

第二十七章 T/CALAS 27—2017《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》实施指南

第一节 工作简况

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的下达的 2016 年团体标准制（修）订计划，由广东省实验动物监测所和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所共同负责团体标准《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》起草工作。该项目由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查，由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作是按照《中华人民共和国国家标准 GB/T1.1 2009 标准化工作导则》第 1 部分“标准的结构和编写规则”的要求进行编写的。本标准是在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”（项目编号 2013BAK11B01）和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”（项目编号 2011B040200010）课题基础上制定而成的，在制定过程中参考了国内外相关文献，对方法的敏感性、特异性、重复性等进行了研究，并对所建立的标准方法进行了应用研究，建立了可行、稳定、特异的小鼠细小病毒 MPV 株实时荧光 PCR 检测方法。

第二节 工作过程

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出，广东省实验动物监测所和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所按照团体标准研制要求和编写工作的程序，组成了由单位专家和专业技术人员参加的编写小组，制定了编写方案，并就编写工作进行了任务分工。编制小组根据任务分工进行了资料收集和调查研究工作，在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”（项目编号 2013BAK11B01）和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”（项目编号 2011B040200010）课题研究基础上，组织编写小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法技术资料，于 2016 年 4 月完成了标准草案的起草工作。标准草案首先征求中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的意见，2016 年 10 月在南宁召开团体标准征求意见会议，参会专家对标准稿提出了系列修订建议和意见。根据提出的意见，编制组对《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》标准草案进行修改。结合调研、试验验证，形成本标准征求意见稿。

2016 年 11 月至 12 月，标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见，共收集意见或建议 6 个，编制组根据专家提出的修改意见和建议，采纳 6 个，未采纳 0 个。

经对《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》团体标准整理修改后形成标准送审稿、标准送审稿编制说明和征求意见汇总处理表。

2017 年 2 月 21 日, 全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿专家审查会。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组, 认真讨论了标准送审稿编制说明、征求意见汇总处理表, 提出了修改意见和建议。与会专家认为本标准填补了小鼠细小病毒 MPV 株分子检测方法空白, 是国标的有力补充, 一致同意通过审查。会后, 编制组根据与会专家提出的修改意见, 经对《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》团体标准修改完善后形成标准报批稿、标准报批稿编制说明和征求意见处理汇总表。

2017 年 5 月, 本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过, 批准发布, 于 2017 年 5 月 19 日起正式实施。

第三节 编写背景

小鼠细小病毒 (minute virus of mice, MVM), Kilham 大鼠病毒 (Kilham rat virus, KRV), Toolan's 病毒 H-1 (Toolan's H-1 parvovirus, H-1) 是目前广为熟知的三种啮齿类动物细小病毒。相对前三种细小病毒, 小鼠细小病毒 (mouse parvovirus, MPV) 是一种较新的细小病毒, 1993 年, 美国 Frank Fitch 细胞免疫实验室的 Fitch 等在进行脾细胞与 L3 细胞毒性 T 淋巴细胞共培养实验中首次分离到小鼠细小病毒 1 型 (mouse parvovirus-1, MPV-1)。2005 年 Besselsen 等从自然感染动物分离鉴定两株新的细小病毒 MPV-2、MPV-3。随后研究人员从小鼠中分离到更多的 MPV。细小病毒感染对科研的危害主要表现在影响免疫学、移植、肿瘤学研究。现已证实 MPV-1 对杂交瘤和肉瘤细胞系有肿瘤抑制作用。MPV 在小鼠中感染率较高, 呈世界范围流行, MPV 在北美和欧洲的感染率为 1.86% (n=594, 539), 国内的感染率在 2% 以上。我国实验动物国家标准中尚未把 MPV 列入检测项目, 为了提高我国实验动物质量, 促进我国实验动物检测技术发展, 有必要制定小鼠细小病毒 (MPV 株) 检测方法标准。

MPV 检测方法主要为血清学和 PCR 方法, 由于 MPV 比较难在体外细胞上传代增值, 因此研究人员采用重组病毒抗原 (rNS1 和 rVP2) 替代全病毒抗原。rNS1 作为属特异性抗原可以检测所有啮齿类动物细小病毒, rVP2 作为种特异性抗原用于病毒分型。同血清学方法一样, PCR 方法也是针对 NS1 和 VP2 两个基因进行检测, NS1 基因作为属特异性基因, VP2 基因则是各个变种的特异性基因。PCR 方法适用于被污染的生物材料、感染动物组织以及粪便等材料的检测。

实时荧光 PCR (real-time fluorescence PCR) 技术是在 PCR 扩增反应过程中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时检测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。它具有定量准确、灵敏度高、反应速度快、重复性好及 PCR 反应后不需电泳检测等优点。该技术自发明以来, 被广泛地应用于 DNA 或 RNA 绝对定量分析、基因表达差异分析和肿瘤基因检测等多个学科领域。

广东省实验动物监测所研究建立的 MPV 实时荧光 PCR 检测技术, 其特异性强、敏感

性高。既可以对直接从小鼠粪便、盲肠内容物、脏器组织等临床样品中取样抽提的 MPV DNA 进行检测,也可以应用于实验动物产品、实验动物接种物和污染环境评价等,而且整个操作过程不超过 4 小时,具有快速、高效的特点。

第四节 编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则:一是科学性原则。在尊重科学、亲身实践、调查研究的基础上,制定本标准。二是可操作性原则。本标准无论是从样品采集、处理、DNA 抽提、PCR 反应,均操作简单,仅需 4 小时既可完成。具有可操作性和实用性。三是协调性原则。以切实提高我国实验动物小鼠细小病毒 MPV 株检测技术水平为核心,符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

第五节 内容解读

本标准由范围,规范性引用文件,术语、定义和缩略语,检测方法原理,主要设备和材料,试剂,检测方法,结果判定,检测过程中防止交叉污染的措施,附录共十章构成。现将《实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法》主要技术内容确定说明如下:

一、本标准范围的确定

本标准规定了实验动物小鼠细小病毒 MPV 株实时荧光 PCR 检测方法。本标准规定适用于实验动物及其产品、细菌培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中小鼠细小病毒 MPV 株的检测。现行的实验动物国家标准抗体检测的适用范围存在一定局限,而本标准规定的荧光 PCR 检测方法适用范围广泛,可以适用于实验动物及产品、实验动物接种物和环境等样本的检测。

二、规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489《实验室 生物安全通用要求》

三、术语、定义和缩略语

为方便标准的使用,本标准规定了以下术语、定义及缩略语

(一) 术语和定义

下列术语和定义适合于本标准。

1. 聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

体外酶催化合成特异 DNA 片段的方法,模板 DNA 先经高温变性成为单链,在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链

上相应的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种 dNTP 为底物,使引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

2. 实时荧光聚合酶链式反应 real-time PCR, 实时荧光 PCR

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上,在反应体系中加入特异性荧光探针,利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程,通过检测每次循环中的荧光发射信号,间接反映了 PCR 扩增的目标基因的量,最后通过扩增曲线对未知模板进行定性或定量分析。

3. Ct 值 cycle threshold

实时荧光 PCR 反应中每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

(二) 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

CPE	细胞病变效应 (cytopathic effect)
DNA	脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
MPV	小鼠细小病毒 MPV 株 (murine parvovirus)
PBS	磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

四、检测方法原理

简要介绍了标准中采用的技术方法原理。根据小鼠细小病毒 MPV 株结构蛋白 VP2 基因序列,设计合成一对特异性引物和一条特异性探针,探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,*Taq* 酶的 5'→3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,淬灭作用消失,荧光信号产生并被检测仪器接受,随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈对应关系。因此,可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

五、主要设备和材料

规定了检测方法所需要的设备和材料。

六、试剂

规定了检测方法所需要的试剂。

(1) 灭菌 PBS。配制方法在标准附录中给出。

(2) DNA 抽提试剂: 基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit, (Qiagen 公司, Cat.No.69504) 或其他等效产品。DNA 抽提试剂给出了具体的信息,目的是为了更方便标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可以使用这些等效产品。

(3) 无水乙醇。

(4) 实时荧光 PCR 试剂: Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), (Takara 公司, Cat.No.

DRR390S)或其他等效产品。实时荧光 PCR 试剂均给出了具体的信息,目的是为了方便的标准的用户,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可以使用这些等效产品。

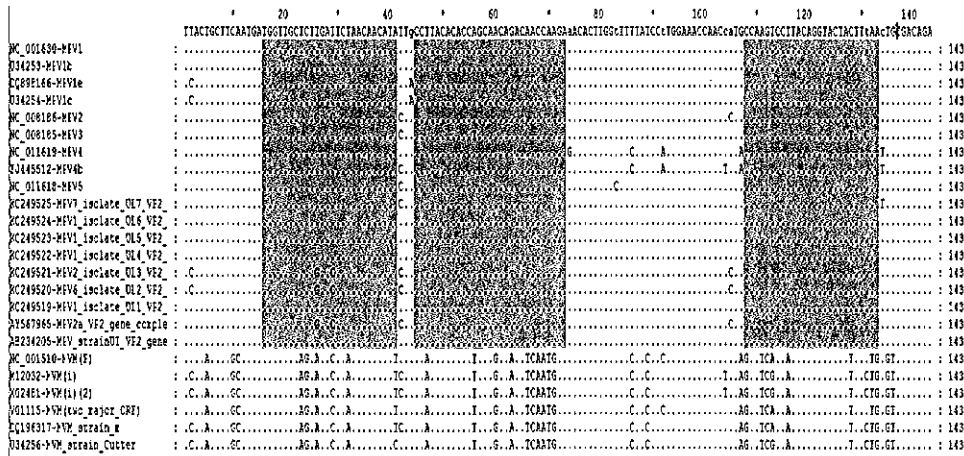
(5) 引物和探针:根据表 1 的序列合成引物和探针,引物和探针加无 RNase 去离子水配制成 10μmol/L 储备液,-20℃保存。

表 1 实时荧光 PCR 检测引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
正向引物	TGGTTGCTCTKGAYTCTAACAAACATA	118
反向引物	TTAAAGTAGTACCTGTAAGGACTTGG	
探针	FAM-CCTTACACACCAGCAACAGACAACCAAGA-BHQ-1	

注:简并碱基 K: T/G Y: T/C。探针也可选用具有与 FAM 和 BHQ-1 荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

引物和探针设计根据 GenBank 中收录的 MPV 病毒 VP2 蛋白基因序列 (Genbank 登录号 NC001630) 为模板,利用 Primer Express3.0 软件 (Applied Biosystems 公司) 设计一套针对病毒 VP2 蛋白基因的荧光定量 PCR 引物和探针,从 NCBI 下载小鼠细小病毒 MPV 株的核酸全序列共 18 条,用 MAGE4.0 软件进行序列比对分析,保证引物和探针序列的通用性 (图 1)。



(二) 采样及样本的处理

标准规定了动物脏器组织,盲肠内容物或粪便,细菌培养物,实验动物饲料、垫料和饮水,实验动物设施设备样本的采集及处理方法。

(三) 样本 DNA 提取

规定了样本 DNA 的提取方法。对两种不同核酸提取方法进行比较,采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Stool DNA Kit(天根公司)和 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen 公司)对 15 份盲肠内容物样本,按各自说明书进行核酸抽提。采用 NanoDrop2000c 仪器对抽提的核酸进行浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280}) 检测。将两种方法提取的 DNA 模板,采用小鼠细小病毒 MPV 株实时荧光 PCR 分别进行检测,统计检测结果,比较两种提取方法用于 PCR 扩增的检出率。结果两种方法的提取效果相当, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8~2.0,满足 DNA 模板的纯度要求(表 2)。将上述提取的 DNA 模板,进行 MPV 检测,结果两种提取方法用于 PCR 扩增的检出率一致(表 3)。因此,两种核酸提取方法均适合用于该检测方法。

表 2 提取 DNA 模板的浓度、纯度比较结果

样本编号	TIANamp Stool DNA Kit		DNeasy Blood & Tissue Kit	
	OD_{260}/OD_{280}	浓度 (ng/ μ L)	OD_{260}/OD_{280}	浓度 (ng/ μ L)
1	1.87	12.0	1.93	16.1
2	1.85	13.6	1.88	15.7
3	1.82	64.8	1.91	59.4
4	1.85	51.1	1.83	53.9
5	1.89	19.8	1.98	21.9
6	1.71	40.4	1.97	52.4
7	1.81	38.3	1.95	28.8
8	1.84	18.3	1.89	18.9
9	1.83	46.5	1.97	35.2
10	1.89	36.9	1.86	52.8
11	1.89	53.7	1.97	47.1
12	1.81	62.5	1.89	58.9
13	1.82	31.8	1.95	39.8
14	1.87	36.4	1.91	41.7
15	1.89	30.6	1.89	23.9

表 3 检出率比较结果

试剂	检出率	参考值
TIANamp Stool DNA Kit	13/15	13/15
DNeasy Blood & Tissue Kit	13/15	

(四) 实时荧光 PCR

规定了实时荧光 PCR 反应体系和反应参数。反应体系和反应参数的确定依据以下优化试验。

1. 方法优化

实时荧光 PCR 反应选用的试剂盒为 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), (Takara 公司, Cat.No.DRR390S), 扩增和检测在全自动荧光定量仪 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems 上进行。

(1) 扩增程序的确定

根据引物、探针的具体特性, 仪器上的反应程序在退火延伸条件选择上试验了 3 种温度和 3 种时间: 95℃ 30s, 95℃ 5s → (58/60/62)℃ (34/45/60)s, 40 次循环, 在退火延伸阶段采集荧光信号。各种试剂的加样量分别为每个反应管中含 2 × Premix Ex Taq 25μL, 正向引物 (10μmol/L) 1μL、反向引物 (10μmol/L) 1μL、探针 (10μmol/L) 2μL, Rox 1μL、模板 DNA 10μL, 用去离子水补足到反应总体积 50μL。结果均可见阳性扩增曲线, 但考虑到使引物扩增有更好的特异性和缩短反应时间, 最后确定扩增程序为: 95℃ 30s, 95℃ 5s → 60℃ 34s, 40 次循环。

(2) 最佳引物浓度的确定

应用以上扩增程序, 先固定探针终浓度为 200nmol/L, MPV 上下游引物浓度在 100nmol/L、200nmol/L、400nmol/L、600nmol/L、800nmol/L、1000nmol/L 之间选择, 通过比较 Ct 值和荧光强度增加值 (绝对荧光强度与背景荧光强度的差值, ΔRn) 来判断优化结果。最佳引物浓度的确定以 Ct 值最小, 扩增曲线荧光强度增加值最大所对应的引物浓度为最佳浓度 (表 4、图 2)。最终确定 MPV 上下游引物终浓度 400nmol/L。

表 4 引物优化 Ct 值结果

MPV-R 终浓度	MPV-F 终浓度					
	100nmol/L	200nmol/L	400nmol/L	600nmol/L	800nmol/L	1000nmol/L
100nmol/L	24.61/24.19	24.12/23.93	24.05/24.08	23.96/23.96	23.92/24.07	23.83/24.01
200nmol/L	24.10/24.11	24.38/23.92	24.15/24.13	24.19/24.12	24.18/24.03	24.15/24.26
400nmol/L	24.78/24.17	24.55/24.33	<u>24.05/24.13</u>	24.03/24.21	24.03/24.39	24.12/24.21
600nmol/L	25.02/24.38	24.47/24.34	24.25/24.27	24.14/24.24	24.23/24.35	24.39/23.82
800nmol/L	25.15/24.53	24.76/24.28	24.58/24.43	24.54/24.28	24.13/24.39	24.01/24.33
1000nmol/L	25.25/24.80	25.16/24.64	24.76/24.29	24.60/24.39	24.25/24.45	24.27/24.74

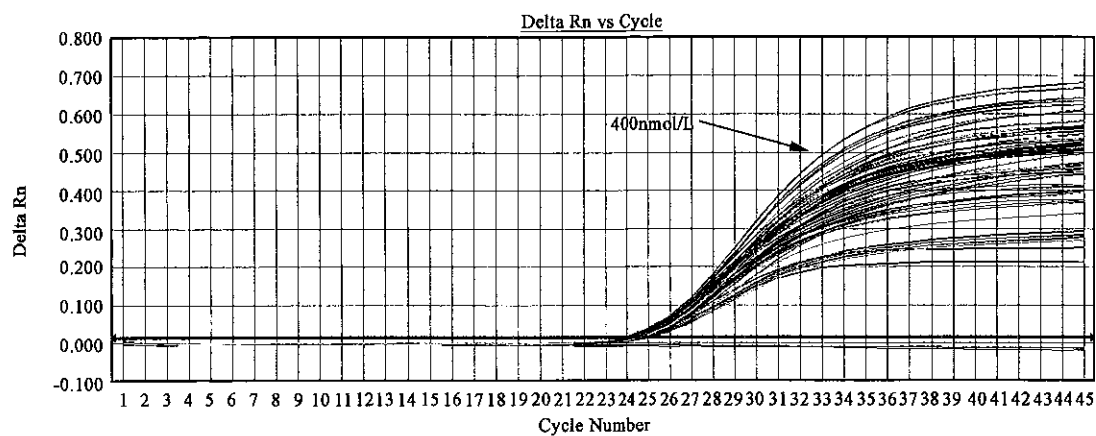


图2 MPV 引物优化扩增曲线图

(3) 最佳探针浓度的确定

根据选择好的最佳 MPV 上下游引物终浓度 400nmol/L，进一步进行 TaqMan 探针浓度的确定，在 100nmol/L、200nmol/L、300nmol/L、400nmol/L、500nmol/L、600nmol/L、700nmol/L 之间选择。以 Ct 值最小，扩增曲线荧光强度增加值最大所对应的探针浓度为最佳浓度（表 5、图 3）。考虑探针成本，最终确定 MPV 探针终浓度 200nmol/L。

表 5 探针优化 Ct 值结果

	MPV-P 终浓度						
	100nmol/L	200nmol/L	300nmol/L	400nmol/L	500nmol/L	600nmol/L	700nmol/L
Ct 值	25.98 ± 0.05	24.72 ± 0.26	25.02 ± 0.04	25.16 ± 0.07	24.82 ± 0.11	24.35 ± 0.12	24.72 ± 0.49

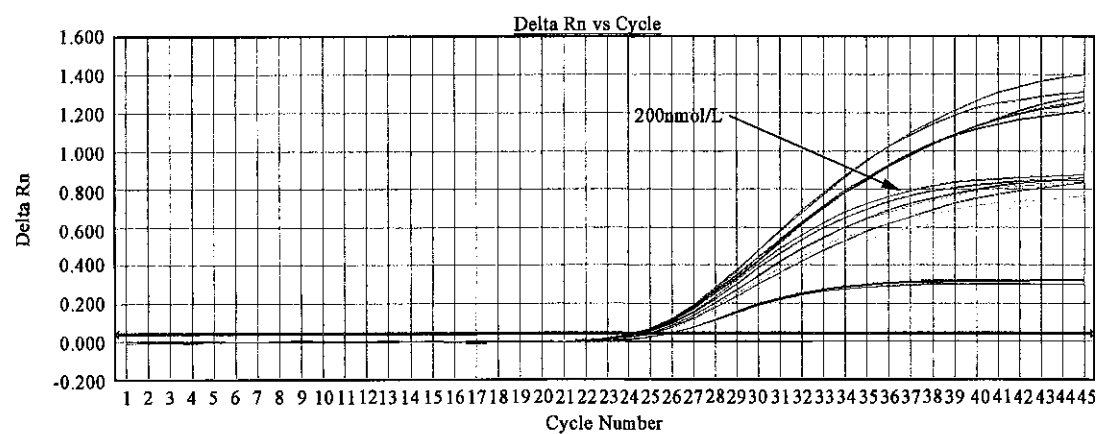


图3 MPV 探针优化扩增曲线图

2. 不同试剂的测试

本标准方法主要采用 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR), (Takara 公司, Cat.No.DRR390S), 除此以外, 还选用了多种试剂 按优化好的引物和探针浓度进行了测试, 即按上下游引物终浓度 400nmol/L, 探针终浓度 200nmol/L, 反应总体积为 50μL 的情况下, 模板 DNA 量为 10μL。不同试剂选用不同的 Taq 酶激活条件及 PCR 条件, 40 次循环。结果所有试剂均可得到很好的扩增结果。这些试剂包括: TaqMan® Universal PCR Master Mix (美国 Applied Biosystems 公司产品, Cat #4304437), GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega 产品, 货号 A6101)。

八、结果判定

(一) 结果分析和条件设定

直接读取检测结果, 基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

(二) 质控标准

(1) 空白对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

(2) 阴性对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

(3) 阳性对照 Ct 值应 ≤ 35 , 并且有明显的荧光扩增曲线, 则表明反应体系运行正常, 否则此次试验无效, 需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

(三) 结果判定

(1) 若待检测样品无荧光扩增曲线, 则判定样品未检出小鼠细小病毒 MPV 株。

(2) 若待检测样品有荧光扩增曲线, 且 Ct 值应 ≤ 35 时, 则判断样品中检出小鼠细小病毒 MPV 株。

(3) 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间时, 应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后, 若 Ct 值 ≥ 40 时, 则判定样品未检出小鼠细小病毒 MPV 株。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样品检出小鼠细小病毒 MPV 株。

其中 CUT OFF 值的确定依据以下试验确定。

对最低检测限稀释度为 100copies/μL MPV 质粒标准品进行 6 次重复检测, 计算其 Ct 值均值和标准差, 并对 90 份正常动物组织和盲肠内容物样本进行检测分析其结果。结合以上结果综合分析实时荧光 PCR 方法的 CUT OFF 值。

实时荧光 PCR 方法最低检测限实验结果显示, 稀释 10copies/μL MPV 质粒标准品无荧光信号。将稀释至 100copies/μL MPV 质粒标准品, 重复检测 6 次, 通过计算 Ct 值的差异来验证方法的重现性。稀释至 100copies/μL MPV 质粒标准品的 Ct 值分别为: 35.00, 35.03, 35.71, 37.75, 37.44, 36.30, Ct 值平均值为 36.21, 标准差为 1.18 (图 4)。以平均值 $+3 \times SD$ 的公式计算阳性样品 Ct 值的参考范围, 结果 MPV 阳性样品 Ct 值范围应为 < 39.75 , 取整数为 < 40 。90 份阴性样本均无荧光信号。综合以上实验结果最终确定 CUT OFF 值为 40。

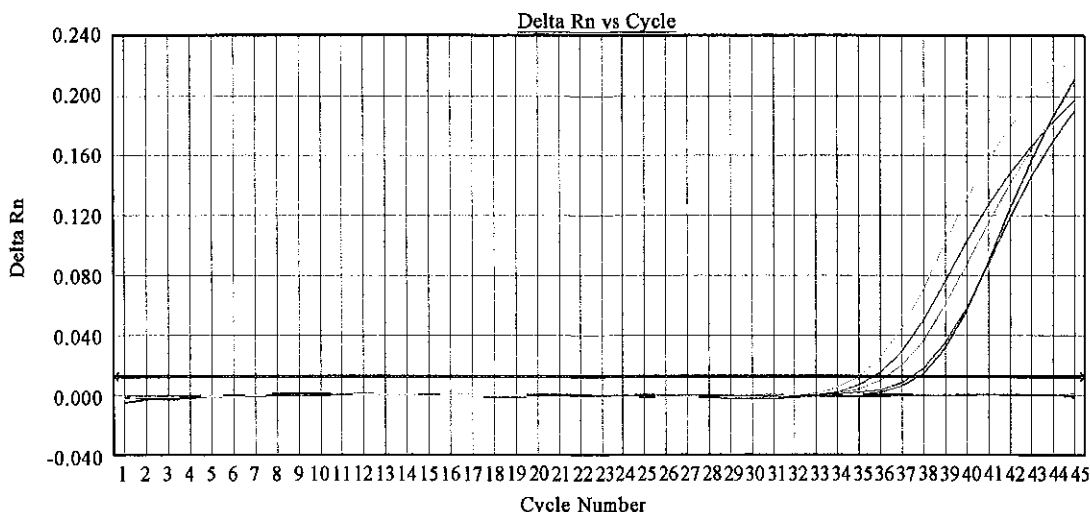


图4 实时荧光PCR方法重复6次检测稀释至100copies/ μ L MPV质粒标准品的反应曲线

九、检测过程中防止交叉污染的措施

给出了检测过程中如何防止交叉污染的措施，具体按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

十、附录 A

本标准附录为规范性附录，给出了 PBS 的配制方法。

第六节 分析报告

一、材料与方法

(一) 病毒、菌株、载体和临床样本

小鼠 MPV GZ-1 毒株由本实验室分离保存，小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM, ATCC VR-1346)、大鼠细小病毒 KRV 株 (KRV, ATCC VR-235)、大鼠细小病毒 H-1 株 (H-1, ATCC VR-356)、鼠痘病毒 (Ect, ATCC VR-1374)、多瘤病毒 (Poly, ATCC VR-252)、小鼠腺病毒 (Mad, ATCC VR-550)、小鼠巨细胞病毒 (MCMV, ATCC VR-1399)、小鼠肝炎病毒 (MHV, ATCC VR-246)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV, ATCC VR-995)、呼肠孤病毒 III 型 (Reo-3, ATCC VR-232) 购自美国典型微生物菌种保藏中心，MNV Guangzhou/K162/09/CHN 毒株由本实验室分离保存，大鼠细小病毒 RPV 株和 RMV 株阳性病料由本实验室鉴定和保存。大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 和克隆载体 pMD19-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (Takara 公司)。临床样本包括：来源于 2010 年至 2014 年本实验室收到广东、湖北、北京、四川、云南和上海等省市送检的 SPF 级活体小鼠或小鼠粪便 100 份，2014 年本实验室收到广东省送检的 KM 小鼠，背景调查表明该 KM 小鼠曾饲养于普通环境，共 52 只。捕获于广州市某实验动物养殖场附近的野鼠 24 份，野鼠为褐家鼠，无菌采

集活体小鼠的盲肠内容物, -40°C 保存, 临床样本共计 176 份。

(二) 引物设计合成

引物和探针序列见表 1。引物和探针由 Invitrogen (广州) 公司合成。

(三) 病毒和样品核酸提取

纯化的病毒样品 DNA 的抽提按病毒基因组提取试剂盒 (天根公司) 操作说明书进行, 病毒 RNA 的抽提采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 按说明书进行。盲肠内容物和粪便样品按照下面的方法预处理, 在装有样本的离心管中加入适量灭菌的 PBS, 匀浆, 采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (天根公司) 按说明书进行抽提。

(四) MPV 质粒标准品的制备

以提取的 MPV DNA 为模板, 用 Premix Ex Taq (Takara 公司) 进行 PCR, 反应体系为: $2 \times \text{Premix Ex Taq } 25\mu\text{L}$, 上游引物 MPV-F ($10\mu\text{mol/L}$) $2.5\mu\text{L}$, 下游引物 MPV-R ($10\mu\text{mol/L}$) $2.5\mu\text{L}$, DNA $5\mu\text{L}$, 加 RNase Free dH₂O 至 $50\mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 2min, 一个循环; 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5min。反应得到目的大小片段后, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 将回收的目的片段连接到 pMD-19T 载体, 并转化至 DH5 α 感受态细胞中。用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆, 用 PCR 鉴定阳性克隆菌, 并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒 (OMEGA 公司) 提取质粒, 微量紫外分光光度计测定浓度与纯度, 根据下面的公式计算拷贝数。拷贝数 ($\text{copies}/\mu\text{L}$) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ DNA 浓度 ($\text{g}/\mu\text{L}$) / 质量 MW (g/mol)。其中, $\text{MW} = \text{DNA 碱基数 (bp)} \times 660 \text{ daltons/bp}$, $\text{DNA 碱基数} = \text{载体序列碱基数} + \text{插入序列碱基数}$ 。

(五) 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法对 MPV、MVM、KRV、H-1、RPV、RMV、Ect、Poly、Mad、MCMV、MHV、MNV、TMEV 和 Reo-3 的 DNA 或 cDNA 进行检测, 验证该方法的特异性。

(六) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 系列标准模板。利用优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值, 以 Ct 值为纵坐标, 以起始模板浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线。

(七) 重复性试验

对 4 份 10 倍系列稀释的 MPV 质粒标准品 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$) 在同一次反应中进行 5 次重复测定, 对各稀释度的 Ct 值进行统计, 计算每个样品各反应管之间的批内变异系数 (CV%); 对上述样品分别进行 5 次测定, 计算同一样品每次测定结果之间的批间变异系数 (CV%)。

(八) 临床样本的检测

利用 MPV 荧光定量 PCR 方法对 176 份临床样本进行检测, 每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。同时采用普通 PCR 方法进行检测, 比较两种方法的阳性检出率。普通 PCR 的反应体系和反应条件参照文献 (Besselsen, 2006) 进行, 具体如下: 上游引物 P1: $5'\text{-GCAGCAATGATGTAAGCTGAAGCT-3'}$; 下游引物 P2: $5'\text{-CCATCTGCCTGAATCATAGCTAA-3'}$, 反应体系为 $20\mu\text{L}$: DNA 模板 $2\mu\text{L}$, Premix

Buffer $2 \times$ (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) $10 \mu L$, 上游引物 ($10 \mu mol/L$) $1 \mu L$, 下游引物 ($10 \mu mol/L$) $1 \mu L$, 补 H_2O 至 $20 \mu L$ 。反应条件: $94^\circ C$ 5min, $94^\circ C$ 30s, $55^\circ C$ 30s, $72^\circ C$ 30s, 共 35 个循环, 最后 $72^\circ C$ 延伸 10min。反应完成后取 $5 \mu L$ 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。MPV 普通 PCR 产物大小为 260bp。采用测序方法对部分阳性样本进行测序, 对检测方法作进一步验证。

二、结果

(一) MPV 质粒标准品的制备

用 PCR 扩增 MPV 得到大小约 118bp 的特异片段, 与预期目的片段大小相符 (图 5)。与 pMD19-T 载体连接构建重组阳性质粒, 对重组质粒进行 PCR 鉴定, 条带大小与预期结果相符。重组质粒的测序结果与目的基因序列同源性的 100%, 表明质粒标准品制备成功。

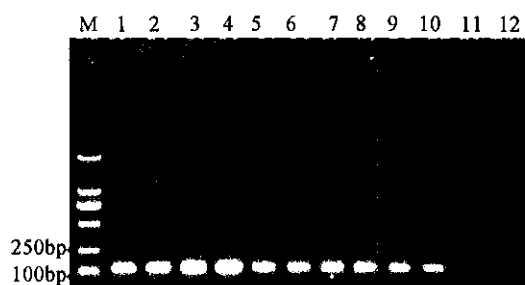


图 5 MPV PCR 电泳图

M: DL2000; 泳道 1-10 泳道: MPV; 11 和 12 泳道: 阴性对照

(二) 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法对 MPV、MVM、KRV、H-1、RPV、RMV、Ect、Poly、Mad、MCMV、MHV、MNV、TMEV 和 Reo-3 的 DNA 或 cDNA 进行检测, 结果除 MPV 为阳性外, 其他病毒均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 6)。

(三) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。利用优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值, 以 Ct 值为纵坐标, 以起始模板浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线。结果见图 7, 可见各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等, 无模板对照 (no template control, NTC) 没有荧光扩增曲线为阴性结果, 该方法的最低检测限为 100copies/ μL 。以标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标, 以临界环数 (threshold cycle, Ct) 为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线, 标准质粒在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ copies/ μL 之间具有良好的线性关系, 结果见图 8。其线性回归方程为 $Ct = -3.47 \times \lg(\text{拷贝数}) + 42.48$, 标准曲线斜率为 -3.47, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.47} - 1 = 0.942$, 即扩增效率为 94.2%, 相关系数 $R^2 = 0.9991$, 说明 PCR 扩增该标准品的效率较高, 线性关系良好。标准质粒在 1×10^1 copies/ μL 和 1×10^0 copies/ μL 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为 100 个拷贝。

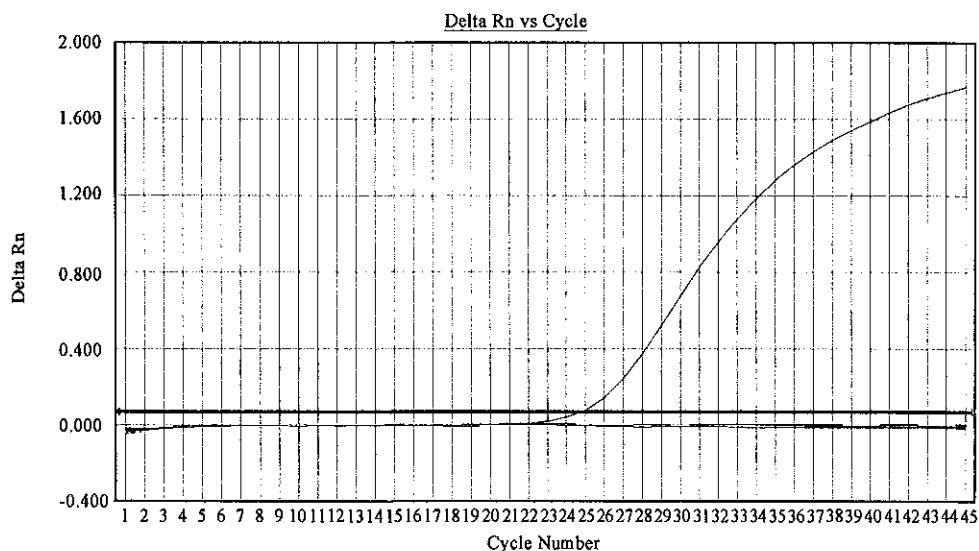


图6 MPV 荧光定量 PCR 特异性检测结果

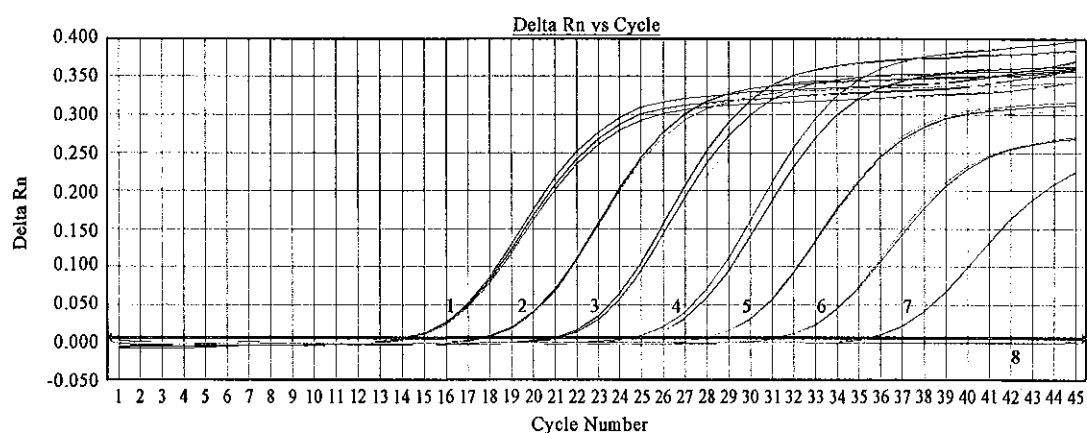


图7 10倍系列稀释质粒标准品的荧光定量扩增曲线

1~7: 1×10^8 copies/ μ L 至 1×10^2 copies/ μ L 质粒标准品, 8: 1×10^1 copies/ μ L、 1×10^0 copies/ μ L 质粒和无模板对照

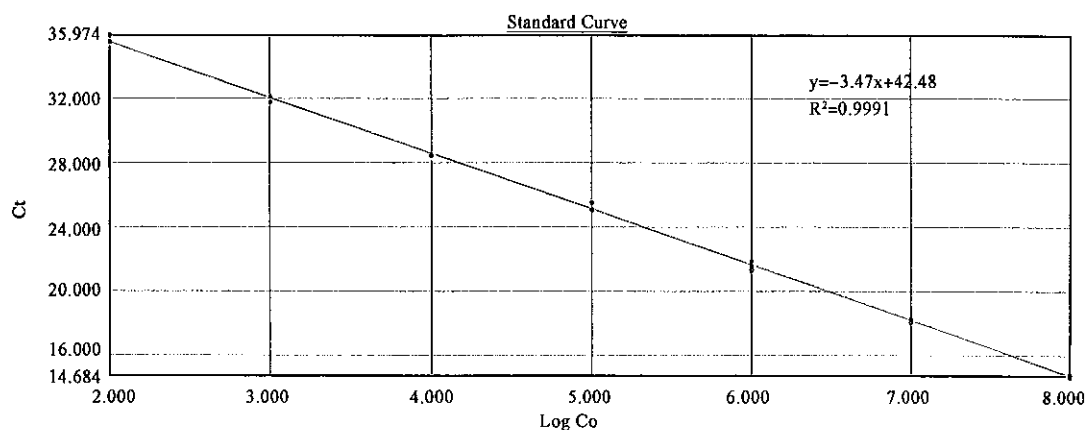


图8 10倍系列稀释标准品的标准曲线

(四) 重复性试验结果

通过对 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3$ copies/ μL 4 个稀释度 RNA 进行重复性检测, 批内及批间重复性试验的变异系数均小于 3% (表 6), 表明建立荧光定量 PCR 方法重复性好, 方法稳定可靠。

表 6 MPV 荧光定量 PCR 批内和批间重复性试验检测结果

样本 (copies/ μL)	Ct 值					Ct 平均值	标准差 SD	变异系数 CV (%)
	1	2	3	4	5			
批内								
1×10^6	21.27	21.11	20.65	20.79	21.15	20.99	0.26	1.25
1×10^5	23.91	24.48	23.94	24.46	23.84	24.13	0.32	1.31
1×10^4	27.91	27.9	27.65	27.81	27.96	27.85	0.12	0.44
1×10^3	31.16	31.12	31.3	31.4	31.17	31.23	0.12	0.37
批间								
1×10^6	21.03	21.02	20.04	20.08	21.08	20.65	0.54	2.61
1×10^5	24.34	24.97	24.28	24.88	24.24	24.54	0.35	1.44
1×10^4	27.28	27.76	27.54	28.18	27.79	27.71	0.33	1.20
1×10^3	31.19	31.05	31.08	31.05	31.36	31.15	0.13	0.43

(五) 荧光定量 PCR 在临床样本检测中的应用

1. 检测结果

应用建立的 MPV 荧光定量 PCR 方法对 176 份样本进行检测, 同时普通 PCR 方法进行检测, 比较两种方法的阳性检出率 (表 7)。结果发现荧光定量 PCR 比普通 PCR 敏感。

表 7 MPV 荧光定量 PCR 临床样本检测结果

临床样品	阳性数 / 样本数 (检出率, %)	
	MPV 荧光定量检测方法	普通 PCR 检测方法
SPF 级小鼠	9/100 (9.0%)	7/100 (7.0%)
普通环境下饲养的 KM 小鼠	10/52 (19.2%)	8/52 (15.4%)
野鼠	0/24 (0%)	0/24 (0%)
合计	19/176 (10.8%)	15/176 (8.5%)

2. 阳性样本测序验证

对其中三份阳性进行测序验证, 测序结果显示三个样本扩增的基因序列相同, 均为 118bp。通过 GenBank 上的 Blast 软件进行序列比对, 阳性样本的序列与 GenBank 上的 MPV 毒株的同源性在 93%~100% (图 9)。证明样本为 MPV 阳性样本, 也验证了建立的检测方法正确有效。

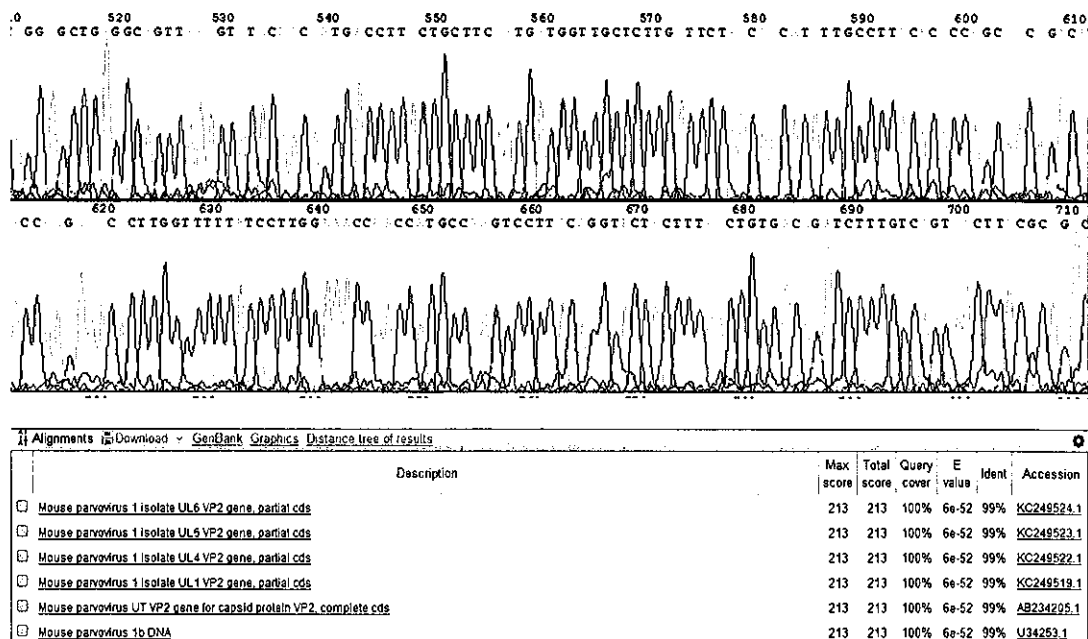


图 9 阳性样品测序验证

第七节 国内外同类标准分析

本标准为国内原创标准，国际上无类似标准。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写，与实验动物标准体系协调统一；本标准与《实验动物管理条例》、《实验动物质量管理办法》等国家相关法规和实验动物强制性标准的规定和要求协调一致。目前实验动物国家标准没有小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法标准，本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

第九节 重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

本标准发布实施后作为推荐性标准使用。

第十一节 标准实施要求和措施

本标准发布实施后, 建议通过培训班、会议宣传和网络宣传等形式积极开展宣贯培训活动。面向各行业开展动物实验的机构和个人, 宣传贯彻标准内容。

第十二节 本标准常见知识问答

一、什么是 PCR 假阳性, 产生假阳性的原因是什么?

假阳性是指对实验材料中阴性目的物检测反而得到阳性结果的现象。如果一次实验中的几个阴性对照中出现一个或几个阳性结果, 提示本次实验中其他标本的检测结果可能有假阳性。假阳性主要来源于样本采集、处理、PCR 过程中的污染, 造成假阳性的原因主要有以下几点。

(1) 样品间交叉污染: 非一次性采样器具由于之前采样的痕量残留物含有本次检测的目的核酸而污染本次样品, 造成假阳性。盛放样品器具密封不严造成样品间的污染样本污染。样本核酸模板在提取过程中, 由于吸样枪污染导致标本间污染。有些微生物标本尤其是病毒可随气溶胶或形成气溶胶而扩散, 导致彼此间的污染。

(2) PCR 试剂的污染: 主要是由于在 PCR 试剂配制过程中, 由于加样枪、容器、双蒸水及其他溶液被 PCR 核酸模板污染。

(3) PCR 扩增产物污染: 由于 PCR 产物拷贝量大, 远远高于 PCR 检测数个拷贝的极限, 所以极微量的 PCR 产物污染, 就可形成假阳性, 这是 PCR 反应中最常见的污染问题。

还有一种容易忽视, 最可能造成 PCR 产物污染的形式是气溶胶污染, 空气与液体面摩擦时可形成气溶胶, 在操作时比较剧烈地摇动反应管, 开盖时、吸样时及污染进样枪的反复吸样都可形成气溶胶而污染。气溶胶造成的污染是造成假阳性的主要原因。

(4) 克隆质粒的污染: 常见于用克隆质粒做阳性对照的实验室。由于克隆质粒在单位容积内含量相当高, 另外在纯化过程中需用较多的用具及试剂, 而且在活细胞内的质粒, 由于活细胞的生长繁殖的简便性及具有很强的生命力, 其污染可能性也很大。

二、如何控制 PCR 假阳性?

(1) 在 PCR 检测时, 每次都要设立阴性对照样品和阳性对照样品对检测参数进行参比对照。只有在阴性对照样品和阳性对照样品检测结果成立的前提下, 才能对检测样品进行结果判定。

(2) 合理分隔实验室: 将样品的处理、配制 PCR 反应液、PCR 扩增及 PCR 产物鉴定等步骤分区或分室进行, 特别注意样本处理及 PCR 产物的鉴定应与其他步骤严格分开, 最好能划分。合理的 PCR 实验室应分为标本处理及核酸抽提区、PCR 反应液制备区、PCR 扩增区和 PCR 产物鉴定区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用, 实验前应将实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA 或 RNA。

(3) 规范试剂耗材管理: 新购买的试剂需进行实验前验证。PCR 试剂可选择小量分装储存, 避免污染。试验过程中所用的一次性塑料耗材, 如吸头、离心管、八连管等均应采购无核酸酶的并且使用前进行高温高压处理。塑料器皿用 0.1% DEPC 水浸泡 4h 后高温高压处理分解 DEPC。玻璃仪器或金属器具使用前须 180℃ 高温干烤 6h 以上。

(4) 采用 UNG 酶防止污染: 由于 PCR 产物是最常见的污染源, 为避免以前检测中所产生的扩增产物的污染, 可在 PCR 试剂中以 dUTP 取代 dTTP, 因此 PCR 产物都是含有 dU 的 DNA 链。在 PCR 开始前增加 50℃ 的保温步骤, UNG 酶即可将反应体系中已有的 U-DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解, 并在随后变性这步的条件下 DNA 链断裂, 消除由于污染 DNA 产生的扩增, 从而保证扩增结果的特异性, 准确性。同时 UNG 酶被灭活, 不会再降解新扩增的产物 U-DNA。

(5) 操作人员应经过专业培训, 具有一定经验和操作技能, 必须严格按照质量体系规定的检测标准和检测方法操作。

三、什么是 PCR 假阴性, 产生假阴性的原因是什么?

假阴性是指实验中设置的阳性对照未能扩增呈阳性结果现象, 但这里应注意, 阳性对照应该包含样品核酸提取和 PCR 扩增步骤。因此, 如果未在样品的核酸提取步骤设置了阳性对照, 而恰好在该步骤存在问题, 即使阳性对照均呈阳性, 样品检测中还可能假阴性。造成 PCR 假阴性问题的原因较为复杂, 概括起来有以下几点。

(1) 仪器因素: PCR 仪孔间差异或控温不准, 引起扩增失败或扩增效率降低。

(2) 试剂因素: 核酸抽提试剂、引物和 PCR 扩增试剂质量问题导致扩增失败。

(3) 采样因素: 不合理的样本采集、转运及处理、样本中微生物滴度过低均有可能导致假阴性结果。

(4) 核酸模板因素: 模板中存在 PCR 抑制剂, 如杂蛋白质、多糖、酚等抑制物; 容器中存在 RNA 酶导致 RNA 降解。

(5) 靶序列变异因素: 待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变, 影响引物与模板特异性结合, 可能会导致假阴性结果。

(6) 操作人员因素: PCR 实验的环节很多, 而且对每一环节的质量要求都很高, 例如少加、漏加试剂、离心不充分、反应参数设计错误等都能造成结果的假阴性。

四、如何控制 PCR 假阴性?

(1) 在 PCR 检测时, 每次都要设立阴性对照样品和阳性对照样品对检测参数进行参比对照。只有在阴性对照样品和阳性对照样品检测结果成立的前提下, 才能对检测样品进行结果判定。此外设置合理的内对照(内标)是判断假阳性的有效手段, 内对照必须覆盖样品处理、核酸抽提、PCR 扩增和产物检测全过程。

(2) 定期监测 PCR 仪, 出现问题应及时进行维护并校准。

(3) 新购买的试剂和引物需进行实验前验证, 试剂应合理保存并分装使用, 防止酶失活, 避免反复冻融。

(4) 严格处理样品程序, 核酸提取过程中尽量去除可能干扰或抑制 PCR 反应的物质。

可采用稀释或再纯化模板 DNA 方法, 进行扩增分析, 减少假阳性发生。

操作人员应经过专业培训, 具有一定经验和操作技能, 必须严格按照质量体系规定的检测标准和检测方法操作。

参 考 文 献

- Ball-Goodrich LJ, Hansen G, Dhawan R, et al.2002. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. *Comp Med*, 52: 160-166.
- Ball-Goodrich LJ, Johnson E.1994.Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J Virol*, 68: 6476-6486.
- Besselsen DG, Besch-Williford CL, et al.1995. Detection of newly recognized rodent parvoviruses by PCR.*J Clin Microbiol*, 33 (11): 2859-63.
- Besselsen DG, Pintel DJ, Purdy GA, et al.1996.Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. *J Gen Virol*, 77: 899-911.
- GB 14922.2—2011 实验动物微生物学等级及监测 .
- McKisic MD, Lancki DW, Otto G, et al.1993. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J Immunol*, 150: 419-428.
- McKisic MD, Paturzo FX, Smith AL.1996. Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplant*, 61: 292-299.
- Riley LK, Knowles R, Purdy G, et al. 1996.Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J Clin Microbiol*, 34: 440-444.
- Smith AL, Jacoby RO, Johnson EA, et al.1993. *In vivo* studies with an “orphan” parvovirus of mice. *Lab Anim Sci*, 43: 175-182.