



# 转基因小鼠常见传染病血清学液相芯片技术多重检测方法 的建立

陈 诚, 朱科燕, 褚燕青, 齐月寒, 蔡月琴\*

(浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

**【摘要】** **目的** 制备小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片, 建立转基因小鼠传染病抗体的 xMAP 多重检测方法。**方法** 将荧光微球分别与小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白进行偶联, 并且对最佳蛋白偶联量、检测抗体最佳工作浓度和 Streptavidin-PE 最佳工作浓度进行优化, 制备小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片, 对 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行 xMAP 多重检测。并应用传统的 ELISA 方法对 xMAP 检测结果进行验证。**结果** 1) 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白的最佳偶联量分别为 20  $\mu\text{g}$ 、20  $\mu\text{g}$ 、40  $\mu\text{g}$  和 20  $\mu\text{g}$ , 检测抗体最佳浓度分别为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Streptavidin-PE 抗体最佳浓度均为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (2) xMAP 检测结果显示, 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠血清 MHV MFI 值和 index 值均高于质控血清, 其余小鼠血清的 MFI 值和 index 值均低于质控血清, 表明 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性, 其余小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体阴性; (3) ELISA 检测结果显示, 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV A450 值和 index 值均高于质控血清, 其余小鼠血清的 A450 值和 index 值均低于质控血清, 表明 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性, 其余小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体阴性, 该 ELISA 检测结果与 xMAP 检测结果相一致。**结论** 建立的 xMAP 多重检测技术可应用于转基因小鼠的传染病检测。

**【关键词】** 转基因小鼠; 传染病; xMAP 技术; 液相芯片

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0030-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.09.006

## Establishment of a flexible multi-analyte profiling assay to detect common infectious disease antibodies in the serum of transgenic mice

CHEN Cheng, ZHU Ke-yan, CHU Yan-qing, Qi Yue-han, CAI Yue-qin\*

(Animal Experiment Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish a multiplex xMAP assay for detection of infectious disease antibodies in the serum of transgenic mice by liquid chips of mouse MHV, LCM, ECT and HANT proteins. **Methods** The fluorescent microspheres were conjugated with mouse MHV, LCM, ECT and HANT proteins, and the amount of protein-conjugates and the working concentrations of antibodies and Streptavidin-PE were optimized, respectively. The liquid chips of mouse MHV, LCM, ECT and HANT were prepared and used to detect the antibodies in the serum samples from 56 transgenic mice, together with the negative, positive and control serum, by the multiplex xMAP assay. The results of xMAP assay were verified by traditional ELISA. **Results** (1) The optimal conjugated amount of mouse MHV, LCM, ECT and HANT

[基金项目] 浙江省科技计划项目(编号:2015C37111); 浙江中医药大学比较医学创新团队(编号:XTD201301)。

[作者简介] 陈诚(1987-), 男, 助理实验师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: 15158050921@163.com

[通讯作者] 蔡月琴(1982-), 女, 高级实验师, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cyq810@hotmail.com

protein was 20  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ , 40  $\mu\text{g}$  and 20  $\mu\text{g}$ , respectively. The optimal concentration of their detection antibodies was 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the optimal concentration of Streptavidin-PE for all of them was 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (2) The results of xMAP assay showed that the MFI and index values of the serum samples from the No. 14, No. 23, No. 55 and No. 56 transgenic mice detected with the liquid chip of MHV were higher than those of the control serum, while other MFI and index values were lower than those of the control serum, indicating that the antibodies of MHV were positive in the No. 14, No. 23, No. 55 and No. 56 transgenic mice and negative in the other mice, and the antibodies of LCM, ECT and HANT were negative in all of the mice. (3) The results of ELISA showed that the A450 and index values of MHV in the No. 14, No. 23, No. 55 and No. 56 transgenic mice were higher than those of the control serum, while other A450 and index values were lower than those of the control serum, indicating that the antibodies of MHV were positive in the No. 14, No. 23, No. 55 and No. 56 transgenic mice and negative in the other mice, and the antibodies of LCM, ECT and HANT were negative in all of the mice. These ELISA results were consistent with the results of the xMAP assay. **Conclusions** The multiplex xMAP assay established in this study can be used in the detection of infectious disease antibodies in transgenic mice.

**【Key words】** Transgenic mice; Infectious diseases; Flexible multi-analyte profiling, xMAP; Liquid chip

xMAP 技术 (flexible multi-analyte profiling), 又称液相芯片技术, 该技术的核心是将微球用荧光染色进行编码, 然后将每种编码微球共价交联上针对特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等捕获分子, 把针对不同检测物的编码微球混合, 再加入微量待检样本, 在悬液中靶分子与微球表面交联的捕获分子发生特异性结合, 最后通过仪器的激光分别识别微球的编码和检测微球上报告分子的荧光强度<sup>[1, 2]</sup>。

转基因动物已成为当今生命科学中一个发展最快、最热门的领域, 用转基因动物的方法构建人类疾病模型可为研究提供理想的动物模型, 但是目前转基因小鼠的微生物质量不容乐观, 这将严重危害人类健康和科研实验<sup>[3, 4]</sup>。根据对实验小鼠的致病性和对实验人员的危害来看, 必须对小鼠肝炎病毒 (mouse hepatitis virus, MHV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCM)、鼠痘病毒 (ectromilia virus, ECT)、汉坦病毒 (Hantaan virus, HANT) 进行监测, 排除此类病原体<sup>[5-8]</sup>。本研究拟通过制备 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白芯片, 建立快速、高通量的血清学多重 xMAP 技术, 并用 ELISA 方法验证, 为最终建立转基因小鼠的传染病监测体系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

56 只转基因小鼠, 其中 1~22 号于 2016 年 3 月从国内某动物研究所引进, 23~56 号于 2015 年分批从国外实验室引进, 均饲养于浙江中医药大学实验研究中心屏障级转基因动物隔离饲养室 [SYXK (浙) 2013-0184], 温度 (22±2) °C, 相对湿度 40%~60%。

### 1.2 实验试剂

体外重组的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白以及 biotin 标记的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体均购自武汉华美公司; 荧光标记的链霉亲和素 (Streptavidin-PE) 购自 Invitrogen 公司; 活化剂 EDC、Sulfo-NHS 购自 Thermo 公司; 96 孔 PVDF 滤膜板购自 Millipore 公司; 荧光微球、鞘液、Bio-Plex 校正试剂盒均购自 Bio-Rad 公司; 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 阴性血清、阳性血清和质控血清以及 ELISA 试剂盒均购自 Smart 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品制备

分别从新引进的转基因小鼠尾巴取适量血, 置于 1.5 mL 离心管中, 4°C, 3000 r/min, 离心 10 min, 分离血清, -20°C 冻存。

#### 1.3.2 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片的制备

一种编码的荧光微球对应偶联一种蛋白, 30 号、36 号、47 号和 56 号 4 种荧光微球, 分别与体外重组亲和纯化的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白进行偶联, 每种蛋白设置 4 个梯度 (分别为 10、20、40 和 80  $\mu\text{g}$ )。荧光微球经 S-NHS、EDC 活化液室温避光活化 30 min, 分别与 10、20、40 和 80  $\mu\text{g}$  的 MHV 蛋白偶联, 在垂直旋转仪上室温避光偶联 2 h, 已偶联蛋白的微球加 1% BSA 封闭 1 h, 该微球即为制备的小鼠 MHV 单重液相芯片, 于 4°C 避光保存, 用于后期效率验证。

按照以上制备方案, 将 36 号荧光微球与 LCM 蛋白偶联, 47 号荧光微球与 ECT 蛋白偶联, 56 号荧光微球与 HANT 蛋白偶联制备液相芯片。

#### 1.3.3 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片制

## 备的验证及蛋白最佳偶联量的确定

将制备的小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片与 PE 抗体直接反应,阴性孔加入未偶联蛋白的微球作为阴性对照,在 Bio-Plex 200 液相悬浮芯片系统上检测荧光值。MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片的荧光值超过 2000 荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI),阴性对照孔低于 100 MFI,即可认为偶联成功。每组芯片中,选取与最高蛋白浓度差异无显著性的蛋白量作为最佳偶联量。

### 1.3.4 检测抗体和 Streptavidin-PE 最佳工作浓度的确定

用 1% PBSB 溶液分别将 biotin 标记的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体稀释成 4 个浓度组,分别为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,Streptavidin-PE 稀释成 3 个浓度组,分别为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每组 3 个复孔,采用棋盘滴定法确定最佳检测抗体浓度和 Streptavidin-PE 工作浓度。

### 1.3.5 小鼠血清 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体的 xMAP 检测

用制备的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片,对 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行 xMAP 检测。取 PVDF 滤膜板,同一反应孔分别加入 100  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  个) MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片微球,用 PBST 溶液洗涤两次,25  $\mu\text{L}$  小鼠血清,室温避光慢摇 (450 r/min) 60 min,洗涤 3 次,加入混合的 biotin 标记的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 检测抗体,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,室温避光慢摇 (450 r/min) 60 min,洗涤 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  Streptavidin-PE,室温避光慢摇 (450 r/min) 30 min,洗涤 3 次,在液相悬浮芯片系统上机检测荧光值,得到每个样品的 MFI 值,小鼠血清样品的 index = 血清样品的 MFI 值/质控血清的 MFI 值。

### 1.3.6 小鼠血清 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体的 ELISA 验证

分别用 MHV、LCM、ECT 和 HANT 进口 ELISA 检测试剂盒对同一批 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行检测。分别取 50  $\mu\text{L}$  阴性血清、阳性血清、稀释后的小鼠血清样品和质控血清加入到包被 MHV 抗体的酶标板孔中,按照 MHV 试剂盒说明书操作,最后在多功能酶标仪上检测 A450。按照以上操作方法,用 LCM、ECT 和 HANT ELISA 检测试剂盒对同一批 56 个转基因小

鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行检测。

### 1.4 统计学方法和结果判定

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计,计量资料均采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有显著性。小鼠血清样品的 index = 血清样品的净 FI 值/质控血清的净 FI 值,或小鼠血清样品的 index = 血清样品的 A450 值/质控血清的 A450 值,按照 ELISA 试剂盒说明书的判定标准,小鼠血清样品的 index  $< 1.0$  判定为阴性, index  $\geq 1.0$  则判定为阳性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片制备的验证和最佳偶联量的确定

MHV、LCM、ECT 和 HANT 阴性孔的荧光值分别为 16.2 MFI、10.5 MFI、12.0 MFI 和 9.8 MFI,均低于 100 MFI。表 1 显示,在 MHV、LCM、ECT 和 HANT 中,4 组偶联量的荧光值均大于 2000 MFI,表明 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片制备成功。

表 1 可以看出,在 MHV、LCM 和 HANT 芯片中,20  $\mu\text{g}$  组、40  $\mu\text{g}$  组、80  $\mu\text{g}$  捕获抗体组的 MFI 值均显著高于 10  $\mu\text{g}$  组 ( $P < 0.01$ ),40  $\mu\text{g}$  组、80  $\mu\text{g}$  组与 20  $\mu\text{g}$  组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ );在 ECT 芯片中,40  $\mu\text{g}$  组、80  $\mu\text{g}$  捕获抗体组的 MFI 值均显著高于 10  $\mu\text{g}$  组和 20  $\mu\text{g}$  组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),40  $\mu\text{g}$  组与 80  $\mu\text{g}$  组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。根据以上优化试验,MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白的最佳偶联量分别为 20、20、40 和 20  $\mu\text{g}$  捕获抗体。

### 2.2 小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 检测抗体最佳工作浓度的确定

Biotin 标记的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 检测抗体稀释为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4 组,表 2 结果显示,在 MHV、LCM 和 ECT 中,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的 MFI 值均显著高于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 ( $P < 0.01$ ),4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组与 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组差异无显著性 ( $P > 0.05$ );在 HANT 中,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的 MFI 值最高,显著高于 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。据此, MHV、LCM、ECT 和 HANT 检测抗体最佳工作浓度分别为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**表 1** MHV、LCM、ECT 和 HANT 不同蛋白偶联量的荧光值 (MFI)

**Tab. 1** Fluorescence intensity of the conjugates with different amounts of MHV, LCM, ECT and HANT proteins

组别 Groups	10 μg 捕获抗体 10 μg-captured antibody	20 μg 捕获抗体 20 μg-captured antibody	40 μg 捕获抗体 40 μg-captured antibody	80 μg 捕获抗体 80 μg-captured antibody
MHV	10563.55 ± 287.35	14703.18 ± 263.42**	15051.22 ± 313.89**	15094.51 ± 369.86**
LCM	8566.40 ± 275.66	11761.69 ± 204.38**	11951.51 ± 284.63**	11894.21 ± 359.74**
ECT	8164.52 ± 289.76	11073.05 ± 305.46**	12679.83 ± 360.85**#	12882.59 ± 381.50**#
HANT	8930.74 ± 206.33	11656.60 ± 243.16**	12041.29 ± 379.44**	12067.18 ± 367.43**

注:与 10 μg 蛋白偶联量组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 20 μg 蛋白偶联量组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the group of 10 μg-captured antibody, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; Compared with the group of 20 μg-captured antibody, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

**表 2** MHV、LCM、ECT 和 HANT 不同检测抗体浓度的荧光值 (MFI)

**Tab. 2** Fluorescence intensity of different concentrations of detection antibody groups in MHV, LCM, ECT and HANT

组别 Groups	0.5 μg/mL 检测抗体 0.5 μg/mL detection antibody	1 μg/mL 检测抗体 1 μg/mL detection antibody	2 μg/mL 检测抗体 2 μg/mL detection antibody	4 μg/mL 检测抗体 4 μg/mL detection antibody
MHV	7590.41 ± 187.03	10107.60 ± 279.54**	14396.83 ± 205.97***	14803.42 ± 285.37***
LCM	7933.75 ± 274.81	10275.88 ± 248.57**	12063.37 ± 269.52***	12254.60 ± 250.79***
ECT	6389.05 ± 310.79	8646.38 ± 307.46**	11640.55 ± 297.04***	12059.38 ± 328.41***
HANT	6507.83 ± 264.39	9042.44 ± 305.30**	11601.72 ± 311.76***	12553.79 ± 301.22***Δ

注:与 0.5 μg/mL 检测抗体组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 1 μg/mL 检测抗体组相比, ## $P < 0.01$ ; 与 2 μg/mL 检测抗体组相比, Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the group of 0.5 μg/mL detection antibody, \*\* $P < 0.01$ ; Compared with the group of 1 μg/mL detection antibody, ## $P < 0.01$ ; Compared with the group of 2 μg/mL detection antibody, Δ $P < 0.05$ .

**表 3** MHV、LCM、ECT 和 HANT 不同 Streptavidin-PE 抗体浓度的荧光值 (MFI)

**Tab. 3** Fluorescence intensity of different concentrations of Streptavidin-PE for MHV, LCM, ECT and HANT detection

组别 Groups	1 μg/mL Streptavidin-PE	2 μg/mL Streptavidin-PE	4 μg/mL Streptavidin-PE
MHV	10249.58 ± 361.41	15316.47 ± 320.64**	15625.60 ± 427.55
LCM	8538.00 ± 345.62	12743.17 ± 380.44**	12944.07 ± 411.43
ECT	8164.59 ± 270.40	13352.73 ± 365.49**	13806.92 ± 481.35
HANT	7839.32 ± 265.81	12409.55 ± 326.17**	12663.27 ± 375.24

注:与 1 μg/mL Streptavidin-PE 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 2 μg/mL Streptavidin-PE 组相比, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with 1 μg/mL Streptavidin-PE, \*\* $P < 0.01$ ; Compared with 2 μg/mL Streptavidin-PE, ## $P < 0.01$ .

### 2.3 Streptavidin-PE 最佳工作浓度的确定

Streptavidin-PE 浓度有 1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL 3 组,由表 3 可见,在 MHV、LCM、ECT 和 HANT 中,2 μg/mL、4 μg/mL 组的 MFI 值均显著高于 1 μg/mL 组( $P < 0.01$ ),4 μg/mL 组与 2 μg/mL 组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。表明, MHV、LCM、ECT 和 HANT 的最佳 Streptavidin-PE 抗体浓度均为 2 μg/mL。

### 2.4 小鼠血清 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体的 xMAP 检测结果

14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠血清的 MHV MFI 值分别为 18813.88、16924.57、20780.34 和 13659.18, index 值分别为 2.6823、2.4130、2.9627 和 1.9474,均高于质控血清的 MFI 值(7014.04)和 index 值(1.0000),表明 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性;1~13 号、

15~22 号、24~54 号转基因小鼠血清的 MHV MFI 值和 index 值均低于质控血清的 MFI 值和 index 值,表明这些转基因小鼠 MHV 抗体阴性。1~56 号转基因小鼠血清的 LCM、ECT 和 HANT 的 MFI 值和 index 值均低于质控血清的 MFI 值和 index 值,表明这些转基因小鼠 LCM、ECT 和 HANT 抗体阴性。

### 2.5 小鼠血清 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体的 ELISA 方法验证

分别用进口 MHV、LCM、ECT 和 HANT ELISA 试剂盒对同一批 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行检测,得到每个样品的 A450 值,小鼠血清样品的 index = 血清样品的 A450 值/质控血清的 A450 值。14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠血清的 MHV A450 值分别为 3.3127、3.0113、3.6234 和 2.4365, index 值分别为 2.5437、2.3122、2.7822 和 1.8709,均高于质控血清

的 A450 值(1.3023)和 index 值(1.0000),表明 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性;1~13 号、15~22 号、24~54 号转基因小鼠血清的 MHV A450 值和 index 值均低于质控血清的 A450 值和 index 值,表明这些转基因小鼠 MHV 抗体阴性。1~56 号转基因小鼠血清的 LCM、ECT 和 HANT 的 MFI 值和 index 值均低于质控血清的 A450 值和 index 值,表明这些转基因小鼠 LCM、ECT 和 HANT 抗体阴性。

由此表明,转基因小鼠血清的 MHV、LCM、ECT 和 HANT 抗体 ELISA 结果与 xMAP 检测结果相一致。

### 3 讨论

在医学研究中,利用转基因动物建立各种人类疾病的动物模型,为深入研究疾病的发病机理以及基因治疗创造了前所未有的条件<sup>[9, 10]</sup>。目前,国内使用的转基因实验动物主要以小鼠为主,大部分转基因小鼠通过代购或者自行携带方式从国外输入,由于受饲养环境控制条件不同等限制,转基因小鼠的微生物质量存在着严重的问题。由于多数感染病毒的转基因小鼠早期缺乏特异的临床表现,必须依赖实验室进行诊断,常用的血清学检测方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)<sup>[11, 12]</sup>。ELISA 这种传统检测方法的主要缺点在于每个反应仅能对标本的一种传染病指标进行检测,且操作耗时较长、成本较高、血清样本使用量较大,不适用于转基因小鼠多种传染病的多重检测和快速诊断。

xMAP 技术即多功能多指标同步分析技术,提供了一个高通量的多重分子检测技术平台<sup>[13]</sup>。xMAP 技术与传统的 ELISA 检测方式有很大的区别,该技术可以在一种反应体系中放入许多不同编码的荧光微球,多种微球可以标记上多种不同的蛋白,每种荧光微球对应一种传染病待测指标,因此 xMAP 技术同时可对一份血清样品进行多种分析指标的检测,标本利用率大大提高,从而实现样品量少的转基因动物血清的高通量分析<sup>[14, 15]</sup>。本研究应用了 30 号、36 号、47 号和 56 号 4 种微球,分别与 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白进行共价偶联,并且对小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 悬浮芯片制备中的最佳蛋白偶联量进行了优化,发现小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 蛋白的最佳偶联量分别为 20  $\mu\text{g}$ 、20  $\mu\text{g}$ 、40  $\mu\text{g}$  和 20  $\mu\text{g}$ ,表明每种蛋白的最佳偶

联量存在差异,因此每个蛋白必须确定其最佳偶联量。此外本研究对小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 检测抗体最佳工作浓度和 Streptavidin-PE 最佳工作浓度进行优化,选取与最高 MFI 值组无显著性差异的抗体浓度作为检测抗体和 Streptavidin-PE 的最佳工作浓度。

根据上述优化的条件,制备小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 液相芯片,对 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行 xMAP 检测,发现阴性血清 MHV、LCM、ECT 和 HANT 中的 index 值均低于 1.0,阳性血清的 index 值均高于 1.0,表明该 xMAP 检测结果可信。从结果中看出,只有 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠血清 MHV 的 index 值均高于 1.0,表明 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性。此外分别用进口小鼠 MHV、LCM、ECT 和 HANT 的 ELISA 检测试剂盒对同一批 56 个转基因小鼠血清样品、阴性血清、阳性血清和质控血清进行一一检测,发现只有 14 号、23 号、55 号和 56 号转基因小鼠 MHV 抗体阳性,其余为阴性,该 ELISA 检测结果与 xMAP 检测结果相一致。

这些结果表明本研究建立的 xMAP 多重检测技术可应用于转基因小鼠的传染病检测,可对一份少量的血清样品进行多种传染病指标的检测,克服了 ELISA 每个反应仅能检测一种传染病指标的缺点,从而实现转基因小鼠传染病抗体的高通量分析,为建立转基因小鼠的传染病监测体系奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Simonova MA, Valyakina TI, Petrova EE, et al. Development of xMAP assay for detection of six protein toxins [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(15): 6326-6330.
- [2] Thierry S, Derzelle S. Multiplexed genotyping of *Bacillus anthracis* by Luminex xMAP suspension array [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1247: 401-412.
- [3] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice [J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 407-411.
- [4] Li LP, Lampert JC, Chen X, et al. Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire [J]. *Nat Med*, 2010, 16(9): 1029-1034.
- [5] Van Cuong N, Carrique-Mas J, Vo Be H, et al. Rodents and risk in the Mekong Delta of Vietnam; seroprevalence of selected zoonotic viruses in rodents and humans [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2015, 15(1): 65-72.
- [6] Parker S, Crump R, Foster S, et al. Co-administration of the

- broad-spectrum antiviral, brincidofovir (CMX001), with small-pox vaccine does not compromise vaccine protection in mice challenged with ectromelia virus [J]. *Antiviral Res*, 2014, 111: 42 - 52.
- [ 7 ] Islam MM, Toohey B, Purcell DF, et al. Suppression subtractive hybridization method for the identification of a new strain of murine hepatitis virus from xenografted SCID mice [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(12): 2945 - 2955.
- [ 8 ] Ma C, Wang Z, Li S, et al. Analysis of an outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in college students in Xi'an, China [J]. *Viruses*, 2014, 6(2): 507 - 515.
- [ 9 ] Todd JA. Intolerable secretion and diabetes in tolerant transgenic mice, revisited [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(5): 476 - 477.
- [10] 叶廷巧, 马双陶, 李丹, 等. 钙蛋白酶抑制蛋白转基因小鼠的构建和鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(4): 47 - 51.
- [11] Plastino M, Fava A, Pirritano D, et al. Effects of insulinic therapy on cognitive impairment in patients with Alzheimer disease and diabetes mellitus type-2 [J]. *J Neurol Sci*, 2010, 288 (1 - 2): 112 - 116.
- [12] Sims-Robinson C, Kim B, Rosko A, et al. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(10): 551 - 559.
- [13] Bongoni AK, Lanz J, Rieben R, et al. Development of a bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of porcine inflammation markers using xMAP technology [J]. *Cytometry A*, 2013, 83(7): 636 - 647.
- [14] Wang LS, Leung YY, Chang SK, et al. Comparison of xMAP and ELISA assays for detecting cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 31(2): 439 - 445.
- [15] Codorean E, Nichita C, Albuлесcu L, et al. Correlation of XMAP and ELISA cytokine profiles; development and validation for immunotoxicological studies *in vitro* [J]. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 2010, 69(1): 13 - 19.

[收稿日期]2017 - 01 - 04

## ·专家问答·

问:关于活体成像穿透深度的问题,比如做荧光、生物发光等实验,活体成像穿透力大概的极限值是多少?

答:目前市面上活体光学成像的设备品牌非常多,基于其物理原理,各家在穿透深度的问题上都没有办法百分之百解决。有最新产品强调用激光来做激发光,由于激光能量比较强,因而穿透深度也比较深,但还是没有办法彻底解决。我们目前有两个解决方式,一个是光声断层扫描系统;另一个是用近红外光做激发,因为近红外光波长比较长,所以能量比较强,可以解决穿透深度的问题。

(感谢第四军医大学实验动物中心 师长宏 教授、冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇先生 的解答)