[文章编号] 1003－4684(2025)05-0079-07

微液滴式 PCR 检测溶瘤病毒 OH2 的方法建立及初步应用

李 乐，杨婧如，王欣雅，夏 雯，汪 洋，胡 翰，刘滨磊

（湖北工业大学生命科学与健康工程学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 为建立一种特异性强、灵敏度高、稳定性好的微液滴式 PCR 法（ddPCR 法），用于检测溶瘤病毒 OH2 的基因拷贝数，对所建立的方法进行扩增线性、灵敏度、定量下限、精密度、选择性验证，并针对反复冻融样本进行稳定性测定。结果显示，该方法具有良好的扩增线性关系（R^2＞0.98），灵敏度达 1.6 copies/μL，定量下限为 5 copies/μL；精密度方面，最大变异系数（CV）为 29.8%，偏差（Bias）范围为－30.4%～20.6%。此外，该方法具有较好的选择性和特异性，其提取回收率可满足全血、病毒采样拭子病毒 DNA 的准确检测，且能对反复冻融样本实现精准检测。上述结果表明，所建立的 ddPCR 方法可用于 OH2 的定量检测。

[关键词] 微液滴式 PCR；溶瘤病毒 OH2；基因拷贝数

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

新兴的溶瘤病毒在肿瘤免疫治疗中展现出良好的潜力。Ⅰ型单纯疱疹病毒（HSV-1）、Ⅱ型单纯疱疹病毒（HSV-2）是具有良好溶瘤活性的病毒载体，其能够特异性杀伤肿瘤细胞而不损伤正常细胞，且可调控肿瘤微环境中处于免疫耐受状态的淋巴细胞，激活其抗肿瘤作用[1]。

我们前期研究以Ⅱ型单纯疱疹病毒（HSV-2）为病毒骨架，构建了溶瘤病毒 OH2。OH2 的改造过程包括敲除神经毒性基因 ICP34.5 和免疫抑制基因 ICP47[2]，并插入人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（hGM-CSF）[3]。改造后的病毒不仅具备较高溶瘤活性，还能招募免疫细胞至肿瘤部位。

目前主流的数字 PCR 技术可分为液滴式 dPCR（ddPCR）和芯片式 dPCR（cdPCR）[4]，但 cdPCR 实验成本高。实时荧光定量 PCR（qPCR）虽在病毒检测中应用广泛，但对于血液和脑脊液（CSF）等病毒载量较低的体液样本，其检测准确度、灵敏度及重复性仍未达到理想水平[5]。相比之下，ddPCR 定量检测采用终点检测而非实时扩增，定量过程受标本中可能存在的扩增抑制剂影响较小，且背景读数相对较低，因此可有效减少假阳性结果的产生[6]，同时较少受到扩增效率不佳的影响[7]。此外，ddPCR 还可在不提取基因组的前提下直接对样本进行检测[8]。ddPCR 可以更精确、灵敏地定量检测靶基因，例如可实现对低病毒载量下抗病毒治疗的精准定量监测[9-10]。ddPCR 基于“油包水”原理，使每个微滴单元包含一个或多个核酸分子，随后对每个单元中的目标分子进行扩增。扩增后，荧光信号强度与 OH2 样品的核酸拷贝数呈正相关，再通过泊松概率分布公式对各单元的荧光信号进行统计和计算，最终实现对起始样品核酸的绝对定量。

在定量研究中，检测方案的建立和验证至关重要。本研究拟建立一种用于 OH2 检测和定量的 ddPCR 方法，并对从特异性、定量下限和检测限、线性关系、准确度、精密度及稳定性等 6 个方面对该方法进行验证[11]。

1 实验材料

实验采用的样本制备仪（Drop Maker M1）、生物芯片分析仪（Chip Reader R1）、样本制备通用试剂盒、微液滴检测通用试剂盒、4 × Probe DpcrUnimix（with UNG）都来自北京新羿；OH2-Primer-F/R 及 OH2 Taqman Probe 由南京金斯瑞生物科技公司合成；OH2 注射液和人外周血样本由武汉滨会生物友情提供；PCR 扩增仪来自苏州东胜兴业科学仪器有限公司。

[收稿日期] 2024－03－13

[第一作者] 李 乐（1998－），女，四川阆中人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为肿瘤生物治疗。

2 实验方法

2.1 引物和探针

根据 GenBank 中 hGM-CSF 基因序列(Gene ID：1437)设计 OH2 的引物和探针，靶向高度保守的 5'非翻译区(5'Untranslated Regions，5'UTR)；探针 5'端标记报告荧光基团(Reporter，R)，该基团为 FAM。引物和探针的具体序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

名称	序列	5'修饰	3'修饰
OH2-Primer-F	GTCATCTCTAGAATGTTTGACCTCC	N/A	N/A
OH2-Primer-R	ATGTGCCTAGAAGTTCCGGGTT	N/A	N/A
OH2 Taqman Probe	AGGCGAATCACAGTGCATACACCC	6-FAM	BHQ1

2.2 核酸提取

取出真空包装的 MagaBio Plus 病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒Ⅲ，将各个组分颠倒混匀数次后，轻甩深孔板，确保深孔板内的磁珠均沉至板底。依据说明书，在裂解液试剂条中按顺序加入 300 μL 的溶瘤病毒 OH2，再将预分装板与裂解液试剂条、磁珠试剂条、去蛋白漂洗液试剂条、洗液试剂条 1、洗液试剂条 2、洗脱液试剂条按实验需求摆放整齐。实验结束后，将洗脱板中的 OH2 基因组转移至无核酸酶的离心管中，用于数字 PCR(ddPCR)实验的线性关系、最低检测限(LOD)、最低定量限(LLOQ)及精密度验证。

2.3 ddPCR 反应体系溶液的配制

实验体系取样源及终浓度/取样体积见表 2。

表 2 反应体系(20μL)及终浓度/取样体积

取样源	终浓度/($\mu mol \cdot L^{-1}$)	取样体积/μL
4×Probe Dpcr Unimix (with UNG)	1	—
OH2-Primer-F(10 μmol/L)	0.8	—
OH2-Primer-R(10 μmol/L)	0.8	—
OH2 Taqman Probe (10 μmol/L)	0.25	—
RNase-free ddH_2O		6.95
模板		10

2.4 ddPCR 扩增

2.4.1 反应体系配制 在无核酸酶的离心管中，每孔加入 20 μLPCR 反应体系溶液；随后向每管中加入 10 μL 样品(含质控样品与待测样品)，充分混匀后进行快速离心，备用。

2.4.2 仪器准备与样品放置 启动样本制备仪，待仪器完成自检后，将八联排管放入仪器指定位置。

2.4.3 微液滴生成芯片组装

1)将微液滴生成芯片装入配套的生成芯片机械卡具中；

2)向芯片的水孔中加入 30 μL 待测样本，向油孔中加入 160 μL 微液滴生成油；

3)分别在芯片的水孔和油孔上覆盖微液滴生成芯片密封垫。

2.4.4 芯片卡具固定与仪器运行 将装有微液滴生成芯片的卡具放入仪器对应位置，压下把手完成固定，随后盖上仪器上盖，启动仪器运行以生成微液滴。

2.4.5 PCR 扩增 微液滴生成完毕后，取出卡具，为含有微液滴的八联排管盖上管盖，将其放入 PCR 扩增仪中，按照以下程序进行样品扩增：

1)预变性：95℃，2.5 min。

2)循环(共 42 个循环)：94℃(变性)，30 s→60℃(退火/延伸，根据引物设计补充)，30 s。

3)冷却：12℃，5 min。

2.5 生物芯片分析仪检测

启动生物芯片分析仪进行自检。自检完成后，打开仪器上盖，先将装有 PCR 反应完成的微液滴八联排管和微液滴检测芯片分别放在检测芯片机械卡具的相应位置，压下卡具上盖固定芯片，在油孔 1 和油孔 2 中分别加入 430 μL 和 500 μL 微液滴检测油，盖上微液滴检测芯片密封垫，然后将带有微液滴检测芯片的卡具放入生物芯片分析仪中，启动生物芯片分析仪进行分析。

2.6 实验数据分析

使用北京新弈数字 PCR 仪专用软件 ChipReader R1-V1 进行数据采集和测试样品浓度计算；采用 Microsoft Office Excel 进行数据汇总；使用 GraphPad Prism 10.1.0 版本(GraphPad Software，San Diego，CA，USA)进行统计分析。

检测结果以拷贝数(copies/μL)为单位，且保留 1 位有效数字；偏差(Bias)及变异系数(CV)等以百分数表示的数据，保留 1 位小数；标准差保留 1 位有效数字。

变异系数(CV)计算公式：

$$CV=(\text{标准偏差}/\text{测定均值})\times 100\%$$

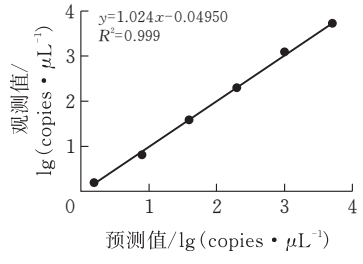
偏差(Bias)计算公式：

$$Bias=\frac{\text{测定浓度均值}-\text{理论浓度值}}{\text{理论浓度值}}\times 100\%$$

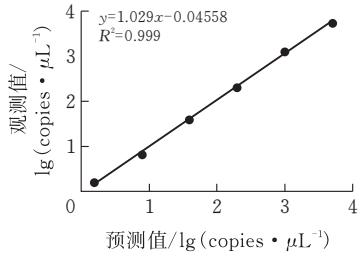
3　实验结果

3.1　ddPCR 扩增线性和检出限

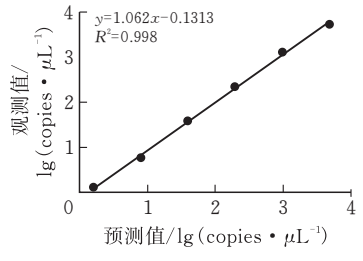
制备 6 个浓度水平的样品于文库稀释缓冲液中，浓度分别为 5×10^3 copies/μL、1×10^3 copies/μL、2×10^2 copies/μL、40 copies/μL、8.00 copies/μL、1.60 copies/μL。每次实验均包含阳性对照(Positive Control，浓度 5×10^2 copies/μL)与阴性对照(Negative Control，NC，浓度 0 copies/μL)。3 次重复实验的线性验证结果如图 1 所示(相关系数 $R^2>0.980$，保留 3 位小数)。



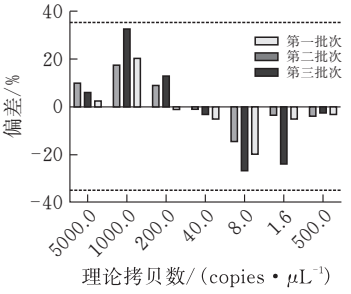
(a)第一次试验



(b)第二次试验



(c)第三次实验



(d)线性验证检测限

图 1　线性和范围验证

根据线性扩增范围结果，确定数字 droplet 聚合酶链式反应(ddPCR)的检测限(limit of detection，LOD)为 1.6 copies/μL。依据“Recommendations on qPCR and ddPCR Assay Validation by GCC”[11]的要求，ddPCR 的 LOD 验证标准为偏差(Bias)≤±35%。如图 1d 所示，3 次实验的偏差结果分别为−0.6%、−3.8%、−23.8%，均满足上述 LOD 验证标准。

3.2　ddPCR 定量下限(LLOQ)的确定

确定数字 droplet 聚合酶链式反应(ddPCR)针对标准品检测的检出限(LOD)为 1.6 copies/μL 后，进一步开展定量下限(Lower Limit of Quantitation，LLOQ)的确定工作。根据 GCC 验证标准中关于 LLOQ 的要求(实验偏差 Bias≤±35%、变异系数 CV<40%)[11]，结合已确定的 LOD(1.6 copies/μL)，选取 2.0 copies/μL 和 5.0 copies/μL 两个浓度进行 LLOQ 验证。

针对上述两个浓度，采用 ddPCR 进行检测，并对多次实验的偏差(Bias)和变异系数(CV)进行统计分析。如表 3 所示：对于浓度为 2.0 copies/μL 的样品，经 5 次重复检测后，其偏差(Bias)超出±35.0%范围，且变异系数(CV)>40.0%，因此 2.0 copies/μL 不符合本研究的 LLOQ 要求。

表 3　5.0 copies/μL 及 2.0 copies/μL 浓度模板进行 ddPCR 扩增实测浓度、偏差及变异系数分析

理论拷贝数/(copies/μL⁻¹)	样本实测值			标准差(S. D)	偏差(Bias)/%	变异系数(CV)/%
	1	2	3			
5.0	4.2	4.4	4.9	0.4	−10.0	8.0
	3.3	4.7	3.6	0.7	−22.7	19.1
	5.3	3.2	4.5	1.1	−13.3	24.5
	6.0	6.3	3.9	1.3	8.0	24.2
	5.4	5.7	6.8	0.7	19.3	12.4
2.0	1.3	1.1	1.4	0.2	−36.7	12.1
	1.1	1.6	1.1	0.3	−36.7	22.8
	2.2	1.6	1.4	0.4	−13.3	24.0
	1.9	1.4	3.7	1.2	16.7	51.8
	1.1	1.6	1.8	0.4	−25.0	24.0

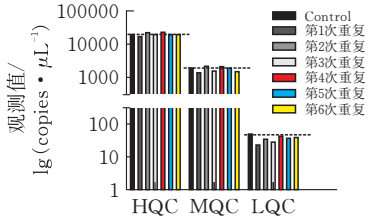
进一步对浓度为 5.0 copies/μL 的样品进行 5 次重复 ddPCR 检测。结果显示：偏差(Bias)范围为

−22.7%～19.3%，变异系数(CV)范围为 8.0%～24.5%，均满足 LLOQ 的判断标准。综上，确定 5.0 copies/μL 为本研究中 ddPCR 针对标准品检测的定量下限(LLOQ)。

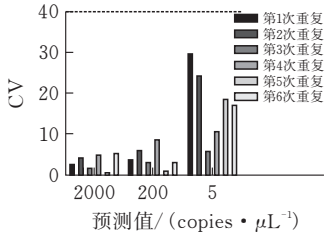
3.3 ddPCR 精密度验证

设置 3 份高浓度(HQC)阳性样本(浓度为 2.0×10^3 copies/μL)、3 份中浓度(MQC)阳性样本(浓度为 2.0×10^2 copies/μL)、3 份低浓度(LQC)阳性样本(浓度为 5.0 copies/μL)。安排 2 名检测人员进行实验，每人各检测 6 份样本，通过对检测结果的分析，评估数字聚合酶链式反应(ddPCR)的精密度。

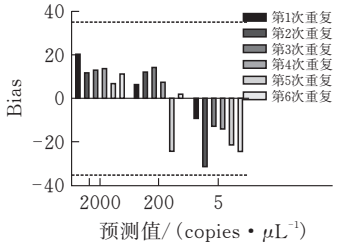
图 2b 中，为 2 人共 6 次重复实验的变异系数(CV)，结果显示所有 CV 值均满足 CV＜40%的要求；图 2c 则展示了 2 人共 6 次重复实验的偏差(Bias)，所有 Bias 值均符合 Bias＜±35%的标准。上述结果表明，采用 ddPCR 技术检测 OH2 具有较高的精密度。



(a)2 人共进行 6 次独立实验的检测结果



(b)2 人共进行 6 次独立实验的变异系数(CV)

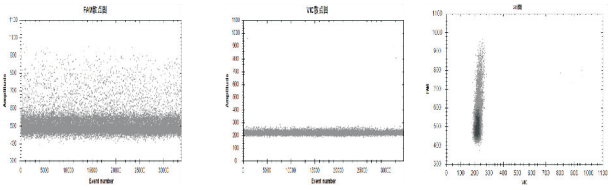


(c)2 人共进行 6 次独立实验的偏差(Bias)

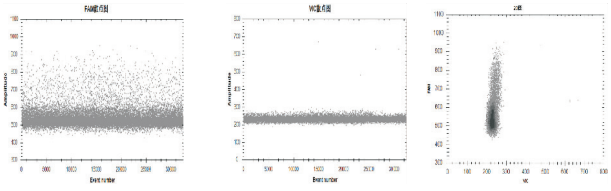
图 2 ddPCR 精密度验证

3.4 ddPCR 特异性验证

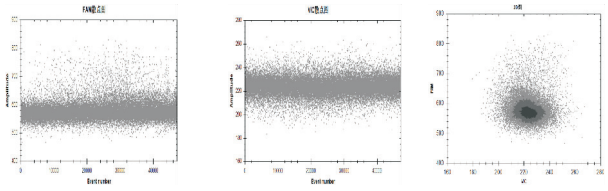
使用下列病毒基因组开展了 ddPCR 特异性验证：Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1)17＋毒株、Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)MS 毒株、CMV、EBV。在特异性实验过程中，设置了阳性对照、阴性对照、无模板对照。特异性结果如图 3 所示，Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1)17＋毒株、Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)MS 毒株、CMV、EBV 均未获得阳性扩增，可证明所建立的 ddPCR 特异性较好。



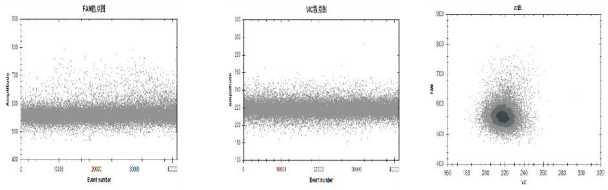
(a)以Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1)17＋毒株基因组为模板



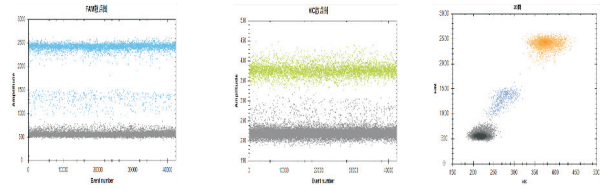
(b)以Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)MS 毒株基因组为模板



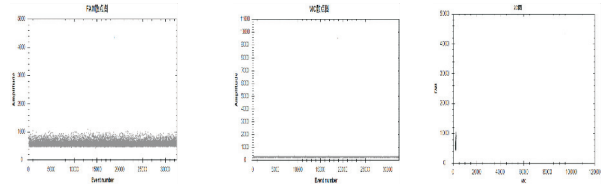
(c)以 CMV 基因组为模板



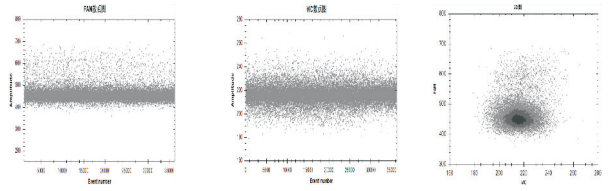
(d)以 EBV 基因组为模板



(e)以阳性对照为模板



(f)无模板对照



(g)以阴性对照为模板

图 3 ddPCR 扩增特异性

3.5　病毒基因组稳定性及反复冻融检测

为验证所建立的 ddPCR 方法对不同时间、温度储存及反复冻融处理的病毒基因组检测稳定性，本研究采用浓度为 2.0×10^3 copies/μL 和 5.0 copies/μL 的 OH2 基因组 DNA 进行检测。

3.5.1　不同时间及温度储存条件下的稳定性检测

针对病毒基因组的储存稳定性，设置以下 3 组保存条件：室温（25℃左右）储存 6 h；4℃冷藏储存 24 h；−70℃冷冻储存 3 个月。

对上述条件下储存的病毒基因组，采用 ddPCR 方法检测其基因拷贝数，并进行偏差（Bias）及变异系数（CV）分析。实验设计为：2.0×10^3 copies/μL 和 5.0 copies/μL 两个浓度组分别进行 3 次独立检测，每次检测设置 5 个重复样本。

3.5.2　反复冻融条件下的稳定性检测

针对病毒基因组的反复冻融稳定性，以 2.0×10^3 copies/μL 和 5.0 copies/μL 为初始浓度，设置两组冻融处理，即：−70℃条件下反复冻融 3 次；−70℃条件下反复冻融 4 次。

同样采用 ddPCR 方法检测基因组拷贝数，并开展偏差（Bias）及变异系数（CV）分析，实验重复设计与“不同时间及温度储存实验”一致（每个浓度组 3 次独立检测，每次检测 5 个重复样本）。

3.5.3　检测合格标准及结果

不同时间及温度储存、反复冻融处理的病毒基因组检测稳定性合格标准为：偏差（Bias）在±25.0%以内，且变异系数（CV）≤25.0%。

不同时间及温度储存结果见表 4。对于 2.0×10^3 copies/μL 浓度组，各储存条件下偏差（Bias）为−14.2%～15.3%，变异系数（CV）为 0.1%～7.5%，均符合合格标准；对于 5.0 copies/μL 浓度组，各储存条件下偏差（Bias）为−38.0%～10.0%（其中部分条件下偏差超出±25.0%合格范围），变异系数（CV）为 1.8%～23.3%（均符合合格标准）。

表 4　不同存储温度及存储时间基因组模板进行 ddPCR 扩增结果

储存条件	冻融/h	2.0×10^3（copies/μL）			
		实测浓度（平均值）	标准差（S.D）	偏差（Bias）/%	变异系数（CV）/%
室温	6	1865.5	85.8	−6.7	4.6
		1767.6	1.8	−11.6	0.1
		2124.3	76.5	6.2	3.6
4℃	24	2306.5	154.5	15.3	6.7
		2035.1	20.4	1.8	1.0
		2048.2	18.4	2.4	0.9
−70℃	2160	1716.2	78.9	−14.2	4.6
		1949.6	146.2	−2.5	7.5
		1996.5	49.9	−0.2	2.5
储存条件	冻融/h	5.0×10^0（copies/μL）			
		实测浓度（平均值）	标准差（S.D）	偏差（Bias）/%	变异系数（CV）/%
室温	6	4.3	1.0	−14.0	23.3
		4.4	0.7	−12.0	15.9
		5.5	0.1	10.0	1.8
4℃	24	3.8	0.2	−24.0	5.3
		4.9	0.5	−2.0	10.2
		4.6	0.2	−8.0	4.3
−70℃	2160	5.5	0.9	10.0	16.4
		4.2	0.8	−16.0	19.0
		3.1	0.7	−38.0	22.6

反复冻融结果如表 5 所示。冻融 3 次（−70℃）：2.0×10^3 copies/μL 浓度组，偏差（Bias）为−6.5%～11.3%，CV 为 0.5%～4.6%（均合格）；5.0 copies/μL浓度组，偏差（Bias）为−20.0%～−2.0%，CV 为 8.2%～24.5%（均合格）。冻融 4 次（−70℃）：2.0×10^3 copies/μL 浓度组，偏差（Bias）为−2.2%～2.6%，CV 为 1.5%～7.1%（均合格）；5.0 copies/μL 浓度组，偏差（Bias）为−8.0%～30.0%（部分结果超出±25.0%合格范围），CV 为 1.5%～6.5%（均合格）。

3.6　基因提取回收率的验证

为考察 OH2 基因组在临床待检基质中提取的回收率，采集了 5 位志愿者的样品基质，具体包括全血（K2EDTA 抗凝）和病毒采样拭子两种类型。实验中，分别向上述混合样品基质中添加两种浓度水平的 OH2 基因组，即 2×10^3 copies/μL（高浓度质控，HQC）和 5 copies/μL（低浓度质控，LQC）。

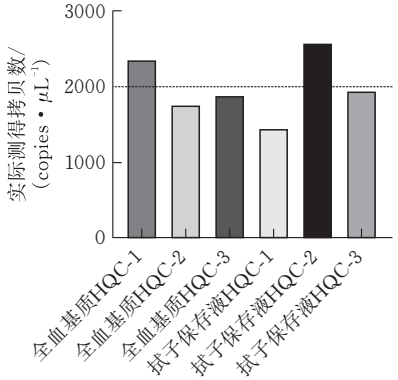
表 5 反复冻融基因组模板进行 ddPCR 扩增结果

储存条件	冻融次数	2.0×10^3(copies/μL)			
		实测浓度(平均值)	标准差(S.D)	偏差(Bias)/%	变异系数(CV)/%
−70℃	3	1869.8	86.0	−6.5	4.6
		1903.0	9.5	−4.9	0.5
		2225.2	71.2	11.3	3.2
−70℃	4	1981.3	47.6	−0.9	2.4
		2052.2	145.7	2.6	7.1
		1956.0	29.3	−2.2	1.5
储存条件	冻融次数	5.0×10^0(copies/μL)			
		实测浓度(平均值)	标准差(S.D)	偏差(Bias)/%	变异系数(CV)/%
−70℃	3	4.0	0.9	−20.0	22.5
		4.9	0.4	−2.0	8.2
		4.9	1.2	−2.0	24.5
−70℃	4	4.6	0.3	−8.0	6.5
		5.0	0.1	0.0	2.0
		6.5	0.1	30.0	1.5

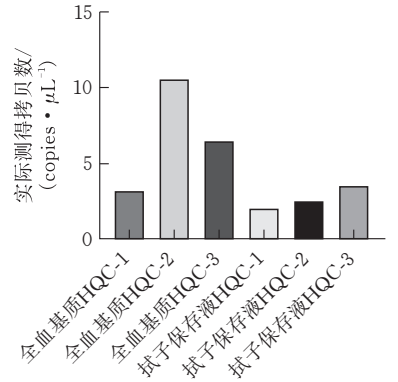
提取回收率按以下公式计算：

$$\text{提取回收率}=\frac{\text{提取后测试浓度}\times\text{提取后样品体积}}{\text{基质样品添加浓度}\times\text{提取前样品体积}}\times100\%$$

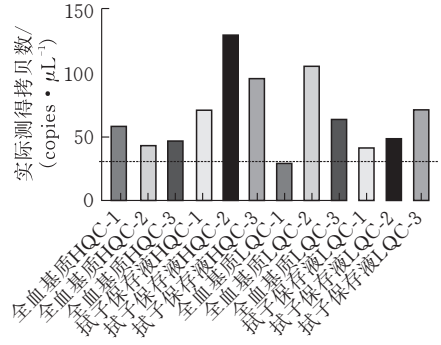
结果显示，将 2×10^3 copies/μL(HQC)和 5 copies/μL(LQC)的 OH2 基因组分别加入全血及病毒采样拭子基质后，所有实验组的提取回收率均大于 30%，符合实验验证要求(图 4)。



(a)全血与拭子保存液中三志愿者 HQC 的 ddPCR 结果



(b)全血与拭子保存液中三志愿者 LQC 的 ddPCR 结果



(c)全血与拭子保存液的病毒基因组提取回收率

图 4 基因组提取回收率验证

4 结束语

本研究建立的针对溶瘤病毒 OH2 的微滴式数字 PCR(ddPCR)检测方法，其扩增靶基因为插入 OH2 病毒基因组中的人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)基因。因此，该 ddPCR 检测方法具有良好的特异性：对Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1)、Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)、巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(EBV)等病毒的基因组均无法实现扩增，仅能特异性扩增溶瘤病毒 OH2 的基因组。这一特异性可确保其在临床样品检测中，能够准确对 OH2 病毒进行定量分析。

需要注意的是，人体感染野生型单纯疱疹病毒(HSV)的概率较高，且感染后病毒会潜伏在神经节内[12]。因此，研发能够特异性检测 OH2 病毒基因组、而非野生型 HSV-1 或 HSV-2 的检测方法很有必要。

实验结果显示，本研究建立的 ddPCR 方法针对 OH2 病毒基因组的检出限为 1.6 copies/μL，定量下限为 5.0 copies/μL；针对病毒基因组的长期冻存实

验及反复冻融实验结果表明，该 ddPCR 方法可对经室温存储 6 h、4℃存储 24 h、－70℃存储 3 个月处理的病毒基因组样本进行有效定量检测。上述实验结果为临床试验过程中样本的收集与处理提供了理论依据。

此外，针对病毒基因组的反复冻融实验结果显示：对于低浓度的病毒基因组样本，经过反复冻融后，其检测结果的偏差较大。这提示在临床试验过程中，应尽量减少病毒基因组样本的反复冻融次数，以保证检测结果的准确性。

[参 考 文 献]

[1] WANG Y, JIN J, WU Z, et al. Stability and antitumor effect of oncolytic herpes simplex virus type 2 [J]. Oncotarget, 2018, 9(37): 24672-24683.

[2] LIU B L, ROBINSON M, HAN Z Q, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties[J]. Gene Therapy, 2003, 10(04): 292-303.

[3] ANDTBACKA R H, KAUFMAN H L, COLLICHIO F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma[J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2015, 33(25): 2780-2788.

[4] 周小匀，周琰，郭玮. 数字 PCR 技术及其在临床检验中的研究进展[J]. 检验医学与临床，2023：2738-2743.

[5] LI H, BAI R, ZHAO Z, et al. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases[J]. Biosci Rep, 2018, 38(06): BSR20181170-BSR20181170.

[6] LIU X, FENG J, ZHANG Q, et al. Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets[J]. Emerging microbes & infections, 2020, 9(01): 1175-1179.

[7] SEDLAK R H, NGUYEN T, PALILEO I, et al. Superiority of digital reverse transcription-PCR (RT-PCR) over real-time RT-PCR for quantitation of highly divergent human rhinoviruses[J]. Journal of clinical microbiology, 2017, 55(02): 442-449.

[8] PAVŠIČJ, ŽEL J, MILAVEC M. Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2016, 408(01): 67-75.

[9] HUDECOVA I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids[J]. Clinical biochemistry, 2015, 48(15): 948-956.

[10] GUO M, DENG L, LIANG H, et al. Development and preliminary application of a droplet digital PCR assay for quantifying the oncolytic herpes simplex virus type 1 in the clinical-grade production[J]. Viruses, 2023, 15(01): 178.

[11] WISSEL M, POIRIER M, SATTERWHITE C, et al. Recommendations on qPCR/ddPCR assay validation by GCC[J]. Bioanalysis, 2022, 14(12): 853-863.

[12] 董亚慧，赵格，周庆军. 单纯疱疹病毒Ⅰ型在三叉神经节潜伏复发机制的研究进展[J]. 国际眼科杂志，2023，23(05)：787-790.

The Establishment of Droplet Digital PCR and TaqMan qPCR Detection Methods for Oncolytic Herpes Simplex Virus Type 2 (OH2)

LI Le, YANG Jingru, WANG Xinya, XIA Wen, WANG Yang, HU Han, LIU Binlei

(*School of Life Science and Health Engineering, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*)

Abstract: Aiming at the establishment of a specific, sensitive and stable method for the detection of lyssavirus OH2 (hereinafter referred to as OH2) gene copy number using microdroplet PCR (ddPCR method), the established method was validated in terms of amplification linearity, sensitivity, lower limit of quantification, precision, selectivity, and the stability of repeated freeze thawed samples was determined. The results showed that the protocol had good amplification linearity ($R^2 > 0.98$). The sensitivity was 1.6copies/μL, the lower limit of quantification was 5copies/μL, the maximum coefficient of variation (%CV) for precision was 29.8%, and the range of deviation (%Bias) was 30.4%～20.6%. The established ddPCR method has good selectivity and specificity, and the extraction recovery can accurately detect the viral DNA in whole blood and swabs as well as the repeated freeze thawing samples. The results showed that the established ddPCR can be used as a quantitative assay for OH2.

Keywords: microdroplet PCR (ddPCR); oncolytic herpes simplex virus OH2; gene copy number

[责任编校：张　众]