

三种小鼠 RNA 病毒样品储运条件对核酸检测的影响

李欣悦, 佟巍, 张丽芳, 阮研硕, 丛日旭, 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 分析实验动物小鼠三种肠道病毒 MHV、Reo-3、MNV 生物样品的储运条件对病原核酸检测结果的影响。方法 将 MHV、Reo-3、MNV 三种 RNA 病毒与小鼠盲肠内容物混合制备参考品;保存剂包括 RNA 提取试剂裂解液 (BufferAVL) 及生理盐水, 存储温度为 4℃ 及室温 (22℃~25℃); 在保存 1、2、3、7、14 d 时间点提取各样品核酸, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测病毒样品量的变化。结果 生理盐水作为保存剂核酸样品检出量低于 RNA 提取试剂裂解液组, 且检出量下降明显; Buffer AVL 组样品储于 4℃ 条件的样品检出量优于室温 25℃ 的条件; 4℃-buffer AVL 组的三种病毒参考品在 3 d 时间点的病毒检出量在 50% 以上, 在 7 d 时间点仍有检出, 但 14 d 时已检测不到。结论 三种小鼠 RNA 病毒样品储运条件优选使用 RNA 提取试剂裂解液, 并在低温条件下储运, 最好在 3 d 内完成核酸检测。

【关键词】 MHV; Reo-3; MNV; 实时荧光定量 PCR; 储运

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0098-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.017

Effects of transport and storage conditions on the nucleic acid detection for three kinds of mouse RNA viral samples

LI Xinyue, TONG Wei, ZHANG Lifang, RUAN Yanshuo, CONG Rixu, XIANG Zhiguang*
(Institute of Laboratory Animals, CAMS/PUMC, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To analyze the effect of transport and storage conditions on the detection of pathogenic nucleic acid MHV, Reo-3, MNV in laboratory mouse cecal contents samples. **Methods** MHV, Reo-3 and MNV were mixed with mouse cecal contents and used as reference samples, respectively. They were placed in the lysis buffer of RNA extraction reagent (buffer AVL) or normal saline, and stored at 4℃ and room temperature (22℃-25℃). RNA of these samples was extracted at 1, 2, 3, 7, and 14 days. Then the amount of nucleic acid in samples was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** A greater decrease of the amount of nucleic acid was observed when the samples were placed in normal saline than that kept in buffer AVL. The amount of nucleic acid in samples stored at 4℃ was found to be higher than that stored at 25℃ room temperature. The amount of nucleic acid in the samples which were kept in buffer AVL at 4℃ for 3 days was higher than 50%, still detectable in the samples kept for 7 days, and undetectable at 14 days. **Conclusions** Mouse cecal content samples are preferably stored in the lysis buffer of RNA extraction reagent and transported at 4℃ for the detection of MHV, Reo-3, and MNV nucleic acid. It is better to complete the detection test within 3 days.

【Key words】 mouse hepatitis virus; MHV; Reovirus 3; Reo-3 virus; murine norovirus; MNV; real-time fluorescence quantitative PCR; storage and transport

【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

核酸检测在实验动物微生物质量控制中发挥着重要作用,它可以在实验动物感染早期检测到病原微生物核酸,还可以持续监测感染动物的排毒状态^[1]。小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)和呼肠孤病毒 III 型(reovirus 3, Reo-3)是最主要的且是最常见的啮齿类动物感染病原体^[2],小鼠诺如病毒(murine norovirus, MNV)是实验小鼠感染率较高的病原体^[3]。这三种病毒常呈隐性感染,一定条件下才会发病,严重影响实验动物健康和实验研究。因此对实验动物粪便或盲肠内容物进行病毒核酸检测是非常重要的。目前已建立实验动物病毒核酸检测方法,在实际应用中采样处理和样品检测步骤中间,需经过一段时间的运输和储存。但实验动物粪便或盲肠内容物复杂,样品的运输或保存不当可能会影响核酸提取质量,进而影响核酸检测结果,特别是 RNA 病毒。针对病毒特性和不同类型的样品的特点,应确定相应运输温度和核酸稳定剂的使用。RNA 提取试剂的裂解液可抑制生物样品中的 RNA 酶,可以作为备选储存剂。而在样品运输时较为方便的条件为蓝冰运输,该运输温度可维持在 0℃~8℃。本研究比较了 MHV, Reo-3, MNV 三种病毒参考品在裂解液和生理盐水中,在不同储存温度及时间等运输条件下病毒检出量的变化。

1 材料和方法

1.1 参考品的制备

MHV、Reo-3、MNV 等病毒来源于 the American Type Culture Collection (ATCC), 本室保存。小鼠盲肠内容物采自-送检至我实验室的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所[SYXK(京)2014-002]进行,并获得本单位实验动物使用和管理委员会的批准(IACUC; XZG17001)。对盲肠内容物应用核酸检测方法排除

了 MHV、Reo-3、MNV 及国家标准须排除的病原项目。将 SPF 级小鼠的盲肠内容物混合分为三组,按每 0.1 g 加入 50 μL 50 倍稀释的病毒原液,制成三种病毒的参考品,使参考品初始病毒核酸量在 10⁴~10⁷ copies/μL 范围之间。

1.2 实验方法

1.2.1 样品分组及保存

将参考品按 1:4 的比例加入 Buffer AVL, 颠倒混匀 10 次,室温放置 2 min 后,按每管 200 μL 分装制成 Buffer AVL 组样品,分别置于 4℃ 冰箱(2℃~8℃)和室温(22℃~25℃)保存 1、2、3、7、14 d。生理盐水(normal saline, NS)组样品以同样的方式处理。分别于各个时间点取两个平行样品置 -80℃ 保存。

1.2.2 样品 RNA 提取

各时间点样品经 12 000 r/min 离心 5 min 后,取 140 μL 上清液,用 QIAGEN 公司病毒 RNA 提取试剂盒进行样品 RNA 提取。

1.2.3 探针法实时荧光定量 PCR 方法检测

试剂采用 Takara 公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit, 引物和探针序列^[4-5]见表 1。用 ABI 7500 Fast 实时 PCR 系统对各样品进行荧光 PCR 分析。以 1 × 10¹ ~ 1 × 10⁷ copies/μL 的稀释质粒样品制作标准曲线,计算各样品的病毒检出量。

1.2.4 实验环境

所有实验步骤均在生物安全二级(BSL-2)实验室内完成,其中病毒参考品的制备,样品分组以及样品 RNA 提取当中的裂解步骤均在 A2 型生物安全柜内操作。

2 结果

2.1 参考品初始病毒核酸量及其在 real time PCR 中的 CT 值

本研究以参考品 0 d 时检测的病毒检出量为基

表 1 引物和探针序列

Tab. 1 Primers and probe sequences

名称 Names	引物和探针序列(5'→3')	产物大小(bp) Product size
MHV-F	GGAAGTCTCTCGTTGGGCATTATACT	
MHV-R	ACCACAAGATTATCATTTTACAACATA	108
MHV-probe	FAM-ACATGCTACGGCTCGTGTAAACCGAACTGT-BHQ1	
Reo-F	TGTGAGGTGACCGCAATAG	
Reo-R	CGTTGATGCAGCGTGAAGAG	67
Reo-probe	FAM-CGCCCCGCTGCTGATCAGAGTATG-BHQ1	
MNV-f	TCTGTCTGCGCTGGGTGC	
MNV-r	GCTGCGCCATCACTCATCC	96
MNV-probe	FAM-ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG-BHQ1	

值,计算并比较各时间点样品病毒检出量的变化。其中 MHV 参考品 0 d 时 CT 值为 19.31,病毒核酸量为 2×10^6 copies/ μ L。Reo-3 参考品 0 d 时 CT 值为 25.05,病毒核酸量为 5×10^4 copies/ μ L。MNV 参考品 0 d 时 CT 值为 16.30,病毒核酸量为 2.5×10^5 copies/ μ L。

2.2 保存剂对核酸样品检出量的影响

无论是 4℃ 还是室温保存,生理盐水组的参考品 2 d 病毒检出量都在 50% 以下,远低于 buffer AVL 组。其中 MHV 生理盐水组 1 d 时已降低至 15%;Reo-3 生理盐水组 1 d 病毒检出量为 73%,而 2 d 时已降低至 7%,其下降幅度最为显著,如图 1 ~ 6 所示。因此,buffer AVL 可以作为样品保存剂,具有延缓 RNA 降解的作用。

2.3 存储温度对样品检出量的影响

4℃ buffer AVL 组 MHV 参考品在 1、2、3、7 d 病毒检出量分别降低了 0%、16%、42%、76%,而室温组样品在 1、2 d 病毒检出量分别降低了 14%、69%,如图 1 和图 2 所示;4℃ buffer AVL 组 Reo-3 参考品 1、2、3、7 d 病毒量分别降低了 3%、11%、17%、50%,而室温组样品在 1、2 d 病毒检出量分别降低了 3%、40%,如图 3 和图 4 所示;4℃ buffer AVL 组 MNV 参考品 1、2、3、7 d 病毒量分别降低了 11%、16%、35%、60%,而室温组样品在 1、2 d 病毒检出量分别降低了 49%、56%,如图 5 和图 6 所示。Buffer AVL 组样品室温组样品的病毒检出量的下降幅度明显高于 4℃ 组。

2.4 保藏时间对样品核酸检出量的影响

4℃ Buffer AVL 组 MHV、Reo-3、MNV 三种病毒参考品在 3 d 时间点的病毒检出量在 50% 以上,分别为 58%、83%、65%;在 7 d 时间点仍有检出,但已经降低至 24%、50%、40%;在 14 d 时间点无检出,如图 1、图 3 和图 5 所示。

3 讨论

3.1 实验动物粪便样品应使用具有抑制 RNA 酶活性的保存剂进行运输

实验动物样品从现场采集到样品检测之间存在一段运送过程。动物粪便样品以及盲肠内容物等样品成分复杂,含有大量的酶类,其中包括 RNA 酶。而这些样品中的病毒等检测的靶标为病毒的核酸,极易受到样品中 RNA 酶的影响而降解。因此需要尽早抑制样品中 RNA 酶的活性。本研究结果

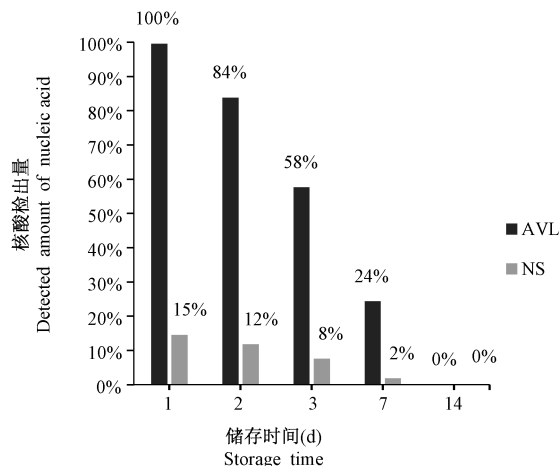


图 1 4℃ 保存盲肠内容物样品不同保存天数小鼠肝炎病毒核酸检出量变化

Fig. 1 Changes of the amount of MHV nucleic acid in cecal content samples stored at 4℃ for different days

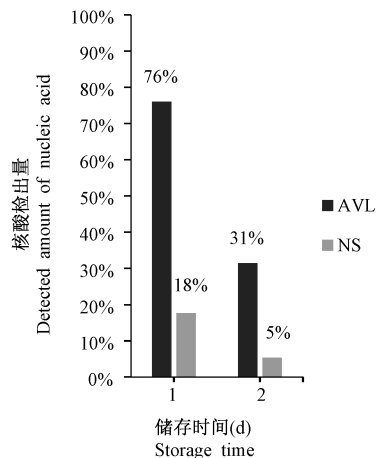


图 2 室温保存盲肠内容物样品 2 d 内小鼠肝炎病毒核酸检出量变化

Fig. 2 Changes of the amount of MHV nucleic acid detected in cecal content samples stored at room temperature for 2 days

表明,选择使用 RNA 提取试剂中的裂解液为保存液,与生理盐水组相比,可以提高核酸检出率。究其原因,在于 RNA 提取试剂裂解液中的 RNA 酶抑制剂有效的抑制了内源性的 RNA 酶,对核酸样品进行了有效保护。

3.2 关于低温运输

4℃ Buffer AVL 保存条件的三种病毒参考品的核酸量降低幅度小于室温条件,说明低温运输与有利于样品核酸的检测。使用干冰运输,储存温度接近 -70℃,某种意义上对核酸样本的保护更有利。但干冰运输的成本较高。在本研究中使用蓝冰运输并结合使用 RNA 提取试剂中的裂解液作为保护

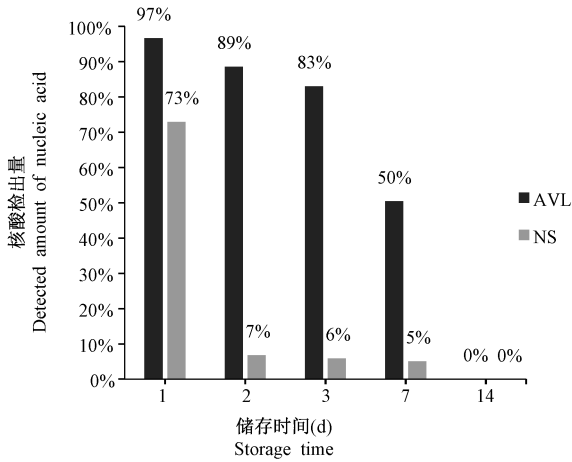


图 3 4°C 保存盲肠内容物样品不同保存天数的呼肠孤病毒 III 型核酸检出量变化

Fig. 3 Changes of the amount of Reo-3 nucleic acid detected in the cecal content samples stored at 4°C for different days

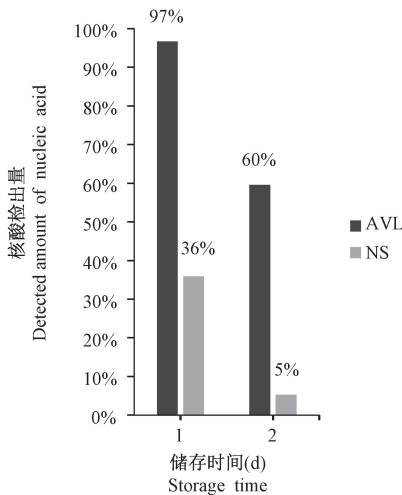


图 4 室温保存盲肠内容物样品不同保存天数的呼肠孤病毒 III 型核酸检出量变化

Fig. 4 Changes of the amount of Reo-3 nucleic acid detected in the cecal content samples stored at room temperature for 2 days

剂,在 3 d 时间点的病毒检出量减少量在 50% 以内,我们认为 MHV、Reo-3、MNV 三种病毒盲肠内容物样品的核酸检测在 3 d 内完成,其检测结果较为可靠。因此,以 RNA 提取试剂中的裂解液为保护剂和蓝冰运输(0°C~8°C)即可基本满足此类核酸检测样品短途储运的需求,且可降低运输成本。

3.3 核酸定量检测方法的适用性

实验动物病原微生物核酸检测方法包括普通 PCR 以及实时荧光定量 PCR 等技术,其检测的目标为微生物的核酸分子。检测结果以检出或未检出

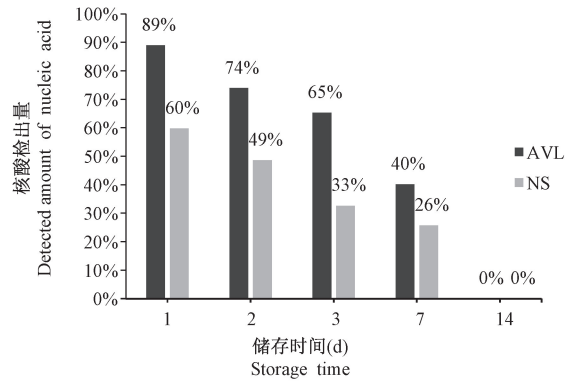


图 5 4°C 保存盲肠内容物样品不同保存天数的鼠诺如病毒核酸检出量变化

Fig. 5 Changes of the amount of MNV nucleic acid detected in cecal content samples stored at 4°C for different days

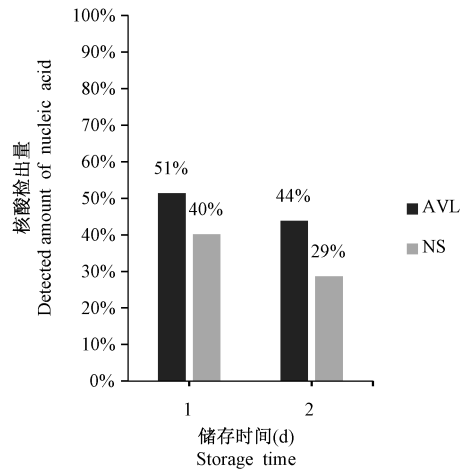


图 6 室温保存盲肠内容物样品不同保存天数的鼠诺如病毒核酸检出量变化

Fig. 6 Changes of the amount of MNV nucleic acid detected in the cecal content samples stored at room temperature for 2 days

进行描述,出具定性结果报告。本研究为了分析检出量的变化采用了实时荧光定量 PCR 的方法。针对三种消化道病原体建立的 real-time PCR 检测体系,其对低拷贝样品的检测下限达到 10 copies/μL, (MHV 1 × 10¹ copies/μL 样品 CT 值 35.61; Reo-3 1 × 10¹ copies/μL 样品 CT 值 36.96; MNV 1 × 10¹ copies/μL 样品 CT 值 31.05,结果未显示),此类方法满足实验动物粪便样品的检测需求。

为了更好的测试保存和运输条件对于核酸样品的影响,本研究所使用的模拟样品的起始浓度为 5 × 10⁴ ~ 2 × 10⁶ copies/μL,检测的 CT 值为 16.30 至 25.05,此样品浓度在 real-time PCR 检测方法的最佳检测范围内^[6],在核酸样品浓度有限降低时(本

研究中下降 98%) 仍可有效检测。通过 MHV、MNV 感染实验动物获得的阳性盲肠内容物和粪便样品, 经 real-time PCR 检测样品 CT 值在 20 ~ 28 范围内^[1, 7-8], 而本研究的模拟样品与实际样品相比其病原核酸浓度偏高, 其目的在于展示储运条件对于核酸样品检测的影响。

实验动物携带其他病原体的样品对储运条件的敏感性亦可进行类似的测试。同时实验动物病原核酸的检测也应该考虑核酸扩增反应存在的其他干扰因素。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Ohsugi T, Matsuura K, Kawabe S, et al. Natural infection of murine norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice [J]. Front Microbiol, 2013, 4(1): 12.
- [4] Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials [J]. Lab Anim, 2003, 37(4): 341 - 351.
- [5] 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): 49 - 56.
- [6] Bar T, Kubista M, Tichopad A. Validation of kinetics similarity in qPCR [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(4): 1395 - 1406.
- [7] 熊炜, 蒋静, 张强, 等. 小鼠肝炎病毒核酸快速检测方法的建立和应用 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 1 - 5.
- [8] 高洁, 贺争鸣. 小鼠诺如病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 70 - 76.
- [9] Gravina P, Ciotti M, Masini S, et al. Impact of storage conditions on genetic analysis or viral load determination in clinical specimens [J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(2): 280 - 282.
- [10] Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance [J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(2-3): 126 - 139.
- [11] 王德文, 师玲玲, 刘赴平, 等. 现行常规采血流程对 HIV RNA 筛查的影响评估 [J]. 中国热带医学, 2007, 7(11): 2100 - 2101.
- [87] Blasco H, Corcia P, Pradat PF, et al. Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2013, 12(8): 3746 - 3754.
- [88] Liao B, Zhao W, Beers DR, et al. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS [J]. Exp Neurol, 2012, 237(1): 147 - 152.
- [89] Beers DR, Zhao W, Liao B, et al. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice [J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(5): 1025 - 1035.
- [90] Roberts K, Zeineddine R, Corcoran L, et al. Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype [J]. Glia, 2013, 61(3): 409 - 419.
- [91] Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated mechanisms in the pathoproduction of amyotrophic lateral sclerosis [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2013, 8(4): 888 - 899.
- [92] O'Rourke JG, Bogdanik L, Yúñez A, et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice [J]. Science, 2016, 351(6279): 1324 - 1329.
- [93] Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease [J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 619 - 643.
- [94] Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 367 - 402.
- [95] Sasaki A. Microglia and brain macrophages: An update [J]. Neuropathology, 2016, 37(5): 452 - 464.
- [96] Solé-Domènech S, Cruz DL, Capetillo-Zarate E, et al. The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2016, 32: 89 - 103.
- [97] Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(5): 601 - 612.
- [98] Fan Y, Xie L, Chung CY. Signaling pathways controlling microglia chemotaxis [J]. Mol Cells, 2017, 40(3): 163 - 168.

[收稿日期]2017 - 09 - 19

(下接第 126 页)

[收稿日期]2017 - 07 - 27