

小鼠巨细胞病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用*

李晓波 付 瑞 王 吉 王淑菁 王莎莎
李 威 秦 晓 黄宗文 贺争鸣 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 102629)

摘要:目的 建立小鼠巨细胞病毒(Mouse Cytomegalovirus, MCMV)荧光定量 PCR 方法并对其进行初步应用。方法 选取NCBI发表的MCMV Smith株DNA polymerase基因保守序列设计引物探针,建立MCMV的荧光定量PCR方法,对方法的特异性、敏感性、重复性及稳定性进行验证,并应用该方法检测掺入MCMV的小鼠血液样品及2018年度送检的409份小鼠血液样本。结果 建立的MCMV荧光定量PCR方法标准曲线Slope为-3.418, R^2 值为0.999,扩增效率为96.137%,可定量检测到的MCMV最低含量为47 copies/ μ L。以大鼠巨细胞病毒,猴巨细胞病毒,人单纯疱疹病毒,伪狂犬病毒及猫疱疹病毒I型为模板均无扩增曲线,特异性良好。方法组内和组间变异系数分别为0.39%~0.68%和0.48%~1.01%,重复性和稳定性好。可检测到掺入小鼠血液样品中MCMV病毒的最大稀释度为1:1000(100.75 TCID₅₀/0.1 mL),409份小鼠血液样品经检测均为阴性。结论 建立的小鼠巨细胞病毒荧光定量PCR方法有很好的敏感性、特异性及稳定性,可有效地检测小鼠中MCMV,为实验小鼠MCMV的监测及相关标准的补充完善提供了技术参考。

关键词:小鼠巨细胞病毒;荧光定量PCR;实验小鼠

中图分类号: R-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0033-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.007

小鼠巨细胞病毒(Mouse Cytomegalovirus, MCMV)分类上属疱疹病毒科,乙型疱疹病毒亚科,具有严格的种属特异性,野生小鼠是该病毒的主要来源,主要通过动物亲密接触传播,也可经胎盘垂直传播^[1]。

自然感染小鼠多呈亚临床过程,但病毒会潜伏在免疫功能健全动物体内^[2],胎鼠或免疫缺陷动物感染会发生严重疾病^[3],如会改变小鼠呼吸系统、血液系统内环境的平衡,从而对细菌和病毒更加易感,更重要的是会抑制动物的免疫应答,抑制抗体产生及Tc细胞的功能^[4]。欧洲实验动物联合会(FELASA)、Charles river实验室及Harlan实验室等均已将MCMV列为实验小鼠日常监测项目^[5],早在八九十年代就有学者建议将MCMV作为SPF动物应排除的病原体^[6],目前我国的实验动物国家标准对MCMV的检测没有规定。本研究建立的MCMV特异的TaqMan探针实时荧光定量PCR(FQ-PCR)

方法,具有高灵敏度和特异性的特点,为实验小鼠MCMV日常监测及动物源性生物制品中MCMV的检测提供了技术参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂

FQ-PCR引物探针由ABI公司合成,TaqMan Universal PCR Master Mix为ABI产品;病毒核酸提取试剂盒购自Takara公司。

1.2 病毒株和样品

小鼠巨细胞病毒(MCMV)smith株(103.75 TCID₅₀/0.1 mL),大鼠巨细胞病毒(RCMV)购自ATCC,编号VR-991;猴巨细胞病毒(SCMV)、人单纯疱疹病毒sm44株(HSV)、伪狂犬病毒(PRV)及猫疱疹病毒I型(FHV-1)均为本室保存;2018年14家单位送检的SPF级小鼠抗凝血样品307份,清洁级小鼠抗凝血102份,具体见表1。

收稿日期:2019-06-28

* 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2017ZX10304402)

作者简介:李晓波(1980—),副研究员,研究方向:实验动物病毒学.E-mail:lx8493059@163.com。

通信作者:岳秉飞(1960—),研究员,研究方向:实验动物学.E-mail:y6784@126.com。

表 1 临床样本信息

Table 1 Clinical samples information

品系 等级	BALB/c	NIH	C57BL/6	ICR	BALB/c-nu	NPG	B6CBAF1	NOD SCID
清洁级	72	/	10	10	/	/	10	/
SPF 级	167	20	30	30	10	10	20	20

1.3 方法

1.3.1 引物设计:选择小鼠巨细胞病毒 Smith 株

(Genbank:KY348373) DNA polymerase 基因保守序列设计引物和探针,序列见表 2。

表 2 MCMV FQ-PCR 引物探针信息

Table 2 Primers and probes for MCMV FQ-PCR

引物名称	序列(5'-3')	序列位置	产物大小(bp)
MCMVF	CCTGCCGATCTTGGTGATAGAAG	80754~80776	86
MCMVR	GCAACGCTTCTACGGTTTCAC	80818~80839	
探针	(FAM)ATGCTCCCGTCTCTCC(NFQ)	80786~80801	

1.3.2 病毒核酸的提取:小鼠巨细胞病毒、大鼠巨细胞病毒、猴巨细胞病毒、人单纯疱疹病毒 sm44 株、伪狂犬病毒及猫疱疹病毒 I 型,各取 0.2 mL 病毒液按试剂盒说明提取 DNA,最后用 150 μ L 灭菌水洗脱。

1.3.3 质粒标准品的制备:由擎科生物合成 MCMV (Genbank:KY348373) 80691~80880 bp 的 DNA 序列,转入 pClone007 Blunt Vector 载体,构建质粒标准品 pClone007-MCMVp,经测定其浓度为 4.7×10^{10} copies/ μ L。

1.3.4 MCMV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立:对引物、探针浓度、退火温度等条件进行优化,优化后的反应体系为: TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L,探针(10 μ mol/L)0.2 μ L,DNA 模板 1 μ L,灭菌 ddH₂O 补足至终体积 20 μ L。反应程序为:50 $^{\circ}$ C 2min;95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1min,40 个循环。将质粒标准品 pClone007-MCMVp 10 倍系列稀释为 $10^9 \sim 10^0$ copies/ μ L,以其为模板,按上述反应体系和反应条件进行 PCR 扩增,每个稀释度做 3 个平行,选取线性较好的 7 个稀释度绘制标准曲线。

1.3.5 MCMV FQ-PCR 方法的敏感性验证:

1.3.5.1 以 $4.7 \times 10^9 \sim 4.7 \times 10^0$ copies/ μ L 系列稀释的质粒标准品为模板,用优化好的反应条件进行检测,每个稀释度做 3 个平行,验证方法的敏感性。

1.3.5.2 与其他 PCR 方法敏感性比较:将步骤 1.3.2 提取的 MCMV 核酸 10^{-1} 至 10^{-8} 系列稀释,使用本方法、文献报道的常规 PCR 法、FQ-PCR 方法分别检测^[7],比较各方法的灵敏性。

1.3.6 MCMV FQ-PCR 方法特异性验证:用建立的荧光定量 PCR 法检测小鼠巨细胞病毒,大鼠巨细胞病毒,猴巨细胞病毒,人单纯疱疹病毒,伪狂犬病毒及猫疱疹病毒 I 型等疱疹病毒科病毒的核酸,验证方法的特异性。

1.3.7 MCMV FQ-PCR 方法的重复性和稳定性验证:应用优化好的反应条件,以不同浓度的质粒标准品(4.7×10^6 , 4.7×10^4 和 4.7×10^2 copies/ μ L)为模板进行 FQ-PCR 扩增,每个浓度设置 3 个重复,同时选择不同的 3 个时间点检测,计算组内和组间 Ct 值均值,标准差及变异系数。

1.3.8 MCMV FQ-PCR 方法的应用

1.3.8.1 模拟感染样本的检测:MCMV 病毒液(103.75 TCID₅₀/0.1 mL)分别按 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 的比例掺入 MCMV 阴性小鼠抗凝血,模拟病毒感染样品,每个稀释度做 3 个平行,各取 200 μ L,按 DNA 提取试剂盒说明提取核酸,用 MCMV FQ-PCR 方法进行检测。

1.3.8.2 临床样本的检测:应用建立的 MCMV FQ-PCR 方法检测 2018 年 14 个实验动物生产和使用单位送检的小鼠抗凝血样品,包括 SPF 级小鼠血清 307 份,清洁级小鼠 102 份(表 1)。

2 结果

2.1 MCMV 荧光定量 PCR 扩增体系及标准曲线的建立

用优化好的体系扩增 $10^8 \sim 10^2$ copies/ μ L 的标准质粒,各稀释度扩增曲线间距均匀,标准曲线 Slope 为 -3.418(在 -3 ~ -3.5 之间), R^2 值为 0.999 (>0.99),扩增效率为 96.137%(90% ~ 105% 之间)

(图 1、2)。

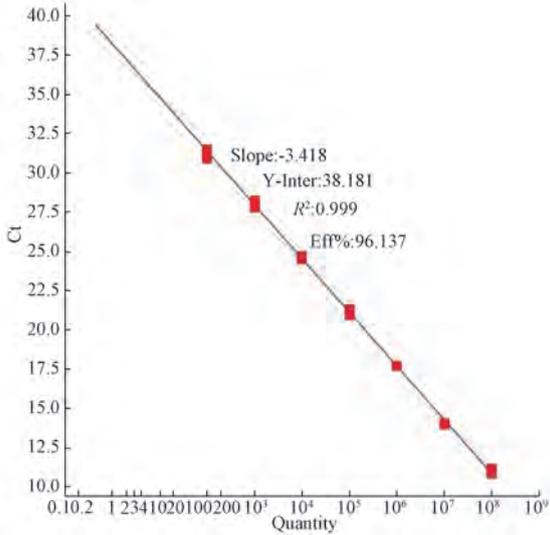


图 1 MCMV 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.1 MCMV FQ-PCR standard curve

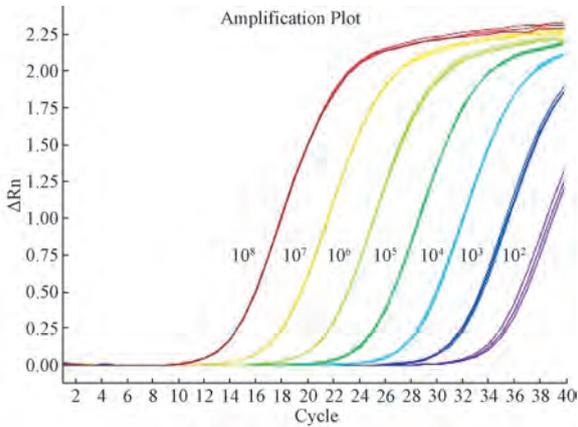


图 2 MCMV 荧光定量 PCR 方法扩增曲线

Fig.2 MCMV FQ-PCR amplification curve

2.2 MCMV FQ-PCR 方法的敏感性验证

如图 3 所示, $4.7 \times 10^9 \sim 4.7 \times 10^1$ copies/ μ L 各稀释度的质粒标准品均出现 S 型扩增曲线, 而 4.7×10^0 copies/ μ L 的 3 个平行实验有 1 个未出现 S 型扩增曲线, 说明本方法最低可定量检测到 47 copies/ μ L 的样品。用 MCMV FQ-PCR 方法和常规 PCR 方法检测同样的 10^{-1} 至 10^{-8} 系列稀释的 MCMV 核酸样品, 由图 4 可见, MCMV FQ-PCR 方法最低可检测到 10^{-4} 稀释度的 MCMV 核酸, 常规 PCR 最低可检测到 10^{-2} 稀释度, 表明 MCMV FQ-PCR 方法敏感性比常规 PCR 方法高两个数量级; 用建立的 MCMV FQ-PCR 方法与文献报道的 FQ-PCR 方法检测相同的 10^{-1} 至 10^{-8} 系列稀释的 MCMV 核酸样品, 每个稀释

度做 3 个平行, 两种方法检测到的最大稀释度均为 10^{-4} , 但本方法每个稀释度的 Ct 值均值均低于文献方法 (表 3), 说明本方法的敏感性高于文献方法。

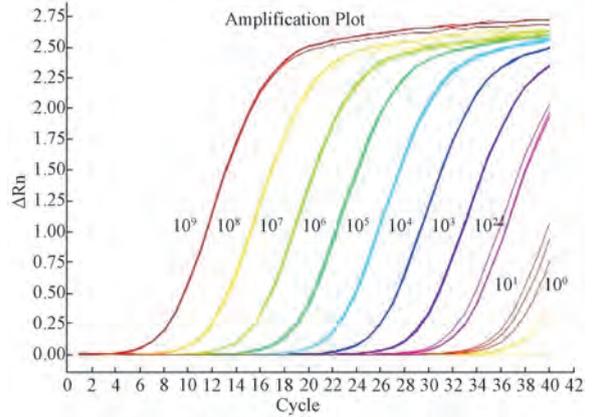


图 3 MCMV 荧光定量 PCR 方法敏感性验证扩增曲线

Fig.3 MCMV FQ-PCR sensitivity test amplification curve

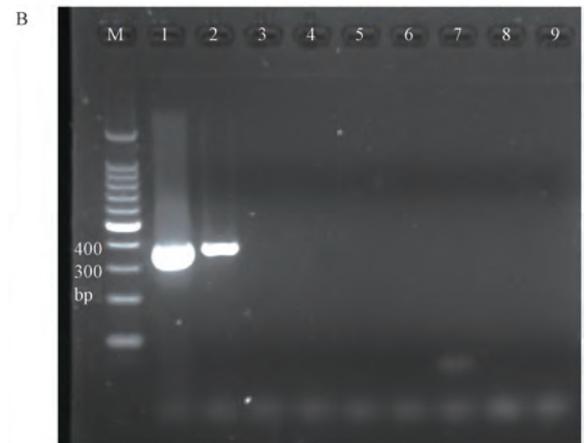
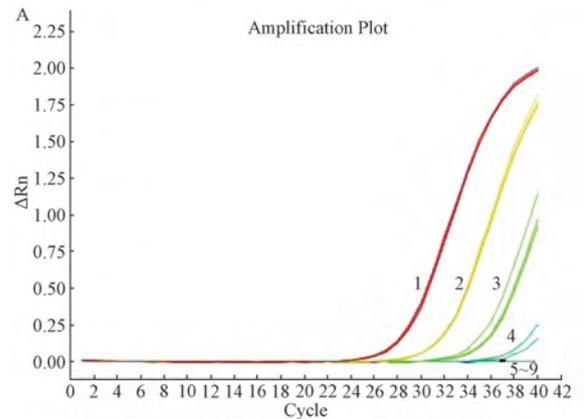


图 4 MCMV 荧光定量 PCR 方法 (A) 与常规 PCR 方法 (B) 敏感性比较

注: M: 100 bp DNA Marker; 1~8: 10^{-1} 至 10^{-8} 系列稀释的 MCMV 核酸; 9: 阴性对照

Fig.4 Comparison of sensitivity between MCMV FQ-PCR (A) and conventional PCR (B)

Note: M: 100 bp DNA Marker; 1~8: 10^{-1} to 10^{-8} serially diluted MCMV nucleic acids; 9: Negative control

表 3 两种荧光定量 PCR 方法敏感性比较

Table 3 Comparison of sensitivity between two fluorescence quantitative PCR methods

MCMV 核酸样品	本方法 (Ct 均值)	文献方法 (Ct 均值)
10^{-1}	26.147	28.893
10^{-2}	29.542	32.457
10^{-3}	33.375	36.269
10^{-4}	37.451	38.560
10^{-5}	/	/
10^{-6}	/	/
10^{-7}	/	/
10^{-8}	/	/

2.3 方法的特异性验证

图 5 显示,当以 MCMV 为模板时,出现 FAM 荧光扩增曲线 (Ct 值为 26, 对应浓度为 7.71×10^4 copies/ μ L), 以大鼠巨细胞病毒, 猴巨细胞病毒, 人单纯疱疹病毒, 伪狂犬病毒及猫疱疹病毒 I 型为模板均无明显扩增曲线。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。

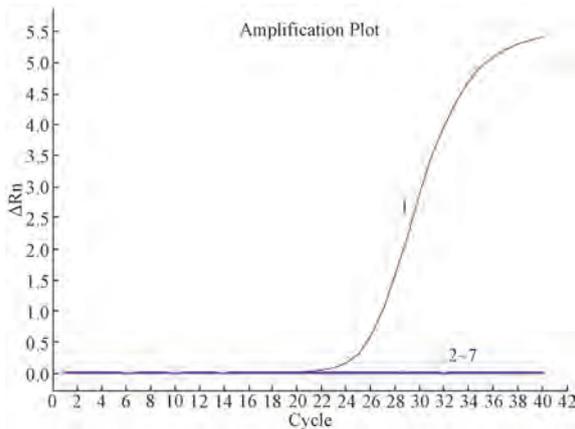


图 5 MCMV 荧光定量 PCR 方法特异性验证扩增曲线

注: 1~7 分别为 MCMV、RCMV、SCMV、
HSV、PRV、FHV-1、阴性对照

Fig.5 MCMV FQ-PCR specificity test amplification curve

Note: 1-7: MCMV、RCMV、SCMV、HSV、
PRV、FHV-1 and negative control

2.4 MCMV FQ-PCR 方法的重复性和稳定性验证

用建立的 FQ-PCR 方法检测 4.7×10^6 , 4.7×10^4 和 4.7×10^2 copies/ μ L 三个浓度的质粒标准品, 由表 4 可见其组内变异系数为 0.39%~0.68%, 组间变异系数为 0.48%~1.01%, 方法的重复稳定性良好。

表 4 MCMV FQ-PCR 方法的重复稳定性验证结果

Table 4 Repeatability verification results of MCMV FQ-PCR

标准质粒浓度 (copies/ μ L)	组内重复性 (Ct)		组间重复性 (Ct)	
	$\bar{x} \pm s$	变异系数/ %	$\bar{x} \pm s$	变异系数/ %
4.7×10^6	16.152 \pm 0.071	0.44	16.148 \pm 0.082	0.51
4.7×10^4	23.075 \pm 0.091	0.39	23.107 \pm 0.112	0.48
4.7×10^2	30.083 \pm 0.206	0.68	29.956 \pm 0.302	1.01

2.5 MCMV FQ-PCR 方法的应用

用建立的 MCMV FQ-PCR 方法检测掺入 MCMV (103.75 TCID₅₀/0.1 mL) 病毒的小鼠抗凝血样品, 10^{-1} ~ 10^{-3} 稀释度 3 个平行均为阳性, 其 Ct 值均值分别为 30.566、33.012、36.337, 10^{-4} 稀释度有 2 个平行出现扩增曲线, 1 个平行未出现, 10^{-5} ~ 10^{-8} 稀释度均为阴性, 表明本方法可检测到小鼠抗凝血样品中 MCMV 的最大稀释度为 1:1000, 对应病毒毒力为 100.75 TCID₅₀/0.1 mL (图 6)。检测 2018 年送检的 307 份 SPF 小鼠及 102 份清洁级小鼠抗凝血样品, 结果均为阴性。

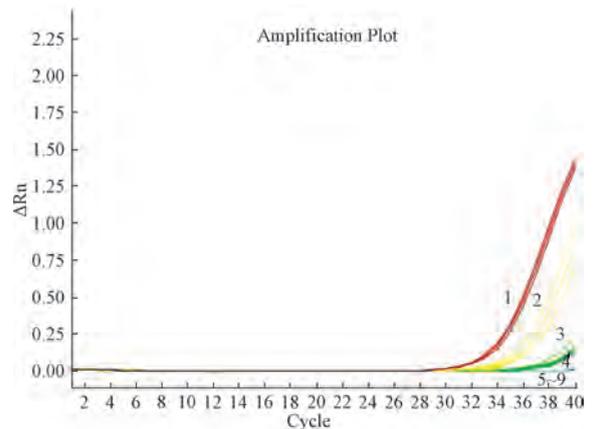


图 6 MCMV 荧光定量 PCR 方法模拟感染样品检测结果

注: 1~8 分别对应 10^{-1} ~ 10^{-8} 掺入 MCMV 的抗凝
血样品, 9 为阴性对照

Fig.6 Detection results of simulated infected samples by MCMV FQ-PCR

Note: 1-8 corresponds to 10^{-1} — 10^{-8} anti-coagulation
samples incorporated by MCMV, 9 is negative control

3 讨论

荧光定量 PCR 方法灵敏度高, 耗时少, 特异性强, 目前已广泛用于病原体的检测^[8-9], 本研究选取小鼠巨细胞病毒 DNA polymerase 基因保守序列设

引物和探针,建立了 MCMV FQ-PCR 检测方法,各稀释度扩增曲线间距均匀,以标准质粒建立标准曲线,Slope 为 -3.418,相关系数 R^2 值为 0.999,扩增效率为 96.14%,说明本 FQ-PCR 方法可实现对 MCMV 的有效定量。MCMV FQ-PCR 在以大鼠巨细胞病毒、猴巨细胞病毒等同类病毒及人单纯疱疹病毒、伪狂犬病毒、猫疱疹病毒 I 型 (FHV-1) 等同科病毒为模板时均无扩增,说明方法的特异性良好;敏感性方面最低可检测到 47copies/ μL 的 MCMV,比常规 PCR 方法的敏感性高两个数量级,与已有的 FQ-PCR 法^[7]相比各浓度的 Ct 值均低于后者,说明本方法的敏感性更高。选取各相差两个数量级的 3 个浓度的标准质粒做方法的重复性及稳定性验证,组内变异系数小于 1.0%,组间变异系数小于 1.5%,表明本方法有很好的重复性和稳定性。

MCMV 感染小鼠后可分布在血液、唾液腺、肝、脾、肺等组织中^[7,10],本研究选取小鼠 EDTA 抗凝血作为检测样品,根据动物福利的“3R”原则,对方法进行应用时本研究未进行动物感染实验,而是检测了模拟感染样品,即将 MCMV 按 10 倍系列稀释掺入小鼠抗凝血样品进行检测,结果 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 每个稀释度的 3 个平行实验均为阳性,说明本方法可有效检测到动物血液样品中的 MCMV。不同品系小鼠对 MCMV 的易感性不同,其中 BALB/c 小鼠对 MCMV 较易感,而 C56BL/6 小鼠对 MCMV 有较强抵抗力^[11-13],研究人员对 2018 年北京地区 14 家单位送检的 409 份小鼠血液样品进行检测,其中 BALB/c 小鼠占大多数,既有 SPF 级也有清洁级,结果均为阴性,表明现阶段北京地区实验小鼠中 MCMV 的控制情况良好,与前几年报道的 14.94% 的感染率相比大幅下降^[9],原因可能在于实验小鼠于 2001 年取消了普通级后,最低等级变为清洁级,要求在屏障环境中饲养,管理水平也相应提高,杜绝了与野生鼠接触的机会,因而感染率得到了有效控制。

鉴于 MCMV 传播特点及对动物尤其是胎鼠的危害,且目前并未纳入实验动物国家标准,因而在实验小鼠种群中仍存在爆发流行的风险,对 MCMV 的日常监控不容忽视。本研究建立的 MCMV 荧光定量 PCR 方法特异性、重复性和稳定性好,并且有更

高的检测灵敏度,适用于实验小鼠及鼠源性制品中 MCMV 的监测,同时可为实验动物相关标准的制定和补充提供技术参考。

参 考 文 献

- [1] 田克恭,贺争鸣,刘群,等. 实验动物疫病学[M]. 北京:中国农业出版社,2015:104-111.
- [2] Pomeroy C, Hilleren P J, Jordan M C. Latent murine cytomegalovirus DNA in splenic stromal cells of mice [J]. J Virol, 1991, **65**(6):3330-3334.
- [3] Stagno S, Pass R F, Dworsky M E, et al. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection [J]. N Engl J Med, 1982, **306**(16):945-949.
- [4] Anderson C A, Murphy J C, Fox J G. Evaluation of murine cytomegalovirus antibody detection by serological techniques [J]. J Clin Microbiol, 1983, **18**(4):753-758.
- [5] Mahler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. Laboratory Animals, 2014, **48**(3):178-192.
- [6] 汤家铭,袁云华,程鸿. 我国实验小鼠群中巨细胞病毒自然感染情况的调查 [J]. 中国病毒学,1992, **7**(2):124-128.
- [7] Vliegen I, Hermgreen S, Grauls G, et al. Improved detection and quantification of mouse cytomegalovirus by real-time PCR [J]. Virus Res, 2003, **98**(1):17-25.
- [8] 冯育芳,邢进,王吉,等. 应用实时荧光定量 PCR 方法检测实验用猫巴尔通体的感染 [J]. 实验动物科学,2018, **35**(4):56-60.
- [9] 王淑菁,林欢,付瑞,等. 同时检测小鼠微小病毒 (MVM) 和小鼠细小病毒 (MPV) 的荧光定量 PCR 的建立及应用 [J]. 实验动物科学,2018, **35**(4):29-32.
- [10] 杜凯,吴德国,赵德明. 小鼠巨细胞病毒 PCR 诊断方法的建立及其应用 [J]. 实验动物科学,2015, **32**(5):11-14.
- [11] Andrews D M, Farrell H E, Densley E H, et al. NK1.1+ cells and murine cytomegalovirus infection: what happens in situ [J]. J Immunol, 2001, **166**(3):1796-1802.
- [12] Pomeroy C, DeLong D, Clabots C, et al. Role of interferon-gamma in murine cytomegalovirus infection [J]. J Lab Clin Med, 1998, **132**(2):124-133.
- [13] Grundy J E, Mackenzie J S, Stanley N F. Influence of H-2 and non-H-2 genes on resistance to murine cytomegalovirus infection [J]. Infect Immun, 1981, **32**(1):277-286.

Establishment and Application of Fluorescent Quantitative PCR Assay for Mice Cytomegalovirus

LI Xiaobo, FU Rui, WANG Ji, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao,
HUANG Zongwen, HE Zhengming, YUE Bingfei

(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective To establishment and apply fluorescent quantitative PCR method for mouse cytomegalovirus. **Method** Primer probes were designed by using the conserved sequence of MCMV Smith strain DNA polymerase gene published by NCBI to establish a quantitative PCR method for MCMV. The specificity, sensitivity, repeatability and stability of the method were verified. The sample was applied to detect mice samples mixed with MCMV and 409 mice blood samples sent in 2018. **Result** The established FQ-PCR method for MCMV has a standard curve Slope of -3.418 , R^2 value of 0.999 , and an amplification efficiency of 96.137% . The minimum detectable amount of MCMV was 47 copies/ μL . There was no amplification curve when rat cytomegalovirus, monkey cytomegalovirus, human herpes simplex virus, pseudorabies virus and cat herpesvirus type I were used as templates, which showing the good specificity. The intra- and inter-assay coefficients of variation were $0.39\% - 0.68\%$ and $0.48\% - 1.01\%$, respectively, with good repeatability and stability. The maximum dilution of MCMV virus in the mouse blood samples was detected to be $1:1\ 000$ (100.75 TCID₅₀/0.1 mL), and 409 mice blood samples were tested negative. **Conclusion** The established FQ-PCR method for mouse cytomegalovirus has good sensitivity, specificity and stability, and can effectively detect MCMV in mice, which provides technical reference for the monitoring of MCMV in lab mice and improvement of related standards.

Key words: Mouse cytomegalovirus; FQ-PCR; laboratory mice