文章编号:1000-5404(2014)16-1679-05

论著

小鼠肝炎病毒反向斑点杂交检测方法的建立及初步应用

赵婷婷[1],严 磊[1],魏立雯[2],韦 莉[3],王会娟[1],谭 毅[1],赖国旗[1] (400016 重庆,重庆医科大学实验动物中心[1];646000 四川 泸州,泸州医学院科技处实验动物中心[2];400065 重庆,重庆市中药研究院[3])

[摘要] **目的** 建立一种反向斑点杂交方法(reverse dot blots, RDB)以检测小鼠肝炎病毒。**方法** 用MHV四个毒株分别感染L929细胞,收获病毒提取RNA并逆转录成cDNA;根据MHV保守区基因组序列设计引物和探针,将上游引物5′端用生物素标记。进行PCR扩增,应用PCR产物进行反向斑点杂交,优化杂交条件,进行稳定性、特异性和灵敏度实验,建立反向斑点杂交法。用此法和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)对41只小鼠进行检测。RDB检测结果阳性样本进行T载体克隆测序。**结果** 试剂条4 ℃保质期为8个月。分别检测MHV、金黄色葡萄球菌、沙门菌和乙型肝炎病毒,仅MHV为阳性,RDB特异性为100%,且MHV PCR产物最低检测限为5 ng/μL。41只小鼠经本方法检测后,有5只MHV阳性,分布于3个群,而ELISA检测结果有5只阳性,分布于2个群,阳性样本T载体克隆测序结果与RDB检测结果一致。**结论** 该方法具有简洁明了、稳定可靠、特异性好、灵敏度高等优点,可应用于实验动物小鼠肝炎病毒的检测。

[关键词] MHV;实验动物;反向斑点杂交
[中图法分类号] R-332;R373.21;R394-33 [文献标志码] A

Establishment and preliminary application of reverse dot blotting for detection of murine hepatitis virus

Zhao Tingting[1], Yan Lei[1], Wei Liwen[2], Wei Li[3], Wang Huijuan[1], Tan Yi[1], Lai Guoqi[1] ([1] Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Experimental Animal Center, Division of Science and Technology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [3]Chongqing Institute of Traditional Chinese Medical, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a method for detection of murine hepatitis virus (MHV) by reverse dot blotting (RDB). **Methods** L929 cells were infected with 4 MHV strains separately. MHV was harvested and RNA was extracted for reverse transcription to obtain cDNA. Primers and specific probes were designed on the basis of conserved sequence of MHV and forward primer was labeled with biotin. The method of RDB was developed using polymerase chain reaction (PCR) products. The stability, specificity and sensitivity of RDB were evaluated. In addition, 41 mice were tested by RDB and ELISA. The positive samples tested by RDB were detected by cloning and sequencing. **Results** The test strip of RDB could be kept at 4 ℃ for 8 months. The specificity of RDB was 100% for MHV (when testing with *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* and hepatitis B virus) and the limit of detection was down to 5 ng/μL MHV PCR products. In 41 mice tested by RDB, there were 5 MHV-positive mice distributed in three groups. But by ELISA, there were five MHV-positive mice distributed in 2 groups. The results by cloning and sequencing were consistent with the positive samples tested by RDB. **Conclusions** RDB is simple, reliable, sensitive and specific for identification of MHV of laboratory animals.

[**Key words**] murine hepatitis virus; laboratory animals; reverse dot blotting

Supported by the Construction Project of Science and Technology Innovative Capacity of Chongqing Commission of Science and Technology (CSTC2010CB5013). Corresponding author: Lai Guoqi, Tel: 86-23-68486187, E-mail: a68895078@21cn.com

[基金项目] 重庆市科委科技创新能力建设项目(CSTC2010CB5013)
[通信作者] 赖国旗,电话:(023)68486187, E-mail:a68895078@21cn.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140623.1642.003.html(2014-06-23)

小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)属日冕冠状病毒科冠状病毒属,为一线性不分段的单股正链RNA病毒。以其不同的嗜组织性将MHV分为呼吸

株病毒(Respiratory MHV strain)和嗜肠株病毒(Enter tropic MHV strain)[1-2]。前者较常见有MHV-S、MHV_1、MHV_2、MHV_3、A_{59}、JHM等;后者较常见有MHV-S、MHV-U、MHV-Y、MHV-RI、DVIM、LIVIM等。国家标准规定MHV的检测包括MHV_1、MHV_3、JHM、A_{59}四个毒株。MHV感染常为隐形或潜伏性,引起小鼠致死性病毒肝炎、病毒性脑炎和病毒性肠炎,有些小鼠甚至会有神经性病变、自身免疫系统混乱、呼吸器官衰竭和基因突变等病变表现。MHV感染将影响实验动物健康及生命,同时也严重制约了动物实验结果的准确性,国家标准规定MHV是清洁级小鼠必检且需排除的病原体之一,及时检出MHV具有重要意义。

目前,检测MHV感染常见方法有很多,如,病毒分离与电镜观察、血清学检测、RT-PCR、逆转录环介导等温扩增检测技术(RT-LAMP),免疫胶体金技术和直接测序等[3-5]。其中,病毒分离和电镜观察,因分离病毒复杂繁琐,不利于日常监测,血清学检测灵敏性不高,检测对象不能为潜伏感染或免疫缺陷者,RT-PCR和免疫胶体金技术特异性低,RT-LAMP法判断结果的指标缺乏客观性,且RT-LAMP和免疫胶体金技术在实验动物MHV检测的推广应用中尚不成熟,另直接测序要求样本浓度较大,周期长,仪器较昂贵,基层检测单位推广应用较困难。故准确有效、特异灵敏的检出MHV对实验动物质量控制尤显重要。

本实验探讨一种利用RT-PCR技术结合反向斑点杂交技术检测小鼠肝炎病毒的新方法。

1 材料与方法

1.1 病毒与动物血清标本

MHV_1、A_{59}、JHM均购自美国菌种保藏中心(ATCC),MHV_3、乙型肝炎病毒、沙门菌和金黄色葡萄球菌由本中心保存;L929细胞购自中国典型培养物保藏中心细胞库;41只小鼠为重庆地区各生产单位送检的清洁级小鼠,其中KM 3个群,分别为:8、8、7只;C_{57}BL/6 2个群,BALB/c 1个群,分别为:6只,并按实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。

1.2 试剂与仪器

胎牛血清、1640培养基购自Gibco公司;胰蛋白酶购自Hyclone公司;大肠杆菌*E. coli* DH5α、*Taq* DNA酶、pMD 18-T载体、柱式液体样品总核酸抽提试剂盒、RNA提取试剂盒、DNA提取试剂盒和RT-PCR试剂盒均购自TaKaRa公司;硝酸纤维膜购自Millipore公司;链霉亲和素碱性磷酸酶(SA-AP)购自Promega公司;牛血清白蛋白(BSA)购自Spain公司;BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;ELISA试剂盒购自中国药品生物制品检定所。细胞培养箱、低温离心机购自Thermo Scientific公司;1000-Series Thermal Cyclers PCR仪、购自Bio-Rad公司;CL-1000 Ultraviolet Crosslinker购自基因有限公司;恒温培养振荡器购自上海智城分析仪器制造有限公司;NANODROP 2000购自Thermo公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计 根据MHV_1、MHV_3、A_{59}、JHM核糖核酸序列保守区相同序列部分设计2对通用引物和2个探针(表1),并与基因库进行同源性比对,与其他生物序列无同源性,上游引物5′端修饰生物素,由Invitrogen公司合成。

表1 MHV引物及探针

引物名称	引物序列
P1(外上游引物)	5′-bio-CGACAGGGAAGGGATTGCTGA-3′
P2(外下游引物)	5′-CTGCAGACAACAAGGTCATGC-3′
P3(内上游引物)	5′-bio-CTCAAACTCCCATCGCCTCTG-3′
P4(内下游引物)	5′-CCGCACAAGCAGCCCTAAAGA-3′
探针Ⅰ	5′-dC-ATCAAAGTAGAACGCA-dC-3′
探针Ⅱ	5′-dC-CACATATGAGACACAA-dC-3′

1.3.2 MHV培养并收获 将L929细胞于含10% FBS的1640培养液,37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,待细胞长至约50%,将MHV病毒液[Titer:10(5.75)TCID]200 μL加入培养瓶中与培养液混匀,连续培养3~5 d,将原培养液和新鲜培养液按1∶1混合,传代培养;待病变达+++ ~ ++++,将细胞用胰蛋白酶消化离心,用PBS悬浮,于-80 ℃与37 ℃反复冻融3次,4 ℃ 2 000 r/min离心15 min,取上清4 ℃ 10 000 /min离心45 min,取上清即为MHV病毒液,置-80 ℃保存备用。

1.3.3 MHV RNA提取并逆转录 取200 μL MHV病毒液,按柱式液体样品总核酸抽提试剂盒说明书提取RNA并定量。按RT-PCR试剂盒,逆转录为cDNA,反应体系为10 μL,其中2 μL 5×Primer Script® Buffer(for Real-Time),0.5 μL Primer Script® RT Enzyme Mix 1,0.5 μL Oligo dT Primer(50 μmol/Lol/L),2 μL Random 6mers(100 μmol/L),400 ng Total RNA,RNase Free ddH_2O补足。反应条件为42 ℃×15 min,85 ℃×5 s,-20 ℃储存备用。

1.3.4 MHV PCR扩增及T载体克隆

1.3.4.1 PCR扩增 扩增体系为50 μL,其中25 μL 5×Primix *Taq*,1 μL 25 μmol/L的上下游引物,150 ng MHV cDNA,ddH_2O补足。扩增条件为:94 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,51 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,30个循环;72 ℃延伸7 min。P1、P2扩增得765 bp目的片段,P3、P4扩增得625 bp目的片段,将扩增产物进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳并定量。

1.3.4.2 T载体克隆 按pMD18-T载体试剂盒操作,将PCR扩增产物连接到T载体上,方法如下:1 μL pMD18-T vector,125 ng PCR产物,1 μL ddH_2O,5 μL solution。16 ℃连接2 h,全量加至100 μL DH5α感受态细胞,冰上30 min,42 ℃ 45 s,冰上1 min,加入900 μL不含氨苄(Amp)抗性的LB液体培养基,37 ℃、250 r/min振荡培养60 min。11 000 r/min离心后弃上清,均匀涂布于含Amp抗性的LB平板培养基上,37 ℃培养过夜,挑取单菌落于含Amp抗性的LB液体培养基中37 ℃、250 r/min培养过夜,提取质粒DNA,送Invitrogen公司测序。

1.3.5 MHV反向斑点杂交

1.3.5.1 杂交膜处理和探针固定 将硝酸纤维素(NC)膜

先后于蒸馏水和 2×SSC 液(含 0.1% SDS)中浸泡 10 min,选浸泡均匀者,120 ℃烘烤 30 min,裁剪为约 0.4 cm 宽、5.5 cm 长的试剂条,室温保存。将 3 ng/μL 生物素修饰的 pMD18-T-MHV PCR 扩增产物作为阳性对照,将 0.1 μmol/L 生物素修饰的上游引物作为通用探针,将探针Ⅰ和探针Ⅱ(Poly-10C、15C、20C)配制成 50 μmol/L。各取 0.8 μL 阳性对照、通用引物、探针Ⅰ和探针Ⅱ自上而下点样制备试剂条,自然晾干后于 1 500×0.1 mJ/cm^{2}进行紫外交联,120 ℃烘烤 30 min,室温干燥保存。

1.3.5.2 杂交条件优化 取 10 μL 生物素修饰的引物扩增的 MHV PCR 产物与 30 μL NaOH 变性液混合,室温作用 15 min,即 PCR 变性产物;将制备的杂交试剂条浸泡于 2 mL 2×SSC(含 0.1% SDS)杂交液中,加入 40 μL PCR 变性产物,于 43、45 或 48 ℃ 40 r/min 振荡杂交 1、1.5 或 2 h。

1.3.5.3 洗膜温度优化 2 mL 2×SSC(含 0.1% SDS)杂交液室温漂洗 3 次,每次 3 min,2 mL 0.5×SSC(含 0.1% SDS)洗膜液于 45 ℃或 50 ℃ 40 r/min 振荡洗脱 20 min。

1.3.5.4 孵育条件优化 将 0.1 g BSA 溶解于 2 mL TTBS,按 1∶2 000、1∶5 000 或 1∶7 000 加入 SA-AP,混匀备用;2 mL TBS 室温漂洗试剂条 3 min,将其浸泡于 2 mL 上述配制的 SA-AP 液中,37 ℃ 40 r/min 振荡孵育 30、60 或 90 min。

1.3.5.5 显色时间优化 根据 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒说明书配制显色工作液,即 2 mL 碱性磷酸酯酶显色缓冲液、13 μL 150×NBT、6 μL 300×BCIP 避光混合;将试剂条先后于 2 mL TBS、生物素缓冲液中室温漂洗 3 min,再浸入 2 mL 显色工作液,避光显色 10、20 或 30 min,最后将杂交膜浸入蒸馏水中终止显色反应,根据杂交信号即紫色斑点出现的位置判断杂交结果。

1.3.6 试剂条稳定性实验 根据阿伦尼乌斯公式结论:37 ℃ 保存 1 d 相当于 4 ℃保存 48 d。将点样后的试剂条于 37 ℃ 分别保存 1、2、3、4、5、6 和 7 d。用样本 A_{59} 进行 RDB 杂交,根据杂交结果判断试剂条的稳定性,推断保质期[11]。

1.3.7 MHV 反向斑点杂交特异性与灵敏性检测 根据文献[9, 12－13]对金黄色葡萄球菌、沙门菌和乙型肝炎病毒 HBV 分别进行 PCR 扩增,将 A_{59}、JHM、MHV_1 和 MHV_3 PCR 产物,及其 1∶1∶1∶1 混合物,用反向斑点杂交方法进行特异性检测。用 RNase Free dH_2O 等比稀释 A_{59} PCR 产物至 125、25、5 和 1 ng/μL,用反向斑点杂交方法进行灵敏度检测,得出检测下限。

1.3.8 反向斑点杂交的初步应用 取小鼠眶后静脉丛血液,4 500 r/min、10 min 离心分离血清,56 ℃ 30 min 灭活。按 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取血清样本总 RNA,逆转录为 cDNA,PCR 扩增后用优化的反向斑点杂交条件进行检测,同时用 ELISA 法对这些样本进行检测。对 RDB 检测结果为阳性的样本,进行 T 克隆测序判定。

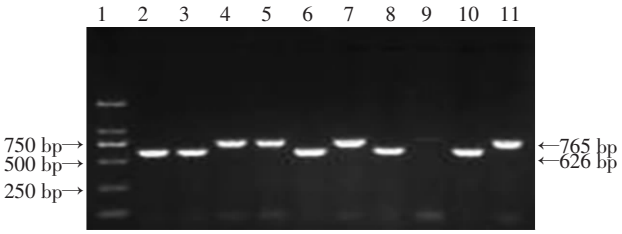
1.4 统计学分析

用 SSPS 17.0 对所得数据进行分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增

用生物素修饰的内、外引物对 MHV 四个毒株(A_{59}、MHV_1、MHV_3、JHM)进行 PCR 扩增,得目的片段为 765 bp 和 625 bp(图 1),将 PCR 产物进行 T 载体克隆,构建质粒 pMD18-T-MHV(pMD18-T-A_{59}、pMD18-T-MHV_1、pMD18-T-MHV_3 和 pMD18-T-JHM),测序后与 MHV 序列进行同源性比较,匹配率为 100%。

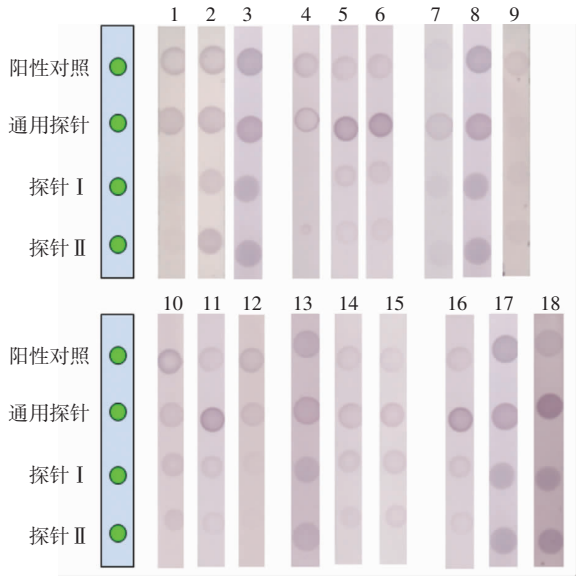


1:2 000 标准;2:A_{59}-1;3:A_{59}-2;4:A_{59}-3;5:A_{59}-4;6:JHM-1;7:JHM-2;8:MHV_3-1;9:MHV_3-2;10:MHV_1-1;11:MHV_1-2

图 1 MHV cDNA PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 反向斑点杂交条件优化

探针Ⅰ和探针Ⅱ在 3′端和 5′端分别用 10C、15C、20C 修饰,将探针按 20、50、100 μmol/L 浓度稀释,点样于试剂条上,在 42、45 和 48 ℃ 温度下分别杂交 60、90、120 min,在 45、50 ℃洗膜 20 min,在 37 ℃与 1∶2 000、1∶5 000、1∶7 000 浓度的 SA-AP 孵育 30、60、90 min,显色 10、20、30 min。结果当杂交条件为:探针Ⅰ和探针Ⅱ均修饰 20C,浓度为 50 μmol/L;杂交温度为 45 ℃,杂交时间为 1 h;洗膜温度为 45 ℃;抗体浓度为 1∶2 000,孵育时间为 1 h;显色时间为 20 min 时,各斑点信号强度较好,无非特异性染色(图 2)。



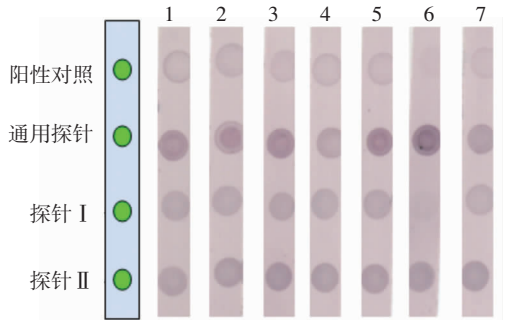
1:探针均修饰 10C;2:探针均修饰 15C;3:探针均修饰 20C;4:探针浓度为 20 μmol/L;5:探针浓度为 50 μmol/L;6:探针浓度为 100 μmol/L;7:杂交温度为 42 ℃;8:杂交温度为 45 ℃;9:杂交温度为 48 ℃;10:杂交时间为 1 h;11:杂交时间为 90 min;12:杂交时间为 2 h;13:AP 浓度为 1∶2 000;14:AP 浓度为 1∶5 000;15:AP 浓度为 1∶7 000;16:孵育时间 30 min;17:孵育时间 1 h;18:孵育时间 90 min

图 2 小鼠肝炎病毒反向斑点杂交条件优化结果

2.3 试剂条稳定性实验

将 37 ℃分别保存不同时间的试剂条 RDB 杂交后,结果如图 3。保存 1～5 d 的试剂条杂交结果均为阳性,保存 6 d 后的

试剂条虽出现阳性结果,但阳性对照和探针Ⅰ阳性较弱,偏离了原来的斑点颜色深度,故根据阿伦尼乌斯公式判断:试剂条4 ℃保质期为8个月。



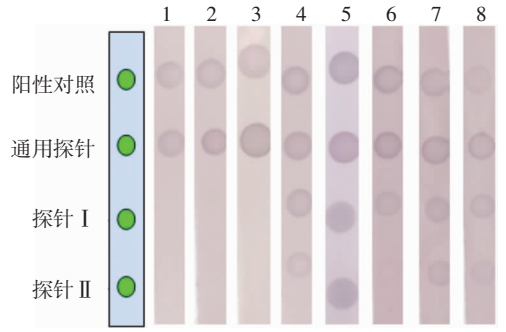
37 ℃保存不同时间检测结果 1:1 d; 2:2 d; 3:3 d; 4:4 d; 5:5 d; 6:6 d; 7:7 d

图3 MHV-A_{59}反向斑点杂交试剂条稳定性实验

2.4 反向斑点杂交检测MHV特异性和灵敏性

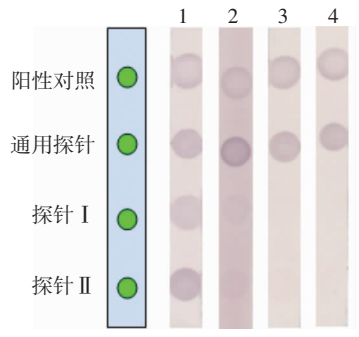
用RDB检测沙门菌、金黄色葡萄球菌和乙型肝炎病毒(HBV),以及A_{59}、JHM、MHV_1、MHV_3和4种毒株混合物。检测结果:沙门菌、金黄色葡萄球菌、HBV为阴性,MHV为阳性,特异性为100%(图4)。

用RDB检测A_{59},当PCR产物浓度最低为5 ng/μL时,可检测出MHV(图5)。



1:沙门菌;2:金黄色葡萄球菌;3:乙型肝炎病毒;4:4种MHV毒株混合;5:A_{59};6:JHM;7:MHV_1;8:MHV_3

图4 小鼠肝炎病毒反向斑点杂交特异性检测



1:125 ng/μL; 2:25 ng/μL; 3:5 ng/μL; 4:1 ng/μL

图5 小鼠肝炎病毒反向斑点杂交灵敏度检测

2.5 反向斑点杂交检测MHV应用

应用ELISA法和反向杂交检测方法检测41只小鼠,6个群,检测结果如表所示(表2、3)。应用ELISA法检测样本MHV感染情况阳性2个群,共5例;阴性4个群,共36例;而反向斑点杂交方法检测MHV结果为阳性3个群,共5例;阴性3个群,共36例。RDB检测结果为阳性的样本,T克隆测序后结果仍为阳性。

表2 41只小鼠MHV检测结果

样品编号	ELISA检测结果	RDB检测结果	DNA测序结果
M44	+	+	+
M45	+	+	+
M46	+	-	/
M48	+	+	+
M52	+	+	+
M62	-	+	+
其他*	-	-	/

*样本编号为:M41~M43,M47,M51,M53~M56,M61,M63~M68,M71~M76,M81~M86,M91~M97

表3 ELISA和RDB法检测对比结果

检测方法	RDB				ELISA			
检测结果	阳性数	阴性数	可疑数	阳性率(%)	阳性数	阴性数	可疑数	阳性率(%)
群数量(个)	3	3	0	50%	2	4	0	33.3%
样本数量(只)	5	36	0	12.2%	5	36	0	12.2%

3 讨论

小鼠肝炎病毒可自然感染啮齿类动物,常为隐形感染或慢性感染,仅当某些应激因素刺激时,会使动物致病,发病无季节性。而MHV毒株能在DBT或L929细胞良好的繁殖,其主要通过吞饮和膜融合两种方式感染细胞,一般情况下,会出现一个约2~4 h的隐蔽期,于12~16 h后才产生子代病毒。

在某些实验因素下,实验动物感染MHV,严重程度会有所不同,同时使动物实验的重复性、准确性无法保证。如应用感染了MHV的实验动物进行某些病毒、细菌、寄生虫感染的研究时,MHV将导致疾病病程改变,加剧病变程度,直接影响实验的准确性与重复性;对于肝脏部分切除的实验动物,感染了MHV后,会降低肝组织的再生速度,造成贫血,白细胞、血小板减少症等[3]。研究认为MHV感染会降低糖尿病易感小鼠的发病率[6]。及时准确的检测出MHV,能有效地控制实验动物质量,确保动物实验的准确可靠性。

目前,MHV检测方法的国家标准(GB/T 14926.22-2001)为ELISA、免疫酶试验(immuno enzyme assay, IEA)和免疫荧光试验(immuno-fluorescence assay, IFA),这3种方法成本高,灵敏度低,操作繁琐复杂,易污染,假阳性率较高,特异性较难保证,更重要的是不适用于少样本检测和免疫缺陷小鼠感染MHV时的检测。另外,研究表明MHV感染后抗体形成需7~14 d,亦不适用于MHV早期感染的检测诊断[7]。

反向斑点杂交检测方法是将PCR、杂交技术和Southern blot相结合,使带标记的PCR产物与探针杂

交,通过对标记物显色而判断杂交信号。在多种病原体的检测中有简便、稳定、可靠等优势[8],并在基因突变、基因分型等领域亦得到广泛应用[9-10,12]。

本方法设计2对通用引物,因为MHV是RNA病毒,易降解;实验动物感染MHV后可能处于病毒复制的不同阶段,分泌的MHV病毒量不同。希望通过巢式PCR扩增,扩大样本浓度,确保后续探索RDB检测方法的顺利进行。通过RT-PCR扩增技术结合反向斑点杂交方法,检测实验动物MHV,根据两个探针的显色情况来判断结果,在阳性对照和通用探针均显色的情况下,若仅1个探针为阳性,则结果为可疑;若2个探针均为阳性,则结果为阳性。因此,弥补了RT-PCR法特异性较低、假阳性率高的缺陷。探针Ⅰ、Ⅱ根据A_{59}、JHM、MHV_1、MHV_3 4个毒株保守区域相同序列设计,与基因库进行同源性比对,发现其为MHV所特异,与其他生物无同源性,确保了该检测方法的特异性;将探针用寡聚多胸腺嘧啶(dC)加尾修饰,紫外交联、高温烘烤方式相结合,使其牢固地固定于试剂条上,确保了该检测方法的重复性;通过试剂条上蓝紫色斑点的判断,使实验结果更加简洁明了。经杂交条件优化,当探针两端均修饰20C,浓度为50 μmol/L;杂交温度为45 ℃,杂交时间为1 h;洗膜温度为45 ℃;抗体的浓度为1∶2 000,孵育时间为1 h;显色时间为20 min时,杂交信号较好,且无非特异信号出现。试剂条稳定性试验结果表明:试剂条可于4 ℃保质期为8个月。当RT-PCR产物浓度为5 ng/μL时,有杂交信号但较弱,故认为本方法最低检测值为5 ng/μL。

本研究采用2种方法验证RDB法检测特异性:一是通过建立的RDB法检测金黄色葡萄球菌、沙门菌和乙型肝炎病毒;二是以国家标准(GB/T 14926.22-2001)ELISA法为对照检测MHV临床样本,为避免结果假阳性,当RDB和ELISA检测结果为阳性时,再以T载体克隆测序为金标准,进行判断。总的结果是:建立的RDB法能检测出MHV,对6个小鼠群进行检测,尽管RDB法和ELISA法检出率均为12.2%,但RDB检出3个小鼠群为阳性,而ELISA法仅检出2个群为阳性,RDB与T载体克隆测序结果完全一致。实验动物微生物质量检测时,要求动物群体大小小于100只时,取样检测数量不少于5只;当群体大小为100~500只时,取样检测数量不少于10只;当群体大小大于500只时,取样检测数量不少于20只。只要取样检测的每群动物中有一只动物一个指标为阳性,此群动物微生物质量就判定为不合格,因此病原微生物检测方法的准确可靠性对于实验动物微生物质量的控制具有十分重要的意义。实验结果表明RDB特异性为100%,且准确性比ELISA方法好。另外,采用等比稀释法确定RDB法最低检测值为5 ng/μL,其检测灵敏度高。

因MHV_1、MHV_3、JHM、A_{59}四个毒株基因序列相似度达90%以上,仅在某些位点个别毒株有差异,另外,几乎所有位点的突变也在MHV_1、MHV_3、A_{59}、JHM这4个毒株之间,难以设计4个能分别区分MHV_1、MHV_3、JHM、A_{59}的探针,故RDB法不能用于区分检测MHV_1、MHV_3、JHM、A_{59}。但是,本实验建立的RDB法准确性好、检出率高,成本低,经本实验条件摸索后,适用于MHV的检测,可推广应用。RDB法弥补了RT-PCR出现假阳性结果的缺陷;克服了国家标准ELISA应用于小样本MHV的筛查或各单位自查,免疫缺陷小鼠、隐性或慢性感染小鼠检测的不足。

总之,本研究所建立的反向斑点杂交方法为实验动物的MHV检测提供了一种新方法。其具有简洁准确、稳定可靠、特异灵敏等优点,有利于实验动物质量的监测,并能保证动物实验的顺利进行。

参考文献:

[1] 富群华. 小鼠肝炎病毒研究若干进展[J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(2): 117-120.
[2] 付红焱, 徐波, 宫泽辉. 小鼠肝炎病毒的研究近况[J]. 生理科学进展, 2004, 35(4): 367-370.
[3] 周艳. 小鼠肝炎病毒N基因的表达与间接ELISA检测方法的建立与应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2008.
[4] 胡晓燕, 佟巍, 刘先菊, 等. 小鼠肝炎病毒金标快速检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 96-100.
[5] 袁文, 刘忠华, 张钰, 等. 小鼠肝炎病毒逆转录环介导等温扩增检测技术的建立[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 354-359, 插7, 插8.
[6] 赵化阳, 李伟, 卢胜明. 浅谈部分啮齿类动物疾病对试验结果的干扰及其诊断要点[J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 70-71, 73.
[7] Yamada Y K, Yabe M, Yamada A, *et al*. Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection[J]. Lab Anim Sci, 1993, 43(4): 285-290.
[8] Forward K R. Risk of coinfection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Nova Scotia[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2010, 21(2): e84-e86.
[9] 赖国旗, 张文露, 胡源, 等. 反向线性探针杂交技术检测慢性乙型肝炎病毒拉米夫定耐药研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(3): 113-119.
[10] 田永强, 朱中元, 王海波. 人乳头瘤病毒线性杂交分型技术的建立及评价[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 389-392.
[11] 武玉香, 沈志强, 唐士云. 定性测定羊奶中黄曲霉毒素M1残留的高灵敏度检测卡的研制[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(8): 31-35.
[12] 韦莉, 魏立雯, 赖国旗, 等. 金黄色葡萄球菌反向线性杂交探针检测方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(6): 78-81, 插10.
[13] 魏立雯, 韦莉, 张文露, 等. 反向线性探针杂交在检测实验动物沙门菌中的研究[J]. 四川动物, 2013, 32(2): 195-198.

(**收稿**:2014-01-09;**修回**:2014-04-06)
(编辑 邓强庭)