广东农业科学 2019，46（8）：123-128
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004-874X.2019.08.017

林志雄，鱼海琼，王莹，佟铁铸，温肖会，张利，翟建新．马鼻肺炎双重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用［J］．广东农业科学，2019，46（8）：123-128.

马鼻肺炎双重荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

林志雄[1]，鱼海琼[1]，王 莹[1]，佟铁铸[1]，温肖会[2]，张 利[3]，翟建新[3]

（1. 广州海关检验检疫技术中心 / 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室，广东 广州 510623；2. 广东省农业科学院动物卫生研究所，广东 广州 510640；3. 深圳澳东检验检测科技有限公司，广东 深圳 518000）

摘 要：【目的】建立快速、准确检测马疱疹病毒 1 型（EHV1）和 4 型（EHV4）的双重荧光定量 PCR 检测方法。【方法】以 EHV1、EHV4 的全基因组序列为基础，针对糖蛋白 B（*gB*）基因的保守序列，分别设计 EHV1 与 EHV4 特异性引物和探针，筛选引物，优化反应条件，分型检测马疱疹病毒（EHV1、EHV4）。【结果】检测到 EHV1、EHV4、EIV、EAV、EVJ 和 EIAV 标准毒株，EHV1、EHV4 为阳性结果，其余病毒为阴性结果；EHV1、EHV4 DNA 模板的最低检出限为 1.47×10^2 copies/μL；检测 64 份临床样本，阳性检出率为 14.06%，病毒分离证实 100% 符合。【结论】双重荧光定量 PCR 检测方法可直接应用于检测并区分 EHV1、EHV4, 并可在短时间内获得对 EHV1/EHV4 特异性及敏感性的检测结果。

关键词：马鼻肺炎；马疱疹病毒 1 型；马疱疹病毒 4 型；实时荧光 PCR；特异性；敏感性；分型检测

中图分类号：S821.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1004-874X（2019）08-0123-06

Establishment and Application of Duplex Quantitative Real-Time PCR Method for Detection of Equine Rhinopneumonitis

LIN Zhixiong[1],YU Haiqiong[1], WANG Ying[1], TONG Tiezhu[1], WEN Xiaohui[2] , ZHANG Li[3], ZHAI Jianxin[3]

（1. *Guangzhou Custom Inspection and Quarantine Technical Center / Guangdong Provincial Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou* 510623, *China;* 2.*Instituteof Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou* 510640, *China;* 3. *Shenzhen Aodong Inspection &Testing Technology Co., Ltd., Shenzhen* 518000, *China*）

Abstract:【Objective】The study was to establish of a duplex quantitative real-time PCR method for rapid and accurate detection of equine herpesvirus 1 (EHV1) and equine herpesvirus 4 (EHV4).【Method】Based on the complete genome sequence of EHV1 and EHV4, according to the conserved sequences of glycoprotein B (*gB*) gene in GenBank, a series of specific primers and probes were designed. By selecting suitable primers, optimizing reaction conditions, two kinds of equine herpesviruses (EHV1, EHV4) were detected.【Result】The standard strains such as EHV1, EHV4, EIV, EAV, EVJ and EIAV were detected, among which EHV1 and EHV4 was positive and other stains were negative. The minimum detection limit was 1.47×10^2copies/μL. The positive detection rate in 64 clinical samples was 14.06%, which was 100% consistent with virus isolation.【Conclusion】The duplex quantitative real-time PCR detection method can be directly applied to detect and distinguish EHV1 and EHV4, and the test results of specificity and sensitivity of EHV1/EHV4 can be obtained in a short time.

Key words: equine rhinopneumonitis; EHV1; EHV4; real-time PCR; specificity; sensitivity; detection for distinction

收稿日期：2019-05-16
基金项目：广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室开放课题（IQTC201801）；国家质检总局科研计划项目（2012IK006）
作者简介：林志雄（1964—），男，硕士，高级兽医师，研究方向为出入境动物检疫，E-mail：linzhixiong@189.com

【研究意义】马鼻肺炎是描述马属动物呼吸道病、流产、新生驹肺炎或脑脊髓炎等几种疾病的总称，在全世界分布广泛。世界动物卫生组织（OIE）将其列为法定报告动物疫病[1]，我国农业部也将马鼻肺炎列为二类动物传染病，国家质量监督检验检疫局与其他国家签订的检疫条款也将其列为出入境马属动物检验检疫的疫病之一[2]。马疱疹病毒 1 型（Equine herpesvirus，EHV1）和马疱疹病毒 4 型（Equine herpesvirus，EHV4）是引起马鼻肺炎的主要病原。EHV1 是马呼吸道疾病、病毒性流产的主要病因[3]，EHV4 主要引起急性呼吸道感染[4]，从致病性来看，区分 EHV1 与 EHV4 意义重大。【前人研究进展】马鼻肺炎的诊断一般采用病毒分离培养、血清学检测、核酸检测[5]。由于 EHV1 与 EHV4 之间存在严重的血清交叉反应，目前我国还没有从血清学角度区分 EHV1 与 EHV4 的标准方法[6]，以 PCR 与荧光定量 PCR 为代表的核酸检测，对样品有较好的生物安全性，适合于早期检测[7]。ELISA 检测方法灵敏度高，但操作复杂，不适合快速筛查。【本研究切入点】相对于上述几种检测方法，实时荧光 PCR（real-time PCR）检测速度快、灵敏度高、特异性强[8]，与传统 PCR 相比具有省时、高效、成本低等优势，且结果易于观察。【拟解决的关键问题】通过设计特异性引物和探针、优化反应条件等手段，建立一种灵敏、特异、快速的双重 real-time PCR 检测方法，对 EHV1 与 EHV4 进行快速检测和分型确认。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　*毒株和标本*　选择 EHV1 和 EHV4 阳性标本各 5 份，马流感病毒（EIV）、马动脉炎病毒（EAV）、马日本脑炎病毒（EVJ）和马传染性贫血病毒（EIAV）阳性标本各 5 份，临床采集马鼻咽喉拭子共 64 份。由于试验所用的病毒株涉及保存条件要求和样本信息保密性，故病毒株测试实验和临床样本测试实验主要在广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室完成。

1.1.2　*主要试剂及仪器*　病毒核酸提取试剂购自凯杰生物工程（深圳）有限公司（QIAGEN），荧光 PCR 试剂购自美国 VitaNavi Technology 公司，pMD-18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司，探针引物由宝生物工程（大连）有限公司合成，7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统（ABI）公司。

1.2　试验方法

1.2.1　*引物设计和筛选*　分别下载 GenBank 报道的不同国家和地区的 EHV1 和 EHV4 基因序列，进行核苷酸序列同源性比对，根据比对结果将比较保守的糖蛋白 B 区（*gB*）基因作为扩增序列，根据荧光定量 PCR 引物和探针设计原则，使用 primer5.0 软件分别对 EHV1 和 EHV4 设计多套引物和探针，并对设计出的引物进行序列比对分析和特殊结构分析，再根据试验结果对几套引物探针和扩增程序进行筛选，最终选择 1 套最佳引物探针，并确定引物探针间的最佳比例。引物探针序列信息见表 1。

表 1　引物探针序列信息

Table 1　Sequence of primers and proke

引物探针 Primer and probe	序列（5′-3′）Sequence（5′-3′）
EHV1-F	CGTTTCCATCGACGGAATGAT
EHV1-R	CGGGAACCTGAGGAACGGTTA
Probe-1	ACGCTTGCGCGTTAAGACCCCG-BHQ1
EHV4-F	CATGTTTCCATGAACGGACAAAT
EHV4-R	TCTGGTGTAACCTGGGGAACTAGTA
Probe-2	ACCACGCGTACATGTCAAGACGCCT-BHQ2

1.2.2　*阳性质粒制备*　通过比对 EHV1 和 EHV4 参考毒株，扩增含有 *gB* 序列的基因片段，PCR 产物回收后与 Peasy-T3 载体连接构建成重组质粒，转化 DH5a 感受态细胞，通过氨苄蓝白斑筛选转化成功的菌株[9]，测序鉴定目的片段，提取质粒制备阳性对照。

1.2.3　*病毒核酸提取*　EHV1 和 EHV4 DNA 提取选择 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒，EIV、EAV、EVJ 和 EIAV RNA 提取选择 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒，病毒核酸提取按照试剂盒说明书进行操作。对 EIV、EAV、EVJ 和 EIAV 标准毒株的 RNA 进行反转录获得 cDNA，所有核酸 -20℃保存备用。

1.2.4　*real-time PCR 反应体系的建立和优化*　根据 Vitanavi Technology 公司 PCR 试剂盒设定 real-time PCR 的基本反应体系 25 μL。设定基本反应条件为：50 ℃ 15 min；95℃ 15 min，95 ℃ 10 s，55 ℃ 40 s，45 个循环；40 ℃ 20 s；退火时采集荧光信号。摸

索各组分对 EHV1 和 EHV4 标准毒株扩增的影响，设置了 Mg^{2+} 浓度（2、3、4、5、6mmol/L）、dNTP 浓度（0.2、0.3、0.4、0.5 mmol/L）、引物和探针的比例（1 ：1、1.5 ：1、2 ：1）和退火温度（52、55、60 ℃），分别以 EHV1 和 EHV4 标准毒株的混合核酸为模板，根据试验结果选择最佳反应体系和扩增条件。

1.2.5 敏感性试验　分别对 EHV1 和 EHV4 阳性对照进行 10 倍稀释，共稀释 10 个梯度，每个梯度 5 次重复，进行 real-time PCR 检测，确定 EHV1 和 EHV4 检测浓度的最低限以及分析方法的灵敏性。

1.2.6 特异性试验　用建立的 real-time PCR 方法分别对 5 份 EHV1、5 份 EHV4 标准毒株和逆转录后的 EIV、EAV、EVJ 和 EIAV 标准毒株（各 5 份）的 cDNA 进行检测，验证该方法的特异性。

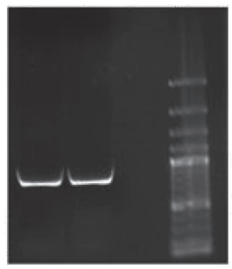
1.2.7 稳定性试验　分别以 1.47×10^5 copies/μL 的 EHV1 和 EHV4 阳性对照为模板，3 次重复，记录 *Ct* 值，计算标准差（*S*）和变异系数（*CV*），验证该方法的稳定性。将上述 3 管样本保存于 −20℃保存 4 d 和 7 d 后重复检测，记录 *Ct* 值，计算标准差（*S*）和变异系数（*CV*）以验证该阳性对照的稳定性和重复性。

1.2.8 临床样本检测　对已有的 64 份临床样本分别用本研究建立的 EHV1/EHV4 real-time PCR、常规 PCR 和病毒分离方法同时进行检测，比较 3 种方法结果的符合率。

2 结果与分析

2.1 *gB* 基因扩增及标准品制备

应用设计的 EHV 引物进行常规 PCR 扩增，结果（图 1）显示，从 EHV 中扩增到 850 bp 的 gB 基因特异性片段。产物回收后构建成重组质粒并转化至 DH5a 感受态细胞，细菌培养后提取重组质粒进行核苷酸序列测定，测序结果与原始序列片段的同源性为 99.8%，表明构建重组质粒成功。抽提质粒 DNA，经超微核酸蛋白浓度仪测定，OD_{260}/OD_{280}=1.92，质粒浓度为 1.373 μg/μL，根据公式换算的拷贝数为 1.47×10^9 copies/μL。



M：DNA 分子质量标准；1、2：*gB* 基因片段 3：阴性对照；
M: DNA Marker；1, 2: *gB gene fragment*; 3: *Negative control*

图 1　*gB* 基因扩增结果
Fig. 1　Amplification result of *gB* gene

2.2 Real-time PCR 方法的建立

2.2.1 Real-time PCR 反应体系的建立和优化　通过对 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、引物和探针的比例进行优化，结果表明，Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L，dNTP 浓度为 0.4 mmol/L，引物探针比例为 2 ：1，退火温度为 55℃时，扩增效果最佳，重复性好。最佳体系扩增效果见图 2。

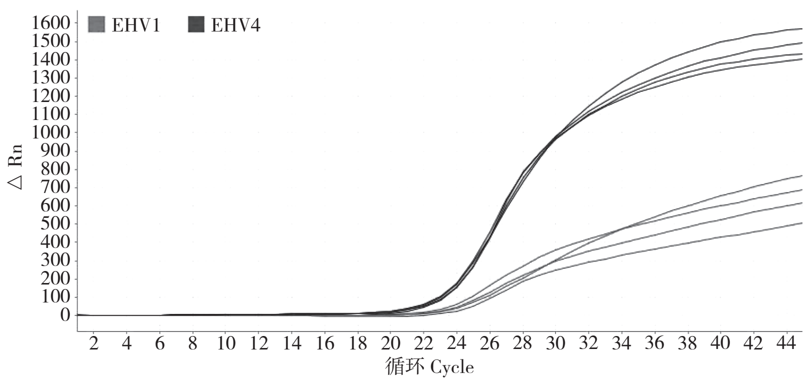


图 2　EHV1、EHV4 实时荧光 PCR 检测结果
Fig. 2　Results of duplex real-time PCR of EHV1 and EHV4

2.2.2 敏感性试验　对阳性对照进行 10 个浓度梯度稀释，图 3 所示蓝色为 EHV1 扩增曲线，红色为 EHV4 扩增曲线，均出现 7 个稀释梯度扩增曲线；质粒拷贝数为 1.47×10^2 copies/μL 时，均能检测到特异性扩增；当质粒拷贝数为 1.47×10^1 copies/μL 时，则不能检测到特异性扩增，阴

性对照也不能检测到扩增曲线。因此样本的最小检测浓度为 1.47×10^2 copies/μL。扩增线性方程为：Ct=20.907−3.214 LogC，扩增效率 E 为 104.687%，相关系数 r^2=1，证实扩增指标正常。

2.2.3 特异性实验 采用本研究建立的 EHV1、EHV4 real-time PCR 方法分别对 EHV1、EHV4、EIV、EAV、EVJ 和 EIAV 各 5 份标准毒株进行检测，结果（图 4）只有 EHV1、EHV4 出现特异性扩增，其他病毒未出现扩增。

2.2.4 稳定性试验 批内重复性试验中，相同浓度样本，检测结果见表 2，EHV1 批内变异系数为 1.68%，EHV4 批内变异数为 2.04%。批间重复性试验中，相同模板不同检测时间结果见表 3，EHV1 批间变异系数为 2.10%，EHV4 批间变异数为 2.08%。批间和批内重复性试验中 Ct 值变异系数均小于 3%，表明该方法重复性良好，能够满足实际检测的要求。

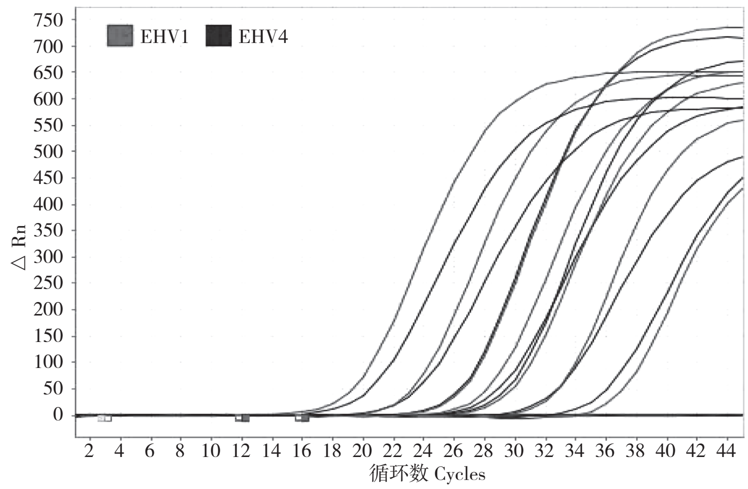


图 3 EHV1、EHV4 双重实时荧光 PCR 敏感性检测结果

Fig. 3 Sensitivity detection of EHV1 and EHV 4 by using duplex real-time PCR

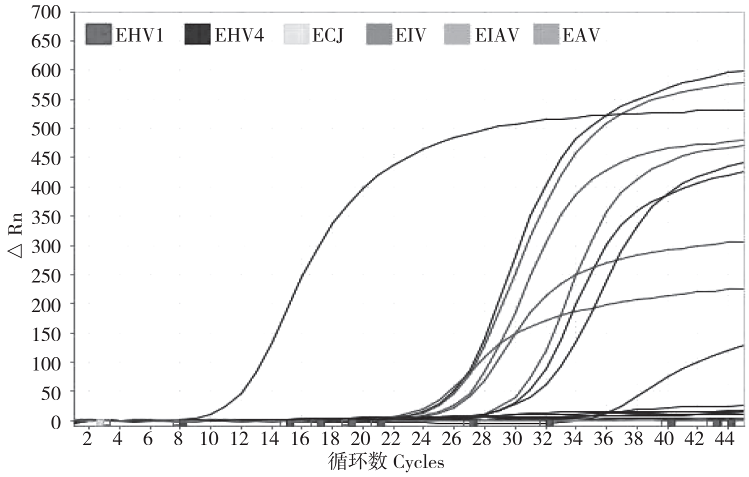


图 4 EHV1、EHV4 双重实时荧光 PCR 特异性检测结果

Fig. 4 Specific detection of EHV1 and EHV 4 by using duplex real-time PCR

表 2 批内重复性试验结果

Table 2 Result of Intra-assay repetitive experiment

样品 Sample	CT 1	2	3	SD	CV (%)
EHV1	26.4	26.9	27.3	0.45	1.68
EHV4	26.7	27.4	27.8	0.56	2.04

表 3 批间重复性试验结果

Table 3 Result of Inter-assay repetitive experiment

样品 Sample	CT 0 d	4 d	7 d	SD	CV (%)
EHV1	26.4	27.2	27.5	0.57	2.10
EHV4	26.7	27.5	27.8	0.57	2.08

2.2.5 临床样本检测　本研究建立的 real-time PCR 方法以 *Ct* 值< 35 并且扩增曲线呈“S”型为阳性判定标准。若 *Ct* 值< 35 且扩增曲线良好可直接判定为阳性；*Ct* 值在 35~38 之间需重复试验，2 次试验均能得到良好“S”型扩增曲线方可判定为阳性；*Ct* 值> 38 判定为阴性。对临床样本进行常规 PCR、real-time PCR 和病毒分离，结果显示，64 份临床样本中，常规 PCR 检出率为 9.38%（6/64）、real-time PCR 检出率为 14.06%（9/64）、病毒分离阳性率为 14.06%（9/64）。证实 real-time PCR 比常规 PCR 检测灵敏度更高。

3　讨论

EHV1 和 EHV4 引起的马鼻肺炎可导致妊娠马流产、胎儿死亡等传染性疾病，是影响我国养马业健康发展的巨大威胁，建立快速、准确的检测方法对 EHV1、EHV4 的鉴别诊断和流行病学调查具有重要意义[10]。SYBR Green 染料的荧光定量 PCR 方法是目前采用的快速检测方法之一，鉴于 SYBR Green 荧光染料的特异性欠佳，该方法对引物的设计要求很高：引物设计中不可出现反向重复序列和发夹结构，引物避免形成二聚体，更不能与模板发生错配扩增等[11]。特异性筛选实验既要保证引物的特异性，又要保证引物的各项参数符合荧光定量 PCR 反应的要求[12]。因此，设计常规引物，建立成熟的 SYBR Green 染料的荧光定量 PCR 方法有一定的挑战性。

为避免因常规引物特异性差造成检测结果假阳性等不利因素[13]，本研究设计了具有强特异性的引物和探针，并建立了检测 EHV1、EHV4 的双重荧光定量 PCR 方法。该方法可在 1 h 内分别检测 EHV1 与 EHV4，从而达到在同一反应体系内对 EHV 进行分型的要求。在设计引物过程中，我们选取 *gB* 基因中 GC 含量较高的区域，提高引物 Tm 值，从而有效防止引物二聚体的产生，并高概率地减少了非特异性扩增。

4　结论

本研究建立的双重荧光定量 PCR 的检测方法对 EHV1 与 EHV4 有特异性检出，且与其他几种马属动物易感病毒（EIV、EAV、EIAV 及 EVJ）无交叉反应。该方法最低检出限为 1.47×10^2 copies/μL，可用于检测目的基因拷贝数较低的样品，实际应用前景广阔。

参考文献（References）：

[1] 朱来华, 陈军, 刘文波, 郑小龙, 凌宗帅, 方邵庆, 姜迪来, 姜帆. 新版OIE《陆生动物卫生法典》的新变化[J]. 检验检疫科学, 2007, 4（9）: 70–74. doi: 10. 3969/j. issn. 1674–5354. 2007. 04. 021.
ZHU L H,CHEN J,LIU W B,ZHENG X L,LING Z S,FANG S Q, JIANG D L,JIANG F. The notable changes of new issue of OIE Terrestrial Animal Health Code[J]. *Inspection And Quarantine Science*, 2007,4（9）: 70–74. doi: 10. 3969/j. issn. 1674–5354. 2007. 04. 021.

[2] 朱来华, 陆承平, 梁成珠 . 马鼻肺炎的检疫[J]. 中国动物检疫, 2005, 22（3）: 46–48. doi: 10. 3969/j. issn. 1005–944X. 2005. 03. 031.
ZHU L H, LU C P, LIANG C Z. The quarantine of equine rhinopneumonitis[J]. *Chinese Journal Of Animal Quarantine*, 2005, 25（3）: 46–48. doi: 10. 3969/j. issn. 1005–944X. 2005. 03. 031.

[3] GOODMAN L B, WAGNER B, FLAMINIO M J, SUSSMAN K H, METZGER S M, HOLLAND R, OSTERRIEDER N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV–1)[J]. *Vaccine*, 2006,24 (17) : 3636–3645. doi: 10.1016/j. vaccine. 2016. 01. 062.

[4] Ostlund E N. The equine herpesviruses C [J]. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1993, 9(2):283–294.doi: 10.1007/978–1–4684–7012–35.

[5] 杨永龙, 刘建华, 宋焕堂, 李 静, 卢亚宾, 胡 月, 范斌, 况玲, 冉多良 . 新疆伊犁地区马疱疹病毒 1 型的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38（7）: 550–553. doi: 10. 3969/j. issn. 1008–0425. 2016. 07.09.
YANG Y L, LIU J H, SONG H T, LI J, LU Y B, HU Y, FAN B, KUANG L, RAN D L, Isolation and identification of equine herpesvirus 1 in Xinjiang[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38（7）:550–553.doi: 10. 3969/j. issn. 1008–0425. 2016. 07.09.

[6] 袁贝, 李海, 马陈, 赵亚南, 马玉辉, 朱义忠, 苏艳 . 新疆伊犁地区马鼻肺炎、马腺疫、马流产沙门菌病的血清学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(7): 540–543. doi: 10. 3969/j. issn.1008–0425. 2017. 07. 06.
YUAN B, LI H, MA C, ZHAO Y N, MA Y H, ZHU Y Z, SU Y. Serum epidemiology investigation of Equine rhinopneumonitis, Strangles, *Salmonella abortus* equi in Yili of Xinjiang[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(7): 540–543. doi: 10. 3969/ j. issn.1008–0425. 2017. 07. 06.

[7] 朱来华, 陆承平, 梁成珠, 王丽, 吴华, 黄丛平, 王树峰, 高宏伟, 岳志芹, 邓明俊. 应用多重PCR检测和区分3个型的马疱疹病毒[J]. 中国兽医科技, 2005(8): 595–599. doi: 10. 3969/j. issn. 1673–4696. 2005. 08. 003.
ZHU L H, LU C P, LIANG C Z, WANG L, WU H, HUANG C P, WANG S F, GAO H W, YUE Z Q, DENG M J. Detection and differentiation of three types of equine herpesviruses by multiplex PCR[J]. *Chinese*

Journal of Veterinary Science and Technology, 2005(8): 595-599. doi:10.3969/j.issn.1673-4596.2005.08.003.

[8] Quinlivan M, Cullinane A, Nelly M, VAN M K, HELDENS J, ARKINS S. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(2): 7563- 7567.doi: 10. 1128/JCM. 42. 2. 759-763. 2004.

[9] 易新萍, 单文鲁, 冉多良, 王宁, 岳城, 恩特马克 . 应用一步 PCR 法检测并鉴定马疱疹病毒 1 型和 4 型[J]. 病毒学报, 2001(2): 158-160.

YI X P, SHAN W L, RAN D L, WANG N, YUE C, ENTE-MaKe. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by one-step polymerase chain reaction[J]. *Chinese Journal Of Virology*, 2001(2): 158-160.

[10] 鱼海琼, 张树, 林志雄, 罗长保, 赵昑, 田纯见, 李守军 . 马鼻肺炎诊断方法研究进展[J]. 中国动物检疫 ,2014, 31(2): 49-52. doi: 10. 3969/j. issn. 1005-944X.2014.02.016.

YU H Q, ZHANG S, LIN Z X, LUO C B, ZHAO Y, TIAN C J, LI S J. Research advance of equine rhinopneumonitis diagnosis method[J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2014, 31(2): 49-52. doi: 10. 3969/j. issn. 1005-944X.2014.02.016.

[11] 王征, 郭巍, 姬媛媛, 曲娟娟, 赵立平, 李红梅, 相文华 . 马疱疹病毒 1 型 SYBR Green Ⅰ荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(2): 116-119. doi: 10. 3969/j. issn. 1008-0589. 2012. 02. 09.

WANG Z,GUO W,JI Y Y,QU J J,ZHAO L P,LI HM ,XIANG W H. Establishment of the SYBR Green Ⅰ real-time PCR for detection of equine herpesvirus type 1[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(2): 116-119. doi: 10. 3969/j. issn. 1008-0589. 2012. 02. 09.

[12] 朱来华, 陆承平, 黄纪徽, 梁成珠, 郑小龙, 魏乃林, 马丰忠, 于红光, 孙敏, 李强. 应用三重PCR快速同步检测和区分3种马疱疹病毒[J]. 中国兽医杂志, 2007(2): 15-17. doi: 10. 3969/j. issn. 0529-6005. 2007. 02. 005.

ZHU L H, LU C P, HUANG J W,LIANG C Z,ZHENG X L, WEI N L, MA F Z,YU H G, SUN M,LI Q. Rapid detection and differentiation of three types of equine herpesviruses by Triple PCR[J]. *Chinese Journal of V eterinary Medicine*, 2007(2): 15-17. doi: 10. 3969/j. issn. 0529-6005. 2007. 02. 005.

[13] 杨夷平, 刘建华, 冉多良, 许全圆, 李娜, 加尔肯 . 马疱疹病毒 1 型 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医 . 2014, 41(9): 35-40.

YANG Y P,LIU J H,RAN D L,XU Q Y,LI N,JIA -ErKen. Establishment of loop-mediated Isothermal amplification assay detection method of equine herpesvirus type 1[J]. *Chinese pasturage veterinary medicine*, 2014, 41(9): 35-40.

（责任编辑　崔建勋）