

小鼠多瘤病毒荧光 PCR 检测方法的建立及其在裸鼹鼠感染情况调查中的应用

李晓波,付 瑞,王淑菁,卫 礼,贺争鸣,王 吉*,岳秉飞*

(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 建立多瘤病毒荧光定量 PCR 检测方法,并对裸鼹鼠中多瘤病毒感染情况进行调查。**方法** 比较 NCBI 中小鼠多瘤病毒 (Genbank: NC_001515) 的核酸序列,选择保守区域设计引物和探针,建立多瘤病毒的荧光定量 PCR 方法,对方法的敏感性和特异性进行验证。人工感染 9 只 1 日龄 KM 乳鼠,21 d 后采集心、肝、脾、肺、肾、脑、胸腺、盲肠内容物和血液等组织脏器,用建立的荧光 PCR 方法进行检测,验证方法在应用中的有效性,最后用该方法检测 62 份裸鼹鼠的盲肠内容物样本。**结果** 建立的检测方法特异性好,在以多瘤病毒为模板时出现明显的荧光信号,以猴空泡病毒、小鼠 K 病毒、小鼠微小病毒和大鼠细小病毒 H-1 株为模板时无荧光信号出现;方法的最低检出限为 100 copies/ μ L;人工感染小鼠的心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物中均检测到多瘤病毒核酸,其中肺组织中含量最高,脑、胸腺和血液中未检出;62 份裸鼹鼠的盲肠内容物样本经检测多瘤病毒为阴性。**结论** 建立的多瘤病毒荧光定量 PCR 方法可有效检测动物组织中的多瘤病毒,对裸鼹鼠自然感染多瘤病毒的调查为实验用裸鼹鼠微生物标准的制定提供了参考。

【关键词】 多瘤病毒;裸鼹鼠;小鼠;荧光定量 PCR 方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 12-0091-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 12. 016

Establishment of a fluorescence quantitative PCR assay for murine polyomavirus detection and its use in the detection in naked mole rats

LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Shu-jing, WEI Li, HE Zheng-ming, WANG Ji*, YUE Bing-fei*

(Institute of Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a fluorescence quantitative PCR assay for polyomavirus and to apply this technique in the investigation of its infection rate in naked mole rats. **Methods** To compare the nucleic acid sequence of murine polyomavirus (Genbank: NC_001515) in NCBI and design primers and probes in its conserved region. To establish a fluorescence quantitative PCR method for polyomavirus and evaluate the sensitivity and specificity of the method. To infect nine one-day old KM strain suckling mice, and to collect samples of the heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, thymus, cecal contents and blood at 21 days after infection. The efficacy of the method was validated by detecting the virus in organs. 62 cecal samples from naked mole rats were tested by the established assay. **Results** There was obvious fluorescence signal when polyomavirus was used as the template and no fluorescence signal when simian virus 40, murine K virus, MVM and H-1 were used as templates. The detection limit of the assay was 100 copies/ μ L. Polyomavirus DNA was

【基金项目】 国家科技支撑计划“普通级封闭群裸鼹鼠种群的建立及耐低氧机制的初步研究”(2015BAI09B02)。

【作者简介】 李晓波(1980-),男,副研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: lxb8493059@163.com。

【通讯作者】 岳秉飞(1960-),男,研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: y6784@126.com。

王吉(1974-),女,副研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: wj_nd_jds@sina.com。* 共同通讯

detected in the heart, liver, spleen, lung, kidney and cecal contents of the mice which were inoculated with polyomavirus. The polyomavirus DNA content was highest in the lung tissue. There was no detectable polyomavirus DNA in the brain, thymus and blood of the infected mice. Sixty-two cecal contents of naked mole rats were tested for polyomavirus and the results were negative. **Conclusions** The fluorescence quantitative PCR assay for polyomavirus established in this study can effectively detect polyomavirus DNA in animal tissues. The results of investigation of the natural infected polyomavirus of naked mole rats provide a reference for the formulation of microbiological criteria for experimental naked mole rats.

【Key words】 Polyomavirus; *Heterocephalus glaber*; Fluorescence quantitative PCR

多瘤病毒(polyomavirus, poly)在分类上属乳多空病毒科,多瘤病毒属,可引起实验小鼠和野生小鼠的地方性流行,在自然条件下多呈隐性或亚临床症状^[1-3]。为中华人民共和国国家标准《实验动物微生物学等级及监测》(GB14922. 2-2011)中 SPF 级小鼠必要时需排除的病原。

多瘤病毒不仅感染小鼠,还会感染大鼠、地鼠等啮齿类动物,在其他哺乳动物如人类、非人灵长类、食肉类、偶蹄类动物和鸟类甚至海洋鱼类中也发现了多瘤病毒的存在^[4-8]。裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*)是一种分布于非洲索马里、肯尼亚、埃塞俄比亚等地的野生动物,动物学分类上属于哺乳纲、啮齿目、滨鼠科、裸鼯鼠属、裸鼯鼠种^[9],野生环境下终生在地下 2 m 左右的黑暗洞穴中生活。作为一种新型的实验用动物,具有寿命长、抗肿瘤、耐缺氧、新陈代谢率低、痛觉缺失、触觉灵敏、视觉功能低下、骨骼再生能力强等诸多特点,可用于抗肿瘤、抗衰老、低氧适应及疼痛等多个领域的研究,在生物医学研究中具有广阔的应用前景^[10]。Jarvis^[11]在 1967 年首次将裸鼯鼠封闭饲养用于科学研究,中国人民解放军第二军医大学于 2011 年从非洲引入裸鼯鼠,并在人工环境下饲养繁殖成功^[12]。裸鼯鼠的实验动物化迫切需要制定其相关的标准,目前裸鼯鼠中病毒和细菌等微生物的自然感染情况还没有报道,也没有裸鼯鼠的相关微生物学标准。

本研究通过建立小鼠多瘤病毒的实时荧光定量 PCR 方法,对裸鼯鼠自然感染小鼠多瘤病毒的情况进行了初步调查,为裸鼯鼠微生物标准的制定提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 乳鼠,10 只,1 日龄,购自本院实验动物生产供应室[SCXK(京)2014-0013][SYXK(京)2011-0008]。成年裸鼯鼠,14 月龄,62 只,体

重 20~40 g,雌雄各半,来自于中国人民解放军第二军医大学实验动物中心,普通环境饲养,采集其盲肠内容物样本,经处理后置 -70℃ 备用。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 病毒株和细胞

小鼠多瘤病毒(poly)、猴空泡病毒(SV40)、小鼠微小病毒(MVM)和大鼠细小病毒 H-1 株(H-1)均为本实验室保存,小鼠 K 病毒(MKV)购于 ATCC(编号:45028),3T3 细胞为本室保存。

1.3 主要试剂

TaqMan Gene Expression Master Mix 为 ABI 产品;病毒核酸提取试剂盒购自 Takara 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 引物探针的设计

选择小鼠多瘤病毒基因组序列(Genbank:NC_001515)中保守序列设计引物和探针,上游引物 P1:5'-TCCTTCCAGTCTGTGTTGTTTC-3';下游引物 P2:5'-CTTCATTCCGTGGGAAGATATGTGT-3';探针:5'-(FAM)CTGCACAACCATTTC(NFQ)-3',预期扩增的目的片段长度为 66 bp,引物探针由华粤瑞科公司合成。

1.4.2 病毒的培养

小鼠多瘤病毒接种 3T3 细胞后,2~3 d 后待出现细胞病变,反复冻融 3 次,置 -70℃ 备用。

1.4.3 核酸的提取

取 0.2 mL 病毒培养液按试剂盒说明提取 DNA,最后用 50 μL 灭菌水洗脱。

1.4.4 标准质粒的制备

在上述引物扩增片段的上下游各设计引物:上游引物 P3:5'-TAGCTAGGCCATCCAGGAAT-3';下游引物 P4:5'-GGGATCCAGCCCTTCTCGAT-3',扩增后的产物连接 pClone007 Blunt Vector 载体,转化宿主菌制备标准质粒。紫外分光光度法测定质粒浓度(ng/μL),根据公式浓度(copies/μL)=[6.02 × 10²³ × 质粒浓度(ng/μL) × 10⁻⁹]/[质粒大小(bp) × 660]换算为拷贝数浓度。

1.4.5 荧光定量 PCR 体系的优化

以同一批次提取的多瘤病毒核酸为模板,分别采用不同的引物浓度(0.1 ~ 1.1 $\mu\text{mol/L}$),探针浓度(0.1 ~ 1.1 $\mu\text{mol/L}$)及退火温度(50 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$)等反应条件,根据其 Ct 值来判定最佳反应条件,每个条件做 3 个重复。

1.4.6 方法的敏感性验证及标准曲线的建立

将标准质粒进行 10 倍系列稀释,稀释成 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L}$,用建立的荧光定量 PCR 方法进行测定,验证其敏感性,并建立标准曲线。

1.4.7 方法的特异性验证

用建立的荧光定量 PCR 法同时检测多瘤病毒, K 病毒,猴空泡病毒(SV40)及大鼠细小病毒 H-1 株(H-1),小鼠微小病毒(MVM)等同属或 DNA 病毒,验证方法的特异性。

1.4.8 人工感染小鼠样本的检测

脑内接种 1 日龄的 KM 乳鼠 poly 病毒,接种 9 只,1 只接种生理盐水作为阴性对照,7 日龄时再次滴鼻感染 5 μL ,21 日龄时脱颈处死,取心、肝、脾、肺、肾、脑和盲肠内容物,按 10% (w/v) 的比例加入 DMEM 培养基,研磨至匀浆,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,进行 poly 核酸的检测。

1.4.9 裸鼯鼠的检测

62 只裸鼯鼠,处死后取盲肠内容物,加入 10% 的 DMEM 培养基,漩涡振荡器震荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清提取核酸检测。

2 结果

2.1 质粒标准品的制备

制备的质粒标准品,对插入片段进行测序,与 NCBI 发表的多瘤病毒序列(Genbank: NC_001515) 同源性为 100%。紫外分光法测得浓度为 119.2 ng/ μL ,换算为拷贝浓度为 $5.126 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。

2.2 荧光定量 PCR 体系的优化

优化后的引物和探针浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$,退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环。

2.3 方法的敏感性验证

提取的标准质粒浓度为 119.2 ng/ μL ,换算成拷贝数浓度为 $5.126 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$,将其稀释成 $10^0 \sim 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L}$,对系列稀释的标准质粒进行荧光 PCR 方法,建立标准曲线,在 10^1 稀释度有一个重复未起峰,其余两个重复起峰晚, $10^2 \sim 10^9$ 稀释度线性关系较好, R^2 值为 0.995,因此本方法判定最低的检测灵敏度为 $10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$,Ct 值 ≤ 32.416 时为阳性,反之为阴性(图 1,图 2)。

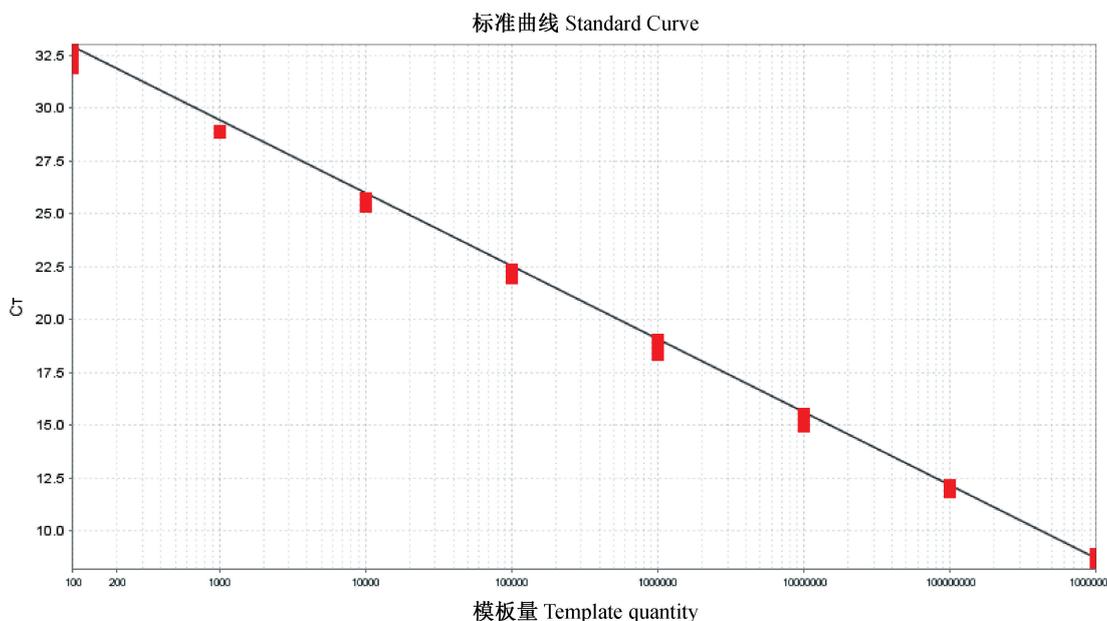


图 1 poly 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of the poly fluorescence real-time PCR assay

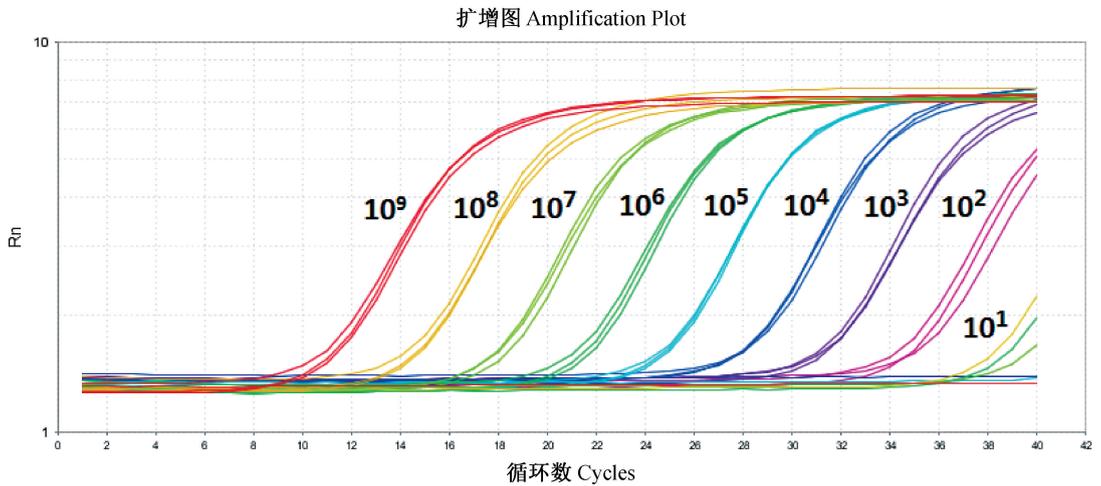


图 2 poly 荧光定量 PCR 方法的敏感性验证

Fig. 2 Sensitivity of the poly fluorescence real-time PCR assay

2.4 方法的特异性验证

检测结果显示,当检测 poly 病毒时,出现 FAM 荧光扩增曲线(Ct 值为 13.984,对应浓度为 2.67×10^7 copies/ μL)。检测猴空泡病毒、K 病毒、小鼠微小病毒和大鼠细小病毒 H-1 株均无明显扩增曲线。表明所建立的荧光定量 PCR 法特异性强,与其他病毒均无交叉反应。(图 3)

2.5 感染样品的检测

9 只人工感染 poly 的小鼠均无明显临床症状,在心、肝、脾、肺、肾、盲肠内容物中均检测到 poly 核酸,各组织核酸含量肺 > 心,肝,脾,肠 > 肾;胸腺,脑和血中 poly 核酸为阴性(图 4)。

2.6 裸鼯鼠的检测

对 62 份裸鼯鼠盲肠内容物样本进行检测,poly

病毒均为阴性(图 5)。

3 讨论

裸鼯鼠作为一种新型的实验动物,在抗肿瘤、抗衰老、耐低氧等研究领域中有广阔的应用前景,我国对裸鼯鼠的研究和应用目前处于起步阶段,中国人民解放军第二军医大学于 2011 年引进并成功进行了裸鼯鼠人工繁殖^[13],为了使其满足实验动物标准化的要求,迫切需要制定裸鼯鼠的微生物、寄生虫和遗传等的质量标准,为此我们对其携带的微生物进行了初步调查,本研究主要对裸鼯鼠中小鼠多瘤病毒的感染情况进行了调查。

我们通过与 NCBI 序列数据库比较,查找其保守序列,最后选取小鼠多瘤病毒核衣壳蛋白基因

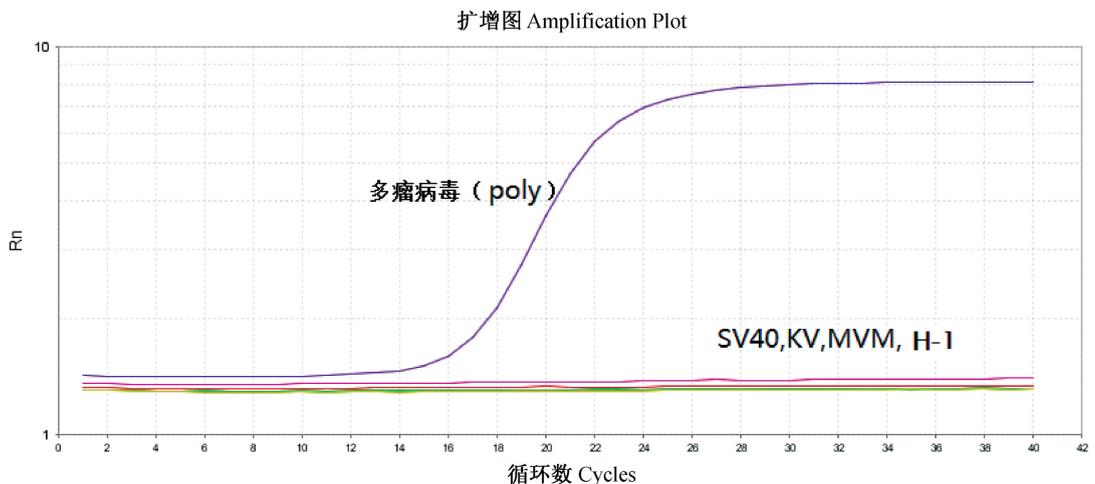
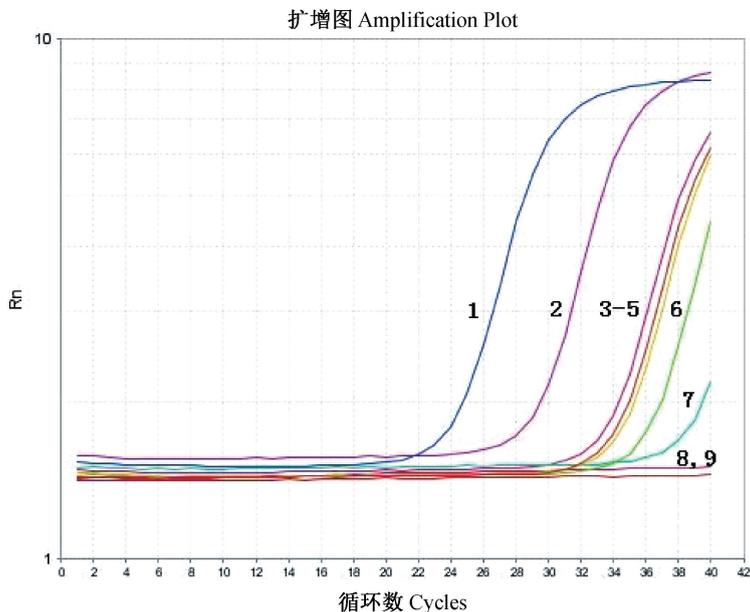


图 3 poly 荧光定量 PCR 方法的特异性

Fig. 3 Specificity of the poly fluorescence real-time PCR assay



注:1-9 依次为肺、阳性对照、肝、肠、心、肾、胸腺、脑和血。

图 4 人工感染小鼠 poly 各组织检测结果

Note. 1-9 represent lung, positive control, liver, cecum, heart, kidney, thymus, brain and blood, respectively.

Fig. 4 Results of detection of polyomavirus distribution in various tissues after artificial infection

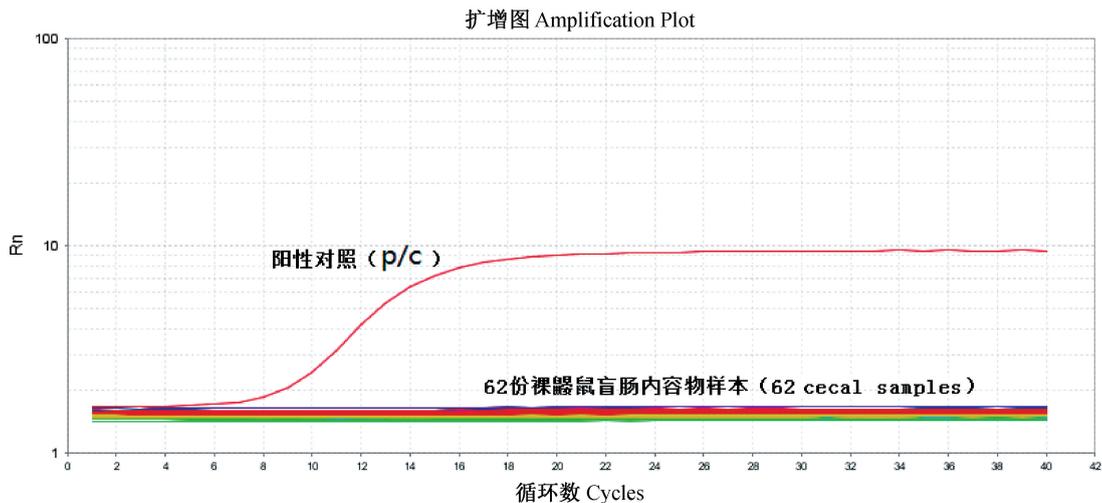


图 5 62 只裸鼹鼠 poly 检测结果 (P/C: 阳性对照)

Fig. 5 Results of detection of polyomavirus in 62 naked mole rats (P/C: positive control).

(Genbank: NC_001515) 序列设计引物探针, 建立了小鼠多瘤病毒的荧光定量 PCR 检测方法。用浓度已经标定的标准质粒对其检测灵敏度进行验证, 在 $10^2 \sim 10^9$ copies/ μ L 范围呈线性关系, 将 10^2 copies/ μ L 作为本方法的检测灵敏度, 对应的 Ct 值为 32.416; 我们用同为多瘤病毒属的猴空泡病毒和小鼠 K 病毒以及大小鼠的两种 DNA 病毒作为对照病毒验证本方法的特异性, 结果只有多瘤病毒出现荧光信号, 其他对照病毒均无荧光信号出现, 表明方

法的特异性良好。为了验证方法在实际样本的检测中是否适用, 我们用多瘤病毒细胞毒感染 9 只 KM 乳鼠, 为了提高感染成功率, 我们分两次分别经脑和鼻饲两个途径进行感染, 检测结果显示在心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物中检测到多瘤病毒核酸, 脑、胸腺和血液中未检测到, 并且各组织病毒含量不同, 肺组织中含量最高, 这与相关文献报道一致^[14]。感染的 9 只小鼠未出现临床症状也未产生肿瘤, 可能是受到了母源抗体的保护。

多瘤病毒的宿主并不局限于小鼠,在大鼠、地鼠以及其他哺乳类动物,鸟类和鱼类中都有发现,裸鼯鼠中也可能存在这种病毒,但我们用建立的荧光定量 PCR 方法并未从裸鼯鼠中检测到多瘤病毒,采用 ELISA 方法也未从裸鼯鼠血清中检测到多瘤病毒抗体(文中未显示),可能的原因有以下几点:选择的靶器官中病毒含量太低,我们进行的感染试验表明多瘤病毒在小鼠肺组织中的含量最高,本次试验参考先前的文献报道我们选择裸鼯鼠的盲肠内容物作为检测的靶器官^[15],后续的试验还需对其其他的靶器官进行检测;另一个原因可能是感染裸鼯鼠的多瘤病毒与小鼠多瘤病毒核酸序列存在差异,由于没有裸鼯鼠多瘤病毒的参考资料,考虑到裸鼯鼠与小鼠同属啮齿目,我们选择小鼠多瘤病毒的基因序列为参考建立了检测方法,有研究表明不同种属动物中的多瘤病毒核酸序列不是完全相同的,这样虽然我们建立的方法检测小鼠中的多瘤病毒是有效的,但用来检测裸鼯鼠中的多瘤病毒就有可能检测不到;本研究检测的裸鼯鼠不是野生状态,是经过人工饲养繁殖多代净化过的,因此包括多瘤病毒在内的一些病原体可能已经净化掉了。以上几个方面均需在今后的实验中继续深入研究。

综上所述,我们建立了小鼠多瘤病毒的荧光定量 PCR 检测方法,并对一定数量的裸鼯鼠样本进行了检测,为实验用裸鼯鼠微生物学标准的制定提供了参考。

参考文献:

- [1] Christopher SS, Chang KS, Christopher DP, et al. Murine polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection [J]. *Virology*, 2009, 387(1): 157 - 167.
- [2] Carroll J, Dey D, Kreisman L, et al. Receptor-binding and oncogenic properties of polyoma viruses isolated from feral mice [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(12): 1879 - 1886.
- [3] 佟巍,张丽芳,向志光,等. 北京地区 2011 ~2012 年度实验小鼠 POLY 病毒感染情况调查与分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(12): 40 - 43.
- [4] Bernhard E, Dania R, Franz-Rainer M, et al. Genome sequences of a rat polyomavirus related to murine polyomavirus, *Rattus norvegicus* polyomavirus 1 [J]. *Genome Announc*, 2015, 3(5): 1 - 2.
- [5] Johne R, Buck CB, Allander T, et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(9): 1627 - 1634.
- [6] Peretti A, FitzGerald PC, Bliskovsky V, et al. Genome sequence of a fish-associated polyomavirus, black sea bass (*Centropristis striata*) polyomavirus 1 [J]. *Genome Announc*, 2015, 3(1): 1 - 2.
- [7] Perez-Losada M, Christensen RG, McClellan DA, et al. Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts [J]. *J Virol*, 2006, 80: 5663 - 5669.
- [8] Kazuo N, Mutsuyo T, Souichi N, et al. Long-term infection of adult mice with murine polyomavirus following stereotaxic inoculation into the brain [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54: 475 - 482.
- [9] Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World* (3 rd ed.) [M]. Johns Hopkins University Press, 2005: 1542 - 1543.
- [10] 崔淑芳. 裸鼯鼠在生物医学研究中的应用前景 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 313 - 320.
- [11] Edrey YH, Hanes M, Pinto M, et al. Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research [J]. *ILAR J*, 2011, 52(1): 41 - 53.
- [12] 赵善民,崔淑芳. 裸鼯鼠生物学特性的研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5): 400 - 405.
- [13] 孙伟,汤球,赵善民,等. 裸鼯鼠人工饲养繁殖初步研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(4): 296 - 300.
- [14] 尹雪琴,袁文,王静,等. 实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测小鼠多瘤病毒方法的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(6): 53 - 58.
- [15] 田克恭. *实验动物病毒性疾病* [M]. 农业出版社, 1992: 99 - 104.

[收稿日期] 2017 - 05 - 05