

小鼠肝炎病毒实时荧光定量 PCR 方法的建立及在部分啮齿类动物的应用

王 吉, 王莎莎, 付 瑞, 王淑菁, 李 威, 秦 骁,

黄宗文, 李晓波, 巩 薇, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院 国家实验动物微生物遗传检测中心, 北京 102629)

[摘要] 目的 建立小鼠肝炎病毒(MHV)实时荧光定量 PCR 检测方法, 并初步应用于实验裸鼯鼠等啮齿类动物的检测。方法 选择 MHV E 基因保守区域设计合成特异性引物和探针, 建立荧光定量 PCR 方法, 并对方法特异度、敏感度、线性、重复性和稳定性进行方法学验证。同时用建立的方法对 79 只清洁级小鼠、35 只 SPF 小鼠、63 只裸鼯鼠、10 只长爪沙鼠、20 只金黄仓鼠和 4 只黄鼠进行 MHV 检测。结果 成功建立了 MHV 实时荧光定量 PCR 方法; 方法的线性范围为 $(1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9)$ 拷贝/μL, 与仙台(SV)病毒、呼肠孤病毒 3 型(Reo3)、小鼠肺炎病毒(PVM)、牛冠状病毒(BCV)均无交叉反应, 方法的检测敏感度为 10 拷贝/μL。重复性和稳定性试验显示实验间变异系数均小于 5%。检测结果显示 63 只裸鼯鼠、35 只 SPF 小鼠、10 只长爪沙鼠、20 只金黄仓鼠和 4 只黄鼠均为阴性。79 只清洁级小鼠 MHV 阳性率为 22.78%。建立的方法与 RT-PCR 比较, 可信度达 97.47%。结论 建立的 MHV 荧光定量 PCR 方法特异、敏感, 能够对多种啮齿类动物体内携带的 MHV 进行检测。

[关键词] 小鼠肝炎病毒; 实时荧光定量 PCR 方法; 啮齿类动物

[中图分类号] R372; Q93-335 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)02-0095-09

小鼠肝炎病毒(MHV)属冠状病毒科冠状病毒属。MHV 基因组为线性不分段的单股正链 RNA。病毒粒子呈圆形或多形态, 直径 80~160 nm, 外有囊膜^[1-4]。根据 MHV 嗜组织特性的不同, 可将其分为呼吸株(Respiratory MHV strain)和嗜肠株(Enterotropic MHV strain)两型^[5-6]。MHV 感染临

床表现为肝炎、脑炎和肠炎, 并可通过胎盘垂直传播^[7-8]。MHV 呈世界范围性分布, 无明显的季节性, 对鼠群的危害极大, 严重影响实验和生产^[1,8-9]。

裸鼯鼠是主要产于非洲肯尼亚、埃塞俄比亚等地的啮齿类动物, 由于其具有抗衰老、耐低氧、抗肿瘤、耐疼痛等方面的特性, 目前广泛用于脑神经、抗氧化、自噬、肿瘤等方面的研究^[10-12]。但裸鼯鼠质量控制没有标准化, 严重制约了在各个领域的应用。本文旨在建立简单、快速、特异、敏感的 MHV 荧光定量 PCR 检测方法, 开展对裸鼯鼠携带 MHV 情况本底筛查, 为裸鼯鼠微生物质量控制标准的制定提供依据。同时, 建立的方法亦可用于小鼠、沙鼠、黄鼠(*Citellus dauricus*)等啮齿类动物携带 MHV 的检测, 不但为保证上述动物安全使用性提供质量控制手段, 同时为上述动物的标准化研究及微生物质量控制标

[收稿日期] 2019-08-12

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI09B02)

[作者简介] 王吉(1974-), 女, 硕士, 研究员, 从事微生物与免疫学研究。Email: wj_nd_jds@sina.com
共同第一作者: 王莎莎(1989-), 女, 免疫学硕士研究生。E-mail: wangsha0316@126.com

[通信作者] 岳秉飞(1960-), 研究员, 从事实验动物学研究。E-mail: y6784@126.com
共同通信作者: 李晓波(1980-), 副研究员, 从事实验物病毒研究。E-mail: lxb8493059@163.com

准的制修订提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病毒及动物

MHV-V1、小鼠仙台病毒(SV)、呼肠孤病毒3型(Reo3)、牛冠状病毒(BCV)为本单位保存;小鼠肺炎病毒(PVM)购自美国 ATCC(编号: VR-25)。

63 只 14~34 月龄屏障环境饲养裸鼯鼠, 体质量 22~42 g, 雌性 31 只, 雄性 32 只, 海军军医大学提供, 饲养于屏障设施[SYXK(沪)2017-0004]; 成年小鼠、长爪沙鼠、金黄仓鼠、黄鼠来自国内 9 个送检单位, 福利伦理审批文件编号为中检动(福)第 2019(A)001 号。所有动物均按 3R 原则给予人道的关怀。具体信息见表 1。

表 1 检测动物信息

Table 1 The information of testing animal

动物	等级 / 饲养环境	年龄	品系	动物数量 / 只	样本名称	样本编号	样本数量 / 份
小鼠	SPF	6 周	BALB/c	10	肝	SM1~SM10	35
			C57BL/6	5		SM11~SM15	
			KM	20		SM16~SM35	
	清洁级	6 周	C57BL/6	24	肝	CM1~CM79	79
			ICR	15			
			KM	20			
长爪沙鼠	清洁级	成年	NIH	20	肝		
			—	10		Mg1~Mg10	
			—	20		Gh1~Gh10	
金黄仓鼠	SPF	成年	—	20	肝	Gh1~Gh10	20
裸鼯鼠	屏障环境	成年	—	63	肝	NL1~NL63	63
					脑	NB1~NB63	63
黄鼠	屏障环境	24 月	—	4	肝	Gs1~Gs4	4
					脾	Gs5~Gs8	4
					脑	Gs9~Gs12	4
					心	Gs13~Gs16	4
					肺	Gs17~Gs20	4
					肾	Gs21~Gs24	4
					盲肠	Gs25~Gs28	4
合计				211			298

1.2 主要试剂及仪器

核酸提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 反转录试剂盒购自 Thermo 公司; pGEM T Easy 质粒购自 Promega 公司; TaqMan Gene Expression Master Mix 购自美国 ABI 公司; PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪(7500fast Real-Time PCR System)购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 TaqMan 探针及引物的设计

将不同株 MHV 病毒序列进行比对, 选择 E 基因(序列号: FJ647223)保守区域, 采用 ABI PrimerExpress 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件, 设计合成 TaqMan 探针及引物。探针的荧光标记选择 FAM(5' 端)作为报告发光基团, NFQ

(3' 端)为淬灭基团, 扩增引物和探针委托美国 ABI 公司合成^[13-14], 序列如表 2。

1.4 质粒标准品的制备

人工合成 MHV(FJ647223)基因组第 28 775~29 031 位 DNA 序列, 转入 pMD19-T 质粒中, 作为 MHV 质粒标准品^[13-15]。

1.5 病毒 RNA/DNA 提取

按照核酸提取试剂盒操作步骤提取 MHV 感染小鼠星形胶质瘤(DBT)细胞毒、SV、Reo3、PVM、BCV 和正常 DBT 细胞 RNA 或 DNA。提取的 RNA 应立即进行反转录。

1.6 反转录

按反转录试剂盒操作步骤进行。反转录获得 cDNA, 冻存于 -30 °C 备用。

表 2 用于扩增 E 基因的引物与 TaqMan 探针序列

Table 2 The sequences of primers and TaqMan probes of used for amplification of E gene

引物	引物序列(5' → 3')	序列位置	扩增片段大小 /bp
MHV-1F	TGCCTTCCTTGCGTCTATTAACTT	28 867~28 891	104
MHV-1R	AAAGCTGCTTACTCCCATTATACACATAAAT	28 940~28 970	
探针	(FAM) CATAAACCGCAAAGTTG (NFQ)	28 914~28 898	—

1.7 扩增体系确定及标准曲线的建立

通过优化在荧光定量 PCR 反应体系中使用的探针和引物浓度, 确定最佳反应条件, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法^[13,15-16]。

在 96 孔板中按 Mix 10 μ L、灭菌水 8 μ L、探针 + 引物 1 μ L 和 DNA 1 μ L 加样, 每个样品做 3 个重复, 反应条件: 先 50 $^{\circ}$ C 保持 2 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 最后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测^[13]。

建立标准曲线, 用含有目的片段的质粒 pGEM-T Easy-pol 作为标准品, 根据公式: 拷贝数/ μ L = $(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA length} \times 660)$, 算出质粒标准品拷贝数。将其稀释为 10^9 拷贝/ μ L ~ 100 拷贝/ μ L, 作为模板进行实时荧光定量 PCR, 建立标准曲线^[13-15], 方法如前。

1.8 特异度实验

设定 MHV、SV、PVM、Reo3、BCV 及 DBT 细胞阴性对照, 检测 MHV 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异度。

1.9 灵敏度实验^[13-15]

1.9.1 质粒标准品拷贝数梯度检测 将质粒标准品以 10^9 ~ 100 拷贝/ μ L 进行梯度稀释, 每个拷贝数梯度均做 3 个复孔。所能检测的最小拷贝数梯度的循环阈值(Ct) $\leq$ 35, 同时拷贝数 $\geq$ 10, 以此条件检测灵敏度。

1.9.2 MHV 滴度梯度检测 将感染滴度为 5.625 lg TCID₅₀/mL 的 MHV 病毒液从原液到 10^{-9} 进行滴度梯度检测, 同时设 10^7 ~ 10^3 拷贝/ μ L 质粒标准品, 通过标准曲线来进行定量。按照方法判定标准, 以能够检测的最小滴度梯度的阳性结果检测敏感度。

1.10 重复性和稳定性实验

用建立的方法对 10^5 拷贝/ μ L、 10^6 拷贝/ μ L、 10^7 拷贝/ μ L 3 个不同阳性标准品分 3 个不同时间

进行检测, 每次检测每个标准品各做 3 个复孔。通过计算实验间变异系数, 评价建立方法的重复性和稳定性。

1.11 实时荧光定量 PCR 方法的应用

1.11.1 样本处理 共取 211 只动物(表 1)的 298 份组织样本, 研磨后 PBS 悬浮, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清除菌过滤后, 取 0.2 mL 作为模板提取核酸, 反转录 cDNA 进行检测。

1.11.2 样本检测 用建立的方法检测上述 298 份组织样本, 同时设 10^7 ~ 10^3 拷贝/ μ L 标准品、MHV 阳性对照和 DBT 细胞阴性对照。

1.11.3 方法验证 为验证实时荧光定量 PCR 方法的可信度, 采用实验室之前建立的 MHV RT-PCR 方法对 79 只清洁级小鼠肝组织样本进行检测^[8]。

1.12 结果判定标准

建立的标准曲线参数斜率为 -3 ~ -3.5、 $R^2 > 0.99$ 、Eff% 为 90% ~ 110%, 实验成立可用于定量检测^[13-15]。

样品 Ct $\leq$ 35, 同时拷贝数 $\geq$ 10, 判定该样品检测结果为阳性; Ct $\geq$ 35、拷贝数 < 10 , 或者 Ct < 35 、拷贝数 ≥ 10 , 或者 Ct < 35 、拷贝数 < 10 , 此样品超出检测限, 不能确定被检样品是阳性样品, 结果判为阴性^[13-15]。

2 结果

2.1 标准曲线的构建

设 1.0×10^1 拷贝/ μ L ~ 1.0×10^9 拷贝/ μ L 含有目的片段的质粒标准品, 作为模板进行实时荧光定量 PCR, 扩增曲线如图 1。从图 1 可以看出扩增曲线各稀释梯度间距均匀, 线性范围 1 个 log (1×10^2 拷贝 ~ 1×10^9 拷贝), 标准曲线斜率为 3.452 (在 -3 ~ -3.5), 相关系数 R^2 值为 0.995 (> 0.99), 扩增效率 Eff 为 94.848% (90% ~ 110%), 均符合标准曲线参数要求。标准品及待测样本 3 个重复的标准差(Ct SD 值)均小于 0.461。说明构建的标

准曲线相关性高，定量结果有效。

2.2 特异度检测

特异度检测结果显示(图 2)，以 SV、PVM、Reo3、BCV 为模板，扩增曲线均为直线无扩增，

阴性对照小鼠星形胶质瘤细胞(DBT)细胞也为直线无扩增。而以 MHV 为模板，扩增曲线明显，检测 Ct 值为 17.409，拷贝数为 7.59×10^5 拷贝/μL。说明建立的方法特异性良好。

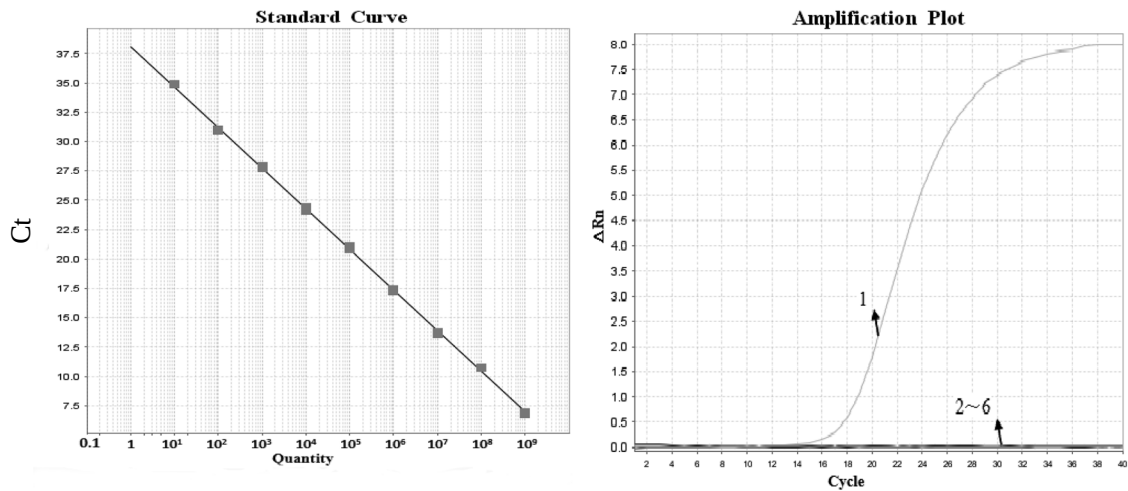


图 1 10⁹~10¹ 拷贝标准品标准曲线
Figure 1 The standard curve of 10⁹-10¹ copies standard

1: MHV; 2-6: SV、PVM、Reo3、BCV、DBT 细胞
图 2 MHV Q-PCR 特异性检测结果
Figure 2 The specific test results of MHV Q-PCR

2.3 重复性和稳定性

起始浓度分别为 1×10^6 拷贝/μL、 1×10^5 拷贝/μL、 1×10^4 拷贝/μL 标准品的最终实测值均值分别为 1.012×10^6 、 0.984×10^5 、 0.997×10^4 拷贝/μL，对应 Ct SD 值及变异系数(CV)值分别见表 3。3 个梯度 3 次重复实验 Ct 值的 CV 均小于 5%，表明方法重复性和稳定性均良好。

2.4 敏感度检测

2.4.1 质粒标准品检测 通过标准曲线(图 3)和扩

增曲线(图 4)可以看出， $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9$ 拷贝/μL 标准品各稀释梯度间距均匀，线性范围良好。斜率为 -3.546，相关系数 R^2 为 0.996(>0.99)，扩增效率 Eff% 为 91.433%(90%~110%)，均符合标准曲线参数要求。标准品稀释到 10 拷贝/μL 时扩增曲线 Ct 值为 34.358，拷贝数为 11.57 拷贝/μL，仍在判断标准阳性样本可信范围之内，因此该方法的敏感度为 10 拷贝/μL。

2.4.2 MHV 浓度梯度检测 标准曲线(图 5)及敏感

表 3 荧光定量 PCR 检测方法的重复性和稳定性

Table 3 The repeatability and stability of fluorescence quantitative PCR method

标准品拷贝数/μL	实验次数	每次检测 Ct 均值	3 次检测 Ct 均值	Ct SD	CV(%)
10 ⁶	1	17.019	17.710	0.604	3.41
	2	17.969			
	3	18.141			
10 ⁵	1	20.742	20.988	0.547	2.60
	2	21.614			
	3	20.607			
10 ⁴	1	23.957	24.402	0.814	3.33
	2	25.342			
	3	24.247			

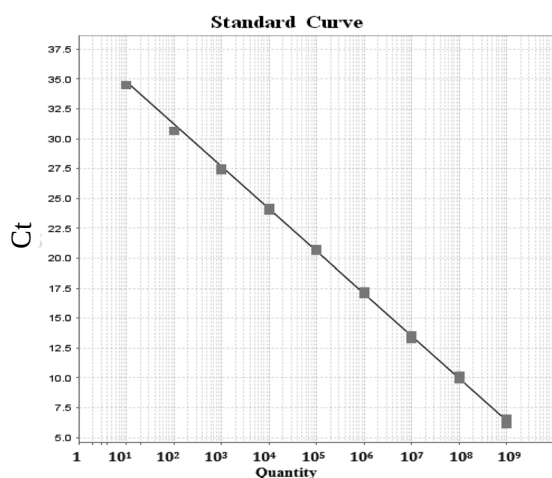


图 3 $10^9 \sim 10^1$ 拷贝标准品的标准曲线
Figure 3 The standard curve of $10^9 \sim 10^1$ copies standard

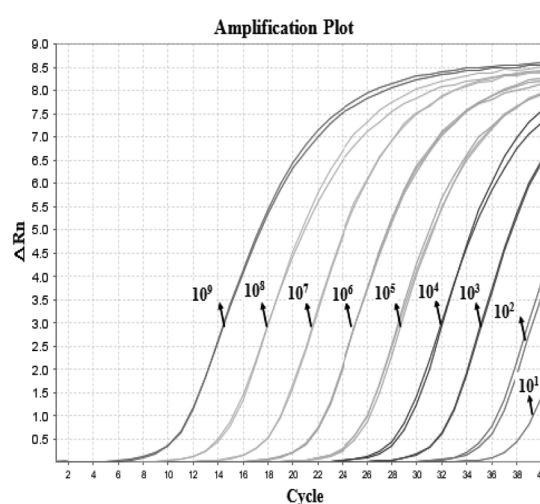


图 4 $10^9 \sim 10^1$ 拷贝标准品扩增曲线图
Figure 4 The amplification curve of $10^9 \sim 10^1$ copies standard

性(图 6)检测结果显示, 在 $10^7 \sim 10^3$ 拷贝标准品标准曲线参数(斜率: -3.387 , R^2 : 0.999 , Eff%: 97.37%)符合要求的条件下, 能够检测到阳性结果 MHV 病毒液最小的梯度为 10^{-5} , 其 Ct 值为 32.953 , 拷贝数为 25.096 拷贝/ μL , 对应的 MHV 病毒滴度为 $1.625 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

2.5 应用

2.5.1 样本检测结果 63 只裸鼯鼠肝、脑组织样本、35 只 SPF 小鼠、10 只长爪沙鼠、20 只仓鼠肝组织样本和 4 只黄鼠肝、脾、脑、心、肺、肾、盲肠内容物样本的循环域值(Ct 值均 > 35 和

拷贝数均 < 10)均在检测限之外, 所以判定上述样本为荧光定量检测结果阴性。以 63 份裸鼯鼠肝组织样本和 28 份黄鼠组织样本为例的检测扩增曲线分别见图 7 和图 8。

79 份清洁级小鼠肝组织样本中有 61 份样本按判定标准判定结果为阴性。有 18 份样本 Ct 值(均 < 35)和拷贝数(均 > 10)均在检测限之内, 检测结果判定为阳性。以前 33 份清洁级小鼠样本(CM1~CM33)为例, 检测扩增曲线见图 9, 相应的标准品扩增曲线见图 10。阳性清洁级小鼠组织样本检测结果见表 4。

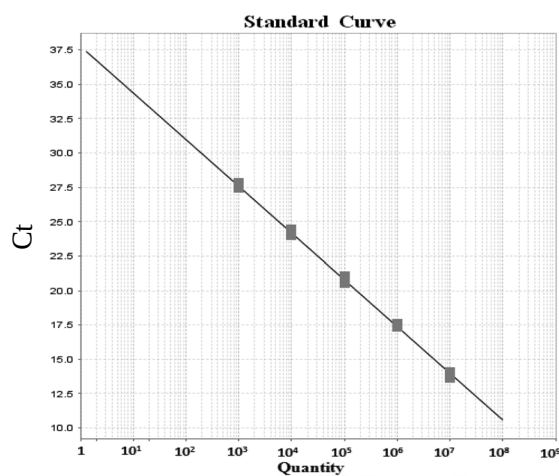
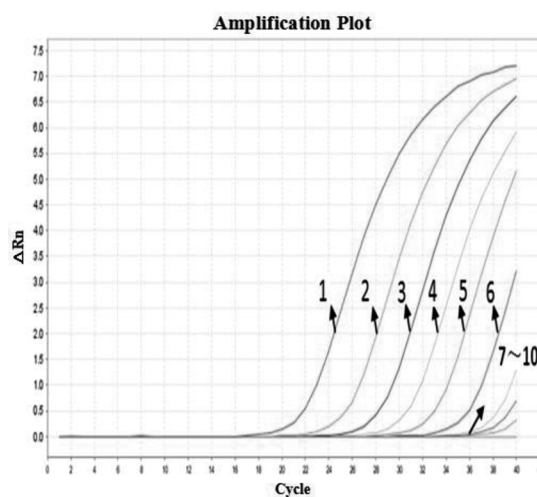


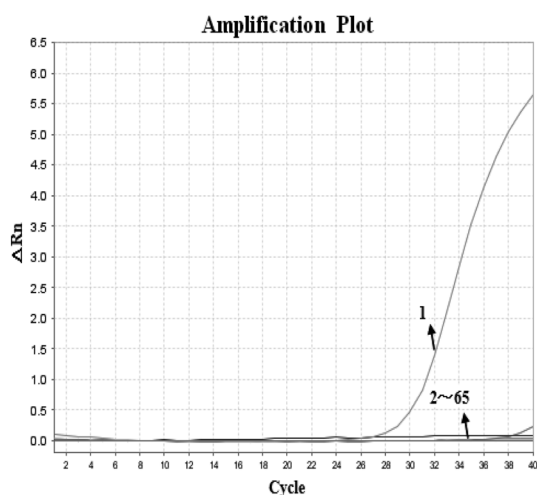
图 5 $10^7 \sim 10^3$ 拷贝标准品标准曲线
Figure 5 The standard curve of $10^7 \sim 10^3$ copies standard



1: MHV 病毒原液; 2~10: $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 梯度稀释的 MHV 病毒液

图 6 MHV 敏感性检测结果

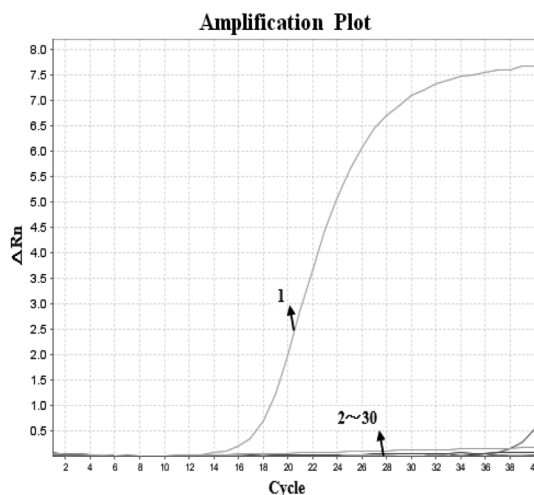
Figure 6 The sensibility test results of MHV



1: MHV; 2~64: NG1~NG63; 65: N/C

图 7 63 份裸鼹鼠肝组织检测结果

Figure 7 The testing results of 63 liver tissues of naked mole-rats



1: MHV; 2~29: Gs1~Gs28; 30: N/C

图 8 28 份黄鼠组织样本检测结果

Figure 8 The test results of 28 tissue samples of ground squirrels

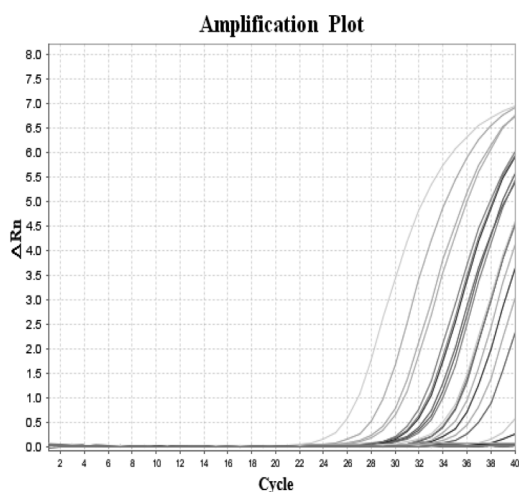


图 9 33 份清洁级小鼠肝组织(CM1~CM33)扩增曲线图

Figure 9 The amplification curve of 33 (CM1~CM33) liver samples of clean mice

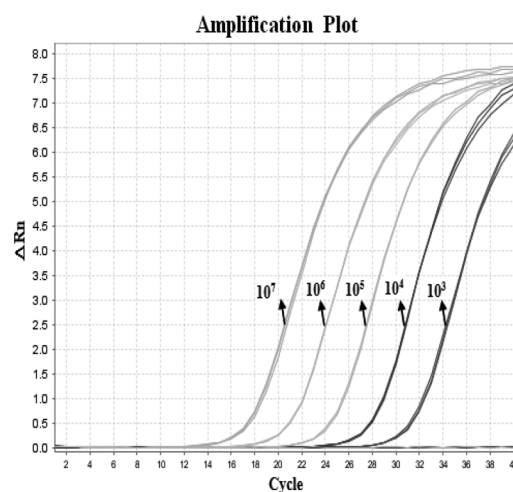


图 10 $10^7 \sim 10^3$ 拷贝标准品扩增曲线图

Figure 10 The amplification curve of $10^7 \sim 10^3$ copies standard

2.5.2 方法的验证 RT-PCR 检测结果显示, 79 份清洁级小鼠肝组织样本中有 16 份样本(编号: CM1、CM3、CM5、CM7、CM8、CM9、CM10、CM12、CM14、CM15、CM17、CM18、CM19、CM30、CM31、CM32)可见目的条带(约 264 bp)。阳性扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果与 GenBank 中 MHV 核

苷酸序列进行比对, 其同源性均在 91% 以上。其他样本均无目的条带产生, 结果均为阴性。

RT-PCR 方法检测 79 份清洁级小鼠肝组织 MHV 核酸阳性率为 20.25%(16/79)。与实时荧光定量 PCR 方法检测结果的符合率为 97.47%(77/79)。以 CM1~CM21 号和 CM22~CM42 号样本为例, 电泳结果分别见图 11~12。

表 4 阳性清洁级小鼠样本检测结果

Table 4 The testing results of positive samples from clean grade mice

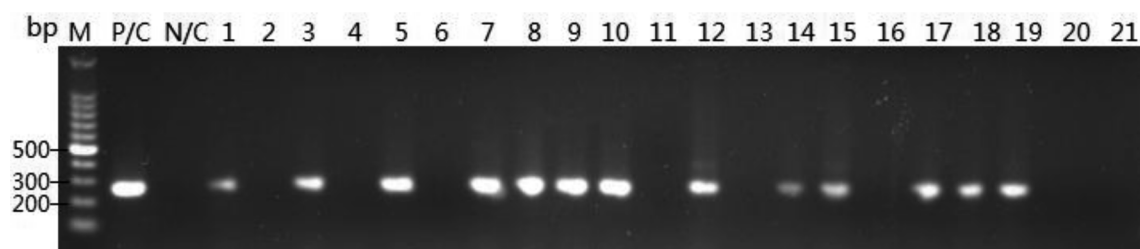
样品编号	Ct 值	拷贝数	检测结果	阳性率 /%
CM1	30.676	117.097	+	22.78(18/79)
CM3	28.866	393.384	+	
CM5	27.677	892.527	+	
CM7	25.511	3 867.860	+	
CM8	25.255	4 602.572	+	
CM9	27.045	1 368.753	+	
CM10	27.924	754.601	+	
CM11	33.439	18.019	+	
CM12	30.812	106.789	+	
CM14	29.605	241.790	+	
CM15	31.172	83.676	+	
CM16	32.204	41.597	+	
CM17	28.766	426.668	+	
CM18	31.647	60.632	+	
CM19	28.462	524.202	+	
CM30	21.935	43 594.578	+	
CM31	23.913	11 418.306	+	
CM32	23.563	14 475.984	+	

注：“+”表示实时荧光定量 PCR 检测结果为阳性；
“-”表示 PCR 检测结果为阴性

3 讨论

裸鼯鼠作为啮齿类动物，体格大小与小鼠相近，其基因组有 93% 的区域与人类、小鼠、大鼠保持较好的共线性关系^[17]。同时其具有寿命长等天然独特的生物学特性，因此越来越多地被用于人类生命科学的研究。但裸鼯鼠在课题项目启动之前还没有实验动物化，没有相应的微生物、寄生虫等质量控制标准，因此裸鼯鼠的使用无法正规化和合法化，亟需制定裸鼯鼠微生物、寄生虫等质量控制标准。MHV 不但是小鼠易感病原，同时也是沙鼠易感病毒之一^[8,18]，而裸鼯鼠是与小鼠体型较近的啮齿类动物，因此，制定裸鼯鼠微生物质量控制标准时，MHV 是首先考虑要筛查和排除的病毒之一。目前国内外还没有关于裸鼯鼠是否感染 MHV 的相关检测报道。因此本文选择具有操作简便、敏感、特异等优点的荧光定量 PCR 方法对裸鼯鼠携带 MHV 的本底进行筛查。

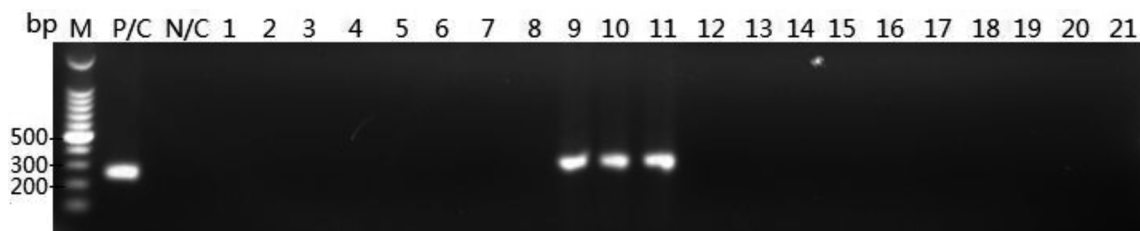
用建立的方法对 63 只裸鼯鼠进行检测，结果均为阴性结果也均为阴性。分析原因：1)裸鼯鼠本身具有抗病毒的特点^[19]，可能确实不感染



M: 100 bp DNA marker; P/C: MHV; N/C: DBT 细胞; 1~21: CM1~CM21 号肝组织样本

图 11 CM1~CM21 号肝组织样本 RT-PCR 检测结果

Figure 11 The electrophoresis results of RT-PCR to detect CM1-CM21 liver samples



M: 100 bp DNA marker; P/C: MHV; N/C: DBT 细胞; 1~21: CM22~CM42 号肝组织样本

图 12 CM22~CM42 号肝组织样本 RT-PCR 检测结果

Figure 12 The electrophoresis results of RT-PCR to detect CM22-CM42 liver samples

MHV; 2)实验检测的裸鼯鼠是经过屏障环境饲养的裸鼯鼠, 由于环境、饲养条件等的改善, 降低了被感染的概率。至于裸鼯鼠是否会感染MHV, 有待进一步研究。

用建立的方法对10只清洁级沙鼠、20只SPF仓鼠及4只屏障环境饲养的黄鼠检测MHV基因拷贝数, 结果均为阴性, 说明检测的动物确实不存在MHV感染。用实验建立的方法对国内7个单位送检的35只SPF小鼠进行检测, 检测结果均为阴性。

用建立的方法检测国内送检的79只清洁级小鼠(均为ELISA方法检测MHV抗体阳性鼠群小鼠), MHV抗体阳性率为26.58%(21/79), MHV核酸阳性率为22.78%。通过同时采用抗原和抗体进行检测发现, 抗体阳性的小鼠或鼠群抗原检测可能为阴性, 抗原阳性的小鼠或鼠群抗体检测可能为阴性, 进一步说明在动物体内确实存在抗原抗体的差异性^[18,20]。二者同时进行检测弥补了漏检的可能, 对鼠群的质量控制会更加有效。

上述79只清洁级小鼠在用实验建立的定时荧光定量PCR检测方法检测的同时, 采用实验室比较成熟的RT-PCR进行检测^[8], 核酸阳性率为20.25%(16/79), 二者符合率97.47%。虽然文献有MHV核酸检测方法的报道^[20-21], 但由于方法没有进行推广应用, 市场上亦没有我国自主研发的商品化MHV荧光定量检测试剂盒, 因此实验室在建立常规RT-PCR方法的同时建立了MHV荧光定量PCR方法^[8], 为试剂盒的研制奠定了基础。

MHV不仅是《实验动物 国家标准》中对清洁级小鼠和SPF小鼠要求必须排除项目, 而且在沙鼠地方标准、《中国药典》和WHO乙型脑炎病毒减毒活疫苗制检规程中对用于疫苗生产用仓鼠均是必须排除项目^[22-28]。建立的MHV检测方法不仅可以用于裸鼯鼠病毒感染的筛查, 亦可用于小鼠、沙鼠、仓鼠等啮齿类实验动物的检测。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992:76-83.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997:692-694.
- [3] 徐耀先, 周晓峰, 刘立德. 分子病毒学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000:324-330.
- [4] Kuo L, Masters PS. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus[J]. J Virol, 2002, 76(10):4987-4999.
- [5] Yang Z, Du J, Chen G, et al. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice[J]. Virol Sin, 2014, 29(6):393-402.
- [6] 陈雪婷, 刘佳. MHV研究进展[J]. 2018, 解剖学进展, 24(4):438-440, 443.
- [7] Asano A, Torigoe D, Sasaki N, et al. Identification of antigenic peptides derived from B-cell epitopes of nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus for serological diagnosis[J]. J Virol Methods, 2011, 177(1):107-111.
- [8] 王吉, 卫礼, 付瑞, 等. 长爪沙鼠MHV RT-PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(2): 58-63.
- [9] Singh M, Kishore A, Maity D, et al. A proline insertion-deletion in the spike glycoprotein fusion peptide of mouse hepatitis virus strongly alters neuropathology[J]. J Biol Chem, 2019, 294(20):8064-8087.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. Learning of nature: The curious case of the naked mole rat[J]. Mech Ageing Dev, 2017, 164:76-81.
- [13] 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):50-57.
- [14] 王吉, 付瑞, 李晓波, 等. 牛副流感病毒3型(BPIV3)实时荧光定量PCR检测方法的建立及在牛源样本检测中的应用[J]. 中国病毒病杂志, 2018, 8(5):393-399.
- [15] 王莎莎, 王吉, 岳秉飞. 牛冠状病毒(BCV)实时荧光定量PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4):69-73.
- [16] 王吉, 付瑞, 冯育芳, 等. 北京地区猫疱疹病毒I型的分离及鉴定[J]. 病毒学报, 2018, 34(5):744-753.
- [17] 杨文静, 崔淑芳. 普通级封闭群裸鼯鼠种群的建立及其生物学特性的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4):518-522.
- [18] 应贤平, 钱琴, 刘连生, 等. 清洁级长爪沙鼠病毒抗体ELISA检测方法的建立[J]. 中国实验动物学杂志, 1995,

- 15(1):24-27.
- [19] 肖邦, 赵善民, 林丽芳, 等. 裸鼯鼠抵抗病毒感染相关机制的初步研究[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(5):422-427.
- [20] 李欣悦. 小鼠三种病毒核酸检测方法的优化及与血清学检测结果的对比分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [21] 熊炜, 蒋静, 张强, 等. MHV核酸快速检测方法的建立和应用[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4):1-5.
- [22] GB/T 14926.2-2011. 实验动物 微生物学等级及监测[S].
- [23] DB11/1461.5-2018. 实验长爪沙鼠 微生物学等级及监测[S].
- [24] DB33/T2110.1-2018. 实验长爪沙鼠 微生物学等级及监测[S].
- [25] 国家药典委员会.《中国药典》[M].北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [26] 俞永新. 中国乙型脑炎病毒株的毒力变异和减毒活疫苗的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(5): 449-457.
- [27] World Health Organization. Global advisory committee on vaccine safety, 9-10 June 2005[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2005, 80(28):242-247.
- [28] WHO. Japanese encephalitis vaccines: WHO position paper, February 2015-recommendation[J]. Vaccine, 2016, 34(3):302-303.

Establishment of Real-time Fluorescent Quantitative PCR Method for Mouse Hepatitis Virus and Application in Some Rodents

WANG Ji, WANG Shasha, FU Rui, WANG Shujing, LI Wei, QIN Xiao,
HUANG Zongwen, LI Xiaobo, GONG Wei, YUE Bingfei, HE Zhengming
(National Institutes for Food and Drug Control, National Center for Quality of
Laboratory Animal, Beijing 102629, China)

[Abstract] **Objective** To establish a real-time fluorescent quantitative PCR (Q-PCR) method for detection of mouse hepatitis virus (MHV) in naked mole-rats and other rodent animals. **Methods** The specific primers and probe were designed and synthesized by selecting conserved regions of MHV E gene to establish the Q-PCR method. Then the linearity, specificity, sensitivity, repeatability and stability of this method was verified. Meanwhile, the established method was used to detect 79 clean grade mice, 63 naked mole-Crats, 35 SPF mice, 10 Mongolian gerbils, 20 golden hamsters and 4 ground squirrels for MHV. **Results** The real-time fluorescent quantitative PCR method for MHV was successfully established. The linear range of the method was 10^1 copies/ μ L to 10^9 copies/ μ L. The method has no cross reaction with Sendai (SV), reovirus type 3 (Reo3), pneumonia virus of mice (PVM), bovine coronavirus (BCV). The detection sensitivity could reach 10 copies/ μ L, the results of repeatability and stability showed that the coefficient of variation between experiments was less than 5%. The positive rate of MHV in 79 clean grade mice was 22.78%, and that of 63 naked mole-Crats, 35 SPF mice, 10 Mongolian gerbis, 20 golden hamsters and 4 ground squirrels were all negative. Established method was compared with RT-PCR, the coincidence rate was 97.47%. **Conclusion** The established Q-PCR method for MHV is good in linearity and specificity, it can be used for the detection MHV in multiple varieties rodents.

[Key words] Mouse hepatitis virus; Real-time fluorescent quantitative PCR; Rodents