

现代养猪生产中的育种理论与我国猪育种工作思路

杜宗亮¹, 唐亚东²

(1. 广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640; 2. 兴宁市客家黄畜牧有限公司, 广东 兴宁 514571)

中图分类号: S815.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0003-05

遗传育种的目的在于发挥猪的最优生产水平和达到最大的经济效益。随着遗传理论和育种技术的不断进步与发展, 猪的育种由最初的表型选育开始, 经历了早期的育种值选育, 发展到当前的基因型选育, 育种工作已经形成相对完整的遗传理论和选育方案。同时借助现代分子生物技术和先进的计算机信息技术, 使得选育准确性和育种效率大大提高。育种实践中, 近年来发达国家的育种已经从单纯的品种选育逐渐转向多元性状综合的专门化配套系的选育。中国作为世界上猪存栏量和产肉量最大的国家, 猪的育种工作虽然取得了显著成绩, 但和欧美育种发达国家相比, 仍然存在较大差距, 尤其在优良品种(系)选育和育种体系建设方面存在着突出的问题。

1 遗传理论与选育程序

现代动物育种技术都是建立在遗传学理论基础之上的。动物遗传育种理论的发展大致经历了四个阶段: 孟德尔遗传学、群体遗传学、数量遗传学、分子数量遗传学。传统的遗传学理论所指导的动物选育主要是考虑动物的形态机能, 依据性状表型值进行选择。虽然选种能够获得一定进展, 但进展速度缓慢, 育种效果也不稳定。现代育种理论是以数量遗传学为基础发展起来, 并融入了分子生物学理论, 借助统计方法从育种值选择的角度进行选育, 从而指导选种的科学型和准确型, 提高了遗传改良效果。但就选育程序而言, 每个完整的选育方案都应包括: 确定育种目标→进行性状选择→测定遗传成绩→评估遗传效果。

1.1 关于育种目标的确定

选育的第一步, 也是任何遗传改良程序中最

重要的一步, 是确定选育目标。选育目标可以认为是育种程序的总目标。理论上讲, 最理想的选育目标是对所有的性状进行遗传改良。实践中, 选育的性状越多, 每一个性状所获得的遗传进展就越少, 同一时间内同时选择很多性状, 甚至有可能导致每个性状都没有遗传进展。因此设计一个有效选育程序的关键在于选育尽可能少的遗传目标, 并确定所选育的目标是最重要的。而目标的重要性是由性状性能和市场需求来决定的, 性状影响猪的生产性能并最终影响养猪生产经济效益, 市场及消费需求是产品定位的导向, 制定育种目标必须以实现生产效益的最大化为出发点。

早期的育种目标在品种特征、生长速度、饲料效率、胴体瘦肉率方面给予了更多的关注。随着养猪生产的发展和市场需求不断变化, 育种工作的重心也在不断调整。当前猪的育种目标必须根据未来的市场及对产品消费的不同需求, 在继续降低单位产品生产成本的同时, 加大产品质量和一致性的选择; 在保持适度胴体瘦肉率的前提下, 继续提高瘦肉组织的生长速度和饲料效率; 在提高繁殖性状的同时, 加强使用年限和抗病性的选择; 制定育种目标的短期与长期规划方案, 在考虑生长速度和胴体品质的同时, 要重视采食能力、消化能力和维持需要的选择; 在考虑繁殖性能时, 不仅是产仔数的选择, 还要重视泌乳、发情、使用年限的性状选择; 在考虑总体性能指标和产品质量的同时, 要重视猪群的抗病能力和健康性状的选择, 因为在目前生产中, 由于许多致病因子更加复杂化, 使很多猪场已经丧失了近 30% 的现有遗传力。表 1 给出了目前养猪生产中的一些重要经济

表 1 当前生产者关注的一些重要经济性状

关注程度	+++ ¹⁾	++	+
种公猪	体形 - 性欲力	精子质量 - 使用年限	肢蹄
种母猪	产仔数 - 泌乳量 - 发情	采食量 - 抗病力 - 使用年限	出生重 - 断乳重
仔 猪	生长速度 - 抗病力	采食量 - 皮毛	饲料效率
生长育成猪	生长速度 - 瘦肉率 - 体形 - 肉质	饲料效率 - 采食量	抗病力 - 皮毛 - 风味

1): “+++”: 表示高度关注; “++”: 表示关注; “+”: 表示一般关注。

性状, 虽然不是所有重要性状, 但却是生产者关注最多的。

尽管现代育种技术对猪的遗传改良产生了非常重要的作用, 但一些对于养猪生产赢利有重要意义的性状, 用常规的育种方法进行选择很难达到要求。二十一世纪的遗传改良依然面临诸多挑战, 诸如: ①疾病的抗性, 动物的健康与福利。②改良性能, 降低医药费用和减少残留的风险; ③提高质量和一致性的标准; ④遗传改良变量的损失和不稳定性。④加快改良速度, 同时使核心群和繁殖群的成本最小化; ⑤养猪业的可持续发展系统, 包括人类的健康、动物的环境和生态循环等。

1.2 关于性状的遗传与选择

育种目标确定后, 首先应该明确与养猪生产效率有关的生产性状以及与生产性状有关的次级性状, 并根据这些性状的经济重要性分别进行加权。选种过程, 实质上是对其经济性持续进行遗传改良的过程, 因此必须研究和了解这些性状的遗传规律。

1.2.1 繁殖性状 猪的繁殖性状包括: 产仔数(总仔数和活仔数)、初生重、泌乳力、断乳仔数、断乳个体(窝)重、产仔间隔等。近年来, 对猪繁殖性状的选择日益受到重视。从遗传学和综合经济效益的角度出发, 产仔数仍然是猪繁殖性状中最重要

的性状。
产仔数: 即总产仔数, 包括产木乃伊胎、死胎、弱仔和正常仔的总数。大量研究表明, 产仔数的遗传力较低, 一般在 0.1 左右, 其估计值的变动范围为 0.05~0.30。产仔数是一个复合性状, 受排卵、受精率和胚胎成活率等三个因素的影响。

初生个体(窝)重: 猪的初生体重是表示其质量的重要指标之一。多数研究表明, 初生个体重的

遗传力估计值约为 0.10, 不宜作为选择指标。初生窝重的遗传力为 0.20~0.35, 可作为繁殖记录的一项指标, 度量比较容易。除遗传因素外, 初生个体(窝)重还受品种、胎次和妊娠期营养等因素的影响。

泌乳力: 一般用 21 日龄窝重来表示, 包括寄养仔猪, 但不包括寄出仔猪。母猪泌乳力能力的高低直接影响仔猪的成活率和哺乳期的生长。由于母猪泌乳的生理特点, 很难直接准确度量泌乳量, 以致其遗传力估值较低。国外文献报道为 0.15, 变动范围为 0.08~0.38; 国内文献报道, 本地品种变动范围在 0.1~0.21。

断奶个体(窝)重: 一般情况下, 断奶性状的遗传力估计值高于初生性状, 但仍属低遗传力范畴。国外报道的断奶仔猪数的遗传力估值为 0.12, 变动范围为 0.1~0.35。21 日龄窝重的遗传力估计值为 0.20, 它与产仔数、初生窝重、断奶仔数和个体重等性状密切相关, 育种实践中通常作为一般性状来选择。

1.2.2 生长性状 猪的生长性状主要包括: 生长速度、饲料效率、采食量、瘦肉、脂肪、肉质、体形外貌等。对于生长性状的选择, 不同的时期, 会由于生产效益和市场消费的变化, 而改变其加权比重。如近年来对猪采食量和肉质性状的选择被日益重视起来。

生长速度: 通常用 30~100 kg 体重间的平均日增重或达到一定目标体重(100 kg)的日龄来表示。生长速度是猪育种的重要性状, 由于日增重遗传力高(0.1~0.5), 且容易度量, 因此个体选择的效果较好。同时由于日增重与耗料比之间有较高的遗传负相关($r_A = -0.7$), 选择日增重可使两者均受益。

饲料效率: 指从 30~100 kg 体重期间单位增

重所消耗的饲料量。计算方法为: 饲料效率 = 饲料消耗总量 / 总增重。饲料效率属高遗传力性状(0.15~0.50)。以丹麦长白猪为例, 在1927-1994年间, 由于坚持对日增重、饲料效率等性状的选择, 使日增重由632 g上升到960 g, 饲料效率也从3.44下降到2.38。

采食量:是度量食欲的性状。在不限食的条件下, 猪的平均日采食量称为采食能力(food intake capacity)或随意采食量(voluntary food intake), 这是近年来猪育种方案中日益受到重视的性状。研究表明, 猪的食欲对生长速度和饲料效率都有一定影响。食欲的下降可能会限制日增重和饲料转化率的长期选择进展, 低食欲还会使哺乳母猪不能获得足够的能量而影响泌乳。因此在目前猪的育种实践中, 食欲是应给予重点考虑的性状。

瘦肉:用瘦肉率或瘦肉量来表示, 是胴体组成性状中最重要的性状。虽然瘦肉率是一个高遗传力(0.40~0.60)性状, 但无法在活体直接度量, 一般是通过选择那些在活体上易于度量而又与瘦肉率有较高遗传相关的性状(如活体背膘)来进行间接选择, 或者是根据同胞等亲属的成绩来进行选择。

脂肪:猪的脂肪包括皮下脂肪、腹内脂肪、肌间脂肪和肌内脂肪, 不同部位的脂肪, 其脂肪酸的类型有所不同。背膘厚度是衡量猪脂肪沉积能力最常用的指标。背膘厚度的遗传力估计值为0.40~0.60, 属高遗传力, 如杜洛克猪背膘厚度的直接选择效果非常明显。脂肪性状选择的总体目标是降低皮下脂肪和腹内脂肪, 保持适量的肌间和肌内脂肪, 以保持良好的肉质。

肉质:猪的肉质性状包括pH值、肉色、系水力、嫩度、大理石纹、肌内脂肪含量等多项指标。遗传力一般为低到中等水平。随着胴体瘦肉量的增加而导致肉质变劣的现象已日益引起研究者、生产者以及消费者的重视, 许多国家已将肉质性状纳入猪的综合育种值评定之中。尽管国内外有不少报道认为风味与某些化学物质有关, 但风味的物质基础仍然没有明确的定论。对肉质的评定通常分客观评定和主观评定两类, 前者通过肉的理化特性和生物学指标进行评定, 后者通过对肉的风味进行品尝评分来评定。目前肉质性状改进的

难点是没有把评定的结果作为选种的依据。

外貌:①体长:对猪的胴体长度和产肉量都有一定的影响, 产肉力高的猪通常具有较大的体长, 体长的遗传力较高, 依据体长进行选种可取得较好的效果。②腿臀:是肢体中产瘦肉最多的部位, 腿臀比例在胴体评定时具有重要意义, 对腿臀比例的适当选择能够提高猪的产肉率。③肢蹄:是外貌性状选育的组成部分, 肢蹄缺陷或肢蹄病不仅会影响公、母猪的繁殖性能, 也影响商品猪的生长速度和产品等级。④毛色、头形、耳形:这是品种特征的重要标志, 具有很强的遗传性, 因其与经济性状的关系不大, 目前国外育种中已不作为重点性状, 尤其在配套系选育中。但就中国养猪生产者的习惯, 这些特征还一直都受到人们的关注。

1.3 关于性能测定

育种程序中, 遗传改良的变化是通过选择来实现的, 客观评定选择效果的手段是性能测定。育种实践中, 选种是实现遗传改良最重要的育种措施, 对种猪的评定是选种的基础, 测定则是客观评定种猪性能的基础。因此性能测定是育种工作不可缺少的重要环节。

1.3.1 种猪性能测定方案 测定站测定(station testing):测定站测定方案是把各核心群的被测种猪集中到中心测定站, 在相对一致的环境下, 按统一的测定规程进行测定。中心测定一般实行公猪个体性能测定或个体性能与同胞性能测定相结合的方案。这种方案能够充分发挥被测种猪的遗传潜力, 并对其性能做出公正的评价, 为育种工作提供可靠的依据和指导。缺点是测定容量有限, 且测定成本较高。

场内测定(on farm testing):或称现场测定。种猪场根据本场情况和条件, 按照种猪性能测定规程, 采用统一的测定方法、评定标准和饲养管理条件, 在场内进行公猪性能测定和后备母猪生长发育测定以及母猪繁殖性能测定。场内测定具有测定容量大、成本低廉的优点, 但存在遗传力偏低, 可供选择的遗传资源少, 测定结果偏差大等缺点。

同步测定(synchronous testing):根据统一的测定规程, 中心测定与场内测定同时进行, 并用双方测定结果, 利用动物模型BLUP法进行遗传评

估,消除场间的环境偏差,进行个体育种值估计,提高群内选择差,加大选择强度。这种测定选留的种猪即可用于场内更新,又可用于场际交流,扩大了优良基因的覆盖频率。目前国内多采用以场内测定为主,现场与中心测定相结合的方案。

网上测定(on-net testing):随着计算机网络应用技术的发展,将场内测定与计算机网络技术结合起来,把场内测定的性能记录及时通过计算机网络传入中心数据库,使各场种猪间建立起一定的遗传联系,并借助育种值估计软件对各场测定猪只的育种值进行估计,这种新的测定方式称为网上测定。由于场内测定完全是在本场进行,各场的饲养管理和测定条件不同,测定结果很难在不同场间进行直接比较;测定站测定是将各场种猪集中在一个相对一致的环境(测定站)下进行的,容易造成疫病的传播和扩散,测定性能优秀的种猪无法返回本场使用。网上测定既可发挥场内测定的优点,又可实现场间育种值的比较,而且方便快捷、准确性高,不会传播和扩散疾病,对于种猪性能的统一评定和进行联合育种具有重要的意义。

1.3.2 种猪性能测定方法 个体性能测定(individual performance testing):即个体选择或表型选择。根据种猪本身的成绩估计育种值,进行选择。这种测定方法对于遗传力较高的性状准确度高,简便直接,是育种时运用较多的方法。

系谱测定(genealogy testing):即系谱选择。根据个体祖先表型值的高低来评定种猪性能的优劣,进行选择。系谱测定准确度高,一般用于个体本身性状尚未表现出来时,作为选择的参考,多适用于中等或低遗传力的性状。

同胞测定(sib testing):根据半同胞或全同胞测定的平均值来估计个体性能,进行选择。同胞测定在数量上超过系谱测定;在时间上可以在没有后裔出现的情况下,较早估计个体育种值。当依据系谱估计不准确,而遗传力达到0.3时,使用同胞测定可以达到较高的准确度。

后裔测定(progeny testing):根据后代性能测定的测定值来估计公猪或母猪的性能,进行选择。采取后裔测定会使世代间隔加长,而且测定能力有限,这将影响性状的年遗传改进量。

对于不同测定方法的使用,可以归纳如下:个体性能测定,主选高遗传力性状时准确性高,直接而简便;系谱测定用于后代早期的选择,简单实用,但准确性不高;同胞测定适用于个体本身无法度量而遗传力中等或偏低的性状;后裔测定准确性高,但世代间隔长,最好用于公猪无法度量的性状或限性性状。不同的测定方法结合使用也是常用的育种手段,如个体性能测定与同胞测定或个体性能与后裔测定相结合的综合测定(combined testing)方法。

1.4 关于遗传评估

遗传评估是选种的基础,是实现遗传改良最重要的育种措施。性能测定得到的是性状的表型值,完全相同的环境下,性状值可直接比较,但对处在不同环境影响下的测定结果,应当尽可能剔除环境因素的影响,并将单个性状的育种值的权重归纳综合,形成对种猪性能的全面评定。20世纪50年代初,美国数量遗传学家Charles R. Henderson博士提出了BLUP育种估计值方法,后经过不断系统和完善,80年代中后期应用于猪的遗传评估中,大大提高了猪的遗传改良速度,目前这种方法已成为猪遗传评估的标准方法。

1.4.1 BLUP 育种值估计方法的主要优点 ①充分利用个体及其父母、同胞、后代等所有信息,提高了育种值估计的准确性。②育种值和环境效应可在一次计算中同步估计,消除环境因素造成的偏差,获得个体真实的育种值。③能校正由于选配所造成的偏差,例如优良公猪配质量不同的母猪。④能考虑不同群体、不同世代的遗传差异,依靠群体间的遗传联系,比较群体内或群体间种猪的优劣。⑤当利用个体的多次记录时,可将由于淘汰所造成的偏差降到最低,例如繁殖母猪淘汰的胎次不同。

1.4.2 在育种实践中运用 BLUP 方法应注意的问题 由于BLUP方法所得指数是一个没有单位的相对值,是以群体平均数(=100)作为比较的依据,因此应用BLUP方法育种的猪场要具备必要的条件,如合理的选种选配、科学的性能测定、完整的记录系统、人工授精系统、数据处理系统等,并有严密的育种组织作为保证。同时还要注意以下几个方面的问题:①所统计的猪群必须是同一品种

的纯种猪群,或同一品系的纯种猪群。②所统计的群体之间(各种猪场)必须要有遗传联系。③各场必须依据规定,对种猪及其后代进行性能测定。④参加 BLUP 方法统计的猪场必须愿意公开自己育种数据。

2 对当前国内育种形势的认识和思考

2.1 当前育种工作存在的主要问题

在过去的几十年中,我国猪的育种工作虽然取得了一定成绩,但作为世界第一猪肉生产大国,我国的种猪质量和育种工作,却一直没有大的实质性进展,其原因比较复杂,除与我国的历史文化、消费市场、经济政策等因素有关外,还包括下列因素:

2.1.1 种猪的基础性育种工作薄弱 长期以来,由于养猪生产的小农经济模式,生产规模有限,难以开展具有商品生产价值的育种工作,同时由于生产技术力量和水平不足,育种手段落后,难以开展具体、系统的育种工作。

2.1.2 观念落后,缺乏系统、持久的育种规划 长期以来国内种猪场多数处于封闭自守、各自为战的状态,没有良好的协作精神,即使各品种成立了相应的育种协作组,也由于各种猪场间无遗传联系,而不能进行场间遗传评价。

2.1.3 育种核心群规模小、育种结构不合理 无论我国自行培育的新品种(系),还是由引进品种组成的基础群,受资金条件等因素的限制,核心群数量大都偏小,遗传基础较窄,导致近交增量过大和遗传方差减少过快。同时由于多采用封闭式育种而丧失了引进优良基因的机会,从而使得其遗传改良的速度相当缓慢。

2.1.4 遗传评估系统不完善 先进的参数估计和育种值估计方法还没有得到普及和应用,各种猪场和育种公司的评估方法也不一致,限制了场间的可比性,同时有效的猪场管理软件和育种软件缺乏推广和普及。

2.1.5 育种资金投入不足 难以完成持久的、规模性的育种工作。长期以来,国内育种工作的资金严重不足,而实际投入到育种和现有品种改良方面的资金都远远低于引种投入的资金。而且国内

的育种工作通常以科研项目的方式在一定时期内进行,缺乏连续性。

2.1.6 组织与协调工作滞后 目前从世界范围内的育种理论和生产应用来讲,猪育种研究工作发达的一些国家,其研究成果的商业化应用也比较深入,一些现代育种技术不断在养猪实践中得到运用;而目前国内的情况在于猪的育种工作在组织、协调方面相对滞后,难以开展大规模的育种工作。形成这种局面的原因不是猪育种理论或技术的掌握上与国外有多大的差距,而在于组织协调工作不力,缺乏连续性和商业化的育种工作,所以难以形成优良和可持续应用的品种或品系。

2.2 我国猪育种工作的发展思路

未来猪育种的方向将是生长性能、肉品质量、健康和繁殖效率的综合提高。中国猪育种的发展思路应该是充分利用已有的优良种猪资源,建立区域性或全国性的育种联合体,将育种新技术与遗传评估有效结合,推动公司化育种体系的建设,形成以育种公司为龙头,以联合育种为纽带的高效繁育生产体系,以实现种猪质量快速、持续的遗传改良,最终实现以种猪选育为基础、核心种群猪自给、少量引进育种种群猪、保持育种群水平与国际水平的接轨。为实现上述目标应该着重做好以下几个方面的工作:

2.2.1 建立区域性或国家级的联合育种体系,通过联合育种选育本国的优良瘦肉型猪专门化品系。

2.2.2 建立完善的瘦肉型种猪遗传评估体系,开展场间的遗传联系和评估,利用计算机网络构建网上遗传评估系统。

2.2.3 建立优良种猪可持续发展的高效繁育体系,实现育种公司→种猪公司→种猪繁育场→商品饲养场(户)的新的金字塔模式。

2.2.4 利用我国丰富的种猪资源,选择优良基因,导入、引入品种,培育猪的新品系和配套系,达到资源合理利用、优势互补的目的。

2.2.5 积极推广育种新技术,实现生物技术、电子技术、计算机与系统工程技术在猪育种中的应用,以提高育种工作的效率和准确性。

构建猪繁殖与呼吸综合征病毒感染性克隆的研究进展

唐丽云

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: cDNA 感染性克隆的成功构建是进行反向遗传操作的关键, 而反向遗传操作的成功构建使得在体外对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV) 进行操作变成了现实。通过反向遗传操作手段, 可以在 DNA 水平上通过突变、缺失、插入和互补等手段来研究 PRRSV 的基因复制、转录和表达、RNA 的自发重组和诱导重组、病毒与宿主的相互作用等, 这给 PRRSV 的进一步研究带来了福音。然而, 此技术还存在很多不完善的地方, 本文综述了构建 PRRSV 感染性克隆的基本思路、关键技术、影响克隆感染性的因素, 旨在为优化 cDNA 的克隆技术提供理论基础, 从而更好地研究 PRRSV。

关键词: PRRSV; 感染性克隆; 构建; 影响因素; 应用

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0008-04

cDNA 克隆是以 mRNA 为原材料, 经体外反转录合成互补的 DNA (cDNA), 再与载体 DNA 分子连接引入寄主细胞。每一 cDNA 反映一种 mRNA 的结构, cDNA 克隆的分布也反映了 mRNA 的分布。随着 Meulenberg (1998) 等建立了第一个猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 反向遗传学技术平台, 其它不同毒株的感染性克隆也相继由不同的实验室构建成功^[1,2]。反向遗传操作的成功构建使体外操作 RNA 病毒变成了现实。虽然 PRRSV 的分子生物学研究方面也取得了一些重要进展, 但是 PRRSV 的致病机理、分子免疫基础及免疫抑制、广泛变异性、持续性感染等机理还不是十分清楚。通过反向遗传操作获得 RNA 病毒的感染性 cDNA 克隆后, 就可以在 DNA 水平上通过突变、缺失、插入和互补等手段来研究 RNA 病毒的基因复制、转录和表达、RNA 的自发重组和诱导重组、病毒与宿主的相互作用等, 也可进行抗病毒策略研究, 还可用于构建新的病毒载体, 研制基因标识、弱毒疫苗等。而 cDNA 感染性克隆的成功构建是进行上述操作的关键, 对 PRRSV 的 cDNA 感染性克隆的研究进展进行综述非常必要。

本文综述了构建 PRRSV 感染性克隆的基本思路、关键技术、影响 PRRSV 的 cDNA 克隆感染性的因素, 以期研究 PRRSV 提供参考。

1 感染性克隆的构建

1.1 PRRSV 全长 cDNA 的构建

目前 PRRSV 的全长 cDNA 都是采用“分段克隆的策略”获得的。首先根据 GenBank 已收录的全基

因组序列或者已测序的全基因序列设计多对引物, 将 PRRSV 的全基因序列分段克隆出来。采用此策略的原因是因为 PRRSV 的全基因序列比较长 (约 15 kb), 进行一次性全段克隆不能获得忠实性的全长 cDNA。所以通常将全基因组分成 6 个或者 4 个相互重叠的片段分别连到合适的载体上, 然后根据它们之间的酶切位点再拼接成全长 cDNA。为了获得真实性的全长 cDNA, 必须保证每个片段的正确性, 因此在连接到各载体后必需对每个片段进行测序验证。通常使用的反转录引物和 PCR 下游引物是同一条, 但是有报道称如果扩增效果不理想时, 可以将 PCR 下游引物位置适当远离反转录引物前移, 往往可以提高扩增特异性^[3]。能否获得忠实性的 PRRSV 全基因组片段是成功构建感染性克隆的关键, 因此保持克隆序列的完整性与真实性, 最大限度地避免碱基突变的发生, 获得病毒基因组的全长 cDNA 序列, 是构建感染性分子克隆过程中最重要的, 也是最难解决的问题。

1.2 构建全长 cDNA 面临的挑战

构建 PRRSV 全长 cDNA 面临的挑战: 第一, PRRSV 的全长基因组较大, 约 15 kb, 因此难以获得真实的全长 cDNA 序列, 原因是 RT-PCR 的保真性会随着 RNA 序列的不断延伸而成比例下降; 第二, 很难找到合适的并且能够容纳较大外源基因的载体^[4]。随着高保真反转录酶和 DNA 聚合酶的研发使用, 第一个挑战目前可以相对成功地克服, 获得错配率较低的 cDNA, 但是此技术对于获取

PRRSV 全基因组依然不是很稳定。对于第二个问题, 虽然大的 DNA 片段克隆载体如酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome, YAC) 和细菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) 相关技术已成功报道^[1], 但是此技术还不够成熟, 在应用上还有很多未知的障碍。

1.3 获得稳定的感染性克隆

1.3.1 体内转录 体内转录是直接构建含有病毒 cDNA 的表达质粒, 使之在体内进行转录、复制得到具有感染性的转录物。体内转录中常用的启动子有 T7、CMV、SV40 和肌动蛋白基因启动子等。

关于体内生成感染性 RNAs 的机理目前尚不清楚, 推测可能是 cDNA 运输到细胞核, 在核内, 被 DNA 依赖性 RNA 聚合酶转录成 RNAs^[2]。但是迄今为止, 只有极少数动物或植物病毒的全长 cDNA 克隆被成功用于在体内产生感染性的 RNA 分子^[5]。所以 PRRSV 通常都是采用体外转录的方式。但是 Lee 等^[6]采用了体内转录的方式, 将 PRRSV P129 株基因组全长 cDNA 置于真核启动子 cMV 下, 直接转染质粒, 通过宿主细胞内的转录酶在细胞内转录出了病毒基因组 RNA。Huang 等^[7]在 I 型 PRRSV 的反向遗传系统 pSD01-08-GFP 的基础上, 将病毒基因组克隆到 cMV 下游, 并且在基因组两端添加核酶序列。通过这种方式构建的全长 cDNA 克隆的病毒拯救效率和稳定性明显提高。

1.3.2 体外转录 Meulenberg (1998) 等建立第一个 PRRSV 反向遗传学技术平台使用的是体外转录获得转录体, 继之构建的反向遗传系统基本都是运用体外转录获得 RNA。

体外转录是指 RNA 聚合酶以 DNA 为模板合成 RNA 的过程, 实际上是利用纯化的转录组分来模拟体内的转录过程。这种转录组分包括: 含噬菌体 RNA 聚合酶启动子的 DNA 模板、三磷酸核苷酸和纯化的噬菌体 RNA 聚合酶等。因此通过体外转录可以将全长 cDNA 转录成 RNA, 再直接去感染敏感细胞便能得到完整的病毒粒子。

RNA 聚合酶启动子对于基因组全长 cDNA 转录成具有感染性的 RNA 非常重要, 因为它直接影响转录体的产量和末端核苷酸序列的精准性。常用的启动子主要有大肠杆菌 λ 噬菌体 Pm (Pr 改造产物) 启动子, 噬菌体 SP6、T3 和 T7 启动子。噬菌体 SP6 可以容易地引入到 5' 上游引物中, 扩增

出来的序列可以直接作为模板进行体外转录, 保证了基因序列的忠实性和基因组末端序列的精确性, 因而在构建感染性克隆中作为常用方法。而 T7 RNA 由于聚合酶启动转录的效率相对较强且具有严格的启动子识别特异性, 因此目前 T7 RNA 聚合酶介导的病毒拯救系统在 PRRSV 的 cDNA 体外转录中也应用相对广泛。Yu-Jeong Choi 等 2006 年, 将韩国分离到的第一株 PRRSV PL97-1 株基因组全长 cDNA 构建成人工染色体 (BAC), 然后通过体外转录获得转录体^[8]。

为了避免转录物含有非病毒的核苷酸序列, 影响转录物的感染性, 还需要解决的是转录物能否正确终止转录的问题。Choi 等^[9]研究表明, 病毒基因组准确的末端序列对病毒的拯救效率有重要作用, 而 P129 全长 cDNA 克隆构建时未考虑这个问题。因此, 李红文^[10]在 cDNA 全长的 3' 末端加上一个特异的限制性酶切位点, 体外转录时, 酶切位点先将重组质粒线性化, 再进行转录过程, 这样可使转录正确终止。

1.4 转染并检测拯救出的病毒

利用体内转录方法时, 通常用含病毒全长 cDNA 的转录质粒直接转染易感细胞或直接注射到动物体内, 但是在体外转录中, 往往会用体外转录产物 (RNA) 转染宿主细胞。阳离子脂质体试剂转染法 (Lipofectin、Lipofectamine 2000 Full Gene 等) 最常用, 但这些试剂大多用于 DNA 转染效果较好。其原理是: 阳离子脂质体无论与 DNA 结合或与 RNA 结合, 都形成人工脂双层, 这样通过与细胞质膜的融合将核酸带入细胞内。但对 RNA 的转染效率相对低一些。

转染细胞后可以通过细胞病变 (Cytopathic Effect, CPE)、RT-PCR 法、收集细胞上清进行空斑滴定、TCID₅₀、LD₅₀ 等检测和滴定方法, 或电子显微镜直接观察病毒粒子以及其他一些特异性指标来判断转录物的感染性。另外, 人们常在基因组 cDNA 中加入一定的遗传标记来区分恢复病毒与野生型病毒, 如在特定的部位改变一个碱基或一段碱基序列、或在基因组加入报告基因等等^[11-13]。

2 影响 PRRSV 全长 cDNA 克隆感染性的因素

获得 cDNA 克隆是关键性的一步, 研究者已对其进行了许多的研究, 但是还是无法保证其稳定

的生物活性。由于 RNA 转录物的不均一性、5' 端和 3' 端冗余核苷酸的数量和序列以及 5' 端的帽子结构和 3' 端的 poly(A)、cDNA 克隆中携带点突变等都会对转录物的感染性产生很大的影响。这些因素对病毒转录体的感染性有显著影响。

2.1 病毒基因组的不均一性

在体外转录过程中得到的转录物是由各种长度的 RNAs 构成的一个类群, 也就是说长短不一, 全长的 RNA 只占其中的一部分, 因此该转录类群在细胞中进行复制时, 不完整的没有复制能力的转录物与完整转录物会竞争性地与宿主发生作用, 从而影响转录物的感染性。这可能是因为转录产物中基因组长度的 RNA 分子太少。在大肠杆菌 RNA 聚合酶 λ Pm 启动子系统中, 转录产物的不均一性是较常见的问题^[14]。Ruggli 等^[15]利用噬菌体 RNA 聚合酶获得的体外转录物的试验中发现, 基因组长度的转录物仅占 30% 时也可以产生有感染性的病毒粒子。

2.2 扩增与连接过程中核苷酸的突变

虽然目前在克隆中使用的合成酶的保真性有所提高, 但由于 PRRSV 的基因组较长, 在获得 cDNA 和转录过程中难免出现基因突变。据报道 T7 和 SP6 RNA 聚合酶在转录过程中具有序列依赖性^[16], 也就是说启动子序列会附着在序列上, 所以在这一步也有可能引入序列突变。加上病毒编码的复制酶忠实性并不是很高, 结果这个 cDNA 克隆(或者相应的体外转录体)并不具感染性已在意料之中。Meshi (1986), Eggen (1989), Holt 和 Beachy (1991), Lai (1991) 等分别得到没有感染性的转录物, 但通过替换这些克隆子中一些核苷酸序列使其具有了感染性。也存在合成的转录物比亲本毒株 RNA 感染性更强的例子^[17, 18], 这说明有利于全长转录物感染性碱基突变存在。

2.3 非编码区 5' 和 3' 端序列的影响

2.3.1 5' 端帽子结构的影响 基因组 5' 非翻译区 (UTR) 一级序列和高级结构调控病毒的感染性、复制、转录以及翻译。高飞等^[19]利用 PRRSV 感染性克隆 pCBC2, 通过突变 PCR, 构建了一系列 5' UTR 序列缺失的全长突变体克隆, 将其体外转录的 RNA 转染细胞, 进行病毒感染性、复制和转录分析后的结果显示, 5' 端能够耐受一定的碱基缺失, 并发现其能够通过突变填补缺失位点的核苷酸, 但

在碱基缺失较多的情况下, 自救能力将受到限制, 无法回复其感染性。

2.3.2 3' 端 poly(A) 尾的影响 PRRSV 3' UTR 的 5' 端可耐受一定数目的核苷酸的缺失 (41 nt) 与插入 (23 nt) 突变, 保守的环结构突变后病毒失去了感染性^[20]。北美株 PRRSV 全长感染性克隆经体外转录转染 Marc-145 细胞, 能产生 CPE 的最小 poly(A) 尾长度为 10, 推测其主要原因可能是过少的 poly(A) 尾不能使病毒基因组 RNA 有效地与宿主蛋白 PABP 结合, 抑制基因组 RNA 的翻译起始, 进而阻止负链 RNA 的复制和基因组以及亚基因组 RNA 的转录, 最终不能包装成完整的病毒颗粒, 从而失去感染性; PRRSV 基因组 poly(A) 尾在感染细胞过程中能被修复^[21]。但 PRRSV 基因组 poly(A) 尾对病毒基因组的翻译、复制、转录所起的具体作用以及 poly(A) 尾的形成机制还有待进一步研究。

3 小结

目前在国际上, 对 RNA 病毒进行遗传拯救或构建感染性克隆已经是分子病毒学进行病毒结构与功能深入研究的必经之路。但是目前 PRRSV 的感染性分子克隆在技术上还存在着很多疑问, 比如, 如何获得全长的 cDNA, 怎样选择高保真性的酶, 如何筛选合适的载体, 体外转录还是体内转录好, 如何克服这两种转录方法中遇到的问题等等。虽然有很多的问题需要解决, 但是不可否认的是, 通过构建 cDNA 感染性克隆进行反向遗传操作, 使深入研究 PRRSV 的前景广阔, 我们有理由相信这些疑问会随着大量的实验研究逐步得到解决。

参考文献:

- [1] Meulenber J J. PRRSV, the virus[J]. *Veterinary Research*, 2000, 31:11-21.
- [2] Nielsen H S, Storgaard T, Oleksiewicz M B. Analysis of ORF 1 in european porcine reproductive and respiratory syndrome virus by long RT-PCR and restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 76:221-228.
- [3] Gritsun T S, Coull E A. Development and analysis of a tick borne encephalitis infectious clone using a novel and rapid strategy[J]. *Journal of Virological Methods*, 1998, 76:109-120.
- [4] 刘光清, 刘在新, 谢庆阁. RNA 病毒感染性克隆的构建原理及应用[J]. *生命的化学*, 2003, 23(4):317-320.
- [5] Boyer J C, Haenni A L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses[J]. *Virology*, 1994, 198:415-426.

- [6] Lee C, Calvert J G, Welch SK. A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity[J]. *Virology*, 2005, 331:47-62.
- [7] Huang Y W, Fang Y, Meng X J. Identification and characterization of a porcine monocytic cell line supporting porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication and progeny virion production by using an improved DNA-launched PRRSV reverse genetics system[J]. *Virus Res*, 2009(1):1-8.
- [8] 张善瑞. 高致病性猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒及其弱毒感染性克隆的构建和应用[D]. 2010:9-10.
- [9] Choi Y J, Yun S I, Kang S Y, et al. Identification of 5' and 3' cis-acting elements of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus: acquisition of novel 5' AU-rich sequences restored replication of a 5' -proximal 7-nucleotide deletion mutant[J]. *J Virol*, 2006(2):723-36.
- [9] Weiland J J, Dreher T W. Infectious TYMV RNA from Cloned cDNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17:4675-4687.
- [10] 李红文. PRRSV CC-1 株分离鉴定及全长 cDNA 克隆与分析[D]. 吉林: 吉林大学, 2007.
- [11] Boyer J C, Haenni A L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses [J]. *Virology*, 1994, 198: 415-426.
- [12] Moorann R J M, Van Gennip H G P, Miedema G K W, et al. Infectious RNA Transcribed from an Engineered Full-length cDNA Template of the Genome of a Pestivirus [J]. *Journal of Virology*, 1996, 70:763-770.
- [13] Meyers G, Thiel H J, Rumenapf T. Classical Swine Fever Virus: Recovery of Infectious Viruses from cDNA Constructs and Generation of Recombinant Cytopathogenic Defective In-terfering Particles[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70:1588-1595.
- [14] Hamilton W D O, Baulcombe D C. Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 cDNA[J]. *Gen Virol*, 1989, 70:963-968.
- [15] Ruggli N, Tratschin J D, Mittelholzer C, et al. Nucleotide Sequence of Classical Swine Fever Virus Strain Alfort/187 and Transcription of Infectious RNA from Stably Cloned Full-length cDNA[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70:3478-3487.
- [16] Schenborn E T, Jr Mierendorf R C. A Novel Transcription Property of SP6 and T7 RNA Polymerases: Dependence on Template Structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13:6223-6236.
- [17] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286(5441):950-952.
- [18] Hayes R J, Buck K W. Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribed in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction [J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(4):2503-2508.
- [19] 高飞, 袁世山. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 5' 非翻译区末端序列调控病毒复制作用的解析[C]. 中国重要会议论文集, 2009:188.
- [20] 孙志, 王金勇, 张建武, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 3' 末端非翻译区病毒复制过程调控作用的研究[C]. 中国重要会议论文集, 2009:189.
- [21] 袁海峰, 高飞, 王金勇, 等. poly(A) 尾对猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组感染性的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(2):86-89.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

主管单位: 广东省农业科学院

主办单位: 广东省畜牧兽医学会、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

订 价: 每期定价 5.5 元, 全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

注意事项: 汇款时请注明订阅份数、邮政编码、详细收刊地址、单位名称、收件人姓名、电话等相关资料, 以免误投。

地 址: 广州市先烈东路 135 号 《广东畜牧兽医科技》编辑部 (邮编: 510500)

电 话: 020-37245052、37288167 E-mail: gdxmsy@163.com, gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

青贮发酵过程中主要微生物的活动规律及控制

李泽青¹, 闫峻^{2*}, 张永芳¹, 张菊¹

(1. 天津市宝坻区畜牧水产发展服务中心, 天津 301800; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

中图分类号: S816.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0012-04

青贮饲料(Silage)是指易被耗氧微生物损坏的青草或其它水分含量高的原料贮存于厌氧条件下调制而成的饲料^[1]。青贮过程实际是微生物竞争发酵的过程,青贮的成功与否取决于乳酸菌是否在青贮发酵过程中占优势地位。

1 青贮发酵过程

青贮发酵过程可以分为四个阶段,即好氧阶段、发酵阶段、稳定阶段和饲喂阶段或好氧腐败阶段^[2]。各阶段有不同的发酵时间和多种多样的有明显差异的微生物。但需要指明的是,青贮发酵是一个连续的过程,这四个阶段并没有明显的界线。

1.1 阶段1——好氧阶段

一旦新鲜的青贮原料被切碎后装容密封,这一阶段立即开始。由于刚收割下来的青绿植株中的细胞并未立即死亡,植株中的细胞仍进行呼吸作用和酶解过程。氧气的残留使得好氧性以及兼性菌的数量大大增加,例如霉菌、酵母以及肠道细菌中的一些种属。随着呼吸作用的继续进行,氧气被逐渐消耗,主导细菌也由好氧菌变为兼性厌氧菌。这一过程一般不会超过24h,时间的长短取决于氧气的残留量。

1.2 阶段2——发酵阶段

这一阶段开始于青贮料中氧气耗尽,并且要持续数天或几周,持续时间取决于适宜的饲草及发酵条件。如果发酵过程成功,乳酸菌大量增加并占据支配地位。乳酸菌利用水溶性碳水化合物(Water Soluble Carbohydrate, WSC)发酵产生乳酸及其它酸类,pH值会逐渐降到3.8~5.0之间。

1.3 阶段3——稳定阶段

此阶段要求空气不能进入青贮窖或其它青贮容器,而生产上一般在阶段2之后即开窖使用,因

此发生几率较小。大部分微生物在第二阶段大幅度减少,部分耐酸微生物依然存活但几乎不活动,梭菌属及杆菌属以孢子形式存活。只有一些耐酸性的蛋白酶、碳水化合物酶和乳酸杆菌继续以低水平活动。

1.4 阶段4——饲喂阶段或好氧腐败阶段

青贮饲料一旦暴露在空气中,这一阶段即开始。在饲喂阶段这是不可避免的,但是它会因为掩盖物的破坏(如老鼠或禽类的破坏)而提前。腐败过程可以分为两个阶段。首先是腐败的开始,由酵母菌和醋酸菌等作用使有机酸降解而引起。这会导致pH值上升,并且伴随着温度的升高以及芽孢杆菌的破坏作用,第二阶段也就开始了。第二阶段也包括其它微生物的作用,像霉菌及大肠菌群。好氧腐败发生在青贮料几乎完全暴露在空气中时,然而损害的程度高度依赖于青贮料中腐败菌的数量及活性,在污染区域每天可能会有1.5%~4.5%DM损失掉。贮存几个月的密封窖内也会发生同等程度的损失^[3]。

2 青贮饲料微生物区系

青贮饲料的微生物对于贮藏是否成功起着关键性的作用。可大致分为两组:(对青贮发酵)有益微生物和有害微生物。有益微生物即乳酸菌;有害微生物指能够导致厌氧损害(如梭菌属和大肠菌群)或者是好氧损害(如酵母菌、芽孢杆菌、李斯特菌属和霉菌)的微生物。许多腐败菌不仅仅降低青贮料的饲喂价值,还对动物健康或乳品质量有害,或者对两者都有害(李斯特菌属、梭菌属、霉菌和芽孢杆菌)。青贮过程中微生物的活动见表1。

2.1 有益微生物—乳酸菌

乳酸菌属于附生在植物上的微生物,通常它

表 1 青贮发酵过程中主要微生物活动

	好氧阶段	发酵阶段	稳定阶段	饲喂阶段
酵母菌	→	→	→	→
霉菌	→		→	→
醋酸菌				
肠道细菌	→		→	→
肠细菌				
杆菌	→		→	→
乳酸菌	→	→		
梭菌属		→		

资料来源: (Muck, R. E. 1993^[4])

的数量会在饲草收获保存和青贮期间大量增加。饲草的品质(如碳水化合物和干物质含量)、乳酸菌的性质(像耐酸及耐渗透)以及底物的利用会对青贮料发酵中乳酸菌区系的竞争能力起决定性作用^[5]。

青贮料中的乳酸菌通常包括乳酸杆菌、片球菌属、明串珠菌属、肠球菌属、乳球菌和链球菌等。他们大都嗜温,可在 5~25℃ 之间生长,最适温度为 25~40℃。在乳酸菌的作用下,pH 值可以降至 4~5。所有的乳酸菌都是兼性厌氧菌,但是其中有一些比较偏好厌氧环境^[6]。

根据对糖的新陈代谢作用,乳酸菌可以被分为正型发酵菌、兼性异型菌和异型发酵菌。正型发酵菌可以利用六碳糖(如葡萄糖)产生乳酸总量的 85%,但是不能降解木糖在内的五碳糖。兼性异型菌也主要利用六碳糖产生乳酸,但是它们还可以降解少量五碳糖产生乳酸、乙酸和(或)乙醇。异型发酵菌可同时降解五碳糖和六碳糖,但是和正型发酵菌不同,他们把六碳糖降解为等分子量的乳酸、CO₂、乙酸和(或)乙醇。正型发酵菌包括片球菌属和瘤胃乳杆菌。兼性异型菌包括植物乳杆菌、戊糖乳杆菌、乳酸片球菌和尿肠球菌。异型发酵菌包括明串珠菌属和部分乳杆菌,例如短乳杆菌、布赫纳乳杆菌^[6]。

同型乳酸发酵反应式为:



异型乳酸发酵反应式为:



2.2 有害微生物

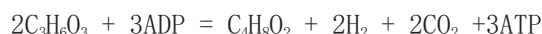
2.2.1 酵母菌 酵母菌是一种真核的兼性厌氧异养菌。青贮料中,无论是厌氧的还是好氧的酵母菌活动都是不希望出现的。在青贮料的缺氧环境中,酵母菌利用糖类发酵生成乙醇和 CO₂^[5]。乙醇的产生不仅减少了乳酸发酵所需要的糖类,而且还会对

牛奶风味造成不良影响。在有氧条件下,酵母菌会将乳酸降解为 CO₂ 和 H₂O。乳酸的降解会导致 pH 值的上升,从而引起其他多种有机物质的腐败^[6]。

发酵的第一周乳酸菌群的数量可以达到每克饲料中 10⁷ 个菌落单位,随着发酵时间的延长酵母菌的数量会逐渐减少^[7]。影响酵母菌生存的原因是发酵过程中形成的厌氧环境和有机酸浓度的增加。发酵过程中氧气的存在促进了酵母菌的生存和生长,反之高浓度的甲酸和乙酸减少酵母菌。

2.2.2 肠道细菌 肠道细菌是一类兼性厌氧菌。青贮料中多数的肠道细菌被认为是不致病的,尽管如此,它们在青贮料中的生长也是有害的,因为它们会与乳酸菌竞争性利用糖类物质,并且还会降解蛋白。蛋白的降解不仅会导致青贮料饲喂价值的降低,还会产生有毒物质,如生物胺和支链脂肪酸。生物胺对青贮料的口味有负面影响。此外,在蛋白降解过程中产生的氨增加了青贮作物的缓冲能力,因而阻止青贮料 pH 值迅速降低。肠道细菌的一个重要性质是它们能在青贮环境条件下将硝酸盐(NO₃) 转化为亚硝酸盐(NO₂)。青贮饲料中,亚硝酸盐被肠道菌降解为氨和氧化亚氮(N₂O),但它还可以被化学降解产生 NO 和硝酸盐^[8]。pH 值降低会阻止肠道细菌的繁殖。

2.2.3 梭菌属 梭菌属是一类能产芽孢的厌氧菌。许多梭菌利用碳水化合物和蛋白质发酵,这样会产生一些问题,比如降低饲喂价值以及产生生物胺,这与肠道细菌很相似。此外,青贮料中的梭菌会破坏牛奶质量。因为梭菌孢子可以在反刍动物消化道内存活,并且青贮料内的梭菌孢子可以经过粪便或者被粪便污染的乳房转移到牛奶中。耐酸性的酪丁酸梭菌是奶酪工业最相关的菌种。除了利用碳水化合物发酵,酪丁酸梭菌还可以降解乳酸生成丁酸、H₂ 和 CO₂。反应式如下:



这种丁酸发酵不仅仅抵消了青贮料以中的乳酸发酵,还产生大量气体。

典型的“含梭菌青贮料”的特征是:丁酸含量高(>5 g/kg DM)、pH 值高(DM 含量较低的青贮料中 pH>5)以及氨和胺的含量高。发酵可以迅速而充分地降低青贮料的 pH 值,从而可以阻止含梭菌青贮料的产生^[9],因为在低 pH 的情况下肠道细菌和梭菌属的活动都将受到抑制。此外,与乳酸菌相比,梭菌对低水分活度(A_w)更为敏感^[9]。因此,不断地降低青贮作物的 A_w 值,比如通过凋萎而获得

更高的干物质含量,是一种可以选择的抑制梭菌的途径。梭菌还可以被青贮料降解产生的亚硝酸盐、NO 或者是二者混合物所抑制。

2.2.4 醋酸菌 醋酸菌是一类专性好氧微生物。至今,所有从青贮料分离出来的醋酸菌都属醋酸杆菌属。醋酸杆菌的活动是有害的,因为它们可以氧化乳酸和醋酸生成 CO_2 和水,从而引起青贮料耗氧酸败。通常,导致好氧酸败的主要因素是酵母菌,醋酸菌不存在或者存在而只发挥很小的作用。然而,也有报道在全株青贮玉米中醋酸菌单独引发好氧酸败。此外,选择性地抑制酵母菌也会扩大青贮料中醋酸菌的繁殖^[10]。

2.2.5 杆状菌 杆状菌是一类和梭菌属相似的可以生成孢子的杆状细菌。然而,它们还是很容易和梭菌属区分开来,因为它们(兼性)好氧菌而所有的梭菌都是专性厌氧菌。兼性好氧杆状菌可以利用多种碳水化合物发酵生成有机酸(醋酸、乳酸和丁酸)、乙醇、2,3-丁二醇和丙三醇。一些特殊的杆状菌可以产生抗真菌物质,有人曾利用其抑制青贮料好氧酸败^[11,12]。除了这些特殊的菌种,杆状菌在青贮料中的繁殖一般认为是有害的。不仅仅是杆状菌的产乳酸和醋酸的能力低于乳酸菌,而且它们还会增加好氧酸败的机会(尤其是青贮后期)^[13]。为了减少青贮料中的杆状菌,储存温度不能太高,并且与空气接触面应尽可能小,此外青贮原料上不能带有泥土或肥料。

2.2.6 霉菌 霉菌是一类真核微生物。霉菌的许多种属可以产生较长的菌丝以及有颜色的孢子,因此被霉菌侵染的青贮料可以很容易地鉴定出来。霉菌在青贮料中残存氧气的部位存活,一般只是在青贮料表层,但是在好氧腐败期间(阶段 4)可以使青贮料全部发霉。从青贮料中正式分离出来的霉菌种属分别有青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉属(*Mucor*)、丝衣霉属(*Byssosclama*)、犁头霉属(*Absidia*)、节菱孢属(*Arthrinium*)、地丝菌属(*Geotrichum*)、红曲霉属(*Monascus*)、帚霉属(*Scopulariopsis*)和木霉属(*Trichoderma*)^[14]。霉菌不仅会降低青贮料的饲喂价值和适口性,还对人和家畜的健康有不良影响。霉菌孢子会引起肺部伤害和过敏症^[15],还有许多疾病与霉菌产生的霉菌毒素有关^[16]。根据类型和含量的不同,青贮料中霉菌毒素可以引起从较轻的消化不良、生殖疾病以及降低

免疫力到严重的肝或肾损伤及流产等健康问题^[17]。青贮料中有许多重要的产毒霉菌,像烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)和丝衣霉(*Byssosclama nivea*)。娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)是一类耐酸而且可以在低氧高 CO_2 环境下存活的霉菌,尤其是在多种不同的青贮料中它都作为优势菌种被检测出来^[18,19]。目前关于青贮料在何种条件下能够产生何种霉菌毒素还不确定。被霉菌严重侵染的青贮料不一定含有高水平的霉菌毒素并且在一批青贮料中霉菌产生的毒素也不是固定的^[19]。黄曲霉毒素 B1(Aflatoxin B1)是黄曲霉产生的毒素的一种,现已被证实可以从家畜饲料转移到乳中。青贮法可以最大限度地减少空气接触(比如压实、表层掩盖等),使用添加剂可以阻止好氧酸败的启动,这些都会防止或抑制霉菌的生长^[20]。

2.2.7 李斯特菌属 李斯特菌属为好氧菌或兼性厌氧菌。对于青贮质量来说,最重要的菌种就是兼性厌氧的单核细胞增生李斯特菌,因为这种菌对多种动物和人都有致病性。免疫力较弱的家畜(如孕期母畜和幼畜)尤其容易受单核细胞增生李斯特菌的感染。此外,Sanaa 等^[21]已经证实劣质青贮料是原料乳中的单核细胞增生李斯特菌的主要来源。青贮料中李斯特菌的生长和生存取决于青贮料的厌氧程度和 pH 值。单核细胞增生李斯特菌在有氧、低 pH 值(3.8~4.2)条件下可存活很长时间,甚至在氧气含量很低的情况下也能存活,但是在绝对厌氧条件下低 pH 值可以迅速将其杀死。发酵良好的青贮料由于其 pH 值低抑制了单核细胞增生李斯特菌的生长。迄今为止,最有效的抑制单核细胞增生李斯特菌生长的方法就是保持青贮料的厌氧环境^[5]。

3 青贮添加剂

青贮发酵过程受原料、制作工艺以及天气等因素的影响,很难保证青贮质量。目前,最有效的控制青贮发酵的方法就是使用青贮添加剂。对于水分含量高、可溶性糖含量低、缓冲容量大等难以青贮的原料,则必须添加青贮添加剂才能制作出优质的青贮饲料。此外,某些青贮添加剂还可以提高青贮饲料营养价值,防止二次发酵造成的腐败。青贮添加剂主要分为四类:发酵抑制剂、腐败抑制剂、营养性添加剂和乳酸发酵促进剂^[22]。发酵抑制剂和腐败抑制剂主要为无机酸、有机酸及其盐类、甲醛等化学添加剂,一直作为传统的青贮添加剂

而被广泛使用,但是这些添加剂有个显著的缺点就是有较强的刺激性气味,且质量不稳定。乳酸发酵促进剂主要为乳酸菌、糖类(可溶性碳水化合物)和酶制剂。国内外科研人员围绕此类添加剂做了大量的研究工作,证实乳酸发酵促进剂在解决粗饲料资源开发上有着天然、无毒、高效等突出的优点和巨大的发展潜力^[23-25]。因此,乳酸发酵促进剂将成为青贮添加剂的发展方向。

4 小结

青贮饲料发酵的四个阶段都具有其各自的微生物活动特征,但是青贮饲料制作成功的关键还是在于是否为乳酸创造了适宜的生长条件。制作初期原料中要尽可能减少空气残留或使用青贮添加剂,促进乳酸菌迅速大量繁殖;开窖后要注意取料方式,保持取料面的整齐性,防止取料方式不当引发二次发酵,降低青贮饲料的品质和使用寿命。

参考文献:

- [1] M K Woolford. The silage Fermentation[M]. New York and Basel: Marcel Dekker, 1984:355.
- [2] 董卫民, 张少敏, 李凤兰, 等. 秸秆饲料开发利用现状及前景展望[J]. 草业科学, 2002(3):53-54.
- [3] 霍鲜鲜, 侯先志, 赵志恭. 日粮不同碳水化合物比例对绵羊瘤胃内纤维物质降解率的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 2004(1):6-11.
- [4] Muck R E. Ensiling and its effect on crop quality[C]. New York: National Silage Production Conference, 1993: 57-66.
- [5] Dnoald M, Hnedosron A R, Hoern S J E. The Biochemistry of Silage[M]. Marlow, U K: Chalombe Publications, 1991:151.
- [6] Schmidt R J, Hua W, Millsa L J A, et al. The development of lactic acid bacteria and Lactobacillus buchneri and their effects on the fermentation of alfalfa silage[J]. Journal of dairy science, 2009, 92(10):5005-5010.
- [7] Driehuis F, van Wikselaar P G. Effects of addition of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability[C]. UK: 11th Int. Silage Conference, 1996:256-257.
- [8] Spoelstra S F. Nitrate in silage[J]. Grass For Sci, 1985, 40:1-11.
- [9] Huchet V, Thuault D, Bourgeois C M. Modelisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycerol et du NaCl sur la croissance des cellules vegetatives de Clostridium tyrobutyricum en milieu de culture[J]. Lait, 1995, 75:585-593.
- [10] Spoelstra S F, Courtin M G, van Beers J A C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage[J]. J Agr Sci Camb, 1988, 111: 127-132.
- [11] Phillip L E, Fellner V. Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers[J]. J Anim Sci, 1992, 70:3178-3187.
- [12] Vreman K, Spoelstra S F, Oude Elferink S J W H. Aerobic spores occur in vast quantities in silages from laboratory and farm silos[J]. Das wirtschaftseigene Futter, 2001, 44:1-8.
- [13] Waes G. Boterzuurbacterien in melk en in kuilvoer[J]. Landbouwkundig Tijdschrift, 1987, 40:925-932.
- [14] Nout M J R, Bouwmeester H M, Haakma J, et al. Fungal growth in silages of sugar beet press pulp and maize[J]. J Agr Sci, 1993, 121:323-326.
- [15] May J J. Respiratory problems associated with work in silos [C]. Syracuse: Proc. NRAES National Silage Production Conference, 1993:283-290.
- [16] Auerbach H. Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit Penicillium roqueforti und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes[J]. Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft, 1996, 168:1-167.
- [17] Scudamore K A, Livesey C T. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review[J]. J Sci Food Agr, 1998, 77:1-7.
- [18] Lacey J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products[J]. J Appl Bacteriol, 1989, 67:115-255.
- [19] Auerbach H, Oldenburg E, Weissbach F. Incidence of Penicillium roqueforti and roquefortin C in silages[J]. J Sci Food Agr, 1998, 76:565-572.
- [20] Wrobel B, Jankowska-Huflejt H. The influence of natural fertilisation on quality and nutritive value of grass silage[C]. Germany: Proceedings of the 23rd General Meeting of the European Grassland Federation, 2010:581-583.
- [21] Sanaa M, Poutrel B, Menard J L, et al. Risk factors associated with contamination of raw milk by Listeria monocytogenes in dairy farms[J]. J Dairy Sci, 1993, 76:2891-2898.
- [22] 储明星译. 青贮饲料添加剂[J]. 国外畜牧科技, 1995, 22(3): 15-16.
- [23] I Filya, E Sucu, A Karabulut. The effects of Propionibacterium acidipropionici and Lactobacillus plantarum, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(5):308-315.
- [24] 管武太, Ashbell G, 等. 微生物添加剂对青贮高粱发酵品质和稳定性的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(11):1401-1405.
- [25] 王昆昆, 玉柱, 邵涛, 等. 乳酸菌制剂对不同比例苜蓿和披碱草混贮发酵品质的影响[J]. 草业学报, 2010(4):94-99.

猪干扰素在临床生产中的应用

王艳晓¹, 罗满林^{1,2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642, 2. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要: 干扰素是由干扰素产生细胞(interferon-producing cells, IPCs)所分泌的一类具有高度生物学活性的糖蛋白, 具有广谱的抗病毒、抗肿瘤、抗细胞增殖和免疫调节等功能。目前, 猪病毒性传染病依然是制约养猪业发展的一类重要且难以控制的疾病, 由于猪干扰素对猪病毒性传染病具有防御和抑制作用, 有关猪干扰素的应用研究十分活跃, 旨在为猪病毒性疾病的防治带来新的突破。本文对猪干扰素在兽医临床上的应用予以述评。

关键词: 猪; 干扰素; 临床; 应用

中图分类号: S852.44

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0016-03

干扰素(Interferons, IFNs)于1957年由Issacs和Lindeman首先发现, 是机体内的干扰素产生细胞(Interferon-producing cells, IPCs)在干扰素诱导剂作用下产生的一类高活性多功能的诱导蛋白。IFNs具有广谱的抗病毒作用, 可抑制RNA病毒和DNA病毒的增殖; 抑制RNA肿瘤病毒及DNA肿瘤病毒的增殖, 可用于治疗肿瘤; 具有比较强的免疫调节作用, 可以调节T、B淋巴细胞的免疫功能; 具有比较强的佐剂活性并能有效地降低副作用的影响, 从而能对疫苗的免疫产生增效作用; 还具有抗细胞内寄生的细菌、立克次氏体、原虫等作用等。猪IFNs是研究最早的动物IFNs之一, 20世纪80年代就有猪IFNs的相关报道。近年来, 对于IFNs的诱导条件和理化活性有了进一步的研究, 同时对猪IFNs进行了大量的临床试验。猪IFNs是预防和治疗猪病毒性疾病的一种有效的广谱抗病毒药物, 市场对猪IFNs的需求量很大。

1 猪IFNs在临床生产中的应用概况

临床上应用的猪IFNs主要是从大肠埃希菌和猪白细胞中获得的基因重组蛋白。近年来, 诸多学者做了大量的有关猪IFNs基因工程及抗病毒的研究, 此外还在酵母菌、杆状病毒、腺病毒等中成功表达出各种猪IFNs, 用以治疗不同的病毒感

染。张存等^[1]从毕赤酵母中表达和纯化猪 α 干扰素, 与从大肠埃希菌和猪白细胞中获得的猪 α 干扰素相比, 前者具有干扰素效价高、毒素含量低, 更类似于天然结构的特点。

1.1 非自身IFN治疗感染性疾病

猪白细胞IFN属于I型干扰素, 其种属特异性不是很严格, 它在异种动物细胞上也可表现较强的抗病毒活性。研究表明, 猪白细胞IFN除对猪的许多病毒性传染病如流行性腹泻、猪瘟、传染性胃肠炎等外, 对牛病毒性腹泻、小鹅瘟、羔羊腹泻等也具有不错的疗效, 试验证实猪IFNs与牛羊等动物之间存在交叉活性。常建华等^[2]用猪白细胞IFN预防羔羊腹泻病, 保护率和治愈率分别达到了95.30%和88.00%; 用猪白细胞IFN治疗水样腹泻及体温升高羔羊, 治愈率89.80%, 其它腹泻治愈率84.21%, 与沈建革等^[3]报道的结果一致。杨华^[4]利用猪白细胞IFN对鹅小鹅瘟病试验性地进行了治疗, 效果良好, 治愈率为95.40%。此外, 黄定余等^[5]利用猪白细胞IFN紧急防治小鹅瘟亦有一定疗效, 保护率达72.8%。

用来自猪白细胞的IFN给人注射也有一定的抗病毒活性。国外研究人员用含猪IFNs的药膏对患面部和生殖器官疱疹的302例患者进行试验治疗, 结果表明IFNs具有明显的治疗活性。

1.2 配合抗生素和抗病毒药物使用

姜天童^[6]报道,使用猪白细胞 IFN 配合相关抗菌药物可以有效地预防猪高热病,保护率为 92.65%~100%。郑永波等^[7]利用猪白细胞 IFN、猪白细胞 IFN+ 抗生素 + 抗病毒药物及对照组抗菌素 + 抗病毒类药物分别治疗患病毒性疫病动物。结果表明,用猪白细胞 IFN 配合抗生素及抗病毒药物进行治疗试验,治疗患病毒性疫病动物 10 284 头(只),其中治愈 9 955 头(只),治愈率为 97%,比对照组治愈率 4%提高 93 个百分点,差异极显著。杨东亮等^[8]用 IFNs 配合抗生素及抗病毒药物对患病动物进行治疗,治疗效果显著提高。此外,猪白细胞 IFN 配合抗生素治疗高致病性蓝耳病等,效果较好。

1.3 治疗混合感染

张真^[9]通过使用猪白细胞 IFN 对猪链球菌、副猪嗜血杆菌、圆环病毒混合感染的治疗试验发现,用药后,病猪基本好转,再无新增病例。刘万钧等^[10]利用猪白细胞 IFN 防治乳猪流行性腹泻,通过临床观察、增重比较、空肠组织毒价测定以及空肠绒毛病损扫描电镜观察,证实猪白细胞 IFN 对乳猪流行性腹泻具有很好的疗效。此外,龙庆军等^[11]利用 IFNs 对猪蓝耳病、链球菌病、附红细胞体病混合感染的病例进行治疗,临床疗效良好。

1.4 作为免疫佐剂,增强疫苗免疫效果

陈传洋等^[12]在有效的疫苗免疫接种基础上,对所有发病和未发病的肉鸡,使用禽用猪白细胞 IFN,同时配合使用抗生素(如头孢类、丁胺卡那、庆大霉素、先锋类等药物),效果十分明显。IFNs 作为免疫佐剂,对疫苗的免疫有增效作用。猪 IFN- γ 可抑制感染猪瘟病毒的单核细胞和肺巨噬细胞的病毒复制。用 IFNs 和猪瘟疫苗同时注射,可增强对猪瘟病毒的防御能力。此外,IFN- γ 还可以增强水泡性口炎病毒亚单位疫苗的抗体水平,也可增强仔猪沙门氏菌感染对痢疾抗原的免疫应答。曹瑞兵等^[13]研究了猪 α 干扰素对猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗免疫效果的影响,发现猪 α 干扰素可显著增强 PCV-2 Cap 蛋白亚单位疫苗接种仔猪的体液免疫反应,提高 PCV-2 Cap 蛋白亚单位疫苗免疫保护效果。

1.5 防治重大威胁性传染病

IFNs 在当前畜牧业中应用广泛,可用于预防和治疗多种猪病毒性疾病,如猪流感、猪病毒性腹泻、猪繁殖与呼吸综合征、猪细小病毒感染、猪圆环病毒病等。王彦彬等^[14]应用杆状病毒表达系统实现猪干扰素 α 和 γ 在昆虫细胞上分泌共表达,重组蛋白在细胞上对 PRRSV 具有抑制作用。Bautista 等^[15]用 IFN- γ 处理感染猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的猪巨噬细胞,结果表明 IFN- γ 可抑制 PRRSV 增殖。孙鏊国等^[16]对临床确诊的 PRRS 病例运用 IFNs 结合其他药物进行治疗,结果表明,IFNs 能降低 PRRS 的死亡率,与对照组比较,死亡率下降 11.13%。岑路等^[17]利用重组猪 α 干扰素治疗高致病性猪蓝耳病,采用毕赤酵母表达系统高效表达的重组猪 α 干扰素制剂,该制剂对高致病性猪蓝耳病的治愈率超过 81%。猪重组 IFN- γ 还可抑制感染传染性胃肠炎冠状病毒 (TGEV) 的猪上皮细胞和肺巨噬细胞中病毒复制^[18],感染 TGEV 的仔猪,可在肠道上皮组织中迅速产生抗 TGEV 的 IFN- α ,从而发生抗病毒活性。此外据报道,猪 IFN- α/β 可有效的抑制口蹄疫病毒的活力。

1.6 作为饲料添加剂使用

研究发现,利用药物控释技术制成的 IFNs 胶囊及纳米粒子可以与特定载体结合,作为保健型饲料药物添加剂使用。岑路^[19]等研究重组猪 α -干扰素在促进生长作用和预防病毒性疾病方面的临床试验表明,猪 α -干扰素对仔猪的生长有良好的促进作用,具有显著的紧急预防病毒性疾病的效果。

2 IFN 的不良反应及注意事项

目前在兽医临床上,研究认为猪 IFNs 对畜禽机体无明显的毒副作用和不良反应。在医学临床上,IFNs 的毒副反应是可逆和可预见的,多为流感样症状、发热、骨髓抑制、胃肠道反应、诱发自身免疫性疾病、神经系统症状等,其它如嗜睡,低血压、心跳过速、皮疹、非特异性皮炎、干燥热等。有关毒副作用和不良反应在畜禽机体到底如何界定仍需要进一步研究。在使用猪 IFNs 时要注意以下几点:①饮水中不得含氯离子消毒剂;②禁止与磺

胺类药物配伍使用;③禁止用葡萄糖盐水稀释,要用无菌注射用水或生理盐水;④肌肉注射时,专用稀释液稀释 IFNs 后,必须在 24 h 内用完,不允许与活疫苗同时使用,可与灭活苗如油苗同时使用,但不要混合注射。

3 问题与展望

随着病原菌新菌株、变异株的不断出现,目前许多药物对某些畜禽疫病已经难以显示满意的防治效果,尤其是病毒性疾病的危害日益严重,因此迫切需要找到一种有效的防治方法。大量研究证明,猪 IFNs 是一种预防和有效治疗猪病毒性疾病的广谱抗病毒药物,对威胁重大的病毒性传染病均具有很好的防治作用,市场对猪 IFNs 的需求量很大,推广应用前景非常广阔。国内进行生产、销售和使用的猪 IFNs 虽多,但仅猪白细胞 IFN 获得农业部新兽药的批文。传统生产 IFNs 有成本高、产品质量难控制及临床疗效不稳定等问题。所以,必须建立 IFNs 的规模化生产体系,利用基因工程技术生产重组 IFN 不失为一条有效途径。而对于一些关键技术问题如猪 IFN 的表达水平、高密度发酵工艺、生物学活性以及临床应用方法等诸多环节均需进行研究。通过对比和优化,以建立有效的生产流程和工艺,使其与传统的 IFNs 相比,具有更大的市场潜力和竞争力。此外,将生产的猪 IFNs 作为增强剂,与不同的疫苗联合应用或与保护性抗原基因融合表达,可以增强疫苗的免疫效果,将对猪病防治产生积极的影响。

IFNs 为临床疾病特别是病毒性疾病的防治作出了重大贡献,同时创造了巨大的经济和社会效益。但在临床使用时,也存在一些亟待解决的问题。IFNs 作用机制复杂,迄今为止尚未完全阐明;IFN 作为一种具有多生物活性的细胞因子,如何发挥最佳作用,以及不同药物最佳配伍等问题也需探索;IFNs 在临床应用中有哪些副作用,尤其是新近研发的新型 IFNs 的安全性也需要阐明。此外,鉴于动物经济价值等因素的考虑,IFNs 难以在食品动物中广泛推广,如何在临床应用上降低成本等问题均尚待解决。随着分子生物学技术的迅速发展,通过基因工程将会生产出大量高效的 IFNs 用于人畜疾病的临床治疗。相信随着研究的

进一步深入,IFNs 将展示出更广阔的前景。

参考文献:

- [1] 张存,叶伟成,王一成,等.猪 α 干扰素在毕赤酵母中的高效表达和纯化[J].浙江农业学报,2010,22(1):6-9.
- [2] 常建华,张建民,高淑兰.猪白细胞干扰素防治羔羊腹泻的临床试验报告[J].内蒙古畜牧科学,1999(3):37-38.
- [3] 沈建革,沈强.猪白细胞干扰素防治羊羔腹泻效果观察[J].养殖技术顾问,2006(11):48.
- [4] 杨华.猪白细胞干扰素治疗小鹅瘟效果观察[J].中国兽医杂志,2000,26(3):54.
- [5] 黄定余,冯运红.猪白细胞干扰素紧急防治小鹅瘟试验[J].湖北畜牧兽医,2000(4):28-29.
- [6] 姜天童.应用猪白细胞干扰素配合相关抗菌药物防治猪高热病[J].湖北畜牧兽医,2009(4):21-22.
- [7] 郑永波,王加力,李克荣,等.猪白细胞干扰素在兽医临床上的应用试验研究[J].甘肃畜牧兽医,2003,33(2):23-24.
- [8] 杨东亮,林永利.干扰素的研究进展及其在动物临床中的应用[J].福建畜牧兽医,2009,31(1):25-26.
- [9] 张真.使用猪白细胞干扰素对猪链球菌、副猪嗜血杆菌、圆环病毒混合感染的治疗报告[J].中国畜牧兽医,2007,34(3):120.
- [10] 刘万钧,张道永,马思奇,等.猪白细胞干扰素防治乳猪流行性腹泻试验[J].中国兽医杂志,1999,25(2):13-14.
- [11] 龙庆军,秦晓华.猪白细胞干扰素对猪蓝耳病、链球菌病、附红细胞体病混合感染的临床治疗报告[J].现代畜牧兽医,2008(4):32-33.
- [12] 陈传洋,陈耀辉.应用禽用猪白细胞干扰素治疗肉鸡新城疫[J].养殖技术顾问,2007(2):49.
- [13] 曹瑞兵,周国栋,陈溥言.猪 α 干扰素对猪圆环病毒2型亚单位疫苗免疫效果的影响[J].畜牧兽医学报,2009,40(6):867-872.
- [14] 王彦彬,孙向丽,魏战勇,等.猪干扰素 α 和 γ 在杆状病毒中共表达及对PRRSV抑制作用[J].中国农业科学,2011,44(9):1931-1938.
- [15] Bautista E M, Molitor T W. IFN- γ inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages[J]. Archives of Virology, 1999, 144(6):1191-1200.
- [16] 孙鏊国,马云,胡方建.猪用干扰素对繁殖障碍与呼吸道综合征的疗效观察[J].中国畜牧兽医,2007,34(6):96-97.
- [17] 岑路,贺亮亮,邓苏理,等.重组猪 α 干扰素治疗高致病性猪蓝耳病的研究[J].动物医学进展,2008,29(6):15-19.
- [18] 赵英杰,徐宏军,李尚波,等.长白猪 γ -干扰素基因的克隆与序列分析[J].动物医学进展,2005,26(7):49-53.
- [19] 岑路,岑伟建,刘键强,等.猪 α -干扰素临床促仔猪生长及疾病预防试验[J].中国畜牧兽医,2010,37(2):141-143.

共轭亚油酸对鸡生产性能、蛋品质及免疫的影响

高存川, 徐春厚*

(广东海洋大学动物科学系, 广东 湛江 524088)

摘要: 共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是一种新型功能性油脂, 具有多种生理功能。文中主要就共轭亚油酸对鸡生长、蛋品质及免疫的作用的研究进展进行综述。

关键词: 共轭亚油酸 (CLA); 鸡产长性能; 蛋品质; 免疫

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0019-02

近年来,随着动物营养研究的不断深入,营养性添加剂从以往的主要满足动物营养需要的氨基酸添加剂、维生素添加剂和矿物质添加剂等,发展到目前的既对动物有营养作用又能提高动物产品品质的营养调节剂。20世纪70年代末,Michael Pariza 发现共轭亚油酸后,研究证明共轭亚油酸是一类具有重要生物学功能的物质,它具有抑制机体的脂肪沉积、提高机体的免疫功能、促进动物的生长等作用。因此,共轭亚油酸对于生产中减少和替代抗生素具有重要意义。

1 共轭亚油酸结构与生物学功能

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 是一系列双键位置和几何构型上呈异构的十八碳二烯酸混合物。由于首先在瘤胃中发现,故又名瘤胃酸 (rumenic acid)。其共轭双键在碳链上的位置有多种排列形式,主要有 8-10,9-11,10-12 和 11-13,每个双键位置又存在顺结构 (cis) 和反结构 (trans)。CLA 的异构体有 10 多种。一般认为,c-9,t-11-CLA 异构体是人类和动物中最主要的异构体^[1]。天然的 CLA 主要存在于反刍动物瘤胃中,瘤胃微生物可将亚油酸代谢成 CLA。自然界食物中 CLA 的含量较低,而且难以提取。目前,工业生产 CLA 的方法主要有:油酸烯丙醇脱水法、蓖麻油合成法、亚油酸碱碱性异构化法、酶催化亚油酸异构化法^[2]。

共轭亚油酸是一类具有重要生物学功能的物质,它具有抑制机体的脂肪沉积、提高机体的

免疫性能、促进动物的生长、增强维生素 A 的吸收、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗氧化的作用,另外,CLA 的钾盐或钠盐可以抑制霉菌的生长,且无毒副作用^[3-5]。

2 共轭亚油酸对鸡生产性能的影响

目前研究 CLA 对鸡生产性能影响的报道不多,而且在提高鸡生产性能方面的研究结果并不一致。张广民等^[3]在肉鸡玉米豆粕型饲料基础日粮中添加 0、0.25%、0.5%、1%、2% CLA,结果表明:CLA 显著提高肉鸡饲料转化率 ($P < 0.05$),极显著地降低了腹脂率 ($P < 0.01$),增加了肌内脂肪的含量 ($P < 0.05$)。另外,Szymczyk 等^[6]研究结果显示:与对照组相比,试验组腹脂率显著降低 ($P < 0.05$),腿肌 CLA 含量显著增加 ($P < 0.05$),饲料转化率差异不显著 ($P > 0.05$)。然而,张海军^[7]在 CLA 对肉仔鸡腹脂率影响的研究中发现:肉仔鸡的腹脂率在各处理之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。陆春瑞^[8]认为 CLA 对 49 日龄黄羽肉鸡的全净膛率、腿肌率无显著影响 ($P > 0.05$);但公、母鸡的腿肌率分别增加了 9.37% ($P < 0.05$) 和 15.92% ($P < 0.05$),母鸡的腹脂率显著下降了 22.05% ($P < 0.05$)。上述报道中,CLA 对肉鸡生长性能 (饲料转化率、腿肌率、增重) 等方面影响结论并不一致,这可能与 CLA 的添加量、鸡的品种、年龄、饲喂时间和日粮组成有关,还需进一步研究。但在 CLA 能抑制鸡的腹部脂肪沉积方面的研究结果基本一致。

CLA 可降低脂肪细胞大小及脂肪的生成率,

从而提高瘦肉率。目前认为,CLA 减少体内脂肪沉积的作用机制主要是抑制与脂肪代谢有关的酶活性及酶基因表达,抑制前体脂肪细胞的分化,加强脂肪酸氧化和利用。戴求仲等^[9]研究发现,CLA 可促进生长激素(GH)和甲状腺素的分泌,而 GH 可通过抑制脂肪酸合成酶 mRNA 的转录,降低脂肪酸合成酶和乙酰 CoA 羧化酶活性,从而降低动物机体脂肪的沉积;甲状腺素可以使脂肪细胞 cAMP 浓度增加,使细胞内无活性的激素敏感酯酶(HSL)磷酸化转变为活性 HSL,进而加速体脂的水解,降低脂肪的合成和加速原有体脂的降解。近年来 CLA 的研究取得了一些进展,但脂肪代谢的作用和机制方面还需深入研究。

3 共轭亚油酸对鸡蛋品质的影响

鸡蛋是目前人们大量生产和消费的动物产品,但胆固醇含量是消费者担心的一个问题,CLA 的出现为解决这一问题提供了新的途径。郑洲^[10]试验结果表明:CLA 在蛋黄中富集量随着 CLA 在饲料中添加量提高而增加,添加 2.0%时 CLA 含量占脂肪酸总量的 7.18%。CLA 对蛋黄总脂含量没有明显影响($P>0.05$),但能显著降低蛋黄中胆固醇的含量($P<0.05$)。饲喂添加 1%CLA 的日粮 15 d 后蛋黄中胆固醇降低了 32%,添 2%CLA 可使胆固醇降低 45%。因此,长期饲喂 CLA 可有效降低蛋黄胆固醇含量。李晓轩^[11]在固始鸡日粮中添加 CLA,结果表明,随着 CLA 添加量的增加,蛋黄总胆固醇和总甘油三酯显著减少($P<0.05$)。当 CLA 添加量达到 2.0%时,能显著增加蛋黄重和改善蛋黄色泽($P<0.05$)。

另外,宾石玉等^[12]的研究结果表明:CLA 可使蛋黄中胆固醇和单不饱和脂肪酸含量显著降低($P<0.05$),蛋黄中饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸和 CLA 含量显著提高($P<0.05$)。许多学者研究表明 CLA 能显著降低蛋黄中胆固醇的含量,提高鸡蛋的品质,但富含 CLA 的鸡蛋在低温条件下保存出现蛋黄变硬及蛋白褪色(Aha)^[13]。而 Aydin^[14]发现,日粮中添加 CLA 的同时添加油菜籽油,可以减少 CLA 对鸡蛋品质的不良影响。陈冬梅等^[15]认为 CLA 能够抑制细胞的载脂蛋白 B 分泌,并阻碍甘油三酯的合成,从而降低鸡蛋中胆固醇的含量。CLA 是一种具有抗氧化性的脂质,其能提高类

胡萝卜素的吸收和增加 CLA 在蛋黄中的沉积性。

4 共轭亚油酸对鸡免疫的影响

CLA 对增加鸡免疫球蛋白的含量、免疫细胞的增殖、T 细胞和自然杀伤细胞(NK)的活化、细胞因子的产生及免疫应答具有不同的调节作用。CLA 对动物体液免疫的作用主要表现为影响免疫球蛋白的表达水平。

郗艳菊^[16]研究结果表明:添加 1.2%CLA 可显著提高各免疫器官指数,IgG、IgM 也有不同程度的提高。张海军^[17]在 CLA 对肉仔鸡免疫机能影响的研究中表明:1%CLA 日粮可显著提高 21 日龄鸡的溶菌酶活性($P<0.05$);降低血清和外周血淋巴细胞前列腺素 E 水平($P<0.05$)。CLA 对血清抗新城疫(NDV)抗体生成水平无影响,但可以显著提高肉仔鸡血清抗布氏杆菌(BA)抗体的水平($P<0.05$)。另外,刘佰阳^[18]研究显示 CLA 能显著提高肉仔鸡的胸腺和法氏囊指数($P<0.05$);与对照组相比,饲喂 1.0%CLA 日粮的 35 和 49 日龄肉仔鸡的胸腺指数分别提高了 50.0%和 43.0%。研究显示,给小鸡饲喂 0.5% CLA,机体受脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激时,对 PHA 诱发的淋巴细胞母细胞的分化也有增强作用^[19]。

目前认为 CLA 对免疫的调节机理是:CLA 通过调节花生四烯酸的合成,来间接控制前列腺素 E₂(PGE₂)的合成。PGE₂是调节免疫功能的重要物质,它通过巨噬细胞和其他免疫细胞来控制细胞因子的合成,适宜浓度的 PGE₂能维持正常的免疫功能^[20]。

5 小结

大量的试验结果表明,共轭亚油酸是一类具有重要生物学功能的物质,具有抑制鸡机体的脂肪沉积,增强机体免疫性能,降低鸡蛋胆固醇含量等功能。由于共轭亚油酸是动物的次级代谢产物,是一种安全性较高的新型绿色添加剂。但共轭亚油酸对鸡的营养作用还有许多问题有待解决,如有关共轭亚油酸作用机理的研究主要是集中在哺乳动物,共轭亚油酸对鸡的免疫作用机制仍有待确定。已有的研究多是采用共轭亚油酸混合物进行实验,而共轭亚油酸有十多种不同的构型,不同的构型的共轭亚油酸对鸡的作用可能不相同,不

(下转第 23 页)

诱导母猪同期分娩的技术

陈海南

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 在集约化猪场中, 要求严格按工艺流程有节奏地进行养猪生产。为了避免夜间产仔和有效地提高商品猪的整体质量, 常采用同期分娩解决这一难题。作为调控繁殖节律的技术之一, 药物诱导母猪同期分娩已成为集约化养猪业的一个重要研究课题。本文对前列腺素 F2 α 和氯前列烯醇在母猪同期分娩中的应用作一简单介绍。

关键词: 同期分娩; 前列腺素 F2 α ; 氯前列烯醇; 母猪

中图分类号: S813

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0021-03

Procedures of parturition induced in sows

Chen Hainan

(College of veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The pig production was done strictly according to the process flow in intensive pig farms. In order to avoid the parturitions in nights and to improve the quality of piglets, the synchronization of parturition was often used. The synchronization of parturition induced with drugs had become one of the important research projects in intensive pig productions. The effects of prostaglandin-F2 α and cloprostenol on the synchronization of parturition of sows will be introduced in this paper.

Key words: The synchronization of parturition; prostaglandin-F2 α ; cloprostenol; sows

正常情况下, 母猪的妊娠期长短不同, 最短 109 天, 最长 123 天产仔, 可相差 14 天^[1]。实际生产中, 母猪常于夜间分娩^[2], 给接产和护理带来很多困难。妊娠母猪分娩与其体内外周血液中孕酮和前列腺素水平的改变有关。许多学者利用外源激素可以控制妊娠母猪分娩的时间^[3]。使大部分母猪于白天分娩, 能有效地降低新生仔仔猪的死亡率, 提高养猪业的经济效益。同期分娩进行得顺利, 可使母猪发情、配种、分娩、哺乳、断奶达到高度同期化, 能充分提高产房和保育舍的利用率。这不但保证了生产的计划性, 还保证了猪群的全进全出, 有利于猪群的保健和对疾病的控制、扑灭和净化^[4,5]。

1 作用机理

分娩的启动跟胎儿的丘脑下部-垂体-肾上腺轴系密切相关。在妊娠中、晚期, 胎盘组织产生

和分泌促肾上腺皮质激素释放激素进入母体和胎儿循环中, 母体血浆中促肾上腺皮质激素释放激素的水平随妊娠期而升高, 分娩前达到高峰。正常分娩之前, 胎儿发育成熟, 促肾上腺皮质激素释放激素促使垂体分泌大量的促肾上腺皮质激素, 使肾上腺皮质醇的含量增多, 引起母畜孕酮分泌减少和雌激素分泌增多。孕酮水平下降, 解除了对子宫的抑制作用。雌激素水平增加, 刺激子宫合成催产素受体和分泌前列腺素。催产素受体浓度增加使子宫对催产素的敏感性迅速增加, 在催产素的作用下子宫开始发生收缩。前列腺素直接刺激子宫肌收缩, 同时还一方面通过子宫静脉转移到卵巢动脉中, 促使妊娠黄体萎缩^[6], 抑制卵巢产生孕酮, 另一方面刺激垂体释放催产素, 使子宫肌收缩加强。在前列腺素和催产素的共同作用下, 子宫肌发生强烈地节律性收缩, 从而将胎儿排出。

前列腺素 $F_{2\alpha}$ 为天然前列腺素 F 型二类 α 异构体的人工合成物,亦称为律胎素,与前列腺素有类似的作用功效。氯前列烯醇是人工合成的前列腺素类似物,兽医临床上广泛应用于诱导家畜同期发情、同期分娩及卵巢、子宫疾病的治疗等方面^[7]。D-氯前列烯醇对黄体的退化作用和子宫的收缩作用表现最强,是前列腺素 $F_{2\alpha}$ 的 50 倍,DL-氯前列烯醇次之,L-氯前列烯醇无效;显示相同药效时,所用的 D-氯前列烯醇的剂量约为 DL-氯前列烯醇的 1/3,因此毒性低;对非靶器官作用不强,故副作用小;进入卵巢和子宫的速度和分布的浓度均比 DL-氯前列烯醇更快更高,从体内排出快,残留时间短^[8]。基于上述原理,可使用前列腺素 $F_{2\alpha}$ 和氯前列烯醇诱导母猪同期分娩,但 D-氯前列烯醇临床效果较为确实,安全性最高。

2 药物的应用

药物诱导母猪同期分娩时,要明确母猪的妊娠天数,避免早产或流产。仔猪成活率与母猪妊娠天数有一定关系,对妊娠 103~106 天的母猪进行引产,仔猪常因太小不能成活,引产最好控制在妊娠 109 天以后。母猪分娩率与药物的用量有一定关系,长时间、大剂量地使用药物对母猪下一胎的发情、排卵有不良影响,故应控制好用药剂量。

2.1 前列腺素 $F_{2\alpha}$

前列腺素在分娩和泌乳启动中起着重要的作用^[9]。妊娠 110~113 天的母猪,做好妊娠期标记,臀部肌肉注射前列腺素 $F_{2\alpha}$ 10mg,详细记录药物的注射时间,注意观察母猪的乳房、阴门有无肿大等分娩预兆。据统计,妊娠 110 天的母猪,药物注射后 24~29 h 内开始分娩;妊娠 111 天的母猪,药物注射后 29~32 h 内开始分娩;妊娠 112 天的母猪,药物注射后 32~39 h 内开始分娩;妊娠 113 天的母猪,药物注射后 33~41 h 内开始分娩^[10]。由此可见,随着妊娠时间的延长,注射前列腺素 $F_{2\alpha}$ 到产仔之间的时间间隔有延长的趋势。为了将分娩时间控制在更小范围内,在注射前列腺素 $F_{2\alpha}$ 后 15~24 h 再注射 20 IU 催产素,母猪数小时后即可分娩。

使用前列腺素 $F_{2\alpha}$ 诱导分娩的母猪和自然分娩的母猪在产仔数、弱仔数、木乃伊胎数、活仔数、平均初生窝重、头平活仔重等项目上均无显著差异 ($P>0.05$),但死胎数差异极显著 ($P<0.01$);在

21 日龄仔猪断奶重、断奶仔猪成活率、断奶后母猪发情的间隔时间等项目上虽然无显著差异 ($P>0.05$),但前列腺素 $F_{2\alpha}$ 诱导分娩的母猪在各项指标上均占优势,特别是断奶后母猪发情的间隔时间平均缩短 0.88 天^[4]。

2.2 氯前列烯醇

妊娠 112~113 天的母猪,颈部肌肉注射 DL-氯前列烯醇 0.175 mg 或 D-氯前列烯醇 0.075 mg,注射药物后 24 ± 4.5 h 内开始正常分娩,其中大部分分娩集中在 24.5 h 左右^[1],配合注射 10 IU 催产素效果更加明显。注射 D-氯前列烯醇的母猪分娩的时间均比注射 DL-氯前列烯醇的母猪分娩的时间推迟约 2 h,是否与剂量有关,有待进一步研究^[11]。氯前列烯醇不仅可诱导正常妊娠母猪的分娩,也能用于诱导异常妊娠母猪的分娩,如死胎、木乃伊胎、过期不产等的分娩。妊娠大于 115 天的母猪,常于注射药物后 48 h 内产下弱胎、畸形胎、死胎或木乃伊胎。因氯前列烯醇能有效快速地溶解母猪卵巢上的持久黄体,增强子宫收缩,加速产后子宫内容物排出以及子宫的复原^[12],因此,同自然分娩的母猪相比,注射药物后母猪集中在白天分娩,其产仔间隔、胎衣和恶露排出时间明显缩短^[13]。DL-氯前列烯醇和 D-氯前列烯醇处理后母猪的产程差异不显著,D-氯前列烯醇处理后的经产母猪胎衣排出时间短于 DL-氯前列烯醇组^[14]。此外,用氯前列烯醇诱产,还可以显著提高哺乳仔猪的生长速度,这表明氯前列烯醇还有催乳的作用。

注射氯前列烯醇的母猪与自然分娩的母猪在产仔数、弱仔数、木乃伊胎数、活仔数、平均初生窝重、头平活仔数等方面差异不显著,说明使用氯前列烯醇诱导母猪同期分娩对仔猪没有产生不良影响。

3 结论

大量实验研究表明,使用前列腺素 $F_{2\alpha}$ 和氯前列烯醇诱导母猪同期分娩能获得很好的效果。药物诱导母猪同期分娩,对仔猪的生长发育和母猪的繁殖性能均无不良影响。妊娠母猪集中在白天分娩,便于猪场合理地调整人员,减轻员工劳动强度;便于仔猪进行交叉寄养,窝哺仔数均匀,母猪泌乳充足使仔猪生长发育一致,发病率明显降低;胎衣排出时间的缩短降低了产程中猪体的能量消耗,降低了死胎率。母猪集中断奶,提高了对

猪群特别是新生仔猪的管理,降低了管理成本,提高了生产效率,利于实行严格的卫生防疫措施,便于集约化生产管理,经济效益显著。

参考文献:

- [1] 王根荣,刘邦友,姜中其. 氯前列烯醇冷冻干燥剂诱导母猪同期分娩研究[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(6):368-371.
- [2] 冯书堂,陶涛,蔡正华. 诱导妊娠母猪白天分娩及其机理的研究[J]. 中国畜牧杂志, 1996, 32(3):6-8.
- [3] 韩春梅,高庆华,周虚. 氯前列烯醇诱导母猪同步分娩的效果[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(6):605-606.
- [4] 郑陶生,唐慧稳. 应用药物诱导母猪同期分娩的研究[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007(9):31-33.
- [5] 吴昌伟. 氯前列烯醇诱导母猪同期分娩的试验[J]. 贵州畜牧兽医, 2002, 26(5):1-2.
- [6] 侯书江. 前列腺素及氯前列烯醇在母猪同期分娩中的应用[J]. 畜禽业, 2000(10):31.
- [7] Borman J M, McCormack B L, Radcliff R P, et al. Synchronisation of oestrus in dairy cows using prostaglandin F-2 alpha, gonadotrophin-releasing hormone, and oestradiol cypionate[J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 76(4):163-176.
- [8] 滕井胜. D- 氯前列烯醇注射液的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(2):104
- [9] Barker I, Hartmann P E, Gooneratne A D. Influence of meclofenamic acid on the initiation of parturition and lactation in the sow[J]. *Journal of reproduction and fertility*, 1982, 65(1):157-162.
- [10] 王建辰,王德芳,孟祥奇,等. 前列腺素 15 甲基 F₂(2a)对母猪同期分娩的初步试验[J]. 中国畜牧杂志, 1980(1):26-28.
- [11] 王杏龙, Frank Duering. D- 氯前列烯醇诱导母猪同期分娩的试验[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(3):27-29.
- [12] 王杏龙,张成. 诱导母猪同期分娩的试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(10):27-28.
- [13] 吴旧生. 氯前列烯醇诱导大约克夏母猪同期分娩试验[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(2):48-50.
- [14] Cerne F. Induction of farrowing with cloprostenol on a commercial pig breeding farm in Yugoslavia [J]. *Vet Res*, 1978, 103(21):469-471.

(上接第 20 页)

同构型的共轭亚油酸是否存在协同效应。另外,共轭亚油酸在饲料中的最佳添加量,从分子生物学水平阐述其代谢机制,均需进一步研究。

参考文献:

- [1] 李舜. 共轭亚油酸对前体脂肪细胞增殖和分化的影响[D]. 合肥:安徽农业大学, 2007.
- [2] 刘佰阳. 共轭亚油酸对肉仔鸡脂类代谢及免疫性能的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2005.
- [3] 张广民,文杰,陈继兰,等. 共轭亚油酸对北京油鸡肉品质及血清和脂蛋白脂酶的影响[J]. 中国饲料, 2006, 15:17-20.
- [4] Lucchi L, Banni S, Iannone A. Changes in conjugated linoleic acid and palmitoleic acid are correlated to retino levels in chronic renal failure in both hemodialysis and conservative treatment patients[J]. *Artif Organs*, 2005, 29(5):413-418.
- [5] 尹福泉. 日粮调控对奶牛乳脂中共轭亚油酸含量影响的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006.
- [6] Szymczyk B, Pisulewski P M, Szczurek W. Effects of conjugated linoleic acid on growth performance, feed conversion efficiency, and subsequent carcass quality in broiler chickens[J]. *Br J Nutrition*, 2001, 5(4):465-473.
- [7] 张海军. 共轭亚油酸对肉仔鸡体组成和肉品质影响[J]. 中国饲料, 2006(18):21-24.
- [8] 陆春瑞. 共轭亚油酸对肉鸡生产性能及腹脂相关基因的影响[D]. 合肥:安徽农业大学, 2007.
- [9] 戴承仲,易昌华,贺建华,等. 共轭亚油酸对肉鸡生产性能和血液生化指标的影响[J]. 湖南畜牧兽医, 2005(6):1-13.
- [10] 郑洲,缪锦来. 共轭亚油酸对蛋鸡产蛋性能和蛋白质的影响[J]. 现代农业科技, 2008, 12:248-252.
- [11] 李晓轩,靳明明,田亚东,等. 共轭亚油酸对固始鸡蛋品质和血清生化指标的影响[J]. 河南农业科学, 2009(7):124-126.
- [12] 宾石玉,李洁,荣贾,等. 共轭亚油酸对蛋鸡生产性能及蛋黄脂肪酸含量的影响[J]. 中国饲料, 2009(7):26-28.
- [13] Ahn. Effects of conjugated linoleic acid on the quality characteristics of chicken eggs during refrigerated storage[J]. *Poult Science*, 1999, 78:922-928.
- [14] Aydin R. The effects of conjugated linoleic acid (CLA) and canola oil on the fatty acid composition and quality of eggs from laying hens[J]. *South African Journal of Animal Science*, 2005, 35(3):172-179.
- [15] 陈冬梅,张克英. 鸡蛋胆固醇的沉淀机制[J]. 动物营养学报, 2003, 15:41-46.
- [16] 郗艳菊,臧素敏,元娜,等. 共轭亚油酸对肉鸡生产性能及免疫指标影响的研究[J]. 中国家禽, 2009, 31(1):19-21.
- [17] 张海军. 共轭亚油酸对肉仔鸡免疫反应的调节作用与机理[D]. 北京:中国农业大学, 2005.
- [18] 刘佰阳. 共轭亚油酸对肉仔鸡脂类代谢及免疫性能的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2005.
- [19] 刘华. 共轭亚油酸对前体脂肪细胞 3T3-L1 的作用研究[D]. 南昌:南昌大学, 2007.
- [20] 郗艳菊. 共轭亚油酸对肉鸡肌肉品质、脂类代谢和免疫功能影响的研究[D]. 石家庄:河北农业大学, 2009.

花生粕的营养组成及其在禽料中的应用

徐运杰

(荆州湘大骆驼饲料有限公司, 湖北 荆州 434000)

摘要: 花生粕作为一种优质的蛋白原料越来越引起饲料企业的重视。文章详细论述了花生粕的营养组成及其在禽料中的应用, 以供饲料配方师和相关人员参考。

关键词: 花生粕; 苏氨酸; 肉鸡; 黄曲霉

中图分类号: S816.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0024-03

花生粕是花生仁经压榨提炼油料后的副产品, 通常花生粕分一次粕和二次粕。一次粕是经过初次压榨剩余的花生渣, 二次粕即压榨过两次的花生渣。通常花生的出油率在 55% 以上, 所以花生粕的产量相对比较少, 约 44% 左右。花生粕富含植物蛋白, 其口感较好, 是一种较理想的植物蛋白原料。

1 花生粕的营养组成

花生粕的营养组成因不同的品种、产地和加工工艺而有所差异。Batal 等^[1]分析了来自 5 个供

应商共 17 个花生粕样品的营养组成, 并用白来航公鸡进行代谢试验分析了花生粕的氮校正真代谢能(TME_n)和氨基酸的消化利用率; 梅娜等^[2]对花生粕的化学成分进行了系统的分析测定。两者结果见表 1 和 2。

分析表 1 数据, Batal 等^[1]测定的 17 个样品花生粕的粗蛋白平均值为 45.6%, 低于中国(2010)^[3]公布的数据 47.8%, 低于梅娜等^[2]的 48.68%, 低于法国(2002)^[4]的平均值 49%, 更低于

表 1 花生粕的概率养分组成及 TME_n 值(90%干物质)

样品	TME _n (Kcal/kg)	粗蛋白(%)	粗脂肪(%)	粗脂肪(%)	粗灰分(%)
平均	2664±171	45.6±2.8	2.47±2.47	8.30±2.05	5.02±0.59
低-高	2273~3009	40.1~50.9	0.68~5.97	5.77~12.60	4.31~7.01
中国 2010	2.60	47.8	1.4	6.2	5.4
法国 2002	2.17~2.41	48.9~49.2	0.9~3.4	6.80~12.00	5.9~6.0
梅娜(2007)		48.68	0.80		5.61

表 2 花生粕的平均氨基酸组成及消化率(%, 90%干物质)

氨基酸	Batal 等(2005)		中国 2010		法国 2002	梅娜(2007)
	含量	消化率	含量	消化率	含量	含量
Lys	1.54±0.12	84.6±2.7	1.40	78	1.59	1.17
Met	0.52±0.04	86.7±3.2	0.41	87	0.49	0.37
Cys	0.64±0.07	78.3±4.7	0.40	78	0.51	
Arg	4.96±0.39	89.6±1.7	4.88	89	5.63	-
Ile	1.54±0.12	87.9±2.3	1.25	87	1.60	1.32
Leu	2.89±0.21	89.6±2.1	2.50	90	3.04	2.59
Thr	1.17±0.08	81.0±2.8	1.11	84	1.30	1.55
Val	1.87±0.13	87.2±2.3	1.36	88	1.90	1.61
Try	0.45±0.03	93.1±0.7	0.45	-	0.56	-

NRC(1994)公布的数据 50.9%。但是,其平均 TME_n 值均高于中国饲料成分与营养价值表^[3]和法国^[4]公布的数据。由此可知,结果的变异生较大。所以,饲料生产厂家在进行配方调整时,应全面考虑花生粕的来源、品种和加工工艺之间的差异,如果条件许可,最好是进行全分析和代谢试验研究,参考分析结果进行配方的调整,以防盲目使用带来不必要的经济损失。

从表 2 数据可知,花生粕的精氨酸含量很高,是优质的精氨酸来源。但与豆粕相比,其赖氨酸和

蛋氨酸含量均较低。综合分析表 1 和表 2,中国饲料成分与营养价值表^[3]公布的花生粕的氨基酸含量似乎有点偏低,比较中国饲料成分与营养价值表^[3]和以前多年的数据,基本没有什么修订,因此,中国饲料成分与营养价值表中的相关数据有没有必要及时更新,值得有关专家的研究和商榷。

Batal 等^[1]研究还发现,与粗脂肪和粗灰分相比,花生粕的粗纤维含量对其 TME_n 值的影响最大,R² 是 0.25。有关花生粕的 TME_n 值与粗纤维、粗脂肪和粗灰分含量之间的回归关系见表 3。

表 3 花生粕 TME_n 值的预测方程(90%干物质)

变量	预测方程	R ²	CV (%)
粗纤维(x1)	TME _n =3001-41.1×x1	0.25	5.75
粗纤维、粗脂肪(x2)	TME _n =2985+42.0×x2-52.1×x1	0.39	5.36
粗纤维、粗脂肪粗灰分(x3)	TME _n =2728+27.5×x2-45.7×x1+49.5×x3	0.40	5.51

此外,Batal 等^[1]和梅娜等^[2]也分析测定了花生粕的矿物元素和维生素含量。由于在设计配方时,两者一般通过预混料添加,原料中的仅作为安全域量考虑,在此就不进行赘述。值得一提的是,花生粕中黄酮的含量较高,达 1.095 mg/g^[2]。

2 花生粕在禽料中的应用

早在 1946 年,Heuser 等^[5]报道,肉鸡日粮中花生粕与豆粕的理想搭配比例 50:50。但 Douglas 等^[6]报道,当花生粕替代 50%豆粕时,降低了肉鸡的生长率,赖氨酸是花生粕日粮的第一限制性氨基酸,日粮中花生粕与豆粕搭配比例 50:50 时,外源添加赖氨酸、蛋氨酸和甘氨酸后,其饲养效果等同于全豆粕型日粮,但在全花生粕型日粮中,即使添加了赖氨酸、蛋氨酸和甘氨酸,也严重抑制了肉鸡的生长。El Boushy 等^[7]研究发现,日粮中花生粕配比从 5%增加到 15%时,即使日粮中赖氨酸和蛋氨酸充足,肉鸡的生长和饲料效率都降低,原因可能是日粮中含铁过高,达到 NRC(1994)^[8]推荐量的 6.5 倍。Carew 等^[9]研究发现,蛋氨酸是花生粕型日粮中的第一限制性氨基酸,原因是在花生粕型日粮中单独添加蛋氨酸改善了肉鸡的生长性能,而只添加赖氨酸并没有起到改善作用。Suswanto 等^[10]报道,如果肉鸡日粮中肉骨粉提供了 43%的粗蛋白,余下的 57%的粗蛋白由花生粕和

豆粕按 63:35 的搭配比例提供,饲料的饲养效果不但等同于肉骨粉—豆粕型日粮,且日粮的代谢能与花生粕呈正相关性。Costa 等^[11]进行了 4 个试验研究,试验 1 和 3 表明,玉米—花生粕型日粮中添加苏氨酸改善了肉鸡的日增重,降低了饲料效率;试验 2 表明,随着日粮中花生粕配比的增加(0%~32%),负面影响了肉鸡的日增重和饲料效率;试验 4 表明,肉鸡在 18~42 日龄生长期,对于生长和料肉比来说,粗蛋白来源和水平之间存在明显的交互作用。

Pesti 等^[12]报道,苏氨酸是花生粕的严重限制性氨基酸,常用来配制苏氨酸缺乏型日粮。这与 Rangel-Lugo 等^[13]的报道一致。Pesti 等^[12]比较研究了花生粕(21%~35%)与豆粕型(20%~33%)日粮对 22~34 周龄白来航蛋鸡生产性能的影响,在添加苏氨酸、色氨酸、蛋氨酸和赖氨酸的情况下,两者之间的产蛋率、蛋重并没有差异,26~30 周龄时,花生粕试验组蛋的内部质量优于豆粕对照组,但在开始的 6 周,试验组蛋重稍轻于对照组。综合比较,花生粕是蛋鸡较优质的蛋白原料。

3 影响花生粕质量的因素

3.1 温度和压力

Ye Zhang 等^[14]在 120 °C 和 105 kPa 条件下分别处理花生粕 0、20、30、40、50、60 和 90 min,

研究了热压处理对花生粕质量的影响,结果表明,经热压处理后,0.2%KOH蛋白溶解度从0 min的78%降到90 min的56%,氨基酸的消化率随着热压处理时间的延长而降低,特别是赖氨酸消化率的影响最大,从0 min的87%降到90 min的57%。

3.2 外源酶

Driver等^[15]研究了植酸酶对花生粕TMEn的影响,结果表明,植酸酶增加了花生粕型日粮的TMEn值,改善率约9%,从3 209 kcal/kg增加到3 559 kcal/kg。

3.3 黄曲霉毒素

花生粕是黄曲霉滋生的良好载体,花生粕如果水分偏高、或者保存环境湿度过高,温度适宜(25~40℃),很容易滋生黄曲霉,导致黄曲霉毒素超标,这是在实际应用中一定要注意的问题。黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉产生的杂环化合物,它的代谢产物主要有B₁、B₂、G₁、G₂、M₁和M₂等类型。黄曲霉毒素非常耐热,只有通过长时间高温(100~120℃)作用,如高压消毒和锻烧才能使其大部分失活。在一般情况下,巴氏消毒法或饲料制粒的蒸气压力和温度(0.2~0.4 MPa和85~95℃)并不足以使黄曲霉毒素完全灭活。这些毒素对强酸和强碱较敏感。因此,在提炼油时,用氢氧化钠萃取游离脂肪酸的工艺可以进一步破坏毒素的活性。一般来说,合格花生粕的水份含量小于12.5%,粗蛋白水平大于45%,粗灰分小于8%,粗纤维小于11%,黄曲霉毒素B₁小于50 μg/kg。

4 小结

综上所述,花生粕是以脱壳花生为原料经有机溶剂提取或预压浸提法提取油脂后的副产品,粗蛋白含量高。虽然低含量的赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸影响了花生粕蛋白的内在质量,但只要通过与几种蛋白原料合理搭配使用(如与蛋氨酸含量最高的芝麻粕)和外源添加合成氨基酸,花生粕是一种非常有竞争力的植物蛋白原料。根据经验,只要黄曲霉毒素不超标,建议脱壳花生粕在中大禽料中使用量5%~10%,且蛋禽料中的用量大于肉禽料中的用量。另外,为了避免黄曲霉毒素中毒,花生粕在幼禽中最好不要使用。

参考文献:

- [1] Batal A, Dale N, Cafe M. Nutrient Composition of Peanut Meal[J]. *J Appl Poult Res*, 2005, 14:254-257.
- [2] 梅娜, 周文明, 胡晓玉, 等. 花生粕营养成分分析[J]. *西北农业学报*, 2007, 16(3):96-99.
- [3] 熊本海, 庞之洪, 罗清尧. 中国饲料成分与营养价值表(2010年第21版)[J]. *中国饲料*, 2010, 21:33-52.
- [4] 譙士彦, 王旭, 王德辉等译. 饲料成分与营养价值表[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005:150-152.
- [5] Heuser G F, Norris L C, McGinnis J. Vegetable protein concentrates fed alone and in combination with soybean oil meal as the chief supplementary protein in chick starting rations[J]. *Poultry Sci*, 1946, 25:130-136.
- [6] Douglas C, Harms R H. Peanut oil meal as a source of protein in broiler diets [J]. *Poultry Sci*, 1959, 38:786-790.
- [7] El Boushy S R, Raterink R. Replacement of soybean meal by cottonseed meal and peanut meal or both in low energy diets for broilers [J]. *Poultry Sci*, 1989, 68:799-804.
- [8] National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry[M]. 9th rev ed. National Academy Press, Washington, DC, 1994:98-118.
- [9] Carew S N, Olomu J M, Ofhiong S A. Amino acid supplementation of ground nut meal protein in broiler diets[J]. *J Trop Agric*, 1988, 65:329-332.
- [10] Suswanto H, Jones G P D. The replacement of soy-bean meal with peanut meal in broiler diets containing animal protein concentrate[C]. Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium. *World's Poultry Science Association* (Australian Branch), Sydney NSW, Australia, 1996:211-218.
- [11] Costa E F, Miller B R, Pesti G M, et al. Studies on Feeding Peanut Meal as a Protein Source For Broiler Chickens[J]. *Poultry Science*, 2001, 80:306-313.
- [12] Pesti G M, Bakalli R I, Driver J P, et al. Comparison of Peanut Meal and Soybean Meal as Protein Supplements for Laying Hens[J]. *Poultry Science*, 2003, 82:1274-1280.
- [13] Rangel-Lugo M, Su C L, Austic R E. Threonine requirement and threonine imbalance in broiler chickens [J]. *Poult Sci*, 1994, 73:670-681.
- [14] Ye Zhang, Carl M, Parsons. Effects of Overprocessing on the Nutritional Quality of Peanut Meal[J]. *Poult Sci*, 1996, 75:514-518.
- [15] Driver J P, Atencio A, Edwards H M, et al. Improvements in Nitrogen-Corrected Apparent Metabolizable Energy of Peanut Meal in Response to Phytase Supplementation[J]. *Poultry Science*, 2006, 85:96-99.

鸭出血性卵巢炎广东病例报道及其 RT-PCR 方法的建立

王林川^{1,3}, 李庆阳¹, 陈瑞爱^{1,3}, 陈芳艳², 刘平¹, 张秀^{1,3}, 冯金牛¹

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 3. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要: 本文对广东省内 9 个白鸭种蛋鸭场发生的鸭出血性卵巢炎症状、病变、流行情况进行了报道, 并建立能从病死鸭肝脾组织直接进行特异性 RT-PCR 的快速检测方法。

关键词: 鸭出血性卵巢炎; 病原分离; RT-PCR

中图分类号: S858.32

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0027-02

Duck hemorrhagic ovaritis in Guangdong province and the construction of a RT-PCR detection method

Wang Linchuan^{1,3}, Li Qingyang¹, Chen Rui-ai^{1,3}, Chen Fangyan^{1,3}, Liu Ping¹, Zhang Xiu^{1,3}, Feng Jinniu¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Guangdong Dahua Animal Health Products Co., Ltd, Yunfu 527400, China)

Abstract: In this paper, the symptom, lesion and epidemiology of duck hemorrhagic ovaritis happened in nine white breed duck farms in Guangdong province were introduced, and the specific RT-PCR detection method for it was developed also using livers and spleens of dead ducks.

Key words: Duck hemorrhagic ovaritis; pathogen isolation; RT-PCR

鸭出血性卵巢炎(duck hemorrhagic ovaritis, DHO; 暂定名), 是由一种黄病毒引起的新疫病, 其特征是蛋鸭、种鸭采食量迅速下降、产蛋率急速下降、甚至停产及不同程度死亡, 卵泡变性、变形, 卵泡膜充血、出血、局部呈紫黑色。该病自 2010 年 4 月初以来, 已有报道在我国江苏、浙江、山东、福建等省得到确诊^[1,2]。本课题组 2010 年 4 月起从江苏、重庆、广西、山东等地的鸭病疫情中开展了鸭减蛋综合症的研究工作, 从 2010 年 10 月起, 陆续从广东的临床表现产蛋骤降的病死种蛋鸭中经无菌采集卵巢及其它病变器官, 分离出了鸭出血性卵巢炎黄病毒病原, 并建立了从病死鸭组织中进行病毒特异性基因检测的 RT-PCR 快速检测方法。现将广东病例情况及研究工作简报如下:

1 广东病例的临床表现

从广东省东北部、珠三角区域的 9 个白鸭种

(蛋)鸭养殖场、专业户送检和现场病例中了解到, 该病主要见于刚开产至开产 2~3 个月的蛋种鸭; 鸭群患病后第 1 天表现为减料, 第二天起即有少量减蛋, 至第 4~5 天左右从产蛋高峰或高产蛋率迅速下降至 20%~30%, 严重的于发病后 4~7 天左右停产; 群内发病率几乎 100%, 病死率为 0%~8%, 同一鸭场内发病病程可达 1 个月时间; 刚开产种(蛋)鸭感染两周后产蛋率缓慢上升, 但长时间低产蛋率或无产蛋高峰出现。剖检病变主要表现为卵泡变性、变形, 卵泡膜充血、出血、局部呈紫黑色, 其它脏器病变表现不明显, 部分病死鸭表现为浆膜炎病变。

经调查, 9 个发病鸭场所在蛋种鸭养殖区域内的所有养殖场先后发生过该病。有的养殖场在 2010 年冬发生过同类疫病, 在 2011 年新进鸭群中再次发生。说明本病传染性极强, 且可能在发病

鸭场中保贮有该病毒, 一段时间后能使无免疫力的新开产鸭感染发病。

由于该疫病临床表现与禽流感极为相似, 但在免疫过 H₅、H₉ 禽流感灭活疫苗的鸭场还出现严重疫情, 因此, 临床确诊存在一定困难。

2 鸭出血性卵巢炎 RT-PCR 快速检测方法的建立

2.1 材料

2.1.1 病料及处理 检测病料为送检到华南农业大学兽医学院实验室或到发病鸭场现场采集的病死鸭肝脾组织; 对照用的鸭出血性卵巢炎黄病毒 GDNS10 株 (广东中山南沙株, 2000)、GDSJ11 株 (广东中山三角株, 2011) 为课题组所在实验室分离鉴定和保存; 禽流感 H₅ 亚型疫苗病毒 (H₅N₁, AIV, Re-4 株, 热灭活)、新城疫病毒 (NDV, La Sota 株) 由广东大华农动物保健品股份有限公司提供。

2.1.2 RT-PCR 引物 按已报道的鸭出血性卵巢炎黄病毒 E 基因、禽流感 H₅ 亚型病毒 HA 基因、新城疫病毒 F 基因中特异序列设计 RT-PCR 引物, 其扩增的片段跨度长分别为黄病毒 401 个碱基、NDV 522 个碱基、H₅ AIV 490 个碱基。

2.1.3 主要试剂及试剂盒 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver 4.0 和 DNA Marker DL2000、DNA Marker DL1000 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 氯仿、异丙醇、乙醇、异戊醇、氯化钠等均为国产分析纯试剂。

2.2 RT-PCR 快速检测方法

2.2.1 方法的特异性鉴定 用鸭出血性卵巢炎黄病毒 GDNS10 株或 GDSJ11 株, 与禽流感 H₅ 亚型疫苗病毒 (H₅N₁ Re-4 株, 热灭活)、新城疫病毒 (La Sota 株) 的混合物作为检测样品, 11 日龄健康 SPF 鸡胚液为平行对照。

技术流程: 病毒 RNA 核酸提取用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver 4.0 试剂盒, RT-PCR 一步扩增用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 20 试剂盒, 分别只加 3 种病毒的 RT-PCR 引物。反应条件如下: 50℃ 30 min, 94℃ 2 min; 然后 94℃ 30s, 48.9℃ 30s, 72℃ 90s, 循环 35 次; 之后, 4℃ 保存; 扩增产物的电泳检测。

2.2.2 诊断和检测技术的应用 用 9 个鸭场的疑似鸭出血性卵巢炎临床病死鸭肝脾组织进行,

检验该 RT-PCR 诊断和检测技术的有效性, 并与鸭胚分离法同步进行。

2.3 结果

2.3.1 检测结果 本方法检测混合病毒样品, 在用单个病毒引物时只能扩增出对应的鸭出血性卵巢炎黄病毒 E 基因、禽流感 H₅ 亚型病毒 HA 基因、新城疫病毒 F 基因内的设定特异片段 (见图 1), 说明该技术特异性良好。

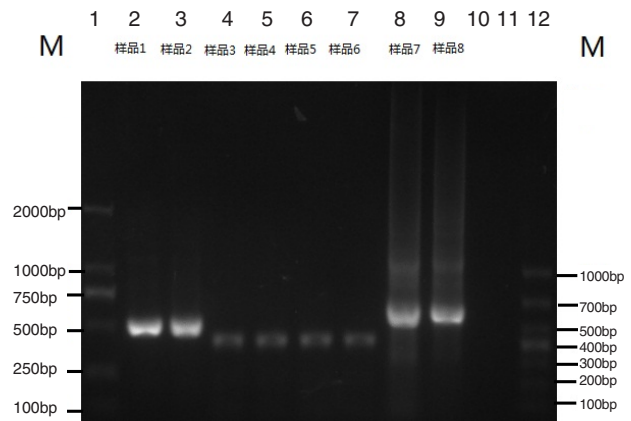


图 1 鸭出血性卵巢炎黄病毒诊断和检测技术的特异性试验结果

泳道 2、3: H₅ AIV 引物; 泳道 4、5: 黄病毒引物及 GDNS10 株; 泳道 6、7: 黄病毒引物及 GDSJ11 株; 泳道 8、9: NDV 引物; 泳道 10、11: SPF 鸡胚液对照; 泳道 1、12: DNA Ladder 精确分子量 Marker

2.3.2 检测方法的应用结果 9 个疑似鸭出血性卵巢炎鸭场临床病死鸭肝脾组织都可直接扩增出鸭出血性卵巢炎黄病毒 E 基因内的设定 401 个碱基特异片段 (见图 2), 4 h 内出结果; 平行的 9 份病料鸭胚病毒分离方法有 6 份出阳性结果, 需耗时 4~6 d。说明本技术特异、敏感、快速, 对指导临床防控工作有重要意义。

3 结语

3.1 从分离病毒的基因 PCR 鉴定及 9 个发病鸭场的临床病料中检测到黄病毒基因和病毒分离结果, 确定广东省内已发生并存在有鸭出血性卵巢炎疫情。该病的诊断和检测技术及有效疫苗的研制和应用研究是当前的主要问题。

3.2 本文建立的鸭出血性卵巢炎病死鸭组织的 RT-PCR 快速检测方法特异性好, 能区分鸭出血性卵巢炎黄病毒、H₅ 亚型禽流感病毒、新城疫 (副粘) 病毒的感染, 并能从病死鸭的肝脾组织中从病毒

(下转第 31 页)

一株鸡肾型传染性支气管炎病毒的分离与鉴定

邹立宏¹, 翟含流²

(1. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071001; 2. 河北省保定市北市区动物卫生监督所, 河北保定 071001)

摘要: 从山东某鸡场疑似肾型传染性支气管炎病死鸡的肾脏中分离到一株病毒, 经 SPF 鸡胚连续传代、血凝试验、鸡新城疫干扰试验、鸡胚矮化试验、RT-PCR 鉴定和动物回归试验, 初步确定该病毒为肾型传染性支气管炎病毒, 并命名为 SD1105 株。

关键词: 传染性支气管炎; 病毒; 分离鉴定

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0029-03

Isolation and identification of kidney-type strain of avian infectious bronchitis virus

Zou Lihong¹, Zhai Hanliu²

(1. Rinpu(Baoding) Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Baoding 071001, China; 2. Beishi District Animal Health Supervision Institute, Baoding 071001, China)

Abstract: A strain of infectious bronchitis virus was isolated from chickens suffered from kidney lesions. The strain was detected by hemagglutination test, dwarfing embryonated chicken eggs, ND interference test, reverse transcription polymerase chain reaction test and animal regression test. The results showed that the strain was a nephropathogenic infectious bronchitis virus and was named SD1105.

Key words: Infectious bronchitis; Virus; Isolation and identification

鸡传染性支气管炎(Infectious Bronchitis, IB)是由冠状病毒科冠状病毒属的传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus, IBV)引起的一种急性、高度接触性传染病,它主要侵害呼吸系统、泌尿生殖系统和消化系统^[1]。1982年,邝荣禄等^[2]在国内首先报道了肾型IBV,此后,北京、上海等地相继报道,目前,该病已蔓延至全国各地,给养鸡业造成了巨大的经济损失。本研究对病死鸡的肾脏材料进行了病毒分离,对该病毒进行了系列试验,最终鉴定该病毒为传染性支气管炎病毒(1BV),并命名为SD1105株。

1 材料与方法

1.1 材料

9~11日龄SPF鸡胚和15日龄SPF鸡均购自北京梅里亚-维通实验动物技术有限公司;PCR

反应试剂均购自宝生物工程有限公司;病毒RNA提取TRIZOL试剂和M-MLV试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 病料及其背景

2011年5月山东某肉鸡场出现疑似IB的发病鸡群,鸡群表现精神不振、呼噜、咳嗽,鼻腔内有粘液,拉白色粪便。剖检发现气管环出血,肾脏肿大,其他脏器未见异常。为探究本次发病原因,采集病死鸡的肾脏进行病毒分离与鉴定。

1.3 鸡胚接种与传代

无菌采集病死鸡肾脏,放入研钵中剪成小块,加入灭菌的PBS冲洗,洗去红细胞,反复2~3次。然后将病料加入研磨器中磨碎,加少量灭菌PBS液稀释,反复冻融3次后,5000 r/min离心10 min,取上清,用0.22 μm的滤膜滤过除菌。将滤液

接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 37 °C 培养 72 h (弃去 24 h 死亡鸡胚), 无菌收取鸡胚尿囊液并连续盲传 3 代。同时留 5 枚活胚培养至 17 日龄, 观察胚体的变化。

1.4 病毒血凝性测定

一组用 1% 鸡红细胞测定各代鸡胚尿囊液血凝性, 另一组用终浓度 1% 胰酶 37 °C 处理 4 h, 再按常规方法作 HA 试验。观察和记录试验结果, 确定其是否有血凝性。

1.5 新城疫病毒增殖干扰试验

将第 3 代 IBV 分离株进行 1:10 倍稀释, 尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 枚, 37 °C 孵化 10 h 后, 其中 5 枚再接种 NDV LaSota 株, 并设 NDV LaSota 株对照组。37 °C 再孵育 48 h 后收取尿囊液, 测定血凝价。

1.6 半数鸡胚感染量(EID₅₀)的测定

将第 3 代分离株稀释成 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 共 5 个稀释度, 每个稀释度各接种 10 日龄的 SPF 鸡胚 5 枚, 同时设空白对照。将鸡胚置 37 °C 温箱内孵育 1 周, 观察、记录 1 周内鸡胚的感染数和存活数, 按 Reed Muench 法计算 EID₅₀。

1.7 引物设计与合成

参照 Zwaagstra 等^[3]报道, 选取 IBV N 基因的 5' 端的一段保守序列, 用 Primer5.0 软件和 Oligo 6.0 软件设计上、下游引物, 预计扩增长度为 438 bp。由北京擎科生物技术有限公司合成。

上游引物 PN1: 5'-GTC TTG TCC CGC GTG TA-3'
下游引物 PN2: 5'-ACC CTT ACC AGC AAC CC-3'。

1.8 RT-PCR 鉴定

按照 TRIZOL 试剂盒的操作说明, 从第 3 代含毒尿囊液中提取病毒 RNA, 按参考文献^[4]进行反转录与 PCR 扩增, 从分子水平作进一步鉴定。

1.9 动物回归试验

用 10⁻⁶EID₅₀ 的分离株通过滴鼻途径感染 15 日龄 SPF 雏鸡 10 只, 0.2 mL/只; 对照组 5 只, 滴鼻点眼接种无菌生理盐水, 0.2 mL/只; 隔离饲养, 每日观察 2 次, 连续观察 14 d, 记录鸡只发病情况。

2 结果

2.1 鸡胚接种与传代

取第 3 代尿囊液接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 观察、结果表明胚体蜷曲成球形, 趾爪变形并紧抱头

部, 羊膜增厚紧裹胚体, 胚体明显小于正常鸡胚。鸡胚病变照片见图 1。

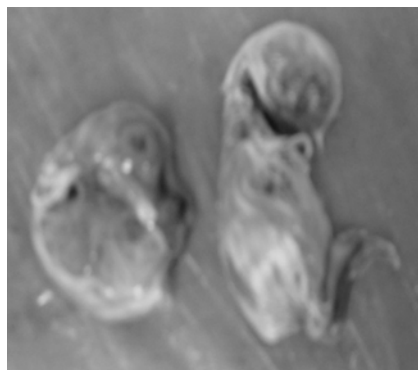


图 1 F3 代侏儒胚

左侧为侏儒胚; 右侧为正常对照

2.2 病毒血凝性测定

未经胰酶处理的各代尿囊液的血凝价为 0, 经胰酶处理后尿囊液的血凝价为 6 log₂。

2.3 新城疫病毒增殖干扰试验

接种分离株的鸡胚尿囊液无血凝性, 单独接种 NDV LaSota 的鸡胚尿囊液的血凝价为 8 log₂, 接种分离株 10 h 后再接种 NDV LaSota 株的鸡胚尿囊液的血凝价为 2 log₂, 说明分离株对 NDV 有干扰作用。

2.4 半数鸡胚感染量(EID₅₀)的测定

收获的尿囊液病毒经鸡胚半数感染量的测定, 结果 EID₅₀ 的值为 1 × 10^{-6.25}/mL。

2.5 RT-PCR 鉴定

采用 RT-PCR 技术, 成功地扩增出 IBV N 基因的特异性片段, 片段大小约为 438 bp, 与预期结果相符。结果见图 2。

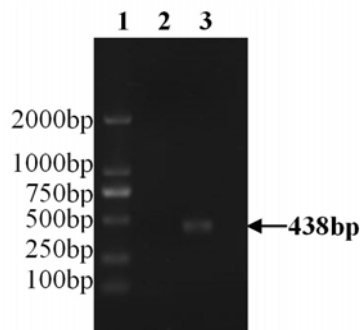


图 2 分离毒 N 基因片段 RT-PCR 产物

1: 标准 Marker DL2000; 2: 阴性对照; 3: 分离毒的部分 N 基因片段

2.6 动物回归试验

动物试验结果表明: 攻毒后 3 d 10 只鸡均发

病。表现精神沉郁、咳嗽、呆立、嗜水,拉白色水样稀便。攻毒后 5 d 开始死亡,死亡率为 60% (6/10)。剖检可见肾苍白、肿胀,输尿管和肾小管内充满白色尿酸盐(见图 3),呈现出鸡传染性支气管炎典型的临床表现和病变特征。对照组未出现异常症状。

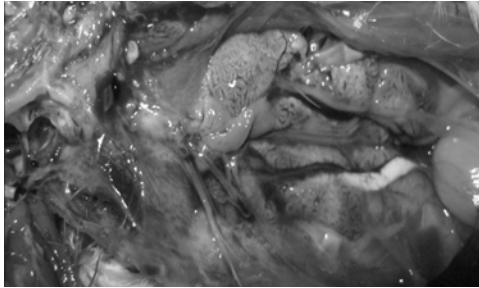


图 3 动物回归试验肾脏苍白肿大

3 讨论

目前,IB 已在我国广泛流行,其中主要以肾病变型为主,自 20 世纪 90 年代以来,不断有分离到新的 IBV 毒株或变异株的报道^[5,6]。本研究中病料接种鸡胚后,传至第 3 代开始出现胚体发育受阻、卷曲胚、侏儒胚等,经一系列的生物学特性试验证实本试验所分离的病毒为 IBV。动物回归试验表现为肾脏肿大、尿酸盐沉积,因而可以认为它为嗜肾型传染性支气管炎病毒,命名为 SD1105。

刘兴友等^[7]报道人工感染 SPF 鸡后,病鸡出现轻度呼吸道症状,拉白色稀粪,饮水增加;病死鸡肾脏肿大,输尿管内有大量尿酸盐沉积,拉白色或黄色稀粪,其他器官未见异常变化。本试验用分离株攻毒后,试验鸡的临床症状和肉眼病变观察与上述描述一致。

参考文献:

[1] B W 卡尔尼克主编. 李福, 苏政民主译. 禽病学[M]. 第十版. 北京: 中国农业出版社, 1999:653-665.
 [2] 邝荣禄. 鸡传染性支气管炎肾病变型在广东的发现[J]. 养禽与禽病防治, 1982(3):44.
 [3] Zwaagstra K A, van der Zeijst B A M, J G Kusters. Rapid Detection and Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus [J]. *American society for Microbiology*, 1992, 30:79-83.
 [4] 王和平. IBV 在 CEK 细胞传代过程中 S1 基因变化的研究[D]. 东北农业大学. 2007:20-22.
 [5] Li H, Yang H C. Sequence analysis of nephropathogenic infectious virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing[J]. *Avian Pathol*, 2001, 30:535-541.
 [6] 张庆霞, 韩宗玺, 邵昱昊, 等. 中国 2000-2004 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株核蛋白基因的遗传变异分析[J]. 中国病毒学, 2006, 21(6):575-580.
 [7] 刘兴友, 何宏轩, 姚四新, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 TJ9602、HN9604、BJ9601 分离株特性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12):1323-1328.

(上接第 28 页)

基因水平上快速地(4 h 内)检测鸭黄病毒感染。

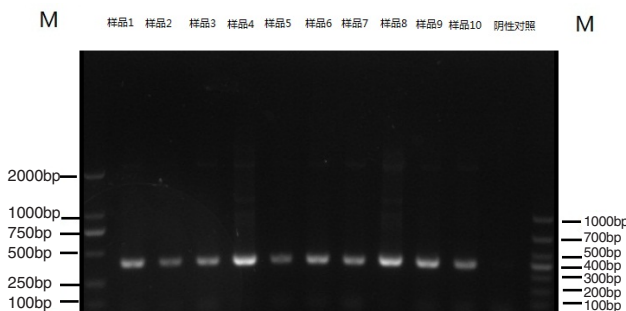


图 2 鸭出血性卵巢炎诊断和检测技术的应用结果

样品 1: 鸭出血性卵巢炎黄病毒 (GDNS10 株) 培养物; 样品 2-10: 9 个疑似鸭出血性卵巢炎发病种蛋鸭临床病死鸭肝脾组织; 阴性对照为健康蛋种鸭肝脾组织; 两边泳道是 DNA Ladder 精确分子量 Marker。

在鸭的减蛋综合症中,现存在三类病原:特异型大肠杆菌引起的表现为经常性个别死亡的蛋子瘟、H₅ 亚型禽流感或副粘病毒引起的较大减蛋和新发生的鸭黄病毒引起的急剧减蛋。本研究技术的建立为基层兽医及蛋种鸭场开展病毒性减蛋疫情的快速确定提供了有效工具。

3.3 本研究中分离鉴定出多株鸭黄病毒广东地方株, 这为该类疫病的灭活疫苗及弱苗疫苗的研制奠定了良好基础。

参考文献:

[1] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(12):3-6.
 [2] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋)鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2010, 25(6):663-666.

一例雏鸡铜绿假单胞菌的分离鉴定及其16SrRNA 基因序列分析

卢受昇, 孔令辰, 罗晶璐, 孙彦伟

(广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

摘要: 为对死亡雏鸡进行病因诊断, 通过大体剖检、细菌分离、生化鉴定, 证实为铜绿假单胞菌感染。测定了该分离株的16S rRNA 基因序列, 并与 GenBank 中收录的序列比较, 结果发现所分离的铜绿假单胞菌及参考株的16S rDNA 基因序列极其保守, 相似性达99%~100%; 与大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌的相似性差异约为9%; 与鸭疫黑默氏杆菌的相似性差异则更大, 超过18%, 提示16S rRNA 序列测定可作为该菌鉴定的一种可靠方法。

关键词: 铜绿假单胞菌; 分离鉴定; 16S rRNA; 序列分析

中图分类号: S855.1*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0032-04

Isolation, identification and 16S rRNA gene analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strain GDC10 isolated from the chicken

Lu Shousheng, Luo Jinglu, Kong Lingchen, Sun Yanwei

(Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, China)

Abstract: In this experiment a bacteria strain isolated from one dead chicken was identified as *Pseudomonas aeruginosa* by morphological characteristics, cultural characteristics and biological characterization. The 16s rRNA gene sequence of this bacteria was also obtained by PCR with a pair of common primers. This strain was closely related to the strains of *Pseudomonas aeruginosa* after the 16s rRNA sequence of this strain was blasted in GenBank. The nucleotide sequence homology was from 99% to 100% between this strain and reference *Pseudomonas aeruginosa* strains. The discrepancy was about 9% between this strain and *E.coli.*, *Salmonella* or *Pasteurella* strains. The discrepancy was more than 18% between this strain and *Riemerella* strains. These results showed that sequencing of 16S rRNA gene was a useful method for identifying the bacteria.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; isolation and identification; 16S rRNA genes; sequence analysis

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 又称绿脓杆菌, 是一种获得性感染的条件致性病菌, 抵抗能力较差的雏禽易引发严重感染。2010年7月, 某孵化场2万羽雏鸡卖给农户后1~2 d发病, 出现精神沉郁, 继而大量死亡, 发病率100%, 死亡率10%~20%, 疑为注射马立克氏疫苗所致。经诊断后, 按药敏结果指导用药, 病情得到迅速控制。现将病理剖检、细菌分离、药敏试验、生化鉴定及其16S rRNA 基因序列测定等诊断过程介绍如下, 供读者参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料 疑为注射马立克氏疫苗后死亡的2日龄病死雏鸡, 由某孵化场送检。

1.1.2 主要仪器与试剂 营养琼脂、血液琼脂、麦康凯琼脂培养基为广州环凯微生物科技有限公司产品, 在使用时自行配制; 全自动微生物鉴定系统 VITEK-32、GNI⁺、NFC 细菌生化鉴定卡, 革兰氏染色液均为法国梅里埃公司产品; 药敏试纸为杭州天和微生物试剂有限公司产品; PCR 预混试剂 Premix Ex、载体 pMD18-T、DH5 α 感受态细胞均为宝生物工程(大连)有限公司产品; DNA 回收试剂盒 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 剖检与细菌分离 常规方法对病死雏鸡进行剖检。无菌操作采集 4 只病死雏鸡的肝脏、卵黄囊和颈部马立克氏疫苗接种部位组织, 分别接种于营养琼脂、血液琼脂、麦康凯琼脂平板培养基, 37 °C 培养 24 h。

1.2.2 生化试验 将细菌的纯培养物进行氧化酶试验, 结果为阳性。再选用梅里埃细菌生化鉴定卡 GNI⁺、NFC, 在 VITEK-32 全自动微生物鉴定系统中进行鉴定。

1.2.3 药敏试验 按试剂说明书进行。

1.2.4 16SrRNA 序列的测定 引物采用细菌 16S rRNA 通用引物 R1492: 5' -TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), F27: 5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' , 扩增长度约为 1 500 bp, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。PCR 扩增采用 50 μL 体系, Premix EX 25 μL、上下游引物各 1 μL、去离子水 20 μL、菌液 3 μL; 反应程序为 95°C 30s, 53°C 30s, 72°C 90s, 30 个循环; 72°C 延伸 8 min。产物电泳后回收后, 与载体 PMD18-T 连接, 转化到 DH5 α 中, 经克隆鉴定后送生工生物工程(上海)有限公司测序。

2 结果

2.1 病理剖检

剖检病死雏鸡 20 余只, 未见注射马立克氏疫苗的颈部皮下有肉眼可见病变, 但肝脏肿大, 呈黄色, 有淤血斑; 输尿管有白色尿酸盐沉积; 部分鸡只有脐炎。见图 1。



图 1 肝脏黄色有淤血斑

2.2 细菌培养及染色特性

从肝脏(4/4)、卵黄囊(4/4)、颈部皮下(3/4)分离到菌落形态较一致的一种细菌。在营养琼脂上为淡灰色; 血液琼脂上为淡绿色, 呈 β 溶血; 麦康凯琼脂上为褐色的中等偏大的菌落或菌苔。见图 2。

取纯培养物进行革兰氏染色, 结果为革兰氏阴性、多单个散在或成双排列中等大小的杆菌, 见图 3。

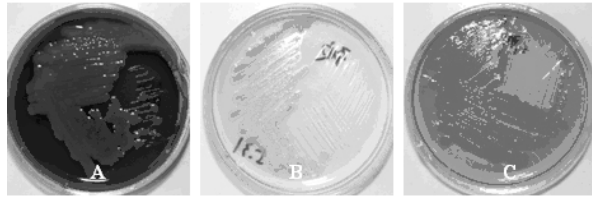


图 2 细菌在三种培养基上的生长特性
注: A: 血液琼脂; B: 营养琼脂; C: 麦康凯琼脂

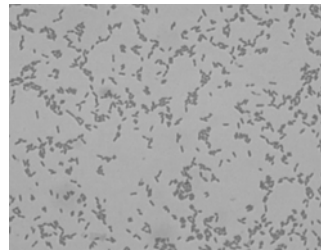


图 3 革兰氏染色结果

2.3 生化鉴定结果

经全自动微生物鉴定系统 VITEK-32 的 GNI⁺、NFC 卡的鉴定结果均为 *Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌), 鉴定值分别为 98% 和 99%。具体生化特性见表 1 和表 2。

表 1 GNI⁺卡 Vitek-32 全自动微生物鉴定系统生化鉴定结果

生化项目	结果	生化项目	结果
三氯新	+	棉子糖	-
葡萄糖氧化	+	山梨醇	-
阳性生长控制	+	蔗糖	-
乙酰氨	+	肌醇	-
七叶树苷	-	侧金盏花醇	-
植尿尿蓝母	-	香豆酸	-
尿素	-	硫化氢	-
枸橼酸盐	+	β 半乳糖苷酶	-
丙二氨酸	+	鼠李糖	-
苯丙氨酸	-	阿拉伯糖	-
多粘菌素	+	葡萄糖发酵	-
乳糖	-	精氨酸	+
麦芽糖	-	赖氨酸	-
甘露醇	+	鸟氨酸	-
木糖	+	10%乳糖	-

2.4 药敏试验结果

纸片法药敏试验结果为先锋必、环丙沙星、氧氟喹诺酮素、氟派酸、阿米卡星、复达欣、妥布霉素

表 2 NFC 卡 Vitek-32 全自动微生物鉴定系统生化鉴定结果

生化项目	结果	生化项目	结果
生长基础培养基	+	柠檬酸	+
任二酸	-	乙酸钠	+
葵二酸	-	肌醇	-
辛二酸	-	甘露醇	+
丙酸	+	DL- 羟基丁酸	+
L- 脯氨酸	-	L- 天门冬氨酸	+
空白	-	阿拉伯糖	-
L- 组氨酸	+	半乳糖	-
L- 精氨酸	+	葡萄糖	+
N- 乙酰葡萄糖胺	+	麦芽糖	-
己二酸	-	松三糖	-
葡萄糖酸	+	甘露糖	-
DL- 乳糖	+	蔗糖	-
衣康酸	+	海藻糖	+
庚酸	+	木糖	-

和庆大霉素等高度敏感; 菌必治、链霉素和卡那霉素等敏感; 氯霉素、强力霉素低敏; 四环素、万古霉素、红霉素、青霉素 G、氨苄青霉素、头孢拉定、先锋 V、头孢呋肟、痢特灵、呋喃妥因和复方新诺明等完全耐药。

2.5 扩增结果

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 可见约 1 500 bp 的特异条带(图 4), 与预期大小相符。

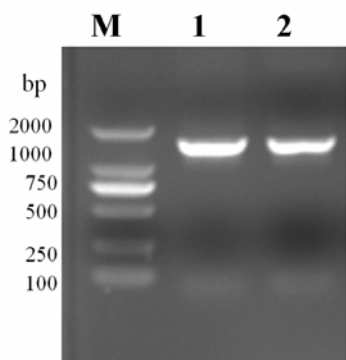


图 4 PCR 扩增结果

M: DNA Marker DL2000; 1: 颈部分离菌株; 2: 肝脏分离菌株

2.6 序列分析

测序结果已提交 GenBank (收录号: JN594664)。将所得菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较, 结果发现在最靠前的 25 个序列均为绿脓杆菌, 与该菌株的相似性在 99%~100%。从 GenBank 数据库中选取株 3 株绿脓杆

菌、1 株沙门氏菌、1 株鸭疫里默氏杆菌、1 株大肠杆菌病(表 3)的 16S rRNA 基因序列, 用软件 MEGA 5.05 进行多序列匹配排列, 以 Neighbor-Joining 方式进行同源性比较, 并绘制进化树。结果发现铜绿假单胞菌的 16S rRNA 基因序列极其保守, 相似性达 99%~100%; 本菌与大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌的相似性差异约为 9%; 与鸭疫里默氏杆菌的相似性差异则更大, 超过 18%(图 5)。

表 3 参考 16S rRNA 基因序列来源及数据库存取号

菌株名称	简称	序列号
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain BSS	PA BSS	JN003625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S164S	PA S164S	JF513146
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MML2212	PA MML2212	EU344794
<i>Riemerella anatipestifer</i> strain D-24046	Riemerella A. D-24046	AY871818
<i>Escherichia coli</i> strain skg007	E. coli skg007	HQ286917
<i>Salmonella enterica</i> subsp. arizonae strain ATCC 13314	Salmonella E.	NR_041696
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. gallicida strain CCUG 17978	<i>Pasteurella M. sp</i>	NR_041811

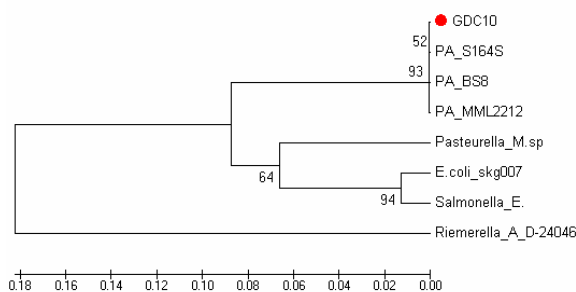


图 5 16S rDNA 序列分析结果

GDC10: 为本分离株

3 讨论

绿脓杆菌在环境中广泛存在, 是一种条件性致病菌。马立克疫苗需在雏鸡出壳时进行注射, 若孵化房中卫生条件较差, 免疫注射器械消毒不严格, 或马立克疫苗稀释液受到污染, 均可能导致细菌从针口侵入感染, 加之幼禽机体抵抗力差, 可引起急性死亡, 造成严重的损失。曾有相似的病例报道^[1,2]。所以做好孵化房卫生、严格消毒免疫注射用具以及做好育雏用具的消毒工作是预防本病发生的重要措施。

随着核酸测序技术的发展, 通过 16S rRNA 基

因的序列测定,从分子遗传进化和分子水平上对细菌进行鉴定,已得到越来越广泛的应用,从而使细菌鉴定更加科学与准确^[3]。16S rRNA 基因序列之所以能作为细菌分类的依据,是因为其在漫长的生物进化过程中,其基因序列的变化非常缓慢,具有高度的保守性,可以用来标记生物的进化距离和亲缘关系,有“细菌化石”之称。具有以下特点:(1)多拷贝:每个细菌含 5~10 个 16S rRNA 拷贝。(2)多信息:16S rRNA 基因内部结构由可变区和保守区组成,保守区为所有细菌所共有,可变区在不同细菌之间存在不同程度的差异,具有属或种的特异性,可变区与保守区交错排列,因此,可根据保守区设计各种细菌的通用引物,也可根据可变区设计特定细菌的特异引物或探针;(3)长度适中:16S rRNA 编码基因长度约 1 500 bp,便于扩增与检测^[4]。在细菌基因组中 16S rRNA 基因与 5S、23S rRNA 基因相邻,按 5'-16S-23S-5S-3'方式排列,由 2 个非编码的间隔区序列分开,

共同组成一个 RNA 操纵子,作为一个单位转录,再加工成为成熟的 rRNA。通常认为整个基因组的相似性在 70%以上就为同一个种,而 16SrRNA 相似性不在 98.8%以上就不属于同一个种^[5]。16S rRNA 序列测定可作为细菌鉴定的一种可靠方法。

参考文献:

- [1] 张成海,杨素平,李灵. 雏鸡注射鸡马立克疫苗不当引发绿脓杆菌病暴发[J]. 新疆畜牧业, 2010(5):15-16.
- [2] 卢受昇,许楚杰. 雏鸡早期大批死亡病例中的细菌检验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2003, 28(6):26-29.
- [3] Lee-Jene Teng, Po-Ren Hsueh, Yu-Hsuan Huang, et al. Identification of *Bacteroides thetaiotaomicron* on the Basis of an Unexpected Specific Amplicon of Universal 16S Ribosomal DNA PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4):1727-1730.
- [4] 荣光,王东劲,周汉林,等. 16S rRNA 在兽医病原菌分类鉴定中的应用[J]. 热带农业科学, 2009, 29(10):45-49.
- [5] 韩文瑜,冯书章. 现代分子病原细菌学[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 2003:160.

2011“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,本刊决定评选 2011 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2012 年第 1 期公布。

1、**评选范围:**本刊 2011 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文 16 篇,分设一等奖 2 篇、二等奖 4 篇、三等奖 10 篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:**总奖金 20000 元,由广东永顺生物制药有限公司赞助。其中一等奖奖金 2000 元/篇;二等奖奖金 1500 元/篇;三等奖奖金 1000 元/篇。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

二〇一一年一月十四日

猪 PHGPx 基因真核表达重组质粒的构建与鉴定

刘平, 李庆阳, 谢永福, 况绍祥, 王林川
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从猪睾丸中提取 RNA 后, 采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法获得 PHGPx cDNA。扩增的目的基因片段经琼脂糖凝胶电泳回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转入 E. coli DH5 α 中筛选鉴定重组子。将质粒经酶切鉴定后, 把酶切下的目的基因 cDNA 进一步克隆到真核表达载体 pGAPZ α A 中, 经 PCR 及序列鉴定, 证实插入载体 pGAPZ α A 中的片段为含有目的基因的核苷酸序列。真核表达重组质粒 pGAPZ α A-PHGPx cDNA 的构建成功, 有利于猪 PHGPx 的真核批量表达及其生物学功能的进一步研究。

关键词: 猪 PHGPx 基因; 真核载体; 重组质粒

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0036-02

Construction and identification of eukaryotic expression recombinant plasmid of pig PHGPx gene

Liu Ping, Li Qingyang, Xie Yongfu, Kuang Shaoxiang, Wang Linchuan

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: PHGPx cDNA was obtained from pig testicular using RT-PCR method after extracting RNA. The amplified PHGPx gene fragment was connected with pMD18-T vector and transformed to E. coli DH5 α . After the modification and identification of the plasmid, the PHGPx gene cDNA was cloned into eukaryotic expression vector pGAPZ α A. Through PCR and sequence analysis, the fragment in the vector pGAPZ α A was proved to be PHGPx gene. Eukaryotic expression recombinant plasmid pGAPZ α A-PHGPx cDNA was successfully constructed. It laid the foundation for the further study of pig PHGPx.

Key words: Pig PHGPx gene; eukaryotic vector; recombinant plasmid

磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPx) 是广泛存在于哺乳动物细胞内的含硒酶, 其独特的功能在于还原过氧化的磷脂、脂蛋白和胆固醇, 清除代谢产生的过氧化物, 保护细胞膜的完整, 维持细胞功能的正常^[1-3]。尤其是在精子成熟过程中变成一种线粒体内囊的无酶活性的结构蛋白成分, 发挥重要的作用^[4]。PHGPx 的硒代半胱氨酸残基由 UGA 编码。UGA 既是终止密码子又是编码硒代半胱氨酸的密码子, 在肽链生成过程中, 由 3' 非编码区的茎环结构确定 UGA 是引导硒代半胱氨酸的插入或是终止肽链的合成^[5]。为了表达出具有生物活性的 PHGPx, 目的基因中就必须同时引入

3' 非编码区。为了获得大量高纯度猪 PHGPx 及进一步研究猪 PHGPx 的生物学功能, 本试验构建了含全长猪 PHGPx cDNA 的真核表达质粒。

1 材料与方法

1.1 材料

猪睾丸。总 RNA 抽提试剂盒、一步法反转录试剂盒、pMD18-T 载体、TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、T4DNA 连接酶, 购自 TaKaRa 公司; 真核表达载体 pGAPZ α A 购自 Invitrogen 公司; E. coli DH5 α 购自 Trans 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的抽提 无菌取猪新鲜睾丸, 利用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver

4.0 试剂盒提取总 RNA。

1.2.2 PHGPx 基因片段的扩增 以 RNA 为模板, 用设计合成的特异性引物进行 RT-PCR 扩增。引物由北京六合华大基因公司合成。

上游引物: 5'-GGGGTACCCCGATGTGCGCGTCC-CGCGAC-3', 引入 KpnI 位点; 下游引物: 5'-GCTC-TAGATTTAGCCAATTTGTATGGT-3', 引入 XbaI 位点。

RT-PCR 扩增条件为: 50°C RT 反应 30 min, 94°C RTase 失活 2 min 后, 按 94°C 变性 30S、56.6°C 退火 30S、72°C 延伸 1 min, 进行 30 个循环, 最后 1 个循环后于 72°C 延伸 10 min, 最后 4°C 保存。于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.3 PCR 产物的纯化及基因的克隆 采用 BIOMIGA 公司 Gel/PCR Extraction kit 将 RT-PCR 扩增产物进行纯化。按产品说明书操作。回收产物与 PMD-18T 载体 16 °C 连接过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 涂布含有氨苄青霉素、IPTG 和 X-Gal LB 平板, 分别挑取蓝白斑, 提取质粒, 筛选鉴定重组子。

1.2.4 GPx4 基因的酶切回收 将以上所提质粒用限制性内切酶 KpnI、XbaI 37°C 水浴双酶切过夜, 于 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收大小约为 740 bp 的 PHGPx 基因。

1.2.5 目的基因与真核载体的连接 将以上所回收的目的基因与已经用限制性内切酶 KpnI、XbaI 37°C 水浴双酶切过夜的载体 pGAPZ α A 通过 T₄DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 涂布含有 Zeocin™ 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取菌落接种于含有 Zeocin™ 的 LB 液体培养基, 37 °C 培养过夜后提取质粒分别用酶切和基因测序鉴定所筛选的阳性克隆。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增 PHGPx 基因片段

以猪睾丸 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 基因产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 740 bp 处可见清晰明亮的目的条带。片段大小与 GenBank 中公布的片段大小相等(图 1)。

2.2 携带目的基因片段的重组真核载体 pGAPZ α A-PHGPx 的鉴定结果

将质粒用限制性内切酶 KpnI、XbaI 37°C 水浴双酶切过夜, 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小

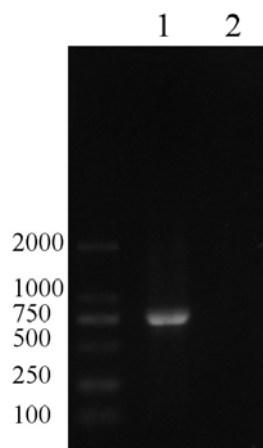


图 1 RT-PCR 图像(2 泳道为阴性对照)

约为 740 bp、3.1 kbp 的 2 条清晰明亮的目的条带。凝胶电泳的结果(图 2), 与预期结果相一致。

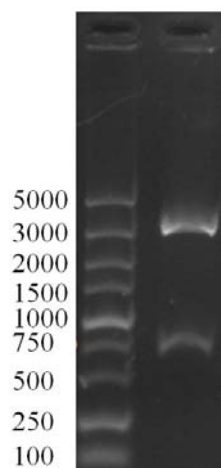


图 2 pGAPZ α A-PHGPx 双酶切电泳图像

以重组真核载体 pGAPZ α A-PHGPx 为模板 PCR 扩增目的基因 PHGPx, 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 3。

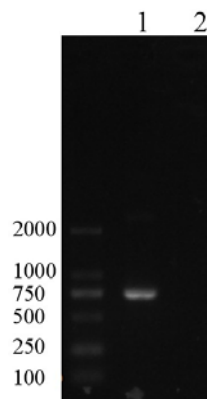


图 3 PCR 图像(2 泳道为阴性对照)

(下转第 40 页)

紫外分光光度法测定甲砒霉素原料含量方法的建立

陈 才, 李 振

(山东省临沂大学生命科学学院, 山东 临沂 276005)

摘要: 采用紫外分光光度法测定甲砒霉素原料药的含量。实验结果表明, 甲砒霉素的吸收最大吸收波长为 228 nm, 在此波长处, 甲砒霉素在 5.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 其吸光度与浓度呈现良好的线性关系: $A=0.0381C-0.1074$, $R^2=0.9992$ ($n=7$)。该方法操作简单、快速, 结果准确, 可用于甲砒霉素原料药的含量测定。

关键词: 甲砒霉素; 紫外分光光度法; 测定

中图分类号: S859.79.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0038-03

Determining the content of thiamphenicol in raw materials by ultraviolet spectrophotometry

Chen Cai, Li Zhen

(College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China)

Abstract: The content of thiamphenicol in raw materials was determined by the method of ultraviolet spectrophotometry. The results showed that the maximum absorption wavelength of thiamphenicol was 228nm and the linear relation between the absorbency and the concentration was good when the concentration of thiamphenicol was between 5.0 and 20.0 $\mu\text{g/mL}$: $A=0.0381C-0.1074$, $R^2=0.9992$ ($n=7$). This method was simple and quick, and the results was reliable. It could be applied to quick determination of thiamphenicol in the raw materials later.

Key words: Thiamphenicol; ultraviolet spectrophotometry; determination

甲砒霉素(Thiamphenicol)又称甲砒氯霉素, 是酰胺醇类广谱抗生素, 对革兰氏阳性菌、阴性菌均有杀灭作用^[1]。与氯霉素相比, 其抗菌活性强, 毒副作用小, 而且细菌耐药性产生较慢, 价格也相对便宜。自氯霉素禁用以来, 甲砒霉素已成为兽医临床上广泛应用的抗生素之一。中华人民共和国农业部《兽药质量标准》(2003年版)对其含量的测定采用电位滴定法^[2]。该方法的局限性较大, 影响因素较多, 不便于质量控制, 且耗费时间较长, 样品用量大。笔者建立了以乙腈-水为溶媒, 228 nm 为最大吸收波长的紫外分光光度法。本方法的测定结果与《兽药质量标准》(2003年版)测定方法所得结果基本上一致, 而且具有样品用量少, 操作简便、快速等优点。

1 试验材料

1.1 仪器

普析 TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), FA2004N 电子天平 (0.1mg, 上海精密科学仪器有限公司), ZD-2 自动电位滴定仪 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甲砒霉素对照品 (批号 K0240706, 含量 100%, 购自中国兽医药品监察所); 甲砒霉素原料, 由山东省临沂大学动物药理学实验室提供; 乙腈 (AR, 天津市恒兴化学试剂制造有限公司); 纯化水等。

2 试验方法和结果

2.1 吸收波长的选择

精密称取甲砒霉素对照品 25 mg, 置 100 mL

的容量瓶,加乙腈溶解,稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 1 mL,置 50 mL 的容量瓶,加水稀释至刻度,摇匀,制成 $5 \mu\text{g/mL}$ 的溶液。以乙腈为空白对照,应用紫外分光光度法在 200~350 nm 范围内扫描,得到一吸收曲线(见图 1)。由曲线可看到在 228 nm 波长下有最大吸收峰。故选择 228 nm 波长为甲砒霉素的测定波长。

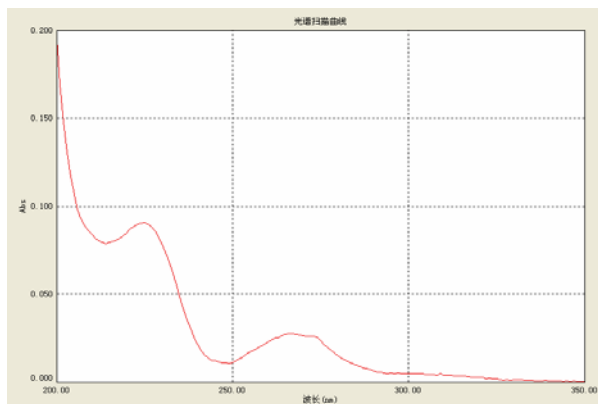


图 1 甲砒霉素在 200~350 nm 范围内的吸收曲线

2.2 标准曲线的制作

用移液管分别吸取上述对照品贮备液 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mL 并分别置于 100 mL 容量瓶中配制成 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,以乙腈作为空白对照,在 228 nm 波长处测定吸光度。以吸光度作为纵坐标(A),以浓度为横坐标(C),绘制吸光度-浓度标准曲线,求得回归方程 $A=0.0381C-0.1074, R^2=0.9992$ ($n=7$)。由回归方程可知,甲砒霉素在 5.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内吸光度与浓度呈良好的线性关系(见图 2)。

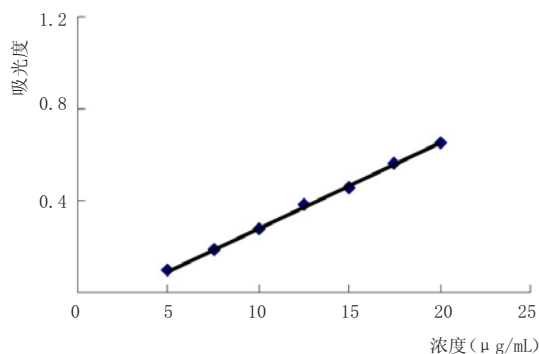


图 2 甲砒霉素紫外分光光度法浓度-吸光度标准工作曲线

2.3 稳定性试验

精密量取浓度为 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 对照品溶液置避光处放置,在 0、15、30、45、60、120 min 等不同时间测定其吸光度,结果见表 1。

表 1 甲砒霉素稳定性试验结果

放置时间(min)	0	15	30	45	60	120
吸光度	0.094	0.095	0.094	0.093	0.092	0.093
相对标准偏差 RSD(%)	0.01					

结果显示,在 0~120 min 不同时间测定甲砒霉素的吸光度,其吸光度基本无变化,表明在该条件下其稳定性良好。

2.4 回收率试验

称定甲砒霉素对照品 20、25、30 mg 各 3 份,分别置烧杯中,各加入甲砒霉素样品 25 mg,用乙腈适量使其溶解,转移至 100 mL 的容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;分别精密量取 1 mL,置 100 mL 的容量瓶,加水稀释至刻度,摇匀;以乙腈溶液为空白对照,在 228 nm 波长处测定吸光度,每个样品测定 5 次,取其平均值。按回归方程计算含量和回收率,结果见表 2。试验结果显示,甲砒霉素对照品的回收率符合要求。

表 2 甲砒霉素对照品回收率试验结果

序号	样品原含量(g)	加标量(g)	测定总量(g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.0255	0.0208	0.0462	99.5		
2	0.0258	0.0200	0.0458	100.0		
3	0.0253	0.0203	0.0454	99.0		
4	0.0251	0.0260	0.0510	99.6		
5	0.0263	0.0258	0.0522	100.4	99.7	0.42
6	0.0255	0.0250	0.0505	100.0		
7	0.0252	0.0309	0.0561	100.0		
8	0.0260	0.0312	0.0570	99.4		
9	0.0258	0.0315	0.0572	99.7		

2.5 样品含量测定

2.5.1 电位滴定法 按照中华人民共和国农业部《兽药质量标准》(2003 年版)方法测定甲砒霉素原料的含量。

2.5.2 紫外分光光度法 称取甲砒霉素样品 25 mg, 置 100 mL 的容量瓶, 加乙腈溶解并用水稀释至刻度, 摇匀; 量取 1 mL, 置 50 mL 的容量瓶, 加水稀释至刻度, 摇匀, 制成 5.0 μg/mL 的溶液。以乙腈溶液为空白对照, 在 228 nm 处测定吸光度, 代入回归方程计算甲砒霉素含量, 并与电位滴定法比较。结果见表 3。经统计学分析, 用紫外分光光度法与电位滴定法测定甲砒霉素原料的含量, 其结果差异不显著 ($P>0.05$)。

表 3 甲砒霉素原料含量的测定结果

样品批号	紫外分光光度法 (UV) (%)	电位滴定法 (%)
1	100.1	99.6
2	99.9	99.8
3	100.0	100.1
4	99.7	99.5
5	100.2	99.9

3 小结

3.1 本试验所建立的用紫外分光光度法测定甲砒霉素原料的含量的方法, 通过其稳定性试验、回

收率试验等, 结果显示该方法稳定、重现性良好, 且用该法与电位滴定法测定甲砒霉素原料的含量, 结果差异不显著, 说明紫外分光光度法可用于甲砒霉素原料药含量的测定。

3.2 紫外分光光度法具有操作简便、检测快速、结果准确、成本较低等优点。因此, 紫外分光光度法可用于甲砒霉素原料药含量的快速检测, 以作为其产品质量控制的方法。

3.3 目前, 市场上的甲砒霉素片剂及胶囊制剂等加有辅料的制剂, 所使用的辅料用紫外分光光度法测定时, 在 228 nm 处基本无吸收。因此, 可使用本方法测定甲砒霉素制剂的含量。但若甲砒霉素制剂经溶解、过滤后, 其处方中的辅料在波长 228 nm 处有吸光度, 可做辅料空白试液, 作为供试品溶液的参比空白。然后, 按本方法测定其含量。若辅料在本波长处的吸光度过大, 则不宜用本方法测定其含量。

参考文献:

[1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
 [2] 中华人民共和国农业部. 兽药质量标准[S]. 2003.



(上接第 37 页)

将所抽得的重组真核载体 pGAPZ α A-PHGPx 送北京六合华大基因公司进行测序, 测序结果与 GenBank 进行 Blast 比对后, 证实了所克隆的片段正确。测序结果进一步表明猪 PHGPx 基因真核表达载体已经构建成功。

3 讨论

本试验通过测序证实连入真核表达载体 pGAPZ α A 中的目的基因含有 PHGPx 基因 3' 非编码区, 进而保证硒代半胱氨酸的插入以表达出具有生物活性的 PHGPx。本研究使用真核表达载体 pGAPZ α A 成功地构建了含有猪 PHGPx 基因的重组真核载体 pGAPZ α A-PHGPx cDNA, 这为下一步研究 PHGPx 在促进精子成熟过程中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] 郭玲, 钟学宽, 周令望, 等. CVB3m 病毒致低硒低维生素 E 鼠心肌损伤特点的实验研究[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(6): 412-413.
 [2] 张邻杰, 钟学宽, 周令望, 等. 低硒小鼠病毒性心肌炎与细胞凋亡关系的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2004, 19(4): 196-199.
 [3] Zhao W R, Zhong X K, Zhou L W. Expression of PHGPx in mammalian cells and its antiviral effect against coxsackievirus group B[J]. *Progress in Natural Science*, 2005, 15(7): 665-668.
 [4] Bri gelius Flohe R. Tissue specific functions of individual glutathione peroxidases[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(9-10): 951-965.
 [5] 闫春燕, 徐承水, 张士瑾. 动物磷脂酰谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 科技信息, 2008, 22: 366-417.

双倍盐 MEM 和传统 MEM 对 BHK-21 细胞生长和 FMDV 增殖的影响

武春芳, 韩四娥, 杨利
(金宇保灵生物药品有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 采用双倍盐 MEM 细胞培养基与传统培养基进行了 BHK-21 细胞生长和 FMDV 增殖对比实验, 实验结果表明两种培养基无明显差异, 双倍盐 MEM 培养基工艺简单, 易于质量控制, 是细胞培养基选择的一个方向。

关键词: 双倍盐 MEM; MEM; BHK-21 细胞生长; FMDV 增殖

中图分类号: S859.79⁷

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0041-02

The influence of double MEM and conventional MEM on the growth of BHK-21 cell and the proliferation of FMDV

Wu Chunfang, Han Sie, Yang Li
(Jinyu Baoling Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Huhehaote 010030, China)

Abstract: The influence of double MEM and conventional MEM on the growth of BHK-21 cell and the proliferation of FMDV was detected by experiments. The results showed that there was not significant difference between double MEM and conventional MEM, but the technic using the double MEM was simple and easy to be controlled and it would be one option for cell culture.

Key words: Double MEM; MEM; BHK-21 growth; FMDV proliferation

目前在口蹄疫疫苗生产中,用于培养 BHK-21 细胞的基础培养基主要是传统的 MEM 和乳汉液,其中 MEM 配制简单,而乳汉液配制程序复杂,人力成本和时间成本较高。因此很有必要摸索一种工艺简单,质量稳定的培养基来进行细胞的培养。

双倍盐 MEM 包含了传统 MEM 和乳汉液的基本成份,是直接进行溶解,无需进行化学原料配制的一种培养基。我们利用了 15 组数据进行了双倍盐 MEM 细胞生长和病毒增殖数据摸索,现总结如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞株 BHK21 细胞,由本单位保存、备用。

1.1.2 培养基及添加物 双倍盐 MEM 细胞培养基(宜兴市赛尔生物科技有限公司,产品批号 0605826)。取双倍盐 MEM 一包 455 g,加纯化水

48.5 L (水温 20~30℃),轻微搅拌溶解后加入 2.5%的水解乳蛋白,121℃灭菌 15 min。水解乳蛋白(海克隆生产厂),传统 MEM 培养基(北京清大天一生物技术有限公司),按农业部颁发的中华人民共和国兽用生物制品规程配制。新生牛血清(太原润生生物材料有限公司),其他溶液(均为自行配制)。

1.1.3 实验动物 2-3 日龄云南昆明系小鼠由本厂自繁自养。

1.1.4 其他 细胞计数板及相关物品、0.4%台盼蓝染液(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞传代 分别用双倍盐 MEM 细胞培养基和传统培养基对试验组和对照组细胞进行连续传代,每组每代只选择一个细胞作为种细胞,传代

的同时观察各组细胞生长情况及形态; 对各代细胞在培养 72 h 进行细胞计数及细胞活力测定^[1]。
1.2.2 增殖培养 实验组及对照组除连续传代需留细胞种子外, 剩余的细胞接种同源同型的口蹄疫病毒, 收获病毒液按常规方法对乳鼠进行 LD₅₀ 测定, 记录毒价结果。

2 结果

2.1 细胞形态观察

对照组细胞形态呈致密长梭形, 外观呈雪花状; 实验组细胞形态略短, 外观花纹细碎, 折光性略差。

2.2 实验组与对照组细胞总数的检测

细胞总数是指培养 72 h 后, 一个 15 L 细胞瓶的细胞数。对两种数据进行 t 测验^[2], (查自由度为 28 时, $t_{0.05}=2.048$ 现 $t=0.4033, P>0.05$), 即两种培养基细胞总数无明显差异(见表 1)。实验组细胞活力 (X_1) 与对照组细胞活力 (X_2) 进行 X^2 测验^[3], 经统计分析, 两组无明显差异(见表 2)。

表 1 实验组细胞数 (X_1) 与对照组细胞数 (X_2) 比较

细胞批	72 h 细胞总数 ($\times 10^9$)		距离平均数离差 $X - \bar{X} (\times 10^9)$		平方之和 ($X - \bar{X}$) ² = $x^2 (\times 10^{18})$	
	X_1	X_2	X_1	X_2	X_1	X_2
	1	4.44	3.53	1.88	0.83	3.53
2	1.32	1.31	-1.24	-1.39	1.54	1.93
3	2.17	1.51	-0.39	-1.19	0.15	1.42
4	2.40	2.70	-0.16	0	0.03	0
5	2.16	1.92	-0.40	-0.78	0.16	0.61
6	1.68	2.71	-0.88	0.01	0.77	0
7	3.04	4.37	0.48	1.67	0.23	2.79
8	4.47	2.25	1.91	-0.45	3.65	0.20
9	2.71	2.43	0.15	-0.27	0.02	0.07
10	2.29	2.14	-0.27	-0.56	0.07	0.31
11	2.88	2.89	0.32	0.19	0.10	0.04
12	2.02	2.74	-0.54	0.04	0.29	0
13	2.55	1.63	-0.01	-1.07	0	1.15
14	2.76	4.48	0.20	1.78	0.04	3.17
15	1.55	3.88	-1.01	1.18	1.02	1.39
	$X_1=2.56$	$X_2=2.70$	0	0	$\sum x_1^2=11.6$	$\sum x_2^2=13.8$

2.3 实验组病毒滴度 (X_1) 与对照组病毒滴度 (X_2) LD₅₀ 的 t 检验

将两组病毒液用浓度为 0.04 mol/L、pH 为

7.6~7.8 的 PBS 液作 10 倍系列稀释, 取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 3 个稀释度。每个稀释度分别颈背部皮下注射

表 2 试验组与对照组细胞活力的比较

细胞批	实验组细胞 总数 ($\times 10^9$)	实验组细胞 活力 (%)	对照组细胞 总数 ($\times 10^9$)	对照组细胞 活力 (%)	X^2
1	4.44	98.06	3.53	98.21	0.18
2	1.32	98.00	1.31	97.92	0
3	2.17	98.10	1.51	98.46	0.20
4	2.40	96.12	2.70	97.15	0.04
5	2.16	97.40	1.92	97.54	0.03
6	1.68	94.50	2.71	95.66	0.62
7	3.04	99.30	4.37	97.73	0.58
8	4.47	96.06	2.25	95.89	1.06
9	2.71	96.12	2.43	96.77	0
10	2.29	97.92	2.14	97.41	0.01
11	2.88	99.15	2.89	98.42	0.01
12	2.02	97.24	2.74	97.24	0.25
13	2.55	98.73	1.63	98.70	0.33
14	2.76	98.11	4.48	98.90	1.08
15	1.55	97.68	3.88	97.72	1.12

表 3 实验组 LD₅₀(X_1) 与对照组 LD₅₀(X_2) 检测结果

毒液批	LD ₅₀ /0.2mL		距离平均数离差 $X - \bar{X}$		平方之和 ($X - \bar{X}$) ² = x^2	
	X_1	X_2	1	2	1	2
	1	7.33	7.50	0.27	0.39	0.07
2	7.67	7.67	0.61	0.56	0.37	0.31
3	6.67	7.00	-0.39	-0.11	0.15	0.01
4	6.67	6.50	-0.39	-0.61	0.15	0.37
5	7.33	7.33	0	0.22	0.00	0.05
6	6.67	6.50	-0.39	-0.61	0.15	0.37
7	7.33	7.50	0.27	0.39	0.07	0.15
8	7.00	6.50	-0.06	-0.61	0.00	0.37
9	7.50	7.50	0.44	0.39	0.19	0.15
10	6.67	6.50	-0.39	-0.61	0.15	0.37
11	6.50	6.50	-0.56	-0.61	0.31	0.37
12	7.50	7.33	0.44	0.22	0.19	0.05
13	7.00	7.50	-0.06	0.39	0.00	0.15
14	7.00	7.50	-0.06	0.39	0.00	0.15
15	7.00	7.33	-0.06	0.22	0.00	0.05
	$\bar{X}_1=7.06$	$\bar{X}_2=7.11$	0	0	$\sum x_1^2=1.80$	$\sum x_2^2=3.07$

(下转第 45 页)

小型犬胫骨骨折的外固定支架手术 2 例

张盈盈, 吴仲恒, 冼文俊, 梅培斌, 周为乔
(广州市海珠区 yy 宠物医院, 广东 广州 510260)

中图分类号: S857.16*4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0043-03

1 引言

KE 型外固定支架大体可分为 Type I a 型、Type I b 型、Type II 型和 Type III 型。Type I a 型外固定支架, 是拥有单侧固定结构的外固定支架。而 Type I b 型外固定支架通常是由 2 个 Type I a 型外固定支架组成, 可以从 2 个不同的平面为断端提供固定结构。Type I 型外固定支架使用侧面螺纹的固定针。Type II 型外固定支架在每个断端至少使用了一根以上的中间螺纹结构的固定针穿过骨头, 在同一个平面上为断端提供 2 个框架固定结构, 同时也可以使用单侧螺纹的固定针辅助。Type III 型外固定支架在 Type II 型外固定支架的基础上提供了第三个方向的固定方式, 是结合了 Type I 与 II 型外固定支架的结果。在外固定支架的操作上, 胫骨骨折比桡尺骨骨折手术相对简单, 而股骨与肱骨骨折手术相对比较复杂。

胫骨、腓骨骨折常同时发生, 是犬常见的骨折部位之一。如果选择内固定方法, 由于其力学原因, 一般会考虑在内侧进行钢板内固定, 也比较流行使用 tie-in 锁型髓内针进行内固定。个别情况下会使用单纯的髓内针进行固定(但是这种方式难以抗拒旋转方向的扭力, 也难以避免术后髓内针脱出的问题)。如果选择外固定方法, 可以使用单纯的包扎外固定。对于温顺、运动能力不是特别强的动物, 也比较推荐使用外固定支架。由于软组织少, 皮下即为骨头, 而且血管神经分布较少, 使得外固定支架手术非常容易开展。术者需避开后肢静脉与骨骺部位, 即可轻松使用各种外固定支架对胫骨进行固定。通常对于小型犬, 可以从内侧打入螺纹针, 使用 Type I a 型外

固定支架进行固定。而相对于比较活跃的, 或者体形较大的犬, 可以使用 Type II 型外固定支架进行固定。

2 典型病例介绍

2.1 病例一

玩具贵宾犬, 3 月龄, 雄性, 体重 2.5 kg, 数天前发现右后肢胫骨斜骨折, 在外院进行了外包扎夹板固定。2 d 后发现再次出现错位。于是到本院进行了 Type I a 型外固定支架手术。

2.1.1 手术准备 准备好全套 KE 型外固定支架, 灭菌常规手术包与骨科钻、导钻器、克氏剪等骨科器械。对动物进行常规术前准备, 安置留置针, 注射镇痛药物与抗生素, 诱导麻醉并进行气管插管, 连接呼吸麻醉机。术部剃毛, 进行外科手术消毒。

术前, 从跗关节开始对术部远端进行绷带包扎。用绷带把患肢悬挂在手术台上, 患肢与手术台垂直, 进行再次消毒。无菌手术助手使用灭菌的自粘绷带对患肢远端包扎。把手术台稍微降低, 动物的约四分之一体重负荷与患肢使软组织拉伸, 从而使骨头错位情况得以改善(此时可用移动式 X 线机对患肢进行拍摄以判断复位状况)。术者对患肢进行最后一次外科消毒后, 铺设 4 条无菌创布于患肢周围, 开始进行手术。

2.1.2 手术过程 在胫骨内侧用手术刀切开皮肤约 2 mm, 小心分离周围软组织, 直达骨膜, 不要切开骨膜, 在胫骨内侧最远端与近端各打入一外螺纹针。打入螺纹针时, 电钻钻速要控制在 50 r/min 以下, 对于没有钻速标识的电钻, 则要注意控制转速, 可用生理盐水降温, 骨头局部超过 50 °C 就会导致

损伤^[1]。螺纹针应穿透两侧骨皮质,其螺纹应超出第二层骨皮质 1.5 圈以上。

在打入最远端与最近端螺纹针后, 根据此前拍摄的 X 线片, 可使用螺纹针与支架, 进一步拉伸患肢, 对骨头的排列进行调整。随后可拍摄 X 线片进行效果观察。对于小型犬胫骨骨折, 除非为陈旧性骨折或错位非常严重, 一般不需要对骨折处进行切开与分离, 使用触诊的办法也可以轻易使骨头复位。

待打入最远端与最近端螺纹针并对骨头复位后, 在骨折线附近打入其余的螺纹针。每个骨断端至少用 2 支, 最好用超过 3 支螺纹针进行固定。由于本病例为小型犬, 可操作空间有限, 所以总共使用了 4 支侧面螺纹针进行固定(如图 1、图 2)。



图 1 患犬右后肢进行了 Type I a 型外固定支架手术固定



图 2 术后 X 线片, 进行外固定支架手术后, 胫骨得到复位

2.1.3 术后护理 术后对动物伤口进行清洁, 对针孔道喷洒溶菌酶, 每天 2 次或以上。清除血液渗出, 防止形成血痂以达到一期愈合。每天常规使用抗生素, 可对患肢进行简单包扎。直至第 8~10 d, 观察对针道皮肤的生长状况。出院后让主人对患犬针道进行定期的溶菌酶喷洒消毒, 定期复诊。此时可对支架进行简单的包扎, 以防支架刮伤家

具或伤害人畜。视环境情况与主人对护理的紧密程度, 可对患肢进行简单包扎或不进行包扎。正常的针孔道应该是针与皮肤连接紧密, 干爽, 无渗出。该犬第六周拍摄了 X 线片, 显示骨头已经完全愈合(如图 3)。于是拆除了外固定支架。



图 3 X 线显示, 6 周后骨头已经完全愈合且不显示骨折线

2.2 病例二

玩具型贵宾犬, 雄性, 3.8 kg, 骨折 12 d, 由于此前在其它医院作外固定, 随后发现错位(如图 4), 并且已经长出很多骨痂, 遂转诊到本院进行治疗。随即进行了 Type II 型外固定支架手术(如图 5)。



图 4 外院拍摄的犬的胫骨侧位 X 线片, 胫骨横骨折、错位, 有大量骨痂



图 5 犬胫骨外固定支架手术后外观

本病例手术过程与病例一相仿, 不同之处在于, 该犬为陈旧性骨折。进行手术时, 需要把骨折处切开, 把骨痂剪掉, 或用高速摆锯把骨痂分离。使断端游离以利于复位。而 Type II 型外固定支架手术, 首先打入最远端与最近端贯穿骨头的中间螺纹针, 把螺纹针固定于 2 根碳纤维连接棒上。随后在各断端打入侧面螺纹髓内针或中间螺纹针。本病例使用了两根碳纤维连接棒, 在骨折最远端与最近端使用了中间螺纹针, 在骨折线附近各使用了一条侧面螺纹针进行固定(如图 6)。



图 6 犬胫骨正位 X 线片, 术后胫骨得到了良好的复位

根据临床经验, 如果重新固定的话需要切开骨头, 分离骨痂, 把多余的骨痂剪掉。此时对局部软组织损伤巨大, 破坏了骨头生长的生态环境, 而且患犬还是成年犬。如果此时用钢板进行内固定的话, 将进一步破坏骨头断端周围软组织的生长, 延缓骨头的愈合, 增加骨折不愈合的可能性。此前我们做的很多钢板的内固定手术, 也有个别陈旧性骨折的手术出现了骨折不愈合。这种状况一般是取出植入物, 重新进行支架外固定, 然后给予药物刺激或者植入骨松质或一小段骨头。

2.3 预后

术后第 3 天, 患犬便能以患肢承重走路, 一周后能以患肢承重跑跳。此时应限制其活动。动物每 2 周进行 X 线拍摄, 以观察骨头生长状态, 病例一在 6 周后康复, 而病例二在 12 周后康复, 预后良好。

参考文献:

[1] Karl H K, James P T, Malcolm G N. External Fixation in Small Animal Practice [M]. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2003.

(上接第 42 页)

2~3 日龄乳鼠 4 只, 观察 5~7 d。根据发病死亡数与发病数, 按 Reed-Muench 法计算 LD₅₀ 后, 查自由度为 28 时, $t_{0.05}=2.048$, 现 $t=0.3283$, $P > 0.05$, 即两种培养基病毒滴度 LD₅₀ 无明显差异。见表 3。

3 小结与讨论

3.1 从本试验数据看, 双倍盐 MEM 培养基在细胞总数、细胞活力及病毒滴度 LD₅₀ 上与传统 MEM 无明显差别。

3.2 双倍盐 MEM 直接溶解, 工艺简单, 无需生产操作人员进行复杂配制, 易于质量控制, 是细胞培养基选择的一个方向。若用于工业化疫苗生产上, 需考虑传代次数对生产稳定性的影响。

3.3 细胞培养技术是提高生物制品竞争力的核心, 培养基尤为重要。采用更先进的细胞培养技术与培养基, 提高单位体积培养液中疫苗或抗体的表

达量, 以提高生产能力、降低生产成本、减少固定资产投资, 是每个生产企业的迫切需求。不同的细胞需求的培养基也不同, 供应商如果能根据用户的配方或技术要求, 开发出优质、价廉的个性化的培养基, 必定为该产业的提升起到较大的促进作用。世界著名的生物制药公司 (Amgen Genetech) 往往与培养基企业合作, 研制最适合自身特点的个性化细胞培养基应用于生产实践, 用于提高细胞产率与生产效率, 我们也将继续加强与各培养基厂家的合作, 研制、筛选适合本公司需求的培养基。

参考文献:

[1] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 41.
[2] 王明俊. 兽医生物制品学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 441-447.

再谈手术缝线与缝合方法的合理选用

周庆国

(佛山科学技术学院动物医学系, 广东 佛山 528231)

中图分类号: S857.12⁵

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0046-03

当前,兽医外科学理论和技术在小动物临床上发挥了极大的作用,每个诊所或医院都十分重视并积极开展各类手术项目,能否开展多种手术及手术水平的高低已成为衡量宠物诊所或医院技术实力的标志之一。缝合是手术的重要操作之一,缝线与缝合方法选择是否正确、合理,关系所缝器官能否顺利愈合,也影响手术成功率及动物生活的质量。目前,小动物临床仍然存在着不合理选用缝线或缝合方法的现象,极易造成手术成功率降低或手术失败。所以,有必要对此问题进行深入探讨。

1 手术缝线的种类

1.1 非吸收性缝线

1.1.1 丝线 是广泛使用的、传统的手术缝线。用蚕茧的连续性蛋白质纤维制成。国产丝线价廉、容易消毒、使用方便和打结确实,传统规格有:0、1、4、7、10、12、18号。丝线为多股编织而成,分线团和线束两种包装。丝线可刺激组织产生炎症反应,主要用于缝合皮肤、皮下或体内结缔组织、肌肉层等。目前,人类医院基本使用一次性医用束线。

美国强生公司生产的慕丝™(musilk)带针手术丝线,采用优质天然丝线经下列加工程序制成:脱胶——除去蚕丝中易引起异物反应的蛋白质成分;编织——去胶后的纤维被精心编成丝线,使其抗张力强度增大;涂层——每股编织线的表面均封一层蜜蜡,使操作更顺利;包装——所有慕丝™丝线都采用实用的方法包装,使用方便;消毒——所有慕丝™产品均经辐射严格消毒。

1.1.2 尼龙线 即聚酰胺纤维(Polyamide),简称PA线或锦纶线,无色,或染成黑色、深蓝色、紫色等。分单丝尼龙线和多丝尼龙线,又分带针和不带针两种,单丝规格有:12-0、10-0~1-0号。

尼龙线生物学特性为惰性,在人体内每年以

15%~20%的速率水解。单丝尼龙缝线表面均匀平滑,张力强度高,植入体内后很少有组织反应,具有极佳弹性。眼科或其他显微手术大多选用带针单丝尼龙线,称为无损伤缝线。

1.1.3 聚丙烯缝线 如美国强生公司生产的普理灵™(prolene)单股合成缝线,是心血管外科公认的首选缝线。被植入组织后保持永久的张力强度(维持2年之久),且手感顺滑,易于打结,很少有组织阻力感,可提供牢固的线结保障。适用于心血管外科如血管吻合、神经吻合、冠状动脉远端吻合、换瓣手术、心室/心房切口缝合;整形外科如皮肤缝合、皮内缝合等。

1.2 可吸收性缝线

1.2.1 天然吸收性缝线——肠线 以羊肠黏膜下层或牛肠浆膜组织为原料,含90%胶原,经铬盐溶液处理后称为铬制肠线,可对抗机体内各种酶的消化作用,实际吸收时间延长至90d以上。规格有:5-0、4-0~1、2号等,用铝箔消毒软包装,内有2mL保护液。

1.2.2 人工吸收性缝线——聚乙醇酸缝线(polyglycolic acid,PGA) 为羟基乙酸的聚合物,属于多股编织缝线。因其采用独特的表面涂层技术,使其柔软顺滑,如丝线般容易打结,且无毒性、无胶原性、无抗原性、无致癌性,组织反应极低。植入组织15d后开始吸收,30d后大量吸收,60~90d安全吸收。水解后产生的羟基乙酸有抑菌作用,是外科手术较理想的缝合材料。

1.2.3 人工吸收性——聚乳酸羟基乙酸缝线(polyglactin 910,PGLA) 如美国强生公司生产的薇乔(VICRYL)系列缝线:

快薇乔(VICRYL Rapide®):为多股编织缝线,在可吸收缝线中吸收最快,其初始强度与丝线和肠

线相仿,术后 5~6 d 张力下降 50%,有效伤口支撑时间为 10~14 d。主要用于皮肤和黏膜缝合。

单乔(MONOCRYL[®]):虽为单股缝线,但打结安全性可与编织缝线相媲美,极具柔韧性,能平滑穿过组织,对组织的拖曳力极小,可用于一般软组织缝合结扎。如用在皮内缝合及皮下组织缝合,组织反应极小,美容效果卓越。

保护薇乔(Coated VICRYL[®]):为合成的多股编织线,每根纤维分开涂层,消除了缝线的粗糙边缘,对组织的拖带和损伤很小,所以打结顺滑,操作安全可靠,能提供强有力的伤口支持达 28~35 d,在 56~70 d 内基本完全吸收,无异物残留。

抗菌薇乔[™](VICRYL[®] Plus):与保护薇乔具有相同的结构、相同的张力维持时间和材质吸收时间,仅在涂层中加入三氯生,可以有效抑制金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌。

1.2.4 聚对二氧环己酮或聚二□烷酮缝线(polydioxanone suture, PDS) 如美国强生公司的普迪思 II 缝线,是目前唯一能提供最长伤口支持时间的可吸收缝合线,集松软、柔韧和单丝结构等特征于一体,维持伤口抗张强度 6 周以上,支持伤口达 56 d,术后 180 d 内被机体完全吸收,分解成二氧化碳和水。

PDS 缝线与 PGA、PGLA 缝线相比,缝合时对组织损伤极小,组织反应极轻,因强度在体内维持时间更长(单丝抗张强度大于不可吸收的聚丙烯缝线),主要用于愈合时间较长或愈合较慢组织器官的缝合,尤其适用于碱性消化液存留的管腔,如肠管吻合、胆囊缝合等。规格有:12-0~5 号。

2 手术缝线的选择

2.1 基本原则

通常选用与缝合组织天然强度相匹配的最细线,选择应用不吸收缝线或时效较长的可吸收缝线来缝合愈合缓慢的组织,如筋膜、肌腱等。用可吸收缝线缝合生长愈合较快的组织,如胃、结肠、膀胱等。对具有潜在污染的组织,应避免使用多股纤维缝线,而应选用不容易被细菌附着的单股纤维缝线及可吸收缝线,尤其是抗菌可吸收缝线。对于特别强调美容效果的部位,考虑使用最细的惰性单股缝合材料,如尼龙缝线、聚丙烯缝线等;同时应尽可能缝合皮下组织,避免单独进行皮肤缝合。因

为存在于含有高浓度晶体溶液内的异物可能会引起沉淀结石形成,因此在进行泌尿系统、胆道手术时,应使用可吸收缝线。

2.2 无菌手术创的缝合

2.2.1 皮肤全层缝合 应当选择非吸收性缝线,如单丝尼龙线或丝线。如果不合理地选用张力保持时间短的可吸收性缝线,就增大切口裂开的风险,也浪费了材料。

2.2.2 表皮下(皮内)缝合 可使用纤细的不吸收丝线、单丝尼龙或聚丙烯线,也可使用吸收性单乔缝线或 PGA 缝线。如使用不吸收缝线,宜在皮肤切口愈合后拆除。

2.2.3 皮下疏松组织 可以选择非吸收性或吸收性缝线,如丝线、尼龙线或肠线、PGA 线。

2.2.4 腹壁筋膜、肌肉 应当选择非吸收性缝线,如丝线或尼龙线。因为腹壁筋膜的愈合需要数月时间,在腹壁筋膜达到其正常强度的 25%之前(术后 20 d),缝线的耐久性和强度至关重要。如果由于感染或局部血液循环不良,将出现愈合延迟或愈合不完全,那么缝线的支持作用需要维持更长时间,必须保持到腹壁组织合拢直至完全愈合。因此,不合理地选用快速吸收的缝线缝合腹壁筋膜、肌肉,肯定增加了切口裂开的风险。

医学临床试验报道:采用可吸收 PGA 缝线或薇乔缝线行腹膜连续缝合,大量生理盐水冲洗切口后更换手套,再以此线分别行腹外斜肌腱膜及皮下组织连续缝合,最后以 3-0 薇乔(Vicryl)行皮内缝合。结果显示,在 301 例中,切口液化 3 例,感染 5 例。而用丝线或 PGA 缝线行腹膜连续缝合,再用丝线间断缝合腹外斜肌腱膜、皮下组织及皮肤。在 267 例中,切口液化 12 例,感染 16 例。

2.2.5 其他部位肌肉 可以选择非吸收性或吸收性缝线,如丝线、尼龙线或 PGA 线。

2.2.6 空腔器官 如计划缝合两层,缝合第一层(全层)应当选用可吸收缝线,如肠线(在胃内酶解快)或人工合成的 PGA 线;缝合第二层(浆膜肌层)可选用丝线(间断缝合)、PGA 线。如计划只缝合一层(浆膜、肌层和黏膜下层),可以选择丝线(间断缝合)、PGA 线。如仅对小肠行一道全层缝合,应当选择单股可吸收的单乔缝线或普迪思 II 缝线。

2.3 感染创的缝合

由于丝线为编织线,有毛细管现象,纤维之间

容易隐藏细菌,其不吸收的特性作为感染创异物,可使创伤永远不愈合,所以绝不能用于缝合污染、可能感染或已感染的创伤。

如果为减小污染或感染创裂口,促进其愈合,可在抗菌治疗数天后选用可吸收单丝线,如单乔缝线、抗菌薇乔™缝线等,对深部组织行部分缝合。

3 缝合方法的选择

众所周知,空腔器官的缝合要求是良好的密闭性、防止内容物渗漏、保持其正常解剖结构和蠕动机能。所以,传统上对空腔器官缝合两道或两层,并且使用肠线。第一道采用单纯连续缝合或康奈尔氏缝合,第二道采用伦勃特氏缝合或库兴氏缝合。

3.1 胃切口的缝合方法

由于术后胃切口要承受较大的压力,所以必须进行接近于全层的两道缝合:第一层采用螺旋缝合或库兴式缝合浆膜、肌层和黏膜下层,或仅缝合黏膜下层和黏膜层;第二层采用连续伦勃特氏缝合或库兴式缝合浆膜、肌层。

3.2 小肠的缝合方法

小动物小肠细,做两道缝合既容易造成狭窄,而且术后也容易发生粘连。由于小肠内容物为液态,内压低,实验证明采用丝线行一道间断伦勃特氏缝合浆膜肌层就很好。如果选用PGA线就可以施行连续伦勃特氏缝合浆膜肌层。因为PGA线既可吸收,又基本不引起组织反应,这是保证肠管术后既不狭窄、又不发生粘连的有利条件。根据国外《小动物外科学》介绍,小肠切开及吻合基本采用人工合成可吸收或不吸收单丝线行单层对接缝合(结节缝合),然后覆盖网膜或浆膜封闭切口。这种缝合有利于快速愈合,比内翻缝合好。

3.3 膀胱的缝合方法

为了确保切口密闭、不渗漏,传统上必须进行两道(层)缝合。对膀胱黏膜出血严重的,可用肠线或PGA线先对黏膜行简单连续缝合,再用PGA线行库兴氏缝合,或用丝线行间断伦勃特氏缝合。如果使用丝线对膀胱进行两层缝合,第一层丝线不吸收,会长期遗留在膀胱腔内;而第二层丝线可以被薄层浆膜所覆盖。所以,膀胱缝合第一层可选用肠线PGA缝线,第二层缝合可选用丝线或PGA缝线。根据国外《小动物外科学》介绍,膀胱也可以行单层

或双层简单对接缝合或内翻缝合,怎样理解呢?单层简单对接缝合:应当是结节缝合,但缝线不能穿透黏膜层,适合于膀胱壁较厚的犬。

双层简单对接缝合:应当是先对黏膜及黏膜下层行单纯连续(螺旋)缝合,再对浆膜肌层行结节缝合。

4 术后抗感染用药

4.1 胃手术

胃内pH低,不利于细菌生长。所以,胃切开后主要预防腹壁创口感染,通常术前、术后宜肌肉或静脉注射广谱的头孢唑啉、头孢拉定、氨苄西林等。

4.2 小肠手术

正常肠道内有大量需氧和厌氧菌,其中十二指肠、空肠内的细菌少于回肠、结肠和直肠。当内容物停滞或肠壁失活引起常驻菌大量繁殖,小肠手术后以埃希氏大肠杆菌、肠球菌和金黄色葡萄球菌引起创口感染或腹膜炎为主。所以,使用恩诺沙星配合氨苄西林有良好作用,两者可取长补短,其中拜有利抗葡萄球菌作用等同于头孢唑啉、头孢拉定,优于氨苄西林,抗大肠杆菌等革兰氏阴性菌作用显著优于其他多种抗菌素。

4.3 大肠手术

大肠术后的危险是肠壁创口裂开和感染。肠腔内有大量需氧菌和厌氧菌,其中厌氧菌数量远大于需氧菌。需氧菌中有埃希氏大肠杆菌、克雷伯氏杆菌、变形杆菌、葡萄球菌和棒状杆菌;厌氧菌中有拟杆菌、双歧杆菌、乳酸杆菌、梭状芽胞杆菌、梭菌、厌氧链球菌等。所以,选用恩诺沙星配合林可霉素比较合理,可肌肉或静脉注射林可霉素,口服恩诺沙星。

拜耳公司关于喹诺酮类药物对生长期犬的承重关节软骨的影响研究结果表明:1~4周龄小犬按照25 mg/kg应用恩诺沙星治疗10 d,没有表现出不良影响。对于6周龄以上犬,软骨所受影响取决于剂量和用药持续时间。相比之下,2~10月龄的青年猫按照25 mg/kg使用恩诺沙星达30 d,却没有出现软骨病变。因此作为预防措施,对12月龄以下犬(大型犬18月龄)不建议或避免使用恩诺沙星。但是没有证据表明,怀孕犬或哺乳犬使用恩诺沙星会对后代软骨发育产生负面影响。

黄体酮在抑制警犬发情中的应用

刘剑郁

(公安部警犬技术学校, 辽宁 沈阳 110034)

中图分类号: S859.79³

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0049-01

随着社会经济的发展, 警犬在国家安全和社会安定等领域发挥着重要作用。正常犬每年一般在3~5月和9~11月各发情一次。母犬发情时, 身体和行为会发生特征性的变化, 主要表现为: 兴奋性增强、活动增加、烦躁不安、吠声粗大、眼睛发亮, 阴门肿胀、潮红、流出伴有血液的红色粘液, 食欲减少、频频排尿、举尾供背、喜欢接近公犬、常爬跨其他犬等。而警犬中的母犬发情直接影响到发情犬自身和其他犬的工作状态和效果。对警犬而言, 发情期适当使用药物加以控制是可行的。笔者临床曾使用黄体酮抑制警犬发情, 效果理想, 现报告如下。

1 基本情况

某警犬训练基地为公安部门开办警犬技术培训班, 参训警犬30头, 其中母犬11头(体重15~20 kg, 6~12月龄)。自2011年3月上旬有5头母犬陆续出现发情表现。为不耽误犬的正常训练和巩固训练效果, 兽医决定对发情母犬使用抑制发情药物。

2 使用方法

黄体酮注射液(规格1 mL:10mg, 天津金耀氨基酸有限公司生产, 批号100513), 每犬每天20 mg, 颈部肌肉注射, 连用3 d。

3 使用效果

5例母犬使用黄体酮处理后1~3 d消除了发情表现, 其它发情行为也随之退去, 且均未出现不良反应。

4 小结与讨论

4.1 对警犬而言, 母犬发情严重影响自身的训练和使用, 同时严重干扰其它犬的状态。尤其近几年

我国多次承办国际性大型活动(如北京奥运会、广州亚运会、上海世博会、深圳大运会等), 警犬在安保工作中的作用尤为突出, 各地公安机关培训了一定数量的警犬, 其工作状态直接影响着安保工作和公安工作。因此, 从工作角度使用药物抑制母犬发情是必要的。

4.2 黄体酮属孕激素。当动物应用本品后, 血液中的黄体酮浓度很快升高, 进而抑制下丘脑促性腺激素释放激素的释放, 随即也抑制了垂体促性腺激素的释放, 使卵泡生长成熟及排卵受阻, 造成人为的黄体期, 抑制动物发情。但是, 当停止用药后, 动物在下一个发情期仍可正常发情。黄体酮大剂量应用时通过对下丘脑的负反馈作用, 抑制垂体促性腺激素的分泌, 产生抑制排卵作用; 而小剂量则与雌激素有协同作用, 促进发情表现。因此, 本报告中黄体酮的使用量为每犬每天20 mg, 连用3 d, 肌肉注射, 显然剂量已足够大。临床效果显著, 但其确切用量为多少, 每犬注射同一剂量是否科学, 其毒副作用如何均有待进一步研究。

4.3 据资料报道, 用于抑制动物发情的药物除黄体酮外, 还有安宫黄体酮(甲孕酮)、甲地孕酮、去甲基睾酮等。刘孝玮^[1]曾报道在控制母猫发情和消除其求偶叫声方面, 黄体酮优于雄性激素丙酸睾酮。但黄体酮、丙酸睾酮等激素用于犬抑制发情的临床应用报道尚属空白。

参考文献:

- [1] 刘孝玮. 黄体酮在控制母猫发情中的应用[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(6): 55-56.

美国实施新壁垒对我国冷冻蛙腿出口的影响及对策

沈 烨, 纪 强, 肖德雄

(汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 515041)

中图分类号: S851.346.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0050-01

2011年7月,国家质检总局发出风险预警称,美国FDA网站通报中国某企业出口到美国的冷冻蛙腿产品被检出新兽药氟甲喹,并由此导致美方对我出口冷冻蛙腿产品采取自动扣留措施。此举对我国水产品出口又增添了新的壁垒,将对汕头乃至全国冷冻蛙腿等水产品出口企业带来较大影响。

氟甲喹也称氟喹酸,是一种广谱抗菌药,广泛用于治疗畜禽类,海水、淡水鱼类,虾蟹类细菌性疾病,具有效果好、不易产生交叉耐药性、残留小、安全范围广、吸收好等特点。氟甲喹属氟喹诺酮类药物在我国允许使用,但美国将该类兽药列为水产养殖中禁用的药物。据悉,2011年以来,我国已有16批冷冻蛙腿产品被美国FDA通报检出新兽药,其中包括氟甲喹药物。此次美国对我出口蛙腿产品全面启动氟甲喹检测应引起相关单位的高度重视。

1 美国采取自动扣留措施对我冷冻蛙腿出口的影响

近年来,我国南方地区牛蛙生产养殖得以迅猛发展,特别是广东、福建沿海一带,牛蛙养殖的单位产量和总产量大幅增加。经加工处理的牛蛙肉营养价值丰富,味道鲜美,深受国外消费者的欢迎,国外市场前景看好,出口量逐年上升。据有关资料显示,我国出口冷冻蛙腿的生产加工主要集中在粤东、闽南地区。汕头是广东省唯一生产出口冷冻蛙腿的地区,冷冻牛蛙腿目前已成为汕头出口水产品的主要创汇品种之一,在水产品出口贸易中占有重要份额。2011年1-7月,汕头出口冷冻牛蛙腿2502吨,货值1441万美元,出口量和创汇额均创历史新高,取得了较好的经济效益和社会效益。此次美国对我所有蛙腿产品实施自动扣留检测氟甲喹,将对汕头乃至全国该类产品出口美国产生重大影响,可能延伸波及到牛蛙的养殖、加工、贸易,甚至养殖饲料、产品安全检测和水产品管理等水产产业。

2 出口冷冻蛙腿产品产生药物残留的原因

近年来,美国FDA多次通报我国输美的蛙腿

产品被检出兽药残留。2011年初,美国FDA更新16-124号进口警报,将列入红色警报清单的包括16家中国企业输往美国的海产品实施自动扣留,其中就有3家公司由于蛙腿产品被FDA检出含有未经批准的兽药而被列入红色清单。出现这些情况说明目前我国养殖牛蛙原料的药残问题依然严峻,产生药物残留的主要原因包括:

一是由于牛蛙具有适应性强的特点,相当一部分牛蛙养殖场规模小,养殖模式相对落后,用药用料管理不规范,滥用药物情况较多。

二是部分产品加工厂与原料基地关系相对松散,企业对配套的备案养殖场约束力有限,监督管理措施得不到有效实施。

三是因环境污染、疫病传播、养殖密度大和气候等因素影响,牛蛙养殖过程疫情疫病常有发生,药物使用不可避免。

四是随着国内牛蛙原料成本上升,为减低成本,个别企业有可能私下收购未经备案监管的养殖场生产的牛蛙作为出口产品的原料,这也是出口牛蛙腿常被国外检出药残的隐患之一。

3 应对美国自动扣留措施的对策与建议

一是针对牛蛙的养殖大环境存在诸多薄弱环节,农业、渔业、检疫等相关部门形成合力,齐抓共管,强化养殖基地的准入制度,加强对养殖环境、药物销售环节、饲料使用情况的检查和监管,创造一个良好的养殖环境。

二是在源头上把关,进一步做好原料基地备案工作,规范原料养殖场药物和饲料的使用,大力推进“公司+基地+标准化”食品生产管理模式,鼓励引导出口加工企业逐步建立自有的高起点、高标准的原料基地。

三是生产企业要进一步完善自身产品质量管理体系,建立出口蛙腿产品质量安全监控体系,针对我国在水产养殖中允许使用氟甲喹药物而美国

(下转第51页)

山羊误饮敌百虫药液中中毒的病例报告

王 武

(广西壮族自治区来宾市动物疫病预防控制中心, 广西 来宾 546100)

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)06-0051-01

用敌百虫驱除羊体内外寄生虫时,易发生由于用药剂量过大、给药方法不当甚至误饮敌百虫药液而引起中毒。2011年6月,笔者在临床中遇到一起羊误饮敌百虫药液中中毒的病例,现报告如下:

1 发病情况

2011年6月11日上午,广西来宾市兴宾区城厢乡某山羊养殖户带2只病死山羊前来求助笔者。主诉:饲养96只本地山羊,11日早上用自配的3%敌百虫溶液给羊喷洒以防治螨病。由于粗心大意,未妥善保管装有药液的水桶,导致大半桶药液被部分羊误饮。40多分钟后,发现误饮药液的山羊开始表现不安,来回走动,惊叫,转圈,并相继出现口吐白沫、腹泻,病情严重的甚至卧地不起的情况。

2 临床症状

病羊初期表现为兴奋、狂躁不安,肌肉痉挛,可视黏膜发绀,口吐白沫,呕吐,呼吸和呕吐物有大蒜气味;以后转为精神沉郁,食欲减少或废绝,反刍停止,呆立不动,呻吟,呼吸急促,流泪,流涎,鼻液增多,眼球震颤,瞳孔缩小,出汗,心跳加快,步态不稳,腹泻,粪中混有粘液。病重的头向上弯,旋即倒地不起,四肢和头颈僵直,咬牙,呼吸困难,瘤胃鼓气,全身大汗,最后心力衰竭而死。

3 剖检病变

剖检病死羊可见肝、脾肿大;心内、外膜有出血点;肾脏稍肿,包膜不易剥落;真胃黏膜充血、出血,黏膜易脱落,瘤胃内散发出大蒜味;肠道黏膜

充血、出血,肠壁变薄,肠系膜淋巴结肿大、出血;肺充血、水肿,肺淋巴结肿胀出血,呼吸道分泌物增多,气管内有白色泡沫黏液。

4 诊断

根据发病情况、临床症状和剖检病变,结合大半桶3%敌百虫溶液被部分羊误饮的情况,诊断该病情为山羊农药敌百虫中毒。

5 治疗措施

5.1 特效解毒 对病羊立即用硫酸阿托品0.1 mg/kg体重进行对症治疗,皮下注射,每隔1 h重复给药1次。再用解磷定20 mg/kg体重溶于10%葡萄糖注射液500 mL中,静脉注射,每隔2 h重复静注1次。硫酸阿托品和解磷定要交替使用,直到病羊瞳孔散大,呈现视觉反应,流涎停止,出汗停止,口腔干燥,呼吸症状减轻时,才停止用药。

5.2 中药解毒 病羊每50 kg体重用当归、大黄各50 g,防风、白矾各45 g,金银花80 g,甘草100 g,水煎去渣,加150 g蜂蜜,1次灌服。每隔3 h重复给药1次。

用药1 h后,中毒较轻的病羊症状减轻或消失,14只中毒较重的病羊死亡5只。要求养殖户按治疗方案继续用药,次日早上死亡3只,其余症状大大减轻。3天后电话回访,中毒病羊已基本恢复健康,叮嘱养殖户要做好恢复期的护理工作,应喂给维生素B、C含量高的青饲料并适当添加健胃剂。

收稿日期:2011-07-21

(上接第50页)

禁止使用该类产品,养殖企业应有选择性的使用药物,尽量选择使用国外允许使用的兽药。

四是检验检疫部门要强化日常监管,确保生产源头和加工过程监管到位,采取扩大抽样数量和增加检测频率等应对措施,特别是对氟喹诺酮类、呋喃类等药残项目的监测,切实把好出口水产品的安全质量关;

五是规范企业行为,促进行业的诚信自律。通过行业协会等组织,要求企业不断强化责任意识,加强行业自律和诚信体系建设,促进水产品出口的良性发展。

六是加大氟甲喹等药物残留检测的投入,相关检测机构应开展包括氟甲喹在内的药残检测项目,以符合美国法规要求,尽可能减少贸易风险。