

第二十一章 T/CALAS 49—2017《实验动物 仙台病毒 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 仙台病毒 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、特异的仙台病毒普通 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)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,组织编写实验动物仙台病毒 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 仙台病毒 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 4 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 3 条,未采纳 1 条。对《实验动物 仙台病毒 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仙台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,经对《实验动物 仙台病毒 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

仙台病毒(Sendai virus, SV)属副黏病毒科、副黏病毒属,可引起啮齿类动物呼吸道疾病,空气传播和直接接触传播是该病毒播散的主要方式。仙台病毒传染性较强,鼠群一旦发生感染难以清除,而且在鼠群中多呈隐性感染,动物不表现临床症状,在一定条件下病毒被激活而急性发作,对科学研究造成干扰,影响实验结果的准确性和重复性,是国标中 SPF 级小鼠需要排除的病原体,快速准确地检测 SV 是有效防制该病的前提。目前,国内 SV 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 SV 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 年起进行仙台病毒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、特异性强、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 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仙台病毒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 仙台病毒病毒 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

本标准适用于实验动物小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、兔及其产品、细胞培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中仙台病毒的检测。

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 14926.23—2001 《实验动物 仙台病毒检测方法》

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

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

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。

4

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

SV 仙台病毒 Sendai virus

四、检测方法原理

根据仙台病毒保守序列 L 蛋白基因, 设计合成一对普通 RT-PCR 引物, 同时根据 M 蛋白基因, 设计合成一对特异性引物和一条特异性探针。用合适的方法提取样本中的病毒 RNA, 通过逆转录酶将病毒 RNA 逆转录成 cDNA, 分别通过特异引物和探针进行 PCR 和实时荧光 PCR, 根据 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测结果判定该样品中是否含有病毒核酸成分。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。因此, 可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。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) 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。

(9) PCR 试剂: Premix Taq TM (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。

(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) 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。

(15) 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 普通 RT-PCR 扩增引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小/bp
正向引物	ATGAAGGACAAAGCATTATCGCCTA	180
反向引物	CAACCAGTCTCCTGATTCCACGTA	

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	GGGCGGCATCTGTAGAAATC	67
反向引物	CGGAAATCACGAGGGATGG-	
Probe	Fam-AGGCGTCGATGCGGTGTTCCAAC- BHQ-1	

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, 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 RNA 提取

规定了样本 RNA 的提取方法。

(四) 普通 RT-PCR 检测

规定了 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 逆转录反应体系

试剂	用量/μL	终浓度
5×PrimeScript Buffer	2	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5	
Oligo dT Primer (50 μmol/L)	0.5	25 pmol/L
Random Primer 6 mers (100 μmol/L)	0.5	50 pmol/L
RNA 模板	5	
Rnase Free dH ₂ O	1.5	
总体积	10	

2. PCR 反应体系

普通 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, 以含有仙台病毒的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板; 以不含有仙台病毒 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; 空白对照即为不加模板对照 (No Template Control, NTC), 即在反应中用水来代替模板。

表4 PCR反应体系

试剂	用量/ μL	终浓度
2×Premix Taq Mix (Loading dye mix)	10	1×
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 $\mu\text{mol/L}$
cDNA 模板	2	
总体积	20	

3. PCR反应参数

PCR反应参数见表5。

表5 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	40
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进行相应调整。

4. RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

RT-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×TAE稀释成1×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

规定了实时荧光PCR反应体系、反应参数及结果检测方法。

1. 实时荧光RT-PCR反应体系

荧光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，以含有仙台病毒的组织或细胞培养物提取的RNA作为阳性对照模板；以不含有仙台病毒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	

续表

反应组分	用量/ μL	终浓度
正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2.5	500 nmol/L
反向引物 (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。

表 7 实时荧光 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	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进行相应调整。实时荧光 RT-PCR 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 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 (856 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，样本未出现预期大小 (180 bp) 的扩增条带，则可判定样本仙台病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下，样本出现预期大小 (180 bp) 的扩增条带，则可判定样本仙台病毒核酸检测阳性。

(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, 则判定样本仙台病毒核酸检测阴性。

(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, 则判断样本仙台病毒核酸检测阳性。

(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 , 则判定样本未检出仙台病毒。重新检测后, 若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样本仙台病毒可疑阳性, 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仙台病毒特异性片段序列进行比对, 序列同源性在 90% 以上, 可确诊待检样本仙台病毒核酸阳性, 否则判定仙台病毒核酸阴性。

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) 菌株和临床样本

仙台病毒病毒 (SV, ATCC VR-105)、小鼠肝炎病毒 (MHV, ATCC VR-246)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV, ATCC VR-995)、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; 小鼠出血热病毒 (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; 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: 核酸检测临床样品包括本实验室人工感染品 150 份, 临床送检 SPF 小鼠活体小鼠或小鼠组织样品 96 份。

(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 TRIzol (Invitrogen) 提取 RNA, 按操作说明书进行。

(四) SV-RNA 标准品的制备

以提取的 SV RNA 为模板, 用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒进行 RT-PCR, 反应体系为: Enzyme Mix 2μL, 2×Buffer 25μL, 上游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 2.5 μL, RNA 5 μL, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μL。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。反应得到目的大小片段后, 用胶回收试剂盒回收, 将回收的目的片段连接至 pGEM-T easy 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。阳性克隆菌 (pGEM-SV) 送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序, pGEM-SVpcr 菌中含有的 PCR 产物大小为 180 bp, pGEM-SVprobe 菌中含有的 PCR 产物大小为 67 bp。

将 pGEM-SV 质粒, 37℃ Sal I 单酶切 4 h, 使质粒线性化, 琼脂糖凝胶电泳及试剂盒回收纯化质粒 DNA 线性化产物, 用于体外转录。按 T7 体外转录试剂盒 Ribomax™ Large Scale RNA Production Systems (Promega 公司) 说明加入反应试剂于 37℃ 作用 2 h, 然后加 DNase I 酶 1 μL, 37℃ 消化转录产物中未转录的 DNA 15 min, 70℃ 灭活 DNase I 酶 15 min, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 (Qiagen 公司) 进行 RNA 提取, 得到体外转录的 SVpcr-RNA、SVprobe-RNA。用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 根据 SV 转录 RNA 产物的大小计算质粒体外转录的 RNA 拷贝数。按照下面的公式计算 RNA 拷贝数: 拷贝数 (copies/μL) = 6.022×10^{23} (copies/mol) × RNA 浓度 (g/μL) / 质量 MW (g/mol)。其中, MW = RNA 碱基数 × 340 daltons/碱基, RNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。根据计算得到的 SV-RNA 的浓度用无 RNase 水调整到 1×10^{11} copies/μL。-80℃ 保存备用。

(五) 普通 RT-PCR 检测方法的建立和优化

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×PrimeScript Buffer 2 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Random Primer 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, RNA 模板 5 μL, RNase Free dH₂O 1.5 μL; 反应条件为 37℃ 25 min, 85℃ 5 s。

PCR 反应: PCR 试剂采用 TaKaRa 公司的 rTaq Premix, 反应体系为 20 μL: cDNA 模板 2 μL, 2×Premix Buffer (含 Mg²⁺、dNTP、rTaq 酶) 10 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 1 μL, 补 H₂O 至 20 μL。反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s, 共 20 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

(六) 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 TaKaRa 公司 Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime Probe) 试剂盒操作说明配制 SV 荧光定量 RT-PCR 反应体系。以 SV-RNA 标准品作为反应模板, 采用矩阵法对荧光 RT-PCR 反应体系中引物 (0.1~0.6 μmol/L) 和 TaqMan 探针浓度 (0.05~0.5 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。

(七) 特异性试验

分别采用建立的普通 PCR 和实时荧光 RT-PCR 方法对仙台病毒病毒(SV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo-3)、小鼠出血热病毒(HV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、MNV 病毒 RNA 进行检测, BHK 细胞 RNA 作为阴性对照;验证该方法的特异性。

(八) 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将 SV-RNA 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。利用表 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。

(九) 重复性试验

将 SV RNA 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 SV 的样本; R2, SV 浓度为 2×10^4 copies/mL; R3, SV 浓度为 1×10^6 copies/mL, R4, SV 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) 临床样本的检测

1. 人工感染试验

实验小鼠分为人工感染组和对照组,其中对照组 3 只小鼠,于感染前一天处死,采集小鼠肺组织待检。感染组 45 只小鼠,每只小鼠经滴鼻途径接种 50 μ L SV 细胞毒,感染组动物分别于感染的第 1 天、3 天、5 天、7 天、9 天、10 天、11 天、13 天、15 天、17 天、19 天、21 天、24 天、27 天、30 天各处死 3 只动物,采集小鼠肺组织提取 RNA,用所建立的荧光 RT-PCR 方法进行检测。

2. 其他临床样本检测

利用实时荧光定量 RT-PCR 方法对收集到的 123 份临床样本进行检测,每次反应同时设置阳性、阴性对照。

二、 结

(一) 普通 PCR 检测方法的建立

按照建立的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,观察结果。结果 SV 阳性样本在约 180 bp 位置有一条目的条带,与预期结果相符(图 1)。

图 1 SV 普通 PCR 电泳结果

1.2 普通 PCR 检测方法特异性试验结果

采用建立的普通 RT-PCR 方法对仙台病毒病毒(SV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)、小鼠肺炎病毒(PVM)、呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo-3)、小鼠出血热病毒(HV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、MNV 病毒 RNA、BHK 细胞 RNA

作为阴性对照进行特异性检测,结果显示 SV 有约 180 bp 目的条带,其他病原核酸无目的条带(图 2)。

(三) 普通 PCR 检测方法敏感性试验

将 SV 质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释,得到 $10^9 \sim 10^1$ copies/ μ L 系列标准模板。按表 5 所述方法进行检测,测定模板最低检出量,普通 PCR 检测敏感性分别为 10^2 copies/ μ L (图 3)。

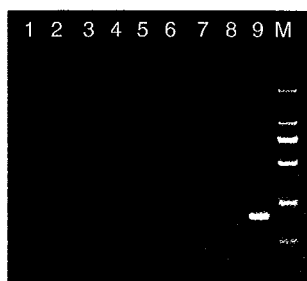


图 2 SV 普通 RT-PCR 特异性试验结果

M, DL2000 DNAMarker; 1~8 依次为 MHV、TMEV、PVM、Reo-3、HV、LCMV、MNV、BHK 特异性样本; 9, SV 阳性对照

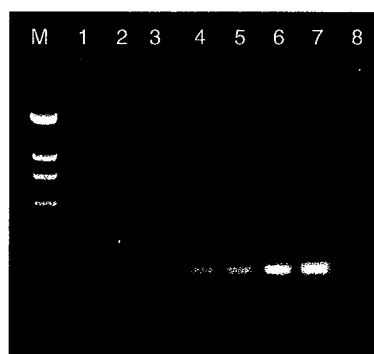


图 3 SV 普通 PCR 检测方法敏感性试验结果

M, DL2000 DNA Marker; 1~7 依次为 $10^2 \sim 10^8$ copies/ μ L 质粒 DNA; 8, 阴性对照

(四) 实时荧光 RT-PCR 反应体系的建立和优化

采用矩阵法对引物浓度、探针浓度进行优化。经优化后的 PCR 反应体系为: $2 \times$ One Step RT-PCR Buffer 25 μ L, SV 上游引物最适终浓度为 0.2 μ mol/L, 下游引物最适终浓度为 0.3 μ mol/L (表 8, 图 4), 探针最适终浓度 0.3 μ mol/L (表 9, 图 5), SV RNA 模板 10 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 一个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}$ C 延伸结束后收集荧光。

表 8 SV 实时荧光 RT-PCR 引物优化结果

SV-F 终浓度	SV-R 终浓度					
	100 nmol/L	200 nmol/L	300 nmol/L	400 nmol/L	500 nmol/L	600 nmol/L
100 nmol/L	21.50/21.55	21.31/21.22	21.23/21.18	21.18/21.29	21.29/21.35	21.56/51.59
200 nmol/L	21.88/21.57	21.37/21.33	21.16/21.19	21.27/21.28	21.39/21.32	21.43/21.62
300 nmol/L	22.24/21.99	21.63/21.49	21.32/21.50	21.45/21.31	21.39/21.42	21.58/51.85
400 nmol/L	22.40/22.01	21.82/21.22	21.22/21.31	21.38/21.43	21.53/21.41	21.91/22.04
500 nmol/L	22.44/22.11	21.90/21.52	21.44/21.34	21.29/21.25	21.34/21.59	21.75/22.03
600 nmol/L	22.69/22.48	22.22/22.02	21.84/21.83	21.72/21.76	21.85/21.93	22.13/22.17

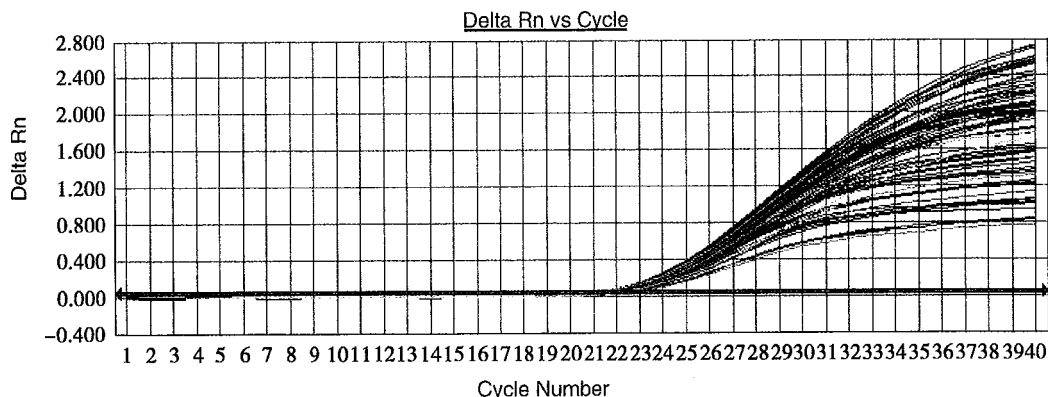


图4 SV 实时荧光 RT-PCR 引物优化实验结果

表9 SV 实时荧光 RT-PCR 探针优化结果

	SV-P 终浓度							
	0.05 $\mu\text{mol/L}$	0.10 $\mu\text{mol/L}$	0.15 $\mu\text{mol/L}$	0.20 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.30 $\mu\text{mol/L}$	0.35 $\mu\text{mol/L}$	0.40 $\mu\text{mol/L}$
Ct 值	25.94 $\pm$	24.03 $\pm$	23.37 $\pm$	23.51 $\pm$	23.27 $\pm$	22.72 $\pm$	22.77 $\pm$	22.81 $\pm$
	0.249	0.423	0.098	0.152	0.220	0.097	0.012	0.133

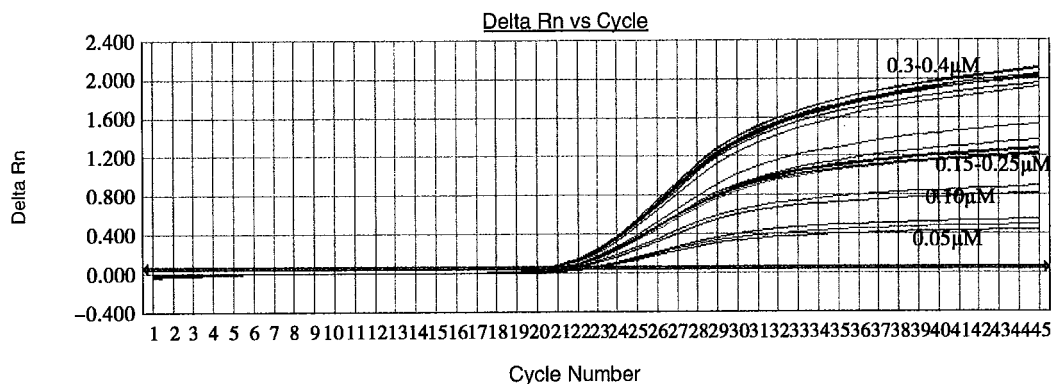


图5 SV 实时荧光 RT-PCR 探针优化结果

(五) 实时荧光 RT-PCR 标准曲线的建立及敏感性试验

将 SV RNA 标准品 Easy Dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 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、以临界环数 (threshold cycle, Ct) 为纵坐标建立荧光实时实时荧光 PCR 的标准曲线 (图 6), 标准品在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 范围内具有良好的线性关系 (结果见表 10、图 7)。其线性回归方程为 $Ct = -3.33 \times \log X (\text{拷贝数}) + 38.312$, 标准曲线斜率为 -3.33, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.33} - 1 = 0.997$, 即扩增效率为 99.7%, 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。标准品 $1 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 无扩增曲线, 故本方法检测的灵敏度为 $10 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。

表 10 SV 实时荧光 RT-PCR 敏感性检测结果

检测方法	检测样本/ (copies/mL)							
	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1
Ct	11.53 ±	14.89 ±	18.52 ±	21.73 ±	25.04 ±	28.52 ±	31.75 ±	34.67 ±
	0.207	0.336	0.174	0.090	0.004	0.020	0.397	0.438

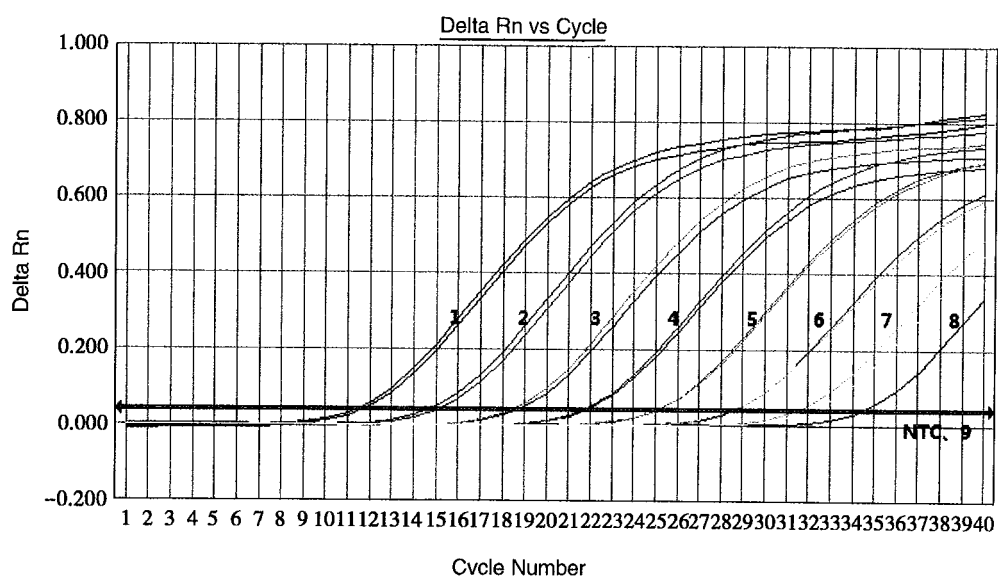


图 6 SV 实时荧光 RT-PCR 敏感性检测结果

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; NTC, 无模板对照

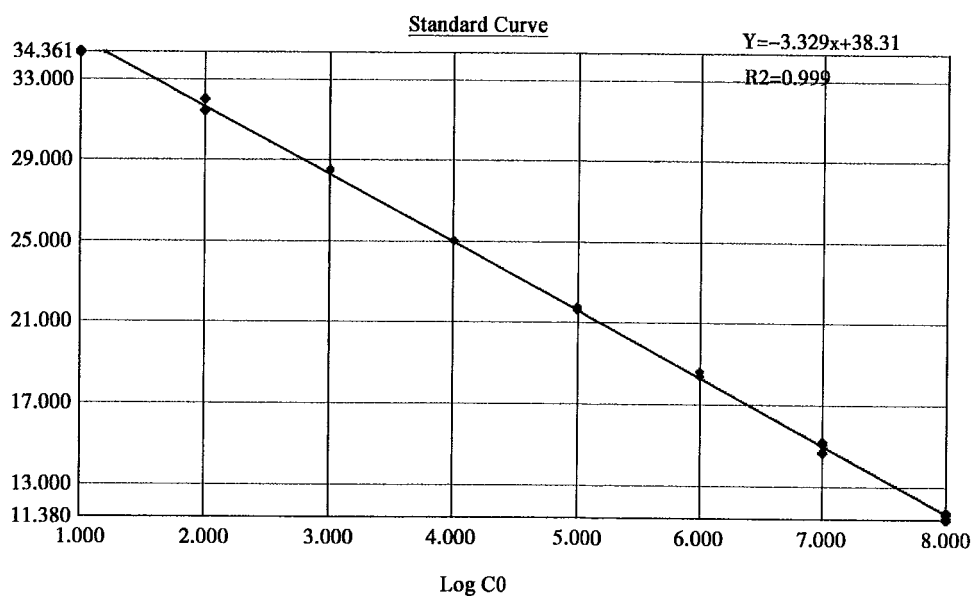


图 7 SV RNA 10 倍系列稀释标准品的标准曲线

(六) 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对仙台病毒病毒 (SV)、小鼠肝炎病毒 (MHV)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)、小鼠肺炎病毒 (PVM)、呼肠孤病毒 III 型 (Reo-3)、小鼠出血热病毒 (HV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、MNV 病毒 RNA、BHK 细胞 RNA 作为阴性对照, 进行特异性检测, 结果显示仅 SV Ct 值为 24, 其他病原核酸均无荧光信号 (结果见表 11), 说明本检测方法具有很好的特异性。

表 11 SV 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

特异性样本编号	样本	平均 Ct 值	结果判定
N-1	阴性样本	Not	阴性
N-2	阴性样本	Not	阴性
N-3	阴性样本	Not	阴性
N-4	BHK 细胞对照	Not	阴性
N-5	小鼠肝炎 (MHV)	Not	阴性
N-6	小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)	Not	阴性
N-7	小鼠肺炎病毒 (PVM)	Not	阴性
N-8	呼肠孤病毒 III 型 (Reo-3)	Not	阴性
N-9	小鼠出血热病毒 (HV)	Not	阴性
N-10	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)	Not	阴性
N-11	小鼠诺如病毒 (MNV)	Not	阴性
P1	仙台病毒 (SV)	24	阳性

(七) 实时荧光 RT-PCR 重复性试验

将 SV RNA 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 SV 的样本; R2, SV 浓度为 2×10^4 copies/mL; R3, SV 浓度为 1×10^5 copies/mL; R4, SVV 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 12、表 13), 表明建立实时荧光 RT-PCR 方法重复性好, 方法稳定可靠。

表 12 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	32.64	32.69	33.03	32.17	32.84	33.09	31.98	32.27	32.66	32.87	1.14
1×10^5	31.54	31.69	31.79	31.94	31.68	31.94	31.87	31.66	31.95	31.96	0.48
1×10^8	22.45	22.43	22.57	22.29	22.38	22.15	22.85	22.37	22.69	22.57	0.90

表 13 三批试剂批间重复性试验数据

试剂	检测样本	检测样品数	平均 Ct	标准差	CV 值/%
三批试剂	R1	30	无	无	无
	R2	30	32.48	0.352	1.08
	R3	30	31.92	0.290	0.91
	R4	30	22.41	0.289	1.29

(八) SV 分子检测方法在临床样本检测中的应用

1. 实时荧光 RT-PCR 在 SV 人工感染样本检测中的应用

人工感染组小鼠在第 3 天就可以检出 SV 核酸, SV 病毒滴度在肺组织中第 3 天开始明显上升, 第 7 天达到峰值, 并在第 11 天后开始下降, 第 21~30 天明显下降至感染前水平, 对照组未检出 SV (表 14)。因此, 本检测方法适用于临床样本的检测, 可以进行早期感染的检测。

表 14 SV 人工感染试验检测结果

样本采集 时间/d	SV 核酸阳性检出率			SV 核酸检测平均 Ct 值		
	2014001	2014002	2014003	2014001	2014002	2014003
	批次	批次	批次	批次	批次	批次
0	0/3	0/3	0/3	0	0	0
1	1/3	1/3	1/3	35.17	34.92	35.33
3	3/3	3/3	3/3	32.43	31.69	32.33
5	3/3	3/3	3/3	27.19	27.38	27.46
7	3/3	3/3	3/3	25.17	24.89	25.63
9	3/3	3/3	3/3	26.34	26.57	26.27
10	3/3	3/3	3/3	28.32	28.64	28.79
13	3/3	3/3	3/3	30.41	31.23	30.77
15	3/3	3/3	3/3	32.45	32.57	32.61
18	3/3	3/3	3/3	33.78	33.64	33.97
19	3/3	3/3	3/3	34.21	34.97	34.32
21	3/3	3/3	3/3	35.79	35.68	35.92
24	1/3	1/3	1/3	37.21	37.32	37.63
27	0/3	0/3	0/3	0	0	0
30	0/3	0/3	0/3	0	0	0

2. 临床样品的检测应用

应用 SV 普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法对 2012~2015 年送检的 96 份 SPF 级小鼠肺组织进行检测, 结果检出 0 份阳性, 阳性率为 0。对 84 份开放环境饲养鼠进行检测, 84 份样品 SV 抗体均为阴性, SV 核酸实时荧光 PCR 检测 84 份样品均为阴性, 普通 PCR 检测 84 份样品均为阴性。

3. 抗体检测与核酸检测结果比较

感染试验分别设人工感染组和脏垫料感染哨兵鼠组，取感染后 0~42 天小鼠血清和组织样本，用 ELISA 检测血清抗体，同时用实时荧光 PCR 及普通 PCR 检测方法进行组织样本 SV 核酸检测，结果见表 15。感染组小鼠血清抗体在感染后第 5 天开始检出，第 7~42 天一直维持在高抗体水平，实时荧光 PCR 检测方法在感染后第 3 天 3 只小鼠组织 SV 核酸全部阳性，组织 SV 全阳性一直维持至第 25 天，32 天后 SV 阳性率开始下降，第 42 天后组织 SV 实时荧光 PCR 检测为阴性。普通 PCR 检测阳性率结果与实时荧光 PCR 接近。哨兵组鼠小鼠抗体阳性出现在同居后第 32 天，但组织阳性率在同居后第 7 天开始能出现少量动物阳性。

表 15 SV 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			哨兵组		
	抗体阳性率	实时荧光 PCR 阳性率	普通 PCR 阳性率	抗体阳性率	实时荧光 PCR 阳性率	普通 PCR 阳性率
0	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	—
3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	—
5	2/3	3/3	3/3	0/3	0/3	—
7	3/3	3/3	3/3	0/3	1/3	—
10	3/3	3/3	3/3	0/3	1/3	—
18	3/3	3/3	3/3	0/3	1/3	—
25	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	—
32	4/4	2/4	2/4	3/6	1/4	—
42	4/4	0/4	0/4	6/7	0/4	—

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仙台病毒 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: 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.
- April M, Wagner, Jessie K, et al. 2003. Detection of Sendai virus and Pneumonia virus of mice by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. Comparative Medicine, 53(2): 65-69.
- 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. Lab Anim, 37(4): 341-351.
- Liang CT, Shih A, Chang YH, et al. 2009. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. J Am Assoc Lab Anim Sci, 48(4): 381-386.
- Manjunath S, Kulkarni PG, Nagavelu K, et al. 2015. Sero-prevalence of rodent pathogens in India. PLoS One, 10(7): 0131706.
- Zenner L, Regnault J P. 2000. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. Lab Anim, 34(1): 76-83.