

# 高抗体水平种鸡 NDV 的分离鉴定和分子特性\*

马保臣<sup>1,2</sup> 何叶峰<sup>1</sup> 徐怀英<sup>1</sup> 王友令<sup>1</sup> 秦卓明<sup>1\*\*</sup>

(山东农业科学院家禽研究所 济南 250100)<sup>1</sup> (中国牧工商集团总公司 北京 100029)<sup>2</sup>

**摘要:** 从抗体水平较高、产蛋下降的种鸡群分离到一株新城疫病毒 (Newcastle Disease virus, NDV) SGM01, 经动物回归可产生 NDV 典型病变, 其 MDT、ICPI 和 IVPI 等分别为 50.5h、1.76 和 2.41, 表明为强毒。对其 F 和 HN 基因进行克隆测序, F 基因氨基酸多肽裂解位点的基序为<sup>111</sup>GRRQKRF<sup>117</sup>, 与强毒基序一致。基因分型表明 SGM01 属 VII 型。氨基酸同源比较显示: SGM01 与 LaSota、SQZ04 等基因 II 型的同源性为: 87.7% ~ 88.3%; 与 Taiwan95、Yunnan03 等基因 VII 型的同源性为: 95.7% ~ 98.2%; 与 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 等基因 IX 型的同源率为: 90.8% ~ 91.7%。HN 基因与 F 基因不同, 具有明显的时空性, SGM01、Taiwan95、SQZ04 等新近分离毒氨基酸高度同源, 同源性为: 95.3% ~ 97.2%, 显著高于与 LaSota (经典弱毒疫苗株) 和 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> (经典强毒株) 的同源性 87.4% ~ 89.0%。

**关键词:** 新城疫病毒, 高抗体水平, 分子特性

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0095-06

## Isolation, Identification and Molecular Characterization of a Velogenic NDV Isolate from a Broiler Flock in High Antibody Level Against NDV\*

MA Bao-Chen<sup>1,2</sup> HE Ye-Feng<sup>1</sup> XU Huai-Ying<sup>1</sup> WANG You-Ling<sup>1</sup> QIN Zhuo-Ming<sup>1\*\*</sup>

(Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100)<sup>1</sup>

(China Animal Husbandry Group Chaoyang, Beijing 100029)<sup>2</sup>

**Abstract:** A Newcastle disease virus (NDV) field strain SGM01 was isolated from a broiler flock in high antibody level against NDV, and identified by HA, HI cross test and animal regression. SGM01 was determined as a virulent strain with MDT of 50.5h, ICPI of 1.76, IVPI of 2.41 after plaque-purification. The F and HN gene of SGM01 were cloned and sequenced. Analysis of F gene indicated that SGM01 belonged to genotype VII. The amino acid sequence<sup>111</sup>GRRQKRF<sup>117</sup> in the F protein cleavage site in SGM01 strain is identical to virulent NDV. The homology analysis of F and HN gene sequences compared to reference strains from GenBank indicated that: The F protein amino acid sequence has homologies of 87.7% ~ 88.3% with published gene type II strains LaSota and SQZ04 *et al.*, 95.7% ~ 98.2% with genotype VII strains Taiwan95, Yunnan03 *et al.*, 91.8% ~ 91.7% with genotype IX strains F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> *et al.*. While HN genes were compared, SGM01 demonstrated a higher homologies of 96.5% ~ 97.2% with strains which were isolated in recent years, but lower homologies of 87.4% and 89.0% with LaSota and F<sub>48</sub>E<sub>9</sub>.

**Key words:** Newcastle disease virus, High antibody level, Molecular characterization

自 2001 年以来, 我国山东、江苏等养禽发达地区的产蛋鸡群普遍流行一种以临床轻微呼吸道症状、产蛋严重下降 (产蛋率通常从 90% 下降至 40%), 死亡率较低, 但对雏鸡致死率较高等为主要特征的疫病。危害的主要对象是处于产蛋高峰

期的鸡群, 发病率较高, 一旦发病, 少则 1 个月, 多则半年, 很难恢复到原来的生产水平, 且孵出的雏鸡质量差, 发病率高。与经典的新城疫 (Newcastle disease, ND) 不同, 发病鸡群通常具有较好的 HI 抗体滴度 [ $2^{8-11}$  (log2)], 这无疑对

\* 山东省科技攻关重点支持项目 (No. 030317)

山东省自然科学基金支持项目 (No. 031020101)

其他作者: 李 莉<sup>1</sup> 欧阳文军<sup>1</sup>

\*\* 通讯作者 Tel: +86-0531-88961344, Fax: +86-0531-88961344, E-mail: qinzm1997@163.com

收稿日期: 2006-04-19, 修回日期: 2006-06-10

于传统的新城疫免疫预防提出了挑战<sup>[1]</sup>。

为揭示 NDV 免疫失败的分子变异机制, 对决定 NDV 毒力的关键基因 F 和 HN 进行了相关研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 病原分离鉴定

**1.1.1 分离鉴定:** 山东肉种鸡场 30 周龄种鸡, 产蛋高峰突然发病, 7d 内产蛋率从 90% 下降至 30%, 死亡较少。采集发病鸡的气管、脑、输卵管等分别按 1:2 加入灭菌生理盐水, 匀浆后经超声波处理, 3,000 r/min 离心 15min, 取上清加青(链)霉素双抗至 2,000IU/mL (2mg/mL), 置 4℃ 冰箱过夜, 菌检合格后, 接种 SPF 鸡胚。经用特异性 ND、AIV-H<sub>9</sub> 和 AIV-H<sub>5</sub> 亚型禽流感、减蛋综合症 (EDS<sub>86</sub>) 等病毒单因子阳性血清进行 HI 交叉抑制试验做鉴别诊断。按常规利用 40 日龄 SPF 鸡进行动物回归试验。

**1.1.2 病毒纯化:** 利用 9~10 日龄 SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞 (CEF), 按文献 [2] 将分离株进行细胞培养, 以琼脂糖覆盖, 挑选蚀斑, 3 代后, 将蚀斑冻融 3 次, 接种 11 日龄 SPF 鸡胚, 作为毒种备用。

**1.1.3 试剂和物品:** AIV-II<sub>9</sub> 和 AIV-H<sub>5</sub> 单因子阳性血清由中国农业大学实验动物研究所提供, NDV 阳性血清自制。F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 购自中国兽药监察所。AIV-H<sub>9</sub> 和 AIV-H<sub>5</sub> 诊断抗原购自农业部哈尔滨兽医研究所。SPF 鸡和鸡胚均由山东农业科学院家禽研究所 SPF 鸡场提供。

Trizol 为 Gibco BRL 产品; AMV 逆转录酶、Rnasin、pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒、dNTPs 购自 TaKaRa 公司。PCR Master Mix 增强剂购自北京朋远公司。DH5α 由山东农业科学院家禽研究所禽病重点实验室保存。

### 1.2 生物学毒力测定

按照 OIE 方法<sup>[3]</sup>, 利用蚀斑纯化后的病毒分别进行鸡胚最小致死量 (MDT)、1 日龄雏鸡脑内致死指数 (ICPI) 和 6 周龄静脉接种指数 (IVPI) 测定。

### 1.3 序列测定

**1.3.1 引物设计:** 参照 GenBank 中 NDV 的 F 和 HN 序列, 设计两对引物, T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 用于扩增 F 基因

全长, HN<sub>1</sub> 和 HN<sub>2</sub> 用于扩增 HN 基因全长。引物由上海 Sangon 合成, 序列为: T<sub>1</sub>: 5' -ATGGGCTC-CAAACTTCTAC-3'; T<sub>2</sub>: 5' -TTGTAGTGGCTCT-CATC-3'; HN<sub>1</sub>: 5' -TCCGTTCTACCACATCACCA-3'; HN<sub>2</sub>: 5' -CGTCTTCCCAAGCATCCTAT-3'。考虑到 NDV 不同编码基因均有共同的起始序列<sup>[4,5]</sup>, 设计通用 RT 引物: 5' -ACGGGTAGAA-3'。

**1.3.2 所用物品:** Trizol 为 Gibco BRL 产品; AMV 逆转录酶、Rnasin、pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒、dNTPs 购自 TaKaRa 公司。PCR Master Mix 增强剂购自北京朋远公司。DH5α 由山东农业科学院家禽研究所禽病重点实验室保存。

**1.3.3 RT-PCR:** 按照 Trizol 试剂盒说明提取病毒 RNA, 加入经 DEPC 处理的灭菌超纯水 12μL 溶解 RNA。取 7μL RNA, 加入 10μmol/L RT 引物 4.5μL, 经 70℃ 变性 5min 后, 冰浴 5min, 依次加入下列体系: 5 × RT buffer 4μL; 10mmol/L dNTP 2μL; 40U/μL Rnasin 0.5μL; 10U/μL 的 AMV 2μL, 反应总体积 20μL, 混匀, 37℃ 1h。然后, 95℃ 5min, 冰浴 5min, -20℃ 保存。合成的 cDNA 可作为 PCR 扩增 F 和 HN 的模板。PCR 反应体系: cDNA 5μL, 上、下游引物各 1.0μL, 2 × PCR Master Mix 25μL, 补足灭菌水至 50μL。F (HN) 反应条件: 94℃ 3min, 然后 94℃ 1min, 54℃ 1min, 72℃ 2.5min (HN 为 2min), 进行 33 (HN 为 32) 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。以标准核酸分子量作对照, 1% 琼脂糖凝胶电泳检验。

**1.3.4 转化鉴定和测序:** 回收 PCR 产物, 将回收物连接 16℃ 1.5h 至 pGEM-T Easy Vector, 转化至感受态 DH5α, 均匀涂布于含 Ampicillin、IPTG、X-gal 的 LB 固体培养基平板, 37℃ 培养 14~16h。挑取白色菌落少量培养, 作 EcoR I 酶切鉴定和 PCR 扩增双重鉴定。将阳性质粒送上海博采公司测序。

### 1.4 NDV F 和 HN 基因氨基酸序列分析

从 GenBank 获取 LaSota 等已发表 F 和 HN 序列的 NDV 参考株, 结合本实验室克隆的 SKY03 等毒株 (见表 1)<sup>[6]</sup>, 结合已知基因型的部分毒株<sup>[7]</sup>, 按文献 [8] 进行基因分型。利用 DNASTar

软件, 比较 LaSota、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub>、Taiwan95 和 SGM01 等 4 株 NDV 代表株 F1/F2 多肽裂解位点氨基酸序列, 并分别对 SGM01 与 LaSota、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub>、Taiwan95 等国

内外新近发生的 NDV 毒株进行 F 和 HN 氨基酸同源性比较, 绘制系统发育树, 进而比较 SGM01 的 F 和 HN 基因氨基酸的遗传变异。

表 1 试验用新城疫毒株

Strain	Location	Host	Year	F Gene accession No	HN Gene accession No	Genotype
La Sota	USA	Chicken	1946	AF077767	AF077767	II
F48E9	China	Chicken	1948	AY997298	AY997298	IX
Taiwan95	Taiwan	Chicken	1995	NDU62620	NDU62620	VII
SGM01	Weifang	Broiler	2001	DQ227248	DQ234592	VII
SBD02	Zhibo	Broiler	2002	DQ227252	DQ234586	IX
SKY03	Kaiying	Broiler	2003	DQ227251	DQ234583	VII
SQZ04	Qingdao	Broiler	2004	DQ228921	DQ228934	II
Yunnan03	Yunnan	Parrot	2003	AY253912	AY253912	VII
JS9701	Jiangsu	Goose	1997	AF456435	AF456429	VII
Zhejiang03	Zhejiang	Goose	2003	AF431744	AF431744	VII

2 结果与分析

2.1 NDV 的分离鉴定

2.1.1 NDV 抗体变化: 发病前 NDV 的抗体平均为 2<sup>8.5</sup> (log<sub>2</sub>, 以下略); H<sub>9</sub> 的平均抗体为 2<sup>8.7</sup>, 发病 10d 后: 发病栏抗体飙升至 2<sup>12</sup> 以上, 6 个抽检样品中: 2 个 2<sup>15</sup>, 2 个 2<sup>17</sup>, 1 个 2<sup>18</sup>, 1 个 2<sup>13</sup>, 而

H<sub>9</sub> 抗体水平无明显变化。证实: 鸡群为 NDV 强毒感染。

2.1.2 病原分离和 HI 交叉: 将分离物悬液接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 鸡胚在 48h 内死亡, 死亡胚全身严重出血、水肿, 呈透明状, 肝脏有坏死和出血点。

表 2 病毒分离与 HA、HI 检测

Passage	Group	Embryo number	Diluted titer	Hours (Death number)	HA	HI		
						ND	H <sub>9</sub>	H <sub>5</sub>
1	Brain	8	Original	70h (2); 80h (2)	2 <sup>0</sup>	-	-	-
	Oviduct	7	Original	24h (4); 36h (2); 46h (1)	2 <sup>8</sup>	2 <sup>6</sup>	-	-
	Trachea	9	Original	24h (1); 46h (1); 70h (2)	2 <sup>0</sup>	-	-	-
2	Brain	6	1: 10	24h (2); 45h (4)	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	-	-
	Oviduct	7	1: 10	24h (1); 45h (6)	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	-	-
	Trachea	6	1: 10	45h (6)	2 <sup>0</sup>	-	-	-
3	Brain	6	1: 10	31h (2); 46h (4)	2 <sup>7</sup>	2 <sup>6</sup>	-	-
	Oviduct	6	1: 10	31h (5); 46h (1)	2 <sup>9</sup>	2 <sup>9</sup>	-	-
	Trachea	6	1: 10	31h (4); 46h (2)	2 <sup>9</sup>	2 <sup>8</sup>	-	-

Note: “-” no reaction

由表 2 可知: 首次分离出病毒的器官不是脑和气管, 而是输卵管。输卵管在第 1 代就分离出了病毒, 脑在第 2 代分离出, 气管在第 3 代分离出, 且病毒只与 NDV 阳性血清反应, 与禽流感 (H<sub>9</sub>、H<sub>5</sub>) 阳性血清无反应, 证实为 NDV, 命名为 SGM01。伴随着传代次数的增加, 病毒对鸡胚的毒力增强, 在 5 代以后, 将病毒做 1: 10<sup>4</sup> 倍稀释, 接种后的鸡胚仍可在 46 h 以内全部死亡。其

第 6 代病毒鸡胚半数感染量 (EID<sub>50</sub>) 为: 3.98 × 10<sup>8</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL。

2.1.3 动物回归试验: 被接种的 10 只 SPF 鸡, 在 48 h 左右开始出现呼吸道症状, 96 h 内全部死亡, 剖检出现典型的新城疫症状: 气管出血、十二指肠、泄殖腔粘膜、盲肠扁桃体等出血。

2.1.4 毒力指标: MDT、ICPI 和 IVPI 等分别为 50.5h、1.76 和 2.41, 表明为 NDV 强毒。

2.2 RT-PCR 和基因分型

SGM01 分离株的 F 和 HN 基因均扩增出目的片段。经双向测序、拼接和校正后, F 基因开放阅读框架 (Open Read Fragment, ORF) 全长 1,662bp, 编码 553 个氨基酸; HN 基因 ORF 全长

1,716bp, 编码 571 个氨基酸。GenBank 号见表 1。  
按照文献 [8] 方法进行 F 基因分型, SQZ04、LaSota 为基因 II 型; SGM01、Taiwan95、Yunnan03、Zhejiang03 和 SKY03 为基因 VII 型; JS9701、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 和 SBD02 为基因 IX 型 (见图 1)。

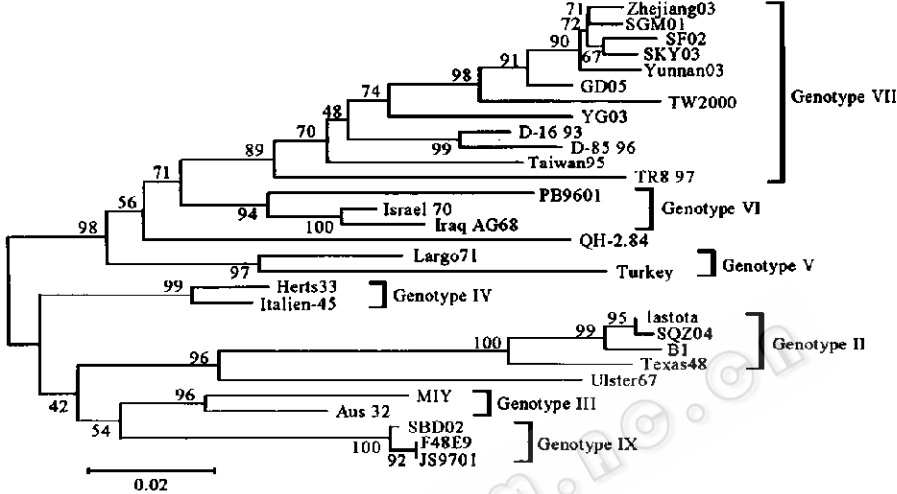


图 1 新城疫病毒 F 基因的系统进化树 (374bp)

2.3 F 基因多肽裂解位点比较

SGM01 株与 LaSota、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 和 Taiwan95 等 NDV 参考株的 F 基因多肽裂解位点附近前 135 个氨基

酸同源性序列比较分析见图 2。SGM01 株在此位点的氨基酸序列为: <sup>111</sup>GRRQK (R) RF<sup>117</sup>, 符合 NDV 强毒株氨基酸基序, 与生物学毒力测定结果相符。

M G S K P S T R V P A P L M L I T R I A L I L S C I R L T S S L D G R P L A A A G I V V T										Majority
10 20 30 40										
1	M G S R P S T K N P A P M M L I V R V A L V L S C I C P A N S I S I D E R P L A A A G I V V V T	LaSota.pro								
1	M G P K S S T N V P A P L M L I T V R I A L A L S C V R L I N S L D G R P L A A A G I V V T	F48E9.pro								
1	M G S E P S T R V P V P L M L I T R I M L I L N C I C L T S S L D G R P L A A A G I V V T	Taiwan95.pro								
1	M G S K P S T R I P A P L M L I T R I M L I L G C I R P T S S L D G R R L A A A G I V V T	SGM01.pro								
G D K A V N I Y T S S O T G S I I V K L L P N M P K D K E A C A K A P L E A Y N R T L T T										Majority
50 60 70 80 90										
46	G D K A V N I Y T S S O T G S I I V K L L P N L P K D K E A C A K A P L D A Y N R T L T T	LaSota.pro								
46	G D K A V N I Y T S S O T G S I I V K L L P N M P K D K E A C A K A P L E A Y N R T L T T	F48E9.pro								
46	G D K A V N I Y T S S O T G S I I V K L L P N M P K D K E A C A K T P L E A Y N R T L T T	Taiwan95.pro								
46	G D K A V N V Y T S S O T G S I I V K L L P N M P R O K E A C A K A P L E A Y N R T L T T	SGM01.pro								
L L T P L G D S I R K I D G S V S T S G G R R Q K R F I G A V I G S V A L C V A T A A A Q I										Majority
100 110 120 130										
91	L L T P L G D S I R R I D E S V T I S G G R R Q R F I G A I I G G V A L C V A T A A A Q I	LaSota.pro								
91	L L T P L G D S I R R I D E S A T I S G G R R Q R R F I G A I I G S V A L C V A T A A A Q I	F48E9.pro								
91	L L T P L G D S I R K I D G S V S T S G G R R Q K R F I G A V I G S V A L C V A T A A A Q I	Taiwan95.pro								
91	L L T P L G D S I R K I D G S V S T S G G R R Q K R F I G A V I G S V A L C V A T A A A Q I	SGM01.pro								

图 2 SGM01 与 NDV 参考株氨基酸同源性比较

2.4 F 和 HN 氨基酸序列同源性比较

SGM01 与 LaSota 等毒株的 F 基因和 HN 基因氨基酸全长同源率比较见表 3。

F 基因: SGM01 与 LaSota、SQZ04 (基因 II 型) 的同源率分别为 87.7% 和 88.3%; 与 Tai-

wan95、Yunnan03、Zhejiang03 和 SKY03 等 (基因 VII 型) 的同源率为 95.7% ~ 98.2%; 与 JS9701、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub>、SBD02 (基因 XI 型) 的同源率分别为 91.5%、90.8% 和 91.7%。相比而言, NDV 同一基因型之间氨基酸同源率较高, 不同基因型之间

同源率较低。

HN 基因: SGM01 (2001) 与 LaSota 和 F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> (1946) 等经典毒株的 HN 同源率较低, 分别为 87.4% 和 89%; 而与新近分离的 NDV 毒株 HN 同源率较高; 与 Taiwan95 的同源率为 95.3%; 与

JS9701 (1997)、Yunnan03 (2003 年)、Zhejiang03 (2003 年)、SBD02 (2002)、SQZ04 (2004) 和 SKY03 (2003 年) 等新近分离的同源率较高: 96.5% ~ 97.2%。

表 3 新城疫病毒株 F 基因和 HN 基因全长氨基酸同源性比较

	LaSota	F48E9	Taiwan95	SGM01	SBD02	SKY03	SQZ04	Yunnan03	JS9701	Zhejiang03
LaSota	*	91.7	89.0	88.6	92.4	88.6	99.3	88.3	92.6	87.7
F48E9	91.1	*	92.1	90.8	98.7	91.0	91.3	91.3	99.6	90.6
Taiwan95	87.8	89.2	*	95.7	92.2	95.7	88.6	95.8	92.7	95.5
SGM01	87.4	89.0	95.3	*	91.5	98.2	88.3	97.7	91.7	97.5
SBD02	87.8	89.9	96.3	96.5	*	91.7	92.1	90.8	99.3	90.6
SKY03	87.6	89.2	95.1	96.5	96.7	*	88.3	97.7	91.8	97.3
SQZ04	88.1	89.5	95.3	97.0	96.9	96.9	*	87.9	92.2	87.4
Yunnan03	86.3	88.6	94.6	95.5	96.2	95.5	95.6	*	92.0	97.7
JS9701	87.9	89.9	96.0	97.2	97.6	97.2	97.2	96.5	*	91.3
Zhejiang03	87.9	89.9	96.5	97.2	97.6	96.6	97	96.9	98.1	*

备注: 左上为 F 基因全长的同源性, 右下为 HN 基因

图 3 直观显示了 SGM01 分离株与 NDV 不同株之间的 HN 氨基酸遗传距离。SGM01 分离株与 Taiwan95 以及目前国内的分离株遗传距离较近, 而与

LaSota、F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 遗传距离较远。这表明: HN 的同源性 与病毒分离的年代相关较大。

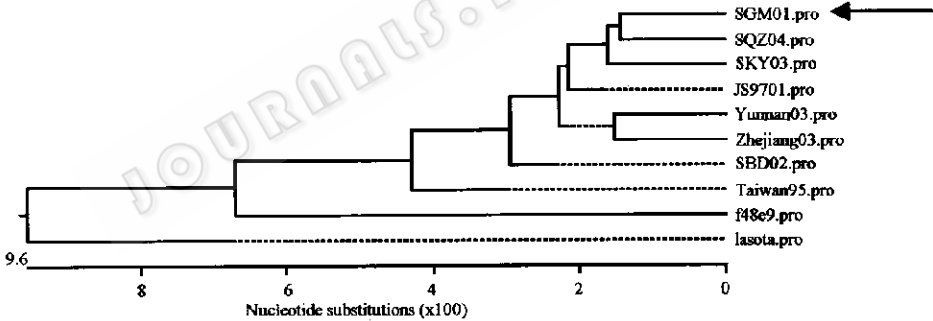


图 3 NDV HN 基因全长氨基酸的进化树

3 讨论

近年来, 我国对 ND 的防控采取了强化免疫措施, 包括多次使用弱毒疫苗和灭活油苗, 取得了一定效果, 但 ND 的发生率一直居高不下。NDV 的抗原性变异问题备受关注: 高抗体水平的鸡群仍然发生; 免疫后的雏鸡和育成鸡致死率较高 (可高达 50% ~ 100%); 紧急接种的效果降低; 对鹅等禽类的致病力增强。传统认为: NDV 对水禽感染, 但不发病。近几年, 有关鹅等新城疫的发病增多<sup>[9,10]</sup>。本研究证实: SGM01 (宿主为鸡)

与江苏 JS9701 (宿主为鹅) 等 NDV 野毒株之间, 不论是 F, 还是 HN, 均高度同源, 显示出较近的亲缘关系。

Kapczynski 等证实目前的商品疫苗和免疫程序对外源的 NDV 野毒已经不能产生良好的保护<sup>[11]</sup>。尽管国内对 NDV 的抗原性变异存有争议<sup>[12]</sup>, 但共识是: 疫苗株与现代 NDV 分离株的 F、HN 基因已经产生了较大幅度分子水平的变异<sup>[13-16]</sup>。本实验证实: SGM01 (Ⅶ) 与 LaSota (Ⅱ) F 基因的同源率仅为 87.7%, 与 HN 基因的同源率为 87.4%。而新近的 NDV 野毒之间<sup>[6]</sup>, HN 同源率一般在

96%左右,高度同源。因此,应加强新城疫变异机制的研究,特别是免疫压力下NDV的分子变异机制和种间传播机制研究,为科学防控NDV奠定理论基础。

**致谢** 本项目得到中国农业大学赵继勳教授和山东农业大学崔治中教授的指导,在此表示衷心感谢!

### 参考文献

- [1] 秦卓明,何叶峰,徐怀英,等. 山东家禽, 2002, 5: 35~37.
- [2] 梁荣,曹殿军,阎丽辉,等. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 533~535.
- [3] 世界动物卫生组织(OIE)著. 哺乳动物、禽、蜜蜂A和B类疫病诊断试验和疫苗标准手册. 农业部畜牧兽医局译(第一版). 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.
- [4] Peeters B P, De Leeuw O S, Koch G, et al. J Vir, 1999, 73(6): 5001~5009.
- [5] Philips R J, Samson. A C R, Emerson P T. Arch Virol, 1998, 143: 1993~2003.
- [6] 秦卓明,马保臣,何叶峰,等. 微生物学报, 2006, 46(2): 227~232.
- [7] 吴艳涛,倪雪霞,万洪全,等. 病毒学报, 2002, 18(3): 264~269.
- [8] Ballagi-Pordany A, Wehman E, Hereszeg J, et al. Arch Virol, 1996, 141: 243~261.
- [9] 陈金顶,廖明,辛朝安. 病毒学报, 2003, 19(4): 355~358.
- [10] 黄勇,万洪全,刘红旗,等. 病毒学报, 2003, 19(4): 348~354.
- [11] Kapczynski D R, King D J. Vaccine, 2005, 23: 3424~3433.
- [12] 崔治中. 中国家禽, 2002, 24(4): 4~6.
- [13] Panshin A, Shihmanter E, Weisman Y, et al. Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases, 2002, 25: 95~108.
- [14] Guan M K, Maw Y L. Journal of Virological Methods, 2001, 97: 1~11.
- [15] Bruce S S, Daniel J K, Richard J M. Virus Reasearch, 2000, 66: 1~11.
- [16] Bruce S S, John M C, Holly S S, et al. Virus Research, 2002, 83: 119~129.

### • 科技信息 •

## 发展生物乙醇以替代传统能源

尽管燃料乙醇的使用有一定局限性,但国外应用的实践证明,多途径发展生物乙醇也显示其生命力。在发展生物乙醇过程中必须扬其优,克其弊,以利燃料乙醇的发展。所谓生物乙醇指的是通过微生物发酵途径,以各种不同的生物质(主要是含糖类)为原料发酵生产乙醇(酒精),尽管有其传统的生产优势,现代生物技术微生物技术的应用则有全新的内含,生产菌种的选育,经过改造或重组建构,或酶活力提高以及各生产工艺改造等等。为扩大乙醇生产,提高其效率和产率是整个乙醇生产的基础和重要环节。

乙醇产品不仅作为洁净能源,配制混合燃料使用,作为一种替代能源显现其特点:洁净、环保、再生能源,而且作为传统化学产品应用广泛,用乙醇生产乙烯,还可替代有致癌作用的MTBE(用于石油的增氧剂)等等。因此,可以说,生物乙醇是支撑“后石油时代”的石化工业的一个新兴基础产业,大有发展之势。以各国对燃料乙醇的研发与应用所取得的成就以证实。

展望未来10~20年,燃料乙醇以其洁净、无污染、可以再生的特点,不仅用于混合燃料,而且它将拥有新型燃料电池30%~40%的市场份额,容量将是车用燃料的5倍以上。我国清华大学汽车工程研发的生物乙醇柴油系统示范车是另一实例;其次,乙醇作为MTBE的替代品充满着巨大商机。在美国,MTBE已被禁用,以乙醇取而代之,作为增氧剂之一,也是可行的。第三,以甜高粱(抗旱能源作物之一)的汁液和籽粒为原料发酵生产乙醇,即用生产菌种经重离子辐射选育的菌种直接发酵生产乙醇优于粮食作物(玉米),缩短了发酵时间,在我国甘肃省作为定点生产甜高粱燃料乙醇的一个省,建立年产10万吨燃料乙醇的工厂。第四,如何利用作物秸秆作为原料通过发酵途径生产乙醇,仍然是一个需要继续探究的重大课题。可从几方面思考:(1)原料成分作为基质发酵生产乙醇的最适化;(2)选育高效优质生产菌株,现代生物技术应用改造或建构生产菌株是条重要途径;(3)有针对性改进生产菌株生产乙醇所必需条件的最适化;(4)多途径开发作物秸秆资源,既获所需产品如甲烷等,又有益于环保。

柯为