

吕玉金,吴凤笋,刘胜利,等.猪日本乙型脑炎及猪细小病毒复合 PCR 检测方法的建立[J].江苏农业科学,2019,47(19):176-179.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.042

猪日本乙型脑炎及猪细小病毒 复合 PCR 检测方法的建立

吕玉金^{1,2}, 吴凤笋^{1,2}, 刘胜利³, 李文刚^{1,2}

(1. 河南牧业经济学院动物医学院,河南郑州 450046; 2. 河南省猪病防控工程技术研究中心,河南郑州 450046;
3. 河南农业大学,河南郑州 450046)

摘要:根据 GenBank 上登录的日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 与猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV) 参考基因序列,设计合成 2 对特异性引物,在建立优化单项 PCR 检测方法的基础上,建立了 PPV-JEV 复合 PCR 检测方法,可扩增出预期的 238 bp 和 152 bp 特异性片段。该方法敏感性高、稳定性好、特异性强,临床样品检测结果与单项 PCR 检测结果符合率 100%,该方法适合 JEV 和 PPV 的联合检测和鉴别诊断。

关键词:猪;日本乙型脑炎病毒;细小病毒;复合 PCR

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)19-0176-03

随着我国养猪业的发展,猪病呈现多病原混合感染或继发感染的现象^[1]。流行性日本乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 又叫日本乙型脑炎,简称乙脑,是由日本乙型脑炎病毒 (JEV) 引起的一种重要的人兽共患传染病,猪群最易感,妊娠母猪主要表现为流产、高热、死胎和木乃伊胎,公猪表现为睾丸炎,被世界卫生组织列为需要重点控制的传染病之一^[2-3]。猪细小病毒病是由猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV) 引起的猪繁殖障碍性疾病,该病主要感染初产母猪,临床表现为胎儿和胚胎的感染和死亡。血清学阴性的母猪主要在怀孕前中期通过口鼻感染病毒,病毒大量繁殖后可引发母猪的病毒血症并且随血液循环到达胎盘传染给胎儿,形成垂直传播^[4]。该病在我国多发生于 4—10 月,猪感染后可终生带毒,全场猪在短时间内即可感染本病。猪在感染 PPV 后的 1~6 d 内会出现病毒血症现象,3~7 d 内即可经粪便排毒,1 周后可以检测到相应抗体^[5]。母猪感染 PPV 后,病毒主要分布于机体内一些快速增生的组织 (例如淋巴结生发中心、结肠固有层、肾间质等)^[6]。研究表明,PPV 仅会在活的猪胚胎中复制,感染胚胎一旦死亡就会被母体重吸收,病毒则无法在母体子宫内传播扩散,若感染胚胎存活,则会在子宫内传播病毒,致使同窝的其他胎儿也发生感染^[7]。

JEV、PPV 感染都可造成母猪繁殖障碍性疾病,检测这 2 种病毒有多种方法,包括病毒的分离鉴定、酶联免疫吸附试验和免疫荧光试验等,但都存在敏感性低、特异性差等缺陷^[8]。近年来,聚合酶链式反应 (PCR) 因其特异性好,灵敏度高,被广泛应用于各种病原的检测,尤其是多重 PCR,比常规 PCR

更高效,目前研究较多^[9]。为快速鉴别诊断这 2 种病毒病,本研究旨在建立 JEV-PPV 复合 PCR 方法,并将该方法初步应用于临床样品检测。

1 材料与方法

1.1 病毒

JEV 疫苗株、PPV 疫苗株及实验室保存的疑似感染 JEV、PPV 的病料。病料采取自河南某养猪场的疑似感染 JEV、PPV 病死猪的肝脏、脾脏、肺脏和淋巴结等 9 份病料,每头猪的各种组织混合为 1 份病毒。

1.2 主要试剂

Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒、Taq DNA 聚合酶,购自上海生物工程公司;HipureViralRNA Spin Kit 试剂盒、M-MLV H-First Strand Synthesis Kit 试剂盒,购自 Magen 公司;DL500 DNA Marker,购自宝生物工程 (大连) 有限公司等。

1.3 方法

1.3.1 病毒 DNA 的提取及检测 应用 Sangon Biotech 的 Ezup 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒提取 PPV 病毒 DNA,按照试剂盒标准抽提步骤进行,其中溶液 A 在 65℃ 预热后沉淀溶解完全后使用,最后用 100 μL 经 65℃ 预热的 ddH₂O 洗脱。用超微量紫外分光光度计对所提取 DNA 的浓度进行检测。

1.3.2 病毒 RNA 的提取、检测及反转录 采用 Magen 公司的 HipureViralRNA Spin Kit 试剂盒提取 JEV 的 RNA,严格按照试剂盒的操作步骤进行。Carrier RNA 固体在使用前须用 DEPC 水溶解完全,浓度为 1 μg/μL,注意分装保存。另外,Buffer VHB、Buffer RW2 用前必须用无水乙醇稀释。最后采用 100 μL DEPC 水洗脱,并使用超微量紫外分光光度计进行 RNA 浓度的测定。

然后利用 Magen 公司的 M-MLV H-First Strand Synthesis Kit 试剂盒将提取的 RNA 进行反转录。取适量 RNA 溶液,依次加入适量 RNA 溶液、Oligo (dT) 1 μL、dNTPs 1 μL、DEPC 水补足至 13 μL,经过孵育冰上冷却后,再加入 5×First Stand

收稿日期:2018-07-20

基金项目:河南牧业经济学院预防兽医学重点学科建设项目 (编号:MXK2016102)。

作者简介:吕玉金 (1984—),女,河南商丘人,硕士,讲师,主要从事动物传染病发病机理及防制研究。E-mail:272166760@qq.com。

通信作者:李文刚,博士,教授,主要从事动物传染病防控研究。E-mail:wengang-li@126.com。

Buffer 4 μL , 0.1 M DTT 1 μL , M - MLV RNase HRT 1 μL , RNase Ihibior(40 U/ μL) 1 μL , 离心, 反应 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 后瞬离, 将产物立即放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 引物的设计和合成 根据 GenBank 公布的 PPV 和 JEV 的全基因序列, 按照引物设计原则设计、选择引物, 并对其特异性进行鉴定, 均具有良好的特异性。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成, 引物设计见表 1。

表 1 PCR 特异性引物序列

引物名字	序列(5'-3')
PPV - F	AATTAGGCCAGCTCAGGT
PPV - R	GGTAATCCATTGTAAATCTTAT
JEV - F	TATCAATATGCTGAAACGC
JEV - R	AATGAGTGTTCCAAGTCTT

1.3.4 单项 PCR 反应体系的建立 单项 PCR 反应体系见表 2。

表 2 单项 PCR 反应体系

体系	剂量(μL)	
	PPV 检测	JEV 检测
10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+})	5.0	5.0
dNTPs(含 2.5 mmol/L)	6.0	6.0
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.0	2.0
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2.0	2.0
模板	2.0	1.0
Taq DNA 聚合酶	0.5	0.5
ddH ₂ O	补至 50.0	补至 50.0
Total	50.0	50.0

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 梯度退火温度(49.5、50.7、52.9、54.1、55.4、57.8、58.7、59.9 $^{\circ}\text{C}$) 下 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定最佳退火温度。

1.3.5 复合 PCR 反应体系的建立 在单项 PCR 的基础上, 建立多重 PCR 反应体系(表 3)。

表 3 复合 PCR 反应体系

体系	剂量(μL)
10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+})	5
dNTPs(含 2.5 mmol/L)	6
PPV - F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
PPV - R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
JEV - F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
JEV - R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
PPV、JEV 混合模板	1.5
Taq DNA 聚合酶	0.5
ddH ₂ O	补至 50.0
Total	50.0

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 梯度退火温度(49.5、50.7、52.9、54.1、55.4、57.8、58.7、59.9 $^{\circ}\text{C}$) 下 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定最佳退火温度。

1.3.6 敏感性试验 将病毒模板进行 10 倍系列稀释, 以 ddH₂O 为模板作为阴性对照, 进行单项和多重 PCR 扩增, 以其模板最高稀释倍数扩增呈阳性为其 PCR 的敏感度。

1.3.7 特异性试验 分别以 PPV、JEV、猪瘟病毒(CSFV)和

猪伪狂犬病毒(PRV)基因组为模板, 以 ddH₂O 为模板作为阴性对照, 应用复合 PCR 方法进行扩增, 电泳, 验证其特异性。

1.3.8 稳定性试验 对 PPV 和 JEV 重复检测 5 次, 以验证该方法的稳定性。

1.3.9 临床样品检测 应用建立的单项 PCR 与多重 PCR 方法, 检测实验室保存的 9 份疑似感染 PPV 和 JEV 的病料, 比较两者检测结果的符合率。

2 结果

2.1 DNA 的检测结果

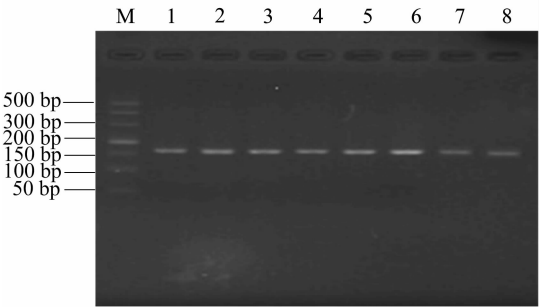
提取的 PPV 的 DNA 浓度为 141.9 ng/ μL , $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.91, 比值在 1.8~2.0 之间, 表明提取的基因组 DNA 质量非常好。

2.2 RNA 的检测结果

提取的 JEV 的 RNA 浓度为 1 325.6 ng/ μL , $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.94, 表明提取的 RNA 质量非常好。

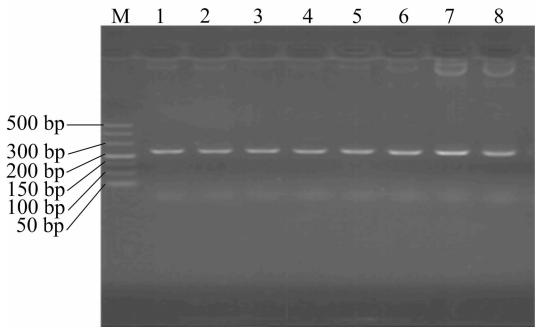
2.3 PPV 和 JEV 的单项 PCR 扩增结果

电泳结果显示, PPV 和 JEV 分别扩增出 152、238 bp 的片段。PPV 单项 PCR 的最佳退火是 57.8 $^{\circ}\text{C}$, JEV 单项 PCR 的最佳退火温度是 58.7 $^{\circ}\text{C}$, 见图 1 和图 2。



M—DL500 DNA Marker; 1~8—退火温度分别为 49.5、50.7、52.9、54.1、55.4、57.8、58.7、59.9 $^{\circ}\text{C}$

图1 PPV 单项 PCR 扩增结果



M—DL500 DNA Marker; 1~8—退火温度分别为 49.5、50.7、52.9、54.1、55.4、57.8、58.7、59.9 $^{\circ}\text{C}$

图2 JEV 单项 PCR 扩增结果

2.4 复合 PCR 扩增结果

电泳结果(图 3)显示, PPV 和 JEV 的最佳退火温度是 54.1 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 敏感性试验

电泳结果(图 4)显示, 可检测到 PPV 和 JEV 的稀释浓度分别为 10^{-7} 、 10^{-5} 。

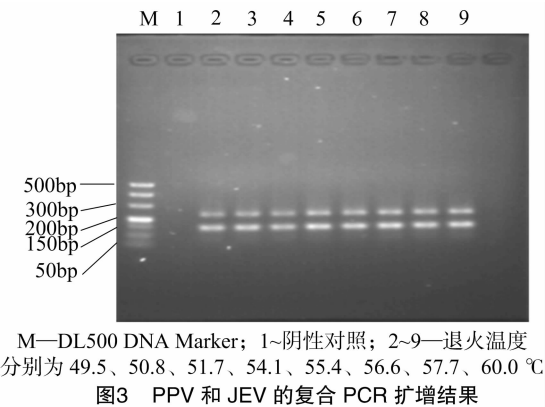


图3 PPV 和 JEV 的复合 PCR 扩增结果

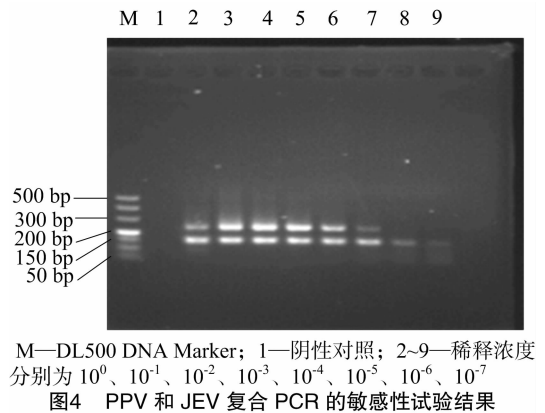


图4 PPV 和 JEV 复合 PCR 的敏感性试验结果

2.6 特异性试验

由图 5 可知,电泳结果显示,PPV 和 JEV 可扩增出目的条带,而 CSFV 和 PRV 则没有产生,说明该方法特异性良好。

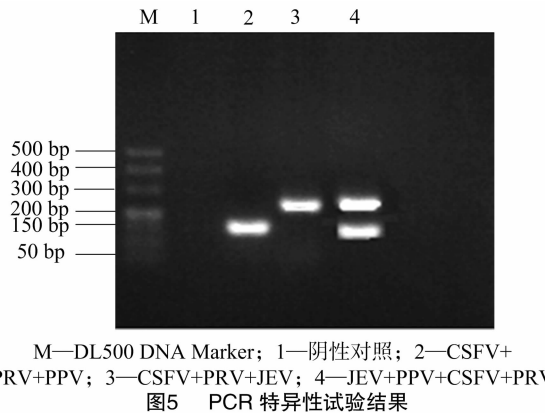


图5 PCR 特异性试验结果

2.7 稳定性试验

以建立的多重 PCR 方法对 PPV 和 JEV 重复检测 5 次。由图 6 可知,5 次的检测结果一致,说明该方法稳定性较好。

2.8 临床样品检测

利用建立的复合 PCR 方法对 9 份临床样品进行检测,然后使用同样的特异性引物进行单项 PCR 检测,结果显示两者结果符合率 100% (表 4)。

3 讨论与分析

目前,国内外发生的动物病毒病或一个征候群的疫病多同时涉及 DNA 和 RNA 两类病毒^[10]。本研究从感染 PPV 和 JEV 的病死猪组织中提取了 DNA 和 RNA,且在紫外线波长

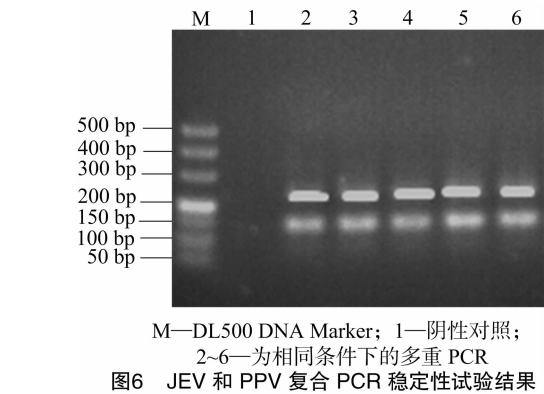


图6 JEV 和 PPV 复合 PCR 稳定性试验结果

表 4 临床样品检测结果

感染类型	样品数 (份)	单项 PCR 检测(份)	复合 PCR 检测(份)	单项 PCR 检测与复合 PCR 检测符合率(%)
JEV	9	3	3	100
PPV	9	7	7	100

260 nm 和 280 nm 处的比值均在 1.8 和 2.0 之间,符合纯的 DNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值为 2.0、纯的 RNA $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值为 1.8 的要求^[11]。

在多重 PCR 反应过程中,引物的设计至关重要,它关系到多重 PCR 反应的成功与否。本试验针对 PPV 和 JEV 这 2 种常见病毒的保守基因分别设计 2 对特异性引物,应用 DNASTar 软件进行综合分析,结果显示,2 对特异性引物较好且同源性较低,各扩增片段相差不大,可在同一种浓度的电泳胶下进行。本试验设计的 2 对引物经试验验证,均是扩增效果较好的引物。

本研究在大量前期试验的基础上,首先确定了 PPV 和 JEV 单项 PCR 反应的最佳反应条件和反应程序,在此基础上摸索出了多重 PCR 的最佳反应条件,弥补了多重 PCR 因引物之间交叉干扰而导致敏感性降低的缺点。敏感性试验结果表明,该双重 PCR 具有较强的敏感性。本研究建立的 PPV 和 JEV 双重 PCR 检测方法,实现了这 2 种病毒的同步检测,为 JEV 和 PPV 感染的快速检测和流行病学调查奠定了基础。

参考文献:

[1] 刘志杰,曾智勇,汤德元,等. 猪繁殖障碍病毒性疫病六重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(9):1429 - 1436.

[2] 邓绪芳,史子学,邱亚峰,等. 流行性乙型脑炎病原生态学的研究概况[J]. 动物医学进展,2011,32(2):111 - 114.

[3] 张飞波. 科学防控猪繁殖障碍性疾病的方法[J]. 山东畜牧兽医,2009,30(9):28 - 29.

[4] 魏润生. 甘肃省规模化猪场 4 种病毒性繁殖障碍病的调查[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005.

[5] 陈世宝. 猪细小病毒病的诊断与防治[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(5):110 - 111.

[6] 徐 峰,高炎坤,蔡 薇. 猪细小病毒的病源诊断与防治[J]. 吉林畜牧兽医,2005(4):36 - 38.

[7] 吕惠序. 猪细小病毒病的危害及综合防治[J]. 养猪,2013(3):127 - 128.

[8] 卜 丹. 河南省乙型脑炎病毒的分离鉴定及 E 基因进化分析[D].

朱梦婷,王晓路,王永健,等. 不同饲养方式对黄羽肉鸡肉品质的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):179-182.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.043

不同饲养方式对黄羽肉鸡肉品质的影响

朱梦婷, 王晓路, 王永健, 赵宗胜

(石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要:为探讨不同饲养方式对黄羽肉鸡肌肉品质的影响,试验以 80 羽 4 周龄体质量接近、健康无病的黄羽肉鸡为试验材料,进行为期 6 周的饲喂试验,随机分 2 组,即笼养组(对照组)和散养组(试验组),分析不同饲养方式对黄羽肉鸡肉品质的影响。结果表明,笼养组胸肌、腿肌的肌内脂肪含量显著高于散养鸡($P < 0.05$);而且笼养鸡胸肌、腿肌肌纤维直径显著低于散养鸡($P < 0.05$)而肌纤维密度显著高于散养鸡($P < 0.05$);散养组胸肌、腿肌粗蛋白含量高于笼养组,差异显著($P < 0.05$);散养组腿肌中水分含量较笼养组高,差异显著($P < 0.05$)。散养不仅可以提高肌肉的蛋白含量及水分含量,而且更有利于改善肉色,使散养鸡肉质更好,口感更佳。

关键词:黄羽肉鸡;不同饲养方式;笼养;散养;肉品质

中图分类号:S831.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)19-0179-04

随家禽产品市场供求关系的变化和城乡人民生活水平的提高,消费者对肉质要求也越来越高,高肉质高标准的散养鸡和天然产品逐渐也就成为大众消费的趋势。散养鸡肌肉结构紧,脂肪少、上口香、营养、口味好、高蛋白、低脂肪,自身抵抗力强、无药物残留,无疾病,适合注重健康的人群^[1]。肉鸡生长过快,脂肪沉积过多、非传染性疾病发病率高是困扰肉鸡业的一大问题,肉鸡腹脂沉积过多则导致饲料中能量、蛋白质等营养物质的大量浪费,降低了饲料转化效率。过快的生长导致肉鸡的体质量迅速增长与骨骼、内脏器官发育缓慢之间的矛盾更加突出^[2]。肉鸡出现猝死症、腿部畸形和腹水症等疾病,使肉鸡的成活率下降,这些都严重影响养殖者的利益。影响肉品质的因素很多,如品种、饲养、加工、存储等方面。肌内脂肪(IMF)是动物肌肉中的重要组成成分,存在于肌纤维内部和肌束间,IMF 作为能量的贮藏形式,与肉的食用品质有着密切的相关,肌内脂肪与系水力、风味和嫩度也有很强的相关性^[3]。适度的脂肪沉积可使肌肉细嫩多汁、香味浓郁^[4]。同时,饲养方式也是影响鸡肉品质的关键因素,国内外集约化养鸡起步较早,但有关鸡的散养研究报道很少,生产上也未见有大规模应用。目前,相对于高密度集约化笼养家禽,散养、放养等饲养模式可增加家禽运动量,降低饲养密度,扩大活动空

间,都有助于改善家禽福利状况进而提高生长性能和肉品质^[5-7]。Lee 等的研究结果表明,散养使得肉鸡饲料转化率得到全面提高^[8]。还有研究显示,散养能减少家禽体脂沉积、改善肉鸡的肉质、增强肉鸡对疾病的抵抗力^[9],而且散养与笼养相比还可以降低肉鸡的心肌易颤性,从而降低肉鸡猝死综合征(SDS)的发病率^[10-11]。对肉鸡进行不同饲养方式的管理可以控制鸡体早期增质量,保证鸡体器官均衡发育,避免了腿脚受力过大,内脏器官负担过重,从而使鸡体各部器官和骨骼发育均衡,不但降低了死淘率和增加了商品率,亦节省了饲料,为饲养后期快速增质量打下良好基础。

我国传统的农家养鸡,均以散养为主,但规模小,饲养方式粗犷原始。而集约化的笼养使得鸡肉中沉积过多脂肪,不利于肉品质的提高。但完全的散养方式,早期雏鸡的死亡率较高,造成养殖户利益损失较大。因此,本试验旨在研究散养鸡和笼养鸡肉质性状的差异,为筛选出适宜的饲养方案,以 80 羽 4 周龄体质量接近、健康无病的黄羽肉鸡为试验材料,随机分为 2 组,即笼养组(对照组)和散养组(试验组),分析不同饲养方式对黄羽肉鸡肉品质的影响。此期间采用自由采食与补料饲养相结合的制度,并保证一定的运动量,提高鸡肉品质,为散养在肉鸡生产中的应用提供理论参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

100 羽 4 周龄体质量接近、健康无病商品代黄羽肉鸡母鸡购自新疆石河子市郊区某家禽养殖场。从 100 羽肉鸡中选择 80 羽体质量相近、健康无病的肉鸡,然后随机分为 2 组,即笼养(对照组)和散养(试验组),每组各 40 羽肉鸡。2 组鸡

收稿日期:2018-07-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460587)。

作者简介:朱梦婷(1995—),女,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:734769085@qq.com。

通信作者:赵宗胜,博士,教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:zhaozongsh@shzu.edu.cn。

郑州:郑州大学,2010。

[9] Bellau - Pujol S, Vabret A, Legrand L, et al. Development of three multiplex RT - PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 126(1/2): 53 - 63.

[10] Murdoch D R. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower

respiratory lower respiratory tract infections[J]. US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2004, 112(11/12): 713 - 727.

[11] 刘维全. 动物生物化学实验指导[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 2014.