

第二十章 T/CALAS 48—2017《实验动物 猴 逆转 D 型病毒 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 猴逆转 D 型病毒 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、特异的猴逆转 D 型病毒普通 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逆转 D 型病毒 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 猴逆转 D 型病毒 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 猴逆转 D 型病毒 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逆转 D 型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 猴逆转 D 型病毒 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

猴逆转 D 型病毒属于逆转录病毒科、肿瘤病毒亚科、D 型肿瘤病毒属,具有多种血清型(SRV-D1, 2, 3, 4, 5 型)。亚洲的猕猴属是 SRV 的主要宿主,有地方性感染的特征,疾病表现为一系列的亚临床症状、机会感染和肿瘤形成,最终导致免疫抑制,类似 AIDS 疾病。SRV-D 在其天然宿主亚洲猕猴中可以致病,有的猴群中其流行程度很高,一旦暴发可能导致整个猴群大批死亡。20 世纪 70 年代至 80 年代初,美国几个灵长类中心暴发的 SAIDS 导致大批猴子死亡,经病毒分离鉴定为 SRV-D,与人 AIDS 相似。感染了 SRV 的动物有时仅仅作为病毒携带者而在相当长一段时期内为无症状状态,不易通过外观发现,从而造成对实验结果的干扰。在 HIV 等逆转录病毒疾病模型构建和抗逆转录病毒药物的筛选中,SRV 是必须排除的一项,也是目前出口实验猴必须检测的项目。因此在实验猴饲养管理工作中、科学研究疾病动物模型的建立过程中,对 SRV-D 的常规监测是非常必要的。目前国内对 SRV 感染的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。通过检测 SRV 抗体判断动物是否感染 SRV,代表试剂为美国 BioReliance 的 ELISA 试剂盒及 VRL 实验室的 DOT-ELISA 试剂。但是,SRV 感染猴通常表现为无症状状态,且病毒载量较低,甚至没有血清学转化,常规血清的 SRV 检测可能出现假阴性的结果。只使用 ELISA 方法进行初筛,将可能增加假阴性结果,这种现象在 SRV ELISA 检测中较突出。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 SRV 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 SRV 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 SRV 感

染后体内 SRV 病毒 RNA 或 DNA 前病毒水平进行实时监测是十分有必要的。随着分子生物学技术的发展,PCR 检测技术因高效、快速、简便等优点而被广泛应用于病原核酸检测。实时荧光 PCR (real-time fluorescence PCR) 技术是在 PCR 扩增反应过程中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时检测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。它具有定量准确、灵敏度高、反应速度快、重复性好及 PCR 反应后不需电泳检测等优点。该技术自发明以来,已被广泛地应用于 DNA 或 RNA 绝对定量分析、基因表达差异分析和肿瘤基因检测等多个学科领域。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 年起进行猴逆转 D 型病毒普通 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逆转 D 型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 猴逆转 D 型病毒 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逆转 D 型病毒的检测。

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 14926.61—2001 《实验动物 猴逆转 D 型病毒检测方法》

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

SRV 猴逆转 D 型病毒 Simian immunodeficiency virus

四、检测方法原理

猴逆转录 D 型病毒属于逆转录病毒科、肿瘤病毒亚科、D 型肿瘤病毒属。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 SRV RNA 或前病毒 DNA 进行诊断。针对 SRV-D 病毒核酸保守序列 gag 基因设计 2 对巢式 PCR 引物,针对 env 基因设计荧光 PCR 引物和探针序列,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 SRV-D 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 比巢式 PCR 检测灵敏度要高,可用于巢式 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) 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) 逆转录试剂: 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) 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。

(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: 10mg/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。

(16) 引物和探针: 根据表 1、表 2 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 μmol/L 和 5 μmol/L 储备液, -20℃保存。

表 1 SRV-D 巢式 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小/bp
F1-outer	GAATCTGTAGCGGACAATTGGCTT	461
R1-outer	GGGCGGATTGCTGCCTGACA	
F2-inner	ACTTGTTAGGGCAGTCCTCTCAGG	
R2-inner	ACAGGCTGGATTAGCGTTTTCATA	

表 2 SRV-D 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
SRV-F1qPCR	CTGGWCAGCCAATGACGGG	110
SRV-R1qPCR	CGCCTGTCTTAGGTTGGAGTG	
探针	FAM-TCACTAACCTAAGACAGGAGGGTCGTCA-BHQ1	
	FAM-TCCTAAACCTAAGACAGGAGGGCTGTCA-BHQ1	

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℃ 25 min; 85℃ 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℃。长时间保藏应置于 -80℃ 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反转录反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
5 $\times$ PrimeScript Buffer	2	1 $\times$
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5	
Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	25 $\mu\text{mol/L}$
Random Primer 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.5	50 $\mu\text{mol/L}$
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, 以含有猴逆转 D 型病毒的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板; 以不含有猴逆转 D 型病毒 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4 巢式 PCR反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
第一轮 PCR		
2 $\times$ Premix Taq Mix	10	1 $\times$
ddH ₂ O	6.4	
F1-outer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
R1-outer (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 $\times$ Premix Taq Mix (Loading dye mix)	10	1 $\times$
ddH ₂ O	7.4	
F2-inner (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
R2-inner (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/℃	时间	循环数
第一轮 PCR	94	5 min	1
	95	30 s	20
	55	30 s	
	72	30 s	
	72	5 min	1
第二轮 PCR	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进行相应调整。

(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 D 型逆转录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 D 型逆转录病毒 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 6 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 Taq HS (5 U/ μL)	1	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	1	
TaqSRV-D-F (10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	500 nmol/L
TaqSRV-D-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 (400 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, 需重新进行巢式 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 (400 bp) 的扩增条带, 则可判定样本猴逆转 D 型病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 两轮 PCR 结束, 若样本出现预期大小 (400 bp) 的扩增条带, 则可判定样本猴逆转 D 型病毒核酸检测阳性。

(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, 则判定样品猴逆转 D 型病毒核酸检测阴性。

(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, 则判断样品中猴逆转 D 型病毒核酸检测阳性。

(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 , 则判定样品未检出猴逆转 D 型病毒。重新检测后,

若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,则判定样品猴逆转 D 型病毒可疑,需进一步进行序列测定。

九、序列测定

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逆转 D 型病毒特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90%以上,可确诊待检样本猴逆转 D 型病毒核酸阳性,否则判定猴逆转 D 型病毒核酸阴性。

十、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。

十一、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)猴逆转 D 型病毒 (SRV) 巢式 PCR 检测方法的建立

1. 材料与方法

1) 毒株、载体和 SRV 感染阳性样本

猴逆转 D 型病毒 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5 共 5 个血清型毒株中国科学院昆明动植物研究所贲昆龙教授惠赠;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 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);24 份 SRV 抗体阳性猴血液样本由本实验室保存(-80℃)。

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 SRV 基因序列(登录号 M11841、M16605、M12349、AF033815),选取 SRV gag 基因保守序列区,设计一套巢式 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) SRV 巢式 PCR 检测方法的建立

SRV 属于逆转录病毒,可提取病毒 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。

(1) 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 μL : 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random Primer 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , RNA 模板 5 μL , RNase Free dH₂O 1.5 μL ; 反应条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 25 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

(2) 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 H₂O 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 H₂O 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 SRV 巢式 PCR 方法对 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、SIV、STLV-1 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

按 1.1.4 所述反应体系和条件扩增 SRV-1 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 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/ μL) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ DNA 浓度 (g/ μL) / 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 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板, 按 1.1.4 所述方法进行检测, 测定检测方法的灵敏度。

7) SRV 抗体阳性猴样品的检测

24 份 SRV 猴血浆样本通过 ELISA 和免疫印迹试验检测确认为 SRV 抗体阳性, 利用血液基因组提取试剂盒提取 200 μL 全血细胞中病毒前 DNA, 利用建立的 SRV 巢式 PCR 检测方法对 24 份 SRV 抗体阳性猴样本进行检测。

2. 结果

1) SRV 巢式 PCR 检测方法的建立

按照 1.1.4 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 SRV 阳性样本在 400 bp 位置有一条目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。

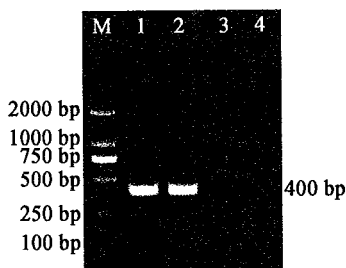


图 1 SRV 巢式 PCR 电泳结果

M, DNA Marker DL2000; 1、2, SRV;

3、4, 阴性对照

2) SRV 巢式 PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 SRV 巢式 PCR 方法对 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、SIV、STLV-1 前 DNA 作为模板进行检测,结果显示 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4 有目的条带,SRV-5 和其他病原核酸无目的条带,因此该方法可以检测 SRV 1~4 四种血清型,但会对 SRV-5 造成漏检(图 2)。

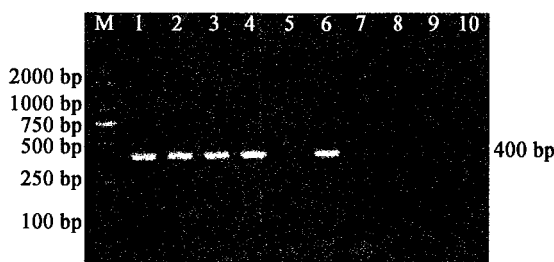


图 2 SRV 巢式 PCR 特异性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1~5, SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5; 6, SRV1~5 Mix; 7, SIV; 8, STLV; 9, 10, 阴性对照

3) SRV 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 $1.7 \times 10^{10} \sim 1.7 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。按 1.1.4 所述方法进行检测,测定模板最低检出量,结果 SRV 检测灵敏度为 1.7×10^2 copies/ μL (图 3)。

4) SRV 抗体阳性猴样品的检测

利用建立的 SRV 巢式 PCR 检测方法对 SRV 抗体阳性猴样本进行检测,结果 24 份样本均为阳性(图 4)。



图 3 SRV 巢式 PCR 检测方法敏感性试验结果

M, 100bp DNA Marker; 10~0, 依次为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL ; N, 阴性对照

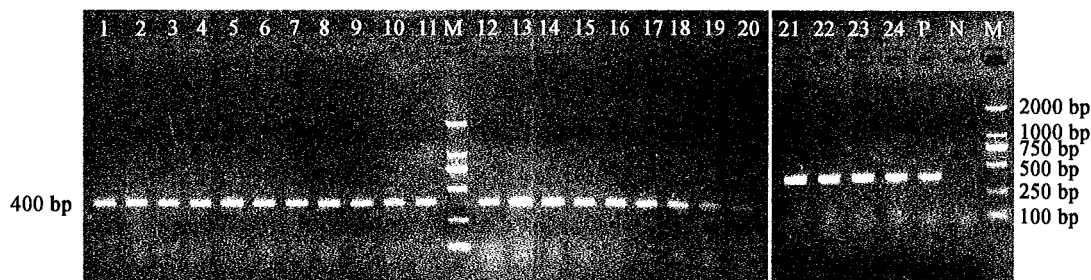


图 4 SRV 实验感染猴阳性样品中的检测

(二) 猴逆转录病毒 (SRV) 实时荧光 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)。

临床样本来自广西、海南 3 个猴场。猴场 1: 46 份 SRV 抗体阳性血液样本;猴场 3: 30 份 SRV 抗体阳性血液样本;猴场 2: 20 份 SRV 抗体阴性血液样本。

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), 参考文献 Jwhite 等 (2009), 根据 GenBank 数据库中登记的 SRV 基因序列 (登录号 M11841、M16605、M12349、AF033815), 选取 SRV *env* 基因保守序列区, 设计一套可以同时检测 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4 和 SRV-5 的 PCR 引物及探针, 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。同时设计一对引物 (SRV-F2、SRV-R2) 扩增 *env* 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) SRV 质粒标准品的制备

以提取的 SRV DNA 为模板、以 SRV-F2/SRV-R2 为引物, 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 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 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。

5) 实时荧光 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 SRV 实时荧光 PCR 反应体系, 以 SRV 质粒标准品 (3.7×10^5 copies/ μ L) 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 μ mol/L) 和 TaqMan 探针浓度 (0.1~0.70 μ 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。

SRV 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 μ L 5 $\times$ Primerscript Buffer, 0.5 μ L Oligo dT (50 μ mol/L),

0.5 μL Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL Primerscript RT Enzyme Mix I, 约 1 μg RNA, 补水至 10 μL , 混匀离心后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 15 min, 最后于 85 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min 失活 Primerscript RTase。

6) 特异性试验

采用建立的实时荧光 PCR 方法对 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、SIV、STLV-1 前 DNA 作为模板进行 SRV qPCR 特异性检测, 同时设 Raji 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 $3.7 \times 10^7 \sim 3.7 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 系列标准模板。利用 5) 实时荧光 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 ($3.7 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$) 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) 实时荧光 PCR 检测方法在临床样品中的检测应用

对来自 3 个猴场的猴血样品进行 PBMC 分离, 采用组织基因组提取试剂盒提取 DNA 后按建立的方法进行检测, 每次检测都采用梯度稀释的质粒标准品绘制标准曲线, 计算病毒的拷贝数。

2. 结果

1) SRV 质粒标准品制备

用 PCR 扩增 SRV 得到大小约 227 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。

2) 实时荧光 PCR 反应体系的建立和优化

经优化后的 PCR 反应体系: 2 $\times$ Premix Ex Taq 10 μL , SRV 上游引物终浓度均为 0.6 $\mu\text{mol/L}$, SRV 下游引物终浓度均为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ (表 8、图 6), 探针终浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (表 9、图 7), SRV DNA 模板 2 μL , 加 RNase Free dH₂O 至 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 一个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 45 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸结束后收集荧光。

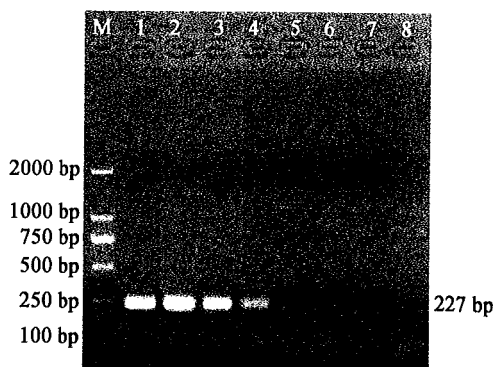


图 5 SRV 重组质粒 PCR 鉴定电泳结果

M, Marker DL2000; 1~4, 筛选到的质粒阳性克隆菌落; 5~7, 阴性质粒菌落; 8, 阴性对照

表 8 引物优化 Ct 值结果

SRV-R1 终浓度	SRV-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	26.48	26.62	26.56	26.80	26.89	27.11
200 nmol/L	26.50	26.63	26.63	26.75	26.97	27.08
400 nmol/L	27.00	26.46	26.62	26.60	26.53	26.78
600 nmol/L	26.25	26.20	26.66	26.50	26.61	26.76
800 nmol/L	26.18	26.29	26.37	26.35	26.49	26.94
1000 nmol/L	26.45	26.34	26.58	26.72	26.86	27.06

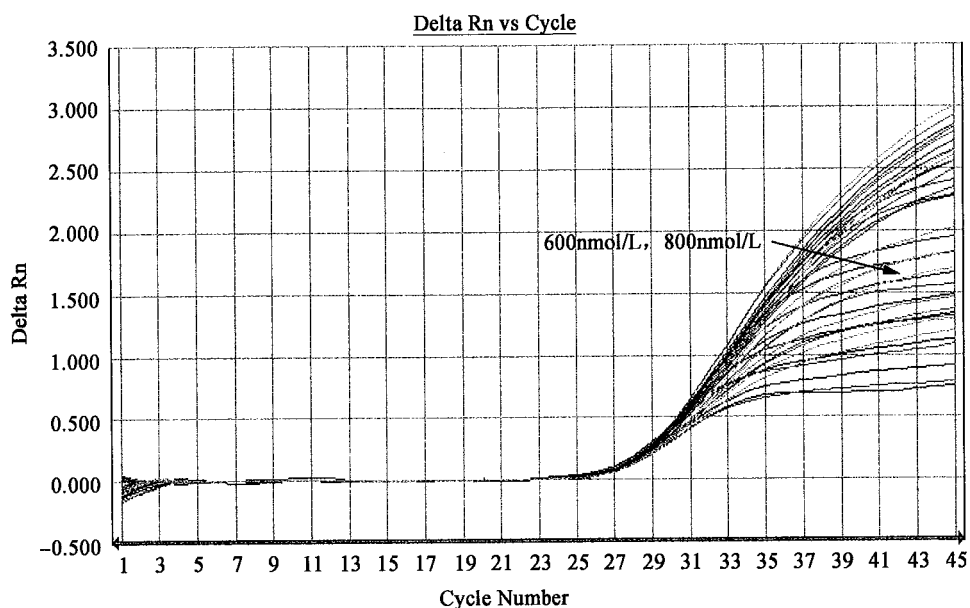


图 6 引物优化扩增曲线

表 9 探针优化 Ct 值结果

	SRV-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	27.54/27.66	27.78/27.58	27.79/27.78	27.91/28.00	28.03/28.07	28.48/28.49	29/29.43

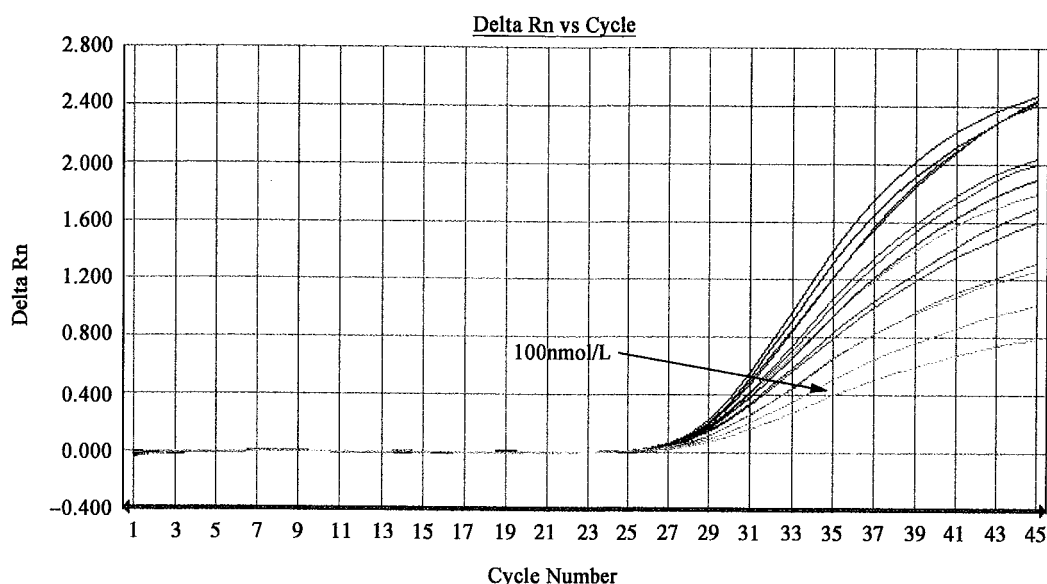


图 7 探针优化扩增曲线

3) 特异性试验

采用建立的实时荧光 PCR 方法对 SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4、SRV-5、SIV、STLV-1 前 DNA 进行检测，5 个血清型的 SRV 在该反应体系中均成功扩增。其中，SRV-1、SRV-2、SRV-3、SRV-4 扩增效果较好，扩增曲线平滑，Ct 值出现在定量标准曲线的中部，qPCR 反应效率较好。SRV-5 虽然也有扩增，但荧光信号出现较晚，Ct 值在 38 左右出现（图 8），对应拷贝数低于 500。因此该方法对于血清型为 SRV5 的样本可能会出现漏检，需要增加检测样本数或采用其他方法检测。

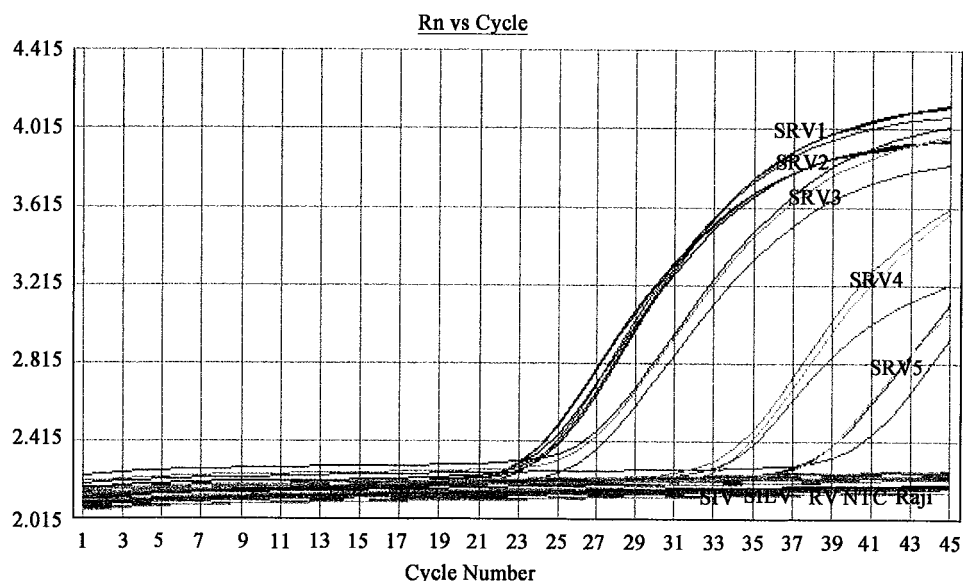


图 8 SRV 实时荧光 PCR 特异性检测结果

4) 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 $3.7 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^0$ copies/ μL 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, 结果见图 9, 可见各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等, Raji 细胞 DNA 和 ddH₂O 没有荧光扩增曲线为阴性结果。质粒浓度为 $3.7 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^3$ copies/ μL 组 PCR 扩增曲线典型, Ct 值落在 11~34 间, 扩增曲线线性关系较好。 3.7×10^2 copies/ μL 质粒 Ct 值约为 38; 因对应模板浓度较低, Ct 值出现较晚, 而且复孔重复性不如前六组, 但仍与前六组具有良好的线性关系, 而 3.7×10^0 copies/ μL 组因模板浓度较低无扩增曲线。因此, 本方法检测的最低检出量为 370 copies/ μL , 定性判定可认为 Ct 值大于 38 为阴性, Ct 值小于 38 为阳性。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 $3.7 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^2$ copies/ μL 具有良好的线性关系, 结果见图 10。其线性回归方程为 $\text{Ct} = -3.44 \times \lg(\text{拷贝数}) + 47.89$, 标准曲线斜率为 -3.44, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.44} - 1 = 0.953$, 即扩增效率为 95.3%, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 说明 PCR 扩增该标准品的效率较高。

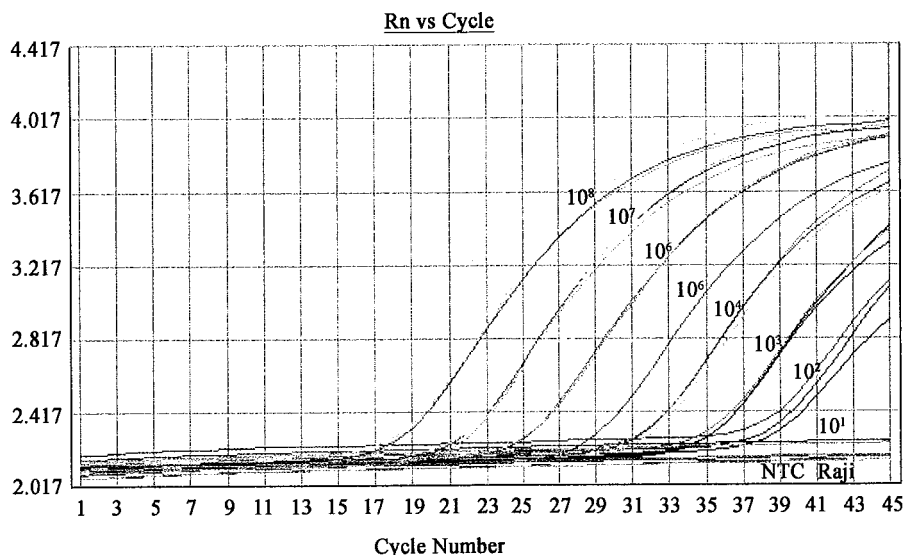


图9 10倍系列稀释质粒标准品的荧光定量扩增曲线

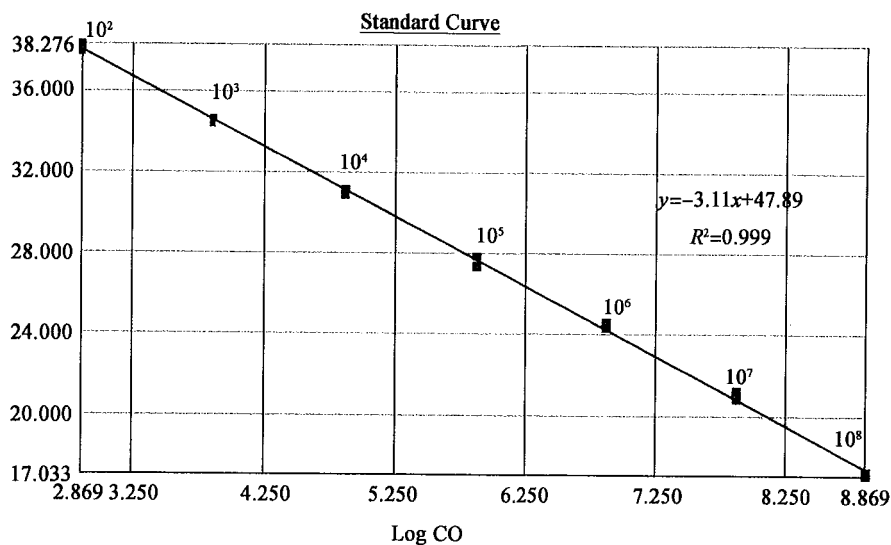


图 10 10倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

5) 重复性试验结果

通过对 $3.7 \times 10^7 \sim 3.7 \times 10^3$ 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 PCR 方法重复性好，方法稳定可靠。

表 10 SRV 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)/%
3.7×10^7	17.32	17.21	17.19	17.51	17.31	17.31	0.13	0.73
3.7×10^6	20.42	20.37	20.45	20.23	20.63	20.42	0.14	0.71
3.7×10^5	23.20	23.32	23.45	23.56	23.57	23.42	0.16	0.68
3.7×10^4	26.59	26.78	26.69	26.43	26.35	26.57	0.18	0.67
3.7×10^3	29.66	29.78	29.73	29.32	29.45	29.59	0.20	0.66
3.7×10^2	32.58	32.65	32.70	32.36	33.11	32.68	0.27	0.84

6) SRV qPCR 测方法在临床样品中的检测应用

对来自 3 个猴场的猴血样品进行 PBMC 分离，采用组织基因组提取试剂盒提取病毒前 DNA 后按建立的方法进行检测，每次检测都采用梯度稀释的质粒标准品绘制标准曲线，计算病毒的拷贝数，结果如下。

(1) 猴场 1 检测结果：46 份样品共检出 32 份阳性，14 份阴性（表 11）。

表 11 猴场 1 的 46 份样品 SRV 前 DNA 病毒拷贝定量结果

序号	样本号	Ct 值	拷贝量	判定	序号	样本号	Ct 值	拷贝量	判定
1	1617	28.8423	1.20×10^5	P	25	26-9	36.2459	649.388	P
2	22-7	30.5798	3.52×10^4	P	26	2213	36.2844	632.013	P
3	22-2	30.6364	3.38×10^4	P	27	2724	36.344	606.017	P
4	22-3	31.1606	2.34×10^4	P	28	2617	36.3827	589.704	P
5	22-8	31.4011	1.97×10^4	P	29	1812	36.7445	456.993	P
6	2217	32.2583	1.08×10^4	P	30	26-6	36.7498	455.295	P
7	1610	32.2625	1.12×10^4	P	31	24-8	36.7998	439.528	P
8	18-3	32.5585	8.73×10^3	P	32	2522	36.9321	400.406	P
9	18-1	32.9523	6.61×10^3	P	33	1519	37	381.712	N
10	18-9	33.6143	4.15×10^3	P	34	15-6	37.0067	379.914	N
11	1813	34.0531	3.04×10^3	P	35	2214	37.0797	360.87	N
12	1821	34.357	2.46×10^3	P	36	2416	37.1465	344.278	N
13	1518	34.4907	2.24×10^3	P	37	2218	37.1893	334.036	N
14	27-8	34.8638	1.72×10^3	P	38	27-2	37.4042	287.108	N
15	1621	35.0042	1.56×10^3	P	39	16-2	38.2737	155.582	N
16	2521	35.1042	1.45×10^3	P	40	1518	Undetermined		N
17	22-4	35.1819	1.37×10^3	P	41	1519	Undetermined		N
18	27-6	35.3163	1.25×10^3	P	42	27-5	Undetermined		N
19	1618	35.3735	1.20×10^3	P	43	27-8	Undetermined		N
20	2613	35.4312	1.15×10^3	P	44	1514	Undetermined		N
21	2916	35.8319	869.318	P	45	25-8	Undetermined		N
22	2519	35.85	858.327	P	46	27-5	Undetermined		N
24	1618	35.9258	813.667	P					
合计		32 份阳性, 12 份阴性。							

注: P 为阳性, N 为阴性。

(2) 猴场 2、猴场 3 检测结果: 对猴场 2 的 20 份 PBMC 样本、猴场 3 的 30 份 PBMC 样本进行 QPCR 定量检测, SRV 抗体阴性猴场 2 的 20 份样品检出 SRV 前 DNA 阳性 6 份、阴性 14 份; SRV 抗体阳性猴场 3 的 30 份样品检出 SRV 前 DNA 阳性 27 份, 阴性 3 份 (表 12)。

表 12 猴场 2 和猴场 3 共 50 份样品 SRV 前 DNA 病毒拷贝定量结果

序号	样本号	Ct 值	拷贝量	判定	序号	样本号	Ct 值	拷贝量	判定
1	HN-1	35.4166	355.085	N	26	GX-6	34.4428	650.361	P
2	HN-2	37.0186	131.212	N	27	GX-7	35.2342	397.703	N
3	HN-3	35.4491	347.975	N	28	GX-8	35.1119	429.098	P
4	HN-4	37.3077	109.633	N	29	GX-9	29.773	1.18×10^4	P
5	HN-5	35.053	445.11	P	30	GX-10	29.0515	1.85×10^4	P
6	HN-6	33.0079	1.59×10^3	P	31	GX-11	33.511	1.16×10^3	P
7	HN-7	34.4842	633.82	P	32	GX-12	31.3146	4.54×10^3	P
8	HN-8	36.4786	183.533	N	33	GX-13	29.7084	1.23×10^4	P
9	HN-9	36.1884	219.798	N	34	GX-14	34.8198	514.509	P
10	HN-10	35.3057	380.417	N	35	GX-15	31.7914	3.38×10^3	P
11	HN-11	34.8588	502.183	P	36	GX-16	34	856.352	P
12	HN-12	34.0569	826.61	P	37	GX-17	33.8771	924.343	P
13	HN-13	35.2739	388.008	N	38	GX-18	33.972	871.399	P
14	HN-14	35.338	372.867	N	39	GX-19	33.0387	1.56×10^3	P
15	HN-15	35.6758	302.25	N	40	GX-20	32.7937	1.81×10^3	P
16	HN-16	35.276	387.501	N	41	GX-21	33.4435	1.21×10^3	P
17	HN-17	35.6354	309.937	N	42	GX-22	34.5171	621.015	P
18	HN-18	36.027	242.985	N	43	GX-23	33.8421	944.614	P
19	HN-19	34.7244	545.943	p	44	GX-24	35.1312	378.872	N
20	HN-20	35.9516	254.641	N	45	GX-25	32.5913	2.06×10^3	P
21	GX-1	32.8808	1.72×10^3	P	46	GX-26	31.6953	3.59×10^3	P
22	GX-2	28.1345	3.28×10^4	P	47	GX-27	30.2684	8.70×10^3	P
23	GX-3	30.7413	6.49×10^3	P	48	GX-28	31.9814	3.00×10^3	P
24	GX-4	30.0026	1.03×10^4	P	49	GX-29	32.703	1.92×10^3	P
25	GX-5	36.2556	210.81	N	50	GX-30	32.832	1.77×10^3	P

合计 HN 阳性 6 份，阴性 14 份，GX 阳性 27 份，阴性 3 份

7) 阳性样本测序验证

对其中 3 份阳性进行测序验证，测序结果显示阳性样本扩增的基因序列为 110bp。通过 GenBank 上的 Blast 软件进行序列比对，阳性样本的序列与 GenBank 上的 SRV-2 和 SRV-4 毒株的同源性在 99%~100%，证明样本为 SRV 阳性样本，也验证了建立的检测方法正确有效（图 11）。

CTGGTCAGCCAATGACGGGTAAGAGAGTGTCTGTTTCTACTAACCTAAGACAGGAG
GGTCGTCATAGCTACTACCTTTTCCTATGACGGGTACCACTGAAGAACTGTAT

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Simian retrovirus 1, complete genome		204	204	100%	2e-49	100%	M15935.1
☐ Simian retrovirus 2, complete genome		198	198	100%	1e-47	99%	AF126467.1
☐ Simian retrovirus SRV-2 strain 03/04/PCV1, complete genome		198	198	100%	1e-47	99%	AF126468.1
☐ Simian SRV-2 retrovirus, nasal secretions, complete cds, and 3 long terminal repeat (LTR)		198	198	100%	1e-47	99%	L38585.1
☐ Simian retrovirus 4 strain SRV4/TX/2002/V3, complete genome		100	100	81%	3e-18	87%	F4975639.1
☐ Simian retrovirus 4 strain SRV4/TX/2002/V2, complete genome		100	100	81%	3e-18	87%	F4975638.1
☐ Simian retrovirus 4 strain SRV4/TX/2002/V1, complete genome		100	100	81%	3e-18	87%	F4975627.1

图 11 阳性样本序列比较结果

8) 抗体检测与核酸检测结果比较

本标准在编制过程中,先后对临床采集的猴血清样本约 61 份样品进行了 SRV 抗体检测和对应样本核酸 QPCR 监测,两种检测方法结果进行配对卡方检验,结果见表 13。两种方法结果无显著性关联,不可反映同一个指标。这与 SRV 这类免疫缺陷病毒的感染机制相关,SRV 感染后,病毒可在动物体内长期并潜伏存在,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。

表 13 抗体检测与核酸检测结果比较

配对卡方检验		ELISA		
		+	-	合计
QPCR	+	2	8	10
	-	4	47	51
	合计	6	55	61
关联性检验				
统计结果	卡方值	p		
	0.36	0.5490		
关联性无显著意义				

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。

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逆转录病毒（SRV）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

- 李晓燕, 代成波, 李春花, 等. 2007. 猴逆转录病毒多重套式 PCR 检测方法的建立. 四川动物, (3): 534-537.
- 马荣, 高英杰, 崔晓兰. 2013. 逆转录病毒及逆转录酶检测方法研究评述. 病毒学报, 29 (1): 92-96.
- 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 2013. 猴免疫缺陷病毒 (SIV) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 中国比较医学杂志, 23 (9): 68-72.
- 熊炜, 蒋静, 张强, 等. 2013. 猴逆转录病毒 RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 检测方法的建立. 动物医学进展, 34 (12): 51-54.
- 杨燕飞. 2016. MBV、SRV、SIV 血清抗体调查及间接 ELISA 检测方法的初步建立. 扬州: 扬州大学.
- 郑霞. 2012. 非人灵长类 SPF 种群建立过程中病毒抗体监测研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文.
- Buchl SJ, Keeling ME, Voss WR. 1997. Establishing specific pathogen-free (SPF) nonhuman primate colonies. Ilar Journal, 38 (1): 22-27.
- Chung HK, Unangst T, Treece J, et al. 2008. Development of real-time PCR assays for quantitation of simian betaretrovirus serotype-1, -2, -3, and -5 viral DNA in Asian monkeys. J Virol Methods, 152 (2): 91-97.
- Liao Q, Guo H, Tang M, et al. 2011. Simultaneous detection of antibodies to five simian viruses in nonhuman primates using recombinant virul protein based multiples microbead immunoassays. J Virol Methods, 178 (2): 143-152.
- White JA, Todd PA, Rosenthal AN, et al. 2009. Development of a generic real-time PCR assay for simultaneous detection of proviral DNA of simian Betaretrovirus serotypes 1, 2, 3, 4 and 5 and secondary uniplex assays for specific serotype identification. J Virol Methods, 162 (1-2): 148-154.