

第二十二章 T/CALAS 50—2017《实验动物 呼肠孤病毒 III 型 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 呼肠孤病毒 III 型 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、特异的呼肠孤病毒 III 型普通 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,组织编写实验动物呼肠孤病毒 III 型 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 呼肠孤病毒 III 型 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 呼肠孤病毒 III 型 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呼肠孤病毒 III 型分子检测方法空白,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 呼肠孤病毒 III 型 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

呼肠孤病毒(Reovirus, Reo-3)属于呼肠病毒科、正呼肠病毒属。病毒粒子呈正二十面体对称,核酸为双股 RNA,病毒核酸由编码 10 个片段的双股 RNA 组成。呼肠孤病毒 III 型(Reovirus type III, Reo-3)是该病毒属的代表株。该病毒可感染所有哺乳动物,包括小鼠、仓鼠、豚鼠、猫和犬等。Reo-3 感染人,能引起幼年儿童腹泻、呼吸道感染及脑膜炎等疾病。实验小鼠感染呼肠孤病毒 III 型的临床症状以油性被毛效应和脂肪性下痢为特征。病理变化主要表现肝炎、脑炎和胰腺炎,病毒可使感染动物免疫功能发生改变,严重干扰动物实验。Reo-3 在实验动物微生物学等级及监测(GB14922.2—2011)中被列为是 SPF 等级实验动物必须排除的病原微生物。

目前,国内 Reo-3 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 Reo-3 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 年起进行呼肠孤病毒 III 型分子诊断方法研究,通过大量临床样本试验证明建立了敏感性高、特异性强、重复性好的普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测技术。

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呼肠孤病毒 III 型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 呼肠孤病毒 III 型 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

本标准适用于小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠及其产品、细胞培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中呼肠孤病毒 III 型核酸的检测。

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 14926.25—2001 《实验动物 呼肠孤病毒 III 型检测方法》

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.

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

Reo-3 呼肠孤病毒 III 型 Reovirus 3

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

四、检测方法原理

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, 针对病毒核酸保守序列 M2 蛋白基因设计特异的引物和探针序列, 分别通过普通 PCR 和实时荧光 PCR 对 cDNA 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 RT-PCR, 可以减少检测过程的污染风险, 同时实时荧光 RT-PCR 比普通 RT-PCR 检测灵敏度要高, 可用于普通 RT-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) 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) 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。

(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。

(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	TGCAAAGATGGGGAACGC	411
反向引物	TGGTGACACTGACAGCAC	

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')
正向引物	TGTGAGGTGGACGCGAATAG
反向引物	CGTTGATGCAGCGTGAAGAG
探针	FAM-CGGCCGGCTGCTGATCAGAGTATG-BHQ-1

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

标准规定了以下样品的采集及处理方法: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,以含有呼肠孤病毒 III 型的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板;以不含有呼肠孤病毒 III 型 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),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 RT-PCR

规定了实时荧光 RT-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

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，以含有呼肠孤病毒 III 型的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板；以不含有呼肠孤病毒 III 型 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	
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 RT-PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42	5min	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 (411 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 (411 bp) 的扩增条带，则可判定样本呼肠孤 III 型病毒核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 若样本出现预期大小 (411 bp) 的扩增条带, 则可判定样本呼肠孤 III 型病毒核酸检测阳性。

(二) 实时荧光 RT-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本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, 若待检测样本无荧光扩增曲线, 则判定样本呼肠孤病毒 III 型核酸检测阴性。

(2) 质控成立条件下, 若待检测样本有荧光扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 时, 则判断样本呼肠孤病毒 III 型核酸检测阳性。

(3) 质控成立条件下, 若待检测样本 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 , 则判定样本未检出呼肠孤病毒 III 型核酸。重新检测后, 若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样本呼肠孤病毒 III 型可疑阳性, 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呼肠孤病毒 III 型特异性片段序列进行比对, 序列同源性在 90% 以上, 可确诊待检样本呼肠孤病毒 III 型核酸阳性, 否则判定呼肠孤病毒 III 型核酸阴性。

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

呼肠孤病毒 III 型 (Reo-3, ATCC VR-232)、仙台病毒 (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) 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: 本实验室人工感染品 192 份, 临床送检 SPF 小鼠活体小鼠或小鼠组织 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) 核酸提取

处理好的组织或细胞样本使用 Trizol (Invitrogen) 提取 RNA, 按操作说明书进行。

(四) Reo-3-RNA 标准品的制备

以提取的 Reo-3 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 2 μ L, 2 $\times$ Buffer 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, RNA 5 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 50 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 一个循环 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应得到目的大小片段后, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 将回收的目的片段连接至 pGEM-T easy 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。阳性克隆菌 (pGEM-Reo-3) 送英潍捷基 (上海) 贸易有限公司进行测序, pGEM-Reo-3pcr 菌中含有的 PCR 产物大小为 411 bp, pGEM-Reo-3probe 菌中含有的 PCR 产物大小为 67 bp。

将 pGEM-Reo-3 质粒于 37 $^{\circ}$ C *Sa*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 $^{\circ}$ C 作用 2 h, 然后加 DNase I 酶 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化转录产物中未转录的 DNA 15 min, 70 $^{\circ}$ C 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 Reo-3pcr-RNA、Reo-3probe-RNA。用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 根据 Reo-3 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/ μ L) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ RNA 浓度 (g/ μ L) / 质量 MW (g/mol)。其中, MW = RNA 碱基数 $\times$ 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 Reo-3-RNA 的浓度用无 RNase 水调整到 1×10^{11} copies/ μ L, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

(五) 普通 RT-PCR 检测方法的建立和优化

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 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 μL , Random Primer 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , RNA 模板 5 μL , RNase Free dH_2O 1.5 μL ; 反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 25 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。

2. 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 $\times$ 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 5min。

(六) 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 TaKaRa 公司 PrimerscriptTM RT-PCR Kit (Perfect Realtime Probe) 试剂盒操作说明配制 Reo-3 实时荧光 RT-PCR 反应体系, 以 Reo-3-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 $\mu\text{mol/L}$) 和 TaqMan 探针浓度 (0.05~0.5 $\mu\text{mol/L}$) 进行优化, 以反应的前 3~15 个循环的荧光信号为荧光本底信号, 通过比较 Ct 值和荧光强度增加值 (绝对荧光强度与背景荧光强度的差值, 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 PCR 方法对仙台病毒 (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 Reo-3-RNA 标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1\times 10^9\sim 1\times 10^0\text{copies}/\mu\text{L}$ 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 Reo-3 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 Reo-3 的样本; R2, Reo-3 浓度为 $2\times 10^4\text{copies}/\text{mL}$; R3, Reo-3 浓度为 $1\times 10^6\text{copies}/\text{mL}$; R4, Reo-3 浓度为 $1\times 10^8\text{copies}/\text{mL}$ 。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本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

取浓度为 $1.5\times 10^7\text{copies}/\mu\text{L}$ Reo-3 病毒液, 尾静脉和腹腔注射病毒液各 0.2 mL/只。动物接种病毒后, 观察 129 天。每天记录动物的被毛、行为活动、饮食和精神状态。并在小鼠感染后第 0 天、4 天、7 天、18 天、25 天、35 天、72 天和 129 天对 2~3 只小鼠进行眼眶采血后脱颈椎处死并采集心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、盲肠内容物置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 用文中所述方法提取 RNA, 并进行实时荧光 RT-PCR 检测病毒拷贝量。在感染实验进行过程中的第 47 天、81 天、103 天, 随机抽取 3 只小鼠进行眼眶采血分离血清置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测血清抗体。

2. 其他临床样本检测

利用实时荧光 RT-PCR 方法对收集到的 96 份临床样本进行检测,每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。

二、结果

(一) 普通 PCR 检测方法的建立

按照所建立的普通 PCR 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 Reo-3 阳性样本在约 411 bp 位置有一目的条带,与预期结果相符(图 1)。



图 1 Reo-3 普通 PCR 电泳结果

M500, DNA Marker; 1~3, Reo3 阳性样本; 4, 阴性对照

(二) 普通 RT-PCR 检测方法特异性试验结果

采用建立的 Reo-3 普通 RT-PCR 方法对仙台病毒(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,呼肠孤病毒 III 型(Reo-3)作为阳性对照,进行特异性检测。结果显示 Reo-3 有约 411 bp 目的条带,其他病原核酸无目的条带(图 2)。

(三) 普通 RT-PCR 检测方法敏感性试验

将 Reo-3 质粒标准品用 Easy Dilution (TaKaRa 公司)做 10 倍系列稀释,得到 $2.7 \times 10^9 \sim 2.7 \times 10^0$ 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 2.7×10^3 copies/ μ L (图 3)。



图 2 Reo-3 普通 RT-PCR 特异性试验结果

M, 2000bp DNA Marker; 1~8 依次为 SV、MHV、TMEV、PVM、HV、LCMV、MNV、BHK 非特异性样本; 9、10, 水对照; 11, Reo3 阳性对照

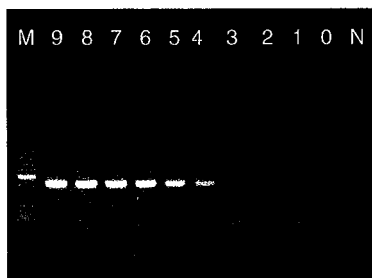


图 3 Reo-3 普通 PCR 检测方法敏感性试验结果

M, 100bp DNA Marker; N, 阴性对照; 9~0 依次为 $2.7 \times 10^9 \sim 2.7 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA

(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×One Step RT-PCR Buffer 25 μL , Reo-3 上游引物最适终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 下游引物最适终浓度为

0.3 $\mu\text{mol/L}$, 探针最适终浓度 0.25 $\mu\text{mol/L}$, Reo-3 RNA 模板 10 μL , 加 RNase Free dH_2O 至 50 μL 。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 一个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸结束后收集荧光。

(五) 实时荧光 RT-PCR 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将 Reo-3 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定量 PCR 的标准曲线 (图 4), 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 (图 5)。其线性回归方程为 $\text{Ct} = -3.28 \times X(\text{拷贝数}) + 40.941$, 标准曲线斜率为 -3.28, 根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.28} - 1 = 1.017$, 即扩增效率为 101.7%, 相关系数 $R^2 = 0.9985$, 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 $\text{copies}/\mu\text{L}$ 。

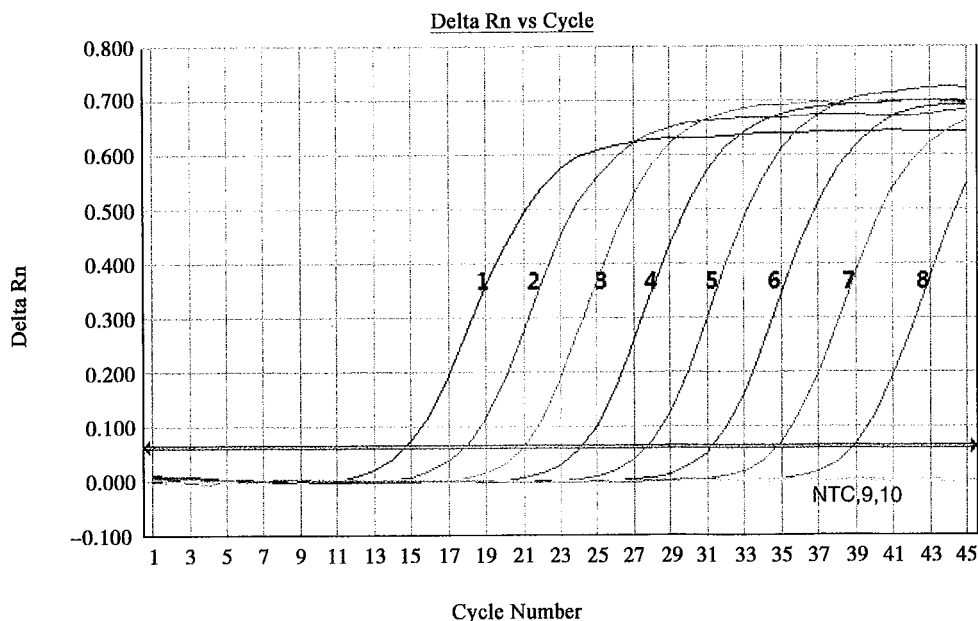


图 4 Reo-3 RT-实时荧光 RT-PCR 敏感性检测结果

1~9 依次为 $1\times 10^8 \sim 1\times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品; 10, BHK 阴性对照; NTC, 无模板对照

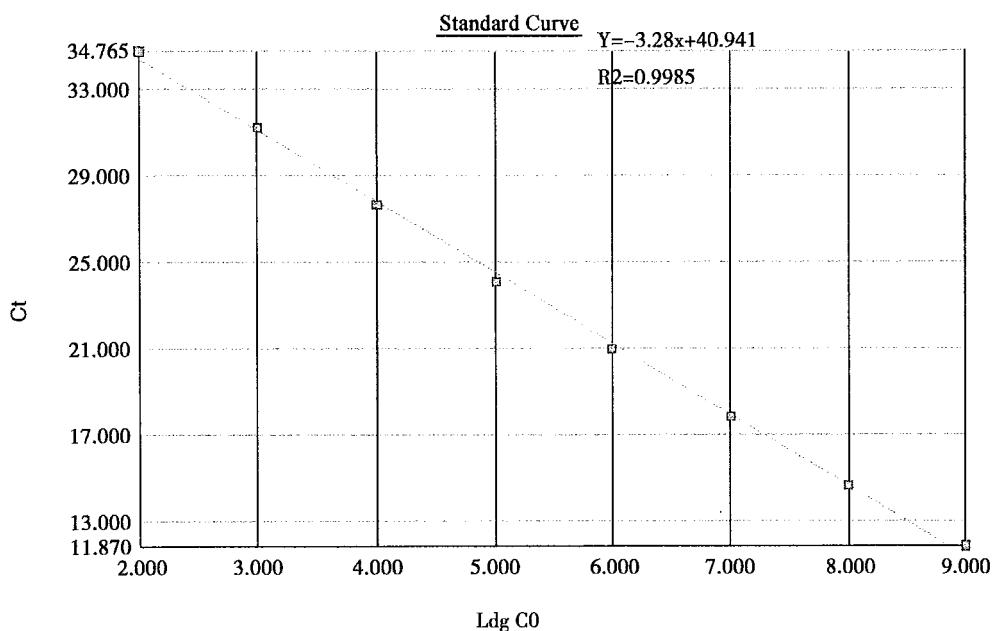


图 5 Reo-3 RNA10倍系列稀释标准品的标准曲线

（六）实时荧光 RT-PCR 特异性试验

采用建立的 Reo-3 实时荧光 RT-PCR 方法对仙台病毒、小鼠肝炎病毒（MHV）、小鼠脑脊髓炎病毒（TMEV）、小鼠肺炎病毒（PVM）、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 进行特异性检测，BHK 细胞 RNA 作为阴性对照，呼肠孤病毒 III 型（Reo-3，）作为阳性对照。结果显示，仅 Reo-3 Ct 值为 24，其他病原核酸均无荧光信号（结果见表 8、图 6），说明本检测方法具有很好的特异性。

表 8 Reo-3 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

编号	样本	平均 Ct	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	仙台病毒	Not	阴性
N-6	小鼠肝炎（MHV）	Not	阴性
N-7	小鼠脑脊髓炎病毒（TMEV）	Not	阴性
N-8	小鼠肺炎病毒（PVM）	Not	阴性
N-9	小鼠诺如病毒（MNV）	Not	阴性
N-10	小鼠出血热病毒（HV）	Not	阴性
N-11	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）	Not	阴性
P1	呼肠孤病毒 III 型（Reo-3）	24	阳性

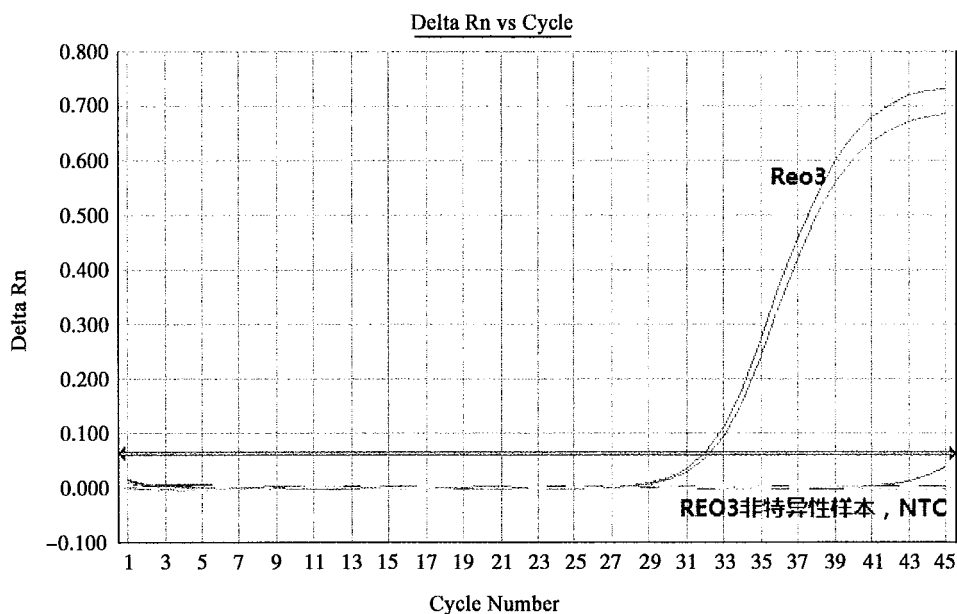


图 6 Reo-3 实时荧光 RT-PCR 特异性试验

(七) 实时荧光 PCR 重复性试验

将 Reo-3 RNA 标准品进行梯度稀释,设置 4 水平的重复性对照,包括:R1,不含 Reo-3V 的样本; R2, Reo-3 浓度为 2×10^4 copies/mL; R3, Reo-3 浓度为 1×10^5 copies/mL, R4, Reo-3V 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 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	32.54	32.47	31.93	31.67	32.79	31.84	32.04	32.77	32.64	32.83	1.36
1×10^5	31.99	31.73	31.44	31.69	31.75	32.49	32.67	32.23	32.19	31.76	1.22
1×10^8	22.76	22.83	22.36	22.57	22.63	22.03	23.09	22.35	22.64	22.09	1.53

(八) 实时荧光 RT-PCR 在临床样本检测中的应用

1. 实时荧光 PCR 在 Reo-3 人工感染样本检测中的应用

1) 人工感染鼠血清抗体滴度变化

感染小鼠体内抗体滴度随着感染时间迁移而升高,接种后 18 天抗体阳性,之后抗体效价逐渐升高,在 25 天抗体稀释度达到 128 天并维持至 129 天抗体稀释度达 512 倍) (表 10)。

表 10 感染小鼠抗 Reo-3 血清抗体的测定

检测结果	接种后时间/d										
	0	4	7	18	25	35	47	72	81	103	129
	抗体滴度 ($\bar{x} \pm s$)	0.00	0.00	0.00	1.00	7.48	7.50	8.00	7.33	8.33	8.33
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0.00	0.00	0.00	1.41	0.74	0.71	1.41	1.15	0.58	0.00	1.16

抗体滴度为能检出阳性结果的最大稀释倍数 log2 数值。

2) 感染靶器官病毒含量的测定

感染早期小鼠以肝病毒载量最高 (图 7A)，其次是心 (Heart)、脾 (Spleen)、肺 (Lung) (图 7B~D) 肝 (Liver) 以 6 天 (3.3×10^6 copies/ μ L) 含量最高 (图 7A)，心 (Heart) 在 11 天 (4.5×10^5 copies/ μ L) (图 7B)，肺 (Lung) 在 18 天 2.9×10^4 copies/ μ L (图 7C)，脑 (Brain) 在 4 天 (4.3×10^5 copies/ μ L) (图 7D)，脾 (Spleen) 在 6 天 (8.7×10^3 copies/ μ L) (图 7E)，肾 (Kidney) 在 18 天 1.9×10^4 copies/ μ L (图 7F)，并随着时间推移小鼠各组组织内病毒核酸含量总体呈现下降趋势，到 129 天除心和脾外检测到少量核酸外，其他组织均检测不到病毒核酸。

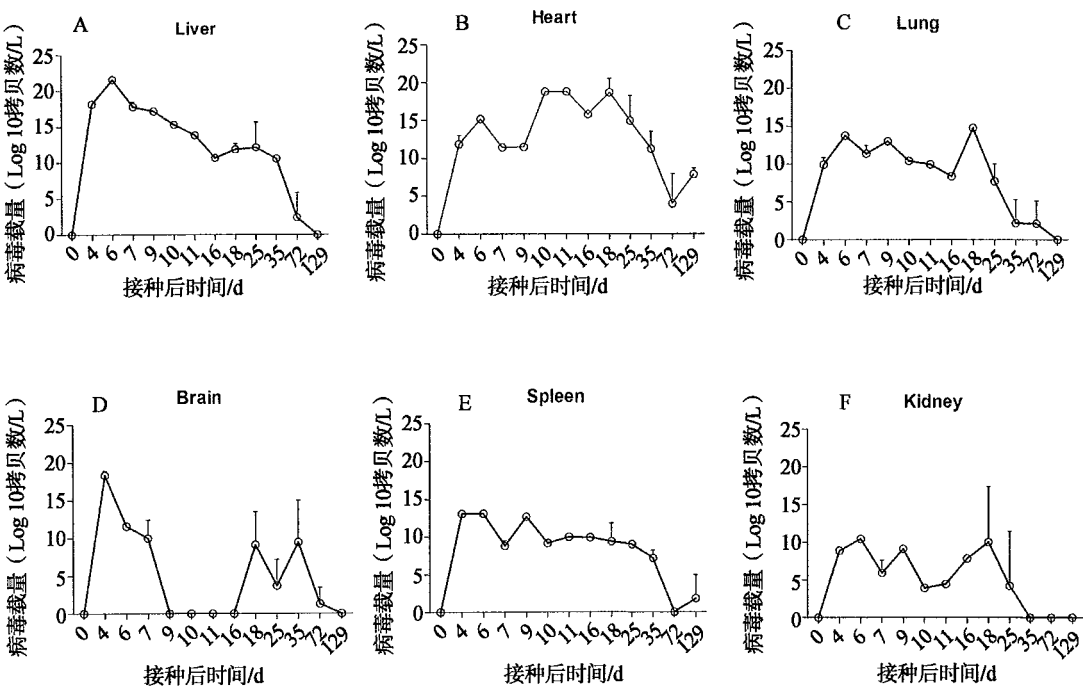


图 7 感染小鼠各内脏组织核酸测定 (n=1~3)

2. 临床样本的检测应用

应用 Reo-3 普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法对 2012~2015 年送检的 96 份 SPF 级小鼠盲肠内容物进行检测，结果检出 0 份阳性，阳性率为 0。

3. 抗体检测与核酸检测结果比较

感染试验取感染后 0~72 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 RT-PCR 及普通 PCR 检测方法进行组织样本 Reo-3 核酸检测。检测结果见表 11。感染组小鼠血清抗体在感染后第 18 天开始检出,第 25~72 天一直维持在高抗体水平,实时荧光 RT-PCR 检测方法在感染后第 3 天小鼠组织 Reo-3 核酸实时荧光 RT-PCR 及普通 PCR 检测均阳性,组织 Reo-3 核酸阳性高滴度一直维持至第 35 天,72~129 天后 Reo-3 组织核酸阳性率明显下降,但仍然在部分高带毒后组织能检测到阳性。普通 PCR 检测阳性率结果与实时荧光 RT-PCR 接近。

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。

表 11 抗体检测与核酸检测结果比较

样本采集 时间/d	感染组		
	抗体阳性率	实时荧光 RT-PCR 各组织阳性率	普通 PCR 各组织阳性率
0	0/3	0/16	0/16
4	0/3	8/16	8/16
18	3/3	11/16	10/16
25	6/6	14/24	12/24
35	5/5	6/16	3/16
72	9/9	1/24	0/24
129	3/3	3/24	1/24

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呼肠孤病毒 III 型 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

- 郎书惠, 贺争鸣, 吴惠英. 1998. 呼肠孤病毒感染不同免疫功能状态小鼠的病理组织学研究. 实验动物科学与管理, 15 (3): 54.
- 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, 31 (2): 20-24.
- 徐蓓, 李建平, 屈霞琴, 等. 1989. 上海地区实验小鼠病毒性传染病的血清学调查. 上海实验动物科学, 9 (1): 34-36.
- 殷震, 刘景华. 1997. 动物病毒学 (第2版). 北京: 科学出版社: 329-330.
- Bai B, Shen H, Hu Y, et al. 2014. Serological survey of a new type of reovirus in humans in China. Epidemiol Infect, 142 (10): 2155-2158.
- 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.
- Cheng P, Lau CS, Lai A, et al. 2009. A novel reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease. J Clin Virol, 45: 79-80.
- Jacoby RO, Lindsey JR. 1998. Risks of infection among laboratory rats and mice at major biomedical research institutions. ILAR J, 39 (4): 266-271.
- Kumar S, Dick EJ, Bommineni YR, et al. 2014. Reovirus-associated meningoencephalomyelitis in baboons. Vet Pathol, 51 (3): 641-650.
- Marty GD, Morrison DB, Bidulka J, et al. 2015. Piscine reovirus in wild and farmed salmonids in British Columbia, Canada: 1974-2013. J Fish Dis, 38 (8): 713-728.
- Mor SK, Verma H, Sharafeldin TA, et al. 2015. Survival of turkey arthritis reovirus in poultry litter and drinking water. Poultry Sci, 94 (4): 639-642.
- Ouattara LA, Barin F, Barthez MA, et al. 2011. Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy. Emerg Infect Dis, 17: 1436-1444.
- Stanley NF, Dorman DC, Ponsford J. 1953. Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepato-encephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice. Aust J Exp Biol Med Sci, 31 (2): 147-159.
- Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, et al. 2004. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. J Infect Dis, 189: 1664-1675.

- Waggie K, Kagiya N, Allen AM. 1994. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals. Bethesda: MD: NIH Publication: 99-100.
- Zhang S, Shu X, Zhou L, et al. 2016. Isolation and identification of a new reovirus associated with mortalities in farmed oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849), in China. J Fish Dis, 39 (3): 371-375.
- Zhang YW, Liu Y, Lian H, et al. 2016. A natural reassortant and mutant serotype 3 reovirus from mink in China. Arch Virol, 161 (2): 495-498.