

结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用

袁文, 王静, 赵维波, 张钰, 郭鹏举, 黄韧*

(广东省实验动物重点实验室, 广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 目的 建立一种快速、特异、敏感的荧光定量 RT-PCR 检测方法, 用于小鼠诺如病毒(murine norovirus, MNV)的检测。**方法** 根据 MNV ORF1-ORF2 结合区域中保守序列设计一对特异性引物和 Taqman 探针, 同时设计和制备了内标用于监控假阴性, 建立含有内标的荧光定量 RT-PCR 检测体系, 通过优化, 得到最佳反应体系和反应条件; 构建质粒标准品并以其为模板绘制标准曲线; 进行特异性、敏感性和重复性试验, 最后用建立的方法检测 344 份小鼠临床样本, 验证在临床应用中的效果。**结果** 该方法特异性强, 与小鼠肝炎病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、呼肠孤病毒 III 型、出血热病毒和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒不发生交叉反应。构建的荧光定量标准曲线 Ct 值与模板浓度呈良好的线性关系相关系数 $r^2 = 0.9986$, 可以检测到 10 copies/ μL 的质粒标准品, 对 MNV 活病毒检测可检测到 1.78×10^{-2} TCID₅₀/mL 的病毒, 检测灵敏度比常规 RT-PCR 高 10 倍, 比病毒分离高 100 倍。对 5 份样品进行 5 次批内和批间重复检测, 检测结果变异系数均小于 2%。通过对 344 份临床样品检测, 检测到阳性样品 103 份, 阳性率 29.94%。有 5 份样本结果为假阴性。**结论** 建立的 MNV 荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性强、敏感性高、重复性好, 由于加入了内标, 能有效地监控假阴性的出现, 适合用于 MNV 日常监测、临床诊断和流行病学调查。

【关键词】 小鼠诺如病毒; 荧光定量 RT-PCR; 内标

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0049-08

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.010

Establishment and application of a fluorescence real-time RT-PCR assay with an internal control for detection of murine norovirus

YUAN Wen, WANG Jing, ZHAO Wei-bo, ZHANG Yu, GUO Peng-ju, HUANG Ren

(Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals
Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To develop a rapid, specific and sensitive fluorescence real-time RT-PCR assay for detection of murine norovirus (MNV). **Methods** A pair of primers and a Taqman probe were designed targeting highly conserved sequences among MNV strains, which are located at the open reading frames 1 (ORF1)-ORF2 junction region. The internal control (IC) was also designed and constructed to determine false-negative results. A real-time RT-PCR assay with the IC was established for MNV detection by optimizing reaction components and conditions. The standard curve was plotted based on the linear relationship between the amount of plasmid DNA and cycle threshold (Ct) values. In addition, the specificity, sensitivity and reproducibility of the assay were evaluated. 344 clinical samples were used to determine the efficacy of this real-time RT-PCR method. **Results** The specificity test showed that this real-time RT-PCR assay could specifically detect MNV and had no cross reactions with mouse hepatitis virus, Theiler's murine encephalomyelitis virus, Sendai virus, pneumonia virus of mice, reovirus III, Hantaan virus and lymphocytic choriomeningitis virus. The standard curve showed

【基金项目】 国家科技支撑计划 (编号: 2013BAK11B01); 广东省科技计划项目 (编号: 2011B040200010); 广东省科技计划项目 (编号: 2012B010300026)。

【作者简介】 袁文 (1979-), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: ywen010101@163.com。

【通讯作者】 黄韧, 男, 研究员, E-mail: labking@sohu.com

fine linear relationship between the amount of plasmid DNA and Ct values (correlation coefficient $r^2 = 0.9986$). The developed assay was sensitive enough to detect as low as 10 copies/ μL . The lower quantification limit of MNV was estimated as 1.78×10^{-2} TCID₅₀/mL, which was 10 times more sensitive than conventional RT-PCR method, and 100 times more sensitive than virus isolation method. Both the intra-batch and inter-batch coefficients of variation were less than 2% based on 5 repeated intra-batch and inter-batch test of 5 samples. 344 clinical samples were tested by this developed real-time RT-PCR assay and showed a positive ratio of 29.94% (103/344). **Conclusions** This real-time RT-PCR assay is a specific, sensitive and reproducible assay. Moreover, the internal control in the real-time RT-PCR system can be used to determine false negative results. This assay could be exploited for routine detection, clinical diagnosis and epidemiological survey of mouse norovirus.

【Key words】 Mouse norovirus (MNV); Real-time RT-PCR; Internal control

小鼠诺如病毒 (murine norovirus, MNV) 属于杯状病毒科、诺如病毒属成员, 是一种新发现的感染实验小鼠的病毒。2003 年 Karst 从信号转导蛋白和转录激活因子 1 (STAT1) 以及重组体激活基因 2 (RAG2) 缺陷 (RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}) 小鼠中首次发现并分离到了原型株小鼠诺如病毒-1 (MNV-1)^[1]。MNV 在正常免疫小鼠中多呈隐性感染, 但可导致一些先天性免疫系统应答组分缺陷的小鼠发生致死性感染, 对一些与巨噬细胞和树突状细胞相关的小鼠模型的实验研究造成干扰^[2,3]。MNV 在小鼠中感染率高, 呈世界范围流行, 是目前已知的小鼠病毒中流行最广泛的一种病毒^[4,7]。MNV 是国外实验动物健康监测的一个必检项目, 我国实验动物国家标准中虽然尚未把 MNV 列入检测项目, 但是一些实验动物生产或使用单位、以及一些 CRO 公司都把 MNV 列为筛查项目。

目前 MNV 检测方法主要为酶联免疫吸附试验 (ELISA)、间接免疫荧光试验 (IFA) 和 RT-PCR 方法。但血清学检测不适合用于病毒早期感染和免疫缺陷小鼠的诊断。普通 RT-PCR 方法具有快速、简便、灵敏、特异等优点, 已成为 MNV 感染诊断的重要手段。荧光定量 RT-PCR 方法相比普通 RT-PCR 方法具有更灵敏、更特异、更快和可定量等优点, 已广泛应用于病原微生物的检测。在 PCR 检测中, 由于样品中存在复杂的未知成分, 以及核酸提取过程中, 一些物质的残留会抑制 PCR 扩增, 使得反应灵敏度降低甚至造成假阴性结果, 在对标本处理时也有可能因为操作失误而丢失病原体核酸, 形成假阴性结果。在 PCR 反应体系中加入指示假阴性的内标 (internal control, IC) 可以有效监控抑制成分的存在和人员的操作失误。

本研究根据 MNV ORF1-ORF2 结合区域中保守序列设计引物和 Taqman 探针, 建立了含有内标的

荧光定量 RT-PCR 检测方法, 内标加到各个样品中, 同步参与样品核酸的提取、加样、PCR 扩增及信号检测的全过程, 不仅能够有效地监控样本中的抑制物, 还能避免了操作误差所造成的假阴性。可以显示抑制成分的存在或指示假阴性的发生, 实现对试验过程监测, 确保检测质量。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株、载体和临床样本

MNV Guangzhou/K162/09/CHN 毒株由本实验室分离保存, 小鼠肝炎病毒 (MHV, ATCC VR-246)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV, ATCC VR-995)、仙台病毒 (SV, ATCC VR-105)、小鼠肺炎病毒 (PVM, ATCC VR-25)、呼肠孤病毒 III 型 (Reo-3, ATCC VR-232) 购自美国典型微生物菌种保藏中心, 小鼠出血热病毒 (HV) 抗原为浙江天元生物药业股份有限公司生产的双价肾综合征出血热 (汉滩型和汉城型) 灭活疫苗, 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 核酸由中国食品药品检定研究院惠赠、RAW264.7 细胞 (ATCC TIB-71) 购自美国典型微生物菌种保藏中心。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、BL21、lambda 噬菌体 DNA (λ DNA) 和克隆载体 pMD19-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (Takara 公司)。含有 MS2 噬菌体衣壳蛋白基因的表达载体 AU2 购自比利时菌种保藏中心。临床样本来源于 2010 年至 2013 年本实验室收到广东、湖北、北京、四川、云南和上海等省市送检的活体小鼠或小鼠粪便, 无菌采集活体小鼠的盲肠内容物, -80°C 保存, 临床样本共 344 份。

1.2 引物和探针设计

根据 GenBank 中收录的 MNV-1 (登录号为 AY228235) 全基因组序列, 选取高度保守的 ORF1-ORF2 结合区域作为检测靶区, 利用 Primer Express 3.0 软件 (Applied Biosystems 公司) 设计一套针对

ORF1-ORF2 结合区域的荧光定量 PCR 引物和 Taqman 探针,并使用 Genbank 的 Blast 软件与 NCBI 数

据库的其他 MNV 毒株序列进行比较,保证引物和探针序列的通用性,引物和探针序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers

引物名称 Name of primers	序列(5' - 3') Primer sequences	位置/nt Location	产物大小/bp Amplicon size
MNV	MNV-F TCTGTCTGCGCTGGGTGC	4983 - 5001	96
	MNV-R GCTGCGCCATCACTCATCC	5060 - 5078	
	MNV-P FAM- ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG -BHQ-1	5017 - 5038	
IC	IC-F CGAGTAAGTCGCTTAATGTTTCGT	25734 - 25756	101
	IC-R TGTCTGTTGGCGAAAAGTCATT	25814 - 25834	
	IC-P JOE-AAGCAGAGAGCAAAGGTGGATGCAGATG -BHQ -1	25761 - 25788	

1.3 内标的设计与制备

为了监控荧光定量 RT-PCR 反应中的假阴性结果,我们应用装甲 RNA 技术设计并且制备了内标。选取一段 lambda 噬菌体 DNA(λ DNA)作为内标检测基因(登录号为 J02459),针对这段序列设计一套检测内标的引物和探针,内标引物和探针序列如表 1 所示,建立内标实时荧光定量 PCR 检测方法。在上下游引物的 5'端各加入一个酶切位点 *Hind* III (Takara 公司),PCR 扩增后将这段外源基因克隆到 pMD19-T 载体上,酶切后再亚克隆到表达载体 AU2,得到含 λ DNA 片段的原核表达载体,将表达载体转化进大肠杆菌 BL21 并进行诱导表达,获得含有 λ DNA RNA 的病毒样颗粒(装甲 RNA 病毒样颗粒),该病毒样颗粒就是内标,采用病毒密度梯度离心方法对内标进行纯化,用建立的荧光定量 RT-PCR 对内标进行定量。

1.4 病毒核酸提取

病毒样品 RNA 的抽提按 Trizol (Invitrogen 公司,美国)操作说明书进行,盲肠内容物和粪便样品按照下面的方法预处理,在装有样本的离心管中加入适量灭菌的 PBS,漩涡混匀,将悬液 12000r/min 离心 10 min,取上清液通过 0.22 μ m 滤膜(Pall 公司,美国)过滤,取滤液进行 RNA 抽提。每份样品均加入内标同步参与样品核酸的提取。

1.5 MNV 质粒标准品的制备

以提取的 MNV RNA 为模板,用 PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒进行 RT-PCR,反应体系为:Enzyme Mix 2 μ L,2 $\times$ buffer 25 μ L,上游引物 MNV-F (10 μ mol/L) 2.5 μ L,下游引物 MNV-R (10 μ mol/L) 2.5 μ L,RNA 5 μ L,加 RNase free dH₂O 至 50 μ L。反应条件:50 $^{\circ}$ C 30 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,一个循环 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应得到目的大小

片段后,用胶回收试剂盒回收目的片段,将回收的目的片段连接至 pMD-19T 载体,并转化至 DH5 α 感受态细胞中。用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆,用 PCR 鉴定阳性克隆菌,并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒(Omega 公司)提取质粒,微量紫外分光光度计测定浓度与纯度,根据下面的公式计算拷贝数。拷贝数(copies/ μ L) = 6.022 $\times 10^{23}$ (copies/mol) $\times$ DNA 浓度(g/ μ L)/质量 MW (g/mol)。其中,MW = DNA 碱基数(bp) $\times$ 660 daltons/bp,DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

1.6 含内标多重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立和条件优化

参照 One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 试剂盒操作说明配制同时检测内标和 MNV 荧光定量 RT-PCR 反应体系,将 MNV 和内标两种 RNA 模板以及各自上游引物、下游引物和 Taqman 探针同时加入反应体系中。采用矩阵法对多重荧光 RT-PCR 反应体系中引物和 TaqMan 探针浓度进行优化,通过比较 Ct 值和荧光强度增加值(绝对荧光强度与背景荧光强度的差值, Δ Rn)来判断优化结果;采用二温循环法对反应的退火温度和循环次数进行优化。为了保证内标荧光通道呈明显的阳性曲线但尽量降低对靶基因检测造成的竞争性抑制而导致假阴性,我们将不同浓度的 MNV 病毒($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L)与不同浓度的内标病毒颗粒($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/反应)提取核酸后,采用棋盘法对内标掺入量进行优化,以能与 MNV 共扩增的最小拷贝数的内标浓度作为反应体系中添加的内标模板浓度。

1.7 特异性试验

采用建立的 qRT-PCR 方法对 MNV、MHV、TMEV、SV、PVM、Reo-3、HV 和 LCMV 的 RNA 进行

检测,验证该方法的特异性。

1.8 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy Dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释,得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。利用 1.6 中优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值,以 Ct 值为纵坐标,以起始模板浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线。

取 100 μL MNV 病毒液(病毒滴度为 1.78×10^6 TCID₅₀/mL),10 倍梯度连续稀释获得 $1.78 \times 10^5 \sim 1.78 \times 10^{-3}$ TCID₅₀/mL 病毒液,采用 Trizol 提取各个梯度的病毒核酸,按上述方法进行检测,测定模板最低检出量,判定该方法的敏感度。同时采用 RT-PCR 方法检测上述样品,进行比对性试验,RT-PCR 的反应体系和参数按参考文献^[4]进行,MNV RT-PCR 产物大小为 187 bp。病毒分离按文献^[8]进行操作。

1.9 重复性试验

对 5 份 10 倍系列稀释的 MNV 样品($1.78 \times 10^3 \sim 1.78 \times 10^{-1}$ TCID₅₀/mL)在同一次反应中进行 5 次重复测定,对各稀释度的 Ct 值进行统计,计算每个样品各反应管之间的批内变异系数(CV%);对上述样品分别进行 5 次测定,计算同一样品每次测定结果之间的批间变异系数(CV%)。

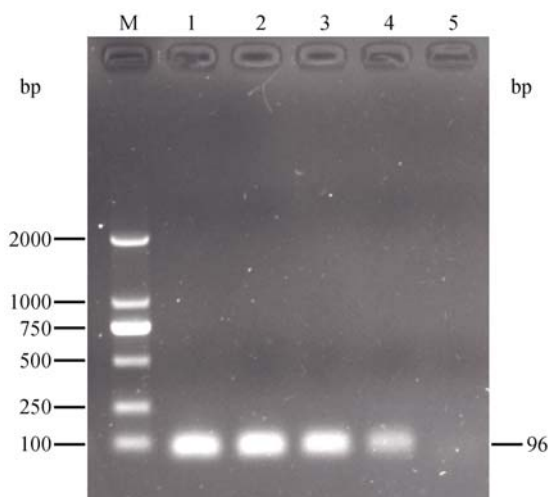
1.10 临床样本的检测

利用 MNV 荧光定量 RT-PCR 对 344 份临床样本进行检测,每份样品均加入内标同步参与样品核酸的提取,每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。对其中 51 份样本同时采用荧光定量 RT-PCR 和普通 RT-PCR 方法进行检测,比较两种方法的阳性检出率。应用荧光定量 RT-PCR 方法对 15 只 BALB/c 和 10 只 ICR MNV 自然感染小鼠粪便、盲肠内容物、肠系膜淋巴结、脾脏、肝脏、心脏、肺脏、肾脏和脑等主要脏器进行检测,查看 MNV 病毒在小鼠体内的分布情况,分析哪些样本是该方法的最佳检测样本。

2 结果

2.1 质粒标准品的制备

用 RT-PCR 扩增 MNV 得到大小约 96 bp 的特异片段,与预期目的片段大小相符(图 1)。与 pMD19-T 载体连接构建重组阳性质粒,对重组质粒进行 PCR 鉴定,条带大小与预期结果相符。重组质粒的测序结果与目的基因序列同源性为 100%,表明质粒标准品制备成功。



注:M: DNA marker DL2000;1~4 泳道: MNV;5 泳道:无模板对照。

图 1 MNV RT-PCR 电泳图

Note: Lane M: DNA marker DL2000; Lane 1~4: MNV; Lane 5: No template control (NTC).

Fig. 1 Electrophoretic analysis of the RT-PCR for MNV

2.2 多重荧光 RT-PCR 反应条件优化

经优化后的双重 RT-PCR 反应体系: $2 \times$ One Step RT-PCR buffer III 10 μL 、Ex Taq HS (5 U/ μL) 0.4 μL 、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL 、MNV 检测上下游引物终浓度均为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、内标上下游引物终浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、MNV RNA 模板 2 μL 、加 RNase free dH₂O 至 20 μL 。反应条件:42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 一个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 45 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸结束后收集荧光。采用优化后的反应条件,在一管内同时检测 MNV 和内标,除检测到 MNV 特异性荧光扩增曲线,检测内标的通道也有特异性扩增曲线产生,表明荧光定量 RT-PCR 正常扩增,可排除假阴性存在,扩增结果见图 2。当内标的浓度为 100 拷贝/反应时有较好的扩增曲线,且不与 MNV 产生较大的相互影响,能够达到体系监测的目的,因此内标模板最佳掺入量为 100 拷贝/反应。

2.3 特异性试验结果

采用建立的荧光定量 RT-PCR 方法对 MNV、MHV、TMEV、SV、PVM、Reo-3、HV 和 LCMV 的 RNA 进行检测,结果除 MNV 为阳性外,其他病毒均为阴性,表明建立的方法具有良好的特异性(图 3)。

2.4 标准曲线的建立及敏感性测定

以重组质粒标准品 10 倍倍比稀释拷贝数 $1 \times$

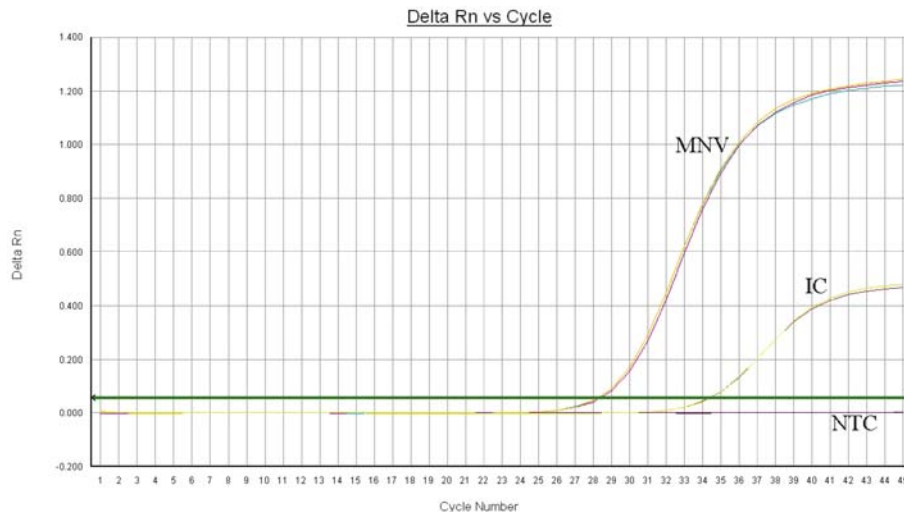


图2 MNV 荧光定量 RT-PCR 检测结果

Fig.2 Results of real-time RT-PCR assay for MNV detection



图3 MNV 荧光定量 RT-PCR 特异性检测结果

Fig.3 Results of specificity test of the real-time RT-PCR assay for MNV

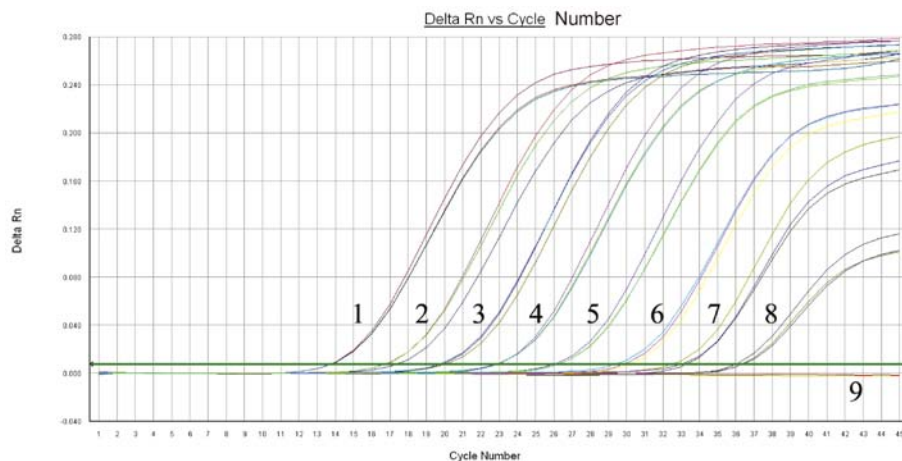
$10^8 \sim 1$ copies/ μL 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增,结果见图 4,可见各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等,无模板对照(no template control, NTC)没有荧光扩增曲线为阴性结果,该方法的最低检测限为 10 copies/ μL 。以标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标,以临界环数(threshold cycle, Ct)为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线,标准质粒在 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 之间具有良好的线性关系,结果见图 5。其线性回归方程为 $\text{Ct} = -3.22 \times \lg(\text{拷贝数}) + 39.41$,标准曲线斜率为 -3.22 ,根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.22} - 1 = 1.045$,即扩增效率为 104.5%,相关系数 $r^2 = 0.9986$,说明 PCR 扩增该标准品的效率较高,线性关系良好,符合制备实时荧光

定量 PCR 标准曲线的要求。

取 100 μL MNV 病毒液($1.78 \times 10^5 \sim 1.78 \times 10^{-3}$ TCID₅₀/mL)分别用荧光定量 RT-PCR、普通 RT-PCR 和病毒分离方法进行检测,结果荧光定量 RT-PCR 方法可以检测到 1.78×10^{-2} TCID₅₀/mL 病毒,普通 RT-PCR 方法可以检测到 1.78×10^{-1} TCID₅₀/mL 病毒,病毒分离方法可以检测到 1.78×10^0 TCID₅₀/mL 病毒。因此荧光定量 RT-PCR 方法的灵敏度是普通 RT-PCR 10 倍,是病毒分离方法的 100 倍。

2.5 重复性试验结果

通过对 5 个稀释度病毒样本进行重复性检测,批内及批间重复性试验的变异系数均小于 2% (表 3),表明建立荧光定量 RT-PCR 方法重复性好,方法



注: 1-8: $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 质粒标准品, 9: 无模板对照。

图 4 10 倍系列稀释质粒标准品的荧光定量扩增曲线

Note: 1~8: from 1×10^8 copies/ μL to 1×10^1 copies/ μL standard plasmid, 9: No template control.

Fig. 4 Amplification plots obtained with 10-fold serial dilutions of the standard plasmid

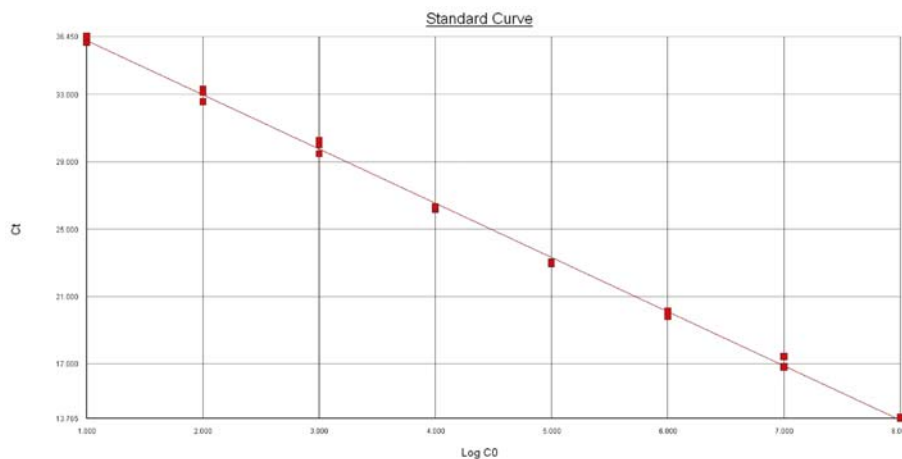


图 5 10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线

Fig. 5 Standard curve is calculated with 8 values ranging from 1×10^8 copies/ μL to 1×10^1 copies/ μL .

稳定可靠。

2.6 临床样本检测结果

应用建立的 MNV 荧光定量 RT-PCR 方法对 344 份样本进行检测, 结果有 103 份为阳性, 阳性率为 29.94%。实验中我们发现 6 份临床样本在荧光 RT-PCR 扩增时 MNV 检测通道和内标监控通道均没有特异性扩增曲线产生, 表明样本中存在 PCR 抑制因子。对核酸进一步纯化后重新扩增, 5 份样本内标模板和 MNV 检测均扩增出曲线, 确定这 5 份样本为假阴性, 判为 MNV 阳性。另外 1 份样本内标模板扩增出曲线, 但 MNV 检测没有扩增曲线, 仍判为 MNV 阴性。假阴性的出现表明内标对于 PCR 检测是非常重要的。

采用荧光定量 RT-PCR 和普通 RT-PCR 方法对其中 51 份样品进行检测, 结果显示普通 RT-PCR 检出的阳性率为 39.2% (20/51), 荧光定量 RT-PCR 检出的阳性率为 49.0% (25/51), 说明在临床样本检测中荧光定量 RT-PCR 也比普通 RT-PCR 更敏感。

应用荧光定量 RT-PCR 方法对 MNV 自然感染小鼠主要脏器进行检测, 结果发现粪便和盲肠内容物中检出率最高, 其次是肠系膜淋巴结和脾脏, 小鼠肝脏也可检出 MNV 核酸, 心脏、肺脏、肾脏和脑则未检出 MNV, 结果见表 4。因此在使用 MNV 荧光定量 RT-PCR 方法进行 MNV 检测时, 粪便和盲肠内容物是最佳的待检样本。

表 2 MNV 荧光定量 RT-PCR 方法与普通 RT-PCR 方法、病毒分离方法灵敏度比较

Tab. 2 Comparison of the sensitivity of the real-time RT-PCR assay, conventional RT-PCR method and virus isolation

检测方法 Methods	检测样本 (TCID ₅₀ /mL) Samples								
	1. 78 × 10 ⁵	1. 78 × 10 ⁴	1. 78 × 10 ³	1. 78 × 10 ²	1. 78 × 10 ¹	1. 78 × 10 ⁰	1. 78 × 10 ⁻¹	1. 78 × 10 ⁻²	1. 78 × 10 ⁻³
荧光定量 Fluorescence RT-PCR (Ct)	15. 20	18. 50	21. 48	24. 39	27. 72	31. 23	34. 30	37. 36	>40
普通 RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-
病毒分离 Virus isolation (CPE)	8	8	8	8	8	5	0	0	0

表 3 MNV 荧光定量 RT-PCR 组内和组间重复性试验检测结果

Tab. 3 Intra-batch and inter-batch reproducibility of the real-time RT-PCR for MNV

样本 (TCID ₅₀ /mL) Samples	Ct 值 Ct value					Ct 平均值 Average Ct value	标准差 SD	变异系数 CV/%
	1	2	3	4	5			
Intra-batch								
1. 78 × 10 ³	21. 40	21. 72	21. 33	21. 40	21. 48	21. 47	0. 15	0. 71
1. 78 × 10 ²	24. 29	24. 41	24. 47	24. 40	24. 35	24. 38	0. 07	0. 28
1. 78 × 10 ¹	27. 53	27. 76	27. 87	27. 75	27. 73	27. 73	0. 12	0. 44
1. 78 × 10 ⁰	31. 18	31. 42	31. 07	31. 00	31. 21	31. 18	0. 16	0. 51
1. 78 × 10 ⁻¹	34. 35	34. 03	34. 52	34. 32	34. 59	34. 36	0. 22	0. 63
Inter-batch								
1. 78 × 10 ³	21. 45	21. 25	21. 78	21. 67	21. 55	21. 54	0. 20	0. 95
1. 78 × 10 ²	24. 21	24. 01	24. 87	24. 67	24. 88	24. 53	0. 40	1. 62
1. 78 × 10 ¹	27. 70	27. 15	27. 80	27. 64	27. 99	27. 66	0. 30	1. 13
1. 78 × 10 ⁰	31. 14	31. 02	32. 14	31. 71	32. 08	31. 62	0. 52	1. 64
1. 78 × 10 ⁻¹	34. 15	33. 57	35. 13	34. 94	34. 87	34. 53	0. 65	1. 89

表 4 MNV 病毒在自然感染小鼠脏器中的分布

Tab. 4 Distribution of MNV in the organs of naturally infected mice

品系 Strain	粪便 Feces	盲肠内容物 Cecal contents	肠系膜淋巴结 Mesenteric lymph nodes	脾脏 Spleen	肝脏 Liver	心脏 Heart	肺脏 Lung	肾脏 Kidney	脑 Brain
BALB/c	15/15	15/15	11/15	8/15	5/15	0/15	0/15	0/15	0/15
ICR	10/10	10/10	6/10	6/10	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10

3 讨论

自 2003 年 Karst^[1] 首次报道 MNV 以来, MNV 成为目前实验小鼠病毒中感染率最高的一种病毒。MNV 感染的诊断主要通过检测血清中是否存在抗 MNV 抗体的血清学方法, 包括 ELISA 和 IFA。此外, Hsu 利用流式荧光微球检测技术 (MFIA) 建立了一种高通量的新型血清学检测方法^[9]。RT-PCR 方法也是诊断 MNV 感染的有效方法^[10], 主要用于检测病原 MNV 的存在。该方法可以直接检测多种样本如粪便、器官和组织等, 但由于需要将 PCR 扩增产物进行电泳, 因而很容易产生 PCR 产物气溶胶的污染问题, 造成假阳性, 而且该方法在灵敏度和检测时间上也存在缺陷。荧光定量 PCR 操作简便, 快速高效, 具有较高的灵敏度和特异性, 并且不需 PCR 后处理, 大大降低了污染的可能性, 因其显著的优越

性, 已被国内外广泛应用于临床诊断。Kitajima 等^[11]报道了利用荧光定量 RT-PCR 检测 MNV, 本研究与该方法相比, 由于引入“内标”的设计, 可避免因测试样本中存在的 RT-PCR 反应抑制因子而导致的假阴性结果, 因而明显优于 Kitajima 等的设计。已有的研究表明, 由于样品中存在大量复杂的未知成分, 以及样品处理过程中, 一些物质的残留会影响 PCR 扩增, 或样品处理过程中核酸的丢失, 均可使反应测得的灵敏度降低甚至造成假阴性结果^[12]。在 PCR 反应体系中加入内标可以指示假阴性的扩增, 由于内标与样本在同一管中进行扩增, 所有影响扩增的因素都同时影响内标与样本, 因此 PCR 检测无论是定性试剂还是定量试剂, 只有含有内标测定的结果才更真实, 这一点已经成为有关专家的共识^[13]。本研究选择了一段 λ DNA 序列作为内标检测的外源基因, 采用装甲 RNA (Armored

RNA) 技术^[14,15], 利用载体上 MS2 噬菌体的外壳蛋白基因合成的外壳蛋白将其装配成球状 RNA 病毒结构的 RNA-蛋白质复合物, 即 RNA 病毒样颗粒, 该病毒样颗粒可以模拟临床标本中病毒核酸的提取过程, 从而对核酸提取这一过程进行有效质控。

本研究以 MNV 高度保守的 ORF1-ORF2 结合区域为靶基因设计引物和探针, 特异性实验表明, 该方法只能够检测到 MNV, 与其他小鼠病毒均没有交叉反应。灵敏度结果表明, 该方法检测质粒标准品和 MNV 病毒的灵敏度分别达到 10 copies/μL 和 1.78×10^{-2} TCID₅₀/mL, 所构建的标准曲线显示具有高扩增效率。与其他方法进行灵敏度比较, 结果该方法的灵敏度比常规 RT-PCR 高 10 倍, 比病毒分离方法高 100 倍。重复性实验表明批内和批间的变异系数均小于 2%, 方法稳定可靠。利用该方法对临床收集的 344 份盲肠内容物和粪便样品进行检测, 发现有 5 份 (1.5%) 样本存在抑制成分。PCR 抑制发生的概率虽然比较低, 但假阴性的出现表明内标对于 PCR 检测是非常重要的。MNV 主要经粪-口途径传播, 研究发现小鼠经口接种 MNV 后通过粪便持续地向外排毒, 至少在感染后 8 周仍可以从粪便和组织中检测到病毒核酸, 有很强的持续性感染特征^[9,10], 我们应用荧光定量 RT-PCR 方法对 MNV 自然感染小鼠的粪便和主要脏器进行检测, 结果发现粪便和盲肠内容物中 MNV 阳性检出率高于其他器官组织。因此在使用 MNV 荧光定量 RT-PCR 方法进行 MNV 检测时, 粪便和盲肠内容物是最佳的待检样本。本研究建立的 MNV 荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性强、敏感性高、重复性好, 由于加入了内标, 能有效地监控假阴性的出现, 适合用于 MNV 日常监测、临床诊断和流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. *Science*, 2003, 299 (5612): 1575–1578.
- [2] Lencioni KC, Seamons A, Treuting PM, et al. Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease [J]. *Comp Med*, 2008, 58 (6): 522–533.
- [3] Paik J, Fierce Y, Drivdahl R, et al. Effects of murine norovirus infection on a mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Comp Med*, 2010, 60 (3): 189–195.
- [4] 袁文, 张钰, 刘忠华, 等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 20 (2): 78–82.
- [5] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Lab Anim*, 2009, 43 (2): 165–173.
- [6] Goto K, Hayashimoto N, Yasuda M, et al. Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice [J]. *Exp Anim*, 2009, 58 (2): 135–140.
- [7] Kim M, Lee H, Chang KO, et al. Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea [J]. *Virus Res*, 2010, 147 (1): 1–6.
- [8] 袁文, 张谱华, 王静, 等. 小鼠诺如病毒分离鉴定及病毒衣壳蛋白 (VP1) 基因测序分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21 (6): 18–25.
- [9] Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice [J]. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, 12 (10): 1145–1151.
- [10] Hsu CC, Riley LK, Wills HM, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses [J]. *Comp Med*, 2006, 56 (4): 247–251.
- [11] Kitajima M, Oka T, Takagi H, et al. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses [J]. *J Virol Methods*, 2010, 169 (2): 269–273.
- [12] Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (5): 1863–1868.
- [13] Gruber F, Falkner FG, Dörner F, et al. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification internal standardization, and two-color fluorescence detection [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (6): 2837–2839.
- [14] Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, et al. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36 (12): 3590–3594.
- [15] WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois D B, et al. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus [J]. *Clin Chem*, 1999, 45 (12): 2079–2085.

[收稿日期] 2014-07-30