

第十七章 T/CALAS 45—2017《实验动物 小鼠腺病毒 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)订计划安排,由广东省实验动物监测所负责团体标准《实验动物 小鼠腺病毒 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”要求进行编写。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)、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、特异的小鼠腺病毒普通 PCR 和实时荧光 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,制订了编写方案,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,组织编写实验动物小鼠腺病毒(Mad.)普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法技术资料,通过起草组成员的努力,经多次修改、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 小鼠腺病毒 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。组织编写了腺病毒普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法技术资料,于 2017 年 3 月完成了标准草案的起草工作。

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3条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳2条,未采纳1条。对《实验动物 小鼠腺病毒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小鼠腺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 小鼠腺病毒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

小鼠腺病毒(mouse adenovirus, Mad)属于腺病毒科、哺乳动物腺病毒属,核酸线性双股DNA。目前已报道有Mad-1型FL株(1960年Hartley等分离)、Mad-2型K87株(Kazuo Hashimaoto等1996年分离)和Mad-3型(Boris Klempa等2009年分离)三个血清型。FL株可引发小鼠的全身性感染,病毒侵入棕色脂肪、肾上腺、心肌和肾等处,对裸鼠,乳鼠的致病性较强,可以引起死亡;对成年鼠不引起死亡,但可产生高滴度的中和抗体。K87株对肠道局部感染,不引起死亡,只是经粪便不断排毒并产生高滴度的中和抗体。小鼠是Mad的自然宿主,Becker等于2007年在英国地区捕获的野血清流行病调查中检测出有较高Mad阳性率(68%),但在实验鼠自然感染率不高,隐性感染居多,被感染的小鼠可长期带毒和排毒并可增加感染其他病原微生物可能性,影响小鼠健康,干扰实验研究。国家实验动物微生物监测标准(GB14922.2—2011)将Mad列入需要排除的检测项目。

目前,国内Mad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Mad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年起进行小鼠腺病毒分子诊断方法研究,通过大量临床样本试验证明PCR检测方法具有敏感高、特异强、重复性好的特点。

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、DNA抽提到PCR反应,均操作简单,仅需4h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小鼠腺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

本标准内容组成:范围;规范性引用文件;术语、定义及缩略语;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 小鼠腺病毒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

本标准规定适用于小鼠及其产品、细菌培养物、实验鼠环境和鼠源性生物制品中小鼠腺病毒的检测。

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 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB/T 14926.27—2001 《实验动物 小鼠腺病毒检测方法》

GB/T 19495.2 《转基因产品检测 实验室技术要求》

三、术语、定义及缩略语

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) 术语及定义

1.

聚合酶链反应 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。本标准中将“PCR”称为“普通 PCR”是为了与“实时荧光 PCR”进行区别,避免名称混淆。

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

CPE 细胞病变效应 cytopathic effect

DNA 脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid

Mad 小鼠腺病毒 Murine adenovirus

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

四、检测方法原理

用合适的方法提取样本中的病毒 DNA,针对 Mad-FL 株、K87 株及 Mad-3 株病毒核酸 Hexon 基因保守序列设计一对通用特异的普通 PCR 引物;针对 Mad-FL 株的 Hexon 基因保守区域设计一套特异的实时荧光 PCR 引物和探针序列,分别通过普通 PCR 和实时荧光 PCR 对模板 DNA 进行扩增,根据普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测结果判定该样品中是否含有病毒核酸成分。采用实时荧光 PCR,可以减少检测过程的污染风险。同时,实时荧光 PCR 比普通 PCR 检测灵敏度要高,可用于普通 PCR 检测结果的验证。

PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 分子为模板,以一对分别与模板 5' 端和 3' 端互补的寡核苷酸片段为引物 (primer),在耐热 DNA 聚合酶的作用下,按照半保留复制的机制沿着模板链延伸直至完成新的 DNA 分子合成。重复这一过程,即可使目的 DNA 片段得以大量扩增。实时荧光 PCR 则是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。

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

(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) PCR 试剂: Premix TaqTM (Version 2.0 plus dye) (TaKaRa 公司, Cat.No.RR901A), 或其他等效产品。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。

(5) 实时荧光 PCR 试剂: TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 公司, Cat.No. 4304437), 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。

(6) DNA 分子质量标准: 100~2000 bp。

(7) 50×TAE 电泳缓冲液, 配制方法在标准附录中给出。

(8) 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。

(9) 1.5%琼脂糖凝胶, 配制方法在标准附录中给出。

(10) 引物和探针: 根据表 1、表 2 的序列合成普通 PCR 引物和实时荧光 PCR 引物及探针, 引物和探针加无 RNase 去离子水配制成 10 μmol/L 和 5 μmol/L 储备液, -20℃保存。

表 1 普通 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小/bp
正向引物	TWCATGCACATCGCBGG	281
反向引物	CCGCGGATGTCAAA	

表 2 实时荧光 RT-PCR 扩增引物和探针

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	ACTCTGAGCGGTGTCCGC	64
反向引物	GATGTGCATGAAGGCCCACT	
探针	FAM - TGACGACGCCTTCAATGCAGCC-BHQ1	

七、检测方法的确

(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，胃内容物、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。

(三) 样本 DNA 提取

规定了样本 DNA 的提取方法。

(四) 普通 PCR

1. 普通 PCR 反应体系

普通 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，以含有小鼠腺病毒的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板；以不含有小鼠腺病毒 DNA 样本（可以是正常动物组织或正常细胞培养物）作为阴性对照模板；空白对照为非模板对照（no template control, NTC）。所有样本和对照设置两个平行反应。若使用其他公司 PCR 试剂，应按照其说明书规定的反应体系进行操作。

表 3 普通 PCR 反应体系

试剂	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ Premix Taq Mix (Loading dye mix)	10	1 $\times$
ddH ₂ O	6.4	
PCR 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
PCR 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	2	
总体积	20	

2. 普通 PCR 反应参数

普通 PCR 反应参数见表 4。

表 4 普通 PCR 反应参数

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

注：可使用其他等效的 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。

3. 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。PCR 反应结束后，取 10 μL PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测，以 DNA 分子质量作为参照。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 PCR

1. 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 5。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, 以含有小鼠腺病毒的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板; 以不含有小鼠腺病毒 DNA 样本 (可以是正常动物组织或正常细胞培养物) 作为阴性对照模板; 空白对照为非模版对照 (no template control, NTC)。所有样本和对照设置两个平行反应。若使用其他公司实时荧光 PCR 试剂, 应按照其说明书规定的反应体系进行操作。

表 5 实时荧光 PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ Premix Ex Taq Mix	10	1 $\times$
正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	400 nmol/L
反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	400 nmol/L
探针 (5 $\mu\text{mol/L}$)	1	250 nmol/L
Rox (50 $\times$)	0.4	
cDNA 模板	2	
ddH ₂ O	5	
总体积	20	

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 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 6。试验检测结束后, 根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

表 6 实时荧光 PCR 反应参数

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

注: 可使用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行, 反应体系和反应参数可进行相应调整。

八、结果判定

(一) 普通 PCR 结果判定

1) 质控标准

阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现预期大小 (281 bp) 的目的扩增条带则表明反应体系运行正常; 否则此次试验无效, 需重新进行普通 PCR 扩增。

2) 结果判定

(1) 质控成立条件下, 若样本未出现预期大小 (281 bp) 的扩增条带, 则可判定样本小鼠腺病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 若样本出现预期大小 (281 bp) 的扩增条带, 则可判定样本小鼠腺病毒核酸检测阳性。

(二) 实时荧光 PCR 结果判定

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 PCR 扩增。

3. 结果判定

(1) 质控成立条件下, 若待检测样品无荧光扩增曲线, 则判定样品小鼠腺病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 若待检测样品有荧光扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 时, 则判断样品中小鼠腺病毒核酸检测阳性。

(3) 质控成立条件下, 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间, 应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后, 若 Ct 值 ≥ 40 , 则判定样品未检出小鼠腺病毒。重新检测后, 若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样品小鼠腺病毒可疑阳性, 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小鼠腺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腺病毒核酸阳性, 否则判定小鼠腺病毒核酸阴性。

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

(一) 菌株和临床样本

小鼠腺病毒 FL 株 (Mad, ATCC VR-550)、小鼠多瘤病毒 (Poly ATCC VR-252)、小鼠细小病毒 (MVM, ATCC VR-1346)、鼠痘病毒 (Ect, VR 1374)、小鼠巨细胞病毒 (MCMV,

ATCC VR-1399)、小鼠淋巴白血病毒(MLLV ATCC VR-190)购自美国典型微生物菌种保藏中心;MPV 核酸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 100 份 SPF 小鼠和 76 份普通环境开放饲养小鼠。

(二) 引物及探针的合成

普通 PCR 引物序列见表 1;实时荧光 PCR 引物和探针序列见表 2。引物和探针均由 Invitrogen(广州)公司合成。

(三) 样品核酸提取

处理好的组织或细胞样品使用组织基因组提取试剂盒(Qiagen 公司)按操作说明书进行;盲肠内容物和粪便样品采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 DP302-02(天根公司)进行核酸提取。

(四) Mad 质粒标准品的制备

分别将普通 PCR 及荧光 PCR 扩增片段克隆至 T 载体中构建阳性质粒对照。以提取的 Mad DNA 为模板,用 Premix Ex Taq(TaKaRa 公司)进行 PCR,反应体系为:2 $\times$ Premix Ex Taq 25 μ L,上游引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,下游引物(10 μ mol/L) 2.5 μ L,DNA 5 μ L,加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,一个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将反应得到目的片段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)= 6.022×10^{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。

(五) 普通 PCR 检测方法的建立和优化

PCR 试剂采用 TaKaRa 公司的 rTaq Premix,反应体系为 20 μ L:DNA 模板 2 μ L,2 $\times$ Premix Buffer(含 Mg²⁺、dNTP、rTaq 酶)10 μ L,上游引物(10 μ mol/L)1 μ L,下游引物(10 μ mol/L)1 μ L,补 H₂O 至 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应完成后取 10 μ L 扩增产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

(六) 实时荧光 PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 TaKaRa 公司 Premix Ex TaqTM Probe qPCR Kit 试剂盒操作说明配制 Mad 实时荧光 PCR 反应体系,以 Mad 质粒标准品作为反应模板,采用矩阵法对多重荧光 PCR 反应体系中引物(0.1~0.6 μ mol/L)和 TaqMan 探针浓度(0.1~0.6 μ mol/L)进行反应条件优化,同时设置 BHK 细胞 DNA 为阴性对照,水为空白对照。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。

(七) 特异性试验

分别采用建立的普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法进行特异性分析。对小鼠多瘤病毒、小鼠细小病毒 MVM 株、MPV 株、小鼠巨细胞病毒 (MCMV)、小鼠淋巴白血病毒 (MLLV)、小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*) DNA 进行检测, 每种病毒 2 个重复孔。同时设立小鼠腺病毒 DNA 为阳性对照, BHK 细胞 DNA 为阴性对照, 水为空白对照。

(八) 敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释。利用表 5 和表 6 中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, 确定检测方法的敏感性。

(九) 重复性试验

将 Mad 质粒标准品进行梯度稀释, 设置 4 个水平的重复性对照, 包括: R1, 不含 Mad 的样本; R2, Mad 浓度为 2×10^4 copies/mL; R3, Mad 浓度为 1×10^6 copies/mL; R4, Mad 浓度为 1×10^8 copies/mL。对 4 份 10 倍系列稀释的质粒标准品在同一次反应中进行 10 次重复测定, 对各稀释度的 Ct 值进行统计, 计算同一次检测中每个样品各反应管之间的变异系数 (CV%)。

(十) 检测方法在临床样品中的检测应用

1. 人工感染样品的临床检测应用

人工感染试验在本实验室的屏障环境实验间 [SYXK (粤) 2012-0122] 进行。SPF 级 BALB/c 小鼠 36 只, 购于广东省医学实验动物中心 (No.44007200018834), 实验前, 随机抽取部分动物血清经酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测确定为 Mad 抗体阴性。取浓度约为 4.5×10^6 copies/ μ L 的病毒液, 腹腔注射病毒液 0.2 mL/只。动物接种病毒后, 观察 60 天。每天观察动物的皮毛、外观、行为活动、饮食和精神状态, 并在感染后第 3 天、7 天、10 天、15 天、18 天、21 天、30 天、37 天、44 天、51 天、60 天时, 随机各取 3 只, 活体采集动物血清进行抗体检测; 同时, 安乐死处死动物后采集心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、盲肠内容物, 按照 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取样本 DNA, 用本研究建立的荧光 PCR 方法进行检测, 每份做 3 个重复检测, 观察扩增曲线, 并用普通 PCR 引物对 qPCR 扩增阳性 DNA 进行验证。

2. 临床样品的检测应用

应用 Mad 普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法进行临床应用评价。临床样品包括 SPF 小鼠和开放饲养小鼠。SPF 小鼠来源于 2010~2014 年本实验室收到的广东、湖北、北京、四川、云南和上海等各地送检的 SPF 级活体小鼠或小鼠粪便 100 份; 开放饲养小鼠为从广州周边地区收集的 76 只 KM 小鼠和褐家鼠。

二、结果

(一) 普通 PCR 检测方法的建立

按照 1.5 反应体系和条件进行 PCR 扩增, 完成后取 10 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, Mad 阳性样本在约 280 bp 位置有一条目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。

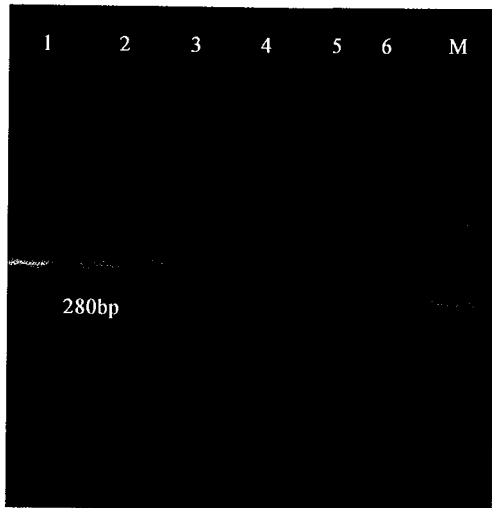


图1 Mad 普通 PCR电泳结果

M, DNA Marker DL500; 1~3, Mad 阳性样本; 4~6, 阴性对照

(二) 普通 PCR 检测方法特异性试验结果

采用建立的 Mad 普通 PCR 方法对小鼠多瘤病毒 (Poly)、小鼠细小病毒 MVM 株、MPV 株、小鼠腺病毒 (Mad)、小鼠巨细胞病毒 (MCMV)、小鼠淋巴白血病毒 (MLLV)、小家鼠螺杆菌 DNA 进行检测, 验证该方法的特异性。结果显示, 仅阳性对照孔有约 280 bp 目的条带, 其他病原核酸无目的条带 (图 2)。

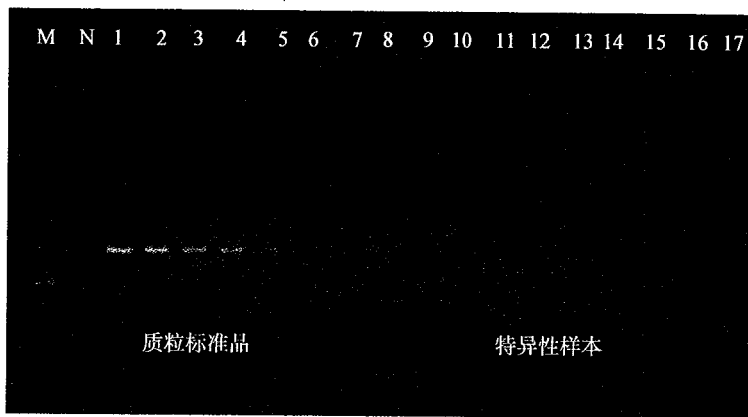


图2 Mad 普通 PCR敏感性试验和特异性试验结果

M, 500bp DNA Marker; N, 空白对照; 1~9 依次为 $6.6 \times 10^8 \sim 6.6 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA; 11~16 依次为 Poly、MVM、MPV、MCMV、MLLV、肝螺杆菌 DNA 对照; 17, 细胞对照阴性

(三) 普通 PCR 检测方法敏感性试验

将 MAD 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。按 1.5 所述方法进行检测, 测定模板最低检出量, 普通 PCR 检测敏感性为 6.6×10^2 copies/ μ L (图 2)。

(四) 实时荧光 PCR 反应体系的建立和优化

以重组质粒 DNA 为模板, 采用矩阵法对引物和探针浓度进行优化。通过对引物浓度 (0.1~0.6 $\mu\text{mol/L}$)、探针浓度 (0.1~0.6 $\mu\text{mol/L}$)、退火温度 (55~65 $^{\circ}\text{C}$) 进行条件优化, 筛选出最佳反应体系如下: 2 $\times$ Premix Ex Taq 10 μL , 上、下游引物终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 探针终浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$, Mad DNA 模板 2 μL , 加 RNase Free dH_2O 至 20 μL 。反应程序两步法为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。读板温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。结果见表 7、表 8, 图 3、图 4。

表 7 Mad 实时荧光 PCR 引物优化结果

Mad-R 用量	Mad-F 用量					
	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.3 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.6 $\mu\text{mol/L}$
0.1 $\mu\text{mol/L}$	26.30/26.12	26.03/26.14	25.67/25.78	25.73/25.47	26.21/26.10	27.01/27.14
0.2 $\mu\text{mol/L}$	26.39/26.42	25.93/26.08	26.01/25.99	25.38/25.22	26.03/26.10	26.38/26.47
0.3 $\mu\text{mol/L}$	25.86/26.11	25.20/25.24	25.45/25.31	25.25/25.13	25.78/25.51	26.72/27.00
0.4 $\mu\text{mol/L}$	26.49/26.46	25.43/25.35	25.54/25.65	25.07/25.05	25.51/25.71	26.97/26.84
0.5 $\mu\text{mol/L}$	26.75/26.57	26.26/26.31	26.01/26.14	25.63/25.44	25.53/25.66	27.09/26.96
0.6 $\mu\text{mol/L}$	26.84/26.93	26.42/26.68	26.15/26.11	26.38/26.13	27.01/27.07	27.24/27.52

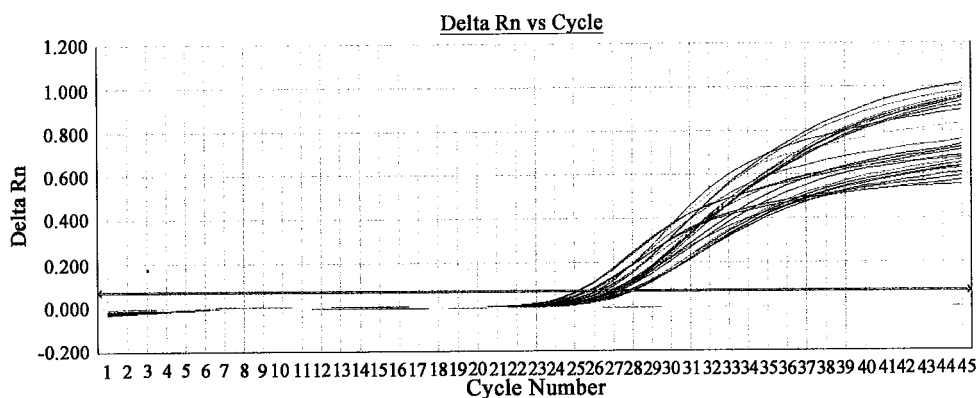


图 3 Mad 实时荧光 PCR 引物量优化实验结果

表 8 Mad 实时荧光 PCR 探针优化结果

Ct 值	Mad-P 终浓度					
	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.3 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.6 $\mu\text{mol/L}$
	27.21/27.35	25.81/25.59	25.63/25.78	25.78/25.71	25.73/25.81	26.01/26.07

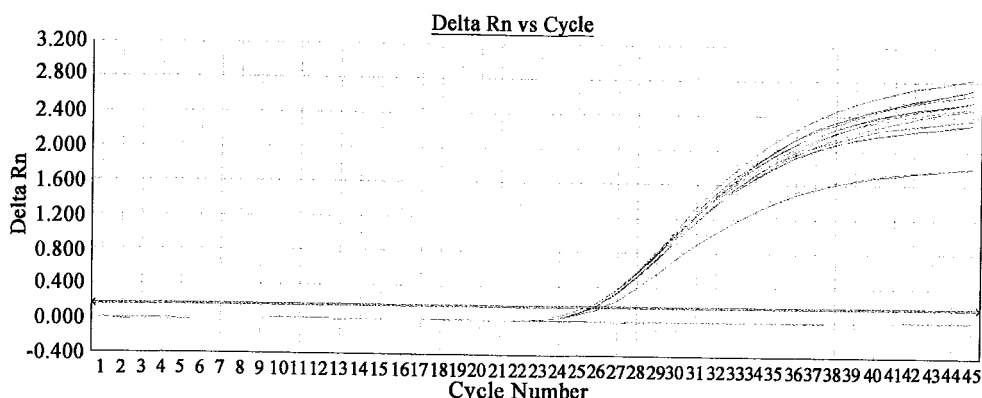


图4 Mad实时荧光PCR探针优化实验结果

(五) 实时荧光PCR定量标准曲线的建立及敏感性试验

将Mad质粒标准品 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、以临界循环数 (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 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 具有良好的线性关系(图5)。其线性回归方程为 $Ct = -3.363X + 36.63$ (拷贝数), 标准曲线斜率为-3.35, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.35} - 1 = 0.982$, 即扩增效率为98.2%, 相关系数 $R^2 = 0.9992$ (图6), 说明PCR扩增该标准品的效率较高, 线性关系良好。标准品 1×10^0 copies/ μ L 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为10 copies/ μ L。

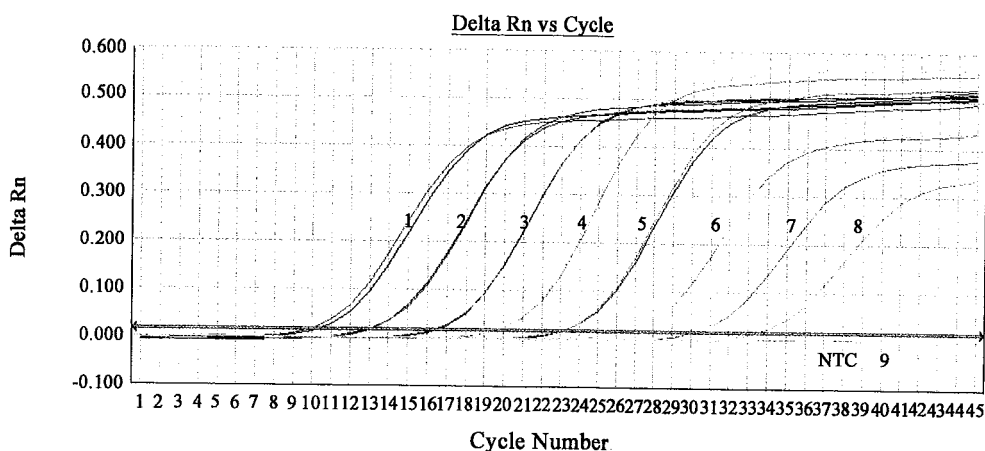


图5 Mad实时荧光PCR方法敏感性试验结果

1~8, 依次为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 标准品; 9, 1×10^0 copies/ μ L 标准品; NTC 为阴性模板对照

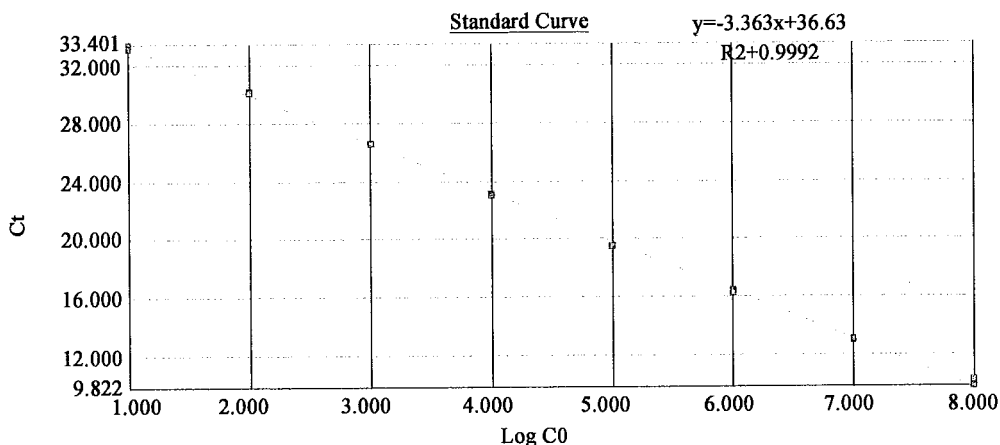


图6 Mad实时荧光PCR方法10倍系列稀释标准品的标准曲线

(六) 实时荧光PCR特异性试验

实时荧光PCR方法特异性分析显示：仅小鼠腺病毒DNA出现扩增曲线，对小鼠多瘤病毒、小鼠细小病毒MVM株、MPV株、小鼠巨细胞病毒(MCMV)、小鼠淋巴白血病毒(MLLV)、小家鼠螺杆菌(*H. muridarum*) DNA及细胞对照和空白对照均无扩增曲线(图7)。

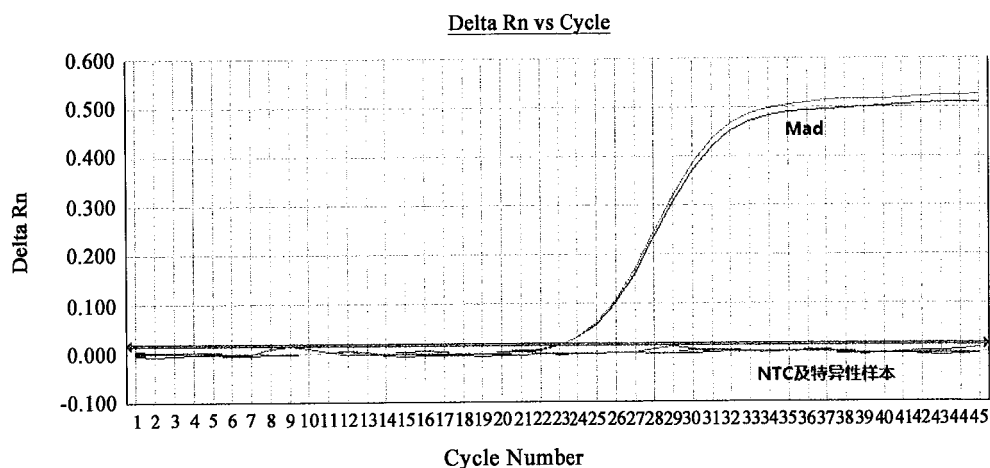


图7 实时荧光PCR特异性试验结果

(七) 实时荧光PCR重复性试验

将Mad质粒标准品进行梯度稀释，设置4个水平的重复性对照，包括：R1，不含Mad的样本；R2，Mad浓度为 2×10^4 copies/mL；R3，Mad浓度为 1×10^6 copies/mL，R4，Mad浓度为 1×10^8 copies/mL。进行检测方法重复性检测，批内及批间重复性试验的变异系数均小于2% (表9)，表明建立实时荧光PCR方法重复性好，方法稳定可靠。

表 9 Mad 重复性试验数据 (Ct) 及变异系数 (CV)

样本浓度/ (copies/mL)	10 次检测结果 (Ct 值)										CV 值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	0
2×10^4	34.56	34.97	34.25	33.98	34.12	34.65	33.79	34.65	34.58	34.97	1.17%
1×10^6	27.81	27.91	28.05	28.16	28.45	28.53	28.75	28.23	28.45	28.67	1.11%
1×10^8	21.98	22.03	21.79	22.29	22.45	22.36	22.17	22.28	22.23	22.38	0.94%

(八) 临床检测应用

1. 对人工感染 MAD 样本的检测

1) qPCR 检测组织病毒含量变化

感染后第 3 天及第 7 天小鼠各组织病毒核酸检测阳性率均为 100% (3/3), 其中以脾脏 100% 阳性检测率维持时间最长 (图 8A)。感染后第 7 天病毒核酸在脾脏组织中含最高, 其次是心脏、盲肠和胃, 最低的是肺脏和肝脏 (图 8B)。小鼠体内各组织病毒含量均在人工感染后第 7 天达到高峰 (肝脏在第 3 天), 随后病毒核酸开始下降 (图 8C、图 8D)。

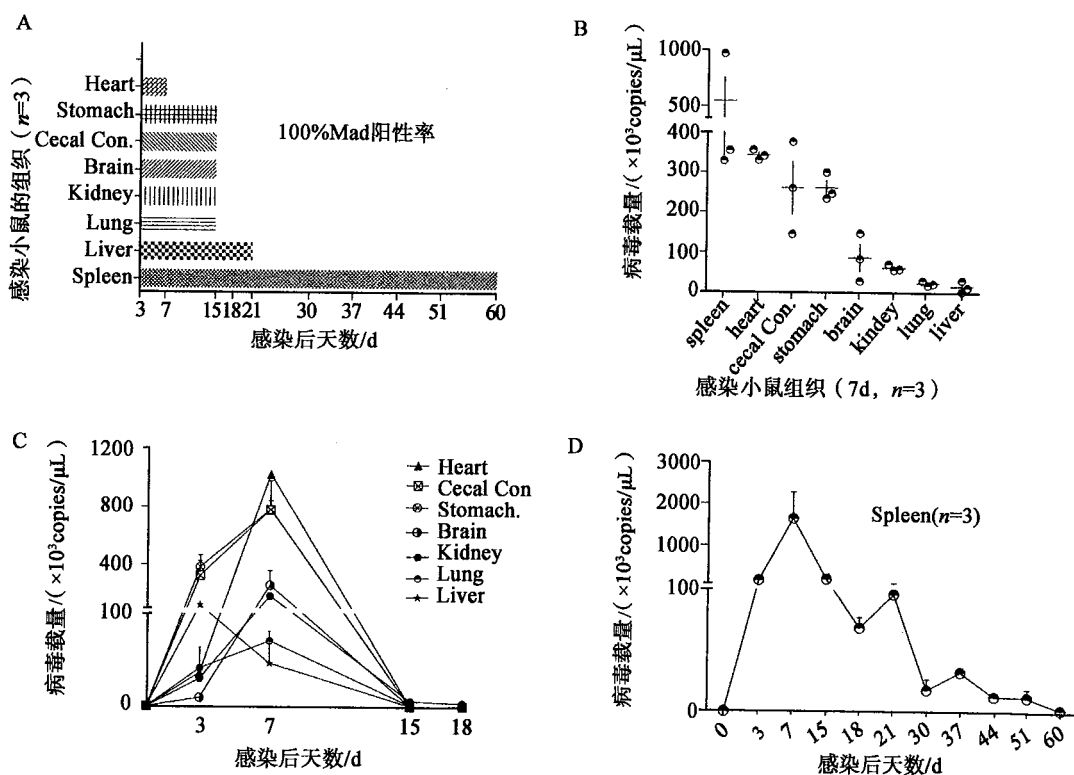


图 8 Mad 病毒在感染小鼠各组织差异

A. 100% 核酸阳性率在各组织的维持时间; B. 0~18 天心、盲肠内容物、胃、脑、肾、肺、肝 Mad 病毒核酸含量变化;
C. 各组织感染第 7 天核酸含量差异; D. 0~60 天脾脏 Mad 病毒核酸含量变化

2) 人工感染鼠 Mad 血清抗体滴度变化

感染小鼠体内抗体滴度随着感染时间迁移而升高, 接种后 15 天可测出阳性抗体[阳性率为 100% (3/3)], 在 37 天达到峰值, 此后至 60 天可一直维持高水平。为便于计算, 抗体滴度用 Log₂ 的指数表示 (图 9)。

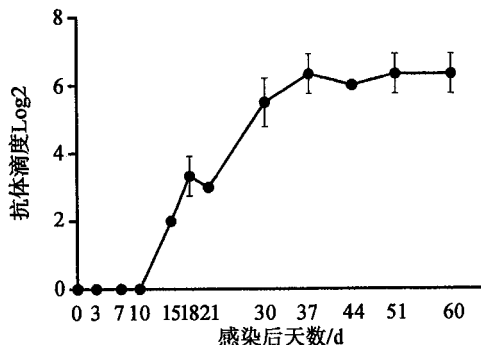


图 9 感染 BALB/c 小鼠抗 Mad 血清抗体的测定 ($n=3$)

2. 临床样品的检测应用

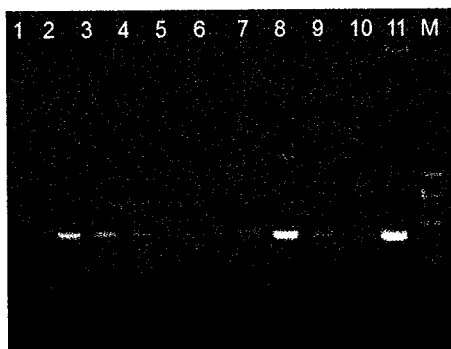


图 10 Mad 临床阳性样本普通 PCR 鉴定

(1) 送检 SPF 小鼠样品检测: 应用 Mad 普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法对 2012~2014 年送检的 100 份 SPF 级活体小鼠或粪便样品进行检测, 结果检出 0 份阳性, 阳性率为 0。

(2) 阳性样本普通 PCR 和测序鉴定: 荧光 PCR 检测 76 份开放环境先饲养小鼠样品, 检测到 8 份阳性; 使用普通 PCR 引物对阳性样本进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果显示片段大小为 280 bp 左右, 与预期片段大小一致, 并送公司测序, 证实为 Mad 阳性 (图 10、图 11)。

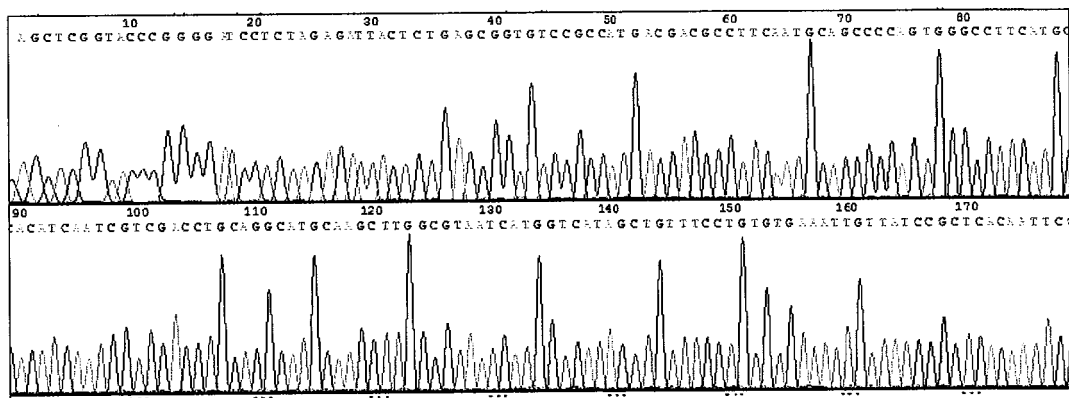


图 11 临床阳性样本测序图

3. 抗体检测与核酸检测结果比较

人工感染试验分别在接种小鼠腺病毒后每隔 3 天取样,对血清样本进行 ELISA 抗体检测,同时用 qPCR 及普通 PCR 检测方法进行组织样本 Mad 核酸检测。检测结果见表 10。结果可见,小鼠血清抗体在感染后第 15 天开始检出,第 18~60 天一直维持在高抗体水平,而 qPCR 及普通 PCR 检测方法在感染后第 3 天开始检测到 Mad 核酸阳性,第 3 天组织含毒量最高,此后组织排毒逐渐下降,持续至第 60 天脾脏组织仍能检测到 Mad 核酸阳性,含毒量较高组织为脾脏。普通 PCR 检测阳性率结果与 qPCR 接近。

表 10 Mad 人工感染试验抗体检测与分子检测结果比较

样本采集时间/d	感染组		
	抗体阳性率	qPCR 各组织阳性率	普通 PCR 各组织阳性率
0	0/3	0/24	0/24
3	0/3	24/24	24/24
7	0/3	24/24	23/24
15	3/3	15/16	5/16
18	3/3	13/24	4/19
21	3/3	16/24	10/24
30	2/2	10/24	5/24
37	3/3	16/24	7/24
44	3/3	9/24	3/24
51	3/3	4/24	4/24
60	3/3	5/24	1/24

该结果表明,采用血清学和病原学检测方法对同一只动物进行检测时,可能出现不一致的结果,这是由于病原感染动物后的不同阶段,抗原和抗体不同消长规律所造成的。在本感染实验中可见在 Mad 感染后约 2 周左右出现抗体,早期抗体检测为阴性,而抗原分子检测早在感染后 3 天就能检测到;在 Mad 抗体维持高滴度水平期间,仍然可在动物组织中检测到 Mad 病原核酸,抗原抗体同时存在,因此在临床监测中,分子检测方法可作为抗体检测的有效补充手段。

第七节 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

本标准的编制依据为现行的法律、法规和国家标准,与这些文件中的规定相一致。目前实验动物国家标准没有小鼠腺病毒普通 PCR 和实时荧光 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

- 贺争鸣,范文平,卫礼,等. 1997. 小鼠腺病毒单克隆抗体的研制及初步应用. 中国实验动物学报, 12: 76-79.
- 贺争鸣,吴惠英,卫礼,等. 1998. 小鼠腺病毒在鼠群中心感染及血清学检测方法的比较. 北京实验动物学, 2: 16-20.
- 田克恭. 1992. 实验动物病毒性疾病. 北京: 中国农业出版社: 41-45.
- 王吉,卫礼,巩薇,等. 2008. 2003~2007 年我国实验小鼠病毒抗体检测结果与分析. 实验动物与比较医学, 6: 394-396.
- 王翠娥,陈立超,周倩,等. 2014. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析. 实验动物科学, 2: 20-24.
- 姚新华,郭英飞. 2015. 实时荧光定量 PCR 快速检测腺病毒方法的建立与评价. 解放军预防医学杂志, 4 (33): 127-129.
- Adams MJ. 2012. Virus Taxonomy: Adenoviridae-Family. Elsevier Inc: 125-141.
- Baker DG. 1998. Natural Pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. Clinical Microbiology Reviews, 11 (2): 231-266.
- Becker SD, Bennett M, Stewart JP, et al. 2007. Serological survey of virus infection among wild house mice (*Mus domesticus*) in the UK. Lab Anim, 41: 229-238.
- 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 (4): 341-351.
- Blailock ZR, Rabin ZR, Melnick JL. 1967. Adenovirus endocarditis in mice. Science, 157: 69-70.
- Blailock ZR, Rabin ER, Melnick JL. 1968. Adenovirus myocarditis in mice. An electron microscopic study. Exp Mol Pathol, 9 (1): 84-96.

- Charles PC, Guida JD, Brosnan CF, et al. 1998. Mouse adenovirus type-1 replication is restricted to vascular endothelium in the CNS of susceptible strains of mice. *Virology*, 245: 216-228.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *The Journal of General Virology*, 84: 2895-2908.
- Ginder DR. 1964. Increased susceptibility of mice infected with mouse adenoviruses to *Escherichia coli*-induced pyelonephritis. *J Exp Med*, 120: 1117-1128.
- Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD, et al. 2009. Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *The Journal of Virology*, 83 (18), 93-98.
- Guida JD, Fejer G, Pirofski LA, et al. 1995. Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice. *J Virol*, 69: 7674-7681.
- Hartley JW, Rowe WP. 1960. A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology*, 11: 645-647.
- Hashimoto K, Sugiyama T, Sasaki S. 1996. An Adenovirus Isolated from the Feces of Mice I. Isolation and identification. *Japanese Journal of Microbiology*, 10 (2): 115-125.
- Klempa B, Krüger DH, Auste B, et al. 2009. A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. *Journal of Virology*, 83 (11): 5749-5759.
- McCarthy MK, Procario MC, Twisselmann N, et al. 2015. Proinflammatory effects of interferon gamma in mouse adenovirus 1 myocarditis. *J Virol*, 89 (1): 468-479.
- van der Veen J, Mes A. 1974. Serological classification of two mouse adenoviruses. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 45 (4): 386-387.