

# 呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo3) RT-PCR 检测方法的建立

王吉, 卫礼, 贺争鸣, 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院、国家实验动物微生物、遗传检测中心, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo3) RT-PCR 检测方法, 应用于实验动物及人用动物源性材料及生物制品外源 Reo3 的检测。方法 根据已发表的呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo3) M1 基因序列, 设计合成引物。提取 Reo3 细胞毒 RNA, 以其为模板, 进行 PCR 扩增。优化反应条件, 进行特异性、敏感性、重复性试验。结果 建立的 Reo3 RT-PCR 检测方法特异、敏感、稳定。以 Reo3 RNA 逆转录产物为模板, 所能检测 RNA 最小模板浓度为 0.42 pg/ $\mu$ L, 可检测病毒最小滴度为  $10^{-9}$ /mL。结论 建立的呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo3) RT-PCR 检测方法可用于实验动物及人用动物源性材料及生物制品外源 Reo3 的检测。

**【关键词】** 呼肠孤病毒Ⅲ型; 反转录聚合酶链式反应; 实验动物; 人用动物源性材料及生物制品

**【中图分类号】** Q781; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)09-0046-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.009.010

## Development of A RT-PCR Method for Determination of Mammalian Orthoreovirus 3

WANG Ji, WEI Li, HE Zheng-ming, YUE Bing-fei

(National Institutes for food and drug Control, National Center for quality of Laboratory Animal, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To develop a RT-PCR method for determination of Mammalian Orthoreovirus 3 (Reo3) in laboratory animal and the biological materials or the biological products for human use from the animal. **Methods** Two pair of primers specific to the sequences of M1 gene were designed according to the published Mammalian Orthoreovirus 3. With which the RNA of Reo3 was extracted and reversely transcribed to cDNA as a template for PCR amplification. The developed RT-PCR method was optimized, verified for specificity and sensitivity. **Results** The developed RT-PCR method is good in ensitivity, specificity and stability, and its minimum detection limit using the recombinant plasmid containing Reo3 gene as atemplate was 0.42pg/ $\mu$ L, and the lowest detection virus titer is  $10^{-9}$ /mL. **Conclusion** The developed RT-PCR method can be used in detecting the Mammalian Orthoreovirus 3 (Reo3) in laboratory animaland the biological materials or the biological products for human use from the animal.

**【Key words】** Mammalian Orthoreovirus 3; RT-PCR; Laboratory animal; Biological materials and the biological products for human use

呼肠孤病毒 3 型(Reo3)为呼肠孤病毒科的正呼肠孤病毒属的代表株。病毒粒子无囊膜,直径 70nm 左右。病毒基因组是分节段双股 RNA

(dsRNA), 全基因组分为 L(L1、L2、L3)、M(M1、M2、M3)、S(S1、S2、S3、S4)3 组共 10 个节段基因组成,共编码 11 种蛋白,其中 8 种结构蛋白,3 种非结

[基金项目]“国家科技支撑计划”疫苗类生物制品安全性评价技术研究(2008BAI54B01)。

[作者简介]王吉(1974-),女,副研究员,研究方向:微生物学和免疫学。

[通讯作者]贺争鸣(1957-),男,研究员,博士,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

构蛋白。此种病毒可感染所有哺乳动物,包括猪、牛、小鼠、地鼠、豚鼠、猫和犬等<sup>[1-4]</sup>。并且能在人、猴、豚鼠、地鼠、猫、狗、猪和牛的原代肾细胞以及 HeLa、KB、FL 和 L 细胞等传代细胞中增殖并引起细胞病变。Reo3 也能感染人,能引起儿童腹泻、呼吸道感染及脑膜炎等疾病<sup>[4-6]</sup>。由于上述动物和细胞存在 Reo3 的自然感染,不仅会给动物实验带来干扰,而且用上述动物源性材料或细胞生产的人用生物制品也可能存在 Reo3 的潜在污染,对人用动物源性材料及动物源性生物制品的使用安全造成潜在威胁<sup>[7]</sup>。

因此建立 Reo3 RT-PCR 检测方法,开展对实验动物和人用动物原材料及动物源性生物制品外源 Reo3 核酸的检测。不仅对保证实验动物的质量,而且对保证人用动物源性生物制品原材料及成品的使用安全性至关重要。本文旨在建立简单、快速、特异、敏感的 RT-PCR 检测方法,开展对实验动物和人用动物源性生物材料及其生物制品 Reo3 的检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒及样品

呼肠孤病毒 3 型(Reo3)、小鼠肺炎(PVM)病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒、小鼠仙台病毒(SV),中国食品药品检定研究院实验动物质量检测室保存。

### 1.2 主要试剂

RNA 快速提取试剂盒购自 xygen 公司;逆转录试剂盒购自 Fermentas; dNTP、Taq DNA 聚合酶和 100 bp DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;PCR 仪、核酸琼脂糖凝胶电泳仪、紫外图像分析系统等

### 1.3 引物设计及合成

分析已报道的 Reo3 基因组序列,将不同株 M1 基因进行比对,根据 GenBank 中登陆的 Reo3 毒株基因序列(序列号:M27261.1)选择保守区域作为靶基因,用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 组引物:1F: 5'-ACTGCTGGAATCGTTCGGAG -3', 1R: 5'-GATGAGATGAGGGGTGCGTA -3'; 2F: 5'-GCTGGCGTTGATTCGTT -3', 2R: 5'-GGGTCGGCTTCTCCTATT -3'。扩增片段大小分别为 354 bp 和 431 bp。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

### 1.4 病毒 RNA 提取

对正常 BSC-1 细胞、Reo3 感染 BSC-1 细胞毒、

小鼠肺炎(PVM)病毒、小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒、小鼠仙台病毒(SV),按照 RNA 快速提取试剂盒(xygen)操作方法进行 RNA 提取。提取后立即进行 cDNA 的合成,剩余的 RNA 冻存于 -70℃ 冰箱备用。

### 1.5 反转录

通过对随机引物及 AMV 逆转录酶浓度进行优化,确定反转录体系为:5 × RNA PCR Buffer 5 μL、dNTPs Mixture 4 μL、RNase Free dH<sub>2</sub>O 6 μL、随机引物 0.5 μL、RNase Inhibitor 1 μL、AMV 反转录酶 0.5 μL、病毒 RNA 8 μL,反应条件为:42℃ 孵育 15 min、95℃ 5 min,获得 cDNA,保存备用。

### 1.6 RT-PCR 检测方法的建立

以获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。对 2 组引物 PCR 反应体系的 dNTPs 浓度、10 × Buffer 浓度、Taq HS 酶浓度、引物、模板量、及反应体系的退火温度及循环次数等进行优化,通过对正常 BSC-1 细胞、Reo3 感染 BSC-1 细胞毒的进行 PCR 扩增来确定 RT-PCR 反应的最佳模式。

### 1.7 RT-PCR 产物的检测

取 5 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳鉴定。电泳缓冲液为 1 × TAE (0.04 mol/L Tris 乙酸, 0.001 mol/L EDTA, pH8.0),110 V 电泳 30 min,在紫外成像仪下观察 PCR 产物条带在凝胶中的位置,以 100 bp DNA ladder Marker 为参照物,判定结果。RT-PCR 阳性扩增片段进行测序,通过与 Genbank 中 Reo3 序列进行比对以确定 PCR 检测的准确性。

### 1.8 特异性的试验

2 组引物分别以呼肠孤病毒 3 型(Reo3)、小鼠肺炎(PVM)病毒、小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒、小鼠仙台病毒(SV)和正常 BSC-1 细胞的反转录产物为模板,用所建立的 PCR 方法进行扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定。

### 1.9 敏感性的试验

(1) Reo3 细胞毒浓度梯度检测:

取感染滴度为 10<sup>5.2</sup>/mL Reo3 病毒液,用 PBS 做系列倍比稀释,分设 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-10</sup> 10 个稀释度。取每个稀释度病毒液各 0.5 mL 制备模板,用所设计的 2 组引物分别进行 RT-PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,确定所能检测病毒最小滴度。

(2) Reo3 RNA 浓度梯度检测:

将起始浓度为 42.4 μg/mL 的 RNA 样本做倍比

稀释,分设  $10^{-1}$  到  $10^{-5}$  个浓度梯度进行 RT-PCR 扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,判断所能扩增的最小 RNA 模板浓度。

## 1.10 初步应用

### 1.10.1 对样品的检测

对 2011 年送检的 25 只 SPF 地鼠进行检测。取 25 只地鼠肾(编号:1~25 号),经过研磨处理后,和正常 BSC-1 细胞与 Reo3 细胞毒,同时提取 RNA,反转录,用引物 1 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定。

### 1.10.2 检测结果验证

扩增到的阳性样品进行测序。测序结果经 BLAST 分析,与 GenBank 中 Reo3 核酸序列进行比对,验证检测结果的准确性。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测方法的建立

通过对 2 组引物 PCR 反应条件及反应体系的优化,确定了 PCR 最佳反应体系为:  $10 \times \text{Ex}^{\text{Taq}}$  Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  Free)  $2.5 \mu\text{L}$ , dNTPs Mixture ( $10 \text{ mmol/L}$ )  $2.5 \mu\text{L}$ , Taq HS 酶 ( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , 上下游引物 ( $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ , cDNA  $2.5 \mu\text{L}$ , 补水至  $25 \mu\text{L}$ ; PCR 最佳反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $55^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 共 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  再延伸  $5 \text{ min}$ 。

### 2.2 RT-PCR 产物的检测

2 组引物对 Reo3 细胞毒分别扩增到长度约为 354 bp 和 431 bp 的特异性目的条带; BSC-1 细胞阴性对照均未扩增到特异性目的条带(结果见图 1)。

从图 1 可以看出,虽然 2 组引物均扩增到特异性目的条带,但引物 2 扩增效果不如引物 1。

### 2.3 检测结果的准确性

选择引物 1 与引物 2 的 PCR 扩增阳性片段分别进行测序,测序结果经 BLAST 分析,与 GenBank 中 Reo3 核酸序列同源性分别为 98% 和 99%,说明该方法检测准确性较好。

### 2.4 特异性验证

2 组引物在以 Reo3 为模板进行扩增有明显目的条带出现,小鼠肺炎(PVM)病毒、小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒、小鼠仙台病毒(SV)和正常 BSC-1 细胞均无目的条带(见图 2 和图 3)。

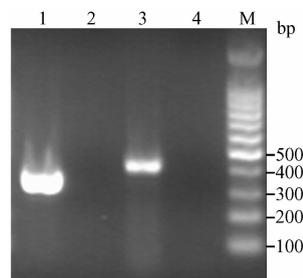


图 1 引物 1,2 PCR 反应条件优化结果  
Fig. 1 The results of primer 1,2 PCR reaction conditions optimization  
M:100bpDNA marker;1:Primer 1 Reo3 virus;  
2: Primer 1 BSC-1 cell control;3: Primer 2Reo3 virus;  
4:Primer 2 BSC-1 cell control  
M:100bp DNA marker;1:引物 1 Reo3 毒;  
2:引物 1 BSC-1 细胞对照;3:引物 2 Reo3 毒;  
4:引物 2 BSC-1 细胞对照

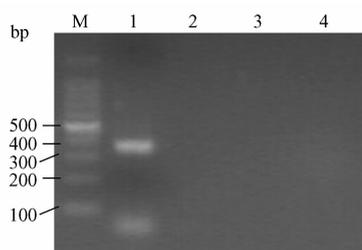


图 2 引物 1 特异性验证  
Fig. 2 Specific validation results of primer 1  
M:100bp DNA marker;1: Reo3 virus;  
2:BSC-1cell control;3: PVM;4: LCM;5:SV  
M:100bp DNA marker;1:Reo3;2:BSC-1  
细胞对照;3:PVM;4:LCM;5: SV

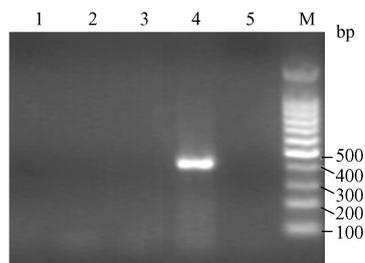


图 3 引物 2 特异性验证  
Fig. 3 Specific validation results of primer 2  
M:100bp DNA marker;1:PVM;2:LCM;  
3:SV;4:Reo3;5:BSC-1 细胞对照  
M:100bp DNA marker;1: PVM;2: LCM;3: SV;  
4: Reo3 virus;5: BSC-1cell control

图 2、图 3 说明 2 组引物 PCR 检测方法特异性均较好。

### 2.5 敏感性试验

(1) Reo3 细胞毒浓度梯度检测: 第 1 组引物在病毒液稀释至  $10^{-9}$ /mL 时, 仍可见目的条带出现(见图 4); 第二组引物仅能检测到病毒液原液浓度。

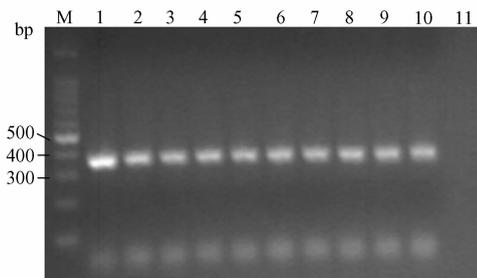


图 4 引物 1 RT-PCR 检测敏感性测定——Reo3 细胞毒浓度梯度

Fig. 4 The sceptibility testing results of RT-PCR using primers 1—Cytotoxic concentration gradient of Reo3

M: 100bp DNA marker; 1: 细胞毒原液; 2:  $10^{-1}$  稀释; 3:  $10^{-2}$  稀释; 4:  $10^{-3}$  稀释; 5:  $10^{-4}$  稀释; 6:  $10^{-5}$  稀释; 7:  $10^{-6}$  稀释; 8:  $10^{-7}$  稀释; 9:  $10^{-8}$  稀释; 10:  $10^{-9}$  稀释; 11:  $10^{-10}$  稀释  
M: 100bp DNA marker; 1: The stock solution of cytotoxic; 2:  $10^{-1}$  dilution; 3:  $10^{-2}$  dilution; 4:  $10^{-3}$  dilution; 5:  $10^{-4}$  dilution; 6:  $10^{-5}$  dilution; 7:  $10^{-6}$  dilution; 8:  $10^{-7}$  dilution; 9:  $10^{-8}$  dilution; 10:  $10^{-9}$  dilution; 11:  $10^{-10}$  dilution

由图 4 和图 5 可知第 1 组引物较第 2 组引物敏感性高。

(2) Reo3 RNA 浓度梯度检测: 第 1 组引物在 Reo3 RNA 模板稀释至  $10^{-5}$  时仍可见目的条带出现(见图 5), 即所能检测到的最小 RNA 模板浓度至少能达到  $0.42 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 第 2 组引物在 Reo3 RNA 模板原浓度时, 仅隐约可见目的条带出现。

由上述结果可看出, 所建立的 RT-PCR 方法, 在保证特异性的前提下, 灵敏度较高, 所能检出的



图 6 利用引物 1 检测 1~16 号地鼠肾电泳结果

Fig. 6 The electrophoretic results of detection in 1 to 16 ground mouse kidneys using primers 1  
M: 100bp DNA marker; 1: Reo3 毒种; 2: BSC-1 细胞对照; 3~18: 1~16 号地鼠肾 PCR 产物检测结果  
M: 100bp DNA marker; 1: Reo3 virus; 2: BSC-1 cell control; 3~18: 1 to 16 ground mouse kidneys

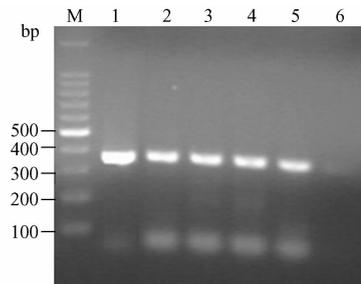


图 5 引物 1 RT-PCR 检测敏感性测定——Reo3 RNA 模板浓度梯度

Fig. 5 The sceptibility testing results of RT-PCR using primers 1—RNA template concentration gradient of Reo3

M: 100bp DNA marker; 1: RNA 原液; 2:  $10^{-1}$  稀释; 3:  $10^{-2}$  稀释; 4:  $10^{-3}$  稀释; 5:  $10^{-4}$  稀释; 6:  $10^{-5}$  稀释  
M: 100bp DNA marker; 1: The stock solution of RNA; 2:  $10^{-1}$  dilution; 3:  $10^{-2}$  dilution; 4:  $10^{-3}$  dilution; 5:  $10^{-4}$  dilution; 6:  $10^{-5}$  dilution

Reo3 最小病毒滴度可达  $10^{-9}$ /mL, 检出的最小 Reo3 RNA 浓度为  $0.42 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。综上比较可得, 第 1 组引物 PCR 方法的特异性、灵敏度较第 2 组引物强, 适合作为 Reo3 RT-PCR 检测方法。

### 2.6 初步应用

2.6.1 利用第 1 组引物对 25 只地鼠肾进行检测: Reo3 毒种扩增到长度约 354 bp 的特异性目的条带, 正常 BSC-1 细胞和 1~25 号地鼠肾均无目的条带出现(见图 6、图 7)。

### 3 讨论

Reo3 作为人畜共患传染病在禽类及有经济价值的大动物中, 在国内外检测的较多, 建立的检测方法也较多, 包括血清学及分子生物学方法<sup>[1,3,8,9]</sup>。但针对实验动物及人用动物源性材料和人用动物源性生物制品的检测, 目前我国还是空

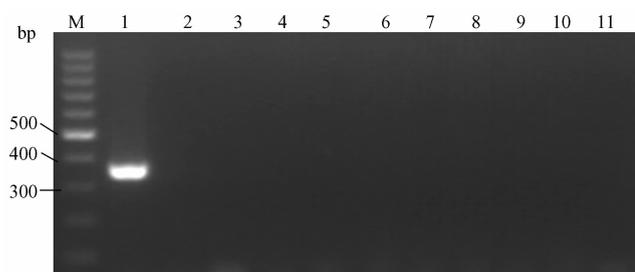


图 7 利用引物 1 检测 17~25 号地鼠肾电泳结果

Fig. 7 The electrophoretic results of detected in 17 to 25 ground mouse kidneys using primers 1

M:100bp DNA marker; 1:Reo3 毒种;  
2:BSC-1 细胞对照; 3~11:17~25 号地鼠肾扩增结果  
M:100bpDNA marker; 1: Reo3 virus; 2: BSC-1 cell  
control; 3~11: 17 to 25 ground mouse kidneys

白。本实验所建立的 Reo3 RT-PCR 检测方法,其目的主要是用于实验动物及人用动物源性材料和人用动物源性生物制品潜在 Reo3 的检测。尤其是一些人用生物制品生产用原材料来源于动物的组织、细胞等,如流行性乙型脑炎(JE)疫苗、麻疹疫苗等。

本实验所建立的 Reo3 RT-PCR 检测方法,特异性试验结果显示,2 组引物特异性均较好;通过敏感性实验比较,可以看出引物 1 较引物 2 敏感性强、稳定性好。引物 1 检测最小病毒滴度可达到 Reo3 细胞毒原液  $10^{-9}$ ,与本实验室建立的免疫荧光检测方法检测滴度 104.7/mL 相比,敏感性要高的多;检测 RNA 浓度可达 0.42 pg/ $\mu$ L;引物 2 病毒含量检测只能达到 Reo3 细胞毒原液浓度,检测 RNA 最小浓度为 42.4  $\mu$ g/mL。因此用引物 1 建立的 Reo3 RT-PCR 检测方法较用引物 2 建立的 Reo3 RT-PCR 检测方法更适合应用于实验动物及人用动物源性材料和人用动物源性生物制品的检测。

本实验之所以选择 25 只地鼠肾用于 Reo3 的检测,是因为目前我国乙脑疫苗生产用细胞来源是 SPF 原代地鼠肾细胞或传代地鼠肾细胞。而地鼠作为实验动物应用也很广泛。25 只地鼠肾 Reo3 病毒检测均为阴性,与本室 ELISA 方法 Reo3 抗体检测均为阴性结果相吻合,更保证了检测结果的准确性和地鼠使用的安全性。

本实验所建立的 RT-PCR 检测方法特异、敏感、可靠,稳定性好,检测的准确性高,可用于实验动物

及人用动物源性材料和人用动物源性生物制品 Reo3 及其核酸的携带或残留的检测。为保证实验动物的质量及人用动物源性材料和人用动物源性生物制品的使用安全性提供了可靠依据。

#### 参考文献:

- [1] 常继涛,李鑫,张亚科,等. 犍牛腹泻粪样中牛呼肠孤病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(9): 711-715.
- [2] 冷雪梅,胡建华,高诚,等. 呼肠孤病毒 3 型 S1 基因的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立. 中国兽医科学[J]. 2008, 38(07): 582-586.
- [3] 侯丽波,佟魏,谢芳芳,等. 小鼠呼肠孤病毒 III 型标准化血清制备及 ELISA 检测方法的建立. 中国比较医学杂志[J]. 2010, 20(8): 60-64.
- [4] 赵亚力,孙衍庆,周捷,等. 外源 3 型呼肠孤病毒污染原代地鼠肾细胞的光镜及电镜诊断[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(1): 33-35.
- [5] Michael R, Roner and Bradley G, Steele. Features of the mammalian orthoreovirus 3 DearingII single-stranded RNA that direct packaging and serotype restriction[J]. Journal of General Virology (2007), 88, 3401-3412.
- [6] Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, Etc. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis[J]. J Infect Dis. 2004 May 1; 189(9): 1664-1675.
- [7] 王军志,贺争鸣,岳乘飞,等. 2002. 10 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 325-334.
- [8] Wright MH, Cera LM, Sarich NA, Etc. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and nucleic acid sequence confirmation of reovirus infection in laboratory mice with discordant serologic indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay results [J]. Comp Med. 2004 Aug; 54(4): 410-417.
- [9] Su YP, Su BS, Shien JH, Etc. The sequence and phylogenetic analysis of avian reovirus genome segments M1, M2, and M3 encoding the minor core protein muA, the major outer capsid protein muB, and the nonstructural protein muNS[J]. J Virol Methods. 2006 May; 133(2): 146-57. Epub 2005 Dec 6.
- [10] Michael R, Roner G, Bradley G, Etc. Features of the Mammalian Orthoreovirus 3 Dearing II single-stranded RNA that direct packaging and serotype restriction[J]. Journal of General virology (2007), 2008; 3401-3412
- [11] Uchiyama A, Besselsen DG. Detection of Reovirus type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Lab Anim. 2003 Oct; 37(4): 352-359.

[修回日期] 2012-08-24