

戴莎莎, 王健霖, 田兴苗, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒糖蛋白 gB 和 gD 的研究进展 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (3): 376-386.
DAI S S, WANG J L, TIAN X M, et al. Research Progress on Glycoprotein gB and gD of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (3): 376-386.

牛传染性鼻气管炎病毒糖蛋白 gB 和 gD 的研究进展

戴莎莎, 王健霖, 田兴苗, 李继东*

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:牛传染性鼻气管炎 (Infectious bovine rhinotracheitis, IBR) 是牛的重要传染病, 临床以呼吸道症状为主, 伴有结膜炎、乳腺炎、流产等症状。其病原是牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV), 又称牛疱疹病毒 1 型 (*Bovine herpesvirus 1*, BHV-1), 共编码 30~40 种结构蛋白, 其中 11 种为囊膜糖蛋白。糖蛋白在病毒吸附、侵入宿主细胞的过程中发挥重要作用。糖蛋白 gB 对病毒侵入宿主细胞、在细胞间扩散及复制至关重要; 糖蛋白 gD 在病毒复制、传播和感染机制方面作用重大, 具有良好的免疫原性, 是诱导产生中和抗体的主要糖蛋白。对 gB、gD 的研究不仅可从蛋白层面解析病毒侵染机制, 还能够为牛传染性鼻气管炎的临床诊断和预防提供理论依据。本文针对牛传染性鼻气管炎病毒的主要糖蛋白 gB、gD 的研究结果进行综述, 分析其生物学功能以及在疫苗和诊断方面的应用, 以期对牛传染性鼻气管炎侵染机制和防控提供参考。

关键词: 牛传染性鼻气管炎病毒; gB 糖蛋白; gD 糖蛋白; 生物学功能; 诊断; 疫苗

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 03-0376-11

Research Progress on Glycoprotein gB and gD of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus

DAI Shasha, WANG Jianlin, TIAN Xingmiao, LI Jidong*

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Infectious bovine rhinotracheitis is an important infectious disease of cattle. The clinical symptoms of the disease were principally respiratory ones that may be accompanied by conjunctivitis, mastitis, abortion, etc. The pathogenic virus is also known as bovine herpesvirus type 1. It encodes 30 to 40 structural proteins with 11 envelope glycoproteins, which play an important role in the process of virus adsorption and host cell invasion. Glycoprotein gB is essential for the virus to invade, spread, and replicate on host cells. Glycoprotein gD is critical in viral replication, transmission, and infection with strong immunogenicity that induces neutralizing antibodies. Studying gB and gD not only helps decipher the infection mechanism at the molecular level but also leads to new clinical diagnosis and prevention method developments on rhinotracheitis. This article summarizes recent research results on glycoprotein gB and gD concerning the biological functions and applications of these proteins in producing vaccines and generating advanced diagnosis methodologies for the infectious disease in cattle.

Key words: Bovine infectious rhinovirus; glycoprotein gB; glycoprotein gD; biological function; diagnosis; vaccine

牛传染性鼻气管炎 (Infectious bovine rhinotracheitis, IBR) 是由牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) 引起的一种接触性传染病, 主要临床症状为高热、呼吸困难、鼻窦炎和上呼吸道感染^[1], 同时存在结膜炎、乳腺炎、脓疱性外阴阴道炎或龟头包皮、幼牛脑膜脑炎和流产等^[2,3], 甚至可通过垂直传播感染胎儿^[4]。

牛是 IBRV 自然感染的唯一宿主, 各种年龄及不同品种的牛均可感染。IBRV 主要以飞沫、交配和接触传播, 吸血昆虫也可传播。更为重要的是牛一旦感染 IBRV, 则在康复牛三叉神经节、扁桃体或腰荐神经节建立潜伏感染^[5]。潜伏感染牛体内的病毒可在应激条件下激活^[6], 引起牛发病并向周围环境排毒, 是本病传播流行的重要因素。由于我国各地区之间畜牧

收稿日期: 2022-09-03 初稿; 2022-12-16 修改稿

作者简介: 戴莎莎 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 动物疫病诊断与防治 (E-mail: 1421164321@qq.com)

* 通信作者: 李继东 (1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医微生物学与免疫学 (E-mail: lijidongi@foxmail.com)

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03075); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2019ZWSF3007)

产业交易频繁,导致IBRV在我国流行广泛,且得不到有效的控制,严重影响畜牧业的经济发展。

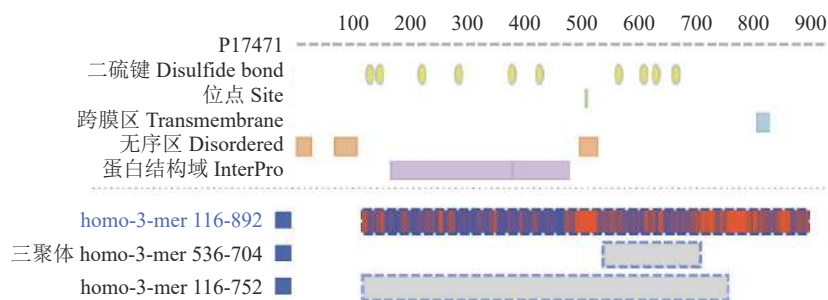
IBRV又称为牛疱疹病毒1型(*Bovine herpesvirus 1*, BHV-1),属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科水痘病毒属,病毒核酸为双股DNA。BHV-1可以感染肿瘤并抑制肿瘤生长,对体内人肺腺癌具有溶瘤作用^[7]。其编码30~40种结构蛋白,包括11种糖蛋白,其中gB、gC、gD和gE是4个存在于BHV-1囊膜表面的主要糖蛋白。gB在BHV-1中遗传性状稳定、不易改变,是疱疹病毒中最保守的蛋白质,是诱导机体免疫反应的主要免疫原^[8];gD在诱导机体免疫应答产生中和抗体的过程中起主要作用,同时也是BHV-1进入细胞的重要分子,病毒进入细胞的成功依赖于gD与细胞表面受体的结合。gB和gD对于病毒复制是必需的,且是BHV-1的主要免疫原。近几年围绕gB和gD两种蛋白新增了BHV-1诊断的新方法和疫苗研发新思路。本文主要探讨gB和gD的生物学

功能以及在BHV-1的诊断和防治方面发挥的作用,为BHV-1的诊断和疫苗研发提供参考。

1 BHV-1 gB和gD糖蛋白结构特征

1.1 BHV-1 gB结构特征

gB蛋白由UL27基因编码。在氨基酸水平上,BHV-1的gB与猪伪狂犬病病毒(*Pseudorabies virus*, PRV)gB的序列一致性为63%,与单纯疱疹病毒(*Herpes simplex virus type 1*, HSV-1)gB的序列一致性为46.5%^[9]。保守结构域集中在gB的2个广泛的疏水区、6个N-糖基化位点和gB细胞外结构域中的10个保守的半胱氨酸残基^[10,11]。尽管序列和结构具有很高的保守性,但HSV-1gB和BHV-1gB翻译后的加工过程并不相同,HSV-1的gB蛋白翻译后不经蛋白酶切加工,而BHV-1和其他大多数的gB同源蛋白则被酶切为由二硫键连接的两个亚基。gB结构见图1。



P17471为BHV-1gB蛋白序列号。图片来源于InterPro蛋白数据库。

P17471: sequence number of BHV-1 gB protein; images adopted from InterPro Protein Database.

图1 BHV-1 gB结构

Fig. 1 Schematic BHV-1 gB structure

1.2 BHV-1 gD结构特征

gD蛋白由US6基因编码,它与病毒和宿主细胞之间的黏附作用有关,能诱导机体产生强烈的免疫反应,是产生中和抗体的主要跨膜糖蛋白,且诱导细胞免疫的能力强于gB^[12]。gD蛋白胞外域位于第1~342位氨基酸残基,跨膜结构域位于第342~371位氨基酸,胞质结构域位于第371~399位氨基酸,信号肽位于胞外域的外侧^[13]。gD的氨基末端部分包含胞外域,其羧基末端由疏水性跨膜序列和约28个氨基酸的胞质尾区组成。单一的抗gD免疫反应足够保护机体免受病毒侵袭^[14]。因为gD参与病毒跨膜运输,所以也是病毒复制的必需糖蛋白。其上有4个抗原决定簇,有5个能够发挥中和活性的抗原表位已经得到了验证^[15]。此外,去除信号肽、跨膜区等表现出强疏水性的序列可明显提高gD蛋白的可溶性和表达量,并且这种形式的蛋白能引起机体产生更

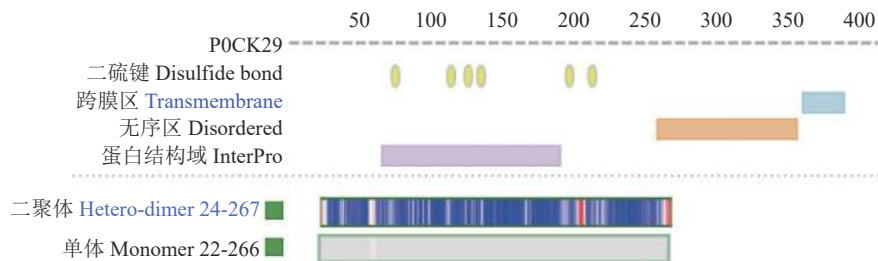
高水平的免疫反应^[16]。gD结构见图2。

2 BHV-1 gB和gD糖蛋白生物学功能

BHV-1侵入细胞时,gB与宿主细胞膜发生黏附作用,gD随之与细胞表面受体稳定结合,促进病毒进入细胞^[17]。同时gB和gD是自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)的靶标。gD是细胞毒性T细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)的靶标,可以刺激CD4+T淋巴细胞特定抗原表位。CTL的靶标通常是保守蛋白质,针对这种保守蛋白质的CTL反应具有保护宿主免受各种病毒株侵害的特性。BHV-1gB和gD蛋白功能见表1。

2.1 BHV-1 gB生物学功能

BHV-1gB是在病毒粒子囊膜表面形成刺突的包膜糖蛋白,对于宿主细胞表面蛋白多糖的初始附着至关重要。病毒最初与其宿主受体结合后,膜融合



POCK29 为 BHV-1 gD 蛋白序列号。图片来源于 InterPro 蛋白数据库。

POCK29: the sequence number of BHV-1 gD protein. Images was a reference from the InterPro Protein Database.

图 2 BHV-1 gD 结构

Fig. 2 Schematic BHV-1 gD structure

表 1 BHV-1 gB、gD 蛋白功能

Table 1 Functions of BHV-1 gB and gD proteins

项目 Item	BHV-1 gB 功能 BHV-1 gB function	BHV-1 gD 功能 BHV-1 gD function
靶细胞 Target cell	自然杀伤细胞 (NK)	自然杀伤细胞 (NK)、 细胞毒性 T 细胞 (CTL)
主要功能 Key function	病毒吸附与复制; 介导膜融合; 肽和蛋白质的转运蛋白	广谱溶瘤载体; 干扰 HveC 介导的同源和异源 α 疱疹病毒的进入; 促进免疫抑制的形成
感染机制 Infection mechanism	gB 和异源二聚体 gH/gL 组成的 融合机制介导膜融合	促进由 gB 和 gH/gL 组成的融合 机制触发病毒与宿主的膜融合

由 gB 和异源二聚体 gH/gL 组成的融合机制介导, 可能参与病毒粒子出胞过程中病毒粒子囊膜与外核膜的融合^[18]。同时, BHV-1 gB 对于 BHV-1 复制是必不可少的, 并且是膜融合过程所必需的^[4]。病毒侵染到目标细胞中, 并将 BHV-1 从受感染的细胞扩散到相邻的未感染细胞。此外, Keil 等^[19] 在 BHV-1 gB 中引入第二个呋喃裂解位点和干预多肽, 分离出绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 和牛 α 干扰素 (Bovine interferon α , boIFN- α)。这些蛋白作为受感染细胞的生物活性蛋白分泌, 说明 BHV-1 gB 可用作肽和蛋白质的转运蛋白, 这对于开发新型疫苗很重要。截短形式的 gB 蛋白能使机体产生更高水平的 IFN- γ , 以及使 CTL 更有效地发挥作用^[20]。此外, 研究表明小反刍兽疫病毒血凝素及融合蛋白结构域与 BHV-1 gB 的氨基末端融合会干扰 gB 在 BHV-1 复制中的运输功能^[21]。

2.2 BHV-1 gD 生物学功能

gD 属于受体结合蛋白, 可通过促进由 gB 和 gH/gL 组成的融合机制触发病毒与宿主的膜融合^[22,23]。与 gD 结合的受体主要有 HveA、HveB 和 HveC。HveC 又被称为 nectin-1, 有研究表明, 表达 HveC 受体的 J1.1-2 细胞易感染 BHV-1。如果在细胞内同时表达 gD 蛋白和 HveC 受体, 则能够抵抗其他 α 疱疹病毒感染^[24]。这表明 BHV-1 gD 糖蛋白可以干

扰 HveC 介导的同源和异源 α 疱疹病毒的进入。nectin-1 是多种 α 疱疹病毒的通用受体^[25], 其在细胞黏附、运动和增殖等活动中起重要作用。BHV-1 gD 与人和牛的 nectin-1 (HU-nectin-1 和 BO-nectin-1) 都能相互作用, 具有相当的结合亲和力, 这种亲和力可以通过突变 BHV-1 gD 中的 R188G 来增强^[12]。且 BHV-1 是一种有前途的广谱溶瘤载体, 可以感染和杀死人类肿瘤细胞^[26], 而这种功能是基于 BHV-1 gD 与 nectin-1 相互作用来实现的。同时, gD 是糖基化蛋白, 糖基化会影响 gD 蛋白的结构和抗原性^[14]。gD 蛋白还可引起牛单核细胞和淋巴细胞凋亡, 促进免疫抑制的形成^[27]。在 BHV-1 感染的早期, 病毒 gD 蛋白与细胞受体凝集素 3 的相互作用触发了 PI3K-Akt-NF- κ B 和 Ras-p1 MAPK 信号通路, 并诱导网格蛋白介导和膜整合蛋白介导的内吞作用, 以促进 BHV-1 进入 MDBK 细胞^[28]。

3 BHV-1 gB 和 gD 糖蛋白在疫苗研发方面的研究

BHV-1 的预防主要依靠疫苗。目前普遍使用的 BHV-1 疫苗由灭活或改良的活病毒研制而成, 存在许多缺点。灭活疫苗免疫原性较差, 如果灭活不足, 还有可能致病。活疫苗可能诱发免疫抑制, 并使被动免疫动物和自然感染动物之间的区分复杂

化。BHV-1 gB、gD 蛋白都具有引起免疫反应的能力。gD 产生的中和抗体拮抗 BHV-1 的能力是最好的，gB 作为疱疹病毒中最为保守的一种糖蛋白也有

其独特的优势。因此，很多研究者们都以 gB、gD 为首选制备 BHV-1 疫苗。基于 BHV-1 gB、gD 蛋白构建的疫苗种类及其优缺点见表 2。

表 2 疫苗优缺点
Table 2 Pros and cons of vaccine

疫苗种类 Vaccines	载体 Vector	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
DNA 疫苗 DNA vaccine	pRSV 质粒、纳米颗粒等	工艺简便，生产成本较低；DNA 分子稳定，便于运输和保存	产生的抗体对机体的保护不够充分
亚单位疫苗 Subunit vaccine	痘病毒、腺病毒、大肠杆菌、杆状病毒、昆虫细胞、哺乳动物细胞及牛骨肉瘤细胞系 D17 等	接种安全，副反应少	免疫原性较低，需与佐剂合用才能产生好的免疫效果
病毒活载体重组疫苗 Virus live vector recombinant vaccine	痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、单股 RNA 病毒等	可以快速获得针对流行毒株的疫苗候选毒株；构建多联多价疫苗，减少免疫次数及改变免疫方法	安全性较低

3.1 DNA 疫苗

DNA 疫苗产生的免疫反应与自然感染诱导的免疫反应非常相似。最早的 BHV-1 DNA 疫苗是用 pRSV 质粒构建的，该质粒属于慢病毒载体，以罗斯肉瘤病毒启动子（Rous sarcoma virus major promotor）启动基因转录表达，可用于多种细胞转染。

黄勇等^[29]用编码分泌形式的 gB（tgB）序列构建的 DNA 疫苗，既能诱导机体产生体液免疫，又可以刺激 CTL 分泌 IFN- γ ，这表明表达 tgB 的 DNA 疫苗可在 BHV-1 宿主中诱导 CTL 反应。gD 作为 BHV-1 囊膜糖蛋白之一，已被确定为 BHV-1 DNA 疫苗的最佳抗原^[30]。与 gD 全序列相比，用编码分泌形式的 gD 序列构建的载体能够诱导更高水平的免疫反应^[31]。虽然 DNA 疫苗与传统疫苗相比具有一定的优势性，但 DNA 疫苗产生的抗体对机体的保护往往不够充分，特别是用单基因构建的疫苗^[32]。用 gB、gD 构建的 BHV-1 gB/gD 的质粒联合疫苗比单个基因构建的 DNA 疫苗能产生更好的免疫效果^[33]。同时，gD DNA 疫苗配合佐剂 Montanide Essai 903110，可诱导牛产生高水平 γ 干扰素^[34]。将 RN-205（富含革兰氏阴性菌脂多糖的免疫调节剂）掺入 DNA 疫苗可引起小鼠细胞特异性免疫反应的增强^[35]。佐剂 GEL40 也可显著提高 DNA 疫苗对 BHV-1 的防御作用^[36]。

3.2 亚单位疫苗

gB、gD 蛋白已经在痘病毒、腺病毒、大肠杆菌、杆状病毒、昆虫细胞、哺乳动物细胞及牛骨肉瘤细胞系 D17 内被表达，并在动物机体上进行了初步免疫试验^[17]。证明重组 gD 蛋白可以引起黏膜免疫，还可产生大量足够保护机体的中和抗体，免疫

效果好，特异性强。仅含有 gD 蛋白的 BHV-1 亚单位疫苗在降低呼吸系统疾病死亡率方面优于 BHV-1 改良活疫苗（Modified live vaccine, MLV）^[37]。MLV 疫苗能诱导机体产生快速免疫应答，伴有相对持久的局部黏膜免疫。但是 MLV 中含有活病毒，存在一定感染的风险。

以杆状病毒为例，gB 蛋白在杆状病毒中表达，产生的抗原信号强度弱于 gD 蛋白在杆状病毒中表达所产生的抗原信号强度^[38]。使用重组杆状病毒表达 gD，考虑到杆状病毒无法在哺乳动物细胞中复制，也不会引起动物免疫反应，对动物自身也不会存在什么危害。与哺乳动物活载体不同，属于外来抗原的杆状病毒载体是亚单位疫苗，即使存在针对载体的自身免疫反应的情况下，也可以引发针对外来抗原的免疫反应^[39]。此外，杆状病毒可以很容易地以非常高的滴度在鳞翅目幼虫体内大规模繁殖，使生产成本几乎可以忽略不计。

国外有学者将 BHV-1 gD 基因克隆到哺乳动物表达载体中，构建 BHV-1 gD 亚单位疫苗，并使用基因枪免疫牛^[40]，使牛产生了高水平滴度的 IgG 特异性抗体。使用基因枪接种疫苗的牛产生的 BHV-1 中和抗体滴度与商业疫苗免疫牛产生的诱导水平相似，证明这种免疫方法能诱导机体产生正常的免疫反应。Hou 等^[41]通过原核表达获得了 BHV-1gB 亚单位疫苗，并且接种 gB 亚单位疫苗能显著减少 BHV-1 引起的病毒脱落和肺组织损伤。

3.3 病毒活载体重组疫苗

病毒活载体重组疫苗是利用基因工程技术将抗原基因导入病毒活载体中表达的活疫苗，可以诱导

机体产生体液免疫、细胞免疫以及黏膜免疫^[42]。一个载体中可以导入多个目的基因并同时表达。

用于研究的病毒疫苗载体包括痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、单股 RNA 病毒等^[43]。基于 gB 蛋白的病毒活载体疫苗尚未见报道。Khattar 等研究出表达 BHV-1 gD 糖蛋白的重组新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV)^[44]。NDV 重组活载体疫苗在牛中不会对牛造成任何危害, 这表明 NDV 可用于引发牛对其他病原体的抗原特异性免疫反应, 并诱导体液和黏膜产生抗体且不会引起牛任何临床症状^[45]。Gogev 等^[46]在人巨细胞病毒启动子/增强子的调控下表达 BHV-1 gD 的复制缺陷型 5 型人腺病毒 (Human adenovirus type 5, HAd5), 其重组 HAd5 可以被开发为单独施用或与非人腺病毒载体一起施用的牛鼻内疫苗载体。此外, 用烟草花叶病毒当载体表达 BHV-1 gD 的胞质形式, 接种后牛产生了特定的体液免疫和细胞免疫^[47]。更重要的是, 接种了烟草花叶病毒产生的 gD 的动物在受到强毒力 BHV-1 攻击后表现出良好的保护水平。病毒活载体疫苗的主要优点之一是将抗原直接呈递到黏膜表面, 诱导体液和细胞介导的免疫反应。Liu 等^[48]优化了 BVDV-1 E2 基因的密码子, 添加了 BHV-1 gD 基因的信号肽序列, 构建了具有 gE 基因缺失的 BHV-1 遗传学工程载体疫苗, 可以产生针对 BHV-1 和 BVDV-1 感染的特异性中和抗体反应。BHV-4 也可作为病毒载体表达 BHV-1 gD 蛋白, 抵御 BHV-1 病毒入侵^[49]。同时 BHV-4 基因组可作为细菌人工染色体 (BAC) 使用, 这极大地促进了其用于疫苗研究的操作性^[50]。

4 BHV-1 gB 和 gD 糖蛋白在诊断应用方面的研究

目前认为 BHV-1 病毒只有 1 个血清型^[51], 利用 gB、gD 糖蛋白进行诊断的方法主要有病毒中和试验 (Virus neutralization, VN)、聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assays, ELISA)、间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescence, IFA) 和免疫胶体金技术 (Gold immununochromatographic, GICA)、环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等。gB、gD 的诊断方法见表 3。

4.1 分子生物学方法

4.1.1 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 所谓 qPCR 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基因, 利用荧光信号积累实时监测

表 3 诊断方法
Table 3 Diagnostic methods

诊断方法 Diagnostic methods	诊断技术 Diagnostic technique	BHV-1	
		gB	gD
分子生物学方法 Molecular biology methods	实时荧光定量 PCR (qPCR)	√	√
	巢式 PCR (Nested PCR)	√	√
	恒温隔绝式荧光 PCR (iiPCR)	√	×
	环介导等温扩增技术 (LAMP)	√	√
	聚合酶螺旋反应 (PSR)	√	×
免疫学方法 Immunologic methods	酶联免疫吸附试验 (ELISA)	√	√
	病毒中和试验 (VN)	×	√
	间接免疫荧光试验 (IFA)	×	√
	免疫胶体金技术 (GICA)	√	√

“√”表示目前已有研究, “×”表示目前未见研究。

√: existing research; ×: no known research activity at present.

整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。目前常用的荧光化学方法有两种, 分别是染料法 (SYBR Green I) 和探针法 (TaqMan 探针、杂交探针)。

2015 年, 乔波等^[52]将小沟结合物 (Minor groove binder, MGB) 与 TaqMan 探针相结合, 建立了基于 gB 蛋白的 TaqMan-MGB 的 qPCR 检测方法, MGB 能够增加 TaqMan 探针的解链温度, 增强探针的特异性。2016 年, Marin 等^[53]使用 qPCR 和高分辨率熔解 (High-resolution melting, HRM) 相结合的方法同时检测和区分 BHV-1 及 BHV-5, 比常规 PCR 表现出更高的灵敏度。2019 年, 任亚初等^[54]针对 gD 保守区域, 利用 SYBR Green I 荧光染料法建立了特异性检测 BHV-1 的 qPCR 方法, SYBR Green I 对双链 DNA 专一性高, 且 qPCR 灵敏度要高于常规 PCR, 不仅可以定性分析 DNA, 还可以定量分析核酸表达量。在此之后两年, 王倩颖等^[55]利用 gD 构建重组质粒标准品 pMD-gD-IBRV 建立的 qPCR 敏感度为 $4.8 \times 10^1 \text{ copies} \cdot \text{uL}^{-1}$, 相比任亚初等研究中的 $6.1 \times 10^1 \text{ copies} \cdot \text{uL}^{-1}$, 检测下限更低, 更加灵敏。同年, 任强林^[56]截取部分 gB 基因序列建立了 BHV-1 TaqMan-gB qPCR 检测技术, 该方法对牛易感的冠状病毒、诺如病毒和腹泻病毒等均未检出。检测下限为 $1.35 \times 10^1 \text{ copies} \cdot \text{uL}^{-1}$, 比常规 PCR 灵敏度高出 100 倍。

4.1.2 巢式 PCR (Nested polymerase chain reaction, nested PCR) 巢式 PCR 是一种新型的 PCR 技术, 相较于普通 PCR, 多出了一对引物扩增片段。第二对引物可以结合在第一次扩增片段的内部, 使第二次扩增的片段小于第一次扩增的片段。如果第一次扩增产生了错误片段, 则第二次扩增会大大降低错误片段产生的概率。因此, 巢式 PCR 的扩增非常特异。

2005 年, 国外有学者以 BHV-1 的 gB 基因为靶

标, 建立巢式 PCR 技术, 以检测可疑的牛、水牛和绵羊临床标本中的 BHV-1^[57], 同时用 IFA 检测加以对照。结果表明, 巢式 PCR 检测结果优于 IFA 免疫检测。此外, 巢式 PCR 是最具判别性的检测方法, 可检测直接从牛和水牛临床标本中提取的 BHV-1 病毒 DNA。这项研究的结果强调了基于 BHV-1 gB 的巢式 PCR 的优越性, 该方法可作为 BHV-1 感染的流行病学研究和控制程序的灵敏, 判别和快速工具, 而不会与其他反刍动物疱疹病毒混淆。次年, 邓碧华^[58]利用 gB、gE 基因建立的巢式 PCR, 对伪狂犬病毒、马立克氏病毒、鸭瘟病毒均未产生条带, 特异性高。同时该方法可以区分基因缺失疫苗接种牛和野毒株感染牛。2018 年, Hidayati 等^[59]利用巢式 PCR 扩增 BHV-1 gB、gD 和 gM 检测印度尼西亚牛群中 BHV-1 的流行情况。

4.1.3 恒温隔绝式荧光 PCR (Insulated isothermal PCR, iiPCR) 与需要复杂且耗时的核酸提取步骤的 PCR 测定不同, iiPCR 测定只需要对样品进行最简单的预处理(重悬和煮沸), 这符合现场检测的条件^[60]。此外, 在测定过程中使用了冻干试剂, 这些试剂在环境温度下易于运输和储存。而且 iiPCR 机重量轻, 自带电源, 操作简便, 结果容易判读。张颖慧^[61]在 2019 年利用 gB 基因首次构建了 iiPCR 方法检测 IBRV, 该方法配合 PetNAD 核酸萃取试剂盒, 可在 1 h 内获得检测结果, 为现场检测 IBRV 提供了一种新方法。

4.1.4 环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) LAMP 是一种体外快速扩增 DNA 的方法, 能在 1 h 内实现 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的扩增, 比常规 PCR 省时、省力, 不需要繁琐的 PCR 过程和凝胶电泳, 是一种适合于现场以及基层的快速检测的方法。

2017 年, Socha 等^[62]比较了 gD 和 gE 两种基因在 LAMP 上的敏感性: gD 的敏感度为 64.7%, 而对 gE 的敏感度为 80%; 对 LAMP gD 和 LAMP gE 的诊断特异性分别为 78.9% 和 89.3%。2018 年, Dong 等^[63]针对 gB 保守区域设计了 3 对引物, 通过优化反应系统建立的 LAMP 检测方法, 灵敏度为 $10 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒 DNA; 该方法与牛病毒性腹泻病毒 (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV)、伪狂犬病病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 和水泡性口炎病毒 (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) 没有交叉反应性, 鼻拭子标本更适合临床 IBRV 检测。同年, 范青等^[64]在 BHV-1 5'端用荧光基团 FAM 合成 BHV-1 的内部引物以检测 BHV-1 gB 基因, 并在 5'末端用荧光基团

CY5 合成 MB 的内部引物以检测 MB uvrC 基因, 建立了基于双重荧光的环介导等温扩增技术 (Duplex fluorescence-based loop-mediated isothermal amplification, DLAMP)。DLAMP 技术可以特异性检测牛支原体 (*Mycoplasma bovis*, MB) 和 BHV-1, 灵敏度为 2×10^2 个含有 MB 和 BHV-1 靶基因的重组质粒的拷贝, 灵敏度和特异性分别为世界动物卫生组织推荐的 PCR 检测现场样品的 95%~96.6% 和 100%。该技术为临床标本中 MB 和 BHV-1 的鉴定以及流行病学监测提供了快速、灵敏和特异性的测定。

4.1.5 聚合酶螺旋反应 (Polymerase spiral reaction, PSR) PSR 是基于 LAMP 和 PCR 建立的一种新型恒温体外核酸扩增技术, 通过在两条引物的 5'端加上一段互为反向的序列, 可以使引物以自我为模板采用自螺旋扩增的方式将目标核酸片段大量扩增出来。Malla 等^[65]建立的 PSR 检测技术, 以检测牛冷冻精液和流产胎儿组织中的 BHV-1 gD 基因来达到诊断 BHV-1 的目的。与使用 6 组引物的 LAMP 不同, PSR 仅使用两种引物, 类似于传统的 PCR, 但灵敏度是传统 PCR 的 100 倍^[46]。在使用 PSR 的情况下, 由于使用多种引物和优化困难而造成的污染机会大大降低。

4.2 免疫学方法

4.2.1 酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) ELISA 试验是使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体, 与检测样品结合后加入酶反应底物, 底物被酶催化为有色产物, 然后根据产物颜色深浅对结果进行定性或定量分析。目前已被广泛应用于病原微生物诊断^[66]。

gB 蛋白是目前做 ELISA 的首选蛋白, gD 蛋白是制备亚单位疫苗的首选蛋白, 因此, 在 2015 年, 费玮彦^[67]利用 gB、gD 两种蛋白建立 ELISA 检测方法, 与单个蛋白建立的 ELISA 方法进行比较, 特异性和稳定性无明显差别, 但是从灵敏度上来说, 前者灵敏度更高。同年, 周跃辉^[68]利用自己所制备的单抗 3C2 和 1F5 初步建立了检测 IBRV 抗原的双抗体 ELISA, 该方法相较于间接 ELISA 来说, 以酶标抗原代替酶标抗体, 检测灵敏度更高。2019 年, 魏鑫等^[69]利用大肠杆菌原核表达载体 pET-32a 表达 gD 蛋白, 与口蹄疫 (*Foot-and-mouth disease virus*, FMDV)、副结核病 [*Paratuberculosis* (Johne's disease)]、结核病 (*Tuberculosis*, TB)、布鲁菌病 (*Brucella*)、BVDV 等阳性血清无交叉反应, 特异性好。将其包被到 ELISA 板上建立的间接 ELISA 试

验, 与 IDEXX 公司生产的 BHV-1 gB X3 抗体检测试剂盒相比, 一致率达到了 96%。2021 年, 史喜娟等^[70] 用 ELISA 试验和病毒中和试验两种方法检测 gB, 发现血清 gB 抗体平均阻断率和中和抗体效价平均值具有较强的相关性, 因此通过检测 gB 抗体阻断率来衡量牛群对 IBRV 的抵抗力强弱基本可以评估其保护效价的高低, 这为使用 gB ELISA 抗体水平的方法快速简便评估牛群中 IBRV 抗体保护效果提供数据支持, 更有利于 IBR 的防控。利用 gD 蛋白建立的阻断 ELISA, 也能够有效检测 BHV-1^[71]。

4.2.2 病毒中和试验 (Virus neutralization, VN) gB 蛋白能产生保护性中和抗体, 但是产生中和抗体的量远不如 gD 蛋白, 所以 VN 在 gD 蛋白上研究的比较多。抗 gD 蛋白的特异性抗体具有中和病毒的能力, 所以利用其产生的单克隆抗体可以与病毒结合从而中和病毒, 达到诊断 BHV-1 的目的。

2017 年, 吴靖^[72] 在制备 gD 糖蛋白单克隆抗体的基础上, 从杂交瘤细胞中提取 RNA 获得单链抗体基因, 制备了抗 BHV-1 的单链抗体, 为牛 IBRV 特异性诊断方法的开发提供了新思路。同年, 毕莹等^[73] 用大肠杆菌原核表达系统表达 gD 蛋白, 得到 IBRV gD 蛋白的单克隆抗体。虽然用原核系统表达出来的 gD 蛋白具有良好的病毒结合活性, 但其表达出来的重组蛋白结构不同于天然蛋白结构, 其表面的抗原表位也不相同, 会影响 gD 蛋白部分功能活性。在此基础上, 贾晓雪等^[74] 于 2019 年利用免疫超纯化的方式纯化 BHV-1 病毒来制备 BHV-1 gD 单克隆抗体, 模拟病毒天然感染动物机体时产生中和抗体的情况。既缩短了制备免疫原的时间, 节省了试验成本, 也可获得与 IBRV 特异性结合的单克隆抗体。针对 gD 蛋白的单克隆抗体即使不需要补体仍能表现出高水平的抗体滴度^[15]。

4.2.3 间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescence assay, IFA) IFA 是利用特异性抗体与待测样中相应抗原结合后, 利用带有荧光素酶标记的第二抗体与之结合, 观察产生的特异性荧光以检测未知抗原或抗体。IFA 相比免疫荧光试验 (Immunofluorescence assay, FA) 的优势在于敏感度有很大程度的提高。同时, 由于 BHV-1 单克隆抗体的特异性很高, IFA 不仅仅局限于用 IBR 阳性血清作为一抗, 增加了一抗的选择性。

gB 蛋白在 IFA 检测方法方面暂时未见有人研究。关于 gD 蛋白, 在 2020 年, 杨飞等^[75] 利用 CHO 细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO) 表达的重组 BHV-1 gD 蛋白作为免疫原, 建立了间接免疫荧光诊

断技术, 用该方法检测几种牛病病毒, 其结果与美国 VMRD 公司生产的 BHV-1 gD 单克隆抗体检测结果一致率为 100%, 重复性高, 效果好, 检测结果可靠。CHO 细胞的优势在于其表达的蛋白在分子结构和理化特性上能尽可能贴近天然的蛋白质, 且很少分泌内源蛋白质, 这有利于外源蛋白的分离和提取。

4.2.4 免疫胶体金技术 (Gold immunochromatographic assay, GICA) GICA 技术是在免疫渗滤技术基础上建立的一种简易快速的免疫学检测技术, 以 NC 膜为载体, 利用微孔膜的毛细作用, 使得待测抗原与胶体金复合物的抗体结合, 最后被固相抗体所捕获, 在膜上出现红色控制线。相较于 ELISA, GICA 不需要洗板过程, 直接加样即可快速检测出结果。

2018 年, 何小丽^[8] 以兔抗牛 IgG 为金标抗体, 以 BHV-1 gB 蛋白为检测抗体建立了 IBR GICA 抗体检测方法, 该方法具有良好的特异性和敏感性, 适用于牧场现场检测。次年, 梅力等^[76] 将胶体金标记的 gD 蛋白作为示踪抗原, 未用胶体金标记的 gD 抗原作为捕获抗原, IgG 抗体作为质控抗体, 建立了 BHV-1 双抗原夹心法胶体金检测试纸条。该试纸条灵敏度高, 特异性好, 检测结果与 IDEXX BHV-1 抗体检测试剂盒检测结果符合率达到了 94.6%。胶体金试纸可以在室温稳定保存且操作方法简便, 所需时间短, 适用于现场快速检测。

5 小结与展望

BHV-1 是 α 疱疹病毒亚科的成员, 该亚科成员在宿主体内能快速复制并导致受感染细胞裂解。与许多 α 疱疹病毒类似, BHV-1 初次感染机体后潜伏在感觉神经元中, 造成潜伏感染。它是一种双链 DNA 病毒, 编码大量包膜糖蛋白以介导病毒包膜和细胞膜之间的受体相互作用, 引发病毒颗粒进入宿主细胞^[77]。通过细胞间相互作用, 以及血液、神经和受感染组织传播到体内。

gB 蛋白是所有疱疹病毒里面同源性最高的糖蛋白, 所以针对 gB 蛋白所建立的诊断方法要多于疫苗研究; gD 糖蛋白可诱导机体产生强烈的细胞免疫和体液免疫, 且其单克隆抗体具有中和病毒的能力, 所以在开发诊断试剂和制备基因工程亚疫苗, 以及研发抗病毒药物方面具有重要作用。相比于传统疫苗, 基因疫苗不仅可以产生体液免疫应答, 而且可以导致 CTL 激活而诱导细胞免疫, 而传统疫苗只有活苗可诱导细胞免疫, 但存在毒力返强的风险。同时要注意, 基因疫苗的免疫效率很难达到百分之百的免疫保护, 且存在明显的种属个体差异, 这可能

与不同动物细胞需要不同启动子、抗原基因、免疫途径、免疫剂量有关。BHV-1的诊断方法也随着对该病毒研究的深入而逐渐变得更加灵敏和特异,也更适用于临床大批量检测样品。

综上,gB糖蛋白是BHV-1最保守的糖蛋白,gD糖蛋白是BHV-1对病毒中和效应最好的糖蛋白,能诱导机体产生大量的中和抗体,在BHV-1预防和诊断上发挥重要作用。且随着科学技术的发展以及生物信息技术的不断成熟,对gB、gD的研究也在不断深入。针对IBRV的各种新型疫苗以及诊断方法在不断被加以丰富,但真正用于临床还有相当一段距离。所以未来研究高效、安全的疫苗以及准确、快速诊断IBRV的方法仍是兽医工作的重中之重,这对IBRV的防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] NAGY A, ABDALLAH F, EL DAMATY H M, et al. Genetic characterization of upper respiratory tract virome from nonvaccinated Egyptian cow-calf operations [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (5) : e0267036.
- [2] HOU P L, ZHAO M, HE W Q, et al. Cellular microRNA bta-miR-2361 inhibits bovine herpesvirus 1 replication by directly targeting *EGR1* gene [J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 233: 174–183.
- [3] WATHES D C, OGUEJIOFOR C F, THOMAS C, et al. Importance of viral disease in dairy cow fertility [J]. *Engineering*, 2020, 6 (1) : 26–33.
- [4] QUEIROZ-CASTRO V L D, DA COSTA E P, ALVES S V P, et al. Detection of bovine herpesvirus 1 in genital organs of naturally infected cows [J]. *Theriogenology*, 2019, 130: 125–129.
- [5] TANG L K, YUAN W F, LI S T, et al. DNA damage response differentially affects BoHV-1 gene transcription in cell type-dependent manners [J]. *Biomedicine*, 2022, 10 (9) : 2282.
- [6] OSTLER J B, JONES C. The bovine herpesvirus 1 latency-reactivation cycle, a chronic problem in the cattle industry [J]. *Viruses*, 2023, 15 (2) : 552.
- [7] QIU W C, DING X Y, LI S T, et al. Oncolytic bovine herpesvirus 1 inhibits human lung adenocarcinoma A549 cell proliferation and tumor growth by inducing DNA damage [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (16) : 8582.
- [8] 何小丽.牛传染性鼻气管炎病毒部分gB蛋白的原核表达及应用[D].银川:宁夏大学,2018.
HE X L. Prokaryotic expression and application of partial gB protein of infectious bovine rhinotracheitis virus[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2018. (in Chinese)
- [9] 李兆利,薛飞,朱远茂.牛传染性鼻气管炎病毒gB蛋白研究进展[J].*动物医学进展*,2006,27(4):1–4.
LI Z L, XUE F, ZHU Y M. Advance in Infectious bovine rhinotracheitis virus Glycoprotein B [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27 (4) : 1–4. (in Chinese)
- [10] ROS C, BELÁK S. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses [J]. *Virus Genes*, 2002, 24 (2) : 99–105.
- [11] VALLBRACHT M, LÖTZSCH H, KLUPP B G, et al. *In vitro* viral evolution identifies a critical residue in the alphaherpesvirus fusion glycoprotein B ectodomain that controls gH/gL-independent entry [J]. *mBio*, 2021, 12 (3) : e00557–e00521.
- [12] HUTCHINGS D L, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, BABIUK L A. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64 (10) : 5114–5122.
- [13] YUE D, CHEN Z J, YANG F L, et al. Crystal structure of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D bound to nectin-1 reveals the basis for its low-affinity binding to the receptor [J]. *Science Advances*, 2020, 6 (20) : eaba5147.
- [14] HONDA T, SAKISAKA T, YAMADA T, et al. Involvement of nectins in the formation of puncta adherentia junctions and the mossy fiber trajectory in the mouse hippocampus [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2006, 31 (2) : 315–325.
- [15] DUMMER L A, LEITE F, HURK L. Bovine herpesvirus glycoprotein D: A review of its structural characteristics and applications in vaccinology [J]. *Veterinary Research*, 2014, 45 (1) : 111.
- [16] RUDD J S, MUSARRAT F, KOUSOULAS K G. Development of a reliable bovine neuronal cell culture system and labeled recombinant bovine herpesvirus type-1 for studying virus-host cell interactions [J]. *Virus Research*, 2021, 293: 198255.
- [17] 杨志元,闻晓波,冉旭华.牛疱疹病毒I型(BHV-1)免疫逃逸机制研究进展[J].*黑龙江八一农垦大学学报*,2018,30(4):42–46.
YANG Z Y, WEN X B, RAN X H. Immune escape mechanism of bovine herpesvirus I (BHV-1) [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2018, 30 (4) : 42–46. (in Chinese)
- [18] GRABOWSKA K, WĄCHALSKA M, GRAUL M, et al. Alphaherpesvirus gB homologs are targeted to extracellular vesicles, but they differentially affect MHC class II molecules [J]. *Viruses*, 2020, 12 (4) : 429.
- [19] KEIL G M, HÖHLE C, GIESOW K, et al. Engineering glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 to function as transporter for secreted proteins: A new protein expression approach [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (2) : 791–799.
- [20] HUANG Y, BABIUK L A, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. The cell-mediated immune response induced by plasmid encoding bovine herpesvirus 1 glycoprotein B is enhanced by plasmid encoding IL-12 when delivered intramuscularly or by gene Gun, but not after intradermal injection [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (25) : 5349–5359.
- [21] OSMAN N A, RÖDER A, GIESOW K, et al. Genetic fusion of peste des petits ruminants virus haemagglutinin and fusion protein domains to the amino terminal subunit of glycoprotein B of bovine herpesvirus 1 interferes with transport and function of gB for BHV-1 infectious

- replication [J]. *Virus Research*, 2018, 258: 9–18.
- [22] NI H B, JIA X X, WANG J, et al. Mapping a highly conserved linear neutralizing epitope at the N-terminus of the gD glycoprotein of bovine herpesvirus type 1 using a monoclonal antibody [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 138: 103815.
- [23] WANG X, BI Y, RAN X H, et al. Mapping a highly conserved linear neutralizing epitope on gD glycoprotein of bovine herpesvirus type 1 using a monoclonal antibody [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81 (5): 780–786.
- [24] 翟璐, 张海威, 涂伟, 等. 牛疱疹病毒 1 型主要囊膜糖蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41 (2): 88–92.
ZHAI L, ZHANG H W, TU W, et al. Progress on envelope glycoproteins of bovine herpesvirus type 1 [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41 (2): 88–92. (in Chinese)
- [25] CONNOLLY S A, WHITBECK J C, RUX A H, et al. Glycoprotein D homologs in *Herpes simplex* virus type 1, pseudorabies virus, and bovine *Herpes* virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities [J]. *Virology*, 2001, 280 (1): 7–18.
- [26] CUDDINGTON B P, MOSSMAN K L. Oncolytic bovine herpesvirus type 1 as a broad spectrum cancer therapeutic [J]. *Current Opinion in Virology*, 2015, 13: 11–16.
- [27] 李河林. IBRV XA 株的分离鉴定及其 gD 蛋白的原核表达 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
LI H L. Isolation and identification of IBRV and prokaryotic expression its glycoprotein D [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010. (in Chinese)
- [28] LIU Y, ZHANG Q, ZOU M, et al. Cell entry of Bovine herpesvirus-1 through clathrin- and caveolin-mediated endocytosis requires activation of PI3K-Akt-NF- κ B and Ras-p38 MAPK pathways as well as the interaction of BoHV-1 gD with cellular receptor nectin-1 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 279: 109672.
- [29] HUANG Y, BABIUK L A, HURK L. Immunization with a bovine herpesvirus 1 glycoprotein B DNA vaccine induces cytotoxic T-lymphocyte responses in mice and cattle [J]. *The Journal of General Virology*, 2005, 86(Pt 4): 887–898.
- [30] TOUSSAINT J F, COEN L, LETELLIER C, et al. Genetic immunisation of cattle against bovine herpesvirus 1: Glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8 [J]. *Veterinary Research*, 2005, 36 (4): 529–544.
- [31] LEWIS P J, COX G J M, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, et al. Polynucleotide vaccines in animals: Enhancing and modulating responses [J]. *Vaccine*, 1997, 15 (8): 861–864.
- [32] LIU X B, YU G W, GAO X Y, et al. Intranasal delivery of plasmids expressing bovine herpesvirus 1 gB/gC/gD proteins by polyethyleneimine magnetic beads activates long-term immune responses in mice [J]. *Virology Journal*, 2021, 18 (1): 60.
- [33] CASELLI E, BONI M, DI LUCA D, et al. A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2005, 28 (2): 155–166.
- [34] DI GIACOMO S, QUATTROCCHI V, ZAMORANO P. Use of adjuvants to enhance the immune response induced by a DNA vaccine against bovine herpesvirus-1 [J]. *Viral Immunology*, 2015, 28 (6): 343–346.
- [35] ZAMORANO P, TABOGA O, DOMÍNGUEZ M, et al. BHV-1 DNA vaccination: Effect of the adjuvant RN-205 on the modulation of the immune response in mice [J]. *Vaccine*, 2002, 20 (21/22): 2656–2664.
- [36] KORNUA C A, LANGELLOTTI C A, BIDART J E, et al. A plasmid encoding the extracellular domain of CD40 ligand and Montanide™ GEL01 as adjuvants enhance the immunogenicity and the protection induced by a DNA vaccine against BoHV-1 [J]. *Vaccine*, 2021, 39 (6): 1007–1017.
- [37] NANDI S, KUMAR M, MANOHAR M, et al. Bovine herpes virus infections in cattle [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10 (1): 85–98.
- [38] ABDELMAGID O Y, MANSOUR M M, MINOCHA H C, et al. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses [J]. *Veterinary Microbiology*, 1998, 61 (4): 249–259.
- [39] PERALTA A, MOLINARI P, CONTE-GRAND D, et al. A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75 (2): 407–414.
- [40] OLIVEIRA S C, HARMS J S, ROSINHA G M S, et al. Biolistic-mediated gene transfer using the bovine herpesvirus-1 glycoprotein D is an effective delivery system to induce neutralizing antibodies in its natural host [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 245 (1/2): 109–118.
- [41] HOU L N, WANG F X, WANG Y X, et al. Subunit vaccine based on glycoprotein B protects pattern animal Guinea pigs from tissue damage caused by infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. *Virus Research*, 2022, 320: 198899.
- [42] 谢青梅, 封柯宇, 沈勇. 动物病毒重组活载体疫苗研究进展 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40 (5): 102–110.
XIE Q M, FENG K Y, SHEN Y. Advances in recombinant live vector vaccines for animal viruses [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40 (5): 102–110. (in Chinese)
- [43] ERTL H C. Viral vectors as vaccine carriers [J]. *Current Opinion in Virology*, 2016, 21: 1–8.
- [44] KHATTAR S K, COLLINS P L, SAMAL S K. Immunization of cattle with recombinant Newcastle disease virus expressing bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D induces mucosal and serum antibody responses and provides partial protection against BHV-1 [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (18): 3159–3170.
- [45] SUBBIAH M, YAN Y Q, ROCKEMANN D, et al. Experimental infection of calves with Newcastle disease virus induces systemic and mucosal antibody responses [J]. *Archives of Virology*, 2008, 153 (6): 1197–1200.
- [46] GOGEV S, VANDERHEIJDEN N, LEMAIRE M, et al. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus

- type 5 expressing glycoprotein gC or gD [J]. *Vaccine*, 2002, 20 (9/10) : 1451-1465.
- [47] PÉREZ FILGUEIRA D M, ZAMORANO P I, DOMÍNGUEZ M G, et al. Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity [J]. *Vaccine*, 2003, 21 (27/28/29/30) : 4201-4209.
- [48] LIU C Y, GUO H, ZHAO H Z, et al. Recombinant bovine herpesvirus type 1 expressing the bovine viral diarrhoea virus E2 protein could effectively prevent infection by two viruses [J]. *Viruses*, 2022, 14 (8) : 1618.
- [49] BILGE-DAGALP S, FARZANI T A, DOĞAN F, et al. Development of a BoHV-4 viral vector expressing tgD of BoHV-1 and evaluation of its immunogenicity in mouse model [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52 (3) : 1119-1133.
- [50] SHRINGI S, O'TOOLE D, COLE E, et al. OvHV-2 glycoprotein B delivered by a recombinant BoHV-4 is immunogenic and induces partial protection against sheep-associated malignant catarrhal fever in a rabbit model [J]. *Vaccines*, 2021, 9 (2) : 90.
- [51] 丁国伟, 李琛, 李玉安, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白的原核表达及其免疫原性 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2018, 44 (1) : 77-81.
- DING G W, LI C, LI Y A, et al. Expression and immunogenicity of protein gD from virus in infectious rhinotracheitis of bovine [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2018, 44 (1) : 77-81. (in Chinese)
- [52] 乔波, 陈楠楠, 赵静虎, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒TaqMan-MGB荧光定量PCR方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37 (4) : 282-285.
- QIAO B, CHEN N N, ZHAO J H, et al. Development of TaqMan-MGB probe real-time PCR for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37 (4) : 282-285. (in Chinese)
- [53] MARIN M S, QUINTANA S, LEUNDA M R, et al. A new method for simultaneous detection and discrimination of Bovine herpesvirus types 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) using real time PCR with high resolution melting (HRM) analysis [J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 227: 14-22.
- [54] 任亚初, 楚会萌, 程凯慧, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒SYBR Green I 荧光定量PCR检测方法的建立及应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41 (10) : 1032-1036.
- REN Y C, CHU H M, CHENG K H, et al. Establishment and application of the SYBY Green I real-time PCR assay for detection of the infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41 (10) : 1032-1036. (in Chinese)
- [55] 王倩颖, 杨森, 刘可欣, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立与初步应用[J/OL]. 中国动物传染病学报: 1-8 [2023-03-24]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211103.001>.
- WANG Q Y, YANG S, LIU K X, et al. Establishment and preliminary application of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus[J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*: 1-8 [2023-03-24]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20211103.001>. (in Chinese)
- [56] 任强林. 牛传染性鼻气管炎病毒TaqMan-gB荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- REN Q L. Establishment and preliminary application of real-time PCR for detection of infectious bovine rhinotracheitis virus[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [57] EL-KHOLY A A. Molecular and immunological detection of bovine herpesvirus-1 in clinical specimens [J]. *The Egyptian Journal of Immunology*, 2005, 12 (2) : 125-136.
- [58] 邓碧华. 牛传染性鼻气管炎病毒套式PCR和荧光PCR检测方法的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- DENG B H. Establishment of nested PCR and real-time PCR methods to detect infectious bovine rhinotracheitis virus[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [59] HIDAYATI D N, UNTARI T, WIBOWO M H, et al. Cloning and sequencing gB, gD, and gM genes to perform the genetic variability of bovine herpesvirus-1 from Indonesia [J]. *Veterinary World*, 2018, 11 (9) : 1255-1261.
- [60] DU T, LIN J H, ZHAO J H, et al. Development and evaluation of an iPCR assay for *Salmonella* and *Shigella* detection on a field-deployable PCR system [J]. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2020, 2020: 9373984.
- [61] 张慧慧. 肉牛呼吸道疾病综合征的病原检测和IBRV恒温隔式荧光PCR方法的建立与应用[D]. 成都: 西南民族大学, 2019.
- ZHANG Y H. Detection of pathogens from beef cattle with bovine respiratory disease complex and establishment and application of an insulated isothermal PCR for on-site detecting IBRV[D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2019. (in Chinese)
- [62] SOCHA W, ROLA J, URBAN-CHMIEL R, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of bovine herpesvirus 1 [J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2017, 20 (3) : 619-622.
- [63] DONG S J, FENG M, YU R S, et al. Establishment and application of visual LAMP detection method of infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34 (10) : 1587-1595.
- [64] FAN Q, XIE Z X, XIE Z Q, et al. Development of duplex fluorescence-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Mycoplasma bovis* and bovine herpes virus 1 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 261: 132-138.
- [65] MALLA J A, CHAKRAVARTI S, GUPTA V, et al. Novel Polymerase Spiral Reaction (PSR) for rapid visual detection of Bovine Herpesvirus 1 genomic DNA from aborted bovine fetus and semen [J]. *Gene*, 2018, 644: 107-112.
- [66] 马思续, 崔春晓, 张留君, 等. 不同包被抗原检测PRRS抗体间接ELISA方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38 (6) : 1082-1087.
- MA S X, CUI C X, ZHANG L J, et al. Establishment of the indirect ELISA method for detecting PRRS antibody using different antigens [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38 (6) :

- 1082–1087. (in Chinese)
- [67] 费玮彦. 牛传染性鼻气管炎病毒SH7株gB、gD基因的原核表达及ELISA方法的建立[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- FEI W Y. Prokaryotic expression of infectious bovine rhinotracheitis virus SH7 isolate glycoprotein B and glycoprotein D and establishment of ELISA methods[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [68] 周跃辉. 牛传染性鼻气管炎病毒糖蛋白gD单抗制备及其抗原表位鉴定与双抗夹心ELISA的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- ZHOU Y H. Identification of an antigen epitope on the glycoprotein D with monoclonal antibody and establishment of A double antibody sandwich ELISA for detection for infectious bovine rhinotracheitis virus[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015. (in Chinese)
- [69] 魏鑫, 张建华, 郭婷, 等. IBRV gD蛋白的原核表达及其间接ELISA检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (11): 2129–2134.
- WEI X, ZHANG J H, GUO T, et al. Prokaryotic expression for gD protein of infectious bovine rhinotracheitis virus and establishment of indirect ELISA-linked testing method [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39 (11) : 2129–2134. (in Chinese)
- [70] 史喜娟, 杨博, 张婷, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒gB ELISA抗体与中和抗体相关性分析[J/OL]. 中国动物传染病学报: 1-8 [2023-03-24]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210817.012>.
- SHI X J, YANG B, ZHANG T, et al. Correlation analysis between gB ELISA antibody and neutralizing antibody of infectious bovine rhinotracheitis virus[J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, : 1-8[2023-03-24]. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20210817.012>. (in Chinese)
- [71] LIU W X, HONG J B, DUAN J L, et al. A neutralizing monoclonal antibody-based blocking ELISA to detect bovine herpesvirus 1 and vaccination efficacy [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107 (1) : 379–390.
- [72] 吴靖. 抗牛传染性鼻气管炎病毒囊膜gD糖蛋白单链抗体的制备与特性鉴定[D]. 南昌: 江西农业大学, 2017.
- WU J. Development and characterization of single chain antibody against gD glycoprotein of bovine infectious rhinotracheitis virus[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [73] 毕莹, 闻晓波, 倪宏波. 牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30 (10): 1050–1054.
- BI Y, WEN X B, NI H B. Preparation and identification of monoclonal antibody against gD protein of bovine infectious rhinotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2017, 30 (10) : 1050–1054. (in Chinese)
- [74] 贾晓雪, 赵微, 倪宏波. 抗牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 (7): 777–780,785.
- JIA X X, ZHAO W, NI H B. Preparation and identification of monoclonal antibody against gD protein of bovine infectious rhinotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2019, 32 (7) : 777–780,785. (in Chinese)
- [75] 杨飞, 黄小洁, 刘丹, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41 (3): 7–11.
- YANG F, HUANG X J, LIU D, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against gD protein of infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41 (3) : 7–11. (in Chinese)
- [76] 梅力, 李永清, 宋彦军, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒抗体胶体金检测试纸条的制备 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55 (1): 39–43,5.
- MEI L, LI Y Q, SONG Y J, et al. Development of acolloidal gold test strip for detection antibody of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55 (1) : 39–43,5. (in Chinese)
- [77] EISENBERG R J, ATANASIU D, CAIRNS T M, et al. Herpes virus fusion and entry: A story with many characters [J]. *Viruses*, 2012, 4 (5) : 800–832.

(责任编辑: 张梅)