



脑心肌炎病毒(EMCV) RT-PCR 检测方法的建立及初步应用

王吉, 付瑞, 卫礼, 李晓波, 冯育芳, 巩薇, 王淑菁, 岳秉飞, 贺争鸣

(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 建立脑心肌炎病毒(EMCV) RT-PCR 检测方法,应用于长爪沙鼠、小鼠等实验动物 EMCV 的检测。方法 根据已发表的 EMCV VP1 基因序列设计合成引物。建立 RT-PCR 方法,并对方法的特异性、敏感性、稳定性等进行验证。用该方法检测 62 只长爪沙鼠、12 只小鼠。结果 建立的 EMCV RT-PCR 检测方法特异、敏感、稳定。以 EMCV RNA 逆转录产物为模板,所能检测 RNA 最小模板浓度为 4.1 pg/ μ L,可检测病毒最小滴度为 10^{-7} mL⁻¹。经 RT-PCR 检测 62 只沙鼠均为阴性;12 只小鼠中有 1 只 EMCV 核酸阳性,测序结果与 GenBank 中 EMCV 标准株核苷酸序列进行比对,其同源性为 85%。结论 建立的脑心肌炎病毒(EMCV) RT-PCR 检测方法特异、敏感、稳定,可用于长爪沙鼠、小鼠等实验动物 EMCV 的检测。

【关键词】 脑心肌炎病毒;反转录聚合酶链式反应;长爪沙鼠;小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)07-0044-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.07.011

Development and preliminary application of RT-PCR method for determination of encephalomyocarditis virus

WANG Ji, FU Rui, WEI Li, LI Xiao-bo, FENG Yu-fang, GONG Wei, WANG Shu-jing, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming, (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 Encephalomyocarditis virus (EMCV) in Mongolian gerbils and Laboratory mice. **Methods** The primers were designed and synthesised according to the published EMCV specific sequences of VP1 gene. RT-PCR method is established, carries on the specificity, sensitivity, stability test. The method is used to detected 62 Mongolian gerbils and 12 mice. **Results** The developed RT-PCR method is good in specificity, ensitivity, stability; and its minimum detection limit using the recombinant plasmid containing EMCV gene as atemplate was 4.1pg/ μ L, and the lowest detection virus titer is 10^{-7} ml⁻¹. The 62 Mongolian gerbils after RT-PCR detection were negative; The 12 mice after RT-PCR detection, there were one EMCV positive, compared with the EMCV in Genebank, The homologies in nucleotide sequence of one positive mice is 85%; there were 5 mice can be detected EMCV in the body of the 6 mice by artificial infection EMCV. **Conclusion** The developed RT-PCR method is good in specificity, ensitivity, stability, can be used in detecting the EMCV in laboratory animal, such as Mongolian gerbils and mice.

【Key words】 Encephalomyocarditis virus; RT-PCR; Mongolian gerbil; Mouse

[基金项目]实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(国家科技支撑计划项目:2011BAI15B01)。

[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。

长爪沙鼠又称蒙古沙鼠(*Meriones unguiculatus*; mongolian gerbil), 分类学上属于啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属, 产于我国内蒙、河北、山西、甘肃等地, 是一种正在开发、有着广阔前景的多功能的实验动物。国内外大量研究资料表明, 长爪沙鼠由于其在多个方面独特的生物学特性, 已被广泛应用于医学、生物学、行为学等多个生物学领域^[1-4], 而且由于该动物的乳鼠对流行性出血热的易感性, 一直用作流行性出血热疫苗的研究及生产^[3,4]。

脑心肌炎病毒(*encephalomyocarditis virus*, EMCV) 在分类上属小 RNA 病毒科、心病毒属, 核酸型为单股 RNA。病毒粒子直径 30nm。由 4 种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成^[5]。其易感宿主广泛, 可感染多种哺乳类动物、鸟类、昆虫和人类。可导致动物和人类发生脑炎、心肌炎或心肌周围炎。哺乳动物中猪最易感, 感染率最高可达 90%, 啮齿类是 EMCV 的天然宿主, 病毒可在体内长期存在而不发病^[6-8]。Matsuzaki H 等^[9] 经试验证实沙鼠是 EMCV 易感啮齿类动物之一, EMCV 可在长爪沙鼠的脑、心、胰腺等器官复制。欧洲、美洲、亚洲等多个国家和地区有该病发生和流行的报道。国内多个省市有 EMCV 流行, 猪是本病主要传染源, 不同地区猪抗体阳性率在 39.4% ~ 90% 之间^[10]。鉴于 EMCV 是一个重要的人兽共患病致病因子, 因此有必要对长爪沙鼠、小鼠等实验动物开展 EMCV 检测。

本文旨在建立简单、快速、特异、敏感的 EMCV RT-PCR 检测方法, 开展对长爪沙鼠、小鼠等实验动物 EMCV 核酸的检测。

1 材料和方法

1.1 病毒及样品

脑心肌炎病毒(EMCV)、小鼠脑脊髓炎(TMEV) 病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM) 病毒, 中国食品药品检定研究院实验动物质量检测室保

存; 65 只开放饲养的长爪沙鼠, 3 ~ 15 月龄, 雌性 30 只, 雄性 35 只, 来源于首都医科大学实验动物科学部【SCXK(京) 2005—0006】; 12 只小鼠, 来自国内某单位送检的成年清洁级 KM 小鼠; 6 只用于 EMCV 感染的 SPF 小鼠, 6 周龄, 雌性, 体重 20 ~ 22g, 来源于中国食品药品检定研究院动物生产供应室【SCXK(京) 2009—0017】。以上动物均按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂及器材

RNA 快速提取试剂盒购自 xygen 公司(美国); 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(日本); 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 EMCV 基因组序列, 将不同株 VP1 基因进行比对, 根据 GenBank 中登陆的 EMCV 毒株基因序列(序列号: JQ864080) 选择保守区域作为靶基因, 用 Primer Premier 5.0 软件设计两组引物见表 1, 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 病毒 RNA 提取

对正常 Vero 细胞、EMCV 感染 Vero 细胞毒、小鼠脑脊髓炎(TMEV) 病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM) 病毒按照 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 dH₂O 5.5、随机引物 1 μL、RNase Inhibitor 1 μL、AMV 反转录酶 0.5 μL、病毒 RNA 8 μL, 反应条件为: 37℃ 90 min、42℃ 孵育 15 min、95℃ 5 min, 获得 cDNA, 保存备用。

表 1 用于扩增 VP1 基因的引物序列及位置

Tab. 1 Used for amplification VP1 gene primer sequence and position

编号 Code	序列 Sequence	位置/bp Location	长度/nt Length
引物 1 Primer 1	P-1F 5'-AGTGAATGCCTTTTCTAATA-3'	1208	518
	P-1R 5'-TGTTFGTCTGAGTCTGGTT-3'	1725	
引物 2 Primer 2	P-2F 5'-TACCTACCAGAGAATCAAAC-3'	2463	849
	P-2R 5'-GAACAACCTAACCTCCAGAC-3'	3311	

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 Vero 细胞、EMCV 感染 Vero 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB) 进行电泳鉴定。电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$ (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 EMCV 序列进行比对以确定 PCR 检测的准确性。

1.8 特异性的试验

用引物 1 分别以脑心肌炎病毒(EMCV)、小鼠脑脊髓炎(TMEV)病毒、小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒及正常 Vero 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

1.9.1 EMCV 浓度梯度检测

取感染滴度为 $10^{-7.5}/\text{mL}$ EMCV 病毒液,用 PBS 做系列倍比稀释,分设 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 10 个稀释度。取每个稀释度病毒液各 0.5 mL 制备模板,用引物 1 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。

1.9.2 EMCV RNA 浓度梯度检测:

将起始浓度为 0.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNA 样本做倍比稀释,分设 10^{-1} 到 10^{-10} 10 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 稳定性和重复性实验

取 EMCV cDNA 及同一批 PCR 检测试剂于 -30°C 冰箱放置 6 个月、12 个月时,进行 PCR 检测。两次试验各做 3 个重复。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.11 初步应用

1.11.1 对 6 只(编号分别为 E1 ~ E6) 经腹腔人工感染的小鼠脑、脾、心、肾、肺、肝、盲肠内容及 E5、E6 号的胸腺组织及正常 Vero 细胞与 EMCV 同时提取 RNA,反转录,用引物 1 进行 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定

1.11.2 将 62 只沙鼠(编号: 1 ~ 62) 脑组织、12 只小鼠(编号: 63 ~ 74) 脑、心、脾和胰腺及正常 Vero 细

胞与 EMCV 同时提取 RNA,反转录,用引物 1 进行 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定。

1.11.3 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 MHV 核酸序列进行比对,验证检测结果的准确性。

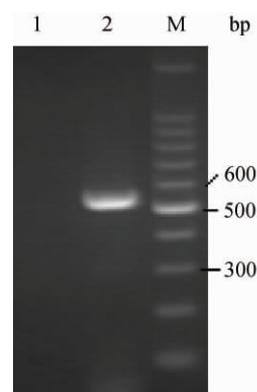
2 结果

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 (Mg^{2+} Free) 2 μL , dNTPs Mixture (10 mmol/L) 2 μL , Taq HS 酶(5 U/ μL) 0.5 μL , 上下游引物(10 pmol/ μL) 各 1 μL , cDNA 2 μL , 补水至 20 μL ; PCR 最佳反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 54°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72°C 再延伸 7 min。

2.2 RT-PCR 产物的检测

从图 1 可以看出,引物 1(P-1) 能扩增到约 518 bp 可见目的条带,而引物 2(P-2) 对 EMCV 和 Vero 细胞均未见目的条带(图略)。



注: M: 100 bp DNA marker; 1: Vero 细胞对照; 2: EMCV。

图 1 引物 1 PCR 反应条件优化结果

Note: M: 100 bp DNA marker; 1: Primer 1 Vero cell control; 2: EMCV.

Fig. 1 The results of primer 1 PCR reaction

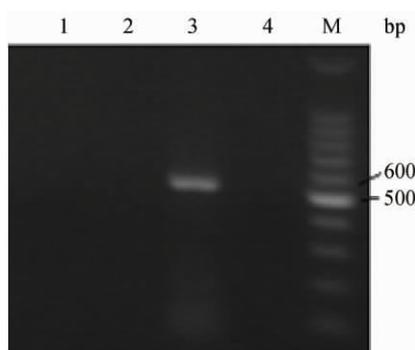
2.3 检测结果的准确性

选择引物 1 的 PCR 扩增阳性片段进行测序,测序结果经 BLAST 分析,与 GenBank 中 EMCV 核酸序列同源性为 96%,说明用引物 1 建立的 PCR 检测方法检测准确性较好。

2.4 特异性验证

利用引物 1 进行特异性试验,在以 EMCV 为模

板进行扩增有明显目的条带出现,小鼠脑脊髓炎(TMEV)病毒、小鼠淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)病毒及正常 Vero 细胞均无目的条带出现(见图 2)。



注: M: 100bp DNA marker; 1: TMEV; 2: LCMV; 3: EMCV; 4: Vero 细胞对照。

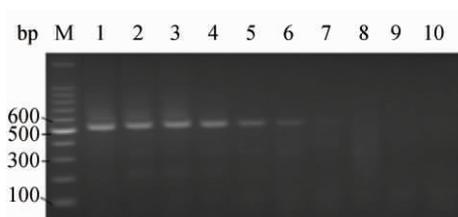
图 2 引物 1 特异性验证电泳结果

Note: M: 100bpDNA marker; 1: TMEV; 2: LCMV; 3: EMCV; 4: Vero cell control.

Fig. 2 Specific validation results of primer 1 conditions optimization

2.5 敏感性试验

2.5.1 用引物 1 进行细胞毒浓度梯度检测: 在病毒液稀释至 $10^{-7} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,仍可见目的条带出现(见图 3)。



注: M: 100bpDNA marker; 1 ~ 10: 10^{-1} 稀释 ~ 10^{-10} 稀释。

图 3 引物 1RT-PCR 检测敏感性测定-EMCV 细胞毒浓度梯度

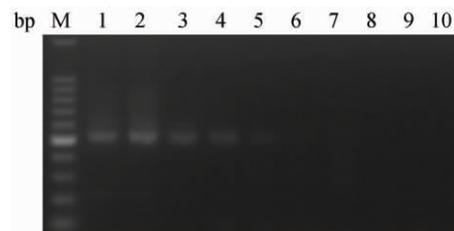
Note: M: 100 bp DNA marker; 1 ~ 10: 10^{-1} dilution ~ 10^{-10} dilution.

Fig. 3 The sceptibility testing results of RT-PCR using primers 1-Cytotoxic concentration gradient of EMCV

2.5.2 EMCV RNA 浓度梯度检测: 引物 1 在 EMCV RNA 模板稀释至 10^{-5} 时仍可见目的条带出现(见图 4) 即所能检测到的最小 RNA 模板浓度至少能达到 $4.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

2.6 稳定性和重复性实验

电泳结果显示 EMCV cDNA -30℃ 冰箱放置 6 个月、12 个月时,用引物 2 进行检测,仍能扩增出约 518 bp 可见目的条带(见图 5)。

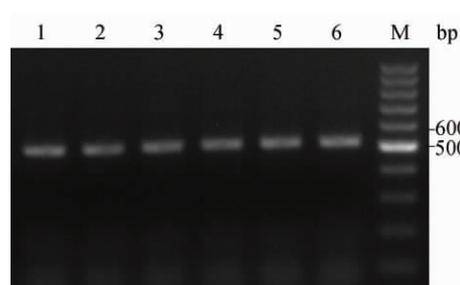


注: M: 100 bp DNA marker; 1 ~ 10: 10^{-1} 稀释 ~ 10^{-10} 稀释。

图 4 引物 1RT-PCR 检测敏感性测定-EMCV RNA 模板浓度梯度

Note: M: 100 bp DNA marker 1 ~ 10: 10^{-1} dilution ~ 10^{-10} dilution.

Fig. 4 The sceptibility testing results of RT-PCR using primers 1-RNA template concentration gradient of EMCV



注: M: 100bpDNA marker; 1 ~ 3: -30℃ 冰箱放置 6 个月的 cDNA; 4 ~ 6: -30℃ 冰箱放置 12 个月的 cDNA。

图 5 引物 1 PCR 法重复性和稳定性试验结果

Note: M: 100bpDNA marker; 1 ~ 3: The cDNA save -30℃ refrigerator 6 months; 4 ~ 6: The cDNA save -30℃ refrigerator 12 months.

Fig. 5 The repeatability and stability testing results of PCR using primers 1

2.7 初步应用

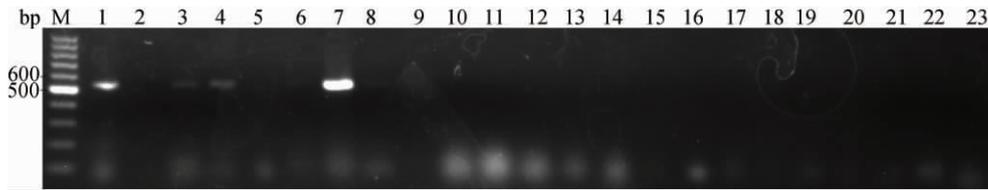
2.7.1 利用引物 1 检测 6 只人工感染 EMCV 的小鼠脑、脾、心、肾、肺、肝、盲肠内容物及 E5、E6 胸腺组织: 电泳结果显示 E1、E2、E4、E5、E6 号小鼠脑及 E6 号盲肠内容物扩增到大小约 518bp 目的条带(见图 6、图 7)。

2.7.2 利用引物 1 检测 62 只沙鼠脑组织: 62 只沙鼠脑组织检测结果均为阴性, 1 ~ 20 号沙鼠脑组织检测电泳结果见图 8(21 ~ 62 号沙鼠脑组织检测结果电泳图略)。

2.7.3 利用引物 1 检测 12 只小鼠脑、心、脾和胰腺组织: 只有 66 号小鼠心脏组织扩增到大小约 518bp 目的条带(见图 9) 其他组织检测结果均为阴性(63 ~ 74 号小鼠脑、脾、胰腺组织, 63 ~ 65、67 ~ 74 号小鼠心脏组织电泳图略)。

2.7.4 检测结果的验证

将 EMCV 感染的 E1、E2、E4、E5、E6 号小鼠脑



注: M: 100bp DNA marker; 1: EMCV; 2: Vero Vero 细胞对照; 3~8: E1~E6 号脑; 9~14: E1~E6 号脾; 15~20: E1~E6 号心脏; 21~23: E1~E3 号肾。

图 6 引物 1 PCR 法检测 E1~E6 号小鼠脑、脾、心脏组织及 E1~E3 号肾脏组织样品

Note: M: 100bpDNA marker; 1: EMCV; 2: Vero cell; 3~8: E1~E6 mice brain; 9~14: E1~E6 mice spleen; 15~20: E1~E6 mice kidney; 21~23: E1~E3 mice kidney.

Fig. 6 The electrophoresis results of primers 1 PCR detect E1~E6 mice brain, spleen, heart tissue or E1~E3 mice kidney tissues

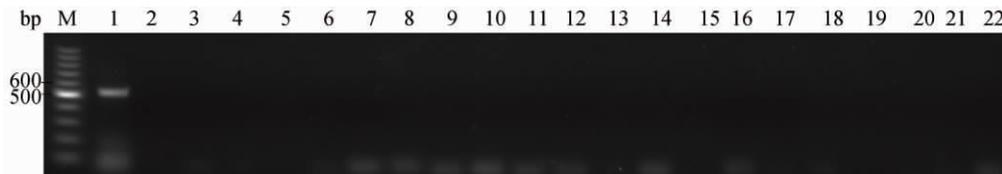


注: M: 100bp DNA marker; 1~3: E1~E3 号小鼠肾; 4~9: E1~E6 小鼠肺; 10~15: E1~E6 号小鼠肝; 16~21: E1~E6 号小鼠盲肠; 22~23: E5~E6 号小鼠胸腺。

图 7 引物 1 PCR 法检测 E1~E3 号小鼠肾脏、E1~E6 号小鼠肺、肝、盲肠及 E5~E6 号小鼠胸腺组织样品

Note: M: 100bpDNA marker; 1~3: E1~E3 mice kidney; 4~9: E1~E6 mice lung; 10~15: E1~E6 mice liver; 16~21: E1~E6 mice cecum; 22~23 mice thymus.

Fig. 7 The electrophoresis results of primers 1 PCR detect E1~E3 mice kidney, E1~E6 mice lung, liver, cecum or E5~E6 mice thymus tissues

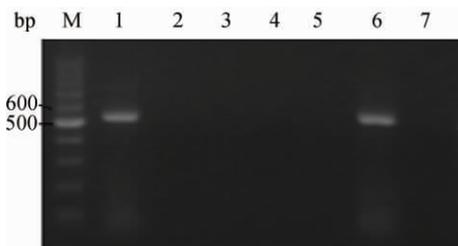


注: M: 100bpDNA marker; 1: EMCV; 2: Vero 细胞对照; 3~22: 1~20 号沙鼠脑组织。

图 8 引物 1 RT-PCR 法检测 1~20 号沙鼠

Note: M: 100bpDNA marker; 1: EMCV; 2: Vero cell control; 3~22: 1~20 gerbil brain tissue.

Fig. 8 The electrophoresis results of primers 1 PCR detect 1~20 gerbil brain tissue



注: M: 100 bp DNA marker; 1: EMCV; 2: Vero Vero 细胞对照; 3~7: 63~67 号小鼠心脏组织样品。

图 9 引物 1 PCR 法检测 63~67 号小鼠心脏组织样品

Note: M: 100 bp DNA marker; 1: EMCV; 2: Vero cell 3~7: 63~67 mice heart tissue.

Fig. 9 The electrophoresis results of primers 1 PCR detect 63~67 mice heart tissue

及 E6 号盲肠内容扩增产物测序,与 GenBank 中 EMCV 标准株核苷酸序列进行比对,其同源性均为 96%。将检测结果为 EMCV 阳性的 66 号小鼠心脏组织扩增产物测序,与 GenBank 中 EMCV 标准株核苷酸序列进行比对,其同源性为 85%。

3 讨论

EMCV 作为人畜共患传染病在猪及其他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^[11]。但针对实验动物的检测,目前在我国还是空白。实验动物国家标准中也没有关于 EMCV 检测的规定,

本实验针对抗原性最强的 VP1 蛋白,选择保守片段,设计引物(引物 1)。建立的 EMCV RT-PCR 检测方法,其目的主要是用于长爪沙鼠、小鼠等实验动物的检测。

本试验检测 62 只沙鼠脑组织,结果均为阴性,可能与与取样(脑组织易自溶)、组织冻融等操作使 RNA 降解,导致检测阴性率上升有关。此次对 62 只长爪沙鼠 EMCV 的检测只是一个初步筛查结果,如果要确切了解我国长爪沙鼠对 EMCV 的感染情况,可能需要扩大检测样本量,并有必要用其他分子生物学检测方法或结合血清学检测方法来进行验证。

本实验通过特异性、敏感性、重复性、稳定性及初步应用实验结果,说明利用引物 1 建立的 RT-PCR 方法特异、敏感、可靠、稳定性、重复性好等特点。检测人工经腹腔途径感染的 6 只小鼠,有 5 只在脑组织、1 只在盲肠内容物中检测到 EMCV。6 只小鼠接种 EMCV 72h 后,E1 号小鼠出现死亡,剖检脑部有淤血;E2~E6 号小鼠出现被毛逆立,走路后肢迟缓,精神沉郁,剖检可见脑部淤血,其他组织无明显病变。本试验对 12 只送检小鼠脑、心、脾和胰腺组织进行检测时,67 号小鼠心脏组织检测出 EMCV 基因。以上结果均说明 EMCV 确实能感染小鼠^[7]。且经过本试验证实 EMCV 主要感染小鼠脑和心脏组织,盲肠内容物中也可检出 EMCV。同时也说明本试验建立的 RT-PCR 方法能用于沙鼠、小鼠等实验动物感染 EMCV 的检测。并为实验室开展 EMCV 核酸的检测及试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 冯育芳,邢进,王吉,等.普通环境长爪沙鼠肠道菌群的分离鉴定[J].实验动物科学,2012,29(3):27-30.
- [2] 刘先菊,扬帆,林树柱,等.长爪沙鼠 IgG 的纯化及抗血清的制备[J].中国比较医学杂志,2007,17(11):641-643.
- [3] 刘月环,吴旧生,施张奎.鼠肝炎病毒在长爪沙鼠消化系统的分布及其组织病理学改变[J].中国比较医学杂志,2007,17(4):197-200.
- [4] 聂金荣,聂朝晖.Z:ZCLA 长爪沙鼠培育及其生物学特性研究[J].医学研究通讯,2004,33(6):27-28.
- [5] 殷震,刘景华.动物病毒学(第 2 版)[M].北京:科学出版社,1997:514-516.
- [6] 田克恭.实验动物病毒性疾病[M].北京:中国农业出版社,1992,104-108.
- [7] Young-Sun Lee,¹ Na Li, Seungjin Shin, et al. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Encephalomyocarditis Virus-Induced Diabetes in Mice [J]. J Virol. 2009 August; 83(16): 8004-8011.
- [8] 刘勇,王海燕,张甲,等.小鼠 IFN- γ 基因的克隆及其分子佐剂作用的研究[J].实验动物与比较医学,2008,28(5):367-371.
- [9] Matsuzaki H, Doi K, Doi C, et al. Susceptibility of four species of small rodents to encephalomyocarditis (EMC) virus infection [J]. Jikken Dobutsu. 1989 Oct; 38(4): 357-61.
- [10] 刘亚兰,陈春花,许玉静,等.河北省猪场脑心肌炎病毒感染的血清学调查[J].中国人兽共患病学报,2010,26(3):252-254.
- [11] 冯若飞,韦鹏建,李向茸,等.猪脑心肌炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J].《黑龙江畜牧兽医》科技报,2011 年 8 月(上):122-123.

(修回日期)2013-03-28

(上接第 40 页)

- of interleukin-2 in mammals and positive in ruminants. Journal of Molecular Evolution, 2000, 51(3): 234-244.
- [10] Taniguchi T. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. Nature, 1983, 46: 302-305.
 - [11] 黄晓燕,李明利,徐娟,等.树鼩 IL-2 全长编码序列克隆及分子特征分析[J].动物学研究,2013,34(2):121-126.
 - [12] Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, et al. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. Infection, 2000, 28(5): 309-313.
 - [13] Fukuda R, Ishimura N, Ishara S, et al. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNA and interferon efficacy in chronic hepatitis C. Liver, 1996, 16: 390-399.
 - [14] Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. Hepatology,

1996, 24(4): 759-765.

- [15] 高万芹,手足口病患儿血清 IL-2、TNF- α 和外周血 B 细胞及 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2010,23(4):390-391.
- [16] 庞国象,陈玉华,武革,等.1 型糖尿病外周血 Th1/Th2 细胞因子表达水平的研究[J].中国医药指南,2008,6(16):11-14.
- [17] Garba M L, Flelinger J A. Intracellular cytokine staining for TGF- β [J]. Immunol Methods 2001, 258(1/2):193-198.
- [18] Payan R R, Medina M A, Parra S E, et al. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR green I [J]. Scand J Immunol 2003, 57(5):439-445.

(修回日期)2013-06-01