

论著

基于 Q β 噬菌体的 A 群轮状病毒装甲 RNA 标准参考样品的研制

张奇, 逢凤娇, 江艳华, 李凤铃, 姚琳, 王联珠, 谭志军, 翟毓秀

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室
农业部水产品质量安全风险评估实验室(青岛), 山东 青岛 266071)

摘要:目的 基于 Q β 噬菌体装甲 RNA 技术构建内含 A 群轮状病毒 (*Rotavirus*, RV) 检测靶标的装甲 RNA (*Rotavirus armored RNA*, AR-RV), 并开展系统的初步定值、均匀性、稳定性研究。方法 人工合成核酸片段 Q β SNRV, 该片段 5' 端至 3' 端依次为 Q β 噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点序列、RV 检测靶标 cDNA 序列、多克隆位点序列, 并将其克隆到 pET-28a(+) 载体中构建重组质粒 pET-Q β SNRV。将 pET-Q β SNRV 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 并诱导表达, 利用氯化铯密度梯度超速离心、丙烯葡聚糖凝胶层析纯化 AR-RV 后电镜观察, 并参照 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3) 标准样品 定值的一般原则和统计方法》规定的方法与原则对制备的 AR-RV 开展定值、均匀性和稳定性研究。结果 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果证实重组质粒在大肠埃希菌中有目的条带表达, 大小约为 14.1 kDa; 经氯化铯密度梯度超速离心、丙烯葡聚糖凝胶层析纯化的 AR-RV 无杂蛋白干扰; 电镜下可见结构完整的病毒样颗粒, 大小约为 25 nm; 定值结果显示, AR-RV 中检测靶标 RNA 的含量为 $(1.02 \pm 0.3) \times 10^7$ copies/ μ l; 均匀性分析结果为 $F = 0.66 < F_{0.05(9,20)}$, 表明样品均匀性良好; 稳定性结果表明, AR-RV 在 37 °C 可保存 15 d、25 °C 可保存 15 d、4 °C 可保存 50 d、-20 °C 至少可保存 270 d、-80 °C 至少可保存 360 d。结论 本研究基于 Q β 噬菌体制备的 AR-RV 拷贝数高, 均匀性和稳定性良好, 可为 RV 分子检测提供安全、稳定的标准参考样品。

关键词: 轮状病毒; 装甲 RNA; Q β 噬菌体; 标准参考样品; 实时荧光逆转录-聚合酶链式反应

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)04-0346-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.04.002

Research on armored RNA reference material of group A *Rotavirus* based on Q β bacteriophage

ZHANG Qi, PANG Feng-jiao, JIANG Yan-hua, LI Feng-ling, YAO Lin,
WANG Lian-zhu, TAN Zhi-jun, ZHAI Yu-xiu

(Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, P. R. China, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products (Qingdao), Ministry of Agriculture of P. R. China, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shandong Qingdao 266071, China)

Abstract: Objective To construct armored RNA reference material containing target RNA of group A *Rotavirus* (RV) based on Q β bacteriophage, to determine the value and to test the homogeneity and stability of such material. **Methods** DNA fragment named Q β SNRV which contained maturase-coding gene, capsid protein-coding gene, packing site of Q β bacteriophage, detection target sequence of group A *Rotavirus* and multiple clone sites from the 5' end to the 3' end was synthesized, and then subcloned into pET-28a(+) expression vector. The recombinant plasmid was pET-Q β SNRV that was identified by enzyme digestion and sequencing, and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells and expressed. The expressed product, virus-like particles of Q β bacteriophage containing RNA of RV, named AR-RV, was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). AR-RV was centrifuged and purified by CsCl density gradient ultracentrifugation and sephacry gel chromatography. The morphology of AR-RV was observed by transmission electron microscopy. The valuation, homogeneity and stability of AR-RV were tested according to the GB/T 15000.3-2008. **Results** SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the expressed protein product

收稿日期: 2018-04-10

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY113300); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016HY-ZD11); 国家贝类产业技术体系(CARS-47)

作者简介: 张奇 女 硕士生 研究方向为水产品食源性病毒标准样品制备 E-mail: qixijinqianhua@foxmail.com

通信作者: 姚琳 男 副研究员 研究方向为食源性病毒的监控与标准样品研发 E-mail: yaolin@ysfri.ac.cn

was about 14.1 kDa. The virus-like particles of AR-RV, 25 nm in diameter, with typical morphology could be observed under electron microscope. AR-RV samples prepared in this study were valued as $(1.02 \pm 0.3) \times 10^7$ copies/ μ l and behaved well in the homogeneity test, $F = 0.66 < F_{0.05(9,20)}$. The stability test indicated that the sample was stable at 37 °C for 15 days, 25 °C for 15 days, 4 °C for 50 days, -20 °C for at least 270 days, -80 °C for at least 360 days with no significant decrease. **Conclusion** The group A *Rotavirus* armored RNA based on Q β bacteriophage was successfully prepared and had good uniformity, stability and high copy number. This method could supply with a good and biologically safe reference material candidate for the *Rotavirus* virus RNA detection.

Key words: *Rotavirus*; armored RNA; Q β bacteriophage; reference material; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

轮状病毒 (*Rotavirus*, RV) 属呼肠病毒科, 轮状病毒属, 基因组由 11 条双链 RNA 片段组成, 可编码 6 种结构蛋白和 5 种非结构蛋白。RV 可分为 A ~ G 等不同群落, 其中 A 群 RV 不仅是儿童腹泻的主要病原, 也是引起成年人急性腹泻的重要因素。世界范围内 RV 每年导致约 20 万名 5 岁以下儿童死亡^[1], 我国成年人 A 群 RV 的检出率可达 33.9%^[2], 美国、意大利、日本等国家多次出现因食用受污染食品导致 RV 集体感染或疫情暴发的事件^[3-5], 已成为影响食品安全与公共卫生安全的重要食源性病毒。

双壳贝类主要靠滤食水体中的有机碎屑或微藻类等生活, 如果水体受到污染, 贝类将会富集其中的病毒粒子^[6], 食用加热不彻底的污染贝类, 将引发 RV 感染甚至疫情^[7-8]。与临床标本比较, 污染贝类中的 RV 含量较低且样品基质复杂, 目前实时荧光逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 是污染贝类 RV 检测的主要方法。为了确保检测结果的准确性, 通常需要在检测过程中添加标准样品作为质量控制手段。目前有标准或研究使用 RV 阳性腹泻标本或互补 RNA (complementary RNA, cRNA) 作为 RV 分子检测的质控手段^[9-10], 然而前者存在生物安全隐患, 后者易降解且不能监控病毒提取、裂解等关键环节。

装甲 RNA (armored RNA) 技术是通过基因工程手段, 将检测靶标 RNA 包裹到某些病毒 (如噬菌体、烟草花叶病毒) 的病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 内的一种技术, 具有可监控完整的检测环节、无生物安全风险、稳定性高、易保存等优点^[11-13], 现已成功用于制备人类免疫缺陷病毒^[14]、寨卡病毒^[15]、流感病毒^[16] 等病毒的装甲 RNA, 但多数研究仅将其作为单纯的阳性质控样品来用, 没有开展系统的定值、均匀性、稳定性等方面的研究, 限制了装甲 RNA 的进一步使用。

本研究基于 Q β 噬菌体的装甲 RNA 技术平台^[17], 研制了内含 RV 检测靶标的装甲 RNA, 并开展初步定值、均匀性、稳定性研究, 为 RV 的核酸检

测提供安全、稳定的标准参考样品。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

大肠埃希菌 BL21 (DE3) [天根生化科技 (北京) 有限公司], 原核表达载体 pET-28a (+)、pGEM-RV 均为本实验室制备或保存, 包含 SN/T 2520—2010《贝类中 A 群轮状病毒检测方法 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法》^[18] 所规定的实时荧光 RT-PCR 方法的检测靶标即 RV 非结构蛋白 3 保守片段 (GenBank 登录号 X81436, 963 ~ 1 049 nt) 对应的 cDNA 序列。

1.1.2 主要仪器与试剂

LightCycler 2.0 实时荧光 PCR 仪 (瑞士 Roche), 微量核酸蛋白测定仪 (德国 IMPLen), 透射电镜, 超速真空冷冻离心机, 电泳仪 (美国 Bio-rad), 凝胶成像分析系统 (法国 Vilber Lourmat), TC-96 PCR 仪 (杭州博日科技有限公司), BS-100A 自动部分收集器 (上海青浦沪西仪器厂)。

同源克隆试剂盒 ClonExpress® II One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技有限公司), 限制性内切酶、一步法荧光定量试剂盒 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 体外转录试剂盒 T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (美国 Promega), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen), 丙烯酰胺葡聚糖凝胶 (Sephacryl S-200 HR, 北京天恩泽生物技术有限公司), 卡那霉素、氯化铯、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 均购自北京索莱宝生物科技有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的合成

参考 SN/T 2520—2010^[18] 中实时荧光 RT-PCR 法, 由北京六合华大基因科技有限公司 (以下简称华大基因) 合成轮状病毒检测用引物与探针, 相关信息见表 1。

表1 引物、探针信息

Table 1 Information of primers and probe

引物、探针名称	序列(5'-3')	位置/nt (GenBank X81436)
NVP3-F	ACCATCTACACATGACCCTC	963~982
NVP3-R	GGTCACATAACGCCCC	1 034~1 049
NVP3-P(探针)	FAM-ATGAGCACAAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-TAMARA	984~1 016

1.2.2 目的片段 Q β SNRV 的合成

参考 Q β 噬菌体基因组序列以及 SN/T 2520—2010^[18] 所规定的 RV 实时荧光 RT-PCR 法检测靶标对应的 cDNA 序列,由华大基因合成核酸片段 Q β SNRV,5'端至 3'端分别为 Q β 噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点序列、RV 检测靶标 cDNA 序列、多克隆位点序列 (*Apa* I、*Kpn* I、*Pst* I、*Spe* I、*Sph* I、*Not* I),长度约为 2.4 kb。

1.2.3 重组质粒的构建与鉴定

采用同源克隆的方法,参照 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 说明书,将 Q β SNRV 亚克隆到线性化的 pET-28a(+)载体中,并将酶切鉴定筛选出的阳性重组质粒,送至华大基因测序验证。

1.2.4 诱导表达

参考《分子克隆实验指南(第三版)》^[19],将阳性重组质粒转入大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞内,涂布在含卡那霉素的 LB 培养基上,过夜培养后挑取单菌落接种到 LB 培养基中振荡活化培养,取 2 ml 活化菌液接种于 200 ml LB 培养基中,37 °C 180 r/min 振荡培养至 600 nm 处吸光度(OD)值约为 0.6,加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达 9 h,离心收集菌体,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.2.5 纯化

将 1.2.4 收集的菌体进行超声波破碎,4 °C 11 000 r/min 离心 20 min,收集上清后分别加入 DNase I 和 RNase A 进行消化,用 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液采用氯化铯密度梯度超速离心,4 °C 80 000 r/min 离心 5 h,小心吸取目标层的 VLPs。将初步纯化的 VLPs 过 Sephacryl S-200 HR 柱层析,10 min/管。将收集到的各管组分测定 260 和 280 nm 处的 OD 值和 SDS-PAGE 鉴定。即可获得内含 RV 检测靶标的装甲 RNA(命名为 AR-RV),用 RNase-Free PBS(pH = 7.2)缓冲液适当稀释后分装备用。

1.2.6 电子显微镜观察

将 AR-RV 进行 2% 磷钨酸负染后用透射电镜进行观察。

1.2.7 残留重组质粒鉴定

用实时荧光 RT-PCR 扩增法检测 AR-RV 是否

含有残留重组质粒 pET-Q β SNRV。反应体系(20 μ l)为 2 \times Premix Ex Taq (Probe qPCR) 10 μ l, NVP3-F 0.4 μ l, NVP3-R 0.4 μ l, NVP3-P 0.8 μ l, AR-RV 2 μ l, RNase-Free H₂O 6.4 μ l;循环参数为 95 °C 预变性 10 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火延伸 20 s;40 个循环。

1.2.8 初步定值

1.2.8.1 cRNA 的制备

以限制性内切酶 *Nde* I 线性化的 pGEM-RV 为模板,进行体外转录,反应体系(20 μ l):RioMAX™ Express T7 2 \times Buffer 10 μ l,线性化的 pGEM-RV 模板 8 μ l, Enzyme Mix T7 Express 2 μ l;37 °C 温育 30 min。向反应后体系中加入 1 μ l 的 RQ1 RNase-Free DNase,37 °C 温育 15 min,按照生产商说明书用 TRIzol 法提取 cRNA。

1.2.8.2 cRNA 标准曲线的构建

使用微量核酸蛋白测定仪测定 cRNA 的浓度。按照公式 $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝/mol}) \times \text{RNA 含量}(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 10^{-9} / [\text{片段长度}(\text{bp}) \times 340] = \text{拷贝数}(\text{copies}/\mu\text{l})$,计算 cRNA 拷贝数。将 cRNA 进行 10 倍系列梯度稀释,进行实时荧光 RT-PCR 检测,反应体系(20 μ l):2 \times one step RT-PCR Buffer III 10 μ l, TakaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l) 0.4 μ l, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ l,引物 NVP3-F、NVP3-R 各 0.4 μ l,探针 NVP3-P 0.8 μ l,cRNA 2 μ l, RNase-Free H₂O 5.6 μ l。循环参数为 42 °C 逆转录 5 min,95 °C 预变性 10 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火延伸 20 s;40 个循环。根据所测得的循环阈值(Ct 值)与各梯度拷贝数的对数绘制标准曲线。

1.2.8.3 初步定值和不确定度分析

参考 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法》^[20] 的要求,随机选取 15 瓶 AR-RV,用 TRIzol 法提取 RNA,按 1.2.8.2 的实时荧光 RT-PCR 方法进行检测,将测定的 Ct 值代入标准曲线计算其拷贝数。参考 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》^[21] 的规定,计算 A 类不确定度,公式为:

$$U(\bar{x}) = \pm t_{\alpha}(m-1) \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\bar{x} - \bar{x})^2}{m(m-1)}}$$

其中 $t_a(m-1)$ 为显著性水平 α 、自由度为 $m-1$ 的 t 值, \bar{x}_i 为单次测量的平均值, $\bar{\bar{x}}$ 为测量的总平均值, m 为测量次数。

1.2.9 均匀性试验

参考 GB/T 15000.3—2008^[20] 的要求和本实验室前期的试验方法^[17], 随机抽取 10 瓶 AR-RV 样品, 每瓶取 100 μ l 样品, 用 TRIzol 法提取 RNA, 按 1.2.8.2 的实时荧光 RT-PCR 方法进行检测, 采用单因素方差分析方法分析瓶间均匀性; 每瓶分别取 3 次样品, 每次取 100 μ l 样品, 用 TRIzol 法提取 RNA, 按 1.2.8.2 的实时荧光 RT-PCR 方法进行检测, 采用单因素方差分析方法分析瓶内均匀性。

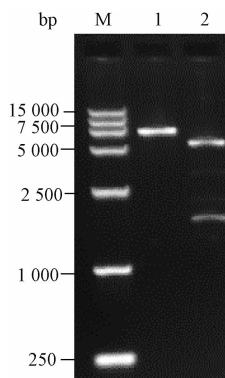
1.2.10 稳定性试验

参考 GB/T 15000.3—2008^[20] 的要求和本实验室前期的试验方法^[17], 将 AR-RV 样品分别置于 37、25、4、-20、-80 $^{\circ}$ C 保存不同天数。按 1.2.8.2 的实时荧光 RT-PCR 方法进行检测, 每瓶重复 3 次, 采用单因素方差和线性回归方法统计样品的稳定性。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

用限制性内切酶 *Bam*H I 单酶切重组质粒, 电泳检测出现 1 条大小约为 7.7 kb 的条带, 与 pET-28a(+) 载体(约 5.3 kb) 和 Q β SNRV 片段(约 2.4 kb) 大小之和一致; *Bam*H I/*Sac*I 双酶切重组质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测出现约 6.0、1.7 kb 的 2 条条带, 与预期一致(图 1), 测序结果经序列比对后确认无突变且读码框正确, 证实重组质粒构建成功, 命名为 pET-Q β SNRV。



注: M: DNA 分子量 DL15 000; 1: *Bam*H I 单酶切; 2: *Bam*H I/*Sac*I 双酶切

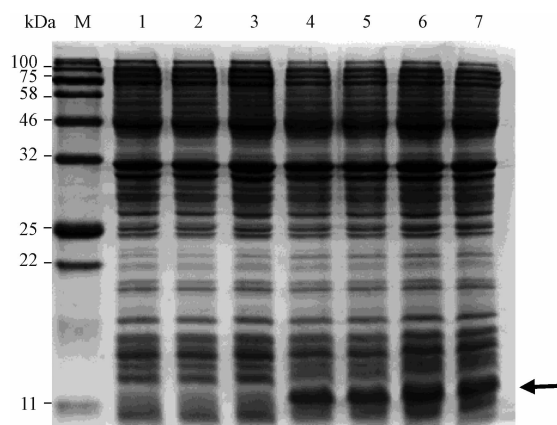
图 1 pET-Q β SNRV 的酶切鉴定图

Figure 1 Enzyme digestion of pET-Q β SNRV

2.2 pET-Q β SNRV 在大肠埃希菌中的诱导表达

pET-Q β SNRV 大肠埃希菌 BL21(DE3) 中经 IPTG 诱导, 在 14.1 kDa 左右有一条明显的重组蛋白条带(图 2, 箭头处), 与预期大小一致, 表明 Q β

噬菌体的衣壳蛋白诱导表达成功。



注: M: 蛋白质分子量; 1: 大肠埃希菌 BL21(DE3) 菌体蛋白; 2: pET-28a(+) 空载体菌体蛋白; 3: 未诱导的重组菌体蛋白; 4~7: 诱导的重组菌体蛋白

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of expressed products

2.3 纯化

表达产物经氯化铯密度梯度离心后, 通过 Sephacryl S-200 HR 层析柱进一步纯化, 将收集到的各个管内的组分分别测定 260 和 280 nm 的 OD 值, 可知峰值均出现在第 22 收集管(图 3), 对第 19~25 收集管内的组分进行 SDS-PAGE 分析可知, AR-RV 集中出现在第 21、22 收集管中, 未见杂蛋白条带, 说明 Sephacryl S-200 HR 的纯化效果较好(图 4)。

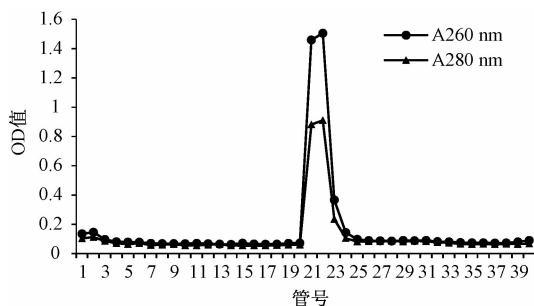


图 3 丙烯葡聚糖凝胶层析 AR-RV 样品的 OD 值分析

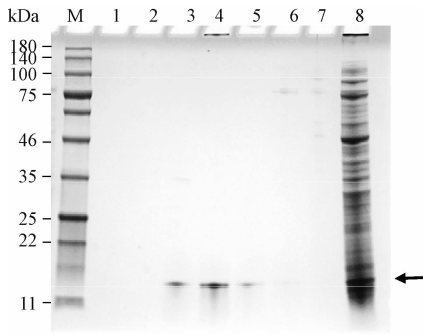
Figure 3 Absorbance value of AR-RV purified by Sephacryl S-200 HR gel chromatography

2.4 电镜观察

电镜观察 AR-RV, 可见大量结构完整、大小一致的病毒样颗粒, 直径为 25 nm 左右, 与预期大小一致, 结果如图 5。

2.5 残留重组质粒的测定

以纯化后的 AR-RV 为模板进行实时荧光 RT-PCR 分析, 同时以质粒 pET-Q β SNRV 为阳性对照, H₂O 为阴性对照。结果表明, 阳性对照组出现特异性扩增, AR-RV 组和阴性对照组结果一致, 均未出现明显的特异性扩增(图 6), 说明纯化后的 AR-RV 中无重组质粒残留影响。



注:M:蛋白质分子量 Marker;1~7:19~25收集管的样品;
8:诱导表达的重组菌体蛋白

图4 吸收峰值附近样品 SDS-PAGE 分析结果
Figure 4 SDS-PAGE analysis of samples around
absorbent peak

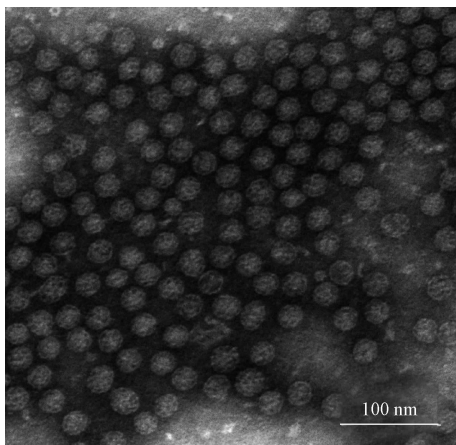
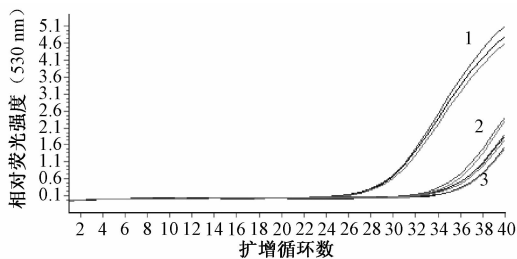


图5 AR-RV 电镜照片

Figure 5 Electron microscopy of AR-RV



注:1:阳性对照组;2:AR-RV组;3:阴性对照组

图6 AR-RV 中残留质粒实时荧光 RT-PCR 检测结果
Figure 6 Real-time RT-PCR for residual plasmid detection
in AR-RV

2.6 初步定值

2.6.1 cRNA 标准曲线的构建

以 10 倍梯度稀释的 cRNA 为模板进行实时荧光 RT-PCR 分析。以 cRNA 各稀释梯度的对数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标建立标准曲线,即 $y = -3.3427x + 43.678, R^2 = 0.9898$ 。

2.6.2 初步定值及其不确定度分析

用 TRIzol 法提取 15 瓶 AR-RV 中的 RNA,进行实时荧光 RT-PCR 检测。参考 JJF 1006—1994《一

级标准物质技术规范》^[22],将样品所测得的 Ct 值经格拉布斯准则剔除可疑数据后代入 cRNA 标准曲线,计算其拷贝数。按公式计算得到其不确定度为 0.3×10^7 。故本次制备的 AR-RV 初步定值结果为 $(1.02 \pm 0.3) \times 10^7$ copies/ μl ,见表 2。

表2 AR-RV 定值结果分析

Table 2 Valuation of AR-RV

\bar{x}	s	自由 度	置信 概率	t_{α} (v)	定值结果
1.02×10^7	4.20×10^6	14	95%	2.14	$(1.02 \pm 0.3) \times 10^7$

2.7 均匀性分析

随机抽取 10 瓶 AR-RV 样品,进行实时荧光 RT-PCR 检测,将测得 Ct 值进行单因素方差分析。根据显著性水平 $\alpha = 0.05$ 和自由度(9,20),查 F 分布表可得临界值 $F_{0.05(9,20)} = 2.39$,与由公式计算所得的 $F = M_{s_{\text{among}}}/M_{s_{\text{within}}} = 0.66$ 比较可知, $F < F_{\alpha}$,表明瓶内和瓶间无明显差异,证实本研究制备的 AR-RV 是均匀的,结果见表 3。

表3 均匀性试验的方差分析

Table 3 Variance analysis of uniformity test

差异源	$SS(10^{15})$	df	$MS(10^{14})$	F	P	F_{crit}
瓶间	0.95	9	1.06	0.66	0.73	2.39
瓶内	3.20	20	1.60			
合计	4.15	29	—	—	—	—

注:SS 表示平方和; df 表示自由度; MS 表示均方; F 表示 F 检验的统计量; P 表示在相应 F 值下的概率值; F_{crit} 表示在相应显著水平下的 F 临界值;—表示该项不统计

2.8 稳定性分析

对不同保存条件下的 AR-RV 样品进行实时荧光 RT-PCR 检测,并将测得 Ct 值进行线性回归方法统计分析。稳定性试验结果显示,本研究制备的 AR-RV 样品在 37 °C 可稳定保存 15 d,25 °C 可稳定保存 15 d,4 °C 可稳定保存 50 d, -20 °C 至少可稳定保存 270 d, -80 °C 至少可稳定保存 360 d,结果见表 4。

3 讨论

装甲 RNA 能弥补 cDNA 和 cRNA 作为阳性质控样品的不足,保证 RNA 病毒检测结果的可靠性和可比性。目前已有多种 RNA 病毒构建了装甲 RNA^[23-25]。虽然装甲 RNA 技术已趋于成熟,但大部分的研究还是将其作为分子检测的阳性质控样品来应用,未系统开展均匀性、稳定性等分析。本研究基于 Q β 噬菌体装甲 RNA 制备平台研发了内含 RV 检测靶标的 AR-AV,而且按 GB/T 15000.3—2008^[20] 的要求对其进行初步定值、均匀性、稳定性研究,后期将与其他实验室进行联合定值分析,将在 RV 检测质控、实验室间检测结果溯源与对比、

表 4 AR-RV 稳定性试验结果
Table 4 Trend test for stability of AR-RV

温度/℃	拟合方程	斜率 b_1	斜率的不确定度 $s(b_1)$	自由度 $n-2$	$t_{0.95,(n-2)}$	$ b_1 - t_{0.95,(n-2)} \times s(b_1)$	趋势
37	$Y = (-7.20 \times 10^5)X + 1.08 \times 10^7$	-7.20×10^5	3.37×10^5	4	2.78	$-2.17 \times 10^5 < 0$	未观测到不稳定性
25	$Y = (-3.45 \times 10^5)X + 1.80 \times 10^7$	-3.45×10^5	1.43×10^5	4	2.78	$-5.14 \times 10^4 < 0$	未观测到不稳定性
4	$Y = (-2.87 \times 10^5)X + 2.57 \times 10^7$	-2.87×10^5	1.26×10^5	5	2.45	$-2.04 \times 10^4 < 0$	未观测到不稳定性
-20	$Y = (-7.38 \times 10^4)X + 1.25 \times 10^7$	-7.38×10^4	3.21×10^5	7	2.36	$-2.04 \times 10^4 < 0$	未观测到不稳定性
-80	$Y = (-1.34 \times 10^5)X + 2.39 \times 10^7$	-1.34×10^5	7.82×10^4	5	2.45	$-5.76 \times 10^4 < 0$	未观测到不稳定性

仪器或方法灵敏度评价等领域得到广泛应用。

目前世界卫生组织认证的 RNA 标准样品主要包括两类,一类是基于慢病毒载体制备的 RNA,如埃博拉病毒,另一类是病毒感染期的宿主血浆,如寨卡病毒、人体免疫缺陷病病毒、登革热病毒^[26];我国有认证的 RNA 标准样品主要为经灭活处理的血清标本,如人类免疫缺陷病病毒、丙型肝炎病毒^[27]。病毒感染期的血浆/血清制备的标本,可高度模拟病毒在人体体液中的状态,但即使经过灭活仍存在一定生物安全隐患,并且其含有的多种生物抑制因子可影响病毒的检测,不适于作为污染贝类等食品检测。基于慢病毒载体构建的 RNA 标准样品,其制备繁琐,需要大量培养哺乳动物细胞,成本较高。国内外对装甲 RNA 类的核酸标准样品目前还处于起步阶段,具有良好的应用前景。

由 SDS-PAGE 结果可知,本研究表达 Q β 噬菌体的衣壳蛋白,分子量约为 14.1 kDa,透射电镜观察到衣壳蛋白已自动组装成为 VLPs,外部结构完整,直径在 25 nm 左右;实时荧光 RT-PCR 结果显示 VLPs 中含有 RV 检测靶标 RNA,以上试验结果均表明 RV 的装甲 RNA 即 AR-RV 完成制备。对残留质粒的检测,实验室前期根据重组质粒中靶标片段上下游序列,设计合成引物,使用普通 PCR 进行检测^[17];由于实时荧光 RT-PCR 比普通 PCR 检测灵敏度更高,本研究采用标准方法中的引物 NVP3-F、NVP3-R 及探针 NVP3-P 进行实时荧光 RT-PCR 检测,结果显示制备的 AR-RV 中无残留质粒污染。

在制备装甲 RNA 的过程需要去除大肠埃希菌的蛋白、基因组等,避免影响标准参考样品的质量,因此装甲 RNA 纯化方式至关重要。有研究^[28]使用组氨酸标签技术纯化装甲 RNA,纯度高,适合于实验室内小量制备;也可使用丙烯葡聚糖凝胶纯化装甲 RNA,效果较好^[29-31],但不经预处理的样品容易堵塞层析柱;本实验室前期使用氯化铯密度梯度超速离心的方式对装甲 RNA 进行纯化^[17],取得良好效果。本研究又在超速离心后用丙烯葡聚糖凝胶层析法进一步纯化,从 SDS-PAGE 结果看,除衣壳蛋白条带之外无肉眼可见杂带,说明“超速离心 + 层析”的纯化效果良好。这两种纯化方式的定值结果

并无明显差异(数据未发表),但超速离心法吸取样品目标层时,易误吸到附近的杂蛋白层,从而造成样品污染,因此对试验人员的操作技能与经验要求较高。与之相比,“超速离心 + 层析”的方法更容易实现标准化操作,便于后期商业化批量制备。

生物大分子类的标准样品在制备、稀释、分装等过程中可能出现微环境下的局部聚集,因此对其均匀性的评价十分重要。本研究随机选取 10 瓶 AR-RV 样品进行检测,对结果进行单因素方差分析,结果 $P = 0.73 (> 0.05)$,表明 AR-RV 具有良好的均匀性。标准样品还须在不同运输、储存条件下保持良好的稳定性,本研究考察了 AR-RV 在 4 种主要运输、储存温度下的稳定性,同时设置 37 ℃ 作为 AR-RV 在运输或储存环节温度异常的极端挑战,结果表明 AR-RV 在 25、4、-20、-80 ℃ 可分别稳定保存 15、50、270、360 d,37 ℃ 下可稳定保持 15 d,稳定性良好。CHANG 等^[31]基于 MS2 噬菌体构建的含 RV NSP3 基因装甲 RNA 可在室温下保存 10 d;WANG 等^[32]构建的埃博拉病毒装甲 RNA 可在 4 ℃ 保存 60 d;ZHANG 等^[33]构建的麻疹病毒装甲 RNA 在 -20 ℃ 可稳定性保存 60 d,与本研究以及前期研究结果比较可知,基于 Q β 噬菌体研发平台制备的装甲 RNA 的稳定性要高于 MS2 噬菌体,因此更适于 RNA 类标准参考样品的制备^[17]。

综上所述,基于 Q β 噬菌体制备的内含 RV 检测靶标的装甲 RNA,拷贝数高、均匀性和稳定性良好,可实现对 RV 核酸检测过程中的病毒粒子裂解、核酸提取、反转录、扩增等关键环节的全程评价,为 RV 分子检测提供了一种安全、稳定的标准参考样品。

参考文献

- [1] TATE J E, BURTON A H, BOSCHI-PINTO C, et al. Global, regional, and national estimates of Rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000-2013 [J]. Clinical Infectious Diseases An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2016, 62 (Suppl 2):S96.
- [2] 田祎,高志勇,王全意. 成人腹泻患者中 A 组轮状病毒的流行概况 [J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6(4):312-316.
- [3] IANIRO G, DELOGU R, FIORE L, et al. Group A Rotavirus

- genotypes in hospital-acquired gastroenteritis in Italy, 2012-14 [J]. *Journal of Hospital Infection*, 2017,96(3):262-267.
- [4] KOTIRUM S, VUTIPONGSATORN N, KONGPAKWATTANA K, et al. Global economic evaluations of *Rotavirus* vaccines: a systematic review [J]. *Vaccine*, 2017,35(26):3364-3386.
- [5] MIZUKOSHI F, KURODA M, TSUKAGOSHI H, et al. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P [8] *Rotavirus* among adolescents in Japan [J]. *Microbiology & Immunology*, 2014,58(9):536-539.
- [6] BAGORDO F, GRASSI T, IDOLO A, et al. *Rotavirus* occurrence in shellfish with low levels of *E. coli* [J]. *Food & Environmental Virology*, 2013,5(3):169-175.
- [7] GUYADER F S L, SAUX J C L, AMBERTBALAY K, et al. *Aichi Virus*, *Norovirus*, *Astrovirus*, *Enterovirus*, and *Rotavirus* involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008,46(12):4011-4017.
- [8] 曹金福. 通过食物传播的病毒性疾病(综述)[J]. *中国食品卫生杂志*, 2002,14(4):49-53.
- [9] 胡秀华, 何苗, 刘丽, 等. 水中轮状病毒实时定量 PCR 外标标准的构建[J]. *环境科学*, 2008,29(2):380-385.
- [10] 王大勇, 方振东, 谢朝新, 等. 轮状病毒荧光定量 PCR 标准的构建[J]. *后勤工程学院学报*, 2013,29(4):66-73.
- [11] ZHANG D, LIN G, YI L, et al. External quality assessment for *Rubella virus* RNA detection using armored RNA in China [J]. *Clinical Laboratory*, 2017,63(2):399-405.
- [12] 张娜娜, 邓永强, 年庆功, 等. 携带圣路易斯脑炎病毒特异基因片段的重组假病毒颗粒的构建与鉴定[J]. *军事医学*, 2017,41(3):194-198.
- [13] 张晓文, 姜帆, 孙明君, 等. 含有 H3N8 马流感病毒 HA 基因噬菌体病毒样颗粒的构建与纯化[J]. *中国预防兽医学报*, 2015,37(3):194-198.
- [14] PASLOSKE B L, WALKERPEACH C R, OBERMOELLER R D, et al. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998,36(12):3590-3594.
- [15] LIN G G, ZHANG K, ZHANG D, et al. Fast preparation of a long chimeric armored RNA as controls for external quality assessment for molecular detection of *Zika virus* [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2017,466(1):138-144.
- [16] SUN Y, JIA T T, SUN Y L, et al. External quality assessment for Avian Influenza A (H7N9) virus detection using armored RNA [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013,51(12):4055-4059.
- [17] 张奇, 姚琳, 江艳华, 等. 基于 Qbeta 噬菌体装甲 RNA 技术的诺如病毒 RNA 标准参考样品的研制[J]. *中国生物工程杂志*, 2018,38(1):42-50.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 贝类中 A 群轮状病毒检测方法 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法:SN/T 2520—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [19] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂,译.北京:科学出版社,2002.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 标准样品工作导则(3) 标准样品 定值的一般原则和统计方法:GB/T 15000.3—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示:JJF 1059.1—2012[S]. 北京:中国计量出版社,2012.
- [22] 国家标准物质研究中心. 一级标准物质技术规范:JJF 1006—1994[S]. 北京:中国计量出版社,1994.
- [23] YANG P, JIA T T, ZHANG Y, et al. MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012,7:5957-5967.
- [24] DONIA D, DIVIZIA M, PANA A. Use of armored RNA as a standard to construct a calibration curve for real-time RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005,126(2):157-163.
- [25] 李金明, 宋如俊, 王露楠, 等. 耐核糖核酸酶内含 HCV RNA 病毒样颗粒的表达[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003,23(10):811-813.
- [26] WHO. Blood products and related biologicals [Z/OL]. 2018 [2018-02-26]. <http://www.who.int/bloodproducts/catalogue/en>.
- [27] 国家标准物质资源共享平台 [Z/OL]. 2018 [2018-02-26]. <http://www.ncrm.org.cn>.
- [28] 邓俊花, 林祥梅, 张永宁, 等. 小反刍兽疫病毒样颗粒的构建及定量分析[J]. *中国兽医科学*, 2014,44(10):997-1002.
- [29] 王宁, 王青波, 李静, 等. 分子尺寸排阻高效液相色谱法检测戊型肝炎类病毒颗粒[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011,24(10):1220-1223.
- [30] 徐纯琼. MS2 噬菌体的纯化和残留核酸的去除研究[D]. 银川:宁夏医科大学,2011.
- [31] CHANG L, ZHANG K, ZHANG R, et al. Construction and expression of virus-like particles containing *Rotavirus* NSP3 gene [J]. *Journal of Peking University*, 2012,44(5):737-741.
- [32] WANG G J, ZHANG R, HAN Y X, et al. The evaluation of 7 commercial real-time PCR kits for *Zaire ebolavirus* using virus-like particle-encapsulated EBOV RNA [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015,83(4):355-358.
- [33] ZHANG D, SUN Y, JIA T T, et al. External quality assessment for the detection of *Measles virus* by reverse transcription-PCR using armored RNA [J]. *PLoS One*, 2015,10(8):e134681.