

猪瘟RT-PCR检测方法的建立与 陕西部分地区猪瘟病毒E0基因分子特征分析

吴旭锦

(咸阳职业技术学院仪祉农林学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 【目的】建立一种基于保守性高E0基因的猪瘟病毒RT-PCR检测方法, 为临床诊断提供一种可靠方法, 同时对获得的E0基因进行序列分析, 揭示猪瘟病毒基因分子衍化特征, 为防控猪瘟提供参考。【方法】根据GenBank中猪瘟病毒参考序列, 设计并合成了2对引物, 进行了CSFV检测灵敏度试验、特异性试验和临床检测应用, 并将获得的8株流行毒株E0基因进行测序分析。【结果】建立的方法检测CSFV cDNA含量的最低极限为 $6.7 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 从BVDV、PRRSV、PCV-2、PRV和PPV参考毒株提取或反转录获得的DNA/cDNA中不能扩增出目的条带, 提示方法灵敏度高、特异性强。对32份疑似猪瘟组织病料检测, 发现12份为阳性, 阳性率为37.5%。序列分析表明, 8株流行毒E0核苷酸、氨基酸同源性分别在97%~99.3%和94.8%~98.5%之间。与参考毒株相比, 核苷酸同源性为83.4%~95.4%, 氨基酸同源性为85.8%~98.1%。流行毒株与我国疫苗毒株HCLV、C HVRI核苷酸同源性仅为83.4%~85.1%, 氨基酸同源性仅为86.1%~89.1%, 呈现出较明显的远离疫苗株变异趋势。进化树分析发现8个流行毒株均属于基因II群。首次发现了一株流行毒株(SXWN02株) E0 R_{nas}活性基序位点第94位由E变异为K, 其他位点没有发生变异。【结论】建立的RT-PCR方法灵敏度高、特异性强, 可作为临床诊断方法。陕西部分地区猪场猪瘟感染仍较严重, 需要做好防控工作。流行毒株E0基因发生较大变异, 尤其是在关键位点上出现变异毒株, 需要密切关注。

关键词: 猪瘟; RT-PCR方法; E0基因; 分子特征

中图分类号: S852.65+1

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2014)03-025-07

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的一种高度接触传染性疫病, 发病率和死亡率高, 广泛分布于世界各国, 严重威胁养猪业的发展^[1]。

CSFV是黄病毒科、瘟病毒属成员, 为单股正链RNA病毒。CSFV基因组大小约为12.3kb, 编码一个独立的多聚蛋白, 自氨基端到羧基端排列顺序为N^{pro}-C-E0-E1-E2-P7-NS2.3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B^[2]。多聚蛋白被宿主蛋白酶修饰转变成一个成熟的蛋白。在这些蛋白中, E0蛋白能诱导机体产生中和性抗体, 也是感染细胞后惟一可以分泌到细胞培养上清液中的糖蛋白^[3]。研究发现, E0蛋白具有RNA酶活性, 且E0可能是导致病毒持续感染宿主的重要原因^[4]。此外, E0基因相对保守, 是CSFV分子诊断的候选基因。猪瘟诊断技术多样, 在病原诊断

上主要有免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验、免疫胶体金技术和RT-PCR技术, 其中以RT-PCR技术最为敏感, 是现代诊断重点技术之一^[5-6]。长期以来, 我国在猪瘟防控上一直坚持疫苗免疫为主的策略, 但随着时间的推移, 分子流行病学研究的兴起, 发现猪瘟病毒已经发生了变异^[7-8]。本研究旨在建立一种RT-PCR扩增E0基因的检测方法, 同时进行E0序列分析, 为临床提供一种快速、灵敏、特异的诊断手段, 并通过序列分析了解CSFV分子衍化情况, 为猪瘟防控提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 猪瘟病毒参考株为疫苗毒株, 参照毒株牛病毒性腹泻黏膜病病毒(BVDV)、蓝耳病病毒

收稿日期: 2014-05-18

基金项目: 咸阳职业技术学院重点科研项目(2013KYA02)

作者简介: 吴旭锦(1979—), 女, 陕西西安人, 副教授, 博士, 主要从事纳米药物开发和动物疫病分子病原学研究工作。

(PRRSV)、圆环病毒(PCV-2)、伪狂犬病毒(PRV)、细小病毒(PPV)为疫苗毒或分离毒株,均由本实验室保存。

1.1.2 组织病料 疑似猪瘟组织病料由本实验室采集,共计32份,分别来自咸阳市(11份)、西安市(5份)、宝鸡市(9份)、渭南市(5份)、汉中市(2份)猪场。组织病料研磨处理,高速离心后取上清液-70℃保存备用。

1.1.3 主要试剂 TRIzol Reagent为Invitrogen公司生产;反转录酶(AMV)、RNA酶抑制剂、DEPC处理水、rTaq酶、dNTP、EcoR I、UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限公司;pMD18-T载体克隆试剂盒、BamH I及Hind III限制性内切酶均为TaKaRa公司产品;DH5 α 大肠杆菌由本实验室保存。

1.1.4 引物设计与合成 根据GenBank上发表的HCLV株(AF531433)、Shimen株(AF092448)全基因序列,设计2对引物,采用RT-nPCR方法扩增E0基因,引物序列如下,E0-1F:5'-AACCACCAGAATCTAGGAAG-3',E0-1R:5'-GTGTTTTTGGGGAGGCAAGC-3',E0-2F:5'-AAAGCCCTATTGGCATGGG-3',E0-2R:5'-GGTGCAGTTGTTAGTGTACC-3',预期扩增片段801 bp,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,用DEPC处理水溶解,终浓度为25 μ mol/L,-20℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 CSFV总RNA的提取与反转录合成第一链cDNA 取CSFV疫苗毒250.0 μ L,用TRIzol Reagent提取总RNA,空气中自然干燥。RNA干燥过程中,配制反转录反应液,成分为:DEPC处理水12.5 μ L,5 \times AMV Buffer 4.0 μ L,dNTP 2.0 μ L,下游引物E0-1R 1.0 μ L,AMV 0.25 μ L,RNA酶抑制剂 0.25 μ L,总体积20.0 μ L,42℃水浴反转录90min,取出后立即冰浴,测定cDNA浓度。

1.2.2 RT-nPCR方法灵敏性试验 将已知含量的cDNA溶液做10倍梯度稀释,第1次扩增反应体系:各梯度cDNA 2.0 μ L,超纯水16.25 μ L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,Mg²⁺ 2.0 μ L,dNTP 1.0 μ L,E0-1F、E0-1R各0.5 μ L,rTaq DNA聚合酶0.25 μ L,总体积25.0 μ L。条件为:95℃预变性5 min,94℃

50 s,54℃1 min,72℃1 min,共进行30个循环,最后72℃延伸10min。第2次扩增反应体系:取2.0 μ L第1次扩增产物作为模板,体系同第1次扩增,引物为E0-2F/E0-2R。条件为:95℃预变性5min,94℃50 s,58℃1 min,72℃1min,共30个循环,最后72℃延伸10min。取5.0 μ L第2次扩增产物,10g/L琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统中照相观察。

1.2.3 RT-nPCR方法特异性试验 提取CSFV、PRRSV、BVDV等RNA病毒的核酸并反转录获得cDNA;按照DNAzol Reagent试剂说明提取PCV-2、PRV和PPV等DNA病毒DNA模板,用E0-1F/E0-1R、E0-2F/E0-2R引物对分别进行第1次和第2次扩增,用10g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.4 病料中E0基因的检测、PCR产物回收及序列测定 用以上建立的检测方法对收集的32份组织病料进行检测诊断,选取不同地区E0基因阳性PCR产物用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒回收PCR扩增条带,与pMD18-T载体进行连接,然后转化DH5 α 感受态细胞,经Amp^r平板筛选,挑取单个菌落,摇动培养后菌液PCR鉴定为阳性,提取质粒,BamH I及Hind III酶切鉴定,将阳性质粒送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.5 E0基因序列及推导氨基酸序列的比较分析 用DNASTAR软件,将获得的12株猪瘟病毒E0基因序列与GenBank中发表的ALD(D49532)、Alfort187(X87939)、Brescia(AF091661)、C HVRI(AY805221)、GXWZ02(AY367767)、HCLV(AF531433)、Paderborn(AY072924)、Riems(AY259122)和Shimen(AF092448)等国内外猪瘟代表毒株进行核苷酸和氨基酸同源性比较分析,绘制系统发生树。

2 结果与分析

2.1 RT-nPCR检测方法灵敏性试验结果

测定反转录第一链cDNA含量为670ng/L,10倍梯度稀释后进行套式扩增。从图1可见所建立的方法能够扩增出可见目的条带的最大稀释度为10⁷,即检测的cDNA含量极限为6.7 \times 10⁻⁵ng/L,表明此方法灵敏度高,完全满足CSFV临床检测需要。

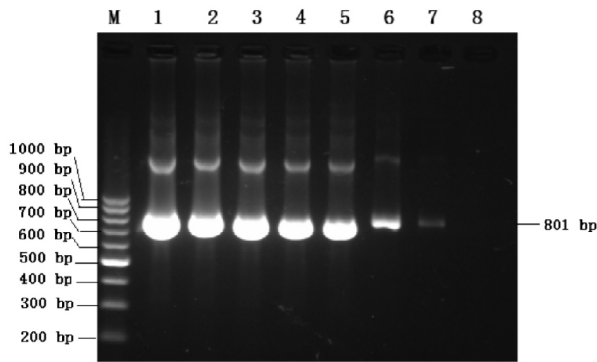


图1 CSFV RT-nPCR检测方法灵敏度试验结果

M: DNA分子质量标准 (100~1000bp) ; 1~8: 依次为cDNA 10倍梯度稀释PCR结果

Fig.1The result of sensitivity test for CSFV RT-nPCR M: DNA Marker (100~1000bp) ; 1~8: 67ng /L to 6.7×10⁻⁵ng /L of CSFV cDNA

2.2 RT-nPCR检测方法特异性试验结果

用所建立的方法对CSFV、PRRSV、BVDV、PCV-2、PRV和PPV阳性毒进行扩增，结果只有CSFV扩增出了801bp的目的条带，与预期条带大小一致，其它5种毒未扩增出条带，提示所建立的方法特异性好，电泳结果见图2。

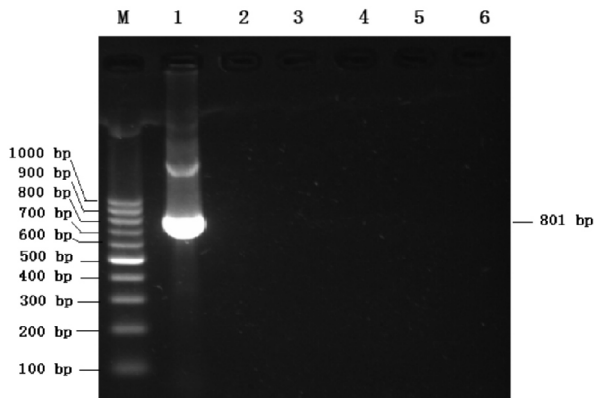


图2 CSFV RT-nested PCR检测方法特异性试验结果

M :DNA分子质量标准 (100~1000bp) ; 1~6: CSFV, PRRSV, PCV-2,PRV,PPV,BVDV

Fig.2 The result of specialization test for CSFV RT-nPCR M:DNA Marker (100~1000bp) ; 1~6: CSFV, PRRSV, PCV-2,PRV,PPV,BVDV

2.3 病料中CSFV的检测结果

用建立的RT-nPCR方法，检测了采集的陕西省部分地区32份疑似猪瘟的淋巴结、脾脏、肝脏、肾脏和扁桃体等组织病料，结果有12份病料为阳性，阳性率为37.5%，部分病料检测见图3。

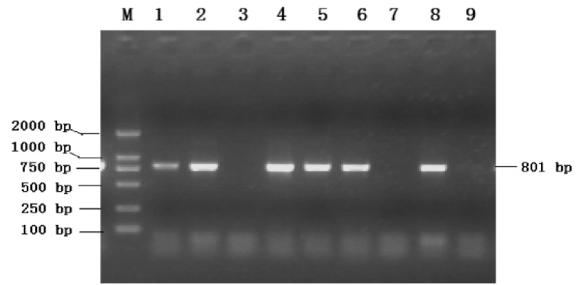


图3 部分病料中CSFV的检测结果

M: DL2000 DNA分子质量标准; 1~9: 部分病料检测

Fig.3 The result of detection CSFV from some dubitable effected CSFV tissue M:DL2000 Marker; 1~9:the detection result of some tissue

2.4 E0基因序列测定

选取不同地区8株流行毒株的E0克隆基因回收连接pMD18-T载体，转化感受态细胞后提取阳性质粒，酶切鉴定（见图4），测序后获得8株CSFV流行毒株E0基因序列，分别命名为SXXY01-E0、SXXY02-E0、SXBJ01-E0、SXWN01-E0、SXWN02-E0、SXXA01-E0、SXXA02-E0和SXHZ01-E0。

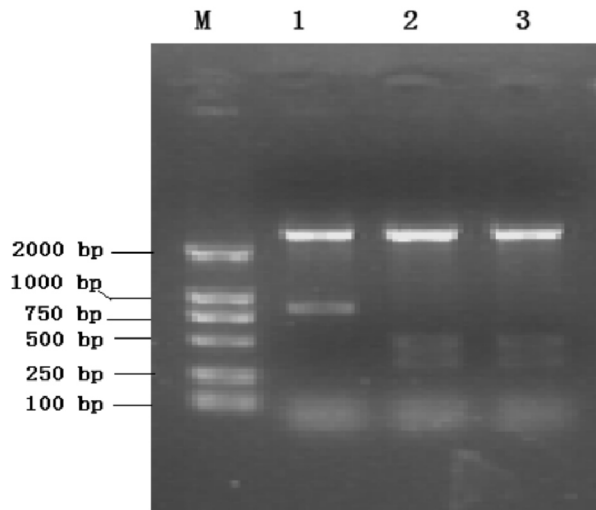


图4 部分阳性质粒酶切鉴定结果

M: DL2000 DNA分子质量标准; 1~3: 部分阳性质粒酶切

Fig.4 The result of enzyme digestion some positive plasmid M:DL2000 Marker; 1~3: enzyme digestion some positive plasmid

2.5 E0基因序列比对分析

将获得的8株E0基因核苷酸序列、推导氨基酸序列与9株参考毒株进行比对分析，同源性见表1，系统发生树见图5。

表1 E0核苷酸、氨基酸序列同源性比较

Table 1 The homology of E0 nucleotide and amino acid sequence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		97.6	98.3	97.4	97.0	97.3	99.0	98.8	94.6	84.4	92.6	84.4	85.3	85.9	86.0	86.8	84.5
2	95.5		97.4	98.8	98.4	98.6	98.1	97.9	94.8	83.8	93.0	83.8	84.9	85.8	85.9	86.4	83.9
3	96.3	96.3		97.1	96.8	97.0	98.8	98.5	94.6	84.5	92.5	84.5	85.6	86.0	86.1	86.9	84.6
4	95.9	98.1	97.4		98.6	98.9	97.9	97.6	94.8	84.0	93.3	84.0	85.0	86.0	86.1	86.6	84.1
5	94.8	97.0	95.5	97.4		98.5	97.5	97.3	94.6	83.4	93.1	83.6	84.3	85.1	85.3	85.8	83.5
6	95.1	97.4	95.9	97.8	96.6		97.8	97.5	94.6	83.6	92.9	83.6	84.6	85.5	85.6	86.1	83.8
7	97.4	97.4	98.1	97.8	96.6	97.0		99.3	95.4	85.0	93.1	85.0	85.9	86.5	86.6	87.4	85.1
8	96.6	96.6	97.4	97.0	95.9	96.3	98.5		94.9	84.9	92.9	84.9	85.5	86.1	86.3	87.0	85.0
9	95.9	96.6	96.6	97.0	95.9	96.3	98.1	97.0		84.0	94.1	84.0	84.9	85.8	85.9	86.5	84.1
10	86.9	86.9	88.0	87.3	86.1	86.5	88.8	88.4	88.4		83.8	99.3	94.9	95.9	95.8	94.8	99.9
11	94.4	95.1	95.1	95.5	94.8	94.8	96.3	95.5	97.8	88.4		83.5	84.4	85.0	85.1	85.8	83.9
12	86.1	86.1	87.3	86.5	86.1	85.8	88.0	87.6	87.6	98.5	88.0		94.9	95.9	95.8	94.8	99.4
13	88.0	88.0	89.1	88.4	87.3	87.6	89.9	89.5	90.3	94.8	90.3	94.0		97.3	97.1	96.4	95.0
14	87.6	88.4	88.8	88.8	87.6	88.0	89.5	89.1	89.9	94.4	90.6	93.6	97.4		99.9	97.4	96.0
15	87.6	88.4	88.8	88.8	87.6	88.0	89.5	89.1	89.9	94.4	90.6	93.6	97.4	100		97.5	95.9
16	89.5	89.5	90.6	89.9	88.8	89.1	91.4	91.0	91.4	95.1	91.4	94.4	98.1	97.8	97.8		94.9
17	87.3	87.3	88.4	87.6	86.5	86.9	89.1	88.8	88.8	99.6	88.8	98.9	95.1	94.8	94.8	95.5	

注：表格右上角为核苷酸同源性，左下角为氨基酸同源性；1-17分别代表SXXY01-E0、SXXY02-E0、SXBj01-E0、SXWN01-E0、SXWN02-E0、SXXA01-E0、SXXA02-E0、SXHZ01-E0、GXWZ02、HCLV、Paderborn、Rimes、Shimen、ALD、Alfort187、Brescia、C HVRI。

从表1可以看出，8株流行毒E0核苷酸、氨基酸同源性最高的是SXXA02-E0与SXHZ01-E0，分别为99.3%和98.5%，最低的是SXXY01-E0与SXWN02-E0，分别为97%和94.8%，其他各株相比同源性在此之间。从数据可见，这8个流行毒株之间同源性较高。与参考毒株相比，核苷酸同源性最高的是SXXA02-E0和GXWZ02，为95.4%，

最低的是SXWN02-E0和HCLV，为83.4%；氨基酸同源性最高的仍为SXXA02-E0与GXWZ02，为98.1%，最低的是SXXA01-E0与Rimes，仅为85.8%。

2.5 E0基因序列系统发生树分析

采用DNASTAR软件绘制E0基因系统发生树，见图5。

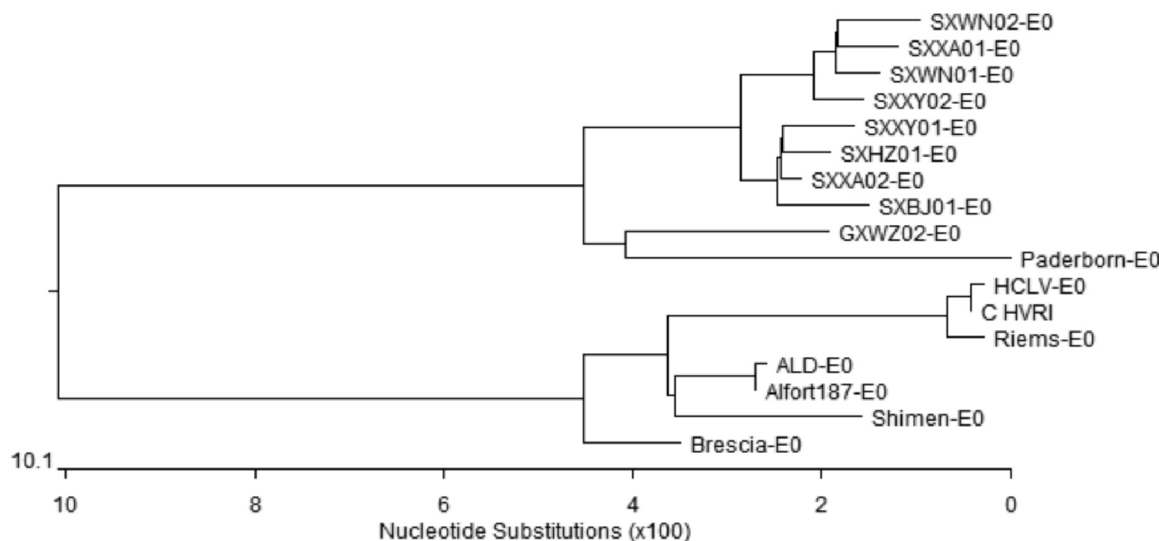


图5 CSFV流行毒株E0基因与参考毒株的系统发生树

Fig.5 Phylogenetic tree of E0 gene

从进化树图可以看出，所有比对毒株分为两大基因群，HCLV、Rimes、Shimen、ALD、Alfort187、Brescia和C HVRI形成一个大的分支，为基因 I 群，而8个流行毒株与GXWZ02、Paderborn形成另一个大的分支，为基因 II 群。

3 讨论

猪瘟是猪群重大疫病之一，其快速诊断在防控猪瘟上具有重要作用。目前主要的诊断方法有荧光抗体染色、兔体中和试验、酶联免疫吸附试验、免疫胶体金技术和RT-PCR技术等。在这些方法中，RT-PCR技术具有快速、灵敏、特异的优点，适合大批量检测。许多学者也针对CSFV不同基因建立了RT-PCR诊断方法，主要针对E2、NS5B、3' -UTR等区域^[9]。本研究选取了E0作为靶基因，原因是E0基因相对保守，便于扩增，并且扩增产物可直接进行回收测序，对研究E0基因的变异有重要意义。试验表明，建立的方法检测cDNA含量极限为 6.7×10^5 ng/L，在常见的猪群疫病病毒中仅能从CSFV中扩增特异性条带，提示建立的方法灵敏度高，特异性好。

应用本方法对采集的陕西省部分地区32份疑似猪瘟病料进行了检测，发现有12份病料为阳性，阳性率为37.5%，表明本方法能够很好的

检测组织病料。此外，结果显示在陕西部分猪场猪瘟感染强度仍然较高，猪瘟仍是猪场防控的重点疫病，这一结果与其他学者近年研究观点相似^[10]。

近年来，猪瘟免疫失败的报道屡见不鲜，有许多研究认为CSFV在长期免疫压力下基因变异是原因之一^[11-12]。E0蛋白具有Rnase活性，与病毒持续感染机体有直接关系，因而研究E0基因变异趋势有重要意义^[13-14]。本研究发现，测定的8株流行毒株E0基因与我国疫苗毒株HCLV、C HVRI同源性仅为83.4%~85.1%，氨基酸同源性仅为86.1%~89.1%，呈现出较明显的远离疫苗株变异趋势。E0蛋白中，氨基酸基序SLHGIWPE和EWNKHGWC具有Rnase活性，分别定位于第47~54位和第94~101位。比较发现，8个流行毒株的E0蛋白SLHGIWPE基序相同，有趣的是，与参考毒株相比，第54位的氨基酸大多数为E，但C HVRI、HCLV和Rimes三个疫苗株均为G，这一变异是否和毒株毒力有关，尚未见到相关文献。EWNKHGWC基序比较发现，除SXWN02第94位由E变异为K外，其他毒株均未发生任何变异。SXWN02这一变异为首次发现，尚未见到相似的公开报道，这一变异对毒株毒力、致病性有何影响，值得深入研究。

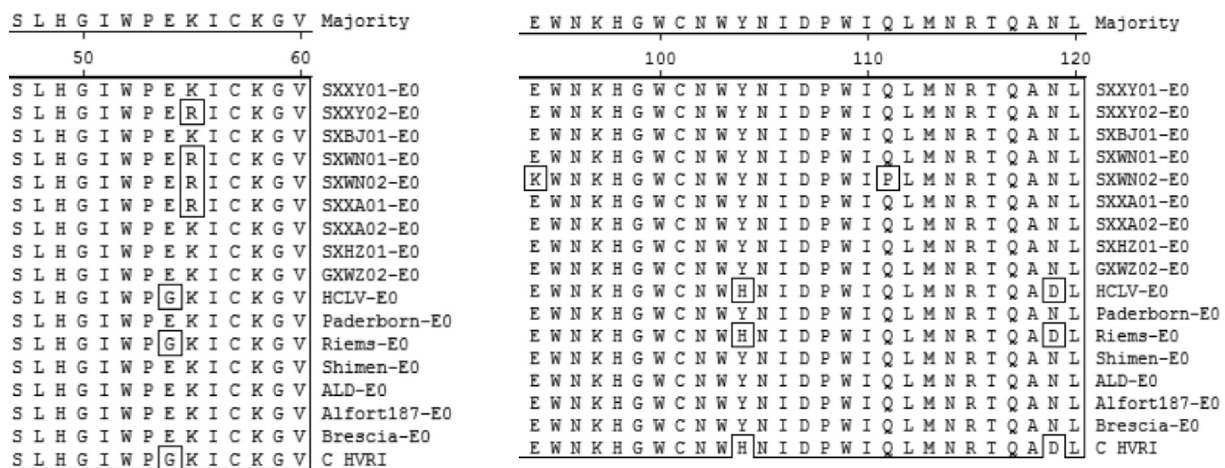


图6 2个Rnase活性区域推导氨基酸序列比较

Fig. 6 Comparison of deduced amino acid sequences of two domain of Rnase activity

总之，本研究建立了一种特异性好、灵敏度高的RT-PCR检测猪瘟病毒方法，并将克隆的E0进行了序列分析。以前研究认为E0具有Rnase活性的氨基酸基序高度保守，未发现变异，但在本研究中首

次发现了Rnase活性氨基酸基序的变异现象，值得关注。综合多位学者的研究成果，CSFV基因变异远离疫苗株已成为普遍现象，且在一些关键位点上呈现变异增多的趋势。这一情况需要引起高度重

视, 虽然目前疫苗尚能保护猪群^[15], 但随着病毒变异的积累由量变到质变, 其后果难以预料。因此, 我国需要做好针对流行毒株新疫苗的开发工作。

参考文献

- [1] Barbara E. Straw. Diseases of Swine[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008, 325-335.
- [2] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestiviruses [J]. Advance Virus Research, 1996, 47: 53-118.
- [3] Rumenapf T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the envelope glycoprotein of pestivirus [J]. Journal Of Virology, 1993, 67: 3288-3294.
- [4] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A, et al. Inactivation of the Rnase activity of glycoprotein Erns of classical swine fever virus in a cytopathogenic virus [J]. Journal Of Virology, 1998, 72(1): 151-157.
- [5] 朱小甫, 张志, 李晓成, 等. 猪瘟病毒RT-nested PCR检测方法的优化和应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(6): 11-14.
ZHU X F, ZHANG Z, LI X C, et al. Optimization and application of RT-nested PCR detection for classical swine fever virus [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Ed., 2007, 35(6): 11-14. (in Chinese)
- [6] 朱小甫, 李晓成, 陈德坤, 等. 猪瘟诊断技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2007, (24)2: 45-47.
ZHU X F, LI X C, CHEN D K, et al. Progress of swine fever diagnostic techniques [J]. China Animal Quarantine, 2007, (24)2: 45-47. (in Chinese)
- [7] Wirz B, Trascbin J D, Muler H. Detection hog cholera virus by polymerase chain reaction [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31: 1148-1154.
- [8] 王波, 张鹏, 杨增岐, 等. 陕西省PRRSV与CSFV, PCV2, PRV混合感染的检测[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 27-30.
WANG B, ZHANG P, YANG Z Q, et al. Detections of the Co-infection of PRRSV, CSFV, PCV2 and PRV in Shaanxi Province, 2009, 18(5): 27-30. (in Chinese)
- [9] 吴旭锦, 朱小甫, 陈德坤. 2006-2007年陕西省古典猪瘟流行毒株E0基因的克隆及序列分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 36(1): 16-22.
Wu X J, Zhu X F, Chen D K. Cloning and sequence analysis of E0 gene of virulent classical swine fever virus isolates in Shaanxi Province in 2006-2007 [J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2010, 36(1): 16-22. (in Chinese)
- [10] 王琴, 宁宜宝, 王在时, 等. 猪瘟病毒流行株与疫苗株Erns基因的序列分析[J]. 中国农业科学, 2004, 37(3): 446-452.
Wang Q, Ning Y B, Wang Z S, et al. Sequence analysis of the Erns gene of field isolates and vaccine strains of hog cholera virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(3): 446-452. (in Chinese)
- [11] 朱小甫, 吴旭锦. 陕西省部分地区猪瘟流行毒株与疫苗毒株E2基因主要抗原区序列变异分析[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2011, 29(6): 24-28.
ZHU X F, WU X J. Sequence Analysis of E2 Gene of Virulent Classical Swine Fever Virus Isolates in Shaanxi Province and Vaccine Strains [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science, 2011, 29(6): 24-28. (in Chinese)
- [12] 万靖, 陈宁, 童超, 等. 猪瘟病毒浙江分离株体外生长特性及其囊膜糖蛋白E2分子的变异分析[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(08): 794-798.
WAN J, CHEN N, TONG C, et al. Growth characteristics of classical swine fever virus strains isolated in Zhejiang and genetic variations of their envelope glycoprotein E2 [J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(08): 794-798. (in Chinese)
- [13] Fernandez-Sainz I, Holinka L G, Gavrilov B K, et al. Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine [J]. Virology, 2009, 386(1): 210-216.
- [14] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein Erns of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation [J]. J Virology, 1999, 73(12): 10224-10235.
- [15] 王在时, 丘惠深, 郎洪武, 等. 猪瘟病毒流行株与疫苗株主要抗原编码基因差异研究[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(1): 1-3.
WANG Z S, QIU H S, LANG H W, et al. Studies on the Essential Antigen Coding Gene Difference of the Field Isolate Strains and Vaccine Strain of Hog Cholera Virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2001, 35(1): 1-3. (in Chinese).

[责任编辑、校对: 王军利]

Established RT-PCR Method of Detection CSFV and Analysed E0 Gene of CSFV in Some Areas of Shaanxi Province

WU Xu-jin

(Yizhi College of Agriculture and Forestry, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

Abstract: 【 Objective 】 In order to established detection CSFV RT-PCR method based on E0 gene, To provide a reliable method for clinical diagnosis, and analysis E0 gene sequence, revealed molecular characteristics of E0 gene of CSFV, provide a reference for the prevention and control of classical swine fever. 【 Method 】 According to CSFV reference sequences in GenBank, we designed and synthesized two pairs of primers, tested RT-PCR method detection sensitivity, specificity and application of clinical detection, and obtained 8 E0 gene sequences. 【 Result 】 The method detection minimum limit was $6.7 \times 10^{-5} \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, it can not obtain target gene from BVDV, PRRSV, PCV-2, PRV and PPV, this result confirmed the method has high sensitivity and specificity. Using the method tested 32 suspected swine fever tissue and found that 12 were positive, the positive rate of 37.5%. Sequence analysis showed that eight prevalent strains E0 nucleotide and amino acid homology shared 97% ~99.3% and 94.8%~ 98.5% respectively. Compared with the reference strains and found that the nucleotide homology was 83.4% ~ 95.4% , amino acid homology was 85.8% ~ 98.1%. The nucleotide homology was only 83.4% ~ 85.1% and amino acid homology was only 86.1% ~ 89.1% by compared with vaccine strain HCLV, C HVRI .It was showing that a significant variation trend away from the vaccine strain. Phylogenetic analysis revealed that eight pandemic strain belongs to genotype II group. It was first discovered E0 Rnase activity motifs 94 sites mutated E→K from a pandemic strain (SXWN02 strain), but the other sites do not mutated. 【 Conclusion 】 The established RT-PCR method has high sensitivity and specificity and it can be used clinical diagnosis. It was still serious infection CSFV in some areas in Shaanxi province, we need to make prevention and control work. We found a greater mutation of pandemic strain E0 gene, especially appeared in key site variant strains, it need to pay close attention.

Keywords: classical swine fever; RT-PCR method; E0 gene; molecular characteristics

赫光中教授荣获陕西省第八届高等学校教学名师称号

按陕西省教育厅公布的“关于表彰第八届高等学校教学名师的通知”（陕教高〔2014〕13号），我院赫光中教授获得了陕西省教学名师称号。

赫光中教授，医学院护理专业学科带头人，长期在一线从事医疗教学工作，创立了具有鲜明咸阳职院特色的“学院建病房、医院设课堂”的“三一制”专业人才培养模式；开发了本专业“工学结合的方向化、学分制人才培养方案”；形成了“围着病床学护理”的理实一体教学模式，对学院人才培养工作、专业建设和课程建设起到了积极的示范引领作用。（教务科研处 吕玉梅）