ICS 67.220.20
CCS B 46

团　　体　　标　　准

T/SAAV 7—2026

饲用植物提取物体外抗病毒活性评价技术规程

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

四川省畜牧兽医学会　　发 布

目　　次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 实验室生物安全要求 2
5 抗病毒活性判定方法 2
附录 A(资料性) 常用病毒标准株及其敏感细胞系 7

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由四川省畜牧兽医学会提出并归口。

本文件起草单位：四川农业大学、湖南农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、扬州大学、桂林莱茵生物科技股份有限公司、桂林风鹏生物科技有限公司、安佑生物科技集团股份有限公司。

本文件主要起草人：谢坤宏、何军、罗玉衡、曾秋凤、黄鹏、秦彤、汪圣晨、宋云飞、李延、王梓旭。

本文件为首次发布。

饲用植物提取物体外抗病毒活性评价技术规程

1 范围

本文件规定了饲用植物提取物体外抗病毒活性测定方法和评价要求。

本文件适用于饲料生产、科研检测中各类饲用植物提取物的体外抗病毒活性测定与评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改版）适用于本文件。

GB/T 6682　分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 16886.5—2017　体外细胞毒性检测标准

GB 19489　实验室生物安全通用要求

GB/T 45138—2024　干扰素抗病毒活性评价技术规范

DB22/T 3283—2021　猪血凝性脑脊髓炎病毒检测TaqMan荧光定量PCR法

《药敏试验性能标准》（第34版）

《饲料原料目录》（中华人民共和国农业农村部公告第1773号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞病变效应

指病毒在宿主细胞内复制增殖引发的细胞病理改变现象，表现为细胞形态异常、功能损伤或死亡。

3.2

病毒效价

指单位体积病毒悬液中所含感染单位数目（IU/ml），其中感染单位为能够引起宿主产生特异反应的病毒最小剂量。

3.3

半数组织培养感染剂量

通常指病毒感染动物体或组织细胞后，引起50%细胞发生死亡或病变的最高病毒稀释度。

3.4

逆转录-聚合酶链式反应

以RNA为模板，在逆转录酶的作用下形成cDNA链，然后以cDNA为模板进行正常的PCR循环扩增。

3.5

半数有效浓度

指特定暴露时间内引起50%受试动物或细胞产生特定效应的药物浓度。

3.6

选择指数

指药物半数细胞毒性浓度CC_{50}与半数有效浓度EC_{50}的比值，当计算结果大于1.00时判定为有效药物，数值越大表明药物安全范围越广。

3.7

病毒抑制率

通常指在抗病毒治疗下，感染动物或细胞内病毒载量被有效控制至检测限以下的比例。

4 实验室生物安全要求

所有操作步骤均需遵守GB 19489《实验室生物安全通用要求》的规定。

5 抗病毒活性判定方法

5.1 噻唑蓝比色法

抗病毒活性判定方法包括噻唑蓝比色法（Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT）、实时荧光定量PCR法（qPCR）、蛋白质免疫印迹分析法（WB）。针对不同植物提取物/病毒组合，实验室应选择一种或多种适合的抗病毒活性评价方法。所有操作步骤均需遵守药敏试验性能标准，GB/T 45138—2024干扰素抗病毒活性评价技术规范，DB22/T 3283—2021猪血凝性脑脊髓炎病毒检测TaqMan荧光定量PCR法和GB/T 16886.5—2017体外细胞毒性检测标准要求。

5.1.1 材料

5.1.1.1 细胞系和病毒株

病毒应在适宜宿主细胞中连续传代，滴度测定应在实验前完成，且滴度应达到10^5 $TCID_{50}$/mL水平。选择针对研究目的所需的病毒标准株、敏感细胞系，参见附录A。

a） 标准病毒株：使用已知滴度的标准病毒株，病毒滴度应达到10^5 $TCID_{50}$/mL水平，分装保存于-80 ℃超低温冰箱，避免反复冻融。

b） 敏感细胞系：根据目标病毒选择合适的宿主细胞，细胞传代次数不超过20代。

5.1.1.2 培养基

按照相关标准进行过滤除菌。

a） 基础培养基：根据所用细胞系选择合适的基础培养基。

b） 维持培养基：基础培养基中添加2%胎牛血清、1%双抗溶液（青霉素-链霉素溶液）。

c） 生长培养基：基础培养基中添加10%胎牛血清、1%双抗溶液（青霉素-链霉素溶液）。

5.1.1.3 水

使用GB/T 6682规定的一级水进行试剂配制。

5.1.1.4 噻唑蓝（MTT）溶液

a） 配制5 mg/mL MTT储备液（PBS溶解），经0.22 μm滤膜除菌后4 ℃避光保存。

b） 使用时现配成工作液，终浓度为0.5 mg/mL。

5.1.1.5 DMSO溶液

用于溶解细胞内形成的甲瓒结晶，浓度100%（分析纯）。

5.1.1.6 饲用植物提取物样品处理

植物原料应符合《饲料原料目录》的要求，植物提取物样品（纯度>90%）制备成100 mg/mL母液，经滤膜除菌，现配现用。

a） 水溶性样品：饲用植物提取物样品用细胞维持培养基配制成100 mg/mL母液，充分溶解后经无菌0.22 μm滤膜过滤除菌，分装保存于-20 ℃。使用前37 ℃预温，用维持培养基稀释至工作浓度。

b） 脂溶性样品：对难溶于水性培养基的饲用植物提取物，可先用有机溶剂DMSO、无水乙醇配制成100 mg/mL母液，充分溶解后经无菌0.22 μm滤膜过滤除菌，分装保存于-20 ℃。使用前37 ℃预温，用维持培养基稀释至工作浓度。确保细胞培养体系中有机溶剂浓度不超过0.5%（v/v），以避免对细胞产生毒性。

5.1.2 操作步骤

5.1.2.1 饲用植物提取物最大安全浓度测定

a） 细胞准备：用细胞培养基复苏细胞，待细胞生长至对数生长期时，对细胞进行传代，用于后续植物提取物体外抗病毒活性检测实验。

b） 梯度稀释处理：细胞在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养至汇合度达80%时，吸弃细胞培养基，PBS洗涤1次，用维持培养基将饲用植物提取物母液进行系列稀释，配制8个浓度梯度（建议采用2倍梯度稀释）。每个浓度最少设置3个复孔，同时设置细胞对照组（只加维持培养基）和溶剂对照组（含相应浓度有机溶剂的维持培养基）。

c） 毒性观察：37 ℃、5%CO_2培养72 h（可按照具体攻毒效果调整），每24 h在倒置显微镜下观察细胞形态变化，记录细胞变圆、皱缩、脱落表现，确定细胞存活率≥90%的最高浓度作为最大安全浓度，并确定致死50%宿主细胞所需要的药物的最小浓度作为半数细胞毒性所需浓度（CC_{50}）。所有操作步骤均需遵守CLSI M100药敏试验性能标准要求。

5.1.2.2 细胞接种

将对数生长期的敏感细胞按1×10^4 个/孔密度接种于96孔板，每孔含100 μL培养基。置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养过夜，待细胞贴壁形成单层。

5.1.2.3 病毒感染

a） 去除已培养好细胞中的培养基，使用新鲜维持培养基清洗细胞表面2次。

b） 用维持培养基将病毒稀释至1×10^4 $TCID_{50}$/mL，然后用2 mL稀释后的病毒感染细胞，病毒感染复数（MOI）一般为0.1。

c） 在37 ℃培养箱中吸附1 h后去除上清，用PBS轻轻洗涤一次，再加入含有不同浓度植物提取物的培养基，在37 ℃培养箱中培养3 d使病毒增殖。

d） 对照组包括：细胞对照（未感染病毒）、病毒对照（不加药物）、溶剂对照（不含植物提取物）。

5.1.2.4 MTT反应

a） 感染并处理72 h后，每孔加入20 μLMTT工作液（0.5 mg/mL）。

b） 继续孵育4 h，使细胞内形成甲瓒结晶。

c） 小心弃去上清，每孔加入150 μLDMSO溶解结晶，轻轻振荡10 min。

5.1.2.5 光密度测定

使用酶标仪在570 nm波长下测定吸光度（OD）。

5.1.3 结果判定

a） 计算细胞存活率（%）：

$$存活率 = \frac{OD_{样品组} - OD_{空白组}}{OD_{细胞对照} - OD_{空白组}} \times 100\%$$

b） 以病毒对照组存活率为基准，比较各浓度植物提取物对细胞存活的提升效果。

c） 通过剂量-反应曲线，计算半数有效浓度（EC_{50}）和选择指数（$SI=CC_{50}/EC_{50}$）。

d） 当植物提取物处理组细胞存活率较病毒对照组显著升高（$p<0.05$）时，判定其具有抗病毒活性。

5.2 荧光定量PCR法

5.2.1 材料

5.2.1.1 核酸提取试剂盒

RNA病毒使用商品化总RNA提取试剂盒，DNA病毒使用商品化DNA提取试剂盒。

5.2.1.2 反转录试剂盒

商品化反转录试剂盒，包含基因组DNA去除试剂、反转录酶、反应缓冲液、dNTP混合液、随机引物和寡聚dT引物、RNase抑制剂组分。

5.2.1.3 荧光定量PCR试剂盒

商品化SYBR Green荧光定量PCR试剂盒。

5.2.1.4 引物

病毒特异性引物，引物长度18 bp～25 bp，Tm值58 ℃～62 ℃。

5.2.2 操作步骤

5.2.2.1 细胞准备和病毒感染

待细胞在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养至汇合度达80%时，用于后续植物提取物体外抗病毒活性检测实验。病毒感染前用PBS洗涤2次。供试组加入病毒稀释液，同时加入含系列浓度饲用植物提取物的维持培养基（浓度不超过最大安全浓度的1/2）；对照组加入病毒稀释液和等量维持培养基。设置3个生物学重复，37 ℃吸附1 h，期间轻摇培养板。

5.2.2.2 样品收集

吸弃上清，PBS洗涤2次，加入含相应浓度饲用植物提取物的维持培养基继续培养。感染72 h后收集样品。收集细胞上清于新EP管，-80 ℃保存；剩余培养基吸弃，PBS洗涤2次，每孔加入1 mL裂解液，用枪头吹打混匀，转移至1.5 mLEP管中，涡旋10 s充分裂解细胞，-80 ℃保存或立即提取RNA。

5.2.2.3 RNA提取

使用商品化RNA快速抽提试剂盒按说明书进行RNA提取。

5.2.2.4 反转录反应

使用商品化RNA反转录试剂盒进行反转录。

5.2.2.5 实时荧光定量PCR

反应体系包含2×SYBR Green qPCR Master Mix、上下游引物各1 μL（10 μM）、cDNA模板1 μL和DNase/RNase free水补足至总体积20 μL。每个样品设3个技术重复，设置无模板对照。反应程序：预变性95 ℃ 5 min；扩增40个循环（变性95 ℃ 15 s，退火60 ℃ 20 s，延伸72 ℃ 30 s）；溶解曲线分析（95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s）。

5.2.3 数据处理

a） 质量控制：记录各样品的Ct值，技术重复间Ct值差异应小于0.5，熔解曲线应为单峰且Tm值一致。

b） 数据标准化：采用$2^{-\Delta\Delta ct}$法计算病毒核酸相对表达量。

c） 抑制率计算：饲用植物提取物对病毒的抑制率（%）=（1-供试组相对表达量/对照组相对表达量）×100%。

5.3 蛋白质免疫印迹分析法

5.3.1 材料

5.3.1.1 试剂

a） 蛋白提取相关试剂：RIPA裂解液，使用前添加蛋白酶抑制剂（如PMSF 1 mM）；4×蛋白SDS上样缓冲液；商品化蛋白定量试剂盒。

b） SDS-PAGE相关试剂：商品化PAGE胶快速制备试剂盒或丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺，Tris-Glycine SDS buffer，电泳缓冲液。

c） 转膜和检测试剂：Tris-Glycine buffer，PVDF膜或硝酸纤维素膜，5%脱脂牛奶封闭液，TBST洗涤缓冲液，ECL化学发光检测试剂。

5.3.1.2 抗体选择

a） 病毒蛋白选择：首选结构蛋白抗体如核衣壳蛋白（N/NP）、衣壳蛋白（VP）、膜蛋白（M），通常表达量高，检测灵敏度好，信号稳定；表面蛋白抗体：如糖蛋白（G/GP）、纤突蛋白（S）、血凝素（HA），适用于囊膜病毒，可反映病毒感染性；功能蛋白抗体：如聚合酶、非结构蛋白（NS），适用于研究病毒复制机制，但表达量可能较低。

b） 病毒靶点选择：RNA病毒：优先选择核衣壳蛋白和膜蛋白抗体；DNA病毒：优先选择主要衣壳蛋白和早期蛋白抗体；轮状病毒：推荐VP6蛋白抗体，种特异性好，表达量高。

c） 抗体类型选择：单克隆抗体、多克隆抗体。

d） 内参抗体：选择β-actin等管家蛋白抗体作为内参。

e） 二抗选择：选择与一抗种属匹配的HRP或荧光标记二。

5.3.2 操作步骤

5.3.2.1 细胞准备和病毒感染

a） 待细胞在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养至汇合度达80%时，用于后续植物提取物体外抗病毒活性检测实验。用维持培养基将病毒稀释至病毒感染复数（MOI）为0.1，供试组加入病毒液和系列浓度的饲用植物提取物，对照组加入病毒液和等体积维持培养基。37 ℃吸附1 h，更换含相应浓度饲用植物提取物的维持培养基继续培养。

b） RNA病毒蛋白样品收集时间点，即早期蛋白检测在感染后12 h，结构蛋白检测在感染后24 h，晚期蛋白检测在感染后48 h；DNA病毒蛋白样品收集时间点，即早期蛋白检测在感染后6 h，中期蛋白检测在感染后24 h，晚期蛋白检测在感染后72 h。

5.3.2.2 蛋白提取和定量

a） 蛋白提取：收集培养的细胞，向细胞沉淀中加入1 mL RIPA裂解液，充分重悬裂解。冰上裂解30 min，期间每10 min涡旋混匀15 s。4 ℃、12000×rpm高速离心15 min，小心吸取上清至新的离心管。

b） 蛋白定量：按照蛋白定量试剂盒说明书操作。将各样品蛋白浓度调整一致，与5×蛋白SDS上样缓冲液按4:1混合，100 ℃煮10 min使蛋白质变性，然后瞬时离心，将样品置于-80 ℃长期保存。

5.3.2.3 SDS-PAGE电泳和蛋白转膜

a） SDS-PAGE电泳：使用商品化凝胶配置试剂盒或自配凝胶制备PAGE胶。PAGE胶每孔上样20 μL总蛋白（上样量控制在20 μg/孔），同时上样蛋白分子量标准。按标准SDS-PAGE电泳程序进行。

b） 蛋白转膜：PVDF膜需甲醇活化处理。电泳结束后将蛋白转移至PVDF膜。按湿法转移程序进行，转膜装置置于冰浴中，恒流40 mA，35 min～90 min（根据蛋白大小调整）。

5.3.2.4 免疫印迹检测

a） 封闭：用5%脱脂牛奶的TBST封闭膜，室温摇摆1 h或4 ℃过夜封闭。

b） 一抗孵育：在膜上加入10 mL稀释后的一抗，4 ℃慢摇过夜。

c） 洗涤和二抗孵育：回收一抗，用TBST洗膜3次，每次10 min。用5%的脱脂牛奶按照一抗说明书对相应种属的二抗进行稀释，并加入膜中，室温慢摇1 h。

d） 检测：回收二抗，用TBST洗膜4次，每次15 min。按照1:1的比例将ECL发光液的A液和B液混合，然后将PVDF膜取出，用滤纸吸干TBST后加入混匀的化学发光液，荧光化学发光显示结果。

e） 内参检测：检测完目标蛋白后，可剥离抗体重新检测内参蛋白。

5.3.3 数据处理

a） 图像分析：使用图像分析软件分析蛋白条带的光密度值并进行灰度分析。以内参蛋白进行标准化，计算目标蛋白的相对表达量，对照组设为1.0。

b） 抑制率计算：饲用植物提取物对病毒蛋白表达的抑制率（%）=（1-供试组相对表达量/对照组相对表达量）×100%。

附录 A
（资料性）
常用病毒标准株及其敏感细胞系

表A.1 猪源病毒、宿主细胞和培养基

病毒种类	病毒株（亚型）	宿主细胞	培养基
猪流行性腹泻病毒 PEDV	CV777、USA/CO/2013、DR13	Vero、Vero-TMPRSS2、Vero E6、IPEC-J2、PK-15、Caco-2	DMEM
猪传染性胃肠炎病毒 TGEV	Purdue 型、Miller 型	ST、PK-15、IPEC-J2、Vero	MEM
猪瘟病毒 CSFV	Shimen（强毒）、Alfort/187、C-strain（弱毒）	PK-15、SK6、ST、BT、BHK-21	MEM / DMEM
伪狂犬病病毒 PRV	NIA3、Becker、Bartha-K61（弱毒）	PK-15、Vero、BHK-21、RK-13、ST、SK6	MEM / DMEM
猪圆环病毒 PCV	PCV2 型（PCV2b、PCV2d）、PCV3 型	PK-15(PCV-free)、3D4/21、ST	MEM
猪流感病毒 SIV	H1N1、H3N2	MDCK、MDCK-SIAT1、PK-15、ST、A549、Vero	MEM(EMEM)
猪德尔塔冠状病毒 PDCoV	USA/IL/2014	IPI-2I、IPEC-J2、ST、PK-15、Vero、Huh-7	DMEM / DMEM-F12
猪轮状病毒 RotaV	A 型、B 型、C 型	PK-15、ST、Vero	MEM / DMEM

表A.2 禽类病毒、宿主细胞和培养基

病毒种类	病毒株（亚型）	宿主细胞	培养基
禽流感病毒 AIV	H5N1、H5N2、H5N6、H7N9、H9N2	MDCK、MDCK-SIAT1、CEF、DF-1、CEK、LMH、Vero、A549	MEM(EMEM) / DMEM
新城疫病毒 NDV	I 型（强毒）、Ⅱ型、Ⅲ型（弱毒）	DF-1、CEF、CEK、BHK-21、Vero、鸡胚	DMEM / MEM
传染性支气管炎病毒 IBV	M41、Beaudette	CEK、CEF、DF-1、Vero、HRT-18G、LMH	MEM / DMEM
传染性法氏囊病病毒 IBDV	D78（强毒）、STC、BC6/85（弱毒）	DF-1、CEF、CEK、BGM-70	DMEM / MEM
禽白血病病毒 ALV	J 型（HPRS-103）、A-E 型	DF-1（ALV-阴性）、CEF、CEK、LMH	DMEM / MEM
马立克氏病病毒 MDV	血清 1 型（强毒：GA、Md5；弱毒疫苗株：CVI988/Rispens）、血清 2 型（SB-1）、血清 3 型（HVT）	CEF、CKC（鸡肾原代）	MEM

表 A.3 牛源病毒、宿主细胞和培养基

病毒种类	病毒株（亚型）	宿主细胞	培养基
牛病毒性腹泻病毒 BVDV	NADL、Singer（BVDV-1 型/2 型）	MDBK、BT、BHK-21、PK-15、Vero	MEM(EMEM) / DMEM
牛传染性鼻气管炎病毒 IBRV	Cooper、Los Angeles	MDBK、BT、Vero、BHK-21、RK-13	MEM(EMEM)

表 A.3 牛源病毒、宿主细胞和培养基（续）

病毒种类	病毒株（亚型）	宿主细胞	培养基
牛冠状病毒 BCoV	Mebus	HRT-18G、MDBK、Vero、HCT-8	DMEM-F12 / MEM(EMEM)
牛呼吸道合胞病毒 BRSV	A51908、375	MDBK、BT、Hep-2、Vero	MEM(EMEM)