

# 小鼠脑脊髓炎病毒 RT-PCR 方法的建立及初步应用

李晓波, 付 瑞, 王 吉, 卫 礼, 王淑菁, 岳秉飞, 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** 建立小鼠脑脊髓炎病毒 RT-PCR 方法并对方法进行初步应用。**方法** 根据 NCBI 发表的 TMEV GD VII 株(GI:62039)基因组序列设计特异引物,建立 RT-PCR 方法,验证方法的敏感性和特异性;脑腔接种方式感染 9 只 BALB/c 小鼠,感染后第 6 天采集动物的脑、心、肝、脾、肺、肾、盲肠内容物和血清等样本,用建立的方法进行检测;同时检测 100 份小鼠盲肠内容物样本,对方法进行初步应用。**结果** 以 GD VII RNA 为模板,建立的 RT-PCR 方法能够扩增出约 371bp 的单一目的条带,敏感性验证显示能够检测到的最低 GD VII cDNA 量为 0.69pg/ $\mu$ L;以脑心肌炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、日本乙型脑炎病毒、小鼠诺如病毒及正常小鼠脑组织为对照进行方法特异性验证,均未出现目的条带。脑腔接种感染小鼠,所有小鼠在接种第 3 天均产生不同程度的精神萎靡后肢麻痹等症状,其中 2 只小鼠于第 5 天死亡;采集心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物及血清等样本进行检测,所有小鼠的脑组织均检测到 GD VII RNA,而其他组织均未检测到;对 100 份小鼠盲肠内容物进行检测,结果均为阴性。**结论** 建立的 TMEV GDVII 株 RT-PCR 方法能够高效的检测小鼠组织中的病毒感染,可作为实验动物国家标准的有力补充。

**【关键词】** Theiler 氏脑脊髓炎病毒;GDVII;脑腔接种;逆转录-聚合酶链式反应

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2015)10-0017-04  
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.004

## Development and application of RT-PCR for detection of TMEV

LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, WEI Li, WANG Shu-jing, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To develop RT-PCR for detection of TMEV and apply the method. **Methods** To design specific primers on the basis of GD VII(GI:62039) genome sequences published in NCBI and establish RT-PCR. To verify the sensitivity and specificity of method after optimizing PCR. We infected 9 BALB/c mice intracerebrally and collected brain, heart, liver, spleen, lung, kidney, cecal contents and serum samples the 6<sup>th</sup> day postinfection. The samples were tested by the TMEV RT-PCR. 100 mouse cecal contents samples were also detected to apply the established method. **Results** The 371bp single band was amplified using GDVII as template. Sensitivity test showed that the RT-PCR method can detect as low as 0.69 pg/ $\mu$ L GDVII cDNA. There were no objective band amplified when encephalomyocarditis virus, lymphocytic choriomeningitis virus, Japanese B encephalitis virus, murine norovirus and normal mouse brain tissue were used as case-control. All infected mice showed symptom of different degrees such as depression and hind limb paralysis the 3th day postinoculation and two of infected mice died the 5th day postinoculation. Tissues such as heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, cecal contents and serum were collected and tested for TMEV. All the brain samples were detected positive for GDVII and other tissues were all negative; The 100 cecal contents samples were tested and all were negative.

**【基金项目】** 国家科技支撑计划“实验动物质量监测体系的完善与检测关键技术研究”(2013BAK11B00)。

**【作者简介】** 李晓波(1980-),助理研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail:lx8493059@163.com。

**【通讯作者】** 贺争鸣(1957-),研究员,研究方向:实验动物微生物学。E-mail:zhengminghe57@163.com。

**Conclusions** RT-PCR for TMEV GDVII strain can detect virus infection in mouse tissues efficiently and can be used as a powerful supplement for the national standard of lab animal.

**【Key words】** TMEV; GDVII; Intracerebral inoculation; RT-PCR

小鼠脑脊髓炎病毒 (mouse encephalomyelitis virus, MEV) 又称 Theiler 氏小鼠脑脊髓炎病毒 (theiler's mouse encephalomyelitis virus, TMEV), 分类上属于小 RNA 病毒科, 肠道病毒属, 主要侵害小鼠中枢神经系统, 多数呈隐性感染, 有时表现脑脊髓炎和后肢麻痹等症状<sup>[1-3]</sup>。目前已从世界各地分离到多个毒株, 根据其毒力的不同分为两个亚群: 高毒力亚群以 GDVII 和 FA 株为代表, 可引起急性致命性脑炎; 低毒力亚群引起持续的中枢神经系统感染和炎性脱髓鞘<sup>[2,4]</sup>。实验动物国标将 TMEV 列为 SPF 小鼠检测项目之一。

本实验建立了 TMEV 的 RT-PCR 检测方法, 通过对病毒感染动物组织样本的检测以及小鼠自然感染情况的监测, 对方法进行了初步应用, 试验结果表明该方法可以作为动物中 TMEV 检测的常规方法, 是对实验动物国标检测技术的有力补充。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

逆转录试剂为 Sigma 产品; PCR 相关试剂购自 Takara 公司; RNA 提取试剂盒为 QIAGEN 产品;

Trizol 试剂为 invitrogen 公司产品; 氯仿、异丙醇等其他化学试剂为北京化工。

### 1.2 病毒毒株

TMEV GDVII 株购自 ATCC, 小鼠脑心肌炎病毒 (mouse encephalomyocarditis virus, EMCV)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCM)、乙型脑炎病毒 (Japanese B encephalitis virus, JEV) 及鼠诺如病毒 (murine norovirus, MNV) 均为本室保存。

### 1.3 BALB/c 小鼠

SPF 级, 3 周龄, 雌性, 共 10 只, 来自本院动物供应室【SCXK(京)2014-0013】, 使用许可证号【SYXK(京)2011-0008】。

### 1.4 动物样本

100 份小鼠盲肠内容物样品来自 2014 年 10 月北京市实验动物会检各实验动物生产单位。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 引物的设计

根据 NCBI 发表的 TMEV GDVII 株 (GI:62039) 基因组序列, 选取保守区域设计引物 (表 1)。

表 1 GD VII RT-PCR 引物

Tab.1 Primers for the GD VII RT-PCR

引物名称	序列(5'至3')	基因组中的位置	产物长度
TMEVF1	GCCGTCAGTCTGTTTATTC	5071	371bp
TMEVR1	GGAGCCAGGTATTCATC	5441	

1.5.2 病毒 RNA 的提取: TMEV GDVII 株 BHK21 细胞培养物经三次冻融后, 分别取 200 $\mu$ L 按试剂盒的操作说明提取 RNA, 其他对照病毒也按照该方法进行。

1.5.3 RT-PCR 方法的建立及反应条件优化: 首先逆转录提取的 TMEV RNA, 再进行 PCR 扩增, 对 PCR 反应体系 dNTP 浓度、DNA 聚合酶量、引物浓度及退火温度等进行优化, 确定最佳反应条件。

1.5.4 敏感性测定: 紫外分光光度法测定 TMEV cDNA 模板浓度, 然后进行  $10^{-1} \sim 10^{-10}$  系列稀释, 用建立的 PCR 方法进行扩增, 检测方法的灵敏度。

1.5.5 特异性测定: 分别以 TEMV, EMCV, LCM, JEV, MNV 及正常小鼠脑组织所提取的 RNA 为模板, 用建立的 RT-PCR 方法进行扩增, 验证方法的特

异性。

#### 1.5.6 初步应用

1.5.6.1 感染试验: 10 只 BALB/c 小鼠, 9 只脑腔注射 30  $\mu$ L TMEV 病毒液, 另外 1 只作为 PBS 对照, 逐日观察, 于感染后第 6 天对所有动物施行安乐死, 取心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物和血清等样本, 心、肝、脾、肺、肾、脑等组织用 Trizol 试剂法提取 RNA, 盲肠内容物和血清参照 1.5.2 用 RNA 试剂盒提取 RNA, 随后用建立的 RT-PCR 方法进行扩增。

1.5.6.2 样本筛查: 100 份小鼠盲肠内容物, 取 100 mg 加入 900  $\mu$ L 灭菌 PBS, 漩涡震荡后 10000 r/min 离心 5 min, 取 200  $\mu$ L 上清按试剂盒说明提取 RNA, 随后用建立的 RT-PCR 方法进行扩增。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 反应体系及条件

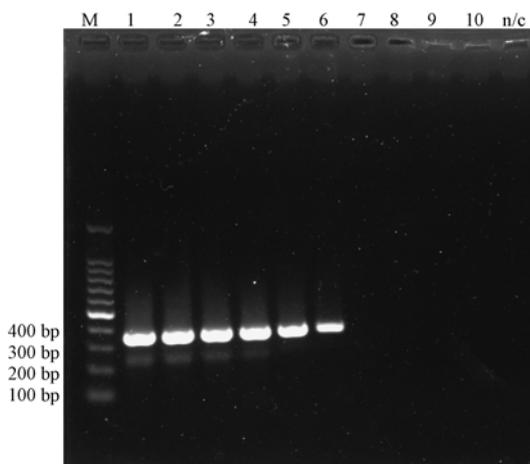
25  $\mu\text{L}$  逆转录体系包括 5  $\times$  RT buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTP 4  $\mu\text{L}$ , 随机引物 1  $\mu\text{L}$ , 逆转录酶和 RNA 酶抑制剂各 0.5  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 8  $\mu\text{L}$ , 无 RNA 酶水 6  $\mu\text{L}$ ; 逆转录反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$  90 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  5 min 各 1 个循环。优化后的 PCR 反应体系为 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , HS Taq 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 最后加灭菌双蒸水补至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。

### 2.2 PCR 产物测序

提取 TMEV GD VII 株细胞培养物 RNA, 用建立的双重 PCR 方法进行扩增, 产物送上海生工进行测序, 序列经 NCBI Blast 比对, 符合率均为 99%。

### 2.3 敏感性测定

紫外分光法测得 TMEV cDNA 模板浓度为 690 ng/ $\mu\text{L}$ , 由图 1 可见, 建立的 TMEV RT-PCR 方法所能检测的最大稀释度为  $10^{-6}$ , 即该方法所能检测的最低 cDNA 浓度为 0.69 pg/ $\mu\text{L}$ 。



注: M: 100 bp marker; 1~10 分别为 TMEV cDNA  $10^{-1}$  ~  $10^{-10}$  稀释。

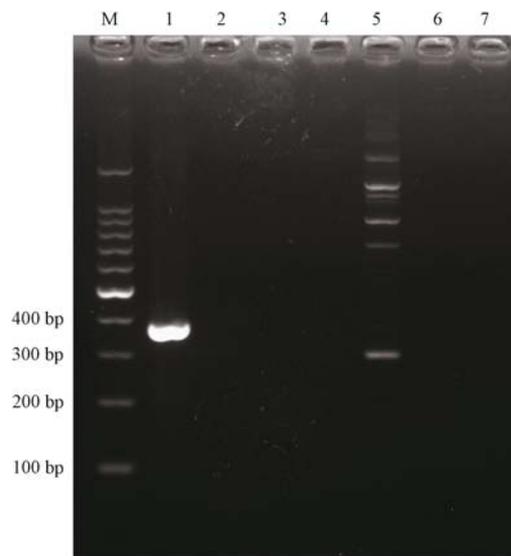
图 1 TMEV RT-PCR 方法敏感性

Note: M: 100 bp marker; 1 to 10:  $10^{-1}$  to  $10^{-10}$  dilution of TMEV cDNA.

Fig. 1 Sensitivity of TMEV RT-PCR

### 2.4 特异性测定

用建立的 RT-PCR 方法分别扩增 TMEV, EMCV, LCM, JEV, MNV 及正常小鼠脑组织, 结果以 TMEV 为模板产生 371 bp 的特异条带, 以其他对照病毒及正常小鼠脑组织为模板均不产生特异条带 (图 2)。



注: M: 100 bp marker; 1~7 分别为: TMEV、EMCV、LCM、JEV、MNV、正常小鼠脑组织、灭菌  $\text{ddH}_2\text{O}$ 。

图 2 TMEV RT-PCR 方法特异性

Note: M: 100 bp marker; 1 to 7: TMEV, EMCV, LCM, JEV, MNV, normal mouse brain tissue, sterile  $\text{ddH}_2\text{O}$ .

Fig. 2 Specificity of TMEV RT-PCR

### 2.5 初步应用

#### 2.5.1 感染实验

感染小鼠于感染第 3 天产生不同程度的临床症状, 比较对照小鼠表现为明显发育不良, 后肢麻痹、精神萎靡 (图 3), 其中 2 只小鼠于感染后第 5 天死亡。对感染小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、盲肠内容物及血清等组织样本进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 所有小鼠脑组织均产生 371 bp 的目的条带, 其他组织均未出现目的条带 (部分结果见图 4)。对脑组织 PCR 产物测序, 结果经 NCBI 比对, 与 TMEV (GI: 62039) 的符合率为 100%。

2.5.2 样本筛查: 对会检的 100 份小鼠盲肠内容物进行 TMEV RT-PCR 扩增, 结果均为阴性。

### 3 讨论

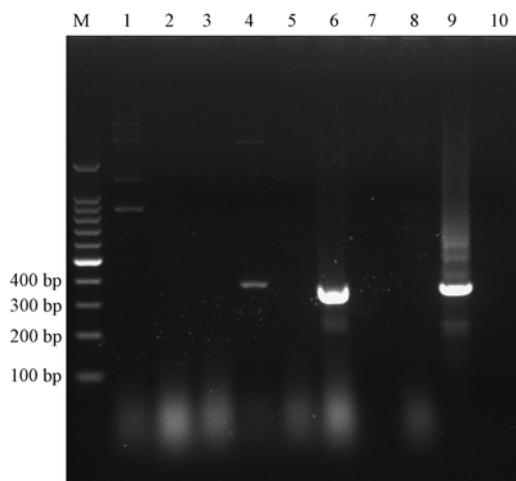
脑脊髓炎病毒在动物中的感染时有报道, 不仅能够感染小鼠, 也可以感染大鼠, 且感染率较高<sup>[5-10]</sup>。实验动物国标中 TMEV 的检测方法主要为血清学方法, 本实验建立了 TMEV 的 RT-PCR 方法, 与以往报道的分子生物学方法相比<sup>[11]</sup>, 不需要进行后续的探针检测, 用时短, 且敏感性更高, 特异性更好。

参考文献报道<sup>[12]</sup>, 本实验在脑腔注射感染小鼠的过程中采用眼角斜上方浅进针 (2 mm) 的方式进



图 3 感染小鼠后肢瘫痪

Fig. 3 Hind legs paralyzed of infected mouse



注: M: 100 bp marker; 1~8: 心、肝、脾、肺、肾、脑、血清、盲肠内容物; 9: 阳性对照; 10: 灭菌 ddH<sub>2</sub>O。

图 4 感染小鼠组织 RT-PCR 扩增结果

Note: M: 100 bp marker; 1 to 8: Heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, serum, cecal contents; 9: Positive control; 10: Sterile ddH<sub>2</sub>O.

Fig. 4 The results of RT-PCR for tissues of infected mice

行注射,减少了对动物脑部的损伤。实验用的 TMEV 毒株为强毒株 GDVII,感染动物在第 3 天均出现明显的临床症状,变现为后肢瘫痪、震颤等,其中 2 只于感染第 5 天死亡。用建立的 RT-PCR 方法对感染小鼠的组织进行检测,所有感染动物的脑组织均检测到 GDVII 核酸,在肺组织产生约 400 bp 的非特异条带,经测序排除了 TMEV,其他组织均未检测到,这与之前的报道结果一致<sup>[13-14]</sup>,可能病毒未通过血脑屏障,因而未感染到其他器官。

对 100 份小鼠的盲肠内容物样本进行 TMEV 的筛查,结果均为阴性,初步表明近年北京地区实验动物中 TMEV 的控制情况良好。

综上所述,我们建立的 TMEV RT-PCR 方法具

有良好的敏感性和特异性,可以作为实验动物国标的补充检测方法。

#### 参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 农业出版社, 1992:99-104.
- [2] Downs WG. Mouse encephalomyelitis virus. In: Foster HL, Small JD, Fox JG ed. The mouse in biomedical research, vol. II [M]. New York: Academic Press, 1982. 341-352.
- [3] Lipton HL, Rozhon EJ. The Theiler's murine encephalomyelitis viruses. In: Bhatt PN, Jacoby RO, Morse HC, et al. Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research[M]. London: Academic Press Inc, 1986. 253-275.
- [4] Lipton HL. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination[J]. Infect. Immun, 1975, 11:1147-1155.
- [5] Roble GS, Gillespie V, Lipman NS. Infectious disease survey of *Mus musculus* from pet stores in New York City[J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2012, 51:37-41.
- [6] Hansen AK, Thomsen P, Jensen HS. A serological indication of the existence of a guinea pig poliovirus[J]. Laboratory Animals, 1997,31:212-218.
- [7] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Microbiological survey of mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japan [J]. Experimental Animals, 2014, Advance Publication:1-15.
- [8] Lipton HL, Kim BS, Yahikozawa H, et al. Serological evidence that *Mus musculus* is the natural host of Theiler's murine encephalomyelitis virus[J]. Virus Research, 2001,76:79-87.
- [9] Rodrigues DM, Martins SS, Gilioli R, et al. Theiler's murine encephalomyelitis virus in nonbarrier rat colonies [J]. Comparative Medicine, 2005,55(5):459-464.
- [10] Dammann P, Hilken G, Hueber B, et al. Infectious microorganisms in mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Germany [J]. Laboratory Animals, 2011,45:271-275.
- [11] Zoll J, Galama J, Melchers W. Molecular identification of cardiomyoviruses by enzymatic amplification [J]. Molecular and Cellular Probes, 1993,7:447-452.
- [12] 李慧,王春华,罗珊,等. 关于小鼠脑内不同注射手法的探讨 [J]. 实验动物科学,2013,30(2):48-50.
- [13] Trotter M, Schlitt BP, Lipton HL. Enhanced detection of Theiler's virus RNA copy equivalents in the mouse central nervous system by real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2002,103:89-99.
- [14] Shaw-Jackson C, Michiel T. Absence of internal ribosome entry site-mediated tissue specificity in the translation of a bicistronic transgene[J]. J Virol, 1999,73(4):2729-2738.

(修回日期)2015-08-31