

BDV 核蛋白 FQ RT-PCR 试剂盒的评价与应用

徐鸣明^{1,2} 展群岭^{1,2} 张英英^{1,2} 张亮^{1,2} 宋武琦³ 张凤鸣³ 谢鹏^{1,2*}

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆 400016)

(2. 重庆医科大学神经科学中心 重庆 400016)

(3. 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省感染和免疫重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 为评价博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)核蛋白荧光定量 PCR (FQ RT-PCR)试剂盒的各项指标, 比较分子信标探针相对普通探针的优势, 并了解其实际检测效果, 本课题组使用 BDV OL 持续感染细胞株、非 BDV 病毒序列转染的 OL 细胞、正常的 OL 细胞, 对 BDV RT-PCR 试剂盒的敏感性、特异性、重复性和稳定性进行评估, 同时检测部分临床病人和动物外周血液 RNA。实验结果显示: 试剂盒可以检测出的病毒 RNA 最低浓度为 2.5×10^1 , 相当于 1 个病毒拷贝数, 无非特异检出; 不同批次的试剂盒的检测结果变异系数小于 0.7; 加速破坏的试剂盒和正常试剂盒检测结果之间变异系数在 2 以内; 对临床病人检测阳性率为 3.6%, 对动物检测阳性率为 4.2% (猪)和 1.5% (马)。可见该试剂盒重复性和稳定性均好; 敏感性、特异性优于普通探针试剂盒, 是 BDV 基础研究、流行病学调查和临床检测的良好工具。

关键词: 博尔纳病病毒, 实时荧光定量 PCR, 核蛋白

Verification and Practical Application of BDV Nucleoprotein FQ RT-PCR Kit

XU Ming-Ming^{1,2} ZHAN Qun-Ling^{1,2} ZHANG Ying-Ying^{1,2} ZHANG Liang^{1,2}
SONG Wu-Qi³ ZHANG Feng-Ming³ XIE Peng^{1,2*}

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(2. Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

(3. Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China)

Abstract: In order to verify the Fluorescent-Quantitation PCR kit specific for Borna disease virus (BDV) nucleoprotein, compare molecular beacon with common probe and study its practical application, the sensitivity, distinctness, repeatability and stability were tested on BDV and non-BDV infected cells, as well as non-infected controls. Human and animal samples were also tested by the kit. The lowest quantity of virus RNA detected by the kit was 2.5×10^1 , which corresponded to 1 virus copy. No false positive result was found. The coefficient of variation (CV) of different batches was less than 0.7, and the CV between normal kits and the kits treated by accelerating decomposition was less than 2. The morbidities of human and animal detected by the kits were 3.6% (human), 4.2% (swine) and 1.5% (horse). The sen-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z196)

*通讯作者: Tel: 86-23-68485490; Fax: 86-23-68485111; 收稿日期: 2009-09-24; 接受日期: 2009-12-07
E-mail: xiepeng502@163.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

sitivity and distinctness of this kit are better than common probe kit. All of the results indicate that this kit is an efficient tool in fundamental research, clinical detection and epidemiological investigation of BDV.

Keywords: Borna disease virus, Real time PCR, Nucleoprotein

博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)是一种通过潜伏感染边缘系统导致人类神经精神疾病的RNA病毒,儿童时期感染BDV还可以严重影响中枢神经系统的发育,因此该病被认为是人类神经精神健康的巨大威胁,建立BDV有效的临床检测方法具有重要的意义^[1]。目前BDV的检测主要包括针对病毒核酸的检测、针对病毒抗体或抗原蛋白的检测和病毒分离^[2]。病毒分离目前被认为是临床诊断的金标准,但是临床上开展困难。荧光定量PCR不仅可以在BDV病毒感染的大多数时期检出阳性结果,而且可以对病毒感染的滴度进行定量。只要在开发早期对试剂盒进行全面的评估,操作时严格按照规范进行,其临床实际应用的价值应该高于病毒分离。本研究对本课题组开发并多次改进的针对BDV核蛋白片段的FQ RT-PCR试剂盒进行了一系列严格验证。与普通的PCR方法相比不仅结果更为可靠,而且易于操作。该试剂盒的开发验证为检测结果的可靠性提供了依据;也为临床诊断BDV感染提供了必要的手段。

1 材料与方法

1.1 试剂、样品和仪器

BDV核蛋白FQ RT-PCR试剂盒:BDV核蛋白FQ RT-PCR检测试剂盒中引物、探针如表1所示,均由美国Invitrogen公司合成;所用的逆转录酶、Taq酶购自大连TaKaRa公司;反应液(同时包含了逆转录体系和扩增体系)由苏州贝尔达生物公司配置并检验合格。

试剂盒的反应体系和反应条件。

| 表1 FQ RT-PCR反应中使用的引物和探针 Table 1 Primer and probe in FQ RT-PCR reaction | |
|---|--|
| 引物或探针 Primer or probe | 序列 Sequence (5' → 3') |
| 上游引物 F Upstream primer | GGACCAGATTAAGCTTGTCGC |
| 下游引物 R Downstream primer | AAACGGGAACAGGTCAGCAT |
| 探针序列 Probe | FAM-ctgcatATGCTGACCTGTTCCCGTT atgcag-DABCYL |

反应体系:反应液 mix (含Taq酶) 10 μL,引物 mix 2 μL,探针 mix 2 μL,逆转录酶 0.2 μL,去酶H₂O 3.8 μL, RNA模板 2 μL。

反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 45 s, 58℃ 60 s, 72℃ 30 s, 40个循环。

RNA PolyATtract[®]提取试剂盒:购自大连宝生物公司。

荧光定量PCR仪: ROTOR GENE 6000 由澳大利亚Corbett公司生产。

所有的吸头、试管、EP管均选用Axygen公司生产的去酶硅化耗材。

BDV OL感染细胞株、非BDV病毒序列转染的OL细胞和正常的OL细胞由哈尔滨医科大学微生物学教研室张凤鸣教授惠赠。

试剂盒检测对象为重庆医科大学附属第一医院神经内科2年内收治的部分不明原因的病毒性脑炎患者92例和神经精神疾病患者66例,40例正常人对照,共计198例;重庆市所辖的40个区县饲养猪共计360例,新疆伊犁地区马匹527例,均为没有发病表现的正常动物。

1.2 方法

1.2.1 细胞总RNA的提取:哈尔滨医科大学微生物学教研室定量的BDV感染OL细胞、西尼罗河病毒(West Nile virus, Wnv)和尼帕病毒(Nipah, Niv) E基因质粒转染的OL细胞(由于博尔纳病病毒属于单股负链RNA病毒目,博尔纳病病毒科,博尔纳病病毒属。其分类相对独立,缺乏近缘的病毒。故本实验选取同样感染中枢神经系统引起人和动物病毒性脑炎症状的两种RNA病毒做特异性验证)、未经处理的OL细胞,使用PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems提取总RNA。琼脂糖凝胶电泳,同时测定OD值来验证RNA提取结果。将BDV感染的OL细胞RNA 10倍7次梯度稀释,以此代表不同的病毒滴度。

1.2.2 FQ RT-PCR试剂盒敏感性验证:将梯度稀释的BDV OL持续感染细胞中提取的RNA作为模板进行PCR反应,反应体系和反应条件见1.1。

1.2.3 FQ RT-PCR试剂盒特异性验证:将BDV OL持续感染细胞(3个病毒滴度梯度),Wnv E片段质粒

转染的 OL 细胞, Niv E 片段质粒转染的 OL 细胞以及正常 OL 细胞中提取的 RNA, 作为模板进行实验, 反应体系和反应条件见 1.1。

1.2.4 FQ RT-PCR 试剂盒重复性的验证: 将梯度稀释的 BDV OL 持续感染细胞以及正常 OL 细胞中提取的 RNA 作为模板, 使用不同批次的 3 个试剂盒进行实验, 反应体系和反应条件见 1.1。

1.2.5 FQ RT-PCR 试剂盒稳定性的验证: 使用 BDV OL 持续感染细胞以及正常 OL 细胞中提取的 RNA 作为模板进行实验。将完整的试剂盒, 分别置于 25℃ 和 37℃ 保存 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h (2 d)、96 h (4 d)、168 h (7 d)、336 h (14 d) 后, 进行实验。反应体系和反应条件见 1.1。使用 3% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6 FQ RT-PCR 的应用: 对临床病人和动物的血液样本, 提取 RNA, 进行 FQ RT-PCR 检测。反应体系和反应条件见 1.1, 以拷贝数大于 10^4 为阳性。同时对结果为阳性的病例进行普通 PCR 的重复检测。

2 结果

2.1 RNA 提取结果验证

所有提取的 RNA 电泳后有 3 个条带: 28 S、18 S 和 5 S。测定 OD 值: 260/280 主要分布在 1.8–2.0 之间, 浓度主要分布在 0.1–1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 之间。

2.2 FQ RT-PCR 试剂盒敏感性验证结果

RNA 样本经梯度稀释后在, 可以检测出的最低浓度为 2.5×10^1 , 换算成拷贝数则理论上可以检出体系中 1 个病毒拷贝, 见图 1 和表 2。同时使用普通 PCR 做为对照, 发现在 10^3 以下条带模糊其敏感性不如荧光定量 PCR, 见图 2。

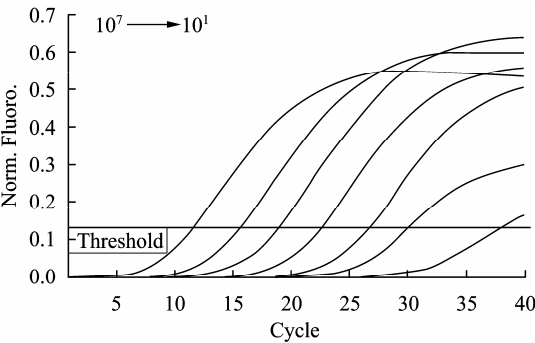


图1 FQ RT-PCR 试剂盒敏感性检测
Fig. 1 Amplification curves of examining sensitivity of FQ RT-PCR Kit

| 表 2 FQ RT-PCR 试剂盒标准曲线的 CT 值 Table 2 CT of standard curves of FQ RT-PCR kit | | | | | |
|---|------------|------------|------------|---------------------|--------------------|
| 样本号 No. | 名字 Name | 种类 Type | CT 值 CT | 给定浓度 Given Conc. | 测定浓度 Calc Conc. |
| 7 | Borna7 | Sample | 11.72 | 10^7 | 1.03×10^7 |
| 6 | Borna6 | Sample | 15.66 | 10^6 | 8.79×10^5 |
| 5 | Borna5 | Sample | 18.99 | 10^5 | 1.09×10^5 |
| 4 | Borna4 | Sample | 22.65 | 10^4 | 1.10×10^4 |
| 3 | Borna3 | Sample | 26.63 | 10^3 | 9.13×10^2 |
| 2 | Borna2 | Sample | 30.15 | 10^2 | 1.01×10^2 |
| 1 | Borna1 | Sample | 34.27 | 10^1 | 2.49×10^1 |

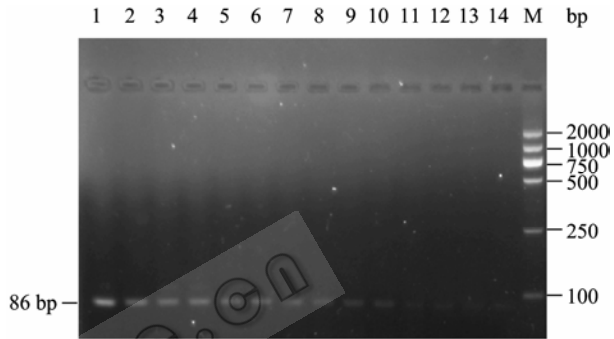


图2 博尔纳病毒不同浓度普通 PCR 电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis of PCR of different concentrations of BDV
注: 1、2: 10^7 ; 3、4: 10^6 ; 5、6: 10^5 ; 7、8: 10^4 ; 9、10: 10^3 ; 11、12: 10^2 ; 13、14: 阴性对照; 15: Marker DL2000.
Note: 1,2: 10^7 ; 3,4: 10^6 ; 5,6: 10^5 ; 7,8: 10^4 ; 9,10: 10^3 ; 11,12: 10^2 ; 13,14: Negative control; 15: Marker DL2000.

2.3 FQ RT-PCR 试剂盒特异性验证结果

RNA 样本的 3 个梯度的样品可见 S 型扩增曲线, Wnv 和 Niv 质粒转染的 OL 细胞和未处理的 OL 细胞未见扩增, 见图 3 和表 3。

2.4 FQ RT-PCR 试剂盒重复性验证结果

每种浓度 RNA 不同批次的试剂盒得出的 3 条曲线基本重合, 见图 4。曲线对应的 CT 值见表 4。

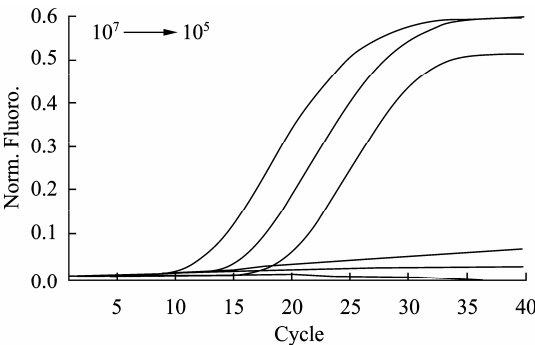


图3 FQ RT-PCR 试剂盒特异性检测扩增曲线
Fig. 3 Amplification curves of examining distinctness of FQ RT-PCR Kit

| 表 3 FQ RT-PCR 试剂盒特异性检测的 CT 值 | | | | | |
|---|------------|------------|------------|---------------------|------------------------|
| Table 3 CT of examining distinctness of FQ RT-PCR kit | | | | | |
| 样本号 No. | 名字 Name | 种类 Type | CT 值 CT | 给定浓度 Given Conc. | 测定浓度 Calc Conc. |
| 7 | Borna7 | P C | 11.08 | 10 ⁷ | 9.72 × 10 ⁶ |
| 6 | Borna6 | P C | 14.95 | 10 ⁶ | 1.22 × 10 ⁶ |
| 5 | Borna5 | P C | 19.36 | 10 ⁵ | 9.75 × 10 ⁴ |
| 4 | Wnv | N C | — | 0 | 0 |
| 3 | Nipah | N C | — | 0 | 0 |
| 2 | OL | N C | — | 0 | 0 |

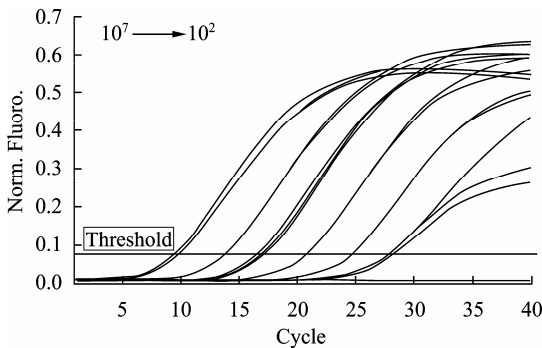


图 4 FQ RT-PCR 试剂盒重复性检测扩增曲线
Fig. 4 Amplification curves of examining repeatability of FQ RT-PCR Kit

| 表 4 FQ RT-PCR 试剂盒重复性检测各组样本的 CT 值及变异系数 | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------|
| Table 4 CT and CV of different groups in examining repeatability of FQ RT-PCR kit | | | | | |
| 样本号 No. | 试剂盒 1 Kit 1 | 试剂盒 2 Kit 2 | 试剂盒 3 Kit 3 | $\bar{x} \pm s$ | CV (%) |
| 7 | 9.89 | 9.91 | 9.79 | 9.86 ± 0.05 | 0.496 |
| 6 | 13.79 | 13.78 | 13.82 | 13.80 ± 0.02 | 0.113 |
| 5 | 16.96 | 17.04 | 16.83 | 16.94 ± 0.08 | 0.446 |
| 4 | 20.74 | 20.72 | 21.05 | 20.84 ± 0.14 | 0.683 |
| 3 | 24.62 | 24.62 | 24.74 | 24.66 ± 0.05 | 0.216 |
| 2 | 27.82 | 27.92 | 28.18 | 27.97 ± 0.14 | 0.493 |

2.5 FQ RT-PCR 试剂盒稳定性验证结果

取 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h (2 d)、96 h (4 d)、168 h (7 d) 和 336 h (14 d) 共 8 个时间点进行检测;将 25℃ 和 37℃ 放置 3 h 和 14 d 后的结果进行对比, 如图 5 所示, 其相应的 CT 值见表 5。

2.6 FQ RT-PCR 试剂盒的应用

临床病人阳性率为 3.6% (7/198); 猪样本阳性率为 4.2% (15/360); 马样本阳性率为 1.5% (8/527) 如表 6。普通 PCR 的重复检测结果与定量 PCR 相一致, 见图 6。

| 表 5 FQ RT-PCR 试剂盒稳定性检测各组试剂盒的 CT 值及变异系数 | | | | | | |
|---|--------------|---------------|--------------|---------------|-----------------|--------|
| Table 5 CT and CV of different groups in examining repeatability of FQ RT-PCR kit | | | | | | |
| 样本号 No. | 25℃ (3 h) | 25℃ (14 d) | 37℃ (3 h) | 37℃ (14 d) | $\bar{x} \pm s$ | CV (%) |
| 7 | 12.50 | 12.24 | 12.66 | 12.99 | 12.60 ± 0.23 | 1.81 |
| 6 | 17.67 | 17.46 | 18.04 | 18.47 | 17.91 ± 0.35 | 1.93 |
| 5 | 21.33 | 21.16 | 21.74 | 21.64 | 21.47 ± 0.22 | 1.04 |
| 4 | 25.26 | 25.22 | 25.68 | 25.96 | 25.53 ± 0.29 | 1.14 |
| 3 | 28.63 | 28.46 | 28.78 | 29.38 | 28.81 ± 0.28 | 0.99 |
| 2 | 32.48 | 33.11 | 33.06 | 32.90 | 32.89 ± 0.20 | 0.62 |

| 表 6 FQ RT-PCR 检测人和动物阳性结果的 CT 值和对应的拷贝数 | | | | | | | |
|---|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|--------------------|
| Table 6 CT and copies of positive samples tested by FQ RT-PCR kit | | | | | | | |
| 样本号 No. | 种类 Type | CT 值 CT | 测定浓度 Calc Conc. | 样本号 No. | 种类 Type | CT 值 CT | 测定浓度 Calc Conc. |
| 1 | Human | 24.33 | 10 ⁵ | 9 | Swine | 24.31 | 10 ⁵ |
| 2 | Haman | 23.53 | 10 ⁵ | 10 | Swine | 23.82 | 10 ⁵ |
| 3 | Haman | 28.26 | 10 ⁴ | 11 | Swine | 23.77 | 10 ⁵ |
| 4 | Haman | 18.31 | 10 ⁶ | 12 | Swine | 23.04 | 10 ⁴ |
| 5 | Haman | 16.71 | 10 ⁶ | 13 | Swine | 23.68 | 10 ⁵ |
| 6 | Haman | 22.02 | 10 ⁵ | 14 | Swine | 27.87 | 10 ⁴ |
| 7 | Haman | 23.15 | 10 ⁵ | 15 | Swine | 27.21 | 10 ⁴ |
| 1 | Swine | 23.69 | 10 ⁵ | 1 | Horse | 17.53 | 10 ⁶ |
| 2 | Swine | 24.63 | 10 ⁵ | 2 | Horse | 23.59 | 10 ⁵ |
| 3 | Swine | 26.86 | 10 ⁴ | 3 | Horse | 27.01 | 10 ⁴ |
| 4 | Swine | 23.46 | 10 ⁵ | 4 | Horse | 24.22 | 10 ⁵ |
| 5 | Swine | 24.17 | 10 ⁵ | 5 | Horse | 18.13 | 10 ⁶ |
| 6 | Swine | 22.99 | 10 ⁵ | 6 | Horse | 23.21 | 10 ⁴ |
| 7 | Swine | 28.03 | 10 ⁴ | 7 | Horse | 23.18 | 10 ⁴ |
| 8 | Swine | 23.98 | 10 ⁵ | 8 | Horse | 22.87 | 10 ⁴ |

3 讨论

BDV 属于单股负链 RNA 病毒目, 博尔纳病毒科, 博尔纳病毒属的一种慢病毒, 它不仅危害严重, 导致各类精神疾病, 而且感染宿主广泛, 几乎包括所有脊柱动物。

BDV 感染动物和人类可以引起严重的病毒性脑炎和各类精神症状。转基因小鼠的研究发现 BDV 表达可以导致小鼠攻击性增强, 过度亢奋和空间记忆下降^[3], 这与 BDV 首次在马群中爆发时观察到的马匹“疯狂”的表现相一致。它在人群中多为潜伏感

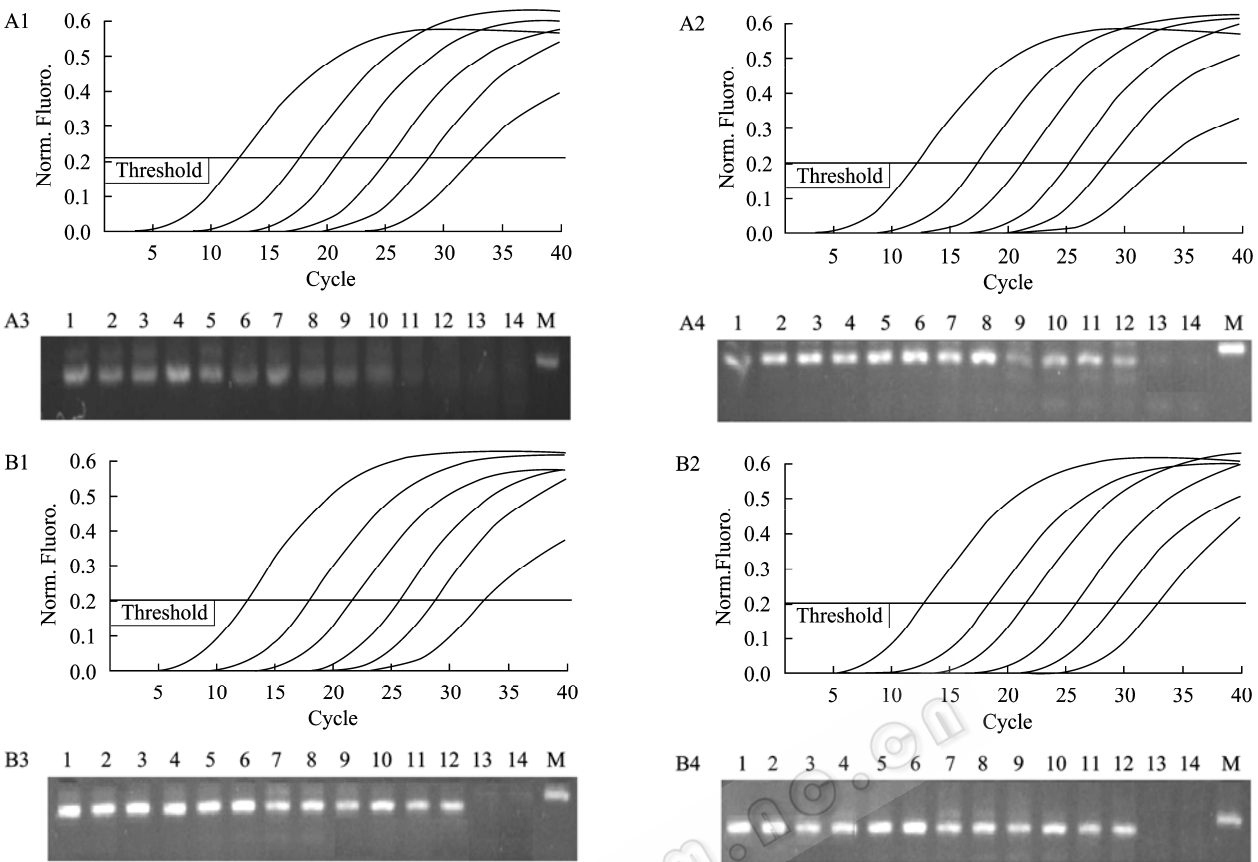


图 5 FQ RT-PCR 试剂盒稳定性检测扩增曲线和电泳图

Fig. 5 Amplification curves and electropherogram of examining stability of FQ RT-PCR Kit

注: A1/A2: 试剂盒在 25°C/37°C 放置 3 h 的扩增曲线, A3/A4: A1/A2 的 PCR 产物电泳图; B1/B2: 试剂盒 25°C/37°C 放置 14 d 的扩增曲线, B3/B4: B1/B2 的 PCR 产物的电泳图; 扩增曲线从左到右依次为 10^7 到 10^2 , 每种浓度有 2 个重复, 每组有 2 个阴性对照; 电泳图从左到右依次为 10^7 到 10^2 , 每种浓度有 2 个重复, 每组有 2 个阴性对照和 Marker.

Note: A1/A2: Amplification curves of kits treated by 25°C/37°C for 3 hours; A3/A4: Electropherogram of PCR products of A1/A2; B1/B2: Amplification curves of kits treated by 25°C/37°C for 14 days; B3/B4: Electropherogram of PCR products of B1/B2; In amplification curves from left to right are curves from 10^7 to 10^2 and in electropherogram from left to right are straps from 10^7 to 10^2 .

染并引起各类精神症状, 捷克发现精神病患者的感染率达 66.7%, 远远高于健康对照组^[4]。德国则发现 BDV 感染在情感障碍和难治性抑郁患者居多^[5-6]。日本和巴西的研究都发现了精神分裂患者 BDV 的感染率高于常人^[7-8]。

BDV 在动物和人群中的感染极为广泛, 几乎涵盖了全球绝大多数的地区和物种。Hagiwara K 等在对日本猕猴的研究中发现其阳性率达 12.6%^[9], 张英英等在对中国新疆地区马匹和驴的 BDV 检测中发现阳性病例^[10]。Cotto E 在对法国西南部的艾滋病人的 BDV 检测过程中发现其阳性率高达 13.41%^[11]。李永杰等在对国内病例检测时发现慢性疲劳综合症组的患者阳性率高于对照组^[12]。本研究检出的人群感染率 3.6%、动物感染率 4.4% (猪)、1.5% (马) 与国内外报道的范围相符。

由于 BDV 的广泛分布和巨大危害, 开发研制 BDV 有效的临床检测方法变得尤为重要。在 BDV 的众多检测方法中, 原位杂交和原位 PCR 技术操作复杂, 不适合临床检测; 免疫学检测 BDV 的时间窗口很小, 而 BDV 蛋白往往低表达甚至不表达, 大多数时候感染病例的抗体和抗原检测不显示阳性结果; 病毒分离需要数月、甚至半年的时间, 且在临床无法为病人所接受; FQ RT-PCR 被认为是最有效和实用的方法之一。Wensman JJ 等使用 FQ RT-PCR 的方法成功地检测出了 He80 株、V 株和 No/98 株^[13]; Miranda HC 等使用 FQ RT-PCR 的方法对巴西的情感障碍和精神病患者进行了 BDV 的检测, 阳性率高达 33.33%^[14]; 我课题组在前期研究 FQ-PCR 检测方法的基础上, 经过改进和完善成功开发了针对 BDV 核蛋白的 FQ-PCR 试剂盒。对不同浓度的病毒 RNA

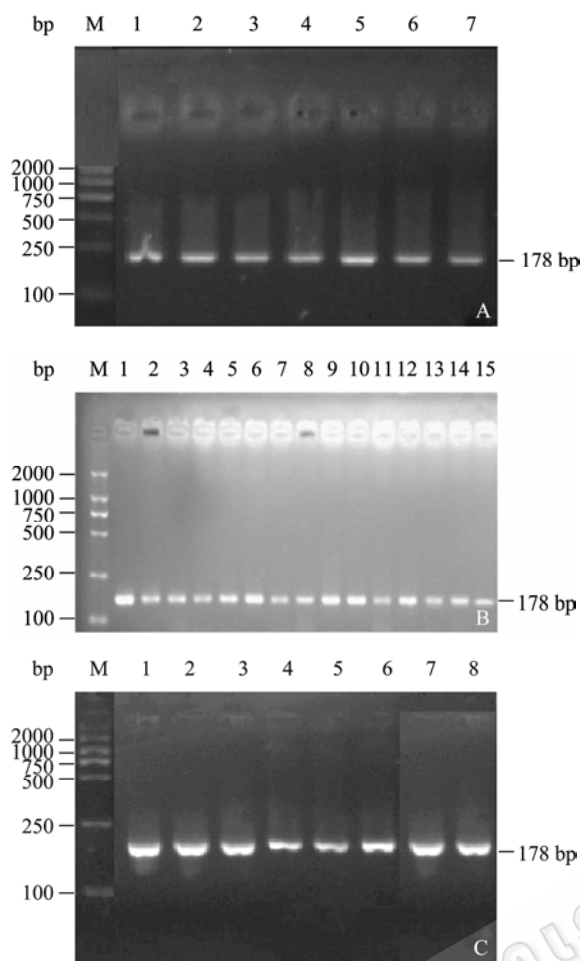


图6 普通PCR阳性样本检测电泳图

Fig. 6 Electropherogram of PCR examining on positive samples

注: A: 人的阳性样本检测电泳图(1-7); B: 猪的阳性样本检测电泳图(1-15); C: 马的阳性样本检测电泳图(1-6).

Note: A: Human positive samples (1-7); B: Swine positive sample (1-15); C: Horse positive sample (1-6).

进行检测,发现其最低检测浓度可以达到体系内 1 个病毒拷贝数,好于原来开发的同类 FQ-PCR 试剂盒,远远优于普通 PCR 的最低检出值;同时检测标准品病毒 RNA 和含其他病毒序列的 RNA 以及空白对照,未发现非特异扩增;使用不同批次的试剂盒,对同一批样本进行检测,其重复性良好;对试剂盒进行模拟常温和环境高温的加速破坏实验,其稳定性良好;因此该试剂盒敏感性、特异性、重复性、稳定性均佳,且可以满足野外及偏远地区流行病学调查的要求。

本试剂盒的检测靶基因是 BDV 保守序列 P40,在该病毒的 2 个常用的保守序列(P24 和 P40)中选择 P40 作为检测目的片段,是因为其特异性要高于等

同病毒数量的 P24,且两者的检出率无明显差异^[15]。这种设计既可以防止由于检测的非特异性导致的假阳性,又不会因为敏感性降低而漏检。通过 NCBI 比对,本试剂盒的目的核酸片段检测范围包括了 He80、strainV、H1766 和 No/98 等标准病毒株在内的几乎所有 BDV 毒株,但由于没有条件对所有病毒株进行真病毒验证,本实验验证的来自哈尔滨医科大学的病毒株是 H1766 株。

试剂盒的探针使用了分子信标技术,与线性核苷酸探针相比其特异性更高,能检出单核苷酸的突变,而敏感性往往可以达到体系内 1 个病毒拷贝数,甚至可以在活体细胞内检测目的核酸片段。与课题组前期开发的 Taqman 探针试剂盒相比,本试剂盒的敏感性,特异性均有所提高。试剂盒使用了一步法的技术,不仅简化了检测步骤,而且还可以防止由于反复开合 PCR 管而导致的污染,大大提高了试剂盒的实用价值。与之前开发的 FQ-PCR 相比,该试剂盒具有更高的敏感性和更好的特异性,且操作更为简便。符合临床和流调的大规模检测的需求。但在实际检测过程中仍应该注意以下几个问题:(1) 每一批次试剂盒使用之前,均要检测有效性;(2) 每一个样本的检测都要进行多次重复;(3) 标准品的操作一定要与样品分区,并使用专用的移液器;(4) 应使用多种不同的方法对本试剂盒检测结果进行验证,以确保实验结果的可靠性和科学性。

本课题组开发的 BDV 核蛋白 FQ-PCR 检测试剂盒,经验证是一种具有良好的敏感性、特异性、重复性、稳定性的诊断试剂盒。可用于大规模的临床检测,流行病学数据获得,并为病毒感染机制、途径等的研究提供了可靠的工具。

参考文献

- [1] Thakur R, Sarma S, Sharma B. Role of Borna disease virus in neuropsychiatric illnesses: are we inching closer. *Indian J Med Microbio*, 2009, **27**(3): 191-201.
- [2] 左联, 邹德智, 谢鹏. Borna 病病毒感染的实验室诊断. *中国人兽共患病杂志*, 2003(5): 116-118.
- [3] Kamitani W, Ono E, Yoshino S, *et al*. Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(15): 8969-8974.
- [4] Rackova S, Janu L, Kabickova H. Borna disease virus circulating immunocomplex positivity and psychopathology

in psychiatric patients in the Czech Republic. *Neuro Endocrinol Lett*, 2009, **30**(3): 414–420.

[5] Dietrich DE, Bode L. Human Borna disease virus-infection and its therapy in affective disorders. *APMIS Suppl*, 2008(124): 61–65.

[6] Bechter K, Herzog S, Schreiner V, *et al*. Borna disease virus-related therapy-resistant depression improved after cerebrospinal fluid filtration. *J Psychiatr Res*, 2000, **34**(6): 393–396.

[7] Nunes SO, Itano EN, Amarante MK, *et al*. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives. *J Clin Lab Anal*, 2008, **22**(4): 314–320.

[8] Terayama H, Nishino Y, Kishi M, *et al*. Detection of anti-Borna Disease Virus (BDV) antibodies from patients with schizophrenia and mood disorders in Japan. *Psychiatry Res*, 2003, **120**(2): 201–206.

[9] Hagiwara K, Tsuge Y, Asakawa M, *et al*. Borna disease virus RNA detected in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primates*, 2008, **49**(1): 57–64.

[10] 张英英, 展群岭, 徐鸣明. 新疆伊犁地区马和驴博尔纳病病毒自然感染的调查. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, **29**(4): 321–325.

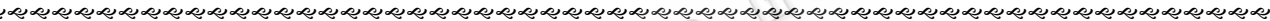
[11] Cotto E, Neau D, Cransac-Neau M, *et al*. Borna disease virus RNA in immunocompromised patients in southwestern France. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(12): 5577–5581.

[12] 李永杰, 王得新, 张凤民, 等. Detection of antibody against Borna disease virus-p24 in the plasma of Chinese patients with chronic fatigue syndrome by Western-blot analysis. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003(4): 32–35.





[13] Wensman JJ, Thoren P, Hakhverdyan M, *et al*. Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. *J Virol Methods*, 2007, **143**(1): 1–10.

[14] Miranda HC, Nunes SO, Calvo ES, *et al*. Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients. *J Affect Disord*, 2006, **90**(1): 43–47.

[15] Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, *et al*. Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes*, 2007, **21**(1): 47–55.



2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

| | |
|---|---|
|  | 《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号:ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。 |
|  | 《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。 |
|  | 《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。 |
|  | 《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。 |
| 订阅 | 欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄 |
| | 汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401 |
| | 收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn |
| | 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量 |