



## 基于 Q $\beta$ 噬菌体的甲肝病毒装甲 RNA 标准参考样品的研制

姚琳<sup>1</sup> 逢凤娇<sup>1</sup> 张奇<sup>1</sup> 庞倩倩<sup>2</sup> 李凤铃<sup>1</sup> 江艳华<sup>\*1</sup> 王联珠<sup>1</sup> 翟毓秀<sup>1</sup>

1 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

2 山东华宇工学院 山东 德州 253000

**摘要:**【背景】目前食品中甲肝病毒分子的检测缺乏安全、稳定的 RNA 标准参考样品,影响了检测结果的科学性与准确性。【目的】基于 Q $\beta$  噬菌体装甲 RNA 技术构建内含甲肝病毒检测靶标的装甲 RNA (Hepatitis A virus armored RNA, AR-HAV),并开展初步定值、均匀性、稳定性研究,为 HAV 分子检测提供标准参考样品。【方法】人工合成包含 Q $\beta$  噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点、HAV 检测靶标 cDNA 序列的核酸片段 QGBHAV,并亚克隆到 pET-28a(+)中构建重组质粒 pET-QGBHAV,转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞进行原核表达,利用超速离心、丙烯葡聚糖凝胶层析柱纯化 AR-HAV 后电镜观察。通过实时荧光 RT-PCR 对 AR-HAV 进行初步定值及均匀性和稳定性研究。【结果】SDS-PAGE 结果表明重组质粒在大肠杆菌中有约 14.1 kD 的目的蛋白表达;纯化后的 AR-HAV 无杂蛋白和残留质粒;电镜下可见结构完整、大小约为 25 nm 的病毒样颗粒;定值结果显示,AR-HAV 中检测靶标 RNA 的含量为 $(2.57\pm 0.12)\times 10^7$  copies/ $\mu$ L;均匀性分析结果为 $F=1.23 < F_{0.05}(9,20)$ ,证实 AR-HAV 的均匀性良好;稳定性结果表明,AR-HAV 在可 37 °C 保存 9 d,25 °C 保存 25 d,4 °C 保存 40 d,-20 °C 保存 180 d,-80 °C 至少保存 360 d。【结论】基于 Q $\beta$  噬菌体制备的 AR-HAV 拷贝数高,具有良好的均匀性和稳定性,可为 HAV 的分子检测提供安全、稳定的标准参考样品。

**关键词:** 甲肝病毒, Q $\beta$  噬菌体, 装甲 RNA, 标准参考样品, 实时荧光 RT-PCR

**Foundation items:** Special Project of the Basic Work for National Science and Technology of China (2013FY113300); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Found, CAFS (2016HY-ZD11); National Shellfish Industry Technology System of China (CARS-47)

\*Corresponding author: E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

Received: 26-02-2018; Accepted: 09-05-2018; Published online: 05-06-2018

基金项目: 国家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)

\*通信作者: E-mail: jiangyh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-02-26; 接受日期: 2018-05-09; 网络首发日期: 2018-06-05

## Armored RNA reference material of hepatitis A virus based on Q $\beta$ bacteriophage

YAO Lin<sup>1</sup> PANG Feng-Jiao<sup>1</sup> ZHANG Qi<sup>1</sup> PANG Qian-Qian<sup>2</sup> LI Feng-Ling<sup>1</sup>  
JIANG Yan-Hua<sup>\*1</sup> WANG Lian-Zhu<sup>1</sup> ZHAI Yu-Xiu<sup>1</sup>

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

2 Shandong Huayu Institute of Technology, Dezhou, Shandong 253000, China

**Abstract:** [Background] The stable RNA reference material without biohazard to improve the accuracy and reliability of the detection result, is urgently needed for hepatitis A virus (HAV) detection in food. [Objective] To construct armored RNA reference material containing target RNA of HAV (HAV armored RNA, AR-HAV) based on Q $\beta$  bacteriophage, and to test its homogeneity, valuation and stability. [Methods] DNA fragment named QGBHAV containing matures coding gene, capsid protein coding gene, packing site of Q $\beta$  bacteriophage, and detection target sequence of HAV in GB/T 22287-2008 was synthesized, and subcloned into pET-28a(+) expression vector to construct the recombinant plasmid pET-QGBHAV, and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells and expressed with isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) induction. The expression product, virus like particles of Q $\beta$  bacteriophage containing RNA of HAV, named AR-HAV, was analyzed by SDS-PAGE. AR-HAV was centrifuged and purified by CsCl density gradient ultracentrifugation and Sephacry molecular sieve chromatography. The morphology of AR-HAV was observed by transmission electron microscopy. The valuation, homogeneity and stability of AR-HAV were tested according to the GB/T 15000.3-2008. [Results] SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the expressed protein was about 14.1 kD. The virus like particles of AR-HAV, 25 nm in diameter, with typical morphology could be observed under electron microscope. AR-HAV samples prepared in this study had no other proteins nor recombinant plasmid DNA residual contamination, were valued as  $(2.57 \pm 0.12) \times 10^7$  copies/ $\mu$ L and behaved well in the homogeneity test,  $F=1.23 < F_{0.05(9,20)}$ . The sample was stable at 37 °C for 9 days, at 25 °C for 25 days, at 4 °C for 40 days, -20 °C for 180 days, at -80 °C for at least 360 days without significant decrease. [Conclusion] The HAV armored RNA based on Q $\beta$  bacteriophage was successfully prepared and had good uniformity, stability and high copy number, could be supplied as a good and secure reference material candidate for HAV nucleic acid detection.

**Keywords:** Hepatitis A virus, Q $\beta$  Bacteriophage, Armored RNA, Reference material, Real-time fluorescence RT-PCR

甲肝病毒(Hepatitis A virus, HAV)为单股正链RNA病毒,属于小RNA病毒科,主要以人类等灵长类动物为宿主,约70%的成年人感染后会发生急性肝炎,严重者可致死<sup>[1-2]</sup>。受污染的贝类等食品是HAV传播的重要媒介之一<sup>[3]</sup>。虽然HAV是严格的细胞内寄生物,在食品中不能繁殖,但是其携带的病毒会引起感染甚至疫情<sup>[4]</sup>。1988年上海暴发了甲肝大流行,共有30多万人发病,这是由HAV引发食品安全与公共卫生安全的典型事件。

近年来,在意大利<sup>[5-6]</sup>、韩国<sup>[7]</sup>、瑞典<sup>[8]</sup>、西班牙<sup>[9]</sup>等国家也暴发了多起由污染食品引发的甲肝疫情。实时荧光RT-PCR方法因其特异、灵敏、快速等优势目前已成为食品中HAV主要的检测方法,而在检测过程中添加核酸类标准参考样品,对于提高食品等复杂基质样本检测结果的可靠性和准确性具有重要意义<sup>[10]</sup>。现有标准参考样品主要包括弱毒病毒株、cRNA、质粒DNA等,但存在一定生物安全隐患,而且易降解,不能真实评价

RNA 提取、反转录过程等缺陷。由特定的 RNA 序列和 MS2 噬菌体衣壳蛋白包装成的装甲 RNA 无生物安全隐患, 耐 RNase 降解, 稳定性良好, 是一种理想的 RNA 标准参考样品<sup>[11-12]</sup>。有研究表明, 与 MS2 噬菌体相比, Q $\beta$  噬菌体的衣壳蛋白更稳定, 更适合标准参考样品的研制和保存<sup>[13]</sup>。因此, 本研究基于 Q $\beta$  噬菌体装甲 RNA 制备平台<sup>[14]</sup>, 将 HAV 检测靶标 RNA 包装在 Q $\beta$  噬菌体衣壳蛋白内, 研发了内含甲肝病毒 RNA 检测靶标的装甲 RNA, 并进行初步定值、均匀性与稳定性研究, 为甲肝病毒的 RNA 检测提供了良好的标准参考样品。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和菌株

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞为天根生化科技(北京)有限公司产品; pET-28a(+)为本实验室保存; 用于体外转录 cRNA 的重组质粒 pGEM-HAV 由本实验室制备并保存, 其包含 GB/T 22287-2008 《贝类中甲型肝炎病毒检测方法普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法》<sup>[15]</sup> 规定的实时荧光 RT-PCR 法检测靶标 cDNA 序列。

### 1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂 TRIzol, Invitrogen 公司; One Step PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit、限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司; T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express Large Scale RNA Production System 体外转录试剂盒, Promega 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 丙烯酰胺葡聚糖凝胶, 北京天恩泽生物技术有限公司; 无水乙醇、异丙醇、氯仿等试剂均为分析纯。

电泳仪, 北京六一生物科技有限公司产品; 实时荧光 PCR 仪, Roche 公司; 微量蛋白核酸测定仪, Implen 公司; 透射电镜, 日本电子公司。

### 1.3 引物和探针

参照 GB/T 22287-2008, 由生工生物工程(上海)股份有限公司(以下简称上海生工)合成 HAV 检测

所需的引物、探针。正向引物 HAV1: 5'-TTTCCGGAGCCCCTCTTG-3', 反向引物 HAV2: 5'-AAAGGGAAATTTAGCCTATAGCC-3'; 探针: 5'-FAM-ACTTGATACCTCACCCGCCGTTTGCCTTAMARA-3'。

### 1.4 重组质粒 pET-QGBHAV 的构建与鉴定

参考本实验室前期建立的方法<sup>[14]</sup>, 由上海生工合成包含 Q $\beta$  噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点、HAV 检测靶标 cDNA 序列的核酸片段 QGBHAV, 并亚克隆到 pET-28a(+) 中, 构建重组表达质粒, 命名为 pET-QGBHAV, 使用限制性内切酶 *Not I* 单酶切和 *Not I/BamH I* 双酶切鉴定重组质粒, 送至上海生工测序。

### 1.5 pET-QGBHAV 的诱导表达及纯化

将重组质粒 pET-QGBHAV 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布至卡那霉素(终浓度为 50 mg/L)的 LB 平板, 37 °C 培养过夜后挑取单菌落, 接种到 5 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 取 200  $\mu$ L 活化后的菌液于 20 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.6, 加入终浓度 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 12 h, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。

按上述方法诱导 200 mL 菌液, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 超声波破碎, 4 °C、11 000 r/min 离心 20 min 后收集上清, 分别加入终浓度为 8 U/mL 的 DNase I 和终浓度为 12  $\mu$ g/mL 的 RNase A 消化。将滤液采用氯化铯密度梯度离心, 4 °C、85 000 r/min 离心 5 h, 用透析缓冲液透析 3 h, 将透析液经 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤后使用丙烯葡聚糖凝胶层析柱纯化, 获得含有甲肝病毒检测靶标 RNA 的装甲 RNA, 命名为 AR-HAV。2% 磷钨酸负染, 用透射电镜观察。

### 1.6 AR-HAV 中残留质粒的检测

用实时荧光 PCR 方法检测纯化后的 AR-HAV

中是否含有残留质粒 pET-QGBHAV 的污染。PCR 反应体系: 2×Premix *ExTaq* (probe qPCR) 10.0 μL, 引物 HAV1/HA2 (10 μmol/L)各 0.4 μL, 探针 (10 μmol/L) 0.8 μL, AR-HAV 2.0 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O 6.4 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。

## 1.7 AR-HAV 的初步定值

### 1.7.1 cRNA 标准曲线的构建

将本实验室保存的 pGEM-HAV 重组质粒使用 *Nde* I 内切酶进行线性化处理, 用凝胶回收试剂盒回收线性化 pGEM-HAV, 参照体外转录试剂盒说明书体外转录 cRNA。

按照说明书用 TRIzol 法提取纯化体外转录的 cRNA, 利用微量蛋白核酸测定仪对 cRNA 进行浓度和纯度鉴定, 根据公式  $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝/mol}) \times \text{RNA 含量}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times (10^{-9}) / (\text{RNA 片段长度} \times 340) = (\text{拷贝}/\mu\text{L})$  计算 cRNA 的拷贝数。将 cRNA 进行 10 倍系列稀释后, 参照 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书及优化后的反应体系与条件进行实时荧光 RT-PCR 检测, 反应体系: 2×One step RT-PCR buffer III 10 μL, TaKaRa *ExTaq* HS (5 U/μL) 0.4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL, 引物 HAV1/HA2 (10 μmol/L)各 1.8 μL, 探针 (10 μmol/L) 0.5 μL, cRNA 2.0 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O 3.1 μL。反应条件: 42 °C 5 min; 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。根据测得的  $C_t$  值与各稀释度拷贝数的对数绘制 cRNA 标准曲线, 建立标准回归方程。

### 1.7.2 AR-HAV 的初步定值及不确定度分析

随机选取 15 管 AR-HAV, 按 1.7.1 方法用 Trizol 试剂提取 RNA 后采用实时荧光 RT-PCR 方法测定  $C_t$  值, 代入建立的标准曲线计算 AR-HAV 拷贝浓度。参照 JJF 1059-1999《测量不确定度表示指南》<sup>[16]</sup>中有关规定, 采用公式

$$U(\bar{x}) = \pm t_{\alpha}(m-1) \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{m(m-1)}} \text{ 计算所得 AR-HAV}$$

的 A 类不确定度, 其中  $t_{\alpha}(m-1)$  代表显著性水平  $\alpha$ , 自由度为  $m-1$  的  $t$  值,  $\bar{x}_i$  为单次测量的平均值,  $\bar{x}$  为测量的总平均值,  $m$  为测量次数。

## 1.8 AR-HAV 的均匀性分析

参考 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则》<sup>[17]</sup>, 按 1.7.1 方法进行检测, 单因素方差分析样本均匀性。

## 1.9 AR-HAV 的稳定性分析

参考 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则》<sup>[17]</sup> 的要求, 将分装后的 AR-HAV 分别置于 37、25、4、-20、-80 °C 保存不同时间, 按照先密后疏的原则定期抽取 3 管 AR-HAV 样品, 按 1.7.1 方法进行实时荧光 RT-PCR 检测, 每管重复 3 次, 单因素方差和线性回归方法统计样本的稳定性程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-QGBHAV 重组质粒鉴定

酶切鉴定重组质粒(图 1)并测序, 结果表明重组质粒构建成功, 命名为 pET-QGBHAV。

### 2.2 pET-QGBHAV 的诱导表达及纯化

pET-QGBHAV 在大肠杆菌 BL21 中经 IPTG 诱导表达, 在大约 14.1 kD 处出现一条明显的蛋白条带, 如图 2 所示, 与预期结果一致。超声破碎后的上清液经过超离、透析、滤膜过滤、丙烯葡聚糖凝胶层析

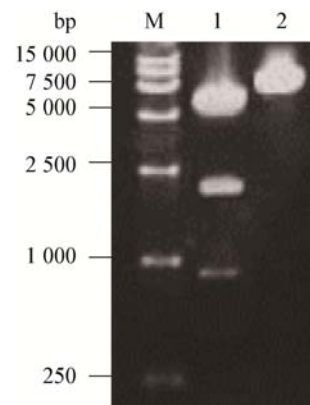


图 1 pET-QGBHAV 的酶切鉴定图

Figure 1 Enzyme digestion of pET-QGBHAV

Note: M: DL15000 DNA marker; 1: *Not* I/*Bam* H I; 2: *Not* I.

柱纯化后得到 AR-HAV, 其 SDS-PAGE 分析结果表明未见其他杂条带, 纯化效果良好, 如图 3 所示。

### 2.3 AR-HAV 的电镜观察

电镜观察纯化后的 AR-HAV, 可看到大量结构完整、大小均一的病毒样颗粒, 直径约 25 nm, 与预期大小一致, 结果如图 4 所示。

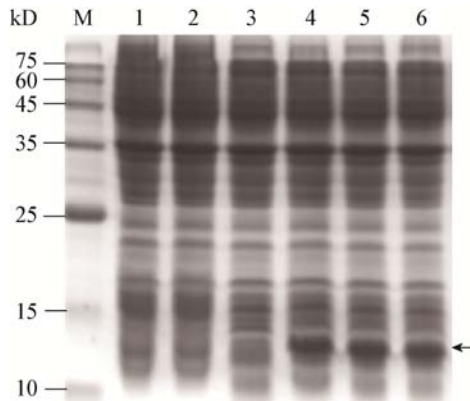


图 2 pET-QGBHAV 表达产物的 SDS-PAGE 分析  
Figure 2 SDS-PAGE analysis of pET-QGBHAV express products

注: M: 蛋白质分子量; 1: 未诱导的 pET-28a(+)空载体; 2: 诱导后的 pET-28a(+)空载体; 3: 诱导前重组菌; 4-6: 诱导后重组菌。  
Note: M: Protein ladder; 1: pET-28a(+) without induction; 2: Induced pET-28a(+); 3: Express products the recombinant bacteria without induction; 4-6: Express products from the induced recombinant bacteria.

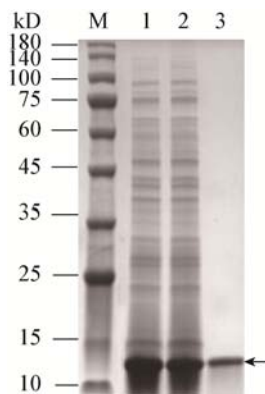


图 3 AR-HAV 纯化后 SDS-PAGE 分析  
Figure 3 SDS-PAGE analysis of AR-HAV after purification

注: M: 蛋白质分子量; 1-2: 诱导表达菌液; 3: 层析纯化 AR-HAV。  
Note: M: Protein ladder; 1-2: Induced recombinant bacteria; 3: Purified AR-HAV.

### 2.4 AR-HAV 中残留质粒检测

以 AR-HAV 为模板进行实时荧光 PCR 检测。结果显示 AR-HAV 与阴性对照的  $C_t$  值接近, 无明显扩增, 说明制备的 AR-HAV 中无质粒 DNA 的残留, 结果如图 5 所示。

### 2.5 AR-HAV 的定值

将制备的 cRNA 进行 10 倍梯度稀释, 采用实时荧光 RT-PCR 法根据稀释梯度和  $C_t$  值绘制出标准曲线:  $y = -3.347 \lg x + 40.682$ ,  $R^2 = 0.999$ 。随机选取 15 管 AR-HAV, 采用实时荧光 RT-PCR 方法测定  $C_t$  值, 根据建立的标准曲线计算得知 AR-HAV 拷贝数为  $2.57 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L。应用 A 类不确定度评定方法进行评定, 所得 AR-HAV 的不确定度为  $0.12 \times 10^7$ , 因此本次制备的 AR-HAV 定值结果为  $(2.57 \pm 0.12) \times 10^7$  copies/ $\mu$ L。

### 2.6 AR-HAV 的均匀性实验

均匀性检验结果显示:  $F = M_{\text{among}} / M_{\text{within}} = 1.23 < F_{0.05(9,20)}$ , 临界值  $F_{0.05(9,20)} = 2.39$  由  $F$  表查得, 因此可认为组内和组间无明显差异, 样品是均匀的(表 1)。

### 2.7 AR-HAV 的稳定性实验

分别在 37、25、4、-20、-80  $^{\circ}$ C 条件下进行 AR-HAV 稳定性检测, 结果表明: AR-HAV 在 37  $^{\circ}$ C 可稳定保存 9 d, 25  $^{\circ}$ C 可稳定保存 25 d, 4  $^{\circ}$ C 可稳定保存 40 d, -20  $^{\circ}$ C 可稳定保存 180 d, -80  $^{\circ}$ C 可稳定保存至少 360 d, 证明研究制备的 AR-HAV 稳定性良好(表 2)。

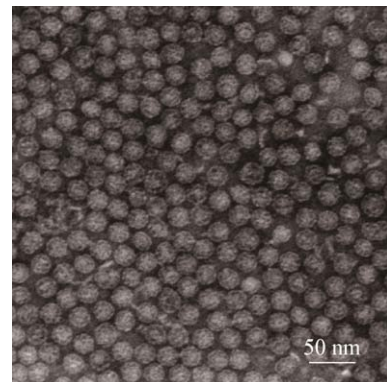


图 4 AR-HAV 的电镜观察  
Figure 4 Transmission electron microscopy of AR-HAV

### 3 讨论与结论

据统计, 全球每年约有 150 万人感染 HAV, 然而由于部分无症状表现, 以及流行病学统计、公开数据的局限性, 这个数字要远远低于实际发病数<sup>[18-19]</sup>, 严重威胁着人类健康。实时荧光 RT-PCR 是检测 HAV 的重要手段, 而标准参考样品是确保检测结果准确性的重要因素。有研究使用 HAV 弱

毒株作为检测阳性质控品<sup>[20-21]</sup>, 存在一定生物安全隐患, 并且无法进行量值测定, 不适宜用于核酸的定量分析; 有研究用质粒 DNA 作为 RNA 病毒检测的阳性质控品, 然而质粒无法对 RNA 提取及逆转录过程进行有效评价<sup>[22]</sup>; 也有研究将含有特定 RNA 病毒的阳性血清冻干处理后作为阳性质控品<sup>[23]</sup>, 该方法模拟了病毒在血清中的原始状态,

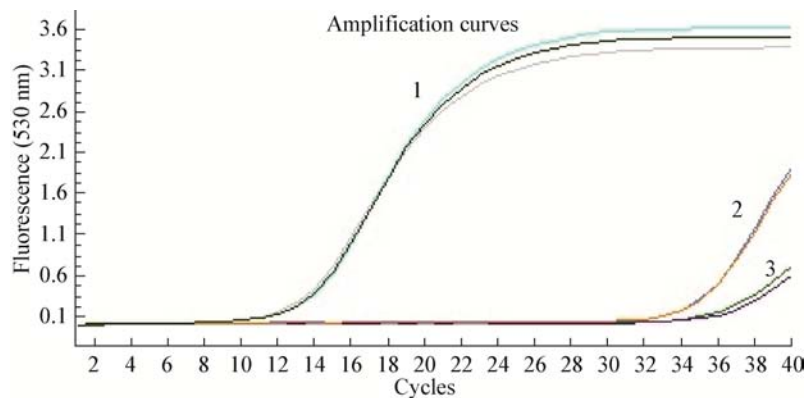


图 5 AR-HAV 中残留质粒实时荧光 PCR 检测结果

Figure 5 Real-time fluorescence PCR of residue plasmid in AR-HAV

注: 1: 阳性对照(pET-QGBHAV); 2: 阴性对照; 3: AR-HAV.

Note: 1: Positive control (pET-QGBHAV); 2: Negative control; 3: AR-HAV.

表 1 AR-HAV 均匀性实验

Table 1 Homogeneity test of AR-HAV

变差源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>F</i> <sub>0.05(9,20)</sub>
Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square		
组间 Between groups	2.54×10 <sup>15</sup>	9	2.82×10 <sup>14</sup>	1.23	2.39
组内 Within groups	4.59×10 <sup>15</sup>	20	2.30×10 <sup>14</sup>		
总和 Total	7.14×10 <sup>15</sup>	29			

表 2 AR-HAV 稳定性实验

Table 2 Stability test of AR-HAV

温度	拟合方程	斜率 <i>b</i> <sub>1</sub>	斜率的不确定度 <i>s</i> ( <i>b</i> <sub>1</sub> )	自由度 n-2	<i>t</i> <sub>0.95,(n-2)</sub>	$ b_1  - t_{0.95,(n-2)} \times s(b_1)$	趋势分析
Temperature (°C)	Linear approximation equation	Slope <i>b</i> <sub>1</sub>	Uncertainty associated with the slope <i>s</i> ( <i>b</i> <sub>1</sub> )	Degrees of freedom n-2			Trend analysis
37	$Y = (-9.65 \times 10^6)X + 1.16 \times 10^8$	$-9.65 \times 10^6$	$2.85 \times 10^6$	2	4.30	$-2.60 \times 10^6 < 0$	No obvious trend
25	$Y = (-5.42 \times 10^5)X + 1.55 \times 10^7$	$-5.42 \times 10^5$	$2.47 \times 10^5$	5	2.57	$-9.35 \times 10^4 < 0$	observed
4	$Y = (-1.40 \times 10^5)X + 1.62 \times 10^7$	$-1.40 \times 10^5$	$9.97 \times 10^4$	4	2.78	$-1.37 \times 10^5 < 0$	
-20	$Y = (-5.30 \times 10^4)X + 1.55 \times 10^7$	$-5.30 \times 10^4$	$4.58 \times 10^4$	4	2.78	$-7.44 \times 10^4 < 0$	
-80	$Y = (3.65 \times 10^4)X + 1.49 \times 10^7$	$-3.65 \times 10^4$	$4.08 \times 10^4$	3	3.18	$-1.66 \times 10^5 < 0$	



但不同个体血清基质的差异对检测存在不同程度的干扰, 既不利于实验室标准化批量制备, 也不适用于食品中 HAV 的检测。

某些病毒如噬菌体的病毒样颗粒可以耐受 RNase 的作用, 目标 RNA 序列包装到这些病毒样颗粒内就可以使其免受环境中 RNase 的降解, 大大提高 RNA 的稳定性, 这也是装甲 RNA 技术的理论基础。噬菌体的宿主范围小, 无生物安全风险, 容易培养和保存, 而且能很好地模拟病毒粒子的结构<sup>[24-26]</sup>, 因此噬菌体成为装甲 RNA 最主要的技术研发工具。现已成功基于 MS2 噬菌体制备了麻疹病毒、丁型肝炎病毒、寨卡病毒等多种病毒的装甲 RNA 作为检测的阳性质控品<sup>[27-29]</sup>。此外, 装甲 RNA 适合标准化批量制备, 可应用于质检、临床、疾控等多个领域。

通过原核表达系统制备装甲 RNA 时极有可能残留质粒 DNA, 将严重影响其作为 RNA 阳性质控品的可信性。本研究通过 DNase I 消化和丙烯葡聚糖凝胶纯化来消除残留质粒 DNA。本实验室前期通过普通 PCR 检测残留质粒 DNA<sup>[14]</sup>, 而本研究基于标准中的引物 HAV1、HAV2 和探针采用灵敏度更高的实时荧光 PCR 方法检测残留质粒, 结果仍未见扩增, 说明制备的 AR-HAV 中无残留质粒。在 GB/T 22287-2008 的实时荧光 RT-PCR 法中, 规定了 3 条 HAV 引物(HAV1、HAV2、HAV3), 其中两条反义引物 HAV2 和 HAV3 均位于 HAV 5'UTR 的保守区域, 二者均具有良好的特异性与代表性, 其扩增产物只存在一个碱基的差异。本研究选取了 HAV1/HAV2 对应的扩增片段作为装甲 RNA 的包装序列, 通用性好, 也避免了同时包装两条高度相似片段引发的样品在定值、均匀性等方面的不确定性。

本研究充分考虑了标准参考样品在保存、运输过程中可能出现的多种温度条件, 设置 25、4、-20、-80 °C 4 个稳定性测试温度, 同时设置 37 °C 作为稳定性的高温挑战实验。结果表明 AR-HAV 在 4 °C 条件下能保存 40 d, -20 °C 条件下能保存 180 d,

-80 °C 条件下能够至少保存 360 d, 在相应时间内未观察到不稳定性, 表明本研究制备的 AR-HAV 标准参考样品拷贝数高、稳定性好, 可在 HAV 的定量检测、仪器设备与新检测方法灵敏度评价等方面开展应用。前期本实验室初步证实了 Q $\beta$  噬菌体制备的装甲 RNA 的稳定性优于 MS2<sup>[14]</sup>, 本研究基于 Q $\beta$  噬菌体制备的 AR-HAV 在 -20 °C 条件下能稳定保存 180 d, 也进一步证实了该结论。虽然 AR-HAV 在 37 °C 条件下的第 9 天后和 25 °C 条件下的第 25 天后表现出不稳定性, 但其拷贝数的数量级均没有变化(数据未发表), 依然可作为普通阳性质控品用于 HAV 定性检测分析。目前大部分基于装甲 RNA 技术的研究多集中在阳性质控品的层面, 本研究按照国家标准的要求进一步评价了 AR-HAV 的均匀性与稳定性, 后续研究中将联合多个实验室进行联合定值, 以期申请国家有证标准样品(Certified reference material, CRM), 为甲肝病毒标准化检测提供安全、稳定的标准样品奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Fang BH, Yue ZQ, Sun T, et al. Risk assessment and genotyping of hepatitis a virus in fruit and vegetable products[J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(4): 484-489 (in Chinese)  
房保海, 岳志芹, 孙涛, 等. 果蔬产品中甲型肝炎病毒风险评估和基因分型研究[J]. 病毒学报, 2016, 32(4): 484-489
- [2] Lanini S, Minosse C, Vairo F, et al. A large ongoing outbreak of hepatitis a predominantly affecting young males in Lazio, Italy; August 2016 - March 2017[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0185428
- [3] Provost K, Dancho BA, Ozbay G, et al. Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8360-8369
- [4] Wu QP, Kou XX, Zhang JM. Foodborne viruses and its detection methods[J]. Microbiology China, 2004, 31(3): 101-105 (in Chinese)  
吴清平, 寇晓霞, 张菊梅. 食源性病毒及其检测方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 101-105
- [5] Lopalco PL, Malfait P, Menniti-Ippolito F, et al. Determinants of acquiring hepatitis a virus disease in a large Italian region in endemic and epidemic periods[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2005, 12(3): 315-321
- [6] Pontrelli G, Boccia D, Di Renzi M, et al. Epidemiological and virological characterization of a large community-wide outbreak of hepatitis a in southern Italy[J]. Epidemiology & Infection, 2008, 136(8): 1027-1034
- [7] Yoon EL, Sinn DH, Lee HW, et al. Current status and strategies for the control of viral hepatitis a in Korea[J]. Clinical and

- Molecular Hepatology, 2017, 23(3): 196-204
- [8] Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7350-7355
- [9] Polo D, Varela MF, Romalde JL. Detection and quantification of hepatitis a virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 193: 43-50
- [10] Li JM. 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 (in Chinese)  
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
- [11] Li JM. Research progress on control products and standards for RNA virus amplification[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2004, 27(12): 873-874 (in Chinese)  
李金明. RNA 病毒扩增检测的质控品和标准品研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(12): 873-874
- [12] Zhang K, Wei YX, Li JM. RNA phage virus-like particle packaging mechanism and its application research progress[J]. Journal of Microbes and Infection, 2008, 3(2): 111-114,123 (in Chinese)  
张括, 魏玉香, 李金明. RNA 噬菌体病毒样颗粒包装机制及其应用研究进展[J]. 微生物与感染, 2008, 3(2): 111-114,123
- [13] Cielens I, Ose V, Petrovskis I, et al. Mutilation of RNA phage Q $\beta$  virus-like particles: from icosahedrons to rods[J]. FEBS Letters, 2000, 482(3): 261-264
- [14] Zhang Q, Yao L, Jiang YH, et al. Development of armored RNA reference material of norovirus based on Qbeta bacteriophage[J]. China Biotechnology, 2018, 38(1): 42-50 (in Chinese)  
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
- [15] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 22287-2008 Detection of hepatitis a virus in shellfish by conventional RT-PCR and real-time fluorescence RT-PCR[S]. Beijing: China Standard Press, 2008 (in Chinese)  
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 22287-2008 贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [16] The State Bureau of Quality and Technical Supervision. JJF 1059-1999 Evaluation and expression of uncertainty in measurement[S]. Beijing: China Measurement Press, 2004 (in Chinese)  
国家质量技术监督局. JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 2004
- [17] Standardization Administration of China. GB/T 15000.3-2008 Directives for the work of reference materials- Reference materials-General and statistical principles for certification[S]. Beijing: China Standard Press, 2008 (in Chinese)  
国家标准化管理委员会. 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]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [18] WHO. WHO position paper on hepatitis a vaccines[J]. Weekly Epidemiological Record, 2012, 28/29(87): 261
- [19] Lemmon SM, Ott JJ, van Damme P, et al. Type a viral hepatitis: a summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention[J]. Journal of Hepatology, 2018, 68(1): 167-184
- [20] Mo XM, Gao DW. SYBR Green I real-time polymerase chain reaction for the detection of HAV in strawberry[J]. Food Science, 2010, 31(14): 153-157 (in Chinese)  
莫雪梅, 高东微. 运用 SYBR Green I 荧光实时 RT-PCR 法检测草莓中甲肝病毒[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 153-157
- [21] Hu Y, Arsov I. A rapid single-tube protocol for HAV detection by nested real-time PCR[J]. Food and Environmental Virology, 2014, 6(3): 189-195
- [22] Wang DY, Fang ZD, Xie CX, et al. Standard construction for detection of rotavirus using the real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Journal of Logistical Engineering University, 2013, 29(4): 66-73 (in Chinese)  
王大勇, 方振东, 谢朝新, 等. 轮状病毒荧光定量 PCR 标准品的构建[J]. 后勤工程学院学报, 2013, 29(4): 66-73
- [23] Saldanha J, Heath A, Lelie N, et al. A World Health Organization International Standard for hepatitis a virus RNA nucleic acid amplification technology assays[J]. Vox Sanguinis, 2005, 89(1): 52-58
- [24] Janner A. Form, symmetry and packing of biomacromolecules. IV. Filled capsids of cowpea, tobacco, MS2 and pariacoto RNA viruses[J]. Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances, 2011, 67(Pt6): 517-520
- [25] Pan Y, Zhang Y, Jia TT, et al. Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles[J]. FEBS Journal, 2012, 279(7): 1198-1208
- [26] ElSawy KM, Caves LSD, Twarock R. The impact of viral RNA on the association rates of capsid protein assembly: bacteriophage MS2 as a case study[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 400(4): 935-947
- [27] Zhang D, Sun Y, Jia TT, et al. External quality assessment for the detection of measles virus by reverse transcription-PCR using armored RNA[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134681
- [28] Karataylı E, Altunoğlu YÇ, Karataylı SC, et al. A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control[J]. Journal of Clinical Virology, 2014, 60(1): 11-15
- [29] Lin GG, 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: 138-144