

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所

碩士論文

Department and Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

兩種小鼠濾過性小病毒多重引子聚合酶鏈鎖反應之建立  
與台灣實驗小鼠感染之調查

Development of the Multiplex PCR Assays for Mouse  
Parvovirus (MPV) and Minute Virus of Mice (MVM), and  
the Surveillance of MPV and MVM Infection in  
Laboratory Mice in Taiwan

王克偉

Ko-Wei Wang

指導教授：萬灼華 博士

闕玲玲 博士

Advisor: Cho-Hua Wan, DVM, Ph.D.

Ling-Ling Chueh, DVM, Ph.D.

中華民國 99 年 8 月

August, 2010

碩士論文

兩種小鼠濾過性小病毒多重引子聚合酶鏈鎖反應之建立與台灣實驗小鼠感染之調查

王克偉 撰

99

8

## 致謝

兩年的時間不算很長，但要讓一個人成長已經足夠。回顧過往，我可以大聲說"我畢業了"，雖然做的不夠好但我仍辦到了。現在的我甚至已經懷念起那不可數的寂靜夜裡，一手拿著 pipetman，一手指縫中夾著八 九管待溶解的 reagents，獨自坐在椅子上看著窗外月的陰晴圓缺與系館草皮上那一對對的閃光，或是在跑了一組 PCR 後，趕緊衝往學校附近的百老匯戲院跟朋友看完電影再衝回學校跑膠的週末。歷經兩年的研究生活，我更會管理自己的時間，不斷挑戰極限，更有毅力的完成目標，很高興能來學習，進入這個實驗室並完成我的研究。感謝我的指導教授萬灼華老師，感謝您在實驗上耐心的指導，讓我對於 PCR 有充分的了解，有能力完成我的實驗並解決問題。感謝您不斷的給我鼓勵與學習的機會，每每遇到挫折，她總會這樣安慰我說"先想最糟能有多糟，失敗就也沒那麼可怕了"，讓我置之死地而後生，一生受用。感謝我的指導教授關玲玲老師，感謝您在我實驗中的許多寶貴建議，讓我看到不同角度的研究方式，你的鼓勵讓我體會勇於嘗試，再接再厲的精神以及無限的希望。感謝國家實驗動物中心，國科會與萬灼華老師實驗室支持我的研究計畫並提供經費，感謝 Dr. Riley 與中研院的廖欽峰博士提供病毒與病毒陽性 DNA，感謝提供我小鼠檢體的單位與實驗室，能夠信任我，讓我完成研究，並感謝我的畢業口試委員王明生教授、廖欽峰博士與黃彥智博士抽空閱讀我的論文並在口試時提供許多寶貴的意見，讓這份論文更盡善盡美。感謝病理組的所有老師龐飛老師、鄭謙仁老師、王汎熒老師、劉振軒老師以及張本恆老師對於病裡的傾囊相授。

感謝我深愛的家人，爸、媽，謝謝你們給我溫飽與關懷，在成長過程中不壓抑我的好奇心，讓我有機會嘗試做自己想做的，我們是家人也是知己；老妹，感謝妳對家裡的照顧，我不在家的期間總是麻煩妳打裡大小事，也感謝妳不厭其煩的聆聽我的煩悶並冷靜的幫我分析，有妳這個妹妹是我的驕傲。感謝我可愛的實驗室夥伴與一起學習的朋友們，縱宇，謝謝你讓我看到該有的果決、判斷力與行動力，這些真的是我最缺乏的，我會努力學習，很高興能作為你的同事與好哥們，

我想我一定會懷念每個星期一與你討論切片的夜晚。詠惠，妳是幽默的學妹、細心的學姊以及我另一個指導教授，你的謹慎與規劃總令我佩服，感謝妳讓我看到作為研究生的拼勁與負責。佑民學長，有了你的樂觀，實驗中的難關都不算什麼，謝謝你不斷的鼓勵與有趣的論點，總給我許多啟發。阿比婆與炳哥，有你們作為學長姐實驗室總充滿歡樂。三叔，你的決心與毅力讓我學到很多，能與你分享那些理想就算餵飽所有停車場中的蚊子也是值得的，不管有什麼夢想一定要努力實現。大傑，很感謝能與隨和的你一起面對接種而來地困境，不管是在實驗、感情或生活上，你的聆聽與建議總會消滅我的不安與壓力，能感受你的真誠真的很幸運。恬恬，謝謝你的照顧與關心以及恬媽的水果，誰娶到妳真是他的福氣，真心希望你未來幸福快樂。克耀，謝謝你歷年的榴槤糕，你成熟的觀念常是我內心的借鏡。感謝所有病理組的同學們，國昭、純純、羅婷以及君倪以及學弟妹、很高興且幸運的能跟你們共事互相成長，希望大家前程似錦。一路上，我要感謝太多太多的長輩、學長姐、學弟妹以及朋友們，很抱歉無法一一說出，是你們的幫助與陪伴才能讓我繼續往前走，謝謝你們！

王克偉 謹誌

中華民國九十八年八月

## 中文摘要

Minute virus of mice (MVM) 與 mouse parvovirus (MPV) 兩種小鼠的濾過性小病毒 (mouse parvoviruses) 為實驗小鼠中常見的病原。此病毒常經由污染的試劑與細胞培養液在實驗操作下或經帶原小鼠傳染給實驗動物中心的實驗小鼠。多項研究資料指出小鼠的濾過性小病毒會影響 *in vitro* 與 *in vivo* 的免疫、腫瘤以及移植等相關的研究結果。為同時偵測此兩種病毒並顯示檢體樣本 DNA 品質，本研究針對 MPV 與 MVM 基因序列與小鼠的管家基因 (housekeeping gene)，建立了一個多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑 (MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay)。利用此試劑可特異性的增幅出 MPV 與 MVM 病毒基因，但不會複製其他的 rodent parvoviruses 的基因；針對敏感度測試結果顯示本試劑可同時偵測到 50 個 MVM 與 MPV 病毒，此結果顯示本診斷試劑具有高特異性與高敏感度。在模擬 MPV 與 MVM 不等量共同感染，即使兩種病毒量相差高達 200 倍的情況下，本試劑仍維持至少可偵測到 50 個病毒的敏感度，顯示本試劑偵測效果穩定。利用本試劑於台灣實驗小鼠的濾過性小病毒感染調查中，分別由 7 個單位蒐集到 14 種品系，共 174 隻實驗小鼠，其中 MPV 的陽性率高達 11.5%，但未偵測到 MVM 的感染。此結果顯示，MPV 在台灣實驗小鼠的感染率高，為了維持動物實驗數據的正確與品質，建議應將此病毒列入主要的疾病監控項目。此 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 可同時且有效的偵測到 MPV 與 MVM 兩種病毒，亦可應用於監測其他生物製劑的污染情形，未來可成為實驗動物疾病管理上的一個利器。

關鍵詞：小鼠濾過性小病毒 (MPV)、小鼠小病毒 (MVM)、小鼠的濾過性小病毒多重引子聚合酶鏈鎖反應、台灣小鼠的濾過性小病毒感染率

## Abstract

Mouse parvoviruses are among the highly prevalent infectious pathogens in contemporary mouse colonies. There are two serotypes, minute virus of mice (MVM) and mouse parvovirus (MPV). Mouse parvoviruses have a predilection for mitotically active cells and can interfere with immunology, transplantation, and oncology research through virus-infected rodents, contaminated cells and biological materials. In order to detect these two viruses simultaneously, a multiplex PCR assay that amplifies the VP gene of MPV and MVM, and a mouse housekeeping gene has been developed in this study. The MPV/MVM/Actin Multiplex PCR assay specifically detects MPV and MVM, but doesn't amplify KRV, RMV-1, RPV-1c, and H-1. The multiplex PCR assay could simultaneously detect both MVM and MPV in as low as 50 copies in the condition of equal-amount dual infection. The sensitivity of this multiplex PCR assay remained to detect at least 50 copies of MPV when the copies of MVM were 200 times higher than the MPV copy number, and vice versa. The prevalence surveillance result revealed that 3 out of 7 laboratory mouse colonies were contaminated with MPV with the prevalence of 11.5%; however, none of the tested mouse colony was contaminated with MVM. The MPV/MVM/Actin Multiplex PCR assay developed in this study can provide a useful tool in the mouse health monitoring in the future.

Key words: mouse parvovirus, minute virus of mice, MPV/MVM multiplex PCR, MPV prevalence, MVM prevalence

## 目錄

致謝 .....	I
中文摘要 .....	III
Abstract.....	IV
目錄 .....	V
Table .....	VII
Figure.....	VIII
第一章、序論.....	1
第一節、前言.....	1
第二節、小鼠的濾過性小病毒 (Mouse parvoviruses) 簡介.....	2
第三節、小鼠的濾過性小病毒 (Mouse parvoviruses) 感染.....	5
第四節、小鼠的濾過性小病毒 (Mouse parvoviruses) 對研究的影響.....	8
第五節、流行病學.....	11
第六節、診斷方式.....	12
第二章、研究動機與實驗設計.....	17
第三章、材料與方法.....	18
第一節、實驗設計與流程.....	18
第二節、實驗檢體與細胞來源.....	18
第三節、聚合酶鏈鎖反應陽性控制組之建立.....	21
第四節、MPV 與 MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑開發.....	25
第五節、台灣實驗小鼠與細胞培養液的濾過性小病毒感染調查.....	31
第四章、結果.....	33
第一節、實驗檢體與細胞培養液收集.....	33
第二節、MPV 與 MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑之開發.....	33
第三節、台灣實驗小鼠與細胞培養液的濾過性小病毒感染調查.....	37

第五章、討論.....	39
第一節、MPV/MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑之開發 .....	40
第二節、台灣實驗小鼠 MPV 與 MVM 病毒之監測 .....	43
第三節、細胞培養液中 MPV 與 MVM 病毒之監測 .....	45
第四節、疾病控制策略.....	46
第五節、結論.....	47
第六節、未來工作與展望.....	47
參考文獻 .....	66



**Table**

Table 1 Oligonucleotide primers used for MPV and MVM VP gene amplification ....49

Table 2 Oligonucleotide primers used for MPV Specific and MVM Specific PCR Assays .....50

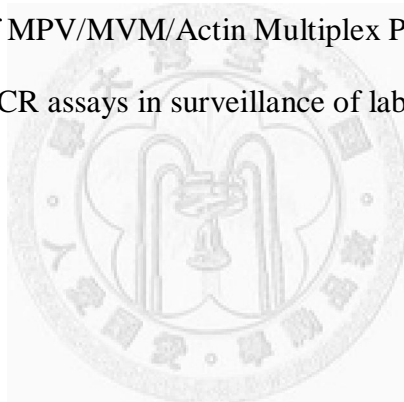
Table 3 Information of mouse samples used in the surveillance of MPV/MVM.....51

Table 4 Information of cell cultures used in the surveillance of MPV/MVM .....52

Table 5 Detection rate of laboratory facilities by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay.....53

Table 6 Detection rate of laboratory mice by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay.....54

Table 7 The consistency of MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay and MPV and MVM confirmatory single PCR assays in surveillance of laboratory mice .....55





## Figure

Figure 1	Flow chart of experimental design .....	56
Figure 2	Specificity of the MPV Specific PCR Assay.....	57
Figure 3	Specificity of the MVM Specific PCR Assay. ....	58
Figure 4	Sensitivity of the MPV Specific PCR Assay.....	59
Figure 5	Sensitivity of the MVM Specific PCR Assay .....	60
Figure 6	Specificity of the MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay .....	61
Figure 7	Sensitivity of the MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay.....	62
Figure 8	Detection of different combination of MPV and MVM by the MPV/MVM/ Actin Multiplex PCR Assay.....	63
Figure 9	Detection of MPV and MVM in laboratory mice by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. ....	64
Figure 10	Detection of MPV and MVM in different cell cultures and cell lines by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay.....	65

## 第一章、序論

### 第一節、前言

科技日新月異，隨著醫學生技產業的快速發展，全球實驗動物的使用亦快速地增加，經過統計結果顯示日本每年的實驗動物使用量為 800 萬隻動物 (Ninomiya *et al.*, 1998)，加拿大為 200 萬隻 (RowSELL *et al.*, 1988)，英國為 280 萬隻 (Home Office *et al.*, 2005)，在美國每年使用量更高達 1,800-2,200 萬隻 (Mukerjee *et al.*, 1997)。

在多種實驗動物之中，老鼠具有體型小，繁殖週期短，與人類基因高達 80% 相似性等優點。從 1995 年 1 月至 2005 年 12 月 31 日期間，在 PubMed biomedicine database 上所發表的文獻中，使用大鼠做為實驗動物的研究共有 365,208 篇，而使用小鼠做為實驗動物的研究共有 314,136 篇，在累積的使用量上分別位居第一 (占有實驗動物相關研究的 36%) 與第二 (24%) (Zhao *et al.*, 2007)。而在 1995-2005 年期間以小鼠做為實驗動物的研究有長足的增長，甚至在 2003 年當年發表的文獻中，小鼠的使用量超過大鼠的使用量 (Zhao *et al.*, 2007)。自二十一世紀初，科學家陸續完成了實驗小鼠的基因體解碼及第一份人類基因體草圖，實驗鼠與人類基因體的高度相似性使其成為探討人類疾病基因的最佳利器。藉著解碼實驗鼠基因，結合動物模式建置、幹細胞醫學及表現行分析技術無疑地已開啟醫藥開發的另一個里程碑。其中在 1988-2005 年間使用基因轉殖小鼠的年平均增長率 (annual mean growth rate) 為 24.76%，在 1994-2005 年間使用基因剔除小鼠的年平均增長率為 41.88%，可見基因轉殖小鼠在生醫研究上快速的受重視 (Zhao *et al.*, 2007)。為了維持良好的實驗品質，產生具可信力的研究數據，實驗小鼠相關的疾病管理顯得特別的重要，定期的健康監測，有效的運作診斷工具與控制感染的情形，成為管理實驗動物中最重要的一環。

嚙齒類濾過性小病毒 (rodent parvoviruses) 名列嚙齒類實驗動物中常見的疾

病之一，對嚙齒類動物實驗的影響甚鉅。嚙齒類動物被此類病毒感染後，雖可能引發致死性的病灶，但絕大多數的感染並不會引起明顯臨床症狀，此病毒卻會感染多種組織器官並影響動物實驗研究數據，而可能誤導動物實驗結論。現今已有多種 rodent parvoviruses 被發現，包含有感染小鼠的 minute virus of mice (MVM) (Crawford, 1966) 與 mouse parvovirus (MPV) (McKisic *et al.*, 1993)；感染大鼠的 Kilham rat virus (KRV) (Kilham and Olivier, 1959)、 Toolan's H-1 virus (H-1) (Toolan *et al.*, 1960)、 rat parvovirus type 1a (RPV-1a) (Ball-Goodrich *et al.*, 1998)、 rat parvovirus type UT (RPV/UT) (Ueno *et al.*, 2001)、 rat parvovirus type 1c (RPV-1c) (廖等, 2009)、 rat minute virus (Wan *et al.*, 2002)；感染倉鼠的 hamster parvovirus (HaPV)，由於基因與 MPV-3 十分相似，現懷疑兩者為同一種病毒，感染不同種的動物 (Besselsen *et al.*, 1996; Besselsen *et al.*, 2006)。Parvovirus 對分裂能力旺盛的細胞具有親和性，易感染生物體內腸道上皮細胞、淋巴細胞或造血細胞，也會感染腫瘤細胞，一旦感染實驗鼠或細胞培養，會擾亂免疫、腫瘤與移植相關的研究數據，除了會誤導實驗結論，造成實驗過程中實驗動物生命、研究人力、經費及時間的極大損失。

## 第二節、Mouse parvoviruses 簡介

### 1.2.1 Minute virus of mice (MVM) 歷史背景

Crawford 在 1966 年首先於培養小鼠腺病毒 (mouse adenovirus) 的培養液中發現一種“過客病毒”(passenger virus)，其細胞培養特性、生化特性與大鼠濾過性小病毒 (Kilham rat virus) 相似 (Crawford, 1966)。此病毒屬於 *Parvoviridae*，具有自發性複製的能力，被命名為 minute virus of mice (MVM)，MVM-CR 品系。後來又將兩種具有不同生物特性的 MVM 分類命名為對纖維母細胞具有親和性的 prototypic MVM (MVMp) (McMaster *et al.*, 1981) 與對血球生成細胞

(erythropoietic progenitor) 與 T 淋巴細胞具有親和性的 immunosuppressive MVM (MVMi) (Tattersall and Spalholz, 1983)。此兩個 MVM 亞型病毒在核酸序列上具有 97% 的相似度, 但對不同宿主細胞的親和性卻大不相同。之後陸續在 baby hamster kidney cell (BHK-21) 分離出 MVM(c) (Besselsen *et al.*, 1996), 另在 NOD- $\mu$  chain knockout mice 分離出 MVM(m) (Besselsen *et al.*, 2006)。

### 1.2.2 Mouse parvovirus (MPV) 歷史背景

在 1990 年以前, MVM 被公認為唯一可自然感染小鼠的 parvovirus。經由實驗動物例行性健康監測的徹底執行與實驗動物診斷技術的改良, 於 1990 年代初, 實驗動物醫學界發現血清抗體檢測數據顯示至少有一種未發現的濾過性小病毒會感染小鼠。McKisic 在 1993 年於 cytolytic T 淋巴細胞實驗中, 發現並分離出第一株非 MVM 的 parvovirus, 其後將此病毒命名為 mouse parvovirus (MPV) (McKisic *et al.*, 1993)。分子生物學數據亦指出, MPV 在非結構蛋白 (non-structural protein; NS protein) 與 MVM 及其他 rodent parvoviruses 極為相似, 但在結構蛋白 (viral protein; VP) 則具有很大的差異, 應屬於不同種的濾過性小病毒。目前已被發現的 MPV 次品系有 MPV-1a、MPV-1b、MPV-1c、MPV-1e、MPV-1f、MPV-2、MPV-3、MPV-4、MPV-5 (施等, 2008; Ball-Goodrich and Johnson, 1994; Besselsen *et al.*, 1996; Besselsen *et al.*, 2006)。

### 1.2.3 分子與生物學性狀特徵

Rodent parvoviruses 屬於小病毒科 (*Parvoviridae* family), 是一種極小型 (20-26 nm), 二十面體無封套 (Non-envelope) 之負向單股 DNA 病毒。此二十面體病毒外殼含有 60 個重複的核心結構胜肽, 此特別的構造使 parvovirus 對環境的耐受性增強 (Tattersall *et al.*, 1976)。Rodent parvoviruses 為自發性病毒

(autonomous), 不需輔助病毒 (helper virus) 的幫助即可自行複製。但是 rodent parvoviruses 並不會引發宿主細胞分裂與分化, 須等宿主細胞進入有絲分裂中的 S 期後, 病毒的 mRNA 開始啟動, 並合成大量的病毒自身的蛋白質進行複製, 因此病毒會對分裂旺盛的細胞具有高度親和性 (Cotmore and Tattersall, 1987)。

MVM 的分子生物學特性已被確認 (Cotmore and Tattersall, 1987), 其分子特徵可代表 MPV 以及其他 autonomous parvovirus (Cotmore and Tattersall, 1987; Ball-Goodrich and Johnson, 1994; Besselsen *et al.*, 1996; Besselsen *et al.*, 2006)。MVM 的 DNA 基因體乃由約 5-kb 的中間單股 DNA 與雙側 3'端與 5'端處的反轉末梢重複序列 (inverted terminal repeat) 所形成的迴紋針狀結構 (hairpin structure)。此迴紋針狀的基因結構是為 parvovirus 自我複製的開端 (Cotmore and Tattersall, 1987)。Rodent parvovirus 的複製過程中, 單股病毒 DNA 會先形成雙股 DNA, 其正向股 DNA 含有兩個大型的開放性讀架 (open reading frame, ORF) 區域與數個較小的 ORF 區域, 較大的 ORF 區段是由分別位於基因地圖 4 與基因地圖 38 位置上的啟動子 (P4 and P38 promoters) 所驅動, 並利用選擇性剪接 (alternative splicing) 來產生多個轉錄子 (transcript)。P4 轉錄子編碼成兩種非結構蛋白質 (non-structural protein, NS), NS-1 與 NS-2。NS-1 具有多種功能, 主要與病毒 DNA 複製與基因表現有關 (Cotmore and Tattersall, 1987); NS-2 主司病毒基因複製, 並且在感染時與宿主細胞特異性有關 (Cater and Pintel, 1992)。NS protein 具有保守序列, 在所有 rodent parvoviruses 中相似度極高, 堆積後具有細胞毒性, 會造成人類細胞的死亡 (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990)。P38 轉錄子編碼成兩種主要的結構蛋白 (viral protein, VP), VP-1 (83 kDa) 與 VP-2 (64 kDa)。VP-3 (60 kDa) 乃 VP-2 經轉譯後蛋白切割移除 N 端約 25 個胺基酸後所形成 (Clinton and Hayashi, 1975; Tattersall *et al.*, 1977)。此三種結構蛋白組成病毒鞘蛋白 (capsid protein)。VP-1 與病毒的感染性有關 (Tattersall *et al.*, 1976; Tullis *et al.*, 1993)。VP-2 為主要的鞘蛋白 (capsid protein), 包含於 VP-1 序列之中, 基因序列相當於 VP-1 的 C 端區域。VP-2 在不同病毒株間變異最大, 主司病毒單股 DNA 的複製

並且與核酸包埋入鞘蛋白的過程有關 (encapsidation) , 本身即足以形成可包覆住病毒 DNA 的二十面體鞘蛋白結構 , 形成類病毒顆粒 (virion-like particle, VLP) , 可應用於區別診斷不同種類的 parvoviruses (Tullis *et al.*, 1993)。VP-3 僅在感染的過程中被發現有表現的情形 (Tattersall *et al.*, 1976)。

MVM(p)可在多種細胞培養液培養 , 如小鼠纖維母細胞培養液 (A9 murine fibroblasts) , C6 大鼠膠質細胞 (C6 rat glial cells) , SV-40 變形人類新生腎細胞 (NB324K human kidney cells) , T 細胞淋巴瘤 (S49 and EL4 cells) , 倉鼠腎細胞 (BHK-21 cells) 以及 Fisher 大鼠纖維母細胞 (FR3T3) , 除了引起細胞病變亦可能造成核內包涵體的產生 (Cotmore and Tattersall, 1987; Koering *et al.*, 1996, Tattersall and Cotmore, 1986; Tattersall and Bratton, 1983)。MPV 相對之下較難在體外細胞中培養 , 目前已知可利用 CD8<sup>+</sup> T 細胞淋巴瘤細胞培養液 (CD8<sup>+</sup> H-2L<sup>d</sup>-reactive T-cell clone; L3) 與繼代後的 324K cells 進行病毒的培養 (McKisic *et al.* 1993)。

### 第三節、Mouse parvoviruses 感染

#### 1.3.1 感染途徑

MVM 與 MPV 的病毒 DNA 可在腎臟、腸道及肺臟中偵測到 , 以 quantitative Polymerase chain reaction (qPCR) 偵測下發現亦可在糞便中排出大量的病毒 , 其他的排出管道包括有尿液、呼出的空氣 , 甚至以直接接觸來傳播 (Smith *et al.*, 1993; Jacoby *et al.*, 1995b; Besselsen *et al.*, 2008)。此外 , 由於病毒在環境中穩定 , 長達三個月仍具有感染性 , 可經由生物性媒介 (fomite) 或機械性 (mechanical) 傳播 , 例如經由汙染的器械、實驗人員手套進而污染細胞株、生物試劑 , 在實驗操作下感染小鼠。

### 1.3.2 臨床症狀

Mouse parvoviruses 可自然感染免疫健全或免疫缺陷的小鼠，大多不會引起明顯臨床症狀，難以從外觀發現任何 parvovirus 感染的病症，最早在感染後的 7-14 天，在少數動物可能開始有抗體的產生，才有可能發現該實驗小鼠已被病毒所侵害 (Jacoby *et al.*, 1996)。人工接種 MVM(i)於特定品系之免疫缺陷小鼠 (例如：SCID mice) 或新生胎鼠，可能會引起致命性的白血球低下症或腎盂部之出血與梗塞，但小鼠外觀僅會出現 sick mouse syndrome 等不具特異性的臨床症狀。MVM(m)則會造成 NOD 品系小鼠的生育力下降、生產胎鼠數目減少、未成熟胎兒死亡等 (Naugler *et al.*, 2001)。

### 1.3.3 致病性

MVM(i)感染新生仔鼠或免疫缺陷小鼠後，會對造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) 與骨髓先驅細胞 (myeloid progenitor cell) 具有直接的細胞毒性傷害 (cytotoxic effect)，可抑制免疫與造血功能細胞的生長 (Lamana *et al.*, 2001 ; McMaster *et al.*, 1981)。研究指出，人工接種 MVM(i)於 BALB/c、SWR、SJL、CBA 以及 C3H 品系的新生胎鼠，會造成腎盂部的出血性梗塞與肝臟增加髓外造血比例，嚴重時可導致死亡 (Brownstein *et al.*, 1991)。DBA/2 品系的仔鼠感染後會有腸道出血與肝臟造血功能損害情形；相對地，C57BL/6 品系的仔鼠感染後則不會出現此類血管性病灶。同時接種 MVM(i)於 C57BL/6 與 C3H 的仔鼠，兩者都可以測得正常複製的病毒量。但經由原位雜交 (In situ hybridization) 與免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry stain) 的結果發現，在 C57BL/6 品系的小鼠中，MVM 病毒較少出現在內皮細胞、淋巴細胞及肝臟的造血細胞中。此外，1996 年 Ramírez 等人以鼻內接種 MVM(i)於 BALB/c 新生仔鼠實驗發現，病毒主要在大腦的發育中心 (proliferative center) 與小腦的神經原細胞中複製且引起該區域

細胞病變,顯示 parvovirus 對處於分裂期的細胞的親和性 (Ramírez *et al.*, 1996)。MVM 在新生仔鼠所引起嚴重的感染情形,並未出現在自然感染下懷孕母鼠體內的胎鼠,推測是相對於母鼠本身,母鼠沒有排出足夠引起感染的病毒量,此外胎鼠可能同時受母體被動免疫抗體保護 (Thomas *et al.*, 2007)。在小鼠性別上,有文獻懷疑雌性 C57BL/6 小鼠比雄性小鼠在同樣自然感染的條件下對 MVM 有較高的抵抗力 (Thomas *et al.*, 2007)。MVM(p)對小鼠並無臨床致病性,經由口鼻接種於 BALB/c 新生仔鼠或成年免疫缺陷小鼠 (SCID mice),小鼠感染後並沒有臨床症狀亦無病理變化 (Kimsey *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 2005)。但有研究指出, MVM(p)的鞘蛋白 (capsid) 胺基酸的突變,可能會導致 MVM(p)產生相似於 MVM(i)的致病性,可損害免疫缺陷鼠 (SCID mouse) 的造血器官,引起致死性的白血球低下症 (Leukopenia) (López-Bueno *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2005)。MVM 在活體小鼠不會造成持續性的感染,經口鼻接種於新生胎鼠與離乳小鼠,可發現病毒感染三週後即發生快速的自行抑制現象 (self-limiting),排毒期不超過一個月 (Smith and Paturzo, 1988)。在組織病理學下,自然感染 MVM 的小鼠不會有病灶出現,人工接種於胎鼠後,在少數胎鼠會引發多系統病變,生長中器官的細胞內也會有病毒核內包涵體的出現 (Kilham and Margolis, 1971)。

MPV 在自然或人工接種下感染免疫健全或免疫抑制的小鼠,引起不顯性感染,都不會有任何臨床症狀與病理變化 (Smith, *et al.*, 1993; Jacoby *et al.*, 1995b; Ball-Goodrich *et al.*, 1998)。將病毒以口鼻接種小鼠數日後,以原位雜交 (In situ hybridization) 偵測病毒抗原,發現腸道上皮固有層中的單核球與微血管或淋巴管內皮呈現陽性反應,隨後感染延伸至腸道培氏斑 (Peyer's patch) 淋巴結、胸腺、脾臟、肺臟、腎臟以及肝臟 (Jacoby and Ball-Goodrich, 1995a)。MPV 早期感染即可見對淋巴細胞有特殊親和性,此特性在病毒血症時有助於其分佈,病毒在動物開始產生抗體後 (seroconversion),因受宿主免疫反應影響,病毒量逐漸減少,最終潛伏於造血淋巴器官中,當造血淋巴細胞受刺激分化時, parvovirus 會利用分裂細胞進行複製 (Jacoby *et al.*, 1995b)。研究中發現 MPV 存在於脾臟白髓



與淋巴結可長達 9 週之久。相對的，病毒在造血組織（脾臟紅髓）間的分佈較為分散，且僅存在感染的早期，因此造血細胞並非 MPV 主要的侵犯目標，此點與 MVM 的感染不同。在病毒持續感染時，在類淋巴組織內可測得含有病毒陽性的細胞，但沒有證據顯示有病毒轉錄子或雙股螺旋 DNA 的產生，推測病毒乃處於非活動性狀態 (quiescent status)，複製的病毒量雖未達到 In situ hybridization 可以偵測的強度，然而以 PCR 或 qPCR 則可檢測出此持續潛伏感染期的微量病毒 (Jacoby *et al.*, 1995b; Besselsen *et al.*, 2007)。MPV 感染並沒有性別上的差異，但對具有免疫抑制或缺陷的老鼠的感染期較在免疫健全的老鼠的感染期為長 (Besselsen *et al.*, 2007)。

雖然 MPV 與 MVM(i)皆對胎鼠與成鼠的類淋巴組織有親和性，但它們之間有三點不同：第一，MPV 自然感染或人工感染新生胎鼠或免疫抑制小鼠都不會引起任何臨床症狀或病理變化 (Smith *et al.*, 1993)。第二，MPV 主要攻擊淋巴細胞，但不會造成細胞本身的生長抑制，而是藉由減少細胞動素 (cytokine) 媒介性的免疫增生反應；MVM(i) 在 *in vitro* 與 *in vivo* 的實驗中會攻擊淋巴與造血細胞，引起細胞毒性傷害，抑制細胞的增殖，進而引起的免疫機制改變，甚至引起免疫抑制小鼠的嚴重的白血球低下症或造血受抑制，進而死亡 (McKisic *et al.*, 1996; McKisic *et al.*, 1998; McMaster *et al.*, 1981; Segovia *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1995; Segovia *et al.*, 1999)。第三，MPV 即使在成鼠的感染也是持續性的，可間歇地經由糞便、尿液排毒並傳染給新進的實驗小鼠長達 4 週之久，病毒在類淋巴的器官甚至可存在 9 週以上。相對地，MVM(i)感染則為短期性，大多在感染三週之後消退 (Jacoby *et al.*, 1995b; Smith *et al.*, 1993; Smith and Paturzo, 1988)。

#### 第四節、Mouse parvoviruses 對研究的影響

Rodent parvoviruses 結構穩定，並且沒有封套，因此對乾熱殺菌 (80 °C、10 分鐘；90 °C、1 分鐘) 與濕熱殺菌 (70 °C、10 分鐘；90 °C、1 分鐘) 皆具有極強

的抵抗力，此外也對多種消毒劑有抵抗力，如 70%酒精、2500 ppm 的 Sodium hypochlorite (消毒 1 分鐘)、0.05%的 Quaternary ammonium (消毒 10 分鐘)、7.5% 的 Hydrogen peroxide (消毒 20 分鐘)，使其在環境中難以清除 (Cotmore and Tattersall, 1986; Nicklas *et al.*, 1999; Saknimit *et al.*, 1988)。相對於其他的 rodent parvoviruses，MVM 對高溫、化學消毒劑以及 UV light 照射等不活化方式較為敏感 (Harris *et al.*, 1974b)。由於不適當的消毒方式無法消滅汙染環境中的 parvoviruses，進而汙染生物試劑或細胞培養後，經由實驗操作再汙染實驗小鼠，在動物體內進行增殖，改變部分的生物功能，無形中擾亂正確的研究結果，主要影響的研究包括免疫相關科學、移植研究以及腫瘤研究等。

#### 1.4.1 MVM 對研究的影響

在免疫學方面，研究指出 MVM(i)可抑制體外淋巴細胞的增殖，使細胞毒性 T 細胞 (cytotoxic T cell) 的生成減少，並且抑制 T 細胞依賴型的 B 細胞反應 (Bonnard *et al.*, 1976; Enger *et al.*, 1981; McMaster *et al.*, 1981)，此外也會阻害許多造血幹細胞的生長 (Segovia *et al.*, 1991; Lamana *et al.*, 2001)。病毒感染淋巴細胞後會造成宿主細胞溶解死亡，導致細胞數量減少。MVM 也會引起活體小鼠的造血幹細胞與淋巴細胞的生成下降，因此不論對 *in vivo* 或 *in vitro* 的免疫學相關研究都有極大的影響 (Lamana *et al.*, 2001; McMaster *et al.*, 1981; Segovia *et al.*, 1995; Segovia *et al.*, 1999)。在細胞動素方面 (cytokine)，MVM(i)感染後會減弱小鼠體內干擾素 (interferon, IFN) 反應，另一方面降低體外培養之哺乳類細胞中 IFN- $\gamma$ 、腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor necrotic factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 以及介白素-6 (IL-6) 的合成量 (Harris *et al.*, 1974a; Schlehofer *et al.*, 1992)。

在細胞生物學方面，MVM 可長期汙染細胞培養液 (Ron and Tal, 1985; Koering *et al.*, 1996)。當細胞進入 S 期，病毒會奪取其複製的路徑，製造 MVM 的蛋白質，當 NS-1 生成後會中止宿主細胞的 DNA 複製，並使細胞停在 S 期 (Op

De Beeck and Caillet-Fauquet, 1997)。病毒開始複製階段，病毒進入核仁時會瓦解核仁的正常功能 (Walton *et al.*, 1989)。

在腫瘤學方面，MVM 容易汙染移植或以化學藥劑引發的腫瘤 (Bonnard *et al.*, 1976; Nicklas *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1970) 以及經過轉化 (transformation) 的細胞培養液 (Rommelaere and Cornelis, 1991)。MVM 具有細胞毒性，引發體內、外腫瘤細胞的死亡，而抑制腫瘤的生成 (Wollmann *et al.*, 2005)。在病理學方面，MVM(i) 接種於母體內胎鼠，會引起核內包涵體的出現 (Kilham and Margolis, 1971)。當 MVM(i) 自然感染五日齡的倉鼠，會引起年長後倉鼠的牙齒缺損 (Baer and Kilham, 1974)。MVM(i) 人工感染新生倉鼠後，會引起眼睛水晶體與鄰近視網膜的退化，併發哈氏腺 (Harderian glands) 廣泛性肥大 (hypertrophy) (Toolan *et al.*, 1983)。

MVM(p) 則不具有體外的淋巴親和性 (McMaster *et al.*, 1981)，在細胞中或活體中都沒有改變免疫反應的情形 (Kimsey *et al.*, 1986)。但 MVM(p) 對經由 avian erythroblastosis virus (AEV) 轉化成惡性 (癌化) 的大鼠細胞 (208F cell) 具有親和性，並且造成細胞死亡 (Cornelis JJ *et al.* 1988)。在腫瘤學方面，經過轉化 (transformation) 的大鼠纖維母細胞培養，被 MVM(p) 感染後較容易產生細胞病變 (cytopathic effect) (Cornelis *et al.*, 1988, Guetta *et al.*, 1990)。此外 MVM(p) 亦具有抑制腫瘤細胞生長的特性 (Guetta *et al.*, 1986)。

#### 1.4.2 MPV 對研究的影響

MPV-1 一旦感染小鼠後，可長期存在類淋巴組織中，並攻擊內皮細胞、淋巴細胞以及 Kupffer 細胞 (Jacoby *et al.* 1995b; Shek *et al.* 1998; Smith *et al.* 1993)。MPV 可引起 CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 以及  $\gamma\delta$  T 細胞株的生長，並且抑制 CD8<sup>+</sup> 與 CD4<sup>+</sup> T 淋巴細胞對介白素-2 (Interleukin-2; IL-2) 的增生反應 (McKisic *et al.* 1993)，但 MPV 不會對混合淋巴培養反應 (mixed lymphocyte culture reaction, MLC reaction)

中的毒殺 T 細胞生長 (cytotoxic T-cell) 有抑制作用，此點與 MVM(i)不同 (McKisic *et al.*, 1993)。在腫瘤學方面，在 MPV 感染移植 sarcoma cell line 的 BALB/c 小鼠一個月後，造成 sarcoma cell 的消退 (McKisic *et al.* 1996)。在移植研究方面，MPV-1 感染 BALB/c 小鼠後，小鼠在皮膚移植後提早開始排斥反應，推斷 MPV-1 改變了抗原呈現細胞 (antigen presenting cell) 或 T 細胞的表面分子，改變細胞的免疫反應，瓦解皮膚對移植之皮瓣的周邊耐受性 (peripheral tolerance)，然而在 C3H/HeSn 與 C57BL/6 品系的小鼠身上則不見相同的排斥反應 (McKisic *et al.*, 1998)。綜合以上資料顯示 MPV-1 可慢性的改變小鼠體內的免疫反應，但隨著感染的小鼠品系不同，可能會有不同的反應。會受 MPV-1 所抑制的腫瘤種類包含有 hybridoma 與 sarcoma cell (McKisic *et al.* 1996)，近年來 MVM 與 MPV 在腫瘤治療的應用上也逐漸受重視 (Abschuetz *et al.* 2006; Geletneky *et al.*, 2005; Wildner, 2001)。其他的 MPV 品系 (如 MPV-2, MPV-3) 因近期才被發表，病毒培養的工作尚在建立中，尚未有進一步的相關研究 (Besselsen *et al.*, 2006)。

## 第五節、流行病學

由於 rodent parvovirus 可由糞口快速的排毒傳播，且對外界環境抵抗性高，可經常循環汙染實驗用品與生物試劑，而造成持續性的感染與高盛行率。Charles River 診斷中心於 2009 年發表的實驗小鼠微生物感染率資料指出，在北美、部分歐洲與亞洲的動物中心的 MPV 感染率為 1.86%，MVM 為 0.33% (Pritchett-Corning *et al.*, 2009)，MPV 位居所有監測的微生物中第 2 高位，僅次於 mouse norovirus (MNV)。Mähler 等人也在 2009 發表西歐實驗小鼠中的 parvovirus 血清學盛行率調查顯示，在超過 100 個單位來源的小鼠中，mouse parvoviruses 的陽性率為 1.01%，位居所有監測病毒第四高位 (Mähler and Köhl, 2009)。台灣近期以血清學 ELISA 方式調查實驗動物健康監測結果顯示，在 2006 年所監測的 96 隻實驗小鼠中 MPV

的陽性率為 14.6%，而在 2007 年所監測的 961 隻實驗小鼠中陽性率則為 11.7%，乃文獻中檢測之所有微生物盛行率之冠，其中 MNV 與 helicobacter 不包括在檢測病原範圍 (Liang *et al.*, 2009)。相較於國外的盛行率，台灣的 mouse parvoviruses 感染率較國外高出 5-10 倍之多，足見國內控制此疾病的急迫性。由於 parvovirus 在自然環境下結構穩定，可長久存在實驗小鼠體內持續且廣泛的傳播，因此如何準確又有效率的診斷出此病毒的感染是為防治此疾病的感染中最重要的一環。

## 第六節、診斷方式

早期發現 rodent parvoviruses 的存在多是利用病毒分離的方式 (Crawford, 1966; McMaster *et al.*, 1981; Tattersall and Spalholz, 1983)，而後學者依據不同的檢測目的，開發出多種方法監測不同檢體中的病毒。在血清學上，利用 hemagglutination inhibition (HAI) assay、indirect fluorescent antibody (IFA) test 及 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 可偵測病毒的抗體；另一方面，依照不同 parvovirus 序列所設計的 generic PCR 診斷試劑，可偵測所有 rodent parvovirus 的 DNA，或是特異性地偵測出不同種的 parvovirus。在檢體組織蠟塊中可利用核酸探針進行 In situ hybridization，偵測病毒 DNA 實際存在組織中的位置。偵測病毒的方法眾多，但是用於臨床上實驗小鼠的病毒感染偵測，診斷試劑需具有高敏感性與高特異性的特點，並且在時間、成本以及人力上的花費符合實際需求。

### 1.6.1 血清學診斷

常見的血清學診斷有 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、indirect fluorescent antibody (IFA) test、hemagglutination inhibition (HAI) assay 以及剛發展出的 multiplex fluorescent immunoassays (MFI)。ELISA 為目前診斷 rodent

parvovirus infection 最常用的診斷方式，可以一次偵測大量的血清樣本。在傳統的 ELISA 是利用病毒作為抗原來監測血清抗體，近代更開發出利用不同的病毒重組表現蛋白 (NS-1 與 VP-2) 作為 ELISA 抗原，來監測血清中的抗體 (Ball-Goodrich *et al.*, 2002; Livingston *et al.*, 2002; Riley *et al.*, 1996)。ELISA 具有高敏感性，然而其特異性較不如 IFA 與 HAI。目前此檢測法已有自動機器操作與判讀系統，可適用於大量監測，常用於初步的診斷試劑。

IFA 乃利用免疫螢光的技術同時偵測感染細胞中病毒所表現的 NS 與 VP 蛋白，具有高敏感性與特異性，但在判讀上較費人工。此外，MPV 只能在 L3 的細胞中引發增殖性的感染 (productive infection)，培養難度較高，因此不利於實際診斷時的需求，較常用於輔助診斷的工具 (Ball-Goodrich *et al.*, 2002)。

HAI 可偵測血清中是否含有可抑制 parvovirus 的 VP 蛋白所引起的血液凝集反應的抗體。由於 HAI 具有高特異性，可應用於品系間的區分，但敏感性較 ELISA 和 IFA 敏感性為低 (Kagiyama *et al.*, 1986; Ueno *et al.*, 1996)。且此檢測法仍需人工判讀，並不適用於診斷上大量的監測。

近期發展了一種 multiplex fluorescent immunoassays (MFI)，是利用內含不同顏色染料的特殊微珠 (microbead)，先將抗原附在表面上，當此抗原與待測血清中的抗體結合後，藉由二次抗體上的螢光，藉由機器讀取螢光值總量判斷感染，不但具有與 ELISA 相同的敏感性，且具有同時檢測多種病原抗體的優點。此檢測法已有自動機器操作與判讀系統，可適用於大量監測，在美國許多實驗動物疾病診斷中心都已引進並改用此一診斷工具，但受限於昂貴的原料與儀器成本，並不普及於一般的實驗動物診斷研究室 (Khan *et al.*, 2005)。血清學的檢測雖然可大量的監測小鼠血清，隨著生醫科技的演化，許多基因改變或免疫缺陷的實驗小鼠已被大量用於生醫研究。由於此類小鼠體內無法產生足量的抗體，無法利用血清抗體檢測法。此外，血清抗體的檢測亦無法應用於判讀實驗中所使用的細胞培養液或生物試劑有無病毒的汙染。

## 1.6.2 分子生物學診斷


PCR 也為國際常用的 parvovirus 診斷方式之一，可直接增幅病毒基因片段，因此具有高敏感性，可用於偵測小鼠組織、細胞培養液、生物試劑甚至環境中的病毒汙染。依據不同的病毒基因序列來設計引子對，可達到不同的診斷目的。若是針對 NS 序列來設計引子對，此 generic PCR assays 可以偵測到所有的 parvoviruses；若是針對 VP2 序列來設計引子對，則可以特異性的偵測到不同的 parvovirus species。已有文獻發表偵測 MVM 與 MPV VP region 的 PCR 試劑 (Besselsen *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997)，敏感性高，可分別偵測到 10 copies 的 MVM 病毒 DNA 片段與 10 pg 的 MPV 病毒，MPV 的 PCR 診斷試劑可同時應用到 HaPV，LuIII virus 等其他的 rodent parvoviruses (Ball-Goodrich *et al.*, 1994; Besselsen *et al.*, 1995)。MPV 血清抗體陽性的 6 週齡小鼠，可利用 PCR 方式的在許多臟器如肝臟、腸管、腎臟，甚至子宮與神經組織中增幅出病毒的 DNA (Besselsen *et al.*, 1995)。由於病毒感染後可在造血淋巴器官中持續存在超過 6-9 個禮拜，PCR 檢體以小鼠的腸系膜淋巴結與脾臟最為合適 (Jacoby *et al.*, 1995a)。近期也有發表以糞便作為檢體的非侵入性的監測方式，由於糞便中排出時間較短，在實際檢測的應用上較不適合用於診斷的樣本 (Bauer and Riley, 2006)。此病毒在環境中非常穩定且具有感染性，因此診斷在環境中汙染的病毒也很重要。PCR 診斷適合用在偵測汙染的生物試劑 (Bauer *et al.*, 2004; Blank *et al.*, 2004; Bootz *et al.*, 2003)，受感染的組織 (Besselsen, 1998; Besselsen *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 2006) 以及糞便和環境表面病原 (Bauer and Riley 2006; Kunita *et al.*, 2006)，具有取代小鼠抗體產生試驗 (mouse antibody production test, MAP test) 的潛力。PCR 敏感性高、可特異性的偵測目標基因，不需等待抗體的生成等優點，使 PCR 可應用於監測早期感染，免疫缺陷小鼠，細胞培養液以及生物試劑的診斷 (Besselsen *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 2006)。

分子生物技術的不斷演進，近幾年發展出可定量 PCR 產物的 real time PCR，

一般的 PCR 只能得到 DNA 被量化後的結果，real time PCR 先將 DNA 接上螢光染料後放入 PCR 機器，機器與電腦連線，在增幅產物的過程中，每一 cycle 都可以知道 DNA 的產量，可以直接畫出 DNA 被量化的曲線。曲線圖的頂端 (peak) 即為增幅成功的目標產物，不需經由電泳後以肉眼判讀是否有被增幅的亮帶 (band) 出現，因此診斷的敏感度可以更高，但礙於需要特別的 PCR 機器，較高的成本考量與不同的判讀技巧，相較之下，傳統的 PCR 成本低且單純的判讀方式使其較為普及於一般實驗室與診斷單位。

除了直接將檢體 DNA 萃取後進行診斷，也可以分子雜交與核酸探針 (molecular hybridization with strand specific probes) 的方式偵測蠟塊包埋的組織中的病原 DNA，此方法可確定病原在不同組織結構中的增殖位置。

### 1.6.3 其他診斷方式

- 
- a) 小鼠抗體產生試驗：用於監測細胞培養液或生物試劑中病毒汙染時使用的診斷方式，是將待測檢體接種於衛兵鼠上，等待 4-6 週以後監測血清中的抗體 (de Souza *et al.*, 1989)。
  - b) 活體組織病毒分離與培養：具有較為昂貴且耗時的缺點之外，且 MPV 的體外培養不易，主要在研究型實驗室的使用，但可作為一個確診的標準 (Paturzo *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1988)。
  - c) 組織病理學診斷與組織免疫化學染色 (Immunohistochemistry stain, IHC)：小鼠在自然感染下一般不會有臨床症狀出現，即使是高病毒量的接種，所可能呈現的臨床症狀與病理變化並不具特異性，無法依病變而確定為 parvovirus 所引起，因此相對於其他診斷，組織病理學診斷乃屬低效率、不精確、耗費時間與人力等缺點。IHC 則已有研究指出其敏感性低並且人為誤差大，不適合應用為有效的診斷方式。
  - d) 電子顯微鏡檢查：電子顯微鏡檢查可直接觀察病毒超顯微結構，但成本昂貴



且無法區別不同 parvovirus 的感染，加上需要特殊昂貴儀器與操作訓練，多使用於病毒學的研究，較不適合做為常規的診斷方式。



## 第二章、研究動機與實驗設計

小鼠的濾過性小病毒 (mouse parvoviruses), 包括 minute virus of mice (MVM) 與 mouse parvovirus (MPV) 兩種病毒, 此病毒在感染小鼠後多不會有臨床症狀, 但會造成實驗數據的異常, 病原除了以糞口方式傳播之外, 還會經由受汙染的細胞培養液與生物試劑, 傳染給實驗小鼠。為了有效的診斷此兩種 mouse parvoviruses, 本研究將開發一個高特異性與高敏感性的多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑 (MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay), 可針對早期感染或免疫缺陷的實驗小鼠、細胞培養液以及生物試劑進行病原偵測。本試劑設計成可於一次反應下同時偵測 MPV 與 MVM 兩種病毒以及小鼠組織中的 actin 基因, 除了能夠節省實驗上的人力、時間與金錢之外, actin 有效的複製可確保在萃取與 PCR 反應過程中 DNA 的品質。目前並沒有以分子生物學監測台灣 mouse parvoviruses 感染的數據, 因此本研究將此多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑, 應用於台灣實驗小鼠中 MPV 與 MVM 的感染率之調查。

## 第三章、材料與方法 (Materials and methods)

### 第一節、實驗設計與流程

建立 mouse parvoviruses 分子診斷套組可應用於感染初期的小鼠、免疫缺陷的動物、細胞培養液及生物試劑污染的病毒監測。本研究針對台灣型的 MPV 品系 (MPV-1f; 中研院廖欽峰博士贈) 與 MVM(i) (美國密蘇里大學 Dr. Riley 贈) 進行兩者 VP 區域序列的 TA clone, 分別製作出 MPV 與 MVM 陽性控制組, 並針對目前已發現的各株 MVM 與 MPV 病毒基因序列, 設計具有高特異性與高敏感性的 MPV 與 MVM PCR 診斷試劑, 將有利於實驗動物疾病診斷單位於實驗動物健康監測與疾病的管理與控制的實際應用。此外目前所發表的文獻中, 台灣尚未利用 PCR 方式進行實驗小鼠的 MPV 與 MVM 感染率之調查報告。本研究的實驗設計分成兩部分, 首要部分為 MPV/MVM/Housekeeping gene (Actin) Multiplex PCR Assay 的開發, 並應用此診斷試劑進行所蒐集之台灣實驗小鼠檢體與細胞培養液的病原偵測。本實驗流程圖如 Figure 1 所示。

### 第二節、實驗檢體與細胞來源

#### 3.2.1 檢體組織、病毒與細胞培養液來源

本研究之檢體為台灣七個不同的動物中心與動物實驗室送檢的 174 隻實驗小鼠, 蒐集的對象包含不同品系、年齡、性別以及飼養條件下的動物。待檢的活體小鼠, 觀察並記錄是否有臨床症狀後, 以過量的二氧化碳進行安樂死, 進行心臟採血並將血清保存於-80 冰櫃中備用。同時解剖動物檢查是否有外觀病理變化, 進行組織樣本檢體的採集, 採集的檢體包含有脾臟、肝臟、腸系膜淋巴結以及其他臟器, 並儲存於-80 冰櫃中備用。MPV 感染的組織檢體是由中研院廖欽

峰博士提供已知 MPV 陽性小鼠的脾臟，並保存於-80 冰櫃中備用。MVM 病毒是由美國 University of Missouri-Columbia 的 Research Animal Diagnostic Laboratory (RADIL) Dr. Riley 提供，保存於-80 冰櫃中備用。KRV、H-1、RPV、RMV 等大鼠 parvoviruses 病毒 (Riley 提供) 的陽性控制組本實驗室已於其他研究中完成製備，保存於-80 冰櫃中備用。本研究由不同動物研究實驗室蒐集多種細胞培養液培養液，並保存於液態氮中備用。

### 3.2.2 組織的 DNA 萃取

由於 parvovirus 感染小鼠後，持續存在於造血淋巴器官的時間最長，本研究所選用的組織檢體以脾臟為優先 (Jacoby *et al.*, 1995)。組織 DNA 的萃取乃利用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，並參照產品說明步驟完成，此 DNA 萃取過程簡要介紹如下。將小鼠脾臟組織 (10 mg) 切碎後放入 1.5-ml 離心管中，立即加入 180  $\mu$ l ATL buffer 與 20  $\mu$ l 的 proteinase K (Qiagen)，振盪混和後放入 56 恆溫槽作用直到組織完全溶解 加入 200  $\mu$ l 的 AL buffer (Qiagen)，上下翻轉數次以混合，此時會出現白色沉澱物，震盪 15 秒後放置於 70 恆溫槽作用 10 分鐘，經短暫快速離心將管壁上的液體離心下來。加入 200  $\mu$ l 100% Ethanol，震盪 15 秒後將所有溶液置入 QIAamp spin column 中，以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘後，將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 AW1 buffer (Qiagen) 於 QIAamp spin column 中，以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘，離心後將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 AW2 buffer (Qiagen)，以 14000 rpm 高速離心 3 分鐘，離心後將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管，再以 14000 rpm 高速離心 1 分鐘 離心後，將 QIAamp Spin Column 放入新的 1.5-ml 離心管中，加入 200  $\mu$ l 的 AE buffer (Qiagen) 加入 QIAamp spin column 中，室溫靜置 1 分鐘後以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘，再次加入 150  $\mu$ l 的

AE buffer，室溫靜置 1 分鐘後以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘。完成總量 350  $\mu$ l 的 DNA 萃取液，保存於-20 備用。

### 3.2.3 MPV 與 MVM 的病毒 DNA 萃取

MPV 陽性小鼠檢體組織取其脾臟組織萃取組織 DNA，方法步驟相同於 3.2.2 組織的 DNA 萃取，得到總量 350  $\mu$ l 的 DNA 萃取液，儲存於-20 備用。MVM 病毒 DNA 的萃取乃 QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>®</sup> Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，並參照產品說明步驟完成，此 DNA 萃取過程簡要介紹如下。將 25  $\mu$ l QIAGEN protease (Qiagen) 放入 1.5-ml 離心管中，加入 200  $\mu$ l 的病毒液，再加入 200  $\mu$ l AL buffer，震盪混合 15 秒後，以 56 加溫培養 15 分鐘，加入 250  $\mu$ l 100% ethanol，震盪混合 15 秒後，放在室溫培養 5 分鐘，將所有混合之溶液置入 QIAamp MinElute column，以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘後，離心後將 QIAamp MinElute column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 AW2 buffer 於 QIAamp MinElute column 中，以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘，離心後將 QIAamp MinElute column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 100% ethanol，以 14000 rpm 高速離心 1 分鐘，離心後將 QIAamp MinElute column 置於新的 2-ml 收集管打開上蓋，以 56 加溫 3 分鐘待乾，將 QIAamp MinElute column 放入新的 1.5-ml 離心管中，加入 150  $\mu$ l 的 AVE buffer (Qiagen)，室溫靜置 1 分鐘後以 14000 rpm 高速離心 1 分鐘，完成總量 150  $\mu$ l 的 DNA 萃取液，儲存於-20 備用。

### 3.2.4 細胞培養液 DNA 萃取

本研究利用所開發的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR 診斷試劑，應用於細胞培養液間 MPV 與 MVM 汙染病原的偵測。細胞 DNA 的萃取乃利用 QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，並參照產品說明步驟完成，此 DNA 萃

取過程簡要介紹如下。將適量的細胞培養液 (約  $5 \times 10^5$ - $10^6$  個細胞), 放入 1.5-ml 離心管中以  $300 \times g$  的速度離心, 上清液移除, 以 200  $\mu$ l PBS 回溶細胞沉積物, 並依序加入 20  $\mu$ l 的 proteinase K 及 200  $\mu$ l 的 AL buffer, 震盪混和 15 秒, 置入 56 恆溫槽作用 10 分鐘。加入 200  $\mu$ l 100% Ethanol, 震盪 15 秒後, 將所有溶液置入 QIAamp spin column 中, 以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘後, 離心後將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 AW1 buffer 於 QIAamp spin column 中, 以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘, 離心後將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管。加入 500  $\mu$ l 的 AW2 buffer, 以 14000 rpm 高速離心 3 分鐘, 離心後將 QIAamp spin column 置於新的 2-ml 收集管。以 14000 rpm 高速離心空轉 1 分鐘。將離心後的 QIAamp spin column 放入新的 1.5-ml 離心管中, 加入 200  $\mu$ l 的 AE buffer, 室溫靜置 1 分鐘後以 8000 rpm 高速離心 1 分鐘, 完成總量 200  $\mu$ l 的 DNA 萃取液, 儲存於 -20 備用。

### 第三節、聚合酶鏈鎖反應陽性控制組之建立

為了確定所開發的聚合酶鏈鎖反應試劑能夠有效增幅出 MPV 與 MVM 的 DNA, 本研究分別將 MPV 與 MVM 的 VP 區段的 DNA 以 TA clone 方式放入 competent cell 中增殖作為陽性控制組, 進而應用於聚合酶鏈鎖反應試劑的特異性與敏感性評估。

#### 3.3.1 MPV 與 MVM VP 基因序列之增幅

以本實驗室設計之 VP 區域長片段增幅的引子對, 分別在 MPV 陽性小鼠檢體組織 DNA 與 MVM 病毒 DNA 中, 進行 MPV 與 MVM 病毒 VP 區段的增幅, 預計 MPV 產物大小為 2219 bp; MVM 產物大小為 1800 bp, 反應條件如下表所示 (Table 1)。長片段聚合酶鏈鎖反應中, 最終反應體積為 50  $\mu$ l, 在此溶液中,

內含有 5  $\mu$ l MPV 陽性組織 DNA 萃取液或 MVM 病毒 DNA 萃取液，0.5  $\mu$ M 之 VPF 及 VPR 引子 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，0.2  $\mu$ M 之 dNTP (OnesStar, Taipei, Taiwan)，1X Phusion<sup>®</sup> HF buffer (Finnzyme, Espoo, Finland) 及 1 U Phusion<sup>®</sup> DNA polymerase (Finnzyme)。此增幅反應乃於聚合酶鏈鎖反應器中進行反應 (C1000 Thermal Cycler； BIO-RAD, Hercules, CA, USA)，其反應條件為：98  $^{\circ}$ C、30 秒鐘，接著重複 35 個循環的 98  $^{\circ}$ C、10 秒鐘，62  $^{\circ}$ C、15 秒鐘，72  $^{\circ}$ C、90 秒鐘，再以 72  $^{\circ}$ C、10 分鐘後，降至 4  $^{\circ}$ C 以終止反應。取適量之增幅產物，利用 Tris-borate EDTA (TBE) 所配製之 1% 瓊脂凝膠 (Alfa Biosciences, Baltimore, MD, USA)，以 50V 進行電泳約 100 分鐘。瓊脂凝膠以溴化乙錠 (0.5 mg/l) 進行染色，以紫外光進行觀察，與 1 kb 的 DNA ladder (Bioman, Taipei, Taiwan) 進行比較，觀察是否有預期大小的 DNA 片段生成。

### 3.3.2 MPV 與 MVM VP DNA 增幅產物之膠體萃取

取適量含有預期大小的 PCR 增幅產物，利用 Tris-borate EDTA (TBE) 所配製之 1% 低熔點瓊脂凝膠 (SeaPlaque GTG Agarose, Lonza, ME, USA)，以 50V 進行電泳約 100 分鐘。瓊脂凝膠以溴化乙錠 (0.5 mg/l) 進行染色，並將含有預期大小的 DNA 片段的膠體進一步純化。聚合酶鏈鎖反應之產物乃利用 QIAquick<sup>®</sup> Gel Extration Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行純化，純化步驟均參照產品說明書進行，簡述如下。利用無菌刀片切下預期產物大小片段位置之膠體，置於 1.5-ml 離心管中秤重，並加入三倍膠體體積量的 QG buffer (Qiagen) (300  $\mu$ l/0.1 g 膠體)。將此離心管置於 50  $^{\circ}$ C 恆溫槽 10 分鐘，待膠體完全溶解後，將此溶解液置於 QIAquick column 內，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於新的 2-ml 收集管，加入 500  $\mu$ l QG buffer，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於新的 2-ml 收集管，加入 750  $\mu$ l PE buffer (Qiagen)，靜置於室溫 5 分鐘，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於新的 1.5-ml

離心管，加入 30  $\mu$ l EB buffer (Qiagen)，靜置於室溫 1 分鐘，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於前述的 1.5-ml 收集管，並抽取前述之離心液，再加回 QIAquick column 中，靜置於室溫 1 分鐘，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，即獲得 VP 區基因增幅產物之膠體萃取純化產物。

### 3.3.3 MPV 與 MVM VP DNA 之 3'腺嘌呤延伸

在 3'腺嘌呤延伸反應中，最終反應體積為 30  $\mu$ l，在此溶液中，內含有適量的純化 MVM 或 MPV VP DNA 片段，0.2 mM 的 dATP (Finnzyme)，1X DyNAzyme buffer (Finnzyme) 及 1 U DyNAzyme II DNA polymerase (Finnzyme)。於聚合酶鏈鎖反應器 (C1000 Thermal Cycler； BIO-RAD)，其反應條件為：72<sup>o</sup>、20 分鐘後，降至 4<sup>o</sup> 以終止反應，即獲得 3'腺嘌呤延伸之病毒增幅產物。

### 3.3.4 MPV 與 MVM 3'腺嘌呤延伸產物之純化

將上述之 3'腺嘌呤延伸反應產物以 QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行純化，其步驟均參照產品說明書進行。PBI buffer (Qiagen) 與 DNA 產物以 5:1 比例充分混合均勻後全數放入 QIAquick spin column，以 13000 rpm 離心 60 秒，離心後將 QIAquick column 置於新的 2-ml 收集管，加入 750  $\mu$ l PE buffer，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於新的 2-ml 收集管，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於新的 1.5-ml 收集管，加入 30  $\mu$ l EB buffer，靜置於室溫 1 分鐘後，以 13000 rpm 離心 1 分鐘。離心後將 QIAquick column 置於前述的 1.5-ml 收集管，並抽取前述之離心液，加回 QIAquick column 中，靜置於室溫 1 分鐘後，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，即獲得 MPV 與 MVM VP 之 3'腺嘌呤延伸產物之純化液。



### 3.3.5 MPV 與 MVM VP 基因之轉殖

取 1  $\mu\text{l}$  純化的 VP 基因產物進行膠體電泳，外染後利用照膠軟體 (QCapture Pro, Media Cybernetics Inc., and QImaging Inc.) 將顯影的產物與 100 bp DNA ladder 作比對，計算出 MPV 與 MVM 產物之 DNA 的濃度。利用 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 進行重組質體 (recombinant plasmid) 的建構。用 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit 將已純化之 MPV 與 MVM DNA 片段植入質體 pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) 的多重選殖位 (multiple cloning site) 中，將重組質體 DNA 轉型 (transform) 到 *E. coli* (TOP10 competent cell; Invitrogen)，其步驟均參照產品說明書進行。首先加入適量的病毒 DNA 片段與 1  $\mu\text{l}$  的 Salt Solution (Invitrogen) 1  $\mu\text{l}$  的 pCR 2.1-TOPO<sup>®</sup> 載體充分混合，最後加入適量二次分餾水，使最後反應之總體積為 6  $\mu\text{l}$ ，混合均勻後置於室溫下作用 5 分鐘，接著將重組過後帶有病毒片段的質體放置冰上準備進行轉型作用 (transformation)。取 2  $\mu\text{l}$  重組質體加入裝有 TOP10 competent cell (Invitrogen) 的 2-ml 離心管中均勻混合，放置冰上作用 5 至 30 分鐘，移至 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽作用 30 秒進行 heat shock 反應，即刻回放至冰上，加入 250  $\mu\text{l}$  的 S.O.C. medium，於 37  $^{\circ}\text{C}$  下以 200 rpm 震盪培養 1 小時。將含有 Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 之 LB plate 表面均勻塗抹 40  $\mu\text{l}$  的 X-gal (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，再取 100  $\mu\text{l}$  菌液均勻塗抹於表面，培養於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱 18 小時後，進行藍白菌落篩選 (blue/white colony screening)。選取白色菌落，經兩次繼代培養於上述步驟處理之 LB plate。選取經兩次繼代後仍為白色的菌落，以無菌的接種環沾取後培養於 LB broth 中，置於 200 rpm 振盪器水平擺盪，並培養於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱 18 小時，以獲得純化菌種。

### 3.3.6 MPV 與 MVM VP 基因轉殖細胞之質體抽取

利用QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 抽取質體，其步驟均參照產品說明進行。將培養好的 *E. coli* 菌液置於1.5-ml離心管中，以8000 rpm 離心3分鐘。將250 µl P1 buffer加入 *E. coli* pellet，震盪15秒。再加入250 µl P2 buffer，將此離心管上下翻轉5次後，加入350 µl N3 buffer，將離心管上下翻轉5次，隨後以13000 rpm離心10分鐘。取上清液置於QIAprep spin column，以13000 rpm離心1分鐘。離心後將QIAprep spin column置於新的2-ml收集管，加入750 µl PB buffer，以13000 rpm離心1分鐘。離心後將QIAprep spin column置於新的1.5-ml no stick收集管，加入50 µl EB buffer，靜置於室溫1分鐘後，以13000 rpm離心1分鐘，將含有質體的離心過濾液保存於-20。

## 第四節、MPV 與 MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑開發

### 3.4.1 核酸引子設計 (MPV、MVM 及 Housekeeping gene)

為了設計出可專一針對 MPV 與 MVM 複製的引子對，本研究利用 BioEdit<sup>®</sup> 與 MegAlign<sup>®</sup> 軟體將所有已發表的 MPV、MVM 病毒株的基因序列以及其他 rodent parvoviruses 的序列作排列 (alignment) 後，在 parvovirus DNA 序列中，於變異度最大的區域設計適合的引子對。並以 Amplify3<sup>®</sup> (Bill Engels, University of Wisconsin, WI, USA)、EditSeq<sup>®</sup> (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) 等軟體篩選出合適的引子對。設計出來的 MPV 引子對位於 VP 基因區域，為 MPV4107F 與 MPV4388R；MVM 引子對位於 VP 基因區域，為 MVM3163F 與 MVM3627R (Table 2)。Housekeeping gene (Actin) 則選擇 Müller 等人於 2003 年發表的  $\alpha$ -actin 基因特異性引子 (ac1:GAGACCACCTACAACAGCATCATG; ac2:CACCTTGATCTTCATGGTGCTGGG) (Müller *et al.*, 2003)。MPV 的引子在所有 MPV 亞型的序列

均為一致，但與其他 rodent parvoviruses 的序列有差異，使其無法增幅其他的 rodent parvoviruses。同理，MVM 的引子與 MVM 亞型序列一致且不同於其他種 rodent parvoviruses 的序列。在聚合酶鏈鎖反應的選擇上，考量複製效果與成本，決定使用 Go Taq<sup>®</sup> flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 聚合酶系統進行本次實驗的核酸增幅反應。

#### 3.4.2 MPV 與 MVM 特異性聚合酶鏈鎖反應試劑建立 (MPV Specific and MVM Specific PCR Assays)

PCR 反應體積為 50  $\mu$ l，每一管的 PCR 反應溶液中含有 5  $\mu$ l 的脾臟組織 DNA 萃取液、0.8  $\mu$ M 的 MPV4107F-4388R 引子對或 MVM3163F-3627R 引子對 (Invitrogen)、0.05  $\mu$ M 的 actin ac1 與 ac2 引子對 (Invitrogen)、0.2  $\mu$ M 之 dNTP (OneStar, Taipei, Taiwan)，1X 之 GoTag<sup>®</sup> flexi buffer (Promega)，1.75 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega) 及 1.25 U 之 GoTag<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega)，將所有反應溶液加入 0.2-ml 的 PCR tube 中，放入聚合酶鏈鎖反應器 (C1000 Thermal Cycler; BIO-RAD) 進行 PCR 增幅反應。PCR 反應條件為：95 °C、2 分鐘，接著 95 °C、30 秒鐘，56 °C、30 秒鐘，72 °C、30 秒鐘重複 35 個循環，降至 4 °C 以終止反應 (Table 2)。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (No template) 陰性對照組，確定試劑無污染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 或 MVM 感染的小鼠組織，作為陰性組織對照組，用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形；一管含有 100 copies 的 MPV 或 MVM VP 區段基因與 MPV/MVM 陰性組織 DNA 作為陽性控制組，模擬病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。

取 10  $\mu$ l MPV Specific or MVM Specific PCR Assays 增殖產物與 0.36  $\mu$ g 的 100-bp DNA ladder (Bioman, Taipei, Taiwan) 載入 2% 的洋菜膠片中進行膠體電泳分析 PCR 產物大小。

### 3.4.3 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 之特異性與敏感性

為了檢測 MPV Specific PCR Assay 的特異性，將定量的 MPV-1f 陽性控制組連續稀釋後加入 PCR tube 中，每管含有  $10^2$  copies MPV VP DNA 於 PCR 反應溶液；同時準備 RPV-1c、RMV-1、KRV、H-1 的陽性控制組連續稀釋後加入不同 PCR tube 中，每管含有  $10^5$  copies 的其他 parvovirus DNA 於 PCR 反應溶液。同理，為了檢測 MVM Specific PCR Assay 的特異性，將定量的 MVM 陽性控制組連續稀釋後加入 PCR tube 中，每管含有  $10^2$  copies MVM VP DNA 於 PCR 反應溶液；同時準備 RPV-1c、RMV-1、KRV、H-1 的陽性控制組連續稀釋後加入不同 PCR tube 中，每管含有  $10^5$  copies 病毒 DNA 於 PCR 反應溶液。每管中加入 rodent parvovirus-free 的組織 DNA，以模擬於自然感染樣本病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。再以上述的 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 反應條件增殖後，觀察複製之產物效果。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無汙染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 或 MVM 感染的小鼠組織，作為陰性組織對照組，用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形。

為了檢測 MPV Specific PCR Assay 的敏感性，將定量的 MPV-1f 陽性控制組連續稀釋後分別加入不同的 PCR tube 中，各管分別含有 1000、100、50、10、5、1 copies MPV VP DNA 於 PCR 反應溶液。同理，為了檢測 MVM Specific PCR Assay 的敏感性，將定量的 MVM 陽性控制組連續稀釋後分別加入不同的 PCR tube 中，各管分別含有 1000、100、50、10、5、1 copies 的 MVM VP DNA 於 PCR 反應溶液。每管 PCR 反應液中加入 rodent parvovirus-free 組織 DNA，以模擬於自然感染樣本中病毒 DNA 存在於組織萃取液的情形。再以上述的 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 反應條件增殖後，觀察複製之產物效果。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無汙染之虞；一管加入以血清學監測確定無 MPV 或 MVM 陽性抗體的

小鼠脾臟組織 DNA，作為陰性組織對照組，用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形。

#### 3.4.4 多重引子聚合酶鏈鎖反應 (MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay)

為了建立可同時監測 MPV、MVM 以及小鼠細胞組織 actin 的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay，本研究合併 MPV4107F – 4388R，MVM3163F – 3627R 以及  $\alpha$ -actin ac1–ac2 等三對引子對，調整 PCR 反應條件達到最佳化後，開發可同時偵測 MPV 與 MVM 病毒 DNA，並同時監測萃取與反應後 DNA 品質的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay。所有 PCR 反應在聚合酶鏈鎖反應器 (C1000 Thermal Cycler; Bio-Rad) 執行。每一管總量為 50  $\mu$ l 的 PCR 反應溶液中含有 5  $\mu$ l 的脾臟組織 DNA 萃取液或 5  $\mu$ l 的培養細胞的萃取液、0.6  $\mu$ M 的 MPV4107F 與 4388R 引子對、0.8  $\mu$ M 的 MVM3163F 與 3627R 引子對、0.05  $\mu$ M 的 actin ac1 與 ac2 引子對 (Invitrogen)、0.2  $\mu$ M 之 dNTP (OneStar)、1X 之 Go Tag<sup>®</sup> Flexi buffer (Promega)、1.75 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega) 及 1.25 U 之 GoTag<sup>®</sup> Flexi DNA polymerase (Promega)，將所有反應溶液加入 0.2-ml 的小離心管中，放入聚合酶鏈鎖反應器 (C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler, Bio-Rad) 執行 PCR 增幅反應。PCR 溫度程式與單一聚合酶鏈鎖反應相同。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無汙染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 或 MVM 感染的小鼠組織，作為陰性組織對照組，用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形；一管含有 100 copies 的 MPV 與 MVM VP 區段基因與 MPV/MVM 陰性的組織 DNA 作為陽性控制組，模擬於自然感染樣本中病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。

取 10  $\mu$ l MPV/MVM/Actin Multiplex PCR assay 增殖產物與 0.36  $\mu$ g 的 100-bp DNA ladder (Bioman) 載入 2% 的洋菜膠片中進行膠體電泳分析 PCR 產物大小。

### 3.4.5 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 之特異性

為了檢測 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 的特異性,將定量的 MPV-1f 與 MVM 陽性控制組加入 PCR tube 中,每管內分別含有  $10^2$  copies MPV-1f 或 MVM VP 區 DNA 於 PCR 反應溶液;同時加入 RPV-1c、RMV-1、KRV、H-1 的陽性控制組於不同 PCR tube 中,每管含有  $10^5$  copies 大鼠 parvovirus 於 PCR 反應溶液。並於每管中加入 rodent parvovirus-free 組織 DNA,以模擬自然感染時病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。以上述的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 反應條件增殖後,觀察複製之產物效果。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組,確定試劑無污染之虞;一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 與 MVM 感染的小鼠組織 DNA,作為陰性組織對照組,用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形。

### 3.4.6 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 之敏感性

為了檢測 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 的敏感性,將定量的 MPV-1f 與 MVM 陽性控制組連續稀釋後分別加入不同的 PCR tube 中,各管分別含有 1000、100、50、10、5 copies 的 MPV-1f 與 MVM DNA 於 PCR 反應溶液。每管中加入 MPV/MVM-free 組織 DNA,以模擬於自然感染樣本中病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。再以上述的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 反應條件增殖後,觀察複製之產物效果。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組,確定試劑無污染之虞;一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 或 MVM 感染的小鼠組織 DNA,作為陰性組織對照組,用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形。

### 3.4.7 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 在不同病毒量共同感染下之偵測穩定度

臨床上實驗小鼠可能會有同時感染 MPV 與 MVM 的情形發生，而隨著暴露的病毒量或感染期的不同，感染小鼠體內的病毒量可能會處於一個不等量的狀態。為了探討不同 MPV 與 MVM 的病毒量在 MPV/MVM/Actin multiplex PCR 下之複製效果，本研究設計兩組 multiplex PCR 實驗組，用以模擬兩種病毒不等量共同感染小鼠的診斷，如高量的 MPV 與低量的 MPV 同時感染小鼠或者是高量的 MVM 與低量的 MPV 共同感染同一隻動物時，比較在高低數量的病毒共同存在的 PCR 偵測效果。第一個實驗組為分別在 5 管 PCR tube 中加入高量的 MPV VP DNA (10000 copies), 再依序分別加入由高至低量的 MVM VP DNA (1000Q 100Q 10Q 5Q 10 copies)。第二個實驗組則為分別在 5 管 PCR tube 中加入高量的 MVM VP DNA (10000 copies), 再依序分別加入由高至低量的 MPV VP DNA (10000、1000、100、50、10 copies)。所有實驗組 PCR tube 中都含有 MPV/MVM-free 的組織 DNA，以模擬於自然感染中病毒 DNA 存在於組織萃取液中的情形。將所有樣本於上述的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 反應條件增殖後，觀察複製之產物效果。每次反應中均包含有一管加入二次蒸餾水代替 DNA 之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無污染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無 MPV 或 MVM 感染的小鼠組織 DNA，作為陰性組織對照組，用以確定 PCR 試劑在組織 DNA 背景下的增幅情形。

## 第五節、台灣實驗小鼠與細胞培養液的濾過性小病毒感染調查

### 3.5.1 台灣實驗小鼠中濾過性小病毒 MPV 與 MVM 的感染率

為了瞭解台灣實驗小鼠MPV與MVM的感染情形，本研究蒐集來自台灣7所不同的實驗動物中心與實驗室送檢的174隻小鼠檢體 (Table 3)，利用建立的MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay進行檢體中MPV與MVM病毒DNA偵測。首先以步驟3.2.2方式萃取小鼠脾臟檢體DNA，將待測的檢體DNA依照步驟3.4.4中MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay反應條件增幅。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替DNA之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無汙染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無MPV或MVM感染的小鼠組織，作為陰性組織對照組，用以確定PCR試劑在組織DNA背景下的增幅情形；一管含有100 copies 的MPV與MVM VP區段基因與MPV/MVM陰性的組織DNA作為陽性控制組，模擬於自然感染樣本中病毒DNA存在於組織萃取液中的情形。取10  $\mu$ l MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 增殖產物與0.36  $\mu$ g的100-bp DNA ladder (Biomax) 載入2%的洋菜膠片中進行膠體電泳分析PCR產物大小。

統計所有小鼠檢體中 MPV 與 MVM 病毒偵測結果，分析 MPV 與 MVM 陽性檢體佔所有檢測小鼠檢體比率以了解台灣實驗小鼠感染情形。並將部分陽性產物進行 DNA 定序與分析，確定 PCR 所增幅到的產物是否為所偵測的目標病毒。

### 3.5.2 細胞培養液中濾過性小病毒 MPV 與 MVM 的污染率

為了瞭解收集到的細胞培養液的MPV與MVM的汙染情形，本研究蒐集來自不同的實驗室送檢的16種細胞培養液檢體 (Table 4)，利用建立的MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay進行檢體中MPV與MVM病毒DNA偵測。



首先以步驟3.2.4方式萃取細胞培養液中的DNA，將待測的檢體DNA依照步驟3.4.4中MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay反應條件增幅。每次反應中包含有一管加入二次蒸餾水代替DNA之無模板 (no template) 陰性對照組，確定試劑無汙染之虞；一管加入以血清學與其他分子生物學監測下確定無MPV或MVM感染的小鼠細胞培養液DNA，作為陰性組織對照組，用以確定PCR試劑在培養細胞DNA背景下的增幅情形；一管含有100 copies的MPV與MVM VP區段基因與MPV/MVM陰性的組織DNA作為陽性控制組，模擬於自然汙染樣本中病毒DNA存在於細胞培養液中的情形。取10 µl MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 增殖產物與0.36 µg的100-bp DNA ladder (Bioman) 載入2%的洋菜膠片中進行膠體電泳分析PCR產物大小。

### 3.5.2 陽性檢體 PCR 產物之定序與分析

經過膠體電泳確定 MPV 或 MVM 陽性的 PCR 產物，以 QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen Inc.) 同上述步驟將 DNA 產物進行膠體萃取與純化，利用分光光度計測量純化後之產物 A260 與 A280 吸光值，估算出產物的濃度與 DNA 的純度。調整純化產物濃度後，往臺灣大學醫學院醫學大樓第二共同研究室進行核苷酸定序，定序是利用 BigDye<sup>®</sup> Termination Cycle Sequencing v3.1 kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystem, Foster, CA, USA) 及雙去氧終止法 (Dideoxy-chain termination) 進行確認。收到定序之結果後，先檢查 DNA 的波形與序列，利用 Lasergene package (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 之 EdiSeq<sup>™</sup> 程式與 SegMan<sup>™</sup> 程式進行序列編輯與所有的 rodent parvoviruses 作排列比對，再將定序後之基因序列結果放上 NCBI 網站的 GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中進行 DNA 的搜尋與比對。

## 第四章、結果

### 第一節、實驗檢體與細胞培養液收集

為了瞭解台灣實驗小鼠的 MPV 與 MVM 感染現況，利用本研究開發之 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 應用於小鼠檢體的偵測。本研究蒐集到來自台灣 7 個不同的動物中心與動物實驗室，共 14 種品系，174 隻實驗小鼠。依檢體的飼養環境乾淨度可分為”conventional”、”clean conventional”、”barrier”三種等級，蒐集到的檢體數量依序分別為 113 隻、51 隻、10 隻小鼠。小鼠年齡介於 6-43 週齡之間 (Table 3)，採取的臟器包括脾臟、腸系膜淋巴結、肝臟、腎臟與糞便。本研究是以脾臟樣本進行 PCR 的偵測檢體。

為了得知目前常應用於生醫研究的細胞培養液與生物試劑的 MPV/MVM 汙染情形，本研究蒐集來自 7 個不同的生物研究實驗室的 16 種不同的細胞培養液 (Table 4)，以 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 檢驗這些細胞培養液是否有 MPV/MVM 汙染。

### 第二節、MPV 與 MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑之開發

#### 4.2.1 MPV 與 MVM 核酸引子的評估

為了確定 MPV 與 MVM 引子對在所有 rodent parvoviruses 中可特異性的偵測目標病毒，本研究將所有已發表的 MPV、MVM 病毒株的基因序列以及其他 rodent parvoviruses 的序列作排列 (alignment) 後，於變異度最大的 VP 基因區域中設計 MPV 與 MVM 適合的引子對。所設計出的 MPV4107F 與 MPV4388R 引子對與目前已發表的 MPV 之間的基因序列較為一致，與其他 rodent parvoviruses 具有明顯的差異，預期之 DNA 複製產物大小為 366 bp。MVM3163F 與 MVM3627R 引子

對與 MVM(i)、MVM(p)之間序列一致，與其他的 rodent parvoviruses 具有差異，預期之 MVM DNA 複製產物大小為 465 bp。當 MPV 引子對應用於 MPV Specific PCR Assay，可順利增殖 MPV 病毒 DNA，且於陰性組織對照組進行 PCR 增幅時，不會有非特異性的 DNA 鍵結出現。同樣的，當 MVM 引子對應用於 MVM Specific PCR Assay，除了可順利增殖 MVM 病毒基因，於陰性組織對照組進行 PCR 增幅時，並沒有產生非特異性的 DNA 複製產物。

#### 4.2.2 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 之特異性

為了確定 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 可特異性的分別增幅出目標 MPV 與 MVM 的 DNA，並且不會複製到其他的 rodent parvoviruses 的序列，本研究將低病毒量的 MPV、MVM 與高病毒量的 KRV、RMV-1、RPV-1、H-1 病毒的陽性控制組加入 rodent parvovirus-free 陰性組織 DNA，分別以 MPV Specific PCR Assay 與 MVM Specific PCR Assay 進行病毒 DNA 增幅。電泳下結果顯示 MPV Specific PCR Assay 僅會具特異性地針對 MPV 陽性控制組增幅出預期產物大小為 366 bp 的 MPV 基因片段，但不會複製 MVM 病毒 DNA 及大鼠的濾過性小病毒 (KRV、H-1、RMV-1、RPV-1) (Figure 2)。MVM Specific PCR Assay 僅會針對 MVM 陽性控制組複製出預期產物大小為 465 bp 的 MVM 基因片段，但不會複製 MPV 病毒 DNA 與大鼠的濾過性小病毒 (KRV、H-1、RMV-1、RPV-1) (Figure 3)。陰性組織控制組都沒有 DNA 產物被增幅出來，顯示所設計的 MPV 引子對與 MVM 引子對不會非特異性地複製動物組織基因。

#### 4.2.3 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 之敏感性

為了確定 MPV Specific and MVM Specific PCR Assays 的敏感性，本研究分別將 MPV 陽性控制組與 MVM 陽性控制組連續稀釋成 1000、100、50、10、5、

1 copies 之後,於各管中加入 MPV/MVM-free 陰性組織 DNA,分別以 MPV Specific PCR Assay 與 MVM Specific PCR Assay 進行病毒 DNA 增幅。電泳下結果顯示 MPV Specific PCR Assay 最低可偵測到 5 copies 的 MPV 陽性控制組 (Figure 4)。MVM Specific PCR Assay 最低可偵測到 10 copies 的 MVM 陽性控制組 (Figure 5)。MPV/MVM 陰性組織控制組可見預期產物大小為 153 bp 的 actin 基因片段被增幅出來。在無 DNA 的陰性對照組或陰性組織對照組中,並沒有與 MPV 或 MVM 的複製產物大小相符合的基因片段 (大小為 366 bp 或 465 bp) 被複製出來。

#### 4.2.4 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 之特異性

為了確定 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 可在同一次反應中專一地增幅出 MPV、MVM 以及小鼠組織中 actin 的 DNA,並且不會複製到其他 rodent parvoviruses 的 DNA。本研究將 100 copies 的 MPV、100 copies 的 MVM 與高病毒量 ( $10^5$  copies) 之大鼠的濾過性小病毒 (KRV、RMV-1、RPV-1、H-1) 病毒的陽性控制組加入 rodent parvovirus-free 的小鼠組織 DNA,以 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 進行病毒 DNA 增幅。電泳下結果顯示 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 會針對 MPV 與 MVM 陽性控制組分別增幅出預期產物大小為 366 bp 的 MPV 基因片段、預期產物大小為 465 bp 的 MVM 基因片段及預期產物大小為 153 bp 的  $\alpha$ -actin 基因片段 (Figure 6)。此外,在陰性組織對照組以及含有陰性組織背景的大鼠 parvovirus 陽性控制組中,皆僅可有效增幅出大小為 153 bp 的  $\alpha$ -actin 基因片段,但並沒有其他大小的特異性或非特異性的增幅產物出現。

#### 4.2.5 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 之敏感性

為了確定 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 的敏感性，本研究將 MPV 與 MVM 的陽性控制組分別連續稀釋成 1000、100、50、10、5 copies 後與 MPV/MVM 陰性組織 DNA，一起加入 PCR 反應溶液中，以 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 進行病毒 DNA 增幅。電泳下結果顯示 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 最低可同時偵測到 50 copies 的 MPV 與 MVM 陽性控制組以及  $\alpha$ -actin 基因片段；並且對 MPV 的偵測更為敏感，至低甚至可偵測到 10 copies 的 MPV DNA (Figure 7)。在陰性組織對照組及所有陽性控制組的 PCR 產物中，皆可測得 actin gene (housekeeping gene) 的複製產物 (153 bp 的基因片段)。並沒有與 MPV 或 MVM 的複製產物大小相符合的基因片段 (大小為 366 bp 或 465 bp) 在無 DNA 的陰性對照組或陰性組織對照組中被複製出來。

#### 4.2.6 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 在不同病毒量共同感染下之偵測穩定度

為了探討在不同 MPV 與 MVM 的病毒量時，MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 之複製效果。本研究設計兩個實驗組，第一組為固定高病毒量的 MPV 陽性控制組 ( $10^4$  copies)，再加入由高至低量的 MVM 陽性控制組 ( $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、50、10 copies) 後，同時進行 multiplex PCR 複製。第二組為固定高病毒量的 MVM 陽性控制組 ( $10^4$  copies)，再加入由高至低量的 MPV 陽性控制組 ( $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、50、10 copies) 後同時進行 multiplex PCR 複製。電泳結果顯示在  $10^4$  copies 的 MPV DNA 存在時，multiplex PCR 仍可同時最低可由 50 copies 的 MVM 中增幅出微弱的基因片段 (465 bp) (Figure 8-A)。相對的，當有  $10^4$  copies 的 MVM DNA 存在時，multiplex PCR 也可同時穩定地由 50 copies 的 MPV 中增幅出 MPV 的基因片段 (366 bp)，甚至偶而可偵測出較微弱的 10 copies 的 MPV DNA (Figure 8-B)。

此外,在陰性組織對照組以及含有陰性組織背景的MPV與MVM陽性控制組中,multiplex PCR皆可同時有效地增幅出預期產物大小為153 bp的 $\alpha$ -actin基因片段(Figure 8-A, 8-B)。

### 第三節、台灣實驗小鼠與細胞培養液的濾過性小病毒感染調查

#### 4.3.1 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR assay 之監測結果

為了瞭解台灣實驗小鼠的感染情形,本研究應用所建立之MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 監測來自台灣7個單位,共174隻實驗小鼠的檢體。小鼠檢體DNA萃取液進行multiplex PCR後,其中可由20隻小鼠檢體中可增幅出預期產物大小366 bp的MPV DNA;並沒有由任何檢體增幅出MVM預期產物大小(465 bp)的DNA;此外,所有檢體中都可增幅出預期大小153 bp的actin DNA,可確定萃取與反應後DNA品質良好且穩定(Figure 9)。反應中無模板之陰性對照組沒有任何DNA產物之增幅,確定試劑無汙染之虞;MPV/MVM-free的陰性組織對照組,僅增幅出預期大小153 bp的actin DNA。100 copies的MPV與MVM陽性控制組,可同時增幅出產物大小366 bp的MPV DNA片段,465 bp的MVM DNA片段以及153 bp的actin DNA,確定multiplex PCR可成功偵測到MPV與MVM的DNA(Figure 9)。統計所有陽性小鼠檢體的背景資料顯示,陽性檢體來源有3個單位,感染之單位量占所有單位的42.86%,單位中小鼠陽性率分別在F1為100%;F4為14.7%;F5為10%(Table 5)。除了來自F5之檢體乃飼養於Clean conventional等級的飼養環境外,其他皆為Conventional等級的飼養環境;所有小鼠皆為ICR品系,年齡介於8-16週齡間。此調查中MPV的感染率為11.5%,並沒有偵測到MVM陽性的小鼠檢體(Table 6)。

#### 4.3.2 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 在細胞培養液中的複製結果

為了確定本試劑能夠有效的應用於細胞培養液的 MPV/MVM 污染監測，本研究總共蒐集到 16 種細胞培養液樣本以 multiplex PCR 進行檢測。檢測結果顯示在 1 個細胞培養液樣本可增幅出 MPV DNA (366 bp) (Figure 10)，其他 15 個檢測樣本中都沒有 MPV (366 bp) 或 MVM DNA (465 bp) 之增幅產物，此外，所有樣本中都可增幅出 $\alpha$ -actin DNA (153 bp)。且 no template 陰性對照組沒有任何 DNA 增幅之產物，確定試劑無污染之虞；MPV/MVM-free 的陰性細胞對照組，僅增幅出預期大小 153 bp 的 actin DNA。100 copies 的 MPV 與 MVM 陽性控制組，可同時增幅出產物大小 366 bp 的 MPV DNA 片段，465 bp 的 MVM DNA 片段及  $\alpha$ -actin DNA 片段 (Figure 10)。本試劑在在檢測 Raw cell 樣本時發現兩個位於 400~500 bp 之間因非特異性鍵結之所產生的微量複製產物。

#### 4.3.3 台灣實驗小鼠濾過性小病毒 DNA 序列分析結果

為了確定本研究建立的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 所增幅的 MPV 陽性產物確實符合預期的 MPV 片段，本研究挑選兩個來自不同單位的檢體的 MPV PCR 複製產物，送往臺灣大學醫學院醫學大樓第二共同研究室進行核苷酸定序，將定序後的產物序列與 MPV-1a 序列比較 (資料未顯示)，發現兩個產物位置在 MPV-1a 序列上核苷酸相對位置的 4040 – 4270 間，與 MPV-1f 序列分別在不同的位置上有 9-15 個核苷酸不同，將基因序列放在 NCBI 網站的 Genbank 中搜尋後，顯示增幅產物的基因序列分別最相似於 MPV-2 與 MPV-1f。

## 第五章、討論

Parvovirus 由於可在環境中長期穩定的存在，感染嚙齒類動物後大多不會呈現任何臨床症狀，因此容易在實驗操作的過程中，經由污染的環境、器械、細胞株甚至生物試劑感染實驗小鼠或培養的細胞，進而影響免疫、腫瘤、移植等相關研究數據結果。在本病毒的預防與控制上，除了環境消毒與實驗人員本身的清潔嚴格遵守實驗操作步驟、實驗器械使用前須滅菌以外，針對實驗小鼠、細胞株以及生物試劑等可能的感染源進行定期監測，可更有效率的管控此疾病的發生。目前台灣尚未建立一套有效的診斷策略，在 MPV 與 MVM 病毒之監測上，主要是經由 ELISA 商業套組的診斷試劑，定期採取衛兵鼠的血清偵測病毒的抗體。雖然具有方便、操作快速、可一次檢測大量檢體的優點，但不能偵測早期感染的小鼠、免疫缺陷小鼠、細胞株或生物試劑中的病毒。此外，衛兵鼠需要至少飼養 3-4 週，體內血清轉換後才有辦法檢測到抗體生成，較為耗時，因此不易在第一時間點達成疾病監控。分子生物學診斷是直接針對病毒 DNA 作偵測，因此可針對以上所提及的感染源進行病毒的監測。本研究已成功建立一組特異性的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay，可偵測 MPV 與 MVM 的感染情形，並藉由偵測小鼠組織的 housekeeping gene，可同時用於受檢測樣本與操作步驟的品質監控。本研究數據指出此 multiplex PCR assay 用於監測小鼠檢體時，效果良好，更能實際有效的應用於實驗小鼠、細胞株及其他生物製劑等樣本的小鼠濾過性小病毒的監測。



## 第一節、MPV/MVM 聚合酶鏈鎖反應試劑之開發

### 5.1.1 PCR 檢體樣本的選擇

MPV 與 MVM 分子生物學檢測所用的檢體樣本，依病毒在自然感染後在組織分佈的情形與病毒的散播排泄方式，可有許多可能的選擇，如血液、淋巴造血器官(脾臟、腸系膜淋巴結等)、肝臟、腎臟、腸、尿液、糞便等 (Jacoby *et al.*, 1996) 毒種類及被病毒感染年齡的不同，病毒存在於不同組織的期間長短與病毒排泄方式與病毒排泄時段均可能稍有不同。研究發現在 parvovirus 陽性的實驗小鼠族群中 (positive colonies)，選取 6-8 週齡的小鼠中分別進行腸系膜淋巴結與糞便進行 PCR 偵測的比較，腸系膜淋巴結中 MPV 的檢出率為 100% 的情況下，糞便的檢出率僅有 74%；而在腸系膜淋巴結中 MVM 的檢出率為 63% 的情況下，糞便的檢出率僅由 34%。顯示 parvovirus 在淋巴造血組織中檢出率較高，但同一檢體中糞便的檢出率則顯著地偏低。這是因為病毒初期感染時會由糞口進入腸道固有層淋巴組織，隨著病毒血症將病毒擴散到全身，此時小鼠體內所存在的病毒量最高，較可由糞便中檢測出，繼而血清轉換產生抗體後，最終病毒大都存在於淋巴造血組織中，僅會間歇性的排毒於糞便中，因此檢出率大幅的下降，因此使用糞便作為 MPV 與 MVM 的檢體將含有較高的風險會出現偽陰性診斷。在病毒存在感染小鼠之糞便時限的研究中發現，MPV 陽性小鼠聚落中，5-11 週齡之小鼠糞便的陽性檢出率為 90-100%，之後陽性率隨著時間的拖延而急速下降，13 週時的檢出率僅達 60%，15 週後的檢出率更低至 20%，到 19 週齡時的檢出率為 0%。在 MVM 所污染的小鼠聚落中，採取小鼠的糞便進行 PCR 的檢測，在 5 週齡的小鼠陽性檢出率為 70%，11 週齡的小鼠陽性檢出率僅剩 10%，在 13 週時就無法從糞便中檢測到病毒的 DNA。相對的，在病毒陽性之小鼠聚落中，35 週齡小鼠的腸系膜淋巴結中 MPV 的陽性檢出率為 90%，MVM 為 80%，因此在一般小鼠檢體的選擇上，由於病毒可長期在脾臟與腸系膜淋巴結等造血淋巴器官中存在長達

7-9 週以上，因此作為檢體較為適合 (Bauer and Riley, 2006; Jacoby *et al.*, 1995b)。

但是隨著研究不斷發展，基因轉殖小鼠、基因剔除小鼠與 germ free mouse 等珍貴小鼠在研究上的使用越來越重要，在病原檢測上必須使用非侵入性的方式，此時可利用 PCR 進行糞便中 MPV 與 MVM 的檢測，但因為 parvovirus 自然感染後沒有任何臨床症狀，無從追溯小鼠感染的時間點，因此利用糞便檢體檢測結果極有可能會有偽陰性的情形發生，建議長期週期型的每 2 個星期進行一次檢測目標小鼠的糞便，才可較為確定檢測小鼠是否有 parvovirus 的感染發生 (Bauer and Riley, 2006; Jacoby *et al.*, 1995b)。

### 5.1.2 Multiplex PCR assay 引子條件最佳化之探討

本研究將 MPV、MVM 以及 $\alpha$ -actin 三對引子組合在一起，經由前試驗知道 MPV 的複製效果較 MVM 為佳，因此降低 MPV 引子在反應中的濃度。此外，因為 $\alpha$ -actin 在組織 DNA 中數量極多，為了避免 actin 的複製影響此試劑主要針對 MPV 與 MVM DNA 的複製效果，經過反覆實驗調整反應條件後，本研究降低 $\alpha$ -actin 引子在反應中的濃度，只達到每次 PCR 反應中，MPV/MVM-free 組織控制組可增幅出能以肉眼判別為 actin 產物之亮帶即可。

### 5.1.3 聚合酶鏈鎖反應試劑特異性與敏感性結果之探討

本研究目的為開發出針對兩種 mouse parvoviruses，MPV 與 MVM 的聚合酶鏈鎖反應試劑。首先開發的 MPV-Specific 與 MVM-Specific PCR assays，經實驗結果確定可特異性地複製 MPV 或 MVM 基因，並且不會與其他 rodent parvoviruses 有非特異性的鍵結。此兩種 PCR 的敏感度極高，可分別偵測到 5 個 MPV 與 10 個 MVM 的 DNA 片段。

進一步開發 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay，在同一次反應中即可檢測檢體中的 MPV 與 MVM，以及小鼠組織內 actin 的 DNA 以確保檢體在萃取和反應過程中的 DNA 品質，作為診斷操作過程的同步品質監控。經過特異性的測試，MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 在含有小鼠組織 DNA 與不同 rodent parvovirus 的存在下，可高特異性的偵測到目標 MPV 與 MVM 陽性控制組以及 actin 的 DNA，但不會與其他 rodent parvoviruses 有非特異性的鍵結。在敏感性的測試下，多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑至低可同時偵測到 50 個 MPV 與 MVM 的病毒。顯示所建立的多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑比單一聚合酶鏈鎖反應試劑節省了成本的支出、人力的耗費以及將近一半的時間，仍然維持高特異性與高敏感性的結果。此外，當檢體樣本具有不等量的 MPV 與 MVM 共同感染下，利用 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 檢測，兩種感染量相距 100 倍的病毒時 ( $10^4$  copies :  $10^2$  copies)，可以有效的複製出預期大小的複製產物。在 MPV 為  $10^4$  copies 時，甚至最低仍可偵測到 50 copies 的 MVM 病毒 DNA (Figure 8A)；相似地，在 MVM 為  $10^4$  copies 時，亦仍可偵測到 50 copies 的 MPV 病毒 DNA (Figure 8B)。在實驗結果中，兩種病毒感染量差距達過 1000 倍以上時，較低感染量的病毒增幅出的產物亮度相對的較為微弱且不穩定。因此，當檢體同時被 MPV 與 MVM 污染，且兩者病毒量相距超過 200 倍以上時，高感染量的病毒可能會影響低感染量的病毒之判讀，因此建議當產物訊號為若有模糊亮帶出現時 (border line)，進一步以 MPV 或 MVM Specific PCR Assay 偵測以確定診斷結果。

與至今已發表過的針對 MPV 與 MVM 的 PCR 診斷試劑作比較。在 MVM 的檢測下，Chang 於 1997 年所發表的 MVM 單一 PCR assay 其敏感度最低可偵測到 10 copies 的病毒 DNA (Chang, *et al.*, 1997)。在 MPV 的檢測下，Besselsen 於 1995 年所發表的 MPV 單一 PCR assay 其敏感度最低可偵測到 10 pg 的 MPV 病毒 (Besselsen, *et al.*, 1995)，相對於本研究開發之 MVM/MPV/Actin Multiplex PCR Assay 在偵測 MVM 病毒敏感度與已發表的單一檢測試劑一致，在偵測 MPV 病毒的敏感度比已發表的單一檢測試劑更佳，並且在同一次反應下可同時偵測到

MPV 與 MVM 兩種病毒。此外，以前發表的文獻中並未加入 housekeeping gene 的檢測，本研發試劑可同時確定檢體的 DNA 在萃取時可獲得足夠的 DNA 量，在經過 PCR 之反應過程後可有效的增幅出產物，可大大的提升診斷的可信度與診斷效率。

## 第二節、台灣實驗小鼠 MPV 與 MVM 病毒之監測

台灣目前使用 ELISA 商業套組的診斷試劑進行衛兵鼠的血清監測。血清學試劑具有操作方便，簡易，可一次大量監測多隻小鼠。但由於血清學抗體診斷試劑不適用於檢測感染初期抗體不足時的小鼠、免疫缺陷的小鼠以及細胞株與生物試劑，在檢測感染的途徑上相對狹隘。亦有研究指出，血清學的診斷的效果可能會因為送檢衛兵鼠的品系與被感染時的年齡的不同而有所差異 (Besselsen *et al.*, 2000)。相對的，聚合酶鏈鎖反應試劑的檢測不需等待抗體生成的時間，可直接針對病毒 DNA 作偵測，除了可用於衛兵鼠的檢體監測外，也可直接監測實驗操作中的小鼠，所以適合應用於早期感染與免疫缺陷的小鼠檢體，此外，也可以應用於細胞株與生物試劑的監測，在管理感染的途徑上相對有效。

### 5.2.1 台灣實驗小鼠檢體中 MPV 與 MVM 的盛行率

Charles River 於 2009 年發表的實驗小鼠微生物感染率研究可知，在國外（包括北美、西歐、亞洲）的 MPV 陽性率為 1.86%，MVM 為 0.33% (Pritchett-Corning *et al.*, 2009)。在台灣的感染方面，國家實驗動物中心於 2009 年發表以血清學檢測台灣實驗大小鼠微生物感染之情況，在未檢測 MNV 與 helicobacters 的情況下，其中 MPV 的盛行率為 11.7%，高居所有檢測病原中第一位，而目前並未檢出 MVM 血清陽性的檢體 (Liang *et al.*, 2009)。本研究以所建立的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 應用於所蒐集到的小鼠檢體的監測，以分子生物學方式調查

台灣實驗小鼠的感染情形。所蒐集到的小鼠檢體來自 7 個單位，共有 14 種品系，總共 174 隻小鼠檢體。檢測結果在 174 隻小鼠檢體中，MPV 陽性的小鼠量占總檢測小鼠量的 11.5%，而目前並沒有檢測出 MVM 陽性的小鼠檢體。本研究利用 multiplex PCR 檢測之結果與國家實驗動物中心以血清學檢測陽性率接近，推測與 MPV 持續感染的特性有關，由於病原可持續在造血淋巴組織內存在長達 9 週之久 (Jacoby *et al.*, 1995)，且飼養在 MPV 污染環境中的小鼠可重複被未清除的病毒感染，此一情形較常見於 conventional 品質的飼養環境或未定期進行 MPV 或 MVM 病原監測的實驗小鼠，因此定期且準確的診斷對於此疾病在小鼠的控制上非常重要。推測檢測結果中 MPV 高感染率而 MVM 感染率為 0% 的可能原因是 MVM 在 1966 就被發現，較在 1993 年才被發現的 MPV 要來的早許多，所以國外較早開始進行在實驗小鼠中 MVM 感染的控制，將 MVM 感染的情形降低，因此台灣早期由國外購入的實驗小鼠，很可能大部分都是 MVM-free 的狀況。此外，被 MVM 感染的實驗小鼠，經過 3~4 個星期的間歇排毒期後，病毒抗原就不存在於糞便、尿液甚至組織器官之中，因此 MVM 在感染的傳播上具有自限性 (self-limiting) (Smith *et al.*, 1983)。相對的，MPV 發現的時間較晚，對此病毒的控制較晚才開始執行。此外，MPV 感染與 MVM 不同，MPV 已證實可以在小鼠造血淋巴組織存在長達 9 週以上，並且會間歇性的排毒污染墊料，導致傳播給其他陰性小鼠或汙染實驗器材與用品的危險性升高。以上兩點推測為台灣實驗小鼠中 MPV 感染率居高不下而 MVM 並無檢測出陽性檢體的原因。

### 5.2.2 陽性檢體定序結果分析

本研究挑選兩個不同來源的陽性檢體之 PCR 產物進行 DNA 定序與序列分析。定序後的序列大小為短片段 230 bp，由序列分析結果可知，得知兩個不同動物來源的病毒分別與 MPV-1 及 MPV-2 最為相似，可確定所開發的多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑可成功偵測到 MPV 病毒陽性的檢體。此外，產物序列與本研究所使

用的 MPV-1f 陽性控制組序列經比較後，分別在不同位置上有 9-15 個核苷酸不同，可確定實驗中的陽性產物，並非在實驗操作中陽性控制組汙染了其他檢體組織樣本所增幅產生的。

### 5.2.3 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 分別與 MPV confirmatory single PCR assay 以及 MVM confirmatory single PCR assay 在相同小鼠檢體監測下之一致性

為了確定所建立之多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑應用於小鼠檢體檢測之陽性率結果，本實驗室利用另外兩組不同引子對的 MPV and MVM confirmatory single PCR assays 進行小鼠檢體的感染監測。將檢測結果與本研究所開發之 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 檢測結果進行比較後，顯示兩者陽性樣本與整體感染率結果一致，得知 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 應用於活體小鼠的監測效果不會受到多重引子對的影響，而降低檢出率 (Table 7)。

### 第三節、細胞培養液中 MPV 與 MVM 病毒之監測

MPV 與 MVM 可在環境中穩定且長期存在，若無法有效且即時的清除病原，會有極高的風險來汙染實驗所使用的細胞株或生物試劑，可能進一步經由實驗操作而感染實驗小鼠，因此僅針對實驗小鼠體內病原偵測，在感染的防治上是不足夠的。針對細胞株與生物試劑中病毒的檢測，是在管控此病毒另一個重要環節。在細胞株或生物試劑的微生物汙染的診斷方面，美國食品與藥物管理局 (FDA) 建議以小鼠抗體產生試驗 (MAP) 方式作為首選的診斷方式。但由於 MAP 試驗需耗費較多的時間、人力與金錢。此外，已有研究指出 MAP 在多種病原的檢測 (包括 MPV 與 MVM) 敏感性比 PCR 為低 (Blank *et al.*, 2004; Bootz *et al.*, 2003)。本研究建立的多重引子聚合酶鏈鎖反應試劑，具有極高的特異性與敏感性，實際進行細胞株的檢測試驗後，可以確定引子對不會與細胞中的 DNA 產生非特異性

的增幅產物，也可成功增幅出陽性細胞株中的病毒 DNA，證實本試劑可實際應用於細胞株 MPV 與 MVM 的病毒監測。

細胞與培養液在 PCR 的檢測結果若出現非特異性的鍵結，可檢查是否為萃取之細胞數量過多，並利用稀釋至總量含有 1.25 µg total DNA 後再進行偵測。本研究發現 Raw cell 檢體 DNA 中可增幅出兩條位於 400~500 bp 大小的產物 (Figure 10)，由於產物大小與 MVM 相近，進一步以 MVM Specific PCR Assay 進行相同樣本 DNA 增幅後，確定為非特異性鍵結 DNA，因此判定此樣本為陰性。

#### 第四節、疾病控制策略

建議飼養實驗小鼠之動物房應將 MPV 與 MVM 列入健康監測之無特定病原清單中，定期以血清學的方式進行衛兵鼠或實驗中小鼠監測，以監控動物房與實驗中小鼠的感染；以 PCR 方式進行細胞株、生物製劑之監測，以監控長期使用的細胞培養液是否有受到汙染或以小鼠抗體產生試驗 (MAP test) 接種於乾淨小鼠，但較耗費成本且檢出效率較差。在外來病原的管控上，新進的小鼠須先隔離飼養，以 PCR 方式可有效率地檢測確定是否帶原，或將髒墊料放入衛兵鼠籠內等待 4-6 週後檢測血清中抗體。若感染發生時，需要多方向的進行偵測，檢測目標包括動物房衛兵鼠、外來引進小鼠、細胞培養液或生物製劑等實驗使用材料的病原偵測，以找出可能的感染源，PCR 方式可提供即時且有效率的檢測方式。當檢測出汙染源後，以淘汰方式清除感染的實驗小鼠與汙染的細胞培養液試劑，並且進行環境全面性的消毒與器械的滅菌。由於本病毒在環境中穩定，可長期存在汙染的器械或環境表面，並且仍具有感染性，因此實驗操作前需以特定消毒劑消毒操作台表面 (e.g. 10% bleach)，所使用器械也應該以高溫高壓滅菌處理，或浸泡於 10 % bleach 中至少 10 分鐘消毒。操作人員需依飼養老鼠動物房之乾淨等級作先後處理，依序進行飼養於 SPF, clean conventional, conventional 區老鼠的實驗操作，並以飼養族群 (mouse colony) 為單位更換所有使用之器械與手套。

## 第五節、結論

本研究成功的建立一組兼具特異性與敏感性的多重引子鏈鎖反應試劑，可同時偵測 MPV、MVM 以及小鼠組織 actin 的 DNA，並且可以實際應用於臨床上的實驗小鼠，細胞株以及生物試劑的診斷。台灣的實驗小鼠中 MPV 與 MVM 感染率的監測顯示，MPV 的感染率很高，約為在歐美實驗小鼠感染率的 5-10 倍。由於此病毒的感染已證實可影響多種研究數據，為了確保台灣生物醫學實驗數據的正確與品質，此病毒的防疫工作應該開始重視，運用本診斷試劑可有效的偵測到病毒感染，亦可應用在其他生物製劑的檢測上，成為疾病管理上的一個利器。

## 第六節、未來工作與展望

本研究已建立兼具高特異性與敏感性的聚合酶鏈鎖反應試劑，未來期望能夠實際運用於實驗小鼠的健康監測上，並設計有效的病原控制策略，找出傳染源傳播，封鎖可能的傳播途徑，達到病毒陽性率下降，以清除本病毒在台灣實驗小鼠的感染為目標。

本研究中所蒐集的細胞株 MPV 與 MVM 檢測結果顯示陽性的檢體是存在的，若使用此類被病毒污染的細胞株或生物試劑接種於實驗小鼠，很可能因此在無形中造成實驗小鼠的感染，未來可利用本研究所建立的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 作為一個常規性的診斷方式，進行哺乳類細胞株的廣泛監測。

在台灣實驗小鼠的 MPV 與 MVM 感染監測結果顯示，陽性的小鼠並非均勻的分佈在各個實驗動物使用單位，可進一步以個別出現陽性檢體的單位為目標，了解該單位本身的陽性率。進行該單位所有衛兵鼠的調查，並針對該單位設計適合的防治策略。

在研究方面，可運用實驗小鼠同時接種不等量之 MPV 與 MVM，以本研究所建立的 MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay 實際進行 co-infection 下的監測



效果，並探討小鼠在 co-infection 下的病毒感染量與小鼠之免疫狀態。



Table 1 Oligonucleotide primers used for MPV and MVM VP gene amplification

Primers	Primer sequence (5'-3')	Product size	Thermocycling Profile
MPV		2219 bp	98 for 30s,
VPF	CTTGACCAAGGAGAACCAAC		(98 for 10s,
VPR	CATATTATTCTATTTCTTAAATCTAT		62 for 15s,
MVM		1800 bp	72 for 90s) x
VP2F	ACCATGAGTGATGGCACCAG		35 cycles, 72
VP2R	GTTAGTAAGTATTTCTAGCAACA		for 10min, 4



Table 2 Oligonucleotide primers used for MPV Specific and MVM Specific PCR assays

Primers	Primer sequence (5'-3')	Product size	Thermocycling profile
MPV		366 bp	95 for 1 min
4107F	CATGACGCCAATGGCAGCCTAA		(95 for 30s,
4388R	CTTGCAAACAAAGGGAGCTTGT		56 for 30s,
MVM		465 bp	72 for 30s) x
3163F	CAATACAACAGACACATCAGTCAA		35 cycles, then
3627R	CCTTTTGGTGTTCCCATCACATT		4 forever



Table 3 Information of mouse samples in the surveillance of MPV/MVM

Identity	Facility code	No.	Age (week)	Facility classification
Case 1	F1	A	12	C <sup>1</sup>
		B	16	C
		C	16	C
Case 2	F2	A-D	8-10	CC <sup>2</sup>
		E-I	8-10	CC
Case 3	F3	A-E	>10	C
Case 4	F2	A-N	8-10	CC
		O	8-10	CC
Case 5	F4	A-F	8	C
		G,H,J,K	6-8	C
		I	6-8	C
		L-U	8	C
Case 6	F4	A-J	8	C
		K-O	8	SPF <sup>3</sup>
Case 7	F5	A-E	8	SPF
		F-G	8	CC
Case 8	F4	A-M	7	SPF
Case 9	F4	1-25	Unknown	Unknown
Case 10	F4	1-24	7	Unknown
		26-30	15-16	Unknown
Case 11	F4	A	6	Unknown
		B-F	6	Unknown
Case 12	F6	2-5	Unknown	CC
		6-11	12	CC
		12-14	20	CC
		15-17	12	CC
		18,20-23	20	CC
Case 13	F7	A-B	43	C
Case 14	F5	A-C	15	CC

<sup>1</sup>Conventional

<sup>2</sup>Clean conventional

<sup>3</sup>Barrier, Specific-pathogen free mice

Table 4 Information of cell cultures used in the surveillance of MPV/MVM

Cell name	Origin
BHK-21 cell	Baby hamster kidney
NB324K cell	SV-40 transformed cell line
Raw cell	Mouse macrophage
SPLC	Mouse spleen cell (primary culture)
EPC	Epithelioma papulosum cyprini
KF1	Koi fin cell
CCB	Common carp brain cell
PCKF	Koi fin cell (primary culture)
TKF	Koi fin cell
High Five™ insect cell	Insect cell
DF1 cell	Chicken fibroblast
Huh7 cell	Human hepatoma tumor cell
293A cell	primary human embryonic cell
B95a cell	marmoset B lymphocytes
MDCK cell	Canine kidney cell
Pk-15 cell	Swine kidney cell

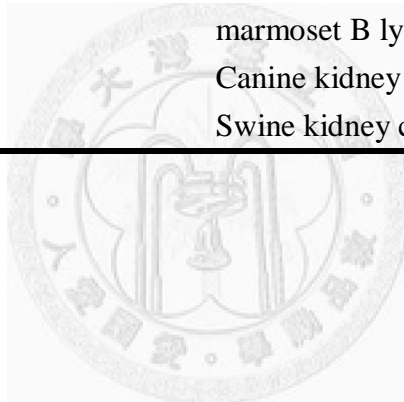


Table 5 Detection rate of laboratory facilities by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay

Facility	Virus spp.	MPV	MVM
F1		100% (3/3)	0% (0/3)
F2		0% (0/24)	0% (0/24)
F3		0% (0/5)	0% (0/5)
F4		14.7% (16/109)	0% (0/109)
F5		10% (1/10)	0% (0/10)
F6		0% (0/21)	0% (0/21)
F7		0% (0/2)	0% (0/2)

<sup>a</sup>Detection rate of MPV and MVM in mouse facility = positive animals/animals screened in facility



Table 6 Detection rate of laboratory mice by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay

Result \ Virus spp.	MPV	MVM
Positive mouse	20	0
Negative mouse	154	174
Total	174	174
Detection rate <sup>a</sup>	11.5% (20/174)	0% (0/174)

<sup>a</sup>Detection rate of MPV and MVM in laboratory mice = positive animal number/total animal number



Table 7 The consistency of MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay and MPV and MVM confirmatory single PCR assays in surveillance of laboratory mice

PCR assay \ Result	MPV and MVM confirmatory single PCR assays	MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay
MPV positive	20/174	20/174
MVM positive	0/174	0/174
Consistency	100%	





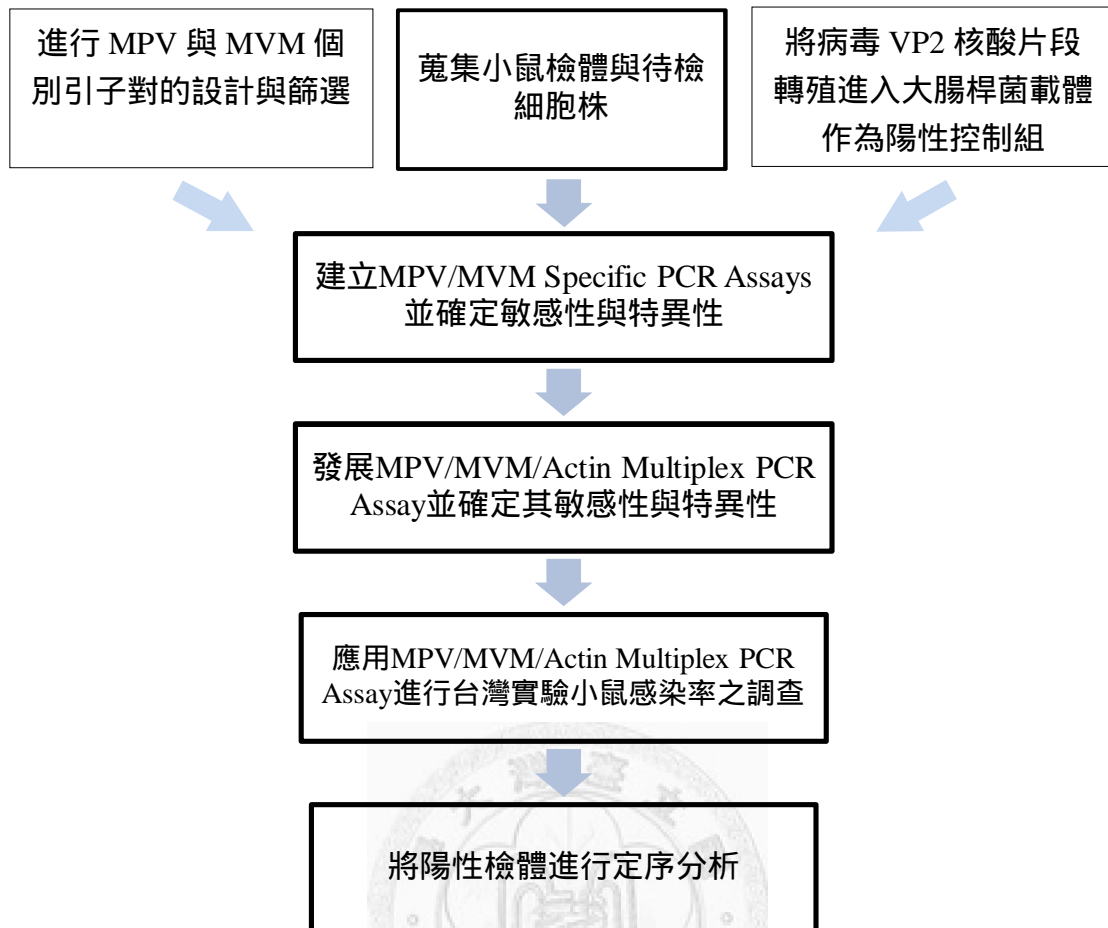


Figure 1 Flow chart of experimental design

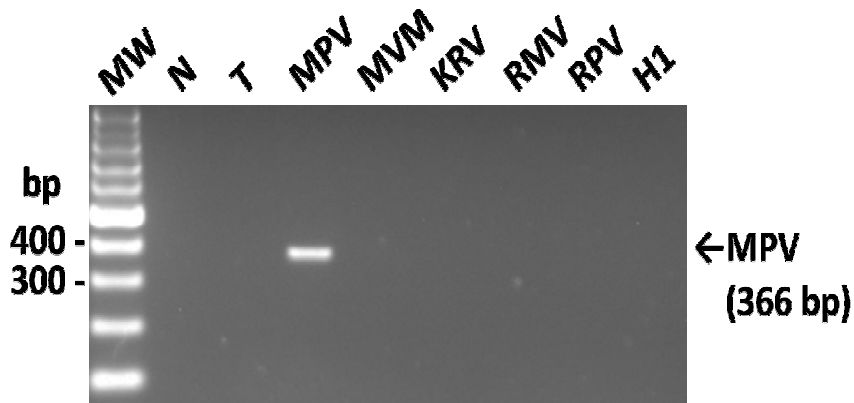


Figure 2 Specificity of the MPV Specific PCR Assay. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control. MPV:  $10^2$  copies of mouse parvovirus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. MVM:  $10^5$  copies of minute virus of mice VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. KRV:  $10^5$  copies of Kilham rat virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. RMV:  $10^5$  copies of rat minute virus type 1 VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. RPV:  $10^5$  copies of rat parvovirus type 1c VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. H1:  $10^5$  copies of Toolan's H-1 virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA.

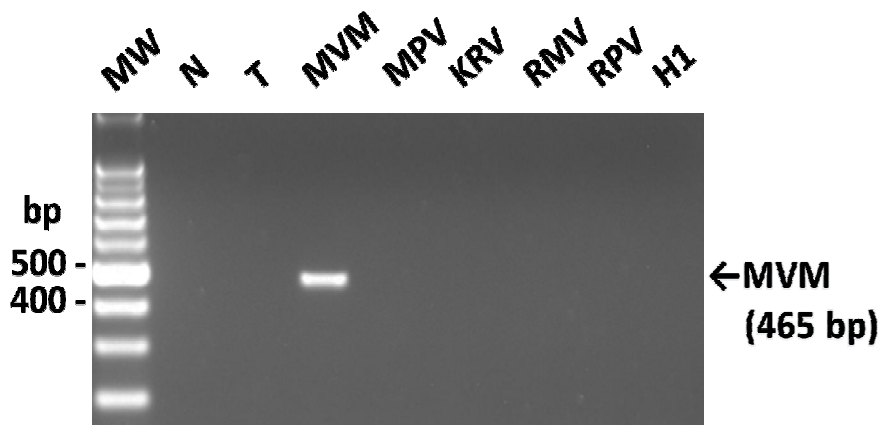


Figure 3 Specificity of the MVM Specific PCR Assay. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control. MPV:  $10^2$  copies of mouse parvovirus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. MVM:  $10^5$  copies of minute virus of mice VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. KRV:  $10^5$  copies of Kilham rat virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. RMV:  $10^5$  copies of rat minute virus type 1 VP DNA mixed with to parvovirus-negative tissue DNA. RPV:  $10^5$  copies of rat parvovirus type 1c VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. H1:  $10^5$  copies of Toolan's H-1 virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA.



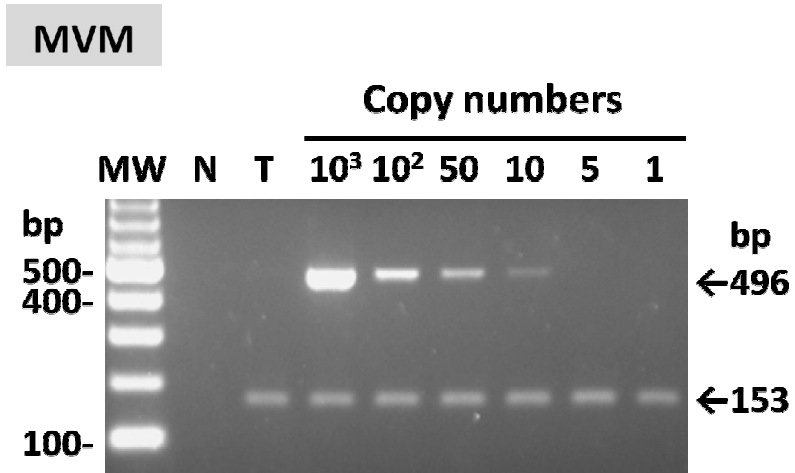


Figure 5 Sensitivity of the MVM specific PCR assay. Serial dilutions of MVM VP DNA mixed with MPV/MVM-negative tissue DNA. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control.



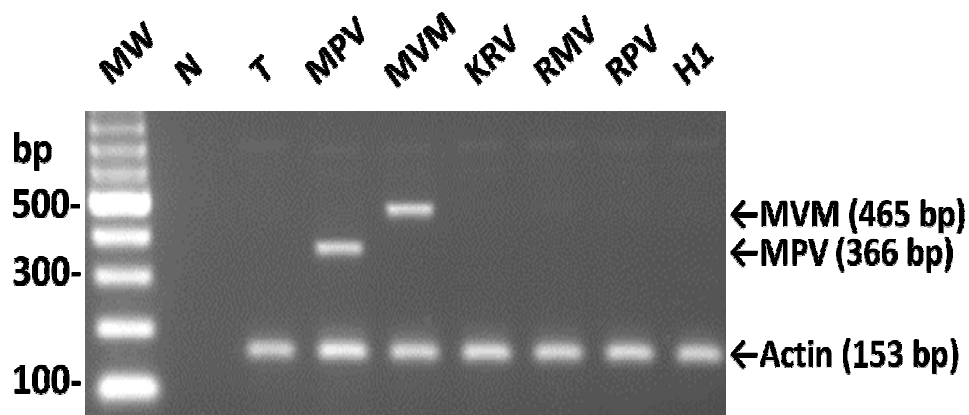


Figure 6 Specificity of the MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control. MPV:  $10^2$  copies mouse parvovirus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. MVM:  $10^5$  copies minute virus of mice VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. KRV:  $10^5$  copies Kilham rat virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. RMV:  $10^5$  copies rat minute virus type 1 VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. RPV:  $10^5$  copies rat parvovirus type 1c VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA. H1:  $10^5$  copies Toolan's H-1 virus VP DNA mixed with parvovirus-negative tissue DNA.

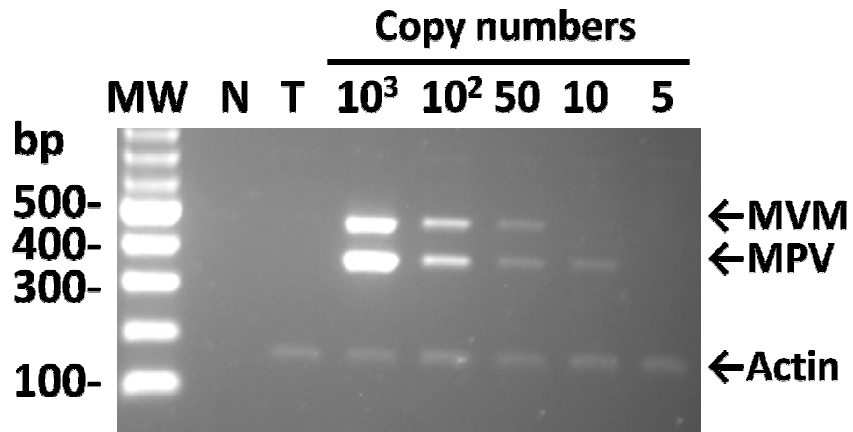


Figure 7 Sensitivity of the MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. Serial dilution of MPV and MVM VP DNA mixed with MPV/MVM-negative tissue DNA. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control.



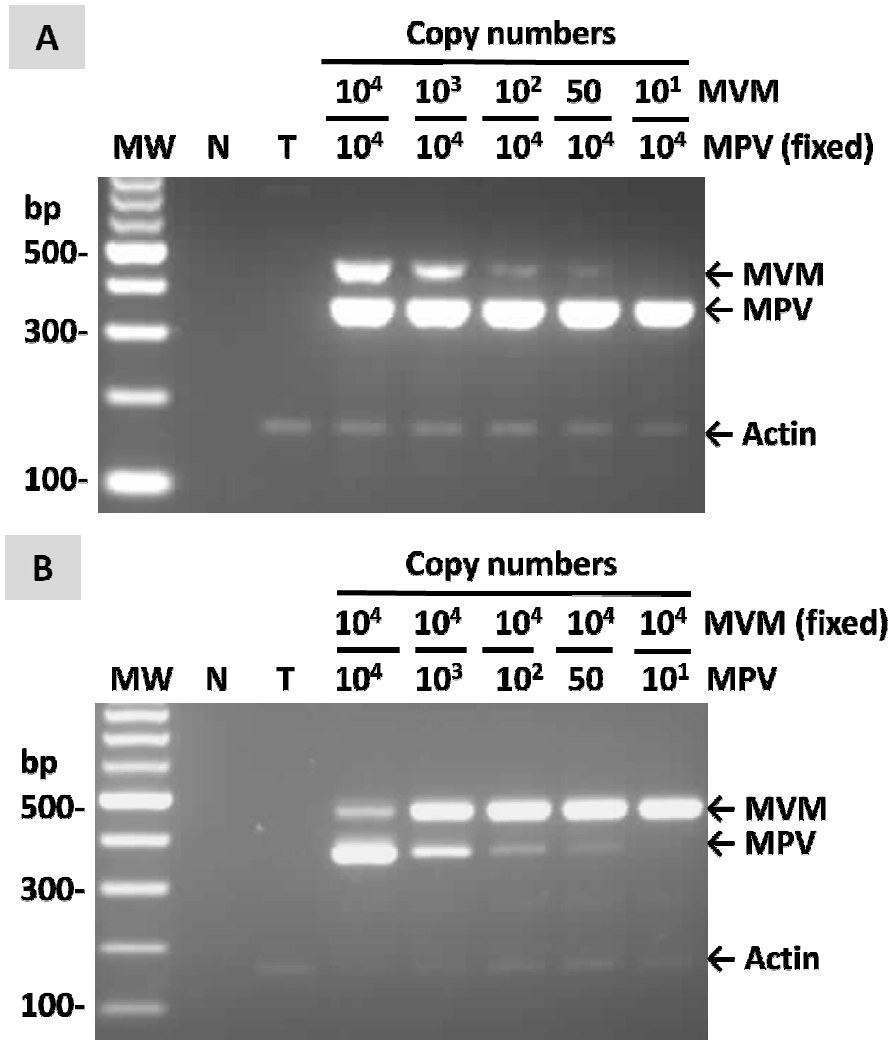


Figure 8 Detection of different combination of MPV and MVM by the MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. (A)  $10^4$  copies of MPV VP DNA mixed with  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 50, 10 copies of MVM VP DNA. (B)  $10^4$  copies of MVM VP DNA mixed with  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 50, 10 copies of MPV VP DNA. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control.



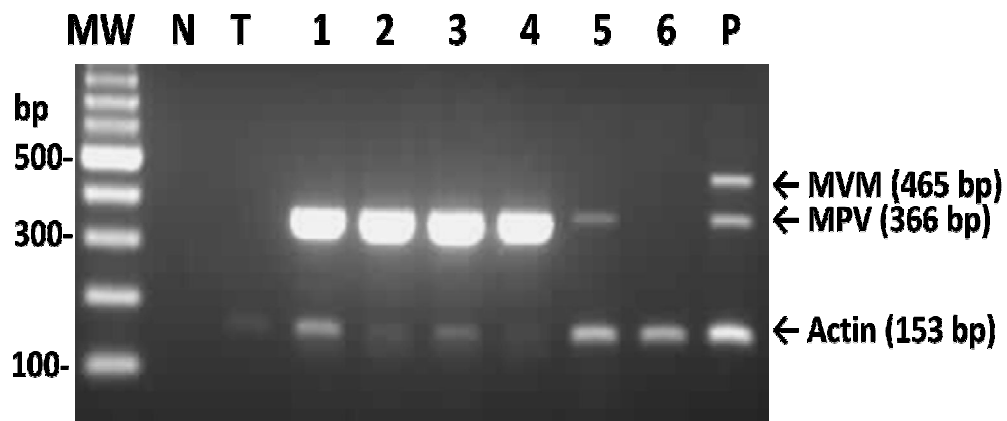


Figure 9 Detection of MPV and MVM in laboratory mice by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. MW: molecular weight marker. N: no template control. T: the MPV/MVM-negative tissue control. 1-6: the tissue DNA extracted from the spleen samples of 6 different mice. P: 100 copies of MPV and MVM VP DNA mixed with MPV/MVM-negative tissue DNA.



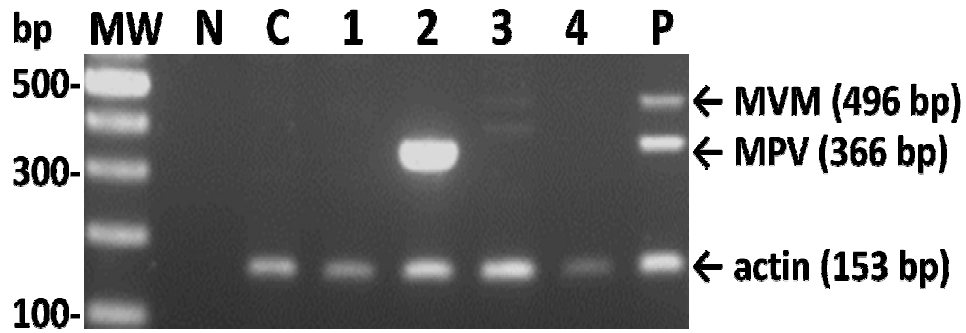


Figure 10 Detection of MPV and MVM in different cell cultures and cell lines by MPV/MVM/Actin Multiplex PCR Assay. MW: molecular weight marker. N: no template control. C: the MPV/MVM-negative A9 cell control. 1: the NB324K cell DNA extract. 2: the SPLC cell DNA extract. 3: the Raw cell DNA extract. 4: the BHK-21 cell DNA extract. P: 100 copies of MPV and MVM VP DNA mixed with MPV/MVM-negative cellular DNA.



## 參考文獻

- 施欣儀。偵測與清除動物房之新興病原。國立陽明大學碩士論文，台北，2008。
- 廖翊君。台灣新發現之大鼠小病毒的分子特徵。國立台灣大學碩士論文，台北，2009。
- Abschuetz, A., Kehl, T., Geibig, R., Leuchs, B., Rommelaere, J., Régnier-Vigouroux, A., 2006. Oncolytic murine autonomous parvovirus, a candidate vector for glioma gene therapy, is innocuous to normal and immunocompetent mouse glial cells. *Cell Tissue Res* 325, 423-6.
- Baer, P.N. and Kilham, L., 1974. Dental defects in hamsters infected with minute virus of mice. *Oral Surg* 37, 385-89.
- Ball-Goodrich, L.J., 1998. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. *Virology* 72, 3289-99.
- Ball-Goodrich, L.J., Hansen, G., Dhawan, R., Paturzo, F.X., Vivas-Gonzalez, B.E., 2002. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. *Comp Med* 52, 160-6.
- Ball-Goodrich, L.J. and Johnson, E. 1994. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J Virol* 68, 6476-86.
- Bauer, B.A., Besch-Williford, C.L., Riley, L.K., 2004. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals* 32, 177-82.
- Bauer, B.A. and Riley, L.K., 2006. Antemortem detection of mouse parvovirus and mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples. *Lab Anim* 40, 144-52.
- Besselsen, D.G., 1998. Detection of rodent parvoviruses by PCR. *Methods Mol Biol* 92, 31-7.

- Besselsen, D.G., Becker, M.D., Henderson, K.S., Wagner, A.M., Banu, L.A., Shek, W.R., 2007. Temporal transmission studies of mouse parvovirus 1 in BALB/c and C.B-17/Icr-Prkdc (scid) mice. *Comp Med* 57, 66-73.
- Besselsen, D.G., Besch-Williford, C.L., Pintel, D.J., Franklin, C.L., Hook, R.R. Jr., Riley, L.K., 1995. Detection of newly recognized rodent parvoviruses by PCR. *J Clin Microbiol* 33, 2859-63.
- Besselsen, D.G., Pintel, D.J., Purdy, G.A., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L., Hook, R.R. Jr., Riley, L.K., 1996. Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. *J Gen Virol* 77, 899-911.
- Besselsen, D.G., Romero, M.J., Wagner, A.M., Henderson, K.S., Livingston R.S., 2006. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J Gen Virol* 87, 1543-56.
- Besselsen, D.G., Myers, E.L., Franklin, C.L., Korte, S.W, Wagner, A.M., Henderson, K.S., Weigler, B.J., 2008. Transmission probabilities of mouse parvovirus 1 to sentinel mice chronically exposed to serial dilutions of contaminated bedding. *Comp Med* 58, 140-4.
- Besselsen, D.G., Wagner, A.M., Loganbill, J.K., 2000. Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comp Med* 50, 498-502.
- Blank, W.A., Henderson, K.S., White, L.A., 2004. Virus PCR assay panels: an alternative to the mouse antibody production test. *Lab Anim* 33, 26-32.
- Bonnard, G.D., Manders, E.K., Campbell, D.A., Herberman, R.B., Collins, M.J., 1976. Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. *J Exp Med* 143, 187-205.
- Brownstein, D.G., Smith, A.L., Jacoby, R.O, Johnson, E.A., Hansen, G., Tattersall, P., 1991. Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice and regulation by host genotype. *Lab Invest* 65, 357-64.

- Bootz, F., Sieber, I., Popovic, D., Tischhauser, M., Homberger, F. R., 2003. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Lab Anim* 37, 341-51.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., Rommelaere, J., 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 9, 2989-95.
- Cater, J.E. and Pintel, D.J., 1992. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in minute cells. *J Gen Virol* 73, 1839-43.
- Chang, A., Havas, S., Borellini, F., Ostrove, J.M., Bird, R.E., 1997. A rapid and simple procedure to detect the presence of MVM in conditioned cell fluids or culture media. *Biologicals* 25, 415-9.
- Clinton, G.M., Hayashi, M., 1975. The parvovirus MVM: particles with altered structural proteins. *Virology* 66, 261-1.
- Cornelis, J.J., Salomé, N., Christiane, D., Rommelaere, J., 2004. Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J Gene Med* 6, S193-S202.
- Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J., Rommelaere, J., 1988. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol* 62, 3438-44.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P., 1986. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 58, 724-32.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P., 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33, 91-174.
- Crawford, L.V., 1966. A minute virus of mice. *Virology* 29, 605-12.

- de Souza, M., Smith, A.L., 1989. Comparison of isolation in cell culture with conventional and modified mouse antibody production tests for detection of murine viruses. *J Clin Microbiol* 27, 185-87.
- Engers, H.D., Louis, J.A., Zubler, R.H., 1981. Inhibition of T cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to minute virus of mice. *J Immunol* 127, 2280-85.
- Guetta, E., Graziani, Y., Tal, J., 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumor in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* 76, 1177.
- Guetta, E., Minberg, M., Mousset, S., Bertinchamps, C., Rommelaere, J., Tal, J., 1990. Selective killing of transformed rat cells by minute virus of mice does not require infectious virus production. *J Virol* 64, 458-62.
- Geletneky, K., Herrero, Y.C.M., Rommelaere, J., Schlehofer, J.R., 2005. Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: A brief review. *J Vet Med Series B* 52, 327-30.
- Harris, R.E., Coleman, P.H., Morahan, P.S., 1974a. Erythrocyte association and interferon production by minute virus of mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 145, 1288-92.
- Harris, R.E., Coleman, P.H., Morahan, P.S., 1974b. Stability of minute virus of mice to chemical and physical agents. *Appl Microbiol* 28, 351-4.
- Home Office, 2005. Statistics of scientific procedures on living animals. The Stationery Office. London, Great Britain.
- Jacoby, R.O., Ball-Goodrich, L.J., 1995a. Parvovirus infections of mice and rats. *Semin Virol* 6, 329-37.
- Jacoby, R.O. and Ball-Goodrich, L.J., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., Smith, A.L., 1996. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* 46, 370-80.
- Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Ball-Goodrich, L.J., Smith, A.L., McKisic, M.D., 1995b. Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. *J Virol* 69, 3915-19.

- Kagiyama, N., Takakura, A., Itoh, T., 1986. A serological survey on 15 murine pathogens in mice and rats. *Jikken Dobutsu* 35, 531-6.
- Khan, I.H., Kendall, L.V., Ziman, M., Wong, S., Mendoza, S., Fahey, J., Griffey, S.M., Barthold, S.W., Luciw, P.A., 2005. Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 513-9.
- Kimsey, P.B., Engers, H.D., Bernrd, H., Jongeneel, C.V., 1986. Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice. *J Virol* 59, 8-13.
- Kilham, L. and Margolis, G., 1971. Fetal infection of hamsters, rats and mice induced with minute virus of mice (MVM). *Teratology* 4, 43-62.
- Kilham, L. and Olivier LJ., 1959. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 7, 428-37.
- Koering, C.E., Geuskens, M., Rommelaere, J., 1996. Continuous production of minute virus of mice by an untransformed variant of Fisher rat fibroblast. *J Gen Virol* 77, 447-52.
- Kunita, S., Chaya, M., Hagiwara, K., Ishida, T., Takakura, A., Sugimoto, T., Iseki, H., Fuke, K., Sugiyama, F., Yagami, K., 2006. Development of ELISA using recombinant antigens for specific detection of mouse parvovirus infection. *Exper Anim* 55, 117-24.
- Lamana, M.L., Alblla, B., Bueren, J.A., Segovia, J.C., 2001. In vitro and in vivo susceptibility of mouse megakaryocytic progenitors to strain I of parvovirus minute virus of mice. *Exp Hematol* 29, 1303-9.
- Liang, C.T., Shih, A., Chang, Y.H, Liu, C.W., Lee, Y.T. Hsieh, W.C., Huang, Y.L., Huang, W.T., Kuang, C.H., Lee, K.H., Zhuo, Y.X., Ho, S.Y., Liao, S.L., Chiu, Y.Y., Hsu, C.N., Liang, S.C., Yu, C.K., 2009. Microbial contaminations of laboraotey mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48, 381-6.

- Livingston, R.S., Besselsen, D.G., Steffen, E.K., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L., Riley, L.K., 2002. Serodiagnosis of mice minute virus and mouse parvovirus infections in mice by enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. *Clin Diagn Lab Immun* 9, 1025-31.
- López-Bueno, A., Segovia, J.C., Bueren, J.A., Gerard O'Sullivan, M., Wang, F., Tattersall, P., Almendral, J.M., 2008. Evolution to pathogenicity of the parvovirus minute virus of mice in immunodeficient mice involves genetic heterogeneity at the capsid domain that determines tropism. *J Virol* 82, 1195-1203.
- Mähler, M., Köhl, W., 2009. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. *Lab Anim (NY)* 38, 161-5.
- McKisic, M.D., 1993. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J Immunol* 150, 419-28.
- McMaster, G.K., Beard, P., Engers, H.D., Hirt, B., 1981. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J Virol* 38, 317-26.
- McKisic, M.D., Paturzo, F.X., Smith, A.L., 1996. Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* 61, 292-9.
- McKisic, M.D., Macy, J.D., Delano, M.L., Jacoby, R.O., Paturzo, F.X., Smith, A.L., 1998. Mouse parvovirus infection potentiates allogeneic skin graft rejection and induces syngeneic graft rejection. *Transplantation* 65, 1436-46.
- McMaster, G.K., Beard, P., Engers, H.D., Hirt, B., 1981. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J Virol* 38, 317-26.
- Mukerjee, M., 1997. Trends in animal research. *Sci Am* 276, 86-93.



- Müller, N., Zimmermann, V., Forster, U., Bienz, M., Gottstein, B., Welle, M., 2003. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol* 114, 223-9.
- Nicklas, W., Homberger, F.B., Illgen-Wilcke, B., Jacobi, K., Kraft, V., Kunstyr., Ivo., Mähler, M., Meyer, H., Pohlmeyer-Esch, G., 1999. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde--Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). *Lab Anim* 33, S39-87.
- Nicklas, W., Kraft, V., Meyer, B., 1993. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci* 43, 296-300.
- Ninomiya, H. and Inomata, T., 1998. Current uses of laboratory animals in Japan and alternative methods in research, testing and education. *Appl Anim Behav Sci* 59, 219-225.
- Op De Beeck, A. and Caillet-Fauquet, P., 1997. The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin. *J Virol* 71, 5323-9.
- Parker, J.C., Collins, M.J., Cross, S.S., Rowe, W.P., 1970. Minute virus of mice. II. Prevalence, epidemiology, and occurrence as a contaminant of transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst* 45, 305-10.
- Paturzo, F.X., Jacoby, R.O., Bhatt, P.N., Smith, A.L., Gaertner, D.J., Ardito, R.B., 1987. Persistence of rat virus in seropositive rats as detected by explant culture. *Arch Virol* 95, 137-42.
- Pritchett-Corning, K.R., Cosentino, J., Clifford, C.B., 2009. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab Anim* 43, 165-73.
- Ramírez, J.C., Fairén, A., Almendral, J.M., 1996. Parvovirus minute virus of mice strain I multiplication and pathogenesis in the newborn mouse brain are restricted to proliferative areas and to migratory cerebellar young neurons. *J Virol* 70, 8109-16.

- Riley, L.K., Knowles, R., Purdy, G., Salome, N., Pintel, D., Hook, R.R. Jr, Franklin, C.L., Besch-Williford, C.L., 1996. Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J Clin Microbiol* 34, 440-4.
- Rommelaere and Cornelis, 1991. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 33, 233-51.
- Ron, D. and Tal, J., 1985. Coevolution of cells and virus as a mechanism for the persistence of lymphotropic minute virus of mice in L-cells. *J Virol* 55, 424-30.
- Rowell, H.C., 1988. The status of animal experimentation in Canada. *Int J Psychol* 23, 377-381.
- Rubio, M., Bueno, A.L., Almendral, J.M., 2005. Virulent variants emerging in mice infected with the apathogenic prototype strain of the parvovirus minute virus of mice exhibit a capsid with low avidity for a primary receptor. *J Virol* 79, 11280-90.
- Saknimit, M., Inatsuki, I., Sugiyama, Y., Yagami, K., 1988. Virucidal efficacy of physico-chemical treatments against coronaviruses and parvoviruses of laboratory animals. *Jikken Dobutsu* 37, 341-5.
- Segovia, J.C., Real, A., Bueren, J.A., Almendral, J.M., 1991. In vitro myelosuppressive effects of the parvovirus minute virus of mice (MVMi) in hematopoietic stem and committed progenitor cells. *Blood* 77, 980-8.
- Segovia, J.C., Bueren, J.A., Almendral, J.M., 1995. Myeloid depression follows infection of susceptible newborn mice with the parvovirus minute virus of mice (strain i). *J Virol* 69, 3229-32.
- Segovia, J.C., Gallego, J.M., Bueren, J.A., Almendral, J.M., 1999. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 73, 1774-84.
- Schlehofer, J.R., Rentrop, M., Mäannel, D.N., 1992. Parvoviruses are inefficient in inducing interferon- $\beta$  in mammalian cells. *Med Microbiol Immunol* 181, 153-64.

- Shek, W.R., Paturzo, F.X., Johnson, E.A., Hansen, G.M., Smith, A.L., 1998. Characterization of mouse parvovirus infection among BALB/c mice from an enzootically infected colony. *Lab Anim Sci* 48, 294-7.
- Smith, A.L., Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Paturzo, F., Bhatt, P.N., 1993. In vivo studies with an “orphan” parvovirus of mice. *Lab Anim Sci* 43, 175-82.
- Smith, A.L. and Paturzo, F.X., 1988. Explant cultures for detection of minute virus of mice in infected mouse tissue. *J Tissue Cult Methods* 11, 45-47.
- Tattersall, P. and Bratton, J., 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J Virol* 46, 944-55.
- Tattersall, P., Cawtet P.J., Shatkin, A.J., Ward, D.C., 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J Virol* 20, 273-89.
- Tattersall, P., Shatkin, A.J., Ward, D.C., 1977. Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J Mol Biol* 111, 375-94.
- Tattersall, P. and Spalholz, B.A., 1983. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* 46, 937-43.
- Thomas M.L. 3rd., Morse, B.C., O'Malley, J., Davis, J.A., St Claire, M.B., Cole, M.N., 2007. Gender influences infectivity in C57BL/6 mice exposed to mouse minute virus. *Comp Med* 57, 74-81.
- Toolan, H.W., Dalldorf, G., Barclay, M., Chandra, S., Moore, A.E., 1960. An unidentified filterable agent isolated from transplantable human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46, 1256-9.
- Toolan, H.H., Moen, P.T., Fox, E., Bodnar, J.W., 1983. Degeneration of lens and overgrowth of Harderian glands in hamsters neonatally injected with parvovirus MVM-i. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 351-56.

- Tullis, G.E., Burger, L.R., Pintel, D.J., 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 67, 131-41.
- Ueno, Y., Harada, T., Iseki, H., Ohshima, T., Sugiyama, F., Yagami, K., 2001. Propagation of rat parvovirus in thymic lymphoma cell line C58(NT)d and subsequent appearance of a resistant cell clone after lytic infection. *J Virol* 75, 3965-70.
- Ueno, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., 1996. Detection and in vivo transmission of rat orphan parvovirus (ROPV). *Lab Anim* 30, 114-9.
- Walton, T.H., Moen, P.T., Fox, E., Bodnar, J.W., 1989. Interactions of minute virus of mice and adenovirus with host nucleoli. *J Virol* 63, 3651-60.
- Wan, C.H., Bauer, B.A., Pintel, D.J., Riley, L.K., 2006. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. *Lab Anim* 40, 63-9.
- Wan, C.H., Soderlund-Venermo, M., Pintel, D.J., Riley, L.K., 2002. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses. *Virology* 83, 2075-83.
- Wildner, O., 2001. Oncolytic viruses as therapeutic agents. *Annals Med* 33, 291-304.
- Wollman, G., Tattersall, P., van den Pol, A.N., 2005. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol* 79, 6005-22.
- Zhao, S., Liu, E., Chu, Y., Zheng, H., Kitajima, S., Morimoto, M., 2007. Numbers of publications related to laboratory animals. *Scand J Lab Anim Sci* 36, 81-6.