

# 鼠痘病毒荧光定量 Taqman-PCR 检测方法的建立与应用

杜江涛<sup>1</sup>, 戴方伟<sup>1</sup>, 周莎桑<sup>1</sup>, 宋晓明<sup>2</sup>, 吕 宇<sup>1</sup>, 萨晓婴<sup>1</sup>

(1 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013; 2 杭州师范大学实验动物中心, 杭州 310036)

**【摘要】 目的** 建立鼠痘病毒的荧光定量 Taqman-PCR 检测方法,以期能快速、准确、灵敏、特异的检出鼠痘病毒。**方法** 经过比对和筛选,本研究选取鼠痘病毒的 ERPV\_027 基因 480 – 800 位序列段,作为引物设计位点设计引物和探针,并对该引物对和探针的特异性、灵敏性、稳定性和重复性进行检测。**结果** 本研究建立的方法,对鼠痘病毒的检测极限是 68 copies/ $\mu$ L;该方法特异性强,只对鼠痘病毒特定片段进行特异性扩增,而对小鼠肝炎病毒、仙台病毒、沙门氏菌等其它病毒、细菌无扩增;该方法稳定性和重复性均较好。**结论** 本研究成功建立了检测鼠痘病毒的荧光定量 Taqman-PCR 方法,该方法特异性强、灵敏度高,且具有较好的稳定性和重复性,具有广阔的应用价值。

**【关键词】** 鼠痘病毒;荧光定量 PCR;Taqman 探针

**【中图分类号】** R – 33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2015) 06-0059-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 006. 012

## Establishment and application of a fluorescence quantitative Taqman-PCR detection method of mouse poxvirus

Du Jiang-tao<sup>1</sup>, DAI Fang-wei<sup>1</sup>, ZHOU Sha-sang<sup>1</sup>, SONG Xiao-ming<sup>2</sup>, LV Yu<sup>1</sup>, SA Xiao-ying<sup>1</sup>

(1. Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2. Center of Laboratory Animals, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

**【Abstract】 Objective** To establish a fluorescence quantitative Taqman-PCR method for rapid and accurate detection of mouse poxvirus. **Methods** After sequence alignment and comparison, ERPV\_027 gene was selected as the primer and probe design gene. Furthermore, the specificity, sensitivity, stability and reproducibility of these primers and probes were detected. **Results** The detection limitation of this method was 68 copies/ $\mu$ L. Data showed that this method has high specificity, which specifically amplifies mouse poxvirus, with no amplification signal of mouse hepatitis virus, Sendai virus, Salmonella and some other viruses and bacteria. This method also showed good stability and reproducibility. **Conclusions** This study has successfully established a fluorescence quantitative Taqman-PCR method for detection of mouse poxvirus, with high specificity, sensitivity, good stability and reproducibility, and a broad application potential.

**【Key words】** Mouse poxvirus; Fluorescence quantitative PCR; Taqman probe

鼠痘 (mouse pox) 是由鼠痘病毒 (mouse poxvirus, MPV) 感染引起的实验小鼠的一种烈性传

[基金项目] 科技部“十二五”科技支撑计划项目子项目 (2013BAK11B01-41), 浙江省医药卫生科技计划项目 (2012ZDA010), 浙江省科技计划项目 (2012C37097)。

[作者简介] 杜江涛 (1986 – ) 男, 研究实习员, 从事实验动物微生物检测等工作。E-mail: djtao1986@126.com。

[通讯作者] 萨晓婴。E-mail: saxiaoyin@163.com。

染病。本病多呈爆发性流行,致死率较高,常造成全群淘汰,危害极大<sup>[1]</sup>。临床表现以四肢、尾和头部肿胀、溃烂、坏死甚至脚趾脱落为特征,故又称脱脚病(Ectromelia, Ect)<sup>[2]</sup>。

目前,鼠痘病毒的检测方法主要是酶联免疫吸附技术(ELISA)和免疫荧光技术(IFA)<sup>[3]</sup>等血清学方法。传统的血清学方法对检测鼠痘病毒感染,特别是隐性感染存在较大的局限性。近年来,随着分子生物学的快速发展,聚合酶链反应(PCR)越来越多地应用于传染病的诊断检测<sup>[4, 5]</sup>。关于鼠痘病毒的普通 PCR 检测方法及应用已有报道<sup>[6-8]</sup>,但未见其荧光定量 PCR 检测方法的相关报道。本研究针对鼠痘病毒建立荧光定量 PCR 检测方法,能快速、准确、灵敏、特异的检出鼠痘病毒。

1 材料方法

1.1 病毒株核酸及样品

鼠痘病毒标准株核酸 ECT-BJ、ECT-GZ (ECT-GZ-1、ECT-GZ-2) 和 4 个临床分离株核酸 001、MB35、HZ、1436R 由中国食品药品检定研究院和广东实验动物监测所提供。种属外病原核酸包括牛痘病毒、泰泽病原体、仙台病毒、小鼠肝炎病毒(以上均来源于中国食品药品检定研究院)以及沙门氏菌、李斯特杆菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及 42 份鼠源性动物粪便、组织等样品(由本实验室收集保存)。

1.2 主要试剂及器材

DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;PMD18-T Vector 载体、DNA Taq 酶、JM109 感受态细胞、聚合酶链反应(PCR)相关试剂

购自日本 TaKaRa 中国分公司;TaqMan Fast Advanced Master Mix 购自 ABI 公司;质粒 DNA 纯化试剂盒由 Axygen 公司生产;DNA Marker、6 × Loading Buffer 为上海捷瑞产品;常温离心机(Thermo),微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000-Thermo),水平电泳仪(Tanon),Gel Image System(Tanon),生化培养箱(上海精宏仪器有限公司),普通 PCR 扩增仪(Bio-RAD),荧光定量 PCR 仪(ABI 7500)。

1.3 方法

1.3.1 引物、探针设计及合成:从 NCBI 上下载鼠痘病毒的全基因组序列,从中选出四个基因利用 Primer Express 3.0 设计荧光定量 PCR 引物对和探针(表 1)。经过筛选和验证,本研究最终选取 ERPV\_027 基因作为靶基因引物、探针均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3.2 DNA 提取:参照 QIAamp DNA Mini Kit 说明书,分别提取鼠痘病毒感染样本、细菌、鼠源性动物粪便组织等样品的 DNA。

1.3.3 特异性检测:对设计的 4 对引物进行筛选后,选择特异性最好的 ECT-027 引物对和探针进行检测,并对 PCR 程序进行优化。

优化后的普通 PCR 体系如下:10 × Taq PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2 μL, dNTPs mixture(2.5 mmol/L) 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 DNA(10 ng/μL) 2 μL, 补水至 20 μL。扩增程序为:95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环;72℃ 再延伸 7 min; 8℃ 保存。

优化后的荧光定量 Taqman-PCR 体系如下:2 × TaqMan Fast Advanced Master Mix 12.5 μL, 上下游

表 1 四组荧光定量 PCR 引物对和 Taqman 探针序列

| Tab. 1 Four groups of fluorescence quantitative PCR primer pairs and Taqman probe sequences |                                    |               |                               |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 编号<br>Codes                                                                                 | 靶基因<br>Target gene                 | 引物<br>Primers | 碱基序列(5'-3')<br>Base sequences | 扩增产物(bp)<br>Amplification products |
| ECT-027                                                                                     | ERPV_027                           | 184F          | ACAAGGGGTTGGGTGTAAGA          | 186                                |
|                                                                                             |                                    | 369R          | GCGTGCTAGTGGTTGCATTA          |                                    |
|                                                                                             |                                    | 225P          | ACCAAAGTGGGTAGACGATGT         |                                    |
| ECT-150                                                                                     | ERPV_150                           | 228F          | TGGTTTGGTTGTCGCGTTAG          | 154                                |
|                                                                                             |                                    | 381R          | ATTACACCTGGATCGACGCA          |                                    |
|                                                                                             |                                    | 340P          | TCAAAGCATGTGACTTATTCGT        |                                    |
| ECT-177                                                                                     | ERPV_177                           | 763F          | AGACCAAGCGTTGTTTCACA          | 192                                |
|                                                                                             |                                    | 954R          | CGTTATGGCATCGTCGTGAA          |                                    |
|                                                                                             |                                    | 879P          | AGGATGGGAATTGATAACGACT        |                                    |
| ECT-33221                                                                                   | secreted chemokine binding protein | 202F          | CAAGCAAGACCAACACCGA           | 145                                |
|                                                                                             |                                    | 346R          | CATTCTCAGACCTCCACCGA          |                                    |
|                                                                                             |                                    | 263P          | TCTGAAGACGATGGGGTATCCGA       |                                    |

引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , 探针(5  $\mu\text{mol/L}$ )1.0  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA(10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )1.0  $\mu\text{L}$ , 补水至 25  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为:50 $^{\circ}\text{C}$  培育 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,预扩增 10 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 1 min,共 40 个循环,收集荧光信号并读取数据。

普通 PCR 和荧光定量 Taqman-PCR 分别对鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2 和分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA,荧光定量 Taqman-PCR 对小鼠肝炎病毒、牛痘病毒、仙台病毒、泰泽病原体、沙门氏菌、李斯特菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌,及鼠痘病毒感染组织样品 DNA 进行扩增,检测引物和探针的特异性。

### 1.3.4 敏感性检测:

1.3.4.1 标准曲线与表达式的建立:将 ERPV\_027 基因克隆至 PMD 18-T vector 上,并对重组质粒(21.7  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )依次作 10 倍稀释直到  $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。选取( $21.7 \times 10^{-8} \sim 21.71 \times 10^{-1}$ )  $\text{ng}/\mu\text{L}$  进行 TaqMan 探针检测制作标准曲线。

1.3.4.2 探针灵敏性:将重组质粒(21.7  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )依次作 10 倍稀释直到  $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,再取 1  $\mu\text{L}$  各稀释倍数的 ERPV\_027 克隆质粒作为模板,用荧光定量 Taqman-PCR 进行检测,PCR 扩增体系和反应程序同上。

1.3.5 稳定性和重复性实验:取鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA 及同一批 PCR 检测试剂于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 1 周、2 周、3 周,用荧光定量 Taqman-PCR 检测,3 次试验各做 3 个重复,PCR 扩增体系和反应程序同上。

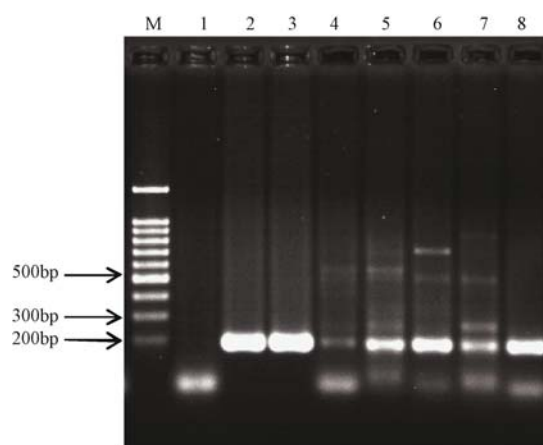
1.3.6 实际检测应用:以 ERPV027 基因克隆质粒作为阳性对照,用荧光定量 Taqman-PCR 分别对取自鼠源性动物粪便、组织等 42 份样品的 DNA 样品及鼠痘病毒感染样本(鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞)的 DNA 样品进行检测。

## 2 结果

### 2.1 引物和探针的特异性

普通 PCR 和荧光定量 Taqman-PCR 分别对鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ 进行检测,均能得到特异性扩增条带和曲线(图 1、2)。荧光定量 Taqman-PCR

对鼠痘病毒感染样本,都能够特异性扩增,而对其它病毒及细菌,如牛痘病毒、泰泽病原体、仙台病毒、小鼠肝炎病毒、沙门氏菌、李斯特杆菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌则无扩增结果。

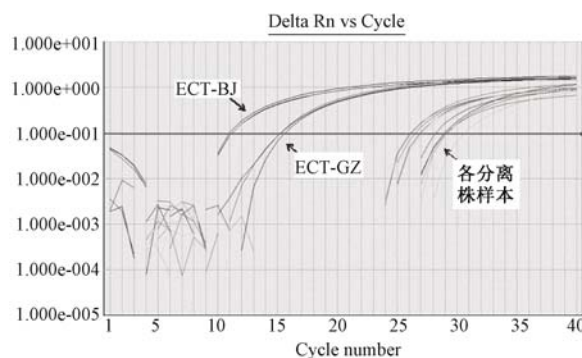


注:M 为 100 bp DNA ladder;1-8 依次为阴性对照(NTC)、ECT-GZ-2、ECT-BJ、001、MB35、1436R、HZ、ECT-GZ-1 的扩增结果

图 1 各鼠痘病毒 DNA 样本的普通 PCR 扩增结果

Note. Lane M represents 100 bp DNA ladder; Lanes 1-8 represent amplification results of NTC, ECT-GZ-2, ECT-BJ, 001, MB35, 1436R, HZ and ECT-GZ-1

Fig. 1 Regular PCR amplification results of each mouse poxvirus DNA samples



注:Delta Rn 表示标准指示信号值减去基线信号值, Cycle Number 表示 PCR 循环数。

图 2 荧光定量 Taqman-PCR 检测各鼠痘病毒 DNA 样本的扩增曲线

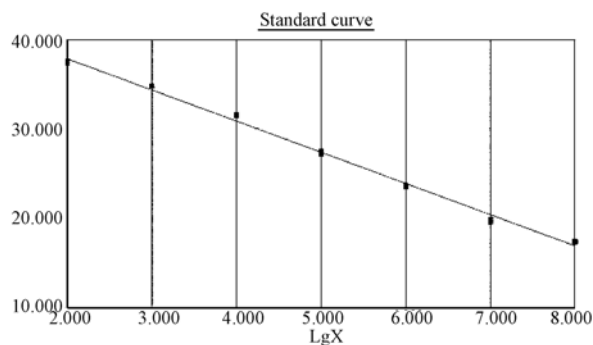
Note. Delta Rn represents the standard indication signal minus the baseline signal value. Cycle number represents the number of PCR cycles.

Fig. 2 Amplification curve of mouse poxvirus DNA detected by FQ Taqman-PCR

### 2.2 敏感性

2.2.1 标准曲线与表达式的建立:将 ERPV\_027 基

因克隆至 PMD 18-T vector 上,并对重组质粒( $21.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )依次作 10 倍稀释直到  $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。选取 ( $21.7 \times 10^{-8} \sim 21.7 \times 10^{-1}$ )  $\text{ng}/\mu\text{L}$  进行 TaqMan 探针检测制作标准曲线,横坐标是以 10 为底的质粒拷贝数的对数值,纵坐标是循环阈值  $C_t$ 。从标准曲线得出重组质粒拷贝数(copy number)与循环阈值( $C_t$ )之间的线性关系曲线表达式  $C_t = -3.47 \times \lg(\text{copy number}) + 44.66$ ,根据该表达式测算出重组质粒的初始拷贝数。根据标准曲线得知,已建立的荧光定量 PCR 的相关系数为  $R^2 = 0.996$ ,扩增效率为 94%,表明已建立的荧光定量 PCR 方法误差较小,使用的标准品是合格的(图 3、4)。

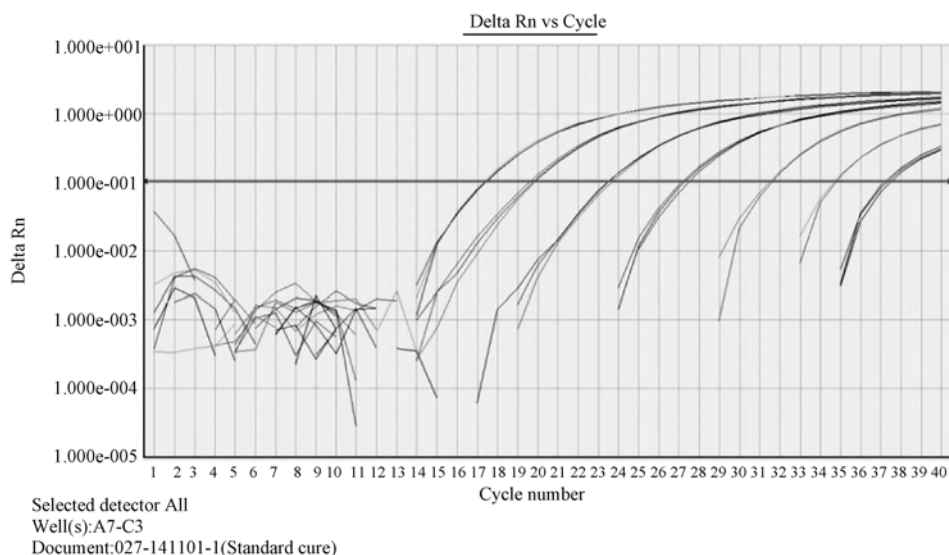


注:横坐标是以 10 为底的质粒拷贝数的对数值,纵坐标是循环阈值  $C_t$

图 3 标准曲线

Note. The abscissa is  $\lg(\text{Copy numbers})$ , and ordinate is  $C_t$ .

Fig.3 The standard curve



注:曲线从左到右依次为克隆质粒  $21.7 \times 10^{-1} \sim 21.7 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{L}$  稀释

图 4 标准曲线扩增图

Note. The curves from left to right are cloning plasmid  $21.7 \times 10^{-1} \sim 21.7 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{L}$  dilution

Fig.4 The standard amplification curves

2.2.2 探针灵敏性检测:将 ERPV027 基因克隆质粒( $21.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )依次 10 倍稀释直到  $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,各取  $1 \mu\text{L}$  作为模板,用荧光定量 Taqman-PCR 进行检测。结果显示:在 40 个 PCR 循环内,最小可以检测到  $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,即:68 copies,探针灵敏性较好。扩增曲线见图 5;从左到右分别是  $21.7 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L} \sim 21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$  已经看不到完整的扩增曲线。

### 2.3 稳定性和重复性

取鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA 及同一批荧光定量 PCR 检测试剂于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱放置 1 周、2 周、3 周,用荧光定量 Taqman-PCR 检测(表 2)。3 次试验各做 3 个重复,3 次试验的  $C_t$  的标准差 SD

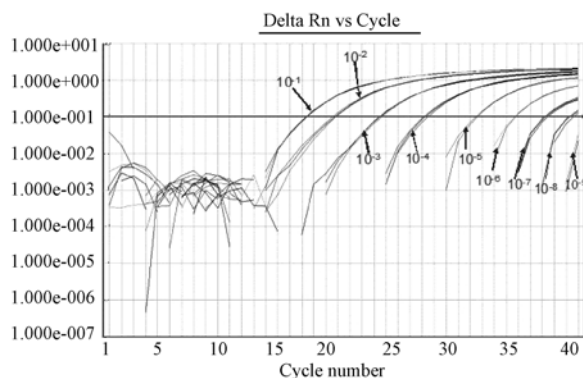


图 5 荧光定量 Taqman-PCR 对 10 倍梯度稀释质粒扩增结果

Fig.5 Amplification results of the plasmid in 10-fold dilutions by FQ Taqman-PCR

表 2 鼠痘病毒 DNA 及试剂放置一段时间后用检测结果

Tab. 2 Detection results of mouse poxvirus DNA samples by FQ Taqman-PCR. The DNA samples and reagents were stored for some time.

| 编号           | 检测周期(周) | CT 值   |        |        | 平均 Ct 值 | SD 值 | CV(%) | DNA 浓度 (ng/μL) |
|--------------|---------|--------|--------|--------|---------|------|-------|----------------|
|              |         | CT 值 1 | CT 值 2 | CT 值 3 |         |      |       |                |
| ECT-BJ       | 1       | 11.03  | 11.24  | 11.23  | 11.23   | 0.12 | 1.07  | 27             |
|              | 2       | 11.08  | 11.26  | 11.21  | 11.21   | 0.09 | 0.80  | 27             |
|              | 3       | 11.58  | 11.76  | 11.70  | 11.70   | 0.09 | 0.77  | 27             |
| 001          | 1       | 28.26  | 28.37  | 28.49  | 28.37   | 0.12 | 0.42  | 25.8           |
|              | 2       | 28.75  | 28.40  | 28.76  | 28.75   | 0.21 | 0.73  | 25.8           |
|              | 3       | 29.30  | 29.19  | 29.41  | 29.30   | 0.11 | 0.38  | 25.8           |
| HZ           | 1       | 29.13  | 29.09  | 29.04  | 29.09   | 0.04 | 0.14  | 16.7           |
|              | 2       | 27.54  | 27.66  | 27.71  | 27.66   | 0.09 | 0.33  | 16.7           |
|              | 3       | 28.65  | 28.56  | 28.47  | 28.56   | 0.09 | 0.32  | 16.7           |
| MB35         | 1       | 26.20  | 26.24  | 26.17  | 26.20   | 0.04 | 0.15  | 27.8           |
|              | 2       | 26.01  | 26.17  | 26.09  | 26.09   | 0.08 | 0.31  | 27.8           |
|              | 3       | 27.43  | 27.46  | 27.47  | 27.46   | 0.02 | 0.07  | 27.8           |
| 1436R        | 1       | 29.25  | 29.27  | 29.24  | 29.25   | 0.02 | 0.07  | 21.8           |
|              | 2       | 29.23  | 28.89  | 29.42  | 29.23   | 0.27 | 0.92  | 21.8           |
|              | 3       | 29.08  | 29.01  | 29.04  | 29.04   | 0.03 | 0.10  | 21.8           |
| ECT - GZ - 1 | 1       | 26.54  | 26.92  | 27.20  | 26.92   | 0.33 | 1.23  | 45.1           |
|              | 2       | 26.21  | 26.78  | 26.35  | 26.35   | 0.30 | 1.14  | 45.1           |
|              | 3       | 26.37  | 26.54  | 26.46  | 26.46   | 0.08 | 0.30  | 45.1           |
| ECT - GZ - 2 | 1       | 15.28  | 15.65  | 15.32  | 15.32   | 0.20 | 1.31  | 10.1           |
|              | 2       | 15.47  | 15.48  | 15.45  | 15.47   | 0.01 | 0.06  | 10.1           |
|              | 3       | 15.52  | 15.69  | 15.70  | 15.69   | 0.10 | 0.64  | 10.1           |

值小于 0.5,变异系数(CV)小于 5%,说明用引物 027 建立的 FQ Taqman-PCR 方法稳定性和重复性均较好。

2.4 实际检测应用

以 ERPV027 基因克隆质粒作为阳性对照,用荧光定量 Taqman-PCR 对取自鼠源性动物粪便、组织等 42 份样本的 DNA 样品及鼠痘病毒感染样本(鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞)的 DNA 样品进行 Real-time PCR 检测。鼠源性动物粪便、组织中均未检测出鼠痘病毒目的基因,鼠痘感染样品中检测到目的基因且含量较高。

3 讨论

目前国内通用的检测鼠痘病毒的方法是血清学方法,如免疫荧光技术(IFA)<sup>[3]</sup>、酶联免疫吸附技术(ELISA)等。但对于急性发病鼠群,其体内尚未产生相应的抗体或抗体未达到可检出的水平时,血清学方法会出现假阴性结果,造成漏检<sup>[9]</sup>。而且血清学检测方法对抗原的纯度要求较高,对能产生抗 DNA 抗体的小鼠血清会出现假阳性,且不能鉴别痘苗病毒免疫抗体和 MPV 感染所产生的抗体。对病毒的早期诊断,存在着很大的局限性。近年来,随着分子生物学的快速发展,应用 PCR 技术扩增病毒

基因的特异 DNA 片段<sup>[10]</sup>,可以在病毒诱生抗体之前确定感染,且可分型和定量。目前,关于鼠痘病毒的普通 PCR 检测已有相关报道<sup>[6-8]</sup>,但其荧光定量 PCR 检测方法仍未见报道。

本研究从 NCBI 的 FTP 下载一株 Ectromelia virus 全基因组的基因序列(Ectromelia virus culture - collection ATCC: VR - 1431, GenBank Accession No: JQ410350.1),将其 183 个基因与 Nt 库对比,获得全部的比对结果。在分析比对结果时,发现 ERPV\_027、ERPV\_60、ERPV\_64、ERPV\_77、ERPV\_116、ERPV\_140、ERPV\_142、ERPV\_145、ERPV\_148、ERPV\_149、ERPV\_150、ERPV\_174、ERPV\_175、ERPV\_177 基因,有非常好的种内特异和种间的差异性(与牛痘病毒差别较大)。我们选择了特异性最好的三个基因 ERPV\_027、ERPV\_150、ERPV\_177 三个基因作为候选基因,设计特异性检测引物。此外,我们还参考文献,将鼠痘的 secreted chemokine binding protein 也作为靶基因设计引物。

针对 ERPV\_027、ERPV\_150、ERPV\_177 三个基因,我们下载了不同分离株各三条序列,针对 secreted chemokine binding protein 我们下载了五条分离株的序列,利用 Mega5 进行多序列联配,针对不同分离株的保守性区域利用 Primer Express 3.0

设计引物和探针(表 1)。我们将 4 对引物用普通 PCR 对标准株进行扩增,发现都能得到目的条带,之后又对不同来源的分离株进行 PCR 检测,发现仅 ERPV\_027 有很好的扩增效果。我们将 ERPV\_027 基因作为候选基因,对 7 株病毒株进行检测,结果也符合预期。

为了进一步验证其特异性,我们对 32 个样本进行检测,其中 18 个样本为鼠痘感染的生物样本,其余样本为不同病原体感染的生物样本。检测结果显示我们所设计的探针的特异性为 100%。为了检测引物的灵敏性,我们制作了该目的基因的标准品,Taqman 检测结果表明该方法对鼠痘病毒的检测限为 68 copies/ $\mu$ L,与普通 PCR 相比,大大提高了检测灵敏度。取鼠痘病毒标准株和分离株样品 DNA 及同一批 PCR 检测试剂于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 1 周、2 周、3 周,Taqman PCR 检测能得到良好的扩增效果,证明所建立的方法稳定性和重复性较好。用荧光定量 Taqman-PCR 均未从鼠源性动物粪便、组织样本的 DNA 中检出鼠痘病毒目的基因,但从鼠痘感染样本的 DNA 中检测到目的基因且含量较高,证明该方法具有良好的实际应用价值。

本方法在实际检测应用中,仅对本实验室收集的沙鼠粪便和组织,野鼠粪便样本及鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞样本进行了检测,并未对鼠痘感染的动物组织样本进行过检测,表明该方法在实际应用中,尚需进一步的验证。

#### 参考文献:

- [1] 景志忠,贾怀杰,周涛. 痘病毒病:值得高度重视的一类人兽共患病[J]. 中国病毒病杂志, 2011. 1(6): 416-418.
- [2] 师长宏,李六金,李成,等. KM 和 BALB/c 小鼠痘病毒感染的诊断[J]. 动物医学进展, 2002. 23(3): 72-73.
- [3] 应贤平,钱琴,屈霞琴,等. 实验小鼠痘病毒感染检测分析[J]. 中国实验动物学杂志, 2000. 10(2): p. 69-72.
- [4] Scaramozzino N, Ferrier-Rembert A, Favier AL, et al. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses[J]. Clin Chem, 2007. 53(4): 606-613.
- [5] Labelle P, Hahn NE, Fraser JK, et al. Mousepox detected in a research facility: case report and failure of mouse antibody production testing to identify Ectromelia virus in contaminated mouse serum[J]. Comp Med, 2009, 59(2): 180-186.
- [6] 赵雅静,宁磊,于风刚. 小鼠痘病毒的聚合酶链反应检测法[J]. 上海实验动物科学, 1998. 18(2): 88-90.
- [7] 付瑞,岳秉飞,贺争鸣. 鼠痘病毒 PCR 检测方法的建立及在鼠源性生物制品检定中的应用[J]. 实验动物科学, 2012. 29(3): 12-14.
- [8] 杨松涛,夏咸柱,乔军,等. 鼠痘病毒 CC 强毒株的分离与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(1): 5.
- [9] Parker S, Siddiquia AM, Oberlea C, et al. Mousepox in the C57BL/6 strain provides an improved model for evaluating anti-poxvirus therapies[J]. Virology, 2009. 385(1): 11-21.
- [10] Kochneva GV, Kolosova TA, Lupan GF, et al. [Orthopoxvirus genes for kelch-like proteins. III. Construction of mousepox (ectromelia) virus variants with targeted gene deletions][J]. Mol Biol (Mosk), 2009. 43(4): 567-572.

[修回日期]2015-05-18