

## PaperPass[免费版]查重报告

## 简明打印版

## 查重结果(相似度):

总体: 18%

本地库: 18% (本地库包含期刊库、学位库、会议库、联合库)

- 期刊库: 8% (期刊库相似度是指论文与学术期刊库的比对结果)
- 学位库: 9% (学位库相似度是指论文与学位论文库的比对结果)
- 会议库: 1% (会议库相似度是指论文与会议论文库的比对结果)
- 联合库: 8% (联合库相似度是指论文与大学生联合比对库的比对结果)
- 图书库: (免费版不检测图书库)
- 专利库: (免费版不检测专利库)
- 报纸库: (免费版不检测报纸库)
- 外文库: (免费版不检测外文库)

互联网: (免费版不检测互联网资源)

检测版本: 免费版(仅检测中文)

报告编号: 6679F73189F23GYJ3

论文题目: 猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光pcr检测试剂盒+创新训练(A类)+张志成  
2024年06月25日03时39分37

论文作者: 佚名

论文字数: 10529

段落个数: 58

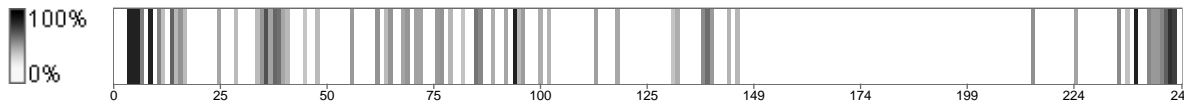
句子个数: 249

提交时间: 2024-6-25 6:46:09

比对范围: 期刊库、硕博学位库、会议库、大学生联合比对库

查询真伪: <https://www.paperpass.com/check>

## 句子相似度分布图:



## 本地库相似资源列表(期刊库、硕博学位库、会议库、大学生联合比对库):

1. 相似度: 8.0%

来源: 大学生联合比对库

2. 相似度: 1.0% 篇名: 《猫细小病毒的分离鉴定及其IgG  
F(ab)'<sub>2</sub>的制备、检验和防治效果的初步评价》

来源: 学位论文 吉林农业大学 2019

3. 相似度: 0.9% 篇名: 《猫三种易感病毒荧光定量PCR方法的建立和应用》

来源: 学位论文 2020

4. 相似度: 0.7% 篇名: 《猫呼吸道病毒混合感染病例中FHV-1的分离鉴定与致病性分析》

来源: 学位论文 2022

5. 相似度: 0.5% 篇名: 《猎豹与虎猫杯状病毒的分离及其超变区基因比较研究》

来源: 学术期刊 中国预防兽医学报 2003年3期

6. 相似度: 0.5% 篇名: 《猫杯状病毒检测方法建立、分离鉴定及感染性克隆构建》

来源: 学位论文 2021

### 互联网相似资源列表:

免费版不检测互联网资源库



# 黑龙江八一农垦大学大学生创新训练项目 计划申请书

项目编号			
项目名称	猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光 RT-PCR 检测试剂盒		
项目负责人	张志诚	联系电话	15558868818
所在学院	动物科技学院		
学号	20225032212	专业班级	动物医学（创新人才班）
指导教师			
E-mail			
申请日期	2024 年 6 月 22 日		
项目期限	一年期		

黑龙江八一农垦大学 教务处



查重 95%  
填写说明

1. 本申请书所列各项内容均须实事求是，认真填写，表达明确严谨，简明扼要。

查重 97%  
2. 申请人可以是个人，也可为创新团队，首页只填负责人。“项目编号”一栏不填。

查重 96%  
3. 本申请书为大 16 开本（A4），左侧装订成册。可网上下载、自行复印或加页，但格式、内容、大小均须与原件一致。

查重 61%  
4. 负责人所在学院认真审核，经初评和答辩，签署意见后，将申请书（一式两份）报送项目管理办公室。



## 一、基本情况

项目名称	猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光 PCR 检测试剂盒						
所属学科	学科一级门：农学 学科二级类：动物医学类						
项目来源	<input type="checkbox"/> A、学生自主选题，来源于自己对课题的长期积累与兴趣 <input checked="" type="checkbox"/> B、学生来源于教师科研项目选题 <input type="checkbox"/> C、学生承担社会、企业委托项目选题 <input type="checkbox"/> D、拔尖专项 <input type="checkbox"/> E、竞赛专项 <input type="checkbox"/> F、研修专项 <input type="checkbox"/> G、其他						
申请金额	11000.00 元	项目期限	一年期	拟申报项目级别		省级	
负责人	张志诚	性别	男	民族	汉族	出生年月	2003 年 12 月
学号	20225032212	联系电话	宅：手机：15558868818				
指导教师		联系电话	宅：手机：				
项目简介	<p>查重 42%</p> <p>本研究旨在建立一种能够快速检测猫杯状病毒（FCV），猫疱疹病毒 I 型（FHV-I）的双重荧光定量 RT-PCR 检测方法，根据 FCV ORF1 基因、FHV-I UL44 基因分别设计引物与探针，采用上述引物经 PCR 扩增并克隆至载体中，构建重组质粒标准品，并均经 PCR 和测序鉴定。采用方阵法优化各反应条件后，建立了上述两种病原的双重荧光定量 RT-PCR 标准曲线，并评估其特异性、灵敏度、重复性、准确性。</p> <p>查重 70%</p> <p>查重 44%</p>						
负责人曾经参与科研的情况	无						
指导教师承担科研课题	1. 国家自然科学基金面上项目，人 SLAM 受体介导犬瘟热病毒						



情况		<p>跨种间感染的分子机制，2020年01月至2023年12月；</p> <p>2. 国家自然科学基金青年基金，犬瘟热病毒变异株对水貂致病性增强的分子机制，2016年01月至2018年12月；</p> <p>3. 吉林省重点科技成果转化项目，水貂犬瘟热活疫苗产业化开发，2014年01月至2016年12月；</p> <p>4. 国家重点研发计划子课题，水貂、狐、貉犬瘟热-细小病毒性肠炎二联活载体疫苗创制，2023年12月至2027年12月；</p> <p>5. 黑龙江省重点研发计划项目，畜禽重要传染病快速诊断关键技术研发与推广，2021年9月至2025年08月；</p> <p>6. 企业横向课题，畜禽传染病免疫诊断技术研发，2023年05月至2025年05月；</p>				
指导教师对本项目的支持情况		<p>查重 50%</p> <p>1. 主要为项目团队的研究背景和研究设计提供方向性的指导，在难点和重点部分进行把关，帮助项目团队解决项目的难点。</p> <p>2. 主要为项目团队的实践创造条件，根据项目团队的实际需求，可以为项目团队协调实地考察方面的工作。</p> <p>3. 基于自身所在的课题组，能够为项目团队的研究提供较为前沿的学术观点的指导</p> <p>4. 依托学院实验室资源及课题组资源，为项目团队的实验提供设备上的支持</p> <p>查重 43%</p>				
项目组 主要成员	姓名	学号	学院	专业班级	联系电话	项目分工
	张志成	20225032212	动物科技学院	动物医学（创新人才班）	15558868818	病毒分离与鉴定
	刘馨聪	20225032213	动物科技学院	动物医学（创新人才班）	15804553967	质粒构建
	张浩琨	20225032203	动物科技学院	动物医学（创新人才班）	13895842713	建立标准曲线



	苑心仪	20225032219	动物科技学院	动物医学 (创新人才班)	17545560511	引物设计与优化
	陈傲	20215032302	动物科技学院	动物医学	13204620867	资料与数据整理
指导教师	姓名	工号	学院/部门	职称	联系电话	电子邮件

## 二、 立项依据（可加页）

### （1）研究目的

现已有研究表明猫杯状病毒（FCV）与猫疱疹病毒 I 型（FHV- I）均可引起猫的上  
 呼吸道感染，其中 FCV 在猫群中高度流行，常引发具有高度传染性的呼吸道疾病，甚  
 至 2009 年 Marti-no B 等从患有肠炎的幼犬肛拭子中也分离到了该病毒，说明 FCV 具有  
 跨种间传播的风险。猫在感染 FCV 后，临床常表现出口腔溃疡、鼻炎、结膜炎和上呼  
 吸道疾病等症状，严重危害着猫的健康安全。FHV- I 容易引发猫急性、高度接触性传  
 染病，常感染 2-3 月龄的幼猫，死亡率较高，可达 50%，约有 80% 的幼猫感染后终生带  
 毒，但是猫感染 FHV- I 后是可治愈的，因此及时检测其是否感染十分重要。目前来  
 看，市面上的检测产品大多只能检测 FCV 和 FHV- I 其中一种是否存在。但是在实际临  
 床诊疗中发现，这两种病毒不仅都会导致类似的临床症状例如传染性鼻炎，且两种病毒  
 的合并感染率在患有 UR TD 的猫中可达 43%，因此建立可以同时检测两种病毒的技术手  
 段在临床诊疗中可以提高诊断的准确度，拥有着较高的重要性。随着变异毒株的增多，  
 原有的核酸检测方法不太适宜新的检测要求，需要针对更为保守的序列片段，开发新的  
 检测引物和方法。本研究的目的是开发一种高效、准确的猫杯状病毒（FCV）和猫疱  
 疹病毒 I 型（FHV-1）双重荧光 RT-PCR 检测试剂盒，为兽医和宠物主人提供一种便捷  
 的诊断工具，用以评估猫的上呼吸道感染状况。通过快速、准确地检测猫是否感染了这



两种常见的传染性病毒，兽医可以制定更有针对性的治疗方案，提高猫的治愈率，同时也为宠物主人提供更全面的宠物猫健康管理服务。

## (2) 研究内容

### 1. 荧光定量 RT-PCR 引物探针的设计及合成

在 NCBI 数据库中以“猫杯状病毒”为关键词查找相关序列，在 NCBI 网页上下载不同猫杯状病毒毒株的基因序列，从中找不同毒株的 ORF1 基因序列，利用 MegAlign 软件进行序列比对分析；在 NCBI 数据库中以“猫疱疹病毒 I 型”为关键词查找相关序列，从 NCBI 网页上下载不同猫疱疹病毒 I 型毒株的基因序列，查重 53%，从中找不同毒株的 UL44 基因序列，利用 MegAlign 软件进行序列比对分析。分析 MegAlign 软件对比结果。针对猫杯状病毒 ORF1 基因、猫疱疹病毒 I 型 UL44 基因中的高度保守序列分别设计引物和探针。

### 2. 引物、探针对猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型序列覆盖情况分析报告

在 NCBI 数据库中以“猫杯状病毒”为关键词查找相关序列，在 NCBI 网页上下载猫杯状病毒基因序列，从中找到 ORF1 基因序列，利用 MegAlign 软件进行序列比对分析；在 NCBI 数据库中以“猫疱疹病毒 I 型”为关键词查找相关序列，从 NCBI 网页上下载猫疱疹病毒 I 型基因序列，查重 55%，从中找到 UL44 基因序列，利用 MegAlign 软件进行序列比对分析。

### 3. 荧光定量 RT-PCR 质粒 (pUC57-FCV) 的构建及鉴定

根据猫杯状病毒、查重 43%猫疱疹病毒 I 型双重荧光 RT-PCR 检测方法中检测猫杯状病毒的靶标序列。查重 55%由生物公司合成目的基因并连接至 pUC57 载体，获得重组质粒 pUC57-FCV。再将重组质粒 pUC57-FCV 转入 TOP10 感受态细胞中获得大肠杆菌 TOP10 (pUC57-FCV) 并对其进行 PCR 鉴定。





#### 4. 荧光定量 RT-PCR 质粒 (pUC57-FHV-1) 的构建及鉴定

根据猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光 RT-PCR 检测方法中检测猫疱疹病毒 I 型的靶标序列。由生物公司合成目的基因并连接至 pUC57 载体, 获得重组质粒 pUC57-FHV-1。再将重组质粒 pUC57-FHV-1 转入 TOP10 感受态细胞中获得大肠杆菌 TOP10 (pUC57-FHV-1) 并对其进行 PCR 鉴定

#### 5. 双重荧光定量 RT-PCR 标准曲线的建立

本研究在双重荧光定量 RT-PCR 技术的构建中使用了探针法荧光定量 PCR 试剂盒。25  $\mu$ L 体系如下: 12.5  $\mu$ L 实时荧光定量 PCR 预混液, 4 种引物各 0.5  $\mu$ L, 2 种探针各 0.3  $\mu$ L, 4.9  $\mu$ L 的无菌去离子水 (ddH<sub>2</sub>O) 和 5  $\mu$ L 的核酸模板。首先以 56°C、58°C、60°C、62°C 分别作为扩增温度进行扩增, 筛选适宜的扩增温度。其次, 采用 5  $\mu$ mol/L、10  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L 的引物和探针, 通过矩阵法测试不同浓度的引物和探针搭配, 筛选适宜引物和探针浓度及搭配组合, 对 pUC57-FCV 和 pUC57-FHV- I 两种重组质粒标准品进行了连续 10 倍的稀释处理, 分别选择了从 101 到 108 copies/ $\mu$ L 的八个不同浓度梯度的质粒作为扩增模板, 按照优化的双重荧光定量 PCR 体系进行扩增, 以建立各自的标准曲线。

#### 6. 双重荧光定量 RT-PCR 特异性实验

以 pUC57-FCV 和 pUC57-FHV- I 两种重组质粒标准品及 FIPV、FeLV、FPV 等常见的猫的病原体核酸作为模板, 无菌去离子水作阴性对照, 遵循经优化的双重荧光定量 PCR 体系进行实验, 对所建立技术的特异性进行评估。

#### 7. 双重荧光定量 RT-PCR 灵敏度实验

使用连续稀释的 pUC57-FCV 和 pUC57-FHV- I 两种重组质粒标准品作模板 (102-108 copies/ $\mu$ L) 无菌去离子水为阴性对照, 按优化的双重荧光定量 PCR 体系进行实验。探究此法的检测灵敏度与检测下限。



## 8. 双重荧光定量 RT-PCR 重复性实验

从连续 10 倍稀释的 pUC57-FCV 和 pUC57-FHV- I 两种重组质粒标准品中, 选择不同浓度梯度 (105-107 copies/  $\mu$  L) 的质粒作为 PCR 扩增的模板, 用经过优化处理的双重荧光定量 PCR 技术开展实验。<sup>查重 47%</sup>通过深入分析实验数据的组内和组间变异系数, 来评估所建立方法的重复性和稳定性。

## 9. 双重荧光定量 RT-PCR 符合率检验

使用购买的成品化检测试剂盒与本研究建立的双重荧光定量 PCR 技术分别检测由相关实验室提供的不少于 100 份核酸样品。<sup>查重 50%</sup>通过对不同检测结果比较, 进而验证该检测方法的准确性。

### (3) 国、内外研究现状和发展动态

#### 1、FCV 与 FHV- I 病毒及其基因组

FCV 无囊膜,<sup>查重 90%</sup>属于杯状病毒科 (Caliciviridae), 水疱疹病毒属 (Vesivirus)。<sup>查重 44%</sup>感染猫后常引起的临床症状表现为发热、喷嚏、鼻炎及结膜炎等<sup>查重 52%</sup>[1]。其基因组为单股正链 RNA<sup>[2]</sup>, 全长共 7690 个核苷酸, 极易发生变异。其上有三个阅读框架 (ORFs), 利用 MegAlign 软件进行比对, 发现 OFR1 的同源性在 OFR1、OFR2、OFR3 中最高, 为 85.68%<sup>[3]</sup>。故针对该序列设计新的检测引物和方法。而 FHV- I 属于疱疹病毒科 (Herpesviridae),  $\alpha$ -疱疹病毒亚科 (Alpha-Herpesvirus subfamily), 水痘疱疹病毒属 (Varicella virus genus)。<sup>查重 47%</sup>感染猫后常引起的临床症状表现为角膜溃疡、打喷嚏、失明、嗜睡及厌食等<sup>[4]</sup>。其基因组为线性双链 DNA, 全长共 134~137kb, 在其疫苗分离株中检测到 UL28 与 UL44 基因具有独特的单核苷酸多态性 (SNP)<sup>查重 45%</sup>[5]故针对该序列设计新的检测引物与方法。



## 2、FCV 与 FHV- I 病毒流行病学

目前 FCV 与 FHV- I 病毒已经在全世界广泛流传开来, 欧洲六国(英国、瑞典、荷兰、德国、法国、意大利)的联合调查显示超 100 份随机采集样品中 FCV 的总体患病率为 9.2%<sup>[6]</sup>。2010-2012 年, 澳大利亚各地报告的被推定为猫疱疹病毒(FHV)或猫杯状病毒(FCV)的猫上呼吸道疾病(URTD)病例共达 251 例<sup>[7]</sup>。2022 年, 在日本 9 个都道府县的 66 只家猫中, 分别有 11 只(16.7%)和 14 只(21.2%)猫检出 FHV-1 和 FCV<sup>[8]</sup>。而在我国许多省份也均有 FCV 与 FHV- I 传播, 北京地区进行过 FCV 与 FHV- I 检测的 412 例病例中 FCV 与 FHV- I 的阳性率分别为 26.3%和 46.3%<sup>[9]</sup>, 广东省内来自五个不同地区的 380 份拭子中 FCV 与 FHV- I 的阳性率分别为 44.1%和 6.9%<sup>[10]</sup>, 2012 年甚至从华南虎身上也分离出了一株 FHV-1 病毒<sup>[11]</sup>。虽然目前 FCV 被认为是宿主特异性的, 并且只感染猫科动物。但是, 已经有几篇关于从腹泻的狗的粪便样品中分离出 FCV 样病毒的报道<sup>[12]</sup>。因此我们不但要警惕 FCV 与 FHV- I 本身对猫科动物的危害, 更要及早预防其可能对其他动物带来的潜在风险。

## 3、FCV 与 FHV- I 荧光定量 RT-PCR 检测技术的发展

2001 年 Sykes J E 等<sup>[13]</sup>开发了一种单管、多重逆转录 RT-PCR 测定法, 用于检测患有上呼吸道疾病(URTD)的猫体内的猫疱疹病毒 1(FHV1)和猫杯状病毒, 其结合了一种能够提取 DNA 和 RNA 的简单、快速的提取程序。该测定法被发现在体外与单纯性测定法一样敏感, 而单纯性测定法先前已被证明对实验感染猫的每种病原体的培养物一样敏感或更敏感<sup>[14]</sup>。但是该方法所需时间较长, 不太适合进行临时医疗诊断。于是 Marsilio F 等<sup>[15]</sup>在 2005 年研究出了一种新的巢式 PCR(nPCR)检测方法, 用于诊断猫杯状病毒感染, 并将 nPCR 灵敏度与其他诊断技术进行比较, 例如细胞培养病毒分离和逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR), 最终得出结论 nPCR 比病毒分离和 RT-PCR 更敏感, 所需时间也相应缩短, 不过并未在特异性方面作出评价。此后随着实时荧光定量



RT-PCR 技术的发展, 因其高效、准确的特点, 许多新的检测技术应运而生。Meli M L 等<sup>[16]</sup>于 2017 年验证了两种已发表的针对 FCV 第一开放阅读框 (ORF 1) 保守区域的实时 TaqMan RT-PCR 检测方法<sup>[17]</sup>。其利用实时逆转录聚合酶链式反应测定法来检测猫的猫杯状病毒感染, 并通过使用 SYBR green I 熔解曲线分析, 可以凭借其熔解温度来区分分离株。经评测该检测方法不仅在很宽的模板浓度范围内皆呈现出较高的灵敏性与线性, 可以准确测定病毒载量, 还可以在收到样品后 2 小时内检测到 FCV 的存在, 具有很高的时效性, 进一步推动了检测技术的发展。但是临床的实际情况是 FCV 往往容易和 FHV-1 同时感染, 因此构建出一种双重检测的方法迫在眉睫。2024 年, Thieulent C J<sup>[18]</sup>开发和验证了用于检测猫呼吸道疾病复合物相关的病原体的多重一步法 qPCR/RT-qPCR 检测技术。其通过设计靶向 FHV-1 的糖蛋白 B (gB) 和 FCV 的开放阅读框 (ORF) 1 的特异性正向和反向引物和探针, 并经过灵敏度、特异性、重复性和重现性测验论证了与传统的传染性病原体鉴定方法, 如细菌培养、病毒分离和常规 PCR 相比多重 qPCR/RT-qPCR 是一种快速、灵敏的技术, 明显更适用于作为兽医临床诊断的方法。

查重 67%

#### 4、总结

目前, 国内对猫杯状病毒 (FCV) 和猫疱疹病毒 I 型 (FHV-1) 的研究主要集中在病毒特性、致病机理、流行病学以及疫苗研发等方面。在诊断方法上, 尽管已有一些常规的检测手段, 例如血清学检测、病毒分离和核酸检测等, 但存在检测窗口期长、灵敏度较低等局限性。因此, 开发一种快速、准确的猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光 RT-PCR 检测试剂盒具有重要的临床价值和研究意义。

而近年来, 国内外学者在荧光 PCR 技术方面取得了显著进展, 为其应用于猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型检测提供了可能。通过优化引物和探针设计, 提高荧光 PCR 反应的灵敏度和特异性, 有助于实现快速、准确的检测。此外, 双重荧光 RT-PCR 检测试



剂盒可以同时检测两种病毒，提高了检测效率，为兽医提供了更为便捷的诊断工具。

查重 44%

总结来看，猫杯状病毒、猫疱疹病毒 I 型双重荧光 RT-PCR 检测试剂盒的研究正处于快速发展阶段，国内外学者正在积极投入研发力量，以期宠物猫健康事业提供更为有效的检测手段。本项目的研究将为这一领域贡献新的技术和产品，推动宠物猫诊断和治疗水平的提升。

### 参考文献：

[1] Truyen U, Schunck B. [Feline calicivirus: a review][J]. Tierarztl Prax, 1995, 23(3): 300-305.

[2] Pesavento P A, Chang K O, Parker J S. Molecular virology of feline calicivirus[J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2008, 38(4): 775-786, vii.

[3] 刘迪, 郑亚婷, 许鑫燕, et al. 检测猫杯状病毒 RT-qPCR 方法的优化与应用[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(01): 53-60.

[4] Lewin A C, Coghill L M, McLellan G J, et al. Genomic analysis for virulence determinants in feline herpesvirus type-1 isolates[J]. Virus Genes, 2020, 56(1): 49-57.

[5] Vaz P K, Job N, Horsington J, et al. Low genetic diversity among historical and contemporary clinical isolates of felid herpesvirus 1[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 704.

[6] Afonso M M, Pinchbeck G L, Smith S L, et al. A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity[J]. Vaccine, 2017, 35(20): 2753-2760.



[7] Wong W T, Kelman M, Ward M P. Surveillance of upper respiratory tract disease in owned cats in Australia, 2009-2012[J]. *Prev Vet Med*, 2013, 112(1-2): 150-155.

[8] Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, et al. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(3): 215-219.

[9] 许楚楚, 胡士玲, 陈宋杰, et al. 北京地区猫杯状病毒和疱疹病毒流行病学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53(11): 23-26+29.

[10] 曲雪婷, 王森, 原昆鹏, et al. 山东部分地区猫细小病毒、疱疹病毒、杯状病毒流行情况调查[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(11): 81-84+124.

[11] Sun H, Li Y, Jiao W, et al. Isolation and identification of feline herpesvirus type 1 from a South China tiger in China[J]. *Viruses*, 2014, 6(3): 1004-1014.

[12] Johnson L R. Preface: Respiratory Diseases in Dogs and Cats[J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2020, 50(2): ix.

[13] Sykes J E, Allen J L, Studdert V P, Browning G F. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR[J]. *Vet Microbiol*, 2001, 81(2): 95-108.

[14] Sykes J E, Studdert V P, Browning G F. Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the



capsid protein gene[J]. Arch Virol, 1998, 143(7): 1321-1334.

[15] Marsilio F, Di Martino B, Decaro N, Buonavoglia C. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat[J]. Vet Microbiol, 2005, 105(1): 1-7.

[16] Meli M L, Berger A, Willi B, et al. Molecular detection of feline calicivirus in clinical samples: A study comparing its detection by RT-qPCR directly from swabs and after virus isolation[J]. J Virol Methods, 2018, 251: 54-60.

[17] Helps C, Lait P, Tasker S, Harbour D. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR[J]. J Virol Methods, 2002, 106(2): 241-244.

[18] Thieulent C J, Carossino M, Peak L, et al. Development and validation of multiplex one-step qPCR/RT-qPCR assays for simultaneous detection of SARS-CoV-2 and pathogens associated with feline respiratory disease complex[J]. PLoS One, 2024, 19(3): e0297796.

#### (4) 创新点与项目特色

相比于以往病毒检测的一些常规检测手段，例如血清学检测、病毒分离、qPCR 检测等，本产品显著缩短了检测周期，具有检测时间更短的优势，可以快速、及时地帮助宠物医生诊断宠物猫所患的呼吸道疾病病原类型，节省诊断时间，使患病动物得到及时的针对性治疗。而相比于近期新兴的新检测技术，本产品具有理论更成熟，发展更完善，灵敏度高，特异性强的优势，不仅能够准确避免宠物猫感染 FCV 和 FHV-1 在临床表现上相似而导致的误诊情况，且能排除其他多数感染宠物猫的病毒例如 FIPV、FeLV 和 FPV 的交叉反应。本产品敏感性高，即使是病毒感染早期，也可检测出宠物猫体内的



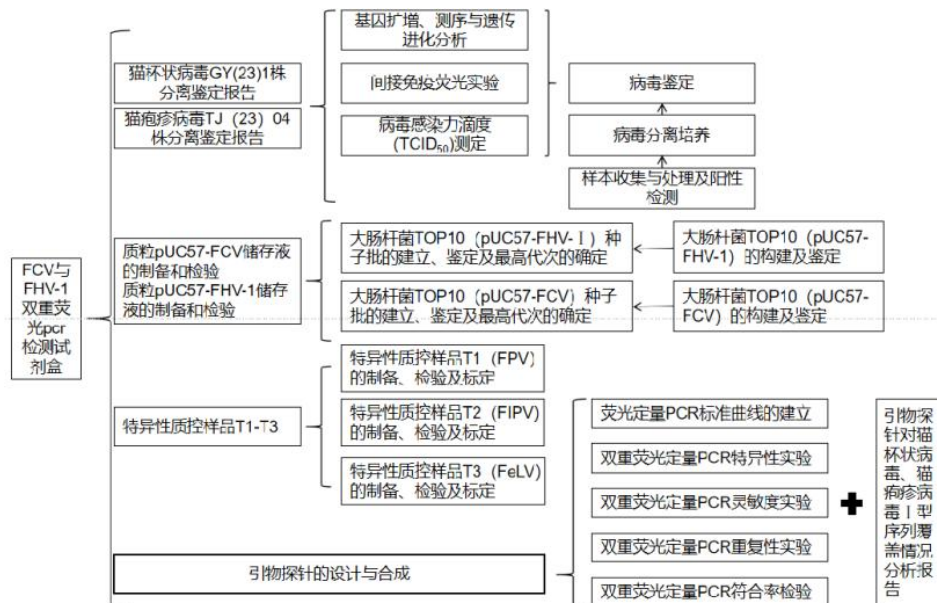


微量病毒，因此，通过本产品既可快速检测出患病动物的病原类型，又可对宠物猫感染FCV和FHV-1进行早期诊断，以便及时进行对症治疗，避免病毒入侵对宠物猫机体功能的进一步危害。

查重 56%

## (5) 技术路线、拟解决的问题及预期成果

### (1) 技术路线



### (2) 拟解决的问题

#### ①病毒分离。





- ②质粒储存液所需验收时间长。
- ③特异性质控样品的检验及标定工作量大，周期长。
- ④引物探针需要反复优化，保证其较高特异性。
- ⑤质粒储存液如何延长其保质期。
- ⑥对于试剂盒所需注册材料要求不够了解。

### (3) 预期成果

- ①分离出 FPV 毒株一株
- ②发表文章一篇
- ③构建出本产品
- ④与企业达成合作

### (6) 项目研究进度安排

- 1.2024.07-2024.08 构建重组质粒
- 2.2024.08-2024.10 制备质粒储存液
- 3.2024.10-2024.12 制备特异性质控样品
- 4.2025.01-2025.04 设计并持续优化引物探针
- 5.2025.04-2025.06 撰写研究报告，完成产品构建，与企业达成合作，准备结题



## 材料

### (7) 已有基础

#### 1. 与本项目有关的研究积累和已取得的成绩

(1) 已分离出猫杯状病毒 GY (23) 1 株

①病料样品中 FCV RT-PCR 检测结果条带正确

②FCV 感染 CRFK 细胞结果，病变情况符合特征

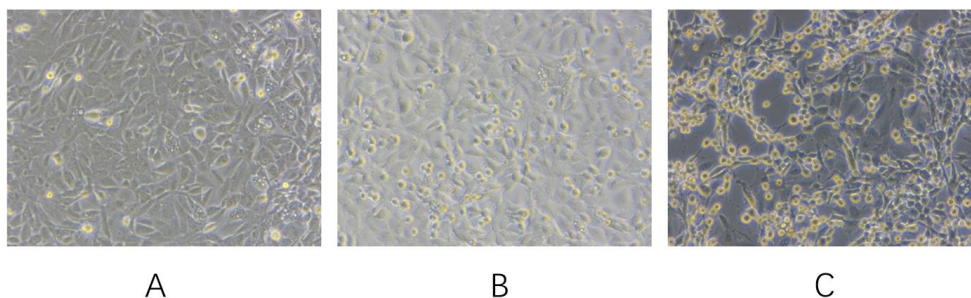


图1 FCV感染CRFK细胞结果 (100×)

A:正常细胞(100×); B:接毒24 h(100×); C:接毒48 h(100×)



③FCV GY(23)1 株的 IFA 鉴定结果出现荧光

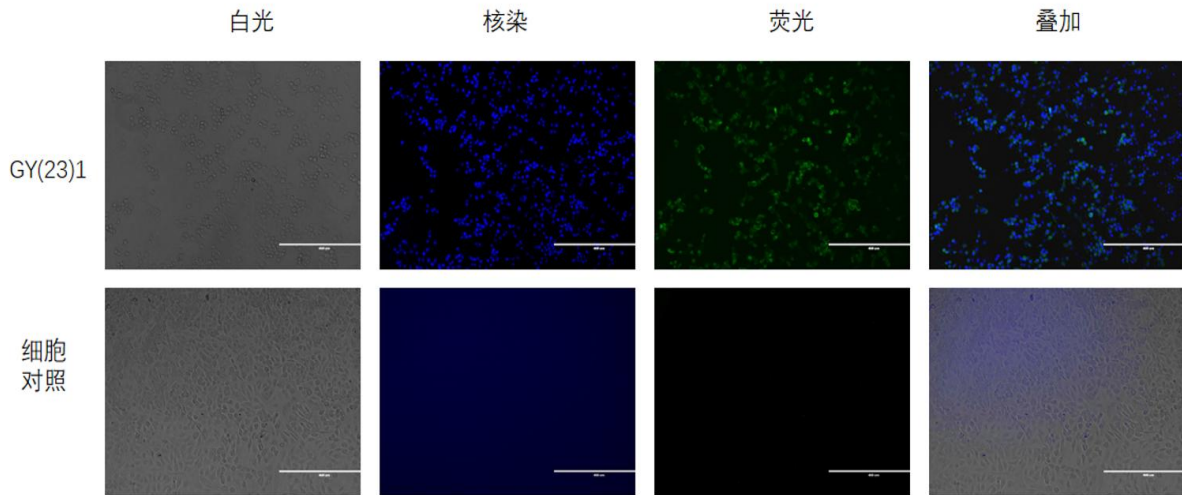
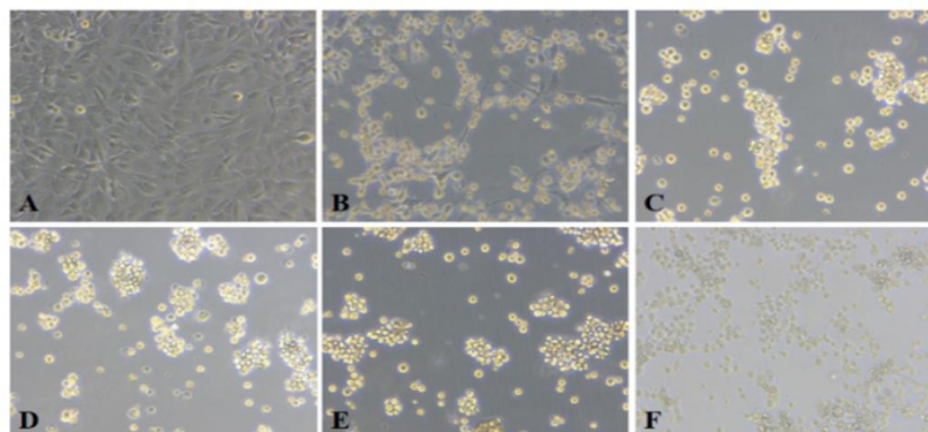


图2 FCV GY(23)1 株的IFA鉴定结果 (400×)

(2) 已分离出猫疱疹病毒 I 型 TJ (23) 04 株

①病料样品中 FHV-1 PCR 检测结果条带正确

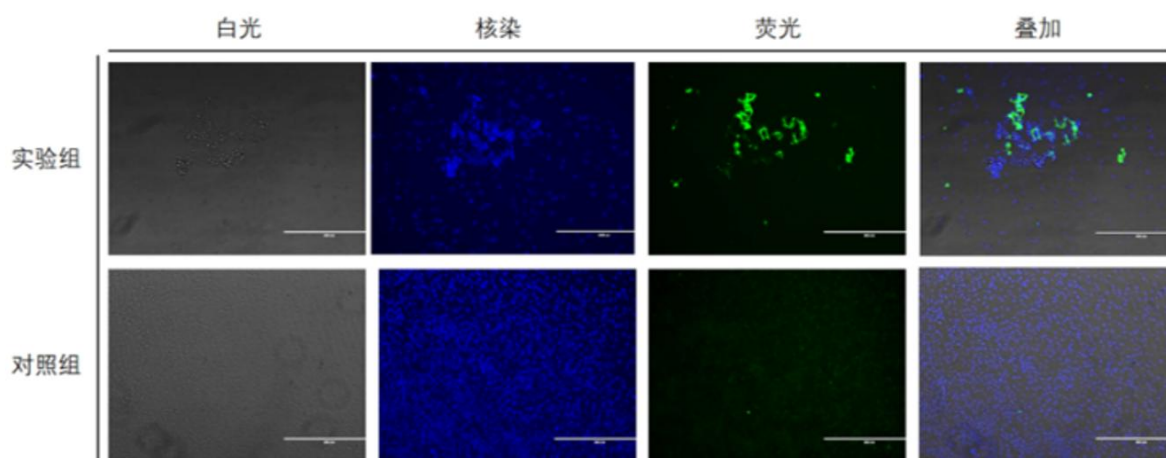
②第 1-5 代 TJ (23) 04 株感染 24h 的细胞病变情况，病变情况符合特征



**图3** 第1-5代TJ (23) 04株感染24h的细胞病变情况 (100×)

A: 正常CRFK细胞; B: TJ (23) 04株P1; C: TJ (23) 04株P2;  
D: TJ (23) 04株P3; E: TJ (23) 04株P4; F: TJ (23) 04株P5

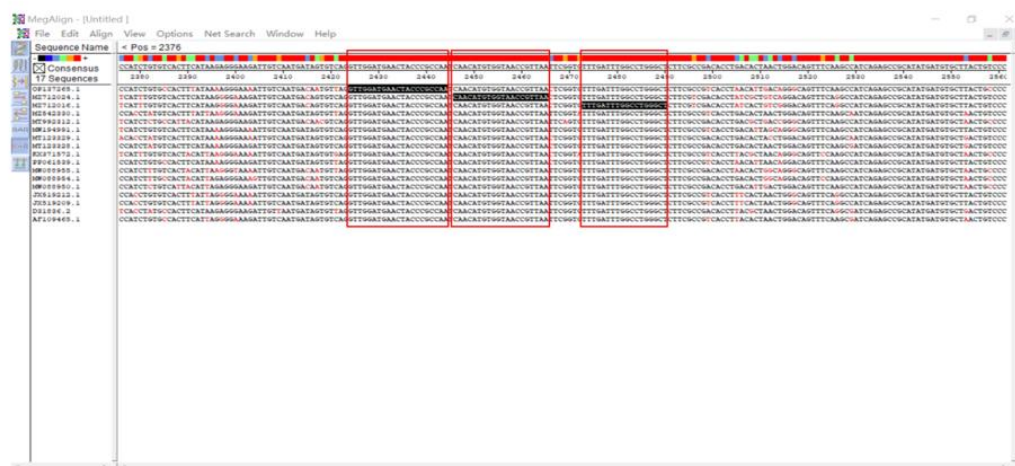
③FHV-1 TJ (23) 04 株的 IFA 鉴定结果出现荧光



**图4** FHV-1 TJ (23) 04株的IFA鉴定结果 (400×)



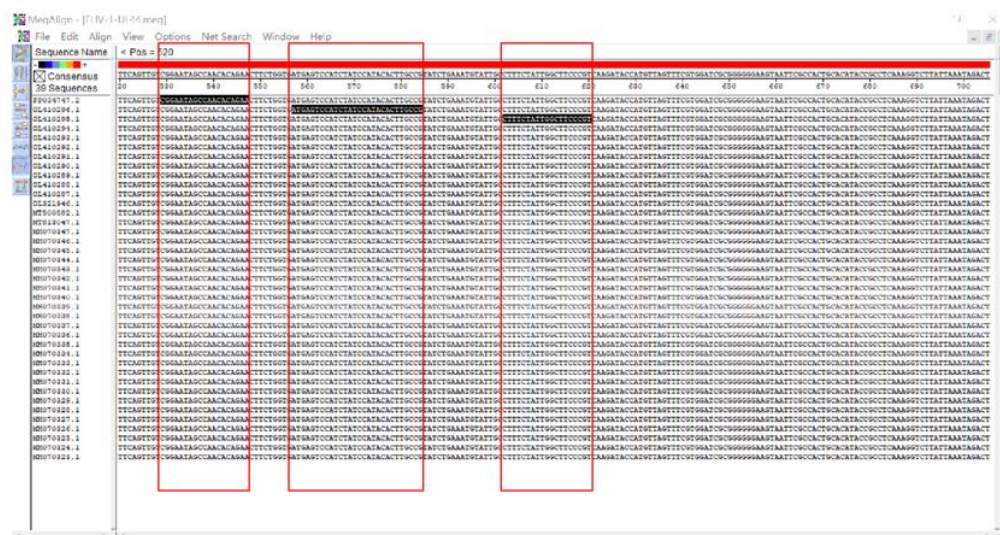
### (3) 已设计完荧光定量 RT-PCR 所需引物和探针



**图5** 不同猫杯状病毒序列比对结果

注：从左至右框中的区域是上游引物、探针、下游引物





**图6** 不同猫杯状病毒序列比对结果  
注：从左至右框中的区域是上游引物、探针、下游引物

2. 已具备的条件, 尚缺少的条件及解决方法



本项目依托的黑龙江八一农垦大学动物医学实验室。此实验室为黑龙江省重点实验室，具有良好的理论知识储备以及实验操作技能。  
申请团队可依托于黑龙江八一农垦大学生物技术中心公共平台。所属实验室和技术中心拥有开展本项课题的所需的主要仪器设备和设施，如超净工作台、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统、酶标仪和荧光显微镜等，可以为项目实施提供充足的保障。

三、经费预算

开支科目	预算经费（元）	主要用途	阶段下达经费计划（元）	
			前半阶段	后半阶段
预算经费总额	11000.00	无	3000.00	8000.00
1. 业务费	3000.00	无	3000.00	0.00
（1）计算、分析、测试费	0.00	无	0.00	0.00
（2）能源动力费	0.00	无	0.00	0.00
（3）会议、差旅费	0.00	无	0.00	0.00
（4）文献检索费	0.00	无	0.00	0.00
（5）论文出版费	3000.00	无	3000.00	0.00
2. 仪器设备购置费	0.00	无	0.00	0.00
3. 实验装置试制费	1000.00	无	0.00	1000.00
4. 材料费	7000.00	实验材料与试剂	0.00	7000.00
学校拨款				



开支科目	预算经费（元）	主要用途	阶段下达经费计划（元）	
			前半阶段	后半阶段
财政拨款				

查重 71%

#### 四、项目组成员签名

#### 五、指导教师意见

导师（签章）：

查重 85%

年 月 日

#### 六、院系大学生创新创业训练计划专家组意见

教学负责人（签章）：

查重 80%

年 月 日





七、学校大学生创新创业训练计划专家组意见

负责人（签章）：  
年    月    日