

内含埃博拉病毒NP基因序列假病毒粒子的构建及应用

赵晓燕¹, 陈金霞², 陆冠亚¹, 祝 贺¹, 龙云凤¹, 叶银波², 白吉山², 姜 焱^{1*}

¹南京海关动植物与食品检测中心, 江苏 南京

²南京农业大学动物医学院, 江苏 南京

收稿日期: 2023年1月5日; 录用日期: 2023年4月3日; 发布日期: 2023年4月13日

摘 要

目的: 构建内含埃博拉病毒(EBOV) NP基因序列的假病毒粒子, 建立EBOV Taqman实时荧光定量PCR检测方法。方法: 对埃博拉病毒的NP基因序列进行分析, 分析基因是否包含重复序列, 复杂二级结构以及高GC含量等; 根据序列分析结果, 合成NP全基因序列, 并将NP基因的序列克隆至慢病毒包装载体pGWLV-pseudovirus中, 转化DH5 α 感受态细胞, 筛选得到阳性克隆pGWLV-NP质粒。将重组质粒转染293T 细胞, 培养48 h后进行除菌, 纯化后获得高纯度假病毒, 通过RT-PCR鉴定该假病毒粒子含有EBOV NP基因。通过荧光定量qPCR对假病毒颗粒进行计数后, 利用本研究所获得的假病毒颗粒制备用于EBOV核酸检测的标准品。结果: 建立了基于EBOV NP基因的Taqman荧光定量PCR检测方法。本研究建立的基于包含NP基因的EBOV假病毒核酸cDNA的Taqman荧光定量PCR检测方法的Ct值与核酸cDNA标准品 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ 个/ μ L范围内呈良好的线性关系, 相关系数可达到0.99。结论: 该方法所用标准品模拟了真实病毒粒子的结构, 无生物传染性, 经检测均匀性和稳定性良好, 可作为EBOV核酸检测的阳性标准质控品, 实现对核酸检测的全程监控。

关键词

埃博拉假病毒, NP基因, 荧光定量PCR

Construction and Application of Pseudovirions Containing Ebola Virus NP Gene Sequence

Xiaoyan Zhao¹, Jinxia Chen², Guanya Lu¹, He Zhu¹, Yunfeng Long¹, Yinbo Ye², Jishan Bai², Yan Jiang^{1*}

¹Plant and Food Testing Center, Nanjing Customs Animal, Nanjing Jiangsu

*通讯作者。

文章引用: 赵晓燕, 陈金霞, 陆冠亚, 祝贺, 龙云凤, 叶银波, 白吉山, 姜焱. 内含埃博拉病毒NP基因序列假病毒粒子的构建及应用[J]. 生物医学, 2023, 13(2): 211-218. DOI: 10.12677/hjbm.2023.132024

Abstract

Objective: To construct pseudovirion containing Ebola virus (EBOV) NP gene sequence and establish EBOV Taqman real-time fluorescence quantitative PCR detection assay. **Methods:** The NP gene sequence of EBOV was analyzed to determine whether the gene contained repetitive sequence, complex secondary structure and high GC content, based on the sequence analysis results, the NP gene sequence was synthesized and cloned into lentivirus packaging vector PGWLV-pseudovirus, transformed into DH5 α competent cells and screened to obtain a positive clone of pGWLV-NP plasmid. The recombinant plasmid was transfected into 293T cells, cultured for 48 h, and purified to obtain a high purity pseudovirus, which was identified by RT-PCR as containing the EBOV NP gene. After counting pseudovirus particles by fluorescence quantitative qPCR, the pseudovirus particles obtained in this study were used to prepare standards for EBOV nucleic acid detection. **Results:** A Taqman real-time PCR method based on EBOV NP gene was established. In this study, the *Ct* values of Taqman fluorescence quantitative PCR method based on cDNA of EBOV pseudovirus containing NP gene showed a good linear relationship with cDNA standard nucleic acid in the range of $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L, and the correlation coefficient could reach 0.99. **Conclusion** The standard substance used in this method simulates the structure of real virions, has good uniformity and stability after detection, and can be used as positive standard quality control substance for EBOV nucleic acid detection, realizing the whole process monitoring of nucleic acid detection.

Keywords

Ebola Virus, NP Gene, Fluorescence Quantitative qPCR

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)曾称埃博拉出血热(Ebola haemorrhagic fever, EHF),是由埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)导致人和非人灵长类动物(如猩猩和猴子)发生急性感染的烈性出血性传染病,是一种人畜共患传染病,严重威胁人类公共卫生安全。临床上主要以多脏器损害、发热、出血和腹泻为特征,是人类历史上最致命的病毒性疾病之一,具有极高的传染性和致死率(50%~90%) [1] [2]。

埃博拉疫情首次于 1976 年在非洲两个相邻国家苏丹(现在的南苏丹)和扎伊尔(现在的刚果民主共和国)同期独立暴发,随后在非洲东部和中部的刚果民主共和国、刚果共和国、乌干达和加蓬继续零星出现或重新出现[3]。2013 年至 2016 年,埃博拉病毒首次出现在西非,这是有史以来规模最大、持续时间最长和最致命的一次埃博拉疫情暴发,疫情波及 10 个国家[4]。EBOV 是单股负链、有包膜、非截断 RNA 病毒,属丝状病毒科[5],其基因组大约 19 kb,可编码 7 个结构蛋白[6]。埃博拉病毒病的潜伏期为 2 天至 21 天,疾病进程很快,一般情况下,病人出现明显症状后才具有传染性[7] [8],因此及时准确地诊断

是防控该病的重要措施。核酸检测是病毒引发的传染性早期诊断的金标准, 主要包括聚合酶链式反应技术(PCR)和核酸分子杂交技术, 针对 RNA 病毒, 是在 PCR 基础上增加了逆转录步骤(RT), 把病毒 RNA 通过逆转录酶转录为 cDNA, 在进行扩增, 过程包括样本采集、病毒 RNA 提取、RNA 逆转录为 cDNA、PCR 扩增及结果分析等, 其中, 病毒内 RNA 的提取率、逆转录效果均会影响结果的准确性, 因此在检测的整个过程中, 需使用一个安全稳定的质控品, 以保证检测结果的准确可靠[9] [10]。本研究通过分析埃博拉病毒 NP 基因序列, 利用分子生物学方法合成 NP 基因, 通过细胞转染, 构建了含埃博拉病毒 NP 基因的假病毒颗粒, 基于该假病毒 NP 基因建立了 Taqman 实时荧光定量检测方法。该病毒颗粒稳定性好, 无生物传染性, 作为埃博拉核酸检测的标准质控品, 可实现对检测全过程的质量控制。

2. 材料与方法

2.1. 载体、基因

pGWLV-pseudovirus 载体、埃博拉病毒 NP 基因由金唯智进行分析及合成。

2.2 主要试剂

DH5 α 感受态细胞、Pfu Polymerase 由苏州金唯智提供; AMV 反转录酶、RNase 抑制剂、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、均购自 TaKaRa 公司; 无内毒素质粒大量制备试剂盒购自诺唯赞公司提供; 293T 细胞由中科院细胞库提供; DMEM、MEM、FBS、D-PBS 购自 Hyclone。

2.3. 引物设计

根据 GenBank 中发表的埃博拉病毒 NP 基因序列, 金唯智公司合成 NP 基因的全序列, 同时利用 Oligo 6 软件设计一对引物用于阳性克隆的筛选, 引物命名为 NPF/NPR, 扩增的片段 538bp, 用于鉴定检测 EBOV NP 基因。同时设计合成 EBOV NP 基因 RT-PCR 以及实时荧光定量 PCR 检测所用引物和探针。所有引物及探针序列见表 1。

2.4. RT-PCR 鉴定 EBOV 假病毒的方法

根据对 Genbank 中不同基因型的 EBOV NP 基因的分析, 选择相对保守的序列用于 RT-PCR 的鉴定与检测, 检测的目的条带为 538bp。

2.5. EBOV NP 基因的克隆

对目的基因序列进行分析, 分析基因是否包含重复序列, 复杂二级结构, GC 含量等; 根据序列分析结果, 利用苏州金唯智自主设计的 oligo 设计软件进行设计并合成; 利用 PCR 方法将全长为 2972bp 的完整 NP 基因克隆至 pGWLV-pseudovirus 中; 转化 DH5 α 感受态细胞; 通过测序和 PCR 鉴定筛选获得阳性克隆质粒。

2.6. 无内毒素质粒大量制备

阳性克隆经过扩大培养后, 用无内毒素质粒大量制备试剂盒进行质粒的大量制备, 无内毒素质粒抽提试剂盒购自诺唯赞公司。

2.7. 假病毒的包装与鉴定

复苏 293T 细胞, 并传至 P3-P4 代; 按照病毒包装系统进行细胞转染; 然后 48 h 后收集病毒; 对病毒进行除菌, 浓缩, 去除残留质粒和纯化后再次进行除菌操作; 取 50 μ L 病毒原液提取病毒 RNA, 通过

PCR 检测反转录产物来验证含 NP 基因的假病毒。

2.8. 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

2.8.1. 假病毒标准阳性 cDNA 的制备

按照 QIAGEN 公司的病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit 进行假病毒 RNA 的提取, 利用 QIAGEN 反转录酶进行反转录, 获得高纯度的 EBOV NP 基因的 cDNA 溶液。将 cDNA 用紫外分光仪测定其 260 nm/280 nm 的值, 通过相对分子质量计算出其拷贝数, 经 10 倍系列稀释获得备用 EBOV NP 假病毒标准品($10^9 \sim 10^1$ copies/ μL)。

2.8.2. 实时荧光定量 RT-PCR 反应体系及条件的优化

采用 20 μL 反应体系: HR qPCR Master Mix(2 \times)10 μL , 探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μL , 上、下游引物(10 μmol) 各 0.4 μL , cDNA 标准品模板 1 μL , Rnase free H₂O 补足 20 μL 。反应程序: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s, 退火温度根据引物 T_m 值设置为 58 $^\circ\text{C}$ 、59 $^\circ\text{C}$ 、60 $^\circ\text{C}$ 进行荧光定量 PCR 试验, 优化退火温度, 退火时间 30 s, 40 个循环, 每个循环结束后进行荧光信号的采集。利用 cDNA 系列标准品所获得的 Ct 值作为定量参数对不同稀释度所含模板拷贝数的对数值做线性回归, 绘制标准曲线, 获得标准回归方程。将病毒样颗粒测定的 Ct 值引入标准回归方程, 计算获得其核酸拷贝数。

2.9. 假病毒 cDNA 中质粒残留的检测

随机分别抽取 10 管制备的标准物质, 提取 RNA, 通过利用质粒 PUC57-NP 建立的标准品建立的检测方法, 见图 1, 对抽取的假病毒进行质粒残留的检测, 获取 Ct 值, 数据采用单因子方差分析进行统计处理。

Table 1. Primer sequence used in this study

表 1. 本研究中所用引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	应用
NP 538bpF	GAGTATGCTCCTTTTCGC	RT-PCR
NP 538bpR	TTTGGTATTCGCCGTAG	RT-PCR
ZEBOV-NP-FQ	TTCCCTTTCCAGGACCCATC	RT-qPCR
ZEBOV-NP-RQ	TCGGGAATGGTCGTATCCTG	RT-qPCR
ZEBOV-NP-FAM-P	CCTGGCCATCAAGATGATGATCCGACT	RT-qPCR probe

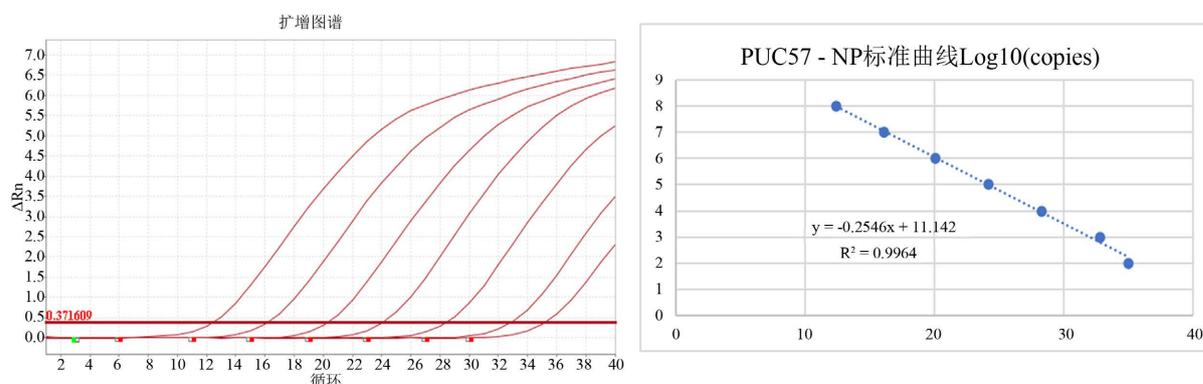


Figure 1. Establishment of standard curve with PUC57-NP plasmid as standard

图 1. PUC57-NP 质粒为标准品建立标准曲线

3. 结果

3.1. pGWLV-NP 质粒的构建和鉴定

根据 NCBI 发表的序列进行人工合成 NP 基因，经过酶切连接转化筛选阳性克隆 pGWLV-NP，经过 PCR 方法和酶切鉴定，与预期结果相符，结果见图 2 和图 3。

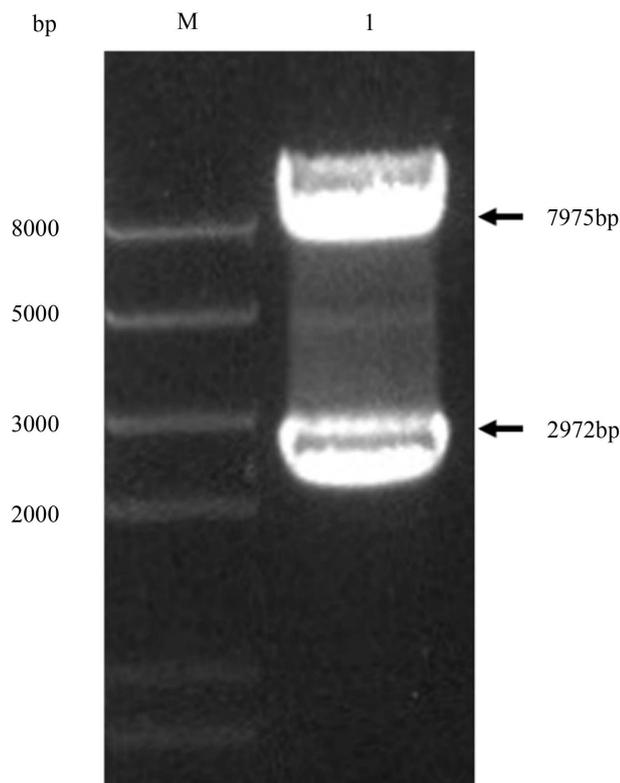


Figure 2. Digestion identification of pGWLV-NP recombinant plasmid

图 2. pGWLV-NP 重组质粒的酶切鉴定

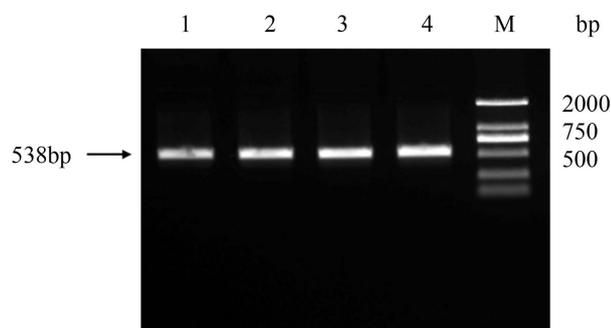


Figure 3. PCR identification of pGWLV-NP recombinant plasmid NP gene

图 3. pGWLV-NP 重组质粒 NP 基因 PCR 鉴定

3.2. 病毒样颗粒作为 EBOV 核酸检测标准品的制备

经过病毒包装并反转录后，将不同稀释度的 cDNA 制备为标准品，同时进行假病毒 cDNA 的 NP 基

因的 RT-PCR 鉴定。结果显示如图 4，在假病毒颗粒稀释至 $10^9 \sim 10^2$ copies/ μL ，所设计的鉴定引物能够在假病毒颗粒的 cDNA 中检测到 NP 基因，并且大小正确。

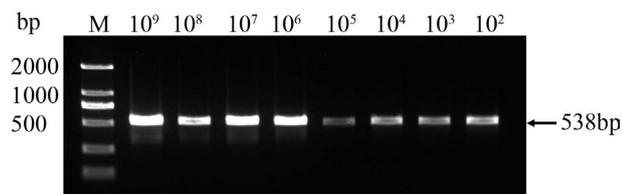


Figure 4. Identification of NP gene by pseudovirus RT-PCR
图 4. 假病毒 RT-PCR 鉴定 NP 基因

3.3. 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

根据假病毒 cDNA 制备的系列倍比稀释的标准品进行标准曲线的绘制，建立基于埃博拉假病毒 NP 基因的实时荧光定量检测方法。结果见图 5。与图 3 对照可以发现，在 $10^4 \sim 10^2$ copies/ μL 时，RT-PCR 结果条带显示亮度差异不大，与荧光定量 PCR 中结果一致，同样的稀释倍数下的 C_t 值差异不大，因此在标准曲线建立时该稀释倍数仅保留一个 C_t 平均值即可。可以看出该标准品线性关系良好，标准曲线方程为 $y = -0.217x + 12.432$ 。相关系数 $R^2 = 0.9928$ 。

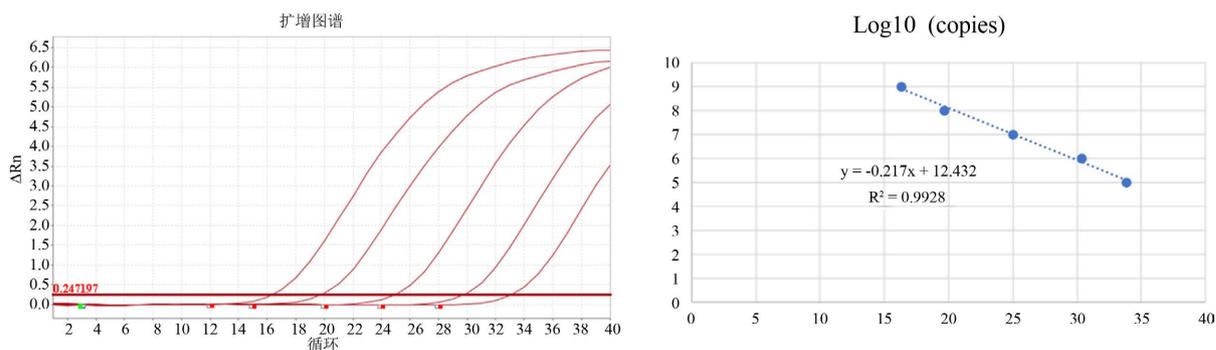


Figure 5. Fluorescence quantitative RT-PCR detection of 10-fold gradient diluted cDNA standard and establishment of standard curve

图 5. 荧光定量 RT-PCR 对 10 倍梯度稀释 cDNA 标准品的检测和标准曲线的建立

3.4. 假病毒中质粒残留的检测

随机抽取标准品 10 管，提取 RNA，利用 PUC57-NP 建立的检测方法进行实时荧光 RT-PCR 检测，对获得 C_t 值进行残留质粒拷贝数的计算，结果表明，根据 1 mL 中假病毒液中残留质粒拷贝数与 1 mL 中病毒液中病毒颗粒拷贝数的百分比是 0.04%。见表 2。

Table 2. Percentage of plasmid residues in pseudovirus

表 2. 假病毒中质粒残留百分比

样品名称	1 mL 病毒液中病毒颗粒拷贝数	1 mL 病毒液中质粒残留拷贝数	百分比
内含 NP 基因的假病毒液	4.12E+09	9.26E+06	0.02%

4. 讨论

假病毒的研究是基于现在逆转录病毒载体的应用，伴随着重组病毒表达技术、哺乳动物细胞蛋白表

达技术的提高而发展起来[11]。目前,多采用质粒共转染哺乳动物细胞系的方法进行假病毒的包装生产,多质粒通过特定转染方法进入细胞,在胞内进行复制、表达组装成含有报告基因的假病毒,通过纯化的方法获得高纯度的假病毒[12]。假病毒一般选用非病毒自身核酸或病毒核酸分子中编码衣壳蛋白的基因被报告基因修饰取代,被包膜蛋白包裹后形成具有感染性的病毒样颗粒,但这种病毒样颗粒丧失了病毒的自我复制能力,只能进行一个细胞周期的侵染,因而具有很高的生物安全性[13][14]。

目前,新发突发传染病和烈性病原体是公共卫生领域研究的热点和难点。2014年暴发的埃博拉病毒(EBOV),也称为出血热,在几内亚、利比里亚和塞拉利昂等西非国家广泛传播,引起了全世界的关注[15]。目前,该病毒的病原学、致病机制等尚未完全认识清楚,且研究上述病毒所需实验室的生物安全等级要求高,缺少经济有效的动物模型等因素,限制了针对此类病毒的药物和疫苗研发。为降低高致病性病毒的生物风险,而在我国,目前没有感染病例,在出入境检验检疫方面缺乏多种对EBOV有效的检测方法,对于该烈性传染病进入我国的防控方面具有一定的风险漏洞,因此可通过构建假病毒的方法来研究EBOV的致病机制以及建立经济有效的检测方法,对这种烈性传染病的防控做到有备无患。

本研究中利用EBOV的核衣壳蛋白NP的编码基因用于EBOV假病毒的包装以及后续RT-PCR和荧光定量PCR的检测目的基因。NP是埃博拉病毒的复制循环中的重要蛋白——核糖核蛋白复合物的亚基,其主要功能是保护病毒RNA免于被降解,保证病毒基因组在装配过程中正确进入到病毒粒子的衣壳中[16]。比较了死于埃博拉出血热的病人和幸存病人的免疫反应后发现幸存病人血液中,早期会出现升高的识别病毒NP和VP40蛋白的IgG,随后血液中的病毒抗原被清除;相反,致死性感染的特征是减弱的体液反应、缺乏特异性的IgM和基本检测不到IgM[17]。本研究中,通过对扎伊尔型(ZEBOV)的NP基因进行序列分析合成后,将该基因克隆至假病毒包装载体后,进行包装骨架质粒和辅助质粒的共转染,在获得高纯度的假病毒后,根据genwise提供的检测方法,对假病毒的病毒颗粒数进行了计算确定,在此基础上,病毒颗粒数10倍梯度稀释至 $10^9\sim 10^1$ copies/mL,提取病毒核酸RNA后,在进行RT-PCR鉴定NP基因的同时利用系列病毒核酸标准品进行Taqman实时荧光定量PCR的标准曲线的建立。同时利用PUC57-NP质粒建立的Taqman实时荧光定量检测方法对假病毒颗粒中的质粒残留进行了检测。结果表明,本研究成功构建并获得了高纯度的内含ZEBOV NP基因的假病毒,并利用该假病毒颗粒的核酸建立了具有生物安全性、灵敏性、重复性、高反应效率的Taqman实时荧光定量检测方法,在该检测方法中利用的假病毒颗粒中质粒残留仅占0.02%,说明本研究所采用假病毒建立的Taqman荧光定量检测方法具有可行性。

本研究中制备的EBOV假病毒标准品对于目前EBOV在我国面对的防控形势而言具有很大的应用前景,具有安全、无生物污染性的优点,只包含病毒的部分片段,不具备病毒复制增殖能力;在不具备全部病毒基因组的条件下,最大程度上模拟了天然病毒的特性,可与临床样本一样,实现对核酸提取和扩增的质控标准,与天然病毒本身的裸露RNA不同,假病毒提取的标准品具有较强的稳定性,利于保存,确保检测结果的真实可靠,在相关检验检疫部门中有望推广应用。

基金项目

海关总署科研项目(计划编号:2021HK158)。

参考文献

- [1] Hartlieb, B. and Weissenhorn, W. (2006) Filovirus Assembly and Budding. *Virology*, **344**, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.018>
- [2] Heymann, D.L., Weisfeld, J.S., Webb, P.A., et al. (1980) Ebola Hemorrhagic Fever: Tandala, Zaire, 1977-1978. *The Journal of Infectious Diseases*, **142**, 372-376. <https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.372>

- [3] (1978) Ebola Haemorrhagic Fever in Zaire, 1976. *Bulletin of the World Health Organization*, **56**, 271-293.
- [4] (1978) Ebola Haemorrhagic Fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bulletin of the World Health Organization*, **56**, 247-270.
- [5] Noda, T., Hagiwara, K., Sagara, H., *et al.* (2010) Characterization of the Ebola Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Journal of General Virology*, **91**, 1478-1483. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019794-0>
- [6] Gire, S.K., Goba, A., Andersen, K.G., *et al.* (2014) Genomic Surveillance Elucidates Ebola Virus Origin and Transmission during the 2014 Outbreak. *Science*, **345**, 1369-1372. <https://doi.org/10.1126/science.1259657>
- [7] Baiyewu, O. (2014) Outbreak of Ebola Virus Disease in the West Africa. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, **43**, 84.
- [8] Feldmann, H. (2014) Ebola—A Growing Threat? *The New England Journal of Medicine*, **371**, 1375-1378. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1405314>
- [9] 林婧, 胡啟龙, 王尚君, 等. 假病毒标准物质在传染性病毒核酸检测质量控制中的应用[J]. 计量与测试技术, 2021, 48(2): 1-2+5.
- [10] 邓俊花, 林祥梅, 吴绍强. 假病毒在 RNA 病毒检测中的应用研究进展[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(11): 67-69.
- [11] WalkerPeach, C.R., Winkler, M., DuBois, D.B., *et al.* (1999) Ribonuclease-Resistant RNA Controls (Armored RNA) for Reverse Transcription-PCR, Branched DNA, and Genotyping Assays for Hepatitis C Virus. *Clinical Chemistry*, **45**, 2079-2085. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.12.2079>
- [12] Mattiuzzo, G., Ashall, J., Doris, K.S., *et al.* (2015) Development of Lentivirus-Based Reference Materials for Ebola Virus Nucleic Acid Amplification Technology-Based Assays. *PLOS ONE*, **10**, e142751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142751>
- [13] Li, Q., Liu, Q., Huang, W., *et al.* (2018) Current Status on the Development of Pseudoviruses for Enveloped Viruses. *Reviews in Medical Virology*, **28**, e1963. <https://doi.org/10.1002/rmv.1963>
- [14] Pasloske, B.L., Walkerpeach, C.R., Obermoeller, R.D., *et al.* (1998) Armored RNA Technology for Production of Ribonuclease-Resistant Viral RNA Controls and Standards. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 3590-3594. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.12.3590-3594.1998>
- [15] Kreuels, B., Wichmann, D., Emmerich, P., *et al.* (2014) A Case of Severe Ebola Virus Infection Complicated by Gram-Negative Septicemia. *The New England Journal of Medicine*, **371**, 2394-2401. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1411677>
- [16] Baize, S., Leroy, E.M., Georges-Courbot, M.C., *et al.* (1999) Defective Humoral Responses and Extensive Intravascular Apoptosis Are Associated with Fatal Outcome in Ebola Virus-Infected Patients. *Nature Medicine*, **5**, 423-426. <https://doi.org/10.1038/7422>
- [17] Piercy, T.J., Smither, S.J., Steward, J.A., *et al.* (2010) The Survival of Filoviruses in Liquids, on Solid Substrates and in a Dynamic Aerosol. *Journal of Applied Microbiology*, **109**, 1531-1539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04778.x>