

赵晓瑜, 佟巍, 郭智, 等. 荧光 RAA 检测小鼠微小病毒的研究和应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 63–68, 82.
Zhao XY, Tong W, Guo Z, et al. Application of recombinase-aid nucleic acid amplification for detection of minute virus of mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 63–68, 82.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.009

荧光 RAA 检测小鼠微小病毒的研究和应用

赵晓瑜, 佟巍, 郭智, 向志光*, 魏强*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 病毒培养、组织学、免疫学及普通 PCR 方法等在小鼠微小病毒(minute virus of mice, MVM)的检测方面都存在一定的不足, 不能满足目前实验动物饲养机构现场检测 MVM 病毒的需要, 因此探索开发一种新的、简单易用, 便于现场检测 MVM 的检测方法具有重要的意义。**方法** 根据 Genbank 公布的 MVM 序列, 对 MVM 高度保守序列区域 *NS1* 基因设计荧光重组酶介导链替换核酸扩增的引物和探针, 建立了一种 MVM 荧光法重组酶介导链替换核酸扩增技术(Real-time RAA)检测方法, 对其特异性、室温储存稳定性、灵敏度及临床样本验证方面与 qPCR 法进行对比分析。**结果** 荧光 RAA 法在 39℃ 20 min 内即可检测到 MVM 病毒特异性扩增曲线; 其灵敏度为 10 copies/μL; 与 Reo-3、MHV-1、MHV-3、MHV-A59、MHV-JHM 病毒均无交叉反应; 检测试剂室温储存 20 d 无明显的扩增性能下降; 分别对 15 份阳性模拟样品进行荧光 RAA 法与 qPCR 法的检测比对, 结果显示两种方法的符合率为 15/15; 对两种方法的相关性进行统计学分析, 结果显示相关系数 $R^2 = 0.85$, 两种方法具有显著的线性相关性。**结论** 本研究建立的 MVM 荧光 RAA 法, 操作简单, 剪异性强、剪敏度高, 能够快速有效地检出临床样本。

【关键词】 小鼠微小病毒; 荧光 RAA 法; 快速检测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0063-06

Application of recombinase-aid nucleic acid amplification for detection of minute virus of mice

ZHAO Xiaoyu, TONG Wei, GUO Zhi, XIANG Zhiguang*, WEI Qiang*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS/PUMC, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Virus culture, histology, immunology, and PCR have certain shortcomings in the detection of minute virus of mice (MVM), which cannot meet the current needs. Exploring a new method for Rapid and reliable detection of MVM is a major problem that needs to be solved. **Methods** On the basis of the MVM sequence published by GenBank, we designed primers and probes for Real-time recombinase-aid nucleic acid amplification (RAA) of the NS1 gene, a highly conserved sequence region of MVM, and established a real-time RAA detection method of MVM. We analyzed its specificity, sensitivity, storage stability, and clinical sample validation in comparison with qPCR. **Results** The sensitivity was 10 copies/μL, and there was no cross-reactivity with Reo-3, MHV-1, MHV-3, MHV-A59, or MHV-JHM viruses. There was no significant deterioration in amplification performance of the RAA stored at room temperature for 20 days. Additionally, the Real-time RAA method was compared with qPCR in 15 positive simulative samples, and the compliance rate was 15/15. Statistical analysis of the correlation between the two method revealed a correlation coefficient

[基金项目] 国家重点研发计划青年科学家项目(2021YFF0702900)。

[作者简介] 赵晓瑜(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物质量评价关键技术。E-mail: zxydnryksynum1@163.com

[通信作者] 魏强(1964—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@cnilas.org

向志光(1980—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物质量, 医学比较免疫学。

E-mail: xiangzg@cnilas.org * 共同通信作者

of $R^2=0.85$, which indicates that the two methods were significantly correlated. **Conclusions** The MVM real-time RAA method in this study quickly and effectively detects MVM virus, which also has the advantages of simple operation, strong specificity, and high sensitivity.

【Keywords】 minute virus of mice; real-time RAA; rapid detection

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

小鼠微小病毒(minute virus of mice, MVM)是目前动物病毒中最小最简单的单链 DNA 病毒^[1]之一,属于细小病毒科,细小病毒属。小鼠感染 MVM 病毒虽无明显的临床症状但可对一些免疫、移植和肿瘤等实验的结果造成严重的干扰^[2]。无论是在国外的 FELESA、Charles River 等大型检测实验室的实验小鼠健康监测的指南中还是国内关于实验动物检测的国标中均明确了 MVM 病毒的检测为实验小鼠的必检项目。目前常见的 MVM 检测方法包括血清学检测技术 IFA、ELISA 法^[3],分子病原学 PCR^[4]、qPCR 法^[5]等,也有一些新的病原分子核酸检测技术如环介导等温扩增技术(LAMP)^[6]等。血清学等回顾性检测适用于病毒感染后的检测,但是对免疫功能低下或免疫缺陷小鼠(如 SCID 小鼠和裸小鼠等)进行抗体检测,不能反映出动物感染病原的真实情况;PCR 和 qPCR 等分子病原学检测技术识别病原,但耗时相对较长,对程序控温仪器有要求,不适合现场检测^[7];LAMP 虽然灵敏度高但其引物设计复杂繁琐,难度较大^[8]。因此建立一种快速简单且准确的检测技术十分必要。

近年来重组酶介导链替换核酸扩增检测(recombinase-aided amplification, RAA)技术^[9]发展迅速。该技术是一种恒温核酸快速扩增技术,利用从细菌或真菌中获得的重组酶^[10-11],在常温下,该重组酶可与引物 DNA 紧密结合,形成酶和引物的聚合体,当引物在模板 DNA 上搜索到与之完全匹配的互补序列时^[12],在单链 DNA 结合蛋白的帮助下,打开模板 DNA 的双链结构,并在 DNA 聚合酶的作用下,形成新的 DNA 互补链,扩增产物以指数级增长^[13]。重组聚合酶扩增技术呈 10^9 倍数扩增,扩增效率较高。同时该方法能够在 $37\sim 42^\circ\text{C}$ 恒温条件下 $20\sim 30\text{ min}$ 内完成对靶基因的有效扩增,具有在部分应用场景下取代传统 PCR 检测技术的潜力,目前该方法已经在体外诊断、兽医、食品安全、生物安全、农业等领域得到广泛的应用。本研究参考 RAA 技术引物探针设计方法^[14],针对 MVM 保守区域 *Ns1* 基因设计了 MVM 探针及多条引物,建立了 MVM 的荧光 RAA 检测方法并对该方法进行了特异

性、敏感性、稳定性验证。应用该方法以及 Real-time PCR^[15]金标准方法对本实验室 45 份送检的动物样品进行测试,并对两种方法进行了符合性分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒

小鼠微小病毒(MVM)、小鼠肝炎 A59 型(MHV-A59)、小鼠肝炎 1 型(MHV-1)、小鼠肝炎 3 型(MHV-3)、小鼠肝炎 JHM 型(MHV-JHM)、小鼠呼吸肠孤病毒 3 型(Reo-3),以上病毒来源于 The American Type Culture Collection(ATCC),由本实验室保存。

1.1.2 样本

45 份送检的小鼠盲肠内容物由本单位保存。

1.2 主要试剂与仪器

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA 提取试剂盒(批号:ALG0523A)购自宝日医生物工程(大连)有限公司;Probe dPCR Mix(批号:ALF2404A)购自北京六合通经贸有限公司;ZC-RAA[®] Basic kits(批号:84831063)、ZC-RAA[®] exo kits(批号:84822012)购自杭州众测生物有限公司;核酸抽提液(批号:20180426)购自北京索莱宝生物科技有限公司;1×TE 缓冲液(批号:H421KA9723)购自生工生物工程股份有限公司;DMEM 培养基(批号:AH29820716)购自美国丹纳赫集团。

移液器购自德国 Eppendorf 公司;生物安全柜购自中国苏州苏洁公司;分析天平购自瑞士 Mettler toledo 公司;ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物系统公司;NanoDrop 2000C 微量分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 核酸提取

本文提到的病毒和小鼠盲肠内容物的核酸均使用 1.2 中的核酸提取试剂盒提取,按照制造商的说明操作提取。

1.3.2 引物和探针的设计

依据 NCBI 上发表的 MVM(NC_0001510)基因

组序列,经 BLAST 比对选择 MVM 高度保守区域 *Ns1* 基因设计 qPCR 与荧光 RAA 方法的引物和探针,qPCR 法来自《中国团体标准汇编及实施指南》第一卷^[15],分别见表 1 和表 2 所示。所有引物探针均由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.3.3 qPCR 反应体系及反应条件

qPCR 反应采用 ABI 7500 荧光仪进行。qPCR 反应体系为:2×Premix Ex Taq(Probe qPCR) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, PCR Reverse Primer(10 μmol/L) 0.4 μL, Probe 0.8 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.2 μL, DNA 模板 2 μL,无 RNA 酶水 6.2 μL;阴性对照中 2 μL 无 RNA 酶水取代 DNA 模板。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 34 s,40 个循环。

1.3.4 荧光 RAA 法反应体系及反应条件

在 RAA 检测中,使用了酶和蛋白质的特定组合,包括重组酶、链置换 DNA 聚合酶和单链结合蛋白。基础 RAA 的反应体系为:每反应单元管总量 50 μL,其中 25 μL A Buffer 缓冲液,上下游引物各 2 μL(10 μmol/L),5 μL DNA 模板,13.5 μL 无 RNase 酶水和 2.5 μL B Buffer 反应液。反应产物在 2%琼脂糖凝胶中进行电泳,后经溴化乙锭染色,用凝胶成像仪观察结果。荧光 RAA 法每反应单元管总量也为 50 μL,除了 RAA 法需要加的反应体系外另加 0.6 μL 探针,并根据总量调整无 RNase 酶水的含量。荧光 RAA 反应条件:39℃ 1 min;39℃ 30 s,45 个循环。用 ABI 7500 荧光仪观察实验结果。

1.3.5 RAA 法筛选引物

本研究根据荧光 RAA 试剂引物探针设计的说明在 MVM 高度保守的 *Ns1* 基因上设计了四对引物。据 RAA 检测的结果选择一对扩增效果最好的引物在其序列上设计一个探针,用荧光 RAA 法检测探针的适用性。RAA 和荧光 RAA 采用 ZC-RAA[®] 试剂盒和 ZC-RAA[®] exo 试剂盒(杭州众测生物有限公司,中国)进行检测。

1.3.6 荧光 RAA 灵敏度试验

MVM 病毒核酸用 ddPCR 测得其浓度为 1×10^5 copies/μL,将 MVM 病毒核酸从 1×10^5 copies/μL 用 1×TE 溶液依次 10 倍倍比稀释至 1 copies/μL,每个稀释度 3 次重复,利用上述建立的荧光 RAA 反应扩增体系对以上 MVM 核酸稀释样品进行检测,考察该方法的灵敏度。

1.3.7 荧光 RAA 特异性试验

提取 Reo-3、MHV-1、MHV-3、MHV-A59、MHV-JHM 病毒的核酸,进行荧光 RAA 检测,考察该引物和探针的特异性。以无 RNase 酶水为阴性对照作为扩增模板。

1.3.8 荧光 RAA 稳定性试验

取荧光 RAA 检测干粉分别室温放置 0 d、3 d、7 d、10 d、15 d、20 d、30 d。将定量提取核酸样本模板样品稀释至 10 copies/μL 作为灵敏度参考品,以无 RNase 酶水为阴性参考品。对室温放置干粉进行荧光检测初步考察检测试剂的储存稳定性,不同室温放置时间的干粉灵敏度参考品重复检测 10 次,阴性

表 1 qPCR/ddPCR 的引物和探针

Table 1 Sequences of primers and probe for the real-time PCR/ddPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物位点 Nucleotide location
MVM-F	5'-AATTCCTTCAGCTGCTGTTAGTT-3'	751~773
MVM-R	5'-TCAAGGGAATGCTGCGAGA-3'	698~680
MVM-P	FAM-ACAGGCTGTTACCAACCATCTGCTCCAG-BHQ1	716~743

表 2 荧光 RAA 的引物和探针

Table 2 Sequences of primers and probe for the real-time RAA

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物位点 Nucleotide location
MVM RAA FP1	5'-CACAAAGAATATATTTCTGCTGATGTTAATTG-3'	569~602
MVM RAA RP1	5'-CTTCTGCTATTTCTCTTAGTTTAATTCTTTTCAG-3'	795~762
MVM RAA FP2	5'-CTTATGATAATCAAACGCATTATAGATTCTTGG-3'	2930~2963
MVM RAA RP2	5'-AACTCTGATTCTGCAATAGTTTCTGATTTAG-3'	3051~3019
MVM RAA FP3	5'-AGAATATATTTCTGCTGATGTTAATTGCTTTG-3'	574~607
MVM RAA RP3	5'-CTCATTGCTCTTCTGCTATTTCTCTTAGTTTAA-3'	803~771
MVM RAA FP4	5'-CGCTCACCATTACACACCGAAAAGTACGCCTCTC-3'	1998~2034
MVM RAA RP4	5'-GGTCCGCACCGAAGCAGCTCTCAAATCCTC-3'	2208~2176
MVM RAA-probe	CTCAAGCTCAAGGGAATGCTGGAAGGCAAC [FAM-dT] A [THF] A [BHQ1-dT] GTTTACTGGAGCAGATG-C3 spacer	673~727

参考品重复检测 10 次,考察检测试剂的室温储存稳定性。

1.3.9 小鼠样本中 MVM 的检测

本研究取本实验室被送检的 45 只 SPF 小鼠盲肠内容物作为检测 MVM 的样本。按照中华人民共和国国家标准 GB/T 14926.42-2001《实验动物细菌学检测标本采集》中方法无菌采集盲肠内容物于 1.5 mL 离心管,保存 -80°C 。将每份小鼠盲肠内容物 0.2 g 加入 1 mL DMEM 培养基,涡旋振荡 1 min, 2000 r/min 离心 5 min 后取上清液 200 μL , 提取样本核酸。用 qPCR 法对其进行检测。

(1) MVM 小鼠阳性模拟样本的制备

qPCR 法的检测结果为 45 只 MVM 的小鼠样本均为阴性。后随机取其中 15 份,按每 0.1 g 小鼠盲肠内容物加入 50 μL 适当倍数稀释的病毒原液,混匀制成 MVM 阳性模拟样本,使阳性模拟样本初始病毒核酸量在 $1/4 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ copies/ μL 范围之间。同时将一份已知 MVM 病毒提取核酸作为此次样本的阳性质控品。

(2) 荧光 RAA 和 qPCR 法对 MVM 阳性模拟样本的检测分析

为了评价荧光 RAA 检测 MVM 的可靠性,分别采用荧光 RAA 和 qPCR 法对样本进行检测,分析两种方法的相关性。

1.4 统计学方法

采集达到设定的荧光阈值(threshold)时荧光 RAA 的检测时间(T_t)和 qPCR 检测周期(C_t)数据,应用 IBM SPSS Statistics 22 统计软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。分析方法为线性回归分析。通过判定系数 R^2 (也称为拟合优度或决定系数)来判断观测值的拟合效果, R^2 越接近 1,表示回归模型拟合效果越好。

2 结果

2.1 特异性试验结果

经过引物筛选第三对 MVM 引物 574F 和 803R 在 MVM 病毒 DNA 模板上成功扩增出目的片段,在该引物片段内设计一条探针,用荧光 RAA 法成功扩增出 MVM 荧光曲线,由此成功建立了荧光 RAA 的反应体系。如图 1 所示将 MVM 病毒核酸作为模板,Rnase-water 作为阴性对照,检测 Reo-3、MHV-1、MHV-3、MHV-A59、MHV-JHM 的核酸模板,验证所建立荧光 RAA 方法的特异性,结果显示在检测模板

为 MVM 病毒核酸时只需 5 min 左右的反应时间即可检测到明显的荧光扩增信号,其他病毒和阴性对照在 20 min 反应时间内均未见荧光扩增信号,表明所建立的荧光 RAA 法具有很强的特异性。

2.2 敏感性试验结果

MVM 病毒核酸从 10^5 copies/ μL 用 $1 \times \text{TE}$ 溶液依次 10 倍倍比稀释至 1 copies/ μL ,每个稀释度进行 3 次重复实验。如图 2 所示两种方法均能在模板浓度为 10 copies/ μL 时出现明显的扩增曲线。当模板浓度为 1 copies/ μL 时两种检测方法均未扩增出荧光曲线,同时阴性对照样本在两种检测方法检测时均未产生明显的荧光扩增信号。故将 MVM 病毒核酸荧光 RAA 法与 qPCR 法的敏感性进行比较得到荧光 RAA 法的灵敏度同 qPCR 法的检测结果一致均为 10 copies/ μL 。采用 3 个独立重复实验,确定荧光 RAA 法和 qPCR 法检测的重复性。

2.3 稳定性试验结果

用灵敏度参考品和阴性参考品检测 0 d、3 d、7 d、10 d、15 d、20 d、30 d 的荧光检测试剂。如表 3 所示,实验结果可见检测试剂室温放置 25 d 时检测试剂检出性能下降,室温放置 30 d 时检测试剂冻干粉已完全失活。室温放置 20 d 时反应干粉的起峰时间和荧光峰值与 -20°C 储存的检测试剂相当。从实验结果来看常温放置 20 d 对检测试剂的性能基本无影响,非常有利于试剂的运输和使用。该结果充分表明本研究所建立的方法有着极大的野外临床应用潜力。

2.4 小鼠样品的检测结果

利用本研究建立的 MVM 荧光 RAA 检测法和传统的荧光定量 PCR 检测法分别对 30 份阴性小鼠盲肠内容物、15 份模拟阳性样品和质控品进行检测,如表 4 所示 RAA 检测方法 with 荧光定量 PCR 检测方法的检测结果完全一致,符合率为 100%。应用 IBM SPSS Statistics 22 统计软件对样本荧光 RAA 的检测时间(T_t)和 qPCR 检测周期(C_t)数据进行统

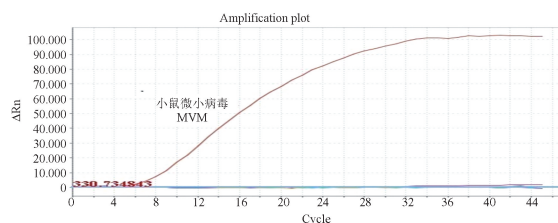
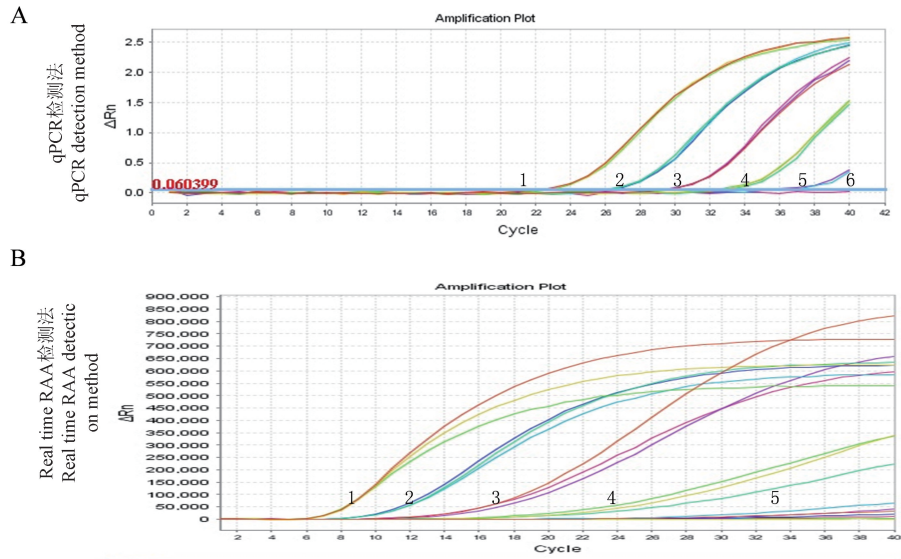


图 1 荧光 RAA 法的特异性试验结果

Figure 1 Specificity of real-time RAA method

计学分析,分析方法为线性回归分析。如图 3 所示线性回归的决定系数 $R^2 = 0.85$,表明两种检测方法

的结果具有显著线性关系,荧光 RAA 法是一种可靠的检测 MVM 病毒的方法。



注:A;qPCR 检测法,1~5 模板浓度:10⁵ copies/μL~10 copies/μL,6:阴性对照;B:荧光 RAA 检测法,1~5 模板浓度:10⁵ copies/μL~10 copies/μL,6:阴性对照。

图 2 MVM 病毒 qPCR 法和荧光 RAA 法的灵敏度

Note. A, qPCR method. 1~5, Template concentration, 10⁵ copies/μL~10 copies/μL. 6, Negative control. B, Real-time RAA method, 1~5 template concentration, 10⁵ copies/μL~10 copies/μL. 6, Negative control.

Figure 2 Sensitivity of qPCR and real-time RAA method for MVM

表 3 检测试剂的室温储存稳定性

检测试剂室温 储存时间 Time	灵敏度参考 品阳性检出率 Positive rate	阴性参考 品检出率 Negative rate
0 d	10/10	10/10
3 d	10/10	10/10
7 d	10/10	10/10
10 d	10/10	10/10
15 d	10/10	10/10
20 d	6/10	10/10
30 d	0/10	10/10

表 4 小鼠样本的检测结果

样本 MVM 浓度 Sample concentration	荧光 RAA 法 Real-time RAA 检测结果/ 样本数量(只) Test result/Number of samples (n)	qPCR 法 Real-time PCR 检测结果/ 样本数量(只) Test result/ Number of samples (n)
1/4×10 ² copies/μL	+/1	+/1
1/2×10 ² copies/μL	+/1	+/1
1×10 ² copies/μL	+/1	+/1
1/4×10 ³ copies/μL	+/1	+/1
1/2×10 ³ copies/μL	+/1	+/1
1×10 ³ copies/μL	+/1	+/1
1/4×10 ⁴ copies/μL	+/1	+/1
1/2×10 ⁴ copies/μL	+/1	+/1
1×10 ⁴ copies/μL	+/1	+/1
1/4×10 ⁵ copies/μL	+/1	+/1
1/2×10 ⁵ copies/μL	+/1	+/1
1×10 ⁵ copies/μL	+/1	+/1
1/4×10 ⁶ copies/μL	+/1	+/1
1/2×10 ⁶ copies/μL	+/1	+/1
1×10 ⁶ copies/μL	+/1	+/1
MVM 阳性质控 Positive control	+/1	+/1
阴性质控 Negative control	-/1	-/1

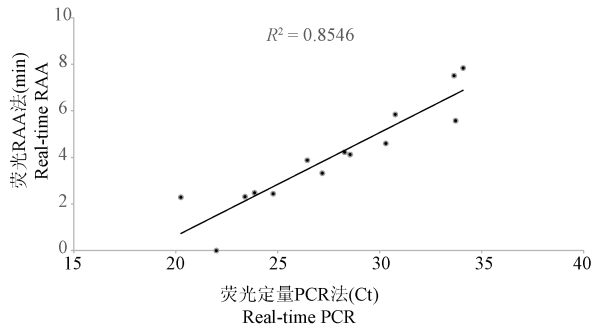


图 3 荧光 RAA 检测时间(Tt)和 qPCR 检测周期(Ct)间的线性回归分析

Figure 3 Linear regression analysis of real-time RAA threshold time (Tt) and qPCR cycle threshold values (Ct)

注:“+”:阳性;“-”:阴性。
Note. “+”, Positive. “-”, Negative.

3 讨论

目前的研究表明小鼠感染 MVM 病毒并不会明显引发临床疾病和组织病变,但是 MVM 病毒可以影响小鼠体内免疫调节,从而对鼠源性生物材料和鼠源性细胞实验研究的结果造成严重偏差。因此实验小鼠的生产饲养机构对 MVM 进行检测具有重要意义^[16]。本研究建立的小鼠 MVM 荧光 RAA 检测方法,其灵敏度为 10 copies/ μ L,与 qPCR 检测方法的检测灵敏度相当^[17]。应用小鼠肠道病毒 Reo-3、MHV-1、MHV-3、MHV-A59、MHV-JHM 核酸进行测试,均未产生扩增,说明建立的小鼠 MVM 荧光 RAA 检测方法具有良好的特异性。对检测试剂的室温储存稳定性进行考察,检测试剂室温放置 20 d 未出现明显的扩增性能下降。具有较好的室温稳定性,可满足常规野外检测使用需求。

2017 年广东省实验动物重点实验室的潘金春等^[18]对开放饲养的小鼠和 SPF 级小鼠的 MVM 病毒感染率进行分析得到结论:开放饲养小鼠的检测阳性率约为 14.5%,SPF 级小鼠检出率约为 0.3%。该数据与欧美国家实验室小鼠感染率研究数低于 0.5%相吻合^[19]。2013 年 Wang 等^[20]检测 174 份小鼠脾 DNA 样品中,MVM 病毒检测均为阴性。这说明对于 SPF 级小鼠来说感染 MVM 病毒的概率相对较低。笔者采集了实验室 45 份 SPF 级小鼠盲肠内容物送检本,结果均为阴性,这与血清学检测结果相一致,表明送检 SPF 动物样品不存在 MVM 感染。为了评估本技术的适用性,我们采用了 15 份模拟阳性样品进行测试。与 qPCR 法进行比对分析,荧光 RAA 法与 qPCR 法对 15 份模拟样品的检测结果均为阳性,两种方法检测结果完全一致且两者的关联性为 $R^2=0.85$,证明所建方法的可行性。实际样本和核酸模拟样本的验证研究证实本研究建立的实时荧光 RAA 检测方法具有与传统荧光定量 PCR 方法一致的稳定性和可靠性,两种方法的检测符合率为 100%。与传统荧光定量 PCR 方法相比,本研究建立的实时荧光 RAA 检测方法的优势在于其检测周期极短(包括结果判读在内,仅需 20~30 min)、操作也相对更加简单^[21]。

与常规荧光定量 PCR 方法需要荧光定量 PCR 仪及标准 PCR 实验室不同,重组酶介导链替换核酸扩增的方法非常适合于临床快速检测^[22]。目前已经开发了一系列适配 RAA 技术的裂解液解决了样

本的前处理问题,叠加各种微流控技术已经在一定程度上开发出了一系列可以实现样本进结果出的临床即时检测解决方案^[23-24]。另外新技术的发展如 CRISPR 检测技术结合 RAA 恒温扩增可实现单碱基突变检测具有广阔的应用前景^[25-26]。因此初步开发 MVM 病毒的 RAA 检测方法对于实现 MVM 病毒的现场即时快速诊断具有重要意义。

综上所述,本研究针对 MVM 病毒所建立的荧光 RAA 检测方法具有快速方便、灵敏度高、特异性强等优点,为实验动物饲养机构实现现场检测 MVM 病毒打下了基础。

参考文献:

- [1] 张英. 细小病毒的分子生物学 [J]. 中国病毒学, 1996, 11(3): 193-200.
- [2] Adeyemi RO, Landry S, Davis ME, et al. Parvovirus minute virus of mice induces a DNA damage response that facilitates viral replication [J]. PLoS Pathog, 2010, 6(10): e1001141.
- [3] Laborde JM, Sguazza GH, Fuentealba NA, et al. Indirect ELISA (iELISA) for routine detection of antibodies against Minute Virus of Mice (MVM) in mice colonies [J]. Rev Argent Microbiol, 2017, 49(3): 210-215.
- [4] Bauer BA, Riley LK. Antemortem detection of mouse parvovirus and mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples [J]. Lab Anim, 2006, 40(2): 144-152.
- [5] Zhan D, Roy MR, Valera C, et al. Detection of minute virus of mice using real time quantitative PCR in assessment of virus clearance during the purification of Mammalian cell substrate derived biotherapeutics [J]. Biologicals, 2002, 30(4): 259-270.
- [6] Zhang X, Zhao Y, Ma C, et al. An optimized visual loop mediated isothermal amplification assay for efficient detection of minute virus of mice with hydroxynaphthol blue dye [J]. J Virol Methods, 2022, 308: 114575.
- [7] 张飞燕, 赵玲, 金洁, 等. 多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 111-116.
- [8] Ye H, Nowak C, Liu Y, et al. Plasmonic LAMP: improving the detection specificity and sensitivity for SARS-CoV-2 by plasmonic sensing of isothermally amplified nucleic acids [J]. Small, 2022, 18(12): e2107832.
- [9] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204.
- [10] Adams DE, West SC. Unwinding of closed circular DNA by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB recombination/repair proteins [J]. J Mol Biol, 1995, 247(3): 404-417.

(下转第 82 页)