

检测小鼠肝炎病毒的 SNaPshot 分型技术 及其应用

赵婷婷^{①②} 王会娟^① 王 蕾^① 谭 毅^① 王 胜^①
张道华^① 赖国旗^{①*}

① 重庆医科大学实验动物中心 重庆 400016; ② 湖北医药学院基础医学院 十堰 442000

摘要: 建立一种能对 MHV₁、MHV₃、JHM、A₅₉ 4 种常见小鼠肝炎病毒 (Murine Hepatitis Virus, MHV) 进行分型检测的 SNaPshot 新方法。根据 MHV 4 种常见毒株基因序列比对结果, 设计内外两对 PCR 通用引物和 4 个单碱基延伸引物, 提取 MHV 4 种常见毒株 RNA, 逆转录后进行 PCR 扩增, 纯化扩增产物, 用 SNaPshot 方法进行单碱基延伸, 将产物进行毛细管凝胶电泳, 根据电泳结果分析毒株基因型。优化 SNaPshot 分析条件, 进行灵敏度、特异性分析。用 ELISA 法和 SNaPshot 方法检测 41 例小鼠 (*Mus musculus*) 血清样本, 将阳性样本进行克隆测序检测。当 T1 ~ T4 引物修饰的 poly T 的数量分别为 0、3、10 和 15, 其浓度比为 4 : 6 : 5 : 10, 引物大小分别为 16 bp、19 bp、26 bp 和 31 bp 时, SNaPshot 分型检测 MHV cDNA 的最低浓度为 1.25 mg/L, 特异性为 100%, 与 ELISA 和 T-克隆测序比较, 其准确性为 100% (41/41), 阳性样本均为 JHM 毒株。实验结果说明, 所建立的 SNaPshot 检测方法能对 MHV₁、MHV₃、JHM、A₅₉ 进行分型检测, 并且具有灵敏、特异、准确的优点。

关键词: 小鼠肝炎病毒; SNaPshot 检测; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 06-1084-08

Typing Mouse Hepatitis Viruses Using SNaPshot Assay

ZHAO Ting-Ting^{①②} WANG Hui-Juan^① WANG Lei^① TAN Yi^① WANG Sheng^①
ZHANG Dao-Hua^① LAI Guo-Qi^{①*}

① *Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016;* ② *Basic Medicine College, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China*

Abstract: SNaPshot assay is a single base extension assay which, by extending a base after four primers, displays color of the base through capillary gel electrophoresis to judge the genotype of samples. We aimed to establish a SNaPshot assay to type mouse hepatitis viruses (MHV), including MHV₁, MHV₃, JHM, and A₅₉. The SNaPshot assay was developed after polymerase chain reaction (PCR) using cDNA from MHV strains

基金项目 重庆市科委应用开发项目 (No. CSTC2014YYKFA110033);

* 通讯作者, E-mail: a68895078@21cn.com;

第一作者介绍 赵婷婷, 女, 助理实验师; 研究方向: 实验动物病原菌的检测; E-mail: zttmtt@sina.cn.

收稿日期: 2015-09-26, 修回日期: 2016-02-18 DOI: 10.13859/j.cjz.201606016

two pairs of universal PCR primers and four single-base primers that were designed according to the conserved sequence of the four strains. The PCR products were analyzed by capillary gel electrophoresis. The sensitivity and specificity of the SNaPshot assay were analyzed using gradient dilution method and compared with human Hepatitis B virus (HBV). The accuracy of the SNaPshot assay was analyzed using 41 murine (*Mus musculus*) serum samples by comparing with ELISA and sequencing the samples containing MHVs. The optimal conditions of SNaPshot assay were that T1 - T4 primers were 0, 3, 10, and 15 Ts in modification, 4 : 6 : 5 : 10 in concentration, and 16 bp, 19 bp, 26 bp and 31 bp in length. The sensitivity of the SNaPshot assay was 1.25 mg/L (MHV cDNA) (Fig. 3), the specificity was 100% (Fig. 4), and the accuracy was 100% (41/41, Table 3), which was confirmed by ELISA, and the sequencing data. The SNaPshot assay is a sensitive, specific, and accurate method for typing MHV₁, MHV₃, JHM, and A₅₉.

Key words: Murine Hepatitis Virus; SNaPshot assay; Enzyme linked immunosorbent assay

小鼠肝炎病毒 (Murine Hepatitis Virus, MHV) 为 RNA 病毒, 是清洁级及以上级别实验用小鼠 (*Mus musculus*) 微生物检测中的重要检测项目, 其主要包括 4 个毒株, 即 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉。MHV 感染可引起小鼠病毒性脑炎、病毒性肝炎或病毒性肠炎。国家标准 (GB/T 14926.22-2001) 规定普通级小鼠每 3 个月至少检测一次 MHV, 检测结果为阳性者, 将直接淘汰。故 MHV 的检测是实验用小鼠质量控制的重要举措。

不同的 MHV 毒株因其嗜组织性不同而导致感染小鼠后具有不同的致病性, 如 JHM 为嗜神经毒性, MHV₃ 为嗜肝性, A₅₉ 同时具有嗜神经毒性和嗜肝性 (奥斯伯等 2005)。感染不同毒株的小鼠对建立某些实验动物模型具有重要意义, 如 MHV₃ 可诱导建立小鼠爆发型或病毒性肝炎模型 (陆玉蕾等 2012, 吴迪等 2012), A₅₉ 感染可构建因慢性病毒性肝炎诱发肝组织脂肪变性的动物模型和湿热证小鼠模型 (苏丽贤等 2011, 甘露等 2012)。感染不同的毒株将对动物实验结果产生显著的影响, 如在 CD8 T 细胞缺陷鼠免疫学相关实验研究中, A₅₉ 感染将导致其巨型胶质细胞、淋巴细胞等清除病毒抗原的能力延迟; 在应用仙台病毒诱导淋巴细胞干扰素分泌的研究中, MHV₃ 的感染将增强仙台病毒的易感性 (周艳 2008)。故 MHV 常见毒株的分型检测对保障实验动物质量的可靠

性、实验动物模型的相似性和动物实验结果的准确性具有重要意义。

目前, 用于 MHV 检测的方法主要有酶联免疫吸附试验、免疫酶试验和免疫荧光试验 (袁文等 2009, 胡晓燕等 2011)。此类方法虽然操作简便, 但是均不能检测出 MHV 感染的具体毒株, 且假阳性率较高。

SNaPshot 基因分型技术是一种新兴的分析检测技术, 能进行 SNPs 分型 (Hurst et al. 2009, Wang et al. 2010, 孙亚男等 2013)。因其具有分型准确、可同时检测多个位点、不受限于 SNP 位点的多态性、检测需要的样本量少、可检测出受污染的样本等特点, 在疾病相关基因分型研究 (张成才等 2014, 王玉珏等 2015)、个体治疗和临床检验 (刘小琦 2013)、法医学检测 (孙亚男等 2013)、遗传检测 (谢雯等 2012, 胡抗等 2013) 等领域取得了显著成果。

本实验在 MHV RT-PCR 后, 根据 SNaPshot 单碱基延伸方法原理, 建立了一种能对 MHV 的 4 个常见毒株 (MHV₁、MHV₃、JHM、A₅₉) 进行分型检测的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与血清标本 MHV₁、JHM、A₅₉ 均购于美国模式菌种收集中心 (American Type

Culture Collection, ATCC), MHV₃ 和乙型肝炎病毒由重庆医科大学实验动物中心保存。41 只小鼠血清标本为重庆地区各单位送检的 SPF 级小鼠的样本, 实验动物使用许可证号 SYXK (渝) 2012-0001。并按实验动物使用的减少、优化和替代原则给予人道主义关怀。

1.1.2 试剂 病毒 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、*Taq* DNA 酶、pMD 19-T 载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 DH5 α 均购于 TaKaRa 公司; Applied Biosystems SNaPshot Multiplex 购于 ABI 公司; 虾碱性磷酸酶 (shrimp alkaline phosphatase, SAP)、核酸外切酶 (*Exo* I) 购于 USB 公司。ELISA 试剂盒购自中国药品生物制品检定所, POP6 分离胶和测序试剂盒购于欧比特公司。

1.2 方法

1.2.1 MHV SNaPshot 单碱基延伸方法原理 通过设计 4 个单碱基延伸引物, 并修饰不同数

量的 Poly T, 以纯化后的普通 RT-PCR 产物为模板, 加入不同颜色荧光标记的 ddNTP (A: 绿色, T: 红色, C: 黑色, G: 蓝色)、4 条单碱基延伸引物 (T1 ~ T4) 和 SNaPshot 酶进行 SNaPshot 反应, 延伸引物 T1 ~ T4 后一个碱基而停止, 经测序仪电泳后, 可见 4 个位点出现不同颜色的峰, 通过判断毒株 4 个位点的碱基种类, 进而判断该毒株的基因型 (图 1)。

1.2.2 MHV 通用引物和单碱基延伸引物的设计 将 NCBI 中 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 基因组全长序列于软件 SECentral 中进行比对分析, 根据 4 个毒株保守区设计 2 对 PCR 扩增通用引物, 即 P1 和 P2 及 P3 和 P4 (表 1), 根据 4 个毒株通用引物内各自特异性碱基, 设计 4 条单碱基延伸引物 T1 ~ T4 (图 1), T1 ~ T4 分别修饰 0 个、5 个、10 个、15 个 Poly T (图 1, 表 2)。

1.2.3 MHV RNA 的提取及逆转录 分别取

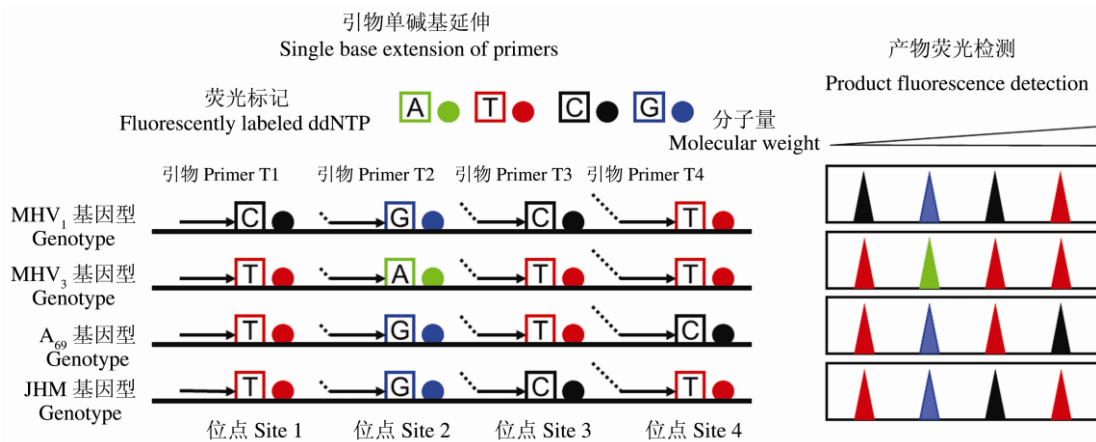


图 1 MHV SNaPshot 分析原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of MHV SNaPshot analysis

表 1 小鼠肝炎病毒 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primers of murine hepatitis virus (MHV)

引物名称 The name of primers	引物序列 (5' - 3') The sequences of primers
内引物上游 Inner primer upstream P1	CGACAGGGAAGGGATTGCTGA
内引物下游 Inner primer downstream P2	CTGCAGACAACAAGGTCATGC
外引物上游 Outer primer upstream P3	CTCAAACCTCCCATCGCCTCTG
外引物下游 Outer primer downstream P4	CCGCACAAGCAGCCCTAAAGA

表 2 小鼠肝炎病毒 SNaPshot 单碱基延伸引物

Table 2 SNaPshot single base extension primers of murine hepatitis virus (MHV)

引物名称 Name of primers	基因型 Genotype	序列 (5' - 3') Sequences	延伸的单碱基 Single base of extension	延伸位点 Sites of extension	大小 Size (bp)
T1	MHV ₁	AAGTGTGTGGATTCTA	C	nt3526	16
T2	MHV ₃	TTTTGCAGAGTTTACCTTT	A	nt3591	19
T3	JHM	TTTTTTTTTAAACTAGTTAAGAGCG	T	nt3705	26
T4	A ₅₉	TTTTTTTTTTTTTTTTGTGTCTCATATGTG	T	nt3882	31

200 μ l MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 病毒液按病毒 RNA 提取试剂盒说明书, 提取病毒 RNA, 用 NANODROP 2000 定量后逆转录为 cDNA。逆转录步骤为: 取 Primer Script[®] RT Enzyme Mix 1 1 μ l, OligodT Primer (50 μ mol/L) 1 μ l, 5 \times Primer Script[®] Buffer (for Real Time) 4 μ l, Random 6mers (100 μ mol/L) 4 μ l, Total RNA 500 ng, 用 RNase Free dH₂O 补足 20 μ l。逆转录条件为 42 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。

1.2.4 MHV 的 PCR 扩增及产物纯化 取 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ cDNA 进行 PCR 扩增, 步骤如下: 取 MHV cDNA 100 ng, 5 \times Primix Taq 12.5 μ l, 25 μ mol/L 的上下游引物各 0.5 μ l, ddH₂O 补足 25 μ l 混匀。PCR 扩增条件, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测并定量。取 MHV PCR 产物 15 μ l, Exo I 2 U, SAP 5 U, 混匀于 PCR 仪中 37 $^{\circ}$ C 1 h, 75 $^{\circ}$ C 15 min, 纯化产物置于 4 $^{\circ}$ C 瞬时保存。

1.2.5 MHV 的 SNaPshot 分析及测序 PCR 纯化产物 1 μ l, 4 种单碱基延伸引物混合物 (T1 ~ T4) 1 μ l, Premix 5 μ l, ddH₂O 补足 10 μ l, 混匀后于 PCR 仪中 96 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 25 个循环; 反应体系中加入 SAP 1 U, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 75 $^{\circ}$ C 15 min。取上述 SNaPshot 单碱基延伸后的样本 0.5 μ l、Applied Biosystems Liz120 size standard (内标) 0.5 μ l 和 Hi-Di 9 μ l 混合, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 冰上放置 5 min, 后用 POP-6polymer 于 3100 测序仪电泳, 并用

GeneMapper 3.5 软件分析电泳结果。另取 SNaPshot 分析后的样本 5 μ l 送公司测序。

根据 SNaPshot 分析后的电泳结果中峰的间距和峰值大小, 分别调节 4 种单碱基延伸引物上修饰的 poly T 的数量和单碱基延伸引物的浓度。将定量后的 A₅₉ cDNA PCR 产物分别按 20 mg/L、10 mg/L、5 mg/L、2.5 mg/L、1.25 mg/L、0 mg/L (ddH₂O) 浓度稀释, 进行 SNaPshot 分析并电泳。SNaPshot 单碱基延伸分析 MHV (MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉) cDNA、乙型肝炎病毒和空白对照 (ddH₂O), 并电泳。同时, 将这 4 个病毒株 cDNA 送上海英骏生物技术有限公司测序, 将两者结果进行比较。

1.2.6 MHV SNaPshot 检测方法的初步应用 根据 ELISA 试剂盒操作说明书对重庆地区各单位送检的 41 份小鼠血清样本进行 MHV 检测。根据病毒 RNA 提取试剂盒, 提取上述 41 份小鼠血清中 MHV RNA, RT-PCR 后, 将阳性样本 PCR 产物进行纯化, 并进行 SNaPshot 单碱基延伸分析后电泳。将 SNaPshot 单碱基延伸分析和 ELISA 法检测出的阳性样本进行 PCR 扩增, 将结果呈阳性的样本进行 T-克隆, 挑取单菌落进行 MHV PCR 扩增, 将阳性样本的菌液送公司测序, 比对其基因序列确定各样本的基因型。

2 结果

2.1 MHV 的 PCR 扩增

以已知的病毒株 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ cDNA 分别经 P3/P4 和 P1/P2 扩增后获得

765 bp 和 625 bp 目的条带 (图 2)。41 份小鼠血清样本经 P3/P4 扩增后, 阳性样本获得 765 bp PCR 产物, 经 P1/P2 扩增后得 625 bp PCR 产物。

2.2 MHV 的 SNaPshot 分析实验条件优化

当 T1 ~ T4 四种单碱基延伸引物上修饰的 poly T 的数量分别为 0、3、10 和 15, SNaPshot 反应的 Primix 中 T1 ~ T4 引物浓度比为 4 : 6 : 5 : 10, T1 ~ T4 引物大小分别为 16 bp、19 bp、26 bp 和 31 bp 时, MHV SNaPshot 反应后电泳图中峰的高度, 峰的位置、峰与峰之间的距离均较稳定, 测序背景较干净。

2.3 MHV 的 SNaPshot 灵敏度分析

将 20 mg/L、10 mg/L、5 mg/L、2.5 mg/L、1.25 mg/L 浓度的 A₅₉ cDNA PCR 产物和用 ddH₂O 为对照, 进行 SNaPshot 单碱基延伸分析并电泳, SNaPshot 分析最低检测限为 1.25 mg/L (图 3)。

2.4 MHV 的 SNaPshot 特异性分析

SNaPshot 单碱基延伸分析 MHV 四个病毒株 (MHV₁、MHV₃、JHM、A₅₉) cDNA、乙型肝炎病毒和空白对照, 并电泳。MHV₁ 毒株的基因型为 CGCT, MHV₃ 毒株为 TATT, JHM

毒株为 TGCT, A₅₉ 毒株为 TGTC, 乙型肝炎病毒和空白对照均为阴性 (图 4)。MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 病毒株 cDNA 的测序结果与 SNaPshot 反应电泳结果一致。

2.5 SNaPshot 检测方法的初步应用

重庆地区 41 份小鼠血清中 MHV ELISA 法检测 5 份为阳性, 36 份阴性; 而 SNaPshot 单碱基延伸分析电泳结果 4 份阳性, 均为 JHM 毒株, 37 份阴性。ELISA 检测的 5 份阳性样本 PCR 扩增后仅 4 份样本呈阳性, 进而进行 T-克隆, 送公司测序后均为 JHM 毒株, 与 SNaPshot 分析检测结果一致 (表 3)。

3 讨论

小鼠肝炎病毒常见的毒株为 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉, 同时, 这 4 种毒株也是国家标准所规定检测的 (GB/T 14926.22-2001)。MHV 仅感染各品种品系的小鼠, 具有潜伏期, 发病传播均无明显规律, 而不同的 MHV 毒株感染小鼠具有不同的致病性, 对不同的小鼠实验会带来不同的影响 (Gonzales et al. 2004, 付红焱等 2004, 周艳 2008)。目前, 用于实验



图 2 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ cDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of MHV₁、MHV₃、JHM and A₅₉ cDNA PCR products

1. 2000 DNA 分子量标准; 2. 阴性对照 (ddH₂O); 3、4. MHV₁; 5、6. MHV₃; 7、8. JHM; 9、10. A₅₉; 11、12. MHV₁; 13、14. MHV₃; 15、16. JHM; 17、18. A₅₉。3 ~ 10 为内引物 P1/P2 扩增产物, 11 ~ 18 为外引物 P3/P4 扩增产物。

1. 2000 DNA maker; 2. Negative control (ddH₂O); 3, 4. MHV₁; 5, 6. MHV₃; 7, 8. JHM; 9, 10. A₅₉; 11, 12. MHV₁; 13, 14. MHV₃; 15, 16. JHM; 17, 18. A₅₉. 3 - 10. Amplification products of inner primers P1/P2; 11 - 18. Amplification products of outer primers P3/P4.

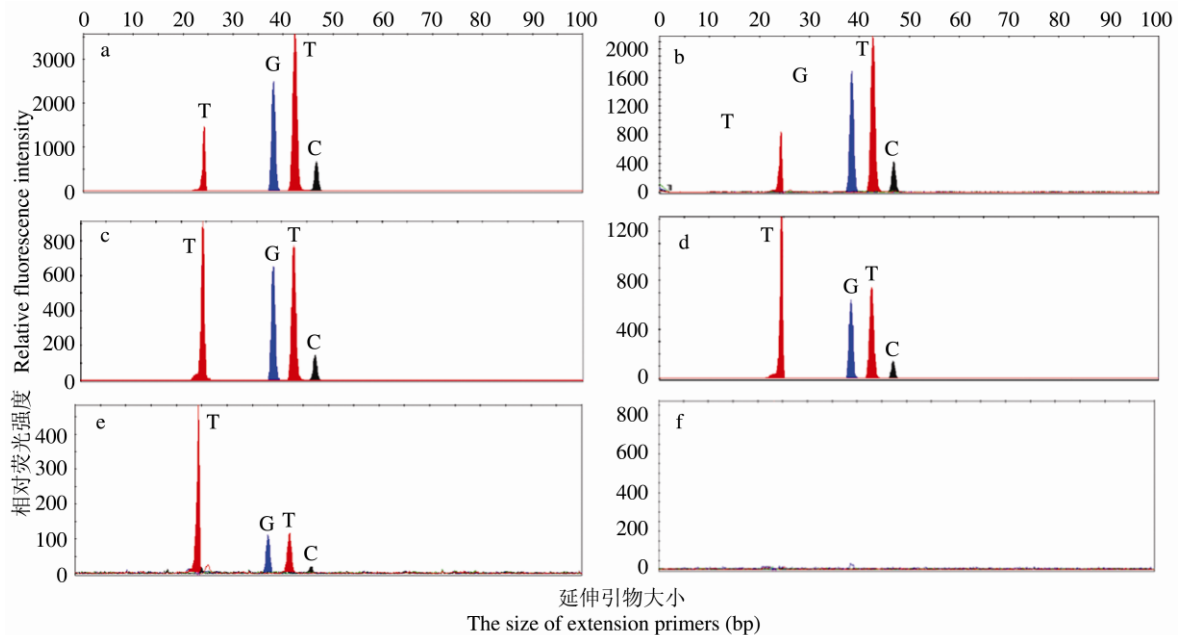


图 3 MHV-A₅₉ SNaPshot 灵敏度分析

Fig. 3 Sensitivity of MHV-A₅₉ by SNaPshot assay

a ~ f 分别含 A₅₉ cDNA 20 mg/L、10 mg/L、5 mg/L、2.5 mg/L、1.25 mg/L、0 mg/L (空白对照)。X 轴为修饰不同数量核苷酸 T 后单碱基延伸引物的大小 (bp); Y 轴为峰的相对荧光强度。其中, 荧光标记的 ddNTP 分别为: T 红色, G 蓝色, C 黑色。

a - f contains A₅₉ cDNA 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2.5 mg/L, 1.25 mg/L and 0 mg/L (negative control) respectively. The X axis is the size (bp) of the single base extension primers with different modified numbers of nucleotides T; The Y axis is the relative fluorescence intensity of the peaks. Fluorescently labeled ddNTPs are represented by T, red; G, blue; C, black.

小鼠 MHV 检测的方法较多, 但都不能灵敏、特异、准确的分型检测 MHV 常见毒株, 如经典的 ELISA 法, 虽然操作简单, 特异准确, 但是不能对 4 种 MHV 毒株进行分型检测 (赵婷婷等 2012)。而金标准 T-克隆测序法结果可靠准确, 但操作繁琐复杂, 不适合大量样本同时检测, 对仪器要求较高, 检测时间长达 3 ~ 5 d。根据 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 基因组序列的特异性设计对应的单碱基延伸引物, 通过 SNaPshot 反应电泳后分别呈现特异的图谱, 即 MHV₁(CGCT)、MHV₃(TATT)、JHM(TGCT) 和 A₅₉(TGTC), 每个单碱基延伸引物修饰了不同数量的 Poly T, 使得 4 个峰处于不同的位置, 而因 ddNTP 修饰了不同的荧光素, 引物延伸后的一个碱基携带了不同重量的荧光素, 使得同一位置不同的峰不会重叠。通过 SNaPshot

分型检测法可清晰、准确、特异地区分出 MHV 4 种常见的毒株。

通过优化实验条件, 当单碱基延伸引物 (T1 ~ T4) 分别修饰 0、3、10 和 15 个 poly T, 大小分别为 16 bp、19 bp、26 bp 和 31 bp, 浓度比为 4 : 6 : 5 : 10 时, SNaPshot 分析电泳结果清楚了, 背景清晰。此外, SNaPshot 检测具有较高的灵敏度及特异性, MHV cDNA 最低检测浓度为 1.25 ng/μL, 可准确检测 4 种 MHV 毒株, 特异性为 100%, 临床样本检测的准确性为 100% (41/41), 41 例临床样本中阳性样本 4 例, 分型检测结果均为 JHM 毒株 (4/4)。实验结果表明, 重庆地区实验动物 MHV 感染可能以 JHM 毒株为主。

本实验针对 4 种 MHV 常见毒株, 设计 4 个单碱基延伸引物, 确保 SNaPshot 分型检测

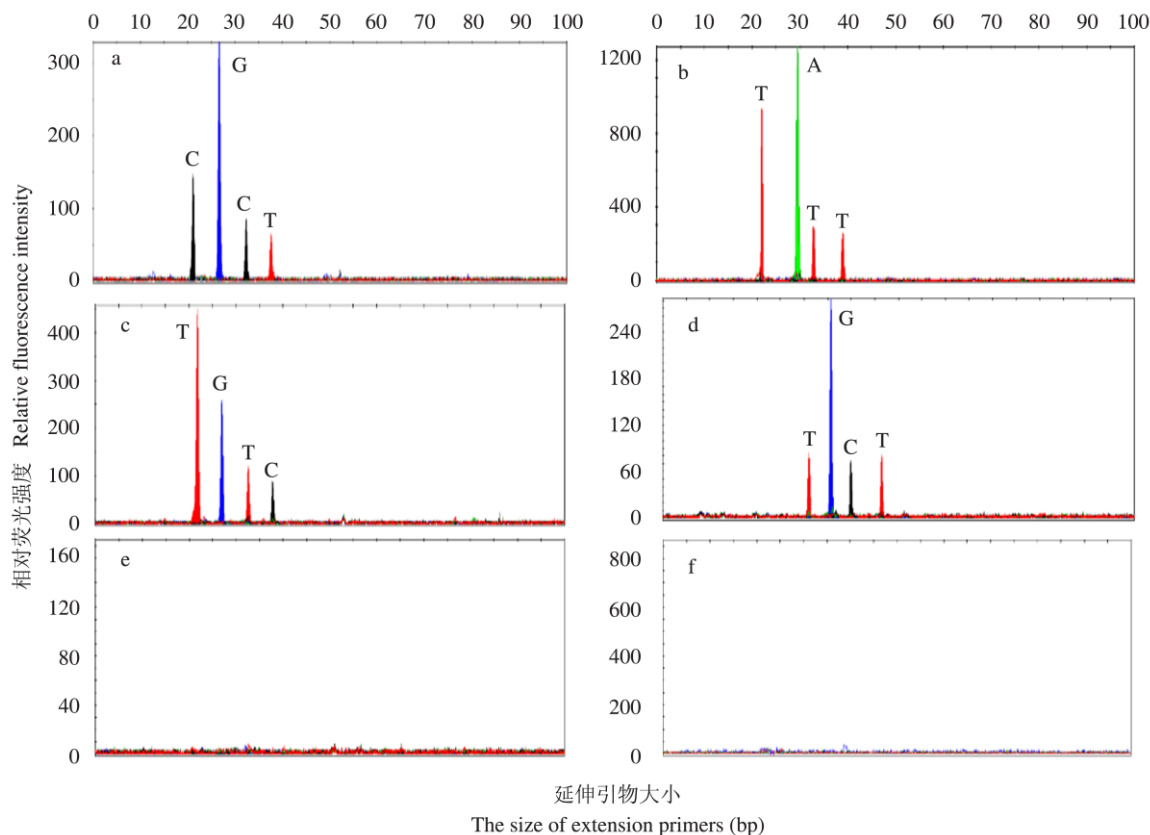


图 4 MHV 四个毒株 SNaPshot 分析电泳

Fig. 4 Electrophoresis SNaPshot analysis of four MHV strains

a ~ f 分别为 MHV₁ (CGCT)、MHV₃ (TATT)、A₅₉ (TGTC)、JHM (TGCT)、乙型肝炎病毒和空白对照。X 轴为修饰不同数量核苷酸 T 后单碱基延伸引物的大小 (bp)；Y 轴为峰的相对荧光强度。其中，荧光标记的 ddNTP 分别为：T 红色，G 蓝色，C 黑色，A 绿色。
 a - f followed by MHV₁ (CGCT), MHV₃ (TATT), A₅₉ (TGTC), JHM (TGCT), hepatitis B virus, and the blank control. The X axis is the size (bp) of the single base extension primers with different modified numbers of nucleotides T; The Y axis is the relative fluorescence intensity of the peaks. Fluorescently labeled ddNTPs are represented by T, red; G, blue; C, black; A, green.

表 3 41 例小鼠血清 MHV 检测结果

Table 3 MHV examination results of 41 murine serum samples

样品编号 The number of samples	酶联免疫吸附试验 Enzyme linked immunosorbent assay	SNaPshot 检测 SNaPshot assay	T-克隆 T-clone
M44	+	JHM	JHM
M45	+	JHM	JHM
M46	+	-	/
M48	+	JHM	JHM
M52	+	JHM	JHM
其他 Others*	-	-	/

* 样本编号为：M41 ~ M43、M47、M51、M53 ~ M56、M61、M63 ~ M68、M71 ~ M76、M81 ~ M86、M91 ~ M97。+ 表示实验结果为阳性，- 表示实验结果为阴性，/ 表示未进行该实验。

* The number of samples: M41 - M43, M47, M51, M53 - M56, M61, M63 - M68, M71 - M76, M81 - M86, M91 - M97. + represented positive results, - represented negative results, and / represented not-to-make the experiment.

方法的特异性,并用经典的 ELISA 法和金标准 T-克隆测序法作为对照方法,确保该方法的准确性。最重要的是,首次尝试将 SNaPshot 技术应用于小鼠肝炎病毒 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 常见毒株的分型研究,成功建立了能分别检测 MHV₁、MHV₃、JHM 和 A₅₉ 的方法,该方法具有方便快捷,结果清晰、灵敏度高、特异性好、准确可靠等优点,为实验小鼠 MHV 毒株检测工作提供了可靠的实验依据和有效的检测方法。

参 考 文 献

- Hurst C D, Zuiverloon T C, Hafner C, et al. 2009. A SNaPshot assay for the rapid and simple detection of four common hotspot codon mutations in the *PIK3CA* gene. *Clinics*, 66(10): 1765-1771.
- Gonzales D M, Fu L, Li Y, et al. 2004. Coronavirus-induced demyelination occurs in the absence of CD28 costimulatory signals. *Journal of Neuroimmunology*, 146(1/2): 140-143.
- Wang H X, Yue J, Han M, et al. 2010. Rapid method for identification of six common species of mycobacteria based on multiplex SNP analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1): 9-15.
- 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 2005. 精编分子生物学实验指南. 4 版. 北京: 科学出版社, 1-27.
- 付红焱, 徐波, 宫泽辉. 2004. 小鼠肝炎病毒的研究进展. *生理科学进展*, 35(4): 367-370.
- 甘露, 张哲, 郭进强, 等. 2012. 小鼠慢性病毒性肝炎诱发肝脂肪变性模型的构建. *南方医科大学学报*, 32(12): 1722-1726.
- 胡抗, 袁东亚, 贺学, 等. 2013. 分子人类学中的单核苷酸突变检测方法的研究进展. *生命科学*, 25(1): 119-125.
- 胡晓燕, 佟巍, 刘先菊, 等. 2011. 小鼠肝炎病毒金标快速检测方法建立. *中国畜牧兽医*, 38(7): 96-100.
- 刘小琦. 2013. 采用 SNaPshot 方法对中国老年黄斑变性 C2 和 C3 基因单核苷酸多态性进行相关性研究. *国际检验医学杂志*, 34(3): 285-290.
- 陆玉蕾, 林有智, 王晓晶, 等. 2012. TNF- α 在 MHV-3 诱导的小鼠病毒性肝炎模型肾脏中的表达及意义. *基础医学*, 2(6): 22-23.
- 苏丽贤, 汤朝晖, 万为人, 等. 2011. 藏茵陈对 MHV-A59 病毒感染湿热证小鼠肝脏损伤的干预作用. *时珍国医国药*, 22(8): 1822-1824.
- 孙亚男, 李安, 史斌, 等. 2013. SNaPshot 技术检测 Y-SNP 位点 O3-M122 单倍群的应用. *中国法医学杂志*, 28(1): 1-4.
- 王玉珏, 岳敏, 顾阳, 等. 2015. 西藏小型猪 GH 基因部分序列的 SNP 分析. *中国比较医学杂志*, 25(1): 50-54.
- 吴迪, 王洪武, 宁琴. 2012. TGF- β 1 在 MHV-3 诱导的小鼠爆发型肝炎模型中的表达研究. *基础医学*, 2(7): 28-30.
- 谢雯, 鲍世民, 谢建云, 等. 2012. 基于 PCR-LDR 平台的近交系小鼠遗传质量快速检测方法. *中国实验动物学报*, 20(4): 1-8.
- 袁文, 刘忠华, 张钰, 等. 2009. 小鼠肝炎病毒逆转录环介导等温扩增检测技术的建立. *中国实验动物学报*, 17(5): 354-359.
- 张成才, 谭礼强, 王丽鸳, 等. 2014. SNaPshot 技术检测茶树 SNP 研究. *茶叶科学*, 34(2): 180-187.
- 赵婷婷, 赖国旗. 2012. 小鼠肝炎病毒研究进展. 第十届中国实验动物科学年会论文集, 315-319.
- 周艳. 2008. 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. 扬州: 扬州大学硕士学位论文.