

内含埃博拉病毒GP基因序列假病毒粒子的构建及应用

龙云凤¹, 陈金霞², 祝 贺¹, 陆冠亚¹, 赵晓燕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: 2024年1月29日; 录用日期: 2024年2月23日; 发布日期: 2024年2月29日

摘 要

目的: 构建内含埃博拉病毒(EBOV) GP基因序列的假病毒粒子, 针对EBOV GP基因建立实时荧光定量PCR检测方法。方法: 人工合成GP基因序列, 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-GP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 GP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 GP基因的Taqman荧光定量PCR检测方法。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, GP基因, 荧光定量PCR

Construction and Application of Pseudovirions Containing Ebola Virus GP Gene Sequence

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

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

²College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu

Received: Jan. 29th, 2024; accepted: Feb. 23rd, 2024; published: Feb. 29th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 龙云凤, 陈金霞, 祝贺, 陆冠亚, 赵晓燕, 叶银波, 白吉山, 姜焱. 内含埃博拉病毒GP基因序列假病毒粒子的构建及应用[J]. 临床医学进展, 2024, 14(2): 4706-4713. DOI: 10.12677/acm.2024.142651

Abstract

Objective: To construct pseudovirion containing Ebola virus (EBOV) GP gene sequence and establish EBOV Taqman real-time fluorescence quantitative PCR detection assay. **Methods:** The GP 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-GP 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 GP 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 GP gene was established. **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.

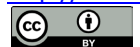
Keywords

Ebola Virus, GP Gene, Fluorescence Quantitative PCR

Copyright © 2024 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)也称为埃博拉出血热(Ebola haemorrhagic fever, EHF),是由丝状病毒科埃博拉病毒属的埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)引起人和非人灵长类动物(如猩猩和猴子)发生急性感染的一种人兽共患传染病。EVD 的临床症状主要有发热、出血、腹泻以及多脏器损害,因其具有较高的传染性和致死率(50%~90%) [1] [2],世界卫生组织分别将 2014 年西非埃博拉疫情和 2019 年刚果(金)埃博拉疫情列为“国际关注的突发公共卫生事件” [3] [4]。

EVD 导致的发热、头痛以及身体虚弱等早期症状,并不是感染埃博拉病毒所特有的症状,这些症状与非洲当地频发的疟疾、伤寒等疫病的症状相似,因此 EVD 的早期临床诊断非常困难[5] [6]。对于疑似 EVD 的急性患者,首选的诊断方法是对血液样本中埃博拉病毒单个或多个基因进行基因扩增检测,实时荧光定量 PCR 方法因其具有操作简便、反应快速、灵敏度和特异性高等特点而被广泛应用于各类病原的实验室检测中,在进行实时荧光 PCR 实验时均会设置阳性对照和阴性对照来保证结果的可靠性,其中阳性对照是核酸检测过程中监控核酸提取过程和判断扩增反应有效性的重要参考物质,而目前大多数 PCR 方法检测中常用含有目的基因的质粒作为阳性对照,重组质粒的使用极容易在操作过程中引起气溶胶污染,造成假阳性结果的出现[7]。另外,针对 RNA 病毒的检测,需在 PCR 基础上增加逆转录过程,即需先将病毒 RNA 逆转录为 cDNA 后再进行扩增,因此样本病毒 RNA 的提取率和逆转录过程会对最终的扩增结果准确性产生直接影响。因此,针对 RNA 病毒开展 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测时,为了准确评价检测结果的准确性,设置既能监控核酸制备过程,又能参与核酸扩增过程的阳性对照是较为科学的。

本研究利用分子生物学技术针对埃博拉病毒构建了包含其 GP 基因的假病毒粒子,并建立了实时荧光 RT-PCR 检测方法。EBOV GP 基因假病毒粒子是一种嵌合型病毒颗粒,既保证了生物安全性、稳定性,

又能够最大限度的模拟真实病毒的物理结构, 可以实现 RT-PCR 检测的全流程质量控制。建立的 GP 基因实时荧光 RT-PCR 方法具有良好的敏感性和特异性, 对临床样本的初步检测应用结果证明该方法可为埃博拉病毒病的防控提供技术支撑。

2. 材料与方法

2.1. 主要试剂

pGWLV-pseudovirus 载体购自金唯智生物科技有限公司提供; DH5 α 感受态细胞为本实验保存; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、AMV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; AccurSTART U⁺ One Step RT-qPCR Probe Kit (FOR FAST)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒大量制备试剂盒(去内毒素)购自 Merck 公司; 293T 细胞购自中科院细胞库; DMEM、MEM、FBS、D-PBS 购自 Gibco 公司; QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司。

2.2. 引物设计

根据 GenBank 中埃博拉病毒序列(登录号: KJ660346.2), 委托苏州金唯智生物科技有限公司合 GP 基因全长序列并克隆至 pUC57 载体中, 针对该基因保守区域设计并合成 PCR 鉴定引物 GPF/GPR, 扩增片段长度为 396 bp, 用于载体构建时的阳性克隆筛选和鉴定, 同时设计并合成一套实时荧光 RT-PCR 的引物和探针, 用于检测方法的建立, 详细序列信息见表 1。

2.3. pGWLV-pseudovirus-GP 重组载体构建

将人工合成的 GP 基因克隆至 pGWLV-pseudovirus, 转化 DH5 α 感受态细胞, 抗性筛选后挑取单菌落摇菌培养后, 采用 PCR、酶切进行鉴定后, 再进行测序确认。

2.4. 无内毒素质粒大量制备

将 pGWLV-pseudovirus-GP 重组质粒阳性克隆菌扩大培养后, 提取质粒, 测定质粒浓度, 及时转染或保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

2.5. 假病毒的制备与鉴定

取对数生长期的 293T 细胞, 提前 1 d 接种至 6 孔板, 观察细胞密度(%汇合度)达到 60%~80%时按照假病毒包装系统进行细胞转染; 转染后每天观察细胞状态, 于 48 h 后收集培养液, 反复冻融 3 次裂解细胞, 离心去除细胞碎片, 进行除菌、浓缩后取 50 μ L 培养液提取病毒 RNA, 通过 PCR 检测反转录产物来验证假病毒构建结果。

2.6. 假病毒颗粒拷贝数测定

使用假病毒载体标准品(10^3 拷贝数/ μ L- 10^{10} 拷贝数/ μ L), 构建标准曲线。取一定体积的假病毒培养液提取核酸后逆转录为 cDNA 后, 使用定量荧光 PCR 方法对假病毒颗粒拷贝数进行定值。

2.7. 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用

2.7.1. 实时荧光 RT-PCR 反应体系及条件的优化

根据一步法实时荧光 RT-PCR 反应试剂, 采用 20 μ L 体系, 依次加入 5 \times One Step U⁺ Mix 4 μ L、One Step U⁺ Enzyme Mix、探针(10 μ mol/L) 0.2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol)各 0.4 μ L, RNA 模板 1 pg~1 μ g, 用 RNase-free H₂O 补足至 20 μ L。反应程序: 逆转录 55 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 扩增阶段(95 $^{\circ}$ C 变性

10 s, 60°C退火 30 s), 扩增设置 40 个循环, 每个循环结束后进行荧光信号的采集。

2.7.2. 实时荧光 RT-PCR 敏感性评价

将 1.7 中定值的假病毒进行十倍倍比稀释后进行实时荧光 RT-PCR 检测, 评价方法的敏感性。

2.7.3. 实时荧光 RT-PCR 特异性评价

方法特异性通过检测实验室保存的猴 D 型逆转录病毒(SRV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)和伪狂犬病病毒(PRV)四种病原核酸来进行评价。

2.7.4. 临床应用

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对实验室收集保存的 30 份猴血清和 20 份小鼠血清进行埃博拉病毒核酸检测, 通过在临床样品中添加适量 GP 基因假病毒颗粒制备 5 份阳性模拟样品进行检测。

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
GP 396F	GCAAGTGGGAAGAGGAG	RT-PCR
GP 396R	CACGGGTGTATTATGGGT	RT-PCR
ZEBOV-GP-FQ	AGCTGTATCAAACGGACCCA	RT-qPCR
ZEBOV-GP-RQ	CTCGTGGAGATTGTGGCAAG	RT-qPCR
ZEBOV-GP-P	CGCGCCGGACTCTGACCACT	RT-qPCR probe

3. 结果

3.1. pGWLV-GP 质粒的构建和鉴定

将人工合成的 GP 基因克隆至 pGWLV 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 抗性筛选后挑取单菌落摇菌培养后, 提取质粒采用 PCR、酶切进行鉴定后, 鉴定结果见图 1 和图 2, 双酶切得到的 DNA 片段大小与预期相符, PCR 扩增片段长度与靶基因大小一致, 说明成果构建了 pGWLV-GP 重组质粒。

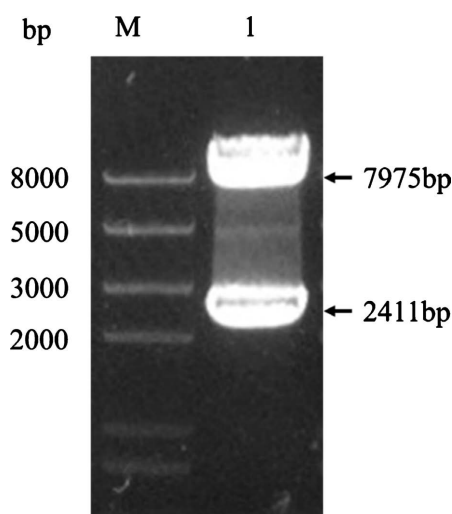


Figure 1. Digestion identification of pGWLV-NP recombinant

图 1. pGWLV-GP 重组质粒的酶切鉴定

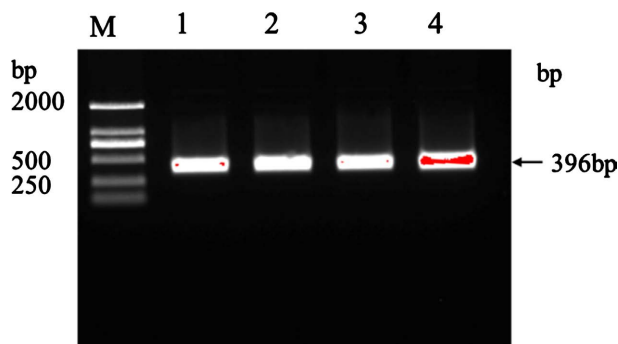


Figure 2. PCR identification of pGWLTV-GP recombinant plasmid GP gene
图 2. pGWLTV-GP 重组质粒 GP 基因 PCR 鉴定

3.2. GP 基因假病毒的鉴定

取转染后的细胞培养液，提取病毒 RNA 后逆转录为 cDNA，测定 cDNA 拷贝数，进行 10 倍系列稀释后采用 PCR 方法进行检测，结果显示，在假病毒 cDNA 稀释至 $10^9 \sim 10^2$ copies/ μL ，采用 GP 基因 PCR 鉴定引物均能扩增出单一、片段大小正确的条带，结果见图 3，说明成功制备内含 GP 基因的假病毒粒子。

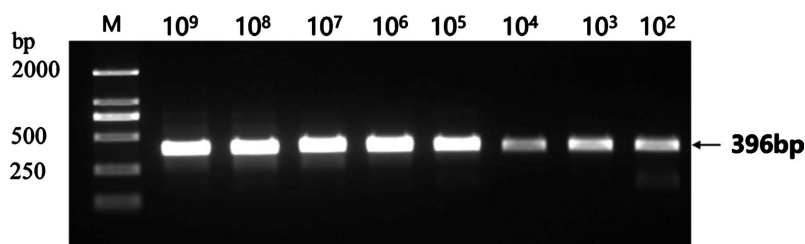


Figure 3. Identification of GP gene by pseudovirus RT-PCR
图 3. 假病毒 RT-PCR 鉴定 GP 基因

3.3. 假病毒颗粒拷贝数的检测

取 50 μL 病毒原液提取病毒 RNA，使用 21 μL 无菌水洗脱，取 7 μL 进行逆转录，逆转录反应体积为 20 μL ，后稀释 5 倍至 100 μL ，通过定量 PCR 检测逆转录产物 CT 值为 20.83，拷贝指数为 5.98，根据标曲(见图 4)计算病毒颗粒数。每 mL 病毒颗粒拷贝数 = $10^{\text{指数}} \times 100$ (逆转录产物总体积 100 $\mu\text{L}) \times 3$ (基因组产物洗脱体积为 21，取 7 μL 进行逆转录) $\times 20$ (病毒液提取基因组体积为 50 $\mu\text{L})/2$ (病毒基因组为双拷贝)，计算获得假病毒颗粒拷贝数为：2.88E+09 个/mL。

样品名称	拷贝数	CT-Mean
RRE-标准品-7	1.00E+07	17.65
RRE-标准品-6	1.00E+06	20.07
RRE-标准品-5	1.00E+05	23.23
RRE-标准品-4	1.00E+04	27.05
RRE-标准品-3	1.00E+03	30.50
RRE-标准品-2	1.00E+02	34.86

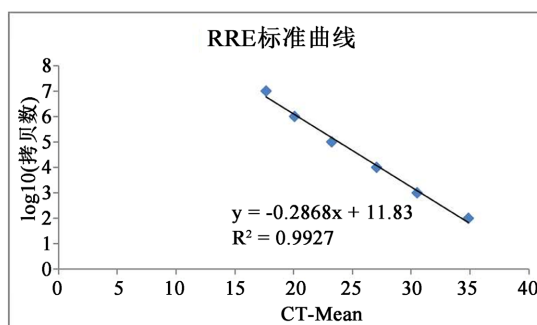


Figure 4. Standard and amplification curve
图 4. 标准品及样本扩增曲线

3.4. 实时荧光 RT-PCR 敏感性结果

将已知拷贝数的假病毒病毒液进行倍比稀释(10 倍梯度稀释成 9 个浓度), 对 $2.88 \times 10^7 \sim 2.88 \times 10^{-1}$ 拷贝/ μL 的稀释样品进行荧光 RT-PCR 检测, 结果见图 5, 本试验建立的埃博拉病毒实时荧光 RT-PCR 方法最低能检测到 2.88×10^1 拷贝/ μL 。

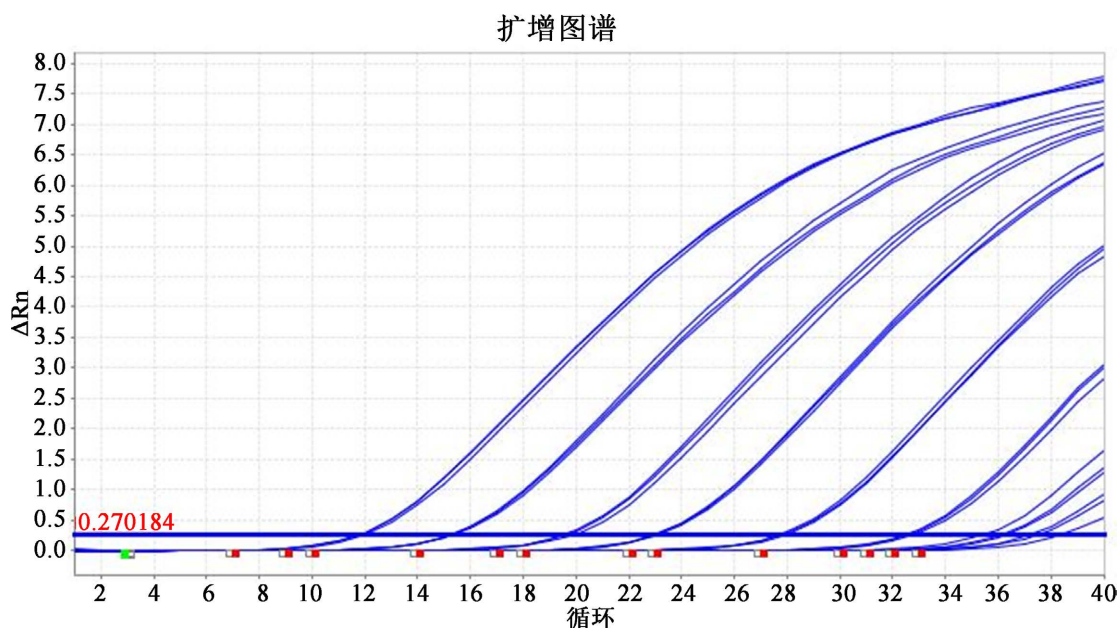


Figure 5. Sensitivity result of Real-time RT-PCR
图 5. 实时荧光 RT-PCR 敏感性结果

3.5. 实时荧光 RT-PCR 特异性结果

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对 SRV、PRRSV、CSFV、PRV 进行检测, 均没有出现特异性扩增, 证明该方法具有良好的特异性。

3.6. 临床应用结果

采用建立的实时荧光 RT-PCR 方法对 50 份临床血清进行埃博拉病毒核酸检测, 检测结果见图 6, 5 份模拟阳性样品均检出, 其余样本检测结果均为阴性, 说明建立的埃博拉实时荧光 RT-PCR 方法具有良好的应用前景。

4. 讨论

埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)是一种具有高病死率和显著流行潜力的烈性人畜共患传染病 [8] [9], 埃博拉病毒病的暴发和流行, 不仅会给人类健康带来严重威胁, 也对社会的经济发展造成了巨大的损失。我国虽然目前还未发现埃博拉病毒的感染病例, 但我国有适宜宿主生存的环境, 随着我国“一带一路”战略的实施, 国家间经贸往来日益频繁, 因此埃博拉病毒随时都有可能传入我国, 对我国人民健康和畜牧业发展的威胁日益加剧, 及时准确的实验室诊断是控制传染源、避免疫情发生和扩散的重要手段, 因此针对埃博拉病毒开展检测技术相关研究是非常必要的。

假病毒是一种具有复制缺陷的嵌合型病毒, 是在一种复制缺陷的病毒载体内部包被外源性核酸片段, 并在病毒表面表达另外一种病毒的重组糖蛋白的嵌合型病毒粒子, 同时具备生物安全性和稳定性, 又能

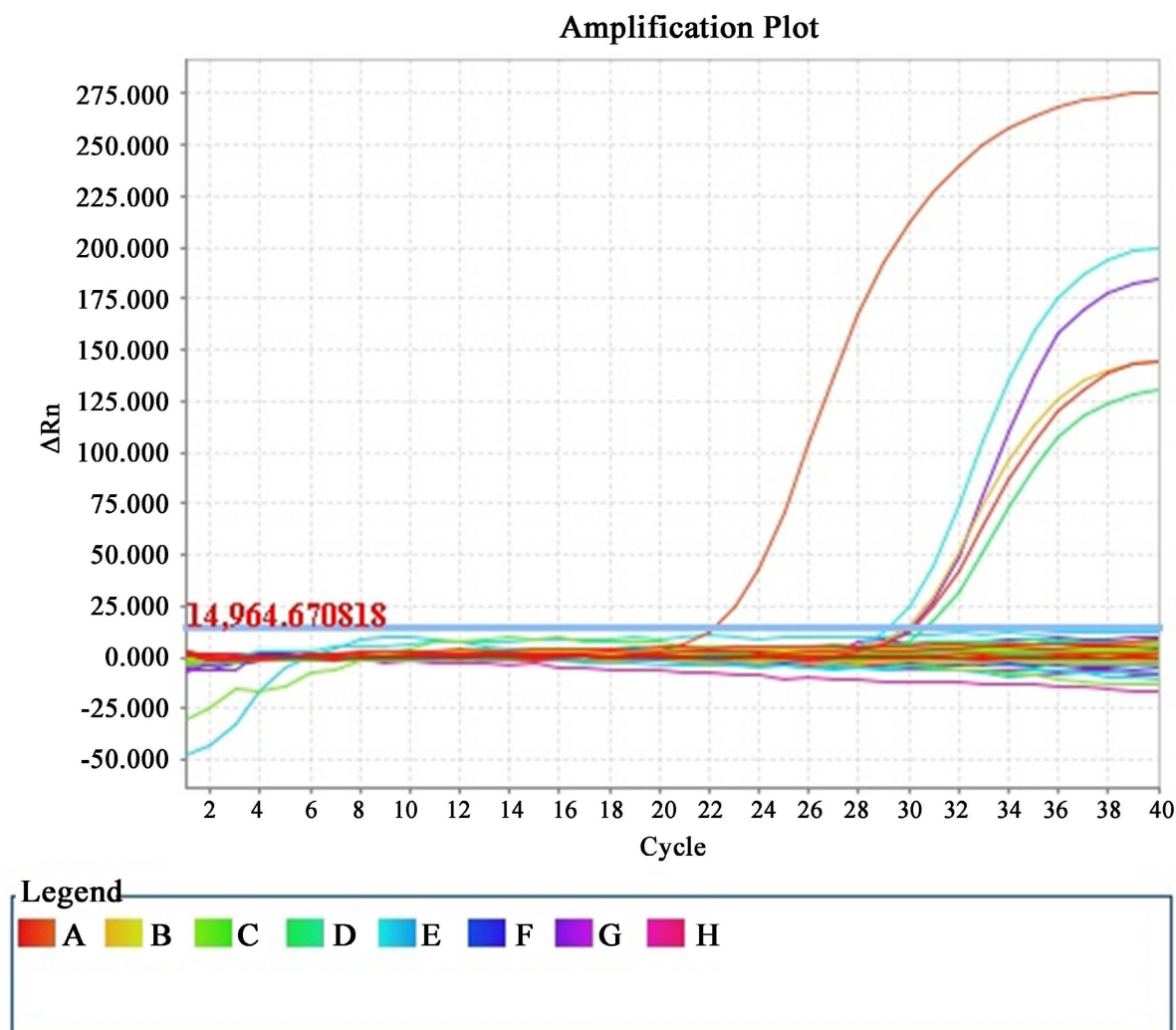


Figure 6. Results of clinical samples
图 6. 临床样本检测结果

最大限度地模拟真实病毒的物理结构[10][11]。假病毒核酸质控样品,是以假病毒为载体,包含待检病原的靶标基因序列,具有真实病毒相似的物理结构,但却没有感染性,确保使用生物安全。相较其他形式的核酸质控样品,假病毒形式的质控样品可作为平行样品参与核酸检测全过程,包括核酸分离纯化、逆转录,核酸扩增及核酸定量等环节,从而实现病毒核酸检测全流程监控,确保检测结果的准确性和可靠性,因此是本研究中利用 EBOV 的糖蛋白 GP 的编码基因,该蛋白在病毒表面以三聚体形式存在,参与病毒与宿主细胞受体的结合以及病毒的进入[12]。由 GP1 和 GP2 片段构成,除了跨膜蛋白 GP 以外,病毒液中还存在可溶性的 sGP 和 ssGP 蛋白,病毒进入细胞 GP 蛋白介导[13][14]。本研究针对埃博拉病毒成功构建了一种包含其 GP 基因假病毒核酸质控样品,并且针对该基因建立了实时荧光 RT-PCR 检测方法,具有较好的灵敏度和特异性,初步应用于临床样本的检测结果显示方法能够检测出模拟阳性样品。研究成果对于目前我国面对的埃博拉病毒防控形势而言具有较好的应用前景,有望在相关口岸实验室推广应用。

基金项目

海关总署“揭榜挂帅”科研项目(项目编号:2023HK005)。

参考文献

- [1] Jacob, S.T., Crozier, I., Fisher, W.A., *et al.* (2020) Ebola Virus Disease. *Nature Reviews Disease Primers*, **6**, Article Number: 13. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3>
- [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] Alexander, K.A., Sanderson, C.E., Marathe, M., *et al.* (2015) What Factors Might Have Led to the Emergence of Ebola in West Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0003652. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003652>
- [4] Elmahdawy, M., Elsisy, G.H., Carapinha, J., *et al.* (2017) Ebola Virus Epidemic in West Africa: Global Health Economic Challenges, Lessons Learned, and Policy Recommendations. *Value in Health Regional Issues*, **13**, 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2017.08.003>
- [5] Goeijenbier, M., Van Kampen, J.J., Reusken, C.B., *et al.* (2014) Ebola Virus Disease: A Review on Epidemiology, Symptoms, Treatment and Pathogenesis. *The Netherlands Journal of Medicine*, **72**, 442-448.
- [6] Nicastrì, E., Kobinger, G., Vairo, F., *et al.* (2019) Ebola Virus Disease: Epidemiology, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, **33**, 953-976. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.005>
- [7] 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.
- [8] World Health Organization (2022) Ebola Virus Disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease>
- [9] Chippaux, J.P. (2014) Outbreaks of Ebola Virus Disease in Africa: The Beginnings of a Tragic Saga. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **20**, Article Number: 44. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-44>
- [10] 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>
- [11] 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>
- [12] Feldmann, H., Volchkov, V.E., Volchkova, V.A., *et al.* (2001) Biosynthesis and Role of Filoviral Glycoproteins. *Journal of General Virology*, **82**, 2839-2848. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-2839>
- [13] Jeffers, S.A., Sanders, D.A. and Sanchez, A. (2002) Covalent Modifications of the Ebola VIRUS Glycoprotein. *Journal of Virology*, **76**, 12463-12472. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12463-12472.2002>
- [14] Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A., *et al.* (1998) Processing of the Ebola Virus Glycoprotein by the Proprotein Convertase Furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 5762-5767. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5762>