

PCR 技术在 SPF 级实验动物鼠检测中的应用

张越华 郑秀青

厦门大学实验动物中心 (福建厦门 361005)

中图分类号: S818.9 S865.13 文献标识码: A 文章编号: 1002-2996(2017)03-0046-03

The application of PCR technology in detection of SPF laboratory animal rats

ZHANG Yue-hua, ZHENG Xiu-qing

(Xiamen university laboratory animal center, Xiamen 361100, China)

Abstract: PCR as a new technology, more and more get people's attention to it in a quick, accurate and convenient advantages are widely used in scientific research fields, in recent years, the PCR technology development, and application in the field of experimental animals, greatly improving the monitoring level of experimental animals, in this paper, the PCR technology in the application of the SPF laboratory animal mouse pathogenic microorganism monitoring.

Key words: PCR technology; SPF; laboratory animal; mouse

摘要: PCR 作为一项新兴技术,越来越受到人们的重视。近几年来,PCR 技术不断发展,它以准确、快速、便捷等优点广泛应用于科学研究的各个领域。PCR 技术应用在实验动物领域中,可提高实验动物临床检测和监测水平。笔者主要介绍 PCR 技术在 SPF 级实验动物鼠病原微生物检测中的应用。

关键词: PCR 技术; SPF 级; 实验动物; 鼠

随着生命科学的迅速发展,实验动物作为生命医学研究的重要支撑条件越来越受到社会各领域的高度关注,科学的发展和更新的研究目标对实验动物的质量提出了越来越高的要求。实验动物质量直接影响到科学研究的结果、产品质量和人民的身体健康。微生物和寄生虫控制水平是实验动物质量高低及标准化程度的重要标志,因此,快速的检测与鉴定病原微生物是及时有效控制与预防病原微生物传播的重要前提。PCR 技术以其超强的特异性和灵敏性,检测速度快、准确性好等突出优点,广泛地应用在实验动物微生物和寄生虫检测的各个领域。

1 PCR 技术在 SPF 级实验动物(大、小鼠)细菌检测中的应用

SPF 级实验动物根据国家标准 GBGB 14922.2-2001 检测项目有金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、支原体、肺炎克雷伯杆菌、嗜肺巴斯德杆菌等。在检测这些微生物的过程中,传统的细菌学培养方法需要富集培养、选择性分离、形态特征观察、生理生化反应、血清学鉴定等过程,操作复杂、耗时费力,而且无法对人工难以培养的病原细菌进行检测。目前,越来越多的研究者使用 PCR 技术检测这些病原菌。

1.1 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌的代表,能引起皮肤软组织感染、肺炎、心内膜炎、肠炎、脑膜炎、

骨髓炎,甚至会引发败血症、中毒性休克综合征等全身感染。对于实验小鼠,金黄色葡萄球菌感染可以引起皮肤脓肿、化脓性睾丸炎、子宫内膜炎,并感染仔鼠,严重地影响了鼠群的自身繁育和动物实验的研究进程。高正琴等利用 PCR 技术扩增耐热核酸酶 nuc 基因检测金黄色葡萄球菌,实验从开始抽取 DNA 到 PCR 扩增产物电泳鉴定结束仅需 4 h,且能检出最低限度为 3 pg 的金黄色葡萄球菌 DNA 和 5 个金黄色葡萄球菌菌体^[1]。

1.2 沙门氏菌

沙门氏菌是各等级实验动物必检的项目之一,它主要引起肠炎和败血症,患病动物和隐性带菌动物均严重干扰科学研究的结果。张嘉宁等根据沙门氏菌保守基因的引物序列,14 株沙门氏菌在同等条件下均扩增出 495 bp 的特异性区带,8 株非沙门氏菌均未见任何扩增条带^[2]。王月玲等利用 invA 基因扩增出 284 bp 特异区带,检测灵敏度达到 50 个 CFU^[3]。

1.3 绿脓杆菌

绿脓杆菌是常见的条件性致病菌,正常存在体内,当其定居部位改变,动物免疫功能低下或失调等特定情况下会引起感染。常引起动物术后感染、败血症甚至死亡,严重影响实验动物质量,干扰试验研究结果。冯洁等根据金黄色葡萄球菌 nuc 基因,绿脓杆菌 toxR 基因、肺炎克雷伯杆菌 PhoE 基因序列设计三重 PCR^[4]。结果显示,3 对引物与不同模板组合进行扩增,每个反应均能扩增出预期目的片段,且没有其他非特异性扩增,无交叉反应。

1.4 鼠棒状杆菌

鼠棒状杆菌是实验动物病原菌必检项目,它在大、小鼠的上呼吸道寄居,主要在鼠群中呈隐形感染,

一旦暴发流行会导致动物成群覆没。唐连飞等根据鼠棒状杆菌 16SrRNA 的核酸序列,设计的引物特异性扩增出大小 200 bp 的 DNA 条带,并能检测到 100 个拷贝的模板 DNA,具有较高的敏感性^[5]。

1.5 支原体

目前,从大、小鼠群中能分离出 5 种支原体:关节炎支原体、鼠肺支原体、鼠支原体、溶神经支原体以及大肠支原体。支原体主要呈隐性感染,能引起呼吸系统和生殖系统疾病。黄冰等根据支原体通用引物及鼠肺支原体特异性引物检测大鼠喉气管拭子洗液和拭子支原体培养液,结果表明,PCR 通用引物检测比普通分离培养省时省力^[6]。

2 PCR 技术在 SPF 级实验动物(大、小鼠)病毒检测中的应用

对实验动物进行病毒微生物的检测方法通常包括抗病毒抗体的血清学检测和病原微生物核酸检测。血清学检测方法涵盖酶联免疫吸附实验(ELISA)、免疫荧光实验(IFA)、血凝实验(HA)和血凝抑制实验(HI)。病原学检测方法主要以聚合酶链反应(PCR、RT-PCR、Real-time PCR)检测动物组织器官或排泄物中的病毒核酸,其快速、敏感、特异、高效的特点可以将病毒的某基因片段扩增到数百万倍,能将含有少到几个病毒的样本检出。

2.1 小鼠肝炎病毒

小鼠肝炎病毒是实验小鼠病原微生物受感染中最常见的一种病毒,影响试验结果的准确性和可靠性。该病原主要存在于血液和内脏,使健康鼠群隐性感染,具有高传染性,可引起小鼠肝炎、脑炎和肠炎,当感染小鼠免疫功能下降时,也可能引起鼠群急性感染,导致动物死亡。赖国旗等根据国家标准(GB/T 14926.22-2001)规定的必须检测 MHV 4 个毒株即 MHV1、MHV3、A59、JHM,根据小鼠肝炎病毒的病毒基因、M 结构蛋白、mRNA 的基因保守区设计引物,利用两步法和一步法 RT-PCR,分别能特异性扩增出 600 bp 和 375 bp 的 MHV 核酸片段^[7]。

2.2 仙台病毒

仙台病毒(Sev)亦称乙型副流感病毒,属副粘病毒科。可引起啮齿类动物呼吸道疾病。该病一年四季都可发生,春季多发,环境因素突变可加重发病和流行。该病传播的主要方式是空气传播和直接接触。仙台病毒在鼠群中主要呈隐形感染,实验用鼠一旦感染,常会引起体内细胞免疫反应改变,干扰试验结果,影响幼鼠发育成长和成年母鼠的繁殖率下降。

熊炜等根据 Sev 的融合糖蛋白基因设计 RT-PCR 引物,扩增片段大小为 507 bp,经 RT-PCR 检测,仅有 Sev 阳性样品出现条带单一的特异性基因扩增,其他对照病毒样品均呈阴性^[8]。根据 Sev 基质蛋白(M)基因的保守序列,设计 Real-time RT-PCR 引物和 Taq Man 探针,经 Real-time RT-PCR 检测,Sev 阳性样品在 18 个~20 个循环处出现显著扩增,对照病毒样品未见扩增,且敏感性比普通 RT-PCR 提高了 3 个数量级。王宗耀等根据仙台病毒 F 蛋白基因序列设计引物,人工感染 8 周龄 BALB/c 小鼠,1 个月取小鼠肺脏用 RT-PCR 方法检测,出现与预期相符的 609 bp 条带,其它对照病毒均没有目的条带^[9]。

2.3 鼠痘病毒

鼠痘(mouse pox)又称脱脚病,是由鼠痘病毒(MPV)引起实验小鼠的一种烈性传染病,本病多呈暴发性流行,造成大批小鼠死亡,常造成全群淘汰,危害极大。临床症状是四肢、尾部和头肿胀、溃烂、坏死,甚至导致脚趾脱落。付瑞等根据鼠痘病毒保守序 crmD 设计一对引物,扩增得到约 436 bp 的单一目的片段,能检测到 10^{-5} 稀释的病毒^[10]。

3 PCR 技术在 SPF 级实验动物(大、小鼠)寄生虫检测中的应用

弓形虫病是一种重要的人兽共患寄生虫病,宿主种类十分广泛,人和多种动物均可感染。弓形虫为细胞内寄生原虫,能侵袭人和易感动物的多种脏器组织,临床表现多样,也是使胎儿致畸的一个重要因素。实验动物感染弓形虫后,不仅生长繁殖受到影响,而且干扰动物试验结果。小鼠感染弓形虫后,T、B 细胞免疫受抑制、巨噬细胞活化,血癌、乳腺癌和肝癌发生过程发生改变。但多数实验动物感染弓形虫后,没有临床症状,会对饲养和实验人员的健康造成严重威胁。陈俏梅等利用常规 PCR 按 B1 基因序列设计引物和巢式 PCR 按 P30 基因序列设计引物,2 种方法都扩增出特异条带,但巢式 PCR 的敏感度比常规 PCR 的敏感度高 100 倍^[11]。巢式 PCR 方法 2 d 后就能从血液中检测出 DNA,检出率为 33.3%,4 d 后检出率达 83.3%。

4 PCR 技术在 SPF 级实验动物(大、小鼠)真菌检测中的应用

国标中对实验动物皮肤病原菌的检测包括石膏样毛癣菌、石膏样小孢子菌、犬小孢子菌和猴类毛癣菌。龚巧玲等根据皮肤病原真菌通用引物(CHS1 1S,

兔抗犬瘟热病毒高免血清的制备及反复冻融对其效价的影响

李婷婷 赵益超 张伟 糜飞 殷健 沈晓东 陶明星

国药集团扬州威克生物工程有限公司 (江苏扬州 225127)

中图分类号: S852.5 文献标识码: B 文章编号: 1002-2996(2017)03-0048-03

The Preparation of Rabbit Anti-Canine Distemper Virus High-immune Serum and the Affection on the Titers of Repeated Freeze-thaw Cycle

Li Tingting, Zhao Yichao, Zhang Wei, Mi Fei, Yin Jian, Shen Xiaodong, Tao Mingxing

(Yangzhou VACBIO BIO-engineering Co Ltd, Yangzhou, Jiangsu, 225127, China)

Abstract: To prepare Canine distemper virus hyper-immune serum and exam the affection on the titers of repeated freeze-thaw cycle of serum, rabbit anti-CDV hyper-immune serum was obtained after multi subcutaneous immunization and serum antibody titers was detected after different number of repeated freeze-thaw cycle. The results showed that the titer of serum antibody obtained by our immunization program was high and stable. The turbidity of anti-CDV hyper-immune serum increased after repeated freeze-thaw cycle. When the number of repeated freeze-thaw cycle went to 40, the antibody titer decreased obviously.

Key words: Canine Distemper virus; Hyper-immune serum; Neutralizing antibody titer

摘要: 为制备犬瘟热病毒的高免血清及研究冻融次数对其效价的影响,笔者采用多次皮下免疫试验制备兔抗 CDV 高免血清,并将获得的血清反复冻融,以检测不同冻融次数对其中和抗体效价的影响。结果表明,按本试验的免疫程序获得的兔抗 CDV 血清中和抗体效价高且稳定,高免血清经反复冻融后浑浊度增加,当冻融次数达 40 次时,中和抗体效价出现明显下降。

关键词: 犬瘟热病毒;血清;中和抗体效价

随着我国水貂养殖业的迅速发展,各类传染病在水貂之间快速传播。其中,水貂犬瘟热病毒严重

威胁着我国的养貂等皮毛动物养殖的发展^[1-3]。国药集团扬州威克生物工程有限公司最新研发的水貂犬瘟热、病毒性肠炎二联活疫苗(CLO8 株 +NAO4 株)在临床试验中需要检测大量的血清样本,而采集的血清样本往往难以第一时间进行检测。在运输及保存过程中,血清可能会被反复冻融,从而可能会影响血清的效价,直接影响疫苗的效果评价。虽有研究表明,某些血清经反复冻融后效价无明显变化,但多采用 ELISA 法进行测定,而我们采用微量血清中和试

(接上页)

CHS1 1R)与随机引物 FM1 相结合用于实验动物皮肤真菌标准菌株的 PCR 扩增,均扩增出大小为 440 bp 的条带,其敏感性可达到 100 fg^[12]。

5 结论

实验动物检测技术的发展方向是提高检测效率(即方便、快速和大批量),试验条件标准化,检测的高特异性和高灵敏度。虽然 PCR 技术在实际应用中仍然存在一些缺陷,但随着 PCR 技术的不断发展和完善,其在实验动物微生物检测中的应用将会越来越广泛。

参考文献

[1] 高正琴,邢华,李厚达,等.PCR 技术在检测鼠金黄色葡萄球菌中的应用研究[J].中国实验动物学报,2003,11(1):26-28.
 [2] 张嘉宁,藏富妍,顾为望,等.应用 PCR 法检测小鼠沙门氏菌[J].中国实验动物学杂志,1999,9(1):45-47.
 [3] 王月玲,黄晓尤,刘云波,等.增菌 PCR 法检测小鼠沙门氏菌[J].上海实验动物科学,2000,20(3):144-147.
 [4] 冯洁,谢建云,胡建华,等.3 种条件性致病菌三重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].中国畜牧兽医,2015,42(6):1389-

1395.
 [5] 唐连飞,周智君,蔡婧怡,等.鼠棒状杆菌 PCR 检测方法的建立及其应用[J].中国比较医学杂志,2012,22(9):51-54.
 [6] 黄冰,陈系古,林勇,等.PCR 技术在鼠肺支原体检测中应用的初步研究[J].中国实验动物学报,1999,7(2):90-93.
 [7] 赖国旗,何明忠,谭毅,等.小鼠肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(6):762-763.
 [8] 熊炜,林颖峥,魏晓锋,等.仙台病毒核酸快速检测方法的建立和应用[J].中国动物传染病学报,2014,22(4):23-28.
 [9] 王宗耀,谢建云,邵伟娟,等.仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J].中国比较医学杂志,2008,18(1):49-53.
 [10] 付瑞,岳秉飞,贺争鸣,等.鼠痘病毒 PCR 检测方法的建立及在鼠源性生物制品检定中的应用[J].实验动物科学,2012,29(3):12-14.
 [11] 陈俏梅,张俐,何国声,等.检测实验动物弓形虫感染的两种 PCR 方法的建立和比较[J].中国兽医寄生虫病,2003,11(20):5-8.
 [12] 龚巧玲,郑龙,张焕玲,等.PCR 方法检测实验动物皮肤病原真菌[J].中国比较医学杂志,2007,17(3):131-135.

基金项目:福建省重点项目(2014Y0083)。

通讯作者:郑秀青,1979 年出生,女,实验师。