



小鼠诺如病毒间接免疫荧光检测方法的建立

田胜男, 佟巍, 张丽芳, 常慧, 李雨函, 苏静芬, 刘先菊, 向志光, 刘云波

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立小鼠诺如病毒(MNV)的间接免疫荧光试验(IFA)的检测方法。方法 将 MNV-1 接种 RAW264.7 细胞, 培养 36 h 收集病毒培养物及未感染细胞培养物, 点制抗原玻片; 以 10^7 TCID₅₀ 的 MNV-1 灌胃接种 BALB/c 小鼠, 收集感染血清做阳性对照血清。收集人工感染后不同时间点的血清样品, 以 1:10 的稀释度使用 IFA 法测定感染血清 MNV 抗体滴度。选取 80 份送检小鼠血清样品, 以 IFA 和 ELISA 方法测定, 差异样品使用 Western blot 方法进行验证。结果 MNV-1 感染 RAW264.7 细胞(36~48)h, 细胞感染率为 60%, 以 36 h 感染细胞状态为佳; IFA 法测定感染小鼠血清, 小鼠感染 1 周后抗体水平逐渐提高, 在 4 周时抗体滴度达到最高值, 之后维持稳定, 采集感染 4 周的动物血清做 IFA 方法的阳性质控品; 80 份血清中, IFA 法测定阳性 27 份, 阴性 53 份, ELISA 法测定阳性 32 份, 阴性 48 份; Western blot 方法对差异样品验证, 其中阳性 3 份, 阴性 2 份, IFA 法和 ELISA 法检测符合率分别为 96.0% 和 97.5%。结论 IFA 方法检测小鼠诺如病毒基本可以反应小鼠的感染情况, 偶有假阴性的出现, 可以选择 IFA 方法和 ELISA 方法作为初筛, 差异样品用 Western blot 方法验证。

【关键词】 间接免疫荧光法; 小鼠诺如病毒

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0058-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.013

Establishment of an indirect immunofluorescence assay for detection of murine norovirus

TIAN Sheng-nan, TONG Wei, ZHANG Li-fang, CHANG Hui, LI Yu-han, SU Jing-fen, LIU Xian-ju,
XIANG Zhi-guang, LIU Yun-bo

(Monitoring Center of Laboratory Animals, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish an indirect immunofluorescence assay for detection of murine norovirus (MNV). **Methods** Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line RAW264.7 cells were infected with MNV-1 and cultured for 36 hours to collect the virus and uninfected cells, and to make antigen glass slides. BALB/c mice were gavaged with MNV-1 (10^7 TCID₅₀) and infected sera were collected as positive control. The serum was 1:10 diluted and used for measuring MNV antibody by immunofluorescence assay (IFA). 80 serum samples were tested using the two methods, IFA and ELISA, and the discrepant samples were validated by Western blotting. **Results** RAW264.7 cells were infected with MNV-1 for 36-48 h, showing an infection rate of 60% of the cells, and the cells infected for 36 h were

【基金项目】 国家科技支撑计划“实验动物质量保证条件和认可评价关键技术研究示范”(2011BAI15B03); 国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”(2013BAK11B01-15)。

【作者简介】 田胜男(1989-)女, 硕士生, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: tianshn@163.com。

【通讯作者】 刘云波, 男, 研究员, E-mail: yunbolu@126.com。

preferred. IFA method was used to detect the serum with MNV-1 infection and showed that the antibody content was gradually increased at one week after infection, reaching a maximum antibody concentration at 4 weeks after infection, and maintained a stable level later. The mouse serum at four weeks after MNV-1 infection was used as positive quality control. Among the 80 serum samples, 27 positive and 53 negative cases were detected by IFA method, and 32 positive and 48 negative cases were detected by ELISA. The five discrepant samples were verified by Western blotting, resulted in 3 positive and 2 negative cases. The coincidence rate of IFA was 96.0% and that of ELISA methods was 97.5%.

Conclusions Basically, immunofluorescence assay can be used to detect the MNV-1 infection in mice, although false negative result may occur occasionally. IFA and ELISA detection can be selected as initial screening measures, and use Western blot assay to verify the discrepant samples.

【Key words】 Indirect immunofluorescence detection; Murine Norovirus.

诺如病毒(Norovirus, NoV)属杯状病毒,是全球流行性与散发性急性胃肠炎的主要病因之一,每年至少导致 100 万例病患就诊和 20 万例 5 岁以下儿童死亡,造成巨大的经济损失^[1]。由于缺少合适的体外培养模式和小动物模型,使该病毒的研究受到了很大限制。小鼠诺如病毒的发现及其能够在体外细胞中培养的特性,使它成为了良好的 NoV 研究模型^[2]。小鼠诺如病毒在实验小鼠中的感染率非常高,我国已有多个实验动物设施检出小鼠感染该病毒的情况。

间接免疫荧光法基于抗原-抗体反应,以全病毒作为抗原识别血清中存在的病毒抗体,因而具有高特异性^[3],该方法在实验小鼠病毒检测中应用非常广泛,多种病毒都能够通过这种方法进行快速检测。本实验旨在建立小鼠诺如病毒间接免疫荧光检测方法,实现 MNV 高效快速检测。

1 材料和方法

1.1 材料

RAW264.7 细胞和 MNV-1 (CW1) 购自 ATCC, Manassas, VA; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 购自 Thermo Scientific, Hyclone; 四周龄 Balb/c 小鼠 (SPF 级) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 感染动物实验得到中国实验动物学会实验动物使用和管理委员会许可 (ILAS-PC-2013-005); 小鼠诺如病毒 ELISA 检测试剂盒 (SMART-M35) 购自 Biotech Trading Partners 公司。荧光显微镜: Nikon, Ni-U; 醋酸纤维素膜: Millipore, Bedford, USA; 多通道杂交仪: AE-6195, ATTO, Tokyo, Japan; 山羊抗小鼠 IgG: Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA (1:10000 用); 化学发光试剂 (ECL): Millipore, Bedford, USA; X-ray 胶片: Kodak, Rochester, USA。

1.2 MNV-1 的富集

取 0.2 mL MNV-1, 加入生长密度为 80% 左右的单层 RAW264.7 细胞, 37℃ 吸附 1 h, 加 6 mL DMEM (含 0.5% 双抗), 37℃, 5% CO₂ 继续培养。观察细胞生长情况。分别取不同培养时间点的细胞反复冻融 3 次, 2 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液。

1.3 TCID₅₀ 法测定病毒效价

在离心管或 12 孔细胞培养板中将病毒液作连续 10 倍的稀释, 稀释度从 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰。将稀释好的病毒悬液接种到铺满单层细胞的 96 孔微量培养板中 (细胞密度约为 2 ~ 3 × 10⁵ 个/mL), 每一稀释度接种一纵排共 8 孔, 每孔接种 100 μL。设正常细胞对照, 正常细胞对照作两纵排 (100 μL 生长液)。逐日观察并记录结果, 连续观察 7 d。按 Reed-Muench 两氏法计算结果。

1.4 血清样品的收集

取四周龄 BALB/c 小鼠 (SPF 级) 进行眼眶采血, 收集血清作为阴性对照。其他小鼠通过灌胃的方式感染 MNV-1 (10⁷ TCID₅₀), 200 μL/只^[4]。取感染后 7 周内不同时间点的小鼠血清进行检测。

1.5 免疫荧光分析抗体检测

1.5.1 抗原片的制备: 选择效价为 10⁷ TCID₅₀ 的病毒接种于 RAW264.7 细胞, 收集感染后不同时间细胞, 滴加至玻片上, 作为抗原孔。未感染的 RAW264.7 细胞作为对照孔。室温晾干, 将玻片浸入 4℃ 预冷的丙酮中固定 15 min, 固定后通风使丙酮挥发。抗原玻片 -30℃ 保存。

1.5.2 检测步骤: 所有的血清样品于 56℃, 灭活 30 min, 待检血清用磷酸缓冲液 (pH 7.2) 1:10 稀释样品。每个样品滴加 2 个孔 (一个抗原孔, 一个对照孔)。样品滴加完毕后将玻片放入湿盒内 37℃ 孵育 30 min。取出玻片, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。

抗原玻片风干后,逐孔滴加荧光结合物,放入湿盒内 37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗 1 次,蒸馏水冲洗 1 次。50% 甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.6 ELISA 试剂盒对小鼠血清的检测

对收集的所有血清进行 ELISA 检测(过程参照说明书),选择强阳性血清作为阳性对照。

1.7 Western blot 法对差异样品的验证

对两种方法检测的结果不一致的血清,用 Western blot 的方法进行验证。按 1.2 方法对 MNV-1 进行富集后,30 000 r/min,3 h 超速离心,PBS 重悬沉淀,NanoDrop 2 000 测定蛋白浓度;制备 SDS-PAGE 凝胶,每孔上样 5 μ L,恒流 100 V 电泳 2 h,电泳结束后立即转膜,恒流 300 A,1 h 将蛋白转移至醋酸纤维素膜(NC)上,3% 脱脂奶粉封闭 1 h,将差异血清 1:100 稀释后孵育 NC 杂交膜,4℃ 过夜,PBST(PBS 含 0.05% 吐温)洗膜 3 次,每次 10 min,山羊抗小鼠 IgG 1:10 000 稀释后 37℃ 孵育 NC 杂交膜 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,暗室显影。

2 结果

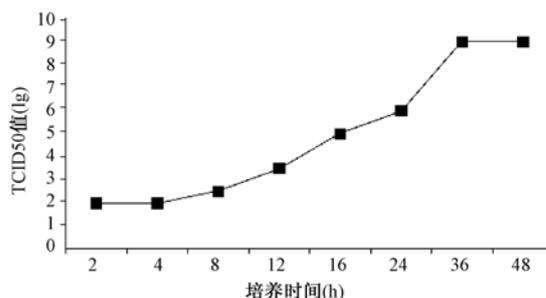
2.1 不同培养时间收集病毒的滴度

对感染 MNV-1 后不同时间点的 RAW264.7 细胞进行病毒收集并测定其效价,结果显示在培养前期病毒感染细胞以及初始复制较慢需要 6~8 h 左右,病毒滴度仅为 10^2 TCID₅₀,随后的 24~28 h 病毒滴度呈对数增长趋势,随着时间的增加,病毒效价明显增强,培养时间增至 36 h 时病毒效价达到峰值,随后的几小时内病毒滴度无上升趋势,此时感染细胞基本呈破碎或半破碎状态(图 1)。

使用 24 孔细胞培养板,以 2 h 为间隔,收集病毒感染后 2 h、8 h、12 h、16 h、20 h、22 h、24 h、36 h、48 h 共 9 个时间点的感染细胞爬片,分别检测 MNV 阳性血清并比较结果。全视野观察 36 h 阳性细胞数可至 50%,视野中细胞形态清晰,荧光强度高,便于观察。选择感染病毒 36 h 的细胞用于 IFA 检测。

2.2 IFA 方法对血清样品的检测

IFA 结果显示小鼠感染 MNV-1 7 d 内血清样品均为阴性,全视野下无荧光可见;感染后两周时有阳性血清检出,视野下偶见微弱荧光,多存在于胞浆处,呈颗粒状;3 周后全部血清样品均为阳性(表 1)。图 2 为 MNV 免疫荧光法检测血清样品荧光显微镜下效果图,其中图 2(a)为典型阳性图像,图 2(b)为典型阴性图像(图 2 见封底)。



注:RAW264.7 细胞感染 MNV-1 后不同时间点收集病毒并测定其效价,结果显示在培养 8 h 后为 10^2 pfu,随着时间的增加,病毒效价也逐渐增强,培养时间增至 36 h 时病毒效价达到峰值。

图 1 MNV-1 体外培养生长曲线

Note: Viruses were collected from RAW264.7 cells infected with MNV-1 at different time points and determined titers. The results show that titer was 10^2 pfu at 8 h after culture. Virus titers increased gradually with the increasing time. Viral titer reached a peak at 36 h of incubation.

Fig. 1 The growth curve of MNV-1 culture in vitro

表 1 IFA 法对小鼠感染 MNV-1 后不同时间血清检测结果

Tab. 1 The results of immunofluorescence assay of the mouse serum at different time points after MNV-1 infection

感染时间 Infection time	动物编号 Serial number				
	1	2	3	4	5
0 h	-	-	-	-	-
2 h	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-
8 h	-	-	-	-	-
16 h	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-
2 d	-	-	-	-	-
3 d	-	-	-	-	-
5 d	-	-	-	-	-
7 d	-	-	-	-	-
2 周	-	-	+	+	-
3 周	+	+	+	+	+
4 周	+	+	+	+	+
5 周	+	+	+	+	+
6 周	+	+	+	+	+
7 周	+	+	+	+	+

注:IFA 结果显示小鼠感染 MNV-1 7 d 内血清样品均为阴性(用“-”表示);感染后两周时有阳性(用“+”表示)血清检出,3 周后全部血清样品均为阳性。

Note: IFA shows that all serum samples of mice infected with MNV-1 7 d after infection were negative (indicated with “-”), positive sera were detected at two weeks after infection, and all serum samples were positive (indicated with “+”).

At three weeks after infection.

表 2 ELISA 法对小鼠感染 MNV-1 后不同时间点血清检测结果

Tab. 2 The results of enzyme-linked immunosorbent assay of infected mouse serum at different time points after MNV-1 infection

感染时间 Infection time	ELISA 结果(A 值) ELISA results(A value)					均值 Mean	标准差 Standard deviation
	1	2	3	4	5		
0 h	0.042	0.058	0.029	0.046	0.062	0.0474	0.0117
2 h	0.074	0.068	0.068	0.076	0.081	0.0734	0.0049
4 h	0.073	0.071	0.062	0.084	0.087	0.0754	0.009
8 h	0.082	0.097	0.08	0.077	0.081	0.0834	0.007
16 h	0.076	0.095	0.085	0.08	0.079	0.083	0.0066
24 h	0.077	0.104	0.089	0.084	0.086	0.088	0.0089
2 d	0.112	0.152	0.136	0.126	0.099	0.125	0.0184
3 d	0.205	0.27	0.246	0.26	0.191	0.2344	0.031
5 d	0.257	0.264	0.314	0.323	0.217	0.275	0.039
7 d	0.457	0.293	0.446	0.463	0.314	0.3946	0.0748
2 wk	0.412	0.344	0.555	0.515	0.306	0.4264	0.0957
3 wk	0.75	0.501	0.464	0.513	0.541	0.5538	0.1011
4 wk	0.694	0.473	0.452	0.511	0.503	0.5266	0.0863
5 wk	0.658	0.433	0.429	0.468	0.422	0.482	0.0894
6 wk	0.647	0.415	0.434	0.462	0.427	0.477	0.0863
7 wk	0.65	0.423	0.419	0.486	0.438	0.4832	0.0867

注:(a) 阳性对照 = 0.676; 阴性对照 = 0.052; 标准品 = 0.344; (b) ELISA 结果显示小鼠感染 MNV-1 16 h 后, 血清中的 MNV-1 抗体明显增加, 感染后 2 周时血清可判定为阳性, 感染 3 周后, 血清中抗体达到峰值, 随后有微弱的下降, 4~7 周数值无明显变化。

Note: (a) Positive control = 0.676; Negative control = 0.052; Calibration = 0.344; (b) ELISA shows that serum MNV-1 antibody was significantly increased at 16 h after MNV-1 infection. The serum could be determined as positive at 2 weeks after MNV-1 infection, the serum antibodies reached a peak at 3 weeks after infection, and there were no significant changes of the values at 4-7 weeks after infection.

2.3 ELISA 试剂盒对血清样品的检测

取不同感染时间的小鼠血清进行 ELISA 检测 (每个时间点采 5 只小鼠血清样品), 统计其吸光值 (表 2), 根据吸光值的结果计算出血清中抗体存在情况。小鼠感染 MNV-1 16 h 后, 血清中的 MNV-1 抗体明显增加, 感染后两周时血清可判定为阳性, 感染 3 周后, 血清中抗体达到峰值, 随后有微弱的下降, 4~7 周数值无明显变化 (图 3)。

2.4 IFA 法与 ELISA 法检测结果对比
 分别用 IFA 法与 ELISA 法检测 80 份小鼠血清, IFA 法测定阳性 27 份, 阴性 53 份, ELISA 法测定阳性 32 份, 阴性 48 份。差异样品用 Western blot 法进行验证, 结果显示, 5 份差异血清中 3 份血清为弱阳

性, 2 份为阴性。两种结果对比显示 IFA 法检测符合率为 96.0%, ELISA 法符合率为 97.5%。

3 讨论

随着对小鼠诺如病毒的认识逐渐加强, 越来越多的设施中检测到实验小鼠感染诺如病毒的情况。北美、欧洲、亚洲 (韩国和日本) 等地区均有实验小鼠感染 MNV 的报道, 相关报道也见于我国上海、广东等地区。研究表明小鼠诺如病毒能够使小鼠发生一系列的炎症反应甚至死亡。因此, 在进行实验研究的过程中, 排除小鼠诺如病毒的干扰, 保证实验结果的准确性非常必要^[5]。

针对小鼠诺如病毒的检测, 酶联免疫吸附试验法试剂盒已经商品化, 其快速准确的特点收到多个实验动物使用单位青睐, 但其特异性较差。常规 PCR 法及也能够有效的检出小鼠诺如病毒的存在, 尤其是 real-time PCR 的灵敏度可以达到几十个甚至十几个拷贝数^[6], 由于不同种类的小鼠诺如病毒序列间存在一定的差异, real-time PCR 作为一种高度特异的检测方法, 可能无法同时满足多种小鼠诺如病毒的检测。

间接免疫荧光法是一种非常传统的病毒检测方法, 在免疫学、生物化学和荧光显微镜技术的基础上建立起来的一项标记检验技术, 检测时间短、

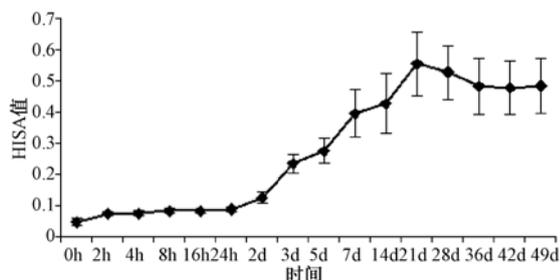


图 3 ELISA 法对小鼠感染 MNV-1 后不同时间血清检测结果

Fig. 3 The ELISA results of the serum after MNV-1 infected mice at different time points after MNV-1 infection

操作容易、特异性好。检测抗原是采用胞内全病毒,具有较高的特异性,但其灵敏度略有不足。ELISA 法灵敏度高,对血清样品的要求也高,微溶血或有其他杂微生物的污染对检测结果都有非常大的影响。

综上所述,IFA 法和 ELISA 法虽然都能够对小鼠诺如病毒进行常规检测,但这两种方法都不能够完全真实的反应出小鼠的感染情况,在对设施中的实验小鼠进行 MNV 排查时,建议采用 IFA 法或 ELISA 法作为初筛方法,对结果可疑的样品,可采用 Western blot 法进行验证,才能够得出真实可靠的结果。

参考文献:

[1] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis

[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8):1224-1231.

[2] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW IV. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis [J]. Virology, 2006, 80(11):5104-5112.

[3] Ison CA, Tanna A, Easmon CSF. Evaluation of a fluorescent monoclonal antibody reagent for identification of cultured *Neisseria gonorrhoeae* [J]. Med Microbiol, 1988, 26(2):121-123.

[4] Vashist S, Urena L, Goodfellow I. Development of a strand specific real-time RT-qPCR assay for the detection and quantitation of murine norovirus RNA [J]. J Virol Methods, 2012, 184(1-2):69-76.

[5] 田胜男,刘云波.鼠诺如病毒概述[J].中国比较医学杂志,2013,23(7):68-71.

[6] 白露,叶伟,于蒙蒙,等.两种方法检测汉坦病毒滴度的比较研究[J].科学技术与工程,2012,12(9):2137-2141.

[修回日期]2014-04-20

(上接第 44 页)

确定以正中矢状线和后毗连线为定标线,前方为额叶,后方为顶叶,在头皮上共取左右额顶叶 4 极,组成单双极导联,以两耳为无关电极,这样所描记的 EEG 受眼及耳活动干扰较小,图形稳定,重复性也较好。

3.5 关于麻醉对 ECoG 的影响

观察分析了使用氯胺酮及氟哌利多混和麻醉家兔后,2 min~25 min ECoG 的图形变化,可以发现使用麻醉剂后,一切肌电、耳及眼的活动干扰消失,但麻醉能影响脑电活动,并影响呼吸使脑缺氧,ECoG 呈(2~3)c/s 的 δ 波为主,并伴有(4~6)c/s 的 θ 波,因而不适宜作常规 EEG 的描记。

参考文献:

[1] 施新猷,编著.医用实验动物学[M].西安:陕西科学技术出版社,1989:28-162.

出版社,1989:28-162.

[2] 南京农业大学出版社.家畜生理学[M].北京:农业出版社,1984:14-50.

[3] 王玢.人体及动物生理学[M].北京:高等教育出版社,1986:28-126.

[4] 陈明. 6β -乙酰氧萘去甲苄苄对清醒兔脑皮层电图的影响[J].上海第二医科大学学报,1992,12:29.

[5] 董献珍.家兔癫痫模型制作及皮层电图分析[J].脑电图学与神经精神疾病杂志,1988,4:95.

[6] 徐家萱,胡振序,潘松青.家兔颅外头皮脑电图的实验研究[J].湖北医科大学学报,1994,15(3):237-241.

[7] 晏正辉,王兴元.老年人急性脑血管疾病的脑电图特征[J].医学研究生学报,2013,26(6):615-617.

[修回日期]2014-03-24