

# 广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

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

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 王贵平 舒鼎铭

孙彦伟 蔡建平 王致富 刘彩霞

特邀编委:

陈 峰 陈大毅 黄小建 陈小云

郑庆禄 贺湘仁 李 岩 林旭埜

陈瑞爱

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdaxmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:10月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



本刊声明:本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》和“万方数据—数字化期刊群”。作者稿件一经本刊录用,将同时被上述三个数据库收录,进入因特网提供信息服务。作者如不同意,请在投稿时向本刊声明,否则本刊将视为同意收录。凡被本刊刊登的稿件,将一次性支付作者著作权使用报酬。

# 目 录

## ·专题综述·

基因工程重组抗体技术的研究进展.....邝贞结(3)

端粒酶的功能、结构与调控的研究进展.....万 向, 马 跃, 等(7)

蚯蚓及其制品在动物生产中应用的研究进展.....万世平, 姜法铭, 等(10)

规模化猪场病毒性腹泻的综合防控.....王斌斌, 廖章辉, 等(14)

## ·畜牧技术·

大豆低聚糖对肉鸭生产性能的影响试验.....罗佳捷, 张 彬, 等(17)

三黄种鸡产蛋期的生长模型的建立与分析.....马发顺, 周建阳(21)

## ·兽医临床·

一例猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪瘟病毒和猪链球菌混合感染病例的诊断  
.....马 琳, 付 薇, 等(24)

鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及药敏试验分析.....刘保光, 肖尚修, 等(26)

## ·试验研究·

一株鸽源新城疫病毒主要毒力基因分析.....孙敏华, 吕殿红, 等(30)

猪圆环病毒2型(PCV2)ORF1基因的系统发育分析和选择压力分析.....  
.....潘德敏, 张婷婷(35)

## ·宠物园地·

“可得福”聚维酮碘与碘酊对犬腹部手术伤口的消毒效果比较.....  
.....周庆国, 李嘉雯(42)

疑似犬血虫净中毒1例.....叶镜岳, 梁淑慧, 等(44)

## ·经验交流·

获取优质猪精液的技术要点.....赵红梅(46)

利用杂交牛进行胚胎移植及其效益分析.....罗蒙和, 李 铭, 等(49)

生猪价格看涨至年底——当前全国生猪生产形势分析... 虞 华, 陈光亚, 等(52)

## ·信息之窗·

2010“永顺杯”优秀论文评选启事.....(6)

本刊征订启事.....(13)

农业部在穗召开广州亚运会动物卫生保障工作座谈会 .....(41)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Oct.2010 Volume 35,Number 5 (Total No.153)

---

## Main Content

- Advances in research on genetically engineered antibody*..... Kuang Zhenjie(3)
- Research progress on function, structure and regulation of telomerase* .....
- .....Wan Xiang , Ma Yue ,et al(7)
- Research Progress on application of earthworm and its products in animal production*.....
- .....Wan Shiping, Jiang Faming, et al(10)
- Prevention and control of viral diarrheas in large-scale pig farms* .....
- .....Wang Binbin, Liao Zhanghui, et al(14)
- Effects of soybean oligosaccharide on growth performance of meat duck* .....Luo Jiajie, Zhang Bin, et al(17)
- Construction and analysis on growth model of yellow feather broiler breeder in laying period* .....
- .....Ma Fashun, Zhou Jianyang(21)
- Diagnosis of the case on co-infections of porcine productive and respiratory syndrome virus, classical swine fever virus and swine streptococcus* .....
- .....Ma Lin, Fu Wei, et al(24)
- Isolation, identification and drug sensitivity test of Riemerella anatipestifer*.....
- .....Liu Baoguang, Xiao Shangxiu, et al(26)
- Analysis of the main virulent genes of one Newcastle disease virus strain isolated from the pigeon*.....
- .....Sun Minhua, Lv Dianhong,et al(30)
- Phylogenetic and selective pressure analysis of ORF1 gene of porcine circovirus type 2 (PCV2)*.....
- .....Pan Demin, Zhang Tingting(35)
- Disinfection effects of povidone-iodine “Kedefu” and iodine tincture on abdominal surgical wounds* ...
- in dogs*.....Zhou Qingguo, Li Jiawen (42)
- One case report on suspected canine diminazene aceturate poisoning*.....Ye Jingyue, Liang Shuhui, et al(44)
- The key points to acquire high quality semen from boar* .....
- .....Zhao Hongmei(46)
- Embryo transfer from crossbred cattle and its benefits analysis* .....
- .....Luo Menghuo, Li Ming,et al(49)



Sponsored by:Guangdong Association of Animal Husbandry  
and Veterinary Medicine,Institute of Animal  
Science and Institute of Vererinary Medicine,  
GuangdongAcademyof AgriculturalSciences.

Published by: Editor Office Guangdong Journal of Animal  
and Veterinary Science.

Chief Editor:JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei  
Editor Add;135 Xianlie Dong Lu, Guangzhou P.R. China  
Post Code: 510500  
Tel:(020)37245052 37288167  
Fax:(020)37245052  
E-mail:gdxmsy@163.com gdxmsyjk@163.com

# 基因工程重组抗体技术的研究进展

邝贞结

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

**摘要:** 经历了多克隆抗体技术、杂交瘤单克隆抗体技术后, 基因工程抗体技术发展十分迅速, 应用也越来越广泛。本文介绍基因工程重组抗体技术的研究进展。

**关键词:** 基因工程抗体; 进展

**中图分类号:** S813

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2010)05-0003-04

在抗体研究的漫长过程中, 相继发展了三代不同水平的抗体制备技术。其中以抗原免疫高等脊椎动物制备的多克隆抗体, 称为第一代抗体; 通过杂交瘤技术生产的只针对某一种特定抗原决定簇的单克隆抗体, 称为第二代抗体; 应用重组 DNA 技术或是基因突变的方法改造某种抗体基因的编码序列, 使之产生出自然界中原本存在的抗体蛋白质分子叫做基因工程抗体, 即第三代抗体。这种基因工程称为抗体工程 (antibody engineering)<sup>[1]</sup>。

Kohler 等<sup>[2]</sup>于 1975 年创立的 B 淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体 (Monoclonal antibody, McAb) 技术, 使抗体技术的研究和应用有了重大突破。该技术已在疾病的研究、诊断、治疗中得到了广泛的应用。尽管如此, 单克隆抗体作为异种蛋白, 应用于机体会受到免疫系统的限制, 产生强烈的免疫应答。另外, 杂交瘤技术还有许多不足之处, 如生产的单抗分子体积过大, 与靶抗原的亲合力不够, 不同的抗原需要单独接种单抗, 细胞融合技术难度高、效率低。最主要的是, 单克隆抗体应用于人体疾病治疗时, 使用单抗两周内就会对其产生免疫反应 (human anti-mouse antibody, HAMA)<sup>[3]</sup>。这使得传统单克隆抗体技术制备的抗体在应用上受到了极大的制约, 无法充分发挥其在疾病防控方面的作用。因此, 基因工程技术及抗体分子遗传学应运而生, 并得到了进一步的发展。在 20 世纪 80 年代中期出现新技术将免疫球蛋白的基因结构和功能同 DNA 重组技术结合起来, 再将重组后的免

疫球蛋白分子基因导入细胞进行表达。由该技术所得的抗体去除或减少了无关结构, 保留 (或增加) 了天然抗体的特异性和生物学活性, 降低或基本消除抗体的免疫原性, 减低抗体中鼠源成分的同时保留原有抗体的特异性。对现有的优良鼠单抗基因进行改造, 所得的抗体人源化程度高, 生产工艺简单, 廉价易得, 且容易获得稀有抗体, 临床应用前景广阔。

1984 年, Morrison 等创立了鼠 / 人嵌合抗体技术, 该技术使得基因工程抗体技术得到了进一步的发展。在第三代抗体中主要包括人源化抗体、小分子抗体、抗体融合蛋白及某些特殊类型抗体等, 从一定程度克服了前两代抗体技术的不足。另外, 噬菌体抗体库、核糖体展示文库等的构建使得不经抗原免疫就可获得特异性抗体。

## 1 人源化的基因工程抗体

人们早期曾尝试用人杂交瘤细胞来生产人单克隆抗体, 但是由于人杂交瘤细胞的不稳定性、人单克隆抗体的低亲和力和伦理争议等方面的原因导致该技术很少被应用<sup>[4]</sup>。

**1.1 嵌合抗体** 降低鼠源单克隆抗体免疫原性的一种方法是将鼠免疫球蛋白的可变区部分链接到相应的人免疫球蛋白的恒定区<sup>[5]</sup>, 这样就产生了鼠 / 人嵌合抗体, 人源区域在 60%~70%。应用重组 DNA 技术, 将鼠源单抗的可变区基因与人的恒定区基因连接, 构建的嵌合基因插入适当的表达质粒, 转染相应的细胞后表达。所产生的嵌合抗体具有结合抗原的功能, 同时降低了鼠源单抗的

异源性, 这样的嵌合抗体在亲和力方面与相应的鼠单抗没有太大的差异, 而人对它的免疫反应会有所降低。但由于其仍然保留了鼠免疫球蛋白可变区的异源性, 临床实验证明该嵌合抗体在应用时还会产生人抗嵌合抗体(HACA)可变区的免疫反应<sup>[6]</sup>。

**1.2 人化抗体** 为了降低嵌合抗体的免疫原性, 使嵌合抗体更加人源化, 产生了 CDR 嫁接技术(CDR grafting)<sup>[7,8]</sup>。该技术将免疫球蛋白的其他区域都用人免疫球蛋白取代, 而仅仅保留鼠免疫球蛋白可变区的 CDR 部分, 这就最大限度地降低鼠源抗体的免疫原性。这样产生的抗体叫做人化抗体(humanized antibody)或改形抗体(reshaped antibody)。这样的操作往往需要复杂的 DNA 操作, 并且有些病人也会产生针对异源 CDR 的免疫反应。为了降低这种反应, 只有 CDR 中最具特异性的氨基酸残基部分才能被嫁接到人抗体的骨架部分<sup>[9]</sup>。尽管抗体的亲和力主要取决于 CDR, 但是抗体的其他部分也会对亲和力产生影响。为了在免疫球蛋白改形后仍然保持原有的亲和力, 还需要对免疫球蛋白骨架区进行改进<sup>[10]</sup>。

## 2 小分子抗体

为了突破单克隆抗体过大带来的限制, 发展了小分子抗体的技术。这些技术的目标是获得抗体的抗原结合片段(Fab)和抗体的可变区(Fv)。这样的片段可以通过对抗体的裂解得到, 也可以通过扩增免疫球蛋白的相关基因并在细菌内克隆表达而得到。小分子抗体分子量小、穿透性强、免疫原性低、半衰期短, 目前研究较多和比较有实用前景的有以下几种。

**2.1 单链抗体** (single chain antibody, scFv) 该技术将重链可变区与轻链可变区用一连接肽连接, 并利用原核表达系统表达成一条单链多肽并折叠成由重链、轻链可变区构成的一种新型抗体。该抗体大小仅为完整 IgG 的 1/6, 同时抗原结合位点没有发生变化, 因此保留了完整的结合特异性。基于这一优势, ScFv 具有更好的组织穿透力, 能够进入一般抗体无法到达的部位, 在临床应用及疾病治疗中能够得到更好的应用。另外, 单链抗体拥有多肽接头, 可根据需要设计为具有特殊功能的位点, 如金属螯合、连接毒素或药物等, 用于

影像和临床治疗。

**2.2 多价抗体** 该抗体的多个抗原结合位点具有不同的特异性, 能够结合不同的抗原分子, 改变了传统抗体只能结合单一抗原分子的不足。目前研究人员关注较多的是双特异性单克隆抗体(bispecific monoclonal antibody, BsAb)。应用基因工程与化学偶联技术, 把识别不同抗原的两种抗体的编码序列进行重新排列, 生产出可同时与两种抗原作特异性结合的新型重组抗体, 即双特异性单克隆抗体。在这种抗体中, 两条臂分别识别两种不同的抗原, 因此构建出既能同肿瘤细胞表面抗原结合, 又能同杀伤性 T 细胞表面抗原结合的双特异性的单克隆抗体。这使两种不同的细胞彼此靠近, 从而有利于杀伤性 T 细胞对肿瘤细胞的致死作用。

**2.3 Fab 片段** 在抗体中, Fab 段主要起到结合抗原的作用, 而利用基因工程的方法, 将 Fd 基因与轻链基因 5' 端通过链间二硫键连接, 并接上细菌的信号序列。表达后的蛋白在信号肽酶的作用下被剪除信号肽并完成立体折叠等步骤成为异二聚体, 发挥正常 Fab 的功能。该抗体仅为 IgG 的 1/3, 且没有 Fc 段, 免疫原性低, 具有良好的穿透力, 常用作导向药物的载体和显影。

## 3 噬菌体抗体技术

20 世纪 90 年代初, 在 PCR 技术、抗体 Fab 片段在大肠杆菌中的表达及噬菌体表面呈现技术快速发展的基础上, 出现了基于分子生物学方法建立的抗体库(repertoire antibody)技术。其中, 噬菌体抗体库技术(Antibody phage display)表现更为优越。

噬菌体抗体(PhAb)技术的基本程序是: 用 PCR 方法扩增全套抗体可变区基因或抗体片段(Fab、Fv 或 scFv)基因, 并与噬菌体衣壳蛋白基因连接后转入载体中, 它能够与丝状噬菌体的外壳蛋白形成融合蛋白, 将抗体 Fab 段或单链抗体表达在噬菌体表面, 然后通过抗原的亲筛选从众多的抗体中得到特异性明确的抗体及其编码基因。该技术绕过细胞杂交环节, 不再使用小鼠进行免疫得到抗体, 在数周内就能够得到特异的人抗体基因而生产人源化抗体。用 B 淋巴细胞全套抗



体可变区基因克隆并组装成的噬菌体群体称之为噬菌体抗体库 (phage antibody library)<sup>[11]</sup>。根据抗体片段大小的不同,抗体库可分为 Fab 库、单链抗体 (scFv) 库、单域抗体库、diabody 库、dsFv 库和 minibody 库等。scFv 和单域抗体分子小、穿透力强、体内半衰期短、免疫原性低。diabody 与 minibody 都是双价抗体,其与抗原的结合能力远高于单链抗体,是较理想的免疫显像和治疗用抗体形式。

该技术操作简单、无需细胞杂交或复杂的 PCR 技术、周期短、花费少;利用不同的抗原可同时筛选几种抗体,并可在百万至亿万个分子中进行选择;适用于抗体、激素、酶、药物、随机多肽等蛋白的制备,更为令人关注的是,该技术能得到由于免疫耐受机制的影响导致免疫动物不能产生的抗体。噬菌体抗体技术极大地推动了基因工程抗体的发展,它们的产生为人类及动物疾病的预防、诊断和治疗带来了新的希望<sup>[12~14]</sup>。

#### 4 核糖体展示技术与 mRNA 展示技术

核糖体展示技术 (ribosome display, RD) 的关键步骤在于,利用分子生物学技术构建 ScFv 抗体基因文库,然后转录成 mRNA;在大肠杆菌等体外表达系统中翻译、表达,最终以固化的抗原进行亲和筛选,从翻译后的 mRNA-ScFv 复合物中得到高亲和力的 ScFv。改进后的 RD 技术,由于 mRNA 上没有任何终止密码子,翻译过程中蛋白和编码它的 mRNA 同时结合在核糖体上,形成了蛋白-mRNA-核糖体复合物,使得蛋白的表型及基因型以这种复合物的形式偶联,经过展示后,筛选蛋白能够被富集 100~1 000 倍。该技术不使用任何细胞,因此相较于其他技术,效率得到了明显的提高,极大的缩短了实验周期,便捷、快速<sup>[15, 16]</sup>。

1997 年 Roberts 等设计了一种与 RD 类似的方法,即 mRNA 展示技术 (mRNA display, 又称 RNA-多肽融合技术, RNA-peptide fusion)。该系统利用嘌呤霉素分子将 mRNA 分子与其所编码的多肽共价结合起来,先将嘌呤霉素与单链 DNA 连接物的 3' 端连结,再与文库编码的 mRNA 连结。这样,当 mRNA 在体外翻译时,核糖体到达 mRNA 和

DNA 的结合点并稳定下来,嘌呤霉素进入核糖体氨酰化位点,在氨酰转移酶的作用下与所编码的多肽偶联,再用固化的抗原分子对 RNA-多肽复合物进行筛选<sup>[17]</sup>。

#### 5 转基因动物技术

近年来,转基因动物技术飞速发展,其应用范围也越来越广。例如,鼠胚胎干细胞的 IgH 和 Igκ 位点在利用同源性重组技术删除 JH 和 Cκ 区而灭活后,能够达到宿主动物相应基因沉默的目的。分别删除这两个区域的小鼠杂交而得的后代 JH<sup>-/-</sup> 和 Cκ<sup>-/-</sup> 两基因被灭活,然后将人抗体基因克隆到酵母人工染色体 (yeast artificial chromosomes, YACs) 上,并整合入该种小鼠的胚胎细胞,这样的细胞经显微注射入母体后得到含人抗体 IgH 和 Igκ 位点序列的杂交后代。经免疫后,这些杂交鼠产生的人源抗体亲和力和高,特异性好,使用效果及安全性得到了较大的提高,对自身免疫性疾病、癌症等慢性病的治疗效果优异。

#### 6 转基因植物技术

与哺乳动物细胞系或转基因动物产生抗体比较,植物抗体 (Plantibody) 具有价廉、高效、安全等优点。1995 年 Ma 等制备了一种产生于烟草植物中的抗体——分泌型二聚体 IgA/G (SIgA/G),能识别变异链球菌细胞表面蛋白。经研究证明,该抗体可用于治疗齿齦病,还可防止变异链球菌定居口腔,效用可持续 4 个月。2002 年, Bouquin 等在转基因芥类植物细胞中成功制备了抗 RhD 抗原的人源化 IgG1 抗体,经研究表明该抗体具有广阔的诊断及治疗应用前景<sup>[18, 19]</sup>。

抗体制备技术在基因工程抗体技术的发展过程中进入了一个全新的时代,可广泛应用于生命科学中的许多领域,对于病毒性疾病、器官移植、肿瘤、自身免疫性疾病、中毒性疾病、变态反应性疾病等方面具有重要的作用。这些技术使制备抗体变得简单便捷、稳定廉价,为大规模的应用提供了良好的基础。另外,所得的抗体在蛋白质纯化工程中也能够得到广泛的应用。随着分子生物学和免疫学技术的不断发展,基因工程抗体技术将在疾病预防、诊断及治疗上得到越来越多的应用,这为提高人类生活质量提供强有力的支持。

## 参考文献:

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [3] Vaughan T J, Williams A J, Pritchard K, *et al.* Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14 (3): 309-314.
- [4] Winter G, Milstein C. Man-made antibodies [J]. *Nature*, 1991, 349 (6307): 293-299.
- [5] Morrison S L, Johnson M J, Herzenberg L A, *et al.* Chimeric human antibody molecules—mouse antigen-binding domains with human constant region domains [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(21): 6851-6855.
- [6] Adair J R. Engineering antibodies for therapy [J]. *Immunol Rev*, 1992, 130: 5-40.
- [7] Jones P T, Dear P H, Foote J, *et al.* Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse [J]. *Nature*, 1986, 321 (6069): 522-525.
- [8] Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity [J]. *Science*, 1988, 239(4847): 1534-1536.
- [9] Kashmiri S V, de Pascalis R, Gonzales N R, *et al.* SDR grafting—a new approach to antibody humanization [J]. *Methods*, 2005, 36 (1): 25-34.
- [10] 何维, 高晓明, 曹学涛, 等. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [11] Watanabe T S, Ohtori S, Koda M, *et al.* Adenoviral gene transfer in the peripheral nervous system [J]. *J Orthop Sci*, 2006, 11(1): 64-69.
- [12] Boel E, Verlaan S, Poppelier M J, *et al.* Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 239(1-2): 153-166.
- [13] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases [J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(18): 845-851.
- [14] O'Connell D, Becerril B, Roy-Burman A, *et al.* Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies [J]. *J Mol Biol*, 2002, 321(1): 49-56.
- [15] Hanes J, Fluckthum A. In vitro selection and evolution functional proteins by using ribosome displaying [J]. *PNAS USA*, 1997, 94: 4937-4942.
- [16] Hanes J, Jermutus L, Bornhauser S W, *et al.* Ribosome play efficiently high affinity antibodies in vitro from libraries [J]. *PNAS USA*, 1998, 95: 14130-14135.
- [17] 李菁, 林彤, 宋帅, 等. 基因工程抗体研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009, 10: 40-44.
- [18] Schillberg S, Fischer R, Emans N. Molecular farming of recombinant antibodies in plants [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(3): 433-445.
- [19] Bouquin T, Thomsen M, Nielsen L K, *et al.* Human anti-rhesus D IgG1 antibody produced in transgenic plants [J]. *Transgenic Res*, 2002, 11(2): 15-22.

## 2010“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 2010 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 2011 年第 1 期公布。

1、**评选范围:** 本刊 2010 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:** 优秀论文数篇, 分设一、二、三等奖。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。

### 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

二〇一〇年一月十六日

# 端粒酶的功能、结构与调控的研究进展

万 向<sup>1</sup>, 马 跃<sup>1</sup>, 曹立亭<sup>1</sup>, 许李丽<sup>1</sup>, 王海珍<sup>1</sup>, 何吉春<sup>2</sup>

(1. 西南大学动物科技学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 江津区德感镇畜牧兽医站, 重庆 江津 402284)

**摘要:** 端粒酶 (Telomerase) 是真核生物细胞内的一种核蛋白酶, 用它自身携带的 RNA 作模板进行反转录, 不断合成新的 DNA 序列添加到染色体末端, 从而弥补细胞分裂时丢失的端粒。近年来研究表明, 端粒酶在保持端粒稳定、基因组完整、细胞长期的活性和潜在的继续增殖能力等方面具有重要作用。如果能明确端粒酶功能、结构及调控方式, 将会进一步推动抗衰老及肿瘤的研究。

**关键词:** 端粒酶; 基因表达; 活性调控

**中图分类号:** S813.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2010)05-0007-03

细胞衰老是细胞生命活动的必然规律, 是生物体内细胞增殖能力和生理功能逐渐下降的变化过程。另外, 体外培养的正常细胞最多只能传40~50代, 传至50代以后就会产生突变。目前, 学者们认为端粒的长度、结构与细胞衰老密切相关。另外, 也有研究表明, 衰老可能和端粒的功能失调有关。端粒长度、结构及功能依赖端粒酶活性的调节。研究端粒酶的功能、组合成分、活性调控以及相关基因的表达等对于揭示细胞衰老的机制具有重要价值。

## 1 端粒酶的主要功能

端粒酶是1985年Blackburn和Greider<sup>[1]</sup>在四膜虫细胞核提取物中首先发现并纯化的, 随后被证实也存在于尖毛虫(*Oxytricha*)、游仆虫(*Euplates*)和人宫颈癌细胞株Hela等细胞中。端粒酶是一种核蛋白逆转录酶, 其主要功能是以自身的RNA(Telomerase RNA, TR)为模板, 以端粒酶逆转录酶(Telomerase reverse transcriptase, TRET)为催化亚基, 以端粒酶相关蛋白为调节亚基, 以端粒3'末端为引物, 合成端粒重复序列, 补充在细胞分裂增殖时丢失的端粒。生殖细胞、干细胞等胚性细胞和肿瘤细胞内可检测出端粒酶活性, 表现为永生细胞; 而在没有端粒酶活性的细胞中, 随着细胞分裂的进行, 细胞进入危机期, 此时大多数细胞就会死亡。但其中有极少数细胞其端粒酶活性会因某些原因被激活, 从而使端粒不断维持在一定的长度而不再缩短, 因而稳定了染色

体, 细胞便逃过死亡成为无限增殖的细胞。相反, 原核生物的环状染色体不存在真核细胞的端粒缩短机制, 但是也会衰老, 可能是不同细胞类型差异造成的。尽管如此, 大多数事实证明, 端粒酶与细胞寿命直接相关, 且端粒酶的激活和表达程度与肿瘤的发生、发展也有十分密切的关系。

端粒酶的另一功能是能修复断裂的染色体末端。当断裂的染色体末端有富含G、T的DNA存在时, 即使没有完整的端粒重复序列存在, 它也能被端粒酶作为引物DNA并为之延伸端粒序列, 从而避免外切酶对染色体DNA更多的切割, 维护基因组遗传的稳定性。端粒延长的旁路途径(alternative lengthening of telomere, ALT)的发现提示了端粒酶可能与减数分裂的同源重组和DNA修复之间存在某种关系。此外, 端粒酶还具有在端粒合成中去除错配碱基的纠错作用, 它不仅可以去错配碱基, 还可除去延伸超过模板范围的碱基。随着研究的深入, 还发现端粒酶在促进细胞存活、染色体分离及提高细胞对毒性因子耐受性等方面具有重要作用。

## 2 端粒酶的核心成分

端粒酶是一种特殊的DNA聚合酶, 一般认为, 它的核心成分是端粒酶RNA(TER)和端粒酶反转录酶(TERT), 即端粒酶有活性的最小组成单位。

**2.1 端粒酶RNA** 目前, 国外已经克隆了许多生物的端粒酶RNA(TR)基因, 包括四膜虫、纤毛虫、鼠、啤酒酵母和人等。其中, 人类端粒酶RNA模板



序列为 CUAACCCUAAC, 由 450 个核苷酸组成<sup>[2]</sup>。国内有关端粒酶 RNA 的研究刚刚起步, 2000 年马永红等<sup>[3]</sup>以人血 DNA 为模板, 成功克隆并鉴定了人的端粒酶 RNA 基因; 2009 年郑梅竹等<sup>[4]</sup>克隆并鉴定了鸡端粒酶 RNA (chicken telomerase RNA, chTR) 基因。

端粒酶 RNA 亚基是合成端粒 DNA 的模板, 对于端粒酶的结构和催化活性都十分重要。端粒酶 RNA 基因缺失的小鼠, 自身细胞丧失端粒酶活性, 而在快速增殖的器官中, 细胞也会快速凋亡<sup>[3]</sup>。另外, 端粒酶 RNA 还可作为肿瘤的特异治疗靶点。目前, 用能抑制基因表达的反义核苷酸 anti-hTR 转染癌细胞, 可抑制端粒酶的活性, 促进细胞凋亡。

端粒酶 RNA 存在于各种细胞中且含量基本恒定, 在多种肿瘤细胞中, 测得的端粒酶 hTR 与端粒酶活性无平行关系。然而, 端粒酶 hTR 基因表达的检测也可能有一定价值。苑昕等<sup>[6]</sup>检测肠癌细胞端粒酶 hTR 基因的表达, 20 例大肠癌 17 例阳性, 提示端粒酶基因 hTR 表达检测在大肠癌的诊断和鉴别诊断中可能有一定的价值。李新贵等<sup>[7]</sup>测定了端粒酶 hTR 基因在大肠癌中的表达, 结果显示, hTR 基因表达与性别及病变部位无关, 而与肠癌的病理分级有关, 提示端粒酶 hTR 基因表达能否作为大肠癌的诊断标准还有待深入研究。

脊椎动物的端粒酶 RNA 模板二级结构 3' 末端包含一个小核仁核蛋白区域 (snoRNP), 它是端粒酶相关蛋白结合域。人类的端粒酶 3' 端具有 box H/AAC snoRNA 所特有的“发夹-铰链-发夹-尾”的二级结构, 并结合了 4 个 snoRNP 复合体核心蛋白。端粒酶的 box H/ACA 结构域可能指导端粒酶 RNA 前体的 3' 端加工, 保证成熟 RNA 的稳定性, 而且能与端粒酶逆转录酶结合从而行使端粒酶的功能。

**2.2 端粒酶反转录酶** 端粒酶反转录酶 (TERT) 仅在端粒酶阳性细胞中正常表达, 其它组织细胞不表达或活性较低。迄今, 鼠、酵母、游仆虫、纤毛虫、鞭毛虫及人等上百种生物的 TERT 基因已经被克隆出来。TERT 基因由三个结构域组成: N 端、中心结构域和 C 端。N 端与端粒酶活性、RNA 结合以及蛋白的聚集和端粒延伸有关。中心结构域含有端粒酶特有的一些基序, 保守性较高, 相反, C 端保守性较低。TERT 基因的表达与端粒酶活性存在

平行关系。HTERT 基因转入人成纤维细胞和视网膜色素细胞, 得永生化的细胞<sup>[8]</sup>。将外源基因转入真核细胞的方法有多种, 逆转录病毒载体是目前最有效的方法。杨玉琮等<sup>[9]</sup>通过  $\Psi$ -2 细胞培养上清重复感染, PA317 细胞所产病毒滴度提高 20 倍, 得到高滴度的 PA317/hTERT 包装细胞系, 建立了高效的逆转录病毒基因转移系统。但是, 当端粒酶延长端粒以后, 切除 hTERT 基因, 细胞的寿命反而会更长<sup>[10]</sup>。虽然如此, TERT 基因的表达仍然被广泛认为是激活端粒酶活性的限速步骤。

### 3 端粒酶活性的调控

端粒酶活性的调控机制是非常复杂和相当严密的, 端粒酶活性受到端粒结合蛋白、基因表达和细胞周期等多方面的调控。

**3.1 端粒结合蛋白的调控** 端粒重复结合因子 1 (TRF1) 与相关因子 TN2 (TRF1 相关核蛋白 2)、Pinxl (Pin2 / TRF1-interacting protein xl) 发挥协同作用, 与端粒酶催化亚基直接结合并导致其失活<sup>[11]</sup>, 是端粒酶活性的负向调控因子。

端粒相关蛋白 tankyrase 以同源二聚体的形式与 TRF1 结合, 共同发挥抑制 TRF1 的作用, 是端粒酶活性的正向调控因子<sup>[12]</sup>。另外, 有报道称 tankyrase-2 与 tankyrase 密切相关, 也是端粒酶活性的正向调控因子。相反, Susan 等<sup>[13]</sup>删除了小鼠 tankyrase-2 的主要成分 RARP 以后, 小鼠表现为生长迟缓, 但它的寿命、端粒长度及端粒的“帽子”结构并没有受到影响, 提示 tankyrase-2 可能只是在小鼠普通的生长发育中扮演重要角色, 并不会对端粒酶发挥作用。

**3.2 基因表达的调控** 众多癌基因和抑癌基因、凋亡相关基因均参与了端粒酶活性的调控过程。Bcl-2 能够正向调控端粒酶活性, 用 Bcl-2 转染 HeLa 细胞后, 端粒酶活性增强 5~10 倍<sup>[14]</sup>。P53 为一种抑癌基因, 能控制细胞从 G0 与 G1 期进入 S 期, 抑制 hTERT 转录, 降低端粒酶活性, 从而抑制细胞增殖, 间接诱导肿瘤细胞凋亡。HPV 病毒基因组中的癌基因 E6, 该基因的表达产物, 在转录后水平调节 MYC 的表达, 间接促进 TERT 基因的表达, 提高端粒酶的活性。这些发现, 较以前单独针对端粒酶 TR 与 TERT 基因进行抗衰老及治疗肿瘤的研究取得了更好的预期效果。

**3.3 细胞周期的调控** 研究表明, 细胞进入 G<sub>0</sub>



期,停止分裂,端粒酶活性下降。当受到其它因素刺激时,细胞再次进入细胞周期,端粒酶被激活。细胞进入 G<sub>1</sub>/S 期后端粒酶活性逐渐增高,于 S 期达到最高,进入 G<sub>2</sub>/M 期后细胞几乎丧失端粒酶活性<sup>[15]</sup>。人雌激素可以使细胞周期发生改变,使更多的细胞进入 S 期,提高端粒酶活性。

#### 4 问题与展望

端粒酶的研究是一项重要的生物学课题,它可能使延缓衰老、肿瘤的诊治治疗等未来研究出现新的突破。另外,端粒酶的激活可以促进肿瘤的形成,针对端粒酶进行抗衰老必须防止肿瘤的形成。然而,端粒酶的研究只是刚刚开始,还有许多问题亟待解决。整体来说,老化和癌症的发生机制是机体各器官、组织及外部环境相互作用的结果,端粒酶的研究作为其中一环并不能解决全部问题。因此,未来还需要对端粒酶的结构、功能及调控进行更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Greider C W, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts[J]. Cell, 1985(2):405-413.
- [2] Feng J, Funk W D, Wang S S, et al. The RNA component telomerase[J]. Science, 1995, 269:1236-1241.
- [3] 马永红, 张玉静, 叶志远, 等. 人端粒酶 RNA 基因的克隆与鉴定[J]. 生物技术, 2000, 10(6):5-7.
- [4] 郑梅竹, 时东方, 潘风光, 等. 鸡端粒酶 RNA 基因的克隆[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5):865-868.
- [5] Blasco M A, Greider T. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA[J]. Cell, 1997, (5):25-34.
- [6] 苑昕, 张波, 应建明, 等. 端粒酶基因在人肿瘤组织中的表达[J]. 病理学杂志, 2000, 29(1):16.
- [7] 李贵新, 张永庆, 王会东, 等. 端粒酶基因 hTR 在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. 潍坊医学院学报, 2002, 24(1):20-22.
- [8] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells[J]. Science, 1998(279):349-352.
- [9] 杨玉琼, 李旭, 陈葳. 转移人端粒酶逆转录酶基因的实验研究[J]. 西安交通大学学报, 2003, 24(6):549-551.
- [10] Wales C P, Holt W E, Ouellette M, et al. Absence of cancer-associated changes in human thyroid and parathyroid tissue[J]. Gerontol, 2002, 37(4):510-513.
- [11] Zhou X Z, Lu K P. The Pin2/TRF1-interacting protein Pinx1 is a potent telomerase inhibitor[J]. Cell, 2001, 107(3):347-359.
- [12] Smith S, Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells[J]. Curr Biol, 2000, 10(20):1299-1302.
- [13] Susan J H, Marc F P, Brando DC, et al. Tankyrase2 Poly(ADP-Ribose) Polymerase Domain-Deleted Mice Exhibit Growth Defects but Have Normal Telomere Length and Capping[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, (3):2044-2054.
- [14] Mandal M, Kumar R. Bcl-2 Modulates Telomerase Activity[J]. Biological chemistry, 1997, 272(22):183-187.
- [15] Peital P, Mello S S, Campart M L, et al. Chromosomal rearrangements involving telomeric DNA sequences in BAL31b/3T3 cells transfected with the Harason cognate[J]. Mutagenesis, 2002, 17(1):67-72.

## 生猪龙头企业产业链整合将获政府奖励

为调动地方发展生猪产业的积极性,保障猪肉市场供应安全,财政部日前修订了《生猪调出大县奖励资金管理办法》。与原《办法》不同,新《办法》明确将龙头企业有关支出列入奖励资金使用范围,同时提出对大型生猪产业化龙头企业实施产业链整合给予支持。

修订后的新《办法》明确,生猪调出大县坚持“引导生产、多调多奖、直拨到县、专项使用”的原则,主要以统计系统公开发布的分县分年数据为基础,对统计数据达到规定标准的县予以奖励。对达不到规定标准,但对区域内的生猪生产和猪肉供应起着重大影响作用的县(如 36 个大中城市周边的产猪大县),可以纳入奖励范围。

新《办法》同时明确,奖励资金以生猪调出量、出栏量和存栏量作为测算因素,所占权重分别为 50%、25%、25%。分县生猪出栏量、存栏量按前 3 年的数据进行算术平均。调出量按生猪出栏量扣除当地生猪消费量计算。

财政部根据每年地方报送数据及当年奖励资金规模等情况,确定当年生猪调出大县后,按奖励因素及各自所占权重计算,将奖励资金直接分配到县。

与原《办法》不同,新《办法》明确提出支持生猪产业链整合。新《办法》称:“为增强产业抵御市场风险、维护消费安全,对大型生猪产业化龙头企业(含专业合作社)实施整合生猪产业链,引导产销有效衔接的项目予以支持。此项目由中央财政统一实施,不包括下达至县级财政的奖励资金。”此外,新《办法》还增加了奖励资金使用范围。新《办法》明确奖励资金还可用于生猪保险保费补助支出,采用先进养殖技术等。(信息来源:中国牧业网)

# 蚯蚓及其制品在动物生产中应用的研究进展

万世平, 姜法铭, 曹 杰, 龚志亮

(上海市浦东新区动物疫病预防控制中心, 上海 浦东 201200)

**摘要:** 蚯蚓及其制品具有优良的营养价值、药用价值及生态价值, 被逐渐运用于动物生产之中, 并产生了较高的经济效益、社会效益和生态效益。本文从蚯蚓的应用价值、应用形式以及具体应用情况等方面探讨了蚯蚓及其制品在动物生产中的研究进展。

**关键词:** 蚯蚓; 营养; 养殖; 应用

**中图分类号:** S816

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2010)05-0010-04

随着畜牧业的迅速发展, 生态养殖理念的不断深入, 现代养殖业对高蛋白质饲料的需求量越来越大。因此, 饲料资源尤其是新型生态的高蛋白质动物性饲料在饲料业的地位显得越来越重要。近年来, 在我国悄然兴起的蚯蚓养殖业为动物性蛋白质饲料资源的开发利用开辟了一条新的途径。由于科学技术的发展, 蚯蚓的各种活性成分的提取已成为现实, 其活性成分的药物功效得以充分研究, 药用功效被逐步认识并被运用于动物疾病防控。同时, 蚯蚓具有强大的处理畜牧养殖粪污及生产垃圾的能力, 在现代畜牧业中得到了广泛应用。本文从蚯蚓及其制品的营养价值、药物价值及生态价值利用三个方面, 综述了蚯蚓在动物生产中的应用。

## 1 蚯蚓的应用价值

**1.1 营养价值** 蚯蚓具有重要的营养利用开发价值, 是优异的蛋白质饲料。新鲜蚯蚓蛋白质含量占 20% 以上, 蚯蚓干物质中蛋白质含量平均为 56.5%, 最高可达 71.0%, 略低于秘鲁鱼粉, 但高于饲用酵母和豆饼, 是玉米的 6 倍<sup>[1]</sup>。蚯蚓富含各种氨基酸, 各种必需氨基酸的组成与含量优于豆饼和玉米, 接近鱼粉, 和饲用酵母相当。其氨基酸以谷氨酸含量最高, 约占氨基酸总量的 8.21%。蚯蚓蛋白质中精氨酸、色氨酸、赖氨酸均较部分饲料原料高。蚯蚓粗脂肪含量高, 油脂含量为 5%~8%, 干蚯蚓的粗脂肪含量为 7.8%, 略高于秘鲁鱼粉, 显著高于饲用酵母、豆饼和玉米。蚯蚓中含有丰富的胡萝卜素和维生素 A、B、E, 可有效弥补

饲料中维生素不足。另外蚯蚓还富含微量元素: 干蚯蚓中铁的含量是鱼粉的 14 倍, 是豆饼的 10 倍多, 铜含量比鱼粉高 1 倍, 锰含量是鱼粉的 4~6 倍, 是豆饼的 4~6 倍, 锌含量是鱼粉及豆粕的 3 倍以上。其他如钾、钠、镁含量都高于豆饼, 钙、磷含量虽低于鱼粉, 但高于豆饼 2~3 倍, 而且动物对蚯蚓体内磷的利用率高达 90%。

**1.2 药用价值** 近年来, 对蚯蚓的药用研究日益增多, 对蚯蚓的活性成分、药理作用及临床效果的研究不断有新的进展和成果。蚯蚓含有蚯蚓解热碱、蚯蚓毒素、琥珀酸、胆碱等成分, 且含有多种氨基酸和特殊酶。蚯蚓可直接用于动物疾病的治疗, 其药用名为地龙, 味咸、性寒, 有清热镇痉, 利尿通淋, 滋补通乳, 敛疮解毒, 平喘通络的功效, 主治高热惊狂, 肺热咳嗽, 痉挛抽搐, 尿涩水肿等疾患, 疗效颇佳。蚯蚓提取物还可用于疾病的防控, 药理活性显著, 且提取成本低廉, 毒副作用低, 疗效确切。其提取物具有抗心律失常、解热、抗癌、平喘、降压、抗凝、抑制或促进血小板聚集、促进伤口愈合、增强免疫、杀菌、通乳等药物功效<sup>[2]</sup>。

**1.3 生态价值** 蚯蚓在畜牧养殖场有机废弃物的无害化处理和资源化利用上的应用引起了人们的格外关注。蚯蚓具有强大的粪污处理能力, 可以减少动物粪便中的臭气, 改善畜舍环境。同时, 经蚯蚓处理后的畜禽粪便返田, 不仅增加土壤有机质、提高土壤肥力, 避免或减轻化肥、重金属对农业环境的污染, 还可以形成土壤团粒结构, 改善土壤环境, 有利于水肥保持, 改善牧草的生长环境。

## 2 蚯蚓在畜牧生产中的应用形式

**2.1 鲜蚯蚓** 鲜蚯蚓是一种多汁、高蛋白质的动物饲料,目前广泛用于鸡、鸭、猪、龟、虾、蟹等动物的活食饵料。研究表明,鲜蚯蚓可提高猪的日增重,降低饲料成本,可明显提高蛋鸡和蛋鸭的产蛋量,增加鸭蛋的重量。鲜蚯蚓具有特殊气味,对水产动物具有良好的诱食效果和促生长作用<sup>[3]</sup>。鲜活蚯蚓被广泛运用于畜牧养殖场粪污的处理和环境的改善。在畜禽养殖中由于使用含有微量元素的添加剂,动物粪便中重金属元素含量过高,严重危害人和动物的健康。蚯蚓具有较强的分解有机废弃物的能力,可直接生长于畜粪中,消耗大量的有机废弃物,蚯蚓对重金属元素具有很强的富集作用<sup>[4]</sup>。

**2.2 蚯蚓液** 蚯蚓液包括蚯蚓原液、蚯蚓提取液、蚯蚓体腔液、蚯蚓营养液等形式,是从鲜蚯蚓中提取的体液、血液和细胞内外液或活性成分,与其他成分的复合制品。蚯蚓液中含有丰富的氨基酸和多肽,能直接被动物机体吸收,在杀伤肿瘤细胞、化学增效、辐射增效及提高机体免疫功能等方面发挥重要作用,可用于细菌、病毒感染性疾病、免疫性疾病的治疗。蚯蚓液中同时含有丰富的矿物质和维生素,尤其以铁及维生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、C 的含量最高,钾、铁、钙、钠、锌等含量较为丰富,并且含有一定的硒、锰等动物机体必需的微量元素<sup>[5]</sup>。

**2.3 蚯蚓粉** 动物用蚯蚓粉由鲜蚯蚓经风干或烘干后粉碎而成,近年来作为蛋白性饲料来源在饲料工业中广为应用。蚯蚓粉含粗蛋白质 54%~70%,含有 18 种氨基酸,必需氨基酸总量占 27%~28%。此外,还含有多种不饱和脂肪酸、多种维生素、微量元素以及某些生长因子,可以促进动物的新陈代谢,提高生产性能。研究表明,蚯蚓可代替鱼粉应用于饲料中,育肥猪饲用后日增重和饲料转化率明显优于国内鱼粉<sup>[6]</sup>。在蛋鸡日粮中添加蚯蚓粉后可提高生产性能,改良鸡蛋品质<sup>[7]</sup>。

**2.4 蚯蚓渣** 蚯蚓渣是蚯蚓蛋白开发利用的一种重要形式,由蚯蚓的活性物质被提取后所残留的中草药和蚯蚓残体组成。蚯蚓渣的蛋白质含量较高,而且含有一定的蚯蚓和中草药的活性物质。经测定,蚯蚓渣粗蛋白质含量高达 56.79%,利用率高达 96.04%。蚯蚓渣中氨基酸种类全面,其中有 11 种必需氨基酸含量较高,尤其蛋氨酸和赖氨酸的含量较丰富,其中蛋氨酸和胱氨酸含量均

高于秘鲁鱼粉,赖氨酸高于优质豆粕。蚯蚓渣是一种营养利用价值很高、开发前景较好的畜禽蛋白质饲料原料,可作为一种新型的动物蛋白饲料和功能性饲料添加剂使用<sup>[8]</sup>。

**2.5 蚯蚓粪** 蚯蚓粪具有较高营养价值,其粗蛋白含量与玉米相当,钙的含量仅次于芝麻饼,磷的含量与豆粕和花生饼相近,还含有一定量的粗脂肪、粗纤维以及磷、钾、镁、铜、硼、锰等微量元素。蚯蚓粪经炭化和发酵处理后作为畜禽饲料添加剂使用,可明显提高畜禽的生长性能。蚯蚓粪在发酵处理过程中产生的多种诱食剂、有机酸,可以显著提高畜禽的采食量。蚯蚓粪在发酵过程中可以产生多种消化酶、有机酸以及维生素、氨基酸、核酸等物质,有助于机体的消化吸收。蚯蚓粪可强化除臭功效,蚯蚓粪在发酵后产生大量的特有菌群,可以抑制肠道内有害微生物的生长,从而降低粪内氨的排放,改善生态环境。蚯蚓粪同时还具有预防腹泻的功效,蚯蚓粪产品在发酵过程中产生了大量的有益微生物,可以抑制病原微生物的生长并使肠道变薄从而防止肠炎的发生<sup>[9]</sup>。蚯蚓粪也是较理想的肥料,可用于畜禽青绿饲料的生产。

**2.6 蚯蚓抗菌肽** 蚯蚓抗菌肽具有分子量小、热稳定、水溶性好、抗菌谱广及材料来源丰富等优点。蚯蚓在受到机械、化学、电和热等刺激后,可分泌出花色的体腔液,含有多种抗菌肽物质,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和链球菌等均有很好的抑制效果。郑津辉等<sup>[10]</sup>用硫酸铵对蚯蚓抗菌肽进行粗提,对其抗菌活性研究发现,蚯蚓抗菌肽受温度以及 pH 值影响不大,在 37~80℃ 条件下, pH 值在 4.0~9.0 范围内均有较强的抗菌活性,仅需很小的浓度就可产生明显的抗菌效果。

## 3 蚯蚓及其制品的应用进展

### 3.1 作为饲料添加剂

**3.1.1 在养猪上的应用** 宋春阳等<sup>[11]</sup>将复合蚯蚓营养液应用于仔猪料中,可显著促进哺乳仔猪的生长发育,提高断奶重、饲料转化率和机体免疫力,且具有较好的诱食效果。曾正清等<sup>[12]</sup>发现在猪饲料中添加蚯蚓粉有增加血清中胆固醇和球蛋白含量的趋势。傅规玉<sup>[6]</sup>研究结果表明用蚯蚓粉代替鱼粉饲喂肥育猪,日增重可以提高 13.1%,料重比降低 0.9,效果明显优于鱼粉。陶延英等<sup>[13]</sup>用蚯蚓作为补料对断乳仔猪进行喂养,结果实验组的



增重率比对照组平均高出 65.1%, 个体增重平均要高 2.7 kg。

**3.1.2 在养禽上的应用** Sun<sup>[14]</sup>将蚯蚓作为蛋白质原料的日粮饲喂肉鸡后, 平均体增重提高了 6.2%, 生产成本降低了 33.9%~43.6%, 饲料转化率优于以鱼粉为基础的日粮, 肉鸡肝脏和胰腺的重量以及血清中胆固醇含量明显降低, 腹脂增加。李云格等<sup>[15]</sup>在基础日粮中加入 3%的蚯蚓粪产品饲喂 AA 肉仔鸡, 与对照组相比, 发现鸡腹泻率下降了 74.2%, 鸡舍中的氨气下降了 31.4%, 同时鸡体重提高了 10.3%。张桂英<sup>[16]</sup>研究发现, 在蛋鸡日粮中以 5%的蚯蚓粉替代等量的鱼粉时, 能显著提高鸡的产蛋量、蛋重、饲料转化率等, 同时还能降低软蛋率。

**3.1.3 在水产养殖上的应用** 蚯蚓体及其体液能释放出特殊气味, 刺激鱼类及其它水产动物的食欲, 具有较好的诱食效果, 作为水产动物的动物性蛋白饲料来源具有较好的优势。陈芳等<sup>[17]</sup>研究发现, 蚯蚓对黄鳝的摄食具有明显的引诱效果, 在一定范围内, 随着蚯蚓添加量的增加, 诱食效果明显, 当饲料中蚯蚓含量为 3%时为最佳。高强等<sup>[18]</sup>对转食阶段杂交鲟的转食诱饵研究发现, 添加 50%陆生蚯蚓的混合饵料时, 鲟鱼的增重率和驯化率最高。刘波等<sup>[19]</sup>研究发现饲料中添加 5%的蚯蚓粪可显著提高育银鲫增重率, 降低饵料系数和死亡率。刘石林<sup>[20]</sup>在对虾的研究中指出, 在人工饵料中投喂 1/4 的蚯蚓可明显加快中国明对虾的生长速率, 增加对虾肌肉蛋白质含量。

**3.2 作为疾病治疗药物** 蚯蚓及其制品中含有丰富的抗菌肽, 具有广谱抗菌、增强免疫力和抗肿瘤的特效, 可作为疫病治疗药物使用。李曾夏子等<sup>[21]</sup>采用蚯蚓提取原液对兔巴氏杆菌进行体内外试验研究, 发现提取液的最小抑菌浓度为 5 倍稀释原液, 原液的抑菌率可达 100%; 体内试验表明 6 mL 原液对兔巴氏杆菌的治愈率为 100%。谢大识等<sup>[22]</sup>在 AA 肉鸡日常饮水中添加 1.5%的蚯蚓提取物, 肉鸡的免疫器官指数、外周血 ANAE+ 淋巴细胞百分率、血清溶血素显著提高, 机体免疫功能增强。

**3.3 改善畜牧生态环境** 畜牧生产中常利用蚯蚓腐食、食性广、食性大的特点, 将生产废弃物如畜禽粪便等经过处理后作为饵料来饲喂蚯蚓。经过蚯蚓的消化、代谢以及肠道挤压等作用, 把废弃

物转化为蚯蚓粪, 同时将经蚯蚓处理过的废弃物可作为牧草肥料使用。李云格<sup>[15]</sup>将蚯蚓粪作为肉鸡垫料, 可以改善肉鸡舍的环境条件, 使肉鸡舍的 NH<sub>3</sub>、RH 明显降低, 也可以显著降低垫料中的球虫卵囊数量, 从而使肉鸡的抗病能力增强, 同时可以提高肉鸡的生产性能。由于饲料添加剂的使用, 猪粪重金属污染已非常普遍, 尤其是铜 (Cu)、锌 (Zn) 污染最为明显。吴国英等<sup>[4]</sup>研究发现蚯蚓对猪粪重金属 Cu 和 Zn 具有一定的吸收能力, 富集系数分别为 0.43 和 0.73; 在物料 C/N 比为 17:1~22:1、温度为 14~21℃、湿度为 70%~75%、接种密度为 10~20 尾/200g 物料条件下, 蚯蚓对 Cu、Zn 的吸收量较高。

## 4 结语

随着我国生态畜牧理念的逐步推广和蚯蚓的生态优势逐步被发现, 蚯蚓及其产品在在畜牧养殖上的应用研究逐渐成为热议的话题。蚯蚓作为一种重要的动物性蛋白来源, 具有养殖简便、饲料报酬高、成本低、生态效益好的优点。大力发展蚯蚓养殖业, 利用蚯蚓来生产转化率高、营养成分齐全的高蛋白动物性饲料, 既有利于缓解动物性蛋白饲料资源的不足, 同时还有利于削减畜牧养殖成本。目前蚯蚓及其制品优良的药物特性在畜牧业的研究刚起步, 有必要进一步充分挖掘其药用潜能, 这对于避免当前由于各种抗生素药物的使用而产生的严重的微生物耐药性问题具有重要意义。同时, 我们应该更深入地开展蚯蚓对养殖废弃物资源化利用优势的研究, 缓解由于畜牧业的发展给人类生存环境造成的压力。进一步开发蚯蚓及其制品可以促进畜牧业和饲料工业, 以及环境保护业的可持续发展, 具有很高的经济效益、社会效益和生态效益。

## 参考文献:

- [1] 李维, 张勇. 蚯蚓饲料添加剂在家禽生产上的应用[J]. 饲料博览, 2009, (11): 42-44.
- [2] 孙晓东, 房泽海. 蚯蚓药物作用及临床的研究进展[J]. 科技创新导报, 2009, (12): 2-3.
- [3] 张蕉南, 胡兵, 李宋钰. 蚯蚓饲用价值的研究进展[J]. 饲料广角, 2008, (17): 45-46, 49.
- [4] 吴国英, 贾秀英, 郭丹, 等. 蚯蚓对猪粪重金属 Cu、Zn 的吸收及影响因素研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6): 1293-1297.



- [5] 宋春阳, 单虎, 孙振钧, 等. 复合蚯蚓营养成分的分析[J]. 饲料研究, 1997, (3): 22-23.
- [6] 傅规玉. 蚯蚓粉代替鱼粉饲喂育肥猪的试验[J]. 湖南畜牧兽医, 2006, (3): 11-12.
- [7] 马雪云, 张仰民. 蚯蚓粉对蛋鸡产蛋性能及鸡蛋品质的影响[J]. 中国家禽, 2002, 24(6): 26.
- [8] 彭椒华. 蚯蚓渣饲喂肉鸡的消化代谢试验[J]. 饲料广角, 2008, (21): 35-37.
- [9] 李云格, 孙振钧. 蚯蚓粪作为肉鸡添加剂的研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1208-1210.
- [10] 郑津辉, 王景安, 宋丽. 蚯蚓抗菌肽的抗菌活性剂影响因素的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 188-190.
- [11] 宋春阳, 单虎, 孙振钧, 等. 复合蚯蚓营养液应用于仔猪补料的研究[J]. 饲料研究, 1998, (1): 25-26.
- [12] 曾正清, 孙振钧, Van K T, 等. 牛粪和蚯蚓粪对猪排泄物中臭气化合物产量的影响[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(3): 37.
- [13] 陶延英, 陶延胜. 用蚯蚓补饲断乳仔猪的效果观察[J]. 四川畜牧兽医, 2007, (6): 26-27.
- [14] Sun Z J. Production and nutritive value of earth worm(Eisenia fetidal) in chicken and fish fatening [D]. Novi Sad: University of Novi Sad Faculty of Agriculture, 1995.
- [15] 李云格. 蚯蚓粪作为肉鸡垫料的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13643-13645.
- [16] 张桂英. 蚯蚓粉替代鱼粉对蛋鸡产蛋性能的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 1995, 30(1): 34-38.
- [17] 陈芳, 杨代勤. 黄鳝配合饲料中蚯蚓含量对其摄食影响的初步研究[J]. 内陆水产, 1999, 24(3): 21.
- [18] 高强, 王忠诚, 陈建. 陆生蚯蚓的不同添加量对转食阶段杂交鲟的影响[J]. 内陆水产, 2003, 28(10): 34-36.
- [19] 刘波, 谢骏, 单昌海, 等. 蚯蚓粪营养组成及其对异育银鲫增重率的影响[J]. 中国饲料, 2006, (17): 30-31.
- [20] 刘石林, 刘鹰, 杨红生, 等. 双齿围沙蚕与赤子爱胜蚓对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 561-565.
- [21] 李曾夏子, 刘智连, 李文平. 蚯蚓提取液对兔巴氏杆菌病的治疗效果[J]. 动物医学进展, 2009, 30(8): 66-69.
- [22] 谢大识, 吴诚, 康映辉, 等. 蚯蚓提取物对肉鸡免疫功能的影响研究[J]. 畜禽业, 2008, (4): 8-10.

欢迎订阅

## 《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

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

读者对象: 畜牧兽医行政管理人员、科研人员、技术推广人员, 大专院校师生, 种畜禽、兽药和饲料生产厂家技术人员, 基层畜牧兽医工作者和饲养专业户等相关人员。

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

# 规模化猪场病毒性腹泻的综合防控

王斌斌<sup>1</sup>, 廖章辉<sup>2</sup>, 何木荣<sup>2</sup>, 温黎俊<sup>3</sup>

(1. 郁南广东温氏家禽有限公司, 广东 郁南 527129; 2. 罗定广东温氏畜牧有限公司, 广东 罗定 527227; 3. 佛山市海纳川药业有限公司, 广东 佛山 511400)

**摘要:** 猪病毒性腹泻是由病毒引起的以水样腹泻为主的急性传染病的统称, 病原主要为猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 和猪轮状病毒 (RTV), 多呈季节性和地方性流行。临床表现以水样腹泻、呕吐、脱水、传播迅速和使用抗生素效果不明显或无效等为主要特征。规模化猪场应采取加强引种管理、饲养管理、生物安全和疫苗免疫等综合性预防方案; 发病时采取及时隔离消毒、提高机体抗病能力、控制继发感染和个体对症治疗等综合性处理措施。

**关键词:** 猪; 病毒性腹泻; 防控

**中图分类号:** S855.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2010)05-0014-03

## 1 病原与流行病学

猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 均为冠状病毒, 在低温环境下可长期存活, 但是对外界环境和消毒药抵抗力不强, 在光、紫外线照射下迅速灭活, 对乙醚、氯仿等敏感, 可被福尔马林、氢氧化钠、含氯或碘的消毒剂、季胺盐类化合物等灭活。猪轮状病毒 (RTV) 在环境中广泛存在且相当稳定, 对温度、化学物质和常用消毒剂有耐受性, 耐乙醚、氯仿, 耐酸碱, 但 EDTA 等促溶剂及 CaCl<sub>2</sub>、硫氰酸钾、过醋酸、碘、酚等可灭活 RTV。

病猪和带毒猪是主要传染源, TGEV 和 PEDV 易感动物限于猪, RTV 也可感染其他动物 (如鼠、牛、羊、犬及禽) 造成交叉感染。病原主要存在于肠绒毛上皮、肠系膜淋巴结和肠内容物等, 随粪便排出, 污染周围环境造成散播传染, 在猪群中主要经粪/口途径传播。

猪病毒性腹泻有严格的季节性, 主要在 11 月至下年 4 月间, 尤其在冬季和早春寒冷季节呈地方性暴发。TGE 在不同日龄的猪中都可发生, 但以 2 周龄内哺乳仔猪易感染; PEDV 能感染各种日龄猪, 以仔猪受害最为严重; RTV 对各日龄的仔猪及产前 5 d 至产后 2 w 的母猪均易感, 但发病猪一般为 13~39 日龄的仔猪, 症状轻重取决于发病日龄或环境条件<sup>[1~3]</sup>。

猪场发生病毒性腹泻一般为 2 种或 3 种病毒的混合感染。主要流行特点是发病急、来势猛、传播快, 感染后很快波及相邻猪舍并引起全场或本地区猪只相继发病。体重越小的猪只发病率、致死率越高。

## 2 症状及病变

三种病毒性疾病都会发生不同程度的呕吐、腹泻、脱水、消瘦和衰竭等临床症状。发病开始时厌食、不安, 偶尔有呕吐, 以后发生水样喷射状腹泻, 粪便有一股特别的臭味。仔猪整窝突然发病, 病猪除腹泻外, 往往伴发呕吐, 特别在吃奶后很快出现。若母猪发病时无奶, 新生仔猪将迅速脱水衰竭。生长育肥猪病初只出现采食减少或不食, 1~2 d 后表现急性水泻, 有时出现呕吐。只要护理到位, 大部分猪都可康复。种母猪和公猪的临床症状表现为普遍厌食, 精神沉郁, 个别呕吐。严重腹泻病猪排出水样粪便, 呈喷射状。妊娠母猪个别发生流产。体温一般正常或稍有升高, 抗生素治疗无效或效果不显著。腹泻可持续 3~5 d, 大猪一般 7~10 d 自行康复, 但抵抗力较弱的猪只, 尤其有并发症时会因脱水、毒素中毒、衰竭而死亡或遭淘汰, 而且猪只的日龄越小死亡率越高。有抗体保护的猪群, 疾病传染速度明显降低, 死淘率也较小<sup>[4]</sup>。

解剖病变常局限在胃肠道。胃内充满凝乳块, 胃黏膜充血, 肠管扩大, 小肠内充满半液状或液状

内容物,并含有未消化的凝乳块,肠壁变薄呈半透明。显微镜下观察小肠黏膜绒毛缩短,呈弥散无边际性萎缩。

### 3 诊断

根据发病季节,发病急、传染快、拉水样粪便伴有呕吐,所有猪发病、日龄越小死亡率越高,病变主要在胃肠道,抗生素治疗无效等可以初步诊断为病毒性腹泻;显微镜下观察绒毛缩短,pH测定粪便呈酸性对确诊该病有一定的帮助;实验室诊断通过病毒中和试验、免疫电镜法、免疫荧光法、ELISA和RT-PCR等方法,可使其得到确诊<sup>[5]</sup>。

### 4 综合性预防措施

带毒猪的存在和气温骤变等应激因素是诱发该病的主要原因,必须把养和防的观念建立起来,采取加强引种管理、饲养管理、生物安全和疫苗免疫等综合性预防措施,防控的重点为控制好原发病原和减少疾病诱因。

**4.1 控制疾病引进** 坚持自繁自养,防止病猪带毒感染或隐性感染,彻底杜绝外源病原传入。如确需引进种猪或育肥猪,要严格遵循防疫要求,使用清洗消毒后的车辆运送回场,并隔离饲养观察30d以上。

**4.2 加强饲养管理** 调控好猪舍内小气候环境,做好猪舍内外的卫生、通风和温度控制工作。冠状病毒怕热不怕冷,因此在冬春季时提高室温、防止贼风,局部环境加温尤其重要。加强猪群各关键环节的保温,如产房断奶前后、转栏后一周的保温等。注意湿度的控制,走道可以用石灰铺撒吸潮并及时更换,地面可铺米糠、稻草等垫料。在猪舍内加强光照,装紫外线灯可以在有效距离内杀灭病毒。特别要注意提高饲料中能量的供给,提高猪群整体抵抗力。把握适当的断奶日龄和体重,选用一些具有增强免疫和抗应激的添加剂,提升群体健康水平和自身免疫力。饲养密度要合理化,尽量避免或减少转栏、混群等应激因素,在天气骤变时应注意避免温差过大对猪群造成的应激。猪受到应激后造成机体抵抗力下降,对本病的易感性升高。

**4.3 建立生物安全体系** 优化养殖模式,采取全进全出的饲养方式,避免不同来源的猪混群。严格执行兽医卫生防疫和消毒制度,限制人员进出和

流动,对运输车辆彻底消毒。猪场内严禁饲养牛、羊、犬、猫及禽类等动物,并驱赶鸟类,定期灭鼠,消灭各种传播媒介。生产区要做到工作人员、猪群、车辆和各种物品与用具的定向流动,避免交叉感染。制定合理的消毒制度,定期对猪舍内外进行消毒处理,降低病原的污染水平及其在猪舍、猪群之间的传播。按计划实施驱虫,尽可能防止各种病原微生物传入猪群,降低病原体对猪群的侵袭,保持猪群的健康。

**4.4 疫苗免疫预防** 接种疫苗是预防病毒性腹泻的有效措施之一。严格执行冬春季相关免疫计划,做好全群疫苗免疫,特别是后备猪及怀孕猪的免疫,猪场一般在9~10月份对种猪群进行腹泻三联苗的普免。邹勇等<sup>[6]</sup>通过试验证实,母猪产前30d交巢穴注射“TGEV、PEDV和RTV三联灭活疫苗”,分娩当天乳汁内能产生较高水平的抗体,新生仔猪吮吸初乳后可获得较好的被动免疫而获得保护。分娩后30d,母猪血清抗体仍然维持在较高的水平。在公猪和肉猪后海穴注射疫苗,也能产生较高的血清抗体效价。肉猪和妊娠母猪免疫后15d达到较高的免疫水平,免疫有效期超过6个月。后备母猪最好是先免疫一次,在初产前15~30d再免疫一次。其他灭活苗、弱毒苗、基因工程苗,以及“PED、TGE二联苗”等疫苗也在猪生产中得到广泛地研究和应用<sup>[7]</sup>。

### 5 发病猪场的处理措施

脱水和电解质的失衡是该病引起死亡的主要因素。发病猪场需采取及时隔离消毒、提高机体抗病能力、控制继发感染和个体对症治疗等综合性处理措施。

**5.1 及时隔离消毒** 猪场一旦发病,要果断采取隔离措施,加强消毒防疫工作,人员要定岗、定行走路线、定冲凉房、分批上下班,避免设备、物资等交叉使用。发病猪舍周边建立隔离带和物资缓冲带,注意排泄物的收集及无害化处理。将病猪隔离治疗,及时消除传染源,并定期进行带猪消毒和转群消毒。对猪舍用2%氢氧化钠或5%~10%石灰乳迅速彻底消毒,猪舍内走道、栏舍底下、门口、猪舍外主要路段用石灰铺盖,猪舍外周围3m用2%烧碱或者用2%烧碱+10%石灰消毒1次/天,整栋猪舍走道2%烧碱消毒1次/天。用生石



灰铺盖腹泻粪便,产房赶起母猪后再撒石灰,3~5 min后拌匀石灰与粪便,用专用的铲子铲走。从最后一头猪治愈开始,至少隔离15 d才能进行猪群调动。

**5.2 提高机体抗病能力** 饲养管理方面,主要是环境控制、补充机体所需的电解质、预防酸中毒和减轻脱水、增强抗病能力。加强怀孕舍与产房的保温工作,尤其是仔猪保温。在保温的同时也要注意适当通风,以保证空气新鲜。保持环境干燥,产房减少冲水,少使用喷雾消毒,用生石灰吸潮;保温箱可洒密斯陀保温与吸潮,同时改善环境气味,也可直接涂密斯陀在仔猪身上保温。对发生腹泻的猪只及时加强补液,防止脱水而死,如口服补液盐饮水,补液配方可用:氯化钠 3.5 g、氯化钾 1.5 g、碳酸氢钠 2.5 g、葡萄糖 20 g,加水 1 L,稀释均匀后供患病猪饮用。注意不可全天饮水,晚上可停留一段时间饮清水。对发病的母猪采取补液或调理,减少因腹泻导致弱仔、死胎与流产。保证哺乳母猪奶水质量,一般将补液成份放入饮水槽中让母猪饮用,可同时在饲料中加入利生菌王、多维与葡萄糖调理。腹泻严重时应当减少喂料量,以减少饲料浪费和减轻猪只肠胃负担。对拒绝饮水的病猪应静脉注射 5%~10%葡萄糖盐水和 5%碳酸氢钠溶液;哺乳仔猪需要人工灌服或腹腔注射补液盐,以防酸中毒和脱水。

**5.3 控制继发感染** 发病猪群易继发其它细菌性疾病,可在饮水或饲料中有针对性地添加一些抗生素药物或微生态制剂,如沙星类药物和乳酸菌制剂等,但不可使用过多的药物治疗。若腹泻过程有血痢,可以适当添加痢菌净、二甲硝等。发病时也可使用可口服的消毒药,按照说明书要求的稀释度放入饮水中,同时用该消毒药对猪体和地面进行喷雾消毒有较好的效果。根据中兽医学“扶正祛邪、扶正固本”等基本治疗原则,选用抗病毒和增强机体免疫力的天然中草药制剂对仔猪腹泻进行临床治疗也可取得较好的效果<sup>[8]</sup>。

**5.4 个体对症治疗及其他** 注意及时护理腹泻过程中伴发体温升高的个别猪只,对重病猪可使用收敛药物以控制腹泻,如硫酸阿托品、番石榴叶汁、痢菌沙、碳粉等,仔猪可用地塞米松。新生仔猪

可选择离开母猪进行人工喂奶。乳仔猪日粮中添加酶制剂、乳清粉,有利于维持肠道微生物平衡,促进营养物质的消化吸收,消除消化不良和减少腹泻的发生<sup>[9]</sup>。对于正在发病的仔猪,可尝试口服或注射康复血清、高免血清或单克隆抗体,可以有效地防止新生仔猪发病或死亡<sup>[10]</sup>。将确诊为病猪的肠道和肠道内容物或粪便经处理后,对产前 3~5 w 的健康母猪人工感染,使之产生免疫力,通过初乳保护仔猪,可有效降低新生仔猪发病率<sup>[11]</sup>。

## 6 结语

规模化猪场猪只腹泻的病因复杂多样,目前尚无有效的治疗方法,也没有非常理想的疫苗,必需采取综合性防控措施才能取得一定的效果。该病最重要的是在于预防,需制定一套适合本场的综合预防措施。发病后最主要的是查找原发病原,控制疾病扩散和继发感染,降低发病率和死亡率,将猪场的损失降到最低限度。

## 参考文献:

- [1] 杨春华,王强,王毅,等.猪流行性腹泻的诊断与科学防治[J].畜牧与饲料科学,2009,30(7-8):34-36.
- [2] 张春叶,沈红,陈永杰,等.猪传染性胃肠炎预防和治疗的研究进展[J].中国农学通报,2010,26(1):5-8.
- [3] 曾艳.猪轮状病毒 NSP4 基因原核与真核表达载体的构建及其表达研究[D].四川农业大学,2008.
- [4] 丁乐堂,张洪让.冬春季节苗猪病毒性腹泻的鉴别诊治[J].养殖与饲料,2009,(1):36-37.
- [5] 黄海龙,胡桂学,陶淑霞.猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻诊断方法研究进展[J].动物医学进展,2004,25(3):43-46.
- [6] 邹勇,许宝华,钱永清等.猪流行性腹泻?猪传染性胃肠炎和猪轮状病毒三联苗免疫试验[J].江西农业大学学报,2005,27(1):107-109.
- [7] 刘岩,柏亚铎,鲁娜等.猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗研究进展[J].中国畜牧兽医文摘,2007,(5):10-12.
- [8] 陈锡平,戴扬川,李勇军等.“止痢口服液”治疗仔猪腹泻的临床试验报告[J].猪群保健,2005,(4):34-35.
- [9] 姜家伟,方希修,李雯雯等.猪传染性胃肠炎与猪轮状病毒性腹泻[J].动物科学与动物医学,2005,(12):18-19.
- [10] 付兴周.应用高免血清防治仔猪流行性腹泻与传染性胃肠炎[J].畜牧与兽医,2006,38(5):38-39.
- [11] 王艳红,朱国怀.母猪产前喂服病料预防仔猪流行性腹泻的效果观察[J].黑龙江畜牧兽医,2005,(3):77.



## 大豆低聚糖对肉鸭生产性能的影响试验

罗佳捷<sup>1,2</sup>, 张彬<sup>1\*</sup>, 李丽立<sup>2</sup>, 陈宇光<sup>1</sup>, 唐武<sup>3</sup>, 刘玉锋<sup>3</sup>

(1. 湖南农业大学经济动物研究所, 湖南长沙 410128; 2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125; 3. 湖南省沅江市畜牧局, 湖南沅江 413101)

**摘要:** 为了研究不同水平添加量的 SBOS 对樱桃谷鸭生产性能的影响及与金霉素的作用效果做比较, 本试验选取 300 只 1d 的樱桃谷鸭, 随机分为 5 组, 每组 5 个重复。试验分为两个部分 (1~14 d 和 15~28 d)。结果表明: SBOS 对肉鸭生产性能的影响呈明显的剂量关系, 第 2、3、4 组肉鸭的 BW、ADG 与对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但各试验组的料肉比有一定程度的降低, 其中第 2、4、5 组在试验后期达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 且第 4、5 组的效果要优于第 2 组。这提示在提高肉鸭生产性能方面, SBOS 可以有效替代金霉素。

**关键词:** 大豆低聚糖; 肉鸭; 生产性能

中图分类号: S816.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0017-04

## Effects of soybean oligosaccharide on growth performance of meat duck

Luo Jiajie<sup>1,2</sup>, Zhang Bin<sup>1\*</sup>, Li Lili<sup>2</sup>, Chen Yuguang<sup>1</sup>, Tang Wu<sup>3</sup>, Liu Yufeng<sup>3</sup>

(1. Institute of Economic Animal Research, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. The Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China; 3. Bureau of Animal Husbandry, Yuanjiang 413101, China)

**Abstract:** To study the effect of soybean oligosaccharide (SBOS) with different levels on growth performance of meat duck, 300 one-day-old cherry valley ducks aged 1-day were randomly divided into 5 groups with 5 replicates in each treatment. The experiment was divided into two parts (1-14 day and 15-28 day). The results showed that the effects of SBOS on growth performance were obvious dose-dependent. Significant differences were not found in BW and ADG between control group and group 2, 3 and 4 ( $P > 0.05$ ). The F/G in group 2, 3, 4 and 5 were reduced and that in group 2, 4 and 5 were significantly lower than that in control group ( $P < 0.05$ ) in the second period. In addition, the effects of group 4 and 5 were better than that of group 2. It was indicated that SBOS could replace chlortetracycline to improve the growth performance of meat duck.

**Key words:** Soybean oligosaccharide; meat duck; growth performance

大豆低聚糖 (SBOS) 又称大豆寡糖, 是一类广泛存在于豆科植物中可溶性寡糖的总称, 主要分为水苏糖 (stachyose)、棉子糖 (raffinose) 和蔗糖 (sucrose)<sup>[1]</sup>。SBOS 在成熟大豆中的含量最高, 约占到大豆总质量的 10%, 其中 1% 是棉子糖, 4% 是水苏糖<sup>[2]</sup>。近年来, 很多研究指出 SBOS 具有促进营养物质吸收、促进双歧杆菌增殖、调节肠道菌群平衡、增强机体免疫功能、保护肝脏和抗氧化等作用<sup>[3]</sup>。由于 SBOS 具有重要的生理功能和丰富

的原料来源, 所以愈来愈受到人们的关注, 对它的研究和开发也日益显示出了重要的理论价值和广阔的应用前景。本研究以 SBOS 为添加物来检验其对肉鸭生产性能的影响, 并与抗生素添加效果做比较, 以探讨用 SBOS 替代抗生素来提高肉鸭生产性能的可行性。

### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 1 d 樱桃谷雏鸭 300 只, 由长沙华英饲料集团养殖厂提供; SBOS 购于陕西森弗

收稿日期: 2010-06-11

\*: 通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571351), 湖南省自然科学基金 (08JJ3080), 长沙市科技攻关项目 (K0802117-21)

生物技术有限公司,纯度为98%;金霉素由金河生物科技股份有限公司生产。各阶段试验基础日粮在湖南农业大学追求饲料公司配制,为了消除豆粕对SBOS生理作用可能存在的影响,本试验基础日粮中未使用豆粕,所需的能量和蛋白用玉米和鱼粉替代,基础日粮组成及营养成分见表1。

表1 基础日粮成分及营养表

日粮成分	第一阶段	第二阶段	营养水平	第一阶段	第二阶段
	(1-14d)	(15-28d)		(1-14d)	(15-28d)
玉米(%)	0.630	0.680	能量 (MJ/kg)	12.077	12.277
鱼粉(%)	0.170	0.150	粗蛋白(%)	19.651	17.348
次粉(%)	0.100	0.100	钙(%)	0.726	0.629
菜籽粕(%)	0.050	0.020	磷(%)	1.117	0.753
预混料(%)	0.050	0.050			
蛋氨酸(%)	0.703	0.661			
赖氨酸(%)	1.142	1.006			

其中预混料包含(%):五水硫酸铜:0.31;一水硫酸亚铁:0.64;一水硫酸锌:0.48;一水硫酸锰:0.56;1%碘酸钙:0.1;1%亚硒酸钠:0.06;蛋氨酸:5;食盐:6.1;胆碱:1.6;石粉:27.5;磷酸氢钙:26;复合多维:0.75;沸石粉:30.91。

**1.2 试验设计及饲养管理** 选取刚出壳的樱桃谷健康雏鸭300只,随机分为5组,每组5个重复,每个重复12只。其中1组为基础组(饲喂基础日粮),2组为对照组(饲喂金霉素日粮100 mg/kg),3、4、5组为试验组(分别饲喂含300、500、700 mg/kg的SBOS日粮)。具体见表2。

表2 试验分组

组别	处理	数量(只)
1	基础日粮	5×12
2	基础日粮+100mg/kg金霉素	5×12
3	基础日粮+300mg/kg SBOS	5×12
4	基础日粮+500mg/kg SBOS	5×12
5	基础日粮+700mg/kg SBOS	5×12

表3 SBOS对各周龄樱桃谷鸭体重的影响

组别	7d 体重(g)	14d 体重(g)	21d 体重(g)	28d 体重(g)
1	131.19±10.032 <sup>A</sup>	332.813±28.982 <sup>A</sup>	725.771±61.748 <sup>A</sup>	1160.267±91.461 <sup>A</sup>
2	121.534±4.350 <sup>B</sup>	316.643±30.846 <sup>A</sup>	726.333±79.061 <sup>A</sup>	1157.600±116.888 <sup>A</sup>
3	114.920±10.028 <sup>B</sup>	315.595±29.591 <sup>A</sup>	726.619±44.345 <sup>A</sup>	1112.933±143.169 <sup>A</sup>
4	119.006±6.144 <sup>B</sup>	329.583±14.607 <sup>A</sup>	779.971±36.014 <sup>A</sup>	1217.933±43.330 <sup>A</sup>
5	105.240±2.554 <sup>C</sup>	250.095±16.423 <sup>B</sup>	521.009±23.719 <sup>B</sup>	857.900±34.003 <sup>B</sup>

注:同列数字肩标字母不同表示差异显著(P<0.05),相同字母表示差异不显著(P>0.05)。下同。

试验在某独立鸭舍内进行,肉鸭按照正常免疫程序免疫。所有供试鸭采用笼养、电热控温、自由饮水采食等常规方法饲养管理,每天观察记录鸭群行为及健康状况,统计病死鸭数,1、7、14、21和28 d早晨以每个重复为单位称重,记录饲料消耗量。

**1.3 生产性能指标测定** 在4周的时间内,以每个重复为单位,分别于每周末早晨饲前空腹称重,分别计算1~4周龄各重复的体重(BW)、平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)和饲料增重比(F/G)。

平均日增重=(末体重-初体重)/天数;

平均日采食量=耗料重/天数;

料重比=耗料/增重

**1.4 数据统计与分析** 采用SAS8.2统计软件(GLM过程)对试验数据进行方差分析,用Duncan统计方法对肉鸭体重、采食量、日增重和料肉比等数据进行多重比较以检验组间差异显著性。

## 2 结果与分析

**2.1 SBOS对不同周龄樱桃谷鸭体重的影响** 由表3可知,各实验组鸭7 d、14 d的体重均低于对照组;而到21 d,第2组比对照组的体重增加了0.077%(P>0.05),第3组比对照组的体重增加了0.117%(P>0.05),第4组比对照组的体重增加了7.468%(P>0.05),而第5组比对照组的体重要低28.213%(P<0.05);28 d时只有第3组比对照组的体重增加了4.970%(P>0.05),而第2、3、4组比对照组的体重分别下降了0.230%(P>0.05)、4.080%(P>0.05)和26.060%(P<0.05)。在整个饲养期,第5组肉鸭的体重均显著小于其它组。

**2.2 SBOS对不同周龄樱桃谷鸭平均日增重的影响** 由表4可知,前三周,第4组比对照组的平

均日增重分别提高了 1.590% ( $P > 0.05$ )、1.004% ( $P > 0.05$ ) 和 3.452% ( $P > 0.05$ ); 第 2 组比对照组分别降低了 11.623% ( $P > 0.05$ )、2.305% ( $P > 0.05$ ) 和 0.181% ( $P > 0.05$ ); 第 3 组比对照组分别降低了 5.480% ( $P > 0.05$ )、2.761% ( $P > 0.05$ ) 和 4.880% ( $P > 0.05$ ); 第 5 组比对照组分别降低了 28.452% ( $P < 0.05$ )、26.953% ( $P > 0.05$ ) 和 28.612% ( $P < 0.05$ )。28 d 时, 第 2、4 组比对照组的平均日增重分别提高了 1.905% ( $P > 0.05$ ) 和 3.542% ( $P > 0.05$ ), 而第 3、5 组比对照组分别降低了 2.661% ( $P > 0.05$ ) 和 12.950% ( $P > 0.05$ )。

**2.3 SBOS 对不同周龄樱桃谷鸭平均日采食量的影响** 日粮中添加金霉素及不同水平 SBOS 对肉鸭日采食量的影响见表 5。7 d 时, 第 3、4 组比对照组的日采食量分别增加了 3.693% ( $P > 0.05$ ) 和 5.070% ( $P > 0.05$ ), 而第 2、5 组比对照组的日采食量降低了 3.540% ( $P > 0.05$ ) 和 16.892% ( $P > 0.05$ ); 14 d 时, 四个试验组的采食量比对照组分

别降低了 7.655% ( $P > 0.05$ )、6.810% ( $P > 0.05$ )、4.419% ( $P > 0.05$ ) 和 27.311% ( $P < 0.05$ ); 21 d 时, 四个试验组的采食量比对照组分别降低了 7.278% ( $P > 0.05$ )、9.728% ( $P > 0.05$ )、5.909% ( $P > 0.05$ ) 和 33.681% ( $P < 0.05$ ); 28 d 时, 四个试验组的采食量比对照组分别降低了 9.785% ( $P > 0.05$ )、10.790% ( $P > 0.05$ )、15.087% ( $P > 0.05$ ) 和 26.761% ( $P < 0.05$ )。

**2.4 SBOS 对不同周龄樱桃谷鸭料肉比的影响** 由表 6 可知, 7 d 时, 四个试验组比对照组肉鸭的料肉比分别提高了 9.306% ( $P > 0.05$ )、9.575% ( $P > 0.05$ )、3.389% ( $P > 0.05$ ) 和 15.923% ( $P < 0.05$ ); 14 d 时, 除第 2 组比对照组的料肉比提高了 0.884% ( $P > 0.05$ ) 以外, 第 3、4、5 组比对照组的料肉比分别降低了 2.653% ( $P > 0.05$ )、5.362% ( $P > 0.05$ ) 和 0.442% ( $P > 0.05$ ); 21 d 时, 各试验组肉鸭的料肉均低于对照组, 分别为 7.185% ( $P > 0.05$ )、5.230% ( $P > 0.05$ )、8.686%

表 4 SBOS 对各周龄樱桃谷鸭平均日增重的影响

组别	7d 平均日增重(g)	14d 平均日增重(g)	21d 平均日增重(g)	28d 平均日增重(g)
1	10.565±1.597 <sup>A</sup>	28.290±4.130 <sup>A</sup>	57.853±3.497 <sup>A</sup>	56.895±8.497 <sup>A</sup>
2	9.337±1.222 <sup>AB</sup>	27.638±4.622 <sup>A</sup>	57.748±7.338 <sup>A</sup>	57.979±8.091 <sup>A</sup>
3	9.986±1.976 <sup>A</sup>	27.509±3.856 <sup>A</sup>	55.030±4.810 <sup>A</sup>	55.381±6.256 <sup>A</sup>
4	10.733±2.285 <sup>A</sup>	28.574±2.960 <sup>A</sup>	59.850±5.527 <sup>A</sup>	58.910±4.562 <sup>A</sup>
5	7.559±0.606 <sup>B</sup>	20.665±1.595 <sup>A</sup>	41.300±3.428 <sup>B</sup>	49.527±3.762 <sup>A</sup>

表 5 SBOS 对各周龄樱桃谷鸭平均日采食量的影响

组别	7d 平均日采食量(g)	14d 平均日采食量(g)	21d 平均日采食量(g)	28d 平均日采食量(g)
1	19.548±2.551 <sup>AB</sup>	51.233±8.000 <sup>A</sup>	127.355±13.703 <sup>A</sup>	152.952±12.581 <sup>A</sup>
2	18.856±1.818 <sup>AB</sup>	47.311±4.541 <sup>A</sup>	118.086±17.548 <sup>A</sup>	137.986±15.713 <sup>A</sup>
3	20.270±3.860 <sup>AB</sup>	47.744±6.901 <sup>A</sup>	114.966±16.359 <sup>A</sup>	136.448±25.827 <sup>A</sup>
4	20.539±3.911 <sup>A</sup>	48.969±6.055 <sup>A</sup>	119.830±12.290 <sup>A</sup>	129.876±15.625 <sup>AB</sup>
5	16.246±1.135 <sup>B</sup>	37.241±3.998 <sup>B</sup>	84.460±9.458 <sup>B</sup>	111.020±8.294 <sup>B</sup>

表 6 SBOS 对各周龄樱桃谷鸭料肉比的影响

组别	7 日龄料肉比	14 日龄料肉比	21 日龄料肉比	28 日龄料肉比
1	1.859±0.136 <sup>B</sup>	1.809±0.038 <sup>A</sup>	2.199±0.149 <sup>A</sup>	2.724±0.334 <sup>A</sup>
2	2.032±0.172 <sup>AB</sup>	1.825±0.126 <sup>A</sup>	2.041±0.059 <sup>A</sup>	2.390±0.122 <sup>B</sup>
3	2.037±0.162 <sup>AB</sup>	1.761±0.113 <sup>A</sup>	2.084±0.186 <sup>A</sup>	2.450±0.257 <sup>AB</sup>
4	1.922±0.117 <sup>B</sup>	1.712±0.084 <sup>A</sup>	2.008±0.194 <sup>A</sup>	2.203±0.181 <sup>B</sup>
5	2.155±0.166 <sup>A</sup>	1.801±0.118 <sup>A</sup>	2.042±0.090 <sup>A</sup>	2.242±0.050 <sup>B</sup>

( $P>0.05$ )和7.140%( $P>0.05$ );28 d时,各试验组肉鸭的料肉比仍然全部低于对照组,分别为12.261%( $P<0.05$ )、10.059%( $P>0.05$ )、19.126%( $P<0.05$ )和17.695%( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

目前,在家禽生产上研究得较多的低聚糖有低聚木糖、低聚果糖、半乳甘露寡糖等,国内外对大豆低聚糖在家禽生产中的应用报道不多。许多试验证明,在家禽日粮中加入寡糖能够显著的提高家禽的生产性能。李寸欣等<sup>[4]</sup>研究证明在新罗曼雏鸡日粮中添加0.15%的功能性寡糖能使雏鸡增重比抗生素对照组高出6.74%;熊峰等<sup>[5]</sup>试验证明在AA肉仔公鸡日粮中添加0.1%和0.3%水平的SBOS均能有效提高其日增重;游金明等<sup>[6]</sup>在肉仔鸡日粮中添加不同剂量的壳寡糖,发现100 mg/kg和150 mg/kg的添加量能使肉仔鸡的平均日增重显著高于抗生素对照组,且以100 mg/kg为最适添加量。

有关寡糖在家禽饲料中的应用也有一些不一致的试验效果。Drust在肉鸡饲料中添加果寡糖,肉鸡的体增重并没有得到明显改善<sup>[7]</sup>;Terada<sup>[8]</sup>和Patterson等<sup>[9]</sup>分别在肉鸡日粮中添加乳蔗糖和蔗果三糖,发现对肉仔鸡体增重均没有明显提高;Iji等<sup>[10]</sup>也发现,在肉鸡日粮中添加0.1%、0.3%和0.5%的MOS对肉鸡生长的影响也不显著。

在本试验中,SBOS添加组在对肉鸭体重和平均日增重的增加影响不明显,但能在一定程度上降低肉鸭的平均日采食量,从而有效的改善了肉鸭的饲料报酬,并在后期比较明显。这是因为前4周是肉鸭肠道微生物群落结构建立的时期,肉鸭对大豆低聚糖有一个适应的过程。

另外,大豆低聚糖对肉鸭生产性能的影响存在很明显的剂量反应关系,剂量过高会起到抑制作用,700 mg/kg大豆低聚糖添加组肉鸭的体重、平均日增重就要显著小于对照组。这可能是由于添加量过大,使肠道后部微生物发酵寡糖过度,引起食物通过消化道过快,影响了营养物质的吸收。

### 4 结论

肉鸭对SBOS的添加量有剂量依赖性,在本试验中,只有500 mg/kg SBOS的添加量能够提高肉鸭的体重和平均日增重,但差异不显著,不过显著的降低了料肉比;300 mg/kg和700 mg/kg添加量未能改善肉鸭的体重和平均日增重,但通过降低其平均日采食量而显著的改善了饲料报酬,且500 mg/kg和700 mg/kg降低料肉比的效果优于金霉素。这提示在改善饲料报酬方面,大豆低聚糖可以有效地替代金霉素。本试验中以500 mg/kg的添加量为最佳。

### 参考文献:

- [1] 张延坤, 刘国忠, 张东祥, 等. 大豆低聚糖的制备工艺研究[J]. 中国现代临床医学, 2005, 4(8): 1-3.
- [2] 杨继远, 袁仲. 大豆低聚糖保健功能及其在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 1-4.
- [3] 张振红. 大豆低聚糖对肉鸡生产性能、血液指标及肠道菌群的影响[D]. 河北农业大学, 2006.
- [4] 李寸欣, 刘海斌, 马旭平, 等. 功能性寡糖对新罗曼鸡生长性能的影响[J]. 养殖与饲料, 2009, (7): 55-57.
- [5] 熊峰, 王晓霞, 余雄. 大豆寡糖和哪都芽孢杆菌在肉鸡日粮中的应用[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(1): 45-49.
- [6] 游金明, 瞿明仁, 王自蕊, 等. 壳寡糖与金霉素在肉仔鸡生长性能上的对比效应[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(1): 94-98.
- [7] Drust L. Inclusion of Fructo- and Galacto-oligosaccharides in Broiler Diets[J]. Archiv fur Geflugelkunde, 1996, 60: 160-164.
- [8] Terada, Hara. Effects of Dietary Supplementation with Lactosucrose on Cecal Flora, Cecal Metabolites and Performance in Broiler Chickens[J]. Poultry Science, 1994, 73: 163-167.
- [9] Patterson J, Orban J, Sutton A. Selective Enrichment of Bifidobacteria in the Intestinal Mace of Broilers by Thermally Produced Kestoses and Effect Broiler Performance[J]. Poultry Science, 1997, 76: 497-500.
- [10] Iji P, Saki A, Tivey D. Intestinal Structure and Function of Broiler Chickens on Diets Supplemented with a Mannan-oligosaccharide[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81: 1186-1192.



# 三黄种鸡产蛋期的生长模型的建立与分析

马发顺, 周建阳

( 安阳工学院生物与食品工程系, 河南 安阳 455000 )

**摘要:** 为了解三黄鸡产蛋期的生长发育规律, 运用 Logistic、Gompertz 和 von Bertalanffy 3 种曲线模型分别对 5~16 月龄的三黄鸡体重数据进行拟合和分析。结果表明: 3 种模型均能很好地模拟三黄鸡产蛋期的生长情况, 以 Logistic 模型拟合效果最佳。应用 3 种模型对三黄鸡产蛋期进行生长曲线拟合和分析是可行的。

**关键词:** 三黄鸡; 产蛋期; 体重; 生长模型

中图分类号: S831.49

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0021-03

## Construction and analysis on growth model of yellow feather broiler breeder in laying period

Ma Fashun, Zhou Jianyang

( Department of Biological and Food Engineering, Anyang Industrial College, Anyang 455000, China )

**Abstract:** In order to study the growth performance of yellow feather broiler breeder in laying period, the growth curve of 5 to 12 month-old yellow feather broiler was analyzed with three growth models (Logistic, Gompertz and von Bertalanffy). The result showed that the growth curves with three models were fitted well, but the best effect was acquired with Logistic model. It is feasible to analyze and fit the growth curve of the yellow feather broiler breeder laying period using these three models.

**Key words:** Yellow feather broiler breeder; body weight; growth model

鸡的生长发育模型建立与分析是研究其生长发育规律的主要方法之一, 也是鸡的育种和生产的基础性工作。理想的生长模型, 在指导饲养管理、育种实践和控制生长发育过程中具有重要作用<sup>[1]</sup>。三黄鸡是通过配套杂交而育成的优质肉用鸡种, 其肉质细嫩、骨细皮薄、皮下脂肪适度、味鲜香浓。所以, 其分布很广, 深受消费者青睐。目前, 对三黄鸡生长发育规律的研究很少, 仅田超等<sup>[2]</sup>、许宗润<sup>[3]</sup>对此做过相关研究报道, 但对其产蛋期的生长模型建立研究未见报道。本研究运用 3 种典型的非线性模型对 5~16 月龄产蛋期的三黄鸡进行了生长曲线拟合, 以揭示其生长发育的规律, 为该鸡种的遗传资源保护、开发利用和选育改良等提供参考依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 蛋鸡来源于河南省濮阳市养鸡场。采

用网上平养方式; 供给母鸡产蛋日粮, 适当限饲; 每周补充洁净的河砂 1 次, 自由饮水。随机抽取 50 只产蛋鸡于 5~16 月龄每月测定 1 次体重(空腹), 计算样本平均值。

#### 1.2 统计方法

**1.2.1 所用软件** 使用 Excel 2003 统计分析软件对数据进行处理, 绘制折线图。

**1.2.2 生长模型表达式** Logistic 模型、Gompertz 模型和 von Bertalanffy 模型的回归函数表达式, 见表 1。式中,  $k$  为最大体重,  $b$  为瞬时生长速度,  $a$  为参数,  $x$  为月龄。

**1.2.3 模型拟合方法** 先将 3 种回归函数作变形处理, 使其转化为修正指数函数的形式, 采用“三和法”求出修正指数函数中的 3 个参数, 然后再作相应还原, 得到原回归曲线函数中的 3 个参数  $k$ 、 $a$ 、 $b$ 。

表 1 用于拟合的 3 种曲线模型

生长模型	表达式
Logistic 模型	$y_L = \frac{k}{1 + ae^{-bx}}$
Gompertz 模型	$y_G = ka^{\delta^x}$
Von Bertalanffy 模型	$y = k(1 - ae^{-bx})^3$

## 2 结果与分析

**2.1 实际观测生长趋势分析** 三黄鸡 5~16 月龄实际测量体重见表 3, 累积生长曲线见图 1, 月绝对生长曲线见图 2。可以看出, 5~9 月龄绝对生长较大, 10~16 月龄绝对生长逐渐降低, 累积生长曲线趋于水平。说明此时生长高峰已过去, 生长发育速度变缓。

**2.2 生长模型的拟合分析** Logistic、Gompertz 和 von Bertalanffy 3 种曲线模型对三黄鸡产蛋期的生长发育进行数学模拟的拟合参数估计值及相关指数 ( $R^2$ ), 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 3 种模型均能很好地模拟三黄鸡产蛋期的生长曲线, 其相关指数都在 0.99 以上, 拟合度很高。利用 3 种模型计算的三黄鸡产

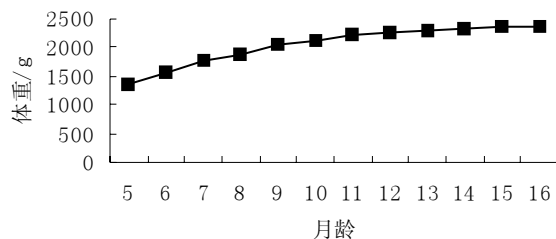


图 1 三黄鸡产蛋期累积生长折线

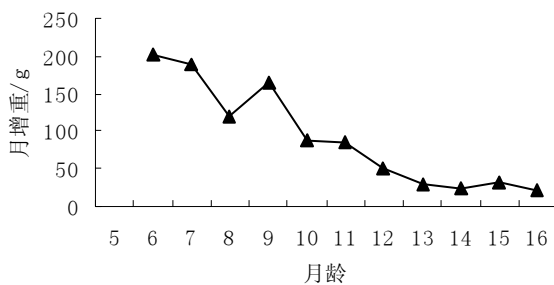


图 2 三黄鸡产蛋期绝对生长折线

表 2 三黄鸡产蛋期 3 种生长模型参数和相关指数

生长模型	k	a	b	$R^2$
Logistic 模型	2389.904	1.1102	0.3756	0.99833
Gompertz 模型	2402.647	0.4423	0.7219	0.99673
Von Bertalanffy 模型	2407.494	0.2466	0.3101	0.99573

蛋期各期估计值见表 3。3 种模型估值曲线与实际曲线高度吻合, 见图 3。

由表 2、表 3、图 3 比较可知, Logistic 曲线模型的拟合效果最好, 相关指数 ( $R^2$ ) 为 0.99833, 各期估计值与实际观测值最接近, 模型曲线与实际生长曲线最靠拢, 拟合的准确度最高; 其次是 Gompertz 曲线模型,  $R^2$  为 0.99673; von Bertalanffy 曲线模型拟合效果最差,  $R^2$  为 0.99573。

表 3 三黄鸡产蛋期体重观测值与拟合模型估计值比较

月龄	体重 (g)	Logistic 估值	Gompertz 估值	Bertalanffy 估值
5	1371	1355.919	1333.316	1323.292
6	1572	1568.392	1570.576	1571.005
7	1760	1757.565	1767.685	1771.096
8	1879	1916.330	1925.181	1928.166
9	2044	2043.098	2047.528	2049.077
10	2132	2140.352	2140.655	2140.892
11	2218	2212.699	2210.505	2209.943
12	2268	2265.292	2262.342	2261.515
13	2297	2302.891	2300.517	2299.843
14	2320	2329.447	2328.476	2328.225
15	2352	2348.046	2348.870	2349.187
16	2373	2360.994	2363.703	2364.640

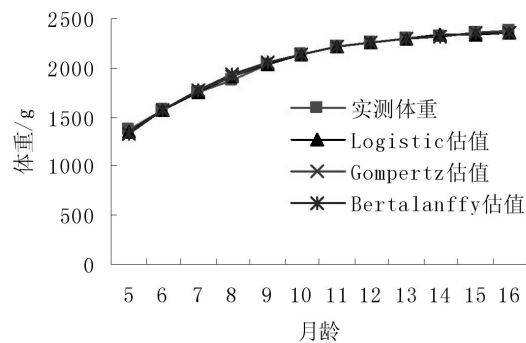


图 3 三黄鸡生长曲线与 3 种模型曲线的比较

## 3 讨论与小结

**3.1 拟合效果及适用区间** 本研究区间是 5~16 月龄的三黄种鸡, 属于成年期, 在研究区间内以月份为观测周期是恰当的, 所以用 3 种曲线模型拟合的效果均非常理想。运用 Logistic、Gompertz 和 von Bertalanffy 模型对 5~16 月龄的三黄种鸡生长发育状况进行模拟、预测是可行的。

**3.2 最佳模型问题** 通过对3种生长模型的模拟效果比较,可以看出,Logistic模型效果最佳,其次是Gompertz模型,再次是von Bertalanffy模型。这与笔者曾对其育成期的生长模型拟合的结果有所不同<sup>[4]</sup>。笔者认为三黄鸡不同生长发育阶段,其最佳生长模型的种类是不同的。故对三黄鸡不同生长阶段应分别优选最佳模型,这样才能更真实地揭示其规律性。

**3.3 小结** 本研究运用Logistic、Gompertz和von Bertalanffy 3种模型对5~16月龄的三黄鸡进行了生长曲线拟合与分析,其中Logistic曲线为最佳拟合模型。这为了解三黄鸡产蛋期的生长发育规律提供了参考。在实际生产中可以根据生长模型对三黄鸡的生长趋势进行预测;根据不

同的生长发育阶段提供不同的营养标准,结合科学的饲养管理,充分挖掘三黄鸡的生长潜力,提高生产性能;也可以在育种工作中对选择反应进行预测。

#### 参考文献:

- [1] 朱志明, 强巴央宗, 朱猛进. 藏鸡生长曲线拟合和分析的比较研究[J]. 中国农业科学, 2005, 39(10): 2159-2162.
- [2] 田超, 张效群. 皖南三黄鸡生长规律与产蛋性能的研究[J]. 现代农业科技, 2006, (8): 26-27.
- [3] 许宗润. 三黄鸡在塔里木地区生长规律初探[J]. 养禽与禽病防治, 1991, (2): 27-28.
- [4] 马发顺, 王聪, 杨前锋. 三黄种鸡1~22周龄生长曲线拟合和分析[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2010, 30(1): 16-17.

## 在浩瀚的信息海洋中谁能为您荟萃需要的内容

- 生猪行情预测分析与近期补栏建议
- 季节疫情流行预警与防治新技术
- 日粮营养配方调控与最新成果推介
- 饲养管理新经验与生产新工艺
- 生产实际的新问题与解决措施对策
- 行业热点聚焦观察与深入性评述

# 畜禽业 南方养猪

一刊在手, 养猪何愁?

邮订代号: 65-285 逢单月出版, 全年共6期, 订价48元

地址: 成都市人民南路四段53号嘉云台乙8-A 邮编: 610041

征订热线: (028) 85256716 广告热线: (028) 85252331



# 一例猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪瘟病毒和猪链球菌混合感染病例的诊断

马琳<sup>1</sup>, 付薇<sup>1</sup>, 易春华<sup>1,2</sup>

(1. 广西动物疫病预防控制中心, 广西南宁 530001; 2. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005)

中图分类号: S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0024-02

目前广西农村中小规模猪场多, 这些猪场饲养管理技术水平落后、猪病综合防控体系不完善, 导致疫病发生频繁, 发病情况日趋复杂, 多病原混合感染严重。这种多病原体的感染使病猪所表现的临床症状缺乏特征性, 而是表现一系列的综合症候群, 这增加了临床诊断的难度, 也给疫病的控制带来困难, 致使猪群发病率和死亡率增高。2010年2月广西北海某猪场发生了一起以体温升高, 呼吸困难, 局部皮肤发紫, 众多脏器出血为主要特征的传染病, 经流行病学调查、临床诊断、病理剖检和实验室检测, 诊断为猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株、猪瘟病毒和链球菌混合感染。现报道如下。

## 1 发病情况

该场卫生条件较差, 猪粪不能及时处理, 粪臭较浓。共饲养育肥猪 130 头, 发病初期仅几头猪出现食量减少的情况, 无其它明显症状。村防治员诊断为链球菌感染, 当天使用黄芪多糖、氟苯尼考、头孢拉定、林肯霉素和恩诺沙星进行治疗, 但疗效不佳。疫情在猪场内蔓延, 一周内疫情扩散至全场, 且发病猪出现呼吸困难等严重的临床症状, 每天死亡 3~5 头, 共死亡 50 头, 发病率几乎 100%, 死亡率高达 36%。

## 2 临床症状

发病猪主要表现为呼吸困难, 食欲减少或废绝, 饮欲增加, 拉黄色稀粪, 体温 40~41℃。部分病猪耳朵、腹下和肛门周围呈紫色。病程急, 从发病到死亡约 2~4 天。

## 3 病理变化

皮下脂肪出血; 喉头有出血点; 胸腔积混浊液

体; 心包积液, 心脏表面有纤维素性渗出物, 并与心包粘连; 腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结肿大、出血; 肺间质增宽、有出血斑; 肾脏苍白, 表面有针尖大小的出血点; 脾边缘梗死, 表面有出血点; 膀胱有出血斑。

## 4 实验室诊断

**4.1 细菌分离鉴定** 无菌取剖检病猪的心、肝、脾、肺和肾接种于鲜血琼脂平板, 37℃培养 24 h, 平板上主要见到一种灰白色、半透明、表面光滑、针尖大小的圆形菌落, 有溶血现象。涂片镜检为革兰氏阳性菌, 呈球状, 单个、两个存在, 偶见三个排列。

将该细菌纯培养后进行鉴定。细菌在麦康凯琼脂平板上不生长, 在普通培养基上生长不良。生化鉴定结果如下: 分解糖类产酸不产气, 能发酵菊糖和棉子糖, 七叶苷水解阳性, 马尿酸盐、尿吡啶交联物吡啶酚和甘露糖阴性, 在富含淀粉的培养基中能产生淀粉酶, VP 反应阴性, 6.5% NaCl 抑制其生长, 不能还原 0.1% 美蓝, 能还原石蕊乳并产酸。综上所述, 判定该细菌为链球菌。

**4.2 病毒检测** 应用 PCR 和 RT-PCR 方法对采集的肺脏、脾脏和淋巴结分别做猪繁殖与呼吸综合征病毒(包括经典株和变异株)、猪瘟病毒、猪流行性感病毒和猪圆环病毒 2 型的检测, 结果仅猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株和猪瘟病毒分别扩增出预期的 460 bp 与 251 bp 的特异性条带, 与阳性对照一致(图 1), 表明该场混合感染了猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株和猪瘟病毒。

通过对发病猪场的流行病学资料、临床症状、病理变化和实验室检测结果进行综合判定, 认为

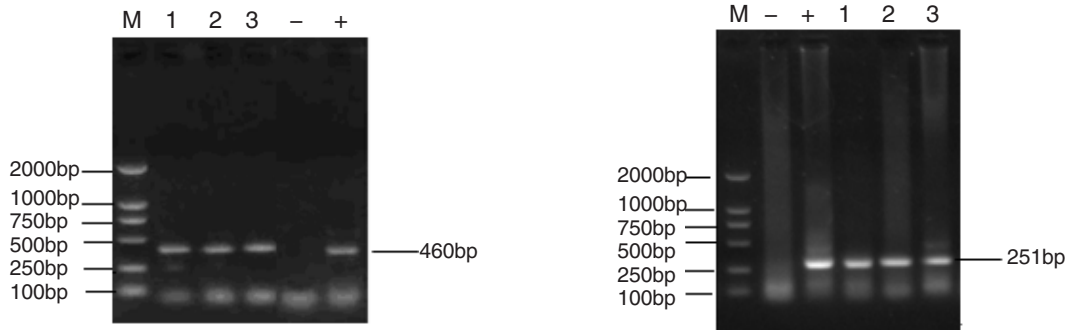


图1 猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株 RT-PCR 扩增结果 猪瘟病毒 RT-PCR 扩增结果  
 M: DNA 2000 marker 1-3: 病猪组织样品 +: 阳性对照 -: 阴性对照

该猪场大规模发病死亡的原因主要为猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株、猪瘟病毒和链球菌混合感染引起。这次疫情的发病率和死亡率都很高, 损失严重, 但哪一种病原是此次疫情的原发性病原还有待于进一步探讨。

## 5 体会与分析

5.1 猪繁殖与呼吸综合征病毒是引起免疫抑制的主要病毒之一, 感染后, 猪的免疫功能下降, 容易引起其它病原继发感染, 同时, 免疫抑制病毒的存在会影响疫苗的免疫效果, 促进其它病毒的感染, 导致猪群大面积发病和死亡。因此, 猪群感染猪繁殖与呼吸综合征病毒后继发感染猪瘟病毒和链球菌, 可能是此次疫情发生的原因。

5.2 正确的诊断是预防和控制疫病的首要条件, 特别是目前临床上多病原混合感染相当严重, 仅从现场了解情况、观察症状、剖检病猪作出判断并不十分可靠, 还必须依据病理检验和实验室诊断的结果做出综合全面的判定, 否则只会误诊和漏诊, 导致延误治疗时机和加大损失。

5.3 目前猪场滥用抗生素的现象比较普遍, 导致许多病原性细菌产生广泛耐药性, 从而使发病后的用药效果十分不理想。猪场应将样品及时送到有条件的实验室进行药敏试验, 根据试验结果有针对性的用药。而且要转变饲养观念, 以预防性用药为主, 根据疫病流行特点制定科学的预防用药方案。

5.4 良好的饲养管理是保证猪只健康的先决条件。首先, 饲养环境很重要。猪场环境差会导致疫病的发生与流行, 因此要保持猪舍的通风、干燥和清洁; 对猪舍和用具进行定期消毒; 合理安排

猪群的饲养密度; 注意冬季防寒保暖和夏季防暑降温。其次, 注重饲料安全。不能饲喂劣质、霉变和受到污染的饲料, 这些饲料会增加猪群的疫病发生率; 在饲料中添加一些抗氧化剂和中草药, 可提高猪只的抗应激能力和疫病抵抗力。第三, 为了减少或避免母猪与仔代间的疾病感染机会, 须推行全进全出的饲养方式, 至少要做到产房和保育两个饲养阶段的全进全出。第四, 科学合理使用疫苗。疫苗不是越多越好, 应根据猪场或所在地区猪病流行状况, 确定应使用的疫苗种类, 并保证疫苗质量; 在使用高质量疫苗的同时, 还应根据抗体监测结果制定适合本场的免疫程序。

### 韩国恢复非口蹄疫疫区资格

韩国农林水产食品部 9 月 28 日表示, 世界动物卫生组织已批准韩国恢复非口蹄疫疫区资格。

该部说, 世界动物卫生组织高度评价韩国在今年初口蹄疫疫情发生后, 根据国际法有关规定采取的防疫和相关事后措施。韩国于 27 日正式获得世界动物卫生组织恢复韩国非口蹄疫疫区资格的批准。

农林水产食品部表示, 将立即着手与有关国家进行协商, 启动被中断的猪肉等畜产品出口。同时, 今后将对前往口蹄疫发生国和外国农场访问、以及海外旅行后回国携带的肉类等畜产品实行更加严格的检查, 加强农户和相关从业者的自律等, 防止疫情再次发生。

韩国今年 1 月暴发口蹄疫。3 月 23 日, 在最后一批染病牲畜被宰杀并掩埋 3 周以后, 韩国宣布口蹄疫疫情结束。然而, 仁川江华郡 4 月初再度暴发口蹄疫疫情, 疫情迅速呈全国蔓延态势。(信息来源: <http://www.china-ah.com/>)

## 鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及药敏试验分析

刘保光<sup>1</sup>, 肖尚修<sup>2</sup>, 吴 华<sup>1</sup>, 徐利纳<sup>1</sup>

( 1 河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 商丘职业技术学院动物工程系, 河南 商丘 476000 )

**摘要:** 从广东、福建不同地区临床疑似鸭疫里氏杆菌感染病死鸭中分离到 12 株鸭疫里氏杆菌, 通过细菌形态、培养特征、生化试验, 鉴定为鸭疫里氏杆菌。采用微量液体二倍稀释法, 测定了 14 种常用抗菌药物对 12 株鸭疫里氏杆菌的抗菌活性, 结果表明, 有 2 个菌株均对 14 种药物高度敏感, 其 MIC 值均  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ , 其它菌株 MIC 值差异较大, 所有抗菌药对 Y4 菌株的最小抑菌浓度较高, 其 MIC 值均  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:** 鸭疫里氏杆菌; 分离; 鉴定; 药敏试验

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0026-04

## Isolation, identification and drug sensitivity test of *Riemerella anatipestifer*

Liu Baoguang<sup>1</sup>, Xiao Shangxiu<sup>2</sup>, Wu Hua<sup>1</sup>, Xu Lina<sup>1</sup>

( 1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002,China; 2.Department of Animal Engineering, Shangqiu Vocational and Technical College, Shangqiu 476000, China )

**Abstract:** Twelve bacteria strains were separated from dead ducks in different areas of Guangdong and Fujian Province. They were identified as *Riemerella anatipestifer* by bacteria morphology, cultural characteristic and biochemical test. Using the micro liquid two-fold dilution method, antibacterial activity of 14 antibiotics against 12 *Riemerella anatipestifer* strains was determined. The results showed that 2 of 12 strains were sensitive to all the 14 antibiotics and all the MIC values were equal or less than  $1 \mu\text{g/mL}$ . There were significant differences among the MIC values of other strains. The MIC values of Y4 strain to all the drugs were very high and all the MIC values were equal or greater than  $32 \mu\text{g/mL}$ .

**Key words:** *Riemerella anatipestifer*; isolation; identification; drug sensitivity test

鸭疫里氏杆菌病(*Riemerella anatipestifer* infection)是由鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)引起的鸭、鹅、火鸡等多种禽类的一种急性或慢性传染病<sup>[1]</sup>,又称为“鸭传染性浆膜炎”<sup>[2]</sup>。有关报道<sup>[3]</sup>称美国学者于1932年在纽约鸭场发现该病,随后国外许多学者对RA进行了陆续报道,1955年Dougherty等将该病命名为“传染性浆膜炎”<sup>[4]</sup>。1~8周龄鸭敏感,死亡率高,常给养鸭业造成重大的经济损失<sup>[5,6]</sup>。目前,鸭疫里氏杆菌病已成为危害养鸭业的主要细菌性传染病之一,它对鹅、火鸡等也造成很大的危害<sup>[7]</sup>。

在中国,1982年郭玉璞<sup>[8]</sup>等在北京郊区鸭场首次分离到RA。刘颖等<sup>[9]</sup>对全国各地85株RA菌进行药敏检测发现,100%对氨苄西林和多西环素敏感,但部分地区也有耐药现象。2003年黎满香等<sup>[10]</sup>也得出湖南株鸭RA对阿莫西林和氨苄西林敏感。但是,赵瑞宏等<sup>[11]</sup>对安徽株鸭RA菌进行药敏试验表明,氨苄西林的耐药率高达80%以上,怀疑是氨苄西林在本地区长期应用导致耐药率增加。

本试验通过细菌形态、培养特征和生化试验鉴定所分离菌株,并采用微量稀释法测定了阿莫西林、头孢吡肟、环丙沙星、左氧氟沙星、氟苯尼



考、多西环素、阿米卡星、庆大霉素、黏菌素和亚胺培南等 14 种临床常用的抗菌药物对 12 株临床分离的鸭疫里氏杆菌的最低抑菌浓度, 为临床合理选择抗菌药、防止耐药菌株的传播提供重要依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 2010 年 3 月从广东、福建不同地区临床疑似鸭疫里氏杆菌感染病死鸭中分离到 12 株细菌(命名为 Y1-Y12)。

**1.1.2 培养基** 胰蛋白胨大豆琼脂(批号: 20090418, 北京奥博星生物技术有限责任公司)、麦康凯琼脂(批号: 20070716, 杭州天和微生物试剂有限公司)及胰蛋白胨大豆肉汤(批号: 20070508, 北京奥博星生物技术有限责任公司)等。

**1.1.3 药品** 阿莫西林(含量 94%, 批号: 070512)、庆大霉素(含量 60%, 批号: 070119)、磷霉素(含量 60%, 批号: 080108)、氨苄西林(含量 98.5%, 批号: 070308)、环丙沙星(含量 93%, 批号: 071002)、左氧氟沙星(含量 89.92%, 批号: 070819)、头孢噻肟钠(含量 90%, 批号: 081108)、头孢曲松钠(含量 85%, 批号: 070229)、氟苯尼考(含量 99.5%, 批号: 080302)、多西环素(含量 83%, 批号: 071004)、亚胺培南(含量 80%, 批号: 081002)、头孢吡肟(含量 77%, 批号: 071203)、黏菌素(含量 80%, 批号: 080701)、阿米卡星(含量 90%, 批号: 080103)等 14 种药物, 均由河南牧翔动物药业有限公司提供。生化微量鉴定管, 杭州微生

物试剂有限公司产品, 批号: 20080218。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基的制备** 按照说明书配制。

**1.2.2 细菌分离鉴定** 无菌采取病死鸭心血、肝脏和脑组织等病料分别接种于胰蛋白胨大豆琼脂平板、巧克力琼脂平板、鲜血琼脂平板和麦康凯琼脂平板上, 置烛缸内 37℃ 培养 24~48 h。观察菌落形态, 挑取单个疑似菌接种于巧克力琼脂平板上作纯培养; 通过细菌瑞氏染色和革兰氏染色镜检及生化试验后观察结果。

**1.2.3 药物敏感性试验** 首先将药液配成初浓度为 1 280 μg/mL 的储备液, 纯培养好的菌液使用前稀释 1 000 倍, 采用微量稀释法<sup>[12]</sup>, 测定抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)。

## 2 结果与分析

**2.1 细菌分离** 从发病鸭的心血、肝和脑中分离出的可疑菌株在巧克力琼脂平上形成圆形、隆起、露珠样、大小均一的菌落; 在血琼脂平板上不溶血, 菌落表面光滑隆起, 圆形似奶油; 在麦康凯琼脂平板上不生长。

**2.2 染色鉴定** 革兰氏染色为阴性, 菌体呈单个或成双的短小杆菌, 不形成芽胞; 瑞氏染色为两极浓染的短小杆菌。

**2.3 生化试验结果** 12 株分离细菌均不发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等多种碳水化合物, 不产生靛基质和硫化氢, 接触酶试验和过氧化氢酶分解为阳性, 符合鸭疫里氏杆菌的生化反应特征。

表 1 阿莫西林等 7 种药物对 12 株鸭疫里氏杆菌的 MIC 测定结果

单位: μg/mL

菌株	阿莫西林	氨苄西林	头孢噻肟	头孢曲松	亚胺培南	头孢吡肟	黏菌素
Y1	16	4	32	16	0.125	2	32
Y2	0.25	0.25	4	1	<0.0625	<0.0625	1
Y3	128	>128	64	64	0.5	8	2
Y4	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Y5	8	32	32	<0.0625	<0.0625	4	<0.0625
Y6	64	32	32	<0.0625	0.125	<0.0625	32
Y7	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625
Y8	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625	<0.0625
Y9	<0.0625	0.25	32	<0.0625	<0.0625	<0.0625	2
Y10	0.125	1	32	<0.0625	0.125	<0.0625	2
Y11	0.5	2	16	8	<0.0625	16	32
Y12	2	4	16	32	<0.0625	32	128

**2.4 MIC 值测定结果** 用阿莫西林、氨苄西林等 14 种药物对 12 株分离细菌进行了药敏试验。结果见表 1、表 2。由表 1 可知,分离菌株(Y4 和 Y12 菌株除外)对亚胺培南、头孢吡肟高度敏感,其最小抑菌浓度 (MIC) 值分别  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$  和  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ ; 其它药物对分离菌的最小抑菌浓度差

异性较大。另外,上述多种药物对 Y4 菌株的最小抑菌浓度均  $>128 \mu\text{g/mL}$ , 说明 Y4 菌株对各药的耐受性较高, 对 Y7、Y8 的最小抑菌浓度均  $<0.0625 \mu\text{g/mL}$ , 说明 Y7、Y8 菌株对各药高度敏感。其它菌株由于菌株之间的差异性和用药不同而表现出不同的耐药性。

表 2 环丙沙星等 7 种药物对 12 株鸭疫里氏杆菌的 MIC 测定结果

单位:  $\mu\text{g/mL}$

菌株	环丙沙星	左氟沙星	氟苯尼考	多西环素	阿米卡星	磷霉素	庆大霉素
Y1	4	128	64	16	32	$>128$	16
Y2	0.5	16	0.25	0.25	0.5	$>128$	8
Y3	8	8	1	16	4	128	16
Y4	32	64	$>128$	32	$>128$	$>128$	$>128$
Y5	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	8	128	0.125
Y6	1	32	32	4	64	16	16
Y7	$<0.0625$	$<0.0625$	1	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$
Y8	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$	$<0.0625$
Y9	1	2	0.25	2	8	$>128$	4
Y10	4	4	1	4	4	64	2
Y11	4	2	1	2	4	$>128$	4
Y12	4	4	0.5	1	0.5	32	1

由表 2 可知,分离菌株(Y4 菌株除外)对环丙沙星、庆大霉素敏感,其最小抑菌浓度 (MIC) 值分别为  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  和  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ ; 其它药物对分离菌的最小抑菌浓度值差异较大。另外,上述多种药物对 Y8 菌株的最小抑菌浓度均  $<0.0625 \mu\text{g/mL}$ , 说明 Y8 菌株对各药高度敏感, 对 Y7 菌株的最小抑菌浓度均  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ , 说明 Y7 菌株对各药有较高的敏感性, 其它几株菌由于菌株之间的差异性而表现出不同的耐药性。

### 3 讨论

鸭疫里氏杆菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素如阿莫西林、氨苄西林、亚胺培南、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟的敏感性较高,其中亚胺培南、头孢吡肟抗菌活性最高,它们对所有菌株的最小抑菌浓度 (MIC) 值较低。亚胺培南对多种  $\beta$ -内酰胺酶稳定,具有广泛的抗菌活性,因此临床上一直是治疗革兰阴性菌感染的有效药物。而且由于亚胺培南的价格较高,在动物治疗方面应用较少,因此不容易产生耐药性。头孢吡肟主要抑制细胞壁肽多糖的形成,通过抑制细菌细胞壁的合成而产生杀菌

作用,能耐受多种  $\beta$ -内酰胺酶的破坏,因此抗菌活性较高。

鸭疫里氏杆菌对氟喹诺酮类药物环丙沙星敏感,其 MIC 值均  $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ 。氟喹诺酮类药物 (FQs) 具有抗菌谱广、临床疗效好及可多途径给药的优点,同时还可通过“抗生素后效应”而发挥杀菌作用<sup>[13]</sup>,在临床应用中与其他抗生素无交叉耐药性。鸭疫里氏杆菌对氨基糖苷类药物阿米卡星、庆大霉素也较敏感,氨基糖苷类药物具有抗菌谱广、性质稳定及水溶性好等优点。该类药物主要通过抑制细菌蛋白质的合成过程来对静止期细菌起杀灭作用。四环素类药物多西环素对鸭疫里氏杆菌的 MIC 值均  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ 。该类物质具有内服吸收迅速、生物利用度高及组织渗透力强等优点。该类抗生素主要通过抑制肽链延长和蛋白质合成及细菌胞质膜通透性使主要营养物质外泄而发挥抗菌作用。其它药物由于菌株之间的差异性和不同地区用药不同而表现不同的敏感性。

目前,由于养鸭户广泛滥用抗生素,导致耐药性的普遍存在,造成当地大部分细菌性疾病已

无药可治。解决这一问题的关键是养鸭户要养成免疫预防的习惯, 摒弃盲目滥用抗生素的观念。鸭疫里氏杆菌很容易产生耐药性, 对其治疗可根据药敏试验选用敏感药物进行。药物治疗短期内有一定效果, 但连续使用很快就产生耐药性。因此每次用药前均需进行药敏试验以确定首选药物, 也可采用联合用药, 提高治疗效果。

**参考文献:**

[1] Calnek B W. 禽病学[M]. 第9版. 高福, 刘文军, 主译. 第10版, 北京:北京农业大学出版社. 1991. 153-157.  
 [2] 杨建远, 何后军, 翁崇鹏. 鸭疫里氏杆菌病的研究进展[J]. 水禽世界, 2006, (3): 59-61.  
 [3] Calnek B W. Diseases of poultry[M]. ninth edition. Iowa State University, 1991. 166-171.  
 [4] Dougherty E. The pathology of infectious serositis of ducks[J]. Am J Pathol, 1995, 31(16): 836-851.  
 [5] 蔡宝祥. 动物传染病诊断学[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1993, 68-69.  
 [6] 胡清海. 鸭疫里氏杆菌病研究进展[J]. 中国家禽, 1998, 2

(4): 32-33.  
 [7] 张大丙, 郭玉璞. 我国鸭疫里氏杆菌血清型的鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(6): 536-542.  
 [8] 郭玉璞, 陈德威, 范国雄, 等. 北京鸭传染性浆膜炎德调查研究. 畜牧兽医学报[J]. 1982, 13(2): 107-112.  
 [9] 刘颖, 苏敬良, 刘文华, 等. 鸭疫里默氏菌的药物敏感性检测[J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(5): 10-12.  
 [10] 黎清香, 董伟, 雷红雨, 等. 鸭疫里默氏菌和大肠杆菌混合感染的诊断及防治[J]. 畜牧兽医杂志, 2004, 23(3): 46-47.  
 [11] 赵瑞宏, 潘孝成, 董成达, 等. 鸭疫巴氏杆菌和大肠杆菌的药敏筛选[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(2): 234-249.  
 [12] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18[S]. Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, 28(1): 1-83.  
 [13] Cattoir V, Leaprit P, Lascols C, et al. In vivo Selection during ofloxacin therapy of Escherichia coli with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(11): 1054-1057.



**欢迎订阅 欢迎刊登广告**

**《中国饲料添加剂》杂志  
征订启事**



为中国饲料工业发展服务

中国饲料添加剂企业的窗口

《中国饲料添加剂》杂志是由中国饲料工业协会饲料添加剂专业委员会主办, 全国饲料添加剂信息站编辑出版的一份综合性科技信息刊物。该杂志1997年创刊(月刊), 主要设“专家论坛”、“饲料添加剂专栏”、“科研开发”、“应用研究”、“分析测试”、“国内外动态”等栏目。

《中国饲料添加剂》杂志是集饲料添加剂行业的科研开发、生产应用研究、信息交流于一体的专业性杂志, 学术性强, 信息面广, 发行量大, 覆盖全国各地。读者对象: 从事饲料、饲料添加剂及其相关行业的企业管理者、主管部门决策者、科研教育、技术推广单位、畜牧养殖企业, 以及饲料原料、饲料添加剂、兽药、饲料机械供应商、广大养殖户等相关人员。

订费: 杂志为月刊, 大16开本。每本单价6元, 全年定价72.00元(含邮费)。

征订办法: 请直接将订费通过邮寄或银行汇款到杂志社订阅。

注意事项: 读者在邮汇订阅费时, 请注明订阅份数、邮政编码、地址、单位名称、收件人姓名、电话等相关资料, 以免误投。

《中国饲料添加剂》杂志社 中国饲料添加剂信息网

地址: 山东省济南市文化东路80号3号楼206室 邮编: 250014  
 电话: 0531-82663150 82663180 传真: 0531-82663150  
 网址: http://www.chinafeedadditive.com 邮箱: zgslstj@163.com slstj@vip.sohu.com

**SALE 72元/年**

【月刊】



## 一株鸽源新城疫病毒主要毒力基因分析

孙敏华, 吕殿红, 董嘉文, 胡奇林\*

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 对2008年从广州市白云区某发病信鸽养殖场分离鉴定的一株鸽源新城疫病毒(简称CP-GD-2008),运用RT-PCR方法扩增出该病毒的F和HN基因的ORF序列,并进行序列测定。经序列对比、进化分析发现,CP-GD-2008属于基因VIb亚型毒株,F蛋白具有强毒株裂解位点序列<sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>。该毒株与欧洲流行的鸽源基因VIb亚型毒株进化关系密切,表明该毒株与欧洲分离株可能存在共同来源。对F和HN蛋白功能研究发现,除HN蛋白第347位抗原位点由E突变为G外,F和HN蛋白的中和位点、糖基化位点及半胱氨酸残基高度保守。

**关键词:** 新城疫病毒; 鸽; F基因; HN基因

**中图分类号:** S852.659.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2010)05-0030-05

## Analysis of the main virulent genes of one Newcastle disease virus strain isolated from the pigeon

Sun Minhua, Lv Dianhong, Dong Jiawen, Hu Qilin\*

(Guangdong Open Laboratory of Public Health, Guangdong Veterinary Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** A Newcastle disease virus strain (CP-GD-2008) was isolated from the carrier pigeon in Baiyun district of Guangzhou city. F and HN gene were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequenced. After alignment and analysis of genes, the isolated strain was clustered into genotype VIb and the cleavage site of F gene was found to have the motif <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>. The strain CP-GD-2008 had high correlation with the epidemic strains of genotype VIb from Europe, which implied that they might have a common ancestor. Neutralizing epitopes, glycosylation sites and cysteine residues of F and HN protein were highly conservative, except that there was a substitution of E to G at position 347 at the neutralizing epitope on HN protein.

**Key words:** Newcastle disease virus; pigeon; F gene; HN gene

新城疫(Newcastle Disease, ND)是由新城疫病毒(NDV)引起的一种严重危害养禽业的急性高度接触性传染病。除家禽外,至少250种鸟类可自然或实验感染NDV<sup>[1]</sup>。

NDV为副粘病毒科(Paramyxoviridae)、副粘病毒亚科(Paramyxovirinae)、禽腮腺炎病毒属(Avulavirus)成员<sup>[2]</sup>。其基因组为单股负链不分节段RNA,长约15.2 kb<sup>[1]</sup>,至少编码6种蛋白,分别为NP、P、M、F、HN和L蛋白。F蛋白(Fusion protein,融合蛋白)和HN蛋白(haemagglutinin-neuraminidase,血凝素神经氨酸酶蛋白)是该病

毒的主要免疫原性蛋白,可诱导机体产生中和抗体。F蛋白介导病毒与宿主细胞的膜融合,其裂解位点序列与病毒毒力有关<sup>[1,3]</sup>。HN蛋白具有吸附、神经氨酸酶及促进融合等作用,此外还可能与病毒毒力有关<sup>[4]</sup>。

鸽群中主要流行基因VI型毒株,上世纪80~90年代以基因VIa亚型毒株为主<sup>[5,6]</sup>,自90年代中期以后,各地主要流行基因VIb亚型毒株<sup>[5~8]</sup>,这可能是疫苗选择压力的结果<sup>[6]</sup>。由于ND的宿主范围广泛,鸽子活动范围大,这些鸽群中流行的毒株对鸡等鸟类新城疫的发生具有潜在的威胁。因此,加

收稿日期:2010-05-26

\*:通讯作者

基金项目:广东省科技厅项目(2007A020300005-12)。

强对鸽源新城疫病毒的监测和防控, 具有重要意义。本研究于 2008 年自广州市白云区某信鸽养殖场分离到 1 株鸽源新城疫病毒强毒株。对该毒株的 F 蛋白和 HN 蛋白进行相关分析, 以期了解近期鸽群中 NDV 的流行情况, 为 ND 的防控提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 SPF 鸡胚** 9-11 日龄 SPF 鸡胚, 由广东永顺生物制药有限公司提供。

**1.1.2 生化试剂** NDV 标准抗原及标准阳性血清购自中国兽医药品监察所; 引物由 Invitrogen 公司合成; ExTaq、dNTP、DNA 分子量标准、胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, TRIzol Reagent、M-MuLV 购自 Invitrogen 公司, 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒的分离鉴定** 采集 2008 年广州市白云区某信鸽场疑似 ND 发病鸽 (共饲养 80 余羽信鸽, 鸽群主要表现为拉稀, 部分病鸽出现扭颈、歪头等神经症状, 主要病变为肠壁变薄, 死亡率为 100%) 的心脏、肝脏、脾脏、肾脏等组织, 研磨后按 1:5 加入无菌 PBS, 同时加入青、链霉素, 使其终浓度分别为 2000 IU 和 2 mg/mL。反复冻融 3 次后, 3 000 rpm 离心 15 min, 按 0.2 mL/ 枚的剂量接种 3 枚 9 日龄 SPF 鸡胚, 收获死亡鸡胚尿囊液。收获的尿囊液按常规微量法进行 HA 和 HI 试验<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 引物的设计** 根据 GenBank 中已登录的 NDV 全基因组序列, 利用 Oligo 6.0 设计了 2 对引物 (见表 1), 引物由 Invitrogen 公司合成。

**1.2.3 F 和 HN 基因序列扩增及测定** 用 TRIzol 提取收获尿囊液的总 RNA, 以随机引物 (Random 6mers) 进行反转录。反转录体系及条件按照 In-

vitrogen 公司说明书进行。PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 18 μL, 10×ExTaq buffer 2.5 μL, 上、下游引物 (10 μM) 各 1 μL, ExTaq 0.125 μL, cDNA 2.5 μL。F 和 HN 基因扩增反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 45 sec, 50℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。扩增的目的片断按大连宝生物胶回收试剂盒说明回收, 经 pMD18-T 载体连接、DH5 α 转化, 菌液 PCR 鉴定后, 阳性菌液送 Invitrogen 公司测序。

**1.2.4 F 和 HN 基因核苷酸进化树绘制及序列分析** 从 GenBank 下载 41 株 NDV F 基因的 ORF 及 21 株 NDV HN 基因的 ORF 序列, 利用 DNASTar 5.0 软件包将其本次分离株的 F、HN 基因序列一起进行分析。使用 MegAlign 中的 Clustal V 方法, 在 F 和 HN 基因核苷酸水平上绘制系统进化树。

## 2 结果

**2.1 病毒的分离鉴定** 病料接种 SPF 鸡胚后, 所有鸡胚均于 72 h 内死亡, 胚体全身出血。收获尿囊液, 按照微量法进行 HA 和 HI 试验。结果显示, 所收获的尿囊液具有血凝活性, 其 HA 效价大于 1:32。该尿囊液的血凝活性能够被 NDV 标准阳性血清完全抑制。将尿囊液毒命名为 Carrier pigeon-Guangdong-2008 (简称 CP-GD-2008)。

**2.2 F 基因系统进化树及序列相似性分析** 根据参考文献<sup>[5,7,10,11]</sup>, 利用 MegAlign 软件 (DNASTar, Version 5.0), 将 NDV 划分为 9 个基因型 (图 1)。进化分析显示, 本次所分离的毒株属于基因 VIb 亚型。与参考毒株核苷酸及推导氨基酸序列相似性比较后, 发现 CP-GD-2008 与基因 I 型 (Queensland V4)、II 型 (B1, La Sota)、III 型 (Mukteswar) 疫苗株之间 F 基因核苷酸的相似性分别为 84.8%、83.3% 和 84.4%, 氨基酸的相似性分别为

表 1 鸽源新城疫病毒 F 和 HN 基因序列扩增引物

引物名称	序列 (5' ~ 3') <sup>a</sup>	位点 <sup>b</sup>	扩增片段大小 (bp)
F4358	GCCATTGCYAAATACAATCC	4358~4377	1993
F6331	GGCTCCTCTKACCGTTCTAC	6331~6350	
HN6178	CCTMGATCAGATGAGAGC	6178~6195	2265
HN8426	TGTGACTCTGGTAGGAT	8426~8442	

<sup>a</sup> Y=T 或 C; K=G 或 T; M=A 或 C;

<sup>b</sup> 核苷酸位点与 NDV dove/Italy/2736/00 全基因组序列相对应。

91.3%、89.5%和 91.2%；与基因VIb 亚型毒株间核苷酸及氨基酸相似性均高于 90%，其中，与比利时毒株 248 VB 之间核苷酸和氨基酸序列相似性最高，分别为 98.6%和 99.5%；与基因VII型代表株 (Taiwan95、Ch-A7-96、ZJ1、SF02、QY97、NA-1) 之间核苷酸及氨基酸相似性为 89.0%~89.6%、93.9%~95.8%；与我国标准强毒 F48E9 株间核苷酸及氨基酸相似性分别为 85.2%、92.2%。

**2.3 HN 基因系统进化树及序列相似性分析** HN 基因进化分析显示 (图 2), CP-GD-2008 属于基因VIb 亚型, 以 HN 基因 ORF 序列绘制的进化树与以 F 基因 ORF 序列绘制的系统进化树所反映出的进化关系极其相似。序列分析发现, HN 基因推导氨基酸长度为 571, 为强毒株。与参考毒株核苷酸及推导氨基酸序列相似性比较发现 CP-GD-2008 与基因 I 型、II 型、III 型疫苗株之间 HN 基因核苷酸的相似性分别为 82.4%、81.0%~81.1%和 84.7%, 氨基酸的相似性分别为 89.3%、87.8%~87.9%和 89.0%；与基因VIb 亚型毒株间核苷酸及氨基酸相似性均高于 91%，其中，与比利时毒株 248 VB 之间核苷酸和氨基酸序列相似性最高, 均为 98.3%，与基因VII型代表株 (ZJ1、SF02、QY97、NA-1) 之间核苷酸及氨基酸相似性为 83.6%~86.7%、89.7%~

92.1%；与我国标准强毒 F48E9 株间核苷酸及氨基酸相似性分别为 82.6%、88.6%。

**2.4 F 蛋白和 HN 蛋白的变异** 序列分析发现, CP-GD-2008 裂解位点附近氨基酸为 <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>, 符合强毒株裂解位点特征。其 F 蛋白上的 6 个糖基化位点、12 个半胱氨酸残基、7 个中和位点高度保守；其 HN 蛋白上的 6 个糖基化位点, 13 个半胱氨酸残基高度保守, 但 HN 蛋白第 347 位抗原位点由 E 突变为 G。经分析发现, 多数基因VI 型毒株均具有 E347G 突变。比较特别的是, 我国的部分基因VIb 亚型鸽源毒株 F 蛋白第 497~499 位获得了一个新的糖基化位点, 这与基因III 型毒株 Miyadera 相似。

### 3 讨论

根据毒力的不同, 可将 NDV 分为 3 类: 强毒株、中强毒株和弱毒株。中强毒株、强毒株裂解位点附近氨基酸序列多为 <sup>112</sup>R/K-R-Q/K-K/R-R-F<sup>117</sup>, 而弱毒株则多为 <sup>112</sup>G/E-K/R-Q-G/E-R-L<sup>117</sup>[1, 12, 13]。本次分离的鸽源毒株 F 蛋白裂解位点序列为 <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>, 符合强毒株裂解位点特征。新城疫病毒 HN 基因编码多肽的长度可能有 3 种<sup>[14]</sup>, 分别为 616、577 和 571。一般弱毒株 HN 蛋白长度为 616, 为无活性前体; 强、中强和弱毒株的 HN 蛋白

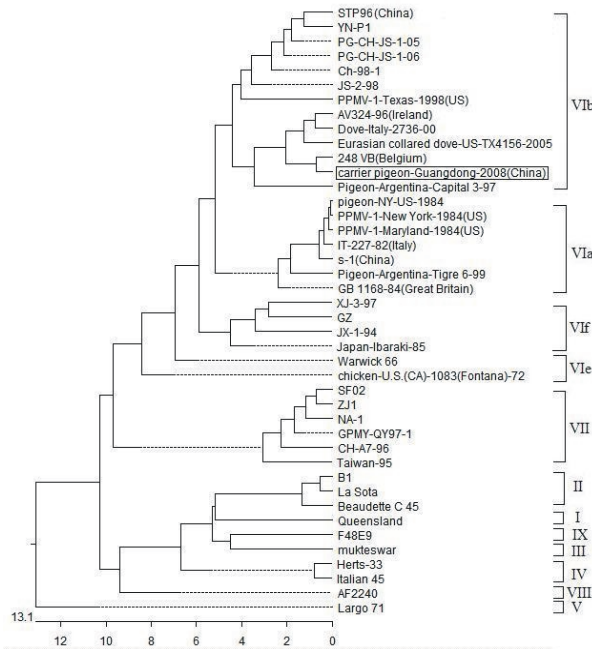


图 1 42 株 NDV F 基因 ORF 绘制的系统进化树

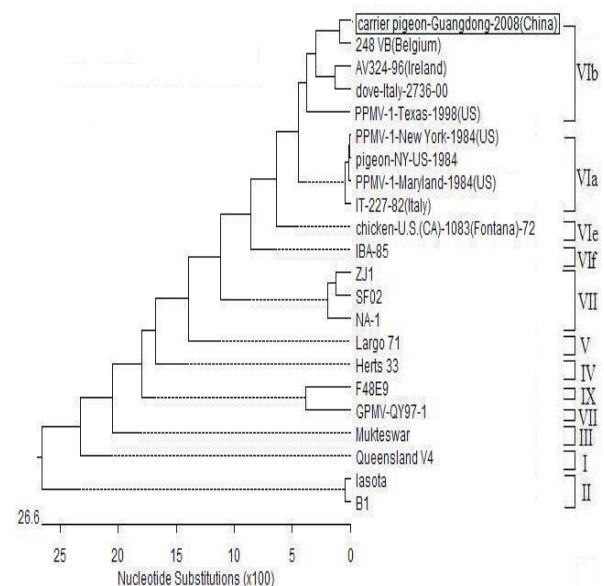


图 2 22 株 NDV HN 基因 ORF 绘制的系统进化树



长度均可能为 577;强毒株 HN 蛋白长度为 571。由于本次分离的毒株能导致发病信鸽 100%死亡,结合其 F 和 HN 蛋白特点,从分子特征上来看,该毒株为强毒株。

目前,NDV 的进化分析多利用 F 基因 ORF 前 374nt 的核苷酸序列。但 Qin 等<sup>[15]</sup>发现了变异株 SRZ03,并发现该毒株为基因 II 型中强毒株和基因 VII d 亚型强毒株的重组毒株。因此建议利用 F 基因 ORF 序列来绘制系统进化树。最近研究发现<sup>[16]</sup>,我国 3 株 ND 分离株 F 蛋白裂解位点特征显示其为弱毒株,但是 HN 基因却具有强毒株特征,且 ICPI 和 IVPI 也显示为强毒株。本研究对 NDV 的 F 和 HN 全基因进行了序列测定,并绘制了系统发育树。结果发现,以 F 基因和 HN 基因 ORF 序列绘制的进化树表现出的进化关系极其相似,CP-GD-2008 属于基因 VI b 亚型毒株。该毒株与比利时流行的基因 VI b 亚型鸽源毒株 248 VB 进化关系密切,F、HN 基因核苷酸和推导氨基酸序列相似性都高达 98%以上,说明二者之间可能存在共同来源。有趣的是,该毒株与我国部分地区同基因型的鸽源毒株并没有表现出更亲密的进化关系,它们虽然同属基因 VI b 亚型,但进化分支却不同。进一步利用本次分离株 F 基因前 374nt 序列 BLAST 后发现,该毒株与欧洲基因 VI b 亚型毒株序列相似性最高。这说明,我国流行的鸽源基因 VI b 亚型毒株可能属于两个不同的群(图 1)。CP-GD-2008 与基因 I 型、II 型、III 型疫苗株及我国标准强毒 F48E9 株之间的核苷酸和氨基酸序列相似性最高仅为 90%左右,这说明,目前流行的基因 VI b 亚型毒株可能存在一定变异。对 F 和 HN 蛋白分析发现,除 HN 蛋白第 347 位抗原位点发生变异外,CP-GD-2008 的糖基化位点、半胱氨酸残基和中和位点高度保守,说明此次分离的鸽源毒株的这些已知功能区高度保守。HN 蛋白 E347G 突变为许多基因 VI 型毒株所共有,该位点是 HN 蛋白极其重要的抗原位点之一,可能是不同毒株抗原性差异的原因之一<sup>[17]</sup>,但其是否为基因 VI 型毒株所特有的突变有待进一步证实。我国部分鸽源基因 VI b 亚型分离株的 F 蛋白第 497~499 位获得了一个新的潜在糖基化位点,这个额外的糖基化位点除基因 III 型毒株 Miyadera 具有外,暂未发现其

它基因型毒株存在。比较特殊的是,与它们同属一个进化小分支的美国分离株 PPMV-1-Texas-1998 并未获得这个新的潜在糖基化位点。推测可能是我国部分基因 VI b 亚型毒株所特有的,这些毒株可能有共同来源。

基因 VI 型毒株主要侵害鸽群,几乎遍布世界各地。自上世纪 90 年代中期以后,各地主要流行基因 VI b 亚型毒株。近年来各地分离的鸽源毒株多数属于基因 VI b 亚型<sup>[5~8]</sup>,因此这可能是疫苗选择压力的结果<sup>[6]</sup>。值得关注的是我国近年部分鸽源毒株属基因 VII d 亚型<sup>[8]</sup>,说明鸽群中的 ND 流行情况更加复杂。尽管鸽源 NDV 主要危害鸽群,但已有研究证实,鸽源 NDV 经过鸡胚传代后能够增强对鸡的致病性<sup>[18]</sup>。因此,加强对鸽源 ND 的监测及综合防控将是今后防治禽类新城疫的重要方向。

#### 参考文献:

- [1] Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, editor. Diseases of poultry[M]. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 2003. 63-92.
- [2] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. Arch Virol, 2002, 147(8):1655-1656.
- [3] Collins M S, Bashiruddin J B, Alexander D J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of NDV showing variation in antigenicity and pathogenicity[J]. Arch Virol, 1993, 128:363-370.
- [4] Huang Z H, Panda A, Elankumaran S, et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence[J]. J Virol, 2004, 78(8):4176-4184.
- [5] Aldous E W, Fuller C M, Mynn J K, et al. A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (CP-GD-2008-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons[J]. Avian Pathol, 2004, 33(2):258-269.
- [6] Kim L M, King D J, Guzman H, et al. Biological and Phylogenetic Characterization of Pigeon Paramyxovirus Serotype 1 Circulating in Wild North American Pigeons and Doves[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(10):3303-3310.
- [7] Mase M, Inoue T, Imada T. Genotyping of Newcastle Disease Viruses Isolated from 2001 to 2007 in Japan [J]. J Vet Med Sci, 2009, 71(8):1101-1104.
- [8] Liu H L, Wang Z L, Song C P. Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in

China[J]. Avian Dis, 2006, 50:636-640.

[9] 马洪超, 杨承渝, 郑志刚, 等. 新城疫检疫技术规范[S]. GB 16550-1996.

[10] Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII) [J]. Arch Virol, 1998, 143:49-64.

[11] Liu XF, Wan HQ, Ni XX, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001[J]. Arch Virol, 2003, 148(7):1387-1403.

[12] Collins MS, Strong I, Alexander D J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses"[J]. Arch Virol, 1994, 134:403-411.

[13] Aldous EW, Mynn JK, Banks J, et al. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene[J]. Avian Pathol, 2003, 32(3):239-257.

[14] Gould A R, Hansson E, Selleck K, et al. Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage[J]. Avian Pathol, 2003, 32(4):361-373.

[15] Qin Z M, Tan L T, Xu H Y, et al. Pathotypical characterization and molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2):601-611.

[16] Tan L T, Xu H Y, Wang Y L, et al. Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2):750-753.

[17] Hu S L, Wang T Y, Liu Y L, et al. Identification of a variable epitope on the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(1-2):92-97.

[18] Kommers G D, King D J, Seal B S, et al. Virulence of Pigeon-Origin Newcastle Disease Virus Isolates for Domestic Chickens[J]. Avian Dis, 2001, 45(4):906-921.

欢迎订阅 2011 年

# 贵州农业科学

(月刊)

- 中文核心期刊      • 中国科技核心期刊      • 全国优秀农业期刊
- 《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊
- 中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊      • 中国学术期刊综合评价数据库来源期刊

月刊, 大 16 开, 240 页, 每月 15 日出版

国内刊号: CN52-1054/S

国际刊号: ISSN1001-3601

CODEN: GNKUAV

邮发代号: 66-6

每期定价 12.00 元, 全年 144.00 元

全国各地邮局(所)均可订阅

地址: 贵州省贵阳市小河区贵州省农业科学院内 《贵州农业科学》编辑部

邮编: 550006

电话: (0851)3760719 3761720(传真) E-mail: gznk@263.net

# 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) ORF1 基因的系统发育分析和选择压力分析

潘德敏<sup>1</sup>, 张婷婷<sup>2</sup>

(1. 广东省农业干部学校, 广东 广州 510500; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 本研究利用脚本语言编写一系列程序流程, 成功对猪圆环病毒 2 型 (PCV2) ORF1 的 Genbank 数据进行快速整理和信息挖掘。同时, 引入 MUSCLE、MrBayes 和 PAML 等生物信息学工具对经过整理的 PCV2 ORF1 的 Genbank 数据进行深度的分析, 快速进行序列比对并获得了高解析度的 BMCMC 系统发育树, 再以该 BMCMC 系统发育树为基础数据进行基因选择压力的分析。结果表明, 中国的猪圆环病毒 2 型 (PCV2) ORF1 可分为三群, 其中两群可能存在明显的祖先, 另一群则可能经过多次从不同地方传入中国。另外, 应用位点模型和分支位点模型 (以不同的选择压力模型将不同群各设为背景) 对 PCV2 ORF1 进行分析, 没有发现各个分支上有明显处于正选择压力下的位点, PCV2 的 ORF1 基因在进化上相当保守, 所有位点的 dN/dS 值均小于等于 1 ( $P > 95\%$ ), 提示该基因没有处于明显的选择压力之下, 所有位点的突变均为中性选择位点或净化选择位点。该结果首次从选择压力分析的角度说明 ORF1 基因为功能保守的基因, 为以后筛选 PCV2 毒株制备抗 ORF1 蛋白的单克隆抗体提供了理论依据。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; ORF1 基因; 系统发育分析; 选择压力分析

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>9.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2010)05-0035-07

## Phylogenetic and selective pressure analysis of ORF1 gene of porcine circovirus type 2 (PCV2)

Pan Demin<sup>1</sup>, Zhang Tingting<sup>2</sup>

(1. Guang Dong Agricultural Administrative School, Guangzhou 510500, China; 2. South China Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In this study, a set of programs were written by Perl script computer language. Based on these programs and Genbank data of ORF1 gene of PCV2, a model for quick data processing and data mining was established. Meanwhile, a set of bioinformatic softwares (like MUSCLE, MrBayes and PAML) were introduced to the deeper data analysis for PCV2 ORF1 gene, including the quick sequence multiple alignment, the reconstruction of the BMCMC phylogenetic tree and the BMCMC tree-based selective pressure analysis. The results indicated that ORF1 gene of Chinese PCV2 strains can be clustered into three lineages. Two lineages may have common ancestors and the other lineage may experience multiple introductions from different place and different time. Moreover, PAML site model and branch-site model (different lineages were set as background) were applied to do the selective pressure analysis for PCV2 ORF1 gene. The results revealed that there were no significant sites under positive selective pressure on ORF1 gene in different models. The ORF1 gene may evolve very conservatively and all the dN/dS values of different models were less than or equal to 1 ( $P > 95\%$ ), which suggested that the ORF1 gene didn't evolve under selective environments and all the amino acid residues were under neutral or purified selection. So the conservative evolutionary process of PCV2 ORF1 gene was revealed by the selective pressure analysis for the first time. This evidence may be helpful to the reference strains selection of PCV2 and thus the further preparation of the anti-ORF1 monoclonal antibody.

**Key words:** Porcine circovirus type 2; ORF1 gene; phylogenetic analysis; selective pressure analysis

### 1 前言

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 属圆环病毒科圆环病毒属, 基因组为单股环状 DNA, 约为 2 000 bp。PCV2

有两个蛋白, 分别是 Cap 蛋白 (由 ORF2 编码) 和 Rep 蛋白 (由 ORF1 编码), Cap 蛋白是病毒的结构蛋白, 具有良好的抗原性, 而 Rep 蛋白是非结构蛋白,

在所有的圆环病毒里高度保守, 参与病毒复制, 对圆环病毒繁殖起重要作用。

PCV2 是引起仔猪多系统衰竭综合征 (post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要病原, 对世界范围内养猪业造成很大的经济损失。自上世纪 90 年代在北美和欧洲首次发现的 PCV2 以来, 该病已经迅速在全世界范围内迅速传播, 然而人们对于 PCV2 的发生和传播的过程仍然知之甚少。

Ma 等<sup>[1]</sup>对香港地区和中国大陆地区的 PCV2 进行重组分析, 发现不同 PCV2 毒株之间存在类似的重组现象, 重组毒株中的重组片段很可能是在其基因组复制起始点的附近插入, 提示了中国大陆地区和香港地区的 PCV2 重组毒株的流行已经很普遍。Lefebvre 等<sup>[2]</sup>应用有限稀释法纯化 PCV2 毒株时也成功分离出三株 PCV2 毒株, 其中一株 PCV2 为重组毒株, 其重组插入位点位于 ORF1 和 ORF2 之间。在美国, Hesse 等<sup>[3]</sup>在用特异性引物进行快速 PCR 诊断时发现, 生产上有 25% 的猪体内存在两种基因型的 PCV2 病毒, 同时也分离到了一株具有两种基因型分子特征的重组毒株。Yang 等<sup>[4]</sup>在浙江省进行不同时间 (2003-2005 年期间) 的血清样品采集, 然后应用间接 ELISA 方法和 PCR 方法检测得出 1 250 份样品里有 500 份样品呈现 PCV2 感染阳性反应, 阳性率高达 40%, 该结果揭示了在中国华东地区 PCV2 的流行同样严重。2007 年, Shuai 等<sup>[5]</sup>对中国华南地区的猪场进行调查, 发现血清样品中约 50% 都呈现 PCV2 阳性反应, 揭示华南地区的养猪场已经普遍感染 PCV2。同年, 克罗地亚的 Lipej 等<sup>[6]</sup>首次在野生公猪也分离到一株 PCV2, 系统发育分析表明该毒株与匈牙利流行的毒株关系较近。以上研究结果表明 PCV2 已经在全世界范围内流行, 不同的 PCV2 毒株之间能发生重组产生新的重组毒株, 并且除了家猪外野猪也能感染 PCV2。

An 等<sup>[7]</sup>对引起不同临床症状的 36 株 PCV2 同时结合 233 株公共序列的 PCV2 的 ORF2 基因进行分析, 根据基因型分成两个群体 (分别命名为 PCV2 I 和 PCV2 II), 但是不同临床症状的 PCV2 均落在两个群体之间, 不同症状的 PCV2 之间并没有显著的分群现象。Kim 等<sup>[8]</sup>对韩国流行的 PCV2 毒株进行分析, 发现不同基因型的 PCV2 毒株之间也能发生重组。Timmusk 等<sup>[9]</sup>应用不同临床症状感

染 PCV2 毒株进行分析却发现基因型与不同症状之间存在着某种联系。在瑞士, Wiederkehr 等发现目前主要流行的是 PCV2 II 基因型的毒株。在巴西, Ciacci-Zanella JR 等也发现了两种基因型的 PCV2 毒株, 但是不同基因型与地理位置的关联性并不明显。Wang 等<sup>[10]</sup>分析 2004-2008 年间中国流行的 PCV2 毒株的 ORF2 基因, 可以将原来的 2 个基因型进一步划分为 4 个基因型。Chae 等<sup>[11]</sup>对韩国的 PCV2 毒株 ORF2 基因进行分析, 同样可以将 2 个基因型进一步划分为 4 个基因型。以上研究结果表明 PCV2 从 ORF2 基因水平上看, 可以将 PCV2 分成 2 个或者 4 个基因型, 但是不同基因型与不同临床症状、不同地方的 PCV2 之间的关系目前还没有一致的定论。

Chiarelli-Neto 等<sup>[12]</sup>用 30 株巴西毒株和 Genbank 上的公共序列进行系统发育地理学分析, 发现巴西目前流行的 PCV2 毒株有三个来源, 即 PCV2 很可能曾经在不同时间 3 次引入巴西。Firth 等<sup>[13]</sup>对 PCV2 毒株进行分子定年确定了大约在 100 年前 PCV2 毒株的共同祖先开始逐步演变成两种基因型的 PCV2 毒株, 并计算出其核酸替代率约为  $1.2 \times 10^{-3}$  替换位点 / 年, 为 DNA 病毒中最高的。该研究首次结合系统发育地理学分析、分子定年等技术对 PCV2 的 ORF2 基因进行分析, 从而揭示 PCV2 的进化和流行历史。

以上研究均以各种生物信息学方法对 PCV2 的 ORF2 基因进行研究分析, 目前还没有系统的报道对 PCV2 的 ORF1 基因进行分析。虽然 PCV2 的 ORF1 基因在所有的圆环病毒里高度保守, 但是其功能是参与病毒复制, 推测 ORF1 可影响病毒的复制进而影响病毒的毒力, 对圆环病毒繁殖起重要作用, 因此, 对 PCV2 的 ORF1 进行系统的生物信息学分析有着重要的意义。本研究应用 Genbank 的 PCV2 公共数据, 编写数据挖掘程序筛选注释信息齐备的 PCV2 毒株, 然后将其整理成信息完整的数据集, 并以贝叶斯马可夫链蒙特卡罗法 (Bayesian Markov Chain Monte Carlo, BMCMC) 建立系统发育树, 观察 ORF1 在进化上的特点, 同时应用 PAML 对数据集进行选择压力的分析, 揭示可能受到正选择压力 ( $dN/dS > 1$ ) 的位点, 为选择适合的 PCV2 毒株的 ORF1 基因克隆表达和单克隆抗体制备做前期准备。



## 2 材料与方法

**2.1 病毒序列** Genbank 上公报的所有 PCV2 全基因组序列。

**2.2 相关数据分析软件和工具** Editplus 3.0 纯文本编辑器, Perlscript 5.1.1.10070 脚本语言, MEGA4.0, Muscle 3.0, MrBayes 3.2, PAML 3.0, Linux 系统。

**2.3 PCV2 的原始数据筛选、过滤、挖掘和重整** 在 Genbank 网页上找出所有 PCV2 全基因组序列, 选择全部序列并应用 Genbank 网页上导出 gb 文件格式的功能将所有 PCV2 的原始数据导出生成一个 PCV2.gb 文件 (内含 PCV2 毒株的分离时间、分离地点、各 ORF 序列注释和蛋白质序列注释等原始信息) 和一个 PCV2.fasta 文件 (内含序列号 and 全基因组序列等信息)。

编写 extract\_ORFs\_from\_pcv\_genome.pl 脚本程序、add\_gbinfo\_to\_simpllify\_fasta.pl 脚本程序、simplify\_fasta.pl 脚本程序和 filter\_complete\_info\_seq.pl 脚本程序。

在 Linux 系统 bash 模式下依次运行:

```
perl simplify_fasta.pl pcv2.fasta>pcv2.fasta.simplify
```

```
perl add_gbinfo_to_simpllify_fasta.pl pcv2.gb pcv2.fasta.simplify>pcv2.fasta.simplify.info.fasta
```

```
perl filter_complete_info_seq.pl pcv2.fasta.simplify.info.fasta>pcv2.fasta.simplify.info.complete.fasta
```

```
perl extract_ORFs_from_pcv_genome.pl pcv2.fasta.simplify.info.complete.fasta
```

最后生成 PCV2\_ORF1.fasta 文件, 此文件为 PCV2 的 ORF1 基因完整 CDS 的 fasta 格式文件, 序列名称由 “>序列号\_毒株分离地点\_毒株分离时间” 构成 (如 >FJ667596\_China\_2008), 并将所有冗余序列去除 (序列 100% 相同的保留分离时间较早的毒株)。

**2.4 PCV2 的 ORF1 序列比对** 应用 MEGA4.0 将 PCV2\_ORF1.fasta 文件打开, 然后转换成氨基酸序列, 再生成 PCV2\_ORF1.pep.fasta 文件。在 Linux 系统 bash 模式下应用 Muscle 3.0 进行蛋白质序列比对, 生成 PCV2\_ORF1.pep.fasta.muscle 文件 (为蛋白质序列比对文件), 编写 pepM-

fa\_to\_cdsMfa.pl 脚本程序, 运行 perl pepM-fa\_to\_cdsMfa.pl PCV2\_ORF1.pep.fasta.muscle PCV2\_ORF1.fasta > PCV2\_ORF1.fasta.muscle。生成 PCV2\_ORF1.fasta.muscle 文件 (为 ORF1 核酸序列以蛋白序列比对为基础模板进行的比对 fasta 格式文件)。

**2.5 BMCMC 系统发育树的建立** 编写 fasta2philip.pl 脚本程序, 运行 perl fasta2philip.pl PCV2\_ORF1.

```
fasta.muscle > PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi。生成 PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi 文件 (为 phylip 格式的 ORF1 核酸序列以蛋白序列比对为基础模板进行的比对文件)。编写 bayes_nex_production_4d_and_phase1.pl 脚本程序, 运行 perl bayes_nex_production_4d_and_phase1.pl PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi。生成 PCV2_ORF1.
```

```
fasta.muscle.phi.interleave.nex 文件 (为 nexus 格式的 ORF1 核酸序列以蛋白序列比对为基础模板进行的比对文件)。以 MrBayes 3.2 的 GTR+I+ $\gamma$  模型 (burnin=10,000,000) 运行 mb -i PCV2_ORF1.fasta.muscle.
```

```
phi.interleave.nex, 生成 PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi.interleave.nex.con (为 BMCMC 系统发育树原始文件)。编写 con2nwk.pl 脚本程序, 运行 perl con2nwk.pl PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi.interleave.nex.con > PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi.interleave.nex.con.nwk, 生成 PCV2_ORF1.fasta.muscle.phi.interleave.nex.con.nwk 文件 (为 newick 格式的 BMCMC 高解析度系统发育树文件)。
```

**2.6 PCV2 的 ORF1 基因不同分支上的选择压力分析** 以 newick 格式的去掉 bootstrap 值的 BMCMC 高解析度系统发育树为 ORF1 基因的拓扑结构基础, 应用 PAML3.0 软件内的位点模型 site-model (M1 和 M2a) 和分支位点模型 branch-site-model 分别进行具有正选择压力位点的检测。对比不同位点模型的或然值 (lnLikelihood) 进行比较, 检测或然值是否差异显著 ( $\Delta \ln \text{Likelihood} > 3$ ), 同时观察经验贝斯方法 (BEB) 能否检测出具有正选择的位点 ( $dN/dS > 1$ )。

## 3 结果

**3.1 快速生成包含有用信息的 PCV2 的 ORF1 基**

**因的 fasta 格式文件** 应用自行编写的脚本程序 `extract_ORFs_from_pcv_genome.pl`、`add_gb-info_to_simpllify_fasta.pl`、`simplify_fasta.pl` 和 `filter_complete_info_seq.pl`, 依次运行 2.3 部分描述的流程, 快速生成 PCV2 的 ORF1 基因完整 CDS 的 fasta 格式文件, 序列名称由“>序列号\_毒株分离地点\_毒株分离时间”(如 >FJ667596\_China\_2008), 并将所有冗余序列去除(序列 100%相同的保留分离时间较早的毒株)。该文件的编写方式有助于进行系统发育树分析的时候归纳病毒的流行病学特征(如流行地点和流行时间)。

**3.2 快速获得 PCV2 的 ORF1 基因序列比对的 fasta 格式文件** 应用 Muscle 3.0 和自行编写的脚本程序 `pepMfa_to_cdsMfa.pl`, 快速生成 PCV2\_ORF1.fasta.muscle 文件(为 ORF1 核酸序列以蛋白序列比对为基础模板进行的比对 fasta 格式文件)。应用该流程生成 PCV2\_ORF1.fasta.muscle 文件(含约 100 条 945 bp 的 PCV2 的 ORF1 序列)只需大约 30 min, 比传统的 CLUSTALW 方法(同样的工作量约需 72 h)快。

**3.3 高解释度 BMC MC 系统发育树的建立** 以上述 PCV2\_ORF1.fasta.muscle 文件为基础结合自行编写的脚本程序 `fasta2philip.pl`、`bayes_nex_production_4d_and_phasel.pl` 和 `conn2nwk.pl`, 应用 BMC MC 法建立了高解析度的系统发育树(图 1)。从图 1 可见后验概率值(posterior probability)较高的分支主要有三支, 分别命名为 cluster1、cluster2 和 cluster3。由树上的地点和时间信息可知 cluster1 内为近年(2007-2009 年)中国华北和部分华中地区流行的 PCV2 毒株的 ORF1 基因与其根部的 2005 年和 2007 年韩国分离株的相似度较高, 提示 cluster1 内的中国 PCV2 毒株的祖先可能来源于韩国毒株。由树上的地点和时间信息可知 cluster2 内为近年(2004-2008 年)中国华东和部分华中地区流行的 PCV2 毒株的 ORF1 基因与其根部的 2007 年台湾分离株的相似度较高, 提示 cluster1 内的中国 PCV2 毒株的祖先可能来源于中国台湾地区毒株。Cluster3 内的毒株流行时间跨度最大(2003-2008 年), 其中很多中国的毒株与来自欧洲的毒株很相似, 没有比较明显的

根, 提示该 cluster 内流行的毒株可能是经过多次从不同地方传入中国, 而且很可能正处于独立进化的过程且尚未形成大面积流行。

综合以上结果, 该高解析度的 BMC MC 系统发育树提示了目前中国 PCV2 流行毒株大概可以分为 3 个群, cluster1 和 cluster2 有比较明显的根部分支(根部分支具有后验概率值=100), 表明这两个群已经发生过大面积流行; 而 cluster3 则没有明显的根部分支, 表明这个群很可能正处于独立进化的过程且尚未形成大面积流行。

**3.4 PCV2 的 ORF1 基因不同分支上的选择压力分析** 应用 PAML 3.0 软件内的位点模型 site-model (M1 和 M2a) 分别对整个 BMC MC 系统发育树进行选择压力分析, 发现两种模型 M1 和 M2a 计算得出的或然值差异不显著 ( $\Delta \ln \text{Likelihood} < 3$ ), 同时经验贝斯方法 (BEB) 也没有检测出具有正选择的位点 ( $dN/dS > 1$ )。应用 PAML 3.0 软件内的分支位点模型 branchsite-model, 分别以一个 cluster 分支为前景并假设其他两个分支 cluster 为背景, 进行选择压力分析, 也没有发现各个分支上有明显处于正选择压力下的位点。

以上的结果均表明 PCV2 的 ORF1 基因在进化上相当保守, 所有位点的  $dN/dS$  值均小于或等于 1 ( $P > 95\%$ ), 提示该基因没有处于明显的选择压力之下所有位点的突变均为中性选择位点或净化选择位点。该结果首次从选择压力分析的角度说明 ORF1 基因为功能保守的基因, 为以后筛选 PCV2 毒株制备抗 ORF1 蛋白的单克隆抗体提供理论依据。

## 4 讨论

本部分研究应用一系列自行编写的脚本程序, 针对 Genbank 上关于 PCV2 病毒的 ORF1 基因的基本信息进行快速筛选、过滤和重整, 得到包含完整信息的 fasta 格式文件。这些自行编写的脚本程序使 PCV2 病毒的 ORF1 基因的基本信息在高效率下快速整合在一起, 为后续的序列比对分析、系统发育树分析和基因选择压力的分析提供了包含完整毒株信息的 fasta 文件(对于 PCV2 病毒来说是分离地点和时间), 为分子流行病学等的分析提供了较直观的原始数据。Genbank 上的 PCV2 序列是实时更新的, 序列的数量随时间呈几何级数

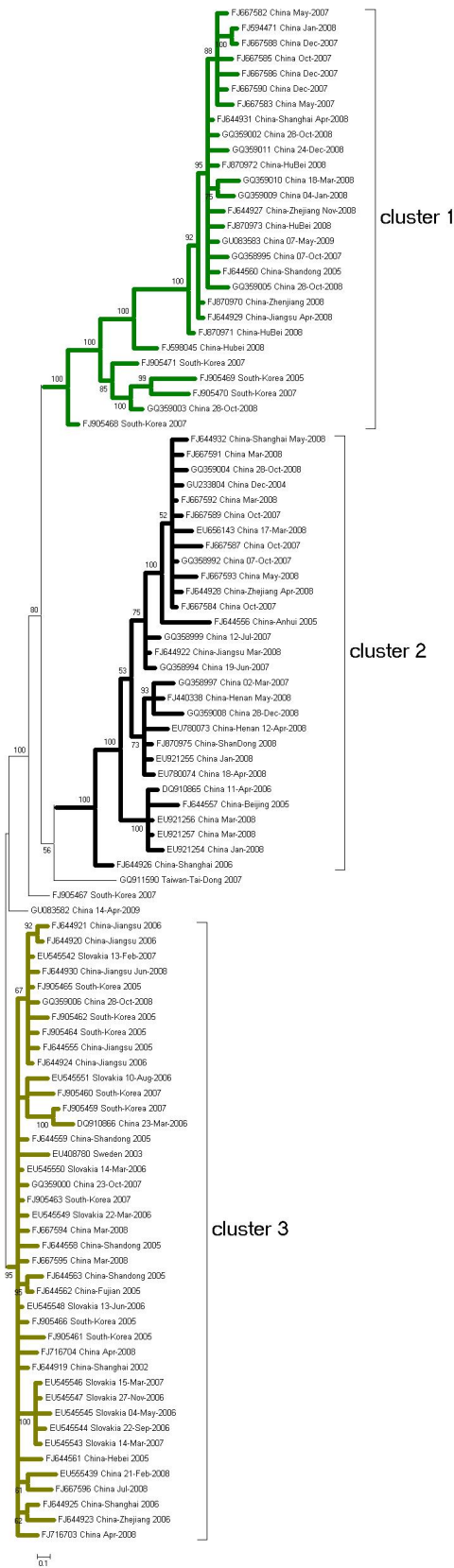


图 1 PCV2 的 ORF1 基因的 BMCMC 系统发育树

的增长,所以用手工编辑这些迅速递增的原始序列信息的 fasta 文件是不现实的,而且必然要浪费大量人力。本研究成功建立了针对 PCV2 毒株的 ORF1 基因的一个数据整理平台,应用 Perlscript 语言编写了一系列脚本程序,列出了一个数据处理流程,并在 Linux 系统下快速生成了对应的文件。假如未来 Genbank 上有 PCV2 序列大量上载,研究人员只要按照该数据处理流程重复运行本研究编写的脚本程序,则可以在短时间内再次整理出一系列新的原始文件供后续分析使用。本研究建立的这个数据整理平台既可以处理 PCV2 毒株的 ORF1 基因的原始数据,也可以处理 PCV2 毒株的 ORF2 基因的原始数据。由于 Genbank 上对于各种物种的注释信息不一样,如果要应用本研究建立的这个数据整理平台分析其他病毒的时候,要对本研究列出的某些源代码作出一定程度的修改。

本研究引入 Muscle 3.0<sup>[14]</sup>进行序列比对,相对于 CLUSTALW 算法,Muscle 3.0 显得更有效率,同时 Muscle 3.0 也广泛应用在动植物基因组的基因比对中。对于本研究(101 条 PCV2 毒株的 ORF1 基因序列数据集)应用 CLUSTALW 算法需要大约几天的时间,而 Muscle 3.0 仅需要 30 min 左右。要得到去除含有潜在重组序列的序列比对文件,研究人员通常要结合 RDP、Simplot 等软件检测序列比对文件,筛选出潜在的重组序列<sup>[15, 16]</sup>,并将其从原比对文件中去除,然后再次建立新的比对文件,这时如果数据集较大的话(例如进行全国大范围 PCV2 毒株的分子流行病学分析),这样的过程所耗费的时间就会很多。为了未来针对巨大通量数据的分析,本研究引入 Muscle 3.0 进行序列比对并自行编写了能生成适合最大或然法(Maximum Likelihood, ML)和 BMCMC 法导入文件的脚本程序。这几个脚本程序能快速生成各种不同格式的导入文件,使整个研究流程更有效率。

国内实验室对其各自分离的病毒的进化树分析主要是应用 Neighbor Joining(with Bootstrapping)和 Maximum Likelihood(with Bootstrapping)两种方法。Neighbor Joining(with Bootstrapping)建立的进化树快速但其揭示的毒株间的进化关系却不太准确,原因在于其算法的制约,该方法适用于较长的核酸序列的分析。Maximum Likelihood (with Bootstrapping)建立的进化树



太慢,但其揭示的毒株间的进化关系却很准确,原因在于其算法是利用树形(tree topology)、核酸替代模型(nucleotide substitution model)和树枝长度(Branch length)三个参数找出或然性(Likelihood)最大的进化树,该方法在分析序列的数量上有较大的限制,当序列数大于 50 条的时候,计算一次可能要花费大约一个月的时间。国内对 PCV2 病毒的分析目前多用 Neighbor Joining (with Bootstrapping), 主要存在的问题是当序列的长度小于 1 000 bp 时,产生的结果不准确,从而极容易得出错误的结论。BMCMC 系统发育树是近年来流行的系统发育树方法,该方法引入了后验概率来取代 bootstrap 值支持,以显示系统发育树分支出现的可能性。BMCMC 方法首先在 2002 年由 Jow 等<sup>[17]</sup>引入进化树分析领域,最初多用于对动植物基因组的分析,近年来开始被病毒学家们应用于病毒序列分析的领域。BMCMC 方法所得出的是后验率分布 (posterior distribution)模型,用概率替代 Bootstrapping 的支持,其结果大致和 Maximum Likelihood (with Bootstrapping)方法一致,而且 BMCMC 方法不需要做 Bootstrapping,所以也适用于序列的长度小于 1 000 bp 的序列。2008 年,Chung-Chau Hon 等用 Bayesian MCMC 方法对大量 SARS 病毒序列进行分析并试图推断其最有可能的祖先。2006 年,Chung-Chau Hon 等用 BMCMC 方法对大量 IBDV 病毒序列进行分析并试图推断其与 vvIBDV 病毒的亲缘关系,其分析结果准确程度与 Maximum Likelihood (with Bootstrapping)方法相当,但所耗费的时间相对少。所以,本研究认为 BMCMC 方法得出的结果对于 PCV2 病毒后续研究有较高的指导意义。

2000 年, Yang 等对适应性进化的统计分析方法进行了系统的阐述,包括位点模型 site-model (M1 和 M2a) 和分支位点模型 branchsite-model 等。2005 年, Zhang 等阐述了改进版的分支位点模型检测处于进化正选择压力下的位点。2009 年,基于以上方法,研究人员对多种基因进行了选择压力分析并找出了目的基因处于正选择压力的位点。基于 BMCMC 高解析度系统发育树应用不同的模型,本研究对 PCV2 的 ORF1 基因进行选择压力分析

发现 PCV2 的 ORF1 基因在进化中并没有显著的正选择压力,提示 PCV2 的 ORF1 基因在进化上相当保守,所有位点的突变均为中性选择位点或净化选择位点,这为以后筛选 PCV2 毒株表达 ORF1 蛋白并制备抗 ORF1 蛋白的单克隆抗体研究提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Ma C M, Hon C C, Lam T Y, et al. Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China[J]. Journal of General Virology, 2007, 88(6):1733-1737.
- [2] Lefebvre D, Van Doorselaere J, Delputte P, et al. Recombination of two porcine circovirus type 2 strains[J]. Archives of Virology, 2009, 154(5):875-879.
- [3] Hesse R, Kerrigan M, Rowland R R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field [J]. Virus Research, 2008, 132(1-2):201-207.
- [4] Yang Z Z, Shuai J B, Dai X J, et al. A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2008, 9(2):148-153.
- [5] Shuai J, Wei W, Li X, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in high-seroprevalence areas in southeastern China[J]. Virus Genes, 2007, 35(3):619-627.
- [6] Lipej Z, Segalés J, Jemeri L, et al. First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences [J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2007, 55(3):389-404.
- [7] An D J, Roh I S, Song D S, et al. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006[J]. Virus Research, 2007, 129(2):115-122.
- [8] Kim H, Luo Y, Moon H, et al. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea[J]. Virus Genes, 2009, 39(3):352-358.
- [9] Timmusk S, Wallgren P, Brunborg I, et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. Virus Genes, 2008, 36(3):509-520.
- [10] Wang F, Guo X, Ge X, et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2 [J]. Virus Research, 2009, 145(1):151-156.
- [11] Chae J S, Choi K S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea[J].



- Research in Veterinary Science, 2010, 88 (2): 333-338.
- [12] Chiarelli-Neto O, Yotoko K S C, Vidigal P M P, et al. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches[J]. Virus Research, 2009, 140 (1-2): 57-63.
- [13] Firth C, Charleston M A, Duffy S, et al. Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2[J]. The Journal of Virology, 2009, 83 (24): 12813-12821.
- [14] Edgar R C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32 (5): 1792-1797.
- [15] Martin D P, Williamson C, Posada D. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments[J]. Bioinformatics, 2005, 21 (2): 260-262.
- [16] Lole K S, Bollinger R C, Paranjape R S, et al. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination[J]. The Journal of Virology, 1999, 73 (1): 152-160.
- [17] Jow H, Hudelot C, Rattray M, et al. Bayesian Phylogenetics Using an RNA Substitution Model Applied to Early Mammalian Evolution[J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19 (9): 1591-1601.

## 农业部在穗召开广州亚运会动物卫生保障工作座谈会

为保障 2010 年广州亚运会、亚残运会期间动物及动物产品卫生安全,保障亚运会、亚残运会顺利召开,9 月 26 日,农业部在广州市召开了广州亚运会动物卫生保障工作座谈会,通报了各有关省区向广州、佛山、汕尾、东莞四个赛区城市供应动物及动物产品检疫监管工作情况,部署了下阶段的保障措施。湖南、福建和江西三省在会上交流了供亚动物及动物产品卫生安全保障工作的经验。农业部兽医局张弘副局长出席会议并讲话。全国 22 个省(区、市)和广州、佛山、汕尾、东莞四市农牧部门的代表参加了会议。

会议指出,广东省及四个赛区城市在保障亚运动物及动物产品安全方面做了大量深入细致的工作。各供亚省、区都按照农业部《2010 年广州亚运会期间动物卫生及动物产品安全监管工作方案》要求,强监管、抓落实,供亚动物及动物产品安全得到了保障。但由于重大动物疫病防控、动物产品监管和亚运会动物产品质量保障任务艰巨,广州亚运会期间动物产品安全保障工作形势依然严峻。会议要求各省必须加强组织领导,认真落实责任,完善联防联控机制,把握重点,查找漏洞和薄弱环节,进一步做好供亚动物及动物产品卫生安全保障工作。

一是抓好兽药残留及使用监管。加强养殖基地、屠宰企业的兽药使用和残留监督监控工作,严禁违规添加兴奋剂物质和违禁药物。加强兽药打假,确保兽药质量。二是抓好动物及动物产品检疫监管。对养殖基地、屠宰加工企业实行备案管理,加强养殖生产、运输流通、交易和屠宰等环节的监管工作。三是抓好亚运无规定马属动物疫病区(简称无马疫区)管理维护和参赛马匹监管。严格按照规定做好进入无马疫区的动物检疫和防疫工作,有效维持无疫状态,保障马术比赛顺利进行。四是抓好应急工作。亚运主协办城市制定专门预案,加强应急物资储备,强化应急值守,做到责任明确、人员到位、信息畅通。五是抓好重大动物疫病防控。扎实做好重大动物疫病防控工作,确保亚运期间不发生重大动物疫情。六是抓好联防联控。

广东省及涉亚城市和各有关省建立健全重大动物疫情联防联控、动物产品监管、兽药残留监控应急联络机制,做到及时通报、快速处置、确保动物产品安全正常供应。(来源: <http://www.gdagri.gov.cn/>)

## “可得福”聚维酮碘与碘酊对犬腹部手术伤口的消毒效果比较

周庆国, 李嘉雯

(佛山科技学院动物医学系, 广东 佛山 528231)

**摘要:** 为了观察聚维酮碘消毒剂“可得福”对犬手术伤口的消毒效果, 选用2~3月龄、3~5 kg的本地杂交犬10只, 随机分为试验组和对照组, 试验组选用1.0%~0.5%“可得福”, 对照组选用2%碘酊和0.1%苯扎溴铵, 在相同的手术条件与伤口情形下, 对比两组犬分别使用上述药液涂擦或清洗对手术伤口的影响。结果显示, 使用“可得福”消毒的有效性和安全性优于2%碘酊和0.1%苯扎溴铵。

**关键词:** “可得福”聚维酮碘; 碘酊; 苯扎溴铵; 伤口消毒

**中图分类号:** S859.79<sup>9</sup>.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2010)05-0042-02

## Disinfection effects of povidone-iodine "Kedefu" and iodine tincture on abdominal surgical wounds in dogs

Zhou Qingguo, Li Jiawen

(College of Veterinary Medicine, Foshan University, Foshan 528231, China)

**Abstract:** In order to investigate the disinfection effect of povidone-iodine "Kedefu" on the surgical wounds in dogs, 10 local hybrid dogs with ages from 2 to 3 months and weights from 3 to 5kg were randomly divided into test group and control group including 5 dogs each. In the same operation conditions and wounds, 1.0% to 0.5% "Kedefu" were used in the test group and 2% iodine tincture and 0.1% benzalkonium bromide were used in the control group. The effects of rubbing or cleaning the surgical wounds were compared. The results showed that "Kedefu" was more effective and safer than 2% iodine tincture and 0.1% benzalkonium bromide.

**Key words:** Povidone-iodine "Kedefu"; iodine tincture; benzalkonium bromide; disinfection

碘酊又名碘酒, 是常用的皮肤消毒剂。碘酊中的碘可直接卤化菌体蛋白质而产生杀菌作用, 其杀菌作用强而快, 1 min 可杀灭各种细菌、霉菌及细菌芽胞。但碘酊对皮肤黏膜的刺激性大, 能灼伤皮肤和黏膜, 其强度与浓度成正比, 碘酊不宜直接涂在破损伤口及口腔、鼻腔和阴道等黏膜上, 因为可引起组织损伤和剧烈疼痛。“可得福”是一种含聚维酮碘的消毒剂, 据医学有关资料, 聚维酮碘(又称碘伏)对大多数细菌包括霉菌都有杀灭作用, 可用于皮肤、黏膜的消毒, 也可治疗烫伤、滴虫性阴道炎、霉菌性阴道炎、皮肤霉菌感染等。为了客观评价“可得福”对犬皮肤伤口的消毒效果, 在模拟室外环境的条件下, 以犬膀胱切开术为实验

模型, 观察“可得福”对术前皮肤的消毒效果及对术后感染伤口的治疗效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 从本地宠物市场购得2~3月龄, 体重3~5 kg的杂交犬10只。根据月龄、性别平均分配到试验组和对照组, 每组各5只犬, 两组犬的年龄、性别相当。常规单笼饲养, 饲喂商品化颗粒狗粮和米饭, 每天临床观察其精神、食欲状态及排便、排尿情况, 一周后未发现任何异常即开始实验。

**1.1.2 手术器械** 常规手术器械, 高压蒸汽灭菌后备用。

**1.1.3 实验药品** 可得福(含10%聚维酮碘):广州兴达动物药业有限公司生产,批号081102。

碘酊(2%):河南省华龙药业有限公司生产,批号081102。

苯扎溴铵(5%):南昌华鑫医药化工有限公司生产,批号090302。

其他:硫喷妥钠、氯胺酮、硫酸阿托品、止血敏、5%葡萄糖氯化钠注射液、生理盐水、10%氯化钾、复合维生素B、维生素C、75%酒精等。

## 1.2 方法

**1.2.1 术前准备** 实验犬手术前禁食24 h,只喂给充足的饮水,并防止受到惊吓等应激。麻醉前,皮下注射硫酸阿托品(0.05 mL/kg)以抑制腺体分泌和调节心脏机能,皮下或肌肉注射止血敏(2 mL/次)以减少出血。15 min后,肌肉注射静松灵0.2~0.4 mL/kg,待犬进入镇静状态后,选犬耻骨前缘腹中线为预定切口,在术部周围5~10 cm<sup>2</sup>范围剃毛并用肥皂水清洗干净,然后静脉滴注0.1%氯胺酮生理盐水溶液,使实验犬进入麻醉状态。

**1.2.2 实验设计** 试验组使用1.0%“可得福”对术部由内向外消毒3遍,对照组使用2%碘酊消毒2遍,再用75%酒精脱碘3遍。两组均待术部自然干燥后用无菌巾隔离,做好手术准备。两组犬均施行常规膀胱切开术,腹部切口约5 cm。从术后第2天开始,每天用0.5%“可得福”和2%碘酊分别对试验组和对照组手术创缘涂擦消毒1次。如手术伤口感染,视炎症程度酌情拆除部分缝线,试验组每天用0.5%“可得福”清洗伤口和涂擦创缘1次,对照组每天则用0.1%苯扎溴铵清洗伤口,另用2%碘酊涂擦创缘后再用酒精脱碘2遍。

**1.2.3 术后护理** 术后对实验犬腹腔注射5%葡萄糖生理盐水50 mL、林可霉素1 mL,以补充能量和水分、预防伤口感染。如术后伤口发生感染,伴随体温升高、精神沉郁和食欲减退,则用前述药物行腹腔注射,至体温下降后停用。

## 2 结果

**2.1 术后犬的体温变化** 手术后试验组和对照组犬体温均呈现不同程度的升高,最高可达39.8℃。伤口未感染组的体温多于术后第4~5天转为正常,而伤口感染组体温多于术后第7~8天转为正常。

**2.2 术后犬的伤口状态** 手术后,试验组和对照组实验犬的伤口均出现不同程度的炎性肿胀,每组各有2只犬伤口微微裂开,有炎性或脓性渗出液流出,两组伤口感染率均为40%,随即按照以上设计进行处理。试验组按上述处理4~6天后,伤口肿胀逐渐消退,渗出液减少,创面干净,肉芽生长,于术后第11~12天愈合。对照组按上述处理5~7天后,创面干净,肉芽生长,于术后第14~15天愈合。

试验组中伤口未感染的3只犬于术后第4天炎症减轻,术后第8天拆线,伤口取第一期愈合。对照组中伤口未感染的3只犬也于第4天炎症减轻,术后第9天拆线,伤口取第一期愈合。

## 3 讨论

实验结果显示,试验组(“可得福”组)和对照组(碘酊组)术后伤口均有炎症表现,符合手术创发生炎症的一般规律。但各组均有2只犬伤口发生轻度感染,分析引起感染的原因很多,包括本实验并未创造严格的无菌环境,模拟室外环境下进行,术中引起感染的几率较大。所以,从两组犬各为40%的感染率来看,似乎难以比较“可得福”与碘酊在预防手术切口感染方面的效果,但表明“可得福”与碘酊对手术切口感染的预防效果无明显区别。

对感染伤口进行的局部治疗实验结果显示,试验组用0.5%“可得福”清洗伤口和对照组用0.1%苯扎溴铵清洗伤口,均于治疗后发现伤口肿胀逐渐消退,渗出液减少,创面净化和肉芽生长良好,其中试验组于术后11~12天愈合,而对照组于术后14~15天愈合,试验组愈合时间比对照组愈合时间缩短3~4天,表明使用0.5%“可得福”清洗犬感染伤口效果较好,能有效控制感染和促进伤口愈合。

## 4 小结

分别使用1.0%“可得福”溶液和2%碘酊对犬的术部皮肤涂擦消毒,能够预防手术伤口感染,两者消毒作用无明显差异。分别使用0.5%“可得福”溶液和0.1%苯扎溴铵清洗犬手术感染伤口,前者可使伤口愈合时间比后者缩短3~4天,治疗效果较好。

# 疑似犬血虫净中毒 1 例

叶镜岳<sup>1</sup>, 梁淑慧<sup>2</sup>, 陈义洲<sup>3\*</sup>

(1. 惠州农业学校, 广东 惠州 516023; 2. 广州市动物卫生监督所, 广东 广州 510440;

3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0044-02

## 1 病例情况

金毛犬, 雄性, 2岁, 体重 28 kg, 正常免疫及驱虫, 日常饮食主要是鸡骨架、米饭及青菜。该犬于 2010年3月13日到某动物医院注射血虫净(主要成分为三氮脒)以预防血液原虫感染, 剂量为 5 mg/kg 体重。用药后第二天患犬出现精神沉郁, 食欲下降症状; 第三天患犬出现明显的神经症状, 主要表现为惊厥、角弓反张、站立不稳、呕吐、流涎及呻吟鸣叫。

## 2 临床症状

患犬于 2010年3月16日到华南农业大学兽医学院动物医院就诊, 就诊时已不能站立, 四肢僵硬, 出现间歇性角弓反张, 对主人的呼叫尚有反应, 呻吟鸣叫, 触摸时反应敏感, 频繁回视腹部, 瞳孔轻微放大, 流涎, 心率 100 次/min, 体温 38℃,

呼吸 24 次/min。触诊浅表淋巴结未见肿大, 腹部触诊未见明显异常, 可视粘膜稍苍白, 眼、鼻无分泌物。患犬体格适中, 定期注射疫苗及驱虫, 发病前无任何不良表现。

## 3 实验室检查

抽血进行血常规和血液生化检查, 连续两天的血常规检查结果均表现为白细胞总数升高, 其中单核细胞比例和中性粒细胞比例升高, 而淋巴细胞比例降低, 其它指标未见异常, 表明患犬体内存在炎症。生化检查除血糖稍高, 血钾降低外, 其它指标未见异常, 表明患犬肝肾功能未出现明显异常。血糖值升高可能是由于患犬出现抽搐, 角弓反张等神经症状导致的(见表 1、2)。

## 4 治疗

根据病史及症状初步诊断为血虫净使用不当

表 1 就诊第 1 天、第 2 天血常规检查结果

项目	就诊第一天	就诊第二天
红细胞 RBC( $10^{12}/L$ )	7.24	6.24
血红蛋白 HGB(g/dl)	17.5	14.6
红细胞比容 HCT(%)	48.57	41.33
平均红细胞体积 MCV(fl)	67	66
平均红细胞血红蛋白含量 MCH(pg)	24.1	23.4
平均红细胞血红蛋白浓度 MCHC(g/dl)	35.9	35.4
白细胞 WBC( $10^9/L$ )	22.2	22.95
淋巴细胞比例 LY(%)	1.0	3.9
单核细胞比例 MO(%)	4.6	5.8
中性粒细胞比例 GR(%)	94.4	90.3
血小板 PLT( $10^9/L$ )	263	223

表 2 就诊第一天、第二天血液生化检查结果

项目	就诊第一天	就诊第二天
白蛋白 ALB(g/dL)	4.1	3.5
碱性磷酸酶 ALP(U/L)	40	45
丙氨酸氨基转移酶 ALT(U/L)	48	42
淀粉酶 AMY(U/L)	750	549
总胆红素 TBIL(mg/dL)	0.3	0.4
尿素氮 BUN(mg/dL)	12	12
血清钙 $Ca^{2+}$ (mg/dL)	10.8	10.3
血清磷 PHOS(mg/dL)	6.6	4.6
肌酐 CRE(mg/dL)	0.8	0.7
血糖 GLU(mg/dL)	198	126
钠离子 $Na^+$ (mmo/L)	145	146
钾离子 $K^+$ (mmo/L)	3.5	3.3
总蛋白 TP(g/dL)	7.2	6.5
球蛋白 GLOB(g/dL)	3.1	3.0

收稿日期: 2010-06-02

\*: 通讯作者



导致中毒。由于血虫净中毒没有特效解毒药,因此在治疗中主要采用对症疗法。第一天静脉注射林格氏液 500 mL,5%葡萄糖盐水 500 mL 内加 ATP 20 mg,肌酐 100 mg,辅酶 A 100 U,维生素 C 0.5 g,每天一次;速尿 40 mg、速诺(阿莫西林克拉维酸)1.5 mL 肌肉注射,皮下注射静安舒(乙酰丙嗪+阿托品)2.8 mL,每天一次,同时给患犬进行吸氧。第二天发现患犬病情加重,神经症状加重,四肢冰凉。在第一天用药的基础上加大 ATP (60 mg),辅酶 A (200 U)的用量,同时皮下注射维生素 B<sub>1</sub> 50 mg、B<sub>6</sub> 50 mg、B<sub>12</sub> 0.1 mg,KCl 注射液 5 mL (0.5 g)补充钾离子。以上药物当天用一次,晚上患犬病情恶化死亡。

## 5 讨论

血虫净是一种广谱抗血液原虫药,主要用于治疗马、牛、羊、犬的巴贝斯虫、锥虫感染。除治疗作用外,还有一定预防家畜梨形虫病的作用。其作用机理主要是通过与血液原虫 DNA 核苷酸结合,抑制虫体 DNA 合成,使血液原虫不能繁殖而发挥强大杀虫作用<sup>[1]</sup>。犬的建议剂量为 2.5~3.5 mg/kg 体重,临用时配成 5%~7%水溶液,肌肉注射,第 1 次注射后 48 h 再注射 1 次,5 d 后再注射 1 次<sup>[2]</sup>。但由于血虫净安全范围较小且毒性较大,因此在使用时稍有不慎就容易出现严重的过敏、休克甚至死亡的情况<sup>[3,4]</sup>。用血虫净给犬进行治疗时无论是常规剂量,还是大剂量,甚至低剂量,都有可能出现犬中毒甚至死亡的情况<sup>[5]</sup>。神经症状为其主要的临床症状,主要表现为不能站立,抽搐,四肢僵直,不停作游泳状划动,角弓反张,嚎叫,眼球震颤,目光呆滞,有瞳孔反射,无视力,有痛感但反应迟钝,部分犬可出现流口水,尿失禁等症状。

有研究表明犬血虫净中毒时可导致全身的组织器官发生病变,但主要是损害肝、肾和脑。肝、肾主要发生脂肪变性和肾小球肾炎,但需至用药后第 4 天才能监测到犬生理指标变化,而用药后第 7 天才出现蛋白尿<sup>[6]</sup>。本病例中在注射血虫净后第 4、5 天已出现明显的神经症状,但进行血液生化

检查时,除血糖稍升高外,肝、肾功能指标均未见异常。这可能是因为犬在注射血虫净后最先受损伤的器官是脑部,而肝肾的损失一般在第四天以后才逐渐出现。研究表明,当连续两天按 3.5 mg/kg 体重给犬肌肉注射时,犬没有出现中毒症状,而连续注射达 6 天以上时,犬开始出现神经症状甚至死亡;当以 10.5 mg/kg 体重注射血虫净时,在 3~5 天内所有的实验犬均死亡。出现中毒症状的犬脑部的损伤部位在小脑,出现出血和脑组织软化等病变<sup>[7]</sup>。

本病例中患犬虽然仅注射了一次血虫净,但由于用药量较大(5 mg/kg 体重),超过了推荐的 2.5~3.5 mg/kg 体重用量,因此患犬出现了明显的中毒症状。虽然经过积极抢救,但仍无法挽救。因此,在日常的临床诊疗中,使用血虫净治疗时,为防止犬出现中毒反应,笔者建议应严格控制用药的剂量和用药时间,尽量按照推荐剂量用药,用药间隔时间至少 48 h 以上,连续用药不能超过 3 次。也可使用强力霉素等其他药物代替血虫净治疗犬血液原虫病,以减轻中毒反应。

## 参考文献:

- [1] 张健,汤小鹏.犬血虫净中毒病例[J].中国兽医杂志,2004,40(2):41-42.
- [2] 吴立君,张久丽,徐世文.犬三氮脒中毒的诊治[J].中国兽医杂志,2009,45(8):76-77.
- [3] Botha H. Berenil: Effect against Babesia canis and comparison with phenamidine[J]. J S Afr Vet Assoc, 1964, 35:23-24.
- [4] Naudé T W, Basson P A, Pienaar J G. Experimental diamidine poisoning due to commonly used babecides [J]. Onderstepoort J Vet Res, 1970, 37:173-184.
- [5] Naidoo V, Mulders M S G, Swana G E. The intravenous pharmacokinetics of diminazene in healthy dogs[J]. J S Afr Vet Assoc, 2009, 80(4):215-219.
- [6] 龚大春,杨玉莹,彭本英,等.血虫净致犬慢性中毒的病理学观察[J].中国兽医杂志,2007,7(43):59-60.
- [7] Naudé T W, Basson P A, Pienaar J G. Experimental diamidine poisoning due to commonly used babecides [J]. Onderstepoort J Vet Res, 1970, 37(3):173-84.

# 获取优质猪精液的技术要点

赵红梅

(广东睿诚达动物保健品有限公司, 广东 广州 510515)

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0046-03

优质的猪精液必须具备受精率高、无传染性微生物,保持时间长等优点。选择优良品种的公猪只是保证精液品质的第一步,而如何确保采集到的猪精液始终保持其优良品质亦是精液采集中的关键技术,其操作过程严格而复杂。本文将针对其中关键的技术要点加以总结。

## 1 良好的卫生条件

微生物污染严重降低精液的品质,导致精子细胞的可储存期缩短;而接触精液的相关人员和公猪本身是造成精液被微生物污染的重要污染源。

**1.1 采精区的卫生** 要获得品质优良的精液,在采精前、采精过程中和采精结束后都必须做好卫生清洁工作:(1)采精区必须彻底清洁,一般采精区要安装紫外线灭菌灯,最好不用刺激性的消毒液,以免影响公猪性反射。(2)采精前剃除公猪阴茎包皮的毛,并将公猪整个下腹部清洗干净并用干净毛巾擦干。(3)每天采精结束后,必须彻底清洁假母猪,并至少每周消毒一次。(4)采精用具如采精杯、手套等最好使用一次性用具;使用“双层手套”也是确保精液卫生的有效做法。(5)采集好的精液,应立即通过专设的窗口转送入检验室,采精人员不得进入检验室。

**1.2 精液检验室的卫生** 检验室的工作人员必须接受相关的卫生安全培训;检验室工作人员在进入检验室之前应在过渡区淋浴消毒,换上干净的实验服;采精区的人员不得进入检验室内;检验室内任何接触过精液的弃置物品或外来的物品必须及时清理;检验室应有每日清洁和每周消毒的完整备案记录。

## 2 精液检验(质量评定)

精液质量评定的目的是保证有足够数量有活力的精子用于人工授精。采集好的精液,应借助检

验仪器对精液样本进行常规质量评定,如哺乳动物精液的评估标准包括:肉眼观察精液的外观、气味和容量;借助显微镜观察精子密度、精子活力和精子形态;理化性质包括pH值的测定。

**2.1 精液容量** 公猪的精液排量通常在100 mL到500 mL之间,根据年龄、品种、季节和采精次数而变化。成年公猪每周采精次数应不超过两次,不到12月龄的年轻公猪两周内采精次数不应超过三次。

**2.2 精液外观** 公猪射精过程包括前分泌和精液射出阶段,各阶段精液的外观各有不同:(1)前分泌:公猪射精过程中最先射出的物质是尿道和辅助腺分泌物,起到清洁尿道的作用,这种分泌物颜色透明,不含精子细胞。(2)多精阶段:呈乳白色,这个阶段排出的精液中精子含量占总精液中精子含量的70%。(3)少精阶段:介于透明和乳白色之间,含有极少的精子,该阶段和多精阶段交替出现。(4)胶状物阶段:通常在精液射出过程的最后阶段出现。根据公猪的射精特点,公猪开始射精后,不要立即收集,待公猪射出部分清亮的液体后,再开始收集含精多的部分。在射精间隙或只射出清亮液体时,放下集精杯,拿纸巾将其吸附,避免流入集精杯中。

**2.3 精子密度** 精液中的精子密度可以使用光度计进行检测,现在常见的光度计的操作已经非常简单,而且准确度极高。有些光度计甚至可以不用事先将精液样品稀释,只需几秒钟的时间就能检测出精子密度,并通过显示屏直观地显示出来。

**2.4 精子活力** 精液中活动的精子细胞比例直接影响受精率。精子活力评估方法可以通过显微镜观察法,这种方法受技能和经验的制约对结果的准确性有一定的影响。目前更准确的方法是采用

电脑辅助精子分析法,即 CASA 法(Computer Assisted Semen Analysis),这种方法使用相差显微镜分析仪结合电脑软件分析精子的活力参数(图 1)。CASA 系统适用于对精子浓度、精子活力和精子形态的检测评估。CASA 系统的运用不仅使得检测结果更客观,而且节约时间。

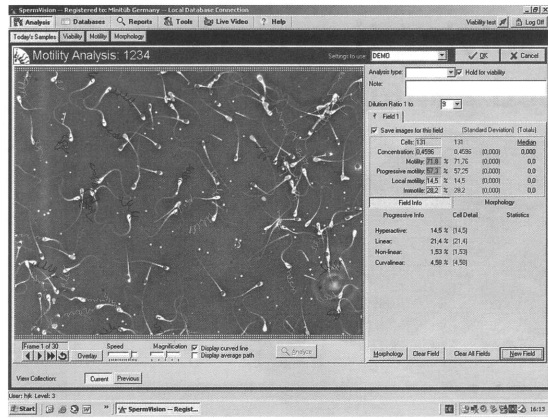


图 1 用 CASA 软件评估精子浓度、活动性和精子形态的电脑图像

**2.5 精子形态** 有活动性的精子如果出现形态学偏差也会严重影响受精率。精子细胞的形态缺陷可能出现在精子顶体部分(图 2),精子头部或精子中部;卷尾(图 3)和细胞质微滴(图 4)也是常见的变异情况。

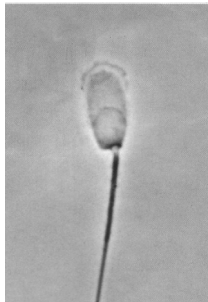


图 2 顶体缺陷

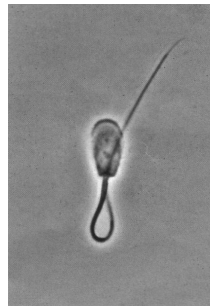


图 3 卷尾

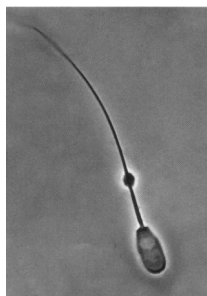


图 4 细胞质微滴

**2.6 合格猪精液的标准** 以德国猪业保护协会(ZDS)有关合格的猪精液标准为例,具体见表 1。

表 1 合格猪精液的最低标准(ZDS,2006)

特 征	最低要求
颜色	灰白、白色、略黄
浓稠度	奶状
混合物(尿、血、脓)	无
污染物(粪便、毛发)	无
气味	无异味
不含尿道球腺分泌物的容量	100 mL
精子密度(10 <sup>9</sup> )	≤9 月龄:0.150; >9 月龄:0.200
精液中总的精子数(10 <sup>9</sup> )	≤9 月龄:15.0; >9 月龄:20.0
活动精子数(%)	70
储存三天后活动精子数(%)	65
形态异常的精子总数(%)	≤25
头部形态异常的精子数(%)	≤5
顶体缺陷的精子数(%)	≤10
细胞质微滴的精子数(%)	≤15
卷尾精子数(%)	≤15
其他形态异常精子数(%)	≤15
微生物含量	无对人和动物致病的微生物

**3 精液处理**

**3.1 适当温度** 温度的变化可能降低精液的品质,影响保存寿命,降低受精率。公猪的精液对低温刺激十分敏感,±1℃的温差就可能严重影响精液的质量,因此,在稀释精液前,稀释液的温度必须调到与精液的温度相同。

在进行精液浓度和活力等检测并计算人工授精剂量期间,待处理的精液和稀释液应保存于同等温度条件下,最佳温度为 32~38℃。可将精液和稀释液分别装于两个杯中,放置于保温板上(如图 5)。



图 5 将精液和稀释液置于保温板上



**3.2 精液稀释** 要保持精液的品质和授精成功率,选择好的保存介质也是不可忽视的关键。长效稀释液可以防止应激和毒素对精子细胞的不良影响,能保护精子的细胞膜、顶体和细胞质。新型的稀释液能保持整个储存期间精子细胞的特征完整性,哪怕是在不稳定或不理想的储存条件下。然而,如果精液处理过程中出现错误和疏忽,就算是用最好的保存介质,也不能弥补由此对精液质量造成的损害。配置稀释液时使用的水必须经蒸馏纯化、消电离、反渗透等适当处理,甚至再次灭菌处理。精液一经检验完毕,必须在 10 分钟内用稀释液稀释,否则精液的活力将迅速下降。稀释的方法是将一定量的稀释液沿杯壁缓慢倒入精液杯中,轻轻摇匀。如果稀释倍数大,先进行低倍稀释,防止精子所处的环境突然改变,造成稀释打击。一头份人工授精剂量的精液中含有精子细胞数根据精液质量和操作人员的经验而不同,通常应含  $1.5 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$  的精子细胞,因此每份精液的稀释倍数也不同。在现代化的精液实验室,通过

CASA 软件系统即可自动计算出精液的稀释倍数。

**3.3 再检验** 在精液处理过程中,过快的稀释、转换容器以及用机械抽吸会对精子细胞造成应激作用。稀释完成后,应再次检验精子的活动力,如果活动精子数低于 70%,应将精液弃用。

#### 4 精液储存

保证精液品质的最后阶段是良好的储存条件。稀释后精液储存的最佳温度是 17~18℃,但是由于农场条件的限制,精液常被保存于过高或是过低的温度下,或是保存过长的时间。为保证精液储存质量,以下方面的问题必须注意:(1)确保精液始终储存于 17~18℃ 温度下直至使用;(2)避光保存,避免暴露于光照下;(3)保存期间不可将精液回温;(4)不可摇晃储精瓶,即使在准备授精前也不可摇晃;(5)进行人工授精前方可打开储精瓶;(6)使用前,只取出所需数量的储精瓶。

只有连储存这一步的工作也严谨完成,才能真正保证精液的品质优良,使用这样的精液进行人工授精,为保障养殖获利奠定坚实基础。

主管：中华人民共和国农业部 主办：中国农业科学院农业信息研究所

## 透视猪业经济 直面生产一线

特别关注  
猪业经济 专家论坛  
环境保护  
猪场建设 品种资源  
猪病防控

中国猪业  
2010  
7  
ISSN 1673-2656  
CN 11-4420/S

邮发代号：80-493  
(月刊)

饲养饲料  
肉品加工  
质量安全 海外猪业  
行业动态  
数据信息

### 前瞻性 权威性 实用性 时效性

定价：每期 8.00 元（全年：96.00 元）地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号 邮编：100081 电话：(010) 82106273 / 74 / 75 传真：82106273 E-mail: zhuye@caas.net.cn

订阅方式：本刊面向国内外公开发行人，全国各地邮政局（所）均可订阅或直接汇款至编辑部随时订阅

银行转账：户名：中国农业科学院农业信息研究所 开户行：中国农业银行北京北下关支行 账号：050601040009874



## 利用杂交牛进行胚胎移植及其效益分析

罗蒙和<sup>1</sup>, 李铭<sup>1\*</sup>, 李炳昌<sup>2</sup>, 何仁春<sup>1</sup>, 王启芝<sup>1</sup>, 莫柳忠<sup>1</sup>

(1. 广西畜牧研究所 广西 南宁 530001 2. 广西贺州渔牧兽医局, 广西 贺州 542800)

**摘要:** 2004年12月到2005年3月, 在广西贺州西牛牧业公司牛场选择10头次西门塔尔牛做超数排卵处理, 超排成功率90% (9/10), 共获得胚胎(包括未受精卵)102枚, 可用胚胎64枚; 可用胚胎平均7.1枚/头。利用从山东购进的杂交牛240头作受体进行西门塔尔牛和荷斯坦牛的胚胎移植, 结果西门塔尔牛鲜胚移植受胎率平均55%, 冻胚移植受胎率平均45.8%; 荷斯坦牛冷冻胚胎移植受胎率为41.5%。目前已经产犊134头, 其中母犊68头, 公犊66头。对其经济效益进行分析, 效益较佳。

**关键词:** 杂交牛; 超数排卵; 胚胎移植; 效益分析

中图分类号: S823.3+2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0049-02

## Embryo transfer from crossbred cattle and its benefits analysis

Luo Menghuo<sup>1</sup>, Li Ming<sup>1\*</sup>, Li Bingchang<sup>2</sup>, He Renchun<sup>1</sup>, Wang Qizhi<sup>1</sup>, Mo Liuzhong<sup>1</sup>

(1. Guangxi Institute of Animal Science, Nanning, 530001, China; 2. Guangxi Hezhou Bureau of Animal Husbandry, Veterinary and Fishery, Hezhou, 542800, China)

**Abstract:** A treatment of superovulation from 10 Simmental cows has been conducted in Xiniu animal husbandry company in Hezhou city of Guangxi province from December 2004 to March 2005. 102 embryos including the unfertilized ova were acquired, which showed that the success rate of superovulation was 90%. The number of available embryos was 64, which showed that averagely 7.1 embryos were available per cow. 240 crossbred cattle bought from Shandong province were used as the recipient cattle for embryo transfer with the embryos from Simmental and Holstein-Friesian cows. The results showed that the conception rate was 55.0% with Simmental fresh embryos and 45.8% with Simmental frozen embryos. However, the conception rate with Holstein-Friesian frozen embryos was only 41.5%. 134 calves have been born up to now, including 68 female and 66 male. The economic effect was significant.

**Key words:** Crossbred cattle; superovulation; embryo transfer; benefit evaluation

近年来, 随着牛胚胎移植技术的不断发展, 胚胎移植技术在纯种牛的扩繁中起到越来越重要的作用。本研究的主要目的是培育纯种西门塔尔牛和荷斯坦奶牛, 利用纯种母牛生产牛奶, 西门塔尔公牛作为种公牛投放市场出售。

### 1 材料

**1.1 供体牛的选择** 2004年12月至2005年3月, 在广西贺州西牛牧业公司选择10头青年西门塔尔母牛。供体牛外貌具有本品种的特性(特性: 毛色为黄白花或淡红白花, 头、胸、腹下、四肢及尾

帚多为白色, 皮肢为粉红色, 头较长, 面宽; 角较细而向外上方弯曲, 尖端稍向上; 颈长中等; 体躯长, 呈圆筒状, 肌肉丰满; 前躯较后躯发育好, 胸深, 尻宽平, 四肢结实, 大腿肌肉发达; 乳房发育好), 空怀, 生殖系统正常, 无繁殖疾病, 有2次正常发情表现, 膘情在中上等。

**1.2 受体牛的选择** 选择从山东购进的240头杂交黄牛经过半年(即2004年6月从山东购进饲养至12月)的饲养和管理, 其中有201头的杂交牛均符合受体牛选择标准, 进行胚胎移植。

收稿日期: 2010-06-08

基金项目: 广西水产畜牧兽医局良种化补贴技术推广项目; 广西牛胚胎移植技术推广项目

\*: 通讯作者

**1.3 药品及器械** 孕酮栓 (CIDR): 由新西兰 Inter Grease 公司提供; 促卵泡素 (FSH): 由加拿大 Vetrephaim Canada Inc 生产, 规格 400 mg/瓶 (内容物含有大量佐剂); 氯前列醇钠 (PGc): 由中国农业科学院畜牧研究所研制生产, 规格 0.33 mg/支; 促排卵素 (LHRH-A<sub>3</sub>): 由宁波市激素制品有限公司生产, 规格 25 μg/支; 采卵液 (PBS) 由本所实验室配制<sup>[1]</sup>; 保存液 (PBSS) 和冷冻液由美国 AB 公司进口; 5% 的盐酸利多卡因由无锡市第七制药有限公司生产; 胚胎采集器械、胚胎移植器械由日本富士平株式会社提供; 胚胎冷冻仪由澳大利亚进口。

## 2 方法

**2.1 超排方法** 超排方法: 注射 CIDR+FSH+PGc+LHRH-A<sub>3</sub><sup>[2]</sup>。在供体牛超排处理发情后 8~12 h, 在人工输精的同时臀部肌肉深处注射 LHRH-A<sub>3</sub> 75 μg, 总量控制在 150 μg 以内。

**2.2 超排程序** 超排程序见表 1。按照递减方式注射 FSH<sup>[3]</sup>, 进口 FSH 用量在 400~448 mg 之间。

表 1 供体牛超排处理程序

时间	处理
第 0 天	阴道内放置 CIDR
第 9 天 9:00am	注射 FSH
第 10 天 9:00am	注射 FSH
第 11 天 9:00am	注射 FSH 和 PGc 2 支 (0.66 mg)
第 12 天 9:00am	注射 FSH 取出 CIDR
第 13 天	观察供体牛发情, 发情后 8 h 第一次输精, 间隔 8~12 h 第二次输精。
第 14 天	于第 13 天晚上 8:00 观察到发情的上午 10 点前再输精一次
第 20 天	采卵 (冲胚)

**2.3 人工授精** 选择谱系明确的优良种公牛的精液, 在输精之前要对本批次的冻精做显微镜检查, 质量达到《牛冷冻精液》GB4143-84 国家标准。输精器保持无菌, 于第 12 天的上午 10:00 及晚上的 8:00 两次输精, 每次使用 0.25 mL 的冻精 2 枚, 行子宫体一点式输精。

## 2.4 胚胎冷冻和解冻

**2.4.1 胚胎采集和使用情况** 2004 年 12 月至 2005 年 3 月, 3 次对 10 头西门塔尔供体牛冲胚, 采集到 64 枚可用胚胎, 其中 38 枚用于鲜胚移植, 26 枚胚胎用于冷冻保存, 用于后续的冷冻胚胎移植。

**2.4.2 胚胎冷冻** 把装有胚胎的细管放入胚胎程序冷冻仪器内, 选定第二程序进行冷冻, 冷冻完毕之后直接投入液氮中保存。

**2.4.3 胚胎解冻** 冷冻胚胎用“一步法”进行解冻, 即: 胚胎细管从液氮罐中取出→18~25℃空气浴 15~20s→32~34℃水浴 15s→拔去细管塞→在显微镜下推出胚胎→胚胎移入保存液洗涤 8~10 次→鉴定胚胎质量<sup>[4]</sup>→成活的胚胎用“三段法”装入细管进行移植。

**2.5 受体牛胚胎移植** 移植前, 先检查受体牛的黄体生长情况, 具有功能性黄体的牛才用于胚胎移植。根据受体牛的发情准确日期和胚龄情况进行同期化再分配: 即把桑椹胚移植给发情在 6.5~7 天的受体牛, 把囊胚移植给发情 7.5~8 天的受体牛<sup>[5]</sup>。

## 3 结果与分析

**3.1 供体牛超数排卵及胚胎采集效果** 见表 2。受体牛胚胎移植情况及效果分别见表 3、表 4 和表 5。

表 2 供体牛超数排卵及胚胎采集情况

采卵日期	供体牛 (头)	采卵数 (枚)	可用胚数 (枚)	可用胚率 (%)	FSH 量 (mg)
2004. 12. 17 (A 组)	2	32	20	62.5	380-400
2005. 2. 15 (B 组)	4	42	26	61.9	380-400
2005. 3. 5 (C 组)	3	28	18	64.3	420-440
合计	9	102	64		
平均		11.3 枚/次	7.1 枚/次	62.7	

表 3 西门塔尔鲜胚移植情况

时间	移植数 (枚)	妊娠数 (枚)	妊娠率 (%)	产仔数 (头)	成活仔数 (头)	成活率 (%)
2004. 12. 17	12	7	58.3	7	6	85.7
2005. 2. 15	10	4	40.0	4	4	100
2005. 3. 5	16	10	62.5	10	10	100
合计	38	21	55.3	21	20	95.2

表 4 西门塔尔冷冻胚胎移植情况

时间	移植数 (枚)	妊娠数 (枚)	妊娠率 (%)	产仔数 (头)	成活仔数 (头)	成活率 (%)
2005. 5. 11	7	3	42.8	3	3	100
2005. 5. 31	6	2	33.3	2	2	100
2005. 10. 14	11	6	54.5	6	6	100
合计	24	11	45.8	11	11	100

注: 26 枚冷冻胚胎解冻后有 24 枚可用于移植, 胚胎可用率为 92.3%。

表5 荷斯坦冷冻胚胎移植情况

时间	移植数 (枚)	妊娠数 (枚)	妊娠率 (%)	产仔数 (头)	成活仔 数(头)	成活率 (%)
2005.1-12	169	68	40.3	65	60	92.3
2006.2-10	58	25	43.1	23	22	95.7
2007.1-4	52	22	42.3	22	22	100
合计	277	115	41.5	110	104	94.5

注:解冻 285 枚冷冻胚胎,有 277 枚可用于移植,胚胎可用率为 97.2%。

**3.2 超数排卵效果分析** 对 10 头次的西门塔尔供体牛进行超排,9 头次对超排有反应,超排成功率达 90%,表明该超排方法和程序是成功的。平均采卵数达 11.3 枚/次(102/9),平均可用胚胎数达 7.1 枚/次(64/9)(见表 2),说明使用进口的 FSH 能获得较好的超排效果。

表 2 中,C 组是 B 组的重复超排(去掉一头超排效果较差的供体牛)。随 FSH 使用量的增加,超排效果没有降低,反而有所增强。以往研究表明,对同一头牛连续多次使用 FSH,易使供体牛体内产生抗体,注射的 FSH 与体内的抗体结合,从而导致作用减弱<sup>[6]</sup>。但本次研究使用的 FSH 量增加 10% 左右,获得较好的效果。

表 3 与表 4、表 5 相比较,鲜胚移植比冻胚移植受胎率高出 10 个百分点以上,这与吴柱月等<sup>[7]</sup>报道相同。从表 3、表 4、表 5 中可知,犊牛成活率随产仔数增加而减低,作者认为,这与受体牛和生产犊牛的饲养管理密切相关。因为产出的犊牛直接由受体牛哺乳,没有专门的产房,犊牛跟随受体牛一起饲养和运动,饲养管理粗放,导致犊牛成活率降低。

**3.3 效益分析** 广西贺州西牛牧业公司在 2004 年 5 月初从山东引进 240 头杂交黄牛做受体移植纯种牛胚胎,杂交黄牛平均价格 2500 元/头,总成本为 240 头×2500 元/头=60 万元;西门塔尔胚胎生产费 700 元/枚,使用西门塔尔胚胎费为 64 枚×700 元/枚=4.48 万元;荷斯坦冷冻胚胎购买费 1100 元/枚,使用胚胎费为 285 枚×1100 元/枚=31.35 万元;

每移植一头受体牛的耗材为 200 元/头,使用耗材费为 200 元/头×339 头=6.78 万元。根

据计算,每一头杂交牛做受体时的饲养管理费用为 4 元/头天×365 天×201 头=29.346 万元。移植总成本是 131.956 万元。

目前,广西地区奶牛母犊断奶价为 6 000 元/头,胚胎移植生产 68 头母犊,收入为 68 头×6000 元/头=40.8 万元;公犊落地价为 400 元/头,胚胎移植生产 66 头公犊,收入为 66 头×400 元/头=2.64 万元;另外,每生产一头胚胎犊牛,畜牧局从畜禽良种化项目中补贴 1 500 元,收入为 1500 元/头×134 头=20.1 万元;杂交牛做受体生产胚胎犊牛,待犊牛断奶后出售,平均价为 4 200 元/头,收入为 4200 元/头×240 头=108.0 万元。综合总收入为 171.54 万元。

可见,通过胚胎移植妊娠生产纯种牛,可以获得较好的经济效益。本项目获得纯收入 171.54 万元-131.956 万元=39.584 万元。

## 4 结论

**4.1** 本次移植杂交受体牛 339 头次,移植妊娠 147 头,妊娠率 43.4%,达到较好的实际应用水平。

**4.2** 利用鲜胚移植可以显著提高移植受胎率。同时,鲜胚移植与胚胎冷冻保存,可以提高移植受胎率和提高胚胎利用率。

**4.3** 受试验条件所限,本试验表明犊牛的成活率随产仔数增加而降低。

## 参考文献:

- [1] 李铭,吴柱月,蒋小刚,等.供体牛重复超数排卵效果试验初报[J].广西畜牧兽医,2006,(6):147-150.
- [2] 张成,叶峰,杨军,等.荷斯坦牛连续超排试验[J].黄牛杂志 2005,(5):4-5.
- [3] 郭志勤,张继慈,张沅,等.家畜胚胎工程[M].第 1 版.北京:中国科学技术出版社,1998.74-75.
- [4] 杨廷忠,刘得元,仲青花,等.牛胚胎移植试验报告[J].黄牛杂志,2004,(5):10-11.
- [5] 包利峰,李剑军.胚胎移植受体牛同期发情处理效果分析[J].黄牛杂志,2001,27(2):27-29.
- [6] 王洪宝,吴胜权,韩永生,等.重复超排效果的研究[J].中国畜牧杂志,2003,39(5):39-40.
- [7] 吴柱月,李铭,莫柳忠,等.广西西门塔尔青年母牛和荷斯坦母牛超数排卵及胚胎移植初报[J].广西畜牧兽医,2003,(4):147-150.

# 生猪价格看涨至年底

## ——当前全国生猪生产形势分析

虞 华, 陈光亚, 程 鑫

(国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005)

中图分类号: S8-1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)05-0052-01

生猪价格从今年年初就开始下跌,4月中旬国家启动第一批猪肉储备后,生猪价格出现了小幅反弹,维持两周后又继续下跌。随着冻猪肉收储力度加大,6月份第2周开始生猪价格止跌回升。虽然生猪价格有所回升,却仍比价格下跌前的12.26元/公斤低了15.5%。由于生猪价格持续低位运行,而饲料玉米价格连续16个月呈涨势,上半年全国生猪养殖出现严重亏损。猪粮比价从2月初开始连续23周低于6:1的盈亏平衡点,7月份第1周为5.39:1。生猪养殖户亏损面从3月份开始明显扩大,6月份为58.2%,比5月份扩大1.2个百分点,比元月份扩大了52.4个百分点。

7月29日,国家发展改革委发布消息:“生猪饲养重回盈亏平衡点之上”。按6:1的盈亏平衡点计算,生猪价格回升到12.6元/公斤才能保本。这个消息令人松了一口气。上半年全国生猪生产呈现出鲜明的特点:价格下降早且长时间低位运行,生猪出栏显著增加,养殖效益严重下滑。由于各方积极努力,生猪产能在低谷期积极调整,从6月中旬开始止跌回升,存栏趋稳。2010年9月15日,全国外三元杂生猪平均价格12.91元/公斤,猪肉(白条肉)平均价格为19.3元/公斤。

据分析,这段时间猪肉价格仍属于恢复性上涨,其主要原因,一是今年春天,受疫情影响,生猪价格和猪肉价格一直比较低迷,曾下跌到9.00元/公斤和14.00元/公斤,很多养殖户由于无利润甚至亏损,开始淘汰、宰杀母猪,一些散户甚至空圈不养,导致生猪存栏减少,造成后续猪源短缺,推动生猪及猪肉价格上涨;二是养殖成本上升,玉米价格自1月份的每公斤1.70元上涨到6

月份的1.90元,上涨幅度达到11.8%,与去年同期的1.56元相比上涨25%。玉米价格的上涨造成生猪养殖成本增加,势必带动生猪及猪肉价格上涨;此外,进入6月,南方许多省份发生的水灾使大量生猪、母猪、仔猪被淹死,加之水灾后的高温天气引发的猪疾病,造成生猪供应紧张,在一定程度上引发价格上涨。

上半年,全国生猪出栏3.27亿头,同比增加了4%;6月末全国生猪存栏43670万头,同比下降2.4%,比去年底下降6.9%;能繁母猪存栏4680万头,同比下降3.1%,比去年底下降4.7%。

因为和百姓生活息息相关,猪肉价格一直是人们关注的热点。按照以往的规律,夏季属于猪肉消费淡季,价格会略降。但是今夏猪肉市场自6月份以来却出现了一轮较为明显的上涨行情。蛰伏了半年多时间后再拾涨势,这是否意味着猪肉价格开始全面反弹?七八月份是猪肉消费淡季,但并没有影响猪肉价格的上涨。近期全国不少地方出现洪涝灾情,一部分生猪肉源被运往受灾地区,导致非灾区市场的供应量相对减少。这些都对肉价坚挺发挥作用。

对于未来猪肉价格走势,业内人士认为,随着秋季猪肉消费旺季逐渐到来,猪肉价格还将有一定幅度的上涨,但涨幅不会过大。生猪存栏量大幅下滑,能繁母猪数量持续下降,是看涨猪肉价格到年底的主要依据。因为即使猪农在8月份开始大规模补栏,3~4个月养殖周期,今年11~12月才有可能产生新的供应,因此在2010年12月份之前,国内猪价将维持在高位强势震荡。