

第二十五章 T/CALAS 25—2017《实验动物 小鼠 肝炎病毒 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发的 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 小鼠肝炎病毒 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、特异的小鼠肝炎病毒 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，组织编写小鼠肝炎病毒 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 小鼠肝炎病毒 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 9 个，编制组根据专家提出的修改意见和建议，采纳 9 个，未采纳 0 个。经对《实验动物 小鼠肝炎病毒 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肝炎病毒分子检测方法空白,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 小鼠肝炎病毒 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

小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)属于冠状病毒科成员,是一类RNA病毒,最早于1949年发现,此后研究者们先后从小鼠和新生乳鼠中分离到MHV。根据其组织嗜性的不同,可将其分为呼吸株(Respiratory MHV strain)和嗜肠株(Enterotropic MHV strain)两型。MHV带毒小鼠分布于全世界,正常情况下呈隐性感染,只在应激因素激发下才成为致死性疾病,表现为肝炎、脑炎和肠炎。感染取决于毒株、宿主的年龄和感染途径。自然感染限制在啮齿动物。MHV不仅严重影响实验小鼠质量,还对科学研究工作造成潜在干扰,影响实验结果的准确性和重复性,是国标中SPF级小鼠需要排除的病原体,快速准确地检测MHV是有效防制该病的前提。目前,国内MHV感染诊断方法主要是针对抗体检测的血清学检测方法如酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫酶试验(IEA)和免疫荧光试验(IFA)等,但是这些方法不能应用于免疫功能低下或免疫缺陷小鼠如SCID小鼠和裸小鼠等的检测,因为它们不能产生正常的抗体反应,而且,血清抗体检测有一定局限性,一般只有活体动物才能采集血清用于检测,对病死动物和一些动物源性的生物制品(如动物细胞,及其他生物材料)检测造成限制。抗原检测方面,常规病毒分离鉴定方法既复杂又烦琐,不利于日常检测。

随着分子生物学的迅速发展,以PCR技术为基础的各种分子生物学诊断技术成为MHV病毒感染诊断的重要手段。PCR病原检测方法具有特异性强、敏感度高、诊断快速等传统诊断方法所无法比拟的优点。美国和欧盟许多实验动物质量检测实验室都推荐采用PCR技术作为实验动物病原的检测方法。国内一些实验动物检测机构也开展了实验动物病原PCR检测技术研究,增加实验动物病毒分子生物学检测技术方法主要应用于无血清实验动物样本的快速检测是实验动物质量控制必不可少的方法。广东省实验动物监测所自2011年起进行小鼠肝炎病毒荧光定量RT-PCR检测方法研究,通过大量临床样本试验证明建立的方法敏感高、特异强、重复性好。

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、RNA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肝炎病毒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、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 小鼠肝炎病毒 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肝炎病毒实时荧光 RT-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肝炎病毒的检测。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 RT-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

(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. 逆转录 - 聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

以 RNA 为模板,采用 Oligo (dT)、随机引物或特异性引物, RNA 在逆转录酶和适宜反应条件下,被逆转录成 cDNA,然后再以 cDNA 作为模板,进行 PCR 扩增。

3. 实时荧光逆转录 - 聚合酶链式反应 real-time RT-PCR, 实时荧光 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR 方法是在常规 RT-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。

4. 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)

DEPC 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

DNA 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

MHV 小鼠肝炎病毒 (murine hepatitis virus)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)

四、检测方法原理

简要介绍了标准中采用的技术方法原理。根据小鼠肝炎病毒保守序列 M 蛋白基因,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) 无 RNase 去离子水:经 DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理的去离子水或商品无 RNase 水。配制方法在标准附录中给出。

(3) RNA 抽提试剂 TRIzol (Life technologies 公司, Cat.No. 15596-026) 或其他等效产品。RNA 抽提试剂给出了具体的信息,目的是为了便于标准的使用者,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。

(4) 无水乙醇。

(5) 75% 乙醇 (无 RNase 去离子水配制)。

(6) 三氯甲烷 (氯仿)。

(7) 异丙醇。

(8) 实时荧光 RT-PCR 试剂: One Step Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime) (Takara 公司, Cat.No.RR064A) 或其他等效产品。实时荧光 RT-PCR 试剂均给出了具体的

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。

(9) 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 10 μ mol/L 储备液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

表1 实时荧光 RT-PCR 检测引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物大小 (bp)
正向引物	GGAAGTCTCTCGTTGGGCATTATACT	108
反向引物	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA	
探针	FAM-ACATGCTACGGCTCGTGTAAACCGAAGTGT-BHQ-1	

注: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 MHV-1 毒株 (GenBank 登录号为 FJ647223) 序列为模板,利用 Primer Express3.0 软件 (Applied Biosystems 公司) 设计一套针对病毒 M 蛋白基因的荧光定量 PCR 引物和探针,从 NCBI 下载小鼠肝炎病毒的核酸全序列共 23 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)。

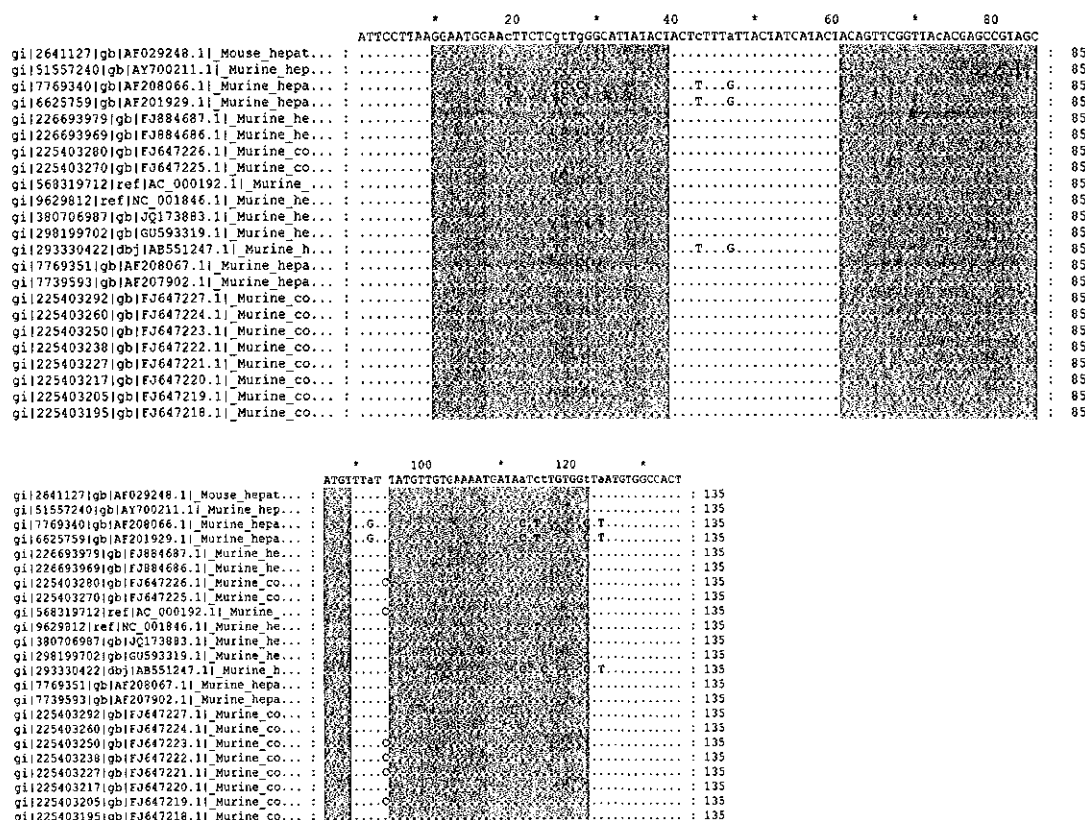


图1 小鼠肝炎病毒 M 基因引物和探针序列比较

七、检测方法的确定

(一) 生物安全措施

实验操作及处理按照 GB 19489 的规定, 由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

(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 RNA 提取

规定了样本 RNA 的提取方法。对两种不同核酸提取方法进行比较, 采用 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 公司) 和 TRIzol (Invitrogen 公司) 对 25 份盲肠内容物和肝脏组织样本, 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 RNA 模板, 采用小鼠肝炎病毒实时荧光 RT-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 1.6~2.0, 满足 RNA 模板的纯度要求 (表 2)。将上述提取的 RNA 模板, 进行 MHV 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 RNA 模板的浓度、纯度比较结果

样本编号	QIAamp Viral RNA Mini Kit		TRIzol	
	OD_{260}/OD_{280}	浓度 (ng/ μ L)	OD_{260}/OD_{280}	浓度 (ng/ μ L)
1	1.78	107.58	1.81	105.46
2	1.85	156.23	1.86	154.78
3	1.81	145.29	1.78	142.56
4	1.83	103.86	1.85	106.85
5	1.84	88.42	1.89	89.45
6	1.77	78.98	1.81	81.69
7	1.81	75.36	1.88	74.56
8	1.83	96.52	1.84	96.48
9	1.78	102.59	1.85	105.24
10	1.79	66.38	1.82	68.75
11	1.78	155.46	1.75	156.56
12	1.89	67.98	1.89	68.45
13	1.88	98.76	1.86	97.56
14	1.67	95.45	1.77	93.21
15	1.78	102.39	1.75	101.23
16	1.68	95.26	1.77	94.21
17	1.73	98.12	1.79	97.58
18	1.75	110.25	1.80	112.03

续表

样本编号	QIAamp Viral RNA Mini Kit		TRIzol	
	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (ng/μL)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (ng/μL)
19	1.79	78.29	1.72	78.98
20	1.78	78.96	1.82	77.45
21	1.76	125.14	1.88	129.32
22	1.71	88.12	1.78	87.56
23	1.82	98.25	1.95	99.56
24	1.75	114.23	1.79	113.89
25	1.78	111.75	1.77	110.25

表 3 检出率比较结果

试剂	检出率	参考值
QIAamp Viral RNA Mini Kit	20/25	20/25
TRIzol	20/25	

(四) 实时荧光 RT-PCR

规定了实时荧光 RT-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

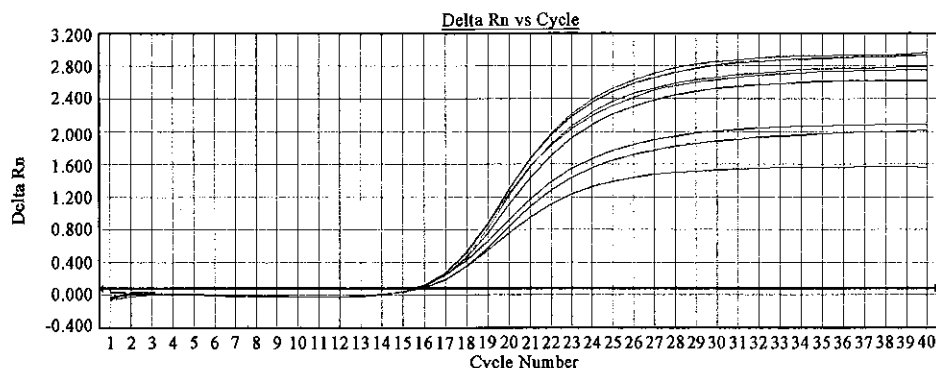
实时荧光 RT-PCR 反应选用的试剂盒为 One Step Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime) (Takara 公司, Cat.No.RR064A), 扩增和检测在全自动荧光定量仪 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems 上进行。

(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: 42℃ 5min, 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 × One Step RT-PCR Buffer III 25μL, *Ex Taq* HS (5 U/μL) 1μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 1μL, Forward Primer (10μmol/L) 1μL、Reverse Primer (10μmol/L) 1μL、Probe (10μmol/L) 2μL, Rox 1μL、模板 RNA 10μL, 用无 RNase 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: 42℃ 5min, 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, MHV 上下游引物浓度在 200nmol/L、250nmol/L、300nmol/L、350nmol/L、400nmol/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 (图 2)。最终确定 MHV 上下游引物终浓度 400nmol/L。



Setup / Instrument / Results					
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
A6	10pmol	MHV--w	Unknown	16.3454	0.191
A7	10pmol	MHV--w	Unknown	16.0753	0.191
B6	15pmol	MHV--w	Unknown	16.17	0.797
B7	15pmol	MHV--w	Unknown	17.2966	0.797
C6	20pmol	MHV--w	Unknown	16.0195	0.00122
C7	20pmol	MHV--w	Unknown	16.0178	0.00122
D6	25pmol	MHV--w	Unknown	16.0711	0.0255
D7	25pmol	MHV--w	Unknown	16.035	0.0255
E6	30pmol	MHV--w	Unknown	16.0793	0.0607
E7	30pmol	MHV--w	Unknown	16.1651	0.0607

图2 MHV引物优化扩增曲线图

引物 MHV-F、MHV-R 各 10nmol 溶于 1000 μ L 纯水中，配制成终浓度为 10pmol/ μ L (10 μ mol/L，每反应加入 1 μ L)

(3) 最佳探针浓度的确定

根据选择好的最佳 MHV 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、250nmol/L、300nmol/L、350nmol/L、400nmol/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，见图 3。最终确定 MHV 探针终浓度 400nmol/L。

2. 不同试剂的测试

本标准方法主要采用 One Step PrimerscriptTM RT-PCR Kit (Perfect Realtime) (Takara 公司, Cat.No.RR064A)，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 400nmol/L，反应总体积为 50 μ L 的情况下，模板 RNA 量为 10 μ L。不同试剂选用不同的反转录和 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：Ag-Path-IDTM One step RT-PCR Kit (美国 Ambion 公司产品, Cat#AM1005)，Quanti Fast Probe QPCR Kits (QIAGEN 产品, 货号 204454)。

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。

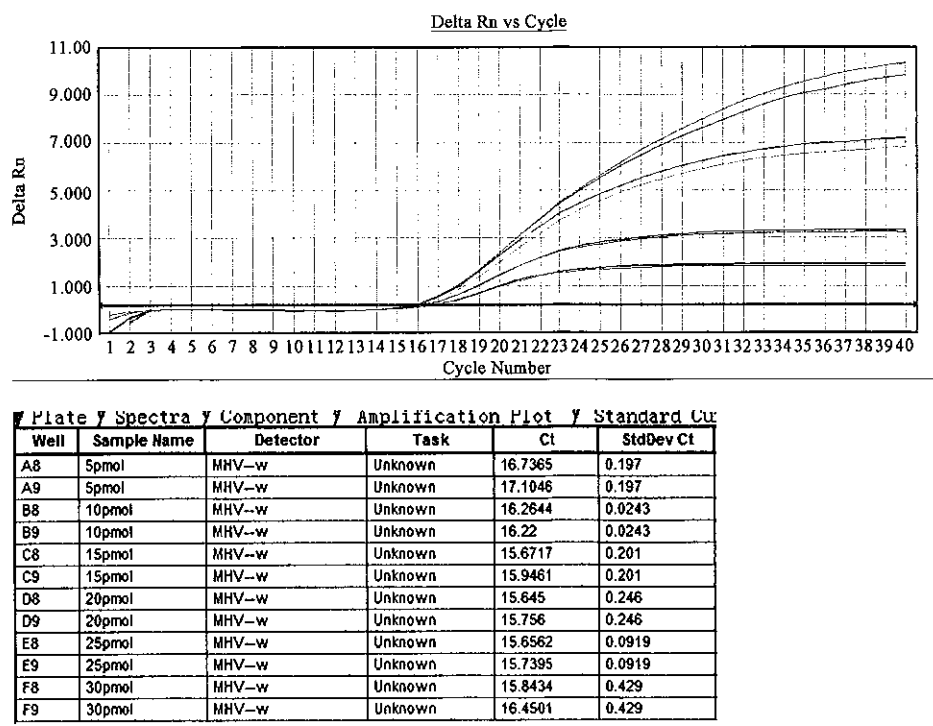


图3 MHV 探针优化扩增曲线图

引物 MHV-P 10nmol 溶于 1000 μ L 纯水中，配制成终浓度为 10pmol/ μ L（10 μ mol/L，每反应加入 1 μ L）

（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肝炎病毒。
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肝炎病毒。
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 RT-PCR 检测。重新检测后，若 Ct 值 ≥ 40 时，则判定样品未检出小鼠肝炎病毒。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肝炎病毒。

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 10copies/ μ L MHV-RNA 标准品进行 4 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 1copies/ μ L MHV-RNA 标准品有荧光信号，但无标准的“S”形荧光信号曲线产生。将稀释至 10copies/ μ L MHV-RNA 标准品，重复检测 4 次，通过计算 Ct 值的差异来验证方法的重现性。稀释至 10copies/ μ L

MHV-RNA 标准品的 Ct 值分别为: 35.23、35.29、36.37、37.84, Ct 值平均值为 36.18, 标准差为 1.22 (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 MHV 阳性样品 Ct 值范围应为 < 39.85 , 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。

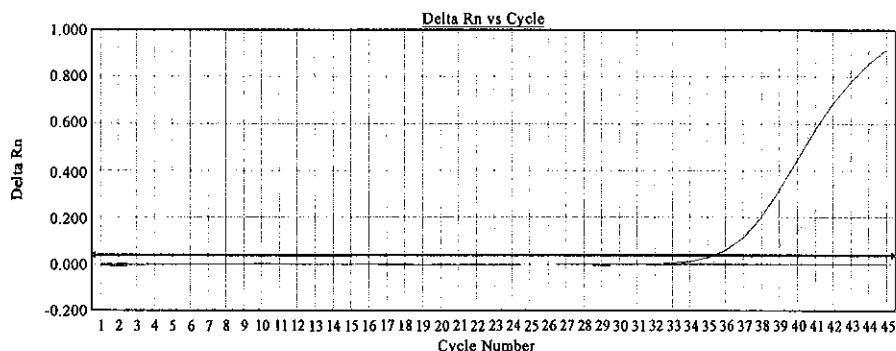


图 4 实时荧光 RT-PCR 方法重复 4 次检测稀释至 10copies/ μ L MHV-RNA 的反应曲线
横坐标为实时荧光 PCR 反应的 Ct 值, 纵坐标为荧光信号强度, 4 条曲线代表稀释至 10copies/ μ L MHV-RNA 分别在 4 个反应孔的检测结果

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 和无 RNase 去离子水的配制方法。

第六节 分析报告

一、材料与方

(一) 病毒、菌株、载体和临床样本

小鼠肝炎病毒 (MHV, ATCC VR-246)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV, ATCC VR-995)、仙台病毒 (SV, ATCC VR-105)、小鼠肺炎病毒 (PVM, ATCC VR-25)、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, 小鼠出血热病毒 (HV) 抗原为浙江天元生物药业股份有限公司生产的双价肾综合征出血热 (汉滩型和汉城型) 灭活疫苗, 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 核酸由中国食品药品检定研究院惠赠、MNV Guangzhou/K162/09/CHN 毒株由本实验室分离保存, BHK 细胞 (ATCC CCL-10) 购自美国典型微生物菌种保藏中心。pGEM-T easy 克隆载体购自 promega 公司, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 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 2012~2014 年本实验室收到广东省送检的 SPF 级活体小鼠或小鼠粪便 123 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

病毒样品 RNA 的抽提按 Trizol (Invitrogen 公司, 美国) 操作说明书进行, 盲肠内容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, 漩涡混匀, 将悬液 12 000r/min 离心 10min, 取上清液通过 0.22 μ m 滤膜 (Pall 公司, 美国) 过滤, 取滤液进行 RNA 抽提。

(四) MHV-RNA 标准品的制备

以提取的 MHV RNA 为模板, 用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒进行 RT-PCR, 反应体系为: Enzyme Mix 2 μ L, 2 $\times$ Buffer 25 μ L, 上游引物 MHV-F (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 下游引物 MHV-R (10 μ mol/L) 2.5 μ L, RNA 5 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30min, 94 $^{\circ}$ C 2min, 一个循环 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。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至 pGEM-T easy 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。阳性克隆菌 (pGEM-MHV) 送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序, pGEM-MHV 菌中含有的 PCR 产物大小为 108bp。

将 pGEM-MHV 质粒, 37 $^{\circ}$ C *Sal* I 单酶切 4h, 使质粒线性化, 琼脂糖凝胶电泳及试剂盒回收纯化质粒 DNA 线性化产物, 用于体外转录, 按 T7 体外转录试剂盒 Ribomax™ Large Scale RNA Production Systems (Promega 公司) 说明加入反应试剂 37 $^{\circ}$ C 作用 2h, 然后加 DNase I 酶 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化转录产物中未转录的 DNA 15min, 70 $^{\circ}$ C 灭活 DNase I 酶 15min, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 (Qiagen 公司) 进行 RNA 提取。得到体外转录的 MHV-RNA, 用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 根据 MHV 转录 RNA 产物的大小计算质粒体外转录的 RNA 拷贝数。按照下面的公式计算 RNA 拷贝数。拷贝数 (copies/ μ L) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ RNA 浓度 (g/ μ L) / 质量 MW (g/mol)。其中, MW = RNA 碱基数 $\times$ 340 daltons/碱基, RNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。根据计算得到的 MHV-RNA 的浓度用无 RNase 水调整到 1×10^{11} copies/ μ L。-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

(五) 特异性试验

采用建立的 MHV 实时荧光 RT-PCR 方法对 MHV、TMEV、MNV、SV、PVM、Reo-3、HV 和 LCMV 的 RNA 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 MHV-RNA 标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ 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 3 份 MHV-RNA 标准品 (1×10^5 copies/ μ L、 1×10^3 copies/ μ L、 2×10^1 copies/ μ 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

1. 人工感染试验

将含有 MHV 病毒的“脏垫料”作为感染源置于 ICR 小鼠笼盒中, 模拟自然感染状态。每笼饲养 5 只, 按品种分别固定放置于小鼠饲养间内中间笼架的底层位置, 每周 1 次固定时间更换包括哨兵鼠在内的饲养鼠垫料。分别在实验第 2、4、8、14、21、28、35、42、56 和 120 天各剖杀动物 5 只, 采集血液、盲肠内容物、粪便、肝脏以及肺脏检测抗原抗体分布情况。

2. 其他临床样本检测

利用实时荧光定量 PCR 方法对收集到的 123 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。

二、结果

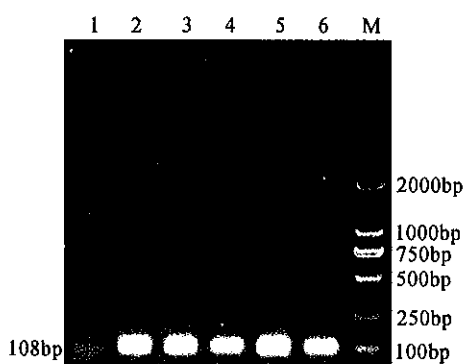


图 5 MHV RT-PCR 电泳图

M: DNA Marker DL2000; 2~6 泳道: MHV 重组质粒; 1 泳道: 无模板对照

(一) MHV 质粒的制备

以用 RT-PCR 扩增 MHV 得到大小约 108bp 的特异片段, 与 pGEM-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 (图 5)。

(二) 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法对 MHV、TMEV、MNV、SV、PVM、Reo-3、HV 和 LCMV 的 RNA 进行检测, 结果除 MHV 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)。

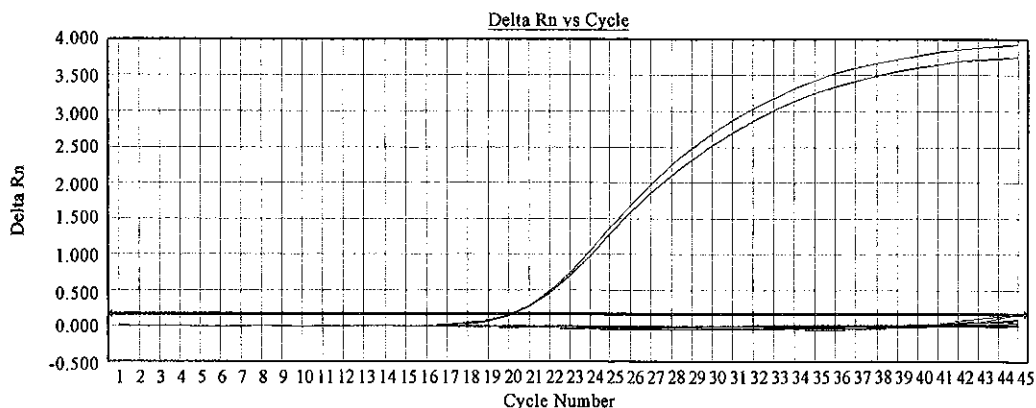


图 6 MHV 荧光定量 RT-PCR 特异性检测结果

(三) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将 MHV-RNA 用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ 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。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。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, 标准品在 1×10^8 copies/ μ L $\sim$ 1×10^1 copies/ μ L 之间具有良好的线性关系, 结果见图 8。其线性回归方程为 $Ct = -3.24 \times \lg(\text{拷贝数}) + 37.92$, 标准曲线斜率为 -3.20, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.20} - 1 = 1.054$,

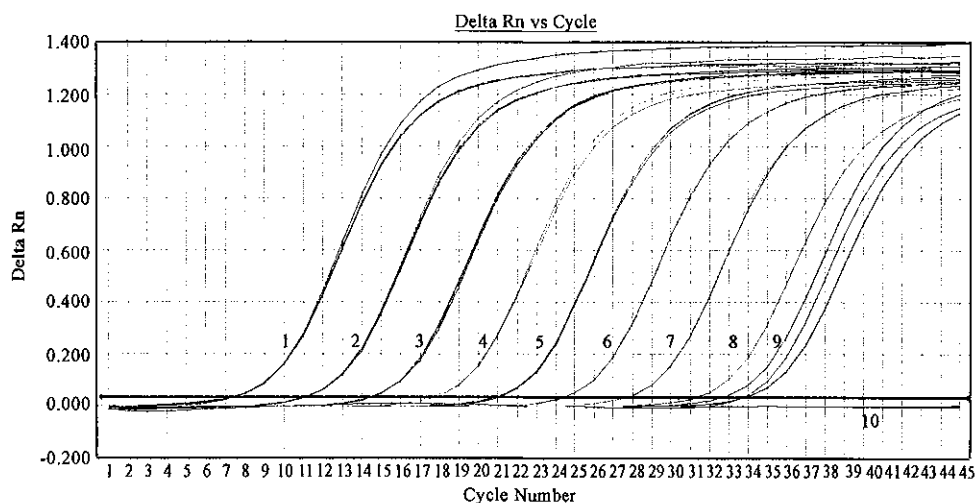


图 7 10 倍系列稀释标准品的荧光定量扩增曲线

1-9: 1×10^9 copies/ μ L 至 1×10^1 copies/ μ L 标准品, 10: 1×10^0 copies/ μ L 标准品和无模板对照

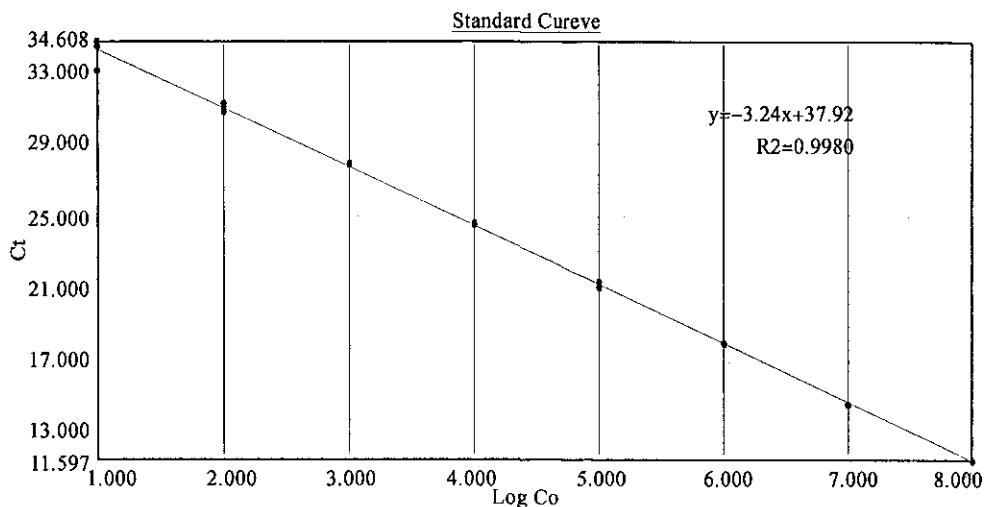


图 8 10 倍系列稀释标准品的标准曲线

即扩增效率为 105.4%，相关系数 $R^2=0.9980$ ，说明 PCR 扩增该标准品的效率较高，线性关系良好。标准品 $1 \times 10^0 \text{copies}/\mu\text{L}$ 无扩增曲线，故本方法检测的灵敏度为 $10 \text{copies}/\mu\text{L}$ 。

(四) 重复性试验结果

通过对 $1 \times 10^5 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $1 \times 10^3 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $2 \times 10^1 \text{copies}/\mu\text{L}$ 3 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 2%（表 4），表明建立荧光定量 RT-PCR 方法重复性好，方法稳定可靠。

表 4 MHV 荧光定量 RT-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								
2×10^1	33.15	34.05	34.22	34.16	33.79	33.87	0.44	1.29
1×10^3	30.68	31.16	31.23	31.07	31.36	31.10	0.26	0.83
1×10^5	20.63	21.08	21.54	21.23	21.15	21.13	0.33	1.55
批间								
2×10^1	33.27	34.28	33.88	34.52	34.35	34.06	0.50	1.47
1×10^3	31.21	30.58	31.65	31.33	31.89	31.33	0.50	1.59
1×10^5	21.02	20.78	21.33	20.84	21.32	21.06	0.26	1.23

(五) 荧光定量 PCR 在临床样本检测中的应用

1. 荧光定量 RT-PCR 在 MHV 人工感染样本检测中的应用

(1) 血清抗体阳性检出率

实验开始第 2 天和第 4 天显示抗体阳性检出率为 0，第 8 天开始，抗体检出阳性，阳性率为 5/5，直至第 8 周，实验结束抗体阳性率仍为 5/5。结果见表 5。

表 5 小鼠肝炎病毒抗体阳性率

时间	2d	4d	8d	14d	21d	28d	35d	42d	56d	84d
阳性率	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

(2) 各检测样本抗原阳性检出率

应用荧光定量 RT-PCR 方法对盲肠内容物、粪便、肝脏以及肺脏进行检测，结果表明（表 6）：在肺脏、肝脏、盲肠和粪便四个检测样本中，肺脏中早检出小鼠肝炎病毒，检出时间为实验开始的第 2 天，但检出率较低，为 1/5；随后，第 4 天，盲肠、粪便和肝脏也检出小鼠肝炎病毒，检出率肝脏为 3/5，其他脏器均为 5/5，因此，在首次检出时间上，肺脏作为检测样本不具备明显优势。从样本带毒的持续性来看，肝脏排毒时间稍短，第 8 周阳性检出率已降为 0/5，但肺脏、盲肠和粪便均可检出小鼠肝炎病毒。与血清学检测比较，PCR 检测可以检测病毒早期感染，而且，在 MHV 检测中，盲肠内容物/粪便应该是最佳的检测样本。

表 6 MHV 荧光定量 RT-PCR 检测结果

实验开始时间	肺脏	肝脏	盲肠	粪便
2d	1/5	0/5	0/5	0/5
4d	5/5	3/5	5/5	5/5
8d	5/5	1/5	5/5	5/5
14d	3/5	4/5	5/5	5/5
21d	1/5	1/5	3/5	4/5
28d	1/5	1/5	5/5	2/5
35d	1/5	4/5	4/5	1/5
42d	2/5	1/5	4/5	1/5
56d	1/5	0/5	5/5	3/5
84d	0/5	0/5	0/5	0/5

2. 荧光定量 RT-PCR 在临床样本检测中的应用

应用荧光定量 RT-PCR 检测方法对 2012~2014 年送检的 123 份 SPF 级小鼠盲肠内容物进行检测, 结果检出 5 份阳性, 阳性率为 4.1%。采用测序方法对阳性样本进行测序验证(图 9)。进一步验证了建立的检测方法正确有效。

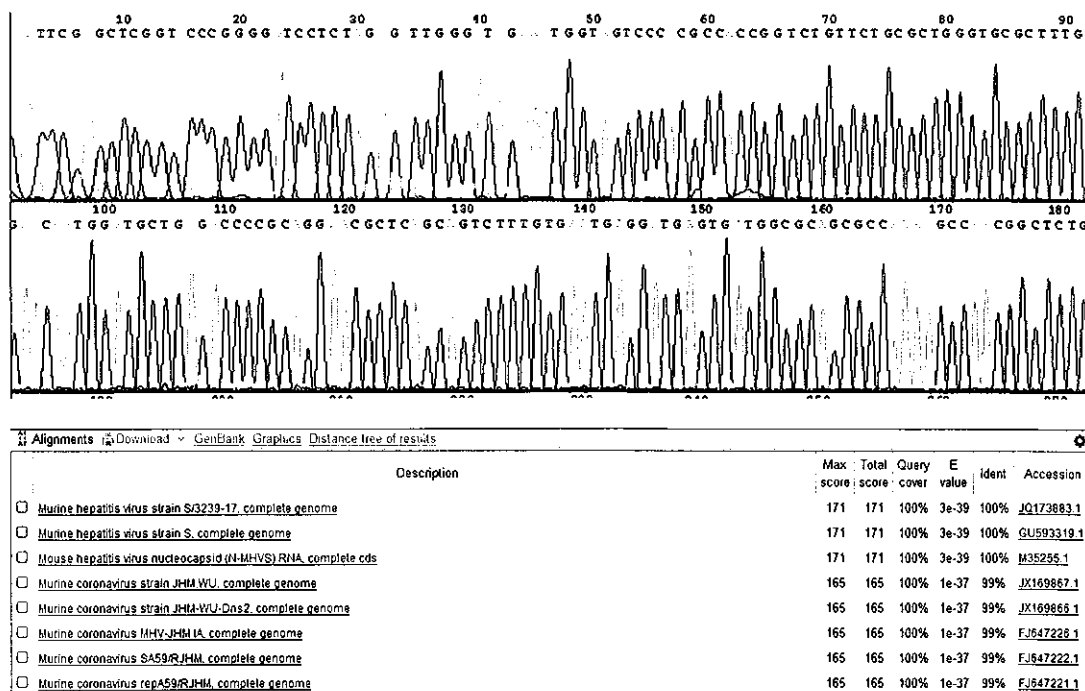


图 9 阳性样品测序图谱及序列 blast 结果

第七节 国内外同类标准分析

本标准在国内原创标准，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肝炎病毒 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、现行实验动物国家标准中已有小鼠肝炎病毒检测方法，本标准如何配合这些检测方法使用？

实验动物国家标准小鼠肝炎病毒检测方法（GB/T 14926.22—2001）规定了 ELISA、IFA 和免疫酶试验（IEA）三种血清学检测方法。这三种方法都是针对动物抗体进行检测，目前最常用的是 ELISA 和 IFA 检测方法，实际检测中 ELISA 可用于样本的大通量筛查，IFA 一般用做确认试验。

本标准中实时荧光 RT-PCR 检测方法为病原学检测方法，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。在实际检测中，如果出现可疑阳性样本，可以通

过测序方法进行最终验证,即取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定,序列结果与已公开发表的小鼠肝炎病毒特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90% 以上,可确诊待检样本小鼠肝炎病毒阳性,否则判定小鼠肝炎病毒阴性。

需要指出的是,血清抗体检测是诊断实验动物病毒感染的经典方法。本标准适用于不能通过血清抗体进行检测的样本快速检测,是实验动物质量控制必不可少的方法。

二、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如下。

(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。

三、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检测结果判定。

(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, 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, 并在随后变性这一步的条件下 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。

四、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。

五、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检测判定。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

- 邵伟娟, 高诚, 陈鸿书, 等. 2000. RT-PCR 方法在小鼠肝炎病毒检测中的应用. 上海实验动物科学, 20(3): 141-143.
- 邵伟娟, 高诚, 陆国平, 等. 2000. 小鼠肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立和比较研究. 中国实验动物学报, 8(1): 26-30.
- 田克恭. 1992. 实验动物病毒性疾病. 北京: 中国农业出版社, 76-83.
- 姚玉霞, 丛斌, 彭郁葱, 等. 1998. 逆转录 - 聚合酶链反应检测鼠肝炎病毒方法的建立. 中国实验动物学报, 6(2): 13-17.
- Barthold SW, Smith AL, Povar ML. 1985. Enterotropic mouse hepatitis virus infection in nude mice. Lab Anim Sci, 35(6): 613-618.
- Casebolt DB, Qian B, Stephensen CB. 1997. Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. Lab Anim Sci, 47(1): 6-10.
- GB 14922.2—2011 实验动物微生物学等级及监测.
- GB/T 14926.22—2001 实验动物 小鼠肝炎病毒检测方法.
- Homburger FR, Smith AL, Barthold SW. 1991. Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 29(12): 2789-2793.
- Huang DS, Emancipator SN, Fletcher DR, et al. 1996. Hepatic pathology resulting from mouse hepatitis virus S infection in severe combined immunodeficiency mice. Lab Anim Sci, 46(2): 167-173.
- Kunita S, Terada E, Goto K, et al. 1992. Sequence analysis and molecular detection of mouse hepatitis virus using the polymerase chain reaction. Lab Anim Sci, 42(6): 593-598.
- Wang RF, Campbell WL, Cao WW, et al. 1999. Diagnosis of mouse hepatitis virus contamination in mouse population by using nude mice and RT-PCR. Mol Cell Probes, 13(1): 29-33.
- Yamada YK, Yabe M, Takimoto K, et al. 1998. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. Exp Anim, 47(4): 261-264.
- Yamada YK, Yabe M, Yamada A, et al. 1993. Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection. Lab Anim Sci, 43(4): 285-290.