研究报告

三种小鼠肠道病毒核酸检测技术在小鼠健康监测中的应用

李欣悦,佟　巍,丛日旭,郭　智,蔡　鹃,阮研硕,向志光*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京　100021)

【摘要】 **目的**　应用核酸检测技术检测小鼠盲肠内容物中 MHV、Reo-3、MNV 三种肠道病毒,并与血清学检测结果相比较,分析核酸检测在小鼠健康监测中的适用性。**方法**　随机选取本实验室接收的小鼠盲肠内容物样品,提取核酸,应用荧光定量 PCR 技术检测 MHV、Reo-3、MNV 三种肠道病毒;并与其血清学抗体检测结果做关联分析。**结果**　在 272 份样品中,MHV、Reo-3、MNV 三种肠道病毒检出率分别为 17.3%,18.8%,16.9%;MHV、Reo-3 核酸检出量多呈低拷贝状态;与血清学抗体检测结果的关联分析表明 3 种病毒的核酸检测结果与抗体检测结果不完全相关。**结论**　实验动物小鼠群体中存在携带 MHV,Reo-3,MNV 三种病毒的可能,作为血清学抗体检测技术的补充,核酸检测可作为高敏感性的方法应用于实验动物群体的健康监测。

【关键词】 MHV;Reo-3;MNV;荧光定量 PCR;健康监测

【中图分类号】R-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2018) 08-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.08.008

Application of nucleic acid detection techniques for three mouse enteroviruses in mouse health monitoring

LI Xinyue, TONG Wei, CONG Rixu, GUO Zhi, CAI Juan, RUAN Yanshuo, XIANG Zhiguang*

(Institute of Laboratory Animals, CAMS/PUMC, Beijing 100021, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To detect three kinds of enterovirus in mouse cecal contents by nucleic acid detection techniques, and analyze the result of nucleic acid detection compared with serological tests to determine the applicability of nucleic acid detection for the health monitoring of mice. **Methods**　Samples of mouse cecal contents from our laboratory were randomly selected to extract nucleic acids. Real-time PCR was used to detect the three enteroviruses MHV, Reo-3, and MNV in these samples. Nucleic acid detection result and serological antibody test result were correlated and analyzed. **Results**　Among the 272 samples, the nucleic acid-positive rates for MHV, Reo-3, and MNV were 17.3%, 18.8%, and 16.9%, respectively. From the detected amounts of nucleic acid of MHV and Reo-3 in samples, they were mostly in a low-copy state. Correlation analysis showed that the nucleic acid detection result were not completely correlated with the result for detecting antibodies to the three viruses. **Conclusions**　It is possible for mice as experimental animals to carry the three viruses MHV, Reo-3, and MNV. As a supplement to serological antibody detection technology, nucleic acid detection can be used as a highly sensitive method to monitor the health of experimental animals.

【**Keywords**】 MHV; Reo-3; MNV; real-time PCR; health monitoring

---

[基金项目]国家重点研发计划(2016YFD0501003);国家重大专项(2017ZX10304402-001-009)。

[作者简介]李欣悦(1992—),女,硕士研究生,研究方向:免疫学。E-mail:446247648@qq.com

[通信作者]向志光(1980—),男,副研究员,博士,研究方向:实验动物学,免疫学。E-mail: xiangzg@cnilas.org

小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV),呼肠孤病毒 III 型(reovirus 3, Reo-3)和小鼠诺如病毒(murine norovirus, MNV)是在实验小鼠中感染率较高的三个病原体,其中 MHV 和 Reo-3 是国内外实验动物微生物质量要求的必须排除的病原体,MNV 虽未列在我国检测标准项目内,但已在国内多次检出[1-6]。目前我国实验动物病毒检测标准主要是采用血清学方法检测动物血清中的抗体,属于回顾性诊断,适用于病毒感染后的检测。PCR 核酸检测技术是对待检样本中病原体的直接检测,其检测结果代表当期实验动物携带病原体情况。而且 PCR 核酸检测技术具有高度的特异性和敏感性,可在实验动物感染病原体初期检测到病原体[7-9]。MHV, Reo-3 和 MNV 属于肠道病毒,经粪便传播,可通过对实验动物盲肠内容物或粪便进行核酸检测。因此病原微生物核酸检测在实验动物健康监测中是非常重要的一部分。本研究对送检本室的实验小鼠的盲肠内容物样品检测上述三种病毒,并与血清学检测结果进行了关联分析,分析核酸检测在实验动物健康监测中的适用性。

1　材料和方法

1.1　主要试剂和仪器

病毒核酸 DNA/RNA 提取试剂盒(Takara, 9766);相关病毒抗体检测抗原片由本室制备;荧光标记的羊抗小鼠 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-095-003);引物和探针由 Invitrogen 公司合成;一步法逆转录核酸扩增试剂盒 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)(Takara, RR064 A)。

台式离心机(Thermo fisher, Thermo Scientific Heraeus Fresco 21);荧光显微镜(Nikon, ECLIPSE Ni);实时 PCR 系统扩增仪(ABI, 7500 Fast)。

1.2　实验方法

1.2.1　样品的选择和储存

送检本室小鼠随机采样,无菌采集盲肠内容物样品 272 份。每份样品取 0.1 g 小鼠盲肠内容物,储存于 -80℃冰箱。

1.2.2　样品核酸的提取

小鼠盲肠内容物样品恢复至室温,加入 200 μL PBS 溶液涡旋振荡 1 min,经 12 000 r/min 离心 10 min,取 200 μL 上清液用病毒核酸 DNA/RNA 提取试剂盒进行核酸提取。

1.2.3　血清学检测方法和核酸检测方法结果判定

本实验室血清学检测采用间接免疫荧光试验技术检测 MHV, Reo-3 和 MNV 抗体[10-12],以 1:10 稀释小鼠血清样品滴加于抗原片,温育结合,以荧光标记的羊抗小鼠 IgG 结合抗原抗体复合物,使用荧光显微镜观察记录抗原孔荧光信号进行血清学判定。小鼠盲肠内容物样品核酸用探针法实时荧光定量 PCR 检测 MHV, Reo-3 和 MNV 核酸[13],取样品核酸提取物 5 μL,进行一步法逆转录实时定量 PCR,用实时 PCR 系统扩增仪对各样品核酸进行荧光信号检测。以 $1\times10^1 \sim 1\times10^7$ copies/μL 质粒的 CT 值绘制标准曲线,作为样品检出量估算的基础。在同一批次检测试验同时设置空白对照和阳性对照。阳性对照为含有目标核酸序列 10 copies/μL 的质粒。阳性对照品的多通道荧光信号图中显示荧光标记 FAM 信号值呈指数上升,扩增曲线图中荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(cycle threshold, CT)值小于 36;空白对照以水为模板。空白对照的多通道荧光信号图中显示荧光标记 FAM 信号一直为水平线,扩增曲线图中荧光信号在设定的最高循环数 40 以内没有特征性扩增曲线,表明该批检测试验体系无污染。满足上述条件下,待检样品的多通道荧光信号图中显示荧光标记 FAM 信号有增长,在扩增曲线图中有指数增长且曲线光滑,CT 值小于 40,即判定待检样本含有目标病原体核酸。

1.3　统计学方法

对检测结果进行统计分析,以检出率表示。对核酸检出样品 CT 值和检出量分布用 GraphPad Prism 7 作箱式图分析。对血清学技术与核酸检测技术检测结果的分析使用 SPSS 25 软件进行 t 检验独立样本分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　MHV、Reo-3、MNV 三种肠道病毒在小鼠盲肠内容物的病毒核酸检出率和核酸检出量

在 272 份实验小鼠盲肠内容物样品中,MHV、Reo-3、MNV 三种肠道病毒核酸检出率为 17.3%, 18.8%, 16.9%,如图 1A 所示。MHV 核酸检出样品的 CT 值分布在34~40之间,最大值是 39.65,最小值是 34.23,中位数是 37.71,离群样品 CT 值为 33.27, 31.22 和 26.3; Reo-3 核酸检出样品的 CT 值分布在34~39之间,最大值是 39.01,最小值是

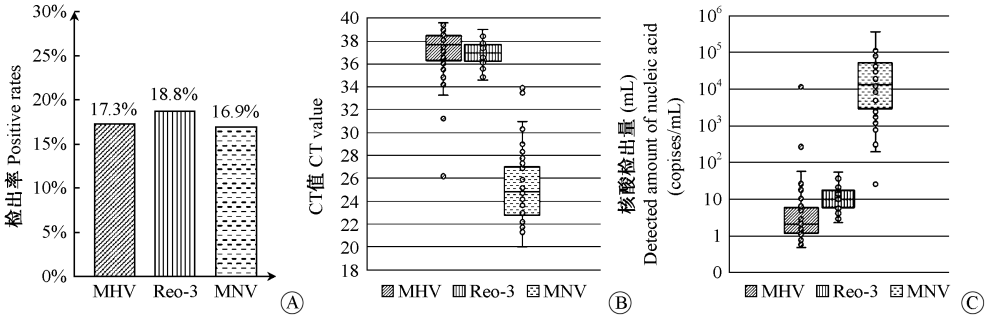


图 1 MHV、Reo-3、MNV 在小鼠盲肠内容物中的病毒核酸检测

Figure. 1 The nucleic acid detection of MHV, Reo-3, and MNV in mouse cecal contents

34.61,中位数是 36.96,无离群样品; MNV 核酸检出样品的 CT 值在 20 ~ 31 之间,最大值是 30.95,最小值是 20.02,中位数是 24.84,离群样品 CT 值为 33.91,33.48,如图 1B 所示。根据三种病毒荧光定量 PCR 方法对 1×10^1 copies/μL ~ 1×10^7 copies/μL 含有病毒靶序列标准质粒测定而绘制的定量标准曲线公式(MHV:CT = −3.075 × X(拷贝数的指数) +38.685;Reo-3:CT = −3.185 × X(拷贝数的指数) +40.16;MNV:CT = −3.347 × X(拷贝数的指数) +38.618)对盲肠内容物样品的核酸检出量进行估算,MHV 检出样品的核酸检出量多分布在0 ~ 100 copies/μL 范围内,另有 3 份样品在 10^2 ~ 10^4 copies/μL 之间,Reo-3 检出样品的核酸检出量多分布在 1 ~ 100 copies/μL 范围内;MNV 检出样品的核酸检出量多分布在100 ~ 10^5 copies/μL 范围,另有 2 份样品在10 ~ 100 copies/μL 之间,如图 1C 所示。综上,MHV 和 Reo-3 在小鼠盲肠内容物中的病毒核酸检出量较低,在1 ~ 100 copies/μL 之间,而 MNV 病毒核酸检出量较高,在100 ~ 10^5 copies/μL 之间。

2.2 MHV、Reo-3、MNV 三种病毒核酸检测结果与血清学结果关联分析

本研究抽取的小鼠盲肠内容物样品有 254 份存在可比较的 MHV、Reo-3 血清抗体检测结果,有 243 份存在 MNV 血清抗体检测结果。其核酸检测结果与血清学结果汇总见表 1。MHV 核酸检出率是 16.5%(42/254),抗体阳性率是 1.2%(3/254),核酸检出阳性样品对应的血清学结果均为抗体阴性,抗体阳性结果对应的核酸检测结果为阴性;Reo-3 的核酸检出率是 18.1%(46/254),抗体阳性率是 1.2%(3/254),核酸检出阳性样品对应的血清学结果均为抗体阴性,抗体阳性结果对应的核酸检测结果为阴性;MNV 的核酸检出率为 15.6%(38/243),抗体阳性率是 14.8%(36/243)。在 36 份血清学抗体阳性的对应盲肠内容物样品中,对应有 24 份 MNV 核酸检出;在 207 份血清学抗体阴性的对应盲肠内容物样品中,对应有 14 份 MNV 核酸检出。对上述 2 组样品的 MNV 检出的 CT 值做统计分析(CT 值分布见图 2),在 24 份 MNV 抗体阳性组的 MNV 检出的 CT 值与 14 份在 MNV 抗体阴性组的 MNV 检出的 CT 值差异无显著性($P = 0.177$, $P > 0.05$)。由此得出,针对免疫应答所产生抗体的血清学检测结果与针对病毒核酸的小鼠盲肠内容物样品核酸检测结果不完全一致,不存在相互替代的关系。

3 讨论

3.1 小鼠盲肠内容物病毒核酸低拷贝检出的情况

小鼠盲肠内容物样品核酸检测结果显示,MHV、Reo-3 检出样品的 CT 值大部分在 34 ~ 40 范围内,部分 MNV 检出样品的 CT 值在 31 ~ 33 之间,接近或低于阳性对照的 CT 值。(MHV 阳性对照品的 CT 值均值为 35.18,Reo-3 阳性对照品的 CT 值均值为 35.62,MNV 阳性对照品的 CT 值均值为 33.7。)三种病毒目标扩增序列分别 108 bp,67 bp,

表 1 MHV、Reo-3、MNV 的小鼠盲肠内容物核酸检测及血清学检测

Table. 1 Nucleic acid detection in cecal contents and serological tests of MHV, Reo-3, and MNV

病毒 Virus	检测结果 Results		PCR +	PCR −
MHV	Ab +	3	0	3
	Ab −	251	42	209
Reo-3	Ab +	3	0	3
	Ab −	251	46	205
MNV	Ab +	36	24	12
	Ab −	237	14	193

注:"PCR"代表核酸检测结果;"Ab"代表血清检测结果;"+"代表阳性;"−"代表阴性。

Note. "PCR" means the results of nucleic acid detection in mice cecal contents. "Ab" means the results of serological test. "+" means positive. "−" means negative.

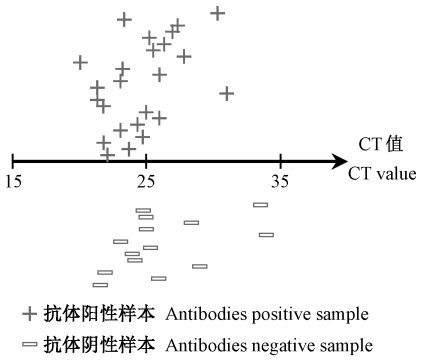


图 2　MNV 抗体阳性和抗体阴性对应的核酸检出样品 CT 值的分布

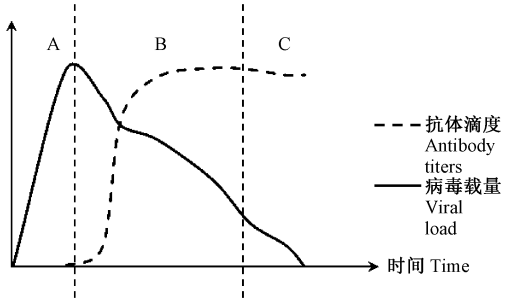
Figure. 2　Distribution of CT values of samples with detected nucleic acid corresponding to antibodies positive and negative for MNV

96 bp,其引物和探针的序列已经覆盖目标序列的 60% 以上,具备高度特异性。且空白对照品在 40 个检测循环内无特异扩增曲线,可保证检测反应体系无污染,当检测样品在 40 个检测循环内出现了特异性扩增曲线,则判为病毒核酸阳性,此种判定方法具有较高的准确性。

在本次小鼠盲肠内容物样品核酸检测中,根据定量标准曲线估算,MHV、Reo-3 核酸检出量范围在 1 ~ 100 copies/μL 之间,MNV 病毒核酸检出量范围在 100 ~ 10^5 copies/μL 范围内。在抗体阴性对应的小鼠盲肠内容物样品中也有核酸检出(MHV 42/251,Reo-3 46/251,MNV 14/237),表明在实验动物群体中可能存在 MHV,Reo-3,MNV 的潜伏感染。

3.2　在实验动物健康监控中核酸检测与血清学方法互为补充

本研究结果显示,MHV 血清学检出率较低(3/254),而血清学检测阳性的 3 份样品核酸检测却为阴性;但是在血清学阴性的 251 份样品中核酸检测阳性率为 42/251。Reo-3 的检测结果类似。MNV 两种检测方法似乎有一些相关性:在血清学阳性的 36 份样品中,核酸检测阳性的占比为 2/3(24/36);血清学阴性的 207 份样品中,核酸检测阴性的占比 193/207。但是这种相关性较低,同时对检出样品分析血清学阳性与阴性之间核酸检出量,也无统计学差异,在此次样品调查中,存在血清学结果为阴性对应的盲肠内容物样品有核酸检出阳性的情况,这说明血清学不能完全反映实验动物当期病原体携带情况。核酸检测结果与血清学抗体检测结果不完全相关,分析这种检测结果的差异,一方面,这与病原感染时实验动物体内病毒载量和血清抗体滴度的消长规律相关,如图 3 所示:在病原体感染早期,病毒存在指数级的扩增,但动物机体的特异性体液免疫应答在感染最初阶段未能快速激活,因此,针对病原免疫抗体的血清学检测方法存在一定的窗口期(A 阶段);理论上存在一个期限,此阶段体液免疫已被激活,而且病毒的复制在动物机体内仍然存在,这时无论血清学还是核酸检测方法都应能检出(B 阶段);在之后,病毒的复制被控制,而免疫抗体将会维持较长的一段时间(C 阶段)。这种一般规律性的变化是血清学检测方法与针对病原的核酸检测出现差异的一种可能原因。另一方面,核酸检测方法与血清学方法存在各自的敏感性和特异性。一般来说核酸检测方法因为具有指数放大的效应而十分敏感,高敏感性同时也带来了特异性的降低,部分样品的检测可能受多种因素影响而出现假阳性;因而在进行核酸检测时需要对多个检测环节进行质量控制。鉴于此,今后须对两类方法的适用性进行标准化的病原感染研究,从而实现对检测结果的确切理解。



注:A 阶段表示动物携带病原体,但不激发免疫应答,或者动物存在感染但抗体产量未达检测限,使得抗体检测结果为阴性,核酸检出阳性;B 阶段表示动物感染了病原体同时处于排毒阶段,能够同时检测出抗体阳性和核酸阳性;C 阶段表示动物感染过病原体,排出病毒量低于核酸方法检测限时,抗体检出阳性,核酸检测结果为阴性。

图 3　实验动物感染病原体期间病毒载量和抗体滴度变化示意图

Note. Phase A indicates that animals carry pathogens but do not elicit an immune response, or animals have an infection but the amount antibody production does not reach the detection limit. It results in antibody negative and nucleic acid positive; phase B indicates that the animal is infected with the pathogen and is detoxifying, so antibody positive and nucleic acid positive were detected. In the C phase, animals were infected with the pathogen, and then the virus output was lower than the detection limit of the nucleic acid method. This result showed antibody positive and the nucleic acid negative.

Figure. 3　Schematic diagram of viral load and antibody titer changes in laboratory animals infected with virus

对于实验动物微生物质量的监测,一方面需要了解动物的既往感染史,需要使用血清学方法;而对于病原携带状态,以及环境中病原的丰度的检测可使用核酸检测方法。因此在实验动物健康监测中,病原体核酸检测结果与血清学结果互为补充,对实验动物病原潜伏感染或感染过情况予以检测。

参考文献:

[1] 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.

[2] 葛文平, 张旭, 高翔,等. 我国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3): 65-68.

[3] 向志光, 佟巍, 张丽芳,等. 实验动物国家标准中大小鼠微生物检测项目的考量[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 33-39.

[4] 向丹丹, 魏晓锋, 胡建华,等. RT-PCR 检测实验小鼠自然和实验感染鼠诺如病毒[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2013, 31(3): 63-69.

[5] 潘金春, 赵维波, 陈梅玲,等. 2013 年~2015 年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 64-69.

[6] 王翠娥, 陈立超, 周倩,等. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(2): 20-24.

[7] 刘香梅, 赵维波, 袁文,等. ICR 小鼠自然感染小鼠肝炎病毒后抗原抗体的变化[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 37-40.

[8] 罗银珠, 张钰, 何丽芳,等. ICR 小鼠感染呼肠孤病毒Ⅲ型的实验研究[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 27(3): 198-203.

[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] 田胜男, 佟巍, 张丽芳,等. 小鼠诺如病毒间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 58-62.

[11] 王吉, 卫礼, 岳秉飞,等. 呼肠孤病毒Ⅲ型免疫荧光检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 1-4.

[12] GB/T 14926.52-2001, 实验动物 免疫荧光试验[S]. 2001.

[13] 李欣悦, 佟巍, 张丽芳,等. 三种小鼠 RNA 病毒样品储运条件对核酸检测的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 98-102.

〔收稿日期〕2018-03-19

(下接第 55 页)

[17] Huang Z, Zhang L, Feng X, et al. A new in vivo method to retard progression of intervertebral disc degeneration through stimulation of endogenous stem cells with simvastatin [J]. Med Hypotheses, 2017, 101: 65-66.

[18] Hu MH, Hung LW, Yang SH, et al. Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture [J]. Artif Organs, 2011, 35(4): 411-416.

[19] 黄泽楠,冯新民,王静成,等. 辛伐他汀调控内源性干细胞进行退变椎间盘的内源性修复和重建 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(5): 809-814.

[20] Liu Z, Li C, Meng X, et al. Hypoxia-inducible factor-lα mediates aggrecan and collagen Π expression via NOTCH1 signaling in nucleus pulposus cells during intervertebral disc degeneration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 488(3): 554-561.

[21] 於绍龙,刘丹平,赵辉,等. 表达 HIF1α~(mu) EPCs 增强 BMP2 转染 BMSCs 成骨及成血管能力 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35(3): 295-302.

〔收稿日期〕2018-03-21