

孟钰榕,郑龙,祝岩波,等. 大鼠冠状病毒和仙台病毒的双重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 181-186.

Meng YR, Zheng L, Zhu YB, et al. Establishment and application of a duplex PCR assay for detection of Rat coronavirus and Sendai virus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 181-186.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.009

大鼠冠状病毒和仙台病毒的双重 PCR 检测方法的建立与应用

孟钰榕¹, 郑龙¹, 祝岩波², 王璇², 尤红煜¹, 刘健敏¹, 栗彦宁¹, 连伟光¹,
张东明¹, 王俊霞^{1*}

(1. 河北省实验动物重点实验室, 河北医科大学实验动物学部, 石家庄 050000;
2. 河北医科大学第二医院, 石家庄 050000)

【摘要】 目的 建立快速检测实验大鼠冠状病毒和仙台病毒的双重 PCR 方法。方法 根据大鼠冠状病毒 *N* 基因、仙台病毒 *L* 基因设计特异性引物; 经过双重 PCR 优化, 特异性和敏感性的检测, 建立双重 PCR 体系。应用该 PCR 体系检测人工感染仙台病毒组织 DNA 样本和实验动物组织样本, 并与 ELISA 方法比对。结果 双重 PCR 扩增出大鼠冠状病毒 (168 bp) 和仙台病毒 (262 bp) 目的条带, PCR 扩增产物测序结果利用核酸 BLAST 功能进行同源序列对比, 仙台病毒和大鼠冠状病毒同源性分别为 100% 和 99%。仙台病毒和大鼠冠状病毒的检测下限为 1.56×10^2 copies/ μ L。特异性检测对小鼠肝炎病毒扩增, 产生片段大小近似大鼠冠状病毒产物。应用建立的双重 PCR 体系检测人工感染仙台病毒组织 DNA 样本, 30 份 DNA 标本均被检出; 检测 94 份实验动物肺组织样本, 结果均阴性。结论 建立的双重 PCR 方法操作简单、快速、特异性强、灵敏度高, 能够实现对实验动物仙台病毒和大鼠冠状病毒病原体的快速检测。

【关键词】 大鼠冠状病毒; 仙台病毒; 双重 PCR

【中图分类号】 Q95-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-4847(2019) 02-0181-06

Establishment and application of a duplex PCR assay for detection of Rat coronavirus and Sendai virus

MENG Yurong¹, ZHENG Long¹, ZHU Yanbo², WANG Xuan², YOU Hongyu¹, LIU Jianmin¹, LI Yanning¹,
LIAN Weiguang¹, ZHANG Dongming¹, WANG Junxia^{1*}

(1. Hebei Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Department of Laboratory Animal Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. 2. the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Corresponding author: WANG Junxia. E-mail: wangjunx@163.com

【Abstract】 **Objective** To establish a rapid duplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of Rat coronavirus and Sendai virus. **Methods** Specific primers were designed based on the *N* gene of Rat coronavirus and *L* gene of Sendai virus. A duplex PCR system was established by optimizing the concentration of primers

[基金项目] 国家科技支持计划(2015BAI07B02)。

Funded by National Science and Technology Support Program(2015BAI07B02)。

[作者简介] 孟钰榕(1993—)女, 硕士研究生, 研究方向: 遗传学。Email: 18232153792@163.com

[通信作者] 王俊霞(1962—)女, 教授, 博士, 研究方向: 遗传学。Email: wangjunx62@163.com

and annealing temperature, and testing the specificity and sensitivity of this system. This was followed by screening DNA samples of artificial infections and tissues of experimental animals through our PCR system and comparing it with the ELISA method. **Results** Duplex PCR amplification of Rat coronavirus (168 bp) and Sendai virus (262 bp) was done. The results of sequencing of the PCR amplification products were compared with homologous sequences using BLAST functions. The homology of the Sendai virus and Rat coronavirus was 100% and 99%, respectively. The lower limit of detection for Rat coronavirus and Sendai virus was 1.56×10^2 copies/ μL . Specific detection of mouse hepatitis virus amplification resulted in a fragment size that similar to the Rat coronavirus product. The established duplex PCR system was used to detect the DNA samples of artificially infected Sendai virus, and 30 positive DNA samples were detected. At the same time, in order to verify the applicability of the system, 94 experimental animal lung tissue samples were detected and the results were negative. **Conclusions** A rapid PCR assay for simultaneous detection of Rat coronavirus and Sendai virus is successfully established. This duplex PCR assay is specific, sensitive, simple and rapid, and can be used for rapid detection of Sendai virus and Rat coronavirus simultaneously in laboratory animals.

【Keywords】 Rat coronavirus; Sendai virus; duplex PCR

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

仙台病毒 (Sendai virus, SeV), 乙型副流感病毒, 属副黏病毒属, 为单股负链 RNA 病毒, 基因组全长 15384 bp, 编码 6 个结构蛋白 (*L*, *P*, *NP*, *HN*, *F*, *M*) 和一个非结构蛋白 *C*, 其基因排列次序为: 3'-Leader-NP-P+C-M-F-HN-L-Leader-5'^[1]。传染性强, 容易扩散, 是啮齿类实验动物最难控制的病毒之一。易引起小鼠和大鼠继发感染, 主要表现呼吸道症状, 多数呈隐性感染, 对实验研究产生严重干扰^[2-3]。

大鼠冠状病毒 (Rat coronavirus, RCV), 属冠状病毒科, 冠状病毒属, 是一种高度接触传染性病毒。冠状病毒基因组的基本结构是 5'-UTR-ORF1ab-(*HE*)-*S-E-M-N*-3' UTR, RNA 链 5' 端有甲基化的帽子结构, 3' 末端有 PolyA 尾结构^[4]。大鼠冠状病毒易引起大鼠发生呼吸道和肺部炎症, 新生大鼠最易感, 病死率较高^[5]。

我国实验动物国家标准 GB14922.2-2011 中规定的 SPF 级大鼠必须排除 7 种病毒, 其中包括仙台病毒和大鼠冠状病毒。国内病毒感染诊断方法主要是针对抗体检测的血清学方法, 但由于免疫缺陷大小鼠不能产生抗体反应, 所以抗体检测不能用于免疫缺陷大小鼠^[6-7]。因此, 本研究旨在针对上述两种病毒建立快速高效的双重 PCR 检测方法, 为及时准确地监控病毒感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验动物临床样本包括: (1) 人工感染仙台病毒组织 DNA 样本 30 份 (广东省实验动物监测所惠

赠); (2) 实验动物肺组织样本 94 份, 其中 SPF 级 SD 大鼠 36 只 (120 ~ 140 g), 清洁级 SD 大鼠 10 只 (120 ~ 140 g), SPF 级 KM 小鼠 24 份 (18 ~ 20 g)、清洁级豚鼠 5 份 (180 ~ 200 g)、普通级家兔 19 份 (2.5 kg)。实验动物来源于河北省实验动物中心、河南省实验动物中心、山西医科大学和望都县彤辉养殖有限公司, 均具有实验动物生产许可证。取样在河北医科大学实验动物学部 P2 实验室进行【SYXK(冀)2013-0026】。

1.1.2 病毒、细胞株

仙台病毒 (SeV, ATCC VR-105)、大鼠冠状病毒 (RCV, ATCC VR-1410) 购自美国典型微生物菌种保藏中心; 小鼠肝炎病毒 (murine hepatitis virus, MHV)、小鼠呼肠孤病毒 III 型 (reovirus type 3, Reo-3)、小鼠肺炎病毒 (pneumonia virus of mice, PVM)、大鼠细小病毒 KRV 株 (Kilham rat virus, KRV)、大鼠细小病毒 H-1 株 (Toolan virus, H-1) 由广东省实验动物监测所惠赠, 细胞 BHK21 由中国食品药品检定研究院惠赠。

1.1.3 引物

根据仙台病毒和大鼠冠状病毒保守特异区域设计相应引物, 引物基因、引物序列、产物长度和参考文献见表 1。引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.1.4 试剂和仪器

Gold Multiplex PCR Mix、SuperRT cDNA Synthesis Kit (康为世纪有限公司), DNA Ladder (南京诺唯赞生物科技有限公司), 琼脂糖 Agarose (Biowest 公司), Tris 和胎牛血清 (北京索莱宝科技有限公司), 核酸染料 ExRed (北京庄盟国际生物基因科技有限公司),

TRIzol(天根生化科技有限公司),1640 培养基(上海立菲生物技术有限公司),SeV 和 RCV ELISA 试剂盒(中国食品药品检定研究院)。

微量分光光度计(基因公司 NanoDrop);PCR 仪(美国 ABI 9700);凝胶成像系统(美国 UVP GDS-8000)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

病原体 Pathogens	基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物长度(bp) Product size	文献出处 References
仙台病毒 SeV	L	TATCAGCCCCGACCGTAAGAG AGGGTCTGGAGCCCAATCTA	262	[8]
大鼠冠状病毒 RCV	N	TGGAATCCTCAAGAAGACCAC ATGCCCGAAACCAAGAG	168	[5]

1.2 方法

1.2.1 病毒培养

BHK21 细胞在含 10%胎牛血清的 1640 培养基中按 1:3 的比例传代培养。贴壁细胞达 80% ~ 90% 时弃培养液,加入 100 μL 的病毒原液,37℃ 培养 1 h,每 20 min 混匀一次,最后加入 4 mL 1640 培养基,直至细胞融合达到 80% 以上,收集病毒, - 80℃ 保存^[9]。

1.2.2 标准毒株和肺组织样品 RNA 的抽提

按 TRIzol 操作说明书进行。

1.2.3 RNA 逆转录为 cDNA

按 SuperRT cDNA Synthesis Kit 试剂说明进行。

1.2.4 双重 PCR 反应体系和反应条件

PCR 反应体系为 50 μL,包括 Mix 25 μL,SeV 上游和下游混合引物 0.72 μL(终浓度为 0.072 μmol/L),RCV 上游和下游混合引物 1.24 μL(终浓度为 0.124 μmol/L),SeV 和 RCV DNA 各 1 μL(1× 10⁴ copies),补水至 50 μL。

反应条件^[10]为 95℃ 5 min;95℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 30 s,共 3 个循环;95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,共 40 个循环;72℃ 7 min。10 μL 扩增产物,2.5%琼脂糖凝胶电泳,120 V 电泳 35 min。

1.2.5 PCR 扩增产物测序

PCR 产物直接由 Invitrogen 完成纯化及测序工作,测序结果于 NCBI 利用核酸 BLAST 功能进行同源序列比对。

1.2.6 特异性试验

用建立的双重 PCR 体系分别对 KRV、H-1、MHV、Reo、PVM、兔、小鼠、大鼠、豚鼠肺组织进行检测,验证该方法的特异性。

1.2.7 敏感性试验

将病毒的阳性质控品做 2 倍系列稀释,取 1 μL 作为 PCR 反应模板,检验双重 PCR 的敏感性。

1.2.8 动物样本的检测

用建立的双重 PCR 体系分别扩增 94 份实验动物肺组织样本和 30 份人工感染仙台病毒组织 DNA 样本。

2 结果

2.1 双重 PCR 方法的建立及优化

分别对仙台病毒和大鼠冠状病毒进行 PCR 实验,结果显示仙台病毒扩增出 262 bp 产物,大鼠冠状病毒扩增出 168 bp 产物(见图 1A)。按照 1.2.4 反应条件进行双重 PCR 体系优化,当 RCV 引物浓度为 0.124 μmol/L 时,比较 SeV 引物浓度分别为 0.054 μmol/L,0.063 μmol/L,0.072 μmol/L,0.081 μmol/L 时扩增效果,结果显示 SeV 引物浓度为 0.072 μmol/L 时,两条扩增条带均一清晰(见图 1B)。将单重 PCR 产物进行测序,在 Genbank 中 Blast 对比,仙台病毒和大鼠冠状病毒源性分别为 100%和 99%(图 2)。

2.2 特异性试验

采用建立的双重 PCR 方法对 KRV、H-1、MHV、Reo、PVM、兔、KM 小鼠、SD 大鼠、豚鼠肺组织进行检测,验证该方法的特异性。结果除阳性对照和 MHV 为阳性外,其他病毒及组织均为阴性,且不存在交叉反应。将 MHV 扩增产物进行测序,在 Genbank 中 BLAST 对比(见图 3、图 4)。

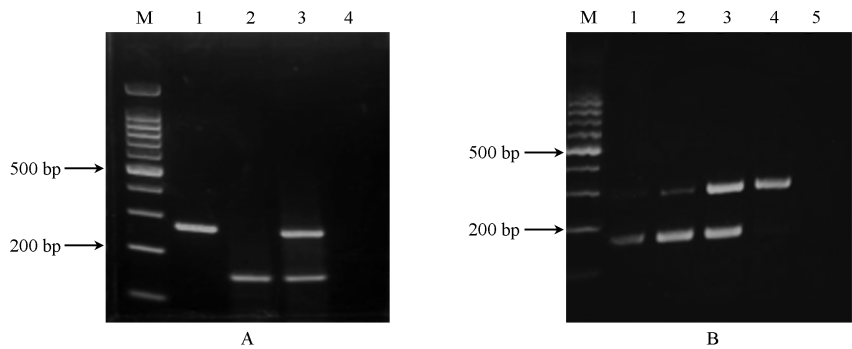
2.3 敏感性试验

将病毒的阳性质控品做 2 倍系列稀释,得到系列标准模板。利用优化后的反应体系和条件进行双重 PCR 检测。结果显示 SeV、RCV 的检测下限为 1.56 × 10² copies/μL(见图 5)。

2.4 双重 PCR 检测方法在动物样本检测中的初步应用

2.4.1 双重 PCR 方法在仙台病毒人工感染样本检测中的初步应用

应用双重 PCR 方法对 30 份人工感染 SeV 组织



注:A:M,100 bp DNA ladder;Lane 1, 仙台病毒 PCR;Lane 2, 大鼠冠状病毒 PCR;Lane 3, 仙台病毒和大鼠冠状病毒双重 PCR;Lane 4, 双重 PCR(阴性对照)。B:M,100 bp DNA ladder;Lanes 1-4 大鼠冠状病毒引物终浓度均为 0.124 μmol/L,仙台病毒引物终浓度分别为 0.054,0.063,0.072,0.081 μmol/L;Lane 5.阴性对照。

图 1 双重 PCR 体系的建立及优化

Note. A. M, 100 bp DNA ladder. Lane 1, Sendai virus PCR. Lane 2, Rat coronavirus PCR. Lane 3, Duplex PCR of SeV and RCV. Lane 4, Duplex PCR (negative control). B. M, 100 bp DNA ladder. Lanes 1-4, Primer concentration of Rat coronavirus was 0.124 μmol/L, Primer concentrations of Sendai virus were 0.054, 0.063, 0.072, 0.081 μmol/L, respectively. 5. Negative control.

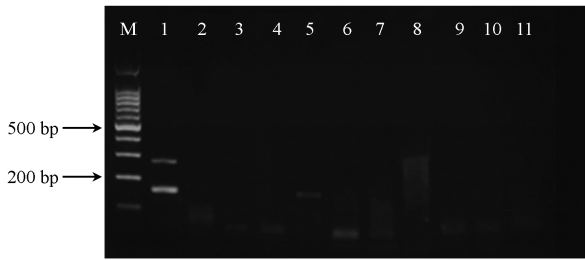
Figure 1 Establishment and optimization of the duplex PCR assay

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Sendai virus (5' end of the viral genome) L gene, complete cds	411	411	95%	7e-111	100%	M14887.1
Sendai virus L gene for polypeptides, complete cds	411	411	95%	7e-111	100%	D00053.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rat coronavirus isolate 8190, complete genome	196	196	97%	8e-47	99%	JF792617.1
Rat coronavirus Parker, complete genome	196	196	97%	8e-47	99%	FJ938068.1

图 2 单重 PCR 产物 BLAST 序列对比结果

Figure 2 Results of BLAST sequence comparison of single PCR products



注:M, 100 bp DNA ladder;Lane 1, 阳性对照;Lane 2, 阴性对照;Lane 3, 大鼠细小病毒 KRV 株;Lane 4, 大鼠细小病毒 H-1 株;Lane 5, 小鼠肝炎病毒;Lane 6, 小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型;Lane 7, 小鼠肺炎病毒;Lanes 8-11 分别为兔、KM 小鼠、SD 大鼠、豚鼠肺样本。

图 3 特异性实验结果

Note. M, 100 bp DNA ladder. Lane 1, Positive control. Lane 2, Negative control. Lane 3, Kilham rat virus. Lane 4, Toolan virus, H-1. Lane 5, Murine hepatitis virus. Lane 6, Reovirus type 3. Lane 7, Pneumonia virus of mice. Lanes 8-11, Lung samples from rabbits, KM mice, SD rats, and guinea pigs, respectively.

Figure 3 Results of the specificity test

DNA 样本进行检测,阳性核酸样本均被检出,与预期结果一致(图 6)。

2.4.2 双重 PCR 方法在实验动物临床样本检测中的初步应用

应用双重 PCR 体系分别对 94 份实验动物肺组织样本进行检测,结果未检出 SeV、RCV(见图 7)。

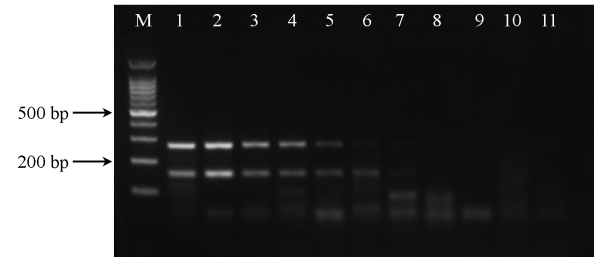
3 讨论

双重 PCR 技术广泛应用于病原微生物检测与鉴定。双重 PCR 是指将多对引物加入同一个反应体系里,扩增出多个不同大小产物的技术,由于会互相造成干扰,引物之间可能会形成二聚体^[11],所以,引物设计和反应条件的优化是本实验成功的关键。本研究根据已发表文献和基因序列,设计选择仙台病毒和大鼠冠状病毒的多对特异性引物,根据产物大小和引物特征进行两种病毒的引物配对,通过筛选和引物浓度优化,最终确定了两对引物。在 PCR 反应中,退火温度对 PCR 的特异性有较大影

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Murine hepatitis virus strain S/3239-17, complete genome	204	204	92%	5e-49	99%	JQ173883.1
Murine hepatitis virus strain S, complete genome	204	204	92%	5e-49	99%	GU593319.1
Mouse hepatitis virus nucleocapsid (N-MHV/S) RNA, complete cds	204	204	92%	5e-49	99%	M35255.1
Murine hepatitis virus isolate MHV/NYU/Manhattan/poolF5, partial genome	195	195	90%	3e-46	98%	MF416379.1
Murine hepatitis virus nucleoprotein gene, complete cds	193	193	92%	1e-45	97%	L37758.1
Murine hepatitis virus nucleoprotein gene, complete cds	189	189	83%	1e-44	100%	L37759.1
Rat coronavirus strain NJ nucleocapsid gene, complete cds	187	187	92%	5e-44	96%	AF088984.1

图 4 MHV 扩增产物序列比对结果

Figure 4 Results of sequence comparison of the MHV amplification products

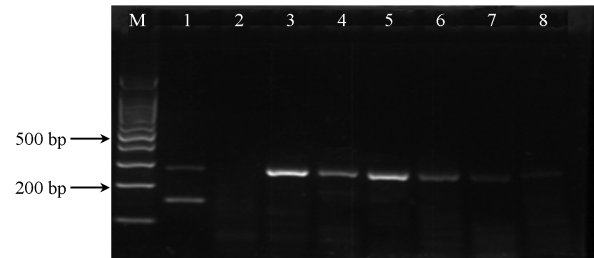


注:M; 100 bp DNA ladder; Lanes 1-10, 质量分别为 1×10^4 , 5×10^3 , 2.5×10^3 , 1.25×10^3 , 6.25×10^2 , 3.125×10^2 , 1.56×10^2 , 7.8×10 , 3.9×10 , 1.95×10 copies/ μL . Lane 11, 阴性对照。

图 5 敏感性实验结果

Note. M. 100 bp DNA ladder. Lanes 1-10, The quantities were 1×10^4 , 5×10^3 , 2.5×10^3 , 1.25×10^3 , 6.25×10^2 , 3.125×10^2 , 1.56×10^2 , 7.8×10 , 3.9×10 , 1.95×10 copies/ μL , respectively. Lane 11, Negative control.

Figure 5 Results of the sensitivity test



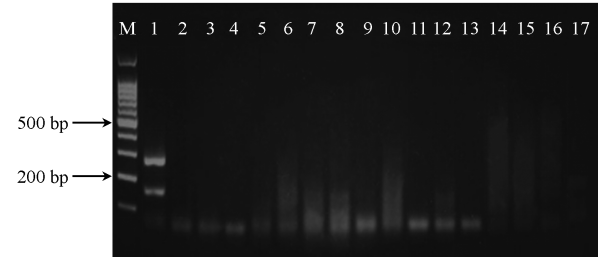
注:M; 100 bp DNA ladder; Lane 1, 阳性对照; Lane 2, 阴性对照; Lanes 3-8, 人工感染仙台病毒组织 DNA 样本。

图 6 人工感染 SeV 组织 DNA 样本结果

Note. M, 100 bp DNA ladder. Lane 1, Positive control. Lane 2, Negative control. Lanes 3-8, DNA samples of Sendai virus infected artificially.

Figure 6 Results of DNA samples from artificially SeV-infected tissues

响,选择合适的退火温度往往需要多次反应,费时费力,并且即使通过多次试验找到最佳的退火温度后,在更换其他的 PCR 仪进行同样的扩增时,最适的退火温度也有可能发生改变,需要重新确定最佳退火温度^[12]。本研究应用 touch-down PCR 技术,设



注:M; 100 bp DNA ladder; Lane 1, 阳性对照; Lane 2, 阴性对照; Lanes 3-8, 小鼠肺组织; Lanes 9-17, 大鼠肺组织。

图 7 双重 PCR 检测实验动物标本

Note. M. 100 bp DNA ladder. Lane 1, Positive control. Lane 2, Negative control. Lanes 3-8, The lung tissues of mice. Lanes 9-17, The lung tissues of rats.

Figure 7 Results of the duplex-PCR detection of laboratory animal specimens

计多循环反应程序,使相连循环的退火温度逐渐降低。先用高温扩增,保证扩增的特异性,待目的基因的丰度升高后降低退火温度,提高扩增效率。此技术不仅避免了因确定最佳退火温度时的复杂反应优化过程,还使目的产物得到富集。目前 touch-down PCR 已广泛应用于病毒、细菌、寄生虫的快速检测等。

本研究结合双重 PCR 技术与 touch-down PCR 技术,建立仙台病毒和大鼠冠状病毒双重 PCR。在双重 PCR 体系优化过程中,当 RCV 引物浓度为 $0.124\ \mu\text{mol/L}$ 时,调整 SeV 引物浓度,在 SeV 引物浓度为 $0.072\ \mu\text{mol/L}$ 时,两条扩增条带均一清晰。通常的 touch-down PCR 反应的退火温度范围可跨越 15°C 左右,在本实验中,由于软件预测的两个退火温度仅相差 2°C ,将退火温度范围设定在 $65\sim62^\circ\text{C}$ 之间,已经达到理想的检测目的。该双重 PCR 体系敏感性检测结果显示,SV 和 RCV 检测下限均为 1.56×10^2 copies/ μL 。应用双重 PCR 体系扩增 KRV、H-1、MHV、Reo、PVM,其中 MHV 扩增片段与 RCV 目的条带大小相似,因为小鼠肝炎病毒和大鼠冠状病毒同属于冠状病毒属, DNA 序列具有高度同

源性。应用双重 PCR 反应体系扩增人工感染仙台病毒组织 DNA 样本,30 份仙台病毒核酸阳性标本均被检出,与预期结果一致。为验证该体系的应用效果,采集实验动物组织样本 94 份,用双重 PCR 体系扩增 SeV 和 RCV 病毒,与 ELISA 检测方法比对结果一致,初步验证了本方法的可行性。本研究旨在当两种病毒混合感染时,双重 PCR 方法使得混合感染的检测变得简单、方便、快速,大大降低检测成本,为大鼠日常监测、临床诊断和流行病学调查提供实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] 范文平.仙台病毒的分子生物学研究进展[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(2):115-118.
Fan WP. Research progress of molecular biology about Sendai virus[J]. Chin J Lab Anim Sci, 1999, 9(2): 115-118.
- [2] 李晓波,付瑞,王吉,等.仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立及灰仓鼠中流行情况调查[J].中国比较医学杂志, 2012, 22(12):18-22.
Li XB, Fu R, Wang J, et al. Establishment of a RT-PCR detection method for Sendai virus and investigation of its infection status in *Cricetulus migratorius*[J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(12):18-22.
- [3] 侯丽波. SV, Reo-3, MHV, MAd, RCV 病毒免疫血清制备及 ELISA 等检测方法的研究[D].中国协和医科大学,2009.
Hou LB. Study of the standard serological methods in detecting virus for SV, Reo-3, MHV, MAd, RCV [D]. Peking Union Medical College, 2009.
- [4] 王文.啮齿动物中冠状病毒的分子流行病学研究及登革病毒在非疫区的再现[D].中国疾病预防控制中心,2017.
Wang W. Molecular epidemiology of coronavirus sampled from rodents and re-emergence of dengue in non-endemic regions[D]. Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017.
- [5] 刘忠华,黄韧,魏社林,等.应用 RT-PCR 技术检测啮齿类动物冠状病毒[J].上海实验动物科学,2004(04):218-220.
Liu ZH, Huang R, Wei SL, et al. Detection of rodent coronavirus by using reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Lab Anim Comp Med, 2004(04):218-220.
- [6] 王宗耀,谢建云,邵伟娟,等.仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(01):49-53.
Wang ZY, Xie JY, Shao WJ, et al. Establishment and application of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for Sendai virus [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(01):49-53.
- [7] 袁文,刘忠华,张钰,等.小鼠肝炎病毒逆转录环介导等温扩增检测技术的建立[J].中国实验动物学报, 2009, 17(05):354-359+409-410.
Yuan W, Liu ZH, Zhang Y, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technique for detection of mouse hepatitis virus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2009, 17(05):354-359+409-410.
- [8] Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials [J]. Lab Anim, 2003, 37(4): 341-351.
- [9] 王宗耀.仙台病毒 F 基因的表达与间接 ELISA 检测方法的建立和应用[D].扬州大学,2007.
Wang ZY. Expression of SeV-F in *E. coli* and development and application of an indirect ELISA for detection of Anti-SeV antibodies[D]. Yangzhou University, 2007.
- [10] Hayase Y, Tobita K, Kii M, et al. Detection of nucleoprotein gene of Sendai virus in the lungs of rats by touchdown nested reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Exp Anim, 1997, 46(4): 307-310.
- [11] 李庆超.多重 PCR 技术同时高效检测食源性致病菌的研究 [D].吉林大学,2017.
Li QC. Study of multiplex PCR technology in the simultaneously and efficiently detection of food-borne pathogenic bacteria [D]. Jilin University, 2017.
- [12] 李玉恒,赵明慧,赵紫阳,等.利用梯度 PCR 和降落 PCR 扩增 CIRP 基因的比较[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(05): 46-49+75.
Li YH, Zhao MH, Zhao ZY, et al. Comparison of the amplification of CIRP genes with touch down PCR and gradient PCR [J]. J Heilongjiang Bayi Agr Univ, 2011, 23(05):46-49+75.

[收稿日期] 2018-10-31