

DOI:CNKI:61-1390/S.20120109.1219.005

网络出版时间:2012-01-09 12:19

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120109.1219.005.html

猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

董玲娟,张彦明,何 雷,程 敏,刘 伟,林 鹭

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立一种能检测猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)含量的荧光定量 RT-PCR 方法,为猪传染性胃肠炎(TGE)的诊断和防治提供技术支持。**【方法】**根据 TGEV TH98 株的 *N* 基因序列设计 1 对特异性引物,扩增出目的片段,连接克隆载体后构建质粒标准品;对荧光定量的循环条件进行优化,建立猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法,对其重复性、特异性进行检测,并与普通 PCR 检测方法进行比较,最后应用该方法对采自陕西杨凌周边的 30 份临床样品进行检测。**【结果】**成功构建了质粒标准品,建立了检测猪传染性胃肠炎病毒的荧光定量 RT-PCR 方法,该方法特异性高、重复性好、敏感性比普通 PCR 检测方法高 2 个数量级,对质粒标准品的线性检测范围为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1$ 拷贝/ μL 。用建立的检测方法对从陕西杨凌周边猪场采集的 30 份样品进行检测,检出 4 份阳性,与普通 PCR 检测方法符合率为 100%。**【结论】**建立的 TGEV 荧光定量 RT-PCR 方法敏感性高、特异性好、省时省力,可以对猪传染性胃肠炎病毒进行快速检测。

【关键词】 猪传染性胃肠炎病毒;荧光定量 RT-PCR;质粒标准品

【中图分类号】 S852.65⁺9.6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)02-0013-07

Establishment of RT-PCR for transmissible gastroenteritis virus

DONG Ling-juan, ZHANG Yan-ming, HE Lei, CHENG Min, LIU Wei, LIN Zhi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to provide technical support for clinic diagnosis, prevention and cure of TGE by establishing RT-PCR method for transmissible gastroenteritis virus. **【Method】** One pair of specific primers based on the conservative region of TGEV TH98 *N* gene sequences was designed, then target region was amplified and cloned into vector to construct the plasmid standards. The PCR assay was developed by optimizing the variety of conditions, and then 30 clinic samples were detected with this method. **【Result】** Plasmid standards and the PCR assay of detecting TGEV were developed successfully. The data showed high specificity and good repeatability, and demonstrated that the method was of high repeatability, which was 100 times higher than general PCR, and the linear range was from 1.0×10^7 to 1.0×10^1 copies/ μL . 30 clinic samples were tested by two PCR methods, and the result showed that four samples were positive, and the PCR results were 100% positive coincident with general PCR. **【Conclusion】** The PCR assay for detecting TGEV has high sensitivity and specificity as well as short time, which provides

* [收稿日期] 2011-09-06

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2010ZDKG-71)

[作者简介] 董玲娟(1987-),女,陕西扶风人,在读硕士,主要从事公共卫生学研究。E-mail:dlj870216@126.com

[通信作者] 张彦明(1956-),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与病毒致病机理研究。

E-mail:ylzhangym@sohu.com

technical support for the diagnosis, prevention and cure of TGE.

Key words: transmissible gastroenteritis virus; RT-PCR; plasmid standards

猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)引起的猪的一种高度接触性消化道传染病,以呕吐、水样腹泻和脱水为临床特征^[1]。资料显示,任何年龄和任何品种的猪都可感染 TGEV,尤其是 3 周龄以内的仔猪,病死率高达 100%,成年猪感染后发病温和,可能会出现生长障碍和无乳等现象^[2]。TGEV 不仅能引起急性肠炎,而且也能导致持续性感染,即便在感染 100 d 后,在康复猪的呼吸道中仍能检测到病毒的存在,严重影响了养猪业的正常发展。近年来,该病在世界各地频频发生,我国大部分省(市、区)也均有流行,并且呈上升趋势^[3]。因此,TGE 每年都给世界养猪业造成严重的经济损失^[2]。而及时对 TGE 做出诊断是减少该病造成经济损失的重要环节,但由于 TGEV 经常存在着与其他病毒混合感染,且常伴有细菌的继发感染,使临床症状复杂化,因而在临床上只能做出初步诊断^[4]。

TGEV 属于冠状病毒科、冠状病毒属,电镜下呈日冕状或皇冠状,为不分节段的单股正链 RNA 病毒,病毒基因组全长约 28.5 kb,是所有 RNA 病毒中基因组最大的病毒,且 5'端有帽子结构,3'端有共价结合的 PolyA 尾巴^[5]。TGEV 整个基因组分为 7 个开放阅读框(ORF1~ORF7),分别编码 4 种结构蛋白和 3 种非结构蛋白,其中 ORF1 编码病毒的复制-转录酶。病毒复制时先以病毒的 mRNA 为模板,翻译出复制-转录酶,然后再在此复制-转录酶的作用下进行各亚基因组的转录,最后形成病毒的 4 种结构蛋白 S、E、M、N 和 3 种非结构蛋白 Rep、3a-3b、7。

迄今为止,研究者对 TGEV 的病原检测进行了大量的研究和探索。吴国平等^[6]根据 TGEV S 基因的保守序列设计特异性引物,建立了检测 TGEV 的 RT-PCR 方法,可满足临床粪便的检测。张坤等^[7]通过设计 3 对特异性引物,建立了一种能够同时检测猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪 A 群轮状病毒(GAR)的多重 RT-PCR 方法,该方法敏感性高,能够检测到 35 pg 的 TGEV-PEDV-GAR 三联苗的混合 RNA。李健等^[8]建立了可检测 5 种动物冠状病毒的基因芯片技术,该技术能很好地诊断和区分这 5 种动物冠状病

毒,包括 TGEV 和猪呼吸道冠状病毒(PRCV)。但上述方法均存在一定的缺陷,RT-PCR 和多重 TR-PCR 方法对于病毒含量较低的粪便样品检出率低,而且不能对病毒含量进行准确定量;基因芯片技术虽然能够消除假阳性结果,特异性好,但是成本较高,不适宜在临床中应用,因此急需建立一种新的 TGEV 检测方法。近几年发展起来的荧光定量 PCR 技术以其敏感性高、特异性好、高通量且能够准确定量等优点,在基因表达水平分析、传染病诊断和病原体定量检测、医学及药物开发、转基因产品生产等方面获得了广泛应用^[9-12]。本研究根据 TGEV TH98 株的 N 基因序列设计 1 对特异性引物,扩增出目的片段,连接克隆载体后构建质粒标准品,对荧光定量的循环条件进行优化,建立一种以质粒为标准品,能准确定量 TGEV 含量的荧光定量 PCR 方法,并探索其应用于实际工作中诊断 TGEV 和检测病毒含量的可能性,以期对 TGE 的临床诊断及 TGEV 病毒的定量检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株和细胞 TGEV TH98 株,由西北农林科技大学动物医学院兽医免疫学实验室穆杨老师惠赠;ST 细胞、DH-5 α 菌株,均由西北农林科技大学预防兽医平台保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 RT-PCR 反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq II,均购自宝生物工程(大连)有限公司;pEASY-T1 克隆载体试剂盒,购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒,均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司。冷冻离心机,德国 Eppendorf 产品;普通 PCR 仪、iQ5 荧光定量 PCR 仪,均为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 N 基因的 PCR 扩增和质粒标准品的制备

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上已公布的 TGEV TH98 株 N 基因序列(GenBank 登录号:AY337931)的保守区设计出 1 对特异性引物,上游引物 P1: 5'-GAGCAGTGCCAAGCATTACCC-3';下游引物 P2: 5'-GACTTCTATCTGGTCGC-CATCTTC-3',用于 Real-time PCR 检测。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2.2 TGEV 的增殖及其 RNA 提取 用含体积

分数 10% 新生牛血清的 DEME 培养基培养 ST 细胞,待细胞融合度达到 80% 时,接种 200 TCID₅₀ 的 TGEV TH98 株,37 ℃ 吸附 1 h 后,补加体积分数 2% 的维持液,在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 3~6 d,待 90% 的细胞出现细胞病变时,收集细胞及培养液,经 3 次快速的反复冻融后,分装并放置在一 80 ℃ 保存备用。病毒 RNA 的提取按 Trizol 试剂盒的说明书进行。

1.2.3 cDNA 的逆转录合成及 N 基因的 PCR 扩增 按照 TaKaRa 反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser)说明进行 TGEV 的 cDNA 合成,采用 30 μL 反应体系,两步法进行反转录。反应体系为:①5×gDNA Eraser Buffer 3 μL, gDNA Eraser 2 μL, Total RNA 5 μL, RNase Free dH₂O 5 μL, 42 ℃ 2 min;②5×PrimeScript Buffer 2 6 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 1.5 μL, RT Prime Mix 1.5 μL, RNase Free dH₂O 6 μL, 混匀后加入到①所得的反应液中,37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。将反应结束后得到的 cDNA 保存在 -20 ℃ 备用。

以反转录获得的 cDNA 为模板,进行标准品目的片段的扩增。反应体系为:cDNA 模板 1 μL, Premix Taq(Load dye mix)12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, RNase Free dH₂O 补足总体积至 25 μL。反应条件:95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 32 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物进行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析,按照威格拉斯生物技术(北京)有限公司的胶回收试剂盒说明书回收标准品目的片段,保存在 -20 ℃。

1.2.4 质粒标准品的制备 将 1.2.3 的胶回收产物克隆至 pEASY-T1 克隆载体中,并转化至 DH-5α 平板,次日挑取白色单克隆菌落,摇菌后按照威格拉斯生物技术(北京)有限公司的质粒提取试剂盒的说明提取质粒,并送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,用 DNAMAN 软件与 GenBank 上已有的 TH98 株序列进行对比分析。同时对阳性质粒进行 BamH I、EcoR V 双酶切鉴定,质粒于 -20 ℃ 保存。

1.3 TGEV 荧光定量 PCR 方法的建立

1.3.1 循环条件的优化 为了得到更高的荧光增幅和最佳扩增效率,对荧光定量 PCR 的循环条件进行三步法和两步法摸索,同时将退火温度从 55 ℃ 依次递增至 60 ℃,递增步长为 1 ℃,对退火温度进行优化。

1.3.2 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 染料,在 Bio-Rad 公司的 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行。扩增反应体系总体积为 20 μL,其中质粒标准品模板 1 μL, SYBR Premix Ex Taq II 10 μL,标准品上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,用 RNase Free dH₂O 补足总体积至 20 μL,混匀后瞬时离心,采用 1.3.1 中优化后的反应程序进行反应。每个样品设置 3 个重复,取平均值。每次都设置以 H₂O 为模板的阴性对照。

1.3.3 标准曲线的绘制 用核酸测定仪测定质粒标准品质量浓度,并验证质粒纯度,之后用 TaKaRa 反转录试剂盒中的 EASY-Solution 对质粒标准品进行 10⁻¹~10⁻⁷ 稀释,以不同稀释度的质粒标准品为模板进行荧光定量 PCR 扩增,每个稀释度设置 3 个重复。标准曲线由 iQ5 荧光定量 PCR 仪自动生成,X 轴代表每个浓度标准品模板中病毒起始含量的常用对数值(lg C),Y 轴代表每个浓度标准品扩增时达到阈值所需的循环数。

1.3.4 重复性和特异性试验 对同一浓度的阳性样品进行 4 次重复测定,以验证 TGEV 荧光定量 PCR 方法的稳定性。用猪圆环病毒(PCV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪瘟病毒(CSFV)的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 扩增,并以稀释度为 10³ 的质粒标准品为阳性对照,验证反应的特异性。重复性和特异性试验均设以水为模板的阴性对照。

1.3.5 与普通 PCR 检测方法的比较 以已经梯度稀释好的质粒标准品为模板,分别进行荧光定量 PCR 检测和普通 PCR 检测,对比其灵敏度,普通 PCR 检测使用标准品引物。

1.3.6 临床样品检测 随机采集陕西杨凌周边地区猪场 30 份临床粪便样品,按照采样时间顺序编为 1~30 号。将收集的粪便加 2 倍 PBS 稀释后反复冻融 3 次,收集上清,提取 RNA 后进行反转录,以得到的 cDNA 为模板,按照 1.3.2 的方法进行荧光定量 RT-PCR 检测,并与普通 PCR 检测结果进行对比分析。

2 结果与分析

2.1 N 基因的 PCR 扩增结果

由于 N 基因全长为 1.7 kb,而本研究设计的用于荧光定量的 N 基因只有 109 bp,用标准品引物对提取的 TGEV TH98 株 RNA 进行 RT-PCR 扩增,经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析后,扩增出 1 条大

小约 109 bp 的条带(图 1),与预期结果相符。

2.2 质粒标准品的鉴定

将质粒标准品目的片段胶回收后,克隆至 pEASY-T1 克隆载体,转化后挑取单克隆,摇菌,提取质粒。提取的质粒标准品经 *Bam*H I、*Eco*R V 双

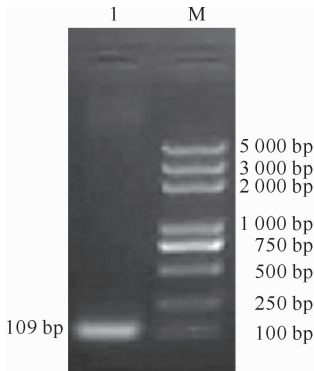


图 1 N 基因的 PCR 扩增结果
M. Marker TransPlus 2K;1. 目的片段

Fig. 1 Amplification results of N gene
M. Marker TransPlus 2K;1. Target fragment

2.3 TGEV 荧光定量 PCR 方法的建立

2.3.1 最佳循环条件的确定 分别采用两步法和三步法进行荧光定量 PCR 扩增,并采用温度梯度进行退火温度摸索,结果表明,两步法及退火温度为 60 ℃时,扩增效率高,特异性好。故优化后的反应程序为:95 ℃预变性 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,并采集荧光,共 40 个循环。

2.3.2 标准曲线的建立 经测定,质粒标准品质量浓度为 120 ng/μL,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.92。质粒标准品经梯度稀释后,质量浓度为 1.2×10⁻¹~1.2×10⁻⁷ mg/mL,经 iQ5 荧光定量 PCR 仪软件自动分析得到了荧光定量标准曲线(图 3)。

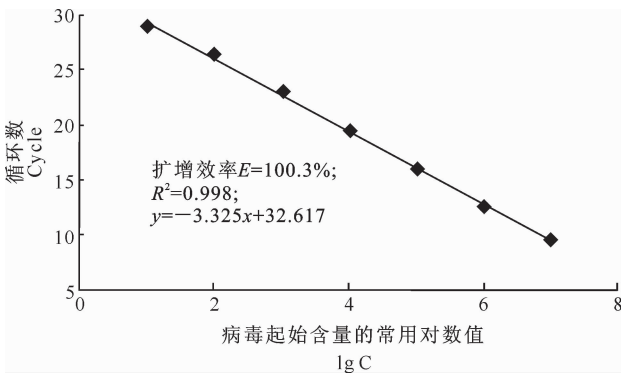


图 3 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的标准曲线

Fig. 3 Standard curve for TGEV RT-PCR
detecting methods

由图 3 可知,建立的 TGEV 荧光定量 RT-PCR

酶切鉴定后获得了 3 928 和 109 bp 2 条条带(图 2)。测序结果显示,目的基因片段长度为 109 bp,与预期结果相符;序列分析结果显示,目的片段与 GenBank 上已有的 TH98 株序列的同源性为 100%。证明获得了正确的重组质粒标准品。

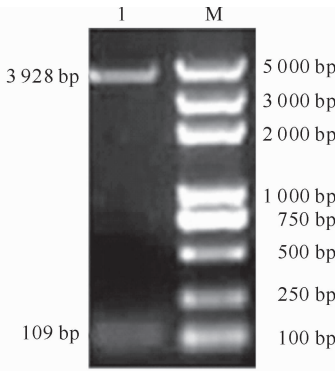


图 2 质粒标准品的 *Bam*H I、*Eco*R V 双酶切鉴定结果
M. Marker TransPlus 2K;1. 质粒标准品

Fig. 2 Results of recombinant plasmid with double digestion
M. Marker TransPlus 2K;1. Plasmid standards

方法的线性检测范围为 1.0×10⁷~1.0×10¹ 拷贝/μL,扩增效率E=100.3%,R²=0.998,标准曲线的线性方程为 y = -3.325x + 32.617,斜率为 -3.325。同时由图 3 也可以看出,本研究建立的荧光定量 PCR 方法检测灵敏度可达 1.2×10⁻⁷ mg/mL。

2.3.3 重复性和特异性 重复处理同一浓度的阳性样品,分 4 组进行荧光定量 PCR,结果表明,在扩增曲线相对荧光强度达到 450 左右,循环数达到 18 时,样品的扩增曲线仍重合在一起,稍后有所分散(图 4),说明本研究建立的 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性、稳定性很好。

TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性结果见图 5。由图 5 可知,在 40 个循环以内,除 TGEV TH98 株外,其他样品均未出现有限的荧光信号,表明本研究建立的 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法对猪传染性胃肠炎病毒具有良好的特异性。

2.3.4 与普通 PCR 检测方法的比较 将质粒标准品从 1.0×10⁷ 拷贝/μL 按 10 倍的梯度稀释至 1.0×10¹ 拷贝/μL,选用 56 ℃退火温度进行普通 PCR 扩增,产物经过 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,普通 PCR 检测方法的灵敏度为 1.0×10³ 拷贝/μL,比本研究建立的荧光定量 RT-PCR 方法低 2 个数量级。

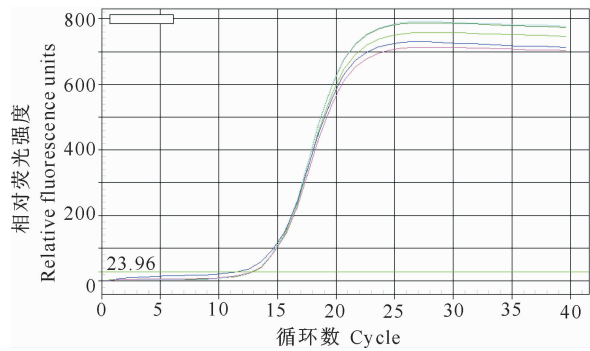


图 4 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性
Fig. 4 Repeatability test of RT-PCR for TGEV detection

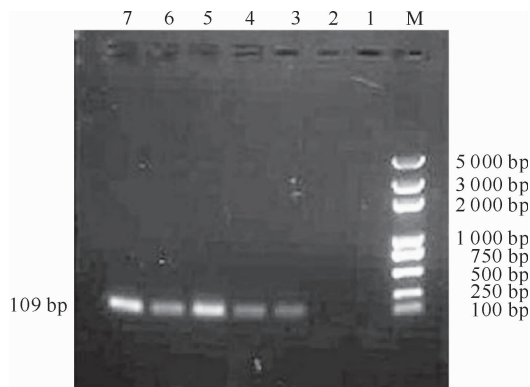


图 6 TGEV 质粒标准品的普通 PCR 扩增结果
M. Marker TransPlus 2K;1~7. 分别为 10 倍梯度稀释
($1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ 拷贝/ μL)的质粒标准品
Fig. 6 Amplification results of standard plasmids of TGEV
M. Marker TransPlus 2K;1~7. $1.0 \times 10^1 -$
 1.0×10^7 copies/ μL standard plasmids

2.3.5 临床样品检测结果 对随机采集的陕西杨凌周边地区猪场的 30 份临床粪便样品,采用本研究建立的荧光定量 RT-PCR 方法进行检测,并与普通 PCR 检测方法进行对比,结果发现,用普通 PCR 方法检出含 TGEV 的样品有 2 份(编号为 4、17 号);而用本研究建立的荧光定量 RT-PCR 方法检出的阳性样品有 4 份(编号为 4、11、17 和 29 号),两者符合率为 100%,同时也说明荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性高于普通 PCR 方法。应用本研究建立的标准曲线($y = -3.325x + 32.617$),对阳性样品中 TGEV 的含量进行计算,结果显示,编号为 4、11、17、29 号样品的 C_t 值分别为 21.34、16.89、21.51 和 21.77, TGEV 含量分别为 $1.0 \times 10^{3.10}$, $1.0 \times 10^{4.44}$, $1.0 \times 10^{3.05}$ 和 $1.0 \times 10^{2.97}$ 拷贝/ μL 。

3 讨论

荧光定量 PCR 检测方法作为一种新型检测方法,是一种在 PCR 反应体系中加入荧光报告基团,

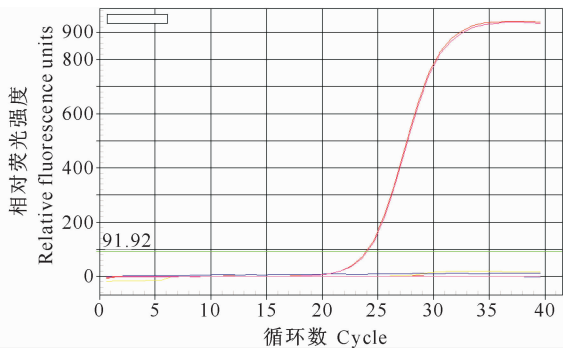


图 5 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性
Fig. 5 Specificity test of RT-PCR for TGEV detection

根据荧光信号积累情况实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量,而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、具实时性和准确性等特点^[13],目前已被广泛应用于分子生物学和医学研究领域^[9-12]。荧光定量 PCR 常用的检测模式有 TaqMan 探针和 SYBR Green I,其中 SYBR Green I 具有价格便宜、使用方便、灵敏度高、无需合成特异性探针的优势,而 TaqMan 探针法需要设计特异性探针,成本较高,且设计过程比较困难。本研究采用的是 SYBR Green I 检测模式,成功建立了一种特异性强、重复性好、灵敏度高的检测猪传染性胃肠炎病毒的荧光定量 RT-PCR 方法。

荧光定量中引物的设计十分重要,因此引物针对的靶序列就成为影响试验结果好坏的关键因素。N 基因编码猪传染性胃肠炎病毒的核衣壳蛋白,全长 1.7 kb,本身含有病毒的遗传物质,是病毒复制所必需的,并且高度保守。Wurm 等^[14]早在 2001 年就发现 N 基因编码的 N 蛋白可以导致细胞分裂停止,延长细胞周期,为病毒的装配提供更合适的条件,特别是对于生命周期比宿主细胞周期长的病毒来说,具有更重要的意义,因此对 N 基因的检测具有重要意义。本研究所选用的引物是根据 GenBank 上已公布的 TGEV TH98 株 N 基因序列(登录号:AY337931)设计的,并将该毒株与 NCBI 数据库中其他 TGEV 毒株,如 Purdue 株、Miller 株和 TS 株等的序列进行比对,发现本试验所用的引物针对的 TH98 毒株的靶序列与其他毒株的同源性为 95%~100%,说明对该序列的检测对于其他毒株也具有参考意义。

荧光定量 PCR 检测方法中标准品的选择是最关键的影响因素。为了最大限度地保证各步骤间扩

增效率一致,标准品需用与被检样品相同或相似的材料^[15-16]。徐丽秋等^[17]以体外合成的 RNA 为标准品建立了 TGEV 的荧光定量 RT-PCR 方法,但该方法较繁琐,且 RNA 本身易降解,稳定性不好。以 cDNA 也可以作为标准品,但是需要在每次荧光定量 PCR 之前单独反转录,操作过程较复杂,也增大了多次开盖导致污染的概率,不适用于高通量样品的检测。白兴华等^[18]采用包含了扩增片段的质粒作为标准品,建立了一种敏感性可高达 15.3 拷贝/ μL 的检测 TGEV 的荧光定量 PCR 方法,该方法特异性高,稳定性好。本研究用基因克隆的方法构建了标准品质粒,经检测,其纯度高,质量较好,能够长期保存;将质粒标准品 10 倍梯度稀释后进行荧光定量 RT-PCR 检测,在 40 个循环内,所得的标准曲线在 TGEV 含量为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1$ 拷贝/ μL 时线性关系良好。

此外,本试验过程中的很多步骤,如病毒 RNA 的提取和 cDNA 的合成等都采用试剂盒来完成,因而大大缩短了试验时间,有效地避免了一些人为因素造成的偏差。另外,应用荧光定量最显著的优点就是可以通过仪器直接观察结果,使得对阳性的判断更为直观,故更适合大规模样品的分析检测。本研究建立的 TGEV 荧光定量 RT-PCR 检测方法,具有准确定量、灵敏度高、特异性强、污染低以及省时省力等优点,在 TGE 的诊断和防治方面具有很高的应用价值。

[参考文献]

- [1] 南文金,娄高明.猪传染性胃肠炎病毒分子结构、检测和疫苗研究进展[J].畜牧与兽医,2010,42(12):95-98.
Nan W J, Lou G M. Research progresses on molecular structures and vaccines of swine transmissible gastroenteritis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 42 (12): 95-98. (in Chinese)
- [2] Zhou J F, Hua X G, Li C, et al. Effective inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus replication in ST cells by shRNAs targeting RNA-dependent RNA polymerase gene [J]. Antivirus Research, 2007, 74: 36-42.
- [3] 李建强,柳纪省,程杰.猪源冠状病毒 ORF3 和 ORF7 的克隆及特性分析[J].甘肃农业大学学报,2007,42(6):1-7.
Li J Q, Liu J S, Cheng J. Cloning and characterization of ORF3 and ORF7 of porcine coronavirus [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2007, 42(6): 1-7. (in Chinese)
- [4] 韩国全,郭万柱,李云云,等.猪传染性胃肠炎病毒检测技术研究进展[J].猪业科学,2008(12):33-36.
Han G Q, Guo W Z, Li Y Y, et al. Research progresses on testing technologies of swine transmissible gastroenteritis [J]. Swine Industry Science, 2008(12): 33-36. (in Chinese)
- [5] 张雷,董毅.猪传染性胃肠炎病毒感染机理的研究进展[J].现代畜牧兽医,2009(7):79-82.
Zhang L, Dong Y. Research progresses on infection mechanism of porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009(7): 79-82. (in Chinese)
- [6] 吴国平,伊燕博,孙淑芳,等. RT-PCR 检测猪传染性胃肠炎病毒方法的建立[J].中国兽医杂志,2009,39(3):19-20.
Wu G P, Yi Y B, Sun S F, et al. Establishment of RT-PCR assays for detecting porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 39(3): 19-20. (in Chinese)
- [7] 张坤,何启盖.猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J].畜牧兽医学报,2010,41(8):1001-1005.
Zhang K, He Q G. Establishment and clinical application of a multiplex reverse transcription-PCR for detection of porcine epidemic diarrhea virus, porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine group A rotavirus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2010, 41(8): 1001-1005. (in Chinese)
- [8] 李健,谢爱织,陈沁,等.基因芯片检测 5 种冠状病毒的初步研究[J].畜牧与兽医,2010,42(12):16-21.
Li J, Xie A Z, Chen Q, et al. Simultaneous detection of five animal coronavirus by genechip hybridization [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 42(12): 16-21. (in Chinese)
- [9] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Research, 1996, 6: 986-994.
- [10] Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [11] 李安,谢金文,魏加贵,等.荧光定量 PCR 技术在分子检测上的研究进展[J].中国畜牧兽医,2009,36(4):73-76.
Li A, Xie J W, Wei J G, et al. The amplification of real-time PCR on molecular detections [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(4): 73-76. (in Chinese)
- [12] 宋勇涛,王勇,刘勤,等. FQ-PCR 在转基因产品检测中的应用研究进展[J].动物医学进展,2008,29(11):55-59.
Song Y T, Wang Y, Liu Q, et al. The amplification of real-time PCR on detections of genetically modified product [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(11): 55-59. (in Chinese)
- [13] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等.实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J].生命的化学,2004,24(1):74-76.
Ouyang S Y, Yang D, Ouyang H S, et al. Technology and application of real-time PCR [J]. Chemistry of Life, 2004, 24(1): 74-76. (in Chinese)
- [14] Wurm T, Chen H Y, Hodgson T. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division [J]. Journal of Virology, 2001, 75(19): 9345-9356.
- [15] Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-

time reverse transcription polymerse chain reaction [J]. Molecular and Cellular Probes,2002,16:99-110.

[16] 邓 力,张彦明,李维维,等. 猪瘟兔化弱毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(2):1-8.

Deng L,Zhang Y M,Li W W,et al. Development and preliminary application of real-time PCR assay for detection and quantitation of the lapinized Chinese strain of classical swine fever virus [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed,2011,39(2):1-8. (in Chinese)

[17] 徐丽秋,苏永生,赵玉军,等. 检测猪传染性胃肠炎病毒 Taq-Man 荧光定量 RT-PCR 方法的建立和初步应用 [J]. 畜牧与兽医,2009,41(9):14-17.

Xu L Q,Su Y S,Zhao Y J,et al. Establishment and preliminary application of a TaqMan real-time RT-PCR method for detection of porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. Animal Husbandry& Veterinary Medicine, 2009, 41 (9): 14-17. (in Chinese)

[18] 白兴华,冯 力,陈建飞,等. 猪传染性胃肠炎病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 畜牧兽医学报,2007,38(5):476-481.

Bai X H,Feng L,Chen J F,et al. Development of TaqMan fluorescence quantitative RT-PCR assay for detection of transmissible gastroenteritis virus of swine [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2007,38(5):476-481. (in Chinese)

(上接第 12 页)

[13] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method [J]. Methods,2001,25:402-408.

[14] Ezer S,Bayes M,Elomaa O,et al. Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and colocalizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells [J]. Hum Mol Genet, 1999,8:2079-2086.

[15] Hashimoto T,Cui C Y,Schlessinger D. Repertoire of mouse ectodysplasin A (EDA-A) isoforms [J]. Gene,2006,371:42-51.

[16] Hymowitz S G,Compaa D M,Yan M,et al. The crystal structures of EDA-A1 and EDA-A2;Splice variants with distinct receptor specificity [J]. Structure,2003,11(12):1513-1520.

[17] Yan M,Wang L C,Hymowitz S G,et al. Two amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors [J]. Science,2000,290:523-527.

[18] Sinha S K,Zachariah S,Quinones H I,et al. Role of TRAF3 and 6 in the activation of the NF-kappa B and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor [J]. J Biol Chem, 2002,277:44953-44961.

[19] Morlon A,Munnich A,Smahi A. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-kappaB activation induced by the TNF-receptor,Edar and its adaptator Edaradd [J]. Hum Mol Genet, 2005,14:3751-3757.

[20] Smahi A,Courtois G,Rabia S H,et al. The NF-kappaB signaling pathway in human diseases;From incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes [J]. Hum Mol Genet,2002,11:2371-2375.