



# 小鼠诺如病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

高洁, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立小鼠诺如病毒(murine norovirus, MNV)实时荧光定量 PCR 检测方法,为建立 MNV 规范化检测方法提供依据。方法 根据 NCBI 公布的 60 个 MNV 病毒株核酸序列设计特异性引物,构建标准阳性质控品,建立 MNV 实时荧光定量 PCR 方法,并进行特异性、灵敏度、重复性及稳定性评价。用该方法对 766 只送检小鼠的盲肠内容物样品进行检测,初步了解北京地区实验小鼠 MNV 感染状况。结果 成功建立 MNV 实时荧光定量 PCR 检测方法,该方法特异性好,与同种属人类诺如病毒(HuNoVs)、猫杯状病毒(FCV)均无交叉反应,检测灵敏度可达  $10^1$  copies/ $\mu$ L。批内及批间 CT 值变异系数均小于 2%。应用该方法在 766 份小鼠盲肠内容物样品中检出 301 份 MNV 核酸阳性样品,阳性率 39.3%。结论 建立的 MNV 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性好,灵敏度高,重复性好,可以用于 MNV 的快速定量检测。

**【关键词】** 鼠诺如病毒 MNV;实时荧光定量 PCR;检测

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)12-0070-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.014

## Establishment and preliminary application of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of murine norovirus

GAO Jie, HE Zheng-ming

(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 10050, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish a real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) method for detection of murine norovirus (MNV) in laboratory mouse and provide the basis for establishment of a standard detection method for MNV. **Methods** Specific primers were designed and MNV DNA standards were prepared according to the MNV genome sequences published on NCBI. The specificity, sensitivity, repeatability and stability of the established Q-PCR method were tested. The established Q-PCR method was applied to detect 766 mouse caecum content samples to explore preliminarily the infection status of laboratory mice in Beijing. **Results** No cross reaction showed in human norovirus and feline calicivirus with the established Q-PCR method. The sensitivity was up to 10 copies/ $\mu$ L. The coefficient of variation (CV) of intra-assay and inter-assay was less than 2%. There were 301 positive cases detected in the 766 samples of laboratory mice. **Conclusions** The established FQ-PCR method is accurate and effective with high specificity, sensitivity and repeatability in the quantitative detection of nucleic acid, and can be applied to rapidly and quantitatively screen MNV in laboratory mice.

[基金项目] 国家科技支撑课题(2013BAK11B01)。

[作者简介] 高洁(1990-),女,硕士,研究方向:实验动物病毒学,E-mail: gaojieru@163.com。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-),男,研究员,博士,研究方向:实验动物微生物学,E-mail: hezm@nifdc.org.cn。

**【Key words】** Murine norovirus; Fluorescent quantitative PCR; Detection

诺如病毒 (murine norovirus, MNV) 属杯状病毒科诺如病毒属, 是无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 核酸大小为 7.4 ~ 7.6 kb。其原型 MNV-1 最早从信号转导蛋白和转录激活因子 1 (STAT1) 与重组体激活基因 2 (RAG2) 缺陷 (RAG2<sup>-/-</sup>/STAT1<sup>-/-</sup>) 小鼠中分离得到。MNV-1 可致免疫缺陷 (STAT1<sup>-/-</sup>, STAT1<sup>-/-</sup>/PKR<sup>-/-</sup>, RAG<sup>-/-</sup>/STAT1<sup>-/-</sup>) 小鼠腹泻或死亡, 也可致干扰素受体缺失 (IFN $\alpha\beta\gamma$ <sup>-/-</sup>) 小鼠出现高致死性<sup>[1]</sup>。MNV 感染正常小鼠无明显临床症状<sup>[2]</sup>, 其感染小鼠后主要侵染免疫细胞<sup>[3]</sup> (树突状细胞核巨噬细胞)。有研究表明 MNV 感染可提高小鼠细小病毒 (mouse parvovirus, MPV) 含量并延长其排毒时间<sup>[4]</sup>。此外, MNV 感染可使肠道固有层 (lamina propria, LP)、肠系膜淋巴结 (mesenteric lymph node, MLN) 等处的树突状细胞 cDCs (conventional dendritic cells) 数量下降<sup>[5]</sup>。

MNV 是目前唯一能在体外有效增殖的诺如病毒<sup>[3]</sup>, 其可在鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞进行传代培养并引起细胞病变效应, 为诺如病毒分子机制的研究提供了细胞培养系统, 也使得 MNV 成为研究人类诺如病毒 (human norovirus, HuNoVs) 生物学特征的最佳替代模型<sup>[6,7]</sup>。

小鼠是目前广泛使用的实验动物之一, 其微生物状况是影响实验数据有效性和重现性的重要因素。目前, 国内外有关 MNV 感染机制和检测方法的研究迅速发展, 全球多项研究表明 MNV 在实验动物设施中有很高的感染率<sup>[8,9]</sup>。欧洲实验动物科学联合会 (FELASA)、国际实验动物科学协会 (ICLAS)、美国 Charles River 实验室等已将 MNV 列入实验小鼠常规检测项目, 我国尚未将 MNV 列入实验小鼠质量控制的国家标准, 本实验旨在建立特异、灵敏、快速、定量精准的 MNV 实时荧光定量 PCR 检测方法, 为我国建立 MNV 规范化检测方法提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒及检测样品

小鼠诺如病毒 (MNV) BJ10-2062<sup>[10]</sup> 由本实验室分离保存; MNV-1 (CW1)、RAW264.7 细胞购自美国 ATCC 公司, 编号分别为 PTA-5935, TIB-71; 猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供; 人诺如病毒 (human

norovirus, HuNoVs) 由中国食品药品检定研究院肠道病毒室提供; pMD19-T simple vector 质粒标准品委托宝生物工程 (大连) 有限公司合成; 766 份小鼠盲肠内容物样品来源于北京 9 个送检单位。

### 1.2 实验动物及实验环境

SPF 级 KM 小鼠, SPF 级 BABL/c 小鼠, SPF 级 C57BL/6 小鼠, SPF 级 NIH 小鼠 (实验单位使用许可证号: SYXK (京) 2011 - 0008, 生产许可证号: SCXK (京) 2014 - 0013, 质量检测单位: 国家实验动物质量检测中心)。

### 1.3 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit、Cador<sup>®</sup> Pathogen 96 QIAcube<sup>®</sup> HT Kit) 购自德国 Qiagen 公司; 100 bp DNA marker、Taq HS 酶、脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)、10 x PCR buffer 及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> GC (Perfect Real Time) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。PCR 仪: 美国 ABI 公司 Veriti 96 well Thermal cycler; 全自动核酸提取仪: 德国 Qiagen 公司 QIAcubeHT; 核酸琼脂糖凝胶电泳仪: 美国 Bio-Rad 公司 PowerPac Basic; 凝胶成像分析仪: 美国 Kodak 公司 GL212Pro; 荧光定量 PCR 仪: 美国 ABI 公司 7500 Fast Real-Time PCR System。

### 1.4 标准阳性性质控品的制备

将 MNV BJ10-2062 基因保守区域 (5018 - 5450 nt) 连接至 pMD19-T simple vector 构建标准阳性性质控品, 该片段包含引物所要扩增的片段并可进行熔解曲线分析。连接完成后, 将重组质粒转染至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆并测序鉴定。提取质粒, 用紫外分光光度计测定 A<sub>260 nm</sub> 和 A<sub>280 nm</sub> A 值, 计算质粒浓度, 并分装保存于 -20 $^{\circ}$ C。

### 1.5 引物的设计

将 NCBI 公布的 60 个 MNV 分离株全基因组序列进行比对, 分析其共有的保守序列, 采用 ABI PrimerExpress 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件, 设计扩增用引物 4 对, 从扩增效率、特异性、灵敏度等方面分析, 选择最佳引物 MNV-4F、MNV-4R。引物由美国 ABI 公司合成。序列如下 (表 1):

### 1.6 实时荧光定量 PCR 扩增体系的建立

分析扩增效率、熔解曲线等数据, 优化荧光定量 PCR 反应体系中使用的引物、模板、PCR MIX 浓度, 确定最佳反应体系 (表 2)。设定不同退火温度,

表 1 MNV 荧光定量 PCR 引物

Tab. 1 The sequences of primers used for amplification of MNV gene

引物 Primers	引物序列(5' - 3')	序列位置 Sequence site	扩增子大小(bp) Amplicon size
MNV-4F	CAGGAAYGCTCAGCAGTCTTTGT	5031-5053	126
MNV-4R	GGYTGAATGGGGACGGC	5140-5156	

表 2 MNV 荧光定量 PCR 反应体系

Tab. 2 Real-time PCR reaction system of MNV

反应体系 Reaction systems	体积 Volume
SYBR Premix Ex Taq GC(2x)	10 $\mu$ L
PCR Forward primer (10 mM)	0.4 $\mu$ L
PCR reverse primer (10 mM)	0.4 $\mu$ L
ROX reference dye II(50x)	0.4 $\mu$ L
Template	2 $\mu$ L
RNase free water	6.8 L
Total	20 $\mu$ L

确定最佳反应条件为:95℃ 预变性 30 s; 然后 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环, 在每个循环延伸结束时采集荧光信号, 最后进行熔解曲线分析。在反应管中按表 2 体系加样, 每个样品做 3 个重复。

用含有目的片段的质粒 pMD19-T vector 作为标准阳性质控品, 根据公式  $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{base pairs} \times 660)$ , 计算质粒标准品拷贝数。将标准质粒作为模板梯度稀释为  $1.1 \times 10^8 \text{ copies}/\mu\text{L} \sim 1.1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ , 进行实时荧光定量 PCR 反应, 建立标准曲线。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 方法的特异性、重复性和稳定性试验评价

以猫杯状病毒 (FCV)、人诺如病毒 (HuNoVs) 及 RAW264.7 细胞作为对照, 检测 MNV 实时荧光定量 PCR 方法的特异性; 用本方法对  $10^6 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ,  $10^5 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ,  $10^4 \text{ copies}/\mu\text{L}$  3 个不同浓度标准阳性质控品进行检测, 重复检测 3 个批次, 每批次做 5 个重复, 计算试验内、试验间变异系数, 评价本方法的重复性和稳定性。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度实验

将质粒标准品作为模板梯度稀释为  $1.1 \times 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L} \sim 1.1 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ , 进行荧光定量 PCR 反应, 每个浓度的标准品做 3 个重复。所能检测的最小浓度的循环阈值 (CT)  $\leq 35$ , 据此得出该方法的检测灵敏度。

### 1.9 实时荧光定量 PCR 方法的初步应用

利用该方法检测来自北京 9 个送检单位的 766 份小鼠样品。取小鼠盲肠内容物样品于 500  $\mu\text{L}$  PBS 溶液中, 涡旋振荡, 12 000 r/min 离心 5 min, 取

上清液, 用全自动核酸提取仪提取 RNA, 逆转录后以 cDNA 为模板检测小鼠盲肠内容物。每次设  $10^8 \sim 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$  标准品及 RAW264.7 细胞阴性对照。标准品、阴性对照及样品做 3 个重复。

以 MNV BJ10-2062 细胞培养物经口感染 8 周龄雌性 KM、BABL/c、C57BL/6、NIH 四个品系的小鼠, 自染毒 24 h 起每间隔 24 h 取其粪便, 用实时荧光定量 PCR 方法进行检测。于染毒 10、21、56 d 后取小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、小肠、大肠、盲肠、卵巢、子宫、胸腺组织及盲肠内容物进行检测。此外, 将正常小鼠与阳性小鼠同笼饲养, 并检测正常小鼠粪便样品。

判断标准: 建立的标准曲线参数 slope 在  $-3 \sim -3.5$  之间,  $R^2$  大于 0.99, 扩增效率在 90% ~ 110% 之间, 可以判定实验成立, 建立的方法可用于定量检测<sup>[11]</sup>。

阳性判定标准: 样品循环阈值 (CT)  $< 35$ , 判定该样品检测结果为阳性; 循环阈值 (CT)  $\geq 35$ , 不能确定被检样品是阳性样品, 结果判定为阴性。

### 1.10 实时荧光定量 PCR 检测方法与 ELISA 检测方法的比较

采集同一只小鼠的盲肠内容物与血清 666 份, 分别进行荧光定量 PCR 核酸检测和重组抗原 ELISA 抗体筛查, 比较两种检测方法的阳性检出率。

## 2 实验结果

### 2.1 标准阳性质控品的制备

阳性克隆载体经测序鉴定, 测序结果与 MNV BJ10-2062 分离株核苷酸序列进行比对, 符合率为 100%。表明标准阳性质控品构建成功, 可作为 MNV 荧光定量 PCR 检测的阳性标准品。

根据公式  $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660)$ , 计算质粒标准品浓度为  $7.9 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$ , 取出部分样品稀释至  $1.1 \times 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L}$ , 分装保存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 扩增体系及标准曲线的建立

对反应体系及反应条件进行优化, 得到 MNV

扩增曲线结果(图 1)。其循环阈值(CT)为 20.03, 拷贝数为  $2.59 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ , 分析其溶解曲线(图 2), 可知溶解曲线为单峰, 无非特异性反应。

用含有目的片段的质粒标准品作为模板, 梯度稀释为  $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 进行荧光定量 PCR 反应, 得到阳性质控品的扩增曲线和标准曲线。扩增曲线(图 3)各稀释梯度间距均等, 扩增效率为 98.32%。标准曲线(图 4)的线性范围是  $1.1 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , 线性相关系数 slope 为 -3.216,  $R^2$  值为 0.998, 表明线性明相关性高, 定量结果有效、可靠。建立的标准曲线参数符合标准的规定范围, 可用于定量检测。

### 2.3 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性、重复性和稳定性试验评价

2.3.1 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性检测结果: 分别以 MNV BJ10-2062、HuNoVs、FCV 及 RAW267.4 细胞核酸提取物为模板进行荧光定量 PCR 反应, 结果如图 5 所示, 可以看出以 HuNoVs、FCV、RAW267.4 细胞为模板, 扩增曲线为直线无扩增, 而以 MNV BJ10-2062 为模板的扩增曲线明显。说明建立的荧光定量 PCR 检测方法具有良好的特异性。

2.3.2 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性和稳定性检测结果: 以起始浓度分别为  $1.1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.1 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.1 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  质粒标准品为模板, 分别进行五次试验内重复和三次试验间重复, 计算试验内和试验间 CT 值、定量拷贝数的标准差和变异系数, 结果见表 3。结果显示, 三个浓度的最终实测定量拷贝数分别为  $1.074 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.118 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.092 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ , 单次试验内循环阈值(CT)的变异系数(CV)分别为 0.3%、0.3%、0.05%, 试验间循环阈值(CT)的变异系数(CV)分别为 1.1%、0.6%、0.8%, 变异系数均小于 2%, 表明此方法精密度高, 具有良好的重复性和稳定性。

### 2.4 实时荧光定量 PCR 检测方法灵敏度检测结果

以质粒标准品作为模板, 10 倍梯度稀释为  $10^9$  copies/ $\mu\text{L} \sim 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ , 进行荧光定量 PCR 反应, 结果显示扩增曲线(图 6)各稀释度间距均匀, 标准曲线(图 7)线性范围良好。可以看出标准品稀释到  $1.1 \times 10^1$  copie/ $\mu\text{L}$  时有明显扩增曲线, CT 值为 33.871, 拷贝数为  $1.08 \times 10^1$  copie/ $\mu\text{L}$ , 在可检测范围之内; 标准品稀释到  $1.1 \times 10^0$  copie/ $\mu\text{L}$  时扩增曲线为水平直线无扩增, 超出可信范围。因此, 认为该法的最低检测限度为 10 copies/ $\mu\text{L}$ , 具有良好的灵敏度。

### 2.5 实时荧光定量 PCR 检测方法的应用

将所建立的实时荧光定量 PCR 方法应用于北京市 9 个送检单位的 766 份小鼠盲肠内容物样品的检测。出现疑似阳性的样品进行复检, 每个样品做 3 个重复, 对部分拷贝数较高的样品进行普通 PCR 反应 (MNVCF: CAGATCACATGCTTC CCAC; MNVCR: AGACCACAAAAGACTCATCAC) 并测序验证。在 766 份小鼠盲肠内容物样品中检出阳性样品 301 份, 阳性率 39.3%, 测序结果显示检出样本与 MNV BJ10-2062 序列同源性高达 97% 以上。

以 MNV BJ10-2062 经口感染 8 周龄雌性 KM、BABL/c、C57BL/6、NIH 四个品系的小鼠, 结果显示各品系小鼠自染毒 24 h 即开始排毒, 排毒时间约为 30 d。染毒 10 d、21 d 后取小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、小肠、大肠、盲肠、卵巢、子宫、胸腺组织及盲肠内容物进行检测, 结果显示染毒 10 d、21 d 的小鼠其脾脏、大肠、小肠、盲肠及盲肠内容物均有阳性检出, 其中, 以盲肠和盲肠内容物病毒拷贝数最高(图 8, 9)。有文献<sup>[12]</sup>报道在肝脏中也可检出 MNV, 本次实验未在肝脏中检出, 可能与病毒株感染能力差异、感染剂量及个体差异有关。正常小鼠与阳性小鼠同笼饲养 48 h 后粪便中有阳性检出。

表 3 MNV qPCR 检测试验内及试验间重复性  
Tab.3 Repeatability of the intra-assay and inter-assay of MNV real-time PCR detection

重复性 Repeatability	标准质粒 Copies/ $\mu\text{L}$	CT (Cycle threshold)			定量拷贝数 (Quantitative copies)		
		Mean	SD	CV (%)	Mean	SD	CV (%)
试验内 Intra-assay (n=5)	$10^6$	18.833	0.052	0.3	$1.074 \times 10^6$	$0.036 \times 10^6$	3.4
	$10^5$	22.275	0.067	0.3	$1.118 \times 10^5$	$0.063 \times 10^5$	5.6
	$10^4$	25.767	0.012	0.05	$1.092 \times 10^4$	$0.008 \times 10^4$	0.8
试验间 Inter-assay (n=3)	$10^6$	18.579	0.196	1.1	$1.032 \times 10^6$	$0.026 \times 10^6$	2.5
	$10^5$	22.043	0.138	0.6	$1.024 \times 10^5$	$0.06 \times 10^5$	5.9
	$10^4$	25.529	0.202	0.8	$1.052 \times 10^4$	$0.054 \times 10^4$	5.1

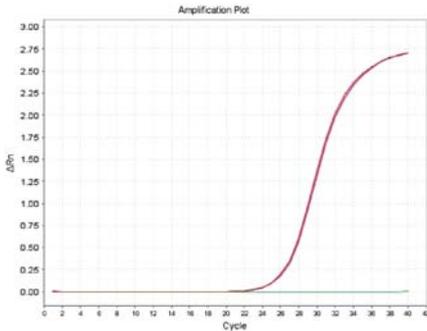


图 1 MNV 扩增曲线

Fig. 1 Amplification curve of the MNV

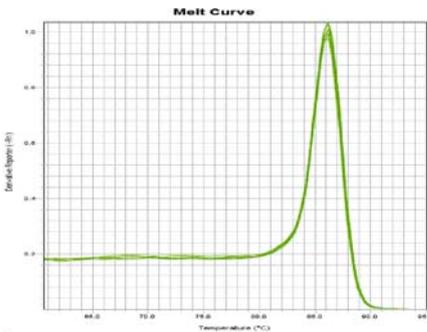


图 2 MNV 扩增熔解曲线

Fig. 2 The melting curve of MNV

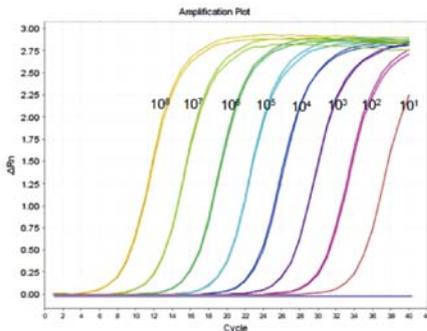


图 3 1.1 × 10<sup>8</sup> ~ 1.1 × 10<sup>1</sup> copies/μL 标准质粒扩增曲线

Fig. 3 Amplification curves of

1.1 × 10<sup>8</sup> to 1.1 × 10<sup>1</sup> copies/μL standard

### 2.6 实时荧光定量 PCR 检测方法与 ELISA 检测方法的比较

对同一只小鼠的盲肠内容物和血清分别进行荧光定量 PCR 核酸检测和重组抗原 ELISA 抗体筛查,结果显示,在 666 份小鼠样品中,荧光定量 PCR 检测方法检出阳性样品 291 份,阳性率为 44%,ELISA 检测方法检出阳性样品 224 份,阳性率为 33%,荧光定量 PCR 阳性检出率较高。两种检测方法均为阳性的样品为 198 份,占样品总数的 30%。

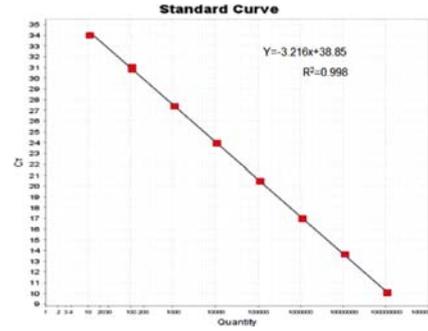


图 4 1.1 × 10<sup>8</sup> ~ 1.1 × 10<sup>3</sup> copies/μL

标准质粒的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of 1.1 × 10<sup>8</sup> to 1.1 × 10<sup>3</sup> copies/μL standard

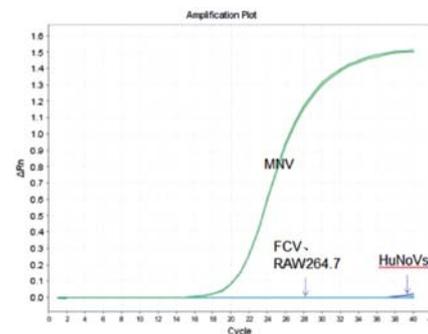


图 5 MNV 特异性实验扩增曲线

Fig. 5 The amplification curve of MNV specificity experiment

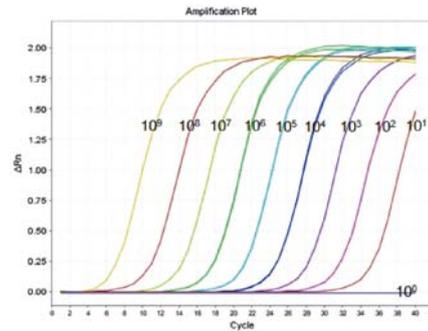


图 6 1.1 × 10<sup>9</sup> ~ 1.1 × 10<sup>0</sup> copies/μL 标准质粒扩增曲线

Fig. 6 Amplification curves of the 1.1 × 10<sup>9</sup> to 1.1 × 10<sup>0</sup> copies/μL standard

### 3 讨论

MNV 是小鼠中传播最广泛的感染因子之一,国外多项研究表明 MNV 在动物设施中都有很高的感染率<sup>[8,9]</sup>。有研究表明<sup>[9]</sup>日本和美国小鼠群体中 MNV 抗体阳性率分别高达 67.3% 和 62.5%。西欧对多个设施中的大、小鼠微生物状况进行检测,结果显示在小鼠群体中,MNV 感染率最高,阳性率为

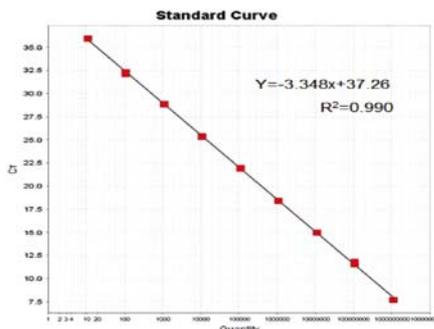


图 7  $1.1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L 标准质粒的标准曲线

Fig. 7 Standard curve of the  $1.1 \times 10^9$  to  $1.1 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L standard

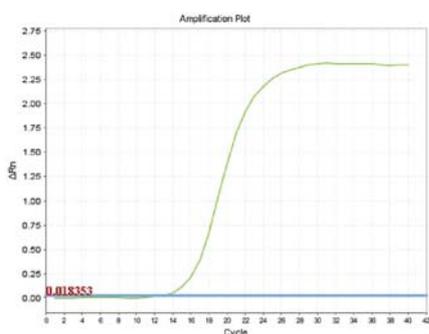


图 8 盲肠扩增曲线 (10 d)

Fig. 8 The amplification curve of cecum

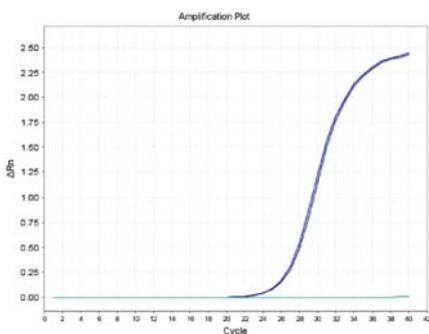


图 9 盲肠内容物扩增曲线 (10 d)

Fig. 9 The standard curve of caecum content

31.8%<sup>[8]</sup>。我国广东<sup>[13,14]</sup>、北京<sup>[15]</sup>、上海<sup>[16]</sup>均有 MNV 感染相关报道,袁文首次报道我国广东省实验小鼠中有 MNV 阳性检出,采用 RT-PCR 方法检测得小鼠 MNV 阳性率为 37.38% (77/206)<sup>[14]</sup>,荧光定量 PCR 方法测得 MNV 阳性率为 29.94% (103/344)<sup>[13]</sup>。随后,医科院动物所对北京地区 600 多只小鼠进行 ELISA 检测,结果显示 MNV 感染率为 11.67%,其中,阳性小鼠主要来自实验设施 (30.94%)<sup>[15]</sup>。向丹丹等<sup>[16]</sup>对上海地区 80 份自然感染的小鼠粪便样本进行 RT-PCR 检测,结果显示

MNV 阳性率为 13.75%。实时荧光定量 PCR 检测方法与 ELISA 相比,可定量检测小鼠 MNV 在体感染状况,且与 RT-PCR 相比,其灵敏度更高。

目前国外已有关于 MNV 荧光定量 PCR 方法的文献报道<sup>[17,18]</sup>,国内有根据 MNV-1 序列设计引物构建 Taqman 探针法的相关报道<sup>[13]</sup>。前两种方法均比对了 44 个 MNV 分离株核酸序列,国内报道的方法主要以 MNV-1 序列为参考设计引物,现 NCBI 上公布的 MNV 分离株全基因组序列已有 60 株,MNV 作为高突变率和增殖周期短的 RNA 病毒,其原有的保守序列有个别碱基发生变异,各分离株间核酸序列差异更加显著,因此,有必要建立更为广谱、高效的方法检测 MNV 在小鼠中的感染情况。此外,Kitajima 等<sup>[17]</sup>建立的 Taqman 探针法检测限为  $1.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,本次建立的检测方法与其相比灵敏度更高。

本实验所建立的 MNV 荧光定量 PCR 检测方法特异性好,不与同种属其他病毒产生非特异性反应,线性范围广,可快速精准定量。批间及批内实验 CT 值变异系数均小于 2%,表明其重复性和稳定性好,可以用于 MNV 核酸的定量检测。用该方法对北京市 9 个送检单位的 766 只小鼠盲肠内容物样品检测,其阳性率为 39.3%,6 个送检单位有阳性检出。对送检样品分析,发现 MNV 感染呈集中趋势,不同批次的阳性样品多来自同一送检单位,且 MNV 感染以动物实验设施为主,其原因可能与 MNV 传播途径及持续性感染有关。小鼠感染 MNV 后主要经粪口途径传播,如污染的食物、水或垫料等,也有文献报道 MNV 可经空气传播<sup>[19]</sup>,相同饲养间的小鼠均可能感染,污染设施很难通过检测和淘汰清除 MNV<sup>[20]</sup>。人工染毒实验表明 MNV 的主要靶器官是肠道组织及脾脏,排毒时间为 30 d 左右。对同一只小鼠的盲肠内容物和血清分别进行荧光定量 PCR 检测和 ELISA 检测,结果显示荧光定量 PCR 阳性检出率为 44% (291/666),高于 ELISA 阳性检出率 (224/666)。

本实验建立了特异、高效的 MNV 荧光定量 PCR 检测方法,为保障实验动物微生物质量和加强进出口动物检验检疫提供技术支撑,也为 MNV 分子机制、感染特征等研究提供了依据。

参考文献:

[1] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. Science, 2003, 299

- (5612): 1575–1578.
- [ 2 ] Fischer AE, Wu SK, Proescher JB, et al. A high-throughput drop microfluidic system for virus culture and analysis [J]. J Virol Methods, 2015, 213: 111–117.
- [ 3 ] Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages [J]. PLoS Biol, 2004, 2 (12): e432.
- [ 4 ] Compton SR, Paturzo FX, Macy JD. Effect of murine norovirus infection on mouse parvovirus infection [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49 (1): 11–21.
- [ 5 ] Chen X, Leach D, Hunter DA, et al. Characterization of intestinal dendritic cells in murine norovirus infection [J]. Open Immunol J, 2011, 4: 22–30.
- [ 6 ] Papafragkou E, Hewitt J Park GW, et al. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e63485.
- [ 7 ] Herod MR, Salim O, Skilton RJ, et al. Expression of the murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e90679.
- [ 8 ] Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in Western Europe [J]. Lab Anim (NY), 2009, 38(5): 161–165.
- [ 9 ] Ohsugi T, Matsuura K, Kawabe S, et al. Natural infection of murine norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice [J]. Front Microbiol. 2013, 4: 12.
- [ 10 ] 王吉, 卫礼, 付瑞, 等. 猫疱疹病毒 I 型实时荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24 (12): 47–54.
- [ 11 ] 李晓波, 付瑞, 岳秉飞, 等. 鼠诺如病毒的体外分离与鉴定 [J]. 中国病毒学杂志, 2011, 1(5): 293–296.
- [ 12 ] Goto K, Hayashimoto N, Yasuda M, et al. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice [J]. Exp Anim, 2009, 58 (2): 135–140.
- [ 13 ] 袁文, 王静, 赵维波, 等. 结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 49–56.
- [ 14 ] 袁文, 张钰, 刘忠华, 等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 78–82.
- [ 15 ] Xiang Z, Tian S, Tong W, et al. MNV primarily surveillance by a recombination VPI-derived ELISA in Beijing area in China [J]. J Immunol Methods, 2014, doi. org/10.1016/j.jim.2014.05.007.
- [ 16 ] 向丹丹. RT-PCR 检测实验小鼠自然和实验感染鼠诺瓦克病毒及病毒株分离[D]. 东华大学, 2013.
- [ 17 ] Kitajima M, Oka T, Takagi H, et al. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine norovirus [J]. J Virol Methods, 2010, 169(2): 269–273.
- [ 18 ] Hanaki K, Ike F, Kajita A, et al. A broadly reactive one-step SYBR green I real-time RT-PCR assay for rapid detection of murine norovirus [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98108
- [ 19 ] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4<sup>th</sup>. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis [J]. J Virol, 2006, 80(11): 5104–5112.
- [ 20 ] Hsu CC, Riley LK, Wills HM, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine novoviruses [J]. Comp Med, 2006, 56 (4): 247–251.

[ 修回日期 ] 2016–06–16

## ( 上接第 44 页 )

- [ 13 ] Furr PM, Taylor-Robinson D. The establishment and persistence of *Ureaplasma urealyticum* in oestradiol-treated female mice [J]. J Med Microbiol. 1989, 29(2): 111–114.
- [ 14 ] 苑贺英. 妇科 II 号方治疗雌性小鼠生殖道解脲支原体感染的实验研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2011.
- [ 15 ] 孙源梅, 李元文, 张颖纯, 等. 解脲支原体造模问题探讨 [J]. 中国性科学, 2012, 21(3): 24–25.
- [ 16 ] Zhu GX, Lu C, Chen CJ, et al. Pathogenicity of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in the lower genital tract of female BALB/c mice [J]. Can J Microbiol. 2011, 57(12): 987–992.

[ 修回日期 ] 2016–07–01