

密级:

论文编号:

中国农业科学院 硕士学位论文

**鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的
复合实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与评价**

**Development and validation of a multiplex TaqMan real-time
RT-PCR for the quantitative and differential detection of wild-type
viruses from C-strain vaccine of *Classical swine fever virus***

硕 士 研 究 生: 赵建军

指 导 教 师: 仇华吉 研究员

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 分子病毒学与免疫学

培 养 单 位: 中国农业科学院研究生院
哈尔滨兽医研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Degree Dissertation

**Development and validation of a multiplex TaqMan real-time
RT-PCR for the quantitative and differential detection of wild-type
viruses from C-strain vaccine of *Classical swine fever virus***

M. Sc. Candidate: Zhao Jian-jun

Advisor: Prof. Qiu Hua-ji

Major: Preventive Veterinary Medicine

Speciality: Molecular Virology and Immunology

The Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2007

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导 师 签 名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的 复合实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与评价				
论文作者	赵建军	指导教师	仇华吉 研究员	培养单位	哈尔滨兽医研究所
评阅人	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
答辩主席	刘文周	教 授	博导	东北农业大学	预防兽医学
答辩委员	刘文周	教 授	博导	东北农业大学	预防兽医学
	师东方	教 授	博导	东北农业大学	预防兽医学
	乔传玲	副研究员	硕导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	刘长军	副研究员	硕导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
	张 云	副研究员	硕导	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学
答辩时间、地点		2007 年 6 月 13 日于哈尔滨兽医研究所学术报告厅			
记 录		刘家森			

摘 要

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种高度接触性传染病, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列入 OIE 疾病名录 (OIE Listed diseases), 为须申报的 (notifiable) 动物传染病。近年来, 我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大的变化, 在临床表现上趋于非典型化, 主要表现为隐性带毒和慢性感染, 成为影响养猪业发展的一大隐患。CSFV 跟同属的牛病毒性腹泻病毒 1 型 (BVDV-1)、牛病毒性腹泻病毒 2 型 (BVDV-2)、绵羊边界病病毒 (BDV) 和长颈鹿瘟病毒 (Pestivirus of giraffe) 都属于黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (Pestivirus) 的成员, 由于瘟病毒属其它成员大都可以感染猪, 与 CSFV 存在血清学交叉反应, 因此给猪瘟诊断造成一定干扰。此外, 猪瘟兔化弱疫苗 (HCLV) 在我国的大规模应用, 为控制猪瘟起到了重要作用, 但同时也给传统的诊断方法对 CSFV 野毒感染猪和疫苗接种猪的鉴别诊断带来较大困难。

本研究旨在建立一种复合荧光定量 RT-PCR 方法, 用于 CSFV 野毒株与兔化弱疫苗株的鉴别诊断。通过对 GenBank 中公布的 34 株 CSFV 野毒和弱疫苗株基因组序列的比较分析, 在其 5' 端非编码区设计了一对针对 CSFV 的通用引物和两条分别针对不同基因亚群的 CSFV 野毒株和兔化弱疫苗株的特异性 TaqMan 水解探针, 建立了一种能区分 CSFV 野毒株和兔化弱疫苗株的敏感、特异、重复性好的复合荧光定量 RT-PCR 鉴别诊断方法。该方法能将我国大陆流行的不同基因亚群 (1.1、2.1、2.2 和 2.3 基因亚群) 的 CSFV 野毒株与猪瘟兔化弱疫苗株完全区分开来, 在 10^6 - 10^1 拷贝/ μ L 范围内, 对 CSFV 野毒和兔化弱疫苗标准品模板的检测具有良好的线性关系, 分别可检测到初始模板中 41.8 个 (野毒) 或 81.5 个 (弱毒) 拷贝的病毒 RNA, 与本实验室建立的复合 RT-套式 PCR (RT-nPCR) 的敏感性相近, 二者对 152 份不同样品 (包括细胞培养物和临床现地样品) 检测阳性符合率分别为 96.2% (野毒) 和 100% (兔化弱疫苗)。应用复合荧光定量 RT-PCR 对其中 106 份现地样品检测发现, 野毒阳性率为 30.2% (32/106)。

应用本方法对人工感染 10^6 TCID₅₀ 猪瘟石门强毒的猪只感染后 0~14d 全血中 CSFV RNA 进行了定量检测, 揭示了 CSFV 在猪体内复制的动态变化, 同时发现, 人工感染猪在感染后第 2 天在其全血中就可检测到病毒 RNA, 而同居感染猪在出现猪瘟临床症状前 3~4d 可从其全血中检出病毒 RNA。

应用本方法对 8 份猪瘟兔化细胞疫苗原液效价的检测, 证实本方法与兔体反应热法在疫苗效价测定上具有良好的相关性, 初步确定细胞疫苗样品中病毒 RNA 的含量为 2.23×10^7 拷贝/mL (相当于 5×10^4 RID₅₀) 以上时才可以用于制苗。

本方法可以及早对猪瘟爆发做出准确快速诊断, 防止疫情蔓延; 可以将 CSFV 野毒感染猪迅速从免疫猪群中筛查出来并予以清除, 有利于猪瘟的净化和无猪瘟疫区的建立; 同时本方法还可辅助传统的兔体定型热反应用于猪瘟疫苗效价估测、CSFV 致病机制研究以及猪瘟疫苗免疫攻毒保护效力评价。

关键词: 猪瘟病毒, 猪瘟兔化弱疫苗, 复合荧光定量 RT-PCR, TaqMan 探针, 鉴别诊断

Abstract

Classical swine fever (CSF), caused by *Classical swine fever virus* (CSFV), is a highly contagious disease of pigs, and one of OIE Listed diseases. In recent years, CSF has changed a lot in clinical manifestations under the pressure of mass vaccination in China, resulting in atypical or chronic forms quite different from acute CSF, and causing great economic losses in pork industry. CSFV, together with Bovine viral diarrhea virus 1 (BVDV-1), BVDV-2, Border disease virus (BDV) and Pestivirus of giraffe, belongs to the genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae*. Pigs can be infected with almost any pestivirus species. It is rather difficult to differentiate CSFV from other pestiviruses by conventional serological tests due to cross-reactivity. On the other hand, extensive vaccination with C-strain vaccine makes it difficult to differentiate the animals infected with wild-type viruses from C-strain vaccine vaccinated ones using conventional assays.

This study is aimed to develop a multiplex real-time RT-PCR for the quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of CSFV. All genomic sequences of pestiviruses available in GenBank including 34 strains CSFV genomic sequences were aligned. CSFV specific primers and two differently labeled TaqMan probes for the differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine were designed in the 5'-UTR of the viral genome of CSFV. The two TaqMan probes specifically hybridize wild-type CSFV of different subgroups or C-strain vaccine virus, respectively, in the multiplex real-time RT-PCR, with no cross-reaction to other viruses of porcine origin. Completely correct differentiation of wild-type CSFV of different subgroups (1.1, 2.1, 2.2 and 2.3 subgroups) from C-strain vaccine was achieved when testing reference strains and characterized field isolates of CSFV. There was an excellent linear relationship from 10^6 to 10^1 copies/ μ L when the positive standards of wild-type and C-strain-type viruses were detected simultaneously by the assay. The sensitivity of the assay for detecting wild-type and C-strain-type vaccine viruses was determined to be 41.8 and 81.5 copies of viral RNA, respectively. The agreements between the multiplex real-time RT-PCR and a multiplex RT-nested PCR for detection of wild-type or C-strain-type viruses were 96.2% (wild-type viruses) and 100% (C-strain-type viruses), respectively, when detecting 152 different samples (including cell cultures and field samples). Thirty-two out of 106 (30.2%) of field samples were detected positive for wild-type viruses by the multiplex real-time RT-PCR.

To determine the viral replication kinetics of CSFV in infected pigs, whole blood samples of pigs experimentally infected with 10^6 TCID₅₀ Shimen strain or contact pigs were quantitated by the multiplex real-time RT-PCR from 0 to 14 days post-infection. The assay was able to detect the viral RNA in the whole blood samples of experimentally infected pigs as early as 2 days post-infection and viral RNA was detectable in contact pigs 3 to 4 days prior to the onset of clinical symptoms.

There is an excellent correlation between the titers of C-strain vaccines titrated in rabbits and

the RNA copies quantitated by the multiplex real-time RT-PCR when detecting 8 different batches of C-strain vaccines. It was determined that cell cultures containing more than 2.23×10^7 viral RNA copies (corresponding to 5×10^4 RID₅₀) can be used for vaccine production.

By using the assay, pigs infected with wild-type CSFV can be identified and removed from the vaccinated population, which will help to establish a CSF-free swineherd. Also this assay can be used in the pathogenesis study, vaccine efficacy evaluation and vaccine titration of CSFV.

Keywords: *Classical swine fever virus*, C-strain vaccine, multiplex real-time RT-PCR, TaqMan probe, differential diagnosis

目 录

第一章 绪 论	1
1.1 猪瘟和猪瘟病毒概述	1
1.1.1 猪瘟	1
1.1.2 猪瘟病毒及其基因组结构	1
1.1.3 猪瘟病毒的编码蛋白及其功能	2
1.1.4 猪瘟病毒的遗传分型	5
1.1.5 猪瘟兔化弱毒疫苗	6
1.2 荧光定量PCR	6
1.2.1 荧光定量PCR技术的原理	7
1.2.2 荧光定量PCR技术的两种定量形式	7
1.2.3 荧光定量PCR技术的种类	8
1.2.4 荧光定量PCR技术在动物疾病检测中的应用	9
1.3 猪瘟诊断方法研究现状	9
1.3.1 病原学检测	9
1.3.2 血清学检测	10
1.3.3 间接免疫荧光试验	11
1.3.4 间接血凝试验	11
1.3.5 分子诊断	12
1.3.6 鉴别诊断	14
1.4 本研究的背景与目的	15
第二章 鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合荧光定量 RT-PCR方法的建立	16
2.1 材料与方法	17
2.1.1 毒株、细胞与质粒	17
2.1.2 主要实验仪器及试剂	17
2.1.3 引物和探针	18
2.1.4 病毒RNA提取和cDNA合成	18
2.1.5 复合荧光定量RT-PCR阳性标准品	20
2.1.6 常规PCR	20
2.1.7 复合荧光定量RT-PCR反应条件的优化	20
2.1.8 特异性试验	21
2.1.9 敏感性试验	21
2.1.10 重复性试验	22
2.1.11 复合荧光定量RT-PCR与复合RT-nPCR的符合率试验	23
2.1.12 病毒分离试验	22
2.1.13 复合荧光定量RT-PCR对现地样品的检测和种系发生分析	22
2.2 结果	23
2.2.1 PCR退火温度的确定	23

2.2.2 复合荧光定量RT-PCR反应参数的优化结果及标准曲线的建立	23
2.2.3 复合荧光定量RT-PCR的特异性	26
2.2.4 复合荧光定量RT-PCR的敏感性	26
2.2.5 复合荧光定量RT-PCR的重复性	26
2.2.6 复合荧光定量RT-PCR与复合RT-nPCR的符合率	27
2.2.7 野毒阳性样品的病毒分离验证	27
2.2.8 复合荧光定量RT-PCR对现地样品的检测和种系发生分析	28
2.3 讨论	30
第三章 复合荧光定量RT-PCR对猪瘟病毒人工感染猪的检测	32
3.1 材料与方法	33
3.1.1 实验动物及病毒	33
3.1.2 仪器和试剂	33
3.1.3 实验动物的人工感染	33
3.1.4 全血中病毒RNA的提取和cDNA的合成	33
3.1.5 人工感染猪全血中猪瘟病毒的检测	33
3.1.6 感染猪各组织中猪瘟病毒的检测	33
3.2 结果	34
3.2.1 人工感染猪临床表现和体温检测	34
3.2.2 人工感染猪全血中猪瘟病毒的检测	34
3.2.3 猪瘟病毒在感染猪体内的复制动态	35
3.2.4 猪瘟病毒在感染猪各组织中的分布	36
3.3 讨论	36
第四章 应用复合荧光定量RT-PCR估测猪瘟兔化弱毒疫苗的效价	38
4.1 材料与方法	39
4.1.1 疫苗与实验动物	39
4.1.2 试剂和仪器	39
4.1.3 兔体定型热法测定疫苗效价	39
4.1.4 病毒RNA的提取与cDNA的合成	39
4.1.5 猪瘟兔化弱毒疫苗病毒RNA浓度的检测	39
4.2 结果	39
4.2.1 猪瘟细胞苗的兔体热反应结果	39
4.2.2 复合荧光定量RT-PCR定量检测结果	40
4.3 讨论	41
第五章 结 论	43
参考文献	44
致 谢	51
作者简历	52

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
BDV	<i>Border disease virus</i>	绵羊边界病病毒
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	牛病毒性腹泻病毒
CSF	Classical swine fever	猪瘟
CSFV	<i>Classical swine fever virus</i>	猪瘟病毒
C _T	threshold cycle	达到阈值的循环数
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FAM	6-carboxy-fluorescein	6-羧基荧光素
FQ-PCR	Fluorescence quantitative PCR	荧光定量 PCR
HCLV	Hog cholera lapinized virus (Chinese strain)	猪瘟兔化弱毒
IFA	indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光试验
IPMA	immunoperoxidase monolayer assay	免疫过氧化物酶单层试验
kDa	kilodalton	千道尔顿
ORF	open reading frame	开放读码框
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PK	porcine kidney cells	猪肾细胞
RFLP	restriction fragment length polymorphism	限制性片段多态性分析
RID ₅₀	50% rabbit infective dose	半数兔体感染剂量
RT-nPCR	reverse transcription and nested PCR	反转录套式聚合酶链式反应
RT-PCR	reverse transcription and PCR	反转录聚合酶链式反应
TAMARA	6-carboxy-tetramethyl rhodamine	6-羧基-4-甲基罗丹明
TCID ₅₀	50% cell culture infective dose	半数组织细胞感染量
TET	6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachloro-fluorescein	四氯-6-羧基荧光素
UTR	untranslated region	非翻译区
VI	virus isolation	病毒分离

第一章 绪论

1.1 猪瘟和猪瘟病毒概述

1.1.1 猪瘟

猪瘟 (Classical swine fever, CSF), 是由猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV) 引起猪的一种以高热稽留、出血、梗死、坏死和高死亡率为主要特征的高度接触性传染病 (Fauquet et al., 2005)。世界动物卫生组织 (OIE) 将其列入 OIE 疾病名录 (OIE Listed diseases), 为须申报的 (notifiable) 动物传染病之一, 我国将其列为一类传染病。

据世界粮农组织—世界动物卫生组织—世界卫生组织 (FAO—OIE—WHO) 出版的《动物卫生年鉴》(1992) 公布, 全世界有44个国家和地区存在猪瘟, 主要分布在南美、欧洲和远东的一些国家和地区。截止到1976年, 阿尔巴尼亚、保加利亚等12个国家宣布消灭了猪瘟。到1992年底又有美国、日本等9个国家宣布为无猪瘟国家, 此外还有新西兰、澳大利亚和斯堪的纳维亚半岛的国家也相继宣布消灭了猪瘟。目前该病主要在亚洲、欧洲、非洲、美洲的国家与地区流行。在我国, 当前各省市均有猪瘟的流行, 每年因猪瘟死亡的约占病死猪的1/3以上 (杜念兴, 1998)。

猪瘟具有高度接触传染性, 发病率、死亡率高, 流行广泛, 给养猪业造成了巨大的经济损失。在荷兰仅 1983 和 1984 年度为控制猪瘟的直接开支就为 1.27 亿荷兰盾。面对如此大的经济损失, 世界各国纷纷开始制定和执行猪瘟防制和根除计划, 在英国 1963~1966 三年半时间内为此耗资 1200 万英镑, 宣布为无猪瘟国家; 美国 1962~1978 年为根除猪瘟花费 1.4 亿美元; 比利时 1990 年爆发猪瘟销毁猪只直接经济损失达 2.7 亿美元。

1.1.2 猪瘟病毒及其基因组结构

根据最新的第八次国际病毒分类委员会报告 (Heinz et al., 2004): 猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV)、牛病毒性腹泻病毒1型 (*Bovine viral diarrhea virus 1*, BVDV-1)、牛病毒性腹泻病毒2型 (BVDV-2)、绵羊边界病病毒 (*Border disease virus*, BDV) 和长颈鹿瘟病毒 (*Pestivirus of giraffe*) 组成了黄病毒科瘟病毒属5个确定的成员。

CSFV的基因组为单股正链RNA, 长约12.3kb (Meyers et al., 1996; Moormann et al., 1996; Ruggli et al., 1996), 5'端无帽子结构, 3'端也没有多聚腺苷酸 (Poly A) 尾。含有一个大的开放性读码框 (ORF), 由其编码一条约3898个氨基酸的多聚蛋白, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的作用下, 多聚蛋白在翻译和翻译后加工过程中形成12种成熟的病毒蛋白, 在聚蛋白上从N端到C端的顺序依次为: N^{pro}、C、E^{ms} (E0)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B (图1-1、表1-1), 其中N^{pro}、C、E^{ms}、E1、E2、p7、NS2对于CSFV RNA的复制是必不可少的 (Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990)。

编码CSFV结构蛋白的基因主要定位于基因组5'端1/3部分, 包括p14 (核衣壳蛋白, C) 和3

种囊膜糖蛋白 (gp): E^{ms} (gp44/48)、E1 (gp33) 和 E2 (gp55)。CSFV的ORF有8种非结构蛋白 (N^{pro}、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B), 除N^{pro}外, 编码其他非结构蛋白的序列定位于CSFV基因组3'端2/3部分 (Elbers et al., 1996; Meyers and Thiel, 1996)。大多数非结构蛋白的功能目前还不是很清楚。CSFV基因组非编码区在病毒基因组复制和多聚蛋白翻译过程中起着重要的作用, 是病毒基因组RNA复制和病毒蛋白表达的主要调控区。5'-UTR是病毒蛋白表达的主要调控区 (Moormann et al., 1990; Ishidawa et al., 1995; Lowings et al., 1994), 而3'-UTR则是病毒RNA复制的重要调控区, 可能含有起始基因组RNA合成的启动子、增强子等顺式作用元件。

通过测定CSFV 4种结构糖蛋白的N端, 确定E^{ms}、E1、E2的N端分别位于氨基酸残基Glu²⁶⁸、Leu⁴⁹⁵和Arg⁶⁹⁰。结构蛋白的加工是由宿主细胞的信号酶介导的, 蛋白酶首先在核衣壳蛋白C和E^{ms}1-2前体之间剪切聚蛋白, 随后在E2的C端切开, 最后E^{ms}1-2被迅速剪切成E^{ms}1和E2。在E2从E^{ms}1-2前体释放后, E^{ms}1被加工成E^{ms}和E1, 最后这三种囊膜糖蛋白通过分子内或分子间二硫键形成复合物 (Rumenapf et al., 1998)。CSFV基因组ORF的两侧的非翻译区 (NTR), 存在一段17个核苷酸的互补序列, 在CSFV种内是非常保守的。在5'NTR上含有多个AUG密码子和一个高度结构化的核糖体进入位点 (IRES)。IRES长约330nt, 其5'边界位于核苷酸28~66nt之间, 这些核苷酸形成一个茎环结构 (发卡B), 该结构可能对于IRES的活性十分重要 (Rijinbrand et al., 1997)。

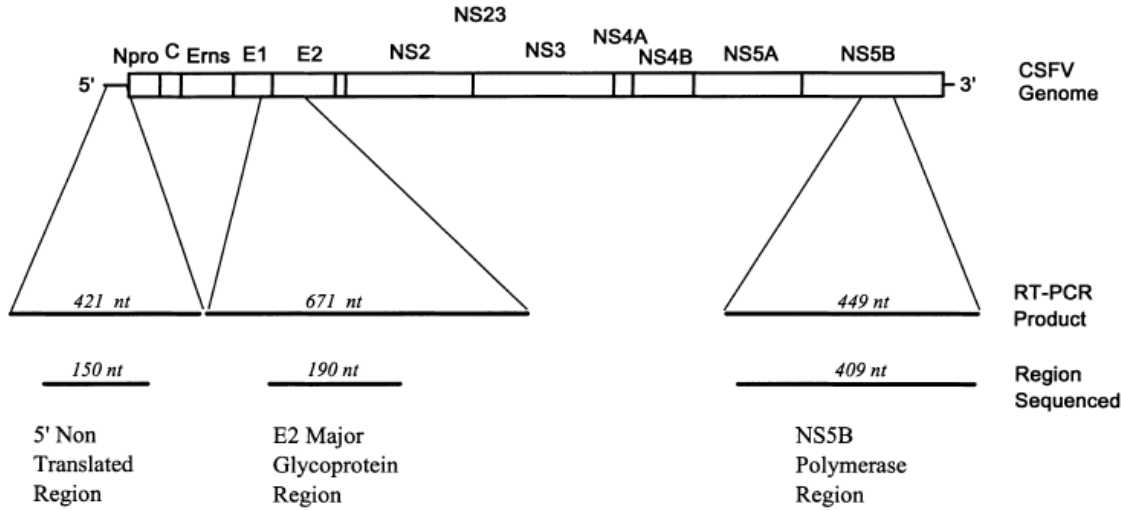


图 1-1 CSFV 基因组结构示意图

Fig. 1-1 Genome organization of CSFV

1.1.3 猪瘟病毒的编码蛋白及其功能

CSFV仅含有一个大的开放阅读框架 (ORF), 此ORF翻译成含3 898个氨基酸残基, 分子量约438kDa的多聚蛋白, 并进一步在病毒和宿主细胞蛋白酶的作用下加工为成熟蛋白, CSFV的所有结构蛋白和非结构蛋白均由该ORF所编码 (Rumenapf et al., 1993)。这一大前体蛋白以共翻译和后翻译的形式在细胞蛋白酶和病毒特异蛋白酶作用下, 加工成结构蛋白和非结构蛋白, 其结构蛋

白和非结构蛋白在病毒RNA上的编码顺序从5'→3'依次为N^{pro}、C、E^{ms}、E1、E2、P7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B编码区，NS2-3可被加工成NS2和NS3（P80），除C、E^{ms}、E1和E2为结构蛋白外，其余均为非结构蛋白。在结构蛋白中，最具有疫苗学研究价值的是E^{ms}和E2，研究得也最为清楚，这两个蛋白均位于病毒粒子的表面，对于一个有囊膜的病毒来说，镶嵌在囊膜中的糖蛋白对于病毒识别、吸附并进入宿主细胞是十分重要的。目前已经定位的CSFV蛋白有5种，即N^{pro}、C、E^{ms}、E1和E2，它们均由CSFV的RNA-ORF 5'-端所编码（Elbers et al., 1996），而非结构蛋白编码区仍不十分明了。

衣壳蛋白C，又称P14，是CSFV编码的第一个结构蛋白，由CSFV多聚蛋白上Ser¹⁶⁹-Ala²⁶⁷间的98个氨基酸组成，其N端由N^{pro}的水解作用产生，C端可能由宿主细胞的信号肽酶作用产生（Rumenapf et al., 1993）。衣壳蛋白C在CSFV基因之间相当保守，其初始功能是为病毒基因组提供了一个保护性屏障，其抗原表位可能是对宿主免疫反应的重要靶蛋白（Handschuh et al., 1995）。用CSFV C蛋白基因构建的重组痘苗病毒活载体疫苗免疫猪，并不能保护猪免受强毒攻击，这说明CSFV C蛋白至少不能诱导机体产生中和抗体（Rumenapf et al., 1991）。最近的研究结果表明CSFV C蛋白不仅是病毒的一个结构蛋白，而且也是一个基因表达的调控因子。

E^{ms}，又称E0，其N末端氨基酸为Glu²⁶⁸，C末端氨基酸为Ala⁴⁹⁴，它由227个氨基酸残基构成，其甲基化程度很高，分子量约为44~48kDa，可诱导产生中和谱很窄的中和抗体。E^{ms}不仅是一种结构蛋白，而且也是一种功能性蛋白，它与CSFV对宿主细胞的嗜性以及致病力有密切关系。E^{ms}有RNase（RNA酶）活性，含有同样保守的两个氨基酸基序SLHGIWPGX（X为G或E）和EWNKHGWC，基序中的H为RNase的催化活性关键氨基酸残基，可降解病毒和细胞的RNA，E^{ms}蛋白的这种RNase活性已分别被试验所证实（Windisch et al., 1996; Hulst et al., 1994; König et al., 1995）。值得注意的是，E^{ms}可导致免疫抑制，引起动物的淋巴和上皮细胞凋亡。CSFV的宿主嗜性也与E^{ms}有关，用E^{ms}可有效阻断CSFV对易感动物细胞的感染（Bruschke et al., 1997）。

CSFV囊膜糖蛋白E1，即gp33，是CSFV三种糖蛋白中分子量最小的一种，由多聚蛋白上的Leu-495至Gly-689间的195个氨基酸组成，分子量约为33kDa。E1蛋白不诱导产生中和抗体，到目前为止还未发现病毒免疫血清中有E1的抗体，而E1的作用可能是通过与E2形成复合抗原结构才得以发挥研究的。在病毒中，E1/E2复合物可能是稳固病毒颗粒构型的主要结构蛋白，并起到稳固E2蛋白穿膜的作用。有研究者认为，昆虫细胞表达的糖蛋白E1可以使猪完全抵抗CSFV强毒攻击（Hulst et al., 1997）。

CSFV囊膜糖蛋白E2，又称gp55，是研究的较为清楚的一种结构蛋白，在CSFV编码的蛋白中，E2是最易发生变异的一种蛋白，但又是CSFV的主要保护性抗原蛋白，能够诱导机体产生中和抗体。E2蛋白由ORF编码的690至1060之间的370个氨基酸组成，在感染细胞中，其分子量为51-58kDa，主要以同源二聚体或与E1蛋白形成异源二聚体形式存在于感染细胞或病毒粒子的表面，这主要是因为E2蛋白的羧基端有一段由约40个疏水性氨基酸残基构成的跨膜区（van Rijn et al., 1993）。利用针对E2蛋白的各种单抗（Wensvoort et al., 1986; Wensvoort, 1989），人们已鉴定出CSFV E2蛋白具有四个主要抗原结构域A、B、C和D，其中A、B、C含有中和性抗原表位（Wensvoort, 1989）。CSFV上述每一个抗原结构单位（B/C或A）所诱导的免疫反应都足以保护猪免受强毒攻击（van Rijn et al., 1996）。由于E2蛋白是CSFV的免疫优势蛋白，所以人们一直尝试着把E2囊膜糖蛋白作为研制针对CSFV新型疫苗的首选靶蛋白。不仅如此，位于病毒粒子表面

的E2蛋白在病毒感染进入细胞过程中,可与宿主细胞表面的E2蛋白特异性受体相互作用,从而介导病毒进入细胞,用一定浓度的重组E2蛋白可完全阻断CSFV对体外培养细胞的感染过程(Hulst et al., 1997)。

目前有关CSFV非结构蛋白的研究并不多,对这些非结构蛋白的确切结构与功能也知之甚少,从已有的资料看,黄病毒科病毒编码的非结构蛋白在结构与功能上基本上是密切相关的。因此我们对CSFV编码的非结构蛋白的认识和推测也主要来自其它一些黄病毒科重要成员的研究结果。

N^{pro},也称p23, CSFV的非结构蛋白,是ORF编码的多聚蛋白N端的第一个蛋白质。N^{pro}由168个氨基酸组成,具有蛋白质水解酶活性,能以自催化的方式从正在翻译的多聚蛋白上断裂下来,成为成熟的病毒蛋白。序列比较发现,编码P23的基因在瘟病毒属中是较为保守的。它的裂解位点在Cys168与其下游的病毒核衣壳p14 N端第一个氨基酸Ser169间。N^{pro}的Cys69和His130可能位于其酶活性中心,能水解断裂Cys与Ala及Gly与Ser间的肽键。Rumenapf等(1998)使用定点突变技术对参与N^{pro}催化活性的氨基酸残基进行测定,确定了其中的Glu22、His49和Cys69是保持N^{pro}蛋白酶活性所必需的氨基酸残基,而His130并非必需。

P7是CSFV的另一非结构蛋白,它对应于黄病毒非结构蛋白NS1,它是连接结构蛋白和非结构蛋白的小肽。目前,对于瘟病毒的NS1仅推测它可能在糖蛋白成熟和病毒形态发生过程中发挥重要作用(Muylaert et al., 1997; Lin et al., 1997)。

NS2由其多聚蛋白前体经两个蛋白酶水解切割而释放。其N端由细胞信号肽酶介导切割后由E2/P7分离出来,而其C端即NS2-NS3连接处由病毒编码的蛋白酶水解出来。据推测,NS2可能与瘟病毒基因组结合来调控基因表达,也可能是导致宿主细胞产生CPE的因素之一。

NS3是一种研究的比较多、对其功能了解也比较清楚的非结构蛋白。它在病毒的复制及病毒与细胞相互作用中扮演重要的角色。通过体外表达NS3蛋白建立的体外非细胞反式切割分析体系证实,NS3蛋白是一种具有三种酶活性即丝氨酸蛋白酶活性、核苷三磷酸酶活性、RNA解旋酶活性的多功能酶蛋白。

NS4包括NS4A和NS4B两种。多聚蛋白产生后,在NS3蛋白酶的作用下,NS4产生NS4A和NS4B。目前对NS4B的功能并不十分清楚,但已发现NS4A在病毒复制及多聚蛋白翻译后加工过程中具有十分重要的作用(Lin et al., 1997)。

NS5在病毒自身编码的NS3的作用下被切割为成熟的NS5A和NS5B。NS5B是一种参与病毒复制的依赖于RNA的RNA聚合酶,即病毒复制酶,同时它又具有优先以ATP为底物的末端核苷酸转移酶活性,其主要功能是起始病毒基因组的复制。

许多单股正链RNA病毒的非结构蛋白在病毒复制及病毒与细胞的相互作用过程中起着非常重要的作用,对其结构与功能的研究为研究重要病毒病的一些基本生命过程和规律提供了新的思路,对这些病毒病的防治具有重要意义。

表1-1 CSFV石门株基因组编码区和非编码区的定位
Table 1-1 Translated or untranslated regions of the CSFV genome

非编码区 及各基因	基因组中的起止 位置 (nt)	核苷酸长度 (bp)	编码产物在多聚蛋 白中的位置 (aa)	氨基酸残基数
5'-UCR	1~373	373	-	-
N ^{pro}	374~877	504	1~168	168
C	878~1 174	297	169~267	99
E ^{rns}	1 175~1 855	681	268~494	227
E1	1 856~2 440	575	495~689	195
E2	2 441~3 559	1 119	690~1 062	373
P7	3 560~3 751	192	1 063~1 126	64
NS2	3 752~5 140	1 389	1 127~1 589	463
NS3	5 141~7 189	2 049	1 590~2 272	683
NS4A	7 190~7 381	192	2 273~2 336	64
NS4B	7 382~8 422	1 041	2 337~2 683	347
NS5A	8 423~9 913	1 491	2 684~3 180	497
NS5B	9 914~12 067	2 154	3 181~3 898	718
3'-UTR	12 068~12 298	231	-	-
总计	1~12 298	12 298	1~3 898	3 898

1.1.4 猪瘟病毒的遗传分型

CSFV可能是瘟病毒中最不易发生变异的，不过利用单抗对其进行分型表明，CSFV可以进一步分为不同的群和亚群，其中区分最明显的是在古典毒株和最新毒株之间。病毒亚型的鉴定将会增进对CSFV进化和流行的了解，并可能得出其生物学特性和毒力的差异。

随着分子生物学技术的进步，使得在确定和比较病毒基因组片段的核苷酸序列的基础上进行病毒的遗传分型已很容易，可以用这种方法来建立不同病毒分离株之间的联系，这对于分类很有用，而且能够帮助追踪病毒传播的类型，发现防制策略中薄弱环节。遗传分型可以对造成病毒持续性感染和传播的可能原因进行评估。对分离自一系列暴发区域、具有相互联系的毒株的遗传比较可使对于遗传分型的理解更加有效，并可确定病毒在自然界突变的速率。遗传分型已被证实是一种追踪CSFV传播的极为有用的方法，一般认为要优于抗原比较的方法，该方法已被用来证实：（1）病毒从传入地点的散播；（2）在家猪和野猪之间的传播；（3）跨国界传播；（4）关系极其相近的病毒的不同毒力的暴发；（5）特别的变异毒株在本地的持续存在，最可能在感染的野猪；（6）区分野毒株和流行毒株（Hoffman et al., 1998; Lowing et al., 1999; Stadejek et al., 1995; Vilcek et al., 1991）。毒株间可能的差异取决于用于比较的基因组的靶区域的长度和变异性。关于基因组的哪一区域应用来进行遗传比较，哪一种比较方法最有意义目前尚有争议。

对不同基因组区域序列比较基础上的CSFV树形关系的研究, 将其分为两个主要的基因群 (Group 1和Group 2) 和另外两个完全不同的分离株 (Kanagawa和Congenital Tremor, 最近被称为Group 3)。Group 1 又进一步分为3个基因亚群 (Subgroups), 即1.1、1.2和1.3亚群; Group 2也进一步被分为3个亚群, 即2.1、2.2和2.3亚群。5'-UTR、E2和NS5B基因是CSFV遗传分型时应用最广泛的基因组区域, 对这三种分型方法的结果进行分析比较表明, 利用NS5B进行遗传分型的可信度最高, 而5'-UTR的可信度最低 (Paton et al., 2000)。

1.1.5 猪瘟兔化弱毒疫苗

在20世纪50年代中期, 中国学者通过将猪瘟强毒在兔体上连续传几百代后培育成功了一株猪瘟兔化弱毒疫苗。目前在国内外有不同“版本”的C株用于研究和疫苗生产。一般来说, C株指的是中国创制的猪瘟兔化弱毒 (Hog cholera lapinized virus, HCLV) 疫苗, 简称“C株” (Chinese strain, C-strain)。20世纪60年代C株从中国被引入东欧和亚洲友邦, 被称“K”株或“LC株” (Lapinized Chinese strain), 后来又流传到西欧和拉美各国, Riems株就是C株的一个变种。因为C株安全有效, 从创制至今被广泛应用于世界各国 (仇华吉等, 2005)。

由于应用的需要, 我国猪瘟兔化弱毒疫苗的生产也由兔脾淋巴疫苗、全乳兔疫苗逐步过渡到用组织培养生产的细胞疫苗。为避免猪体可能带有的病原体 (包括病毒) 对疫苗质量产生影响, 生产上一般使用异源细胞, 如牛睾丸、羊睾丸、羊肾等原代细胞增殖猪瘟C株疫苗。该株具有以下遗传特性: 遗传稳定性高; 接种各品种猪都安全、不保毒、不排毒, 特别对于怀孕母猪、胎猪、乳猪都无残余毒力, 且不通过胎盘诱发仔猪慢性猪瘟; 免疫力坚强, 免疫猪可以抵抗多种CSFV强毒株的攻击, 产生免疫力快而持久。

目前, 我国各地生物制品厂一般都采用犊牛睾丸细胞生产猪瘟兔化弱毒疫苗, 疫苗效价的高低是疫苗质量合格与否的关键指标。HCLV虽然可以在多种细胞上生长, 但病毒增殖力相对较弱, 不产生细胞病变 (cytopathic effects, CPE), 病毒滴度低。对效价的测定一般沿用兔体定型热法 (兔热法), 按中华人民共和国兽用生物制品规程 (2000年版, 规程) 将所收获细胞苗用5万倍稀释, 各取1mL分别注射两只兔子, 在注射48~96h内对兔体测量一次体温, 根据兔体产生定型热反应情况, 分一次通过, 重检通过和不通过三个档次, 重检通过不能用于配苗。检测合格的疫苗每毫升含50 000个半数兔体感染量 (50% rabbit infective dose, RID₅₀), 免疫剂量为150 RID₅₀, 即37 PD₅₀ (猪体半数保护量)。这种方法在HCLV滴度测定上敏感性高、重复性好, 是目前我国测定疫苗效价的标准方法。但该方法也存在明显的不足之处: 测毒周期长, 约需要1w; 成本高, 一次需要两只重1.5~3.0kg的家兔; 不能准确定量, 兔体个体差异会造成测毒结果不准确; 检测方法烦琐, 费时费力, 不适合大批量样品的检测。因此如何快速、准确测定HCLV疫苗效价是目前猪瘟疫苗生产中面临的主要难题之一。

杜念兴 (杜念兴, 1998) 曾建立一种微量细胞培养ELISA方法, 用于对HCLV效价的检测, 效果较好, 但这种方法需要进行细胞培养, 操作烦琐且不能准确定量。李宝臣 (李宝臣等, 1999) 探讨了用反向间接血凝试验代替兔体测定HCLV效价的可行性, 该方法可相应缩短检测时间, 降低生产成本, 但仍不能对毒价准确定量。

1.2 荧光定量 PCR

实时荧光定量PCR技术于1996年由美国Applied Biosystems公司推出，它是一种在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。目前报道的荧光探针主要有TaqMan、Amplisensor、分子信标、Lightcycler以及在这4种探针基础上发展起来的荧光探针(陈忠斌等, 2003)。该技术不仅实现了对DNA/ RNA模板的定量，而且与常规的PCR相比，具有灵敏性和特异性高、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时和准确等特点。目前，已广泛应用于分子生物学和医学研究等领域，特别是近几年来在动物疫病的诊断中得到了广泛的应用。

1.2.1 荧光定量 PCR 技术的原理

荧光定量PCR技术，是指在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。在荧光定量PCR中，对整个PCR反应扩增过程进行了实时的监测和连续地分析扩增相关的荧光信号，随着反应时间的进行，监测到的荧光信号的变化可以绘制成一条曲线。在PCR反应早期，产生荧光的水平不能与背景明显地区别，而后荧光的产生进入指数期、线性期和最终的平台期，因此可以在PCR反应处于指数期的某一点上来检测PCR产物的量，并且由此来推断模板最初的含量。为了能准确判断样品中某基因转录产物(mRNA)的起始拷贝数，荧光定量PCR采用参数— C_T 值，所谓C代表循环(Cycle)，T代表阈值(Threshold)。 C_T 值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。研究表明，每个模板的 C_T 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多， C_T 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可做出标准曲线。因此，只要获得未知样品的 C_T 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

1.2.2 荧光定量 PCR 技术的两种定量形式

FQ-PCR一般采用外标准品定量的制备来实现绝对定量，可以通过化学合成目的基因；或是将PCR扩增产物直接梯度稀释；或是将PCR产物克隆到载体上，然后抽出质粒，经过测量浓度和拷贝数可准确定量，它的优点是稳定、准确。对于RNA 样品，标准品最好是体外转录的RNA，如果用cDNA、PCR 产物作为标准品，虽然制备简单易于保存，但是将会因为标准品无法准确指示样品反转录效率，而给最终定量起始拷贝数带来影响(Ke et al., 2000; 李文涛等, 2006)。绝对定量也具有相应的缺陷，标准品的稳定保存很难获得成功；目前广泛使用的在260nm波长下定量的方法与众多因素有关，如水、缓冲液、仪器性能，乃至核酸的抽提过程都会影响到结果的稳定性。

相对定量是指在测定目的基因的同时测定某一内源性管家基因，该管家基因主要是用于核苷酸的拷贝数的比较、反映反应体系内是否存在PCR扩增的影响因素，通常选用的管家基因有GAPDH、 β -actin、 β 2-微球蛋白和rRNA。使用的相对定量较为早期的方法是用一系列浓度的已知竞争模板绘制标准曲线，根据该标准曲线得到目的基因和管家基因的量，再将目的基因同管家基

因的比值作为定量的最后结果（张蓓和沈立松，2003）。这一方法的缺陷是要求外参、目的基因和管家基因的扩增效率一致，此外加入已知起始拷贝数的内标相当于是进行双重PCR反应，存在两种模板相互的干扰和竞争。

1.2.3 荧光定量 PCR 技术的种类

目前荧光定量PCR技术所使用的荧光化学方法按照荧光产生原理可分为两大类，即染料法和探针法。

染料法是在常规PCR反应体系中加入了染料分子，当反应体系中存在dsDNA时，染料分子特异性地掺入dsDNA后发射荧光信号。目前常用的染料分子包括溴化乙锭（EB）、YO-PRO、YOYO、SYBR Green I及SYBR Gold（Schnell et al., 1997），其中以SYBR Green I染料应用最广泛。染料法能监测任何dsDNA序列的扩增，不需要探针的设计，具有检测方法简便以及检测成本低廉等优点。但是染料分子除了与特异性的靶序列扩增产物结合外，还能与在PCR扩增过程中形成的引物二聚体、非特异性扩增产物结合，从而造成扩增效率的降低、结果的不准确。因此染料分子与dsDNA的结合只具有结构特异性而不具有序列特异性，采用该方法对于引物的设计及实验条件的优化要求很高，确保反应过程中没有非特异性产物的扩增。由于染料分子的上述特点，因此该方法不能应用于Multiplex-FQ-PCR技术（在一个反应管中同时检测多个目的基因的表达情况）。

探针法荧光定量PCR具有扩增序列特异性的特点。该方法与常规PCR的不同之处在于：在上、下游引物外还加入了具有序列特异性的探针（探针本身具有荧光标记），该探针根据需要扩增的靶序列设计，因此只能与待检测序列结合，与染料法相比提高了实验的特异性。目前市场上的探针主要种类有：TaqMan、Molecular Beacon、Hybridization probe等，其中以TaqMan探针应用最广泛。

TaqMan技术主要是在PCR扩增时，除了加入一对引物的同时还需再加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团，此时5'端荧光基团吸收能量后将能量转移给临近的3'端荧光淬灭基团（荧光共振能量转移，FRET），因此探针完整时，检测不到该探针5'端荧光基团发出的荧光。但在PCR扩增中，溶液中的模板变性后低温退火时，引物与探针同时与模板结合。在引物的介导下，沿模板向前延伸至探针结合处，发生链的置换，Taq酶的5'→3'外切酶活性（此活性是双链特异性的，游离的单链探针不受影响）将探针5'端连接的荧光基团从探针上切割下来，游离于反应体系中，从而脱离3'端荧光淬灭基团的屏蔽，接受光刺激发出荧光信号，即每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步。

分子信标本质上是一种标记荧光的发夹探针，当探针分子呈发夹结构时，结合在其两端的荧光基团距离上接近，使得产生能量转移效应，而不发生荧光。当互补序列出现时，探针与DNA杂交，探针转变成一个开放的线性结构，报告荧光基团与淬灭荧光基团彼此在空间上产生足够的分离，荧光基团脱离了淬灭基团的影响，从而产生可被检测到的荧光。

杂交探针使用两个特异的探针，其中上游的探针的3'端标记有供体荧光素（donor），而下游的探针的5'端标记有受体荧光素（acceptor）。在PCR中模板退火阶段，两探针同时与扩增产物杂交，并形成头尾结合的形式，使供体和受体荧光素距离非常接近，两者产生荧光共振能量转移

(FRET, 此作用与上述水解探针的方式相反), 使得受体荧光基团发出荧光; 当两探针处于游离状态时, 无荧光产生。由于反应中运用了两个探针, 因此增加了方法的特异性, 另外也可利用荧光寡核苷酸熔解曲线 (melting curve) 对与寡核苷酸探针结合的序列进行分析, 从中获取有用的信息。

与染料法相比, 探针法不仅具有实验特异性高的优点, 而且对探针的5'端采用不同的荧光标记就可以进行Multiplex FQ-PCR的优点。但是同染料法相比, 探针法又存在实验成本高、需要设计探针等不足。

1.2.4 荧光定量 PCR 技术在动物疾病检测中的应用

荧光定量PCR技术具有快速、准确、特异性高、可实时监测、定量以及自动化程度高等其他方法无法比拟的优点, 更弥补了一般技术对疾病亚临床或潜伏感染的诊断无法确诊的缺点, 其次, 该技术对某些烈性传染病病原体的诊断尤为安全, 但是由于所需仪器、试剂价格昂贵, 限制了该技术的普及, 目前仅用于新城疫、禽流感、马立克氏病、鸭乙型肝炎、伪狂犬病、猪瘟及口蹄疫等重要动物传染病的诊断 (张鹤晓等, 2003; 2004; 朱文斯等, 2003; 杨德胜等, 2005; 杨素等, 2004a; 陈玉栋等, 2003; 温国元等, 2004; 花群义等, 2005)。但随着实时荧光PCR技术的进一步发展, 荧光定量PCR试剂盒的进一步开发, 以及它具有比传统病原学、血清学和常规的PCR更敏感、特异、无污染等优点, 此技术将会在动物疫病诊断中得到更加广泛的应用。

1.3 猪瘟诊断方法研究现状

在猪瘟的综合防治中, 对CSFV的检测与鉴别诊断是至关重要的一环。CSFV的检测方法必须达到快速、准确、可靠、重复性好、结果易判断, 传统的方法是通过细胞培养分离病毒; 以血清学反应为基础的免疫荧光法, ELISA及其衍生技术, 如Dot-ELISA, 抗原捕获ELISA等免疫诊断技术来检测病毒抗原或抗体 (Clavijo et al., 1998; Thur et al., 1998; Colijn et al., 1997; Depner et al., 1995)。这些检测技术的建立与实用化为猪瘟的综合防控作出了重要贡献。近几年来, 随着CSFV及其它黄病毒和瘟病毒的基因组全序列的相继测定, 以及分子生物学技术的广泛应用, 这使得建立以检测 CSFV 核酸为基础的分子诊断技术成为可能, 基于此, 人们分别建立了RT-PCR、RT-nested PCR 以及基于 RT-PCR 产物的快速序列分析方法, 并尝试用于临床实践和畜产品的检测 (Vydelingums et al., 1998; Diaz de Arce et al., 1998; McGoldrick et al., 1999)。在CSFV的鉴别诊断中, 由于瘟病毒间具有相互交叉血清学反应, 这使得对瘟病毒间的准确区分比较困难, 好在人们研制了各种能鉴别瘟病毒的属特异性、CSFV 特异性以及针对疫苗株和流行毒株的单抗 (Edwards et al., 1991), 结合上述免疫诊断技术和分子分析技术, 我们可更全面准确的了解CSFV的分子流行病学特征, 为猪瘟的综合防治提供了有力的技术支持。

1.3.1 病原学检测

(1) 病毒分离

CSFV 的特点是在感染细胞后不引起细胞病变 (cytopathic effects, CPE), 同时该病毒具有囊膜, 滴度很低, 病毒颗粒容易裂解, 难以采用 CsCl 密度梯度离心等常用的病毒分离纯化方法来分离纯化 (Caij et al., 1993), 许多研究者使用不同种类的细胞, 主要是猪源细胞载体体外增殖 CSFV, 证明骨髓、睾丸、肺、脾和肾的细胞以及白细胞均可增殖 CSFV。兔化弱毒疫苗株易在犊牛睾丸和羔羊肾细胞内增殖。

病毒分离是目前体外检测感染性 CSFV 最特异的方法。已报道有几种方法可以从组织、全血中分离病毒 (Kaden et al., 1999), 白细胞是分离病毒的最佳样品。然而一些研究人员发现, 白细胞以及单核细胞在动物感染后较长时间才能感染病毒。因此, 对于猪瘟的早期诊断, 全血或血浆可能比白细胞更为敏感 (Gisler et al., 1999)。最常用于 CSFV 分离的细胞为猪肾细胞系 (PK15 或 SK6) 或猪睾丸细胞 (ST)。无论用什么方法进行病毒分离, 均费时费力。

(2) IPMA

免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA) 目前是一些北美和拉丁美洲国家最常用的检测 CSFV 抗体的方法 (Morrin et al., 1997)。该方法同过氧化物酶中和试验 (NPLA) 一样, 都是以病毒中和试验为基础, 但 NPLA 法更费时。Wensvoort 等应用 IPMA 评价其实验室制备的 13 株 CSFV Brescia 株单抗的效果, 结果显示所有的单抗都与被检的 CSFV 株 (一株除外) 反应, 而没有一株单抗与 BVDV 毒株发生反应 (Wensvoort et al., 1986)。

(3) 直接免疫荧光试验

取病猪组织做触片或冰冻切片, 荧光抗体染色后用荧光显微镜直接检查是否有特异性亮绿色荧光。此法操作简单, 是普遍应用标准方法。

(4) 免疫组化

利用免疫组化技术检测 CSFV 感染的扁桃体组织, 可早在感染后 2d 检测到病毒抗原, 淋巴结、脾脏以及胰腺均可作为病毒早期检测的组织样品。de las Mulas 等及 Narita 等报道了一种检测 CSFV 抗原的免疫组化方法, 即利用针对 E2 糖蛋白的单克隆抗体检测福尔马林固定、石蜡包埋的组织样品的免疫组化方法, 并建议将此法作为猪瘟的常规诊断方法, 但其敏感性较低 (de las Mulas et al., 1997; Narita et al., 1999)。该方法的优点是能检测长期保存的样品, 缺点是较费时, 而且福尔马林固定后的组织不能再进行病毒分离。利用亲合素-生物素-过氧化物酶 (ABC) 的免疫组化方法也能用于 CSFV 组织切片上抗原的检测 (Kaden et al., 1999)。此外, 王镇等应用免疫金银技术 (immunogold silver staining, IGSS) 成功地对猪瘟弱毒株 (Thiveral 株) 在 PK15 细胞中的繁殖进行了检测, 同免疫荧光技术相比, 此技术灵敏度高、特异性强、重复性较好, 并且不需要特殊仪器, 在显微镜下可明显区分 Thiveral 株感染细胞和未感染细胞。这一技术如果应用于对 C 株的检测, 则可能为测定兔化弱毒株效价提供简便易行的辅助性方法 (王镇等, 1998)。

1.3.2 血清学检测

(1) 中和试验

中和试验是在细胞培养物上进行的一种采用固定病毒、变化血清, 同时设阴性、阳性血清对照进行检测的方法 (Carbrey et al., 1969)。由于 CSFV 无细胞病变, 所以在病毒繁殖后, 必须用一种指示系统检测未被中和的病毒。免疫荧光中和试验 (IFCNT) 和过氧化物酶联中和试验

(NPLA) 特异而且敏感, 是国际上通用的方法 (Jalvingh et al., 1999; Jensen et al., 1981)。这两种实验都可以在微量滴定板上进行, 结果可用肉眼进行判读, 也能够通过仪器自动测定。Gillespie等根据PAV-1 毒株具有使培养细胞产生CPE并能被特异免疫血清所中和的特性, 将PAV-1 株病毒稀释成每 0.5mL 含 100 TCID₅₀ 的溶液, 随后加入等量的稀释血清, 混合后置室温感作 90min, 接种于细胞单层, 同时设置不加血清的病毒对照组, 于 37℃ 培养 3~4d 后判定结果。按不同稀释度血清抑制病毒产生细胞病变的瓶数, 计算被检血清的中和效价。中和试验对CSFV和BVDV有一定的区分能力, 一般说来, 同源病毒比异源病毒感染产生的抗体滴度要高得多, 但猪瘟弱毒疫苗的广泛应用, 猪群中的猪瘟抗体滴度普遍较高, 应进行双份血清的检测, 才能确定抗体的滴度增高与病毒的关系。

(2) 间接 ELISA 和阻断 ELISA

ELISA是经典且较为成熟的技术, 其应用广泛、发展快速, 是检测CSFV抗体的主要方法, 也是监测免疫猪抗体水平的主要手段。此法的缺点是由于手工操作的误差, 可能对检测结果有一定的影响 (李亚敏和王伟峰, 2000)。根据具体试验方法的不同, 又衍生出很多新的子技术。包括检测针对粗蛋白、特异结构蛋白如E2、E^{ms}以及非结构蛋白NS3 抗体的方法 (贾洪林等, 2005; Paton et al., 1991; Colijn et al., 1997)。目前使用最广泛的是CSFV E₂-ELISA, 其敏感性与VNT相比为 90%~99%, 特异性为 99% (Moser et al., 1996)。加拿大学者Clavijo采用竞争ELISA法用E2 蛋白作为标准竞争剂特异性达到 100% (Clavijo et al., 2001)。

此外, 还建立了 PPA-ELISA (HRP SPA ELISA)、CTB ELISA (complex trapping blocking ELISA)、AC ELISA (antigen capture ELISA) 等。

1.3.3 间接免疫荧光试验

一般是采用发病动物器官的冰冻组织切片直接进行荧光抗体试验, 许多国家和地区已将该法作为法定诊断方法, 在我国的应用也较为广泛。此法操作简便、结果可靠, 可在 2h 内完成。检查器官可以是扁桃体、脾、肾等, 以扁桃体为最佳。也可将病料乳剂接种细胞培养物, 随后再用荧光抗体检出感染细胞, 这样可提高敏感性。具体做法是在病猪组织片上滴加稀释成一定比例的抗猪瘟阳性血清, 作用 45min 后洗涤, 再加 FITC 标记的兔抗猪 IgG 荧光抗体, 作用 45min 后, 漂洗、干燥、镜检。意大利学者 Buonavoglia 等建立 96 孔板间接荧光抗体法检测猪瘟抗原 (Buonavoglia et al., 1989)。但无论直接法还是间接法免疫荧光都需要昂贵的荧光显微镜和有经验的检验员, 使此法的应用受到了一定的限制。

1.3.4 间接血凝试验

李树春等 (1993) 将猪瘟兔化弱毒株细胞培养物浓缩纯化后, 致敏由戊二醛鞣酸处理的健康绵羊红细胞, 制成冻干猪瘟间接血凝诊断液, 用以检测血清中的猪瘟抗体效价。经376份免疫猪、45份非免疫猪血清检测, 结果表明符合率高达98%。检测猪瘟抗体消长动态的结果为, 接种冻干猪瘟兔化弱毒苗后, 第3~4天出现特异性抗体, 第15天抗体效价进入高峰期, 并维持到接种后的第3个月, 然后缓慢下降, 于接种后第11个月消失。该方法具有操作简单、无需特殊仪器设备、特异性强、快速, 2h内可判定结果, 重复性好等特点。

1.3.5 分子诊断

(1) RT-PCR

RT-PCR技术(reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)是以病毒RNA为模板进行反转录后,再以PCR进行核酸扩增来检测病毒的方法。已报道利用RT-PCR方法检测CSFV RNA有数种程序(Choi et al., 2003)。Liu等报道了用RT-PCR检测感染组织中的CSFV,以感染组织中提取的总RNA为模板,进行反转录合成第一链cDNA,然后进行PCR扩增,扩增的DNA片段用琼脂糖凝胶电泳进行检测。该方法的敏感度可达 10^{-4} TCID₅₀。当用套式PT-PCR进行检测时,敏感性可提高1000倍。该法还能分别扩增出CSFV和BVDV的特异性核酸片段、区别与CSFV相关的其它病毒,如非洲猪瘟病毒、伪狂犬病病毒等,具有特异性强,灵敏度高,重复性好,检测时间短等特点,适合临床应用(Liu et al., 1991)。波兰学者Stadejek等(1995)利用RT-PCR诊断猪瘟。Singh等(2005)用RT-PCR检测福尔马林固定组织中的CSFV,并用斑点杂交试验验证了扩增产物的真实性。

RT-PCR技术常被用于基因分型,瘟病毒属特异的引物多选自基因组的5'端保守区,其最突出的优点是其产物能用来直接测序,直接进行病毒株的分型。Blacksell等利用RT-PCR方法对老挝1997至1999年分离的27株CSFV的5'-UTR进行了进化树分析,结果表明这27株CSFV分属于2.1和2.2两个基因亚群(Blacksell et al., 2005)。当然也有选用瘟病毒基因组其它区域设计引物的,Pan等用RT-PCR对台湾1989-2003年分离的158株CSFV的囊膜糖蛋白E^{ms}和E2编码区进行了种系发生分析,结果显示E^{ms}区较E2区更适于作种系发生分析,并将其中的115株划分为2.1和2.2亚群(可进一步划分为2.1a和2.1b亚群),而将剩余的43株划分为3.4亚群(Pan et al., 2005)。Wang等用RT-PCR分别扩增了猪瘟石门株、HCLV株、F03株和F07株囊膜糖蛋白E2基因的片段(1273bp),并将其分别克隆至pGEM-T载体上进行测序,并进行了序列比较,发现有一段保守序列RYLASLH可能是E2表位的组成部分(Wang et al., 2001)。罗廷荣等(2004)运用RT-PCR技术对广西不同地区的猪瘟进行了诊断研究,并首次将该技术用于国内CSFV的流行病学调查。

(2) RT-nPCR

RT-nPCR(RT-nested PCR)技术是在RT-PCR的基础上再设计一对或多对引物对其模板进行扩增,因此是一种更敏感的分分子检测方法。韩国的Choi等利用半套式RT-PCR(semi-nested RT-PCR)对人工接种CSFV的5头公猪的精液进行了检测。其结果为:在接种后7d就有一头猪的精液CSFV阳性,感染后14d 5头猪精液CSFV全部都是阳性。将精液中的精子分离后,再次进行检测,发现CSFV核酸主要在精液中,偶尔存在于精子中。而病毒分离和免疫组化法通常在精液或精子中都检测不到病毒(Choi et al., 2003)。Ha等又建立了一种半套式RT-PCR从福尔马林固定组织和石蜡包埋组织中检测CSFV,并与原位杂交方法的检测结果进行了比较,结果表明二者的敏感性相同(Ha et al., 2004)。Paton等做了一项由6个实验室参与的比较RT-PCR/RT-nPCR检测CSFV敏感性和特异性实验的研究,证实RT-nPCR比RT-PCR敏感性可高达10~100倍(Paton et al., 2000)。比利时的Dewulf等对128头CSFV感染猪进行了病毒分离(包括全血、白细胞、血清、血浆中的病毒)、抗原ELISA和RT-nPCR试验,并对几种试验方法的检出率进行了比较,结果发现RT-nPCR的检出率(98.9%)最高,抗原ELISA的检出率(74.7%)最低,表明RT-nPCR是CSFV感染早期诊断的最好方法(Dewulf et al., 2004)。Katz等和Wirz等设计2对特异引物利

用套式 PCR 法可以区分出 CSFV 和 BVDV (Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993)。李艳等 (2006) 设计了一对 CSFV 通用引物, 并在该对引物跨越区域的内部设计了猪瘟兔化弱毒疫苗和 CSFV 强毒特异性引物, 建立了一种能区分猪瘟强毒和兔化弱毒疫苗的 RT-nPCR 鉴别诊断方法, 该方法可以检测出 0.04pg 的 CSFV RNA。

一般来说套式 RT-PCR 方法是检测 CSFV 更敏感的方法, 但其缺点是比较费时, 不适用于大量样品的检测。

(3) 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

早在 1998 年, McGoldrick 应用 TaqMan 探针建立了一种检测 CSFV 的单管荧光 RT-PCR 方法, 此方法可检测出仔猪血样中感染了中等毒力或高等毒力的 CSFV, 其敏感性高于病毒分离方法, 并且简化了试验程序, 减少了污染的风险, 还可进行大量样品的检测 (McGoldrick et al., 1998); Risatti 等建立了一种实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 CSFV, 并与病毒分离作了比较, 证明其敏感性高于病毒分离 (100% 比 72.4%), 特异性略低于病毒分离 (98.9% 比 100%) (Risatti et al., 2003; 2005); Hoffmann 等建立了一种应用内参照的复合实时荧光定量 RT-PCR 方法, 并证明其检测猪瘟病毒 RNA 敏感性可达 8 拷贝/ μL (Hoffmann et al., 2005)。日本学者 Ophuis 等应用荧光定量 RT-PCR 方法对攻毒猪各组织脏器中的病毒进行了检测, 结果发现早在攻毒后 1d 即在扁桃体中检测到了病毒的存在, 而在攻毒后 3d 分别在颌下淋巴结、脾脏以及肠系膜淋巴结等中检出了病毒, 此后病毒逐渐扩散入各脏器, 最终进入到胰腺和脑, 并发现扁桃体及鼻、直肠拭子和全血样品一样是适合 CSFV 早期诊断的材料 (Ophuis et al., 2006)。Utenthal 等应用定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR) 对 10 周龄猪人工感染 CSFV 后, 病毒在其体内复制的动力学进行了研究 (Utenthal et al., 2003)。Cho 等 (2006) 应用不同荧光基团标记的两条 TaqMan-MGB 探针建立了一种能鉴别韩国 CSFV 野毒株和 LOM 疫苗株的荧光 RT-PCR 方法。Gaede 等 (2005) 应用实时荧光定量 RT-PCR 方法鉴别瘟病毒。

(4) 基因芯片技术

基因芯片是指将大量的核酸分子以大规模阵列形式排布在很小的载玻片等载体上, 通过与标记的样品进行杂交, 检测杂交信号的强弱进而判断样品中被检分子的数量。包被在固相载体上的核酸分子有序排列成微点阵 (microarray)。目标是用于 DNA 序列的测定、基因表达谱鉴定、基因突变体的检测分析, 以及基因组的功能研究等。自 DNA 芯片首次报道以后 (Schena et al., 1995), 芯片技术对不同生物体的基因表达谱研究进行了改革, 通过原位合成寡聚核苷酸或者合成后自动点样技术制成芯片, 可以大规模分析基因的表达情况 (Brown et al., 1992; Duggan et al., 1999), 最近还广泛用于药物筛选、突变的检测、遗传进化分析和基因组绘图 (Favis et al., 2000; Debouck et al., 1999; Shalon et al., 1996)。由于芯片技术允许同时扫描成百上千的核苷酸序列, 也显示了作为一种诊断方法的巨大潜能 (Kawaguchi et al., 2003; Vernet, 2002)。杨素等分别用水疱性口炎病毒、口蹄疫病毒、CSFV 等病毒的一段高度保守的基因片段构建质粒, 在此基础上制备了芯片探针。提取样品中的核酸, 经反转录和荧光标记后滴加到芯片上进行特异性杂交, 对杂交结果扫描检测, 可同时对上述 7 种动物传染病进行快速、准确的诊断, 此方法敏感性高, 特异性强, 适合于大批动物高通量检疫 (杨素等, 2004b)。

1.3.6 鉴别诊断

近年来,我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大的变化,在临床表现上趋于复杂化,以非典型、温和型猪瘟和母猪带毒综合征为主,在病理剖检上也常常不同于典型猪瘟病理变化,给兽医临床诊断带来了极大的困难。猪瘟弱毒疫苗在我国的大规模应用使得 CSFV 野毒感染和疫苗接种的区分变得非常困难和必要。此外,猪还可以感染其它瘟病毒 (BVDV 或 BDV),瘟病毒之间具有血清学交叉反应。基于上述这些原因,对 CSFV 或 CSFV 与同属其他病毒的鉴别诊断显得极为必要和势在必行。

(1) 单抗 ELISA

瘟病毒之间存在交叉免疫反应,ELISA 仍不能有效区分瘟病毒。单克隆抗体的出现为 ELISA 试验注入了新的活力,应用猪瘟单抗代替多抗,大大提高了 ELISA 试验的特异性,使得分析相关病毒间细微的抗原差异成为可能。Dahle 等研究猪瘟特异性单抗用以区分猪瘟抗体和牛粘膜性腹泻病病毒抗体,但是仍存在微弱的交叉反应 (Dahle et al., 1991)。Wensvoort 等 (1986) 和丘惠深等 (1994) 相继构建了针对 CSFV 的单抗,证实这些单抗能用于 BVDV 和 CSFV 间以及 CSFV 野毒株和中国兔化弱毒疫苗株之间的鉴别,此法为 BVDV 和 CSFV 的鉴别提供了有效的手段,但是基于抗原抗体反应的检测技术仍有一定的局限性 (敏感性不够高)。

Leforban 等建立了一种 ELISA 方法,能够区分 BVDV、BDV 以及 CSFV 抗体,这个方法对于 BVDV 或 BDV 高流行地区 (如荷兰) CSF 的检测非常有意义 (de Smit et al., 2000; Leforban et al., 1990)。瑞士学者 Moser 将昆虫细胞表达的 E2 蛋白制成间接 ELISA 试剂盒也可以鉴别诊断 CSFV 和 BVDV 的抗体 (Moser et al., 1996)。

(2) RT-PCR

CSFV 与同属其他病毒间的鉴别可以通过血清中和试验得到一定程度的区分,CSFV 疫苗感染和野毒感染也可通过家兔接种试验区分开来,但是血清中和试验和家兔接种试验存在特异性不高、实验时间太长等缺点,使用单克隆抗体技术能够较好的解决这一问题,但基于抗原抗体的反应存在自己的局限性,且国产单抗试剂盒效果一般,国外的单抗试剂盒价格昂贵,使得检测成本大大提高。

随着基因组的核酸序列资料的相继发表,使得以 CSFV 保守区特异序列为基础的分子诊断技术的建立成为可能。RT-PCR 技术在 CSFV 研究领域中的应用迅速升温,作为 CSFV 的一种检测方法,它特异性强、灵敏度高、重复性好,整个过程在 1d 内即可完成,能达到快速检测的目的,并适用于各种含毒病料的检测。

除常被用于病毒检测和分型外,RT-PCR方法还常被用于鉴别诊断。德国学者Schelp等探索核酸探针区分CSFV与牛粘膜性腹泻病毒 (Schelp et al., 1991)。法国学者Cruciere探索应用cDNA探针技术来区分CSFV和BVDV。但是区分的结果依靠显色的强弱给试验带来人为不确定性 (Cruciere et al., 1991)。德国学者Kaden等比较几种诊断低毒力株猪瘟的几种方法,敏感性比较指出:流式细胞仪技术敏感性不如PCR法,病毒分离法与PCR法敏感性相同,德国常用的两种商品化检测抗原的试剂盒不能检测初期感染 (Kaden et al., 1999)。为了区分CSFV和BVDV,周绪斌设计能同时区分BVDV和CSFV的 2 对特异性引物,建立了一步检测BVDV和CSFV的复合PCR方法,利用本方法对吉林地区送检病料和长山地区疑似猪瘟病料进行了检测,结果表明此方法能对CSFV和

BVDV感染的猪进行鉴别,其最小检出量为 0.1 TCID₅₀ (周绪斌等, 2002)。Barlic-Maganja等以瘟病毒属 5'-UTR设计一对引物及编码N、C或E^{ms}蛋白的基因区设计了另一对引物,建立了单管单酶RT-PCR检测并鉴别BVDV和CSFV的诊断方法,此方法消除了传统的RT-PCR两步完成过程中的污染问题,简化了检测步骤,缩短了检测时间,提高了病毒的检出率,可用于疾病的诊断和流行病学调查 (Barlic-Maganja et al., 2001)。在对猪瘟野毒株和疫苗株的鉴别检测方面,罗廷荣 (罗廷荣等, 2004) 以 3 对猪瘟病毒特异性引物对病料进行数次RT-PCR检测,并结合RFLP分析,用以区分猪瘟野毒株、石门株与兔化弱毒疫苗株;李艳 (李艳等, 2006) 设计了一对CSFV通用引物,并在该对引物跨越区域的内部设计了猪瘟兔化弱毒疫苗和CSFV强毒特异性引物,建立了一种能区分猪瘟强毒和弱毒的RT-nPCR鉴别诊断方法,该方法可以检测出 0.04pg的CSFV RNA。

1.4 本研究的背景与目的

近年来,在免疫压力下,我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大变化,在临床表现上趋于复杂化,出现了由于低毒力猪瘟野毒株或持续感染株感染而产生的所谓“非典型猪瘟”、“温和型猪瘟”和“带毒母猪综合征”,在病理剖检上也常常不同于典型猪瘟的病理变化,给兽医临床诊断带来了很大困难 (乔军等, 2001; 吕宗吉等, 2001)。

以上所述的猪瘟实验室诊断方法 (包括: 动物接种试验、病毒分离培养、免疫荧光试验、抗原捕捉ELISA, RT-PCR等) 在敏感性、特异性、时效性等方面都存在各自的不足,而且这些方法都不能有效地区分野毒感染与疫苗接种。由于我国多年来一直普遍采取猪瘟兔化弱毒疫苗免疫接种政策,使得猪群中猪瘟抗体多数呈阳性,这种疫苗抗体很容易与猪瘟野毒感染产生的抗体相混淆,因此二者从血清学上不易区分;此外,经猪瘟兔化弱毒疫苗免疫接种后的猪群在免疫后2周甚至更长时间在体内某些组织 (扁桃体、血液等) 中通过病毒分离或PCR等方法依然可以检测到猪瘟兔化弱毒病毒或其RNA的存在 (Koenig et al., 2006), 且猪瘟野毒和兔化弱毒疫苗株在基因组核酸序列上具有高度保守性,这更是给常规的分子诊断方法对其两者的鉴别带来了难度。按照国际通行的做法,一旦爆发猪瘟疫情,对涉及的所有猪只一律进行扑杀焚烧处理。依照我国现有国情,这样势必造成大量“无辜猪”遭误杀,损害养猪者利益,冲击养猪业发展,破坏肉品供应,影响社会稳定。因此比较可行的策略是,开发可有效鉴别野毒感染猪和疫苗接种猪的检测方法,避免淘汰未受感染的免疫接种猪,减少不必要的损失和浪费。

为此我们曾建立了一种复合RT-nPCR方法 (Li et al., 2007), 可有效区分CSFV野毒和兔化弱毒疫苗。但在实际应用中,发现该方法仍存在一些缺陷,例如操作步骤复杂,容易污染,并且不能用于病毒定量研究。为了弥补这些不足,本研究旨在建立一种复合荧光定量RT-PCR方法,可用于CSFV野毒与兔化弱毒疫苗的鉴别诊断以及CSFV的定量研究。

应用该方法可以及早对猪瘟爆发做出准确快速诊断,防止疫情蔓延;可以将 CSFV 野毒感染猪迅速从免疫猪群中筛查出来并予以清除,有利于猪瘟的净化和无猪瘟疫区的建立;同时该方法还可望取代传统的兔体定型热反应应用于猪瘟疫苗效价估测、CSFV 致病机制研究以及猪瘟疫苗免疫攻毒保护效力评价。

第二章 鉴别猪瘟病毒野毒和兔化弱毒疫苗的复合荧光定量

RT-PCR 方法的建立

摘要: 通过对GenBank中公布的 34 株猪瘟病毒野毒株和疫苗株基因组序列的比较分析, 在其 5'端非编码区设计了一对针对猪瘟病毒的通用引物和两条分别针对猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的特异性TaqMan水解探针, 建立了一种能区分猪瘟野毒株和兔化弱毒疫苗株的敏感、特异、重复性好的复合荧光定量RT-PCR鉴别检测方法。该方法能将我国大陆流行的不同基因亚群(1.1、2.1、2.2 和 2.3 基因亚群)的猪瘟病毒野毒株与猪瘟兔化弱毒疫苗株完全区分开来, 而不与其它猪源病毒发生非特异反应, 检测的线性范围为 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL , 达 6 个梯度的数量级, 分别可检测到初始模板中 41.8 (野毒株) 和 81.5 (兔化弱毒疫苗株) 个拷贝的病毒RNA, 与已建立的复合 RT-套式PCR (RT-nPCR) 的敏感性相近, 二者对 152 份不同样品检测符合率分别为 96.2% (野毒株) 和 100% (兔化弱毒疫苗株)。应用本方法对现地 106 份临床现地样品的检测, 其中野毒阳性率为 30.2% (32/106), 通过对部分阳性样品CSFV进行基因分群表明, 野毒株主要为 1.1 和 2.1 基因亚群。

关键词: 猪瘟病毒; 猪瘟兔化弱毒疫苗; 复合荧光定量 RT-PCR; 鉴别诊断

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (*Classical swine fever virus*, CSFV) 引起猪的一种以高热稽留、出血、梗死、坏死和高死亡率为主要特征的高度接触性传染病。

近年来, 我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大变化, 在临床表现上趋于复杂化, 出现了所谓“非典型猪瘟”、“温和型猪瘟”和“带毒母猪综合征”, 在病理剖检上也常常不同于典型猪瘟的病理变化, 给兽医临床诊断带来了很大困难 (乔军等, 2001; 吕宗吉等, 2001)。此外, 猪还可以感染同属的其它瘟病毒 (BVDV-1、BVDV-2 和 BDV), 而由于不同瘟病毒之间具有血清学交叉反应, 导致猪瘟的诊断更加复杂 (Paton et al., 1992)。在我国, 猪瘟兔化弱毒疫苗 (HCLV) 的大规模应用, 为控制猪瘟起到了重要作用, 但同时也给 CSFV 野毒感染猪和疫苗接种猪的鉴别诊断带来较大困难。国内已建立了一种复合 RT-nPCR 方法 (Li et al., 2007), 可有效区分猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株。但在实际应用中, 发现该方法仍存在一些缺陷, 例如操作步骤复杂, 容易污染, 并且不能用于病毒定量研究。因此, 亟待建立一种可以准确诊断 CSFV 感染的敏感而特异的检测方法。

荧光定量PCR (FQ-PCR) 已广泛用于猪瘟定性的诊断和猪瘟病毒感染的定量研究 (Risatti et al., 2003; Uttenthal et al., 2003; Risatti et al., 2005; Hoffmann et al., 2005; Ophuis et al., 2006), 但对于CSFV野毒株和疫苗株的鉴别诊断方面却鲜有报道, 目前Cho等 (2006) 应用不同荧光基团标记的两条TaqMan-MGB探针建立了一种能鉴别韩国CSFV野毒株和LOM疫苗株的荧光RT-PCR方法, 但此方法没有做到定量检测, 而且也无法对我国野毒株和猪瘟兔化弱毒疫苗株 (HCLV) 进行鉴别性检测。本研究旨在建立一种能快速区分CSFV野毒和弱毒疫苗株的特异而敏感的复合荧光定量RT-PCR鉴别诊断方法, 对猪瘟病毒感染进行早期快速准确诊断, 从而防止猪瘟感染的

蔓延，并及时发现新的猪瘟病毒流行毒株，为制定猪瘟防制策略提供依据。

2.1 材料与方法

2.1.1 病毒、细胞与质粒

猪瘟病毒石门系强毒株（Shimen）、猪瘟兔化弱毒疫苗株（HCLV）、BVDV Oregon C24V 株、传染性胃肠炎病毒（TGEV）华毒株、猪流行性腹泻病毒（PEDV）CV777 株、伪狂犬病病毒（PrV）双城株、猪细小病毒（PPV）Z 株、猪圆环病毒 2 型（PCV2）JXL 株均由哈尔滨兽医研究所保存并提供。8 个代表我国大陆主要基因亚群（1.1、2.1、2.2 和 2.3 基因亚群）的猪瘟病毒野毒分离株 HLJ-1(05)、HLJ-2(05)、YN4(96)、GZ1(98)、ZJ2(99)、SD4(98)、HaN1(99)和 HuB2(98)，分别由本实验室或长春军事兽医研究所动物流行病学实验室分离并保存（Tu et al., 2001; Li et al., 2007）（表 2-1）。PK-15 猪肾细胞、分别克隆有猪瘟石门强毒和兔化弱毒疫苗株基因组 5'-UTR 的重组阳性质粒 TF1T7 和 pOK/F1-4 由本实验室以前构建并保存（李国新等，2006；王明杰等，2007）。pMD18-T 载体购自宝生物工程（大连）有限公司。

表 2-1 8 株我国大陆不同地区的分离猪瘟野毒株

Table 2-1 The sources, isolation dates, subgroups and GenBank accession numbers of 8 Chinese CSFV isolates

猪瘟病毒株名称 ^a	分离地点	分离时间	基因亚群	GenBank 登录号
HLJ-1(05)	黑龙江省	2005	1.1	AY968685
HLJ-2(05)	黑龙江省	2005	1.1	AY968686
YN4(96)	云南省	1996	2.1	EF218617
GZ1(98)	贵州省	1998	2.1	EF218616
ZJ2(99)	浙江省	1999	2.2	EF408548
SD4(98)	山东省	1998	2.2	EF218613
HaN1(99)	海南省	1999	2.3	EF218615
HuB2(98)	湖北省	1998	2.3	EF408547

注：a：参考文献 Tu et al.（2001）和 Li et al.（2007）。

2.1.2 主要实验仪器及试剂

Beckman高速低温离心机J21-M、GS-15R台式离心机、电热恒温水浴锅（DK-8D型，上海精宏实验设备有限公司）、Biometra T-GRADIENT PCR仪、RotorGene3000（Corbett 公司）、RS-232C Eppendorf Biophotometer生物分光光度计（Eppendorff公司）、HZQ-C空气浴摇床（哈尔滨市东联电子技术开发有限公司）、SYNGENE型凝胶成像系统（GENE公司）。

QIAamp Viral RNA Kit提取试剂盒（QIAgen公司）、TRIzol试剂（Invitrogen公司）、DEPC

(Promega公司)、RNA外转录试剂盒RNA MaxxTM High Yield Transcription kit (Stratagene公司)、Hot Start EX *Taq*、Reverse Transcriptase XL (AMV)、RNA酶抑制剂 (HPRI) 和dNTP (10mmol/L 和2.5mmol/L) 购自宝生物 (大连) 有限公司。

2.1.3 引物和探针

应用 MegAlign 软件对 GenBank 中公布的 34 株 CSFV (包括 23 株国内外不同基因型的野毒株和 11 株弱毒疫苗株) 和其它瘟病毒 (包括 BVDV-1、BVDV-2 和 BDV 共 4 株) 基因组序列进行比对分析 (图 2-1), 在高度保守的 5'-UTR 内设计了针对 CSFV 的通用上下游引物 CSFV-F 和 CSFV-R (预期扩增产物大小为 98~99bp) 以及不同荧光基团标记的 CSFV 野毒特异性探针 (CSFVv111) 和猪瘟兔化弱毒疫苗株特异性探针 (CSFVa110) (表 2-2), 引物和探针由上海生物工程有限公司合成。

表 2-2 复合荧光定量 RT-PCR 引物和探针序列及两端标记情况

Table 2-2 Sequences, T_m values and their positions in the genome of primers and probes of the multiplex real-time RT-PCR

名称	序列	T _m 值 (°C)	基因组位置 ^a (bp)
CSFV-F	5'- GAACTGGGCTAGCCATG-3'	57.01	86-102
CSFV-R	5'- ACTGTCCTGTACTCAGGAC-3'	57.56	166-184
CSFVv111	5'- FAM-AGGACTAGCAAACGGAGGGACTAGCCG-TAMARA-3'	68.08	111-137
CSFVa110	5'-TET-TAGGACTAGCAAAACGGAGGGACTAGCCA-TAMARA-3'	66.27	110-138

注: a-根据猪瘟病毒石门株 (GenBank No. AF092448) 基因组位置。

2.1.4 病毒 RNA 提取和 cDNA 合成

(1) 接毒细胞培养物上清、组织病料匀浆上清和血清病毒 RNA 的提取

取 140μL 以上样品, 用 QIAamp Viral RNA Kit 提取试剂盒 (QIAgen 公司) 参照使用说明书提取病毒 RNA, 提取的 RNA 用 40μL AVE 洗脱液洗脱溶解。

(2) 全血中病毒 RNA 的提取

取 100μL 全血样品, 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 参照使用说明书提取总 RNA, 具体操作步骤如下:

- ① 加入 TRIzol 1mL, 剧烈震荡 15s。
- ② 室温静置 5min。
- ③ 每毫升 TRIzol 加入 0.2mL 的氯仿。
- ④ 盖好管盖, 剧烈震荡 15s, 室温作用 2~3min。
- ⑤ 4°C, 11 000×g 离心 15min。

Primers/Probe	CSFV-F		FAM-CSFV _v 111/TET-CSFV _a 110		CSFV-R	
	GAAGTGGGCTAGCCATG		AGGACTAGC AAACGGAGGGACTAGCCG		CAGGACTCATGTCCTGTCA	
Shimen-HVRI (AY775178)	86 GAAGTGGGCTAGCCATG	***	TAGGACTAGC-AAAACGGAGGGACTAGCCA	***	← CAGGACTCATGTCCTGTCA	184
Shimen-WD (AF092448)	*** -	***
cF114 (AF333000)	*** -	***
ALD (D49532)	*** -	***
Alfort A19 (U90951)	*** -	***
Alfort/187 (X87939)	*** -	***
Alfort/Tuebingen (J04358)	... A.	*** -	***
GXWZ02 (AY367767)	*** -	***
Brescia (AF091661)	*** -	***
Brescia (M31768)	.. G.	*** -	***
BRESCIAX (AY578687)	.. G.	*** -	***
Eystrup (NC_002657)	*** -	***
Eystrup (AF326963)	*** -	***
P97 (L49347)	*** CG-	***
SWH (DQ127910)	*** -	***
94. 4/IL/94/TWN (AY646427)	*** -	***
39 (AF407339)	*** -	***
0406/CH/01/TWN (AY568569)	*** - ... T.	***
96TD (AY554397)	*** -	***
Paderborn (AY072924)	*** -	***
RUCSFPLUM (AY578688)	*** -	***
CAP (X96550) A. ..	*** -	***
CS (AF099102)	*** -	***
GPE- (D49533)	*** -	***
Riems (AY259122)	*** -	***
Riems (U45477)	*** -	***
LPC (AF352565)	*** -	A ***
Glentorf (U45478)	*** -	A ***
HCLV-HVRI (AY805221)	*** A.	A ***
HCLV-CC (AF531433)	*** A.	A ***
HCLV-HZ (AY663656)	*** A.	A ***
HCLV-WD (AF091507)	*** A.	A ***
HCLV-BD (AY382481)	*** A.	A ***
C-strain (Z46258)	*** A.	A ***
BVDV-1 (NC000141)	... AA. A.	*** AT. . T. AG. . . GG. . . AA	***	. C. GT.
BVDV-2 (NC002032)	... AA. A.	*** A. . G. AG. . . . G.	***	. C. GG.
BDV (NC003679. 1)	... C. T. T. . A. . . A	*** -G. . . . GA. A	***	A. T.
BDV (AF002227. 1)	... AA. . A.	*** A. G. G.	***	CC. GG.

图 2-1 复合荧光定量 RT-PCR 引物（箭头）和野毒株和免化弱毒疫苗特异性探针序列及其在基因组中的位置

Fig. 2-1 Nucleotide sequences and location of primers and TaqMan probes in the viral genome of CSFV

圆点 (.) 表示同一碱基；短线 (-)，表示缺失碱基；星号 (*) 表示省略的碱基。

- ⑥ 取上清约 450 μ L (注意不要吸壁上附着物)。
- ⑦ 每毫升TRIzol加入 0.5mL的异丙醇, 室温作用 15min; 4 $^{\circ}$ C, 11 000 \times g离心 10min。
- ⑧ 弃掉上清, 每毫升TRIzol加入 1mL 75%乙醇洗涤沉淀; 4 $^{\circ}$ C, 7 400 \times g离心 5min。
- ⑨ 弃上清, 吹干, 溶于 20 μ L DEPC处理的灭菌双蒸水。

(3) cDNA的合成

取RNA 20 μ L, 加入到 30 μ L反转录反应体系中, 内含 6 μ L 5 \times RT Buffer、1 μ L dNTP (各10mmol/L)、50pmol 9-mer随机引物、10U禽源反转录酶 (AMV RT XL) 和 20U RNA酶抑制剂 (HPRI), 42 $^{\circ}$ C水浴 1h, 最后 70 $^{\circ}$ C 15min灭活反转录酶, 置-20 $^{\circ}$ C备用。

2.1.5 复合荧光定量 RT-PCR 阳性标准品

用本实验室先前构建的分别克隆有猪瘟疫病毒Shimen株和HCLV株基因组5'-UTR的重组质粒TF1T7和pOK/F1-4(李国新等, 2006; 王明杰等, 2007), 作为复合荧光定量RT-PCR的标准品(TF1T7质粒上克隆有T7启动子基因, pOK/F1-4质粒载体上本身也带有T7启动子基因, 因此在体外应用T7 RNA聚合酶体外转录试剂盒可转录为RNA)。

此两种质粒标准品的构建过程为: 设计用RT-PCR方法分别扩增出猪瘟疫病毒Shimen强毒株和HCLV株的5'-UTR的cDNA片段, 然后分别克隆入pMD-18T和pOK12载体, 筛选出阳性质粒测序鉴定后, 分别在紫外分光光度计OD₂₆₀测定其质量浓度, 按公式 $[X(\text{g}/\mu\text{L}) \text{DNA}/\text{DNA长度}(\text{bp}) \times 660] \times 6.02 \times 10^{23} = Y$ (拷贝/ μ L)) 换算为摩尔浓度后, 分别都稀释至 10^8 拷贝/ μ L, -20 $^{\circ}$ C保存, 用前稀释。

2.1.6 常规 PCR

取稀释到 10^8 拷贝/ μ L阳性质粒标准品TF1T7 1 μ L为模板, 在不同退火温度 (56~64 $^{\circ}$ C) 下在梯度PCR仪 (T-GRADIENT PCR仪) 上进行两步法PCR反应。反应体系25 μ L, 其中含1 μ L模板、2.5 μ L 10 \times EX Taq Buffer、2 μ L dNTP (各2.5mmol/L)、CSFV-F (10 μ mol/L) 和CSFV-R (10 μ mol/L) 各1 μ L、Hot Start EX Taq 1U, 余下用去离子水补足。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 45s, 40个循环。取5 μ L扩增产物, 于2%的琼脂糖电泳分析结果, 确定最佳的引物退火温度。

2.1.7 复合荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化

(1) 复合荧光定量RT-PCR退火温度的优化

分别取浓度为 10^6 拷贝/ μ L的猪瘟疫强弱毒质粒标准品TF1T7 或pOK/F1-4 1 μ L为模板。加入含有野毒特异探针 (CSFVv111) 和弱毒特异探针 (CSFVa110) 各0.5 μ L的PCR反应体系中, 分别在58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C和62 $^{\circ}$ C的退火温度下在RotorGene3000上运行3次PCR。反应体系为25 μ L (表2-1), 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C 10s、58 $^{\circ}$ C/60 $^{\circ}$ C/62 $^{\circ}$ C 45s; 40个循环, 退火延伸时检测荧光信号。确定其中哪个退火温度下野毒特异探针与猪瘟疫弱毒模板和弱毒特异探针与野毒模板最不容易发生非特异性反应, 即FAM荧光通道和TET荧光通道中非特异荧光信号的变化 (ΔR_n) 最低。

表2-3 复合荧光定量RT-PCR反应成份 (25 μ L体系)Table 2-3 The volumes of reagents in the multiplex real-time RT-PCR (volume: 25 μ L)

成份	ddH ₂ O	Buffer	dNTP	上游引物	下游引物	探针	Taq酶	模板
单位浓度		10×	2.5mmol/L	10 μ mol/L	10 μ mol/L	10 μ mol/L	5U/ μ L	
加样量 (μ L)	14.3	2.5	2	1	1	强弱毒各 0.5	0.2	1

(2) 复合荧光定量RT-PCR探针浓度和Mg²⁺浓度的优化

确定最佳的退火温度后, 分别取10⁶~10¹拷贝/ μ L的猪瘟强弱毒质粒标准品TF1T7或pOK/F1-4 1 μ L强弱毒模板, 按野毒和兔化弱毒特异性探针终浓度分别为0.05~0.4 μ mol/L的等浓度梯度和Mg²⁺终浓度1.5~10mmol/L的梯度应用距阵法进行条件优化。

(3) 复合荧光定量RT-PCR对CSFV野毒株和猪瘟兔化弱毒疫苗株的鉴别检测

根据以上优化过程确定复合荧光定量RT-PCR最终反应条件和参数并对实验室现有的不同基因亚型CSFV野毒株HLJ-1(05)、HLJ-2(05)、YN4(96)、GZ1(98)、ZJ2(99)、SD4(98)、HaN1(99)和HuB2(98) (1.1、2.1、2.2和2.3基因亚群各2株) 和猪瘟兔化弱毒疫苗株进行检测验证。

2.1.8 特异性试验

应用“2.1.7”建立的复合荧光定量 RT-PCR 对 Shimen、HCLV、BVDV、TGEV、PEDV、PRV、PrV、PCV2、PRRSV、PPV 感染的细胞培养物和正常细胞对照, 分别取等量样品提取病毒 RNA (DNA), 然后用随机引物反转录, 取 1 μ L 模板 cDNA 用复合荧光定量 RT-PCR 进行检测。

2.1.9 敏感性试验

分别取 0.5 μ g TF1T7 或pOK/F1-4 质粒标准品分别用限制性内切酶SalI或NotI酶切线性化后, 分别用T7 RNA聚合酶体外转录试剂盒 (RNA MaxTM High Yield Transcription kit) 按操作按说明书进行体外转录, 合成RNA。操作步骤如下:

转录体系 25 μ L, 37 $^{\circ}$ C作用 2h 后, 将体系扩大到 50 μ L: 加入 10U 无 RNA 酶的 DNA 酶(DNase I, MBI 公司), 10 \times DNase I buffer, 用 DEPC 处理的水补充到 50 μ L, 以消化未转录完的 DNA。37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后再将体系扩大到 200 μ L, 各加入 100 μ L 苯酚 (水饱和酚) 和氯仿抽提后加入等体积异丙醇沉淀, 吹干后, 将体外转录的 RNA 溶于 30 μ L DEPC 处理的水中。

经紫外分光光度计测定其质量浓度后, 按公式 ($[X \text{ (g/}\mu\text{L)} \text{ RNA/转录的RNA长度 (bp)} \times 340] \times 6.02 \times 10^{23} = Y \text{ 拷贝/}\mu\text{L}$) 分别换算成摩尔浓度约为 4.18 $\times 10^{12}$ 拷贝/ μ L或 8.15 $\times 10^{11}$ 拷贝/ μ L, 分别将其 10 倍系列稀释至 4.18 拷贝/ μ L (1.75 $\times 10^{-3}$ pg/ μ L) 或 8.15 拷贝/ μ L (6.83 $\times 10^{-3}$ pg/ μ L) 后, 按“2.1.4”方法反转录后, 分别取cDNA 1 μ L作为模板, 每个梯度做两个重复, 进行复合荧光定量RT-PCR反应, 确定检测的敏感度。

2.1.10 重复性试验

批间重复：各取等量的3份不同滴度的猪瘟病毒Shimen株或HCLV株细胞培养物，先后分3次提取RNA，反转录后，在同一反应条件下进行3次独立的复合荧光定量RT-PCR检测。

批内重复：各取3份不同滴度的猪瘟病毒Shimen株或HCLV株细胞培养物，每份样品做3个重复提取RNA，反转录后，进行一次复合荧光定量RT-PCR检测。

2.1.11 复合荧光定量 RT-PCR 与复合 RT-nPCR 的符合率试验

对46份CSFV接毒细胞培养物、106份疑似猪瘟组织样品（包括全血或血清53份，扁桃体、淋巴结、脾脏、肾脏等53份）总共152份样品按“2.1.4”方法提取RNA反转录后，各取1 μ L cDNA作为模板，分别应用本实验室已建立的鉴别CSFV野毒和兔化弱毒的复合RT-nPCR方法（Li et al., 2007）和以上优化的复合荧光定量RT-PCR的方法进行检测，计算二者的符合率。

2.1.12 病毒分离试验

取经复合荧光定量RT-PCR与复合RT-nPCR检测结果为野毒阳性和两者检测结果不符合的样品应用病毒分离的方法进行符合性试验。具体操作如下：

取组织样品100mg，研磨匀浆后，12 000rpm 4℃离心15min后取上清加入4 000U的双抗（青霉素和链霉素各4 000U）4℃作用1h后，100倍稀释后按10%的量接种接近长成单层的PK-15细胞（全血样品同样100倍稀释后按同样量接种细胞），37℃（5% CO₂）感作1h后，倒掉上清用无菌PBS洗两次后换含牛血清2%的DMEM维持液37℃（5% CO₂）温箱中培养72h后，反复冻融3次后收毒，再接种PK-15细胞，按以上方法将样品上清在PK-15传3代，每代收毒后都接种96孔板，每样重复3孔，设定阴阳性对照。应用间接免疫荧光方法对病毒抗原进行检测。

2.1.13 复合荧光定量 RT-PCR 对现地样品的检测和种系发生分析

用复合荧光定量 RT-PCR 对中国各地（包括湖南、河南、黑龙江、吉林、江苏、内蒙古、上海、天津）总共 106 份现地样品（包括全血、血清和组织样品）进行了检测。

从检测为 CSFV 野毒阳性的样品中选取 17 份，提取基因组 RNA，用 CSFV NS5B 基因特异性引物 P5（5'-TRA CCA YGC AYA TGW CAG AAG TAC C-3'，Y=C/T，W=A/T）和 P6（5'-AGT CGA CTT CCC TGG TTT CAC TTG-3'）分别进行 RT-PCR 扩增。反转录过程同上，PCR 扩增条件是 94℃预变性 5min；94℃变性 1min、56℃退火 1min、72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 10min，预期扩增产物 599bp，将扩增产物克隆于 pMD-18T 载体测序，然后用 DNASTar 软件进行种系发生分析。

2.2 结果

2.2.1 PCR 退火温度的确定

由图 2-2 可见,引物在以上不同退火和延伸温度下对模板能特异扩增出 98bp 的特异条带,且扩增效率没有明显的差异,考虑到 *Taq* 酶对探针 5'→3'的外切活性最强和两条特异探针的 T_m 值,所以选择 58℃、60℃和 62℃三个温度梯度对复合荧光定量 RT-PCR 的退火延伸温度进行优化。

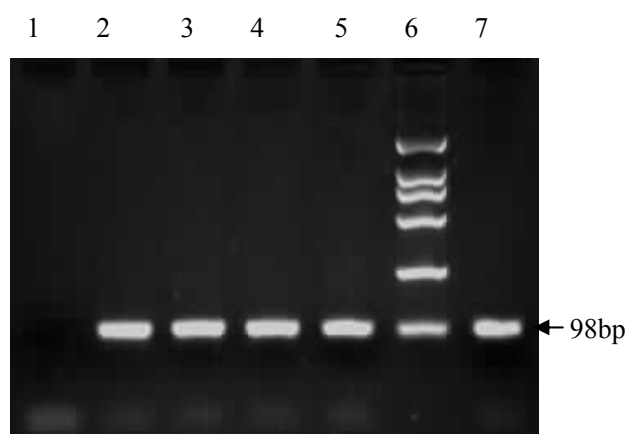


图 2-2 不同退火温度下的 PCR 反应结果

Fig. 2-2 The result for PCR at the different annealing temperatures

1~7 依次表示H₂O、56℃、58℃、60℃、62℃、DL2000、64℃

2.2.2 复合荧光定量 RT-PCR 反应参数的优化结果及标准曲线的建立

复合荧光定量RT-PCR在最佳的退火温度(60℃)下,通过检测野毒和兔化弱毒特异性探针浓度和 Mg^{2+} 浓度的梯度优化,实现了复合荧光定量RT-PCR对猪CSFV野毒和兔化弱毒模板鉴别检测。

在复合荧光定量RT-PCR最佳的退火温度(60℃)下运行 40 个循环,通过CSFV野毒和兔化弱毒特异性探针和 Mg^{2+} 浓度的一系列梯度优化,在野毒和兔化弱毒特异性探针终浓度均为 0.2 μ mol/L, Mg^{2+} 终浓度 8.5 μ mol/L时,野毒特异性探针对无论高浓度还是低浓度($10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μ L)的兔化弱毒模板的错配能力最低,40 个循环内非特异性信号达不到检测的域值,即不会影响野毒特异性探针对野毒模板的特异检测(图 2-3);同样,兔化弱毒特异性探针与兔化弱毒和野毒模板之间的非特异性结合信号也是最低(图 2-4)。

此外,模板为 CSFV 野毒和兔化弱毒混合物时,在反应过程中由于两条探针特异性反应竞争抑制了非特异性反应,取得了更好的特异性。

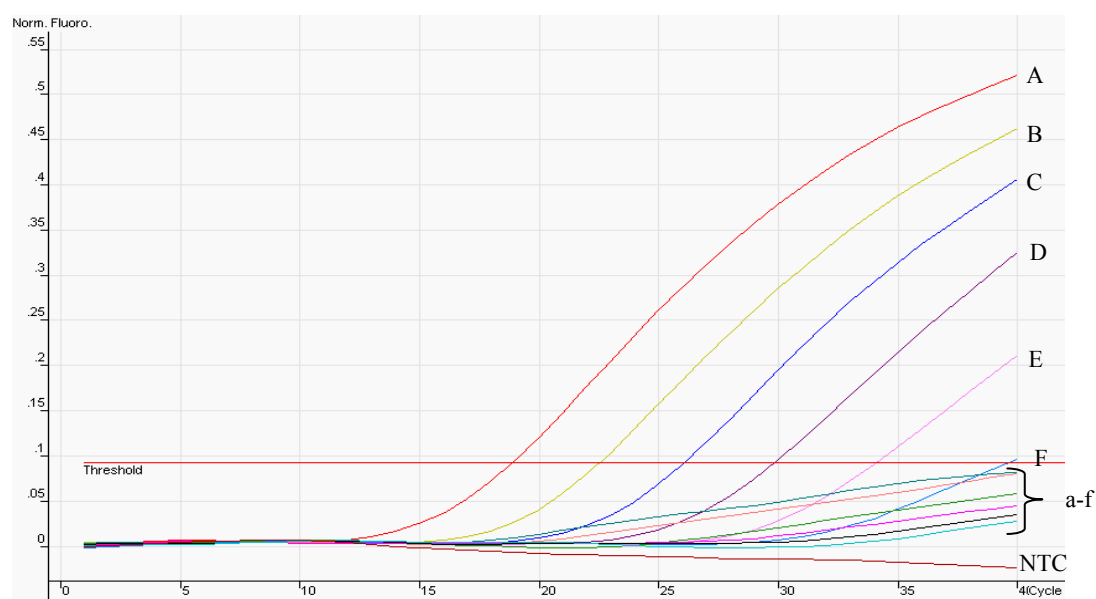


图 2-3 应用优化的复合荧光定量 RT-PCR 检测不同浓度的 Shimen 强毒或 HCLV 弱毒模板 (FAM 检测通道)

Fig. 2-3 Detection of different concentrations of Shimen strain or HCLV strain templates using the optimized multiplex real-time RT-PCR (FAM channel)

A-F分别为浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μL 的强毒质粒标准品；a-f分别为浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μL 的弱毒质粒标准品；NTC为模板为 H_2O 的阴性对照

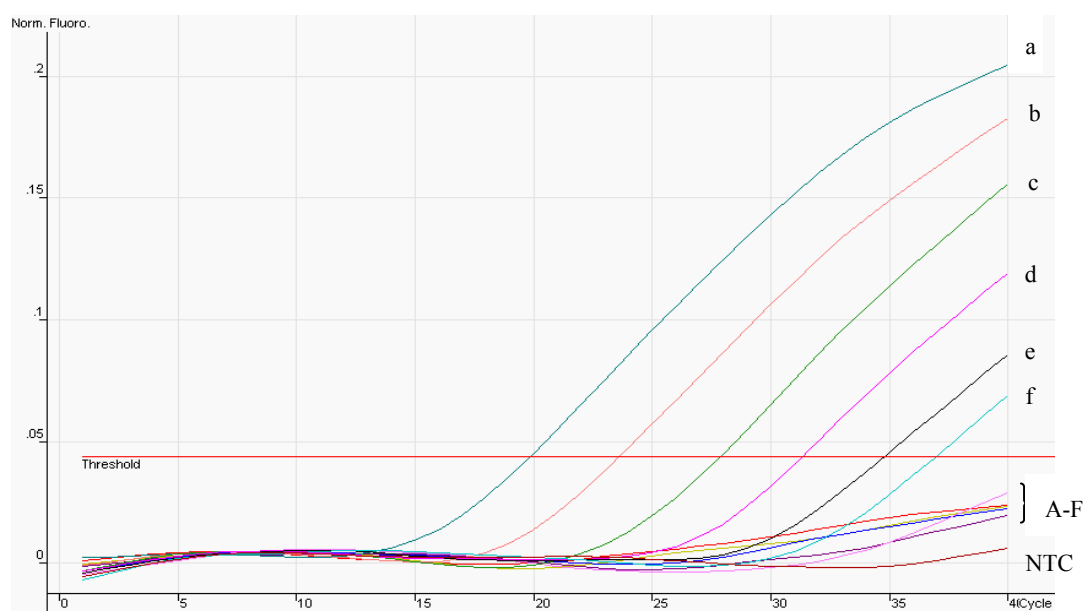


图 2-4 应用优化的复合荧光定量 RT-PCR 检测不同浓度的 Shimen 强毒或 HCLV 弱毒模板 (TET 检测通道)

Fig. 2-4 Detection of different concentrations of Shimen strain or HCLV strain templates using the optimized multiplex real-time RT-PCR (TET channel)

A-F分别为浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μL 的强毒质粒标准品；a-f分别为浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝/ μL 的弱毒质粒标准品；NTC为模板为 H_2O 的阴性对照

最终确定最佳反应体系和参数为：反应体系 25 μ L，其中含 1 μ L cDNA、2.5 μ L 10 \times EX *Taq* Buffer、2 μ L dNTP（各 2.5mmol/L）、7 μ L MgCl₂（25mmol/L）、CSFV-F（10 μ mol/L）和CSFV-R（10 μ mol/L）各 1 μ L、CSFVv111（10 μ mol/L）和CSFVa110（10 μ mol/L）各 0.5 μ L、Hot Start EX *Taq*1U，余下用去离子水补足。反应条件为：95 $^{\circ}$ C 5min；95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 45s，40 个循环，退火延伸时检测荧光信号。

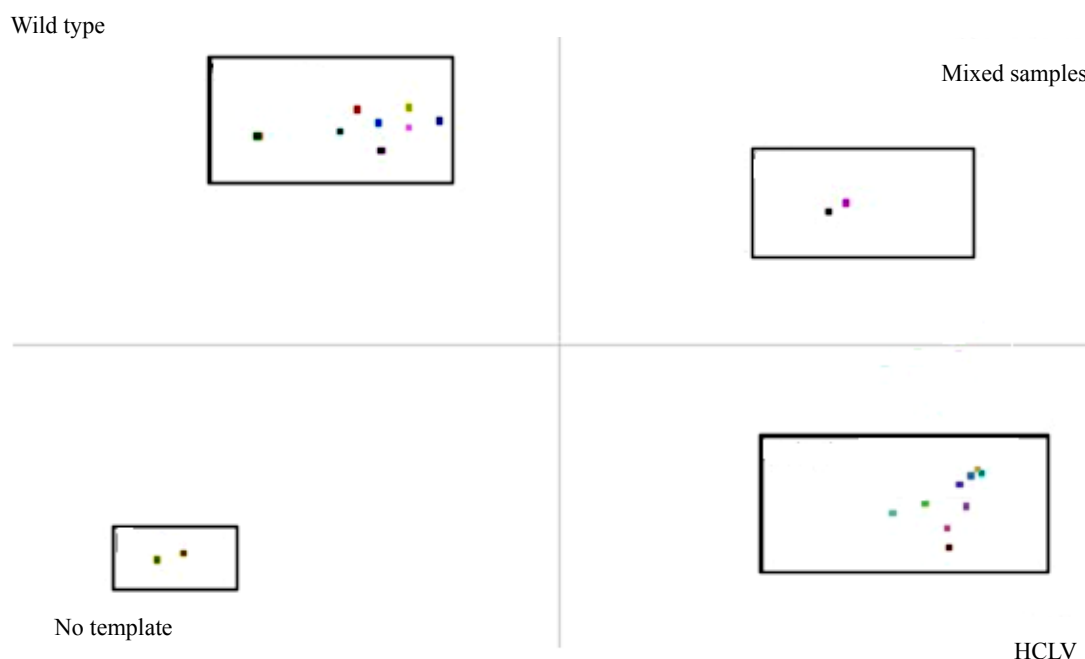


图 2-5 复合荧光定量 RT-PCR 通过对特异荧光信号的变化对猪瘟野（强）毒株和疫苗株的特异性区分

Fig. 2-5 Specific differentiation between wild-type viruses and C-strain vaccine by the multiplex real-time RT-PCR based on post-run measurement of the fluorescence intensities

Wild type: 为 8 株不同基因亚群的猪瘟病毒野毒株（HLJ-1(05)、HLJ-2(05)、YN4(96)、GZ1(98)、ZJ2(99)、SD4(98)、HaN1(99)和 HuB2(98)）；HCLV: 为 9 份不同滴度的猪瘟兔化弱毒疫苗；Mixed samples: 为 2 份Shimen强毒和HCLV的混合模板；No template: 为 2 份模板为H₂O的阴性对照

应用优化的复合荧光定量 RT-PCR 反应条件和参数在 RotorGene3000 定量 PCR 仪上对实验室现有的不同基因亚型猪瘟病毒野毒株 HLJ-1(05)、HLJ-2(05)、YN4(96)、GZ1(98)、ZJ2(99)、SD4(98)、HaN1(99)和 HuB2(98)(1.1、2.1、2.2 和 2.3 基因亚群各 2 株)和不同浓度的猪瘟兔化弱毒疫苗(HCLV)进行检测验证，通过其输出散点图（Scatter Graph Analysis）结果（图 2-5），可见方框内的 8 株猪瘟病毒野毒（Wild type CSFV）、9 份不同浓度的猪瘟兔化弱毒疫苗（HCLV）和 2 份野毒和兔化弱毒混合模板（Mixed samples）根据不同荧光信号的变化被分布在不同的象限，并且得到了明显的区分。

通过大量的实验和临床样品检测确定浓度梯度为 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL 的强毒（野毒）标准品和兔化弱毒标准品完全可以覆盖所有检测样品模板浓度的范围。因此取 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL 6 个数量级浓度的强毒和弱毒质粒标准品做复合荧光定量 RT-PCR 的标准品，得复合荧光定量 RT-PCR 的标准曲线（图 2-6），（检测野毒标准曲线：相关系数 $R^2=0.992$ ，扩增效率 $E=0.76$ ；检测兔化弱毒疫苗标准曲线： $R^2=0.992$ ， $E=0.90$ ）。可见复合荧光定量 RT-PCR 在 40 个循环内检测 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝/ μL 的猪瘟野毒和兔化弱毒模板时，具有良好的线性关系。

2.2.3 复合荧光定量 RT-PCR 的特异性

用建立复合荧光定量 RT-PCR 对 Shimen、HCLV、BVDV、TGEV、PEDV、PRV、PrV、PCV2、PRRSV、PPV 感染的细胞培养物和正常细胞对照提取病毒 RNA（DNA）反转录后进行检测，结果表明，在 40 个循环扩增期间，在野毒和兔化弱毒荧光检测通道均未检测到特异性荧光信号，表明荧光探针能特异性地检测和区分 CSFV 野毒和兔化弱毒，同时与其它猪源病毒也不发生特异性反应，证实“2.2.2”方法建立的复合荧光定量 RT-PCR 具有良好的特异性。

2.2.4 复合荧光定量 RT-PCR 的敏感性

经过检测，确定复合荧光定量 RT-PCR 针对 CSFV 野毒 RNA 的最低检出限为 41.8 拷贝/ μL ($1.75 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$)，针对猪瘟兔化弱毒疫苗 RNA 的最低检出限为 81.5 拷贝/ μL ($6.83 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$)。与鉴别检测 CSFV 野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合 RT-nPCR (Li et al., 2007) 的敏感度处于同一数量级 ($4.00 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$)。

2.2.5 复合荧光定量 RT-PCR 的重复性

用 3 份不同滴度的猪瘟石门强毒株和兔化弱毒疫苗株细胞培养物，分别进行 3 个批内重复和批间重复试验，结果显示变异系数 (CV) 均小于 3% (表 2-4)。

表 2-4 复合荧光定量 RT-PCR 的重复性

Table 2-4 The reproducibility of the multiplex real-time RT-PCR

病毒 RNA (copies/ μL)	批内重复			批间重复		
	10^2	10^3	10^4	10^2	10^3	10^4
(Mean $C_T \pm S.D.$) ^a	33.45 \pm 0.41	30.81 \pm 0.43	26.56 \pm 0.38	33.80 \pm 0.69	31.24 \pm 0.52	26.17 \pm 0.67
变异系数 CV ^a (%)	1.23	1.40	1.43	2.04	1.66	2.56
(Mean $C_T \pm S.D.$) ^b	34.42 \pm 0.43	30.67 \pm 0.32	27.21 \pm 0.34	33.81 \pm 0.84	30.32 \pm 0.67	26.77 \pm 0.50
变异系数 CV ^b (%)	1.25	1.04	1.25	2.48	2.21	1.87

注：a—Shimen；b—HCLV

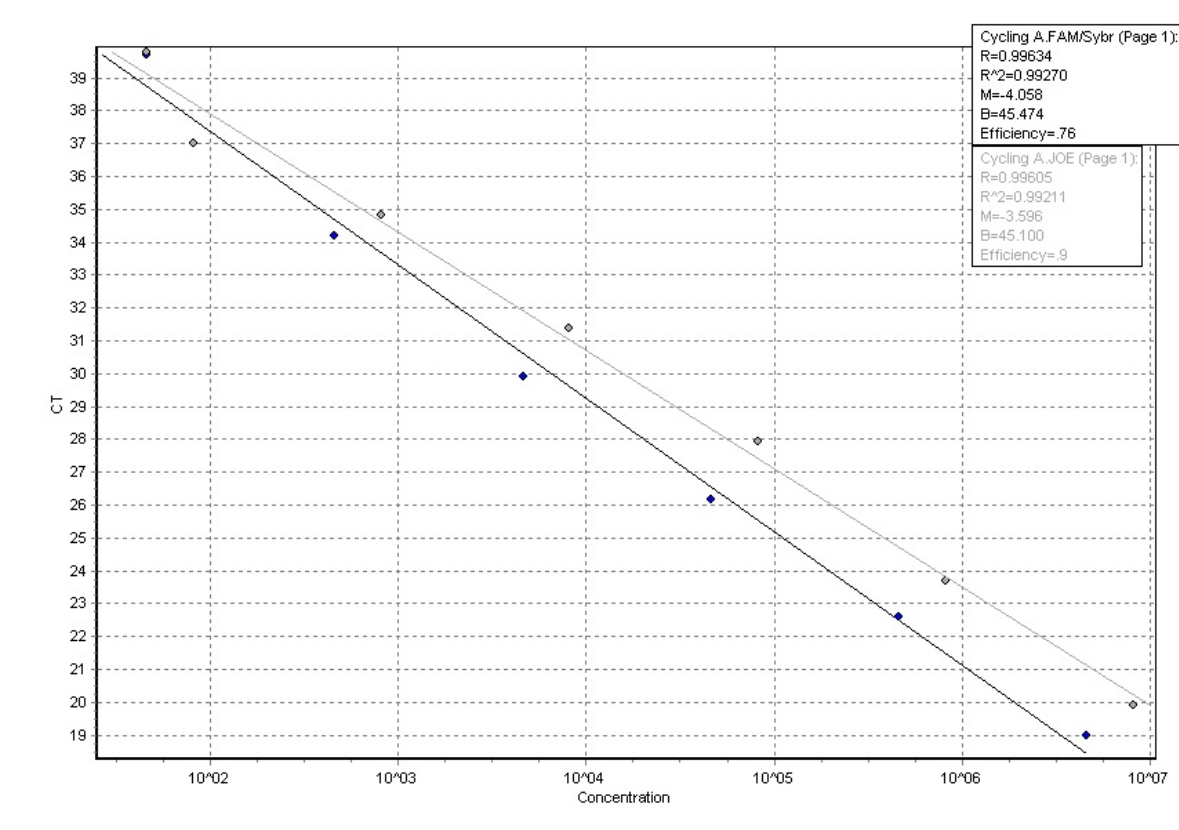


图 2-6 复合荧光定量 RT-PCR 检测 CSFV 野毒（深色）和弱毒的标准曲线（浅色）

Fig. 2-6 The standard curves of the multiplex real-time RT-PCR for wild-type virus (dark black) and C-strain (gray)

2.2.6 复合荧光定量 RT-PCR 与复合 RT-nPCR 的符合率

用复合荧光定量 RT-PCR 和复合 RT-nPCR 同时对总共 152 份不同样品（包括实验室细胞培养物 46 份和现地样品 106 份）进行了检测，二者检测阳性符合率分别为 96.2%（野毒）和 100%（兔化弱毒疫苗），其中有 2 份现地样品中前者检测为野毒阴性而后者检测阳性（表 2-5）。为进一步判定此两份样品是否为猪瘟野毒感染，对此进行了病毒分离试验。

2.2.7 野毒阳性样品的病毒分离验证

根据表 2-5 中检测结果，任取 17 份经复合荧光定量 RT-PCR 与复合 RT-nPCR 检测为野毒阳性临床样品和 2 份（全血和组织样品各 1 份）前者检测阴性而后者检测阳性样品，应用病毒分离试验进行符合性验证，结果阳性样品在病毒分离的第一代、二代和三代分别各有 11 份、4 份和 4 份（包括 2 份复合荧光定量 RT-PCR 检测阴性样品在病毒分离第三代检测阳性）检测为阳性。由此证实复合荧光定量 RT-PCR 检出率略低于复合 RT-nPCR，可能是由于复合荧光定量 RT-PCR 的扩增效率较低，造成在检测现地样品时敏感性略低于复合 RT-nPCR。

表 2-5 复合荧光定量 RT-PCR 与复合 RT-nPCR 的符合率

Table 2-5 The agreement between multiplex real-time RT-PCR and multiplex RT-nPCR

		细胞培养物	全血/血清*	组织病料	合计
real-time RT-PCR	野毒	20/46	17/53	14/53	51/152
	弱毒	17/46	4/53	6/53	27/152
RT-nPCR	野毒	20/46	18/53	15/53	53**/152
	弱毒	17/46	4/53	6/53	27/152
符合率	野毒		96.2%		
	弱毒		100%		

注：* 血清样品中有 1 份同时检出猪瘟病毒野毒和兔化弱毒疫苗株；** 其中有 2 份复合荧光定量 RT-PCR 检测阴性

表 2-6 复合荧光定量 RT-PCR 我国不同地区现地样品的检测

Table 2-6 Detection of CSFV in field samples from different regions in China

地点	样品类型	份数	检测结果	
			野毒	弱毒
湖南	淋巴结/脾脏/肾脏	12	3	1
河南	脾脏/淋巴结/血清	36	7	5
黑龙江	淋巴结/全血/血清	32	11	3
吉林	淋巴结	5	3	0
江苏	脾脏/肾脏	4	2	0
内蒙古	淋巴结	3	1	0
上海	淋巴结	12	5	0
天津	淋巴结	2	0	1
合计		106	32*	10*

注：* 其中黑龙江送检血清样品 1 份同时检测出猪瘟野毒和兔化弱毒疫苗株。

2.2.8 复合荧光定量 RT-PCR 对现地样品的检测和种系发生分析

表 2-6 中显示了复合荧光定量 RT-PCR 对中国不同地区（包括湖南、河南、黑龙江、吉林、江苏、内蒙古、上海、天津）总共 106 份现地样品（包括全血、血清、淋巴结、脾脏、肾脏等）的检测结果，可见 CSFV 野毒阳性率为 30.2%（32/106）（包括后来经病毒分离检测为阳性的 2 份样品）。

从复合荧光定量 RT-PCR 检测为野毒阳性的 32 份猪瘟临床病料选取的 17 份提取基因组后，应用猪瘟病毒基因分群 NS5B 引物扩增，测序后与已知基因亚群参考株比对发现这 17 个样中有 11 份与 Shimen 株 (AY775178)、和 Alfort/187 (X87939) 同属于 1.1 基因亚群，但 C-strain (AY8052216) 疫苗株分别处于明显不同的分支，分别为：HLJ-1(05)、HLJ-2(05)、HLJ-3(05)、HLJ-5(05)、HLJ-7(05)、

HLJ-8(05)、HLJ-1(06)、HLJ-3(06)、JL-1(06)、HeN-3(06)和 HeN-5(06); 6 份与 GXWZ02 (AY367767) 属于 2.1 基因亚群, 分别为: HuN-1(06)、NMG-1(06)、SH-7(06)、SH-9(06)、SH-11(06)和 SH-12(06) (图 2-7 中用虚线方框表示)。

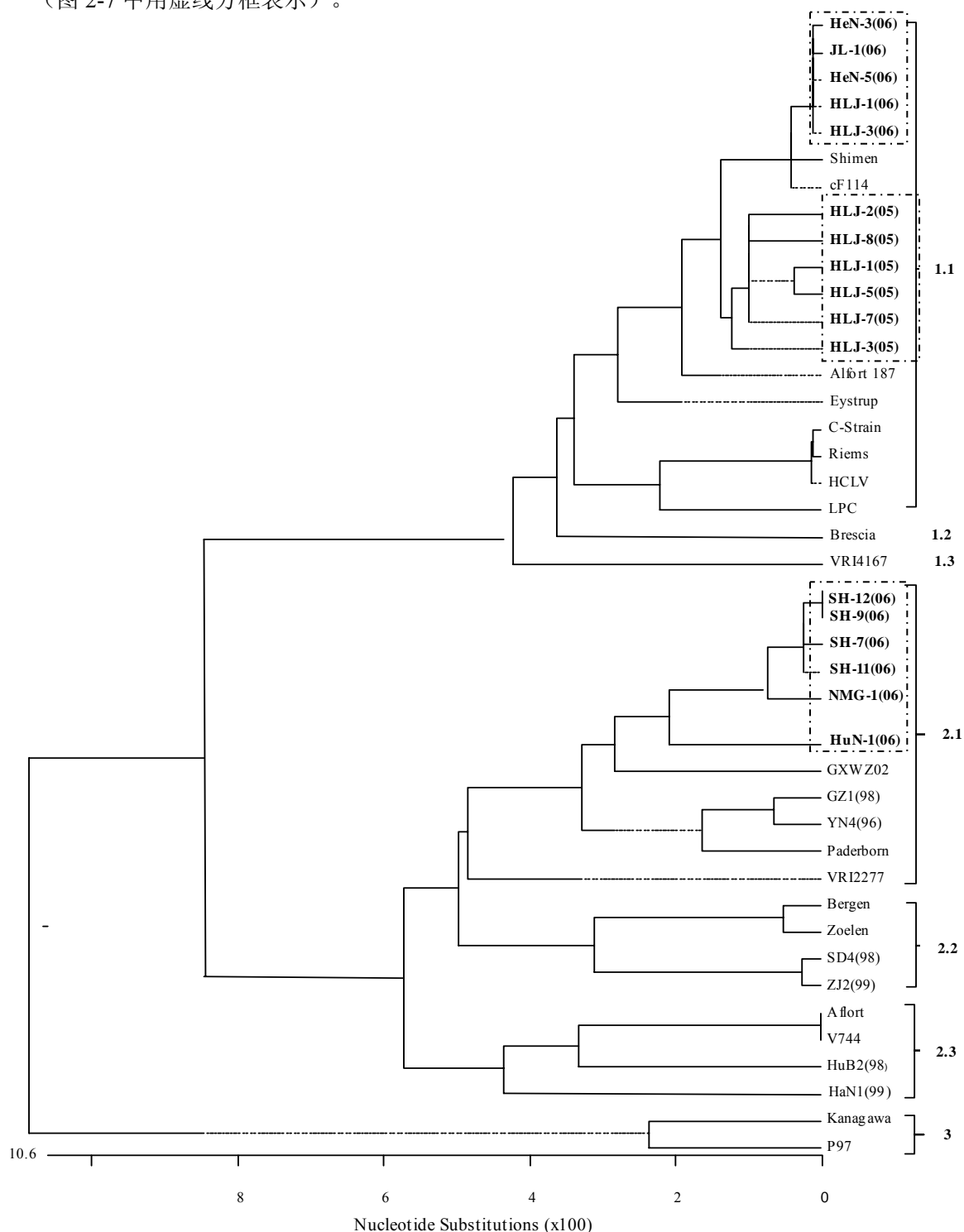


图2-7 基于NS5B基因的不同CSFV毒株的种系发生树

Fig. 2-7 Phylogenetic tree based on the NS5B genes of different CSFV isolates

虚线方框表示本研究所用的不同基因亚群毒株。

2.3 讨论

基于 TaqMan 水解探针的实时荧光定量 RT-PCR 以其快速、敏感、特异、通量高、污染几率小等优点,在猪瘟的定性诊断和猪瘟病毒感染的定量研究方面得到了广泛应用(Risatti et al., 2003; Uttenthal et al., 2003; Risatti et al., 2005; Hoffmann et al., 2005; Ophuis et al., 2006)。

本研究通过对GenBank中公布的34株CSFV毒株(包括23株国内外不同基因型的野毒株和11株疫苗株)全基因组序列进行比对分析,在其保守的5'端非编码区设计了能特异性检测猪瘟病毒的通用引物,同时利用CSFV野毒株与兔化弱毒疫苗株基因组5'端非编码区2个碱基的差异,设计了分别针对目前国内外流行的CSFV野毒和猪瘟兔化弱毒(也包括大部分国外疫苗株)的两条特异性 TaqMan探针,结合Corbett公司的RotorGene3000荧光检测系统,通过对其反应条件和参数的优化建立了一种能鉴别检测猪瘟病毒野毒和疫苗弱毒的复合荧光定量RT-PCR方法。

考虑到反转录系统的效率,通过体外转录的RNA进行的敏感性试验,确定本方法可检测到10拷贝/ μL 的CSFV野毒或弱毒RNA,与RT-nPCR的敏感性处于同一数量级,检测的线性范围为 $10^6\sim 10^1$,达6个数量级;分别取3份不同滴度的CSFV石门强毒和兔化弱毒各做3次重复,批间和批内变异系数(CV)均小于3%;对我国近来流行的不同基因亚群(1.1、2.1、2.2和2.3基因亚群)的8株猪瘟病毒野毒和9份不同效价的猪瘟兔化弱毒疫苗的检测证实其区分猪瘟野毒和兔化弱毒的特异性可达100%,并且不与其它猪源病毒发生非特异性反应;另外,通过对总共152份不同样品(包括实验接毒细胞培养物和现地疑似猪瘟样品)猪瘟病毒的检测,与本实验室以前建立的鉴别猪瘟强弱毒复合RT-nPCR的符合率为96.2%(野毒)和100%(兔化弱毒疫苗),经过病毒分离试验(virus isolation, VI)符合性验证,前者检测临床样品敏感性略低于后者。可能是因为复合荧光定量RT-PCR扩增效率没有完全达到结果“2.2.2”中标准曲线的扩增效率。尽管复合荧光定量RT-PCR方法的检出率略低于复合RT-nPCR,但前者与后者相比,操作步骤更简便,污染几率更小,检出时间更短(4.5h比6h)等。

需要指明的是,由于某些猪瘟毒株基因序列在本方法设计的探针位置个别碱基的错配,对某些疫苗株(LOM、CS、GPE-和Riems)和野毒株(P97和0406/TWN)可能无法做到鉴别检测(图2-1),但LOM、CS、GPE-和Riems为国外应用的弱毒疫苗,到目前为止未在中国应用,而台湾分离的P97和0406/TWN野毒株,目前也未见在中国大陆检测或分离到的报道。因此,该问题目前不会影响到本方法在现地的应用。

在试验中我们应用了Hot Start EX Taq热启动酶,此酶对实时荧光定量RT-PCR尤为适用,其优点在于在PCR反应模板的变性解链时其才会产生DNA酶聚合活性,这就大大降低了PCR过程发生非特异性扩增和引物二聚体产生的机率。为了使检测野毒和兔化弱毒特异性探针与模板发生错配的效率最低,在确定了引物浓度和最佳的退火温度和后,对探针浓度和 Mg^{2+} 进行了一系列的梯度优化。探针浓度过低会引起特异性的荧光信号变弱,而浓度过高则会引起两条探针与模板发生非特异结合,产生非特异性荧光信号从而干扰特异性荧光信号; Mg^{2+} 浓度对Taq酶的活性强弱有重要影响, Mg^{2+} 浓度过低会使Taq酶无法完全发挥活性,而浓度过高则会引起引物和探针的非特异反应,影响PCR的扩增效率(Mackay et al., 2002)。在条件优化的过程中,我们发现,由于本试验目的

着重在于猪瘟野毒和兔化弱毒的鉴别,在保证鉴别检测的特异性时,复合荧光定量RT-PCR对模板的扩增效率没有达到最理想的效果。

以质粒作为标准品,避免了以体外转录RNA为标准品时出现RNA易降解、每次试验前需要重新稀释定量的缺点,虽然存在检测样品RNA提取和反转录效率的问题,但质粒较稳定,易贮存和标准化,本研究对保存于4℃的梯度稀释的质粒标准品2个月后重新定量发现其浓度未发生明显改变,此外根据Hayward等的研究,尽管对不同目的片段的反转录效率相差很大,但对于同一个靶片段来说,其反转录效率是稳定的(Hayward et al., 1998)。本研究通过对同一样品进行5次独立的RNA提取和反转录,结果重复性很好。

应用本试验建立的复合荧光定量RT-PCR对我国不同地区送检的现地106份样品(包括全血、血清、淋巴结、脾脏、扁桃体等)进行检测,其中野毒阳性率为30.2%(32/106),兔化弱毒疫苗阳性率为9.4%(10/106),其中从黑龙江省某猪场送检的1份全血样品中同时检出猪瘟病毒野毒和弱毒,弱毒测序分析为疫苗株,而且通过回访证实,猪群发病后实施过紧急疫苗接种,而对于其余9份兔化弱毒疫苗阳性的现地样品其主要来自河南和黑龙江省的猪场,全血、血清和其它组织中都检测阳性的样品,证实在猪瘟兔化弱毒疫苗免疫的猪群中,在免疫后的一定时间内猪瘟兔化弱毒疫苗在猪体内多种组织都可以检测到(Koenig et al., 2006)。在我国现阶段防制猪瘟的主要手段还是通过疫苗接种,目前还没有证据表明猪瘟的流行是由于猪瘟野毒株的变异致使猪群无法通过接种猪瘟兔化弱毒疫苗对其提供保护造成的,然而免疫失败造成的猪瘟在我国的暴发也时有发生,其主要可能有两方面的原因:疫苗质量或免疫程序的不合理可能造成人为的猪瘟流行,另外,妊娠母猪感染低毒力的猪瘟野毒,产下表面健康的仔猪可能先天感染猪瘟野毒而造成机体免疫耐受,在不表现临床症状的同时却能排毒,对健康猪群造成严重威胁(涂长春, 2003)。

对应用复合荧光定量RT-PCR检测为野毒阳性的猪瘟的临床病料选取的17份提取基因组应用猪瘟病毒基因分型NS5B引物扩增,测序后与已知基因亚群参考株比对后发现这17份样品中有11份(黑龙江省8份、吉林省1份、河南省2份)与Shimen株(AY775178)、和Alfort/187(X87939)株同属于1.1基因亚群,但C-strain(AY8052216)疫苗株分别处于明显不同的分支;6份(上海市4份、内蒙古省1份、湖南省1份)与GXWZ02(AY367767)株属于2.1基因亚群,证实了不同基因亚群的猪瘟病毒正在我国流行,但由于本次试验检测样品有限,分析结果未发现在我国流行的其它基因亚群(2.2和2.3基因亚群)的猪瘟病毒野毒株(韩雪清等, 1999; Tu et al., 2001; 孙世琪等, 2004)。

第三章 复合荧光定量 RT-PCR 对猪瘟病毒人工感染猪的检测

摘要：应用建立的复合荧光定量RT-PCR对 5 头人工感染 10^6 TCID₅₀猪瘟石门强毒的猪只和 4 头同居感染猪只感染后 0~14d全血中猪瘟病毒RNA进行了定量检测，发现在人工感染猪感染后 2d 就有 80%（4/5）检测为阳性（ $10^{3.9}$ 拷贝/mL全血以上的病毒RNA），而在感染后 5~8d病毒在血液中的复制达到高峰，达到 10^8 拷贝/mL以上，直到濒死前病毒RNA的载量一直维持在 10^8 拷贝/mL，从而揭示了猪瘟病毒在猪体内复制的动态变化，证实了感染猪临床表现与病毒滴度存在明显的时间相关性。此外发现，50%同居感染猪（2/4）在感染后 6d，即出现猪瘟临床症状前 3~4d，在其全血中检出病毒RNA。对同居感染猪的扁桃体、脾脏、淋巴结、肾脏、脑等组织的检测结果发现，猪瘟病毒在全身各组织中广泛分布，其中脾脏、淋巴结、扁桃体等淋巴组织中病毒滴度最高。

关键词：猪瘟石门强毒，复合荧光定量 RT-PCR，人工感染

由猪瘟病毒（*Classical swine fever virus*, CSFV）引起的猪瘟（Classical swine fever, CSF），其典型临床特征和病理变化为：感染猪体温高热稽留，皮肤有出血点，怀孕母猪流产，小血管出血变性，脾脏梗死，扁桃体有白色坏死灶，肾脏和膀胱有出血点，回盲瓣扣状肿等。根据临床表现和病程猪瘟有可分为急性、亚急性、慢性和繁殖障碍型（杜念兴，1998）。

目前，我国防制猪瘟的主要手段还是通过疫苗接种，在猪瘟兔化弱毒疫苗强大的免疫压力下，我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大变化，在临床表现上趋于复杂化，出现了由于中、低毒力猪瘟野毒株或持续感染株感染而产生的所谓“非典型猪瘟”、“温和型猪瘟”和“带毒母猪综合征”，在病理剖检上也常常不同于典型猪瘟的病理变化，因此给兽医临床诊断带来了很大困难（乔军等，2001；吕宗吉等，2001），由于以上临床病例猪瘟病毒在感染猪体内持续低水平的复制，在猪体内造成了低水平的病毒血症，因此通过常规的猪瘟诊断方法（包括：动物接种试验、病毒分离培养、免疫荧光试验、抗原捕捉ELISA，RT-PCR等）在对“非典型猪瘟”和“温和型猪瘟”等的临床猪瘟的隐性或慢性感染的诊断上，其在敏感性、特异性、时效性等方面都暴露了各自的不足，因此不适于现地隐性感染病例或感染猪的早期诊断。

而荧光定量PCR技术以其可实时定量、灵敏度高、特异性好、高通量检测等优点在猪瘟的感染的确证和猪瘟病毒的致病性研究方面得到广泛的应用（Risatti et al., 2003; Uttenthal et al., 2003; Risatti et al., 2005; Hoffmann et al., 2005; Ophuis et al., 2006）。在本试验中，我们将通过对猪瘟病毒人工感染猪及其同居感染猪体内病毒RNA的定量检测，对第二章建立的复合荧光定量 RT-PCR的敏感性、时效性等作出评价，并通过对感染猪外周血中病毒RNA的检测，对猪瘟病毒在猪体内复制的动态进行研究，根据感染猪临床表现和与RT-nPCR检测结果的验证，确定本方法对猪瘟病毒感染早期快速确诊的可靠性。

3.1 材料与方法

3.1.1 实验动物及病毒

10头10周龄健康猪只购自哈尔滨市郊某猪瘟阴性猪场。 10^6 TCID₅₀/mL猪瘟石门血毒由本实验室保存。

3.1.2 仪器和试剂

IDEXX猪瘟抗体阻断ELISA试剂盒（北京世纪元亨有限公司）、柠檬酸钠抗凝剂（天津化学试剂三厂），其余仪器试剂同“2.1.2仪器和试剂”。

3.1.3 实验动物的人工感染

10头10周龄健康猪只购自哈尔滨市郊某猪瘟阴性猪场，经IDEXX猪瘟抗体阻断ELISA试剂盒检测为猪瘟抗体阴性（猪瘟抗体阻断率低于30%），随机分为3组：攻毒组5头（#1、#2、#3、#4、#5），每头而后肌肉注射猪瘟石门强毒株血毒1mL（ 10^6 TCID₅₀/mL）；同居感染组4头（#6、#7、#8、#9），不攻毒，但与攻毒组混群饲养；对照组1头（#10），不攻毒，与攻毒组和同居感染组完全隔离饲养。各组分别在攻毒后0~8d每天前腔静脉采集抗凝血（4%柠檬酸钠抗凝），攻毒后8-14d每隔1d采集抗凝全血，冻存于-80℃，用于复合荧光定量RT-PCR和RT-nPCR检测，同时，每天进行直肠温度检测，并进行临床观察。

3.1.4 全血中病毒 RNA 的提取和 cDNA 的合成

全血中病毒 RNA 的提取和 cDNA 的合成按方法“2.1.4” (2)和(3)操作。

3.1.5 人工感染猪全血中猪瘟病毒的检测

从30μL反转录的cDNA中取1μL作为模板，分别用复合荧光定量RT-PCR和RT-nPCR进行检测。每毫升全血所含有的猪瘟病毒RNA浓度约为每个复合荧光定量RT-PCR反应所测得的cDNA浓度的300倍。

3.1.6 感染猪各组织中猪瘟病毒的检测

人工感染后第14d，剖杀3头同居感染猪（#7、#8、#9）和未攻毒的对照猪（#10），分别取其扁桃体、颌下淋巴结、脾脏、肾脏、肝脏、脑等组织各100mg，研磨成匀浆后，提取总RNA，各取100ng RNA进行反转录后，取1μL cDNA进行复合荧光定量RT-PCR检测。

3.2 结果

3.2.1 人工感染猪临床表现和体温检测

攻毒猪在攻毒后第2天即可检测到体温上升,伴有厌食,到第3~5天体温上升到最高峰(41℃以上)(图3-1),感染猪出现精神沉郁,便秘,后躯无力,感染后第6~10天体温一直稽留在40.5℃左右,感染后第10、12、13天均有1头病猪(#3、#2、#4)死亡,3头死亡猪和在第14天剖检濒死的2头猪都呈现典型的急性猪瘟病理变化:全身淋巴结肿大出血,扁桃体有白色坏死灶,脾脏梗死,肾脏和膀胱有出血点,回盲瓣扣状肿等。

同居感染猪在攻毒后第8天以内无明显的症状表现,但在第10天有2头猪(#6、#7)体温升到40℃,出现了精神沉郁、食欲不振等症状,其中#6猪升高到41.5℃以上,该猪在第13天死亡。在攻毒后第14天对4头同居感染猪进行剖检,各脏器呈现典型猪瘟病变。

试验期间未攻毒的对照猪始终处于健康状态。

3.2.2 人工感染猪全血中猪瘟病毒的检测

检测结果显示(表3-1),两种方法检出率基本一致(攻毒后第6天RT-nPCR比复合荧光定量RT-PCR多检出1头阳性)。感染后第2天,5头攻毒猪中有4头(#1、#2、#3、#4)用两种方法检测均为阳性,到第3天,5头攻毒猪全部为阳性;4头同居感染猪在感染后第6天有2头(#6、#8)用复合荧光定量RT-PCR检测为阳性,另外1头猪用RT-nPCR检测为阳性;到第7天至试验结束,两种方法全部检测为阳性。

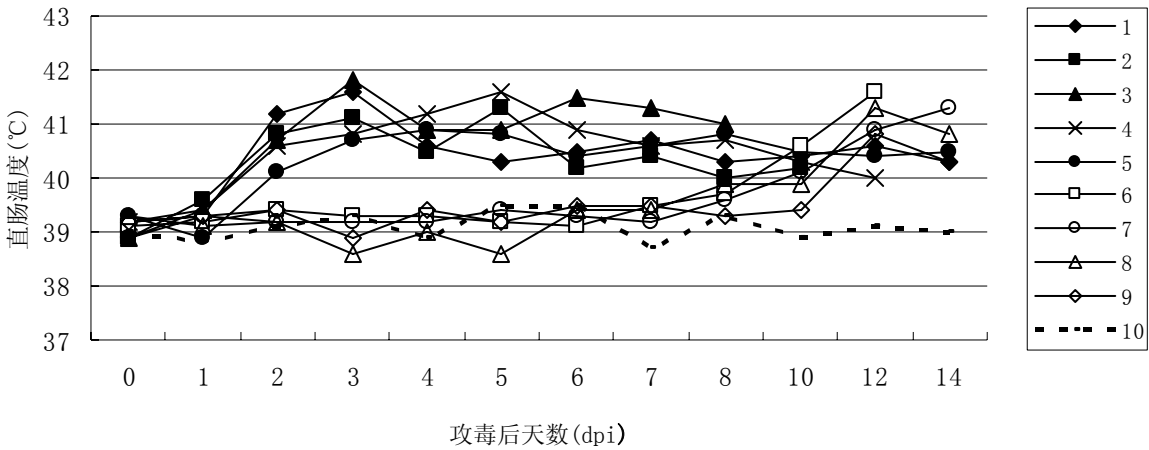


图3-1 猪瘟病毒人工感染猪及其同居感染猪体温变化曲线

Fig. 3-1 Rectal temperatures of the infected or contact pigs following infection

(#1、#2、#3、#4、#5 为人工感染猪, #6、#7、#8、#9 为同居感染猪, #10 为未攻毒对照猪)

表 3-1 荧光定量 RT-PCR 和 RT-nPCR 检测感染猪全血中猪瘟病毒 RNA
Table 3-1 Detection of CSFV RNA in whole blood samples by the multiplex real-time RT-PCR
and the multiplex RT-nPCR

试验组	方法	攻毒后天数 (dpi)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14
攻毒组	real-time												
	RT-PCR	0/5	0/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4 *	3/3 *	2/2
	RT-nPCR	0/5	0/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4 *	3/3 *	2/2
同居感 染组	real-time												
	RT-PCR	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3
	RT-nPCR	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/3

注：* 此时间各有 1 头猪死亡。

3. 2. 3 猪瘟病毒在感染猪体内的复制动态

以复合荧光定量RT-PCR所检测得到的猪瘟病毒RNA拷贝数 (Log₁₀/mL) 为纵坐标, 感染后时间为横坐标作曲线图 (图 3-2), 可以看出所得曲线与攻毒后体温变化曲线 (图 3-1) 存在一定的相似性, 结合攻毒后猪只表现的其它临床症状, 可见感染猪在临床表现与病毒滴度存在明显的相关性。此外, 通过复合荧光定量RT-PCR对人工感染猪 (#1、#2、#3、#4、#5) 和同居感染猪 (#6、#7、#8、#9) 感染后 0~14d全血样品的检测, 可知从检测到猪瘟病毒RNA阳性 (#1、#2、#3、#4), 到病毒复制的最高峰, 病毒RNA的含量相差 10^{4.5}倍, 可见猪瘟病毒在 3d内在人工感染猪体内可进行高达上万倍的增殖。

同时由图 3-2 可看出, 人工感染猪在 10⁶ TCID₅₀/mL石门强毒攻击后第 2 天, 可从全血中检测到病毒RNA (>10^{3.9}拷贝/mL全血), 而到攻毒后第 4~6 天病毒RNA在猪体内复制达到高峰 (10⁸拷贝/mL以上), 此后到死亡其浓度维持在 10⁷/mL以上。而同居感染组在第 6 天有 2 头 (#6、#8) 检测为阳性 (大于 10^{3.9}拷贝/mL), 到第 7 天 4 头全部呈阳性, 而到第 10 天个别猪 (#6、#7) 体温开始上升到 40℃以上 (图 3-1), 临床症状开始表现。由此证实, 本方法可在感染猪出现症状前 3~4d检测到猪瘟病毒RNA。

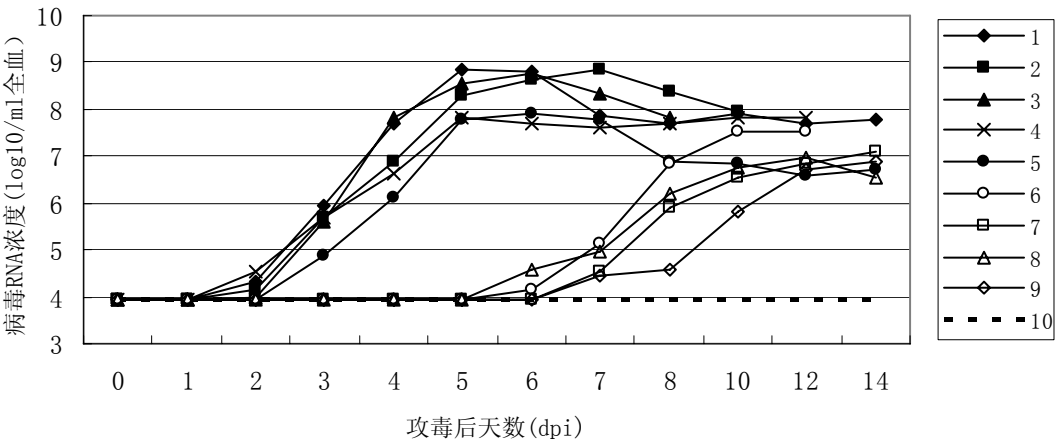


图 3-2 定量 RT-PCR 检测人工感染猪全血中猪瘟病毒 RNA 含量

Fig. 3-2 Quantitative detection of the viral RNA loads in whole blood samples of CSFV-infected or contact pigs.

#1、#2、#3、#4、#5 为人工感染猪，#6、#7、#8、#9 为同居感染猪，#10 为未攻毒对照猪。

3.2.4 猪瘟病毒在感染猪各组织中的分布

对人工感染后第 14 天剖杀的 3 头同居感染猪（#7、#8、#9）和未攻毒的对照猪（#10）的扁桃体、颌下淋巴结、脾脏、肾脏、肝脏、脑等各组织中的猪瘟病毒进行复合荧光定量 RT-PCR 检测，结果发现病毒在脾脏中含量最高，淋巴结和肾脏次之，肺脏和脑组织中也有分布（表 3-2）。

表 3-2 同居感染猪各组中猪瘟病毒含量（拷贝数/μL cDNA）

Table 3-2 The viral RNA loads in different tissues of contact pigs (copies/μL cDNA)

	扁桃体	颌下淋巴结	脾脏	肾脏	肺脏	脑
#7	3.74×10^5	7.65×10^4	6.54×10^5	4.43×10^4	4.67×10^3	2.90×10^3
#8	8.91×10^3	2.23×10^4	2.23×10^4	7.63×10^3	1.03×10^2	7.77×10^2
#9	7.22×10^4	4.46×10^4	1.34×10^5	6.47×10^4	7.32×10^3	9.31×10^2
#10	0	0	0	0	0	0

注：#7、#8、#9 同居感染猪；#10，未接种对照猪

3.3 讨论

将荧光定量RT-PCR应用于猪瘟病毒的临床检测已有报道。Risatti等（2003；2005）用荧光定量RT-PCR对实验感染猪鼻、扁桃体拭子和全血检测结果表明，该方法的敏感性超过病毒分离（100%比 72.4%），达 1~100 TCID₅₀，但对从现地采集的鼻拭子样品进行检测时，其特异性略低于后者（98.9%比 100%）。Risatti等（2003）用 10⁶ TCID₅₀ Haiti-96 株接种猪，通过荧光定量RT-PCR检测了 4 头同居感染猪的全血、扁桃体拭子和鼻拭子样品，证实在感染猪出现症状前 2~4d即可从

扁桃体拭子和鼻拭子检测到病毒，而全血样品则在症状出现前 0~3d 检测为阳性。

Ophuis 等（2006）利用荧光定量 RT-PCR 方法，对人工感染 10^3 TCID₅₀ Weybridge 株猪瘟病毒的猪感染后 1~13d 全血和其它组织中猪瘟病毒的动力复制进行了详细研究，确定荧光定量 RT-PCR 对全血中病毒 RNA 浓度 (log/mL) 与其病毒滴度 (TCID₅₀/mL) 在其数值上的相关性超过 10^6 范围；同时发现在攻毒后第 3 天所有猪的全血都可以检测到猪瘟病毒 RNA，而早在攻毒后第 1 天从扁桃体、淋巴结、脾脏等淋巴组织中即可检测出猪瘟病毒 RNA，随后（感染后 3~8d）分别在肾脏、回肠、肺脏、肝脏、脑等组织中相继检测出浓度较高的病毒 RNA，因此可确定在猪感染病毒第 3 天后即可通过其呼吸道和消化道向外排毒。Ophuis 等（2006）的研究表明，全血或以上其它组织样品都可以用于荧光定量 RT-PCR，进行猪瘟早期诊断。显然，经口鼻途径感染的猪瘟病毒在宿主体内的复制是先在扁桃体等淋巴组织，而后向其它器官（肺、回肠和大脑等）扩散，最终导致全身病毒血症的出现。

本研究应用建立的荧光定量 RT-PCR 检测了人工感染 10^6 TCID₅₀ 猪瘟石门强毒的猪只及其同居感染猪的全血样品，发现人工感染猪多数在攻毒后第 2 天即可检测到病毒 RNA，而到第 5 天病毒复制达到最高峰，此时病毒血症开始出现，到第 10 天感染猪开始出现急性死亡，此时全血中病毒 RNA 浓度维持在 10^7 拷贝/mL 以上。同居感染猪在感染后第 7 天检测结果全部为阳性，此时全血中病毒 RNA 浓度大于 $10^{3.9}$ 拷贝/mL，但此时体温升高等临床症状尚未出现，而到临床症状出现的第 10 天（体温 40℃ 以上、精神沉郁、食欲不振、后躯无力等），此时全血中病毒 RNA 浓度已接近人工感染猪的水平 (10^7 拷贝/mL)，也就是说，此时猪瘟病毒载量已是感染后第 7 天的 1 000 倍，达到了致死水平，这与 Uttenthal 等研究结果一致。Uttenthal 等（2003）应用荧光定量 RT-PCR 研究了人工感染 $10^{4.7}$ TCID₅₀ Paderborn 株 CSFV 的 10 周龄猪体内病毒复制动力学，发现在感染后出现猪瘟临床症状猪血清中 CSFV 含量比未表现症状的猪高达 1 000 倍。

本研究用同居感染方法，证明了本复合荧光定量 RT-PCR 方法可以用于早期诊断，即可以在感染猪出现猪瘟临床症状前 3~4d 内作出快速确诊，此时猪瘟病毒在宿主体内呈低水平复制的潜伏感染，通过病毒分离、免疫荧光试验、ELISA 等诊断方法很难及时而准确地检测到。根据 Risatti 等（2003）和 Ophuis 等（2006）的研究，扁桃体和鼻拭子最适于猪瘟早期诊断，而鼻拭子、粪便样品可以更好地用于评价排毒与否，但这类样品的采集、保存和处理等比全血复杂，不便于现场快速检测，因此本研究未进行这类样品的采集和检测。

对攻毒后第 14 天剖杀的 3 头同居感染猪的扁桃体、脾脏、淋巴结、肾脏、脑等组织的检测结果发现，猪瘟病毒在全身各组织中广泛分布，其中脾脏、淋巴结、扁桃体等淋巴组织中病毒滴度最高，其它呼吸道和消化道组织器官中也有分布，此外在脑组织中也检测到了一定滴度的病毒，可见此时病毒已扩散到脑组织中，可能与感染猪表现的后躯麻痹等神经症状有关。

第四章 应用复合荧光定量 RT-PCR 估测

猪瘟兔化弱毒疫苗的效价

摘要：本试验应用第二章建立的复合荧光定量RT-PCR方法对8份不同时间收获的猪瘟兔化弱毒疫苗原液和其2.5万、5万、7.5万和10万倍的稀释液的病毒效价进行了测定，并且与兔体定型热反应方法相比较，其结果有很好的相关性，确定两只兔子均产生定型热反应的疫苗原液中病毒RNA拷贝数的含量为 $2.23 \times 10^7/\text{mL}$ 以上（ $5 \times 10^4 \text{RID}_{50}$ 以上）；两只兔子均无定型热反应的疫苗原液病毒RNA拷贝数为 10^6 （ 9.82×10^5 ）/mL以下（ $3 \times 10^3 \text{RID}_{50}$ 以下）；推测一只只有定型热一只没有的疫苗原液中病毒RNA拷贝数为 $10^6 \sim 10^7/\text{mL}$ 。该方法对疫苗样品得整个检测过程时间短（仅需4.5h）、重复性好、检测通量高（每次可检测72个样品）等优点可望弥补传统的兔体定型热反应不能准确定量、测毒结果易受兔体个体差异的影响、实验周期长等缺点而成为一种新的、简捷有效用于疫苗生产过程中的效价测定及指导疫苗的配制的工具。

关键词：猪瘟兔化弱毒疫苗，复合荧光定量RT-PCR，效价

1956年，中国成功培育出的猪瘟兔化弱毒疫苗（Hog cholera lapinized virus, HCLV），简称“C株”，猪瘟兔化弱毒疫苗（HCLV）以其诱导细胞免疫和体液免疫反应快，对怀孕母猪、乳猪不产生残余毒力，免疫保护期长等优点，成为国际上公认的最安全有效的弱毒疫苗。由于应用的需要，我国猪瘟兔化弱毒疫苗的生产也由兔脾淋巴疫苗、全乳兔疫苗逐步过渡到用组织培养生产的细胞疫苗。为避免猪体可能带有的病原体（包括病毒）对疫苗质量产生影响，生产上一般使用异源细胞，如牛睾丸、羊睾丸、羊肾等原代细胞增殖猪瘟C株疫苗。该株具有以下遗传特性：遗传稳定性高；接种各品种猪都安全、不保毒、不排毒，特别对于怀孕母猪、胎猪、乳猪都无残余毒力，且不通过胎盘诱发仔猪慢性猪瘟；免疫力坚强，免疫猪可以抵抗多种CSFV强毒株的攻击，产生免疫力快而持久。

目前，我国各地生物制品厂一般都采用犊牛睾丸细胞生产猪瘟兔化弱毒疫苗，疫苗效价的高低是疫苗质量合格与否的关键指标。HCLV虽然可以在多种细胞上生长，但病毒增殖力相对较弱，不产生细胞病变（cytopathic effects, CPE），病毒滴度低，应用免疫荧光技术也较难检测到感染细胞中抗原的存在。对效价的测定一般沿用兔体定型热法（兔热法），但该方法不能准确定量；兔体个体差异会造成测毒结果不准确；检测方法烦琐，费时费力，不适合大批量样品的检测。因此如何快速、准确测定HCLV疫苗效价是目前猪瘟疫苗生产中面临的主要难题之一。

近年来发展起来的荧光定量PCR（FQ-PCR）技术以其可实时定量、灵敏度高、特异性好、高通量检测等优点在基因表达水平分析，病原体定量和定量检测等方面得到广泛的应用。在应用荧光定量PCR对HCLV细胞疫苗的效价的测定方面在我国已有报道（陈玉栋等，2003；蒋春燕，2006）。此方法弥补了动物实验过程中测毒周期长、成本高、准确定量等缺点，因此可望取代传统的兔体定型热反应用于疫苗生产过程中的效价测定及指导疫苗的配制。

4.1 材料与方法

4.1.1 疫苗与实验动物

猪瘟兔化弱毒疫苗悬液由哈尔滨兽医研究所朱庆虎副研究员惠赠，疫苗悬液为初生犊牛睾丸细胞培养上清不同收获次数，收获后，-20℃保存备用。新西兰大耳白兔由哈尔滨兽医研究所提供。

4.1.2 仪器和试剂

同“2.1.2”仪器和试剂。

4.1.3 兔体定型热法测定疫苗效价

疫苗效价由哈尔滨兽医研究所猪瘟疫苗生产组应用兔体反应热法测定，将所收获8份不同收次的（三收#1、#2、#3，四收#1、#2、#3，十收#1、#2）细胞苗分别按2.5万、5万、7.5万和10万倍稀释后，各取1mL分别注射两只兔子，注射后48~96h内每隔6h测肛温一次，兔体在该段时间内体温升高1℃以上的为有定型热反应，1℃以下上下波动的为轻型热，无体温升高的为无定型热。两只兔均产生定型热反应的样品记为“++”，一只有定型热反应一只没有的记为“+-”，两只均不产生定型热反应的记为“—”，同时根据兔检产生定型热反应的最高稀释度可估算8份疫苗原液的半数兔体感染剂量（RID₅₀）。

4.1.4 病毒 RNA 的提取与 cDNA 的合成

细胞培养上清中病毒 RNA 的提取与反转录按方法“2.1.4” (1)和(3)操作。

4.1.5 猪瘟兔化弱毒疫苗病毒 RNA 浓度的检测

从 30μL 反转录产物中取 1μL 作为模板，用复合荧光定量 RT-PCR 进行定量检测。每毫升疫苗悬液所含有的猪瘟病毒 RNA 浓度约为每个复合荧光定量 RT-PCR 反应所测得的 cDNA 浓度的 428 倍。

4.2 结果

4.2.1 猪瘟细胞苗的兔体热反应结果

用家兔测定对 8 个批次猪瘟细胞苗的兔体热反应，可见不同收次的兔体热反应差异很大（表 4-1）。

表 4-1 8 份疫苗的兔体热反应情况

Table 4-1 Fever reactions of 8 batches of C-strain vaccine in rabbits

疫苗样品	不同稀释倍数的兔体热反应情况			
	2.5 万倍	5 万倍	7.5 万倍	10 万倍
#1 (三收 1 号)	++	++	++	+-
#2 (三收 2 号)	++	++	+-	—
#3 (三收 3 号)	++	++	++	+-
#4 (四收 1 号)	+-	+-	—	—
#5 (四收 2 号)	++	++	+-	—
#6 (四收 3 号)	++	+-	+-	—
#7 (十收 1 号)	+-	—	—	—
#8 (十收 2 号)	+-	—	—	—

注：兔检时两只均产生定型热反应样品记为“++”，一只只有定型热反应一只没有的记为“+-”，两只均不产生定型热反应记为“—”。

按中华人民共和国兽用生物制品规程（2000年版）规定：将所收获疫苗原液用5万倍稀释进行兔检，判定疫苗是否合格，即检测合格的疫苗每毫升含 5×10^4 个半数兔体感染量（RID₅₀）。由表4-1可知8份疫苗原液的5万倍稀释液的兔体反应情况分别为，#1、#2和#3样品两只兔体产生定型热（++）；#4、#5和#6样品一只产生定型热另一只为轻型热（+-）；#7和#8样品两只均不产生定型热（—）。根据表4-1中兔检产生定型热反应的最高稀释度可估算8份疫苗原液的半数兔体感染剂量（RID₅₀），结果表明，疫苗的不同收次之间其病毒的效价也有很大的差异，三收和四收疫苗的效价明显高于十收。

4.2.2 复合荧光定量 RT-PCR 定量检测结果

应用第二章建立的复合荧光定量RT-PCR对3个不同收次的8份猪瘟兔化弱毒细胞培养苗上清原液和其2.5万、5万、7.5万和10万倍的稀释液分别进行了定量检测，试验中发现由于本方法的敏感性原因检测部分疫苗稀释液样品中的病毒RNA结果为阴性（数据未显示），即此疫苗稀释液样品经过提取RNA反转录后的cDNA浓度低于81.5拷贝/μL，疫苗稀释液中病毒RNA的浓度低于 2.14×10^4 拷贝/mL。因此本试验着重对8份猪瘟兔化弱毒细胞培养苗上清原液进行了检测后的分析。

通过8份疫苗在5万倍稀释后对兔体反应热情况与估算的8份疫苗原液的半数兔体感染剂量（RID₅₀）和复合荧光定量RT-PCR测定病毒RNA拷贝数三者的结果比较（表4-2），可知其三者有很好的相关性：#1、#2、#3和#5疫苗兔检产生定型热反应（++），疫苗原液中病毒RNA拷贝数的含量为 $6.68 \times 10^7 \sim 10^8$ /mL，半数兔体感染剂量为 $4 \times 10^4 \sim 10^5$ RID₅₀；#4和#6疫苗样品兔检一只产生定型热一只没有（+-），其疫苗原液中病毒RNA拷贝数为 10^7 /mL，半数兔体感染剂量为 10^4 RID₅₀；#7和#8兔检不通过（—）；其疫苗原液病毒RNA拷贝数为 10^6 /mL以下，半数兔体感染剂量为 10^3 RID₅₀。

由于8份样品中未涵盖 10^6 拷贝数/mL浓度梯度，所以疫苗原液病毒RNA拷贝数为 10^6 /mL时兔体热反应情况为“+-”还是“—”，目前还需要进一步检测。

表 4-2 猪瘟疫苗兔体反应热与荧光定量 RT-PCR 测定结果比较

Table 4-2 Quantitative detection of C-strain vaccines titrated in rabbits by the multiplex real-time RT-PCR

	疫苗样品							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
兔体反应热	++	++	++	+-	++	+-	—	—
半数兔体感染剂量 (RID ₅₀)	1.5×10 ⁵	7.5×10 ⁴	6×10 ⁴	4×10 ⁴	5×10 ⁴	3×10 ⁴	3×10 ³	1.5×10 ³
real-time RT-PCR(copies/mL)	5.3×10 ⁸	2.18×10 ⁸	1.19×10 ⁸	4.16×10 ⁷	6.68×10 ⁷	2.23×10 ⁷	9.82×10 ⁵	5.82×10 ⁵

注：兔检时两只均产生定型热反应样品记为“++”，一只有定型热反应一只没有的记为“+-”，两只均不产生定型热反应记为“—”。

4.3 讨论

猪瘟兔化弱毒疫苗（HCLV）虽然可以在多种细胞上生长，但病毒增殖力相对较弱，不产生细胞病变（cytopathic effects, CPE），病毒滴度低。对效价的测定一般沿用兔体定型热法（兔热法），该方法也存在明显的不足之处：测毒周期长，约需要1w；成本高，一次需要两只重1.5~3.0kg的家兔；不能准确定量，兔体个体差异会造成测毒结果不准确；检测方法烦琐，费时费力，不适合大批量样品的检测。近年来发展起来的荧光定量PCR（FQ-PCR）技术其具有可实时定量、灵敏度高、特异性好、高通量检测的特点，可望取代传统的兔体定型热反应用于疫苗生产过程中的效价测定及指导疫苗的配制（陈玉栋等，2003；蒋春燕，2006）。

本试验应用第二章建立的复合荧光定量RT-PCR对3个不同收次的8份猪瘟兔化弱毒细胞培养苗上清原液和其2.5万、5万、7.5万和10万倍的稀释液分别进行了定量检测，结果由于本方法的敏感性有限对部分疫苗稀释液样品中的病毒RNA结果为阴性（数据未显示），因此本试验着重对8份猪瘟兔化弱毒细胞培养苗上清原液进行了检测后的分析。

我们用8份疫苗原液的5万倍稀释液兔体反应热情况为参考，通过兔体反应热情况，半数兔体感染剂量（RID₅₀）和复合荧光定量RT-PCR测定病毒RNA拷贝数三者的结果比较，证实三者对疫苗效价的测定结果具有良好的相关性。由复合荧光定量RT-PCR以上的检测结果确定，病毒RNA在2.23×10⁷拷贝/mL以上（5×10⁴ RID₅₀以上）的疫苗原液兔检结果为“++”或“+-”，可用来直接配苗或搭配配苗；10⁶（9.82×10⁵）拷贝/mL以下（3×10³ RID₅₀以下）的疫苗原液兔检不能通过，因此不能用来配苗；疫苗原液病毒RNA拷贝数为10⁶/mL~10⁷拷贝/mL的疫苗的判定，由于本次检测样品有限，8份样品中未涵盖10⁶拷贝数/mL浓度梯度，因此对其滴度的判定还需以后进一步试验。陈玉栋等（2003）应用兔体反应热法和荧光定量PCR对疫苗样品中HCLV效价的检测结果显示：HCLV含量为5×10⁶~10⁷拷贝/mL时，兔检为定型热反应（++）；而兔检为“+-”反应的疫苗HCLV含量为5×10⁶拷贝/mL以下；疫苗HCLV含量在10⁶拷贝/mL以下时兔检已不能通过（—）。

与后者试验的结果比较可见，本试验根据定量结果对疫苗兔体反应情况的判定与其认为的结果判定在数值上的差异大约为 4 倍(后者认为病毒含量为 5×10^6 拷贝/mL 以上样品才能用来直接配苗或搭配配苗，而本实验结果为 2.23×10^7 拷贝/mL 以上)，而对兔检不通过样品病毒含量的判定却是一致的(10^6 拷贝/mL 以下)。而这 4 倍数值上的差异很可能是因为在病毒 RNA 提取、反转录或 PCR 等试验过程中的误差引起的。

另外，通过对这不同收次的 8 份疫苗原液病毒含量的检测结果发现三收和四收疫苗的效价明显高于十收，证实了不同收别之间其病毒的效价也有很大的差异(王镇等，2000 年)。根据王镇的研究也证实了疫苗生产过程中第一次收获病毒时毒价不稳定，二、三收开始稳定，而到第十收时由于牛睾丸细胞中细胞类群的改变，毒价已开始有所降低。因此应用本方法对不同收别的细胞上清定量检测，可以确定不同收别病毒的增殖情况。为在疫苗生产过程中确定最合适收毒时间提供依据。

此外，荧光定量 PCR 方法只是对 HCLV 疫苗的核酸(RNA)进行检测和定量，所以无法准确体现一定量的免疫原(活的 HCLV 病毒粒子)在疫苗中的具体含量和在动物体内引起的临床症状；此外，在检测疫苗成品时其中的稳定剂等成份也会引起提取 RNA 的过程中一定的损耗，造成了客观误差，因此荧光定量 PCR 更适合与疫苗半成品的效价估测。

与兔体反应热方法相比，本方法对疫苗效价的检测充分体现了荧光定量 PCR 方法灵敏度高，重复性好，定量准确，并还可检测疫苗生产中有无猪瘟野毒的污染，这些都有效克服了兔子个体反应性差异带来的误差，测毒工作也不再受气候无常变化的影响，并可根据疫苗的病毒粒子含量更有效地指导疫苗的配制；操作步骤简单、自动化程度高、检测速度快，利用 RotorGene3000 荧光定量 PCR 仪高通量(一次可上样 72 份)的检测，节省了人力物力。定量检测过程加上样品的制备整个过程也仅需 4.5h，因此它不但能快速对收获疫苗进行准确定量，而且能及时监控疫苗生产中细胞产毒情况、淘汰不合格批次；荧光定量检测所需样品量和试剂量较少，这相应地降低了疫苗的生产成本，也大大减少了对家兔等生物资源的浪费。

第五章 结 论

- 5.1 利用猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株基因组 5'-UTR 序列间的差异,设计了分别针对猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的两条 TaqMan 水解探针,建立了一种能鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合荧光定量 RT-PCR 方法,该方法分别可检测到初始模板中 41.8 个(野毒)或 81.5 个(兔化弱毒疫苗)拷贝的病毒 RNA,与复合 RT-nPCR 具有相近的敏感性,对现地样品的检测结果表明与复合 RT-nPCR 的符合率为 96.2%(野毒株)和 100%(兔化弱毒疫苗株)。
- 5.2 应用建立的复合荧光定量 RT-PCR 方法,对来自我国不同地区的共 106 份送检样品进行了检测,发现其野毒阳性率为 30.2%,通过对部分阳性样品 CSFV 进行基因分群表明,野毒株主要为 1.1 和 2.1 基因亚群。
- 5.3 应用建立的复合荧光定量 RT-PCR 方法,对人工感染猪瘟病毒石门强毒的猪只及其同居感染猪只全血和各组织器官中猪瘟病毒 RNA 进行了定量检测,揭示了猪瘟病毒在猪体内复制的动态变化,同时发现,在同居感染猪出现猪瘟临床症状前 3~4d 可从其外周血中检出病毒 RNA。
- 5.4 应用建立的复合荧光定量 RT-PCR 方法,对猪瘟兔化弱毒细胞疫苗的效价进行了检测,其结果与兔体反应热测定结果具有一定的正相关性,证实本方法可望作为一种辅助手段用于猪瘟疫苗效价的估测。

参考文献

1. 陈玉栋, 张楚瑜, 邹俊煊, 等. 建立快速定量检测猪瘟兔化弱毒苗的荧光定量PCR技术. 中国病毒学报, 2003, 18 (2): 124-128.
2. 陈忠斌, 王升启. 荧光定量PCR技术及其应用. 医学研究通讯, 2003, 32(6): 51-53.
3. 仇华吉, 童光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1675-1685.
4. 杜念兴. 猪瘟的回顾与展望. 中国畜禽传染病, 1998, 20 (5): 317-319.
5. 花群义, 金宁一, 周晓黎, 等. 应用实时荧光定量TaqMan RT-PCR检测口蹄疫病毒. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 116-119.
6. 贾洪林, 仇华吉, 朱庆虎, 等. 基于重组E^{ms}蛋白的猪瘟E^{ms}-ELISA的建立和优化. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10): 1028-1032.
7. 蒋春燕. 猪瘟病毒实时荧光定量PCR快速检测试剂盒的研制与应用. 北京: 中国兽药监察所硕士学位论文. 2006.
8. 李宝臣, 郭兴福, 韩正博, 等. 运用反向间接血凝方法对猪瘟细胞毒原液效检试验. 黑龙江畜牧兽医, 1999, 5: 46-49.
9. 李国新, 李娜, 仇华吉, 等. 猪瘟病毒石门株基因组全长cDNA的克隆与序列分析. 中国预防兽医学报, 2006, 28(3): 275-278.
10. 李树春, 何建新, 李德珍, 等. 猪瘟间接血凝试验的研究. 中国兽医杂志, 1993, 23(7): 3-6.
11. 李文涛, 王俊东, 杨利峰, 等. 实时荧光定量PCR技术及其应用. 生物技术通讯, 2006, 17(1): 112-114.
12. 李亚敏, 王伟峰. PPA-ELISA检测猪瘟抗体方法在江苏省的应用. 畜牧与兽医, 1995, 27(2): 88-89.
13. 李艳, 仇华吉, 李娜, 等. 鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)的建立. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1907-1914.
14. 吕宗吉, 涂长春, 余兴龙, 等. 我国猪瘟的流行病学现状分析. 中国预防兽医学报, 2001, 23(4): 300-303.
15. 罗廷荣, 孙敬锋, 莫扬, 等. RT-PCR检测健康猪扁桃体和流产死胎猪瘟病毒的应用及RFLP分析. 中国预防兽医学报, 2004, 26(3): 192-195.
16. 乔军, 陈创夫, 高丰, 等. 用RT-PCR法对猪瘟病毒检测的研究. 塔里木农垦大学学报, 2001, 13(4): 25-27.
17. 丘惠深, 王在时, 廖图安. 猪瘟单克隆抗体诊断试剂及其应用研究. 中国免疫学会94'全国兽医免疫学学术研讨会论文汇编. 云南大理, 1994, 54-55.
18. 孙世琪, 靳野, 郭慧琛, 等. 我国近期猪瘟分子流行病学动态. 动物医学进展, 2004, 25(6): 69-71.
19. 涂长春. 猪瘟的国际流行态势、我国现状及防止对策. 中国农业科学, 2003, 36(8): 955-960.

20. 王明杰, 李娜, 仇华吉, 等. 猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株基因组的遗传变异分析. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1):8-12.
21. 王镇, 陆宇, 丁明孝. 中国猪瘟兔化弱毒疫苗株在原代牛睾丸细胞中增殖特性的研究. 中国病毒学. 2000, 15(2):170-179.
22. 王镇, 张海, 丁明孝. 应用免疫金银技术检测猪瘟病毒兔化弱毒株感染细胞. 微生物学通报. 1998, 25(6):356-359.
23. 温国元, 万超, 潘兹书, 等. 应用荧光定量PCR技术快速定量检测猪病毒. 武汉大学学报(理学版), 2004, 50(6):746-750.
24. 杨德胜, 崔剑峰, 谢海燕, 等. 荧光RT-PCR技术快速检测新城疫病毒. 广东畜牧兽医科技, 2005, 30 (3):41-42.
25. 杨素, 花群义, 徐自忠, 等. 几种动物病毒的基因芯片检测技术. 中国兽医科技, 2004a, 34(3): 35-38.
26. 杨素, 吴小伦, 花群义, 等. 口蹄疫病毒群特异性荧光PCR检测方法研究. 中国畜牧兽医, 2004b, 31 (11):44-46.
27. 张蓓, 沈立松. 实时荧光定量PCR的研究进展及其应用. 国外医学. 2003, 24(6):326-329.
28. 张鹤晓, 赖平安, 刘环, 等. 荧光定量RT-PCR检测活禽和禽组织中禽流感病毒的研究. 检验检疫科学, 2004, 14 (1):125.
29. 张鹤晓, 刘环, 刘继红, 等. 荧光RT-PCR检测中强毒力新城疫病毒方法的敏感性和特异性. 检验检疫科学, 2003, 13(3):526.
30. 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000年版, 规程).
31. 周绪斌, 王新平, 宣华, 等. 鉴别牛病毒性腹泻粘膜病毒和猪瘟病毒复合PCR方法及其应用. 中国兽医学报, 2002, 22(6):173-179.
32. 朱文斯, 赖平安, 黄茜华, 等. 荧光RT-PCR快速检测禽流感病毒H5亚型的研究. 中国医药导刊, 2003, 5 (1):27-30.
33. Barlic-Maganja D, Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. J Virol Methods, 2001, 95(122): 101-110.
34. Blacksell SD, Khounsy S, Boyle DB, et al. Genetic typing of classical swine fever viruses from Lao PDR by analysis of the 5' non-coding region. Virus Genes, 2005, 31(3): 349-355.
35. Brown EA, Zhang HC, Ping LH. Secondary structure of the 5'-nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. Nucleic Acid Res, 1992, 20:5041-5045.
36. Bruschke CJ, Hulst MM, Moormann RJ, et al. Glycoprotein Enns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. J Virol, 1997, 71(9): 6692-6696.
37. Buonavoglia C, Falcone E, Pestalozza S, et al. A rapid serum neutralization test in microplates for the detection of antibodyies to hog cholera virus. J Virol Methods, 1989, 23(1):77-79.
38. Caij A, Muyldermans G, De Smet A, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against hog cholera virus (Alfort 187 strain). Arch Virol, 1993, 131(1-2): 185-192.
39. Carbrey EA, Stewart WC, Kresse JI. Confirmation of hog cholera diagnosis by rapid

- serum-neutralization technique. *J Am Vet Med Assoc*, 1969, 155(12): 2201-10.
40. Cho HS, Park SJ, Park NY. Development of a reverse-transcription polymerase chain reaction assay with fluorogenic probes to discriminate Korean wild-type and vaccine isolates of Classical swine fever virus. *Can J Vet Res*, 2006, 70, 226-229.
 41. Choi C, Chae C. Detection of classical swine fever virus in boar semen by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Inves*, 2003, 15(1): 35-41.
 42. Clavijo A, Lin M, Riva J, et al. Application of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serologic diagnosis of classical swine fever virus infection. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(4): 357-360.
 43. Clavijo A, Zhou EM, Vydellingum S, et al. Development and evaluation of a novel antigen capture assay for the detection of classical swine fever virus antigens. *Vet Microbiol*, 1998, 60: 155-168.
 44. Colijn EC, Bloemraad M, Wensvart G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 1997, 59:15-25.
 45. Cruciere C, Bakkali L, Gonzague M, et al. cDNA probes for the detection of pestiviruses. *Arch Virol Suppl*. 1991, 3:191-197.
 46. Dahle J, Liess B, Moennig V, et al. Use of monoclonal antibodies for the differential diagnosis of pestivirus infections in swine. *Tierarz Prax*, 1991, 19(2): 151-155.
 47. de las Mulas JM, Ruiz Villamor E, Donoso S, et al. Immuno-histochemical detection of hog cholera viral Glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissue. *J Vet Diagn Invest*, 1997, 9(1): 10-16.
 48. de Smit AJ, Eble PL, de Kluijver EP, et al. Laboratory experience during the classical swine fever virus epizootic in the Netherlands in 1997-1998. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2-3): 197-208.
 49. Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*, 1999, 21:48-50.
 50. Depner K, Paton DJ, Cruciere C, et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Rev Sci Tech*, 1995, 14:677-689.
 51. Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, et al. Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *J Virol Methods*, 2004, 119:137-143.
 52. Diaz de Arce H, Nunez JI, Ganges L, et al. An RT-PCR assay for the specific detection of classical swine fever virus in clinical samples. *Vet Res*, 1998, 29: 431-440.
 53. Duggan DJ, Bittner M, Chen YD, et al. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genetics*, 1999, 21:10-14.
 54. Edwards S, Moenning V, Wensveort G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestivirus. *Vet Microbiol*, 1991, 29:101-108.
 55. Elbers K, Tautz N, Becher P, et al. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol*, 1996, 70:4131-4135.

56. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press. 2005.
57. Favis R, Day JP, Gerry NP, et al. Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat Biotech*, 2000, 18:561-564.
58. Gaede W, Reiting R, Schirrmeier H, et al. Detection and species-specific differentiation of pestiviruses using real-time RT-PCR. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2005, 118(3-4): 113-120.
59. Gisler ACF, Nardi NB, Nonning RB, et al. Classical swine fever virus in plasma and peripheral blood mononuclear cells of acutely infected swine. *J Vet Med B*, 1999, 46 (9): 585-593.
60. Ha SK, Choi C, Chae C. Development of an optimized protocol for the detection of classical swine fever virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by seminested reverse transcription-polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization. *Res Vet Sci*, 2004, 77(2): 163-169.
61. Handschuh G, Caselmann WH. Bacterial expression and purification of hepatitis C virus capsid proteins of different size. *J Hepatol*, 1995, 22(2): 143-150.
62. Heinz FX, Collett MS, Purcekk RH, Gould EA, Howard CR, Houghton, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ. 2004. Family Flaviridae. In: Fauquet CM, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*, Academic Press, San Diego, pp.981-998.
63. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods*, 2005, 130(1-2): 36-44.
64. Hulst MM, Himes G, Newbigin E, et al. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 1994, 200(2): 558-565.
65. Hulst MM, Moormann RJ. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol*, 1997, 78 (11):2779-2787.
66. Jalvingh AW, Nielen M, Maurice H, et al. Spatial and stochastic simulation to evaluate the impact of events and control measures in the 1997-1998 classical swine epidemic in the Netherlands. I. Description of simulation model. *Prev Vet Med*, 1999, 42(3-4): 271-295.
67. Jensen MH. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays. *Acta Vet Scand*, 1981, 22(1): 85-98.
68. Kaden V, Steyer H, Strbelow G, et al. Detection of low-virulent classical swine fever virus in blood of experimentally infected animals: comparison of different methods. *Acta Virol*, 1999, (6): 373-380.
69. Katz JB, Ridpath JF, Bolin SR. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nest-amplification approach. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(3): 565-568.
70. Kawaguchi K, Kaneko S, Honda M, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients

- with chronic hepatitis B virus infection by DNA microarray method. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1701-1704.
71. Koenig P, Hoffmann B, Depner KR, et al. Detection of classical swine fever vaccine virus in blood and tissue samples of pigs vaccinated either with a conventional C-strain vaccine or a modified live marker vaccine. *Vet Microbiol*, 2007, 120(3-4):343-51.
72. Konig M, Lengsfeld T, Pauly T, et al. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995, 69(10): 6479-6486.
73. Leforban Y, Edwards S, Ibata G, et al. A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Ann Rech Vet*, 1990, 21(2): 119-29.
74. Li Y, Zhao JJ, Li N, et al. A multiplex nested RT-PCR for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus. *J Virol Methods*, 2007, doi:10.1016/j.jviromet.2007.01.032.
75. Lin C, Lindenbach BD, Pragaic BM, et al. Pressing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol*, 1997, 71:291-298.
76. Lin C, Wu JW, Hsiao K, et al. The hepatitis C virus NS4A protein: interaction with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol*, 1997, 71:6465-6471.
77. Liu ST, Li SN, Wang DC, et al. Rapid detection of hog choera virus in tissues by the polymerase chain rea ction. *J Virol Methods*, 1991, 35(2): 227-236.
78. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(6): 1292-1305.
79. McGoldrick A, Bensaude E, Ibata G, et al. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 1999, 79(1): 85-95.
80. McGoldrick A, Lowings JP, Ibata G, et al. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J Virol Methods*, 1998, 72(2): 125-135.
81. Morrin F, Wilson B, O'Conner M. Evaluation of an immuno-peroxidase monolayer assay for detection of pestivirus antibodies in pigs. *Irish Vet J*, 1997, 50:294-299.
82. Moser C, Ruggli N, Tratschin JD, et al. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Vet Microbiol*, 1996, 51:41-53.
83. Muylaert EG, Mackenzie JM, Kenney MT. Ultra-structure of Kunjin virus infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-strand RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structure. *J Virol*, 1997, 71:6650-6661.
84. Narita M, Kimura K, Tanimura N, et al. Immunohistochemical detection of hog cholera virus antigen in paraffin wax-embedded tissue from naturally infected pigs. *J Comp Pathol*, 1999, 121(3): 283-286.

85. Ophuis RJ, Morrissy CJ, Boyle DB. Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay. *J Virol Methods*, 2006, 131(1): 78-85.
86. Pan CH, Jong MH, Huang TS, et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. *Arch Virol*, 2005, 150(6): 1101-19.
87. Paton DJ, Ibata G, Edwards S, et al. An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. *J Virol Methods*, 1991, 31(2-3): 315-324.
88. Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, et al. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 2000, 73(2-3): 137-157.
89. Paton DJ, Simpson V, Done SH. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet Rec*, 1992, 131:185-188.
90. Risatti G, Holinka L, Lu Z, et al. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 468-471.
91. Risatti GR, Callahan JD, Nelson WM, et al. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1):500-5.
92. Rumenapf T, Stark R, Heimann M, et al. N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J Virol*, 1998, 72(3):2544-7.
93. Rumenapf T, Stark R, Meyers G, et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity *J Virol*, 1991, 65: 589-597.
94. Rumenapf T, Unger G, Strauss JH, et al. Processing of the envelope glycoprotein of pestivirus. *J Virol*, 1993, 67:3288-3294.
95. Schelp C, Dable J, Krietsch T, et al. Differentiation of pestiviruses by a hog cholera virus-specific genetic probe. *Arch Virol (Suppl.)*, 1991, 3:209-215.
96. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270:467-470.
97. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 1996, 6(7): 639-645.
98. Singh VK, Sai Kumar G, Paliwal OP. Detection of classical swine fever virus in archival formalin-fixed tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Res Vet Sci*, 2005, 79(1): 81-84.
99. Stadejek T, Pejsak Z, Kwinkowski M, et al. Reverse transcription combined with polymerase chain reaction as a detection method for pestiviral infections. *Rev Sci Tech*, 1995, 14(3): 811-818.
100. Thur B, Hofmann MA. Comparative detection of classical swine fever virus in striated muscle from experimentally infected pigs by reverse transcription polymerase chain reaction, cell culture isolation and immunohistochemistry. *J Virol Methods*, 1998, 74:47-56.
101. Uttenthal A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, et al. Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetics by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA. *Vet Microbiol*, 2003, 92(3):

- 197-212.
102. van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, et al. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol*, 1996, 77 (11): 2737-2745.
103. van Rijn PA, van Gennip HG, de Meijer EJ, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia. *J Gen Virol*, 1993, 74 (10): 2053-2060.
104. Vernet G. DNA-chip technology and infectious diseases. *Virus Res*, 2002, 82:65-71.
105. Vydelingums S, Tao T, Balazsik, et al. Comparison of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay and virus isolation for the detection of classical swine fever virus. *Rev Sci Tech*, 1998, 17:674-689.
106. Wang Q, Li B, Wang Z, et al. Sequencing of E2 gene and comparison analysis of four strains hog cholera virus (HCV). *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2001, 41(3): 320-8.
107. Wensvoort G, Terpstra C, Boonstra J, et al. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet Microbiol*, 1986, 12: 101-108.
108. Wensvoort G. Topographical and functional mapping of epitopes on hog cholera virus with monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 1989, 70 (11): 2865-2876.
109. Windisch JM, Schneider R, Stark R, et al. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol*, 1996, 70(1): 352-358.
110. Wirz B, Tratschin J D, Muller H K, et al. Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(5): 1148-1154.

致 谢

值此论文定稿之际，首先衷心感谢我的导师哈尔滨兽医研究所猪病研究室主任仇华吉研究员，在三年来硕士学习期间有幸师从仇华吉研究员，无论是在本课题的论文选题、课题设计还是实验实施、结果总结、论文撰写和文章的发表等方面，仇老师都给予了详细的统筹安排和精心指导。同时仇老师对工作严谨、认真和追求完美的态度，以及对科研事业忘我追求和勇于创新的精神，是我今后工作和生活的榜样，三年来，仇老师对我的科研工作高标准、严要求、是我在学习和生活过程得到不断的提高的动力。同时，特别感谢师母李娜博士在实验室日常生活中对我和猪瘟课题组每一位成员的亲切爱护和无私的帮助，在此表示衷心的感谢和深深的祝福。

向兽医生物技术国家重点实验室主任童光志研究员表示深深的谢意与崇高的敬意，感谢他所提供的良好的实验条件及宽松、自由、互助的工作环境。衷心感谢王云峰研究员、田志军副研究员、王玫助理研究员、姜红女士和赵和老师在实验中提出的有益建议和无私帮助表示衷心的感谢。

特别感谢禽病室主任刘胜旺研究员和猪瘟疫苗组朱庆虎副研究员在本实验过程中给予的精心指导和无私帮助。

对本实验室的孙元老师、周艳君老师、华荣虹老师、彭金美老师、石星明老师在实验完成过程中的关心和帮助表示衷心的感谢；特别感谢本实验室李艳硕士、侯强硕士、韩成钢硕士、王明杰硕士、卢宝伟硕士、彭伍平硕士、高辉硕士、王忠华硕士、成丹硕士、祁巧芬硕士、金美玲硕士、夏照和硕士、赵和平硕士、孙建富硕士和王煜硕士的支持和帮助表示真诚的感谢。

感谢科研处的王笑梅研究员、刘益民老师的关心和帮助。对仪器室的徐哮老师、王岳老师以及兽医生物技术国家重点实验室各位老师和同学在学习和生活上给予的帮助表示感谢。

另外，对中国军事医学科学院长春军事兽医研究所动物流行病学实验室主任涂长春研究员在试验过程给予的帮助表示深深的谢意与崇高的敬意，对朱妍博士、史子学博士、孙金福博士及其实验室全体同学的帮助表示感谢。

感谢中国农业科学院研究生院有关老师的帮助和支持。

在硕士生活即将结束之际，深深的爱意献给深切理解我、爱护我，在我生活中永远鼓励我、支持我的父亲、母亲。

本研究得到了“973”计划“动物重大传染病病原变异与致病的分子机制”（项目编号2005CB523200）的资助。

作者简历

赵建军, 男, 1980 年生, 山东省潍坊市人, 1999 年 9 月考入山东莱阳农学院动物医学专业, 2003 年 7 月毕业, 获学士学位; 2004 年 9 月考入中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 攻读预防兽医学硕士学位, 师从猪病研究室主任仇华吉研究员。硕士期间主要研究课题为: “鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与评价”, 同时参与: “猪瘟病毒 E2 基因工程疫苗的研究”; “鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应 (RT-nPCR) 的建立”; “猪瘟病毒强/弱毒感染性克隆全长 cDNA 的构建”; “鉴别检测猪瘟病毒和蓝耳病病毒复合荧光定量 RT-PCR 方法的建立”; “衣壳蛋白靶向灭活策略体外抑制猪瘟病毒复制的研究” 等课题研究。

研究成果和已发表文章:

专利: 仇华吉, 李娜, **赵建军**, 罗玉子, 涂长春, 童光志. 一种猪瘟 RNA 疫苗、其制备方法及应用. 专利受理号: 200610111304.0.

1. **Jian-Jun Zhao**, Dan Cheng, Na Li, Yuan Sun, Zixue Shi, Qing-Hu Zhu, Changchun Tu, Guang-Zhi Tong, Hua-Ji Qiu*. Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of classical swine fever virus. Vet Microbiol, 2007, accepted.
2. Yan Li¹, **Jian-Jun Zhao**¹, Na Li, Zixue Shi, Dan Cheng, Qing-Hu Zhu, Changchun Tu, Guang-Zhi Tong, Hua-Ji Qiu*. A multiplex nested RT-PCR for detection and differentiation of wild-type from C-strain vaccine of classical swine fever virus. J Virol Methods, 2007, 143(1):16-22. (共同第一作者)
3. Na Li, **Jian-Jun Zhao**, He-Ping Zhao, Yuan Sun, Qing-Hu Zhu, Guang-Zhi Tong*, Hua-Ji Qiu*. Protection of pigs against lethal viral challenge conferred by low dosage of a DNA vaccine based on an alphavirus replicon expressing E2 glycoprotein of classical swine fever virus. J Virol Methods, 2007 May 10; [Epub ahead of print].
4. Na Li, Hua-Ji Qiu*, **Jian-Jun Zhao**, Yan Li, Ming-Jie Wang, Bao-Wei Lu, Cheng-Gang Han, Qiang Hou, Zhong-Hua Wang, Hui Gao, Wu-Ping Peng, Guo-Xin Li, Qing-Hu Zhu, Guang-Zhi Tong*. A Semliki Forest virus replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus protects pigs from lethal challenge. Vaccine, 2007, 25(15):2907-2912.
5. **赵建军**, 成 丹, 李 娜, 孙 元, 赵和平, 朱庆虎, 仇华吉*. 猪瘟病毒实时荧光定量 RT-PCR 的建立及其对人工感染猪体内猪瘟病毒的检测. 畜牧兽医学报, 2007, 第 7 期(待出版).
6. 李 娜, **赵建军**, 赵和平, 孙 元, 朱庆虎, 童光志*, 仇华吉*. 基于甲病毒复制子载体的猪瘟 DNA 疫苗的免疫效力评价. 生物工程学报, 2007, 23(3):92-97.
7. **赵建军**, 成 丹, 孙 元, 李 娜, 仇华吉*. 鉴别猪瘟病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 中国兽医科学, 2007, 37(05):406-412.