



猪繁殖与呼吸综合征病毒基因2型实时荧光RT-PCR盔甲RNA阳性质控品的构建

朱向东¹, 孙伟珊², 曹琪², 尹春博¹, 杨丹¹, 李硕², 邓钰萍², 李文钢^{1*}

(1. 天津市动物疫病预防控制中心, 天津 300402; 2. 天津测易生物科技有限公司, 天津 301600)

摘要: 本研究旨在利用MS2噬菌体外壳蛋白自组装并包封外源核酸的特性, 制备用于猪繁殖与呼吸综合征病毒基因2型(porcine reproductive and respiratory syndrome virus genotype 2, PRRSV-2) RT-qPCR检测阳性质控品, 并探究其稳定性及耐RNase特性。选取PRRSV-2的特异性靶基因(ORF7保守区), 插入pET28a(+)/CP-A重组质粒PAC位点下游构建重组载体, 经原核表达、硫酸铵沉淀及凝胶过滤层析纯化, 获得20~28 nm均一的MS2病毒样颗粒; 通过全能核酸酶消化及RT-qPCR, 验证其热稳定性和抗RNase能力。结果显示: 成功构建含MS2噬菌体外壳蛋白、PAC位点和PRRSV-2靶基因的重组载体, 纯化后形成包封靶基因的盔甲RNA, 可耐受RNase降解, 37℃无菌条件下稳定存在7 d。该盔甲RNA可作为PRRSV-2 RT-qPCR阳性质控品, 相比传统合成核酸, 优势在于: 1) 模拟真实病毒核酸状态, 监控全检测流程; 2) 耐RNase能力强; 3) 3批次批内及批间变异系数均<2%; 4) 37℃稳定保存7 d, 为PRRSV-2检测提供可靠质控工具。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 基因2型; 盔甲RNA; 实时荧光RT-PCR; 质控品; 病毒样颗粒; MS2噬菌体

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1759-07

Construction of an Armored RNA Positive Control for Real-time RT-PCR Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Genotype 2

ZHU Xiangdong¹, SUN Weishan², CAO Qi², YIN Chunbo¹, YANG Dan¹, LI Shuo²,
DENG Yuping², LI Wengang^{1*}

(1. *Tianjin Animal Disease Prevention and Control Center, Tianjin 300402, China*; 2. *Tianjin Ceyi Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 301600, China*)

Abstract: This study aimed to prepare a positive control for RT-qPCR detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus genotype 2 (PRRSV-2) by utilizing the property of MS2 phage capsid protein to self-assemble and encapsulate exogenous nucleic acids into armored RNA, and to investigate its stability and RNase resistance. The specific target gene (conserved region of ORF7) of PRRSV-2 was inserted downstream of the PAC site in the pET28a(+)/CP-A recombinant plasmid to construct a recombinant vector. Through prokaryotic expression, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration chromatography purification, uniform MS2 virus-like particles (VLPs) with a diameter of 20-28 nm were obtained. Benzonase nuclease digestion and RT-qPCR were used to verify its thermal stability and RNase resistance. The recombinant vector containing

收稿日期: 2025-06-26

基金项目: 天津市科技计划项目(24ZYCGSN01410); 天津市生猪产业技术体系创新团队猪重大疫病监测与预警岗位项目(ITTPRS2021004)

作者简介: 朱向东, 高级兽医师, 博士, 主要从事动物病毒学、分子生物学和生猪综合防控技术研究, E-mail: xiangdongzhu87@163.com

* 通信作者: 李文钢, 主要从事动物疫病防控技术研究, E-mail: Liwengang0102@163.com

MS2 phage capsid protein, PAC site, and PRRSV-2 target gene was successfully constructed. After purification, armored RNA encapsulating the target gene was formed, which was resistant to RNase degradation and stable for 7 days at 37 °C under sterile conditions. This armored RNA can serve as a positive control for PRRSV-2 RT-qPCR detection. Compared with traditional synthetic nucleic acids, its advantages include: 1) simulating the nucleic acid state of real viruses and monitoring the entire detection process; 2) strong RNase resistance; 3) intra- and inter-batch coefficients of variation (CV) of <2% among 3 batches; 4) stable storage at 37 °C for 7 days. It provides a reliable quality control tool for PRRSV-2 detection.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); genotype 2; armored RNA; real-time RT-PCR; quality control product; virus-like particles (VLPs); MS2 bacteriophage

* **Corresponding author:** LI Wengang, E-mail: Liwengang0102@163.com

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是严重危害全球养猪业的重要烈性传染病,以妊娠母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状为主要特征,自1987年首次报道以来,对生猪产业造成巨大经济损失^[1]。PRRSV分离株主要为基因1型(PRRSV-1)和基因2型(PRRSV-2),其中,PRRSV-2是我国优势流行毒株^[2]。PRRSV属于动脉炎病毒科,具有高变异性,导致疫苗交叉保护能力有限,且缺乏特效治疗药物,因此早期精准诊断至关重要^[3]。PRRSV ORF7基因编码核衣壳(N)蛋白,占病毒粒子的40%,是早期诊断的理想靶标^[4]。目前检测方法中,实时荧光RT-PCR因快速、灵敏、特异被广泛应用^[5],但市售试剂盒的合成核酸质控品存在无法模拟病毒结构、稳定性差等缺陷。近年来,病毒样颗粒(VLPs)技术通过MS2噬菌体衣壳蛋白自组装形成盔甲RNA,可包封并保护靶RNA免受降解,已成功用于多种病原检测^[6-7]。本研究基于PRRSV-2 ORF7基因构建盔甲RNA阳性质控品,旨在解决传统质控品的技术局限,为PRRSV-2精准检测提供可靠工具。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和主要试剂

试验所用克隆菌株DH5 α 、表达菌株BL21(DE3),以及两端引入Hind III和Not I酶切位点的A基因、Nco I和BamH I酶切位点的CP基因均由通用生物(安徽)股份有限公司合成;限制性内切酶(Not I、Nco I、BamH I、Hind III)、T4 DNA连接酶、Protein Marker、RNAiso Plus核酸提取试剂、PrimeScriptTM RT Master Mix反转录试剂、PerfectStart[®] II Probe qPCR Mix荧光探针PCR试

剂、Universal Nuclease (GMP Grade)全能核酸酶(GMP级)(货号:LN201-01)购自北京全式金生物技术有限公司;变性蛋白电泳预制胶(货号:PG01510-S)、蛋白上样缓冲液(货号:P1041)、考马斯亮蓝染色套装(染色液+脱色液)(货号:P1305)等,均购自北京索莱宝科技有限公司;猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲经典株(PRRSV VR2332)核酸标准物质,标准物质编号为GBW(E)090930,定值核酸拷贝数浓度为 $(2.06 \pm 0.31) \times 10^4$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,购自北京普天同创生物科技有限公司商城分公司。

1.2 引物

根据PRRSV株13GXYL-1 (GenBank: KJ850329.1) ORF7保守区设计引物与探针,上游引物PRRSV-F1 (5'-CGCGGATCCATGCCAMAT-AACAAMGGCAG-3',含BamH I位点)、下游引物PRRSV-R1 (5'-CCAAGCTTTCATGCTGAGGGT-GACGCT-3',含Hind III位点)、探针PRRSV-P (FAM-5'-CCCAACAGAGCCAGTCCAG-3'-BHQ-1)。引物、探针及携带PRRSV ORF7基因(372 bp)靶序列的pUC57载体均由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.3 重组载体构建

先用Nco I/BamH I双酶切pET28a(+)载体与CP基因片段,酶切产物纯化后经T4 DNA连接酶连接,连接产物转化DH5 α 感受态细胞,通过菌落PCR与测序验证正确后,获得重组质粒pET28a(+)/CP;随后用Hind III/Not I双酶切该质粒与A基因片段,同样经连接、转化及酶切鉴定,最终得到pET28a(+)/CP-A载体。以pUC57为模板,用PRRSV-F1/PRRSV-R1引物扩增ORF7基因,将扩增产物与pET28a(+)/CP-A载体均用

*Bam*H I/*Hind* III 双酶切后连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,经双酶切与测序验证无误,获得重组载体 pET28a(+)/CP-PRRSV-A。

1.4 重组蛋白的表达与盔甲 RNA 纯化

将重组质粒 pET28a(+)/CP-PRRSV-A,质粒转化至 BL21(DE3)菌株,待菌体 OD_{600 nm} 达 0.5~0.7 时,加入 0.3 mmol·L⁻¹ IPTG 于 25℃振荡诱导表达 14 h,菌体经超声破碎(200 W,10 s/10 s,20 min)后取上清液,经 0.45 μ m 滤器过滤,按镍离子亲和层析柱步骤纯化。取纯化的盔甲 RNA 蛋白,用变性蛋白电泳预制胶进行 SDS-PAGE 电泳(上样量 10 μ L,稳压 150 V,50 min)。

1.5 盔甲 RNA 透射电镜观察

取纯化盔甲 RNA,磷钨酸染色(2%染料,4 min)后自然晾干,在 Hitachi ht7700 透射电镜(120 000 $\times$)下观察 VLPs 形态与粒径。

1.6 盔甲 RNA 核酸酶消化和残余核酸检测

用 0.01 mol·L⁻¹ PB 缓冲液透析盔甲 RNA,取 1 mL 透析液加入 300 U 全能核酸酶(Mg²⁺终浓度 2 mmol·L⁻¹),37℃孵育 8 h;分别取消化产物直接检测、提取 RNA 后反转录为 cDNA 再检测,通过实时荧光 RT-PCR 验证靶序列包封效果。

1.7 盔甲 RNA 耐核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)攻击检测

将 600 μ L 核酸酶消化后的盔甲 RNA 分为对照组(无 RNase)与处理组(加 10 μ L 1 mg·L⁻¹ RNase,37℃孵育 60 min),每组 3 个重复;两组均提取 RNA 并反转录,通过实时荧光 RT-PCR(比较 *Ct* 值)与 1.5% 琼脂糖电泳验证耐酶性。

1.8 盔甲 RNA 阳性质控品的制备与效能检验

测定重组质粒 pET28a(+)/CP-PRRSV-A 的浓度计算其核酸拷贝数,10 倍倍比稀释(10⁶~10¹ copies· μ L⁻¹),构建实时荧光 RT-PCR 标准曲线。确定盔甲 RNA 中包封靶基因的核酸拷贝数。将盔甲 RNA 溶液用 DEPC 处理水进行稀释,得到 RNA 拷贝数为 10⁵ copies· μ L⁻¹盔甲 RNA 溶液,经 0.22 μ m 滤器过滤除菌,按照 1.0 mL·管⁻¹无菌分装至 1.5 mL 的红色盖螺帽管中,共制备 3 批(PRRSV/P-1,PRRSV/P-2,PRRSV/P-3),均置于-20℃ $\pm$ 5℃环境保存,作为阳性质控品。3 批阳性质控品中各随机抽取 3 管进行均匀性试验,以 PRRSV VR2332 核酸标准物质为阳性参照,用实时荧光 RT-PCR 检测核酸含量并分析 *Ct* 值变化;取同

一批次 4 管阳性质控品进行稳定性试验,对照组 4℃保存,试验组 3 组分别于 37℃保存 3、5、7 d,通过实时荧光 RT-PCR 检测核酸含量并分析 *Ct* 值变化。

2 结 果

2.1 重组蛋白的表达纯化与盔甲 RNA 形态特征

双酶切与测序验证显示,pET28a(+)/CP-PRRSV-A 载体构建正确;SDS-PAGE 结果显示,纯化产物在 15 ku 处出现单一蛋白条带,无杂蛋白(图 1A)。透射电镜观察可见,盔甲 RNA 为完整二十面体 VLPs,直径 20~28 nm(图 1B)。

2.2 盔甲 RNA 功能验证

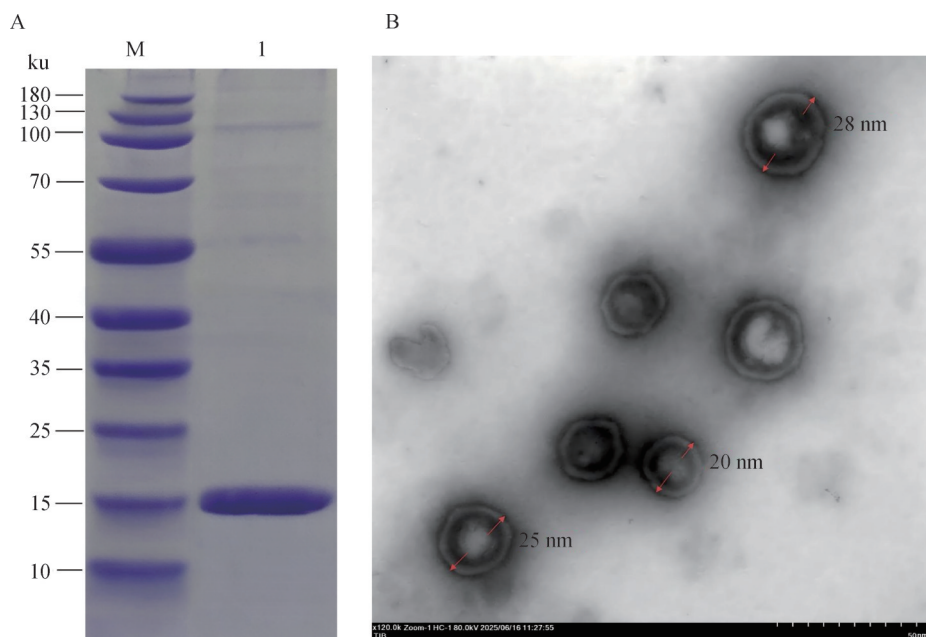
全能核酸酶消化后,直接检测盔甲 RNA 无荧光信号,表明残留核酸已完全降解;提取 RNA 反转录后检测 *Ct* 值为 17.03,证实 VLPs 有效包封 ORF7 靶序列(图 2A)。耐 RNase 试验中,处理组与对照组 *Ct* 值无显著性差异(图 2B),琼脂糖电泳条带亮度一致(图 2C),表明盔甲 RNA 可抵御 RNase 降解。

2.3 盔甲 RNA 阳性质控品的制备与检验

经计算,重组质粒 pET28a(+)/CP-PRRSV-A 的初始浓度为 1.56 $\times$ 10⁷ copies· μ L⁻¹。经 10 倍梯度稀释后形成 10⁶~10 copies· μ L⁻¹的浓度构建的标准曲线,回归方程为 $y=3.434\ 9x+13.52$,相关系数 $R^2=0.998\ 5$ 。对于经过 100 倍稀释的盔甲 RNA 样本,测得其 *Ct* 值为 20.25,根据标准曲线计算得出其浓度为 1.1 $\times$ 10⁷ copies· μ L⁻¹。制备 3 批盔甲 RNA 阳性质控品,批号分别为 PRRSV/P-1、PRRSV/P-2、PRRSV/P-3,每批 100 支。均匀性试验显示,3 批质控品批内 CV 分别为 0.39%(PRRSV/P-2311)、1.43%(PRRSV/P-2312)、0.96%(PRRSV/P-2313),批间平均 CV 为 0.99%,均小于 2%(图 3A)。稳定性试验显示,37℃保存 3、5、7 d 的质控品 *Ct* 值与 4℃对照组无显著差异,表明其在 37℃下可稳定保存 7 d(图 3B)。

3 讨 论

PRRSV 是危害我国养猪业的重要病原,且近年病毒基因组变异与重组加剧,凸显快速精准诊断对疫病防控的重要性^[8]。实时荧光 RT-PCR 可在感染极早期精准检测 PRRSV-2,但其检测质量需依赖优质质控品把控,病毒样颗粒(盔甲 RNA)是理想的创新型质控材料^[9]。本研究将 PRRSV-2 ORF7 基因插入 pET28a(+)/CP-A 重组质粒 PAC 位点下



A. 重组蛋白 SDS-PAGE 分析(M. 蛋白相对分子质量标准; 1. 凝胶层析纯化后产物); B. 盔甲 RNA 透射电镜图(120 000 $\times$, 标尺: 50 nm)

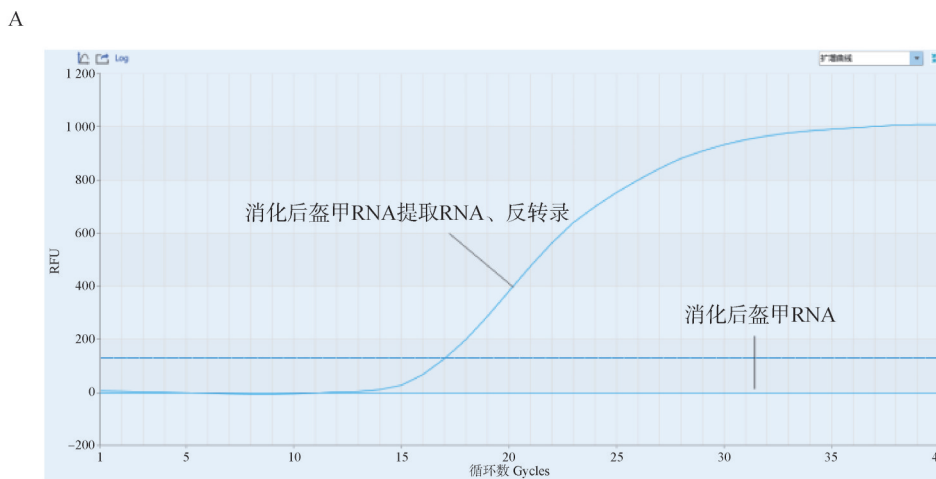
A. Recombinant protein SDS-PAGE analysis (M. Protein marker; 1. Product after gel filtration chromatography); B. Transmission electron micrograph of armored RNA (120 000 $\times$, Scale bar: 50 nm)

图 1 重组蛋白纯度与盔甲 RNA 形态特征

Fig. 1 Recombinant protein purity and armored RNA morphological characteristics

游, 构建 pET28a(+)/CP-PRRSV-A 重组载体, 经原核表达纯化获得包封靶基因的盔甲 RNA; 全能核酸酶处理验证其耐 RNase 降解能力, 制备的 3 批阳性质控品($-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存) 批内、批间变异系数均小于 2%, 37°C 条件下可稳定保存 7 d, 能有效监控核酸提取、逆转录及扩增全流程, 且相较于何嘉敏等^[10]选用的 PRRSV M 基因, 本研究选取的

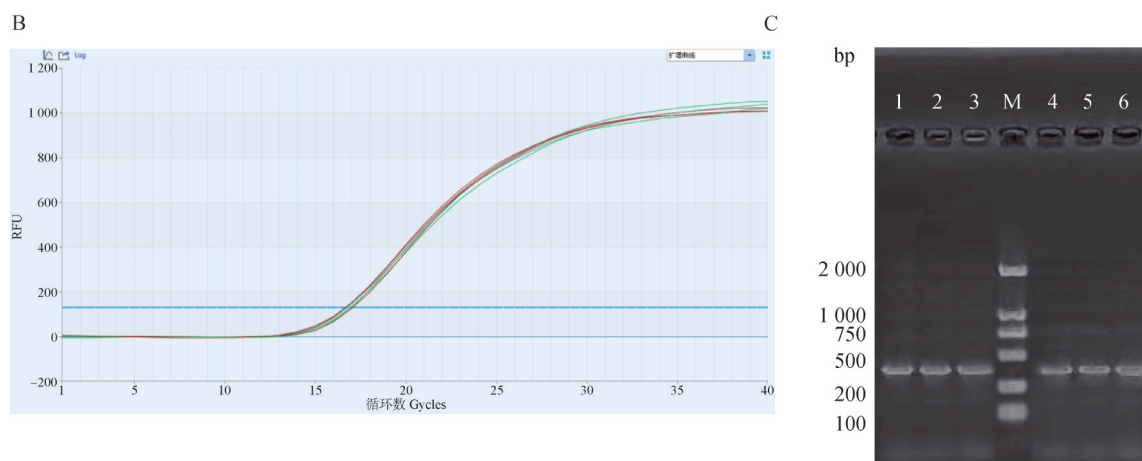
ORF7 基因保守性更强, 直接参与病毒 RNA 合成与颗粒装配, 更能模拟病毒自然状态^[11]。但本研究尚未验证其在不同品牌实时荧光 RT-PCR 试剂盒中的通用性, 也缺乏 -80°C 超低温或室温下的长期储存稳定性数据, 未来需进一步优化其兼容性并评估在临床样本混合检测中的抗干扰能力。



(图 2 Fig.2)

(转下页 Carried forward)

(续图2 Continued)



A. 核酸酶消化后实时荧光 RT-PCR 曲线 (红色. 消化后直接检测; 蓝色. 消化后提取 RNA 反转录检测); B. 耐 RNase 试验 RT-PCR 曲线 (红色. 无 RNase 处理; 绿色. RNase 37 °C 处理 60 min); C. 耐 RNase 试验琼脂糖电泳 (M. 核酸分子量标准; 1~3. 无 RNase 处理; 4~6. RNase 处理)

A. Real-time RT-PCR curves after nuclease digestion (Red. Direct detection after digestion; Blue. Detection after RNA extraction and reverse transcription); B. RT-PCR curves of RNase resistance assay (Red. Without RNase treatment; Green. Treated with RNase at 37 °C for 60 min); C. Agarose gel electrophoresis of RNase resistance assay (M. DNA molecular weight marker; 1-3. Without RNase treatment; 4-6. Treated with RNase)

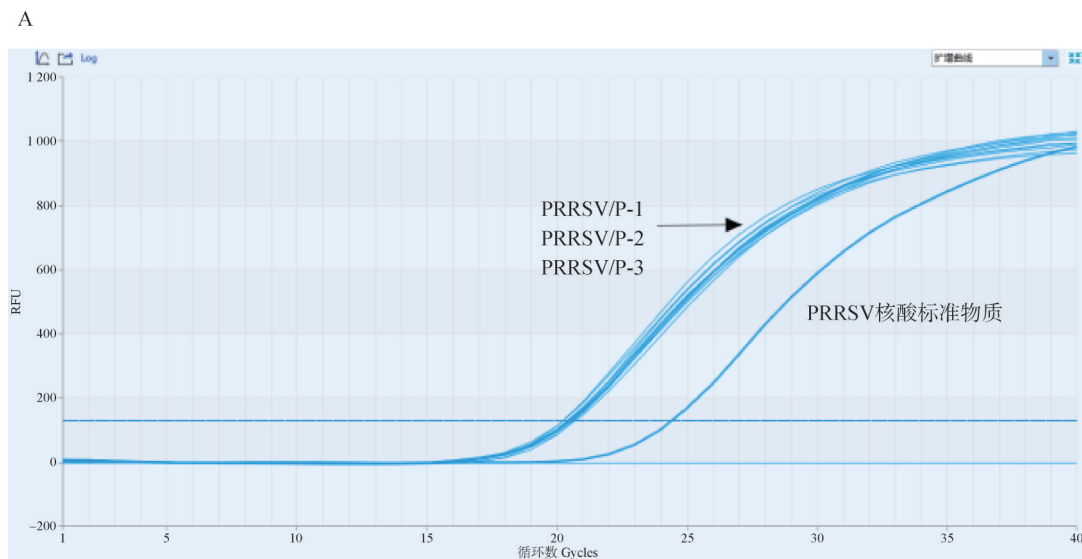
图2 盔甲RNA功能验证结果

Fig. 2 Functional validation results of armored RNA

4 结论

MS2噬菌体外壳蛋白体外可包封 PRRSV N 蛋白基因靶序列, 形成兼具热稳定性与耐 RNase 特性

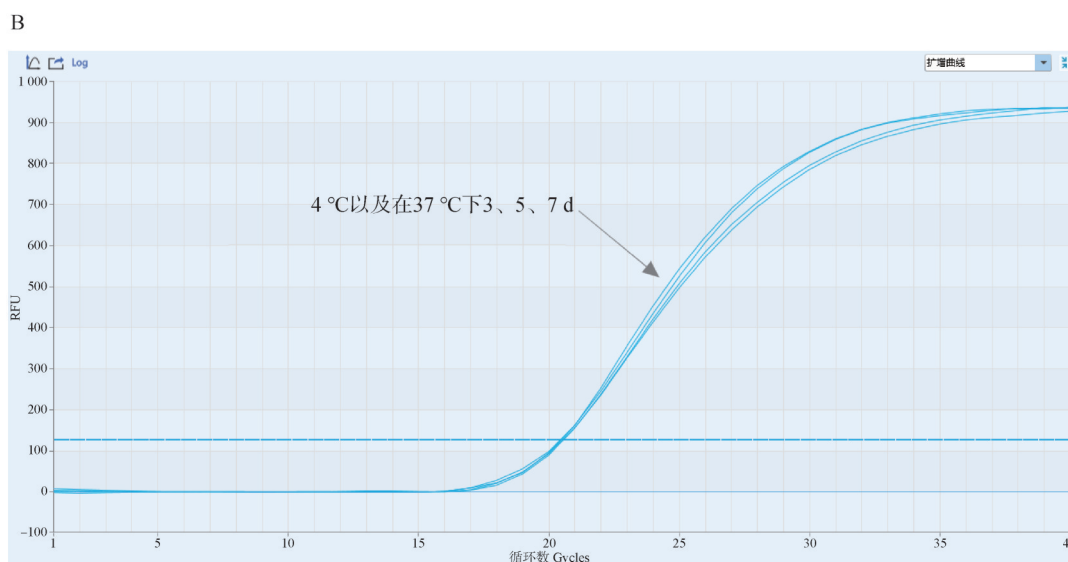
的病毒样颗粒 (盔甲 RNA), 该盔甲 RNA 能监控荧光 RT-PCR 提取、反转录及扩增全流程, 可作为 PRRSV 荧光 RT-PCR 检测阳性质控品, 保障检测结果准确性。



(图3 Fig.3)

(转下页 Carried forward)

(续图3 Continued)



A. 均匀性试验;B. 稳定性试验

A. Uniformity test; B. Stability test

图3 盔甲RNA阳性质控品的均匀性和稳定性验证

Fig. 3 Uniformity and stability verification of armored RNA positive quality control materials

参考文献 (References):

- [1] ZIMMERMAN J J, DEE S A, HOLTKAMP D J, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (porcine Arteriviruses) // [M] ZIMMERMAN J J, KARRIKER L A, RAMIREZ A, et al. Diseases of swine. 11th edition. John Wiley & Sons, Inc., 2019: 685-708.
- [2] ZHANG R, LI H, XIE H, et al. Comparing the molecular evolution and recombination patterns of predominant PRRSV-2 lineages co-circulating in China [J]. *Front Microbiol.* 2024, 15: 1398470.
- [3] CUI Z, LIU J, XIE C, et al. High-throughput screening unveils nitazoxanide as a potent PRRSV inhibitor by targeting NMRAL1 [J]. *Nat Commun.* 2024, 15(1): 4813.
- [4] 王 俊, 代军飞, 马 炳, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白的原核可溶性表达和间接ELISA抗体检测方法的初步建立 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48 (4): 419-427.
- WANG J, DAI J F, MA B, et al. Soluble prokaryotic expression of nucleocapsid protein encoding gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the primary establishment of indirect ELISA for the detection of serum antibodies against PRRSV [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48 (4): 419- 427. (in Chinese)
- [5] 吴 迪, 栗云鹏, 巴洪宇, 等. 美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光RT-PCR定量检测试剂盒测量不确定度研究 [J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(5): 94-100.
- WU D, LI Y P, BA H Y, et al. Study on the uncertainty of real-time PCR kits for quantitative detection of PRRSV of American type [J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37 (5): 94-100. (in Chinese)
- [6] 王国强, 马红芳, 曾华辉, 等. 基于MS2噬菌体病毒样颗粒的RT-PCR检测猪流行性腹泻病毒质控品的制备 [J]. *西南农业学报*, 2020, 33(11): 2686-2692.
- WANG G Q, MA H F, ZENG H H, et al. Preparation of quality control for detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR based on MS2 phage virus-like particles [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(11): 2686-2692. (in Chinese)
- [7] 陈信全, 张 展, 周伟光, 等. 猪塞内卡病毒(SVA)和O型口蹄疫病毒双重荧光RT-PCR检测方法中阳性参考品的制备 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2024, 49(5): 56-69.
- CHEN X Q, ZHANG Z, ZHOU W G, et al. Preparation of positive reference in duplex fluorescent RT-PCR for detecting SVA and FMDV-O [J].

- Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2024, 49(5):56-69. (in Chinese)
- [8] JI G, LI Y, TAN F, et al. Complete genome sequence of an NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Genome Announc*, 2016, 4(2):e00303-16.
- [9] NASKALSKA A, HEDDLE J. G. Virus-like particles derived from bacteriophage MS2 as antigen scaffolds and RNA protective shells [J]. *Nanomedicine*, 2024, 19(12):1103-1115.
- [10] 何嘉敏, 庞旋飞, 罗 律, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 MS2 装甲病毒样颗粒质控品的制备及应用[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(11):2316-2323.
- HE J M, PANG X F, LUO L, et al. Preparation and application of PRRSV MS2 armored virus-like particles qualityas control products [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(11):2316-2323. (in Chinese)
- [11] ZHENG Y, LI G, LUO Q, et al. Research progress on the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15:1391697.
- (编辑 白永平)