

第十九章 T/CALAS 47—2017《实验动物 猴免疫缺陷病毒 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 猴免疫缺陷病毒 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)、“非人灵长类实验动物标准化服务平台”(穗科信字 2012 224-41 号)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、特异的猴免疫缺陷病毒普通 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)、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)和“非人灵长类实验动物标准化服务平台”(穗科信字 2012 224-41 号)课题研究基础上,组织编写实验动物猴免疫缺陷病毒 RT-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 猴免疫缺陷病毒 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。

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 5 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 4 条,未采纳 1 条。对《实验动物 猴免疫缺陷病毒 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猴免疫缺陷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 猴免疫缺陷病毒 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

非人灵长类动物由于具有与人高度相似的生理生化特征,在人类重大疾病的基础研究及新药临床评价中越来越受到人们的重视,如猴艾滋病(SAIDS)就是研究人艾滋病的主要动物模型。近年来,全世界实验猴的使用量剧增,我国每年出口和引进实验猴的数量也增多。为保证实验结果的科学性、准确性和可重复性,实验猴的质量标准化程度至关重要的。在实验猴疾病控制方面,已报道的多种实验猴病原如猴免疫缺陷病毒、猴淋巴细胞白血病病毒、猴逆转 D 型病毒、猴疱疹 B 病毒等,这些病原不仅影响实验猴质量,对实验结果造成干扰,而且有感染人或潜在感染人的危险,是国标中 SPF 级猴需要排除的病原体,也是进出口猴必须检测项目。

SIV 是 RNA 病毒,属逆转录病毒科、慢病毒亚科。SIV 感染宿主细胞后,首先将病毒的 RNA 转录成双链 DNA,后者再在整合酶的作用下,整合于宿主 DNA 中,形成前病毒。目前,国内 SIV 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。SIV 感染猴通常表现为无症状状态,且在感染的初期或终末期,动物免疫系统功能低下,常规血清学 SIV 抗体检测可能出现假阴性的结果,抗体检测方法不能真实反映动物体内的 SIV 病毒感染状态。对于需要进行实验动物种群净化的单位来说,通常需要增加病原检测方法。传统的 SIV 病原检测以病毒分离结果作为衡量病毒感染情况的重要指标,病毒分离的方法操作相对简便,结果稳定,特异性好,但培养周期过长,敏感性低,尤其在疾病的潜伏期和平台期,即血浆 RNA 病毒载量降低的情况下,病毒分离出现假阴性结果,不能真实反映 SIV 感染猴的病毒感染状态。因此,建立一个敏感的实验技术,对实验猴 SIV 感染后体内 SIV 病毒 RNA 或 DNA 前病毒水平进行实时监测是十分有必要的。

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 SIV 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除了应用于实验动物质量检测之外,还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,具有快速、高效的特点。广东省实验动物监测所自 2011 年起进行猴免疫缺陷病毒普通 RT-PCR 及荧光定量 RT-PCR 检测方法研究,并通过大量临床样本试验证明建立的方法敏感高、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/DNA 抽提到 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猴免疫缺陷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;检测过程中防污染措施;附录,共 10 章。现将《实验动物 猴免疫缺陷病毒 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

本标准适用于实验猴及其产品、细胞培养物、实验猴环境和猴源性生物制品中猴免疫缺陷病毒的检测。

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/T 14926.62—2001 《实验动物 猴免疫缺陷病毒检测方法》

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 4 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.

巢式 PCR nest polymerase chain reaction

巢式 PCR 通过两轮 PCR 反应, 使用两套引物扩增特异性的 DNA 片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第二对引物以第一轮 PCR 产物为模板, 特异性地扩增位于首轮 PCR 产物内的一段 DNA 片段, 从而大大提高了检测的敏感性和特异性。

4.

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

5.

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

DEPC 焦碳酸二乙酯 diethyl pyrocarbonate

DNA 脱氧核糖核酸 deoxyribonucleic acid

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

SIV 猴免疫缺陷病毒 Simian immunodeficiency virus

四、检测方法原理

猴免疫缺陷病毒属于逆转录病毒科、正逆转录病毒亚科、慢病毒属。病毒基因组的复制和转录都需要经过 DNA 中间体, 这种 DNA 中间体称为前病毒。在临床检测中可通过检

测样本中的 SIV RNA 或前病毒 DNA 进行诊断。根据猴免疫缺陷病毒保守序列病毒核酸保守序列 gag 基因设计巢式 PCR 引物 Gag-outF/R 和 Gag-inF/R, 并设计一对荧光 PCR 引物及探针; 通过巢式 PCR 或实时荧光 PCR 对 cDNA 进行扩增; 也可以直接提取样本 DNA, 对 SIV 前病毒 DNA 进行 PCR 扩增, 根据 PCR 或实时荧光 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。

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) 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。

(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) 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。

(9) 反转录试剂: PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa 公司) 或其他等效产品。逆转录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。

(10) PCR 试剂: Premix Taq[™] (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。

(11) DNA 分子质量标准: 100~2000 bp。

(12) 50×TAE 电泳缓冲液, 配制方法在标准附录中给出。

(13) 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。

(14) 1.5%琼脂糖凝胶, 配制方法在标准附录中给出。

(15) 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。

(16) 引物和探针:根据表 1、表 2 的序列合成引物及探针,引物及探针加无 RNase 去离子水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 储备液, -20°C 保存。

表 1 SIV 巢式 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小/bp
Gag-outF	TGTCAAAAAATACTTTCGGTCTTAG	796
Gag-outR	TGTTTGAGTCATCCAATTCTTTACT	
Gag-inF	TAAATGCCTGGGTAAAAT	313
Gag-inR	TGGTATGGGGTTCTGTTGTCTGT	

表 2 SIV 实时荧光 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
TaqSiv-F	GGAAACAGGAACAGCAGAACTAT	97
TaqSiv-R	ACCACCTATTTGTTGTACTGGGTA	
TaqMan-probe	FAM-CCTCCTCTGCCGCTAGATGGTGCT-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

标准规定了动物血液样本、动物组织样本、细胞培养物的采集及处理方法。

(三) 样本 RNA 提取

规定了样本 RNA 的提取方法。

(四) 样本 DNA 提取

规定了样本 DNA 的提取方法。

(五) 巢式 RT-PCR 检测

规定了巢式 RT-PCR 反应体系、反应参数及结果检测方法。

1. RNA 逆转录

RNA 逆转录反应体系见表 3。反应液的配制在冰上操作,反应条件为 37°C 25 min; 85°C 5 s。反应产物即为 cDNA,立即进行下一步 PCR 反应;若不能立即进行 PCR, cDNA 保存温度不能低于 -20°C ,长时间保藏应置于 -80°C 冰箱。10 μL 反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA。若使用其他公司逆转录试剂,应按照其说明书规定的反应体系和反应条件进行操作。

表 3 RNA 逆转录反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
5×PrimeScript Buffer	2	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5	
Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	25 pmol/L
Random Primer 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	50 pmol/L
RNA 模板	5	
RNase Free dH ₂ O	1.5	
总体积	10	

2. 巢式 PCR 反应

巢式 PCR 反应体系见表 4。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, 以含有猴免疫缺陷病毒的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板; 以不含有猴免疫缺陷病毒 RNA 样品 (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; 空白对照为不加模版对照 (no template control, NTC), 即在反应中用水来代替模板。

表 4 巢式 PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
第一轮 PCR		
2×Premix Taq Mix	10	1×
ddH ₂ O	6.4	
Gag-outF (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Gag-outR (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
cDNA 模板/前病毒 DNA	2	
总体积	20	
第二轮 PCR		
2×Premix Taq Mix (Loading dye mix)	10	1×
ddH ₂ O	7.4	
Gag-in F (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Gag-in R (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
第一轮 PCR 产物	1	
总体积	20	

3. 巢式 PCR 反应参数

巢式 PCR 反应参数见表 5。

表 5 巢式 PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
第一轮 PCR	94	5 min	1
	95	30 s	20
	55	30 s	

续表

步骤	温度/℃	时间	循环数
第二轮 PCR	72	30 s	
	72	5 min	1
	94	3 min	1
	95	30 s	35
	55	30 s	
	72	30 s	
	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。

4. RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

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。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。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。

(六) 实时荧光 RT-PCR

规定了实时荧光 RT-PCR 的反应体系、反应参数。

1. 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 6。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，以含有猴免疫缺陷病毒的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板；以不含有猴免疫缺陷病毒 RNA 样品（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；空白对照为不加模板对照（no template control, NTC），即在反应中用水来代替模板。

表 6 实时荧光 RT-PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ One Step RT-PCR Buffer III	25	1 $\times$
Ex Taq HS (5 U/ μL)	1	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	1	
Taqsv-F (10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	500 nmol/L
Taqsv-R (10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	500 nmol/L
探针 (5 $\mu\text{mol/L}$)	2	250 nmol/L
Rox	1	
RNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	5	
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

实时荧光 RT-PCR 反应参数见表 7, 反应结束, 根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

表 7 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度/℃	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42	5 min	否	1
预变性	95	30 s		1
变性	95	5 s		40
退火, 延伸	60	34 s	是	

注: 可使用其他等效的一步法或两步法实时荧光 PCR 检测试剂盒进行, 反应体系和反应参数可做相应调整。

八、结果判定

(一) 巢式 RT-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 (313 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, 两轮 PCR 结束, 若样本未出现预期大小 (313 bp) 的扩增条带, 则可判定样本猴免疫缺陷病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 两轮 PCR 结束, 若样本出现预期大小 (313 bp) 的扩增条带, 则可判定样本猴免疫缺陷病毒核酸检测阳性。

(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, 则判定样品未检出猴免疫缺陷病毒。

(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, 则判断样品中检出猴免疫缺陷病毒。

(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 时, 则判定样品未检出猴免疫缺陷病毒。重新检测后, 若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样品猴免疫缺陷病毒可疑, 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猴免疫缺陷病毒特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90%以上,可确诊待检样本猴免疫缺陷病毒核酸阳性,否则判定猴免疫缺陷病毒核酸阴性。

九、检测过程中防止交叉污染的措施

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) 猴免疫缺陷病毒(SIV)普通 PCR 检测方法的建立

1. 材料与方法

1) 毒株、载体和 SIV 人工感染阳性样本

猴免疫缺陷病毒 SIVmac251 毒株由美国伊利诺伊大学陈维政教授惠赠,猴逆转 D 型病毒 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5 共 5 个血清型毒株由中国科学院昆明动植物研究所贾昆龙教授惠赠。猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型(STLV-1)阳性血液病料由本实验室保存。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)。恒河猴 SIV 感染模型由本实验室制作,15 份恒河猴 SIV 人工感染血液样本由本实验室-80℃保存。

2) 引物的设计合成

利用 Primer Premier5.0 引物设计软件,根据 GenBank 数据库中登记的 SIV gag 基因序列,设计一套巢式特异性 PCR 引物,并使用 GenBank 的 Blast 软件与数据库同一病毒的其他毒株及其他种类病毒序列进行比较,保证引物序列的通用性和特异性。引物由 Invitrogen(广州)公司合成。引物序列见表 1。

3) 病毒和样品核酸提取

血浆 RNA 的抽提按 TRIzol(Invitrogen)操作说明书进行。全血样本使用 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen)按操作说明书进行。

4) SIV 普通 RT-PCR 检测方法的建立

SIV 属于逆转录病毒,也可以提取病毒 RNA,逆转录得到 cDNA,再按照优化的反应体系和条件进行 PCR 扩增;也可以直接提取病毒 DNA 进行 PCR 检测。

RNA 逆转录:采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT Kit 对制备的 RNA 进行逆转录。反应体系为 10 μ L: 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μ L, Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 0.5 μ L, Random Primer 6 mers (100 μ mol/L) 0.5 μ L, RNA 模板 5 μ L, RNase Free dH₂O 1.5 μ L; 反应条件为: 37℃ 25 min, 85℃ 5 s。

巢式 PCR 反应: PCR 试剂采用 TaKaRa 公司的 rTaq Premix, 采用巢式 PCR 反应进行检测, 第一轮 PCR 反应体系为 20 μL : cDNA/DNA 模板 2 μL , 2 $\times$ Premix Buffer (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 补 H_2O 至 20 μL ; 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 20 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。第二轮 PCR 反应体系 20 μL : 第一轮 PCR 反应产物为模板取 1 μL , 2 $\times$ Premix Buffer (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μL , 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 补 H_2O 至 20 μL ; 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。反应完成后取 10 μL 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

5) 特异性试验

采用建立的 SIV 普通 PCR 方法对 SIV、SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、STLV 前 DNA 作为模板进行检测, 验证该方法的特异性。

6) 敏感性试验

将 4) STV 普通 RT-PCR 检测方法的建立中反应得到的目的片段用胶回收试剂盒回收, 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 ($\text{copies}/\mu\text{L}$) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ DNA 浓度 ($\text{g}/\mu\text{L}$) / 质量 MW (g/mol)。其中, 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。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, 按 4) STV 普通 RT-PCR 检测方法的建立中所述方法进行检测, 测定检测方法的灵敏度。

7) SIV 实验感染猴阳性样品中的检测

利用血液基因组提取试剂盒提取 1 mL 血浆中病毒 RNA, 利用建立的 SIV 普通 RT-PCR 检测方法对 15 份恒河猴 SIV 人工感染样本进行检测。

2. 结果

1) SIV 巢式 PCR 检测方法的建立

按照建立的 SIV 巢式 PCR 方法反应体系和条件进行 PCR 扩增, 完成后取 5 μL 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果 SIV 阳性样本在 313 bp 位置有一条目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。

2) SIV 巢式 PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 SIV 巢式 PCR 方法对 SIV、SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、STLV 前 DNA 作为模板进行检测, 结果显示只有 SIV 有目的条带, 其他病原核酸均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 2)。

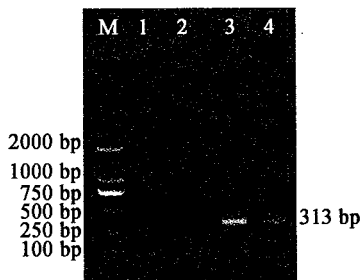


图 1 SIV 巢式 PCR 电泳结果
M, DNA Marker DL2000; 1、2, 阴性对照; 3、4, SIV

3) SIV 巢式 PCR 检测方法敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution 做 10 倍系列稀释, 得到 $2.3 \times 10^9 \sim 2.3 \times 10^0$ copies/ μL 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 SIV 检测灵敏度为 2.3×10^3 copies/ μL (图 3)。

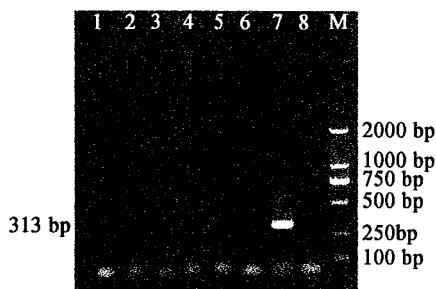


图 2 SIV 巢式 PCR 特异性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1~5, SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5; 6. STLV; 7. SIV; 8. 阴性对照

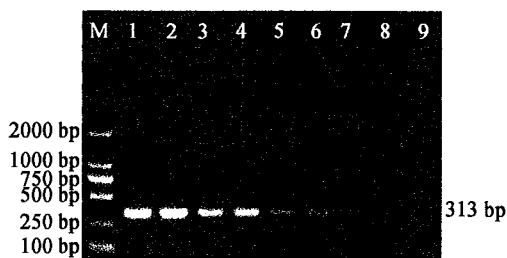


图 3 SIV 巢式 PCR 检测方法敏感性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1~9, 依次为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL SIV 质粒 DNA

4) SIV 实验感染猴阳性样品中的检测

利用建立的 SIV 巢式 PCR 检测方法对 15 份恒河猴 SIV 人工感染样本进行检测, 结果 15 份样本均为阳性 (图 4)。



图 4 SIV 实验感染猴阳性样品中的检测

(二) 猴免疫缺陷病毒 (SIV) 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立

1. 材料与方法

1) 菌株、载体和临床样本

猴免疫缺陷病毒 SIVmac251 毒株由美国伊利诺伊大学陈维政教授惠赠; 猴逆转 D 型病毒 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5 共 5 个血清型毒株由中国科学院昆明动植物研究所贾昆龙教授惠赠; 猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型 (STLV-1) 阳性血液病料由本实验室保存; 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); 恒河猴 SIV 感染模型由本实验室制作, 90 份恒河猴 SIV 人工感染血液样本由本实验室 -80°C 保存; 临床样品为 40 份食蟹猴血液样品, 由广东省某猴场送检。

2) 引物及探针的设计合成

利用 Primer Express3.0 引物探针设计软件 (Applied Biosystems), 根据 GenBank 数据库中登记的 SIV gag 基因序列, 设计一套特异性实时荧光 RT-PCR 引物及探针。使用

GenBank 的 Blast 软件与数据库同一病毒的其他毒株及其他种类病毒序列进行比较, 保证引物序列的通用性和特异性。同时设计一对普通 PCR 引物 (gag-outF1/R1) 扩增 gag 基因片段, 包含 qPCR 扩增片段。引物和探针由 Invitrogen (广州) 公司合成。引物和探针序列见表 2。

3) 病毒和样品核酸提取

血浆 RNA 的抽提按 TRIzol (Invitrogen) 操作说明书进行。全血样本使用 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), 按操作说明书进行。

4) SIV 质粒标准品的制备

以提取的 SIV DNA 为模板, 以普通 PCR 外引物 gagoutF1/R1 为引物, 用 Premix Ex Taq (TaKaRa 公司) 进行 PCR, 反应体系为: 2×Premix Ex Taq 25 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, DNA 5 μL, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μL。反应条件: 94℃ 2 min, 一个循环; 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 60 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。将反应得到目的片段用胶回收试剂盒回收, 将回收的目的片段连接至 pMD-19T 载体, 并转化至 DH5α 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/μL) = 6.022×10^{23} (copies/mol) × DNA 浓度 (g/μL) / 质量 MW (g/mol)。其中, MW = DNA 碱基数 (bp) × 660 daltons/bp, DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

5) 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 TaKaRa 公司 Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒操作说明配制 SIV 实时荧光 RT-PCR 反应体系, 以 SIV 质粒标准品 (1×10^5 copies/μl) 作为反应模板, 采用矩阵法对荧光 PCR 反应体系中引物 (0.1~1.0 μmol/L) 和 TaqMan 探针浓度 (0.1~0.70 μmol/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, ΔRn) 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。

SIV 属于逆转录病毒, 也可以提取病毒 RNA, 逆转录得到 cDNA, 再按照优化的反应体系和条件进行 PCR 扩增。逆转录试剂采用 TaKaRa 公司的 Primerscript RT reagent Kit (Perfect Real Time), 反应体系: 2 μL 5×Primerscript Buffer, 0.5 μL oligo dT (50 μmol/L), 0.5 μL Random 6 mers (100 μmol/L), 0.5 μL Primerscript RT Enzyme Mix I, 约 1 μg RNA, 补水至 10 μL, 混匀离心后于 37℃ 作用 15 min, 最后于 85℃ 作用 5 min 失活 Primerscript RTase。

6) 特异性试验

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对 SIV、SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、STLV 前 DNA 作为模板进行 SIV qPCR 特异性检测, 同时设 Cem174 细胞 DNA 为阴性对照, 水作为空白对照 (NTC), 验证该方法的特异性。

7) 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 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^0$ copies/μL 系列标准模板。利用 5) 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化中优化

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。

8) 重复性试验

对 6 份 10 倍系列稀释的质粒标准品 ($2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^2$ 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变异系数 (CV%)。

9) SIV 实时荧光 RT-PCR 检测方法的检测应用

(1) 恒河猴 SIV 感染模型中的检测应用。

恒河猴 SIV 感染模型由本实验室制作, 3 只 3~4 岁雄性恒河猴购于广东蓝岛生物技术有限公司, 隔离检疫后静脉接种 $1.6 \times 10^2 \sim 7.2 \times 10^3$ TCID₅₀/mL SIV 病毒液。动物接种病毒后应用 SIV 实时荧光 RT-PCR 检测方法对 SIV 实验感染猴感染急性期 (1~56 天)、无症状潜伏期和 ARC 期 (56~690 天) 血浆中 SIV 病毒载量进行了连续采样测定。前 3 个月每周采集血液进行病毒载量的检测, 之后每个月采集血样进行检测。

利用 Qiagen 公司 RNA 大提试剂盒提取 1 mL 血浆中病毒 RNA, 参照 TaKaRa 公司逆转录试剂盒操作说明按 10 μ L 反应体系配制反应试剂: 42℃作用 20 min, 95℃ 2 min, 逆转录获得 cDNA 模板。参照 5) 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化中所建立和优化的反应体系和条件进行 qPCR, 测定血浆病毒载量。

(2) 在临床样品中的检测应用。

对送检的 40 份猴血样品提取 PBMC DNA 后按建立的方法进行检测。

2. 结果

1) SIV 质粒标准品制备

用 PCR 扩增 SIV 得到大小约 796 bp 的特异片段与 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 (图 5)。重组质粒的测序结果与目的基因序列同源性为 100%, 表明质粒标准品制备成功。

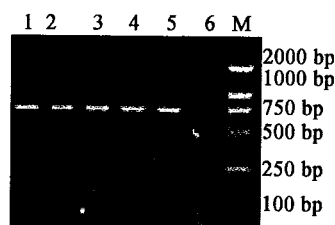


图 5 SIV 重组质粒 PCR 鉴定电泳结果

M, Marker DL2000; 1~5, 筛选到的 pMD-SIV-gag 质粒阳性克隆菌落, 目的片段约 796bp; 6, 阴性对照

2) 实时荧光 RT-PCR 反应体系的建立和优化

经优化后的 PCR 反应体系: 2×Premix Ex

Taq 10 μ L, SIV 上游引物终浓度均为 0.6 μ mol/L, SIV 下游引物终浓度均为 0.8 μ mol/L (表 8、图 6), 探针终浓度 0.2 μ mol/L (表 9、图 7), SIV DNA 模板 2 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 20 μ L。反应条件: 95℃ 30 s, 一个循环; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 45 个循环, 60℃延伸结束后收集荧光。

表 8 引物优化 Ct 值结果

SIV-R1 终浓度	SIV-F1 终浓度					
	100 nmol/L	200 nmol/L	400 nmol/L	600 nmol/L	800 nmol/L	1000 nmol/L
100 nmol/L	27.94	27.76	27.80	27.52	27.34	27.25

续表

SIV-R1 终浓度	SIV-F1 终浓度					
	100 nmol/L	200 nmol/L	400 nmol/L	600 nmol/L	800 nmol/L	1000 nmol/L
200 nmol/L	28.00	27.52	27.57	27.39	27.34	27.21
400 nmol/L	27.89	27.43	27.22	27.27	27.27	27.11
600 nmol/L	28.06	27.22	27.42	27.20	27.25	27.27
800 nmol/L	29.24	27.46	27.24	27.16	27.25	27.32
1000 nmol/L	28.09	27.46	28.00	27.47	27.29	27.11

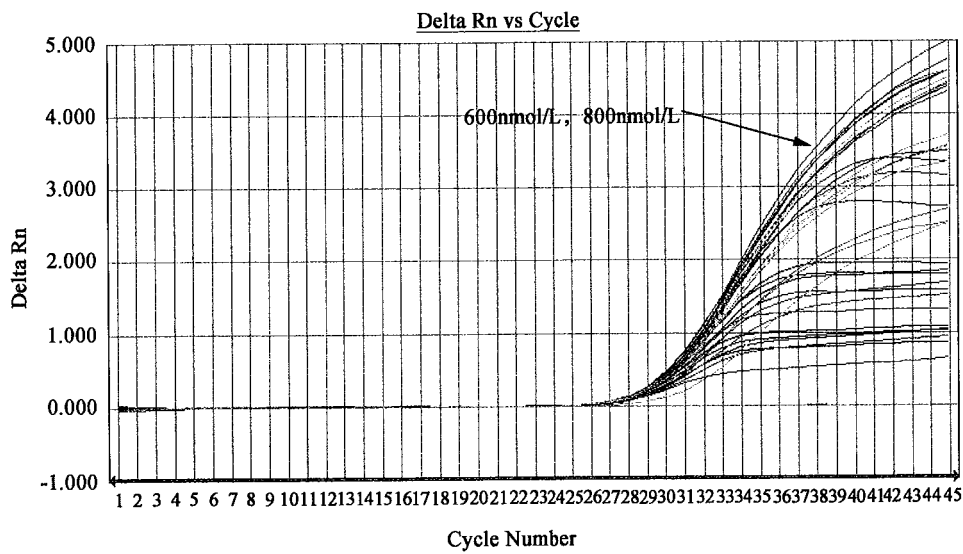


图 6 引物优化扩增曲线

表 9 探针优化 Ct 值结果

	SIV-P 终浓度						
	100 nmol/L	200 nmol/L	300 nmol/L	400 nmol/L	500 nmol/L	600 nmol/L	700 nmol/L
Ct 值	27.93/28.19	28.13/28.23	28.43/28.51	28.60/28.64	29.05/28.77	29.33/29.13	30.00/29.74

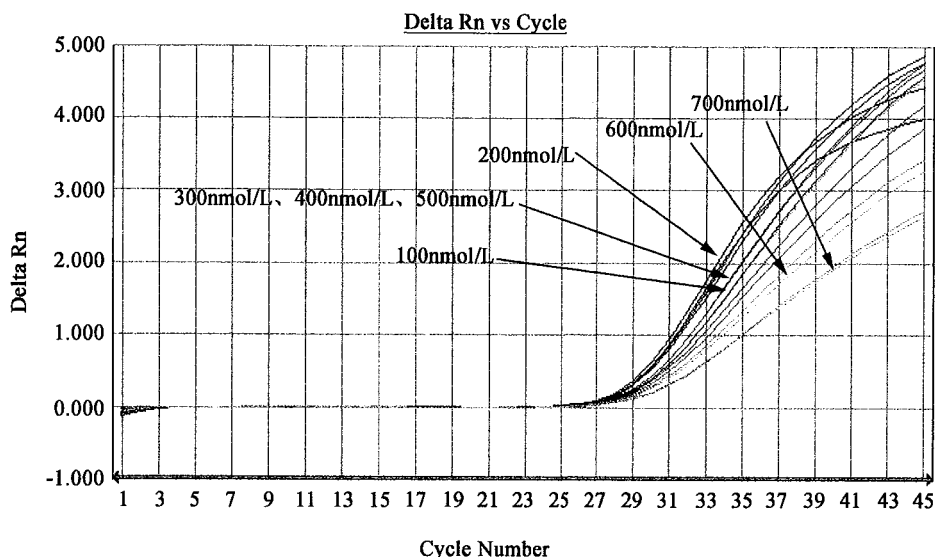


图7 探针优化扩增曲线

3) 特异性试验

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对 SIV、SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、STLV 前 DNA 进行检测, 结果除 SIV 为阳性外, 其他病毒均为阴性, 用空白 Cem174 细胞 DNA 和水空白对照也均未出现扩增, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 8)。

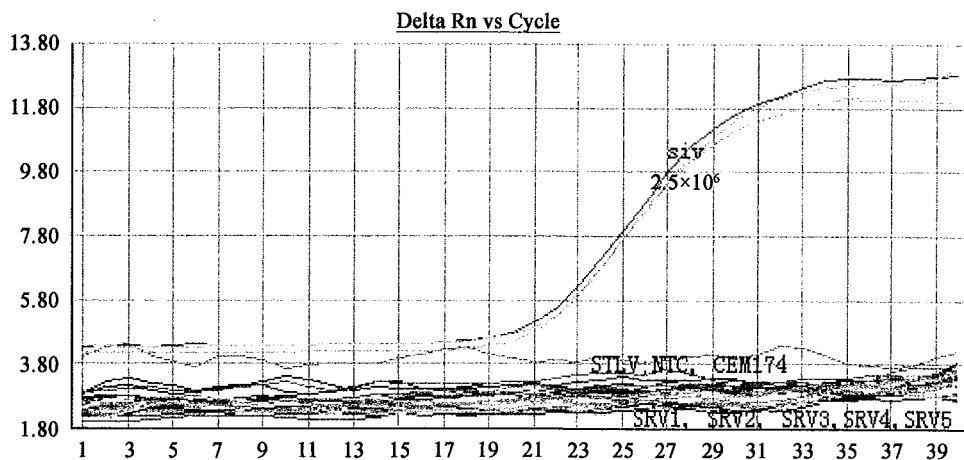


图8 SIV实时荧光 RT-PCR 特异性检测结果

4) 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 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^0$ 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 9。由图可见, 各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等, Cem174 细胞 DNA 和 ddH₂O 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, 标准质粒在 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 范围内具有良好的线性关系, 结果见图 10。其线性回归方程为 $C_t = -3.26 \times \lg(\text{拷贝数}) + 41.02$, 标准曲线斜率为 -3.26 , 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.26} - 1 = 1.027$, 即扩增效率为 102.7%, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 说明 PCR 扩增该标准品的效率较高, 线性关系良好。 $2 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 组因模板浓度较低无扩增曲线。因此, 本研究中标准品定量 200 拷贝以上能表现较好的线性和相关性, 故本方法检测的灵敏度为 200 个拷贝。定性判定可认为 C_t 值大于 35 为阴性, C_t 值小于 35 为阳性。

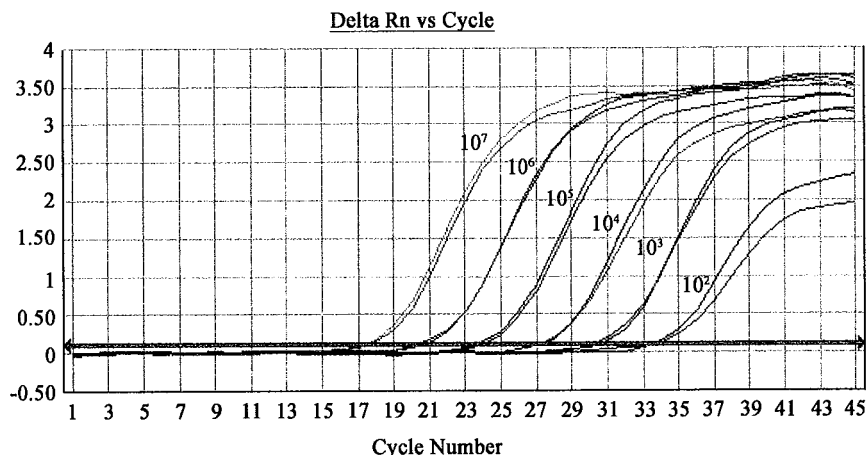


图 9 10 倍系列稀释质粒标准品的荧光定量扩增曲线

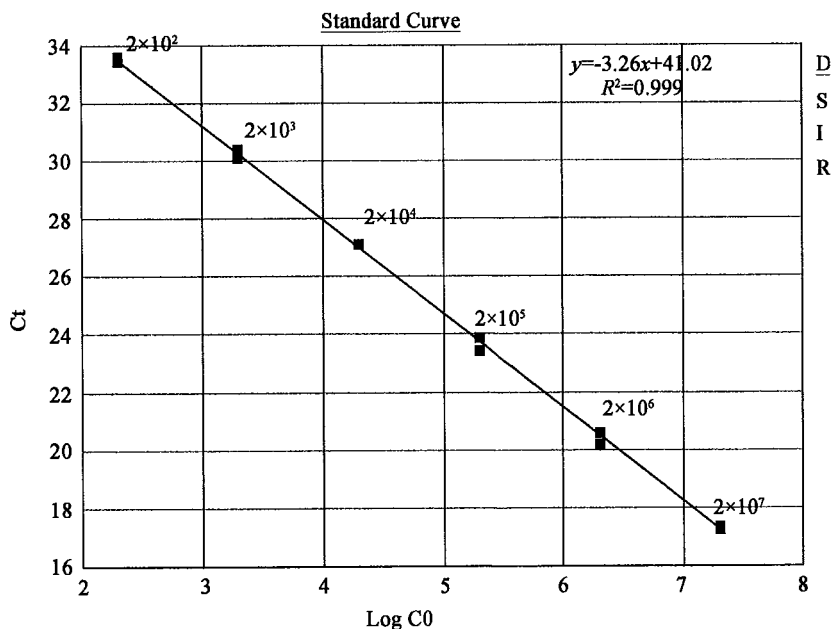


图 10 10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

5) 重复性试验结果

通过对 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^2$ copies/ μ L 6 个稀释度样本进行重复性检测, 重复性试验的变异系数均小于 1 % (表 10), 表明建立实时荧光 RT-PCR 方法重复性好, 方法稳定可靠。

表 10 SIV 荧光定量检测方法的重复性实验

模板/ (copies/well)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 平均值	标准差 (SD)	变异系数 (CV) /%
2×10^7	17.26	17.35	17.26	17.21	17.29	17.27	0.051	0.30
2×10^6	20.2	20.6	20.37	20.38	20.71	20.45	0.202	0.99
2×10^5	23.9	23.4	23.46	23.56	23.48	23.56	0.198	0.84
2×10^4	27.1	27.09	27.03	27.53	27.11	27.17	0.203	0.75
2×10^3	30.13	30.41	30.78	30.48	30.01	30.36	0.304	1.00
2×10^2	33.42	33.6	33.76	33.8	33.15	33.55	0.267	0.80

6) SIV 实时荧光 RT-PCR 检测方法在 SIV 实验感染猴阳性样品中的检测应用

应用 SIV 实时荧光 RT-PCR 检测方对 SIV 实验感染猴感染急性期 (1~56 天)、无症状潜伏期和 ARC 期 (56~690 天) 血浆中 SIV RNA 载量进行了连续采样测定。结果显示, 所建立的 SIV RNA 实时荧光 RT-PCR 检测系统最低检测限度为每反应 5000 DNA 拷贝, Ct 值和 DNA 拷贝数呈线性关系 ($R^2 > 0.990$)。本研究中对标准品由 $10^9 \sim 10^1$ 的 10 倍倍比稀释作为反应模板验证复合探针的检测灵敏性, 发现模板在 $10^7 \sim 10^2$ copies 范围之内, 理论上其定量准确性可以达到 200 个拷贝, 但我们在对样品 cDNA 进行倍比稀释进行扩增时, 只有 5000 copies 以上能表现良好的浓度相关性, 因此本研究中对 5000 copies 以下的样品设置为检测极限值, 这也就降低了定量检测的灵敏度。这可能与我们的标准品是用质粒来进行定量而忽略了逆转录效率及 RNA 提取率有关。

数据分析结果可见, 在感染急性期, 血浆病毒载量急速上升, 最高可以达到 10^8 RNA copies/mL 血浆 (表 11), 随后出现缓慢下降, 下降程度可达 2 个数量级以上; 无症状潜伏期, 血浆病毒载量维持相对稳定, 5 只感染猴维持在 10^4 RNA copies/mL 血浆以上 (图 11)。感染后 510 天, 477 号猴死亡, 死前病毒载量未出现大幅度上升, 但与感染第 1 年相比, 上升 10.9%, 具有显著差异。感染 690 天, 649 号猴的血浆病毒载量出现缓慢地上升, 与感染第 1 年相比上升 17.1%, 也具有显著差异; 623 号猴的血浆病毒载量出现下降趋势, 下降至 10^4 RNA copies/mL 血浆以下, 与感染第 1 年相比下降 7.7%, 无显著差异。

感染急性期 SIV 感染猴的血浆病毒载量出现一过性上升; 进入无症状潜伏期和 ARC 期, 维持稳定的病毒载量变化。649 号、477 号猴感染第 2 年比第 1 年病毒载量出现上升趋势, 623 号猴出现下降趋势。

表 11 SIV 感染急性期血浆 SIV 病毒载量

(单位: copies/mL 血浆)

时间/d	动物编号		
	477	623	649
7	1.82×10^8	5.72×10^8	5.15×10^8
14	1.93×10^8	2.54×10^8	1.26×10^9
21	1.09×10^8	1.70×10^8	2.20×10^8
35	7.16×10^6	3.53×10^8	2.30×10^8
42	5.19×10^6	3.23×10^6	6.73×10^6
49	7.50×10^5	6.46×10^5	5.96×10^7
56	9.25×10^5	7.68×10^5	1.38×10^7

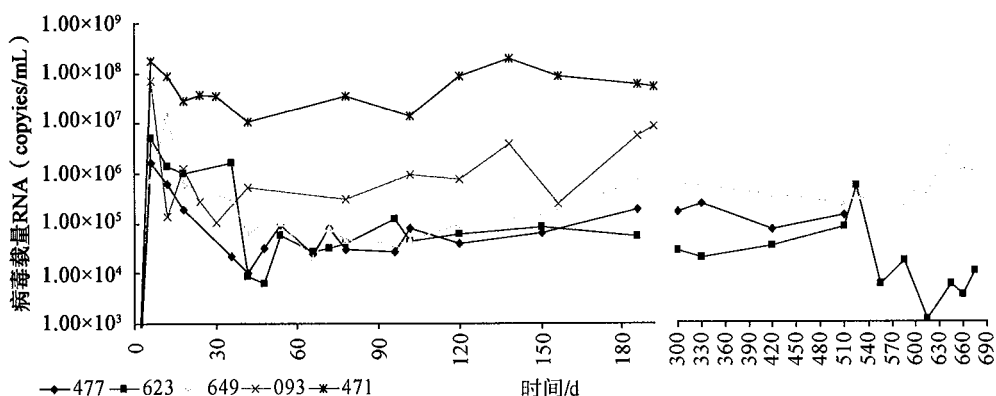


图 11 SIV 感染猴病毒载量的变化

7) 抗体检测与核酸检测结果比较

在 SIV 感染急性期, 5 只猴病毒 SIV 抗体滴度较低, OD 值小于 0.2 以下; 进入无症状潜伏期后, 病毒抗体值逐渐上升, 维持较高的抗体水平, OD 值大于 1.0 以上。相比较而言, 血浆病毒载量较高的 471 号猴的抗体上升较慢, 感染 120 天 SIV 抗体 OD 值为 0.315。

与血浆 SIV 病毒载量 QPCR 监测结果比较, 可见在 SIV 感染急性期病毒血浆病毒量处于高水平阶段; 而在进入平台期后, 血浆 SIV 抗体水平上升, 病毒载量下降, 二者有一定对于关系, 但对于 SIV、SRV 这类免疫缺陷病毒感染来说, 病毒在动物内长期并潜伏存在, 随着动物免疫系统机能的改变, 有可能又启动病毒大量复制, 因此, 临床上使用分子检测方法对病毒核酸载量进行监测是一个非常必要和常规的手段。

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

感染早期，动物体内可检测到病原核酸却无抗体产生。而在动物群里可能出现不同感染阶段的动物，或某些病原在动物体内潜伏感染，未刺激抗体产生却可能会持续带毒排毒，因此分子检测方法可作为抗体检测的有效补充手段。

8) SIV 实时荧光 RT-PCR 检测方法在临床样品中的检测应用

对送检的 40 份猴血样品提取 PBMC DNA，进行 SIV QPCR 检测 SIV 前 DNA，阴性、阳性对照成立，而检测样本均未出现阳性扩增，Ct 值均大于 35，可判定为 SIV 阴性（图 12）。

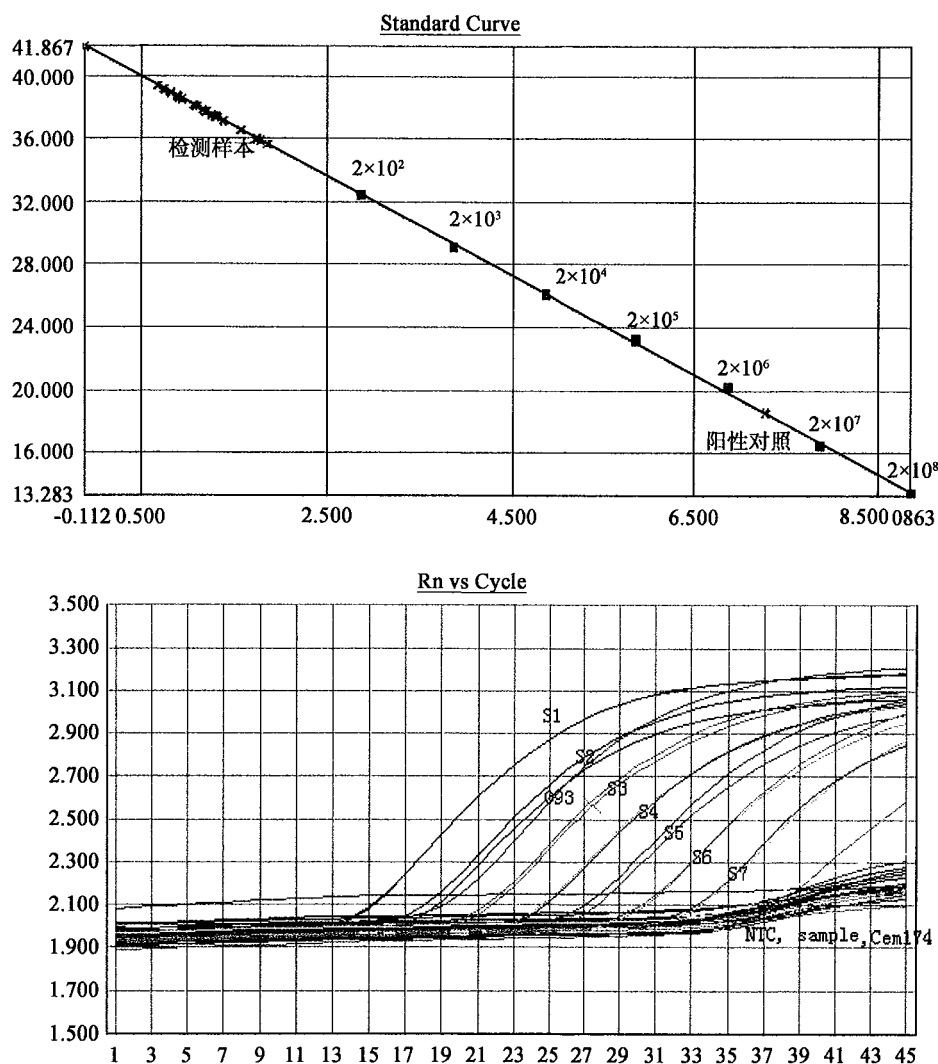


图 12 临床猴血 PBMC 样中 QPCR 检测结果

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猴免疫缺陷病毒(SIV)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

- 陈静,李茂清,符林春,等. 2012. 中国恒河猴 SIVmac239 艾滋病模型急性期的试验观察. 广州中医药大学学报, 29(5): 582-586.
- 丛喆,涂新明,蒋红,等. 2015. PCR 技术在猴免疫缺陷病毒(SIV)感染模型中的应用. 中国实验动物学报, 13(2): 84-87.
- 卢耀增,吴小闲,涂新明,等. 1994. 猴免疫缺陷病毒(SIV)猴模型的建立. 中国实验动物学报, 2(2): 94-102.
- 王静,张钰,闵凡贵,等. 2013. 实时荧光定量 PCR 技术在猴免疫缺陷病毒感染模型中的应用. 中国比较医学杂志, 23(9): 68-72.
- 吴小闲,张奉学,何伏秋. 2000. 猴免疫缺陷病毒(SIV)慢性感染猴模型的建立. 广州中医药大学学报, 17(4): 355-373.
- Axel F, Stefanhle E, Se'bastien F, et al. 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using salmonella as a model organism. Applied And Environmental Microbiology, 70(6): 3618-3623.
- Hayward AL, Oefner PJ, Sabatini S, et al. 1998. Modeling and analysis of immunodeficiency virus type 1 proviral Load by a TaqMan competitive RT-PCR. Nucl Acids Res, 26(11): 2511-2518.
- <http://www.un.org/en/events/aidsday/2012/pdf/TC2434 World AIDS day results en.Pdf>.

- Li MH, Li SY, Xia HJ, et al. 2007. Establishment of AIDS animal model with SIVmac239 infected Chinese rhesus monkey. *Virologica Sinica*, 22 (6): 509-516.
- Manches O, Bhardwaj N. 2009. Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *J Clin Invest*, 119 (12): 3512 -3515.
- Schupbach J. 1999. Human immunodeficiency viruses. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: ASM Press; 847-870.
- Staprans SI, Dailey PJ, Rosenthal A, et al. 1999. Simian immunodeficiency virus disease course is predicted by the extent of virus replication during primary infection. *Virology*, 73 (6): 4829-4839.