

# 荧光定量 RT-PCR 滴度检测法在腮腺炎减毒活疫苗制造中的应用

张敬武<sup>1\*</sup>, 刘先超<sup>2</sup>[1.大连市药品检验所, 辽宁大连 116021; 2.科兴(大连)疫苗技术有限公司, 辽宁大连 116620]

中图分类号 R373.1;R392 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2578-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.47

**摘要** 目的:为促进荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)滴度检测法在腮腺炎减毒活疫苗制造中的实际应用提供参考。方法:建立滴度- $c$ 值标准曲线回归方程;分别用微量细胞病变法和荧光定量RT-PCR滴度检测法对10批腮腺炎减毒活疫苗单次收获液及成品进行滴度检测,比较检测结果。结果:两种方法检测结果经配对 $t$ 检验分析, $P$ 分别为0.743、0.868,差值均值分别在(-0.174,0.094)、(-0.113,0.153)之间,差异无统计学意义,可以认为等同。结论:荧光定量RT-PCR滴度检测法可用于腮腺炎减毒活疫苗制造过程中的单次收获液及成品滴度检测,有望进一步升级为《中国药典》方法。

**关键词** 腮腺炎减毒活疫苗;S79株;荧光定量逆转录-聚合酶链反应滴度检测法;病毒滴度

## Application of Fluorescence Quantitative RT-PCR for Live-attenuated Mumps Vaccine Manufacturing

ZHANG Jing-wu<sup>1</sup>, LIU Xian-chao<sup>2</sup>[1.Dalian Institute for Drug Control, Liaoning Dalian 116021, China; 2.Sino-vac (Dalian) Vaccine Technology Co., Ltd., Liaoning Dalian 116620, China]

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for improving the practical application of fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the live-attenuated mumps vaccine manufacturing. METHODS: A regression equation of standard titer- $c$  value was established; micro cytopathic effect (micro-CPE) and fluorescence quantitative RT-PCR were respectively adopted for the titer of 10 batches of single harvest liquid of live-attenuated mumps vaccine and end products, and the results were compared. RESULTS: According to the  $t$ -test analysis, the  $P$  were respectively 0.743 and 0.868, and the average values were in the range of (-0.174, 0.094) and (-0.113, 0.153), with no significant differences. They were similar. CONCLUSIONS: Fluorescence quantitative RT-PCR can be used for the titer detection of single harvest liquid and end products in the process of live-attenuated mumps vaccine manufacturing. And it is expected to further upgrade to *Chinese Pharmacopoeia* method.

**KEYWORDS** Live-attenuated mumps vaccine; S79 strain; Fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; Titer of virus

腮腺炎疫苗是一种常见的儿童接种疫苗,主要用于预防流行性腮腺炎。我国用于生产该疫苗的病毒株主要为S79株,为RNA病毒,属副黏病毒科。目前,国内判定腮腺炎减毒活疫苗病毒滴度的方法一直采用微量细胞病变法<sup>[1]</sup>,为《中国药典》法定方法,但该方法消耗时间长、定量精确性低、影响因素较多。而国内外已有荧光定量逆转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR)滴度检测法

(简称荧光定量RT-PCR滴度检测法)在疫苗制造、疾病诊断等方面应用的报道。本试验通过对上述两种方法用于腮腺炎减毒活疫苗单次收获液及成品的病毒滴度检测的结果进行比较,旨在为荧光定量RT-PCR滴度检测法在腮腺炎减毒活疫苗制造中的实际应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

- [6] 钱桂英,柏大为.微生物检定法测定庆大霉素普鲁卡因胶囊中庆大霉素含量的不确定度分析[J].中国药房,2011,22(45):4 289.
- [7] 李海芳,王维剑,朱毅忠.注射器针尖刺穿力测定的不确定度分析[J].中国医疗器械信息,2011,17(7):55.
- [8] 刘英.效价测定法标定标准品含量的不确定度分析[J].中国计量,2006(6):70.
- [9] 谢鹏.注射用门冬酰胺酶效价测量的不确定度评定[J].

- 广东轻工职业技术学院学报,2011,10(1):18.
- [10] 李海芳,钱德明.缩宫素生物效价测定实验的几点体会[J].中国药品标准,2008,9(4):247.
- [11] 朱爱民,李昇刚,袁雪涛,等.缩宫素生物测定试验中离体子宫的稳定性研究[J].中国药事,2011,25(10):988.
- [12] 全国流量容量计量技术委员会.JJG196-2006常用玻璃量器检定规程[S].北京:中国计量出版社,2006.

(收稿日期:2014-05-14 修回日期:2015-05-07)

(编辑:周 箐)

\* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析、分子生物学。E-mail: gssyphu@163.com

腮腺炎减毒活疫苗单次收获液(批号:E03-011、E03-012、E03-013、E03-014、E03-015、E03-016、E04-017、E04-018、E04-019、E04-020)及成品(批号:s03011、s03012、s03013、s03014、s03015、s03016、s04017、s04018、s04019、s04020)、建立标准曲线用腮腺炎减毒活疫苗(批号:04025)、Vero 细胞由科兴(大连)疫苗技术有限公司提供(建立标准曲线用腮腺炎减毒活疫苗经中国食品药品检定研究院检定合格;Vero 细胞购自美国 ATCC 细胞库,代次:120);Premix Ex Taq™(Probe qPCR)试剂盒(货号:DRR390)、PrimeScript RT Master Mix 试剂盒(货号:DRR036)购自宝生物工程(大连)有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 引物与探针设计 在腮腺炎病毒(MuV)H 基因保守区域设计特异性引物和探针。腮腺炎病毒 S79 株基因序列为 GenBank:HQ416907.1,采用 Primer Premier 5.0 软件进行引物和探针设计,序列如下:sense primer(正向引物)5'-CCGTTA-ATCCATATAATCCA-3',antisense primer(反向引物)5'-CGAC-TAGAGAAGTAACTTG-3',探针 5' 端标记的荧光报告基因为 FAM,探针 3' 端标记的荧光淬灭基因为 Eclipse,Probe(探针序列)为 5'-TTCAGGACCACCACAAGAGTTAGAT-3'。

1.2.2 细胞制备 培养瓶培养单层 Vero 细胞,乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶消化后,加入含 10% 新生牛血清的 MEM 培养液制成细胞悬液,细胞悬液浓度为 20 万 ml<sup>-1</sup>,将制备好的细胞悬液加入微量细胞培养板,每孔 100 μl,补加 100 μl 培养液,放置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2~3 d(具体时间以细胞长成单层状态为佳),待用。

1.2.3 标准曲线建立 (1)疫苗稀释。取建立标准曲线用腮腺炎减毒活疫苗 500 μl 以水复溶,用培养液进行 5 倍 3 个梯度稀释。(2)接种及培养。取长成单层的细胞,弃去培养液,用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 2 次,弃去 PBS。将已稀释好的不同浓度的疫苗加入到已洗完的细胞培养板,每孔 100 μl,补加 100 μl 培养液,于 36.5 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18 h。(3)细胞裂解。培养结束后,弃去培养液,加入适量无菌注射用水,于 -70 °C 存放 30 min 以上,取出细胞培养板,于室温下融化,用振荡器轻微振荡 10 s 左右。(4)荧光定量 RT-PCR 反应。Primer mix(引物混合液)制备:取浓度为 20 μmol/L 的正向引物和反向引物等量混合成浓度为 10 μmol/L 的引物混合液。第一步:RT 反应。细胞裂解物融化,振荡混匀后,取 2 μl,再取 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒中的 5×Prime-Script® RT Master Mix 试剂 2 μl,用无 RNA 酶 H<sub>2</sub>O 补足 10 μl,按以下反应方式进行逆转录反应:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 保温。第二步:PCR 反应。取 RT 反应产物 2 μl、Premix Ex Taq™ 12.5 μl、引物混合液 1 μl(10 μmol/L)、探针 1 μl(3 μmol/L),加水补足至 25 μl,按照以下温度条件进行 PCR 反应:95 °C 30 s,再进行 45 个循环(95 °C 5 s、55 °C 10 s、72 °C 20 s)。记录结果。(5)建立标准曲线回归方程。依据《中国药典》中微量细胞病变法进行滴度检测,以滴度值为横坐标、荧光定量 RT-PCR 反应测得 c<sub>i</sub> 值为纵坐标,建立标准曲线回归方程。

1.2.4 以荧光定量 RT-PCR 法进行病毒滴度检测 取 10 批腮腺炎减毒活疫苗单次收获液和 10 批成品,单次收获液用 MEM 培养液进行 10 倍稀释后接种细胞,成品复溶后直接接种细胞,试验过程同“1.2.3”项。记录所得 c<sub>i</sub> 值数据,并代入标准曲线回归方程,计算供试品的病毒滴度值,记录结果。

1.2.5 以微量细胞病变法进行病毒滴度检测 使用《中国药典》微量细胞病变法对“1.2.4”项下单次收获液和成品进行病毒滴度检测,记录结果,并将两种方法所得结果进行比较,以微量细胞病变法结果作为真值,计算相对误差。同时,通过 SPSS 19.0 软件对两种方法测得的结果进行等效分析。

## 2 结果

### 2.1 检测结果

建立标准曲线用腮腺炎减毒疫苗经逐级 5 倍梯度稀释后,以微量细胞病变法检测滴度值、荧光定量 RT-PCR 反应测定 c<sub>i</sub> 值,结果详见表 1。

表 1 建立标准曲线的疫苗 c<sub>i</sub> 值结果

Tab 1 Results of vaccine c<sub>i</sub> value of the established standard curve

稀释比例	细胞病变法测得病毒滴度	荧光定量 RT-PCR 反应测得 c <sub>i</sub> 值
1	5.0	28.50
1:5	4.3	30.49
1:25	3.6	34.06
1:125	2.9	36.07

以病毒滴度值(y)对 c<sub>i</sub> 值(x)进行线性回归,得标准曲线回归方程 y = -3.753 6x + 47.103 (r = 0.986 1)。将 10 批单次收获液和成品按荧光定量 RT-PCR 反应测得的 c<sub>i</sub> 值代入上述回归方程,计算病毒滴度值,并与微量细胞病变法测得病毒滴度值进行比较,结果详见表 2。

表 2 两种方法病毒滴度检测结果

Tab 2 Results of virus titer test by 2 kinds of methods

样品	批号	c <sub>i</sub> 值	RT-PCR 法测得病毒滴度	细胞病变法测得病毒滴度	相对误差, %
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-011	29.42	5.7	5.8	-0.9
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-012	28.63	5.9	5.8	2.6
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-013	29.55	5.7	5.6	1.8
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-014	29.33	5.7	6.0	-5.0
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-015	30.25	5.5	5.6	-1.8
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E03-016	30.36	5.5	5.6	-1.8
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E04-017	27.86	6.1	5.8	5.2
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E04-018	29.44	5.7	5.9	-3.4
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E04-019	28.98	5.8	5.9	-1.7
腮腺炎减毒活疫苗单次收获液	E04-020	29.47	5.7	5.5	3.6
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03011	28.96	4.8	4.9	-2.0
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03012	30.62	4.4	4.6	-4.3
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03013	30.31	4.5	4.4	2.3
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03014	28.62	4.9	4.8	2.1
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03015	28.78	4.9	4.6	6.5
腮腺炎减毒活疫苗成品	s03016	30.39	4.5	4.6	-2.2
腮腺炎减毒活疫苗成品	s04017	29.14	4.8	4.5	6.7
腮腺炎减毒活疫苗成品	s04018	29.26	4.8	4.9	-2.0
腮腺炎减毒活疫苗成品	s04019	28.44	5.0	5.0	0.0
腮腺炎减毒活疫苗成品	s04020	30.67	4.4	4.6	-4.3

### 2.2 检测结果分析

采用统计学软件对上述两种方法测得的单次收获液、成品的病毒滴度结果进行等效分析,设定等效界值为(-0.5, 0.5),采用配对 t 检验分析,结果详见表 3、表 4、表 5、表 6。

从表 4 可知, P = 0.743 > 0.05, 两种方法差值均值在(-0.174, 0.094)之间,在设定等效界值(-0.5, 0.5)范围之内,因此两种方法测得的单次收获液的病毒滴度结果差异无统计学意义,可以认为等同。

表3 腮腺炎减毒活疫苗单次收获液成对样本统计量

Tab 3 Statistics of paired samples of live-attenuated mumps vaccine for single harvest liquid

项目	均值	n	标准差	均值的标准误
对1 PCR法病毒滴度	5.730	10	0.176 70	0.055 88
细胞病变法病毒滴度	5.750	10	0.164 99	0.052 17

表4 腮腺炎减毒活疫苗单次收获液成对样本检验结果

Tab 4 Results of paired samples test of live-attenuated mumps vaccine for single harvest liquid

项目	成对差分					t	df	Sig.(双侧)
	均值	标准差	均值的标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
对1 PCR法病毒滴度-细胞病变法病毒滴度	-0.020	0.187 38	0.059 25	-0.154 04	0.114 04	0.338	9	0.743

表5 腮腺炎减毒活疫苗成品成对样本统计量

Tab 5 Statistics of paired samples of live-attenuated mumps vaccine

项目	均值	n	标准差	均值的标准误
对1 PCR法病毒滴度	4.700	10	0.226 08	0.071 49
细胞病变法病毒滴度	4.690	10	0.196 92	0.062 27

表6 腮腺炎减毒活疫苗成品成对样本检验结果

Tab 6 Results of paired samples test of live-attenuated mumps vaccine

项目	成对差分					t	df	Sig.(双侧)
	均值	标准差	均值的标准误	差分的95%置信区间				
				下限	上限			
对1 PCR法病毒滴度-细胞病变法病毒滴度	0.010	0.185 29	0.058 59	-0.122 55	0.142 55	0.171	9	0.868

影响,以Vero细胞液为模板,用上述试验引物进行PCR反应,未扩增出任何DNA序列。建立标准曲线用疫苗是滴度-c<sub>t</sub>值转换的重要媒介,对试验结果的准确性至关重要。本试验所用建立标准曲线用腮腺炎减毒活疫苗经中国食品药品检定研究院检定合格,其滴度值为不同试验人员采用微量细胞病变法进行10次检测结果的平均值,而其生产所用主要原辅材料与试验疫苗相同。

#### 4 结论

本试验对两种检测方法所得结果进行经统计学分析,相对误差在±10%范围内,且在设定的等效限值内,故可以认为检测结果等同。经过多批次试验,根据该方法检测结果进行疫苗半成品配制,分装后成品滴度检测完全符合《中国药典》要求,所用时间由8d缩短为1d,提高了生产效率。但由于该检测方法并不是法定方法,现阶段尚不能应用于成品放行,仅可以作为辅助放行的手段,代替微量细胞病变法用于腮腺炎减毒活疫苗半成品配制。今后,随着荧光定量PCR技术的普遍使用,通过对不同疫苗厂家检测数据更广泛的深入分析,荧光定量RT-PCR滴度检测法有望升级为《中国药典》方法。

#### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 141-142.  
 [2] Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, et al. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 808.  
 [3] 周才学, 田细凤, 罗红, 等. 逆转录-聚合酶链反应在乙型

从表6可知,  $P=0.868 > 0.05$ , 两种方法差值均值在(-0.113, 0.153)之间, 在设定等效限值(-0.5, 0.5)范围之内, 因此两种方法测得的成品的病毒滴度结果差异无统计学意义, 可以认为等同。

#### 3 讨论

荧光定量PCR技术在临床研究上已广泛应用于各种病毒

滴度检测<sup>[2-5]</sup>, 但在疫苗制造过程中应用还有待进一步研究。对样品稀释浓度的选择是本试验成功的关键, 由于单次收获液病毒含量较高, 故进行了10倍稀释; 而成品由于在配制过程中已经进行了稀释, 所以直接进行试验。适当的稀释度保证了样品滴度与c<sub>t</sub>值之间存在较好的线性关系。本试验中引物的设计参考了部分文献<sup>[6-10]</sup>, 引物的特异性对试验结果有直接

影响, 以Vero细胞液为模板, 用上述试验引物进行PCR反应, 未扩增出任何DNA序列。建立标准曲线用疫苗是滴度-c<sub>t</sub>值转换的重要媒介, 对试验结果的准确性至关重要。本试验所用建立标准曲线用腮腺炎减毒活疫苗经中国食品药品检定研究院检定合格, 其滴度值为不同试验人员采用微量细胞病变法进行10次检测结果的平均值, 而其生产所用主要原辅材料与试验疫苗相同。

[4] 沈波, 孟哲峰, 彭颖, 等. 荧光定量PCR用于重组杆状病毒鉴定及病毒滴度检测的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(11): 853.

[5] 钱汶, 陈悦青, 洪艳, 等. RT-PCR-ELISA方法检测甲肝减毒活疫苗病毒滴度的初步研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(3): 261.

[6] 孟凡红, 刘先超, 王爽, 等. 腮腺炎减毒活疫苗感染性滴度荧光定量RT-PCR检测方法的建立及验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(11): 1467.

[7] Sauder CJ, Zhang CX, Ngo L, et al. Gene-specific contributions to mumps virus neurovirulence and neuroattenuation[J]. *J Virol*, 2011, 85(14): 7059.

[8] Palacios G, Jabado O, Cisterna D, et al. Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1869.

[9] 冯燕, 卢亦愚. 流行性腮腺炎病毒荧光定量逆转录-聚合酶链反应快速检测方法的建立[J]. *中国计划免疫*, 2006, 12(5): 394.

[10] 孙鹏宇, 张艳玲, 荆玉明, 等. 腺病毒滴度不同测定方法比较[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(2): 234.

(收稿日期: 2014-12-14 修回日期: 2015-04-30)

(编辑: 周 箐)