技术方法

树鼩呼肠孤病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及初步应用

李晓飞,殷安国,张 媛,罗 军,孙晓梅,代解杰

(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心,
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

【摘要】 目的 建立树鼩呼肠孤病毒(TRV)RT-nPCR 检测方法,为树鼩的质量控制提供检测方法。**方法** 从三批野外来源的具有感染临床症状的树鼩粪便中分离得到三株病毒,经电镜观察和聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为哺乳动物呼肠孤病毒(MRV)。根据 GenBank 中已发表的 MRV L1 基因的保守区域,设计合成巢式引物,对所分离的三株树鼩呼肠孤病毒(TRV1、TRV2、TRV3)的 RNA 进行 RT-nPCR 扩增,优化反应条件,进行特异性、敏感性试验。应用 RT-nPCR 方法对 25 只野外来源的相同症状疑似病例样本进行检测。**结果** 针对分离到的三株树鼩呼肠孤病毒的 RNA 进行 RT-nPCR 扩增,均得到 513 bp 的特异性目的片段,培养细胞及甲肝病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒阴性对照均未扩增出条带。敏感性试验结果显示可检测到的最小 RNA 模板浓度为 0.01 pg/μL。25 只树鼩粪便样本经 RT-nPCR 检测,有 14 只 TRV 阳性,其中死亡动物组 10 只,检出率为 100%;存活动物组 15 只,检出率为 27%。**结论** 建立的 TRV RT-nPCR 检测方法特异、敏感、稳定,可用于 TRV 的常规检测。

【关键词】 树鼩;哺乳动物呼肠孤病毒;反转录巢式聚合酶链式反应;巢式引物
【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0063-06
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2014.006.014

Establishment and application of a RT-nPCR assay for detection of orthoreovirus in tree shrews

LI Xiao-fei, YIN An-guo, ZHANG Yuan, LUO Jun, SUN Xiao-mei, DAI Jie-jie
(Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infection Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To establish a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) assay for detection of tree shrews orthoreovirus (TRV). **Methods** Three strains of TRV were respectively isolated from fresh feces of three tree shrews that came from the same field at different times. We designed and synthesized two pairs of MRV L1 gene nested primers and established the system of RT-nPCR. The TRV RNA was extracted and reversely transcribed to cDNA as a template for nested-PCR amplification. The developed RT-nPCR was optimized. The specificity and sensitivity were tested. Finally, the RT-nPCR was used to detect TRV in 25 tree shrew samples. **Results** Taking the genomic RNA of TRV as template, the RT-nPCR was able to amplify a specific fragment band targeting the L1 gene, while there were no

[**基金项目**]国家科技支撑计划(2011BAI15B01-21;2012BAI39B01;2014BAI01B01),云南省科技创新平台建设(2013DA002)
[**作者简介**]李晓飞(1988-),女,硕士,研究方向:实验动物病毒学。
[**通讯作者**]孙晓梅(1963-),女,主任技师,E-mail: sxm@imbcams.com.cn;代解杰(1962-),男,研究员,课题负责人,E-mail: djj@imbcams.com.cn

target bands in the normal cell control, (Wa strain rotavirus, hepatitis A virus, and herpes simplex virus). The RNA of TRV was diluted by 1:10 to $1:10^9$. Each dilution sample was analyzed by the RT-nPCR. The minimum detectable concentration of RNA was 0.01 pg/μL. The results of RT-nPCR detection showed that 4 of the 15 tree shrews were TRV-positive in the survival group, and 10 of 10 tree shrews were TRV-positive in the death group. **Conclusions** The RT-nRCR assay established in this study is accurate, specific and sensitive. Therefore, it can be used for routine detection of TRV in quality assurance testing.

【Key words】 Tree Shrew; Mammalian orthoreovirus; RT-nPCR; Nested primers

哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus, MRV)在分类学上属呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus)第一亚群[1]。基因组为 10 个节段的双链 RNA,分为 3 个大片段(L1 ~ L3)、3 个中片段(M1 ~ M3)及 4 个小片段(S1 ~ S4)。根据红细胞凝集活性 MRV 分为三种血清型及标准株,分别为:血清 1 型(T1L, Long)、血清 2 型(T2J, Jone)和血清 3 型(T3D, Dearing; T3A, Abney)[2]。MRV 具有广泛的宿主谱,牛、羊、马、猪、狗、猫、小鼠、蝙蝠、人及非人灵长类体内都已报道分离到呼肠孤病毒[3-5]。呼肠孤病毒与肺部感染、神经系统感染、消化系统感染密切相关[6]。Reo-3 感染可致小鼠呼吸窘迫综合症,肺水肿、肺泡出血、肺纤维化和致死性间质性肺炎等症状,最后显现病毒血症及神经系统感染所致脑炎心肌炎等[7],Reo-3 型是国标要求 SPF 级实验小鼠必检的项目之一。

近年来,树鼩(tree shrews)由于其独特的生物学特性和分类学地位正在被培育成为实验动物新品种,研究证实它在感染性疾病动物模型方面独具价值。中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心目前正在开展实验树鼩饲养繁殖和标准化研究工作。

2011 ~2012 年期间,本中心先后从同一地区野外引进了三批树鼩,少数树鼩出现精神萎靡、眼角膜及鼻分泌物增多,足爪皮肤溃烂脱皮等类似病毒性感染的临床症状。为探明何种感染病原体,我们对死亡动物粪便中的未知病毒进行分离鉴定,确认得到三株呼肠孤病毒毒株,分别命名为 TRV1、TRV2、TRV3。鉴于树鼩对呼肠孤病毒易感,且在抵抗力差的情况下可出现致死性后果,需建立相应的灵敏快速的检测方法,作为实验树鼩种群病原微生物质量控制的有效手段。

1 材料和方法

1.1 病毒及样品

呼肠孤病毒 III 型(Reo3)由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所赠予;轮状(RV)病毒 Wa 株,甲肝(HAV)病毒,单纯疱疹(HSV-1)病毒由中国医学科学院医学生物学研究所保存;三株树鼩呼肠孤病毒 TRV1、TRV2、TRV3 来源于三只动物(表 1);25 只树鼩病毒感染疑似病例的粪便处理样本。

1.2 设备及试剂

美国产 Forma 恒温培养箱,日本产 Nikon 显微镜,Hitachi 透射电镜,美国产 Bio-Rad 梯度 PCR 仪、Bio-Rad 电泳仪系统、Bio-Rad 凝胶成像系统。病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自 Axygen 公司;逆转录试剂盒购自 Fermentas;PCR 试剂盒购自 Thermo 公司;胶回收试剂盒购自 TakaRa 公司。

1.3 病毒分离及电镜观察

采集发病树鼩粪便(1 ~2)g,用磷酸盐缓冲液(PBS)制成 10% ~20% 粪便悬液,5 000 r/min 离心 30 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液加入终浓度 10% 的双抗(青霉素和链霉素),按 1/10(V/V)接种比接种于铺满 80% ~90% 的 VERO 单层细胞,37℃吸附 30 min,弃接种液,立即加入 2%

表 1 从不同批次野外引入树鼩中分离到的 MRV

Tab. 1 MRV strains isolated from tree shrews of three batches

批次 Batch	时间 Time	临床症状 Clinical symptoms	分离毒株 Strains
1	2011 年 11 月	眼角、鼻夹、口角炎症,足爪脱皮,血便。死亡	TRV1
2	2012 年 04 月	肠系膜充血,稀便。死亡	TRV2
3	2012 年 11 月	精神萎靡,眼角膜分泌物增多,黑色稀便。存活	TRV3

胎牛血清 MEM 维持液,37℃,5% CO_2 培养并观察 CPE,继续盲传并收集病毒液,反复冻融三次置 -80℃保存待鉴定。

收集的病毒液于 4 500 r/min 离心 30 min,取上清液,经 40%、20%、10% 蔗糖密度梯度离心(35 000 r/min,2.5 h,4℃),以 100 μL PBS 4℃过夜溶解,次日取 20 μL 经 1% 磷钨酸常规染色,于 Hitachi 透射电镜下观察病毒形态。

1.4 病毒 RNA 提取

对正常 VERO 细胞,TRV1、TRV2、TRV3 感染的 VERO 细胞上清液,呼肠孤病毒 III 型(Reo3),轮状(RV)病毒 Wa 株,甲肝(HAV)病毒,单纯疱疹(HSV-1)病毒以及 25 只树鼩病毒感染疑似病例的粪便处理样本按照 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒操作步骤提取核酸。提取后的 RNA 立即反转录合成 cDNA,剩余的 RNA 冻存于 -80℃冰箱备用。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

将 TRV1、TRV2、TRV3 三株病毒细胞培养上清液中提取的病毒 RNA 按 9∶1 与 10 × loading buffer 混匀后经核酸聚丙烯凝胶电泳(积层胶 3.5%,分离胶 10%),每孔上样 15 μL,90 V 恒压电泳 9 h,硝酸银染色观察[8]。

1.6 反转录巢式 PCR

1.6.1 引物设计:哺乳动物呼肠孤病毒(MRV)的 L1 基因片段编码呼肠孤病毒内衣壳蛋白 λ3,λ3 具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性,在呼肠孤病毒的整个基因组中是最保守的[9]。分析已报道的 MRV 的 L1 基因的保守区域,用 Primer Premier 5.0 软件设计巢式引物见表 2,依次使用两对引物进行巢式 PCR 扩增后的目的片段为 513 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.6.2 反转录合成 cDNA:参照 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书确定反转录体系为:病毒 RNA 8 μL、Random Hexamer Primer 1 μL、nuclease-free water 3 μL、5 × reaction buffer 4 μL、RiboLock RNase inhibitor (20 U/μL) 1 μL、10 mM dNTP Mix 2 μL、RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL) 1 μL。反应条件为:25℃ 5 min,42℃孵育 60 min,70℃ 5 min 获得 cDNA。

1.6.3 巢式 PCR:对巢式 PCR 反应体系的引物、模板及反应体系的退火温度及循环次数等进行优化,确定最佳反应模式。第一次 PCR 反应体系:反转录 cDNA 模板 3 μL、DreamTaq Green PCR Master Mix 12.5 μL、nuclease-free water 7.5 μL,以外围引物 TRV-F1 (5 μM)、TRV-R1 (5 μM)各 1 μL 进行巢式第一次 PCR 扩增。扩增条件:95℃变性 5 min;95℃ 30 sec,50℃ 30 sec,72℃ 2 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。取第一次 PCR 产物 3 μL,以内围引物 TRV-F2 (5 μM)、TRV-R2 (5 μM)各 1 μL 进行第二次 PCR 扩增,反应体系及反应条件同第一次 PCR 扩增。利用此 RT-nPCR 方法对正常 VERO 细胞、TRV1、TRV2、TRV3 感染的细胞上清液进行检测。

1.6.4 RT-nPCR 产物的检测:取 10 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测,在 1 × TAE 电泳缓冲液中,90 V 电泳 40 min,于凝胶成像系统紫外灯下观察并切下 PCR 产物条带,使用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,由宝生物(大连)工程公司测序,测序结果于 NCBI BLAST 进行序列相似性和同源性分析,以确定 RT-nPCR 检测的准确性。

1.6.5 特异性的试验:使用巢式引物 TRV-F1,R1;TRV-F2,R2 分别以三株树鼩呼肠孤病毒(TRV1、TRV2、TRV3),呼肠孤病毒 III 型(Reo3),轮状(RV)病毒 Wa 株,甲肝(HAV)病毒 RNA 的 cDNA 及单纯疱疹(HSV-1)病毒的 DNA 为模板,用所建立的 RT-nPCR 方法进行扩增,扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.6 敏感性的试验:将起始浓度为 10.2 ng/μL 的 RNA 样本做倍比稀释,分设 10^{0}、10^{-1}到 10^{-10}浓度梯度进行 RT-nPCR 扩增,扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,判断可扩增的最小 RNA 模板浓度。

表 2 用于扩增 L1 基因的巢式引物序列及位置

Tab. 2 Sequence and position of the nested primers used for L1 gene amplification

编号 Code		序列 Sequences	位置/bp Location	长度/nt Length
外围引物	TRV-F1	5′-CCATGATACTGACTCAGTTTGGACCG-3′	12	1126
	TRV-R1	5′-CACTAAGAAAATACCRCTAGTRCAWGCCAT-3′	1138	
内围引物	TRV-F2	5′-GATTAAGGCBCCWTTGGAGAAGTTTG-3′	442	513
	TRV-R2	5′-GACAAGGGCRTRRCTCCCATGTACAT-3′	954	

1.6.7 初步应用：对 25 只树鼩病毒感染疑似病例的粪便处理样本（编号：1 ~25 号，其中 1 ~15 号为存活动物组，16 ~25 号样本为死亡动物组）提取 RNA，进行 RT-nPCR 扩增，扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 病毒的细胞病变、电镜形态及聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

接种病毒后的 VERO 细胞于 12 h 即出现明显的细胞病变（cytopathic effects，CPE），继续盲传第 2 ~6 代均出现稳定的 CPE，细胞颗粒感增强、圆缩、聚集最终脱落；病毒液浓缩纯化后透视电镜下观察，可见病毒为球形颗粒，完整直径约 70 nm，双层衣壳，为呼肠孤病毒的典型形态特征见图 1；提取三株 TRV RNA 进行聚丙烯凝胶电泳鉴定，结果显示三株病毒均由 10 个基因片段组成，按分子量大小可分为大（L1、L2、L3）、中（M1、M2、M3）和小（S1、S2、S3，S4）三个类群，呈现典型的 3:3:4 排列。各分离株的 PAGE 电泳图谱特征见图 2。

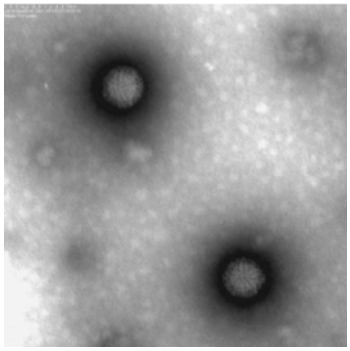


图 1 树鼩呼肠孤病毒株 TRV2 透视电镜观察

Fig. 1 Morphological characteristics of TRV2 by TEM observation

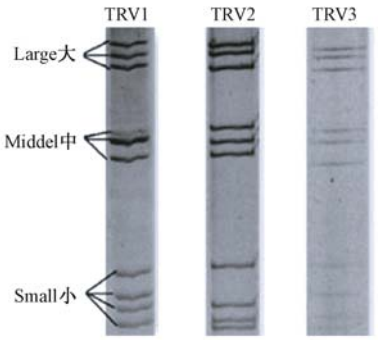
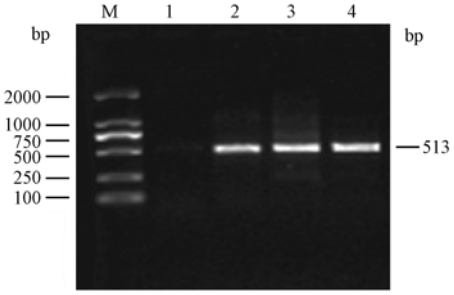


图 2 三株呼肠孤病毒 PAGE 电泳图谱

Fig. 2 PAGE electrophoretogram of three TRVs PAGE

2.2 RT-nPCR 产物的检测

巢式引物 TRV-F1，R1；TRV-F2，R2 对三株树鼩呼肠孤病毒（TRV1、TRV2、TRV3）扩增均得到长度为 513 bp 的特异性目的条带；VERO 细胞阴性对照未扩增到特异性目的条带（图 3）。目的片段纯化后测序，测序结果经 BLAST 分析，TRV1 与 GenBank 中 MRV 分离株 T3/Bat/Germany/342/08 株和 SI-MRV01 株的序列同源性最高，为 96%；TRV2 与 MRV 分离株 Ndelle virus 株的序列同源性为 90%；TRV3 与 MRV 分离株 MRV-HLJ/2007 株的序列同源性为 94%。



M：2 000 bp DNA marker；1：VERO 细胞对照；2：TRV1；3：TRV2；4：TRV3

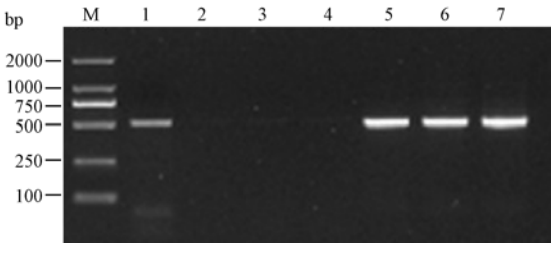
图 3 巢式引物 RT-nPCR 反应条件优化结果

M：2000 bp DNA marker；1：VERO cell control；2：TRV1；3：TRV2；4：TRV3

Fig. 3 The results of optimized RT-nPCR reaction conditions for the nested primers

2.3 特异性试验

巢式引物 TRV-F1，R1；TRV-F2，R2 在以 TRV1、TRV2、TRV3 及呼肠孤病毒 III 型（Reo3）为模板进行扩增有明显目的条带出现，轮状（RV）病毒 Wa 株，甲肝（HAV）病毒及单纯疱疹（HSV-1）均无目的条带（图 4）。

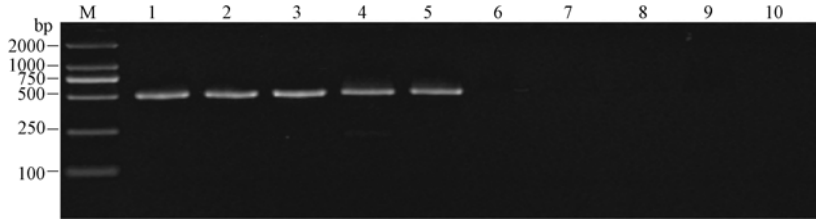


M：2000bp DNA marker；1：呼肠孤病毒Ⅲ型；2：轮状（RV）病毒 Wa 株；3：甲肝（HAV）病毒；4：单纯疱疹（HSV-1）；5：TRV1；6：TRV2；7：TRV3

图 4 巢式引物特异性验证电泳结果

M：2 000 bp DNA marker；1：Reo3；2：Wa strain of RV；3：HAV；4：HSV-1；5：TRV1；6：TRV2；7：TRV3

Fig. 4 Validation results of specificity of the nested primers

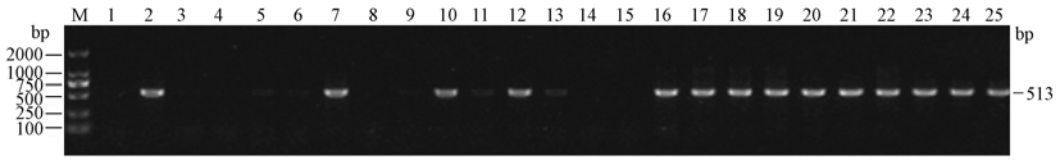


M: 2000 bp DNA marker;1:RNA 原液;2:10^{-1}稀释;3:10^{-2}稀释;4:10^{-3}稀释;
5:10^{-4}稀释;6:10^{-5}稀释;7:10^{-6}稀释;8:10^{-7} 稀释;9:10^{-8}稀释;10:10^{-9}稀释。

图 5　巢式引物 RT-nPCR 检测敏感性

M: 2000 bp DNA marker;1:Stock solution of RNA;2:10^{-1} dilution;3: 10^{-2} dilution;4:10^{-3} dilution;
5: 10^{-4} dilution;6: 10^{-5} dilution;7: 10^{-6} dilution;8: 10^{-7} dilution;9: 10^{-8} dilution;10: 10^{-9} dilution

Fig. 5　Results of sensitivity test of RT-nPCR using nested primers-RNA template concentration gradient of TRV2



M: 2000 bp DNA marker;1 ~ 15:存活动物组;16 ~ 25 号:死亡动物组

图 6　应用 RT-nPCR 筛查 25 只疑似病毒感染的 25 只树鼩粪便样本

M: 2000 bp DNA marker;1 - 15: the survival group. ;16 - 25: the death group

Fig. 6　Results of electrophoresis of stool samples of the tree shrews 1 - 25, screened by RT-nPCR detection

2.4　敏感性试验

巢式引物 TRV-F1, R1; TRV-F2, R2 在起始浓度为 10.2 ng/μL 的 TRV2 RNA 模板稀释至 10^{-4}时仍可见清晰的目的条带(图 5),即所能检测到的最小 RNA 模板浓度至少能达到 0.01 pg/μL。

2.5　初步应用

应用建立的 RT-nPCR 方法对 25 只树鼩病毒感染疑似病例的粪便处理样本的检测结果如下:存活动物组(1 ~ 15 号)中 2、7、10、12 号粪便样本及死亡动物组(15 ~ 25 号)的 15 ~ 25 号粪便样本均扩增出 513 bp 的目的片段。死亡动物(15 ~ 25 号)中 TRV 阳性携带率为 100%;存活动物(1 ~ 15 号)中 TRV 阳性携带率为 27%。(图 6)

3　讨论

我中心在实验树鼩种群建立过程中,先后三次从昆明郊区同一地域野外引进的部分树鼩中发现了病毒感染的临床症状,通过病毒分离培养鉴定,发现所分离的 TRV1、TRV2 和 TRV3 病毒株具有呼肠孤病毒独特的 CPE 和典型的电镜形态,独特的 3:3:4 基因组带型,且三株病毒的 L1 基因序列与哺乳动物呼肠孤病毒有较高的序列同源性。采用建立的 RT-nRCR 方法对 25 只野外来源树鼩疑似病例样本进行检测,发现具有较高的感染率,说明 MRV 的宿主范围确实广泛,建议作为树鼩微生物质量控制必须考虑的指标之一。

目前已建立的呼肠孤病毒检测方法有:ELISA 检测[10]、免疫荧光检测[11]、电镜法(DEM)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、PCR[12,13]等。电镜法需扩增病毒、纯化浓缩、超速离心,耗时耗力;PAGE 法需谨慎防止 RNA 酶的降解影响,灵敏度有限,易出现假阴性;PCR 方法具简单、快捷、灵敏的优点,我们曾尝试使用 Leary TR[14]报道的引物 rv5m 和 rv4m 对所分离的 3 株 TRVs 进行扩增,但未获得理想结果。因此改用针对 L1 基因保守区域设计巢式引物,并建立 RT-nPCR 的方法。该方法对 Reo3 和 3 株 TRVs 通用,且不针对同为呼肠孤病毒科的轮状病毒、单链 RNA 的甲肝病毒和双链 DNA 的单纯疱疹病毒进行扩增,特异性好;最低 RNA 模板检测浓度为 0.01pg/μL,不仅可检测到经细胞培养增殖后的病毒,亦可直接检测到动物粪便中的病毒 RNA。当前我们正在研究 TRV 对树鼩的致病性及致病机理,以进一步揭示 TRV 的感染机制,此 RT-nPCR 方法可作为 TRV 检测的有效手段。此外,我们提议利用此方法对野外引进的树鼩在隔离检疫期间进行 TRV 的筛查,这对树鼩 TRV 进行微生物控制有重要意义。

分析三株呼肠孤病毒 TRV1、TRV2、TRV3 基因

组的聚丙烯酰胺凝胶电泳的带型,不难发现三株病毒的基因组 10 个片段分布特征有区别,M 片段和 S 片段差异较大。另外,经 RT-nPCR 得到的 L1 基因的 513 bp 片段序列也有差异。推导不同时间来源的三株病毒具有一定遗传差异,这对今后开展树鼩呼肠孤病毒的分子流行病学研究提供了基础。至于 TRV1、TRV2、TRV3 之间的变异关系或与已报道的哺乳动物呼肠孤病毒(MRV)的亲缘性关系,有赖于今后全基因序列的测定结果作进一步的研究。

参考文献:

[1] 张云,刘明,欧阳岁东, 等. 呼肠孤病毒及其分类学依据研究进展[J]. 动物医学进展,2004, 25(6):46 - 49.

[2] 孙颖,辛绍杰,貌盼勇. 呼肠病毒的生物学特征及其致病性[J]. 国外医学. 流行病学传染病学分册,2005, 32(3):145 - 148.

[3] Tyler KL. Mammalian reoviruses. In: Knipe DM and Howley PM (eds): Fields Virology [M]. 4th edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 2001,1729 - 1745.

[4] Kohl C, Lesnik R, Brinkmann A, et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats [J]. PloS One, 2012, 7(8):e43106.

[5] Hrdy DB, Rosen L, Fields BN. Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of reovirus isolates from humans, cattle, and mice [J]. Jf Virol, 1979, 31(1):104 - 111.

[6] 左庭婷, 端青. 呼肠病毒感染实验动物致病性的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(4):389 - 391.

[7] Gauvin L, Bennett S, Liu H, et al. Respiratory infection of mice with mammalian reoviruses causes systemic infection with age and strain dependent pneumonia and encephalitis [J]. Virol J, 2013, 10:67.

[8] 徐娟, 黄晓燕, 李晓飞, 等. 树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定[J]. 动物学研究, 2013, 34(2):116 - 120.

[9] Leary TR, Erker JC, Chalmers ML, et al. Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the λ3-encoding L1 gene [J]. J Clini Microbiol, 2001, 1368 - 1375.

[10] 侯丽波, 佟巍, 谢军芳, 等. 小鼠呼肠孤病毒 III 型标准化血清制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8):60 - 64.

[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] 冉旭华. 犬蝠源呼肠孤病毒的分离鉴定及其生物学特性的研究[D]. 中国农业科学院研究生院哈尔滨兽医研究所, 2006:1 - 106.

[13] 王吉, 卫礼, 贺争鸣, 等. 呼肠孤病毒 III 型(Reo3)RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9):46 - 50.

[14] Leary TR, Erker JC, Chalmers ML, et al. Detection of reovirus transcription-polymerase chain reaction using primers corresponding to conserved regions of the viral L1 genome segment [J]. J Virol Methods, 2001, 104(2):161 - 165.

〔修回日期〕2014-02-28