

第二十二章 T/CALAS 22—2017《实验动物 小鼠诺如病毒检测方法》实施指南

第一节 工 作 简 况

中国实验动物学会作为团体标准改革的试点单位，结合实际需求，提出了该标准的研究和撰写，由中国食品药品检定研究院和广东省实验动物监测所共同完成。

第二节 工 作 过 程

2015年12月编写组提出框架，2016年上半年完成标准草案的编写。2016年10月10日在广西召开的第十二届中国实验动物学会学术年会上征求与会专家意见，经修改成为征求意见稿。11月，经标委会公开征求意见，收集到反馈意见三条，经研究采纳吸收，形成送审稿。

2017年2月21日经过标准审查会议讨论，与会专家针对该标准提出了生物安全要求标准和荧光PCR名称规范等问题，均做了修改，形成标准报批稿。

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

诺如病毒（Norovirus）属于杯状病毒科，诺如病毒属，90%以上的非细菌传染性胃肠炎由该病毒引起。除了人以外，诺如病毒还发现于猪、牛和实验小鼠中。

诺如病毒有严格的种属性，小鼠诺如病毒（murine norovirus, MNV）是2003年由Karst等首次从实验中意外死亡的免疫缺陷小鼠（RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}）体内分离得到，是一种胃肠道病原体，经粪便排出，主要通过粪口途径传播，也可经呼吸道传播，小鼠经口感染MNV后可持续通过粪便向外排毒，在感染7天~8周均可检测到病毒核酸具有较强的持续性感染，污染设施很难通过检测和淘汰清除MNV。

MNV是目前实验小鼠中感染率最高的病毒，自MNV-1于2003年被发现并成功分离后，世界上许多地区相继发现该病毒并得到不同的分离株。无论在发达国家还是发展中国家，此病毒在实验动物设施中都有很高的感染率。Masaaki Kitajima等采用巢式RT-PCR对日本六个独立实验动物设施小鼠粪便样品进行检测，发现MNV阳性率为22%（8/37），

这是关于 MNV 在日本流行的首例报道。随后,有研究者对日本和美国普通级小鼠、SPF 级小鼠以及商业化实验小鼠中 MNV 的自然感染进行检测,数据显示 MNV 是实验用小鼠中感染率最高的病原体,其中,日本普通级小鼠 MNV 抗体阳性率为 67.3%,SPF 级小鼠为 39.1%,商业化 SPF 级 C57BL/6 实验小鼠为 20%,商业化美国普通级小鼠 MNV 抗体阳性率为 62.5%;韩国对 15 个场所的 745 份小鼠血清调查表明,供应商购买的小鼠阳性率为 6.6%,养殖场所阳性率为 9.6%,而基因修饰小鼠的阳性率高达 27.0%;西欧对 100 多个设施中实验大、小鼠流行的 24 种病毒及支原体检测结果显示,在小鼠群体中,MNV 是感染率最高的病原体,阳性率约为 31.8%,该结果与另一项对 42 000 多只小鼠 MNV 抗体阳性率结果(32.4%)基本一致。

2010 年,广东首次报道我国广东省实验小鼠携带有 MNV,携带率为 37.38 (77/206),且不同设施来源的病毒基因型有差异;北京地区对 600 只小鼠进行 ELISA 检测显示 MNV 感染率为 11.67%,其中,MNV 阳性小鼠主要来自实验设施(30.94%),商业供应小鼠感染率为 0.27%。MNV 在小鼠群体中易感可能与其传播途径及持续感染有关。中检院从北京一家实验动物使用单位分离到一株 MNV,经分析与原始株 MNV1 的同源性较高,并对 2014 和 2015 年来自全国 17 个实验动物生产和使用单位的实验小鼠进行了 MNV 的监测,MNV 抗体阳性率为 18.3% (204/1114),核酸阳性率为 34.8% (181/520)。

MNV 感染免疫缺陷小鼠会致其死亡,但对于不同的免疫缺陷动物,感染诺如病毒后症状有一定的差异:先天性免疫系统应答组分缺陷的小鼠,如信号转导子和转录激活子 1 缺陷(RAG-/-/STAT-/-)小鼠、I 型和 II 型干扰素受体同时缺陷(IFN 体同时缺陷 AT-/-)应答组分缺陷的小小鼠发生致死性感染,表现为体重减轻、竖毛和弓背等临床症状,组织病变主要包括脑炎、脑膜炎、脑脉管炎、肝炎和肺炎,但 RAG1-/-/RAG2-/- 小鼠感染 MNV 后仍能存活,在持续感染后 90 天时仍能检测到病毒存在,也就是说,在某些免疫缺陷动物体内 MNV 能够持续存在。

免疫功能正常的小鼠和大多数免疫缺陷小鼠感染后不表现临床症状和病理变化。但在进行小鼠实验的过程中,携带有 MNV 的小鼠可能会对实验结果产生影响。小鼠巨细胞病毒(MCMV)感染的小鼠模型感染 MNV 后,CD8+T 细胞应答免疫减弱,但并不影响 MCMV 效价也没有引起 MCMV 的再活化,表明 MNV 对小鼠体内 MCMV 的免疫应答会产生影响。另有报道表明 MNV 感染可加快肠炎小鼠模型的疾病进程,并可改变树突状细胞的抗原递呈活性。尽管免疫活性小鼠感染 MNV 的临床症状不明显,但该病毒疑似能够改变实验小鼠的表现型,主要是引起炎症和免疫反应。有研究表明 MNV 的共感染会对绿脓杆菌引起的小鼠急性肺炎产生保护作用,延长动物的存活期,减少体内促炎因子的产生,因而导致疾病模型的假阴性结果。

MNV 已被国际上的一些实验动物权威监管和检测机构如欧洲实验动物科学委员会(FELASA)、Charles River 实验室、杰克逊实验室等列为实验小鼠的常规必检项目,而我国的实验动物国家标准和其他地方标准均未涉及,为提高实验小鼠质量,适应我国目前的研究水平和应用要求,与国际接轨,亟须制定小鼠诺如病毒检测技术的相关标准。

第四节 编制原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则：

- (1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1 符合以下基的规定；
- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理，具有适用性和可操作性；
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

第五节 内容解读

本标准参考国内外相关的标准和技术文献，规定了小鼠诺如病毒的分离与鉴定、免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验、聚合酶链式反应（PCR）、实时荧光 PCR 法（染料法和探针法）等几种检测方法，基本覆盖了目前国际上检测小鼠诺如病毒的主流检测技术。病毒的分离和鉴定主要是检测病毒的抗原，是检测的“金标准”，但费时费力，影响因素较多，并且敏感性较低；免疫荧光试验和酶联免疫吸附试验用来检测小鼠诺如病毒的抗体，酶联免疫吸附试验可作为大量样本的筛查方法，免疫荧光试验主要用来对检测结果进行确认；PCR 技术包括普通 PCR 和荧光定量 PCR，作为检测病毒 RNA 的常用技术，荧光定量 PCR 检测敏感性高于普通 PCR，并且操作简便，降低了 PCR 产物污染的可能性，但成本较高。本标准规定了两种荧光定量 PCR 方法：染料法和探针法，染料法检测敏感性较高，特异性较低，探针法特异性较高。普通 PCR 方法可对 PCR 产物进行测序验证，并且成本较低。普通 PCR 又分为单次 PCR 和套式 PCR 两个方法，之所以加入两个方法，主要是考虑这两个方法的不同优缺点：单次 PCR 相对来说费时较短，但检测敏感度较低；套式 PCR 检测敏感性较高，但费时费力。实验室可根据检测的目的及实际情况来选择相应的检测方法。

每个方法的内容包括工作原理、主要试剂和器材、操作步骤、结果判定等，本标准对于试剂的要求没有描述得很详细，比如 PCR 方法的试剂，推荐购买知名试剂公司的产品，同时使用过程中需参考所用产品的说明来进行操作。

一、MNV 的分离培养

（一）材料

RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。

逆转录试剂购自 promega 公司。

PCR 试剂购自 Takara 公司。

RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞库，ATCC 编号为 TIB-71。

MNV 阳性样本：来自于平时送检小鼠，经 RT-PCR 方法筛查为 MNV 阳性。

（二）方法

1. 进行病毒分离样本的来源

用 RT-PCR 法进行 MNV 感染率调查过程中筛查到的阳性样本，无菌采集动物的盲肠

内容物,加入 10% (m/V) 的灭菌 PBS,震荡悬浮,12 000r/min 离心 10min,上清经 0.2 μ m 滤膜过滤除菌,直接接种细胞。

2. 细胞的接种

观察 RAW264.7 细胞生长情况,待细胞铺满培养瓶 60%~70% 时,倒弃培养液,加入 1mL 上述处理后的样本,转动培养瓶使含病毒的上清浸润细胞,置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱吸附 1h,加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,观察细胞病变情况。

3. 病毒的鉴定

待细胞出现病变,提取病变细胞的 RNA,经 RT-PCR 扩增,产物送上海生工测序鉴定。

4. 病毒全基因组序列测定

MNV 感染的细胞液,提取 RNA 后,送上海英骏公司,参考 MNV-1 株 (AY228235) 的基因组序列,通过分段 PCR 扩增并测序,然后通过软件拼接得到病毒基因全长序列。

(三) 结果

1. 病毒的分离

含病毒的阳性样本上清接种 RAW264.7 细胞,培养 72h 后出现细胞病变,如图 1 所示,正常细胞呈椭圆形,大小均一,边界清楚,分布均匀;而出现病变的细胞呈聚集生长,形状不规则,细胞核出现固缩。

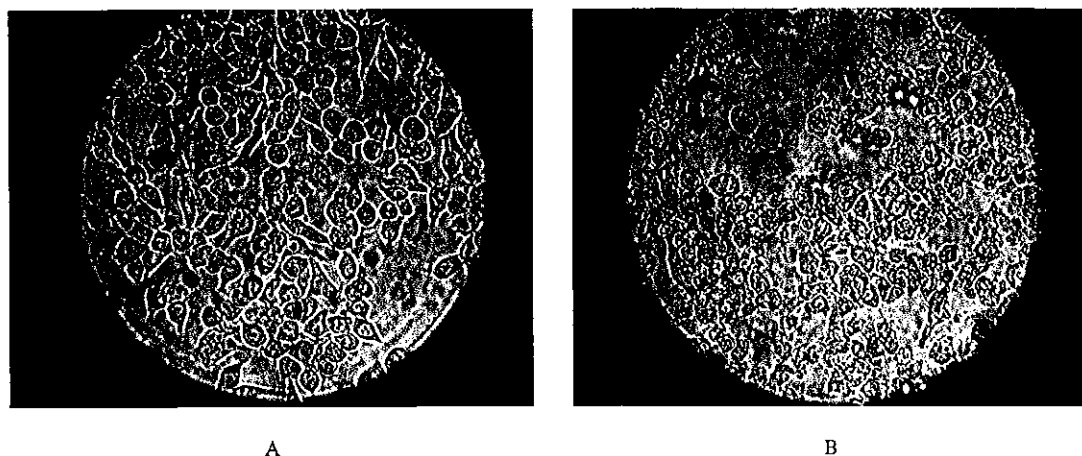


图 1 正常及 MNV 上毒的 RAW264.7 细胞

A: 正常 RAW264.7 细胞; B: MNV 感染 72h 后的 RAW264.7 细胞

2. 毒种的鉴定

病毒感染的 RAW264.7 细胞提取 RNA 后经 RT-PCR 扩增,产物测序,与 NCBI 基因库比对证实为 MNV。

3. 毒种全基因组序列测定

MNV 感染的细胞液,提取 RNA 后,送上海英骏公司,参考 MNV-1 株 (AY228235) 的基因组序列,通过分段 PCR 扩增并测序,然后通过软件拼接得到病毒基因全长序列。所用引物见表 4。本毒株基因组全长 7381bp,经与 NCBI 基因库比对发现,该毒株与美国 GV/CR4/2005/USA 株同源性最高,核苷酸一致率达 93%。将该毒株命名为 BJ10-2062。

二、MNV 的免疫荧光 (IFA) 检测法

(一) 材料和方法

1. 病毒及样品

小鼠诺如病毒 (MNV) BJ10-2062 株由中国食品药品检定研究院实验动物质量检测室分离并保存; 100 份小鼠血清为 2014 年 10 月北京市实验动物会检送检小鼠。

2. 主要试剂

RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞库, 目录号: TCM13; FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 为 KPL 产品; MNV 抗体阳性小鼠血清为免疫所得, MNV 阴性血清为 SPF 级小鼠血清; 荧光显微镜, 恒温水浴箱等。

3. 抗原片的制备

RAW 细胞为贴壁生长, 胰酶消化, 吹打, 灭菌 PBS 洗 3 遍后滴片, 丙酮固定 15min, 风干后锡箔纸包好置 -70°C 备用。

4. 免疫荧光操作步骤

加样: 取出抗原片, 室温干燥后, 将 1:10 稀释的待测血清、阴性对照血清、阳性对照血清分别滴于抗原片上, 每份血清分别加 2 个 MNV 抗原孔, 置湿盒内, 37°C 30min。

洗涤: PBS 洗 3 次, 每次 5min, 室温干燥。

加抗体: 将 1:300 稀释的荧光抗体滴加于抗原片上, 置湿盒内, 37°C 30min, 洗涤同步骤 2。

观察: 滴加 50% 甘油 PBS, 盖玻片封片, 荧光显微镜下观察。

5. 特异性的试验

以小鼠肝炎病毒和仙台病毒阳性血清做对照, 验证方法的特异性。

6. 敏感性的试验

将阳性血清进行倍比稀释, 验证方法的敏感性。

7. 稳定性和重复性实验

将 MNV 抗原片及相关试剂于 -70°C 冰箱放置 3 个月、6 个月时, 进行检测。2 次试验各做 3 个重复。

8. 初步应用

用建立的 MNV 免疫荧光法检测 100 份小鼠血清。

(二) 结果

1. MNV 免疫荧光检测方法的建立

由图 2 可见, MNV 阳性血清在荧光显微镜下显示绿色荧光, 阴性血清没有荧光出现。

2. 特异性验证

MNV 制备的抗原片与小鼠肝炎病毒、小鼠仙台病毒的阳性血清反应未出现特异荧光, 说明本方法特异性较好。

3. 敏感性试验

MNV 阳性血清分别 1:10、1:20、1:40、1:160、1:320、1:640 倍比稀释, 在荧

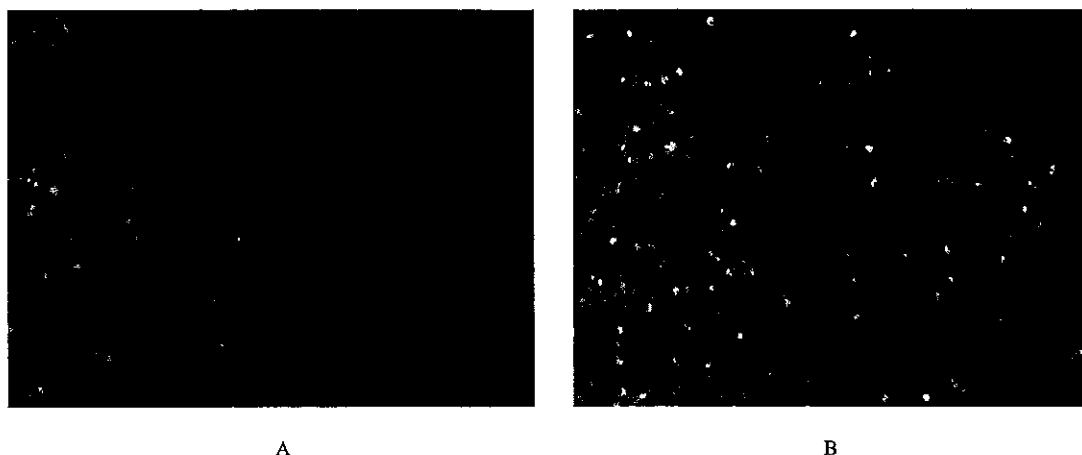


图 2 MNV 免疫荧光结果
A: MNV 阴性血清 B: MNV 阳性血清

光显微镜下能观察到荧光的最大稀释度为 1 : 160。

4. 重复性试验

将 MNV 抗原片及相关试剂于 -70℃ 冰箱放置 3 个月、6 个月时再次试验，荧光显微镜下观察仍显示明显荧光。

5. 初步应用

用建立的免疫荧光法检测 2014 年 10 月北京市实验动物会检的 100 份小鼠血清，结果均为阴性。

三、MNV 的间接酶联免疫吸附试验（ELISA）

（一）材料

1. 菌株和质粒

感受态大肠杆菌 DH5 α	鼎国昌盛
表达宿主大肠杆菌 transetta	北京全式金
pET32a (+) 质粒	Novagen 公司
pMD19-T simple vector	TAKARA

2. 小鼠血清样本

2014~2015 年来自 13 个送检单位的小鼠血清 1445 份。

3. 实验动物

KM 小鼠，8 周龄，SPF 级，雌雄各半，购自中国食品药品检定研究院实验动物供应室。

4. 免疫小鼠制备抗血清

用 MNV 免疫小鼠的方法获得抗 MNV 阳性血清。选 KM 小鼠进行基础免疫及加强免疫。第一次免疫阶段 MNV 抗原量为 50 μ g，每只小鼠每次注射 0.3mL，其中，病毒稀释液与弗氏完全佐剂 1 : 1 混合。注射部位：腹腔注射 0.2mL，肌肉注射 0.1mL。两周后进

行加强免疫,加强免疫时,病毒稀释液与弗氏不完全佐剂 1:1 混合,病毒量及注射部位同上。再加强免疫三次后,毛细管眼球取血测滴度后,摘眼球取血,得到抗 MNV 的阳性血清。

(二) 方法

1. MNV 全病毒的纯化、抗原的表达见硕士论文“小鼠诺如病毒检测方法的建立及感染特征研究”。

2. ELISA 检测方法的建立

将 MNV 阴性血清、阳性血清、包被抗原(纯化的全病毒和表达的重组抗原 MNV-VP1)、HRP 标记的羊抗小鼠二抗进行梯度稀释,用方阵滴定法确定每种成分的最适工作浓度:阴性对照血清与重组抗原反应的 OD492 值 <0.2 ,阳性对照血清与重组抗原反应的 OD492 值 >1.0 ,以阳性对照 OD492/阴性对照 OD492 (P/N) 值最大的抗原包被浓度、血清稀释度和酶结合物浓度作为 ELISA 最佳实验条件。具体的操作步骤如下。

(1) 将抗原及 RAW264.7 细胞对照以 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $3\mu\text{g/mL}$ 、 $5\mu\text{g/mL}$ 浓度包被抗原板,每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 温箱放置 1h。 4°C 过夜。弃液体,用洗涤液 1 夜。弃液(含 0.1% 吐温)洗 5 次,每次间隔 1min。

(2) 扣干板后,每孔加入用稀释液 0.5%BSA(用 1 用 A 后,配制) 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:120, 1:140, 1:160 系列稀释的抗血清 $100\mu\text{L}$, 37°C 温育 1h。弃液。

(3) 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 用稀释液 1:5000、1:10 000、1:20 000、1:40 000 倍比稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗, 37°C 温育 1h。弃液体,洗涤液洗 5 次,扣干。

(4) 每孔加入底物, 37°C 温育 10min。

(5) 每孔加入 $50\mu\text{L}$ 终止液(2mol/L H_2SO_4),用酶标仪测 A492,按国际判定标准对结果进行判定。

3. ELISA 检测方法的评价

(1) ELISA 检测方法精密度评价

取 MNV 阳性血清和阴性血清各一份,分别做 48 个重复,计算阳性血清与阴性血清 A492 平均值和标准差。

(2) ELISA 检测方法重复性评价

从样品中随机盲抽小鼠血清 64 份,分批次重复测 3 次,计算 3 次的符合率。

(3) ELISA 检测方法灵敏性评价

选取 MNV 阳性血清自 1:40 起倍比稀释(1:40、1:80、1:160、1:320、1:640),确定能检出阳性结果的血清最高稀释度。

(4) ELISA 检测方法稳定性评价

将重组抗原以 $3\mu\text{g/mL}$ 包被 16 块抗原板,封板后置于 37°C 培养箱中,于第 0~15 天各取一块板置于 4°C ,16 天后检测同一份阳性血清和阴性血清,比较不同时间的检测结果。

(5) 重组抗原 ELISA 试剂盒比对

从样品中随机盲抽小鼠血清 88 份,用本实验建立的重组抗原 ELISA 方法和两种国外鼠诺如病毒检测试剂盒 SMART-M35 (Biotech Trading Partners)、XpressBio (Life Science

Products) 同时进行检测, 比较三者检测结果的符合率。

4. ELISA 检测方法的初步应用

从 2014~2015 年送检小鼠血清中随机抽取 1445 份血清, 用建立的 ELISA 方法进行检测。

(三) 结果

1. 重组抗原及全病毒纯化抗原浓度的测定

紫外分光法测定 OD_{260} 及 OD_{280} , 代入公式 $1.45 \times OD_{260} - 0.74 \times OD_{280}$, 得出重组抗原浓度为 1.25mg/mL, 全病毒纯化抗原浓度为 7.5mg/mL。

2. ELISA 检测方法的建立

采用棋盘滴定法, 用一个批次的 MNV 免疫阳性和阴性血清对照, 确定抗原的最佳工作条件: 抗原包被浓度、血清稀释度和酶标二抗的稀释度。经 ELISA 检测, 结果显示纯化的 MNV BJ10-2062 全病毒与正抗 RAW264.7 细胞有非特异性结合, 检测结果可能出现假阳性, 不能直接包被用于 MNV 抗体检测。而重组抗原 MNV-VP1 特异性强, 且与抗体的亲和力较强, 因此, 选用重组抗原 MNV-VP1 作为包被抗原用于 MNV 抗体检测。棋盘滴定法确定 MNV-VP1 重组抗原 ELISA 检测方法的最佳实验条件为: 抗原包被浓度 $3\mu\text{g/mL}$ 、血清稀释度 1 : 40, 酶标二抗的稀释度 1 : 20 000 (表 1)。

表 1 MNV-VP1 重组抗原 ELISA 检测方法的最佳实验条件

抗原名称	包被抗原浓度	血清稀释度	羊抗小鼠二抗稀释度
MNV-VP1	3NV-VP	1 : 40	1 : 20 000

3. ELISA 检测方法的评价

(1) ELISA 检测方法精密度评价

取 MNV 阳性血清和阴性血清各一份, 各检测 48 个孔, 分别计算平均值和标准差。结果见表 2, 分析可知, 建立的 MNV-VP1 重组抗原 ELISA 检测方法具有较高的精密度。

表 2 ELISA 检测精密度实验

	MNV-VP1	
	阳性血清	阴性血清
平均值 (x)	1.620 6	0.041 2
标准差 (SD)	0.063 9	0.020 6
x.020	1.316 308	0.095 76
	1.795 484	0.169 136

(2) ELISA 检测方法重复性评价

从样品中随机盲抽小鼠血清 64 份, 分批次重复测 3 次, 计算 3 次的符合率, 结果见表 3, 63 号血清三次检测结果有差异, 符合率为 98.4% (63/64), 表明该方法具有良好的重复性。

表3 ELISA 检测重复性实验

血清号	第一次	第二次	第三次	血清号	第一次	第二次	第三次
1	+	+	+	33	+	+	+
2	+	+	+	34	+	+	+
3	+	+	+	35	+	+	+
4	+	+	+	36	+	+	+
5	+	+	+	37	+	+	+
6	-	-	-	38	-	-	-
7	+	+	+	39	+	+	+
8	+	+	+	40	+	+	+
9	+	+	+	41	+	+	+
10	+	+	+	42	+	+	+
11	+	+	+	43	-	-	-
12	+	+	+	44	+	+	+
13	-	-	-	45	+	+	+
14	+	+	+	46	+	+	+
15	+	+	+	47	+	+	+
16	+	+	+	48	+	+	+
17	-	-	-	49	+	+	+
18	+	+	+	50	+	+	+
19	+	+	+	51	+	+	+
20	+	+	+	52	+	+	+
21	+	+	+	53	+	+	+
22	+	+	+	54	+	+	+
23	+	+	+	55	+	+	+
24	+	+	+	56	+	+	+
25	+	+	+	57	+	+	+
26	+	+	+	58	+	+	+
27	+	+	+	59	+	+	+
28	-	-	-	60	+	+	+
29	-	-	-	61	+	+	+
30	+	+	+	62	+	+	+
31	-	-	-	63*	+	+	-
32	+	+	+	64	+	+	+

* 表示3次测定不符的样本。

(3) ELISA 检测方法灵敏性评价

选取 MNV 阳性血清自 1 : 40 起倍比稀释 (1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640……), 检测结果如图 3 所示, 当 MNV 阳性血清稀释至 1 : 1280 时, 其 OD₄₉₂ 为 0.286, 仍为阳性, 表明建立的 ELISA 方法灵敏度高。

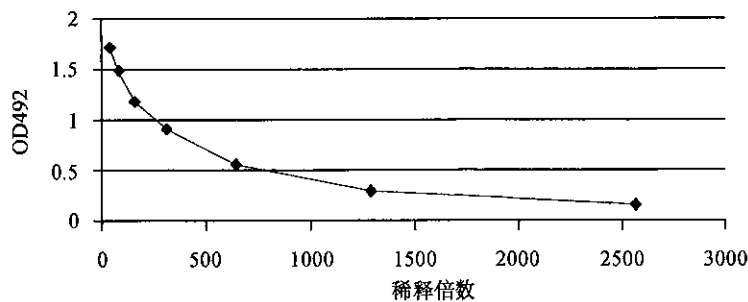


图 3 ELISA 检测方法灵敏度实验

(4) ELISA 检测方法稳定性评价

第 0~15 天 ELISA 检测数据如表 4 所示, 结果显示 0~15 天阳性血清 OD₄₉₂ 由 1.902 衰减到 1.685, 表明建立的 ELISA 方法具有较好的稳定性。

表 4 ELISA 检测稳定性实验

时间	OD ₄₉₂		时间	OD ₄₉₂	
	阳性血清	阴性血清		阳性血清	阴性血清
0d	1.902	0.007	8d	1.729	0.015
1d	1.904	0.005	9d	1.74	0.002
2d	1.789	0.002	10d	1.746	0.001
3d	1.801	0.001	11d	1.782	0.005
4d	1.783	0.014	12d	1.75	0.002
5d	1.813	0.005	13d	1.776	0.002
6d	1.782	0.001	14d	1.767	0.001
7d	1.715	0.002	15d	1.685	0.002

(5) 重组抗原 ELISA 试剂盒比对

采用本实验建立的重组抗原 ELISA 方法和两种国外鼠诺如病毒检测试剂盒 SMART-M35 (Biotech Trading Partners)、XpressBio (Life Science Products) 同时检测 88 份小鼠血清, 三者检测结果见表 5, 7 号、33 号、34 号、48 号、69 号、74 号样品三种方法检测结果不符合。检测结果显示本实验建立的重组抗原 ELISA 检测方法 with XpressBio 试剂盒检测结果的符合率为 93.2% (82/88), 与 SMART-M35 试剂盒检测结果的符合率为 96.6 (85/88), 三种检测方法的符合率为 93.2% (82/88), 表明本实验建立的 ELISA 方法检测结果可靠, 可以用于小鼠诺如病毒抗体的检测。

表 5 ELISA 检测试剂盒比对

血清号	A	B	C	血清号	A	B	C	血清号	A	B	C
1	+	+	+	31	+	+	+	61	-	-	-
2	+	+	+	32	+	+	+	62	-	-	-
3	+	+	+	33*	+	-	-	63	-	-	-
4	+	+	+	34*	+	-	-	64	-	-	-
5	+	+	+	35	+	+	+	65	-	-	-
6	+	+	+	36	+	+	+	66	-	-	-
7*	-	+	-	37	+	+	+	67	-	-	-
8	+	+	+	38	+	+	+	68	-	-	-
9	+	+	+	39	+	+	+	69*	-	+	-
10	+	+	+	40	+	+	+	70	-	-	-
11	+	+	+	41	+	+	+	71	-	-	-
12	+	+	+	42	+	+	+	72	-	-	-
13	+	+	+	43	+	+	+	73	-	-	-
14	+	+	+	44	+	+	+	74*	-	+	-
15	+	+	+	45	-	-	-	75	-	-	-
16	+	+	+	46	-	-	-	76	-	-	-
17	+	+	+	47	-	-	-	77	-	-	-
18	+	+	+	48*	-	+	+	78	-	-	-
19	+	+	+	49	-	-	-	79	-	-	-
20	+	+	+	50	-	-	-	80	-	-	-
21	+	+	+	51	-	-	-	81	-	-	-
22	+	+	+	52	-	-	-	82	-	-	-
23	+	+	+	53	-	-	-	83	-	-	-
24	+	+	+	54	-	-	-	84	-	-	-
25	+	+	+	55	-	-	-	85	-	-	-
26	+	+	+	56	-	-	-	86	-	-	-
27	+	+	+	57	-	-	-	87	-	-	-
28	+	+	+	58	-	-	-	88	-	-	-
29	+	+	+	59	-	-	-				
30	+	+	+	60	-	-	-				

* 表示 3 次测定不符的样本

A、B、C 分别代表本实验建立的重组抗原 ELISA 检测方法、XpressBio、SMART-M35 ELISA 检测方法。

4. ELISA 检测方法的初步应用

从 2014~2015 年送检小鼠血清中随机抽取 1445 份血清，用重组抗原 ELISA 方法进行检测，并对筛出的阳性血清进行复检。ELISA 法共检测 1445 份小鼠血清，检出阳性血清 583 份，阳性率达 40.35%，其中，普通级为 100%（23/23），清洁级为 60.53%（184/304），SPF 级为 33.63%（376/1118）。小鼠阳性血清样本的 OD₄₉₂ 值分布状况如图 4。

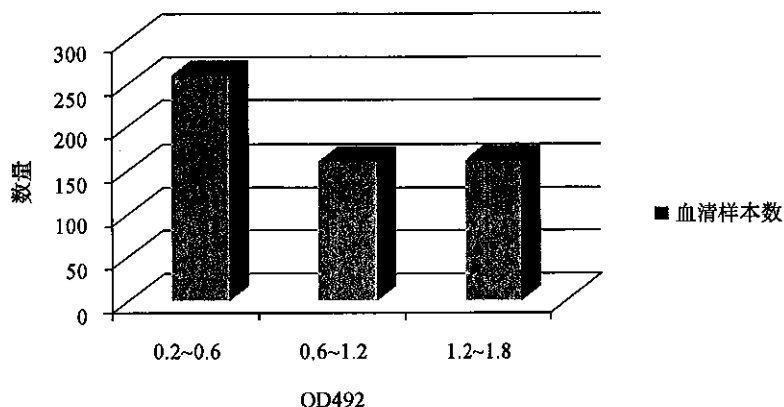


图 4 ELISA 法检测小鼠阳性血清 OD₄₉₂ 分布状况

5. 与 MNV 抗体的间接免疫荧光检测法比较

（1）荧光显微镜下观察结果见图 5，RAW264.7 细胞对照无荧光出现，也未观察到荧光背景干扰。阳性血清的 IFA 检测可见绿色荧光，且细胞形态完整，荧光分布在细胞胞浆。阴性血清的 IFA 检测结果为红色细胞，可见少量非特异荧光，为典型的 IFA 检测阴性表现。结果表明所建立的鼠诺如病毒抗体的间接免疫荧光检测方法效果较好。

（2）应用所建立的间接免疫荧光方法对 ELISA 检测筛查过的 100 份阳性血清及 100 份阴性血清进行复检。结果显示阳性血清的符合率为 100%（100/100），阴性血清的符合率为 98%（98/100），其中有 2 份阴性血清的免疫荧光结果显示弱阳性，应判定为阳性。结合 ELISA 和免疫荧光结果可知两种检测方法的灵敏度存在一定差异，ELISA 可作为 MNV 抗体检测的初筛方法，当测得到 A492 位于临界值时，可利用免疫荧光方法进行验证，最终判定血清检测结果。

四、MNV 核酸的实时荧光 PCR 检测方法（qPCR）

（一）材料

1. 菌株和质粒

质粒标准品委托 TAKARA 公司合成，将序列连接至 pMD19-T simple 载体上，并保存于大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。

2. 毒株、细胞和培养基

鼠诺如病毒 BJ10-2062（MNV-1 BJ10-2062）

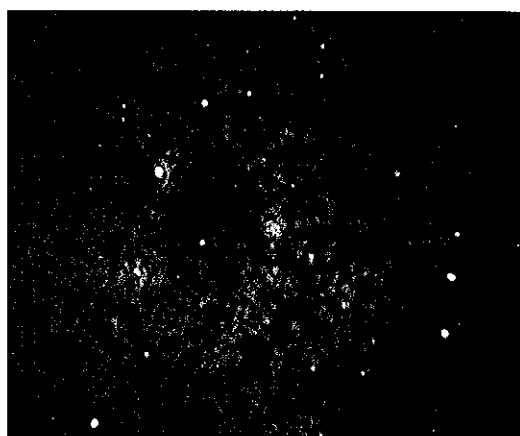
本实验室保存

鼠诺如病毒 -1 CW1（MNV-1 CW1）

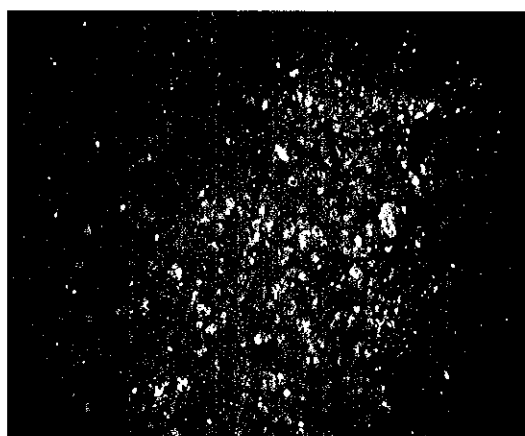
购自 ATCC（PTA-5935）



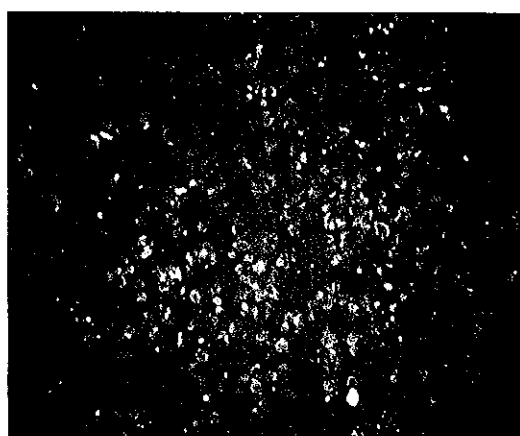
RAW264.7 细胞对照



阴性血清



阳性血清 (二抗 1 : 100)



阳性血清 (二抗 1 : 200)

图 5 鼠诺如病毒间接免疫荧光结果

猫杯状病毒 (FCV)

人类诺如病毒 (HuNoVs)

RAW264.7 细胞

DMEM (1mol/L) 培养基

3. 试剂盒

RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit)

RNA 提取试剂盒 (Cador® Pathogen 96

Qiacube® HT Kit)

由哈尔滨兽医研究所惠赠

由中检院肠道病毒室惠赠

购自 ATCC (TIB-71)

购自 GIBCO

购自德国 Qiagen 公司

购自德国 Qiagen 公司

(二) 方法

1. 病毒 RNA 的提取

将 MNV 的细胞培养液反复冻融三次, 12 000r/min 离心 5min, 收集上清。按试剂盒操作提取 RNA。

2. 病毒 RNA 逆转录

MNV 为 RNA 病毒, RNA 易降解, 本实验为两步法荧光定量检测方法, 需要经过反转录成 cDNA 再进行反应。通过优化随机引物、模板量及逆转录酶浓度等, 确定逆转录体系及条件, 于冰浴中加入表 6 所示试剂。

表 6 qPCR 反应体系

反应体系	体积
5× 反转录酶缓冲液	5μL
无 RNase 水	6.5μL
dNTP mixture (2.5mmol/L each)	4μL
随机引物	1μL
RNA	8μL
AMV 反转录酶 (10U/μL)	0.5μL
总体积	25μL

注: 其反应条件为: 37℃ 90min, 72℃ 15min, 4℃ 5min。

3. 标准阳性质控品的制备

委托 TAKARA 公司将 MNV BJ10-2062 基因保守区域 (5018~5450nt) 连接至 pMD19-T simple vector 构建标准阳性质控品, 该片段包含引物所要扩增的片段并可进行熔解曲线分析。连接完成后, 将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α, 挑取阳性克隆并测序鉴定。过夜培养阳性克隆菌, 提取质粒, 用紫外分光光度计测定 A260nm 和 A280nm OD 值, 计算质粒浓度并分装保存于 -20℃。

4. 引物的设计

在 NCBI 获取现有的 60 个 MNV 分离株全基因组序列并进行序列比对, 分析其共有序列, 采用 ABI Primer Express 3.0 实时荧光定量 PCR 引物设计软件, 设计扩增用引物 4 对, 从扩增效率、特异性、灵敏度等方面分析, 选择最佳引物 MNV-4F、MNV-4R。引物由美国 ABI 公司合成。序列如表 7 所示:

表 7 qPCR 所用引物

引物	引物序列 (5'-3')	序列位置	扩增子大小 (bp)
MNV-4F	CAGGAAYGCTCAGCAGTCTTTGT	5031~5053	126
MNV-4R	GGYTGAATGGGGACGGC	5140~5156	

5. qPCR 扩增体系及标准曲线的建立

(1) 优化 qPCR 反应体系中的引物、模板、PCR MIX 浓度, 确定最佳反应体系, 设定不同的退火温度, 确定最佳反应条件, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法。

在反应管中按表 8 所示体系加样, 每个样品做三个重复。

表 8 qPCR 优化反应体系

反应体系	体积
SYBR Premix Ex Taq GC (2x)	10 μ L
PCR 正向引物 (10mmol/L)	0.4 μ L
PCR 反向引物 (10mmol/L)	0.4 μ L
ROX Reference Dye II (50X)	0.4 μ L
模板	2 μ L
RNase free water	6.8 μ L
总计	20 μ L

注：反应条件为：95℃预变性 30s；然后 95℃ 10s，60℃ 30s，共 40 个循环，在每个循环延伸结束时采集荧光信号，最后进行熔解曲线分析。

(2) 用含有目的片段的质粒 pMD19-T simple vector 作为标准品，将其 10 倍梯度稀释，做 9 个稀释度 (1.1×10^9 10 倍梯度稀释至 1.1×10^1 copies/ μ L)，作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应，建立标准曲线。每个稀释度做三个重复。

6. 鼠诺如病毒 qPCR 检测方法特异性、重复性和稳定性试验评价

以猫杯状病毒 (FCV)、人类诺如病毒 (HuNoVs) 及 RAW264.7 细胞为对照，检测鼠诺如病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性；用实时荧光定量 PCR 检测方法对 1.1×10^6 、 1.1×10^5 、 1.1×10^4 copies/ μ L 三种浓度标准质粒进行重复性和稳定性试验评价。每个浓度的标准质粒重复 3 个批次，每个批次做 5 个重复，计算试验内、试验间变异系数。qPCR 检测的反应体系及反应条件与实验方法 5-(1) 相同。

7. qPCR 检测方法灵敏度检测

将质粒标准品作为模板，用 DEPC 水 10 倍梯度稀释成 $1.1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^0$ copies/ μ L，进行荧光定量 PCR 反应，反应体系及反应条件与实验方法 5-(1) 相同，每个浓度标准品做 3 个重复。所能检测的最小浓度的循环阈值 (CT) ≤ 35 ，据此得出该方法的检测灵敏度。文献报道的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法的检测限为 1×10^2 copies/ μ L。

8. qPCR 方法的初步应用

利用所建立的 qPCR 方法检测来自北京 9 个送检单位的 766 份小鼠样品。取小鼠盲肠内容物样品于 500 μ L PBS 溶液中，涡旋振荡，12 000r/min 离心 5min，取上清，用全自动核酸提取仪提取 RNA，逆转录后以 cDNA 为模板进行检测。每次设 $10^8 \sim 10^1$ copies/ μ L 标准品及 RAW264.7 细胞阴性对照，各样品均做三个重复，以确定该方法的准确性。

判断标准：建立的标准曲线参数 slope 在 $-3.5 \sim -3$ ， $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在 90%~110%，可以判定实验成立，建立的方法可用于定量检测。

阳性判定标准：样品循环阈值 (CT) < 35 ，判定该样品为阳性；循环阈值 (CT) ≤ 35 ，不能确定被检样品是阳性样品，结果判定为阴性。

(三) 结果

1. 构建 pMD19-T simple vector 重组质粒

(1) 重组质粒经测序鉴定，测序结果与 MNV BJ20-2062 分离株核苷酸序列进行比对，

符合率为 100%。表明标准阳性指控品构建成功, 可以作为 MNV 荧光定量 PCR 检测用阳性标准品。

(2) 根据公式 $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{base pairs} \times 660)$, 计算质粒标准品浓度为 $7.9 \times 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$, 取出部分样品稀释至 $1.1 \times 10^9 \text{ copies}/\mu\text{L}$, 分装保存于 -20°C 。

2. qPCR 扩增体系及标准曲线的建立

(1) 优化反应体系及反应条件, 得到扩增曲线结果如图 6。其循环阈值 (CT) 为 20.03, 拷贝数为 $2.59 \times 10^5 \text{ copies}/\mu\text{L}$, 分析其熔解曲线 (图 7), 可知熔解曲线为单峰, 无非特异性反应。

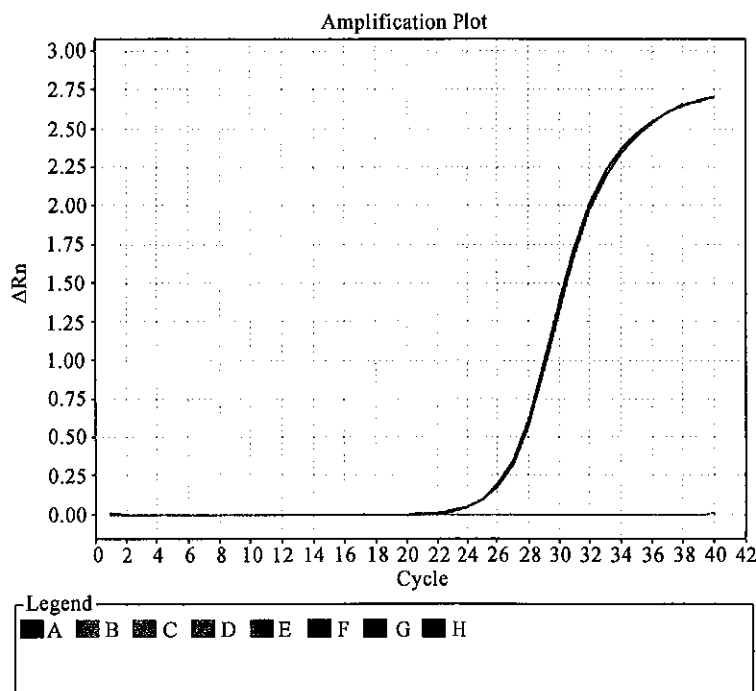


图 6 MNV 荧光定量 PCR 扩增曲线

(2) 用含有目的片段的质粒 pMD19-T simple vector 作为标准品, 将其 10 倍梯度稀释 ($1.1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$), 以倍比稀释的标准质粒为模板进行 qPCR 反应, 得到阳性质控品的扩增曲线和标准曲线。扩增曲线 (图 8) 各稀释梯度间距均等, 扩增效率为 98.32%。标准曲线 (图 9) 的线性范围是 $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$, 线性相关系数 slope 为 -3.216, R2 值为 0.998, 表明标准曲线线性相关性高, 定量结果有效、可靠。建立的标准曲线参数符合标准的规定范围, 可用于定量检测。

3. 鼠诺如病毒 qPCR 检测方法特异性、重复性和稳定性试验评价

(1) qPCR 检测方法特异性试验评价

分别以 MNV BJ10-2062、HuNoVs、FCV 及 RAW264.7 细胞核酸提取物为模板进行荧光定量 PCR 反应, 结果如图 10 所示, 可以看出以 MNV BJ10-2062 为模板会出现明显的扩增曲线, 而以 HuNoVs、FCV 及 RAW264.7 细胞核酸提取物为模板, 扩增曲线为直

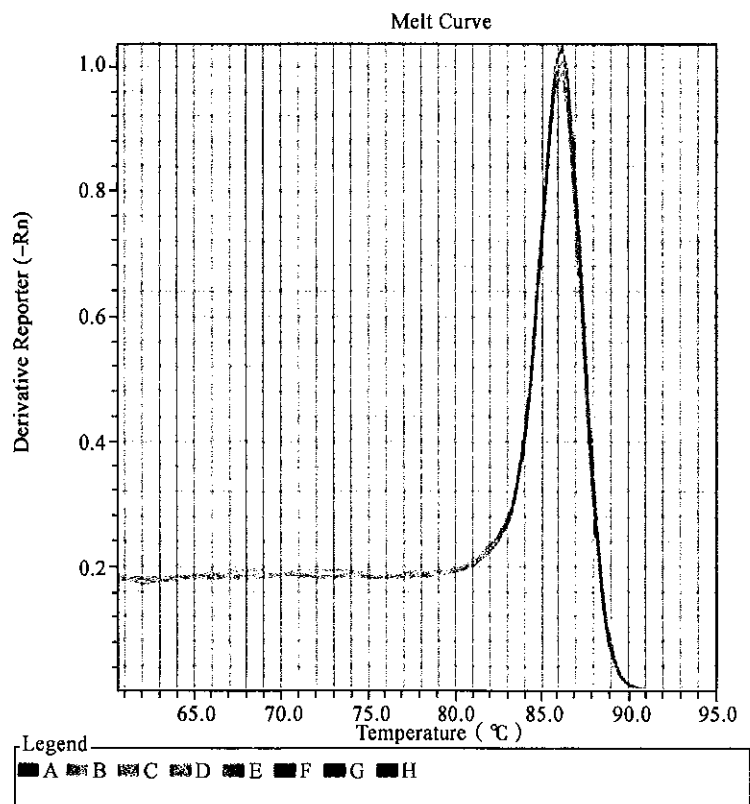
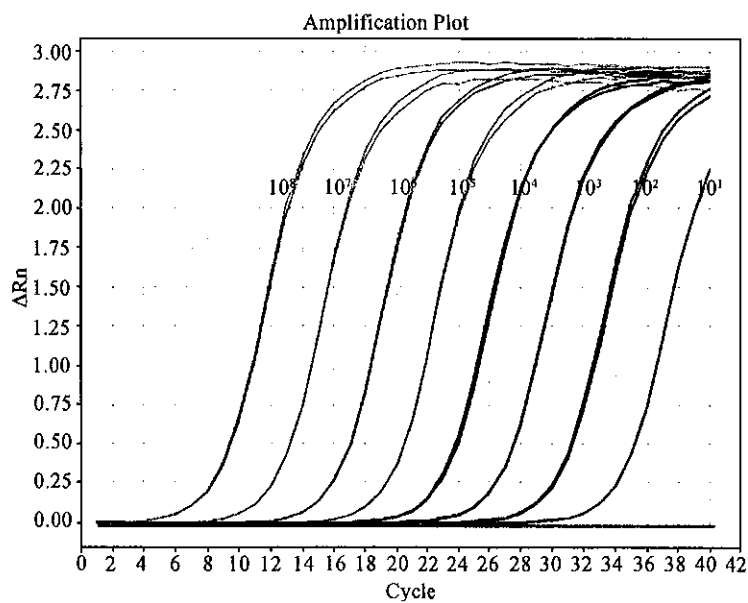


图7 MNV 扩增熔解曲线

图8 $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^1$ copies/ μ L 标准质粒扩增曲线

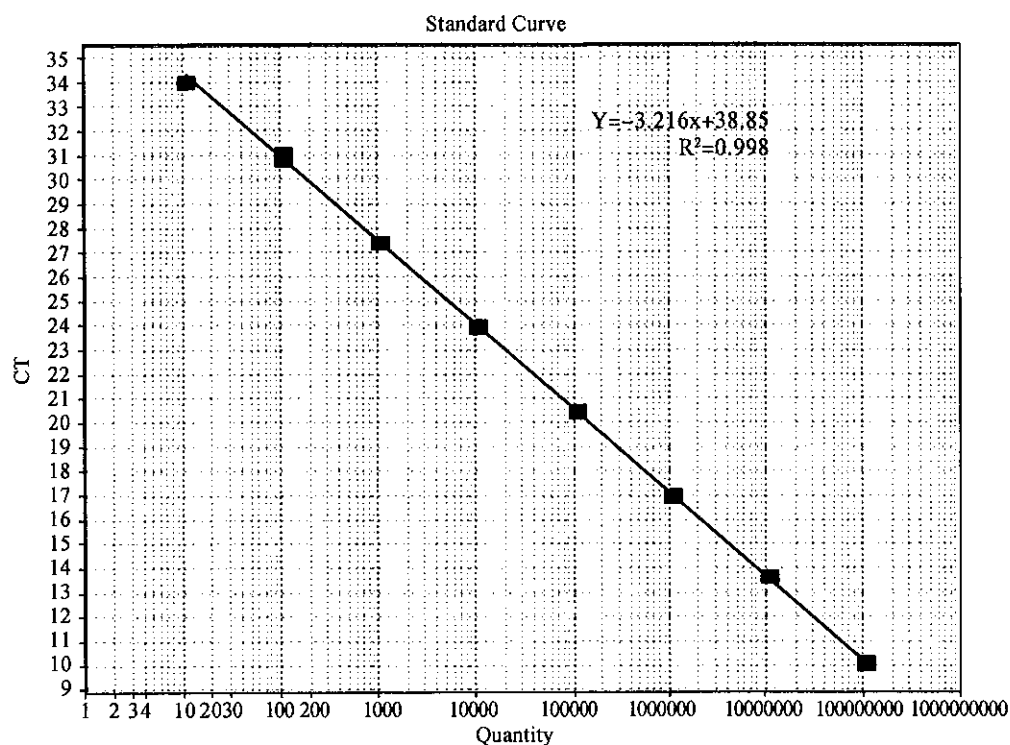


图9 $1.1 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^3$ copies/ μ L 标准质粒的标准曲线

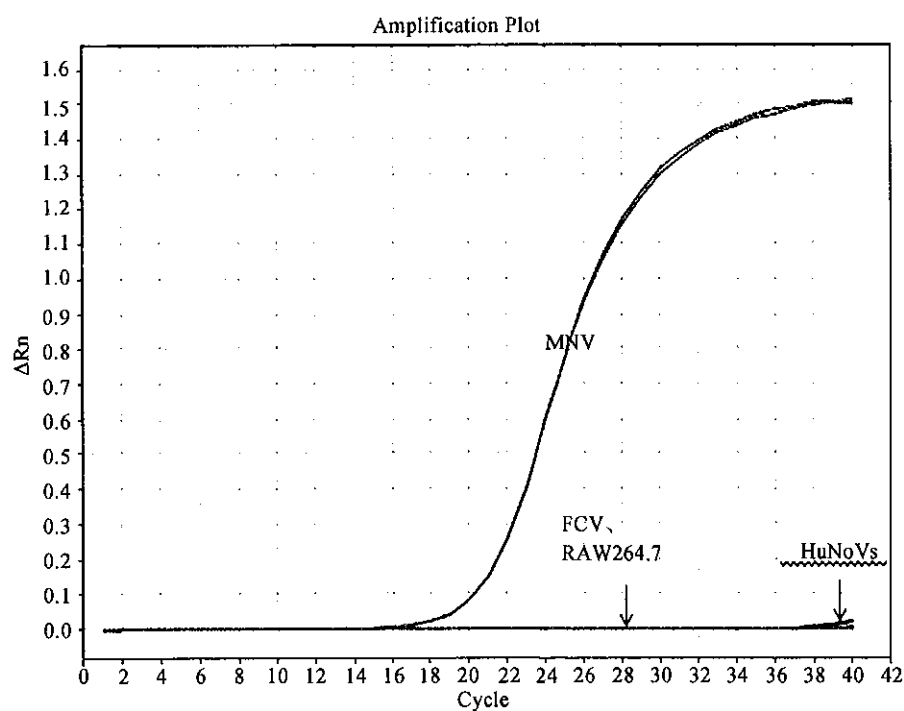


图10 MNV 特异性实验扩增曲线

线无扩增，表明所建立的 qPCR 检测方法特异性好，不与同种属其他病毒发生非特异性反应。

(2) qPCR 方法重复性和稳定性试验评价

以三种不同浓度 (1.1×10^6 、 1.1×10^5 、 1.1×10^4 copies/ μL) 的标准品作为模板，分别进行 5 次实验内重复和 3 次试验间重复，计算试验内和试验间 CT 值、定量拷贝数的标准差及变异系数，结果分别见表 9 和表 10。结果显示，3 种不同浓度标准品的实测定量拷贝数分别为 1.074×10^6 、 1.118×10^5 、 1.092×10^4 copies/ μL ，单次实验内 3 个浓度循环阈值 (CT) 份变异系数 (CV) 分别为 0.3%、0.3%、0.05%，试验间 3 个浓度循环阈值 (CT) 份变异系数 (CV) 分别为 1.1%、0.6%、0.8%。说明此方法精密度高，具有良好的重复性和稳定性。

表 9 MNV qPCR 检测试验内重复性

质粒标准品浓度	试验次数	1	2	3	4	5	Mean	SD	CV (%)
10^6	CT	18.848	18.900	18.835	18.754	18.828	18.833	0.052	0.3
	定量拷贝数	1.060	1.030	1.070	1.130	1.080	1.074	0.036	3.4
10^5	CT	22.242	22.207	22.284	22.259	22.385	22.275	0.067	0.3
	定量拷贝数	1.200	1.150	1.100	1.110	1.030	1.118	0.063	5.6
10^4	CT	25.769	25.775	25.748	25.763	25.780	25.767	0.012	0.05
	定量拷贝数	1.090	1.090	1.100	1.100	1.080	1.092	0.008	0.8

表 10 MNV qPCR 检测试验间重复性

质粒标准品浓度	试验次数	1	2	3	Mean1	Mean2	SD	CV (%)
10^6	CT	18.454	18.462	18.455	18.450			
		18.419	18.545	18.463	18.476	18.579	0.196	1.1
		18.754	18.835	18.828	18.806			
	定量拷贝数	0.980	0.950	1.080	1.003			
		0.990	1.050	1.080	1.040	1.032	0.026	2.5
		1.030	1.060	1.070	1.053			
10^5	CT	21.987	21.955	21.940	21.961			
		21.924	21.986	21.985	21.965	22.043	0.138	0.6
		22.142	22.207	22.259	22.203			
	定量拷贝数	0.99	0.94	0.95	0.96			
		1.06	1.02	1.02	1.033	1.024	0.06	5.9
		1.1	1.11	1.03	1.08			
10^4	CT	25.437	25.408	25.489	25.445	25.529	0.202	0.8

续表

质粒标准品浓度	试验次数	1	2	3	Mean1	Mean2	SD	CV (%)
10^4		25.361	25.412	25.378	25.384			
		25.748	25.763	25.769	25.760			
		1.030	0.980	0.960	0.990			
	定量拷贝数	1.060	1.080	1.100	1.080	1.052	0.054	5.1
		1.080	1.090	1.090	1.087			

4. qPCR 检测方法灵敏度试验评价

以质粒标准品作为模板，10 倍梯度稀释为 $10^9\sim100$ copies/ μL ，进行荧光定量 PCR 反应，扩增曲线（图 11）各稀释度间距均匀，标准曲线（图 12）线性范围良好。可以看出稀释至 1.1×10^1 copies/ μL 时有明显扩增曲线，CT 值为 33.871，对应的模板量为 1.08×10^1 copies/ μL ，在可检测范围之内；标准品稀释到 1.1×10^0 copies/ μL 是扩增曲线为直线无扩增，超出可信范围。因此，认为所建立的鼠诺如病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的最低检测限度为 10copies/ μL ，具有较高的灵敏度。文献报道的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 方法的灵敏度为 1×10^2 copies/ μL 。本次建立的荧光定量 PCR 检测的灵敏度比文献报道的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 方法高 10 倍，且具有更高的广谱性。

5. 实时荧光定量 PCR 方法的应用

将所建立的实时荧光定量 PCR 方法应用于北京市 9 个送检单位的 766 份小鼠盲肠内

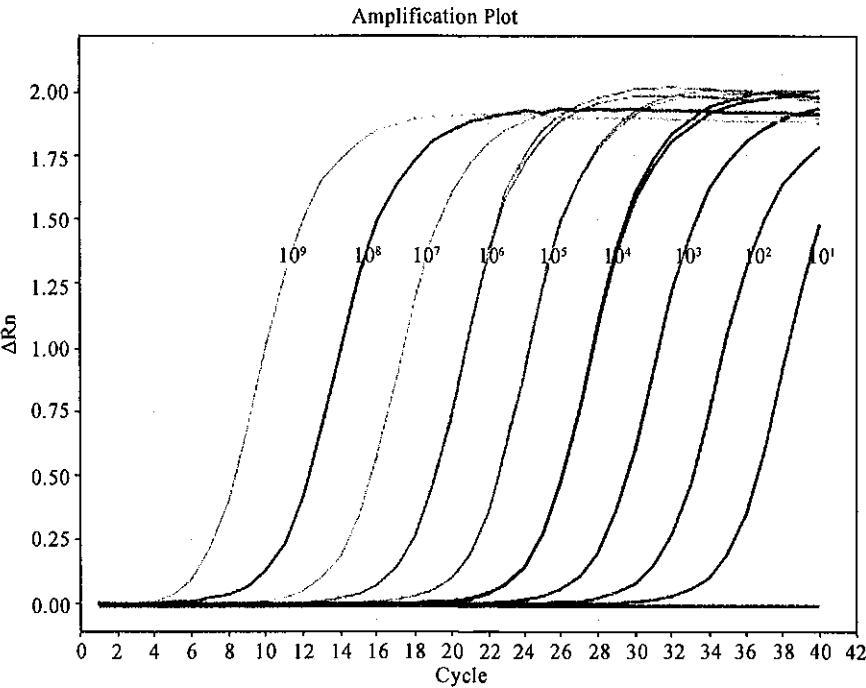


图 11 $1.1\times10^9\sim1.1\times10^1$ copies/ μL 标准质粒扩增曲线

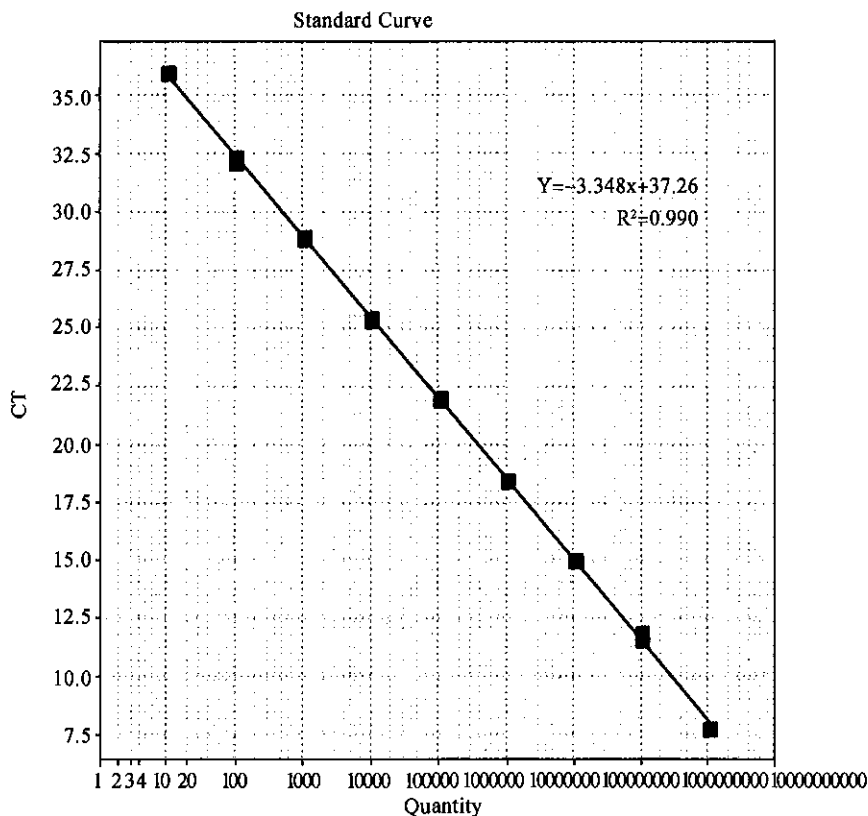


图 12 $1.1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^1$ copies/ μ L 标准质粒的标准曲线

容器样品的检测。对盲肠内容物样品提取的 RNA 进行逆转录，以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测，对出现疑似阳性的样品进行复检，每个样品做 3 个重复，对部分拷贝数较高的样品进行普通 PCR 反应（MNVCF：CAGATCACATGCTTCCCAC；MNVCR：AGACCACAAAAGACTCA-TCAC）并测序验证。在 766 份小鼠盲肠内容物样品中检出阳性样品 301 份，阳性率 39.3%，其中，SPF 级 44.8%（285/636），清洁级 12.3%（16/130），测序结果显示检出样本与 MNV BJ10-2062 序列同源性高达 97% 以上。

第六节 分析报告

通过以上具体的实验数据，本标准所列方法性能可靠，可行性强，既做到与国际接轨，同时还考虑到我国实验用小鼠检测技术的现有水平和发展的需要，对提高实验小鼠的质量提供技术支持。

第七节 国内外同类标准分析

本部分在制定时，参考了 FELASA、Charles River 实验室杰克逊实验室等知名机构有关实验小鼠诸如病毒检测的标准，尽可能做到与国际接轨，同时还考虑到我国实验用小鼠

检测技术的现有水平和发展的需要,既不能盲目攀高,脱离我国现阶段的具体国情;也不能停滞保守,保护落后。

由于随着生物学技术的发展还会有新方法不断出现,建议将检测方法标准作为推荐性标准,从而有利于推动检测工作的开展、确保检测结果的准确性以及促进检测技术的全面发展。

在检测方法的先进性与实用性关系上,首先考虑选用国内外通用的、成熟和稳定的方法,方法的可操作性较强,便于一般检验实验室应用。同时所列的检测方法还考虑到国内能否提供相应的检测试剂。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准是在收集、整理国内外有关组织、地方和实验动物专业生产公司的实验小鼠诺如病毒检测的先进标准,研究分析质量标准和控制要求的异同点后,以我国现有的实验小鼠目前微生物质量控制研究基础上制定的。在确定本标准各项指标时,以国家科委第2号令《实验动物管理条例》和国家科委与国家技术监督局联合颁发《实验动物质量管理办法》为依据,同时参考国家标准《实验动物 微生物学等级及监测》、《实验动物 微生物学检测方法》,以及国际公认的具有权威性的资料(如 FELASA、OIE)等。使本标准的各项指标与国际水平接轨,符合国家标准的要求,使标准具有一定的可操作性。

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

本标准的制定旨在对我国实验小鼠诺如病毒检测技术的标准化起到指导和引领作用,提出的内容不直接涉及保障人体健康、人身、财产安全等强制性标准领域,新标准实施的过程也是在实施进程中积累经验、逐步改进的过程。因此,根据《中华人民共和国标准法》第七条的规定,建议将本标准作为推荐性标准发布实施。

第十一节 标准实施要求和措施

本标准在制定时,充分借鉴了国家标准《实验动物 微生物学等级及监测》、《实验动物 微生物学检测方法》,在此基础上,参考了国际公认的权威机构的标准(FELASA等)但是,由于本标准是首次制定,因此还需要经过实践的检验逐步完善。

建议实验动物生产部门将其列为常规检测项目，实验动物使用部门根据实验的具体要求选择是否检测，同时根据现有的实验条件及实验目的选择检测方法。

第十二节 本标准常见知识问答

问：本标准规定的检测方法有哪几种？分别检测病毒的哪个方面？

答：本标准规定了小鼠诺如病毒的分离与鉴定、免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验、聚合酶链式反应（PCR）、实时荧光 PCR 法（染料法和探针法）等几种检测方法，其中病毒的分离和鉴定主要检测病毒的抗原；免疫荧光试验和酶联免疫吸附试验检测病毒的抗体；PCR 方法检测病毒的核酸（RNA）。

问：请简要说明本标准规定的各个方法的特点。

答：病毒的分离和鉴定是检测的“金标准”，但费时费力，影响因素较多，并且敏感性较低；酶联免疫吸附试验可作为大量样本的筛查方法，免疫荧光试验主要用来对检测结果进行确认；PCR 技术包括普通 PCR 和荧光定量 PCR，相比普通 PCR，荧光定量 PCR 检测敏感性高，并且操作简便，同时降低了 PCR 产物污染的可能性，但成本较高。实验室可根据检测的目的及实际情况来选择相应的方法。