

第十一章 T/CALAS 39—2017《实验动物 汉坦病毒 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下达的 2017 年团体标准制(修)订计划,由广东省实验动物监测所负责团体标准《实验动物 汉坦病毒普通 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。本标准是在广东省科技计划项目“实验动物病毒分子生物学检测技术的建立”(项目编号 2007A060305003)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、特异的汉坦病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-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按照团体标准研制要求和编写工作的程序,组成了由本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,在广东省科技计划项目“实验动物病毒分子生物学检测技术的建立”(项目编号 2007A060305003)课题研究基础上,组织编写实验动物汉坦病毒 RT-PCR 检测方法技术资料,通过起草组成员的努力,多次修改、补充和完善,形成了标准和编制说明初稿。

2017 年 3 月,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,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 汉坦病毒 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法》标准草案进行修改,形成本标准征求意见稿和编制说明。

2017 年 4~6 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 18 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 14 条,未采纳 4 条。对《实验动物 汉坦病毒 RT-PCR 和实时荧光 RT-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8月30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汉坦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,对《实验动物 汉坦病毒 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10月10日,编写组就8月30日的专家意见进行了讨论修改,形成了报批稿。

2017年12月29日,中国实验动物学会第七届理事会常务理事会第一次会议批准发布包括本标准在内的《实验动物 教学用动物使用指南》等23项团体标准,并于2018年1月1日起正式实施。

第三节 编写背景

汉坦病毒(Hantavirus, HV),又称流行性出血热病毒(EHFRV),属于布尼病毒科汉坦病毒属,病毒粒子呈圆形、椭圆形或多形性,有囊膜。核酸为单股负链RNA。流行性出血热是由HV引起的以发热、出血和肾脏损伤为主要临床表现的烈性传染病,常见于人类,属于自然疫源性疾​​病,宿主以啮齿类动物为主。啮齿类动物多表现为隐性感染,感染动物可长期向外排毒,从而危及人类健康。HV主要分为汉滩型(HTN型)和汉城型(SEO型)。

HV是国标中SPF级大小鼠需要排除的病原体,快速、准确地检测HV是有效防治该病的前提。目前,国内HV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,而且血清学检测方法不适用于病毒早期感染的诊断,检测结果也不能真实反映疾病感染的真实情况。此外,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HV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2007年起进行HV RT-PCR检测方法研究,通过临床样本试验证明建立的方法敏感性高、特异性强、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。①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。②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 h 即可完成，具有可操作性和实用性。③协调性原则。以切实提高我国实验动物汉坦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

本标准的组成：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 10 章。现将《实验动物 汉坦病毒 PCR 检测方法》征求意见稿主要技术内容确定说明如下。

一、本标准范围的确定

本标准规定适用于实验动物怀疑本病发生，实验动物接种物、实验动物环境和动物源性生物制品中汉坦病毒的检测。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 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，仅所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/T 14926.19—2001 《实验动物 汉坦病毒检测方法》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB/T 19495.2 《转基因产品检测 实验室技术要求》

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、定义和缩略语：

CPE 细胞病变效应 cytopathic effect

Ct 值 荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数 cycle threshold

DEPC 焦碳酸二乙酯 diethyl pyrocarbonate

HV 汉坦病毒 Hantavirus

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

PCR 聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

RT-PCR 逆转录-聚合酶链反应 reverse transcription polymerase chain reaction

实时荧光 RT-PCR 实时荧光逆转录-聚合酶链反应 real-time RT-PCR

四、检测方法原理

标准中采用的技术方法原理：用合适的方法提取样本中的总 RNA，针对汉坦病毒 M 片段基因设计特异的引物序列，通过 RT-PCR 对模板 RNA 进行扩增，根据 RT-PCR 检测结果判定该样品中是否含有汉坦病毒，套式 PCR 引物中的内引物可用于病毒分型。

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上，加入了一条特异性的荧光探针，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（焦炭酸乙二酯）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) RT-PCR 试剂：PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒，或其他等效产品。RT-PCR 试剂均给出了具体的信息，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。

(9) 实时荧光 RT-PCR 试剂：One Step Primerscript™ RT-PCR Kit（Perfect Realtime），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。

(10) DNA 分子质量标准：100~2000 bp。

(11) 50×TAE 电泳缓冲液, 配制方法在标准附录中给出。

(12) 溴化乙锭: 10 mg/mL, 配制方法在标准附录中给出; 或其他等效产品。

(13) 1.5%琼脂糖凝胶, 配制方法在标准附录中给出。

(14) 引物和探针: 普通 RT-PCR 引物设计参照参考文献 (Feng, 2005)。根据表 1、表 2 的序列合成引物和探针, 引物和探针加无灭菌去离子水配制成 10 μmol/L 储备液, -20℃保存。

表 1 普通 RT-PCR 检测引物

引物	引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小/bp
HV 通用外引物	P1	AAAGTAGGTGITYATCYTIACAATGTGG	464
	P2	GTACAICCTGTRCCIACCCC	
型特异性引物 (汉滩型)	P3	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	383
	P4	GGATTAGAACCCCAGCTCGTCTC	
型特异性引物 (汉城型)	P5	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	418
	P6	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	

注: 简并碱基 Y: T/C; R: A/G。

表 2 实时荧光 RT-PCR 检测引物和探针

病毒基因型	引物和探针名称	引物和探针序列 (5' → 3')
汉滩型	HTN-F	CAATCAYATTTTCACTATTATTATCAGG
	HTN-R	TTAACTGACCCACCCCKYTGARTAAT
	HTN-P	FAM- TTCCCACCCATAAAATG -MGB
汉城型	SEO-F	GGTGATGAYATGGAYCCAGA
	SEO-R	TTCATAGGTTCTGGTTHGAGA
	SEO-P	VIC-CTTCGTAGCCTGGCTCA -MGB

注: 简并碱基 Y: T/C; R: A/G; K: T/G; H: A/T/C。

探针也可选用具有与 FAM、VIC 和 MGB 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。

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

标准规定了以下样本的采集及处理方法: 动物脏器组织, 细胞培养物, 实验动物饲料、垫料和饮水, 实验动物设施设备样本。

(三) 样本 RNA 提取

规定了样本 RNA 的提取方法。

(四) 普通 RT-PCR

1. RT-PCR 反应体系

第一轮 RT-PCR 反应体系见表 3。反应液的配制在冰上操作,每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照。其中,以含有汉坦病毒的组织或培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板;以不含有汉坦病毒 DNA 样本(可以是正常动物组织或正常培养物)作为阴性对照模板;空白对照为不加模板对照(no template control, NTC),即在反应中用水来代替模板。除引物终浓度不变,RT-PCR 反应体系根据选择的试剂进行确定。

表 3 每个样品反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ Buffer	25	1 $\times$
Enzyme Mix	2	
P1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
P2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
DNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	9	
总体积	50	

2. RT-PCR 反应参数(表 4)

表 4 RT-PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
逆转录	50	30 min	1
预变性	95	5 min	1
变性	94	1 min	
退火	55	1 min	35
延伸	72	45 s	
延伸	72	10 min	1

注:当使用其他等效的 RT-PCR 检测试剂进行,反应体系和反应参数可进行相应调整。

3. 第二轮 RT-PCR

取第一轮 RT-PCR 的扩增产物 10 μL 作为模板,分别采用汉滩型和汉城型两对型特异性引物,参照第一轮 RT-PCR 的反应体系和反应参数(省去逆转录步骤)进行第二轮 PCR 扩增。

4. RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

将适量 50 $\times$ TAE 稀释成 1 $\times$ TAE 溶液,配制含核酸染料溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶。RT-PCR 反应结束后,取 10 μL RT-PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测,以 DNA 分子质量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3~5 V/cm,当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

(五) 实时荧光 RT-PCR

1. 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 5。

表 5 实时荧光 RT-PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2×One Step RT-PCR Buffer III	25	1×
Ex TaqHS (5 U/ μL)	1	
PrimeScriptRT Enzyme Mix II	1	
正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
汉滩型探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
汉城型探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
Rox	1	
RNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	4	
总体积	50	

注：试剂 Rox 只在具有 Rox 荧光校正通道的实时荧光 PCR 仪上进行扩增时添加，否则用水补齐。

2. 实时荧光 RT-PCR 反应参数 (表 6)

表 6 实时荧光 RT-PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42	5 min		1
预变性	95	30 s	否	1
变性	95	5 s		
退火, 延伸	60	34 s	是	40

注：试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

八、结果判定

(一) 普通 RT-PCR

1. 质控标准

(1) 第一轮 RT-PCR 反应 (外引物) 中阴性对照和空白对照未出现条带，阳性对照出现预期大小 (464 bp) 的扩增条带，则表明反应体系运行正常。

(2) 第一轮 RT-PCR 反应 (外引物) 中阴性对照和空白对照未出现条带，阳性对照也未出现预期大小 (464 bp) 的扩增条带，但是第二轮 PCR 反应 (基因型鉴别引物) 中一对引物的阳性对照出现预期大小 (383 bp 或 418 bp) 的扩增条带，则表明反应体系运行正常，且阴性对照和空白对照未出现目的条带。

(3) 符合上述两种情况之一，即可进行结果判定；否则此次试验无效，需重新进行普通 PCR 扩增。

2. 结果判定

(1) 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到 383 bp 扩增条带，判为汉滩型汉坦病毒核酸阳性。

(2) 样本经琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪上观察到 418 bp 扩增条带, 判为汉城型汉坦病毒核酸阳性。

(3) 样本经琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪上均未观察到 383 bp 和 418 bp 扩增条带, 判为汉坦病毒核酸阴性。

(二) 实时荧光 RT-PCR

1. 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。

2. 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 ≤ 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 RT-PCR 扩增。

3. 结果判定

(1) 若待检测样品无荧光扩增曲线, 则判定样品未检出汉坦病毒。

(2) 若待检测样品有荧光扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 时, 则判断样品中检出汉坦病毒。

(3) 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间, 应重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。重新检测后, 若 Ct 值 ≥ 40 , 则判定样品未检出汉坦病毒; 重新检测后, 若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定汉坦病毒核酸可疑阳性, 需进一步进行序列测定。

(三) 序列测定

必要时, 可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汉坦病毒特异性片段序列进行比对, 序列同源性在 90% 以上, 可确诊待检样本汉坦病毒核酸阳性, 否则判定汉坦病毒核酸阴性。

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, 给出了试剂的配制方法。

第六节 分析报告

一、材料与方法

1. 病毒、菌株、载体和临床样本

汉坦病毒 (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, 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,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: 2010~2014 年本实验室收到的广东、湖北、北京、四川、云南和上海等省市送检的 SPF 级活体小鼠 100 份。捕获于广州市某实验动物养殖场附近的野鼠 21 份, 野鼠为褐家鼠, 无菌采集活体小鼠的肺脏, -40℃保存, 临床样本共计 121 份。

2. 引物设计合成

普通 RT-PCR 引物源自参考文献, 实时荧光 RT-PCR 引物和探针自行设计。引物和探针序列见表 1、表 2, 引物和探针由 Invitrogen(广州)公司合成。

3. 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, 脏器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, 涡旋混匀, 将悬液 12 000g 离心 10min, 取上清液进行 RNA 抽提。

4. HV 质粒标准品的制备

提取的 HV 汉滩型和汉城型 RNA, 逆转录后以 cDNA 为模板, 用 Premix Ex Taq(TaKaRa 公司)进行 PCR, 反应体系为: 2×Premix Ex Taq 25 μ L, 上游引物 MPV-F(10 μ mol/L) 2.5 μ L, 下游引物 MPV-R(10 μ mol/L) 2.5 μ L, DNA 5 μ L, 加 RNase Freed H₂O 至 50 μ L。反应条件: 94℃ 2 min, 一个循环; 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 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 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(copies/ μ L)=6.022 $\times 10^{23}$ (copies/mol) $\times$ DNA 浓度(g/ μ L)/质量 MW(g/mol)。其中, MW=DNA 碱基数(bp) $\times$ 660 daltons/bp, DNA 碱基数=载体序列碱基数+插入序列碱基数。按照上述方法分别构建普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 的质粒标准。

5. 汉坦病毒普通 RT-PCR 检测方法

采用 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×Buffer 25 μ L, 上游引物 TMEV-F(10 μ mol/L) 2.5 μ L, 下游引物 TMEV-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℃ 30 min, 94℃ 2 min, 一个循环 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

6. 普通 RT-PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 HV RT-PCR 方法对 HV、LCMV、MHV、TMEV、MNV、SV、PVM 和 Reo-3 的 RNA 进行检测, 验证该方法的特异性。

7. 普通 RT-PCR 检测方法敏感性试验

构建 HV 的汉滩型和汉城型重组质粒, 将质粒标准品用 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。按建立的方法进行检测, 测定模板最低检出量,

8. 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 试剂盒操作说明配制 HV 荧光定量 RT-PCR 反应体系, 以汉滩型和汉城型质粒标准品作为反应模板, 对多重荧光 RT-PCR 反应体系中引物 ($0.1 \sim 1 \mu\text{mol/L}$) 和 TaqMan 探针浓度 ($0.05 \sim 1 \mu\text{mol/L}$) 进行优化, 以反应的前 3~15 个循环的荧光信号为荧光本底信号, 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, ΔR_n) 来判断优化结果; 采用二温循环法对反应的退火温度和循环次数进行优化。

9. 普通 RT-PCR 检测方法特异性试验

采用建立的荧光定量 RT-PCR 方法对 HV、LCMV、MHV、TMEV、MNV、SV、PVM 和 Reo-3 的 RNA 进行检测, 验证该方法的特异性。

10. 普通 RT-PCR 检测方法敏感性试验

将汉滩型和汉城型质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ 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。

11. 临床样本的检测

利用汉坦病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 方法对 121 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。采用 ELISA 方法检测动物血清。

二、结果

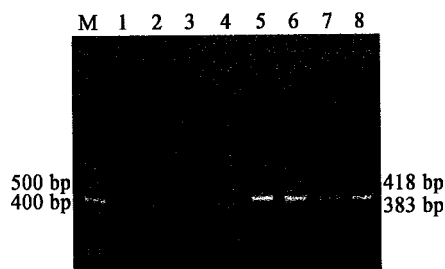


图1 HV 普通 RT-PCR 分型结果

M, DNA Marker DL1000; 1~4, HV 汉滩型病毒;
5~8, HV 汉城型病毒

1. 汉坦病毒普通 RT-PCR 检测方法

采用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒进行 RT-PCR, 反应完成后取 5 μ L 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果表明, 汉滩型和汉城型汉坦病毒分别在 383 bp、418 bp 位置有目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。

2. 普通 RT-PCR 特异性试验

采用建立的 HV RT-PCR 方法对 HV、LCMV、MHV、TMEV、MNV、SV、PVM 和 Reo-3 的 RNA 进行检测, 验证该方法的特异性。结果表明, 除 HV 为阳性外, 其他病毒均为阴性, 说明建立的方法具有良好的特异性 (图 2)。

3. 普通 RT-PCR 敏感性试验

构建 HV 的汉滩型和汉城型重组质粒, 将质粒标准品用 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。按所述方法进行检测, 测定模板最低检出量, 结果 HV 的汉滩型和汉城型敏感性均为 1×10^2 copies/ μ L (图 3)。

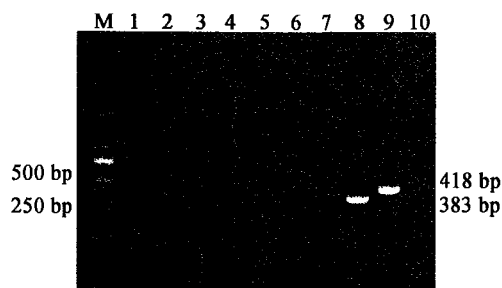


图2 RT-PCR检测方法特异性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1~7, LCMV、MHV、TMEV、MNV、SV、PVM 和 Reo-; 8, HV 汉滩型病毒; 9, HV 汉城型病毒; 10, 阴性对照

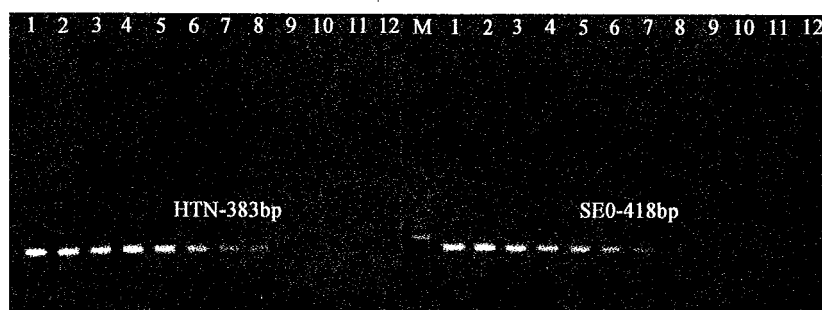


图3 HV检测方法敏感性试验结果

M, DNA Marker DL100; 1~10, $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA; 11 和 12, NTC

4. 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

经优化后的 PCR 反应体系: $2 \times$ One Step RT-PCR Buffer III 25 μ L, Ex Taq HS (5 U/ μ L) 1 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 1 μ L, 上、下游引物终浓度均为 0.4 μ mol/L, 汉滩型和汉城型探针终浓度均为 0.4 μ mol/L, RNA 模板各 5 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 一个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 45 个循环, 60 $^{\circ}$ C 延伸结束后收集荧光。

5. HV 荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性试验

采用建立的荧光定量 RT-PCR 方法对 HV、LCMV、MHV、TMEV、MNV、SV、PVM 和 Reo-3 的 RNA 进行检测, 验证该方法的特异性。结果表明, 除 HV 为阳性外, 其他病毒均为阴性, 说明建立的方法具有良好的特异性 (图 4)。

6. 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将汉滩型和汉城型质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ 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 5。由图 5 可见, 各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等, 基本在 3.5 个循环左右, 无模板对照 (no template control, NTC) 没有荧光扩增曲线为阴性结果。

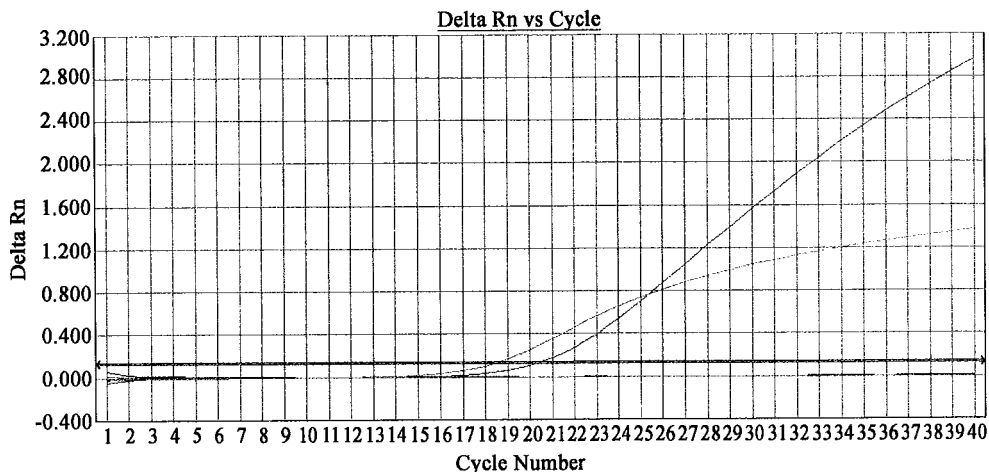


图4 HV荧光定量 RT-PCR 特异性检测结果

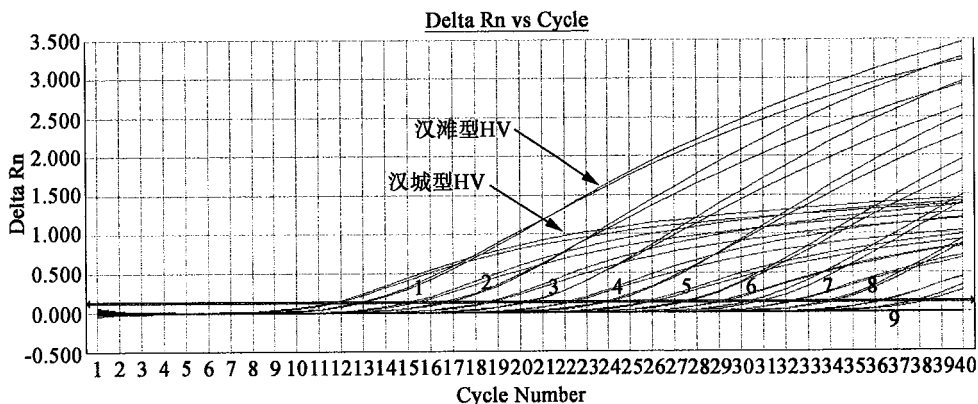


图5 10倍系列稀释质粒标准品的荧光定量 RT-PCR 扩增曲线

1~7, $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 质粒标准品; 8, 1×10^0 copies/ μL 质粒和无模板对照

以汉滩型标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标、以临界环数 (threshold cycle, C_t) 为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线, 标准质粒在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 具有良好的线性关系, 结果见图 6。其线性回归方程为 $C_t = -3.54 \times \lg(\text{拷贝数}) + 41.43$, 标准曲线斜率为 -3.54 , 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.54} - 1 = 0.916$, 即扩增效率为 91.6%, 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 1×10^0 copies/ μL 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为 10 copies/ μL 。

以汉城型标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标、以临界环数 (threshold cycle, C_t) 为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线, 标准质粒在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 具有良好的线性关系, 结果见图 7。其线性回归方程为 $C_t = -3.48 \times \lg(\text{拷贝数}) + 39.61$, 标准曲线斜率为 -3.48 , 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.48} - 1 = 0.938$, 即扩增效率为 93.8%, 相关系数 $R^2 = 0.9995$, 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 1×10^0 copies/ μL 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为 10 copies/ μL 。

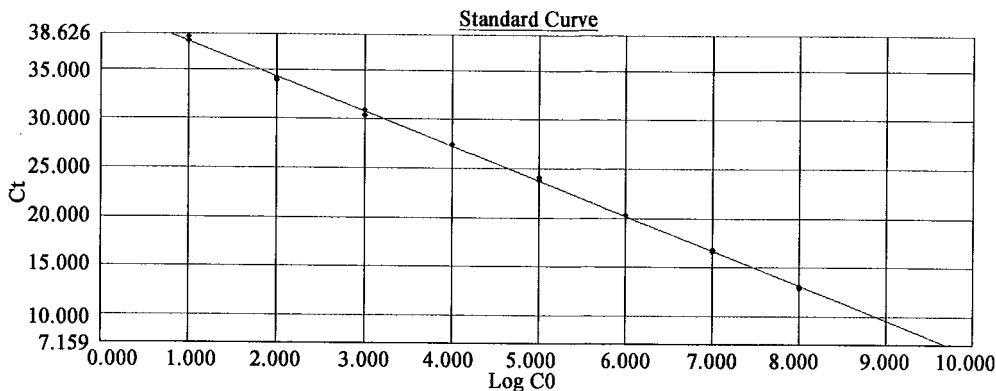


图 6 汉滩型 10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

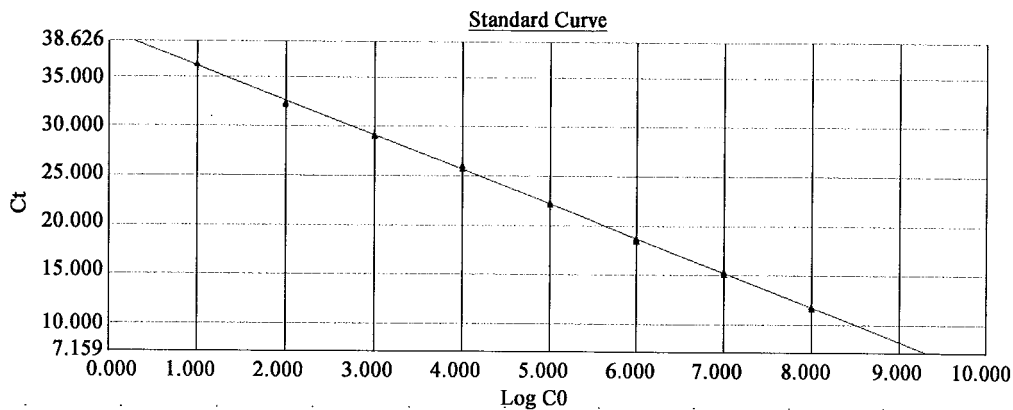


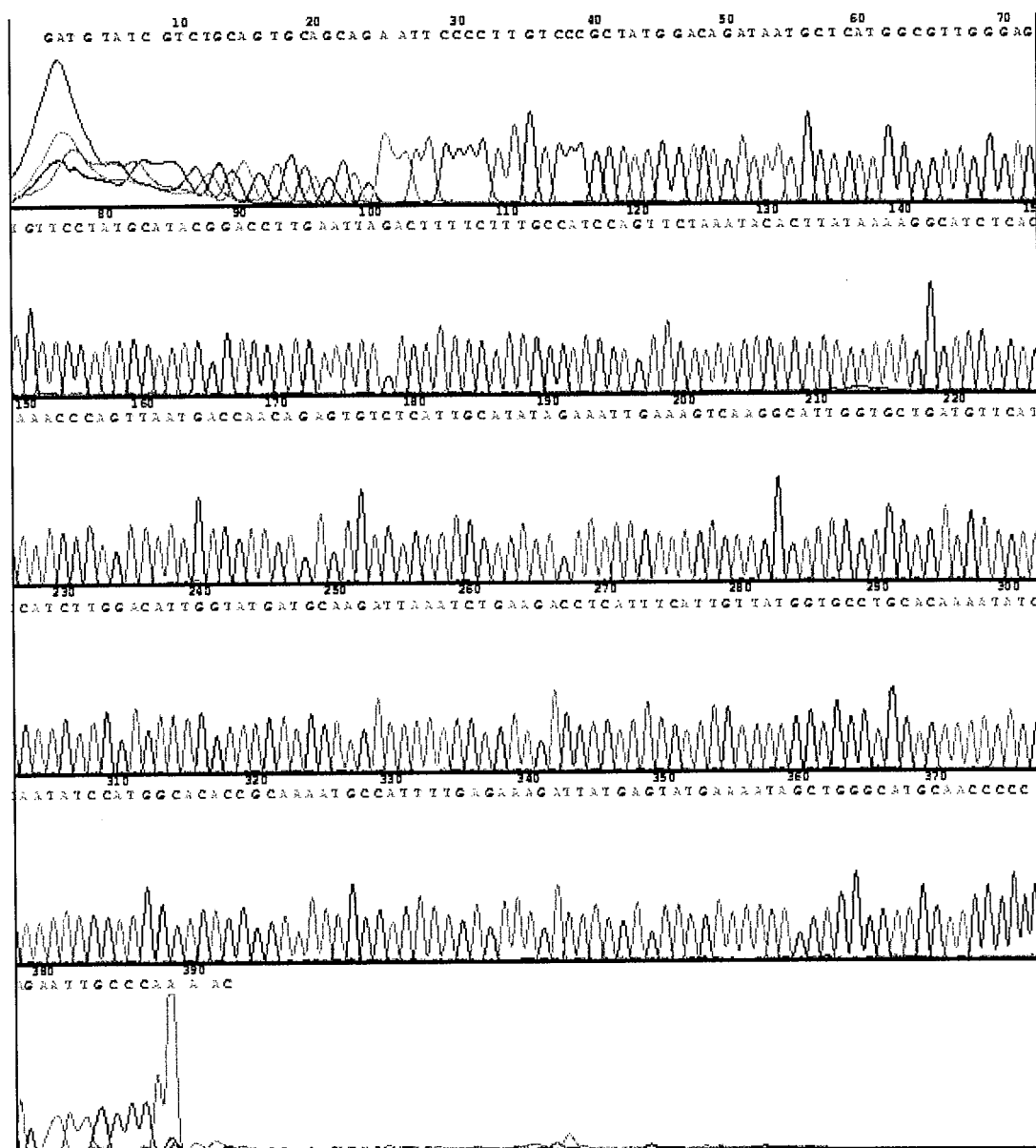
图 7 汉城型 10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

7. 汉坦病毒 PCR 检测方法的临床应用临床样本的检测

利用汉坦病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 方法对 121 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 ELISA 方法检测动物血清。临床样本检测结果见表 7，结果表明 SPF 级大小鼠中未检出汉坦病毒，野鼠中有检测出汉坦病毒，测序结果表明均为汉城型（图 8）。需要指出的是，采用 PCR 和 ELISA 检测方法对同一只动物进行检测时，部分动物出现不一致的结果，这是由于病原感染动物后抗原和抗体不同消长规律所造成的。但是对整个动物群体进行检测时，两种方法具有较好的相关性，说明在临床监测中，普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 方法可以作为抗体检测的有效补充手段。

表 7 PCR 临床样本检测结果

方法	阳性检出率（阳性样本/总样本数量）	
	野鼠样本	SPF 级大小鼠
荧光定量 RT-PCR	4/21	0/100
普通 RT-PCR	3/21	0/100
ELISA	10/21	0/100



GATGTATCGTCTGCAGTGCAGCAGAAATTCCCCTTGTCCCGCTATGGACAGATAATGCT
CATGGCGTTGGGAGTGTTTCTATGCATACGGACCTTGAATTAGACTTTTCTTTGCCATC
CAGTTCTAAATACACTTATAAAAGGCATCTCACAAACCCAGTTAATGACCAACAGAGT
GTCTCATTGCATATAGAAATTGAAAAGTCAAGGCATTGGTGCTGATGTTTCATCATCTGG
ACATTGGTATGATGCAAGATTAAATCTGAAGACCTCATTTCATTGTTATGGTGCCCTGCA
AAAATATCAATATCCATGGCACACCGCAAATGCCATTTTGAGAAAGATTATGAGTAT
GAAAATAGCTGGGCATGCAACCCCCCAGATTGCCCAAAACC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Sequi virus B-1 mRNA for proteins G1 and G2	614	614	95%	6e-172	96%	X52881.1
☐ Sequi virus strain WuhanRn63 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655891.1
☐ Sequi virus strain WuhanRn58 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655890.1
☐ Sequi virus strain WuhanRn57 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655892.1
☐ Sequi virus strain WuhanRn25 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655897.1
☐ Sequi virus strain WuhanRn10 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655896.1
☐ Sequi virus strain WuhanRT18 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655893.1
☐ Sequi virus strain WuhanRT11 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655891.1
☐ Sequi virus strain WuhanRT07 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655899.1
☐ Sequi virus strain WuhanRm13 glycoprotein gene, complete cds	608	608	95%	3e-170	96%	JQ655896.1

图 8 测序验证图谱

第七节 本标准常见知识问答

1. 现行实验动物国家标准中已有汉坦病毒检测方法，本标准如何配合这些检测方法使用？

答：实验动物国家标准汉坦病毒检测方法（GB/T 14926.19—2001）规定了酶联免疫吸附试验（ELISA）和间接免疫荧光试验（IFA）两种血清学检测方法，这两种方法都是针对动物抗体进行检测。实际检测中 ELISA 可用于样本的大通量筛查，IFA 一般用于确认试验。

本标准中规定的普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法属于病原学检测方法，针对病毒的核酸进行检测，适用于发病动物或怀疑发生本病动物，以及实验动物接种物、实验动物环境和动物源性生物制品等样本的检测。可根据实验室的条件，选择其中一种或两种方法进行检测，实时荧光 RT-PCR 检测方法采用闭管检测分析，可以减少检测过程的污染风险。在实际应用中，当普通 RT-PCR 检测为阳性时，可以采用实时荧光 RT-PCR 方法进行确证。当两种方法检测结果不一致时，可通过序列测定方法进行最终验证。

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的快速检测，是实验动物质量控制必不可少的方法。

2. 什么是 PCR 假阳性？产生假阳性的原因是什么？

答：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个方面。

（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，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,而且活细胞内的质粒由于活细胞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。

3. 如何控制 PCR 假阳性?

答:(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。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 4 h 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 6 h 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,并在随后变性步骤中使 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和准确性。同时,UNG 酶被灭活,不会再降解新扩增的 U-DNA 产物。

(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。

4. 什么是 PCR 假阴性? 产生假阴性的原因是什么?

答:假阴性是指实验中设置的阳性对照未能扩增成阳性结果的现象。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、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, 如少加或漏加试剂、离心不充分、反应参数设计错误等都能造成结果的假阴性。

5. 如何控制 PCR 假阴性?

答: (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) 是判断假阴性的有效手段。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, 减少假阴性发生。

(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。

第八节 其他说明

一、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。

二、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》等国家相关法规及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汉坦病毒 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。

三、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。

四、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传贯彻培训活动。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。

参 考 文 献

田克恭. 1992. 实验动物病毒性疾病. 北京: 中国农业出版社: 76-83.

中华人民共和国卫生部. 2005. 《全国肾综合征出血热监测方案(试行)》.

Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. 2003. Comparison of the sensitivity of *in vivo* antibody production tests with *in vitro* PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Laboratory Animals*, 37: 341-351.