

GI/GII 型诺如病毒两联装甲 RNA 标准样品的研制

王鸣秋^{1,2}, 杨俊², 常雨桐², 张涛¹, 刘丽娟²

(1. 湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 湖北武汉 430075) (2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘要: 针对目前缺乏适配多项检测标准、稳定、安全的诺如病毒 RNA 标准样品的问题, 研制基于 MS2 噬菌体内含常见 GI/GII 型诺如病毒检测靶标两联装甲 RNA 标准参考样品。人工合成 MS2 噬菌体成熟酶基因、衣壳蛋白基因、包装位点及 GI/GII 型诺如病毒靶标基因, 克隆于表达载体 pET-28a(+) 中, 构建重组质粒 pET-MS2-NoV。经大肠杆菌 BL21 诱导表达, 先后利用 PEG6000、酶处理和丙烯葡聚糖凝胶层析柱纯化表达产物。SDS-PAGE 和透射电镜鉴定产物大小及结构, 荧光定量 PCR 检测有无残留核酸。之后对纯化的病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 开展定值、均匀性和短期稳定性研究。SDS-PAGE 结果表明重组质粒在 BL21 中表达出了目的蛋白, 大小在 10~15 ku 之间, 与预期一致; 纯化后的 VLPs 无杂蛋白和残留核酸; 透射电镜下呈结构完整、大小均一的球状, 直径约 25 nm。纯化后 AR-NoV 中 GI 型和 GII 型靶标定值结果分别为 $(4.04 \pm 0.62) \times 10^7$ copies/ μ L 和 $(6.16 \pm 0.30) \times 10^7$ copies/ μ L。单因素方差检验证实样品均一性良好, $F < F_{0.05(25,52)}$; 短期稳定性研究结果表明 AR-NoV 在 37 °C 至少可稳定保存 15 d, 25 °C 至少稳定保存 24 d。本研究制备的诺如病毒 GI/GII 型两联装甲 RNA 标准样品稳定均一, 拷贝数高, 能够为 GI/GII 型诺如病毒核酸分子检测提供全过程质控。

关键词: 诺如病毒; 两联装甲 RNA; MS2 噬菌体; 标准样品; 实时荧光定量 RT-PCR

文章编号: 1673-9078(2021)03-286-293

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0835

Preparation of Coupled Armored RNA Reference Material for Norovirus GI/GII

WANG Ming-qiu^{1,2}, YANG Jun², CHANG Yu-tong², ZHANG Tao¹, LIU Li-juan²

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China)

(2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: To provide a safe and stable reference material for *Norovirus* nucleic detection, the armored RNA containing target RNA of *Norovirus* GI and GII based on MS2 bacteriophage was developed in this work. DNA fragments including maturase coding gene, capsid protein coding gene and packing site of MS2 bacteriophage, target cDNA sequence of *Norovirus* GI and GII were synthesized artificially and then cloned into expression vector pET-28a(+) to construct recombinant plasmid pET-MS2-NoV. After expressed in *E. coli* BL21 cells by IPTG induction, the expression product was purified by PEG6000, enzyme digestion and molecular sieve chromatography. The purified product, also named AR-NoV, was identified by SDS-PAGE, transmission electron microscopy (TEM) and RT-PCR. The value, homogeneity and stability of the AR-NoV were evaluated. SDS-PAGE analysis showed that with the molecular weight of target protein expressed in BL21 was 10~15 ku, which was consistent with the predicted value. There were no impure proteins and residual nucleic acids in AR-NoV after purification. The AR-NoV presented as spherical VLPs with uniform particle size (about 25 nm) and integrated structure under TEM. The values of GI and GII targets in AR-NoV were $(4.04 \pm 0.62) \times 10^7$ copies/ μ L and $(6.16 \pm 0.30) \times 10^7$ copies/ μ L, respectively. The good homogeneity of AR-NoV was confirmed by single-factor ANOVA test ($F < F_{0.05(25,52)}$). In addition, the stability result indicated that the AR-NoV could be stable at 37 °C for

引文格式:

王鸣秋, 杨俊, 常雨桐, 等. GI/GII 型诺如病毒两联装甲 RNA 标准样品的研制[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 286-293

WANG Ming-qiu, YANG Jun, CHANG Yu-tong, et al. Preparation of coupled armored RNA reference material for *Norovirus* GI/GII [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 286-293

收稿日期: 2020-09-04

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2020BCA091); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目 (2019JK017)

作者简介: 王鸣秋 (1986-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物检测

通讯作者: 刘丽娟 (1971-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 病原微生物检测与检疫研究

15 days and 25 °C for 24 days at least. In conclusion, the armored RNA containing coupled *Norovirus* GI/GII prepared in this work was stable and uniform, with high copy number, which could help the whole process quality control of molecular detection for *Norovirus*.

Key words: *Norovirus*; coupled armored RNA; MS2 bacteriophage; reference material; real-time RT-PCR

诺如病毒 (*Norovirus*, *NoV*) 属于杯状病毒科 (Caliciviridae), 为单股正链无包膜 RNA 病毒, 直径约为 27~40 nm, 全长 7.5~7.7 kb。诺如病毒是引起人类食源性急性胃肠炎的最重要的病原体之一, 在全球范围内广泛分布, 诺如病毒引起的食物中毒占食源性疾病暴发的 50% 以上, 在非菌性胃肠炎暴发中占 90% 以上^[1]。我国作为全球 15 个腹泻高负担国家之一, 腹泻病例中有 11.6% 检出诺如病毒^[2], 且病例数量呈现出逐年增长的态势^[3]。

诺如病毒目前无法进行体外培养, 根据基因组特征分类, 可将其分为 7 组, GI 和 GII 是引起人类感染的两个主要基因组。食品中诺如病毒的检测方法主要基于分子生物学, 其中实时荧光逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法相对较灵敏、特异性高, 应用广泛。由于食品基质复杂, 病毒载量低, 加之 PCR 检测中操作人员随机误差、模板质量和试剂扩增效率等问题可能会造成结果的偏差, 因此通常需要加入阳性质控样品保证检测结果的可靠性和准确性^[4]。目前主要采用冻干病毒颗粒或裸露的 DNA/RNA 作为质控品^[5,6], 但两种方法均有其缺陷, 由于诺如病毒无法进行体外培养, 无法大量获取冻干的阳性颗粒, 且具有感染可能性; 而裸露的 DNA/RNA 作为质控品则无法监测核酸提取过程, 没有蛋白保护也容易降解。装甲 RNA 技术^[7]是将噬菌体衣壳蛋白自行包装形成病毒粒子结构, 将特定的病毒 RNA 片段包裹到衣壳蛋白内, 这样制成的病毒样颗粒 (virus like particles, VLPs) 既无生物危险性, 又能和阳性病毒样本一样, 监控整个检测过程, 耐受 RNase 的降解, 易于保存和运输。目前装甲

RNA 技术已成功应用于 RNA 病毒核酸检测标准样品的研究, 包括肠道病毒^[8]、人体免疫缺陷病毒^[9]、戊肝病毒^[10]等。然而, 适配多项检测标准且同时含有 GI 和 GII 两种基因组的诺如病毒装甲 RNA 标准样品制备研究鲜有报道。

本研究基于 MS2 噬菌体装甲 RNA 技术, 研制了内含 GI、GII 型诺如病毒两联检测靶标的病毒样颗粒标准品, 并开展均匀性、稳定性和定值研究, 可作为食品检测、医疗卫生等机构诺如病毒检测的阳性质控品, 符合 GB 4789.42-2016、SN/T 4784-2017、SN/T 4055-2014 等检测标准, 为保障食品安全和控制公共卫生事件的发生提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Life Technologies 公司; Qubit 荧光定量仪, 美国 Life Technologies 公司; HT7700 透射电子显微镜, 日本日立公司; Gel DocTM XR+凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; AKTA 蛋白纯化系统, 美国 GE 公司。

大肠杆菌 BL21 为本实验室保存; 引物和探针由上海生工合成, 序列信息见表 1; Takara Premix Ex Taq; PrimeScript One Step RT-PCR kit, 大连宝生物工程有限公司; Qubit® RNA BR Assay Kit, 美国 Life technologies 公司; RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; High capacity cDNA reverse transcription kit, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

表 1 诺如病毒 RT-PCR 引物探针序列^[11]

Table 1 Primers and probes of RT-PCR for *Norovirus*

靶标	序列 (5'-3')	产物长度/bp
NoV GI	QNIF4(Forward): CGCTGGATGCGNTTCCAT	86
	NV1LCR(Reverse): CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	
	NVGG1p(Probe): FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TAMRA	
NoV GII	QNIF2(Forward): ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	89
	COG2R(Reverse): TCGACGCCATCTTCATTACACA	
	QNIFs(Probe): FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA	

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒构建

参考 GenBank 数据库中的 MS2 噬菌体 (NC_001417.2) 基因组序列以及 GB 4789.42-2016、SN/T 4784-2017 和 SN/T 4055-2014 中规定的 GI/GII

型检测靶标所对应的 cDNA 序列, 委托苏州泓迅生物科技股份有限公司人工合成包含 MS2 噬菌体成熟酶蛋白、衣壳蛋白、包装位点和检测靶标 (GI、GII 串联) 的核酸片段, 并克隆到 pET-28a(+) 载体中, 构建

重组质粒, 命名为 pET-MS2-NoV (见图 1)。用 *Not* I 单酶切和 *Sac* I/*Not* I 双酶切鉴定阳性重组质粒, 并进行测序验证。

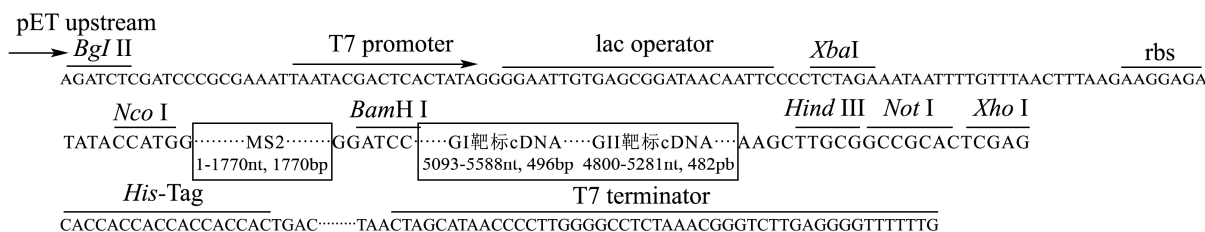


图 1 重组质粒 pET-MS2-NoV 构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of the construction of pET-MS2-NoV plasmid

1.2.2 病毒样颗粒的诱导表达

将重组质粒 pET-MS2-NoV 转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 取转化产物 50 μ L 涂布于 Kana 抗性 (50 μ g/mL) LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落到含有 Kana 抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养过夜。按 1:100 比例将过夜培养菌液接入 500 mL 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD600 约为 0.5, 加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 10 μ mol/L 诱导培养 12 h, 离心 5 min 收集菌体沉淀, 加入 PBS 缓冲液溶解, SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.3 病毒样颗粒的纯化

将 1.2.2 收集的菌体沉淀加入 PBS 缓冲液重悬, 超声破碎, 10000 r/min 离心 15 min 收取上清, 按照 0.25 g/mL 的比例加入 NaCl 粉末, 在加入等体积 20% PEG6000, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜充分沉淀, 11000 r/min 离心 20 min 去上清, 沉淀于 PBS 中重悬, 4 $^{\circ}$ C 放置 5 h 后 11000 r/min 离心 20 min, 收集上清为初步纯化产物。纯化后的上清加入高浓度 DNaseI 和 RNase, 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h。降解产物通过丙脍葡聚糖凝胶 (Sephacryl S-200 HR) 柱层析进一步纯化, 柱压 0.15 MPa, 流速 0.5 mL/min, 使用样品自动收集器收集 A280>50 mmol/L 范围的样品峰, 并进行 SDS-PAGE 电泳检测鉴定。由此获得纯化后含 GI-GII 诺如病毒两联装甲 RNA, 命名为 AR-NoV。

1.2.4 病毒样颗粒的鉴定

1.2.4.1 电镜观察

将 AR-NoV 稀释到合适浓度, 2% 磷钨酸负染, 透射电镜观察病毒样颗粒的形态, 测量其直径。

1.2.4.2 AR-NoV 中残留质粒的检测

RNAsimple RNA 试剂盒提取 AR-NoV 中 RNA, 将其设置为两组, 一组进行反转录, 另一组不进行反转录, 之后两组均以 QNIF2、COG2R、QNIFs 为引物探针, 同时进行荧光定量 PCR 检测, 验证是否含有残

留质粒 DNA。反转录反应条件为: 10 $\times$ RT buffer 2.0 μ L, 25 $\times$ dNTP Mix 0.8 μ L, 10 $\times$ RT Random Primers 2.0 μ L, Multiscribe reverse transcriptase 1.0 μ L, RNase Inhibitor 1.0 μ L, 模板 10 μ L, 补水至 20 μ L; 25 $^{\circ}$ C 10 min, 37 $^{\circ}$ C 120 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。荧光定量 PCR 反应条件为: Premix taq 预混液 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各 1 μ L, 探针 (10 μ M) 0.5 μ L, 模板 1 μ L, 补水至 25 μ L; 95 $^{\circ}$ C 20 s; 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 收集荧光信号; 40 个循环。

1.2.5 初步定值

1.2.5.1 标准曲线的建立

提取 AR-NoV 中的 RNA, 用 Qubit $^{\circ}$ RNA BR Assay Kit 测定 RNA 浓度, 参照公式: RNA 拷贝数 /copies/ μ L=6.02 $\times$ 10²³ copies/mol $\times$ RNA 浓度 /ng/ μ L $\times$ 10⁻⁹/(片段长度/bp $\times$ 340) 计算其对应的拷贝数。10 倍梯度稀释提取的 RNA, 用表 1 中引物与探针分别对两种型别靶标进行一步法 RT-PCR 检测, 每个样品设置 3 个平行。反应条件为: 2 $\times$ One step RT-PCR buffer III 10 μ L, Takara Ex Taq HS 0.4 μ L, PrimeScript RT Enzyme MixII 0.4 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各 0.5 μ L, 探针 (10 μ M) 0.25 μ L, 模板 1 μ L, 补水至 20 μ L; 42 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 收集荧光信号; 40 个循环。以拷贝数对数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5.2 定值及不确定度分析

根据初步计算的拷贝数将纯化的 AR-NoV 用 PBS 稀释到浓度约为 10⁷ copies/ μ L, 加入保护剂, 每瓶 300 μ L, 分装到 2 mL 西林瓶中进行真空冷冻干燥。随机选取 15 管, RNAsimple RNA 试剂盒提取 RNA, 按 1.2.5.1 反应条件进行 RT-PCR 分别测定两个靶标的 Ct 值, 根据标准曲线计算其拷贝数, 计算平均值, 得到诺如病毒 GI/GII 型 VLPs 初步定值结果。定值过程产生的不确定度分析参考 JJF 1059.1-2012 《测量不确定

度评定与表示》^[12], 采用 A 类不确定度公式进行不确定度分析。

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

其中 $t_{\alpha(m-1)}$ 表示显著性水平 α , 自由度为 $m-1$ 的 t 值; $\bar{x}$ 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。

1.2.6 均匀性测定

参照 GB/T 15000.3-2008^[13] 要求, 随机抽取 26 瓶冻干 AR-NoV, 每瓶设置 3 个子样, 共 52 个子样。按 1.2.5 方法检测 2 个靶标的有无, 并根据标准曲线计算拷贝数, 采用 SPSS 23.0 软件单因素方差分析法检验样本均匀性。

1.2.7 短期稳定性测定

参照 GB/T 15000.3-2008^[13] 要求, 将冻干 AR-NoV 分别放置在 37℃、25℃ 保存不同天数后置于 -80℃ 保存, 统一按 1.2.5 方法测定, 每个时间点设置 3 个平行, 采用 SPSS 23.0 软件单因素方差和线性回归方法统计样本的稳定性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-MS2-NoV 的构建

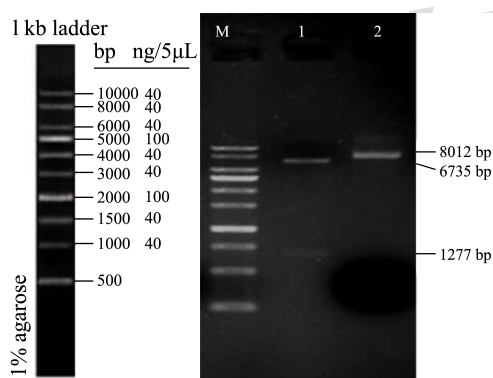


图2 pET-MS2-NoV 的酶切鉴定电泳图

Fig.2 Enzyme digestion of pET-MS2-NoV

注: M: DNA ladder DL10000; 1: *Sac I/Not I*; 2: *Not I*。

本研究中病毒样颗粒的表达体系, 是利用 MS2 噬菌体蛋白质和基因组 RNA 相互作用的机制及噬菌体衣壳蛋白空间构象的特点构建的。MS2 噬菌体复制酶编码基因 5'端存在一个由 19 个碱基组成的茎环结构 (ACAUGAGGAUUAACCAUGU), 该茎环结构实际上是包装位点, 衣壳蛋白二聚体与其结合形成复合物后可启动噬菌体自我包装^[14]。若将外源 cDNA 序列融合至包装位点后, 经转录翻译即可将外源 RNA 包装到衣壳蛋白内组装成 MS2 噬菌体样颗粒, 从而有效保护外源 RNA 不被 RNase 降解^[7]。分别用 *Sac I/Not*

I 双酶切和 *Not I* 单酶切鉴定构建的重组质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测条带大小与预期一致, 如图 2 所示, 同时测序结果表明人工合成片段正确克隆到载体 pET-28a(+) 中, 证实重组质粒构建成功, 命名为 pET-MS2-NoV。

2.2 pET-MS2-NoV 在原核细胞中的诱导表达

将重组质粒 pET-MS2-NoV 转入 BL21 感受态细胞中, 加入 IPTG 诱导表达, 噬菌体 MS2 衣壳蛋白自主装配形成病毒样颗粒, 并将诺如病毒 RNA 片段包装到粒子内部。经 SDS-PAGE 检测, 在 10~15 ku 之间可观察到一条明显的重组蛋白表达条带, 如图 3 箭头所示, 大小与预期一致, 表明 MS2 噬菌体衣壳蛋白表达成功。

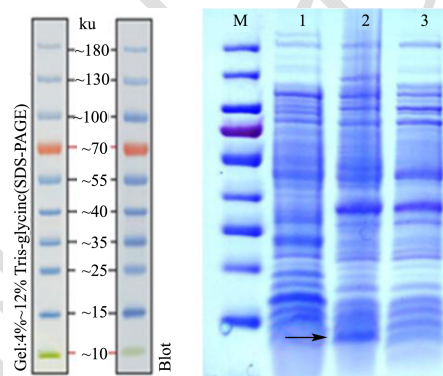


图3 蛋白表达产物的 SDS-PAGE 结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression product

注: M: 蛋白质分子 Marker; 1: 菌体蛋白; 2: IPTG 诱导表达的重组菌体蛋白; 3: 未加 IPTG 诱导表达的重组菌体蛋白。

2.3 病毒样颗粒的纯化

在病毒样颗粒纯化过程中, 我们发现原核表达蛋白中混有大量的质粒 DNA 和杂蛋白, 常规 DNase 酶消化根本不能完全去除残留质粒 DNA。残留的质粒 DNA 不经 RNA 提取和反转录即可呈现阳性结果, 失去了装甲 RNA 全过程监测的优势, 对标准样品质量影响很大。PEG 沉淀和超速离心法是经典的蛋白质/病毒纯化方式, 可有效去除杂蛋白和残留核酸, 在 RNA 病毒标准品的制备研究中多有报道^[15-18], 但 PEG 沉淀后会使得终产物残留大量化学试剂, 而超速离心效率低仅适合小量制备^[19]。Wang S^[10] 和刘莹等^[20] 在戊肝病毒装甲 RNA 制备中使用超滤离心管可有效去除杂蛋白, 时间短、操作简单。而凝胶色谱是利用分子筛效应分离分子量大小不同的蛋白, 根据目的蛋白的分子量选择孔径合适的凝胶色谱柱, 纯化简单易行、适合规模化操作^[21], 在多篇文献中均有报道^[15-17]。在实际应用中往往会联合使用以上两种或多种不同的病毒样颗粒的纯化方法, 相互弥补不足从而达到纯化目的。

本研究经预实验发现凝胶色谱的纯化效果与超速离心相当,但如果将表达产物直接上柱可能会因杂蛋白过多而造成堵塞。因此最终采用 PEG6000 沉淀大量杂蛋白,高浓度 DNase 消化残留 DNA 和 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤再次纯化的组合方式。

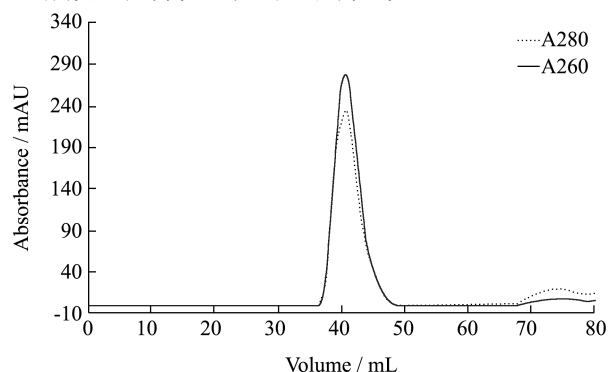


图4 Sephacryl S-200 HR 柱纯化吸光度分析

Fig.4 Absorbance of samples during purification by Sephacryl S-200 HR gel chromatography

2.2 中表达产物经 PEG6000、高浓度 DNase 和 RNase 处理初步纯化后,再通过分子筛凝胶柱纯化,图4显示了目的产物峰出现在洗脱体积40 mL左右,此时260 nm和280 nm吸光值均达到最大,说明此处靶标 RNA 和蛋白外壳含量最高,因此收集该处洗脱液进行琼脂糖凝胶电泳和 SDS-PAGE 鉴定。图5显示了纯化后的表达产物,在10~15 ku处有一明显条带,无杂带干扰,说明病毒样颗粒的纯化效果较好,命名为 AR-NoV。

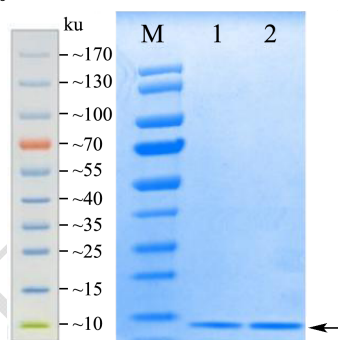


图5 VLPs 纯化后 SDS-PAGE 结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of VLPs after purification

注: M: 蛋白质分子 Marker; 1-2: 纯化后的 VLPs。

2.4 病毒样颗粒的鉴定

2.4.1 电镜形态鉴定

应用 HT7700 透射电镜,100 kV 加速电压下观察 AR-NoV 形态,如图6所示可见大量结构完整,大小均一的球形颗粒,直径为25 nm左右,表明该蛋白已自组装形成病毒样颗粒,而且纯化过程中没有造成 VLPs 结构破坏,仍保持天然状态。

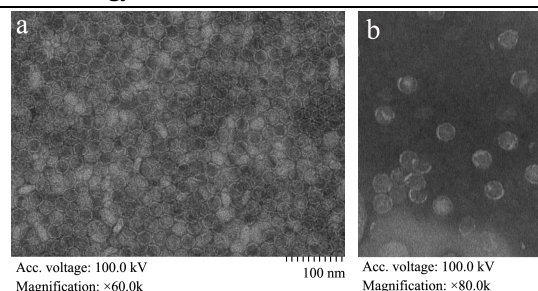


图6 AR-NoV 电镜图

Fig.6 The transmission electron microscopy of AR-NoV

注: a 放大倍数 60.0 k; b 放大倍数 80.0 k。

2.4.2 AR-NoV 中残留质粒的检测

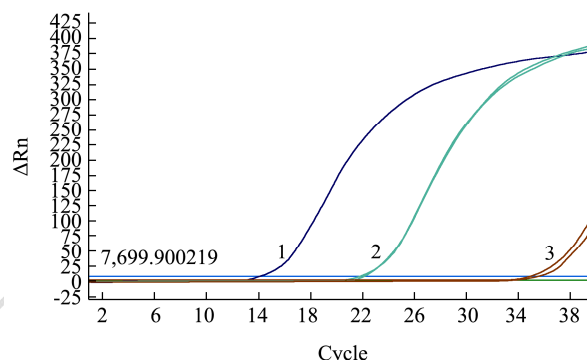


图7 AR-NoV 残留核酸荧光定量 PCR 检测结果

Fig.7 Real-time PCR for residual DNA detection in the AR-NoV

注: 1: 阳性对照; 2: 经逆转录样本; 3: 未经逆转录样本。

以 AR-NoV 提取的 RNA 为模板,经反转录或不经反转录后同时进行荧光定量 PCR,设置重组质粒为阳性对照,ddH₂O 为空白对照,如图7所示,AR-NoV 经 RT-PCR 后 Ct 值为 21.71,而直接进行荧光定量 PCR 的 Ct 为 35.63 (可视为阴性),说明 AR-NoV 中无质粒 DNA 残留。

2.5 AR-NoV 初步定值

将提取的 RNA 用 Qubit RNA BR Assay Kits 测定浓度为 12.3 ng/μL,根据拷贝数计算公式,计算其拷贝数为 2.19×10^{10} copies/μL。10 倍梯度稀释 RNA,一步法 RT-PCR 分别测定 GI 型和 GII 型各浓度模板 Ct 值,扩增曲线如图8所示。以 RNA 各稀释度拷贝数对数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线。GI 型 NoV 标准曲线为 $y = -0.241x + 12.036$, $R^2 = 0.994$; GII 型 NoV 标准曲线为 $y = -0.2333x + 11.643$, $R^2 = 0.999$ 。

将随机选取的 15 管冻干 AR-NoV 用 PBS 稀释后提取 RNA,采用 RT-qPCR 测定 Ct 值,带入上述标准曲线公式计算得到 GI 和 GII 型 AR-NoV 的拷贝数分别为 4.04×10^7 copies/μL 和 6.16×10^7 copies/μL。采用 A 类不确定度公式计算得到 GI 和 GII 由定值过程引入的不确定度为 0.62×10^7 copies/μL 和 0.30×10^7 copies/μL,

详情见表2。因此本次制备的诺如病毒标准品 AR-NoV 中 GI 型 NoV 定值结果为 $(4.04\pm0.62)\times10^7$ copies/ μL , GII 型 NoV 定值结果为 $(6.16\pm0.30)\times10^7$ copies/ μL 。

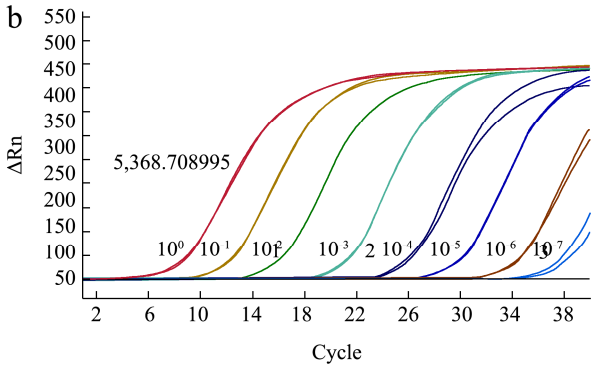
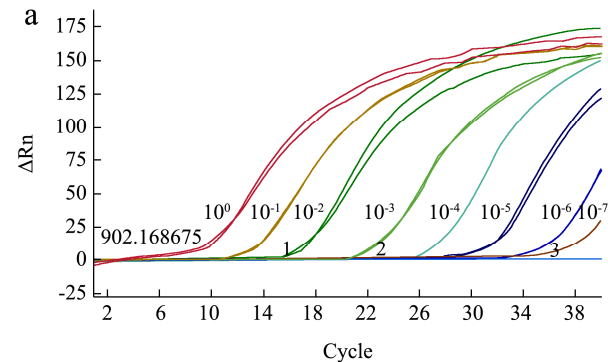


图8 AR-NoV 标准曲线制备 RT-PCR 扩增图

Fig.8 Standard curve preparation RT-PCR of AR-NoV

注: a: GI 型 NoV; b: GII 型 NoV。

表 2 AR-NoV 中 GI/GII 型靶标定值不确定度结果

Table 2 Quantification uncertainty of AR-NoV for type GI/GII Norovirus

Target	$\bar{x}/(10^7 \text{ copies}/\mu\text{L})$	$s/(10^7 \text{ copies}/\mu\text{L})$	v	p	$t_{\alpha(v)}$	Uncertainty/ $(10^7 \text{ copies}/\mu\text{L})$
NoV GI	4.04	1.13	14	0.95	2.14	0.62
NoV GII	6.16	0.55				0.30

表 3 均匀性检测方差分析

Table 3 Variance analysis of homogeneity test

靶标	变差源	平方和	自由度	均方	F	$F_{0.05(25,52)}$
NoV GI	组间	3.34×10^{15}	25	1.34×10^{14}	0.64	1.72
	组内	1.09×10^{16}	52	2.10×10^{14}		
	总和	1.43×10^{16}	77			
NoV G II	组间	2.54×10^{15}	25	1.02×10^{14}	0.46	
	组内	1.15×10^{16}	52	2.22×10^{14}		
	总和	1.41×10^{16}	77			

表 4 短期稳定性结果分析

Table 4 Trend test for short-term stability

靶标	温度	拟合方程	斜率的 不确定度 $S(b_1)$	自由度	$t_{0.95, (n-2)}$	$ b_1 -t_{0.95, (n-2)}\times S(b_1)$	趋势
NoV GI	37 °C	$Y=(-2.70\times10^5)X+3.90\times10^7$	2.41×10^5	4	2.78	-3.98×10^5	没有观察到不稳定趋势
	25 °C	$Y=(-1.51\times10^5)X+4.11\times10^7$	2.01×10^5	7	2.37	-4.98×10^4	
NoV GII	37 °C	$Y=(-1.38\times10^5)X+4.62\times10^7$	6.32×10^5	4	2.78	-1.62×10^6	
	25 °C	$Y=(-7.84\times10^4)X+4.97\times10^7$	8.70×10^5	7	2.37	-7.92×10^5	

2.6 均匀性检验

为考察特征量值的均匀性, 随机选取 26 管冻干 AR-NoV 提取 RNA 后进行 RT-PCR 检测, 根据 2.5 得到的标准曲线定量 AR-NoV 中 GI/GII 元件拷贝数浓度, 采用单因素方差分析法进行均匀性检验 (表 3)。根据显著性水平 $\alpha=0.05$ 和自由度 (25,52) 可得临界值 $F_{0.05(25,52)}=1.72$, 统计结果表明 GI 和 GII 所得 F 均小于 $F_{0.05(25,52)}$, 组内与组间无明显差异, 本批标准样品的拷贝数浓度量值在瓶间具有良好的均匀性。

2.7 短期稳定性检验

短期稳定性检验旨在考察标准样品的运输稳定性, 本研究选择了 37 °C 和 25 °C 两个运输中可能出现的温度点考察标准样品拷贝数浓度短期稳定性。采用 RT-PCR 标准曲线定量 37 °C/25 °C 在不同时间点抽取样品的拷贝数浓度, 通过样品拷贝数浓度随时间变化情况, 采用线性回归模型 $Y=b_0+b_1X$ 进行趋势分析(b_0 , b_1 为回归系数, X 为保存时间, Y 为标准物质特征量值)。通过数据分析显示, $|b_1|$ 均小于 $t_{0.95,(n-2)}\times S(b_1)$, 表

明斜率不显著,没有观察到不稳定(表4)。因此,本研究制备的AR-NoV标样在37℃至少可稳定保存15 d;25℃至少可稳定保存24 d,结果见表4。与传统方法制备的RNA病毒标准品相比,如原霖等^[22]研制的PRRSV冻干病毒颗粒标准品25℃和37℃可稳定7 d和1 d,刘志玲等^[23]研制的病毒性出血性败血症病毒cDNA标准物质室温可稳定7 d,该装甲RNA标样短期稳定性远高于冻干病毒颗粒和cDNA,有效解决了RNA质控品保存和运输稳定性问题。

3 结论

3.1 诺如病毒的传播途径主要为人与人之间的接触传播、食源性传播和水源性传播,不同基因型的诺如病毒的传播途径存在一定的差异^[24]。GII型诺如病毒是全球所有年龄段人群中大部分诺如病毒爆发的原因,而在食源性和水源性暴发中更常检测到GI型^[25]。由于诺如病毒仅有一小段足够保守的基因组序列可用于设计RT-PCR检测引物和探针^[26],大部分研究报道的检测靶标均集中在ORF1-ORF2连接区域^[27,28]。本研究对现有食品中诺如病毒检测标准中靶标序列进行梳理,将GI和GII型检测靶标对应的cDNA序列串联合成,表达出同时含有GI和GII型靶标的两联装甲RNA,可适用于GB 4789.42-2016、SN/T 4784-2017和、SN/T 4055-2014三个检测标准的阳性参考物质,同时两联装甲RNA能够满足多重检测对阳性标准样品的需求,减少质控样品提取、加样、扩增等步骤,提高检测的时效性和经济性,与现有标准品相比具有一定优势。

3.2 从理论上讲,MS2衣壳蛋白的包装长度应与其基因组大小3569 nt相近,但研究人员通过改变包装策略、增加或修饰包装位点等方法大幅度提升了外源片段包装长度。Zhan S等^[29]采用单质粒双表达系统在大肠杆菌中成功包装3024 nt的HIV病毒;Lin GG等^[15]通过增加pac位点的数目和亲和力构建了包含4942 nt的寨卡病毒装甲RNA表达系统;Zhang L等^[30]首次实现了MS2噬菌体衣壳蛋白对双链DNA的包装,包装长度达到6.5 kb。包装长度的增加意味着MS2噬菌体可包容多种病毒或单种病毒多重靶标,使得标准样品的制备更加经济、高效。另外,Yao L等^[25]通过对噬菌体MS2和Q β 装甲RNA在-20℃、4℃、45℃三种保存条件下的对比试验,发现由噬菌体Q β 制备的装甲RNA具有更高的稳定性,为标准品提供了一条新的制备策略。

3.3 综上所述,本研究制备的内含GI和GII型诺如病毒检测靶标的两联装甲RNA纯度高,拷贝数高,

均匀性和稳定性良好,可作为GB 4789.42-2016、SN/T 4784-2017和、SN/T 4055-2014三项检测标准的阳性质控品,同时满足多重检测需求,实现了对诺如病毒检测全过程质控,有望申报为国家标准样品,并为其其他病原体核酸标准样品制备提供了思路。

参考文献

- [1] Belliot G, Lopman B A, Ambert-Balay K, et al. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare related infection [J]. *Clinical Microbiology & Infection*, 2014, 20(8): 724-730
- [2] 谢雅晶,刘贤金.食源性诺如病毒在果蔬农产品中的污染及检测研究[J].*病毒学报*,2015,31(6):685-697
XIE Ya-jing, LIU Xian-jin. The advances in the contamination and detection of foodborne pathogen *Noroviruses* in fresh produce [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(6): 685-697
- [3] 孔翔羽,靳淼,段招军.诺如病毒与食源性疾病[J].*中国临床医生杂志*,2015,43(7):21-23
KONG Xiang-yu, JIN Miao, DUAN Zhao-jun. *Norovirus* and food-borne diseases [J]. *Chinese Journal for Clinicians*, 2015, 43(7): 21-23
- [4] 李金明.标准物质在乙型和丙型肝炎病毒核酸检测标准化中的重要性[J].*中华检验医学杂志*,2007,30(8):850-852
LI Jin-ming. The role of nucleic acid reference materials in detection of HBV DNA and HCV RNA [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2007, 30(8): 850-852
- [5] 徐蕾蕊,魏海燕,林长军,等.星状病毒核酸检测标准物质的研制[J].*食品科学*,2016,37(6):172-177
XU Lei-rui, WEI Hai-yan, LIN Chang-jun, et al. Development of astrovirus reference material used in nucleic acid amplification testing [J]. *Food Science*, 2016, 37(6): 172-177
- [6] 原霖,李尔华,董浩,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒国家核酸标准物质的研制[J].*中国兽医学报*,2019, 39(5):826-829
YUAN Lin, LI Er-hua, DONG Hao, et al. Establishment of the national nucleic acid reference material of HP-PRRSV [J]. *Chinese Journal Veterinary Science*, 2019, 39(5): 826-829
- [7] Pasloske B L, Cindy R. Walkerpeach C R, 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

- [8] Song L Q, Sun S P, Li B, et al. External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(10): 3591-3595
- [9] Okello J B A, Rodriguez L, Poinar D, et al. Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA [J]. *PLoS One*, 2013, 5(11): e13931
- [10] Wang S, Liu Y, Li D D, et al. Preparation and evaluation of MS2 bacteriophage-like particles packaging hepatitis E virus RNA [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(20): fnw221
- [11] GB 4789.42-2016, 食品安全国家标准, 食品微生物学检验, 诺如病毒检验[S]
GB 4789.42-2016, National Food Safety Standard, Food Microbiology Examination, *Norovirus* [S]
- [12] JJF 1059.1-2012, 测量不确定度评定与表示[S]
JJF 1059.1-2012, Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement [S]
- [13] 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[S]
GB/T 15000.3-2008, Directives for the Work of Reference Materials (3), Reference Materials, General and Statistical Principles for Certification [S]
- [14] Witherell G W, Gott J M, Uhlenbeck O C. Specific Interaction between RNA phage coat proteins and RNA [J]. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*, 1991, 40: 185-220
- [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 International Journal of Clinical Chemistry & Applied Molecular Biology*, 2017, 466: 138-144
- [16] Yao L, Li F L, Qu M, et al. Development and evaluation of a novel armored RNA technology using bacteriophage Q β [J]. *Food and Environmental Virology*, 2019, 11(3): 383-392
- [17] Gholami M, Ravanshad M, Baesi K, et al. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology [J]. *Infection Genetics & Evolution*, 2018, 22(6): 394-400
- [18] 姚琳, 张奇, 李凤铃, 等. 含 4 种食源性病毒检测靶标多联装甲 RNA 的制备、纯化与定值[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 301-307
- YAO Lin, ZHANG Qi, LI Feng-ling, et al. Construction, purification and quantification of multiplex armored RNA containing targets for detection of 4 foodborne viruses [J]. *Food Science*, 2019, 40(8): 301-307
- [19] 王席, 李国攀, 陈清清, 等. 猪圆环病毒 2 型病毒样颗粒的纯化及鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(6): 1792-1800
- WANG Xi, LI Guo-pan, CHEN Qing-qing, et al. Purification and identification of porcine circovirus type 2 virus-like particles [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(6): 1792-1800
- [20] 刘莹, 王坤, 周铁忠, 等. 装载戊型肝炎病毒核酸片段的重组 MS2 噬菌体衣壳的制备及其特性研究[J]. *病毒学报*, 2016, 32(5): 538-544
- LIU Ying, WANG Kun, ZHOU Tie-zhong, et al. Preparation and characterization of recombinant HEV RNA-loaded MS2 bacteriophage capsid by armored RNA technology [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2016, 32(5): 538-544
- [21] 卢渊录, 董虎, 李璐莹, 等. 分子排阻色谱(SEC)分离纯化口蹄疫病毒及其病毒样颗粒的比较[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(6): 694-699
- LU Yuan-lu, DONG Hu, LI Lu-ying, et al. Isolation and purification of FMDV and FMDV-VLPs by size exclusion chromatography [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(6): 694-699
- [22] 原霖, 高旭年, 董浩, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲经典株国家核酸标准物质的研制[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(11): 78-82
- YUAN Lin, GAO Xu-nian, DONG Hao, et al. Development of the national nucleic acid reference material of NA-PRRSV [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(11): 78-82
- [23] 刘志玲, 陈茹, 朱道中, 等. 病毒性出血性败血症病毒 RNA 标准物质的研制[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(3): 15-19
- LIU Zhi-ling, CHEN Ru, ZHU Dao-zhong, et al. Preparation of VHS reference material used for nucleic acid detection [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2018, 54(3): 15-19
- [24] Vinjé J, Doern G V. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(2): 373-381

(下转第 131 页)