

实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测 小鼠多瘤病毒方法的建立

尹雪琴, 袁 文, 王 静, 黄碧洪, 饶 丹, 伍妙梨, 朱余军,
冯胜鹏, 郭鹏举, 张 钰, 黄 韧

(广东省实验动物重点实验室, 广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 目的 建立一种快速、特异、敏感的小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, MPyV) 荧光定量 TaqMan PCR 检测方法, 用于 MPyV 核酸的检测。**方法** 根据 GenBank 中小鼠多瘤病毒基因组序列设计了一对特异性引物及 TaqMan 探针, 扩增长度为 69 bp 的片段, 通过优化反应体系和反应条件, 对构建的重组质粒标准品进行检测, 并绘制标准曲线, 进行特异性、敏感性和重复性试验。最后用建立的方法对人工感染 MPyV 的肺脏、脾脏和粪便, 及 86 份小鼠临床样本进行检测, 验证在临床应用中的效果。**结果** 所建立的检测方法特异性强, 只能在小鼠多瘤病毒 DNA 中检出荧光信号, 检测灵敏度达到 100 拷贝, 批内和批间重复性好, 检测结果变异系数 (CV) 均小于 1.13%, 人工感染 MPyV 小鼠的肺脏、脾脏和粪便均为阳性, 对 86 份临床样本进行检测, 有 3 份样本呈阳性 (阳性率为 3.5%)。**结论** 建立的 MPyV 荧光定量 TaqMan-PCR 检测方法特异性强、敏感性高、重复性好, 适合用于 MPyV 临床诊断、日常监测和流行病学调查。

【关键词】 小鼠多瘤病毒; 实时荧光定量 PCR; TaqMan 探针

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0053-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.011

Establishment of a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detection of murine polyomavirus

YIN Xue-qin, YUAN Wen, WANG Jing, HUANG Bi-hong, RAO Dan, WU Miao-li,
ZHU Yu-jun, FENG Sheng-peng, GUO Peng-ju, ZHANG Yu, HUANG Ren

(Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute,
Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To establish a rapid, specific and sensitive TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR assay for detection of murine polyomavirus (MPyV). **Methods** The specific primers and TaqMan probe were designed based on genome sequence of MPyV. The primers amplified a 69 bp fragment. After optimizing the reaction system and reaction condition, the standard curve was plotted by detecting recombinant plasmid standards. The specificity, sensitivity and reproducibility of this method were evaluated. In addition, samples of lungs, spleens and feces obtained from experimentally infected mice and 86 clinical samples were used to validate the efficacy of this real-time PCR assay. **Results** The specificity assay showed that this assay could specifically detect MPyV and the sensitivity for MPyV was about 100

[基金项目] 国家科技支撑计划 (编号: 2013BAK11B01); 广东省科技计划项目 (编号: 2012B010300026)。

[作者简介] 尹雪琴 (1988-), 女, 实习研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: yinxueqin.dr@163.com。

[通讯作者] 黄韧 (1959-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学和比较医学研究。E-mail: labking@sohu.com。

copies/well. The coefficients of variation (CV) of both intra-assay and inter-assay were less than 1.13%. All of the samples from experimentally infected mice were positive for MPyV and 3 out of 86 clinical samples were positive by this TaqMan-PCR detection with a positive rate of 3.5%. **Conclusions** The real-time fluorescence quantitative TaqMan-PCR assay established in this study has high specificity, sensitivity and stability. It can be used for clinical diagnosis, routine detection and epidemiological investigation of murine polyomavirus infections.

【Key words】 Murine polyomavirus; Real-time fluorescence quantitative PCR; TaqMan probe; Mice

小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, MPyV) 属于多瘤病毒科多瘤病毒属, 为双链 DNA 病毒, 病毒粒子呈圆形, 无囊膜, 可存在于实验鼠群和野生鼠群中, 为中国实验动物国家标准《实验动物微生物等级及监测》(GB14922. 2-2011) 中 SPF 级小鼠必要时需排除的病原^[1-3]。此外人工感染可使小鼠等动物产生各种组织肿瘤, 故 MPyV 也可用于研究病毒介导的肿瘤机制以及肿瘤模型的建立。然而尽管 MPyV 具有致肿瘤的特性, 但在自然条件下小鼠感染多瘤病毒呈隐性或亚临床感染^[4-6]。在研究病毒介导肿瘤的模型中, 小鼠体内 MPyV 含量的变化是分析肿瘤发展、免疫反应及疾病表征的重要指标。故隐性感染一方面可对实验动物本身造成危害, 对科研工作造成潜在干扰, 另一方面也可作为研究感染病毒后宿主免疫反应的模型。因此建立一个敏感有效的监测 MPyV 感染小鼠的检测方法, 不仅可以保证实验动物的质量, 而且有利于建立一个针对病毒、免疫和肿瘤有效的模型系统。本试验建立了荧光定量 PCR 检测 MPyV 的方法, 具有敏感性高、特异性强、稳定性好、速度快的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂: 荧光定量 PCR 仪为 ABI 的 7500, 常规 PCR 仪为购自 Biometra 的 TProfessional Standard Gradient, 紫外分光光度计 Nanodrop 2000C 购自 Thermo; PCR Premix、PMD-T19 载体、T4 连接酶、HotStart Tag 酶、dNTPs、MgCl₂ 和 DL5000 DNA marker 均购自 Takara 公司, 病毒 DNA 抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.2 动物、毒株及菌株: 小鼠多瘤病毒购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC VR-252), BHK 细胞及大肠埃希菌 DH-5 肠菌株由本实验室保存, SPF 级 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心 (SCXK (粤) 2013-0002)、(SYXK (粤) 2008-0002)。

1.1.3 引物和探针: 根据小鼠多瘤病毒基因组序列 (GenBank: AF442959.1), 应用 Oligo7 软件设计一对

特异性引物, 扩增产物用于克隆至 pMD-T19 载体中, 上游引物 P1: 5'-CCATGGCCTACTT CATTCCG-3', 下游引物 P2: 5'-CGGTCAACATAGCGCGTCA-3', 该引物扩增的目的片段长度为 1603 bp。同时在上述扩增片段内设计一对特异性引物及探针用于荧光定量检测, 上游引物 P3: 5'-CGGCGTCTCTAAA TGCGAG-3', 下游引物 P4: 5'-AGCAGTTTGGG AAC GGGTG-3', TaqMan 探针: 5'-(FAM) CAAAATGTA CAAAGGCCTGTCCAAGACCC (BHQ-1)-3', 该引物扩增的目的片段长度为 69 bp。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 提取: 于 BHK 细胞接种小鼠多瘤病毒, 48 h 后反复冻融细胞 3 次收获病毒, 按照病毒 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取病毒 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.2 MPyV 基因片段的 PCR 扩增: PCR 反应体积为 20 μL, 反应液包括 DNA 2 μL, P1、P2 上下游引物各 1 μL (终浓度为 0.4 μM)。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 同时设阴性对照。取 PCR 扩增产物于经溴乙锭预染的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 5 μL DL 5000 DNA marker 作分子量参照, 凝胶成像仪下观察结果。

1.2.3 MPyV 标准质粒的构建: P1、P2 扩增的 PCR 产物 (1603 bp) 电泳后经胶回收试剂盒回收纯化后 TA 克隆连接到 pMD-T19 载体, 并转化至 DH-5α 感受态细胞中, 37℃ 培养过夜, 挑取单个菌落, 筛选阳性克隆并送立菲生物技术有限公司测序。扩增阳性克隆菌落, 提取重组质粒, 命名为 pMD-T19-MPyV, 通过紫外分光光度计测定浓度后, 按公式: 浓度 (拷贝/μL) = [质粒浓度 (g/ml) × 6.02 × 10²³] / [质粒大小 (bp) × 660] 计算初始拷贝数, 重组质粒于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 荧光定量 PCR 反应体系的建立和优化: 以质粒 pMD-T19-MPyV 为模板, 用 P3、P4 及 TaqMan 探针建立荧光定量 PCR 检测方法, 按照 Premix Ex Tag (probe) 试剂盒操作说明配制反应体系, 分别对

引物浓度(0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、探针浓度(0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、退火温度(55 ~ 65) $^{\circ}\text{C}$ 、循环条件(两步法与三步法)进行条件优化,每个条件 3 个重复孔,通过比较同一浓度质粒的 Ct 值,荧光强度来判断最优条件。同时设置 BHK 细胞 DNA 为阴性对照,水为空白对照。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测方法特异性分析:使用 10 种感染小鼠病原的 DNA 或 cDNA 为模板进行特异性分析,包括:小鼠巨细胞病毒(MCMV)、小鼠细小病毒 MVM 株(MVM)、鼠痘病毒(ECT)、小鼠腺病毒(MAD)、小鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)、呼肠孤病毒 III 型(Reo3)、仙台病毒(SV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠诺如病毒(MNV)、小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*),每种病毒 2 个重复孔。同时设立小鼠多瘤病毒 DNA 为阳性对照,BHK 细胞 DNA 为阴性对照,水为空白对照。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测方法敏感性验证及线性标准曲线的建立:重组质粒 pMD-T19-MPyV 计算出初始拷贝数后,用超纯水连续 10 倍梯度稀释至浓度在(1.0×10^1) ~ (1.0×10^7) 拷贝/ μL ,取 2 μL 作为荧光定量 PCR 模板,反应体系为 1.2.4 建立的最优条件。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测方法的重复性分析:取 3 份阳性感染 MPyV 的 BHK 细胞 DNA 用该方法测定 3 次;每次试验每个样本设 3 个重复孔,计算批内、批间差异,从而对本方法检测的重复性进行考核。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 方法在临床实际样本的检测:

1.2.8.1 对人工感染 MPyV 组织样本的检测:人工感染试验在本实验室的屏障环境实验间[SYXK(粤)2012-0122]进行。用 MPyV 细胞毒(Ct 值为 28.33)对 1 日龄 BALB/c 小鼠进行 0.5 μL 滴鼻感染,感染后 1 周再滴鼻感染 10 μL ,共感染 6 只;另设 2 只阴性对照小鼠,滴鼻等量灭菌生理盐水。饲养小鼠至 21 日龄,断颈处死后收集肺脏、脾脏和粪便,按照 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取样本 DNA,用本研究建立的荧光 PCR 方法分别对 6 只攻毒鼠与 2 只阴性小鼠各组织器官样品进行检测,每份做 3 个重复检测,观察扩增曲线。

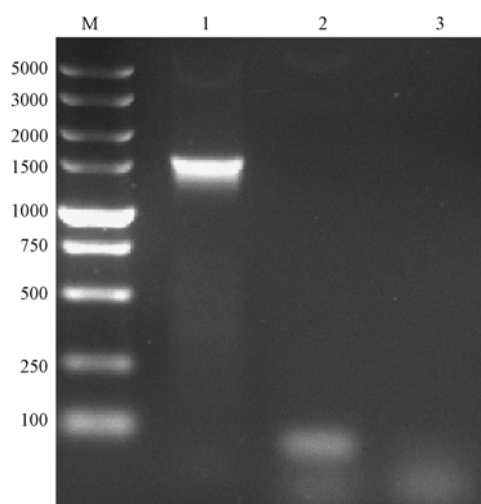
1.2.8.2 对临床样品的检测:用建立的荧光 PCR 方法对来自广东省广州市一家大型实验鼠场的 86 份送检粪便样品进行了测定,同时设立阳性对照,

观察各样品的扩增曲线与 Ct 值。并用引物对 P1/P2 PCR 扩增阳性粪便 DNA,同时设立阴性对照,凝胶电泳观察结果。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

用引物对 P1/P2 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,得到约 1 603 bp 长度的片段,与预期大小一致,且测序鉴定表明与 GenBank 登记的序列同源性为 100%。经荧光定量 PCR 引物对 P3/P4 扩增出的片段长度约为 69 bp,条带具有特异性,没有二聚体,结果见图 1。提取的重组质粒浓度为 117.7 ng/ μL 。



注:Marker:DL5000;泳道 1 为 P1/P2 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,片段约 1603 bp;泳道 2 为 P3/P4 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,片段约 69 bp;泳道 3 为水空白对照。

图 1 重组质粒 pMD-T19-MPyV 的 PCR 鉴定

Note. Lane M is 5Kb DNA ladder, lane 1-2 represent PCR results of positive recombinant plasmids using primers P1/P2 and P3/P4, respectively, lane 3 represents blank control.

Fig. 1 PCR-identified results of the recombinant plasmid pMD-T19-MPyV

2.2 实时荧光定量 PCR 方法的条件优化

以重组质粒 DNA 为模板,通过对引物浓度(0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、探针浓度(0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、退火温度(55 ~ 65) $^{\circ}\text{C}$ 、循环条件(两步法与三步法)条件的优化,筛选出最佳反应体系如下:上、下游引物终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$,探针终浓度 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。反应程序两步法为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 个循环。读板温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 特异性试验

对小鼠多瘤病毒及其他非小鼠多瘤病毒的病原 DNA 或 cDNA 进行检测,只有小鼠多瘤病毒 DNA 出现特异性扩增,在小鼠巨细胞病毒 (MCMV)、小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM)、鼠痘病毒 (ECT)、小鼠腺病毒 (MAD)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)、呼肠孤病毒 III 型 (Reo3)、仙台病毒 (SV)、小鼠肝炎病毒 (MHV)、小鼠诺如病毒 (MNV)、小家鼠螺旋杆菌 (*H. muridarum*)、BHK 细胞阴性对照及水空白对照组中无扩增 (图 2)。

2.4 敏感性验证及线性标准曲线的建立

提取的重组质粒浓度为 $117.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 换算成拷贝数为 3.5×10^{10} 拷贝/ μL , 本试验建立的荧光定

量 PCR 方法以 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝稀释度为模板, 样本检测呈现良好的线性关系, 相关性为 0.999。 10^1 拷贝稀释度起峰较晚, 重复性较其他稀释度差, 故排除, 因此本方法判定 100 个拷贝以上有较好的线性相关性, C_t 值大于 33.085 为阴性, 反之为阳性。图 3 为以样本的拷贝数为横轴, 检测的循环数为纵轴, 建立的标准曲线。

2.5 重复性分析

用荧光定量 PCR 对 3 份不同的阳性细胞毒 DNA 进行重复性检测, 每次试验每个样本设 3 个重复, 并对检测结果进行统计学分析, 做出批内批间重复性评价, 结果表明批内检测变异系数 (CV) 均小于 0.85% (表 1), 批间检测变异系数 (CV) 均小于 1.13% (表 2)

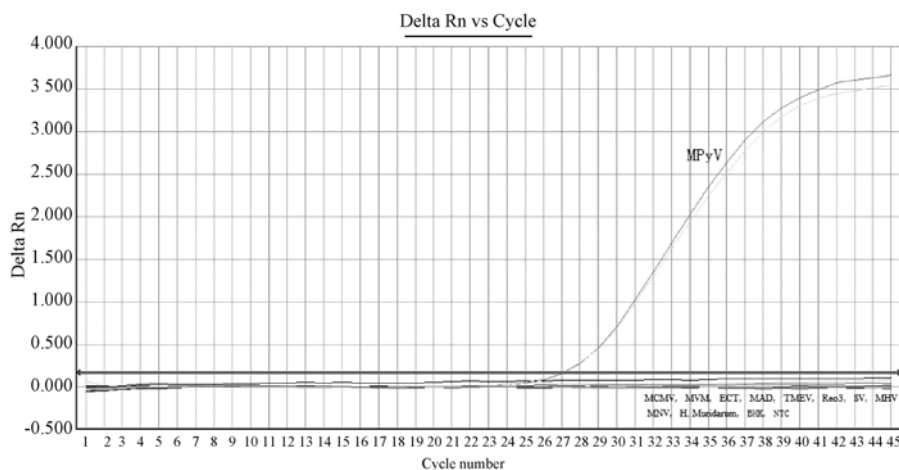
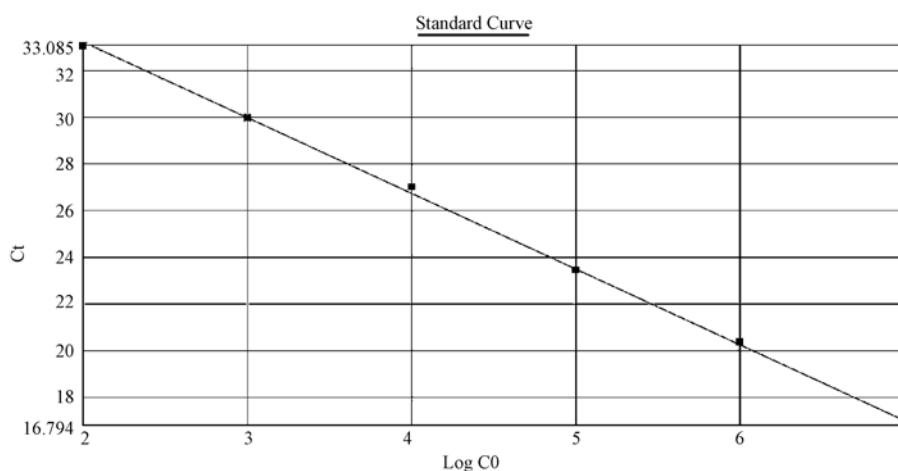


图 2 MPyV TaqMan-PCR 方法特异性试验结果

Fig. 2 Specificity evaluation of the TaqMan-PCR method



注: 从左到右依次为 10^2 到 10^7 拷贝 10 倍系列稀释质粒标准品; 标准曲线定量线性方程: $Y = -3.25x + 39.75, R^2 = 0.999$ 。

图 3 荧光定量 PCR 检测 MPyV DNA 的标准曲线

Note. Standard curve was obtained with serial dilution of the recombinant plasmid from 10^2 to 10^7 copies.

The quantitative linear equation of the standard curve: $Y = -3.25x + 39.75, R^2 = 0.999$.

Fig. 3 The standard curve of quantitative fluorescence PCR to detect the DNA of MPyV

表 1 阳性样本批内重复性实验

Tab. 1 The intra-assay reproducibility of the positive samples

阳性样本 Positive samples	Ct 值			平均值 Mean values	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	27.96	28.33	28.06	28.12	0.69
2	24.53	24.62	24.53	24.56	0.20
3	21.68	21.53	21.90	21.70	0.85

表 2 阳性样本批间重复性实验

Tab. 2 The inter-assay reproducibility of the r positive samples

阳性样本 Positive sample	Ct 值			平均值 Mean values	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	28.12	28.06	28.43	28.20	0.70
2	24.56	24.76	24.79	24.70	0.50
3	21.70	21.88	22.19	21.92	1.13

2.6 对人工感染 MPyV 组织样本的检测

从 21 日龄的试验感染鼠的组织脏器中检出病毒;6 只感染小鼠的肺脏与脾脏的荧光定量 PCR 检测均为强阳性(Ct 值在 21.10 ~ 28.61 内),且每只小鼠脾脏病毒含量高于肺脏,粪便检测 Ct 值在 22.24 ~ 32.97 范围内,2 只阴性对照小鼠均为阴性。

2.7 临床样品调查结果

用本研究建立的荧光定量 PCR 方法对广东省广州市一家大型实验鼠场抽样送检的 86 份粪便样品进行了测定,检出 3 只小鼠粪便中含有多瘤病毒,引物对 P1/P2 对此 3 只粪便 DNA 进行 PCR 扩增,凝胶电泳结果显示片段大小为 1 603 bp 左右,与预期片段大小一致,证实为 MPyV 阳性。

3 讨论

MPyV 感染对实验动物本身造成危害,对科研工作造成潜在干扰,且小鼠体内 MPyV 含量的变化是分析肿瘤发展、免疫反应及疾病表征的重要指标,而病毒感染的病理学研究亦需要一个敏感有效的检测方法。TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术具有较高的灵敏度和特异性,操作简单快速,且后期不需要开盖处理,大大降低了假阳性的发生,因其显著的优越性,已被国内外广泛应用于临床诊断^[7,8]。我们根据小鼠多瘤病毒基因组序列(GenBank: AF442959.1)中保守的序列设计引物和探针建立了实时荧光定量 PCR 检测 MPyV 病毒 DNA 方法,该方法只能从含有 MPyV 病毒的样本中检测出特异性扩增荧光信号,而不与正常组织及小鼠巨细胞病毒等非 MPyV 病原 DNA 发生交叉反应,充分证明了其检测的高度特异性。

用荧光定量 PCR 检测构建的 pMD-T19-MPyV 重组质粒标准品,在样本 DNA 为 10⁷ ~ 10²拷贝时呈

现良好的线性关系,其定量准确性可达到 100 拷贝,对应的 Ct 值为 33.085,即 Ct 值大于 33.085 判定为阴性,小于 33.085 判为阳性。重复性分析批内检测变异系数(CV)均小于 0.85%,批间检测变异系数(CV)均小于 1.13%,说明方法稳定可靠。且从样本核酸提取到报告结果全程在 3 小时内即可完成。

经母体垂直传播的 7 日龄幼鼠体内唾液腺、肾脏、肝脏和脾脏的病毒量最高^[9],本研究对 1 日龄 BALB/c 小鼠滴鼻 0.5 μL MPyV 病毒液因不确实病毒是否进入小鼠体内,故于 7 日龄进行了第二次滴鼻,21 日龄时取肺、脾脏及粪便。本研究未能在不同时间点采取组织样本以研究 MPyV 在小鼠体内载量的变化规律,但通过建立的荧光定量 PCR 检测结果可知感染后的小鼠在其 21 日龄均可检出 MPyV,且脾脏病毒含量高于肺脏,证明 MPyV 通过鼻腔进入体内并在体内增殖。同时 86 个实验小鼠场的粪便检查出 3 份样品为阳性,说明建立的定量方法能用于人工感染小鼠及临床样品的检测,也为进一步的研究提供了技术支持。佟巍等曾报道用血清学方法及普通 PCR 方法对北京地区实验小鼠 MPyV 感染情况进行初步调查,结果表明对实验动物使用机构检出了 MPyV^[4]。谢军芳^[10]也建立了小鼠多瘤病毒的血清学普通 PCR 检测方法。上述的血清学方法及普通 PCR 方法虽然能检测小鼠多瘤病毒 DNA,但不能定量,而本研究建立的 TaqMan 探针荧光定量不仅能满足小鼠多瘤病毒临床快速诊断检疫及其分子流行病学调查的需要,还能精确定量,敏感度高,报告结果快,能较好满足 MPyV 临床快速诊断、日常监测和分子流行病学调查的需要,对实验动物质量检测具有实际应用价值。

参考文献:

- [1] Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, et al. Murine polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection [J]. *Virology*, 2009, 387(1): 157–167.
- [2] Nakamichi K, Takayama-Ito M, Nukuzuma S, et al. Long-term infection of adult mice with murine polyomavirus following stereotaxic inoculation into the brain [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(8): 475–482.
- [3] Simon C, Klose T, Herbst S, et al. Disulfide linkage and structure of highly stable yeast-derived virus-like particles of murine polyomavirus [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(15): 10411–10418.
- [4] 佟巍, 张丽芳, 向志光, 等. 北京地区 2011~2012 年度实验小鼠 POLY 病毒感染情况调查与分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(12): 40–43.
- [5] Carroll J, Dey D, Kreisman L, et al. Receptor-binding and oncogenic properties of polyoma viruses isolated from feral mice [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(12): e179.
- [6] Benjamin TL. Polyoma virus: old findings and new challenges [J]. *Virology*, 2001, 289(2): 167–173.
- [7] 袁文, 王静, 赵维波, 等. 结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 50–56.
- [8] 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9): 68–72.
- [9] Zhang S, McNees AL, Butel JS. Quantification of vertical transmission of murine polyoma virus by real-time quantitative PCR [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(10): 2721–2729.
- [10] 谢军芳. TMEV、Ect、LCMV、POLY 和 PVM 病毒免疫血清制备及 ELISA 等检测方法的研究 [D]. 硕士学位论文, 中国医学科学院实验动物研究所, 2009, 45–54.

[修回日期] 2015-04-09