

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.08.002

新型冠状病毒 Omicron I1566V 突变位点 MS2 噬菌体病毒样颗粒的构建^{*}

杨静远^{1,2}, 李永鑫², 史 茜², 刘春燕², 梁梦洁², 张 新^{2△}

1. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832000; 2. 新疆生产建设兵团医院/石河子大学医学院第二附属医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830002

摘要:目的 构建新型冠状病毒 Omicron I1566V 突变位点 MS2 噬菌体病毒样颗粒。方法 选取并合成带有 6×His 标签的 MS2 噬菌体的衣壳蛋白(CP)、成熟蛋白(A 蛋白)及 Omicron I1566V 突变基因序列, 插入 pACYCDuet-1 质粒构建重组载体, 通过原核系统诱导表达目的蛋白, 纯化重组蛋白后利用透射电镜对蛋白质进行物理表征, 最后通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测病毒样颗粒的热稳定性及耐核酸酶水解能力。结果 成功构建包含有 6×His 标签的 CP、A 蛋白和 Omicron I1566V 突变基因序列的重组载体, 经限制性内切酶 BamH I 和 Kpn I 酶切鉴定和测序验证, 结果均与预期相符。经诱导并纯化后, 通过电镜观察到了大小均匀、直径为 23~28 nm 的病毒样颗粒, 该病毒样颗粒经核酸酶消化后可在 37 ℃ 条件下稳定储存 20 d 以上。结论 该研究成功利用 MS2 噬菌体的 CP 和 A 蛋白构建了 Omicron I1566V 突变位点病毒样颗粒, 为该突变位点的 RT-PCR 检测体系提供了可靠的质量保障。

关键词:新型冠状病毒变异株; Omicron I1566V 突变位点; 反转录聚合酶链反应; MS2 噬菌体; 病毒样颗粒

中图法分类号: R563.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)08-1030-05

Construction of MS2 phage virus-like particles with Omicron I1566V mutation site of SARS-CoV-2^{*}

YANG Jingyuan^{1,2}, LI Yongxin², SHI Qian², LIU Chunyan², LIANG Mengjie², ZHANG Xin^{2△}

1. Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi

University/Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi, Xinjiang 830002, China

Abstract: **Objective** To construct MS2 phage virus-like particles with Omicron I1566V mutation site of SARS-CoV-2. **Methods** The capsid protein (CP), mature protein (A protein) and Omicron I1566V mutant gene sequences of MS2 phage with 6×His tag were selected and synthesized, and inserted into the pACYCDuet-1 plasmid to construct the recombinant vector. The recombinant protein was purified and characterized by transmission electron microscopy. Finally, the thermal stability and nuclease resistance of the virus-like particles were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The recombinant vector containing CP and A protein with 6×His tag and Omicron I1566V mutant gene sequence was successfully constructed. The results were confirmed by restriction enzyme BamH I and Kpn I digestion and sequencing. After induction and purification, the virus-like particles with a diameter of 23–28 nm were observed by electron microscopy. The virus-like particles were digested by nuclease and stored stably at 37 ℃ for more than 20 days. **Conclusion** In this study, the Omicron I1566V mutation site virus-like particles were successfully constructed using the CP and A protein of bacteriophage MS2, which provided reliable quality assurance for the RT-PCR detection system of Omicron I1566V mutation site.

Key words: SARS-CoV-2 variants; Omicron I1566V mutation; reverse transcriptase polymerase chain reaction; bacteriophage MS2; virus-like particles

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的 Omicron 变异株具有极强的传染性和免疫逃逸能力^[1], 在全球的流行周期已长达 22 个月^[2]。基因测序技术是鉴定

SARS-CoV-2 基因分型的金标准, 但由于该技术检测设备昂贵、操作难度大、生物信息分析复杂、检测周期长等原因, 在 SARS-CoV-2 变异株检测中受到极大限

^{*} 基金项目: 国家临床重点专科建设项目[兵财社(2023)16 号]; 兵团临床医学研究中心建设项目[兵科发(2023)12 号]; 兵团重点领域科技攻关计划项目(2022AB030); 新疆生产建设兵团医院院级科技计划项目(2022014)。

作者简介: 杨静远, 男, 在读硕士研究生, 主要从事病原学分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail: xjzhangxin108@126.com。

制^[3]。为此,研究者们不断尝试采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、等温扩增技术和熔解曲线等方法在常规 PCR 实验室完成对 SARS-CoV-2 变异株的检测^[4-7]。本课题组前期在常规 PCR 实验室构建了基于分子信标探针技术快速检测 Omicron I1566V 突变位点的 RT-PCR 检测体系,为确保该体系的检测质量,急需可靠的质控品用于每检测批的室内质量控制。MS2 噬菌体的衣壳蛋白(CP)可包装外源核酸制备成病毒样颗粒,能够模拟从核酸提取到 PCR 检测质量控制的全过程^[8]。因此,本研究基于 MS2 噬菌体构建了包含 Omicron I1566V 突变位点的病毒样颗粒,旨在用于已构建的 Omicron I1566V 突变位点的 RT-PCR 检测体系的质量控制。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和主要试剂 克隆菌株 DH5α 和表达菌株 BL21(DE3)均购自天根生化科技(北京)有限公司;pACYCDuet-1 质粒购自安诺伦(北京)生物科技有限公司;限制性内切酶 Bgl II、Kpn I、BamH I、Hind III、T4DNA 连接酶、核酸 Marker、蛋白质 Marker、RNA 核酸提取试剂盒、反转录试剂均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;Benzonase 核酸酶购自 Sigma 公司。

1.2 引物和探针 通过 Primer Premier 5.0 软件设计扩增引物,通过 DNAMAN 6.0 软件设计分子信标。正向和反向扩增 Omicron 突变序列的引物和探针序列见表 1,探针和引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物和探针序列	
引物名称	引物序列(5'-3')
正向	CAGGCACCTACACACCTCAGTG
反向	CAGACATTTTGTCTCTCAAGCTG
分子信标探针	CY5-cgcgcGCCAGGTACGTCAACACcggcg-BHQ2

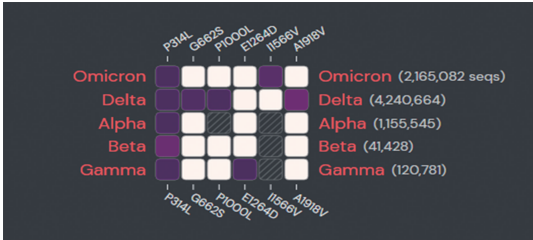
注:CY5 为荧光报告基团;BHQ2 为淬灭基团;小写部分为分子信标探针的互补序列。

1.3 方法

1.3.1 序列选取与合成 参考 GenBank 数据库中 MS2 噬菌体序列(GenBank:MK213795.1)合成 MS2 噬菌体 CP 和成熟蛋白(A 蛋白)基因(1 692 bp),并在 CP 基因中插入 6×His 标签,序列两边分别加入酶切位点 BamH I 和 Hind III。在 Outbreak 数据库(<https://outbreak.info/>)比对筛选出 Omicron 突变频率高且特异性好的 I1566V 突变位点(图 1),参考 GenBank 数据库中 Omicron 变异株序列(GenBank:OR472660.1),合成含有 Omicron 的高频特异突变位点 I1566V 的序列(184 bp),序列两边分别加入酶切位点 Bgl II 和 Kpn I,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成上述 2 条序列。

1.3.2 重组载体构建 以 BamH I 和 Not I 分别双酶切质粒 pACYCDuet-1 和 CP、A 蛋白基因序列,

回收、连接、转化到大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中。提取质粒,通过双酶切和测序进行鉴定,鉴定正确的重组载体命名为 pACYCDuet-MS2。以 Bgl II 和 Kpn I 分别双酶切重组载体 pACYCDuet-MS2 和 Omicron 突变序列,回收、连接、转化到大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中。提取质粒,通过双酶切和测序进行鉴定,鉴定正确的重组载体命名为 pACYCDuet-MS2-O。



注:每一行对应于左边列出的 SARS-CoV-2 变异株;每一列表示顶部列出的突变。

图 1 ORF1b 蛋白内突变热图

1.3.3 重组蛋白的表达与纯化 将重组载体 pACYCDuet-MS2-O 转化到表达菌株 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆,37℃培养至 A_{600 nm} 值为 0.5~0.7,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),终浓度为 0.3 mmol/L,25℃振荡诱导表达 14 h。8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,按照菌体湿重 1 g:20 mL 比例加入 TBS 缓冲液(pH=7.4)重悬后超声破碎菌体,将破碎后的标本以 12 000 r/min 离心 10 min,将获得的上清液加入 NI 柱中,分别取 10 μL 洗脱标本用于 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 重组病毒样颗粒的鉴定 取纯化后的标本,在 2% 磷酸钨复染,100 kV 加速电压条件下,通过透射电子显微镜(JEM-1200EX)观察颗粒粒径和均匀程度。

1.3.5 重组病毒样颗粒的定量 按照 Microdrop-100 微滴式数字 PCR 仪(广州永诺生物科技有限公司)标准实验流程,用表 1 中的引物对稀释的病毒样颗粒进行 3 次重复性检测来对标本进行定量。

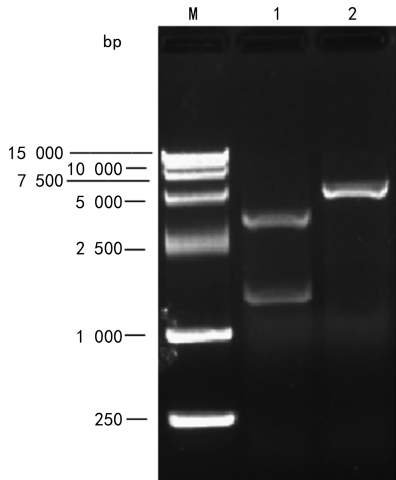
1.3.6 重组病毒样颗粒的稳定性试验 取纯化后的病毒样颗粒,每管 500 μL,1 份 4℃放置,剩余 4 份冻存至-20℃冰箱中,分别在第 1、5、10、15 天将 1 份假病毒取出放置在 37℃中,然后在第 20 天将 5 份假病毒同时进行标本裂解和反转录,利用表 1 中的引物和探针进行 RT-PCR,比较其 Ct 值变化。

2 结果

2.1 重组载体构建 所有合成序列均经过测序验证后进行后续试验,重组载体 pACYCDuet-MS2-O 经酶切鉴定(图 2),片段大小与预期一致(1 876 bp),经测序鉴定 MS2 噬菌体 CP 和 A 蛋白基因序列与 I1566V 突变序列均正确。

2.2 重组蛋白的表达与纯化 重组载体 pACYCDuet-MS2-O 在表达菌株 BL21(DE3)经过 IPTG 诱导表

达,SDS-PAGE 分析结果显示,A 蛋白(44×10^3)、CP (14×10^3)均成功表达(图 3)。



注:M 为 15 000 bp 标志物;1 泳道为 BamH I /Kpn I 酶切片段; 2 泳道为 BamH I 酶切片段。

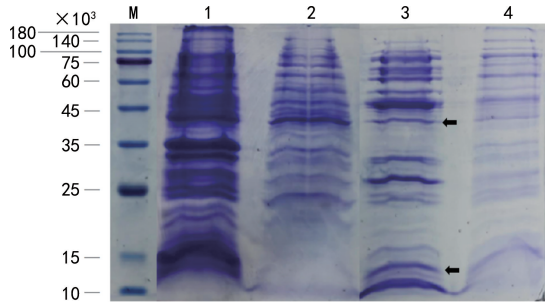
图 2 重组载体 PCR 扩增电泳图

2.3 重组病毒样颗粒的鉴定 将目的蛋白稀释后染色,通过透射电镜观察粒径,目的蛋白在体外自组装形成了大小均匀的病毒样颗粒,直径为 23~28 nm (图 4),符合 MS2 噬菌体直径大小。

2.4 重组病毒样颗粒的定量 将纯化后的标本稀释到合适的浓度后进行数字 PCR 定值(图 5),经换算后病毒样颗粒的浓度为 8.2×10^{11} copy/mL。

2.5 重组病毒样颗粒的稳定性试验 在 37 ℃ 条件

下,其 Ct 值随着放置时间延长逐渐升高,但与 4 ℃ 条件下的 Ct 值比较差异较小(图 6)。制备的病毒样颗粒在 37 ℃ 条件下可储存 20 d 以上,具有良好的热稳定性。



注:M 为蛋白相对分子质量标准;泳道 1 为诱导后沉淀;泳道 2 为诱导后的上清液;泳道 3 为纯化后沉淀;泳道 4 为纯化后的上清液。

图 3 SDS-PAGE 验证纯化的病毒样颗粒蛋白

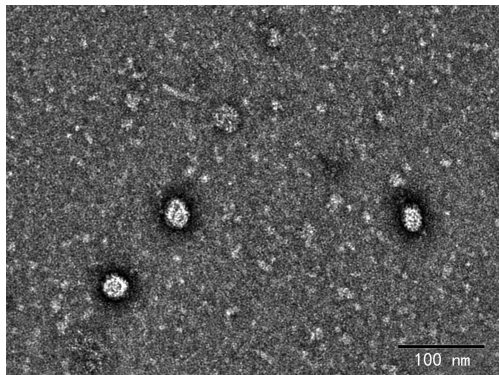


图 4 病毒样颗粒的物理表征

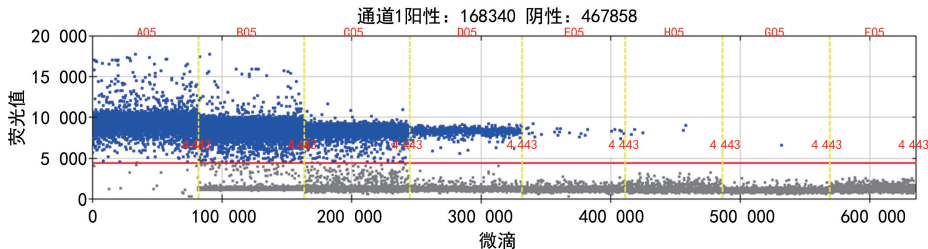


图 5 数字 PCR 测试结果

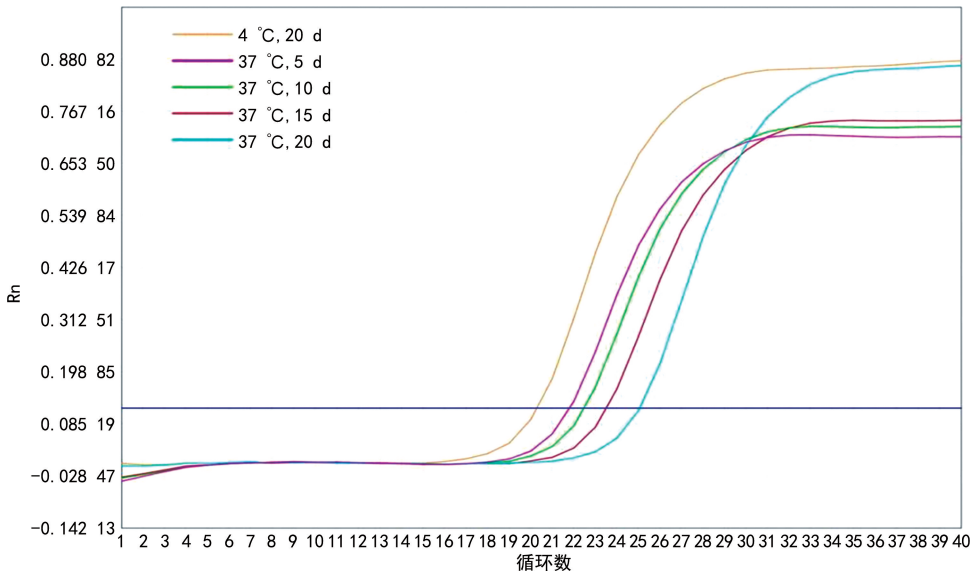


图 6 病毒样颗粒的热稳定性检测

3 讨 论

众所周知,稳定、可靠的质控品对于 RT-PCR 检测室内质量控制十分重要,目前重组质粒常作为 RT-PCR 检测中的质控品,但存在不能模拟核酸提取及反转录过程、易造成实验室污染等缺点^[9]。因此,使用噬菌体或病毒的蛋白质外壳来包裹靶序列制备成病毒样颗粒就能够弥补上述缺点。常用为病毒样颗粒的噬菌体或病毒有 Lambda 噬菌体、丝状噬菌体、烟草花叶病毒及 MS2 噬菌体等^[10-11]。MS2 噬菌体基因组全长 3 569 bp,共编码 4 种蛋白^[12],自身的 CP 和 A 蛋白可在体外自行组装形成病毒样颗粒,并将包装位点反向的外源核酸组装封装在病毒样颗粒中,常作为检测 RNA 病毒过程中稳定、可靠的阳性质控品^[13]。近期有研究基于 MS2 噬菌体分别制备了 SARS-CoV-2 和猪流行性腹泻病毒的病毒样颗粒,用于其 RT-PCR 检测体系的质控品^[14-15];WANG 等^[16]基于 MS2 噬菌体制备的戊型肝炎病毒的病毒样颗粒用于戊型肝炎病毒检测时的质量控制;MIKEL 等^[17]制备了基于 MS2 噬菌体肠道 RNA 病毒样颗粒。以上研究均表明 MS2 噬菌体病毒样颗粒在 RT-PCR 检测体系的质控品构建中具有良好的应用前景。

本研究构建的病毒样颗粒是基于单质粒双表达包装系统的 pACYCDuet-1 质粒,目前有各种质粒驱动力的包装系统,它们在不同程度上均有 RNA 包装能力有限、包装效率较低、系统构建复杂及生产的病毒样颗粒纯化复杂而耗时等缺点。而单质粒双表达包装系统的优点就是能够构建具有高效率 and 自包装的病毒样颗粒,并且允许最大长度的封装, RNA 长达 3 600 个核苷酸^[18]。相关研究表明,MS2 序列中仅选取 CP 基因序列,虽然也能形成病毒样颗粒,但形成的病毒样颗粒稳定性差,无法耐受核酸酶攻击^[19],所以本研究同时选取 CP 和 A 蛋白基因序列来形成稳定的 MS2 噬菌体病毒样颗粒。合成上述序列后酶切插入质粒 pACYCDuet-1 中,首先构建重组载体 pACYCDuet-MS2。其次,本研究选取 Omicron 变异株 ORF1b 基因序列上的 I1566V 高频特异突变位点作为检测靶点,该突变位点经过数据库比对,其变异位点的突变频率在 95% 以上,属于 Omicron 保守且特异的突变位点^[20]。随后将包含这个特定突变位点的核酸序列作为靶序列,插入重组载体 pACYCDuet-MS2 中,成功构建重组载体 pACYCDuet-MS2-O。重组载体在大肠埃希菌中诱导表达和纯化,得到目的蛋白,目的蛋白通过透射电镜进行物理表征,显示在体外自组装形成了 23~28 nm 的病毒样颗粒。此外,本研究选用数字 PCR 对该病毒样颗粒进行定量检测,直接对单分子 RNA 水平进行定值,相对于实时荧光定量 PCR,其不需要依赖于 Ct 值和标准曲线,直接得到病毒样颗粒的拷贝数,具有灵敏度高和精准定量的特点。该病毒样颗粒用核酸酶消化后进行稳定性试

验提取 RNA,通过 RT-PCR 检测,提示本研究构建的病毒样颗粒具有良好的热稳定性,MS2 的蛋白质外壳能够有效保护包裹的靶序列。病毒样颗粒在形态和结构上与天然病毒相似,因其被包裹的核酸不能复制,故不具有传染性,且因为耐核酸酶的攻击,热稳定性好^[21]。因此,该病毒样颗粒可全程模拟从核酸提取、反转录到核酸扩增,能够为构建的 Omicron 变异株 RT-PCR 反应体系提供高质量保证。

目前,SARS-CoV-2 在全球范围内流行,依然对人类健康造成极大的威胁,如何快速对新发变异株进行监测始终是公共卫生领域所面临的挑战^[22],当前基因测序技术从递交标本到数据发布存在严重的变异监测滞后性^[23]。本课题组已构建了基于分子信标技术,通过识别 I1566V 位点快速检测 Omicron 的 RT-PCR 反应体系,并且制备了该技术配套的变异株质控品,保证了在常规 PCR 实验室内对 Omicron 检测结果的可靠性。总之,该质控品制备的方法具有通用性,使用该方法快速构建的 RNA 病毒质控品,在面对大规模的突发公共卫生事件时能够快速提供高质量的阳性对照,能够为临床患者救治及公共卫生政策的制定提供强有力的支持。

参考文献

- [1] ZHOU Y B,ZHI H L,TENG Y. The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages,immune escape,and vaccine effectiveness[J]. J Med Virol,2023,95(1):e28138.
- [2] HE X M,HONG W Q,PAN X Y,et al. SARS-CoV-2 omicron variant: characteristics and prevention [J]. Med Comm,2021,2(4):838-845.
- [3] NIU P H,ZHAO X,LU R J,et al. Full-length genome sequencing of SARS-CoV-2 directly from clinical and environmental samples based on the multiplex polymerase chain reaction method[J]. Biomed Environ Sci,2021,34(9):725-728.
- [4] SIT B H,PO K H,CHEUNG Y Y,et al. Detection of SARS-CoV-2 VOC-Omicron using commercial sample-to-answer real-time RT-PCR platforms and melting curve-based SNP assays [J]. J Clin Virol Plus,2022,2(3):100091.
- [5] CHAN C T,LEUNG J S,LEE L K,et al. A low-cost TaqMan minor groove binder probe-based one-step RT-qPCR assay for rapid identification of N501Y variants of SARS-CoV-2[J]. J Virol Methods,2022,299:114333.
- [6] YANG J N,HU X J,WANG W Z,et al. RT-LAMP assay for rapid detection of the R203M mutation in SARS-CoV-2 delta variant[J]. Emerg Microbes Infect,2022,11(1):978-987.
- [7] 马玉楠,邹丽容,梁源浩,等. RT-PCR/CRISPR-Cas12a 快速检测和区分 SARS-CoV-2 Omicron BA. 4/5 变异株 [J]. 南方医科大学学报,2023,43(4):516-526.
- [8] HASHEMI K,GHAHRAMANI S M,AHMADIAN M

R, et al. Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):19851.

[9] KEMPSTER S L, DOUGALL T, MORRIS C, et al. Utility of reference materials for Zika virus nucleic acid testing [J]. *Biologicals*, 2019, 61:55-60.

[10] 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.

[11] 乔彩霞, 张鹤晓, 高志强, 等. 动物病毒核酸检测质控品和标准物质研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(7):582-584.

[12] 吕敏佳, 刘捷婧, 周于婷, 等. 基于 MS2 噬菌体 lys 基因的质粒型条件自溶菌的构建与应用[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(11):4598-4607.

[13] ZHANG J W, LI D D, ZHANG R, et al. Delivery of microRNA-21-sponge and pre-microRNA-122 by MS2 virus-like particles to therapeutically target hepatocellular carcinoma cells[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(23):2463-2472.

[14] 王国强, 于茵茵, 曾华辉, 等. 基于 MS2 噬菌体病毒样颗粒的 RT-PCR 检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)质控品制备[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(12):31-40.

[15] 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.

[16] WANG S, LIU Y, LI D D, et al. Preparation and evaluation of MS2 bacteriophage-like particles packaging hepatitis E virus RNA [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(20):fnw221.

[17] MIKEL P, VASICKOVA P, TESARIK R, et al. Prepara-

tion of MS2 phage-like particles and their use as potential process control viruses for detection and quantification of enteric RNA viruses in different matrices[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:1911.

[18] MIKEL P, VASICKOVA P, KRALIK P. One-plasmid double-expression his-tag system for rapid production and easy purification of MS2 phage-like particles[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):17501.

[19] ZHANG D, SUN Y, JIA T T, 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.

[20] GANGAVARAPU K, LATIF A A, MULLEN J L, et al. Outbreak. info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations[J]. *Nat Methods*, 2023, 20(4):512-522.

[21] CHENG Y J, NIU J J, ZHANG Y Y, et al. Preparation of his-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(10):3557-3561.

[22] YU D L, YANG X, TANG B X, et al. Coronavirus gen browser for monitoring the transmission and evolution of SARS-CoV-2[J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(2):bbab583.

[23] KANDEEL M, MOHAMED M E, EL-LATEEF H M, et al. Omicron variant genome evolution and phylogenetics [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(4):1627-1632.

(收稿日期:2023-10-16 修回日期:2024-02-08)

(上接第 1029 页)

[16] 郭丹, 赵冬雪. γ -谷氨酰转移酶与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2016, 16(3):164-168.

[17] 鲍韵如, 王绵, 张力辉, 等. 2 型糖尿病患者血清 γ -谷氨酰转肽酶水平的变化及其与颈动脉粥样硬化的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(5):420-422.

[18] MITRIĆ A, CASTELLANO I. Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: a pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208:672-683.

[19] AIMO A, CHIAPPINO S, PAOLICCHI A, et al. Big gamma-glutamyltransferase is associated with epicardial fat volume and cardiovascular outcome in the general population[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2022, 29(11):1510-1518.

[20] 褚叶, 程丽, 金晶, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血清 γ -谷氨酰基转移酶与颈动脉粥样硬化的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(20):2651-2655.

[21] KIM Y G, PARK G M, LEE S B, et al. Association of gamma-glutamyl transferase with subclinical coronary atherosclerosis and cardiac outcomes in non-alcoholics

[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):17994.

[22] NDREPEPA G, COLLERAN R, KASTRATI A. Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476:130-138.

[23] GONG S J, GAN S L, ZHANG Y H, et al. Gamma-glutamyl transferase to high-density lipoprotein cholesterol ratio is a more powerful marker than TyG index for predicting metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:1248614.

[24] BIJNENS E M, DEROM C, THIERY E, et al. Serum gamma-glutamyl transferase, a marker of alcohol intake, is associated with telomere length and cardiometabolic risk in young adulthood[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):12407.

[25] KUNUTSOR S K. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within? [J]. *Liver Int*, 2016, 36(12):1723-1734.

[26] BULUSU S, SHARMA M. What does serum γ -glutamyltransferase tell us as a cardiometabolic risk marker? [J]. *Ann Clin Biochem*, 2016, 53(Pt 3):312-332.

(收稿日期:2023-08-16 修回日期:2023-12-08)