

张文慧,李雪娇,钱爱东.猪流感病毒分子检测技术研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(9):59-61.

猪流感病毒分子检测技术研究进展

张文慧,李雪娇,钱爱东

(吉林农业大学,吉林长春 130118)

摘要:猪流感是由猪流感病毒引起的一种急性、高度接触传染性猪传染病,对养猪业危害极大。猪流感病毒也可感染人类,对人类的生命健康造成威胁。对猪流感病毒的分子检测技术及我国猪流感的流行现状进行了综述。

关键词:猪流感;流行现状;分子检测

中图分类号: S858.28;S852.65⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)09-0059-02

猪流感(swine influenza, SI)是由猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)引起的一种急性、高度接触传染性猪传染病。1918年,美国首次报道了 SI。1930年,Shope 分离并鉴定了第一株猪流感病毒 SIV A/Swine/Iowa/15/30(H1N1),该病毒被认为是美国 20 世纪初发生的 SI 病原^[1]。该病传播迅速,往往 2~3 d 内波及全群。康复猪、隐性感染猪是猪流感病毒的主要储存宿主,也是猪流感的主要传染源^[2]。该病一年四季都可发生,在规模化养猪场难以根除,对养猪业危害极大。另外, SIV 的 HA 受体结合位点具有与人流感病毒、禽流感病毒 2 种流感病毒受体相同的结合特异性,这决定了 SIV 不仅可以感染猪,同时也可感染人类^[3]。历史上 SIV 感染人的报道并不罕见。1976 年美国新泽西州一名士兵死于古典 H1N1 SIV 感染,这是人类历史上首例 SIV 致死人的报道,之后在其他地区也出现 SIV 感染并致死的报告^[4-5]。迄今为止,猪流感已遍及世界各地,已经分离出 H1N1、H1N2、H2N3、H3N1、H1N7、H3N3、H4N6、H5N1 等多种血清型,其中在猪群中广泛流行的猪流感病毒主要有古典猪 H1N1 毒株、类禽 H1N1 毒株、类人 H3N2 毒株^[6]。本研究对猪流感病毒的分子检测技术以及猪流感在我国的流行现状进行综述,旨在为开展猪流感研究提供参考。

1 猪流感病毒分子检测技术研究进展

1.1 反转录聚合酶链式反应

反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)是目前发展最成熟的分子诊断技术,可以从基因水平检测 SIV 的 RNA,大大缩短了 SI 病原的检出时间,为猪流感的快速诊断提供了更敏感、更快速的方法。该方法具有省时、省力、灵敏度高、特异性强、诊断速度快等优点,已在猪流感病毒检测中得到广泛应用^[7]。Lee 等利用 RT-PCR 方法分别在临床样本中鉴定出 H1、H3、N1、N2 亚型猪流感病毒^[8]。杨焕良等建立了猪流感病毒 H1N1、H1N2、H3N2 亚型多重 RT-PCR 诊断方法,可以

在 2 个反应体系中对猪流感 HA、NA 基因进行亚型鉴定,极大地节约了人力与时间^[9]。特异性试验检测多重 RT-PCR 不能扩增其他猪病毒核酸,核酸最低检测量达 2 ng。

1.2 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction)是将荧光基团加入 PCR 反应体系中,利用荧光信号积累对整个 PCR 进程进行实时监测,敏感性远远高于普通的 RT-PCR。实时 PCR/RT-PCR 技术是将 PCR、核酸杂交、信号放大相结合的实时、在线检测的定量 PCR 技术,比常规 PCR 更灵敏、特异性更强。目前已被广泛应用于基因表达研究、转基因研究、药物疗效分析、病原体检测等诸多领域。此方法已被用于 A 型、B 型流感病毒检测,检测流感病毒的 M 基因、HA 基因来区别 A 型、B 型流感病毒,或是用于区别 A 型流感病毒的亚型^[10-11]。段廷云等建立了实时荧光定量 PCR 检测 H1N1 亚型猪流感病毒,以 NP 基因的阳性重组质粒为荧光定量 PCR 标准品模板建立标准曲线。对探针浓度、引物浓度、镁离子浓度、退火温度进行优化,建立最佳荧光定量 PCR 反应体系、扩增程序^[12]。荧光定量 PCR 的建立为早期诊断猪流感病毒、定量分析猪流感病毒感染程度奠定了基础。张太翔等选取猪流感病毒的 NP 基因序列设计引物、探针,建立了检测 SIV 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法^[13]。张鹏超等建立的猪流感病毒 SYBR Green I 定量 RT-PCR 检测方法对 SIV 核酸检测灵敏度达 30 TCID₅₀^[14]。陈艳等建立了 H3N2 亚型猪流感病毒实时荧光定量 PCR 快速检测方法^[15]。徐敏等建立了以 RNA 为反应模板的一步法荧光定量 RT-PCR 诊断方法,该方法操作简单,可以用 RNA 作为模板直接检测,节省时间,特异性好,灵敏度高^[16]。张春明等根据猪流感病毒(SIV) M 基因的保守序列,设计并合成 1 对特异性引物及 TaqMan MGB 探针,建立了 SIV M 基因实时荧光定量 PCR 检测方法,结果表明,该方法样品检测与病毒滴定及病毒分离结果的符合率均达到 100%,特异性强,重复性好^[17]。Real-Time PCR 技术能精确检测样品中 SIV 的含量,对 SI 临床检测诊断具有较强的实用价值^[18]。

1.3 基因芯片

基因芯片技术指将大量探针分子固定于支持物后,与标记的样品分子进行杂交,通过检测杂交信号强度而获取样品分子的数量、序列信息。通过设计不同的探针阵列,使用特定的分析方法,可将该技术用于基因表达检测、突变检测、多态

收稿日期:2013-12-09

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD04B01-5)。

作者简介:张文慧(1977—),女,吉林桦甸人,博士,副教授,从事微生物学研究。E-mail:215267612@qq.com。

通信作者:钱爱东,从事微生物学研究。Tel:(0431)84533426; E-mail:qianaidong0115@163.com。

性分析、基因文库作图、杂交测序、微生物检测等领域^[19]。陈红军等根据流感病毒血凝素、神经氨酸酶、亚型基因序列间的差异性,分别设计 H1、H3、H9、N1、N2 的特异分型引物,根据 *M* 基因设计 A 型流感病毒的通用引物制成基因芯片,并对 217 份不同地区的样品进行检测,结果表明,该芯片可以同时检测待检样品中 5 种亚型 A 型流感病毒,并显示了较高的灵敏度、特异性,灵敏度比 PCR 高 1 个稀释度,比病毒分离高 2 个稀释度^[20]。杨林等根据猪流感病毒的 *M* 基因序列设计了 1 对特异性引物,通过将单链 PCR 产物与芯片杂交实现对 SIV 的检测^[21]。高淑霞等制备了检测 H1N1、H3N2、H5N1、H9N2 4 种亚型猪流感病毒的基因芯片技术,与 PCR 方法相比,该基因芯片技术显示了较高的灵敏度^[22]。王慧煜等建立了能同时鉴别甲型 H1N1 及猪流感病毒常见亚型的新型基因芯片检测方法^[23]。

2 我国猪流感流行现状

近年来,我国很多学者分离到不同亚型的 SIV^[24]。李海燕等对黑龙江省、吉林省、辽宁省等地猪群进行了猪流感血清学、病原学调查研究,从 1 306 份猪鼻拭子样品及死亡猪肺、气管样品中分离到 39 株 H3N2 亚型猪流感病毒、12 株 H1 亚型猪流感病毒及其他亚型猪流感病毒^[25]。辛晓光等进行了黑龙江省猪流感病原学及血清学调查,1997—2002 年共采集到 414 份猪血清样品,经猪流感血清学检查出猪流感阳性血清 57 份,平均阳性率为 14%;采集到猪的病毒材料 275 例,经技术处理后接鸡胚,分离出猪流感病毒 26 株,表明有些猪场污染情况比较严重,直接影响猪场的生存及发展^[26]。王隆柏等于 2005 年 8—12 月对福建省猪群猪流感病毒感染情况进行调查,猪流感 H1 亚型抗体检测的平均阳性率为 53.0%,猪流感 H3 亚型抗体检测的平均阳性率为 23.7%,由此可知,福建省猪群不仅存在不同程度的 H1、H3 亚型 SIV 感染,而且感染较为普遍^[27]。康文彪等在甘肃省 11 个市州的猪群中检出猪流感 H3N2 抗体阳性 118 份,平均阳性率为 27.89%,其中健康猪血清检出阳性 42 份,阳性率为 22.34%;患病猪血清检出阳性 76 份,阳性率为 32.34%^[28]。朱善德等对浙江省宁波市 10 个县(市、区)5 个猪场的 457 份血清进行猪流感 H3N2 抗体检测,结果表明,猪场阳性率为 25.93%,全市猪群平均阳性率为 16.41%;检测健康猪血清 373 份,阳性率达 11%;检测发病猪血清 84 份,阳性率达 40.48%^[29]。姚敬明等 2010 年 6 月至 2011 年 11 月在山西省采集了 1 018 份血样,用 ELISA 试剂盒检测猪流感血清抗体,阳性率为 0.98%^[30]。禹思宇等 2010 年 6 月采用间接 ELISA 及实时荧光 RT-PCR 技术,对湖南省规模化猪场采集的 1 065 份猪血清、16 796 份猪棉拭子、360 份肺脏样品进行检测,结果显示,SIV H1N1 抗体阳性率达 37.84%,H1N1 猪流感病毒抗原阳性率为 0.12%^[31]。由此可知,SIV 在我国不同地区均呈现地方性流行趋势,猪群普遍受 H1 亚型、H3 亚型 SIV 感染。

参考文献:

- [1] Shope R E. Swine influenza; III. Filtration experiments and etiology [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1931, 54(3): 373-385.
- [2] Thacker E, Janke B. Swine influenza virus; zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenza [J]. Journal of Infectious Diseases, 2008, 197(1): 19-24.
- [3] Shinde V, Bridges C B, Uyeki T M, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005—2009 [J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 360(25): 2616-2625.
- [4] Gaydos J C, Hodder R A, Top F H, et al. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). I. Case finding and clinical study of cases [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1977, 136(Suppl): 356-362.
- [5] Gregory V, Lim W, Cameron K, et al. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs [J]. The Journal of General Virology, 2001, 82(6): 1397-1406.
- [6] Brown I H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs [J]. Veterinary Microbiology, 2000, 74(1/2): 29-46.
- [7] Phipps L P, Essen S C, Brown I H. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region [J]. Journal of Virological Methods, 2004, 122(1): 119-122.
- [8] Lee C S, Kang B K, Lee D H, et al. One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 151(1): 30-34.
- [9] 杨焕良, 乔传玲, 陈艳, 等. 猪流感病毒 H1N1、H1N2 和 H3N2 亚型多重 RT-PCR 诊断方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 714-718.
- [10] Choi Y K, Goyal S M, Kang S W, et al. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 102(1/2): 53-59.
- [11] Wang R X, Taubenberger J K. Methods for molecular surveillance of influenza [J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2010, 8(5): 517-527.
- [12] 段廷云, 陈红英, 崔保安, 等. 实时荧光定量 PCR 检测 H1N1 亚型猪流感病毒 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 752-756.
- [13] 张太翔, 凌宗帅, 岳志芹, 等. 猪流感病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 181-184.
- [14] 张鹏超, 师小潇, 哈卓, 等. 猪流感病毒 SYBR Green I 定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(10): 768-772.
- [15] 陈艳, 张春明, 乔传玲, 等. H3N2 亚型猪流感病毒实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2009, 39(10): 894-899.
- [16] 徐敏, 李志强, 黄元, 等. 猪流感病毒一步法荧光定量 RT-PCR 诊断方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(10): 1021-1025.
- [17] 张春明, 乔传玲, 陈艳, 等. 猪流感病毒 *M* 基因实时荧光定量 PCR 诊断方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 805-810.
- [18] Kowalczyk A, Markowska-Daniel I, Rasmussen T B. Development of a primer-probe energy transfer based real-time PCR for the detection of swine influenza virus [J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(2): 228-233.

王 丹,吕小红,付立东,等. 不同收获期对水稻茎秆抗倒伏性状的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):61-63.

不同收获期对水稻茎秆抗倒伏性状的影响

王 丹,吕小红,付立东,王 宇,隋 鑫,任 海

(辽宁省盐碱地利用研究所,辽宁盘锦 124010)

摘要:在不同收获时期测定了水稻不同品种的茎秆倒伏性状。结果表明,不同收获期内 5 个水稻品种均在 10 月 10 日倒伏指数最小,10 月 10 日前为最佳收获期,此时机械收割损失最小。分析结果表明,与其他指标比较,茎基宽、茎壁厚是影响倒伏指数的重要因素,植株茎越粗,抗倒性越强;基部茎秆厚度增大,抗倒伏能力显著增强。

关键词:收获时期;茎秆;倒伏指数

中图分类号: S511.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0061-03

目前,水稻生产仍采用劳动密集型高强度传统耕作方式,传统耕作方式已不能适应农村经济发展和农民生活观念、生产行为变化的形势,制约了水稻生产的发展。水稻机械收获对提高劳动生产率、土地产出率和资源利用率,增强农业综合生产能力、抗风险能力和市场竞争力,保障粮食安全具有十分重要的作用。然而随着超级稻的推广,穗部重量增加,倒伏风险增大,影响水稻优质、稳产和高产,也影响了机械收割。我国北方水稻倒伏方式以茎秆倒伏为主,倒伏发生除与品种自身特性有关外,栽培措施和气候条件也是重要影响因素^[1-6]。本试验测定不同收获时期对水稻茎秆抗倒伏性状的影响,以期探索水稻品种获得最优产量与品质的最佳收获时间,旨在把倒伏引起的机械收割产量损失降到最低,对提高水稻收获机械化水平,确保丰产、丰收具有重要的现实意义。

1 材料与方法

收稿日期:2014-07-01

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAD05B07);中央财政农技推广项目(编号:GCNT-LN-16)。

作者简介:王 丹(1979—),女,助理研究员,从事水稻抗逆性研究。

E-mail:aronben@sina.com。

通信作者:吕小红,助理研究员,从事水稻抗逆性研究。

1.1 试验设计

试验于 2013 年在辽宁省盐碱地利用研究所试验基地进行。试验水稻品种为盐丰 47、盐粳 218、盐粳 377、盐粳 456、盐粳 1001 共 5 个,设 10 月 3 日、10 月 10 日、10 月 17 日 3 个收获期,小区长 8.0 m,宽 3.0 m,面积 24.0 m²。随机区组排列,3 次重复。试验于 4 月 22 日播种,5 月 27 日移栽,机械插秧,插秧规格行距为 30.0 cm,株距为 16.5 cm。其他生产措施按常规栽培管理进行。

1.2 测定指标与方法

各处理取 5 穴,每穴选取代表性茎 2 个,每个处理共取 10 个单茎,保持不失水。测定株高、穗长、节间长、穗颈节以下第 1、2、3、4、5 节间抗折力及各节基部至穗顶的长度和鲜质量、茎基宽及茎壁的厚度。

按赖古秀生的方法^[6]计算各品种各节间的弯曲力矩、抗折力和倒伏指数。自田间取回茎秆,保留叶鞘、叶片和穗,保持不失水,将测定仪放在台式电子秤上后,再将待测节间(保留叶鞘)置于测定仪上,该节间中点与测定仪支架中点(支点对应,将电子秤归零后,在节间中点悬挂一个体积适当的容器,加入一定质量的砝码(此时容器与砝码重量应小于抗折力),再往容器中逐渐加入沙子,直至茎秆折断,此时电子秤显示的重量即为该节间的抗折力(g)。

[19] Li J, Chen S, Evans D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(2): 696-704.

[20] 陈红军,侯义宏,白 华,等. 猪流感病毒分型基因芯片的建立和初步应用[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(7):708-712.

[21] 杨 林,马世春,苏增华,等. 猪流感病毒基因芯片检测技术的研究[J]. 中国兽医杂志,2008,44(7):3-5.

[22] 高淑霞,王文志,张 伟. 猪流感病毒低密度分型芯片的试验研究[J]. 西南农业学报,2011,24(6):2385-2388.

[23] 王慧煜,梅 琳,侯义宏,等. H1N1 和 H3N2 亚型流感病毒基因芯片检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2011,41(12):1234-1241.

[24] 陈君彦,李海燕,申之义,等. H1N1 亚型猪流感病毒中国分离株血凝素基因分子演化的研究[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):13-17.

[25] 李海燕,于康震,辛晓光,等. 部分省市猪群猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定[J]. 动物医学进展,2003,24(3):67-72.

[26] 辛晓光,霍庆贵,秦运安,等. 黑龙江省猪流感疫病的血清学及病原学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002(12):22-23.

[27] 王隆柏,魏 宏,陈少莺,等. 福建省猪流感流行病学调查与分析[J]. 养猪,2006(5):47-48.

[28] 康文彪,宋建国,赵春玲,等. 甘肃省猪流感(H3N2)抗体的血清学调查研究[J]. 畜牧兽医学报,2008(1):14-15,17.

[29] 朱善德,鲍伟华,卢黎明,等. 宁波地区猪流感(H3N2)抗体的血清学调查研究[J]. 兽医导刊,2009(5):39-40.

[30] 姚敬明,樊振华,杨 裕,等. 山西猪流感分子流行病学调研[J]. 养猪,2012(2):115-116.

[31] 禹思宇,易征璇,孟 芳,等. 湖南省规模化猪场 H1N1 猪流感流行病学调查[J]. 湖南农业科学,2011(5):126-128.