

网络出版时间:2015-12-02 14:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.01.005

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151202.1425.010.html

PRRSV 经典株和变异株 RT-nPCR 鉴别诊断方法的建立

朱小甫, 吴旭锦

(咸阳职业技术学院 畜牧兽医研究所 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] **【目的】**建立一种能够区分猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)经典株和变异株的 RT-nPCR 诊断方法,能够从病料组织、血清或精液中直接进行目的基因检测,达到快速诊断的目的。**【方法】**根据 GenBank 上发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒基因序列,设计并合成了 2 对引物,通过改变不同的反应体系和反应条件,建立 PRRSV 经典株和变异株的 RT-nPCR 诊断方法,并通过灵敏性试验、特异性试验、病料组织和血清或精液样品检测,验证建立 RT-nPCR 方法的适用性。**【结果】**建立了 PRRSV 经典株和变异株的 RT-nPCR 诊断方法,该方法检测的 cDNA 含量极限为 1.3×10^{-7} pg/ μ L;且仅能从 PRRSV 毒株中扩增到目的条带,从 CH-1R 经典株扩增出 649 bp 条带,从 SXXY/2013 变异株扩增出 562 bp 条带,电泳后能清晰区别,而从其他参考毒株中均不能扩增出目的条带。从 48 份疑似病料组织和血清中能直接检测出 31 份阳性结果。**【结论】**建立了一种灵敏度高、特异性好、可直接从病料组织和血清中快速鉴别 PRRSV 经典株和变异株的 RT-nPCR 方法。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征;经典株;变异株;诊断方法

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)01-0025-06

Establishment of a RT-nPCR diagnostic method for PRRSV classical and variant strains

ZHU Xiao-fu, WU Xu-jin

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **【Objective】** This study established a RT-nPCR diagnostic method to distinguish classical and variants strains of porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) quickly from tissue and serum. **【Method】** Based on PRRSV gene sequences in GenBank, two pairs of primers were designed and synthesized and a RT-nPCR diagnostic method was established to distinguish classical and variants strains of PRRSV through sensitive test, specificity test, and detection of tissue and serum samples. **【Result】** The established method had the detection limit of 1.3×10^{-7} pg/ μ L and it only amplified target band from PRRSV. A total of 649 bp bands were amplified from classic strain CH-1R and 562 bp bands were amplified from variant strain SXXY/2013. These bands were clearly distinguished after electrophoresis, while no bands were amplified from other reference strains. 31 out of the 48 suspected tissues and serum were detected positive. **【Conclusion】** A highly sensitive and specific RT-nPCR method was established and it can directly differentiate PRRSV classic strains and variant strains from diseased tissues and serum.

[收稿日期] 2014-04-25

[基金项目] 咸阳市科学技术研究发展计划项目(2014K02-21);咸阳职业技术学院重点科研项目(2013KYA01)

[作者简介] 朱小甫(1977-),男,陕西眉县人,执业兽医师,硕士,主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究。

E-mail:zhuxiaofu2004@aliyun.com

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; classical strains; variant strain; diagnostic methods

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)又称蓝耳病,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种猪群重大疫病^[1-2]。1987年,本病首次在美国北卡罗来纳州爆发,随后迅速扩散到世界各地^[3]。1996年,我国郭宝清首次从北京地区发病的猪群中分离出 PRRSV,从而证实了本病在我国的存在^[4]。2006年,首先在我国南方爆发的“猪无名高热”疫情中,农业部最终调查结果表明,猪繁殖与呼吸障碍综合征变异株是该疫病的元凶^[5]。2008年,我国农业部规定高致病性猪蓝耳病为一类动物疫病,经典蓝耳病为二类动物疫病,本病成为严重威胁养猪业的重大疫病之一。

PRRSV 属于尼多病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属的成员,根据病毒的抗原性质、基因组及致病性的差异,PRRSV 分为欧洲型(LV 株为代表株)和美洲型(ATCC-VR2332 株为代表株)。PRRSV 基因组为不分节段的单链正股 RNA,大小约为 15 kb^[6]。目前诊断蓝耳病的技术手段主要有病毒分离鉴定、病毒中和试验、荧光抗体技术、酶联免疫吸附试验和 RT-PCR 技术^[7]。大多数诊断方法耗时较长,不能满足临床快速诊断的需要,RT-PCR 技术是目前诊断方法中最为灵敏和快速的技术,但目前建立的大多数方法不能直接区分经典毒株和变异株。由于我国猪群经典蓝耳毒株和变异株共存,急需开发快速、准确的鉴别诊断技术。序列比较分析表明,与经典毒株相比,变异株在 NSP2 基因上连续缺失 87 个核苷酸^[8]。针对这一特点,本研究旨在建立一种能够直观区分经典蓝耳毒株和变异株的 RT-nPCR 诊断方法,以期提供一种快速、准确的诊断手段,为临床防控猪蓝耳病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 蓝耳病毒变异株是由本实验室从旬邑县某猪场采集病料,用 Marc-145 细胞传代分离获得,测定了 NSP2 基因序列,命名为 SXXY/2013 株。参考毒株中,蓝耳经典毒株 CH-1R、猪瘟病毒疫苗 C 株、伪狂犬 Bartha-K 毒株疫苗,均为普莱柯生物工程股份有限公司生产;圆环病毒 2 型(PCV-

2)、细小病毒(PPV)、流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV),均为本实验室分离保存。

1.1.2 病料 本实验室采集或猪场送检病料组织(肺脏、淋巴结、脾脏、肝脏和肾脏)、血清或精液,分别来自咸阳、渭南、西安和宝鸡等地区不同规模猪场,共计 48 份,组织病料研磨处理后,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液-70℃保存备用。

1.1.3 试剂 TRIzol Reagent、DNAzol Reagent 为 Invitrogen 公司生产;AMV 反转录酶(10 U/ μ L)、RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)、DEPC 处理水、rTaq 酶(5 U/ μ L)、dNTP(各成分均为 10 mmol/L)等,均购自生工生物工程(上海)有限公司。DL 2000 Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 根据 GenBank 上公开的 PRRSV CH-1a 株(登录号:AY032626)、HUN4 株(登录号:EF635006)、JXA1 株(登录号:EF112445)和 VR2332 株(登录号:AY150564)等全基因组序列,设计并合成了 2 对引物,NSP2-1F:5'-CGATCTGGTACCCGTCAA-3'(2 272~2 289,为相对于 CH-1a 株基因组位置,下同),NSP2-1R:5'-CAATG GTCATGGCACC-3'(3 564~3 681),NSP2-2F:5'-GAATGTCGCAGCTCACT-3'(2 726~2 744),NSP2-2R:5'-GCGTCGCATGGTACCTA-3'(3 357~3 374)。预期扩增片段长度经典毒株为 649 bp,变异株为 562 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,均用 DEPC 处理水稀释到 20 μ mol/L。

1.2 方法

1.2.1 PRRSV RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成 取 SXXY/2013 株细胞培养液 250 μ L,按照 TRIzol Reagent 试剂说明提取总 RNA,倒置离心管自然干燥。在核酸干燥过程中,按照以下体系配制反转录反应液:DEPC 处理水 10.5 μ L,上游引物 NSP2-1R 1.0 μ L,dNTP 4.0 μ L,5 $\times$ AMV Buffer 4.0 μ L,AMV 0.25 μ L,RNA 酶抑制剂 0.25 μ L,总体积 20.0 μ L。核酸干燥后用配制好的反转录反应液充分溶解核酸,置 42℃水浴反转录 90 min,取出后在微量紫外分光光度计上测定 cDNA 的含量。

1.2.2 PRRSV RT-nPCR 检测方法的建立 取已知浓度的 cDNA 溶液为模板,摸索扩增条件。第 1 次扩增反应体系中 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,

cDNA 2.0 μL , dNTP 1.0 μL , 引物 NSP2-1F 和 NSP2-1R 各 0.5 μL , 改变 *rTaq* DNA 聚合酶用量 (0.25~1.0 μL) 和 Mg^{2+} 用量 (0.5~3.0 μL), 用超纯水补足总体积 25.0 μL 。反应条件设定为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 退火温度由 52~58 $^{\circ}\text{C}$ 按 1 $^{\circ}\text{C}$ 递增设定退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 2 次扩增时, 取 2.0 μL 第 1 次扩增产物作为模板, 其他成分同第 1 次扩增进行设定摸索, 只是引物更换为 NSP2-2F、NSP2-2R。反应条件设定为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 退火温度由 52~58 $^{\circ}\text{C}$ 按 1 $^{\circ}\text{C}$ 递增设定退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.3 PRRSV RT-nPCR 方法灵敏性试验 将 cDNA 溶液做 10 倍梯度稀释至 10^{-10} 倍, 分别以各稀释后 cDNA 溶液作为模板进行 PCR 扩增。按照摸索出的最优反应体系与条件进行 RT-nPCR 反应, 取 5.0 μL 第 2 次扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统中照相。

1.2.4 PRRSV RT-nPCR 方法特异性试验 提取 PRRSV SXXY/2013 株、PRRSV CH-1R 株及 CS-FV C 株、流行性腹泻病毒 (PEDV)、传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 等 RNA 病毒的核酸并反转录获得 cDNA; 按照 DNAzol Reagent 试剂说明提取伪狂犬 Bartha-K 株、圆环病毒 2 型 (PCV-2)、细小病毒 (PPV) 等 DNA 病毒 DNA, 用 NSP2-1F/NSP2-1R、NSP2-2F/NSP2-2R 引物对分别进行第 1 次和第 2 次扩增, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 成像系

统中观察照相。
1.2.5 病料中 PRRSV 的检测 用以上建立的检测方法对收集的 48 份组织病料进行检测, 验证建立的 RT-nPCR 方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 PRRSV RT-nPCR 检测方法的建立

通过改变反应体系中 *rTaq* DNA 聚合酶用量和 Mg^{2+} 用量, 以及反应条件中的退火温度, 优化反应体系和反应条件, 最终确定的最优反应体系和反应条件为: 第 1 次扩增 cDNA 2.0 μL , 超纯水 16.0 μL , 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 2.0 μL , dNTP 1.0 μL , 引物 NSP2-1F 和 NSP2-1R 各 0.5 μL , *rTaq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 总体积 25.0 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。第 2 次扩增反应体系: 取 2.0 μL 第 1 次扩增产物作为模板, 体系其余组分同第 1 次扩增, 引物为 NSP2-2F/NSP2-2R。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2.2 PRRSV RT-nPCR 检测方法的灵敏性

经测定, 反转录第一链 cDNA 含量为 130 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 将其 10 倍梯度稀释后进行套式扩增。从图 1 可见, 所建立的检测方法能够扩增出可见目的条带的最大稀释度为 10^{-9} , 即检测的 cDNA 含量极限为 $1.3 \times 10^{-7} \text{ pg}/\mu\text{L}$, 表明此方法灵敏度较高, 可完全满足 PRRSV 临床检测的需要。

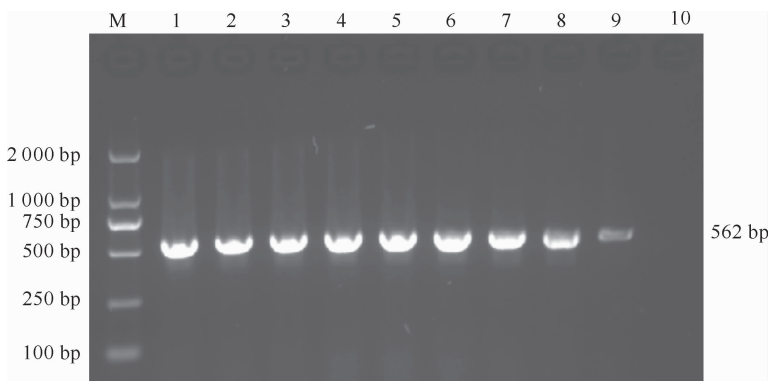


图 1 PRRSV NSP2 基因 RT-nPCR 检测方法灵敏度试验结果

M, DL 2000 DNA Marker; 1~10, 依次为 $130 \times 10^{-1} \sim 130 \times 10^{-10} \text{ pg}/\mu\text{L}$ cDNA PCR 结果

Fig. 1 Sensitivity test for NSP2 gene of PRRSV by RT-nPCR

M, DL 2000 DNA Marker; 1~10, $130 \times 10^{-1} \sim 130 \times 10^{-10} \text{ pg}/\mu\text{L}$ of PRRSV cDNA

2.3 PRRSV RT-nPCR 检测方法的特异性

用所建立的方法对 PRRSV SXXY/2013 株、

CH-1R 株及 CSFV C 株、流行性腹泻病毒 (PEDV)、传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、伪狂犬 Bartha-K 株、

圆环病毒 2 型(PCV-2)、细小病毒(PPV)等进行扩增,结果只有 PRRSV SXXY/2013 株扩增出了 562 bp 的目的条带,PRRSV CH-1R 株扩增出了 649 bp

的目的条带,与预期条带长度一致,其他 6 种毒株未扩增出条带(图 2),提示所建立的检测方法特异性好。

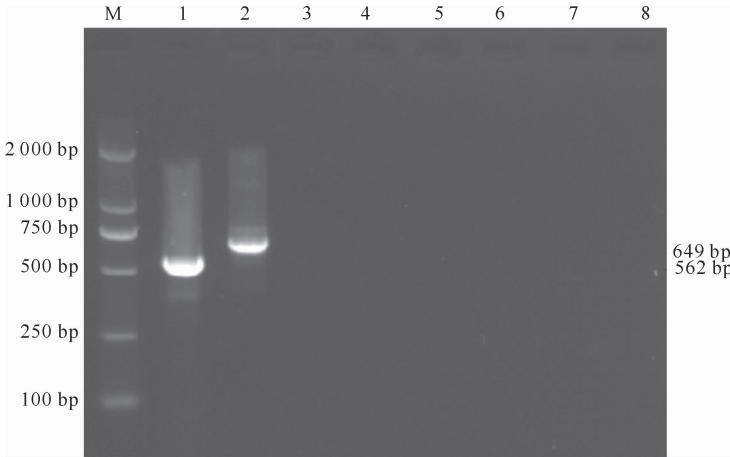


图 2 PRRSV NSP2 基因 RT-nPCR 检测方法特异性试验结果
M. DL 2000 DNA Marker;1~8. 分别为 PRRSV SXXY/2013 株、PRRSV CH-1R 株、CSFV、PEDV、TGEV、PRV、PCV-2、PPV RT-nPCR 结果
Fig. 2 Specialization test for NSP2 gene of PRRSV by RT-nPCR
M. DL 2000 DNA Marker;1~8. The results of PRRSV SXXY/2013,PRRSV CH-1R,CSFV,PEDV,TGEV,PRV,PCV-2,and PPV RT-nPCR, respectively

2.4 PRRSV RT-nPCR 方法对临床样品的检测结果

用建立的 RT-nPCR 方法检测陕西省部分地区采集的 48 份疑似 PRRS 的猪肺脏、淋巴结、脾脏、肝脏、肾脏等组织以及血清、精液等样品,结果有 31 份

样品为阳性,阳性率为 64. 6%,部分病料检测结果见图 3。由图 3 可知,2~4 号血清样品为蓝耳病毒变异株阳性,7 号精液样品为蓝耳病毒变异株阳性,9、10、12、13 号组织样品为蓝耳病毒变异株阳性,而 15 号组织样品为蓝耳病毒经典株阳性。

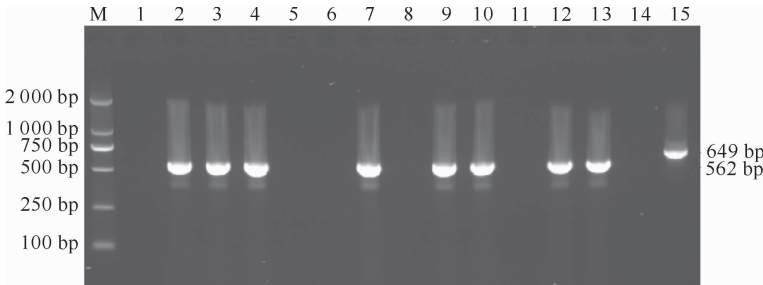


图 3 部分疑似 PRRS 病料中 PRRSV NSP2 基因检测结果
M. DL 2000 DNA Marker;1~15. 部分病料(1~5 血清样品;6~8 精液样品;9~15 组织样品)检测结果
Fig. 3 Detection of PRRSV NSP2 gene from some dubitable affected PRRS tissues
M. DL 2000 DNA Marker;1~15. Detection results of samples(1~5 serum samples;6~8 semen samples;and 9~15 tissue samples)

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征是近年严重危害我国养猪业的重大传染病之一,其传播迅速,发病率和死亡率均较高,造成了严重的经济损失^[9]。由于目前对 PRRS 尚无有效的治疗药物和办法,因此建立快速有效的诊断方法是控制 PRRS 的重要前提。由于 PRRS 与多种猪繁殖障碍性疾病临床症状相似,临

床诊断无法确诊。血清学技术中目前应用最广的是 ELISA 技术^[7],但由于临床应用的 PRRS 疫苗无论是灭活苗还是弱毒苗均为非基因缺失苗,无法用 ELISA 技术区分疫苗免疫抗体和野毒感染抗体,不能用于诊断。

在我国《高致病性猪蓝耳病防治技术规范》中规定,要确诊高致病性猪蓝耳病必须满足病原学指标,即高致病性猪蓝耳病病毒分离鉴定阳性或高致病性

猪蓝耳病病毒反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测阳性。因此,在 PRRS 的诊断中最为可靠的方法是病毒分离鉴定和 RT-PCR 诊断。病毒分离鉴定的优点是准确可靠,并能获得宝贵的病毒毒株,但缺点是需要进行细胞培养传代,费用高、耗时长,不能满足临床快速诊断的需要。随着分子生物学的兴起,RT-PCR 技术得到迅速发展,这一技术已广泛应用于 PRRSV 的快速诊断。周丹等^[10]针对 PRRSV 普通株和变异株 NSP2 基因设计合成了 3 条引物,建立了一步鉴别诊断 PRRSV 普通株与变异株的 RT-PCR 检测方法,通过不同长度的 RT-PCR 扩增产物将二者区分开来,该方法最低能检测到 1.5 pg 的核酸含量。李和平等^[11]建立了检测 PRRSV 的套式 RT-PCR,该方法具有极高的敏感性,将 $10^{6.5}$ TCID₅₀ 的 PRRSV 细胞毒稀释 10 000 倍后,依然能扩增出相应的目的片段,并且具有较好的重复性和特异性。Reicks 等^[12]发现,采用套式 RT-PCR 从接种感染 24 h 后的血清中能检测出 PRRSV。但是,以上学者建立的检测方法中,李和平和 Reicks 建立的套式 RT-PCR 不能区分经典毒株和变异株,周丹建立的方法能够区分但灵敏度稍低。本研究在分析 PRRSV 经典毒株和变异株基因差异的基础上,针对 NSP2 基因设计了 2 对引物,扩增片段包含了变异株缺失的 87 个核苷酸,通过改变反应体系和反应条件等参数进行优化组合,建立了鉴别诊断 PRRSV 经典株和变异株的 RT-nPCR 方法,结果表明,本方法检测 cDNA 极限质量浓度为 1.3×10^{-7} pg/ μ L,远优于周丹等建立的一步法 RT-PCR 检测方法,提示套式 PCR 方法灵敏度确实高于普通 PCR。特异性试验表明,本方法能从变异株扩增出 562 bp 特异性片段,从经典株扩增出 649 bp 特异性片段,但从其他常见猪病毒中均不能扩增特异性条带,提示建立的方法特异性高,且通过电泳图能直观区分经典株和变异株,解决了李和平等建立的套式检测方法不能区分 PRRSV 经典毒株和变异株的问题,对临床病例快速鉴别诊断提供了有力的技术手段,具有较高的应用价值。

应用建立的鉴别诊断方法,对收集的 48 份临床样品进行检测,发现 31 份样品为阳性,阳性率为 64.6%,提示陕西咸阳地区不同规模的猪场均存在 PRRSV 感染且感染率高,而且检测证实 PRRSV 变异株和经典株在猪群中均有流行,以变异株感染为主,在 PRRS 防控上要引起重视,这一结果与国内不同学者的研究结果^[13-15]一致。在检测的样品中,包

括组织样、血清和精液,本方法从这 3 种样品中均成功扩增出特异性目的条带,提示对 PRRSV 的检测样品选择比较宽泛,尤其是血清来源较易,不需剖检采集组织,为流行病学调查提供了便利手段。精液中检测出 PRRSV 的存在,提示公猪精液带毒并可能通过人工授精传播,需要引起高度重视。

[参考文献]

- [1] Kim W I, Kim J J, Cha S H, et al. Significance of genetic variation of PRRSV ORFs in virus neutralization and molecular determinants corresponding to cross neutralization among PRRS viruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 10-22.
- [2] Choi E J, Lee C H, Hyun B H, et al. A survey of porcine reproductive and respiratory syndrome among wild boar populations in Korea [J]. *J Vet Sci*, 2012, 13(4): 377-383.
- [3] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. *Am Assoc Swine Pract Newsl*, 1989(1): 1-9.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. *中国畜禽传染病*, 1996(2): 1-4.
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS [J]. *China Animal Infectious Diseases*, 1996(2): 1-4. (in Chinese)
- [5] Zhou I, Yang H C. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China [J]. *Virus Res*, 2010, 154: 31-37.
- [6] Han J, Rutherford M S, Faaborg K S. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 cysteine protease domain possesses both trans and cis-cleavage activities [J]. *J Virol*, 2009(18): 9449-9463.
- [7] 程亮亮, 占松鹤, 朱良强. 猪繁殖与呼吸综合征诊断技术研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2013, 34(3): 113-117.
Cheng L L, Zhan S H, Zhu L Q. The research progress of diagnostic techniques in porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013, 34(3): 113-117. (in Chinese)
- [8] 卢晓艳, 周永辉, 李伟娟, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒河南分离株 NSP2 和 GP5 基因遗传变异分析 [J]. *华北农学报*, 2012, 27(2): 100-104.
Lu X Y, Zhou Y H, Li W J, et al. Analysis of NSP2 and GP5 gene variation of porcine reproductive and respiratory virus strain isolated in Henan province [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(2): 100-104. (in Chinese)
- [9] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007(5): 323-326.
Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Identification and molecular epidemiology of the very virulent porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerged in China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2007(5): 323-326. (in Chinese)
- [10] 周 丹, 郭万柱, 漆信桥, 等. PRRSV 普通株与变异株鉴别诊

- 断 RT-PCR 方法的建立与临床应用 [J]. 中国兽医学报, 2012 (3): 367-370.
- Zhou D, Guo W Z, Qi X Q, et al. Establishment of differential diagnostic method for normal and mutant PRRSV strains by RT-PCR [J]. Chin J Vet Sci, 2012 (3): 367-370. (in Chinese)
- [11] 李和平, 吴发兴, 李晓成, 等. 猪繁殖与呼吸综合征的套式 PCR 方法建立及应用 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (1): 115-118.
- Li H P, Wu F X, Li X C, et al. Establishment and application of the PRRSV nest PCR methods [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24 (1): 115-118. (in Chinese)
- [12] Reicks D L, Munoz-Zanzi C, Mengeling W, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and serum of boars during the first six days after inoculation [J]. J Swine Health Product, 2006, 14 (1): 35.
- [13] 安春霞, 闫若潜, 吴志明, 等. 高致病性与低致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40 (5): 66-70.
- An C X, Yan R Q, Wu Z M, et al. Establishment and application of duplex RT-PCR assay for detection of highly and lowly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. China Animal Husbandry and Veterinary, 2013, 40 (5): 66-70. (in Chinese)
- [14] 邹敏, 吴发兴, 王福军, 等. 2007—2009 年部分猪群 PRRSV ORF5 和 NSP2 基因的克隆与序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38 (10): 7-14.
- Zou M, Wu F X, Wang F J, et al. Cloning and sequence analysis of ORF5 and NSP2 genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from some pig farms in 2007—2009 [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2010, 38 (10): 7-14. (in Chinese)
- [15] 张冲, 武小椿, 王波, 等. 野猪源与家猪源 PRRSV 陕西分离株全基因组测序与遗传进化分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39 (2): 9-16.
- Zhang C, Wu X C, Wang B, et al. Genomic sequencing and phylogenetic analysis of PRRSV isolated from domestic pig and wild boar in Shaanxi Province [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2011, 39 (2): 9-16. (in Chinese)
- (上接第 24 页)
- [16] 郭林英. 大豆 β -伴球蛋白提取物对鲤鱼肠上皮细胞增殖及其功能的影响 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2006.
- Guo L Y. Effects of soybean β -conglycinin extract on the proliferation and function of carp intestinal-epithelial cells in primary culture [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [17] Wu S W, Murphy P A, Johnsno L A, et al. Simplified process for soybean glycinin and β -conglycinin fractionation [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 2702-2708.
- [18] 吴莉芳, 赖红娥, 杨 嫒, 等. 大豆抗原蛋白 Glycinin 对鲤稚鱼、幼鱼蛋白酶和淀粉酶的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41 (12): 30-36.
- Wu L F, Lai H E, Yang H, et al. Effects of soybean antigen protein glycinin on the activities of protease and amylase in the larval and juvenile common carp [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2013, 41 (12): 30-36. (in Chinese)
- [19] Burrells C P D, Williams P J, Southgate V O, et al. Immunological, physiological and pathological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72: 277-288.
- [20] Krogdahl Å, Bakke-mckellep A M, Baeverfjord G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure mucosal enzyme activities, and pancreatic response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Aquaculture Nutr, 2003, 9: 361-371.
- [21] Ksudhik S J, Coves D, Dutto G. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax* [J]. Aquaculture, 2004, 230: 391-404.
- [22] 彭翔, 宋文新, 周 凡, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对黑鲫胃肠道和血清指标的影响 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28 (5): 1096-1103.
- Peng X, Song W X, Zhou F, et al. Effects of fermented soybean meal replacing fish meal on gastrointestinal tract and serum indexes in black sea bream [J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2012, 28 (5): 1096-1103. (in Chinese)
- [23] 吴莉芳, 赵 晗, 秦贵信, 等. 2 种大豆蛋白替代鱼粉蛋白对鲤鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33 (2): 222-226.
- Wu L F, Zhao H, Qin G X, et al. Effects of replacement of fish meal with two soybean protein sources on the activities of protease and amylase in *Cyprinus carpio* [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2011, 33 (2): 222-226. (in Chinese)
- [24] 钱 曦, 王桂芹, 周洪琪, 等. 饲料蛋白水平及豆粕替代鱼粉比例对翘嘴红鲌消化酶活力的影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19 (2): 182-187.
- Qian X, Wang G Q, Zhou H Q, et al. Effect of dietary protein on the activities of digestive enzymes of topmouth culter (*Erythroculter iliishaeformis* Bleeker) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19 (2): 182-187. (in Chinese)
- [25] Das K M, Tripathi S D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val) [J]. Aquaculture, 1991, 92: 21-32.