

王莎莎,付瑞,王吉,等. 鼠痘病毒 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 101-105.
Wang SS, Fu R, Wang J, et al. Development of an FQ-PCR method to detect and quantitate ectromelia virus and primary applications [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 101-105.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.015

鼠痘病毒 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用

王莎莎[#], 付 瑞[#], 王 吉^{*}, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 目的 建立鼠痘病毒(ECTV)的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法,并对实验室保存的裸鼯鼠组织样本、小鼠组织样本以及黄鼠组织样本进行检测。**方法** 根据 GenBank 中鼠痘病毒的 *crmD* 基因序列设计引物探针,建立 ECTV 的 FQ-PCR 检测方法,对保存的样本进行筛查,并对部分阳性样本进行测序鉴定。**结果** 建立的 ECTV FQ-PCR 检测方法灵敏度高、特异性强,最低能检测到 ECTV 核酸浓度为 10 copies/ μ L 的样本,方法的标准曲线相关参数符合标准。使用该方法检测实验室 63 份裸鼯鼠脾组织样本和 22 份小鼠脾组织样本,结果全为阴性,检测 4 只黄鼠组织样本,结果阳性率为 50%。阳性样本进行 PCR 检测后测序比对为 ECTV 核酸序列。**结论** 经验证,建立的 ECTV FQ-PCR 检测方法能够灵敏特异的对样本中的 ECTV 进行筛查,实验室小鼠的日常监测不应忽视 ECTV 污染的潜在风险。

【关键词】 鼠痘病毒; TaqMan 探针法荧光定量 PCR 方法; 裸鼯鼠; 黄鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0101-05

Development of an FQ-PCR method to detect and quantitate ectromelia virus and primary applications

WANG Shasha[#], FU Rui[#], WANG Ji^{*}, YUE Bingfei^{*}

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To identify the prevalence of ECTV in mice. **Methods** A sensitive and specific FQ-PCR assay for ECTV was developed and used to detect and quantitate ECTV in mouse samples by analyzing the sequence of the *crmD* gene in ECTV. **Results** This assay detected a minimum of 10 copies of standard DNA. The assay was applied to 63 naked mole rat spleen samples and 22 mouse spleen samples raised in the laboratory, which provided negative result. In tissue samples from four ground squirrels raised in our laboratory, the positive rate was 50%. Some positive samples amplified with primers for the *crmD* gene had 99% similarities to ECTV as determined by sequencing the PCR products. **Conclusions** Our result suggest that routine surveillance of ECTV in laboratory mice cannot be ignored.

【Keywords】 ectromelia virus; TaqMan FQ-PCR; naked mole rats; ground squirrel

鼠痘病毒(ectromelia virus, ECTV)是一类有囊膜,基因组为 180~200 kb 大小的线性双股 DNA 病毒,是动物病毒中体积大、结构最复杂的 DNA 病毒,

病毒粒子呈卵圆形或砖形,大小为 230 nm \times 170 nm,在分类上属于痘病毒科,脊索动物痘病毒亚科,正痘病毒属。ECTV 的自然宿主为小鼠,1930 年首次在英

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI09B02)。

[作者简介] 王莎莎(1989—),女,免疫学硕士,从事实验动物病毒研究。E-mail: wangsha0316@126.com

付瑞(1978—),男,免疫学硕士,副研究员,从事实验动物病毒研究。E-mail: furui78@nifdc.org.cn [#]共同第一作者

[通信作者] 岳秉飞(1960—),男,研究员,博士,从事实验动物学研究。E-mail: y6784@126.com

王吉(1974—),女,硕士,研究员,从事实验动物病毒研究。E-mail: wj_nd_jds@sina.com ^{*}共同通信作者

国的实验小鼠种群中分离,随后在墨西哥、日本、美国、中国均有发现^[1]。ECTV 多呈爆发性流行,致死率较高,常造成全群淘汰,危害极大。不同宿主的易感性不同,临床上急性感染小鼠以四肢、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,而隐性带毒鼠通常没有明显症状,为实验小鼠种群的重大安全隐患。实验室常用酶联免疫吸附试验检测 ECTV 抗体进行日常监测,而隐性带毒鼠的血清抗体水平较低,血清学检测方法有可能造成假阴性^[2],且感染动物的病毒抗体的产生存在空窗期,因此,对实验小鼠的 ECTV 核酸筛查在感染初期非常重要。本研究建立了 ECTV 特异灵敏的 TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 检测方法,能够实现快速批量检测,且首次在黄鼠组织中检测到 ECTV 核酸,提示在使用实验用动物时还需重视 ECTV 的感染情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

22 只 6 周龄雄性 (18~22 g) 清洁级小鼠来自中国食品药品检定研究院动物生产供应室 [SCXK (京) 2017-0005], [SYXK (京) 2017-0013], 63 只 14~34 月龄屏障环境饲养裸鼯鼠,重 22g~42g,其中雌性 31 只,雄性 32 只,由海军军医大学提供 [SCXK (沪) 2017-0002]。动物饲养于屏障设施 [SYXK (沪) 2017-0004]。由中国食品药品检定研究院审批通过 (中检动 (福) 第 2019 (A) 001 号),所有动物均按 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验样品与毒种

鼠痘病毒 (ectromelia virus, ECTV)、牛痘病毒 (vaccinia virus, VACV)、鼠腺病毒 (murine adenovirus, MAdV)、小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, Poly)、小鼠微小病毒 (minute virus of mice, MVM) 为本室保存;63 份裸鼯鼠脾组织样本 (编号为 NP1~NP63 号) 来自中国人民解放军第二军医大学;22 只清洁级小鼠脾组织 (编号为 MS1~MS22) 和 4 只黄鼠的 20 份组织样本为本实验室送检样品,来自于国内 4 个实验动物使用单位,其中黄鼠的组织包括肝组织 (编号为 SQLi1~SQLi4)、脾组织 (编号为 SQS1~SQS4)、肾组织 (编号为 SQK1~

SQK4)、肺组织 (编号为 SQLu1~SQLu4)、淋巴组织 (编号为 SQLy1~SQLy4)。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 快速提取试剂盒品牌为 QIAGEN; 普通 PCR 系列试剂及标准阳性质粒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; TaqMan Gene Expression Master Mix 品牌为 ABI。PCR 仪和核酸琼脂糖凝胶电泳仪品牌为美国 Bio-RAD; 凝胶成像分析仪品牌为美国 Kodak; 荧光定量 PCR 仪 7500fast Real-Time PCR System 品牌为美国 ABI。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计

比对 NCBI 上现有的 ECTV 基因序列,选择同源性最高的 *crmD* 基因 (NCBI ID: KJ563295) 保守区域,设计 FQ-PCR 的引物探针,序列如表 1 示。

1.3.2 质粒标准品的制备

合成 ECTV 基因 *crmD* 序列包含引物探针的部分,转入 pMD19-T 质粒中,作为 ECTV FQ-PCR 的标准质粒 pMD19-ECTV,浓度为 1.0×10^9 copies/ μ L。

1.3.3 病毒 DNA 的获取

对正常 BHK21 细胞、BHK21 细胞培养的 ECTV 毒株和 VACV、MAdV、Poly、MVM 病毒培养液,以及 63 份裸鼯鼠脾组织样本和 22 份小鼠脾组织样本、4 只黄鼠的肝、脾、肾、肺、淋巴结等 20 份组织样本按照 DNA 快速提取试剂盒操作方式进行 DNA 提取。提取的 DNA 冻存于 -30°C 备用。

1.3.4 ECTV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

经条件优化, FQ-PCR 的最佳反应体系为引物探针混合物 ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, 模板 $1 \mu\text{L}$, 加入 TaqMan Gene Expression Master Mix 以及无 RNase 水使总反应体积达到 $20 \mu\text{L}$ 。使用荧光定量 PCR 仪 7500fast Real-time PCR System 设定程序 50°C 预热 2 min; 95°C 预变性 10 min; 扩增循环为 95°C 15 s, 60°C 1 min, 共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

将 pMD19-ECTV 作为标准品,进行 10 倍系列稀释为 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL , 作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,选取线性较好 6 个稀释度建立标准曲线。

1.3.5 ECTV FQ-PCR 检测方法的特异性、灵敏性、准确性和稳定性检测

表 1 用于扩增 *crmD* 基因的引物与 TaqMan 探针序列

Table 1 Primers and TaqMan probes sequences for the *crmD* gene amplification

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	序列位置 Primer locations	扩增子大小 (bp) PCR product size
EctV-1F	GTGTTAGTTGTCTAGATTCTCTTCCAGAA	5771~5779	92
EctV-1R	AAACGATAAAGTACATCAAGACCTCACA	5835~5862	
探针 Probe	(FAM) ACGCAGTGCAAGATTA(NFQ)	5819~5834	

使用建立的 FQ-PCR 方法检测 ECTV、VACV、MAV、Poly、MVM 病毒核酸,并设立 BHK21 细胞核酸和无 RNase 水作为阴性对照(N/C)检测 ECTV FQ-PCR 方法的特异性。检测 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 的标准质粒,每个稀释度做三个平行,检测方法的灵敏性。使用建立的 FQ-PCR 方法对 3 份阳性样品进行多次重复实验,评价方法的准确性和稳定性。

1.3.6 ECTV FQ-PCR 在不同样品中的应用

使用建立的 ECTV FQ-PCR 方法对 1.3.3 中获取的不同的样本 DNA 进行 ECTV 筛查,并对阳性样本使用普通 PCR 引物 crmD1 : 5'-CTGCGAATTTGAAGGATC-3'; crmD2 : 5'-CGTCGTGGGTGTTAGTTG-3'进行扩增^[3],扩增产物测序鉴定。

2 结果

2.1 ECTV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

选取标准质粒 pMD19-ECTV 稀释度为 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^3$ copies/ μL 的检测结果显示标准曲线,标准曲线如图 1 所示,其相关系数 Slope 为 -3.487、相关系数 R^2 值为 0.998,扩增效率 Eff% 为 93.544% (90%~110%之间)。

2.2 ECTV FQ-PCR 特异性检测

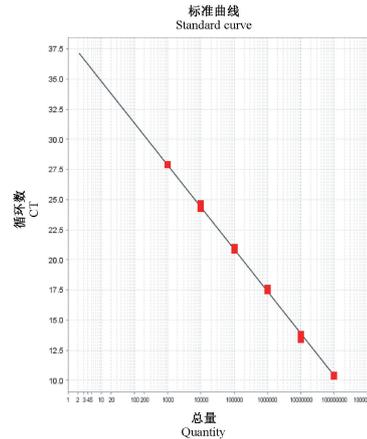
如图 2 所示,建立的 ECTV FQ-PCR 检测 VACV、MAV、Poly、MVM 病毒核酸以及 BHK21 细胞核酸和无 RNase 水均无明显扩增曲线,而对 ECTV 病毒 DNA 有 S 型扩增曲线,CT 值为 12.29,说明建立的方法有很好的特异性。

2.3 ECTV FQ-PCR 灵敏性检测

对 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 稀释度的标准质粒 pMD19-ECTV 进行检测,每个稀释度三个平行,所能检测的最小浓度梯度的循环阈值 (CT) ≤ 35 ,拷贝数 (Copies) ≥ 10 时 FQ-PCR 结果可信,结果如图 3,显示标准质粒浓度为 10 copies/ μL 时 CT 值为 33.09,三个平行实验均有扩增曲线,测得拷贝数为 30.90 copies,在可信范围之内,而浓度为 1 copies/ μL 时 CT 值为 36.01,测得的拷贝数为 4.5 copies,但在三个平行实验中,仅有一个实验有数据,说明已超出检测限。因此确定该方法的灵敏度为 10 copies。

2.4 ECTV FQ-PCR 准确性和稳定性检测

使用浓度分别为 1×10^6 copies/ μL 、 1×10^5 copies/ μL 、 1×10^4 copies/ μL 的标准品进行荧光定量 PCR 检测,且进行三个平行实验,最终实测值的均

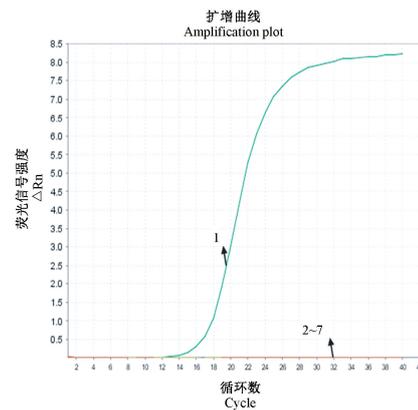


注:目标:目标 1 斜率:-3.487; Y 轴截距:38.291; 相关系数:0.998; 扩增效率:93.544%。

图 1 ECTV FQ-PCR 标准曲线

Note. Target, Target 1 Slope, -3.487. Y-Inter, 38.291. R2, 0.998. Eff%, 93.544%.

Figure 1 ECTV FQ-PCR standard curve



注:1: ECTV; 2-7: VACV、MAV、Poly、MVM、BHK21 细胞、无 RNase 水。

图 2 ECTV FQ-PCR 特异性检测结果

Note. 1, ECTV. 2-7, VACV/MAV/Poly/MVM/BHK21 cell/RNase free water.

Figure 2 ECTV FQ-PCR specificity test

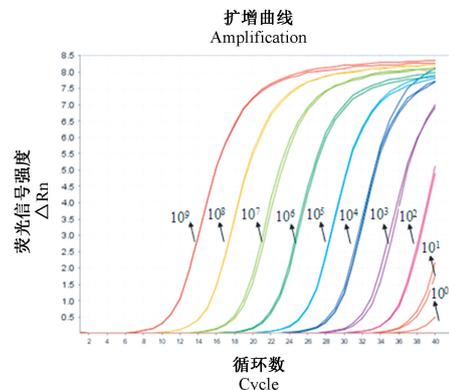


图 3 ECTV FQ-PCR 灵敏度检测扩增曲线

Figure 3 ECTV FQ-PCR sensitivity test amplification curves

值分别为 1.2×10^6 copies/ μL 、 1.078×10^5 copies/ μL 、 1.33×10^4 copies/ μL , 计算 CTSD 值及 CV 值如表 2。3 个浓度梯度 3 次重复实验 Ct 值的变异系数(CV)均小于 5%, 表明方法重复性、稳定性良好。

2.5 ECTV FQ-PCR 在鼠组织样品中的应用

对收集到的动物组织样本进行 ECTV 筛查, 结果如表 3、图 4 所示, 显示在黄鼠的肝、脾、肾、肺、淋巴组织中均检测到 ECTV 阳性, 阳性样品中 ECTV 的核酸拷贝量均较低, 其中浓度最高的是黄鼠淋巴组织 SQLy1, 达 106.967 copies/ μL , 且淋巴组织的检测结果均为阳性。对阳性样本进行 PCR 后测序, 显示其与 ECTV 核酸的同源性为 99%, 进一步验证了检测的黄鼠感染了 ECTV。而在实验室裸鼯鼠组织和小鼠组织 ECTV 筛查结果显示均为阴性。

3 讨论

鼠痘病毒作为我国现行国标《实验动物微生物等级及检测》(GB14922.2-2011)中规定的清洁级及以上级别小鼠的必检项目^[4], 我国实验室已经建立了较为严格的饲养管理及卫生防疫制度, 对国内实验室中的鼠痘病毒的流行情况进行了很好的控制。现行国家标准中实验动物鼠痘病毒的检测方法为血清学方法, 包括酶联免疫吸附实验、免疫酶试验、免疫荧光试验、免疫酶组织化学法, 通常情况下, 实验室的标准检测方法为酶联免疫吸附试验。据不完全统计, 我国 1983 年至 2011 年间的 7 篇关于 ECTV 的报道, 仅有两篇报道检出 ECTV 阳性, 且阳性率很低^[5]。近些年已经很少有关于 ECTV 阳性的报道, 本实验室 2017 至 2019 年间使用酶联免疫吸附试验方法检测小鼠血清中的 ECTV 抗体, 未检出阳性, 本实验使用的小鼠、裸鼯鼠、黄鼠分别使用小鼠、裸鼯鼠、大鼠的鼠痘病毒酶联免疫吸附试验方法检测为鼠痘抗体阴性。由于分子学方法直接检测抗原, 且弥补了血清学检测方法在感染空窗期检测造成的假阴性, 具有很好的应用前景。

为了全面的评价 ECTV 对实验室小鼠的感染威胁, 本研究拟建立 ECTV FQ-PCR 对裸鼯鼠、黄鼠、小鼠组织进行筛查。选取了位于 ECTV 核酸两端的重复序列中的 *CrmD* 基因的保守区域设计引物探针, 建立的 ECTV Q-PCR 能够灵敏特异的检测 ECTV 核酸, 标准曲线的相关系数 Slope 为 -3.487、相关系数 R^2 值为 0.998, 扩增效率 Eff% 为 93.544%, 最低能检测到浓度为 10copies 的样品。

表 2 荧光定量 PCR 检测方法的重复性和稳定性实验结果
Table 2 Repeatability and stability testing results of Q-PCR

标准品 (copies/ μL) Standard sample	实验次数 Number of experiments	每次检测 CT 均值 Mean CT value per test	3 次检测 CT 均值 Mean CT value for three times tests	标准差 CT _s	变异系数 CV(%) Coefficient of variation
10 ⁶	1	16.559	17.10	0.544	3.18
	2	17.647			
	3	17.093			
10 ⁵	1	19.377	20.405	0.894	4.38
	2	21.002			
	3	20.835			
10 ⁴	1	23.806	23.909	0.721	3.02
	2	24.676			
	3	23.245			

表 3 黄鼠组织样本 ECTV 检测结果

Table 3 Results of ECTV detection for ground squirrel tissue samples

组织 Tissue	编号 Number	Q-PCR		
		CT 值 CT value	拷贝数 Copies	结果* Result
肝 Liver	SQLi1	/	/	-
	SQLi2	/	/	-
	SQLi3	36.456	3.357	-
	SQLi4	32.276	53.051	+
脾 Spleen	SQS1	36.184	4.018	-
	SQS2	/	/	-
	SQS3	34.013	16.848	+
	SQS4	/	/	-
肾 Kidney	SQK1	32.157	57.388	+
	SQK2	35.401	6.738	-
	SQK3	34.375	13.266	+
	SQK4	32.155	57.463	+
肺 Lung	SQLu1	34.302	13.921	+
	SQLu2	35.648	5.724	-
	SQLu3	37.000	2.344	-
	SQLu4	34.965	8.985	-
淋巴组织 Lymphatic tissue	SQLy1	31.214	106.967	+
	SQLy2	34.729	10.501	+
	SQLy3	34.666	10.947	+
	SQLy4	33.374	25.693	+
阳性率 Positive Rate	/	/	/	50% (10/20)

注: “结果*”中“-”表示结果为阴性; “+”指结果为阳性。

Note: “-” in “Result” indicates negative result. “+” indicates positive result.

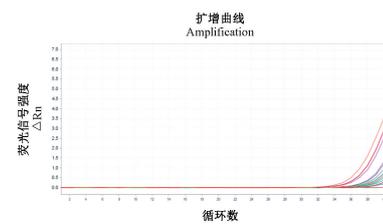


图 4 黄鼠组织 ECTV FQ-PCR 检测的扩增曲线
Figure 4 The amplification curve of ground squirrel tissue samples for ECTV FQ-PCR test

近年来关于 ECTV 的分子学诊断方法得到了广泛关注,分别针对 *ERPV_027* 基因^[6]、核心蛋白 *P4b* 基因^[7]设计了荧光定量 PCR 方法,针对 *CrmD* 基因建立了环介导等温扩增可视化检测方法^[2]。本研究针对 *CrmD* 基因建立 FQ-PCR 方法,*CrmD* 基因位于 ECTV 的两端重复序列中,相当于一个病毒粒子中含有 2 个拷贝的基因,且 *CrmD* 基因与病毒繁殖方式有关^[8],在感染组织中核酸峰度较高,进一步提高了检测的灵敏度。TaqMan 荧光定量 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便易于高通量检测等优点,具有较高的适用性。

使用建立的 ECTV FQ-PCR 检测实验室 22 份小鼠组织,未检测出阳性,说明国内屏障系统小鼠 ECTV 的感染得到了很好的监测和控制。检测 63 份裸鼯鼠组织 ECTV 结果为阴性,说明裸鼯鼠对 ECTV 敏感性较低,但裸鼯鼠对 ECTV 是否具有抗病毒作用还需要进一步的研究分析。20 份黄鼠组织检测出 ECTV 阳性,说明黄鼠为 ECTV 的易感宿主。小鼠感染 ECTV 时,首先通过皮下感染位点扩散至淋巴结,侵入血液后引发一级病毒血症使病毒进入脾和肝^[8]。本研究在 4 只黄鼠的淋巴结均检测到 ECTV,而在肝、脾、肾、肺组织仅有部分检测出病毒,说明 ECTV 在黄鼠体内有与小鼠相似感染途径。使用 ECTV FQ-PCR 黄鼠组织的检出率为 50%,但病毒的拷贝数都比较低,而使用血清学方法未检出黄鼠鼠痘抗体阳性可能是由于此时正处于感染初期,为鼠痘抗体产生的空窗期,因此造成假阴性,也可能是由于使用大鼠的酶联免疫吸附实验与黄鼠中鼠痘抗体没有交叉反应,造成阴性结果。黄鼠主要分布于我国北部和西部地区,由于其特有的生物学特性,已被大量用于医学实验和冬眠生理学的实验材料,神经生物学工作者也开始使用黄鼠作为研究对象^[9-10],也应用于病毒性肝炎的实验动物模型^[11]。但是黄鼠的实验动物化研究还存在很多空白,微生物携带情况及致病性研究为黄鼠饲养

规范提供技术支持,有效促进黄鼠的实验动物化进程。同时,黄鼠感染 ECTV 提示其作为新兴实验用动物使用时,需要避免其对实验动物饲养环境的污染,以免引起 ECTV 在实验室小鼠的爆发。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物疫病学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [2] 周洁, 陶凌云, 赵丽娟, 等. 鼠痘病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 343-349.
- [3] 付瑞, 岳秉飞, 贺争鸣, 等. 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, 19.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB 14922.2-2011, 实验动物微生物学等级及监测 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [5] 仇保丰, 宋鸿雁, 董蓉莲, 等. 鼠痘、小鼠肝炎和鼠仙台病毒感染症的国内流行情况及防控对策 [J]. 中国动物检疫, 2015, 32(10): 14-19.
- [6] 杜江涛, 戴方伟, 周莎桑, 等. 鼠痘病毒荧光定量 Taqman-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 59-64.
- [7] Cheng W, He X, Jia H, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for detection and quantitation of orthopoxvirus by using Ectromelia virus [J]. Mol Cell Probes, 2018, 38: 45-50.
- [8] 周洁, 赵丽娟, 陶凌云, 等. 鼠痘病毒感染机制及其检测方法研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 160-164.
- [9] 夏长友, 关云涛, 魏炳泉, 等. 达乌尔黄鼠的生物学特性及实验动物化研究概况 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2006, (2): 59-60.
- [10] 王琦, 马宁, 李春明. 达乌尔黄鼠实验动物化研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 211-213.
- [11] 王静, 纪维红, 苏军虎, 等. 达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 生态学研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 33-39.

[收稿日期] 2020-05-29