

申 报	系列：实验技术
	专业：兽医学
	职称：高级实验师

业绩成果材料

(申报人的业绩成果材料包括论文、科研项目等)

单 位 (二级单位) 测试中心 (实验动物中心)

姓 名 马晓莉

材料核对人:

单位盖章:

核对时间:

华南农业大学制

目 录

一、科研项目

1.主持:	1
1.1.关于《珍稀濒危广东地方猪保种场重要疫病防控机制研究》项目的任务书	1
1.2.关于《好义三黄鸡新资源鉴定研究及其健康养殖技术应用推》项目的下达文件	9
1.3.关于《实验动物屏障环境内环境指标的监测与分析》项目的技术合同	15
1.4.关于《兴泰生猪健康养殖与安全生产技术服务与推广示范》项目的项目合同	26
1.5.1.关于《华南农业大学对接增城区石滩镇南坐村实施“狂犬病及其防控技术科普行”》项目的合同	39
1.5.2.承担市科协科普项目《华南农业大学对接增城区石滩镇南坐村实施“狂犬病及其防控技术科普行”》项目绩效评价结果	45
2.主参:	46
2.1.关于《胶原蛋白 COL-117 对线虫表皮形成的影响及其理化特性解析》项目的项目立项书	46
2.2.关于《生猪健康高效养殖技术示范推广乡村行》项目的立项通知	58
2.3.关于《种猪体细胞克隆技术研发与应用成果科普化》项目的合同书	64
2.4.关于《2024 盛泰生猪健康养殖技术服务》项目的技术服务合同书	69
2.5.关于《诺尔路猪病诊治技术服务》项目的技术服务合同书	74

2.6.关于《广州深华生猪疾病防治技术服务》项目技术服务合同书	79
---------------------------------------	----

二、论文、著作等

1.检索证明.....	83
2.以第一作者发表本专业论文情况	
2.1.非洲猪瘟病毒 p72 蛋白抗体全自动化学发光酶免疫检测方法 的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2025.....	86
2.2.猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及 其中和活性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020.....	101
2.3.猪源 CD163 受体蛋白多克隆抗体的制备及其 PRRSV 阻 断效力研究 [J]. 畜牧与兽医, 2019.....	109
2.4.猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备及其 中和活性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019	117
2.5.猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在 Vero 细胞中真核表达的研 究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018.....	126
2.6.狂犬病认知现状调查分析与防控对策[J].畜牧兽医科技信 息, 2019.....	133
3.以通讯作者发表本专业论文情况	
3.1.2023—2024 年我国部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学 调查 [J].中国兽医杂志, 2025.....	139
3.2.动物体细胞克隆与转基因技术科普需求及认知度调研分 析 [J].现代农业科技, 2019.....	154

**【佐证材料切记与目录页所列页码对应, 不要用图片格式的材料
进行打印。】**

项目编号：
子课题编号：

密 级：公开

2024 年省级乡村振兴战略种业振兴行动项目 子课题 10 任务书

子课题 10 名称：珍稀濒危广东地方猪保种场重要疫病防控机制研究

子课题 10 承担单位（乙方）：华南农业大学（公章）

子课题 10 负责人：马晓莉

项目名称：珍稀濒危广东地方猪种生物安全抢救性保护与集成示范

项目牵头承担单位（甲方）：华南农业大学（公章）

项目负责人：宋长绪

执行期限： 2 年

2025 年 月

一、子课题任务内容

逐项分段说明各任务的研究目标、主要研究内容、拟解决的重大科学问题或关键技术、考核指标及评测手段/方法等。

1. 主要研究内容：

集成濒危地方猪非洲猪瘟、蓝耳病的快速诊断和检测技术，制定检测评估技术规范；研究相关重大疫病的疫苗免疫抗体消长规律，确定抗体与病毒感染之间的关系，制定个性化的免疫方案；集成检测、免疫、监测、防控、净化于一体的广东地方猪抢救性保护技术，实现相关重大疫病的稳定防控机制。

二、子课题考核指标

考核指标	考核内容	目标参数
约束性指标	集成濒危地方猪非洲猪瘟、蓝耳病的快速诊断和检测技术，制定检测评估技术规范。	1套
	研究相关重大疫病的疫苗免疫抗体消长规律，制定个性化的免疫方案。	1套
	集成检测、免疫、监测、防控、净化于一体的广东地方猪抢救性保护技术	1套
预期指标	实现相关重大疫病的稳定防控机制	1套

三、子课题工作进度计划

按年度制定完成子课题的计划进度，应将子课题的考核指标明确、具体的分解落实到各年度计划中。

年度	任务内容	考核指标
2025年1-6月	采集地方猪保种场母猪、仔猪、育肥等不同阶段猪群的口鼻拭子、血清、肛拭子等样本进行猪蓝耳病、猪流行性腹泻病毒、猪圆环病毒2型、猪圆环病毒3型、猪肺炎支原体、猪链球菌等主要疫病的分离鉴定和检测。	技术方案
2025年7-12月	摸清保种场重大疫病疫苗免疫抗体消长规律，优化药物的保健治疗方案，制定个性化的免疫方案。	技术方案
2026年1-6月	针对保种场的口蹄疫、猪瘟、猪伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征及地方猪重要传染病支原体肺炎建立“精准免疫，精准用药”防控体系。	技术方案
2026年7-12月	集成濒危地方猪非洲猪瘟、蓝耳病的快速诊断和检测技术，制定检测评估技术规范，集成检测、免疫、监测、防控、净化于一体的广东地方猪抢救性保护技术	技术方案

四、子课题人员

子课题成员基本情况表

填表说明：1. 人员分类：负责人、骨干、其他人员；
 2. 职称分类：正高级、副高级、中级、初级、其他；
 3. 固定人员需填写人员明细。

序号	姓名	身份证号码 (士官证、护照)	工作单位	技术职称	投入本项目 (课题) 的全时工 作时间 (人月)	人员 分类
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	马晓莉	440103198109051524	华南农业大学	中级	14	负责 人
2	张乐宜	410327198409076019	华南农业大学	中级	16	骨 干
固定人员合计				2	/	/
流动人员或临时聘用人员合计				0	/	/
累计				2	/	/

五、经费分配及预算说明

本项目经费总额为 300 万元，甲方分配给乙方 50 万元，经费应编制预算，并按照国家 and 地方相关科研财务制度，根据预算合理支出。

子课题预算表

金额单位：万元

序号	预算科目名称	合计	专项经费	自筹经费
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	一、经费支出	50	50	/
2	(一) 直接费用	47	47	/
3	1.设备费	/	/	/
4	(1) 购置设备费	/	/	/
5	(2) 试制设备费	/	/	/
6	(3) 设备改造与租赁费	/	/	/
7	2.材料费	30	30	/
8	3.测试化验加工费	17	17	/
9	4.燃料动力费	/	/	/
10	5.差旅/会议/国际合作与交流费	/	/	/
11	6.出版/文献/信息传播/知识产权事务费	/	/	/
12	7.劳务费	/	/	/
13	8.专家咨询费	/	/	/
14	9.其他支出	/	/	/
15	(二) 间接费用	3	3	/

注：1. 子课题在研期间，年度剩余资金可以结转下一年度继续使用。子课题完成任务目标并通过验收，且承担单位信用评价好的，结余资金按规定在 2 年内由单位统筹安排用于科研活动的直接支出；2 年后未使用完的，按规定收回。

2. 项目资金将结合项目实施和资金使用进度，由专业机构及时拨付项目牵头承担单位，项目牵头承担单位拨付至课题承担单位。同时，项目资金实行部门预算批复前预拨制度，保证科研任务顺利实施。

六、其他约定

1. 关于科研成果、知识产权和奖励约定

在课题执行过程中涉及到的信息公开与分享、科研成果处理、知识产权申请与转让、奖励申报和收益分享等事宜按照以下约定执行，本协议未尽之处，应采取“一事一议”的方式签订补充协议：

(1) 课题执行期间，各方承诺尽最大可能互为提供资料数据，共享研究成果，但相关资料和数据仅限于各方的研究目的，任何一方都不得将其他方未公开的材料和资料向其他方转移和泄露。

(2) 课题承担单位与参加单位在课题执行日之前各自所获得的知识产权及相应权益均归各自所有，不因共同合作本课题而改变。

(3) 在课题执行过程中，各方应对科技成果及时采取知识产权保护措施，并按照国家科技计划知识产权管理相关规定决定归属。独自完成的科技成果及获得的知识产权归各方独自所有，相关成果被授予的奖励归各方独自所有。各方共同完成的科技成果及其形成的知识产权归各方共有，共同享有知识产权使用权，相关成果获得的荣誉和奖励归完成各方共有。

(4) 共有知识产权所有权申请及转让需要各方共同同意，并另行起草签署书面约定明确归属和收益共享方式。无论是独有还是共有的知识产权转让，课题各参与方有以同等条件优先受让的权利。

2. 保密约定

各方均对对方提供的技术情报和资料等承担保密义务，不论本合作协议是否变更、解除或终止，本条款长期有效。

3. 课题执行违约责任

(1) 根据任务书约定，各方负有按时完成各自负责的任务并达到相关考核指标的义务。如乙方和丙方研发进展滞后，甲方有权督促相关责任方加快进度；出现进展严重滞后并影响课题甚至整个项目考核指标完成的情况，甲方报项目牵头单位并报批专业机构后，有权缓拨、停拨、甚至追缴部分或全部课题经费。

(2) 各方为完成任务书规定研究任务的支出，超出各自预算的部分由各方自行承担。

(3) 违反本协议第四条关于科研成果和知识产权申请和权属等约定，违约方应向

知识产权所属人支付违约金赔偿相关损失；在课题承担单位或有关部门调解无法达成谅解的情况下，项目各方均有权通过法律途径追究违约方责任，但相关纠纷不作为影响本课题研究进度的理由。

(4) 本课题因难以克服的技术挑战或无法预见的客观条件变化而无法达到预期考核指标的情况，应及时通知甲方并报主管部门，需要时应及时报告专业机构申请调整，责任和损失由各方协调共同决定承担方式。因责任方未及时通知课题承担单位造成的额外损失，由相关责任方自行承担。

(5) 因不可抗力不能履行任务书规定义务时，可以免除违约责任，但应及时通知甲方并报主管部门，需要时应根据相关流程及时报告专业机构。在出现不可抗力的情况下，各方均采取适当措施减轻损失。因乙方未及时采取应对措施或通知甲方造成的额外损失，由相关责任方自行承担。

4. 过程管理及验收

课题承担单位应积极配合专业机构和项目牵头单位对项目执行的过程管理和验收，并采取召开会议、进展报告等方式协调和促进项目和课题的执行，督促和保证本项目的研究任务按时完成，并达到相应考核指标。

课题单位应严格按照省农业农村厅项目管理的相关规定和办法执行课题预算，保证任务书规定的研究任务按时完成，并达到相应考核指标。

因一方或几方原因导致整个项目或课题验收不通过，相关参加单位应承担相应责任。

5. 补充协议和争议解决办法

(1) 若课题执行过程中，任何重大调整（如任务考核指标调整、经费调整、参加单位变化等）都应及时通知课题承担单位和主管部门，经批准后签署补充协议。补充协议应对调整后的各方责任义务进行约定，与本协议具有同等效力。

(2) 在项目执行过程中，各参加单位发生争议应当友好协商解决。课题承担单位和项目牵头单位出面协调无法达成一致的，可请求专业机构或主管部门进行调解。协商和调解不成的，双方同意提交甲方所在地的仲裁委员会仲裁。

本协议自各方盖章（签字）之日起生效，有效期至项目验收合格之日。协议一式 3 份，甲方保留 2 份，乙方保留 1 份。具有同等法律效力。

（此后无正文）

任务书签署

根据国家文件规定，以及有关法律、政策和管理要求，依据项目立项通知，签署本任务书。

项目承担单位（甲方）：

法定代表人签字（签章）：薛红已



项目负责人签字（签章）：张培

2025年6月5日

子课题承担单位（乙方）：

法定代表人签字（签章）：薛红已



子课题负责人签字（签章）：马晓莉

2025年6月5日

广东省科学技术厅文件

粤科农字〔2024〕200号

广东省科学技术厅关于下达“百千万工程” 农村科技特派员第二轮重点派驻人员 名单和任务清单的通知

各有关地市科技局，各农村科技特派员派出单位：

为深入贯彻落实省委关于实施“百县千镇万村高质量发展工程”有关决策部署，进一步推动农村科技特派员下乡助力城乡区域协调发展，按照《广东省农村科技特派员科技助力百县千镇万村高质量发展行动计划（2023-2026）》《广东省科学技术厅关于落实“百千万工程”开展新一轮农村科技特派员重点派驻任务（2024-2026年）选派管理工作的通知》要求，在第一轮农村科技特派员3年帮扶重点派驻任务即将到期的情况下，按照“镇村

发榜+地市组织选派+省级认定支持”的新型组织管理方式，第二轮共选派 2960 名农村科技特派员组建 984 个团队，“一对一”结对科技帮扶全省涉农县（市、区）辖内 984 个乡镇。现将“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员名单和任务清单印发给你们：

一、各地市科技管理部门、派出单位应按照《广东省科学技术厅关于落实“百千万工程”开展新一轮农村科技特派员重点派驻任务（2024-2026 年）选派管理工作的通知》（粤科函农字〔2023〕1649 号）、《广东省科学技术厅关于印发〈农村科技特派员助力“百千万工程”管理工作指引（2024-2026 年）〉的通知》（粤科函农字〔2024〕192 号）有关要求，做好本辖区、本单位农村科技特派员组织、管理、考核和验收相关工作。

二、各农村科技特派员团队应聚焦落实省委实施“百千万工程”决策部署，在省、市科技管理部门指导下，扎根基层一线，配合驻镇帮扶工作队开展科技帮扶工作，农村科技特派员团队纳入驻镇帮扶工作队（乡镇人民政府）统一管理，本轮帮扶任务周期为 3 年。

三、农村科技特派员承担重点派驻任务经费保障，按年度以科技支撑“百千万工程”专项资金下达到各地市，各地市科技管理部门要加强管理，压实责任，专款专用，提高资金使用效率，应将专项资金拨付到相关派出单位，用于开展科技帮扶工作。

附件：“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员名单和任务清单

省科技厅

2024年9月5日

(联系人及电话：赵清泉，020-83163909)

附件

“百千万工程”农村科技特派员第二轮重点派驻人员名单和任务清单

序号	编号	帮扶镇（乡）	派出单位	团队成员	任务名称
一、汕头市					
1	KTP20240001	潮南区两英镇	汕头市乡村振兴发展中心	陈梓敏、杨伟权、郑秋枫	麻叶的种植与加工技术研究及示范推广
2	KTP20240002	潮南区司马浦镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、汕头市农业科学研究所（成员1）	董博、张建林、黄丹	农田综合利用与乡镇景观关键技术示范推广
3	KTP20240003	潮南区陈店镇	广东开放大学（负责人、成员2）、汕头职业技术学院（成员1）	王紫虹、刘毅嘉、罗学强	乡镇特色产业电商综合服务示范与推广
4	KTP20240004	潮南区胪岗镇	汕头市农业科学研究所	汤昌兴、张秀珊、王玉	粮油花卉等作物新品种及栽培技术与示范推广
5	KTP20240005	潮南区仙城镇	仲恺农业工程学院（负责人）、汕头市农业科学研究所（成员1、成员2）	陈青春、王兴才、王文举	鲜食玉米、水稻等作物高效周年轮作模式推广
6	KTP20240006	潮南区成田镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、汕头市农业科学研究所（成员1）	闫晋强、郭英铎、蔡金森	“成甜”牌水果玉米周年生产技术支撑
7	KTP20240007	潮南区陇田镇	仲恺农业工程学院（负责人、成员2）、汕头市白沙蔬菜原种研究所（成员1）	樊丽娜、郭商羿、齐永文	甘薯、玉米产业提质增效技术示范推广

192	KTP20240192	紫金县中坝镇	华南农业大学（负责人、成员1）、 广东省科学院（成员2）	张钰乾、赵明磊、王飞燕	茶树、三华李提质栽培措施与茶叶优化加工技术推广
193	KTP20240193	紫金县九和镇	华南农业大学	吴琪、何凯、苏冠贤	九和镇文化品牌创新及示范推广
194	KTP20240194	紫金县柏埔镇	仲恺农业工程学院	吴东庆、侯超钧、韩群鑫	柏埔镇富民农业产业与数字乡村治理技术服务
195	KTP20240195	紫金县苏区镇	华南农业大学	韩丽、黄征、邱冠文	红色文旅融合赋能乡村振兴模式的实践与应用
196	KTP20240196	紫金县黄塘镇	仲恺农业工程学院	肖海林、李秀金、王溢	油茶提质增效栽培技术示范与推广
197	KTP20240197	紫金县龙窝镇	华南农业大学（负责人、成员1）、 广东农工商职业技术学院（成员2）	谭新东、孟慧、桂明	龙窝镇茶园管理及茶叶加工与包装技术服务
198	KTP20240198	紫金县蓝塘镇	华南农业大学	田兴国、李向梅、岳淑丽	猪肉品质提升养殖与多维评价关键技术示范推广
199	KTP20240199	紫金县敬梓镇	华南农业大学	谢家兴、孙道宗、薛秀云	智慧农业技术助力乡村发展
200	KTP20240200	紫金县水墩镇	华南农业大学	李丹、郝彦伟、羊海军	紫金县水墩镇茶产业提质增效技术服务
201	KTP20240201	紫金县义容镇	广东省农业科学院	李贞明、肖静英、黄琛	种养结合模式下生态农业技术的应用与示范推广
202	KTP20240202	紫金县临江镇	广东技术师范大学	周莉、郑振兴、胡广齐	临江镇新一代电子信息产业技术支撑与服务
203	KTP20240203	紫金县凤安镇	广东省农业科学院（负责人、成员2）、 广州市农业农村科学院（成员1）	郭栋梁、乔燕春、梁冬霞	岭南特色水果产业提质增效技术示范推广
204	KTP20240204	紫金县南岭镇	华南农业大学	赵竑博、郑鹏、田晓成	特色茶叶种植与加工技术应用示范与推广
205	KTP20240205	紫金县好义镇	华南农业大学	马晓莉、罗文、蔺文成	好义三黄鸡新资源鉴定研究及其健康养殖技术应用推广

公开方式：依申请公开

抄送：省“百千万工程”指挥部办公室，省农业农村厅。

广东省科学技术厅办公室

2024年9月5日印发

4X1024/2023 13 16

合同编号:

技术服务合同

项目名称: 实验动物屏障环境内环境指标的监测与分析

委托方: 广州市瀚程实验器材有限公司

(甲方) _____

受托方: 华南农业大学

(乙方) _____

签订时间: _____

签订地点: 华南农业大学实验动物中心

有效期限: 2023.05.01-2024.12.31

中华人民共和国科学技术部印制

填写说明

一、本合同为中华人民共和国科学技术部印制的技术服务合同示范文本，各技术合同认定登记机构可推介技术合同当事人参照使用。

二、本合同书适用于一方当事人（受托方）以技术知识为另一方（委托方）解决特定技术问题所订立的合同。

三、签约一方为多个当事人的，可按各自在合同关系中的作用等，在“委托方”、“受托方”项下（增页）分别排列为共同委托人或共同受托人。

四、本合同书未尽事项，可由当事人附页另行约定，并作为本合同的组成部分。

五、当事人使用本合同书时约定无需填写的条款，应在该条款处注明“无”等字样。

技术服务合同

委托方（甲方）：广州市瀚程实验器材有限公司

住 所 地：广州市天河区范屋街 28 号 302 铺自编 03 房

法定代表人：顾燕青

项目联系人：黄华

联系方式：13342808253

通讯地址：广州市天河区范屋街 28 号 302 铺自编 03 房

电 话：13342808253 传真：/

电子信箱：763898447@qq.com

受托方（乙方）：华南农业大学

住 所 地：广东省广州市天河区五山路 483 号华南农业大学

法定代表人：刘雅红

项目联系人：马晓莉

联系方式：15813378275

通讯地址：广东省广州市天河区华南农业大学实验动物中心

电 话：15813378275 传真：/

电子信箱：maxl@scau.edu.cn

本合同甲方委托乙方就实验动物屏障环境内环境指标的监测与分析项目进行的专项技术服务，并支付相应的技术服务报酬。双方经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共和国合同法》的规定，达成如下协议，并由双方共同恪守。

第一条：甲方委托乙方进行技术服务的内容如下：

1. 技术服务的目标：分析屏障环境内温湿度及尘埃粒子数量对小鼠 IVC 设施内环境是否有影响。

2. 技术服务的内容：监测屏障环境内不同房间的温度、湿度及尘埃粒子。

3. 技术服务的方式：通过温湿度仪与尘埃粒子计数器监测屏障环境内不同房间的温度、湿度及尘埃粒子，并比较分析。

第二条：乙方应按下列要求完成技术服务工作：

1. 技术服务地点：华南农业大学实验动物中心

2. 技术服务期限：2023.05.01-2024.12.31

3. 技术服务进度：2024 年 9 月 30 日前完成实验工作，完成资料整理，结题。

4. 技术服务质量要求：完成房间温湿度及尘埃粒子的监测。

5. 技术服务质量期限要求：2024 年 12 月 31 日前完成所有内环境检测。

第三条：为保证乙方有效进行技术服务工作，甲方应当向乙方提供下列工作条件和协作事项：

1. 提供技术资料：

(1) 设施平面图

(2) _____

(3) _____

(4) _____

2. 提供工作条件:

- (1) 屏障环境
- (2) _____
- (3) _____
- (4) _____

3. 其他: 无

_____。

4. 甲方提供上述工作条件和协作事项的时间及方式: 2023年9月30日前一次性交付设施平面图等背景资料。

第四条: 甲方向乙方支付技术服务报酬及支付方式为:

- 1. 技术服务费总额为: 300000 元
- 2. 技术服务费由甲方 分期 (一次或分期) 支付乙方。

具体支付方式和时间如下:

- (1) 2023年9月30日前支付15万元。
- (2) 2024年7月30日前支付15万元。
- (3) _____

乙方开户银行名称、地址和帐号为:

收款单位: 华南农业大学
开户银行: 中国工商银行广州五山支行
地址: 广州市天河区五山路483号
帐号: 3602002609000310520

第五条: 双方确定因履行本合同应遵守的保密义务如下:

甲方:

1.保密内容（包括技术信息和经营信息）： 无

_____。
_____。

2. 涉密人员范围： 无

_____；

3. 保密期限： 无

_____。

4. 泄密责任： 无

_____。

乙方：

1.保密内容（包括技术信息和经营信息）： 监测结果

_____。
_____。

2. 涉密人员范围： 所有参与项目的人员

_____；

3. 保密期限： 合同结束后三年

_____。

4. 泄密责任： 无

_____。

第六条：本合同的变更必须由双方协商一致，并以书面形式确定。但有下列情形之一的，一方可以向另一方提出变更合同权利与义务的请求，另一方应当在15日内予以答复；逾期未予答复的，视为

同意：

1. _____ / _____
2. _____ / _____
3. _____ / _____
4. _____ / _____

第七条：双方确定以下列标准和方式对乙方的技术服务工作成果进行验收：

1. 乙方完成技术服务工作的形式：完成实验动物屏障环境内环境指标的监测与分析。

2. 技术服务工作成果的验收标准：完成实验动物屏障环境内环境指标的监测与分析，移交数据和分析结果。

3. 技术服务工作成果的验收方法：查看书面结果。

4. 验收的时间和地点：项目合作结束，华南农业大学实验动物中心验收。

第八条：双方确定：

1. 在本合同有效期内，甲方利用乙方提交的技术服务工作成果所完成的新的技术成果，归甲（甲、双）方所有。

2. 在本合同有效期内，乙方利用甲方提供的技术资料和工作条件所完成的新的技术成果，归乙（乙、双）方所有。

第九条：双方确定，按以下约定承担各自的违约责任：

1. 甲方违反本合同第三、四条约定，应当_____

_____承担违约责任，乙方除继续履行合同外，还应支付违约金，违约金上限为合同额 20%_____（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

2. 乙方违反本合同第二、五、七条约定，应当_____承担违约责任，乙方除继续履行合同外，还应支付违约金，违约金上限为合同额 20%_____（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

3. _____方违反本合同第_____条约定，应当_____（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

4 _____方违反本合同第_____条约定，应当_____（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

第十条：双方确定，在本合同有效期内，甲方指定黄华为甲方项目联系人，乙方指定马晓莉为乙方项目联系人。项目联系人承担以下责任：

1. 甲方联系人配合双方合作事宜的沟通和协调，乙方有情况负责通知甲方。

2. 乙方联系人全面负责整个项目的开展、结题等。

3. _____

一方变更项目联系人的，应当及时以书面形式通知另一方，未及时通知并影响本合同履行或造成损失的，应承担相应的责任。

第十一条：双方确定，出现下列情形，致使本合同的履行成为不必要或不可能的，可以解除本合同：

1. 发生不可抗力;

2. _____

3. _____

第十二条: 双方因履行本合同而发生的争议, 应协商、调解解决。协商、调解不成的, 确定按以下第 1 种方式处理:

1. 提交 广州 _____ 仲裁委员会仲裁;

2. 依法向人民法院起诉。

第十三条: 双方确定: 本合同及相关附件中所涉及的有关名词和技术术语, 其定义和解释如下:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

第十四条: 与履行本合同有关的下列技术文件, 经双方确认后, _____ 为本合同的组成部分:

1. 技术背景资料: _____;

2. 可行性论证报告: _____;

3. 技术评价报告: _____;

4. 技术标准和规范: _____;

5. 原始设计和工艺文件: _____;

大
家
公
司

6. 其他: _____;

第十五条: 双方约定本合同其他相关事项为: _____

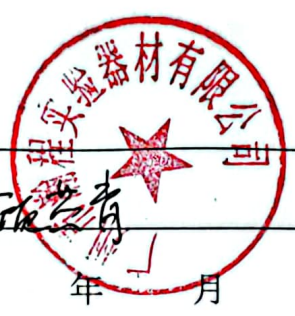
_____。

第十六条: 本合同一式_____份, 具有同等法律效力。

第十七条: 本合同经双方签字盖章后生效。

甲方: _____ (盖章)

法定代表人 / 委托代理人: _____ (签名)



年 月 日

乙方: _____ (盖章)

法定代表人 / 委托代理人: _____ (签名)



年 月 日

印花税票粘贴处：

(以下由技术合同登记机构填写)

合同登记编号：

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1. 申请登记人：_____

2. 登记材料：(1) _____

(2) _____

(3) _____

3. 合同类型：_____

4. 合同交易额：_____

5. 技术交易额：_____

技术合同登记机构（印章）

经办人：

年 月 日

大
庆
章

章

受理编号:

项目编号:

文件编号:

河源市科技计划项目 合 同 书

项 目 名 称:	兴泰生猪健康养殖与安全生产技术服务与推广示范		
计划类别:	新技术推广示范		
项目起止时间	2022年9月——2023年8月		
管理单位(甲方):	河源市科学技术局		
承担单位(乙方):	华南农业大学		
通讯地址	广东省广州市天河区五山路483号		
邮政编码	510642	单位电话	020-38632819
项目负责人	马晓莉	联系电话	15813378275
项目联系人	徐铮	联系电话	13602496031
乙方主管部门(丙方):			

河源市科学技术局

二〇一七年制

一、项目实施内容（具体业务合同填写说明见合同填报界面）（详见附件）

除非洲猪瘟外，在生猪养殖中重要传染病还有：猪繁殖与呼吸综合征、猪流行性腹泻、猪圆环病毒等病毒性疾病和猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌等细菌性疾病，这些传染病对生猪养殖产生巨大危害和经济损失。本项目拟针对当前疫病复杂且防控难的现状，开展生猪健康养殖与安全生产技术服务与推广示范，充分利用团队在生猪健康养殖与疾病防控方面的技术力量，以进一步提高对接企业安全养猪生产效率，促进企业增产增收，保障肉品和种业安全，带动乡村振兴。

1.基本方案：

(1) 收集省内规模化猪场组织、血液样本，用 ELISA 方法对猪群重要传染性疾病的抗体水平进行检测，掌握各地相关疫病整体免疫水平。通过 PCR 方法对相关病原进行检测，掌握各地生猪疾病的阳性率及其流行状况。

(2) 对检测为阳性病原样本进行测序，利用分析软件对测序结果进行进化树构建和同源性比对分析，根据分析结果对相关疫病的流行情况和流行趋势分析，提出合理的疫苗免疫程序建议，形成主要猪病流行病学调查报告。

(3) 对服务企业环境进行考察调研，开展水源和饲料安全性检测研究，并结合流行病学调查结果，制定合理的生物安全防控体系。

2.技术路线：

(1) 样本采集——ELISA 方法检测样本抗体水平

(2) 样本采集——样本核酸提取——PCR 检测相应抗原并进行测序——进行同源性比对分析病原变异情况——形成主要猪病流行病学调查报告

(3) 实地调查研究——开展水源和饲料安全性检测研究——生物安全防控研究查漏补缺

(4) 根据调研和流行病学调查结果制定合理的生物安全防控措施

3.拟解决的关键问题：

(1) 解决企业对区域性猪病流行情况与趋势不明、调查难的状况，开展流行病学调查，形成生猪主要疾病流行病学分析报告，为对接企业及当地政府提供防疫的重要理论和实践依据。

(2) 弥补养猪企业生物安全体系漏洞，解决当前生猪疫病复杂且防控难的现状，构建生猪疫病防控技术理论体系，进一步提高对接企业安全养猪生产效率，促进企业增产增收，保障地区肉品和种业安全，带动乡村振兴。

二、项目考核指标				
(一) 项目完成后提供的研究开发成果及形式(须明确产品、专利、版权、标准等成果的类型及数量)				
成果形式		成果数量	成果形式	成果数量
发明专利	申请		引进人才(人)	
	授权		培养人才(人)	
实用新型专利	申请		科技人才奖励(人)	
	授权		技术标准制定	牵头(个) 参与(个)
			科技报告(篇)	2
外观设计专利	申请		软件著作权(项)	
	授权		论文论著(篇)	
国外专利	PCT受理		其中: 被收录论文数(篇)	SCI
	授权			IE
获国家级奖项(项)				CA
获省级奖项(项)				
新产品(或新材料、新装备、新品种(系))				
新工艺(或新方法、新模式、新技术)			新服务(项)	
服务企业数量(家)		技术服务数量(项)		
		服务企业数量(家)		1
科技金融项目必填		开展培训宣讲活动场次(次)		
		服务企业数量(家)		
		帮助企业融资(万元)		
		引进专业机构(家)		
院士工作站项目必填		引进院士及其团队科技成果转化数量		
		院士开展的战略咨询和技术指导次数		
		院士年进站次数		
		院士及院士团队年进站时间		
软科学项目必填		决策咨询报告(篇)(至少1篇)		
		决策咨询报告(篇)(至少1篇)		
		研究中后期报告(篇)		
		研究分报告(篇)		
		调研报告(篇)		
		专著(篇)[须注明“**市软科学研究计划项目(项目编号:)资助”]		

	专著(篇)[须注明“**市软科学研究计划项目(项目编号:)资助”]	
	培养人才(人)	
	获国家级奖项(项)	
	获省级奖项(项)	
	其他(具体形式: _____)	

其他成果及形式说明:

无

(二) 主要技术经济指标及社会效益

累计新增销售收入(万元)

累计新增利税(万元)

其他主要技术经济指标及社会效益说明:

项目把科技和生产结合于一体,在非洲猪瘟疫情常态化背景下,推动农业企业生猪生物安全体系的升级,带动周边生猪健康养殖和安全生产技术水平提高,促进农业科技技术的推广应用。生猪疫病的流行不但严重威胁养殖企业的安全,而且有些人畜共患病甚至影响人民群众的健康安全,不利于社会和谐发展。通过对国家及地区生猪育种和肉猪养殖龙头企业开展“兴泰生猪健康养殖与安全生产技术服务与推广示范”,可以为企业和群众驱散阴霾。

通过技术服务的实施,一方面,可以进一步提高对接企业安全养猪生产效率,促进企业增产增收,保障地方肉品和种业安全;另一方面,通过企业示范引领作用,带动农户参与到生猪养殖产业中来,推动乡村养猪业的发展,促进乡村振兴;更为重要的是,推广生猪健康养殖模式,实现农村生猪产业的规范化发展,减少人民群众患病风险,保障人民群众生命财产安全,保障社会和谐发展。

因此项目实施对于打好种业翻身仗、保障食品安全、促进乡村振兴与和谐都有突出而显著的意义。


三、项目进度和阶段目标			
(一) 项目起止时间： 2022 年 9 月 —— 2023 年 8 月			
(二) 项目实施进度及阶段主要目标			
开始日期--结束日期	主要工作内容（限 500 字）		
2022 年 9 月—2022 年 12 月	持续收集省内规模化猪场组织、血液样本，用 ELISA 方法对猪群重要传染性疾病的抗体水平进行检测，掌握各地相关疫病整体免疫水平；通过 PCR 方法对相关病原进行检测，掌握各地生猪疾病的阳性率及其流行状况。		
2023 年 1 月—2023 年 4 月	对检测为阳性病原样本进行测序，利用分析软件对测序结果进行进化树构建和同源性比对分析，根据分析结果对相关疫病的流行情况和流行趋势分析，提出合理的疫苗免疫程序建议，形成主要猪病流行病学调查报告。		
2023 年 5 月—2023 年 8 月	对服务企业环境进行考察调研，开展水源和饲料安全性检测研究，并结合流行病学调查结果，提出合理的生物安全防控体系措施；整理材料，结题。		
四、承担、参与单位工作分工及经费分配情况			
承担/参与单位名称（盖章）	工作分工	总经费分摊 (万元)	市科技局经费 分配(万元)
 华南农业大学（承担单位）	在非洲猪瘟常态化的背景下，根据服务对象的需求和河源市生猪养殖实际情况，通过开展区域性生猪重要传染病流行病学调查及饮水和饲料的安全性检测研究，形成主要疾病流行病学分析报告，并据此提出合理的免疫和生物安全防控方案。	5	5
 河源兴泰农牧股份有限公司（服务对象和参与单位）	协助甲方按照工作计划推进生猪健康养殖与安全生产技术服务工作；配合甲方进行水样、饲料等采样工作。	0	0
	合计	5	5

五、项目总经费及市科技局经费预算						
(一) 市科技局经费下达总额：(大写) 伍万元；(小写)： 5 万元						
(二) 市科技局经费拨付方式： 事前一次性拨付						
(三) 市科技局经费年度下达计划：						
年度	2022 年					
经费 (万元)	5					
(四) 总经费及市科技局经费开支预算计划：						
经费筹集情况：						(单位：万元)
总投入经费： 5						
	市科技局 经费	自筹资金				合计
		自有资金	贷款	地方政府投入	其它	
已投入经费						
新增经费	5					5
政府部门、境外资金及其他资金投入情况说明：						
无						
新增经费预算：						(单位：万元)
	新增经费总额			市科技局经费		
支出经费	经费额	用途说明		经费额	用途说明	
基建费						
1、直接费用	4.7	主要用于流行病学调查采样、试剂、测序等费用，还有实地调研的差旅费等。		4.7	主要用于流行病学调查采样、试剂、测序等费用，还有实地调研的差旅费等。	
(1)设备费						
(2)材料费	3	PCR/RT-PCR 检测试剂、ELISA 检测试剂盒等		3	PCR/RT-PCR 检测试剂、ELISA 检测试剂盒等	
(3)测试化验加工外协费	1	基因测序分析		1	基因测序分析	
(4)燃料动力费						
(5)差旅费	0.7	采样和调研的差旅费		0.7	采样和调研的差旅费	
(6)会议费						
(7)国际合作与交流费						
(8)出版/文献/信息传播/知识产权事务费						


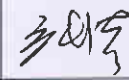
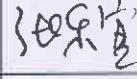
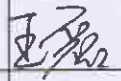
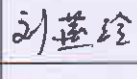
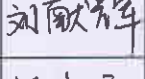
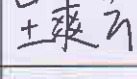
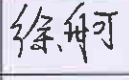
(9) 租赁费				
(10) 人员费				
(11) 专家咨询费				
(12) 直接费其他支出				
(13) 科技金融服务体系其他费用				
① 信用评级补贴				
② 大赛场租				
③ 特派员奖励与补贴				
2、间接费用	0.3	单位管理费 6%	0.3	单位管理费 6%
合计	5		5	

六、人员信息

项目负责人：

姓名	性别	年龄	职务	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
马晓莉	女	41	无	实验师	硕士	全面负责	华南农业大学	

主要研究开发人员：

姓名	性别	年龄	职务	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
徐铮	男	42	无	高级实验师	硕士	调研与技术对接支撑	华南农业大学	
李颂潮	男	42	无	兽医师	本科	技术指导方案设计	广东广弘农牧发展有限公司	
宋长绪	男	57	无	研究员	博士	现场与技术指导、方案设计	华南农业大学	
张乐宜	男	38	无	兽医师	硕士	技术指导与检测分析	华南农业大学	
王磊	男	34	博士后	无	博士	基因检测与分析	华南农业大学	
刘燕玲	女	39	无	兽医师	硕士	项目材料与财务管理	华南农业大学	
刘献辉	男	27	博士生	无	硕士	样品采集与调研	华南农业大学	
王爽云	女	27	博士生	无	硕士	样品采集与数据整理分析	华南农业大学	
徐舸	男	25	硕士生	无	本科	现场调研与检测分析	华南农业大学	

七、承担、参与单位合作协议（须与申报书中合作协议或意向书相一致）

河源市农村科技特派员与派驻单位对接表

派驻单位名称	河源兴泰农牧股份有限公司 (盖章)	特派员姓名	马晓莉
派驻单位地址	河源市紫金县义容镇南洋村	联系电话	15813378275
派驻单位基本情况	<p>公司是一家主营种猪育种扩繁、为客户提供优质健康种猪解决方案的省级重点农业龙头企业，以“自繁自养一体化生态养殖”模式，致力于打造环境友好、绿色健康的生猪生态养殖产业。</p>		
派驻单位技术需求	<p>生猪疫病是养猪业最大的威胁，在非洲猪瘟常态化的背景下，企业急需弥补生物安全体系漏洞，解决当前生猪疫病复杂且防控难的现状，构建生猪疫病防控技术理论体系，进一步提高企业安全养猪生产效率，促进增产增收。</p>		
拟开展技术服务的形式	<p>大力开展生猪健康养殖与安全生产农业新技术、新方法的服务与推广示范，推广示范先进适用的生猪健康养殖、疫病防控等实用技术成果。</p>		
备注			

特派员：马晓莉

八、合同条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国合同法》和国家有关法规和规定,为顺利完成2022年河源市科技计划中兴泰生猪健康养殖与安全生产技术服务与推广示范项目(文件编号:河科[2022]49号)经协商一致,特订立本合同,作为甲乙双方在合同执行中共同遵守的依据。

第二条 甲方应:1.按合同规定进行经费核拨和工作协调。2.检查乙方项目实施和经费使用情况。3.在收到乙方项目验收申请书后一个月内组织验收。

第三条 乙方应:1.按合同规定的开支范围,对甲方核拨经费实行专款专用,单独列账,配合甲方进行监督检查。2.在每年十二月一日前向甲方如实提交本年度项目实施情况、年度经费使用的书面报告。3.项目完成后,乙方应在合同规定完成期限后一个月内向甲方提交书面报告(验收申请和结题报告),申请甲方进行验收。4.项目验收后,乙方须在验收日期完成后的一个月内向甲方提供完整的验收资料和结题报告。

第四条 在履行本合同的过程中,如遇到市财政计划改变等不可抗拒的特殊情况,甲方对所核拨经费的数量和时间可进行相应变更。

第五条 在履行本合同过程中,如乙方需要调整项目进度,需向甲方提出书面申请并阐明理由,甲方可对合同中经费年度下达计划、项目进度和阶段目标进行相应调整。

第六条 在履行本合同的过程中,当事人一方发现可能导致项目失败或部分失败的情形时,应及时通知另一方,并采取适当措施减少损失,没有及时通知并采取适当措施,致使损失扩大的,应当就扩大的损失承担责任。

第七条 在履行本合同的过程中,因出现在现有水平下无法克服的技术困难,致使项目失败或部分失败造成损失,1.乙方应及时通知甲方,提供相关证据并予以说明。2.甲方以已核拨的经费为最高限承担部分责任,乙方不得再要求甲方承担最高限额以外的其他任何责任。

第八条 乙方违反约定造成项目工作停滞、延误或失败,未能通过验收,应承担违约责任。

第九条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享,除双方另有约定外,按国家和省有关法规执行。

第十条 属技术保密的项目当事人双方订立技术保密条款,作为合同正式内容的一部分。

第十一条 根据项目具体情况,经双方协商订立的附加条款作为本合同正式内容的一部分。

第十二条 甲方可根据具体情况决定乙方是否需要单位担保,若需要保证单位,应订立担保条款,作为本合同正式内容一部分。

第十三条 本合同的争议应由双方本着协商一致的原则解决,当合同需要更改或解除时,双方应订立变更条款或协议。协商不成或不愿意协商解决的,任何一方均有权向甲方所在地人民法院提起诉讼解决。

第十四条 本合同一式六份,各份具有同等效力。甲方存三份,乙方存二份,保证单位存一份,本合同自签字之日起生效,有效期至项目验收后一年内。各方均应负合同的法律责任,不应受机构、人事变动而影响。

第十五条 违约责任:

违反本合同约定，违约方应承担违约责任。

1.违反本合同第三条约定，经甲方催告后5日内仍未解决的，乙方应当承担违约责任，承担方式和违约金额如下：(1)合同解除。(2)乙方应在违约事由发生后7日内全额退还甲方已核拨的经费，并自行承担由此引起的损失。

2.违反本合同第八条约定，乙方应当承担违约责任，承担方式和违约金额如下：(1)在发生违约事由的7日内全额退还甲方已核拨的经费。(2)按已核拨经费的20%支付违约金。

第十六条 保密条款：

1.本合同保密内容范围为：

2.本合同保密期限为：

3.乙方应与可解知悉保密内容的人员签订技术秘密保护协议。

4.双方应建立技术秘密保护制度。

5.属技术保密的项目必须经省负责技术保密部门审查后，确定可否发表或用于国际合作和交流。

第十七条 保证条款(可由保证人和被保证人另行约定)

当乙方不履行或不完全履行本合同，并没有或没有完全承担违约责任时，保证人承担一般保证责任。

说明：1.本合同书中，凡是当事人约定无需填写的条款，在该条款的空白处划（/）。

2.委托代理人签订本合同书的，应出具合法、有效的委托书。

九、本合同签约各方	
管理单位（甲方）：河源市科学技术局（盖章）	
单位地址：	
法定代表人（或授权代表）：	叶小权  (签章)
联系人（经办人）姓名：	伍文彬  (签章)
E-mail:	
电话:	
	2022.9.30 年 月 日
承担单位（乙方）：	华南农业大学  (盖章)
单位地址：	广东省广州市天河区五山路 483 号
法定代表人（或法人代理）：	刘雅红  (签章)
联系人（项目主管）姓名：	马晓莉  (签章)
E-mail:	maxl@scau.edu.cn
电话:	15813378275
开户单位名称：	华南农业大学
开户银行：	广州工行五山支行
开户帐号：	3602 0026 0900 0310 520
	年 月 日
乙方主管部门（丙方）：	(签章)
单位地址：	
法定代表人（或法人代理）：	_____ (签章)
联系人（项目主管）姓名：	_____ (签章)
E-mail:	
电话:	
开户银行：	
开户帐号：	
	年 月 日

28
合同编号：K2019020101001

广州市科学技术协会

项目合同书

(科普经费类)

项目名称：农村居民科学素质提升工程——科普惠农兴村计划

子项目名称：华南农业大学对接增城区石滩镇南坐村实施

“狂犬病及其防控技术科普行”项目

项目类别：1. 一次性专项经费项目

2. 经常性专项业务费项目

经办部门（处室）：广州市科学技术协会科学普及部

项目承担单位：华南农业大学

起止年限：2019年3月到2019年12月



一、项目单位基本情况			
项目承担单位	华南农业大学	单位性质	国有
项目参加单位	参加单位 1: 广州市增城区石滩镇南垌村		
承担单位地址	广州市天河区五山路 483 号	邮政编码	510642
单位负责人	刘雅红	职称/职务	教授/校长
联系电话	020-85280006	手机	13602706880
电子邮件	gale@scau.edu.cn	传真	020-85280004
项目负责人	马晓莉	职称/职务	实验师
联系电话	020-38617467-821	手机	15813378275
电子邮件	maxl@scau.edu.cn	传真	无
二、项目团队主要参加人员情况			
姓名	工作单位	职务和职称	此项目的分工职责
郭雪峰	华南农业大学	教授	技术指导
徐铮	华南农业大学	兽医师	现场指导与培训
刘永伦	华南农业大学	兽医师	现状调研与走访
陈旭	华南农业大学	会计师	财务管理
谢淑敏	华南农业大学	兽医师	数据分析资料整理
李紫聪	华南农业大学	教授	数据分析资料整理
赵路漫	华南农业大学	硕士生	现状调研与走访

三、项目总目标

通过狂犬病及防控知识的普及，带动周边地区防控水平提高，促进农业科技成果的推广应用。主要目标：

1. 进行自主研发的高效狂犬病疫苗推广应用示范；
2. 进行狂犬病及其防控知识的科普，实现农村狂犬病防控规范化发展；
3. 通过示范村的模范引领作用，带动周边村镇相关知识的宣传普及，建设长效稳定的狂犬病防控机制。

四、主要工作任务和考核指标

（一）工作任务

充分利用本团队多年来在狂犬病研究与防控方面的科研成果和技术力量的优势，结合对接村镇广州市增城区石滩镇南坐村对狂犬病防控的需求，通过自主研发的适合我国国情的高效狂犬病疫苗的推广应用及其防控技术科普宣传，减少对对接村镇人民群众患病风险，一方面，保障人民群众生命财产安全；另一方面，提高对接村镇民众对狂犬病及其防控知识认识的水平，保障社会和谐发展。

（二）考核指标（指标总个数需达6个以上，其中量化指标个数占比须达50%（含）以上。）

1. 产出指标（三个以上）

（1）数量指标：结合当地实际，进行调研走访、问卷调查等形式形成民众对狂犬病认识情况调研报告1份。

（2）质量指标：计划在2019年发表相关期刊论文1篇以上。

（3）时效指标：计划在一年内完成所有目标。

（4）成本指标：计划将成本控制在5万元以内。

2. 效益指标（三个以上）

（1）科普效益：计划在2019年开展狂犬病相关科普讲座1场以上，进行科普展示或科普咨询1次，服务村民100人次以上。

（2）社会效益：将研究成果的科学知识和思想传播到社会的各方，使之成为公众理解，让公众有能力参与科技政策的决策活动，用以提高素质，培养人才，发展生产力，促进社会物质和精神文明发展。其次，提高公众对科技的发展促进生产力提高和社会进步认知程度，以本项目科普为契机，增强公众的科技意识和科学文化素质，使科学思想在全社会广泛传播，倡导积极向上的先进科学文化。

因此，从长远来看，项目实施有利于推进科技和生产力的发展，利国利民。

(3) 经济效益:进行对自主研发的狂犬病疫苗(dG株)的成果转换。

(4) 生态效益:认真贯彻党的十九大会议提出的“乡村振兴战略”和十八届五中全会提出的“创新、协调、绿色、开放、共享”五大发展理念，全面落实建设广东特色科技现代化普及的决策部署，以持续推进现代科技普及体系建设为主要抓手，实施现代科普提升工程，结合本项目和成果的特点，以科技创新为核心、公共服务健全为保障，促进重大科技成果普及化，提升公众对科学技术的发展促进生产力提高和社会进步认知程度，加快提高公众对狂犬病知识与产品的正确认知能力和水平。

(5) 满意度指标:计划服务对象满意度达85%以上。

五、经费额度及支出主要用途

编号	支出内容	金额	备注
1	图书资料费	4000 元	购买和制作宣传资料、调查问卷:10 元/册*200 册=2000 元;设计和制作展板 500 元;发表论文 1500 元/篇*1=1500 元。
2	科普培训讲座费	3000 元	聘请师资:1500 元/人/次*1 人*2 次=3000 元。
3	科普展览费	15500 元	调研和宣讲交通费:租车往返 1000 元/天*10 天=10000 元;劳务费:用于支付参加项目研究生、科研辅助人员劳务费 500 元/人/月*11 月=5500 元。
4	新产品推广费	25000 元	购买疫苗:50 元/支*500 支=25000 元。
5	间接费用	2500 元	项目承担单位管理费 5%。
合计		50000 元	

说明：

1. 项目主要用于会议费、培训费、印刷费、劳务费等商品和服务支出。会议费应按照市财政局的穗财编〔2018〕206号文有关规定执行；培训费应按市财政局、市人社局的穗财编〔2018〕4号文有关规定执行。

2. 项目不得用于人员经费及与项目无关的各类支出，如人员工资、福利、奖金；日常办公、出国和接待费；基建、办公设备维修改造支出；组织协调等各种管理性费用；罚款、还贷、捐赠、赞助、对外投资；购买纪念品、礼品；与项目无关的其他支出。

3. 会议费不得使用现金结算。其他费用非特殊情况也不得使用现金结算。

4. 项目承担单位应完善经费使用管理，经费支出应有完善的申请、审批、报销等手续及经办人、负责人签名。

5. 项目承担单位应完善合同管理制度。

6. 经费应随项目开展在当年支出完毕，不得跨年使用。

六、共同条款

（一）项目承担单位必须按要求编报项目执行情况和有关统计报表，及时上报项目归口管理部门，并配合市财政局、市科协对项目进行支出进度统计、绩效跟踪和评价等工作；项目归口管理部门按规定做好项目绩效跟踪和评价。

（二）任务执行过程中，如项目承担单位提出需调整任务内容或绩效目标，必须按照规定程序报市科协、市财政局审批。

（三）项目承担单位因某种原因（如：与可行性研究内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）不能按计划执行而主动要求中止任务时，应视不同情况，部分或全部退还所拨经费；项目承担单位未按财经法规列支且未主动提出中止任务的要求，市科协有权提出中止任务。

（四）项目承担单位承担任务所需经费应按本合同书中规定的经费支出范围开支，市科协有权监督项目经费使用情况或委托第三方对项目经费支出情况、项目绩效完成情况进行审计。

（五）合同书签订各方均负有相应的责任。若有争议或纠纷时，按有关法规和管理办法处理。

（六）由市科协专项经费全额支持的项目研究成果及其形成的知识产权归市科协所有，部分支持项目列明市科协权限。

（七）本合同书一式四份，广州市科协三份，项目承担单位一份。

七、合同签署各方



项目承担单位名称：华南农业大学

开户名称：华南农业大学

开户银行：广州工行五山支行

银行账号：3602 0026 0900 0310 520

法定代表人/委托代理人（签字）：



经办部门（处室）：

法定代表人/委托代理人（签字）：



广州市科学技术协会

广州市科协关于项目绩效评价结果的通知

华南农业大学:

你单位承接我会 2019 年 K2019020101001 项目, 项目名称为 华南农业大学对接增城石滩镇南垆村实施“狂犬病及其防控技术科普行”项目, 资助金额 5 万元, 项目负责人为 马晓莉。经第三方绩效评价, 该项目绩效评价结果为优。

感谢贵单位对我会工作的大力支持, 欢迎继续申报我会项目!

特此通知。





项目批准号	32473055
申请代码	C1805
归口管理部门	
依托单位代码	51064208A0499-0932



32473055 1005362

国家自然科学基金 资助项目计划书 (预算制项目)

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：胶原蛋白COL-117对线虫表皮形成的影响及其理化特性解析

直接费用：50万元 执行年限：2025.01-2028.12

负责人：元冬娟 BRID：05188.00.57570

通讯地址：广东省广州市天河区五山路483号

邮政编码：510642 电 话：13824434220

电子邮件：yuandj@scau.edu.cn

依托单位：华南农业大学

联系人：唐家林 电 话：020-85280070

填表日期：2024年08月28日

国家自然科学基金委员会制



国家自然科学基金资助项目计划书填报说明 （预算制项目）

- 一、项目负责人收到《国家自然科学基金资助项目批准通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办​​法和新修订的《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（以下简称《资金管理办法》，请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行、检查和验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都应当填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果《批准通知》所附“项目评审意见及修改意见表”中“修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准的项目资助额度，按规定调整项目预算，并按照《国家自然科学基金项目计划书预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》所附“项目评审意见及修改意见表”中“修改意见”栏目没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中上述栏目明确要求调整研究期限或研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、重大研究计划重点支持项目、重大研究计划集成项目、国家重大科研仪器研制项目、联合基金项目、原创探索计划项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标、验收技术指标等）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位（如有）之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。
 3. 创新研究群体项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：



- (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，按下列提纲撰写：
- (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 数学天元基金项目：天元前沿重点专项项目和数学与其他学科交叉联合资助项目，参照重点项目的方式进行选择和填写；其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。
6. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

项目负责人信息	姓名	元冬娟	性别	女	出生年月	1980年11月	民族	汉族	
	学位	博士			职称	副研究员			
	是否在站博士后	否		电子邮件	yuandj@scau.edu.cn				
	电话	13824434220		个人网页					
	工作单位	华南农业大学							
	所在院系所	兽医学院							
依托单位信息	名称	华南农业大学					代码	51064208A0499	
	联系人	唐家林		电子邮件	kyc.jhk@scau.edu.cn				
	电话	020-85280070		网站地址	http://kjc.scau.edu.cn/				
合作单位信息	单位名称								
项目基本信息	项目名称	胶原蛋白COL-117对线虫表皮形成的影响及其理化特性解析							
	资助类别	面上项目			亚类说明				
	附注说明								
	申请代码	C1805:兽医寄生虫学							
	基地类别								
	执行年限	2025.01-2028.12							
	直接费用	50万元							



项目摘要

中文摘要:

胶原蛋白是线虫表皮的主要组分，调节线虫表型和发育。前期研究发现，胶原蛋白col-117在线虫寄生阶段高表达，是蜕皮相关核受体的下游靶基因。在脂质转运蛋白干扰表达的虫体，伴随脂质减少和表皮形成障碍，该基因表达下调50%。因此，COL-117很可能是影响线虫寄生阶段表皮形成的关键蛋白，且与脂质关系密切，但该蛋白如何发挥作用尚不清楚。为解答该问题，本项目针对巴西日圆线虫COL-117，拟开展：1) 对col-117进行慢病毒介导的持续干扰表达，明确其对虫体表皮形成的影响；2) 采用col-117干扰表达虫体，表征COL-117胶原三聚体理化特性；3) 分析脂质转运蛋白干扰表达虫体的差异脂质，通过脂质添加/缺乏饲料饲喂感染大鼠，评估表皮形成及COL-117胶原三聚体理化特性，鉴定COL-117协同脂质调节表皮形成的分子机制。研究结果有助于理解人兽共患寄生线虫的表皮形成和抗寄生线虫药物靶标筛选。

Abstract:

Collagen is the main component of the nematode epidermis and regulates nematode phenotype and development. Results from previous studies showed that the collagen col-117 was highly expressed during the parasitic stage of nematodes and the downstream gene of molting-related nuclear receptor. The nematodes with RNAi of lipid transport protein showed reduced lipid content in the body and epidermal formation disorder, accompanied with 50% down-regulated expression of col-117. These indicate that COL-117 may be responsible for the formation of the nematode epidermis and is closely related to the lipids. However, the action and physicochemical properties of COL-117 remain unclear. To reveal the effect of COL-117 from *Nippostrongylus brasiliensis* on the epidermis formation as well as its physicochemical properties, the project intends to: 1) elucidate the role of COL-117 in the formation of nematode epidermis by lentivirus-mediated RNAi of col-117; 2) determine the physicochemical properties of COL-117 collagen trimer using col-117 RNAi isolate; 3) evaluate the epidermal formation and physicochemical properties of COL-117 collagen trimer of *N. brasiliensis* by feeding the host with corresponding lipid-addition / lipid-deficiency diets after differential lipid analysis using far-1 RNAi isolate. Results of the project will be helpful in understanding the epidermal formation of zoonotic parasitic nematodes and the development of drugs against parasitic nematodes.

关键词(用分号分开): 线虫; 功能蛋白; 表皮形成; 理化特性; 脂质

Keywords(用分号分开): Nematode; Functional protein; Epidermization; Physicochemical properties; Lipid



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间 (月)			
1	元冬娟	1980.11	女	副研究员	博士	华南农业大学	13824434220	332623198011200043	项目负责人	10			
2	马晓莉	1981.09	女	实验师	硕士	华南农业大学		440301198109051524	动物实验	6			
3	傅叶琪	1992.03	男	讲师	硕士	华南农业大学		445102199203111217	干扰实验	6			
总人数		高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
7		1		2		0		0		1		3	



国家自然科学基金预算制项目预算表

项目批准号：32473055

项目负责人：元冬娟

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	一、科学基金资助项目直接费用合计	50.0000
2	1、设备费	2.0000
3	其中：设备购置费	0.0000
4	2、业务费	37.3600
5	3、劳务费	10.6400
6	二、其他来源资金	0.0000
7	三、合计	50.0000

注：请按照项目研究实际需要合理填写各科目预算金额。



预算说明书

一、科学基金资助项目直接费用

请按照《国家自然科学基金项目计划书预算编制说明》等有关要求，按照政策相符性、目标相关性和经济合理性原则，实事求是编制项目预算。填报时，直接费用应按设备费、业务费、劳务费三个科目填报，每个科目结合科研任务按支出用途进行说明。

1. 设备费（是指在项目实施过程中购置或试制专用仪器设备，对现有仪器设备进行升级改造，以及租赁外单位仪器设备而发生的费用。计算类仪器设备和软件工具可在设备费科目列支。填报时，应对设备费支出的必要性和测算的合理性等内容进行说明。单价大于50万元（含50万元）的设备需补充说明设备的主要性能指标、主要技术参数等内容；单价小于50万元的设备仅需按照设备购置费、试制改造费和租赁使用费分类进行说明即可。）

用于实验室已有仪器的维修，合计 2.00 万元。

设备费合计 2.00 万元。

2. 业务费（是指项目实施过程中消耗的各种材料、辅助材料等低值易耗品的采购、运输、装卸、整理等费用，发生的测试化验加工、燃料动力、出版/文献/信息传播/知识产权事务、会议/差旅/国际合作交流等费用，以及其他相关支出。）

(1) 材料费：18.47 万元

① 分子克隆和实时荧光定量等试剂盒：RNA 抽提试剂盒（4000 元/个×4=1.60 万元），反转录试剂盒（2000 元/个×4=0.80 万元）、qPCR SYBR green 试剂盒（1500 元/个×4=0.60 万元）、PCR 扩增试剂盒（500 元/个×6=0.30 万元）、DNA 凝胶回收试剂盒（900 元/个×8=0.72 万元）、dsRNA 合成试剂盒（1500 元/个×3=0.45 万元）、质粒提取试剂盒（600 元/个×6=0.36 万元）等，合计 4.83 万元。

② 常规分子生物学和生物化学试剂：用于胶原蛋白提取的胃蛋白酶，用于分子克隆的限制性内切酶、DNA 连接酶和 DNA 聚合酶、DNA 和蛋白 Marker、胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖、Tris、无水乙醇、工业酒精等，约 2.00 万元；常规一抗和二抗（平均 1600 元/mL×3=0.48 万元）、各种抗生素（300 元/瓶×3=0.09 万元）、各种感受态细胞（平均 400 元/套×3=0.12 万元），合计 2.69 万元。

③ 病毒制备和虫体培养相关试剂：DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基（600 元/瓶×10=0.60 万元）、优质胎牛血清（3000 元/瓶×4=1.20 万元）、Lipofectamine 2000 转染试剂（1900 元/支×3=0.57 万元）、胰酶（190 元/瓶×2=0.04 万元）等，合计 2.41 万元。

④ 蛋白纯化试剂：His 标签蛋白纯化填料（3500 元/根×2=0.70 万元）、瑞典 Pharmacia Biotech 的 Q-Sepharose 柱（3300 元/根×2=0.66 万元）、BCA 蛋白定量试剂盒（300 元/个×6=0.18 万元），合计 1.54 万元。

⑤ 脂质检测相关试剂：各种脂质标准品、油红 O、亲脂性荧光染料 FM4-64，合计 1.00 万元。

⑥ 实验耗材：0.2 mL 进口 PCR 反应管，国产 10 μ L/200 μ L/1000 μ L 吸头，国产 15mL/10mL/1.5mL/1mL 离心管，一次性 PE 手套，乳胶手套，口罩，10mL 移液管，酶标板、不同规格滤器等，合计 3.00 万元。

⑦ 实验动物及饲料费：主要用于购买清洁级 SD 大鼠、普通饲料和脂肪酸、视黄醇等缺乏模型饲料、垫料等，合计 3.00 万元。

(2) 测试化验加工费：9.81 万元

① 引物合成和 DNA 测序费：送上海生工生物工程有限公司进行引物合成和 DNA 测序，引物合成费约 0.80 万元，DNA 测序费约 1.00 万元，合计 1.80 万元。

② 转录组学检测费：送上海派森诺生物科技股份有限公司进行转录组测序，600 元/例×30 例=1.80 万元。

③ Real-time PCR 仪器使用费：检测基因表达，60 元/h×100h=0.60 万元。



- ④ 蛋白质质谱检测费：检测多肽链的蛋白序列，1300元/例×4例=0.52万元。
- ⑤ 气相色谱-质谱仪使用费：检测虫体脂肪酸组成，60元/h×30h=0.18万元。
- ⑥ 液相色谱-串联质谱联用仪使用费：检测虫体脂质组成，200元/h×50h=1.00万元。
- ⑦ 肽谱质谱检测费：检测多肽链蛋白序列，2500元/样品×5个=1.25万元。
- ⑧ 电镜使用费：扫描电镜观察胶原蛋白形貌和巴西日圆线虫表皮形态，250元/h×30h=0.75万元。
- 透射电镜观察巴西日圆线虫皮层及其细胞形态，350元/h×30h=1.05万元。

- ⑨ 蛋白结构检测使用费：圆二色谱仪检测胶原蛋白结构和热稳定性，150元/h×20h=0.30万元。
- 傅里叶变换红外光谱仪检测胶原蛋白结构，30元/h×20h=0.06万元。

⑩ 实验动物中心等平台使用费：基因干扰虫株的传代和相应虫株表皮形成的评估，大约需要饲养SD大鼠140只，平均每只大鼠饲养12天，每笼4只，笼位费7元/天，共0.29万元。巴西日圆线虫保种需要20只SD大鼠，每笼2只，平均饲养30天，笼位费7元/天，共0.21万元。合计0.50万元。

(3) 差旅/会议/国际合作与交流费：3.28万元

参加中国畜牧兽医学学会兽医寄生虫学年会、中国动物学会寄生虫学研讨会或者中华预防医学会全国人兽共患病国际研讨会4次，每次参加2人，会期3天，交通费平均往返机票约2000元，会议注册或会务费1200元/人，住宿费平均每天300元/人。2人×[2000元+1200元+300元×3天]×4次=3.28万元。

(4) 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：5.80万元

文献出版费：发表SCI文章的版面费、审稿费等，预计发表SCI论文4篇，1.20万元/篇，共4.80万元。

文献检索、资料费：文献检索、资料购买、资料打印和复印等，合计1.00万元。

业务费合计 37.36万元。

3. 劳务费（是指在项目实施过程中支付给参与项目研究的研究生、博士后、访问学者以及项目聘用的研究人员、科研辅助人员等的劳务性费用，以及支付给临时聘请的咨询专家的费用等。填报时，应综合考量劳务费支出对象所承担研究任务的必要性、投入本项目的工作时长、费用标准的合理性等因素。）

专家咨询费：邀请专家对本项目进行指导，拟邀请2次，每次2名（800元/天×2天）×2人×2次=0.64万元。

研究生的助研津贴：支付参加项目的研究生的助研津贴，博士研究生1人，每人工作40个月，1000元/月，共4.00万元。硕士研究生3人，每人工作40个月，500元/月，共6.00万元。合计10.00万元。

劳务费合计 10.64万元。

本项目直接费用合计：50.00万元。

二、其他来源资金

对其他来源资金的经费来源、主要用途、支出预算做简要说明。

无

三、合作研究外拨资金

对合作研究单位承担研究任务及资金外拨情况进行必要说明。如存在多个合作研究单位，请逐一说明。如存在资金外拨的情况，还需对外拨资金的金额进行重点说明。

无



报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。



国家自然科学基金项目负责人、依托单位承诺书

国家自然科学基金项目负责人承诺书

本人郑重承诺：我接受国家自然科学基金的资助，严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》《关于进一步弘扬科学家精神加强作风和学风建设的意见》《关于加强科技伦理治理的意见》《科技伦理审查办法（试行）》等规定，和国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、项目资金管理等各项规章，在《计划书》填写及项目执行过程中：

（一）按照《批准通知》《国家自然科学基金资助项目计划书填报说明》的要求填写《计划书》，未自行降低、更改目标任务或约定要求，或缩减研究（研制）内容；

（二）树立“红线”意识，严格履行科研合同义务，按照《计划书》负责实施本项目（批准号：32473055），切实保证研究工作时间，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，不违规将科研任务转包、分包他人，不以项目实施周期外或不相关成果充抵交差；

（三）遵守科研诚信、科技伦理规范和学术道德，认真开展研究工作，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注，不在非本项目资助的成果或其他无关成果上标注本项目批准号，反对无实质学术贡献者“挂名”，不在成果署名、知识产权归属等方面侵占他人合法权益，并如实报告本人及项目组成员发生的违背科研诚信要求的任何行为；

（四）尊重科研规律，弘扬科学家精神，严谨求实，追求卓越，反对浮夸浮躁、投机取巧，不人为夸大学术或技术价值，不传播未经科学验证的现象和观点；

（五）将项目资金全部用于与本项目研究工作相关的支出，并结合科研活动需要，科学合理安排项目资金支出进度；

（六）做好项目组成员的教育和管理，确保遵守以上相关要求。

如违背上述承诺，本人愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定。

项目负责人（签字）：

年 月 日

依托单位科研管理部门：

负责人（签章）：

年 月 日

依托单位财务管理部门：

负责人（签章）：

年 月 日

国家自然科学基金项目依托单位承诺书

我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》《关于进一步弘扬科学家精神加强作风和学风建设的意见》《关于加强科技伦理治理的意见》《科技伦理审查办法（试行）》等规定，和国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、项目资金管理、科研诚信管理和科技伦理管理等各项规定，并督促实施。

依托单位（公章）

年 月 日



国家自然科学基金资助项目签批审核表

本栏目由自然科学基金委填写

科学处审查意见：

负责人（签章）：
年 月 日

科学部审查意见：

负责人（签章）：
年 月 日

华南农业大学新农村发展研究院

关于华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目立项的通知

各学院,各相关单位:

为充分发挥我校科研人员在科技创新、产业服务与技术示范、智库服务等方面的支撑作用,鼓励广大科研工作者将科研成果转化和先进技术的应用和推广服务于基层,打造我校服务乡村振兴的品牌亮点,学校设立了新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目,该项目认定为 B 类项目。现对 2022 年度我校农业科技合作共建项目立项名单予以公布,详情请参见附件。

附件:华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目立项清单

华南农业大学新农村发展研究院

2023 年 11 月 14 日



附件

华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技 合作共建项目立项清单

序号	项目类别	项目负责人
1	珠海市对虾苗种重要病害防控技术的示范与推广	莫泽权
2	基于渔稻联作模式的养殖尾水处理技术服务	杨慧荣
3	花卉新品种和产业化技术示范推广	张志胜
4	遂溪特色火龙果新品种示范与生产技术集成示范	秦永华
5	湛江鸡健康养殖技术推广与示范	何 唱
6	湛江徐闻辣椒种植技术示范	姜 峰
7	云浮市观叶花木高效栽培和扩繁技术推广与示范	何 茜
8	郁南黄皮提质增效生产技术的示范与推广	张志珂
9	南药资源高值化利用关键技术研究	熊 平
10	清远大豆新品种及相关产业技术示范推广	年 海
11	阳江优质贝类种苗规模化生产与养殖示范	范兰芬
12	墨脱高香茶树品种引种及生态栽培技术示范推广	郑 鹏
13	楼房养猪生物安全防控技术推广与应用	张桂红
14	南雄市香稻增香富硒锌栽培技术示范	唐湘如
15	乐昌香芋病害病绿色防控	张炼辉
16	多源种养废物耦合利用技术集成示范	谭 涛
17	优良蔬菜新品种新技术示范推广	陈国菊
18	封开杏花鸡集中育雏综合技术集成示范	罗庆斌

19	乡村建设技术推广服务	舒 畅
20	清远麻鸡健康养殖技术推广与示范	谢青梅
21	粤北山区稻渔综合种养技术集成示范	章家恩
22	河源龙川食用菌栽培关键技术示范与推广	莫美华
23	连南县茶叶栽培加工技术推广	张凌云
24	连山黑山羊饲料均衡供应技术集成示范	邓 铭
25	梅州柚果生产机械化	李 震
26	梅州食用菌产业提质增效技术集成示范	王 杰
27	荔枝高产高效生产技术集成与推广	苏钻贤
28	高州市水果可食性涂膜保鲜技术开发与应用示范	徐小艳
29	沉香高效结香技术及新产品开发	黄少伟
30	惠来黑山羊饲料资源开发与利用技术应用与示范	孙宝丽
31	新会陈皮初加工及仓储智能装备关键技术	闫国琦
32	惠东蔬菜生产新技术应用与示范	翁群芳
33	惠东茶树优良品种引种及生产加工技术示范推广	刘少群
34	猕猴桃整果加工利用技术集成示范	韦晓群
35	高效设施农业技术示范推广	刘厚诚
36	东源水稻智慧农场关键技术的推广	周志艳
37	河源美林油茶科学化种植基地构建与示范	黄久香
38	东源航天丝苗水稻新品种示范及推广	陈 淳
39	佛山丹灶自然教育项目	高 伟
40	湛江葛根精深加工关键技术及新产品集成示范	杜 冰
41	智慧农业科技示范基地建设	肖德琴
42	南沙渔业创新科技实践及其示范应用	伍亚泰

43	香稻新品种试验示范与推广	程 雄
44	从化特色荔枝品种‘井岗红糯’配套栽培技术的集成与示范	王惠聪
45	从化蛋鸡健康养殖技术推广与示范	张新珩
46	彩色马蹄莲杂交亲和性和二代种球复花技术	范燕萍
47	广州从化乡村体育产业创新与示范	吕 立
48	从化达南楼房养猪生物安全体系的建立及运行	马静云
49	从化水果种植数字化管理技术集成示范	姜 晟
50	自然研学赋能的广州白云区乡村文旅产业创新发展模式示范与推广	汤 辉
51	广西马山县玉米制种技术集成及鲜食玉米新品种示范推广	黄 君
52	马山县桑树病虫害绿色生态防控技术集成与示范	刘吉平
53	智能农机技术推广服务	王红军
54	佛山南海设施蓝莓产业化技术示范与推广	陈日远
55	油茶副产物高值化综合利用	曹 庸
56	农产品设计与媒体推广	石娟娟
57	清远麻鸡禽白血病抗性选育技术推广与示范	陈伟国
58	广东省牛羊健康养殖技术示范推广	郭勇庆
59	生猪健康高效养殖技术示范推广乡村行	徐 铮
60	饲用酶制剂开发与推广	王声斌
61	广东乡村治理蓝皮书《广东乡村治理创新报告（2023）》	唐 斌
62	广东农业产业发展研究报告	谭砚文
63	大变局下推动高质量发展研究团队建设	张日新
64	岭南农耕文明重点实验室建设	倪根金

65	华南农业大学广东省习近平新时代中国特色社会主义思想研究中心基地建设	张丰清
66	华南农业大学中华优秀传统文化（广东音乐）传承研究	郑颜文
67	青年智库人才培养	唐斌
68	构建农业科研项目经理人机制研究	罗明忠
69	社会工作介入乡村治理的基层服务模式研究	韩丽
70	广东现代农业产业园调研报告(2022)	蒋育燕
71	乌克兰危机以来北极八国的北极政策调整及中国的应对策略	杨松霖
72	数字乡村背景下乡村治理困境及对策研究	宋星洲
73	重金属污染场地土壤的修复与管控问题研究	任宗玲
74	国家公园生态补偿何以有效？社区的双重代理角色及其作用机制	苏柳方
75	助力南平村，建设社会主义新农村	马亚男
76	吕田镇塘田村葡萄栽培技术提升	黄旭明
77	三华李高效种植及品牌构建与推广	邓兰生
78	服务井岗红糯，助力乡村振兴	甄文斌
79	基于互联网+网络直播和人工智能的木棉村休闲农业快速发展	彭红星
80	保生产拓市场促中田村荔农增收	齐文娥
81	土壤改良促从化良口镇礞溪青梅优质高产技术	彭桂香
82	蛋鸡重要病原快速检测技术示范推广	张新珩
83	粉葛种植与加工、包装关键技术服务	范小平
84	特色荔枝干果加工关键技术研发及推广	赵雷
85	河源现代农业综合试验站总体规划	卢丹梅
86	华南农业大学研究团队奋“豆”系列纪实	唐涤非

87	一带一路成果示范推广（大豆产业化）	程艳波
88	一带一路成果示范推广（生物农药产业化）	钟国华
89	一带一路成果示范推广（水稻产业化）	蔡昆争

受理编号: c1831650100026

项目编号: 2018A070701012

文件编号: 粤科规财字〔2018〕252号(科普)

广东省省级科技计划项目

合同书

项目名称: 种猪体细胞克隆技术研发与应用成果科普化

专项资金类别: 协同创新与平台环境建设

计划类别: 科技创新普及领域

项目起止时间: 2018-12-01 至 2019-11-30

管理单位(甲方): 广东省科学技术厅

承担单位(乙方): 华南农业大学

乙方主管部门(丙方): 华南农业大学

通讯地址: 广东省广州市天河区五山路483号

邮政编码: 510642

单位电话: 020-38632819

项目负责人: 徐铮

联系电话: 020-85281060

项目联系人: 徐铮

联系电话: 13602496031

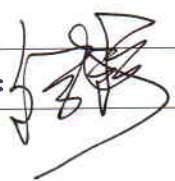


(广东科技微信公众号)

广东省科学技术厅
二〇一七年制



(受理纸质材料二维码)

	获国家级奖项(项)	
	获省级奖项(项)	
	其他	
2. 其他成果及形式说明:		
<p>1. 制作本科技成果科普微视频, 每段视频不少于5分钟, 利用网络、微信等新媒体平台对公众发布。</p> <p>2. 制作本科技成果展板, 进行科技成果系列展示活动, 或在大型科技场馆中展示。</p> <p>3. 组织召开1场以上科普宣传会。</p>		
3. 主要技术经济指标及社会效益		
累计新增销售收入(万元)		
累计新增利税(万元)		
4. 其他主要技术经济指标及社会效益说明:		
<p>随着人们生活水平的提高, 消费对象的日趋多元化, 国内外对畜产品特别是高档肉、蛋、奶制品的需求量将不断增大, 其市场前景十分广阔。本科普项目的实施, 从产业链高端入手, 提高了公众对本科技成果的理解, 并为公众对本科技活动的支持奠定了群众基础, 本项目的成果保障了高档、优质、特色产品的供给, 为我国现代种业发展带来的经济效益极其巨大。同时, 本项目成果的加大研发, 可有效遏制基因资源的流失和保护知识产权, 其间接带来的经济效益更是不可估量。</p> <p>认真贯彻党的十九大会议提出的“乡村振兴战略”和十八届五中全会提出的“创新、协调、绿色、开放、共享”五大发展理念, 全面落实建设广东特色科技现代化普及的决策部署, 以持续推进现代科技普及体系建设为主要抓手, 实施现代科普提升工程, 结合本项目和成果的特点, 以克隆转基因科技创新为核心、种质资源保护和利用为立足点、公共服务健全为保障, 促进重大科技成果普及化, 提升公众对科学技术的发展促进生产力提高和社会进步认知程度, 加快提高公众对克隆和转基因知识与产品的正确认知能力和水平。</p>		
项目负责人(签章):  2018年12月27日		

四、承担、参与单位工作分工及经费分配情况





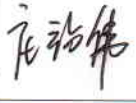
承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	省科技厅经费分配 (万元)
华南农业大学	主持和全面实施	10.00	10.00
	合计	10.00	10.00

六、人员信息

项目负责人情况

姓名	年龄	性别	职称	职务	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
徐铮	39	男	兽医师	科长	硕士研究生	全面负责与协调	华南农业大学	
马晓莉	37	女	实验师	无	硕士研究生	项目管理与资料整理分析	华南农业大学	
李雷鸣	36	男	讲师	教研室主任	硕士研究生	视频与展板设计、监制与指导	华南农业大学	

主要研究开发人员

姓名	年龄	性别	职称	职务	学历	在项目中承担的任务	所在单位	签名
李紫聪	39	男	教授	无	博士研究生	技术指导与现场	华南农业大学	
蔡更元	48	男	研究员	副主任	博士研究生	技术指导与现场	华南农业大学	
杨化强	37	男	副研究员	无	博士研究生	技术指导与现场	华南农业大学	
杨杰	31	男	副教授	无	博士研究生	技术指导与现场	华南农业大学	
洪林君	32	男	副教授	无	博士研究生	技术指导与现场	华南农业大学	
郑恩琴	37	女	实验师	无	硕士研究生	项目管理与财务	华南农业大学	
吴霄	24	男	未取得	无	硕士研究生	技术指导与现场、数据整理与制作	华南农业大学	
庄站伟	25	男	未取得	无	本科	技术指导与现场、数据整理与制作	华南农业大学	

九、本合同签约各方

管理单位（甲方）： 广东省科学技术厅 （盖章）

单位地址： 连新路171号

法定代表人（或授权代表）： 王瑞军



立项责任人： 夏兴林 （签章）

2019-03-21
年 月 日

承担单位（乙方）： 华南农业大学 （盖章）

二级部门：

单位地址： 五山路483号

法定代表人（或法人代理）： 陈晓阳

联系人（项目主管）姓名： 郑鹏

Email: kjcgxk@scau.edu.cn

电话： 020-85283435 / 13560344902

开户单位名称： 华南农业大学

开户银行及帐号： 广东广州工行五山支行 3602002609000310520

乙方主管部门（丙方）： 华南农业大学 （盖章）

单位地址： 五山路483号

法定代表人（或法人代理）： 陈晓阳



1XK20/20 2022P4

合同编号：

技术服务合同

项目名称：盛泰生猪健康养殖技术服务

委托方：河源盛泰种养有限公司

(甲方)

受托方：华南农业大学

(乙方)

签订时间：2024年9月18日

签订地点：河源市紫金县

有效期限：壹年

中华人民共和国科学技术部印制

技术服务合同

委托方（甲方）：河源盛泰种养有限公司

住 所 地：紫金县紫城镇金山大道中 1 号紫金花园六幢 3 号

法定代表人：贺远清

项目联系人：李达开

联系方式：18163266888

通讯地址：紫金县紫城镇金山大道中 1 号紫金花园六幢 3 号

电 话：0762-8202222 传真：0762-8202222

电子信箱：46746979@qq.com

受托方（乙方）：华南农业大学

住 所 地：广州市天河区五山路 483 号

法定代表人：薛红卫

项目联系人：徐铮

联系方式：13602496031

通讯地址：广州市天河区五山路 483 号华南农业大学动科学院

电 话：02085281060 传真：02085281060

电子信箱：stonezen@scau.edu.cn

本合同甲方委托乙方就盛泰生猪健康养殖技术服务

项目进行的专项技术服务，并支付相应的技术服务报酬。双方经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共和国民法典》的规定，达成如下协议，并由双方共同恪守。

第一条：甲方委托乙方进行技术服务的内容如下：

1. 技术服务的目标：协助甲方落实该猪场引种、疫病监测、疫病防控、疫病应急处置、饲养管理及人员操作规程等技术和
管理措施，为猪场系统规范化管理提供技术支持。

2. 技术服务的内容：(1) 协助健全猪场生物安全体系；(2) 指导甲方建立猪群主要疫病检测实验室；(3) 提供猪群主要疫病实验室诊断分析服务；(4) 提供猪场种猪饲养管理、疾病防控、饲料营养测定、环保管理等技术咨询和培训；(5) 提供疫病流行情况及预警信息。

3. 技术服务的方式：(1) 现场指导；(2) 远程指导；(3) 技术咨询；(4) 技术培训；(5) 派专人协助。

第二条：乙方应按下列要求完成技术服务工作：

1. 技术服务地点：广东省河源市紫金县水墩镇群丰村大水坑。

2. 技术服务期限：壹年

3. 技术服务进度：根据实际需求情况常年开展技术服务。

4. 技术服务质量要求：(1) 注重最新的实用技术与猪场实际相结合，具备先进性、实用性和可操作性；(2) 乙方委派属下的国家生猪种业工程技术研究中心相关专家和技术人员负责项目具体实施。

5. 技术服务质量期限要求：技术服务质量期限要求仅限于本技术服务合同期限内。

第三条：为保证乙方有效进行技术服务工作，甲方应当向乙方提

供下列工作条件和协作事项：

1. 提供技术资料：

- (1) 猪场所在地地形图和卫星图
- (2) 现有猪场规划设计平面图、猪舍面积、设备清单
- (3) 现有猪场猪舍、设备、设施等现场图片
- (4) 现有猪场技术资料和生产数据

2. 提供工作条件：

(1) 为乙方专家和技术人员在需要时提供办公室、电脑等必要办公条件；

(2) 为乙方专家和技术人员在需要时配备助手或联络人员。

3. 其他：无。

4. 甲方提供上述工作条件和协作事项的时间及方式：以不影响工作为前提，及时提供上述工作条件和协作事项。

第四条：甲方向乙方支付技术服务报酬及支付方式为：

1. 技术服务费为：4万元（肆万元）；

2. 技术服务费由甲方一次支付乙方。

具体支付方式和时间如下：

(1) 技术服务费4万元在本合同签订后一周内支付给乙方，本合同到期前1个月甲乙双方协商下一个服务周期合同的相关事宜；

(2) 技术服务费以电子转账的形式汇到乙方指定账户，并注明“生猪养殖技术服务”字样，同时告知项目联系人。

乙方开户银行名称、地址和账号为：

决。协商、调解不成的，确定按以下第1种方式处理：

1. 提交甲方所在地仲裁委员会仲裁；
2. 依法向甲方所在地人民法院起诉。

第十三条：双方确定：本合同及相关附件中所涉及的有关名词和技术术语，其定义和解释如下：

1. /

第十四条：与履行本合同有关的下列技术文件，经双方确认后， / 为本合同的组成部分：

1. 技术背景资料： ；
2. 可行性论证报告： ；
3. 技术评价报告： ；
4. 技术标准和规范： ；
5. 原始设计和工艺文件： ；
6. 其他： ；

第十五条：双方约定本合同其他相关事项为： / 。

第十六条：本合同一式陆份，具有同等法律效力。

第十七条：本合同经双方签字盖章后生效。

甲方： 河源盛泰种养有限公司 （盖章）

法定代表人 / 委托代理人： [Signature] （签名）

 年 月 日

乙方： 华南农业大学 （盖章）

法定代表人 / 委托代理人： [Signature] （签名）

 年 月 日

合同编号：

技术服务合同

项目名称： 诺尔路猪病诊治技术服务

委托方： 广州诺尔路生物科技有限公司
(甲方)

受托方： 华南农业大学
(乙方)

签订时间： 2021年7月17日

签订地点： 广州市

有效期限： 壹年

中华人民共和国科学技术部印制

技术服务合同

委托方（甲方）： 广州诺尔路生物科技有限公司

住 所 地： 广州市黄埔区瑞发路1号自编（1）栋四层007房

法定代表人： 向美华

项目联系人： 向美华

联系方式： 13660836112

通讯地址： 广州市黄埔区瑞发路1号自编（1）栋四层007房

电 话： 13660836112 传真：

电子信箱：

受托方（乙方）： 华南农业大学

住 所 地： 广州市天河区五山路483号

法定代表人： 刘雅红

项目联系人： 徐铮

联系方式： 13602496031

通讯地址： 广州市天河区五山路483号华南农业大学

动物科学学院新楼六楼

电 话： 020-85281060 传真： 020-85281060

电子信箱： stonezen@scau.edu.cn

本合同甲方委托乙方就 生猪疾病诊治技术研发与管理
项目进行的专项技术服务，并支付相应的技术服务报酬。双方经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共

和国合同法》的规定，达成如下协议，并由双方共同恪守。

第一条：甲方委托乙方进行技术服务的内容如下：

1. 技术服务的目标：(1) 甲方的生猪疾病诊治技术研发工作按计划推进；(2) 甲方对外培训工作顺利开展。

2. 技术服务的内容：(1) 协助甲方按照科研工作计划推进生猪疾病诊治技术研发；(2) 协助甲方开展对外技术培训工作。

3. 技术服务的方式：(1) 现场指导；(2) 远程指导；(3) 技术咨询；(4) 技术培训；(5) 派专人协助。

第二条：乙方应按下列要求完成技术服务工作：

1. 技术服务地点：广州诺尔路生物科技有限公司

2. 技术服务期限：壹年，即从 2021 年 7 月 1 日起至 2022 年 6 月 30 日止。

3. 技术服务进度：根据实际需求情况常年开展技术服务。

4. 技术服务质量要求：(1) 注重最新的实用诊断试剂盒和疫苗技术与实际相结合，具备先进性、实用性和可操作性；(2) 乙方委派属下的国家生猪种业工程技术研究中心相关专家和技术人员负责项目具体实施。

5. 技术服务质量期限要求：技术服务质量期限要求仅限于本技术服务合同期限内。

第三条：为保证乙方有效进行技术服务工作，甲方应当向乙方提供下列工作条件和协作事项：

1. 提供技术资料：

(1) 公司生猪疾病诊治研发、人员培训、项目等方面日常管理与运行基本情况。

2. 提供工作条件:

(1) 为乙方专家和技术人员在需要时提供办公室、电脑等必要办公条件;

(2) 为乙方专家和技术人员在需要时配备助手或联络人。

3. 其他: /。

4. 甲方提供上述工作条件和协作事项的时间及方式: 以不影响工作为前提, 及时提供上述工作条件和协作事项。

第四条: 甲方向乙方支付技术服务报酬及支付方式为:

1. 技术服务费为: 人民币 1 万元 (壹万元整);

2. 技术服务费由甲方 一次 (一次或分期) 支付乙方。

具体支付方式和时间如下:

(1) 技术服务费 1 万元在本合同签订后一周内支付给乙方;

(2) 技术服务费以电子转账的形式汇到乙方指定账户, 并注明“猪病诊治技术服务”字样, 同时将转账截图发给项目联系人;

乙方开户银行名称、地址和帐号为:

开户银行: 中国工商银行广州五山支行

地址: 广州市天河区五山路 483 号

帐号: 3602002609000310520

第五条: 双方确定因履行本合同应遵守的保密义务如下:

甲方:

_____为本合同的组成部分：

- 1. 技术背景资料：_____；
- 2. 可行性论证报告：_____；
- 3. 技术评价报告：_____；
- 4. 技术标准和规范：_____；
- 5. 原始设计和工艺文件：_____；
- 6. 其他：_____；

第十五条： 双方约定本合同其他相关事项为： / 。

第十六条： 本合同一式 陆 份，具有同等法律效力。

第十七条： 本合同经双方签字盖章后生效。

甲方： 广州诺尔路生物科技有限公司 (盖章)

法定代表人 / 委托代理人： 白学军 (签名)

2021年 7月 17日

乙方： 华南农业大学 (盖章)

法定代表人 / 委托代理人： 刘雅红 (签名)

科技合同专用章
(1) 2021年 7月 17日

印花税票粘贴处：

(以下由技术合同登记机构填写)

合同登记编号：

合同编号：

技术服务合同

项目名称：广州深华生猪疾病防治技术服务

委托方：广州市深华生物技术有限公司

(甲方)

受托方：华南农业大学

(乙方)

签订时间：2021年5月18日

签订地点：广州市

有效期限：壹年

中华人民共和国科学技术部印制

技术服务合同

委托方（甲方）：广州市深华生物技术有限公司

住 所 地：广州市越秀区先烈中路 76 号 15 楼 B、C 单元

法定代表人：张清杰

项目联系人：张学政

联系方式：18688876112

通讯地址：广州市越秀区先烈中路 76 号 15 楼 B、C 单元

电 话：020-37611206 传真：

电子信箱：

受托方（乙方）：华南农业大学

住 所 地：广州市天河区五山路 483 号

法定代表人：刘雅红

项目联系人：徐铮

联系方式：13602496031

通讯地址：广州市天河区五山路 483 号华南农业大学

动物科学学院新楼六楼

电 话：020-85281060 传真：020-85281060

电子信箱：stonezen@scau.edu.cn

本合同甲方委托乙方就生猪疾病防治技术研发与管理项目进行的专项技术服务，并支付相应的技术服务报酬。双方经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共

技术服务合同期限内。

第三条：为保证乙方有效进行技术服务工作，甲方应当向乙方提供下列工作条件和协作事项：

1. 提供技术资料：

(1) 公司生猪疾病防治研发、人员培训、项目等方面日常管理与运行基本情况。

2. 提供工作条件：

(1) 为乙方专家和技术人员在需要时提供办公室、电脑等必要办公条件；

(2) 为乙方专家和技术人员在需要时配备助手或联络人。

3. 其他： / 。

4. 甲方提供上述工作条件和协作事项的时间及方式：以不影响工作为前提，及时提供上述工作条件和协作事项。

第四条：甲方向乙方支付技术服务报酬及支付方式为：

1. 技术服务费为：人民币 17 万元（壹拾柒万元整）；

2. 技术服务费由甲方一次（一次或分期）支付乙方。

具体支付方式和时间如下：

(1) 技术服务费 17 万元在本合同签订后一周内支付给乙方；

(2) 技术服务费以电子转账的形式汇到乙方指定账户，并注明“生猪疾病防治技术服务”字样，同时将转账截图发给项目联系人；

乙方开户银行名称、地址和帐号为：

开户银行：中国工商银行广州五山支行

决。协商、调解不成的，确定按以下第1种方式处理：

1. 提交甲方所在地仲裁委员会仲裁；
2. 依法向人民法院起诉。

第十三条：双方确定：本合同及相关附件中所涉及的有关名词和技术术语，其定义和解释如下：

1. /

第十四条：与履行本合同有关的下列技术文件，经双方确认后，/为本合同的组成部分：

1. 技术背景资料： ；2. 可行性论证报告： ；
3. 技术评价报告： ；4. 技术标准和规范： ；5. 原始设计和工艺文件： ；6. 其他： ；

第十五条：双方约定本合同其他相关事项为：/。

第十六条：本合同一式陆份，具有同等法律效力。

第十七条：本合同经双方签字盖章后生效。

甲方：广州市深华生物技术有限公司 (盖章)

法定代表人/委托代理人： (签名)

2021年5月19日

乙方：华南农业大学 (盖章)

法定代表人/委托代理人： (签名)

2021年5月18日

检索证明

根据委托人提供的论文材料，委托人华南农业大学实验动物中心 马晓莉(学科类型:自然科学) 8 篇论文收录情况如下表。

序号	论文名称	发表刊物及发表的年月卷期/页码等	作者排名	论文等级	作者文中单位	收录情况	影响因子	中科院大分区
1	非洲猪瘟病毒 p72 蛋白抗体全自动化学发光酶免疫检测方法的建立	畜牧兽医学报 出版年: 2025 出版日期: 2025-01-15 18:55 卷期: 56 03 页码: - 文献号: 文献类型: 期刊论文	第一	A 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无
2	猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究	黑龙江畜牧兽医 出版年: 2020 出版日期: 2020-06-10 卷期: 11 页码: - 文献号: 文献类型: 期刊论文	第一	C 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无
3	猪源 CD163 受体蛋白多克隆抗体的制备及其 PRRSV 阻断效力研究	畜牧与兽医 出版年: 2019 出版日期: 2019-10-10 卷期: 51 10 页码: - 文献号:	第一	C 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无

	文献类型：期刊论文								
4	猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究	黑龙江畜牧兽医 出版年：2019 出版日期：2019-10-10 卷期：19 页码：- 文献号： 文献类型：期刊论文	第一	C 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无	
5	猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在 Vero 细胞中真核表达的研究	黑龙江畜牧兽医 出版年：2018 出版日期：2018-06-10 卷期：11 页码：- 文献号： 文献类型：期刊论文	第一	C 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无	
6	狂犬病认知现状调查分析与防控对策	畜牧兽医科技信息 出版年：2019 出版日期：2019-09-25 卷期：09 页码：- 文献号： 文献类型：期刊论文	第一	普刊 类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	CNKI	无	无	

7	2023—2024 年我国部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查	中国兽医杂志 出版年: 2025 出版日期: 2025-09-08 卷期: 61 09 页码: - 文献号: 文献类型: 期刊论文	共同通讯作者 (倒数第一)	C类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	北大核心	无	无
8	动物体细胞克隆与转基因技术科普需求及认知度调研分析	现代农业科技 出版年: 2019 出版日期: 2019-08-19 卷期: 16 页码: 16:24 文献号: 文献类型: 期刊论文	通讯作者	普刊类	华南农业大学 测试中心实验 动物中心	CNKI	无	无

说明: 论文来源和期刊来源按《中国农业大学学位论文价格方案(试行)》划分。

报告免责声明: 如未盖章, 报告无效



中国科技核心期刊

《中文核心期刊要目总览》核心期刊

中国科学引文数据库来源期刊

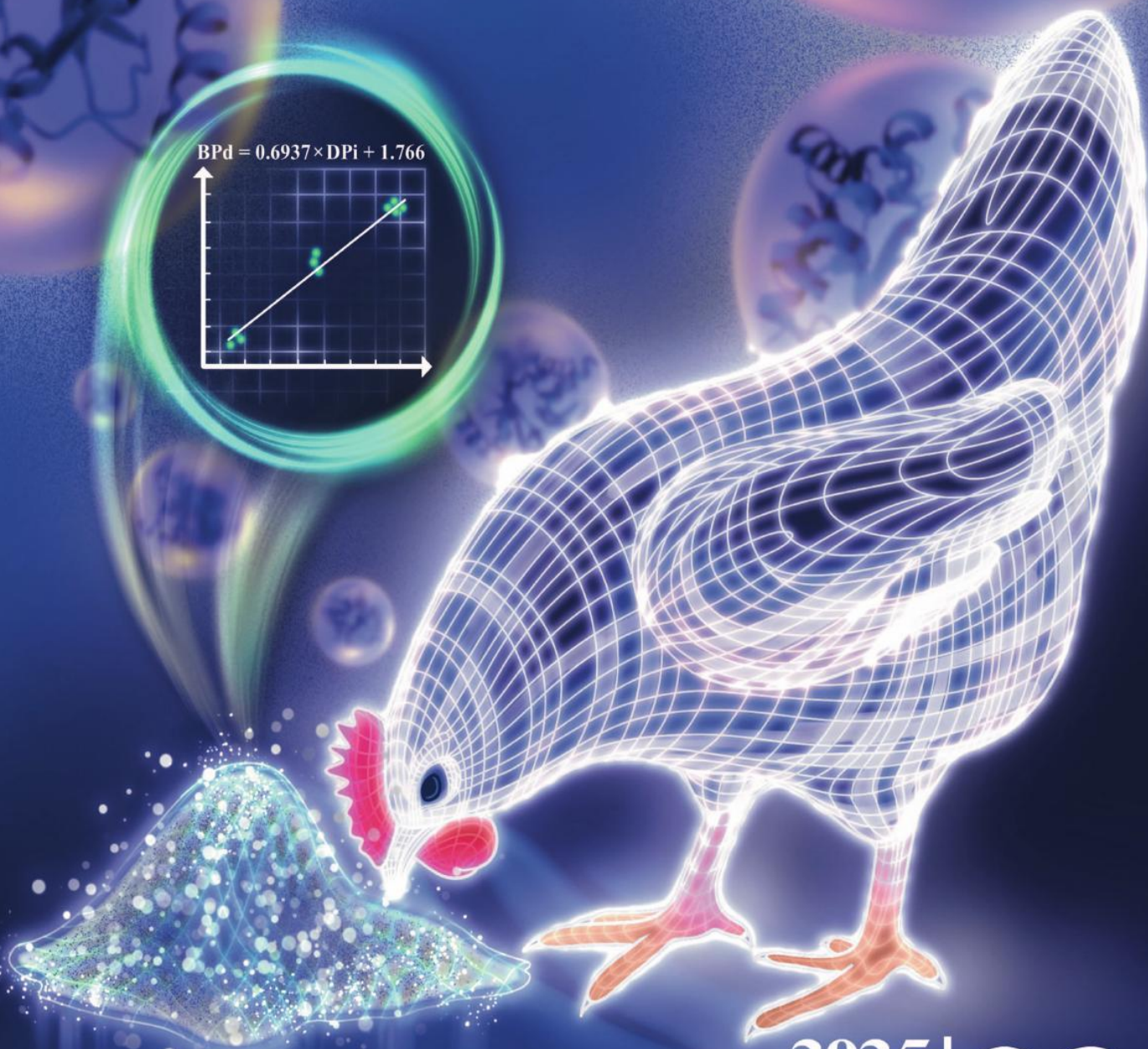
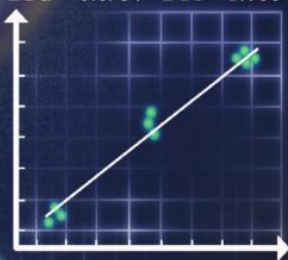
ISSN 0366-6964

CN 11-1985/S

畜牧兽医学报

ACTA VETERINARIA ET ZOOTECHNICA SINICA

$$BPd = 0.6937 \times DPi + 1.766$$



中国畜牧兽医学会 主办

2025 | 03
Vol.56

畜牧兽医学报

第五十六卷

第三期

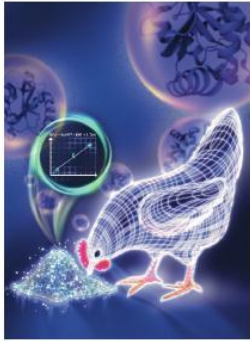
二〇二五年

中国畜牧兽医学会

畜牧兽医学报

XUMU SHOUYI XUEBAO

第56卷 第3期 2025年3月



广明2号是我国自主培育的白羽肉鸡新品种,针对其营养需要的研究相对较少,影响品种的推广和应用。蛋白质对于肉鸡的生长至关重要,供给不足会影响肉鸡的生长和健康,供应过量会增加饲料成本且环境污染,因此准确测定蛋白质需要量对于肉鸡养殖至关重要。在本文中,赵少猛等(1313-1323)通过建立体重与体蛋白重的线性回归方程,计算出广明2号肉鸡饲料蛋白质的生长需要量;结合课题组前期测定的维持需要量,建立了广明2号肉鸡饲料蛋白质需要量的预测模型并进行了验证。

目次

综 述

- Hedgehog 信号通路在动物卵巢卵泡发育和类固醇生成中的调控作用
 灭列·马达尼牙提,孙 萌,褚瑰燕(969)
- 功能性寡糖缓解犊牛腹泻的机理研究进展
 张燕敏,刘 帅,滕战伟,谢红兵,夏小静,贺永惠,常美楠(979)
- β -防御素的生物学特性及其在调控动物肠道屏障中的研究进展
 王 卓,赵雨薇,屠 焰,刁其玉,崔 凯(995)
- 胆汁酸调控动物肠道健康的作用及机制研究进展
 王馨怡,姚军虎,张 霞,张 俊(1006)
- 肠道共生生物对肠道干细胞的调节机制研究进展..... 丁莹莹,
 张嘉芸,唐龙轩,张少华,郭小腊,蒲丽霞,牟文杰,王 帅(1019)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒生命周期的研究进展
 刘爱军,张传亮,黄晓兵,周彩琴(1027)
- 猪流行性腹泻疫苗研究进展
 鄂沛伶,李依璇,王浩杰,李亚菲,刘绍蒙,刘青芸,王湘如(1042)
- 隐孢子虫基因组学研究进展..... 陈远才,黄建营,秦慧凯,张龙现(1059)
- 水杨酰苯胺类及咪唑并噻唑类抗寄生虫药物的理化性质及其应用研究进展
 代国年,李 冰,周雅馨,李 江,徐 晶,
 周绪正,彭晓婷,张继瑜(1065)
- 组学技术在奶牛乳腺炎发病机制和诊断上应用研究进展
 范曼婷,黄若婷,余远航,郭建超,刘建营,郭勇庆(1076)
- 细胞焦亡及其在角膜炎症疾病中的作用机制研究进展
 王志浩,郭 龙,王培莉,李建基,王 亨(1089)

遗传育种

- 大规模群体解析猪日增重及达百千克体重日龄的潜在因果基因
 ... 黄雅妮,唐 熹,李井泉,魏嘉诚,吴珍芳,李新云,肖石军,张志燕(1100)
- 豫农黑猪生长相关性状的拷贝数变异全基因组关联分析研究
 吴嘉浩,吴姿仪,窦腾飞,白利瑶,张永前,
 董联合,李鹏飞,李新建,韩雪蕾,李秀领(1110)
- miR-375-3p 靶向 *Fam229a* 调控猪前体脂肪细胞分化
 杨宇婷,陈国梁,常巧宁,鲍 武,刘靖超,姬梦婷,
 荣晓音,郭晓红,杨 阳,李步高(1120)
- 基于转录组测序技术鉴别影响莱芜猪滴水损失的关键基因
 贾万里,王继英,李菁璇,王彦平,耿立英,张传生,赵雪艳(1134)
- 猪 *CYP3A29* 基因核心启动子鉴定及转录调控分析
 王 红,赵为民,程金花,李惠侠,方晓敏(1147)
- 胚蛋给养核黄素对鸡骨骼肌发育的影响..... 李远方,
 张鸿源,李鸿泰,李 智,魏千然,王亚东,李国喜,王丹丹,刘翹铭(1159)
- 基于简化基因组测序评估小骨山羊群体遗传多样性和群体结构
 王浩宇,马克岩,李讨论,栗登攀,赵 箐,马友记(1170)
- 荷斯坦牛日反刍时间和产奶量的影响因素分析及遗传参数估计
 王子晨,张 娜,张琬婷,朱 浩,卢徐斌,田 雨,葛继文,
 王永宽,陈玉海,王雅春,杨章平,毛永江(1180)
- 基于全基因组重测序分析西门塔尔牛遗传多样性与群体结构
 胡 鑫,游 伟,姜富贵,成海建,孙志刚,宋恩亮(1189)
- 雷琼牛和陆丰牛半腱肌的 lncRNA 表达特征及其在骨骼肌发育和脂肪沉积
 中的 ceRNA 网络分析 陈 琼,毛帅翔,吴龙飞,杨 闯,孙宝丽(1203)

塔里木马鹿抗氧化基因 *PRDX1* 的功能初探
..... 布威海丽且姆·阿巴拜科日,艾合麦提尼亚孜·艾合麦提江,
乃比江·麦图荪,单文娟(1216)

生物技术与繁殖

母猪死胎和木乃伊全基因组关联分析
..... 周泰增,杨祎挺,朱悦华,钱洪喜,刘一辉,甘麦邻,朱 砾,沈林园(1231)
FST 对猪卵巢颗粒细胞增殖凋亡及激素分泌的影响
..... 刘晨龙,季华员,卢 丹,万明春,胡 耀,周泉勇(1242)
洛岛红鸡卵黄囊源性间充质干细胞的分离培养及其分化潜能研究
..... 闫 炎,刘晏辰,王仲发,李旻娟,何玉楠,关伟军,姜运良(1252)
绵羊季节性发情性状核心基因和关键 lncRNA 的筛选与分析
..... 杨 杨,李良远,万鹏程,卢守亮,刘长彬,杨 华,王立民,代 蓉,周 平(1264)

营养与饲料

丁酸钠对幼鼠回肠发育、炎症因子及物理屏障功能的调控作用
..... 张 萱,杨 雪,李新科,郑 楠,孟 璐(1278)
单宁酸对免疫应激断奶仔猪肌肉形态、风味氨基酸及肌纤维相关基因表达的影响
..... 周文涛,王晨昱,周 辉,刘洪彪,冯舒媛,范高升,李铁军,何流琴(1290)
饲料 NFC/NDF 比例对奶牛瘤胃中微生物尿素氮代谢流的影响
..... 张仕琦,郑 楠,王加启,赵圣国(1302)
广明 2 号肉鸡蛋白质需要量预测模型的研究及验证 赵少猛,董瑞玲,刘大伟,
营 凡,李 森,赵桂苹,张敏红,文 杰,冯京海(1313)

预防兽医

牛呼吸道疾病综合征主要病毒的流行病学调查
..... 赵婉玥,徐肖文,常舒舒,项志杰,郭爱珍,陈颖钰(1324)
HE 基因受体结合域变异对冠状病毒感染的影响
..... 姜慧华,赵 龙,郭抗抗(1336)
非洲猪瘟病毒 H108R 蛋白的制备及其免疫原性评价
..... 张 越,茹 毅,郝荣增,杨 锐,赵陇和,
李亚军,杨 洋,张 荣,蒋成辉,郑海学(1344)
非洲猪瘟病毒 p72 蛋白抗体全自动化学发光酶免疫检测方法的建立 马晓莉,
李 段,曾道平,刘燕玲,王晓敏,彭国良,宋长绪,王 磊,徐 铮(1355)
LncRNA 18850 对猪流行性腹泻病毒复制的影响
..... 余昕雅,何海健,王 磊,倪语晨,杜 静,周莹珊,董婉玉,王晓杜(1366)
近年湖南省猪圆环病毒 2 型感染状况的调查及遗传演化分析 范 杰,
邵易润,朱艳丽,陈志雄,胡巧云,陈 智,刘甜甜,李 欣,范仲鑫,葛 猛(1376)
禽流感病毒与新城疫病毒多靶标核酸质谱检测方法研究及应用
..... 高志强,赖平安,宋悦谦,种 焱,郭悠然,白子龙,郭惠民,
汪 琳,蒲 静,史喜菊,任 彤,赵相鹏(1386)
基于荧光定量 PCR 检测和原位杂交技术分析湖北省蛋鸡滑液支原体的感染情况
..... 王 纯,王 晴,吴晓倩,胡 婷,崔卫涛,裴 洁,
宋铁平,胡思顺,张万坡,李自力,周祖涛(1396)
贾第虫对长爪沙鼠的致病性分析 张营营,郭佳业,许会艳,毋亚运,吴龙飞,
孙嵩英,赵文超,张龙现,张素梅,李俊强(1408)
鸡毒害艾美耳球虫 ROP30 蛋白的原核表达及其对鸡免疫保护效果的观察
..... 李慧中,张 弛,严丹丽,宋鹏慧,汪飞燕,冯茜茜,
刘丹丹,许金俊,陶建平(1419)

基础兽医

表达牛乳铁蛋白肽的罗伊氏乳杆菌分泌型信号肽的筛选及鉴定
..... 赵文悦,杨 景,邵怡岚,李佳璇,姜艳平,崔 文,王晓娜,唐丽杰(1431)

临床兽医

基于转录组学探究日粮添加酵母 β -葡聚糖对新城疫疫苗免疫鸡肠道免疫的影响
..... 李常营,李 俊,李锡锋,毕师诚,曹立亭(1441)
紫花前胡苷对犬特异性皮炎的疗效分析 王子姣,刘春晓,李光玉(1453)

研究简报

一种羊种布鲁氏菌复方新诺明耐药株荧光定量 PCR 检测方法的建立
..... 杨晓雯,宁文晴,周师众,袁雅琴,侯雪新,丁家波(1465)



非洲猪瘟病毒 p72 蛋白抗体全自动化学发光酶免疫检测方法的建立

马晓莉¹, 李 段^{1,3}, 曾道平³, 刘燕玲¹, 王晓敏¹, 彭国良², 宋长绪¹, 王 磊^{1,2*}, 徐 铮^{1*}

(1. 华南农业大学实验动物中心/动物科学学院/猪禽种业全国重点实验室/国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642; 2. 韶关学院英东生物与农业学院, 韶关 512005; 3. 温氏食品集团股份有限公司/广东标允生物科技有限公司, 云浮 527400)

摘要: 抗体检测对于非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染诊断和疫苗研究至关重要,因此建立一种基于 ASFV p72 蛋白抗体的全自动化学发光酶免疫分析方法(chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)具有重要意义。本研究以重组 p72 蛋白偶联的磁微粒(magnetic particles, MPs)捕获 p72 蛋白抗体,再结合碱性磷酸酶(alkaline phosphates, AP)标记的 p72 蛋白,借助全自动化学发光分析仪,分析猪血清中 p72 蛋白特异性抗体水平。经反应条件优化,建立了一种 ASFV p72 蛋白抗体全自动化学发光酶免疫检测方法。结果显示,建立的 CLEIA 阴性、阳性临界值为 $9.505 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 诊断特异性和灵敏性分别为 98.33% 和 100%, 与其他猪病原阳性血清无交叉反应,批内和批间变异系数分别小于 5% 和 10%,各种试剂组分可以保存 6 个月以上,对 ASFV 阳性标准血清,分析敏感性为 1:12 800,与国产商品化试剂盒的总符合率达 95.90%。综上,本研究建立的化学发光方法具有高灵敏性和可重复性,有自动化检测、操作步骤简单的优势,可为 ASFV 的检测提供新的技术支持。

关键词: 非洲猪瘟病毒;p72;化学发光酶免疫;抗体检测

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2025)03-1355-11

Establishment of a Fully Automated Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Detecting Antibodies against African Swine Fever Virus p72

MA Xiaoli¹, LI Duan^{1,3}, ZENG Daoping³, LIU Yanling¹, WANG Xiaomin¹, PENG Guoliang², SONG Changxu¹, WANG Lei^{1,2*}, XU Zheng^{1*}

(1. Laboratory Animal Center and College of Animal Science, National Engineering Center for Swine Breeding Industry, State Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; 3. Wens Foodstuff Group Co., Ltd, Guangdong Biaoyun Biotechnology Co., Ltd, Yunfu 527400, China)

Abstract: Antibody detection is important for African swine fever virus (ASFV) infection diagnosis and vaccine research. Therefore, it is of great significance to establish a fully automatic chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA) based on ASFV p72 protein antibody. For the

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD2001205); 广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515010234)

作者简介: 马晓莉(1981-), 女, 广东深圳人, 实验师, 硕士, 主要从事预防兽医及实验动物模型研究, E-mail: maxl@scau.edu.cn; 李 段(1987-), 女, 河南上蔡人, 兽医师, 硕士, 主要从事动物疫病诊断技术研究, E-mail: 517341252@qq.com。马晓莉和李段为同等贡献作者

* 通信作者: 徐 铮, 主要从事猪病防控技术研究, E-mail: stonezen@scau.edu.cn; 王 磊, 主要从事动物疫病诊断技术研究, E-mail: 9286980098@qq.com

detection, antibodies against p72 were captured by magnetic particles (MPs) coupled with purified p72 protein, then combined with alkaline phosphates (AP)-labelled p72, and ASFV p72 antibodies can be determined using a fully automated chemiluminescence analyzer. Under optimal working conditions, the cut-off value of the established CLEIA was $9.505 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ with a diagnostic specificity and sensitivity of 98.33% and 100%, respectively, and no cross-reactivity with other porcine pathogen-positive sera were found. The intra- and inter-batch coefficients of variation were less than 5% and 10%, respectively, and all components can be stored for more than 6 months at 4 °C. The lowest detection limit for ASFV-positive standard serum was 1:12 800. The total coincidence rate with the commercial kit was up to 95.90%, indicating a good applicability. In conclusion, the established CLIEA has the advantages of high sensitivity and reproducibility, combining with automated detection and simple operation steps, which can provide an important tool for the clinical diagnosis of ASF.

Keywords: African swine fever virus; p72; chemiluminescent enzyme immunoassay; antibody detection

* **Corresponding authors:** XU Zheng, E-mail: stonezen@scau.edu.cn; WANG Lei, E-mail: 9286980098@qq.com

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种致死率高的急性、高度接触烈性传染病^[1],被世界动物卫生组织(WOAH)列为法定报告疾病。1921年,ASF在肯尼亚被确认并在整个撒哈拉以南非洲地区传播^[2]。2018年8月,ASF首次在中国暴发并迅速席卷全国和持续流行,给养猪业造成巨大的经济损失,已成为我国养猪业最重要的传染病^[3]。目前尚未研发出安全有效的疫苗和药物来防控ASF,只能通过高效精准的诊断方法早发现早处理来控制疫情的扩散。由于天然弱毒毒株存在,核酸检测已不能完全满足检测需求。此外,自ASF暴发以后,养猪企业、第三方检测机构等相继建成了不同规模的疫病诊断实验室,随着ASFV抗体检测量的不断增大,人力成本不断升高,对于高通量的,自动化检测的需求逐渐显现。因此,建立一种自动化程度高,灵敏性高且稳定的ASFV抗体检测方法非常必要。

化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是将化学发光或生物发光体系与免疫反应相结合,用于检测微量抗原或抗体的一种新型标记免疫测定技术。根据反应原理,分为直接化学发光(CLIA)、间接化学发光(也称化学发光酶免疫分析 chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)和电化学发光(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)^[4-5]。CLIA已广泛应用于生命科学、临床诊断、环境监测、食品安全和药物分析等领

域。特别是新型冠状病毒病(corona virus disease 2019, COVID-19)暴发以后。全自动的CLIA可以对COVID-19抗原和抗体进行快速精准检测,从而在COVID-19的诊断和疫苗研发中发挥了重要作用^[6-7]。在猪病方面,O和A型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)^[8]、猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)^[9]的CLIA已有研究,在检测灵敏性上,CLIA明显高于传统的酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。但在临床上,这些CLIA仍少有应用。

ASFV是一种大型包膜的DNA病毒,属于Asfarviridae家族成员^[10]。ASFV基因组大小为170至190 kb,编码150~200种蛋白质^[11]。ASFV B646 L基因编码主要的衣壳蛋白p72^[12]。在不同的ASFV毒株中,p72的氨基酸序列具有很高的同源性。p72质量约占ASFV病毒粒子总质量的30%^[13],是最早诱导猪产生抗体的病毒蛋白之一。另外,基于p72的亚单位疫苗研究已经取得进展^[14-15],针对p72抗体的精准评估对亚单位疫苗研发具有重要意义。因此,ASFV p72是比较理想的作为诊断靶标。本研究建立了一种ASFV p72蛋白抗体的CLEIA,为有效防控ASF提供简便快速的监测、检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 非洲猪瘟病毒重组

p72 蛋白由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心制备和保存^[16];亲水的甲苯磺酰基磁微粒(货号:J-MS-S160T)购自北京博尔迈生物技术有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphates, AP;编号:APMB-RO)购自美国 Roche 公司;全自动化学发光免疫分析仪(型号:Venus 100H)购自重庆科斯迈有限公司;非洲猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒(西班牙英吉纳,批号:210099)购自青岛瑞尔生物技术有限公司;非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒(货号:Y. ME06C)购自洛阳普泰生物技术有限公司。

结合缓冲液:0.1 mol·L⁻¹ HEPES 缓冲液(pH 9.5);催化剂:1 mol·L⁻¹ 硫酸钠;封闭剂:10% 牛血清白蛋白(BSA);洗涤缓冲液:Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBS, pH 7.4)含 0.05% Tween 20;MPs 保存液:HEPES 缓冲液(pH7.4)含 1% BSA、0.05% Tween-20、0.05% Proclin 300。

1.1.2 血清样品 标准阴性参考血清、非洲猪瘟病毒阳性标准血清由中国兽医药品监察所菌种中心(cvcc.ivdc.org.cn)提供;猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、PRV、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪流行腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)和猪葡萄球菌(*Staphylococcus hyicus*, *S. hyicus*)的阳性血清,由华南农业大学动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心保存。122 份灭活后的临床血清,包括 58 份阴性血清样品和 26 份阳性血清由华南农业大学国家非洲猪瘟区域实验室(广州)提供。

1.2 p72 偶联 MPs 的制备

用洗涤缓冲液洗涤 1 mg MPs 三次,磁力架去除上清液,加入 900 μL 结合缓冲液重悬后加入 5 μg 纯化的 p72,加入结合缓冲液补齐至 1 mL,混匀,加入 500 μL 催化剂,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转仪孵育 18 h,弃上清,加入 15 μL 封闭剂,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续旋转孵育 6 h,弃清液,洗涤 3 次,用 MPs 保存液重悬后调整浓度至 0.6 mg·mL⁻¹,取样送武汉赛维尔生物科技有限公司,用扫描式电子显微镜(scanning electron microscopes, SEM)和动态光散射(dynamic light scattering, DLS)分析,p72 偶联的 MPs(p72-MPs)在棕色瓶中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 AP 标记 p72 蛋白的制备

按文献方法^[17],将 AP 和 p72 蛋白分别稀释至 0.5、1 mg·mL⁻¹后,各取 500 μL 置 2 mL 离心管,轻轻混匀,加入含有 1% 戊二醛的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,加入 100 μL 1 mol·L⁻¹ 的单乙醇胺溶液,继续孵育 2 h,用脱盐柱纯化 AP 标记物(p72-AP),保存至 HEPES 缓冲液(pH 7.4)中,棕色瓶装,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.4 化学发光检测程序建立

分别用一步法和两步法模式检测。

一步法模式:加入待检样品和标准品各 20 μL , p72-MP 工作液和 AP-p72 工作液各 100 μL ,混匀 6 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;两步法模式:加入待检样品和标准品各 20 μL ,加入 100 μL p72-MPs 工作液,混匀 4 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,洗涤 4 次,加入 100 μL p72-AP 工作液,混匀 4 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。后续步骤一致,即洗涤 4 次,加入 200 μL 化学发光底物,混匀 4 s,反应 5 min;读取相对光单位(relative light unit, RLU)值。

样本中的 p72 抗体浓度与收集到的 RLU 呈正相关,通过检测系列 ASFV 阳性标准血清绘制标准曲线,利用标准曲线即可计算待测样品中 p72 抗体浓度。

1.5 标准品曲线的绘制

将 ASFV 阳性标准血清按 2 倍梯度稀释,分别用本研究建立的化学发光方法和商品化的 ELISA 试剂盒检测。根据商用试剂盒检测出的阴性、阳性临界范围,选择适当的 6 个稀释品作为标准品,用于绘制标准曲线。假定 p72 抗体浓度单位为 U·mL⁻¹,以 p72 抗体浓度值作为横坐标、RLU 为纵坐标,进行四参数曲线拟合方法绘制标准曲线。

1.6 反应条件优化

1.6.1 抗原偶联磁微粒的工作剂量优化 稀释 p72-MPs,反应剂量分别为 50、100、150、200 μL ,同时检测 1:6 400 稀释的 ASFV 阴性、阳性标准血清,读取 RLU 值,计算 P/N 值,P 为阳性样品 RLU 值,N 为阴性样品 RLU 值。当 P/N 值最大时为抗原偶联磁微粒的最佳工作剂量。

1.6.2 碱性磷酸酶标记抗原工作剂量的优化 稀释 p72-AP,反应剂量分别为 50、100、150、200 μL ,同时检测 1:6 400 稀释的 ASFV 阴性、阳性标准血清,读取 RLU 值,计算 P/N 值,当 P/N 值最

大时为 ALP 标记抗原最佳工作剂量。

1.6.3 反应模式的优化 将反应设置为一步和两步模式,检测 1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600 稀释的 ASFV 阳性和阴性标准血清,阳性血清样品进行检测并读取 RLU 值,同时计算 P/N 值,当 P/N 值最大时为最佳反应模式。

1.6.4 酶促反应时间的优化 将化学发光底物的反应时间分别设置为 1、3、5 和 8 min,同时检测 1:6 400 稀释的 ASFV 阴性、阳性标准血清,读取 RLU 值,计算 P/N 值,当 P/N 值最大时为酶促反应的最佳时间。

1.7 临界值、诊断敏感性和特异性测定

用本研究建立的 CLEIA 方法检测 58 份阴性血清样品和 26 份阳性血清样品,将检测结果输入 MedCalc 软件,进行 ROC 曲线(receiver operating characteristic curve)分析,测定诊断灵敏性和特异性,计算临界(cut-off)值。

1.8 交叉反应性试验

用本研究建立的 CLEIA 方法检测 CSFV、PRV、PRRSV、PEDV、PCV2 和 *S. hyicus* 共 6 种病原的血清,根据判断标准,判定阴阳性,分析本方法的交叉反应性。

1.9 重复性试验

用同一批次的 p72-MPs 和 p72-AP,检测 6 份血清样品,包括 2 份阴性,2 份弱阳性,2 份中等阳性,每个样品做 3 个重复,通过已优化好的反应条件,进行批内的重复性试验,同时对抗体浓度值进行统计学分析,计算变异系数。用 3 组不同批次的 p72-MP 和 p72-AP,检测 6 份血清样品,进行批间的重复性试验,计算变异系数。

1.10 试剂稳定性试验

将本研究使用的 p72-MPs、p72-AP、洗涤液、样品稀释液、发光底物等组分,于 4 °C 冰箱分别保存 1、2、3、6 个月,检测同一阳性样品和阴性样品,测试试剂稳定性。

1.11 灵敏性试验

用研究建立好的 CLEIA 方法,西班牙英吉钠公司生产的阻断法 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒和洛阳普泰生物技术有限公司生产的间接法 ASFV 抗体 ELISA 检测试剂盒对梯度稀释的 ASFV 样品标准血清和临床血清进行检测,比较灵敏性。

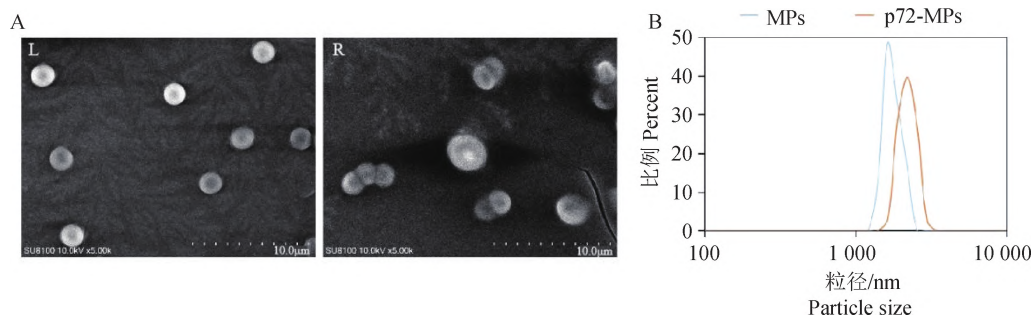
1.12 符合率试验

用研究建立好的 CLEIA 方法和商品化 ELISA 试剂盒检测 122 份临床血清样品,根据判定标准,分析 CLEIA 和 ELISA 检测结果的符合率。

2 结果

2.1 p72-MPs 的制备和特征

本研究选择 1.5 μm 的磁微粒,参照 JSR 抗原-磁微粒偶联方法,把重组 p72 蛋白偶联到磁微粒,并用其捕获血清样品中的 p72 抗体。最终保存浓度为 0.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过 SEM 图像可以观察到 MPs 和 p72-MPs 大小均匀,且偶联前后均分散均匀,未发生团聚现象。未偶联的 MPs 表面价光滑,微粒尺寸均一,而偶联后的 MPs 均被聚合物覆盖,微粒尺寸略有增大(图 1A)。另外,通过 DLS 分析可以看到,偶联前 MPs 的水合粒径为 1.72 $\mu\text{m}\pm 0.06 \mu\text{m}$,而偶联后 MPs 的水合粒径为 2.05 $\mu\text{m}\pm 0.28 \mu\text{m}$ (图 1B)。以上结果表明 p72 蛋白已经成功偶联到磁 MPs 表面。



A. SEM 结果(L. MPs;R. p72 蛋白偶联后的 MPs);B. DLS 结果

A. Results of SEM (L. MPs; R. p72 conjugated MPs); B. Results of DLS

图 1 磁微粒偶联前后的扫描电镜(SEM)和动态光散射(DLS)分析结果

Fig. 1 Scanning electron microscopes (SEM) images and dynamic light scattering (DLS) measurements of MPs before and after conjugation

2.2 p72-MPs 最佳稀释度的确定

MPs 和 AP 的稀释比例是影响免疫测定灵敏度和特异性的关键参数,通过测量 6 400 倍稀释的标准样品,以 P/N 值作为评价指标。将 p72 和 AP 标记到纯化的 p72 蛋白上,用 BCA 试剂盒测定标记物蛋白浓度为 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以不同剂量的

p72-MPs 检测样品,以确定最佳的 p72-MP 最佳使用量。结果如表 1 所示,随着 p72-MP 剂量增大,样品 RLU 值增大,当 p72-MPs 的量为 $100 \mu\text{L}$ 时候 P/N 值最大(为 5.11),可确定重组 p72-MP 的最佳工作剂量为 $100 \mu\text{L}$ 。

表 1 抗原偶联磁微粒最佳稀释度的确定

Table 1 Optimal dilution of p72 conjugated MP

项目 Item	p72-MP 用量/ μL p72-MP volume			
	50	100	150	200
阳性血清 RLU 值(P) RLU value of positive serum (P)	167 220	238 945	225 090	240 024
阴性血清 RLU 值(N) RLU value of negative serum (N)	45 620	46 805	57 009	63 726
P/N 值 P/N value	3.66	5.11	3.95	3.77

2.3 P72-AP 最佳稀释度的确定

根据优化的条件,用不同体积的 p72-AP 蛋白,检测阴性、阳性血清样品,以确定最佳 p72-AP 工作

剂量。结果如表 2 所示,当 p72-AP 为 $100 \mu\text{L}$ 时 P/N 值最大,由此可确定 p72-AP 最适工作剂量为 $100 \mu\text{L}$ 。

表 2 ALP 标记抗原最佳稀释度的确定

Table 2 Optimal dilution of labeled antigen

项目 Item	p72-AP 用量/ μL p72-AP volume			
	50	100	150	200
阳性血清 RLU 值(P) RLU value of positive serum (P)	17 200	240 050	250 740	260 575
阴性血清 RLU 值(N) RLU value of negative serum (N)	41 201	42 575	55 099	59 366
P/N 值 P/N value	4.18	5.64	4.55	4.39

2.4 酶促反应时间的确定

化学发光反应,根据标记物不同,分为辉光型和闪光型,CLEIA 发光属于辉光型,发光可持续数分钟至数十分钟以上,AP-AMPPD 系统的信号检测在发光信号相对稳定的区域任意点测量单位时间的发光强度^[18]。根据已优化好的条件,优化最佳的酶

促反应时间。随着反应时间的延长,阴性、阳性血清样品 RLU 值基本处于稳定状态。如表 3 所示,当反应时间为 5 min 时,酶与底物结合最充分且阳性、阴性血清样品 P/N 值达到最大。因此,本研究建立的 CLEIA 方法最佳酶促反应时间确定为 5 min。

表 3 酶催化反应时间的确定

Table 3 Determination of enzymatic reaction time

项目 Item	反应时间/min Reaction time			
	1	3	5	8
阳性血清 RLU 值(P) RLU value of positive serum (P)	120 056	175 578	273 667	269 900
阴性血清 RLU 值(N) RLU value of Negative serum (N)	30 093	41 173	45 552	45 892
P/N 值 P/N value	3.99	4.26	6.01	5.88

2.5 检测程序的确定

化学发光的反应模式分为一步法和两步法,反应的模式会对反应时间和灵敏度产生影响^[19]。对本方法的反应模式进行优化,检测不同浓度的标准

品。以标准品和阴性样品的信号比值(P/N)为纵坐标,抗体浓度为横坐标,进行线性分析。如图 2 所示,一步法的 P/N 较高且线性相关性较好,说明一步法相对两步法具有更高的灵敏度;一步法孵育

时间至少为 15 min,而两步法孵育时间至少需要 20 min,一步法比两步法可以节省反应时间,因此,确定一步法为选定检测程序。

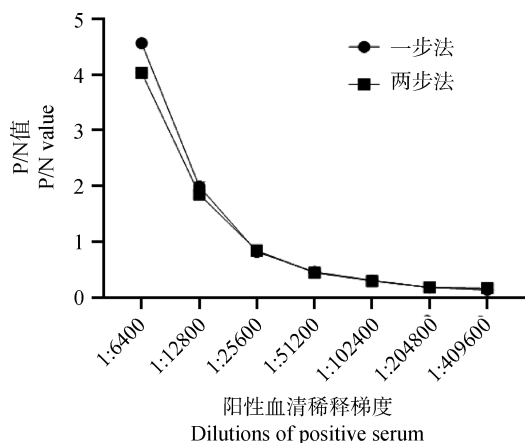


图2 不同反应模式分析

Fig. 2 Analysis of different reaction modules

2.6 标准曲线的建立

用优化好的抗原偶联磁微粒工作剂量、碱性磷酸酶标记抗原工作剂量和反应时间,通过 CLEIA 检测 ASFV 阳性标准血清,选择 1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600 作为标准品。参考之前的研究,将血清中 p72 抗体浓度赋为 160、80、40、20、10、5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以发光值(RLU)为纵坐标,以假定抗体浓度($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,以四参数曲线拟合方法绘制标准曲线。方程式为: $y = (A - D) / [1 + (1/C)^B] + D$,如图 3 所示,方程为: $y = (87\ 640.75 - 36\ 085.98) / [1 + (x/8.36)^{-1.7}] + 36\ 085.97$, $R^2 = 0.999\ 52$,说明发光值和 p72 蛋白抗体浓度具有很好的相关性。

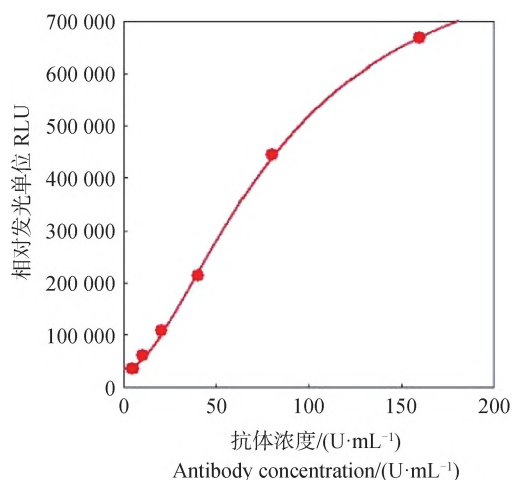


图3 化学发光检测标准曲线

Fig. 3 Standard curve for developed CLEIA

2.7 临界值、诊断灵敏性和特异性测定

为了确定 CLEIA 的最佳临界值,用建立的 CLEIA 检测了 58 份 ASFV 阴性和 26 份灭活的 ASFV 阳性血清样品。ROC 曲线如图 4 所示,曲线下面积(AUC)面积为 0.999 (95%置信区间:0.956~1.00 之间, $P < 0.001$),诊断特异性为 98.33%,诊断敏感性为 100.00%。此时, CLEIA 的临界值为 $9.505\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当样品中 p72 抗体浓度 $\geq 9.505\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,样品为 ASFV 抗体阳性;当样品中 p72 抗体浓度 $< 9.505\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,样品为 ASFV 抗体阴性。

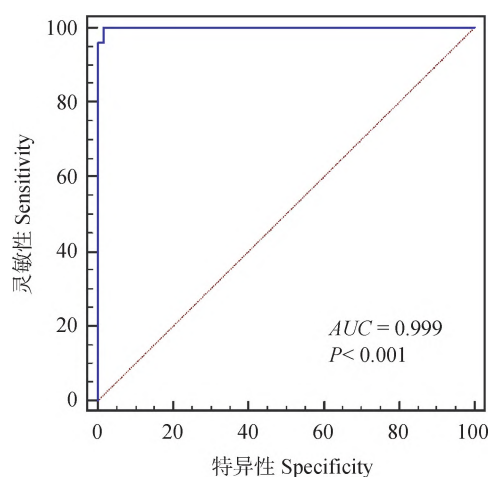


图4 最佳临界值的 ROC 曲线分析

Fig. 4 ROC curve analysis of optimal cut-off value

2.8 交叉反应性分析

为了评价建立的 CLEIA 的交叉反应性,用建立的 CLIA 法检测了 CSFV、PRRSV、PRV、PEDV、PCV2 和 *S. hyicus* 的抗体阳性血清,同时设置 ASFV 抗体阳性血清和阴性血清对照。根据 RLU 值计算各样品 p72 抗体浓度。结果图 5 所示,只有 ASFV 抗体阳性血清判定为阳性(抗体浓度 $> 9.505\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$),其他病原的阳性血清中 p72 抗体浓度均小于临界值($< 9.505\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$),判定为阴性,表明建立的 CLEIA 方法对 ASFV 抗体阳性血清有较好的特异性。

2.9 分析灵敏性测试

为了分析检测灵敏性,研究中使用了国产和进口的商品化 ELISA 试剂盒,与本研究建立的 CLEIA 方法进行对比,检测不同稀释度的 ASFV 阳性标准血清和临床血清,结果显示,当 ASFV 阳性标准血清稀释度为 1:12 800 时,p72 抗体浓度为

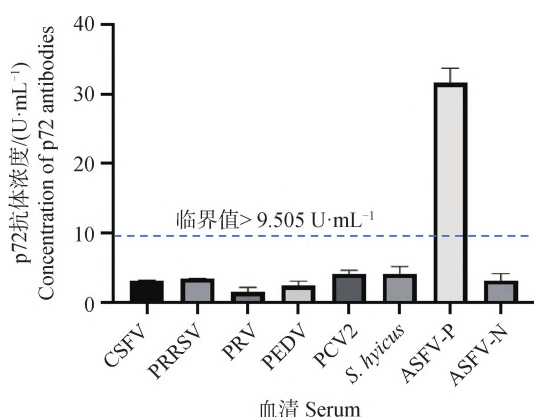


图 5 建立的 CLEIA 方法的交叉反应性分析

Fig. 5 Cross-reactivity analysis of the developed CLEIA

表 4 不同检测方法灵敏性分析结果

Table 4 The analytical sensitivity result of different methods

样品 Sample	稀释度 Dilution ratios	CLEIA		英吉钠 ELISA		普泰 ELISA	
		浓度 Concentration	结果 Result	X/%	结果 Result	S/P	结果 Result
ASFV 阳性标准血清 ASFV standard serum	1:400	320.00	+	76	+	2.80	+
	1:800	160.0	+	53	+	2.10	+
	1:1 600	80.0	+	27	-	1.55	+
	1:3 200	40.0	+	10	-	1.01	+
	1:6 400	20.0	+	-7	-	0.59	+
	1:12 800	10.0	+	-19	-	0.33	-
临床样品 Clinical sample	1:25 600	5.0	-	-21	-	0.21	-
	1:2	18.2	+	39	-	1.76	+
	1:4	11.2	+	18	-	0.58	+
	1:8	7.9	-	7	-	0.25	-
	1:16	4.82	-	-2	-	0.19	-

采用的试剂长期保存 6 个月仍然稳定,具有良好的实际应用价值。

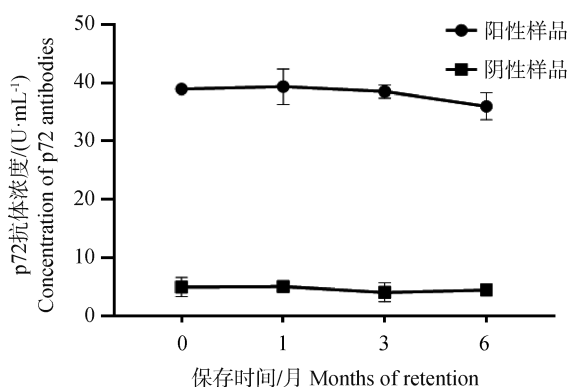


图 6 试剂稳定性测试结果

Fig. 6 Stability of reagents test

10 U·mL⁻¹, 大于临界值 9.505 U·mL⁻¹, 判定为阳性, 而进口 ELISA 试剂盒检测限为 1:800, 国产试剂盒为 1:6 400, 检测临床血清也显示出本研究的 CLEIA 最为灵敏, 其次是国产试剂盒(表 4)。表明建立的 CLEIA 方法敏感性较好, 灵敏性高于商品化试剂盒。

2.10 试剂稳定性测试

对于检测方法的试剂应用, 其试剂组分的稳定性是重要评价的指标之一。2~8 °C 被广泛用于生物试剂的存储^[20]。将检测试剂保存 1~6 个月, 通过分析同一样品的结果, 测试试剂稳定性, 结果如图 6 所示, 抗体浓度没有发生显著变化, 表明本研究

2.11 批内和批间重复性测试

为了评价 CLEIA 的重复性, 随机选取 6 份血清, 2 个阴性, 2 个弱阳性, 2 个中等阳性, 每份做 3 个重复, 进行检测并计算变异系数。结果如表 5 所示, 批内变异系数(CV%) 在 0.76%~4.90% 之间, 小于 5%, 表明所建立的 CLEIA 方法批内重复性好。抽取 3 个不同批次磁微粒和酶标记抗原, 按已建立的 CLEIA 方法检测 6 份血清样品, 结果如表 5 所示, 批间变异系数(CV%) 在 1.27%~9.75% 之间, 小于 10%, 从而表明所建立的方法批间重复性好。

2.12 与商品化试剂盒的符合率评价

为确定建立的 CLEIA 能否用于猪场血清检测, 从出现疑似 ASF 的猪场采集 122 份猪血清样本, 灭活后进行检测。由于商品化试剂盒和建立的

表 5 批内和批间重复性试验

Table 5 Reproducibility test of intra-batch and inter-batch

血清编号 Serum number	批内变异系数 Intrabatch coefficient of variation		批间变异系数 Interbatch coefficient of variation	
	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%
1	4.36 ± 0.33	0.76	4.70 ± 0.24	5.10
2	4.66 ± 0.10	2.15	4.59 ± 0.16	3.49
3	11.14 ± 0.54	4.74	11.89 ± 0.59	9.75
4	16.57 ± 0.48	2.90	16.94 ± 1.04	6.13
5	67.17 ± 0.87	1.30	64.07 ± 1.59	2.49
6	102.02 ± 5.0	4.90	11.85 ± 0.15	1.27

CLEIA 敏感性相近, 试验用商品化试剂盒和建立的 CLEIA 同时检测样品, 并比较两者检测结果。如表 6 所示, CLEIA 检测结果显示 18 份 ASFV 抗体阳性血清样品和 104 份 ASFV 抗体阴性血清样品, 而商品化 ELISA 试剂盒检测结果显示 17 份阳性

血清样品和 105 份阴性血清样品。统计结果显示, 两种方法的总符合率为 95.90%, 阴性符合率为 98.10%, 阳性符合率为 83.33%。表明建立的 CLEIA 的结果与商品化试剂盒的结果符合率较高。

表 6 与商品化试剂盒符合率比较

Table 6 Comparison of coincidence rate with commercial ELISA kit

方法 Methods	商品化 ELISA Commercial ELISA			符合率/% Coincidence rate
	阳性样品数 Positive serum numbers	阴性样品数 Negative serum numbers	总数 Total	
	CLEIA	15	3	
	2	102	104	98.10
	17	105	122	95.90

3 讨论

ASF 给养猪业带来了巨大的经济损失。抗体检测为 ASF 防控提供了关键的技术支撑。目前, 抗体检测方法中, 应用最为广泛的是 ELISA 和胶体金试纸条, 但是传统的 ELISA 方法, 也存在一些不足, 比如操作步骤多, 检测时间长等; 胶体金试纸条虽然简单, 但是无法满足高通量的检测。随着人力成本增加, 以及高通量检测需求增多, 自动化程度高、灵敏性好的检测方法逐渐得到关注。因此, 建立了一种用来检测 ASFV p72 特异性抗体自动化的 CLEIA 至关重要。

CLEIA 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合, 用于各种抗原、抗体、激素、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析。CLEIA 检测技术日益成熟, 代表了免疫诊断的发展方向。之前研究中, 一种多表位的 CLEIA, 可以检测 O 型 FMDV 血清型 O 的抗体, 评估多表位疫苗

和灭活疫苗的免疫效力^[21]。而 2C 和 3ABC 非结构蛋白的 CLEIA 可以快速、准确地区分感染 FMDV 的猪和接种过疫苗的猪, 有效解决了非结构蛋白对灭活疫苗污染而导致较高的假阳性率问题^[22]。而一种纳米探针被应用于 CLEIA 中, 以确定是否存在猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 感染^[23]。人类狂犬病疫苗 (human rabies vaccine) 中糖蛋白的质量控制是基于 ELISA, 然而 ELISA 并不能满足现代化质量控制系统的需要。而全自动的 CLEIA 分析性能优于 ELISA, 可能在现代疫苗质量控制中具有重要的应用价值^[24]。可以看出, CLEIA 在疾病诊断、疫苗生产和疫苗免疫效力评价等方面发挥重要作用。

本研究建立的 CLEIA 方法具有较好的特异性和灵敏性, 可以检出低至 1:12 800 倍稀释的 ASFV 阳性血清, 灵敏度优于 ELISA 方法。与商业化 ELISA 试剂盒相比, 所开发的 CLEIA 可实现全自动化的检测, 进一步缩短了检测时间并降低了人员

手动操作带来的假阳性或假阴性概率,且能够根据标准曲线精确地实现抗体水平的定量检测。主要得益于三方面的设计。一是本研究建立的 CLEIA 方法基于双抗原夹心原理,能检测 IgM、IgA 和 IgG^[25],而猪感染 ASFV 后就能产生上述抗体。研究表明,双抗原夹心 ELISA 检测 ASFV 抗体具有更高的特异性和灵敏度^[16]。二是建立的 CLIEA 使用 MPs 而不是传统的 96 孔板来固定 p72。目前有研究使用 96 孔板建立了间接法的 CLEIA 检测 ASFV p54 抗体^[26],也有通过羧基的 MPs 偶联 p30 蛋白,建立了间接法的 CLEIA,而羧基的 MPs 的使用显著提高了检测的灵敏度和特异性^[27];化学发光常用羧基或甲苯磺酰基修饰的 MPs,在实际生产中,羧基 MPs 使用过程工艺复杂,关键控制点多,而甲苯磺酰基 MPs 使用工艺简单,可进一步提升批间的稳定性。三是本研究建立的 CLEIA 基于 AP 和 1,2-二氧环己烷衍生物(AMPPD)构建化学发光体。CLEIA 通常用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和 AP 作为化学发光催化酶,对应的发光底物分别是鲁米诺及其衍生物和 AMPPD,而以 AP-AMPPD 发光体系最为灵敏^[28]。AMPPD 反应速度快、灵敏度高,发光能够在极短时间内给出较为精确的结果,敏感性和特异性均优于 ELSIA 方法^[29]。

在本研究中,我们也得到一些启发,一是行业缺乏针对 ASFV 抗原的特异性抗体的标准品,希望行业能提供一个通用的猪源 p72 抗体标准品,以方便对所有 p72 抗体定量检测进行校正,就像 COVID-19 一样,形成统一标准^[30]。二是目前行业内对 ASFV 已经普遍使用核酸提取仪和开展定量检测,相比早期手动提取核酸进行普通 PCR 检测,大大提高了效率,节省了人力,若采用全自动的化学发光检测,将更有助于提高病原抗体检测的效率。三是化学发光根据所选仪器不同可进行 360 测试或 480 测试这样的超高通量检测,也可以根据标记物的不同,同时分析同一样本中不同指标的含量^[31],这是传统的 ELISA 方法所不具备的优势。

4 结 论

本研究将双抗原夹心的 CLEIA 技术用于 ASFV p72 蛋白抗体的检测,建立的 CLEIA 方法较 ELISA 方法具有更好的敏感性,检测流程的自动化,检测性能更具优势,且具有实现抗体的绝对定量

检测的潜力,为更灵敏、精确的检测猪 ASFV 抗体水平提供了重要的技术支撑,也具有非常好的市场应用前景。

参考文献(References):

- [1] WANG N, ZHAO D M, WANG J L, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. *Science*, 2019, 366(6465):640-644.
- [2] GAUDREAU N N, MADDEN D W, WILSON W C, et al. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus[J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7:215.
- [3] GE S Q, LI J M, FAN X X, et al. Molecular characterization of African swine fever virus, China, 2018 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24 (11): 2131-2133.
- [4] 向国庆, 连 聪, 孙 栋, 等. 化学发光免疫分析法及在动物生产领域检测中的应用进展[J]. *中国兽医学*, 2023, 53(10):1320-1325.
XIANG G Q, LIANG C, SUN D, et al. Progress of chemiluminescence immunoassay and its application in the detection of animal production [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(10):1320-1325. (in Chinese)
- [5] 赵 协, 安利民, 高沙沙, 等. 化学发光免疫分析技术在动物疫病检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(8):82-87.
ZHAO X, AN L M, GAO S S, et al. Application of chemiluminescence immunoassay in detection of animal diseases [J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(8):82-87. (in Chinese)
- [6] LIU B J, SU X B, YU G, et al. An automated chemiluminescent immunoassay (CLIA) detects SARS-CoV-2 neutralizing antibody levels in COVID-19 patients and vaccinees[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 115:116-125.
- [7] MOELLER M E, ENGSIG F N, BADE M, et al. Rapid quantitative point-of-care diagnostic test for post COVID-19 vaccination antibody monitoring[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(2):e0039622.
- [8] 孙 雨, 宋晓晖, 王睿男, 等. A 型口蹄疫病毒抗体化学发光免疫分析检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(8):29-36.
SUN Y, SONG X H, WANG R N, et al. Establishment of chemiluminescent immunoassay for detection of type A FMDV antibody[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41 (8): 29-36. (in

- Chinese)
- [9] 马震原, 王淑娟, 闫若潜, 等. 猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白抗体竞争化学发光酶联免疫检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(3):574-583.
MA Z Y, WANG S J, YAN R Q, et al. Establishment of competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detecting antibodies against gB protein of pseudorabies virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(3):574-583. (in Chinese)
- [10] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Asfarviridae* [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(5):613-614.
- [11] DIXON L K, CHAPMAN D A G, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics[J]. *Virus Res*, 2013, 173(1):3-14.
- [12] LIU Q, MA B T, QIAN N C, et al. Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72 [J]. *Cell Res*, 2019, 29(11):953-955.
- [13] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *J Virol*, 2018, 92(23):e01293-18.
- [14] LIU W M, LI H C, LIU B, et al. A new vaccination regimen using adenovirus-vectored vaccine confers effective protection against African swine fever virus in swine [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12(2):2233643.
- [15] CHEN X X, YANG J F, JI Y H, et al. Recombinant Newcastle disease virus expressing African swine fever virus protein 72 is safe and immunogenic in mice [J]. *Virol Sin*, 2016, 31(2):150-159.
- [16] WANG L, LI D, LIU Y L, et al. Development of an effective one-step double-antigen sandwich ELISA based on p72 to detect antibodies against African swine fever virus [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10:1160583.
- [17] LIU F F, ZOU J J, LUO X X, et al. A point-of-care chemiluminescence immunoassay for pepsinogen I enables large-scale community health screening[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(17):4493-4500.
- [18] WANG W W, OUYANG H, YANG S J, et al. Multiplexed detection of two proteins by a reaction kinetics-resolved chemiluminescence immunoassay strategy[J]. *Analyst*, 2015, 140(4):1215-1220.
- [19] 柳方方. 胃蛋白酶原 I 磁微粒化学发光检测方法的建立与应用评价[D]. 广州:华南理工大学, 2021.
LIU F F. Establishment and evaluation of the magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for pepsinogen I[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021. (in Chinese)
- [20] KHRAMTSOV P, BARKINA I, KROPANEVA M, et al. Magnetic nanoclusters coated with albumin, casein, and gelatin: size tuning, relaxivity, stability, protein corona, and application in nuclear magnetic resonance immunoassay[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 9(9):1345.
- [21] LIU W, SHAO J J, ZHANG G L, et al. Development of an indirect chemiluminescence immunoassay using a multiepitope recombinant protein to specifically detect antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in swine[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(3):e02464-20.
- [22] LIU Z Z, SHAO J J, ZHAO F R, et al. Chemiluminescence immunoassay for the detection of antibodies against the 2C and 3ABC nonstructural proteins induced by infecting pigs with foot-and-mouth disease virus [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2017, 24(8):e00153-17.
- [23] ZHOU Y, ZHOU T, ZHOU R, et al. Chemiluminescence immunoassay for the rapid and sensitive detection of antibody against porcine parvovirus by using horseradish peroxidase/detection antibody-coated gold nanoparticles as nanoprobe[J]. *Luminescence*, 2014, 29(4):338-343.
- [24] YE K, SHI D W, ZHANG Z G, et al. A chemiluminescence immunoassay for precise automatic quality control of glycoprotein in human rabies vaccine [J]. *Vaccine*, 2021, 39(51):7470-7476.
- [25] QIN Y J, SHA R C, FENG Y C, et al. Comparison of double antigen sandwich and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of hepatitis C virus antibodies [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(11):e23481.
- [26] YANG Y, LV C J, FAN J Q, et al. Development of a chemiluminescence immunoassay to accurately detect African swine fever virus antibodies in serum [J]. *J Virol Methods*, 2021, 298:114269.
- [27] SHI Z W, CAO L Y, LUO J C, et al. A chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay for the detection of antibody against African swine fever virus[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107(11):3779-3788.
- [28] CINQUANTA L, FONTANA D E, BIZZARO N.

- Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? [J]. *Autoimmun Highlights*, 2017, 8(1):9.
- [29] 银凤桂, 侯力丹, 魏艳秋, 等. 鸭甲型肝炎病毒 1 型抗体 CLEIA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(6):451-455, 460.
- YIN F G, HOU L D, WEI Y Q, et al. Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of antibodies against duck hepatitis A virus type 1[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(6):451-455, 460. (in Chinese)
- [30] PEGHIN M, BONTEMPO G, DE MARTINO M, et al. Evaluation of qualitative and semi-quantitative cut offs for rapid diagnostic lateral flow test in relation to serology for the detection of SARS-CoV-2 antibodies: findings of a prospective study[J]. *BMC Infect Dis*, 2022, 22(1):810.
- [31] TANNOUS B A, VERHAEGEN M, CHRISTOPOULOS T K, et al. Combined flash- and glow-type chemiluminescent reactions for high-throughput genotyping of biallelic polymorphisms [J]. *Anal Biochem*, 2003, 320(2):266-272.

(编辑 白永平)

《畜牧兽医学报》第六届编辑委员会成员

顾问 张子仪 刘守仁 吴常信 夏咸柱 刘秀梵

主任委员 陈焕春

副主任委员 阎汉平 汪明 苏振环 时建忠

编委成员 (按姓名英文字母/汉字笔画排序)

Chris Anderson David Lindsay Graham Gardner W.Bruce Currie

马月辉 王加启 方维焕 宁宜宝 卢德勋 朱士恩 朱兴全 刘湘涛 余锐萍

杜立新 芮于明 陆承平 陈溥言 陈瑶生 李奎 李庆章 李学伟 李德发

沙玉圣 张涌 张仲秋 张家骅 沈建忠 杨宁 罗绪刚 孟庆翔 郑友民

周继勇 姜平 赵兴绪 赵茹茜 夏国良 涂长春 郭万柱 黄维义 崔治中

童光志 蒋小松 舒鼎铭

名誉主编 陈幼春 蒋金书

主编 文杰

副主编 张沅 时建忠 汪明 杨汉春 于康震 王立贤 任鹏

编辑部主任 孟培

主编 文杰

广告部主任 程金华 本期责任编辑 白永平

畜牧兽医学报

(月刊,1956年创刊)

2025年 第56卷 第3期

2025年3月23日出版

主管 中国科学技术协会
主办 中国畜牧兽医学会
编辑 《畜牧兽医学报》编委会
中国农业部北京畜牧兽医研究所
地址 北京海淀区圆明园西路2号
邮编 100193
电话 010-62815987 62816996 62893836
网址 <http://www.xmsyxb.com>
电子邮箱 xmsyxb@caas.cn
出版单位 《中国畜牧兽医杂志》有限公司
印刷 北京博海升彩色印刷有限公司
国内总发行 中国邮政集团公司北京市报刊发行局
国外总发行 中国国际图书贸易集团有限公司
(中国国际书店) 北京399信箱
订购 全国各地邮局

中国标准连续出版物号 ISSN 0366-6964
CN 11-1985/S

ACTA VETERINARIA ET ZOOTECHNICA SINICA

(Monthly, Started in 1956)

Vol. 56 No. 3 2025

Published on Mar. 23, 2025

Supervised by China Association for Science and Technology
Sponsored by Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine
Edited by Editorial Board of the ACTA VETERINARIA ET ZOOTECHNICA SINICA
Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences
Address No.2 West Road Yuanmingyuan, Haidian Beijing, China. Post Code 100193
Telephone 010-62815987 62816996 62893836
Website <http://www.xmsyxb.com>
E-mail xmsyxb@caas.cn
Published by Chinese Journal of Animal Science and Veterinary Medicine Co., Ltd.
Printed by Beijing Bohai Sheng Color Printing Co., Ltd.
Distributed by Domestic Beijing Post Office, China Post Group Corporation
Overseas China International Book Trading Corporation, P.O. Box 399

国内定价:50.00元(全年600元)

邮发代号:82-453 国外代号:M446

广告发布登记证号:京海工商广登字20170255号

ISSN 0366-6964



9 770366 696254



· 全国中文核心期刊
· RCCSE 中国学术期刊 (A-)

· 国家首批 A 类学术期刊
· 国际著名检索系统《化学文摘》(美国) 刊源

ISSN 1004-7034

CN 23-1205/S

黑龙江畜牧兽医

HEILONGJIANG ANIMAL SCIENCE
AND VETERINARY MEDICINE

主管：黑龙江省农业科学院
主办：黑龙江省农业科学院

11

2020
半月刊



黑龙江畜牧兽医

(2020年第11期 总第599期)

目次

试验研究

- miR-23b-3p对延边黄牛垂体细胞中生长激素分泌影响的研究
..... 张睿,季久秀,相思宇,金太花,陈莹莹,娄安钢,崔成都,于龙政,关立增(1)
- 太阳能加热饮水系统节能效果研究 贾爽,郝薇,孙妍,刘继军,陈昭辉,朱跃明(7)
- 抗猪瘟病毒单链抗体的原核表达及活性鉴定 刘金凤,覃绍敏,姜佳佳,白安斌,陈凤莲,秦树英,任鹏飞,霍孔林,吴健敏(14)
- 敖汉细毛羊 Hoxa7 基因表达载体的构建及在成纤维细胞中的表达 郑仰清,张梦瑶,刘鸿艳,徐晶,张廷荣(19)
- 绵羊肺炎支原体 NM2010 株 P60 基因的生物信息学分析及原核表达 徐春光,郝永清,张建华,刘波,高明华,李艳(25)

专论与综述

- 影响肌内脂肪沉积的候选基因及分子机制研究进展 谢红月,瞿秋红,潘鹏,夏琴,蒋钦杨,黄艳娜(30)
- 鸡舍内氨气的来源及对肉鸡生产影响的研究进展 郭艳,张进良,刘洪涌(35)
- 基于杂交 F2 代的家鸡经济性状研究进展
..... 赵净颖,闫世雄,王秋婷,李涛,豆腾飞,张全富,柳明正,李琦华,葛长荣,贾俊静(39)
- 姜黄素的生理功能及其在肉鸡生产上的应用研究进展
..... 陈明霞,方心灵,刘贤旭(43)
- 单宁的生物学功能及其在动物生产中的应用研究 张灵梅,杨玲媛,沈维军,朱晋佳,汤少勤(47)
- 中国新型兽用疫苗生产的现状与存在问题分析 赵凯,刘洪斌,毛春玲,张凤强,康宏,金政(51)

畜牧科学

- 卵巢静止奶牛血液矿物质及生化指标变化研究 张锋,张江,白云龙,夏成,徐闯,张洪友(54)
- 不同采样量、保存时间和温度对猪血常规测定结果的影响
..... 莫家远,高九昱,张琰芳,赵铭伟,黄叶,奉玲丽,梁晶,兰千球(57)
- 不同月龄新疆褐牛和安格斯牛背最长肌肌纤维形态特征比较研究
..... 加依娜古丽·吐尔逊拜,孙亚伟,闫向民,翟少华,张晓红,姚刚(63)
- 不同妊娠、哺乳环境对母猪生产性能的影响 赵晓宇,王磊,尹国安(68)
- 解耦联蛋白 1(UCP1)基因单体型差异及其与不同性别绵羊生长性状关联性分析 安清明,王星,孟金柱,赵园园,吴震洋(72)
- 金堂黑山羊 TGFβR1 基因克隆及表达分析 傅芳,王利,吴开年,李晨阳,张桦,魏勇(76)

兽医科学

- 五种方案治疗犬蠕形螨病的疗效对比 冻杨美,刘凤军,张玉玲,朱晓娟,秦丹青,张庆庆(82)
- 仔猪腹泻性大肠杆菌多黏菌素耐药基因 mcr-1 筛查及其多重耐药基因检测
..... 于吉锋,康润敏,谢晶,曹冶,周沅,魏甬,廖党金,李兴玉,林毅,叶勇刚,肖璐,叶健强,潘梦(86)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究 马晓莉,夏兆伦,余文兰,刘永伦,徐铮(92)
- 2016—2018 年我国华北部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因的遗传变异分析 朱国坡,马凤龙,王家福,刘金华(96)
- 一种快速检测绵羊消化道线虫幼虫活力方法的研究 吕旭,刘晓磊,陆静,方伟,刘甜,王文龙(101)
- 貉细小病毒的原核表达及病毒样颗粒的制备 雷欢,李希辰,孙博,吴丛梅,殷玉和(104)

饲草、饲料与添加剂

- 蒙辽农牧交错区草地资源植物组成及分布概况 关海雯,鲍雅静,曹玥,杨雨婷,顾湘,赵珊,杜煜(110)

[期刊基本参数]CN 23-1205/S * 1958 * s * A₄ * 172 * zh * P * ¥40.00 * 2650 * 36 * 2020-11



编者按:猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)是一种严重影响全球养猪业的病原,由其引起的疾病称为猪繁殖与呼吸综合征(PRRS),以母猪繁殖障碍和各年龄段猪只呼吸系统疾病为特征,给养猪生产造成巨大的经济损失。PRRSV的出现和流行迄今已有30多年,国内外学者针对该病的发病机理、免疫应答机制、流行病学、防控措施等方面做了大量研究。采用免疫、生物安全管理、净化等科学防控策略可有效阻止PRRSV的传播和流行,从而降低对养猪业的危害和经济损失。由于该病毒变异和演化速度极高,以及对其致病性和毒力的分子机制缺乏了解,使其在全球范围内仍未取得实质性控制,其对养猪业的影响和危害持续存在。本栏目汇总相关文章两篇,以供科研工作者参考。

DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2019.06.0045

猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究

马晓莉,夏兆伦,余文兰,刘永伦,徐 铮*

(华南农业大学 实验动物中心/国家生猪种业工程技术研究中心/动物科学学院,广州 510642)

中图分类号: S852.65; S852.4

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2020)11-0092-05

摘要:为了制备猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) Nsp9 蛋白鼠源多克隆抗体并检验其中和活性,试验采用 RT-PCR 方法扩增了 PRRSV 的 Nsp9 基因保守区域片段,将其克隆至原核表达载体 pET-28a 中,并在大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中表达重组 Nsp9 蛋白;纯化后的重组 Nsp9 蛋白与弗氏佐剂充分混合乳化,采用皮下多点注射免疫 Balb/c 小鼠,经 3 次免疫后获得多克隆抗体;用间接 ELISA 法检测抗体效价,以血清中和试验和间接免疫荧光试验检验其中和活性。结果表明:试验成功扩增了大小为 951 bp 的 Nsp9 基因片段,经双酶切和序列测定,重组表达质粒 pET-28a-Nsp9 构建成功;重组 Nsp9 蛋白的分子质量约为 36.0 ku;制备的多克隆抗体效价较高,重组 Nsp9 蛋白多克隆抗体经 2~8 倍倍比稀释时,与 PBS 对照相比荧光数量递增。说明在大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中成功表达了 PRRSV 重组 Nsp9 蛋白,制备的鼠源多克隆抗体有一定的抗 PRRSV 中和活性。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒;重组 Nsp9 蛋白;原核表达;弗氏佐剂;多克隆抗体;中和活性

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)系由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的母猪繁殖障碍和各阶段猪呼吸道症状的高度接触性传染性疾病,现已成为严重威胁全球养猪业的主要疫病之一^[1-2]。该病毒基因组为单股正链 RNA,长约 15 kb,包含 10 个开放阅读框(ORF),其中 ORF1 在病毒基因组中占比八

成,编码病毒的非结构蛋白(Nsp)。Nsp9 基因位于 ORF1b 中,高度保守^[3-4],编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp),仅在复制时产生^[5],在病毒复制过程中的作用非常重要^[6-8]。现阶段,关于 PRRSV Nsp 的研究已成为热点,但关于 Nsp9 蛋白功能及其中和活性的报道和研究较少,因此制备 Nsp9 蛋白的多克隆抗体并研究其中和活性,对 PRRSV 诊断和疫苗研究具有较显著的现实意义。

本试验以 PRRSV GDgz 株为模板^[9],扩增其 Nsp9 基因保守区域片段并构建重组表达质粒 pET-28a-Nsp9,原核表达并纯化重组 Nsp9 蛋白后免疫 Balb/c 小鼠,制备鼠源多克隆抗体,以血清中和试验和间接免疫荧光试验检验该多克隆抗体是否具有抗 PRRSV 中和活性,以期对 PRRSV 的监测和防控提供

收稿日期: 2019-06-03; 修回日期: 2020-02-16

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2018A070701012); 广东省农业科技特派员项目(2018A0121); 广州市科协项目(K2019020101001)

作者简介: 马晓莉(1981—),女,实验师,硕士,研究方向为兽医实验动物学, maxl@scau.edu.cn.

* 通信作者: 徐 铮(1979—),男,兽医师,硕士,研究方向为动物健康养殖与安全生产, stonezen@scau.edu.cn.



重要的试验基础和新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 病毒、细胞、菌株及质粒

PRRSV GD_{gz} 株,由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心分离和保存; Marc-145 细胞、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 感受态细胞,购自北京博迈德基因技术有限公司; 原核表达载体 pET-28a, 购自 Invitrogen 公司。

1.2 试验动物

SPF 级 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 10 只,体重约为 16 g, 购自南方医科大学实验动物中心。

1.3 主要试剂

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒, 均购自广州美基(欣研)生物科技有限公司; PrimeScript One Step RT-PCR Kit、DL-2 000 Marker、蛋白质 Marker、限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶, 均购自宝日医生物技术(北京)有限公司; EB 替代染料, 购自广州华奇盛生物科技有限公司; 胶回收试剂盒, Promega 公司产品; 卡那霉素(Kan)、IPTG、Ni-IDA 树脂、蛋白纯化试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 弗氏佐剂, Sigma 公司产品; DMEM、底物显色液 TMB、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG, 购自 Invitrogen 公司; PRRSV N 蛋白单克隆抗体, 购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.4 引物的设计与合成

参照 PRRSV GD_{gz} 株基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对 Nsp9 基因保守区域片段的特异性引物, 引物序列为 Nsp9-F 5'-CGC GGATCC AGTGAAGTTGAGCTAAAAGAC-3'(下划线部分为 BamH I 酶切位点) 和 Nsp9-R 5'-GGC AAGCTTTTA-AACAGTTTGCCAGTTTCTCG-3'(下划线部分为 Hind III 酶切位点), 预计扩增片段长度为 951 bp, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.5 Nsp9 基因保守区域片段的 PCR 扩增

用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 以提取的病毒 RNA 为模板, 利用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit 对目的片段进行扩增。PCR 扩增体系(总体积为 50 μ L): PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μ L, 2 \times 1 Step Buffer 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, RNA 模板 4 μ L, RNase Free ddH₂O 15 μ L。PCR 扩增程序: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 重组表达质粒的构建及双酶切鉴定

取原核表达载体 pET-28a 和胶回收产物置 37 $^{\circ}$ C 水浴环境中双酶切 3 h; 分别回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 将 Nsp9 基因保守区域片段克

隆至原核表达载体 pET-28a 上, 然后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中; 挑取阳性菌落接种于含卡那霉素的 LB 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h; 抽提质粒, 双酶切鉴定后送苏州金唯智生物科技有限公司测序, 测序无误后命名为 pET-28a-Nsp9。

1.7 重组 Nsp9 蛋白诱导表达及纯化

将重组表达质粒 pET-28a-Nsp9 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养过夜; 待菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导培养 6 h, 同时设未诱导对照; 诱导完成后, 取 1 mL 诱导表达后的菌液, 10 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 40 μ L PBS 溶液重悬菌泥, 再加入 10 μ L 1 \times 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

按照 1:50 比例将阳性重组菌液接种于 1 L 含卡那霉素的 LB 液体培养基内扩大培养, 至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导表达 6 h; 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 30 mL 超声波细胞破碎液, 充分重悬, 置冰浴中超声裂解至菌体变清亮; 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min; 收集上清液, 根据蛋白纯化试剂盒说明书用 Ni-IDA 树脂过柱纯化蛋白质, 洗脱 6 次; 收集各次洗脱液, 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白质浓度。

1.8 多克隆抗体制备和检测

将纯化后的重组 Nsp9 蛋白稀释至浓度为 0.2 mg/mL, 首次免疫时将重组蛋白抗原与弗氏完全佐剂等量乳化, 第 2、3 次加强免疫时将重组蛋白抗原与弗氏不完全佐剂等量乳化, 按照 100 μ g/只的剂量经皮下多点注射免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠 5 只, 同时设 PBS 对照(100 μ L/只), 每次免疫间隔 14 d。免疫前 1 天、1 免和 2 免后 14 天对小鼠进行断尾采血, 3 免后 14 天对小鼠进行眼球采血, 恒温静置后离心收集血清。采用间接 ELISA 方法^[10]测定血清抗体水平, 以原核表达的纯化蛋白作为抗原(2 μ g/mL) 进行包被, 分别加入 4 次采集的小鼠血清, 同时以 PBS 对照组小鼠血清作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(按照 1:10 000 比例稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加入底物显色液 TMB 孵育 10 min(避光), 终止反应后用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

1.9 血清中和试验和间接免疫荧光检测

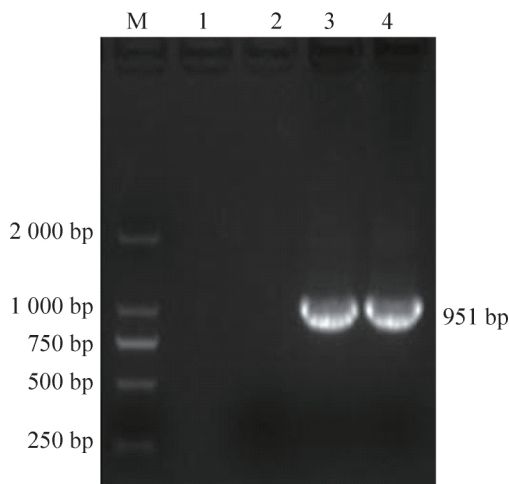
取已灭活的血清, 在 96 孔微量细胞培养板上进行倍比稀释, 使其稀释度分别为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64(100 μ L/孔), 同时设 PBS 对照; 取-70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存的病毒液(毒价为 1 \times 10⁵ TCID₅₀/mL), 500 倍稀释至浓度为 2 \times 10² 个 TCID₅₀/mL; 每孔加入 100 μ L 病毒液, 封好盖, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内中和 1 h; 每孔加入 100 μ L Marc-145 细胞悬液, 置 37 $^{\circ}$ C、5%

CO₂ 培养箱中培养 48 h; 用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 每孔加入 100 μL 4% 多聚甲醛封闭固定 20 min; PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 50 μL PRRSV N 蛋白单克隆抗体(按照 1:200 比例稀释) 作为一抗, 置 37 °C 温箱中孵育 1 h; PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 50 μL FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (按照 1:500 比例稀释) 作为二抗, 置 37 °C 温箱中避光孵育 1 h; 用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 在荧光显微镜下观察结果。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增

通过特异性引物扩增 Nsp9 基因保守区域片段, 结果扩增出大小约为 951 bp 的条带(见图 1), 与目的基因大小一致。

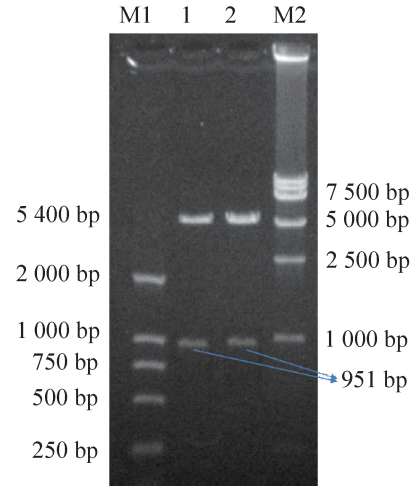


M. DL-2 000 Marker; 1 2.空白对照; 3 4.Nsp9 基因片段 PCR 产物。

图 1 Nsp9 基因片段 PCR 扩增结果

2.2 重组表达质粒的双酶切鉴定

用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切重组表达质粒, 结果得到大小约为 951 bp 的目的基因条带和 5 400 bp 的载体基因条带(见图 2), 表明试验成功构建出重组表达质粒 pET-28a-Nsp9。

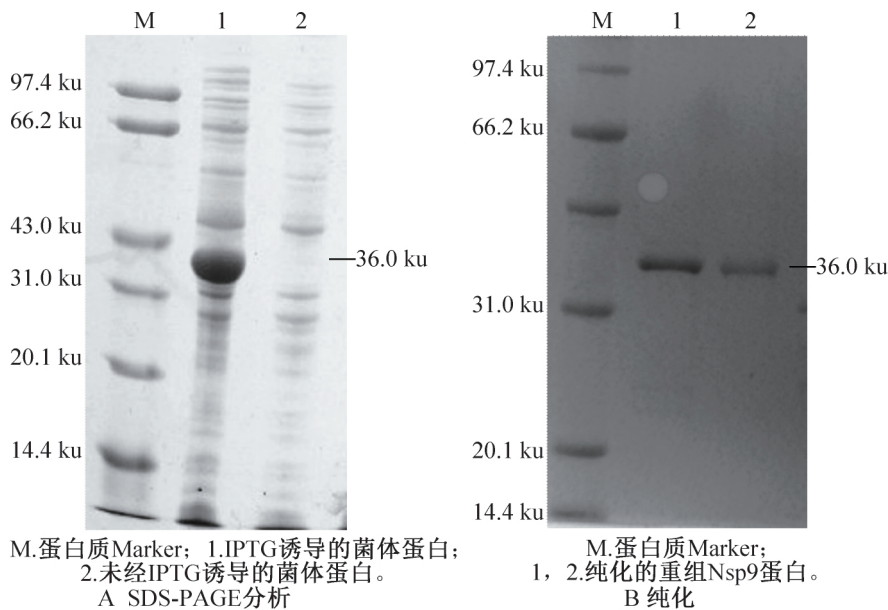


M1. DL-2 000 Marker; 1 2.双酶切产物;
M2.DL-15 000 Marker。

图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定结果

2.3 重组 Nsp9 蛋白表达及纯化

诱导表达的重组 Nsp9 蛋白经 SDS-PAGE 分析显示, 重组目的蛋白获得成功表达, 分子质量约为 36.0 ku(见图 3A); 纯化结果显示, 仅在约 36.0 ku 处有一条条带(见图 3B), 表明纯化效果较好, 纯化蛋白质的浓度为 0.473 mg/mL。



M.蛋白质Marker; 1.IPTG诱导的菌体蛋白;
2.未经IPTG诱导的菌体蛋白。
A SDS-PAGE分析

M.蛋白质Marker;
1, 2.纯化的重组Nsp9蛋白。
B 纯化

图 3 重组 Nsp9 蛋白表达鉴定及纯化结果

2.4 多克隆抗体检测

间接 ELISA 法检测发现, 3 次免疫后 OD₄₅₀ 值逐

步明显变大, 表明小鼠经免疫后抗体水平逐步上升, 且与 PBS 对照组相比 OD₄₅₀ 值差异明显, 见图 4, 说

明用重组 Nsp9 蛋白免疫小鼠后产生了效价较高的多克隆抗体。

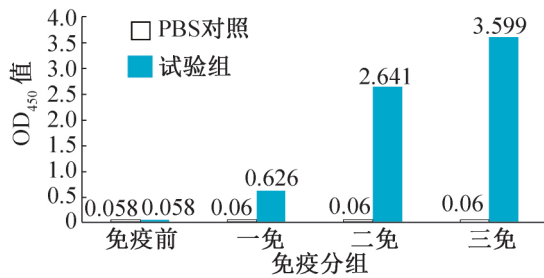


图4 多克隆抗体的间接 ELISA 法检测结果

2.5 血清中和试验和间接免疫荧光检测

与 PBS 对照组相比, Nsp9 蛋白多克隆抗体按照 1:2 比例稀释时荧光数量最少,按照 1:4 比例稀释时荧光数量较少,按照 1:8 比例稀释时荧光数量相近(见 169 页彩图 5),表明重组 Nsp9 蛋白多克隆抗体有一定的抗 PRRSV 中和活性,能够在一定程度上抑制 PRRSV 的复制。

3 讨论与结论

近年来 PRRSV 在我国大部分地区流行,给我国养猪业带来了巨大的经济损失,大量使用强制免疫的活疫苗使弱毒疫苗有可能在选择压作用下发生毒力返强^[11]。另外,弱毒疫苗株和野毒株在猪群中同时存在,使毒株间重组的概率增加^[12-14]。因此,对 PRRSV 进行检测和防控技术的研究很有必要。

目前,关于 PRRSV 结构蛋白方面的研究已取得重大突破,而关于 Nsp 的研究探索相对偏少。在防控该病过程中,常用的针对结构蛋白的诊断方法无法区分感染猪和免疫猪。Nsp9 不但与病毒毒力紧密关联^[15],而且与抗药性和细胞免疫相关^[16-17]。对 Nsp9 和 RdRp 的探索不仅有可能成为控制该病的新途径(设计药物或者疫苗),而且还可能为该病研究提供新的靶基因和诊断材料。

本试验参照 PRRSV GDgz 株的基因序列,设计针对 Nsp9 基因保守区域片段的特异性引物,扩增 Nsp9 基因保守区域片段,克隆至原核表达载体 pET-28a 上,构建重组表达质粒 pET-28a-Nsp9,原核表达并纯化重组 Nsp9 蛋白后免疫 Balb/c 小鼠,制备鼠源多克隆抗体,通过血清中和试验和间接免疫荧光检测验证了该多克隆抗体能与 PRRSV 发生特异性反应,且具备一定的抗 PRRSV 中和活性,为 PRRSV Nsp9 蛋白的免疫学检测和 PRRS 的防控提供了新的试验思路。

参考文献:

[1] HAN K, SEO H W, PARK C, et al. Vaccination of sows against type 2 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) before artificial insemination protects against type 2 PRRSV challenge but does not protect against type 1 PRRSV chal-

lenge in late gestation[J]. *Vet Res* 2014, 45(1): 1-11.

[2] FAN B, ZHANG H, BAI J, et al. Pathogenesis of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chinese Tibetan swine[J]. *Res Vet Sci* 2016, 108(10): 33-37.

[3] 赵孟孟, 宋中宝, 冯松林, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 FS 株 Nsp9 基因的克隆与序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(9): 2249-2256.

[4] ZHAO M, NING Z, WANG H, et al. Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(1): 88-96.

[5] ZHOU Y, ZHENG H, GAO F, et al. Mutational analysis of the SDD sequence motif of a PRRSV RNA-dependent RNA polymerase[J]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(9): 870-879.

[6] DONG J, ZHANG N, GE X, et al. The interaction of nonstructural protein 9 with retinoblastoma protein benefits the replication of genotype 2 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro[J]. *Virology*, 2014, 464-465(1): 432-440.

[7] ZHAO S, GE X, WANG X, et al. The DEAD-box RNA helicase 5 positively regulates the replication of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interacting with viral Nsp9 in vitro[J]. *Virus Res*, 2015, 195: 217-224.

[8] LI J, GUO D, HUANG L, et al. The interaction between host Annexin A2 and viral Nsp9 is beneficial for replication of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Res*, 2014, 189: 106-113.

[9] 于林洋, 董建国, 张乐宜, 等. 猪繁殖与呼吸系统综合征病毒华南株 GDgz 的分离鉴定及遗传进化分析[J]. *广东农业科学*, 2017, 44(4): 138-145.

[10] 黄志强. PRRSV Nsp9 基因单克隆抗体及阻断 ELISA 检测试剂盒的制备[D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[11] JIANG Y F, XIA T Q, ZHOU Y J, et al. Characterization of three Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3/4): 242-249.

[12] SHI M, HOLMES E C, BRAR M S, et al. Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China[J]. *J Virol*, 2013, 87(19): 10904-10907.

[13] XIAO Y, WU W, GAO J, et al. Characterization of the interactome of the Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) NSP2 protein reveals the hyper variable region as a binding platform for association with 14-3-3 proteins[J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(5): 1388-1401.

[14] ZHANG Q, XU X, YOU S, et al. Emerging of two new subgenotypes of Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in southeast China[J]. *Microb Pathog*, 2016, 97: 27-33.

[15] LI Y, ZHOU L, ZHANG J, et al. Nsp9 and Nsp10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(7): e1004216.

[16] ALEXEL B E, IVAN D, RODRÍGUEZ-GÓMEZ I M, et al. Predicted peptides from non-structural proteins of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN- γ and IL-10[J]. *Viruses*, 2013, 5(2): 663-677.

[17] TIAN D, MENG X J. Amino acid residues Ala283 and His421 in the RNA-dependent RNA polymerase of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus play important roles in viral ribavirin sensitivity and quasispecies diversity[J]. *J Gen Virol*, 2015, 97(1): 53-59.

· 兽医科学 ·

猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究

(作者马晓莉等,正文见 92-95,169 页)

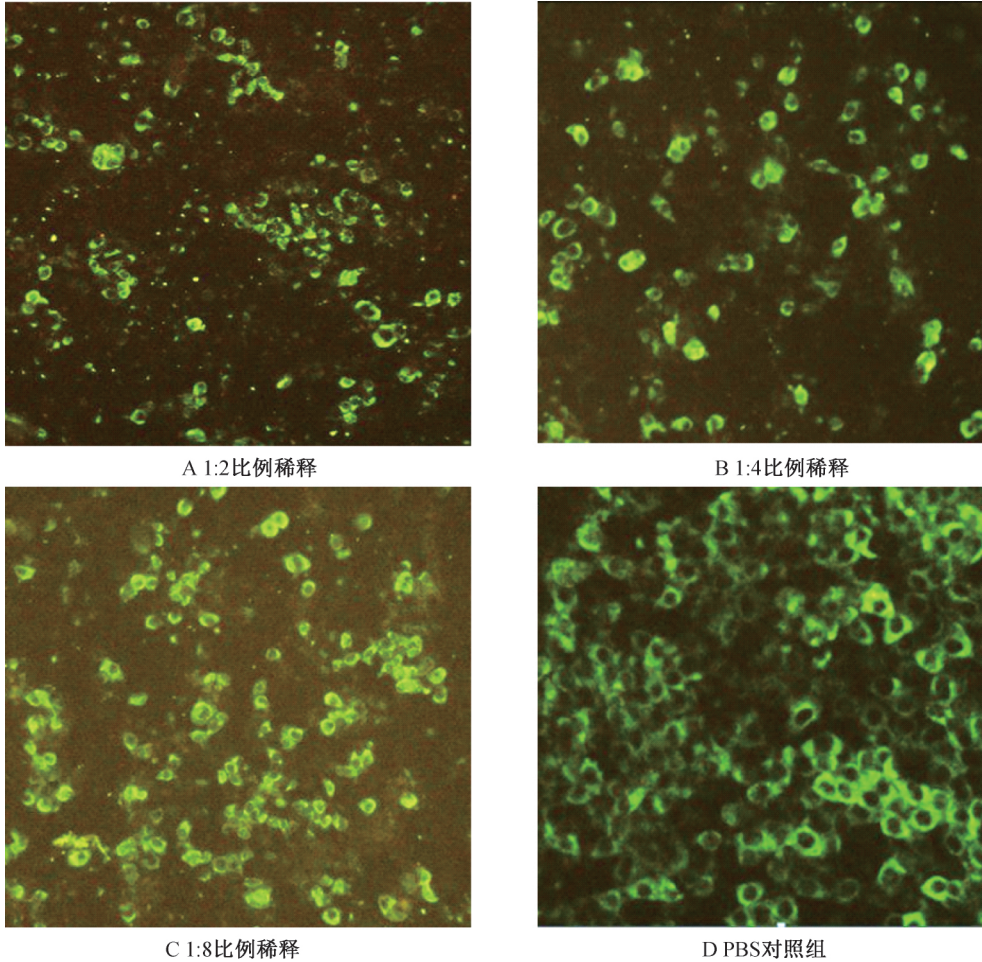


图5 间接免疫荧光试验结果(40 μm)

· 兽医科学 ·

一种快速检测绵羊消化道线虫幼虫活力方法的研究

(作者吕旭等,正文见 101-103,109,169-170 页)



图1 亚甲基蓝染色结果



绿色印刷产品



微信平台



QQ群

ISSN 1004-7034



9 771004 703204

畜牧与兽医

ANIMAL HUSBANDRY & VETERINARY MEDICINE

主管：中华人民共和国教育部

主办：南京农业大学



开启“圆环+”时代



因为专注所以选择

江苏南农高科技股份有限公司
JIANGSU NANNONG HI-TECH CO., LTD
江苏省江阴市锡澄路890号
www.jnngk.com

销售中心：0510-86178891
服务热线：0510-86178901
传真：0510-86178891
邮编：214405



ISSN 0529-5130



中国科学引文数据库来源期刊
中国学术期刊评价数据库来源期刊

10/2019

第 51 卷 Vol.51

目次

名家风采

勤朴立身 大道至简

——记我国著名兽医药理及毒理学家包鸿俊教授…………… 顾胜楠,熊富强,许秋华,沈冰儿,李群 (1)

遗传繁育

香梅 F1 代猪 PRKAA1 基因对肉品质和屠宰性能的影响…………… 韩雪,陶宇航,张雄,陈林,黄波,陈伟 (5)

CRTC2 基因在不同品种和月龄肉牛的表达分析…………… 吴磊,刘瑞莉,袁玮,柏学进,刘贤勋,吕娟娟,肖超柱,董雅娟 (9)

秦川牛主要体尺、体重与剩余采食量主成分分析

…………… 叶连萌,杨朝云,卢鑫,朱云,周靖航,赵国丽,李鹏,淡新刚,康晓龙,史远刚 (15)

沙乌头猪不同杂交组合性能比较研究…………… 王欢,赵默然,李伯江,唐慧娟,鲍德江,李平华,吴望军,黄瑞华 (20)

动物营养

葡萄糖氧化酶、葡萄糖酸、蜂蜜源添加剂对黄羽肉鸡生长及养分消化率的影响…………… 范京辉,楼立峰,张雷,董善彪 (26)

基于响应面法优化饲用粪肠球菌发酵培养基…………… 郭建军,曾静,涂熠坤,魏国汶,袁林 (31)

环境卫生

新技术发酵床养殖模式下育肥猪舍的绿色建筑设计研究…………… 侯万钧,梁丽飞,贾世楨,余鑫阳 (38)

基础兽医

喇叭美辛人工抗原及其多克隆抗体的制备…………… 宋炎博,赵贵山,汝晓飞,侯珂,林梦舟,李辛洁,孟庆蓉,王捍东 (44)

福建黄兔 Nramp1 基因的克隆及序列分析…………… 陈冬金,桑雷,孙世坤,陈岩锋,王锦祥,谢喜平 (49)

鸡 STARD3 胞外域的原核表达及其抗血清制备…………… 吴悠,马宇驰,赵祎云,隋国燕,石辛月,唐峰 (54)

地顶孢霉培养物对 AA 肉鸡生长性能、免疫机能及血清抗氧化功能的影响

…………… 冯柳柳,单春乔,王业华,刘恩,宋蕙男,刘艳 (57)

高效液相色谱法检测奶牛血清中脂肪酸浓度…………… 马建民,段素云,张凡建 (62)

预防兽医

猪肺炎支原体工业化高密度发酵与纯化工艺研究…………… 刘汉平,畅通 (66)

CSFV 与 PRRSV 双重 RT-PCR 检测方法的建立及应用

… 杨伟,单春兰,李林,高洪,严玉霖,赵汝,敖平星,高利波,刘超英,富国文,高斌,景麟稀,茶金龙,王浩 (71)

猪源 CD163 受体蛋白多克隆抗体的制备及其 PRRSV 阻断效力研究… 马晓莉,舒会友,夏兆伦,余文兰,刘永伦,徐铮 (76)

犬瘟热病毒截短 P 蛋白的表达及纯化…………… 李爽,易立,程悦宁,曹智刚,林鹏,程世鹏 (81)

猪 IL-17A 荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在 PCV2 感染检测中的应用……………

…………… 赵晶,柳亚茹,王金良,董林,沈志强,朱瑞良 (87)

羊血清中口蹄疫病毒非结构蛋白 3A-3B1-3B2 抗体 ELISA 检测方法的建立

…………… 孙雨,宋晓晖,肖颖,王旭,董浩,王睿男,毕一鸣,蒋菲,李晓霞,杨林,王传彬 (92)

马晓莉, 舒会友, 夏兆伦, 等. 猪源 CD163 受体蛋白多克隆抗体的制备及其 PRRSV 阻断效力研究 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51 (10): 76-80.
Ma X L, Shu H Y, Xia Z L, et al. Preparation of polyclonal antibody against CD163 and its effect on blocking PRRSV infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51 (10): 76-80.

猪源 CD163 受体蛋白多克隆抗体的制备 及其 PRRSV 阻断效力研究

马晓莉¹, 舒会友², 夏兆伦¹, 余文兰¹, 刘永伦¹, 徐铮^{1*}

(1. 华南农业大学实验动物中心/国家生猪种业工程技术研究中心/动物科学学院, 广东 广州 510642;

2. 广州广力莱生物科技有限公司, 广东 广州 510550)

摘要: 为了制备猪源 CD163 受体蛋白鼠源多克隆抗体并检验其病毒阻断效力, 采用 RT-PCR 方法扩增了猪肺泡巨噬细胞 (PAM) CD163 受体 SRCR4-6 功能区域片段, 将其克隆至载体 pET-32a 中, 并在大肠杆菌中表达重组 CD163 受体蛋白, 纯化后的重组蛋白与弗氏佐剂充分混合乳化; 采用皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠, 经 3 次免疫后获得多克隆抗体, 应用间接 ELISA 方法检测抗体含量, 以病毒阻断试验和间接免疫荧光法验证其病毒阻断效力。结果显示: 重组蛋白主要以包涵体的形式表达, 相对分子量约为 50 kDa, 制备的 CD163 受体蛋白多克隆抗体含量较高, 经 2~8 倍稀释后, 抗体阻断 PRRSV 感染细胞的能力逐渐下降。研究表明, 在大肠杆菌中成功表达了 PRRSV 重组 CD163 受体蛋白, 制备的鼠源多克隆抗体具有较明显的阻断 PRRSV 感染细胞的效力。本研究为深入研究病毒的入侵机制和 PRRSV 的防控提供了试验基础和新的思路。

关键词: CD163 受体蛋白; 原核表达; 弗氏佐剂; 多克隆抗体; 病毒阻断效力

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2019)10-0076-05

Preparation of polyclonal antibody against CD163 and its effect on blocking PRRSV infection

MA Xiaoli¹, SHU Huiyou², XIA Zhaolun¹, YU Wenlan¹, LIU Yonglun¹, XU Zheng^{1*}

(1. Laboratory Animal Center and National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry/

College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangzhou Guanglilai Biotechnology Co. Ltd, Guangzhou 510550, China)

Abstract: In order to obtain a polyclonal antibody against CD163 and to reveal its effect on the blocking of PRRSV infection, the SRCR4-6 structure domain of the CD163 gene was amplified by RT-PCR, and the recombinant expression plasmid pET-32a-CD163 was constructed using the pET-32a vector. The recombinant CD163 proteins were obtained by using the Escherichia coli expressing system. Then, the purified proteins of CD163 were emulsified with Freund's adjuvant. After 3 times of subcutaneous injection of the protein into BALB/c mice, the polyclonal antibody was obtained. Indirect ELISA test was used to detect the antibody level in serum. Indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to examine the polyclonal antibody against CD163 and its effect on blocking PRRSV infection. The results showed that the recombinant protein mainly expressed as inclusion bodies and its relative molecular weight was about 50 kDa. The indirect ELISA test showed that the level of polyclonal antibody was higher. The IFA result indicated that the fluorescence intensity of CD163 polyclonal antibodies gradually increased when they were diluted by 2-8 times. In conclusions, the recombinant CD163 protein was successfully expressed in *Escherichia coli*, and it was effective in blocking PRRSV infection. This study provided useful data and new ideas for further research on control and prevention of PRRSV infection.

Key words: CD163 protein; prokaryotic expression; Freund's adjuvant; polyclonal antibody; PRRSV blocking efficacy

收稿日期: 2019-01-06; 修回日期: 2019-08-03

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2018A070701012); 广东省农业科技特派员项目 (2018A0121)

作者简介: 马晓莉 (1981-), 女, 硕士, 实验师

* 通信作者: 徐铮, 硕士, 实验师, 主要从事动物健康养殖与安全生产研究, E-mail: stonezen@scau.edu.cn.

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 系由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的母猪繁殖障碍和各阶段猪呼吸道症状的高度接触性传染性疾病, 现已成为严重威胁全球养猪业的主要疫病之一^[1-2]。PRRSV 具有严格的宿主专一性, 只对猪易感, 其他物种不感染, 且具有非常专一的细胞嗜性, 在体内主要感染猪肺泡巨噬细胞 (PAM), 在体外则仅对 Marc-145 等细胞系易感^[3-5]。原因是这些细胞表面存在特异性受体^[6]。其中, CD163 是 PRRSV 入侵猪体的必需受体^[5]。CD163 是一种富含半胱氨酸的 SRCR 超家族的清道夫受体, 含有 9 个 SRCR 结构域, 在病毒入侵细胞过程中介导病毒脱衣壳和基因组的释放^[7-8]。目前国内外众多研究表明 SRCR5 是 CD163 受体与 PRRSV 产生相互作用的至关重要的功能区域^[9-11]。但该功能区域与病毒的作用机制还不是十分清楚, 而且对其抗体在病毒感染细胞过程中能否发挥作用的报道和研究较少。因此, 制备 CD163 受体 SRCR4-6 功能区域蛋白的多克隆抗体并研究其封闭细胞阻断病毒的效力, 在 PRRSV 的入侵机制研究和防控方面具有较显著的意义。

本试验以猪 PAM 细胞 RNA 为模板, 扩增其 CD163 基因 SRCR4-6 功能区域片段, 并构建重组质粒 pET-32a-CD163, 原核表达并纯化重组 CD163 受体蛋白后免疫小鼠, 制备鼠源多克隆抗体, 应用该抗体封闭 Marc-145 细胞 CD163 受体相应的结构域, 进行病毒阻断试验和间接免疫荧光检测, 旨在验证该多克隆抗体对 PRRSV 阻断效力, 以期为深入研究病毒的入侵机制和 PRRS 的防控提供新的思路和试验依据。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞、菌株及质粒

PRRSV GDgz 株由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心分离和保存^[12]; Marc-145 细胞、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌株购自北京博迈德基因技术有限公司; pET-32a 原核表达载体购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂与实验动物

DNA/RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒均购自广州美基 (欣研) 生物科技有限公司; PrimeScript One Step RT-PCR kit、DNA Marker、蛋白 Marker、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自宝日生物技术 (北京) 有限公司; EB 替代染料购自广州华奇盛生物科技有限公司; 胶回收试剂盒为 Promega 公司产品; 氨苄青霉素、IPTG、Ni-IDA-Sefinose (TM) Resin Kit 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工

生物工程股份有限公司; 弗氏佐剂为 Sigma 公司产品; DMEM、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司; PRRSV N 蛋白单克隆抗体购自上海优宁维生物科技股份有限公司; SPF 级 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心。

1.3 引物设计

参照 GenBank 发布的 CD163 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 设计 1 对 CD163 基因片段的特异性引物, 包含有 BamH I 和 Hind III 酶切位点: CD163-F: 5'-CGCGGATCCAAGATGGATCAGATCTGGAG-3'; CD163-R: 5'-GCCAAGCTTCTATTGCCCTGAAG-GACATAG-3', 预计扩增片段长为 954 bp, 覆盖 SRCR4-6 功能区域 (936 bp), 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.4 CD163 基因的扩增

按照文献 [13] 方法分离培养猪 PAM 细胞, 用 DNA/RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 以提取的 RNA 为模板, 利用 PrimeScript[®] One Step RT-PCR kit 对目的片段进行扩增。扩增体系为 50 μ L, PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2 μ L, 2 \times 1 step Buffer 25 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L, RNA 模板 4 μ L, RNase Free ddH₂O 15 μ L。PCR 反应循环参数为: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 重组原核表达载体的构建

对 pET-32a 空载体和胶回收产物在 37 $^{\circ}$ C 水浴进行双酶切 3 h, 分别回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 12 h 条件下将 CD163 基因片段克隆于 pET-32a 载体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑阳性菌落接种于 LB (Amp⁺) 培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h, 抽提质粒, 双酶切鉴定后送苏州金唯智生物科技有限公司测序, 序列无误后命名重组质粒为 pET-32a-CD163。

1.6 重组 CD163 受体蛋白诱导表达及纯化

将重组表达载体 pET-32a-CD163 转化 BL21, 经 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 (Amp⁺) 过夜。待菌液 OD_{600nm} 值达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 180 r/min, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h, 同时设未诱导对照。诱导完成后, 取 1 mL 诱导表达后的菌液, 离心后弃上清液并加 40 μ L PBS 重悬菌泥, 加入 10 μ L 1 \times 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 分析。

将阳性重组菌液按 1:50 接种于 1.0 L LB (Amp⁺) 培养基内扩大培养, 至菌液 OD_{600nm} 值为 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱

导表达 6 h。然后 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入 30 mL 超声波细胞破碎液，充分重悬，置于冰浴中超声裂解，4 °C、10 000 r/min 离心 30 min，收集包涵体沉淀，用 PBS 洗涤数次，用 Buffer (pH=8.0，磷酸盐缓冲对、Tris-Cl、尿素) 溶解沉淀，溶解的包涵体根据试剂盒说明书用 Ni-IDA 树脂过柱纯化，洗脱 8 次，收集各次洗脱液。根据 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。

1.7 多克隆抗体制备和检测

将纯化后的重组蛋白稀释到 0.2 mg/mL，首次免疫时将重组蛋白抗原与完全弗氏佐剂等量乳化，第 2 和 3 次加强免疫时将重组蛋白抗原与不完全弗氏佐剂等量乳化，按 100 μg/只的剂量经皮下多点注射免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠 5 只，同时设 PBS 对照 (100 μL/只)，每次免疫间隔 14 d。免疫前 1 d、一免和二免后 14 d 对小鼠进行断尾采血，三免后 2 周对小鼠进行眼球采血，恒温静置后离心收集血清。用间接 ELISA 方法测血清抗体含量，以原核表达的纯化蛋白作为抗原 (2 μg/mL) 包被，分别加入 4 次采集的小鼠血清，同时以 PBS 对照组小鼠血清为阴性对照，37 °C 孵育 30 min，加入酶标二抗 HRP-山羊抗鼠 IgG (1 : 10 000 稀释) 37 °C 孵育 30 min，加入底物显色液 TMB 孵育 10 min (避光)，终止反应后酶标仪读取 OD_{450 nm} 值。

1.8 病毒阻断试验和间接免疫荧光检测

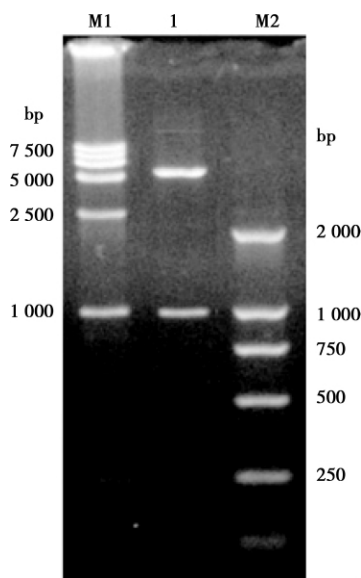
取已灭活处理的血清，在 96 孔微量细胞培养板上进行倍比稀释，使其稀释度分别为 1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64 (100 μL/孔)，同时设 PBS 对照；每孔加入 100 μL Mark-145 细胞悬液，置 5% CO₂ 培养箱作用 1 h 后取出；取 -70 °C 冰箱保存的病毒液 (毒价为 10⁵ TCID₅₀/mL) 500 倍稀释到 200 个 TCID₅₀/mL，每孔加入 100 μL 病毒液，封好盖，置 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养 48 h。取出培养板，用 PBS 洗涤细胞 3 遍，每孔加入 100 μL 4% 多聚甲醛封闭固定 20 min；PBS 洗涤细胞 3 遍，加入 50 μL PRRSV N 蛋白单克隆抗体 (1 : 200 稀释) 作为一抗，置 37 °C 温箱孵育 1 h；PBS 洗涤细胞 3 遍，加入 50 μL FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 500 稀释) 作为二抗，置 37 °C 温箱避光孵育 1 h，用 PBS 洗涤细胞 3 遍，在荧光显微镜下观察结果。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增和原核表达载体双酶切鉴定

通过特异性引物扩增 CD163 基因，结果显示扩增出约 954 bp 的条带，与目的基因大小一致。阳性表达载体质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切，结果可

见约 954 bp 的目的基因条带和 5 900 bp 的载体基因条带 (图 1)，表明成功构建了载体 pET-32a-CD163。

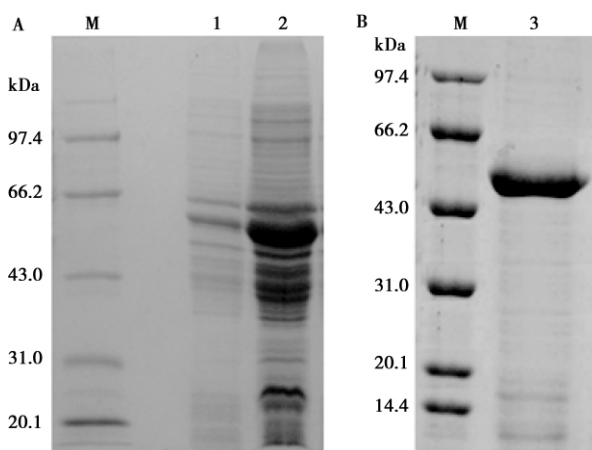


M1. DL15000 DNA Marker; M2. DL2000 DNA Marker; 1. 双酶切产物

图 1 重组载体双酶切鉴定结果

2.2 重组蛋白表达鉴定及纯化

诱导表达的重组蛋白经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，重组目的蛋白获得成功表达，分子量约为 50 kDa (图 2A)；纯化结果显示 (图 2B) 仅在约 50 kDa 处有 1 个条带，表明纯化效果较好；经检测纯化蛋白浓度为 0.487 mg/mL。



M. 标准分子量蛋白 Marker; 1. 未经 IPTG 诱导的菌体蛋白; 2. IPTG 诱导的菌体蛋白; 3. 纯化的重组蛋白

图 2 重组蛋白表达 (A) 与纯化 (B) 产物 SDS-PAGE 分析结果

2.3 多克隆抗体检测

间接 ELISA 方法检测发现, 3 次免疫后 $OD_{450\text{ nm}}$ 值逐步增加, 表明小鼠经过免疫后抗体水平明显上升, 且与 PBS 对照组相比 $OD_{450\text{ nm}}$ 值差异明显 (图 3), 说明重组 CD163 受体蛋白免疫小鼠后产生了较高浓度的多克隆抗体。

2.4 血清中和试验间接免疫荧光检测结果

CD163 受体蛋白多克隆抗体 1:2、1:4 和 1:8 稀释, 与 PBS 对照组相比荧光数量递增 (图 4), 表明该多克隆抗体有较明显的 PRRSV 阻断效力, 且这

种阻断效力具有抗体浓度依赖性。

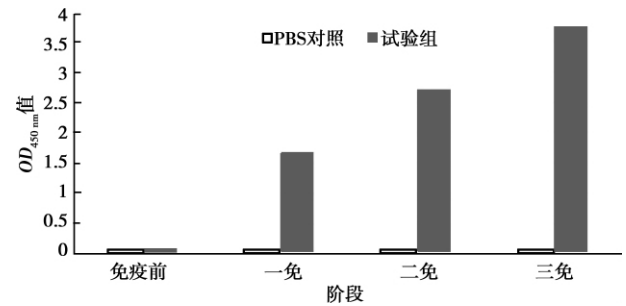


图 3 多克隆抗体间接 ELISA 检测结果

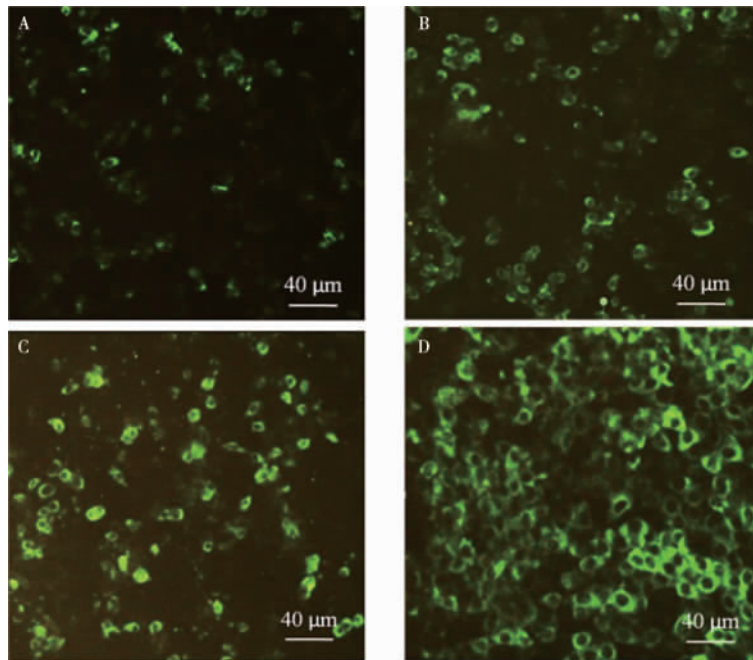


图 4 间接免疫荧光试验结果

3 讨论

PRRS 近年来在我国大部分地区流行甚至暴发, 使我国养猪业损失惨重, 大量的强制免疫的活疫苗涌入市场, 使得弱毒疫苗有可能在选择压力作用下发生毒力返强^[14]。本实验室曾对 2016—2017 年采自广东省各地 906 份疑似病料进行分子检测, PRRSV 核酸阳性率达到 44%, 在高强度免疫的状态下出现如此高的阳性率, 提示或为疫苗株毒力返强。另外, 弱毒疫苗株和野毒株在猪群中同时存在, 使得毒株间重组的概率增加^[15-17]。因此, 对 PRRSV 进行入侵机制和防控技术的研究是很有必要的。

在本研究中, 以猪 PAM 细胞 CD163 基因为模板, 设计了针对 CD163 基因 SRCR4-6 功能区域片段

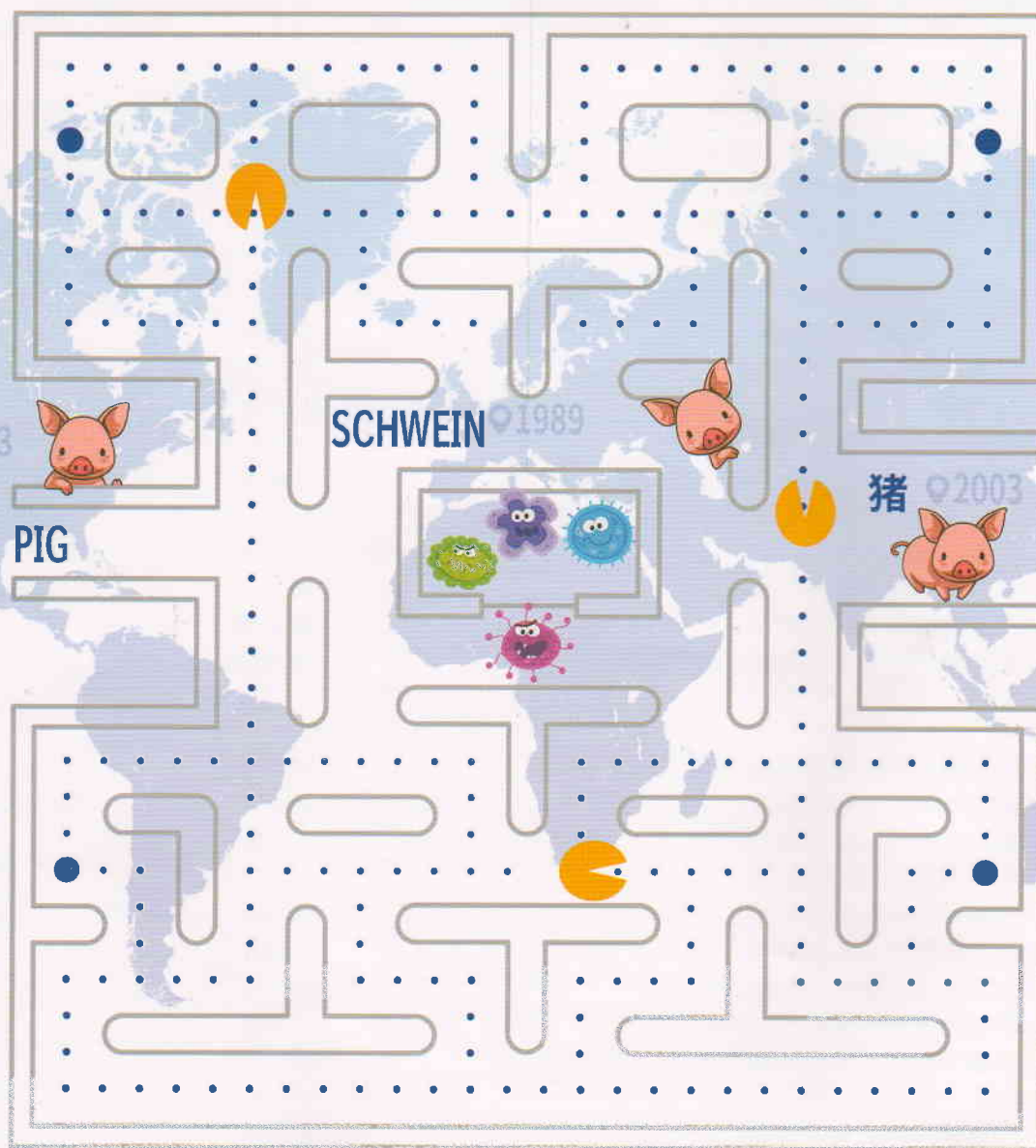
的特异性引物, 扩增了 CD163 基因片段, 克隆于 pET-32a 载体上, 构建重组表达质粒 pET-32a-CD163, 原核表达并纯化了重组 CD163 受体蛋白后免疫小鼠, 制备了鼠源多克隆抗体, 通过病毒阻断试验和间接免疫荧光检测, 验证了该多克隆抗体具备 PRRSV 阻断效力, 能够与细胞 CD163 受体蛋白发生特异反应并有效封闭 PRRSV 入侵细胞通路。本研究一方面验证了 PRRSV 与受体蛋白结合的功能表位, 另一方面也为深入研究 PRRSV 入侵机制和该病的防控提供了重要的试验基础和新的思路。

参考文献:

- [1] Han K, Seo H W, Park C, et al. Vaccination of sows against type 2

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) before artificial insemination protects against type 2 PRRSV challenge but does not protect against type 1 PRRSV challenge in late gestation [J]. *Vet Res*, 2014, 45 (1): 1-11.
- [2] Fan B, Zhang H, Bai J, et al. Pathogenesis of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chinese Tibetan swine [J]. *Res Vet Sci*, 2016, 108 (10): 33-37.
- [3] Duan X, Nauwynck H J, Pensaert M B. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 56 (2): 9-19.
- [4] Ding Z, Li Z J, Zhang X D, et al. Proteomic alteration of Marc-145 cells and PAMs after infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2012, 145 (2): 206-213.
- [5] Patton J B, Rowland R R, Yoo D W, et al. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages [J]. *Virus Res*, 2009, 140 (1): 161-171.
- [6] Jusa E R, Inaba Y, Kouno M, et al. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Am J Vet Res*, 1997, 58 (5): 488-491.
- [7] Welch S K W, Calvert J G. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection [J]. *Virus Res*, 2010, 154 (1): 98-103.
- [8] Lee Y J, Park C K, Nam E, et al. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol Methods*, 2010, 163 (2): 410-415.
- [9] 冯亚琼, 杜东颖, 王冬梅, 等. 猪 CD163 分子在 PRRSV 感染 PAM 细胞中的作用研究 [J]. *免疫学杂志*, 2015 (1): 22-26.
- [10] 冯亚琼, 崔春晓, 夏禹豪, 等. CD163 分子在 PRRSV 免疫复合感染 PAM 细胞过程中的作用 [J]. *免疫学杂志*, 2015 (9): 757-761.
- [11] 曹宗喜, 焦培荣, 林哲敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 CD163 受体功能域鉴定 [J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47 (3): 23-30.
- [12] 于林洋, 董建国, 张乐宜, 等. 猪繁殖与呼吸系统综合征病毒华南株 GDgz 的分离鉴定及遗传进化分析 [J]. *广东农业科学*, 2017, 44 (4): 138-145.
- [13] 张岩岩, 胡亚萍, 张雪梅, 等. 猪肺脏巨噬细胞的分离培养 [J]. *大连大学学报*, 2015 (6): 66-69.
- [14] Jiang Y F, Xia T Q, Zhou Y J, et al. Characterization of three porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179 (3/4): 242-249.
- [15] Shi M, Holmes E C, Brar M S, et al. Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China [J]. *J Virol*, 2013, 87 (19): 10904-10907.
- [16] Xiao Y, Wu W, Gao J, et al. Characterization of the interactome of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) NSP2 protein reveals the hyper variable region as a binding platform for association with 14-3-3 proteins [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15 (5): 1388-1401.
- [17] Zhang Q, Xu X, You S, et al. Emerging of two new subgenotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in Southeast China [J]. *Microb Pathog*, 2016, 97: 27-33.

岁月洗炼 经典验证



猪伪狂犬病活疫苗 (K-61株) Ingelvac® Aujeszky MLV

《进口兽药注册证书》证号：(2016)外兽药证字15号

国兽药广审(文)2019050055





· 全国中文核心期刊 · 国家首批A类学术期刊
· RCCSE中国学术期刊(A-) · 国际著名检索系统《化学文摘》(美国)刊源

ISSN 1004-7034

CN 23-1205/S

黑龙江畜牧兽医

HEILONGJIANG ANIMAL SCIENCE
AND VETERINARY MEDICINE

主管：黑龙江省畜牧兽医局
主办：黑龙江畜牧兽医杂志社

19 2019
半月刊



黑龙江畜牧兽医

(2019年第19期 总第583期)

目次

试验研究

- 牛 FOXM1 基因特异性 siRNA 干扰效率的分析 王超,张淑琴,宋雪莹,王改丽,孙娜,郭利,程世鹏(1)
- 重组鹅 IFN- α 在大肠杆菌中的表达及抗血清制备 周游,杨文涛,黄科谚,晋玉北,冯博,石春卫,黄海滨,王建忠,姜延龙,康元环,杨桂连,王春风(5)
- 高铜诱导肉鸡肝脏差异表达的 microRNA 分析 杨帆,唐兆新,廖建昭,裴若男(10)
- 蛋氨酸硒通过 ROS/RIP3 通路抑制 LPS 诱导的鸡肝脏组织程序性坏死研究 赵之嵘,屈婧睿,郭金铭,汪圣晨,郑舒方,徐世文(13)
- 山羊 CXCR1 基因的克隆及组织表达谱研究 徐涛,王利,魏勇(19)
- 基于测序技术的海南地方猪 TLR4 基因多态性分析 张艳,刘海隆,王文秀,黄丽丽(25)

专论与综述

- 外源寡糖在动物生产中的应用研究概况 王雪,孙劲松,高昌鹏,周玉香(30)
- 饲用微生态制剂代替抗生素在动物生产中的应用研究进展 李俊,姜宁,张爱忠,张仲卿,董立强,李天阳(34)
- 日粮营养对动物基因表达的影响 吴东旺,邓茗月,毛华明,杨舒黎(39)
- 我国肉用绵羊不同杂交组合效果研究进展 李倩,邵勇维克,冯天雨,李宇,张利坤,白秦生,李梅,胡建宏(43)

畜牧科学

- 基于 16S rDNA 高通量测序技术分析湖北黑头羊瘤胃细菌的多样性 索效军,杨前平,陶虎,熊琪,李晓锋,陈明新,张年(46)
- 伊犁鹅及其与豁眼鹅杂交后代屠宰性能、肉品质和抗氧化性能的比较研究 王俊花,彭箫,吴盈萍,赵晓钰,段玉青,刘金瑞,方书宝,李海英(51)
- 尼西鸡与艾维茵鸡肌肉营养成分及 FAS 基因表达差异研究 张得梅,荣华,刘丽仙,李琦华,葛长荣,贾俊静,徐志强,谷大海,段小花(56)
- 大尾寒羊和小尾寒羊尾脂、心脂和肾脂脂肪细胞比较研究 杨广礼,刘凯迪,付欢欢,冯果,王铭超(60)
- 竹醋液、壳聚糖和茶多酚对冷却猪肉的复合保鲜研究 韩紫音,姜惠,梁焕结,陈代杰,姜鸿瑞,包文斌,杨章平,张慧敏(65)

兽医科学

- I 群禽腺病毒血清 4 型 QD 株的分离与鉴定 陈惠娴,李桂梅,李宁,单虎(69)
- 狂犬病病毒 CVS-11 株间隔区缩短的缺失株构建及特性研究 杨金金,陈腾,张艳艳,齐宇,周鑫韬,米丽娟,张守峰,扈荣良(73)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究 马晓莉,舒会友,郑恩琴,夏兆伦,余文兰,谢淑敏,刘永伦,徐铮(78)
- CSFV 强弱毒株双重 RT-PCR 方法的建立与应用 周怡,杨美,王柏林,何玲,王开功,程振涛(82)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪流行性腹泻病毒双重 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 于新友,李天芝,王玉茂,修晓娜(86)
- 李斯特杆菌感染山羊实质器官和中枢神经系统器官病理变化研究 伍钢,唐慕德,冯妮,刘彝,郑文亚(90)

饲草、饲料与添加剂

- 不同厌氧处理对小黑麦秸品质、体外模拟瘤胃发酵的影响 徐芳,张丹丹,孙锐锋,张元庆,靳光,张变英,陈泽,王曦,程景,王栋才,李博,韩淑芳(93)
- 草原 3 号杂花苜蓿根围植物寄生线虫种类及数量的研究 张晶,白力嘎,海棠(98)
- 玉米行距对草田间作物根围土壤酶活性的影响 王家豪,王普昶,赵丽丽,陈超,黄佳能(103)
- 功能性寡糖配合复合益生菌在娟姗牛奶上的应用效果 梁金逢,文信旺,周晓情,李秀良,肖正中,黄华强,朱文,方治山,黄明光(110)

[期刊基本参数]CN 23-1205/S * 1958 * s * A₄ * 185 * zh * P * ¥40.00 * 2650 * 42 * 2019-19



猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆 抗体的制备及其中和活性研究

马晓莉¹, 舒会友², 郑恩琴¹, 夏兆伦¹, 余文兰¹, 谢淑敏¹, 刘永伦¹, 徐 铮^{1*}

(1. 华南农业大学 国家生猪种业工程技术研究中心/动物科学学院/实验动物中心, 广州 510642;

2. 广州广力莱生物科技有限公司, 广州 510080)

中图分类号: S852. 65⁺9. 6

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2019) 19-0078-06

摘 要: 为了制备猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus , PRRSV) N 蛋白鼠源多克隆抗体并验证其中和活性, 试验采用 RT-PCR 方法扩增了 PRRSV 的 ORF7 基因, 将其克隆至原核表达载体 pET-32a 中, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中表达重组 N 蛋白, 纯化重组 N 蛋白制成弗氏佐剂抗原, 采用皮下多点注射法免疫 Balb/c 小鼠, 经 3 次免疫后获得多克隆抗体, 用间接 ELISA 法检测抗体效价, 以血清中和试验和间接免疫荧光法验证其中和活性。结果表明: 试验成功扩增了大小为 390 bp 的 ORF7 基因片段, 经双酶切和序列测定, 重组表达质粒 pET-32a-N 构建成功, 重组 N 蛋白分子质量约为 28. 0 ku, 制备的多克隆抗体效价较高, 重组 N 蛋白多克隆抗体按照 1 : 2、1 : 4 和 1 : 8 比例稀释时, 荧光数量与不加多克隆抗体时比较无明显区别。说明在大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中成功表达了 PRRSV 重组 N 蛋白, 制备的鼠源多克隆抗体能够与重组 N 蛋白发生特异性反应, 但没有抗 PRRSV 中和活性。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 重组 N 蛋白; 原核表达; 弗氏佐剂; 多克隆抗体; 中和活性

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome , PRRS) 系由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus , PRRSV) 引起的母猪繁殖障碍和各阶段猪呼吸道症状的高度接触性、传染性疾病, 现已成为严重威胁全球养猪业的主要疫病之一^[1-2]。该病毒基因组为单股正链 RNA, 长约 15 kb, 包含 10 个开放阅读框(ORF), 其中由 ORF7 编码的 N 蛋白为核衣壳蛋白^[3-4], 是 PRRSV 最保守的蛋白, 也是在被感染细胞中检测到的占比最高的病毒蛋白^[5]。PRRSV 入侵机体后, 最先产生针对 N 蛋白的抗体, 而且是在体内持续时间最长的抗体^[6]。因此, 制备 N 蛋白的多克隆抗体并研究其中和活性, 对 PRRSV 诊断和疫苗研究具有显著意义。

本试验以 PRRSV GDgz 株为模板^[7], 扩增其 ORF7 基因并构建重组表达质粒 pET-32a-N, 原核表

达并纯化重组 N 蛋白后免疫 Balb/c 小鼠, 制备鼠源多克隆抗体, 进行血清中和试验和间接免疫荧光检测, 旨在验证该多克隆抗体的反应原性和抗 PRRSV 中和活性, 以期 PRRSV N 蛋白的免疫学检测和该病的防控提供一定试验依据。

1 材料与方法

1. 1 病毒、细胞、菌株及质粒

PRRSV GDgz 株, 由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心分离和保存; Marc-145 细胞、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 感受态细胞, 购自北京博迈德基因技术有限公司; 原核表达载体 pET-32a, 购自 Invitrogen 公司。

1. 2 试验动物

6 周龄雌性 SPF 级 Balb/c 小鼠 10 只, 体重为 16 g/只, 购自南方医科大学实验动物中心。

1. 3 主要试剂

DNA/RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒, 均购自广州美基(欣研) 生物科技有限公司; PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit、DL-2 000 Marker、蛋白质 Marker、限制性内切酶 BamH I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶, 均购自宝日医生物技术(北京) 有限公司; EB 替代染料, 购自广州华奇盛生物科技有限公司; 胶回收试剂盒, 为 Promega 公司产品; 氨苄西林、IPTG、蛋

收稿日期: 2018-12-27; 修回日期: 2019-06-11

基金项目: 国家重点研发计划专项(2017YFD0502001); 广东省科技计划项目(2018A070701012)

作者简介: 马晓莉(1981—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为兽医实验动物学, maxl@scau.edu.cn.

* 通信作者: 徐 铮(1979—), 男, 兽医师, 硕士, 研究方向为动物健康养殖与安全生产, stonezen@scau.edu.cn.

白纯化试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;弗氏佐剂,为 Sigma 公司产品;DMEM、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG,购自 Invitrogen 公司;PRRSV N 蛋白单克隆抗体,购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

1.4 引物的设计与合成

参照 PRRSV GDgz 株基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对 ORF7 基因的特异性引物,引物序列为 ORF7-F 5'-AAAGGATCCATGCCAAATAA-CAACGGCAAG-3'(下划线部分为 BamH I 酶切位点)和 ORF7-R 5'-GCCAAGCTTTCATGCTGAGGGTGATG-C-3'(下划线部分为 Hind III 酶切位点),预计扩增片段长度为 390 bp,覆盖整个 ORF7 阅读框(372 bp),引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.5 ORF7 基因的 PCR 扩增

用 DNA/RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,以提取的病毒 RNA 为模板,利用 PrimeScript® One Step RT-PCR Kit 对目的片段进行扩增。PCR 扩增体系(总体积为 50 μ L): PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μ L, 2 \times 1 Step Buffer 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, RNA 模板 4 μ L, RNase Free ddH₂O 15 μ L。PCR 扩增程序: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.6 重组表达质粒的构建及双酶切鉴定

对原核表达载体 pET-32a 和胶回收产物在 37 $^{\circ}$ C 水浴环境中双酶切 3 h, 分别回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C、12 h 条件下将 ORF7 基因克隆至原核表达载体 pET-32a 上, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性菌落接种于含 Amp⁺ 的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 12 h, 抽提质粒, 双酶切鉴定后送苏州金唯智生物科技有限公司测序, 序列无误后命名为 pET-32a-N。

1.7 重组 N 蛋白诱导表达及纯化

将重组表达质粒 pET-32a-N 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 经 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养(Amp⁺) 过夜。待菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导培养 6 h, 同时设未诱导对照。诱导完成后, 取 1 mL 诱导表达后的菌液, 离心后弃上清液, 加入 PBS 重悬菌泥 40 μ L 及 1 \times 上样缓冲液 10 μ L 进行 SDS-PAGE 分析。

将阳性重组菌液按照 1:50 比例接种于含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中扩大培养, 至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导表达 6 h; 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 加入 30 mL 超声波细胞破碎液, 充

分重悬, 置冰浴中超声裂解; 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。根据蛋白纯化试剂盒说明书纯化蛋白质, 洗脱 8 次, 收集各次洗脱液, 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白质浓度。

1.8 多克隆抗体制备和检测

将纯化后的重组 N 蛋白稀释至浓度为 0.2 mg/mL, 按照 1:1 比例加入弗氏佐剂, 乳化后分别制成弗氏完全和不完全佐剂抗原, 按照 100 μ g/只的剂量经皮下多点注射免疫 6 周龄 Balb/c 小鼠 5 只, 同时设 PBS 对照(100 μ L/只)。首免使用弗氏完全佐剂抗原, 2 免和 3 免使用弗氏不完全佐剂抗原, 每次免疫间隔 14 d。免疫前 1 天、一免和二免后 14 天对小鼠进行断尾采血, 三免后 2 周对小鼠进行眼球采血, 恒温静置后离心收集血清。采用间接 ELISA 方法测定血清效价^[8], 以原核表达的纯化蛋白作为抗原(2 μ g/mL) 进行包被, 分别加入 4 次采集的小鼠血清, 同时以 PBS 对照组小鼠血清为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(按照 1:10 000 比例稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加入底物显色液 TMB 孵育 10 min(避光), 终止反应后用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

1.9 血清中和试验和间接免疫荧光检测

取已灭活血清, 在 96 孔微量细胞培养板上进行倍比稀释, 使其稀释度分别为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64(100 μ L/孔), 同时设 PBS 对照; 取 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存的病毒液(毒价为 1×10^5 TCID₅₀/mL), 500 倍稀释至浓度为 200 个 TCID₅₀/mL; 每孔加入 100 μ L 病毒液, 封好盖, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱内中和 1 h; 取出, 每孔加入 Mark-145 细胞悬液 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h; 取出培养板, 用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 每孔加入 4% 多聚甲醛 100 μ L 封闭固定 20 min; PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 50 μ L PRRSV N 蛋白单克隆抗体(按照 1:200 比例稀释) 作为一抗, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 1 h; PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 50 μ L FITC 标记的山羊抗鼠 IgG(按照 1:500 比例稀释) 作为二抗, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱中避光孵育 1 h; 用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 在荧光显微镜下观察结果。

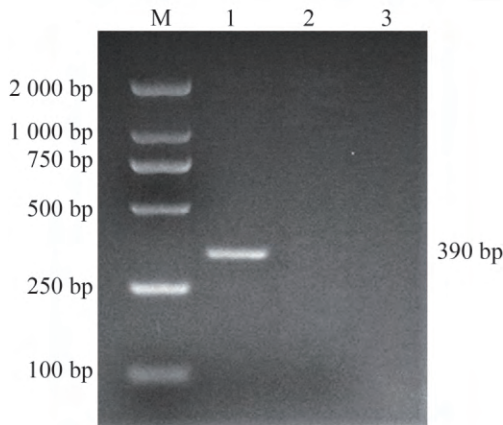
2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增

通过特异性引物扩增 ORF7 基因, 结果扩增出大小约为 390 bp 的条带(见图 1), 与目的基因大小一致。

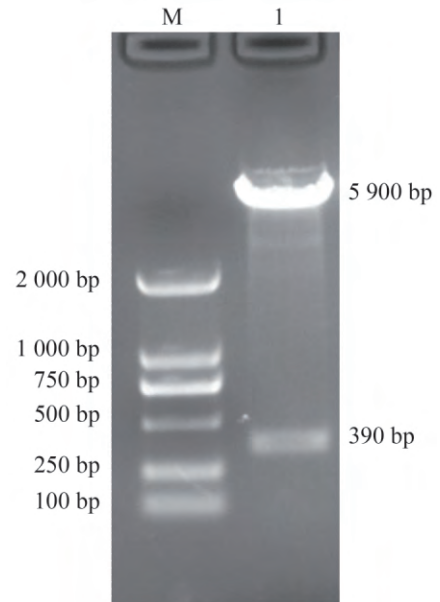
2.2 重组表达质粒的双酶切鉴定

用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切重组表达质粒, 结果得到约 390 bp 的目的基因条带和 5 900 bp 的载体条带(见图 2), 表明试验成功构建出重组表达质粒 pET-32a-N。



M.DL-2 000 Marker; 1.ORF7 基因 PCR 产物; 2 ,3.空白对照。

图 1 ORF7 基因 PCR 扩增结果



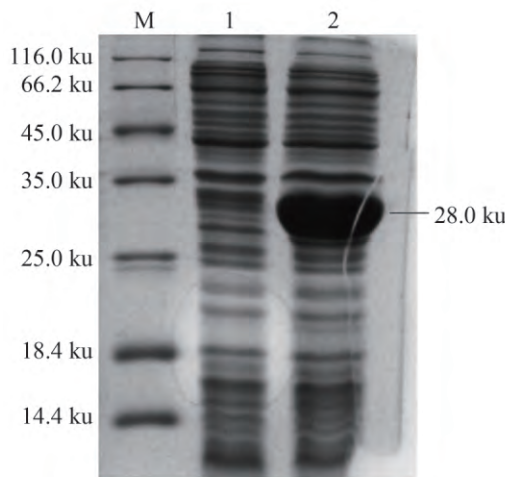
M.DL-2 000 Marker; 1.双酶切产物。

图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定结果

2.3 重组 N 蛋白表达鉴定及纯化

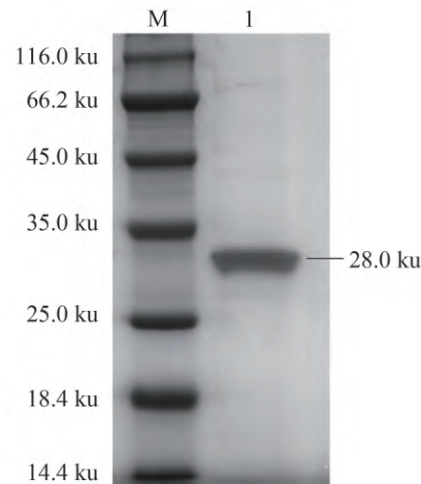
诱导表达的重组 N 蛋白经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 ,重组目的蛋白获得成功表达 ,分子质量约为 28.0 ku(见图 3A) ;纯化结果显示 ,仅在约 28.0 ku 处有一条条带(见图 3B) 。表明纯化效果较好 ,经测

定纯化蛋白质的浓度为 0.436 mg/mL。



M.蛋白质Marker;1.未经IPTG诱导的菌体蛋白; 2.IPTG诱导的菌体蛋白。

A 原核表达SDS-PAGE分析



M.蛋白质Marker;1.纯化的重组N蛋白。

B 重组蛋白纯化后结果

图 3 重组 N 蛋白表达鉴定及纯化结果

2.4 多克隆抗体检测

间接 ELISA 法检测发现 3 次免疫后 OD₄₅₀ 值逐渐变大 ,表明小鼠经免疫后抗体水平逐步上升 ,且与 PBS 对照组相比 OD₄₅₀ 值差异明显(见图 4) ,说明用重组 N 蛋白免疫小鼠后产生了较高效价的多克隆抗体 ,且能够特异性识别病毒 N 蛋白 ,具有良好反应原性。

2.5 血清中和试验和间接免疫荧光检测

将重组 N 蛋白多克隆抗体按照 1:2、1:4和 1:8 比例稀释 ,荧光数量与不加多克隆抗体的 PBS 对照组并无明显区别(见 181 彩页图 5) ,表明重组 N 蛋白多克隆抗体并无 PRRSV 中和活性 ,不能有效抑制

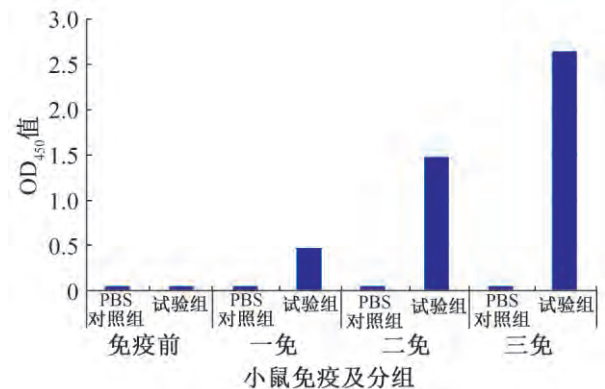


图 4 多克隆抗体间接 ELISA 法检测结果

PRRSV 的增殖。

3 讨论与结论

近年来 PRRSV 在我国大部分地区流行甚至暴发,使我国养猪业经济损失惨重,大量强制免疫的活疫苗涌入市场,使得弱毒疫苗有可能在选择压力作用下发生毒力返强^[9]。华南农业大学动物科学学院猪病研究室曾对 2016—2017 年采自广东省各地 906 份疑似病料进行分子检测,结果 PRRSV 核酸阳性率达到 44%,在高强度免疫状态下出现如此高的阳性率提示可能为疫苗株毒力返强。另外,弱毒疫苗株和野毒株在猪群中同时存在,使得毒株间重组的概率增加^[10-12]。因此,对 PRRSV 进行检测和防控技术的研究是很有必要的。

PRRSV ORF7 基因编码的 N 蛋白在感染细胞内表达水平最高,是该病毒的优势结构蛋白^[13]。N 蛋白含有多个抗原表位,其中含有对所有毒株都保守的表位^[14],其良好的反应原性和相对的保守性成为检测该病毒的重要抗原^[15-16]。

本研究参照 PRRSV GDgz 株基因序列,设计了针对 ORF7 基因的特异性引物,扩增了 ORF7 基因,并克隆至原核表达载体 pET-32a 上,构建重组表达质粒 pET-32a-N,原核表达并纯化重组 N 蛋白后免疫 Balb/c 小鼠,制备鼠源多克隆抗体,通过血清中和试验和间接免疫荧光检测,验证了该多克隆抗体不具备抗 PRRSV 中和活性,但能与全病毒发生特异性反应,为 PRRSV N 蛋白的免疫学检测和 PRRS 的防控提供了试验基础。

参考文献:

[1] VHAN K ,SEO H W ,PARK C , et al. Vaccination of sows against type 2 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) before artificial insemination protects against type 2 PRRSV challenge but does not protect against type 1 PRRSV challenge in late gestation[J]. *Vet Res* , 2014 ,45(1) : 1-11.

[2] FAN B ,ZHANG H ,BAI J , et al. Pathogenesis of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chinese Tibetan swine[J]. *Res Vet Sci* , 2016 ,108(10) : 33-37.

[3] PUJHARI S ,ZAKHARTCHOUK A N. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope (E) protein interacts with mitochondrial proteins and induces apoptosis [J]. *Arch Virol* , 2016 ,161(7) : 1821-1830.

[4] TANG Y D ,FANG Q Q ,LIU J T , et al. Open reading frames 1a and 1b of the Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

(PRRSV) collaboratively initiate viral minus-strand RNA synthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2016 ,477(4) : 927-931.

[5] VENITEO A ,REBOLLO B ,SARRASECA J , et al. A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of european Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. *J Virol Methods* , 2012 , 181(1) : 109-113.

[6] OLASZ F ,DENES B ,BALINT A , et al. Immunological and biochemical characterisation of 7ap , a short protein translated from an alternative frame of ORF7 of PRRSV [J]. *Acta Vet Hung* , 2016 ,64(2) : 273-287.

[7] 于林洋 ,董建国 ,张乐宜 ,等. 猪繁殖与呼吸系统综合征病毒华南株 GDgz 的分离鉴定及遗传进化分析 [J]. *广东农业科学* , 2017 ,44(4) : 138-145.

[8] 程福亮 ,李复辉 ,刘洋庆 ,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒重组 N 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立及应用 [J]. *中国畜牧兽医* , 2016 ,43(11) : 2900-2906.

[9] JIANG Y F ,XIA T Q ,ZHOU Y J , et al. Characterization of three Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain [J]. *Vet Microbiol* , 2015 ,179(3/4) : 242-249.

[10] SHI M ,HOLMES E C ,BRAR M S , et al. Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China [J]. *J Virol* , 2013 , 87(19) : 10904-10907.

[11] XIAO Y ,WU W ,GAO J , et al. Characterization of the interactome of the Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) NSP2 protein reveals the hyper variable region as a binding platform for association with 14-3-3 proteins [J]. *J Proteome Res* , 2016 ,15(5) : 1388-1401.

[12] ZHANG Q ,XU X ,YOU S , et al. Emerging of two new subgenotypes of Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in Southeast China [J]. *Microb Pathog* , 2016 , 97: 27-33.

[13] WOOTTON S K ,YOO D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages [J]. *J Virol* , 2003 , 77(8) : 4546-4557.

[14] TAHARA S M. Coronavirus transnational regulation: leader affects mRNA efficiency [J]. *Virology* , 1994 , 202(2) : 621-630.

[15] SEUBERLICH T ,TRATSCHIN J D ,THÜR B , et al. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Clin Diagn Lab Immunol* , 2002 , 9(6) : 1183-1191.

[16] 王亚 ,平李鹏 ,任鹏举 ,等. 猪繁殖与呼吸综合征新型疫苗的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医* , 2018(21) : 49-52.

(下转第 85 页)



参考文献:

- [1] 沈志强, 谢金文, 王金良, 等. CSFV 强毒与弱毒鉴别检测方法的研究进展[J]. 养猪, 2015, 44(1): 97-101.
- [2] STARK R, RUMENAPF T, MEYERS G, et al. Genomic localization of Hog cholera virus glycoproteins[J]. Virology, 1990, 174(1): 286-289.
- [3] 朱俊灵, 叶佐东, 邓洁汝, 等. CSFV 病毒 RT-LAMP-LFD 检测方法的建立与应用[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(1): 1-7.
- [4] 栾培贤, 肖建华, 王洪斌. 猪瘟防控技术的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(07上): 50-53.
- [5] CANNAL C W, HOTZEL I, ALMEIDA L L, et al. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR) [J]. Vet Microbiol, 1996, 48(3/4): 373-379.
- [6] 张改平, 何文博, 王德国, 等. CSFV 强毒株与兔化弱毒疫苗株的 LAMP 鉴别检测[J]. 郑州大学学报(理学版), 2014, 46(3): 85-90.
- [7] 陈本龙, 张立怀, 王建华, 等. 鉴别猪瘟病毒强毒和疫苗弱毒的 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(11): 71-74.
- [8] 李晶梅, 刘丹, 薛霜, 等. CSFV 病毒和牛病毒性腹泻病毒双重 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2014, 35(4): 66-71.
- [9] 邓显文, 谢芝勋, 谢志勤, 等. RT-LAMP 可视化检测猪瘟病毒及特异性鉴别猪瘟兔化弱毒疫苗[J]. 南方农业学报, 2015, 46(2): 338-343.
- [10] 王晓波, 李丽敏, 袁万哲, 等. 猪瘟病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性/经典毒株多重 RT-PCR 方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(5): 675-679, 691.
- [11] 周婷婷, 刘伟, 贾松涛, 等. 河南某地区 4 个规模化猪场猪瘟免疫抗体检测及免疫程序制订[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(02下): 139-140.
- [12] 唐景峰, 周康平, 韩振伟, 等. 猪瘟病毒荧光定量 RT-PCR 和 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2014, 35(3): 1-5.
- [13] 王娟萍, 孟帆, 姚敬明, 等. 种猪场 CSFV 净化试验[J]. 山西农业科学, 2016, 44(4): 524-527.
- [14] 元文宝, 张桂红, 伍少钦, 等. CSFV 净化技术与应用[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(10): 58-61.
- [15] 刘芳生. 规模化猪场 CSFV 净化方案的思考与探究[J]. 湖北畜牧兽医, 2015, 36(5): 37-38.
- [16] 冷依伊, 任梅滢, 蒙正群, 等. 5 种猪病毒性传染病病原的多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(2): 123-126.
- [17] 陆继爽, 格日勒图. 非洲 CSFV 流行病学研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3377-3382.

(011)

(上接第 81 页)

Preparation and neutralizing activity of N protein polyclonal antibodies of PRRSV

MA Xiaoli¹, SHU Huiyou², ZHENG Enqin¹, XIA Zhaolun¹, YU Wenlan¹,
XIE Shumin¹, LIU Yonglun¹, XU Zheng^{1*}

(1. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry and College of Animal Science and Laboratory Animal Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangzhou Guanglilai Biotechnology Co., Ltd, Guangzhou 510080, China)

Abstract: In order to prepare and study the neutralization activity of N protein polyclonal antibody of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The ORF7 gene of PRRSV was amplified by RT-PCR method, and cloned into the pET-32a vector as recombinant expression plasmid pET-32a-N. The recombinant N protein was expressed in *Escherichia coli*, and purified recombinant protein was made into the Freund's adjuvant antigen. The polyclonal antibody was obtained by injecting the Freund's adjuvant antigen subcutaneous multi-point immune for 3 times in Balb/c mice. Serum antibody titer was detected by indirect ELISA, and the neutralizing activity of polyclonal antibody was verified by serum neutralization test and indirect immunofluorescence assay (IFA). The results showed that the 390 bp ORF7 gene fragment size was successfully amplified and recombinant expression plasmid pET-32a-N was successfully constructed. The relative molecular weight of recombinant N protein was about 28.0 ku. The antibody titer of polyclonal antibody was good. N protein polyclonal antibody was 2-8 times diluted, and the number of fluorescence had no significant difference compare with PBS control group. Conclusions: The PRRSV recombinant N protein was successfully expressed in *Escherichia coli*, and the prepared rat source polyclonal antibodies could have specific reaction with N protein, while that did not have anti-PRRSV neutralizing activity.

Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; recombinant N protein; prokaryotic expression; Freund's adjuvant; polyclonal antibody; neutralizing activity

(011)

· 兽医科学 ·

猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究

(作者马晓莉等,正文见第 78-81,85,181 页)

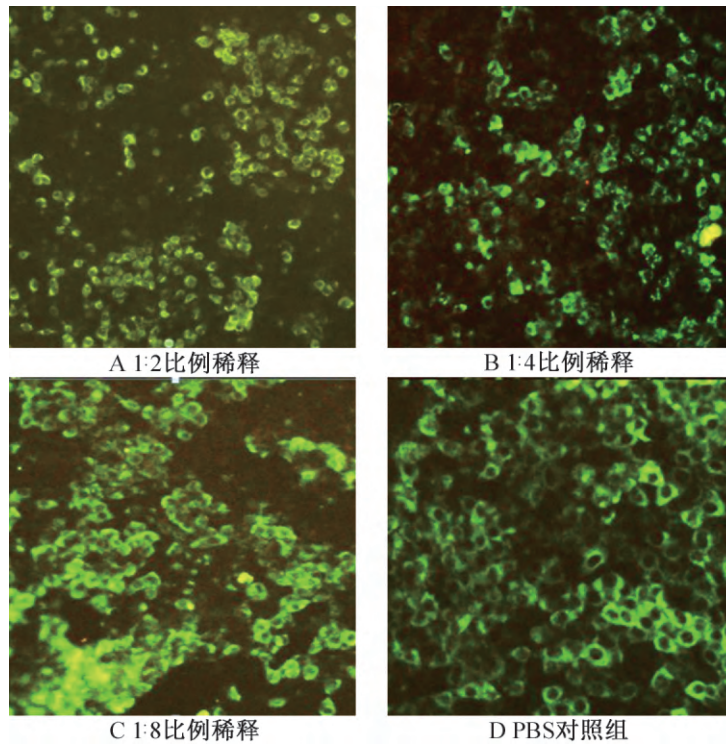


图 5 间接免疫荧光试验结果(40 μm)

· 兽医科学 ·

李斯特杆菌感染山羊实质器官和中枢神经系统器官病理变化

(作者伍钢等,正文见第 90-92,181-182 页)



图 1 病羊主要实质器官和中枢神经系统主要器官宏观病变



绿色印刷产品



微信平台



QQ群

125

ISSN 1004-7034



9 771004 703198



· 全国中文核心期刊 · 国家首批A类学术期刊
· RCCSE中国学术期刊 (A-) · 国际著名检索系统《化学文摘》(美国)刊源

ISSN 1004-7034

CN 23-1205/S

黑龙江畜牧兽医

HEILONGJIANG ANIMAL SCIENCE
AND VETERINARY MEDICINE

主管：黑龙江省畜牧兽医局
主办：黑龙江畜牧兽医杂志社

11

2018
半月刊



黑龙江畜牧兽医

(2018年第11期 总第551期)

目次

专题报道

- 猪圆环病毒2型疫苗的研究进展 张爱琼,梁海英,曾智勇,汤德元,王彬,黄涛,徐国,叶百川,咸文,何小莉(1)
- 猪圆环病毒2型疫苗的功效及前景分析 刘东旭,李虹瑾,李国江,尹柏双,沙万里,付连军,牛伟(7)
- 猪圆环病毒2型 ORF2 基因在 Vero 细胞中真核表达的研究 马晓莉,林彦星,董建国,刘燕玲,刘清神,宋长绪,徐铮(12)
- PCV-2 GZ-BJJS2015 株感染性克隆质粒的构建 咸文,梁海英,曾智勇,王彬,刘钊,徐国,叶百川,张爱琼,何小莉(16)
- 豫北猪圆环病毒2型的分离及全基因组序列分析 连凯琪,周玲玲,张明亮,宋玉伟,张慢,王英杰(20)
- 猪圆环病毒2型河北株全基因组序列分析 芮萍,田瑞,郝建香,刘玄福,王秋悦,刘谢荣,潘朔楠,辛树阳,张守聪,马增军(23)
- 猪圆环病毒2型在猪气管上皮细胞中的增殖研究 汤智慧,王翠华,郭抗抗(26)
- 广东省某猪场 CSF、PR、PCV-2、PRRS 等6种病毒性疾病抗体水平的检测与分析 廖洁丹,甘佩婷,王基胜,彭宇欣,刘明杰,涂常松,黄良宗,顾万军(30)

试验研究

- 水貂源伪狂犬病毒 DL14/08 株的分离鉴定及生物学特性研究 李欣彤,刘昊,张蕾,朱言柱,张永国,闫喜军(33)
- 伪狂犬病毒被膜蛋白 VP22 单克隆抗体的制备及免疫电镜方法的建立 刘慧敏,陈利红,史智宾,刘春国,仇铮,王靖飞(37)
- 育肥猪舍内空气污染物排放规律研究 蒲施桦,龙定彪,黄开佩,刘作华,杨飞云,李爽(41)
- 妊娠母猪后肢运动能力与品种、产次、瞳孔强直时间相关性的研究 吕芳璐,邹洪波,尹国安,李想(48)
- 蔗糖密度梯度离心技术纯化山羊痘病毒的研究 高顺平,吴国华,颜新敏,赵志荀,张强(52)
- 拉萨河中游高寒草地植被群落光谱特征的研究 李伟娟,方江平,周尧治(55)
- 不同饲喂模式对绵羊营养物质表观消化率及血液生化指标的影响 于忠升,张爱忠,姜宁(59)

专论与综述

- 山羊产羔性状相关基因研究进展 邹辉,崔悦悦,夏琴,程晓芳,吴廷军,张名媛,廖顺连,韦英明,蒋钦杨(63)
- 母羊多胎基因研究进展 吴翠玲,赵卓,赵云辉,翟博,宗兴龙,张明新,王春昕(68)
- 微生物菌剂处理畜禽养殖场含氨和硫化氢气体技术进展 刘建伟,段粹,刘越(72)
- 骨髓间充质干细胞的诱导分化研究进展 周刘涛,朱雪敏(76)
- 有害气体对畜禽健康的影响及防控措施研究进展 朱伟,郑琛,杨华明,班志彬,梁浩,闫晓刚(79)
- 牛肌内脂肪沉积相关 miRNA 研究进展 邵静,夏广军(84)
- 奶牛性控精液技术研究进展 许晓玲,白佳桦,冯涛,肖霖力,宋玉清,肖银霞,刘彦(88)
- 谷氨酰胺对动物免疫应激的影响 王樱洁,张忠远(91)
- 酪氨酸酶对乌骨鸡黑色素合成影响的研究进展 刘青,江彦,何资颖,王璋铤(93)

畜牧科学

- 不同贮藏温度对热鲜肉食用品质变化的影响 黄彩燕,董超,刘晶晶,张松山,韩玲,余群力,孙宝忠,杨食堂,李海鹏,谢鹏(96)
- 中药负离子功能制剂对猪肉食用品质和氨基酸含量的影响 乔鹏飞,王传龙,王震,韩东魁,张敏(99)
- 蔗糖不同添加量对调理驴肉卷冷冻贮藏品质的影响 王维婷,王东亮,柳尧波,胡鹏,汝医,李东阳,王守经(103)
- 不同品种猪不同泌乳期母乳外核体中 miR-30a 和 miR-30d 的差异表达研究 梁艳,顾以韧,杨雪梅,陶璇,钟志君,杨跃奎,曾凯,陈晓晖,吕学斌(106)

[期刊基本参数]CN 23-1205/S * 1958 * s * A₄ * 259 * zh * P * ¥40.00 * 2650 * 68 * 2018-11



猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在 Vero 细胞中 真核表达的研究

马晓莉¹ 林彦星² 董建国³ 刘燕玲³ 刘清神³ 宋长绪^{3*} 徐 铮^{3*}

(1. 华南农业大学 实验动物中心, 广州 510642; 2. 深圳出入境检验检疫局 动植物检验检疫技术中心, 深圳 518045; 3. 华南农业大学 国家生猪种业工程技术研究中心/动物科学学院, 广州 510642)

中图分类号: S852.65⁺9.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2018)11-0012-06

摘要: 为了研究猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV-2) ORF2 基因在 Vero 细胞中的表达情况, 试验利用 PCR 方法将扩增的 PCV-2 ORF2 基因片段克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+) 上, 构建重组表达质粒 pcDNA-ORF2, 测序后对 4 株毒株的 ORF2 基因进行核苷酸序列和推导氨基酸序列同源性比较分析, 并分别采用磷酸钙法和脂质体法将重组表达质粒 pcDNA-ORF2 导入哺乳动物 Vero 细胞内, 通过间接免疫荧光试验验证重组表达质粒在 Vero 细胞中的表达情况。结果表明: PCR 方法成功扩增出 4 株 PCV-2 毒株的 ORF2 基因; 成功构建出重组表达质粒 pcDNA-ORF2; 4 株毒株的 ORF2 基因核苷酸序列同源性在 98.6%~99.1% 之间, 推导氨基酸序列的同源性在 97.4%~98.7% 之间; 间接免疫荧光试验检测到 Vero 细胞内发出绿色荧光。说明重组表达质粒 pcDNA-ORF2 在 Vero 细胞中得到了正确表达。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; ORF2 基因; Vero 细胞; 真核表达载体; 重组表达质粒; 间接免疫荧光试验

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV) 属于圆环病毒科, 是迄今发现的一种最小的动物病毒之一^[1], 直径仅为 17 nm, 是无囊膜、二十面体对称、共价闭环环状单股 DNA 病毒^[2]。猪圆环病毒 2 型(PCV-2) 的流行已呈世界性分布, 全世界养猪业因 PCV-2 造成的经济损失不可估量^[3-5]。PCV-2 基因组为一条长约 1 768 bp 的单股 DNA^[6], 含有 2 个主要的开放阅读框^[7], 其中 ORF2 基因编码病毒的衣壳蛋白, 是主要的结构蛋白, 具有良好的免疫原性^[8-12]。

常用大肠杆菌表达 ORF2 基因的原核表达系统, 其优点是操作简单, 成本低廉, 表达量相对较高, 表达产物相对稳定。但是真核基因 mRNA 分子结构同细

菌之间存在较大差异, 大肠杆菌细胞中没有真核 RNA 加工剪切的酶催化体系, 表达蛋白不能进行翻译后加工修饰, 因而常常不具有天然活性。而真核表达蛋白能进行翻译后加工, 因此常具有天然活性, 更接近天然蛋白。针对此情况, 本试验构建了 PCV-2 ORF2 基因的重组表达质粒, 转染至哺乳动物 Vero 细胞中进行表达, 旨在为建立 ELISA 诊断及开发诊断试剂盒奠定基础。

1 材料

1.1 病毒

ZS、GZ、LB、CZ 株 4 株 PCV-2 毒株, 由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心分离、鉴定并保存。

1.2 质粒和酶

pcDNA3.1(+) 表达载体, Invitrogen 公司产品; T4 DNA 连接酶, Promega 公司产品; 限制性内切酶 Hind III 和 EcoR V, TaKaRa 公司产品。

1.3 细胞和抗体

Vero 细胞, 由广东省疾病预防控制中心保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、PCV-2 阳性血清, 由华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心保存; 羊抗猪 FITC 标记抗体, 购自 KPL 公司。

1.4 主要试剂

细胞基础培养基(Dmem), 购自 GIBCO 公司; 小

收稿日期: 2017-11-02; 修回日期: 2017-11-15

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2015BAD12B02-5); 现代农业产业共性技术创新团队项目(2016LM2150); 前沿与关键技术创新项目(2015B020230004); 广东省省级科技计划项目(2016A020212021); 广州市科技计划项目(201508020062)

作者简介: 马晓莉(1981—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为兽医实验动物学, maxl@scau.edu.cn

* 通信作者: 宋长绪(1965—), 男, 研究员, 博士, 博士生导师, 研究方向为动物传染病学, cxsong@scau.edu.cn; 徐 铮(1979—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为动物传染病学, stonezen@scau.edu.cn.



牛血清, 购自哈尔滨江海生物工程有限公司; 脂质体 2000, 购自 Invitrogen 公司; DNA 胶回收试剂盒, 购自杭州维特洁生物技术公司。

1.5 主要仪器

24 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司产品; CO₂ 培养箱, Thermo Fisher Scientific 公司产品; 荧光显微镜, 德国徕卡公司产品。

2 方法

2.1 ORF2 基因的 PCR 扩增和产物回收

参照 GenBank 中已发表的 PCV-2 ORF2 基因序列, 选取保守片段, 设计 1 对引物 P1 和 P2, 序列为 P1 5'-CCAAGCTTATGACGTATCCAAGGAGGC-3' (下画线部分为 Hind III 酶切位点) 和 P2 5'-CCGATATCTCAAGGGTTAAGTGGG-3' (下画线部分为 EcoR V 酶切位点), 扩增片段大小为 718 bp, 覆盖完整 ORF2 基因序列, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成并经 PAGE 电泳纯化, 浓度为 25 μmol/L。以 ZS、GZ、CZ 和 LB 4 株毒株为样品, 以细胞中抽提的病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系 (总体积为 25 μL): 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol) 2.0 μL, P1 (25 μmol/L) 0.5 μL, P2 (25 μmol/L) 0.5 μL, 模板 0.5 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 加无菌双蒸水至 25 μL。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 53℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 再延伸 5 min。同时设不加模板的空白对照。反应结束后, 取 3 μL PCR 产物用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检测合格后参照 DNA 胶回收试剂盒说明书回收目的条带。

2.2 重组表达质粒的鉴定

2.2.1 PCR 产物和 pcDNA3.1(+) 表达载体的双酶切反应 PCR 产物的 Hind III/EcoR V 双酶切反应体系: 10×Buffer 8 μL, PCR 产物 20 μL, Hind III 2 μL, EcoR V 2 μL, 加无菌三蒸水至 80 μL。将上述各组分混匀后分装入 4 支 0.5 mL Eppendorf 管中, 37℃ 水浴作用 4 h。

pcDNA3.1(+) 表达载体的 Hind III/EcoR V 双酶切反应体系: 10×Buffer 4 μL, pcDNA3.1(+) 表达载体 10 μL, Hind III 1 μL, EcoR V 1 μL, 加无菌三蒸水至 40 μL。将上述各组分轻轻混匀后分装入 2 支 0.5 mL Eppendorf 管中, 37℃ 水浴作用 4 h。

2.2.2 酶切产物的纯化和回收 参照 DNA 胶回收试剂盒说明书进行。取 PCR 纯化酶切产物和 pcDNA3.1(+) 表达载体双酶切产物, 分别用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带。

2.2.3 ORF2 基因与 pcDNA3.1(+) 表达载体的连接 各取少量回收产物进行琼脂糖凝胶电泳, 估计两者浓度比, 连接体系中 ORF2 基因片段与 pcDNA3.1

(+) 表达载体的克分子数之比约为 4:1。连接体系: 10×Buffer 1 250 μL, pcDNA3.1(+) 表达载体酶切产物 2 μL, ORF2 酶切产物 4 μL, T4 DNA 连接酶 0.5 μL, 加无菌三蒸水至 10 μL。将以上各组分轻轻混匀, 16℃ 连接过夜。

2.2.4 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞 从 -70℃ 冰箱中取出大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 立即手搓溶解, 加入 10 μL 连接产物, 混匀, 冰浴 30 min; 42℃ 热应激 90 s; 冰浴 2 min; 加入 37℃ 预热的新鲜 LB 液体培养基 800 μL, 37℃、150 r/min 连续培养 45~60 min; 12 000 r/min 离心 30 s; 弃大部分上清液, 向剩余的 80 μL 重悬菌泥中加入 X-gal (20 mg/mL) 40 μL, IPTG (200 mg/mL) 4 μL, 混匀后涂布于含 Amp (50 μg/mL) 的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养 12~16 h。

2.2.5 重组表达质粒 DNA 的提取 用 SDS 碱裂解法提取重组质粒 DNA。从含 Amp 的 LB 固体培养基上挑取白色单个菌落, 接种于 3 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃、150 r/min 摇动培养过夜; 冰浴 10 min; 6 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 加入预冷的 Solution I 100 μL、新配制的 Solution II 200 μL, 缓慢混匀, 冰浴 5 min; 加入预冷的 Solution III 150 μL, 缓慢混匀, 冰浴 5 min; 12 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液至另一支 Eppendorf 管中, 加入等体积的 Tris-Cl 饱和酚-氯仿-异戊醇 (体积比为 25:24:1), 12 000 r/min 离心 5 min; 吸取上清液加入等量的氯仿-异戊醇 (体积比为 24:1), 12 000 r/min 离心 5 min; 吸取上清液, 加入 2 倍体积以上的无水乙醇, -20℃ 作用 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇漂洗 2 次, 用适量含 RNA 酶 (20 μg/mL) 的 TE (pH 值为 8.0) 缓冲液溶解质粒 DNA。

2.2.6 重组表达质粒的 PCR 鉴定 以提取的重组表达质粒为模板进行 PCR 扩增, 同时设不加模板的空白对照。反应结束后, 取 3 μL PCR 产物用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.7 重组表达质粒的双酶切鉴定 用 Hind III 和 EcoR V 对重组表达质粒进行双酶切。双酶切鉴定体系: 10×Buffer 2 μL, 重组表达质粒 3 μL, Hind III 0.5 μL, EcoR V 0.5 μL, 加无菌三蒸水至 20 μL。将以上各组分轻轻混匀, 37℃ 水浴 4 h, 取酶切产物 5 μL 用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 ORF2 基因序列的测定和分析

将经 PCR 扩增和酶切鉴定正确的阳性重组表达质粒 (命名为 pcDNA-ORF2) 送上海博亚生物技术有限公司测序。每个插入片段从正反两个方向测通后, 相互验证无误, 且覆盖完整阅读框 (ORF2), 才确定为目的基因序列。对测定的 4 株毒株的 ORF2 基因片段



应用 DNASTar 分析软件进行核苷酸序列同源性分析, 并对其推导的氨基酸序列进行同源性比较分析。

2.4 重组表达质粒在 Vero 细胞中的表达与鉴定

2.4.1 转染用 Vero 细胞的准备 转染前的第 1 天, 将形态正常且已长成单层的 Vero 细胞用胰酶-EDTA 消化液从细胞瓶壁上消化下来, 用含小牛血清的 DMEM 培养液调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL; 将调整好浓度的 Vero 细胞接种至 24 孔细胞培养板中, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

2.4.2 磷酸钙法转染重组表达质粒 pcDNA-ORF2 设空载体 pcDNA3.1(+) 为对照。用不含小牛血清的 DMEM 培养液洗涤 Vero 细胞 3 次, 将 pcDNA-ORF2 DNA 用 $0.1 \times \text{TE}$ (pH 值后 8.0) 稀释成 $40 \mu\text{g/mL}$, 加入 HBS 溶液 $85 \mu\text{L}$ 小心混匀; 缓慢加入 CaCl_2 (2 mol/L) $12 \mu\text{L}$ 室温条件下作用 20~30 min; 将上述混合物逐滴加到 Vero 细胞表面, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4~5 h; 弃去混合物的营养液, 加入含 10% 小牛血清的生长液, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养; 待 Vero 细胞长满单层后, 将生长液换成含 2% 小牛血清的维持液, 培养 48 h 后进行间接免疫荧光检测。

2.4.3 脂质体法转染重组表达质粒 pcDNA-ORF2 设空载体 pcDNA3.1(+) 为对照。转染前将细胞培养液换成不含小牛血清的 DMEM。在 1.5 mL 无菌离心管中制备质粒-脂质体复合物: 用不含小牛血清的 DMEM 将 $0.8 \mu\text{g}$ pcDNA-ORF2 DNA 稀释至 $50 \mu\text{L}$; 将 $2.0 \mu\text{L}$ 脂质体 2000 加到 $50 \mu\text{L}$ 不含小牛血清的 DMEM 中; 将二者在 5 min 内混合, 室温条件下静置 15~20 min。将质粒-脂质体复合物用 $50 \mu\text{L}$ 不含小牛血清的 DMEM 稀释, 混匀, 逐滴加到弃去旧培养液的细胞培养板中, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4~6 h; 弃去质粒-脂质体复合物, 加入含 10% 小牛血清的生长液, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞长成单层; 将生长液换成含 2% 小牛血清的维持液, 培养 48 h 后进行间接免疫荧光检测。

2.4.4 表达产物的间接免疫荧光鉴定 滴加稀释的 PCV-2 阳性血清(1:50 和 1:100) 37°C 孵育 90 min; PBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min; 加入按照 1:100 比例稀释的羊抗猪 FITC 标记抗体, 37°C 孵育 90 min; PBST 溶液洗涤 5 次, 每次 5 min; 弃去 PBST 溶液, 用甘油-磷酸(体积比为 9:1) 封底, 荧光显微镜下观察。

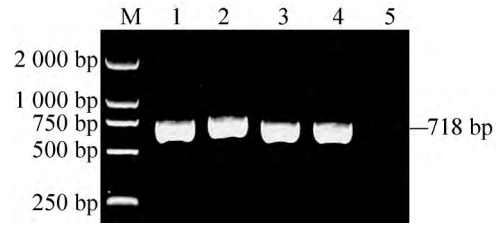
3 结果与分析

3.1 ORF2 基因的 PCR 扩增

经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳, 在 718 bp 处出现一条特异性条带, 其大小与预期目的条带相符, 结果见图 1。

3.2 重组表达质粒的鉴定

3.2.1 重组表达质粒的 PCR 鉴定 以提取的重组表达质粒为模板对 ORF2 基因进行 PCR 扩增, 扩增



M.DL-2 000 Marker; 1.ZS 株 ORF2 基因 PCR 产物; 2.GZ 株 ORF2 基因 PCR 产物; 3.LB 株 ORF2 基因 PCR 产物; 4.CZ 株 ORF2 基因 PCR 产物; 5.空白对照。

图 1 ORF2 基因 PCR 扩增结果

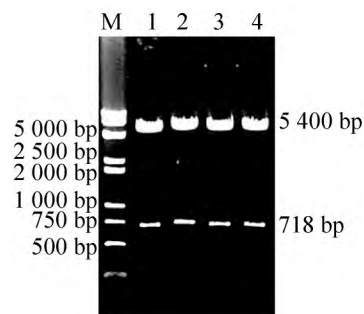
产物用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳, 结果在 718 bp 处出现特异性条带, 与预期目的条带相符, 结果见图 2。



M.DL-2 000 Marker; 1.ZS 株重组表达质粒 PCR 产物; 2.GZ 株重组表达质粒 PCR 产物; 3.LB 株重组表达质粒 PCR 产物; 4.CZ 株重组表达质粒 PCR 产物; 5.空白对照。

图 2 重组表达质粒 pcDNA-ORF2 的 PCR 鉴定结果

3.2.2 重组表达质粒的双酶切鉴定 将经 PCR 鉴定正确的阳性重组表达质粒用 Hind III 和 EcoR V 进行双酶切, 结果分别得到一条大小为 718 bp 的条带(与 ORF2 基因相符)和 5 400 bp 左右的条带[与 pcDNA3.1(+) 表达载体相符], 与预期结果一致, 见图 3。以上结果说明 ORF2 基因已被成功克隆到表达载体 pcDNA3.1(+) 上。



M.DL-5 000 Marker; 1.ZS 株重组表达质粒双酶切产物; 2.GZ 株重组表达质粒双酶切产物; 3.LB 株重组表达质粒双酶切产物; 4.CZ 株重组表达质粒双酶切产物。

图 3 重组表达质粒 pcDNA-ORF2 的双酶切鉴定结果

3.3 ORF2 基因序列的测定和分析

经测序 4 株毒株的 ORF2 基因大小均为 702 bp, 与预期结果一致。经 DNASTar 软件分析 4 株毒株的 ORF2 基因核苷酸序列同源性在 98.6%~99.1% 之间, 其中 ZS 株和其他 3 株毒株的 ORF2 基因核苷酸

序列同源性都在 99.0% 以上,而 GZ-ORF2 与 LB-ORF2 间核苷酸序列同源性最低,为 98.6%。4 株毒株的 ORF2 基因核苷酸序列同源性差异 $\leq 1.4\%$,结果见图 4。推导氨基酸序列的同源性在 97.4%~98.7% 之间,氨基酸同源性差异 $\leq 2.6\%$,结果见图 5。

		同源性/%				
		1	2	3	4	
差异性/%	1	■	99.0	99.1	99.1	1
	2	1.0	■	98.6	98.9	2
	3	0.9	1.4	■	98.9	3
	4	0.9	1.1	1.1	■	4
		1	2	3	4	■

图 4 ORF2 基因核苷酸序列同源性比较结果

		同源性/%				
		1	2	3	4	
差异性/%	1	■	98.7	97.9	98.3	1
	2	1.3	■	97.4	97.9	2
	3	2.2	2.6	■	97.9	3
	4	1.7	2.2	2.2	■	4
		1	2	3	4	■

图 5 ORF2 基因推导氨基酸序列同源性比较结果

3.4 表达产物的间接免疫荧光鉴定

3.4.1 磷酸钙法转染的重组表达质粒免疫荧光鉴定
构建的 4 个重组表达质粒同源性较高,试验选取 ZS 株的重组表达质粒转染 Vero 细胞,采用间接免疫荧光反应检测转染的 Vero 细胞,荧光显微镜下观察可见转染的 Vero 细胞发绿色荧光,空载体对照没有出现荧光,说明利用磷酸钙法介导转染重组表达质粒 pcDNA-ORF2 使 ORF2 基因在 Vero 细胞中成功获得表达,见 250 页彩图 6。

3.4.2 脂质体法转染的重组表达质粒免疫荧光鉴定
构建的 4 个重组表达质粒同源性较高,试验选取 ZS 株的重组表达质粒转染 Vero 细胞,采用间接免疫荧光反应检测转染的 Vero 细胞,荧光显微镜下观察可见转染的 Vero 细胞发绿色荧光,空载体对照没有出现荧光,说明利用脂质体法转染重组表达质粒 pcDNA-ORF2 使 ORF2 基因在 Vero 细胞中成功获得表达,见 250 页彩图 7。

4 讨论

对 ORF2 基因核苷酸序列及推导氨基酸序列的同源性比较分析可知:4 株 PCV-2 毒株的 ORF2 核苷酸序列同源性较高,在 98.6%~99.1% 之间,核苷酸序列同源性差异仅 $\leq 1.4\%$ 核苷酸序列比较保守;推导的氨基酸序列同源性也在 97.4%~98.7% 之间。

本试验采用磷酸钙法和脂质体法转染重组表达质粒。采用磷酸钙法转染时转染了多次,但是转染效率较差,只有一次转染成功。其原因可能是影响磷酸

钙转染效率的因素较多:DNA-磷酸钙共沉淀物中 DNA 的数量、共沉淀物与细胞的接触时间、DNA 的纯度和质量、HEPES 缓冲液的 pH 值及转染时的细胞状态等。在实际操作过程中,这些因素较难控制,同时要求操作者的技术熟练。采用脂质体法进行转染,只转染一次 ORF2 基因就获得了表达,与磷酸钙法比较转染效率大大提高。同时还发现,磷酸钙法转染时,常常在转染的第 2~3 天出现细胞变圆、脱落死亡的现象;而用脂质体法转染时,整个转染过程基本看不到细胞脱落死亡的现象,这说明脂质体法转染对细胞的毒性可能要比磷酸钙法小。

间接免疫荧光检测法快速、敏感,简单易行。本试验结果表明,表达产物在荧光显微镜下发出绿色荧光,ORF2 基因在 Vero 细胞中获得了表达,与免疫印迹法比较,间接免疫荧光法更易检测到真核表达产物。

本试验旨在探索重组表达质粒 pcDNA-ORF2 能否在哺乳动物细胞中表达,以及检测 ORF2 基因编码蛋白的免疫原性,因此在转染时选用了瞬时转染。瞬时转染所需时间短,可以快速检测目的基因的表达。同时还发现,瞬时转染时表达的产物非常有限,要想获得大量的表达产物,还需要建立 ELISA 方法及研制诊断试剂盒等进行稳定转染。稳定转染可使目的基因整合到宿主细胞染色体 DNA 中,获得稳定表达目的蛋白的细胞系,且随着细胞的生长、繁殖而稳定合成目的蛋白。对筛选的细胞系批量化培养和繁殖就可以获得大量目的表达蛋白,有利于工业化操作。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] TISCHER I, GELDERBLUM H, VETTERMANN W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. Nature, 1982, 295(5844): 64-66.
- [3] BEACH N M, MENG X J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against Porcine circovirus type 2 (PCV-2) [J]. Virus Res, 2012, 164(1/2): 33-42.
- [4] ALARCON P, RUSHTON J, WIELAND B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and Porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - An economic disease model [J]. Prev Vet Med 2013, 110(2): 88-102.
- [5] 曹东阳, 王小敏, 钱爱东, 等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型 (PCV-2) 分子流行病学调查 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390-398.
- [6] SEGALÉS J, KEKARAINEN T, CORTEY M. The natural history of Porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease [J]. Vet Microbiol, 2013, 165(1/2): 13-20.
- [7] 杨克礼, 时代, 段正赢, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 基因的克隆与原核表达 [J]. 江西农业学报, 2017, 29(1): 96-101.
- [8] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of Porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. J Gen Virol, 2000, 81(9): 2281-2287.

(下转第 19 页)



绿色印刷产品



微信平台



QQ群

ISSN 1004-7034



9 771004 703181



主管：中华人民共和国农业农村部

主办：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所



ISSN 1671-6027

畜牧兽医 科技信息

2019 09

本期导读

美姑岩鹰鸡品种资源的保护及利用 ●

奶牛场主要动物疫病的净化 ●

美国警用幼犬社会化培养、环境锻炼及专项能力培训模式概述 ●

中药“新温康”防控非洲猪瘟的效果 ●

狂犬病认知现状调查分析与防控对策 ●

2016~2018年常州市金坛区猪伪狂犬病血清流行病学调查 ●

浅析勐腊镇农业面源污染治理现状、问题及建议 ●

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址：黑龙江省哈尔滨市香坊区哈平路678号 邮编：150069

ISSN 1671-6027



国家新闻出版广电总局第一批认定学术期刊
黑龙江省新闻出版广电局认定A类科技期刊
中国知网全文收录
万方数据全文收录
重庆维普全文收录
超星期刊域出版平台全文收录
博看网全文收录
中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊



目 录

◆ 专论与综述 ◆

- 美姑岩鹰鸡品种资源的保护及利用 周爱民等(04)
奶牛场主要动物疫病的净化 曹平等(06)
赛加羚羊保护发展现状分析与思考 周应杰等(09)
美国警用幼犬社会化培养、环境锻炼及专项能力
 培训模式概述 翟 嵩等(11)
关于无抗养殖的思考 蔡文瑜(14)
野生动物的疾病防治现状与发展趋势 曹周燕(16)

◆ 非洲猪瘟专题 ◆

- 中药“新温康”防控非洲猪瘟的效果 李大宾等(18)
基层非洲猪瘟防控存在的问题及对策 陈 宵等(19)
对非洲猪瘟防控工作的探究 严浩辉(20)
非洲猪瘟的传播与防控 樱 桃(21)
巢湖市非洲猪瘟防控工作的体会 徐华春(22)
非洲猪瘟传入风险与应对策略 黄建芬(24)

◆ 试验研究 ◆

- 狂犬病认知现状调查分析与防控对策 马晓莉等(25)
2016~2018年常州市金坛区猪伪狂犬病血清
 流行病学调查 蔡文博(28)
南京市六合区羊布病防控现状及对策 韩春华(31)
2015~2018年我国部分地区猪伪狂犬病的流行病学
 调查与分析 冯寿华等(33)
一例公猫完全阻塞性自发性膀胱炎的诊治 刘 玲等(35)
天津地区羊包虫病流行情况初步调查 孙 涛等(37)
有氧运动联合补充 MT 对被动吸烟大鼠肺组织
 抗氧化酶活性的影响 肖晓玲等(38)
家兔分色灌注标本的制作 张彦昕等(39)

◆ 养殖污染治理 ◆

- 浅析勐腊镇农业面源污染治理现状、问题
 及建议 依旺叫等(41)

畜牧兽医科技信息

Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine

(1985年创刊)

月刊

2019年第9期

总第513期

主管单位:中华人民共和国农业农村部

主办单位:中国农业科学院

哈尔滨兽医研究所

主 编:刘胜旺

副 主 编:秦红丽

责任编辑:朱明艳

编辑出版:《畜牧兽医科技信息》编辑部

刊社地址:哈尔滨市香坊区哈平路678号

邮政编码:150069

咨询电话:0451-51051813

举报电话:18946066051

E-mail:xmsykjxx2016@163.com

广告部联系电话:

0451-51051813

订阅发行:每月25日 邮局发行

印 刷:哈尔滨超群印务有限公司

印刷电话:15204679850

刊 号: ISSN 1671-6027
CN23-1501/S

广告许可证号:2301004010095

邮发代号:14-48

定价:10.00元

全球第一中文报刊网
bookan.com.cn



狂犬病认知现状调查分析与防控对策

马晓莉, 庄站伟, 刘永伦, 赵路漫, 徐 铮*

(华南农业大学 实验动物中心 / 动物科学学院 / 兽医学院 / 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 为了解民众对狂犬病及其防控科普知识的认知度和需求情况, 以制定切实有效的防控对策, 本研究采取问卷调查的方式, 获得公众对当前狂犬病的认知水平与态度等情况, 并进行统计分析, 根据公众对狂犬病及其防控技术需求和认知水平基础数据, 提出对狂犬病的科学防控建议和对策。

关键词: 狂犬病; 认知度; 防控

DOI:10.3969/J.ISSN.1671-6027.2019.09.014

狂犬病是由狂犬病毒引起的迄今为止人类唯一病死率高达 100% 的急性传染病。我国是该病疫情最严重的国家之一, 尤其农村更是该病的“重灾区”, 1950~2008 年, 我国(不含港澳台)累计报告人间狂犬病死亡病例 119 983 例; 2009~2013 年每年造成千人以上死亡, 2014~2018 年每年死亡几百例(见图 1)。因此, 在我国狂犬病仍然是一个严重的公共卫生问题, 疫情的防控已刻不容缓。

本研究结合狂犬病防控相关知识, 针对不同知识层次的民众设计了调查问卷, 通过网络和现场等方式进行线上和线下的调研, 并对回收的调查问卷进行分析, 得到公众对狂犬病及其防控技术科普需求和认知度情况, 给出了相应的对应策略, 为进一步制定出有针对性、指导性强以及客观合理的狂犬病及其防控技术宣传和推广提供有力依据。

1 基本情况

2019 年 1~3 月期间, 通过线上线下相结合问卷调查, 共收回有效调研问卷 535 份。参与本次调研的民众年龄阶段主要集中在 18~45 岁, 占比为 79.62%, 以本科及以下人群参与问卷较多, 所占比例为 71.22%。本次调查问题主要涉及被调查者的基本信息、社区在狂犬病防控方面的宣传和措施、公众获取狂犬病相关知识的渠道、受访者对狂犬病及其防控与防治相关知识的认知水平和态度。回收问卷后, 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 社区开展狂犬病宣传的情况和建议对策

日本是全球少数狂犬病非疫区之一, 在狂犬病防疫方面有着不少经验和教训, 值得我们借鉴, 其中重要的一个环节就是狂犬病科学知识的普及。科普是向居民宣传科学技术知识的重要载体, 对狂犬病科学知识的深入人心, 进而自发自

觉对动物进行定期免疫具有重要意义。目前, 全国部分城市的社会和学校均会以多种形式定期举办科普活动, 如社区科学栏宣传、科普教育进社区和校园、讲座等。本调查问卷统计了社区开展海报宣传的情况。结果表明, 25.42% 的受访者表示所在社区没有狂犬病防治的宣传。对民众所在社区有哪些狂犬病防治措施, 仅有 18.88% 的人表示社区会开展犬只免疫(见表 1)。因此, 建议社区要丰富举办狂犬病科普活动的形式, 增加科普活动的频次, 可以探索提倡和开展定时定点的犬只免疫活动措施。

2.2 群众获取狂犬病相关知识的渠道和了解程度

随着时代的发展以及网络的普及, 人们可以随时随地地获取想要的知识。因此, 大部分人(86.92%)知道狂犬病是高风险等级, 但是我们看到还有其他 13.09% 的受调查人群将其归类为中低等级的传染病; 仅有 28.41% 的受众表示对狂犬病及其相关知识比较或者非常了解, 一般了解(59.81%)和不了解(11.78%)的占了大多数, 表明在对狂犬病科学普及的宣传力度方面仍然任重道远。对获取狂犬病知识的渠道, 相比于网络, 传统的科普讲座、科学宣传册等受到极大的挑战: 人们开始不喜欢特别关注纸上的知识。因此, 我们在设计调查问卷时也关注到这个现象, 并注重在网络上进行宣传。综合分析结果, 71.4% 的受访者选择了网络, 排名第一, 传统的科普书籍为 53.08%, 电视为 51.78%, 分列第二、三位。从了解到的情况来看, 虽然科普书籍不是最高的来源途径, 但由于其科学性较强, 因此受到最高的信赖度。相比于随身携带纸质科普书籍, 网络上获取知识有一个最显著的优点, 那就是人们可以利用碎片化的时间去浏览科普网页、文章, 并且不占用空间。但网络上的科学知识的准确性有事存在偏差, 建议人们需要注意加强甄别, 做到有疑问必深究。除此之外, 受访者还通过其它的渠道去获取科普知识, 如 38.69% 和 34.39% 的受访者表示自己也会通过讲座和医生获取相关知识(见表 2)。

从调研结果也可以看出, 虽然大部分人群喜欢通过网络了解科学知识, 但也有很大比例的人群喜欢相信权威(医生与科普讲座)、喜欢零距离与科学知识“接触”。这也提示我

基金项目: 广州市科协科普经费计划项目(K2019020101001)

作者简介: 马晓莉(1981~), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 兽医实验动物学。

★通信作者: 徐铮(1979~), 男, 兽医师, 硕士, 研究方向: 动物健康养殖与安全生产。Email: stonezen@scau.edu.cn。



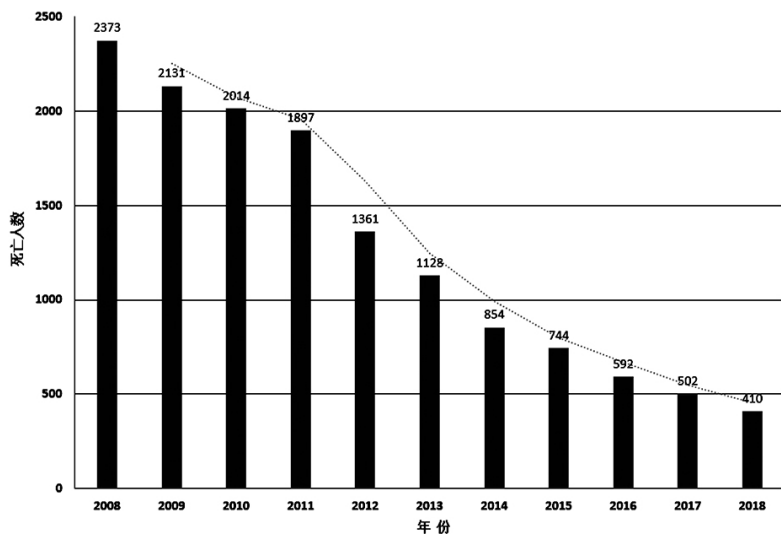


图1 我国近10年狂犬病死亡人数

们,虽然信息时代,网络占据了人们大部分的时间,但只要科普人员认真准备,精心组织,让科学和普通民众零距离接触也能达到理想的科普效果。

2.3 对狂犬病的了解程度与态度调查及建议

受访者中,有96.07%的人知道人间狂犬病是由犬类引起的,99.63%的人知道狗和猫咬伤后可能会感染狂犬病,而且大多数人不会或偶尔会逗弄流浪猫狗,表明大家对狂犬病的主要传染源还是非常了解的。但是,对鼠、蝙蝠等家畜和野生动物都可能携带狂犬病毒,部分民众并不清楚(仅56.26%和32.34%的受访者认为鼠类和兔子咬伤可致病)。当问及狗何时能传播狂犬病,大部分人做出了错误的选择(仅5.79%的人选择发病时),更有44.11%的人认为什么时候都可能(见表3),显然大家对这个问题不是很了解,提示我们对有关狂犬病知识的宣传有待加强,必须让人们明白处于发病期的犬才有传染性。

表3 对狂犬病治疗状况的认知

排名	项目	人数	比例/%
1	无有效治疗途径,一旦发病100%致死	392	73.27
2	可以治疗	74	13.83
3	不清楚	69	12.9

调查发现大家对狂犬病的发病因素的认识比较清楚,知道咬伤部位、伤口深浅、伤口是否清洗和动物是否免疫与发病息息相关,关于狂犬病的潜伏期,分歧较大,50.28%的受访者认为一年及以上,28.6%的受众选择1~3个月,12.15%的人认为一周以内,8.97%的民众觉得为6个月左右。提示我们在宣传的时候,有必要告诉群众,狂犬病的潜伏期多数在1~3个月,但也有小于1周,多于1年的情况,如果被狗咬伤已多年,可排除感染该病的风险,以消除人们的疑虑。狂犬病能否治愈调查发现,73.27%的受访者选择了“无有效治疗和发病100%致死”,但还是有13.83%和12.9%的人认为可以治疗和

表1 社区的狂犬病防治措施(多选)

排名	项目	人数	比例/%
1	不知道	308	57.57
2	宣传	208	38.88
3	开展犬只免疫	101	18.88
4	扑杀流浪犬猫	68	12.71

表2 获取狂犬病相关知识的渠道(多选)

排名	项目	人数	比例/%
1	网络	382	71.4
2	书籍	284	53.08
3	电视	277	51.78
4	讲座、宣传页	207	38.69
5	医生	184	34.39

不清楚(见表3)。提示我们,必须让民众认识到“狂犬病一旦发病100%致死,没有治愈途径”。

2.4 民众对狂犬病主要的防控措施了解程度与相应对策

给狗注射狂犬病疫苗是预防人简狂犬病最好的办法,同时也是全球已消灭该病国家进行防控的最主要方法。但是,在我国人用狂犬病疫苗却成为了防治狂犬病的主要手段。我国是世界上人用狂犬病疫苗使用最多的国家,付出的人力物力和财力代价巨大,效果却远不如为犬类注射疫苗好。因此我们重点调查了人们对该病主要防控措施的了解程度,为该病宣传和防控策略奠定数据基础。当问到防控狂犬病的关键环节时,88.79%的受访者知道应该给动物注射疫苗来从源头防治,虽然比例很高,但是我们也看到仍有部分人并不特别清楚这个道理;有85.79%的受访者了解需要对动物定期进行狂犬病免疫,但是仅有11.96%的受访者会严格按照免疫程序对动物进行免疫。表明虽然大家清楚需要定期对动物进行狂犬病免疫接种,但是可能由于重视不够、嫌麻烦等种种原因并没有很好的落实和实施。提示我们要加大科普宣传的力度和覆盖面,一方面让更多的民众知悉和重视,另一方面督促政府制定强有力的强制免疫制度并严格执行。

2.5 民众对狂犬病预防措施的认识情况与对策

狂犬病的防控要点主要在于控制传染源,即尽可能让所有的犬、猫定期接种疫苗。1957年起,日本本土的狂犬病就已经绝迹,用的就是国际通行办法,给犬类注射疫苗。研究表明,某一地区如果进行持续有效的免疫犬只达到70%,就足以切断该病的传播。但是,在我国狂犬病仍旧肆虐的情况下,加强对狂犬病的预防措施的科普宣传,在保护人民群众生命安全方面也是必不可少的。因此我们设计了一些狂犬病防控方面的问题,以便了解公众对该病预防措施的认识情况,为开展有的放矢的科普宣传和防控提供数据支持。

在问到受访者及家人有无被犬、猫咬或抓伤及如何处理的时,55.7%的受访者表示:有,及时严格接种疫苗治疗;



26.36%的人没有被攻击过;13.83%的受众选择:有,但没严格接种疫苗;另有4.11%的被狗猫咬伤、抓伤者没有做任何处理。那么被咬伤后该如何处理才对呢(多选)?有95.51%的受访者会立即去医疗机构注射狂犬病疫苗,有76.64%的受访者会立即用清水或肥皂水冲洗伤口,有53.64%的人会用酒精或碘酒消毒,14.95%的人会用纱布包裹止血。调查表明,大部分人对狂犬病存在一种恐惧心理,疑似感染都会采取正确的方式处理,这也是人用狂犬病疫苗使用量大的原因。所以,在与动物接触中,如果被可疑动物咬伤或者暴露(暴露指被疑似狂犬及相关动物咬伤、抓伤舔舐的皮肤、伤口和黏膜组织),我们建议针对不同的暴露程度,采取不同的处理措施。一级暴露是指接触或喂养动物、完好皮肤被舔、完好皮肤接触狂犬病动物分泌物或排泄物,这种程度的暴露没有危险,无需进行医学处理。二级暴露是指裸露皮肤被轻咬和未出血的轻微抓伤或擦伤,有一定的危险性,应用大量清水冲洗后再用肥皂水反复冲洗2次,尽量不缝合不包扎伤口,并注射疫苗。三级暴露是指单处或多处贯穿皮肤的咬伤或抓伤、破损皮肤被舔舐、粘膜被动物唾液污染、与蝙蝠之间发生接触,危险指数最高,应立即处理伤口,并按规定使用抗狂犬病血清或人用免疫球蛋白,并接种狂犬病疫苗。

被咬伤后是否需要注射疫苗治疗呢?76.26%的受访者认为有必要,20.93%的受众选择如果确定该动物有定期免疫,且无感染该病,可以不必要打,2.62%的人认为如果家养动物没必要打疫苗,流浪犬、猫则要打疫苗(见表4)。调查表明大部分人是比较谨慎的,毕竟性命攸关,不能说错。但是我们建议采用世卫组织推荐的“十日观察法”,这种方法可以排除一个人被传染狂犬病的可能性。当被咬伤后,伤者立即注射疫苗,观察动物10d,若动物未发病死亡,则可以停止注射,若动物发病死亡,则需要继续注射。

表4 被动物咬伤后是否有必要打狂犬疫苗

排名	项目	人数	比例/%
1	有必要	408	76.26
2	如果确定该动物定期接种疫苗,且无感染,则可不打	112	20.93
3	如果是家养动物就没必要,如果是流浪动物则需要	14	2.62
4	没必要,自己能好	1	0.19

4 讨论

每年我国因被动物侵犯而进行狂犬病疫苗注射的人数约占全球总量的80%。而对动物的狂犬病疫苗接种率却很低,这是造成每年都有上百上千人因患该病死亡的主要原因,也是对该病疫苗使用本末倒置的例证。防控狂犬病最关键的措施不是在人被咬之后去注射疫苗治疗,而是应该定期免疫动物去防止病畜感染人。换句话说,在人间狂犬病防控方面,动物的狂犬病疫苗免疫应该优先做好。在我国对犬的狂犬病免疫推广成为一直以来的难题,尤其在农村地区,人们对狂犬病的认知度普遍较低,流浪犬多而分散,犬只管理

比较薄弱,相关经费又非常紧缺,因此犬只的狂犬病免疫率较城市更低。家养犬是狂犬病的重要传播宿主,85%~95%的人间狂犬病病例是由犬咬伤所致,50%~70%狂犬病病例发生在农村。随着我国和谐社会的逐步建成,人们开始倡导人和动物的和谐相处,因此再像过往一样通过捕杀法控制狂犬病疫情可以说是极为不人道的。这就意味着目前为止,要想彻底控制疫情,只能依靠狂犬病疫苗和狂犬病科学防控知识的普及和犬只免疫的推广。

同时通过调研也看到,普通民众对科普知识、科普文化的需求呈现上升的趋势。虽然目前社区或村镇举办科普活动的频次不是很多,但仍有大部分民众通过各种形式主动去接触和学习科学知识,进行“自我科普”。因此,政府在鼓励社区和村镇积极开展科普活动的同时,也应提供多种方式增加人民获得科学知识的途径。加强对民众进行科学知识消费的引导,发挥社区和村镇科学宣传的力量,一定能更好地提高公众对狂犬病及其防控知识认识的水平,减少人民群众患病风险,保障人民群众生命财产安全,保障社会和谐发展。

参考文献

- [1] 朱士茂,等.狂犬病病毒及其与宿主之间的相互作用[J].中国预防兽医学报,2015,37(06):486-490.
- [2] 许炜迪,等.甘肃省首例实验室确诊犬狂犬病疫情流行病学分析[J].中国兽医学报,2017(2):258-261.
- [3] 国家卫生健康委员会卫生健康事业发展统计公报[Z].
- [4] 周航,等.狂犬病预防控制技术指南(2016版)[J].中华流行病学杂志,2016,37(2):139-163.
- [5] World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report [M]. World Health Organ Tech Rep Ser,2013,982(982):1-139.
- [6] Lembo T, et al. The feasibility of canine Rabies elimination in Africa: Dispelling doubts with data[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(2): e626.
- [7] Fu Zhen-fang. Rabies and rabies research: Past, present and future [J]. Vaccine, 1997, 15 Suppl: S20-24.
- [8] Wallace R M, et al. Elimination of dog-mediated human Rabies deaths by 2030: Needs assessment and alternatives for progress based on dog vaccination [J].Front Vet Sci, 2017, 4(4): 9.
- [9] WHO.Rabies[N/OL].FactSheet,2014.http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/.
- [10] 孙永波,等.1990-2014年中国狂犬病流行态势和防护问题[J].中国全科医学,2016,19(5):570-573.
- [11] 李艳荣,等.中国2016年狂犬病流行病学特征分析[J].中华流行病学杂志,2018,39(1):40-43.



一周内回复 两月内发表

欢迎投稿

- ◎ 国家新闻出版广电总局第一批认定学术期刊
- ◎ 黑龙江省新闻出版广电局认定A类科技期刊
- ◎ 中国知网全文收录
- ◎ 万方数据全文收录
- ◎ 重庆维普全文收录
- ◎ 超星期刊域出版平台全文收录
- ◎ 博看网全文收录
- ◎ 中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊



2020 欢迎订阅

《畜牧兽医科技信息》

国家新闻出版广电总局第一批认定学术期刊
黑龙江省新闻出版广电局认定A类科技期刊



最新
邮箱

E-mail: xmsykjxx2016@163.com

联系电话: 0451-51051813 18946066051
 邮政编码: 150069
 联系地址: 哈尔滨市香坊区哈平路678号
 《畜牧兽医科技信息》编辑部收

刊号: ISSN 1671-6027
 CN 23-1501/S

广告许可证号: 2301004010095 邮发代号: 14-48 定价: 10.00元

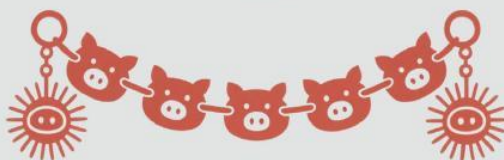
ISSN 0529-6005
CN 11-2471/S

中国兽医杂志

ZHONGGUO SHOUYI ZAZHI
CHINESE JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

2025年9月 第61卷 第9期

猪病防治专刊



ISSN 0529-6005



中国科学技术协会 主管
中国畜牧兽医学会 主办

目次

研究论文

猪肺炎支原体实时荧光重组酶介导的等温扩增快速检测方法的建立和应用

……康浩然, 黄雨薇, 宋程, 高鹏, 张永宁, 周磊, 盖新娜, 韩军, 郭鑫, 杨汉春(1)

不同地区猪场临床样本中多杀性巴氏杆菌的分离鉴定和强毒株筛选

……张宇, 张海洋, 张国良, 吴营霞, 高盛果, 孙哲, 田克恭(10)

猪瘟病毒E^m结构蛋白鼠源单个B细胞抗体的制备和鉴定

……黄禹丰, 吴睿智, 徐璐, 邹兴启, 车斯琪, 李芳韬, 夏应菊,

赵俊杰, 赵启祖, 刘业兵, 贾伟新, 朱元源(18)

盐酸恩诺沙星颗粒治疗自然感染细菌性猪呼吸道疾病的剂量筛选

……周凯仁, 何源, 董朕, 吴灵玉, 翟斌涛, 王玮玮, 程富胜,

李冰, 魏小娟, 周绪正, 张继瑜(28)

伪狂犬病病毒US1缺失株的构建和生物学特性分析 ……屈玮钰, 李鑫(36)

猪氨基肽酶N受体结合区Fc融合表达及其病毒结合活性分析

……郭宏伟, 刘妍, 赵绪永, 龚婷, 马辉, 刘薇, 郑鸣(44)

猪焦孔素B同源异构体的鉴定、生物信息学和功能分析

……黄宁, 黄心钰, 姚瑶, 原梦琪, 刘平黄(53)

基于单B细胞筛选技术制备PRRSV N蛋白单克隆抗体

……李钰婷, 王衡平, 李芳, 周昕, 王会岩(63)

PEDV、PoRV、PDCoV多重荧光定量RT-PCR方法的建立和应用

……陈登金, 李鹏宇, 董楠, 常昊天, 胡渤, 肖进, 张蕾, 马良(71)

猪流行性腹泻病毒 HNxp23 株的分离鉴定及其基因特性分析

.....饶丹, 秦锋, 阮梦凡, 葛雨, 张明旭, 杨喜梅, 李美佳,

陈文雪, 于林洋, 赵攀登, 胡静, 刘向楠, 郑全芳, 董建国(79)

2023—2024年我国部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查

.....刘逸龙, 熊谋康, 王洪, 商琦, 张乐宜, 钟帆, 苗俊好, 宋长绪, 徐铮, 马晓莉(87)

文献综述

非洲猪瘟病毒检测方法研究进展

.....刘书慈, 张海林, 汪渤森, 张永宁, 周磊, 盖新娜, 郭鑫, 韩军, 杨汉春, 高鹏(98)

非洲猪瘟病毒调控宿主细胞凋亡的研究进展

.....李强, 高鹏, 周琼琼, 周磊, 盖新娜, 韩军, 郭鑫, 张永宁, 杨汉春(108)

非洲猪瘟病毒感染诱导猪体内细胞因子表达变化的研究进展

.....殷磊, 李志娟, 左媛媛, 戈胜强, 李桂梅, 初薛霏, 李金明, 王志亮(119)

临床实践

“全群检测 + 精准清除”法在已感染非洲猪瘟病毒猪群中清除病毒的离散-连续混合数学模型推导和应用

.....闫之春, 李鹏, 李孝文(127)

多来源后备新建场猪繁殖与呼吸综合征的控制和思考

.....张振东, 李铎, 李超斯, 闫才杰, 韩峰, 刘兆喜, 周庆新, 王尊民,

黄律, 方树河, 胡玉龙, 陈锴, 樊爱华, 李向东(134)

广告信息 (封底)

2023—2024年我国部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查

刘逸龙¹, 熊谋康¹, 王 淇¹, 商 琦², 张乐宜¹, 钟 帆³,
苗俊好³, 宋长绪¹, 徐 铮¹, 马晓莉⁴

(1. 华南农业大学动物科学学院 国家生猪种业工程技术研究中心 猪禽种业全国重点实验室, 广东 广州 510642 ;
2. 安徽东方帝维生物制品股份有限公司, 安徽 亳州 236000 ; 3. 河源盛泰种养有限公司, 广东 河源 517400 ;
4. 华南农业大学实验动物中心, 广东 广州 510642)

摘要:为调查分析2023—2024年我国部分地区猪流行性腹泻病毒(PEDV)的遗传变异情况,本试验采用实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测了9省42家猪场的806份疑似PEDV阳性样品,对阳性样品的PEDV 刺突蛋白(S1)、膜蛋白(M)和辅助蛋白(ORF3)基因进行反转录聚合酶链反应(RT-PCR)扩增并测序,得到的代表毒株序列与参考毒株进行比对,构建遗传进化树,分析核苷酸序列相似性和氨基酸序列突变位点。结果显示,806份样品中检出阳性样品473份,样品阳性率为58.68%。共测序鉴定出10株PEDV代表毒株,其S1基因核苷酸序列的相似性介于97.4%~99.7%,均属于G2-2亚型;M基因核苷酸序列的相似性介于96.0%~100%,其中8株属于G2-2亚型,2株属于G2-1亚型;ORF3基因核苷酸序列的相似性介于95.6%~100%,其中8株属于G1-2亚型,1株属于G1-1亚型,1株属于G2-1亚型。与各亚型参考毒株相比,10株代表毒株的S1、M和ORF3基因均存在多个氨基酸位点突变。结果表明,2023—2024年我国部分地区猪群中PEDV感染情况较为严重,主要流行G2型毒株。

关键词:猪流行性腹泻病毒(PEDV);遗传变异;遗传进化分析

中图分类号:S858.28

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2025)09-0087-11

Epidemiological Survey of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Selected Regions of China from 2023 to 2024

LIU Yilong¹, XIONG Moukang¹, WANG Qi¹, SHANG Qi², ZHANG Leyi¹, ZHONG Fan³,
MIAO Junhao³, SONG Changxu¹, XU Zheng¹, MA Xiaoli⁴

(1. National Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding, National Pig Breeding Engineering and Technology Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Anhui Dongfang Dewei Biological Products Co., Ltd., Bozhou 236000, China; 3. Heyuan Shengtai breeding Co., Ltd., Heyuan 517400, China; 4. Laboratory Animal Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To investigate and analyze the genetic variation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in some regions of China from 2023 to 2024, a total of 806 suspected PEDV-positive samples were collected from 42 pig farms across 9 provinces and tested by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The spike protein 1 (S1), membrane protein (M), and auxiliary protein (ORF3) genes of the positive samples were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced. Representative strain sequences obtained were compared with reference strains to construct phylogenetic trees, analyze nucleotide sequence similarity, and identify amino acid mutation sites. The results showed that 473 out of 806 samples tested positive, with a positivity rate of 58.68%. Ten representative PEDV strains were sequenced and identified. The nucleotide sequence similarity of the S1 gene ranged from 97.4% to 99.7%, and all belonged to the G2-2 subtype. The M gene similarity ranged from 96.0% to 100%, with eight strains classified as G2-2 subtype and two as G2-1 subtype. The ORF3 gene similarity

收稿日期:2025-04-19

基金项目:广东省省级科技计划项目(KTP20240477);华南农业大学永根科技站项目(BQWZX2024-01-01)

作者简介:刘逸龙(2000-),男,硕士生,研究方向为动物免疫与安全生产,E-mail:1254715937@qq.com

通信作者:徐铮,E-mail:stonezen@scau.edu.cn;马晓莉,E-mail:maxl@scau.edu.cn

ranged from 95.6% to 100%, with eight strains classified as G1-2 subtype, one as G1-1 subtype, and one as G2-1 subtype. Compared with reference strains of each subtype, multiple amino acid mutations were found in the *S1*, *M*, and *ORF3* genes of the ten representative strains. These results indicate that PEDV infection was relatively severe in pig populations in some regions of China during 2023—2024, with G2-type strains being predominant.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); genetic variation; genetic evolutionary analysis

Corresponding authors: XU Zheng, E-mail: stonezen@scau.edu.cn; MA Xiaoli, E-mail: maxl@scau.edu.cn

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)属于冠状病毒科、 α 冠状病毒属,能够感染各个年龄段的猪,引发不同程度的临床症状,其中仔猪最为严重,感染后的死亡率可达100%^[1]。PEDV主要感染猪小肠绒毛上皮细胞,引起新生仔猪出现急性肠道疾病,临床表现为呕吐、腹泻和脱水等症状^[2]。自出现以来,PEDV在亚洲和美洲的许多国家持续肆虐。经过长时间的大规模传播,PEDV已经进化出致病性更强、传染性更高的突变毒株,给全球养猪业造成巨大的经济损失^[3]。

根据毒株出现的时间,PEDV可分为经典毒株和突变毒株。经典毒株是20世纪70年代以来出现的毒株,而突变毒株是自2010年以来在全球范围内流行的新型毒株^[4]。基于刺突蛋白(Spike protein, S)及其N端高变异的S1区域序列的同源性分析,PEDV可进一步划分为G1和G2型2个基因型,其中G1型又分为G1-1和G1-2亚型,G2型又分为G2-1、G2-2和G2-3亚型。不同基因型毒株在毒力和遗传变异方面存在显著差异,其中G2型毒株的毒力高于G1型毒株,且更容易发生突变^[5]。在2010年以前,PEDV对我国养猪业的影响有限且具有区域性。但自2010年10月华南地区首次出现了以急性腹泻为临床特征的高致病性PEDV疫情后,病毒迅速在全国范围内传播扩散^[6-7],至此,PEDV在我国开始大规模流行。

PEDV是正义单链RNA包膜病毒,基因组全长约为28 kb,包括5'端帽(5' Cap)、5'端非编码区(5' Untranslated region, 5' UTR)、7个开放阅读框(Open reading frame, ORF)、3'端非编码区(3' UTR)和3'端多聚腺苷酸化尾部(3'-poly A tail)^[8-9]。位于C端的S、E、M、N、ORF3这5个ORF则分别编码4种结构蛋白和1种辅助蛋白,这些蛋白在病毒的复制、转录、翻译和逃避宿主先天性免疫反应中发挥关键作用^[8, 10]。

S蛋白是冠状病毒中最大的结构蛋白,包含了能够被中和抗体识别的表位以及病毒进入细胞时与特定受体结合的位点^[11]。PEDV S蛋白的氨基酸序列保守性与其他冠状病毒存在显著差异,S蛋白

可分为S1和S2蛋白,其中编码S1蛋白的基因易发生突变,具有很强的遗传多样性,因此常作为分析病毒遗传变异的靶基因。膜蛋白(Membrane protein, M)是PEDV感染、复制和组装过程中必不可少的结构蛋白。*M*基因虽在冠状病毒之间差异显著,但在不同PEDV毒株间相对保守^[12]。因此,*M*基因是建立酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和反转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)等检测方法的有效靶基因^[13]。辅助蛋白ORF3是冠状病毒的特征蛋白,对病毒的复制和致病性起重要作用^[14]。*ORF3*基因在不同地区流行的PEDV毒株中表现出遗传多样性,说明病毒具有较强的适应性和进化能力,有助于理解其流行病学特征并制定有效的防控策略^[15]。因此,本试验选择PEDV *S1*、*M*和*ORF3*基因进行流行病学调查,旨在全面了解我国部分地区PEDV毒株的遗传多样性和进化特征。

本试验从我国9个省份的42家猪场收集806份样品,进行PEDV抗原检测,并对阳性样品进行测序分析,所得代表毒株序列与PEDV参考毒株进行比对,构建基于PEDV *S1*、*M*和*ORF3*基因的遗传进化树,并比对核苷酸序列相似性和氨基酸序列突变位点,旨在为掌握PEDV流行动态、遗传变异机制和制定有效防控措施提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 样品采集和处理 从我国广东、河南、湖南、云南、山西、重庆、黑龙江、甘肃和四川共计9个省份的42家猪场采集806份腹泻猪的肠道组织、粪便和肛拭子样品。肠道组织剪碎后,在冰上用磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffered saline, PBS)研磨成匀浆;粪便和肛拭子样品用PBS稀释混匀。处理后样品均置于-20℃冷冻保存,备用。

1.2 主要试剂 病毒总DNA/RNA提取试剂盒,购自广州美基生物科技有限公司;SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒,购自湖南艾科瑞生物工程股份有限公司;One Step RT-PCR Kit,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DL2 000 DNA Marker和

10×DNA Loading Buffer,均购自广州东盛生物科技有限公司;琼脂糖,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 主要仪器 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)热循环仪(C1000 Touch Thermal Cycler)和水平电泳系统(PowerPac Basic),均购自美国 BIO-RAD 公司;凝胶成像分析系统(Tanon-

1600),购自上海天能科技有限公司;高速冷冻离心机(Centrifuge 5418),购自德国 Eppendorf 公司;涡旋混匀仪(Vortex-2),购自上海沪析实业有限公司。

1.4 引物设计和合成 根据 GenBank 上公布的 PEDV S1、M 和 ORF3 基因序列(登录号:MG983755.1)的保守区域设计引物(表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	产物长度(bp) Product length
PEDV-qPCR	F:GATACTTTGGCCTCTTGTGT R:CACAACCGAATGCTATTGACG	60.0	116
PEDV S1	F:TAGTGATGTTGCTTAGGCTTGTG R:AGGATCTGAGGAATTACTGCAAAC	54.5	1 170
PEDV M	F:GTCCTTACATGCCAATTGACC R:GGCATAGAGAGATAATGGCA	54.5	788
PEDV ORF3	F:CGGTGCTTGTTTTTCAGTTG R:CAATTGGACGAAGGTAATGCT	54.5	814

1.5 PEDV 抗原检测 提取处理后样品的病毒核酸并反转录,根据 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒说明书配制反应体系并进行实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qPCR)扩增。引物为 PEDV-qPCR(表1),扩增体系(20 μL):上、下游引物(浓度为 10 pmol/μL)各 0.4 μL,ROX 染料 0.2 μL,2 × SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μL,RNase-free ddH₂O 7 μL,模板(cDNA)2 μL。扩增程序:预变性 95 °C 2 min;变性 95 °C 2 min,退火/延伸 60 °C 45 s,共 40 个循环。在退火和延伸阶段采集荧光,统计阳性样品数[PEDV 阳性样品的判定标准:Ct 值 ≤ 38(曲线典型)为阳性;Ct 值介于 38 ~ 40(曲线典型)复检后确认;Ct 值 ≥ 40 为阴性]。选取检测出的 PEDV 强阳性(Ct 值 < 25)样品进行 RT-PCR 扩增。

1.6 PEDV S1、M 和 ORF3 基因的 RT-PCR 扩增和测序 利用设计的 3 对引物(表1)扩增 PEDV S1、M 和 ORF3 基因。根据 One Step RT-PCR Kit 说明书配制反应体系并进行 RT-PCR 扩增。扩增体系(25 μL):上、下游引物(浓度为 10 pmol/μL)各 1 μL,2 × One Step Mix 12.5 μL,One Step Enzyme Mix 1 μL,病毒核酸 2 μL,RNase-free ddH₂O 7.5 μL。扩增程序:反转录 50 °C 30min;预变性 95 °C 4 min;变性 95 °C 45 s,退火温度 54.5 °C 45 s,延伸 72 °C 1 min 30 s,共计 35 个循环;延伸 72 °C 7 min。阴性对照为无酶核酸水,阳性对照为本实验室分离鉴定的 PEDV CV777

毒株。反应结束后取 8 μL 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,筛选 PEDV S1、M 和 ORF3 基因目的条带均明亮的阳性扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.7 生物信息学分析 使用生物软件 SeqMan 对 1.6 中测序结果进行拼接,并在 NCBI 上进行 Blast 分析。使用 Mega 11 软件以比邻法(Neighbor-joining)构建 PEDV S1、M 和 ORF3 基因遗传进化树,设置自展值为 1 000。利用 MegAlign 软件将 PEDV S1、M 和 ORF3 基因序列与 GenBank 中的具有典型致病性和近年来分离的 PEDV 流行毒株的参考序列进行比对,分析核苷酸序列相似性和氨基酸序列突变位点。

2 结果

2.1 样品阳性率统计 qPCR 检测结果显示,检出阳性样品 473 份,样品阳性率为 58.68%;采集的 42 家猪场中有 37 家猪场检测出 PEDV 阳性样品,猪场阳性率为 88.10%。其中,广东、四川、云南、重庆和河南等省的样品阳性率均较高(表2)。

2.2 PEDV S1、M 和 ORF3 基因的 RT-PCR 扩增和测序 对阳性样品进行 PEDV S1、M 和 ORF3 基因的 RT-PCR 扩增,分别获得大小约 1 170 bp(PEDV S1)、788 bp(PEDV M)和 814 bp(PEDV ORF3)的目的条带(图1)。测序鉴定出的 10 株 PEDV 代表毒株信息见表3。

表2 2023—2024年我国部分地区疑似PEDV样品阳性率统计

Table 2 Statistics on the positive rate of suspected PEDV samples collected from selected areas of China (2023—2024)

采集地点 Collection site	样品总数(份) Total number of samples	阳性样品数(份) Number of positive samples	阳性率(%) Positivity rate
甘肃省 Gansu Province	147	57	38.78
广东省 Guangdong Province	195	173	88.72
河南省 Henan Province	59	35	59.32
黑龙江省 Heilongjiang Province	84	16	19.05
湖南省 Hunan Province	40	10	25.00
山西省 Shanxi Province	54	17	31.48
四川省 Sichuan Province	98	75	76.53
云南省 Yunnan Province	89	65	73.03
重庆市 Chongqing Municipality	40	25	62.50
总计 Total	806	473	58.68

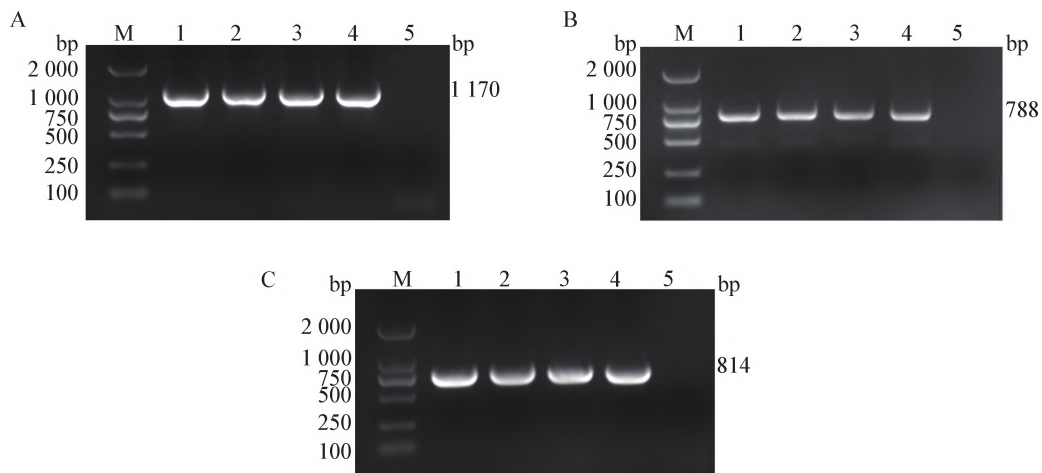


图1 PEDV S1(A)、M(B)和ORF3(C)基因的RT-PCR扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of PEDV S1(A), M(B) and ORF3(C) genes

M:DL2 000 DNA 相对分子质量标准;1~3:PEDV 阳性样品;4:阳性对照;5:阴性对照

M:DL2 000 DNA Marker; 1-3:PEDV positive samples; 4:Positive control; 5:Negative control

2.3 PEDV S1 基因遗传进化树构建 PEDV S1 基因遗传进化树结果显示,10株代表毒株全部属于以毒株GD-A-S为代表的G2-2亚型(图2)。

2.4 PEDV S1 基因核苷酸序列相似性分析 相似性比对结果显示,10株PEDV代表毒株S1基因核苷酸序列的相似性介于97.4%~99.7%;与G1-1亚型参考毒株CV777相似性介于87.9%~88.4%,与G1-2亚型参考毒株FR-001-2014的相似性介于86.9%~87.6%,与G2-1亚型参考毒株VN-

JFP1013-1-2013-Vinh An-Vietnam 的相似性介于96.6%~98.2%,与G2-2亚型参考毒株GD-A-S的相似性介于97.3%~100%(图3)。

2.5 PEDV S1 蛋白氨基酸序列分析 以G1-1亚型参考毒株CV777为参考,进行S1蛋白氨基酸序列分析,结果见表4,10株代表毒株在第28(S→A)、90(G→W)、113(H→Y)、137(Y→H)、179(C→F)、201(S→Q)、252(Y→H)、281(L→I)位点均发生突变;此外,在第83(Q)位点,10株代表毒株均出现氨基酸缺失。与

表3 10株PEDV代表毒株命名和信息
Table 3 Names and information of 10 representative PEDV strains

编号 Number	代表毒株名称 Representative strain name	样品类型 Sample type	样品来源 Sample source
1	HN	肠道组织 Intestinal tissue	河南省 Henan Province
2	SX	肠道组织 Intestinal tissue	陕西省 Shaanxi Province
3	SW	肠道组织 Intestinal tissue	广东省汕尾市 Shanwei City, Guangdong Province
4	SCBZ	肠道组织 Intestinal tissue	四川省巴中市 Bazhong City, Sichuan Province
5	HNHK	肛拭子 Anal swab	海南省海口市 Haikou City, Hainan Province
6	SC	粪便 Faeces	四川省 Sichuan Province
7	ZQ	粪便 Faeces	广东省肇庆市 Zhaoqing City, Guangdong Province
8	SWLF	粪便 Faeces	广东省陆丰市 Lufeng City, Guangdong Province
9	HNSMX	粪便 Faeces	河南省三门峡市 Sanmenxia City, Henan Province
10	SXTY	粪便 Faeces	山西省太原市 Taiyuan City, Shanxi Province

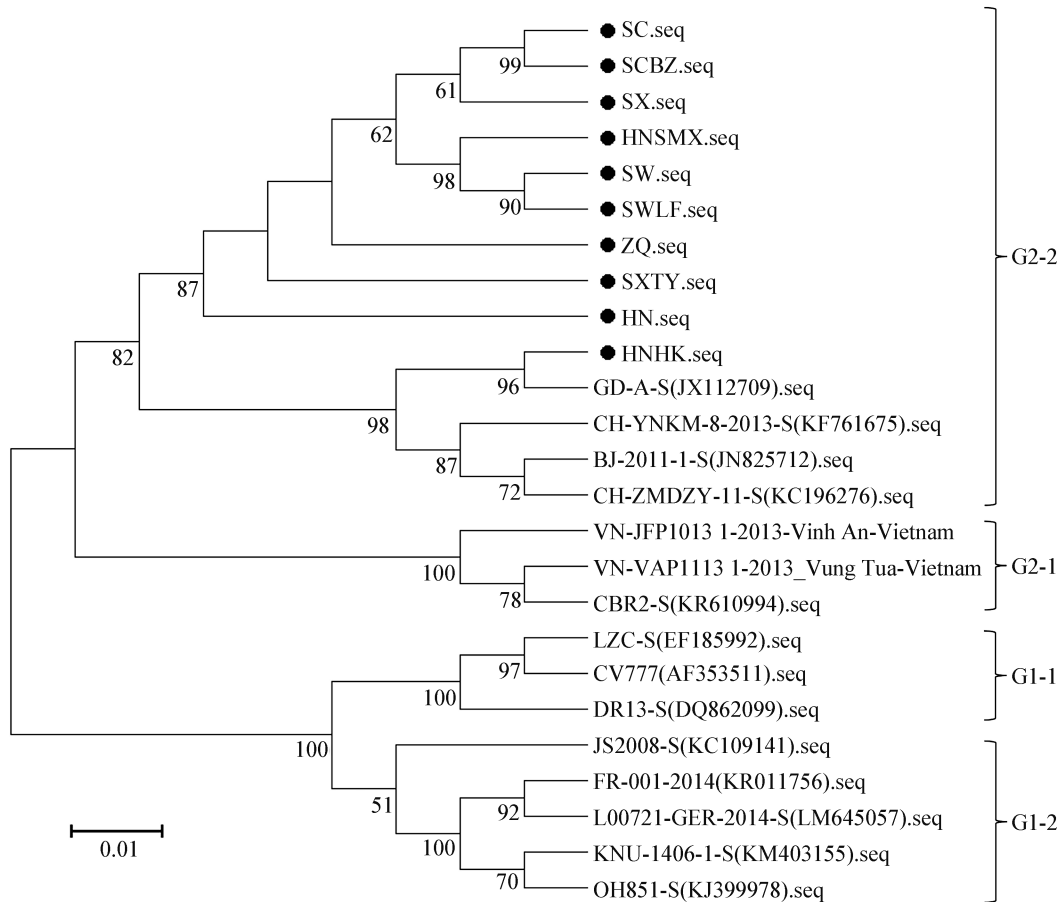


图2 基于PEDV S1基因构建遗传进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on the PEDV S1 gene

●:本试验测序鉴定的PEDV代表毒株;下同

●:The PEDV representative strain identified by sequencing in this study. The same below

		相似性 (%) Percent identity																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25				
差异性 (%) Divergence	1	■	98.0	98.5	98.5	98.4	98.5	96.7	97.7	99.0	99.0	87.9	97.9	87.0	87.1	86.9	87.2	87.2	97.3	97.3	97.7	97.3	97.8	97.2	87.8	86.9	1	HN.seq		
	2	1.4	■	97.6	97.5	97.4	97.5	97.4	97.5	98.0	98.1	88.4	100.0	87.6	87.6	87.5	87.7	87.7	98.2	98.2	99.4	98.2	99.5	98.9	88.4	87.6	2	HNHK.seq		
	3	1.3	2.0	■	98.4	98.0	99.8	98.4	98.6	98.7	98.4	88.1	97.6	87.3	87.3	87.1	87.3	87.4	97.0	97.0	97.2	97.0	97.3	97.0	88.1	87.1	3	HNSMX.seq		
	4	1.3	2.1	1.6	■	99.7	98.6	97.4	98.8	98.6	98.3	88.4	97.5	87.5	87.6	87.4	87.7	87.7	97.0	97.0	97.0	97.0	97.2	96.7	88.4	87.4	4	SC.seq		
	5	1.4	2.2	1.7	0.0	■	98.2	97.5	98.4	98.2	98.8	88.4	97.4	87.6	87.4	87.2	87.6	87.5	97.2	97.2	97.0	97.2	97.1	96.7	88.4	87.3	5	SCBZ.seq		
	6	1.3	2.0	0.2	1.5	1.5	■	98.7	98.6	98.7	98.4	88.0	97.5	87.3	87.2	86.9	87.3	87.3	97.1	97.1	97.1	97.1	97.2	97.0	88.0	86.9	6	SW.seq		
	7	2.1	2.3	0.3	1.3	1.5	0.0	■	97.3	97.4	97.9	88.3	97.3	87.7	87.7	87.5	87.6	87.8	96.7	96.7	96.9	96.7	97.0	96.7	88.3	87.4	7	SX.seq		
	8	2.1	2.1	1.4	1.2	1.3	1.5	1.4	■	98.8	98.3	88.2	97.5	87.4	87.4	87.2	87.5	87.5	96.9	96.9	97.3	96.9	97.2	96.9	88.2	87.2	8	SWLF.seq		
	9	0.8	1.5	1.3	1.5	1.5	1.3	1.3	1.2	■	98.9	88.3	98.0	87.3	87.2	86.9	87.6	87.3	97.6	97.6	97.8	97.6	97.7	97.4	88.3	86.9	9	SXTY.seq		
	10	0.7	1.5	1.1	1.2	1.2	1.1	1.3	1.2	0.6	■	88.2	98.1	87.4	87.2	86.9	87.4	87.2	97.8	97.8	97.7	97.8	97.8	97.3	88.2	87.0	10	ZQ.seq		
	11	12.5	12.7	12.4	12.0	12.3	12.4	12.2	12.2	12.1	12.6	■	88.6	96.2	95.3	94.9	99.3	95.2	88.9	88.9	88.4	88.9	88.5	88.0	100.0	94.6	11	CV777(AF353511).seq		
	12	1.5	0.0	1.9	2.1	2.2	2.0	2.3	2.0	1.5	1.5	12.4	■	87.8	87.8	87.7	87.9	87.9	98.2	98.2	99.4	98.2	99.5	98.8	88.6	87.8	12	GD-A-S(JX112709).seq		
	13	13.7	13.7	13.3	13.0	13.2	13.2	12.9	13.2	13.3	13.5	3.9	13.5	■	95.8	95.5	95.5	95.8	88.1	88.1	87.7	88.1	87.8	87.5	96.2	95.2	13	JS2008-S(KC109141).seq		
	14	13.5	13.7	13.2	12.9	13.4	13.4	12.9	13.2	13.5	13.7	4.9	13.4	4.3	■	99.4	94.6	99.9	88.1	88.1	87.7	88.1	87.8	87.5	95.3	99.3	14	KNU-1406-1-S(KM403155).seq		
	15	13.7	13.8	13.5	13.2	13.7	13.7	13.1	13.4	13.7	14.1	5.3	13.5	4.7	0.5	■	94.2	99.5	87.8	87.8	87.6	87.7	87.4	94.9	99.5	15	L00721-GER-2014-S(LM645057).seq			
	16	13.4	13.5	13.2	12.8	13.2	13.3	13.0	13.0	12.9	13.4	0.7	13.3	4.7	5.6	6.0	■	94.5	98.2	88.2	87.7	88.2	87.8	87.3	99.3	93.9	16	LZC-S(EF185992).seq		
	17	13.4	13.5	13.1	12.8	13.3	13.3	12.8	13.0	13.3	13.7	5.0	13.3	4.3	0.1	0.5	5.7	■	98.2	88.2	87.8	88.2	87.9	87.6	95.2	99.4	17	OH851-S(KJ399978).seq		
	18	2.1	1.9	2.6	2.5	2.5	2.4	3.0	2.7	1.9	1.8	12.1	1.8	12.1	1.8	13.1	13.0	13.4	12.9	12.9	■	99.8	97.8	99.8	97.3	88.9	87.9	18	VN-JFP1013-1-2013-Vinh An-Vietnam	
	19	2.1	1.9	2.6	2.5	2.5	2.4	3.0	2.7	1.9	1.8	12.1	1.8	12.1	1.8	13.1	13.0	13.4	12.9	12.9	0.2	■	97.8	100.0	97.9	97.3	88.9	87.9	19	VN-VAP1113-1-2013-Vung Tua-Vietnam
	20	1.7	0.6	2.4	2.5	2.7	2.4	2.8	2.2	1.7	1.9	12.7	0.6	13.6	13.5	13.6	13.5	13.4	2.2	2.2	■	97.8	99.7	99.4	88.4	87.7	20	BJ-2011-1-S(JN825712).seq		
	21	2.1	1.9	2.6	2.5	2.5	2.4	3.0	2.7	1.9	1.8	12.1	1.8	12.1	1.8	13.1	13.0	13.4	12.9	12.9	0.2	0.0	2.2	■	97.9	97.3	88.9	87.9	21	CBR2-S(KR610994).seq
	22	1.6	0.5	2.3	2.4	2.6	2.3	2.7	2.4	1.8	1.8	12.6	0.5	13.5	13.4	13.5	13.4	13.3	2.1	2.1	0.3	2.1	■	99.1	88.5	87.8	22	CH-YNMK-3-2013-S(KF761675).seq		
	23	2.3	1.1	2.6	2.8	3.0	2.5	3.0	2.7	2.1	2.4	13.2	1.2	13.8	13.8	13.9	14.0	13.7	2.8	2.8	0.6	2.8	0.9	■	88.0	87.5	23	CH-ZMDZY-11-S(KC196276).seq		
	24	12.6	12.7	12.4	12.0	12.3	12.4	12.2	12.2	12.1	12.6	0.0	12.4	3.9	4.9	5.3	0.7	5.0	12.1	12.7	12.1	12.6	13.2	■	94.6	24	DR13-S(DQ862099).seq			
	25	13.7	13.7	13.5	13.2	13.6	13.7	13.3	13.4	13.7	14.0	5.6	13.4	5.0	0.7	0.5	6.4	0.6	13.3	13.3	13.5	13.3	13.4	13.8	5.6	■	25	FR-001-2014(KR011756).seq		

图3 PEDV S1 基因核苷酸序列相似性分析

Fig. 3 Nucleotide sequence similarity analysis of PEDV S1 gene

表4 PEDV S1 蛋白氨基酸突变位点分析(参考毒株:G1-1 亚型毒株 CV777)

Table 4 Analysis of PEDV S1 protein amino acid mutation sites (reference strain:G1-1 subtype strain CV777)

代表毒株 Representative strain	氨基酸突变位点 Amino acid mutation sites										
	28 (S)	52 (Y)	83 (Q)	90 (G)	113 (H)	137 (Y)	179 (C)	201 (S)	252 (Y)	281 (L)	330 (R)
HN	A	F	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
SC	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
SX	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
SWLF	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
HNHK	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
SCBZ	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	-
ZQ	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	-
SW	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	-
HNSMX	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	C
SXTY	A	Y	-	W	Y	H	F	Q	H	I	-

注:-:氨基酸缺失;下同

Note:-: Amino acid deletion. The same below

G1-2 亚型参考毒株 FR-001-2014 相比,10 株代表毒株在第 30(I→T)、100(V→F)、165(R→C)、240(R→C) 位点发生突变。与 G2-1 亚型参考毒株 VN-JFP1013-1-2013-Vinh An-Vietnam 相比,10 株代表毒株均在第 213 位点发生突变(Y→H)。与 G2-2 亚型参考毒株 GD-A-S 相比,在第 115(R)位点,只有代表毒株 HNHK 未发生突变,其余代表毒株均发生突变(R→W)。

2.6 PEDV M 基因遗传进化树构建 PEDV M 基因遗传进化树结果显示,除代表毒株 HN、HNHK 属于以毒株 GD-A 为代表的 G2-1 亚型外,其余代表毒株均属于以毒株 FR-001-2014 为代表的 G2-2 亚型,未检出 G1 型毒株(图 4)。

2.7 PEDV M 基因核苷酸序列相似性分析 相似性比对结果显示,10 株 PEDV 代表毒株 M 基因核苷酸序列的相似性介于 96.0% ~ 100%;与 G1-1 亚型参考毒株 CV777 的相似性介于 97.1% ~ 98.3%,与 G1-2 亚型参考毒株 JS2008 的相似性介于 96.8% ~ 98.4%,与 G2-1 亚型参考毒株 GD-A 的相似性介于 97.7% ~ 99.7%,与 G2-2 亚型参考毒株 FR-001-2014 的相似性介于 98.4% ~ 99.7%(图 5)。

2.8 PEDV M 蛋白氨基酸序列分析 以 G1-1 亚型参考毒株 CV777 为参考,进行 M 蛋白氨基酸序列分析,结果见表 5,10 株代表毒株均在第 137(L→Q)位点发生突变;在第 81(W)位点,除代表毒株 HN、HNHK 未发生突变外,其余代表毒株均发生氨基酸缺失。与

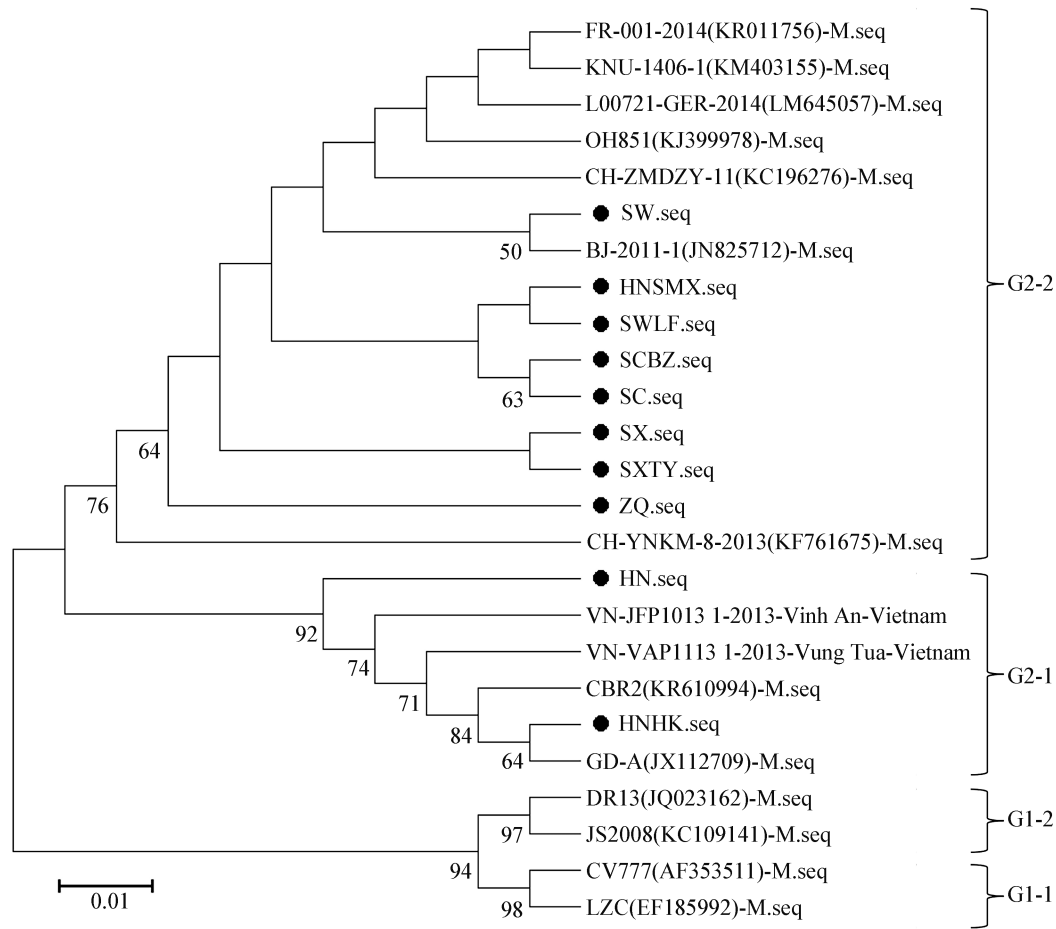


图4 基于PEDV M基因构建遗传进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on the PEDV M gene

		相似性 (%) Percent identity																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
差异性 (%) Divergence	1	■	98.4	99.5	98.4	98.3	98.4	98.5	98.0	97.8	98.0	98.6	98.6	97.2	98.4	99.8	98.8	98.3	98.3	99.8	98.9	98.4	98.3	98.4	98.4	99.7	1	
	2	1.6	■	98.3	99.8	99.8	100.0	100.0	99.2	99.1	99.3	99.8	99.8	96.9	99.7	98.6	98.6	99.5	97.7	98.6	99.2	99.7	98.0	97.8	99.7	98.3	2	
	3	0.5	1.7	■	98.2	98.2	96.0	98.3	97.8	98.0	97.8	98.5	98.5	97.2	98.4	99.7	99.7	98.2	98.4	99.7	98.8	98.4	98.2	98.2	98.4	99.4	3	
	4	1.7	0.2	1.8	■	100.0	99.8	99.8	99.0	98.9	99.1	99.7	99.7	96.8	99.5	98.5	98.5	99.5	97.6	98.5	99.0	99.7	97.9	97.7	99.5	98.2	4	
	5	1.7	0.2	1.8	0.0	■	99.9	99.8	99.1	98.9	99.2	99.7	99.7	96.8	99.5	98.5	98.5	99.4	97.6	98.5	99.1	99.5	97.9	97.7	99.5	98.2	5	
	6	1.6	0.0	4.2	0.2	0.1	■	100.0	99.2	99.1	99.3	99.9	99.9	97.1	99.7	98.7	98.7	99.6	97.7	98.7	99.3	99.7	98.1	97.8	99.7	98.4	6	
	7	1.5	0.0	1.7	0.2	0.2	0.0	■	99.2	99.0	99.3	99.8	99.8	97.0	99.7	98.7	98.7	99.8	97.7	98.7	99.2	99.8	98.0	97.8	99.7	98.3	7	
	8	2.1	0.8	2.2	1.0	0.9	0.8	0.8	■	98.6	98.7	99.1	99.1	96.1	98.9	98.1	98.1	98.8	97.2	98.1	98.5	98.9	97.2	97.4	98.9	97.8	8	
	9	2.2	0.9	2.0	1.1	1.1	0.9	1.0	1.4	■	98.5	98.9	98.9	96.0	99.1	98.0	98.0	98.5	96.8	98.0	98.6	98.8	97.1	97.0	98.8	97.7	9	
	10	2.0	0.7	2.2	0.9	0.8	0.7	0.7	1.4	1.5	■	99.2	99.2	97.3	99.0	98.2	98.2	98.8	97.8	98.2	98.7	99.0	98.2	98.0	99.0	97.8	10	
	11	1.4	0.2	1.5	0.3	0.3	0.1	0.2	0.9	1.1	0.8	■	100.0	97.2	99.9	98.8	98.8	98.8	99.7	97.8	98.8	99.4	99.9	98.2	97.9	99.9	98.5	11
	12	1.4	0.2	1.5	0.3	0.3	0.1	0.2	0.9	1.1	0.8	0.0	■	97.2	99.9	98.8	98.8	99.7	97.8	98.8	99.4	99.9	98.2	97.9	99.9	98.5	12	
	13	2.9	3.2	2.8	3.3	3.2	3.0	3.1	4.0	4.1	2.7	2.8	2.8	■	97.1	97.5	97.5	96.9	97.9	97.5	97.2	97.1	99.0	98.1	97.1	97.2	13	
	14	1.6	0.3	1.6	0.5	0.5	0.3	0.1	0.9	1.0	1.0	0.1	0.1	0.1	3.0	■	98.7	98.7	99.6	97.7	98.7	99.3	99.7	98.1	97.8	99.7	98.4	14
	15	0.2	1.4	0.3	1.5	1.5	1.3	1.3	1.9	2.0	1.9	1.2	1.2	2.5	1.3	0.0	■	100.0	98.5	98.4	100.0	99.1	98.7	98.5	98.5	98.7	15	
	16	0.2	1.4	0.3	1.5	1.5	1.3	1.3	1.9	2.0	1.9	1.2	1.2	2.5	1.3	0.0	98.5	98.4	100.0	99.1	98.7	98.5	98.5	98.7	99.7	16		
	17	1.7	0.5	1.8	0.5	0.6	0.4	0.2	1.3	1.4	1.2	0.3	0.3	3.1	0.4	1.5	1.5	■	97.5	98.5	99.1	99.6	97.9	97.7	99.6	98.2	17	
	18	1.7	2.4	1.6	2.5	2.5	2.4	2.4	2.8	3.3	2.2	2.2	2.2	2.1	2.4	1.6	1.6	2.5	■	98.4	97.8	97.7	99.0	99.9	97.7	98.1	18	
	19	0.2	1.4	0.3	1.5	1.5	1.3	1.3	1.9	2.0	1.9	1.2	1.2	2.5	1.3	0.0	1.5	1.6	98.4	■	99.1	98.7	98.5	98.5	98.7	99.7	19	
	20	1.1	0.8	1.2	1.0	0.9	0.7	0.8	1.6	1.4	1.3	0.6	0.6	2.8	0.7	0.9	0.9	2.2	0.9	99.3	■	98.2	97.9	99.3	98.8	20		
	21	1.6	0.3	1.6	0.3	0.5	0.3	0.2	1.1	1.2	1.0	0.1	0.1	3.0	0.3	1.3	1.3	0.4	2.4	1.3	0.7	■	98.1	97.8	99.7	98.4	21	
	22	1.7	2.1	1.8	2.1	2.1	1.9	2.0	2.8	3.0	1.9	1.8	1.8	1.0	1.9	1.5	1.5	2.1	1.0	1.5	1.8	1.9	■	99.1	98.1	98.2	22	
	23	1.6	2.2	1.8	2.3	2.3	2.2	2.2	2.7	3.1	2.0	2.1	2.1	1.9	2.2	1.5	1.5	2.4	0.1	1.5	2.1	2.2	0.9	■	97.8	98.2	23	
	24	1.6	0.3	1.6	0.5	0.5	0.3	0.3	1.1	1.2	1.0	0.1	0.1	3.0	0.3	1.3	1.3	0.4	2.4	1.3	0.7	0.3	1.9	2.2	■	98.4	24	
	25	0.3	1.7	0.6	1.8	1.8	1.6	1.7	2.2	2.3	2.2	1.5	1.5	2.8	1.6	0.3	0.3	1.8	1.9	0.3	1.2	1.6	1.8	1.8	1.6	■	25	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			

图5 PEDV M基因核苷酸序列相似性分析

Fig. 5 Nucleotide sequence similarity analysis of PEDV M gene

G1-2亚型参考毒株JS2008相比,所有代表毒株在第99(S→L)、116(I→T)、186(C→Y)位点均发生突变。与G2-1亚型参考毒株GD-A相比,10株代表毒株均第80(W→C)位点发生突变。与G2-2亚型参考毒株FR-001-2014相比,在第95(I)位点,除代表毒株HNHK和HN发生突变(I→T)外,其余代表毒株均正常。

2.9 PEDV ORF3 基因遗传进化树构建 PEDV ORF3 基因遗传进化树结果显示,除代表毒株HN属于以参考毒株CV777为代表的G1-1亚型,HNHK属于以参考毒株GD-A为代表的G2-1亚型外,其余8株代表毒株全部属于以参考毒株FR-001-2014为代表的G1-2亚型,未测出G2-2亚型毒株(图6)。

表5 PEDV M蛋白氨基酸突变位点分析(参考毒株:G1-1亚型毒株 CV777)

Table 5 Analysis of PEDV M protein amino acid mutation sites (reference strain: G1-1 subtype strain CV777)

代表毒株 Representative strain	氨基酸突变位点 Amino acid mutation sites									
	58 (I)	81 (W)	95 (T)	116 (I)	137 (L)	150 (S)	162 (R)	201 (T)	222 (Q)	242 (K)
HN	I	W	T	T	Q	F	R	M	Q	K
SC	I	-	I	T	Q	S	R	T	P	K
SX	T	-	I	T	Q	S	R	M	P	K
SWLF	I	-	I	T	Q	S	R	T	P	K
HNHK	I	W	T	T	Q	S	R	M	Q	K
SCBZ	I	-	I	T	Q	S	R	T	P	K
ZQ	I	-	I	I	Q	S	H	T	L	-
SW	I	-	I	T	Q	S	R	T	P	K
HNSMX	I	-	I	T	Q	S	R	T	P	K
SXTY	T	-	I	T	Q	S	R	T	P	K

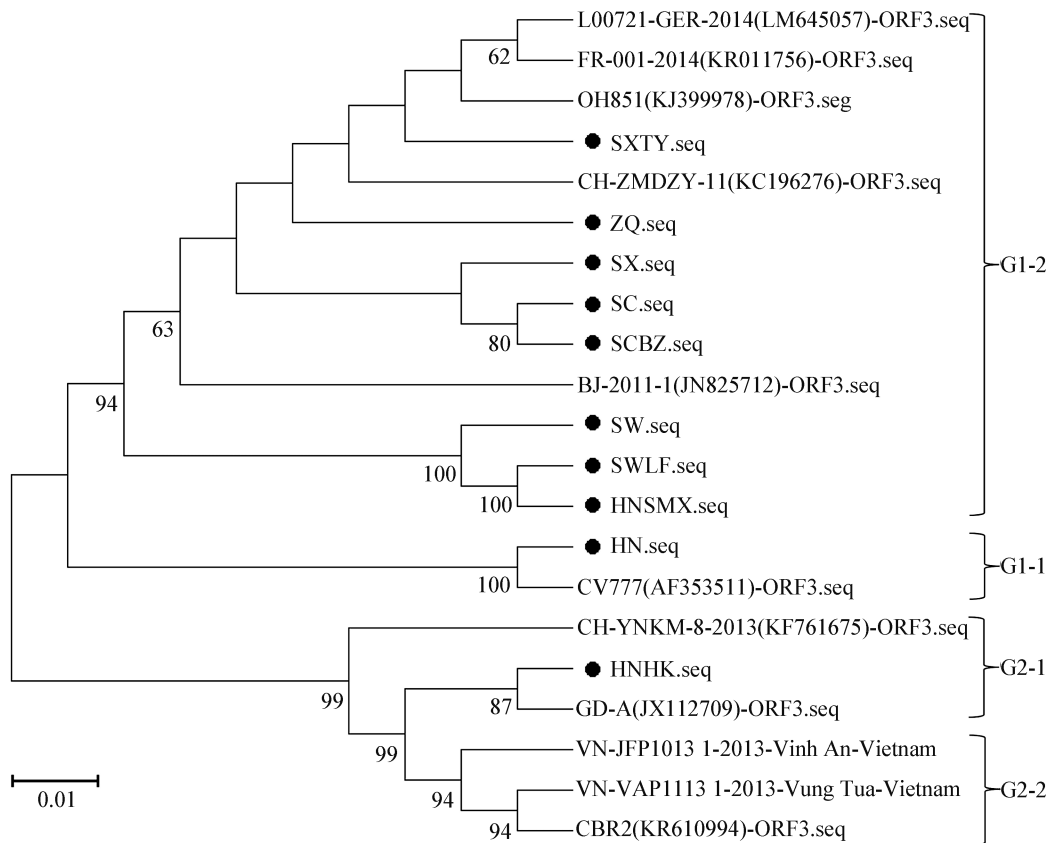


图6 基于PEDV ORF3基因构建遗传进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed based on the PEDV ORF3 gene

2.10 PEDV ORF3基因核苷酸序列相似性分析 相似性比对结果显示,10株PEDV代表毒株 ORF3 基因核苷酸序列的相似性介于 95.6% ~ 100%;与 G1-1 亚型参考毒株 CV777 的相似性介于 96.1% ~ 100%,与 G1-2 亚型参考毒株 FR-001-2014 的相似性介于 96.0% ~ 99.6%,与 G2-1 亚型参考毒株 GD-

A 的相似性介于 95.3% ~ 99.7%,与 G2-2 亚型参考毒株 VN-JFP1013-1-2013-Vinh An-Vietnam 的相似性介于 95.4% ~ 99.3%(图7)。

2.11 PEDV ORF3 蛋白氨基酸序列分析 以 G1-1 亚型参考毒株 CV777 为参考,进行 ORF3 蛋白氨基酸序列分析,结果见表6,在第 21(V)、54(V)位点,

		相似性 (%) Percent identity																						
差异性 (%) Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	1	■	96.4	96.1	96.9	96.9	96.1	96.1	96.3	96.7	96.4	96.7	96.1	96.7	96.9	96.3	96.3	97.3	96.3	96.6	96.7	100.0	1	HN.seq
	2	3.7	■	96.3	96.1	96.1	96.3	96.3	95.6	95.7	95.9	96.0	99.7	96.0	96.1	99.3	99.3	96.3	99.3	99.0	96.0	96.4	2	HNHK.seq
	3	4.0	3.8	■	98.5	98.5	100.0	100.0	98.2	98.1	98.1	98.4	96.0	98.4	98.5	96.1	96.1	98.4	96.1	97.0	98.1	96.1	3	HNSMX.seq
	4	3.2	4.0	1.5	■	100.0	98.5	98.5	99.1	99.3	99.0	99.6	95.9	99.6	99.7	96.0	96.0	99.3	96.0	96.9	99.3	96.9	4	SC.seq
	5	3.2	4.0	1.5	0.0	■	98.5	98.5	99.1	99.3	99.0	99.6	95.9	99.6	99.7	96.0	96.0	99.3	96.0	96.9	99.3	96.9	5	SCBZ.seq
	6	4.0	3.8	0.0	1.5	1.5	■	100.0	98.2	98.1	98.1	98.4	96.0	98.4	98.5	96.1	96.1	98.4	96.1	97.0	98.1	96.1	6	SW.seq
	7	4.0	3.8	0.0	1.5	1.5	0.0	■	98.2	98.1	98.1	98.4	96.0	98.4	98.5	96.1	96.1	98.4	96.1	97.0	98.1	96.1	7	SWLF-ORF3.seq
	8	3.8	4.6	1.8	0.9	0.9	1.8	1.8	■	98.7	98.7	99.0	95.3	99.0	99.1	95.4	95.4	98.7	95.4	96.3	98.7	96.3	8	SX.seq
	9	3.4	4.5	2.0	0.7	0.7	2.0	2.0	1.3	■	98.8	99.4	95.4	99.4	99.6	95.6	95.6	99.1	95.6	96.4	99.1	96.7	9	SXTY.seq
	10	3.7	4.3	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0	1.3	1.2	■	99.1	95.6	99.1	99.3	95.7	95.7	98.8	95.7	96.6	98.8	96.4	10	ZQ.seq
	11	3.4	4.1	1.7	0.4	0.4	1.7	1.7	1.0	0.6	0.9	■	95.7	100.0	99.9	95.9	95.9	99.4	95.9	96.7	99.4	96.7	11	FR-001-2014(KR011756)-ORF3.seq
	12	4.0	0.3	4.1	4.3	4.3	4.1	4.1	4.9	4.8	4.6	4.4	■	95.7	95.9	99.0	99.0	96.0	99.0	98.7	95.7	96.1	12	GD-A(JX112709)-ORF3.seq
	13	3.4	4.1	1.7	0.4	0.4	1.7	1.7	1.0	0.6	0.9	0.0	4.4	■	99.9	95.9	95.9	99.4	95.9	96.7	99.4	96.7	13	L00721-GER-2014(LM645057)-ORF3.seq
	14	3.2	4.0	1.5	0.3	0.3	1.5	1.5	0.9	0.4	0.7	0.1	4.3	0.1	■	96.0	96.0	99.6	96.0	96.9	99.6	96.9	14	OH851(KJ39978)-ORF3.seq
	15	3.8	0.7	4.0	4.1	4.1	4.0	4.0	4.8	4.6	4.5	4.3	1.0	4.3	4.1	■	100.0	96.1	100.0	98.8	95.9	96.3	15	VN-JFP1013 1-2013-Vinh An-Vietnam(KJ960
	16	3.8	0.7	4.0	4.1	4.1	4.0	4.0	4.8	4.6	4.5	4.3	1.0	4.3	4.1	0.0	■	96.1	100.0	98.8	95.9	96.3	16	VN-VAP1113 1-2013-Vung Tua-Vietnam(KJ96
	17	2.7	3.8	1.7	0.7	0.7	1.7	1.7	1.3	0.9	1.2	0.6	4.1	0.6	0.4	4.0	4.0	■	96.1	96.7	99.1	97.3	17	BJ-2011-1(JN825712)-ORF3.seq
	18	3.8	0.7	4.0	4.1	4.1	4.0	4.0	4.8	4.6	4.5	4.3	1.0	4.3	4.1	0.0	4.0	■	98.8	95.9	96.3	18	CBR2(KR610994)-ORF3.seq	
	19	3.5	1.0	3.0	3.2	3.2	3.0	3.0	3.8	3.7	3.5	3.3	1.3	3.3	3.2	1.2	1.2	3.3	1.2	■	96.4	96.6	19	CH-YNKM-8-2013(KF761675)-ORF3.seq
	20	3.4	4.1	2.0	0.7	0.7	2.0	2.0	1.3	0.9	1.2	0.6	4.4	0.6	0.4	4.3	4.3	0.9	4.3	3.7	■	96.7	20	CH-ZMDZY-11(KC196276)-ORF3.seq
	21	0.0	3.7	4.0	3.2	3.2	4.0	4.0	3.8	3.4	3.7	3.4	4.0	3.4	3.2	3.8	3.8	2.7	3.8	3.5	3.4	■	21	CV777(AF353511)-ORF3.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			

图7 PEDV ORF3基因核苷酸序列相似性分析

Fig. 7 Nucleotide sequence similarity analysis of PEDV ORF3 gene

表6 PEDV ORF3蛋白氨基酸突变位点分析(参考毒株:G1-1亚型毒株CV777)

Table 6 Analysis of PEDV ORF3 protein amino acid mutation sites(reference strain:G1-1 subtype strain CV777)

代表毒株 Representative strain	氨基酸突变位点 Amino acid mutation sites									
	21 (V)	25 (L)	43 (N)	54 (V)	70 (I)	80 (F)	92 (L)	107 (C)	160 (F)	202 (Q)
HN	V	L	N	V	I	F	L	C	F	Q
SC	A	L	N	I	I	V	F	C	L	Q
SX	A	L	N	I	I	V	F	C	F	Q
SWLF	A	S	N	I	F	V	F	C	L	Q
HNHK	A	S	N	I	V	F	F	F	F	H
SCBZ	A	L	N	I	I	V	F	C	F	Q
ZQ	A	L	Q	I	I	V	F	C	F	Q
SW	A	S	N	I	F	V	F	C	L	Q
HNSMX	A	S	N	I	F	V	F	C	F	Q
SXTY	A	L	N	I	I	V	F	C	F	Q

除代表毒株 HN 未发生突变外,其余代表毒株均发生突变 21(V→A)、54(V→I);在第 107(C→F)和 202(Q→H)位点,除代表毒株 HNHK 存在突变外,其余代表毒株均未发现氨基酸异常。与 G1-2 亚型参考毒株 FR-001-2014 相比,第 92(L)位点,除代表毒株 HN 外,其余代表毒株均存在突变(L→F)。与 G2-1 亚型参考毒株 GD-A 相比,10 株代表毒株均在第 124(L→F)位点发生突变。与 G2-2 亚型参考毒株 VN-JFP1013-1-2013-Vinh An-Vietnam 相比,除代表毒株 HN 和 HNHK 在第 80(F)位点无异常外,其余代表毒株均存在突变(F→V)。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代首次发现以来,PEDV 在全球多个地区持续流行,特别是在欧洲和亚洲的生猪生

产国,多次暴发疫情^[16]。在我国,最初接种疫苗可以有效预防 PEDV 经典毒株,但自 2010 年 12 月以来,以严重呕吐、水样腹泻为主要临床特征的 PEDV 突变毒株出现,导致新生仔猪高发病率和高死亡率,造成严重经济损失^[17-18]。目前,我国流行的 PEDV 毒株主要为 G2 型毒株,其中 G2-1 亚型毒株的流行逐年下降,G2-2 和 G2-3 亚型毒株则呈逐年上升趋势,且 G2-3 亚型毒株不仅流行广泛,并且逐渐成为优势毒株^[19]。本试验在 2023—2024 年开展期间,G2-3 亚型毒株尚未形成流行态势,故构建进化树时未将其纳入。因此,后续研究中需加强对 G2-3 亚型毒株的监测和研究,并扩大参考毒株范围,以更好地反映当前 PEDV 的进化趋势。比较 PEDV 变异毒株(G2 型)和经典毒株(G1 型)的基因差异发现,变异毒株中 S 基因的变异最显著,尤其在 S1 区

域^[20]。对S1基因中和表位的比对发现,变异毒株在3个关键抗原表位(248~280aa、442~499aa和697~742aa)存在突变,这可能是导致变异毒株毒力增强和现有疫苗保护效果下降的重要原因^[21]。由于PEDV在进化过程中易发生突变,传统疫苗难以提供有效的交叉免疫保护^[22],因此,需要优化免疫策略,减少新型突变毒株引发的经济损失。

本试验调查了2023—2024年我国部分地区PEDV流行情况,结果显示,样品阳性率为58.68%(473/806),猪场阳性率高达88.10%(37/42)。这与Zhang等^[23]报道的近年来我国部分地区PEDV阳性率超过40%的结果基本一致。进一步的分析发现,广东和河南是我国PEDV传播的主要区域,与以往研究结果相符^[24]。PEDV在两地高发且广泛传播,可能是由于生猪贸易对病毒传播的促进作用,以及适宜的环境条件共同导致。然而,本试验部分调查地区样品量较少,可能存在抽样偏倚和假阳性/假阴性风险,影响整体数据的地域分布精确性。未来研究应优化抽样设计,确保区域样品数量充足并进行统计学分析。本试验结果提示,我国部分地区PEDV感染形势依然严峻,具有广泛的地域分布特征,因此需持续加强防控工作。

本试验测序鉴定的10株PEDV代表毒株的S1、M和ORF3基因核苷酸序列相似性分别介于97.4%~99.7%、96.0%~100%和95.6%~100%,表明这些代表毒株之间具有较高的相似性,遗传距离较近。此外,10株代表毒株与各亚型参考毒株相似性也均比较高,说明代表毒株与参考毒株亲缘关系密切,整体变异程度不大,表明我国部分地区可能尚未出现新型突变毒株。遗传进化树结果显示,本试验测序的大部分代表毒株均属于G2型毒株,亦有部分G1型毒株存在,这一结果进一步证实了近年来我国流行的PEDV毒株大多数属于G2型毒株^[25]。G2型毒株的毒力相较于G1型毒株更强,且在进化过程中更容易出现突变,现有市售疫苗难以提供完全的保护作用^[26]。因此,应持续加强对PEDV毒株变异趋势的监测,并加快针对性疫苗的研发,以对PEDV流行毒株进行有效防控。

PEDV的S蛋白在病毒入侵细胞过程中起关键作用,是中和抗体的主要靶标。目前已经鉴定出6个中和表位:S1⁰(19~220aa)^[27]、S1^A(435~485aa)^[28]、COE(499~638aa)^[29]、SS2(748~755aa)、SS6(764~771aa)^[30]和2C10(1368~1374aa)^[31]。氨基酸突变会改变病毒致病性,影响机体中和抗体产生,可能导致在进化过程中形成新的毒株^[32]。本

试验氨基酸序列分析显示,10株代表毒株的S1、M和ORF3基因在多个位点存在不同程度的突变。尤以中和抗原表位更为集中,提示PEDV的中和表位突变概率更高,可能影响关键抗原表位产生的中和抗体水平,导致毒株的抗原性发生变化。本试验中S1基因氨基酸突变现象比M和ORF3基因更显著,表明S1基因更加不稳定、更易突变,M和ORF3基因则相对保守、变异程度低。研究表明,S蛋白存在多种插入、缺失和替换现象,可能会改变G2型毒株的抗原性,导致G1型毒株疫苗无法有效应对我国流行的变异毒株^[33]。M蛋白是诱导机体产生免疫保护的重要抗原蛋白之一,其氨基酸序列高度保守,若发生突变则可能增强病毒粒子的产生和释放,影响病毒载量和传播效率,促进病毒在宿主细胞内的复制^[12]。ORF3蛋白具有离子通道功能,其跨膜区突变可直接影响离子通道活性、膜通透性和离子平衡,从而影响病毒的感染和致病能力^[15]。氨基酸序列分析结果提示,后续需对我国PEDV的流行病学情况开展更深入的调查,以更准确地掌握其流行趋势和遗传演化规律。

综上所述,PEDV在我国部分地区广泛流行,2023—2024年我国部分地区PEDV样品阳性率达到58.68%,流行毒株主要为G2型,并与参考毒株GD-A-S和FR-001-2014具有较近的亲缘关系。本试验系统解析了我国部分地区PEDV的流行特征和遗传演化规律,揭示了当前流行毒株的遗传多样性和关键突变位点,为阐明PEDV的区域性传播规律和制定精准防控策略提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Shibata I, Tsuda T, Mori M, *et al.* Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 72(3-4): 173-182.
- [2] Lin F, Zhang H, Li L, *et al.* PEDV: insights and advances into types, function, structure, and receptor recognition [J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1744.
- [3] Cima G. Fighting a deadly pig disease. Industry, veterinarians trying to contain PED virus, new to the US [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2013, 243(4): 469-470.
- [4] Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, *et al.* Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013—2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 96.
- [5] Huang Y W, Dickerman A W, Piñeyro P, *et al.* Origin, evolu-

- tion, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States [J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00737-13.
- [6] Li M, Pan Y, Xi Y, *et al.* Insights and progress on epidemic characteristics, genotyping, and preventive measures of PEDV in China: a review [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 181: 106185.
- [7] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, *et al.* Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161-163.
- [8] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication [M]//*Coronavirus replication and reverse genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Nature, 2005: 1-30.
- [9] Li X, Wu Y, Yan Z, *et al.* A comprehensive view on the protein functions of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Genes*, 2024, 15(2): 165.
- [10] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, *et al.* Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence [J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 137-144.
- [11] Wang D, Ge X, Chen D, *et al.* The S gene is necessary but not sufficient for the virulence of porcine epidemic diarrhea virus novel variant strain BJ2011C [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(13): e00603-18.
- [12] Kim O, Chae C. *In situ* hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets [J]. *Veterinary Pathology*, 2000, 37(1): 62-67.
- [13] Fan J H, Zuo Y Z, Shen X Q, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the monitoring and surveillance of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant membrane protein [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 225: 90-94.
- [14] Jantraphakorn Y, Viriyakitkosol R, Jongkaewwattana A, *et al.* Interaction between PEDV and its hosts: a closer look at the ORF3 accessory protein [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 744276.
- [15] Beall A, Yount B, Lin C M, *et al.* Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A [J]. *mBio*, 2016, 7(1): e01451-15.
- [16] Chen J, Wang C, Shi H, *et al.* Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(9): 1471-1476.
- [17] Pensaert M B, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Archives of Virology*, 1978, 58(3): 243-247.
- [18] Bi J, Zeng S, Xiao S, *et al.* Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain AJ1102 isolated from a suckling piglet with acute diarrhea in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10910-10911.
- [19] Su M, Li C, Qi S, *et al.* A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1129-1140.
- [20] Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [21] Sun M, Ma J, Wang Y, *et al.* Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1484-1492.
- [22] 熊谋康, 梁太润, 刘献辉, 等. 2020—2021年我国部分地区猪流行性腹泻病毒S1、M和ORF3基因遗传进化分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023, (15): 8-17.
- [23] Zhang H, Zou C, Peng O, *et al.* Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(3): msad052.
- [24] He W T, Bollen N, Xu Y, *et al.* Phylogeography reveals association between swine trade and the spread of porcine epidemic diarrhea virus in China and across the world [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2022, 39(2): msab364.
- [25] López-Figueroa C, Cano E, Navarro N, *et al.* Clinical, pathological and virological outcomes of tissue-homogenate-derived and cell-adapted strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in a neonatal pig model [J]. *Viruses*, 2023, 16(1): 44.
- [26] Li Z, Ma Z, Li Y, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus: molecular mechanisms of attenuation and vaccines [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104553.
- [27] Li C, Li W, Lucio de Esarte E, *et al.* Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(12): e00273-17.
- [28] Chang C Y, Cheng I C, Chang Y C, *et al.* Identification of neutralizing monoclonal antibodies targeting novel conformational epitopes of the porcine epidemic diarrhoea virus spike protein [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 2529.
- [29] Chang S H, Bae J L, Kang T J, *et al.* Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Molecules and Cells*, 2002, 14(2): 295-299.
- [30] Okda F A, Lawson S, Singrey A, *et al.* The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes [J]. *Virology*, 2017, 509: 185-194.
- [31] Cruz D J M, Kim C J, Shin H J. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Virus Research*, 2008, 132(1-2): 192-196.
- [32] Lei J, Miao Y, Bi W, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus: etiology, epidemiology, antigenicity, and control strategies in China [J]. *Animals*, 2024, 14(2): 294.
- [33] Li W, Li H, Liu Y, *et al.* New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350-1353.

(责任编辑 孟迪)

中国农业大学动物医院



第三方诊断服务平台

年诊断检测量超350000单

业务合作单位超过1500家

专职临床诊断技术人员70+名

全国领先一批GCP试验基地

实验室诊断送检服务

实验动物（鼠、兔、猴等）、经济动物（猪、牛、羊、马、家禽等）和伴侣动物（犬、猫等）

320000+ 单 实验室年诊断检测量



血液学

血常规、血气、血型鉴定等



生化

肝功能、肾功能、血糖、血脂等

微生物学

细菌培养与鉴定、药敏试验

分子生物学

病原 PCR、肿瘤基因突变检测等

免疫学

抗原、抗体检测

内分泌学

性激素、甲状腺素、皮质醇检测

组织病理学

切片、HE 染色、免疫组化

特殊项目

结石分析、过敏原等

影像远程判读服务

犬、猫及异宠

根据病史和提交的X线、CT及MRI图像出具详细书面解释

38000+ 例 影像年判读量



中国农业大学动物医院

咨询电话：010-62731273；62733305

网址：www.cauvet.com

地址：北京市海淀区圆明园西路2号



检验中心服务微信



影像中心服务微信

立足教学科研 发展动物医疗

主管单位:安徽省农业科学院
主办单位:安徽省农业科学院

ISSN 1007-5739
CN 34-1278/S

现代农业科技

XIANDAI NONGYE KEJI

半月刊

2019.16

ISSN 1007-5739



9 771007 573194



农村经济学

◆农业经济管理

- 阿克陶县乡村旅游发展现状及对策·····热则古丽·阿卜杜热合曼(207)
- 传统小农户和现代农业的融合机制研究·····李欢欢 石晓华(209)
- 无棣县现代农业发展存在的问题及对策·····袁玉峰(212)
- 农村区块链技术推广应用存在的问题及对策·····赵宇琛 谭子聪(213)
- 白城市发展庭院经济探析·····陈丹(215)
- 社群经济视角下横县茉莉花茶特色文化旅游品牌提升策略研究·····黎海霞 黄永新 韦昌银等(216)
- 基于摘帽贫困县贫困人口变化和现状的思考与建议——以河南省扶沟县为例·····王永才 宫辰(219)
- 贫困县实施乡村振兴面临的困难与对策——以湖北省巴东县为例·····邓凤英 陈代龙(221)
- 平山县农业产业化发展现状及对策·····王晓聪(224)
- 农民专业合作社高质量发展的多维度分析——基于河南省鲁山县的实地调查·····杨书焱 刘威 韩谨禧等(225)
- 安阳市农业供给侧结构调整对策·····李晓珍(228)
- 双驱动型家庭农场发展模式研究——以南充市丘陵地区为例·····黄浩原宇(230)
- 朝阳市农业技术推广创新工作存在的问题及建议·····杜海英(233)
- 宁海县胡陈乡村级集体经济发展现状及对策·····王升尧(234)
- 贫困村产业扶贫存在的问题及对策·····钟有榛(236)
- 温县农村集体产权制度改革新路径探析·····警芳菊 刘士烜(237)
- 遂昌县农业产业助推低收入农户增收措施·····李湘萍(239)

◆农业教育

- 动物体细胞克隆与转基因技术科普需求及认知度调研分析·····庄站伟 徐铮 吴霄等(240)
- 行动导向教学法在食品质量管理教学中的应用·····王荣荣 张文辉(242)
- 中职学校种植专业实践教学探析·····张楠(244)
- 都匀市鼠害控制农民田间学校的实践应用·····周朝霞 罗全丽 肖卫平等(245)
- 多层次模块化实验教学体系在园林实践教学中的应用·····祝海燕 杜迎刚(247)
- 地方特色专业课程生产实习教学改革探析——以贵州大学水产养殖专业冷水性鱼类养殖学课程为例·····邵俭 安苗 陈江凤等(248)

◆农业信息

- 阜宁县“互联网+农业”经济发展探析·····陈昌尧 陈足青 汤静静(250)
- 利用 Excel 软件实现的家蚕饲养卡片系统·····童晓琪 张彦 黄浩等(251)

◆土地资源管理

- 农村土地确权登记颁证工作存在的问题及对策——以宁海县胡陈乡为例·····王升尧(257)

◆新农村建设

- 乡村振兴背景下黑龙江省空心村整治问题研究·····段玉 孙丽娜(259)

◆农村金融

- 辽宁海洋牧场建设的金融投入探析·····郑世忠 陈放(262)
- 遂昌县茶叶低温气象指数保险的实践应用·····朱彩虹(264)

◆财务管理

- 新常态下中小企业财务管理存在的问题及对策·····王碧晗(265)

广告

- 公益广告·····(封二)
- 安徽皖垦种业股份有限公司“抗病先锋”“徐农 029”“扬麦 25”·····(封三)

本刊声明:①凡本刊采用的文章,即视为作者同意授权本刊使用其作品,包括电子版信息网络传播权、无线增值业务权(本刊有权授权合作伙伴龙源期刊网增值再使用)。所刊文章稿费中已包括上述使用方式的稿费。②根据协议,中国知网等对由其复检的论文相似度超 30% 的网络版文献进行删除。

动物体细胞克隆与转基因技术科普需求及认知度调研分析

庄站伟^{1,2,3} 徐铮^{1,2,3} 吴霄^{1,2,3} 马晓莉^{1,2,3*}

(¹华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心,广东广州 510642; ²华南农业大学动物科学学院; ³华南农业大学实验动物中心)

摘要 当前,社会上存在着对“克隆”“转基因”的误解。为使民众对克隆和转基因有科学性的认知,本研究采取问卷调查的方式,获取公众对当前体细胞克隆和转基因技术的认知水平与态度的数据,以期为相关的科普活动提供参考。

关键词 体细胞克隆;转基因;问卷调查;科普宣传

中图分类号 F323.8 **文献标识码** A

文章编号 1007-5739(2019)16-0240-02



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Investigation and Analysis on Popular Science Demand and Cognition of Animal Somatic Cell Cloning and Transgenic Technology

ZHUANG Zhan-wei^{1,2,3} XU Zheng^{1,2,3} WU Xiao^{1,2,3} MA Xiao-li^{1,2,3*}

(¹National Engineering and Technology Research Center for Pig Breeding Industry, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642; ²College of Animal Science, South China Agricultural University; ³Laboratory Animal Center, South China Agricultural University)

Abstract At present, there are misunderstanding over the "cloning" "transgenic technology". In order to make people has a scientific cognition to the cloning and transgenic technology, this study adopt the method of questionnaire survey and obtained the data of the public's perception of the somatic cell cloning and transgenic technology, so as to provide reference for related science popularization activity.

Key words somatic cloning; transgenic technology; questionnaire survey; popular science propaganda

近年来,随着我国社会经济的发展,与科技相关的社会热点、焦点问题频发,与民众相关的科普需求快速增长,特别是体细胞克隆和转基因技术更是频频引起社会的广泛讨论和争议。因此,大力加强科学技术普及工作,增强全社会的科技意识,对于增进公众对科学技术的认知显得尤为重要^[1]。本研究结合克隆和转基因技术原理和相关知识,针对不同知识层次的民众设计了调查问卷,通过网络等多种方式进行线上和线下的调研,并对回收的调查问卷进行分析,得到公众对克隆和转基因科普需求和认知度情况,为进一步制定出有针对性、指导性和客观合理的克隆和转基因技术科普宣传方案提供依据。

1 调研背景

在当前克隆和转基因逐渐被误解和“妖魔化”的趋势下,在人民群众对与自身密切相关的科学知识日益增长的需求下,本研究充分利用在种猪体细胞克隆和转基因技术的研发与应用基础和取得的重大科研成果^[2-3],拟开展该项技术及成果科学普及。本研究团队研发的猪体细胞克隆技术的“受体母猪怀孕率和分娩率”等指标高于国内外其他研究团队,并且评价克隆技术水平的最重要指标“克隆胚胎总体发育效率”与浙江大学 UM.Jong 研究团队和丹麦奥胡斯大学 H. Callesen 研究团队非常接近,也远高于其他研究团队^[4-8]。因此,拟将科技成果通过通俗易懂、深入浅出的科普微视频、展板等多种方式,结合目前群众对该领域知识的需求,将成果包含的科学知识、思想、方法、主要突破等,向社会公众介绍、推广,以推动重大科技成果科普化,满足公众对此类知识与产品正确认识的迫切需求,使科学思想在全社会广泛传

播,推动社会进步。

2 调研基本情况

2019年1—3月,通过微信公众号、微信朋友圈、QQ等网络方式和现场问卷进行调查,线上线下相结合,共收回有效调研问卷667份。参与本次调研的民众年龄阶段主要集中在18岁到35岁之间,占比为76.46%,以本科学历及以下人群参与问卷较多,所占比例为83.50%。问卷共设置13题,其中单项选择10题、多项选择3题。问题主要涉及被调查者的基本信息、公众参加科普的次数、公众喜欢的科普形式以及对于克隆和转基因技术的认知水平和态度。回收问卷后,采用Excel和SPSS进行数据统计分析。

3 调研结果统计分析

3.1 举办和参加科普活动的情况

科普是向居民、学生宣传科学知识的重要载体,对于提高居民的科学素养、激发青少年的科学兴趣,从而养成勤于探索和创造的精神具有重要意义。目前,全国大部分城市的社区和学校均会以多种形式定期举办科普活动,如社区科学栏宣传、“科普教育进社区、校园”、科普讲座等。本次调查问卷,统计了社区、学校开展科普活动(如讲座、科学知识竞赛和展览等)的频率。调查结果表明,23.54%的受访者表示所在社区或学校会定期开展科普讲座;35.23%的受访者表示社区或学校不定期开展科普讲座;有41.23%的受访者表示社区或学校很少或没有开展过科普活动。对于民众是否经常参加科普活动,仅8.4%的受访者表示经常参加科普活动,高达86.36%的受访者表示偶尔参加或者没参加过科普活动。此外,本团队也调查了学校和社区经常开展的科普活动形式(表1)。结果表明,社区或学校开展科普活动仍不积极,这可能会导致部分人群参加科普活动,但受限于举办科普活动的频次少,久而久之便很少将参加科普活动作为日常生活中要做的事情。因此,建议社区和学校要丰富举办科普活动的形式,增加举办科普活动的频次,可以探索定时定点举办科普活动。

基金项目 广东省省级科技计划项目(2018A070701012);广东省农业科技特派员项目(生猪规范养殖技术及良种推广示范);广州市科协科普经费计划项目(K2019020101001)。

作者简介 庄站伟(1993-),男,河南永城人,在读硕士研究生。研究方向:动物遗传育种与繁殖。

* 通信作者

收稿日期 2019-05-11

表 1 学校和社区经常开展的科普活动形式

排名	项目	人数	比例/%
1	讲座	333	49.93
2	科普宣传页	126	18.89
3	图文展览	105	15.74
4	其他	58	8.70
6	科普竞赛	45	6.75

3.2 喜欢的科普形式

随着时代的发展以及网络的普及,人们可以随时随地地获取想要的知识。在科普的形式上,相比于网络视频、图文,传统的科普讲座、科学宣传册等受到极大的挑战。因此,在设计调查问卷时应注重在网络上进行宣传。综合分析结果,43.33%的受访者表示最喜欢的科普形式是“现场科普讲座、报告”;58.17%的受访者最喜欢的科普形式是“看网络视频讲解”;52.02%的受访者最喜欢“科研人员现场讲解、演示”;49.18%的受访者表示最喜欢“亲自参与”。从调研结果也可以看出,虽然大部分人群喜欢通过网络了解科学知识,但也有很大比例的人群喜欢零距离和科学知识“接触”。虽然信息时代网络占据了人们大部分的时间,但只要科普人员认真准备,精心组织,让科学和普通民众零距离接触也能达到理想的科普效果(表 2)。

表 2 民众最喜欢的科普形式

排名	项目	人数	比例/%
1	观看网络视频讲解	388	58.17
2	科研人员现场讲授	347	52.02
3	亲自参与	328	49.18
4	现场科普讲座、报告	289	43.33

3.3 获取科普知识的途径和目的

从受访人员获取科普知识的途径来看,86.66%的受访者选择了网络,排名第一;传统的科普书籍为 67.17%,科普讲座为 37.78%,分列第二、三。虽然科普书籍不是最高的来源途径,但由于其科学性较强,因而受到最高的信赖度。相比于随身携带纸质科普书籍,从网络上获取知识有一个最显著的优点,那就是人们可以利用碎片化的时间去浏览科普网页、文章,并且不占用空间。但网络上科学知识的准确性有时存在偏差,提示民众需要注意加强甄别,做到有疑问必深究。除此之外,受访者还通过其他的渠道去获取科普知识,如 28.19%的受访者表示自己也会通过图文展览获取科普知识。另外,国内也有许多高校和科研机构的实验室会定期邀请青少年、居民亲临科研一线,比如参观实验室等,这也是培养人们的科学兴趣,推广宣传科学技术的有益形式(表 3)。对于学习科普知识的目的,占比最高为兴趣(42.88%),其次为学习(37.78%)。“兴趣是最好的老师”,表明科普宣传过程中应注意方法和方式,应提高知识普及的趣味性,可以通过通俗易懂、深入浅出的科普微视频、展板、图书作品、实物模型等多种方式,以网络、展会、宣讲会等多种形式,面向社会公众广泛宣传。

3.4 民众对克隆和转基因技术的了解程度及态度

克隆和转基因技术作为重要的基因工程工具,从问世起便在生命科学领域扮演着重要角色。近年来,转基因和克隆技术也是频繁登上媒体头条,引起广泛的讨论。本调研问卷

表 3 民众获取科普知识的途径

排名	项目	人数	比例/%
1	网络	578	86.66
2	科普书籍	448	67.17
3	科普讲座	252	37.78
4	图文展览	188	28.19
5	其他	146	21.89
6	社区活动	64	9.60

针对克隆和转基因最基础的知识设计了问题,以了解普通民众对其了解程度,从而为本课题组进行针对性的科普提供坚实基础。作为克隆技术问世的重大事件,克隆羊“多莉”时常被很多人提及。调研结果也表明,92.05%的民众知道“多莉”,但 81.41%的受访者不知道克隆技术的原理。这说明绝大部分人群仅仅只是知道“克隆”这一名词,但对于其科学原理,往往不会去深究。关于转基因技术,41.23%的受访者持支持态度,18.44%的受访者持反对态度,40.33%的受访者表示并不关心,持中立态度;但是有 73.61%的受访者表示知道转基因的原理,另外 26.39%的人表示不知道或不关心,这点似乎与受访者对待转基因的态度不相符,这或许与部分受访者并未真正了解转基因及其原理但却以为自己清楚有关;另外,通过调研发现,66.57%的受访者想了解有关体细胞克隆技术的应用,55.92%的受访者想了解克隆技术和转基因技术的区别,超过 30%的人想了解什么是体细胞克隆技术以及其原理。调查结果表明在进行科普准备时,应结合具体应用实例为民众介绍体细胞克隆和转基因技术的原理和实际应用,以消除民众的误解。

4 结论

分析调研结果可知,民众对科普活动及克隆和转基因技术的需求呈现以下特点:

(1)普通民众对于科普知识,科普文化消费的需求呈现上升的趋势。虽然目前社区或学校举办科普活动的频次不是很高,但仍有大部分民众通过各种形式主动去接触科学知识,学习科学知识,进行“自我科普”。因此,政府在鼓励社区和学校积极开展科普活动的同时,也应提供多种方式增加人们获得科学知识的途径,加强对民众进行科普消费的引导,发挥社区科普的力量,相信一定能更好地满足市民科普文化消费的需求。

(2)网络的普及影响着人们接受科普的方式,网络正在逐渐取代传统的传播媒介。因此,需要加强对网络科普的管理,建立健全相应的法律法规,促进网络科普的健康成长^[9]。

(3)民众对于克隆和转基因技术存在很大讨论和争议,可能有很大一部分原因是因为其不了解克隆和转基因技术的科学原理,盲目跟从去反对转基因。因此,目前的主要任务是选拔专业人士,以多种形式举办关于克隆和转基因技术的科普活动,耐心为民众讲解其科学原理。同时,政府部门应在社会的大讨论中主动发声,主动作为,及时发布权威信息,对于恶意散布、抹黑克隆和转基因技术的谣言也应给予相应处罚。

(4)克隆和转基因作为一种新兴的生物技术手段,使得人们对生物体的受孕、出生、身体构造甚至寿命等各方面具有更多的把控能力,但也正是这样一门科学,在国内逐渐被

(下转第 243 页)

当中,引导学生运用已掌握的知识与技能,去解决案例中出现的状况^[3]。

在讲解食品质量管理课程中 ISO 22000 食品安全管理体系危害分析与关键控制点这一知识点时,选用企业生产酱鸭的案例来进行解读,酱鸭的生产工艺流程分为原料鸭及其他辅料的选择→宰杀→浸泡、清洗→腌制→酱制→冷却、真空包装→杀菌→冷却、检验。其中每个工序都会存在潜在危害、对潜在危害的判定依据及如何预防这些危害,最终对关键控制点的判断。

根据典型性案例的选择,教师对酱鸭的制作工艺进行了详细介绍,帮助学生了解每个工艺流程的潜在危害,为后期危害的预防提出可操作性的措施。通过案例的学习最终获得教学重难点关键控制点的判断。因此,课堂教学中引入合适的案例能够帮助学生对重要知识点的深入理解。

3.3 角色扮演法

角色扮演法是情境模拟活动中应用非常广泛的一种方法,教师创设真实的模拟情境,学生扮演其中的角色;根据情境及角色,学生处于逼真的情境中,从所扮演角色的视角出发,处理可能出现的各种问题,获得一定的心理体验。角色扮演法充分调动了学生的积极性和主动性,锻炼了学生的语言表达能力、团队合作的精神以及分析解决问题的能力^[4]。

在食品质量管理课程中的绿色食品认证章节中运用角色扮演法,教师首先为学生提供绿色食品认证的流程及相关的视频材料,组织学生展开讨论。明确绿色食品是遵循可

(上接第 239 页)

党员结对低收入农户养蜂“一联三”包干制,即每位党员带头并包干联系指导 3~5 户蜂农养蜂,包括蜂桶制作、取蜜、销售等环节,为低收入农户提供“一站式”服务,实现农户增收致富。

4 强化技术支撑

多次组织低收入农户到外地参观学习,邀请院校等专家前来授课,本土专家团队上门服务,为低收入农户提供全方位培训,举办各类培训班 56 期,参训人员达 3 500 余人次。

5 结语

下一步,遂昌县以实施乡村振兴战略为契机,继续推进

(上接第 241 页)

误解和“妖魔化”,已成为人们关注和争论的焦点,因而解决当前人民群众对该领域知识的需求与愿望显得尤为迫切。加强科普工作,对于增强全社会的科技意识,提高全民族的科学文化素质,使科学思想在全社会广泛传播,倡导积极向上的先进文化和科学具有深远的意义。科学技术是人类进步的阶梯,一个国家的普通民众科学素养得以提高,科技强国之路走得也就更为顺畅。

5 参考文献

- [1] 李蔚然,丁振国.关于社会热点焦点问题及其科普需求的调研报告[J].科普研究,2013,8(1):18-24.
- [2] ZHANG X,LI Z,YANG H,et al.Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact[J].Elife,2018(7):22.
- [3] XU W,LI Z,YU B,et al.Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer[J].PLoS One,2013,8(5):e64705.

持续发展原则,按照特定生产方式生产,经专门机构认定,许可使用绿色食品标志的食品。然后确定角色扮演的脚本,最终交给教师来完善。

角色扮演分 5 组进行,每组 6~8 人参加,分别扮演农场主、定点环境监测机构的监测人员、定点产品检测机构的检测人员、中国绿色食品发展中心与中国绿色食品认证评审委员会成员。每组学生按照脚本进行,其余 4 组和教师在一旁观看并点评,分析其优缺点,特别是对关键知识的掌握与处理。同时教师需要拓宽讨论的深度和广度。角色扮演法使学生全程参与课堂教学,授课形式新奇,能最大程度地调动学生的积极性,课堂氛围活跃。

4 结语

行动导向教学法可以培养学生的综合素养,让学生积极参与到小组活动中,通过合作完成项目,不仅提高了学生的交流沟通能力,还培养了团队合作意识。教学中运用行动导向教学法增加了学生学习的兴趣,培养了他们团队合作能力,提高了综合职业素养,促进其全面发展。

5 参考文献

- [1] 林桦.行动导向教学法及其在高职教学中应用探析[J].科技信息,2012(7):454-455.
- [2] 朱秀清,周莉,王旭.《项目教学法》指导课程设计教学实践的思考[J].教育教学论坛,2019(11):149-150.
- [3] 曾维丽,张臻.角色扮演法在《食品法律法规与标准》教学中的应用[J].中国医学教育技术,2015,29(1):108-109.
- [4] 李佳鸿.浅谈案例教学法在药理学教学中的实施[J].科技经济导刊,2019,27(3):187.

农业产业助推低收入农户增收工作,突出一个“准”字,精准施策、精准落地、精准扶贫;狠抓一个“快”字,抢抓机遇、加大力度、加快进度;做好一个“长”字,完善工作推进和长效运行管理机制,让农业产业成为低收入农户增收的法宝。

6 参考文献

- [1] 杨群义,王书奎.响水县推动经济薄弱村精准脱贫的实践[J].当代农村财经,2018(7):17-19.
- [2] 袁玉明,严冬平,杨小丽.精准施策促增收 力推脱贫奔小康[J].江苏农村经济,2017(3):60-62.
- [3] 耿士威,罗剑朝.农户参与农业产业链融资意愿研究:基于农户收入差距的视角[J].金融理论与实践,2018(6):67-71.
- [4] 杜立峰,王艳杰.丽水市低收入农户精准脱贫的路径探讨[J].现代商业,2017(16):187-189.

- [4] HUANG Y,OUYANG H,YU H,et al.Efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer—a retrospective study of factors related to embryo recipient and embryos transferred[J].Biol Open,2013,2(11):1223-1228.
- [5] KOO O J,KANG J T,KWON D K,et al.Influence of evulation status, seasonality and embryo transfer method on development of cloned porcine embryos[J].Reprod Domest Anim,2010,45(5):773-778.
- [6] MAO J,TESSANNE K,Whitworth K M,et al.Effects of combined treatment of MG132 and scriptaid on early and term development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos[J].Cell Reprogram,2012,14(5):385-389.
- [7] RIM C H,Fu Z,Bao L,et al.The effect of the number of transferred embryos,the interval between nuclear transfer and embryo transfer,and the transfer pattern on pig cloning efficiency [J].Anim Reprod Sci,2013,143(1-4):91-96.
- [8] WEI H,QING Y,PAN W,et al.Comparison of the efficiency of banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells[J].PLoS One,2013,8(2):e57728.
- [9] 罗德燕,谢立,陈志刚,等.成都市市民科普消费调研报告[J].云南科技管理,2015,28(4):41-44.

顾问 杨剑波

主任委员 李泽福

副主任委员 杨前进

委员 (以姓氏笔画为序)

马传喜	王芳	王艳	王大刚	王文杰	王永杰	王重龙	王洪江
任杰	伊兴凯	江莹芬	孙义祥	严从生	李廷春	李泽福	杨永新
杨前进	吴文革	吴跃进	张磊	张平治	张立平	陈雨	武际
郑曙峰	姚升	徐丽娜	戚仁德	董玲	谢宁宁	詹凯	魏鹏程



现代农业科技

Modern Agricultural Science and Technology

1972年创刊 半月刊

主编 王洪江

副主编 徐桂珍

社长 徐桂珍

副社长 江珊

编辑部 李继红 余蓉蓉 朱迎弟 李小娟 林翠翠 李阿娜 秦艳梅 李婷
许璐 范龙惠

通联部 汪莹 张晓芳 张兆肇 林万红 张华红

照排部 韩磊 王伟

美术编辑 张颖

法律顾问 王方东(安徽事茂律师事务所 13053085269)

主管单位 安徽省农业科学院

主办单位 安徽省农业科学院

协办单位 安徽皖垦种业股份有限公司
安徽省神农农业技术开发有限公司

出版单位 《现代农业科技》编辑部

编辑部电话 (0551) 65197539 65160772 65160883

通联部电话 (0551) 65160716 65148819 65147509

印刷 合肥市创新印务有限公司

总发行 安徽省报刊发行局

电子邮箱 xdneykj@188.com

xdneykj@163.com

网址 <http://www.xdneykj.com>

地址 合肥市庐阳区农科南路40号(邮编230031)

出版日期 2019年8月20日

全国优秀农业科技期刊

《中文科技期刊数据库(全文版)》来源期刊

安徽省优秀科技期刊

2011年中国科学文献计量评价研究中心科技类统计源期刊

《中国核心期刊(遴选)数据库》来源期刊

2015年被国家新闻出版广电总局认定为A类学术期刊(首批)

《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊

2017年荣登数字阅读影响力期刊TOP100国内排行第67名