

仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立 及灰仓鼠中流行情况调查

李晓波, 付 瑞, 王 吉, 卫 礼, 邢 进, 冯育芳, 岳乘飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立仙台病毒(SV)RT-PCR 检测方法,并对灰仓鼠仙台病毒感染情况进行调查。方法 根据 NCBI 发表的 SV (gi:9627219) 基因组序列设计引物,建立 RT-PCR 方法,对方法的特异性和灵敏性进行验证,并用该方法检测 60 份灰仓鼠的肺脏样本。结果 建立的 SV RT-PCR 方法显示有较好的敏感性和特异性:以仙台病毒为模板扩增产生 197 bp 的单一目的条带,经测序比对与 NCBI 数据库中 SV 相关序列的一致率为 98%,而以猴副流感病毒(SV5)、犬瘟热病毒、小鼠肺炎病毒、呼肠孤病毒 III 型及腮腺炎病毒为对照无任何条带产生;能检出的 SV cDNA 最低浓度是 96.8 ng/mL;用该方法检测 60 份灰仓鼠,SV 的感染率为 3.33% (2/60)。结论 建立的 SV RT-PCR 方法可用于实验类啮齿动物 SV 的常规检测,自然条件下灰仓鼠感染 SV 的问题不容忽视。

【关键词】 仙台病毒;感染;检测;逆转录-聚合酶链反应;灰仓鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.005

Establishment of a RT-PCR Detection Method for Sendai Virus and Investigation of Its Infection status in *Cricetulus migratorius*

LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, WEI Li, XING Jin, FENG Yu-fang, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming
(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish a RT-PCR detection method for Sendai virus and to investigate the infection status in *Cricetulus migratorius*. **Methods** To design PCR primers according to the Sendai virus (gi:9627219) genome in NCBI and establish a RT-PCR detection method using the Sendai virus strain from our department. To screen the Sendai virus infection in sixty *Cricetulus migratorius* lung samples by the established RT-PCR procedure. **Results** The RT-PCR method established was more sensitive and specific: there was a 197 bp single band when SV was used as template and no any band occurred when SV5, CDV, PVM, Reo3 and MuV were used as templates. Sequencing results revealed that the 197 bp nucleotides showed 98% coincidence with the SV sequence published by NCBI. The assay could detect as low as 96.8 ng/mL SV cDNA. Results showed that the infection rate of Sendai virus was 3.33% (2/60) in *Cricetulus migratorius*. **Conclusions** The established RT-PCR detection technique is sensitive, specific and rapid, and can be used to detect Sendai virus routinely in laboratory rodent animals. The positive results of Sendai virus infection show that Sendai virus infection in *Cricetulus migratorius* can not be ignored.

[基金项目] 国家科技支撑计划“野生动物人工种群生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价”(2009BAI83B02)。

[作者简介] 李晓波(1980-),男,硕士,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: lxb8493059@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 贺争鸣,研究员,研究方向:实验动物微生物学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

【 Key words 】 Sendai virus; Infection; Detection; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; *Cricetulus migratorius*

仙台病毒属于副粘病毒科,副粘病毒属,核酸型为单股负链 RNA,基因组全长 15 384 bp^[1],编码 6 个结构蛋白(L,P,NP,HN,F,M)和一个非结构蛋白 C,其基因排序次序为:3'-Leader-NP-P + C-M- F-HN-L- Leader-5'^[2]。仙台病毒传染性强,容易扩散,是啮齿类实验动物最难控制的病毒之一。啮齿类实验动物感染 SeV 会对其免疫系统、致瘤作用及繁殖等产生影响,从而影响实验结果^[3],动物一旦感染很难清除,严重影响幼鼠生长发育并降低成年鼠的繁殖率^[4]。

现有的实验动物种属和品系已越来越不能满足科学快速发展的要求,迫切需要开发更多适应不同要求的新型实验动物,灰仓鼠(*Cricetulus migratorius*)就是在包虫病研究中筛选出来的一种鼠类。灰仓鼠属于啮齿目,仓鼠科,仓鼠亚科,仓鼠属。广泛分布于中亚地区,栖息生境从荒漠平原至海拔 3 000 m 以上的高山草甸均有分布。已查明该鼠在自然界参与土拉伦、森林脑炎、鼠疫等多种自然疫源性疾病的传播^[5,6],并且对仙台病毒易感。目前我国还没有关于灰仓鼠仙台病毒感染的报道,也没有可用于灰仓鼠 SV 的检测方法。我们针对仙台病毒 L 基因设计引物,建立了仙台病毒 RT-PCR 检测方法,并对 60 只采自我国新疆地区的灰仓鼠,进行 SV 感染的检测。

1 材料

1.1 试剂

AMV 逆转录酶、随机引物购自 Promega 公司; RNA 酶抑制剂购自庄盟公司; Taq Hs DNA 酶、dNTP、100 bp DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 病毒毒株及疫苗

仙台病毒、猴副流感病毒(SV5)、犬瘟热病毒、小鼠肺炎病毒、呼肠孤病毒 III 型均为本实验室保存。腮腺炎病毒减毒活疫苗来自本院病毒一室。SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.3 灰仓鼠

由新疆地方病防治研究所提供。普通级环境饲养,60 只,成年,体重在(40 ~ 50) g 之间,雌雄各半。

2 方法

2.1 病毒的培养

用 8 ~ 13 日龄的鸡胚,SeV 毒种接种绒毛尿囊腔,接种后第 4 天收获尿囊液,冻 -70℃ 备用。

2.2 RNA 的提取

取 0.5 mL 上述上清液按试剂盒的操作说明提取 RNA,最后用 40 μL 去 RNA 酶的无菌水溶解。

2.3 RT-PCR 方法建立

2.3.1 逆转录:25 μL 反应体系中含 5 × RT buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)4 μL,随机引物(500 μg/mL)1 μL, AMV(10 U/μL)0.5 μL, RNA 酶抑制剂(40 U/μL)0.5 μL,病毒 RNA 8 μL,反应条件:37℃ 90 min,72℃ 15 min,4℃ 5 min。

2.3.2 PCR 引物设计:参照 NCBI 发表的仙台病毒(gi:9627219)基因组序列设计引物,引物信息见表 1,由生工生物工程(上海)有限公司合成,使用时用灭菌超纯水稀释为 10 μM,PCR 产物长度为 197 bp。

表 1 SeV RT-PCR 引物
Tab. 1 Primers for the SeV RT-PCR

引物 Primers	序列(5'至 3') Sequences (5' - 3')	基因组中的位置 Position in genome	产物长度 Product length
SVLF	GCTTACGGGACAG ATGAGAT	12303 ~ 12322	197 bp
SVLR	ATTGTTATGAACCG ACTTGC	12480 ~ 12499	

2.3.3 PCR 扩增:反应体系包括,10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)2 μL,引物(10 μmol/L)各 1 μL, cDNA 2 μL, Taq Hs 酶(5 U/μL)0.5 μL, 灭菌 dH₂O 16 μL。反应条件:94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。

2.4 RT-PCR 方法的验证

2.4.1 敏感性:紫外分光法测定 SV cDNA 浓度,将 cDNA 10 倍系列稀释后进行 PCR 扩增,测定方法的最大检出限。

2.4.2 特异性:分别提取小鼠肺炎病毒、呼肠孤病毒 III 型、猴副流感病毒、腮腺炎病毒、犬瘟热病毒、正常鸡胚尿囊液及小鼠肺脏组织 RNA,用建立的 RT-PCR 法进行检测,测定方法的特异性。

2.5 灰仓鼠的检测

每一份样本按以下方法处理:取灰仓鼠肺脏约 100

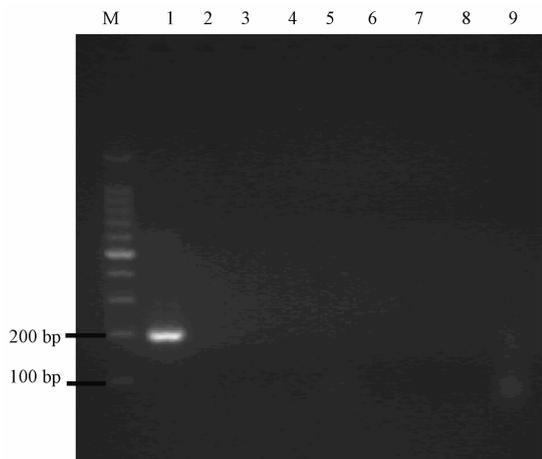


图 4 特异性试验结果

Lane M: DNA marker; 1: 仙台病毒; 2: 小鼠肺炎病毒; 3: 呼肠孤病毒 III 型; 4: 猴副流感病毒; 5: 腮腺炎病毒; 6: 犬瘟热病毒; 7: 正常鸡胚尿囊液; 8: 小鼠肺脏; 9: 阴性对照。

Fig. 4 Results of specificity test of the detection technique for Sendai virus.

Lane M: DNA marker; 1: Sendai virus; 2: PVM; 3: Reo3; 4: SV5; 5: Mumps virus; 6: CDV; 7: Normal allantoic fluid; 8: Lung of mouse; 9: Negative control.

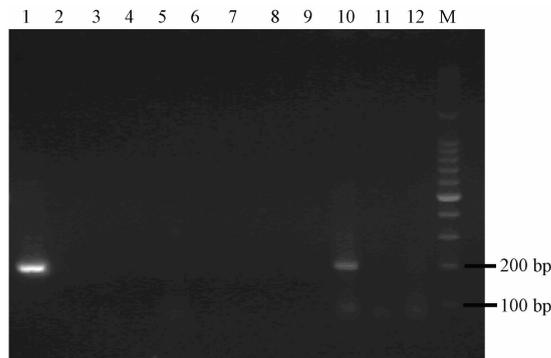


图 5 60 份灰仓鼠样本部分检测结果

1: 仙台阳性对照 2~11: 样本 12: 阴性对照 M: DNA marker

Fig. 5 Some results of RT-PCR assay for sixty *Cricetulus migratorius* samples.

Lane 1: SeV positive control; 2~11: Samples; 12: Negative control; M: DNA marker

98%, 证实为仙台病毒感染(图 6)。

4 讨论

本实验的灰仓鼠来自新疆地方病防治研究所, 廖立夫教授等早在上世纪 90 年代就开始从事野生

```
>|gb|DQ219803.1| Sendai virus strain BB1, complete genome
Length=15384

Score = 270 bits (146), Expect = 2e-69
Identities = 153/156 (98%), Gaps = 1/156 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 17 ATAGCCC-GACAAGAGCTAAATCTGAGCCTGGAAAATCTAAAACCTGCTGACTCCTGTTCA 75
Sbjct 12345 ATAGCCCAACAAGAGCTAAATCTGAGCCTGGAAAATCTAAAACCTGCTGACTCCTGTTCA 12404

Query 76 ACATCCACGAACTCTCTCATAGGTTAAAGGACACAGCAACCCAGATGAAGTTCTCTAGT 135
Sbjct 12405 ACATCCACGAACTCTCTCATAGGTTAAAGGACACAGCAACCCAGATGAAGTTCTCCAGT 12464

Query 136 GCAACACTGGTCCGTGCAAGTCGGTTCATAACAATA 171
Sbjct 12465 GCAACACTGGTCCGTGCAAGTCGGTTCATAACAATA 12500
```

图 6 灰仓鼠 SeV 阳性样本测序比对结果

Fig. 6 The BLAST results of RT-PCR products sequencing of SeV-positive samples of *Cricetulus migratorius*.

灰仓鼠的驯化繁殖工作, 现在已经成功繁育出具有一定规模的动物种群^[7], 虽然目前已有灰仓鼠用于各种实验研究的报道, 但作为一种实验动物, 其标准化程度还较低。

实验啮齿类动物是 SV 的自然宿主, 自然条件下 SV 能感染小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠。灰仓鼠作为新的实验动物品种, 迫切需要对其微生物携带情况进行调查, 灰仓鼠与实验常用的地鼠同属仓鼠科, 仓鼠属, 实验动物国标将 SV 列为 SPF 地鼠的必检项目^[8], 因此, 我们对灰仓鼠中携带 SeV 的情况进行了调查。

血清学调查显示仙台病毒在小鼠等啮齿类实验动物中感染率较高, 但国内外还没有灰仓鼠中 SV 感染率调查的相关报道。病毒的分离鉴定是仙台病毒诊断的金标准, 除鸡胚外, SV 也可在 BHK21 或 Vero 细胞上进行增殖^[3], 但病毒分离鉴定周期较长, 费时费力; 目前, 国内主要采用 ELISA 方法检测动物血清中的 SV 抗体, ELISA 虽然具有较高的敏感性, 但需要纯度很高的纯化检测抗原, 并不适用于检测乳鼠和免疫缺陷动物, 同时对抗体的检测不能反应当前病毒的感染情况。PCR 技术作为分子生物学检测的重要方法, 具有快速、敏感、简便等优

点,国内外已有 SV RT-PCR 检测方法的相关报道^[9-11]。与之相比,我们建立的 SV RT-PCR 检测方法具有更好的特异性和敏感性(结果未显示),适用于对动物当前的病毒感染情况进行调查。

虽然本次检出的灰仓鼠 SV 感染率较低,阳性动物也无明显临床症状,但是该病毒可通过直接接触和空气传播的方式扩散,给整个种群 SV 感染的控制带来很大困难,需要引起我们的重视。本实验建立的 SV RT-PCR 检测方法,也为今后制定灰仓鼠质量标准提供了一定的基础数据。

致谢:感谢新疆地方病防治研究所廖立夫教授等对本课题的大力支持!

参考文献:

- [1] Itoh M, Isegawa Y, Hotta H, et al. Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78:3207 - 3215.
- [2] 范文平. 仙台病毒的分子生物学研究进展 [J]. *中国实验动物学杂志*, 1999, 2:115 - 119.
- [3] 田克恭. 实验动物病毒性疾病 [M]. 北京: 农业出版社. 1991:57 - 64.
- [4] 吴惠英, 卫礼, 贺争鸣, 等. 不同方法检测鼠群 Sendai 抗体的研究 [J]. *北京实验动物科学*, 1989, 6(1):12 - 16.
- [5] 廖立夫. 灰仓鼠实验动物化研究 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12(3):183 - 185.
- [6] 王思博, 杨赣源. 新疆啮齿动物志 [M]. 乌鲁木齐: 新疆卫生出版社. 1982. 165.
- [7] 廖立夫, 黎唯. 灰仓鼠的室内繁殖研究 [J]. *中国实验动物学报*, 1998, 6(2):33 - 35.
- [8] 实验动物国家标准 [S]. GB/T14926.23 - 2001
- [9] Hayase Y, Tobita K, Kii M, et al. Detection of nucleoprotein gene of Sendai virus in the lungs of rats by touchdown nested reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. *Exp Anim*, 1997, 46(4):307 - 310.
- [10] Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials [J]. *Lab Animals*, 2003, 37(4):341 - 351.
- [11] 王宗耀, 谢建云, 邵伟娟, 等. 仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(1):49 - 53.

[修回日期]2012-10-25