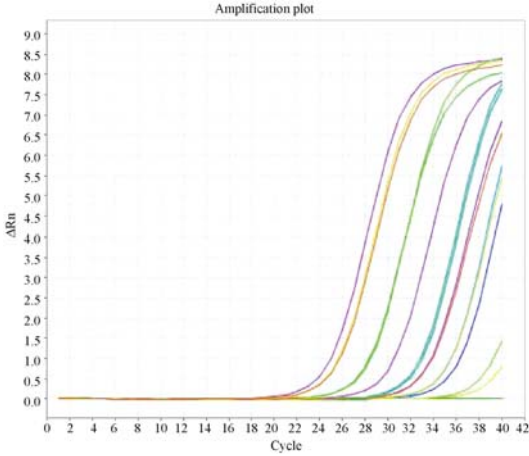


图 7 1 ~ 15 号猫鼻分泌物 (b1 ~ b15) 扩增曲线
Fig. 7 Fig. 7 The amplification curves of tested 1 - 15 nasal secretions

yb56、yb64、yb65、x16、x18、x19、x24、x28、x29、x38、x40、x41、x44、x46、x47、x56、x57、x63 扩增曲线。2 次检测标准品扩增曲线分别为图 10、图 11,标准曲线相关系数 Slope 分别为 3.19、3.27 (均在 -3 ~ -3.5 之间),R² 值分别为 0.996、0.994 (均 >0.99),扩增效率 Eff 分别为 105.127%、101.639 (均在 90% - 110% 之间)。

经过荧光定量 PCR 检测 b3、b4、b5、b6、b7、b8、b11 ~ b15, y4、y5、y6、y7、y11 ~ y15, yb56、yb64、yb65、x16、x19、x24、x28、x38、x41、x47、x56、x57、x63 的循环域值 (Ct 值均 ≥ 35) 和拷贝数 (copies 均 ≥ 10) 均在检测限之内,所以判定上述样品为荧光定量检测阳性。其他 15 份样品或循环域值 (CT) 超出检测限,或扩增拷贝数小于检测限,或同时在检测限之外,所以均判为阴性 (样品检测结果见表 3)。48 份样品检测结果阳性率为 (33/48) 68.75%, 33 只猫经检测 FHV-1 阳性率为 (23/33) 69.70%。

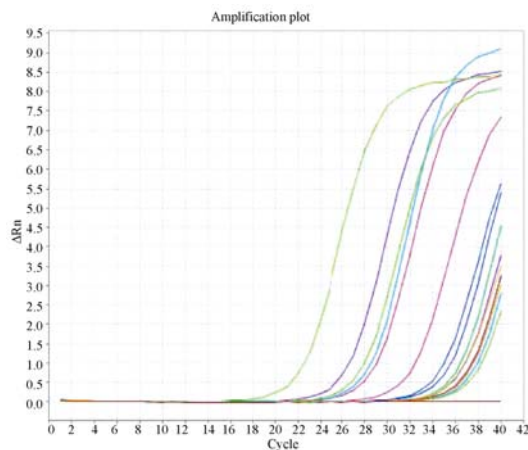


图 8 1~15 号猫眼分泌物(y1~y15)扩增曲线

Fig. 8 The amplification curves of 1-15 eye secretions

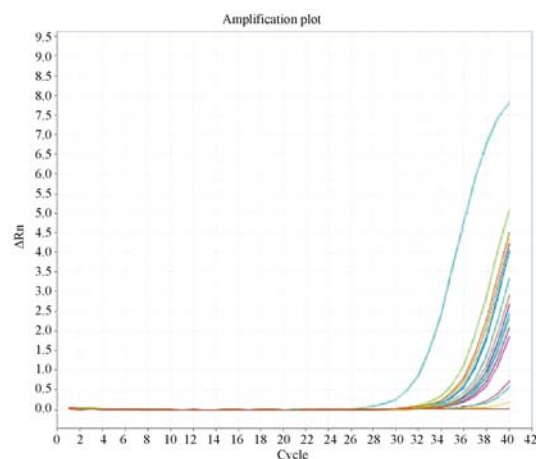


图 9 3 只猫眼鼻分泌物和 15 份血清扩增曲线

Fig. 9 The amplification curves of 3 eye and nasal secretions and 15 serum samples

3 讨论

猫可较好的耐受麻醉和一般手术,手术时能保持正常血压。在药品的降压物质检查中,猫作为中国药典规定的实验动物^[10,15],越来越多的被用于形觉剥夺性弱视、食管病等研究^[16,17]。猫作为实验动物,虽然应用越来越广泛^[18-20],但国内目前尚未见有开展猫的检测。虽然早在 1999 年,蒋虹等^[21]就建立过猫鼻气管炎病毒血清学检测方法,2011 年前刘宝山、林颖、屈哲^[22-24]先后建立了 FHV-1 PCR 检测方法,但都没有推广开来,实验用猫到目前为止也没有标准化规定。目前,实验用猫也多是从小贩或收购型饲养场购买,其来源混杂,遗传、年龄、微生物和寄生虫等携带情况不清,实验重现性差,

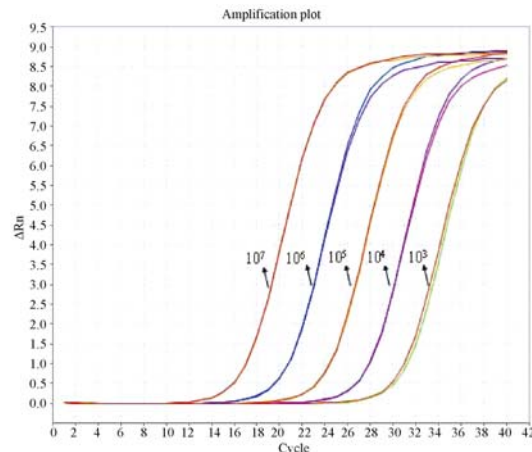


图 10 第一次检测的标准品扩增曲线

Fig. 10 The standard amplification curves of the first testing

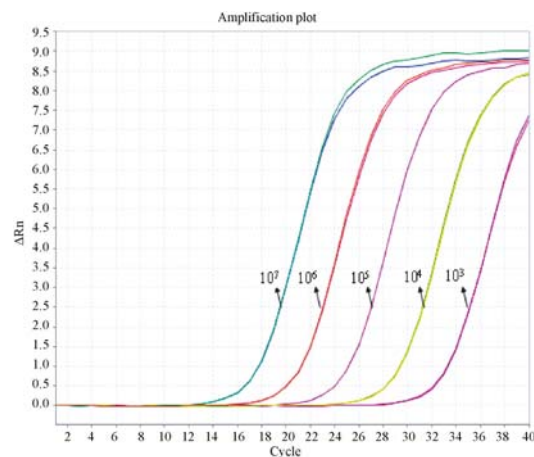


图 11 第二次检测的标准品扩增曲线

Fig. 11 The standard amplification curves of the second testing

结果隐存着未知因素的影响^[15]。FHV-1 是目前已知最重要的猫呼吸道疾病之一,其发病率和死亡率均较高,严重危害猫的健康。目前国内还没有开展猫疱疹病毒等猫易感病毒临床检测的机构,仍未见有开展实验用猫 FHV-1 检测的报道,国内也没有相关检测试剂盒的出售。

近年来,实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR) 技术以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用^[12-14]。该方法提供了用于对 FHV-1 进行实时荧光定量 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针,以实现猫 FHV-1 核酸的定量检测,提高检测的特异性和准确性。

表 3 荧光定量 PCR 方法检测 48 份样品结果
Tab.3 The results of Q-PCR detection of 48 samples

样品编号 Sample number	循环数平均值 CT _M	拷贝数平均值 Average copies	检测结果阳性率/% Result positive rate
b1	36.117	/	68.75
b2	33.913	5.183	
b3	30.735	79.42	
b4	29.661	147.446	
b5	30.473	87.094	
b6	29.549	97.575	
b7	25.148	730.59	
b8	28.627	313.54	
b9	33.617	6.397	
b10	36.923	/	
b11	21.701	10944.562	
b12	22.476	8676.703	
b13	27.314	790.912	
b14	21.901	8932.266	
b15	25.042	745.164	
y1	35.438	/	
y2	36.662	/	
y3	35.534	/	
y4	31.288	49.022	
y5	30.786	83.697	
y6	27.964	597.084	
y7	30.453	89.292	
y8	36.204	/	
y9	36.990	/	
y10	36.137	/	
y11	21.123	23867.362	
y12	18.308	232076.439	
y13	23.313	7932.428	
y14	23.679	7157.634	
y15	22.610	1.0086.526	
by56	28.565	357.692	
by64	29.126	117.524	
by65	32.257	15.623	
x16	30.167	63.654	
x18	34.737	1.537	
x19	32.552	17.239	
x24	30.879	59.627	
x28	32.387	19.253/	
x29	36.572	/	
x38	31.124	45.321	
x40	35.656	/	
x41	31.339	39.685	
x44	34.038	3.657	
x46	35.124	/	
x47	31.671	31.525	
x56	31.215	42.324	
x57	31.885	27.362	
x63	32.061	21.543	
CRFK 细胞对照 Control CRFK cells	ND	/	

+ 表示 PCR 检测结果为阳性; - 表示 PCR 检测结果为阴性; / 表示荧光定量 PCR 检测结果拷贝数超出检测限;

Note. + indicates a positive result of PCR assay; - indicates a negative result of PCR assay; / indicates that the number of copies exceeded the measurement limit of Q-PCR.

实验所建立的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法,以重组质粒为标准品,扩增曲线各稀释梯度间距均匀,线性范围 8 个 $\log(10^2 \sim 10^9)$ 拷贝)定量范围宽,标准曲线相关系数 R^2 值均为 >0.99 ,说明相关性高定量结果准确。建立的标准曲线参数(Slope 均在 $-3 \sim -3.5$ 之间、 R^2 均大于 0.99、Eff% 均在 90% ~ 110% 之间)均在规定的范围之内,优于标准。经特异性检测与猫细小病毒、单纯疱疹病毒 1 型、犬疱疹病毒及猪伪狂犬病毒均无交叉反应,证明方法特异性良好。经灵敏度检测,标准品稀释到 10^1 时仍有扩增曲线,最低可检测到 10 拷贝/ μL 。对起始浓度分别为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 拷贝/ μL 的标准品进行重复测定,CT 值变异系数均小于 5%。说明此方法具有较好的准确性和重复性^[12-14]。

用荧光定量 PCR 技术检测 FHV-1,目前在国内尚未有报道。本研究对引物和探针的浓度及反应条件进行优化,建立了特异、敏感的 FHV-1 快速定量检测方法。对猫的检测结果显示,该方法检测的 33 只猫,阳性率为 69.70% (23/33),明显高于本室建立的常规 PCR (阳性率 63.64 (21/33)) 检出率。但从检测成本考虑,荧光定量 PCR 检测成本稍高于常规 PCR。实验建立的 FHV-1 荧光定量 PCR 方法为进一步研究 FHV-1 在猫群中的流行情况以及对猫的感染机制及其致病机制奠定了基础。为实验用猫的质量控制及标准的制定提供了科学参考依据。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第2版)[M]. 北京:科学出版社,1997:1048-1051.
- [2] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京:中国农业出版社,1992:232-237.
- [3] Henzel A, Brum MC, Lautert C, et al. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil [J]. Braz J Microbiol, 2012, 43(2): 560-568.
- [4] Nakamura K, Ikeda Y, Miyazawa T, et al. Comparison of prevalence of feline herpesvirus type 1, calicivirus and parvovirus infections in and leopard cats in Vietnam [J]. J Vet Med Sci, 1999, 61(12): 1313-1315.
- [5] 黄明. 猫传染性鼻气管炎研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2013, 34(9): 80-82.
- [6] 张硕,李纯玲,汪葆月,等. 猫疱疹病毒 I 型的分离与鉴定[J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 21-25.
- [7] 刘继峰,谷昱,白玉,等. 虎皮猫用于 MZR 降压物质的检查[J]. 实验动物科学, 2009, 26(2): 33-35.
- [8] 化志鹏,江春光. 左旋多巴对形觉剥夺性弱视幼猫图形视觉诱发电位的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(5): 12-16.
- [9] 刘文舟,罗向霞,段俊国,等. 家猫高血压模型的建立及特征分析[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(10): 1881-1884.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010年版二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录 XI G: 103.
- [11] Jack HN, Deann KW, Georgette EC, et al. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs [J]. J Virol. 1989, 63(8): 3240-3249.
- [12] 张荣建. 猴腺病毒检测方法的建立与初步应用[D]. 北京:中国食品药品检定研究院, 2012.
- [13] 栗景蕊. 猴泡沫病毒(SFV)检测方法的建立与初步应用[D]. 北京:中国食品药品检定研究院, 2010.
- [14] 冯育芳,李晓波,邢进,等. 猴副流感病毒 5 型实时荧光定量 PCR 方法的建立与初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 40-43.
- [15] 刘继峰,刘军须,曾振山,等. 虎皮猫在降压物质检查中的应用[J]. 医学动物防制, 2012, 28(6): 597-599.
- [16] 化志鹏,江春光. 左旋多巴对形觉剥夺性弱视幼猫图形视觉诱发电位的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(5): 12-16.
- [17] 刘文舟,罗向霞,段俊国,等. 家猫高血压模型的建立及特征分析[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(10): 1881-1884.
- [18] 张晓艳,谢鹏雁,王化虹,等. 电针灌注食管炎猫足三里穴对下食管括约肌调节功能的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(20): 2490-2492.
- [19] 罗勋,王云,王春花,等. 猫下丘中央核 52HT/P 物质和星形胶质细胞年龄相关变化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20(3): 207-211.
- [20] 华田苗,王振华,徐金旺,等. 对比度检测学习提高猫的视觉对比敏感度[J]. 动物学研究, 2010, 31(2): 155-162.
- [21] 蒋虹,时建东,吴小闲. 猫病毒血清学检测方法的建立及初步应用[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(1): 39-41.
- [22] 刘宝山,林颖,尹荣焕,等. 猫疱疹病毒 1 型 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(1): 74-76.
- [23] 林颖,刘宝山,任会军,等. 猫传染性鼻气管炎 PCR 检测方法的建立[J]. 现代畜牧兽医, 2010, 8: 71-73.
- [24] 屈哲,徐滨蕊,睢艳平,等. 猫病毒性鼻气管炎 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(5): 25-26.

[修回日期]2014-09-29