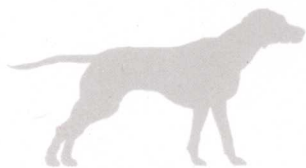
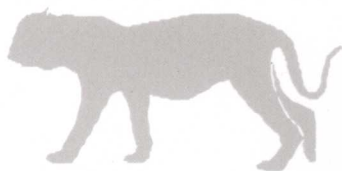
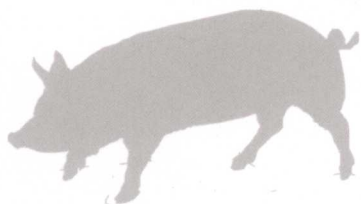


孙颖杰 主编  
王作佳 徐自忠 副主编

# 出入境动物检验 检疫技术 研 究

CHURUJING DONGWU JIANYAN  
JIANYI JISHU YANJIU



中国海洋大学出版社

# 出入境动物检验检疫技术研究

主 编 孙颖杰  
副主编 王作佳 徐自忠

中国海洋大学出版社  
· 青 岛 ·

**图书在版编目(CIP)数据**

出入境动物检验检疫技术研究/孙颖杰主编. —青岛:  
中国海洋大学出版社, 2009. 7  
ISBN 978-7-81125-339-9

I. 出… II. 孙… III. 动物—国境检疫: 卫生检疫—研  
究 IV. S851.34 R185.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 111585 号

出版发行 中国海洋大学出版社  
社 址 青岛市香港东路 23 号 邮政编码 266071  
网 址 <http://www.ouc-press.com>  
电子信箱 [peacockjasmine@gmail.co](mailto:peacockjasmine@gmail.co)  
订购电话 0532-82032573(传真)  
责任编辑 王积庆  
印 制 日照报业印刷有限公司  
版 次 2009 年 7 月第 1 版  
印 次 2009 年 7 月第 1 次印刷  
成品尺寸 185 mm×260 mm  
印 张 52.625  
字 数 1100 千字  
定 价 128 元

# 《出入境动物检验检疫技术研究》编委会

主 编 孙颖杰  
副主编 王作佳 徐自忠  
编 委 (以汉语拼音为序)  
薄清如 陈茂盛 胡永强  
梁成珠 林志雄 石建平  
袁文泽 张鹤晓 张敬友  
赵祥平

# 前 言

近年来,我国国际贸易繁荣,动物及其产品进出口数量不断上升,而国内外频发重大动物疫情,动物传染病及有害生物的传入传出风险增加。为认真贯彻总局“科技兴检”的战略方针,提高动物检验检疫技术水平,增强突发重大疫情的应急处理能力,了解动物检疫的发展最新动态,跨越国外技术壁垒,加强检验检疫技术保障体系建设,更好地发挥检验检疫技术执法的作用;为贯彻落实“科技兴检、人才强检”的战略方针,鼓励检验检疫系统广大科技人员的创新精神,推动检验检疫工作不断进步,国家质量监督检验检疫总局动物检验检疫专业委员会开展了面向全国检验检疫系统征集有关动物检疫优秀论文的活动。征集到论文 161 篇,经过专家认真审阅,筛选出论文 105 篇,并另筛选出 56 篇论文以摘要的形式刊登,汇编成此书。

本书介绍了出入境动物检验检疫专业的最新研究进展,包括动物疫病检测方法的研究、动物疫情风险分析、动物疫病防控体系、无规定动物疫病区建设、生物物种资源保护与查验、动物检疫政策法规研究及其他与动物检疫相关的内容。本书共分 10 章,内容涵盖了动物检验检疫的各个领域,包括禽病检测技术论文 20 篇,猪病检测技术论文 18 篇,牛羊病检测技术论文 17 篇,马病检测技术论文 6 篇,水生动物病检测技术论文 14 篇,细菌病原体检测技术论文 12 篇,农兽药残留检测技术论文 6 篇,物种鉴定技术及其他论文 4 篇,综述管理类论文 8 篇。

本书以出入境检验检疫科技问题的需求为主线,体现了技术创新与出入境检验检疫相结合、关键技术研究与实际应用相结合、重点突破与全面提升相结合的原则,贴合出入境检验检疫行业的发展要求,对于提升检验检疫科技领域自主创新的能力,实现我国出入境检验检疫综合科技实力的跨越式发展,具有重要意义。

由于编者水平有限,书中错误和缺憾在所难免,敬请期待同行、广大技术人员和读者的批评与斧正。

# 目次

## 第一章 禽病检测技术

9 株水禽 H5N1 亚型禽流感病毒株主要基因信息分析	王伟利 孟庆峰 刘和平 等(3)
PCR 快速检测鸭病毒性肠炎标准方法的建立	孟日增 石建平 肖成蕊 等(12)
表达 H7 亚型禽流感 HA 基因杆状病毒转移载体的构建及重组病毒的鉴定	李 贺 孟庆文 马保华(20)
不同动物来源新城疫病毒对不同种属细胞的感染性分析	高以明 张敬友 王水明 等(24)
产蛋鸭大肠杆菌疾病的检定及其结果分析	刘永松 韦 兵 黄 奋 等(28)
鹅源副粘病毒和新城疫病毒与受体结合动力学比较	宋战昀 冯 新 王伟利 等(31)
鸽源 H5N1 亚型禽流感病毒株的全基因克隆及序列分析	王伟利 孟庆峰 钱爱东 等(38)
基因芯片技术检测新城疫病毒	耿 捷 罗 卫 刘 勇(46)
基于 DPV UL6 基因主要抗原域蛋白免疫组化方法的建立及其在 DPV 强毒感染鸭组织中定位分布规律的检测	孙 涛 梁成珠 徐 彪 等(52)
昆虫/杆状病毒表达系统规模化表达禽流感 H7HA 重组目的蛋白的研究	李 贺 孟庆文 王文娟(65)
利用 IBVD VP3 蛋白初步建立鸡传染性法式囊病间接 ELISA 方法	宋铁彬 孙 森 陈福勇(71)
两株鹅源 H5N1 亚型禽流感病毒分离株全基因序列分析	孟庆峰 王伟利 肖成蕊 等(76)
禽流感病毒检测方法标准比较及在国际能力验证上应用	田纯见 刘中勇 林志雄 等(85)
禽流感群特异性间接原位 RT-PCR 检测方法研究	杨 素 陈博文 廖秀云 等(91)
实时荧光定量 PCR 快速检测鸭病毒性肠炎标准方法的建立	石建平 孟日增 肖成蕊 等(100)
西藏拉萨市 H5、H9 型禽流感血清学监测	刘忠清 王顺芝 李建民 等(109)

新城疫病毒融合蛋白的真核表达及其单克隆抗体的研制、应用  
..... 崔平福 秦爱建 吴晓丰 等(114)

鸭病毒性肠炎 gB 基因的原核表达及产物的抗原性分析  
..... 唐泰山 王文洁 王凯民 等(121)

鸭肠炎病毒 UL6 基因 B 细胞抗原表位预测、主要抗原域蛋白原核表达及其抗体  
制备 ..... 孙 涛 肖西志 郑小龙 等(126)

鸭新城疫病毒山东分离株 F 基因的克隆和序列分析  
..... 张太翔 田国宁 张金玲 等(140)

## 第二章 猪病检测技术

Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and  
human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay  
..... LI Jian XIONG Wei WANG Qiao-quan et al(146)

应用实时荧光定量 TaqManRT-PCR 检测猪水泡病毒的研究  
..... 钟金栋 花群义 肖荣海 等(160)

猪水泡病病毒 VP1 基因的克隆和表达 ..... 钟金栋 花群义 肖荣海 等(168)

多重 PCR 同时检测鉴别口蹄疫、猪水泡和水泡性口炎病毒  
..... 钟金栋 花群义 肖荣海 等(175)

非洲猪瘟病毒 VP73 基因克隆及在大肠杆菌中的高效表达  
..... 常 华 花群义 段 纲 等(181)

进境种猪繁殖与呼吸综合征病毒快速检测鉴定初探  
..... 方绍庆 梁君妮 孟广校 等(189)

口蹄疫通用型实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立  
..... 邱 杨 岳学民 肖性龙 等(194)

美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒及其变异株(NSP2 1 594~1 680 变异)荧光  
RT-PCR 鉴别检测方法的建立 ..... 罗宝正 王连想 薄清如 等(203)

猪胸膜肺炎放线杆菌 PCR 快速分型系统的建立及应用 ..... 邱索平 何孔旺(210)

液相阻断 ELISA 和 IH 检测 O 型口蹄疫抗体相关性研究  
..... 王巧全 李树清 夏 谦 等(221)

乙型脑炎病毒 NS3 基因实时 RT-LAMP 快速检测方法的建立  
..... 田纯见 林志雄 罗 琼 等(227)

应用实时荧光定量 TaqMan RT-PCR 检测口蹄疫病毒的研究  
..... 花群义 金宁一 周晓黎 等(238)

猪 II 型圆环病毒检测方法的建立及应用 ..... 姜 焱 王凯民 张常印(245)

猪传染性胃肠炎(TGE)病毒在组织细胞上增殖及其抗体的鉴定研究 ..... 王树成(252)

猪戊型肝炎病毒 ELISA 检测体系建立及其应用 ..... 张晓峰 帅江冰 董 强 等(267)

猪细小病毒 SC1 株非结构蛋白 NS1 基因的原核表达及 PPA-NS1-ELISA 的初步  
建立 ..... 陈进会 郭万柱 殷华平 等(275)

猪衣原体( <i>Chlamydia suis</i> )的聚合酶链式反应(PCR)检测方法的建立	李应国	王 昱	李正国 等(282)
仔猪 O 型口蹄疫疫苗母源抗体与母猪抗体关联性研究	夏 谦	李树清	潘晓钟 等(292)
<b>第三章 牛羊病检测技术</b>			
牛白血病病毒 GP51 在大肠杆菌中表达及初步应用	宋阳威	张鑫宇	张常印 等(299)
血凝块样品中牛传染性鼻气管炎病毒的 PCR 检测方法	段宏安	朱向玲	周 毅 等(306)
流行性牛白血病间接 gp51-ELISA 抗体检测试剂盒的研制	周 毅	吴玉石	段宏安 等(312)
牛白血病病毒 env(gp51)基因的克隆和原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立	周 毅	吴玉石	段宏安 等(320)
BVDV C <sub>24</sub> V 株 P14, P20 基因的克隆和序列分析	李正高	张国瑞	王维志 等(328)
牛 BVDV C <sub>24</sub> V 株 P80 蛋白在大肠杆菌中的高效表达	李正高	王维志	姜 焱 等(334)
赤羽病病毒的纯化及其单克隆抗体的制备	赵祥平	董志珍	肖 妍 等(339)
赤羽病毒单克隆抗体的研制及鉴定	杨 素	陈博文	沙才华 等(345)
副结核病随进境动物引入风险模型建立研究	曹志玲(352)		
副结核荧光 PCR 试剂盒研制与应用	陈 茹	刘中勇	高小博 等(369)
牛传染性鼻气管炎病毒血清抗体检测及结果分析	季新成	段晓东	王大孝 等(376)
吐尔尕特口岸区域牛、羊体内寄生虫调查研究	王兴福	格热提	张乐云 等(382)
温氏附红细胞体病 PCR 诊断方法的建立及其应用	李树清	杜 凯	胡永强 等(388)
小反刍兽疫病毒 H 抗原基因硫氧还蛋白融合表达载体的构建及表达	刘玉洪	花群义	杨云庆 等(395)
小反刍兽疫病毒 N 基因的克隆及原核表达	艾 军	杨建明	叶玲玲 等(401)
羊痘病毒 P32 蛋白编码基因的克隆与表达	康文玉	徐自忠	花群义 等(406)
应用实时荧光定量 TaqManPCR 检测羊痘病毒	康文玉	徐自忠	花群义 等(414)

#### 第四章 马病检测技术

复合定量荧光 PCR 检测和鉴别马疱疹病毒 1 型和 4 型的研究	朱来华	梁成珠	马丰忠 等(425)
-----------------------------------	-----	-----	------------



检测马西尼罗热病毒抗体的重组 E 蛋白-ELISA 的建立	姜 焱	张常印	王凯民 等(439)
抗马 IgG 单克隆抗体的研制	顾炳泉	葛卜峰	张敬友 等(446)
马巴贝斯虫病实验室诊断方法的研究进展	王玉玲	姜 红	柴铭骏 等(450)
马冠状病毒核衣壳蛋白基因片段的克隆及其表达	顾炳泉	彭志生	张敬友 等(457)
马西尼罗热病毒 E 蛋白部分基因在大肠杆菌中的表达	姜 焱	侯玉峰	张常印 等(464)

### 第五章 水生动物病检测技术

单管 RT-PCR 方法检测鱼类 VHSV, IPNV 和 IHNV	段宏安	陆承平	张 睿 等(471)
PCR 检测流行性造血器官坏死病病毒	徐 晔	段宏安	张 睿 等(479)
鲤春病毒血症病毒(SVCV)实时定量 RT-PCR 诊断方法的建立	岳志芹	梁成珠	徐 彪 等(489)
甲鱼虹彩病毒(STIV)环介导等温扩增检测方法的建立	何俊强	岳志芹	刘宗晓 等(498)
甲鱼虹彩病毒单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立	张 旻	林天龙	林祥梅 等(506)
锦鲤疱疹病毒的 PCR 鉴定	段宏安	张 睿	徐 晔 等(510)
经济水产品种类的快速检验鉴定	徐宪仲	王运涛	(515)
淋巴囊肿病毒环介导等温扩增检测方法的建立与应用	辛学谦	李 琼	赵 巍 等(526)
诺如病毒衣壳蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备	赵玉然	赵 巍	梁成珠 等(535)
日本“肯定列表制度”对江苏输日水生动物的影响与对策	吴晓丰	柯家法	孙蓓玲 等(541)
汕头贻贝中有毒有害物质污染状况分析	肖德雄	郭奕亮	黄丽玫 等(545)
实时荧光 RT-PCR 快速检测对虾黄头病病毒方法的建立	方绍庆	梁君妮	孟广校 等(550)
水生动物细菌性人畜共患病的研究进展	吕 青	孟广校	张 明(555)
应用 PCR 方法检测海鱼异尖线虫的研究	鱼海琼	陈 强	林志雄 等(560)

### 第六章 细菌病原体

FTA 卡-16S rRNA 测序法鉴定李斯特菌	蔡 颖	卢次勇	相大鹏 等(568)
LUX <sup>TM</sup> 荧光 PCR 快速检测副溶血性弧菌的研究	许如苏	陈 茹	林彩华 等(573)
SN 标准和 3M Petrifilm 法检测水产品卫生指标菌的比较	林彩华	许如苏	曾梅锦 等(580)

复合 PCR 鉴定胸膜肺炎放线杆菌方法的建立及初步应用	李树清	易建平	陈志飞	等(585)
空肠弯曲菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备	唐泰山	王婷	祝长青	等(594)
李斯特菌套式 PCR 快速检测方法的建立及应用	马保华	张辉华	吕平	等(598)
能力验证试验中大肠杆菌 O <sub>157</sub> : H <sub>7</sub> 的分离与鉴定	林彩华	蔡颖	曾梅锦	等(603)
沙门氏菌和大肠杆菌 O <sub>157</sub> : H <sub>7</sub> 双重荧光 PCR 检测方法的研究	许如苏	林彩华	蔡颖	等(606)
使用 LAMP 技术快速检测单增李斯特氏菌	马保华	李贺	高家明	等(614)
铜绿假单胞菌实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用	邱杨	刘建丽	赵丽	(619)
志贺氏菌实时荧光 PCR 检测试剂的研制	邱杨	唐丽霞	赵丽	等(627)
禽类产品中单增李斯特菌的二重 PCR 检测方法的建立	吴晓薇	廖明	江经纬	等(635)

## 第七章 农兽药残留检测技术

莱克多巴胺单克隆抗体的研制及其 ELISA 检测方法的建立	高以明	阳露	吴艳涛	(642)
高效液相色谱法同时法检测水产品中四种氟喹诺酮类药物残留	张林田	陈小雪	张冬辉	等(653)
酶联免疫法检测克伦特罗残留量的质量控制	何松			(658)
兽药残留分析中样品前处理技术研究进展	叶克应	牛志兴		(663)
液相色谱-串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物	张林田	陈建伟	张冬辉	等(671)
超高效液相色谱-电喷雾串联三重四级杆质谱法测定宠物食品中的三聚氰胺	张静	张朋杰	杨杏	等(679)

## 第八章 物种鉴定及其他

中国猕猴属部分物种分子生物学鉴定方法的研究	郑腾	周月才	唐耀	等(687)
应用线粒体序列对几种海参的初步鉴定	梁君妮	孟广校	耿金培	等(698)
家蚕微粒子病 PCR 快速检测技术研究及诊断试剂盒的研制	刘骏	钱科	沈中元	(704)
猴 B 病毒 gB 基因在昆虫细胞中的表达	周晓黎	王琼	毛永杨	等(720)

## 第九章 管理及其他综述类

防范外来有害生物与中国动物检疫发展战略研究	徐自忠	冯学平	李凌枫	等(727)
-----------------------	-----	-----	-----	--------

动物福利壁垒分析与应对措施 .....	许军 黄渊涛 李琳等(766)
动物疫病样品前处理关键技术的研究 .....	吴斌 孙颖杰 李叶等(771)
构筑动物检验检疫屏障 严防重大动物疫病传入传出 .....	李凌枫(778)
入境伴侣动物检验检疫监管现状与建议 .....	邓海 周俊平 何卫筠(783)
兔魏氏梭菌病的诊断检测与防制技术研究 .....	余华 严玉宝 胡娟等(788)
新城疫免疫与疫苗研究进展 .....	邹冬辉(792)
动物疫病对我国动物产品出口贸易的影响及对策 .....	于维军(799)

## 第十章 其他论文摘要

“多点报关,口岸验放”通关模式下关检通关协调机制亟待改革 .....	纪强 黄少锋(806)
《出境水生动物检验检疫监督管理办法》对基层执法的指导意义 .....	张联军 周卫东(806)
HACCP 在面包糠虾制品生产中的应用 .....	何松(807)
PCR 技术在出入境检验检疫中的应用前景 .....	袁源 葛勇 周启生(807)
WTO 后过渡期出口食品技术性贸易新壁垒浅析及对策初探 .....	何松 陈定虎 石先来(808)
四川绵阳市狂犬病发病状况分析及防治对策 .....	余华 秦建军 严玉宝等(808)
澳大利亚种牛的检疫与思考 .....	吴松浩 郭光楷(809)
保障动物源性食品安全 健全动物疫病的防控体系 .....	冯国金(809)
比对试验中李斯特菌的分离与鉴定 .....	林彩华 曾梅锦 许如苏等(810)
必须加强进境洗净羽毛羽绒的检验检疫 .....	林利明 吴松浩 张健民(810)
潮州供港活猪风险分析及对策研究 .....	陈少鹏 陈沛生(811)
出口冻牛蛙腿的加工技术及质量控制 .....	沈焯 高丽芳 纪强等(811)
对出口水产品加施检验检疫标志检验监管的探讨 .....	纪强 高丽芳 杨燕忠(812)
出口养殖虾产品药残问题与应对策略 .....	杨燕忠 黄俊生 蔡东生等(812)
船舶压舱水带来的生态隐患与检疫监管措施的探讨 .....	葛卜峰 顾炳泉 李建(812)
大肠埃希菌 O157:H7 实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用 .....	许如苏 林彩华 杨奇志等(813)
动物检疫实验室标准化管理 .....	姚跟 甘彦欢 胡锴略(813)
对进境水产品的检验检疫和监管有关问题的探讨 .....	吴悦赟 吴松浩 郭建红(814)
对进境水洗白鸭毛的透明度和耗氧量的检测及体会 .....	吴悦赟 吴松浩 郭建红(814)
副溶血性弧菌快速测试片检测性能研究 .....	许如苏 林彩华 黄桂荣等(814)
关注人畜共患病 .....	林利明 郭奕亮(815)
国际动物贸易可持续发展与动物检验检疫标准化发展战略 .....	李凌枫(815)
国外兽用生物制品监管政策科学解读 .....	宋战昀 冯新 王伟利等(816)
韩国牛肉风波带给我们的启示 .....	于维军(816)
河豚鱼加工、销售有限开禁问题的探讨 .....	郭建红 吴松浩(816)

鸡肠炎沙门氏菌病的病原分离鉴定·····	冯国金 龙建勇(817)
进境疫区动物产品销毁方法急需规范·····	林利明 许如苏 郭奕亮(817)
进口海鱼中异尖线虫的风险分析·····	李树清 黄忠荣 王巧全等(818)
菌落总数检验结果的影响因素与控制措施的探讨·····	林彩华 许如苏(818)
跨越欧盟签证障碍的方法探究·····	纪强 郑小明(818)
立夫特谷热综述·····	黄宝柳(818)
卤禽制品有毒有害物质的研究·····	郭建红 蔡东生 郭奕亮等(819)
美国和澳大利亚防控生物入侵策略分析及对我国的启示·····	李浩 郑安明(819)
敏感的进境肉类产品的检验检疫·····	林利明 吴松浩 郭建红(819)
欧盟贝类养殖管理体系的研究·····	吕青 卢晓中 杜琦等(820)
浅谈出口水产品使用水分保持剂的种类及限量·····	陈丽娟 陈莹(820)
浅谈国际航行船舶动植物检疫工作现状与对策·····	葛卜峰 张士才 阎升等(821)
如何建设进境动物隔离场·····	朱广勤(821)
沙门菌和副溶血性弧菌双重荧光 PCR 快速检测方法的建立 ·····	许如苏 林彩华 陈其生等(821)
副溶血性弧菌和沙门氏菌检验的几点体会·····	林彩华 曾梅锦 吴悦赟等(822)
汕头出口水产品养殖水质调查·····	许如苏 郭奕亮 肖德雄等(822)
上海供港中猪注册饲养场口蹄疫 O 型灭活疫苗免疫效果监测 ·····	潘晓钟 夏谦 李树清等(823)
食品安全与检验检疫·····	许如苏 纪强 郭奕亮(823)
水产品中甲醛本底调查、检测方法及危险性评估研究进展 ·····	魏建华 肖德雄 林隆强等(823)
饲料中药物残留超标的原因分析及控制对策·····	葛勇 周启生 袁源(824)
提高奶粉中阪崎肠杆菌检出率方法探讨·····	陈冠武 马少玲 许如苏(824)
我国海洋底栖甲壳类资源研究与保护·····	曾碧健 黄建荣 林志雄等(824)
西尼罗河热研究进展·····	刘文斌 高逢结 张敬友(825)
畜产品中沙门氏菌的风险分析·····	吴斌 苏永生 肇慧君等(825)
一批象牙的检测鉴定·····	郭建红 吴松浩 林利明等(826)
应对人畜共患病引起的公共危机·····	冯国金(826)
中草药治疗鸭肠炎沙门氏菌病的作用机制的初步研究 ·····	冯国金 冯翠兰 林崇瑜等(826)
重金属镉在猪肌肉和肾脏组织中含量相关性分析·····	吴丰春 王煜 刘尧志(827)
猪流感的流行病学及其公共卫生意义·····	张强 童光志(827)
猪增生性回肠炎及其风险分析·····	沈涛(827)
仔猪 O 型口蹄疫母源抗体消长规律的研究·····	徐朝哲 夏谦 李树清等(828)

# 第一章 禽病检测技术

随着我国养禽生产的发展和禽类产品贸易量的增加,禽病的检测和研究工作也取得了较大的进展和卓越的成果。禽病检测和防治的队伍日益扩大,素质不断提高。从本次学术研究的论文中可以看到,各出入境单位的研究型论文约占 80%,这表明了我国禽病检测的经验和研究成果不断增多,水平又有了较大的提高,特别是分子生物学的介入,使得检测手段大大丰富。下面就禽病章节作一概述。

## 1. 高致病性传染病的防控检测

我国加入 WTO 后,禽类产品国际贸易进一步增加,禽流感、新城疫等高致病性传染病一直备受质检系统各检测单位的重视,从本次收录的论文来看,基于两病的研究占到了 50%以上。

目前国内外研究者针对两病的研究已开发了多项禽病快速检测诊断方法,如血凝及血凝抑制实验、ELISA 技术、琼脂扩散技术、PCR 及 RT-PCR 技术等。但病原检测技术上的差距在禽类产品检验检疫中依然表现突出,使我国禽类产品贸易在国际竞争中处于劣势。为改变这一不利局面,研究先进的传染病病原检测方法已成为各检测单位的当务之急。伴随技术手段的创新,基因芯片等先进检测技术得以在检验检疫领域中运用。

同时,传统的检测手段在许多欠发达地区因其成本低廉、可操作性强的特点依然延续应用,并对高致病性禽流感的防控工作作出了重大贡献,如西藏出入境检疫局利用血凝血凝抑制试验对拉萨市区 H5 及 H9 型禽流感感染情况和免疫状态,作了摸底调查,填补了西藏缺乏禽流感血清亚型资料的空白,为西藏建立健全禽流感疫情检疫、监测模式和防疫机制提供了重要的科学依据。

## 2. 病原学研究大大拓展

基于对禽病检测事业的进一步开拓,许多分支局已经开始对各种禽类病毒的病原学进行深入的研究。鉴于许多高致病性传染病易变异、宿主范围广的特点,采用生物信息学进行的研究已经起步,如吉林出入境检疫局就对 9 株 H5N1 高致病性禽流感进行了分析,并对其流行病学和生态学意义进行了探讨。更深层次上,有研究者已着眼于病毒和宿主相互作用的始动和限速环节,从受体角度来审视病毒以及病毒宿主特异性,并通过等离子共振技术(SPR)等先进手段,进行了开拓性研究。

在病原的基因学研究方面,挑取主要抗原性基因,并采用克隆表达的方式对禽类病毒进行的研究已经普及,大多数检测单位掌握该项技术后,已有许多实际成果用于检测手段的开发和利用,如间接 ELISA 技术等。同时更为先进的杆状病毒表达技术也已在出入境检验检疫单位中得到开发,有的还转入到了规模化的工业生产,对表达系统规模化表达重组目的蛋白进行了探索,并为进一步发展基因工程亚单位疫苗,为抗原进行产业化生产奠定了基础。

除此之外,许多研究人员利用表达蛋白制作多克隆抗血清和单克隆抗体,并针对病原学开展了病原的组织定位和感染宿主的规律研究,这大大延伸了病原学的研究平台,并为临床病例的监控和现场检疫提供了科学依据。

### 3. 二类疫病受到重视

鸭瘟、传染性法氏囊病、大肠杆菌病等传统危害养禽业发展的疫病受到各分支单位的重视。虽然这些二类疫病并非烈性传染性疫病,但对养殖业的发展危害重大,且大大影响禽产品的贸易和质量安全,例如鸭瘟。

鸭病毒性肠炎(简称鸭瘟)作为进出境动物检疫双边协议中实施检疫的重要疫病,是法定检测项目,但是我国现在还没有规范的检疫诊断标准与检测方法(包括与许多国家签定的双边协定中的病毒中和试验在内)。因此制定进出境种鸭、鹅、其他禽鸟类的有效诊断方法和检测标准对控制二类疫病的发生和监测均有重要意义。基于我国分子生物学方面的技术发展,更为简便、快速的 PCR 检测方法已在很多疾病中成功应用,而且有些已经转化成国家标准。因此,各分支在病原学鉴定与血清学诊断的基础上,积极开发建立 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法,并制定标准的检测操作规程,使检测结果更加可靠,这都有助于提高二类疫病的检出,并可缩短检疫流程,满足企业大通关的需求,符合国际、国内检测的要求。

### 4. 能力验证在检测质量上的对比研究

能力验证是保证实验室诊断质量的重要手段。目前能力验证已用于各种试验类型。在能力验证中,PCR 类试验被划分 CLIA(临床实验室改进法案)高度复杂试验。为确保终端用户能正确进行实验操作,广东出入境检疫局田纯见对禽流感病原的抗原检测进行了能力验证数据评估,在客观、科学、合理的基础上,为尽可能确保验证试验的可重复性,减少实验结果的变异性进行了有意义的研究。这对提高实验室校准检测能力和出具证书报告的国际等效性,提供了样本。

## 9 株水禽 H5N1 亚型禽流感病毒株主要基因信息分析

王伟利 孟庆峰<sup>1</sup> 刘和平<sup>1</sup> 钱爱东<sup>2</sup> 刘明<sup>3</sup>

(1. 吉林出入境检验检疫局; 2. 吉林农业大学预防兽医学学科;  
3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室)

**摘要** 自行设计合成两对特异性引物,通过 RT-PCR 扩增出 9 株水禽的 H5N1 亚型禽流感病毒血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)两个基因的 cDNA 片段,将它们成功克隆于 pMD 18-T 载体上,然后进行序列测定。结果表明, HA 基因全长 1 707 bp,编码 568 个氨基酸, HA 基因分别有 6 或 7 个糖基化位点,在裂解位点附近有连续 6 个碱性氨基酸 R-R-R-K-K-R)的插入,具有高致病性毒株的分子特征。受体结合位点的氨基酸分别为 YWIHELY,左侧壁氨基酸为 SGVSSA,右侧壁为 NGQSGR。NA 基因全长 1 350 bp,编码 446 个氨基酸,NA 基因有 3 个糖基化位点(G7,1 470 bp,469 氨基酸,4 个糖基化位点)。

**关键词** 禽流感病毒 血凝素基因 神经氨酸酶 序列分析

根据禽流感病毒血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)基因,禽流感病毒有 16 个 HA 亚型(H1-H16)、有 9 个 NA 亚型(N1-N9)。A 型禽流感病毒的表面抗原 HA 和 NA 容易发生变异,它们之间发生不同的组合产生血清亚型,而且各亚型之间无交互免疫。如果 2 个亚型的病毒株同时感染同一宿主的细胞时,病毒的基因组片段可以随机互换,发生基因重组,这样就会出现新的血清亚型,就有可能产生高致病性的毒株。据报道有的 H5 和 H7 的毒株其毒力弱致病性不强,但在自然流行过程中,也会变异为高致病性的 H5 和 H7 的毒株。这种现象在自然流行过程中都出现过,使原来致病性弱的毒株经基因重组后出现高致病性。禽流感主要感染鸡、火鸡,水禽(包括鸭、鹅和野鸭)携带禽流感病毒相当普遍。据国内外报道,从外观健康的鸭泄殖腔采样品可以分离到禽流感病毒,但大多数无致病性或致病性弱,分离到的 H5 和 H7 血清型毒株对鸭、鹅无致病性,所以认为水禽是禽流感病毒的主要宿主。在 20 世纪 90 年代后期,水禽的禽流感的流行特点发生变化。一些高致病性的毒株对番鸭、肉鸭和鹅都有易感性,而且形成自然感染和引起死亡。本研究对 8 株鹅源禽流感病毒株和 1 株鸭源禽流感病毒株进行扩增、克隆和测序分析,从分子流行病学角度进一步研究其来源及其演化规律,为政府有关部门监控禽的流行与防治提供科学依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 病毒毒株

8 株鹅源和 1 株鸭源禽流感毒株分别简称为 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 和 D, 均

由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室保存。

## 1.2 载体和菌种

克隆载体 pMD18-T, JM109 大肠埃希氏菌感受态细胞购自宝生物工程有限公司。

## 1.3 试剂

病毒 RNA 提取试剂 Trizol, cDNA 反转录试剂禽源反转录酶 AMV 购自 promega 公司; ExTagDNA 聚合酶、限制性内切酶 Hind III, Xho I, EcoR I 胶纯化回收试剂盒、DNA Marker DL2000 等购自宝生物工程有限公司; 质粒提取试剂盒购自鼎国生物公司。

## 1.4 引物合成

根据禽流感病毒已知的基因序列, 设计合成一对引物。

HA P1: 5'-GTCAAGCTTCAACCATGGAGAAAATAGTGC-3'

P2: 5'-CGCCTCGAGTTAAATGCAAATTCTG-3'

NA P1: 5'-ATAGAATTCACCATGAATCCAAATCAGAAG-3'

P2: 5'-CGAAAGCTTCTACTTGTCAATGGTG-3'

## 1.5 病毒 RNA 的提取

按病毒 RNA 提取试剂 Trizol 说明从禽流感病毒的鸡胚尿囊液中提取病毒总 RNA。

## 1.6 HA 和 NA 基因的 RT-PCR 扩增

根据设计合成的引物, 用禽源反转录酶 AMV 反转录成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板按以下程序进行 PCR 扩增: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 40 s, 49℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。结束后取 PCR 产物 5 μL, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检查结果。

## 1.7 HA 和 NA 基因的克隆与鉴定

PCR 产物纯化回收后与 pMD18-T 载体连接, 转入 JM109 大肠埃希氏菌感受态细胞, 培养 2 h 后取 100 μL 菌液涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养 16 h, 挑取白色菌落接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 16 h, 小量提取质粒。然后对重组质粒进行 PCR 鉴定与酶切鉴定。

## 1.8 HA 和 NA 基因的序列特征性分析与比较

应用分析软件对整个阅读框内的 HA 和 NA 基因序列的核苷酸和推导的氨基酸序列比较分析以及与其他试验毒株和已知序列比较分析。

# 2 结果

## 2.1 HA 和 NA 基因 RT-PCR、克隆后 PCR 鉴定及酶切鉴定

PCR 产物及重组阳性质粒的 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检查, HA 和 NA 基因扩增片段大小与预期结果相符, 分别约 1.7 kb 和 1.3 kb。

用限制性内切酶 Hind III, Xho I 对 HA 基因的阳性质粒进行酶切, 结果所切片段大小分别为 1.7 kb 和 2.6 kb, 与预期结果相符。

用限制性内切酶 Hind III, EcoR I 对 NA 基因的阳性质粒进行酶切, 结果所切片段大小分别为 1.3 kb 和 2.6 kb, 与预期结果相符, 证明两个目的片段均已插入到载体质粒



pMD18-T 载体多克隆位点。

## 2.2 8 株鹅源和 1 株鸭源 H5N1 禽流感病毒株 HA 基因和 NA 基因的核苷酸和氨基酸测定与特征性分析结果

8 株鹅源禽流感毒株和 1 株鸭源禽流感病毒株血凝素(HA)基因全长均为 1 707 bp, 编码 568 个氨基酸(见图 1)。HA 切割后裂解为 HA1 和 HA2, 分别为 330 个氨基酸和 222 氨基酸。HA1、HA2 的裂解位点附近有连续 6 个碱性氨基酸(RRRKKR)的插入, G1, G3, G6, D(170 位为 NST)和 G8(170 位为 NNT)在 HA 肽链上有 7 个潜在的糖基化位点, 分别位于 HA1 上的 27, 39, 170, 181, 302 位和 HA2 上的 154 位和 213 位; G2, G4, G5 和 G7 在 HA 肽链上有 6 个潜在的糖基化位点, 分别位于 HA1 上的 27, 39, 181, 302 位和 HA2 上的 154 位和 213 位。受体结合位点分别位于(以人 H3 亚型流感病毒的 HA 基因氨基酸序列作为参照)98, 153, 155, 183, 190, 194 和 195, 相对应的氨基酸分别为 YWIIHELY, 左侧壁氨基酸 SGVSS, 右侧壁氨基酸 NGQSG。决定宿主特异性的受体结合位点 226 位和 228 位氨基酸分别为谷氨酰胺(Q)和甘氨酸(G), 均具有与禽类细胞受体结合特异性。8 株鹅源禽流感毒株和 1 株鸭源禽流感病毒株 G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8 和 D 神经氨酸酶(NA)扩增基因全长均为 1371 bp, 编码 449 个氨基酸, 包含 3 个糖基化位点, 鹅源禽流感毒株 G7 神经氨酸酶(NA)扩增基因全长为 1470 bp, 编码 469 个氨基酸, 包含 4 个糖基化位点(见图 2)。

G1HA: .....	: 62
G2HA: .....	: 62
G3HA: ..... H.....	: 62
G4HA: ..... L..... Y.....	: 62
G5HA: .....	: 62
G6HA: ..... F.....	: 62
G7HA: .....	: 62
G8HA: ..... I.....	: 62
DHA: .....	: 62
MEKIVLLLAIVSIVKSDqICIGYhA <u>NNSTEQVD</u> IMEK <u>NVTVT</u> HAQDILEKTHNGKLCdLDG	
G1HA: ..... I.....	: 124
G2HA: ..... L..... N. S. N.....	: 124
G3HA: .....	: 124
G4HA: ..... N..... N..... K.:	: 124
G5HA: ..... L..... IN..... N.....	: 124
G6HA: ..... L.....	: 124
G7HA: ..... v..... N..... T:	: 124
G8HA: .....	: 124
DHA: .....	: 124
VKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFiNVPEWSYIVEKasPAnDLCYPGdFNdYEELKHLLSri	
G1HA: ..... S. H. .... K. ... F.....	: 186
G2HA: ..... D..... Q. S. ... K..... A.....	: 186