CSSC
第五届中国猪业科技大会
中国畜牧兽医学会2023年学术年会

论文集
PROCEEDINGS

第五届中国猪业科技大会
暨中国畜牧兽医学会2023年学术年会

效率·质量·生态

2023年8月9日-11日

第五届中国猪业科技大会
暨中国畜牧兽医学会
2023年学术年会

论文集

PROCEEDING

2023 年 8 月 9 日 - 11 日

主　　编：杨汉春　王楚端

责任编辑：潘玉春　曾勇庆　黄瑞华　吕学斌　滚双宝
王金勇　吴珍芳　王希彪　梅书棋　殷宗俊
朱　砺　丁向东　周　磊　车炼强

编　　辑：翟丽维　石　娟　申　凌

封面设计：鞠心怡

第五届中国猪业科技大会组织机构

主办单位：中国畜牧兽医学会

承办单位：中国畜牧兽医学会养猪学分会
北京博亚和讯农牧技术有限公司
中国农业大学动物医学院

特别支持单位：农业农村部畜牧兽医局
中国动物疫病预防控制中心

支持单位：国家生猪产业技术体系
国家畜牧科技创新联盟
国家生猪技术创新中心

大会主席：黄路生

顾问委员会：阎汉平　陈焕春　张改平　李德发　印遇龙

大会组委会：

主　　席：杨汉春
副 主 席：乔玉锋　秦英林　邵根伙　张许科　洪　平　李守军　余　平　张翀宇
　　周立明　陈瑶生　王楚端　孔平涛　刘作华
秘 书 长：马　闯
副秘书长：李传业　王必勇

大会学术委员会：

主　　席：王楚端
委　　员：王立贤　张桂红　董红敏　李保明　殷宗俊　滚双宝　吴珍芳　王希彪
　　梅书棋　黄瑞华　曾勇庆　吕学斌　朱　砺　潘玉春　宋维平　闫之春
　　车炼强　韩　军
秘 书 长：王金勇
副秘书长：石　娟　丁向东　周　磊　翟丽维

致　谢

诚挚感谢给予“中国畜牧兽医学会2023年学术年会”积极支持的政府相关部门、学会支撑单位、科研院校、团体会员单位、相关赞助企业。

（以下单位排名不分先后）

中国科学技术协会
中国农业大学
农业农村部畜牧兽医局
中国兽医药品监察所
全国畜牧总站
中国动物疫病预防控制中心
中国动物卫生与流行病学中心
国家生猪技术创新中心
重庆市畜牧科学院
中国牧工商集团有限公司
北京大北农科技集团股份有限公司
普莱柯生物工程股份有限公司
天津瑞普生物技术股份有限公司
金宇保灵生物药品有限公司
安琪酵母股份有限公司
播恩集团股份有限公司
江苏农牧科技职业学院
肇庆大华农生物药品有限公司
齐鲁动物保健品有限公司
海南罗牛山畜牧有限公司
四川省畜科集团有限公司
艾美科健（中国）生物医药有限公司
大连三仪动物药品有限公司
国药集团动物保健股份有限公司
四川华蜀动物药业有限公司
河北地邦动物保健科技有限公司
成都新亨药业有限公司
内蒙古必威安泰生物科技有限公司
北京市华都峪口禽业有限责任公司
北京爱德士生物科技有限公司
辽宁益康生物股份有限公司
河北远征药业有限公司
四川维尔康动物药业有限公司
浙江惠嘉生物科技股份有限公司
北京康普森农业科技有限公司
中佳国基（四川）农业科技有限公司
宁波三生生物科技股份有限公司
河北美荷药业有限公司
菲吉乐科（中国）生物科技有限公司

致　谢

诚挚感谢以下单位对第五届中国猪业科技大会的大力支持！

战略合作伙伴：

牧原食品股份有限公司

北京大北农科技集团股份有限公司

勃林格殷格翰动物保健（上海）有限公司

金宇生物技术股份有限公司

铂金赞助单位：

硕腾中国

安佑生物科技集团股份有限公司

金牌赞助单位：

天康制药股份有限公司

法国诗华动物保健公司

福建倍思达生物有限公司

佰高威盛（上海）动物药业有限公司

宁波三生生物科技股份有限公司

宁波第二激素厂

石家庄博瑞迪生物技术有限公司

普莱柯生物工程股份有限公司

美国世界动物出口公司

大悟汉悟畜牧有限公司

银牌赞助单位：

北京金诺百泰生物技术有限公司

太原市威尔潞威科技发展有限公司

单项赞助单位：

大会资料包：浙江海正动物保健品有限公司

会议指南：建明（中国）科技有限公司

文具：上海秣宝互联网科技有限公司

展示支持单位：

福建永诚农牧科技集团有限公司

北京纳百生物科技有限公司

北京康普森农业科技有限公司

福建银顶农业科技有限公司

成都瀚辰光翼科技有限责任公司

前　言

科学技术是第一生产力。作为世界养猪生产大国的中国，科技的支撑对养猪业的高效、稳定、可持续发展尤为重要。中国畜牧兽医学会于 2015、2017、2019 年分别在厦门、重庆、青岛成功举办了三届中国猪业科技大会，在学界、业界产生了十分积极的影响。原定在 2021 年举办的第四届中国猪业科技大会，因新冠疫情影响推迟到 2022 年 5 月以线上形式召开，收获空前成功。中国畜牧兽医学会本着以科技推动产业发展的宗旨，聚集学术界和产业界人士，在山城重庆召开第五届中国猪业科技大会，中国畜牧兽医学会 2023 年学术年会将合并召开。本次大会以“效率、质量、生态”为主题，汇聚学术界和产业界智慧，邀请了近 80 位国内外知名专家、学者做精彩的大会报告或在 10 个不同类型的分会场做内容丰富的专题交流。

本次大会征文活动，得到了广大畜牧兽医科技工作者的积极响应及参与，投稿踊跃。经整理及初审后，会议录用论文详细摘要 220 篇，其中遗传与繁育专题 61 篇、营养与饲料专题 33 篇、疫病与防治专题 109 篇、其他各类论文 17 篇。论文质量水平有了新的提高。

因版面所限，编者对一些文稿做了修改和删节，敬请作者和读者谅解！由于编辑时间紧迫，编辑人员水平所限，难免有遗误之处，望多指正。在论文征集、审稿以及论文集编印过程中，各位论文作者、特邀报告专家、学术委员会专家都付出了辛勤劳动，在此表示诚挚地感谢！

最后，我们衷心期望每年一届的中国畜牧兽医学会学术年会和每两年一届的中国猪业科技大会在中国科协、农业农村部及各农业高等院校、科研院所、企业等单位的关注、支持下，在专家、学者、科研人员、基层和企业的科技工作者、青年学者的热心参与下，成为广大畜牧兽医科技工作者展示最新科研成果，交流、互动、启迪共进的重要平台，为推动我国猪业科技创新、学科繁荣、人才培养和产业持续健康发展起到积极的、更大的作用。

目 录

特邀报告

（排名不分先后）

猪繁殖与呼吸综合征预防与控制的难题与方向.....杨汉春 （3）
猪气喘病免疫防控与效力评价方法.....邵国青 （4）
非洲猪瘟病毒的入侵与感染机制.....韩 军 （5）
副猪格拉瑟病研究与防控技术进展.....何启盖 （6）
非洲猪瘟净化操作失败的原因.....樊福好 （7）
非洲猪瘟病毒基因缺失毒株感染场清除与净化要点.....赖 志 （8）
猪流行性腹泻的流行特征与防控策略.....肖少波 （9）
小分子、大作为——非洲猪瘟病毒毒力基因 I73R 功能研究.....陈鸿军（10）
磷酸化依赖的 CcpS 调控猪链球菌 2 型荚膜合成及毒力的机制.....范红结（11）
非洲猪瘟病毒抑制宿主蛋白合成的分子机制.....彭贵青（12）
非洲猪瘟病毒抑制免疫机制研究与应用.....郑海学（13）
非洲猪瘟病毒体内感染细胞嗜性及其快速复制的分子机制.....朱紫祥（14）
非洲猪瘟病毒实验室检测注意事项.....张桂红（15）
非洲猪瘟病毒感染诱导炎症反应与负调控机制.....翁长江（16）
猪圆环病毒遗传变异与防控策略.....姜 平（17）
营养和饲料成分对猪肉品质的影响-关于饲料中氨基酸浓度控制和饲料用大米的给与....胜俣昌也（18）
猪营养与经济效益.....姜海龙（19）

遗传与繁育专题

口述报告

磷酸肌酸对冷冻保存猪精子质量与抗氧化能力的影响.....王赫川等（23）
美系长白和杜洛克种猪生长性状和繁殖性状遗传力估计.....孟庆利等（24）
一种外三元纯种猪、二元猪、三元猪和多元回交猪的鉴定方法研究.....郑春婷等（25）
槲皮素缓解高铜诱导的猪卵泡颗粒细胞氧化损伤的分子机制研究.....齐南南等（26）

猪卵泡液外泌体处理卵巢颗粒细胞的 SNP/Indel 筛选及分析 ..... 刘阳光等（27）
OPTN 基因在猪肌肉发育中的作用研究 ..... 曹佳鑫等（28）
冷应激对马身猪和大白猪骨骼肌的影响及其机制研究 ..... 李文霞等（29）
母猪发情行为相关转录图谱构建与 lncRNA-HEOE 功能分析 ..... 柳明正等（30）
开发重组蛋白激素应用于批次化生产的研究 ..... 罗昊澍等（31）
scRNA-seq 揭示苏淮猪背最长肌细胞组成图谱及通讯分析 ..... 肖　伟等（32）
基于 REML 法估计仔猪均匀度的遗传参数 ..... 王露露等（33）
STAT3 调控猪乳腺上皮细胞增殖和凋亡的效应研究 ..... 吴　燕等（34）
豫南黑猪的遗传多样性分析及背膘厚基因定位 ..... 胡潘阳等（35）
影响苏淮猪胴体背膘厚 QTL 和候选基因的鉴别 ..... 刘　倩等（36）
全基因组关联分析挖掘影响荷兰大白猪乳头数的新 QTL 和候选基因 ..... 邱子健等（37）
用初生重预测长白和杜洛克达 115kg 日龄和背膘厚 ..... 张　犇等（38）
基于全基因组重测序技术挖掘秦川黑猪生长性状优势基因 ..... 曹明浩等（39）
淫羊藿苷对猪卵巢颗粒细胞雌二醇合成、增殖和凋亡的影响 ..... 王津洁等（40）

专题报告

17℃负压环境下谷胱甘肽对猪精液保存质量的影响 ..... 张　涵等（41）
四种抗氧化剂对猪精液冷冻保存影响研究进展 ..... 冯赫泽等（42）
枸杞多糖对猪精液低温保存质量的影响 ..... 宋宇伦等（43）
维生素 E 对猪精液常温负压保存效果影响 ..... 李天峰等（44）
黑龙江祥龙祖代猪场长白猪核心群的选育及杂交繁育体系建立 ..... 姚美玲等（45）
猪肌内脂肪细胞生成中的 m6A 甲基化修饰及其对猪肉品质的影响 ..... 巢明坤等（46）
对香豆酸对猪精液冷冻保存效果的影响 ..... 张　涵等（47）
S100A9 在产气荚膜梭菌 beta2 毒素诱导的猪 IPEC-J2 肠上皮细胞的炎症性损伤中发挥关键作用 ..... 李　杰等（48）
基于 ATAC-seq 和 RNA-seq 筛选猪肺炎支原体关键抗性基因 ..... 刘　莹等（49）
高×撒杂交猪与高黎贡山猪和撒坝猪生产性能的比较分析 ..... 周戚斌等（50）
SLC7A2 在猪宫内发育迟缓胎盘中的表达及其对滋养层细胞增殖和迁移的影响 ..... 胡光玲等（51）
猪卵泡液外泌体的 SNP/InDel 筛选及分析 ..... 刘阳光等（52）
miR-10b 靶向调节 PTEN 基因及其蛋白对猪卵巢颗粒细胞凋亡的调控作用 ..... 章会斌等（53）
河南省和陕西省猪群 PCV4 和 PRRSV 分子检测及其遗传特征 ..... 陈曦艋等（54）
基于 RNA-Seq 技术对淮猪和大约克猪排卵前卵泡差异表达基因的研究 ..... 刘林清等（55）
PIK3R5 基因对猪骨骼肌生长发育的影响 ..... 张建民等（56）
妊娠后期和哺乳期补充鱼油对母猪繁殖和断奶仔猪生长免疫及粪菌组成的影响 ..... 游君怡等（57）

仔猪肠道氧化应激相关的 lncRNA 的鉴定与功能预测……李金宝等（58）
单细胞核测序揭示江泉黑猪背最长肌构成细胞的分群及占比……曹红珍等（59）
猪 NCK1 基因多态性影响母猪产仔数性状研究……雷润雨等（60）
硒都黑猪 CYP2J34 基因遗传多态性对猪肉质性状的遗传效应分析……李亚赛等（61）
脂质组学分析马身猪和杜长大猪肉品质及各部位脂质沉积差异……史明月等（62）
CSDE1 在猪骨骼肌肌纤维形成过程中的功能和机制研究……蔡睿杰等（63）
STC-1 的克隆及其在合作猪和大白猪中表达差异分析……闫继弘等（64）
冷应激对合作猪肝脏抗氧化能力和脂质代谢的影响……贾 蕊等（65）
低温环境下合作猪和大白猪抗寒性能比较及激素水平分析……唐于然等（66）
TGFBR3 拷贝数变异与大白猪与民猪背部脂肪厚度差异有关……张春雷等（67）
SLCO3A1 和 SEMA5A 基因拷贝数的变化与混群后断奶仔猪的攻击行为有关……张春雷等（68）
湘沙猪配套系生长发育测定及生长曲线拟合研究……李玉莲等（69）
基于全基因组关联分析鉴别影响安徽地方猪肉质性状的功能候选基因……时坤鹏等（70）
USP16 基因与 ABHD4 基因对猪主要生长性状的遗传效应分析……王自洋等（71）
基于 RNA-seq 技术对柯乐猪异常乳腺组织的转录组学分析……王春源等（72）
柯乐猪 DSP 基因 SNP 鉴定及其对繁殖性状的影响……向 进等（73）
不同品种猪肠道菌群结构差异比较分析……周 浩等（74）
不同解冻方式及冻融次数对安庆六白猪肉品质的影响……胡晓静等（75）
L-脯氨酸对猪精液冷冻保存过程中精子质量的影响……刘 闯等（76）
安庆六白猪不同生理阶段肠道菌群多样性研究……汤晴晴等（77）
调控鲜味受体 T1R1/T1R3 对间质细胞 mTOR 自噬信号相关因子的影响……牟 琪等（78）
mTOR 和 Ca^{2+}在 T1R1/T1R3 参与睾丸间质细胞自噬调控过程中的作用……牟 琪等（79）
规模化猪场不同因素对长大二元母猪繁殖性能的影响……张 哲等（80）
葛根素对猪精液常温保存效果的研究……张琦琦等（81）
大白猪哺乳期背膘损失和发情间隔的全基因组关联分析研究……潘 艺等（82）
发酵葡萄渣对保育猪免疫性能和肠道健康的影响……袁甜甜等（83）

营养与饲料专题

口述报告

低聚壳聚糖硒拮抗 ZEA 对 IPEC-J2 的损伤作用与机理研究……佘福泽等（87）
细粉碎小麦麸改善母猪的食糜理化特性及肠道微生物组成……王子捷等（88）
益生元纳米粒子对植物乳杆菌抑菌性能、益生特性的影响及其机制探究……李炜月等（89）
Arf1-mTORC1 信号网络感应谷氨酰胺促进猪肠上皮细胞增殖的机制研究……闫 玲等（90）

菌酶协同发酵棉粕在猪中有效能和回肠氨基酸消化率的研究.....刘碧凡等（91）
饲粮豆粕水平及其酶解对断奶仔猪生长性能、免疫功能及肠道微生物的影响.....陈邱虹等（92）

专题报告

mTOR 信号通路调控乳成分合成.....段红娟（93）
中草药添加剂对猪生长性能及免疫功能的影响研究进展.....刘　文等（94）
低蛋白饲粮氨基酸平衡对猪生长性能及氮排泄量的影响研究进展.....林秀蔚等（95）
哺乳料添加 MCT 和 HMB 对母猪生产性能和仔猪生长性能的影响.....刘孟宇等（96）
饮用 AMC 碱性矿物质水通过调节脑-菌群-肠道轴稳态提高断奶仔猪腹泻抗性.....陈　建等（97）
使用非线性回归与神经网络模型对生长育肥猪净能分配模式进行建模.....王　力等（98）
植物提取物的功能及其在断奶仔猪上的应用进展.....梁　城等（99）
褪黑素通过调节肠肝轴缓解黄曲霉毒素 B1 诱导的肝损伤.....刘水平等（100）
海参内脏对慢性冷应激小鼠生长性能、脏器指数、抗氧化与肝脏损伤的影响.....乔　鑫等（101）
日粮添加蛹虫草对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响.....李劲树等（102）
基于微生物组学和代谢组学揭示低蛋白日粮对河西猪肠道健康的影响机制.....王　东等（103）
植物提取物对母猪繁殖性能的影响及其机制研究.....赵林露等（104）
谷氨酰胺通过调节微生物和线粒体内质网结构偶联途径降低仔猪肠道炎性损伤.....刘心恋等（105）
谷氨酰胺通过调节微生物群和 Th17/Treg 平衡相关免疫信号来增强仔猪的肠道免疫力
.....张　婷等（106）
饲粮添加酵母硒对育肥猪肠黏膜形态、免疫、抗氧化功能及微生物多样性的影响.....苏玲玲等（107）
速益卫®对断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响.....周　贤等（108）
益生菌对断奶仔猪生产性能影响的 Meta 分析.....赵禹铭等（109）
基于 Meta 分析探究壳聚糖对猪生长性能的影响.....张　悦等（110）
党参、黄芪提取物对断奶仔猪生长性能、血液参数、粪样菌群和短链脂肪酸的影响.....郭容霞（111）
β 防御素 yTAP 的抑菌活性、原核表达及其对小鼠肠道菌群多样性的影响.....黎小银等（112）
全株玉米青贮不同添加比例对新吉林黑猪后备母猪生长性能的影响.....郝　桐等（113）
脂质组学分析揭示发酵桑叶对豫西黑猪脂肪和肌肉组织中脂质谱的影响.....侯俊杰等（114）
谷氨酰胺通过 Wnt/β-catenin 信号通路调节猪肠上皮细胞生长.....方永霞等（115）
低蛋白日粮对河西猪生产性能和肠道菌群的影响.....王　东等（116）
饲粮中充足的色氨酸可通过色氨酸代谢物和肠道抗菌肽改善感染猪产肠毒素大肠杆菌的断奶仔猪的
生长性能和肠道健康.....陈　琛等（117）
牛磺酸缓解断奶仔猪肠道氧化损伤及其对生长性能的改善作用.....王林岗等（118）
酿酒酵母有机铁替代硫酸亚铁对断奶仔猪生长与健康的影响.....蒋丽雯等（119）

疫病与防治专题

口述报告

高通量扩增子测序实现 15 种猪病原的快速、精准检测……左 扬（123）
嗜淀粉乳杆菌外泌体缓解黄曲霉毒素 B1 诱导的小鼠肠道屏障损伤和炎症……刘云欢等（124）
MARCO 通过加剧 PRRSV GP5 诱导的 PAMs 凋亡抑制病毒感染……张晓晓等（125）
circ_0020647 促进 ETEC 诱导猪小肠上皮细胞焦亡的作用机制研究……朱凯晴等（126）
宏感染组特征分析揭示腹泻猪群的复杂共感染模型……邢家宝等（127）
PRRSV 促进 DDX10 的自噬性降解拮抗其抗病毒作用……周艳荣等（128）
全球非洲猪瘟幸存猪临床案例分析……戈胜强等（129）
PRRSV 感染中铁代谢调控及铁死亡机制的研究……李长艳等（130）
猪蓝耳病净化技术在一点式猪场生产体系中的应用……胡睿铭等（131）
基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的建立……谢梦琪等（133）
贵州某猪场猪伪狂犬、猪圆环病血清抗体及其病原学检测与分析……赵 静（134）
基因组靶向整合高表达免疫分子酵母底盘构筑技术研究……李树君等（135）
小鼠腹腔巨噬细胞通过 GSDMD 介导的细胞焦亡抵御 SEZ 感染……李 舜等（136）
猪源 IFITM3 抑制 TGEV 早期感染 PK-15 细胞的机制研究……程家浩等（137）
植物乳杆菌 LP-1 上清调控肠道钙离子抗 PEDV 作用研究……阚子斐等（138）
CD44 介导 TGEV 调控 NHE3 诱导仔猪 Na^+ 失衡的研究及激活剂的筛选……徐沙沙等（139）
猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）利用细胞间传播抵抗抗体的中和……夏思进等（141）
PRRSV 复制酶蛋白 nsp2 遗传变异调节病毒的毒力和持续性感染……高 鹏等（142）
非洲猪瘟病毒激活 BAX 诱导细胞凋亡的分子机制……向智勇等（143）
猪流行性腹泻病毒 GX15 株的遗传进化分析及其致病性初探……孙 倩等（144）
非洲猪瘟病毒的分离鉴定和低温消毒剂制备与评估……王 惠等（145）

专题报告

猪细小病毒 6 型 ORF2 基因的截短表达及多克隆抗体制备……欧云文等（146）
控蓝净蓝操作细则系列一……迁 斌等（147）
控蓝净蓝操作细则系列二……迁 斌等（148）
“维泰蓝”经典组方案例分享……迁 斌等（149）
2012-2020 年四川省 PRRSV 株 Nsp2 和 orf5 的分子特征……简芝洁等（150）
表达 NADC30-like 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白的重组伪狂犬病毒的构建及其免疫原性评价……邓李霜等（151）
盖塔病毒对雄性小鼠生殖能力的影响研究……李凤琴等（152）

河南省猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 和 NSP2 基因的遗传多样性及系统发育分析
.....赵士杰等（153）
2005-2023 年我国猪群中猪瘟病毒的流行报告：Meta 分析及系统评价 .....邹　宏等（154）
不同商品化病毒 DNA 提取试剂盒对非洲猪瘟病毒检测效果的比较研究 .....杨云龙等（155）
非洲猪瘟病毒诱导猪红细胞凋亡并促进猪外周血单核细胞的吞噬作用 .....杨云龙等（156）
猪繁殖与呼吸综合征病毒通过脂质代谢途径调节脂滴积聚以促进病毒复制 .....杨云龙等（157）
芦荟大黄素通过调节 NF-κB 信号通路促进细胞凋亡抑制非洲猪瘟病毒复制 .....罗依琢等（158）
非洲猪瘟病毒对稳定表达 CD163 和 Siglec1 的猪肾细胞的适应性 .....高　琦等（159）
宿主因子 HNRNPU 通过 YTHDF2 调控 TRAF3 甲基化修饰促进 PEDV 复制.....闫玉超等（160）
口蹄疫病毒 O 型鼠源单个 B 细胞抗体的制备及阻断 ELISA 方法的建立 .....杨郑欣等（161）
用于中国非洲猪瘟病毒Ⅰ型和Ⅱ型鉴定的双实时 PCR 方法的建立 .....高　琦等（162）
PRRSV-2 经不同免疫途径诱导体液免疫反应的差异 .....李　闻等（163）
猪繁殖与呼吸综合征病毒 NADC30-Like 毒株的分离鉴定.....张晓晓等（164）
一株新分离的三片段基因缺失非洲猪瘟病毒株的致病性和水平传播评估 .....高　寒等（165）
猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定 .....胡晓静（166）
不同规癖水平母猪的情感状态、肠道菌群及脑肠肽差异分析.....张金悦等（167）
一株胰蛋白酶非依赖 PEDV 毒株驯化及制备的灭活疫苗免疫效果评估.....高冬生等（168）
非洲猪瘟抗原捕获 LAMP 检测方法的建立及条件优化.....朱日宁等（169）
碱性矿物质复合物（AMC）抑制猪肠道病原微生物传播的多组学研究.....姚　鑫等（170）
河南省猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及病毒分离鉴定.....李洪炫等（171）
表达 PCV2d Cap 蛋白的重组猪伪狂犬病病毒的构建及免疫原性初步探究.....许瑞勤等（172）
仔猪结肠炎模型中肠道炎症的时间和空间发展规律.....王铭育等（173）
PRRSV 和 PCV2 共感染猪肺泡巨噬细胞中免疫分子 mRNA 表达水平的检测 .....周立坤等（174）
非洲猪瘟五基因缺失株的发现与分离鉴定.....戈胜强等（175）
非肌性肌球蛋白 IIA（NM-ⅡA）介导 PEDV 感染的功能及机制研究 .....胡　意等（176）
宿主蛋白 Haspin 激酶参与 PRV 感染的机制研究.....谭　磊等（177）
纳米银消毒剂杀菌效果及安全性评价研究.....谢小红等（178）
PRRSV 结构蛋白 GP3 调节 Claudin 4 促进其早期感染 .....丁国飞等（179）
新肠道毒株进化以逃避现有防控手段：现代生猪养殖新挑战.....姚　鑫等（180）
利用 p30、p54 和 p72 多聚抗原优势表位重组蛋白的间接 ELISA 检测非洲猪瘟病毒抗体
.....李德昕等（181）
非洲猪瘟病毒空气传播途径研究现状.....戈胜强等（182）
一株仔猪产肠毒素大肠杆菌分离鉴定、耐药性分析及其卵黄抗体的制备 .....尹家银等（183）
越南非洲猪瘟基因缺失减毒活疫苗临床研究进展.....徐天刚等（184）

非洲猪瘟弱毒疫苗研究困惑与思考.....左媛媛等（185）
基于非洲猪瘟病毒 p10 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立.....魏 天等（186）
美国在非洲猪瘟病毒基因缺失疫苗研究中的路线及进展.....韩乃君等（187）
后疫情时代猪业中医药绿色防控经验推广.....陈 宏（188）
适应非洲猪瘟病毒增殖的传代细胞系研究进展.....路皓东等（189）
应用原代细胞繁殖非洲猪瘟病毒的研究进展.....左媛媛等（190）
黄芩苷对 ROS/MAPK 信号通路介导 IPEC-J2 细胞炎症反应的作用.....孙心怡等（191）
Rhodococcus opacus 对早期断奶仔猪腹泻、生产性能、肠道健康及免疫功能的影响
.....李娜娜等（192）
表达 CSFV E2 和 NADC30-like PRRSV GP5 蛋白重组 PRV 的构建及免疫效力初步探究
.....马世杰等（193）
高致病性 PTV-2 型变异株的分离与分子特征分析.....梁雯棋等（194）
猪繁殖与呼吸综合征病毒通过自噬降解 MDA5 的机制研究.....孙瑞骐等（195）
表达高致病性和 NADC30 样 PRRSV 毒株 GP5 蛋白的重组伪狂犬病病毒的生物学特性
.....霍 健等（196）
猪流行性腹泻病毒 G2a 变异株的分离鉴定及遗传进化分析.....张梦迪等（197）
黑龙江省 5 个地区仔猪腹泻病的调查分析.....张启钧（198）
PRRSV 感染中的脂代谢调控分子及其作用机制研究.....崔大庆等（199）
规模猪场蓝耳病强制免疫疫苗接种情况、影响因素与田间评价.....李树博等（200）
宏基因组流行病学揭示 2021—2022 年中国猪细小病毒复杂的混合感染和进化模式.....李 跃等（201）
人肠道肉孢子虫病病原体在云南家畜中的流行情况、形态与遗传标记特点及其分子检测方法构建
.....张明珠等（202）
非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体制备及线性抗原表位的定位.....王凤杰等（204）
猪圆环病毒 2 型全基因组分析及 Cap 蛋白可溶性表达研究.....侯承尧等（205）
全球猪繁殖与呼吸综合征病毒 Lineage 8 疫苗的系统地理学、进化、传播和临床影响
.....刘 静等（206）
高致病性猪捷申病毒 2 型变异株的宏病毒组测序与分子特征分析.....胡睿铭等（207）
非洲猪瘟检测样品的选择.....许光勇（208）
猪繁殖与呼吸综合征病毒通过细胞钙信号通路激活自噬利于病毒复制及机制研究.....刁非非等（209）
SERPINB1 通过降解 IKBKE 和调节自噬介导的 IFN 通路促进塞内卡病毒 A 复制
.....延君芳等（210）
STX17 和 SNAP29 调控不完全自噬对猪肺炎支原体胞内增殖的影响.....周可心等（211）
福建省邵武市某猪场发生猪轮状病毒感染的病例分析和防控建议.....王燕玲（212）
猪伪狂犬病毒 EP0 蛋白单克隆抗体的制备及其应用.....王 迪等（213）

伪狂犬病毒被膜蛋白 UL21 靶向宿主 cGAS 逃逸天然免疫机制研究……马梓承等（214）
E111R 基因对非洲猪瘟病毒复制及毒力影响的研究……樊嘉琦等（215）
非洲猪瘟 pp62、E165R 和 H240R 蛋白原核表达以及 ELISA 方法的建立……郑　凡等（216）
猪 δ 冠状病毒（PDCoV）N 蛋白的原核表达……赵丽均等（217）
非洲猪瘟 K205R 蛋白及其单链抗体的表达纯化……龙学琳等（218）
G5 型猪 A 群轮状病毒 VP2-VP6-VP7 VLPs 的构建及免疫原性研究……田明月等（219）
马链球菌兽疫亚种 SclE 蛋白原核表达及其免疫效力评价……黄云飞等（220）
PEDV 感染通过激活 EGFR 调控 NHE3 活性的机制研究……张依玲等（221）
TGEV N 抑制 NHE3 活性诱导仔猪 Na+失衡性腹泻的机制研究……牛　铮等（223）
miR-223-3p 靶向 NLRP3 调节马链球菌兽疫亚种炎症反应的研究……李亚娟等（225）
规模化猪场腹泻猪群腹泻相关病毒的检测与分析……张益野等（226）
猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测及分离毒株基因特征分析……杜营彬等（227）
人工密码子优化有效提高 ASFV 基因的表达水平……王世民等（228）
2 株新分离的 NADC34-like PRRSV 重组毒株的基因组比较分析和致病性评估……徐思佳等（229）
猪盖塔病毒的分离鉴定与致病性分析……向昭颖等（230）
非洲猪瘟病毒 p30 蛋白线性抗原表位的鉴定……单朝萌等（231）
猪繁殖与呼吸综合征不同疫苗组合的免疫程序评估……任文慧等（232）
伪狂犬病毒双重微滴式数字 PCR 检测方法的建立……田梓翰等（233）
河南省猪伪狂犬病毒野毒感染血清学调查及 gE 基因遗传变异分析……王林青等（234）
猪繁殖与呼吸综合征病毒 IgM 抗体 ELISA 检测方法的建立与应用……温　平等（235）
非洲猪瘟病毒基因Ⅰ型和基因Ⅱ型鉴别荧光 PCR 检测方法的建立与用……吴昊蔚等（236）

其他相关专题

口述报告

血管内皮生长因子 A 在多杀性巴氏杆菌感染致哺乳动物呼吸道上皮通透性增加中的作用
……林　琳等（239）
首农模式猪场生物安全体系防控非洲猪瘟的实践效果……许光勇（240）

专题报告

四川地区猪圆环病毒 4 型首次检测及遗传进化分析……徐　通等（241）
猪可食用组织中非甾体抗炎药的残留检测……孙志轩等（242）
新生仔畜肠道微生物群的形成及作用……宋　文（243）
黑龙江省养猪业粪污的时空分布……林秀蔚（244）

脐带血管和产程时长对母猪产仔性能的影响及相关性分析.....从光雷等（245）
寒带猪舍低成本节能通风方法探索与实践.....赵 骞等（246）
猪肉可食用组织中泰拉霉素 UPLC-MS/MS 检测技术研究.....黄婧洁等（247）
ALKBH5 介导 m6A 修饰对 PEDV 病毒复制的调控作用及机制分析.....杨 荔等（248）
呕吐毒素 DON 感染猪小肠上皮细胞全基因组 m^6A 图谱分析.....单祎祎等（249）
基于 IPCC 方法的河南省畜禽温室气体排放时空分析.....沙艳羽等（250）
东三省畜牧业温室气体排放测算及灰色分析.....徐 蔚等（251）
猪 importin 7 功能以及对猪 δ 冠状病毒复制的影响.....谢林梅等（252）
ACE2 在 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞中的作用研究.....张静怡等（253）
膳食纤维在仔猪腹泻防治中的应用及其机制研究进展.....冉 亿等（255）
猪肠道微生物对养殖环境的影响.....韩锦仪等（256）

特邀报告

猪繁殖与呼吸综合征预防与控制的难题与方向

杨汉春
（中国农业大学动物医学院，北京 100193）

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是严重影响养猪生产的病毒性疫病。从免疫学层面而言，迄今为止其预防与控制并未取得实质性成效，成为世界性难题。由于猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）的生物学特性与致病机制的复杂性，免疫预防与控制面临的难题在于：①免疫抑制是 PRRSV 致病的核心；②PRRSV 不能诱导猪产生高水平中和抗体与特异性细胞免疫；③病毒不能及时被清除而造成持续性感染；④PRRSV 不断演化、变异、重组和新毒株层出不穷；⑤PRRSV 减毒活疫苗（MLV）的安全性、灭活疫苗的免疫效力低下。

已有的研究表明，PRRSV 对肺泡巨噬细胞天然免疫相关功能的抑制而引发细菌性继发感染；PRRSV 感染肺泡巨噬细胞不能有效或高效提呈抗原，而造成特异性细胞免疫延迟和低下；不同 PRRSV 毒株引起的临床疾病基本相同，但严重程度存在差异，致病性与其体内外的增殖能力密切相关；我国 PRRSV 毒株的多样性，包括 PRRSV-2 多谱系毒株、变异毒株、疫苗演化毒株、重组毒株等，采用现有疫苗进行免疫控制难有实效；PRRSV 减毒活疫苗返强的事实毋庸置疑。

预防与控制 PRRS 的目标应是：猪场的 PRRSV 毒株越少越好，阳性猪场单一 PRRSV 毒株；降低 PRRSV 在猪群间的传播与循环，猪群的 PRRSV 感染率越低越好；猪场实现无 PRRSV 和零感染。因此，方向策略包括：①开展监测与检测，评估猪场 PRRSV 感染状况；②构建完善的猪场生物安全体系；③策略性地使用 PRRS 减毒活疫苗，阳性猪场实施后备母猪的驯化管理；④控制 PRRS 阳性猪群的细菌性继发感染，降低死淘率；⑤推进种猪场猪繁殖与呼吸综合征的净化工作，实现不免疫无疫，进一步推进区域净化和根除。

非感染性疫苗（non-infective vaccine）是 PRRS 新型疫苗研发的重要方向，包括病毒颗粒样疫苗（VLPs）、基于抗体的靶向树突状细胞抗原递送疫苗、感染组织细胞而非巨噬细胞的活疫苗等。理想的 PRRS 疫苗应具备的特性：①安全性好，不诱导免疫抑制，免疫猪不带毒、不排毒；②效力高，可诱导高水平的中和抗体和特异性的细胞免疫；③疫苗病毒不演化、不返强、不与 PRRSV 野毒株重组；④可以区分疫苗免疫猪和野毒感染猪，便于鉴别诊断和野毒感染猪的清除；⑤免疫效力的广谱性，即针对不同毒株均可产生足够的交叉免疫保护。

主要参考文献

[1] Zhou L, Ge X, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome modified Live virus vaccine: A "Leaky" vaccine with debatable efficacy and safety. Vaccines, 2021, 9(4): 362.

[2] Gao P, Liu Y, Wang H, et al. Viral evasion of PKR restriction by reprogramming cellular stress granules. Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America, 2022, 119 (29): e2201169119.

[3] Wang J, Zhang M, Cui X, et al. Attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus regains its fatal virulence by serial passaging in pigs or porcine alveolar macrophages to increase its adaptation to target cells. Microbiology Spectrum, 2022, 10 (6): spectrum.03084-22.

[4] Cao X, Ge X, Zhang Y, et al. Genetic characteristics of three single-farm-isolated porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with novel recombination among NADC30-like, JXA1-like, and QYYZ-like strains. Transboundary and Emerging Diseases, 2023, Article ID 8871321.

猪气喘病免疫防控与效力评价方法

邵国青
（苏省农业科学院兽医研究所，江苏南京 210014）

猪支原体肺炎（Mycoplasma pneumoniae of swine，MPS）俗称猪气喘病、猪喘气病，是由 Mhp 引起的一种慢性接触性呼吸道传染病，普遍存在于世界各地。常用地方性肺炎描述由 Mhp 和其他致病菌混合感染，Mhp 与其它细菌、病毒混合感染，引发猪呼吸道疾病综合征（PRDC）。

对猪支原体肺炎等呼吸道传染病的有效预防和控制应当基于为猪群提供最佳的生活环境，包括良好的空气质量、通风和室内温度以及适当的饲养密度。在临床上，抗菌药物与灭活疫苗的联合使用是国外最为常用的控制方法，尽管两者均无法完全控制与清除 Mhp 感染。

直到上世纪九十年代末美国注册了第一个灭活疫苗，但免疫效果有争议。随着抗原滴度的提高和佐剂的改进，灭活疫苗保护效力得到提高。美国辉瑞率先注册的瑞倍适使用 4.5%的大豆磷脂做成水包油佐剂。通常油性佐剂和二次免疫有较好的免疫作用，但出于动物福利的考虑，市场更接受水佐剂和单针免疫，免疫期 3~6 个月，保护率 40%~67 %。

活疫苗免疫可模拟病原在体内的感染，并可激活呼吸道靶器官局部的黏膜免疫反应。国内已有 168 株、RM48 株。通过肺内靶向免疫 1 次注射，2 周内可产生保护力，平均保护率 80%。肌肉注射免疫佐剂、气溶胶免疫技术研究已经取得进展。肺内靶向免疫、喷鼻免疫、气溶胶免疫技术的方法仍需进一步改进。

疫苗免疫效力评估方法的金标准是 SPF 猪攻毒保护看肺病变，临床症状、屠宰猪肺脏病变统计、咳嗽指数测定（咳嗽总次数/受检猪的数量× 总观察时间（Nathues，2012））、呼吸道样本连续病原载量精确评估、黏膜抗体检测均有参考价值。最有指导价值的是大数据效益评价方法，包括料肉比、出栏时间、药费下降。

非洲猪瘟病毒的入侵与感染机制

韩军
（中国农业大学动物医学院，北京 100193）

非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）是严重威胁世界养猪业的“头号杀手”，100 年来全球对 ASFV 的预防控制尚未取得实质性成效。ASFV 为一类由虫媒传播的、大型大 DNA 病毒，为非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属成员。该病毒粒子结构复杂，具有双层囊膜，主要感染猪体单核-巨噬细胞系统，但目前其入侵和感染宿主细胞的机制尚不清楚。

先前的研究揭示，ASFV 通过网格蛋白介导的内化以及巨胞饮途径入侵宿主细胞。在侵染过程中，病毒粒子逐步脱去外膜和衣壳，暴露出病毒粒子内膜，随后病毒内膜介导病毒-宿主膜融合过程，其中内膜蛋白 pE248、E199L 发挥重要作用。除经典途径外，本研究揭示 ASFV 可通过凋亡小体途径入侵和感染宿主细胞。研究发现，ASFV 在感染后期诱导猪巨噬细胞（PAMs）凋亡，并诱导产生大量直径 500-5000 nm 左右的凋亡小体（ApoBDs）。这些凋亡小体装载不含外层囊膜的病毒粒子，可被邻近的未感染 PAMs 吞噬，从而引发新一轮感染。进一步研究发现，这种病毒粒子形式具有感染性，是 ASFV 感染后期主要的存在形式。Annexin V 阻断 ApoBD 表面 “吃我”信号磷脂酰丝氨酸（PS）或使用 anti-TIM4 抗体阻断 PAMs 表面胞葬受体 TIM4 均可显著抑制 ApoBD-ASFV 有效感染 PAMs，而过表达 TIM4 可增强 ASFV 感染效率。重要的是，ASFV 阳性猪血清对凋亡小体介导的 ASFV 传播无阻断作用，但可部分阻断无外层囊膜病毒粒子的感染。

综上所述，本研究揭示了一种新的 ASFV 入侵和感染途径，为阐释其免疫抑制与逃逸机制以及病毒抗体不完全中和机制提供了新的启示作用。

副猪格拉瑟病研究与防控技术进展

何启盖
（华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070）

一、疾病概述

本病是由副猪格拉瑟菌（*Glaesserella parasuis*，GPS）引起，以多发性浆膜炎、脑膜炎和关节炎为特征，常见于保育阶段猪群，发病率和死亡率与感染菌株血清型、是否继发感染和饲养管理是否科学等因素有关，是规模化猪场常见细菌病之一。本菌可分为 15 个血清型和不可分型菌株。我国流行的血清型是血清型 4 和 5 型，但不同地区略有差异。

二、流行病学：

本病传染源是病猪和带菌猪，带菌的分娩母猪通过直接接触，造成产房仔猪感染。保育仔猪之间可通过呼吸道和消化道发生传播。易感动物主要是断奶仔猪，也是经济损失最严重的感染阶段。

三、临床症状：

常见于保育后期。急性病例出现败血症或神经症状，死亡迅速，但较为少见。慢性病例，病猪咳嗽，生长不良、消瘦；关节肿大，跛行。有些猪健康带菌，在转栏或其他应激时发病。病理变化：急性型病理变化不显著。慢性型主要是肺脏、心包和腹腔器官表面有纤维素性炎症，关节液增多或关节腔皮下水肿。

四、实验室检测

由于上呼吸道中存在本菌，抗体检测只作为参考。我们研制了用重组 rApd 为抗原的 ELISA 抗体检测试剂盒，可检测到所有 15 个血清型感染抗体，特异性更高。

可用含 NAD 的营养琼脂培养基来分离细菌。气管液、肺脏、关节液和脑组织是分离细菌的靶组织。可疑菌落纯化后，使用标准血清鉴定血清型；可以使用多重 PCR 扩增靶基因，根据扩增产物种类和图谱判定是何种血清型。病例复制时，常可通过腹腔注射分离菌株。

五、致病机制

建立在细菌全基因组序列公开基础上，主要聚焦在发现细菌新毒力因子和引起炎症的各种信号通路，是基础研究热点。

六、疫苗研发与应用

我国已经研发多种多价灭活疫苗和、副猪格拉瑟病-猪链球菌病二联灭活苗和二价亚单位疫苗、副猪格拉瑟病-猪圆环病毒 2 型灭活疫苗等。为避免母源抗体干扰，建议仔猪在 35 日龄以后免疫副猪格拉瑟菌疫苗。如果是联苗，就要根据猪场疾病特点，制定兼顾两个病的免疫程序。

主要参考文献

（略）

非洲猪瘟净化操作失败的原因

樊福好
（农业农村部种猪质量监督检验测试中心，广东广州 510630）

非洲猪瘟于 2018 年进入中国，以秋风扫落叶之势横扫中国大陆，养猪从业者措施不及，无所适从。面对非洲猪瘟，从管理者到专家体系手忙脚乱了一段很长时间。

中华民族是一个充满智慧的民族，短短半年过去了，非洲猪瘟的控制方法和手段如雨后春笋般涌现，如高温制粒、唾液检测、单元格饲养管理等等。尤其是在养猪业中，净化非洲猪瘟已经在行业内达成共识，行业一致只有净化了非洲猪瘟，中国养猪业才有竞争的空间和动力。但是，净化工作仍然不尽人意。主要原因如下：

1.对当前非洲猪瘟感染新规律认识不足：非洲猪瘟进入中国大陆先后经历了最急性型、急性型、亚急性型、慢性型和无症状感染型等五种类型。当前主要以慢性型和无症状感染型为主，机体出现抗体和核酸双阳性的比例较高，且持续时间较长，间歇性排毒现象多见。仅仅依靠临床症状去判别是否出现非洲猪瘟疫情的方法已经完全失效了，高频度的抗体检测和核酸检测必须列入生产管理的必备程序。

2. 必须更新检测标准。非洲猪瘟最急性型、急性型和亚急性型在进行核酸检测时，CT 值往往较低，以 35 为界限进行判别，漏检率不算太高。但是慢性型和无症状感染型的非洲猪瘟在进行核酸检测时，CT 值往往超过 35，甚至超过 40 的也比比皆是。

若持续执行过时的行业标准：CT 值≤35 为阳性，CT 值≥37 为阴性，则贻害无穷。

必须坚持“起跳即阳”的判断方法，防患于未然。

3. 坚持有效消毒。2018 年、2019 年研究机构根据红细胞吸附试验推荐的几款消毒药，绝大多数是对非洲猪瘟病毒是不具备杀灭作用的，误导了中国养猪业很长时间，无效消毒的情况在猪场广泛存在。根据笔者所在实验室的测试，戊二醛、葵甲溴胺、烧碱和碘制剂在厂家推荐浓度下使用基本无效。

建议使用过硫酸氢钾、过氧乙酸和氯制剂以及其他核酸祛除剂进行非洲猪瘟的消毒工作。

4. 进行猪舍改造。到目前为止，仍然存在较多的猪场坚持使用通槽饮水和饲喂，一旦感染往往是大面积的，若进行补救则为时已晚。必须实行独立饮水和饲喂，实施单元格化生产和管理，减少人猪接触，强调生物隔离（Biosecurity），设置防虫网和防鼠设备。

5. 强调营养在非洲猪瘟防控中的重要作用。在中国猪兽医体系中，漠视营养对非洲猪瘟防控作用的专家较多，这种认识极大影响了非洲猪瘟防控和净化的进程。

众多的临床、生产数据和研究已经证实蛋白（氨基酸）营养的有效提升可以提高猪群对非洲猪瘟的免疫力，仅仅推广低蛋白日粮而不强调氨基酸平衡会对中国养猪业造成次生伤害。

主要参考文献

[1] 李亮 樊福好 《非洲猪瘟防控关键词》 广东科技出版社 2022 年 3 月第一版

[2] Penrith, M.L.; Vosloo, W.; Jori, F.; Bastos, A.D. African swine fever virus eradication in Africa. Virus Res. 2013, 173, 228–246.

[3] Boklund, A.; Cay, B.; Depner, K.; Földi, Z.; Guberti, V.; Masiulis, M.; Miteva, A.; More, S.; Olsevskis, E.; Šatrán, P.; et al.Epidemiological Analyses of African Swine Fever in the European Union (November 2017 until November 2018). EFSA J. 2018,16, e05494.

[4] Dixon, L.K.; Islam, M.; Nash, R.; Reis, A.L. African Swine Fever Virus Evasion of Host Defences. Virus Res. 2019, 266, 25–33.Life 2022, 12, 1255 30 of 41

[5] Sanchez-Vizcaino, J.M.; Mur, L.; Gomez-Villamandos, J.C.; Carrasco, L. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. J. Comp. Pathol. 2015, 152, 9–21.

非洲猪瘟病毒基因缺失毒株感染场清除与净化要点

赖志
（八方同创，上海 201619）

非洲猪瘟弱毒株或基因缺失毒株感染猪群具有无症状感染、间歇性排毒、潜伏期长等特点，临床上不容易被监测到。一旦感染猪群出现临床症状，病毒已大面积扩散，难以做到精准清除和净化，多数阳性猪场只能清群，造成巨大损失。针对非洲猪瘟弱毒株或基因缺失毒株的流行变化，我们总结以下几点经验，供同行参考。

认清非洲猪瘟病毒基因缺失毒株的临床特征，有助于一线人员早发现。非洲猪瘟基因缺失毒株感染猪群后既有无症状感染特点，大部分猪群也会表现临床症状，体现为厌食或采食时间延长、关节疼痛、皮肤坏死，呼吸困难、死亡等。怀孕母猪还表现流产，产死胎及木乃伊胎；保育猪表现突然倒地死亡、皮肤发红或苍白、呼吸困难；育肥猪表现为呼吸困难、突然死亡、皮肤发红或苍白等。解剖常见心包积液、纤维素渗出、绒毛心、胸肺黏连、肺脏充血等。

了解非洲猪瘟病毒基因缺失毒株排毒方式、潜伏期、抗体消长规律特点，可以更好提升实验室的检测方案。基因缺失毒株的潜伏期一般在 10 天以上，甚至有的 1 个月以上。而且间歇性排毒明显，实验室经常出现检测结果“可疑”的样品，重采复测为“阴性”检测结果，误判为“假阳性”，错失清除病原和截断传播途径时机。无症状感染猪群在强应激下排毒，造成二次感染风险。基因缺失毒株具有排毒量低特点，CT 值常在 35 以上。感染后 21 天以后才能检测到抗体，PP 值 40%~100%之间。

基因缺失毒株感染场清除和净化成功的关键点，第一，建立由一线技术员和检测员组成的双“吹哨人”体系；第二，日常严格网格化管理；第三，确诊后全场执行“停、静、消、杀、狠”方案有序开展排查和清除工作，切断场内病毒水平传播，结合风险猪群的抗原、抗体检测结果，淘汰阳性及可疑猪群。第四，猪群平稳后一个月，对风险区域母猪群进行两次抗原、抗体检测（间隔 1 个月），均为阴性，才可复产。

我们对规模为 2018 头母猪的基因缺失毒株感染场进行精准清除和净化，历时 4 个月，清除中高风险母猪群 291 头以及亚健康母猪 56 头，对剩余母猪群进抗原、抗体检测，结果均为阴性；同时开展对环境、物资、人员、车辆等进行抗原检测，结果均为阴性。复产至今，该猪场非洲猪瘟阴性正常生产。案例表明，认清非洲基因缺失毒的特点，做好生物安全防控、网格化管理等要点，是可以实现猪群的清除和净化。

猪流行性腹泻的流行特征与防控策略

肖少波
（华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070）

自 2010 年底猪流行性腹泻病毒（PEDV）变异毒株在我国流行以来，PEDV 已成为引起新生仔猪病毒性腹泻的最重要病原，给养猪业造成了巨大的经济损失。通过对近年来 PEDV 病原学监测数据以及基因组或 S 基因序列的分析，发现 PEDV 流行毒株日趋复杂，目前在我国流行的 PEDV 以 G2 群（G2a、G2b）变异毒株为主，而且从 G2a 亚型中又逐渐衍生了一个新的分支（暂定为 G2c）。同时，过去主要在欧洲流行的 PEDV S-INDEL 毒株近年来在我国出现，而且有逐渐上升的趋势。值得关注的是，2022 年底以来，全国各地多个猪场出现怀孕母猪发生腹泻后流产，流产可发生在怀孕后不同时期（前、中、后），其中前中期怀孕母猪的流产比例较高。有学者怀疑在我国新出现的 S-INDEL 毒株可能与此次怀孕母猪发生腹泻后流产有关，但通过一系列的病原学调查，尚不能确定新出现的 S-INDEL 毒株就是引起母猪腹泻后流产的主要因素。PEDV 是否与母猪流产有关联还需进一步研究。

作为一种主要导致新生仔猪腹泻、脱水和死亡的肠道冠状病毒，临床上 PED 的防控非常困难。PED 防控困难是由多种因素决定的，包括通过免疫母猪预防仔猪的被动免疫方式难以提供完全的免疫保护；病毒的变异导致毒力、传染性增强，不同亚型毒株之间仅有部分交叉免疫保护；临床上 PEDV 与轮状病毒、猪 Delta 冠状病毒等病原混合感染严重。随着对 PEDV 研究的深入，还发现 PEDV 传播途径多样、体外存活时间长、可通过多种途径逃逸宿主的天然免疫与获得性免疫。更重要的是，相对于猪传染性胃肠炎病毒、猪 Delta 冠状病毒等其他肠道冠状病毒，PEDV 本身的免疫原性较差。

如何有效防控 PED?首先要做好全面的生物安全、开展定期的病原检测，其次是选择有针对性的疫苗、制定合理的免疫程序。一旦发生疫情，必须果断处置、快速扑灭，减少经济损失。鉴于 PEDV 的持续变异以及不同亚型毒株间交叉保护力有限，开发涵盖多种不同亚型流行毒株的疫苗、以及可针对不同亚型毒株的广谱性疫苗，有望提高临床免疫保护效力；同时，探索口服免疫等新的免疫途径，将有助于提升 PED 的防控效果。

主要参考文献

略

小分子、大作为——非洲猪瘟病毒毒力基因 I73R 功能研究

陈鸿军

（中国农业科学院上海兽医研究所，上海 200241）

非洲猪瘟病毒（ASFV）是一种大型双链 DNA 病毒，对家猪的致死性可达 100%，对全球生猪产业造成巨大的经济损失。ASFV 主要感染宿主单核-巨噬细胞系统，调控细胞免疫功能，实现免疫逃逸。ASFV 至少编码 150 种病毒蛋白，超过 50%蛋白功能未知。本研究中，我们通过 ASFV 动态转录组学分析，发现 ASFV 感染早期高表达的未知功能基因 *I73R*。晶体结构显示，I73R 含有 Zalpha 结构域，具有核酸结合活性，在病毒感染早期启动转录表达，定位于细胞核，广谱抑制宿主天然免疫应答，劫持并阻止细胞高 GC 含量 mRNA 出核，抑制宿主抗病毒蛋白合成。动物实验结果表明，缺失 I73R 的 ASFV 毒力显著降低，对免疫动物足够安全，并且能够抵抗致死剂量亲本强毒的攻毒，提供完全的免疫保护作用。由此可见，*I73R* 是 ASFV 编码的一个非常重要的毒力相关基因。

磷酸化依赖的 CcpS 调控猪链球菌 2 型荚膜合成及毒力的机制

范红结
（南京农业大学动物医学院，江苏南京 210095）

猪链球菌2型（*Streptococcus suis* serotype 2, SS2）是一种重要的人畜共患病原，可引起人链球菌中毒性休克样综合征（Streptococcal toxic shock-like syndrome, STSLS）和猪的败血症、脑膜脑炎等。真核样丝氨酸/苏氨酸激酶及磷酸酶（eukaryotic-like serine/threonine kinase and phosphatase, eSTK/eSTP）系统是细菌重要的磷酸化修饰调控类型，其中eSTK能通过修饰转录因子、功能蛋白等多种方式实现磷酸化调控，且特定磷酸酶能去除磷酸基团实现可逆的精确调节。eSTK/eSTP系统能够影响细菌的诸多重要细胞生物学进程，如初生与次生代谢、孢子形成与萌发、毒力与抗生素耐药等。荚膜多糖（capsular polysaccharide, CPS）是病原菌的重要毒力因子，有助于细菌应对剧烈的环境变化与宿主免疫系统，如补体沉积和调理吞噬等。但是，细菌如何感应胞外刺激并调节CPS的生物合成，从而调控细菌毒力的机制尚不清楚。前期研究中，我们发现SS2 Stk1与该菌突破血脑屏障的能力有关，能够影响细菌的毒力。但是，SS2 Stk1磷酸化修饰调控细菌毒力的机制未见报道。

本研究通过比较磷酸化组学结合体内外试验方法鉴定到 SS2 Stk1 特异性的底物蛋白 CcpS，磷酸化发生在特异的 Thr4 与 Thr7 氨基酸残基。研究发现 Stk1/CcpS 磷酸化信号级联调控 SS2 CPS 的生物合成，介导细菌抗巨噬细胞吞噬能力与细菌毒力。进一步研究揭示了磷酸化依赖的 CcpS 能够调控荚膜合成酶 CpsB 的磷酸酶活性，而 CpsB 能够直接调控 CpsD 的磷酸化水平，并最终调控 SS2 荚膜生物合成的机制。研究同时发现 Stk1-CcpS 信号轴在 SS2 的生命过程中活跃，广泛参与 SS2 抗应激反应。此外，本研究表明，CcpS 的磷酸化修饰在几种重要的革兰氏阳性病原菌（包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌等）中普遍存在，其调控模式亦保守。该研究揭示了 SS2 Stk1 磷酸化修饰调控细菌 CPS 生物合成及毒力的机制，为细菌应对周围环境变化或者不同的宿主小生境时，操纵 Wzx-Wzy 途径的能力提供了新的见解。有助于进一步阐明 SS2 的致病机制，并为相应的药物靶标发掘提供指导。鉴于 CcpS 蛋白在厚壁菌门中较保守，本研究提出的 CcpS 的功能模式，对厚壁菌门中几种常见的病原菌毒力调控机制研究有重要参考价值。

非洲猪瘟病毒抑制宿主蛋白合成的分子机制

彭贵青
（华中农业大学，湖北武汉 430000）

病毒作为一类严格的胞内寄生物，完全依赖于宿主的蛋白翻译机制来实现有效的复制，从而完成其生命周期并产生新的子代病毒。同时宿主细胞会合成抗病毒蛋白来限制病毒感染，所以病毒需要操纵细胞 mRNA 的翻译，破坏宿主蛋白的合成，从而释放细胞资源，以确保和优化自身的复制和传播。非洲猪瘟病毒（ASFV）能否抑制宿主蛋白合成，哪些病毒蛋白能调控宿主翻译和优化病毒基因表达，这些科学问题尚不清楚。我们研究发现，ASFV 编码的 E66L 和 I73R 蛋白能显著抑制宿主蛋白合成。

蛋白质合成受到体内多种因素的调控，其中包括基因表达、蛋白水解、转录后修饰等复杂的生物学过程。翻译起始因子（Translation initiation factor, eIF）是调控蛋白质合成的关键蛋白质，eIF2α 的磷酸化会引起全局翻译的抑制，反之会促进局限性翻译。ASFV pDP71L 通过招募 PP1 对 eIF2α 进行去磷酸化从而抑制宿主细胞的蛋白合成。我们发现，ASFV 跨膜蛋白 E66L 具有显著抑制宿主蛋白合成的作用，并确定 E66L 是通过跨膜区（13-34 aa）调控 PKR/eIF2α 通路来抑制宿主蛋白的翻译。I73R 基因在 ASFV 感染早期定位在细胞核中，发挥核酸结合特性，阻止宿主高 GC 成分的 mRNA 出核，从而广泛抑制宿主抗病毒蛋白的合成。

单独缺失 I73R 基因的重组毒株（ASFV-GZΔI73R）和单独缺失 E66L 基因的毒株（ASFV- GZΔE66L）感染肺泡巨噬细胞（Pulmonary Alveolar Macrophage, PAM）会显著回复宿主蛋白的表达。动物实验结果表明，ASFV-GZΔI73R 在高剂量下接种，其毒力完全丧失，不会出现病毒血症。在感染 ASFV-GZΔI73R 猪的口腔和鼻拭子中只能检测出少量的病毒，不会引起水平传播。组织学检查发现感染 ASFV-GZΔI73R 猪的扁桃体、胸腺、肾、脾、肺、肝、腹股沟淋巴结或肠系膜淋巴结都不会出现病变，所以 ASFV-GZΔI73R 对猪的安全性好。更重要的是，利用 ASFV-GZΔI73R 免疫的猪体内会产生高水平的 IgG 和 IgM 抗体，显著诱导 IL-6 和 IFN-β 的表达，能抵抗 ASFV-GZ 强毒攻击，获得完全保护。我们的研究为深入理解非洲猪瘟病毒致病性和免疫逃逸机制提供了新的理论基础，为非洲猪瘟缺失疫苗的研发提供了新的思路。

主要参考文献

[1] Liu Y, Shen Z, Wang H, Peng G, Chen H, et al. African swine fever virus I73R is a critical virulence-related gene: A potential target for attenuation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2023 Apr 11;120(15).

[2] Shen Z, Hu R, Chen H, Peng G, et al. A novel function of African Swine Fever Virus pE66L in inhibition of host translation by the PKR/eIF2α pathway. J Virol. 2020 Dec 16;95(5)

[3] Zhang, F, Dixon, L. K, et al. The African Swine Fever Virus DP71L Protein Recruits the Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit To Dephosphorylate eIF2αand Inhibits CHOP Induction but Is Dispensable for These Activities during Virus Infection. J Virol. 84, 10681–10689 (2010).

[4] Schneider RJ, Mohr I, et al. Translation initiation and viral tricks. Trends Biochem Sci. 2003 Mar;28(3):130-6.

非洲猪瘟病毒抑制免疫机制研究与应用

郑海学

（动物疫病防控全国重点实验室，中国农业科学院兰州兽医研究所，兰州大学动物医学与生物安全学院，甘肃兰州 730046）

非洲猪瘟是威胁世界养猪业的“头号杀手”，其病原为非洲猪瘟病毒（African swine fever virus, ASFV）[1]。ASFV 感染家猪和野猪，引起家高热、广泛性出血，最终导致感染猪的死亡，死亡率可达 100% [2]。非洲猪瘟自 2018 年传入我国后，迅速在全国传播开来，对我国养猪业造成了毁灭性打击，直接经济损失超上千亿元，重创我国养猪业[3]。由于 ASFV 基因组庞大、结构复杂、多数基因功能不清，免疫抑制与免疫逃逸严重，诱导和激发免疫系统的抗原知之甚少，导致至今仍无安全有效的疫苗能够用于非洲猪瘟的防控[4]。因此，急需开展 ASFV 感染致病及免疫机理研究，为非洲猪瘟防控产品研发提供理论支撑。

针对非洲猪瘟病原感染、免疫和致病机理尚不清，疫苗研究的理论和发展受限等问题，本团队系统筛选鉴定了 ASFV 免疫抑制及免疫激活相关蛋白，并开展了 ASFV 抑制宿主天然免疫应答的分子机制研究。鉴定了 ASFV I267L 靶向 RIPLET 抑制 RIG-I 样通路活化，降低干扰素表达的机制。揭示了 ASFV E120R、MGF-505-7R 等病毒蛋白靶向抑制 cGAS-STING 通路活化，进而抑制 I 型干扰素表达促进病毒复制的分子机制。解析了 ASFV 多家族基因蛋白抑制 JAK-STAT 通路活化的多种拮抗策略。此外，阐明了 ASFV 调控宿主能量代谢和氨基酸代谢、调控乳酸表达抑制宿主抗病毒反应的分子机制。并揭示了 ASFV E184L 蛋白靶向与天然免疫关键节点分子 STING 相互作用，抑制其二聚化，阻断宿主抗病毒天然免疫应答的分子机制。筛选评价了能够促进特异性淋巴细胞增殖的 ASFV 蛋白及多肽。上述相关研究为非洲猪瘟基因缺失疫苗和亚单位疫苗研制提供了重要靶点和思路。因此，基于上述相关免疫抑制机制及相关靶点，进一步开展了非洲猪瘟疫苗的设计与创制研究，创制了非洲猪瘟亚单位疫苗，为非洲猪瘟的防控提供了重要的理论和技术支撑。

主要参考文献

[1] Dixon, L., H. Sun, and H. Roberts, *African swine fever.* Antiviral research, 2019. **165**: p. 34-41.

[2] Blome, S., C. Gabriel, and M. Beer, *Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar.* Virus research, 2013. **173**(1): p. 122-130.

[3] 王涛, et al., *非洲猪瘟疫苗的研发策略与应用前景：可行性和可能性.* 中国农业科学, 2023. **56**(11): p. 2212-2222.

[4] Galindo, I. and C. Alonso, *African swine fever virus: a review.* Viruses, 2017. **9**(5): p. 103.

非洲猪瘟病毒体内感染细胞嗜性及其快速复制的分子机制

朱紫祥

（动物疫病防控全国重点实验室，中国农业科学院兰州兽医研究所，兰州大学动物医学与生物安全学院，甘肃兰州 730046）

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus, ASFV）感染猪而引起的一种急性、接触性、广泛出血性、烈性传染病，发病后死亡率可高达 100%。被世界动物卫生组织列为法定报告的动物疫病，也是我国重点防范的一类动物疫病[1]。2018 年非洲猪瘟传入我国，对我国养猪业造成了毁灭性的打击[2]。当前关于 ASFV 感染与致病机制研究的认知仍然有限，且主要集中于 ASFV 如何逃逸或抑制天然免疫信号通路，而从宿主角度研究 ASFV 感染入侵的机制较少。这也是限制非洲猪瘟疫苗及抗病毒药物研发的一个重要原因。ASFV 感染能够诱导多种细胞反应，诸如：炎症反应、细胞凋亡反应等。但这些研究大多数是基于 ASFV 体外感染巨噬细胞开展，关于 ASFV 感染后体内免疫细胞的变化及其应答特征并不清楚，尤其是 ASFV 感染后不同阶段免疫细胞的动态变化规律及特征均有待于深入研究[3]。

高通量单细胞测序已经被广泛应用于动物体内各类细胞的动态规律变化及应答规律研究[4]。尤其是 10×Genomics 单细胞测序技术的发明和应用，可以更好的研究单细胞水平的转录表达谱，也可以研究不同应激条件下细胞-细胞间信号转导、细胞增值状态等。此外，对病毒 RNA 进行定量分析，单细胞测序可以更好的比较病毒感染后感染细胞与非感染细胞的表达谱差异，绘制病毒感染后的宿主不同细胞的动态应答规律。本研究通过单细胞测序方法对 ASFV 感染后不同时期的猪的脾脏进行转录谱分析，测定了细胞应答规律，开展了单细胞差异基因表达模式聚类，并利用流式细胞术及 qPCR 等方法进行了验证。研究结果表明非洲猪瘟病毒感染脾脏的靶细胞为单核细胞和巨噬细胞，其不感染脾脏中的淋巴细胞，且感染的单核细胞为非经典的未成熟的单核细胞。ASFV 感染导致大量巨噬细胞死亡，但是其感染未成熟的单核细胞能够抑制这些细胞发生凋亡，进而保证自身持续高效复制。ASFV 通过抑制感染细胞中的干扰素表达、阻断抗原递呈过程、抑制抗病毒蛋白表达等方式抑制宿主抗病毒反应，促进自身复制。本研究初步阐明了 ASFV 体内感染的细胞嗜性及其快速复制的机制，为非洲猪瘟的防控和抗病毒策略研究提供了重要理论依据。

主要参考文献

[1] 张帅, et al., *非洲猪瘟病毒研究进展.* 中国兽医学报, 2022. **42**(12): p. 2569-2577.

[2] 王宏燕, 周晨阳, and 董娜, *辽宁沈阳发生我国首例非洲猪瘟疫情.* 现代畜牧兽医, 2018(10): p. 40-43.

[3] Blome, S., C. Gabriel, and M. Beer, *Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar.* Virus research, 2013. **173**(1): p. 122-130.

[4] Madissoon, E., et al., *scRNA-seq assessment of the human lung, spleen, and esophagus tissue stability after cold preservation.* Genome biology, 2020. **21**(1): p. 1-16.

非洲猪瘟病毒实验室检测注意事项

张桂红
（华南农业大学，广东广州 510642）

非洲猪瘟已在我国定植，且流行毒株具有一定的多样性。按照农业农村部颁布的 ASFV 检测方法包括：病原学检测，如聚合酶链式反应（PCR）、实时荧光 PCR、核酸等温 PCR(Lamp）或试纸条及血清学检测，如竞争酶联免疫吸附试验（ELISA）或间接 ELISA 方法。

非洲猪瘟已在我国流行多年，各省市县及企业均具备了一定的检测能力，在检测中建议注意一下事项：

1、检测实验室要懂得国家的相关法律、法规和标准：如中华人民共和国动物防疫法、动物病原微生物实验活动生物安全要求细则。省级、县级兽医实验室及企业自建实验室均要符合相关要求，如广西自治区颁发的《非洲猪瘟检测实验室条件要求（2022 年版）》。对实验室设施设备及人员及管理均做出了明确的要求。

2、要了解非洲猪瘟实验室的检测技术规范，认真学习国家的相关检测质量和安全指南，防止实验室污染！

3、科学采样：可采集口鼻拭子、尾根血、唾液、前腔静脉血、腹股沟淋巴结穿刺样、各种组织样品、环境样品等等。还可按照需要采集前腔静脉血或尾静脉血，分离血清后进行非洲猪瘟病毒抗体检测。采样要防止交叉污染。

4、防止检测实验室环境核酸污染

工作结束后，必须立即对工作区进行清洁。可使用含氯等消毒剂彻底擦拭（桌面，地面，冰箱、生物安全柜、离心机、移液器表面）。试验白服可加如 84 消毒液等消毒剂清洗。精密仪器内部，如高速离心机转子使用核酸清除剂。移液器联系厂家协助拆卸处理。紫外线彻底照射。由于紫外照射的距离和能量对去污染的效果非常关键，因此可使用可移动紫外灯（254nm 波长），在工作完成后调至实验台上 60～90cm 距离内照射。

实验室检测要严格按照实验室质量规程管理，严防气溶胶的产生；要严格规范实验操作，严防样本之间的交叉污染；要特别注意移液器和吸头引起的交叉污染，必须使用带滤芯吸头；要经常使用 DNA 清除剂！

5、规范各检测仪器设备的管理：不同厂家、不同年份的 PCR 仪对核酸扩增结果有很大影响，注意仪器的选择，做好仪器日常护理及维修！各实验室的荧光 PCR 仪已经使用了 3 年左右，需要进行相关的维护、保养及校验！

6、建议设置内参及标准物质。

总之，非洲猪瘟病毒实验室检测一定要高度重视检测的准确性，防止检测污染，以免给企业带来不必要的物质和精神损失。

主要参考文献

非洲猪瘟病毒感染诱导炎症反应与负调控机制

翁长江

（中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，黑龙江哈尔滨 150069）

病毒感染宿主过程中，宿主的模式识别受体识别病毒组分诱导炎症反应以抵抗病毒的感染，同时，病毒的一些蛋白可以负调控宿主的炎症反应，确保病毒顺利复制。非洲猪瘟病毒（ASFV）感染能否诱导炎症反应，哪些病毒蛋白能调控炎症反应，这些科学问题仍然不清楚。我们研究发现，ASFV 感染猪肺泡巨噬细胞（PAMs）能诱导低水平炎症反应。通过高通量的无偏见筛选，我们发现 ASFV 编码的 MGF505-7R、H240R 和 S273R 蛋白能抑制炎症反应。

细胞分泌炎性细胞因子受到三个信号的调控，一是 NF-κB 信号通路的激活，诱导炎性因子的转录，一是炎症小体的活化，诱导炎性因子的成熟，另一个是 GSDMD 的切割，诱导炎性因子的分泌。我们发现，ASFV MGF505-7R 和 H240R 既能够与 NF-κB 信号通路中的重要信号分子 NEMO 相互作用抑制 IL-1β 前体的转录，又能够与 NLRP3 相互作用抑制 NLRP3 炎症小体的活化，最终抑制 IL-1β 的成熟；S273R 蛋白则通过切割 GSDMD 蛋白抑制炎性因子的释放，促进病毒的复制。

单独缺失 MGF505-7R 基因的重组毒株（ASFV-ΔMGF505-7R）和单独缺失 H240R 基因的毒株（ASFV- ΔH240R）感染 PAMs 和 SPF 猪均诱导大量炎性细胞因子的产生。动物实验结果表明，10^3 HAD_{50} MGF505-7R 感染 SPF 猪的存活率为 70%；10^3 HAD_{50} ASFV-ΔH240R 感染 SPF 猪全部存活，10^5 HAD_{50} ASFV-ΔH240R 感染组仅一头猪（1/5）死亡。该研究表明，MGF505-7R 和 H240R 基因是 ASFV 的关键毒力基因，其通过抑制炎症反应影响 ASFV 致病力。联合缺失 MGF505-7R 和 H240R 基因的 ASFV（ASFV-ΔMGF505-7R-ΔH240R-）毒力完全丧失，并失去了水平传播的能力，利用该病毒免疫的猪能抵抗 ASFV 强毒攻击，并获得完全保护。我们的研究初步揭示了 ASFV 通过抑制病毒感染激活的炎症反应以逃逸宿主免疫的“伎俩”，为 ASFV 致弱机制探索和疫苗的研发提供了新的理论依据。

主要参考文献

[1] Huang L, Liu H, Ye G, Weng C, et al. Deletion of African Swine Fever Virus (ASFV) H240R Gene Attenuates the Virulence of ASFV by Enhancing NLRP3-Mediated Inflammatory Responses. J Virol. 2023 Feb 28;97(2): e0122722.

[2] Ye G, Liu H, Weng C, Huang L, et al. African Swine Fever Virus H240R Protein Inhibits the Production of Type I Interferon through Disrupting the Oligomerization of STING. J Virol. 2023 May 18: e0057723.

[3] Zhao G, Li T, Liu X, Weng C, et al. African swine fever virus cysteine protease pS273R inhibits pyroptosis by noncanonically cleaving gasdermin D. J Biol Chem. 2022 Jan; 298(1):101480.

[4] Li J, Song J, Kang L, Huang L, Weng C, et al. pMGF505-7R determines pathogenicity of African swine fever virus infection by inhibiting IL-1β and type I IFN production. PLoS Pathog. 2021 Jul 26;17(7):e1009733.

[5] Zhou P, Li LF, Zhang K, Qiu HJ, et al., Deletion of the H240R Gene of African Swine Fever Virus Decreases Infectious Progeny Virus Production Due to Aberrant Virion Morphogenesis and Enhances Inflammatory Cytokine Expression in Porcine Macrophages. J Virol. 2022 Feb 9;96(3):e0166721.

猪圆环病毒遗传变异与防控策略

姜 平
（南京农业大学动物医学院，江苏南京 210095）

猪圆环病毒 2 型（PCV2）感染可引起断奶仔猪多系统衰竭综合症（PMWS）、猪皮炎肾病综合症（PDNS）、猪呼吸道病、肠炎、母猪繁殖障碍等多种临床疾病，并可导致猪群产生免疫抑制，引起其它病原继发感染。PMWS 于 1997 年在加拿大年暴发流行，随后遍及世界各养猪国家和地区，造成严重经济损失。我国于 2001 年首次报道，并在我国猪群中广泛流行，严重影响养猪生产水平。2010 年研制成功 PCV2 疫苗，该病得到有效控制。

1. 猪圆环病毒遗传变异：猪圆环病毒（PCV）分为 4 个血清型，在自然界广泛存在，其中 PCV2 研究最多，其基因组为单股负链环状 DNA，全长约 1.7kb，病毒核衣壳蛋白（Cap）抗原性较强，可以诱导猪体产生免疫保护作用。PCV2 存在基因漂移现象，目前已经发现存在 PCV2a、PCV2b、PCV2d、PCV2e 和 PCV2c 等基因亚型毒株。我国 PCV2 有多种基因亚型，21 世纪初期临床感染猪中以 PCV2a 为主导，之后 PCV2b 占据主导地位。目前，我国猪群中 PCV2 主要属于 PCV2b 和 PCV2d。PCV2b 毒力相对较强，PCV2a 和 PCV2b 混合感染致病性增强。PCV2d 随着疫苗的使用逐步增加，但其抗原性没有明显变化。

2. 致病与免疫机制：PCV2主要侵害机体的免疫系统，单核细胞和巨嗜细胞是PCV2的靶细胞，可以造成机体的免疫抑制。PCV3多存在于PDNS、繁殖障碍、心脏和多系统炎症病例。致病性研究很少。PCV2感染仔猪后14~28d，可诱导产生PCV2特异抗体。田间调查结果显示，仔猪母源抗体在哺乳期及保育期会逐渐下降，7~12周龄抗体又会明显上升，并持续至28周，但PCV2抗体不能完全抵抗感染。PCV2感染可诱导产生细胞免疫应答，亚临床感染猪的细胞毒性（$CD4^{-}CD8^{+}$）和γδ（$CD4^{-}CD8^{-}$）T淋巴细胞数量升高。

3. 疫病诊断技术：由于PCV2广泛存在，PCVD影响因素较多，本病诊断必须依靠临床症状、病理变化和病毒检测三个方面。实验室诊断需要根据临床症状采集病猪相应内脏组织，包括淋巴结、肺脏、脾脏、肠道组织等，用于检测PCV2抗原或病毒核酸。免疫组织化学方法和免疫荧光法检测肺或淋巴结组织中PCV2抗原，敏感性高，特异性强，结果可靠。荧光定量PCR方法比较快速、简便、特异，但操作时必须注意实验室污染。

3. 综合防控与免疫技术：本病预防和控制主要依靠免疫接种和综合性措施。综合性措施主要有：第一，改进完善猪场传统的饲养管理，采用分段同步生产、两点式或三点式饲养方式，同时确保饲料具有良好的品质；第二，有效的环境卫生和消毒措施；第三，控制其它病原体共同感染或继发感染。第四，发病猪及时隔离饲养或淘汰，降低死亡率。

疫苗接种是本病预防控制关键措施之一。国外主要有 PCV2、PCV1-2 灭活疫苗及杆状病毒表达的重组 Cap 蛋白亚单位疫苗。我国商品疫苗主要有 PCV2 灭活疫苗、Cap 蛋白亚单位疫苗（重组杆状病毒、大肠杆菌系统表达）、合成肽疫苗及 PCV2 与猪肺炎支原体、PCV2 与副猪嗜血杆菌二联灭活疫苗等。疫苗质量影响因素主要有：疫苗种毒和疫苗抗原免疫特性、疫苗抗原制造工艺、佐剂类型、疫苗生产质量控制方法及标准。目前，PCV2 商品疫苗对不同流行毒株均有较好免疫保护效果。2-3 周龄仔猪免疫 1-2 次，每次间隔 3 周，可以有效减低发病率和死淘率，提高猪群生产性能。母猪妊娠中后期接种疫苗，能提高母猪免疫力和降低母猪分娩期病毒血症，有助于预防子代出现猪圆环病毒病和 PCV2 相关呼吸道疾病，提高仔猪存活数、仔猪出生体重和每窝断奶仔猪数。高水平的母源抗体可能会干扰仔猪免疫接种效果。疫苗免疫可降低 PCV2 病毒血症，但尚不能抵抗野毒攻击和病毒清除。疫苗免疫抗体和野毒抗体尚不能有效鉴别。

营养和饲料成分对猪肉品质的影响-关于饲料中氨基酸浓度控制和饲料用大米的给与

胜俣昌也
（麻布大学兽医学院）

报告人一直致力于研究“通过营养控制等技术生产质量好的猪肉（脂肪交杂丰富）”，以及“为提高饲料自给率，饲料用大米给与育肥猪的基础性研究”。这次的报告，关于营养控制介绍“通过低赖氨酸饲料给与促进育肥猪的筋肉内脂肪累积”的关于饲料大米给与介绍“饲料用大米给与对育肥猪脂肪酸组成的影响”。

一般认为脂肪交杂的猪肉嫩而多汁，肉制好。首先，研究中发现给与赖氨酸浓度比要求量低的“低赖氨酸饲料”后，筋肉里柠檬酸合成酶活性提高，柠檬酸合成酶的活性是组织（细胞）的氧化能的指标。进一步查明筋肉的氧化肌纤维的比例是可以通过给与低赖氨酸饲料后来提高。，因为氧化能高的筋肉脂肪积累也较高，所以设想给与低赖氨酸饲料可以提高筋肉内脂肪积蓄，实验结果如设想的，将低赖氨酸饲料给予育肥猪筋肉内脂肪含量约增加了 2 倍。而且，我们发现筋肉内脂肪含量根据饲料里的赖氨酸浓度而变化，这一发现可以应用到养殖生产中。

饲料用大米给与对育肥猪脂肪酸组成的影响玉米等精饲料几乎 100%依靠进口。在这样背景下，为了提高饲料自给率推进饲料大米的利用。我们一直研究饲料用大米给与育肥猪的饲养成绩、对脂肪状态的影响。饲料用大米的营养价值同玉米相比毫不逊色，及时饲料大米全部替代玉米也对饲养成绩没有影响。关于在脂肪性状，饲料用大米给与会提高米糠油酸的比例，降低亚油酸。玉米的亚油酸含量较高，饲料用大米的米糠油酸含量较高。除了饲料用大米以外的自给饲料原料也可以考虑甘薯。即使甘薯和饲料用大米的并用，结果脂肪酸组成显示同样变化，另外，脂肪的溶解点也会高提高。这意味着饲料大米和甘薯并用会提供猪肉的口感。

猪营养与经济效益

姜海龙
（吉林农业大学，吉林长春 130118）

本报告以断奶前后仔猪、生长猪和育肥猪的体组织发育规律为主线，辅以不同组织器官对生命力的影响程度、优先发育的原因、不同组织对养分利用的规律等内容，系统论述不同营养水平对生长发育的影响程度，揭示不同猪只生理阶段、营养水平、市场价格等因素间的相互作用规律，为提高养猪经济效益提供科学依据。报告的主要内容如下：

一、猪体组织生长发育规律

用数据说明骨骼、肌肉、皮肤、脂肪的生长发育规律；内脏占机体的比例等。以不同国家制定的生猪营养需要为主要例子，阐明不同生理阶段的猪只体组织发育的重点不一致，因为体组织含有的养分不一致，也对养分的需求产生不同的需求。

二、不同生理阶段猪对养分利用规律

以仔猪营养性腹泻为例子，阐述不同生理阶段猪只对植物性和动物源性蛋白质饲料、能量饲料的利用差异性，论证不同生理阶段的猪的投入/产出不一致；以不同饲料原料价格的影响因素为线索，证明不同生理阶段的猪需要不同价格的全价配合饲料，继续计算单位体重猪的生产成本。

三、不同生理阶段评价指标

根据不同体组织发育的规律及生命的本质，以肠道营养为突破口和生产经验，阐述不同体组织对于生命力的影响，早起生长状态对一生生长状态的影响，继续阐述不同生理阶段的猪只需要建立不同指标或者不同权重的相同指标的评价体系，来论证猪营养需求的阶段性特点。

四、边际效益的概念及应用

建立虚拟数字模型，根据边际效益的计算原理，说明生长育肥阶段的猪在不同的饲料投入、不同的生长阶段产生边际效益的原因及趋势。

五、盈亏平衡点计算

以不同市场价格下的“标猪二次肥育”为例子，将边际效益与生猪市场价格相联系后，阐述养猪盈亏平衡点的变化规律。

在上述论证基础之上，提出生猪市场预警关注点及营养体调控模式。

遗传与繁育专题

口述报告

磷酸肌酸对冷冻保存猪精子质量与抗氧化能力的影响

王赫川※，郭铭晖，张 涵，李天峰，冯赫泽，宋宇伦，魏 姚，
董莹莹，程 烨，李用昕，李雁冰，魏国生，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

引言

与其他家畜相比，猪精子对体外保存过程中的温度变化更为敏感，因而通常进行液体保存以用于人工授精，尽管这可能会受到细菌及微生物对精子保存效果的影响。活性氧是细胞有氧代谢的副产物，精子在冷冻保存和解冻过程中均可能出现超生理剂量的活性氧产生，导致精子活力和活率降低。线粒体通过氧化磷酸化产生三磷酸腺苷以维持精子运动与活性，同时也是活性氧的主要产生与攻击位点之一。磷酸肌酸是一种重要的能量载体与缓冲剂，能够使二磷酸腺苷再磷酸化，同时还能维持线粒体膜电位处于较高水平以避免细胞凋亡。磷酸肌酸去磷酸化后的产物肌酸也可以作为抗氧化剂保护精子免受活性氧的影响。因此本研究拟验证磷酸肌酸对冷冻保存猪精子质量与抗氧化能力的影响。

材料与方法

由商业化种猪站采集公猪精液，初步分析合格后进入后续处理。使用含有不同浓度磷酸肌酸（0、5.0、7.5、10.0 及 12.5 mmol/L）的冷冻保存稀释剂稀释精子，稀释完成后填充入 0.5 mL 冷冻细管中，使用可编程控制速率冷冻机进行预冷，预冷完成后立刻投入液氮并保存 30 天。之后使用精子解冻剂进行解冻。使用计算机辅助精子分析系统检测精子的形态学参数与动力学参数。使用荧光染色法检测精子顶体完整性、质膜完整性、DNA 完整性与线粒体活性。使用商业试剂盒检测精子总抗氧化能力、过氧化氢酶活性、谷胱甘肽过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及 H_2O_2 水平。

结果与讨论

试验结果表明，向冷冻保存稀释剂中添加 10.0 mmol/L 磷酸肌酸提高了冷冻保存猪精子的活力、活率、平均路径速度、直线速度、曲线速度与鞭打频率，同时降低了畸形率；缓解了精子的顶体完整性、质膜完整性、DNA 完整性及线粒体活性的降低水平；提高了精子的总抗氧化能力、过氧化氢酶活性、谷胱甘肽过氧化物酶活性及超氧化物歧化酶活性，降低了丙二醛含量及 H_2O_2 水平。

一项研究表明，磷酸肌酸能够显著提高人类精子活力和活率。磷酸肌酸与质膜磷脂极性头部之间的离子相互作用可以避免质膜通透性增加和细胞裂解[1]，这是由于其极性分子结构能够使质膜由液相转变为凝胶相，从而避免脂质过氧化[2]。磷酸肌酸还能以浓度依赖方式抑制线粒体通透性改变，并通过增加 Bcl-2/Bax 比率阻止活性氧和细胞色素 C 由线粒体向胞质的迁移，进而抑制 Caspase 级联信号通路激活。此外，还有研究表明，磷酸肌酸通过 PI3K/Akt/eNOS 和/或 Nrf2/HO-1 信号通路减少细胞氧化应激。另一项研究表明，磷酸肌酸可通过抑制一种或多种导致自由基生成的反应，保护离体大鼠心脏免受 H_2O_2 诱导的氧化应激。

主要参考文献

[1] Tokarska-Schlattner M，Epand R F，Meiler F，*et al.* Phosphocreatine interacts with phospholipids，affects membrane properties and exerts membrane-protective effects[J]. PloS One，2012，7（8）： e43178.

[2] Strumia E，Pelliccia F，D'Ambrosio G. Creatine phosphate： pharmacological and clinical perspectives[J]. Advances in Therapy，2012，29（2）： 99-123.

※ 作者简介：王赫川，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖技术，E-mail：wanghechuan1999@outlook.com。
※※ 通讯作者：李井春，副教授，硕士生导师，研究方向为动物繁殖技术，E-mail：ljchun112@163.com。

美系长白和杜洛克种猪生长性状和繁殖性状遗传力估计

孟庆利※，王朝军，石国魁
（北京中育种猪有限责任公司，北京 100194）

引言

畜禽各表型性状是遗传因素和环境因素共同作用的结果。只有遗传力高的性状，个体选择才能达到很好的选择效果。动物繁殖性状的遗传力一般比较低，表明繁殖性状受环境因素影响较大，依据个体表型值选择，遗传进展缓慢。本文通过对北京中育种猪有限责任公司美系长白和杜洛克种猪繁殖和生产相关性状进行遗传参数估计，为制定精准的育种目标、种猪测定选育方案以及计算估计育种值提供依据并奠定基础。

材料与方法

北京中育种猪有限责任公司 34555 头美系长白猪，18053 头杜洛克。基于动物模型，利用 DMU 软件完成上述各性状的遗传力估计，性状包括初生重（BW）、校正 100 公斤体重日龄（D100kg）、校正 100 公斤日增重（DG100kg）、校正 100 公斤背膘厚（BF100kg）、校正 100 公斤眼肌厚（LET100kg）、校正 115 公斤体重日龄（D115kg）、校正 115 公斤日增重（DG115kg）、校正 115 公斤背膘厚（BF115kg）、总产仔数（TNB）、产活仔数（NBA）、健仔数（NBH）、出生窝重（BLW）、子宫容量（UC）、断奶头数（NBW）、断奶窝重（WLW）、校正 21 日龄窝重（D21LW）。

结果与讨论

种猪繁殖性状的遗传力较低，通过常规选择所取得的遗传进展比较缓慢，陈海龙[1]2020 年研究结果表明，对于美系种猪繁殖性状遗传力，长白猪的范围为 0.111-0.190，杜洛克猪的范围为 0.094-0.242。本研结果与陈海龙的研究结果类似，长白猪繁殖性状遗传力范围是 0.019-0.0563；杜洛克猪繁殖性状遗传力范围是 0.0034-0.0617。张蕾[2]2021 年研究也得到类似结果，三个品种母猪（大白、长白和杜洛克）的繁殖性状均为低遗传力性状，估计值在 0.01-0.18 之间。张婧[3]2020 年研究也与本研究结果类似。以上大量结果研究结果表明，繁殖相关性状属于低遗传力性状，在种猪选育过程中遗传进展缓慢，取得遗传进展需要较长时间。低遗传力的繁殖性状要取得较快的遗传，需提高选择强度和选择的准确性以及缩小世代间隔，提高选择准确性的方法之一就是将全基因组选择技术应用于低遗传力性状的选育中，加速整个群体的遗传进展。

陈海龙[1]2020 年研究结果表明，长白和杜洛克 100kg 体重日龄遗传力分别为 0.351 和 0.331，100kg 体重背膘厚遗传力估计值为 0.426 和 0.445。张蕾 2021 年研究结果如下，长白猪 100 千克体重日龄和 100 千克体重背膘厚遗传力均为 0.06[2]。本研结果与张蕾的研究结果类似。美系长白和杜洛克种猪生长性状的遗传力较低，与陈海龙研究结果之间有一定差异，其中美系长白种猪生长性状的遗传力在 0.03-0.1757 之间；美系杜洛克种猪生长性状的遗传力在之间 0.0846-0.1783。导致本研究生长性状遗传力低的原因可能是因为残差比较大或样本数量大小的问题。

主要参考文献

[1] 陈海龙. 2020. 美系猪群繁殖和生长性状影响因素分析及遗传参数估计[硕士学位论文].泰安：山东农业大学。
[2] 张蕾. 2021. 种猪繁殖与生长性状的遗传参数估计及影响因素分析 [硕士学位论文].杨凌：西北农林科技大学。
[3] 张婧. 2020. 猪重要经济性状遗传参数估计[硕士学位论文].保定：河北农业大学。

※ 作者简介：孟庆利（1977-），男，北京昌平人，高级畜牧师，主要从事种猪生产管理工作，mql1977@126.com

一种外三元纯种猪、二元猪、三元猪和多元回交猪的鉴定方法研究

郑春婷※，罗云燕，秦 蕾，张春光，楚 菡，张建斌，洪 亮，蒲 蕾※※
（天津农学院动物科学与动物医学学院，天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室，天津 300384）

引言

受猪周期、非洲猪瘟及其他疫病的影响，当能繁母猪数量下降时，一些商家利用二元或二元回交猪充当纯种猪，将三元猪或三元回交猪充当二元猪售卖，造成市场猪种质不纯，影响猪群各项生产性能的发挥。目前种质鉴定相关研究很少，且主要集中于个别地方猪种的鉴定，缺乏外三元猪分子鉴定的有效基因型，也没有系统鉴定的方案。本研究通过芯片数据比对，获得特异性位点后，进行多品种、多品系的验证工作，初步确定鉴定方案，为开发外三元猪的纯种、二元、三元及多元回交猪的鉴定方法提供借鉴。

材料与方法

本试验对 10 头大白猪重测序数据、503 头长白猪 Illumina 中芯一号 SNP50 芯片数据和 613 头杜洛克猪 Illumina SNP60 芯片数据进行纯合位点分析，比对筛选获得不同猪种常染色体上特异性的位点信息，选定位点，制定初步的外三元猪种质鉴定方案。再通过以 115 头不同品种、不同品系猪耳样 DNA 为模板，进行特异位点的 PCR 扩增，并测序验证。根据不同品种、不同品系猪的验证结果，最终确定有效的特异性基因位点，通过三位点联合分析制定外三元纯种、二元、三元及多元回交猪品种鉴定方案。

结果与讨论

根据 613 头杜洛克猪 Illumina SNP60 芯片位点数据、503 头长白猪 Illumina SNP50 芯片位点数据、10 头大白猪重测序数据分析，经过位点筛选，计算出杜洛克猪 1-18 号常染色体总位点数是 52258，90%以上纯合位点数是 17948；长白猪 1-18 号常染色体总位点数是 48036，90%以上纯合位点数是 11919；大白猪 1-18 号常染色体总位点数是 19989824，90%以上纯合位点数是 5108549。通过数据的对比分析找到长白猪有 6 个特有突变位点，杜洛克猪有 7 个特有的突变位点，大白猪有 1 个特有的突变位点。根据长白猪、大白猪、杜洛克猪特有的突变位点，通过在美系大白猪、加系大白猪、丹系大白猪、法系长白猪、加系长白猪、丹系长白猪、美系杜洛克猪和丹系杜洛克猪及相关二元猪和三元猪内进行验证。最终确定 13 号染色体的 57293969 位点在大白猪中均为 AA 型，杜洛克猪均为 AA 型，长白猪中均为 GG 型；11 号染色体的 47494227 位点在大白猪中均为 TT 型，杜洛克猪中均为 TT 型，长白猪中均为 GG 型和 6 号染色体的 110653413 位点在大白猪中均为 TT 型，杜洛克猪中均为 CC 型，长白猪中均为 TT 型。这三个位点可作为外三元猪种质鉴定的优选位点。本研究针对位点特色制定了外三元纯种、二元、三元及多元回交猪品种鉴定方案，为市场上猪群种质净化提供参考。

※ 作者简介：郑春婷，在读硕士研究生，研究方向为猪分子育种。E-mail：zcting0216@163.com。
※※ 作者简介：蒲蕾，讲师，硕士生导师，研究方向为猪分子育种。E-mail：pulei87@126.com。

槲皮素缓解高铜诱导的猪卵泡颗粒细胞氧化损伤的分子机制研究

齐南南※，邢文文，李梦轩，刘吉英※※
（江苏科技大学生物技术学院，江苏镇江 212018）

引言

硫酸铜有驱虫、促生长及类抗生素的作用，多是目前养猪生产中使用最多的饲料添加剂，长期摄入过量铜会导致慢性铜中毒[1]。目前，铜中毒的研究集中于肝肾[2-4]，对生殖系统毒性的研究较少。槲皮素有较强的抗氧化功能，能降低肾细胞高铜的毒性[3]。高铜造成母猪繁殖效益下降[5]，严重影响养猪业发展，猪卵泡颗粒细胞（pig graulosa cell，pGC）对卵泡发育命运至关重要。因此，本研究拟通过构建高铜诱导 pGC 氧化损伤模型，探讨槲皮素缓解高铜诱导的颗粒细胞氧化损伤的分子机制。

材料与方法

分离培养 pGC，使用 0、100、200、400 μM 硫酸铜处理细胞 24h，通过 qPCR、WB、检测氧化指标等方法检测细胞氧化损伤情况，构建高铜诱导 pGC 氧化损伤模型；利用 JC-1 染色、MitoSOX 染色、透射电镜等分析高铜对线粒体的损伤情况；添加槲皮素检测细胞中 GPX4、CAT、SOD1、SOD2、HO-1 等的 mRNA 水平以及 SOD1、HO-1 的蛋白表达水平，同时分析线粒体形态、MMP 以及 mtROS 水平的变化，研究槲皮素对高铜诱导的生殖毒性的保护作用。

结果与讨论

CCK-8 结果表明，200 μM 及以上浓度的硫酸铜处理 24h 后细胞活力极显著下降（$P<0.01$）。qPCR 与 WB 结果显示，抗氧化基因 GPX4、CAT、SOD2 表达量明显下降（$P<0.05$），SOD1、TRX、HO-1 表达量显著上升（$P<0.05$）。此外，检测到 ROS 水平升高，MDA 水平显著高于对照组（$P<0.05$），说明细胞发生氧化应激，造成脂质过氧化，表明成功构建了高铜诱导的 pGC 铜中毒模型。此外，高铜处理后 MMP 下降，mtROS 水平明显上升，线粒体嵴结构紊乱甚至出现空泡化，表明高铜引起了线粒体氧化损伤。添加槲皮素后，SOD2 基因水平回升（$P<0.05$）、HO-1 基因水平极显著下降（$P<0.01$），且蛋白水平结果与此一致（$P<0.05$）。与铜处理组相比，槲皮素降低细胞 ROS 的积累，并且极显著地降低 MDA 水平（$P<0.01$）。以上结果说明铜能够诱导 ROS 产生，对细胞造成氧化损伤，槲皮素能清除自由基保护细胞。另外，槲皮素减少了 mtROS 的累积、逆转 MMP 下降，表明槲皮素减轻高铜对线粒体的氧化损伤。本研究显示高铜对 pGC 有氧化毒性，槲皮素能清除高铜诱导的 ROS，保护线粒体免受氧化应激损伤，改善 pGC 的功能，减少猪卵泡闭锁，提高母猪的繁殖能力。

主要参考文献

[1] 刘军. 猪铜中毒的病因、临床表现、诊断与防治措施[J]. 现代畜牧科技，2018，03，：92.

[2] Wu L，Kang Z，Qiao N，*et al*. Cu-induced mitochondrial dysfunction is mediated by abnormal mitochondrial fission through oxidative stress in primary chicken embryo hepatocytes[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology，2021，65：126721.

[3] Peng X，Dai C，Zhang M，*et al*. Molecular Mechanisms Underlying Protective Role of Quercetin on Copper Sulfate-Induced Nephrotoxicity in Mice[J]. Frontiers in Veterinary Science，2021，7：586033.

[4] Wan F，Zhong G，Ning Z，*et al*. Long-term exposure to copper induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in rat kidneys[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety，2020，190：110158.

[5] Chen J，Cui Z，Qiu Y，*et al*. Exposure to copper compromises the maturational competency of porcine oocytes by impairing mitochondrial function[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology，2021，9：678665.

※ 作者简介：齐南南，在读硕士研究生，研究方向为畜牧。E-mail：qinannan416@163.com。
※※ 通讯作者：刘吉英，讲师，硕士生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：liujiying@just.edu.cn。

猪卵泡液外泌体处理卵巢颗粒细胞的 SNP/Indel 筛选及分析

刘阳光※，章会斌，谢帆，邱梦瑶，张晓东※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

外泌体一种由细胞分泌的直径在 30-150nm 的细胞外囊泡，参与细胞间的信息传递。近期研究人员发现卵泡液外泌体在卵泡的生长发育及闭锁等方面起到非常重要的调控作用[1]。为探究外泌体在卵泡微环境中的作用机制，本研究利用 RNA-seq 技术对猪卵巢颗粒细胞（GC，n=3）和与外泌体共培养的猪卵巢颗粒细胞（GCE，n=3）进行测序分析，旨在探究卵泡液外泌体对颗粒细胞的影响机制，为揭示外泌体在生殖上的作用提供帮助。

材料与方法

试验材料为实验室前期所分离的猪卵巢颗粒细胞，待颗粒细胞增殖到 70%~80%的汇合度后加入外泌体，随后进行 RNA-seq。采用 samtools 和 picard-tool 工具对测序数据 SNP//InDel 数据进行统计，使用 SPSS 和 R 软件对数据进行统计学分析和富集分析，以 $P<0.05$ 记为差异显著。

结果与讨论

samtools 和 picard-tool 结果显示，在 GC 和 GCE 组的样品共获得 1310979 个 SNP 突变和 104498 个 InDel 突变，与 GC 组相比较，GCE 组基因的 SNP//InDel 突变情况显著增加（$P<0.05$）。此外，在 SNP 转换和颠换的突变类型中，转换类型共计 973003 个，颠换类型 339974 个。通过组间比较发现，GCE 组 SNP 的突变转化和颠换类型均显著高于 GC 组（$P<0.05$）。通过注释发现两组 SNP 突变位点主要来自基因上的 3'UTR、基因间隔区、内含子区和外显子区，其中发生在内含子区 SNP 突变数量最多，约占总量的 59.82%。InDel 注释结果显示，InDel 突变主要来源于基因上的 3'UTR 和内含子区。其中位于内含子的 InDel 突变总计 54375 个，占总量的 52.03%。据此，本研究推测外泌体能够对颗粒细胞的基因造成突变的影响。经对比分析，共有 1583 差异表达基因发生 SNP/InDe 突变。通过 GO 富集分析发现，这些基因显著富集在细胞周期、细胞分类以及对细胞增殖调控生物过程中（$P<0.05$）；KEGG 结果显示，这些基因主要在细胞周期以及细胞增殖/凋亡相关通路显著富集。例如，细胞周期、Rap1 信号通路、TNF 信号通路、细胞衰老和 FoxO 信号通路。因此，本研究推测外泌体能够对卵巢颗粒细胞的基因产生突变的影响，这些发现能够为研究外泌体在生殖上的调控提供理论依据。

主要参考文献

[1] Cao J，Huo P，Cui K，et al. Follicular fluid-derived exosomal miR-143-3p/miR-155-5p regulate follicular dysplasia by modulating glycolysis in granulosa cells in polycystic ovary syndrome[J]. Cell Commun Signal， 2022，20（1）：61.

※ 作者简介：刘阳光，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：22710033@stu.ahau.edu.cn。
※※ 通讯作者：张晓东，教授，博士生导师，研究方向为猪分子育种。E-mail：xdzhang1983@ahau.edu.cn。

OPTN 基因在猪肌肉发育中的作用研究

曹佳鑫[1※]，李娜娜[1]，贺孜怡[1]，韩文龙[1]，夏博[1※※]
（1.西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100）

引言

猪作为农业生产领域中的重要商品动物，在肉类市场中的需求量高居榜首，其产肉量和肉质的好坏决定其经济价值。本团队前期研究发现天然产物鞣花酸在不影响胴体重的基础上，可显著提高猪胴体的瘦肉含量，同时降低脂肪含量[1]。鞣花酸通过肠道微生物代谢为一种线粒体自噬激动剂—尿石素类代谢物(Urolithin A)[1]。利用生物信息学方法对公开数据库中 5 个与肌肉发育相关的 RNA-sequence 数据进行差异基因重叠筛选，发现线粒体自噬受体 Optineurin(OPTN)是 Urolithin A 调节猪肌肉发育的一个潜在因子。基于此，本研究以 *OPTN* 为靶标，利用分子生物学和细胞生物学等技术，探究鞣花酸是否通过 *OPTN* 调节猪肌肉发育，评估了 *OPTN* 作为猪肌肉品质和产量等相关性状遗传育种靶标的潜力。

材料与方法

将 12 头生长育肥猪随机分配到两组，分别饲喂正常育肥饲料或添加 5%鞣花酸的育肥饲料，探究鞣花酸对猪生长性能及相关肉品质的作用；构建小鼠腺病毒介导的 *OPTN* 过表达/干扰模型及猪骨骼肌卫星细胞 *OPTN* 干扰模型。利用形态学、WB 技术、蛋白质组学、双荧光素酶和生物信息学分析 *OPTN* 调控猪骨骼肌卫星细胞肌生成的潜在机理。

结果与讨论

鞣花酸对育肥猪生长性能并无影响，处理后可显著提高胴体的肌肉含量，同时降低脂肪含量; 鞣花酸处理组背最长肌肉色、系水力及 pH 值均显著高于对照组；鞣花酸处理组背最长肌中亚油酸(C18:2)和二十二碳六烯酸(C22:6)的含量显著高于对照；

利用 ISwine 数据库全基因组关联分析发现，*OPTN* 与猪肉产量及品质性状的 QTL 具有相关性。进一步验证发现，*OPTN* 在猪肌肉生长发育阶段表达量显著上升($P<0.05$)，且 *OPTN* 表达量在猪肌卫星细胞分化阶段也显著升高($P<0.05$)，*OPTN* 的蛋白表达量在骨骼肌损伤后显著升高($P<0.05$)，在第 5 天达到最高水平；

利用靶向 *Optn* shRNA 重组腺相关病毒，在骨骼肌中敲低 *Optn* 后显示，*Optn* 敲降显著延迟了骨骼肌损伤后的恢复过程。为探究 *OPTN* 影响成肌分化的潜在机制，本研究利用生物信息学、分子生物学方法和细胞分析发现，在成肌分化过程中 OPTN 通过抑制 GSK3β 进而激活 Wnt 信号；

另一机制结果表明，线粒体自噬受体 OPTN 可以与 GSK3β 直接结合，并通过 LIR 和 UBAN 结构域将其以自噬依赖的方式降解，进而激活 Wnt 信号通路，从而促进成肌分化介导的肌生成。因此，本研究推测 OPTN 可能是在成肌分化过程中自噬和 Wnt 信号通路互作的桥梁，该工作为扩展 OPTN 的新生物学功能提供了理论基础。

综上，本研究表明鞣花酸通过 *OPTN* 对猪肌肉发育起促进作用，通过抑制 GSK3β 进而激活 Wnt 信号通路发挥作用，并发现猪 *OPTN* 与其肌肉生长发育以及肌肉品质具有强相关性，为猪选择育种提供了新的靶点，对生猪产业具有实际意义。

主要参考文献

[1] Xia B, Shi XC, Xie BC, Zhu MQ, Chen Y, Chu XY, Cai GH, Liu M, Yang SZ, Mitchell GA, Pang WJ, Wu JW. Urolithin A exerts antiobesity effects through enhancing adipose tissue thermogenesis in mice. PLoS Biol. 2020 Mar 27;18(3):e3000688. doi: 10.1371/journal.pbio.3000688. PMID: 32218572; PMCID: PMC7141696.

※ 作者简介：曹佳鑫，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：caojx@nwafu.edu.cn。
※※ 通讯作者：夏博，副教授，研究生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：imed23@nwafu.edu.cn。

冷应激对马身猪和大白猪骨骼肌的影响及其机制研究

李文霞※，史明月，牛 瑾，王首元，李一飞，曹果清※※
（山西农业大学动物科学学院，山西太谷 030801）

引言

冷应激是高寒地区动物生产养殖中一种普遍存在的应激因素，会造成动物的神经系统、内分泌系统、免疫系统以及抗氧化系统等生理系统紊乱，并严重危害畜牧业的生产与发展。猪与其他畜禽相比受环境温度影响较大，研究表明低温会导致猪发病率增加，死亡率升高，肉质下降。骨骼肌是动物机体最大的代谢器官，在调节能量代谢和产热中发挥关键作用[1]。目前，猪骨骼肌抗寒相关研究较少，尚未完全揭示其调控机制。本文主要探究冷应激对马身猪和大白猪骨骼肌的影响，并基于 RNA-seq 筛选抗寒靶基因。该研究有助于揭示两者对冷应激的不同转录反应，并为猪抗寒抗逆性品种选育提供参考。

材料与方法

试验对象为山西省大同市种猪场 90 日龄的 12 头马身猪（MS）和大白猪（LW），两者分别在环境舱内进行常温（25℃）与低温（4℃）饲养，共 4 天。每日检测猪的体温、呼吸与战栗频率。试验开始与结束时，记录体重并进行椎前静脉采血。采用 Elisa 检测血清生化水平；采用透射电镜和酶组织化学染色检测猪背最长肌超微结构和酶活水平；采用 GO、KEGG 及 WGCNA 挖掘分析两者骨骼肌共有和 MS 特有抗寒靶基因；采用 qRT-PCR 与 WB 验证测序结果。试验数据用平均数±标准误表示。利用 SPSS 20.0 统计分析，采用单因素方差和 T 检验分析显著性，P*<0.05 为差异显著，P**<0.01 为差异极显著。

结果与讨论

本研究结果显示冷应激降低猪的体温和体重，并增加其呼吸速率和战栗频率。MS 在冷刺激后的生理变化不明显且较恒定，然而 LW 在冷胁迫后的生理变化较明显。血清生化和激素检测表明冷应激极显著（P＜0.01）提高了 LW 的 EPI、NE 及 Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase 产热激素水平，LDH、PFK-1、HK2 等糖酵解代谢水平以及 SDH、CS 等脂肪酸氧化水平。而 MS 冷胁迫后仅极显著（P＜0.01）提高了 SDH、CS 等脂肪酸氧化水平。猪背最长肌 SDH 和 LDH 染色结果也表明 LW 通过提高糖酵解和脂肪酸氧化代谢水平抵御寒冷，而 MS 通过提高脂肪酸氧化代谢水平抗寒。透射电镜结果也表明 2 个品种通过提高骨骼肌线粒体丰度增加脂肪酸氧化代谢水平抗寒。且 MS 的骨骼肌线粒体丰度较高，线粒体嵴结构较完整，具有较强的脂肪酸氧化能力。RNA-seq 和 WGCNA 结果表明 LW 和 MS 主要通过调控产热、糖酵解、脂肪酸氧化等能量代谢途径抗寒。而 MS 特异性抗寒除参与产热和糖脂能量代谢途径外，还通过增强免疫应答增强抗逆性以应对寒冷。最后筛选出 *ARRDC*3、*ADRB*2、*CEBPB*、*NR*1D1、*NR*4A2、*SIK*1 及 *GPCPD*1 为 2 个品种共有抗寒靶基因，*ACTC*1、*PRSS*8 及 *IL*18 为 MS 特有抗寒靶基因。靶基因的 qRT-PCR 结果与测序表达趋势一致。WB 结果表明两者通过提高 CASQ2、PFK1 及 HADHB 能量代谢水平抗寒，而 MS 的 UCP3 在常温与低温均极显著（P＜0.01）高于 LW，表明 MS 的线粒体氧化磷酸化水平较高。本研究揭示了马身猪和大白猪骨骼肌对冷应激的不同响应，并为耐寒抗逆猪种选育提供一定的理论依据。

主要参考文献

[1] Feng Y，Cui Z，Lu X，et al. Transcriptomics Dissection of Calorie Restriction and Exercise Training in Brown Adipose Tissue and Skeletal Muscle[J]. Nutrients，2023，15（4）： 1047.

※ 作者简介：李文霞，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：lwx8lois@163.com。
※※ 通讯作者：曹果清，教授，博士生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：anniecao710502@aliyun.com。

母猪发情行为相关转录图谱构建与 lncRNA-HEOE 功能分析

柳明正※，陈家浩，张春雷，刘姝含，徐庆磊，晁小焕，杨桓，
Muhammad Asim，周波※※
（南京农业大学动物科技学院，江苏南京 210095）

引言

清晰、持久的发情行为有助于母猪发情鉴定与适时配种，以提高情期受胎率和产仔数等重要繁殖性状。母猪发情时，阴道分泌粘液、外阴血管扩张、出现爬跨和静立反射等行为，向外界传达发情和排卵信号。下丘脑-垂体-卵巢轴控制卵泡发育影响发情行为。本研究系统构建了参与母猪发情行为的多组织基因和 lincRNA 调控网络，分析功能通路的动态变化，深入解析了发情期卵巢高表达 lncRNA-*HEOE*（Highly Expressed in the Ovary during Estrus）的调控机制。

材料与方法

选取米猪和大白猪发情期（排卵前期）和间情期（黄体期）的 5 个发情行为相关组织（下丘脑-垂体-卵巢-阴道-外阴）的 60 个样品进行转录组测序，使用“Trimmomatic-HISAT2-StringTie-lincRNA 筛选-Featurecots-DESeq2”流程对蛋白编码基因和 lincRNA 进行筛选和差异表达分析；“WGCNA-GSEA-GSVA-GSEABase-miRanda”等软件对核心基因及功能、调控的 miRNA 和转录因子、功能通路的动态变化、ceRNA 调控网络等进行预测和构建；“RACE-FISH-qPCR-edu 增殖-流式凋亡-RNAseq”等实验进行 lncRNA-HEOE 的功能研究。

结果与讨论

本研究发现大白猪和米猪在发情期和间情期的外阴形态、阴道粘液分泌、卵巢类固醇激素生成、行为上都存在差异（$P<0.05$）；五个组织的蛋白编码基因和 lincRNA 表现出品种和时期特异性；核糖体、DNA 损伤修复、受体互作等通路只在生殖系统中活跃，在下丘脑、卵巢、阴道组织中发现了凋亡、自噬、低氧、血管生成等生物学过程，它们受到一些差异表达转录因子的调控；构建了完整的猪发情-排卵事件的调控网络，包含来自五个组织的 358 个核心基因，以及 130 个神经内分泌系统、49 个 HPO 轴和 122 个生殖系统的差异共表达互作蛋白；85 个 lincRNA 的 230 个靶基因与行为、受体、凋亡功能等相关，构建了包含 3 个 lincRNA 的 ceRNA 调控网络。本研究还发现一个只在发情期卵巢特异性高表达的 lncRNA-HEOE，它长度为 1824bp，在颗粒细胞的核质中均有表达，在小卵泡中的表达量显著高于大卵泡（$P<0.01$）。功能分析表明它促进颗粒细胞凋亡抑制其增殖，RNA-seq 显示它在发情期高表达后抑制颗粒细胞 G2/m 期转换使其退出细胞周期，促进排卵。机制研究发现它通过与 *ZMAT3* 竞争结合 miR-16 调控 P53 信号与下游基因的可变剪切影响激素生成调控发情行为。

各组织的基因和 lncRNA 发挥的功能、重要通路的变化对于整个发情-排卵事件的调控非常重要，本研究将在未来的研究中解析其奥秘，特别是 lncRNA-HEOE 在细胞周期退出中的深层机制将被进一步解析。本研究的结果可用于参考多组织协调控制复杂性状，提供关于母猪发情性状的全面系统转录图谱信息，也能为人类卵巢和排卵相关研究提供借鉴。

主要参考文献

[1] Morris ME，Meinsohn MC，Chauvin M，et al. A single-cell atlas of the cycling murine ovary[J]. Elife, 2022，11：e77239. doi： 10.7554/eLife.77239.

基金项目：NSFC32172786 和 31672465，JBGS[2021]101
※ 作者简介：柳明正，在读博士研究生，研究方向为猪的发情行为与繁殖。E-mail：liumingzheng@stu.njau.edu.cn。
※※ 通讯作者：周波，教授，博士生导师，研究方向为猪的行为遗传与智慧养猪生产。E-mail：zhoubo@njau.edu.cn。

开发重组蛋白激素应用于批次化生产的研究

罗昊澍，张佳伟，黄 正
（北京伟杰信生物科技有限公司，北京 100094）

引言

目前，批次化生产管理模式得到了广泛的认可和应用。批次化生产主要通过注射外源激素，人为调控母畜生理活动，使之在预定的时间内集中发情、排卵、配种和分娩。其中 PMSG 为促卵泡发育的关键激素，但由于其是孕马提取的产品，原料来源有限，纯化工艺复杂，易造成疫病传播。由于动物福利问题，欧盟已在 2021 年呼吁停止生产和使用 PMSG。因而开发替代 PMSG 的产品势在必行。在正常的生理情况下，主要是 FSH 促进卵泡生长，在牛和羊上会使用猪垂体提取的 FSH 产品促进卵泡发育。但因其半衰期较短，需多次注射，且存在动物应激大、产品原料有限、纯化工艺复杂、易造成疫病传播等问题。而在促排卵阶段使用的 HCG 产品为孕妇尿液提取物，原料来源有限，成本高，纯化工艺难度大，产品品质和批次稳定性很难保证。

因而开发重组长效猪 FSH 产品和重组 HCG 产品成为解决上述问题的关键，长效能够解决多次注射的问题，并且重组蛋白产品不受提取原料限制，其蛋白纯度高，成本优势明显，产品能够做到安全、有效、质量可控。

材料方法

本研究使用人药标准的 CHO 细胞表达系统表达重组长效的 pFSH 融合蛋白（rpFSH-FC）和 HCG 蛋白，获得纯化蛋白后，以小鼠为模式动物验证重组蛋白的作用机制，以猪为靶动物对重组蛋白在批次化生产中的作用效果进行验证。

结果与讨论

小鼠体外实验结果显示 rpFSH-FC 可以有效促进卵丘扩展和 GVBD，具有 FSH 的生物学活性。小鼠超排实验结果显示 rpFSH-FC 可以有效促进卵泡生长，HCG 能够有效促进排卵，超排小鼠排卵数量多于 PMSG 处理组，并且经 rpFSH-FC 和 HCG 超排处理后的小鼠生仔数量与对照组无明显差异。对 rpFSH-FC 的半衰期进行检测，结果发现其半衰期在 55 个小时左右，具有长效性。

接下来，在靶动物猪上进行实验，利用 rpFSH-FC 联合重组 HCG 进行促卵泡发育，利用重组 HCG 产品促排卵，结果显示在经产母猪和后备母猪实验中，重组蛋白激素产品可有效促进母猪发情、排卵和配种，参配率能够达到 95%-98%，妊娠率能够达到 92%-96%，产仔数较未使用重组激素产品前有显著提升，不同猪场因猪的品种以及管理水平等因素导致结果有略微差异，但生产成绩在使用重组蛋白激素产品后都得到了明显改善。

以上结果说明，使用 rpFSH-FC 和重组 HCG 组合可以有效促进母猪的繁殖生产，能够替代提取类产品，还需要进行多次大规模实验进行验证。重组繁殖激素蛋白产品将是未来发展的必然方向，重组产品更加天然、更加安全，生产工艺质量可控，并且能够不断优化降低生产成本，为畜牧生产提供质优价廉的产品，提高养殖收益，促进畜牧业的健康快速发展。

主要参考文献

略

scRNA-seq 揭示苏淮猪背最长肌细胞组成图谱及通讯分析

肖伟※，蒋能静，刘晨曦，赵清波，李平华，黄瑞华，侯黎明※※
（南京农业大学动物科学技术学院，江苏南京 210000；）

引言

苏淮猪是我国自主培育的瘦肉型品种，具有肉质鲜美、瘦肉率高等特点[1]。而背最长肌作为研究肉质的最重要组织之一，可用于评估肉色、风味、嫩度等经济指标，目前有关于猪背最长肌的细胞组成图谱及细胞间潜在的信号交流仍不清楚。因此，本研究采用单细胞转录组测序解析 1 日龄苏淮公猪背最长肌细胞图谱，旨在解析苏淮猪背最长肌细胞组成异质性及潜在的生物信号传递，为后续研究肉质性状奠定理论基础。

材料与方法

试验对象为 1 日龄苏淮公猪，对其麻醉后取其背最长肌用于细胞悬液制备，经过质检合格后进行单细胞转录组测序。数据采用 10x Genomics Cell Ranger 3.0 进行质控分析处理。采用 Seurat 进行了全面的流程分析。采用 Monocle2 对肌源性细胞的拟时分化轨迹分析。采用 CellChat 对每个细胞群进行细胞通讯分析。

结果与讨论

1 日龄苏淮公猪背最长肌可分为 12 个细胞群，包括 FAP 细胞（*DCN*、*LUM*、*MFAP5*、*PDGFRA*），骨骼肌卫星细胞 （*PAX7*、*PI15*、*MYF5*、*TAGLN3*），内皮细胞（*CD34*、*KDR*、*PECAM1*、*FABP4*、*CDH5*），成肌细胞（*TOP2A*、*MYOD1*、*CENPF*），肌细胞（*MYOD1*、*MYMK*、*MYOG*、*ACTC1*），肌管细胞（*MYLPF*、*MYL1*、*TNNT3*、*TCAP*、*PPP1R1A*、*CKM*、*COX8H*、*ACTA1*），雪旺氏细胞（*MPZ*、*MBP*、*CEFL8*，*CNMD*、*PLP1*、*CDH19*），平滑肌细胞（*MYH11*、*MYLK*、*ACTA2*、*ACTG2*、*CNN1*、*ADIRF*），树突状细胞 （*CCL5*、*FOLR1*、*PTPRC*、*CD52*），周细胞（*STEAP4*、*NEBL*、*LRRC3B*） 和中性粒细胞（*SLC4A1*、*ARG1*、*TRIM10*、*TRIM58*）。其中，内皮细胞占比最多（24.4%），FAP 细胞占比为 18.1%，中心粒细胞占比最少，仅有 0.3%。统计结果表明，与肌肉形成相关的细胞（FAP、骨骼肌卫星细胞、成肌细胞、肌细胞、肌管细胞和平滑肌细胞）占总细胞数的 66.62%，该结果与最近报道的结果相似[2]。另外，与现有研究不同的是，在细胞亚群分析结果中发现 FAP 细胞不仅与纤维/脂肪及软骨的形成相关[3]，FAP 细胞还与肌腱细胞的形成具有紧密联系。利用 CellChat 对 12 个细胞群进行通讯分析，结果表明，在初生仔猪背最长肌细胞群中，FAP 细胞和周细胞信号交流最强，显著富集到的信号通路为 *ANGPTL*、*MIF*、*MK*、*PTN*、*TGFb* 等。综上，本研究首次鉴定了 1 日龄苏淮猪背最长肌细胞组成及细胞之间的生物通讯，为后续研究猪肉质性状提供了重要信息和理论依据。

主要参考文献

[1] Wang，B.，P. Li，R. Huang，et al. Genome-wide association study and genomic prediction for intramuscular fat content in Suhuai pigs using imputed whole-genome sequencing data[J]. Evolutionary applications， 15（12）：2054-2066.

[2] Qiu K，Xu D，Yin J，et al. Association Analysis of Single-Cell RNA Sequencing and Proteomics Reveals a Vital Role of Ca^{2+} Signaling in the Determination of Skeletal Muscle Development Potential[J]. Cells， 2020， 9（4）：1045.

[3] Molina T，Fabre P，Dumont NA. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis，regeneration and diseases [J]. Open Biol，2021，11（12）： 210110.

※ 作者简介：肖伟，在读博士研究生，专业为动物遗传育种与繁殖。E-mail：18786136362@163.com。
※※ 通讯作者：侯黎明，副教授，硕士生导师，研究领域为基因编辑与生物育种。E-mail：liminghou@njau.edu.cn

基于 REML 法估计仔猪均匀度的遗传参数

王露露[1※]，李 航[2]，杨 森[2]，赵 欢[2]，李文军[3]，王楚端[2※※]

（1.中国农业大学动物科学技术学院，北京 100193；2.北京顺鑫农业股份有限公司小店种猪分公司，北京 101300；3.天津农垦康嘉生态养殖有限公司，天津 303800）

引言

近年来母猪总产仔数的选育取得一定成效，导致仔猪初生重的窝内变异程度及从出生到断奶的死亡损失增加[1]，可见仔猪均匀度（Piglet Uniformity，PU）是影响仔猪断奶成活率的重要因素，解析其遗传机制对优化育种方案及提高猪场经济效益具有重要意义。在这里 PU 采用同一窝内仔猪初生重的变异系数除去百分号的倒数 1/（CV×100）来表示，其数值在 0~1 之间，越接近 1 表明均匀度越好。本研究基于 REML 法估计大白猪、长白猪 PU 的遗传参数，旨在探究该群体 PU 性状的遗传规律，为进一步制定合理的育种计划和方案提供参考依据。

材料与方法

试验数据来自于北京顺鑫农业有限公司小店种猪分公司及天津农垦康嘉养殖有限公司旗下某种猪场 2016-2021 年的母猪繁殖记录和仔猪个体生长信息，包括 1925 头长白母猪的 3727 窝数据及 10915 头大白母猪的 23045 窝数据，系谱文件可追溯 3 代及以上。本研究利用 R v4.2.2 软件的 aov 函数分析分娩场次、年份、季节、胎次对 PU 的显著性水平，利用 DMU 6.0 软件的 dmuai 模块对长白猪、大白猪 PU 进行方差组分估计，研究采用单性状重复力模型。

结果与讨论

固定效应显著性水平检验结果显示，分娩场次、年份、季节、胎次对 PU 的影响均在 $P<0.001$ 水平显著。方差组分结果显示，长白猪 PU 性状的遗传力为 0.023±0.014，大白猪 PU 性状的遗传力为 0.043±0.007，两者均属于低遗传力，低于 Sell-Kubiak 等[2]估计出的大白猪和长白猪窝内初生重变异系数 CV 遗传力，与 Zhao 等[3]、Ederson 等[4]研究结果较为相近。PU 是影响仔猪成活率的关键因素，在优化群体育种方案时应考虑将 PU 性状纳入选育计划以降低仔猪个体初生重的变异程度，实现母系繁殖潜力的最大化。

主要参考文献

[1] Wolf J，Žáková E，Groeneveld E. Within-litter variation of birth weight in hyperprolific Czech Large White sows and its relation to litter size traits，stillborn piglets and losses until weaning [J]. Livestock Science，2008，115（2–3）：195-205.

[2] Sell-Kubiak E，Bijma P，Knol E F，et al. Comparison of methods to study uniformity of traits： Application to birth weight in pigs [J]. Journal of Animal Science，2015，93（3）：900-911.

[3] Zhao Y X，Gao G X，Zhou Y，et al. Genome-wide association studies uncover genes associated with litter traits in the pig [J]. Animal，2022，16（12）：100672.

[4] Ederson G C，Daniele B D M，Elsio A P de F，et al. Genetic study of litter size and litter uniformity in Landrace pigs [J]. Revista Brasileira de Zootecnia，2020，49.

※ 作者简介：王露露，在读硕士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：wllu@cau.edu.cn。

※※ 通讯作者：王楚端，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种与规模化生产。E-mail：cdwang@cau.edu.cn。

STAT3 调控猪乳腺上皮细胞增殖和凋亡的效应研究

吴　燕※，杨　酸，王春源，向　进，张依裕※※
（贵州大学动物科学学院/高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025）

引言

猪乳腺是哺乳动物中重要的乳腺器官之一，对猪的繁殖和生产具有重要的经济价值。研究乳腺上皮细胞增殖和凋亡的调控机制对于理解乳腺生物学以及相关乳腺疾病的发生和治疗具有重要意义。信号转导及转录激活蛋白 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）在畜禽机体的多个生物过程中发挥关键作用，包括细胞增殖和凋亡。然而，对于 STAT3 在猪乳腺上皮细胞中的功能和调控机制的了解仍然有限。本研究旨在探究 STAT3 对猪乳腺上皮细胞增殖和凋亡的调控效应，旨在从分子遗传的角度挖掘 STAT3 信号通路关键调控因子和相关基因，探讨其调控乳腺发育的分子机制，为进一步阐明 STAT3 的生物学功能提供理论支持，也为改善乳腺发育寻找新的科学依据。

材料与方法

以断奶 14 天的经产母猪柯乐猪乳腺上皮细胞为研究对象，构建 STAT3 基因 shRNA 干扰载体和过表达载体（pcDNA3.1-），分别转染乳腺上皮细胞，TMT 定量蛋白组学筛选干扰组和空转组的差异蛋白，构建差异蛋白的分子网络，通过 GO 和 KEGG 富集分析寻找关键信号通路。采用 PRM、qPCR 技术检测过表达细胞组、干扰细胞组、空转组细胞中的关键差异蛋白的表达量进行验证，通过 CCK-8 细胞增殖试验和流式细胞术检测细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。利用 SPSS 软件对数据进行统计。

结果与讨论

通过 TMT 定量蛋白组学从干扰组和空转组柯乐猪乳腺上皮细胞中筛选到 1349 个差异蛋白，其中上调蛋白 471 个，下调蛋白 878 个，差异蛋白形成 1 个互作调控网络。GO 富集分析发现，在生物学过程分类中，差异蛋白主要富集在多肽生物合成过程、酰胺生物合成过程和肽代谢过程；在细胞组分的分类中，差异蛋白主要富集在核糖体、核糖体亚单位和游离胞浆核糖体；在分子功能分类中，差异蛋白主要富集在核糖体的结构组成、翻译因子活性，RNA 结合和修饰的氨基酸结合。KEGG 富集分析显示，差异蛋白主要富集在核糖体、坏死性凋亡、化学致癌性、磷酸戊糖途径、丙型肝炎信号通路，核糖体信号通路在上调蛋白中被富集，坏死性凋亡信号通路在下调蛋白中被富集。通过对筛选到的 70 个显著差异蛋白进行 PRM 验证，鉴定出 20 个差异蛋白。qPCR 方法对 PRM 靶向验证的 20 个蛋白中的 8 个蛋白编码基因（IFIT1、ISG15、PARP14、PARP9、GRB2、RPS9、RACK1、RSAD2）进行 mRNA 表达水平的验证，PARP14、PARP9 和 RPS9 基因的 mRNA 表达水平与蛋白水平表达模式保持一致，其余基因的 mRNA 表达水平与对应的蛋白水平表现出不同的变化趋势。细胞周期和凋亡结果显示，干扰 STAT3 表达导致细胞周期 G1/S 期阻滞，导致乳腺上皮细胞增殖能力下降，从而抑制细胞增殖。反之，过表达 STAT3 可促进乳腺上皮细胞增殖并抑制细胞凋亡。前人研究表明，STAT3 信号通路在猪乳腺上皮细胞中调节细胞增殖和凋亡的平衡，适度的 STAT3 活化可以促进细胞增殖，并同时抑制细胞凋亡，从而维持乳腺上皮细胞的正常生长和发育。然而，过度的 STAT3 激活可能导致细胞增殖过程的异常，甚至与肿瘤的发生和发展相关。本研究有助于深入了解乳腺发育和疾病过程中 STAT3 信号通路的功能，并为乳腺疾病的预防和治疗提供了新的潜在靶点和治疗策略。

主要参考文献：

略

基金项目：贵州省科技支撑计划（黔科合支撑[2021]一般 147 号）。
※ 作者简介：吴燕（1998-），女 ，贵州玉屏人，在读硕士研究生，研究方向： 动物遗传育种与繁殖，E-mail：3196236912@qq.com。
※※ 通信作者：张依裕（1976-），男，贵州黔西人，教授，博士，研究方向： 动物遗传与育种，E-mail：zyy8yyc@163.com。

豫南黑猪的遗传多样性分析及背膘厚基因定位

胡潘阳※，张孟浩，张犇，李新建，韩雪蕾，王克君，李秀领，杨峰，乔瑞敏※※
（河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046）

引言

豫南黑猪是以河南地方品种淮南猪和杜洛克为亲本，历经 11 年 9 个世代培育的瘦肉型猪种，包含 37.5%淮南猪血统和 62.5%杜洛克血统。近年来由于缺乏系统选育和重大疫病影响，豫南黑猪背膘厚性状的一致性下降。本研究通过豫南黑猪的群体遗传结构分析和背膘厚性状的全基因组关联分析，明确豫南黑猪的分子系谱，定位其背膘厚性状的影响基因，为豫南黑猪背膘厚性状的快速选育提供理论依据。

材料与方法

本研究以 120 头核心群豫南黑猪为研究对象，记录背膘厚性状数据，包括 P2 点、肩部最厚处、六七肋骨处、最后肋骨处、腰荐结合处的背膘厚度和平均背膘厚。利用康普森“中芯一号”50K SNP 芯片进行个体基因分型。使用 PCA、t-SNE 和 NJ-tree 方法对分型数据进行群体结构分析。利用 PLINK 计算豫南黑猪、淮南猪和杜洛克的遗传参数 MAF、Ho、He 及基于 ROH 的近交系数（F_{ROH}），评估豫南黑猪遗传多样性。最后采用 GEMMA 软件的混合线性模型，在淮南猪和杜洛克猪的背景下定位豫南黑猪不同胎次不同背膘厚性状的相关基因组区域，确定影响豫南黑猪背膘厚性状的基因，综合豫南黑猪的遗传结构，确定豫南黑猪群体下一步的配种和分子育种工作。

结果与讨论

PCA 和 t-SNE 的结果显示，豫南黑猪共有 3 个分子血统，今后将在血统间进行轮交开展生产育种工作。豫南黑猪 MAF、Ho、He 均高于淮南猪和杜洛克，初步说明豫南黑猪具有较高的遗传多样性，F_{ROH}=0.043 显示豫南黑猪没有近交的风险。

通过 GWAS 分析，在 6 个背膘性状中共检测到 34 个与背膘厚性状相关的显著 SNPs，在这些显著 SNP 左右 1 Mb 存在 15 个与脂肪生成或代谢的相关基因，包括 *SAMD12*、*HACD2*、*SLC30A8* 等。显著 SNPs 所在 SSC4（20.03-21.43 Mb）与 P2 点和最后肋骨处背膘厚以及平均背膘厚显著相关，且该区域曾被报道存在一个平均背膘 QTL[1]（20.37-21.95 Mb），该区域的连锁不平衡分析共检测到 4 个连锁区块，其中在 block 4 中仅存在 1 个基因 *SLC30A8*，该基因编码锌转运蛋白，参与胰岛素的分泌，而胰岛素分泌受损和胰岛素抵抗是 II 型糖尿病的发病机制[2]，因此本研究认为其可能是影响豫南黑猪背膘厚的关键基因。综上，本研究定位到的显著位点所在的区间对豫南黑猪后续的杂交生产和背膘厚性状的快速遗传改良提供了理论依据。

主要参考文献

[1] Bink M C，Te Pas M F，Harders F L，et al. A transmission disequilibrium test approach to screen for quantitative trait loci in two selected lines of large white pigs[J]. Genet Res，2000，75 （1）：115–121.

[2] Witka B Z，Oktaviani D J，Marcellino M，et al. Type 2 diabetes-associated genetic polymorphisms as potential diseasepredictors[J]. Diabetes Metab Syndr Obes，2019，12：2689–2706.

※ 作者简介：胡潘阳，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：hpy9809@163.com。
※※ 通讯作者：乔瑞敏，副教授，硕士生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：qrm480@163.com。

影响苏淮猪胴体背膘厚 QTL 和候选基因的鉴别

刘倩[1※]，许会英[1]，于江辉[1]，赵清波[1]，李平华[1,2※※]，黄瑞华[1,2※※]
（1. 南京农业大学养猪研究所（农业农村部畜禽（猪）资源评价利用重点实验室（南京）），江苏南京 210095；
2. 南京农业大学淮安研究院，江苏淮安 223001）

引言

背膘是猪背部皮下脂肪组织，是一种白色脂肪组织，其沉积能力直接影响猪的胴体品质、瘦肉率以及种猪的繁殖性能[1]。苏淮猪是含有 1/4 淮猪血统和 3/4 大白猪血统的新型培育品种，具有肉质优、耐粗饲、生长速度较快等特点。但苏淮猪的背膘厚度相对于西方猪种仍比较厚，养殖者期望对背膘厚性状持续选育，以提高养殖经济效益。背膘厚是一种典型的数量性状，具有中等到高等的遗传力（0.12～0.74）[2]，因此本研究对苏淮猪胴体背膘厚进行全基因组关联分析（Genome-Wide Association Study，GWAS），旨在鉴定与背膘厚相关的数量性状基因座（Quantitative Trait Locus，QTL）和候选基因。

材料与方法

试验对象为 2017 年至 2019 年在淮安市淮阴新淮种猪场筛选的 418 头 80~90kg 的苏淮猪，饲养的环境与饲料日粮基本相同。屠宰并测定其肩部最厚处背膘厚、胸腰结合处背膘、第 6、7 肋骨处背膘厚及腰荐结合处背膘厚。通过 GGP Porcine 80K SNP （纽勤生物科技有限公司）基因芯片分型，并填充至重测序水平。基于基因芯片分型数据和填充数据利用 LDAK 软件[3]对各个背膘厚参数进行单个标记的混合线性模型 GWAS 分析。

结果与讨论

在 SSC1、4、12、14 共鉴别到 65 个候选位点与苏淮猪群体的不同部位的背膘厚性状显著关联。基于填充数据 GWAS 在 SSC2、4、9 鉴别到 4 个与苏淮猪第 6-7 肋背膘厚相关的 QTL，在 SSC4 鉴别到 1 个与苏淮猪腰荐结合处背膘厚相关的 QTL，鉴别到的 5 个 QTL 均为新发现的 QTL。在鉴定到的 5 个 QTL 上下游 250Kb 的候选区间内筛选到 50 个与脂肪沉积相关的基因，筛选到的基因富集到 25 个与脂肪沉积相关的通路，主要为胰岛素、胰高血糖素和胰岛素抵抗等通路，通过调节葡萄糖和脂质的代谢影响脂肪的沉积。对筛选到的基因进一步分析，鉴别到已经报道过的影响背膘厚的候选基因 *PLAG1*、*PEA15*、*CRTC2*。黄弋轩[4]对莱芜猪和二花脸猪背膘厚进行 GWAS，表明 *PLAG1* 基因与猪的背膘厚相关。Verschoor[5]等研究表明 *PEA15* 基因双敲除的小鼠与野生型小鼠相比，体重增加，白色脂肪组织扩张更大，*PEA15* 表现为脂肪沉积强有力的候选基因。同时鉴定到 3 个新发现的背膘厚候选基因 *TGS1*、*COPA*、*SLC27A3*。王立刚[6]等在猪肌内脂的 GWAS 中发现 *COPA* 基因所编辑的 α 亚基为与肌内脂相关的候选 RNA 编辑位点。研究表明在 *TGS1* 基因与胰腺 β 细胞质量和功能的研究发现，该基因在高脂饲喂的小鼠胰岛素中上调，该基因缺失会诱导葡萄糖稳态和胰岛素分泌发生改变[7]。本研究鉴定到影响猪背膘厚的 QTL 及候选基因，能够丰富猪背膘厚调控机制的分子理论，为苏淮猪的背膘厚性状选育和改良提供分子标记。

主要参考文献

略

※ 作者简介：刘倩，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：liuqian521818@163.com。
※※ 通讯作者：李平华，研究员，硕士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：lipinghua718@njau.edu.cn。
通讯作者：黄瑞华，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：rhhuang@njau.edu.cn。

全基因组关联分析挖掘影响荷兰大白猪乳头数的新QTL和候选基因

邱子健[1※]，邓汨超[1]，钟丽菁[3]，李平华[1,2]，黄瑞华[1,2※※]，赵清波[1※※]
（1.南京农业大学动物科技学院，江苏南京 210095；2.南京农业大学淮安研究院，江苏淮安 223322；
3.江苏立华牧业股份有限公司，江苏常州 213168）

引言

针对瘦肉型种猪，繁殖性状是很重要的选育目标。随着产仔数的增加，母猪能否拥有更多的乳头去喂养仔猪关系到仔猪断奶存活率[1]，乳头的缺乏还会影响仔猪的增重和生长[2]。因此在猪的选育过程中，母猪乳头数性状的选育引起了育种研究者的重视[3]，鉴别影响猪的乳头数性状的遗传位点和基因有助于猪繁殖性能的遗传改良。目前已有研究对不同品种的猪开展了乳头数性状相关 QTL 鉴定，但关于荷兰系大白猪乳头数性状相关 SNP 的研究较少。

材料与方法

本研究以 1166 头荷兰系大白猪群体为研究对象，使用 50K SNP 芯片对具有乳头数表型的大白猪进行基因分型，并将芯片数据填充至重测序水平。采用 HIBLUP（v1.1.0）软件基于芯片数据估计该群体乳头数遗传参数。采用 LDAK 软件分别基于芯片数据和填充数据进行单个标记与表型之间的关联分析。使用 CAVIARBF 软件基于填充数据的 GWAS 结果进行贝叶斯精细定位，计算每个 SNP 的因果后验概率，位于后验概率大于 0.95 的区域内的基因被认为是影响荷兰大白猪乳头数的候选基因。

结果与讨论

经估计左乳头数、右乳头数和总乳头数的遗传力分别为 0.21、0.19 和 0.3，属于中等遗传力性状。使用全基因组关联分析（GWAS）的方法，基于芯片数据，在 SSC2、SSC5、SSC9 和 SSC13 上鉴别到显著影响猪右乳头数的 SNP；在 SSC2、SSC5 和 SSC7 上鉴别到显著影响猪总乳头数的 SNP。基于填充数据，在 SSC17 上鉴别到显著影响猪左乳头数的 QTL；在 SSC2 和 SSC9 上鉴别到显著影响猪右乳头数的 QTL；在 SSC5 和 SSC6 上鉴别到显著影响猪总乳头数的 QTL。本研究共发现了 4 个新的 QTL。使用贝叶斯精细定位的方法对填充数据 GWAS 中鉴别到的 QTL 进行精细定位，分别确定了影响左乳头数（SSC17：45.22Mb-46.20Mb）、右乳头数（SSC9：122.18Mb-122.80Mb）和总乳头数（SSC5：14.01Mb-15.91Mb、SSC6：120.06Mb-121.25Mb）的 QTL 置信区间，共获得 52 个候选基因。通过基因注释，其中 *WNT10B*、*AQP5*、*FMNL3*、*NUAK1* 和 *CKAP4* 是首次发现的与猪乳头数性状相关的强候选基因。这些发现将为猪的乳头数性状的分子遗传育种提供参考。

主要参考文献

[1]Hirooka H，De Koning D J，Harlizius B，et al. A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs[J]. Journal of Animal Science，2001，79（9）： 2320–2326.

[2]Chalkias H，Rydhmer L，et al. Genetic analysis of functional and non-functional teats in a population of Yorkshire pigs[J]. Livestock Science，2013，152（2）： 127–134.

[3]Fang F，Li J，Guo M，et al. Genomic evaluation and genome-wide association studies for total number of teats in a combined American and Danish Yorkshire pig populations selected in China[J]. Journal of Animal Science，2022，100（7）： skac174

※ 作者简介：邱子健，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：2021105010@stu.njau.edu.cn。
※※ 通讯作者：黄瑞华，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：rhhuang@njau.edu.cn。
通讯作者：赵清波，副研究员，研究方向为猪遗传育种。E-mail：zhaoqingbo@njau.edu.cn。

用初生重预测长白和杜洛克达 115kg 日龄和背膘厚

张犇[1※]，胡潘阳[1]，石丽丹[1]，吴相哲[1]，李新建[1,2]，韩雪蕾[1]，王克君[1]，李秀领[1]，杨峰[1]，辛文水[2※※]，乔瑞敏[1※※]

（1.河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046；2. 海南省农业科学院三亚研究所，海南三亚 572000）

引言

种猪的育种评价通过计算估计育种值（EBV）来完成，而 EBV 的计算依赖于表型的测定。有些表型，如达 115 kg 日龄（AGE）和背膘厚（BF）的测定是一项耗时费力的工作，并有加速疾病传播的风险。因此，为了简便估计 EBV 并减少疫病传播的风险，人们开始关注表型之间的相关性，力求寻找一种易测的表型来作为其他表型的预测指标。本研究通过分析长白和杜洛克的初生重（BW）、AGE 和 BF 的遗传参数，并利用 BW 和 BW 与 AGE、BF 的方差关系预测 AGE 和 BF 的估计育种值 EBV’，并验证预测的准确性。

材料与方法

试验对象为国内某核心种猪场 2001 年至 2018 年出生的 26614 头长白猪和 19984 头杜洛克猪，所有种猪的饲养管理水平相同，收集并记录系谱信息（46598 条）、生长性状信息（BW、AGE、BF 均 46598 条）。首先通过 R 软件分别对测定场、出生年份、品种和性别 4 个因素进行固定效应显著性检验，确定影响 BW、AGE、BF 的固定效应。其次，运用 DMU 软件的 AI 版块，利用多性状动物模型估计 BW、AGE、BF 的群体遗传参数和 EBV。在 10 折交叉验证下，缺失部分长白猪群体和杜洛克猪群体的 AGE 和 BF（缺失总数的十分之一），然后通过 BW 和性状之间（BW 和 AGE、BW 和 BF）的方差关系，分别计算 AGE 或 BF 表型缺失个体的 AGE 和 BF 的“预测”估计育种值 EBV’。通过 Kendall 方法计算 EBV 和 EBV’的相关性评估 BW 预测 AGE 和 BF 育种值的准确性。

结果与讨论

研究结果显示，测定场、出生年份、性别和品种对 BW、AGE 和 BF 的影响具有极显著性（P<0.01）。长白和杜洛克的 BW、AGE、BF 的估计遗传力分别为 0.4 和 0.37、0.28 和 0.28、0.14 和 0.15，其中 BW 和 AGE 属于中等遗传力，BF 则较低，与先前研究的猪生长性状遗传力范围在 0.1-0.6 之间相符。长白猪群体中，BW 和 AGE 遗传相关为-0.213，表型相关为-0.248；而杜洛克群体中，BW 和 AGE 遗传相关为-0.214，表型相关为-0.240。通过分析 BW 和性状（AGE、BF）之间的方差关系，预测缺失个体的育种值，结果显示长白和杜洛克两个品种中 BW 对 AGE 和 BF 的预测准确性分别为 0.655 和 0.611，0.665 和 0.617。在加入窝效应后，准确性分别提高了 1%和 5.4%，4%和 3.2%。初生体重是养猪生产中的重要经济性状，也是最容易测量的表型值。许多研究人员将初生体重作为早期选择的标准，通过选留初生重大的个体缩短出栏时间，达到降本增效的目的[1]。本研究表明，在一定程度上，初生体重可以作为长白和杜洛克达到 115 kg 日龄和背膘厚 EBV 的预测指标，并且窝效应可以提高预测的准确性，提示我们充分挖掘历史数据及当前已有的数据记录，利用现有数据及协同选育的方法预测缺失表型个体的 EBV 是个不错的选择。

主要参考文献

[1] Bangar YC，Magotra A，Yadav AS. Estimates of covariance components and genetic parameters for growth，average daily gain and Kleiber ratio in Harnali sheep[J]. Trop Anim Health Prod， 2020，52：2291-2296.

※ 作者简介：张犇，在读硕士研究生，研究方向为动物育种与繁殖。E-mail：zbandfs@163.com。

※※ 通讯作者：辛文水，博士，副研究员，研究方向为猪遗传育种。E-mail：xinwenshui@yeah.net。

通讯作者：乔瑞敏，副教授，硕士生导师，研究方向为生猪遗传育种与繁殖。E-mail：qrm480@163.com。

基于全基因组重测序技术挖掘秦川黑猪生长性状优势基因

曹明浩※，黄燕燕，吕广泉，李栋，杨公社，于太永※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西省动物遗传育种与繁殖重点实验室，陕西杨凌 712000）

引言

秦川黑猪是以关中黑猪为母本，丹系大白猪为父本，采用群体闭锁继代选育法和分子育种技术正在培育的新品种。本研究通过对秦川黑猪 G1 世代群体进行全基因组重测序，探究 G1 世代群体的遗传多样性和遗传结构，采用选择信号分析筛选受选择区域和优势性状候选基因，并结合生长表型数据进行全基因组关联分析（Genome-wide association study，GWAS）等手段挖掘与生长性状相关的重要候选基因，为加快秦川黑猪育种进程提供一定的理论基础和分子依据。

材料与方法

试验对象为西北农林科技大学畜牧教学实验基地 99 头秦川黑猪，收集并统计了该猪场 2021 年 6 月至 2022 年 9 月的所有在群个体生长性状表型信息，共计 542 头。利用全基因组重测序技术获得个体基因型数据并进行质控。将重测序数据比对至当前猪参考基因组，检测秦川黑猪基因组的遗传变异信息，通过邻接树、主成分分析和群体结构分析分子系谱和鉴定血统组成，统计群体连续长纯和片段（ROH）信息，计算群体近交系数。基于个体表型数据，对秦川黑猪生长性状进行遗传参数估计。利用基因型和表型数据，进行选择信号分析和全基因组关联分析，挖掘与生长性状相关的关键基因。

结果与讨论

本研究主要结果如下：（1）分子系谱结果表明，秦川黑猪 G1 世代群体分为 4 个家系；ROH 检测结果显示群体平均近交系数为 0.08，表明群体内近交程度较高；连锁不平衡衰减分析表明家系 4 的遗传多样性较高。（2）遗传参数估计研究表明，出生季节对秦川黑猪 G1 世代早期生长具有极显著影响（$P < 0.01$）；除 2 月龄管围遗传力为 0.02 外，2 月龄和 4 月龄其他生长性状遗传力在 0.31-0.51 之间，属于中高遗传力水平；2 月龄和 4 月龄体重和体尺性状的遗传相关分别在 0.07-0.98 和 0.53-0.99 之间，表型相关在 0.62-0.89 和 0.65-0.83 之间，均为正相关。（3）采用 Fst 和 XP-CLR 进行秦川黑猪与大白猪群体间信号分析，检测到 *MPP7*、*CHD9*、*RFTN2*、*TMEM170B*、*CSN1S2*、*BAMBI* 等 43 个候选基因，分别与猪生长、繁殖等性状相关；基因功能富集到一些与骨骼生长发育（Rap1 signaling pathway）、胚胎发育和器官生长（Hippo signaling pathway）、生殖激素合成与分泌（GnRH signaling pathway）和能量代谢和抗病抗癌（Apelin signaling pathway）等相关的通路；QTL 映射发现秦川黑猪基因组上受到正向选择的 43 个候选基因映射到生长、繁殖、胴体和肉质等性状的 QTL 区域。（4）采用混合线性模型（Mixed Linear Mode，MLM）、固定随机模型循环概率模型（Fixed and random model Circulating Probability Unification，FarmCPU）和贝叶斯信息与连锁不平衡迭代嵌套式模型（Bayesian-information and Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway，BLINK）三种模型对秦川黑猪生长性状进行全基因组关联研究，发现 FarmCPU 模型能够较好地检测出生长性状显著相关的变异位点；经 GWAS 分析后在 2 月龄体长性状上发现了 10 个显著的 SNPs，SNP 注释筛选到 *ABHD5*、*MAP3K1* 和 *FAM180A* 等 30 个候选基因，基因功能注释后发现这些基因与骨骼发育、平均初生重、抗病性和免疫相关。

本研究通过对秦川黑猪生长性状进行遗传参数估计、群体遗传学分析、选择信号检测和全基因组关联分析，鉴定到 *MPP7*、*ABHD5* 等与秦川黑猪生长性状相关的基因，研究结果为秦川黑猪后续育种方案的制定和优化提供了参考，为秦川黑猪基因组选择育种体系的建立提供了分子标记。

主要参考文献

略

※ 作者简介：曹明浩，在读硕士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：caominghao@nwafu.edu.cn。
※※ 通讯作者：于太永，副教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yutaiyong310@nwsuaf.edu.cn。

淫羊藿苷对猪卵巢颗粒细胞雌二醇合成、增殖和凋亡的影响

王津洁※，褚瑰燕※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100）

引言

提高母猪繁殖性能是我国畜牧业发展的重要研究方向，卵泡的生长发育状态会直接影响卵巢组织的正常生理功能，而颗粒细胞作为卵泡中主要的体细胞，其雌二醇合成、增殖和凋亡会影响卵泡的生长发育和闭锁，因此探究调控颗粒细胞雌二醇合成、增殖和凋亡的影响因素至关重要[1]。淫羊藿是一种传统的草本植物，淫羊藿苷（Icariin，ICA）是淫羊藿的主要活性成分，它对动物机体的心血管系统、运动系统、免疫系统、神经系统等具有广泛的生物学功能[2]。已有研究证明 ICA 有明显的性激素样作用，能促进雌性生殖器官发育，保护生殖损伤[3]。目前 ICA 对于母猪繁殖的作用研究还比较少。因此，本研究以猪卵巢颗粒细胞为研究对象，旨在探究 ICA 对猪卵巢颗粒细胞雌二醇合成、增殖和凋亡的影响。

材料与方法

试验对象为猪原代卵巢颗粒细胞，在含 FBS 的 DMEM/F12 培养基中添加 ICA 并培养 24h，采用 RT-qPCR、Western Blot、Elisa、流式细胞术、EdU 染色、CCK-8、免疫荧光等方法探究 ICA 对猪卵巢颗粒细胞雌二醇合成、增殖和凋亡的调控作用，采用 SPSS21.0 软件对试验数据进行单因素方差分析。

结果与讨论

通过 CCK-8 试验检测在体外培养猪卵巢颗粒细胞的培养基中添加不同浓度的 ICA 后颗粒细胞的增殖情况，确定猪卵巢颗粒细胞体外培养过程中添加 ICA 最佳浓度为 0.1uM（$P<0.05$），并在后续试验中添加该浓度的 ICA。Elisa 检测细胞上清中雌二醇和孕酮的浓度结果显示 0.1uM ICA 显著促进猪卵巢颗粒细胞雌二醇的分泌（$P<0.05$），并显著上调颗粒细胞中雌二醇合成关键基因 *StAR*（$P<0.05$）、*Cyp19a1*（$P<0.001$）、*HSD3β1*（$P<0.001$）mRNA 水平的表达，显著上调雌二醇合成关键蛋白 StAR（$P<0.01$）、Cyp11a1（$P<0.05$）、Cyp17a1（$P<0.05$）的表达。表明体外培养过程中添加 0.1uM ICA 能够促进猪卵巢颗粒细胞雌二醇合成。EdU 细胞增殖试验结果显示，0.1uM ICA 能够显著促进猪卵巢颗粒细胞增殖（$P<0.05$），并上调细胞周期相关基因 *Cyclin B*（$P<0.001$）、*Cyclin D*（$P<0.05$）、*Cyclin E*（$P<0.001$）和 *CDK4*（$P<0.01$）mRNA 的表达，显著上调细胞周期相关蛋白 Cyclin D1（$P<0.05$）、Cyclin E1（$P<0.001$）和 CDK4（$P<0.01$）的表达，表明体外培养过程中添加 0.1uM ICA 能促进猪卵巢颗粒细胞增殖。此外，通过流式细胞仪检测 Annxin V-FITC/PI 双染的颗粒细胞结果显示 0.1uM ICA 显著增加了活细胞比例（$P<0.05$），并显著降低早期凋亡的细胞比例（$P<0.01$），表明体外培养过程中添加 0.1uM ICA 抑制了猪卵巢颗粒细胞凋亡。综上所述，本研究表明在体外培养的猪卵巢颗粒细胞中，ICA 能促进颗粒细胞的雌二醇合成，促进细胞增殖并抑制细胞凋亡，为促进卵泡的生长发育从而提高母猪的繁殖性能提供了可参考的理论依据。

主要参考文献

略

※ 作者简介：王津洁，在读硕士研究生，研究方向为动物生物技术。E-mail：wangjinjie199905@163.com。
※※ 通讯作者：褚瑰燕，副教授，博士生导师，研究方向为猪繁殖生理。E-mail：guiyanchu@nwafu.edu.cn。

专题报告

17℃负压环境下谷胱甘肽对猪精液保存质量的影响

张 涵※，王赫川，李天峰，王 骞，张 群，孙 超，黄大鹏，魏国生，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学 动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

为探究谷胱甘肽(glutathione，GSH)在 17℃负压环境下对猪精液保存质量及抗氧化能力的影响，试验采集 4 头 2~3 岁的健康长白猪精液，取合格精液混合后分为 4 组进行稀释保存，试验Ⅰ组未在 Modena 稀释液中添加 GSH，试验Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组在 Modena 稀释液中添加 1、5、10 mmol/L GSH，4 组精液均在 17 ℃、-0.04 Mpa 条件下保存 11 d，分别在 0、1、3、5，7、9、11 天检测精子活率、精子活力、精子畸形率及运动参数[曲线线速度、平均路径速度、鞭打频率（除第 1 天外）]指标和精液的抗氧化能力（T-AOC）及 H_2O_2 含量。结果表明：第 1、3、5、7、9、11 天时，添加 1、5、10 mmol/L GSH 的精子活率、精子活力及运动参数（曲线线速度、平均路径速度、鞭打频率）指标和精液的抗氧化能力（T-AOC）均高于未添加 GSH，精子畸形率、H_2O_2 含量（除第 1 天外）低于未添加 GSH。其中第 11 天时，添加 5 mmol/L GSH 的精子活率可达 18.5%，显著高于添加 1、10 mmol/L GSH（P <0.05）；第 5 天时，添加 5 mmol/L GSH 的精子活力显著高于添加 1，10 mmol/L GSH （P<0.05），第 11 天时，添加 5 mmol/L GSH 的精子活力显著高于添加 1 mmol/L GSH（P<0.05），与 10 mmol/L GSH 差异不显著（P>0.05）；第 7 天时，添加 5 mmol/L GSH 的精子畸形率显著低于添加 1、10 mmol/L GSH（P<0.05），第 11 天时，添加 5 mmol/L GSH 的精子畸形率最低，显著低于添加 1 mmol/L GSH（P <0.05），但与添加 10 mmol/L GSH 差异不显著（P>0.05）；第 11 天时，添加 5 mmol/L GSH 的鞭打频率显著高于添加 1、10 mmol/L GSH（P <0.05）；第 9 天时，添加 1、5 mmol/L GSH 的 T-AOC 显著高于添加 10 mmol/L GSH（P<0.05）；第 3、5、9、11 天时，添加 1、5 mmol/L GSH 的 H_2O_2 含量均显著低于添加 10 mmol/L GSH（P<0.05）。 说明在-0.04 MPa 条件下添加 GSH 可提高 17℃保存的猪精液的精子品质和抗氧化性能，其中添加 5 mmol/LGSH 最合适。

主要参考文献

略

基金项目：黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育（自然）项目（ZRCPY202107）；黑龙江八一农垦大学博士启动基金项目（XYB-2016-04）；黑龙江八一农垦大学学位与研究生教育教学改革项目(YJG202006)。
※ 作者简介：张涵（1998-），女，黑龙江省大庆市人。E-mail：394607151@qq.com。
※※ 通讯作者：李井春，E-mail：ljchun112@163.com.,固定电话：13936906905，手机号：13936906905。

四种抗氧化剂对猪精液冷冻保存影响研究进展

冯赫泽※，宋宇伦，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

随着我国养猪业的发展，人工授精已成为包括精液保存在内的猪育种关键技术。作为人工授精技术的核心，精子体外保存过程中防止氧化应激和降低精子质量越来越受到重视。猪精子抗氧化作为猪精液冷冻保存技术当中最为重要的环节，由于猪精液在冷冻-解冻过程中精子细胞膜磷脂不饱和脂肪酸浓度与牛羊相比较高，更易受到 ROS 攻击，导致抗氧化能力降低并造成猪精子的氧化损伤。本文对维生素 E、没食子酸、丹参素、迷迭香酸在猪精液冷冻保存中的应用进行综述，旨在为未来猪生产技术以及人工授精发展应用提供参考。为了保证养猪生产效率和生产质量，现在多采用人工授精进行规模化生产养殖。目前猪精液地保存方法多采用常温下 17℃保存、4℃的低温保存、超低温-79℃（干冰）或-196℃（液氮）三种方法。随着人工授精技术在养猪业的普及，对猪精液保存技术的研究正在逐步深入。猪精液可以在常温下短时间保存，并且精子活力和质量也受许多因素影响。与冷冻精液相比，常温保存的精液受孕率高、投资少、人工操作方便，可产生较大的经济效益。因此与其他方法相比，常温保存精液是猪人工授精的首要选择。虽然常温保存技术被广泛应用，但冷冻精液在储存、运输、使用地域、抵抗疫病、节约配种成本、降低育种强度方面与常温精液相比优势显著。目前，由于猪精子结构的特殊性，猪精液冷冻保存技术始终没有获得突破性进展，世界上应用猪冻精进行人工授精所占的比例不到 1%。因此，可以尝试通过研究例如没食子酸、丹参素和迷迭香酸等在猪精液冷冻保存中的抗氧化能力，并选取出效果最佳的抗氧化剂加入到冷冻稀释液中，以便在猪生产实践中提高生产效率。

主要参考文献

略

基金项目：黑龙江省自然科学基金联合引导项目，编号：LH2022C068；黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育（自然）项目，编号：ZRCPY202107；黑龙江省大学生创新创业训练计划项目（创业实践项目，编号：S202210223120S）。
※ 作者简介：冯赫泽（1999-），男，黑龙江省大庆市人。E-mail：1623509628@qq.com。
※※ 通讯作者：李井春，E-mail：ljchun112@163.com,固定电话：无，手机号：13936906905。

枸杞多糖对猪精液低温保存质量的影响

宋宇伦※，冯赫泽，魏国生，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

引言

猪精液对温度较其他精液更为敏感，若降温速度过快，精子容易发生冷休克或低温损伤，使精子处于氧化应激状态，产生大量活性氧（ROS），对精子结构及功能造成损伤[1]。枸杞多糖是枸杞的主要提取物，具有抗衰老化、抗细胞凋亡、调节血糖等多种生物活性。为研究不同浓度的枸杞多糖在低温条件下保存精子质量的影响，选出适宜浓度的枸杞多糖，以保存猪精液。

材料与方法

本试验在稀释液中分别添加 0、0.5、1、1.5、2mg/mL 枸杞多糖，分为对照组和试验组，在保存 1d、3d、5d、7d 时，通过迈朗全自动精子分析仪等仪器分别检测精子活率、活力、直线速度、路径速度和精子畸形率，探讨不同浓度枸杞多糖对猪低温保存精子质量的影响。

结果与讨论

结果显示，在低温环境下，对比不同浓度的枸杞多糖对猪精液精子活率影响的试验结果表明，各组添加不同浓度枸杞多糖的猪精液，随着保存天数的增加，精子活率以及精子活力均呈下降趋势。低温保存 3d 开始，各组之间与试验组差异明显，1.5mg/mL 浓度枸杞多糖组的精子活率最高，其次是 0.5mg/mL 组，5-7d 时，各试验组之间差异显著，其中加入 1.5mg/mL 浓度的枸杞多糖，所维持的精子活率和精子活力最优。随着保存天数的增加，直线速度、路径速度也均呈下降趋势。低温保存猪精液在 3d 之前，各组之间差异不显著，1.5mg/mL 组的各项参数指标最佳，其次是 1mg/mL 组，3-5d 时，1mg/mL 组与 1.5mg/mL 组之间路径速度无明显差异，到 7d 时，1mg/mL 组与 1.5mg/mL 组差异显著。随着试验天数的增加，对照组与试验组的精子畸形率均呈上升趋势。保存 1-5d 时，各组畸形率上升趋势较缓慢，保存 5-7d 时，各组畸形率急剧上升，其中 1.5mg/mL 浓度枸杞多糖上升幅度最缓慢。综上所述，添加 1.5mg/mL 枸杞多糖，保存 5-7d 时，精子活率、活力、直线速度、路径速度、精子畸形率分别为 55.14%、33.53%、39.29μm/s、34.42μm/s、16.59%，各项指标均显著优于对照组（$P<0.05$）。低温保存条件下添加 1.5mg/mL 的枸杞多糖效果最佳，为低温保存猪精液提供了参考。

主要参考文献

[1]胡传活，许春荣，陆媚，等.黄芪多糖对猪精液低温保存的影响[J].中国兽医学报，2015，35（01）：150-154.

基金项目：黑龙江省博士后启动基金项目（LBH-Q18100）；黑龙江八一农垦大学博士启动基金项目（ XYB-2016-04）；黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育（自然）项目（ZRCPY202107）。
※ 作者简介：宋宇伦，在读硕士研究生，研究方向为动物繁殖生物技术。E-mail：1469443547@qq.com。
※※ 通讯作者：李井春，副教授，硕士生导师，研究方向为动物繁殖生物技术。E-mail：ljchun112@163.com.。

维生素 E 对猪精液常温负压保存效果影响

李天峰※，张　涵，王赫川，王　骞，孙　超，郭　庆，魏国生，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学 动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

摘　要：为了探究不同浓度维生素 E 在负压（-0.04 MPa）条件下对猪精液常温（17 ℃）保存效果的影响，试验分为 A、B、C、D 组，分别添加浓度为 0、0.1、0.5、1 mg/mL 的维生素 E，将维生素 E 加入 Modena 基础稀释液中，将稀释完成的精液分装入真空瓶中，通过真空泵将瓶内压强调整为-0.04 MPa。再用全自动精子质量分析仪检测猪精子质量指标及畸形率，用酸度计检测猪精液 pH 值，用相应试剂盒检测总抗氧化能力（T-AOC）活性及过氧化氢（H_2O_2）含量。结果表明：在精液保存至第 7、11 天时，0.5 mg/mL 维生素 E 添加组的精子活率显著高于其他各组（P<0.05），且在第 1~5 天精子活率高于 60%；在精液保存期间，0.5 mg/mL 维生素 E 添加组的精子活力高于其他组，与此同时，该组精子平均直线速度、平均曲线速度、平均路径速度及鞭打频率均高于其他组，畸形率低于其他组；在精液保存至第 9 天时，0.5 mg/mL 维生素 E 添加组的精子总抗氧化能力（T-AOC）显著高于其他组（P<0.05）；在精液保存至第 9、11 天时，0.5 mg/mL 维生素 E 添加组的过氧化氢（H_2O_2）含量显著低于其他组（P<0.05）；在精液保存期间，0.5 mg/mL 维生素 E 添加组 pH 值的下降趋势相较其他组最缓慢，pH 值最高，使猪精子处于较为适宜的弱酸环境中。试验结果说明，将 0.5 mg/mL 维生素 E 添加到 Modena 基础稀释液中有助于猪精液在常温负压条件下保存。

主要参考文献

略

基金项目：黑龙江省博士后启动基金项目(LBH-Q18100)；黑龙江八一农垦大学博士启动基金项目(XYB-2016-04)；黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育(自然)项目(ZRCPY202107)。
※ 作者简介：李天峰（1997-），男，黑龙江省大庆市人。
※※ 李井春，E-mail：ljchun112@163.com,固定电话：13936906905，手机号：13936906905。

黑龙江祥龙祖代猪场长白猪核心群的选育及杂交繁育体系建立

姚美玲*，林秀蔚，韩永胜，刘文，丁得利，李伟，朱元芳，王艳菲，李青莹，黄萌，王德香，郭春晖，姚爽，丁丽艳，李平，王皓，李红宇，高圣玥
（黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院，黑龙江齐齐哈尔 163005）

引言

目前，我国的养猪业正处于由数量增长向质量提升转变的关键时期，养猪产业面临着日益突出的“种猪大战”。由于缺乏核心群选育和杂交繁育技术，导致我国猪品种基础不牢、整体水平较低、种猪性能退化、生产性能下降等问题日益突显。因此，如何建立完整的养猪育种体系、提升种猪质量和生产水平是养猪业发展面临的紧迫问题。近年来，我国已成为世界上最大的生猪生产国和消费国，2018 年出栏量位居世界第一。但在种猪质量方面，我国与美国、加拿大等发达国家相比存在较大差距，因此，需从国外引进优良种猪资源开展杂交育种工作。养殖过程中出现的母猪繁殖障碍性疾病、产仔数降低等问题严重制约着我国养猪产业的发展。本文以黑龙江省祥龙祖代猪场为例，在开展种猪引进和推广的基础上，通过制定科学的核心群选育目标、建立杂交繁育体系等措施，成功培育出具有高繁殖力、高生长速度等特点的长白猪核心群，建立了以生产性能测定为基础的杂交繁育体系，并对杂交繁育体系下不同生产性能指标进行测定。本文介绍了祥龙祖代猪场在核心群选育和杂交繁育体系下对长白猪生产性能指标的测定，依据性能指数组建核心群种猪，确定猪群选育目标，建立选择指数，持续对猪群进行选育，为中小规模猪场开展场内种猪选育和繁育体系建立提供指导。

材料与方法

试验对象为黑龙江省祥龙祖代猪场长白猪群，核心群种猪根据配种计划每世代从 30 头母猪的后代中选择公母各一头，分别于 2 月龄、4 月龄、6 月龄测定猪只的体重、体长及背膘厚度；母猪繁殖成绩主要测定母猪窝产总仔字数、窝产活仔数、初生窝重及个体重、20 日龄窝重及 28 日龄断奶重和母猪断奶到再发情时间；繁殖性能指标记录母猪产仔总数、仔猪初生重、20 日龄仔猪窝重（泌乳力）、28 日龄断奶窝重。计算各猪群母猪的杂种优势率。

结果与讨论

（1）经过 4 世代持续选育，核心群后备公猪 6 月龄体重可达 102.4kg，平均背膘厚度 2.08cm 以下；后备母猪 6 月龄体重达到 101.3kg，平均背膘厚度 1.89cm。

（2）3 世代生长期公猪日增重可达 783.26g，料重比 3.04∶1，达 100kg 体重时间为 172.41d；母猪日增重可达 752.23g，料重比 3.04∶1，达 100kg 体重时间为 172.65d；

（3）长白猪核心群 3 世代母猪窝产总仔数 13.39 头，窝产活仔数 12.61 头，初生窝重 18.99kg，初生个体重 1.43kg，20 日龄窝重为 61.79kg，28 日龄断奶重 80.74kg，母猪断奶到再发情时间 7.39d。

（4）长白猪与大白猪正反交的二元母猪与杜洛克公猪交配的三元猪，母猪产仔数 13.69 头，仔猪初生重 1.51kg 以上，杂交优势明显；其三元育肥猪日增重 842g，料重比达到 2.84∶1。

主要参考文献

略

猪肌内脂肪细胞生成中的 m6A 甲基化修饰及其对猪肉品质的影响

巢明坤※，蔡瑞，庞卫军※※
(西北农林科技大学动物科技学院，陕西咸阳 712100)

Intramuscular fat (IMF) content considerably influences pork quality. However, the impact of N6-methyladenosine (m6A) methylation modification on intramuscular preadipocyte adipogenesis and pork quality remains unclear. Herein, we discovered that IMF and free fatty acid content in the longissimus thoracis of Bamei pigs were higher than those in Large White pigs. However, the m6A methylation level was found to be lower in BM pig compared to LW pig. Furthermore, m6A-sequencing results revealed that 418 m6A-modified RNAs were differentially expressed during intramuscular preadipocyte adipogenesis. These RNAs were enriched in insulin secretion, lipolysis, and glucagon signaling pathways, as determined using the KEGG analysis. We found a positive correlation between m6A levels and the expression of PHKG1. Moreover, m6A level and the expression of PHKG1 were significantly correlated with meat quality traits, including IMF content, pH, a* and cooking loss. Our findings provide a novel m6A-modified biomarker for promoting IMF deposition to improve meat quality in pigs.

主要参考文献

略

※ 作者简介：巢明坤（1980-），陕西省咸阳市人。E-mail：cmk1262384926@nwafu.edu.cn。
※※ 通讯作者：庞卫军，E-mail：pwj1226@nwsuaf.edu.cn,固定电话：+86-29-87092430，手机号：+86-29-87091017。

对香豆酸对猪精液冷冻保存效果的影响

张　涵※，王赫川，李天峰，王　骞，张　群，黄大鹏，魏国生，李井春※※
（黑龙江八一农垦大学　动物科技学院，黑龙江大庆 163319）

为探究对香豆酸（p-coumaric acid，PCA）对猪精液冷冻保存效果的影响，试验采集 10 头 2~3 岁的健康长白猪精液，取合格精液混合后分为 5 组进行精液冷冻保存，试验Ⅰ组未添加 PCA，试验Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组分别在冷冻稀释液中添加 30、60、90、120 μg/mL PCA，检测冷冻-解冻后精子活率、精子活力、精子畸形率、精子运动参数（直线速度、曲线线速度、路径速度、鞭打频率）指标、精子顶体完整性率和精子质膜完整率。结果表明，在猪精子冷冻稀释液中添加 PCA 后，冻融精子活率、精子活力、运动参数（直线速度、曲线线速度、路径速度、鞭打频率）、顶体完整性率和质膜完整率均高于未添加 PCA 组，畸形率低于未添加 PCA 组。当添加量为 30 μg/mL 时，精子活率、精子活力、精子直线速度、精子曲线速度、精子顶体完整率和精子质膜完整率显著低于 90 μg/mL PCA 组（P<0.05），与 120 μg/mL PCA 组精子畸形率差异不显著（P>0.05）；当添加量为 60 μg/mL 时，精子活率、精子活力、精子路径速度、精子曲线速度、鞭打频率、精子顶体完整率和精子质膜完整率均低于 90、120 μg/mL PCA 组；当添加量为 90 μg/mL 时，精子活力可达 66.12%，畸形率最低为 12.57%，精子活率显著高于 30 μg/mL PCA（P<0.05），且与 60、120 μg/mL PCA 组精子活率差异不显著（P>0.05），精子运动参数、精子顶体完整率和精子质膜完整率最高；当添加剂量为 120 μg/mL 时，精子活率、精子活力运动参数、精子顶体完整率、精子质膜完整率均低于 90 μg/mL 组。综上所述，在冷冻稀释液中添加对香豆酸提高冷冻保存的猪精液的精子品质，其中添加 90 μg/mL 保存效果最佳。

基金项目：黑龙江八一农垦大学“三纵”基础培育（自然）项目（ZRCPY202107）；黑龙江八一农垦大学博士启动基金项目（XYB-2016-04）；黑龙江省自然科学基金联合引导项目，（编号：LH2022C068）。
※ 作者简介：张 涵（1998—　），女，硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖技术，394607151@qq.com.
※※ 通讯作者：李井春（1979—　），男，副教授，博士，研究方向为动物遗传育种与繁殖技术，ljchun112@163.com.

S100A9 在产气荚膜梭菌 beta2 毒素诱导的猪 IPEC-J2 肠上皮细胞的炎症性损伤中发挥关键作用

李杰[1※]，谢开会[1]，杨姣姣[1]，张娟丽[1]，杨巧丽[1]，王鹏飞[1]，滚双宝[1, 2※※]，黄晓宇[1]
（1.甘肃农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州 730070；2.甘肃省现代养猪技术工程研究中心，甘肃兰州 730070）

引言

仔猪腹泻病严重影响了全球养猪业的经济增长。仔猪对 C 型产气荚膜梭菌引起的肠炎高度敏感，受感染的仔猪发病率高，这种病原体的致病性主要是通过产生的多种毒素来介导的，其中 C 型产气荚膜梭菌产生的 C 型产气荚膜梭菌 beta2 （CPB2） 毒素是主要的病原体之一。*S100A9* 基因具有调控细胞增殖、诱导细胞凋亡和参与炎性应答等多种生物学功能。最新研究表明 *S100A9* 基因在猪抵抗病原菌感染性腹泻疾病的过程中具有重要作用。基于此，本研究构建敲低 *S100A9* 的 IPEC-J2 小肠上皮细胞系，通过转录组测序筛选下游关键基因，接着用一些分子生物学方法研究了 *S100A9* 对 CPB2 毒素诱导的 IPEC-J2 细胞凋亡和炎性损伤的影响，皆在为进一步研究 *S100A9* 调控炎症反应疾病的作用机制提供研究基础。

材料与方法

猪 IPEC-J2 细胞系由北纳生物技术有限公司提供。本研究构建敲低 *S100A9* 的 IPEC-J2 细胞，用 CPB2 毒素构建细胞损伤模型，通过 RNA-Seq 技术筛选受 *S100A9* 调控的下游基因，并进行功能富集分析。通过测定凋亡蛋白表达、线粒体膜电位和超氧化物歧化酶 （SOD） 的水平，评估 *S100A9* 在 CPB2 毒素诱导的 IPEC-J2 细胞损伤中的作用。

结果与讨论

S100A9 在调节炎症过程和免疫反应中起重要作用。炎症部位存在高浓度的 *S100A9*，具有引起炎症性疾病的功能。*S100A9* 在肿瘤疾病、类风湿性关节炎等各种炎症性疾病中发挥关键作用，但 *S100A9* 调控仔猪腹泻病的分子机制是首次研究。为了探索 *S100A9* 在 CPB2 毒素诱导的 IPEC-J2 中的表达，本研究使用 CPB2 诱导 IPEC-J2 建立细胞损伤模型，检测 mRNA 和蛋白表达水平，研究结果发现 CPB2 刺激 IPEC-J2 后 S100A9 表达显著升高。这表明 *S100A9* 可能是调节 CPB2 毒素诱导 IPEC-J2 细胞炎症反应的关键分子。本项研究首次下调 IPEC-J2 细胞中 *S100A9* 的表达，用 CPB2 毒素构建损伤模型，然后进行转录组测序，共筛选出 316 个差异表达 mRNA，包括 221 个上调和 95 个下调基因，对其进行功能富集分析发现，差异表达基因显著富集在纤毛运动、凋亡过程的负向调节、免疫反应等 GO 术语和蛋白质的消化和吸收、补体和凝血级联、细胞因子- 细胞因子受体的相互作用等通路中。免疫应答的关键基因是 *TNF*、*CCL1*、*CCR7*、*CSF2*、*CXCL9*。在 CPB2 毒素诱导的 IPEC-J2 细胞中，*S100A9* 过表达使得 Bax 的表达增加，Bcl-2 的表达量下降，线粒体膜电位下降，SOD 酶活受到抑制。

综述所述，*S100A9* 通过调控下游靶基因 *TNF*、*CCL1*、*CCR7*、*CSF2*、*CXCL9* 等的表达参与 CPB2 毒素诱导的 IPEC-J2 细胞炎症反应，促进细胞凋亡，加剧细胞氧化损伤。研究结果为进一步研究 *S100A9* 在仔猪腹泻病中的作用机制奠定了基础。

主要参考文献

[1] Gao X，Yang Q，Huang X，et al. Effects of Clostridium Perfringens Beta2 Toxin on Apoptosis，Inflammation，and Barrier Function of Intestinal Porcine Epithelial Cells[J]. Microbial Pathogenesis，2020，147：104379.

[2] McDonel JL. Clostridium perfringens toxins （type A，B，C，D，E）[J]. Pharmacol Ther， 1980，10（3）：617–55.

基金项目：甘肃省高等教育创新基金（2022B-106）；甘肃省地方猪种质资源保护与质量提升项目（GSLK-2021-13）。
※ 作者简介：李杰，在读博士研究生，研究方向为动物育种理论与技术。E-mail：lijie5272@126.com。
※※ 通讯作者：滚双宝，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：gunsbao056@126.com。

基于 ATAC-seq 和 RNA-seq 筛选猪肺炎支原体关键抗性基因

刘莹※，张志勇，郑先瑞，殷宗俊※※
（安徽省农业大学动物科学技术学院，安徽合肥 230036）

引言

猪支原体肺炎（mycoplasmal pneumonia of swine，MPS）是存在于世界各地的严重危害养猪业的一种常见的慢性呼吸道传染病。目前，病理诊断、疫苗与抗生素药物研发等方面的研究往往难以根除肺炎支原体（Mhp）的感染，亟待从分子水平上解释其遗传机制，进而利用遗传规律进行抗病育种。本研究利用 Mhp 感染猪肺泡巨噬细胞（3D4/21）模型，通过 ATAC-seq 和 RNA-seq 联合分析筛选猪肺炎支原体关键抗性基因和调控元件，为阐明 Mhp 的致病机理及 MPS 的分子育种提供理论基础。

材料与方法

本试验首先探究了 Mhp 感染 3D4/21 的最佳浓度和时间，然后利用 ATAC-seq 及转录组测序筛选对照组（n=6）及 Mhp 感染组（n=6）3D4/21 细胞中差异表达基因。使用 Trizol 法提取细胞 RNA，并构建 cDNA 文库，采用 Illumina 高通量测序系统 NovaSeq 6000 进行转录组测序。首先使用 Bowtie2 对原始 ATAC-seq 原始数据进行质控，并比对到猪参考基因组（Sus scrofa11.1）。然后利用 deeptools 进行开放性信号分布分析，并使用 MACS2 对开放区进行 peak 富集分析与注释，以鉴定不同功能区的 peak 分布，利用 DEseq2 进行差异 peak 分析，以|Log2 Fold Change |≥0.263，FDR<0.05 为差异标准，对 Mhp 感染组和对照组的染色质开放情况以及差异基因的表达情况进行检测。对于筛选出的差异表达基因进行 GO、KEGG 分析，并构建转录因子-靶基因调控网络图，以寻找抗 Mhp 关键基因和转录因子。

结果与讨论

本试验确定可能与抗 Mhp 及免疫相关的基因和途径包括：*ANXA1*、*CD2AP* 与适应性免疫反应相关[1, 2]，*NRAS*、*EIF3E* 介导免疫调节细胞因子产生免疫抑制[3, 4]，*SNX2* 参与细胞内吞作用，可对 Mhp 进行吞噬，从而消灭部分侵入的 Mhp。*KIAA1324L* 可正向调节 BMP 信号通路，产生抑癌作用。*CBLL1* 通过增加 Ecadherin 蛋白表达[5]，来抑制细胞被 Mhp 侵袭，*ATP6V1C1* 在肺腺癌转移中具有重要作用[6]，*ADGRL1*、*ASB1* 参与细胞内信号转导[7, 8]，与免疫失调有关，能对 Mhp 做出及时的免疫反应。TSC2 激活 mTOR 和抑制自噬[9]，可用于 Mhp 感染的治疗。GO 富集分析发现，Mhp 感染组和对照组的差异基因大多富集在免疫蛋白调控相关的功能上。KEGG 富集分析发现，差异基因多数富集在抗原递呈加工、细胞因子-细胞因子受体作用、趋化因子等信号通路上。本研究筛选出抗 Mhp 的关键基因并揭示了其作用机制，为猪气喘病抗病性研究提供参考，为猪的抗病育种工作提供了重要信息。

主要参考文献

略

※ 作者简介：刘莹，在读研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：570476653@qq.com。
※※ 通讯作者：殷宗俊，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yinzongjun@ahau.edu.cn。

高×撒杂交猪与高黎贡山猪和撒坝猪生产性能的比较分析

周戚斌[1※]，和胜[2]，赵国松[3]，何荣[4]，吴玲想[1]，杨世婷[1]，刘珈纶[1]，
余世海[1]，赵桂英[1※※]

（1 云南农业大学，云南昆明 650000；2 怒江州畜牧技术推广站，云南怒江傈僳族自治州 673100；
3 云南宝来客彼格农业科技发展有限公司，云南昆明 650000；4 怒江高黎一号农牧科技有限公司，
云南怒江傈僳族自治州 673100）

通过对云南地方猪种高黎贡山猪和撒坝猪及杂交组合后代的生产性能进行研究，目的是生产出能适应云南气候环境且生产性能好的杂优商品猪。试验选取胎次、出生日期、体重相近的高黎贡山猪、撒坝猪、高×撒杂交猪（高黎贡山猪×撒坝猪）各 12 头（6♂，6♀）进行饲养，饲养结束后每组随机屠宰 6 头（3♂，3♀），对其各项生产性能指标进行测定及比较分析。结果为：高×撒杂交猪的平均日增重（320.1±25.65g）显著高于高黎贡山猪，但低于撒坝猪（P＜0.05），且料重比最低；高×撒杂交猪的皮厚低于高黎贡山猪和撒坝猪、胴体重高于高黎贡山猪但低于撒坝猪，宰前活重高于高黎贡山猪，且差异极显著（P＜0.01）；高×撒杂交猪的皮率低于高黎贡山猪和撒坝猪，瘦肉率高于撒坝猪、高黎贡山猪，宰前活重、脂率、胴体直长、平均背膘厚低于撒坝猪，且差异显著（P＜0.05）；高×撒杂交猪的腰大肌纤维直径极显著低于高黎贡山猪（P＜0.01），熟肉率高于撒坝猪，滴水损失低于高黎贡山猪和撒坝猪，且差异显著（P＜0.05）；高×撒杂交猪的粗脂肪显著高于撒坝猪，粗蛋白显著低于撒坝猪（P＜0.05），高×撒杂交猪的粗脂肪、粗蛋白与高黎贡山猪差异均不显著（P＞0.05）；高×撒杂交猪的氨基酸含量介于高黎贡山猪和撒坝猪之间，饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量均介于高黎贡山猪和撒坝猪之间，多不饱和脂肪酸和脂肪酸总量与高黎贡山猪和撒坝猪相比差异不显著；高×撒杂交猪的胆固醇含量较高黎贡山猪有明显降低。高×撒杂交猪结合了高黎贡山猪和撒坝猪的优良肉质性能、较好的肌肉营养成分等特性，可进行生产推广应用。

主要参考文献

略

基金项目：云南省地方猪种杂交利用技术集成（A3032022211）；云南地方猪种业创新研究及产业化（A3032023245）。
※ 作者简介：周戚斌（1999-），男，云南省昆明市人。E-mail：122974190@qq.com。
※※ 通讯作者：赵桂英（1966-），女，云南昆明人，教授，主要从事猪的遗传育种和地方猪种资源的评价、开发及利用研究工作。Email：zhaoguiying2006@163.com

SLC7A2 在猪宫内发育迟缓胎盘中的表达及其对滋养层细胞增殖和迁移的影响

胡光玲[1, 2, 3※]，伍治敏[1, 2, 3]，张才在[1, 2, 3]，杨振清[1, 2, 3]，张依裕[1, 2, 3]，敖政[1, 2, 3※※]

（1.贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025；2.贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室，贵州贵阳 550025；3.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025）

引言

宫内发育迟缓（Intrauterine growth retardation，IUGR）不仅会降低仔猪初生重，导致仔猪的生长发育障碍、仔猪发病率和死亡率升高，从而对养猪业造成巨大的经济损失[1]。课题组前期通过 mRNA 测序鉴定了正常初生重（Normal birth weight，NBW）与 IUGR 胎盘的差异表达基因，发现氨基酸转运基因溶质载体家族 7 成员 2（solute carrier family 7 member 2，SLC7A2）在 IUGR 胎盘中显著上调。在胎盘中，氨基酸、葡萄糖、脂肪酸等营养物质转运需要溶质载体（solute carrier，SLC）的参与，并且这些溶质载体的表达与胎儿的生长发育密切相关。因此，本研究旨在通过实时荧光定量 PCR 和免疫组化方法鉴定 SLC7A2 在 NBW 和 IUGR 胎盘中的表达，以及 SLC7A2 基因的表达对猪滋养层细胞（PTr2）增殖和迁移的影响。

材料与方法

实验动物为贵州富之源农业发展有限公司下属种猪场饲养的 24 头遗传背景和产仔数接近、胎次在 2 ~ 4 胎的健康大白母猪，所有母猪的饲养条件均保持一致。仔猪刚出生脐带未断时，在其脐带上进行标记，待胎衣排出后根据脐带上的标记区分每头新生仔猪对应的胎盘。利用实时荧光定量 PCR 技术检测和比较NBW 和IUGR 胎盘中*SLC7A2*的 mRNA 表达水平差异；采用免疫组织化学方法检测NBW 和 IUGR 胎盘组织中 SLC7A2 蛋白的表达定位分布；构建 SLC7A2 过表达载体，利用 CCK8 法和细胞划痕法检测 SLC7A2 过表达对猪滋养层细胞（PTr2）增殖和迁移能力的影响。基因相对表达水平和免疫荧光定量分析利用 SPSS 19.0 软件的 One-Way ANOVA 方法进行。

结果与讨论

IUGR 仔猪胎盘中 *SLC7A2* 的转录水平极显著高于 NBW 胎盘（$P<0.01$）。免疫组织化学结果显示，IUGR 仔猪胎盘相较于 NBW 胎盘呈现更高的 SLC7A2 阳性表达水平。将 Vector-SLC7A2 和 Vector-NC 转染进 PTr2 细胞中，48 h 后检测其过表达效率。结果显示，转染 Vector-SLC7A2 后，*SLC7A2* 的 mRNA 表达水平相对于 Vector-NC 组极显著上调（$P<0.001$），表明成功构建 SLC7A2 的过表达载体，并可用于后续试验；将 Vector-SLC7A2 和 Vector-NC 转染进 PTr2 细胞中，检测转染后 *SLC7A2* 表达对 PTr2 细胞增殖和迁移能力的影响，CCK8 结果显示，Vector-SLC7A2 组的细胞增殖在 12 h、24 h、48 h 和 72 h 均显著低于 Vector-NC 组。通过细胞划痕实验可以看出，Vector-SLC7A2 组的细胞迁移率极显著低于 Vector-NC（$P<0.01$），表明 *SLC7A2* 过表达可抑制 PTr2 细胞增殖和迁移。本研究发现 IUGR 胎盘中 SLC7A2 的表达水平显著高于 NBW 胎盘，SLC7A2 过表达可能通过抑制滋养层细胞增殖和迁移，导致母体-胎儿营养物质的交换效率下降，从而诱发 IUGR 的产生。

主要参考文献

[1] Zhang X Y，Qin X Y，Shen H H，et al. IL-27 deficiency inhibits proliferation and invasion of trophoblasts via the SFRP2/Wnt/beta-catenin pathway in fetal growth restriction[J]. Int J Med Sci， 2023，20（3）： 392-405.

※ 作者简介：胡光玲，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。 E-mail：1335262712@qq.com。

※※ 通讯作者：敖政，副教授，研究方向为猪遗传育种与繁殖。 E-mail：zao@gzu.edu.cn。

猪卵泡液外泌体的 SNP/InDel 筛选及分析

刘阳光※，章会斌，谢帆，赵世明，邱梦瑶，殷宗俊※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

外泌体是一种可由多种细胞分泌的直径在 30-150nm 之间的细胞外囊泡，能够携带部分供体细胞的 DNA、RNA、蛋白质和 ncRNA，在生物机体中作为细胞间信息传递的桥梁[1]。有研究表明外泌体存在于卵泡液微环境中，其所携带的分子能够参与到对卵泡生长发育、排卵或闭锁过程中的调节[2]。为探究卵泡发育过程中外泌体所参与的机制，本研究使用高通量测序技术对猪卵泡液外泌体进行了 RNA-seq 测序，皆在为研究外泌体在生殖上的作用提供参考依据。

材料方法

以 150 枚白猪卵巢为试验样本，采用抽提法收集猪卵泡液，利用梯度离心得到猪卵泡液外泌体，随后将所得外泌体分为三组（分组情况：Exo-1、Exo-2、Exo-3）。使用 Magzol 试剂从外泌体中提取总 RNA，随后进行 RNA 测序。随后对原始结果进行过滤，使用 samtools 和 picard-tool 软件对结果进行对比处理，得到 SNP/InDel 的分析结果。使用 SPSS 和 clusterProfiler R 软件包对基因进行基因本体（Gene Ontology，GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书，所有结果以 P<0.05 记为差异显著。

结果与讨论

经 RNA-seq 测序后，共获取下机原始数据 21.1Gb，通过过滤和去除冗余数据后，获得 clean reads 数据 14.3GB。每个样品的 Q20 和 Q30 评分均大于 92%。分析结果显示，卵泡液外泌体样品共获得 44955 个 SNP/InDel 突变，其中 SNP 突变数量为 43752 个，而 InDel 突变数量仅为 1203 个，且杂合型突变显著多于纯合型突变（$P<0.05$）。在 SNP/InDel 突变类型中，转换类型共计 2.30×10^4 个，占突变类型总数的 52.48%，颠换类型 2.08×10^4 个，占比 47.52%。经 SNPPEff 工具注释显示，发生 SNP 和 InDel 突变主要集中在基因间隔区，占总数的 66%。此外，经统计发生 SNP 突变的基因共计 1057 个，发生 InDel 突变的基因共计 35 个，二者存在 19 个相同基因。使用 clusterProfiler R 软件包对上述突变基因进行富集分析，功能富集结果显示，突变基因显著富集在细胞的氧化磷酸化过程、细胞周期调控、细胞衰老、细胞凋亡、卵母细胞减数分裂以及 Hippo 信号通路等方面（$P<0.05$）。本研究表明卵泡外泌体中携带多个突变基因，这些基因可能作为卵泡生长发育过程中的分子标记物。

主要参考文献

[1] Zhang J，Li S，Li L，et al. Exosome and exosomal microRNA： trafficking，sorting，and function[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics，2015，13（1）：17-24.

[2] Grzesiak M，Popiolek K，Knapczyk-Stwora K. Extracellular vesicles in follicular fluid of sexually mature gilts' ovarian antral follicles - identification and proteomic analysis[J]. J Physiol Pharmacol. 2020;71（1）：10.26402/jpp.2020.1.13.

※ 作者简介：刘阳光，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：22710033@stu.ahau.edu.cn。
※※ 通讯作者：殷宗俊，教授，博士生导师，研究方向为猪分子育种。E-mail：yinzongjun@ahau.edu.cn。

miR-10b 靶向调节 PTEN 基因及其蛋白对猪卵巢颗粒细胞凋亡的调控作用

章会斌※，谢帆，杨颜竹，文浩宇，陈龙，张晓东，殷宗俊※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

作为一类进化保守的内源性单链非编码 RNA 分子，miRNA 一般由约 22 个核苷酸组成，可在转录后水平逆调节基因的表达，在哺乳动物卵巢功能发育、卵泡闭锁、卵巢颗粒细胞凋亡等过程中发挥重要作用。近年来，miR-10b 已被证实参与调节猪、牛和山羊等哺乳动物卵巢颗粒细胞的凋亡。*PTEN* 基因具有蛋白磷酸酶和肌醇磷酸酶的双重功能，可以参与细胞迁移、细胞凋亡及胚胎发育等过程。然而，miR-10b 与 *PTEN* 在猪卵巢颗粒细胞中的关系尚不清楚。本研究旨在探讨 miR-10b 和 *PTEN* 在体外对猪卵巢颗粒细胞凋亡的调控关系，为揭示 miR-10b 调控猪卵巢颗粒细胞凋亡的机制提供一定的理论依据。

材料方法

收集新鲜猪卵巢用于卵巢颗粒细胞提取，体外合成 miR-10b 模拟物及其阴性对照（miR-10b mimic，mimic NC）、miR-10b 抑制物及其阴性对照（miR-10b inhibitor，inhibitor NC）、*PTEN* 干扰 RNA （*PTEN* siRNA，si-*PTEN*）及其阴性对照（siRNA-NC），并分别转染至猪卵巢颗粒细胞中，利用 RT-qPCR 和 WB 检测 miR-10b 对 *PTEN* 基因及蛋白表达的影响，通过流式细胞仪检测颗粒细胞凋亡情况，两者靶向关系通过双荧光素酶系统验证。

结果

结果显示，过表达 miR-10b 极显著增加了颗粒细胞凋亡率（P<0.01），抑制 miR-10b 表达后颗粒细胞凋亡率极显著降低（P<0.01）。基于生物信息学分析可知，miR-10b 能直接结合 *PTEN* 3'UTR 区，通过双荧光素酶报告基因系统进一步证实了 miR-10b 能靶向结合 *PTEN* 3'UTR 区，抑制 *PTEN* 基因表达。利用 RT-qPCR 及 WB 检测 *PTEN* 基因及其蛋白的表达水平，发现 miR-10b 可以抑制 *PTEN* 基因及其蛋白的表达水平。此外，在抑制 miR-10b 表达后，引入 siRNA 下调 *PTEN* 基因的表达，可以缓解 miR-10b 对颗粒细胞凋亡的促进作用。

讨论与结论

PTEN 在调节哺乳动物卵泡发育中发挥基本作用，可能参与了卵泡发育不良和卵巢功能障碍的发病机制，并通过 p21 基因诱导卵巢癌细胞衰老，去泛素化 *PTEN* 可以调节 PI3K/AKT 信号通路影响颗粒细胞的增殖和凋亡。有研究证实 miR-10b 可靶向结合 *PTEN* 参与结肠癌细胞增殖、迁移以及凋亡，因此，*PTEN* 可以作为颗粒细胞凋亡的重要靶点。本研究证实了 miR-10b 对猪卵巢颗粒细胞凋亡起正调控作用，干扰 *PTEN* 基因能抑制猪卵巢颗粒细胞凋亡，并且在细胞、转录及蛋白水平上发现了 miR-10b 能够靶向结合 *PTEN* 进而调控猪卵巢颗粒细胞凋亡。初步推测 miR-10b 可能通过负向调控 *PTEN* 的表达对猪卵巢颗粒细胞凋亡进行调控。

基金项目：国家重点研发计划（2021YDF1301200）、国家自然科学基金（31972531）和安徽省科技重大专项（202103a06020013）的经费支持。
※ 作者简介：章会斌，在读博士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：zhanghuibin1997@126.com
※※ 通讯作者：殷宗俊，教授，博士生导师，研究方向为猪分子育种。E-mail：yinzongjun@ahau.edu.cn

河南省和陕西省猪群 PCV4 和 PRRSV 分子检测及其遗传特征

陈曦艋[1※]，赵友驿[1]，李洪炫[1]，马世杰[1]，郑兰兰[1, 2]，陈红英[1, 2※※]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2. 动物病原与生物安全教育部重点实验室，河南郑州 450046）

引言

2019 年，Zhang 等[1]从湖南省患有严重呼吸道疾病、腹泻和猪皮炎与肾病综合征的猪体内首次发现了一种新型猪圆环病毒（porcine circovirus，PCV），命名为猪圆环病毒 4 型（PCV4），其基因组长度为 1770 bp，与其他 PCV 的同源性为 43.2%-51.5%。随后，内蒙古、江苏、山西和四川等地和韩国猪场中相继被检测到 PCV4。猪繁殖与呼吸综合征病毒（porcine reproductive and respiratory syndrome virus，PRRSV）感染可引起仔猪呼吸道疾病和母猪繁殖障碍。前期研究显示，我国猪场中存在 PCV4 和 PRRSV 的合并感染[2]。为了进一步确认 PCV4 和 PRRSV 的合并感染及其遗传特征，本研究采用 PCV4 和 PRRSV 二重荧光定量 PCR 方法对河南省和陕西省 2022 年期间收集的 150 份猪临床样本进行 PCV4 和 PRRSV 的检测，并进行病原基因克隆及遗传进化分析。

材料方法

2022 年，150 份猪组织和血清样本采自河南省和陕西省 9 个猪场。使用 PCV4 和 PRRSV 二重荧光定量 PCR 对临床样本进行检测，然后使用 PCV4 全基因组引物和 PRRSV *ORF5* 基因引物对检测为阳性的样本进行 PCV4 全基因组和 PRRSV *ORF5* 基因的扩增、克隆及测序。采用 MEGA 7.0 软件将本试验克隆获得的 PCV4 全基因组和 PRRSV *ORF5* 基因序列进行核苷酸同源性分析，并建立遗传进化树。

结果与讨论

结果表明 150 份临床样本中 12 份为 PCV4 阳性，阳性率为 8%；18 份为 PRRSV 阳性，阳性率为 12%。在一例哺乳仔猪病料中检测到 PCV4 和 PRRSV 的合并感染。对 12 份 PCV4 阳性样本进行全基因组扩增，得到了 5 条 PCV4 全基因组序列，其中 1 条序列（SX-ZX）来自陕西省，其余 4 条序列来自河南省。获得的 5 条 PCV4 全基因组序列间同源性为 98.3%-99.8%，与来自 NCBI 的 59 条 PCV4 全基因组参考序列的同源性为 97.7%-99.4%。遗传进化分析显示，5 株 PCV4 菌株中有 3 株为 PCV4b，与水貂、狐狸、奶牛、狗和貉处于一个较大的分支中，余下的 2 个毒株属于 PCV4c。本研究来自河南省的 7 株 PRRSV 属于 PRRSV2，其中 5 株为类 NADC30 毒株，1 株为 HP-PRRSV 毒株，表明类 NADC30 毒株已成为河南省猪场主要流行毒株，HP-PRRSV 仍在当地猪场流行。本实验对进一步研究 PCV4 和 PRRSV 的遗传演化，开发新型疫苗防控 PRRSV 具有重要意义。

主要参考文献

[1] Zhang H H，Hu W Q，Li J Y，et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4，Hunan province，China [J]. Transboundary and Emerging Diseases，2020，67（3）：1057-1061.

[2] Hou C Y，Zhang L H，Zhang Y H，et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus 4 in Henan Province of China： A retrospective study from 2011 to 2021[J] . Transboundary and Emerging Diseases，2022，69（4）：1890-1901.

※ 作者简介：陈曦艋，男，四川仁寿人，在读硕士研究生，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: 252926939 @qq.com.
※※ 通讯作者：陈红英，教授，E-mail: chhy927@163.com.

基于 RNA-Seq 技术对淮猪和大约克猪排卵前卵泡差异表达基因的研究

刘林清，李庆岗，苏世广，周梅，张威，王重龙*
（安徽省农业科学院畜牧兽医研究所，畜禽产品安全工程安徽省重点实验室，安徽合肥 230031）

引言

繁殖性状尤其是产仔数是养猪业重要的生产性状之一，是猪商业化品系选育中的重要选育指标，直接关系到养猪产业的经济效益。作为复杂的数量性状，产仔数遗传力较低，且影响因素很多。中外猪种在繁殖性状方面存在显著差异[1]，利用组学技术筛选该类性状的功能候选基因具有重要意义。因此，本研究选取淮猪和大约克猪的卵巢进行了 RNA-Seq 分析，旨在挖掘在卵泡发育、排卵过程中瞬时表达的关键基因，从而为完善与猪卵泡生长发育、排卵的基因调控及其复杂的调控网络提供依据。

材料与方法

试验对象都来自于安徽省科鑫养猪育种有限公司的，淮猪 3 头、大约克猪 3 头的卵巢，提取 RNA，个体独立建库。采用 RNA-Seq 技术对样本库进行高通量转录组测序，获得两个猪种的转录组图谱，并筛选出差异基因。对差异基因，分别进行 GO 功能注释和 KEGG Pathway 分析，筛选出与繁殖性状相关的功能基因和调控通路，并获得影响猪繁殖性状的功能候选基因。

结果与讨论

（1）获得的淮猪、大约克猪 clean Reads 数分别为 HH-1，85958912；HH-2，91701082；HH-3，84448828，其中有效 Reads 数分别达到 98.39%、98.59%、96.04%；YY-1，87914166；YY-2，80480542；YY-3，85994612，其中有效 Reads 数分别达到 98.61%、96.95%、98.80%。

（2）筛选到 121 个差异基因，其中 67 个为上调基因，54 个为下调基因。GO 功能富集的差异基因富集在繁殖过程、生长过程和代谢过程等。KEGG Pathway 分析发现，这些基因可能与猪繁殖性状相关，主要包括 WNT 信号通路、卵巢类固醇生成通路和类固醇生物合成通路等。

（3）转录组的差异基因分析，结果发现，在卵巢类固醇因子通路中有也有 12 个关键基因参与，发现其中 CYP19A3、LDLR、BMP15 等基因主要在卵巢类固醇因子通路中发挥作用，可作为影响猪繁殖性状的功能候选基因来研究。

主要参考文献

[1] 闻爱友，桑仁富，戴四发等，定远母猪繁殖性能及其杂种优势研究[J]. 安徽技术师范学报，2005，19（4）：5—7。

PIK3R5 基因对猪骨骼肌生长发育的影响

张建民※，杜颖滨，马立霞，李金宝，陈伟，曾勇庆※※
（山东农业大学动物科技学院，山东泰安 271000）

引言

骨骼肌作为哺乳动物体重占比最高的组织，其组成和大小直接影响肌肉产量和品质评价，关乎肉畜产业的经济效益及肉类食物的供给平衡[1]。骨骼肌生长发育过程包括肌细胞的增殖和分化两个阶段，因此探究成肌细胞的生长发育调控机制对猪业生产具有重要意义。本实验室前期通过对生长后期不同日增重的杜洛克猪进行全转录组测序，筛选出差异表达基因 *PIK3R5*。*PIK3R5* 是磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）信号转导途径的一个亚单位，PI3K 信号通路参与维持正常细胞增殖、分化和代谢等重要生物学过程[2]。研究 *PIK3R5* 在成肌细胞分化过程中的作用，对探究 *PIK3R5* 在猪骨骼肌生长发育的作用具有重要意义。

材料与方法

根据 NCBI 中 *PIK3R5* 基因序列（登录号：NM_177320），构建 *PIK3R5* 基因过表达载体，同时合成干扰片段 si-*PIK3R5*。将过表达载体和 si-PIK3R5 转染至 C2C12 细胞系，并对细胞进行诱导分化，分化至第 6 天，通过激光共聚焦检测 *PIK3R5* 蛋白的亚细胞定位，通过吉姆萨染色观察细胞数量和肌管形成情况，荧光定量 PCR 检测成肌分化标志基因 *MyoD*、*MyoG* 的表达水平，分析 *PIK3R5* 基因对成肌细胞分化的影响。

结果与讨论

结果表明，在细胞分化过程中，*PIK3R5* 过表达组细胞数目和肌管发育程度低于对照组；荧光定量 PCR 结果显示，*MyoG* 的表达水平显著低于对照组（$P<0.05$）；干扰 *PIK3R5* 后，细胞数目和肌管发育情况与对照组相比差异不明显；荧光定量 PCR 结果显示，*MyoG* 的表达水平显著高于对照组（$P<0.05$）。亚细胞定位结果显示，第 0 天时 *PIK3R5* 蛋白主要在核外表达，而第 6 天时 *PIK3R5* 蛋白主要在核内表达。综上表明，*PIK3R5* 基因具有抑制成肌细胞分化的作用，在被诱导分化后 *PIK3R5* 蛋白从细胞质转移进入细胞核。

主要参考文献

[1] Zammit P S. Function of the myogenic regulatory factors myf5，myod，myogenin and mrf4 in skeletal muscle，satellite cells and regenerative myogenesis[J]. Cell Dev. Biol，2017，72：19-32.

[2] Yu JS，Cui W. Proliferation，survival and metabolism： the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. Development. 2016，143（17）：3050-3060.

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFD1301200），山东省农业良种工程重点项目（2020LZGC012），山东省生猪产业技术体系建设专项（SDAIT-08-02），山东省自然科学基金项目（ZR2019MC053）资助。
※ 作者简介：张建民，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种学。E-mail: 13793627973@163.com
※※ 通讯作者：曾勇庆，教授，博士生导师，研究方向为动物遗传育种学。E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn

妊娠后期和哺乳期补充鱼油对母猪繁殖和断奶仔猪生长免疫及粪菌组成的影响

游君怡[1※]，杜朝晖[1]，康亚豪[1]，张选应[1]，刘晓玮[1]，史新娥[1,2]，杨公社[1,2]，李 晓[1,※※]

（1.西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100；2.西北农林科技大学家畜生物学重点实验室，陕西杨凌 712100）

引言

经产母猪断奶后发情延迟将延长母猪的非生产天数，降低每头母猪每年提供断奶仔猪数。通过对母猪进行营养干预，促进母猪在断奶后快速进入发情期[1]。旨在研究妊娠后期和哺乳期母猪日粮中补充富含二十碳五烯酸（Eicosapentaenoic Acid，EPA）和二十二碳六烯酸（Docosahexenoic Acid，DHA）的鱼油对母猪繁殖性能、免疫机能，以及对断奶仔猪生长性能、免疫性能的影响，探究鱼油在母猪生产上的应用效果。

材料与方法

本试验选取 45 头健康大约克×长白二元母猪，随机分成三组：对照组、低剂量组（30g/d）和高剂量组（60g/d），每个处理 15 头母猪。正式试验从妊娠期第 90 天开始，至哺乳期 21 天断奶后一周结束。数据分析采用 SPSS（21.0）对所有数据进行单因素方差分析（One Way ANOVA），最小显著差数法（LSD 法）进行多重比较。

结果与讨论

（1）与对照组相比，鱼油组显著提高了母猪血清和初乳中 EPA 和 DHA 含量（$P < 0.05$）；鱼油组显著提高了泌乳力（$P<0.05$），显著缩短了母猪断奶发情间隔 1.7d 左右（$P<0.05$）；60g/d 鱼油组母猪血清雌二醇、催乳素及前列腺素 E2 浓度显著升高（$P<0.05$）。（2）与对照组相比，60g/d 鱼油组母猪血清 IgA 浓度显著增加（$P<0.05$）；血清过氧化氢酶活力显著提高（$P<0.05$）；30g/d 鱼油组血清谷胱甘肽过氧化物酶活力显著升高（$P<0.05$），皮质醇浓度显著降低（$P<0.05$）。（3）与对照组相比，60g/d 鱼油组母猪血清连蛋白 zonulin 水平显著降低（$P<0.05$）；母猪粪菌微生物 16S rRNA 测序分析发现，鱼油组母猪粪菌微生物 Simpson 指数均显著高于对照组（$P<0.05$）；鱼油组显著提高乳杆菌属（*Lactobacillus*）丰度（$P<0.05$）；相关性分析发现，*Lactobacillus* 与血清雌二醇、催乳素浓度呈现显著正相关（$P<0.05$）。（4）与对照组相比，60g/d 鱼油组显著增加仔猪断奶窝重（$P<0.05$）；鱼油组仔猪断奶后一周腹泻率均显著降低（$P<0.05$）；鱼油组皮质醇浓度显著低于对照组（$P<0.05$）。（5）与对照组相比，断奶前后鱼油组仔猪血清 IgM 和 IgG 浓度显著上升（$P<0.05$）；鱼油组显著提高了仔猪血清过氧化氢酶活力（$P<0.05$）。（6）与对照组相比，鱼油组仔猪断奶前后血清二胺氧化酶（DAO）、D－乳酸、连蛋白 Zonulin 浓度均显著下降（$P<0.05$）。30g/d 鱼油组仔猪粪菌微生物 PD _ whole tree 指数显著升高（$P<0.05$）；60g/d 鱼油组乳杆菌科（*Lactobacillaceae*）丰度显著高于 30g/d 鱼油组（$P<0.05$）；相关性分析发现，断奶仔猪 *Lactobacillus* 与仔猪血清 IgA 浓度呈显著正相关（$P<0.05$）。

综上，母猪妊娠后期和哺乳期日粮补充鱼油可缩短母猪的断奶发情间隔，提高母猪免疫力及抗应激能力，改善母猪粪便菌群结构进而促进母猪肠道健康；提高断奶仔猪生长免疫，降低应激反应，改善肠道屏障。鱼油添加量为 60g/d 更有利于母猪机体健康和生产。

主要参考文献

略

基金项目：陕西省科技创新计划（2019NY-078）。

※ 作者简介：游君怡（1998-），女，四川内江人，硕士，主要从事猪生长繁殖及其调控的研究，E-mail： Y3476611077@163.com。

※※ 通讯作者：李晓（1982-），女，河北辛集人，博士，副教授，主要从事猪生长繁殖及其调控的研究，E-mail：nice.lixiao@gmail.com。

仔猪肠道氧化应激相关的 lncRNA 的鉴定与功能预测

李金宝※，张建民，曾勇庆，王金，陈伟※※
（山东农业大学动物科学技术学院，山东泰安 271001）

引言

氧化应激是指机体内自由基和活性代谢物与其抗氧化系统失去平衡，从而导致机体内重要的生物分子和细胞受损，引起细胞毒性的病理过程[1]。氧化应激可以引起肠道细胞损伤和肠屏障损伤，导致严重的炎症性肠道疾病，甚至结肠癌。LncRNA 是长度超过 200 个核苷酸的转录本，其缺乏用于翻译的有效开放阅读框。本研究利用 RNA-seq 技术来研究氧化应激下仔猪 lncRNAs 的表达量的变化，探讨 DQ 诱导的氧化应激引起 lncRNAs 的差异表达，皆在为今后研究肠道对氧化应激反应的过程提供基础。

材料与方法

在 SRA 数据库中下载本研究的原始数据，其 SRA 号为 PRJNA661634。使用 fastp 对 raw reads 进行质控；Hisat2 用于比对到猪的参考基因组；Stringtie 对转录本进行组装；FeatureCounts 计算基因表达量以获得基因计数表，RStudio 对基因表达量进行标准化；CPC2、CNCI 和 pfam 鉴定转录本的编码能力，筛选那些不编码的转录本，即为 novel lncRNAs，与已知的猪基因组注释文件比对筛选出 known lncRNAs；使用 DESeq2 进行差异表达分析；bedtools 预测差异表达 lncRNA 的顺式靶基因，皮尔逊相关系数法预测差异表达 lncRNA 的反式靶基因；将差异表达 lncRNAs 的靶基因提交到 DAVID 数据库来进行 GO 和 KEGG 分析；qRT-PCR 验证随机挑选的 6 个 lncRNA 的表达量趋势是否和 RNA-seq 相一致。

结果与讨论

经数据质控与比对，六个样品的 Q30 含量都超过 93.50%，总比对率都超过了 95.33%。经过 lncRNA 的过滤流程，共筛选出 790 个 novel lncRNA，5289 个 known lncRNA，共计 6079 个 lncRNA。经差异表达分析，在氧化应激组与阴性对照组之间，共发现 79 个差异表达的 lncRNA。在这些差异表达的 lncRNA 中，其中 61 个 lncRNA 的上下游 100kb 范围内有其顺式靶基因，共计 135 个；共发现 12980 个 lncRNA-mRNA 反式靶基因对。GO 和 KEGG 富集分析结果显示，靶基因显著富集到 68 个生物学过程、40 个细胞组分、48 个分子功能和 96 条 KEGG 通路。经 qRT-PCR 验证，发现其与 RNA-seq 的表达趋势相一致（R^2=0.87，p=0.03）。本研究为今后研究氧化诱导的疾病奠定了基础。

主要参考文献

[1] Durackova Z. Some current insights into oxidative stress [J]. Physiological Research，2010，4，459-469.

基金项目：山东省自然科学基金（ZR2022QC075）、山东省 "双一流 "计划（SYL2017YSTD12）和山东省生猪产业技术体系项目（SDAIT-08-02）。
※ 作者简介：李金宝，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：jinbaol15127735952@163.com。
※※ 通讯作者：陈伟，副教授，硕士生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：wchen@sdau.edu.cn。

单细胞核测序揭示江泉黑猪背最长肌构成细胞的分群及占比

曹红珍※，张建民，靳昕琳，陈伟，曾勇庆※※
（山东农业大学动物科技学院，山东泰安 271000）

引言

骨骼肌是一个高度复杂的器官，且骨骼肌细胞是多核细胞[1]。单细胞测序提供了基因表达在细胞的异质性，可以识别特异性基因表达[2]。对于猪背最长肌细胞组成的研究仍处于空白阶段。本研究通过单细胞核 RNA 测序分析来自成年江泉黑猪背最长肌肌肉细胞，以说明其细胞的分群以及细胞所属类别，单细胞核转录通过已知的肌肉骨骼标记的表达模式鉴定出了包括肌肉干细胞、卫星细胞、成肌细胞和成纤维细胞在内的 12 个细胞亚群，比较了不同日增重的江泉黑猪肌肉中差异表达的基因，为下一步的验证试验提供理论基础，同时为阐明不同类型背最长肌构成细胞之间相互作用奠定基础。

材料与方法

根据日增重的不同，选取体重范围在 90~105 kg 具有同胞关系的江泉黑猪 4 头（增长速度快慢各 2 头）的背最长肌进行单细胞核测序，根据单细胞中基因数量在 250.0~4900.0；UMI 总数小于 24000.0 和线粒体基因表达量比例小于 10%三个指标对细胞进行过滤，最终获得单个细胞核所检测的基因数目应大于 20K。结合国家基因组科学数据中心单细胞组学中的 Cell Types and Markers、CellMarker 两个数据库和已发表文献证明的 marker 基因对细胞类型进行注释分析，分别鉴定不同的细胞亚群及其所占比例。

结果与讨论

结果表明，过滤前共得到细胞的数目为 36937 个，按照要求对不合格的细胞进行过滤，最终共得到 33439 个细胞，达到分析的质控要求，并分为 27 个细胞亚群。使用数据库对细胞类型进行标记，对该 27 个骨骼肌细胞群进行细胞类型注释，经过注释后可将其分为 12 个细胞亚群。对各细胞亚群占总细胞数的百分比及其亚群统计结果显示：高日增重组：成纤维细胞 10.14%、免疫细胞 1.01%、巨噬细胞 1.74%、脂肪细胞 2.65%、内皮细胞 10.95%、周细胞 3.49%、肌肉干细胞 8.08%、卫星细胞 4.37%、神经细胞 0.14%、肌肉细胞 48.01%、成肌细胞 2.16%、肌肉细胞和成肌细胞的混合细胞 7.27%；低日增重组：成纤维细胞 10.42%、免疫细胞 0.91%、巨噬细胞 1.8%、脂肪细胞 0.78%、内皮细胞 10.41%、周细胞 3.32%、肌肉干细胞 7.06%、卫星细胞 3.23%、神经细胞 0.22%、肌肉细胞 48.38%、成肌细胞 2.38%、肌肉细胞和成肌细胞的混合细胞 11.08%。综上述结果可得，肌肉细胞、成纤维细胞和内皮细胞是背最长肌位列前 3 位的构成细胞。

主要参考文献

[1] Petrany M J，Swoboda C O，Sun C，et al. Single-nucleus RNA-seq identifies transcriptional heterogeneity in multinucleated skeletal myofibers[J]. Nature Communications，2020，11（1）.

[2] Hwang B，Lee J H，Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines[J]. Experimental & Molecular Medicine，2018，50（8）：1-14.

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFD1301200），山东省农业良种工程重点项目（2020LZGC012），山东省生猪产业技术体系建设专项（SDAIT-08-02）。
※ 作者简介： 曹红珍，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种学。E-mail： hongzhencao@163.com
※※ 通讯作者：曾勇庆，教授，博士生导师，研究方向为动物遗传育种学。E-mail： yqzeng@sdau.edu.cn

猪 NCK1 基因多态性影响母猪产仔数性状研究

雷润雨[1, 2※]，李亚赛[3]，冯越[1]，周佳伟[1]，张宇[1]，梅书棋[1※※]

（1.湖北省农业科学研究院畜牧兽医研究所，湖北武汉 430064；；2.华中农业大学动物科学学院，湖北武汉 430070；3.长江大学动物科学学院，湖北荆州 430100）

引言

繁殖性状包括种母猪的初配妊率、再配妊率、产仔数、断奶活仔数等指标，以及仔猪的成活率等，是生猪产业的重要经济性状，猪繁殖能力的高低直接影响猪场的生产和经济效益。繁殖力属于低遗传力性状，其遗传力在 0.06~0.3 之间。有研究运用遗传连锁、基因组关联等方法，对繁殖性状进行基因定位和定量遗传分析。通过这些方法，已经找到了一些与繁殖性状相关的候选基因，但是能够利用并阐明其对繁殖性状影响机制的关键基因仍然不足。作者在前期利用 1100 头大白猪群体对其繁殖性状进行 GWAS 分析，结果表明酪氨酸激酶衔接蛋白 1（*NCK1*）基因与总产仔数、产活仔数及健仔数性状都显著关联。*NCK1* 最初发现于人黑色素瘤细胞中，是具有与 Scr 同源性 2、3（SH2、SH3）结构域的细胞内信号转导蛋白。*NCK1* 通过 SH2 结构域与酪氨酸激酶受体或者磷酸酪氨酸对接蛋白结合，通过 SH3 结构域募集下游 G 蛋白从而调节细胞骨架重排，参与细胞增殖、迁移等多，种生物过程。为了挖掘该基因中的高效分子标记，本研究利用 468 头大白猪群体，基于 Sanger 测序针对该基因进行分子标记筛查和基因分型，并与繁殖性状表型进行关联分析，以期获得高效的遗传标记，并用于高繁新品种（系）的培育。

材料与方法

试验对象为贵州某商品猪场的 468 头纯种大白猪。采集猪耳组织并提取基因组 DNA。采用 PCR 和 Sanger 测序检测 *NCK1* 突变位点，进行分子标记筛查和基因分型。利用 SAS 13.0 统计软件的广义线性模型将 468 头大白猪 *NCK1* 基因型与繁殖性状进行关联分析。

结果与讨论

本研究使用大白猪 GWAS 数据获得繁殖性状相关候选基因 *NCK1*，通过重测序精细定位，利用 Sanger 测序进行基因分型，确定了 *NCK1* 基因 g.77886190A>G 位点与繁殖性状存在显著关联。对大白猪群体进行统计分析，结果表明，A 等位基因是优势等位基因，AA 基因型是优势基因型；AA 基因型、AG 基因型、GG 基因型的频率分别是 0.447、0.395、0.158，A 等位基因和 G 等位基因的频率分别是 0.645 和 0.355。采用哈代温伯格平衡进行检验，p 值为 0.012，说明该位点可能在选育过程中受到了选择。利用 SAS 13.0 的 GLM 程序对候选位点与繁殖性状进行关联分析，结果表明，g.77886190A>G 位点的 AA 基因型个体的总产仔数、产活仔数和健仔数性状都显著高于 AG 和 GG 基因型个体（$P<0.05$），且加性效应达到极显著水平（$P<0.01$）。所以 A 等位基因具有更好的表型，A 等位基因是优势等位基因，该分子标记可以作为高繁殖性状的候选标记。因此 *NCK1* 基因 g.77886190A>G 位点可以有效提高母猪的繁殖性能，该位点的发现和应用对于选育高繁新品种具有重要意义。

主要参考文献

[1] 张宇，周佳伟，吴俊静，等.大白猪繁殖性状全基因组关联分析[J].中国畜牧杂志，2022，58（08）：94-99.

[2] Lundgren H，Fikse WF，Grandinson K，et al. Genetic parameters for feed intake，litter weight，body condition and rebreeding success in primiparous Norwegian Landrace sows[J] .Animal，2014，8： 175-83.

[3] Sell-Kubiak E，Dobrzanski J，Derks MFL，et al. Meta-Analysis of SNPs Determining Litter Traits in Pigs[J] .Genes（Basel），2022，13： undefined.

※ 作者简介：雷润雨，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种。E-mail：936223722@qq.com。

※※ 通讯作者：梅书棋（1971-），男，湖北武穴人，硕士，二级研究员，主要从事猪遗传育种研究，E-mail：msqlfe@163.com。

硒都黑猪 CYP2J34 基因遗传多态性对猪肉质性状的遗传效应分析

李亚赛[1,2※]，杨涛[2,3]，雷润雨[2,4]，任双[1,2]，周佳伟[2]，张宇[2]，杜志强[1]，梅书棋[2※※]

（1.长江大学动物科学学院，湖北荆州 430100；2.湖北省农业科学研究院畜牧兽医研究所，湖北武汉 430064；3.武汉轻工大学，湖北武汉 430048；4.华中农业大学动物科学学院，湖北武汉 430070）

引言

肉质性状是生猪育种产业的重要经济性状，其遗传力在 0.25～0.42 之间，大多为中遗传力性状。硒都黑猪是由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所历经十余年培育的国审优质黑猪新品种，平均肌内脂肪含量达 3.4 以上。前期研究表明，*CYP2J34* 基因在肌内脂肪含量性状极端个体中存在基因型差异，且 *CYP2J34* 的主要代谢物 EETs 参与血管舒张及血压降低过程的调节，可通过激活 MAPK 与 PI3-K/Akt 信号通路，促进内皮细胞增殖，调节细胞骨架重排，参与细胞增殖、迁移等多项生物过程。因此 *CYP2J34* 基因可能作为肉质性状相关的候选基因。本研究基于相同饲养条件下达 100kg 体重进行屠宰测定的 147 头硒都黑猪群体，收集肌内脂肪含量、大理石纹评分、肌肉色值 L1 和肌肉色值 L24 等肉质相关性状，针对 *CYP2J34* 基因遗传多态性和单倍型进行关联分析，旨在探究控制猪肉质性状的关键分子遗传标记，并将其用于优质猪新品种选育，对提高猪的肉质性状，增加经济效益具有重要意义。

材料与方法

试验对象为 147 头硒都黑猪，试验猪饲养管理和免疫水平相同，提取其基因组 DNA。采用 PCR 和一代测序技术分析 *CYP2J34* 基因多态性，并分析多态位点的不同基因型与大理石纹、肌内脂肪、肌肉色值 L1、肌肉色值 L24 性状的相关性。采用 SAS 统计软件（SAS Institute Inc，Version 9.4）GLM 程序，进行不同 SNP 基因型组合的方差分析，并使用 Duncan 法进行显著性检验，所采用模型为：

$Y_{ijkl} = \mu + G_i + W_j + B_k + e_{ijkl}$

Y_{ijkl} 为性状表型值，μ 为平均值，G_i 为基因型效应（包括基因加性效应和显性效应；W_j 为宰前活重；B_k 为胴体背膘厚；e_{ijk} 为残差效应。

结果与讨论

CYP2J34 基因扩增序列的第 189bp、190bp、194bp 和 198bp 处分别存在 g.189 C>T、g.190 T>C、g.194 T>C 和 g.198 C>T 碱基突变，这四个突变位点完全连锁构成 2 种单倍型 T-C-C-T 和 C-T-T-C，形成 CC-TT-TT-CC、CT-CT-CT-CT 或 TT-CC-CC-TT 三种基因型，其中等位基因 CC-TT-TT-CC 为优势等位基因。统计分析显示，*CYP2J34* 基因中的四个 SNP 分子标记与猪的大理石纹、肌内脂肪、肌肉色值 L1、肌肉色值 L24 性状相关（$P<0.01$）。Duncan 差异显著性分析结果显示 CC-TT-TT-CC、CT-CT-CT-CT 或 TT-CC-CC-TT 三种基因型的不同性状均值有差异，其中三种基因型个体的大理石纹性状均值分别是 2.924、2.682、2.333；肌内脂肪性状均值分别是 2.9497、2.6336、2.3633；肌肉色值 L1 性状均值分别是 42.3476、42.5009、40.6033；肌肉色值 L24 性状均值分别是 47.7733、47.8209、46.6533。CC-TT-TT-CC 基因型个体的大理石纹、肌内脂肪都显著高于 CT-CT-CT-CT 和 TT-CC-CC-TT 基因型个体（$P<0.05$）。本研究表明 *CYP2J34* 基因的单倍型间核苷酸的连锁遗传显著影响仔猪肉质，为筛选猪肉质性状及选育工作提供了重要的信息参考，将在猪肉质性状筛选和猪育种中发挥重要作用。

主要参考文献

[1]孙华，彭先文，吴俊静等，硒都黑猪新品种选育进展报告[J].中国畜牧杂志，2022，58（08）：165-172.

[2] Messina A，Siniscalco A，Puccinelli E，et al.Cloning and tissues expression of the pig CYP1B1and CYP2J34[J].Res Vet Sci，2012，92（3）：438-443.

※ 作者简介：李亚赛，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种。E-mail：1249625082@qq.com。

※※ 通讯作者：梅书棋（1971-），男，湖北武穴人，硕士，二级研究员，主要从事猪遗传育种研究，E-mail：msqlfe@163.com

脂质组学分析马身猪和杜长大猪肉品质及各部位脂质沉积差异

史明月※，李文霞，牛瑾，曹果清※※
（山西农业大学动物科学学院，山西太谷 080301）

引言

猪肉是中国最主要的肉类食品。肌内脂肪（Intramuscular fat，IMF）和内脏脂肪（Visceral adipose tissue，VAT）组织都是脂类，但是具有明显不同的沉积过程。此外，脂类分子沉积的异质性尚不清楚，因此，本研究对杜长大猪和马身猪的血清生化指标，肉质及背部皮下脂肪、背最长肌、板油、大网膜进行了脂质组学分析，旨在探究马身猪不同部位脂质沉积差异的具体机制。

材料与方法

试验对象为体重 120 kg 的杜长大猪（DLY）和马身猪（MS）各 6 头，采集血液，以及背部皮下脂肪组织（ULB）、背最长肌（LDM）、板油（LO）、大网膜（GOM）等组织于-80℃保存。血清生化指标由医院测定，肉质按照“猪肌肉品质测定技术规范（NY/T821-2004）”进行测定。包括肉色、pH 值、滴水损失、肌内脂肪含量等。提取各样品脂质后采用 LC-MS 进行脂质组学分析。

结果与讨论

血清测定结果发现马身猪和杜长大猪血液常规指标处于正常范围，可用于后续分析，且马身猪总蛋白、球蛋白含量显著高于杜长大猪（P<0.05），血糖和低密度脂蛋白含量显著低于杜长大猪（P<0.05）。肉品质结果检测发现，马身猪的肉色和肌内脂肪含量极显著优于杜长大猪（P<0.01）。脂质组学共检测出 13 种脂质亚类，其中，在正离子模式下，共检测到 1739 种脂质成分，在负离子模式下，共检测到 676 种脂质成分。进一步对马身猪和杜长大猪各部位的差异脂质进行分析，与 DLY-ULB 相比，MS-ULB 中有 70 个上调的差异脂质，55 个下调的差异脂质。MS-LDM 相对于 DLY-LDM，有 59 个差异上调的脂质，7 个下调的差异脂质，MS-LO 相较与 DLY-LO 有 64 个差异上调的脂质和 9 个差异下调的脂质，MS-GOM 与 DLY-GOM 相比有 63 个差异上调的脂质和 65 个差异下调的脂质。此外对杜长大猪和马身猪四个部位的脂肪酸组成和甘油三酯（TG）的脂肪酸位置分布进行了分析，DLY-ULB 中的 SFA 相对含量极显著高于 MS-ULB（P<0.01），而 MUFA 和 PUFA 的相对含量极显著低于 MS-ULB。MS-LDM，MS-LO 的 SFA、UFA 都极显著高于 DLY-ULB 和 DLY-LO（P<0.01）。DLY-GOM 的 SFA 相对含量极显著低于 MS-GOM（P<0.01），UFA 的相对含量差异不显著。MUFA、PUFA 在 TG 的 sn-1、sn-2 位分布较多，SFA 在 sn-1 位分布较少。对马身猪各部位的脂质成分进行了比较。本研究筛选出 21 种关键的差异脂质分子，包括 TG（10：0_18：1_18：3）、TG（14：0_18：2_18：3）、TG（16：0_16：1_18：3）、TG（16：0_18：1_22：4）、TG（16：1_18：1_18：2）等，它们对于脂质的沉积和分布可能具有重要作用。

本研究表明脂质分子的差异表达对于马身猪各部位的肉质品质和脂质沉积可能具有重要作用，为 IMF 和 VAT 的异质性沉积提供见解，对于猪肉质品质改善提供了重要信息。

主要参考文献

[1] Xie C，Zhu X，Xu B，et al. Integrated analysis of multi-tissues lipidome and gut microbiome reveals microbiota-induced shifts on lipid metabolism in pigs[J]. Anim Nutr，2022，10：280-293.

※ 作者简介：史明月，在读博士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：2730803983@qq.com。
※※ 通讯作者：曹果清，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：anniecao710502@aliyun.com。

CSDE1 在猪骨骼肌肌纤维形成过程中的功能和机制研究

蔡睿杰[1, 2※]，靳建军[1, 2]，史新娥[1, 2]，杨公社[1, 2※※]

（1. 西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室，陕西杨凌 712100；

2. 西北农林科技大学动物科技学院陕西省动物遗传育种与繁殖重点实验室，陕西杨凌 712100）

引言

肌纤维的形成影响猪肌肉的生长速度和产肉量。猪骨骼肌卫星细胞增殖、分化、融合形成肌纤维，挖掘影响该过程的关键调控因子对于提高猪骨骼肌生长速度和产肉量具有重要意义。CSDE1 基因是一个物种间高度保守的 RNA 结合蛋白，该蛋白可以通过调节靶基因 mRNA 的稳定性和翻译参与多种生物学过程。据目前已报道的数据显示，CSDE1 可能参与到肌肉发育过程。因此本研究旨在探究 CSDE1 对猪骨骼肌纤维形成的调控作用和分子机制。

材料与方法

试验材料为不同生长发育阶段的大白猪、猪骨骼肌卫星细胞、C57BL/6J 小鼠以及小鼠成肌细胞 C2C12。采用 RT-qPCR、Western Blot 以及免疫荧光检测 CSDE1 缺失后对细胞增殖分化过程的影响。利用 RNA-seq 及 CLIP-seq 鉴定肌纤维形成相关的靶基因。

结果与讨论

研究发现 CSDE1 基因在猪骨骼肌中高表达，且随着肌肉的生长发育，表达水平持续升高。敲低 CSDE1 基因后，猪骨骼肌卫星细胞增殖和分化能力显著下降。同时，利用小鼠成肌细胞 C2C12 验证了 CSDE1 功能的保守性。为了进一步研究 CSDE1 基因调节肌纤维形成的分子机制，本研究分析了 CSDE1 蛋白 CLIP-seq 和 RNA-seq 数据，鉴定到了 4 个与肌纤维形成相关的靶基因 Akap6、Ptn、Sparcl1、Pkia，敲低 CSDE1 后这些基因表达水平显著下降。基于以上结果，可以推测 CSDE1 可能结合靶基因 mRNA 并影响其稳定性或者翻译过程，从而在转录后水平调节肌纤维的形成。

主要参考文献

[1] Gangfuss A，Lochmuller H，Topf A，et al. A de novo CSDE1 variant causing neurodevelopmental delay，intellectual disability，neurologic and psychiatric symptoms in a child of consanguineous parents[J]. Am J Med Genet A，2022，188（1）：283-291.

[2] Zhou Q，Liu M，Xia X，et al. A mouse tissue transcription factor atlas[J]. Nat Commun，2017，8： 15089

[3] Guo H，Li Y，Shen L，et al. Disruptive variants of CSDE1 associate with autism and interfere with neuronal development and synaptic transmission[J]. Sci Adv，2019 5（9）： eaax2166.

[4] Becker R，Vergarajauregui S，Billing F，Sharkova M，Lippolis E，Mamchaoui K，et al. Myogenin controls via AKAP6 non-centrosomal microtubule-organizing center formation at the nuclear envelope[J]. Elife，2021，10.

[5] Wang Y，Liu S，Yan Y，Li S，Tong H. SPARCL1 Influences Bovine Skeletal Muscle-Derived Satellite Cell Migration and Differentiation through an ITGB1-Mediated Signaling Pathway[J]. Animals （Basel），2020，10.

[6] Fang Q，Mok PY，Thomas AE，Haddad DJ，Saini SA，Clifford BT，et al. Pleiotrophin gene therapy for peripheral ischemia：evaluation of full-length and truncated gene variants[J]. PLoS One， 2013，8：e61413.

※ 作者简介： 蔡睿杰，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种。E-mail： cairuijie-nwafu@nwafu。edu.cn

※※ 通讯作者：杨公社，教授，博士生导师，研究方向为动物遗传育种。E-mail： gsyang999@hotmail.com

STC-1 的克隆及其在合作猪和大白猪中表达差异分析

闫继弘[1※]，王鹏飞[1]，闫尊强[1]，杨巧丽[1]，黄晓宇[1]，高小莉[1]，李积友[2]，王自科[2]，高一[3]，滚双宝[1, 4※※]

（1.甘肃省农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州；2.甘肃省畜牧技术推广总站，甘肃兰州；3.吉林融泰农业开发有限公司，吉林长春；4.甘肃省生猪生产工程技术研究中心，甘肃兰州）

引言

合作猪是甘肃高寒牧区小型地方猪种。该猪种肉质鲜美、抗逆性强，但也表现出体型微小、生长缓慢和产肉量低的特点。为了提高和培育猪种，研究大型猪和微型猪之间的差异至关重要。斯钙素（STCs）是一类糖蛋白激素，最早在硬骨动物中发现。随后的研究表明，它通常作为一种旁分泌或自分泌因子参与身体的各种生理功能，如调节钙磷代谢、神经发生、炎症反应、生殖生理、肿瘤发育、肌肉和骨骼发育等。STC-1 在各种哺乳动物组织中广泛表达，转基因过表达 *STC-1* 在骨骼和肌肉组织中产生了“侏儒型”实验动物，这表明它抑制了骨骼和肌肉的发育。基因和蛋白的结构特点，以及它分别在大、小体型猪不同组织中的表达，对阐明其调节骨骼发育的功能机制和改进猪的育种具有重要意义。

材料和方法

本研究对长白猪和合作猪的心、肝、脾、肺、肾、胃、十二指肠、空肠、回肠和骨骼肌 10 个组织进行了研究。利用 PCR 和生物信息学方法，克隆合作猪 *STC-1* 基因的编码序列，并分析了其核苷酸、氨基酸序列和蛋白质结构特征。通过 RT-qPCR 和 Western blot 方法检测了该基因和蛋白在这 10 个组织中的表达。

结果和讨论

本研究通过克隆获得了合作猪 *STC-1* 基因的编码区序列。核苷酸序列比较结果显示，合作猪与牛、羊的亲缘关系最高，超过 94%，与斑马鱼的亲缘关系最低，仅为 61.87%。说明 *STC-1* 在哺乳动物中保守率较高。生物信息学分析表明，STC-1 是一种具有强亲水性的碱性蛋白，它没有跨膜结构，但具有分泌特性。它定位于细胞膜上，所以推测它是一种外周膜蛋白，可以分泌到细胞外发挥作用。STC-1 对生物体的生长发育有直接的调节作用。在本研究中发现，STC-1 在合作猪和长白猪的 10 个组织中都有表达，而且 STC-1 蛋白在合作猪的大多数组织中的表达都高于长白猪，在肺部、回肠和肌肉中的 mRNA 和蛋白表达不一致。造成 mRNA 和蛋白表达不一致的原因很多，推测可能与 STC-1 的生理功能和作用方式有关，STC-1 可以通过自分泌或旁分泌途径作用于邻近组织。本试验结果为进一步研究该基因的功能及其如何参与猪体型的调控提供了理论依据。

主要参考文献

[1] YEUNG B H Y，LAW A Y S，WONG C K C. Evolution and roles of stanniocalcin[J]. Mol Cell Endocrinol， 2012， 349（2）： 272-80.

※ 作者简介： 闫继弘，在读博士研究生，研究方向为动物育种理论与技术。E-mail：1825155991@qq.com。

※※ 通讯作者：滚双宝，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：gunsbao056@126.com。

冷应激对合作猪肝脏抗氧化能力和脂质代谢的影响

贾蕊※，李瑶，王龙龙，张鹏霞，杨巧丽※※
（甘肃省农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州 730000）

引言

冷应激是北方高寒地区动物最普遍的应激源之一，易导致动物生产性能下降，疾病发生率增加，严重影响养猪效益[1]。在鸡、阿勒泰羊和小鼠等动物上的研究表明[2]，肝脏脂质代谢在动物维持体温恒定和适应寒冷环境中发挥着重要作用。合作猪是藏猪的一个类群，可在甘肃省甘南藏族自治州高寒阴湿区冬季-15℃以下不采取任何供暖措施正常生长和繁殖，具有较强的抗寒性。本研究旨在探讨冷应激对合作猪肝脏抗氧化能力和脂质代谢的影响，为进一步探究合作猪抗寒性状形成的机制提供理论依据。

材料与方法

以 75 日龄健康合作猪为试验对象，常温饲养适应 7 d 后随机分为冷应激组和常温对照组，每组 5 头。冷应激组在装有温度控制装置的室内（-15 ±2 ℃）饲养，常温对照组在室内常温（23 ±2 ℃）饲养。试验期 15d。试验期内猪只饲喂标准日粮，自由采食和饮用温水。于试验第 0、5、10、15 d 早晨空腹前腔静脉采集试验猪血液样品；试验结束后，屠宰猪只，采集肝脏样品，测定抗氧化性能和脂质代谢指标。

结果与讨论

结果显示，与对照组相比，冷应激后合作猪：（1）肝脏蛋白质羰基和 8-羟基脱氧鸟苷含量极显著升高（$P<0.01$）；（2）血清总抗氧化能力含量呈先增加后降低趋势，第 10 d 达最高值 1.94，极显著高于第 0 d 和 5 d（$P<0.01$），显著高于第 15 d（$P<0.05$）；血清超氧化物歧化酶活性 10 d 后极显著升高（$P<0.01$），15 d 达到最大值 119.57；血清谷胱甘肽过氧化物酶活性极显著升高至 166.57（$P<0.01$）；血清过氧化氢酶活性极显著升高（$P<0.01$），15 d 达到最大值 165.37；（3）脂肪酸合成酶、乙酰辅酶 A 羧化酶活性均显著降低（$P<0.05$），肉碱棕榈酰转移酶活性极显著升高（$P<0.01$），脂蛋白脂酶、谷丙转氨酶、谷丙转氨酶、过氧化氢酶、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 活性均极显著降低（$P<0.01$）。（4）血清甘油三酯含量在 5 d 时最高，为 0.82，15 d 时显著降低至 0.61（$P<0.05$），游离脂肪酸含量呈先升高后降低趋势，但无显著差异（$P>0.05$）；（5）肝脏中 *SREBP* 和 PPARα 基因 mRNA 表达量显著降低（$P<0.05$），*PCAF* 基因 mRNA 表达量显著增加（$P<0.05$）。上述结果说明，冷应激会造成合作猪肝脏氧化损伤，处于寒冷环境时合作猪能够通过加剧肝脏脂质代谢提高其寒冷适应性。

主要参考文献

[1] 李金敏. 谷氨酰胺对慢性冷应激雏鸡肝脏损伤的影响[D].东北农业大学，2009.

[2] 杨莉. 寒冷应激对阿勒泰羊和湖羊脂肪代谢相关基因及血脂变化的对比分析[D]. 石河子大学，2015.

※ 作者简介： 贾蕊，在读硕士研究生，研究方向为动物育种与繁殖。E-mail：2280013630@qq.com。
※※ 通讯作者：杨巧丽，副教授，硕士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yangql0112@163.com。

低温环境下合作猪和大白猪抗寒性能比较及激素水平分析

唐于然[1※]，闫继弘[1]，王鹏飞[1]，滚双宝[1, 2※※]

（1.甘肃省农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州 730070；2.甘肃省现代养猪工程技术研究中心，甘肃兰州 730070）

引言

低温环境会引起畜禽产生冷应激，导致机体免疫力及抗病能力变差、饲料转化率降低、生长变缓或停滞、生产力降低、产品质量改变、繁殖率下降、行为异常、发病率及死亡率增高。目前，有关仔猪冷刺激后抗寒性能及相关激素测定的研究鲜有报道，具有抗寒特性的合作猪在这方面的研究仍处于空白区域。因此，本试验比较了合作猪和大白猪的抗寒性能，分析了冷刺激对不同品种仔猪神经内分泌系统的影响，目的是为后续进一步研究仔猪抗寒及应用相关激素评价仔猪冷应激提供理论基础，为今后利用合作猪进行猪抗寒育种工作提供实验依据和参考。

材料与方法

本试验通过对 1 月龄合作猪和大白猪实施（4±2）℃冷刺激，测定冷刺激前（0 h）和冷刺激后不同时间点（6 h、12 h、24 h、5 d、10 d 和 15 d）的体表温度、直肠温度、呼吸频率、颤栗频率以及血清中促肾上腺皮质激素（ACTH）、皮质醇（Cortisol）、三碘甲腺原氨酸（T3）和甲状腺素（T4）水平的动态变化情况，观察冷刺激结束后各部位冻伤情况。

结果与讨论

结果显示，受冷刺激后，合作猪和大白猪体表温度均降低，且大白猪在冷刺激 6 h 后便极显著降低（$P < 0.01$），表明大白猪对低温环境更敏感。合作猪和大白猪在冷刺激后各时间点直肠温度均未发生显著变化（$P > 0.05$），说明合作猪和大白猪都能在（4±2）℃环境下维持正常体温。合作猪和大白猪受冷刺激后呼吸频率均先增加后恢复到正常水平。呼吸频率加快，供氧量增加，代谢产热提高，机体以此抵抗寒冷环境。受冷刺激后，两品种猪均出现颤栗现象，且合作猪在冷刺激后各时间点颤栗频率均极显著低于大白猪（$P < 0.01$），说明合作猪比大白猪更耐寒，不需要过度依赖肌肉颤栗来增加产热。大白猪在冷刺激 15 d 后各部位出现冻红、冻伤结痂等现象，而合作猪无冻红、冻伤现象，此结果进一步证明了合作猪不易受到低温环境的危害，比大白猪更耐寒。合作猪和大白猪受冷刺激后各时间点 ACTH 含量均出现降低现象，推测可能是因为合作猪和大白猪遭受冷刺激后，某些调节信号抑制了垂体功能，导致垂体前叶细胞表面接受 CRH 信号的受体受阻，或者是阿黑皮素原（POMC）转变为有活性的 ACTH 受阻，但具体原因仍需进一步深入研究。大白猪 Cortisol、T3 和 T4 含量均增加，而合作猪均降低，这种差异可能与低温环境对不同冷刺激强度及时间、动物种属、性别、年龄、营养状况的机体会产生不同趋势的神经内分泌变化情况有关。

主要参考文献

[1] Liu Z G，Zhang D J，Wang W，*et al*. A comparative study of the effects of long-term cold exposure，and cold resistance in Min Pigs and Large White Pigs[J]. Acta Agriculturae Scandinavica，Section A — Animal Science，2017，67： 34 - 39.

基金项目：2022 年度甘肃省优秀研究生“创新之星”项目（2022CXZXB-005）。

※ 作者简介：唐于然，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：tangyuran520@163.com。

※※ 通讯作者：滚双宝，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：gunsb@gsau.edu.cn。

TGFBR3 拷贝数变异与大白猪与民猪背部脂肪厚度差异有关

张春雷※，徐庆磊，柳明正，晁小焕，杨桓，陈家浩，周波※※
(南京农业大学动物科技学院，江苏南京 210018)

引言

猪背膘厚（Back fat thickness，BFT)与肉质和瘦肉率密切相关。大白猪与中国地方脂肪型猪民猪在 BFT 性状上有显著差异。拷贝数变异(Copy number variation, CNV)是基因组上普遍存在的遗传变异，在猪的经济性状调控中起着重要作用。然而，在大白猪和民猪中，CNV 对 BFT 的潜在贡献仍然是未知的。

材料与方法

使用大白猪（n=12)和民猪（n=11)的全基因测序数据来检测猪的全基因组拷贝数变异。为了增加结论的可靠性，使用了苏淮猪（n=23,含有 75%大白猪血统与 25%淮猪血统）作为参考群体。除此之外，分析了 180 日龄的大白猪（n=3)和民猪（n=3）背膘组织的转录组，并通过 eQTL（expression quanti-tative trait loci）方法整合全基因组和转录组数据。

结果

在大白猪和民猪中分别检测到 10403 和 10800 个 CNV 区域。这些 CNV 区域超过 4400 万个碱基,占据了猪基因组(Sscrofa 11.1)的 1.85%。通过计算 VST 值并结合 IGV 鉴定出大白猪和民猪之间存在 22 个差异 CNV 区域。分析了 180 日龄的大白猪和民猪背膘组织转录组学数据，相比于民猪,在大白猪中上调的基因有 5317 个,下调的基因有 3868 个。通过 Matrix-eQTL 对检测到的差异 CNV 区域与差异基因进行 eQTL 分析，发现覆盖 KIT 与 TGFBR3 的 CNV 区域基因组拷贝数与其转录组表达量成正相关，这可能是由于 DNA 层面剂量效应导致了 mRNA 转录水平改变。对存在顺式 eQTL 作用的 CNV 区域与已发现的猪 QTLs 数据进行比对分析，发现在该区域存在大量与脂肪代谢相关 QTLs 位点。

讨论

通过对存在显著 BFT 差异的大白猪和民猪进行全基因组数据与转录组数据整合分析，鉴定到 KIT 与 TGFBR3 可能拷贝数变异的剂量效应导致其转录水平改变，KIT 被认为与猪的毛色密切相关，在白色被毛猪种中为高拷贝。本研究中的大白猪为全白毛色，民猪与苏淮猪为全黑毛色，这与已报道研究结果一致。TGFBR3 曾被广泛报道参与脂肪代谢，本研究中发现，民猪中 TGFBR3 的 CNV 区域呈现高拷贝状态，显著超过大白猪与苏淮猪，并且其 mRNA 转录水平也随之增强，这可能与民猪的背膘厚度增加有关。

关键词：背膘厚；地方猪；拷贝数变异；TGFBR3

主要参考文献

[1]. Mas, G.; Llavall, M.; Coll, D.; Roca, R.; Diaz, I.; Oliver, M. A.; Gispert, M.; Realini, C. E., Effect of an elevated monounsaturated fat diet on pork carcass and meat quality traits and tissue fatty acid composition from York-crossed barrows and gilts. Meat Sci 2011, 89, (4), 419-25.http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.011

[2] Lassaletta, L.; Estelles, F.; Beusen, A. H. W.; Bouwman, L.; Calvet, S.; van Grinsven, H. J. M.; Doelman, J. C.; Stehfest, E.; Uwizeye, A.; Westhoek, H., Future global pig production systems according to the Shared Socioeconomic Pathways. Sci Total Environ 2019, 665, 739-751.http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.079

[3] Alnahhas, N.; Berri, C.; Chabault, M.; Chartrin, P.; Boulay, M.; Bourin, M. C.; Le Bihan-Duval, E., Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. BMC Genet 2016, 17, 61.http://doi.org/10.1186/s12863-016-0369-2

基金项目：本研究由国家自然科学基金项目 (项目编号:32172786,31672465)；江苏省种业振兴揭榜挂帅项目（项目编号：JBGS [2021] 101）资助。
※ 作者简介： 张春雷（1998-），男，江苏省南京市人。E-mail：1573855833@qq.com。
※※ 通讯作者：周波，E-mail：zhoubo@njau.edu.cn,固定电话：020-854321234，手机号：18913901843。

SLCO3A1 和 SEMA5A 基因拷贝数的变化与混群后断奶仔猪的攻击行为有关

张春雷※，杨桓，徐庆磊，柳明正，晁小焕，陈家浩，周波※※
（南京农业大学动物科技学院，江苏南京 210009）

引言

拷贝数变异(Copy number variation, CNV)是基因组中的一类结构变异，与重要性状和疾病有着密切的关系。攻击行为对猪的生产性能、免疫能力和肉质有负面影响。然而，CNV 对猪的攻击行为的影响尚不清楚。

材料与方法

在本研究中，根据综合攻击性评分(composite aggressive score, CAS)，从 500 头断奶苏淮猪中选取混群后攻击性最强(n=12)和最弱(n=11)的猪进行全基因组测序并开展 CNV 检测。在另一个独立的试验中，从 160 头混群仔猪中挑选攻击性最强(n=4)和攻击性最弱(n=4)的猪颞叶组织进行转录组测序，并通过 eQTL（expression quanti-tative trait loci）方法整合全基因组和转录组数据。

结果

在苏淮猪中共检测到 6869 个拷贝数变异区(CNVRs)，其中缺失型 3675 个，混合型 2103 个，重复型 1091 个，占 31.07 Mb，占染色体的 1.30%。通过评估 VST 值来确定攻击性最强和攻击性猪最弱组猪之间的差异 CNVR。并挑选排名前 10 的 CNVRs 与颞叶转录组数据进行 eQTL 关联分析。其中，2 个 CNVRs（CNVR1,CNVR5)被认为与 SLCO3A1、SEMA5A 基因在强弱攻击性组猪中表达量变化有关。使用 qPCR 在大群中验证了 CNVR1 (SLCO3A1) 和 CNVR5 (SEMA5A)与混群后断奶仔猪 72 小时内攻击行为的关系。

讨论

通过整合基因组数据与转录组数据鉴定到影响断奶仔猪攻击行为候选基因 SLCO3A1 与 SEMA5A。而 SLCO3A1 和 SEMA5A 基因在神经发育和精神疾病中起着关键作用，我们推断它们在猪的攻击行为中具有调节潜力。在之前的研究中，qPCR 方法已被广泛应用于 CNV 研究。在本研究中，通过 qPCR 分析 SLCO3A1 和 SEMA5A 基因的 CNVs 与猪混合后的攻击行为相关。全基因组 CNV 检测丰富了猪基因组的 CNV 图谱，为研究猪攻击行为与 CNV 之间的关系提供了有价值的信息。

关键词：拷贝数变异；攻击行为；猪

主要参考文献

[1].Argos, M., Tong, L., Pierce, B.L., Rakibuz-Zaman, M., Ahmed, A., Islam, T., Rahman, M., Paul-Brutus, R., Rahaman, R., Roy, S., Jasmine, F., Kibriya, M.G., Ahsan, H., 2014. Genome-wide association study of smoking behaviours among Bangladeshi adults. J Med Genet 51, 327-333. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102151.

[2].Aviles-Rosa, E.O., Surowiec, K., McGlone, J., 2020. Identification of Faecal Maternal Semiochemicals in Swine (Sus scrofa) and their Effects on Weaned Piglets. Sci Rep 10, 5349. doi:10.1038/s41598-020-62280-9.

[3].Bushby, E.V., Dye, L., Collins, L.M., 2020. Is Magnesium Supplementation an Effective Nutritional Method to Reduce Stress in Domestic Pigs? A Systematic Review. Front Vet Sci 7, 596205. doi:10.3389/fvets.2020.596205.

[4].Chen, C., Liu, C., Xiong, X., Fang, S., Yang, H., Zhang, Z., Ren, J., Guo, Y., Huang, L., 2018. Copy number variation in the MSRB3 gene enlarges porcine ear size through a mechanism involving miR-584-5p. Genet Sel Evol 50, 72. doi:10.1186/s12711-018-0442-6.

[5].Chen, C., Qiao, R., Wei, R., Guo, Y., Ai, H., Ma, J., Ren, J., Huang, L., 2012. A comprehensive survey of copy number variation in 18 diverse pig populations and identification of candidate copy number variable genes associated with complex traits. BMC Genomics 13, 733. doi:10.1186/1471-2164-13-733.

基金项目：基金项目:本研究由国家自然科学基金项目 (项目编号:32172786,31672465)；江苏省种业振兴揭榜挂帅项目（项目编号：JBGS [2021] 101）资助。

※ 作者简介：张春雷（1998-），男，江苏省南京市人。E-mail：1573855833@qq.com。
※※ 通讯作者：周波，E-mail：zhoubo@njau.edu.cn,固定电话：020-82341234，手机号：18913901843。

湘沙猪配套系生长发育测定及生长曲线拟合研究

李玉莲[1※]，谭 红[1]，吴买生[2※※]
（1.湘潭市家畜育种站，湖南湘潭 411104；2.湘潭市农业农村局，湖南湘潭 411104）

为研究湘沙猪配套系父母代猪和商品代猪从初生到适宜上市体重阶段的生长发育规律，试验选择同期出生的湘沙猪配套系父母代和商品代 1 日龄健康仔猪（公）共 40 头，按品种分为两组，每组 20 头仔猪。在相同的饲养管理和日粮营养水平条件下，比较湘沙猪配套系父母代和商品代育肥猪从初生至商品代猪达 100kg 育肥期间体重，并利用线性模型、二次多项式模型、幂函数模型拟合生长曲线。结果表明：在相同日龄情况下，商品代猪体重均高于父母代猪，特别是 98 日龄后，持续极显著高于父母代猪（$P<0.01$）；父母代猪和商品代猪在 35 日龄至 189 日龄期间，利用线性模型、二次多项式模型、幂函数模型拟合生长曲线拟合度均较高，利用幂函数模型拟合父母代猪最优，二次多项式模型拟合商品代猪最优 。

主要参考文献

[1]吴买生,陈斌,彭英林,张善文,李玉莲,刘冬明.湘沙猪配套系选育及展望[J].养猪,2020,No.168(01):49-54.

[2]张善文,吴买生,李朝晖,向拥军,刘伟,吴攀峰,张兴,李玉莲.湘沙猪配套系母系母本、父母代猪及商品猪肥育性能与胴体品质测定[J].中国猪业,2017,12(07):77-79+81.

基金项目：湖南省农业农村厅现代生猪产业技术体系建设项目（2019 年-2023 年）
※ 作者简介：李玉莲（1987-），女，安徽枞阳人，硕士，畜牧师，主要从事猪遗传育种工作，E-mail：1063103404@qq.com
※※ 通讯作者：吴买生（1962-），男，湖南涟源人，研究员，主要从事猪遗传育种工作，E-mail：wms621220@hotmail.com

基于全基因组关联分析鉴别影响安徽地方猪肉质性状的功能候选基因

时坤鹏※，张志勇，王自洋，郑先瑞，殷宗俊※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

安庆六白猪和霍寿黑猪是我国优良地方猪品种，肉质优良，但影响肉质性状的遗传调控机制尚不明确。本研究利用全基因组关联分析鉴定影响 2 个群体（安庆六白猪和霍寿黑猪）11 种肉质性状（45minL*、45mina*、45minb*、24hL*、24ha*、24hb*、45minPH、24hPH、24h 滴水损失、48h 滴水损失、肌内脂肪含量）的显著 SNP，旨在为最后定位影响这些性状的因果基因提供前期基础，同时为猪肉质性状选育工作提供参考。

结果与讨论

安庆六白猪与霍寿黑猪 2 个群体通过质控的有效表型数据个体数分别为 191 头和 142 头，有效 SNPs 个数分别为 49267 和 47659 个。我国地方猪种的 LD 程度普遍较低，r^2 为 0.3 时的平均 LD 衰减距离仅有 10.5kb[6]，本次选择的安庆六白猪与霍寿黑猪为我国安徽省优良地方品种，两个群体的位点平均连锁范围大小均为 50kb，相较我国地方猪平均水平偏高。相关 GWAS 分析软件种类较多，包括 GEMMA、GCTA、GenABEL、GAPIT 和 LDAK 等，本次研究利用 LDAK[7]软件进行关联分析，它的优势在于构建亲缘矩阵时将高 LD 水平的 SNPs 进行修剪，降低了冗余的随机效应对 MLM 模型的过度矫正，也加快了迭代的速度。通过运用单性状 MLM 模型[8]进行全基因组关联分析共鉴定到 121 个显著影响 2 个群体 11 种肉质性状的 SNPs，其中 17 个 SNPs 达基因组显著水平，104 个 SNPs 达染色体显著水平。在安庆六白猪群体中共鉴别到 5 个基因组显著水平 SNPs 以及 21 个染色体显著水平 SNPs，且 5 种性状存在基因组显著水平的 SNPs，分别是 45minb*、45minPH、24hPH、24h 滴水损失和肌内脂肪含量。在霍寿黑猪中共定位到 12 个基因组显著水平 SNPs 以及 83 个染色体显著水平 SNPs，且 4 种性状存在基因组显著水平的 SNPs，分别是 45mina*、24h 滴水损失、48h 滴水损失和肌内脂肪含量。本研究关于 11 种肉质性状共定位到位置候选基因 123 个，对其全部进行功能注释。其中 *MYH3* 基因在红度 a*与肌内脂肪含量中均被定位到，此结果与 cho 等[9]研究一致。该基因参与编码肌球蛋白重链 3 并与肌肉收缩及肌纤维类型相关[10]。而且 *TMEM* 家族中 *TMEM238L* 与 *TMEM220* 基因同样也在上述两种性状中均被筛选出，*TMEM* 家族是一组跨膜蛋白质家族，参与细胞信号转导和调节，影响细胞增殖、分化、凋亡和迁移等，可以通过调节脂肪细胞分化进而调控脂肪代谢，所以本研究将 *MYH3*、*TMEM238L* 和 *TMEM220* 作为调节红度与肌内脂肪含量的功能候选基因。针对 PH 值性状共定位到 20 个位置候选基因，其中包括位于 SSC18 上的 *GRM8* 基因，Wang 等[11]对杂交猪肉质性状候选基因研究中也鉴定到 *GRM8* 显著影响 45minPH 值，该基因编码 G 蛋白偶联的代谢性谷氨酸受体，谷氨酸是一种酸性氨基酸，*GRM8* 可通过调控谷氨酸代谢进而影响 PH 值。对于肉色性状中的黄度 b*，本研究定位到了 15 号染色体上 *DOCK4* 基因，该基因参与色素沉着和骨骼肌代谢等活动，因此将其作为黄度 b*的功能候选基因，*DOCK4* 基因在 Li[11]等人针对肌内脂肪含量候选基因筛选中也被鉴定出，可能是因为数量性状由微效多基因控制且一因多效作用的结果。氧化反应与滴水损失密不可分，当发生氧化反应时，肌浆内质网的钙存储能力下降，钙依赖蛋白酶将对蛋白进行降解，而蛋白对肌细胞结构的维持有着关键作用，当肌细胞结构和通透性被改变，其中的不易流动水也将发生丢失。此次对于滴水损失性状筛选到了编码糖基转移酶的 *GALNT2* 基因，糖基化会产生 AGEs（高级糖化终产物），AGE 形成时也会产生 ROS（活性氧）等副产物，氧化应激正是由 ROS 分子引起的细胞损伤，因而可将 *GALNT2* 视为影响滴水损失的功能候选基因。本研究新发现的功能候选基因将为猪肉质性状选育提供帮助。

主要参考文献

略

※ 作者简介：时坤鹏，在读研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：1046028332@qq.com。
※※ 通讯作者：殷宗俊，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yinzongjun@ahau.edu.cn。

USP16 基因与 ABHD4 基因对猪主要生长性状的遗传效应分析

王自洋，邓绍均，郑先瑞，殷宗俊*
（安徽农业大学动物科学技术学院，安徽合肥 230036）

引言

随着现代分子生物技术的发展，传统猪育种方式逐渐被分子育种所取代。猪重要生长性状的改良对养殖业的可持续发展具有重要意义，团队经过前期全基因组关联分析发现，*USP16* 与 *ABHD4* 基因是猪 100kg 背膘厚性状的功能候选基因。本研究在大白猪群体中将两个候选基因与 100kg 背膘厚和 100kg 眼肌面积间进行关联分析，目的是为猪的分子育种提供基因资源和有效的分子标记，并将其运用于生产实践中。

材料与方法

本试验以 238 头大白猪为试验群体，测定 100kg 背膘厚、100kg 眼肌面积两个性状的表型，采集耳组织并提取 DNA，对 *USP16* 及 *ABHD4* 两个基因全覆盖外显子区、基因上下游 2000-3000bp 区设计引物后进行混池测序。利用飞行时间质谱方法对筛选出的 SNP 位点进行基因分型，并对 SNP 位点与两个性状进行关联分析。

结果与讨论

猪的生长性状不仅受环境的影响，同时受多数量基因座调控[1]。生长性状包括背膘厚、眼肌面积、饲料转化率等，都能反映猪的生长性能[2]。经飞行时间质谱分型后，在 *USP16* 基因与 *ABHD4* 基因分别发现了 6 个和 5 个 SNP 位点。背膘厚是评价猪肉瘦肉率高低的指标[3]，与猪胴体重呈正相关[4]。背膘厚对猪肉的肌内脂肪含量、风味、品质都具有显著影响[5]，因此对背膘厚性状的研究具有重要意义。眼肌面积是指家畜背最长肌的横断面面积，与产肉性能呈强相关，故在育种上显得尤为重要[6] 。将 SNPs 与两性状进行关联分析后发现，*USP16* 基因的 g.192401821G>A、g.192407026G>A、 g.192407237A>G、g.192408287T>C、g.192408499C>T 位点与大白猪群体 100kg 背膘厚显著关联（P<0.05），与 100kg 眼肌面积无显著关联。*ABHD4* 基因的 g.76405883A>G、g.76405942T>C、g.76405956G>A、g.76406109A>G 位点在大白猪群体中与 100kg 眼肌面积显著关联（P<0.05），与 100kg 背膘厚极显著关联（P<0.01），g.76432041C>T 位点在大白猪群体中与 100kg 眼肌面积和 100kg 背膘厚都呈极显著关联（P<0.01）。以上显著关联 SNPs 可以作为有效的分子标记应用于分子辅助选择。

关键词：猪；*USP16*；*ABHD4*；关联分析

主要参考文献

[1]王克君. 基于多重关联分析鉴定猪生长性状相关基因及其功能验证[D].中国农业大学，2017.

[2]Rothschild MF，Hu ZL，Jiang Z. Advances in QTL mapping in pigs[J]. Int J Biol Sci. 2007 ;3（3）：192-7.

[3]Lavery A，Lawlor PG，Magowan E，Miller HM，O'Driscoll K，Berry DP. An association analysis of sow parity，live-weight and back-fat depth as indicators of sow productivity[J]. Animal. 2019 ;13（3）：622-630.

[4]Kim GW，Kim HY. Effects of Carcass Weight and Back-fat Thickness on Carcass Properties of Korean Native Pigs[J]. Korean J Food Sci Anim Resour.,2017,37（3）：385-391.

[5]Hoa VB，Seo HW，Seong PN，Cho SH，Kang SM，Kim YS，Moon SS，Choi YM，Kim JH，Seol KH. Back-fat thickness as a primary index reflecting the yield and overall acceptance of pork meat[J]. Anim Sci J. 2021 ;92（1）：e13515.

[6]刘培峰，杜海涛，吴甜，宋瑞鹏.不同净能水平日粮对育肥猪生长性能、背膘厚度及眼肌面积的影 响[J].饲料研究，2021，44（04）：22-25.

基于 RNA-seq 技术对柯乐猪异常乳腺组织的转录组学分析

王春源※，向进，吴燕，谭元成，杨酸，张依裕※※
（贵州大学 动物科学学院，高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025）

引言

乳腺是哺乳动物的一个特殊器官，它能为幼小动物提供含有丰富营养和生长所需免疫物质的乳汁。初产母猪的乳腺发育，尤其是妊娠期的乳腺发育，对其泌乳性能具有决定性作用[1]。哺乳动物的乳腺发育受遗传、营养、内分泌、环境等多种因素的影响，于是，从分子遗传的角度发掘哺乳动物乳腺发育的关键调控基因或分子信号通路，阐明其机制是改善乳腺发育的根本途径。本试验拟利用 RNA-seq 技术研究发育良好和发育不良乳腺组织中基因表达差异，筛选与母猪乳腺发育相关的差异表达基因，为柯乐猪在繁殖性能方面的选育相关工作提供理论依据。

材料与方法

6 头断奶 14 天经产柯乐猪来自贵州省毕节市赫章县柯乐猪保种场，采集乳腺发育正常组和发育不良组各 3 头猪只的中部乳腺组织送华大基因有限公司进行转录组测序，利用华大基因多组学系统分析差异基因，并进行 GO 和 KEGG 富集分析，筛选出影响猪乳腺发育关键信号通路，并绘制差异基因间的网络互作图。

结果与讨论

通过对转录组数据进行分析，共筛选到 1847 个差异表达基因，其中 767 个上调，1080 个下调。Go 富集分析显示，在生物学过程方面，差异表达基因主要富集在细胞过程和生物调节；在细胞组分部分，差异表达基因主要富集在细胞、细胞部分和膜；在分子功能方面，差异基因主要集中在黏合剂和催化活性方面。KEGG 富集分析显示，差异表达基因在神经活性配体-受体相互作用通路相关的数量最多，其次为细胞因子与细胞因子受体的相互作用以及 PI3K-Akt 信号通路；上调的差异表达基因主要富集在细胞因子与细胞因子受体相互作用的信号通路，其次为神经活性配体-受体相互作用通路；下调的差异表达基因主要富集在人乳头瘤病毒感染和神经活性配体-受体相互作用信号通路，其次为 PI3K-Akt 信号通路和细胞周期等通路。通过对差异蛋白及其信号通路的功能注释分析发现，乳腺发育显著相关的差异基因主要来源于细胞周期、Th1 和 Th2 细胞的分化、PI3K-Akt 信号通路和焦点粘连等信号通路。绘制了 173 个差异基因的网络互作图，筛选出关联度前 10 位的差异基因为 CDC6、F2、E2F1、DRD2、KNG1、GHRL、LEP、IFNG、FN1、PPARG，且关联度最高的 CDC6 可调节多个信号通路。前人的研究表明，哺乳动物的乳腺发育与母畜的生理状态存在显著的关性，且不同的生理状态乳腺发育调控的基因表达模式存在较大差异。本研究的结果也进对一步研究乳腺发育的调控机制有一定的科学价值。

主要参考文献

[1] Hurley WL. Review：Mammary gland development in swine：embryo to early lactation[J]. Animal，2019，13（S1）：s11-s19.

基金项目：贵州省科技支撑计划（黔科合支撑[2021]一般 147 号）
※ 作者简介：王春源（1997-），男，贵州绥阳人，硕士研究生，研究方向：动物遗传育种与繁殖。E-mail：1772552571@qq.com
※※ 通讯作者：张依裕，博士，教授，研究方向：动物遗传育种 E-mail：zyy8yyc@163.com

柯乐猪 DSP 基因 SNP 鉴定及其对繁殖性状的影响

向 进※，王春源，吴 燕，张依裕※※
（贵州大学 动物科学学院/高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025）

引言

猪的繁殖性状一直是动物育种学家和养殖业最为关注的目标性状。然而，由于猪的繁殖性状是一个低遗传力的性状，受到营养与饲料、环境卫生、疾病、遗传等因素的影响大，育种进展较缓慢。从分子水平阐明猪的繁殖性状机理是提高繁殖力的根本途径，国内外学者也从分子水平开展了大量的研究工作，为猪的繁殖力提升作为了贡献。Ozer 等研究发现，桥粒斑蛋白（ desmoplakin，DSP）对人组织器官的细胞增殖和分化产生影响，主要是因为 DSP 可促进骨骼相关标志物、转录因子和生长因子的基因表达来进行调节。目前尚未证明 DSP 基因能够作为猪繁殖性能的关键候选基因。本研究以柯乐猪为研究对象，筛查 *DSP* 基因的 SNP 位点，并与 7 个繁殖性状进行关联性分析，旨在探讨 SNP 作为猪繁殖性能选择的可行性，为猪的繁殖性能提升提供科学依据。

材料与方法

记录贵州省毕节市赫章县柯乐猪保种场的213头经产母猪的繁殖数据，对应采集耳组织，提取DNA，设计 DSP 基因扩增引物进行 PCR 扩增，对 PCR 产物送上海生工进行测序，利用 DNAStar 软件和人工校对鉴定 SNP 位点，统计基因型频率、等位基因频率、有效等位基因数（Ne）、多态信息含量（PIC）和 χ^2 值，SHEsis 在线软件对 SNP 位点进行连锁不平衡分析，SPSS 23.0 软件对 SNP 位点与柯乐猪的繁殖性状进行关联分析。

结果与讨论

通过 PCR 产物直接测序法对柯乐猪 DSP 基因进行筛查鉴定，共发现了 9 个 SNP 位点，其中在第 14 外显子发现 3 个同义突变：g.4897767G>A、g.4897776C>T 和 g.4897824G>A，第 14 内含子发现 6 个 SNP 位点：g.4897943G>T、g.4897954C>T、g.4897991T>C、g.4897997T>G、g.4897999C>G 和 g.4898004C>T，9 个 SNP 位点均检测到 3 种基因型。连锁不平衡分析发现，g.4897767G>A、g.4897999C>G 和 g.4898004C>T 位点之间，g.4897824G>A 与 g.4897999C>G、g.4898004C>T 位点之间以及 g.4897954C>T 和 g.4897897T>C 位点之间均存在强连锁不平衡，而其他位点之间未观察到强连锁不平衡现象。统计分析显示，g.4897943G>T 位点对断奶平均重的影响达到显著水平（P<0.05），TT 基因型个体的断奶个体平均重显著高于 GT 基因型个体（P<0.05）。其他 8 个 SNP 位点与柯乐猪繁殖性能各指标的影响未达到显著水平（P>0.05），通过对第 14 外显子 3 个 SNP 组成的单倍型 mRNA 二级结构进行分析发现，3 个 SNP 位点能引起其 DSP mRNA 二级结构的改变，表明可能会影响转录和翻译的效率，进而影响猪的繁殖性能，可能作为柯乐猪繁殖性状选择的分子标记。

主要参考文献.

[1] Ozer A，Yuan G，Yang G，Wang F，Li W，Yang Y，et al. Domain of Dentine Sialoprotein Mediates Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells[J]. PLoS ONE 2013,8（12）： e81655.

基金项目：贵州省科技支撑计划（黔科合支撑[2021]一般 147 号）
※ 作者简介：向进，在读研究生，研究方向：动物遗传育种与繁殖。E-mail：1911005146@qq.com
※※ 通讯作者：张依裕，博士，教授，研究方向：动物遗传育种，E-mail：zyy8yyc@163.com。

不同品种猪肠道菌群结构差异比较分析

周浩※，刘闯，韩锦仪，冯浩义，李新建※※
（河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046）

引言

在正常的动物肠道中，大约定居着 10^{13}~10^{14} 个微生物，这些微生物可以通过脑-肠轴、肠-肝轴等多条途径，对大脑、肝脏等多个器官组织产生影响。肠道菌群拥有的基因数量是动物宿主所拥有基因数量的数百倍，因此肠道菌群被称为“第二基因组”。猪的肠道微生物包含了超过 770 万个基因，是猪基因组基因数量的 300 倍，这为通过调控微生物的组成进而改善动物表型提供了可能。众多研究表明，品种对肠道菌群的构成影响极大。然而，对于猪肠道菌群的构成，尤其是品种对猪肠道菌群结构的影响，目前相关研究依然较少。本研究通过对 4 个品种猪的肠道菌群样本进行 16S rRNA 扩增子测序，分析其中的微生物组成，旨在分析不同猪品种中微生物在组成结构上的特点和差异，为猪的种质创新工作提供新思路。

材料与方法

本试验选择 4 个品种（杜洛克、皮特兰、大白、长白）各 10 头健康、未使用抗生素公猪，并在相同饲养条件下饲养至 220 d。利用直肠刺激法采集其新鲜粪便样本，经液氮冷冻运输后，储存在-80℃冰箱中。对采集样本进行 16S rRNA 基因扩增子测序，采用 Illumina MiSeq/NovaSeq 平台对群落 DNA 片段进行双端 （Paired-end）测序。采用 QIIME-2 软件对 Alpha 多样性和 Beta 多样性指数进行评估；基于微生物基因组数据库，应用 PICRUSt2 软件对潜在功能基因进行预测。

结果与讨论

采用 16S rRNA 扩增子测序技术，对 4 个品种共 40 头猪的直肠内容物样本进行测序分析。在对门水平肠道菌群组成结构分析时发现，厚壁菌门（*Firmicutes*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、螺旋体门（*Spirochates*）和变形菌门（*Proteobacteria*）是 4 个猪种肠道菌群中的优势门，分别占大白猪、长白猪、杜洛克猪、皮特兰猪肠道菌群总量的 97.7%、97.2%、97.7%和 97.3%。而在厚壁菌门与拟杆菌门的组成上，皮特兰猪显著区别于其他三个猪种（$P<0.05$）。同时，皮特兰猪肠道菌群中纤维分解和产生丁酸的细菌富集程度更高。而杜洛克猪的肠道菌群在芽孢杆菌目的富集程度更高。本研究发现，不同品种因性能不同会导致肠道菌群的变化，研究结果可为生猪种质创新提供理论依据。

主要参考文献

[1] SONG L，WANG C，JIANG G，et al. Bioaerosol is an important transmission route of antibiotic resistance genes in pig farms [J]. Environ Int，2021，154： 106559.

[2] MOOR J，WUTHRICH T，AEBI S，et al. Influence of pig farming on human Gut Microbiota： role of airborne microbial communities [J]. Gut Microbes，2021，13（1）： 1-13.

※ 作者简介：周浩，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖，E-mail： 2459252308@qq.com。
※※ 通讯作者：李新建，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种与繁殖，E-mail： lxjlongfei@163.com。

不同解冻方式及冻融次数对安庆六白猪肉品质的影响

胡晓静※，荣耀，郑先瑞，殷宗俊※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

随着人们生活水平的提高，对肉品质的要求也越来越高。不同解冻方式及冻融次数对肉品质的影响，有待进一步研究。已有研究表明，不同冷冻方式与解冻后猪肉的弹性之间存在显著相关性[1]。目前常见的解冻方式包括冷藏解冻、微波解冻、静水解冻和空气解冻等。每种解冻方式都有其优缺点，因此，寻找适宜的解冻方式变得尤为重要。本研究以我国优良地方猪品种安庆六白猪为研究对象，旨在探究对冷冻猪肉品质影响最小的解冻方式及冻融次数，为猪肉的冷冻保存提供理论参考。

材料与方法

本研究以安徽省安庆市太湖县花亭湖保种场的 7 头安庆六白母猪为试验对象，在相同的饲养管理条件下，体重达 90-95kg 时进行屠宰，对照组测定鲜肉的背最长肌相关指标，将检测完成的鲜肉放入-20℃冰箱中冻藏作为试验组。采用空气自然解冻、冷藏解冻及静水解冻三种方式进行试验，测定肉色、pH 值、水分含量等。并对肉品质常规化学成分进行测定，包括：干物质、肌内脂肪以及肌苷酸含量等。在冻融次数试验中，继对照组鲜肉和冻融 1 次的部分指标，对冷冻 7 天后取出用冷藏解冻的方式解冻肉样完成 1 次冻融，其余按照上述方法继续冻融，分别进行 2 次和 3 次冻融，并记录相关测定指标。

结果与讨论

结果显示，与对照组相比，冷藏解冻、空气解冻和静水解冻处理后的肌肉 pH 值和粗蛋白含量显著下降（$P<0.05$）；冷藏解冻和静水解冻后的猪肉的 L*值相较对照组显著上升（$P<0.05$）；冷藏解冻和空气解冻的水分含量较对照组显著下降（$P<0.05$）；空气解冻和静水解冻组肌肉肌内脂肪含量、肌苷酸、胆固醇含量相较对照组显著下降（$P<0.05$）。在探究冻融次数对猪肉品质影响的试验中，与对照组相比冻融 1 次、2 次和 3 次后猪肉 pH 值显著下降（$P<0.05$），冻融 2 次和 3 次的剪切力极显著下降（$P<0.01$）；随着冻融次数的增加，亮氨酸和赖氨酸含量相较对照组极显著下降（$P<0.01$），而丙氨酸和苯丙氨酸的含量相较对照组极显著上升（$P<0.01$）。有研究表明，猪在屠宰后，体内开始进行肌糖原无氧酵解产生糖酵解酶使猪肉的 pH 值下降[2]。反复冻融牛肉中的水分含量和粗蛋白含量不断下降[3]。综上，本研究表明冷藏解冻组优于空气解冻和静水解冻组；随着冻融次数的增加，猪肉内氨基酸、粗蛋白等含量不断降低。因此，采用冷藏解冻方式且冻融次数越少对猪肉品质影的响越小，该研究为猪肉的冷冻保存和解冻方式提供了一定的理论参考。

主要参考文献

[1] 惠庆玲，邹同华，宋睿琪，张坤生.不同冷冻方式对真空解冻猪肉品质的影响[J].食品与发酵工业，2020，46（24）：115-120.

[2] 常海军，唐翠，唐春红.不同解冻方式对猪肉品质特性的影响[J].食品科学，2014，35（10）： 1-5.

[3] 李贞子，阿依木古丽，等.反复冻融对早胜牛肉理化品质和营养成分的影响[J].西北民族大学学报，2010，31（03）：71-75.

※ 作者简介：胡晓静，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：huxiaojing0211@163.com。
※※ 通讯作者：殷宗俊，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yinzongjun@ahau.edu.cn。

L-脯氨酸对猪精液冷冻保存过程中精子质量的影响

刘闯※，冯浩义，韩锦仪，周浩，韩雪蕾，乔瑞敏，王克君，李秀领，
杨峰※※，李新建※※
（河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046）

引言

精液冷冻保存是保存动物遗传潜力的有效方法，它还有助于濒危物种的保护。与室温（17℃）保存精液相比，冷冻解冻精液在养猪业中的应用仍然有限。有研究表明，L-脯氨酸（LP）作为一种抗氧化剂，可以提高公驴冷冻精子解冻后的活力和质量[1]。本研究的目的是评估不同浓度的 LP（0、10、30、50 和 90 mM）对冷冻和解冻后公猪精液质量的影响。

材料与方法

用添加不同浓度 LP 的冷冻液冷冻 6 头杜洛克公猪的精液。解冻后评估精子总活率（TM）、渐进式活力（PM）、37℃下存活时间、顶体完整性率、线粒体活性、DNA 完整率、脂质过氧化产物丙二醛（MDA）含量、总抗氧化能力（T-AOC）、凋亡蛋白（cleaved caspase 3 和 Bax）表达水平。所有试验数据均使用 Excel 进行预处理，采用 SPSS 进行单因素方差分析，然后进行多重比较，采用 ImageJ 软件定量测定线粒体活性荧光强度和 DNA 完整性率。

结果与讨论

结果表明，10 mM LP 处理组的精子解冻后 TM 和 PM 显著高于对照组（$P < 0.05$）。37℃下的存活时间和解冻后 1 小时内 10 mM 组精子总活力均显著高于对照组（$P < 0.05$）。10 mM 组精子顶体完整性和线粒体活性显著高于对照组、50 mM 组和 90 mM 组（$P < 0.05$）。10 mM 组的 DNA 完整性率显著高于对照组（$P < 0.05$）。LP 处理不影响精子 MDA 含量和 T-AOC。10 mM 组细胞凋亡蛋白（cleaved caspase 3 和 Bax）表达水平低于对照组。精子活力是受冻融过程影响最重要的因素之一。本研究发现，在冷冻液中添加 10 mM LP 可以提高冷冻精液的 TM 和 PM，减少氧化损伤，提高冷冻精液质量。当 LP 加入冷冻液浓度超过 30 mM 时，没有观察到同样的效果，且 90 mM LP 对猪精子活力有负面影响。因此，高浓度的 LP 可能引起渗透毒性，降低精子活力。在本试验中，添加 LP 可以改善顶体和 DNA 的完整率，这与之前在公羊、狗和驴中的研究结果一致。10 mM LP 添加组的 Bax 和 cleaved caspase 3 蛋白表达水平低于对照组，说明 10 mM LP 能有效防止精子冷冻死亡，降低精子凋亡比例。这与 10 mM 组活性、顶体完整性率、DNA 完整性率和线粒体活性的变化一致。由于 LP 的添加保护了线粒体和 DNA 的完整性，因此推测 LP 通过保护精子免受冷休克和氧化应激而在精子中起保护作用。此外，LP 也可能直接参与调控细胞凋亡通路。

主要参考文献

[1] LI N，YU J，YANG F，et al. L-Proline： An Effective Agent for Frozen and Post-thawed Donkey Semen Storage[J]. Journal of Equine Veterinary Science，2021，101： 103393.

※ 作者简介：刘闯，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：liuchuang9828@163.com。
※※ 通讯作者：杨峰，讲师，研究生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：chinafy6868@163.com。
通讯作者：李新建，教授，博士生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：lxjlongfei@henau.edu.cn

安庆六白猪不同生理阶段肠道菌群多样性研究

汤晴晴，吴雅婷，郑先瑞，殷宗俊※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

肠道微生物与母猪的繁殖性能密切相关。且有研究表明，妊娠期肠道微生态与多种妊娠代谢性并发症有关[1]。安庆六白猪是我国优良地方品种，具有肉质好、耐粗饲、繁殖力强等优点。因此，本研究对在青年后备期、妊娠期（30 天、75 天、104 天）、泌乳期（7 天、14 天、28 天）、空怀期（断奶后 7 天）不同时间点的安庆六白母猪收集新鲜直肠粪便及前腔静脉采血，通过酶联免疫吸附法测定母猪不同生理阶段免疫指标、激素、酶水平的变化并与肠道菌群进行关联分析，使用 Illumina NovaSeq 测序技术分析，旨在为研究猪的生理健康、繁殖性能提供依据。

材料与方法

试验以安徽省安庆六白猪保种场内 64 头健康、背膘厚相近、相同遗传背景下、未使用抗菌药的安庆六白母猪为研究对象。分别于青年后备期（HBMZ）、妊娠期（RS30、RS75、RS104）、泌乳期（MR7、MR14、MR28）、断奶空怀期（DNKH7）不同时间点收集直肠粪便，提取样品 DNA。同时进行前腔静脉采血各 5mL 左右。

采用 Illumina NovaSeq 测序技术，并结合 ASV 分析、物种组成和差异分析、Alpha 及 Beta 分析、功能潜能预测分析肠道菌群结构多样性变化，同时通过 ELISA 法测定母猪不同生理阶段免疫指标、激素、酶水平的变化与肠道菌群进行关联分析。

结果与讨论

安庆六白母猪肠道菌群结构和多样性随不同生理阶段的发展发生了显著的变化，母猪肠道菌群多样性在后备期显著高于妊娠期。与妊娠期相比，泌乳期肠道菌群多样性下降。安庆六白母猪在青年后备期相对于其他时期显著富集的优势菌属为 *Prevotella* 和 *Roseburia*；妊娠初期显著富集的优势菌属为 *Thiobacillus*；妊娠中期显著富集的优势菌属为 *Shigella*；泌乳初期显著富集的优势菌属为 *Oscillospira* 及 *Fibrobacter*；泌乳中期显著富集的优势菌属为 *Turicibacter* 和 *Dehalobacterium*；断奶空怀期显著富集的优势菌属为 *Treponema* 及 *Paludibacter*。本试验揭示了安庆六白母猪肠道菌群与血清生化指标存在重要联系[2]。Treponema、Ruminococcus 与血液免疫指标 IgA、IgM 有显著的正相关性。Oscillospira 与血液催乳素有极显著的正相关性。Treponema、Ruminococcus 与血液碱性磷酸酶有显著的正相关性。

关键词：安庆六白母猪；不同生理阶段；肠道；微生物多样性；繁殖

主要参考文献

[1] 孔祥峰，刘雅婷.母猪肠道微生态与繁殖生理研究进展[J].猪业科学，2020，37（05）：64-66.

[2] 丁月云，孟云，周晓明等.安庆六白猪血液生化指标的发育性变化及性别差异[J].江苏农业科学，2013，41（10）：161-163.

调控鲜味受体 T1R1/T1R3 对间质细胞 mTOR 自噬信号相关因子的影响

牟琪[1, 2, 3※]，王涵[1, 2, 3]，龚婷[1, 2, 3※※]

（1.贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025；2.贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室，贵州贵阳 550025；3.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025）

引言

哺乳动物可以感知鲜、甜、苦、酸和咸五种味觉，其中鲜味由味觉受体家族 1 亚基 3（T1R3）与味觉受体家族 1 亚基 1（T1R1）形成的异二聚体感知，而哺乳动物产生鲜味的来源主要是各种 L-氨基酸。研究发现，在某些非味觉细胞中，鲜味受体 T1R1/T1R3 作为氨基酸感受器，可感知氨基酸并将信号传至哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR），从而抑制自噬。若鲜味受体被抑制，则 mTOR 抑制自噬的作用减弱，细胞自噬增强。课题组前期研究结果表明，自噬相关因子在香猪睾丸发育过程中均有广泛表达，且这些因子在睾丸发育过程中同时存在于间质细胞。鲜味受体 T1R1/T1R3 与间质细胞 mTOR 自噬信号是否有关，此课题值得研究。

材料与方法

本试验以从江香猪为对象，培养原代睾丸间质细胞，通过 RNA 干扰试验和 L-谷氨酸刺激试验，探索影响鲜味受体 T1R1/T1R3 对间质细胞 mTOR 自噬信号相关因子的作用。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测沉默 *TAS1R3* 基因对味觉受体 T1R1 以及自噬相关因子细胞外信号调节蛋白 1（ERK1）、细胞外信号调节蛋白 2（ERK2）、磷酸化 p70 核糖体 S6 激酶 1（p-S6K1）、mTOR、自噬启动子 1（Beclin 1）和微管相关蛋白 1 轻链 3 β（MAP1LC3B）的影响。

结果与讨论

睾丸间质细胞转染 *TAS1R3* 干扰载体后，*TAS1R1*、*mTOR*、*ERK1*、*ERK2* 的 mRNA 表达量降低，而自噬相关因子 *Beclin 1* 和 *MAP1LC3B* 的 mRNA 表达量显著升高（$P<0.05$）；p-mTOR、T1R1、p-ERK1/2 蛋白水平降低，自噬相关因子 Beclin 1 的蛋白水平升高（$P<0.05$）；LC3-II 以及 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达增加（$P<0.05$）。经 10 mmol/L 的 L-谷氨酸处理细胞 8 h，与对照组相比，*TAS1R3*、*TAS1R1*、*mTOR*、*ERK1*、*ERK2* 的 mRNA 表达量增加，而 *Beclin 1* 和 *MAP1LC3B* 的 mRNA 表达量降低（$P<0.05$）；蛋白水平上，T1R1、T1R3、ERK1/2、p-S6K1 的表达也增强（$P<0.05$）；mTOR 和 Beclin 1 表达下降（$P>0.05$）。以上结果表明，鲜味受体 T1R1/T1R3 可能通过 mTOR 信号通路调控间质细胞自噬因子。已有研究发现，睾丸间质细胞自噬相对活跃，自噬程度与睾酮合成密切相关，可能通过自噬来调控胆固醇摄入，进而影响睾酮合成[1]。总之，激活或抑制鲜味受体 T1R1/T1R3 可相应地促进或抑制 mTOR，调控睾丸间质细胞自噬因子的表达。

主要参考文献

[1] Gong T，Wang W，Xu H，*et al*. Longitudinal Expression of Testicular TAS1R3 from Prepuberty to Sexual Maturity in Congjiang Xiang Pigs[J]. Animals （Basel），2021，1（2）：437.

基金项目：国家自然科学基金（32260836）。

※ 作者简介：牟琪，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：1070230607@qq.com。

※※ 通讯作者：龚婷，副教授，研究生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：tgong@gzu.edu.cn。

mTOR 和 Ca^{2+}在 T1R1/T1R3 参与睾丸间质细胞自噬调控过程中的作用

牟琪[1, 2, 3※]，王涵[1, 2, 3]，龚婷[1, 2, 3※※]

（1.贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025；2.贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室，贵州贵阳 550025；3.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025）

引言

鲜味受体 T1R1/T1R3（Taste receptor type 1 subunit 1/ Taste receptor type 1 subunit 3）在哺乳动物多个组织器官表达并发挥着特殊的非味觉功能。T1R1/T1R3 作为氨基酸感受器可通过 Ca^{2+}-ERK1/2（细胞外信号调节蛋白 1 和 2）促进哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）所介导的自噬抑制信号[1]。课题组前期试验表明，L-谷氨酸可激活从江香猪睾丸间质细胞 T1R1/T1R3，从而抑制细胞自噬，促进睾酮合成，但具体机制尚不清楚。本研究借助自噬信号抑制剂，筛选 Ca^{2+}抑制剂 BAPTA-AM 和 mTOR 抑制剂雷帕霉素的最佳抑制浓度，分析 mTOR 和 Ca^{2+}在 T1R1/T1R3 参与的睾丸间质细胞自噬调控中的作用，旨在了解 T1R1/T1R3 介导调控 mTOR 通路下游自噬的调节机制。

材料与方法

本试验在香猪原代睾丸间质细胞上，筛选 Ca^{2+}抑制剂（BAPTA-AM）和 mTOR 抑制剂（雷帕霉素）的最佳抑制浓度。试验利用单丹磺酰尸胺（MDC）染色、Flou-3 钙离子荧光探针技术和流式细胞术对处理后细胞内的自噬小体、Ca^{2+}和细胞周期进行检测，再采用 Western blot 对处理后细胞自噬相关因子 mTOR、磷酸化 p70 核糖体 S6 激酶 1（p-S6K1）、ERK1/2 蛋白水平进行检测。

结论与讨论

本试验筛选出雷帕霉素的有效抑制浓度为 1000 nmol/L，BAPTA-AM 为 50 μmol/L。雷帕霉素处理细胞可增加胞内自噬小体荧光强度，而 L-谷氨酸处理则抑制胞内自噬小体荧光强度。细胞周期检测发现，雷帕霉素处理组与对照组相比，细胞被滞留于 S 期，G2/M 期细胞数量减少。BAPTA-AM 处理组细胞胞内 Ca^{2+}显著下降，而 L-谷氨酸则促进胞内 Ca^{2+}浓度升高。此外，与对照组相比，BAPTA-AM 处理组细胞周期被滞留于 G2/M 期。这表明 T1R1/T1R3 可通过 Ca^{2+}-ERK1/2 影响 mTOR，进而调节香猪睾丸间质细胞自噬过程，影响细胞周期。总之，T1R1/T1R3 感知氨基酸可通过 Ca^{2+}-ERK1/2-mTOR 对自噬起到负调控作用。

主要参考文献

[1] Zhou Y，Ren J，Song T，*et al*. Methionine Regulates mTORC1 via the T1R1/T1R3-PLCβ-Ca^{2+}-ERK1/2 Signal Transduction Process in C2C12 Cells. Int J Mol Sci. 2016，17（10）：1684.

基金项目：国家自然科学基金（32260836）

※ 作者简介：牟琪，在读硕士研究生，研究方向为为动物遗传育种与繁殖。E-mail：1070230607@qq.com。

※※ 通讯作者：龚婷，副教授，研究生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：tgong@gzu.edu.cn。

规模化猪场不同因素对长大二元母猪繁殖性能的影响

张　哲※，李晨雷，宋承磊，齐昆龙，豆雅晴，韦怡林，李新建，李秀领，乔瑞敏，王克君，杨　峰，韩雪蕾※※
（河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046）

引言

中国是全球最大的肉类消费国，猪作为六畜之首，其肉制品深受国内消费者的喜爱。在现代规模化养殖中，母猪的繁殖性能是影响猪场生产经济效益的重要指标[1]，然而，母猪繁殖性状的遗传力较低，受到季节、胎次、哺乳天数、妊娠天数和营养等非遗传因素的影响[2, 3]。因此，研究这些因素对母猪繁殖性能的影响至关重要。本试验通过分析与探讨配种季节、分娩季节、产前干预方式、妊娠天数、胎次和哺乳天数等因素对长大二元母猪繁殖性能的影响分析与探讨，以期为提高长大二元母猪繁殖性能提供参考，提升规模化猪场的经济效益。

材料与方法

本数据来源于河南某猪场 2022-2023 年间共计 4 127 条长大二元母猪繁殖性能统计数据，指标包括总产仔数、健仔数、死胎数、木乃伊数、弱仔数以及畸形数。按照分娩季节、配种季节、干预方式、妊娠天数、胎次、哺乳天数进行分组。采用 Excel 2021 对繁殖数据进行整理和分组，使用 SPSS 26.0 统计软件进行独立样本 T 检验及单因素方差分析，并使用 Duncan's 法进行多重比较。分析结果用平均值±标准误表示，以 $P<0.05$ 表示差异显著。

结果与讨论

通过分析不同因素对母猪繁殖性能的影响，结果显示：母猪在秋季配种的总产仔数和健仔数最高，弱仔数和畸形数最低，夏季配种的总产仔数和健仔数显著高于春季；夏季分娩的总产仔数和健仔数显著低于秋季和冬季，冬季分娩的死胎数、木乃伊数和弱仔数最高；氯前列醇钠组的总产仔数和健仔数显著低于自然分娩组，而弱仔数和畸形数显著高于自然分娩组；随着妊娠天数的增加，总产仔数和健仔数呈下降趋势，妊娠天数在 113-115 d 期间，总产仔数和健仔数最高且显著高于 119-121 d；随着胎次的增加，总产仔数和健仔数呈现上升趋势，第 1 胎次的总产仔数和健仔数显著低于其他胎次，而弱仔数和畸形数最高，第 3、4 胎次的总产仔数显著高于第 1、2 胎次；哺乳天数在 20 d 及以下时，母猪下一胎的总产仔数和健仔数显著低于哺乳天数在 20 d 以上的母猪，且弱仔数和畸形数最高，哺乳天数在 20 d 以上的母猪，其下一胎的生产性能随哺乳天数的增加呈现先增高后降低的趋势，哺乳天数在 25-28 d 时，总产仔数和健仔数最高，畸形数最低，生产性能最佳。综上所述，配种季节、分娩季节、干预方式、妊娠天数、胎次和哺乳天数对长大二元母猪的繁殖性能均有不同程度的影响，其中 3~4 胎次的经产母猪在秋季进行配种并自然分娩，妊娠天数和哺乳天数分别维持在 113-115 d 和 25-28 d 内繁殖性能最佳。在规模化猪场批次化生产中，需按照长大二元母猪的繁殖特点进行合理安排生产，以充分发挥其生产性能，提高经济效益。

主要参考文献

略

※ 作者简介：张哲，硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖，E-mail：z13588308672@163.com。
※※ 通讯作者：韩雪蕾，副教授，研究生导师，研究方向为动物遗传育种与繁殖，E-mail：hxl014@126.com。

葛根素对猪精液常温保存效果的研究

张琦琦※，邓绍均，郑先瑞，殷宗俊※※
（安徽农业大学动物科技学院，安徽合肥 230036）

引言

人工授精技术在养猪业中已被广泛应用，精液品质是影响人工授精成功率的重要因素。目前我国养殖场在猪人工授精中大多以常温精液为主。有研究表明，在精液常温保存稀释液中，适当添加抗氧化剂及其他保护成分有助于维持精液品质，延长精液保存时间[1-4]。本研究选用天然异黄酮类抗氧化剂—葛根素，通过比较添加不同浓度葛根素的精液稀释液的精液品质，进一步探究葛根素在猪精液抗氧化能力和能量转化上的作用效果。

材料与方法

以来自安徽省浩宇牧业有限公司 3 头 14 月龄健康的霍寿黑猪种公猪为试验对象，其饲养环境完全一致，日粮营养水平满足种公猪营养需求。采精稀释后，置于 17℃恒温保存。在精液稀释液中分别添加浓度为 10μmol/L、25μmol/L、50μmol/L、75μmol/L、100μmol/L 的葛根素溶液，在常温状态下检测七天内各浓度组的精液品质。利用卡苏精子分析仪（CASA）测定精子活力以及运动参数，低渗透肿胀实验测定质膜完整率，FITC-PNA 荧光染色法测定顶体完整率，再用相应的的试剂盒检测总抗氧化能力（T-AOC）、活性氧（ROS）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）、乳酸脱氢酶（LDH）以及 ATP 水平，采用 SPSS26.0 软件进行单因素方差分析，筛选出最适浓度的葛根素溶液。

结果与讨论

通过比较同一天不同浓度的葛根素添加组与对照组精子活力，结果发现随着葛根素浓度的增加，精子的活力显著升高（$P<0.05$），到达一定浓度值 50μmol/L 后差异不显著（$P>0.05$）。延长精液的保存时间，精液活力呈下降趋势，但葛根素添加组能够延缓下降的速度（保存第七天精子活率>60%），表明葛根素能够提高猪精液活力水平、延缓精液保存时间。同样，葛根素添加量为 50μmol/L 时，能够延缓质膜完整率、顶体完整率、T-AOC、SOD 活性、CAT 活性、GSH-PX 活性、LDH 活性、ATP 水平以及运动参数 VAP、VCL、VSL 下降的趋势，延缓 ROS 和 MDA 上升的幅度，表明葛根素能够保护精子的完整性，能够清除自由基，防御 ROS 带来的氧化损伤，提高精液的总抗氧化能力和能量代谢水平，使猪精液品质显著上升，延长猪精液常温保存时间。

主要参考文献

[1] 石武,任毅杰,赵梦洁,等.壳聚糖、维生素 C 及庆大霉素对猪精液保存效果的比较分析[J].畜牧兽医杂志,2021,40(03):9-13.

[2] Jing Chun Li, et al.The effect of the addition of Co-Q10 on the preservation of boar semen at 17°C[J].Indian Journal of Animal Research 56.12(2022).

[3] P. Perumal,Jai Sunder, A.K. De, et al.Flaxseed oil modulates testicular biometrics, hormone, libido, antioxidant and semen profiles in endangered Teressa goat of Andaman and Nicobar Islands[J].Reproductive Biology,2023,23(1)：100730.

[4] Hu, Y., Hu, J., Pang, W., Yang, G., et al. Astaxanthin improves preserved semen quality at 17°C by enhancing sperm antioxidant and motility properties[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2022, 57, 1187– 1197.

※ 作者简介：张琦琦（1996-），女，安徽省合肥市人。E-mail：1070579223@qq.com。
※※ 通讯作者：郑先瑞，E-mail：870815152@qq.com,手机号：15600910839。

大白猪哺乳期背膘损失和发情间隔的全基因组关联分析研究

潘艺※，刘静怡，韦佳霖，孙敬春，杨公社，于太永※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西省动物遗传育种与繁殖重点实验室，陕西杨凌 712000）

引言

本研究通过对大白猪进行全基因组重测序，使用全基因组关联分析技术（Genome-wide association studies，GWAS）挖掘影响大白猪妊娠末期背膘、断奶背膘、哺乳期背膘损失以及发情间隔的重要变异位点，同时对性状的遗传参数进行估计，旨在关键候选基因，以此控制大白猪哺乳期的背膘损失，缩短发情间隔，从而提高猪场的经济效益，也为大白猪优良个体的早期选育提供有效的分子标记。

材料与方法

试验对象为陕西顺鑫丹系原种猪场 560 头丹系大白母猪，测定并记录该场内 2022 年 7 月到 11 月妊娠母猪的妊娠末期背膘厚度、断奶背膘厚度、哺乳期背膘损失、发情间隔、总产仔数、产活仔数、出生窝重、系谱、胎次等。采用 ASReml 软件（Version 9.4）对大白猪妊娠末期背膘、断奶背膘、哺乳期背膘损失和发情间隔性状进行遗传参数的估计。采集 560 头丹系大白猪耳组织样，进行全基因组重测序（≥10×），结合表型数据，进行全基因组关联分析，鉴定全基因组范围内与性状显著相关的单核苷酸多态性（Single nucleotide polymorphisms，SNP）位点，并筛选相关的候选基因。

结果与讨论

主要研究结果如下：（1）母猪的妊娠末期背膘遗传力为 0.12、断奶背膘遗传力为 0.08、哺乳期背膘损失遗传力为 0.17、发情间隔遗传力为 0.08，均为低遗传力性状。（2）妊娠末期背膘与总产仔数、产活仔数和出生窝重呈极显著负相关（P<0.01）；断奶背膘与发情间隔、总产仔数和产活仔数呈显著负相关（P<0.05），与出生窝重呈极显著负相关（P<0.01）；哺乳期背膘损失与发情间隔呈极显著正相关（P<0.01），与总产仔数呈显著负相关（P<0.05）。数量性状之间存在一定的相关性，在改良其中某些性状的同时，与之相关的其他性状也会受到影响[4]，所以控制母猪不同繁殖阶段的背膘厚能够有效提高其繁殖性能，对提高猪场的经济效益具有重要意义。哺乳期背膘损失与发情间隔遗传相关为弱负相关，遗传相关为-0.29±0.057，这种负相关可能与哺乳期背膘损失过大有关，在生产上应避免因哺乳期背膘损失过大对繁殖性能造成的负面影响，对提升群体繁殖性能具有实践意义。（3）通过全基因组重测序技术，基于质控后的 SNPs 对妊娠末期背膘、断奶背膘、哺乳期背膘损失和发情间隔性状进行全基因组关联分析，分别检测到了 4、1、20 和 11 个显著的 SNP 位点。对 SNP 位点注释、富集分析和单倍型分析等，最终筛选到 3 个与妊娠末期背膘性状有关的基因，分别为 *PARP2*、*APEX1*、*TMEM55B*；1 个与断奶背膘性状有关的基因，为 *MAS1*。5 个与哺乳期背膘损失有关的基因，分别为 *PRKCB*、*AQP8*、*NDUFAB1*、*METTL9*、*TMEM159*；3 个与发情间隔性状有关的基因，分别为 *DCTN3*、*ADCY2*、*SIGMAR1*。对相关性状的候选基因进行 GO 和 KEGG 富集分析后发现，大白猪哺乳期背膘损失性状的候选基因主要富集在脂肪酸生物合成、脂滴形成等过程和丁酸代谢、代谢途径等信号通路；发情间隔性状相关的候选基因主要富集在 cAMP 的生物合成过程、减数分裂细胞周期等过程和卵母细胞减数分裂、Jak-STAT 信号传导、卵巢类固醇形成等信号通路。

主要参考文献

略

※ 作者简介：潘艺，在读硕士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：panyi@nwafu.edu.cn。
※※ 通讯作者：于太永，副教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yutaiyong310@nwsuaf.edu.cn。

发酵葡萄渣对保育猪免疫性能和肠道健康的影响

袁甜甜※，李琦，田学凯，杨公社，于太永※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西省动物遗传育种与繁殖重点实验室，陕西杨凌 712000）

引言

本研究探讨发酵葡萄渣对保育猪免疫性能和肠道健康的影响，以缓解断奶应激的发生，提高农业副产品利用率，促进果业和畜牧产业可持续发展，为开发利用葡萄渣作为饲料来源提供理论依据。

材料与方法

本研究选取 120 头 28 日龄 8.42±0.19kg 保育猪，根据体重随机分为基础日粮组和基础日粮添加 5%发酵葡萄渣组，进行 28 天饲养试验。利用酶联免疫吸附测定法测定血清抗氧化能力和免疫指标，利用苏木精-伊红染色、实时荧光定量 PCR 等技术分析发酵葡萄渣对肠道屏障功能的影响，利用 16S rRNA 扩增子测序技术测定分析肠道微生物的变化，并通过靶向代谢组学测序技术，探究饲喂 5%发酵葡萄渣后对保育猪肠道代谢物的影响。综合以上方法，探究发酵葡萄渣对保育猪肠道健康和免疫性能的影响。

结果与讨论

研究结果如下：（1）在 0-14 天，日粮添加 5%发酵葡萄渣组的保育猪平均日增重、日采食量和料重比均无显著差异（$P>0.05$）；在 0-28 和 14-28 天，添加 5%发酵葡萄渣组保育猪料重比显著降低（$P<0.05$）；在 0-28 天，添加 5%发酵葡萄渣组保育猪腹泻率显著降低（$P<0.05$）。（2）与对照组相比，日粮添加 5%发酵葡萄渣组保育猪血清中免疫指标免疫球蛋白 G（IgG）和白介素-10（IL-10）水平显著升高（$P<0.05$），炎症因子白介素-6（IL-6）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）水平显著降低（$P<0.05$），抗氧化指标丙二醛（MDA）水平显著下降（$P<0.05$）。（3）日粮添加 5%发酵葡萄渣组保育猪小肠绒毛高度（VH）和绒隐比（V/C）显著升高（$P<0.05$）；回肠紧密连接蛋白（ZO-1、Occludin-1 和 Claudin-1）丰度及 mRNA 表达显著上升；回肠黏蛋白（MUC-2）和分泌型免疫球蛋白 A（SIgA）丰度显著增加（$P<0.05$）；回肠杯状细胞数量显著增加（$P<0.05$）。（4）在门水平上，与对照组相比，添加 5%发酵葡萄渣组保育猪肠道有害菌粪便微生物螺旋体（Spirochaetes）相对丰度显著降低（$P<0.05$）。在属水平上，添加发酵葡萄渣组保育猪肠道有益菌牙殖菌属（Gemmiger）相对丰度显著升高（$P<0.05$），有害菌孢杆菌属（Sporobacter）相对丰度显著降低（$P<0.05$）。（5）代谢组学结果发现，添加 5%发酵葡萄渣组和对照组肠道代谢物具有显著差异，其中 4 种代谢物下调，影响丁酸盐和嘌呤代谢等通路（$P<0.05$）。

综上所述，日粮添加 5%发酵葡萄渣可提高保育猪生长和免疫性能，增强其肠道免疫屏障功能，显著增加保育猪肠道有益菌相对丰度，降低有害菌相对丰度，改善其肠道菌群结构，维持保育猪肠道内环境稳态，促进其生长发育。本研究对养猪生产中缓解保育猪应激反应、提高生产效率和降低经济成本具有重要意义。

主要参考文献

略

※ 作者简介：袁甜甜，在读硕士研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：ytt7586@163.com。
※※ 通讯作者：于太永，副教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：yutaiyong310@nwsuaf.edu.cn。

营养与饲料专题

口述报告

低聚壳聚糖硒拮抗 ZEA 对 IPEC-J2 的损伤作用与机理研究

佘福泽※，李鹏程，秦顺义※※
（天津农学院动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室，天津 300384）

引言

低聚壳聚糖硒是一种新型的含硒化合物其在抵抗 ZEA 毒性作用方面已表现出一定的效果，具有较好的应用前景。ZEA 对肠道功能的损伤是其毒性表现的重要方面，国内外文献未见低聚壳聚糖硒拮抗 ZEA 损伤肠道功能的作用或作用机理的研究报道；本研究采用猪肠上皮细胞（IPEC-J2）为研究对象，探究低聚壳聚糖硒拮抗 ZEA 对肠道损伤的作用机理，以期为 ZEA 的脱毒处理和 ZEA 毒素脱毒剂的研制提供理论依据。

材料与方法

采用天津市畜牧兽医研究所提供的猪肠上皮细胞（IPEC-J2）为研究对象，分为 5 组：对照组（C 组）、ZEA 组、Z+0.5Se 组、Z+1.5Se 组、Z+2.5Se 组。采用荧光显微镜观察低聚壳聚糖硒 ZEA 对 IPEC-J2 活性氧影响；采用 Western blotting 测定细胞凋亡相关蛋白表达水平；采用荧光定量 PCR 测定 p38MAPK 和 P53 mRNA 表达；采用 Western blotting 测定 p38MPAK、Phospho-p38 MAPK 和 p53 等蛋白的表达水平。测定值用平均数±标准差表示，采用 SPSS22.0 统计分析软件对试验数据进行单因素方差分析。

结果与讨论

在本研究中，ZEA 会使 ROS 水平大量增加，导致 IPEC-J2 细胞氧化损伤和细胞凋亡，猜测 ZEA 导致的 IPEC-J2 细胞凋亡是由于细胞氧化损伤引起的。添加低聚壳聚糖硒后，ROS 水平降低，说明低聚壳聚糖硒对活性氧的产生有一定的抑制作用，可启动细胞内的抗氧化机制，并且调节细胞凋亡率也下降。本试验结果表明，低聚壳聚糖硒能明显改善 ZEA 引起的 ROS 堆积；推测 ZEA 使 IPEC-J2 中 ROS 堆积导致细胞发生凋亡。ZEA 的添加可以显著提高 P38、P53mRNA 水平以及 P-P38、P53 蛋白表达水平。ZEA 能显著提高 ASK-1、MKK3/6 的活性，低聚壳聚糖硒可以显著降低这一趋势，且 Z+0.5、Z+2.5 对 ZEA 致使 ASK-1 活化抑制作用更加明显。p-MKK3/6 各处理组差异不显著，说明 ASK-1 在该处理环境下是通过活化 MKK3/6 发挥作用。ZEA 能够抑制 ATF-2 蛋白的表达，这与 ATF-2 抗细胞凋亡的作用相吻合；低聚壳聚糖硒有效改善了这一变化。综上，可以得出 ZEA 导致 IPEC-J2 细胞 ROS 堆积发生氧化损伤，使细胞发生凋亡；这一过程产生 ROS 激活了 ASK-1→MKK3/6→P38MAPK→P53/ATF-2 信号通路的致使细胞出现凋亡。

主要参考文献

略

※ 作者简介：佘福泽，在读硕士研究生，研究方向为临床兽医学。E-mail：934476307@qq.com。
※※ 通讯作者：秦顺义，副教授，硕士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：qinshunyi@163.com。

细粉碎小麦麸改善母猪的食糜理化特性及肠道微生物组成

王子捷[1※]，王文惠[1]，徐松[1]，丁健[2]，曾祥芳[1]，刘虎[1※※]，王凤来[1]
(1.中国农业大学，北京 100193；2.全国畜牧总站，北京 100125)

引言

小麦麸作为常用饲料原料广泛应用于母猪配合饲料，而其主要含有不可溶纤维，不易被大肠微生物发酵，因此降低了小麦麸的营养价值。目前有研究表明细粉碎可以改善纤维的理化特性和生理效应[1]。因此，本研究通过细粉碎工艺改变小麦麸粒径，旨在探究日粮添加细粉碎小麦麸对母猪纤维利用和肠道健康的影响。

材料与方法

试验选取约克夏×长白二元空怀母猪 6 头。采用 3×3 拉丁方设计，将 6 头母猪随机分配到 3 个试验日粮中，每期每个处理 2 个重复。每个试验期 19 d。试验日粮分别为玉米-豆粕基础日粮（CON），含有 20%粗小麦麸（CWB；粒度：605 μm）的试验日粮和含有 20%细粉碎小麦麸（FWB；粒度：438 μm）的试验日粮。使用 SAS 9.2 中的一般线性模型（Generalizedlinear models，GLM）进行数据分析，每头母猪作为试验单位，用最小二乘法计算平均值，Tukey 检验计算日粮处理之间的差异。

结果与讨论

试验结果表明，与 CON 组相比，FWB 组和 CWB 组中性洗涤剂纤维和能量的全肠道表观消化率显著降低（$P < 0.05$）。FWB 组母猪的食糜黏度显著增加（$P < 0.001$），从口腔到回肠的食糜流通速率显著降低（$P < 0.001$）。饲喂细粉碎小麦麸 30 min 后，酪酪肽（Peptide YY，PYY）浓度显著增加（$P = 0.01$）。FWB 组母猪食糜中，在科水平上，乳酸杆菌的相对丰度显著增加（$P < 0.05$）。在纲水平上，FWB 饲喂母猪的粪便中梭状芽胞杆菌的相对丰度显著降低（$P < 0.05$）。与 CON 和 CWB 组相比，FWB 组显著增加了母猪粪便中丁酸盐的浓度（$P = 0.04$）。研究结果表明，添加细粉碎小麦麸可降低食糜的流通速率，增加肠道有益微生物的相对丰度，并提高母猪粪便中短链脂肪酸和血浆 PYY 的浓度，进而改善母猪的饱腹感和肠道微生物组成。

主要参考文献

[1] Li X, Zhang X, Zhang R, Ni Z, Elam E, Thakur K, Cespedes-Acuña C, Zhang J, Wei Z. Gut modulation based anti-diabetic effects of carboxymethylated wheat bran dietary fiber in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice and their potential mechanisms[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 152(6): e112235

※ 作者简介：王子捷，北京市海淀区人。E-mail：1042670405@qq.com。
※※ 通讯作者：刘虎，E-mail：liuhu0674@cau.edu.cn,固定电话：010-62733588，手机号：15652807056。

益生元纳米粒子对植物乳杆菌抑菌性能、益生特性的影响及其机制探究

李炜月，乔 鑫，荆学毅，程雨菲，洪 亮*
（天津农学院动物科学与动物医学学院，天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室，天津 300392）

引言

研发安全、高效的新型抗生素替代物用于畜牧生产是大势所趋。目前常用的饲用抗生素替代物有微生态制剂、酸化剂、酶制剂、植物提取物和噬菌体、抗菌肽等[1]。这些替代剂难以发挥原本饲料添加用抗生素所具有的促生长作用，而饲料添加用抗生素的作用机制是抑制肠道内病原菌的定殖以促进畜禽生长。因此，研发既能代替饲料添加用抗生素，又能提高肠道菌群抑菌能力的天然抗生素替代剂（包括益生菌、益生元、合生元和后生元等）也成为了当今畜牧业的研究热点[2~4]。先行研究证明了纳米粒子可以作为新的益生元剂型，纳米化益生元可以刺激植物乳杆菌产生更多的细菌素，从而提高益生菌的抑菌性能，但并未对其机制进行深入探究。本研究旨在利用菊粉和丙酸酐合成丙酸化菊粉（IPr）和丙基菊粉纳米粒子（PIN），测定其对植物乳杆菌（LP）抑菌性能和益生特性的影响，探究 LP 细菌素分泌增多进而增强抗菌活性的机制，最后验证纳米粒子对动物肠道菌群的影响。

材料与方法

本研究利用菊粉和丙酸酐合成纳米粒子，探究合成的 IPr 和 PIN 对 LP 抑菌性能及益生性能的影响。首先对合成的纳米粒子进行表征，接下来用菊粉、IPr、PIN 处理植物乳杆菌，测定其生长过程中的 OD_{600}、pH 等指标，进而采用琼脂扩散试验和共培养试验探究不同的益生元剂型是否对植物乳杆菌的抑菌性能产生影响。先验证植物乳杆菌是否具有与群体感应相关基因，再利用不同的益生元剂型处理 LP，通过 qRT-PCR 验证纳米粒子内化过程中是否会影响相关基因的 mRNA 表达水平。接下来依次测定了不同组别的 LP 在不同时间点耐胆盐、耐酸的能力以及在模拟胃液（SGF）、模拟肠液（SIF）、模拟结肠液（SCF）中的存活率，以此反映三种益生元剂型对 LP 益生性能的影响。最后，在小鼠模型中验证了不同益生元剂型在动物机体内的抑菌性能。

结果与讨论

目前已经证实了菊粉、IPr、PIN 对 LP 的生长特性无显著影响，琼脂扩散试验和共培养试验均证明了 IPr、PIN 可以显著提高 LP 对革兰氏阴性菌（*E. coli* K99、鼠伤寒沙门氏菌）、革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌）的抑菌活性。通过 PCR 验证了 LP 具有 AI-2/LuxS 系统的相关基因。动物试验已经结束，将进一步检测纳米粒子对小鼠肝脏、肾脏功能的影响，通过 16S rRNA 测序探究不同的益生元剂型对小鼠肠道菌群的影响。本研究验证了 PIN 作为一种新的益生元可以调节益生菌的代谢，益生元纳米颗粒与益生菌结合可以作为抗生素替代剂，为解决细菌耐药性提供新策略。

主要参考文献

[1] 姚蒙蒙，李仲玄，王晓冰，等.常用饲用抗生素替代物研究进展[J].饲料工业，2019，40（08）： 61-64.

[2] Mahesh M S，Mohanta R K，Patra A K. Probiotics in livestock and poultry nutrition and health[M]//Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine. Springer，Singapore，2021： 149-179.

[3] Anadón A，Ares I，Martínez-Larrañaga M R，et al. Prebiotics and probiotics in feed and animal health[M]//Nutraceuticals in Veterinary Medicine. Springer，Cham，2019： 261-285.

[4] Zamojska D，Nowak A，Nowak I，et al. Probiotics and postbiotics as substitutes of antibiotics in farm animals： A Review[J]. Animals，2021，11（12）： 3431.

Arf1-mTORC1 信号网络感应谷氨酰胺促进猪肠上皮细胞增殖的机制研究

闫玲[1, 2, 3※]，方永霞[1, 2, 3]，陆恩庆[1, 2, 3]，朱敏[1, 2, 3※※]

（1.贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025；
2.贵州大学动物营养与饲料研究所，贵州贵阳 550025；3.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025）

引言

肠道是动物重要的消化吸收场所，也是动物体内重要的免疫器官之一。猪的肠道健康是维持猪机体正常生理机能、生长发育和繁殖功能的基础。谷氨酰胺（Glutamine，Gln）是一种条件性必需氨基酸，也是肠上皮细胞首选能量底物，对哺乳动物肠道具有保护作用，并在肠道发育和稳态中发挥重要作用[1]。然而，肠上皮细胞响应谷氨酰胺的机制有待研究揭示。因此，本研究以猪肠上皮细胞 IPEC-J2 为材料，探究 Arf1-mTORC1 信号网络感应谷氨酰胺促进猪肠上皮细胞增殖的作用机制。

材料与方法

本研究以 IPEC-J2 细胞为材料，通过 CCK8、细胞免疫荧光染色法筛选谷氨酰胺作用的最适浓度与时间。结合 TMT 磷酸化蛋白质组学的检测结果，利用 Western Blotting、实时荧光定量 PCR、抑制剂处理、RNA 干扰等技术探究了谷氨酰胺通过 Arf1 激活 mTORC1 通路促进猪肠上皮细胞增殖的分子机制。

结果与讨论

本研究采用 CCK8 法和免疫荧光染色检测谷氨酰胺对猪肠上皮细胞增殖的影响。研究发现，在氨基酸饥饿处理条件下，不同浓度谷氨酰胺（0.5、1、2、4、5 mM）处理均能促进 IPEC-J2 细胞增殖，且处理 24 h 与处理 6 h 结果基本一致。通过磷酸化蛋白质组分析显示，谷氨酰胺显著上调了 S6 在丝氨酸 235/236 位点的磷酸化，提示谷氨酰胺激活 mTORC1 信号通路。Western Blotting 结果证实 p-S6（Ser235/236）蛋白质表达水平显著上调，p-S6 的免疫荧光染色结果与 Western Blotting 结果一致。此外，mTORC1 信号通路关键靶标 p-mTOR 和 p-S6K1 的表达水平均显著上调。mTORC1 抑制剂雷帕霉素试验进一步验证 mTORC1 参与谷氨酰胺促进 IPEC-J2 细胞增殖的过程。实时荧光定量 PCR 结果表明，谷氨酰胺显著提高 Arf1 和 RagA 的 mRNA 丰度（$P<0.05$），但对 RagB 的 mRNA 丰度无显著影响。Western Blotting 检测结果与实时荧光定量 PCR 结果一致。布雷非德菌素 A（Brefeldin A，BFA）是 Arf1 功能的特异性抑制剂，BFA 抑制剂试验显示其降低了谷氨酰胺诱导的 p-S6K1 和 p-S6 的蛋白质表达水平，且 Arf1 干扰试验显示其也降低了谷氨酰胺诱导的 p-mTOR 和 p-S6K1 的蛋白质表达水平，进一步证实了 Arf1 参与谷氨酰胺诱导的 mTORC1 激活促进 IPEC-J2 细胞增殖的过程。此外，敲低 RagA 并没有改变谷氨酰胺对 mTORC1 的激活。由此可知，谷氨酰胺激活 mTORC1 通路依赖于 Arf1，而不依赖于 RagA/B GTPases。本研究阐明了 mTORC1 感应谷氨酰胺促进猪肠上皮细胞增殖的分子路径，丰富了氨基酸营养调控理论，为谷氨酰胺更好地应用于生产提供理论依据。

主要参考文献

[1] Wang H，Zhang C，Wu G，et al. Glutamine enhances tight junction protein expression and modulates corticotropin-releasing factor signaling in the jejunum of weanling piglets[J]. Journal of Nutrition，2015，145（1）： 25-31.

基金项目：国家自然科学基金（32202710），贵州省科技厅项目（黔科合基础-ZK[2022]一般 159）。
※ 作者简介：闫玲，硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：1528773260@qq.com。
※※ 通讯作者：朱敏，副教授，研究生导师，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：mzhudky@gzu.edu.cn。

菌酶协同发酵棉粕在猪中有效能和回肠氨基酸消化率的研究

刘碧凡※，陈博民，刘寰宇，龙阔，邢艺苑，程浩，欧阳文斌，赵雨杰，杨凯，张琛，王婧，马晓康，谭碧娥※※，印遇龙

（湖南农业大学动物科学技术学院，湖南长沙 410000）

引言

棉籽是我国仅次于大豆的重要植物蛋白质来源，但是深度利用率不高，其主要是含有的棉酚作为一种抗营养因子对人和动物机体具有毒害作用，从而严重制约了棉粕在动物饲料中的使用[1~2]。目前，针对非粮饲料脱毒菌株多采用传统方式选育，脱毒能力有限，并且菌酶协同发酵工艺存在非定向创制，效果不佳等问题。因此，本研究通过定向筛选棉酚代谢型菌株，结合菌酶协同发酵技术降低棉籽粕有毒物质，旨在提高棉籽粕蛋白品质和消化利用率。

材料与方法

试验首先从棉田腐殖土中筛选降解游离棉酚菌株，与复合酶组合用于棉粕的发酵，优化菌酶协同发酵参数，比较发酵前后常规养分和氨基酸含量。然后采用全收粪法测定菌酶发酵棉粕对猪消化能和代谢能的影响。选用 16 头健康杜 × 长 × 大去势公猪（初始体重为 25.19 ± 1.72 kg），随机分为 2 个处理，每个处理 7 个重复，每个重复 1 头猪。试验处理分为玉米基础饲粮和菌酶协同发酵棉粕饲粮，试验共 12 d，前 7 d 为预饲期，后 5 d 为粪尿收集期。最后测定菌酶协同发酵棉粕对猪回肠氨基酸消化率的影响。选用 14 头安装 T 型回肠瘘管的杜 × 长 × 大去势公猪（初始体重为 30.25 ± 1.45 kg），随机分为无氮饲粮和菌酶发酵棉粕饲粮 2 个处理，每个处理 7 个重复，每个重复 1 头猪，试验共 17 d，10 d 为术后恢复期，5 d 为适应期，后 2 d 为食糜收集期。采用 SPSS 软件 One-Way ANOVA 程序进行方差分析和 DUNCAN 法进行多重比较。

结果与讨论

结果表明：（1）筛选鉴定得到的一株植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）可以降低棉酚含量，降解率为 75%（P<0.01）。菌酶协同优化后发酵参数：温度为 37℃，水分 45%，菌添加量 7%，复合酶添加量 0.25%，时间 12 d。（2）菌酶协同发酵提高了棉粕饲料品质，发酵后棉粕松散，颗粒分明，具有红薯味和酸香味，发酵 10 天后 pH=3.5，乳酸含量由 1.26 mmol/g 提高为 5.07mmol/g（P<0.01），粗蛋白含量由 46%提高为 51%（P<0.01），18 种氨基酸含量总和由 29.83%提高为 43.87%，减少了非蛋白氮含量，能量由 19.39 MJ/kg 降低为 19.30 MJ/kg，粗脂肪由 0.87%降低为 0.85%，粗纤维含量由 15.9%降低为 14.3%，酸性洗涤纤维含量由 21.02%降低为 20.38%，中性洗涤纤维由 34.55%降低为 29.92%。（3）菌酶协同发酵棉粕干物质基础下消化能和代谢能分别为 12.40 MJ/kg 和 11.55 MJ/kg。（4）菌酶协同发酵棉粕的赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、色氨酸和粗蛋白的标准回肠消化率（Standardized ileal digestibility，SID）值分别为 63.22%，68.06%，91.30%，84.17%和 89.06%，其余氨基酸的 SID 值均在 76.63%~95.70%之间。由此可见，菌酶协同发酵可以降低棉粕抗营养因子棉酚含量，发酵后棉粕具有红薯味和酸香味，并且发酵后提高了棉粕相对粗蛋白含量、消化能、代谢能和氨基酸吸收。

主要参考文献

[1] Liu L X，Zhao S G，Lu H N，et al. Association between polymorphisms of the swine MHC-DQA gene and diarrhea in three Chinese native piglets [J]. International Journal of Immunogenetics，2015，42，208-215.

[2] 汤小朋，陈磊.棉籽粕脱毒技术及其在家禽生产中的应用研究进展[J].云南农业大学学报：自然科学版，2020，35（1）：7.

※ 作者简介：刘碧凡，在读博士研究生。研究方向为畜牧学。E-mail： 18890028512@163.com。

※※ 通讯作者：谭碧娥，教授，博士生导师。E-mail： bietan@hunau.edu.cn。

饲粮豆粕水平及其酶解对断奶仔猪生长性能、免疫功能及肠道微生物的影响

陈邱虹※，周强，林燕，吴德，车炼强※※
（四川农业大学动物营养研究所，四川成都 610000）

引言

断奶仔猪因胃肠道发育不健全，饲粮由易消化的液态母乳转变为不易消化的玉米-豆粕型固体饲粮时，易导致生长性能降低、肠道疾患突出。豆粕自身抗营养因子可损伤肠道黏膜，阻碍营养物质消化吸收，增加仔猪腹泻，加剧断奶应激[1]。酶解法可消除序列抗原表位，反应温和、效率高。因此，本试验旨在通过适宜酶解工艺对豆粕进行酶解，减少致敏源和胀气因子，增加营养物质可利用性[2]，通过液态饲喂方式探究添加酶解豆粕后减少豆粕用量的可能性及其对仔猪养分消化率及肠道健康的影响，为我国生猪养殖业蛋白原料预消化技术及新型饲喂方式提供科学参考。

材料与方法

试验共选取 96 头 DLY 断奶仔猪（21±1 d，初始体重 7.49±0.19 kg），采用随机区组设计（断奶体重为区组）分为 4 个处理（n=8）：15%豆粕浸泡处理、15%豆粕酶解处理、10%豆粕浸泡处理、10%豆粕酶解处理，试验周期 21 天。15%与 10%豆粕组饲粮能蛋比分别为 17.39 与 19.12 Mcal/kg。酶解参数：0.75%碱性酶（基于豆粕粗蛋白）、水料比 3.5：1、酶解温度 50℃、酶解时间 3 h、初始 *pH*=9.20；3 h 时加入 0.5%风味酶（基于豆粕粗蛋白）与 0.5%半乳糖苷酶（基于豆粕含量），酶解 1.5 h。

结果与讨论

试验全期，与 10%豆粕水平相比，饲喂含 15%豆粕水平饲粮的仔猪 F：G 显著降低（*P*=0.04），有增加粗蛋白消化率的趋势（*P*=0.08）；与未酶解豆粕处理相比，酶解处理豆粕有提高断奶仔猪回肠绒毛高度（*P*=0.07）的趋势；酶解处理豆粕显著降低断奶仔猪结肠食糜丙酸、异丁酸及总挥发性脂肪酸的浓度（*P*<0.05）；15%豆粕组饲粮显著增加仔猪结肠食糜中 *Lactobacillus*、*o_Peptostreptococcales-Tissierellales*、*c_Actinobacteria*、*f_Bifidobacteriaceae*、*s_Prevotella_bivia* 等微生物丰度；饲喂含 15%豆粕的较高蛋白水平饲粮改善了仔猪料重比并影响仔猪肠道微生物；酶解处理豆粕使抗原蛋白和寡糖含量降低、酸溶蛋白含量升高，改善了断奶仔猪肠道形态结构并降低后肠短链脂肪酸含量。本试验条件下，通过酶解豆粕并现场液态全价料调制饲喂能改善仔猪生长性能及肠道结构并影响微生物代谢。尽管如此，饲粮豆粕水平对于仔猪生长性能的影响更加明显，这可能与饲粮豆粕水平不同导致的蛋白含量或能蛋比差异有关。

主要参考文献

[1] Park S，Lee J W，Cowieson AJ，et al。 Soybean meal allergenic protein degradation and gut health of piglets fed protease-supplemented diets[J]. Journal of Animal Science，2020，98.

[2] Zhang L，Piao X. Different dietary protein sources influence growth performance，antioxidant capacity，immunity，fecal microbiota and metabolites in weaned piglets[J]. Animal Nutrition，2022，8：71-81.

※ 作者简介：陈邱虹，在读硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：17572450867@qq.com。
※※ 通讯作者：车炼强，教授，博士生导师，研究方向为猪的营养。E-mail：Che.lianqiang@sicau.edu.cn。

专题报告

mTOR 信号通路调控乳成分合成

段红娟※
（宁夏大学，宁夏回族自治区银川 750021）

乳品因富含包括优质蛋白质和丰富短链脂肪酸在内的多种营养物质已成为人类日常生活中优质营养的重要来源之一,其中乳脂乳和蛋白含量是衡量乳品质的重要指标，如何提高乳品中乳脂和乳蛋白含量成为研究热点。对此，科学家们进行了大量的体外研究，但是关于细胞分子方面的调控机制依旧处于探索阶段。近期研究结果表明，一些基因网络在对乳成分的合成和分泌过程的调控中发挥着核心作用。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）是广泛存在于机体细胞中的一种重要信号传递因子，参与调控细胞生存、增殖、凋亡等全过程。mTOR 是一种进化上相对保守的丝氨酸/苏氨酸激酶，在联系和调控细胞代谢上下游因子的活性中起调控中枢的作用。其活性受多种细胞内、外因子的调节；相反的，mTOR 也会改变翻译、转录、蛋白质降解、细胞信号、新陈代谢和细胞骨架动力学的速率。同时，mTOR 在哺乳动物机体内可以调控包括蛋白质合成、能量代谢和氧化应激在内的多项生理功能。mTOR 信号蛋白可以分为 2 种在机体内发挥不同生理调控功能的 mTOR 复合物：mTOR 复合物 1（mTOR complex 1，mTORC1）以及 mTOR 复合物 2（mTOR complex 2，mTORC2）。mTORC1 是由 Deptor、mLST8、Raptor 和 PRAS40 等亚单位组成的；mTORC2 由 Rictor、mLST8、Protor、mSin1 和 Deptor 等多个亚单位组成。mTOR 是生长因子和营养信号的整合器，通过接收多种上游信号来调节细胞的生长：mTORC1 主要由上游刺激因子如氧气、氨基酸和生长因子等激活，而 mTORC2 主要是由上游生长因子激活的。此外，mTOR 信号通路是调控乳蛋白合成的重要调控通路之一，mTOR 在动物机体内对维持正常细胞生理功能发挥至关重要的调控作用，乳成分合成过程受到 mTOR 信号通路的调控。为系统了解 mTOR 及其 mTOR 信号通路对乳成分合成过程的影响，文章通过阐述 mTOR 信号蛋白及其上下游效应分子，系统了解 mTOR 信号蛋白及其信号通路在乳蛋白合成过程中发挥的重要作用，以期为提高乳中优质营养成分含量提供参考和研究思路。

主要参考文献

略

※ 作者简介：段红娟（1999-），女，宁夏回族自治区银川市人。E-mail：ddduanhongjuan@163.com。
※※ 通讯作者：段红娟，E-mail：ddduanhongjuan@163.com,手机号：19995065258。

中草药添加剂对猪生长性能及免疫功能的影响研究进展

刘文，林秀蔚，沈思思，陈国旺，姚美玲，杨坤，王欢，李伟
（黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院，黑龙江齐齐哈尔 163005）

近年来，我国畜牧业迅猛发展，“绿色畜牧”的发展策略也必将推动我国畜牧业的发展达到新的高度。目前，我国的畜牧业仍然存在着资源浪费和环境污染的问题。针对这一现象，国家颁布了《全国动物性饲料添加剂品种目录》，对不符合我国“绿色畜牧”发展战略要求的饲料添加剂进行了全面淘汰。在新的发展策略下，寻找新的绿色环保的饲料添加剂显得尤为重要。中草药添加剂因其具有安全、高效、低毒、来源丰富等优点，在众多饲料添加剂中脱颖而出。中草药添加剂是在传统中草药理论的基础上，结合现代科技手段，研制出的具有特殊功效的中药制剂，具有抗病毒、抗菌消炎、调节免疫等功效。另外，中草药添加剂对动物的生长发育也有一定的促进作用。然而，由于成分复杂，作用机制不明，许多中草药添加剂难以在畜禽养殖中推广使用，严重制约了其发展。针对这些问题，国内的学者已经做了很多工作。结果发现，复合中草药添加剂可显著提高断奶仔猪的免疫器官指数和免疫蛋白表达水平。其中对黄芩、黄芪、茯苓、黄连和人参等中草药的研究最多，中药复方（如黄芩、黄芪和人参）可显著提高仔猪的生长性能，其作用机制可能与提高机体免疫力和抗氧化能力有关。发酵中药（如黄芪和茯苓）对猪的免疫器官及血清免疫因子水平的影响，结果表明发酵中药可显著提高猪血清 IgA 和 IgG 水平，但对细胞因子 IL-2、IL-6 和 IL-10 水平影响不显著。中药复方制剂（如黄芩、黄芪和黄连）可显著提高仔猪血液中 T 淋巴细胞数量和血清 IgG 水平，其作用机制可能与增加细胞因子 IL-2 的表达有关。另外，还有大量学者利用中草药添加剂来改善动物的生长性能和免疫机能。山楂、陈皮、茯苓和山药等中草药添加剂改善断奶仔猪生长性能，研究结果表明，山楂和茯苓具有明显提高仔猪日增重和饲料转化率的作用，且山楂效果最好。复合中草药添加剂可提高断奶仔猪的日增重，且在添加量为 4%时，效果最好。中草药对免疫器官重量及血清免疫因子水平也会造成影响，中草药可提高动物的免疫力及胸腺、脾脏等免疫器官的重量。综上所述，中草药是一种具有促进畜禽生长发育和免疫功能的绿色饲料添加剂。随着人们对中药作用机制的进一步认识，以及中草药制剂的产品研发水平的提高，中草药制剂在畜牧业中的应用将会越来越广泛。

主要参考文献

[1] 安琦，曹亚彬，牛彦波等. 发酵黄芩药渣对仔猪生长性能、氧化应激及免疫功能的影响[J]. 饲料工业，2021，42（16）：17-21.

[2] 董延江，陈稼，韩庆军等. 发酵中草药（本草酵素）对断奶仔猪生长性能、免疫力和抗氧化能力的影响[J]. 饲料研究，2020，43（11）： 37-39.

[3] 方磊涵，王中华，王留. 中药复方发酵剂对断奶仔猪生长性能、血清抗氧化活性及肠道菌群的影响[J] .饲料研究，2019，42（08）： 11-15.

[4] YANG C，LUO，WU S，et al. Effects of Chinese Herbal Medicine Additives on Growth，Immunity and Antioxidation of Chickens[J] .Medicinal Plant，2022，13（05）： 114-118.

低蛋白饲粮氨基酸平衡对猪生长性能及氮排泄量的影响研究进展

林秀蔚，刘文，姚美玲，张国华，王欢，沈思思，陈国旺，韩永胜*
（黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院，黑龙江齐齐哈尔 163005）

动物对蛋白质的需求其实就是对氨基酸的需要，氨基酸是蛋白质的基本组成单元，在氨基酸的代谢过程中，会涉及到许多生理生化过程，比如糖类、脂肪、蛋白质等物质的消化吸收、转运及代谢等。畜禽对蛋白质的吸收与利用，将直接影响到畜禽的生长发育与繁殖能力。饲喂高蛋白质饲粮不仅会导致饲料成本升高，而且对动物的身体健康也有不利影响，从而导致动物疫病的发生。此外，在饲喂高蛋白饲料的过程中，部分必需氨基酸和氮将通过粪便、尿液等方式被排泄出来，对环境产生了污染。如何最大限度地减少日粮中的蛋白含量，以保障家畜的生长发育，并保持其健康状态，是当前饲料行业关注的焦点。近年来，低蛋白日粮的优点已逐渐被人们认识，并且正在生产中推广应用。研究发现，饲粮中蛋白含量每减少 1%，育肥猪的氮排放量就减少 13.7%，饲粮的蛋白含量减少能明显减少育肥猪的氮排放量，能有效地改善周围环境。随着饲粮中蛋白含量下降，饲粮中蛋氨酸、赖氨酸的含量也会相应下降，这会导致日增重、日采食量下降，料重比上升。在饲料中添加蛋氨酸、赖氨酸等能够明显改善猪的生长性能，改善饲料转化率，改善肉品质，但是也会引起腹泻，氨气浓度增高，导致猪的氮排泄量增多，造成环境污染。因此，在降低饲粮中蛋白质水平的同时如何保证动物营养需求和环境保护成为目前研究的重点。为了解决这个问题，一些学者采用氨基酸平衡策略进行研究，即通过添加其他氨基酸来平衡饲粮中氨基酸的水平。赖氨酸是猪饲粮中的第一限制性氨基酸，氨基酸的供给量与猪的生长性能、氮的沉积及营养物质的利用率密切相关，理想氨基酸平衡是以冻质氨酸作为标准氨基酸，推导出其他氨基酸水平，构建出理想的氨基酸平衡。将饲粮的蛋白质水平从 19%逐步降低至 12%，同时在低蛋白日粮中以赖氨酸水平为标准，建立理想的氨基酸平衡时，猪的生长性能无显著差异。在理想的氨基酸平衡条件下，赖氨酸的含量从 0.6%逐渐增加到 0.8%的时候，血清中尿素氮、游离赖氨酸、苯丙氨酸和其它必需氨基酸的含量明显增加，使蛋白质和氨基酸的利用率进一步提高，猪的日增重明显增加，料重比下降，提高了猪的生长性能。在氨基酸平衡条件下，当赖氨酸含量提高时，可以有效地减少水分流失，而提高肉品的质量和色泽。开发氨基酸平衡的低蛋白质日粮，既能缓解我国饲料资源短缺问题，又与环保思想相一致，具有十分重要的现实意义，是一项值得深入研究的课题。

主要参考文献

[1] JY Cui，HL Zhang，D Zang，et al. Effects of Low Protein Diets Supplemented with Amino Acids on Production Performance，Carcass Quality and Input-output Ratio of Pigs[J]. Animal Husbandry and Feed Science，2017，9（01）： 7-11.

[2] 于树龙，陈雪雪，张巧霞等. 低蛋白质日粮在猪生产中的应用及优化策略[J]. 畜牧与兽医，2021，53（11）：123-128.

[3] LM Wei，QW Liu，RP Sun，et al. Effects on Growth Performance and Feed Digestibility of Hainan Black Pigs by Adding Lysine in Low Protein Diet[J]. Animal Husbandry and Feed Science，2018，10（02）： 109-112.

[4] 宋博，尹杰，郑昌炳等. 低蛋白质日粮在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 中国饲料，2020，No. 647（03）： 8-15.

[5] 刘影，赖玉娇，高环等. 低蛋白日粮在生长育肥猪上的研究进展[J]. 中国猪业，2016，11（12）： 49-53.

哺乳料添加 MCT 和 HMB 对母猪生产性能和仔猪生长性能的影响

刘孟宇※，宫田庚，赵帅，崔卫国，尹国安※※
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163000）

引言

大多数养殖场存在着母猪产程过长，能量储备不足的问题。中链脂肪酸甘油三酯（Medium chain triglycerides，MCT）除能快速补充能量外，还具有调节脂质代谢、缩短母猪分娩过程和抗菌抗炎等作用，β-羟基-β-甲基丁酸（β-hydroxy-β-methyl butyrate，HMB）则具有调节脂质代谢和增强免疫力的作用。在饲料中单独添加 MCT 或 HMB 都能改善母猪分娩过程和仔猪生长性能[1, 2]。本研究旨在探究单独补充 MCT 或同时补充 MCT 和 HMB 对母猪生产性能和仔猪生长性能的影响。

材料与方法

选取 30 头（妊娠第 110 天，2~3 胎）长大二元杂交母猪，按背膘厚度分为三组：对照组（不做任何处理，n=10）、MCT 组（每日额外饲喂 14.3 g MCT，n=10）、MCT+HMB 组（每日额外饲喂 14.3 g MCT+2 g HMB，n=10），试验期从妊娠第 110 天至泌乳第 14 天。试验期间记录母猪产程、产仔数、活仔数等分娩指标和母猪背膘厚度，在分娩当天和泌乳第 14 天，分别采集母猪初乳、常乳和血液；记录仔猪初重和哺乳期日增重，在仔猪 7 日龄时采集血液。

结果与讨论

（1）MCT 组和 MCT+HMB 组母猪产程和产仔间隔显著低于对照组（P＜0.05），各处理组母猪产仔数、死胎数、木乃伊数和健仔数无显著差异（*P*＞0.05），MCT 组活仔数和弱仔数与对照组相比无显著差异（*P*＞0.05），MCT+HMB 组活仔数和弱仔数显著高于对照组和 MCT 组（*P*＜0.05），分娩当天 MCT 组和 MCT+HMB 组母猪血清 *IL-6* 和 *CRP* 显著低于对照组（*P*＜0.05）。

（2）在分娩当天，MCT 组和 MCT+HMB 组母猪血清游离脂肪酸浓度显著高于对照组（*P*＜0.05），低密度脂蛋白浓度显著低于对照组（*P*＜0.05），MCT+HMB 组总胆固醇浓度显著低于对照组和 MCT 组（*P*＜0.05）；在分娩后第 14 天，MCT 组和 MCT+HMB 组母猪血清总胆固醇和低密度脂蛋白浓度显著低于对照组（*P*＜0.05），MCT+HMB 组高密度脂蛋白浓度显著高于对照组和 MCT 组（*P*＜0.05）。MCT+HMB 组母猪泌乳期背膘损失显著高于对照组和 MCT 组（*P*＜0.05）。

MCT 组和 MCT+HMB 组母猪初乳乳脂和乳蛋白含量显著高于对照组（*P*＜0.05），初乳中各类脂肪酸比例与对照组相比存在显著差异（*P*＜0.05）；MCT 组和 MCT+HMB 组母猪常乳乳蛋白含量显著高于对照组（*P*＜0.05），MCT+HMB 组母猪常乳乳脂含量显著高于对照组和 MCT 组（*P*＜0.05）。

（3）三个处理组仔猪初生重无显著差异（*P*＞0.05），MCT 组和 MCT+HMB 组仔猪平均日增重显著高于对照组（*P*＜0.05）。MCT 组和 MCT+HMB 组母猪初乳 *IgA* 浓度显著高于对照组（*P*＜0.05），MCT+HMB 组初乳 *IgG* 浓度显著高于对照组（*P*＜0.05），MCT 组和 MCT+HMB 组仔猪血清 *IgA* 浓度显著高于对照组（*P*＜0.05），MCT+HMB 组仔猪血清 IgG 浓度显著高于对照组（*P*＜0.05）。

综上所述，从母猪妊娠第 110 天至泌乳第 14 天，单独补充 MCT 或同时补充 MCT 和 HMB 都能够显著提高母猪生产性能与仔猪生长性能，同时补充 MCT 和 HMB 能够产生更好的效果。

主要参考文献

略

※ 作者简介：刘孟宇，在读硕士研究生，研究方向为动物行为与福利。E-mail：1453581684@qq.com。
※※ 通讯作者：尹国安，教授，博士生导师，研究方向为动物行为与福利。E-mail：guoanyin@foxmail.com。

饮用 AMC 碱性矿物质水通过调节脑-菌群-肠道轴稳态提高断奶仔猪腹泻抗性

陈建※，姚鑫，赵璧忱，许雅茹，李金龙※※
（东北农业大学动物医学院，黑龙江哈尔滨 150030）

引言

仔猪断奶后腹泻给生猪生产带来巨大的医疗负担和经济损失，严重制约了养猪业的健康可持续发展[1]。断奶应激及其诱导的菌群紊乱[2]、激素异常[3]和肠道损伤[4]被认为是仔猪断奶后腹泻的主要原因。饮用碱性矿物质复合物（AMC）水对胃肠道疾病，特别是腹泻有潜在的治疗作用[5~6]，但动物研究的支撑证据及其机制尚未报道。最新研究表明，脑-菌群-肠道轴可能是治疗腹泻和肠易激综合征等胃肠道疾病的潜在靶点[7]。因此推测 AMC 水可能通过调节脑-菌群-肠道轴提高断奶仔猪的腹泻抗性。然而，目前对脑-菌群-肠道轴和腹泻表型相关的报道有限。

材料与方法

基于本试验室之前的研究，试验首先制备了一种含 Na^+、K^+、Zn^{2+}和 Ge^{4+}等多种碱性金属元素的 AMC 水。试验选取 240 头 28 日龄的三元断奶仔猪，根据性别和体重随机分为对照组和 AMC 组，每组 6 个重复，每个重复 20 头。试验仔猪饲养管理和免疫水平相同，其中对照组仔猪饮用普通饮水，而 AMC 组仔猪饮用 AMC 水。仔猪断奶后 15 天，从每个重复中随机选取 1 头仔猪进行屠宰取样（n = 6）。记录断奶仔猪腹泻率。采用 16S rRNA PacBio SMRT 基因全长测序分析肠道菌群组成和功能。

结果与讨论

AMC 水显著提高了断奶仔猪的平均日增重（ADG），并显著降低了料重比（F∶G）。与对照组相比，AMC 组的腹泻率降低了 20%以上。研究表明断奶应激会诱导 HPA 轴的异常激活，诱导皮质醇（COR）和应激激素的活化，进而改变肠道菌群的组成和功能[2~3]。在本研究中，AMC 水通过抑制 HPA 轴活性、改善肠道菌群结构和功能，并进一步刺激肠道干细胞（ISC）的增殖和分化，加速肠上皮损伤修复，进而降低断奶仔猪的腹泻率。这一结果提示脑-菌群-肠道轴介导了 AMC 水增强断奶仔猪的腹泻抗性。机制上，AMC 水通过抑制 HPA 轴激活降低应激相关激素（COR 和 Hpt）的分泌，进而促进肠道有益菌群丰度的增加。此外，AMC 水通过激活 Wnt/β-catenin 信号维持肠上皮的增殖再生和诱导 ISC 向杯状细胞和潘氏细胞分化，以增强肠道的化学和免疫屏障完整性，进而抑制 LPS 进入体循环和血脑屏障，从而改善 HPA 轴功能紊乱。综上所述，本研究证明饮用 AMC 碱性矿物质水能够通过调节脑-菌群-肠道轴稳态提高断奶仔猪腹泻抗性和生产性能，为有肠道损伤和腹泻风险的断奶仔猪提供了一种潜在的预防和治疗策略。

主要参考文献

略

※ 作者简介：陈建，在读博士研究生，研究方向为动物营养与肠道健康。E-mail：986222040@qq.com。
※※ 通讯作者：李金龙，教授，博士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：Jinlongli@neau.edu.cn。

使用非线性回归与神经网络模型对生长育肥猪净能分配模式进行建模

王力※，师煌伟，胡奇乐，高文君，王璐，赖长华，张帅※※
（中国农业大学动物科技学院，北京 100193）

引言

猪营养学中最常用的能量体系包括消化能、代谢能和净能体系，其中净能体系考虑了热增耗与动物采食不同营养物质后的热效应，是描述能量最准确的体系。然而，由于测定净能的成本较高，目前净能体系多采用预测模型来描述猪的净能需要量与饲料的净能值。神经网络（ANN）在寻找数据内部联系，建立模型等方面表现出强大能力，逐渐应用于各个领域，但目前尚未有研究在猪的净能模型上使用 ANN。因此，本研究旨在使用非线性回归（NLR）与 ANN 对生长育肥猪净能分配模式进行建模。

材料与方法

试验选取 24 头体重约 30 kg 的猪在代谢笼内饲养，饲养周期为 12 周，采食模式为自由采食。动物试验整体分为净能试验与代谢试验，试验周期为闭环设计（适应期→净能试验期→恢复期→代谢能试验期→下一期循环），24 头猪分为 4 组，每组 6 头，每组轮流进入周期中各环节，每期持续 1 周。净能试验与代谢试验中，使用全收粪法、氮平衡法及呼吸测热法计算净能摄入量（NE intake），维持净能（NE_m）、蛋白沉积净能（NE_p）及脂肪沉积净能（NE_l）。试验分析阶段分为两部分，一是使用以上数据评估不同体重阶段生长育肥猪的净能分配模式，二是使用以上数据建立对应的 NLR 与 ANN 模型。在部分二中，整体数据随机分为 75%的训练集和 25%的验证集，利用训练集数据，使用 NLR 和不同结构的 ANN 建立 ME intake、NE intake、NE_m、NE_p 及 NE_l 的最佳预测模型，最后使用验证集验证并比较二者模型。

结果与讨论

随着猪体重增加，采食量不断增加，机体的基础代谢强度更高，导致 NE_m 数值增加，但 NE_m 比例始终保持在 42.0%~48.6%的范围内。NE_l 的数值（MJ/d）与占总 NE intake 的比例随体重增加而增加。蛋白沉积存在最大速率（P_{dmax}），因此 NE_p 随体重增加到最大值后，保持在一定范围内（4.64~4.88 MJ/d）。建模方面，ANN 在所有输出变量的预测表现上均优于 NLR 模型。NLR 模型在建立之前要求我们给出既定关系式，而动物的能量代谢过程是动态变化且复杂的，不一定与实际情况吻合。相反，ANN 模型不作此假设，更加灵活。总之，净能的分配在猪的不同体重阶段发生了变化，在建立生长育肥猪的净能分配模型方面，ANN 比 NLR 更加灵活和强大。

主要参考文献

[1] Wang L，Shi H，Hu Q，et al. Modeling net energy partition patterns of growing-finishing pigs using nonlinear regression and artificial neural networks. Journal of Animal Science. 2023，101，skac405.

※ 作者简介：王力，在读博士研究生，研究方向为猪营养与饲料。E-mail：q15928806587@163.com。
※※ 通讯作者：张帅，教授，博士生导师，研究方向为猪营养与饲料。E-mail：zhansghuai16@cau.edu.cn。

植物提取物的功能及其在断奶仔猪上的应用进展

梁 城，史新娥※
(西北农林科技大学，陕西咸阳 712100)

由于长期添加抗生素导致的耐药性，环境污染等问题越来越严重，2020 年我国饲料行业正式开启了全面“禁抗”模式，抗生素替代产品的研发应用是当下的行业热点。植物提取物是从天然植物中提取出的具有药用、保健等多种功效的化学成分，包括多糖类、皂苷类、生物碱、精油、有机酸等成分，是一类天然、安全的新型营养添加剂，具有无残留、无耐药性、来源广泛等优点，具有广阔的应用前景。。近年来，有关植物提取物在断奶仔猪中的研究应用多见报道。研究表明，植物提取物可以提高断奶仔猪的免疫力，减少疾病的发生率，可以激发断奶仔猪的胃肠道分泌和运动，促进饲料的消化吸收，可以调整肠道微生态平衡，增加有益菌的数量，抑制有害菌的生长，维护肠道健康，可以为断奶仔猪提供丰富的营养和必需的生长因子，促进生长发育，提高体重和产肉性能。因此植物提取物具有在断奶仔猪的饲料中广泛应用，成为断奶仔猪日粮中的一类绿色、安全、高效的营养补充剂的潜力。但在应用过程中也需要注意，不同的植物提取物的成分组合和添加剂量不同，具体应用需要根据不同阶段和不同品种的断奶仔猪的需要和特点进行综合考虑。目前，植物提取物在断奶仔猪方面的应用进展还较为有限。需要进一步深入的研究，如探讨不同植物提取物的适用范围、用量、作用机理等方面的问题。同时，还需要开发出更加优质、高效的植物提取物，以提高其在断奶仔猪养殖中的应用效果和经济效益。本文综述了近年来国内外有关植物提取物的功能研究及在断奶仔猪上的应用文献，为植物提取物在断奶仔猪上的深入应用研究提供参考。

主要参考文献

略

※ 作者简介：梁城（1998-），，陕西省咸阳市人。E-mail：15674333347@163.com。
※※ 通讯作者：史新娥，E-mail：xineshi@163.com,固定电话：13572575995，手机号：13572575995。

褪黑素通过调节肠肝轴缓解黄曲霉毒素 B1 诱导的肝损伤

刘水平※，康玮笠，李金燕，刘丹丹，刘云欢※※，黄克和※※
（南京农业大学动物医学院，江苏南京 210000）

引言

霉菌毒素污染日益成为人们重点关注的食品安全问题。黄曲霉毒素 B1（AFB1）是由黄曲霉和寄生曲霉产生的次生代谢产物，是霉菌毒素中毒性最强并广泛存在于食品和饲料中的污染物之一；长期摄入可导致肝脏、肠道等多器官损伤[1, 2]。褪黑素（MT）是一种主要由松果体合成的色氨酸衍生物，具有抗氧化、抗炎、抗肥胖等功效[3]，但 MT 是否通过肠道菌群缓解 AFB1 诱导的肠道和肝脏损伤尚不清楚。因此，本研究旨在探究 MT 对 AFB1 暴露的肝损伤的保护作用，阐明 MT 对肠道菌群、肠道 FXR 表达和肠道屏障的影响。

材料与方法

本试验模型为 C57BL/6 小鼠，适应性喂养一周后将小鼠随机分为 4 组，每组 8 只小鼠，分别为空白对照组（Con），AFB1 处理组（AFB1），AFB1 和 MT 处理组（AFB1+MT），AFB1、MT 和 Gly - β - MCA 共同处理组（AFB1+MT+Gly - β - MCA）。试验周期为 14 d。同时开展伪无菌小鼠实验和粪菌移植（FMT）验证试验。采用试剂盒检测血清肝功能、血清及肝脏中 LPS 的含量，采用 FD-4 方法检测小鼠肠道通透性，采用 qRT-PCR 或 Western blot 方法检测小鼠肠道炎症、肠道屏障功能、肝脏炎症等基因或蛋白的变化，采用 16s rRNA 检测小鼠肠道菌群的变化。

结果与讨论

MT 预处理显著增加了肠道紧密连接蛋白（ZO-1、Occludin 和 Claudin-1）的表达，降低了肠道通透性，减少了肠道来源的脂多糖（LPS）的产生，并重塑了小鼠肠道菌群，最终缓解了 AFB1 暴露诱导的小鼠肝脏损伤。在伪无菌老鼠中 MT 预处理并不能缓解 AFB1 暴露诱导的肠道屏障功能障碍和肝脏损伤。试验还发现，在 FMT 小鼠中移植 AFB1+MT 组小鼠的粪便仍然对 AFB1 暴露诱导的肠道屏障功能障碍和肝脏损伤具有保护作用。同时，与 AFB1 单独暴露组比较，MT 预处理显著提高回肠 FXR 蛋白的表达水平和抑制肝脏中 TLR4/NF-κB 信号通路相关的 mRNA 和蛋白（TLR4、MyD88、p-IκBα 和 p-p65）的表达水平。随后，试验使用肠道特异性 FXR 抑制剂 Gly - β - MCA 来抑制回肠 FXR 蛋白的表达。试验结果发现，Gly - β - MCA 预处理可以通过抑制回肠 FXR 信号通路和激活肝脏 TLR4/NF-κB 信号通路来消除 MT 对 AFB1 暴露诱导的肝脏损伤的保护作用。本试验结果表明，MT 预处理能够通过重塑肠道菌群、降低肠道源性 LPS 的含量、改善肠道屏障功能来缓解 AFB1 暴露诱导的肝损伤，其机制是通过激活肠道菌群/FXR 信号通路和抑制肝脏 TLR4/NF-κB 信号通路。本研究为治疗肠源性肝脏炎症提供了有力证据。

主要参考文献

[1] Jallow A，Xie H，Tang X，et al. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods： From occurrence to control [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety，2021，20（3）： 2332-2381.

[2] Rushing BR，Selim MI. Aflatoxin B1： A review on metabolism，toxicity，occurrence in food，occupational exposure，and detoxification methods [J]. Food and Chemical Toxicology，2019，124： 81-100.

[3] Sato K，Meng F，Francis H，et al. Melatonin and circadian rhythms in liver diseases： Functional roles and potential therapies [J]. Journal of Pineal Research，2020，68（3）： e12639.

※ 作者简介：刘水平，在读博士研究生，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：2019207035@njau.edu.cn。
※※ 通讯作者：刘云欢，副教授，硕士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：2020018@njau.edu.cn。
通讯作者：黄克和，教授，博士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：khhuang@njau.edu.cn。

海参内脏对慢性冷应激小鼠生长性能、脏器指数、抗氧化与肝脏损伤的影响

乔 鑫※，李炜月，荆学毅，程雨菲，高 杨，何惠媛，洪 亮※※
（天津农学院 动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室，天津 300392）

引言

海参副产物富含多种营养物质，部分含量甚至高于体壁，具有抗肿瘤、抗炎等多种功效，对提高动物健康水平，增强动物免疫力，减少动物应激等均有益处[1]。目前海参副产物在加工生产过程中作为废弃物被丢弃，造成极大的资源浪费和环境污染。我国北部冬季因天气寒冷，动物须从饮食和脂肪组织中获取更多热量，以提高机体代谢率来维持体温恒定，导致机体正常代谢改变，从而对动物的生产性能、繁殖性能、自身免疫以及畜产品质量造成影响，称为冷应激[2]。海参副产物具有安全、绿色、高效、价格低廉等多种优势，具有成为动物抗冷应激饲料的潜力。

材料与方法

1.海参内脏冻干粉制备：海参内脏主要包括海参肠与海参花，将原料经过漂洗干净后，冷冻干燥，制备海参内脏冻干粉（1∶1）。2.营养成分测定：参照国标方法测定营养成分（粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、水分、矿物质、多糖等）。3.动物实验：实验动物选用昆明白母鼠，分为 5 个处理组，空白对照组，冷应激组，低、中、高（200、400、800mg/kg/d）剂量海参内脏组。试验期为 28 天，期间记录小鼠生长指标。对照组环境温度：室温，冷应激及海参内脏处理组将小鼠置于低温环境中构建慢性冷应激小鼠模型。4.屠宰取样：采取心、肝、脾、肾、胸腺，称重，计算脏器比。

肝脏：采取小鼠肝脏。检测项目：肝组织氧化与抗氧化指标（MDA、T-SOD、GSH-Px），肝组织功能酶（ASL、ALP、AKP）。

血清：眶静脉丛采血，分离血清。检测项目：血清抗氧化与抗氧化指标（MDA、T-SOD、GSH-Px），肝组织功能酶（ASL、ALP、AKP）。

结果与讨论

通过对海参内脏基本营养成分测定，海参肠与海参花原料含水量分别为 84.97%与 90.05%。海参内脏冻干粉（海参肠与海参花 1∶1）含水量为 4.19%；粗蛋白含量为 56.97%；粗灰分含量为 7.47%；粗脂肪含量为 24.27%；多糖含量为 4.52%；钙与磷含量分别为 2.66 mg/g、7.81 mg/g，富含多种营养成分，具有较高营养价值。动物试验发现与空白组比较，冷应激组日均采食量与体温升高，各海参内脏组日均采食量下降，体温与空白组水平一致，各组间平均日增重无明显变化。冷应激组小鼠的肝脏、肾脏、胸腺脏器指数相比空白组均明显降低，心脏指数明显上升，各海参内脏组的脏器指数均能得到恢复，接近于正常组。冷应激组小鼠的肝脏蛋白含量与 T-SOD、GSH-Px 较空白组活性降低，MDA 水平提高，各剂量海参内脏组得到恢复，血清中结果与肝脏一致。相对于空白组，冷应激组 AST、ALT、AKP 含量明显提高，海参内脏各组中血清与肝脏组织中 AST、ALT、AKP 含量明显减少。肝脏组织学检查发现，冷刺激组较空白组肝组织破坏并伴随炎细胞浸润，海参内脏组小鼠肝组织病理情况得到明显缓解。海参内脏冻干粉可通过调节机体氧化与抗氧化系统间平衡，起到恢复冷应激引起小鼠氧化应激损伤的作用。

主要参考文献

略

※ 作者简介：乔鑫，在读硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料资源开发。E-mail：tjau_qiaoxin@163.com。
※※ 通讯作者：洪亮，讲师，硕士生导师，研究方向为抗生素替代剂（益生菌、益生元、噬菌体），肠道健康，饲料资源开发。E-mail：hongl0626@163.com。

日粮添加蛹虫草对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响

李劲树※，梁城，高宇辉，史新娥※※

（陕西省动物遗传育种与繁殖重点实验室 西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室，陕西杨凌 712100）

引言

本试验通过在断奶仔猪日粮中添加蛹虫草粉，旨在探究蛹虫草对断奶仔猪生长性能、肠道屏障功能的影响以及蛹虫草调节断奶应激条件下仔猪肠道健康功能的机制。

材料与方法

本试验选取 144 头体重为 8.53±0.16 kg 的杜×长×大三无杂交好猪（公母各半），随机分为 4 组，每组 36 头，每组 6 个重复，每个重复 6 头猪，试验期为 28 天。分别为对照组、LPS（脂多糖）组、500 mg/kg 蛹虫草组、1000 mg/kg 蛹虫草组。试验期结束时从每个重复中挑选两头（一公一母）进行屠宰取样。试验期结束每组选 6 头体重均等猪只空腹抽血，屠宰前除对照组外其余猪只腹腔注射 300 μg/kg BW 的 LPS 溶液，对照组猪只注射等剂量生理盐水。按腹泻评分 1～4 级标准记录仔猪腹泻情况。使用 RT-qPCR 技术检测断奶仔猪肠道紧密连接蛋白、TLR4/TRAF6/NF-κB 信号通路相关基因的表达水平，使用 Western blot 测定肠上皮紧密连接蛋白和 TLR4/TRAF6/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达水平，通过 16S rRNA 技术检测断奶仔猪结肠内容物和结肠黏膜中菌群组成。

结果与讨论

（1）蛹虫草饲料添加剂可提高断奶仔猪生长性能和降低腹泻率。在第四周时日粮中添加 1000 mg/kg 蛹虫草显著增加断奶仔猪平均日增重（P<0.05）。添加蛹虫草显著降低断奶仔猪血液转氨酶浓度和胆固醇的浓度（P<0.05）。蛹虫草饲料添加剂能够显著降低断奶仔猪腹泻率和腹泻指数（P<0.05）。能够显著提高断奶仔猪免疫水平和抗氧化能力（P<0.05）。（2）蛹虫草饲料添加剂可改善断奶仔猪肠道物理屏障和化学屏障功能。通过测量肠道组织形态学指标发现蛹虫草饲料添加剂显著增加断奶仔猪肠道绒毛高度（P < 0.05）显著提高绒隐比值指数（P<0.05）。蛹虫草显著提高紧密连接蛋白 mRNA 的表达水平（P<0.05）十二指肠物理屏障相关蛋白的表达水平（P<0.05）。蛹虫草组肠道上皮杯状细胞数量极显著高于对照组（P<0.01），黏液蛋白 *MUC-2* mRNA 表达显著上调（P<0.05）。由此可见，蛹虫草能改善断奶仔猪的十二指肠化学屏障功能。（3）蛹虫草可提高断奶仔猪肠道免疫屏障功能和生物屏障功能。与 LPS 组相比，添加蛹虫草饲料添加剂显著提高了 IL-4 浓度（（P<0.05）。蛹虫草组十二指肠粘膜炎症因子中 TNF-α 含量显著降低（P<0.05）。与对照组相比，添加蛹虫草可降低十二指肠 *TLR4*、*MyD88* 和 *NF-κB* 炎症信号通路 mRNA 的表达量（P<0.05），降低十二指肠 NF-κB、TLR4、MyD88 和 TRAF6 蛋白的表达量（P<0.05）。在机制上，蛹虫草可通过抑制炎症信号通路调控炎症反应。高通量测序结果表明，添加蛹虫草增加了厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度（P<0.05）。此外，在属水平上，链球菌和梭状芽胞杆菌是最主要的优势菌群。与对照组相比，饲粮中添加蛹虫草增加了未知梭菌的相对丰度（P<0.05）。本研究发现了蛹虫草在促进仔猪生长、改善断奶仔猪腹泻、调节肠道屏障功能方面的新作用。

主要参考文献

略

※ 作者简介：李劲树，在读硕士研究生，研究方向为猪肠道营养健康。E-mail：lijinshu@nwafu.edu.cn。

※※ 通讯作者：史新娥，教授，博士生导师，研究方向为动物生物技术。E-mail：xineshi@nwafu.edu.cn。

基于微生物组学和代谢组学揭示低蛋白日粮对河西猪肠道健康的影响机制

王东[1※]，柴明杰[2]，陈国顺[1※※]

（1.甘肃农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州 730070；2.平凉市畜牧渔业站，甘肃平凉 744000）

引言

氨基酸平衡低蛋白日粮是在满足畜禽营养需要的基础上降低日粮中的蛋白质，从而提高了饲料中蛋白质的利用率，降低饲料生产成本，提高畜禽的生产性能和肉品质，对动物肠道健康有积极作用[1]。国家种质资源保护和利用战略的实施，能够充分发挥地方猪种的优势性能，促进地方猪种产业健康发展。目前研究表明，低蛋白日粮可以提高育肥猪的生产性能和肉质风味，并且可以改善肠道菌群结构和多样性[2, 3]。因此，本研究评价低蛋白氨基酸平衡日粮对河西猪肠道微生物及代谢相关的影响，以期为低蛋白氨基酸平衡日粮在地方养猪中的应用提供理论依据。

材料与方法

试验对象为甘肃省高台县六禾农牧生态养殖场 27 头育肥期河西猪，试验猪饲养管理和免疫水平相同，按 NRC（2012）标准配制试验日粮，粗蛋白含量分别为 16.0%、14.0%和 12.0%的氨基酸平衡日粮。适应期为 7 天，试验期为 65 天。试验期结束后每组随机选择 6 头进行屠宰，基于多组学技术（16S rRNA 测序（全长）和代谢组学），综合探讨氨基酸平衡低蛋白日粮对河西猪盲肠微生物菌群特性和代谢产物及通路之间的相互关系，揭示低蛋白日粮对河西猪肠道健康效果及机理。

结果与讨论

通过 16S rRNA 全长测序，18 个河西猪盲肠内容物样品测序共获得 134 317 对 Raw Reads，85 415 条 Clean Reads，80 230 条 Effective Reads。3 个组共有 239 个 OTU，16.0% CP 组、14.0% CP 组和 12.0% CP 组分别特有 13、4 和 22 个 OTU。细菌门水平，12.0% CP 组的厚壁菌门与拟杆菌门的比值最大为 1.23，显著高于其余两组（P<0.01）。细菌属水平，14.0% CP 组细菌的多样性和丰度具有显著差异（P<0.01）。研究发现，低蛋白日粮具有改善河西猪肠道微生物多样性和丰度的趋势，对动物体肠道健康有积极作用[2]。代谢组分析共注释到 4 908 个代谢物，其中低蛋白组与 16.0%蛋白组相比，共检测到 1 360 个差异代谢物（199 个上调，1 161 个下调），差异代谢物主要富集在氨基酸代谢、脂质代谢、碳水化合物代谢以及其他次生代谢产物的生物合成相关通路中，从而在生理调节、营养消化代谢以及细胞代谢反应中起促进作用。本研究表明低蛋白日粮通过改变肠道微生物菌群多样性及丰度，进而影响微生物代谢通路，以提高动物体对饲料的消化利用率，促进肠道健康。

主要参考文献

[1] Rocha GC，Duarte ME，Kim SW. Advances，Implications，and Limitations of Low-Crude-Protein Diets in Pig Production[J]. Animals （Basel）. 2022;12 （24）：. doi：10.3390/ani12243478

[2] Yu D，Zhu W，Hang S. Effects of low-protein diet on the intestinal morphology，digestive enzyme activity，blood urea nitrogen，and gut microbiota and metabolites in weaned pigs[J]. Arch Anim Nutr. 2019;73 （4）：287-305. doi：10.1080/1745039X.2019.1614849

[3] Wang D，Chen G，Chai M，et al. Effects of dietary protein levels on production performance，meat quality and flavor of fattening pigs[J]. Front Nutr. 2022;9：910519. doi：10.3389/fnut.2022.910519

※ 作者简介：王东，在读博士研究生，研究方向为动物营生理与产品品质调控。E-mail：wangd@st.gsau.edu.cn，电话：18893813147

※※ 通讯作者：陈国顺，教授，博士生导师，研究方向为动物营生理与产品品质调控。E-mail：chengs@gsau.edu.cn。

植物提取物对母猪繁殖性能的影响及其机制研究

赵林露※，刘晓曦※※
（广东海洋大学滨海农业学院，广东湛江 724000）

引言

我国虽为养猪大国，但母猪繁殖成绩与其他高水平国家相比仍有一定的差距[1]。针对目前现状，可以通过研发新型绿色饲料添加剂提高母猪的繁殖性能。本植物提取物采用了来自中华人民共和国农业部第 1773 号公告发布批准的饲料添加剂，观察其对妊娠后期母猪繁殖性能的影响，并初步探究机制，旨在改善母猪的繁殖性能。

材料与方法

试验在广西省玉林市某猪场进行。试验一为主成分试验，试验二为临床试验，均采用单因子实验设计，随机选择 200 头繁殖状态正常、体况良好、体重大致相近的长大二元第二胎次母猪，将其随机分为 2 组，每组 2 个重复，每个重复 50 头，试验于妊娠第 74d 开始，每天在基础日粮添加 20g 复合植物提取物，连续饲喂至分娩，对照组母猪正常饲喂基础日粮。

分娩 24h 内，试验一和二均记录母猪的产仔总数、活仔数、健仔数、弱仔数、死胎数、木乃伊数、初生重、出生窝重；21 天断奶时记录断奶头数和体重，作为母猪繁殖性能的评价指标；试验二于分娩 24h 内，采集母猪血液，用 ELISA 试剂盒检测母猪血清中 IgA、IgG 和 IgM 的含量、ROS 水平和 SOD 含量；采用 SPSS23.0 版本软件进行独立样本 T 检验，试验结果 $P>0.05$ 表示差异不显著，$P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

结果与讨论

（1）繁殖性能：主成分试验中，试验组和对照组相比，死胎数显著降低（$P<0.05$），说明该复方可以提高繁殖性能。临床试验中，试验组与对照组相比，产仔总数、健仔数、初生窝重、断奶头数及断奶窝重均极显著升高（$P<0.01$）。对产仔总数进行分析发现对照组中产仔总数≥14 头的占比为 31%，产仔总数≤11 头的占比为 43%，而试验组占比分别为 46%、25%。对产仔总数≤11 头的样本分析，发现试验组弱仔数和死胎数显著低于对照组（$P<0.05$），断奶头数和断奶窝重极显著高于对照组（$P<0.01$），说明该复合植物提取物提高了低产母猪的产仔总数及产健仔数。

（2）免疫水平：与对照组相比，试验组母猪血清中 IgA 含量极显著升高（$P<0.01$），对产仔总数≤11 头的母猪血液进行检测，发现试验组母猪血清中 IgG 极显著升高（$P<0.01$），IgM 和 IgA 含量均显著升高（$P<0.05$），提示该复合植物提取物可以改善妊娠母猪的免疫功能。

（3）抗氧化：对妊娠母猪抗氧化性能的研究表明,试验组与对照组相比 ROS 含量极显著升高（$P<0.01$），且产仔总数≤11 头的母猪 ROS 含量也极显著升高（$P<0.01$），但超氧化物歧化酶（SOD）含量也伴随显著升高（$P<0.05$），其抗氧化性能的具体作用机制仍有待研究。

妊娠后期日粮中添加植物提取物可能通过提升母猪的免疫功能来改善母猪的繁殖性能，但其具体作用机制仍有待阐述。

关键词:复合植物提取物；母猪；繁殖性能；免疫功能

主要参考文献

[1] 刘少才.丹麦：北欧小国走上世界养猪强国之路[J]. 今日养猪业，2017,（05）：106-107.

※ 作者简介：赵林露，在读硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料。E-mail：zhaolinlu2023@163.com。
※※ 通讯作者：刘晓曦，讲师，硕士生导师，研究方向为中兽医药。E-mail：liuxiaoxi_06@163.com。

谷氨酰胺通过调节微生物和线粒体内质网结构偶联途径降低仔猪肠道炎性损伤

刘心恋※，孙微笑※，王芳※，刘光芒※※，贾刚，赵华，陈小玲，田刚，蔡景义
（四川农业大学动物营养研究所，动物抗病营养教育部重点实验室，四川成都 611130）

引言

免疫应激在仔猪中普遍存在，它会破坏肠道形态和功能，造成肠道微生物失衡和肠道损伤。谷氨酰胺能缓解肠道损伤，保护仔猪肠道健康。线粒体内质网结构偶联（MAM）主要参与调控线粒体功能、内质网应激、机体炎性损伤[1]。肠道微生物也可调控肠道炎性损伤。本试验旨在研究谷氨酰胺是否可通过微生物和线粒体内质网结构偶联途径调控仔猪肠道炎性损伤。

材料与方法

试验采用 2×2 因子设计，主因子为谷氨酰胺（饲粮中添加、不添加）和脂多糖（腹腔注射、不注射）。将 24 头断奶仔猪随机分为对照组和谷氨酰胺组，饲喂 21 天，然后将两组一分为二，分别注射生理盐水和脂多糖（100 μg/kg BW），形成四组。注射 4 h 后屠宰取样。

结果与讨论

谷氨酰胺显著提高仔猪平均日增重和平均日采食量，显著降低料肉比（$P < 0.05$），表明谷氨酰胺能改善生长性能。在应激条件下，谷氨酰胺显著提高空肠绒毛高度和绒隐比，显著降低隐窝深度（$P < 0.05$），表明谷氨酰胺能缓解仔猪肠道损伤，改善肠道形态。在应激条件下，谷氨酰胺显著提高血清和空肠中总超氧化物歧化酶的活性和还原性谷胱甘肽含量，显著降低丙二醛含量（$P < 0.05$），显著降低血清中 D-乳酸含量和二胺氧化酶活力（$P < 0.05$），显著提高 *ZO-1*、*claudin-1* 的 mRNA 表达和蛋白表达（$P < 0.05$），表明谷氨酰胺可缓解仔猪氧化应激和肠道损伤。在应激条件下，谷氨酰胺显著提高空肠 *Mfn1*、*Mfn2*、*presenilin2* 的 mRNA 表达和 Mfn2 蛋白表达，显著降低 *Miefl*、*MFF*、*VDAC1*、*ATF4* 的 mRNA 表达和 MFF、VDAC1、ATF6 蛋白表达（$P < 0.05$），表明谷氨酰胺可通过 MAM 维持线粒体动态平衡，抑制内质网应激来缓解仔猪肠道损伤。在属水平上，谷氨酰胺增加仔猪肠道 *Lactobacillus*、*Blautia* 和 *Ruminococcus* 的丰度，显著降低 *Terrisporobacter* 和 *Turicibacter* 的丰度（$P < 0.05$）。研究发现肠道微生物和空肠炎性损伤分子具有显著相关性。在应激条件下，谷氨酰胺显著增加乙酸、丙酸和丁酸含量（$P < 0.05$），短链脂肪酸与空肠 DAO、D-LA 的含量呈负相关，与 *ZO-1* 和 *claudin1* mRNA 的表达呈正相关，表明谷氨酰胺可通过短链脂肪酸降低肠道炎性损伤。综上，谷氨酰胺能提高仔猪生产性能，可通过肠道微生物和 MAM 信号通路降低仔猪肠道炎性损伤。

主要参考文献

[1] YOU K，WANG L，CHOU C H，et al. QRICH1 dictates the outcome of ER stress through transcriptional control of proteostasis [J]. Science，2021，371（6524）：eabb6896.

※ 作者简介：刘心恋，在读硕士研究生，研究方向为猪的营养。E-mail：lxl13368009833@163.com。
刘心恋，孙微笑和王芳为共同第一作者。
※※ 通讯作者：刘光芒，副教授，硕士生导师，研究方向为猪营养与功能性饲料。E-mail：liugm@sicau.edu.cn。

谷氨酰胺通过调节微生物群和 Th17/Treg 平衡相关免疫信号来增强仔猪的肠道免疫力

张婷※，鲁佳佳※，王芳※，刘光芒※※，贾刚，赵华，陈小玲，田刚，蔡景义
（四川农业大学动物营养研究所，动物抗病营养教育部重点实验室，四川成都 611130）

引言

免疫应激普遍存在于养猪生产中，会导致猪生长抑制[1]，提高养猪成本，降低经济效益。谷氨酰胺可减轻仔猪免疫应激，提高猪免疫力。但谷氨酰胺（Gln）如何提高猪肠道免疫力的机制还不清楚。

材料与方法

采用 2×2 因子试验设计，主因子为 Gln（添加或不添加）和脂多糖（LPS）（注射或不注射），将 24 头仔猪喂食基础日粮或含有 1%Gln 的日粮 21 天，然后将两组一分为二，分别注射生理盐水和脂多糖（100 μg/ BW），形成四组。所有仔猪于注射 4 h 后进行屠宰取样。

结果与讨论

谷氨酰胺组仔猪回肠的隐窝深度显著低于对照组，绒毛面积、绒毛高度和绒隐比显著高于对照组（P<0.05），表明谷氨酰胺改善了仔猪肠道形态结构。谷氨酰胺+LPS 组仔猪回肠 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 及 *IL-8* 的 mRNA 表达水平显著降低于 LPS 组（P<0.05）；回肠 *IL-10* 和 *TGF-β1* 的 mRNA 表达水平显著高于 LPS 组（P<0.05），表明谷氨酰胺减轻了断奶仔猪由 LPS 刺激导致的肠道炎症，提高了断奶仔猪的肠道免疫力。谷氨酰胺显著降低回肠 *IL-17*、*IL-21*、转 *STAT3*、*RORc* 的 mRNA 表达水平（P<0.05），显著增加回肠 *STAT5* 和 *FOXP3* 的 mRNA 表达水平（P<0.05）。试验还发现 Th17/Treg 免疫平衡相关基因 *STAT3*、*RORc*、*IL17*、*IL21*、*FOXP3*、*STAT5* 与回肠 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 及 *IL-8* mRNA 的表达水平呈正相关，与 *IL10*、*TGFβ1* 及 *IL-8* mRNA 的表达水平呈负相关。表明谷氨酰胺可以通过调节 Th17/Treg 免疫平衡来调节机体的免疫反应，增强肠道免疫功能。在微生物属水平上，发现谷氨酰胺处理显著增加了仔猪肠道中 *Lactobacillus*、*Coprococcus* 和 *Marvinbryantia* 的丰度（P<0.1）。谷氨酰胺还显著提高了戊酸和异戊酸的含量（P<0.05）。短链脂肪酸与回肠免疫相关因子 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* mRNA 的表达水平呈负相关，与 *IL10*、*TGFβ1*mRNA 的表达水平呈正相关。以上结果表明，谷氨酰胺可调节肠道微生态提高肠道免疫力。综上所述，谷氨酰胺可通过调节微生物和 Th17/Treg 信号通路缓解断奶仔猪免疫应激、提高肠道免疫力。

主要参考文献

[1] Chen Q，Han X，Zhu H，et al. A comparison of two supplementary doses of vitamin A on performance，intestine and immune organ development，as well as gene expression of inflammatory factors in young hy-line brown laying pullets[J]. Animals，2022，12（10）： 1271.

※ 作者简介：张婷，在读硕士研究生，动物营养与饲料专业。E-mail：zhangting1105@126.com。
张婷，鲁佳佳，王芳为共同第一作者。
※※ 通讯作者：刘光芒，教授，硕士生导师，研究方向为猪营养与功能性饲料。E-mail：liugm@sicau.edu.cn。

饲粮添加酵母硒对育肥猪肠黏膜形态、免疫、抗氧化功能及微生物多样性的影响

苏玲玲[1※]，徐娥[2]，易宏波[3]，肖明飞[2]，黎小银[1]，高彦华[1※※]

（1.西南民族大学畜牧兽医学院，青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室，动物科学国家民委重点实验室，四川成都 610041；2.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025；3. 广东省农业科学院动物科学研究所，广东广州 510640）

引言

酵母硒因其在抗氧化功能、免疫防御系统和生产性能等方面在畜禽生产中起到了至关重要的作用[1]。自国家颁布取消《食品中污染物限量》中硒指标的公告后[2]，养殖户为提高富硒猪肉中硒的含量而添加过量酵母硒。因此，本研究从肠道形态、肠道抗氧化、肠道免疫、肠道屏障和微生物多个方面进行分析，旨在探究饲粮添加不同水平酵母硒对育肥猪肠道健康的影响。

材料与方法

试验将 30 头杜长大育肥猪分为 5 组，对照组饲喂基础饲粮（不添加酵母硒，CON 组），酵母硒组在基础饲粮中分别添加 0.3 mg/kg（SeY0.3 组）、1 mg/kg（SeY1 组）、3 mg/kg（SeY3 组）和 5 mg/kg（SeY5 组）的酵母硒。屠宰采集空肠和回肠，分析肠道形态、抗氧化功能、细胞因子和紧密连接蛋白表达情况，采集结肠内容物和粪便用于短链脂肪酸、细菌 16S rDNA 扩增子高通量测序以及粪便硒含量分析。

结果与讨论

与 CON 组相比，推荐剂量硒 SeY0.3 组显著提高了回肠的绒毛高度，然而高剂量硒 SeY5 组空肠和回肠的绒毛高度显著降低（P<0.05）。在抗氧化中，与 CON 组相比，推荐剂量硒 SeY0.3 组显著提高了空肠 *GPX*-1 和 *GPX*-4 的 mRNA 表达量（P<0.05），而高剂量硒 SeY1 和 SeY3 组显著降低了回肠 *GPX*-4 的 mRNA 表达量（P<0.05），高剂量硒 SeY5 组显著降低了空肠中 SOD 水平（P<0.05）。在肠道屏障中，高剂量硒 SeY3 和 SeY5 组显著降低了回肠杯状细胞数量（P<0.05），而推荐剂量 SeY0.3 组则显著增加了回肠的黏液层厚度以及回肠中 *MUC*-1、*Claudin*-1、*Occludin* 和 *ZO*-1 的 mRNA 表达量（P<0.05）。此外，酵母硒组均增加了试验中期和末期粪便硒含量（P<0.05）。在肠道菌群分析中，与 CON 组相比，推荐剂量硒 SeY0.3、高剂量硒 SeY1 和 SeY3 组显著提高了门水平 *Firmicutes* 和属水平 *Lactobacillus* 的相对丰度（P<0.05），其中 SeY0.3 和 SeY3 组显著降低了门水平 *Spirochaetota* 和属水平 *Treponema* 的相对丰度（P<0.05）。本研究表明，酵母硒剂量不超过 1mg/kg 时可改善育肥猪肠道形态、抗氧化功能、肠道上皮屏障功能和肠道菌群结构。这为育肥猪科学补硒及健康养殖提供相关理论依据，并为酵母硒在育肥猪中的使用和富硒猪肉产业的发展提供数据支撑。

主要参考文献

[1] HACHEMI M A，CARDOSO D，De MARCO M，et al. Inorganic and Organic Selenium Speciation of Seleno-Yeasts Used as Feed Additives： New Insights from Elemental Selenium Determination[J]. Biological Trace Element Research，2023： 1-9.

[2] 杜绿君. GB2762-2012《食品安全国家标准食品中污染物限量》解读[J]. 啤酒科技，2013（03）： 1-3.

※ 作者简介：苏玲玲，在读研究生，研究方向为动物营养与肠道健康。E-mail：llsu7789@gmail.com。

※※ 通讯作者：高彦华，讲师，硕士生导师，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：gaoyanhua@swun.edu.cn。

速益卫®对断奶仔猪生长性能及肠道健康的影响

周贤[1※]，范泽群[1]，孙腆腆[1]，Lea Hübertz Birch Hansen[2]，盛永帅[2]，郑萍[1※※]
（1.四川农业大学动物营养研究所，教育部动物抗病营养重点实验室，四川省动物抗病营养重点实验室，四川成都 611130；2.丹麦科汉森，动植物营养与健康研究中心，丹麦赫斯霍尔姆 2970）

引言

断奶可导致仔猪断奶应激，降低仔猪采食量，引发腹泻，影响仔猪的生长发育[1] 。研究表明，益生菌能够维持肠道菌群平衡，保护肠黏膜结构，调节肠道免疫功能，提升肠道健康水平[2-5]。枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌具有平衡肠道菌群、提高免疫力等功能 [6]。速益卫®（SOLVENS，简称 SLV）是一种由两种枯草芽孢杆菌菌株和一种地衣芽孢杆菌菌株组合而成的饲料添加剂。本研究在断奶仔猪饲料中添加不同剂量的 SLV，旨在研究其对断奶仔猪生长性能、肠道健康等方面的影响。

材料与方法

试验选择 360 头体重为 7.79±0.52 kg 的 DLY 健康断奶仔猪（公母各半），按体重和性别随机分为 3 个处理，分别为对照组、0.02%SLV 组（6.5E+08 CFU/g）、0.04%SLV 组（1.3E+09 CFU/g），每个处理 30 个重复，每个重复 4 头猪，试验期为 42 天。试验分两轮进行，每轮试验 180 头仔猪。第一轮试验第 14、42 天每个处理选择 1 头仔猪采集血清、粪便样品，并在第 43 天对采集血清样品的仔猪进行屠宰，采集肠道样品（N=15）。结果采用 SPSS 27.0 进行单因素方差分析，并结合 DUNCAN 法进行多重比较。

结果与讨论

本研究结果显示：与对照组相比，（1）饲料中添加 0.02%和 0.04%的 SLV 均可以显著降低断奶仔猪的腹泻率（P<0.05），且饲料中添加 0.04%的 SLV 有增加仔猪断奶后 15-42 天 ADG 的趋势（P<0.10），并显著降低了仔猪的料肉比（P<0.05）；（2）饲料中添加 0.02%的 SLV 显著增加了仔猪断奶后第 42 天粪便中的干物质含量（P<0.05）；（3）饲料中添加 0.02%的 SLV 显著增加了仔猪断奶后第 14 天粪便中乳酸杆菌数量，降低了大肠杆菌数量（P＜0.05），饲料中添加 0.04%的 SLV 显著增加了仔猪断奶后第 14 天、42 天粪便中乳酸杆菌数量，并显著减少了仔猪断奶后第 14 天粪便中大肠杆菌数量（P＜0.05）；（4）饲料中添加 0.02%和 0.04%的 SLV 有提高仔猪断奶后第 14 天粪便中 sIgA 含量的趋势（P<0.10），且添加 0.02%的 SLV 显著增加了仔猪断奶后第 42 天粪便中 sIgA 的含量（P＜0.05）；（5）饲料中添加 0.02%的 SLV 显著提高了仔猪断奶后第 42 天血清中 IgG 含量，添加 0.04%的 SLV 显著提高了仔猪断奶后第 14 天血清中 IgG、IgM，以及第 42 天血清中 IgA 的含量（P＜0.05）；（6）饲料中添加 0.02% 的 SLV 有提高仔猪回肠绒毛高度的趋势（P＜0.10）；（7）饲料中添加 0.02%的 SLV 显著降低了仔猪回肠促炎因子 *IL-1β*、*TNF-α* 基因相对表达量，添加 0.04%的 SLV 显著降低了仔猪回肠促炎因子 *TNF-α* 基因相对表达量（P＜0.05）。综上所述，饲料中添加 0.04%的 SLV 提高了仔猪断奶后 15-42 天的日增重，显著降低其料肉比；日粮添加 0.02%和 0.04% 的 SLV 可以显著降低断奶仔猪的腹泻率，对断奶仔猪粪便微生物具有积极调节作用，能够促进仔猪肠道绒毛发育，增强仔猪的免疫力。

主要参考文献

略

※ 作者简介：周贤，在读硕士研究生，研究方向为仔猪营养与健康。E-mail：zhouxian@stu.sicau.edu.cn
※※ 通讯作者：郑萍，教授，博士生导师，研究方向为猪抗病营养、营养与免疫、养分代谢与利用。E-mail： pingzheng@sicau.edu.cn

益生菌对断奶仔猪生产性能影响的 Meta 分析

赵禹铭※，迟浩天
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室，黑龙江大庆 163319）

引言

断奶仔猪由于胃肠道功能发育不完全、机体免疫系统功能不完善，会出现断奶应激，这会导致仔猪出现腹泻、生长缓慢等现象，严重影响养殖场生产效益及经济效益[1]。随着饲料中禁止使用抗生素，益生菌作为替抗产品在畜牧养殖中的应用研究逐渐增多。因此本文旨在探究益生菌对断奶仔猪生产性能的影响，对断奶仔猪平均日采食量、平均日增重、料重比、腹泻率这四个指标进行综合对比分析，为其在生产中的应用提供理论依据。

材料与方法

本研究检索了从 2018 年 1 月 1 日至 2023 年 3 月 1 日在知网、维普、万方、Web of science、PubMed 以及 ScienceDirect 等数据库中发表的益生菌对断奶仔猪生产性能影响的相关论文，检索词为益生菌、断奶仔猪及生产性能。本研究共纳入 763 篇文献，经筛选最终纳入符合要求的文献共 15 篇。使用 STATA（12.0）进行数据统计分析。采用标准化均数差（SMD）表示效应量及其 95%置信区间（CI）作为效应尺度，对仔猪生产性能进行计算，采用 I^2 值与 P 值估计不同文献之间的异质性，当异质性检验 I^2>50%，P<0.05 时，则认为存在统计学异质性，此时采用随机效应模型进行 Meta 分析；反之采用固定效应模型进行 Meta 分析，并采用 Egger's 检验评价发表偏倚；按照其是否为复合益生菌进行亚组分析。

结果与讨论

添加益生菌可以有效提升断奶仔猪平均日采食量[SMD=0.78，95%CI（0.50，1.06），P<0.05]，平均日增重[SMD=2.51，95%CI（2.17，4.36），P<0.05]，料重比[SMD=-0.42，95%CI（-0.68，-0.15），P<0.05]，并显著降低腹泻率[SMD=-8.17，95%CI（-9.53，-6.82），P<0.05]。亚组分析表明，复合益生菌对提高平均日采食量、平均日增重、料重比效果好；单独益生菌对降低腹泻率效果好。产生以上结果的原因为：（1）饲料中添加益生菌可以调节肠道菌群、促进养分的消化吸收、提高动物机体的免疫力。（2）益生菌进入肠道后，各种益生菌与肠道微生物之间可以产生协同互补作用，调节猪的肠道菌群，促进猪的生长。（3）益生菌利用糖类发酵产生大量有机酸，降低肠道 pH，有利于提高消化酶活性，此外，有机酸的产生还可以防止有害菌在肠道的定植，加强胃肠道蠕动和消化酶的分泌，维持消化道微生物平衡，因而有利于养分的消化吸收。

主要参考文献

[1] 李永彦，谭涛.断奶应激对仔猪的影响及其解决方法[J].猪业科学，2021，38（08）：32-34.

※ 作者简介：赵禹铭，在读硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：zhaoyuming0099@163.com。

基于 Meta 分析探究壳聚糖对猪生长性能的影响

张 悦※，刘思雯

（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室，黑龙江大庆 163319）

引言

壳聚糖是由甲壳素脱乙酰基后得到的一种天然、无毒、生物可降解的碱性多糖，它不仅具有提高动物生产性能、改善肠道微生态环境、增强免疫及调节脂肪代谢等生理功能，而且在繁殖和代谢过程中发挥重要作用[1]。但各研究结果之间差异较大，难以确定适宜添加量和最佳生物学效应。因此，本文使用 Meta 分析深入探讨壳聚糖对猪生长性能方面的作用。

材料与方法

本文从中国知网、万方、维普等中文数据库以及 PubMed、Science Direct、Web of Science 等英文数据库中提取近十年（2010.01.01-2023.04.20）发表的相关文献，检索关键词：壳寡糖（Chitosan）、猪（pig）、生长性能（growth performance）等相应的中英文词，共检索出 275 篇中、英文文献，经过筛选后，利用 CMA（Comprehensive Meta Analysis V3.3）将 18 篇符合条件的文献纳入 Meta 分析，当 P<0.05 时认为该指标具有显著异质性。

结果与讨论

Meta 分析结果显示，在日粮中添加壳聚糖可以显著提高猪的日增重（ADG）（SMD=0.983，P<0.001）、但对于平均日采食量（ADFI）的影响并不显著（SMD=0.859，P=0.003），显著降低料重比（F/G）（SMD=-0.861，P=0.013），有效提高猪的生长性能，这与杨志刚[2]等人的研究结果一致。通过 Egger 检验，得到 ADG、ADFI 存在显著发表偏（P <0.05），F/G（P>0.05）无显著的发表偏倚。由于本文各研究结果的异质性较高，故进行亚组分析，结果显示在日粮中添加壳聚糖螯合物对猪 ADFI 和 F/G 影响的效果优于直接添加壳聚糖。进行亚组分析后各结果的异质性仍然较高，这可能是由于壳聚糖添加量的不同、壳聚糖分子量大小不同或饲料中营养水平不同所致。剂量效应图显示随着壳聚糖含量的增多，ADG 急速上升首先达到峰值，而后下降至最低点，ADG 壳聚糖较优添加量约为 0.025%～0.03%；ADFI 呈现稍增而后降低达持平的现象，较优添加量大约在 0.01%～0.02%；F/G 随添加量的增多呈现先急速下降后逐渐上升且趋于平缓的态势，最佳水平为 0.025%。因此，哺乳猪及育肥猪饲料中壳聚糖的最佳添加含量约为 0.01%～0.03%。综上所述，日粮中添加壳聚糖对可以显著提高猪生长性能，用壳聚糖替代抗生素是完全可行的。

主要参考文献

[1] 杨富民，张媛媛，刘志昌等.壳聚糖在畜牧生产中的应用研究进展[J].广东畜牧兽医科技，2020，45（02）：17-19+23.

[2] 杨志刚，魏攀鹏，贺永惠等.膨化壳聚糖微粒对仔猪生长性能与小肠形态结构的影响[J].黑龙江畜牧兽医，2017（09）：126-128.

※ 作者简介：张悦，在读硕士研究生，研究方向为畜牧系统工程。E-mail：zhangyue20000623@163.com。

党参、黄芪提取物对断奶仔猪生长性能、血液参数、粪样菌群和短链脂肪酸的影响

郭容霞※
（甘肃农业大学，甘肃兰州 730000）

本研究旨在探究党参、黄芪对断奶仔猪生长性能、腹泻率、免疫球蛋白、抗氧化能力、粪样菌群和短链脂肪酸的影响。将 48 头健康且体重相近的 31 日龄断奶仔猪随机分为对照组(K)、党参、黄芪低剂量组(D)、中剂量组(Z)和高剂量组(G),每组 12 头，分别饲喂基础饲粮和基础日粮中添加 0.5%、1.0%和 1.5%党参、黄芪提取物，连续饲喂 28 天，于第 29 天采集血液和粪便。结果表明：（1）不同添加比例的党参、黄芪提取物均能提高仔猪平均日增重和降低料重比，与 K 组比较，D 和 Z 组腹泻率降低。（2）不同添加比例的党参、黄芪提取物均能提高 T-AOC、SOD、GSH-Px、MDA 活性，与 K 组相比，D 和 Z 组的 T-AOC 活性、Z 组的 SOD 活性、G 组的 GSH-Px 活性显著升高(P<0.05)。（3）与 K 组比较，不同添加比例党参、黄芪提取物均可显著或极显著提高血清 IgM、IgG 和 IgA 水平(P < 0.05)。（4）高通量测序数据显示，党参、黄芪提取物影响了粪便的细菌数量和多样性。与 K 组比较，在门水平，不同添加比例的党参、黄芪提取物均能提高厚壁菌门相对丰富度，D 和 Z 组拟杆菌门相对丰富度升高，D 组螺旋菌门、变形菌门相对丰富度降低。在属水平，G 组的拟杆菌属、G 和 Z 组的梭菌属相对丰富度均升高。（5）不同添加比例的党参、黄芪提取物均能提高总 SCFA、乙酸和正丁酸含量，其中 Z 和 G 组的总 SCFA 和乙酸含量极显著高于 K 组(P<0.01)。G 组的丙酸、异丁酸、正丁酸、异戊酸和正戊酸含量显著或极显著高于 K 组(P<0.05)。综上，饲料中添加党参、黄芪提取物提高了断奶仔猪的生产性能、降低了腹泻率，显著或极显著提高血清免疫球蛋白水平和抗氧化能力，提高短链脂肪酸产生菌厚壁菌门、拟杆菌门、拟杆菌属和梭菌属相对丰富度，提高总 SCFA、乙酸和正丁酸含量。因此，日粮中添加党参、黄芪可能有利于优化猪的生产性能，减少对抗生素的依赖。

主要参考文献

略

基金项目：甘肃省教育厅双一流重大科研项目(GSSYLXM-02); 国家自然科学基金项目（32260898）；国家肉牛/牦牛产业技术体系（CARS-37）；甘肃农业大学伏羲杰出人才培育计划（No.Gaufx-03J01）
※ 作者简介：郭容霞，甘肃省兰州市人。E-mail：3290105518@qq.com。
※※ 通讯作者：郭容霞，E-mail：3290105518@qq.com,手机号：15214043697。

β 防御素 yTAP 的抑菌活性、原核表达及其对小鼠肠道菌群多样性的影响

黎小银[1※]，刘萌[1]，武新学[1]，刘静怡[1]，高彦华[1※※]

（1.西南民族大学畜牧兽医学院，四川成都 610041；2.青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室，四川成都 610041；3.动物科学国家民委重点实验室，四川成都 610041）

引言

牦牛 TAP 抗菌肽（yTAP）是抗菌肽 β-防御素超家族的一员。研究表明，牛 TAP 对病原微生物具有抑菌能力，而 yTAP 与牛 TAP 结构类似且具备两亲性，推测 yTAP 也具有抑菌活性[1]。本研究合成线性肽链结构和含二硫键结构的 yTAP 并以合成牛 TAP 为对照，旨在探讨 β 防御素 yTAP 体外抑菌活性的基础上，构建 yTAP 抗菌肽在大肠杆菌中的原核表达载体，并对 ryTAP 重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。以小鼠作为动物模型研究 yTAP 的急性毒性和体内分布规律，揭示其对肠道菌群的影响。

材料与方法

试验一：微量肉汤稀释法和平板培养法分析化学合成 yTAP 的最小抑菌浓度（MIC）和最小杀菌浓度。试验二：构建 yTAP 在大肠杆菌的原核表达载体，对其表达产物 ryTAP 重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。试验三：尾静脉注射不同剂量的 yTAP（5，10，20，40，80，160 mg/kg·BW）对小鼠急性毒性作用。试验四：活体成像技术分析尾静脉注射 10 mg/kg·BW 菁染料 Cy5.5 标记的 yTAP（Cy5.5-yTAP）后不同时间（1，3，6，24，48，72，96，120，144h）在小鼠体内的分布规律。试验五：采用 16s rRNA 研究尾静脉注射安全剂量（5，10 mg/kg·BW）的 yTAP 对肠道菌群的影响。

结果与讨论

（1）二硫键结构有助于提高 yTAP 的抑菌活性，含有二硫键结构的 yTAP 对金黄色葡萄球菌和鼠柠檬酸杆菌的 MIC 为 16 和 8 μg/mL，分别是线性肽链 yTAP 的 4 倍和 2 倍。（2） ryTAP 重组蛋白进行 SDS-PAGE 检测可见差异条带，分子量在 23.04 kDa 左右。纯化后的 ryTAP 总量有 1 mg，纯度为 90%。（3） yTAP 对小鼠的 LD50 为 46.79mg/kg·BW，组织病理学评分表明 5、10 mg/kg·BW 的 yTAP 对脾脏、肝脏和肾脏组织无损伤。（4）尾静脉注射 Cy5.5-yTAP 后，随着时间推移荧光信号值逐渐增强，3h 达到最大，与其他时间相比差异显著（P<0.05）；胃和大肠的荧光值在 24h 时最高。（5）与对照组相比，10 mg/kg·BW 的 yTAP 处理明显降低了小鼠结肠菌群的 α 多样性香农指数（P<0.05），改变 β 多样性（PERMANOVA，P=0.033，R^2=0.193）；线性判别分析（LDA 值>3）表明，10 mg/kg·BW 的 yTAP 组显著增加的标志菌有 γ - 变形菌纲和葡萄球菌属。

主要参考文献

[1] 周晓舟，刘静怡，程运谋，杨修竹，闫睿，武新学，彭忠利，高彦华. 2020.牦牛 TAP 基因编码区的克隆与序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医，（10）：110-115

※ 作者简介：黎小银，在读硕士研究生，研究方向为单胃动物营养。E-mail：lixiaoyin98@163.com。

※※ 通讯作者：高彦华，教授，讲师，研究方向为动物营养与肠道健康。E-mail：gaoyanhua@swun.edu.cn。

全株玉米青贮不同添加比例对新吉林黑猪后备母猪生长性能的影响

郝桐[1, 2※]，李娜[1※※]

（1.吉林省农业科学院畜牧兽医研究所，吉林长春 136100 ；2.吉林农业大学动物科学技术学院，吉林长春 130000）

引言

全株玉米青贮是一类以玉米为原料进行发酵而得到的产物。研究表明，全株玉米青贮在饲养方面有着巨大的潜力。而现有的研究中对于全株玉米青贮的研究多应用于反刍动物中，在猪等单胃动物中的应用较少。因此，本研究将全株玉米青贮按照不同的比例添加进新吉林黑猪后备母猪日粮中，代替相对应比例的基础日粮，探究全株玉米青贮的添加对于后备母猪生长性能的影响。

材料与方法

试验选取体重 60.32±3.75 kg 的新吉林黑猪后备母猪 36 头。随机分为 4 组，每组 3 个重复，每个重复 3 头。分别为对照组（100%基础饲粮）、10%组（90%基础饲粮+10%全株玉米青贮）、20%组（80%基础饲粮+20%全株玉米青贮）、30%组（70%基础饲粮+30%全株玉米青贮）。试验期共 67 天，预饲期为 7 天，正式试验 60 天。每日记录被试新吉林黑猪后备母猪的饮食情况。血液样本在试验第 60 天对试验猪进行颈静脉穿刺采集血液。粪便样本在试验结束前 3 天开始采集。

结果与讨论

在生长性能方面，相较于对照组，20%组和 30%组组日增重显著降低；日采食量方面与对照组相比，30%组和 10%组日采食量有所提高，而 20%组日采食量显著降低。

在表观消化率方面，20%组和 30%组干物质消化率有所下降；表观粗灰分消化率中，10%组和 20%组明显提高；粗脂肪消化率中，各组均有所提高，但 30%组与对照组差异不显著；粗纤维消化率中，各试验组显著降低；粗蛋白消化率 10%组显著提高，20%组和 30%组均有所降低。

血清生化指标方面，与对照组相比，10%组与 20%组白蛋白含量有所下降；试验组血清尿素氮均有所降低。血清抗氧化指标方面，谷胱甘肽过氧化氢酶与对照组相比，20%和 30%组明显提高。

在生长激素指标方面，10%组与 30%组生长激素含量明显降低；10%组与 20%组生长抑制素显著下降。10%组三碘甲状腺原氨酸减少的较为明显；试验组甲状腺激素均有显著提高。

本研究表明，新吉林黑猪后备母猪日粮中添加 10%-20%的全株玉米青贮与对照组相比，生长情况没有显著差异。但是 30%全株玉米青贮的添加则降低了母猪的生长性能。

主要参考文献

略

※ 作者简介：郝桐，在读硕士研究生，研究方向为畜牧。E-mail：158345948@qq.com。

※※ 通讯作者：李娜，研究员，硕士生导师，研究方向为猪的育种与养猪生产。E-mail：lina_0507@126.com。

脂质组学分析揭示发酵桑叶对豫西黑猪脂肪和肌肉组织中脂质谱的影响

侯俊杰[1※]，冀祥[1]，楚潇然[1]，史卓言[1]，王彬洁[1]，孙康乐[1]，魏海波[1]，宋祯[1,2]，文凤云[1,2※※]

（1.河南科技大学动物科技学院，河南洛阳 471000；2.洛阳市畜禽优质种质资源与遗传育种实验室，河南洛阳 471000）

引言

桑叶作为一种广泛使用的蛋白质补充饲料，在畜牧业中经常被视为一种降低饲料成本和提高肉质的策略。到目前为止，关于桑叶改善肉质的研究还很缺乏，确切的机制还不清楚。本文通过脂质组学技术探究发酵桑叶对豫西黑猪脂质沉积的影响以及脂质谱的变化。

材料与方法

试验选取洛阳栾川豫西黑猪保种场 60 头体重 120kg 的豫西黑猪，对照组和试验组各 30 头，试验组饲粮中添加 8%发酵桑叶，并对普通饲粮和试验饲粮进行营养配平。试验结束后分别取皮下脂肪组织和背最长肌 200g 在液氮中保存。本试验通过索氏抽提技术测定肌内脂肪含量，采用甘油三酯试剂盒测定肌肉和脂肪组织 TG 含量，通过脂质组学分析肌肉和脂肪的脂质分子组成，筛选出差异脂质代谢物进行显著性分析和聚类分析，然后对差异脂质代谢物的酰基碳链长度进行显著性分析和聚类分析，最后通过 KEGG 通路富集分析和 GO 功能富集分析筛选出差异脂质代谢物主要的作用通路。

结果与讨论

结果显示，发酵桑叶可显著降低背脂含量，但对肌内脂肪（IMF）无显著影响，脂肪组织和肌肉组织中分别鉴定出 98 个和 303 个显著差异（$P<0.05$）的脂质分子，包括甘油三酯（TG）、磷脂酰胆碱（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、鞘脂（SP），其中 TG 最为显著，包括 TG（19：1/18：0/18：1），TG（18：：1/13：0/18：2），TG（24：0/18：2/18：2），TG（24：0 /18：2/18：2），TG（12：1e/6：0/18：4）等，通过对甘油三酯的酰基碳链长度进行分析，发现长度为 13 个碳原子的酰基（C13）显著上调，但 C15、C16、C17、C23 显著下调。在肌肉组织的 TG 中 C12、C19、C23、C25、C26 显著下调，说明发酵桑叶在不同组织中对不同长度的 TG 酰基影响是不同的。试验还发现 C（14-18）在脂肪组织中的相关性较高，而在肌肉组织中 C（18-26）的相关性较高。通过 KEGG 通路富集分析，试验还分别鉴定出脂肪和肌肉组织中差异脂质代谢物贡献最大的 6 条和 4 条代谢通路，包括鞘脂代谢通路、甘油磷脂代谢通路、甘油脂代谢通路、亚油酸代谢通路等，这为探索发酵桑叶改善肉质的机制提供了新的思路。

主要参考文献

[1] Wu Y，Zhao J，Xu C，Ma N，He T，Zhao J，Ma X，Thacker PA，Progress towards pig nutrition in the last 27 years. J Sci Food Agric 100： 5102-5110 （2020）.

[2] Srivastava S，Kapoor R，Thathola A，Srivastava RP，Mulberry （Morus alba） leaves as human food： a new dimension of sericulture. Int J Food Sci Nutr 54： 411-416 （2003）.

※ 作者简介：侯俊杰，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail：1394172046@qq.com。

※※ 通讯作者：文凤云，博士，副教授，硕士生导师，奥本大学访问学者。研究方向为动物重要经济性状功能基因挖掘及肉质的营养与代谢调控机理。E-mail：newwfyun@haust.edu.cn。

谷氨酰胺通过 Wnt/β-catenin 信号通路调节猪肠上皮细胞生长

方永霞[1, 2, 3※]，陆恩庆[1, 2, 3]，朱敏[1, 2, 3※※]

（1.贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室，贵州贵阳 550025；2.贵州大学动物营养与饲料研究所，贵州贵阳 550025；3.贵州大学动物科学学院，贵州贵阳 550025）

引言

肠上皮细胞的发育、维持和功能与整个机体的健康密切相关，其功能受氨基酸和其他外部营养物质的影响很大。谷氨酰胺（Gln）作为合成核苷酸、葡萄糖、氨基酸和蛋白质的前体，是肠上皮细胞利用的主要代谢“燃料”，也是维持肠上皮稳态、屏障功能和促进肠上皮细胞增殖的关键营养素。体内外研究表明，Gln 通过改善肠道形态维持肠道屏障，参与调节屏障、紧密连接蛋白和免疫相关基因表达[1]。而且，体外研究证实，谷氨酰胺对肠上皮细胞的增殖具有促进作用[2]。Wnt/β-catenin 信号对肠上皮细胞的增殖和肠道干细胞的维持至关重要，谷氨酰胺是否通过 Wnt/β-catenin 促进肠上皮的发育仍不清楚，因此本研究以猪肠上皮细胞（IPEC-J2）为研究模型，探究 Wnt/β-catenin 信号通路在谷氨酰胺促进肠上皮发育中的作用。

材料与方法

本试验以猪肠上皮细胞为体外研究模型，采用 CCK-8、Western blotting、蛋白质组学和 RNA 干扰等技术检测谷氨酰胺处理下 IPEC-J2 细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的表达，以验证谷氨酰胺是否通过 Wnt/β-catenin 信号通路促进细胞增殖。

结果与讨论

本研究使用 IPEC-J2 细胞评估 Gln 促进细胞生长的分子机制，添加 1 mM 谷氨酰胺，IPEC-J2 细胞活力明显增加。蛋白质组学结合基因集富集分析（GSEA）表明 Gln 显著激活了 Wnt/β-catenin 信号通路，Western Blotting 进一步验证组学结果。随后利用 LF3 小分子抑制剂一种 β-catenin/TCF4 相互作用的拮抗剂以及构建 β-catenin 干扰细胞株，来探讨 Gln 是否通过 Wnt/β-catenin 信号通路促进猪肠上皮细胞增殖。结果表明，Gln 显著增加了 β-catenin、active-β-catenin、TCF4、cyclin D1、c-Myc 等 Wnt/β-catenin 信号通路关键靶标的表达；谷氨酰胺联合 LF3 共处理 IPEC-J2 细胞以及谷氨酰胺处理干扰 β-catenin 细胞时，与谷氨酰胺处理组相比，添加 LF3 或干扰 β-catenin 显著降低了 β-catenin、active-β-catenin、TCF4、cyclin D1、c-Myc 等蛋白的表达。Wnt/β-catenin 信号对维持肠上皮动态平衡十分重要，阻断 Wnt/β-catenin 信号通路会抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡。综上所述，谷氨酰胺可通过 Wnt/β-catenin 信号通路促进 IPEC-J2 细胞增殖。

主要参考文献

[1] Chen S，Xia Y，Zhu G，et al. Glutamine supplementation improves intestinal cell proliferation and stem cell differentiation in weanling mice[J]. Food & nutrition research. 2018，62.

[2] Gu A，Yang L，Wang J，et al. Protective effect of glutamine and alanyl-glutamine against zearalenone-induced intestinal epithelial barrier dysfunction in IPEC-J2 cells [J]. Research in veterinary science. 2021，137，48-55.

基金项目：国家自然科学基金（32202710），贵州省科技厅项目（黔科合基础-ZK[2022]一般 159）。

※ 作者简介：方永霞，在读硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：724843504@qq.com。

※※ 通讯作者：朱敏，副教授，研究生导师，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：mzhudky@gzu.edu.cn。

低蛋白日粮对河西猪生产性能和肠道菌群的影响

王东[1※]，陈国顺[1※※]，柴明杰[2]，张华[1]，刘帅帅[1]，李延翠[1]，车育彦[1]，孔梦洁[1]
（1.甘肃农业大学动物科学技术学院，甘肃兰州 730070；2.平凉市畜牧渔业站，甘肃平凉 744000）

引言

随着社会的快速发展，消费者对畜产品的需求已经从量转变到质，而我国地方猪种具有生产优质肉产品的潜能，加强地方猪种遗传资源保护与开发势在必行[1]。低蛋白饲料配方技术具备营养学理论基础解决了蛋白饲料的短缺的问题[2]。因此，本研究评价了低蛋白氨基酸平衡日粮对河西猪生长性能、屠宰性能、肉品质及肠道微生物的影响，以期为低蛋白氨基酸平衡日粮在地方养猪中的应用提供理论依据。

材料与方法

试验选取甘肃省高台县六禾农牧生态养殖场 27 头育肥期河西猪，试验猪饲养管理和免疫水平相同，基础日粮分别为高蛋白组（HP 16%CP）、中蛋白组（MP 14%CP）和低蛋白组（LP 12%CP）。预饲期为 7 天，试验期为 65 天。试验期结束后每组随机选择 6 头进行屠宰，对生长性能、屠宰性能、肉品质及肠道微生物进行测定分析。

结果与讨论

低蛋白日粮对河西猪生长性能无显著影响，MP 组河西猪的末重、ADG 和 F/G 略高于 HP 组，而 ADFI 低于 HP 组。LP 组的 ADFI 和 F/G 均高于其他两组。屠宰性能方面，MP 组和 LP 组的屠宰率分别提高了 2.49%和 6.18%，胴体斜长分别增加了 2.85%和 1.87%，剪切力分别减少了 2.43%和 15.57%，蒸煮损失分别减少了 24.02%和 11.59%；LP 组的背膘厚显著高于其他两组；HP 组的 pH 值下降幅度最大，为 1.02，其他两组的酸度下降较慢。空肠微生物差异比较发现，MP 组和 LP 组的空肠中独特 OTU 数量显著高于 HP 组。盲肠中 MP 组的独特 OTU 数量显著高于 HP 组和 LP 组。MP 组和 LP 组 Simpson 指数和 Shannon 指数均高于 HP 组；空肠中的 Euryarchaeota 菌门的相对丰度在 MP 组显著高于 HP 组；Euryarchaeota 菌门在 LP 组的相对丰度也比 HP 组高。MP 组和 LP 组其他菌门的相对丰度较 HP 组显著增加。盲肠中 Firmicutes 菌门在 MP 组和 LP 组的相对丰富度分别降低 2.92%和 5.75%，Bacteroidetes 菌门的相对丰度分别增加了 7.20%和 31.14%。空肠中，Lactobacillus 菌属在 MP 组和 LP 组中的相对丰度显著高于 HP 组；Streptococcus 菌属在 MP 组的相对丰度显著低于 HP 组。盲肠内容物中 MP 组和 LP 组 Lactobacillus 菌属相对丰度较 HP 组均有增加趋势。因此，日粮蛋白质水平的降低对河西猪的生长性能无不利影响，但可以提高生产性能和肉质，同时改善肠道菌群平衡。

主要参考文献

[1] 熊刚华，付木水，周莉芬等. 地方猪种遗传资源保护与开发探究[J]. 中国畜禽种业，2021，17（12）：95-96.

[2] Wang D，Chen G，Chai M，et al. Effects of dietary protein levels on production performance，meat quality and flavor of fattening pigs[J]. Front Nutr. 2022;9：910519. doi：10.3389/fnut.2022.910519

※作者简介：王东，在读博士研究生，研究方向为动物营生理与产品品质调控。E-mail：wangd@st.gsau.edu.cn，电话：18893813147
※※通讯作者：陈国顺，教授，博士生导师，研究方向为动物营生理与产品品质调控。E-mail：chengs@gsau.edu.cn。

饲粮中充足的色氨酸可通过色氨酸代谢物和肠道抗菌肽改善感染猪产肠毒素大肠杆菌的断奶仔猪的生长性能和肠道健康

陈 琛※，蒋丽雯，胡 红，胡志进，王林岗，冯 复，邱义彬，唐志如※※
（西南大学动物科技学院，重庆 400715）

饮食中充足的 L-色氨酸（Trp）支配着仔猪的肠道稳态。然而，日粮中充足的 Trp 对猪肠毒性大肠杆菌（ETEC）的防御作用仍然知之甚少。试验选用 60 头 24 日龄断奶（6.15 ± 1.52kg）的杜×长×大仔猪进行 2×2 因子设计的肠毒性大肠杆菌攻毒试验。试验动物随机分为 4 组，每组 15 头，分别饲喂含 0.14%Trp（试验第 22 天口服 1 mL 0.85%生理盐水，LT）、含 0.35%Trp（第 22 天口服 0.85%生理盐水 1 mL，HT），含 0.14%Trp（第 22 天口服含 1×10^9 CFU/mL ETEC K88 的 0.85%生理盐水 1 mL，LTK）、含 0.35%Trp（第 22 天口服含 1×10^9 CFU/mL ETEC K88 的 0.85%生理盐水 1 mL，HTK）的基础日粮，每天 3 次，持续 28 天。HT、HTK 组仔猪的生长（ADG、ADFI、GH）、免疫因子（IL-10、IgA、IgG、IgM）、色氨酸代谢产物 5-TH、抗氧化能力（SOD、GSH-PX）、肠道形态（空肠和结肠 VH）、β-防御素（空肠 BD-127 和 BD-119、回肠 BD-1 和 BD-127）的 mRNA 表达、结肠内容物有益微生物（*Prevotella 9*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Faecalibacterium*）的丰度均高于 LT、LTK 组（$P < 0.05$），而 FCR、腹泻率、腹泻指数、血清中的 Trp、Kyn、IDO、D-LA、ET、MDA、结肠内容物有害微生物的丰度（*Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Prevotella*, *Christensenellaceae R7*）均低于 LT、LTK 组（$P < 0.05$）。高 Trp 能降低 ETEC K88 攻毒后毒力基因（K88 和 LT）的表达（$P < 0.05$）。LT 组仔猪的 ADG、ADFI 高于 LTK 组（$P < 0.05$），而 FCR、腹泻率、腹泻指数低于 LTK 组（$P < 0.05$）。HTK 组的 IL-6、TNF-α 低于 LT 和 LTK 组（$P < 0.05$）。HT 和 HTK 组的 IGF-1、CAT、TPH 高于 LTK 组（$P < 0.05$）。HT 组仔猪的 Trp、Kyn、IDO、TPH 均高于 HTK 组（$P < 0.05$）。HT 组的 *Fibrobacteres* 丰度高于 HTK 组（$P < 0.05$）。HT 组的 *Megasphaera*、*Subdoligranulum* 的丰度高于 LT、LTK、HTK 组（$P<0.05$）。综上所述，Trp 充足的日粮可增强断奶仔猪对 ETEC K88 入侵的防御能力，降低肠道有害菌的相对丰度，降低腹泻率，提高生长性能，促进肠道黏膜免疫和抗氧化能力。

基金项目：国家自然基金（31772610）；国家重点研发计划（2018YFD0501000）；重庆市留学人才创新计划重点项目(cx2017024)。
※ 作者简介：陈琛，1994 年 2 月，在读博士研究生。E-mail：m15587125971@136.com。
※※ 通讯作者：唐志如，1977 年 12 月，研究员，博士，博士生导师。E-mail：tangzhiru2326@sina.com。

牛磺酸缓解断奶仔猪肠道氧化损伤及其对生长性能的改善作用

王林岗，唐志如*
（西南大学动物科技学院，重庆 400715）

仔猪的早期断奶会引起机体产生高浓度的自由基，会氧化损伤仔猪的肠道，引起消化不良、生长缓慢、腹泻、菌群失调和肠源感染等疾病。牛磺酸可通过提高电子传递链蛋白组分的更新效率、激活核因子 Nrf2 并上调其下游抗氧化酶基因的表达和增强谷胱甘肽氧化还原系统的反应能力三种主要机制发挥其抗氧化性能，在断奶仔猪日粮中添加适量牛磺酸能够维护肠道形态结构、修复肠道防御屏障和改善肠道微生物菌群。牛磺酸是仔猪生长阶段重要的机体调节剂，为了探讨日粮中不同水平牛磺酸在断奶仔猪中的实际应用效果，进行了这项研究。选取 48 头 28 日龄杜×长×大杂交断奶仔猪（6.71±0.73 Kg），分配到 4 个组（组间的性别比例、平均体重和体重标准差均无显著差异），每组 12 个重复，每个重复 1 头猪。CON 组饲喂基础日粮，L-Tau、M-Tau 和 H-Tau 组分别在基础日粮中添加浓度为 0.2%、0.3%和 0.4%的牛磺酸。试验期 30 日结果表明：与对照组相比，随着日粮中牛磺酸添加剂量的增加，抗氧化酶活性和机体抗氧化能力显著上调（一次，P<0.05），空肠粘膜紧密连接蛋白 ZO-1、OCLN 和 CLDN-1 表达丰度显著上调（一次，P <0.05），空肠和回肠的绒毛高度和绒毛高度/隐窝深度显著上调（一次，P <0.05），盲肠微生物区系显著改善（一次，P <0.05），腹泻指数显著降低（一次，P <0.05），饲料转化率显著升高（一次，P <0.05）。饲料中添加适量的牛磺酸能够通过增强机体的抗氧化能力显著缓解仔猪肠道的氧化损伤，因此提高仔猪对饲料的消化吸收能力。

主要参考文献：

略

酿酒酵母有机铁替代硫酸亚铁对断奶仔猪生长与健康的影响

蒋丽雯，胡志进，陈琛，王林岗，冯复，邱义彬，唐志如※
（西南大学动物科学技术学院，重庆 400715）

相比于无机铁，有机铁有着更高的生物学效价，并且安全稳定，对环境污染小, 有望取代无机铁作为饲料铁源。本研究旨在研究酿酒酵母制备的有机铁（酵母铁）对断奶仔猪生长性能、血常规、肝功肾功、免疫、抗氧化、器官指数、消化吸收、肠道形态和盲肠菌群的影响。将健康的 28 日龄断奶仔猪分为 4 组：基础日粮含铁 104 mg/kg（硫酸亚铁，CON）、84 mg/kg（酵母铁，LSC）、104 mg/kg（酵母铁，MSC）和 124 mg/kg（酵母铁，HSC）。实验持续 35d。与 CON 组相比，HSC 组的增重明显提高($P < 0.05$)。LSC、MSC 和 HSC 组的血红蛋白含量和红细胞体积均高于 CON 组($P < 0.05$)。血清中，MSC 和 HSC 组的白细胞介素 IL-4 和免疫球蛋白 IgA 水平高于 LSC 和 CON 组($P < 0.05$)，LSC、MSC 和 HSC 组的 IL-10 水平均高于 CON 组($P < 0.01$)，并且在空肠粘膜中，LSC 组、MSC 组和 HSC 组的 IL-6 和 TNF-α 含量均低于 CON 组（$P < 0.01$），MSC 和 HSC 组的肠道屏障相关蛋白 claudin、ZO-1 和 occludin 含量均高于 CON 组。MSC 和 HMS 组断奶仔猪的血清过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性、超氧阴离子、谷胱甘肽、羟基自由基清除率、总抗氧化能力、肝脏超氧阴离子清除率和过氧化物酶均高于 CON 和 LSC 组（$P < 0.05$），而一氧化氮和过氧化物含量低于 CON 和 LSC 组（$P < 0.05$），MSC 组高于 CON（$P < 0.01$）。在器官指数方面，LSC、MSC 和 HMS 组的肝脏和胆囊指数均高于 CON 组($P < 0.01$)，而 MSC 和 HSC 组的肾脏和肾上腺指数均高于 CON 组和 LSC 组($P < 0.05$)。此外，MSC 和 HSC 组仔猪的回肠和空肠长度指数以及空肠绒毛高度均高于 CON 和 LSC 组($P < 0.01$)。通过消化试验发现，LSC、MSC 和 HMS 组对铁的表观消化率高于 CON 组（$P < 0.01$），粪便铁含量低于 CON 组（$P < 0.01$）。CON 和 LSC 组中乳酸杆菌的丰度高于 MSC 和 HSC（$P > 0.01$）。结果表明，与含 104 mg/kg 硫酸亚铁的日粮相比，含 104 和 124mg/kg 酵母铁的日粮对断奶仔猪的生长性能、免疫力、抗氧化性、肠道形态、盲肠微生物区系的结构和丰度影响更好，含 84 mg/kg 酵母铁的日粮与含 104 mg/kg 硫酸铁的日粮效果相似，而含 104 或 124 mg/kg 酵母铁的日粮效果优于含 104 mg/kg 硫酸盐铁的日粮。

基金项目：重庆市自然科学基因(cstc2021jcyj-msxmX0966)、重庆市留学人员重点创新项目(cx2017024)、中国学位与研究生教育学会农林学科委员会 2021-研究课题(2021-NL2X-YB76)、湖南省自然科学基金项目(2022JJ30353)、四川省科技计划项目(2023YFQ0031, 2023ZHYZ0007)
※ 通讯作者：唐志如，研究员，博士，博士生导师。E-mail：tangzhiru2326@sina.com；

疫病与防治专题

口述报告

高通量扩增子测序实现 15 种猪病原的快速、精准检测

左 扬※
（中国农业大学，北京 100193）

多种病毒、细菌和其他病原单独或混合感染能引起猪产生多种临床症状，甚至死亡，给猪养殖业造成巨大经济损失。而病原的诊断方法通常为核酸检测、抗原检测等，一般来说每种检测手段大多都是单一地针对某种病原，尚不能实现多种病原同时快速、精准诊断。此外，当今猪场疫病检测应用最广泛的荧光定量检测手段最多只能检测 3~5 种病原，但也只能进行病原基因的诊断，而不能在疾病诊断的基础上进一步检测出病原基因突变，从而发现新的变异病原。因此，本研究拟建立一种能快速、精准检测 15 种猪病原的高通量测序方法，并将其应用于患病猪的多种样本检测，旨在为养猪场病原诊断提供新方法。

本试验基于 MGI 测序平台 MGISEQ-200 设计了针对 15 种猪病原的高通量扩增子靶向测序 panel，包括 7 种病毒性病原，即非洲猪瘟病毒、猪呼吸道与繁殖综合征病毒（北美型、欧洲型）、猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒（2 型、3 型）、经典猪瘟病毒、口蹄疫病毒和猪流感病毒；4 种细菌性病原，即副猪嗜血杆菌、猪多杀性巴氏杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌和猪链球菌；以及 4 种其他类型病原，即猪附红细胞体、猪弓形虫、猪鼻支原体和猪肺炎支原体。每种病原包括 2~8 个靶标基因，每个靶标基因设计 3~4 对扩增子。Panel 包含 151 对扩增子组成的特异性引物池，构建扩增子测序文库后进行分析，最终通过高通量测序将该 panel 成功应用于患病猪的全血、血清、鼻拭子、咽拭子以及肺组织等样本的病原检测，实现了 15 种猪病原的快速、精准检测。

测序完成后生成一份总结报告，报告显示测序质量高，≥ Q30 的数据结果在 90%以上，Barcode 能被正常识别，所有样品均被正确区分。经生物信息学分析，所有样本均检出 panel 种的靶标基因，颜色越深，病原载量越大。靶标基因检出即对应病原检出，可以看出 96%（24/25）的样本为两种及两种以上病原感染。

本研究采用靶向扩增技术富集宏基因组中的靶标基因，旨在实现的对患病猪进行 15 种常见病原的快速同时检测。可以看出，扩增子测序将在猪的病原筛查中发挥重要作用，并且该方法已成功应用于患病猪的血液、血清、肺组织、鼻拭子和咽拭子等样品，同时也可以扩展到其他样本类型，如唾液、痰液或其他宏基因组样本。未来可将该方法推广于各大猪场，应用于患病猪多病原的同时鉴定，为临床诊断、猪场疫病防控和生物安全提供有力支持。

主要参考文献

M. A. A. Mehmet Olcu, Duygu Percin Renders., Development of multiplex PCR panel for detection of anaerobic bacteria in clinical samples[J]. Anaerobe, 2022, 76, 102611.

※ 作者简介：左扬（1998-），女，北京市海淀区人。E-mail：zy15901128739@163.com。
※※ 通讯作者：左扬，E-mail：zy15901128739@163.com,手机号：15901128739。

嗜淀粉乳杆菌外泌体缓解黄曲霉毒素 B1 诱导的小鼠肠道屏障损伤和炎症

刘云欢※，李金艳，刘金燕，史梦蝶，王禹博，陈兴祥，黄克和
（江苏省南京农业大学，江苏南京 210095）

引言

黄曲霉毒素 B1（AFB1）是一种普遍存在于食品和饲料中的污染物，对动物胃肠道造成严重损伤。益生菌在生长过程中产生的外泌体 （EVs） 携带各种生物活性分子，参与细胞间的信号调节，调控机体健康。但益生菌-嗜淀粉乳杆菌来源的外泌体 （LA-EVs） 对于 AFB1 诱导的小鼠肠道损伤的保护作用及机制尚未见报道。

材料和方法

本研究首先利用密度梯度离心法和电镜制备猪粪便来源的 LA-EVs；然后，使用 0.75 mg/kg AFB1 灌胃 28 d，构建小鼠 AFB1 中毒模型，LA-EVs（25μg/d）灌胃给予 AFB1 中毒小鼠，观察其保护作用；通过 16s rRNA 菌群分析、差异代谢组学，抗生素处理和 AHR 抑制剂，进一步揭示 LA-EVs 对 AFB1 中毒小鼠的保护作用机制。

结果与结论

成功分离得到纳米级的嗜淀粉乳杆菌来源的外泌体；与空白对照组相比，AFB1 暴露组小鼠肠道组织结构出现严重破坏，炎性因子表达量显著增加，回肠组织中紧密连接蛋白（ZO-1，Occludin，Claudin 1）和黏蛋白-2 （MUC-2） 表达显著降低；LA-EVs 处理可以显著改善以上结果。研究结果进一步表明，LA-EVs 通过调节肠道菌群，增加肠道中吲哚三乙酸（IAA）的水平，从而激活小鼠肠道中芳香烃受体 （AHR） 表达并显著增加下游 CYP1A1 的表达，促进 IL-22 的分泌，修复肠黏膜屏障，最终缓解 AFB1 中毒导致的小鼠肠道屏障损伤和炎症。LA-EVs 通过调节肠道菌群，激活肠道 AHR/IL-22 信号通路，缓解 AFB1 诱导的小鼠肠道屏障损伤和炎症。

主要参考文献

略

※ 通讯作者：刘云欢，副教授，硕士导师，研究方向为动物营养代谢病与免疫。E-mail：liuyunhuan@njau.edu.cn。

MARCO 通过加剧 PRRSV GP5 诱导的 PAMs 凋亡抑制病毒感染

张晓晓[1, 2※]，陈永杰[1, 2]，李松倍[1, 2]，郭春和[1, 2※※]
（1.华南农业大学兽医学院，广东广州 510640；2.岭南现代农业科学与技术广东省实验室，广东广州 510640）

引言

由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）导致的猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）给养猪业造成巨大的经济损失。由于 PRRSV 引起免疫抑制，现有的疫苗不能有效地控制该病的发生和流行。干预病毒糖蛋白与受体的互作有望成为一种高效的防控策略。GP5 是 PRRSV 的主要糖蛋白，参与病毒入侵。课题组利用猪 cDNA 酵母双杂交文库，以 GP5 为诱饵，筛选与其互作的宿主膜蛋白，共鉴定到 49 个膜蛋白。其中，具有胶原结构域的巨噬细胞受体 MARCO （Macrophage receptor with collagenous structure）与 CD163 受体具有诸多相似性，且被多次报道参与病毒入侵。目前，MARCO 在 PRRSV 感染中的作用尚不清楚，本研究拟探究 MARCO 在 PRRSV 感染中的功能。

材料与方法

通过 Co-IP 等进一步验证经酵母双杂交证明的 MARCO 与 GP5 互作；利用配体封闭在猪肺泡巨噬细胞（PAMs）中过表达或敲低验证 MARCO 对病毒吸附内化及增殖的影响；构建 MARCO 不同结构域缺失突变体，明确在病毒感染中发挥功能的重要结构域；通过凋亡双染实验探究 MARCO 对病毒及 GP5 诱导的细胞凋亡的影响。

结果与讨论

PRRSV 感染导致 MARCO 在 PAMs 及猪肺组织中的表达量下降。共聚焦及 Co-IP 实验进一步证明 MARCO 与 GP5 互作。然而，利用配体封闭 MARCO 或者在 PAMs 中过表达 MARCO 均不影响 PRRSV 进入细胞，表明 MARCO 不是 PRRSV 的进入受体。在 PAMs 过表达 MARCO 抑制 PRRSV 增殖，相反，敲低 MARCO 则促进病毒增殖，证明 MARCO 是 PRRSV 的宿主抑制因子。MARCO N 端的胞质尾结构域对其抑制病毒发挥重要作用，并且缺失该结构域的 MARCO 主要集中在细胞质中，不再定位于细胞膜。PRRSV 感染导致 PAMs 凋亡，GP5 是 PRRSV 诱导细胞凋亡的重要病毒因子。MARCO 自身不能引起 PAMs 凋亡，但可以加重 PRRSV 或 GP5 诱导的凋亡。因此，推测 MARCO 与 GP5 的相互作用可能是其在 PRRSV 感染过程中促进 PAMs 凋亡的原因。使用凋亡抑制剂处理有效地抑制 PRRSV 诱导的 PAMs 凋亡，同时缓解了 MARCO 过表达对病毒的抑制作用，表明 MARCO 通过加剧 PAMs 凋亡抑制病毒增殖。综上，本研究揭示了 MARCO 新的抗病毒机制，将为制定 PRRS 防控策略提供理论依据。

※ 作者简介：张晓晓，博士研究生，研究方向为病毒-宿主相互作用。E-mail：13246815692@163.com。
※※ 通讯作者：郭春和，教授，博士生导师，研究方向为 PRRSV 致病机理、病毒-宿主相互作用。 E-mail：guochunh@mail.sysu.edu.cn。

circ_0020647 促进 ETEC 诱导猪小肠上皮细胞焦亡的作用机制研究

朱凯晴※，李　妍※※
（河北农业大学动物医学院，河北保定 071001）

引言

产肠毒素大肠杆菌（Enterotoxigenic Escherichia coli，ETEC）是引起仔猪初生和断奶后腹泻的主要病原之一[1]。环状 RNA（circularRNA，circRNA）是由 mRNA 前体反向剪接连接产生的非编码 RNA 分子，有研究发现 circRNA 参与动物肠道细胞的免疫调控[2]。本研究对 ETEC 感染 IPEC-J2 细胞样本进行高通量测序，并对差异表达 circRNA 分析，旨在研究 circRNA 在 ETEC 感染初期的调控机制和作用通路。

材料与方法

ETEC F14 菌株和 IPEC-J2 细胞均为本实验室保存。采用高通量测序平台对 ETEC 感染 IPEC-J2 细胞进行转录组测序，用实时荧光定量 PCR 验证 circRNA 表达情况及核糖核酸酶 R（RNase R）消化结果。经过 GO 功能和 KEGG 通路富集分析筛选出 ETEC 感染末期相关 circRNA，选择感染末期极显著上调 circ_0020647 为研究对象，通过 miRanda 预测与其结合的 microRNA（MiRNA），并找到下游靶基因，通过实时荧光定量 PCR、双荧光素酶实验和拯救实验验证靶标关系和功能研究。

结果与讨论

10 条随机挑选差异表达 circRNAs 在荧光定量 PCR 与测序结果一致，通过 RNase R 消化后，实时荧光定量 PCR 检测到 circRNAs 相对表达量与未消化组无显著变化，说明 circRNA 确为环状结构。GO 分析和 KEGG 通路富集分析表明末期主要参与肿瘤和癌症等过程，可能与细胞程序死亡相关。测序和实时荧光定量 PCR 确定候选 circ_0020647 在感染末期有极显著的差异表达变化。通过 miRanda 预测、实时荧光定量 PCR 和双荧光素酶试验初步确定 circ_0020647/ssc-miR-185/BRD4 轴的上下游关系。在拯救实验中敲低 circ_0020647 时 BRD4 表达量下降，敲低 ssc-miR-185 而表达上调。焦亡相关蛋白 caspase-1、GSDMD 和 NLRP3 表达量变化与 BRD4 一致，另外在 ETEC 感染下敲低 BRD4 通过实时荧光定量 PCR 检测到焦亡相关蛋白表达量下降。本研究确定 circ_0020647 在感染后表达显著上调，通过对 ssc-miR-185 的海绵效应调控 BRD4 表达，促进 ETEC 感染诱导的细胞焦亡。

主要参考文献

[1] DUBREUIL J D，ISAACSON R E，SCHIFFERLI D M. Animal Enterotoxigenic Escherichia coli[J]. EcoSal Plus，2016，7（1）：10.1128.

[2] CHEN L，WANG C，SUN H，et al. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis[J]. Briefings in Bioinformatics，2021，22（2）：1706-1728.

※ 作者简介：朱凯晴，在读硕士研究生，研究方向为细胞生物学和分子免疫学。E-mail:zhukaiqing0228@163.com。
※※ 通讯作者：李妍，副教授，硕士生导师，研究方向为细胞生物学和分子免疫学。E-mail: dyly@hebau.edu.cn。

宏感染组特征分析揭示腹泻猪群的复杂共感染模型

邢家宝[1※]，王衡[1]，施莽[2]，郑泽中[1]，龚浪[1]，孙彦阔[1]，张桂红[1※※]
（1.华南农业大学兽医学院广东省人畜共患病防控重点实验室，广东广州 510642；
2. 中山大学医学院深圳校区，深圳 518107）

引言

生猪腹泻主要由传染性病原体引起，会导致食欲下降、消化不良、肠道炎症、生态失调和体重减轻乃至仔猪死亡等生产问题，这些因素也同时影响现代农业系统中生猪集约化养殖的生产力和绩效。在仔猪腹泻模型中，病原体的出现往往不是单独出现的。相反，不同病原共同作用，表征该病征为集约化养殖中常见的现象[1]。然而，这些引起腹泻的病原体之间的相互作用、时空分布特征，以及它们与多器官复杂疾病中其他并发病原体的相互作用很少被深入挖掘。

材料方法

本研究使用宏转录组学方法综合揭示了来自不同养猪场的 122 例急性腹泻病例中传染性泛病原体（包括细菌，真菌，病毒，寄生虫）的流行率、体内感染丰度、遗传进化历史和以及其互作动态，其中包括 47 个包含其他部位的病理表征的混合样本。

结果与讨论

样本分为两组：“肠道”和“混合组织”，从样本中共确定了 43 种致病微生物，包括 37 种病毒和 6 种对猪群健康具有显著性影响的原核生物。遗传进化分析揭示了重要猪病原体的高度特异性的进化动态。比如，PRRSV NADC34-like 毒株在国内流行率的明显上升，以及 SADS-CoV 在广西再次被检出等（Spike 基因相似度仅为 93.7%）[2]。对病原流行动态进行 alpha 和 beta 多样性分析表明，季节性更替是影响肠道病原体组成变化的最重要因素，在冬季时共感染的病原多样性更加丰富，显著高于其他季节。然而，在空间分布上基本无差距。在共感染特征方面，观察到 PEDV 和 Rotavirus A 的共感染频率最高，其次是一些细菌性病原的继发感染。值得注意的是，共感染出现显著性正相关的病原是一些亚临床感染的病原，如 Kobuvirus、EnterovirusG、和 RotavirusB、C 等，提示其共同出现的频率最高。对两种不同采样分类感染组的比较分析。得出了多器官复杂疾病背后的致病群落的高度异质性，绝大多数的混合感染样本均与 PRRSV 有关，这在一定程度上也能反映国内猪场的主要问题，即 PRRSV 存在时宿主先天性免疫防御水平降低后其他病原的继发感染。

结论

宏转录组学方法揭示了猪腹泻的复杂感染组特征，共感染趋势。该结果不仅为兽医在临床诊断时了解传染性疾病的互作动态提供宝贵的先验知识，而且为了解猪腹泻致病微生物群落动态提供参考，为疾病预防和控制策略提供关键信息。

主要参考文献

1. Huang X，Wu W，Tian X，Hou X，Cui X，Xiao Y，et al. A total infectome approach to understand the etiology of infectious disease in pigs[J]. Microbiome，2022，10（1）.

2. Zhou P，Fan H，Lan T，Yang XL，Shi WF，Zhang W，et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin[J]. Nature，2018，556（7700）：255-8.

※ 作者简介：邢家宝，在读硕士研究生，研究方向为生物信息学与流行病学。E-mail：jobsxing@stu.scau.edu.cn。
※※ 通讯作者：张桂红，教授，博士生导师，研究方向为生猪疫病防控。E-mail：guihongzh@scau.edu.cn。

PRRSV 促进 DDX10 的自噬性降解拮抗其抗病毒作用

周艳荣[1※]，李佳[1]，段锴琪[1]，柯淇匀[1]，方六荣[1]，肖少波[1※※]
（1.华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；
2.湖北省生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）是一种典型的免疫抑制性病毒，具有复杂的免疫抑制和免疫逃逸机制，给新型疫苗和药物开发带来巨大挑战。DEAD-box（DDX）解旋酶是一类 ATP 依赖的 RNA 解旋酶，越来越多的研究证实 DDX 参与调控天然免疫和病毒增殖，是潜在的抗病毒药物靶标，但调控 PRRSV 的 DDX 的报道较缺乏。因此，本研究筛选了影响 PRRSV 增殖的 DDX，并对其调控机制进行了探究，旨在为开发抗 PRRSV 药物提供理论基础。

材料与方法

本试验利用流式细胞术、$TCID_{50}$ 等实验检测病毒增殖情况，采用双荧光素酶等实验分析 IFN-β 信号通路的活性，通过 Co-IP 实验筛选互作蛋白，采用核质分离等实验检测 DDX 定位的变化，利用 CRISPR-Cas9 技术分析 p62、ATG5、ATG7 等蛋白的作用。

结果与讨论

本研究利用表达绿色荧光蛋白（EGFP）的重组 PRRSV 高通量筛选 40 个 DDX 家族蛋白，发现 DDX4、DDX21 和 DDX27 促进 PRRSV 增殖，而 DDX10 和 DDX49 抑制 PRRSV 增殖，并对其中抑制 PRRSV 增殖最为显著的 DDX10 进行深入研究。机制研究发现，DDX10 通过正调控 IFN-β 产生、转录因子 IRF3 和 NF-κB 活化以及干扰素刺激基因（ISGs）表达拮抗 PRRSV 增殖，但这种效应并不依赖于 DDX10 的 ATP 酶活性和 RNA 解旋酶活性。此外，发现 PRRSV 感染促进 DDX10 从细胞核移位至细胞质，并通过自噬溶酶体途径降解 DDX10。同时，发现 PRRSV 编码蛋白中只有包膜（Envelop，E）蛋白与 DDX10 存在互作，并降解 DDX10，且上调 LC3-II 的表达；而自噬溶酶体途径的特异性抑制剂（NH_4Cl）处理或自噬关键基因 ATG5/ATG7 敲除均能阻断 E 蛋白对 DDX10 的降解，提示 E 蛋白通过自噬溶酶体途径降解 DDX10。核质分离实验也进一步证实 PRRSV 通过 E 蛋白促进 DDX10 从细胞核移位至细胞质并发生自噬性降解。筛选与 DDX10 互作的自噬受体蛋白，发现只有 p62 与 DDX10 相互作用，敲除 p62 几乎完全阻断了 E 蛋白对 DDX10 的降解，表明 E 蛋白以选择性受体 p62 依赖的方式降解 DDX10。上述研究结果揭示了 PRRSV 利用选择性自噬逃逸天然免疫反应的新机制，并为抗 PRRSV 药物开发提供了新靶点。相关研究内容已发表于国际学术期刊 Autophagy （2023，1-18）[1]。

主要参考文献

[1] Li J，Zhou Y R，Zhao W K，et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus degrades DDX10 via SQSTM1/p62-dependent selective autophagy to antagonize its antiviral activity [J]. Autophagy， 2023，1-18.

※ 作者简介：周艳荣，副研究员，硕士生导师，研究方向为猪病毒学。E-mail：yrzhou@mail.hzau.edu.cn。
※※ 通讯作者：肖少波，教授，博士生导师，研究方向为动物病毒学。E-mail：vet@mail.hzau.edu.cn。

全球非洲猪瘟幸存猪临床案例分析

戈胜强[1]，徐天刚[1]，胡永新[1]，左媛媛[1]，李玉杰[2]，韩乃君[1]，
李金明[1]，包静月[1]，兰邹然[2]，王志亮[1]*
（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2. 山东省动物疫病预防与控制中心，山东济南 250109）

摘要： 按临床表现，非洲猪瘟（African swine fever，ASF）可分为最急性、急性、亚急性和慢性四个类型。大多数情况下，强毒株感染家猪/欧亚野猪后会引起高热、食欲下降、皮肤和多内脏器官出血，在 3-10 天内死亡，有的猪死亡前无任何临床症状，死亡率可高达 100%。但在某些情况下，猪群感染非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）后，个别猪只会幸存下来，这种情况临床常称之为“幸存猪”或“存活猪”（文后统称为“幸存猪”）。“幸存猪”可进一步划分为 2 种类型。第一种类型是感染猪只出现 ASF 典型临床症状后逐渐康复，临床可称之为“感染存活猪”、“耐过猪”或“康复猪”。此类猪一般是感染了中等毒力以上毒株，可能存在排毒风险，因此也有文献将其称为“病毒携带猪”，为便于表述，下文统称为“耐过猪”。第二种类型是猪只未表现出任何临床症状，可称之为“无症状猪”或“隐性感染猪”。这种情况可能是猪只未实际接触到 ASFV 或感染了低毒力毒株。

ASF 长时间流行传播过程中，特别是在同一地区持续存在或频繁在家猪/野猪、野猪/野猪之间传播流行，容易出现“耐过猪”。“耐过猪”现象受到多种因素影响，如生态环境、当地兽医体系能力、每平方公里内猪只密度、当地家猪或野猪的种群情况和疫病流行趋势等，特别是与 ASFV 的自然进化紧密相关（如 ASFV 基因组中广泛分布的重复序列可能诱发同源重组，进而导致毒株的多样性）。虽然，易感猪感染 ASF 后幸存的机制尚不清楚，但部分观察/研究显示，ASF 疫情暴发后，“耐过猪”获得抵御 ASF 感染的可能原因是其曾经长时间/重复暴露在低剂量的病毒污染环境中，或接触的病毒是低毒力的毒株。上述原因恰与我国当前 ASF 流行形势相似，即 ASF 已在我国定植，污染面较大且临床中存在毒力减弱的变异株流行。

ASF“耐过猪”的持续存在/增多会大大增加疫病早期发现的难度，且“耐过猪”及其猪肉制品中可能存在活病毒，更会在一定程度下造成更大范围的扩散。因此，这迫使我们需要持续开展监测工作，更快/更准确地了解病毒流行/进化情况，找准有效切入点采取更有效防控措施，切断疫病传播途径，为从有效控制逐步过渡到净化、根除阶段提供坚实基础。

关键词：非洲猪瘟；幸存猪；防控

主要参考文献

略

PRRSV 感染中铁代谢调控及铁死亡机制的研究

李长艳※，黄金海※※
（天津大学生命科学学院，天津 300110）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus，PRRSV）的传播速度快，发病率高，致死率高，且目前缺少有效的防御治疗手段，严重威胁全球养猪业的发展[1]。机体铁代谢稳态易在病原感染和炎性疾病期间被破坏，而且铁代谢紊乱与细胞铁死亡的发生密切相关[2]。病原体可诱导宿主细胞发生铁死亡，促进其增殖或逃避宿主免疫监视[3]。现有关铁代谢、铁死亡与病原感染之间的相互作用仍有待完全阐明。本研究探究了 PRRSV 感染后引起宿主细胞铁代谢异常，并导致细胞发生铁死亡的新机制，皆在为 PRRSV 的防治提供新角度。

材料与方法

PRRSV 感染细胞的转录组测序分析发现，铁代谢基因 STEAP3 表达显著上调，并且部分与铁死亡发生相关的驱动基因、抑制基因和标志基因也存在显著变化。通过 qRT-PCR、Western Blot 等实验进一步验证基因变化程度，利用 FerroOrange 对活细胞内的 Fe^{2+}进行荧光成像，并使用荧光探针 DCFH-DA 和 BDP 581/591 C11 检测宿主细胞 ROS 和脂质过氧化，以表征宿主细胞铁死亡水平。通过柠檬酸铁胺和去铁胺以及铁死亡抑制剂、诱导剂的添加探究 PRRSV 感染导致的铁死亡对其增殖的影响。通过过表达、敲低 STEAP3、质谱等实验探究其在宿主细胞铁死亡发生中的作用和途径。

结果与讨论

转录组数据分析发现，铁还原酶 STEAP3 在 PRRSV 感染后显著上调，并伴随着胞内 Fe^{2+}水平升高，细胞出现铁死亡现象，PRRSV 的增殖受到抑制。通过柠檬酸铁胺和去铁胺的添加进一步说明胞内 Fe^{2+}增多导致铁死亡，并且抑制 PRRSV 增殖。质谱数据分析显示 STEAP3 与 TMEM33 存在互作关系，PRRSV 感染后两者互作域的共定位增强，STEAP3 蛋白的铁还原活性加强，胞内 Fe^{2+}增加，直接影响铁死亡。本研究阐明了 STEAP3 在 PRRSV 感染后造成的宿主细胞铁代谢失衡和铁死亡中的重要作用和途径，从铁死亡角度为 PRRSV 的防御与治疗提供了新思路。

主要参考文献

[1] LUNNEY J K，FANG Y，LADINIG A，et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus（PRRSV）：Pathogenesis and Interaction with the Immune System [J]. Annu Rev Anim Biosci，2016，4： 129-54.

[2] HASCHKA D，HOFFMANN A，WEISS G. Iron in immune cell function and host defense [J]. Semin Cell Dev Biol，2021，115： 27-36.

[3] GAO J，WANG Q，TANG Y D，et al. When ferroptosis meets pathogenic infections [J]. Trends Microbiol，2023，31（5）：468-79.

※ 作者简介：李长艳，在读硕士研究生，研究方向为病毒与免疫。E-mail：lichangyanlcy@163.com。
※※ 通讯作者：黄金海，教授，博士生导师，研究方向为病毒与免疫。E-mail：jinhaih@tju.edu.cn。

猪蓝耳病净化技术在一点式猪场生产体系中的应用

胡睿铭[1※]，张田生[2]，赖荣斌[2]，龙毅[2]，丁珍[1]，刘濠[1]，曹华斌[1]，郭小权[1]，胡国良[1]，丁能水[1,2]，邓舜洲[1※※]

（1. 江西农业大学动物科学技术学院，江西南昌 430070；2. 傲农集团福建省猪营养和饲料科学重点实验室 福建漳州 363000）

引言

猪繁殖与呼吸综合征俗称猪蓝耳病，是一种由蓝耳病毒引起的，对养猪业危害巨大的病毒性传染病。猪蓝耳病疫苗能够在一定程度上降低该病造成的经济损失，但是不能将蓝耳病毒彻底清除。蓝耳病净化是唯一种能够在猪场实现蓝耳病毒彻底清除的方法，这种方法的本质是在闭群生产的基础上，通过同期感染、同期康复的原理，实现全群的猪蓝耳病毒净化[1, 2]。猪蓝耳病净化在国内外取得了一定的成功，但是已有的报道多是集中在多点式生产体系中。一点式生产体系中蓝耳病净化的难度要显著高于多点式生产体系，而我国目前大多数猪场仍然是一点式生产体系。因此，本研究旨在探讨在一点式生产体系中，如何使用尽可能少的成本，完成猪蓝耳病的净化。

猪场背景

本次猪蓝耳病净化案例是一家原种母猪场，生产模式为一点式生产，规模为 1252 头母猪，630 头后备母猪。该猪场从建场开始一直保持猪蓝耳病双阴性生产，其他常见疾病均得到有效控制，并且生产成绩良好。2020 年 8 月 11 日，猪场发生猪蓝耳病疫情，猪群出现集中的流产风暴，母猪和仔猪群均出现蓝耳病的典型症状。PCR 检测和测序证明，猪场感染了 JXA1 类型的蓝耳病毒。本研究在标准的闭群净化方案的基础上，针对该猪场一点式生产的实际情况，设计了猪蓝耳病净化方案，并且取得了成功[1]。

净化方案设计和实施

本研究设计的净化方案如下：1）封群之前不引入额外的后备猪；2）持续封群生产一直到稳定产出阴性断奶仔猪；3）不做任何疫苗或者野毒主动接种；4）在种猪群能够连续 4 周生产出阴性断奶仔猪的时候开始保育舍和后备培育舍清群；5）强化生物安全管理，切断种猪生产区域和保育舍、后备培育舍之间任何人员、物流的交叉；6）从感染后的第 15 周，即封群后的第 12 周开始对断奶仔猪做蓝耳病毒核酸检测，一直持续到净化结束。本次蓝耳病净化从感染后第 3 周开始，从感染后第 15 周开始对断奶仔猪的睾丸处理液做检测，每 1 窝合并为 1 个样品，每一窝均做检测。到感染后第 23 周，断奶猪开始保持蓝耳病核酸 100%阴性。到感染后第 27 周，断奶仔猪已经保持了连续 4 周的蓝耳病毒核酸阴性。这个时候开始保育舍和后备培育舍的清群，清群 1 周后重新开始承接产房断奶仔猪，逐渐恢复生产。到这个时间节点，一般认为蓝耳病毒已经不在场内有任何的传播。这个时候猪场的生产成绩也恢复到蓝耳病暴发之前的水平。在感染后第 28 周，猪场一次性引入蓝耳病毒核酸抗体双阴性后备猪 90 头，放置在妊娠舍，作为哨兵猪。对哨兵猪做定期的抗体监测，在哨兵猪引入后的 60 天（感染后第 37 周），没有一头哨兵猪出现了蓝耳病毒抗体阳转，猪群断奶仔猪维持了病原核酸与抗体的双阴性，67%的母猪在感染后 38 周转为抗体阴性，说明该群体中已经不存在任何蓝耳病毒的传播；至此封群结束。之后，本研究对猪群的蓝耳病毒做了持续的病原核酸和抗体监测，结果均显示猪群能够持续生产蓝耳病毒核酸和抗

※ 作者简介：胡睿铭，讲师，硕士生导师。E-mail：hrmvet19@163.com。
※※ 通讯作者：邓舜洲，教授，博士生导师，研究方向为猪蓝耳病流行病学和临床防控技术。E-mail：shzhdeng@163.com。

体双阴性的仔猪，保育育肥舍保持双阴性生产，母猪群蓝耳病毒核酸检测 100%阴性，抗体阳性率持续下降，并且生产保持稳定。同时猪场加大了经产母猪淘汰的力度，至 2022 年 3 月份，所有经历了蓝耳病疫情的猪只均已淘汰，猪群成功恢复到蓝耳病双阴性生产的状态[1]。

讨论

常见的蓝耳病净化方案一般有三个步骤，第一步是引入足够封群生产所需的后备母猪；第二步是全群统一感染蓝耳病毒，可以是猪场内流行的野毒株，也可以是集中接种弱毒疫苗；第三步是封群生产，持续监测，一直维持到猪群能够持续生产蓝耳病毒核酸阴性仔猪，并且能够保证哨兵猪在 60 天以上的时间不会出现蓝耳病毒抗体阳转[3]。在这个技术方案中，人工主动感染野毒或者免疫弱毒疫苗存在一定的争议。人工感染野毒往往导致较高的死淘率，尤其是后备猪，带来额外的生物安全风险，并且操作比较繁琐。如果是免疫疫苗，现在我国主要流行类 NADC30 和类 NADC34 毒株，对这些毒株，现有的商品化疫苗的保护力并不一致，有可能会出现保护力不佳导致净化失败。如果蓝耳病净化过程中能够避免人工主动感染的步骤，将显著提升蓝耳病净化的适用范围，显著降低失败的风险。事实上，不论是主动接种还是被动感染，最终的目标就是在一致的时间内保证整个猪群建立对本场蓝耳病毒的清除性免疫，以此彻底阻断蓝耳病毒传播的链条[4]。本研究中，整个猪群在蓝耳病毒感染前是蓝耳病双阴性群体，并且病毒的传播非常迅速，因此保障了整个群体能够在短时间内完成感染，并且迅速建立了清除性的免疫。对于蓝耳病持续循环感染的猪群，目前尚没有比人工主动接种更有效的方式来实现同期感染-同期康复。有研究显示，通过灭活疫苗接种，在蓝耳病毒持续流行的猪群同样能够完成净化，同时生物安全风险较低。因此，虽然灭活疫苗成功完成蓝耳病净化的案例仍然较少，将来有必要进一步研究能否通过灭活疫苗或者亚单位疫苗来实现蓝耳病的净化。

对于一点式生产体系中蓝耳病的净化，一般要求在封群开始的时候完成保育育肥舍和后备培育舍的清群，并且停止使用保育育肥舍和后备培育舍，一直到封群结束。这样的流程对一点式生产体系的成本是非常高昂的，这也限制了蓝耳病净化的推广。本研究尝试了保育育肥舍和后备培育舍的延迟清群，成功降低了蓝耳病净化的成本。笔者认为，在蓝耳病毒逐渐消退的过程中，延迟清群是可行的，前提是高水平的生物安全管理和母猪群健康管理，保证母猪群能够快速建立较强的免疫力，并且确保保育舍的蓝耳病毒不会重新侵染母猪群。本研究成功地在 27 周内实现了蓝耳病毒的有效控制，全 37 周结束封群，充分说明本研究实施的生物安全措施是非常有效的。

综上所述，本研究在一点式生产体系中成功实现了蓝耳病净化，净化过程规避了主动感染的步骤，并且采用了延期清群的策略来降低净化的成本，为蓝耳病净化在我国的进一步推广提供了新的信息和探索的方向。

主要参考文献

[1] Hu R，Zhang T，Lai R，Ding Z，et al. PRRSV Elimination in a Farrow-to-Finish Pig Herd Using Herd Closure and Rollover Approach [J]. Viruses. 2023; 15（6）：1239.

[2] Corzo C A，Mondaca E，Wayne S，et al. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res，2010. 154（1-2）： p. 185-92.

[3] Desrosiers R and Boutin M，An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus （PRRSV） after an outbreak in a breeding herd： eradication strategy and persistence of antibody titers in sows [J]. Journal of swine health and production.，2002. 10（1）： p. 23-25.

[4] Zhang Z，Qu X，Wang X，et al，Production Performance of Four Pig Herds Infected With Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Using the "Load-Close-Exposure" Approach in China [J]. Front Vet Sci，2022. 9： p. 882971.

基于 Mhp336 蛋白的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法的建立

谢梦琪※，董青霜，丁红雷※※
(西南大学动物医学院，重庆 400715)

引言

目前，检测猪肺炎支原体最常见的方法是采用美国 IDEXX 公司生产的猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumoniae*，Mhp）抗体检测试剂盒，它采用间接 ELISA 方法，以猪肺炎支原体全菌为抗原包被酶标板，然而全菌中的部分蛋白与其他支原体的蛋白存在交叉反应，且血清中猪肺炎支原体抗体检出率较低。因此，本研究拟建立一种灵敏性和特异性较高的猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测方法，以提高猪血清中猪肺炎支原体抗体检出率。

材料与方法

本试验用 Primer Premier 6.0 设计 *mhp336* 基因的引物，以重组质粒 pGEX-6P-1-mhp336 为模板进行 PCR 扩增，将扩增产物连接 pET-32a(+)载体质粒后转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，构建重组菌 *E.coli* BL21(DE3)-pET-32a(+)-mhp336。诱导剂 IPTG 16 °C 诱导表达目的蛋白 20 h。破菌上清经镍离子亲和层析柱纯化。首先确定检测方法的最佳反应条件，包括抗原包被浓度的确定、封闭液的选择、封闭时间的确定、一抗稀释比例、一抗孵育时间、二抗稀释比例、二抗孵育时间、显色时间和检测方法的判定标准。然后进行批内和批间重复性试验、特异性和灵敏性试验。最后用建立的方法对 226 份临床猪血清样品进行检测，并与本实验室前期建立的基于 Mhp366 蛋白的 ELISA 抗体检测试剂盒以及 IDEXX 公司的 Mhp 抗体试剂盒进行比较。

结果与讨论

构建的 *E.coli* BL21(DE3)-pET-32a(+)-mhp336 重组菌能以可溶和包涵体两种形式表达 61 kDa 的 Mhp336 蛋白。纯化的 Mhp336 蛋白纯度超过 95%。建立的 ELISA 检测方法参数包括：最佳抗原包被浓度为 0.05 μg/mL，封闭液为 2.5%脱脂奶粉，最佳封闭时间为 1 h，最佳一抗稀释比例为 1:500，最佳一抗孵育时间为 0.5 h，最佳二抗稀释比例为 1:10 000，最佳二抗孵育时间为 1 h，最佳显色时间为 5 min。以 OD_{600} 确定的 Cut off 值为 0.332。批内和批间重复的变异系数均低于 7%。该试剂盒不与其他猪的病原抗体反应，具有良好的特异性。对 226 份临床猪血清样品的检测结果表明，本研究建立的 ELISA 抗体检测方法的 Mhp 抗体检出率高于 IDEXX 公司的试剂盒和本实验室开发的基于 Mhp366 蛋白的 ELISA 抗体检测方法，具有较高的灵敏性。

主要参考文献

[1] Simionatto S, Marchioro S, Dos M, et al. Development of ELISA Using Recombinant Proteins for the Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection[J]. Indian Journal of Microbiology, 2022, 62(1): 88-95.

[2] Bai Y, Gan Y, Hua L Z, et al. Application of a sIgA-ELISA method for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* infected from vaccinated pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 223: 86-92.

基金项目：《猪肺炎支原体诱导的自噬促进其胞内增殖机制研究》（项目编号：32172870）。
※ 作者简介：谢梦琪，重庆市北碚区人。E-mail：1808989691@qq.com。
※※ 通讯作者：丁红雷，E-mail： hongleiding@swu.edu.cn,手机号：13883357970。

贵州某猪场猪伪狂犬、猪圆环病血清抗体及其病原学检测与分析

赵　静※

（贵州大学，贵州贵阳 550025）

为了解贵州省某规模化猪场猪伪狂犬病病毒（PRV）、猪圆环病毒 2 型（PCV-2）感染情况以及免疫情况。试验对贵州省某猪场采集的 100 份血清样品，采用酶联免疫吸附方法检测 PCV-2、PRV 抗体，统计分析血清中抗体水平，PCV-2 核酸检测。结果表明：PRV gE 抗体总阳性率为 10%（10/100），后备猪、空怀猪、保育猪的 PRV gE 抗体阳性率分别为 35%（7/20）、10%（2/20）和 4.7%（1/21）；PRV gB 抗体总阳性率 100%（100/100），后备猪、空怀猪、怀孕早期母猪、怀孕中期母猪、保育猪的 PRV gB 抗体阳性率分别为 100%（20/20）、100%（20/20）、100（19\19）、100%（20/20）、100%（21/21），PRV gB 抗体含量最高的是怀孕中期母猪，保育猪最低，且保育猪 PRV gB 抗体含量显著低于怀孕中期母猪（$P<0.05$）；PCV-2 抗体总阳性率 97%（97/100），后备猪、空怀猪、怀孕早期母猪、怀孕中期母猪、保育猪的 PCV-2 抗体阳性率分别为 90%（18/20）、95%（19/20）、100%（19/19）、100%（20/20）、100%（21/21），PCV-2 抗体含量最高的是怀孕中期母猪，空怀猪最低，且空怀猪 PCV-2 抗体含量极显著低于怀孕中期母猪（$P<0.01$），显著低于保育猪（$P<0.05$）。PCV-2 核酸检测结果显示，19 份血清样本存在 PCV-2 感染，阳性率为 19%（19/100）。说明该生猪养殖场出现 PCV-2 和 PRV 感染情况。

主要参考文献

略

基金项目：国家自然科学基金项目（32060794）；贵州大学 2020 年省级教学内容和课程体系改革项目（GZJG20200035）。

※ 作者简介： 赵静（1998-），女，贵州省贵阳市人。E-mail：1145007237@qq.com。

※※ 通讯作者：赵静，E-mail：1145007237@qq.com,手机号：13639234038。

基因组靶向整合高表达免疫分子酵母底盘构筑技术研究

李树君，黄金海※※
（天津大学生命科学学院，天津 300110）

引言

酿酒酵母是一种广泛用于蛋白质生产的细胞工厂。为提高基因编辑效率，利用 CRISPR-Cas9 技术在酿酒酵母基因组不同位点处整合由 20 个碱基的合成 DNA 和相邻基序（PAM）组成的合成 23 个碱基 DNA，可实现一步多拷贝的异源基因整合[1]。然而，异源蛋白的表达通常会给细胞带来压力，通过靶向编辑 HAC1 几个相关的基因，可提高细胞未折叠蛋白反应（UPR）信号通路应对压力的能力以提高蛋白质产量[2]。通过基因编辑缺失与细胞壁合成相关的非必需基因 chs3/fsk1 也可提高蛋白质产量。本研究通过 CRISPR-Cas9 技术，靶向三个高表达基因相邻的基因间隔区，两个细胞壁合成相关的非必需基因，以及 HPR 信号通路相关的两个基因，构建 1-5 拷贝高表达的分泌型 JDY52 酵母底盘和锚定型 ST1814G/EBY100 酵母底盘，分别利用猪 I、III 型干扰素和猪流行性腹泻病毒纳米抗体整合这些酵母底盘，并对多拷贝免疫分子重组菌株的整合效率和表达特性进行验证和评价，最后通过细胞和动物模型证实多拷贝免疫分子重组菌株表达蛋白的抗病毒活性，皆在为重组蛋白质产品在酿酒酵母中增加产量提供新思路，为生猪养殖疫病防治及净化提供潜在的候选制剂。

材料与方法

主要采用 CRISPR Cas9 技术对酵母进行基因编辑，醋酸锂转化法转化酵母感受态细胞，Western blot 技术、间接 ELISA 实验鉴定多拷贝重组酵母菌株的免疫蛋白表达，RT-qPCR 检测抗病毒 ISGs 基因表达情况和病毒 mRNA 水平等。

结果与讨论

通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术实现对酿酒酵母底盘细胞壁相关基因 chs3/fsk1 的缺失和合成 gRNA 靶标的整合，对 HPR 信号通路相关的 cbc1/rrp6 基因的缺失，以及在三个高表达基因 ADH1/PDC1/PGK1 附件的基因间隔区的合成 gRNA 靶标整合，构建 CRISPR 一步多靶点整合的酵母平台。通过酶切连接的方法将不同靶标的同源臂连接至免疫分子转录单位两端，通过 CRISPR-Cas9 整合入不同多拷贝酵母底盘的各靶点，基因分型验证整合正确性后，对筛选的重组菌株进行表达特性研究，结果证实表达量均与对照组相比显著提升。重组菌株分泌的免疫分子通过细胞和动物模型分别证实了具有良好的抗病毒活性。这为酿酒酵母底盘中增加蛋白产量提供了新思路。

主要参考文献

[1] Baek S，Utomo JC，Lee JY，Dalal K，Yoon YJ，Ro DK. The yeast platform engineered for synthetic gRNA-landing pads enables multiple gene integrations by a single gRNA/Cas9 system[J]. Metab Eng, 2021 64：111-121. doi：10.1016/j.ymben.2021.01.011. Epub 2021 Feb 4. PMID： 33549837.

[2] Lin Y，Feng Y，Zheng L，Zhao M，Huang M. Improved protein production in yeast using cell engineering with genes related to a key factor in the unfolded protein response[J]. Metab Eng, 2023,77：152-161. doi： 10.1016/j.ymben.2023.04.004. Epub 2023 Apr 10. PMID： 37044356.

※※ 通讯作者：黄金海，教授，博士生导师，研究方向为病毒与免疫。E-mail：jinhaih@tju.edu.cn。

小鼠腹腔巨噬细胞通过 GSDMD 介导的细胞焦亡抵御 SEZ 感染

李舜※，许国彬※，邓静飞，刘雨轩，郭政，李亚娟，黄云飞，付强※※
（佛山科学技术学院生命科学与工程学院，广东佛山 528225）

引言

马链球菌兽疫亚种（SEZ）是一种重要的人兽共患病病原，对我国的畜牧业和公共卫生安全构成了严重的威胁[1]。巨噬细胞作为机体固有免疫反应的重要效应细胞，可通过多种途径杀灭和清除病原菌，从而抵御其感染[2]。其中巨噬细胞焦亡在 SEZ 感染过程中的作用机制尚不明确。因此，本研究以细胞焦亡的执行蛋白 GSDMD 为切入点，旨在探究 GSDMD 在 SEZ 诱导的巨噬细胞焦亡中的作用机制。

材料与方法

通过构建 SEZ 感染 $GSDMD^{+/+}$与 $GSDMD^{-/-}$小鼠及腹腔巨噬细胞模型，采用转录组测序筛选 SEZ 感染后宿主差异基因；采用 HE 染色观察脾脏病变，流式细胞术和全自动血液生化分析仪检测小鼠腹腔巨噬/单核细胞变化，采用 ELISA 检测腹腔液及细胞上清炎性因子的含量，采用 WB 检测 GSDMD 蛋白的表达，通过荧光显微镜和 SEM 观察细胞形态。

结果与讨论

通过对小鼠脾脏转录组测序并进行生信分析，发现 NOD 样受体信号通路中经典炎症小体相关多个基因显著上调；体外验证表明，SEZ 感染后小鼠脾脏白髓结构被严重破坏，且 GSDMD 蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；与野生型小鼠相比，GSDMD 缺失小鼠在 SEZ 感染后脾脏多核巨噬细胞无明显差异，但脾脏中含铁血黄素含量显著升高（$P<0.01$）。与对照组相比，SEZ 感染组小鼠腹腔灌洗液中单核细胞和巨噬细胞比例显著升高（$P<0.01$）；其中 $GSDMD^{-/-}$小鼠单核细胞比例显著高于野生型小鼠（$P<0.01$），而巨噬细胞比例无差异。ELISA 结果表明，SEZ 感染组的腹腔灌洗液和巨噬细胞上清中 IL-1β 和 IL-18 的释放显著升高（$P<0.01$）；而 $GSDMD^{-/-}$小鼠腹腔液和细胞上清中 IL-1β 和 IL-18 的释放显著低于野生型小鼠（$P<0.01$）。进一步通过 Western Blot 对 SEZ 感染后巨噬细胞 GSDMD 及 GSDMD-N 的表达量进行分析，结果显示，野生型小鼠 GSDMD 和 GSDMD-N 蛋白表达量均显著上调，而 $GSDMD^{-/-}$巨噬细胞中不表达这些蛋白。荧光显微镜和扫描电镜结果表明，$GSDMD^{+/+}$组巨噬细胞在 SEZ 刺激后 PI 阳性细胞显著增多且电镜下可见明显的泡状凸出，而 GSDMD 缺失组巨噬细胞 PI 阳性细胞显著减少且未见泡状凸出。本研究表明，GSDMD 通过介导巨噬细胞焦亡并促进 IL-1β 和 IL-18 的释放而发挥促炎作用，从而抵御 SEZ 感染，为深入研究宿主抵御 SEZ 感染的机制提供了理论基础。

主要参考文献

[1] Kim M，Heo S T，Oh H，et al. Human zoonotic infectious disease caused by Streptococcus equi subsp. zooepidemicus [J]. Zoonoses Public Health，2022，69：136–142.

[2] Epelman S，Lavine K J，Randolph G J. Origin and functions of tissue macrophages[J]. Immunity，2014，41：21–35.

※ 作者简介：许国彬，在读硕士研究生，研究方向为动物细菌性疫病防控。E-mail：gb.xu.fosu@outlook.com。
作者简介：李舜，讲师，博士研究生，研究方向为动物细菌性疫病防控。E-mail：lishun@fosu.edu.cn。
※※ 通讯作者：付强，教授，博士生导师，研究方向为动物细菌性疫病防控。E-mail：fuqiang@fosu.edu.cn。

猪源 IFITM3 抑制 TGEV 早期感染 PK-15 细胞的机制研究

程家浩※，颜可欣，郑凡，李志强，袁晓民※※
（湖南农业大学动物医学学院，湖南长沙 410128 ）

引言

干扰素诱导跨膜蛋白（IFITMs）作为一种宿主限制因子，在天然免疫中发挥着重要的抗病毒作用。IFITMs 可限制多种囊膜 RNA 病毒入侵宿主细胞，通过阻止病毒核酸释放至胞质中来抑制病毒复制。猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）属于冠状病毒中的一员，其感染可导致仔猪腹泻，给养猪业造成巨大的经济损失[1]。目前尚无研究表明 IFITM3 是否对 TGEV 感染具有抗病毒作用及相关机制。本研究旨在揭示猪源 IFITM3 对 TGEV 的抗病毒机制。

材料与方法

本试验用 PK-15（猪肾-15）细胞进行相关实验，测定 TGEV 滴度，用重组慢病毒构建稳定表达 pIFITM3 或 pIFITM3 shRNA 的 PK-15 细胞。pCI-neo 载体构建 IFITM3 突变质粒。对相关蛋白进行 WB、IFA，并通过 RT-PCR 方法检测相关细胞因子。

结果与讨论

用 RT-PCR 检测 TGEV 感染后多个细胞因子和几个 ISGs 的 mRNA 表达水平[2]，结果显示 TGEV 刺激 PK-15 细胞中 IFN 和 IFITM3 等 ISGs 的表达上调，而抑制了 TGEV-N mRNA 的表达。在 PK-15 细胞系中稳定过表达猪 IFITM3，IFA 结果显示其核周围有绿色荧光。干扰 TGEV 感染后 IFITM3 的表达，并发现其能限制 TGEV 与 PK-15 细胞的结合。检测了 TGEV 感染后多种炎症因子的 mRNA 表达水平，并发现 IFITM3 能抑制其上调。将其 N 端 19-24 位点替换为丙氨酸，发现 Y20A 突变导致其失去抗病毒活性，而 K24A 突变则增强其抗病毒作用。

本研究证明，TGEV 感染后 PK-15 细胞中干扰素、促炎因子和 ISGs、的表达上调，而过表达 IFITM3 蛋白能抑制这些反应。通过构建 IFITM3 突变质粒发现 Y20A 突变使 IFITM3 失去抗病毒功能；K24A 突变增强 IFITM3 对 TGEV 的阻断作用；M22A 突变削弱 IFITM3 的抗病毒作用。我们发现 IFITM3 与 NIAI 协同作用，增强抗病毒作用。综上，发现 IFITM3 通过阻断 TGEV 与质膜的结合来抑制 TGEV 的侵袭；Y20A 和 M22A 突变体削弱了 IFITM3 对 TGEV 的抗病毒作用，而 K24A 突变体增强了 IFITM3 对 TGEV 的抗病毒作用；IFITM3 与 CQ 协同作用[3]，增强抗病毒作用。基于这项研究得出 IFITM3 可作为一种新型的抗 TGEV 药物靶点。

主要参考文献

[1] Chen，B.，Tian，E.K.，He，B.，Tian，L.，Han，R.，Wang，S.，Cheng，W.，2020. Overview of lethal human coronaviruses. Signal Transduct. Target Ther. 5 （1），89. https：//doi. org/10.1038/s41392-020-0190-2.

[2] Raftery，N.，Stevenson，N.J.，2017. Advances in anti-viral immune defence： revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway. Cell Mol. Life Sci. 74 （14），2525–2535. https：//doi.org/10.1007/s00018-017-2520-2.

[3] Gao，J.，Tian，Z.，& Yang，X.J.B. t，2020 Breakthrough： Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. 14（1），72–73. doi：10.5582/bst.2020.01047.

※ 作者简介：程家浩，在读硕士研究生，研究方向为病原分子生物学及免疫学。E-mail：chengjiahao@stu.hunsu.edu.cn 。
※※ 通讯作者：袁晓民，讲师，硕士生导师，研究方向为宿主天然免疫与病毒相互作用研究。E-mail：yxm1230@hunau.edu.cn 。

植物乳杆菌 LP-1 上清调控肠道钙离子抗 PEDV 作用研究

阚子斐※，廖贵松，宋振辉**
（西南大学荣昌校区动物医学院，重庆 402460）

引言

猪流行性腹泻病对两周龄内的仔猪有极高致死率，给养猪业带来严重经济损失。据相关报道，益生菌可以对多种病毒有抑制效果。益生菌菌体及其代谢产物中有多种抗病毒的生物活性物质[1]。而 Ca^{2+} 作为细胞内信号转导过程中重要的第二信使，对机体众多生理活动起重要作用[2, 3]。本研究通过探讨细胞内外 Ca^{2+}浓度与 PEDV 复制的关系，探究植物乳杆菌改变细胞内钙离子的机制，皆在为研究抗 PEDV 药物提供新思路。

材料与方法

植物乳杆菌为课题组前期分离得到，PEDV 病毒为本实验室保存的 LJX 毒株。利用 Western-blot 方法检测 LP-1S 处理 IPEC-J2 细胞后 PEDVN 蛋白表达量情况，用 TCID50 检测 LP-1S 预处理组感染 PEDV-LJX 株病毒滴度；用火焰原子吸收法检测细胞外 Ca^{2+}浓度。用钙离子荧光探针 Fluo-3AM 检测细胞内 Ca^{2+}浓度。用 BAPTA-AM、EGTA 螯合胞内外钙离子，用绝对荧光定量 PCR、Western-blot 方法检测 PEDVM 基因拷贝数和 N 蛋白表达量；用相对荧光定量、Western-blot 检测 TRPV6、PMCA1b 的表达量；用绝对荧光定量 PCR、Western-blot、TCID50 方法检测干扰 TRPV6、PMCA1b 组的 PEDVN 蛋白、PEDVM 基因、病毒滴度。

结果与讨论

Western-blot 检测发现，1/4 倍稀释为抗 PEDV 最佳浓度且具有浓度依赖性。LP-1S 处理 IPEC-J2 细胞在 8h、12h、24h 时能显著降低 PEDVN 蛋白表达。TCID50 结果表明，在 12h、24h、48h 时 LP-1S 预处理组能显著降低病毒滴度。表明植物乳杆菌 LP-1 上清具有良好的抗 PEDV 作用；PEDV 感染后细胞外 Ca^{2+}浓度低于空白对照组。PEDV 感染组细胞内 Ca^{2+}荧光强度都极显著高于空白对照组 EGTA 预处理组 PEDVM 基因拷贝数和 N 蛋白表达量都显著低于 PEDV 组。BAPTA-AM 预处理也能降低 PEDV M 基因拷贝数和 N 蛋白表达量。这些结论说明，细胞内外钙离子在 PEDV 感染过程中起着重要作用；LP-1S 预处理组能降低在 PEDV 感染情况下 TRPV6 的表达。LP-1S 能够升高在 PEDV 感染情况下 PMCA1b 的表达。结果表明植物乳杆菌 LP-1 上清能调控 TRPV6 和 PMCA1b 来减少进入细胞内 Ca^{2+}量达到抗 PEDV 的作用；干扰 TRPV6 组的 PEDVN 蛋白、PEDV M 基因、病毒滴度都显著高于 PEDV 组，干扰 TRPV6 后导致 PEDV 显著升高，与预期不符其原因可能是代偿机制引起其他钙离子信号通路表达变化。干扰 PMCA1b 后 PEDVN 蛋白、PEDV M 基因、病毒滴度显著高于 PEDV 组，说明干扰 PMCA1b 后细胞内 Ca^{2+}浓度上升是导致 PEDV 复制增多的主要原因。

综上所述，研究阐明了植物乳杆菌 LP-1 上清抗病毒作用，PEDV 感染能引起细胞内外 Ca^{2+}浓度的变化，细胞内外 Ca^{2+}在 PEDV 感染过程中起着重要作用，植物乳杆菌 LP-1 上清能通过调节 TRPV6 和 PMCA1b 的表达量来调控细胞内 Ca^{2+}浓度来达到抗 PEDV 的作用。

主要参考文献

[1] Mousavi E，MakvandI M，TeimoorI A，et al. Antiviral effects of Lactobacillus crispatus against HSV-2 in mammalian cell lines[J]. 2018.

[2] Berridge M J，Bootman M D，RodericK H L. CALCIUM SIGNALLING ： DYNAMICS[J]. 2003.

[3] Liou J，Kim M L，Heo W D，et al. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+}-store-depletion-triggered Ca2+ influx [J]. 2005，15（13）： 1235-41.

※ 作者简介：阚子斐，硕士研究生，研究方向为动物微生物及免疫学。E-mail：13220241298@163.com。
※※ 通讯作者：宋振辉，教授，硕士生导师，研究方向为动物微生物及免疫学。E-mail：szh7678@swu.cn。

CD44 介导 TGEV 调控 NHE3 诱导仔猪 Na^+ 失衡的研究及激活剂的筛选

徐沙沙※，宋艳雯，宋振辉※※
（西南大学动物医学院，重庆 402460）

引言

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）引起的一种以仔猪严重腹泻、呕吐和脱水为临床症状的急性、高度接触性肠道传染病，仔猪易感染且具有高死亡率[1]。肠道内电解质吸收和/或分泌过程平衡紊乱，进而破坏了渗透压梯度，导致水潴留和腹泻。NHE3 通过将胞外 Na^+转运到胞内、将胞内 H^+转运到胞外来发挥其主要生理功能[2]。实验室前期试验已证明，TGEV 感染猪后在小肠上皮细胞大量复制，破坏了上皮细胞 Na^+转运功能，导致肠道渗透压升高，并可促进仔猪腹泻，但其具体作用机制尚不清楚。而 CD44 的主要生理作用是介导细胞与细胞间及细胞与细胞外基质间的相互作用，可调控许多生物过程，包括细胞黏附、迁移和增殖[3]。有研究表明 CD44 可参与病毒的感染，其在冠状病毒性疾病的致病过程中可抑制或促进病毒复制[4]。基于此，本课题旨在探究 CD44 在 TGEV 感染过程中与 NHE3 之间的调控关系及 CD44 在 TGEV 致腹泻过程中发挥的作用，并以 CD44 为靶点筛选抗 TGEV 的药物。

材料与方法

本研究 IPEC-J2 细胞和 ST 细胞购自上海苏尔生物科技有限公司；TGEV Miller 株由本实验室保存。本试验中使用的仔猪为 3 日龄的荣昌猪，购自西南大学动物医学院实验动物中心。CD44 蛋白过表达质粒 pEGFP-CD44 与干扰质粒 pLVX- CD44#1-3 由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

首先，对空白对照的健康仔猪和 TGEV 感染的仔猪小肠分别取样进行转录组测序，分析其内部基因的表达变化。通过转录组学分析方法对差异表达基因进行 GO 富集、KEGG 富集分析，对筛选出的 CD44 和 NHE3 进行蛋白质互作网络（Protein-Protein interaction networks，PPI）预测研究。利用 RT-qPCR 在组织和细胞水平上验证 CD44 和 NHE3 变化情况。

其次，将 TGEV 以不同的感染复数（MOI=0.5，MOI=1，MOI=2）感染 IPEC-J2 细胞，分别利用 Western blot 和 RT-qPCR 法检测 NHE3 的总蛋白和质膜蛋白水平；并通过火焰原子吸收法检测细胞内外 Na^+浓度的变化情况。

然后，通过构建 CD44 蛋白干扰质粒 pLVX-CD44#1-3 与过表达质粒 pEGFP-CD44，并利用 Westernblot 和 RT-qPCR 方法探究 CD44 对 NHE3 mRNA 水平、总蛋白及膜蛋白数量的影响；TGEV 感染下，利用绝对荧光定量和 TCID50 方法检测干扰/过表达 CD44 后 TGEV N 基因的表达水平和 TGEV 的复制情况；最后利用 Western blot 和 RT-qPCR 检测 NHE3 的 mRNA 水平和总蛋白数量的影响，通过免疫荧光检测 NHE3 蛋白在质膜上的表达情况。

最后，利用 Trrosetta 基于蛋白质序列对 CD44 进行了模型的构建；使用 Smina 等对 CD44 与一系列配体进行分子对接筛选潜在激活剂；最后分别通过细胞和动物实验确定药物的效果。

结果与讨论

1. TGEV 感染猪小肠转录组学分析及验证　通过对实验室前期 TGEV 感染仔猪肠道组织转录组

※ 作者简介：徐沙沙，硕士研究生，研究方向为兽医微生物学与免疫。E-mail：962060187@qq.com。
※※ 通讯作者：宋振辉，教授，研究生导师，研究方向为兽医微生物学与免疫。E-mail：szh7678@swu.edu.cn。

学数据进行分析，发现肠道上皮细胞中负责 Na^+/H^+交换体 NHE3 出现了显著下调，而细胞外基质通路中的 CD44 出现了显著上调，试验也证明了 TGEV 感染可抑制 NHE3 mRNA 表达，促进 CD44 mRNA 的表达；通过对 CD44 和 NHE3 进行蛋白互作预测，发现 CD44 与 NHE3 可能存在潜在联系。

2. TGEV 感染 IPEC-J2 细胞对 NHE3 和 CD44 的影响 结果表明 TGEV 可促进 CD44 的表达；TGEV 可抑制 NHE3 的表达，影响 IPEC-J2 细胞对 Na^+的吸收；通过用不同的感染复数（MOI=0.5，MOI=1，MOI=2）的 TGEV 感染 IPEC-J2 细胞，发现 NHE3 的表达对 TGEV 具有剂量依赖性。

3. CD44 对 NHE3 和 TGEV 复制的影响 结果发现，CD44 蛋白可导致 NHE3 质膜表达显著下调并影响细胞内外 Na^+的交换，CD44 也可以影响 TGEV 的复制，即过表达 CD44 能抑制 TEGV 的复制，而干扰 CD44 能促进 TGEV 的复制。上述结果证明，CD44 可通过调节 TGEV 的复制影响 NHE3 的数量和活性。

4. CD44 小分子激活剂的筛选及效果验证 使用 Smina 等对 CD44 与候选配体进行了分子对接筛选到了潜在激活剂 Conivaptan，；细胞试验发现，4×10^{-4}mol/L 的 Conivaptan 可显著激活 CD44 的表达；而在动物试验中，在对仔猪饲喂 Conivaptan 后使用 TGEV 感染，剖检后无明显病理变化。Conivaptan 可减少 TGEV N 基因在肠上皮细胞上的表达，也可降低 TGEV 感染后 NHE3 的减少，并有效阻止病毒的复制。

本研究证明了 CD44 可以介导 TGEV 调控 NHE3，从而影响 Na^+的交换，并筛选出了激活剂减弱 TGEV 引起的仔猪腹泻。本研究旨在阐明 CD44 在 TGEV 感染过程中与 NHE3 之间的调控关系，确证 CD44 在 TGEV 致腹泻过程中发挥的作用。本研究将为设计以 CD44 为靶点的抗 TGEV 新药物和研发其他冠状病毒引起腹泻的药开辟新思路。

主要参考文献

[1] 王欢，丁铲，廖瑛. 冠状病毒入胞途径的研究进展[J]. 病毒学报，2019，35（6）： 116- 123.

[2] Karasov W H. Integrative physiology of transcellular and paracellular intestinal absorption[J]. Journal of Experimental Biology，2017，220（14）： 2495-2501.

[3] 毛竹君，张慈安，赵胜佳，等. 肿瘤缺氧微环境与黏附分子相关性的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2011，18（4）：4.

[4] Orian-Rousseau V. CD44 acts as a signaling platform controlling tumor progression and metastasis[J]. Frontiers in immunology，2015，6： 154.

猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）利用细胞间传播抵抗抗体的中和

夏思进[1,2※]，肖雯雯[1,2]，朱雪瑞[1,2]，廖树森[1,2]，郭嘉辉[1,2]，周俊伟[1,2]，肖少波[1,2]，方谱县[1,2※※]，方六荣[1,2※※]

（1.华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；
2.湖北省生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）是一种新兴的肠道冠状病毒，主要引起新生仔猪急性腹泻、脱水、呕吐和死亡。据报道，PDCoV 还具有跨物种传播的潜力，可以感染鸡、火鸡、牛、小鼠甚至人类。因此，研究 PDCoV 具有重要的公共卫生意义和基础研究价值。很多包膜病毒能够通过细胞间（cell-to-cell）传播模式迅速增殖，逃避特异性中和抗体和其他固有/先天抗病毒反应，从而促进病毒的有效感染和致病[1]。但是，PDCoV 利用 cell-to-cell 传播模式的能力及其相关机制尚未完全阐明。本项工作拟评估 PDCoV cell-to-cell 传播的能力，目的是揭示 PDCoV 先前未被认识的 cell-to-cell 传播的作用，可能影响其传播、致病机制和抗体逃逸。

材料与方法

为了评估 PDCoV 的细胞间和非细胞间传播能力，使用细胞-细胞接触或 Transwell 共培养系统，并利用 IFA、RT-qPCR 和 $TCID_{50}$ 等实验来检测 PDCoV 在靶细胞中的感染；同时，通用流式分选的方式收集绿色荧光标记的靶细胞，检测 PDCoV 是否能够通过 cell-to-cell 方式感染非易感细胞。此外，还通过中和实验来检测 PDCoV 是否能够利用 cell-to-cell 传播抵抗中和性单克隆抗体和免疫血清的中和效应。

结果与讨论

经过共培养系统的 RT-qPCR 结果分析，发现 PDCoV 在易感细胞（IPI-2I 和 ST）上的 cell-to-cell 传播比经典的释放再感染（cell-free）传播更具优势，占总感染的 80%以上。将 PDCoV 感染的 IPI-2I 细胞和绿色荧光标记的非易感细胞（Vero 和 BHK-21）进行共培养，并通过流式分选筛选出非易感细胞，进一步检测病毒 RNA 拷贝数。结果表明，PDCoV 能够通过 cell-to-cell 途径而非 cell-free 途径在非易感细胞中有效传播。体外膜融合双荧光素酶系统的结果表明，膜融合抑制剂 EK1C4 可以抑制 PDCoV S 蛋白介导的膜融合。此外，RT-qPCR 结果发现，EK1C4 也能有效抑制 PDCoV 的 cell-to-cell 传播。以上结果表明，PDCoV S 蛋白介导的细胞-细胞融合在病毒的 cell-to-cell 传播中发挥了一定作用。敲除功能受体 pAPN 和使用内体途径抑制剂能够显著减弱 PDCoV S 蛋白介导的细胞-细胞融合和病毒的 cell-to-cell 传播，这进一步证实细胞-细胞融合是 PDCoV cell-to-cell 传播的重要模式。最重要的是，在共培养环境中添加中和性单克隆抗体或免疫血清能够显著降低 PDCoV 的 cell-free 传播，而不显著影响其 cell-to-cell 传播，这表明 PDCoV 能够通过 cell-to-cell 传播有效地抵抗抗体的中和。本研究证实 PDCoV 主要利用 cell-to-cell 方式而非 cell-free 方式向邻近的未感染细胞传播。功能性受体 pAPN 和内体中的组织蛋白酶在病毒的 cell-to-cell 传播中发挥重要的作用。此外，PDCoV 的 cell-to-cell 传播表现出对抗体中和的抗性。这些发现拓展了我们对 PDCoV 感染的认识，深化了我们对 PDCoV 致病和体液免疫机制的理解。

主要参考文献

[1] Cifuentes-Munoz N，El Najjar F，Dutch RE. Viral cell-to-cell spread：Conventional and non-conventional ways[J]. Adv Virus Res, 2020,108：85-125.

※ 作者简介：夏思进，在读博士研究生，研究方向为动物病毒学。E-mail：sjx19940618@webmail.hzau.edu.cn。
※※ 通讯作者：方谱县，博士后，研究方向为动物病毒学。E-mail： pxfang@mail.hzau.edu.cn。
通讯作者：方六荣，教授，博士生导师，研究方向为动物病毒学。E-mail：fanglr@mail.hzau.edu.cn。

PRRSV 复制酶蛋白 nsp2 遗传变异调节病毒的毒力和持续性感染

高鹏，孔璨，张永宁，周磊，盖新娜，郭鑫，韩军，杨汉春
（中国农业大学动物医学院，北京 100193）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）是严重危害世界养猪业的重要病原，具有高度变异、持续性感染等特性，复制酶非结构蛋白 nsp2 编码区是 PRRSV 基因组遗传变异最快和遗传差异最大的区域[1-3]，但 nsp2 变异的生物学意义尚不清楚。本研究从 nsp2 变异角度探究了遗传变异对 PRRSV 致病性和免疫逃逸特性的影响，皆在为 PRRSV 遗传演化的生物学基础提供重要科学依据，同时为研发新型 PRRSV 疫苗提供新思路。

材料与方法

HP-PRRSV JXwn06（谱系 8）和类 NADC30 毒株 CHsx1401（谱系 1）作为模式病原，以 CHsx1401 为骨架，利用反向遗传操作系统构建置换 JXwn06 nsp2 的系列嵌合突变体，通过 1 月龄仔猪致病性实验和转录组学等方法分析不同嵌合病毒的致病和免疫抑制能力的差异。

结果与讨论

单独置换 nsp2 对 CHsx1401 具有致死性，但同时置换结构蛋白（SP）编码区可成功拯救病毒。致病性实验显示，单独置换 SP 编码区不能显著增强 CHsx1401 毒力，但同时置换 JXwn06 nsp2 编码区使得 CHsx1401 获得了 HP-PRRSV 部分致病特征，证实了 HP-PRRSV nsp2 是重要毒力因子。转录组学分析持续性感染期的淋巴组织发现，谱系 8 源 nsp2 具有较强的炎症诱导和免疫激活能力，谱系 1 源 nsp2 具有更强的免疫逃逸和免疫抑制能力。热图分析筛选出了 190 个由 HP-PRRSV nsp2 调节的差异表达基因，主要参与炎症、趋化、细胞黏附、补体激活、凝血、ROS、中性粒细胞激活和适应性免疫等相关通路，其中 TLR4、IL-1β 和 MPO 等为核心差异基因。与其他感染组相比，置换 nsp2 的嵌合病毒感染组仔猪拥有更快的病毒血症清除速率和更低的病毒载毒量。这表明嵌合病毒由于获得了 HP-PRRSV nsp2 较强的炎症诱导和免疫激活能力，从而促进了病毒血症的清除并降低了组织载毒量。反观类 NADC30 毒株 CHsx1401，其感染组仔猪的病毒血症持续时间最长，淋巴组织的病毒载毒量最高，不能有效产生高水平的促炎因子和 N 蛋白抗体，不能引起宿主强烈的免疫反应。这些指标均揭示 CHsx1401 具有更强的免疫逃逸能力，从而不利于病毒的清除。

本研究阐明了 PRRSV nsp2 遗传演化通过宿主免疫反应调节病毒的毒力和持续性感染，这种免疫调节能力的差异为 PRRSV nsp2 快速演化和频繁重组的方向提供了合理的解释。推测这种重组模式有利于病毒提高在宿主体内的存活能力，重组类 NADC30 毒株 nsp2 是病毒在演化过程中提高免疫逃避的一种手段。这种谱系间 nsp2 的特性差异为类 NADC30 逐渐替代 HP-PRRSV 上升为我国优势毒株的生物学基础提供了重要科学依据。

主要参考文献

[1] Pejsak Z，Stadejek T，Markowska-Daniel I. Clinical signs and economic losses caused by PRRSV in a large breeding farm[J]. Vet Microbiol，1997，55（1-4）： 317-322.

[2] Han J，Zhou L，Ge X，et al. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Vet Microbiol，2017，209： 30-47.

[3] Kong C，Li D，Hu Y，Gao P，Zhang Y，Zhou L，Ge X，Guo X，Han J，Yang H. The Genetic Variation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replicase Protein nsp2 Modulates Viral Virulence and Persistence[J]. J Virol, 2023;97（3）：e0168922.

非洲猪瘟病毒激活 BAX 诱导细胞凋亡的分子机制

向智勇，周磊，盖新娜，郭鑫，张永宁，韩军，杨汉春*
（农业农村部动物流行病学重点实验室，中国农业大学动物医学院，北京 100193）

引言

非洲猪瘟病毒（ASFV）是严重威胁生猪产业的重要病原。非洲猪瘟（ASF）的临床症状主要表现为多组织器官（心、肺、肾、肠、淋巴结、脾等）严重出血。已有大量研究表明，ASFV 感染引起的病理变化与靶器官靶细胞凋亡（Apoptosis）密切相关[1, 2]。迄今为止，有关 ASFV 感染诱导的细胞凋亡与其致病性的关系尚知之甚少，深入研究 ASFV 诱导细胞凋亡的分子机制可为理解其致病机制提供科学依据。已有研究发现，ASFV 感染晚期可级联激活 Caspase3、9 和 12，从而诱导细胞凋亡[3]，但具体分子机制尚不清楚。本研究旨在分析 ASFV 编码的晚期非结构蛋白 MGF360-16R 激活促凋亡蛋白 BAX/p21 诱导细胞线粒体途径凋亡的分子机制。

材料与方法

猪肺泡巨噬细胞（PAMs）和野猪肺传代细胞（WSL），ASFV-HN09 毒株，由本实验室制备和保存。研究主要采用 Co-IP、RNAi、细胞生物学染色、流式细胞术、透射电镜以及激光共聚焦技术。

结果与讨论

对 ASFV 感染细胞的凋亡表型分析显示，ASFV 感染细胞呈现空泡化、线粒体膜电势降低、线粒体肿胀破碎、PS 外翻以及核 DNA 片段化，表明 ASFV 感染可激活 BAX/p21，活化的 BAX/p18 转位于线粒体引起线粒体外膜通透性改变以及线粒体碎裂，进而释放细胞色素 c 级联激活下游凋亡通路（Caspase9、Caspase3 等），最终诱导细胞凋亡。进一步筛选和鉴定与细胞线粒体共定位的 ASFV 蛋白，发现 MGF360-16R 不仅与 WSL 细胞的线粒体共定位，而且能够活化 Caspase3；MGF360-16R 激活 BAX 的关键结构域是其线粒体定位信号。此外，发现 BAX 抑制剂和干扰 BAX 均能抑制细胞凋亡进而阻碍病毒的传播。

本研究揭示了 ASFV pMGF360-16R 诱导细胞凋亡的分子机制，丰富了 pMGF360-16R 的新功能和生物学意义，研究结果为理解 ASFV 的致病提供了科学依据。

主要参考文献

[1] Oura CA，Powell PP，Parkhouse RM. African swine fever：a disease characterized by apoptosis[J]. J Gen Virol, 1998,79（Pt 6）：1427-38.

[2] Neilan JG，Lu Z，Kutish GF，et al. A BIR motif containing gene of African swine fever virus，4CL，is nonessential for growth in vitro and viral virulence[J]. Virology, 1997,230（2）：252-64.

[3] Galindo I，Hernáez B，Muñoz-Moreno R，Cuesta-Geijo MA，Dalmau-Mena I，Alonso C. The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection[J]. Cell Death Dis, 2012,3（7）： e341. doi：10.1038/cddis.2012.81.

猪流行性腹泻病毒 GX15 株的遗传进化分析及其致病性初探

孙倩[1, 2※]，宋瑞鹏[1, 2]，林俊[2]，覃绍敏[2]，陆晨阳[2]，杜泓明[1]，岑敏[2]，劳论邦[3]，刘金凤[2※※]，吴健敏[2※※]

（1.广西大学动物科学技术学院，广西南宁 530004；2.广西壮族自治区兽医研究所，农业农村部中国（广西）-东盟跨境动物疫病防控重点实验室/广西兽医生物技术重点实验室，广西南宁 530001；3.广西一遍天种猪集团，广西南宁 530004）

引言

猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarrhea，PED）是由猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）引起，主要通过粪口途径传播，在欧洲、亚洲、美洲和大洋洲亚等世界主要猪肉生产和消费地区均有流行，对新生仔猪的致死率可达 100%，是危害我国生猪生产安全的主要疫病之一。因此，本研究针对分离自广西的猪流行性腹泻病毒（PEDV）*GX15* 毒株开展全基因序列遗传进化分析、重组分析、突变位点分析及新生仔猪致病性试验，以期为 PEDV 疫苗的研发及病毒致病性研究提供科学依据，助力 PED 的防控。

材料与方法

以 PEDV *GX15* 株为研究对象，通过分段克隆测序获得病毒全基因组序列并进行遗传进化分析。在动物感染试验中，将 12 只 6 日龄仔猪按每组 4 只动物随机分为 3 组，分别以 $10^{4.23}$ $TCID_{50}$/只、$10^{1.23}$ $TCID_{50}$/只和 0 $TCID_{50}$/只剂量口服感染，探索 *GX15* 株在 6 日龄仔猪上的致病性。

结果与讨论

GX15 株基因全长为 28042 nt，属于 GIIb 基因亚型内的一个独立于疫苗株 *AJ1102* 的进化分枝。与参考毒株相比，S 蛋白上存在多处氨基酸差异，其中，第 254-255 位 NW 的缺失是 *GX15* 所独有的；ORF3 蛋白上同样存在氨基酸差异，以及 F70I 和 A126T2 个独有突变。

动物感染试验中，高剂量组（$10^{4.23}$ $TCID_{50}$）仔猪在攻毒后腹泻率 100%（4/4），死亡率 75%（3/4），在 1 dpi 检测到一过性的病毒血症，肛门拭子和咽拭子病毒载量高峰出现在 3 dpi；低剂量组（$10^{1.23}$ $TCID_{50}$）攻毒后腹泻率 75%（3/4），死亡率 0%（0/4）。所有仔猪在整个试验周期内均未检测到病毒血症，肛门拭子和咽拭子在 5 dpi 检测到一个低于高剂量组的病毒载量高峰。组织病理学检查可见所有攻毒组仔猪肠绒毛断裂，黏膜上皮细胞变性、坏死；IHC 检测发现 PEDV 主要定植在空肠和回肠绒毛中。

本研究表明 *GX15* 株为 GIIb 基因亚型毒株，可感染仔猪产生典型的腹泻症状，$10^{4.23}$ $TCID_{50}$ 剂量能够使 6 日龄仔猪 75%死亡，可通过消化道和呼吸道排毒，并且感染仔猪后主要定植在空肠和回肠。研究结果为深入了解广西地区 PEDV 流行情况提供了数据支持，也为后续建立 PEDV 动物感染模型、评价新型疫苗及新型治疗药物奠定了基础。

主要参考文献

略

※ 作者简介：孙倩，在读硕士研究生，研究方向为动物传染病与分子免疫学。E-mail：1805495132@qq.com。

※※ 通讯作者：刘金凤，副研究员，研究方向为动物传染病与分子免疫学。E-mail：fjinliu@163.com。

通讯作者：吴健敏，研究员，研究生导师，研究方向为动物传染病与分子免疫学。E-mail：wu-jm20@163.com。

非洲猪瘟病毒的分离鉴定和低温消毒剂制备与评估

王惠[1, 2, 3※]，于学祥[1, 2, 3]，李栋凡[1, 2, 3]，何启盖[1, 2, 3※※]

（1.华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070；2.农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；3.生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）引起的一种传染性极强、致死率极高的疫病，在全球范围内已流行多年，造成严重的经济损失，对养猪业和食品安全业带来巨大威胁。由于目前缺乏安全有效的疫苗和针对性药物，因此，掌握病毒的传播特性、实施有效的生物安全措施是预防和控制该疾病的主要手段。目前我国流行的 ASFV 主要为基因Ⅱ型野生型毒株，掌握其在不同介质中的生存和消亡规律，利于追溯疫源及可能的传播方式，为疫情传播风险的评估和防控措施的制定提供科学支撑。消毒是生物安全措施的核心环节，而绝大部分消毒剂在低温条件下的消毒效力会大幅减弱，因此，制备一种安全有效的低温消毒剂迫在眉睫。

材料与方法

本研究于湖北省 ASF 的监测排查样品中分离得到一株 ASFV，通过测定该毒株在不同环境中的存活天数进行病毒衰减速率的线性回归拟合，模拟其环境耐受性。本研究通过正交试验和悬液定量灭活试验，在 4℃和-20℃筛选出了抗 ASFV 的最佳低温消毒剂，并与其他常用消毒剂进行对比。最后进行模拟现场鉴定试验来评估该低温消毒剂在实际中的使用效果，并进行金属腐蚀性测定。

结果与讨论

测序结果显示，该分离株 B646L 基因（P72）分型为基因Ⅱ型，其 EP402R 序列（CD2v）和 MGF 序列保留完整，该分离株属于 ASFV 基因Ⅱ型野生型毒株，并且具有明显的红细胞吸附能力，将其命名为 HBJZ202110。HBJZ202110 在高浓度有机物中的病毒衰减速率显著低于在水中，并且存活天数显著多于在水中。这表明，有机物的存在能极大地延长 ASFV 在环境中的存活时间。

在 4℃条件下确定的最佳消毒配方为：0.4%过硫酸氢钾复合物，6%乙二醇，消毒时间 30 min；在-20℃条件下，最佳消毒配方为 0.4%过硫酸氢钾复合物，20%乙二醇，消毒时间 30 min。该低温消毒剂在 4℃和-20℃环境下对 ASFV 杀灭效果良好，且明显优于其他常用消毒剂。金属腐蚀性试验结果表明，该低温消毒剂对不锈钢、铜和铝基本无腐蚀作用，对碳钢和锌仅有轻微腐蚀作用。模拟现场鉴定试验中，该低温消毒剂能够完全灭活金属和塑料表面病毒滴度为 10^{-7} HAD50/mL 的 ASFV。

综上，本研究成功分离得到一株 ASFV 基因Ⅱ型野生型毒株，为进一步研究基因Ⅱ型野生型 ASFV 的生物学特征奠定了基础。所制备的低温消毒剂对 ASFV 具有可靠的杀灭效果，且该配方成本低廉、易于制备与使用、对金属腐蚀性低。因此，该消毒剂可作为车辆、口岸现场或冷链运输条件等低温环境下对 ASFV 进行消杀的良好选择。

主要参考文献

[1] 卫生部卫生法制与监督司．消毒技术规范[S]．2002，北京：中华人民共和国卫生部．

[2] Dixon LK，Chapman DA，Netherton CL，et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. Virus Res，2013，173，3-14.

[3] Rao RS，Kumar CG，Prakasham RS，et al. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications：a critical appraisal [J]. Biotechnol J，2008，3：510-523.

※ 作者简介：王惠，在读硕士研究生，研究方向为猪传染病预防与控制。E-mail：114636133@qq.com。

※※ 通讯作者：何启盖，教授，博士生导师，研究方向为猪传染病临床诊断和控制、致病机制、新型疫苗与诊断制剂。E-mail：he628@mail.hzau.edu.cn。

专题报告

猪细小病毒 6 型 ORF2 基因的截短表达及多克隆抗体制备

欧云文[1,2※]，潘琴[1]，汪洋[2]，代军飞[2]，任绍科[1]，张洋[1]，张杰[2]

（1.开江县动物疫病预防控制中心，四川达州 636250；2.中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室，甘肃兰州 730046）

引言

猪细小病毒（Porcine parvovirus，PPV）是引起母猪繁殖障碍性疫病的主要病原体之一，家猪、野猪均为其宿主动物，母猪感染后可出现流产、产木乃伊胎及死胎等临床症状，仔猪、后备猪、育肥猪等均可感染而无明显临床症状，严重威胁全球生猪产业的健康发展。2014 年，中国学者首次从流产胎儿和仔猪样品中分离出 PPV6。此外，猪群中常发生 PPV6 与其他型猪细小病毒（PPV）、猪繁殖与呼吸综合征病毒 （PRRSV）、猪圆环病毒（PCV）等病原的混合感染，加重了对动物机体的致病程度，然而 PPV6 的致病机理、病原学和流行病学等生物学特性均不清晰。PPV6 为单链 DNA 病毒，基因组大小约为 6 100 bp，包括 5 ’非编码区、 3 ’非编码区和 2 个开放阅读框（ORFs）。PPV6 *ORF1* 基因编码 NS1 蛋白，*ORF2* 基因编码 VP1 蛋白。PPV6 VP1 蛋白由 1 189 个氨基酸组成，大小约 132 ku，是病毒主要的结构蛋白和抗原蛋白，参与病毒粒子的组装。不同 PPV 毒株间 VP1 蛋白氨基酸序列存在较大差异，且不同 PPV6 毒株间 VP1 蛋白大小略有差异。因此，本研究原核截短表达 PPV6 *ORF2* 基因并制备兔抗 PPV6 VP1$_{(348aa\text{-}675aa)}$ 蛋白多克隆抗体，为 PPV6 血清学检测方法的建立和 PPV6 VP1 蛋白的进一步研究提供了参考。

材料与方法

本研究对 NCBI 数据库中 PPV6 流行毒株的基因序列进行比对分析，筛选出高度保守的 *ORF*2 基因序列作为目标片段，设计特异性引物，以实验室分离的 PPV6 毒株基因为模板，截短表达 VP1$_{(348aa\text{-}675aa)}$ 蛋白，亲和层析纯化，纯化后重组蛋白作为免疫原，经背部皮下多点注射免疫新西兰大耳白兔，制备 VP1 蛋白多克隆抗体，并采用 Western blot、间接免疫荧光（IFA）和间接 ELISA 方法鉴定免疫兔血清特异性。

结果与讨论

成功构建了 pET30a-PPV6-ORF2 重组表达载体，原核截短表达了 PPV6 VP1$_{(348aa\text{-}675aa)}$ 蛋白，大小约为 40 ku，主要以包涵体形式存在；该蛋白可与 PPV6 阳性猪血清发生特异性结合，具有良好的反应原性；纯化后免疫兔血清与 PPV6 全病毒蛋白发生特异性反应，抗体效价为 1∶25 600，为 PPV6 VP1 蛋白的进一步研究和检测方法的建立提供了物质基础。

主要参考文献

[1] NI J，QIAO C，HAN X，et al. Identification and genomic characterization of a novel Porcine parvovirus（PPV6）in china[J]. Virology Journal，2014，11：203.

[2] WANG J，LIU Y，CHEN Y，et al. Capsid assembly is regulated by amino acid residues asparagine 47 and 48 in the VP2 protein of Porcine parvovirus[J]. Veterinary Microbiology，2021，253：108974.

※ 作者简介：欧云文，硕士，研究员，研究方向为动物传染病学研究。E-mail：oyw813@163.com。

控蓝净蓝操作细则系列一

迁 斌※， 李 慧※※，张玲玲
（浙江惠嘉生物科技股份有限公司，浙江湖州 313000）

引言

诊断监测是蓝耳病重要的防控前提适合两点式、三点式养殖模式。一点式难度大，维持蓝耳阴性对猪场设备设施及生物安全体系要求较高，猪场周边感染压力大的情况下种公猪/种母猪舍需要有空气过滤系统，防止蓝耳病经空气途径传播。此方案借鉴了六西格玛管理法则的核心内容，由评估、了解现状、设定目标、限制性因素分析、方案制订、执行监测六个步骤组成。

材料与方法

评估

饲养模式：一点式或多点式、后备猪引进情况及驯化方式、断奶日龄、生产流程控制、疫苗免疫程序、保健程序等.

设备设施：场址选择、场内布局、猪群管理、空气过滤、水质监测.

生物安全：

实验室检测条件（疫病净化的基础）、人员、车辆、物资、清洁、洗消烘干、风险动物、污物管理.

确定猪群的感染状态

了解现状：互联网现场评估、生物安全评估.

互联网现场评估：猪舍内外部、栏舍内外部;猪舍的全进全出、猪场多点式饲养、分胎次饲养，闭群饲养、废弃物无害化处理等措施是否具备。

实验室指标检测：

核酸检测（批次）RT-PCR：去势断尾处理液（一栋 6 个样-15-20 窝一个样）、断奶猪血清（60 头-10 合一）或窝唾液（6 窝）、弱仔掉队猪、后备猪口腔液、母猪血清、流产木乃伊胎儿胸腺淋巴结、精液。疑似感染的 2 个阶段（间隔 2 周），各采 5～10 个血样，qPCR 评估病毒载量；

抗体检测 ELISA：入群 60 天阴性后备母猪、经产母猪血清（30～60 头）.

制定目标

依据本场的感染状态，比如打造蓝耳阳性稳定场-非净化阶段（Ⅱ-A）或暂时阴性（Ⅲ），降低保育/育肥阶段死淘率（<3%）.践行“一场一策”个性化方案，保证后备猪病原 100%阴性，也是实现蓝耳病净化的关键点。

结果与讨论

方案制定（建议）-本部分只介绍控蓝操作细则：

需关注本场优势毒株、引种来源、引种计划及栏舍准备、免疫均质化、后备猪监测、基础母猪群持续监测.

※ 作者简介：迁斌，（1982-）黑龙江龙江人，动物科学本科毕业，惠嘉大动保全国技术服务总监，研究方向为母猪健康管理、疫病监测与检测。E-mail：13936628769@163.com
※※ 通讯作者：李慧，（1989-）河南省潢川人，动物营养硕士毕业，惠嘉大动保技术经理，研究方向为动物肠道健康调控.E-mail：neva1717@163.com

控蓝净蓝操作细则系列二

迁 斌※，李 慧※※，张玲玲
（浙江惠嘉生物科技股份有限公司，浙江湖州 313000）

引言

依据本场的感染状态，打造蓝耳阳性稳定场-非净化阶段（Ⅱ-A）或暂时阴性（Ⅲ），降低保育/育肥阶段死淘率（<3%）.践行“一场一策”个性化方案，保证后备猪病原 100%阴性，也是实现蓝耳病净化的关键点。

限制性因素分析：是为了根据猪场评估的实际结果，将不利于疾病防控的各种因素作系统的探讨，比如某些因素不利于疾病的防控，但是完全没有办法改变实施，有些因素不能按照理想要求完全改变，但是可以结合猪场的实际情况进行适当改善等，限制性因素的系统分析有利于后续方案的制定。

完全没有办法改变的不利因素：周边猪场的养殖密度、周边猪场的蓝耳感染状态、单独的后备猪隔离场地、猪场的地理位置、猪场的栏舍布局、可以适当改善的不利因素：精液的来源、外来精液的实验室检测、后备猪的引进计划、外部车辆的消毒管理、内部车辆的消毒管理、猪场的养殖密度控制、内外部的车辆管理、内外部人员的流动管理、免疫针头管理、方案制定（建议）-本部分只介绍控蓝操作细则需关注本场优势毒株、引种来源、引种计划及栏舍准备、免疫均质化、后备猪监测、基础母猪群持续监测.

蓝耳阳性稳定场-非净化阶段：

界定标准：S/P 值＞2.5 的个体低于 5%，种猪群体 S/P 平均值介于 1.0一1.2 之间;CV 值< 50%;

蓝可消 2kg/t+20%泰洛辛 1kg/t+维力嘉 1kg/t，连用 14 天，1 次/季度，一年 4 次。建议每年两次猪群蓝耳核酸、抗体的监测;

蓝耳阳性不稳定场-高流行率：

界定标准：S/P 值大于 2.5 的比例≧20%;CV 值≥50%;每吨饲料添加蓝可消 3kg/t+20%替勇（200）2kg/t+维力嘉 1kg/t，连用 14 天/月，连用 3 个月.用药前后最好都检测蓝耳 S/P 值。

关键节点：

切断母仔垂直、水平传播：妊娠 70 天～断奶当天，连续添加蓝可消 2～3kg/t+维力嘉 1kg/t;

疫苗免疫前 2 周至免疫当日前 3 天：连续添加蓝可消 2kg/t+泰洛辛 0.5～1kg+维力嘉 1kg/t，降低机体病毒载量!断奶应激与切断 6～8 周龄继发感染：断奶后四周，仔猪前两周连续添加蓝可消 3kg/t+替勇（200）0.5～1kg+维力嘉 1kg/t;后两周蓝可消 2kg/t+维力嘉 1kg/t;有效阻断 6～8 周龄墙;

切断公猪精液感染：每季度（3 个月）连续添加 45 天，蓝可消 2kg/t+嘉士勇 10～15g/天/头+维力嘉 1kg/t，降低机体病毒载量和提高生殖系统功能!

产房、保育清洁消毒一定要用泡沫清洗剂，以降低病毒载量，阻断水平传播。

产房断奶、保育转育肥一定要做到全进全出。

综合方案在执行两个胎次后，依据产后仔猪脐带血、去势断尾液的核酸阳性结果和断奶后仔猪的发病比例，再来调整下一步的方案。

※ 作者简介：迁斌（1982-），黑龙江龙江人，动物科学本科毕业，惠嘉大动保全国技术服务总监，研究方向为母猪健康管理、疫病监测与检测。E-mail：13936628769@163.com
※※ 通讯作者：李慧（1989-），河南省潢川人，动物营养硕士毕业，惠嘉大动保技术经理，研究方向为动物肠道健康调控.E-mail：neva1717@163.com

“维泰蓝”经典组方案例分享

迁 斌※，李 慧※※，张玲玲
（浙江惠嘉生物科技股份有限公司，浙江湖州 313000）

引言

本着公平、公开、公正的方案落实原则，在 21 年年底立项，22 年举集团绿色科技研究院、动保技术研究部、各省平台的优势资源和大量规模化、集约化、工厂化养猪企业实践应用的基础上，在科学论证、深入挖掘、大量实证的基础上确定了”维泰蓝”经典组方在控蓝净蓝维蓝的业内领先地位。

随着”维泰蓝”经典组方在生产一线的大量应用，大量的临床应用案例与数据也不断反馈到集团研究院和技术研究部，我们在结合评估饲养模式-一点式或多点式、猪群的感染状态-病原血清学、后备猪引进情况及驯化方式、断奶日龄、生产流程控制、疫苗免疫程序、保健程序等要素基础上进行抽丝剥茧、系统化进行方案使用阶段、使用时间、剂量加减的方面制定了更有实效性、科学性的方案应用，现将其中比较有典型指导意义的使用方案为大家呈现，期望可为广大养猪企业提供可以借鉴的方案。

材料与方法

四川某规模场，基础母猪存栏 1000 头，一点四段式生产模式，主要呈现母猪产仔日龄前移或延迟，产程长、产后炎症突出及奶水质量差。仔猪出生后 3 天左右拉稀、急剧消瘦死亡，弱仔比例在 20%以上，死亡率接近 100%。一周前后小猪表现呼吸道症状（体温偏高、背脊暗红、被毛粗乱、眼屎多、打喷嚏、关节肿大及个别喘气呼吸困难）。28 天断奶转保育后 2 周（42 日龄）小猪开始急剧发病，死淘率接近 50%。

结果与讨论

依据上述核酸和测序报告分析得出，此场感染的是高致病性蓝耳毒株，而且存在很严重的母仔垂直传播，说明妊娠后期（90 天-）通过胎盘屏障感染;断奶时的核酸阳性比例偏高，说明产房的母仔、仔仔水平传播的感染压力很大;我们只有通过在妊娠后期阻断垂直传播和产房的水平传播，以降低机体的病毒载量为主要方向进行方案推进.如果到断奶时采取措施，效果不会太理想，因为这时感染的病毒载量（CT）已经很大，任何措施都不会有太好的效果，最科学的方案就是抓源头进行层层阻隔，步步递减机体病毒载量。

1、切断垂直传播（存在可能性）和水平传播（产房、保育循环排毒）

①切断垂直传播：妊娠 70 天～断奶当天，每吨料连续添加新蓝可消 3kg/t+维力嘉 1kg/t。注：垂直传播目前是推断，等到脐带血核酸检测结果出来后确定。

②切断母猪水平传播：产后第 1 天～断奶，每吨料连续添加新蓝可消 3kg/t+维力嘉 1kg/t.切断产房水平传播。

2、降低仔猪病毒血症

原因：42 日龄发病仔猪通过报告可以判定病毒血症载量很高，继而临床症状（副猪、链球菌）一定很严重。

方案：断奶后四周-仔猪前两周连续添加蓝可消 3kg/t+替勇（200）1kg/t+维力嘉 1kg/t;后两周蓝可消 2kg/t+维力嘉 1kg/t，规避 6一8 周龄墙，继而降低发病临床症状。

3、产房、保育清洁消毒一定要用泡沫清洗剂，以降低病毒载量，阻断水平传播。

4、产房断奶、保育转育肥一定要做到全进全出。

综合方案在执行两个胎次后，依据产后仔猪脐带血、去势断尾液的核酸阳性结果和断奶后仔猪的发病比例，再来调整下一步的方案。

效果跟踪

进过一个胎次，在妊娠 90 天使用维泰蓝组合到断奶（28 天），共 60 天时间，通过此批次断奶仔猪的病原（CT 值）载量，以确定垂直和水平传播是否得到了有效的缓解和阻断。

※作者简介：迁斌（1982-），黑龙江龙江人，动物科学本科毕业，惠嘉大动保全国技术服务总监，研究方向为母猪健康管理、疫病监测与检测。E-mail：13936628769@163.com
※※通讯作者：李慧（1989-），河南省潢川人，动物营养硕士毕业，惠嘉大动保技术经理，研究方向为动物肠道健康调控.E-mail：neva1717@163.com

2012-2020 年四川省 PRRSV 株 Nsp2 和 orf5 的分子特征

简芝洁，赵军，徐志文，朱玲
（四川农业大学动物医学院，四川成都 611130）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus，PRRSV）是猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）的病原体，是一种小的包膜单链阳性 RNA 病毒，至少编码 10 个开放阅读框（ORFs）。Nsp2 和 ORF5 具有较高的突变率，也适合作为系统发育和流行病学标记[1]。PRRS 是一种主要感染呼吸和生殖系统的猪经济毁灭性流行病，对全球养猪业构成严重威胁。四川省是中国最大的养猪省之一，既往研究表明，四川地区 PRRSV 毒株的基因组发生了显著的变化。近年来，缺乏对四川省 PRRSV 流行菌株的持续监测和系统分析的报告。

材料与方法

我们在四川 13 个养殖区共采集了 539 份样品。以组织、血液和流产胎儿样本为研究对象，对四川省 PRRSV 患病率进行了调查。通过分析 Nsp2 和 ORF5 基因的遗传变异，研究 2012-2020 年四川省流行病毒的遗传多样性。针对 Nsp2 和 ORF5 的基因组序列，分别设计特异性检测引物和特异性基因组扩增引物。对 2016-2020 年期间采集的来自四川省 13 个地区规模化猪场的 539 份疑似 PRRSV 的临床组织样品进行 PCR 检测，并对检测为阳性的临床组织样品进行基因组扩增、克隆与遗传进化分析。

结果与讨论

结果显示，在 539 份临床组织样品共检出 282 份 PRRSV，其中 HP-PRRSV、经典 PRRSV、NADC30-like PRRSV 和欧洲 PRRSV 分别为 170、22、86 和 4 份。经典 PRRSV 和 HP-PRRSV 是 2012—2017 年四川省流行的主要 PRRSV 流行株。NADC34 样毒株于 2019 年首次在四川省发现。序列比对显示，四川省 5 株 NADC34 样 PRRSV 毒株与 2014 年分离自美国的 NADC34 毒株具有相同的 Nsp2 蛋白缺失。基于本研究对 GP5 蛋白的分析，目前流行的野毒株关键氨基酸位点的突变可能是导致疫苗免疫效果不佳的原因之一。系统进化树分析显示，5 株毒株的 Nsp2 基因和 ORF5 基因处于不同的分支，提示 PRRSV 基因组可能发生重组。综上所述，本文从分子流行病学角度系统分析了 2012—2020 年四川地区 PRRSV 的流行历史和遗传进化。本研究结果为 PRRSV 流行趋势和控制策略提供了有价值的信息和新的视野。

主要参考文献

[1]Johnson CR，Griggs TF，Gnanandarajah J，Murtaugh MP. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses[J]. Journal of General Virology，2011，92（Pt 5）：1107-16.

表达 NADC30-like 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 和 M 蛋白的重组伪狂犬病毒的构建及其免疫原性评价

邓李霜[1※]，赵军[1※]，徐志文[1※]，朱玲[1, 2※※]

（1.四川农业大学动物医学院，四川成都 611130；2.四川省动物疫病与人类健康重点实验室，四川成都 61130）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）和伪狂犬病（PR）是具有高度传染性的猪病毒病，对中国乃至世界养猪业造成了巨大的经济损失，呼吸系统和生殖系统是它们的主要靶系统。现有的伪狂犬病毒（PRV）和猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）商品疫苗不能对中国的 PRV 变异株和 NADC30-like 的 PRRSV 毒株提供完全保护。因此，本研究以 gE/gI/TK 基因缺失的 PRV 变异株 XJ 和 NADC30-like PRRSV 株 CHSCDJY-2019 为母本，拟构建一株表达 NADC30-like PRRSV GP5 和 M 蛋白的重组伪狂犬病病毒 rPRV-NC56，并在小鼠体内评价 rPRV-NC56 的安全性和免疫原性，旨在为 PRV 变异株和 NADC30-like PRRSV 毒株的疫苗研发提供参考资料和技术支撑。

材料与方法

PRV-XJ（Genbank 登录号：MW893682.1）和 CHSCDJY-2019（Genbank 登录号：MT075480.1）毒株由四川农业大学动物医学院动物生物技术中心分离并保存。通过 RT-PCR 扩增 PRRSV CHSCDJY-2019 毒株编码 GP5 蛋白和 M 蛋白的 ORF5 和 ORF6 基因片段，引入裂解肽编码核酸序列后采用同源重组技术插入 pEGFP-gI/28K 载体成功构建转移载体 pEGFP-2A-NC-OFR5-6，再通过同源重组、Crispr/cas9 基因敲除技术获得重组病毒 rPRV-NC56。采用 ELISA、流式细胞术、组织病理切片等技术评价 rPRV-NC56 在 BALB/c 小鼠体内的安全性和免疫原性。

结果与讨论

本研究构建了一株表达 NADC30-like PRRSV GP5 和 M 蛋白的重组伪狂犬病病毒 rPRV-NC56。研究结果显示 rPRV-NC56 能够有效表达目的蛋白，生物学特性与亲本毒株无显著差异，遗传稳定性良好，外源基因插入和毒力基因缺失稳定。rPRV-NC56 在小鼠体内的安全性和免疫原性结果显示，rPRV-NC56 免疫小鼠后无临床症状和死亡，脑组织无明显病理变化。rPRV-NC56 免疫小鼠后可保护小鼠抵御 PRV 野毒攻击，诱导高水平针对 PRV gB 和 NADC30-like PRRSV GP5 和 M 蛋白的特异性抗体，产生针对 NADC30-like PRRSV 的中和抗体，血清中炎性因子水平升高极显著，脾细胞中 $CD3^+$、$CD3^+CD8^+$、$CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞百分比显著高于对照组。

主要参考文献

[1] TONG W，ZHENG H，LI G X，et al. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus （CSFV） protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV [J]. Antiviral research，2020，173： 104652.

[2] XU W，DU S，LI T，et al. Generation and Evaluation of Recombinant Baculovirus Co-expressing GP5 and M Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type 1 [J]. Viral immunology，2021，34（10）： 697-707.

※ 作者简介：邓李霜，在读博士研究生，研究方向为动物微生物与免疫学，猪病病原分子生物学。E-mail：1406433134@qq.com。

作者简介：赵军，博士研究生，研究方向为动物微生物与免疫学，猪病病原分子生物学。E-mail：zhaojunjoy@126.com。

作者简介：徐志文，教授，博士生导师，研究方向为动物微生物与免疫学，猪病病原分子生物学。E-mail：abtcxzw@126.com。

※※ 通讯作者：朱玲，教授，博士生导师，研究方向为动物微生物与免疫学，猪病病原分子生物学。E-mail：abtczl72@126.com。

盖塔病毒对雄性小鼠生殖能力的影响研究

李凤琴[1、2※]，徐志文[1]，徐雷[1]，朱玲[1※※]
（1.四川农业大学动物医学院，四川成都 611130；2.西昌学院动物科学学院，四川西昌 615013）

引言

盖塔病毒可引起多种动物的感染和多种途径的传播。近年来，我国在多种动物中检测到 GETV，猪群中 GETV 的发病和传播也时有发生，是需要引起关注的重要新发猪病[1]。目前对于盖塔病毒的研究，主要集中在蚊源病毒的检测和分离及不同动物的血清学调查，针对 GETV 的致病性、致病机制等方面的研究报道较少，而病毒对雄性动物的生殖影响还未见报道。因此，本研究用 GETV 感染雄性小鼠，旨在探究 GETV 对雄性小鼠生殖能力的影响。

材料与方法

用实验室分离保存的 GETV 后肢肌肉注射感染雄性小鼠，于 0.5d、1d、2d、3d、5d、7d、14d、21d、28d 分别采集小鼠血清、附睾和睾丸。用 ELISA 方法检测血清中睾酮含量；检测附睾中精液质量，包括精子数量、活力和畸形率等，同时用电镜观察附睾中精子超微结构的变化；测量睾丸脏器指数，用电镜和 HE 染色观察病毒对睾丸的病理损伤，用 q-PCR 方法检测睾丸中病毒拷贝数变化，采用免疫组化方法观察病毒在睾丸中的分布和含量变化。

结果与讨论

结果显示，病毒在短时间内就可进入睾丸并在睾丸间质中增殖，快速引起睾酮含量降低、精子质量下降和睾丸损伤。病毒感染小鼠后，其血清睾酮含量在 0.5 dpi 时就降至 2.33 ng/ml，1 dpi 时达到最低水平 2.14 ng/ml。感染小鼠精子数量和畸形率同时在感染后 2 天达到最低和最高值，分别为 3.99×10^6/ml 和 43.67%，而精子活率在 21dpi 时最低，为 62.03%；经电镜观察，实验组小鼠精子轴突呈不同程度缺失，线粒体出现肿胀，对照组未见异常。实验组小鼠睾丸系数与对照组无明显差异（P>0.05），但 H&E 染色可见实验组小鼠睾丸组织出现严重空化，生精小管间隙不规则且变宽，生精小管管腔内精子减少；睾丸病理损伤在第 14 天出现好转，第 28 天空化减少，生精小管中心出现精细胞。病毒拷贝数在 0.5 dpi 时就在小鼠睾丸中达到峰值，为 1.07×10^5 copies/ug RNA，在 21 dpi 时消失；免疫组化发现，GETV 只在小鼠睾丸间质细胞中出现，增殖趋势与 q-PCR 检测结果一致。本研究探索了 GETV 对雄性小鼠生殖功能的影响，发现了 GETV 在小鼠睾丸中的定植规律，为 GETV 致病机制和新型疫苗、载体等的研究提供了重要信息，将在 GETV 的防治和进一步研究中发挥重要作用。

主要参考文献

[1] Liu L X，Zhao S G，Lu H N，et al. Association between polymorphisms of the swine MHC-DQA gene and diarrhea in three Chinese native piglets [J]. International Journal of Immunogenetics，2015，42，208-215.

※ 作者简介：李凤琴，在读博士研究生，研究方向为动物疫病病原分子学。E-mail：410726908@qq.com。
※※ 通讯作者：朱玲，教授，博士生导师，研究方向为动物微生物与免疫学；猪病病原分子生物学。E-mail：abtczl72@126.com。

河南省猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 和 NSP2 基因的遗传多样性及系统发育分析

赵士杰[1※]，陈 静[2]，张宜娜[1]，夏平安[1※※]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2.河南农业大学生命科学院，河南郑州 450002）

引言

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒感染引起的一种以妊娠母猪流产及产死胎、弱胎、木乃伊胎等繁殖障碍，以及处于不同生长阶段的猪只呼吸系统障碍为特征的传染病，断奶仔猪感染后多表现为呼吸系统障碍及高热。我国在 1996 年首次发现并分离到 PRRSV，2006 年我国首次爆发高致病性 PRRS 疫情，给我国养猪业带来了空前打击。2013 年我国开始出现 PRRSV NADC30-like 毒株，其中河南省的临床检测率逐年增加[1]。河南省是我国主要的生猪养殖及肉制品加工省份，及时做好本地区猪群 PRRSV 流行检测及防控意义重大。因此，本研究旨在了解河南地区流行的 PRRSV 的遗传多样性和分子流行病学特点，也为该地区制订更合理的 PRRSV 防控措施提供理论依据[2~3]。

材料与方法

试验对象为河南省 11 个地市 39 家猪场采集的 175 份疑似 PRRS 的临床样本，包括肺脏、肝脏、脾脏和淋巴结。采用 RT-PCR 和克隆测序分析获得的 18 株 PRRSV 的 ORF5 和 NSP2 序列，包括 16 个 ORF5 和 10 个 NSP2 基因序列，并用 DNASTAR 5.0 的 MegAlign 程序对 PRRSV ORF5 和 NSP2 基因序列进行分析，用 MEGA 7.0 中的邻接法构建基于 PRRSV ORF5 和 NSP2 基因推导氨基酸序列的系统发育树。

结果与讨论

本研究对河南地区养殖场送检的 175 份临床样本进行 PRRSV 的 RT-PCR 检测，总阳性率为 25.71%（45/175），后续对扩增出的 16 个 ORF5 和 10 个 NSP2 基因序列进行遗传变异分析。本研究基于全长 ORF5 基因推导氨基酸的系统发育分析结果表明，16 株 PRRSV 毒株均属于基因 2 型。同时，本研究基于部分 NSP2 基因推导氨基酸的系统发育分析结果表明，10 株 PRRSV 毒株均属于基因 2 型。10 株 PRRSV 毒株中的 9 株毒株有 3 处（322~432 aa、483 aa 和 504~522 aa）不连续的氨基酸缺失，这些氨基酸缺失与 NADC30 毒株相同。结合 ORF5 基因推导氨基酸的系统发育分析结果，可以确定类 NADC30 毒株目前是河南地区的优势毒株[4]。此外，在部分毒株的 NSP2 蛋白中也观察到了新的氨基酸缺失，说明河南地区 PRRSV 遗传进化与流行的复杂性在不断增加。本研究结果为了解河南地区流行的 PRRSV 的遗传多样性和分子流行病学提供了理论依据，也为预防和控制猪的 PRRSV 感染提供了帮助。

主要参考文献

[1] 周群，周可磊，胡承哲，等. 西南地区 PRRSV 分子流行病学调查及其类 NADC30 株基因组特征分析 [J]. 中国预防兽医学报，2019，41（12）： 1275-1279.

[2] 方凯，桂淦，陈晓荣. 高致病性猪蓝耳病的综合防控 [J]. 畜牧兽医科技信息，2019（2）： 107.

[3] GUO Z，CHEN X，LI R，et al. The prevalent status and genetic diversity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China： a molecular epidemiological perspective [J]. J Virol，2018，15（1）： 2.

[4] 石青青，姜轩，张奥，等. 2016--2017 年我国华北地区猪繁殖与呼吸综合征病毒类 NADC30 毒株分子遗传演化分析 [J]. 中国动物传染病学报，2020，28（3）： 80-85.

※ 作者简介：赵士杰，在读博士研究生，研究方向为动物分子免疫学。E-mail：1002935527@qq.com。
※※ 通讯作者：夏平安，教授，博士生导师，研究方向为动物分子免疫学。E-mail：xpa88@163.com。

2005-2023 年我国猪群中猪瘟病毒的流行报告：Meta 分析及系统评价

邹　宏[1※]，程　鹏[2]，李文杰[2]，姚淑华[2]，吴春霞[2]，程方俊[1]，罗　干[2※※]
（1. 西南大学 动物医学院，重庆 402460；2. 重庆市万州区畜牧产业发展中心，重庆 404100）

引言

目前有相关文献报道猪瘟（CSF）已经逐渐演变为一种地方性、慢性、非典型的流行态势，表现为仔猪生长迟缓、震颤及妊娠母猪流产等，各地每年频发，但缺乏相关的实证证据[1]。Meta 分析及系统评价是临床循证医学的重要组成部分，其中 Meta 流行病学作为重要工具在定量分析研究以及中识别与量化潜在偏移特征影响研究中发挥重要作用[2]。因此本研究利用 Meta 分析及系统评价分析我国 2005-2023 年猪群中猪瘟病毒（CSFV）流行感染的情况，旨在后期为 CSFV 研究和流行病学调查提供更高级的流行病学证据。

材料与方法

本研究基于中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 和 Science Direct 等国内外 6 种主要数据库进行检索 CSFV 的流行病学调查，时间范围为 2005 年 1 月 1 日。2023 年 1 月 1 日。利用相关标准对检索结果进行排除并评分，然后对文献数据进行双反正弦转换使数据接近于正态分布，再利用 *StataMP17* 软件分析 CSFV 的流行率，评价所选文献间 CSFV 流行率是否存在异质性，利用 Egger 检验来评价所选文献是否发生偏移影响，并使用敏感性分析本研究所获结果的稳健性，进一步利用 Meta 回归和亚组分析探究 CSFV 异质性的来源因素。

结果与讨论

结果表明所选文献 CSFV 流行率 I^2=94.94%，P<0.05，存在明显的异质性，Egger 检验确定了所选文献之间发生偏移，敏感性分析结果稳定。对 CSFV 流行率进行效应量合并，结果显示，我国 2007~2023 年猪群中 CSFV 的整体流行率为 12%（95%CI：0.09~0.15），和最新报告的 CSFV 流行率 10%~30%结果一致[3]，证实了随着对 CSFV 研究的深入，CSF 的防控趋于稳定状态。进一步利用 Meta 回归分析所选文献的异质性来源，发现采样时间和猪只种类（P>0.05）不是其异质性高的原因，而影响 CSFV 流行率的风险因子主要包括诊断方法、季节变化、气候因素、海拔高度、纬度因素、经度因素以及地区分布（P<0.05），其中不同地区之间 CSFV 流行率差异极显著（P<0.001）。证实了目前 CSFV 的地方性流行趋势。本研究整合了 2005~2023 年 CSFV 的流行趋势，利用 Meta 分析和系统评价证实了 CSF 的整体流行率和地方流行趋势，为 CSF 的防控和净化提供了数据上的帮助。

主要参考文献

[1] CHEN Y，SHI K，LIU H，et al. Development of a multiplex qRT-PCR assay for detection of African swine fever virus，classical swine fever virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. J Vet Sci，2021，22（6）： e87.

[2] HERNANDEZ A V，MARTI K M，ROMAN Y M. Meta-Analysis[J]. Chest，2020，158（1S）： S97-S102.

[3] YAO J，SU L，WANG Q，et al. Epidemiological investigation and phylogenetic analysis of Classical Swine Fever virus in Yunnan province from 2015 to 2021[J]. J Vet Sci，2022，23（4）： e57.

※ 作者简介：邹 宏，硕士，研究方向为动物微生物学及免疫学、猪瘟病毒感染及免疫机制。Email：767713928@qq.com。
※※ 通讯作者：罗 干，助理兽医师，硕士，研究方向为兽医微生物学及免疫学、动物养殖环节粪污资源化利用、动物疫病分子流行病学调查。E-mail：LOU-Gan@outlook.com。

不同商品化病毒 DNA 提取试剂盒对非洲猪瘟病毒检测效果的比较研究

杨云龙[1, 2※]，冯永智[1]，高 琦[1, 3]，吴小仪[1, 3]，龚浪[2, 3]，张桂红[1, 2, 3※※]

（1.华南农业大学兽医学院，广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室，广东广州 510642；2.国家非洲猪瘟区域实验室（广州）广东广州 510642；3.华南农业大学非洲猪瘟防控技术研究中心，广东广州 510642）

引言

ASF 疫苗的研发始于 1960 年，但由于 ASFV 生物学特性较为复杂，目前尚未研制出安全有效的商业化疫苗[1]。因此，对 ASF 的常规监测与制定精准的防控策略显得尤为重要。针对样品 DNA 提取的方法有很多种，最常用的有十六烷基三甲基溴化胺（CTAB）法、十二烷基硫酸钠（SDS）法、尿素法、试剂盒法、磁珠法和高盐低 pH 法等，但综合成本、提取时间、操作繁琐程度和提取效率等方面因素，目前市面上多种商品化 DNA 提取试剂盒被普遍使用，但提取效率尚未进行系统地比较与评估[2]。因此，本文首先构建了晚期 p72 基因的标准品质粒，针对病毒基因序列设计荧光定量 PCR 的引物和探针，并构建基于 p72 基因的标准曲线。同时，本文通过对 OIE 和 CADC 引物、探针灵敏性的对比，并对多种商品化 DNA 提取试剂盒的效率进行评估，挑选出适用于检测中国流行 ASFV 毒株的 CADC 推荐引物、探针和性价比较高的 Axygen 试剂盒，然后进行病毒基因组的提取与检测。以上研究皆在为 ASFV 的 DNA 提取和检测提供更加精准、灵敏的方法，从而为精准剔除 ASF 患病猪提供参考。

材料和方法

试验针对 ASFV 的晚期翻译 p72 蛋白基因构建了标准品质粒和标准曲线，并利用荧光定量 PCR 技术对 OIE 和 CADC 提供的引物和探针进行灵敏性的比对，并对多种 DNA 提取试剂盒提取的 ASFV DNA 检测效率进行了评价，为 ASFV 的高效检测提供数据参考。

结果与讨论

结果表明，构建的 ASFV 晚期 p72 基因的标准品质粒和标准曲线中，p72 标准品质粒的检测效率与灵敏度较优。通过使用 OIE、CADC 分别提供的引物、探针和多种 DNA 提取试剂盒进行 ASFV 荧光定量 PCR 检测，发现 CADC 提供的引物和探针对于 ASFV 的检测更加灵敏，Axygen 品牌的 DNA 提取试剂盒对 ASFV 的检测性价比更高。

主要参考文献

[1] 雷建林，曹 宏，杨丽霞，等.非洲猪瘟病毒的生物学特性与疫苗研制的难点[J].生物工程学报，2020，36（1）： 13-24.

[2] 李姗姗，赵民楷，冯丹彦，等.五种大蒜 DNA 提取方法的比较研究[J].岳阳职业技术学院学报，2022，37（1）： 67-70.

※ 通讯作者：张桂红，教授，博士生导师，研究方向为猪病临床诊断技术及分子生物学研究。E-mail：guihongzh@scau.edu.cn

非洲猪瘟病毒诱导猪红细胞凋亡并促进猪外周血单核细胞的吞噬作用

杨云龙[1, 2※]，冯永智[2, 3]，高　琦[1, 2]，郑佳琛[1, 3]，王　衡[1, 3]，张桂红[1, 2, 3]，龚　浪[1, 2※※]

（1.华南农业大学兽医学院/广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室，广东广州 510642；2.国家非洲猪瘟区域实验室（广州）/华南农业大学非洲猪瘟防控技术研究中心，广东广州 510642；3.华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心，广东广州 510642）

引言

ASFV 是非洲猪瘟病毒科（Asfarviridae）、非洲猪瘟病毒属（Asfivirus）的成员，基因组长度为 170-190 kb，为双链 DNA 病毒（dsDNA）。CD2v 是 ASFV 外膜蛋白中唯一的特征性病毒蛋白，由一个信号肽、一个跨膜区和两个免疫球蛋白样结构域组成，它具有与 CD2 相似的氨基酸序列[1]。已有研究发现，从 ASFV 基因组中敲除 EP402R 基因会降低 ASFV 引起的死亡率，并可以延缓病毒血症的发生和病毒向组织的传播，这表明 CD2v 介导的 ASFV 吸附 RBCs 的能力有助于病毒在宿主中的传播[2]。基于此，研究 ASFV 吸附 RBCs 后对细胞凋亡的影响，以及 ASFV 吸附诱导 RBCs 发生凋亡后对猪外周血单核细胞（PBMs）吞噬能力的影响。

材料和方法

试验采用流式细胞术检测 ASFV 侵染猪原代肺泡巨噬细胞（PAMs）和猪红细胞（RBCs）的能力，并检测 ASFV 诱导 RBCs 发生凋亡的百分比；同时采用激光共聚焦实验（Confocal）观察 ASFV 诱导 RBCs 发生凋亡是否影响 PBMs 的吞噬能力。

结果和讨论

结果显示，ASFV 不能入侵 RBCs，但以时间和剂量依赖性方式诱导 RBCs 发生凋亡。0.1 MOI ASFV 接种 RBCs 后 1 d、3 d、5 d 和 7 d 可分别诱导 1.27%、3.23%、7.39%和 8.56%的 RBCs 发生凋亡；1 MOI ASFV 接种 RBCs 后 1 d、3 d、5 d 和 7 d 可分别诱导 1.54%、3.73%、8.46%和 10.74%的 RBCs 发生凋亡；3 MOI ASFV 接种 RBCs 后 1 d、3 d、5 d 和 7 d 可分别诱导 2.65%、5.01%、12.44%和 18.61%的 RBCs 发生凋亡。同时，凋亡的 RBCs 可以增加 PBMs 对黄绿色荧光微球的吞噬数量，ASFV 诱导 RBCs 凋亡的百分比越高，PBMs 吞噬黄绿色荧光微球的数量越多。综上所述，ASFV 不能侵染猪 RBCs，但可以以时间和剂量依赖性方式诱导 RBCs 发生凋亡并增强 PBMs 的吞噬功能。试验通过感染 ASFV 的 PAMs 发现了血液吸附（haemadsorption，HAD）现象。进一步研究表明，ASFV 可诱导 RBCs 发生凋亡，并且凋亡的 RBCs 可以促进 PBMs 的吞噬作用，表明这种现象可能是加剧宿主 ASFV 感染传播的另一种方式，为 ASFV 的感染传播和致病机制的研究提供理论基础。

主要参考文献

[1] Chaulagain S，Delhon GA，Khatiwada S，et al. African Swine Fever Virus CD2v Protein Induces β-Interferon Expression and Apoptosis in Swine Peripheral Blood Mononuclear Cells [J]. Viruses，2021，13（8）：1480.

[2] Goatley LC，Dixon LK. Processing and Localization of the African Swine Fever Virus CD2v Transmembrane Protein [J]. J Virol，2011，85（7）：3294-3305.

※ 作者简介：杨云龙，硕士研究生，研究方向为非洲猪瘟的致病机制研究。E-mail：yunlongyang@stu.scau.edu.cn

※※ 通讯作者：龚浪，教授，硕士生导师，研究方向为分子病毒学研究。E-mail：gonglang@scau.edu.cn

猪繁殖与呼吸综合征病毒通过脂质代谢途径调节脂滴积聚以促进病毒复制

杨云龙[1,2※]，罗依琢[1,2]，易松强[3]，高琦[1,2]，龚婷[1,4]，冯永智[1]，吴东东[1,4]，郑晓宇[1,4]，王衡[2]，张桂红[1,2,4]，孙彦阔[1,2,4※※]

（1.华南农业大学动物医学院，广东省人畜共患病防治重点实验室，广东广州 510642；2.广东省岭南现代农业重点实验室茂名分院，广东茂名 525000；3.江西省农业技术推广中心，江西南昌；4.中国农业农村部动物疫苗研制重点实验室，北京 100083）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）引起的一种严重的呼吸系统疾病，可导致妊娠母猪流产和公猪精液质量下降。然而，PRRSV 在宿主体内复制的机制尚未完全阐明。脂质代谢和脂滴（LDs）在多种病毒的复制中发挥重要作用。脂滴（LD）是一种主要由甘油三酯和胆固醇酯组成的动态细胞器[1]，参与多种生物过程，包括脂质储存和运输、代谢、蛋白质储存和降解[2]。内质网产生 LD 后，其大小和细胞位置在小范围内不断变化[3]。最近的许多研究表明，病原体在感染宿主细胞后可以诱导 LD 积累，并且宿主 LD 还可以调节病毒的生命周期[4]。本研究旨在探讨 LDs 影响 PRRSV 复制的机制。

材料和方法

本文通过激光共聚焦和透射电镜，Western blot，IFA 和 RT-qPCR 等方法研究 PRRSV 感染调控细胞内 LD 的积累从而促进病毒复制的机制。

结论

通过激光共聚焦和透射电镜显示，PRRSV 感染可促进细胞内 LD 的积累，而 NF-κB 信号通路抑制剂 BAY11-7082 和盐酸二甲双胍（MH）可显著降低 LD 的积累。此外，DGAT1 抑制剂显著降低磷酸化 NF-KB p65 和 PIκB 的蛋白表达以及 NF-KB 信号通路中 IL-1β 和 IL-8 的转录。此外，还发现 NF-κB 信号通路和 LDs 的减少显著降低了 PRRSV 的复制。综上所述，本研究结果提示 PRRSV 通过调控 NF-κB 信号通路增加 LD 积累和促进病毒复制的新机制。此外，研究证明 BAY11-7082 和 MH 都可以通过减少 NF-κB 信号通路和 LD 积累来减少 PRRSV 的复制。本研究为 PRRS 防控机制的研究以及抗病毒药物的研发奠定了理论基础。

主要参考文献：

[1] Preuss，C.，Jelenik，T.，Bódis，K.，Müssig，K.，Burkart，V.，Szendroedi，J.，Roden，M.，Markgraf，D. F.，2019. A New Targeted Lipidomics Approach Reveals Lipid Droplets in Liver，Muscle and Heart as a Repository for Diacylglycerol and Ceramide Species in Non-Alcoholic Fatty Liver. Cells. 8，277.

[2] Bartz，R.，Li，W. H.，Venables，B.，Zehmer，J. K.，Roth，M. R.，Welti，R.，Anderson，R. G.，Liu，P.，Chapman，K. D.，2007. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic[J]. J Lipid Res, 48，：837-847.

[3] Monson EA，Crosse KM，Duan M，Chen W，O'Shea RD，Wakim LM，Carr JM，Whelan DR，Helbig KJ. Intracellular lipid droplet accumulation occurs early following viral infection and is required for an efficient interferon response[J]. Nat Commun, 2021，12（1）： 4303.

[4] Roingeard，P.，Melo，R. C.，2017. Lipid droplet hijacking by intracellular pathogens. Cell. 19. Microbiol.

※ 作者简介：杨云龙，硕士研究生，研究方向为非洲猪瘟的致病机制研究。E-mail：yunlongyang@stu.scau.edu.cn

※※ 通讯作者：孙彦阔，副教授，硕士生导师，研究方向为病毒分子流行病学。E-mail：yankuosun@scau.edu.cn

芦荟大黄素通过调节 NF-κB 信号通路促进细胞凋亡抑制非洲猪瘟病毒复制

罗依琢[1,2,5※]，杨云龙[1,2]，王文如[1]，高琦[1,2,3]，龚婷[1,4]，冯永智[1,3]，吴东东[1,4]，郑晓宇[1,3]，张桂红[1,2,3,4,5]王衡[1,2,3,4,5※※]

（1.华南农业大学动物医学院，广东省人畜共患病防治重点实验室，广东广州 510462；2.非洲猪瘟中国区域实验室（广州），广东广州 510642；3.广东省岭南现代农业重点实验室茂名分院，茂名 525000；4.华南农业大学非洲猪瘟防控研究中心，广东广州 510642；5.中国农业农村部动物疫苗研制重点实验室，北京 100083）

引言

非洲猪瘟（African swine fever，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）引起的猪的急性出血发热传染病，是世界动物卫生组织（OIE）认定的一类动物疾病。所有品种和年龄的家猪和野猪易受感染，致死率高达 100%[1]。天然植物可作为新型抗病毒药物，芦荟对流感病毒、单纯疱疹病毒有明显的抑制作用。芦荟大黄素（Ae）是一种具有抗病毒、抗癌、抗炎作用的中药活性成分，在炎症应激下，Ae 可抑制 NF-κB 信号通路中 I-κB α 蛋白的降解和磷酸化 ERK，p38，JNK 和 Akt 蛋白的表达[2]。此外，Ae 能显著提高细胞内活性氧水平，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡[3] 虽然有研究报道 Ae 对猪复制病毒有抗病毒作用，好传导与呼吸综合征病毒（PRRSV）、流感病毒（IV）以及 SARS-CoV2，但其对 ASFV 的抗病毒活性及其相关机制尚不清楚。

方法和材料

本文采用实时荧光定量 PCR、western blotting、间接免疫荧光法、转录组学分析和流式细胞术研究 Ae 对 ASFV 的抗病毒活性和作用机制。

结论

本文通过转录组学分析显示，ASFV 感染在早期激活 NF-κB 信号通路，在晚期激活凋亡通路。Ae 显著下调猪肺泡巨噬细胞感染 ASFV 后 MyD88、磷酸化 NF-κB p65、pIκB 蛋白表达水平以及 IL-1β、IL-8 mRNA 表达水平，从而抑制 ASFV 诱导的 NF-κB 信号通路的激活。流式细胞术和 western blot 分析显示，Ae 显著增加了 asfv 诱导的凋亡细胞百分比。此外，Ae 通过上调 cleaved-caspase3 和 Bax 蛋白的表达水平，下调 Bcl-2 蛋白的表达水平，促进细胞凋亡。这表明 Ae 通过抑制 NF-κB 通路促进细胞凋亡，从而抑制 ASFV 的复制。这些发现进一步完善了预防和治疗非洲猪瘟的治疗储备。

主要参考文献

[1] Dixon LK，Stahl K，Jori F，Vial L，Pfeiffer DU. African Swine Fever Epidemiology and Control[J]. Annu Rev Anim Biosci， 2020, 8. 366221-246.

[2] Xian M ，Cai J ，Zheng K ，et al. Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the 390 PI3K/AKT/mTOR and NF-κB pathway[J]. Food Funct, 2021, 12. 8056-8067.

[3] Byun EB，Kim HM，Sung NY，et al. Gamma irradiation of aloe-emodin induced structural modification and apoptosis through 392 a ROS- and caspase-dependent mitochondrial pathway in stomach tumor cells[J]. Int J Radiat Biol, 2018, 94. 403-416

※ 作者简介：罗依琢，硕士研究生，研究方向为非洲猪瘟的致病机制研究。E-mail：lawzz@stu.scau.edu.cn

※※ 通讯作者：王衡，副教授，硕士生导师，研究方向猪病发病机制和流行病学的研究。E-mail：wangheng2009@scau.edu.cn

非洲猪瘟病毒对稳定表达 CD163 和 Siglec1 的猪肾细胞的适应性

高琦[1,2,3※]，杨云龙[1,2]，罗依琢[1,2,5]，郑佳琛[1,4]，龚浪[1,2,3]，王衡[1,2,3]，冯永智[1,3]，龚婷[1,4]，吴东东[1,4]，许润达[1,4]，郑晓宇[1,3]，郑泽中[1,2,3]，张桂红[※※1,2,3]

(1.华南农业大学兽医学院广东省人畜共患病预防控制重点实验室，广东广州 510642；2.中国非洲猪瘟区域实验室，广东广州 510642；3.广东岭南现代农业实验室茂名分院，广东茂名 525000；4.华南农业大学非洲猪瘟防控研究中心，广东广州 510642；5.中国农业农村部动物疫苗研制重点实验室，北京 100026)

非洲猪瘟病毒（ASFV）是一种复杂的大 DNA 包膜病毒，其导致非洲猪瘟，致死率高达 100%，严重威胁着全球养猪业。由于 ASFV 具有严格的细胞嗜性，目前还没有有效的体外细胞系，这阻碍了其预防和控制。本研究分析了 ASFV 易感猪肺泡巨噬细胞（PAM）和非易感细胞系 PK15 和 3D4-21 的全基因组转录产物，发现与 PK15 和 3D 4-21 细胞系中观察到的相比，PAM 表面模式识别受体（PRR）在吞噬作用中显著更高，共有差异基因显著富集。因此，宿主细胞表面 PRRs 的内吞功能可能在体外感染 ASFV 中发挥关键作用。结果发现，ASFV 对过表达 CD163 和 Siglec1 的 PK15 和 3D4-21 细胞系，以及对稳定表达 CD163 及 Siglec2 的 PK15S1-CD163 细胞系具有感染性。然而，单独过表达 CD163 或 Siglec1 的 PK15 和 3D4-21 细胞系没有感染性。小干扰 RNA（siRNA）同时干扰 PAMs 中的 CD163 和 Siglec1 显著降低了 ASFV 的传染性。同时发现，CD163 和 Siglec1 的 siRNA 干扰分别不影响 ASFV 的感染性。ASFV 显著抑制 PAMs 和 PK15S1-CD163 细胞中 IFN 的表达水平，但对 PK15 和 3D4-21 细胞系没有影响。这些结果表明，CD163 和 Siglec1 是 ASFV 感染宿主细胞的关键受体，两者在 ASFV 的感染过程中都发挥协同作用。ASFV 抑制易感细胞中 IFN 的表达，从而下调宿主免疫反应并逃避免疫机制。ASFV 受体的发现为研究 ASFV 与宿主细胞的相互作用、致病机制、受体阻断剂的开发、疫苗设计和抗病育种提供了新的思路。

主要参考文献

[1]Borca MV, Rai A, Ramirez-Medina E, Silva E, Velazquez-Salinas L, Vuono E, et al. A cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain[J]. J Virol, 2021, 95:e0012321. doi: 10.1128/JVI.00123-21

[2]Alejo A, Matamoros T, Guerra M, Andres G. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. J Virol, 2018,92:e01293–18. doi: 10.1128/JVI.01293-18

[3]André s G. African Swine fever virus gets undressed: New insights on the entry pathway[J]. J Virol,2017, 91:e01906–16. doi: 10.1128/JVI.01906-16

※ 作者简介：高琦（1993-），女，广东省广州市人。E-mail：qigao2021@scau.edu.cn。

※※ 通讯作者：张桂红，E-mail：guihongzh@scau.edu.cn,手机号：13380065978。

宿主因子 HNRNPU 通过 YTHDF2 调控 TRAF3 甲基化修饰促进 PEDV 复制

闫玉超※，周宏超※※，许信刚※※
（西北农林科技大学动物医学院，陕西杨凌 712100）

摘要

猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarrhea，PED）是由猪流行性腹泻病毒（PEDV）引起的急性、高度传染性肠道感染疾病，能够对养猪业造成严重的经济损失。异质核蛋白 U（HNRNPU）是一种 RNA 传感器，参与感知病毒 dsRNA 并介导抗病毒免疫[1]。当前研究表明，HNRNPU 在天然免疫、可变剪接以及 mRNA 稳定性等方面发挥着重要作用[2]。因此，本研究对 HNRNPU 与 PEDV 的相互关系及其作用机制进行了分析，旨在探究 PEDV 免疫逃逸的新机制。

本研究利用质谱技术筛选与 PEDV Nsp13 互作的宿主蛋白，并通过免疫共沉淀（Co-IP）和激光共聚焦实验证明 PEDV Nsp13 和宿主蛋白 HNRNPU 在细胞质共定位并存在互作。Western blot 和 RT-qPCR 检测发现 PEDV 感染细胞后 HNRNPU 的 mRNA 和蛋白水平均上调。通过分析 HNRNPU 的启动子序列，发现 HNRNPU 启动子-1360～-1460 位的核心区域包含 HNF1α 转录因子的结合位点。经 Western blot、RT-qPCR 和双荧光素酶报告实验证明 HNF1α 负调控 HNRNPU 的表达。

为探究 HNRNPU 在 PEDV 增殖中的作用，本研究通过 Western blot、qRT-PCR 和 $TCID_{50}$ 检测发现 HNRNPU 促进 PEDV 的复制。为揭示 HNRNPU 促进 PEDV 复制的具体机制，本研究通过 Western blot、RT-qPCR、MeRIP-qPCR、Co-IP 和双荧光素酶等实验发现 HNRNPU 与 TRAF3 蛋白发生互作，并且 HNRNPU 能够增加 TRAF3 转录本 m^6A 甲基化水平。m^6A 甲基化是一种由甲基化酶、去甲基化酶以及阅读蛋白参与修饰的可逆过程[3]。本研究通过 Western blot、RT-qPCR 和 $TCID_{50}$ 试验，表明 HNRNPU 通过 YTHDF2 降解 TRAF3 转录本，促进 PEDV 的复制。

本研究从 PEDV 对宿主蛋白 HNRNPU 的调控以及宿主蛋白 HNRNPU 的促病毒机制两方面入手，发现 PEDV 感染宿主细胞的过程中，转录因子 HNF1α 可通过结合 HNRNPU 启动子的核心区域，下调 HNRNPU 的表达，而 HNRNPU 可通过 YTHDF2 介导的 m^6A 甲基化修饰降解 TRAF3 蛋白，从而促进 PEDV 的增殖。本研究发现 HNRNPU 蛋白是一种新的促病毒蛋白，并解析了其抗病毒机制，为 PED 的防控提供新的研究思路。

主要参考文献

[1] Cao L，Liu S，Li Y，et al. The Nuclear Matrix Protein SAFA Surveils Viral RNA and Facilitates Immunity by Activating Antiviral Enhancers and Super-enhancers[J]. Cell Host Microbe,2019,26：369-84 e8.

[2] Xiao R，Tang P，Yang B，et al. Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation[J]. Mol Cell,2012,45：656-68.

[3] Yue H，Nie X，Yan Z，et al. N6-methyladenosine regulatory machinery in plants： composition，function and evolution[J]. Plant Biotechnol J, 2019,17：1194-208.

※ 作者简介：闫玉超，在读硕士研究生，研究方向为基础兽医学。E-mail：550674657@qq.com。
※※ 通讯作者：周宏超，副教授，硕士生导师，研究方向为猪场主要疾病防控技术研究。E-mail：zhcxn@126.com
通讯作者：许信刚，副教授，博士生导师，研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail：286567031@qq.com。

口蹄疫病毒 O 型鼠源单个 B 细胞抗体的制备及阻断 ELISA 方法的建立

杨郑欣[1※]，朱元源[2※※]，李文涛[1※※]

（1. 华中农业大学兽医学院湖北洪山实验室农业微生物学国家重点实验室，湖北武汉 430070；

2. 中国兽医药品监察所，国家 WOAH 经典猪瘟参考实验室，北京 100086）

引言

口蹄疫（FMD）是由口蹄疫病毒（FMDV）引起的一种急性、烈性和高度致死性传染病。FMDV 主要侵害猪、牛和羊等偶蹄动物，每年造成巨大的经济损失，严重影响畜牧业的发展。FMDV 包括 7 种血清型：A 型、O 型、C 型、亚洲 1 型、南非 1、2 和 3 型。不同血清型间无交叉保护，病毒的免疫逃逸导致疫苗免疫效果差、病毒传染力强。单克隆抗体（MAb）可识别特定的抗原决定簇，是检测抗原抗体的基础工具。单个 B 细胞抗体制备技术作为新一代快速制备抗体的方法，具有快速、高效、产量高等优点，且表达的抗体具有天然构象，该技术已开始应用于病原体诊断、疾病治疗以及病毒跨种传播机制研究等。本研究拟建立单个 B 细胞抗体制备平台，筛选 O 型 FMDV 的单克隆抗体，并建立阻断 ELISA 检测方法。

材料与方法

本研究首先将 O 型 FMDV146S 灭活抗原，免疫雌性 BALB/c 小鼠，采集小鼠脾细胞；通过生物素（Biotin）标记的 O 型 FMDV 146S 抗原为诱饵抗原，利用流式细胞分选技术，筛选 CD19+/CD21/35+/CD43- /IgM-/ Biotin+抗原特异性单个 B 细胞；通过单细胞巢式 PCR 反应扩增，获得鼠 IgG 抗体重链/轻链可变区基因序列，分别构建完整 IgG 抗体表达的重链/轻链质粒；将两种质粒共转染 HEK293T 细胞，表达、纯化后获得 MAbs。将所获得抗体经酶联免疫吸附试验（ELISA）、间接免疫荧光试验（IFA）进行验证。随后选取 ELISA 抗原反应性好的 1 株 MAbs 作为酶标抗体、FMDV 抗原作为包被物、TMB 为显色体系，对最佳反应条件进行摸索，确定最佳反应条件后，对 140 份背景清晰的血清进行检测，通过绘制 ROC 曲线，在特异性和敏感性最大处确定该方法的阻断率。随后进行敏感性试验、特异性试验、符合性实验。

结果与讨论

经过表达、纯化后获得 15 株特异性 MAbs。经酶联免疫吸附试验（ELISA）、间接免疫荧光试验（IFA）、Western-blot（WB）试验证明：10 株 MAbs 具有抗原亲和力；6 株 MAbs 具有抗原反应活性。结果表明，本研究成功建立了 FMDV 鼠源单个 B 细胞抗体制备方法，为诊断技术及抗原结构变异分析奠定了基础。

通过以上条件探索后成功建立了检测 O 型 FMDV 的阻断 ELISA 方法，阻断率为 58.53%，且具有良好的特异性和敏感性，与商品化试剂盒检测结果比较，符合率为 96.47%。

主要参考文献

[1]Kurosawa N，Yoshioka M，Fujimoto R，et al. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals [J]. BMC Biol，2012，10（1）： 80.

[2]Tiller T，Busse C E，Wardemann H．Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells．J Immunol Methods，2009，350：183-193．

[3]Von Boehmer L，Liu C，Ackerman S，Gitlin A D，Wang Q，Gazumyan A，Nussenzweig M C．Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells．Nat Protoc，2016，11：1908-1923．

※ 作者简介：杨郑欣，在读硕士研究生，研究方向为动物病毒抗体相关研究，E-mail： silverxin@webmail.hzau.edu.cn

※※ 通讯作者：朱元源，副研究员，研究方向为事分子病毒学研究。E-mail：zhuyuanyzz@163.com。

通讯作者：李文涛，教授，博士生导师，研究方向为新病毒的发现、分子流行病学、分离培养、致病机制、新型疫苗和治疗性单克隆抗体的研发等相关研究。E-mail：wentao@mail.hzau.edu.cn。

用于中国非洲猪瘟病毒Ⅰ型和Ⅱ型鉴定的双实时 PCR 方法的建立

高琦[1,2,3※]，杨云龙[2,3]，罗伊琢[1,4]，龚婷[1,4]，王衡[1,2,3]，龚浪[1,3]，张桂红[1,2,3]，郑泽中[※※1,2,3]
(1.华南农业大学兽医学院，广东广州 510642；2.中国非洲猪瘟区域实验室（广州），广东广州 510642；
3.华南农业大学非洲猪瘟防治研究中心，广东广州 510642；4.广东岭南现代农业实验室，广东茂名 525000)

自 2018 年中国首次暴发 ASFV 基因型 II 以来，ASF 对养猪业构成了重大威胁。2020 年中国出现基因型 I 后，疫情防控变得更加困难。目前还没有有效的商业疫苗，这种疾病很难根除。因此，ASFV 基因型的鉴定对于制定生物安全控制措施至关重要。目前有几种分子和血清学方法可用于识别感染 ASFV 的动物。血清学检测用于确定动物是否接触过非洲猪瘟病毒，分子检测可以在猪出现临床症状之前检测猪体内是否存在非洲猪瘟病毒。聚合酶链反应（PCR）和酶联免疫吸附测定是检测抗原或抗体的主要常规诊断方法。世界动物卫生组织（OIE）建议使用经过验证的实时 PCR 方法来诊断 ASF。与传统 PCR 相比，实时荧光定量 PCR 具有快速、高灵敏度和特异性。市场上已经开发和验证了各种用于 ASFV 检测的实时 PCR 诊断方法，其中大多数针对 B14L 基因。已经表明，E646L 基因序列是分子流行病学研究中基因分型鉴定 ASFV 基因型 I 的有价值基因。本研究开发了一种基于 B646L 和 E183L 基因的双实时 PCR 检测方法，通过特异性扩增基因型 I E183L 来区分 ASFV 基因型 I 和 II。该方法具有很强的特异性，能同时检测 B646L 和 E183L 基因，并且不与 PEDV、PCV、PRRSV、PRV 和 CSFV 交叉反应。ASFV 基因型 I 和 II 的双实时 PCR 检测显示 B646L 扩增曲线，只有基因型 I 显示 E183L 扩增曲线。这与预期结果一致。该方法灵敏度高，重组质粒 B646L 和 E183L 的最低拷贝数分别为 1.07×10^2 和 3.13×10^4 拷贝/μL。该方法具有重现性，检测两种重组质粒变异系数（CV）值的变异系数小于 2%。7 份样本呈阳性，277 份呈阴性，两种方法的结果一致。本研究提出的双实时 PCR 为 ASFV 基因型 I 和 II 的鉴定提供了一种快速检测方法，这可能有助于改进中国 ASF 的有效防控措施。

主要参考文献

[1]King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, et al. Development of a TaqMan RPCR assay with internal amplifification control for the detection of African swine fever virus[J]. J Virol Methods, 2003, 107:53–61. doi: 10.1016/s0166-0934(02)00189-1

[2]Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van D, Stede Y, et al. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus[J]. J Virol Methods, 2011, 178:161–70. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.09.007

※ 作者简介：高琦（1993-），女，广东省广州市人。E-mail：qigao2021@scau.edu.cn。
※※ 通讯作者：郑泽中，E-mail：zezhong@scau.edu.cn,固定电话：15521091197，手机号：15521091197。

PRRSV-2 经不同免疫途径诱导体液免疫反应的差异

李闻[1※]，孙杨杨，赵士杰[1]，陈静[2]，张宜娜[1※※]，夏平安[1]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2.河南农业大学生命科学学院，河南郑州 450046）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是一种主要以母猪生殖障碍和仔猪呼吸障碍为表现症状的传染病，严重危害养猪业的发展[1]。猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）感染引起猪群的免疫抑制，且中和抗体产生迟缓[2]，不能完全清除病毒，导致机体持续感染，病毒血症反复发作，易造成其他病原体的继发感染。黏膜免疫系统作为机体的第一道免疫防线，在抵挡病原入侵方面具有重要作用。近些年，对黏膜免疫的研究证明了黏膜免疫对某些疾病防控的有效性[3~5]，而作为仔猪的一种重要呼吸道疾病，关于黏膜免疫在 PRRSV 疫苗中的应用研究较少。因此，本研究监测了 PRRSV-2 经不同途径感染仔猪后，诱导猪体病毒血症和抗体产生规律的差异，旨在为完善 PRRSV 疫苗的免疫策略提供理论依据。

材料与方法

试验对象为购自某猪场的 12 头 20 日龄健康仔猪，随机分为滴鼻组、注射组和对照组（每组各 4 头），各组隔离饲养。将 PRRSV-2 弱毒株分别经滴鼻和肌肉注射途径感染仔猪，分别于感染后不同时间点（第 3-43 天）采集血液和唾液，于最后一个时间点采集猪的各脏器组织和淋巴结，并无菌收集 PAM 细胞。采用荧光定量 PCR、间接 ELISA 和基于 PAM 细胞的中和试验分别对病毒载量、抗体水平和中和抗体水平进行监测。

结果与讨论

病毒增殖规律的差异比较结果显示，两感染组的病毒血症持续时间均为感染后第 3-31 天，但滴鼻组诱导的病毒血症水平显著低于注射组（$p < 0.05$）；病毒清除后病毒在肺部和淋巴结存活，猪体持续带毒，且滴鼻组诱导的病毒载量水平极显著低于注射组（$p < 0.001$）。抗体产生规律的差异比较结果显示，从感染后第 11 天开始检测到抗体反应，滴鼻组血清中阳性 IgG 产生较早，且在感染后第 27 天内水平显著高于注射（$p < 0.01$）；滴鼻组唾液样品中阳性的 SIgA 产生较早且水平较高（$p < 0.01$）。中和抗体产生规律的差异比较结果显示，中和抗体反应延迟到感染后第 3-4 周，滴鼻免疫比注射免疫刺激猪只血清中较晚地产生中和抗体但抗体，水平较高（$p < 0.01$）；而滴鼻免疫比注射免疫能刺激猪只唾液中更早地产生更高水平的中和抗体（$p < 0.001$）。本研究表明，PRRSV-2 弱毒株经滴鼻免疫较注射免疫可诱导更强的抗体反应和更低的病毒载量，黏膜免疫可能是 PRRSV 疫苗的合适接种途径，该结果对于改进 PRRSV 弱毒疫苗的免疫策略具有重要的指导意义。

主要参考文献

[1] An T Q，Li J N，Su C M，et al. Molecular and Cellular Mechanisms for PRRSV Pathogenesis and Host Response to Infection [J].Virus Research，2020，286：197980.

[2] Loving C L，Osorio F A，Murtaugh M P，et al. Innate and Adaptive Immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology，2015，167：1-14.

[3] Iwasaki，A. Exploiting Mucosal Immunity for Antiviral Vaccines [J]. Annual Review of Immunology，2016，34：575-608.

[4] Chen J D，Wang J H，Zhang J P，et al. Advances in Development and Application of Influenza Vaccines [J]. Frontiers in Immunology，2021，12：711997.

[5] Ku M，Bourgine M，Authie P，et al. Intranasal Vaccination with a Lentiviral Vector Protects against SARS-CoV-2 in Preclinical Animal Models [J]. Cell Host Microbe，2021，29：236-249.

※ 作者简介：李闻，在读博士研究生，研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail：lw839466399@163.com。
※※ 通讯作者：张宜娜，副教授，硕士生导师，研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail：yinazhang2020@henau.edu.cn。

猪繁殖与呼吸综合征病毒 NADC30-Like 毒株的分离鉴定

张晓晓[1※]，陈雨，李梦娟[1]，李闻，陈静[2]，张宜娜[1]，夏平安[1※※]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2.河南农业大学生命科学学院，河南郑州 450046）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）引起的一种急性、高度接触性传染病，主要侵害母猪繁殖系统与仔猪呼吸系统，给养猪业造成严重的经济损失[1]。现有研究表明，当前在中国流行的美洲型 PRRSV 毒株中，NADC30 毒株和高致病毒株的检出率明显高于经典毒株，且在临床上不断出现大量的重组变异毒株[2~4]，及时监测 PRRSV 的流行与变异情况对该病的防控具有重要意义。因此，本研究对河南省 PRRSV 病原进行流行病学调查，旨在分离出 PRRSV 流行毒株并解析其基因变异情况。

材料与方法

试验对象为河南省洛阳市某猪场病死猪的肺部组织，RT-PCR 检出 PRRSV 阳性后，将 PRRSV 病料无菌研磨，0.22μm 滤器过滤除菌后接种到非洲绿猴胚胎肾细胞（Marc-145）上进行病毒分离，连续盲传三代，利用间接免疫荧光对分离病毒进行鉴定，采用噬斑技术纯化分离的病毒，并对该毒株的 ORF5 基因和 Nsp2 基因进行测序分析。

结果与讨论

提取病猪组织 RNA，经 RT-PCR 扩增得到 501bp 的特异性 ORF7 基因片段，初步表明该病毒为 PRRSV，命名为 LY34。将组织研磨液在 Marc-145 细胞上连续盲传三代进行病毒分离，Marc-145 细胞出现稳定的病变，主要表现为细胞变圆、边缘模糊、折光性增强、细胞拉网脱落、视野内呈现空洞等。使用抗 PRRSV-N 蛋白的单克隆抗体进行间接免疫荧光鉴定，结果显示，感染组可观察到明显的特异性荧光。收集细胞上清液进行电镜负染观察，可见大小 50-70nm 的病毒粒子，其形态、大小与 PRRSV 一致，确定该病毒为 PRRSV。此外，PRRSV-LY34 ORF5 和部分 Nsp2 基因的核酸测序结果显示，其 ORF5 和 Nsp2 基因序列与 NADC30-Like 毒株同源性最高，分别为 94.8%和 94.6%。最后，遗传进化分析显示，该分离株与我国 2013 年以来流行的 NADC30-Like（Lineage1）毒株处于同一进化分支。综上所述，本实验室成功分离出一株 PRRSV NADC30-Like 毒株，为进一步研究 PRRSV NADC30-Like 毒株的致病性和了解河南地区 PRRSV 的遗传变异情况提供了理论依据。

主要参考文献

[1] Zhang H，Leng C，Ding Y，et al. Characterization of newly emerged NADC30-like strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. Archives of Virology，2019，164（2）：401-411.

[2] Bai X，Wang Y，Xu X，et al. Commercial vaccines provide limited protection to NADC30-like PRRSV Infection [J]. Vaccine，2016，34（46）：5540-5545

[3] Wang H M，Llu Y G，Tang Y D，et al. A natural recombinant PRRSV between HP-PRRSV JXA1-like and NADC30-like strains [J].Transboundary And Emerging Diseases，2018，65（4）：1078-1086.

[4] Zhao K C，Chang X B，et al. importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J].Journal of Virology，2015，89（20）：10712-10716.

※ 作者简介：张晓晓，在读硕士研究生，研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail：zx18438489182@163.com。
※※ 通讯作者：夏平安，教授，博士生导师，研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail：xpa88@163.com。

一株新分离的三片段基因缺失非洲猪瘟病毒株的致病性和水平传播评估

高寒[1※]，狄栋栋[2]，吴倩雯[1]，李劼[2]，刘星[1]，许志颖[1]，徐思佳[1]，吴诚煜[1]，龚浪[1]，孙彦阔[1]，张桂红[1]，陈鸿军[3]，王衡[1※※]

（1.华南农业大学兽医学院，广东广州 510642；2. 金宇保灵生物药品有限公司生物安全三级动物实验室，内蒙古呼和浩特 010111；3. 中国农业科学院上海兽医研究所，上海 200241）

引言

非洲猪瘟病毒（ASFV）是一种高传染性、高致死率的一种虫媒 DNA 病毒，自 2018 年在我国被报道检出后，对我国生猪产业及农业等造成巨大损失。近年来有研究表明，我国现今的流行情况已从初期以 HLJ/18、GZ201801_2 为代表的基因 II 型毒株为主的散点式流行，转变为以基因 II 型毒株为主，各种基因缺失模式的基因 II 型毒株与基因 I 型毒株为辅的散点式流行。ASFV 全基因组的遗传异质性被认为是毒力表型差异的基础。一系列新出现的症状较轻、潜伏期和发病时间较长的新型毒株给 ASFV 防控带来了巨大困难，并不断给全国养猪业造成巨大损失。本研究对从一株从临床样品中分离出的、具有特征性的三个大基因片段缺失的 ASFV 毒株（命名为 YNFN202103）进行了分析，旨在探究其基因组特点、生物学特性、致病性等，为临床 ASFV 防控提供理论依据。

材料与方法

试验对象为 25 头 4-6 周龄 SPF 猪，分别设置 YNFN202103、GZ201801_2 以及阴性对照组。按照动物实验计划将每组内部分猪只进行设定剂量的攻毒，剩余组内猪只自动成为同居哨兵猪。按日期记录常规的体温监测、死亡率，血液以及口、鼻、肛拭子样品的病毒载量、血液中抗体水平、检测剖检后各组织器官的病毒载量等数据，对该新分离三片段缺失毒株进行致病性、水平传播效率等指标的评估。

结果与讨论

本试验发现 YNFN202103 毒株全基因组显示特征性的三片段缺失（8355-10469 bp，11954-19725 bp 以及 73640-75117 bp）。此外，因为 EP402R 片段的缺失，该毒株不显示红细胞吸附的特性。以 2×10^6 $TCID_{50}$/头作为 YNFN202103 组的攻毒剂量，同时以 50 HAD_{50}/头作为 GZ201801_2 组的攻毒剂量。攻毒结果显示，YNFN202103 组显示出明显延长的发病时间以及存活时间。YNFN202103 组的平均存活时间为 13.2 天（直接攻毒）和 24.5 天（同居哨兵），而强毒 GZ201801_2 组的平均存活时间仅为 7.6 天及 14.3 天。病毒血症以及拭子样本的检测结果也指示 YNFN202103 展现更低的毒力。拭子样本的检测结果还显示，YNFN202103 组同居哨兵猪样本的拷贝数明显低于强毒 GZ201801_2 组。剖检后组织器官的病毒载量显示，YNFN202103 组的部分组织器官病毒载量显著低于 GZ201801_2，显示更低的毒力。大体剖检、病理切片以及免疫组化结果也显示 YNFN202103 组毒力更低。本试验结果评估了一株新分离的三片段基因缺失毒株 YNFN202103 的基因组特点，发现其显著延长的潜伏期以及生存期，具有更低的致病性，为临床防控 ASFV 提供理论依据。

主要参考文献

[1] Sun，Y，et al. 2022. Detection of a Novel African Swine Fever Virus with Three Large-Fragment Deletions in Genome，China. Microbiol Spectr，e0215522.

[2] Gao H，et al. Pathogenicity and horizontal transmission evaluation of a novel-isolated African swine fever virus strain with a three-large-fragment-gene deletion （In press）

※ 作者简介：高寒，在读博士研究生，研究方向为动物育种理论与技术。E-mail：gh1@stu，scau.edu.cn

※※ 通讯作者：王衡，教授，博士生导师，研究领域主要为畜禽疫病诊断技术及分子生物学相关方面的研究。E-mail：wangheng2009@scau.edu.cn.

猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定

胡晓静※
(南京农业大学，江苏南京 476000)

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）容易变异，疫苗免疫仍不能诱导广泛的保护作用。PRRSV 属于尼多病毒目动脉炎病毒科动脉炎病毒属，是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒。该病毒基因组大小约 15 kb，约有 11 个开放阅读框（ORFs），其中 ORF7 编码病毒核衣壳蛋白（N），是病毒的主要结构蛋白。该蛋白含有丰富的抗原决定簇，免疫原性强，是目前 PRRS 血清学诊断方法的抗原基础。目前已鉴定出多个 B 细胞线性表位，可作为开发诊断试剂的理想靶标。

材料与方法

PCR 扩增 PRRSV BB0907 毒株 ORF7(N)。将目的片段和 pET-28a (+)载体经双酶切后连接。为鉴定 N 蛋白单抗抗原表位，本文设计一系列截短体。将重组质粒 pET-28a-N 转化至感受态中诱导表达。将表达后的菌体进行超声破碎，通过 SDS-PAGE 鉴定 N 蛋白表达形式。将纯化 N 蛋白皮下注射 BALB/c 小鼠。三免后，间接 ELISA 方法测定小鼠血清抗体效价后进行细胞融合。阳性杂交瘤细胞进行至少两次亚克隆，直至所有亚克隆后的细胞团均为阳性时可定株，扩大培养稳定分泌抗 N 蛋白抗体的杂交瘤细胞株。

结果与讨论

本试验成功构建了重组质粒 pET-28a-N，并在大肠杆菌中诱导表达，结果显示目的蛋白成功表达，且为可溶性表达。His 单抗和 PRRSV 阳性血清进行 Western blot 试验，结果证明纯化蛋白具有较好抗原性。BALB/c 小鼠免疫 3 次，间接 ELISA 检测抗体效价均大于 1:12 800。采集小鼠脾脏与 SP2/0 细胞进行细胞融合，经过 ELISA 筛选和细胞亚克隆，共获得 7 株杂交瘤细胞株。将 7 株杂交瘤细胞传代至 20 代，间接 ELISA 检测抗体水平基本一致，证明其具有较好稳定性。8F1、5E2、2B1、12E1 单抗重链类型为 IgG1 亚类，其余单抗重链类型为 IgG2b 亚类，轻链类型都为 Kappa 型。将重组 N 蛋白、PRRSV 感染细胞作为抗原进行 Western blot，结果显示，7 株单抗均具有抗原特异性。IFA 显示，制备的 7 株单抗均有绿色荧光产生。采用叠加 ELISA 检测单抗 AI，结果提示 7 株单抗可能既识别相同又有识别不同抗原表位。为进一步鉴定单抗识别的表位，构建了 6 个 N 蛋白截短体。7 株单抗进行两轮 Western blot 鉴定，结果显示，12E1、2H2、2B1 位于 57~67aa， 4F1、5A2 位于 47~57aa；8F1、5E2 位于 67~77aa。

主要参考文献

略

基金项目：江苏省自主创新研发基金（BE2018386）；国家生猪产业技术体系专项（CARS-36）；国家自然科学基金（31672565）。
※ 作者简介：胡晓静，江苏省南京市人。E-mail：1150551062@qq.com。
※※ 通讯作者：胡晓静，E-mail：1150551062@qq.com,手机号：13914476474。

不同规癖水平母猪的情感状态、肠道菌群及脑肠肽差异分析

张金悦[1※]，王磊[2]，尹国安[1※※]

（1.黑龙江八一农垦大学，黑龙江大庆 163319；2.四川德康农牧食品集团股份有限公司，四川成都 610200）

引言

在现代集约化生产中，环境贫瘠等不良因素导致母猪遭受生理和心理双重应激，表现多种规癖行为，并伴有生理异常。而长期慢性应激导致神经系统相关神经元形态和功能受损，机体出现情感系统功能障碍[1, 2]。不同规癖特征母猪可能存在不同程度情感障碍，且这些情感障碍可能通过脑肠轴影响肠道菌群，并影响母猪生产性能。目前针对规癖母猪情感与肠道菌群的相互影响及作用途径的研究较少，本研究对规癖母猪的行为表征、神经生理指标进行分析，并将不同规癖水平母猪肠道菌群与情感状态进行关联分析，旨在探究不同规癖水平母猪的情感状态以及肠道菌群变化规律。

材料与方法

试验选取 35 头二元妊娠母猪（大白×长白）为研究对象，8 头后备母猪为后备组，27 头经产母猪为处理组，根据经产母猪规癖水平分为低规癖组（9 头）和高规癖组（7 头），对不同规癖水平母猪进行行为学测试、情感状态评价和肠道菌群差异分析。

结果与讨论

（1）高规癖组和低规癖组母猪无食咀嚼、啃栏和俯卧显著高于后备组（$P<0.05$），而啃槽和侧卧极显著低于后备组（$P<0.01$）；高规癖组无食咀嚼和拱地显著高于低规癖组，而犬坐行为显著低于低规癖组（$P<0.05$）。

（2）高规癖组和低规癖组持续接触新事物次数和时间显著低于后备组（$P<0.05$）；高规癖组反应延迟时间显著高于低规癖组和后备组（$P<0.01$），接触持续次数和接触时间显著降低（$P<0.05$）。高规癖组蔗糖测试评分极显著低于低规癖组和后备组（$P<0.01$）。高规癖组瞳孔收缩率和瞳孔潜伏期显著高于低规癖组（$P<0.05$）。高规癖组 miR-1202 水平显著低于后备组，miR-134 显著低于低规癖组和后备组，低规癖组 miR-34a、miR-335、miR-132 和 miR-30a 显著高于高规癖组和后备组（$P<0.05$）。高规癖组血清五羟色胺、皮质醇和突触素显著高于低规癖组和后备组，β 内啡肽显著高于后备组，β 淀粉样蛋白显著高于低规癖组（$P<0.05$）。

（3）不同规癖水平母猪肠道菌群 α 多样性分析无显著差异，β 多样性分析后备组与两组间物种差异较大。门水平和属水平，高规癖组和低规癖组母猪肠道差异菌群分别为 Spirochaetes 和 Lentisphaerae、Treponema、Coprococcus 和 Faecalibacterium。

（4）本研究表明不同规癖水平母猪行为表现、情感状态和肠道菌群均存在差异，为探究情感障碍与肠道菌群的作用机制提供了重要信息。

主要参考文献

[1] Cabib S，Puglisi A S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress[J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews，2012，36（1）： 79-89.

[2] Briefer F S，Beuret S，Ruet A，et al. Stereotypic behaviour in horses lowers stress but not spatial learning performance[J]. Applied Animal Behaviour Science，2020，232： 105099.

※ 作者简介：张金悦，在读博士研究生，研究方向为动物福利与健康。E-mail：18345449957@163.com。

※※ 通讯作者：尹国安，教授，博士生导师，研究方向为动物行为与福利。E-mail：guoanyin@foxmail.com。

一株胰蛋白酶非依赖 PEDV 毒株驯化及制备的灭活疫苗免疫效果评估

高冬生※，王永生，王川庆，陈陆※※
（河南农业大学动物医学院，河南郑州 450002）

引言

PEDV 引起仔猪水样腹泻死亡，给养猪业造成巨大经济损失。目前 PEDV 的培养往往依赖胰酶，而胰酶对细胞生长有抑制作用，进而影响病毒的高效增殖。有研究表明，胆汁酸可以替代胰酶促进 PEDV 的增殖[1]。因此，本研究尝试利用胆汁酸驯化一株不依赖胰酶便能在 VERO 细胞上高效增殖的毒株，并用其制备灭活疫苗评价免疫效果，从而为高效疫苗研发奠定基础。

材料与方法

在 VERO 细胞上，利用甘氨鹅脱氧胆酸（GCDCA）对 PEDV 毒株 HeNAY16 进行驯化，至细胞稳定出现病变后测定毒价，分析 S 基因变化。然后以此毒株作为抗原制备灭活疫苗，田间条件下对 10 头初胎母猪在产前 40 天和 20 天进行两次免疫，同时设 3 头不免疫对照组，免疫后采集血液或初乳，测定样品的中和抗体及 IgA 抗体。

结果与讨论

毒株 HeNAY16 经 GCDCA 驯化后，可以在不添加胰酶情况下稳定高效增殖，病毒滴度达 $10^{8.0}$ TCID50/mL，S 基因序列分析，驯化毒株出现 S29N、H157Y、V395I、R941L 和 G965S 等 6 个位点突变，其中，S1 区有 3 个位点的变化。母猪免疫试验结果显示，首次免疫前，10 头母猪的平均血清中和抗体和 IgA 抗体分别为 4.2 log2 和 0.37（0.5 以下为阴性），对照组分别为 4.3 log2 和 0.32，一免二周免疫组分别为 9.1 log2 和 3.72，对照组分别为 4.1 log2 和 0.19，分娩当天（二免三周）血清中和抗体和 IgA 抗体分别为 6.7 log2 和 2.49，初乳中分别为 10.8 log2 和 3.99，而对照组血清中和抗体和 IgA 抗体分别为 3.7 log2 和 0.13，初乳分别为 5.2 log2 和 0.35。灭活疫苗免疫前，母猪的抗体水平较低，IgA 抗体均为阴性，一次免疫后两种抗体均有了大幅升高，中和抗体升高了 4.9 log2，IgA 抗体全部转阳，均在 1.5 以上。而未免疫对照组两种抗体基本保持不变，分娩后免疫组母猪的血清中，两种抗体较一免后均有一定程度的降低，而初乳中两种抗体则达到了非常高的水平，出现这种现象，推测应该是母猪分娩前后，血清抗体通过血乳屏障主动向乳汁中转运的结果。本研究采用 GCDCA 驯化 PEDV 毒株后获得了一株不依赖胰酶、高效增殖的毒株，利用该毒株制备的灭活疫苗免疫母猪后能够刺激机体产生较高保护水平的中和抗体和 IgA 抗体。本研究为生产高效 PEDV 灭活疫苗提供了一种新的疫苗毒株制备方案。

主要参考文献

[1]Kim Y，Oh C，Shivanna V，et al.Trypsin-independent porcine epidemic diarrhea virus US strain with altered virus entry mechanism[J].Bmc Veterinary Research，2017，13（1）：356.

※ 作者简介：高冬生，硕士研究生，研究方向为动物病毒学。E-mail：13838547677@163.com。
※※ 通讯作者：陈陆，教授，博士生导师，研究方向为猪重大疫病防控技术研究。E-mail：chenluhau@126.com。

非洲猪瘟抗原捕获 LAMP 检测方法的建立及条件优化

朱日宁※，魏天，王成宇，王永志※※
（吉林省农业科学院，吉林长春 130033）

引言

非洲猪瘟（African Swine Fever，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African Swine Fever Virus，ASFV）感染野猪和家猪引起的一种接触性烈性传染病，致死率几乎达到 100%。我国自 2018 年发生首例非洲猪瘟疫情以来，大量生猪被扑杀，我国生猪养殖业遭受到毁灭性的打击。鉴于当前并无有效的商品化疫苗进行预防，非洲猪瘟的早期快速准确诊断对该病的防控具有重要的意义。因此，本研究基于环介导等温扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）以及抗体捕获技术（Antibody capture，AC），旨在建立一种快速准确且可视化，并可以用于非洲猪瘟早期诊断的检测方法。

材料与方法

本研究选取非洲猪瘟病毒 p72 基因核酸序列以及课题组前期制备的针对非洲猪瘟病毒 p72 蛋白的单克隆抗体，设计合成 2 组 LAMP 引物，对引物进行筛选，并对抗体包被条件、病料孵育条件及 LAMP 反应条件进行优化，确定该检测方法的灵敏度和特异性。

结果与讨论

该方法优化后的抗体包被条件如下：抗体包被浓度为 0.01μg/管，2.5%戊二醛固定，3%BSA 封闭。病料孵育时间为 30min 以上。LAMP 最佳反应体系如下：内外引物浓度比为 8∶1，1μL 甜菜碱（5M），2μL Bst 3.0 DNA 聚合酶，在 62℃恒温条件下扩增 60 min，能够特异性检测出非洲猪瘟病毒，具有较好的特异性，与其他病毒无交叉反应。该方法的最低检测段为 5.58copies/反应，灵敏度较高。阳性样本经 10000*SYBR Green I 染色后呈现荧光绿色，阴性样本呈现橘色。综上所述，本研究基于非洲猪瘟病毒 p72 基因和 p72 蛋白的单克隆抗体建立了一种可靠且可以通过可视化分析结果的 LAMP 检测方法，其特异性强、敏感性较高，为进一步将该方法转化成商品化试剂盒奠定了基础。

目前对非洲猪瘟诊断技术的研究趋势来看，其检测方法的研究方向主要围绕经济和高效两个方面。AC-LAMP 技术具有操作简便、反应时间短、不需要特殊设备、结果实时可视等优点。当前的核酸检测方法包括 PCR、qPCR 及 ddPCR 等方法，都具有较高的灵敏度和精确度，但都需要借助昂贵的仪器设备和专业的技术人员操作等，在实践中很难满足。血清学检测技术例如间接免疫荧光试验（IFA）和间接免疫过氧化物酶试验（IPT）等，目前尚无商品化试剂盒，且操作繁琐，成本较高，难以推广实施。本方法在加样品前加入颜色指示剂，反应全程中不开盖，可以很大程度上避免假阳性结果出现。本研究建立的可视化 AC-LAMP 方法，提高了检测效率，方便快捷，避免了没有专用设备的局限性，并可以通过反应液颜色变化判断结果，具有较好的应用前景。

主要参考文献

[1] Dokphut A ，Boonpornprasert P ，Songkasupa T ，et al.Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of African swine fever[J]. 2021.19（1）：87-100.

[2] 王春奕.抗原捕获反转录聚合酶链式反应（AC-RT/PCR）检测口蹄疫病毒方法的建立[D].甘肃农业大学.

※ 作者简介：朱日宁，博士，助理研究员，研究方向为病原微生物。E-mail：ningerxiaoxian@126.com。
※※ 通讯作者：王永志，博士，研究员，研究方向为病原微生物。E-mail：yzwang@126.com。

碱性矿物质复合物（AMC）抑制猪肠道病原微生物传播的多组学研究

姚鑫※，李金龙※※

（东北农业大学动物医学学院，黑龙江哈尔滨 150000）

引言

疫病控制是反映生猪养殖生产水平和经济效益的重要指标。已有研究表明碱性矿物质复合物（AMC）在促进肠道健康、抗炎抗氧化等方面得到了广泛的研究和报道[1]。在先前的研究中，AMC 作为一种含有 SiO_3^{2-}、Na^+、K^+、Zn^{2+}的非特异性免疫刺激剂，具有显著促进仔猪生长和肠道屏障的功能[2, 3]，然而 AMC 是否能够赋予患病仔猪腹泻抵抗力以及抑制猪肠道病原微生物的传播，在“减抗替抗”时代是一个迫切需要解决的问题。

材料与方法

建立 Vero/PEDV、ST/PDCoV、IPEC-J2/PRV，Marc-145/PCV2 和 Marc-145/RV 体外细胞感染模型，以 CT（对照组）、CS（AMC 处理组）、PT（感染组）和 PS（AMC 处理+感染组）为研究对象，进行转录组学和代谢组学关联分析。以黑龙江省某养殖场 36 头杜洛克仔猪为试验对象，在东北农业大学动物实验中心建立 C（对照组）、A（AMC 处理组）、R（感染 PRV 组）、S（感染 PEDV 组）、AR（AMC 处理+感染 PRV 组）和 AS（AMC 处理+感染 PEDV 组）体外动物感染模型，进行转录组学和代谢组学关联分析。

结果与讨论

本研究通过药物处理细胞和饲喂仔猪发现，AMC 抑制 PEDV、PDCoV、PRV、PCV2 和 RV 等猪肠道病毒复制，进一步的研究利用全转录组测序比较体外细胞感染模型差异性基因经 GO、KEGG 分析得到 SLC5A11、EPHB1 和 ZND610 等 30 个可能影响 AMC 抗病毒的候选基因，主要富集在 PPAR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 MicroRNAs in cancer 信号通路。通过构建 lncRNA/miRNA/mRNA 轴 ceRNA 表达网络，筛选出 887 个关键 ceRNA，主要富集在 Metabolic 信号通路和脂肪酸相关通路。利用代谢组学比较四组差异性代谢产物分析发现，PT 组较 PS 组存在 28 个差异性代谢物，主要富集在乳糖、蔗糖、果糖等糖类代谢和甘油酯代谢、甘油磷脂代谢等共 28 个通路。利用转录组测序和代谢组学组联合分析策略，通过建立体内细胞和体外动物共有 pathway 功能模型、降维 O2PLS 模型和皮尔逊相关系数计算，初步筛选与代谢物关联的差异基因分别为 16 个，25 个和 24 个，均富集到甘油酯代谢通路和甘油磷脂代谢通路。本研究表明碱性矿物质复合物（AMC）显著抑制猪肠道病原微生物传播，为养猪业疫病防控提供了新思路。

主要参考文献

[1]. Costantino M，Conti V，Corbi G，Filippelli A. 2021. Hydropinotherapy with Sulphurous Mineral Water as Complementary Treatment to Improve Glucose Metabolism，Oxidative Status，and Quality of Life. Antioxidants （Basel） 10.

[2]. Chen J，Xu XW，Kang JX，Zhao BC，Xu YR，Li JL. 2023. Metasilicate-based alkaline mineral water confers diarrhea resistance in maternally separated piglets via the microbiota-gut interaction. Pharmacological Research 187.

[3]. Chen J，Zhao BC，Dai XY，Xu YR，Kang JX，Li JL. 2022. Drinking alkaline mineral water confers diarrhea resistance in maternally separated piglets by maintaining intestinal epithelial regeneration via the brain-microbe-gut axis. J Adv Res doi：10.1016/j.jare.2022.12.008.

※ 作者简介：姚鑫，在读博士研究生，研究方向为动物营养代谢与疫病防控。E-mail：850682712@qq.com。

※※ 通讯作者：李金龙，教授，博士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：Jinlongli@neau.edu.cn。

河南省猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及病毒分离鉴定

李洪炫[1※]，张远航[1]，陈曦艋[1]，马世杰[1]，郑兰兰[1, 2]，陈红英[1, 2※※]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2. 动物病原与生物安全教育部重点实验室，河南郑州 450046）

引言

猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarhea，PED）是由猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）引起的一种急性、高传染性疾病，以肠炎和致死性水样腹泻为特征。2010 年以来，由 PEDV 变异毒株引起的 PED 在中国大规模暴发[1]，给我国养猪业造成了巨大的经济损失。因此，为了解 PEDV 不同毒株之间的遗传变异关系，本研究对 2020 年至 2022 年底采集自河南省猪场患有腹泻的猪临床样本进行 PEDV 的检测，对部分毒株 *S*、*ORF3* 基因及全基因组进行遗传变异分析，并进行 PEDV 的分离鉴定、致病性评价，为 PED 的预防和控制提出新的策略。

材料方法

65 份临床猪样本（小肠及内容物）采集自 2020-2022 年河南省暴发腹泻的猪场。用 RT-PCR 方法对全部临床样本进行 PEDV 的检测，随后对检测为 PEDV 阳性的样品进行 *S* 和 *ORF3* 基因的扩增、克隆及测序。利用 MEGA 7.0 软件将获得的序列进行核苷酸以及氨基酸的同源性分析，并建立遗传进化树。将鉴定出的 PEDV 阳性样品接种至 Vero 细胞连续盲传。分离的病毒接种 3 日龄健康小猪，进行其致病性研究。

结果与讨论

结果显示，65 份临床样品中 19 份为 PEDV 阳性，对 PEDV 阳性样品进行 *S* 和 *ORF3* 基因克隆、测序，获得了 11 条 S 和 ORF3 基因序列。遗传进化显示，4 株 PEDV 均位于 G2a 支系，其余 7 株 PEDV 聚集成一个独立的亚支 G2c，位置处于 G1 分支和 G2 分支之间。重组分析结果显示，G2c 分支内的毒株可能来源于两个不同亚型 PEDV 突变体的自然重组。PEDV 阳性样品接种 Vero 细胞，分离出一株病毒，经细胞病变、RT-qPCR、病毒透射电镜以及免疫荧光鉴定证实所分离的病毒为 PEDV，将其命名为 HN2021。HN2021 在 Vero 细胞上的增殖曲线表明，病毒接种后 48 h 病毒增殖达到高峰，病毒滴度为 $1\times10^{4.6}$ $TCID_{50}$/0.1ml。分离株与参考毒株核苷酸同源性为 95.6%~98.7%，属于 G2a 变异毒株。通过 RT-PCR 进一步证实，该分离株 ORF3 基因在 207-373 nt 有较大的自然缺失，这在以前从未报道过。为了确定该缺失模式是否与 HN2021 的致病性有关，选择 HN2021 毒株进行后续动物研究，以评估其体内致病性。受 PEDV HN2021 攻击的仔猪表现出严重腹泻和高死亡率，证实 PEDV HN2021 是一株强毒株。本研究为后续相关疫苗制备及疾病防治奠定了重要基础。

主要参考文献

[1] Wang D，Fang L R，Xiao S B. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. Virus Research，2016，226，7-13.

※ 作者简介：李洪炫，男，河南新密人，在读硕士研究生，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: 1404978960@qq.com.
※※ 通讯作者：陈红英，教授，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: chhy927@163.com.

表达 PCV2d Cap 蛋白的重组猪伪狂犬病病毒的构建及免疫原性初步探究

许瑞勤[1※]，田润博[1]，李洪炫[1]，马世杰[1]，郑兰兰[1, 2]，陈红英[1, 2※※]
（1.河南农业大学，河南郑州 450046；2.动物病原与生物安全教育部重点实验室，河南郑州 450046）

引言

猪圆环病毒 2 型（Porcine circovirus 2，PCV2）是引起猪圆环病毒相关疾病的主要病原[1]。PCV2 在各个国家和地区都普遍存在，且各个阶段的猪群均表现出极强的易感性。近年来，PCV2 的流行由 PCV2d 亚型取代 PCV2b 成为当前流行的优势毒株，为 PCV2 防控带来新的挑战。自 2011 年我国流行猪伪狂犬病病毒（Pseudorabies virus，PRV）变异株以来，经典弱毒活疫苗 Bartha-K61 已不能为临床上 PRV 感染猪只提供完全保护。目前，我国猪场 PRV 与 PCV2d 混合感染屡有报道。因此，研发针对 PCV2d 和 PRV 变异株的新型疫苗具有重大意义。

材料方法

本研究将 PCV2d ORF2 基因插入 PRV 通用转移质粒 pG，构建重组质粒 pG-2d-EGFP，转染已感染缺失 gE、gI 和 TK 基因的 PRV NY 株（PRV NY-gE$^-$/gI$^-$/TK$^-$）的 ST 细胞，经筛选绿色荧光蚀斑，获得重组病毒。利用 CRISPR/Cas9-EGFP 敲除质粒，再将重组病毒中 EGFP 荧光标签敲除。然后对重组病毒进行了培养特性、生长特性和遗传稳定性试验，以及小鼠安全性试验和免疫原性试验。

结果与讨论

将重组质粒 pG-2d-EGFP 转染至已感染 PRV 的 ST 细胞，经 8 轮绿色荧光蚀斑筛选，获得重组病毒 rPRV-2d-EGFP。再将 EGFP 荧光标签敲除、3 轮蚀斑纯化，获得重组病毒 rPRV-2d。经 RT-PCR、Western blot 和间接免疫荧光试验，证实在 ST 细胞中 Cap 蛋白的表达。在 ST、PK-15、IPEC-J2 和 Vero 细胞中培养，重组病毒具有相似的生长特性，而在 ST 细胞中 $TCID_{50}$ 最高，为 $10^{6.25}$/0.1mL。重组病毒与亲本株的生长曲线试验相比，没有明显变化，且遗传稳定性良好。重组病毒接种小鼠后，两周内小鼠正常采食，且未出现任何症状。表明插入 Cap 基因不影响亲本株的增殖特性，且对小鼠是安全的。将重组病毒、商品化 PCV2 灭活苗、PRV NY-gE$^-$/gI$^-$/TK$^-$及 DMEM 培养液分别接种 6 周龄雌性昆明小鼠，2 周后加强免疫，二免后小鼠 PCV2 特异性 ELISA 抗体滴度迅猛增加，且抗体滴度显著高于商品化 PCV2 灭活苗组（$P<0.01$），而重组病毒诱导小鼠产生 PCV2 中和抗体滴度与商品化 PCV2 灭活苗组相当（$P>0.05$）。重组病毒诱导的 ELISA 抗体滴度及中和抗体滴度均与 PRV NY-gE$^-$/gI$^-$/TK$^-$组无显著差异（$P>0.05$）。重组病毒与商品化 PCV2 灭活苗组均能有效抵抗 PCV2d 强毒攻击，且用 PRV NY 强毒株攻毒时重组病毒能为小鼠提供完全保护。本研究为 PCV2 和 PRV 的防控和净化提供了有力工具。

主要参考文献

[1] Opriessnig T，Meng XJ，Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated disease： update on current terminology，clinical manifestations，pathogenesis，diagnosis，and intervention strategies [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation，2007，19（6），591-615.

※ 作者简介：许瑞勤，女，河南安阳人，在读博士研究生，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: 1270433669 @qq.com。
※※ 通讯作者：陈红英，教授，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: chhy927@163.com。

仔猪结肠炎模型中肠道炎症的时间和空间发展规律

王铭育※，钟琴，陈代文，余 冰，何 军，虞 洁，毛湘冰，黄志清，罗玉衡，罗钧秋，阎 辉，伍爱民，蒲俊宁，郑萍※※

（四川农业大学动物营养研究所，农业农村部动物抗病营养与饲料重点实验室，动物抗病营养四川省重点实验室，四川成都 611130）

引言

结肠炎会导致肠道功能紊乱，损害肠道 GLP-2 和 IGF-1 介导的黏膜修复功能[1~3]。在动物生产中，结肠炎降低动物生产性能，延缓动物生长发育，导致死亡率升高，致使养殖效益下降。然而，目前很少有研究同时从时间和空间的角度阐述仔猪结肠炎期间的炎症性变化。因此，本试验以 DAI 为标准，研究结肠、盲肠、回肠和空肠中肠道屏障和促炎细胞因子在不同结肠炎时期的变化，旨在研究不同仔猪结肠炎时期肠道的炎症性变化，为生产中探索缓解结肠炎的措施提供参考。

材料与方法

试验选取 40 头公母各半、体重相近的 24 日龄 DLY 断奶仔猪，按照体重相近、性别比例一致的原则分为 5 个处理，每个处理 8 个重复，每个重复 1 头仔猪。试验用 5%的 DSS 溶液对仔猪进行连续灌胃 4 天诱导仔猪肠炎，在此期间考察仔猪 DAI 的变化。在试验的第 0（对照组）、1、3、5、7 天分别麻醉屠宰 8 头仔猪，采集结肠、盲肠、空肠、回肠样品。测定肠道形态结构和肠道发育相关基因以评估肠道功能，测定免疫球蛋白和促炎因子蛋白水平以评估肠道免疫功能。

结果与讨论

仔猪 DAI 在试验第 1 天显著升高（$P<0.05$），在试验第 3 有升高趋势（$P=0.08$），在试验第 5 天到达显著高峰（$P<0.01$），并在第 7 天显著降低（$P<0.001$）。参考 DAI 的变化，本试验将 DSS 诱导的仔猪结肠炎分为初期、高峰期和消退期，以此进一步研究不同结肠炎时期发生的炎症性改变。

在炎症初期，与对照组（第 0 天）相比，结肠杯状细胞数量在第 1 天显著降低（$P<0.01$）。结肠 IgM、IgG、sIgA 在第 1 天较对照组显著升高（$P<0.01$）。结肠 TNF-α（$P<0.01$）、IL-1β（$P<0.05$）和 IL-18（$P<0.01$）在第 1 天较对照组显著升高。在炎症高峰期，组织学染色结果显示结肠结构损伤在第 5 天最为严重；结肠 *GLP2* 和 *IGF-1* 的相对表达在第 3 天显著降低至试验期最低水平（$P<0.001$）。在炎症消退期，结肠形态结构有所改善，但杯状细胞数量依旧显著低于对照组（$P<0.05$）。结肠中屏障修复相关因子 *GLP2*（$P<0.05$）和 *IGF-1*（$P<0.01$）的相对表达较炎症高峰期显著升高，但 *GLP2* 的相对表达量依旧低于对照组（$P<0.001$）。结肠 IgM（$P<0.01$）、IgG（$P<0.01$）、IL-1β（$P<0.01$）的蛋白水平显著降低，甚至 sIgA（$P<0.05$）、TNF-α（$P<0.01$）和 IL-18（$P<0.05$）降低至比对照组更低的水平。另外，本研究首次在仔猪模型中证明了结肠炎导致的炎症损伤扩散至盲肠、回肠和空肠。值得注意的是，在炎症消退期，盲肠（$P<0.001$）、回肠（$P<0.05$）、空肠（$P<0.05$）中 *IGF-1* 的相对表达都显著低于对照组。综上所述，肠道免疫系统在炎症初期被激活，在炎症高峰期炎症性损伤最严重，而炎症消退期间肠道存在免疫耐受。此外，在结肠炎消退期，盲肠、回肠和空肠仍然存在屏障功能障碍。

主要参考文献

[1] GUIJARRO L G，CANO-MARTINEZ D，TOLEDO-LOBO M V，et al. Relationship between IGF-1 and body weight in inflammatory bowel diseases： Cellular and molecular mechanisms involved [J]. Biomed Pharmacother，2021，144（112239.

[2] NING M M，YANG W J，GUAN W B，et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protected against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by potentiating the action of GLP-2 [J]. Acta Pharmacol Sin，2020，41（11）： 1446-56.

[3] CAO X，DUAN L，HOU H，et al. IGF-1C hydrogel improves the therapeutic effects of MSCs on colitis in mice through PGE（2）-mediated M2 macrophage polarization [J]. Theranostics，2020，10（17）： 7697-709.

※ 作者简介：王铭育，在读博士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学，仔猪抗病营养。E-mail：1026329070@qq.com。

※※ 通讯作者：郑萍，教授，博士生导师，研究方向为动物营养与饲料科学，仔猪抗病营养。E-mail：zpind05@163.com。

PRRSV 和 PCV2 共感染猪肺泡巨噬细胞中免疫分子 mRNA 表达水平的检测

周立坤[2※]，陈静[2※※]，张宜娜[1]，夏平安[1]
（1. 河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2.河南农业大学生命科学学院，河南郑州 450046）

引言

猪繁殖和呼吸综合征病毒（PRRSV）和猪环状病毒 2（PCV2）是猪重要的经济病原体，两者均属于免疫抑制性病毒，猪群感染后免疫系统受损，免疫机能下降，二者协同并发加重了猪免疫机能抑制的程度，易造成其他疫病的继发感染，从而加重病情，造成巨大的经济损失。然而，PRRSV 和 PCV2 混合感染诱导的协同发病机制尚未被阐明。因此，本研究的目的是评估单独感染 PRRSV 或 PCV2 和二者同时感染时，猪肺泡巨噬细胞（PAMs）中免疫调节因子、炎症因子和免疫抑制分子的表达水平差异，阐明它们与 PRRSV 和 PCV2 混合感染过程中免疫抑制和协同发病机制的相关性，为相关疾病的防治提供理论依据和有效靶点。

材料与方法

试验对象为健康的 PAMs（PRRSV 和 PCV2 检测均为阴性）。试验分为六组：阴性对照组（Mock），单组感染 PCV2 组（PCV2），单独感染 PRRSV 组（PRRSV），PCV2 感染 12h 后再感染 PRRSV 组（PCV2-PRRSV），PRRSV 感染 12h 后再感染 PCV2 组（PRRSV-PCV2），PCV2 和 PRRSV 同时感染组（PCV2+PRRSV）。通过 $TCID_{50}$ 和 RT-qPCR 的方法，检测不同处理组 6、12、24、36 和 48h PAMs 中 PCV2 与 PRRSV 的病毒载量及免疫调节因子、炎症因子和免疫抑制分子的 mRNA 转录水平。

结果与讨论

本研究通过 $TCID_{50}$ 和 RT-qPCR 的方法分别检测了不同试验组中 PCV2 与 PRRSV 的病毒载量及部分免疫调节因子（IFN-α、IFN-γ）、炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-10、TGF-β）和免疫抑制分子（PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3）的 mRNA 转录水平。病毒载量检测结果显示，PCV2 和 PRRSV 混合感染，无论感染顺序如何，对 PCV2 复制没有影响，而 PRRSV 和 PCV2 混合感染能够促进 PRRSV 复制。对相关的免疫因子的检测结果显示，感染后 36-48h，混合感染组中免疫调节因子（IFN-α 和 IFN-γ）的 mRNA 水平始终低于单独感染组；而炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-10 和 TGF-β）和免疫抑制分子（PD-1、LAG-3、CTLA-4 和 TIM-3）在感染病毒后 24-48h 的 mRNA 水平则显著上调，且在混合感染组的水平显著高于单独感染组，特别是在先感染 PCV2 后感染 PRRSV 的 PAMs 中。本研究部分解释了 PAMs 中 PCV2 和 PRRSV 双重感染增强肺部病变的潜在机制，为了解 PCV2 和 PRRSV 混合感染后 PAMs 中发生的潜在免疫反应提供了见解。

主要参考文献

[1] Ma，Z，Han，Z，Liu，Z，et al. Epidemiological investigation of porcine pseudorabies virus and its coinfection rate in Shandong Province in China from 2015 to 2018 [J]. Journal of Veterinary Science，2020，21，e36.

[2] Ouyang，T，Zhang，X，Liu，X，et al. Co-Infection of Swine with Porcine Circovirus Type 2 and Other Swine Viruses [J]. Viruses，2019，11，185.

※ 作者简介：周立坤，硕士研究生，研究方向为动物病毒与分子免疫学。E-mail：zlk2436@163.com
※※ 通讯作者：陈静，讲师，研究方向为动物病毒与分子免疫学。E-mail：chenjing@henau.edu.cn。

非洲猪瘟五基因缺失株的发现与分离鉴定

戈胜强[1#]，路皓东[2]，初薛菲[2]，徐天刚[1]，左媛媛[1]，包静月[1]，李金明[1]，王志亮[1*]
（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2.山东农业大学，山东泰安 271018）

非洲猪瘟病毒（ASFV）是非洲猪瘟病毒科（Asfarviridae）非洲猪瘟病毒属（Asfivirus）唯一成员，是一种大的胞浆内复制的 DNA 虫媒病毒。非洲猪瘟（African swine fever，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）感染引起的高度致死性传染病，从 1921 年第一次被发现至今，一直在全球范围内广泛传播。研究表明，ASFV 强毒株在传代细胞上连续传代会出现基因丢失导致毒力减弱，这为研发 ASFV 弱毒疫苗提供了重要思路。但在原代细胞上多次传代发生基因丢失的相关研究还未见报道。

本研究将 ASFV-CN2018 强毒株在猪原代 PAM 细胞上进行连续传代的过程中，发现出现五基因缺失株（ASFV-CN2018-MGF）。这表明 ASFV 毒株在原代细胞中进行连续传代也会导致 ASFV 毒株出现基因缺失，这可能与原代细胞系批次间差异大有关。ASFV-CN2018 毒株在连续传代过程中所使用的 PAM 细胞是通过不同批次巴马香猪进行制备，导致不同批次间的 PAM 细胞存在个体差异，从而可能导致 ASFV-CN2018 毒株接种于 PAM 细胞进行连续传代时出现基因丢失。经测序分析表明，ASFV-CN2018-MGF 株的基因缺失位置位于 ASFV 基因组左端可变区，与 ASFV-G-ΔMGF 弱毒株的缺失区域相近。该区域是非洲猪瘟多基因家族研究热点区域，涉及毒力基因或免疫逃逸基因，已有多株自然缺失株或基因缺失株在此区域出现基因丢失或进行基因敲除操作。

该缺失毒株出现后，在随后的 40 代连续传代过程中，该缺失毒株会在与母本野毒的混合增殖扩繁中稳定存在，且常规 qPCR 检测方法不容易发现缺失毒株。提示非洲猪瘟病毒在种子批毒制备过程中应保持较低的传代次数，以防止可能的缺失毒株出现，从而影响试验结果。

主要参考文献

略

非肌性肌球蛋白 IIA （NM-ⅡA）介导 PEDV 感染的功能及机制研究

胡意[1, 2※]，唐青海[1]，刘会敬[1]，王爱兵[2※※]

（1.衡阳师范学院生命科学学院，湖南衡阳 421008；2.湖南农业大学动物医学院，湖南长沙 410128）

引言

PED 是由 PEDV 引发的猪肠道传染病，病猪主要的临床症状表现为呕吐、腹泻和脱水等。PEDV 在仔猪中引发高致病率和死亡率，严重威胁生猪养殖业的健康发展并造成巨大经济损失[1]。因此，深入研究 PEDV 与宿主因子的相互作用，探究该病毒的感染机制，对于防控 PED 具有重要指导意义，同时也为抗 PEDV 药物研发及疫苗设计提供理论依据[2]。

材料与方法

本项目通过 qPCR、Western-Blot、IFA 等方法分析 PEDV 感染仔猪小肠组织和细胞中 NM-IIA 表达与分布变化，观察通过抑制 NM-IIA 活性和 shRNA 干扰的方法研究降低其表达对 PEDV 感染的影响，再利用 Co-IP 验证病毒蛋白与 NM-IIA 直接的相互作用及 IFA 检测两者在细胞内的共定位等。最后利用 SPSS 软件对数据进行统计分析。

结果与讨论

通过 IFA 发现，在受 PEDV 感染的小肠组织中 NM-IIA 和 PEDV 在小肠绒毛上存在共定位现象；并且这些 PEDV 感染的小肠组织中 NM-ⅡA mRNA 与蛋白水平显著上升。在 Vero 细胞中也是如此，且观察到两者在细胞膜附近有共定位现象。而抑制 NM-ⅡA 活性可使 PEDV 复制受到很大的影响，表现为病毒拷贝数显著下降。过表达 NM-ⅡA 基因可显著促进 PEDV 感染，而敲降 NM-ⅡA 基因导致 PEDV 感染明显下降。在此基础上，分别转染携带 NM-ⅡA 蛋白头部和尾部功能域的质粒，发现过表达 NM-ⅡA 尾部功能域可显著提升 PEDV 感染。最后分别构建 PEDV 结构蛋白真核表达质粒，分别转染至 293T 细胞中，分析 NM-ⅡA 表达水平和细胞内定位状况。结果显示，仅在转染 S 蛋白和 E 蛋白表达质粒的细胞中，NM-ⅡA 表达量显著上调。另外，利用免疫共沉淀实验确认了 S 蛋白和 NM-ⅡA 两者之间的互作关系。本研究证实了 NM-ⅡA 具有促进 PEDV 感染的功能，该作用可能与 NM-ⅡA 的尾部功能结构域密切相关，并且可能至少通过与 PEDV S 蛋白相互作用而实现。本研究发现，PEDV 感染细胞后引起 NM-ⅡA 表达水平显著上调，提示 NM-ⅡA 的表达变化可能与该病毒感染存在相关性。后续研究证实 NM-ⅡA 有促进 PEDV 对靶细胞感染的作用。这些结果拓展了受 NM-ⅡA 功能影响的病毒谱，为进一步研究 PEDV S 和 E 蛋白的功能，及 NM-ⅡA 在 PEDV 感染不同阶段如吸附、内化和组装释放等过程中的作用奠定基础，也为 PED 防治提供新思路和靶点。

主要参考文献

[1] Tan L，Li Y，He J，et al. Epidemic and genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in the regions around Hunan，China，during 2017-2018 [J]. Arch Virol，2020，165（4）：877-889.

[2] Hu Y，Xie X，Yang L，et al.，A comprehensive view on the host factors and viral proteins associated with porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. Front Microbiol，2021，12： 762358.

※作者简介：胡意，博士研究生，研究方向为动物疫病病理。E-mail：yihu@stu.hunau.edu.cn。

※※通讯作者：王爱兵，教授，博士生导师，研究方向为病毒宿主因子功能及机制。E-mail：bingaiwang@hunau.edu.cn。

宿主蛋白 Haspin 激酶参与 PRV 感染的机制研究※

谭 磊[1,2]，王爱兵[1]
(1.湖南农业大学，湖南长沙 410128；2.长江大学，湖北荆州 430110)

猪伪狂犬病（pseudorabies，PR）是由猪伪狂犬病病毒（pseudorabies virus，PRV）感染所引起的一种以新生仔猪表现腹泻、神经症状及高死亡率，妊娠母猪流产、死胎，及育肥猪轻微呼吸道症状等为特征的传染病[1]。此外，近年来已有研究证实 PRV 可感染多种哺乳动物，其中包括人[2]。值得注意的是，当前用于治疗人类疱疹病毒感染的抗病毒药物（如阿昔洛韦）对 PR 治疗效果较差，提示我们需要寻找新的靶标分子用于研发抗 PRV 感染药物。单倍体生殖细胞特异性核蛋白激酶基因（haspin）可编码哺乳动物细胞有丝分裂密切相关的 Ser/Thr 蛋白激酶（Haspin 激酶）[3]。Haspin 激酶介导哺乳动物细胞组蛋白磷酸化过程，对细胞有丝分裂和调控细胞周期等至关重要[4]。本课题组前期通过 RNA-Seq 技术分析 PRV 变异株和经典株感染猪肺泡巨噬细胞转录本差异，发现 PRV 变异株和经典猪感染均可上调细胞 Haspin 基因转录水平，提示 Haspin 激酶可能参与 PRV 感染，但具体机制尚未知。

因此，本研究旨在探究宿主蛋白 Haspin 激酶参与 PRV 感染的作用及潜在机制。本研究拟首先在 PRV 变异株感染的细胞（3D4/21 和 PK15 细胞）和动物模型（昆明小鼠）的基础上，检测 *haspin* 基因在转录水平（mRNA）和 Haspin 蛋白表达水平的变化情况；其后分别探究抑制 Haspin 激酶活性、降低或过表达 *haspin* 基因对 PRV 感染的影响。结果发现，PRV 感染可显著上调 *haspin* 基因转录和蛋白表达水平；抑制 Haspin 激酶活性或降低 *haspin* 基因可抑制 PRV 复制，且缓解 PRV 感染引起的“炎症因子风暴”，过表达 *haspin* 则显著促进 PRV 感染。进一步试验结果发现，Haspin 激酶抑制剂通过 NF-κB 信号通路发挥抗 PRV 感染作用，且 Haspin 激酶抑制剂对单纯疱疹病毒感染也具有较好的抑制效果。

主要参考文献

[1] Sun Y，Luo Y，Wang CH，*et al.*，Control of swine pseudorabies in China： Opportunities and limitations[J]. Vet Microbiol，2016，183： 119-124.

[2] Tan L，Yao J，Yang Y，*et al.*，Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China[J]. Virol Sin，2021，36（4）： 588-607.

[3] 赵小蓉. Haspin 抑制剂抗肿瘤的研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2020，8（26）： 30-31.

[4] Yu W，Liu W，Feng Y，*et al.*，Knockdown of GSG2 suppresses the progression of colorectal cancer cells[J]. Genet Test Mol Biomarkers，2022，26（1）： 26-36.

基金项目：国家自然科学基金项目（31571432）；湖南省自然科学基金项目（2020JJ4041）及云南省重大科技专项（202102AE090007）。

纳米银消毒剂杀菌效果及安全性评价研究

谢小红[1, 2]，李鑫[1]，麦金辉[3]，丘沛炎[3]，文利新[2, 3]
（1.长沙绿叶生物科技有限公司，湖南长沙 410128；2.畜禽保健湖南省工程研究中心，湖南长沙 410128；
湖南农业大学，湖南长沙 410128）

引言

近几年非洲猪瘟时刻威胁着我国养猪业健康稳定发展，当前对养殖场所进行消杀工作是疫病防控的重中之重[1]。纳米抗菌材料是一类具备抑菌性能的新型材料，是在纳米技术出现后，将抗菌剂通过一定的方法和技术制备成纳米级抗菌剂，再与抗菌载体通过一定的方法和技术制备而成的具有抗菌功能的材料。研制和利用抗菌材料来抑制和杀灭有害细菌是提高畜禽健康养殖水平的重要手段。传统的抗菌材料不但会导致微生物的抗性，还会造成严重的环境污染。纳米抗菌材料具有超强抗菌性能、作用持久、不易诱发耐药性，有望成为一种畜禽舍新型消毒材料[2, 3]。在众多金属及其氧化物纳米粒子中，银纳米颗粒抗菌效果最好，研究也最为广泛[4-7]，在养殖行业具有巨大的潜在应用前景。因此，本文以新型纳米材料——纳米银作为主要活性成份研制了纳米银消毒剂，并对其杀菌效果及安全性进行研究，以期为养殖行业提供新型安全无毒、快速长效的消毒产品，提升养殖场生物安全等级。

材料与方法

纳米银消毒剂由绿叶（浏阳）生物科技有限公司提供。杀菌性能、金属腐蚀性能及安全性评价试验检测参照《消毒技术规范》[8]进行。大肠杆菌、链球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌标准菌株均由广东省食品微生物安全工程技术研究中心提供。

结果与结论

菌悬液杀灭试验结果显示，纳米银消毒剂对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌作用 5 分钟杀灭对数值分别为 5.07，5.05 和 4.05，可见纳米银消毒剂具有快速高效杀菌效果。

金属腐蚀性试验显示，纳米银消毒剂对铜片腐蚀速率为 0.0091，对碳钢片腐蚀速率为 0.037 mm/a，对不锈钢片腐蚀速率为 0.0117 mm/a，属于基本无腐蚀性。对铝片腐蚀速率为 0.1267 mm/a，属于轻度腐蚀。表明纳米银消毒剂对金属友好，可用于金属设备杀菌消毒。

安全性评价试验显示纳米银消毒剂对小鼠的急性经口毒性 LD50 > 5000 mg/kg·bw，属实际无毒。纳米银消毒剂对小鼠的急性吸入毒性 LC50 > 10500 mg/m^3，属实际无毒。纳米银消毒剂对新西兰兔一次完整皮肤刺激试验均无不良反应产生，刺激强度属无刺激性。同时小鼠进行骨髓嗜多染红细胞微核试验显示，纳米银消毒剂不会引起小鼠骨髓微核率升高，属致突变阴性。

以上试验结果表明，纳米银消毒剂具有快速安全的杀菌效果，可以作为一种新型消毒剂应用于畜禽养殖行业，加固养殖场所的生物安全等级。

主要参考文献

略

PRRSV 结构蛋白 GP3 调节 Claudin 4 促进其早期感染

丁国飞※，邵清源，刘思当，肖一红※※
（山东农业大学 动物科技学院 山东省动物生物技术与疾病防控重点实验室，山东泰安 271018）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）是危害养猪业最严重的病原体之一。Claudins（CLDNs）是一个蛋白质家族，代表了紧密连接的最重要的组成部分，它们通过建立细胞屏障，控制相邻细胞之间的分子流动。多种病毒充分利用 CLDNs 来促进其自身感染。经典 PRRSV 以猪肺泡巨噬细胞为主要靶细胞，但也有研究发现 HP-PRRSV 可以感染血管内皮细胞、上皮细胞和其他类型细胞、然而，CLDNs 在 PRRSV 感染这些细胞过程中的作用机制尚不清楚。

材料与方法

为了验证紧密连接蛋白与 PRRSV 感染过程的关系，本研究通过构建 CLDN4 敲除和过表达的细胞系、抗体阻断、荧光定量、双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 等方法，还使用了免疫沉淀技术来探索具体的相互作用位点。

结果与讨论

本研究显示，PRRSV 的感染早期下调细胞中 CLDN4 的表达，后期则上调 CLDN4 的表达，提示 CLDN4 在 PRRSV 感染过程中可能起到非常重要的作用。通过构建 CLDN4 敲除和过表达的细胞系、抗体阻断、荧光定量和 Western blot 等方法，发现 CLDN4 可以抑制 PRRSV 的吸附，从而抑制病毒感染。进一步研究显示 PRRSV 结构蛋白 GP3 的 C 末端与 CLDN4 的小细胞外环结构域（ECL2）具有相互作用，人工合成的 ECL2 多肽可以显著抑制病毒的吸附，抑制 PRRSV 的感染，并呈现剂量依赖性。最后发现 GP3 蛋白可以提高 CLDN4 的转录因子 SP1 的泛素化水平，促进 SP1 降解，从而下调 *CLDN4* 基因的转录，最终有利于 PRRSV 吸附易感细胞，促进其感染。该研究结果阐述了转录因子 SP1 以及紧密连接蛋白 CLDN4 在 PRRSV 感染过程中的重要作用，揭示了 PRRSV 感染的新机制，并为新的治疗性抗病毒药物提供了新的思路。

主要参考文献

[1] Anderson JM，Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology，2009，1：a002584.

※ 作者简介：丁国飞，在读博士研究生，研究方向为基础兽医学。E-mail：18706385381@163.com。
※※ 通讯作者：肖一红，教授，博士生导师，研究方向为动物免疫病理学。E-mail：xiaoyihong01@163.com。

新肠道毒株进化以逃避现有防控手段：现代生猪养殖新挑战

姚鑫※，乔文婷，李金龙※※
（东北农业大学动物医学学院，黑龙江哈尔滨 150000）

引言

疫病控制是反映生猪养殖生产水平和经济效益的重要指标，近年来养猪业中 PEDV、PDCoV 等肠道病毒流行传播尚未得到有效控制[1]。研究表明部分肠道病毒从经典毒株衍生的疫苗无法对流行毒株提供足够的防护[2, 3]。因此，本研究对东北地区 PEDV、PDCoV、PRV 和 PCV2 流行毒株和疫苗毒株进行比对分析，旨在探究现有防控手段对流行毒株的影响，为肠道病毒防控和疫苗研发提供数据支持。

材料与方法

试验对象为东北地区腹泻猪只样本 300 余份。通过 RT-qPCR 和 immunofluorescence 确定病原，采用 Vero、ST、IPEC-J2、Marc-145 等易感细胞系进行病毒分离培养，进行极限稀释和 Electron microscope 纯化病毒，浓缩后进行高通量测序。MEGA6 和 DNASTAR 用于构建毒株系统发育进化树和抗原表位分析，利用 Phyre2、SWISS-MODEL 和 FirstGlance in JMOL 进行病毒蛋白三级结构差异性分析，通过 TMHMM 预测病毒蛋白功能。

结果与讨论

自 2016 年 PEDV 商品化 AJ1102 株疫苗出现后，源自其疫苗株所在分型株流行率下降。但由于免疫压力，在 GII 亚群中新出现以 CH/JLDH/2016 和 CH/HLJJS/2022 为代表的 2016 年后亚型和 2020 年后亚型，新流行毒株与其他毒株全基因组同源性为 96.1% ~ 98.9%，在高度保守的膜蛋白（M）和核衣壳蛋白（N）中首次发现 4 个氨基酸同时突变，在刺突蛋白中首次发现 8 个与其他毒株不同的氨基酸突变，其中 3 个突变改变了棘突（S）蛋白空间结构和中和表位。PDCoV 新流行毒株与原有毒株相比，其 S 蛋白 NTD 中和表位、S1/2 冠状病毒 3C 样切割酶位点、HR-C 六螺旋束跨膜结构发生改变，由于疫苗的缺失和病毒人畜共患的争议[4, 5]，其 S 蛋白多样化突变形式严重危害了公共卫生安全。目前对于 PRV 进化分析研究多数基于 gB、gC、gE、gH 等单个蛋白分析[6, 7]，对现有疫苗株和流行株进行 gC 进化分析发现各亚型均分布疫苗株，但 PRV 全基因组进化分析发现新出现流行株独立分支，与以 HN1201 和 HNX-12 为代表的 gE 基因缺失苗最为相近。本研究为猪肠道病毒进化提供了重要信息，在养猪业疫病防控和疫苗研发中发挥重要的作用。

主要参考文献

略

※作者简介：姚鑫，在读博士研究生，研究方向为动物营养代谢与疫病防控。E-mail：850682712@qq.com。
※※通讯作者：李金龙，教授，博士生导师，研究方向为动物营养代谢病与中毒病。E-mail：Jinlongli@neau.edu.cn。

利用 p30、p54 和 p72 多聚抗原优势表位重组蛋白的间接 ELISA 检测非洲猪瘟病毒抗体

李德昕[1※]，张钦[1]，刘雨田[2]，王苗丽[3]，张磊[1]，韩丽媛[1]，初薛霏[1]，丁国飞[1]，李英超[1]，侯衍猛[1]，刘思当[1]，王志亮[2]，肖一红[1※※]

（1.山东农业大学动物科学技术学院，山东泰安 271018；2.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；3.山东省动物疫病预防与控制中心，山东济南 250022）

引言

本研究筛选并串联表达了抗原优势蛋白 p30、p54 和 p72 的优势表位区，与单抗原包被的商品化 ELISA 相比，串联表达包被的间接 ELISA 具有更高的灵敏性和特异性，可用于 ASFV 的监测和根除。

材料与方法

p30、*p54* 和 *p72* 基因的密码子基于大肠杆菌密码子偏好性进行优化并合成（Gene Script，中国南京）。根据 p30、p54 和 p72 蛋白的抗原指数分析，*p30* 中有 3 个优势表位 1-66aa、78-132 aa 和 134-174 aa；*p54* 有 1 个优势表位 54-124aa；*p72* 中的 4 个优势表位 12-89aa、139-324aa、445-524aa 和 552-647aa。将所有相应的基因克隆到原核表达载体中，并在大肠杆菌中表达，使用制备的 p30、p54 和 p72 多克隆抗体以及临床 ASFV 阳性血清通过 Western-blot 筛选优势表位。将筛选的 *p30*（78–132 aa、134–174 aa）、*p54*（54–124 aa）和 *p72*（12–89 aa、139–324 aa 和 445–524 aa）的基因片段按顺序连接，并插入 pET-28a 载体，在每个基因之间加入含有 10aa 的连接子，构建 His-p30-54-72 融合质粒。基因测序证实后，将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，诱导并纯化蛋白。

为了开发 p30-54-72 包被的 iELISA，进行了 ELISA 条件的优化。在优化的 ELISA 条件下，通过检测 82 份阳性和 38 份阴性血清样品获得了 cut–off 值。总共 192 份临床血清为中国动物卫生与流行病学中心国家非洲猪瘟参考实验室检测和保存。192 份临床样本均用 ASFV 抗体 ELISA 试剂盒（北京金诺百泰生物技术有限公司（JN60915）和青岛瑞尔唯特生物技术有限公司（ASF.K001/5））检测。

结果与讨论

在本研究中，分析了高抗原性基因病毒蛋白 p30、p54 和 p72 的表位序列，使用制备的 p30、p54 和 p72 的多克隆抗体和猪的 ASFV 阳性血清筛选优势抗原结构域，并将优势抗原结构域串联后获得 His-p30-54-72。用 His-p30-54-72 包被的间接 ELISA （iELISA）和商品化的 ASFV 抗体试剂盒检测了同样的 192 份临床样本。结果表明，His-p30-54-72 包被的 iELISA 的阳性率比基于 p30 或 p72 单一病毒蛋白包被的商品化 ASFV 抗体检测试剂盒的阳性率分别提高了 4.7%和 14.6%。同时也开发了 p54 包被的 iELISA 用于检测 192 份临床样品，将 His-p30-54-72 包被的 iELISA 与 p54 包被的 iELISA 检测结果相比，His-p30-54-72 包被的 iELISA 检测到的阳性样品数增加了 12 个，阳性检测率增加了 6.3%。

本方法与单一病毒蛋白包被的 ELISA 相比，特异性和敏感性均有所提高，表明该方法适用于 ASFV 的血清学诊断，这些为今后 ASFV 的临床诊断和疫苗免疫效果评估提供了有力的平台。

主要参考文献

略

※ 作者简介：李德昕，在读硕士研究生，研究方向为动物疫病防控。E-mail：lidexin0123@163.com。

※※ 通讯作者：肖一红，教授，博士生导师，研究方向为动物免疫病理学。E-mail：xiaoyihong01@163.com。

非洲猪瘟病毒空气传播途径研究现状

戈胜强[1]，徐天刚[1, 2, 3]，孙洪涛[1]，左媛媛[1, 2]，王栋[1]，初薛菲[4]，蔡玉梅[4]，包静月[1]，李金明[1]，王志亮[1]*

（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2.青岛市现代生物工程及动物疫病研究重点实验室，山东青岛 266032；3.农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室（南方），山东青岛 266032；4. 山东农业大学，山东泰安 271001）

非洲猪瘟（African swine fever，ASF）的传播途径主要是通过接触或采食受非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）污染的物品而经口传染或通过昆虫吸血而传染。此外，亦有通过空气传播 ASFV 的案例报道，具备空气过滤系统的猪场在应对 ASF 疫情方面更有优势。鉴于当前国内养殖企业对 ASFV 能否通过空气传播高度关注，本文就国内外研究进展进行综述，以期为我国学界和相关从业人员提供借鉴和参考。

ASFV 能否能通过空气传播取决于感染猪向空气中排放的 ASFV 数量、易感猪从空气中接触 ASFV 的最小感染剂量以及 ASFV 在空气中的存活时长等因素。虽然关于 ASFV 通过空气传播的研究较少，但是结合现有数据分析，在封闭的实验室环境下，病毒核酸可以从“供体猪”周边的空气样本中检测到且能引起“空气接触猪”（“受试猪”）发病，即 ASFV 可以通过空气进行短距离传播。进一步分析显示，空气样本中检测出 ASFV 的时间与对应栏内“供体猪”的排毒和临床症状出现时间相吻，合且空气中的 ASFV 滴度与“供体猪”粪便排泄的病毒量存在正相关。这种情况的合理解释可能是，出现 ASF 症状时，猪的分泌物和排泄物中病毒含量明显增加，在这种环境污染的情况下，猪的移动和排泄物的飞溅可能会产生感染性灰尘或气溶胶，造成短暂的空气传播窗口。同时，研究分析显示，“受试猪”的空气样本中检测出 ASFV 的时间早于“受试猪”出现临床症状的时间，这提示评估养殖场内是否存在 ASFV 空气传播时，可以进行空气样本检测。此外，有研究分析显示，考虑到空气中 ASFV 的含量、易感猪的最小感染剂量以及 ASFV 在空气中的存活时间，养殖场内 ASF V 的空气传播能力可能会低于古典猪瘟。

综上所述，ASFV 可以通过空气传播，但因其传播能力有限，当猪场新暴发 ASFV 时，空气传播不应作为主要风险因素进行分析。ASFV 的空气传播更多情况下是在集约化饲养过程中、病毒大范围流行时才可能出现的问题。以目前的研究资料还不足以确认 ASFV 可以远距离空气传播。对于评估 ASFV 远距离空气传播可能性，应设计实验在感染设施的内部、排气孔和下风口收集空气样本，通过实验室分析来量化空气样本内的感染性病毒数量，或利用计算机模型，综合空气扩散模型天气分析和流行病学调查进行综合判断研究。

主要参考文献

略

一株仔猪产肠毒素大肠杆菌分离鉴定、耐药性分析及其卵黄抗体的制备

尹家银※，喻 娇，唐青海※※，滕 威，阳 坤，曹 馨，徐 晴，刘 博，李 泽

（衡阳师范学院生命科学与环境学院/南岳山区生物资源保护与利用湖南省重点实验室/动物微生物新型检测技术及生物制剂衡阳市重点实验室，湖南衡阳 421008）

引言

猪大肠杆菌病是一类由肠道致病性大肠杆菌引起的传染病，发病率较高，给养猪业带来重大经济损失[1]。其中，仔猪断奶后腹泻与肠产毒性大肠杆菌在肠道定植有巨大关系，每年其导致的死亡占全球仔猪死亡率的 50%，严重威胁生猪生产[2, 3]。因致病性大肠杆菌的血清型多、变异快，接种疫苗一般达不到预防效果，临床常用抗生素来治疗仔猪细菌性腹泻。大肠杆菌易产生耐药性，甚至形成多重交叉耐药株，致使细菌耐药性问题愈发严重[4]。因此急需一种绿色安全的抗生素替代品，而卵黄抗体作为理想的抗生素替代品之一，在养殖业具有巨大的发展潜力。因此，本研究从某猪场仔猪腹泻粪便样品中分离一株致病性大肠杆菌、分析其毒力基因和耐药性、制备特异性卵黄抗体，皆在为临床仔猪大肠杆菌病的防治提供依据和技术手段。

材料与方法

采用细菌分离培养、生化试验、16SrRNA PCR 鉴定及系统进化树分析、药敏试验等方法对病料进行研究，并利用全菌体灭活和超声波破碎法制备抗原，将其分别与不同佐剂（ISA 71VG、ISA201VG 和 15AVG）配伍乳化制备疫苗免疫蛋鸡、聚乙二醇法提取高免卵黄抗体、SDS-PAGE 电泳和 Bradford 法鉴定抗体质量及浓度、双向琼脂扩散试验测定抗体效价。

结果与讨论

研究结果显示分离菌株的形状、大小及生化特性均与大肠杆菌相符。分离株的主要毒力基因 E.coli-estb 和 elt 基因分别为 113、272 bp；分离株 elt 和 estb 基因与美国流行毒株如 UMNK88 处于同一分支，亲缘关系较近；与丹麦株 CFSAN018748、瑞士株 14OD0056 处于不同分支，亲缘关系较远。分离菌株对头孢噻肟、诺氟沙星和复方新诺明敏感，对头孢曲松和多黏菌素 B 中介，对多西环素、呋喃唑酮以及多种氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药物耐药。各组卵黄抗体的重链（约 70 ku）和轻链（约 25 ku）均明显，纯度高。首免后 56 d 0.2%甲醛处理的菌液与 ISA 15AVG 配伍所制疫苗的卵黄抗体蛋白含量最高（1.462 mg/g 卵黄），超声破碎处理的菌液与 ISA 71VG 配合所制疫苗的卵黄抗体蛋白含量次之（1.459 mg/g 卵黄）。血清抗体与菌体抗原反应性良好，超声波破碎抗原与 ISA 71VG 配伍所制疫苗的血清抗体、卵黄抗体效价分别高达 1：16、1：4。综上，本研究成功分离得到一株具有多重耐药性的产肠毒素大肠杆菌，命名为 E.coli-HuNHY19，所制备的卵黄抗体特异性好、纯度高，为临床仔猪大肠杆菌病的防治提供了技术支撑。

主要参考文献

略

※ 通讯作者：滚双宝，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：gunsb@gsau.edu.cn。

越南非洲猪瘟基因缺失减毒活疫苗临床研究进展

徐天刚[1]，胡永新[1]，左媛媛[1]，初薛霏[2]，张永强[1]，赵永刚[1]，王英丽[1]，戈胜强[1]
（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2.山东农业大学，山东泰安 271018）

2019 年 2 月初，越南海阳省首次发现非洲猪瘟疫情（African swine fever，ASF），随后蔓延至全国所有省份。截至 2019 年底，越南共有 660 多个地区的 8500 多个公社发生 ASF 疫情，共计扑杀近 600 万头猪，约占全国生猪总量的 9%。截至 2022 年 6 月，ASF 疫情造成的损失已超过 30 万亿越南盾（约 88 亿人民币），严重影响了 350 万养殖户和数百家企业的生计，直接影响了消费者物价指数（CPI）和出口。

ASF 传入越南后不久，越南农业科学院便启动了 ASF 疫苗研究，包括灭活疫苗、弱毒疫苗等多个研究方向均取得了一定进展。2019 年 11 月美国报道研制成功 I177L 基因缺失疫苗株（ASFV-G-ΔI177L 株）后，越南几乎将所有研究力量投入到基因缺失弱毒疫苗领域，并与美国建立了密切的合作关系。ASFV-G-ΔI177L 疫苗株报道后，越南农业与农村发展部（Ministry of Agriculture and Rural Development，MARD）领导人便立即派遣动物卫生部（Department of Animal Health，DAH）负责人前往美国参加相关会议，并与美国专家讨论 ASF 疫苗的研发合作问题。2022 年 2 月，越南疫苗相关研究机构与美国非洲猪瘟疫苗研制专家建立正式合作关系，并与美国农业部农业研究局（Agricultural Research Service，ARS）签订技术合作谅解备忘录（1387/BNN-VP 号文件），为执行任务提供框架。2020 年 7 月，越南农业部批准引进 ASFV-G-ΔI177L 疫苗株，并开展相关生产及研究工作，对基因缺失弱毒疫苗的安全性和有效性进行评价。为向国内生猪养殖从业人员提供越南非洲猪瘟基因缺失减毒疫苗的最新进展，本文就越南引进的基因缺失减毒疫苗株背景及临床应用情况进行综述。

主要参考文献

略

非洲猪瘟弱毒疫苗研究困惑与思考

左媛媛[1]，初薛菲[2]，戈胜强[1]，徐天刚[1]，张永强[1]，王振忠[3]，李金明[1]，王志亮[1]
（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2. 山东农业大学，山东泰安 271001；
3.南京农业大学，江苏南京 210095）

摘要：自非洲猪瘟被发现以来，各国科学家一直在努力探索研发非洲猪瘟弱毒疫苗。从最早的细胞传代致弱株（基因 I 型 L'60BM89 和基因 II 型 ASFV-G/VP110）、自然弱毒株（基因 I 型 NH/P68 和基因 II 型 Lv17/WB/Rie1）到基因缺失株（基因 I 型 BA71ΔCD2v 和基因 II 型 HLJ/18-7GD），已开展大量试验对弱毒疫苗的安全性和免疫效力进行评价。虽然目前还未有普遍认可的商品化疫苗上市，但是 7 基因缺失株和 I177L 缺失株均已在中国和越南开展临床试验，显示出一定的疫苗开发潜力。这也进一步促使科学家加大对基因缺失株研究投入，采取挑选更多基因，尝试更多组合和敲除更大范围等研究策略。伴随着可分析的数据不断叠加，非洲猪瘟弱毒疫苗展现了更多的“特性”或“难点”，有一些“特性”仍需开展深入研究才能科学解释。为开阔非洲猪瘟弱毒疫苗研究思路，理顺非洲猪瘟弱毒疫苗研究过程中发现的“难点”，本研究总结了非洲猪瘟弱毒疫苗研究中的动物试验数据，特别是基因缺失株的安全性和效力数据，以期为我国相关研究提供参考，为非洲猪瘟的疫苗研制提供思考。

目前，非洲猪瘟弱毒疫苗可能存在以下几个“难点”。1. 安全性与有效性兼顾性问题，即一味强调弱毒株安全性，可能会导致攻毒保护效果不好，而攻毒保护效果好的弱毒株常常会伴随安全性有“瑕疵”。2.非洲猪瘟研究中有时会发现，候选疫苗株接种剂量越大，攻毒保护效果反而较差或不尽人意。3. 非洲猪瘟不同基因型或毒株敲除相同基因后结果可能差异显著。4. 非洲猪瘟疫苗评价主要指标如免疫/攻毒剂量、途径及攻毒毒株等没有统一标准，相互之间不便横向评价。5.非洲猪瘟免疫保护机理复杂且缺乏较强的中和抗体，这导致弱毒株接种后无法用常规方法及早预判攻毒保护效果，对试验周期和处置预判等造成一定影响。6. 弱毒疫苗安全性与动物健康状况有一定相关。

大范围使用弱毒疫苗时，理论上是可以通过一定的技术管控措施减少可能的负面风险。如葡萄牙提出的疫苗接种与强制补偿屠宰联合策略，其目的是通过补偿屠宰，强制养殖户尽快处理高风险猪只，消除所有感染源。相似的，俄罗斯提出的非洲猪瘟弱毒疫苗应用的必备条件是：一是疫苗应限定在最重要的受威胁区内使用；二是疫苗只能用于大型猪场；三是在严格的兽医监管和卫生防疫条件下，疫苗使用 4 个月内，所有猪只必须屠宰并用于制备熟化香肠或炖煮加工。以上策略最终目的是缩小弱毒疫苗的潜在扩散范围，减少与流行强毒株的接触机会，降低整个环境的病毒载量。综上，目前基于生物安全防控理念的非洲猪瘟防控及加强/恢复动物机体自身抵抗力的平衡调节仍将是未来一段时间净化非洲猪瘟的关键措施。

主要参考文献

略.

基于非洲猪瘟病毒 p10 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立

魏天[1※]，王成宇[1]，王凤杰[2]，扈荣良[2]，王永志[1※※]
（1.吉林省农业科学院，吉林长春 130124；2.中国农业科学院长春兽医研究所，吉林长春 130122）

引言

非洲猪瘟（ASF）具有病程短、传染性强、死亡率高等特征，严重危害了我国养猪业。由于目前尚无有效疫苗控制 ASF 的发生，受威胁地区需高效灵敏的检测方法来监测该病的流行。非洲猪瘟病毒（ASFV）p10 蛋白是一种亲核蛋白，具有 DNA 结合活性[1]。本研究构建的重组 p10 蛋白具有良好的反应原性，能特异性识别 ASFV 阳性血清，可作为 ASFV 抗体检测试剂。本研究尝试将 p10 表达蛋白作为检测抗原，优化反应条件，引入 S/P 值进行阴阳性判定，旨在建立一种具有良好特异性和重复性的 ASFV 间接 ELISA 抗体检测方法，为 ASF 的快速检测及临床诊断提供技术支持。

材料与方法

本研究通过原核表达系统获得 pET-28a（+）-p10 重组蛋白，Western-blot 分析重组蛋白的反应原性，并将其作为包被抗原，通过优化反应条件，开展灵敏性、特异性、重复性和可行性试验，构建检测 ASFV 抗体的间接 ELISA 方法。

结果与讨论

原核表达是 ASFV 蛋白的常用表达方式，具备操作简单、成本低、安全的特点。本研究将重组构建的 pET-28a（+）-p10 质粒转移至原核表达菌株中，获得了体外诱导表达的 p10 蛋白，该重组蛋白存在可溶性与包涵体两种表达方式。Western-blot 试验显示重组 p10 蛋白具有良好的反应原性，说明重组 p10 蛋白可被 ASFV 阳性血清识别。利用重组 p10 蛋白构建 ASFV 间接 ELISA 抗体检测方法，通过 P/N 值确定了的最佳反应条件，试验引入 S/P 值进行阴阳性判定，能够更准确地反映样品抗体水平，减少抗原包被批间差异对结果的影响，排除假阴性和假阳性干扰，符合商品化 ELISA 试剂盒应用实际。本方法阳性血清的最低检测限为 1∶800，与猪伪狂犬病病毒、猪口蹄疫病毒、猪圆环病毒 2 型、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清不发生反应，批内变异系数和批间变异系数均小于 10%，与商品化 ASFV 检测试剂盒的符合率为 90.38%，说明本方法具备良好的灵敏性、特异性重复性和符合率，进一步证明了重组 p10 蛋白良好的反应原性。本研究所建立的针对 ASFV 抗体的间接 ELISA 检测方法成本低廉且操作便捷，具备很强的临床应用前景，为非洲猪瘟多样化临床检测丰富了技术储备。

主要参考文献

[1]Wang G，Xie M，Wu W，et al. Structuresand Functional diversities of ASFV proteins [J]. Virus，2021，13（11）：2124.

※ 作者简介：魏天，硕士，助理研究员，研究方向为预防兽医学。E-mail：595972178@qq.com。
※※ 通讯作者：王永志，研究员，研究方向为预防兽医学。E-mail：yzwang@126.com。

美国在非洲猪瘟病毒基因缺失疫苗研究中的路线及进展

韩乃君，徐天刚，戈胜强，左媛媛，胡永新，屈海龙，吴晓东，王志亮
（中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032）

二十世纪 50 年代末，非洲猪瘟基因 I 型毒株传入葡萄牙（1957 年）和西班牙（1960 年）等西欧国家，引发了非洲猪瘟疫苗研究热潮。以基因 I 型毒株为基础，科研人员先后发现了自然弱毒株 NH/P68、OUR T88/3，开发了基因缺失株 BA71ΔCD2、BeninΔMGF 和细胞传代致弱株 BA71v、E75CV1 等候选疫苗株。然而，相关活疫苗在西班牙和葡萄牙临床使用的失败，使得对疫苗的研究一度陷入停滞。2007 年，非洲猪瘟基因 II 型毒株传入格鲁吉亚并很快蔓延至俄罗斯（2007 年）、东欧（乌克兰，2012 年）、西欧（比利时，2018 年）、东亚（中国，2018 年）、大洋洲（东帝汶，2019 年）、南亚（印度，2020 年）和加勒比地区（多米尼加，2021 年）等地区，对全球养猪业造成严重影响，也再次引发了国际关注。其中，美国是最早参与疫苗研究的国家之一，目前在基因缺失弱毒疫苗研究方面取得一系列突破，特别是研发的 I177L 基因缺失株已在越南开展临床评估。本文就美国在基因 II 型非洲猪瘟病毒基因缺失活疫苗方向的进展进行梳理，以期为我国相关研究提供参考。

美国开展非洲猪瘟弱毒疫苗研制策略主要分为 4 个阶段，第一阶段策略是在非洲猪瘟基因 I 型病毒基因组左侧可变区和右侧可变区有针对性敲除与其相近病毒序列/功能相似的基因。第二阶段策略是针对非洲猪瘟病毒新发现的关键区域（如多基因家族）开展持续钻研并最终有所理论突破。第三阶段策略是不断尝试多基因联合缺失。第四阶段策略是在基因 II 型非洲猪瘟病毒基因组左侧可变区、右侧可变区乃至中央保守区进行大量基因敲除筛选。

基于以上策略的不断研究，美国成功研制出 ASFV-G-Δ9GL/ΔUK、ASFV-G-ΔMGF、ASFV-G-ΔI177L 等多个疫苗候选株，并在越南开展了大规模临床试验。尽管对比已在研的其他类型疫苗（如亚单位疫苗和活载体疫苗），基因缺失活疫苗在抗体应答、同源/异源保护以及生产工艺方面均具有其独特的优势，但存在潜在的安全隐患，如母猪安全性问题、免疫猪生产性能影响问题、免疫猪免疫系统受损问题、疫苗株毒力返强问题以及免疫猪再接种其他疫苗的干扰问题等仍需要逐项评价，这使得非洲猪瘟基因缺失活疫苗乃至其他非洲猪瘟疫苗的探索之路必将是一个漫长而艰辛的征程。

主要参考文献

略

后疫情时代猪业中医药绿色防控经验推广

陈 宏
（四川省凉山彝族自治州会理市农业农村局，四川会理 615100）

引言

在非洲猪瘟（ASF）防控背景下，无形中推动了人类防疫意识和防疫基础设施（手段）的大转变与大提升。中医中药集成应用技术方案优势凸显，有望实现 ASF 等重大动物疫病可防可治可控的终极目标。

材料与方法

采用穴位疗法治疗常见高发的仔猪痢疾腹泻，轻症直接采用针刺后海穴，配合口服补液盐或复合电解多维液，病猪即可快速康复，该穴位针刺刺激还可缓解便秘症状（排干硬粪球）；重症病例（伴严重继发感染）采用敏感抗菌药作后海穴封闭注射，常用复方庆大霉素或复方间甲氧嘧啶钠注射液，实际用抗减量 50%～80%，总有效率达 90%以上。采用三棱针刺猪蹄头穴、蹄门穴、涌泉穴、滴水穴等特定穴位放血（排积液）适量，取到扶正祛邪、引毒外出的作用，对于僵猪、猪风湿症、猪跛足等均有良效；采用三棱针刺玉堂穴、马口穴放血适量，可纠治猪消化和食欲不良；采用光滑细枝条（常用柳枝）缓慢插入猪顺气穴（有孔）深部刺激，可治猪结膜炎、仔猪白痢及腹胀；采用耳尖及四肢特定穴位紧急针刺放血适量可救治家畜过度应激综合征及猝死综合征，临床上能够显著提升综合治愈率并降低病死率。

辩证使用党参、首乌、刺五加能升高外周白细胞和增强网状内皮系统吞噬功能，动物服用黄芪后血中 IgE、IgM 含量显著增加。辩证使用复方黄芪多糖、四料子汤、四物汤、六味地黄丸等对细胞免疫和抗体形成有促进作用。猪群常见高发的细菌性（含类细菌）感染诸症，可选用具有清热解毒、清热燥湿、广谱抗菌功效作用的大黄、黄柏、穿心莲、黄芩、金银花、鱼腥草、艾叶、薄荷、穿心莲散、小柴胡散、黄芪多糖散、麻黄鱼腥草散等。其中，发挥抗菌作用的活性成分主要是生物碱、有机酸、萜类、黄酮类、醌类等，其抗菌谱较广，对葡萄球菌、溶血性链球菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌等 G+、G-菌都有抑杀作用，且对病毒、钩端螺旋体、致病性真菌和原虫感染等也有一定抑制作用，同时能激发动物机体免疫潜力、增强网状内皮系统吞噬能力、促进抗体形成。

结果与讨论

养殖减抗与人畜健康之间存在诸多必然联系，养猪滥用抗菌药可经食物链构成一个恶性循环链，因而单纯强调人或兽用抗菌药减量化并不科学。中医中药减（替）抗应用技术方案应对养殖长期大量用抗导致的耐药性、药残、食品安全、环境污染等一系列制约问题，并打破了人用抗菌药不能用于家畜禽的壁垒。“同一世界、同一健康”的中医理念值得提倡，猪业推行中医中药减（替）抗应用技术方案大前景光明。

主要参考文献

[1]刘纪玉.非洲猪瘟背景下原种猪场的生物安全管理措施[J].猪业科学，2019，36（08）：32-34.
[2]闫玉慧.提升基层中医药服务能力策略研究[J].中医药管理杂志，2020，28（24）：171-173.
[3]丁自力.加强中医药服务体系建设[J].人口与健康，2019（10）：63-64.
[4]叶青，郑国玲.多举措提升乡镇医院中医药服务水平[J].中医药管理杂志， 2018，26（19）：195-197.
[5]张晓欢，张云飞.中医药供给侧结构性改革研究[J].中国市场，2018（23）：6-8.

适应非洲猪瘟病毒增殖的传代细胞系研究进展

路皓东[1]，左媛媛[2]，戈胜强[2]，韩乃君[2]，王振忠[3]，张永强[2]，吴晓东[2]，蔡玉梅[1]，王志亮[2]

（1.山东农业大学，山东泰安 271001；2.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；3.南京农业大学，江苏南京 210095）

非洲猪瘟（African swine fever，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）引起的一种烈性传染病。其可导致家猪高烧、出血、厌食，死亡率可达 100%。自 1921 年 ASF 首次被报道以来，ASFV 已在全球多个国家暴发，对生猪养殖业造成了严重的损失。截至目前，全球范围内尚未研制出安全有效的 ASFV 疫苗，疫情防控主要依赖于消灭传染源、切断传播途径和保护易感动物等综合防控措施。无理想传代细胞系用于 ASFV 大规模培养，是阻碍 ASFV 减毒疫苗研发的重要原因之一，因此开发支持 ASFV 高效复制、稳定遗传的传代细胞系迫在眉睫。ASFV 主要感染猪源原代靶细胞，主要是血液或特定器官/组织中获得的猪单核细胞-巨噬细胞。长久以来，ASFV 毒株感染传代细胞的研究并不顺利，即便可以将毒株驯化适应传代细胞，但常常又发生病毒复制能力降低或关键基因的缺失等问题，这使得至今无可高效增殖 ASFV 的传代细胞系应用于商业化疫苗制备阶段。

近年来，特别是 ASF 传入东欧（2007 年），又跨越式传入亚洲（2018 年）以来，科研人员对 ASF 的研究的关注度不断提高，这促使开发可适宜增殖 ASFV 的传代细胞系研究取得了飞快进展，目前已经研制出了 IPKM、PIPEC、A4C2/9K、WSL 和 ZMAC-4 等多种猪源传代细胞系。这些新型传代细胞系不仅为 ASFV 基础研究提供了便利，更为大规模生产疫苗提供了可能性。此外，适应 ASFV 增殖的传代细胞系研究不仅能为疫苗领域服务，而且能为病毒受体研究、病毒复制机理等研究提供更多的试验素材，甚至为非洲猪瘟更深入的研究提供更广阔的平台支撑，这是未来 ASFV 研究的重要方向之一。

本文拟对可增殖 ASFV 的传代细胞系的种类、优缺点以及在疫苗研发的应用现状进行综述，以期为可增殖 ASFV 的传代细胞系研究及 ASFV 减毒疫苗研制等提供参考。

主要参考文献：

略

应用原代细胞繁殖非洲猪瘟病毒的研究进展

左媛媛[1]，路皓东[2]，巩明霞[1]，郑东霞[1]，王英丽[1]，迟田英[1]，莫绍江[3]，徐福朋[4]，徐天刚[1]，戈胜强[1]

（1.中国动物卫生与流行病学中心，山东青岛 266032；2.山东农业大学，山东泰安 271001；3.塔里木大学，新疆阿拉尔 843300；4.青岛宝迈得生物科技有限公司，山东青岛 266237）

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）引起的一种家猪和野猪出血性传染病。该病自 1921 年首次报道以来，已在全球多个国家扩散蔓延，尤其是 2007 年传入东欧，并在 2018 年长距离传入亚洲以来，对全球养猪业造成了严重的损失。截至目前，全球范围内尚未研制出安全有效的 ASFV 疫苗，仅有少数国家通过采取扑杀净化措施最终消灭疫情。ASFV 主要感染猪源原代靶细胞，即血液或特定器官/组织中猪单核细胞-巨噬细胞。但长久以来，对于 ASFV 研究，尤其是疫苗研发进展缓慢，其主要障碍就是缺乏可用于 ASFV 繁殖的传代细胞系。尽管目前已有少数毒株经驯化可以适应传代，但深入研究发现在多次传代后病毒会出现复制能力降低或关键基因缺失等诸多问题。深入开展可繁殖 ASFV 原代细胞研究不失为解决问题的替代方案。

自 1957 年（葡萄牙首次传入 ASFV）以来，国外研究者已对常用传代细胞系进行了大量驯化尝试，取得一定进展。但研究也发现，ASFV 在异源传代细胞系中连续传代容易发生基因丢失，导致其免疫原性发生改变，这也决定了在开发出真正适宜非洲猪瘟繁殖的传代细胞系前，原代细胞仍将是今后一段时间用于非洲猪瘟研究的重要选择。值得一提的是，据中国农科院哈尔滨兽医研究所团队介绍，其自主研发的一株双基因缺失弱毒活疫苗已在 SPF 猪原代骨髓细胞中实现了高效培养，一头健康仔猪的原代细胞能制备出至少 20 万头份的疫苗，具备大规模生产条件，这说明理论上原代细胞依然具备用于疫苗产业化的潜力。因此，在继续寻找或改造适宜 ASFV 传代细胞系同时，我们完全可以进一步挖掘原代细胞的潜力，将提高原代细胞使用能效作为未来的一个研究方向。通过开展原代细胞制备相关工艺研究，强化标准化培养流程，有望在同等条件下提高细胞制备数量和质量，从而为 ASF 疫苗研发和产业化提供可替代和有效的解决方案。

本文对国内外文献中涉及的原代细胞种类和优缺点，以及在 ASFV 疫苗研发的应用现状进行综述，以期为从事 ASF 研究以及疫苗研制的相关人员提供一些参考。

主要参考文献：

略

黄芩苷对 ROS/MAPK 信号通路介导 IPEC-J2 细胞炎症反应的作用

孙心怡※，刘晓曦※※
（广东海洋大学滨海农业学院，广东湛江 524088）

引言

猪肠道炎症是制约我国养猪业发展的关键问题，在饲料中添加抗生素缓解肠道炎症是常规的治疗方式，而农业农村部 194 号公告提出：饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂（中药类除外）的商品饲料。中草药提取物在生产中具有残留量少、耐药能力弱、副作用小的特点，可以作为抗生素药物替代物对养猪业发挥重要作用。黄芩是一种中药，黄芩苷是从黄芩根部提取出的一种具有抗炎、抗氧化作用的黄酮类中药提取物。目前已知黄芩苷具有抗炎、抗氧化作用，用于治疗与预防，但黄芩苷能否通过 ROS/MAPK 信号通路改善 IPEC-J2 细胞和小鼠肠道炎症反应还尚不清楚。因此本试验通过 LPS 诱导建立体内、体外炎症模型，通过 ROS 清除剂和黄芩苷预处理，来探讨黄芩苷对于炎症及氧化应激的作用及机制。

材料与方法

试验细胞为猪肠道上皮细胞（IPEC-J2 细胞），饲养管理条件相同。采用 ELISA 和 WB 法检测 MAPK 信号通路蛋白、ROS 和炎性因子的表达，通过 qPCR 法检测 MAPK 信号通路 mRAN 与炎性因子的表达。分析软件使用 SPSS12.0，采用单因素方差分析（ANOVA）的方法对数据进行分析，并且采用 Tukey 多重比较来进行显著性检验。

结果与讨论

（1）在 IPEC-J2 细胞上，LPS 能够引起 IPEC-J2 细胞中 ROS、LDH 和炎症因子（TNF-α 和 IL-6）表达的显著升高（$P < 0.05$），并显著引起 MAPK 信号通路中 ERK、P38 mRNA 和关键蛋白的表达（$P < 0.05$）；活性氧清除剂可以显著降低 ROS、LDH 的表达（$P < 0.05$），抑制 MAPK 信号通路中 ERK、P38 mRNA 和关键蛋白的表达（$P < 0.05$），降低炎症因子（TNF-α 和 IL-6）的表达（$P < 0.05$），表明 NAC 可以通过调控 MAPK 信号通路抑制 IPEC-J2 细胞中 LPS 诱导引起的炎症反应。（2）黄芩苷能够显著抑制由 LPS 诱导引起的 ROS、LDH 表达的升高（$P < 0.05$），并抑制 MAPK 信号通路中 ERK mRNA（$P < 0.05$）和 ERK、P-ERK、P-P38 蛋白（$P < 0.05$）的表达，缓解 LPS 诱导引起的 IPEC-J2 细胞中的炎性因子（TNF-α 和 IL-6）的表达（$P < 0.05$），表明黄芩苷可以通过调控 MAPK 信号通路抑制 IPEC-J2 细胞中 LPS 诱导引起的炎症反应。

研究表明，在 IPEC-J2 细胞中，加入 ROS 清除剂后可调控 ROS/MAPK 信号通路可调控影响炎症的发生，黄芩苷可以通过 ROS/MAPK 信号通路抑制 LPS 诱导的炎症反应。

主要参考文献

略

※ 作者简介：孙心怡，硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料学。E-mail：1466470758@qq.com。
※※ 通讯作者：刘晓曦，讲师，硕士生导师，研究方向为中药（含天然植物饲料原料）药效活性成分筛选及作用机制。E-mail：liuxiaoxi_06@163.com。

Rhodococcus opacus 对早期断奶仔猪腹泻、生产性能、肠道健康及免疫功能的影响

李娜娜※，曹佳鑫，贺孜怡，韩文龙，夏博※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100）

引言

随着现代集约化养殖业的快速发展以及生猪养殖规模的不断扩大，仔猪早期断奶技术已得到大规模的应用。仔猪断奶时饲粮、环境、生理等因素的变化会使仔猪受到不同程度的应激，导致仔猪肠道形态改变，肠道细胞能量供应不足，消化和吸收能力降低，进而引起仔猪腹泻。现已有研究指出，甘油三脂是肠道细胞的主要能量来源，能够提高仔猪肠道对脂质的吸收，可以改善仔猪早期断奶时能量供应不足，缓解断奶应激[1]。*Rhodococcus opacus* 是一种产油革兰氏阳性菌，能够利用多种有机物质合成甘油三脂，本试验将 *Rhodococcus opacus* 经口饲喂给未断奶仔猪，以期 *Rhodococcus opacus* 产生的甘油三脂可以作为外源性能量，在仔猪断奶时增强其免疫力，减缓腹泻，并对其生产性能产生积极影响。

材料与方法

试验对象选用平均体重相近的三元杂交（杜长大）7 日龄仔猪 360 头，采用完全随机单因子设计将其分成四个处理组，每个处理 90 头，每个处理设 3 个重复，每个重复 30 头。对照组（CON）按试验猪场原日粮饲养，其他三个处理组分别在仔猪开食料添加低（R1）、中（R2）、高（R3）剂量的 *Rhodococcus opacus* 菌制剂，试验进行 14 天，21 日龄时断奶。试验仔猪饲养管理和免疫水平相同，按腹泻评分 0～3 级标准记录仔猪腹泻情况，记录仔猪平均日采食量（ADFI）、平均日增重（ADG）、饲料利用率（FCR）、断奶末重等生长性能。试验结束时屠宰仔猪取尿样、肠道食糜及组织样品，测定肠道形态、肠道屏障功能和先天性免疫指标。

结果与讨论

（1）与 CON 相比，R1 组仔猪断奶末重、ADFI、ADG、FCR 没有显著差异，R2 组仔猪断奶末重、ADFI、ADG、FCR 显著增加（$P<0.05$），R3 组仔猪断奶末重、ADFI、ADG、FCR 显著降低（$P<0.05$）。（2）与 CON 相比，R3 组仔猪断奶后腹泻评分显著升高（$P<0.05$）；空肠隐窝深度显著增加（$P<0.05$），绒毛高度、绒毛隐窝比（VCR）及肠道杯状细胞数量显著降低（$P<0.05$）；回肠 Claudin-1 的相对表达量显著降低，然而，R2 组仔猪断奶后腹泻评分显著降低（$P<0.01$）；仔猪回肠 Claudin-1 相对表达量增加（$P<0.05$），并且 R3 与 R2 的腹泻评分及 VCR 存在显著差异（$P<0.05$）。（3）R2 与 R3 相比，R3 显著增加仔猪血液淋巴细胞的数量和比率（$P<0.05$），并且显著增加仔猪回肠 TLR-2 和 NF-κB 的相对表达量（$P<0.05$）。与 CON 组相比，R2 组仔猪显著降低仔猪回肠 TLR-2，TLR-9 和 NF-κB 的相对表达量（$P<0.05$）；同时，与 CON 组相比，R2 组仔猪血液 CD8+细胞百分比及回肠 TLR-9 的相对表达量显著降低（$P<0.05$）。本试验结果表明，*Rhodococcus opacus* 菌制剂可以缓解仔猪断奶应激引起的腹泻，保障仔猪生产性能的正常发挥，同时对仔猪的肠道健康及免疫功能产生积极影响。

主要参考文献

[1] Xu M ，Che L ，Niu L ，et al.Molecular mechanism of valine and its metabolite in improving triglyceride synthesis of porcine intestinal epithelial cells[J].Scientific Reports，2023，13（1）.

※ 作者简介：李娜娜，在读硕士研究生，研究方向为猪的遗传育种与繁殖。E-mail：linan4723@nwafu.edu.cn。
※※ 通讯作者：夏博，副教授，硕士生导师，研究方向为猪的遗传育种与繁殖。E-mail：imed23@nwafu.edu.cn。

表达 CSFV E2 和 NADC30-like PRRSV GP5 蛋白重组 PRV 的构建及免疫效力初步探究

马世杰[1※]，张刘辉[1]，李洪炫[1]，陈曦艋[1]，郑兰兰[1, 2]，陈红英[1, 2※※]
（1.河南农业大学，河南郑州 450046；2.动物病原与生物安全教育部重点实验室，河南郑州 450046）

引言

目前，猪瘟（Classical swine fever，CSF）多以非典型形式存在于我国猪场，发病率有增加的趋势，且常与猪繁殖与呼吸综合征（Porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS）和伪狂犬病（Pseudorabies，PR）等疫病共感染，增加了 CSF 的防控难度。2011 年底，我国许多省份已免疫过 PRV 疫苗的规模化猪场相继暴发新一轮 PR 疫情，严重阻碍我国生猪业可持续发展。疫苗接种仍是当前防控及净化 CSF、PRRS 和 PR 最有效的手段。因此，开发出安全有效的多联疫苗对这三种疫病的预防和净化工作具有重要意义。

材料方法

本研究将 NADC30-like PRRSV GP5 基因通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 插入到真核表达载体 pBApo-EF1a_Pur_DNA 中，构建重组质粒 pBA-GP5/NA。PCR 扩增获得含同源臂和 GP5 基因的表达盒，通过同源重组酶克隆到已线性的含 CSFV E2 蛋白 AD 表位区的 PRV 转移质粒 pG-E2AD-EGFP 中，构建重组质粒 pG-E2AD-GP5/NA-EGFP，转染、蚀斑纯化，拯救重组病毒。利用 CRISPR/Cas9-EGFP 敲除质粒，再将重组病毒中 EGFP 荧光标签敲除，然后对重组病毒进行了培养特性以及小鼠体内安全性试验和免疫效力试验。

结果与讨论

将重组质粒 pG-E2AD-GP5/NA-EGFP 转染已感染已感染 PRV 弱毒株的 ST 细胞，经蚀斑纯化，获得重组病毒 rPRV-E2AD-GP5/NA-EGFP。再将 EGFP 荧光标签敲除、蚀斑纯化，获得重组病毒 rPRV-E2AD-GP5/NA。经 RT-PCR、Western blot 和间接免疫荧光试验证实 ST 细胞中病毒量最高，$TCID_{50}$ 为 $10^{6.625}$/0.1mL。一步生长曲线试验显示，重组病毒与亲本株相比，没有明显变化，表明插入外源基因不影响亲本株增殖特性。重组病毒接种小鼠后，两周内小鼠未出现任何症状，表明重组病毒对小鼠是安全的。重组病毒可诱导小鼠产生针对 PRV 和 CSFV-E2AD 蛋白的 ELISA 抗体。用 PRV NY 强毒株进行攻毒后，重组病毒组和亲本株组未出现小鼠死亡，在脑、脾和肾等组织中均未检测到 PRV 强毒株，说明重组病毒能保护小鼠抵抗 PRV NY 强毒株的攻击。本研究为研发 PRV 活载体疫苗和 CSF、PRRS 和 PR 的防控提供技术支持。

主要参考文献

[1] Zhou B. Classical Swine Fever in China-An Update Minireview [J]. Frontiers in Veterinary Science，2019，6，187.

※ 作者简介：马世杰，男，河南新郑人，博士，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: participate2006@126.com。
※※ 通讯作者：陈红英，教授，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: chhy927@163.com。

高致病性 PTV-2 型变异株的分离与分子特征分析

梁雯棋，邬向东，丁珍，钟胜伟，钱新杰，叶培，刘濠，陈政，张锦华，曹华斌，胡国良、罗军荣，丁能水，胡睿铭*

（江西农业大学动物科学技术学院，江西南昌 330045）

引言

猪捷申病毒（Porcine Teschovirus，PTV）是小 RNA 病毒科，捷申病毒属的成员，被该病毒感染的猪会出现腹泻、繁殖障碍、脑脊髓炎、神经功能紊乱等临床症状。本研究分析了分离株 HeNZ1 的基因组序列，并对其重要的结构蛋白 VP1、VP2 进行了蛋白质三维结构预测和抗原表位预测。HeNZ1 株是 PTV-2 的高毒力株，具有高致病性，能够感染仔猪并且引起严重的神经症状。生物信息学分析表明，HeNZ1 与中国其他 PTV-2 株在基因和抗原上有着不同程度的差异。总体而言，该病例拓展了我们对 PTV-2 临床上的认识，并且揭示了具有遗传多样性和高毒力的 PTV-2 毒株的出现。

材料与方法

病料来自于河南某规模化猪场，从病猪的脑组织匀浆中提取 RNA，借助 RT-PCR 扩增猪捷申病毒并进行全基因组测序。取被感染猪的脑组织样本做石蜡病理切片并观察脑组织病变情况。从 GenBank 数据库获取 PTV 参考株序列，通过 MEGA 7.0.26 使用邻域连接法构建系统发育树，并将参考序列和分离到的该毒株进行遗传距离分析。通过 I-TASSER 在线软件对 VP1 进行蛋白质三维结构预测。通过 DiscoTope 2.0 对 VP1 和 VP2 蛋白抗原表位进行预测。

结果与讨论

2020 年在河南某猪场出现了新生仔猪的集中发病，症状包括腹泻、嗜睡、运动性共济失调、眼球震颤、后肢瘫痪和仔猪昏迷。哺乳仔猪的死亡率达到高 38%。本研究采取了宏基因组诊断技术，对腹泻样品的总 RNA 进行宏基因组测序，发现致病原为猪捷申病毒（Porcine Teschovirus，PTV），分离毒株命名为 HeNZ1。

通过系统发育和进化差异分析表明，HeNZ1 属于 PTV-2 型，并且在基因和抗原上与中国其他 PTV-2 毒株有着不同程度的差异。VP1 和 VP2 蛋白都是衣壳的主要成分，并含有主要的中和表位。VP1 的突变可能导致抗原漂移和免疫逃逸。在 HeNZ1 VP1 中，预测了 6 个 B 细胞表位，并鉴定了 24 个独特的突变位点。根据 Disco Top 表位预测结果，HeNZ1 VP1 的 24 个独特氨基酸突变位点中有 13 个位于 5 组 B 细胞抗原表位内。另外发现，位于 B 细胞表位内的 13 个独特突变位点中有 11 个暴露于 VP1 的表面。在 VP2 中，预测了 4 组 B 细胞抗原表位，并鉴定了 12 个独特的突变位点，其中 7 个独特的突变位点位于预测的 B 细胞表位内。

总之，本研究报告了中国河南省养猪场发生的一起严重的猪捷申病毒引发的疫情。该病在猪场发病率较低，一般呈散发。因此，常规 PCR 检测往往由于不会检测到该病原而导致漏检。本次病原调查在 PCR 检测猪肠道冠状病毒和轮状病毒均为阴性的养殖场中，通过宏基因组测序的方法准确找到了样品中的致病原为 PTV-2，同时利用生物信息等手段对全基因组序列进行比对分析了获得了病毒的分子遗传信息及特点。

猪繁殖与呼吸综合征病毒通过自噬降解 MDA5 的机制研究

孙瑞骐※，黄金海※※
（天津大学生命科学学院，天津 300110）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）是引起猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）的病原体，给全球养猪业带来严重的经济损失[1]。先前的研究表明，PRRSV 具有免疫抑制性，不能很好地诱导先天性免疫反应，抑制 I 型干扰素的产生。RIG-I 样受体中的 RIG-I 和 MDA5 在识别细胞质中的病毒 RNA 和激活随后的干扰素信号通路方面至关重要[2]。目前，RIG-I 及下游信号分子 MAVs 等受到了广泛关注，但关于 PRRSV 与 MDA5 之间的调节关系却相对未知。之前研究表明，PRRSV 通过介导 MDA5 与两种自噬受体（CCT2 和 P62）结合的自噬途径降解 MDA5 来抑制 IFN 的产生。此项工作通过探究 PRRSV 抑制 MDA5，负向调控 I 型干扰素信号通路的机制，从细胞与分子层面认识病毒-宿主细胞互作的关系，为认识 PRRSV 抑制宿主天然免疫的机制提供新视角，为 PRRSV 的防控提供新思路。

材料与方法

通过全转录组数据分析、qRT-PCR、Western-blot 等方式检测 PRRSV 感染前后猪巨噬肺泡细胞中 I 型干扰素信号通路信号分子的表达差异，确定 MDA5 为本项目的研究核心。利用不同途径抑制剂检测 MDA5 的表达水平，质谱及 Co-IP 筛选与 MDA5 自噬相关的基因，并进行机制的研究。

结果与讨论

在 I 型干扰素信号通路中，MDA5 是识别 PRRSV 的关键受体，敲除 MDA5 显著抑制了 PRRSV 感染下的 IFN 水平。PRRSV 已进化出各种策略来规避先天免疫。在本研究中，PRRSV 感染降低 MDA5 的水平可以由自噬抑制剂所恢复。从机制上来说，PRRSV 通过促进 MDA5 与两个自噬受体 CCT2 和 P62 的结合，诱导 MDA5 依赖性自噬途径降解，从而通过抑制 IFN 的产生逃避先天免疫，这一过程得到病毒蛋白 NSP3 和宿主蛋白如 TRIM21 和 CK2α 的支持。总之，本结果阐明了 PRRSV 免疫逃避的新机制，并为猪繁殖和呼吸综合征提供了一个可能的治疗目标。

主要参考文献

[1] LUNNEY J K，FANG Y，LADINIG A，et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus （PRRSV）: Pathogenesis and Interaction with the Immune System [J]. Annual review of animal biosciences，2016，4： 129-54.

[2] REHWINKEL J，GACK M U. RIG-I-like receptors： their regulation and roles in RNA sensing [J]. Nature reviews Immunology，2020，20（9）： 537-51.

※ 作者简介：孙瑞骐，在读博士研究生，研究方向为病毒与免疫。E-mail：18845043758@163.com。
※※ 通讯作者：黄金海，教授，博士生导师，研究方向为病毒与免疫。E-mail：jinhaih@tju.edu.cn。

表达高致病性和 NADC30 样 PRRSV 毒株 GP5 蛋白的重组伪狂犬病病毒的生物学特性

霍健[1※]，侯承尧[1]，王林青[1]，郑兰兰[1, 2]，陈红英[1, 2]，马世杰[1, 2※※]

（1.河南农业大学，河南郑州 450046；2.动物病原与生物安全教育部重点实验室，河南郑州 450046）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（Porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS）是当前我国猪场非常重要的一种病毒性疾病，由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）感染所致，引起仔猪呼吸系统疾病、生长迟缓和母猪繁殖障碍[1]。2006 年，我国猪群中出现高致病性（HP-PRRSV）毒株，导致 PRRS 大流行。2013 年，我国出现新的 PRRSV 变异体——NADC30 样 PRRSV 毒株（NADC30-like PRRSV），引起 PRRS 再次流行。目前，NADC30-like PRRSV 已成为我国 PRRSV 优势毒株，现有 PRRSV 疫苗不能完全保护。因此，本研究利用同源重组和 CRISPR/Cas9 技术，将 HP-PRRSV 和 NADC30-like PRRSV 的 GP5 基因插入猪伪狂犬病病毒（PRV）变异株三基因缺失株 rPRV-gE$^-$/gI$^-$/TK$^-$基因组中，构建表达两种不同亚型 PRRSV GP5 蛋白的重组病毒，并进行生物学特性试验，为猪繁殖与呼吸综合征和猪伪狂犬病的防控提供一种新的策略。

材料方法

本研究将 NADC30-like PRRSV GP5 基因插入到真核表达载体 pBApo-EF1a_Pur_DNA 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 中，构建重组质粒 pBA-GP5/NADC30。PCR 扩增含有同源臂的 GP5/NADC30 表达盒，用 SE Seamless Cloning and Assembly Kit，无缝克隆含有 HP-PRRSV GP5 基因的 PRV 转移质粒 pG-GP5/HP-EGFP 中，构建重组质粒 pG-GP5/HP-GP5/NADC30-EGFP，转染 ST 细胞，筛选绿色荧光蚀斑纯化，拯救重组病毒，接种到已转染 CRISPR/Cas9-EGFP 敲除质粒的 ST 细胞，筛选无绿色荧光蚀斑纯化，获得无绿色荧光的重组病毒，然后进行重组病毒的培养特性、生长特性、理化特性和遗传稳定性，以及小鼠体内的安全性试验。

结果与讨论

将重组质粒 pG-GP5/HP-GP5/NADC30-EGFP 转染已感染 PRV 变异株三基因缺失株 rPRV-gE$^-$/gI$^-$/TK$^-$的 ST 细胞，经绿色荧光蚀斑筛选，获得重组病毒 rPRV-GP5/HP-GP5/NADC30-EGFP。再转染 CRISPR/Cas9-EGFP 敲除质粒，经无绿色荧光蚀斑纯化，获得重组病毒 rPRV-GP5/HP-GP5/NADC30。经 RT-PCR、间接免疫荧光试验和 Western blot 验证，GP5 基因在 ST 细胞中得到了转录与表达。重组病毒在 ST、Vero、PK-15 以及 IPEC-J2 细胞中具有相似的生长特性，但 ST 细胞中 $TCID_{50}$ 最高，为 $10^{6.5}$/0.1mL。重组病毒对酸碱、甲醛、氯仿和乙醚敏感，而对 60℃水浴和 30 min 紫外线有一定的抵抗力。重组病毒与亲本株相比，一步生长曲线是相似的，且遗传稳定性良好，表明插入外源基因不影响亲本株的生长特性。重组病毒接种小鼠试验，表明重组病毒对小鼠是安全的。本研究为猪繁殖与呼吸综合征和猪伪狂犬病疫苗提供候选毒株。

主要参考文献

[1] 殷震，刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京： 科学技术出版社，1997： 998-1000.

※ 作者简介：霍健，男，河南安阳人，在读博士研究生，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: hj960510@163.com。

※※ 通讯作者：马世杰，讲师，研究方向为分子病原学与分子免疫学。E-mail: participate2006@126.com。

猪流行性腹泻病毒 G2a 变异株的分离鉴定及遗传进化分析

张梦迪，张梦佳，马海龙，林莉莉，杨郑欣，李文涛
（华中农业大学动物科学技术学院动物医学院，湖北武汉 430064）

引言

猪流行性腹泻病毒（PEDV）是引起猪病毒性腹泻的重要病原之一，主要引起仔猪呕吐、腹泻、脱水等临床症状。近年来，随着 CV777（G1）和 AJ1102（G2b）等商品化疫苗的广泛应用，群体免疫压力加快了 PEDV 的变异，导致现有疫苗不能够提供完全的保护力，给国内猪场造成巨大的经济损失，严重制约了畜牧业的发展[1]。本课题组长期监测 PEDV 的流行趋势，并从 2021 年收集的仔猪腹泻病料中分离到 1 株高滴度的 G2a 毒株，为 PED 的进化研究和疫苗开发奠定了基础。

材料与方法

针对 PEDV N 基因设计通用型引物，利用 RT-PCR 方法检测仔猪临床腹泻样品；处理后的 PEDV 阳性样品在 Vero-CCL81 细胞上进行病毒分离。采用 RT-PCR、间接免疫荧光、透射电镜、Western blot 等对分离的病毒进行鉴定；获取病毒的 cDNA，扩增并拼接全基因组序列，利用 MEGA 7.0 软件对分离株的全基因组进行同源性分析和系统发育分析。

结果与讨论

2021 年 12 月底，9 份来自某 PEDV 商品化疫苗普免场的仔猪腹泻样品送到本实验室，经 RT-PCR 病原常规检测，所有样品均为 PEDV 阳性。阳性样品经处理后接种 Vero-CCL81 细胞，在接种后 24h，HCHL 样品细胞出现变圆、聚集、合胞体等典型病变；接种后 36h，细胞开始脱落；提取细胞培养物 RNA，对 PDCoV、PEDV、PRoV 和 TGEV 进行 RT-PCR 检测，结果显示仅为 PEDV 阳性。二轮空斑纯化后，将细胞培养物在 Vero-CCL81 细胞上连续传代，第 4 代病毒滴度可达 $10^{7.8}$ $TCID_{50}$/ml。使用 PEDV N 单抗进行间接免疫荧光和 Western blot 试验，均能在感染细胞中检测到特异性 PEDV N 蛋白。将病毒培养物超离后经负染可在透射电镜下观察到“皇冠”样的冠状病毒粒子，且直径为 80-160 nm 不等，证明成功分离到一株 PEDV，命名为 PEDV-HCHL。全基因组分析发现 5' 到 3' 依次包含 5'UTR-ORF1ab-S-E-M-ORF3-N-3'UTR，具有典型的 PEDV 基因组结构特征。全基因组同源性分析显示，HCHL 与 2013 年报道的 ZJU/G2/2013 毒株同源性最高，可达 99.96%。全基因组系统发育分析显示，HCHL 与疫苗毒株 CV777 分属于不同亚群，与 AJ1102 等 G2b 疫苗毒株亲缘关系较远，位于现在流行的 G2a 亚群中。

本研究成功分离到一株 PEDV G2a 流行毒株，非细胞适应病毒便具有较高的增殖滴度，为 PEDV 疫苗的研制奠定了基础。

主要参考文献

[1] 隋灵. 猪流行性腹泻病毒 CH/HLJ/18 株的分离与鉴定 [D]. 东北农业大学，2021.DOI：10.27010/d.cnki.gdbnu.2021.000521

黑龙江省 5 个地区仔猪腹泻病的调查分析

张启钧※
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163199）

引言

仔猪腹泻是养猪生产中的常见病、多发病。近几年来，黑龙江省的部分养猪场都不同程度地发生以初生至 7 日龄哺乳仔猪为主的腹泻病，给养猪业带来了很大损失。仔猪腹泻是由多种因素导致的，包括传染性病原感染以及非传染性因素等，且发病率高、死亡率高。前期研究调查表明，由细菌引起的仔猪腹泻在仔猪感染性腹泻中占有较大比重[1]。本研究以调查为主要方法，通过走访养殖场和查阅高校等可公开的资料，收集猪腹泻的数据，记录数据，进而分析仔猪腹泻的原因。

材料与方法

本研究资料来源于 5 个地区（哈尔滨、佳木斯、大庆、齐齐哈尔、绥化）10 家规模化养猪场的存档材料，部分来源于高校等可公开查阅的资料。通过查看发病仔猪的主要症状，观察其腹泻情况，将各个场内患病仔猪的粪便、肠道及其内容物等进行无菌采集。对 2022 年 1 月至 2023 年 5 月黑龙江省 5 个地区 10 个规模化养殖场中收集到 278 例仔猪腹泻病例的检验报告、研究报告及发表的相关文章等数据资料进行统计分析，调查仔猪腹泻主要感染类型流行情况、病原种类、发病日龄、疫病季节分布、疫病地域分布等。

结果与讨论

根据调查报告得到以下结果：仔猪发病时常体现为精神沉郁、采食量降低、拉稀黄或灰白水样的粪便、消瘦严重、肛门红肿等症状。该病大多发生 0-7 日龄的仔猪，以 0-3 日龄较为多见；但 7 天以上的仔猪则极少发现，其发病率极高，最高可达 90-100%。黑龙江地区仔猪腹泻病一年四季均有发病，但春夏季节多发。引发猪场发生腹泻的可能传染源包括粪便、饲料、水源、运输货物的车辆、来往人员、野生动物等。对腹泻感染的类型调查结果表明，细菌性感染占 73.7%（205/278），病毒性感染占 5.4%（15/278），非传染性腹泻占 20.9%（58/278）。对病原种类调研结果显示，仔猪细菌性腹泻中大肠杆菌导致的仔猪腹泻最多，其次是沙门氏菌，主要是由大肠杆菌、沙门氏菌和链球菌感染导致。仔猪腹泻主要疫病季节分布调查结果表明，仔猪细菌性腹泻大多发生在春 24.1%（67/278）、夏 22.3%（62/278）两季。同时，哈尔滨地区和佳木斯地区发生仔猪细菌性腹泻较多，大庆地区和齐齐哈尔地区发生仔猪细菌性腹泻较少，绥化地区发生仔猪细菌性腹泻最少。通过上述分析为我国仔猪腹泻问题在未来能够得到更好的解决方法提供了参考。

主要参考文献

[1] 柳玉平.仔猪腹泻的病因与防治[J].吉林畜牧兽医，2021，42（09）：36，38.

※ 作者简介：张启钧，在读硕士研究生，研究方向为动物遗传育种。E-mail：zqj459820814@163.com。

PRRSV 感染中的脂代谢调控分子及其作用机制研究

崔大庆※，黄金海※※
（天津大学生命科学学院，天津 300110）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）一直是对全球经济产生巨大冲击的猪疾病之一，猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）是引起 PRRS 的主要元凶[1]。细胞代谢尤其是脂代谢在病毒内吞、复制复合体的形成、病毒粒子的组装以及释放等感染过程中发挥重要作用[2~3]。此外，病毒还通过利用和调节脂质信号和代谢来促进其复制，因此，脂质代谢的重编程是病毒与宿主相互作用的一个关键特征。虽然已经有研究证实宿主细胞脂代谢水平变化能够影响 PRRSV 的复制效率[4]，但目前对于 PRRSV 感染后细胞内脂质代谢如何改变的机制尚不清楚。因此，本研究以脂质代谢通路为切入点，对 PRRSV 感染后细胞内代谢改变及其相关分子机制进行了初步探讨。

材料与方法

本研究以 PRRSV 感染猪肺泡巨噬细胞（3D4/21）为模型，通过转录组测序筛选脂质代谢相关基因，通过 qRT-PCR、Western blot 等方法进一步验证基因的表达变化是否与转录组一致；随后进行分子克隆与氨基酸序列分析，在基因过表达或敲除的情况下探究脂代谢相关分子对 PRRSV 增殖的影响，探究 PRRSV 对宿主脂质代谢重编程的调控机制。通过质谱挖掘细胞中与脂代谢分子互作的宿主蛋白，探究脂质代谢重编程对宿主细胞周期、抗原提呈、炎症反应、先天免疫等方面的影响。

结果与讨论

本研究通过转录组测序筛选到 35 种表达差异显著的脂质代谢相关基因，并进一步通过 qRT-PCR、Western blot 等方法聚焦到胆固醇合成代谢中的关键酶——24-羟基胆固醇还原酶（DHCR24）。通过 qRT-PCR、Western blot 等方法研究并证实 DHCR24 在 PRRSV 感染后 mRNA、蛋白水平显著上调，并且过表达 DHCR24 促进了 PRRSV 复制，相反，敲低或者抑制剂处理显著抑制 PRRSV 复制。另一方面，DHCR24 通过与宿主蛋白 VIM 相互作用，在 PRRSV 感染后负向调控 IFN 信号通路，抑制先天免疫以实现免疫逃逸。本研究对 PRRSV 感染后细胞内胆固醇代谢变化及其调控机制进行了探讨，为进一步阐明 PRRSV 的复制机理，以及为 PRRS 的预防和控制提供了理论依据。

主要参考文献

[1] Done SH. Porcine reproductive and respiratory syndrome （PRRS）： A review with emphasis on pathological，virological and diagnostic aspects[J]. Br.vet.j， 1996，152：153-174

[2] Miller S，Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication[J]. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY，2008，6：363-374

[3] Schwartz M， Chen J， Lee W M ， et al. Alternate， virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，2004，101：11263-11268

[4] Schoggins JW，Randall G. Lipids in innate antiviral defense[J]. Cell Host Microbe，2013，14： 379-85

※ 作者简介：崔大庆，在读硕士研究生，研究方向为病毒与免疫。E-mail：daqingcui812@163.com。
※※ 通讯作者：黄金海，教授，博士生导师，研究方向为病毒与免疫。E-mail：jinhaih@tju.edu.cn。

规模猪场蓝耳病强制免疫疫苗接种情况、影响因素与田间评价

李树博※，崔基贤，李凤元
（辽宁省农业发展服务中心，辽宁沈阳 110164）

引言

本研究以回溯调查的方式对辽宁省规模猪场的蓝耳病疫苗接种情况及效果进行了描述，建立了强制免疫疫苗接种预测模型与疫苗质量田间体验评价模型，并应用其对国内蓝耳病疫苗进行了评价。

材料与方法

采用队列研究的方法，在辽宁省内按多阶段抽样法选择存栏在 100 头以上的 750 个规模猪场开展回溯性问卷调查、查验实物并进行数据挖掘。应用 logistic 回归分析建立强制免疫疫苗接种预测模型。根据疫苗免疫后的抗体水平、疫苗免疫后影响猪食欲的天数、疫苗免疫后是否发生蓝耳病等数据，利用向量等数学工具建立疫苗田间质量体验评价模型。在等比例权重的情况下，对国内的疫苗进行了评价。

结果与讨论

2015 年 8 月 1 日的横断面中，辽宁省规模猪场蓝耳病疫苗：场群接种率为 96.49%（95%CI，94.49%-98.49%），个体接种率为 94.55%；强制免疫疫苗场群接种率为 87.94%（95%CI，84.94%-90.94%），个体接种率为 69.11%。决策者 79.44%认为有必要开展该病强制免疫。同时，计算了被调查群体内该病所有疫苗的场群接种率和个体接种率。应用 ArcGIS 软件分别制作是否接种疫苗、是否是政府疫苗、经典株-高致病株的空间分布对比图。描述了有效宣传干预者、产品有效供应者、接种服务提供者、接种服务收费情况、接种生物安全情况、接种后抗体合格率、接种后影响进食的天数。根据“年出栏量”“有原种猪”“杂交品种” 建立预测是否接种强制免疫疫苗的 logistic 回归模型。模型的 ROC 曲线下面积为 0.877（95%CI，0.833-0.921）。说明该模型预测效果较好，可基于报表等表观数据进行预判，减少入户调查。

决策者自认为不使用政府疫苗的原因分别是质量（51.47%）、品牌（23.53%）毒株（16.18%）。Logistic 单因素分析结果说明，规模猪场的防疫条件、疫苗品牌价值、疫苗毒株可能是强制免疫疫苗接种决策的影响因素。

质量田间体验的评价显示，规模猪场自选疫苗在免疫抗体水平、免疫后不发病两方面优于强制免疫疫苗；在影响猪食欲的天数方面差异不明显。自选疫苗综合评价优于强制免疫疫苗，但其价格远高于强制免疫疫苗。同时比较了不同疫苗毒株、不同生产厂家疫苗的质量田间体验。

主要参考文献

略

基金项目：辽宁省科学事业公益研究基金资助项目《辽宁省重大人畜共患病疫情防控体制机制研究》（2020JH4/10100046）；辽宁省兴辽英才计划青年拔尖人才项目《重大疫病防控关键技术研究》（XLYC2007098）；辽宁省应用基础研究计划（青年专项）《畜禽良种扩繁与种源疫病防控关键技术研究与集成示范》，（2023JH2/101600052）。

※作者简介：李树博，1985 年 5 月出生，38 岁，正高级兽医师，手机 15904051151，邮箱 shuboli_1985@163.com

宏基因组流行病学揭示 2021—2022 年中国猪细小病毒复杂的混合感染和进化模式

李跃※，邢家宝，许志颖，张桂红，孙彦阔※※
（华南农业大学兽医学院广东省人畜共患病防控重点实验室，广东广州 510642）

引言

猪细小病毒（PPV）是集约化养猪生产中繁殖失败的重要原因，可导致死胎、木乃伊胎和不育，会给养猪业带来巨大的经济损失。在野外条件下，猪的 PPV 感染通常涉及同一个体中多种基因型的混合感染，但很少有研究关注共感染谱和感染偏好，这可能是由于一代测序的局限性[1]。然而，宏基因组学技术可以在了解宿主的整体感染概况的基础上，展现出其在解决共感染方面问题的能力。同时，目前缺乏对 PPV 的潜在进化过程、基因型间和基因型内重组以及突变热点的详细研究[2]。

材料方法

本研究在 2021 年 1 月至 2022 年 8 月期间从中国 16 个省份的集约化养猪场收集了 163 个血清样本，使用宏基因组学技术调查了中国 PPV 不同基因型的流行病学、进化史和共感染状况。之后，分析在宿主免疫应答适应中衣壳蛋白可能发挥作用的氨基酸表位位点。

结果与讨论

在所有来自猪场的血清样本中，95 份样本被检测为 PPV 阳性，阳性率为 58.28%。高通量测序显示存在 7 种 PPV 基因型，其中 PPV7 最为普遍，其次是 PPV6 和 PPV3。不同基因型的共感染很常见，PPV6 和 PPV7 是最常见的共感染基因型。系统发育分析表明，PPV 具有不同的进化关系，每个基因型内均鉴定出多个谱系。虽然没有发现交叉基因型毒株，但在每个基因型中发现了两个以上的谱系，这表明 PPV 经历了长期的进化后逐渐形成新的谱系。通过分析基因组特征，在基因型 2、6 和 7 中仅发现了基因型内重组。总体而言，我国 PPV 存在多种基因型，其强毒株的遗传变异和基因组重组具有多样性。通过计算 Shannon 熵，以测量不同 PPV 基因型的衣壳蛋白的总体多样性。在 PPV 的衣壳蛋白中发现了突变热点，具有高比例的非同义突变，所有定位于 B 细胞表位的突变热点都集中在 PPV2 和 PPV3 的潜在抗体表位上。一些突变热点具有较高的 Shannon 熵水平，并位于 B 细胞预测表位上。总之，结果表明，突变可能在促进 PPV 响应宿主免疫的适应性进化中发挥作用。PPV 对宿主免疫反应的适应性进化可能是逃避宿主免疫监视的主要原因。

结论

本研究揭示了 PPV 的流行病学、共感染状况和基因组变异，为了解中国 PPV 的复杂性提供了新的见解，并对未来的 PPV 控制策略具有重要意义。

主要参考文献

[1]Li JX，Xiao YZ，Qiu M，et al. A Systematic Investigation Unveils High Coinfection Status of Porcine Parvovirus Types 1 through 7 in China from 2016 to 2020. Microbiol Spectr. 2021 Dec;9（3）.

[2]Xu ZY，et al. Genomic epidemiology of Porcine Parvovirus between 2021 to 2022 in China reveals intricate patterns of co-infection and evolution.（in press）

※ 作者简介：李跃，在读硕士研究生，研究方向为生物信息学与流行病学。E-mail：liyue20222028024@stu.scau.edu.cn。
※※ 通讯作者：孙彦阔，副教授，硕士生导师，研究领域主要为生物信息学与流行病学。E-mail：yankuosun@scau.edu.cn。

人肠道肉孢子虫病病原体在云南家畜中的流行情况、形态与遗传标记特点及其分子检测方法构建

张明珠※，吴志鹏，覃涛，唐奎，廖哲，胡俊杰※※
（云南大学生态与环境学院，云南昆明 650504）

引言

人肠道肉孢子虫病的病原体有 2 种：猪人肉孢子虫（*Sarcocystis suihominis*）和人肉孢子虫（*Sarcocystis hominis*），其中间宿主分别为猪和黄牛，终末宿主均为人。人通过吃食未煮熟的猪肉或黄牛肉而感染该病，感染后常出现上腹痛、便血、腹泻等症状；猪或黄牛感染后会出现肌肉炎症，并伴随体重减轻、厌食等症状，感染严重时会出现死亡[1]。我国西南地区是人肠道肉孢子虫病的自然流行区[2]，本文采用形态学和分子生物学方法对人肠道肉孢子虫病病原的形态特征、遗传标记特点和在家畜中的自然感染情况等进行研究，并在此基础上建立特异性 PCR 诊断方法和 PCR-RFLP 鉴定方法。

材料与方法

猪肉和黄牛肉样品购自云南省昆明市、保山市、普洱市的农贸市场，共采集猪肉样品 732 份（每份样品来自不同个体），黄牛肉样品 750 份（每份样品来自不同个体），单份样品重 100~200 g。在实验室中使用体视解剖镜镜检肌肉样品并分离肌细胞中的肉孢子虫包囊，在光学显微镜下观察包囊形态、测量大小，并进行种类鉴定。分离猪人肉孢子虫和人肉孢子虫包囊（每个虫种分离 6 个，并单独分装），分别提取其总 DNA，对其 18S rDNA、28S rDNA、*ITS* 和线粒体基因 *COX1* 进行扩增、克隆和测序。测序序列使用 NCBI Blast（https：//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）、BioEdit（Borland，USA）等进行分析，确定区分它们的适合分子标记；基于分子标记序列利用 Primer Premier 5.0（Premier，Canada）和 Oligo 7.0（National Biosciences，USA）设计种特异性 PCR 扩增引物并确定其限制性内切酶的酶切位点。

结果与讨论

猪体内猪人肉孢子虫的自然感染率为 37.70%（276/732）。光镜下包囊乳白色、长梭状，大小为 445.2~920.5×101.8~208.1 μm（n=58）。包囊壁上有毛发状突起，突起长度为 3.99~19.42 μm（n=38）。缓殖子香蕉形，大小为 9.94~12.77×5.28~6.63 μm（n=23）。黄牛中人肉孢子的自然感染率为 14%（105/750）。光镜下包囊乳白色，梭状，大小为 1525.4~2447.3×113.15~158.40 μm（n=58）。包囊壁上有直立指状突起，突起长度为 4.24~7.87 μm（n=32）。缓殖子香蕉形，大小为 10.33~13.48×5.12~6.47 μm（n=38）。

猪人肉孢子虫包囊和人肉孢子虫包囊的上述 4 个基因都成功被扩增和测序，每个虫种的每个基因都获得了 6 条序列。猪人肉孢子虫 18S rDNA 序列的长度为 1868~1871 bp，种内相似度为 98.85%~99.7%（均值 99.25%）；28S rDNA 序列的长度为 1648~1650 bp，种内相似度为 98.20%~100%（均值 99.10%）；*ITS* 区序列的长度为 854~865 bp，种内相似度为 91.8%~99.7%（均值 95.36%）；*COX1* 序列的长度为 1085 bp，种内相似度为 98.9%~100%（均值 99.48%）。人肉孢子虫 18S rDNA 序列的长度为 1805~1807 bp，种内相似度为 99.4~99.8%（均值 99.56%）；28S rDNA 序列的长度为 1585~1597 bp，种内相似度为 98.3%~100%（均值 98.81%）；*ITS* 区序列的长度为 649~657 bp，种内相似度为 95.4%~98.4%（均值为 96.8%）； *COX1* 序列的长度为 1085 bp，种内相似度为 99.5%~100%（均值 99.67%）。与猪人肉孢子虫的上述基因序列相比，其相似度分别为 91.27%、90.73%、58.09%和 75.7%。

项目支持：国家自然科学基金（31460557）、生态环境科技竞赛
※ 作者简介：张明珠，在读硕士研究生，研究方向为动物寄生虫学。E-mail：mzzhang@mail.ynu.edu.cn。
※※ 通讯作者：胡俊杰，副教授，硕士生导师，研究方向为动物寄生虫学。E-mail：jjhu@ynu.edu.cn。

根据这 2 种肉孢子虫的 18S rDNA 序列设计了能对它们进行种特异性区分的 PCR 扩增引物 F1/ShR5/ZR1（5′-TGAGAAACGGCTACCACATC-3′/5′-TCATTATATTAAGAATAATAGATGCCAGA-3′/5′-TCAAAGTAACATTTCTCCCACA-3′）。使用引物 F1/ZR1、F1/ShR5 和 F1/ZR1/ShR5 分别对猪人肉孢子虫 DNA、黄牛人肉孢子虫 DNA、猪肉 DNA、黄牛肉 DNA、猪人肉孢子虫和黄牛人肉孢子虫混合 DNA 进行 PCR 扩增。结果显示，F1/ZR1 只能对猪人肉孢子虫 DNA 扩增出长度为 403 bp 的片段；F1/ShR5 只能对人肉孢子虫 DNA 扩增出长度为 323 bp 的片段；F1/ZR1/ShR5 能对猪人肉孢子虫和黄牛人肉孢子虫混合 DNA 扩增出 2 条长度为 323 bp 和 403 bp 的条带。

使用限制性内切酶 ClaI 和 BamHI-HF 分别对猪人肉孢子虫的 *COX1*、人肉孢子虫的 *COX1* 和猪人肉孢子虫与人肉孢子虫混合 *COX1* 进行双酶切。结果显示，猪人肉孢子虫的 *COX1* 的酶切图谱有 2 条带：282 bp 和 803 bp；人肉孢子虫 *COX1* 的酶切图谱有 3 条带：255 bp、357 bp 和 473 bp；猪人肉孢子虫与人肉孢子虫的混合 *COX1* 的酶切图谱有 5 条带：255 bp、282 bp、357 bp、473 bp 和 803 bp。

本试验所得猪肉中猪人肉孢子虫的自然感染率为 37.70%，高于云南省 2010 年报道的 29.51%[3]和 2019 年报道的 17.1%[4]，也高于广西 2009 年报道的 33.64%[5]和 2010 年报道的 20.51%[6]。黄牛肉中人肉孢子虫自然感染率为 14%，低于云南 1987 年报道的 92.3%[7]和 2000 年报道的 60%[8]，也低于广西 1988 年报道的 27.8%[9]。本次调查中发现，猪肉中猪人肉孢子虫的自然感染率增加，而黄牛肉中人肉孢子虫的自然感染率降低，极有可能与云南当地的消费习惯有关。随着生活水平的提高，当地猪肉的消费增长远高于黄牛肉的消费增长，且当地有吃食生猪肉的习惯。

本研究提供了 2 种肉孢子虫病原的 4 种分子标记，其中猪人肉孢子虫和人肉孢子虫的 28S rDNA 和 *ITS* 序列系首次进行测序。4 种分子标记的种内和种间相似性比较结果表明，它们均可作为区分这 2 种病原的可靠分子标记。本试验首次提供了基于这 2 种病原的 18S rDNA 和线粒体 *COX1* 的快速分子诊断方法。目前，人肠道肉孢子虫病患者的医学诊断主要依靠镜检人排泄物中的肉孢子虫卵囊/孢子囊[2]，但这种方法灵敏性低且无法鉴定病原种类（2 种肉孢子虫的卵囊/孢子囊形态相似且大小重叠）。因此，本次所建立的分子诊断方法对于临床上人肠道肉孢子虫的诊断亦有实际意义。

主要参考文献：

[1] Dubey J P，Bernal R C，Rosenthal B M，et al. Sarcocystosis of Animals and man [M]. Chemical Rubber Company Press，1989.

[2] 胡俊杰，孟余，陈新文等. 人肉孢子虫病的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2010，28（06）：460−465.

[3] 刘莹，欧阳颐，黄铿凌等. 大理市下关镇市售猪肉、牛肉肉孢子虫感染情况调查[J]. 热带医学杂志，2010，10（06）：730−732.

[4] Huang Z，Ye Y，Zhang H，et al. Morphological and molecular characterizations of Sarcocystis miescheriana and Sarcocystis suihominis in domestic pigs （Sus scrofa） in China[J]. Parasitology research，2019，118（12），3491–3496.

[5] 李锦辉，黎学铭，覃业新等. 广西猪人肉孢子虫的发现与研究[J]. 中国热带医学，2009，9（03）：405−406+425.

[6] 刘莹. 广西与云南两地市售猪、牛肉的肉孢子虫感染情况调查和亲缘关系研究[D]. 广西医科大学，2010.

[7] 连自强，马俊华，周镇炳等. 云南耿马县人肉孢子虫病调查[J]. 中国人兽共患病杂志，1987（05）：47.

[8] 杨照青，左仰贤，陈新文等.黄牛、水牛体内人肉孢子虫 18SrRNA 基因研究及虫种鉴定[J]. 动物学研究，2000（02）：133−138.

[9] 左仰贤，毛建斌，张永宏. 广西发现人肉孢子虫病[J]. 中国人兽共患病杂志，1990（01）：60−61.

非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体制备及线性抗原表位的定位

王凤杰[1※]，魏天[2]，王成宇[2]，李忠鹏[2]，张芳毓[2]，张守峰[3]，扈荣良[3※※]，
吕礼良[3]，王永志[2]

(1.宁夏大学，宁夏回族自治区银川 750000；2.吉林省农业科学院，吉林长春 130124；
3.中国农业科学院长春兽医研究所，吉林长春 130122)

引言

非洲猪瘟（African swine fever，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）引起的一种急性、热性、高度接触性传染病。该病具有病程短、传染性强、死亡率高等特征，严重危害了生猪养殖产业。世界动物卫生组织（OIE）将其列为法定报告疫病，我国将其列为一类动物疫病。目前尚无有效疫苗控制 ASF 的发生，受威胁地区需高效灵敏的检测方法来监测 ASF 的流行。p30 作为 ASFV 的主要早期蛋白之一，通常在感染后 2~4 h 内产生，感染期间持续高水平表达，这些特点使 p30 蛋白成为在感染周期中早期检测非典型 ASF 的理想诊断目标。因此，本研究应用原核表达的 ASFV p30 重组蛋白制备 MAb，以两组截短体融合蛋白为包被抗原，并通过间接 ELISA 检测各株 MAbs 的抗原识别区，为 ASFV 检测方法开发奠定基础。

材料与方法

利用原核表达纯化的 ASFV P30 蛋白免疫 BALB/c 小鼠，三次免疫后取小鼠脾淋巴细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合，采用间接酶联免疫吸附检测（ELISA）、间接免疫荧光（IFA）及免疫印迹试验（Western blot）筛选获得 p30 MAbs。表达部分重叠的截短 p30 蛋白，利用获得的 p30 蛋白 MAbs 采用间接 ELISA 方法初步定位 p30 蛋白的抗原表位。

结果与讨论

以纯化的重组蛋白为包被抗原，经间接 ELISA 实验筛选出 25 株可分泌抗重组 p30 蛋白的杂交瘤细胞株。IFA 结果显示，5 株 MAbs（8F4、1D3、1H2、6C3、8E11）与 ASFV 感染细胞的 IFA 反应呈阳性。Western blot 结果显示，5 株单抗均可特异性识别 ASFV。试验构建的 p30 截短体重组蛋白 GST-p30ab 以可溶和包涵体两种形式表达，而 GST-p30bc 仅以包涵体形式表达，以两组截短体融合蛋白为包被抗原，通过间接 ELISA 检测出 MAb 8F4、MAb 1H2 和 MAb 6C3 抗原识别区域为 120~153 位氨基酸；MAb 8E11 和 MAb 1D3 抗原识别区域为 86~119 位氨基酸。本研究可溶性地表达了 p30 蛋白的 86~153aa 截短体重组蛋白，制备了 5 株 p30 单克隆抗体，定位到 2 个 p30 蛋白抗原表位，结合 ELISA 技术和 IF，可形成十分可靠的 ASFV 及其抗体的检测手段。本研究不仅为 p30 蛋白结构和功能的研究奠定了基础，同时也为今后研制血清学快速诊断试剂提供材料。

主要参考文献

[1] PETROVAN V, YUAN F, LI Y, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies against p30 protein of African swine fever virus[J]. Virus Research, 2019, 269：197632.

[2] PING W, ANDRE D L, YELITZA Y R, et al. Antigenic regions of African swine fever virus phosphoprotein p30 [J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 00: 1-12.

[3] GIMENEZ-LIROLA L G, MUR L, RIVERA B, et al. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA[J]. PLoS ONE, 2016,11(9).

基金项目：吉林省农业科技创新工程项目（CXGC2021TD008, CXGC2021ZY033），非洲猪瘟血清学监测技术研究（2019Y03013）。
※ 作者简介：王凤杰（1997-），女，宁夏回族自治区银川市人。E-mail：15144262507@163.com。
※※ 通讯作者：王永志，E-mail：yzwang@126.com,固定电话：0431-87063145，手机号：13029032702。

猪圆环病毒 2 型全基因组分析及 Cap 蛋白可溶性表达研究

侯承尧※，龙学琳，赵丽均，田明月，杨鑫※※
（四川大学生命科学学院，动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室，四川成都 610064）

引言

猪圆环病毒病（Porcine Circovirus Associated Disease，PCVAD）是猪圆环病毒 2 型（Porcine Circovirus，PCV2）引起的一系列疾病的总称。PCV2 自被发现以来，相继在世界各地暴发，使全球养猪业遭受了巨大的经济损失。PCV2 基因组全长 1.7 kb，包含两个主要的开放阅读框，即 ORF1 和 ORF2，分别编码 296 个氨基酸的 Rep 蛋白和 231 个氨基酸的 Cap 蛋白。其中 Cap 蛋白是病毒的衣壳蛋白，具有体外自组装成病毒样颗粒的能力。本研究通过扩增获得三条 PCV2 全基因组序列信息，然而建立遗传进化树进行亲缘关系分析，并将 Cap 基因连接至 pET-28a 载体后转化至 BL21 感受态细胞进行诱导表达，通过优化表达条件，成功获得可溶性 Cap 蛋白进行表达研究。

材料与方法

疑似圆环病毒感染猪的血液样本和粪便样本采集于四川省某猪场，所有样本经匀浆后，使用磷酸盐缓冲液稀释（PBS，0.1M，pH7.4）处理，抽提 DNA，保存于-20℃或进行 PCR 扩增。将 qPCR 检测为阳性的 DNA 进行全基因组扩增并测序[1]。利用 MEGA7.0 软件，将获得的基因组序列进行同源性分析，并建立遗传进化树。将 Cap 基因优化并与 pET-28a 载体连接，转化至 BL21 感受态细胞。诱导表达最优条件为终浓度为 1 mM IPTG，16℃震荡培养 20 h 后离心收集菌体，使用裂解缓冲液重悬菌体，反复冻融后超声破碎 30 min，12 000 rpm/min 离心 30 min，分别收集上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 电泳验证蛋白表达，并将上清液进行 Ni-NTA 亲和层析。

结果与讨论

三条 PCV2 全基因组序列之间的同源性为 96.7%~98.1%，与参考序列的同源性为 92.0%~99.7%。其中 PCV2-A 与越南株 JX506730 同源性最高为 99.7%。遗传进化树结果显示，PCV2-A 和 PCV2-B 属于 PCV2h 亚型，PCV2-C 属于 PCV2d 亚型。选用 PCV2-C Cap 基因进行表达。经 Ni-NTA 纯化后，成功获得可溶性 Cap 蛋白，蛋白大小约 45 kDa。病毒样颗粒由于其高度重复的表面结构且与天然病毒颗粒相似，天然具有高度的免疫原性，常结合“plug and display”策略被用作递送载体。本研究为 PCV2 病毒样颗粒疫苗的制备及其作为递送载体的探究奠定了基础。PCV2 Cap 蛋白的可溶性表达，为其能自组装成病毒样颗粒奠定了基础。

主要参考文献

[1] Xu Tong，et al."Prevalence and genetic analysis of porcine circovirus type 2 （PCV2） and type 3 （PCV3） between 2018 and 2020 in central China.." Infection，genetics and evolution ： 94.（2021）.

※ 作者简介：侯承尧，在读博士研究生，研究方向为动物病原微生物。E-mail：1185194154@qq.com。
※※ 通讯作者：杨鑫，副教授，博士生导师，研究方向为 9 动物病原微生物。E-mail：yangxin0822@163.com。

全球猪繁殖与呼吸综合征病毒 Lineage 8 疫苗的系统地理学、进化、传播和临床影响

刘静※，邢家宝，李跃，张桂红，孙彦阔※※
（华南农业大学兽医学院广东省人畜共患病防控重点实验室，广东广州 510642）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是在全球范围内传播的最具破坏性的疾病之一，特别是在中国和美国，造成了数十年的持续经济损失。根据 PRRSV 的抗原性、基因组及致病性等特性，目前可将 PRRSV 分为 2 个主要亚型，即欧洲型（主要以 LV 株为代表株）和美洲型（主要以 VR2332 株为代表株）。根据 ORF5 基因，可以进一步划分为 9 个不同的谱系。迄今为止，已在中国大陆流行的毒株有 Lineage 1、Lineage 3、Lineage 5 和 Lineage 8.7。1995 年，一场“堕胎风暴”席卷了爱荷华州并波及了整个美国，其中 Lineage 8 PRRSV 是新兴毒株的一部分。随后，亚系 8.7 毒株 CH-1a 在中国首次被发现，并在没有区域生物安全措施的农场广泛传播。此后，在中国经常检测到 Lineage 8.7 毒株并确定为地方性集群。2006 年报道更高毒力的高致病性 PRRSV （HP-PRRSV）爆发进一步加剧了 Lineage 8.7 的进化历史，并随着全球生猪贸易的快速增长而导致更多的经济损失。随后几年，HP-PRRSV 的重组、适应性进化等一系列突变行为也增加了遗传多样性的复杂性。基于此，本项目开启了一项跨区域 PRRSV 全年检测计划。

材料方法

在我国 PRRSV 国家监测项目中，2005—2022 年从中国大部分养猪地区的 PRRSV 疑似阳性猪场中采集了 6000 多份临床样本，获得了 242 个新的 ORF5 序列和 42 个属于 Lineage 8.7 的新完整基因组。研究提供了一种交互式方法来揭示 PRRSV Lineage 8 和 Lineage 8.7 的流行病学特征，比如 Nextstrain，这是一种跟踪病原体进化的实时交互式工具，提供病原体种群不断变化的实时快照，并向病毒学家、流行病学家、公共卫生官员和社区科学家提供交互式数据可视化。

结果与讨论

使用 3000 多个基因组序列系统地调查了 Lineage 8 的出现、在美国的暴发、国际传播和流行，及其此外，综合系统发育分析还证明了广东作为亚洲本地来源在 Lineage 8.7 病毒生态学中发挥的潜在作用。系间和系内的独立重组分析显示相当不平行的数量，其中系间重组事件远少于系内重组。疫苗同源性分析提示目前一共出现了 32 个疫苗反强株，它们与三种改良活病毒疫苗 （MLV） 在进化关系上具有极强的相关性，其中两个同时发生突变的氨基酸突变位于 ORF1a 957、ORF2 250。

结论

总之，本研究结果展示了 PRRSV Lineage 8 进化的全面知识，结果还提供可能源自 MLV 的野外反强毒株的进化特征上的氨基酸共突变位点。HP-PRRSV MLV 疫苗的传播动力学和潜在逆转分析为靶向控制策略以及 MLV 疫苗研究提供了新见解。未来工作重点放在可能源自 MLV 的野外分离株进化特征上。结合这些，仍然需要持续监测和进化研究提供有价值的信息来制定 PRRSV 控制和预防策略，特别是 MLV 的研究。

主要参考文献

略

※ 作者简介：刘静，在读硕士研究生，研究方向为病毒遗传进化。E-mail：20212028@stu.scau.edu.cn。
※※ 通讯作者：孙彦阔，副教授，硕士生导师，研究方向为宏病毒组学、动物病毒分子流行病学、遗传进化及致病性研究。E-mail：yankuosun@scau.edu.cn。

高致病性猪捷申病毒 2 型变异株的宏病毒组测序与分子特征分析

胡睿铭[1※※]，梁雯棋[1※]，邬向东[1]，丁珍[1]，钟圣伟[1]，陈政[1]，张锦华[1]，曹华斌[1]，郭小权[1]，邓舜洲[1]，罗军荣[1]，丁能水[1,2]，胡国良[1]

（1. 江西农业大学动物科学技术学院，江西南昌 330045；2. 傲农集团福建省猪营养和饲料科学重点实验室，福建漳州 363000）

引言

猪捷申病毒（Porcine Teschovirus，PTV）是小 RNA 病毒科、捷申病毒属的成员，被该病毒感染的猪会出现腹泻、繁殖障碍、脑脊髓炎、神经功能紊乱等临床症状。本研究分析了分离株 HeNZ1 的基因组序列，并对其重要的结构蛋白 VP1、VP2 进行了蛋白质三维结构预测和抗原表位预测。

材料与方法

病料来自于河南某规模化猪场，从组织样病猪的脑组织匀浆中提取 RNA，借助 RT-PCR 扩增猪捷申病毒并进行全基因组测序。取被感染猪的脑做石蜡病理切片并观察脑组织病变情况。从 GenBank 数据库获取 PTV 参考株序列，通过 MEGA 7.0.26 使用邻域连接法构建系统发育树，并将参考序列和分离到的该毒株进行遗传距离分析。通过 I-TASSER 在线软件对 VP1 进行蛋白质三维结构预测。通过 DiscoTope 2.0 对 VP1 和 VP2 蛋白抗原表位进行预测。

结果与讨论

2020 年在河南某猪场出现了新生仔猪的集中发病，症状包括腹泻、嗜睡、运动性共济失调、眼球震颤、后肢瘫痪和仔猪昏迷。哺乳仔猪的发病率达到 50%以上，死亡率高达 38%。本研究采取了宏基因组诊断技术，对腹泻样品的总 RNA 进行宏基因组测序，发现致病原为猪捷申病毒（Porcine Teschovirus，PTV），分离毒株命名为 HeNZ1[1]。

通过系统发育和进化差异分析表明，HeNZ1 属于 PTV-2 型，并且在基因和抗原上与中国其他 PTV-2 毒株有着不同程度的差异。VP1 的突变可能导致抗原漂移和免疫逃逸。在 HeNZ1 VP1 中，预测了 6 个 B 细胞表位，并鉴定了 24 个独特的突变位点。根据 Disco Top 表位预测结果，HeNZ1 VP1 的 24 个独特氨基酸突变位点中有 13 个位于 5 组 B 细胞抗原表位内。并且位于 B 细胞表位内的 13 个独特突变位点中有 11 个暴露于 VP1 的表面。在 VP2 中，预测了 4 组 B 细胞抗原表位，并鉴定了 12 个独特的突变位点，其中 7 个独特的突变位点位于预测的 B 细胞表位内。

综上所述，本研究报告了中国河南省养猪场发生的一起严重的猪捷申病毒引发的疫情。该病在猪场发病率较低，一般呈散发。因此，常规 PCR 检测往往由于不会检测该病原而导致漏检。本次病原调查在 PCR 检测猪肠道冠状病毒和轮状病毒均为阴性的养殖场中，通过宏基因组测序的方法准确找到了样品中的致病原为 PTV-2 同时利用生物信息等手段对全基因组序列进行比对分析结果显示 PTV HeN1 株和中国国内其他 PTV-2 毒株同源性较低，存在显著的抗原性差异。

主要参考文献

[1] Liang W，Wu X D，Ding Z，et al，Identification of a novel porcine Teschovirus 2 strain as causative agent of encephalomyelitis in suckling piglets with high mortality in China [J]. BMC Vet Res，2023. 19（1）： p. 2.

※ 作者简介：梁雯棋，在读硕士研究生。E-mail：lwq19980813@163.com。

※※ 通讯作者：胡睿铭，讲师，硕士生导师，研究方向为猪病毒性疾病的流行病学和临床猪病防控。E-mail：hrmvet19@163.com。

非洲猪瘟检测样品的选择

许光勇※
（北京中育种猪有限责任公司，北京 100194）

引言

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）感染猪引起的一种热性、出血性、高度接触性传染病，感染后猪群可能出现精神萎靡、采食量下降、全身性出血、体温升高以及母猪流产等典型特征。世界动物卫生组织将非洲猪瘟规定为法定报告动物疫病，我国将其列为一类传染病。非洲猪瘟在我国已然存在近五年时间，其对生猪养殖行业发展影响巨大。为了选择非洲猪瘟病毒感染早期、中期和晚期三个阶段的非洲猪瘟病毒诊断最佳样品，本试验以六种类型样品为检测对象，通过比较核酸阳性率和 Ct 值来加以确定。

材料与方法

试验对象为 50 头异常母猪，以现场出现采食下降或不食、发烧、流产、精神萎靡为第 1 天，第 1~3 天为非洲猪瘟病毒感染前期，4~7 天为感染中期，8~21 天为感染后期。感染前、中、后期的异常母猪均采集个体对应的环境样品、咽拭子、鼻拭子、肛拭子、静脉血和尾根血六种样品。采用荧光定量 PCR 检测非洲猪瘟病毒核酸，结果 Ct 值≤40 且有明显指数增长，则为 ASFV 核酸阳性；无 Ct 值判定为阴性。

结果与分析

感染早期咽拭子检出核酸阳性率最高为 42%；中期血液核酸阳性率为 25%；后期环境样品核酸阳性率最高为 54%，血液病毒载量最高。综合现场操作，认为非洲猪瘟诊断选择的最佳样品：感染前期为咽拭子，中期为尾根血，后期为环境样品。感染前期血液未检出 ASFV 核酸，所以血液一般不适用于 ASFV 感染前期的排查。虽然环境样品和肛拭子也检出了病毒核酸阳性，但与咽拭子相比阳性率相差较多。而鼻拭子检出核酸阳性率为 20%，与咽拭子比较虽有差别，但采样方法简单便捷，必要时也可以考虑使用。因此，感染前期最佳样品为咽拭子，其次是鼻拭子。由于拭子采样方法需要直接接触猪只口腔或鼻腔，因此现场操作一定注重细节，杜绝出现人为传播。感染中期六种样品均可检出 ASFV 核酸阳性，尾根血、静脉血、肛拭子和环境样品的核酸阳性率在 18%~26%范围，Ct 值在 31.3~36.1。尾根血与静脉血检出 ASFV 核酸阳性率和 Ct 值均为最佳，综合认为尾根血采集更加便捷、安全。因此，感染中期尾根血为检测 ASFV 核酸的最佳采集样品对象。虽然采集尾根血相对安全，但其所采集数量偏少，不利于开展多次检测。感染后期，除咽拭子外，其余五种样品均可检出 ASFV 核酸阳性。环境样品、静脉血和尾根血核酸阳性率较高，肛拭子核酸阳性率也达到了 26%，静脉血 Ct 值更是低至 26.9。表明感染后期猪只个体在大量排毒。根据结果初步判定，静脉血、尾根血、肛拭子和环境样品均可作为检测样品。鉴于血液污染环境、人员、工具等风险更高，故肛拭子和环境样品优先选择；同时考虑到现场操作的便捷和安全性，环境样品与肛拭子相比，前者具备采样更加方便、省时省力、不交叉等优点。因此认为，感染后期环境样品是最适合的选择。环境样品具备采集方便、独立性强、交叉污染几率低等优点。本研究明确了猪感染 ASFV 三个时期检测 ASFV 核酸的最佳样品种类，可以为 ASF 控制与精准剔除提供更加清晰的思路与现场指导，进一步促进生猪产业高质量发展提供了有力支撑。

主要参考文献

[1] 王志亮，吴晓东，王君玮.非洲猪瘟[M].1 版.北京：中国农业出版社，2015.

[2] SUN E C，ZHANG Z J，WANG Z L，et al. Emergence and prevalence of naturally occuring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020[J]. Science China life sciences，2021，64（5）：752-765.

※ 作者简介：许光勇，博士，研究方向为猪病防控与现代化养猪生产，E-mail： vetbbsc@163.com

猪繁殖与呼吸综合征病毒通过细胞钙信号通路激活自噬利于病毒复制及机制研究

刁非非[1※]，姜辰龙[1]，孙杨杨[1]，高雁倪[1,3]，白娟[1,3]，Hans Nauwynck[2]，王先炜[1,3]，杨元奇[1]，刘星[1,3]，姜平[1,3※※]

（1.南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点实验室，江苏南京 210095；

2.Laboratory of Virology，Faculty of Veterinary Medicine，Ghent University，Salisburylaan 133，B-9820 Merelbeke，Belgium；3.江苏省动物重要传染病与人畜共患病防控协同创新中心，扬州大学，江苏扬州 225009）

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）属于动脉炎病毒科，其感染会导致妊娠母猪典型的繁殖障碍和仔猪呼吸问题，给全球养猪业带来巨大损失。深入探究 PRRSV 复制机制有助于该病的防治。研究报道，细胞中的 Ca^{2+}及相关蛋白在基因转录、细胞功能与免疫反应等方面有着重要作用，同时参与多种病毒复制周期调控。本研究拟研究宿主 Ca^{2+}及钙感受蛋白调控 PRRSV 逃逸宿主抗病毒新机制，皆在为该病毒感染阻断技术研究奠定重要基础。

材料与方法

本研究主要使用 Marc-145 细胞、PAM、PRRSV 高致病性毒株 BB0907、钙离子检测试剂盒等材料，利用 $TCID_{50}$ 测定、Western blotting、共聚焦、活细胞工作站等实验方法进行验证。所有数据使用 GraphPad Prism 7.0 软件（GraphPad Software，Inc.）进行分析，并以平均值±SD 的形式呈现。

结果与讨论

研究发现 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞胞质 Ca^{2+}水平显著增加，降低细胞内 Ca^{2+}显著抑制 PRRSV 复制。Ca^{2+}可以通过自噬途径影响病毒复制。PRRSV 感染诱导细胞钙稳态失调，激活钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 2（CaMKII）介导自噬，从而利于病毒复制。在细胞水平上，有两种途径获取 Ca^{2+}，细胞外的摄入和内部储存，内质网（ER）作为细胞内最大 Ca^{2+}储存器，当发生应激时，可以打开细胞膜上的 Ca^{2+}通道，引入外源 Ca^{2+}。为了研究外源 Ca^{2+}对 PRRSV 复制的作用，本研究将感染 PRRSV 的细胞加入含有不同浓度 Ca^{2+}的培养基，结果发现，PRRSV 感染导致细胞外 Ca^{2+}内流，通过调节 CaMKII-AMPK-mTOR 信号通路有利于自身复制。在机制上，发现 PRRSV 感染能够引起内质网应激（ER stress），形成闭合的内质网-细胞膜接触点（ER-PM CSs），导致细胞膜 Ca^{2+}通路存储操作钙离子流入通道（SOCE）的打开，随后胞外 Ca^{2+}进入 ER 中。进一步研究发现，ER 中的 Ca^{2+}通过肌醇三磷酸受体（IP3R）介导的离子通道释放到细胞质中，激活 CaMKII 介导的自噬。同时发现利用药物阻断 ER stress 或 Ca^{2+}信号通路能够抑制 PRRSV 复制。更深入研究结果表明 PRRSV 的 Nsp2 蛋白能够引起 ER stress 和 CaMKII 介导的自噬，Nsp2 能够与 SOCE 通道的主要组成蛋白钙感受基质相互作用分子 1（STIM1）相互作用。总之，该研究揭示了 PRRSV 感染与细胞钙信号之间的相互作用关系，为后续开发抗病毒和控制该病提供了新的理论。

主要参考文献

[1] Xingjuan Chen，Ruiyuan Cao and Wu Zhong. Host Calcium Channels and Pumps in Viral Infections [J]. Cells, 2020，9：94.

※ 作者简介：刁非非，在读博士研究生，研究方向为动物传染病发病机制与免疫。E-mail：2019207016@njau.edu.cn。

※※ 通讯作者：姜平，教授，博士生导师，研究方向为动物传染病。E-mail：jiangp@njau.edu.cn。

SERPINB1 通过降解 IKBKE 和调节自噬介导的 IFN 通路促进塞内卡病毒 A 复制

延君芳※，高雁怩，白娟，李剑，李旻婧，刘星，姜平※※
（南京农业大学农业部动物细菌学重点实验室，江苏南京 210095）

引言

塞内卡病毒 A（SVA）是一种我国新出现的小 RNA 病毒，临床上可引起猪水疱病及仔猪急性死亡，与动物水疱型传染病极其相似，严重威胁全球养猪业发展。本课题组从临床发病猪群分离获得 SVA 毒株，人工感染试验证明其可引起 90 日龄以上猪口蹄出现水泡和溃疡。为了进一步明确该病毒株复制及其与宿主相互作用机制，本研究在 SVA 感染 ST 细胞蛋白质组学研究基础上，发现宿主细胞丝氨酸蛋白酶抑制剂 SERPINB1 可显著促进 SVA 复制，敲低或敲除细胞上病毒复制明显降低。另外，SERPINB1 能够同时调控 I 型 IFN 通路和经典自噬级联。进一步研究发现，SERPINB1 靶向 IκB 激酶 epsilon（IKBKE）并通过泛素蛋白酶体途径促进其降解。SERPINB1 对 IKBKE 的表达抑制可以激活自噬进而抑制 I 型 IFN 信号传导。

材料与方法

采用 iTARQ 技术鉴定 SVA 感染 ST 细胞差异表达蛋白，通过质粒转染、病毒感染确定丝苏氨酸蛋白酶抑制剂 SERPINB1 促进 SVA 复制。采用截短体构建及免疫共沉淀方法确定关键功能域。采用免疫印迹、荧光定量、双荧光素酶报告基因试验确定 SERPINB1 影响病毒复制的机制。

结果与讨论

宿主蛋白 SERPINB1（丝氨酸蛋白酶抑制剂）促进 SVA 复制，其关键功能域位于 303LTGMSEAR310，独立于其蛋白酶抑制活性及核酸内切酶活性区域。SERPINB1 能够抑制 I 型 IFN 通路，促进经典细胞自噬。采用 CRISPR/Cas 9 技术构建获得 SERPINB1 和 BECN1（自噬调控基因）基因缺失的 HEK-293T 细胞，发现 SERPINB1 表达沉默导致 I 型 IFN 信号通路活化、自噬途径阻滞和 SVA 复制显著抑制。采用 IFN 信号通路关键分子 Co-IP（免疫共沉淀）试验，发现 SERPINB1 靶向 IKBKE（IκB 激酶 epsilon），并且通过泛素-蛋白酶体途径促进 IKBKE 降解，其关键功能域也位于 303LTGMSEAR310。BECN1 缺失的 HEK-293T 细胞中，IFN 通路级联高度活化、SERPINB1 对 IFN-β 启动子活性的抑制作用消失、SVA 复制抑制、SERPINB1 促病毒作用消失。当使用自噬抑制剂 3MA（3-甲基腺嘌呤）处理 IBRS-2 细胞时，SVA 增殖抑制、SERPINB 对病毒复制的促进作用消失。总的来说，SERPINB1 通过泛素-蛋白酶体途径降解 IKBKE，上调胞内自噬水平，抑制 IFN 应答，从而促进 SVA 复制。综上，SERPINB1 通过调控自噬与 I 型 IFN 应答之间的相互作用促进 SVA 复制，丰富了 SVA 复制和致病机制理论基础。

主要参考文献

[1] Li L，Bai J，Fan H，et al. E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2L6 promotes Senecavirus A proliferation by stabilizing the viral RNA polymerase[J]. PLOS Pathogens，2020，16（10）： e1008970.

※ 作者简介：延君芳，研究方向为动物传染病发病机制与免疫。E-mail：2019207015@njau.edu.cn
※※ 通讯作者：姜平，教授，博士生导师，研究方向为动物传染病发病机制与免疫。E-mail：jiangp@njau.edu.cn

STX17 和 SNAP29 调控不完全自噬对猪肺炎支原体胞内增殖的影响

周可心※，陈政锟，丁红雷※※
（西南大学动物医学院动物支原体学实验室，重庆 404100）

引言

猪支原体肺炎是由猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumoniae*，Mhp）引起的一种以接触性的、高传染性、高发病率和低死亡率为特征的慢性呼吸道疾病。猪肺炎支原体可引起猪气管、支气管、肺脏严重的炎症反应，并会引起猪只生长受阻和饲料转化率大幅下降[1]，给全球养猪生产造成巨大的经济损失。本实验室已经证明，猪肺炎支原体可以进入猪肺泡巨噬细胞并诱导细胞内不完全自噬的发生，进而实现其胞内增殖[2]。因此，本文从研究猪肺炎支原体通过切割 STX17-SNAP29-VAMP8 复合体中的 STX17、SNAP29 蛋白破坏猪肺泡巨噬细胞自噬流着手，进一步揭示猪肺炎支原体的胞内生存机制。

材料与方法

试验对象为感染猪肺炎支原体 AH 株的猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21。首先采用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 AH 株感染 3D4/21 细胞后细胞中 STX17、SNAP29 蛋白的表达变化。其次采用 Western blot、免疫荧光、透射电镜检测猪肺炎支原体感染沉默或过表达 STX17、SNAP29 蛋白的 3D4/21 细胞中相关指标的变化，验证 STX17、SNAP29 蛋白对猪肺炎支原体诱导不完全自噬的影响。最后通过测定胞内 AH 株的颜色变化单位（Colour changing unit，CCU）探究 STX17、SNAP29 蛋白对猪肺炎支原体胞内增殖的影响。

结果与讨论

AH 株感染 3D4/21 细胞后，与对照组相比，*snap29* 基因的转录水平显著升高，而 *stx17* 和 *vamp8* 基因的转录水平在感染前后无显著差异；AH 株感染组中 STX17 和 SNAP29 蛋白量随感染时间延长显著降低，VAMP8 蛋白量无显著差异。AH 株感染沉默 STX17/SNAP29 的 3D4/21 细胞后，与对照组相比，LC3-Ⅱ和 p62 蛋白水平没有进一步提升，mCherry-LC3 与 GFP-LC3 的共定位黄色荧光斑点数量没有显著变化，自噬体数量无显著差异。AH 株感染过表达 STX17/SNAP29 的 3D4/21 细胞后，LC3-Ⅱ和 p62 蛋白水平显著降低，mCherry-LC3 与 GFP-LC3 的共定位黄色荧光斑点数量显著降低，自噬体数量显著减少。沉默 STX17/SNAP29 后，以 MOI=2 的 AH 株感染 3D4/21 细胞，与对照组相比，STX17/SNAP29 沉默组胞内 AH 株 CCU 显著升高；而以 MOI=200 的 AH 株感染 3D4/21 细胞，各组之间胞内 AH 株 CCU 无显著差异。过表达 STX17/SNAP29 后，以 MOI=2 的 AH 株感染 3D4/21 细胞，与对照组相比，STX17/SNAP29 过表达组胞内 AH 株 CCU 显著降低；以 MOI=200 的 AH 株感染 3D4/21 细胞，与对照组相比，过表达 SNAP29 组胞内 AH 株 CCU 显著降低，而过表达 STX17 组胞内 AH 株 CCU 无显著差异。本研究表明猪肺炎支原体通过作用于 STX17 或 SNAP29 蛋白，能破坏 STX17-SNAP29-VAMP8 复合体，阻断自噬体与溶酶体融合为自噬溶酶体，从而避免了猪肺炎支原体被溶酶体酶消化降解，促使猪肺炎支原体在胞内实现了增殖。

主要参考文献

[1] Maes D，Sibila M，Kuhnert P，et al. Update on Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs： Knowledge gaps for improved disease control[J]. Transbound Emerg Dis，2018，65 Suppl 1： 110-24.

[2] Wen Y K，Chen Z K，Tian Y Q，et al. Incomplete autophagy promotes the proliferation of Mycoplasma hyopneumoniae through the JNK and Akt pathways in porcine alveolar macrophages[J]. Veterinary Research，2022，53（1）： 62.

※ 作者简介：周可心，在读硕士研究生，研究方向为动物传染病学。E-mail：347899917@qq.com。
※※ 通讯作者：丁红雷，副教授，硕士生导师，研究方向为动物传染病。E-mail：hongleiding@swu.edu.cn。

福建省邵武市某猪场发生猪轮状病毒感染的病例分析和防控建议

王燕玲※
(邵武市动物疫病预防控制中心，福建南平 354000)

引发猪只腹泻的病原很多，有细菌性的、病毒性的以及寄生虫性的。其中临床最为常见、影响也重大的病毒有猪传染性胃肠炎病毒和猪流行性腹泻病毒及轮状病毒感染导致的腹泻。不同阶段的猪只对这三种病毒均易感，尤其对仔猪的健康危害最大，易导致仔猪高发病率和高死亡率。由轮状病毒引起的仔猪腹泻是一种急性肠道传染病，是危害养猪业主要疾病之一。通常情况下仔猪感染轮状病毒是隐性感染，当环境因素发生变化，如温度、湿度等变化，仔猪自身免疫力下降时则可能引起暴发。轮状病毒的分离鉴定必须通过实验室方法才能获得。仔猪感染轮状病毒目前无有效的治疗药物，预防该病的方法主要是加强饲养管理和寻找合适的基因型疫苗进行接种。邵武市某猪场共有能繁母猪 500 头左右，自 2021 年开始，每年的 12—翌年 3 月不间断发生断奶仔猪腹泻。该场自 2021 年开始发病，持续了 3 年，当该病发生时，养殖场分析腹泻原因，考虑了饲料因素，更换饲料依然不能缓解腹泻的发生和流行。临床上仔猪出现被毛粗乱、眼脸有黏液、精神沉郁、运动减少、常卧地不起、食欲减少或废绝，并且伴有呕吐、腹泻。小猪排出的粪便有黄色,也有灰色，部分呈现黑色，水样或糊状，严重的带有黏液和血液。经剖检发现主要病变在小肠，肠系淋巴结肿大，小肠肠壁变薄，有时小肠出血，小肠绒毛缩短，呈现半透明色，小肠内充满白色和黄色的液体，有一股腥味。

2023 年通过分子病原学检测手段在粪便中 100%检出轮状病毒，就其毒株进行基因测序和分型，该毒株与 G9 型 PoRV 代表毒株 NMTL-2008 等处于同一分支，为该场疫苗选择和腹泻病的防控提供了重要的技术支撑。

主要参考文献

略

※ 作者简介：王燕玲，女，福建省南平市人。E-mail：332617684@qq.com。
※※ 通讯作者：王燕玲，E-mail：332617684@qq.com,手机号：13860019083。

猪伪狂犬病毒 EP0 蛋白单克隆抗体的制备及其应用

王迪[1※]，陈冬杰[2※※]
（1.国家开放大学农林医药教学部，北京 100039；2.中国检验检疫科学研究院动物检验与检疫研究所，北京 100176）

引言

EP0 基因是猪伪狂犬病毒（PRV）的早期基因，编码 EP0 蛋白。EP0 蛋白作为 PRV 复制周期的早期蛋白，可激活 PRV EP180、TK 和 gG44 等基因的启动子，发挥重要生理功能[1]。研究表明 EP0 缺失突变株复制缓慢，毒性显著降低，并可对强毒攻击产生强大的免疫保护。EP0 缺失突变株在干扰素预处理的细胞中复制能力有所减弱，揭示了 EP0 在 PRV 拮抗干扰素免疫应答过程中发挥重要作用，但其机制还未研究清楚[2]。为了研究 EP0 基因的更多功能，本研究以原核表达的 EP0 重组蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠并制备了针对 EP0 蛋白的单克隆抗体，目的是为进一步研究 EP0 功能提供较好的生物材料和研究基础。

材料与方法

本研究使用表达并纯化的 His-EP0 重组蛋白免疫 6~8 周龄、雌性 BALB/c 小鼠，免疫 3 次后，使用 ELISA 方法测定血清抗体水平。在其血清效价达到要求后，取其脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合，将融合后的细胞使用 HAT 培养基进行重悬后均匀分散于 96 孔细胞培养板内培养。通过 ELISA 方法筛选阳性克隆进行 3 次亚克隆，挑选出可以稳定传代并高水平分泌抗体的杂交瘤细胞株，并通过 western blotting、IFA、叠加 ELISA 等方法对其进行鉴定。

结果与讨论

通过杂交瘤细胞株亚克隆，本研究共获得了 3 株能够稳定分泌抗 EP0 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2C5、4C6 和 3B5。Western blotting 结果显示，McAb 4C6、2C5 和 3B5 均能和重组 EP0 蛋白反应，且不与 pET-28a 空载体对照反应，说明获得的 3 株单克隆抗体能够特异性识别 EP0 蛋白。单抗亚型实验鉴定结果显示，2C5 为 IgG2b/κ 型，3B5 和 4C6 均为 IgG1/κ 型。叠加 ELISA 结果证明，3 株 McAb 2C5、3B5 和 4C6 单独加入时 ELISA 值分别为 1.237、1.560 和 1.021，叠加后的 AI 值均大于 50 而接近于 100，说明 3 株 McAb 针对的是 EP0 蛋白的不同抗原表位。IFA 结果表明，McAb 2C5 和 4C6 均能与 PRV 感染的 PK-15 细胞反应，而 3B5 不能与 PRV 感染的 PK-15 细胞反应。McAb 2C5 和 4C6 不与 PRV EP0 缺失株反应。综上所述，本试验所制备的单克隆抗体 4C6 和 2C5 可用于 EP0 缺失的 PRV 毒株的检测，并用于区分 PRV EP0 缺失毒和 PRV 野毒，为进一步研究 EP0 蛋白功能提供了重要的生物材料。

主要参考文献

[1] GUO H，ZHOU R，XI Y，et al. Transcriptional suppression of IE180 and TK promoters by the EP0 of pseudorabies virus strains Ea and Fa[J]. Virus Genes，2009，38（2）：269-275.

[2] Wesley RD，Cheung AK. A pseudorabies virus mutant with deletions in the latency and early protein O genes： replication，virulence，and immunity in neonatal piglets[J]. J Vet Diagn Invest.，1996，;8（1）：21-4.

※ 作者简介：王迪，讲师，博士，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail：wangd@ouchn.edu.cn。
※※ 通讯作者：陈冬杰，讲师，博士，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail：chendongjie1212@163.com。

伪狂犬病毒被膜蛋白 UL21 靶向宿主 cGAS 逃逸天然免疫机制研究

马梓承※，刘星，白娟，姜平※※
（1.南京农业大学动物医学院，江苏南京 210095）

引言

PRV 具有较强的传染性，是困扰世界养猪业的一大重要疫病，给生猪养殖业带来了严重的经济损失。最新报道 PRV 甚至可以感染人类，具有重要的公共卫生意义。大量研究表明，疱疹病毒被膜蛋白 UL21 在病毒复制中发挥重要作用，伪狂犬被膜蛋白 UL21 是重要的神经毒力决定基因，其通过与 DYNLRB1 相互作用，增强 PRV 神经侵袭[1]。尽管有这些观察结果，但 UL21 如何调节 PRV 复制和发病的潜在机制尚不清楚。本研究深入探索 PRV 致病机制，拟发掘 UL21 的重要功能，揭示 PRV 逃避宿主天然免疫反应的新机制，旨在丰富病毒持续感染和免疫逃逸的理论基础。

材料与方法

PRV 变异毒株 ZJ01（GenBank：KM061380.1）由本实验室于 2012 年分离于浙江省，该病毒作为伪狂犬亲本毒株用于本文所有试验；野生型小鼠和 cGAS 基因缺失小鼠购自南京大学-南京生物医药研究院；采用双荧光素酶报告系统检测试剂测定荧光素酶活性；采用 CRISPR/Cas9 构建上述缺失重组病毒；采用 CRISPR/Cas9 和慢病毒系统建立基因敲除细胞系。

结果与讨论

PRV 被膜蛋白 UL21 显著抑制 cGAS-STING 刺激的 IFN-β 启动子活性和干扰素刺激基因的表达；小鼠致病性实验发现，当 UL21 缺失后 PRV 对小鼠的致死率显著降低，且组织器官病毒载量及病理损伤减轻，证明被膜蛋白 UL21 是 PRV 重要的毒力基因。

研究发现伴随 UL21 表达量的增多，cGAS 表达量逐渐降低，二者呈负相关。疱疹病毒被膜蛋白 UL21 降解 cGAS 从而抑制 IFN-β 产生的机制尚不清楚，为进一步发掘 UL21 与 cGAS 之间的联系，后续研究通过 Co-IP，激光共聚焦试验证明 UL21 与宿主蛋白 cGAS 存在特异性互作；通过细胞凋亡途径、泛素-蛋白酶体途径和自噬溶酶体途径三种途径的抑制剂和自噬关键分子 ATG7 干扰实验明确 UL21 通过自噬溶酶体途径降解 cGAS。将 PRV-WT、PRV-ΔUL21、PRV-ΔUL21R 感染野生型和 $cGAS^{-/-}$细胞，发现在 $cGAS^{-/-}$细胞中 PRV-ΔUL21 复制明显增强。

自噬分为非选择性自噬和选择性自噬[2]，研究发现 UL21 通过选择性自噬受体 TOLLIP 降解 cGAS，这一现象在 TOLLIP 缺失细胞系中得到了验证。选择性自噬受体配备了泛素结合域和 LC3 结合域，使它们能够将被泛素的目的蛋白输送到自噬体精确降解。本试验证明当 UL21 存在时，cGAS 存在 K27 连接的泛素化修饰。由于 UL21 自身不具备 E3 泛素酶活性，通过质谱分析和软件预测找到 E3 泛素连接酶 UBE3C，并通过 RNA 干扰和 UBE3C 缺失细胞系进一步证实 UBE3C 参与到 UL21 对 cGAS 的降解过程。利用 CRISPR/Cas9 技术构建 UL21 截断体缺失病毒 PRV-ΔUL21（200-532 aa）（保留 C 端）和 PRV-ΔUL21（1-200 aa）（保留 N 端），通过 cGAS 缺失小鼠证明 UL21 N 端发挥上述功能。

本研究首次发现 PRV 感染过程中会形成 UL21-UBE3C-TOLLIP-cGAS 复合物，揭示了 PRV 逃避宿主天然免疫反应新机制，为抗病毒药物研究提供了新的靶点。

主要参考文献

略

※ 作者简介：马梓承，博士研究生，研究方向为动物传染病发病机制与免疫。E-mail：mazichengvet@163.com。
※※ 通讯作者：姜平，教授，博士生导师，研究方向为动物传染病发病机制与免疫。E-mail：jiangp@njau.edu.cn。

E111R 基因对非洲猪瘟病毒复制及毒力影响的研究

樊嘉琦※，扈荣良※※
（宁夏大学生命科学学院，宁夏银川 750021）

引言

非洲猪瘟（African swine fever ，ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）引起的家猪和野猪急性、发热性、致死性的传染病，可导致家猪死亡率高达 100%。ASFV 基因组全长 170-193kb，含有 160 多个开放阅读框。但其中大多基因功能尚不明确，导致载体疫苗的研发缓慢，国内至今无成功的商品化疫苗，因此研究 ASFV 基因组中未知基因的功能十分重要。本研究对从未报道的 E111R 基因进行研究，初步探究 ASFV 基因组中 E111R 基因复制和毒力的影响。

材料与方法

使用无菌无猪源性病毒的家猪肺脏组织作为试验材料，通过灌洗方式收集肺脏中的肺泡巨噬细胞（PAM）。ASFV SY18 毒株由军事医学院军事兽医研究所于 2018 年在沈阳某猪场分离[1]。所有试验在生物安全 3 级（ABSL-3）实验室进行。使用 MAFFT 软件和 Jalview 软件分析 E111R 氨基酸序列的同源性。采用同源重组方法构建 E111R 基因缺失的重组病毒（SY18ΔE111R）。使用 PAM 检测 SY18ΔE111R 和 ASFV SY18 的生长曲线。将病毒培养物用 10 倍梯度稀释法接种到细胞上，培养 5 天。SY18ΔE111R 自发绿色荧光，可直接在荧光显微镜下观察滴度。ASFV SY18 与异硫氰酸荧光素（FITC）标记的 p30 蛋白的单克隆抗体（本实验室制备）结合，进行免疫荧光分析。使用 Reed-Muench 方法计算病毒滴度[2]。使用 $10^{2.0}TCID_{50}$（n = 5）、$10^{5.0}TCID_{50}$（n = 5）SY18ΔE111R 和 $10^{2.0}TCID_{50}$（n = 5）ASFV SY18 感染兰德瑞斯猪，检测重组病毒的毒力。

结果与讨论

对比 16 个不同基因型的 ASFV 中 E111R 氨基酸序列发现，E111R 基因编码的氨基酸同源性在 95.5%-100%之间，并且在基因Ⅰ型和Ⅱ型的 ASFV 毒株中的保守性更强。SY18ΔE111R 是 ASFV SY18 和重组转移载体（包含 E111R 左/右约 1200bp 的同源臂、p72 启动子、EGFP 基因报告盒）同源重组所构建，通过终点稀释法获得纯化的 SY18ΔE111R 病毒。二代测序技术发现 SY18ΔE111R 中 E111R 基因被成功替换，基因组中不包含其他突变。重组 SY18ΔE111R 的复制能力与 ASFV SY18 的复制能力相似，E111R 并不是 ASFV 基因组中复制必需基因。在动物试验中，不同剂量的 SY18ΔE111R 显示出不同的存活率和临床症状。感染高剂量 SY18ΔE111R（$10^{5.0}$ $TCID_{50}$）的猪与感染低剂量 ASFV SY18（$10^{2.0}$ $TCID_{50}$）的猪均表现出典型的 ASF 临床症状（出现发烧、厌食、腹泻、皮肤发紫、脚步蹒跚和颤抖），在存活天数、初始发烧时间、发烧天数和最高发烧温度没有显著差异，死亡率为 100%。感染低剂量 SY18ΔE111R（$10^{2.0}$ $TCID_{50}$）的 5 头猪在观察期的 21 天中有 2 头存活，死亡率为 60%，初始发热和死亡时间推迟，与其他两组相比临床症状较轻（出现发热、腹泻和厌食，最后存活的两头猪轻微厌食）。高剂量 SY18ΔE111R 感染猪是急性感染，低剂量 SY18ΔE111R 感染的猪成为亚急性感染。本研究发现 E111R 在不同基因型的 ASFV 分离株中高度保守，氨基酸的同源性高，E111R 并不影响 ASFV 的复制，低剂量 SY18ΔE111R 感染猪会存在 40%存活率，这表明 E111R 基因影响 ASFV 中的一小部分毒力。

主要参考文献

[1] Zhou X T，Li N，Luo Y Z，et al. Emergence of African Swine Fever in China，2018.[J]. Transboundary and emerging diseases，2018，65（6）.

[2] REED L J，MUENCH H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS[J]. American Journal of Epidemiology，1938，27（3）.

※ 作者简介：樊嘉琦，在读博士研究生，研究方向为动物病原生物学。E-mail：2090883224@qq.com。
※※ 通讯作者：扈荣良，研究院，博士生导师，研究方向为病毒学。E-mail：ronglianghu@hotmail.com。

非洲猪瘟 pp62、E165R 和 H240R 蛋白原核表达以及 ELISA 方法的建立

郑凡[1※]，钟可心[2]，袁琦超[3]，程家浩[4]，李志强[5]，袁晓民[1※※]
（1.湖南农业大学动物医学院，湖南长沙 410128；2.湖南省动物疫病预防控制中心，湖南长沙 410014）

引言

非洲猪瘟(ASF)是由非洲猪瘟病毒(ASFV)引起的一种高致病性的传染病，强毒株感染致死率高达100%，对养猪业和国民经济造成了严重影响。现有的控制和预防方法包括早期诊断、迅速消除传染源和阻断传播途径。然而，早期诊断中筛查的样本数量较大，因此筛选和鉴定具有 ASFV 免疫原性的蛋白，建立高灵敏和高准确性的 ELISA 方法具有重要意义。本研究对 ASFV 的 pp62、E165R 和 H240R 蛋白进行原核表达以及纯化，建立并优化了 ELISA 检测方法 ，为 ASFV 早期诊断试剂盒的研发与三种蛋白的结构和功能研究奠定了基础。

材料与方法

本研究标准血清来自长沙市动物疾病预防控制中心，实验血清采自商业猪场母猪和成年猪。分别合成三个目的基因并与 pET-28a 载体连接构建重组原核表达质粒，对其进行诱导表达，用 SDS-PAGE 进行可溶性分析，用镍柱亲和层析对蛋白进行纯化。用标准阳性 ASFV 血清为一抗进行 Western blot 鉴定其免疫原性。将纯化后的蛋白作为抗原包被，建立并优化三种重组蛋白 ELISA 检测方法。

结果与讨论

原核表达系统的生产成本较低，蛋白稳定且易于纯化，适合大规模生产。因此，本研究将 pp62、E165R 和 H240R 与 pET-28a 连接构建了三个重组质粒，诱导其原核表达后进行 SDS-PAGE，结果表明在上清和沉淀中均有表达。纯化上清中的蛋白，获得蛋白浓度约为 0.2mg/mL。Western blot 显示纯化后的蛋白有较强的免疫原性。建立并优化 ELISA 检测方法，结果显示最适包被条件为 0.05M 的碳酸盐缓冲液 4℃包被过夜；最佳封闭条件为 5%脱脂奶粉 37℃ 2h；血清和酶标二抗的最佳稀释度和孵育时间分别为 1：200 37℃ 1h 和 1:7500 37℃ 30min；TMB 显色液最佳反应时间为 37℃避光 10min。三种重组蛋白的试验结果均表明与其他猪病血清无交叉反应，具有良好的特异性；稀释 1600 倍标准阳性血清仍呈阳性，灵敏度较高；批内批间重复性良好；与商品化试剂盒相比阳性符合率为 100%，总体符合率为 98.28%，符合率较高。三种重组蛋白的实验结果均表明其可用于临床血清标本中 ASFV 抗体的检测，且具有重复性好、特异性强、生产和操作简便、省时等优点。本报告可能有助于开发一种可靠的大规模检测 ASFV 的工具，为 ASFV 检测试剂盒的进一步研究奠定重要基础。对 ASF 的预防、控制和根除具有重要意义。

参考文献

[1] 储珺，赵普，张婕妮等．非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定[J]．中国兽医科学, 2022,52(05):579-585.DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0103.

[2] Oliveros, M et al. “African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages.” *Journal of virology* vol. 73,11 (1999): 8934-43. doi:10.1128/JVI.73.11.8934-8943.1999

[3]Zhou, Pingping et al. “Deletion of the *H240R* Gene of African Swine Fever Virus Decreases Infectious Progeny Virus Production Due to Aberrant Virion Morphogenesis and Enhances

※ 作者简介：郑凡，在读硕士研究生，研究方向为动物疫病防治。E-mail：1374566938@qq.com。
※※ 通讯作者：袁晓民，讲师，硕士生导师，研究方向宿主天然免疫与病毒相互作用研究。E-mail：yxm1230@hunau.edu.cn。

猪δ冠状病毒（PDCoV）N 蛋白的原核表达

赵丽均※，侯承尧，田明月，龙学琳，杨鑫※※
（四川大学生命科学学院，动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室，四川成都 610064）

引言

猪德尔塔冠状病毒（porcine Deltacoronavirus，PDCoV）是 2012 年首次在中国香港猪群中发现的肠道致病性冠状病毒[1]。PDCoV 可感染不同年龄阶段的猪，且对新生仔猪有较强的致病性，临床症状表现为脱水、急性粥样腹泻和呕吐等，其发病率和病死率较高，逐渐成为威胁世界养猪业的重要腹泻病原之一。PDCoV 属于冠状病毒科、德尔塔（δ）冠状病毒属，其是有囊膜的单股正链 RNA 病毒，PDCoV 在基因组排序次序为：5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-E-M-NS6-N-NS7-3'UTR，其中核衣壳蛋白（Nucleocapsid protein，N）在冠状病毒感染的细胞中含量丰富，在不同的毒株中保守性高。本研究将优化后的 N 基因合成至 PGEX-4T-1 载体上后转化至 BL21（DE3）大肠杆菌感受态细胞进行诱导表达，通过优化表达条件，成功获得可溶性 N 蛋白。

材料与方法

将合成的重组质粒 PGEX-4T-1-PDCoV-N-Opti 转化至 BL21（DE3）大肠杆菌感受态细胞，获得重组菌 BL21（DE3）/PGEX-4T-1-PDCoV-N-Opti，再进行诱导表达条件的探究，最优条件为终浓度 0.8 mM 的 IPTG，37℃震荡培养 24 h。诱导表达后离心收集菌体，使用 PBS 缓冲液清洗并重悬菌体，反复冻融三次后超声破碎 30 min，12 000 rpm/min 离心 30 min，分别收集上清和沉淀，沉淀用 PBS 缓冲液重悬. 后续进行 SDS-PAGE 电泳验证上清和沉淀的蛋白表达，并将上清液进行 GST 亲和层析，纯化获得可溶性 N 蛋白。

结果与讨论

PDCoV 的 N 蛋白具有高度保守性，所以选用 N 基因进行优化合成至 PGEX-4T-1 载体，转化后挑选单克隆，进行 PCR 验证并测序。将验证正确的克隆活化后以 1%的接种量进行扩大培养，于 37℃震荡培养至 OD_{600} 值 0.6-0.8，加入 IPTG 终浓度为 0.8 mM，在 37℃震荡培养 24 h。样品处理后，经 SDS-PAGE 电泳验证，目的蛋白大小与预期大小 64.1 kDa 一致，而未诱导的重组菌和 PGEX-4T-1 空载对照无相应条带，蛋白主要存在于上清且表达量较高。上清经 GST 预装重力柱纯化后，成功获得可溶性 N 蛋白。本研究经诱导表达和纯化，成功制备了高纯度、可溶性重组蛋白 PDCoV-N-GST，为后续 PDCoV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立奠定了基础。

主要参考文献

[1] WOO P C，LAU S K，LAM C S，et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. Virol，2012，86（7）： 3995-4008.

※ 作者简介：赵丽均，在读硕士研究生，研究方向为动物病原微生物。E-mail：zlj17743293660@163.com。
※※ 通讯作者：杨鑫，副教授，博士生导师，研究方向为动物病原微生物。E-mail：yangxin0822@163.com。

非洲猪瘟 K205R 蛋白及其单链抗体的表达纯化

龙学琳※，侯承尧 ，赵丽均，田明月，杨鑫※※
（四川大学生命科学学院，动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室，四川成都 610064）

引言

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus，ASFV）引起的猪一种高致病性传染病。对养猪业造成了重大的经济损失。K205R 蛋白属于早期功能性非结构蛋白，可以引起体液免疫刺激机体产生明显的抗体反应[1]。因此，基于该蛋白建立非洲猪瘟检测方法有重要意义。单链抗体是仅含有抗体的 VL 和 VH 基因，属于重组小分子抗体，通过改造使抗体的分子量减小可有效减缓人体对抗体的免疫排斥，但其抗原结合位点得到了完整的保留。本研究将 K205R 基因与前期筛选得到的单链抗体 scFv-10 分别与 pET-28a 载体和 pET-30a 载体连接，进行原核诱导表达并验证二者的特异性结合能力后，将 scFv-10 进行真核表达处理，将其作为 K205R 蛋白的特异性抗体，旨在建立一种检测猪血清中的 ASFV 抗体的竞争 ELISA 方法。

材料与方法

将 K205R 基因与单链抗体 scFv-10 分别与 pET-28a 载体和 pET-30a 载体连接，挑选阳性克隆子进行诱导表达。诱导表达最优条件为终浓度为 1.0 mM IPTG，16℃震荡培养 20 h 后离心收集菌体，反复冻融后超声破碎，收集上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 电泳验证表达后进行 Ni-NTA 亲和层析，获得纯化的 K205R 蛋白和 scFv-10，通过 ELISA 验证二者的特异性结合能力。再将单链抗体 scFv-10 基因经酶切连接到融合 HRP 标签的真核表达载体上，转染至 HEK 293T 细胞，培养 36 h 后离心收集上清，经 WB 验证表达后获得 scFv-10。以融合 HRP 标签的 scFv-10 为 K205R 特异性抗体，建立一种检测猪血清中的 ASFV 抗体竞争性 ELISA 方法。

结果与讨论

以包涵体形式存在的 K205R 蛋白和 scFv-10 蛋白，经变性、复性成功纯化得到了 K205R 蛋白与 scFv-10，二者具有良好的特异性结合能力。将 scFv-10 基因重新连接至带有 HRP 标签的 pMCV-N1 的真核表达载体，成功获得重组质粒。将该质粒转染至 HEK 293T 细胞中进行真核表达，36 h 后收集蛋白，经过 WB 和 ELISA 验证蛋白表达情况，成功获得了带 HRP 标签的 scFv-10。单链抗体在疾病的临床诊断、治疗、预防等方面具有重要作用。本研究获得的 K205R 蛋白与 scFv-10-HRP 蛋白为后续建立竞争 ELISA 检测方法奠定了基础，为后续 ASFV 检测试剂盒的开发、抗病毒研究提供了材料。

主要参考文献

[1] Reis A L，Parkhouse R M E，Penedos A R，et al. . Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus[J]. J Gen Virol ，2007，88：2426-34.

※ 作者简介：龙学琳，在读硕士研究生，研究方向为动物病原微生物。E-mail：xlinlong7872@163.com。
※※ 通讯作者：杨鑫，副教授，博士生导师，研究方向为动物病原微生物。E-mail：yangxin0822@163.com。

G5 型猪 A 群轮状病毒 VP2-VP6-VP7 VLPs 的构建及免疫原性研究

田明月※，黄思宇，张兰，龙学琳，赵丽均，侯承尧，杨鑫※※
（四川大学生命科学学院，动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室，四川成都 610064）

引言

猪轮状病毒病是由猪轮状病毒（Porcine rotavirus，PoRV）引起的一种以急性腹泻为特征的急性肠道传染病，会引起猪腹泻、呕吐、死亡，从而造成严重的经济损失。幼龄动物易感，随着年龄的增长，动物对该病的易感性会降低[1]。病毒样颗粒（Virus-Like Particles，VLPs）疫苗成为如今疫苗研发的方向之一。本研究针对当前我国猪场流行的 G5 型猪轮状病毒，构建 VP2、VP6 和 VP7 三种结构蛋白共同表达的 VLPs 疫苗，并评价其免疫原性。

材料与方法

本研究以 G5 型 NX 毒株为研究对象，扩增出 VP2、VP6 和 VP7 三种结构蛋白基因，通过昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达 VP2、VP6 和 VP7 蛋白，以共感染的方式组装病毒样颗粒，组装 VP2-VP6-VP7 VLPs。通过皮下注射途径，将上述制备的 VLPs 免疫小鼠。同时以商品化弱毒活疫苗和 sf9 细胞培养上清作为疫苗对照组和阴性对照组分别免疫小鼠。使用 ELISA 检测首次免疫后第 7、14、21、28 天小鼠体内 PoRV 特异性抗体水平，以及首次免疫后第 14、28 天小鼠体内 IL-4 和 IFN-γ 细胞因子水平。使用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测攻毒后小鼠肛拭子中 PoRV 核酸拷贝数。

结果与讨论

通过在昆虫细胞-杆状病毒表达系统共表达 VP2、VP6 和 VP7 这三种结构蛋白，SDS-PAGE 和 Western Blot 检测分析得到 VP2 条带约为 98KDa，VP6 条带约为 43 KDa，VP7 条带约为 34 KDa。成功制备了携带 G5 型猪 A 群轮状病毒 VP2、VP6 和 VP7 三种结构蛋白的病毒样颗粒（VP2-VP6-VP7 VLPs）。小鼠免疫试验结果显示：首次免疫后的第 7 天和第 14 天，VLPs 免疫组诱导机体产生的 PoRV 特异性抗体水平显著高于阴性对照组和疫苗对照组（$P < 0.01$）。VLPs 免疫组刺激机体产生 IL-4 和 IFN-γ 细胞因子水平显著高于阴性对照组和疫苗对照组（$P < 0.01$），并且与 IL-4 相比，VLPs 免疫组能更有效地诱导机体产生 IFN-γ。在 PoRV 攻毒后的第 2、4、8 天，VLPs 免疫组中 PoRV 核酸拷贝数显著低于阴性对照组（$P < 0.01$）。在攻毒后的第 6、8、10 天，VLPs 免疫组中的平均 PoRV 核酸拷贝数低于疫苗对照组，均为小鼠提供了 100%的保护。综上所述，本研究制备的 VLPs 具有良好的免疫原性，为猪轮状病毒的防控提供了新的技术支撑。

主要参考文献

[1] Parashar U D，Gibson C J，Bresee J S，et al.. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. Emerg Infect Dis，2006，12：304-6.

※ 作者简介：田明月，在读硕士研究生，研究方向为动物病原微生物。E-mail：351656130@qq.com。
※※ 通讯作者：杨鑫，副教授，博士生导师，研究方向为动物病原微生物学。E-mail：yangxin0822@163.com。

马链球菌兽疫亚种 SclE 蛋白原核表达及其免疫效力评价

黄云飞[1, 2]，徐宇萌[1]，郭　政[1]，李亚娟[1, 2]，邓静飞[1]，何颍欣[1]，付　强[1, 2※※]
（1 佛山科学技术学院，广东佛山 528225；2 佛山佛科院动物医院有限公司，广东佛山 528225）

【目的】探究马链球菌兽疫亚种（*Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*，SEZ）表面蛋白 SclE 的免疫效力，为 SEZ 引起的链球菌病的预防提供新的理论依据。

【方法】采用 PCR 扩增 SEZ 的 *SclE* 基因，再将该片段克隆进原核表达 pCold I 载体上，然后转化大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞，经 IPTG 诱导表达后以 SDS-PAGE 进行分析鉴定，获得的重组蛋白 SclE（rSclE）（100 μg/mL，0.5 mL）以腹腔注射的形式免疫 BALB/c 小鼠（n=10，一免、二免的周期均为 14 d）。一免、二免 14 d 后收集血清，通过 ELISA 和 Western blotting 检测抗体水平和特异性。二免后进行免疫保护试验，并对攻毒后小鼠的肝、脾、肺、肾进行细菌载量检测和病理组织学观察。

【结果】SDS-PAGE 检测到大小约为 93 kD 的蛋白表达，与 SclE 的理论分子量大小一致；Western blotting 检测显示，表达所得重组蛋白能与 SEZ 阳性对照组小鼠血清发生特异性结合，表明其具有良好的反应原性；通过上述试验表明本研究成功表达 rSclE。ELISA 检测显示，二免后小鼠血清中特异性抗体滴度与一免后相比均有显著提升，且可诱导小鼠产生高滴度的 IgG，其中 IgG1 抗体水平显著高于 IgG2a（0.436±0.031 vs 0.161±0.009，P<0.05），表明 rSclE 诱导的抗体亚型以 IgG1 为主；rSclE 免疫小鼠可显著抑制 SEZ 在各脏器中的增殖能力（P<0.05），肝脏、脾脏出血及炎性细胞浸润的症状得到改善，肺脏、肾脏出血等病理损伤减轻；在小鼠免疫攻毒保护实验中保护 70%的小鼠免受致死剂量 SEZ 毒株的攻击。

【结论】本研究成功表达获得的 rSclE 且能诱导小鼠产生 SclE 特异性的抗体，且具有较好的保护效果，为 rSclE 作为一种 SEZ 潜在的疫苗候选抗原提供了理论依据。

基金项目：国家自然科学基金项目（31872443）；佛山市高层次人才及岭南学者科研启动项目（CGZ07001）；广东省基础与应用基础研究基金项目（2022A1515140052）；佛山市科技创新项目（2020001004909）。
※※ 通讯作者：付强（1983-），https：//orcid.org/0000-0001-7136-5849，教授，主要从事动物分子免疫学研究，E-mail：fuqiang@fosu.edu.cn。

PEDV 感染通过激活 EGFR 调控 NHE3 活性的机制研究

张依玲※，钟 意，宋振辉※※
（西南大学动物医学院，重庆 402460）

引言

猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）属于猪肠道致病性冠状病毒（CoV），是猪流行性腹泻（Porcine epidemic diarrhea，PED）的病原，可引起猪高死亡率的急性、高传染性的肠道传染病。该病可引起各年龄段的猪发病，对新生仔猪危害最大，年龄较大的猪症状较轻，临床上表现为严重急性腹泻、呕吐、脱水和水样稀粪，哺乳仔猪死亡率可高达 100%。该病主要的病理变化为小肠肿胀，肠壁薄且透明，肠绒毛明显萎缩或消失，最终极度脱水、营养不良导致死亡，严重威胁着全球养猪业的健康发展。近年来，由于不断有新的 PEDV 流行株出现，传统疫苗免疫未能提供预期的防控效果，该病仍在大规模流行，给养猪业带来惨重损失。因此，阐明 PEDV 引发腹泻的病因和致病机制，可为防控猪流行性腹泻提供更有效的途径。

材料与方法

研究材料：本研究中的 PEDV-LJX 株由中国农业科学院兰州兽医研究所刘光亮研究员惠赠，TGEV Miller 株由本实验室保存；非洲绿猴肾细胞（VERO）、猪睾丸细胞（ST）、猪小肠上皮细胞（IPEC-J2）均由实验室冻存；3 日龄仔猪购自规模化养殖场。

研究方法：首先建立 PEDV 感染仔猪模型，给仔猪灌服 PEDV 感染的小肠组织研磨液，待出现特征性病变后剖检仔猪并鉴定；制备肠道组织石蜡切片，通过 HE 染色观察仔猪肠黏膜组织病理变化；利用免疫组化和免疫荧光检测 PEDV 感染仔猪肠道 NHE3 分布；使用 Ca^{2+}螯合法提取肠道组织中新鲜分离的小肠上皮细胞，Western-blot 测定组织 NHE3 蛋白相对含量；PEDV-LJX 感染 IPEC-J2 细胞，Western-blot 检测细胞水平 NHE3 总蛋白及膜蛋白变化，RT-qPCR 检测细胞水平 NHE3 mRNA 变化。

再用 PEDV-LJX 感染 IPEC-J2 细胞，Western-blot 检测不同时间点 EGFR 磷酸化水平；通过 EGFR 激活剂 EGF 和抑制剂 AG1478 调控 IPEC-J2 细胞中 EGFR 活性后感染 PEDV，Western-blot 检测 EGFR 磷酸化水平、PEDV N 蛋白表达，TCID50 检测病毒滴度；构建 PEDV S1 和 EGFR 胞外区真核表达载体，共转染 HEK 293T 细胞，使用免疫共沉淀检测两者之间是否存在相互作用关系。

验证上述步骤后，再通过 EGFR 激活剂 EGF 和抑制剂 AG1478 调控 EGFR 活性，Western-blot 检测 NHE3 总蛋白和膜蛋白变化；复苏并鉴定重组表达质粒 pEGFP-NHE3，转染 IPEC-J2 细胞后荧光显微镜观察荧光蛋白的表达；调控 EGFR 活性后通过荧光恢复漂白技术检测质膜上 NHE3 流动性变化，分析实时荧光恢复率和动态分数结果等。

PEDV 破坏小肠上皮细胞的吸收功能，抑制 NHE3 的表达和活性，引起仔猪腹泻脱水为依据，以“EGFR 参与 PEDV 的入侵和 NHE3 活性调控”为切入点，探讨 PEDV 感染小肠上皮细胞后，仔猪肠道中 NHE3 的表达变化，确证 EGFR 在 PEDV 感染中的作用，以及 EGFR 对 NHE3 的活性调控机理，研究 PEDV 通过 EGFR/ERK 信号通路对 NHE3 的活性调控机制，为揭示 NHE3 参与的 PEDV 致仔猪腹泻机制提供新见解。

※ 作者简介：张依玲，硕士研究生，研究方向为动物微生物及免疫学。E-mail：302744520@qq.com
※※ 通讯作者：宋振辉，教授，硕士生导师，研究方向为动物微生物及免疫学。E-mail：szh7678@swu.cn

结果与讨论

1、PEDV 感染会引起新生仔猪空肠和回肠中 NHE3 分布减少和表达下调。

2、PEDV 感染能迅速诱导 EGFR 的活化，并通过 S1 蛋白与 EGFR 胞外区互作，引起 EGFR 激活促进了 PEDV 的增殖。

3、EGFR 可调控 NHE3 的活性，当 EGFR 活性受到抑制时，NHE3 的蛋白水平和流动性会相对上调。

4、EGFR/ERK 信号通路参与了 PEDV 感染对 NHE3 的调控，PEDV 感染情况下 EGFR 能负反馈调节 NHE3 的活性。

综上所述，EGFR 可作为受体之一参与 PEDV 入侵肠上皮细胞，并且 PEDV 感染能通过激活 EGFR 调控 NHE3 的表达下降以及质膜上 NHE3 的流动性减弱，最终引起 NHE3 活性降低。本研究初步表明 PEDV 感染通过 EGFR 调控 NHE3 活性的机制在于：EGFR 可作为 PEDV 的受体被激活，肠上皮细胞中 EGFR 的水平可影响 PEDV 的感染，并且激活的 EGFR 调控胞内相关信号通路，调节 NHE3 的表达和流动性，影响质膜上 NHE3 的活性。肠上皮细胞中 NHE3 水平的低表达可能是导致新生仔猪感染 PEDV 诱发腹泻的关键因素。这项研究结果可能有助于通过为新生仔猪饲喂 EGFR 抑制剂来开发抗 PEDV 疗法。

PEDV 作为肠道致病冠状病毒家族的成员，对我国养猪业造成了严重的危害。新生仔猪对 PEDV 相对易感，80%~100%的小猪在感染数日内死亡，是仔猪早期腹泻和死亡的重要病原，也是我国目前除非洲猪瘟以外最难防控的猪病之一。PEDV 的主要感染部位是仔猪肠上皮细胞，可造成肠道细胞功能障碍，水盐代谢相关通道蛋白异常表达，导致肠道物质吸收和分泌间的平衡被破坏，造成水和电解液流失，进而引起呕吐、食欲降低和吸收障碍性腹泻的发生。严重的腹泻与脱水往往是导致新生仔猪死亡的关键因素，钠氢交换体 NHE3 是介导肠内 Na^+ /H^+吸收的最重要的跨膜转运蛋白之一，NHE3 的活性状态与腹泻的发生密切相关。

本实验室前期研究表明，特异性抑制猪小肠上皮细胞 NHE3 的活性可导致仔猪出现严重腹泻，其症状与 PEDV 致病相似，因此 NHE3 可能在 PEDV 感染致仔猪腹泻过程中发挥重要作用。已有研究表明，表皮生长因子受体 EGFR 可介导 PEDV 的感染过程，但是否参与 PEDV 感染调控 NHE3 活性机制还未见报道。基于此，本研究以新生仔猪和猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 为感染模型，探讨 PEDV 感染小肠上皮细胞后，仔猪肠道中 NHE3 的表达变化，解析 EGFR 在 PEDV 感染中的作用，以及生理情况下 EGFR 对 NHE3 活性的调控机理，进一步研究了 EGFR/ERK 信号通路在 PEDV 感染对 NHE3 的活性调控中的作用，揭示了 PEDV 感染通过 EGFR 介导的信号通路调控 NHE3 活性的机制，为防治 PEDV 腹泻作用靶点提供了新参考。

主要参考文献

[1] Alvarez J，Sarradell J，Morrison R，et al. Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs[J]. PLoS One，2015，10（3）：e120532.

[2] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus： An emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. Virol J，2015，12：193.

[3] Chen X，Zhang X X，Li C，et al. Epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus among Chinese pig populations： A meta-analysis[J]. Microb Pathog，2019，129：43- 49.

[4] Wang X M，Niu B B，Yan H，et al. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010[J]. Arch Virol，2013，158（12）：2487-2494.

[5] Wang Z，Li X，Shang Y，et al. Rapid differentiation of PEDV wild-type strains and classical attenuated vaccine strains by fluorescent probe-based reverse transcription recombinase polymerase amplification assay[J]. BMC Vet Res，2020，16（1）：208.

TGEV N 抑制 NHE3 活性诱导仔猪 Na+失衡性腹泻的机制研究

牛铮※，孙志伟，宋振辉※※
（西南大学动物医学院，重庆 402460）

引言

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）引起的一种以仔猪严重腹泻、呕吐和脱水为临床症状的急性、高度接触性肠道传染病。TGEV 对两周龄以内的仔猪有极高的致死率，给养猪业带来极大的危害，但其致腹泻病因目前尚未完全阐明。正常情况下，水在肠腔内大部分是通过渗透作用被吸收，尤其是 Na^+吸收所形成的渗透梯度是水吸收的主要动力，而致泻物质作用于肠道时，会改变离子通道和转运体的表达与活性，从而打破吸收和分泌间的平衡，造成大量的水电解质丢失，进而使肠腔渗透压升高，水被动进入肠腔，最终引发腹泻。实验室前期研究表明，TGEV 感染会导致 Na^+/H^+交换体 3（NHE3）的活性降低，并可促进仔猪腹泻，但其具体作用机制尚不清楚。

材料与方法

本研究首先通过动物试验确证了 NHE3 在仔猪腹泻中具有重要作用，继而阐明了 TGEV 感染 IPEC-J2 细胞可导致细胞质膜 NHE3 数量减少及 Na^+/H^+交换活性降低。试验通过 MTT 法筛选得到 Tenapanor 在 IPEC-J2 细胞中的最大无毒浓度，通过 RT-qPCR、Western blot 与免疫荧光等方法检测了 NHE3 的表达情况，并利用火焰原子吸收法与 pH 荧光探针法检测了细胞内外液 Na+浓度及单位时间内 H^+的交换情况。将构建得到的 TGEV N 与 NHE3 的蛋白模型进行对接以发现互作位点，并基于互作位点利用计算机辅助筛选技术筛选出互作抑制剂伊立替康。细胞试验发现，4 μg/mL 的伊立替康可显著逆转 TGEV 感染导致的细胞膜 NHE3 的减少情况；动物试验表明，在对感染 TGEV 的仔猪饲喂伊立替康后，仔猪腹泻得到缓解，且剖检后无明显异常。

结果与讨论

1. NHE3 在仔猪腹泻中的作用探究：成功构建了 TGEV 感染及肠道 NHE3 抑制（Tenapanor）仔猪模型，且 TGEV 感染仔猪与肠道 NHE3 抑制仔猪均发生了腹泻，剖检后可观察到肠腔变薄、胀气等现象；TGEV 感染及 Tenapanor 灌服仔猪均出现肠绒毛数量减少、长度变短等病变。且试验结果表明，两试验组肠 NHE3 蛋白表达量减少。利用转录组学方法证明， TGEV 感染后 NHEs 家族中绝大多数成员表达均出现下降，而 NHE3 作为肠道中主要表达的 NHEs 成员，其在腹泻中的重要作用被证明。

2. TGEV 感染小肠上皮细胞对 NHE3 数量及活性的影响：发现 TGEV 可下调 NHE3 的表达，且下调幅度随时间推移逐渐增大；证实了 TGEV 感染可影响 IPEC-J2 细胞对 Na^+的吸收与 H^+交换，初步证明 TGEV 感染会影响 NHE3 的活性。

3. TGEV N 蛋白调控 NHE3 活性的机制研究：利用荧光共定位及 Co-IP 分别在组织与细胞水平确定了 TGEV N 与 NHE3 存在互作关系，且二者的互作可能位于内质网；利用 TGEV N 过表达及干扰质粒进行试验后发现，TGEV N 蛋白在 TGEV 导致的 NHE3 总/膜蛋白表达下调中起到了重要作用，且可影响细胞内外 Na^+的交换。

4. 针对 TGEV N 蛋白与 NHE3 互作域的小分子抑制剂筛选及效果验证：构建了 TGEV N 与 NHE3 的蛋白模型，并基于对接发现的互作位点成功筛选出互作抑制剂伊立替康；细胞试验表明，4

μg/mL 的伊立替康可以显著逆转 TGEV 感染导致的细胞膜 NHE3 减少；伊立替康在作为治疗药物可有效缓解 TGEV 感染造成的腹泻。

讨论

NHE3（SLC9A3）负责细胞内水和 Na^+的吸收及内环境 pH 稳态，是调节肠道内环境稳态的重要通道蛋白。本实验室前期研究结果也表明，TGEV 感染猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 后会下调 NHE3 的表达，但该结果是否能准确表达宿主感染 TGEV 后的情况尚无定论。TGEV 感染会在体内外诱导内质网应激并触发了未折叠蛋白质反应（unfolded protein response，UPR）。而 NHE3 除了在产生阶段经由内质网合成，也会在质膜-胞内循环过程中被内置网重加工。因此本研究推断，二者在内质网发生相互作用而影响 NHE3 再加工，进而减少向质膜上转移是导致肠上皮细胞 Na^+/H^+交换失衡的重要原因，但仍需后续研究证明。

主要参考文献

[1] LAUDE H，RASSCHAERT D，DELMAS B，etal. Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus[J/OL]. Veterinary Microbiology，1990，23（1-4）： 147-154. DOI：10.1016/0378-1135（90）90144-K.

[2] KIM B，CHAE C. In situ hybridization for the detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs and comparison with other methods[J]. Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire，2001，65（1）：33-37.

[3] CHAE C，KIM O，CHOI C，etal. Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs[J/OL]. Veterinary Record，2000，147（21）： 606-608. DOI：10.1136/vr.147.21.606.

[4] DOYLE L P，HUTCHINGS L M. A transmissible gastroenteritis in pigs[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association，1946，108： 257-259.

miR-223-3p 靶向 NLRP3 调节马链球菌兽疫亚种炎症反应的研究

李亚娟※，李国潮，冯佩然，余靖宇，李 舜，黄云飞，付 强※※
（佛山科学技术学院生命与工程学院，广东佛山 528225）

引言

马链球菌兽疫亚种（*Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*，SEZ）是一种传染性强、致死率高的重要细菌性病原体，能引发猪的脑膜炎、心内膜炎和关节炎等病症，严重危害养猪业的健康发展。研究表明，miR-223-3p 可通过抑制 NLRP3、Caspase-1 等炎性小体的活化调节病原体诱导宿主的炎性反应[1-2]。本研究对 miR-223-3p 影响 SEZ 诱导小鼠的炎症反应及分子机制进行分析，旨在为 SEZ 的防控提供新的科学依据。

材料与方法

本研究选取 6 周龄 BALB/c 小鼠分为空白组，SEZ 感染组、NC 组和 mimics 组。空白组腹腔注射 500μL PBS，SEZ 感染组腹腔注射 500μL 1×10^4 CFU SEZ，NC 组经尾静脉注射 *vivo*-jetPEI-NC 复合物，mimics 组经尾静脉注射 *vivo*-jetPEI-mimics 复合物后腹腔注射 500μL 1×10^4 CFU SEZ。收集肺脏、肝脏、脾脏等进行病理组织学检查。体外培养 J774A.1 细胞，分为空白组，SEZ 感染组，mimics 组和 inhibitor 组，空白组不作处理，SEZ 感染组以 MOI=10 进行感染，mimics 组与 inhibitor 组加入转染复合物 6h 后，以 MOI=10 进行 SEZ 感染。感染 48h 后检测巨噬细胞中 NLRP3 相关通路上关键分子的 mRNA 及蛋白表达量。

结果与讨论

SEZ 感染可导致小鼠肺脏、肝脏及脾脏损伤及巨噬细胞浸润，注射 miR-223-3p 模拟物可显著改善 SEZ 感染引起的组织损伤。SEZ 能显著上调巨噬细胞中 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的 mRNA 及蛋白表达量（$P<0.01$），表明 SEZ 可诱导巨噬细胞中 NLRP3/caspase-1 炎症通路的激活。抑制细胞中 miR-223-3p 表达时，上述关键蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）；促进 miR-223-3p 表达时，NLRP3/caspase-1 炎症通路中的关键蛋白表达量显著降低，上清液中 IL-1β 和 IL-18 的含量显著降低（$P<0.05$）。本研究表明 miR-223-3p 可通过靶向 NLRP3 抑制巨噬细胞中 NLRP3/caspase-1 炎症通路，从而改善 SEZ 引起的小鼠炎性损伤，为 SEZ 感染的治疗药物提了供新的靶点。

主要参考文献

[1] Tang H，Lin Y，Huang L，et al. MiR-223-3p Regulates Autophagy and Inflammation by Targeting ATG16L1 in Fusarium solani-Induced Keratitis [J]. Invest Ophthalmol Visual Science，2022，63 （1）：41.

[2] Xia Y，Zhou K，Sun M，et al.The miR-223-3p Regulates Pyroptosis Through NLRP3-Caspase 1-GSDMD Signal Axis in Periodontitis [J]. Inflammation，2021，44 （6）：2531-2542.

※ 作者简介：李亚娟，讲师，研究方向为猪链球菌病防治。E-mail：liyajuan@fosu.edu.cn。
※※ 通讯作者：付强，教授，硕士生导师，研究方向为猪重要传染病防治。E-mail：fuqiang@fosu.edu.cn。

规模化猪场腹泻猪群腹泻相关病毒的检测与分析

张益野[1, 2※]，王子瑄[1, 2]，杨启[1, 2]，庄彤[1, 2]，方六荣[1, 2]，肖少波[1, 2※※]

（1.华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；

2.湖北省生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

仔猪病毒性腹泻是严重危害养猪业的重大疫病，目前引起仔猪腹泻的病毒主要有 4 种：猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus，PEDV）、猪轮状病毒（Porcine rotavirus，PoRV）、猪德尔塔冠状病毒（Porcine deltacoronavirus，PDCoV）和传染性胃肠炎病毒（Transmissible gastroenteritis virus，TGEV）。本研究主要采集我国规模化猪场腹泻仔猪的肠道及肛拭子样品，检测并分析腹泻样品中这 4 种病毒的占比情况，以期为我国规模化猪场仔猪病毒性腹泻的防控提供数据支持。

材料与方法

自 2021 年 9 月至 2023 年 3 月从全国 327 个猪场采集 1030 份仔猪腹泻样品。提取样品总 RNA，通过 RT-PCR 对样品进行 PEDV、PoRV、PDCoV 和 TGEV 四种病原的检测。

结果与讨论

RT-PCR 检测结果显示，1030 份样品中 PEDV、PoRV、PDCoV 及 TGEV 的阳性率分别为 37.77%（389/1030）、18.25%（188/1030）、6.60%（68/1030）和 2.52%（26/1030），其中 PEDV 阳性检出率最高，说明 PEDV 是当前引起仔猪腹泻的主要病毒。对 PEDV、TGEV、PoRV 和 PDCoV 单一感染及混合感染情况进行统计，发现病毒性腹泻样品以单一病毒感染为主，其中 PEDV 单一感染率最高，为 29.32%（302/1030），其次是 PoRV 为 10.97%（113/1030），PDCoV 为 4.47%（33/1030），TGEV 最低，为 0.87%（9/1030）。混合感染主要以 PEDV 与其他病原的混合感染为主，并以 PoRV 和 PEDV 的混合感染率最高，为 6.60%（68/1030），TEGV、PDCoV 与其他病原的混合感染率均低于 2%。三种病原的混合感染检出率较低，PEDV、PoRV、PDCoV 的混合感染率为 0.68%（7/1030），PEDV、PoRV、TGEV 混合感染率为 0.49%（5/1030）。

PEDV 依然是当前猪群病毒性腹泻的最主要病原，PoRV 的感染率较前几年有所上升，而且 PoRV 与其他 3 种病毒混合感染的情况比较多见，这意味着 PoRV 可能是一种条件致病性病原。PDCoV 则呈现地方性流行，TGEV 在全国零星发生，且主要为混合感染。猪场发生病毒性腹泻时不仅会使哺乳仔猪大规模死亡，造成严重经济损失，也会对耐过猪群的生长性能造成严重影响，而良好的生物安全措施是防控病毒性疾病的重要措施，因此病毒的检测与分析可以了解当前病毒流行情况，病原的分布以及季节流行趋势，进而指导猪场制定合理有效的综合防控措施，有效防止疾病的发生和流行。

※ 作者简介：张益野，在读博士研究生，研究方向为动物病毒学、动物疫苗研究。E-mail：852501218@qq.com。

※※ 通讯作者：肖少波，教授，博士生导师，研究方向为动物病毒学。E-mail：vet@mail.hzau.edu.cn。

猪繁殖与呼吸综合征病毒的检测及分离毒株基因特征分析

杜营彬[1,2※]，任天泽[1,2]，姜艺[1,2]，周艳荣[1,2]，肖少波[1,2]，方六荣[1,2※※]

（1. 华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；

2.湖北省生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（Porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS）是影响养猪业发展的重要病毒性传染病，临床上主要表现为妊娠母猪的繁殖障碍及各年龄段猪的呼吸系统症状，其病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus，PRRSV）。近年来，由于PRRSV 基因组的高度变异性以及新流行毒株（PRRSV NADC30-like/NADC34-like 等）的出现，导致PRRSV 在临床上的流行更加复杂。

材料与方法

为了解当前我国 PRRSV 的流行情况，自 2022 年 6 月至 2023 年 3 月采集 1044 份来自全国不同地区的疑似 PRRSV 感染猪的肺脏组织，利用可鉴别检测 PRRSV 经典毒株（1072 bp）、HP-PRRSV 毒株（985 bp）和 NADC30-like 毒株（682 bp）Nsp2 基因的特异性引物进行 RT-PCR 检测，将 PRRSV 阳性的部分组织样品处理后接种猪肺泡巨噬细胞（PAMs）中盲传 3 代后，再接种于 Marc-145 细胞进行病毒的分离。

结果与讨论

RT-PCR 检测结果显示，PRRSV 阳性样品为 311 份，阳性率为 29.8 %（311/1044），其中 NADC30-like 样品为 179 份，占阳性样品的 57.6 %（179/311）；HP-PRRSV 样品为 118 份，占阳性样品的 37.9 %（118/311），并存在 NADC-like 毒株与 HP-PRRSV 毒株混合感染的情况。从临床样品中还检测到少量为 PRRSV 经典毒株阳性，后与所在猪场联系发现这些猪场都用过 PRRSV 的弱毒疫苗。通过 RT-PCR 鉴定和间接免疫荧光试验检测证实成功分离到 4 株 PRRSV 毒株，分别命名为 JX03、HB04、GS05 和 ZJ06。同源性比对分析发现，4 株分离毒株之间 ORF5 基因同源性为 83.3%~88.7 %，其中 JX03 株与高致病性代表毒株 JXA1 ORF5 基因的同源性最高，为 99.4 %；其余 3 株毒株与 NADC30 毒株 ORF5 基因的同源性为 89.2%~90.3 %。根据 ORF5 基因序列建立了遗传进化树，结果显示 JX03 属于 Lineage8.7（HP-PRRSV），其余 3 株病毒均为 Lineage1.9（NADC30-like）。有研究表明，GP5 的第 13 位和 151 位氨基酸可能与病毒的毒力相关，对分离毒株 GP5 的氨基酸序列分析发现，处于 Lineage1.9 分支的 3 株病毒与 NADC30 株相比第 151 位的氨基酸均发生了突变（R151K），并且 HB202223R4 株的第 13 位氨基酸也发生了突变（Q13S）；处于 Lineage8.7 的 JX03 株则与 JXA1 株保持一致（R13 和 R151）。与 NADC30 和 JXA1 相比，分离毒株 GP5 均在 N 端信号肽区域、高变区（HVR1 和 HVR2）存在较大变异，在诱骗表位（27aa~31aa）、中和表位（37aa~41aa）存在少量的氨基酸置换。

通过对临床疑似 PRRSV 感染的样品检测发现，我国当前 PRRSV 流行毒株以 NADC30-like 毒株为主，其次是 HP-PRRSV 毒株，同时存在不同毒株混合感染的现象。对分离毒株 ORF5 基因的同源性比较、遗传进化分析和氨基酸序列比对发现，我国 PRRSV 流行毒株复杂多样，主要流行毒株为 Lineage 1，其次为 Lineage 8，且在 Lineage1 毒株的 GP5 中存在毒力基因相关的重组突变。

※ 作者简介：杜营彬，在读博士研究生，研究方向为猪繁殖与呼吸综合征流行病学，E-mail：dyblky@webmail.hzau.edu.cn。

※※ 通讯作者：方六荣，教授，博士生导师，研究方向为动物病毒学。E-mail：fanglr@mail.hzau.edu.cn。

人工密码子优化有效提高 ASFV 基因的表达水平

王世民[1,2]，向智勇[1]，周磊[1]，盖新娜[1]，郭鑫[1]，张永宁[1]，韩军[1]，杨汉春[1※※]
（1.中国农业大学 动物医学院，北京 100193；2.新疆农业大学 动物医学学院，新疆乌鲁木齐 830052）

引言

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒（Africa swine fever virus，ASFV）引起的一种急性、出血性、高度接触性高致死性传染病，对我国养猪业造成了巨大的经济损失。ASFV 是唯一一种虫媒 dsDNA 病毒，其基因组编码约 160 个病毒蛋白，其中大部分病毒蛋白的生物学功能还不清楚[1]。为了对 ASFV 蛋白开展系统性的生物学功能研究，本课题组以 ASFV 基因组为模板，克隆并构建了 111 个 ASFV 基因真核表达质粒。然而，在质粒表达鉴定过程中发现，大部分 ASFV 基因真核表达质粒在哺乳动物表达系统中表达水平较低或不表达。为此，本研究对 111 个 ASFV 编码基因的表达水平与其密码子偏好性的相关性做了分析，旨在提高 ASFV 基因表达水平，为今后研究 ASFV 编码蛋白的生物学功能奠定基础。

材料与方法

材料：BHK-21 及 293T 细胞，ASFV 基因组等；

方法：PCR、WB、IFA 等。

结果与讨论

在成功构建的 111 个 ASFV 基因真核表达质粒中，有 86 个基因（≥240 bp）的 3’末端融合 myc 标签，有 25 个基因（＜240 bp）的 3’末端融合 EGFP 标签。将构建的真核表达质粒分别转染至 BHK-21 及 293T 细胞，利用 IFA 及 WB 技术对转染质粒的表达情况进行鉴定。同时，利用适应指数（Codon adaptive index，CAI）衡量 ASFV 基因密码子的偏好性，分析各基因的表达水平与其密码子偏好性的相关性。结果表明，25 个 ASFV 基因（＜240 bp）的荧光阳性率为 100%，其 CAI 指数总体介于 0.44~0.74 之间；在 86 个 ASFV 基因（≥240 bp）中，IFA 阳性率为 48.84% （42/86），WB 阳性率为 11.63% （10/86），其 CAI 指数总体介于 0.48~0.69 之间。根据不同的 CAI 指数区间，进一步对 ASFV 基因（≥240 bp）表达情况进行分析。结果显示，CAI 指数介于 0.46~0.50 之间的表达阳性率为 0.00%（0/4）；CAI 指数介于 0.51~0.55 之间的表达阳性率为 47.62%（10/21）；CAI 指数介于 0.56~0.60 之间的表达阳性率为 53.66%（22/41）；CAI 指数介于 0.61~0.65 之间的表达阳性率为 55.56%（10/18）；CAI 指数介于 0.66~0.70 之间的表达阳性率为 0.00%（0/2）。另外，WB 阳性结果的 10 个 ASFV 基因（≥240 bp）中，高表达水平的基因，其 CAI 指数也较高。以上结果表明，不同 ASFV 基因的密码子偏好性与其表达水平有一定的相关性。随后，随机选取 8 个 ASFV 基因进行人工密码子优化，其中 5 个基因的表达量得到了有效提高，成功率为 62.5%。因此，密码子优化手段可作为提高 ASFV 基因表达水平的有效策略。

主要参考文献

[1] Ren J，Li D，Zhu G，et al.Deletion of MGF-110-9L gene from African swine fever virus weakens autophagic degradation of TBK1 as a mechanism for enhancing type I interferon production[J].FASEB j，2023，37（6）：e22934.

※※ 通讯作者：杨汉春，教授，博士生导师，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail：yanghanchun1@cau.edu.cn。

2 株新分离的 NADC34-like PRRSV 重组毒株的基因组比较分析和致病性评估

徐思佳※，孙彦阔，王衡，龚浪，张桂红※※
（华南农业大学兽医学院，广东广州 510642）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（Porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）引起的以种猪繁殖障碍和仔猪、生长育肥猪呼吸道问题为特点，严重危害养猪业的重要病毒性疾病，给全世界的养猪业造成了巨大的经济损失[1]。市场上也有商品化的疫苗以及系统科学的控制措施用于疾病防控。但目前该病流行越来越复杂，仍然是影响养猪业最重要的疾病之一。2017 年以来，NADC34-like PRRSV 在我国多个省份对养猪业产生了重大影响，因此引起了高度关注[2–4]。但是目前关于 NADC34-like PRRSV 毒株的流行特征和致病性的研究尚不明确。因此，本研究对华南地区收集的 2 株 PRRSV 毒株进行基因组分析和致病性评估，为 PRRSV 的预防和控制提供参考。

材料与方法

该试验分别于 2020 年和 2022 年在华南地区同一种猪场收集的血清样品中分离获得两株 PRRSV 毒株。通过高通量测序（MGI 平台）获得毒株全基因组并通过 PCR 验证。采用 IQ-TREE 和 Figtree v1.4.4 软件对病毒序列进行遗传进化分析，采用 RDP4 和 Simplot 3.5.1 软件进行重组分析和验证。利用 UPARSE 7.1 软件对操作分类单元（OTU）进行聚类致病性试验，分为三组：试验组 1（GDHZ109/2021 感染组）8 头、试验组 2（GDHZ109/2021 感染组）8 头以及对照组 3 头，其中试验组每组 5 头仔猪进行病毒接种，其余 3 头仔猪作为易感动物研究其感染情况。

结果与讨论

本研究分离的 2 株 PRRSV 毒株分别命名为 GDHZ109/2020 和 GDYS162/2022。基于 ORF5 基因序列的遗传进化分析结果表明，这两个毒株与 NADC34 毒株聚类，而分别基于全基因组和 NSP2 基因的遗传进化分析结果表明，这两个毒株与 NADC30 毒株为代表的 Lineage1.8 毒株归类到同一分支内。由此推断两个毒株均可能发生重组，随后进行重组分析，结果显示这两种毒株可能都具有复杂的重组模式：在 NADC30、NADC34 和 JXA1 毒株之间发生重组。有许多重组区域几乎相同，但两个毒株之间也有一些差异。进一步探究其致病性，试验结果显示 GDHZ109/2020 在仔猪中表现出比 GDYS162/2022 更高的致病性，试验组 1 死亡 2 头仔猪。呼吸道微生物多样性分析结果表明，感染 PRRSV 后仔猪呼吸道中潜在致病微生物群如肺炎克雷伯氏菌和丹毒丝菌的丰度相对增加。以上这些结果表明，NADC34-like 重组毒株在该养殖场区域流行期间发生了进化且表现出不同的致病性。这突出了对区域流行毒株进行全基因组监测的必要性，因为它们可能在实地的不同时间发生遗传变异。本研究有助于更好地了解目前 PRRSV 的流行特点，为养猪业 PRRSV 的防控提供参考。

主要参考文献

略

※ 作者简介：徐思佳，在读硕士研究生，研究方向为基于高通量测序和生物信息学分析的动物流行病学调查。E-mail：sijiaxu@stu.scau.edu.cn。
※※ 通讯作者：张桂红，教授，博士生导师，研究方向为猪病临床诊断技术及分子生物学研究。E-mail：guihongzh@scau.edu.cn。

猪盖塔病毒的分离鉴定与致病性分析

向昭颖，张凯璇，周磊，盖新娜，张永宁，郭鑫，韩军，杨汉春*
（农业农村部动物流行病学重点实验室，中国农业大学动物医学院，北京 100193）

引言

盖塔病毒（Getah virus，GETV）可导致妊娠母猪繁殖障碍、仔猪出现神经症状，严重者发生死亡。目前，GETV 在中国的流行呈上升趋势，已成为影响养猪业生产的重要病原之一。同时该病毒具有潜在的人畜共患风险，严重威胁着公共卫生安全。本研究从某猪场的临床病料中分离、鉴定出 GETV，并对该分离毒株进行全基因组序列测定、遗传演化分析与致病性分析，以期为阐明 GETV 的部分生物学特性及其致病机制的深入研究奠定基础。

材料与方法

采集发病仔猪的脑、肺组织样品，使用宏病毒组学技术对该临床病料中的病原组成进行预测分析。使用 Vero CCL81 细胞和 BHK-21 细胞进行病毒分离、RT-PCR 检测及透射电镜观察。以毒株 AH9192 为模板设计 13 对引物，利用 RT-PCR 扩增其全长基因组，然后进行测序、拼接和遗传演化分析。在嗜斑纯化过程中发现一株突变毒株，利用多步生长曲线比较了野生型和突变型 GETV 在 Vero CCL81、BHK-21、HT-22、N2a、IPEC-J2 细胞上的增殖差异。将野生毒株和突变毒株分别颅内接种 3 日龄小鼠，通过临床症状观察、qRT-PCR 检测不同组织器官的病毒载量、IFA 检测血清抗体水平，分析野生毒和突变毒对小鼠的致病性差异。

结果与讨论

宏病毒组学结果显示，引起疫情的病原为 GETV，无其他病毒或细菌混合感染。将组织研磨上清接种 Vero CCL81、BHK-21 细胞 24 h 后，细胞表现出变圆、脱落等明显细胞病变，RT-PCR 及测序结果表明成功分离到一株 GETV，将其命名为 GETV NM2022。透射电镜观察病毒粒子形态，发现其呈球形、直径为 70 nm。序列测定及遗传演化分析结果表明，该毒株全长为 11689 nt，不包括 3’端的 poly（A）尾；处于进化分支 Group III，与 GenBank 中 71 株 GETV 的核苷酸同源性在 94.1%~99.76%之间。多步生长曲线显示，突变毒与野生毒在 Vero 细胞上的增殖特性无差异；相较野生毒株，突变毒株在 BHK 细胞上增殖缓慢，在 N2a 细胞上的增殖水平显著降低，在 HT-22 和 IPEC 细胞上病毒滴度达到高峰后的下降速度显著加快。GETV 对小鼠的致病性试验结果显示，野生型 GETV 感染小鼠呈现出高死亡率、多组织器官高病毒载量、血清抗体 IFA 检测为强阳性，而突变毒株感染小鼠后不致死、组织器官病毒载量低、血清抗体 IFA 检测为阳性。

主要参考文献

[1] YANG T，LI R，HU Y，et al. An outbreak of Getah virus infection among pigs in China，2017 [J]. Transbound Emerg Dis，2018，65（3）： 632-7.

非洲猪瘟病毒 p30 蛋白线性抗原表位的鉴定

单朝萌※，于思慧，杨菁菁，刘伊宁，吴长德，文雪霞※※
（沈阳农业大学动物科学与医学学院/重要家畜疫病研究教育部重点实验室/农业农村部反刍动物重大疫病防控重点实验室（东部），辽宁沈阳 110866）

引言

非洲猪瘟（ASF）的持续流行严重威胁全球养猪业的健康发展。该病目前缺乏可应用于临床的疫苗和药物，早期的精准检测对于 ASF 的有效防控至关重要[1]。p30 蛋白在病毒感染早期表达，免疫原性较好且诱导产生抗体水平较高，这些特性使其成为较为理想的非洲猪瘟病毒（ASFV）检测靶点之一[2]。因此，本研究制备可稳定分泌抗 ASFV p30 蛋白的单克隆抗体，并进一步对单抗特性及识别的抗原表位进行鉴定，旨在为检测方法的开发提供材料和基础，为病毒致病机理和免疫机制等基础研究提供工具。

材料与方法

原核表达的 p30 重组蛋白经亲和层析纯化后，免疫小鼠。利用常规技术进行细胞融合筛选单克隆抗体，采用 Western blotting 和间接免疫荧光对单克隆抗体特性进行鉴定，并通过截短表达鉴定其识别的抗原表位。在此基础上，进一步利用 MEGA-X 分析抗原表位在不同毒株中的保守性。

结果与讨论

以原核表达的重组 p30 蛋白（序列来源于 Pig/HLJ/2018 毒株）为免疫原，制备了两株可稳定分泌抗 ASFV p30 蛋白的单克隆抗体细胞株 4F2 和 7F3。利用 Western blotting 和间接免疫荧光技术鉴定两株单克隆抗体均能识别 ASFV 感染细胞中的 p30 蛋白。亚型鉴定结果显示，4F2 和 7F3 的重链分别为 IgG1 和 IgG2b，轻链均为 κ 链。随后，通过原核表达一系列截短 p30 蛋白鉴定 4F2 和 7F3 识别的抗原表位。经 5 轮截短和 Western blotting 试验最终确定 4F2 和 7F3 识别的最短抗原表位分别为 ^{118}SFETL^{122} 和 ^{76}EHQAQEEWNMILHV^{89}。在此基础上，进一步分析两个抗原表位在不同毒株 p30 蛋白序列中的保守性。序列比对结果表明，GenBank 数据库中所有 p30 蛋白序列均包含 ^{118}SFETL^{122} ，73.99 % 的 p30 蛋白序列含有 ^{76}EHQAQEEWNMILHV^{89} 表位，而其余 26.01 % 序列在第 77 位氨基酸处为谷氨酰胺（Q）。通过突变试验证明第 77 位组氨酸（H）替换为 Q 影响 7F3 与抗原表位的结合，说明该处氨基酸对于 7F3 识别抗原表位至关重要。对包含 ^{76}EQQAQEEWNMILHV^{89} 序列的 p30 蛋白序列进行分析发现，其主要来源于包括肯尼亚、赞比亚、坦桑尼亚、南非、乌干达、津巴布韦、莫桑比克、刚果、布隆迪和马拉维[3]在内的非洲地区，而在非洲以外的地区，目前尚未发现此序列的报道。因此，本研究获得的两株单克隆抗体及其抗原表位可联合用于此类毒株的鉴别诊断，同时也可作为病毒基础研究的工具。

主要参考文献

[1] Wang J，Shi X J，Sun H W，et al. Insights into African swine fever virus immunoevasion strategies [J]. Journal of Integrative Agriculture，2020，19，11-22.

[2] Gimenez-Lirola L G，Mur L，Rivera B，et al. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 （p30） dual matrix indirect ELISA [J]. PLoS One，2016，11，e0161230.

[3] Hakizimana J N，Ntirandekura J B，Yona C，et al. Complete genome analysis of African swine fever virus responsible for outbreaks in domestic pigs in 2018 in Burundi and 2019 in Malawi [J]. Tropical Animal Health and Production，2021，53，438.

※作者简介：单朝萌，在读硕士研究生，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail：Szmmmm22@163.com。
※※通讯作者：文雪霞，讲师，硕士生导师，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。E-mail：wenxuexia123@syau.edu.cn。

猪繁殖与呼吸综合征不同疫苗组合的免疫程序评估

任文慧[1, 2※]，阮胜男[1, 2]，何启盖[1, 2, 3※※]，江云波[1, 2※※]
（1.华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070；2.农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，
湖北武汉 430070；3.生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是由猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）感染，主要引起母猪繁殖系统和保育猪呼吸系统障碍的疾病。该病广泛流行于各地猪场，病程长且会导致机体免疫抑制，给猪场带来巨大经济损失。目前临床上对 PRRSV 疫苗的使用及免疫程序的制定普遍较为混乱，且各种免疫程序对于重组 PRRSV 毒株的保护效果尚不明确。因此，本研究基于 PRRSV 经典、高致病性和重组毒株对当前临床 PRRSV 疫苗不同免疫方案进行免疫评估，对其免疫程序的交叉保护效果进行评价，以评估和筛选最优的免疫程序。

材料与方法

本研究从猪场内选取 180 头 PRRSV 抗原和抗体双阴性长白二元母猪，基于 PRRSV 经典株弱毒疫苗（CH-1R 株）和 PRRSV 经典株灭活疫苗（CH-1a 株）设置三种免疫组合，第一组首次免疫 PRRSV 弱毒疫苗，28d 后加强免疫 PRRSV 灭活疫苗（MLV+INV 组）；第二组两次免疫弱毒疫苗（MLV+MLV 组）；第三组两次免疫灭活疫苗（INV+INV 组）。疫苗首次免疫后 14、28、42、56 d 采集猪血清分别进行 PRRSV ELISA（N 蛋白）和中和试验（经典毒株、高致病性毒株和重组毒株），最后对试验效果进行临床评价。

结果与讨论

ELISA 结果显示，MLV+INV 免疫组在免疫 56 d 时 ELISA 检测 S/P 值极显著高于 MLV+MLV 组和 INV+INV 组（$P<0.001$）。中和试验结果表明，不同免疫组合的血清样品对重组毒株的中和抗体滴度均低于 1∶4，不同疫苗组合均未能抵御重组毒株。但针对经典毒株和高致病性毒株的交叉保护结果显示，免疫 56 d 时 MLV+INV 组中和抗体水平极显著高于其他两组（$P<0.001$），其中对经典毒株的中和抗体滴度达 1∶4 的样品比率为 100%，达 1∶8 的样品比率超过 70%，对高致病性毒株的中和抗体滴度高于 1∶4 的样品比率超过 95%，高于 1∶8 的比率超过 40%。另外两个免疫组对经典毒株和高致病性毒株的中和抗体滴度不低于 1∶4 的样品比率小于 20%，不低于 1∶8 的样品比率为 0。各组试验猪分娩后头胎的活仔数、断奶仔猪数和窝均总仔数之间差异不显著（$P>0.05$）。以上研究表明，PRRSV 疫苗免疫程序 MLV+INV 组的免疫效果显著优于 MLV+MLV 组和 INV+INV 组。

主要参考文献：

[1] Bian T，Sun Y，Hao M，et al. A recombinant type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus between NADC30-like and a MLV-like：Genetic characterization and pathogenicity for piglets [J]. Infect Genet Evol，2017，54，279-286.
[2] Lopez OJ，Oliveira MF，Garcia EA，et al. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus（PRRSV）infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent [J]. Clin Vaccine Immunol，2007，14，269-275.

※ 作者简介：任文慧，硕士研究生，研究方向为动物传染病的研究与防控。E-mail：2753715898@qq.com。
※※ 通讯作者：何启盖，教授，博士生导师，研究方向为动物传染病的研究与防控。E-mail：he628@mail.hzau.edu.cn。
通讯作者：江云波，副教授，硕士生导师，研究方向为动物传染病的研究与防控。E-mail：502031949@qq.com。

伪狂犬病毒双重微滴式数字 PCR 检测方法的建立

田梓翰[1, 2, 3※]，刘小惠[1, 2, 3]，何启盖[1, 2, 3※※]

（1.华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070；2.农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；3.生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

伪狂犬病（Pseudorabies，PR）也称为奥耶斯基氏病（Aujeszky's disease，AD），是由伪狂犬病毒（Pseudorabies virus，PRV）引起的一种高度传染性的疾病。PRV 可感染各种哺乳动物，主要侵害宿主的中枢神经系统，除猪以外其他哺乳动物皆表现为致死性感染[1]。2011 年后，随着我国 PRV 变异株的出现，基于经典毒株开发的 Bartha-K61 等疫苗已不能有效地抵御新型变异毒株的感染[2]，且传统的病原学检测和血清学检测工具在 PR 早期诊断和检测 PRV 潜伏感染方面存在着不足，开发一种新型的、敏感度更高的分子生物学检测方法具有重要意义。

本研究利用 ddPCR 平台，克服传统分子生物学检测方法对抑制物不耐受、受扩增动力学影响大、定量依赖于外部标准等缺点，建立一种敏感度更高、复现性更好、方法适用性更广的 PRV 分子生物学检测方法，旨在提供可靠的 PRV 早期检测和 PRV 潜伏感染检测方法，为 PRV 核酸标准物质的研制提供技术支持，从而服务于我国的 PR 净化工作。

材料与方法

本研究根据 PRV HNX 株基因全长和 PRV Bartha-K61 株缺失片段，根据 gH 与 gE 基因的保守区域设计并合成了 PRV 特异性引物探针组合，并对 ddPCR 反应进行了引物探针浓度、退火温度、退火延伸时间、变性温度、循环次数及升降温速率等一系列优化，通过引入评价微滴簇分离程度的分离系数 k，确定了 PRV-ddPCR 最优的反应条件。

结果与讨论

经过系统性的优化，确定出 PRV-gH/gE-ddPCR 的最优反应条件，引物浓度为 900 nmol/L，探针浓度 gH-Probe 为 50 nmol/L，gE-Probe 为 150 nmol/L。反应程序为：酶热启动 96℃，10 min；变性 96℃，60s；退火延伸，50.7℃，3 min；5 个循环。变性 94℃，60 s；退火延伸 50.7℃，3 min；55 个循环。酶失活 98℃，10 min。最后缓慢降温至 4℃保存。所有步骤的升降温速率皆为 1℃/s，极大减少了 ddPCR 在扩增高 GC 模板时中等振幅微滴的出现。

方法建立后通过动态线性范围检测确定，本方法在 1×10^0 至 1×10^4 copies/μL 之间具有良好的线性相关性（$R^2 > 0.99$）。特异性试验表明，该方法可以区分 PRV 野毒感染动物和 PRV 基因缺失疫苗免疫动物，且与其他猪源病毒无交叉反应，表明该方法特异性强。重复性试验结果表明，该方法在检测低拷贝分析物时组间与组内检测结果的变异系数均小于 5%，表明该方法重复性好。通过无分析物模板（NTC）检测计算出，该方法的 gH 与 gE 基因的空白检测限（Limit of Blank，LOB）分别为 5.22 阳性微滴/反应与 5.45 阳性微滴/反应，最低检测限（Limit of Detection，LOD）分别为 10.60 阳性微滴/反应与 10.92 阳性微滴/反应，为避免出现假阳性和假阴性结果提供了方法保证。

本研究建立的伪狂犬病毒微滴式数字 PCR 检测方法在检测低拷贝数模板的样品和进行分析物绝对定量试验时具有显著优势，可作为当前 PRV 荧光定量 PCR 国家标准的补充，也可为 PRV 核酸标准物质的研制奠定基础，对我国 PRV 的净化工作提供了有力的技术支持。

主要参考文献

略

※ 作者简介：田梓翰，男，在读硕士研究生，研究方向为动物传染病的研究与防控，E-mail:759635501@qq.com

※※ 通讯作者：何启盖，教授，博士生导师，研究方向为猪传染病临床诊断和控制、致病机制、新型疫苗与诊断制剂，E-mail:he628@mail.hzau.edu.cn

河南省猪伪狂犬病毒野毒感染血清学调查及 gE 基因遗传变异分析

王林青[1,2]，赵　丽[3]，陈曦艋[1]，吴少峰[4]，韩莹莹[1]，刘　芳[1]，金　钺[1※※]，陈红英[1※※]
（1.河南农业大学动物医学院，河南郑州 450046；2.郑州师范学院分子生物学郑州市重点实验室，河南郑州 450044；
3.河南牧业经济学院动物医药学院，河南郑州 450046；4.河南农业大学动物科技学院，河南郑州 450046）

本研究对 2020-2021 年河南省 18 个地区 766 个规模化猪场的 25 411 份血清样本进行 gE 抗体检测，结果表明，血清总阳性率为 18.42%，猪场总阳性率为 50.26%。2020 和 2021 年血清样本阳性率分别为 20.32%和 16.69%，表明河南省 PR 疫情仍存在，但呈现下降趋势，且低于解伟涛等[17-18]报道的 2012（38.0%）、2013（31.3%）、2014（42.6%）、2015（53.5%）和 2016 年（43.1%）gE 抗体血清阳性率。此外，2020-2021 年种猪场的血清样本阳性率为 6.21%，不仅远低于同时期屠宰场和商品代养殖场，而且也低于 2014-2016 年河南省成年种猪（53.1%）和后备种猪（27.6%）的血清样本阳性率[18]。表明近年来通过补充阴性后备种猪和自然淘汰阳性种猪，降低了种猪群的带毒率，有利于 PR 的净化。

不同规模猪场的 gE 抗体检测结果发现，阳性率呈现小型＞中型＞大型猪场，这表明规模更大的猪场在 PR 的防治上表现更好，可能是受益于更严格的生物安全措施。2020 年底，国家统计局河南省调查总局发布的统计数据显示，生猪存栏呈现出明显的南＞东＞中＞北＞西趋势。虽然南部和东部的猪群较大，但个别城市血清样本阳性率反而较低，如位于豫东的周口在省内存栏排名第二，抗体阳性率为 7.82%（220/2814），位于豫南的南阳在省内存栏排名第三，gE 抗体阳性率为 10.43%（217/2081）。进一步证实了规模较大的猪场具有更严格的生物安全措施而受益，如良好的硬件设施（猪舍安装空气过滤装置），日常生物安全防护和严格执行科学免疫程序等。据报道 PRV 感染与季节性和区域性相关 [19]。本研究发现，PR 感染高峰期在 2020、2021 年分别是 1～3 月和 4～6 月，而 10～12 月感染较低，符合 PR 在一年四季均能发生但寒冷的冬春季较为多发的特点。2020-2021 年河南省豫东、豫西、豫南、豫北、豫中各区域血清阳性率不一致，表明随着种猪场净化措施的实施，逐步净化策略可以扩大到区域性防治和省内联合净化。

本研究克隆获得了 9 株 PRV 毒株，*gE* 基因遗传进化分析结果显示，大多数来自中国和亚洲的 PRV 毒株处于一个相对独立的分支，亲缘关系较近，与欧美 PRV 毒株亲缘关系相对较远。欧美的 PRV 毒株聚为 Genotype Ⅰ型，而中国和亚洲其他国家的 PRV 毒株聚成 Genotype Ⅱ型。姜平[20]发现新暴发的 PRV 与以前流行的 PRV 毒株相比，在基因和蛋白水平上发生了变异。有研究报道 PRV gE 氨基酸序列的第 48、496 位均插入天冬氨酸（D）[21-22]，而第 496 位氨基酸插入天冬氨酸是 PRV 变异毒株的一个特征[5,17]，这是由 *gE* 基因第 1472—1474 位的碱基插入造成的。在本研究中，Genotype Ⅱ中的毒株除了 Yangsan-1996-South Korea-AY249861 和来自中国的 Fa-1962-Cow-AF403049 外，其他毒株都在 48$^{(25D/2\ no\ insertions)}$ 插入氨基酸，这可能是 PR 在 20 世纪 70-80 年代暴发后亚洲猪群中传播的 PR *gE* 基因的特征。2012 年中国新暴发的 PRV 毒株和以前流行的 PRV 毒株分别组成了 Genotype Ⅱ的两个小簇，Variant PRV 和 Classical PRV。属于 Variant PRV 的 11 株 PRV 变异株有 1 个氨基酸插入位于 497 $^{(11D\ insertion)}$ 和 3 个氨基酸突变分别位于 54$^{(11G→11D)}$、449$^{(11V→10I/1V)}$ 和 512$^{(11G→8S/3G)}$。推测这可能是新暴发的 PRV 变异毒株的特点，也符合中国 PRV 株独立进化导致变异株出现的观点[23-24]。2016-2020 年的湖南省血清学调查分离株中也出现 1 株 PRV 经典株[25]。今后 PRV 是否会恢复为经典毒株，尚需进一步研究。

2020-2021 年间河南省猪场中仍然存在猪伪狂犬病，但呈现下降趋势，近年来通过补充阴性后备种猪和自然淘汰阳性种猪，降低了种猪群的带毒率，有一定成效。本研究分离获得的 9 株 PRV 分离株既有经典株也有变异株，都属于 Genotype Ⅱ型，其中 8 株 PRV 经典株与 Classical PRV 簇内其他毒株相比，于 556$^{(8D→7G/1D)}$ 处存在独特的氨基酸突变。

主要参考文献

略

※※ 通讯作者：金　钺
※※ 通讯作者：陈红英

猪繁殖与呼吸综合征病毒 IgM 抗体 ELISA 检测方法的建立与应用

温平[1, 2, 3※]，李畅[4]，何启盖[1, 2, 3※※]

（1.华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070；2.农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；3.生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070；4.湖北省农业科学院畜牧兽医研究所，湖北武汉 430070）

引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）是全球养猪业面临的最重要的传染病之一。IgM 是机体抗病毒免疫反应中最先产生的抗体，通过 ELISA 检测 IgM 可以达到早期诊断的目的。N 蛋白和 GP5 蛋白是 PRRSV 的主要免疫原性蛋白，可以诱导 IgM 的产生，被广泛应用于开发 ELISA 试剂盒[1]。然而，目前尚无针对 PRRS IgM 的诊断方法。因此，本研究拟建立一种针对 PRRSV IgM 的间接 ELISA 方法。

材料与方法

将本实验室分离的高致病性 PRRSV 毒株 H-1 的 N 蛋白抗原表位串联并命名为 Nm，合成 Nm 蛋白基因并连接到 pGEX-6p-1 载体表达纯化 Nm 蛋白。将 NADC30 毒株 JN654459 的 N 和 GP5 蛋白的氨基酸序列，分别截去跨膜区和信号肽，重组后的 GP5 蛋白命名为 GP5s，合成 GP5s 蛋白基因并连接到 pFastBac1 载体表达纯化 GP5s 蛋白。分别以 Nm 蛋白和 GP5s 蛋白为包被抗原，经 ELISA 条件优化，建立 PRRSV IgM 间接 ELISA，分别为 Nm IgM-ELISA 和 GP5s IgM-ELISA。

结果与讨论

Nm IgM-ELISA 的最佳反应条件为：0.1 μg/孔 Nm 蛋白，于 4℃过夜包被；5% BSA，于 37℃封闭 2h；待检血清稀释 160 倍，于 37℃孵育 1.5h；二抗为 HRP 标记羊抗猪 IgM，按 1∶12000 体积比稀释，于 37℃作用 1h；最后，使用 TMB 室温显色 15min。GP5s IgM-ELISA 的最佳反应条件为：0.05 μg/孔 GP5s 蛋白，于 4℃过夜包被；5% BSA，于 37℃封闭 2h；待检血清稀释 160 倍，于 37℃孵育 1h；二抗为 HRP 标记羊抗猪 IgM，按 1∶10000 体积比稀释，于 37℃作用 1h；最后，使用 TMB 室温显色 10min。结果判定：Nm IgM-ELISA 和 GP5s IgM-ELISA 的阳性临界值分别为 0.38 和 0.49。Nm IgM-ELISA 和 GP5s IgM-ELISA 的重复性良好，与 PEDV、PRV、PCV、ASFV 病原的阳性血清无交叉反应。

对 NADC30 毒株攻毒后不同时期的 198 份猪阳性血清进行抗体检测发现，Nm IgM-ELISA 比 GP5s IgM-ELISA 更适用于 PRRSV IgM 检测。分析不同感染时期的抗体检测水平得出，Nm IgM-ELISA 在感染 7 天即可检测出 IgM 抗体，早于商品试剂盒对 IgG 抗体的检测。使用 Nm IgM-ELISA 和 IgG-ELISA 商品试剂盒检测 182 份临床血清，检测结果表明 Nm IgM-ELISA 临床检测效果良好。并且，相比于 IgG-ELISA 商品试剂盒，Nm IgM-ELISA 可以在感染早期检测 PRRSV 特异性抗体，是一种有前景的早期诊断方法。

主要参考文献

[1] Pan J，Zeng M，Zhao M，et al. Research Progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Front Microbiol，2023，14，1097905.

※ 作者简介：温平，硕士研究生，研究方向为动物传染病的研究与防控。E-mail：3500904010@qq.com。

※※ 通讯作者：何启盖，教授，博士生导师，研究方向为猪传染病临床诊断和控制、致病机制、新型疫苗与诊断制剂。E-mail：he628@mail.hzau.edu.cn。

非洲猪瘟病毒基因Ⅰ型和基因Ⅱ型鉴别荧光 PCR 检测方法的建立与用

吴昊蔚[1※]，于学祥[1]，陈晓雨[1]，何启盖[1, 2, 3※※]

（1.华中农业大学动物医学院，湖北武汉 430070；2.农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室，湖北武汉 430070；3.生猪健康养殖协同创新中心，湖北武汉 430070）

引言

非洲猪瘟（ASF）属于一种急性、高传染性动物疫病。非洲猪瘟病毒（ASFV）共有 24 个基因型，在我国 ASF 毒株流行基因型主要为基因Ⅱ型，但偶有基因Ⅰ型发生的报道[1, 2]。本研究旨在建立一种不用进行基因组测序就能区分出 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型的方法，为 ASFV 的检测及 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型的区分提供一种方便快捷的检测技术。

材料与方法

基于 ASFV MGF505-9R 到 MGF505-10R 区域设计一对引物，建立一种能够同时检测并区分 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型的 SYBR Green Ⅰ荧光 PCR 方法，并对该方法进行条件优化及灵敏性、特异性、敏感性、重复性验证，最后通过对收集的临床样品检测验证该方法。

结果与讨论

本研究基于 ASFV MGF505-9R 到 MGF505-10R 区域设计了一对引物，通过优化该方法的反应体系和条件，建立了一种能够区分 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型的鉴别 SYBR Green Ⅰ荧光 PCR 检测方法。检测结果显示，该方法最低检测下限可达 10 个 $TCID_{50}$/mL，比普通 PCR 方法灵敏度高 10^7-10^9 倍，并且该方法具有良好的线性关系；与其他常见猪源性病原均无交叉反应；两种基因型病毒检测的批内和批间变异系数均小于 1.2%；临床样品检测结果显示 100 份中有 47 份阳性样品，包括 3 份 ASFV 基因Ⅰ型样品和 44 份 ASFV 基因Ⅱ型样品，与世界动物卫生组织（WOAH）推荐的方法和国家标准方法检测结果一致。经大量检测结果表明，截至目前，并未出现 ASFV 基因 MGF505-9R 与 MGF505-10R 之间碱基突变或缺失情况，未来是否发生此区域碱基突变或缺失还不能明确。但该方法针对目前国内出现的 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型情况能够进行短时间内的准确鉴别诊断，具有一定的临床意义，为 ASFV 基因Ⅰ型和基因Ⅱ型的鉴别诊断提供技术储备。

主要参考文献

[1] Sun E，Huang L，Zhang X，et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection [J]. Emerg Microbes Infect，2021a，10，2183-2193.

[2] Sun E，Zhang Z，Wang Z，et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020 [J]. Science China（Life Sciences），2021b，64，752-765.

※ 作者简介：吴昊蔚，在读硕士研究生，研究方向为猪传染病检测方法建立，E-mail：1658499239@qq.com。

※※ 通讯作者：何启盖，教授，博士生导师，研究方向为猪传染病临床诊断和控制、致病机制、新型疫苗与诊断制剂。E-mail：he628@mail.hzau.edu.cn。

其他相关专题

口述报告

血管内皮生长因子 A 在多杀性巴氏杆菌感染致哺乳动物呼吸道上皮通透性增加中的作用

林琳※，杨洁[1]，张大俊[1]，吕庆杰[1]，王斐[1]，刘鹏[1]，王米雪[1]，史聪聪[1]，黄茜[1]，陈焕春[1]，吴斌[1]，彭忠[1※※]

（1.华中农业的大学动物科学技术学院、动物医学院，湖北武汉 430070；2.湖北洪山实验室，湖北武汉 430070）

引言

多杀性巴氏杆菌（*Pasteurella multocida*，PM）是一种重要的人兽共患病原菌，主要经宿主呼吸道致病，其在感染过程中需要突破呼吸道上皮屏障，进而引起感染[1-2]。目前关于 PM 感染引起宿主上呼吸道屏障破坏的机制还鲜见报道。本研究以小鼠、鼠源呼吸道上皮细胞（MLE-12）和人呼吸道上皮细胞（BEAS-2B）作为模型，探讨了 PM 感染对呼吸道上皮屏障功能的影响及致病机制，为深入了解 PM 的感染和致病机理奠定基础。

材料与方法

以小鼠为模型，滴鼻感染 PM-HuN001 株（15 CFU 每只小鼠）后尾静脉注射伊文思蓝（30 mg/kg），作用 40min 后解剖小鼠，分析比较感染组和空白对照组气管和肺脏的染色情况；通过免疫组化、ELISA 等方法检测不同组小鼠中内皮型一氧化氮合酶（eNOS）和血管内皮生长因子（VEGFA）的产生水平；在体外模型中，通过开展 Transwell 渗透性试验、荧光定量 PCR（qPCR）和蛋白质免疫印迹试验（WB）检测正常细胞和缺氧诱导因子 HIF-1α 敲降细胞中紧密连接分子和 VEGFA 的产生水平等一系列试验评估 PM 感染对 MLE-12 和 BEAS-2B 形成屏障功能的影响和机制；最后利用 PM 感染 HIF-1α/VEGFA 通路抑制或激活的小鼠，评估发病率和死亡率。使用 GraphPad Prism8.0 对独立样本进行统计学分析。

结果与讨论

小鼠试验显示，PM 感染显著增加了实验小鼠的呼吸道上皮通透性和小鼠肺脏中 eNOS 及 VEGFA 的产生水平；在 MLE-12 和 BEAS-2B 模型中，PM 感染显著激活 HIF-1α/VEGFA 通路并降低了紧密连接分子和黏附连接分子的表达；细胞干扰试验表明，PM 感染介导的紧密连接分子和黏附连接分子表达水平降低与 HIF-1α/VEGFA 的激活密切相关；小鼠致病性回归试验显示，抑制 HIF-1α/VEGFA 通路可显著降低 PM 感染引起的发病率和死亡率；而激活该通路后，PM 诱导的发病率和死亡率均显著增加。本研究首次证实 PM 感染会引起宿主呼吸道屏障的破坏且这一过程与 HIF-1α/VEGFA 通路的激活密切相关，为深入了解 PM 的感染和致病机理提供理论依据。

主要参考文献

[1] Peng Z，Lin L，Wang X，Chen H，Wu B. 2022. The public health concern of Pasteurella multocida should not be ignored. Lancet Microbe 3：e560.

[2] Wilson BA，Ho M. 2013. Pasteurella multocida： from zoonosis to cellular microbiology. Clin Microbiol Rev 26：631–655.

[3] Zihni C，Mills C，Matter K，Balda MS. 2016. Tight junctions： from simple barriers to multifunctional molecular gates. Nat Rev Mol Cell Biol 17：564–580.

※ 作者简介：林琳，在读硕士研究生，研究方向为动物传染病。E-mail：linlin20201118@163.com。

※※ 通讯作者：彭忠，教授，博士生导师，研究方向为动物传染病。E-mail：pengzhong@mail.hzau.edu.cn。

首农模式猪场生物安全体系防控非洲猪瘟的实践效果

许光勇※
（北京中育种猪有限责任公司，北京 100194）

引言

非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）感染猪引起的一种热性、出血性、高度接触性传染病，感染后猪群可能出现精神萎靡、采食量下降、全身性出血、体温升高以及母猪流产等典型特征。世界动物卫生组织将非洲猪瘟规定为法定报告动物疫病，我国将其列为一类传染病。非洲猪瘟在我国已然存在近四年时间，其对生猪养殖行业发展影响巨大，同时造成了生猪价格的大幅波动。截至目前，没有任何有效的疫苗和药物可以控制非洲猪瘟，生物安全是当前最有效的防控措施。自 2018 年以来，首农集团北京中育种猪公司发挥科技型人才团队优势，积极探索高效规模化猪场生物安全防控措施以阻止非洲猪瘟的传入，经三年养猪现场实践，基本形成了以“五级分区 三级管理 二级洗烘”为标准的首农模式规模化猪场生物安全体系。该体系能够有效地防控以非洲猪瘟为代表的猪场常见重要疾病，为保障首农集团生猪养殖高质量健康发展提供强而有力的技术支撑。

材料与方法

首农模式规模化猪场生物安全体系构建及运行过程中，围绕车辆、人员、物资、猪群和环境五大关键要素开展样品采集工作，分为定期和即时采样两种方式。其中车辆、人员和物资为随时发生随时采样，各个关口、饲养区域、生活办公区域等环境为每周定时采样，猪群根据疾病发生状况灵活安排采样。使用长棉签、纱布擦拭、纱布滚轮等方法开展样品采集操作。采用荧光定量 PCR 检测非洲猪瘟病毒核酸，以评估生物安全体系运行效力。

结果与分析

通过三年猪场实践，形成的以“五级分区 三级管理 二级洗烘”为标准的首农模式规模化猪场生物安全体系。同时组建了一支专业化兽医技术团队，保证了生物安全体系在猪场的高效运转。2020-2022 年，已构建的高级别生物安全体系的各项防控措施在首农集团中育种猪公司下属规模化猪场落地执行。为评估生物安全体系对非洲猪瘟防控效果，按制定计划进行样品采集和检测工作。2020-2022 年共收集样品 120919 份，车辆、人员、物资和环境样品均能检出非洲猪瘟病毒核酸阳性，对比发现车辆是检出非洲猪瘟病毒核酸阳性率最高的环节，猪群均为核酸阴性。结合猪场 2020-2022 年生产成绩及稳定状况，表明生物安全体系的执行能够有效阻止车辆、人员、物资和环境等载体携带外源性非洲猪瘟病毒传入猪场感染猪群，生物安全体系为保障猪群健康发挥重要作用。在生物安全管理团队的精准实施下，首农模式规模化猪场生物安全体系保持高效运行状态，2019-2021 年日常采集与监测样品数量分别为 30779、36826 和 53314 份，主动识别出非洲猪瘟病毒核酸阳性事件达 60、112 和 48 次，通过采取车辆弃用或二次消毒、人员管控、物资再处理、环境消杀、猪群淘汰等关键措施，有效阻止非洲猪瘟病毒传入猪场及在猪群内循环传播，在一定程度上降低猪场疫情的发生，为企业稳定生产经营做出巨大贡献。从生物安全防控五大要素分析发现，车辆仍然是非洲猪瘟携带风险最高的载体，病毒核酸阳性率达 3.52%，其次是人员为 1.39%，物资和环境分别为 0.52%和 0.02%，此结果与现场实际情况较相符合。2020-2022 年，猪群未检出非洲猪瘟病毒核酸阳性，说明猪群没有感染非洲猪瘟病毒，间接表明首农模式猪场生物安全体系在防控非洲猪瘟方面卓有成效。

主要参考文献

[1] 王志亮，吴晓东，王君玮.非洲猪瘟[M].1 版.北京：中国农业出版社，2015.

※ 作者简介：许光勇，博士，研究方向为猪病防控与现代化养猪生产，E-mail：vetbbsc@163.com。

专题报告

四川地区猪圆环病毒 4 型首次检测及遗传进化分析

徐通※，游冬，吴放，朱玲，徐志文※※
（四川农业大学动物医学院，四川成都 611130）

引言

猪圆环病毒（Porcine circovirus，PCV）为圆环病毒科圆环病毒属成员。2019 年前，全球范围鉴定出 3 种猪圆环病毒，其中包括 PCV1、PCV2 和 PCV3[1]。2019 年 4 月，中国学者在湖南省的几只临床疾病严重的猪身上发现了一种与其他圆环病毒有明显亲缘关系的新型圆环病毒，并命名为 PCV4[2]。自 2019 年首次在家猪身上发现 PCV4 以后，国内外开始陆续出现 PCV4 相关报道。目前，该病毒已在我国和韩国多省的猪群中传播，然而 PCV4 在中国西南地区流行情况尚不清楚。本研究对 2021～2022 年西南地区收集的 374 份临床组织样品进行 PCV4 检测和遗传进化分析，旨在了解西南地区 PCV4 的流行态势和发生风险。

材料与方法

针对 PCV4 的全基因组序列，分别设计 1 对特异性检测引物及 3 对特异性全基因组扩增引物。对 2021～2022 年采自中国西南地区 12 个地级市规模化猪场的 374 份临床组织样品进行 PCR 检测，并对检测为阳性的临床组织样品进行全基因组扩增、克隆与遗传进化分析。

结果与讨论

结果显示，在 374 份临床组织样品中，PCV4 阳性样品有 5 份，阳性率为 1.34% （5/374）。12 个地区中有 2 个地区存在 PCV4 感染，表明 PCV4 在中国西南地区存在，但流行率较低。这也是首次在中国西南地区鉴定出 PCV4 基因组。5 份阳性样品中，2 份采自患有严重腹泻的新生仔猪，与 PEDV 共感染；其余 3 份采自患有猪皮炎和肾病综合征断奶仔猪，与 PCV2 共感染。至于 PCV4 单独感染情况及其致病性仍需要进一步研究。对 PCV4 的全基因组进行扩增，成功获得 1 条 PCV4 全基因组序列（SC-GA2022ABTC，登录号为：OP497960），并与 GenBank 数据库中的 41 条 PCV4 参考序列进行比对分析。序列比对结果显示，SC-GA2022ABTC 与参考序列的全基因组核苷酸同源性很高（98.1%-99.7%）。PCV4 参考序列来自不同年份（最早可以追溯到 2012 年），不同地方（中国和韩国多个省）以及不同物种（猪、野猪、牛、狐狸和貉）。这些结果表明 PCV4 基因组较为保守。基于全基因组的系统发育树结果显示，PCV4 序列可分为 3 个基因型（PCV4a、PCV4b 和 PCV4c），SC-GA2022ABTC 属于 PCV4c 基因型。这些数据为中国西南地区 PCV4 的分子流行病学调查及科学防控提供了依据。

主要参考文献

[1] OPRIESSNIG T，KARUPPANNAN A K，CASTRO A，et al. Porcine circoviruses： current status，knowledge gaps and challenges [J]. Virus research，2020，286： 198044.

[2] ZHANG H H，HU W Q，LI J Y，et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4，Hunan province，China [J]. Transboundary and emerging diseases，2020，67（3）： 1057-61.

※ 作者简介：徐通，在读博士研究生，研究方向为动物传染病病原分子生物学。E-mail：934740574@qq.com。
※※ 通讯作者：徐志文，教授，博士生导师 E-mail：abtcxzw@126.com。

猪可食用组织中非甾体抗炎药的残留检测

孙志轩※，顾雅妮，李苗，李建成※※
（中国农业大学动物医学院，北京 100193）

引言

非甾体抗炎药（Non-steroidal anti-inflammatory drugs，NSAIDs）是一类没有甾体结构的抗炎、镇痛、和解热的药物，通过抑制环氧合酶及其同工酶，从而阻断前列腺素、白三烯和血栓素 A 的合成来发挥作用[1]。NSAIDs 目前是全世界兽医和人类医学中使用最为广泛的药物之一，尽管 NSAIDs 是相对安全的药物，带来了许多益处，但其使用可同时引起严重的副作用，其中胃肠道并发症最为常见[2]。并且，在许多研究中这类药物已被确定为新兴的微量环境污染物[3]。动物源性食品中兽药残留不仅对人类健康构成威胁，而且还制约着畜牧业发展，危害生态平衡。监测动物源性食品中的残留物是保障人类和动物健康的重要任务。猪可食用组织在人们的肉类饮食消费中有着重要地位，因此，建立猪可食用组织中 NSAIDs 的残留检测方法，对确保人类和动物健康有着重要意义。

材料与方法

猪组织样品通过磷酸化乙腈提取的同时加入内标工作液，用乙腈饱和正己烷进行脱脂后经 HLB 固相萃取柱净化，采用 UPLC BEH Shield RP_{18} 色谱柱进行分离，0.1%甲酸水与 0.1%甲酸乙腈溶液进行梯度洗脱，多反应监测模式进行检测。

结果与讨论

在本研究所建立的方法中，猪肉中检测限（Limit of detection，LOD）为 0.2~2 μg/kg，定量限（Limit of quantification，LOQ）为 5 μg/kg。当添加 NSAIDs 浓度为 5~500 μg/kg 时，总平均回收率在 71.9%~104.4%之间。回归方程在 5~500 μg/kg 的浓度范围内呈线性相关，相关系数大于 0.99；在猪肝中 LOD 为 2~4 μg/kg，LOQ 为 10 μg/kg。当添加浓度为 10~500 μg/kg 时，总平均回收率在 72.4%~99.4%之间。回归方程在 10~500 μg/kg 的浓度范围内呈线性相关，相关系数大于 0.99；在猪肾中 LOD 为 1.5~3 μg/kg，LOQ 为 10 μg/kg。当添加浓度为 10~500 μg/kg 时，总平均回收率在 74.8%~103.7%之间。回归方程在 10~500 μg/kg 的浓度范围内呈线性相关，相关系数大于 0.99；在猪脂中 LOD 为 0.2~1.5 μg/kg，LOQ 为 5 μg/kg。添加浓度为 5~500 μg/kg，总平均回收率在 70.9%~109.8%之间。回归方程在 5~500 μg/kg 的浓度范围内呈线性相关，相关系数大于 0.99。以上所有结果的批内、批间变异系数均小于 14.4％，说明本方法的准确度、精密度良好。本研究结果满足 NSAIDs 的残留检测要求，为保障合理用药，促进畜牧业健康发展提供了技术支撑。

主要参考文献

[1] Siqueira S V，Oliveira G M，Weckwerth G M，et al. Analysis of Different Methods of Extracting NSAIDs in Biological Fluid Samples for LC-MS/MS Assays： Scoping Review [J]. Metabolites，2022，12（8）.

[2] Bhala N，Emberson J，Merhi A，et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs：meta-analyses of individual participant data from randomised trials [J]. Lancet，2013，382（9894）：769-779.

[3] Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs （NSAIDs） acetylsalicylic acid，paracetamol，diclofenac，ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates： A review [J]. Sci Total Environ，2020，740：140043.

※ 作者简介：孙志轩，在读硕士研究生，研究方向为动物源性食品安全。E-mail：sunzhx2021@163.com。
※※ 通讯作者：李建成，副教授，博士生导师，研究方向为兽医药理与毒理学。E-mail：horse20@cau.edu.cn。

新生仔畜肠道微生物群的形成及作用

宋 文※
(黑龙江八一农垦大学，黑龙江大庆 163000)

肠道微生物既包括有益菌，也包括有害菌。在人类胎儿环境中，有许多综述报道称子宫内微生物对人类健康有深远的影响，如母乳中的微生物成分会影响婴儿的发育。肠道微生物群在系统发育地位上除厚壁菌门外，还有拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微菌门、梭杆菌门，共 6 大门类。不同种属的新生仔畜肠道微生物群会存在差异。

众所周知，新生仔畜肠道微生物群种类繁多，主要来源于母体口腔、外部环境和羊水脐带。哺乳动物存在口腔黏膜，当母体动物处于免疫力较差的阶段，致病微生物便会侵袭口腔黏膜，引起口腔炎性等疾病。目前可通过口腔途径传播的微生物主要有四大类，即病毒、真菌、细菌、螺旋体[1]。它们通过聚集或黏附作用，阻碍母体正常吸收营养和生长，进而间接影响新生仔畜福利健康问题。外部环境主要是进行仔畜接生保育员的卫生状况和来自食物与水源中的微生物等多种途径。幼畜吮吸母畜乳头也存在污染的可能性。健康母畜的乳房常有细菌存在，主要存在于乳头管及其分枝上。围产期的母牛胎盘、脐带、羊水、初乳和粪便中的微生物也可通过母源传递方式在犊牛肠道中进行定植，其中脐带微生物对胎粪微生物的定植贡献最大[2]。

微生物的定植途径对幼畜肠道发育有很多影响，平时进食不能消化的物质可以通过微生物发酵进行消化，如果其中拟杆菌门数量增加，对动物机体能量稳态具有重要意义。同时，肠道微生物群还可以附着在其表面的黏膜层，构成细菌的外屏障来阻止病原菌入侵。动物肠道细菌能够刺激黏膜上淋巴组织的分化，增加免疫球蛋白在血浆中的水平，促进免疫系统的激活。早期幼畜体内的微生物定植对后期成长过程起着至关重要的作用，它可以帮助机体抵御外来细菌干扰并建立起自身的免疫性。

总之，新生仔畜肠道微生物群与消化系统疾病有着密切的关系，协调饲料营养、肠道黏膜、微生物菌群三者之间的平衡互作关系，才能促进动物的肠道健康，保证动物福利。肠道形态与氧化应激密切相关，氧化应激可引起肠道消化功能障碍，而神经性功能会间接影响动物肢体障碍或脊髓损伤。只有充分研究肠道微生物的来源及作用，才能减少新生动物生长速度慢、存活率低等问题，满足仔畜快速生长和日常代谢的营养需要，为动物肠道微生物群在动物生产中更高效的应用提供参考。

参考文献

[1] 冉亚兰，夏东坡，孙丙华，等.基于 16SrDNA 高通量测序的短尾猴口腔微生物多样性[J].兽类学报,2017,37(01):78-86.DOI:10.16829/j.slxb.201701006.

[2] 杨敏娜，朱焕，高伟星,等.新生荷斯坦犊牛后肠道微生物母源传递特征的研究[J]. 动物营养学报，2021，33 (11): 6445-6451.

※ 作者简介：宋文（1999-），女，黑龙江省大庆市人。

黑龙江省养猪业粪污的时空分布

林秀蔚
（黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院，黑龙江齐齐哈尔 163005）

引言

近年来，我国畜牧业发展迅速，黑龙江省作为我国的畜牧业大省，畜牧养殖规模和结构不断升级优化。由于畜牧业生产过程中会产生大量的污水、粪便和污染物，对环境造成一定程度的污染，因此研究畜牧养殖粪便污染及其治理具有重要意义。由于养殖结构和粪便污染处理系统的不同，不同地区、不同时期、不同品种的畜禽粪便对环境造成的污染也有差异。鉴于此，对黑龙江省全省及各个地区的养猪业粪便、尿液及其污染物的排放量及分布特点进行深入研究，为黑龙江省畜牧业的可持续健康发展提供理论参考。

材料与方法

数据来自《黑龙江省统计年鉴》，2009-2020 年数据。调查包括绥化市、大庆市、哈尔滨市、齐齐哈尔市、牡丹江市、佳木斯市、双鸭山市、鸡西市、鹤岗市、黑河市、伊春市、七台河市、大兴安岭地区共 13 个地区的生猪出栏量。该研究估算的生猪粪尿污染物包括：生化需氧量（BOD）、化学需氧量（COD）、氨态氮（NH_3-N）。计算公式根据基础数据和计算参数确定，该研究采用的指标计算方法如下：生猪（粪便/尿液）量=生猪养殖量（万头/万只）×日排泄系数［kg/（d·头/只）］×生猪饲养周期（d）；BOD、COD、NH_3-N=畜禽养殖数量（万头/万只）×年排泄系数［kg/（年·头或只）］；畜禽粪尿耕地负荷量=畜禽粪尿猪粪当量（万 t）/耕地面积（万 hm^2）；估算系数参考生态环境部和有关研究机构。

结果与讨论

黑龙江省猪粪尿总排放年际变化有一定波动且略有上浮，其变异系数为 11.2%，粪尿由 2009 年的 2034.10 万 t 增加到 2020 年的 2442.42 万 t，上升了 20.07%，主要原因与 2009 年相比，2020 年猪的生产规模扩大，BOD、COD、NH_3-N 产生量都有所增加，粪尿中污染物平均年排放量的大小排序为 COD>BOD>NH_3-N。2019 年黑龙江省猪粪当量耕地负荷量平均值为 8.21t/hm^2，远小于我国土地最适宜负荷量 30t/hm^2。各地区猪粪当量耕地负荷量的顺序为：大庆市＞绥化市＞牡丹江市＞齐齐哈尔市＞哈尔滨市＞伊春市＞七台河市＞黑河市＞佳木斯市＞大兴安岭地区＞鸡西市＞鹤岗市＞双鸭山市，且分布不均衡。目前，黑龙江省单位耕地面积畜禽猪粪当量耕地负荷量远低于我国最适宜的土地负荷，对环境没有不良影响。然而，随着黑龙江省畜牧业的快速发展，畜禽污染问题也应引起重视。

主要参考文献

[1] 陈红，王浩岩. 黑龙江省整县推进畜禽粪污资源化利用路径与对策建议[J].黑龙江畜牧兽医，2020， 595（07）： 71-74.

[2] 薛晓聪，樊斌，张乃夕，等. 粪污处理视角下黑龙江省畜牧业发展策略研究[J]. 黑龙江畜牧兽医，2019，. 586（22）：1-6.

[3] 董彭旭，姜兵. 黑龙江省畜禽养殖污染防治措施探析[J]. 现代农业科技，2019， 746（12）： 158-165.

脐带血管和产程时长对母猪产仔性能的影响及相关性分析

从光雷※，夏双双，刘春雪，余涵婧
（安佑生物科技集团股份有限公司，江苏苏州 215437）

引言

母猪产仔性能受多种因素影响，如母猪分娩时间过长可能会造成胎猪缺氧，导致死胎数增加和仔猪活力降低[1]。另外，母猪和仔猪的许多生理特征都与缺氧风险增加有关，如分娩间隔增加、母猪膘情过肥或过瘦等[1, 2]。因此，本研究旨在探究母猪脐带血管直径、产仔间隔时长和产程时长对母猪产仔性能的影响及关联性分析，为生产现场能及时优化和评价母猪的产仔性能提供依据。

材料与方法

数据来源于河南某猪场 2022 年的 2 批次母猪分娩产程时长、分娩间隔时长和脐带血管直径的数据。根据数据实际分布，按照≤10、11-20、21-30 和>30 min 将分娩间隔时间分为 4 组；按照≤100、101-200、201-300、301-400、401-500 和>500 min 将产程时长分为 6 组；按照≤2.6、2.7-3.0、3.1-3.6 和 3.7-4.0 mm 将脐带静脉直径分为 4 组；按照≤1.5、1.6-2.0 和 2.0-2.5 mm 将脐带动脉直径分为 3 组。使用 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析。结果用平均值和标准误表示，$P<0.05$ 表示差异显著。另外使用 Graphpad prism 9.0 软件进行 Spearman 相关性分析。

结果与讨论

（1）母猪分娩间隔时间<10min 时产弱仔猪数的趋势有所提高（$P=0.060$）。（2）产程时间越长母猪产木乃伊的头数越多（$P=0.095$）。产程时长<400min 时产仔性能在数值上优于>400min 产程的母猪（$P>0.05$）。（3）母猪脐带静脉直径越大，仔猪出生均重也具有越重（$P=0.082$），产弱仔数也越少（$P=0.063$）。但脐带静脉直径在 3.6~4.0mm 时产死胎数的趋势也越高（$P=0.079$）。（4）脐带动脉直径 2.0~2.5 mm 比<2.0 mm 时的产活仔均重在数值上高 290 g/头左右（$P>0.05$）。（5）弱仔数与脐带动脉直径具有中等负相关性趋势（$P=0.080$），与脐带静脉直径呈显著强负相关性（$P<0.010$）。死胎数与分娩间隔呈显著强正相关性（$P<0.010$）。出生活仔均重与脐带静脉直径呈显著强正相关性（$P<0.010$）。由此可知，母猪产程时长、仔猪分娩间隔时长和脐带血管直径对母猪产仔性能均有影响，且仔猪分娩间隔的时长与死胎数之间具有强正相关；脐带静脉直径与弱仔数呈强负相关，与产活仔均重呈强正相关。

主要参考文献

[1] ALONSO-SPILSBURY M，MOTA-ROJAS D，VILLANUEVA-GARCíA D，et al. Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human： a review [J]. Animal Reproduction Science，2005，90（1-2）： 1-30.

[2] RANDALL G C. Observations on parturition in the sow. II. Factors influencing stillbirth and perinatal mortality [J]. Veterinary Record，1972，90（7）： 183-186.

※ 作者简介：从光雷，硕士，助理畜牧兽医师，研究方向为动物生产与营养。E-mail：congguanglei@anschina.cn。

寒带猪舍低成本节能通风方法探索与实践

赵　骞※，许光锋，董　娜，黄　贺，郑　鹏
（东北农业大学，动物科学技术学院，家畜环境卫生教研室，黑龙江哈尔滨 150030）

黑龙江省冬季寒冷且漫长，猪舍特别是需要较高温度的产房和保育舍，其室内外温差能达到 60 摄氏度。寒带猪舍散热主要由外围护结构和通风组成，保温越好的舍，通风损耗的热量占比越高达六至七成。大多数养殖户出于成本考虑会降低通风量来保证舍内温度，这样会造成舍内二氧化碳、氨气、水汽和粉尘等严重超标，影响猪只健康，特别是容易造成呼吸道系统疾病。很多猪舍甚至出现雾气太重，一两米距离都看不到猪的状态。用俗话概括就是“通风冷，不通风喘”。为解决此问题东北农业大学家畜环境卫生教研室一直致力于本地猪舍节能通风方法的研究。为了能够在东北中小猪场推广，研究方法的重点放在低成本、易安装和免维护上。在不破坏原有畜舍结构的前提下，尽可能使用猪场里现有的原材料达到设计要求。根据简单热交换原理，先后研发测试了长进气管法、套管法、砖堵窗法、对置铁管法、热交换房法、铁板堵窗法、铸铁热交换箱法等。在黑龙江十余个猪场通过温湿度及各种气体传感器，热成像仪，CFD 等方法，经过多年现场测试，结合能源实际消耗证明方法有效。在室外零下 17 摄氏度，保证舍内空气指标合格的情况下，每头母猪每日能够节能 7 度以上，效果显著，改进的方法效能逐步提升。

基金项目：国家生猪产业体系，CARS-35，生猪饲养管理与养殖环境控制 2017
※ 作者简介：男，1978 年出生，副教授，zhaoqian@neau.edu.cn，13359985455

猪肉可食用组织中泰拉霉素 UPLC-MS/MS 检测技术研究

黄婧洁※，李建成※※
（中国农业大学动物医学院，北京 100094）

引言

泰拉霉素为新型半合成大环内酯类动物专用抗生素，给药后具有药物吸收迅速、半衰期长、生物利用度高等优点，在猪体内具有良好的药动学特征。原农业部在 2008 年第 957 号公告中首次允许在动物生产中使用，但随着用药时间的延长以及用药量的不断增大，泰拉霉素在动物体性组织中会出现不同程度的药物残留[1]。因此加强该药物的残留检测，对保障动物源性食品安全具有重要意义。

材料与方法

泰拉霉素及其代谢物标准品由艾美科健（中国）生物医药有限公司提供，含量分别为 98.0%和 100%。称取组织 2±0.05 g，加入适量内标工作液，用乙腈-0.1%甲酸水（7+3）10 mL，于多管混合涡旋器上高速震荡提取 2 min，10000 rpm 离心 5 min，重复提取 1 次，合并两次上清提取液。在提取液中加入 10 mL 正己烷除脂，弃去正己烷层，重复除脂 1 次。MCX 小柱依次用甲醇、2%甲酸水平衡，取全部备用液过柱，依次用 2%甲酸水、甲醇洗涤后用 5%氨化甲醇洗脱，收集洗脱液并于 40℃氮气吹干，加复溶液溶解并定容至 1 ml，上清液过 0.22 μm 滤膜后，供超高相液相色谱-串联质谱仪测定。

结果与讨论

对猪组织中泰拉霉素及其代谢物 CP-60，300 残留量的测定方法进行了研究，基于超高效液相色谱-串联质谱建立了猪肌肉、猪脂肪、猪肾脏、猪肝脏和注射部位中泰拉霉素及其代谢物残留量的测定方法。试样加入内标后经乙腈-0.1%甲酸水（7+3）提取两次，固相萃取柱净化，氮吹后用 0.5%甲酸水-0.5%甲酸甲醇水（9+1）复溶，正离子扫描，多反应监测模式下上机分析，基质外标法定量。结果表明，泰拉霉素及其代谢物在 0～500 μg/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系，相关系数（R^2）均大于 0.99；该方法的检出限为 5 μg/kg，定量限为 10 μg/kg；在不同浓度添加水平下，泰拉霉素的平均回收率为 82.9%～113.1%，泰拉霉素代谢物 CP-60，300 的平均回收率为 82.6%～110.9%，日内相对标准偏差为 2.8%～13.2%，日间相对标准偏差为 4.7%～12.7%。稀释稳定性在 14.6%以内，说明稀释测量高浓度时是稳定可行的。反复冻融后各组织样品的 RSD 均小于 13.17%。标准储备液配置并放置 3 个月，泰拉霉素及其代谢物含量变化不超过 10%。该方法简便、快速、灵敏度高、重现性好，能够满足猪组织中泰拉霉素及其代谢物残留量的测定。

主要参考文献

[1] Song J S，Park S J，Choi J Y，et al. Development of Analytical Method and Monitoring of Veterinary Drug Residues in Korean Animal Products.[J]. Korean journal for food science of animal resources，2016，36（3）.

※ 作者简介：黄婧洁，在读博士研究生，研究方向为兽药残留快速检测技术。E-mail：h15081883875@163.com。
※※ 通讯作者：李建成，副教授，博士生导师，研究方向为药理与毒理学。E-mail：horse20@cau.edu.cn。

ALKBH5 介导 m6A 修饰对 PEDV 病毒复制的调控作用及机制分析

杨荔※，单祎祎，吴正常，吴圣龙，包文斌※※
（江苏省现代农业（生猪）产业技术体系良种繁育创新团队，江苏扬州 225009；
扬州大学动物科学与技术学院，江苏扬州 225009）

引言

猪流行性腹泻病毒（PEDV）是我国当前猪场猪病毒性腹泻的主要病原，因此迫切需要对 PEDV 的致病机理进行更深入地研究以制订新型防控策略。N^6-甲基腺苷（m^6A）甲基化是哺乳动物和微生物基因组中广泛存在的转录后修饰，在 RNA 病毒复制和基因表达过程中发挥重要的调控作用。然而，目前很多关于病毒 m^6A 修饰的分子机制尚不清楚，病毒 m^6A 的研究在未来一段时间仍将是病毒表观遗传学研究的热点和难点。

材料与方法

以 PEDV 感染仔猪和猪小肠上皮细胞（IPEC-J2）为研究对象，首先利用 qPCR 和 WB 验证不同 m^6A 酶在 PEDV 感染前后肠道组织和 IPEC-J2 细胞中的差异表达，同时在细胞水平上结合 RNA 敲除、过表达以及病毒复制测定（$TCID_{50}$、拷贝数、WB、IFA），验证与确定影响 PEDV 抗性的关键 m^6A 修饰酶；其次利用 m^6A 测序和转录组测序筛选 m^6A 修饰的重要靶基因及信号通路；然后通过 MeRIP-qPCR、双荧光素酶、WB 以及 RIP 等系统探究 m^6A 修饰对靶基因表达的调控机制；最后，利用 RNA 敲除、转录组测序以及表达验证揭示靶基因介导信号通路对 PEDV 复制的作用。

结果与讨论

功能验证表明，ALKBH5 酶在 PEDV 感染仔猪个体肠道组织和 PEDV 侵染后的 IPEC-J2 中均极显著高表达；ALKBH5 干扰后，IPEC-J2 中 PEDV 复制水平极显著上升，过表达后则反之，由此表明 ALKBH5 表达上调提高宿主对 PEDV 抗性。组学测序及机制探究发现，ALKBH5 通过 m^6A 修饰调控 IFIT3 和 HERC5 基因 CDS 区，进而促进其转录和翻译水平。其中，IFIT3 激活 TBK1-IRF3 信号通路，调控机体的抗病毒机能；HERC5 则参与催化 IRF3 的 ISG 化，并削弱 IRF3-PIN1 的相互作用，从而拮抗了 IRF3 的泛素化和降解，并促进了抗病毒反应。ALKBH5 属于 m^6A 去甲基化酶，能够通过去除靶基因 mRNA 上的 m^6A 修饰，降低其甲基化水平，进而调控靶基因的表达水平。m^6A 修饰可能发生在基因的 CDS 区，从而直接调控相关靶基因的表达。本研究发现 ALKBH5 通过直接调控靶基因 IFIT3 和 HERC5 CDS 区关键位点的 m^6A 修饰水平，进而调控其表达水平，来调控其 PEDV 复制水平。本研究为解析仔猪病毒性腹泻病的分子调控机制提供了新视角和新思路，同时确定了 PEDV 抗性候选基因，为今后制订抗仔猪病毒性腹泻病分子选育策略奠定基础和提供依据。

主要参考文献

[1] Hao H，Hao S，Chen H，et al. N6-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication[J]. Nucleic Acids Research，2019，47（1）： 362-374.

※ 作者简介：杨荔，在读博士研究生，研究方向为动物遗传育种。E-mail： 18705272191@163.com。
※※ 通讯作者：包文斌，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：wwbao@yzu.edu.cn。

呕吐毒素 DON 感染猪小肠上皮细胞全基因组 m^6A 图谱分析

单祎祎[1※]，吴正常[1, 2]，吴圣龙[1, 2]，包文斌[2※※]

（1. 扬州大学动物科学与技术学院，江苏扬州 225009；2.扬州大学教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室，江苏扬州 225009）

引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）又称呕吐毒素，是最常见的一类镰刀菌毒素，通过影响肠道损伤和免疫性能来造成机体腹泻、呕吐和肠道炎症等，对畜禽生产性能造成严重的危害。N^6-甲基腺苷（N6-methyladenosine，m^6A）是高等真核生物中多聚腺苷酸 mRNAs 最常见的内在修饰方式，转录后调控基因的表达水平。近年来，利用免疫沉淀结合高通量测序技术（MeRIP-seq）已成功构建出人、小鼠等少数物种全转录组 m^6A 甲基化修饰图谱，揭示出潜在的生物学调控功能，但目前关于呕吐毒素诱导猪小肠上皮细胞 m^6A 修饰图谱尚未报道。

材料与方法

本研究通过比较不同浓度（0、300、500、1000、2000、2500 和 3000 ng/mL）DON 处理的 IPEC-J2 细胞在不同培养时间（24、48、72 h）下细胞活性、凋亡、细胞周期、炎症因子水平以及活性氧 ROS 的变化情况，来建立 DON 感染 IPEC-J2 细胞病变模型，并对 DON 感染组和对照组细胞分别进行 m^6A 甲基化和转录组联合测序分析。

结果与讨论

结果显示，IPEC-J2 细胞活性随 DON 浓度的升高和培养时间的延长而逐渐降低，其中 1000 ng/mL DON 培养 48 h 组的 IPEC-J2 细胞活性降低最为明显。DON 感染组和对照组中分别存在 5406 和 2615 个 m^6A 甲基化修饰位点，关联 1617 和 705 个表达基因。M^6A 修饰位点主要分布于基因 CDS 区、起始密码子、终止密码子和 3'UTR 区域，并且猪 RNA m^6A 甲基化修饰区域存在经典保守序列 RRACH。结合转录组测序，筛选出 1957 个共性 733 基因发生 m^6A 甲基化修饰，这些基因主要富集于 TNF、NF-κB、MAPK 等信号通路。通过 m^6A 修饰蛋白互作网络构建发现，*CSF2* 作为网络核心基因，进一步利用 qRT-PCR 验证发现，*CSF2* 在 DON 感染组和对照组 IPEC-J2 细胞中表达差异程度最为显著。因此，m^6A 甲基化和表达水平的变化暗示相关基因可能参与 DON 细胞毒性反应，*CSF2* 可能作为 DON 引起猪小肠上皮细胞损伤的关键功能基因。本研究从 RNA 表观遗传学角度为理解 DON 发挥其细胞毒性的分子机制提供了新的见解，在全基因组水平揭示了 DON 诱导猪小肠上皮细胞基因表达模式的变化，研究结果可为鉴定 DON 毒性相关分子标记以及制定相应的防控策略提供理论依据。

※ 作者简介：单祎祎，在读硕士研究生，研究方向为动物育种理论与技术。E-mail：7575090928@qq.com

※※ 通讯作者： 包文斌（1974-），研究员，博士生导师，研究方向：猪遗传育种。E-mail： wbbao@yzu.edu.cn

基于 IPCC 方法的河南省畜禽温室气体排放时空分析

沙艳羽※，王玥涵
（黑龙江八一农垦大学动物科学技术学院，黑龙江大庆 163319）

引言

温室气体是指任何会吸收和释放红外线辐射并存在大气中的气体。京都议定书中规定控制的 6 种温室气体为二氧化碳（CO_2）、甲烷（CH_4）、氧化亚氮（N_2O）、氢氟碳化合物（HFCs）、全氟碳化合物（PFCs）、六氟化硫（SF_6）。随着人类社会的进步与发展，人类对畜牧业的需求量日益增加，畜牧业也实现了快速发展。但在改善居民膳食结构的同时，其造成的温室气体排放、资源浪费等对全球气候变暖产生了不容忽视的影响。而畜牧业是河南省农业和农村经济的支柱产业，在保障国家食物安全、增加农民收入、推进农业现代化中发挥着极为重要的作用。在 IPCC 方法的基础上，对 2012-2021 年河南省畜禽温室气体排放的时空变化特征进行了研究，以期为促进河南省“十四五”农业温室气体减排及碳达峰，碳中和目标的实现提供参考依据。

材料与方法

利用 IPCC 系数法对河南省 18 个市 2012-2021 年牛、马、驴、骡、猪、羊、家禽等数据进行估算并结合其时空特征进行分析。数据来源《河南统计年鉴》《中国统计年鉴》和《中国农业统计年鉴》。为便于分析，根据全球升温潜能值，将 CH_4 和 N_2O 统一转化为 CO_2 当量，即 1tCH_4 相当于 25tCO_2，1tN_2O 相当于 298tCO_2[1]。

结果与讨论

本文从时间和空间两个角度对河南省畜禽温室气体排放进行研究，研究结果表明在时间维度上，河南省畜禽温室气体排放总量呈现出逐渐上升-快速下降-缓慢增长三个阶段，畜禽胃肠发酵甲烷排放占温室气体排放总量的 47%，是河南省畜禽温室气体的主要贡献者，其次是畜禽粪便管理氧化亚氮的排放和甲烷的排放；而主要的畜禽温室气体排放以牛、羊、猪为主。最后，通过对 2021 年河南省畜禽温室气体排放空间变化分析可知，驻马店市温室气体排放量最高，为 2958.90×10^4tCO_2。而温室气体排放量最小的济源市仅有 8.72×10^4tCO_2，说明河南省畜禽温室气体排放存在较大的空间差异性。由于饲养方法、年龄、体重和饲料使用的不同，甲烷排放系数因物种而异，同一物种的甲烷和氧化亚氮排放系数也不同。此外，在施用牛粪时，甲烷和一氧化二氮的排放会受到管理方法和气候条件差异的影响，这可能给估算结果带来误差和不确定性。河南省畜牧业可采用规模化、标准化、生态化养殖方式，实施种养结合，将畜禽粪便进行资源化、无害化处理，既可减少温室气体排放，又可实现畜禽粪便的资源化利用，进而推动河南省畜牧业的可持续发展。

主要参考文献

[1]胡向东，王济民.中国畜禽温室气体排放量估算[J].农业工程学报，2010，26（10）：247-252.

※ 作者简介：沙艳羽，在读硕士研究生，研究方向为畜牧生产管理。E-mail：1392735679@qq.com。

东三省畜牧业温室气体排放测算及灰色分析

徐 蔚※，鹿 雪
（黑龙江八一农垦大学动物科技学院，黑龙江大庆 163199）

引言

近年来，我国畜牧业发展迅速，然而在畜牧业高速发展的同时，畜禽养殖过程中会产生大量温室气体，给生态环境和气候带来一定影响[1]。为对东北三省畜禽温室气体排放量的预测与分析，本文以2017-2021年东北三省黄牛和肉牛、奶牛、绵羊、山羊、猪、家禽七种动物的出栏数和年末存栏数为统计基数，根据畜禽 CH_4 和 N_2O 排放系数，通过 GM（1，1）模型与灰色关联度分析法，对东三省畜牧业温室气体排放进行分析预测。

材料与方法

采用 IPCC（2006）的调整公式对牲畜年饲养量进行校准。根据 IPCC 和省级清单编制指南将甲烷（CH_4）和 N_2O 转化为 CO_2 当量，分别乘以转化系数 25 和 298，来计算东北三省动物温室气体排放量[2]。灰色关联度分析通过计算关联系数的平均值来衡量各评价项与“参考值”（母序列）之间的相似性。使用 DPS 软件进行测算，得出三个指标的 GM（1，1）模型。数据来源于《IPCC 2006 年国家温室气体清单排放指南》以及东北各省统计年鉴。选择研究畜禽为黄牛和肉牛、奶牛、猪、马、山羊、绵羊、家禽，统计 2017-2021 年三省的年末存栏/出栏量。

结果与讨论

本研究结果表明 2017-2021 年东北三省畜禽年均饲养量趋势较平稳，其中吉林省畜禽数量最多，峰值为 2021 年，畜禽年均饲养量达到 8879.56 万头；其次为黑龙江省 2020 年数量最多，为 5138.45 万头。因《辽宁省统计年鉴》中家禽数据未进行统计，故不进行排名比较。东北三省畜禽温室气体总的变化趋势与畜禽数量的变化趋势有所差异。其中，奶牛和黄牛及肉牛肠道发酵和粪便管理产生的 CH_4 排放在温室气体排放总量中占比较高。黑龙江省饲养奶牛、黄牛和肉牛数量较多，所以黑龙江省温室气体排放总量较高（41.8%），吉林省温室气体排放量只占总量的 28.1%，辽宁省为 30%。根据 GM（1，1）模型可知，2022-2026 年，随着年份的增加，东北三省畜牧业温室气体排放量呈现逐年递增的趋势，年均增高 4.4%。2017 年东北三省温室气体排放总量为 3491.57 万 tCO_2-eq，到 2026 年东北三省温室气体排放总量为 4455.87 万 tCO_2-eq，较 2017 年增高了 27.6%。预计在 2030 年达到畜牧业碳排放峰值。灰色关联度分析结果针对本次 3 个评价项，辽宁省评价最高（关联度为：0.842），其次是黑龙江（关联度为：0.731）。本研究根据结果分析提出相应对策：植树造林，实行种养结合模式；养殖企业可利用配套种植用地，组建配套生态链，实现种养结合循环发展，推动农业、养殖业资源再利用，有效控制温室气体的排放。其次，提高畜禽产量和质量，筛选高效品种，加强繁殖管理，提升单头产量。优化畜禽管理方式，控制畜禽规模，提升畜禽粪便处理水平、清粪技术，从而降低畜禽温室气体的排放量。

主要参考文献

[1] 韩振. 中国畜牧业环境全要素生产率研究[D]. 中国农业科学院，2020.

[2] 《2021 年中国温室气体公报》发布[J]. 中国环境监察，2023（01）： 6.

※ 作者简介：徐蔚，在读硕士研究生，研究方向为畜牧经济生产。E-mail：172230420@qq.com.

猪 importin 7 功能以及对猪 δ 冠状病毒复制的影响

谢林梅※，陈佳佳，龚旺，胡睿铭，丁能水，邬向东，唐玉新，丁珍※※
（江西农业大学动物科学技术学院，江西南昌 330045）

引言

猪核输入蛋白 β 家族成员能够与核输入蛋白 α 家族成员结合，共同调控蛋白（包括调控免疫应答的转录因子）细胞核质之间的运输，该过程对病毒复致至关重要。δ 冠状病毒（PDCoV）是能引起猪只腹泻、脱水甚至死亡，导致仔猪高发病率和高死亡率的猪肠道冠状病毒[1~4]。本研究筛选了能够抑制 PDCoV 复制的猪核输入蛋白 β 超家族成员，且进一步对 importin 7 的功能以及抑制猪 δ 冠状病毒复制的分子机制进行探究，为阐明猪 importin 7 功能及 PDCoV 致病性奠定理论基础。

材料与方法

PDCoV 病毒由本实验室分离且保存。通过 Real-time PCR 和间接免疫荧光实验（IFA）检测了猪核输入蛋白 β 超家族成员对 PDCoV 复制的影响。Western blot 和半数感染量（$TCID_{50}$）确定猪 importin 7 具有抑制 PDCoV 复制的活性。通过过表达和 shRNA 沉默确定 猪 importin 7 蛋白对 PDCoV N 蛋白表达量及病毒滴度的影响。同时通过氨基酸同源性分析和进化树分析确定猪 importin 7 与其他物种的亲缘关系，并通过 IFA 发现猪 importin 7 的细胞定位，通过 Sub-G1 试验确定过表达猪 importin 7 导致 LLC-PK1 细胞死亡与转染质粒剂量、转染时间的关系。

结果与讨论

筛选猪核输入蛋白 β 家族成员中的 importin 5、importin 7、importin 9 和 importin 12 能够抑制 PDCoV 复制。确定猪 importin 7 抑制 PDCoV 具有计量依赖性，同时 shRNA 干扰猪 importin 7 表达显著提高 PDCoV N 蛋白表达和病毒滴度。但 PDCoV 感染会显著抑制猪 importin 7 转录，以克制 importin 7 的抑制效果，为病毒的增殖和生存提供条件。发现猪 importin 7 与牛 importin 7 亲缘关系最近，与人 imp 7 同源性也达到 85.9%。且猪 importin 7 主要定位于细胞质，部分单独定位于细胞核，且定位于细胞核时宿主细胞核发生皱缩、变形。Sub-G1 分析发现猪 importin 7 能够引起 LLC-PK1 细胞死亡，且呈时间和计量依赖性。这可能是猪 importin 7 抑制 PDCoV 复制的分子机制。本研究为阐述猪 importin 7 功能和 PDCoV 致病性奠定基础。

主要参考文献

[1] THACHIL A，GERBER P F，XIAO C T，et al. Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies[J]. PLoS One，2015，10（4）： e124363.

[2] MA Y，ZHANG Y，LIANG X，et al. Origin，evolution，and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States[J]. mBio，2015，6（2）： e64.

[3] WANG L，BYRUM B，ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs，Ohio，USA，2014[J]. Emerg Infect Dis，2014，20（7）： 1227-1230.

[4] 刘朝晖，邵宁生. 核定位信号的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊，2003（03）： 216-219.

※ 作者简介：谢林梅（1997— ），女，硕士研究生，研究方向为动物传染病及病原学，3514643748@qq.com.
※※ 通讯作者：丁珍（1989— ），女，副教授，博士，研究方向为动物病原微生物学，dingzhenhuz@jxau.edu.cn

ACE2 在 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞中的作用研究

张静怡※，李 怡，宋振辉※※
（西南大学动物医学院，重庆 402460）

引言

PEDV 是猪肠道冠状病毒的一员，是引起 PED 的肠道病原，能够引起猪不同程度的急性水样腹泻、呕吐、脱水、厌食等，一周龄内仔猪的致死率甚至高达 100%。自 PEDV 被发现以来，给国内外养猪业带来了非常严重的危害，其防控仍是一大难题。本实验室前期研究表明，猪小肠上皮细胞中的 Na^+/H^+ 转运蛋白（NHE3）能够调控肠道中电解质的吸收或分泌，维持肠道的渗透压平衡。而 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞可抑制 NHE3 的表达，并且降低细胞对胞外 Na^+ 的吸收，可导致仔猪出现严重腹泻和脱水。经过蛋白互作网络预测发现，ACE2 与 NHE3 具有一定的关联，且目前 ACE2 已被确定为多种冠状病毒的受体。冠状病毒如 SARS-CoV-2 S 蛋白能够与特异性受体 ACE2 进行特异性的结合，进而感染宿主细胞，但其在同为冠状病毒的 PEDV 感染过程中是否能够作为受体参与病毒识别的调节机制尚未可知。因此，本研究对猪源 ACE2 的物理化学性质、结构等进行了预测分析，加深对 ACE2 的了解，通过 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞验证 PEDV 是否对 ACE2 的表达有影响，调控 ACE2 的表达量能否影响 PEDV 的侵染，从而探究 ACE2 与 PEDV 感染之间的联系，为后续研究 PEDV 感染机制奠定基础，也为挖掘防治 PEDV 致腹泻作用靶点提供新参考。

材料与方法

给仔猪灌服含 PEDV 的小肠组织研磨液，出现 PED 临床症状后，立即解剖采集空肠组织，送予公司进行转录组学测序，同时采集小段肠道用于 PCR 鉴定 PEDV 是否成功感染肠道，提取组织样品 RNA 通过 RT-qPCR 验证 mRNA 的变化情况。利用在线软件分析 ACE2 蛋白的物理化学性质、亲疏水性、跨膜结构、信号肽、磷酸化位点与糖基化位点及 ACE2 蛋白的二、三级结构，预测与 ACE2 可能存在互作关系的蛋白网络。转录组数据中查找 ACE2 的变化情况，并同过 RT-qPCR 检测组织水平和细胞水平上 ACE2 mRNA 的变化情况。以 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞，通过 RT-qPCR 检测不同时间点 ACE2 mRNA 的变化，通过 Western-blot 检测不同时间点 ACE2 总蛋白的变化。通过 ACE2 过表达质粒 pEGFP-ACE2 和干扰质粒 pLVX-shRNA 调控 ACE2 的表达量，RT-qPCR 检测不同时间点 PEDV M mRNA 的变化，Western-blot、免疫荧光检测 PEDV N 总蛋白的变化，TCID50 检测 PEDV 病毒滴度的变化。将真核表达质粒 pTT5-PEDV S1 和 pPCDNA3.1-ACE2 共转染到 HEK 293T 细胞中，通过 Co-IP 的方法检测 ACE2 与 PEDV S 蛋白之间是否存在互作关系。

结果与讨论

通过转录组学测序筛选出转录组测序结果中显著变化的基因，并在功能注释为膜相关的基因中挑选 4 个上调的基因和 4 个下调的基因。结果显示，PEDV 感染能够使血管紧张素转换酶 2（ACE2）表达量显著降低。随后对 ACE2 的结构、性质进行了生物信息学预测分析，发现猪 ACE2 与人 ACE2 在性质、结构等方面具有较高的相似性，可能预示着 ACE2 在猪冠状病毒的侵染过程中有一定的作用。最后通过调控 ACE2 的表达量检测了对 PEDV 复制的影响，结果显示过表达质粒 pEGFP-ACE2 预处理后 PEDV M

※ 作者简介：张静怡，硕士研究生，研究方向为动物微生物与免疫。E-mail：564461985@qq.com。
※※ 通讯作者：宋振辉，教授，硕士生导师，研究方向为动物微生物与免疫。E-mail：szh7678@126.com。

mRNA 表达水平在 12h、24h、36h、48h 时均显著上升（*P*<0.05，*P* <0.01），PEDV N 蛋白表达量在 12h、24h、36h、48h 时均显著上升（*P*<0.05），PEDV 病毒滴度在 12h、48h 显著上升（*P*<0.05，*P*<0.01，）；干扰质粒 pLVX-shRNA2 预处理后 PEDV M mRNA 表达水平在 12h、24h、36h、48h 时均显著下降（*P*<0.01），PEDV N 蛋白表达量在 12h、24h、36h、48h 时均显著上升（*P*<0.05，*P*<0.01，），PEDV 病毒滴度在 24h、48h 显著下降（*P* <0.01），表明调控 ACE2 上调能够促进 PEDV 的复制，抑制 ACE2 的表达能减少 PEDV 的复制。Co-IP 确定了 ACE2 能够调控 PEDV 的感染，但 ACE2 与 PEDV S 蛋白之间不存在互作关系，ACE2 不是 PEDV 感染的受体。

PEDV 感染仔猪肠道后 ACE2 的表达显著下降，通过 RT-qPCR 分别在组织、细胞水平的检测也印证了这一点，即 PEDV 能下调 ACE2 的表达。这与 SARS-CoV-2 感染人后其功能性受体 ACE2 显著下降的现象类似，因此，本研究推测 ACE2 是否可能作为猪肠道冠状病毒 PEDV 的受体之一或相关因子影响 PEDV 感染猪的肠道，进而引起仔猪腹泻。但其在猪及猪冠状病毒中能否发挥重要作用还有待进一步研究。通过预测分析 ACE2 的主要生物学信息，推测 ACE2 具有作为膜受体的条件，因此进一步研究 ACE2 的功能能够为深入开展猪 ACE2 蛋白的酶学特性及在炎性损伤等过程中的分子作用机制研究提供理论参考，从而促进 ACE2 相关的抑制剂或激活剂及候选药物的研发，为相关药物的研发提供新的靶点。试验结果显示 ACE2 可以正调控 PEDV 的表达，促进该病毒复制。PEDV S 蛋白与 ACE2 之间没有直接的相互作用关系，这意味着 ACE2 调控 PEDV N 变化的途径可能不是通过直接与 PEDV S 蛋白识别来协助 PEDV 的入侵，而是可能通过其他通路途径产生效果，如 ACE2/Ang-（1-7）/Mas 途径、VEGFa/VEGFR2/ERK 通路等。ACE2 促进 PEDV 复制的作用机制及其与 PEDV 之间的具体联系有待进一步研究。本研究揭示了 PEDV 感染猪肠道的机制，为防治 PEDV 致腹泻提供了新策略。

主要参考文献

[1]李继堂.猪流行性腹泻病毒致病机制和防治措施[J].猪业观察，2020（03）：43-44.

[2]LU R，Zhao X，LI J，et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus： implications for virus origins and receptor binding[J]. Lancet. 2020 395（10224）：565-574.

[3]王楚彪，卢万鸿，林彦，等.转录组测序的发展和应用[J].桉树科技，2018，35（04）：20-26.

膳食纤维在仔猪腹泻防治中的应用及其机制研究进展

冉 亿※，史新娥※※
（西北农林科技大学动物科技学院，陕西杨凌 712100）

引言

当前集约化养猪业中，一般在 2-4 周龄对仔猪进行断奶，以提高经济效益，而自然断奶一般是在出生后 17 周左右。此时期仔猪的消化和免疫系统还不成熟，又由于饮食从液态奶转变为固体饲料等外来不可抗力对仔猪内环境的侵袭，将会导致肠道形态及其物理屏障功能的破坏，包括紧密连接的破坏，粘蛋白产生减少，肠道通透性增加等。接着会造成其他胃肠道的改变，如相关的炎症反应信号通路的激活，激素水平的变化，胃蠕动减少，养分、水和电解质吸收的减少，并导致抗原和毒素的入侵增加。此外早期断奶会导致微生物多样性的丧失和肠道微生物群的生态失调，并进一步增加仔猪胃肠道疾病的风险。因此早期断奶仔猪通常表现为肠道功能障碍、生长性能下降和腹泻患病率增加。此前抗生素被大量用于仔猪腹泻以减少经济损失。但由于环境问题和抗生素耐药性的风险，一些国家已经禁止或限制在猪日粮中加入高水平锌或抗菌剂。因此需要开发一种营养替代策略，以减轻仔猪腹泻。在过去的几年中，已经研究了包括控制日粮蛋白质、粗纤维，调节电解质平衡等改善仔猪腹泻的各种营养方法。

适宜的日粮纤维（Dietary fiber，DF）及其代谢产物短链脂肪酸（Short-chain fatty acids，SCFAs）可以影响食糜的理化特性以改善肠道的形态和微生态环境，刺激消化酶的分泌，促进消化道黏膜的发育和完整性，增强仔猪免疫能力，进而改善仔猪肠道健康以预防仔猪腹泻。本文通过对日粮纤维的理化特性及作用机理做以介绍，并对日粮纤维在仔猪生产中的应用及其缓解仔猪腹泻的可能机制进行综述，为推动其在养猪生产中的合理应用提供理论依据。

主要参考文献

[1] Hu R，Li S，Diao H，et al. The interaction between dietary fiber and gut microbiota，and its effect on pig intestinal health. Front Immunol. 2023;14：1095740. Published 2023 Feb 14. doi：10.3389/fimmu.2023.1095740

[2] Jha R，Berrocoso JD. Review： Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. Animal. 2015;9（9）：1441-1452. doi：10.1017/S1751731115000919

[3] Grześkowiak，Ł，Saliu，E.，Martínez-Vallespín，B.，Aschenbach，J.，Brockmann，G.，Fulde，M.，. . . Zentek，J.（2022）. Dietary fiber and its role in performance，welfare，and health of pigs. Animal Health Research Reviews，23（2），165-193. doi：10.1017/S1466252322000081

[4]Gill，S.K.，Rossi，M.，Bajka，B. et al. Dietary fibre in gastrointestinal health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18，101–116 （2021）. https：//doi.org/10.1038/s41575-020-00375-4

※ 作者简介：冉亿，在读硕士研究生，研究方向为肌肉生物学与猪遗传改良创新。E-mail：ranyi100@163.com。
※※ 通讯作者：史新娥，教授，博士生导师，研究方向为猪骨骼肌卫星细胞发育及肌纤维类型分化的分子机理研究。E-mail：xineshi@nwafu.edu.cn.

猪肠道微生物对养殖环境的影响

韩锦仪[1※]，李梦雨[1]，刘闯[1]，李欣[1]，李秀领[1]，王克君[1]，乔瑞敏[1]，
杨峰[1]，韩雪蕾[1※※]，李新建[1, 2※※]
（1.河南农业大学动物科学技术学院，河南郑州 450002；2. 海南农业科学院三亚研究院，海南三亚 572025）

引言

猪粪便中的微生物通过气溶胶方式传播。已有的研究表明，猪肠道微生物的气溶胶影响了猪场周围的环境微生物[1]，也改变了职业养猪人的肠道微生物[2]。然而，哪些微生物更有可能受到影响仍是未知的。因此，本研究选取了两个养猪场，比较了猪舍内、外，距离猪场 5m、500m、1000m 的粉尘微生物以及 25 名养殖户、6 名非暴露个体的肠道微生物，探讨生猪养殖对对周围环境中微生物、职业暴露对农民肠道微生物的影响。本研究旨在从微生物的角度来论证养猪场的可持续发展。

材料与方法

在 A 养猪场收集了 136 份样本，其中 70 份猪粪、18 名养猪人的粪便、4 份志愿者（未接触任何类型农场动物）的粪便，以及 44 份环境粉尘微生物（来自猪舍、猪场内外）。在 B 养猪场采集 43 份样本，其中 10 份猪粪、24 份环境粉尘微生物、7 名养猪人的粪便，以及 2 名志愿者的粪便。两次采样时隔一年，其中有三位志愿者在两次采样中身份互换，既作为养猪人，也作为志愿者。将采集的样品液氮中保存，并进行 16S rRNA 测序、分类学分析。

结果与讨论

25 名养猪人与 6 名志愿者之间存在显著差异的微生物，其中在养猪人的肠道微生物显著上调菌属 7 个。根据与生猪接触的频率，将养猪人分为饲养组与领导组。对饲养组、领导组、志愿者组进行随机森林分析，前 20 个菌属里随着与生猪接触时间增长而增多的菌属有 4 个。皆包含 *Turicibacter*、*Terrisporobacter* 和 *Clostridium_sensu_stricto_1* 等。互为对照组的三人根据采样时的身份分组进行 lesfe 分析，发现“作为养猪人”时 *Terrisporobacter* 和 *Clostridium_sensu_stricto_1* 也显著存在。聚类分析粉尘微生物发现，猪舍内的微生物组与生猪肠道微生物组更接近。其中，*Turicibacter*、*Terrisporobacter* 和 *Clostridium_sensu_stricto_1* 这 3 种菌属的丰度在猪舍内更高。随后对不同位置的这三个菌属的丰度进行交互火山图分析，发现距离生猪越远，三个菌的丰度越低。且在 A 场，三个菌属距离猪场 1000 米时都呈现显著差异（P<0.001）。根据对 A、B 两猪场的实地调查发现，A 场有简单空气过滤装置。本研究分别对 A、B 场猪舍内外挡风板上的粉尘微生物进行分析，发现 A 场猪舍内外挡风板上的菌属存在显著差异，而 B 场仅猪舍外挡风板上有显著上调的菌属。结果表明，简单的空气过滤装置可以减少栋舍间气溶胶微生物的交叉感染。本研究为阻断养猪场微生物气溶胶的传播和减少污染提供了理论依据。

主要参考文献

[1] SONG L，WANG C，JIANG G，et al. Bioaerosol is an important transmission route of antibiotic resistance genes in pig farms [J]. Environ Int，2021，154： 106559.

[2] MOOR J，WUTHRICH T，AEBI S，et al. Influence of pig farming on human Gut Microbiota： role of airborne microbial communities [J]. Gut Microbes，2021，13（1）： 1-13.

※ 作者简介：韩锦仪，在读研究生，研究方向为猪遗传育种。E-mail：huanghxy100@163.com。
※※ 通讯作者：韩雪蕾，教授，研究生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：hxl014@126.com。
通讯作者：李新建，教授，博士生导师，研究方向为猪遗传育种。E-mail：lxjlongfei@henau.edu.cn。

CSSC

第五届中国猪业科技大会

中国畜牧兽医学会2023年学术年会