

文章编号 :1003-8701(2010)03-0030-05

# 分子生物学技术在猪流感诊断中的应用

谢金文<sup>1,2</sup>, 苗立中<sup>2</sup>, 沈志强<sup>1,2</sup>

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600; 2. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600)

**摘要:**猪流感是由正粘病毒科猪流感病毒引起的猪的一种急性、热性和高度接触性、群发性呼吸道疾病,其临床上以发病急促、高热咳嗽、鼻中流出分泌物、呼吸困难、衰竭、怀孕母猪繁殖障碍、流产、死亡等病症为特征。目前,猪流感在我国各地广泛存在和发生,给养猪业带来了巨大的经济损失,并且严重危害人类的健康。文章就猪流感分子生物学诊断技术进行简要概述,以期对猪流感的及时诊断提供参考。

**关键词:**猪流感;分子生物学;诊断

中图分类号:S851.3

文献标识码:A

## Application of Molecular Biology in Diagnosis of Swine Influenza

XIE Jin-wen<sup>1,2</sup>, MIAO Li-zhong<sup>2</sup>, SHEN Zhi-qiang<sup>1,2</sup>

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600;

2. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co, Ltd. Binzhou 256600, China)

**Abstract:** Swine influenza, caused by Orthomyxoviridae Division swine influenza viruses, is an acute, fever and a high degree of contact, and repeated respiratory disease. The clinical exhibition characterized the rapid onset, high fever cough, nasal discharge from the breathing difficulties, failure, and pregnant swine reproductive failure, abortion, death and so on. At present, the swine influenza widespread occurred in China and around and brought huge economic losses and serious harm to human health. It is brief overview on the swine influenza diagnostic techniques of molecular biology in the paper, to provide the reference of timely diagnosis of swine influenza.

**Keywords:** Swine influenza; Molecular biology; Diagnosis

猪流行性感 冒,简称猪流感(Swine influenza, SI),由猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)引起的不同日龄、性别和品种猪的一种急性、热性和高度接触性、群发性呼吸道疾病,其临床上以发病急促、高热咳嗽、鼻中流出分泌物、呼吸困难、衰竭、怀孕母猪繁殖障碍、流产、死亡等病症为特征。

目前已经发现流感病毒的血凝素(Hemagglutinin, HA)有16个亚型,神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)有9个亚型,而发现的SIV至少有H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H2N3、H3N1、H3N6、H4N6、H5N1和H9N2共10种不同的血清亚型<sup>[1-2]</sup>。但目前造成世界性流行的SIV血清型只有H1N1、

H1N2和H3N2。同时也有其它血清型的零星报道,如英国的H1N7、美国的H4N6、中国的H9N2和H5N1等,但都没有造成大规模的流行<sup>[3]</sup>。

该病一年四季都可发生,但多发生于冬季、早春等天气骤变季节,各种年龄、品种和性别的猪均能感染。单纯的SIV感染能引起猪的高发病率(几乎100%)和低死亡率(病死率≤1%),病猪一般能够迅速康复,此病的发生只使患病猪生产性能下降,推迟上市。其严重程度与流行毒株、猪只日龄和健康状况、环境条件以及与其他病原体并发继发感染相关,常因与其他病原体混合感染,使死亡率明显增高<sup>[4]</sup>。由于SIV是猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)的主要病原体之一,感染后常发生肺炎,还可引起怀孕母猪繁殖障碍。SIV可损害呼吸道上皮细胞,容易继发和并发传染性胸

收稿日期:2009-12-11 修回日期:2010-01-06

作者简介:谢金文(1981-),男,助理研究员,硕士,主要从事分子生物学与兽医免疫学方面的研究。

膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)、巴氏杆菌和弓形虫感染等,使疫病更为复杂,死亡率增加,给养猪业带来了极大的危害。

本病主要是猪与猪之间经空气传播,或因猪群中转入带毒猪只而传播。另外,猪的种间屏障相对较低,猪可被禽流感病毒和人流感病毒感染,因此,猪被认为是人、禽和(或)猪流感病毒通过基因重排产生新的亚型流感病毒的“混合器”或活载体,在流感病毒传播链中起到中间宿主的作用,因此猪流感已成为世界医学界共同关注的焦点。SIV 不仅可感染猪,同时也具有感染人、禽、马、鸟类和其他哺乳动物的能力。因此,猪流感的影响不仅在于其显而易见的兽医传染病的意义,更在于其深远的公共卫生意义<sup>[3]</sup>。

自美国 1918 年首次报道本病以来,欧、美、亚、非、澳等世界各大洲均有本病的发生和流行,是一种世界性的猪呼吸道传染病,但主要以地方流行为主,已成为规模化猪场的常发传染病。近年来,我国不少省市地区调查表明,我国猪群中普遍受 H1 亚型和 H3 亚型 SIV 感染,Si 抗体阳性率呈上升趋势。因此,本文综合阐述了猪流感的分子生物学诊断技术的研究,为及早及时确诊猪流感提供技术参考。

## 1 常规聚合酶链式反应

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)是一种人工体外 DNA 扩增技术,最早是由 Mallis 等于 1985 年建立的,并于 1987 年完成了自动化操作,极大地推动了分子生物学的发展,同时也为病毒性疾病的诊断提供了一个崭新的手段。在临床病料检测中,要经常检测 RNA 病毒,而通常所用的 PCR 试剂盒中的是 DNA 聚合酶,不能以 RNA 为模板直接扩增,故在进行 PCR 前先将病毒 RNA 反转录为 cDNA,因此建立了 RT-PCR 技术。随着猪流感病毒分子生物学研究的深入,一些基于不同靶基因的 RT-PCR 检测方法在国内外相继建立。RT-PCR 作为检测病毒的一种方法,特异性强、灵敏度高、重复性好、操作也不复杂、整个过程在一天内即可完成,能达到快速检测的目的,并且适合于各种含毒材料的检测,可用于临床。目前,在许多实验室里已广泛应用 PCR 方法来检测猪流感病毒,且检测的敏感度达到了 pg

水平<sup>[5-6]</sup>。吕翠等<sup>[7]</sup>根据猪流感病毒的 M 基因的序列,设计合成了 1 对引物,建立了检测猪流感的 RT-PCR 方法。应用该方法对 H1、H3、H9 亚型的猪流感病毒进行基因扩增,均获得了分子量为 460bp 的特异性目的片段,而对 PRRSV、猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus 2, PCV2)、猪伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)进行同条件检测,结果均为阴性;SIV 扩增产物测序结果与 SIV 其他毒株序列同源性达 99%~100%。敏感性试验表明,该方法可检测到 103 EID<sub>50</sub> 的 SIV;可直接从猪流感病毒感染小鼠的组织样品中检测到病毒。Fouchier 等<sup>[8]</sup>用相当于 4 $\mu$ L 尿囊液中的 RNA 进行 PCR 扩增,对于检测的每株 A 型流感病毒,均扩增了 244bp 片段;用相当于 0.2TCID<sub>50</sub> 流感病毒的 RNA 进行 PCR 扩增,可见 244bp 预计大小的 DNA 片段,表明该法快速、敏感、特异,适于目前所知所有 A 型流感病毒变异株。

## 2 RT-PCR-ELISA 技术

RT-PCR-ELISA 诊断技术是将 RT-PCR 方法和高灵敏度的地高辛检测系统相结合,用地高辛标记猪流感病毒的 RT-PCR 产物,再建立猪流感的 PCR-ELISA 方法。用生物素标记的探针在链亲和素包被的微量板孔中杂交捕获地高辛标记的 PCR 产物,最后进行免疫显色得出结果。该方法的敏感性比常规琼脂糖凝胶电泳检测高 100 倍以上,克服了组织样品中猪流感含量少而难以检测的困难,为猪流感的早期诊断和分子流行病学调查提供了一条新途径<sup>[9]</sup>。Munch 等<sup>[9]</sup>建立了 RT-PCR-ELISA 方法,该方法比 RT-PCR 敏感 100 倍,并可用于隐性感染的检出。但该方法对 SIV 的检测国内未见报道。

## 3 套式 RT-PCR 技术

套式 RT-PCR 技术是一种先后用两套引物(外引物和内引物)对反转录产生的 cDNA 进行扩增的 PCR 技术,将外引物扩增片段又经内引物扩增,这样既可增加反应的特异性,又可获得高丰度特异靶序列,增加了敏感性。将 RT-PCR 技术与石蜡切片结合,检测石蜡包埋组织中 RNA 进行基因分析已成为一个热点,该技术已被广泛应用于临床,特别是病毒感染性疾病的基因诊断<sup>[10]</sup>。祁贤等<sup>[11]</sup>针对 SIV 保守基因 NP(核蛋白 Nucleocapsid protein, NP)建立了套式 RT-PCR 法,其敏感性与 RT-PCR-ELISA 法相同,但比后者易于操作。35

份临床样品套式 PCR 阳性率为 28/35, 鸡胚病毒分离方法阳性率 23/35, 两者符合率为 82%, 且比后者敏感。部分临床样品采自无明显流感症状的猪体, 经套式 RT-PCR 和病毒分离都为阳性, 表明该法也适用于 SIV 隐性感染的检出。

## 4 多重 RT-PCR 技术

多重 PCR, 又名复合 PCR, 是一种特殊的 PCR 形式, 是在单一 PCR 基础上发展起来的新技术, 通过寡核苷酸引物组合, 在一个 PCR 反应体系中同时扩增多个靶序列, 其扩增的特异性和效率与单一 PCR 相当, 但同时可扩增针对不同模板的多个靶序列, 能节约时间和精力, 在样品的鉴别诊断中是一项简便、快速的方法, 尤其适用临床病原分型检测。Choi 等<sup>[12,13]</sup>采用多重 RT-PCR 方法对 SIV 和人流感病毒进行了分型研究, 但仅限于对已知 H1、H3 和 N1、N2 亚型的鉴定, 不能确定被检样品中是否还有其他亚型的流感病毒。刘惠莉等<sup>[14]</sup>根据 GenBank 登录的猪流感病毒各血清亚型 NP 基因, H1、H3 亚型 HA 基因, N1、N2 亚型 NA 基因核苷酸序列, 经 DNASTar 软件类比选择保守区设计引物, 经对不同亚型模板的扩增、检验, 建立的 2 个多重 RT-PCR 体系可用于猪流感病毒及 H1/H3 血凝素亚型、N1/N2 神经氨酸酶亚型的快速鉴别、诊断。特异性试验检测多重 RT-PCR 不能扩增其他猪病毒核酸, 核酸的最低检测量达 0.2ng。采集临床具有呼吸道症状的猪肺、鼻腔棉拭子等 85 份, 与鸡胚分离及血凝/血凝抑制试验比较, 阴性样品检测符合率达 100%。温纳相等<sup>[15]</sup>为区分 H1、H3 和 N1、N2, 以便及时掌握猪流感流行情况, 为更准确地选用猪流感疫苗及免疫提供更科学的理论依据, 建立了快速、灵敏、准确的猪流感双重 RT-PCR 检测技术。吕晓丽等<sup>[16]</sup>根据已发表的猪乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)的 E 基因序列和猪流感病毒的 NP 基因序列, 设计合成了 2 对特异引物, 最终成功地建立了 JEV 和 SIV 的复合 RT-PCR 诊断方法。该方法特异性较好, 敏感性较高, 对 JEV 和 SIV 的最低检出量分别为 100 和 10pg 的 cDNA。

## 5 实时荧光定量 PCR 技术

所谓实时荧光定量 PCR 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术于 1996 年由

美国 Applied Biosystems 公司推出。与常规 PCR 相比, 它的特异性更强, 有效解决了 PCR 产物污染的问题, 且自动化程度高, 同时能对起始模板进行准确定量。由于实时定量荧光 PCR 技术的种种优点, 使得它在动物疫病的诊断中也有广泛的应用。目前, 实时定量荧光 PCR 技术已经被正式写入我国的禽流感检测技术规范, 作为一种法定的诊断方法。该技术也逐渐成为猪流感诊断方法研究的方向。由于实时定量荧光 PCR 仪可以同时检测多种荧光, 因此可以进行多重检测, 即在同一个反应体系中, 将不同探针标记不同的荧光基团, 这样就可以同时检测多种疾病的病原, 这也是疫病诊断的一个研究方向<sup>[17-18]</sup>。Landolt 等<sup>[19]</sup>将基于 M 基因保守部位的实时 RT-PCR 和两种细胞系(MDCK 和 Mv1Lu) 分离病毒检测鼻拭子样品进行比较, 结果显示它的特异性达 100%, 敏感性达 88%~100%, 表明实时 RT-PCR 在筛选大量鼻拭子样品中的 SIV 时是一种快速、准确的方法。Richt 等<sup>[20]</sup>建立的实时 RT-PCR, 能检测 H1 和 H3 SIV, 敏感性可达每一反应仅需 2 个 M 基因特异的负链 RNA 分子, 试验感染猪的肺洗液中仅需 0.05 TCID<sub>50</sub>。与病毒分离相比, 该 RT-PCR 的敏感性和特异性分别为 94%和 85%。张春明等<sup>[21]</sup>根据猪流感病毒 M 基因的保守序列, 设计并合成一对特异性引物和 Taq Man MGB 探针, 建立了 SIV M 基因实时荧光定量 PCR 检测方法。该方法的敏感性可达到 1 个 EID<sub>50</sub>, 样品检测与病毒滴定及病毒分离结果的符合率均达到 100%, 该方法特异性强、重复性好, 有望成为 SIV 的一种特异、敏感、快速的定量检测方法。段廷云等<sup>[22]</sup>根据 GenBank 中 H1N1 亚型猪流感病毒 NP 基因的序列(DQ889686), 利用 Premier express 设计并合成 1 对引物和相应的 TaqMan 探针, 从猪流感病毒 HN407 株接种的鸡胚尿囊液中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增 NP 基因。将鉴定正确的 NP 基因片段克隆入 pGEM-T Easy 载体中, 转化大肠杆菌 JM109, 经 PCR 及测序鉴定后得到阳性重组质粒。以该阳性重组质粒为荧光定量 PCR 标准品模板建立标准曲线。对探针浓度、引物浓度、镁离子浓度和退火温度进行优化, 建立了最佳的荧光定量 PCR 反应体系和扩增程序。经临床应用表明荧光定量 PCR 的建立为早期诊断猪流感病毒、定量分析猪流感病毒感染程度奠定了基础。

## 6 NASBA 法

NASBA 即核酸序列依赖的扩增(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA), 是一种扩增 RNA 的新技术, 是由一对引物引导的、连续均一的、体外特异核苷酸序列等温扩增的酶促反应过程。反应在 42℃ 进行, 可以在 2 h 左右将模板 RNA 扩增约  $10^9$  倍, 并且不需要任何特殊的仪器。Lau L T 等<sup>[23]</sup>将 NASBA 方法应用于 AIV 检测, 整个试验过程在 6 h 内即可完成, 且具有很高的敏感性和特异性。目前, 国内还没有应用该方法检测 SIV 的报道, 由于 SIV 和 AIV 同属 A 型流感病毒, NASBA 在 SIV 检测上应用前景广阔<sup>[5]</sup>。

## 7 核酸探针技术

核酸探针技术是以病毒基因组为模板, 在分子标记的基础上制备探针, 反转录生成 cDNA 后进行 Southern blot。特异的核酸探针会在不同病毒基因组 cDNA 上产生特异性条带。核酸探针技术有特异性强、准确可靠的优点, 但需要合成核酸探针, 诊断费用较高<sup>[6]</sup>。吕翠等<sup>[24]</sup>以地高辛(DIG)标记猪流感病毒 M 基因的保守片段制成核酸探针, 与 H1 及 H3 亚型的 SIV 的 cDNA、PRRSV 的 cDNA、PCV2 的 DNA、CSFV 的 cDNA、PRV 的 DNA 进行斑点杂交, 以检测探针的特异性, 结果该探针仅与 H1 及 H3 亚型的 SIV 的 cDNA 杂交呈阳性, 与其余病毒杂交呈阴性; 敏感性试验显示, 探针最低能检出约 5pg 的 H3 亚型的 SIV RT-PCR 产物。应用该探针对 35 份疑似 SI 临床病料进行检测, 结果检出 9 份阳性, 与 RT-PCR 检测结果一致。研究结果表明, 建立的 DIG 标记的核酸探针特异性强, 敏感性高, 适合于对 SI 的诊断和流行病学调查。

## 8 基因芯片检测技术

基因芯片(Gene Chip)通常指 DNA 芯片, 其基本原理是将大量寡核苷酸分子固定于支持物上, 然后与标记的样品进行杂交, 通过检测杂交信号的强弱进而判断样品中靶分子的数量。基因芯片集成了探针固相原位合成技术、照相平板印刷技术、高分子合成技术、精密控制技术和激光共聚焦显微技术, 使得合成、固定高密度的数以万计的探针分子以及对杂交信号进行实时、灵敏、准确的检测分析变得切实可行。基因芯片技术在分子生物学研究、临床检验、生物制药和环境医学等领域显示出了强大的生命力, 其中关键就是基因芯片具有微型化、集约化和标准化的特点, 从而有可能

实现“将整个实验室缩微到一片芯片上”的愿望。基因芯片技术在动物疾病诊断等领域有广泛的应用前景, 对于 SI 的防控也具有一定的意义。Li J. 等<sup>[25]</sup>建立了用以鉴别流感病毒型和亚型的 DNA 芯片检测方法, 设计的 26 个引物对可从 A 型流感病毒的 HA(H1、H2、H3)、NA(N1、N2)和 NP 基因, 以及 B 型流感病毒的 HA、NA、NP 基因上的目的基因杂交, 从而达到鉴别型和亚型的目的, 他们认为 DNA 芯片的方法可以作为 PCR 方法的一个补充, 但这种方法检测临床样品中的核酸序列的有效性还有待于作进一步的研究<sup>[5]</sup>。陈红军<sup>[26]</sup>根据流感病毒的 HA 和 NA 基因序列间的差异性, 采用基因芯片技术, 借助多重 PCR 和核酸标记技术, 构建了猪流感病毒亚型分型基因芯片, 用于猪流感病毒亚型的分型, 具有检测 A 型流感病毒和同步鉴别猪流感病毒 H1、H3、H9、N1 和 N2 亚型的功能。并利用制备好的基因芯片检测了从青岛、烟台、潍坊、济宁、南昌、葫芦岛等市健康猪群或病死猪采集的鼻拭子或组织 426 份, 检测结果和 PCR 的符合率在 87% 以上, 鸡胚传代病毒分离检测结果同基因芯片与 PCR 的检测结果相差比较大。结果表明猪流感病毒分型基因芯片可以作为猪流感病毒监测的一种重要手段, 其灵敏度高于 PCR 方法。

SI 是主要的猪免疫抑制病之一, 在我国养猪场中普遍存在, 难以根除。SIV 不仅给畜禽养殖造成了重大经济损失, 而且 SIV 在流感病毒的种间传播中具有重要作用, 对人类健康造成了很大的威胁。随着分子生物学的不断发展, 基于 PCR 技术的新的快速诊断方法的相继建立, 为快速准确检测 SIV 提供可靠的技术手段, 为最终控制和消灭 SI 奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Ma W., Vincent A. L., Gramer M., et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States[J]. Proc Natl Acad Sci. USA, 2007, 104(52): 20949-20954.
- [2] Ma W., Gramer M., Rossow K., et al. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States [J]. J Virol, 2006, 80(10): 5092-5096.
- [3] 韩庆功, 张智勇, 崔艳红. 我国猪流感的流行现状与危害[J]. 吉林农业科学, 2008, 33(5): 49-52.
- [4] 黄如渠, 潘新尤, 钟志林. 猪流感和猪瘟混合感染并发细菌感染病例[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(10): 48-49.
- [5] 王方昆, 王一成, 袁秀芳, 等. 猪流感诊断方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(4): 17-21.

- [6] 毕保良,李进涛,刘旭川,等. 分子生物学技术在猪瘟诊断中的应用[J]. 动物医学进展, 2009, 30(2): 106-108.
- [7] 吕翠,马小明,尹燕博,等. RT-PCR 技术检测猪流感病毒[J]. 中国农学通报, 2008, 24(10): 31-34.
- [8] Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11): 4096-4101.
- [9] Munch M., Nielsen L P., Handberg K. J., et al. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA [J]. Arch Virol, 2001, 146: 87-97.
- [10] 肖一红,尹训南,仇华吉,等. 用套式 RT-PCR 技术检测石蜡包埋组织中的猪瘟病毒 RNA [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 389-393.
- [11] 祁贤,陆承平,王贵平,等. 套式 RT-PCR 方法检测临床样品中的猪流感病毒[J]. 中国病毒学, 2004, 20(2): 200-202.
- [12] Choi Y K, Goyal S M, Kang S W. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays [J]. J Virol Methods, 2002, 102: 53-59.
- [13] Poddar S K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis [J]. J Virol Methods, 2002, 99: 63-70.
- [14] 刘惠莉,周宗清,邢继兰,等. 多重 RT-PCR 检测猪流感病毒及血清亚型[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(11): 1262-1265.
- [15] 温纳相,吴德铭,宋延华,等. 不同亚型猪流感病毒双重 RT-PCR 快速检测[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(12): 83-85.
- [16] 吕晓丽,崔保安,陈红英,等. 复合 RT-PCR 检测猪乙脑病毒和猪流感病毒方法的建立 [J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(4): 79-82.
- [17] Deng M Y, Wang H, Gordon B, et al. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR [J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 17: 574-578.
- [18] Risatti G, Holinka L, Lu Z, et al. Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus [J]. J Clin Microbiol, 2007, 9: 468-471.
- [19] Landolt GA, Karasin AI, Hofer C, et al. Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses [J]. Am J Vet Res, 2005, 66(1): 119-124.
- [20] Richt JA, Lager KM, Clouser DF, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the detection and differentiation of North American swine influenza viruses [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16(5): 367-373.
- [21] 张春明,乔传玲,陈艳,等. 猪流感病毒 M 基因实时荧光定量 PCR 诊断方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 805-810.
- [22] 段廷云,陈红英,崔保安,等. 实时荧光定量 PCR 检测 H1N1 亚型猪流感病毒 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 752-756.
- [23] Lau L T, Banks J, Aherne R, et al. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(2): 336-342.
- [24] 吕翠,马小明,尹燕博,等. 猪流感病毒 M 基因核酸探针的制备与应用 [J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 87-92.
- [25] Li J, Chen S, Evans D H, et al. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 696-704.
- [26] 陈红军. 猪流感病毒分型基因芯片的研制与应用 [D]. 西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2007.

(上接第 11 页) 100 mg/kg 时, 植株体内对 Cd 的富集逐渐下降, 这可能是由于百日草对周围环境中 Cd 的吸收, 同时 Cd 元素也会不断的被植株排出体外, 在对重金属的累积和交换的过程中逐渐达到平衡, 所以在 Cd 浓度为 100 mg/kg 时植株对重金属的富集效果较好。

### 3 结 论

在含不同 Cd、Pb 浓度的土壤中种植百日草的盆栽试验中, 通过对植株的各项生理生化指标以及植株体内富集重金属含量的测定, 试验结果表明 ①随着土壤中含 Cd、Pb 浓度的增大, 对种子的萌发均会起到抑制作用, 同时随着重金属浓度的增加, 植株体内的叶绿素含量、丙二醛含量也有明显的下降趋势。②在 Cd 浓度为 100 mg/kg 时, 百日草对 Cd 的富集效果最好; 在 Pb 浓度为 1 000 mg/kg 时, 植株对 Pb 的富集效果也较好, 此时植

株的长势与生物量也能够达到较好状态。

参考文献:

- [1] Sanka M, Strnad M, Vondra J, et al. Sources of soil and plant contamination in an urban environment and possible assessment methods [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1995, 59: 327-343.
- [2] 李恋卿,潘根兴,张平究,等. 太湖地区水稻土层土壤 10 年尺度重金属元素积累速率的估计 [J]. 环境科学, 2002, 23(3): 119-123.
- [3] 杨元根, PATERSONE, CAMPBELL C. 城市土壤中重金属元素的积累及其微生物效应 [J]. 环境科学, 2001, 22(3): 44-48.
- [4] 李波. 含油污水处理技术 [J]. 辽宁化工, 2007, 36(1): 56.
- [5] 侯士兵, 玄雪梅. 含油废水处理技术的研究与应用现状 [J]. 上海化工, 2009, 28(9): 11-12.
- [6] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 118-281.
- [7] 周化斌, 姜丹, 金卫挺. 镉对大豆种子萌发的影响 [J]. 种子, 2003, 130(4): 22-23.
- [8] 程炯, 吴志峰, 刘平, 等. 福建沿海地区不同用地土壤重金属污染及其评价 [J]. 土壤通报, 2004, 35(5): 639-643.