[文章编号] 1003－4684(2026)01-0103-05

定量检测溶瘤病毒 OH2 的 TaqMan qPCR 方法建立

李 乐，杨婧如，王欣雅，夏 雯，汪 洋，胡 翰，刘滨磊

(1 湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 420068；2 武汉滨会生物科技股份有限公司，湖北 武汉 420030)

[摘 要] 为定量检测溶瘤病毒 OH2，建立了一种基于 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR(qPCR)方法。对建立的 TaqMan qPCR 方法进行线性扩增能力、灵敏度、定量下限、特异性进行验证，并验证该方法的提取回收率。结果显示，该方法具有良好的扩增线性关系($R^2>0.980$)，检出限(LOD)为 4 copies/μL，定量下限(LLOQ)为 50 copies/μL，并且 TaqMan qPCR 方法具有很好的特异性。该定量检测方法的建立为针对溶瘤病毒 OH2 临床试验样品的生物分布研究提供了可靠的工具。

[关键词] TaqMan qPCR；溶瘤病毒 OH2；基因组拷贝数；方法学验证

[中图分类号] R373 [文献标识码] A

Ⅰ型单纯疱疹病毒和 Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV 1/2)是具有良好溶瘤活性的病毒载体。溶瘤病毒作为一种自然存在或经过基因工程改造的病毒，能够在肿瘤细胞中选择性复制、裂解肿瘤细胞并调节肿瘤微环境[1]。本研究所检测的溶瘤病毒 OH2，是以Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)HG52 株为载体，通过敲除 ICP34.5 和 IICP47 基因，并在 ICP34.5 位点插入人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)基因构建而成[2]。其结构蛋白 VP5 能够通过 TP53I3 分子诱导 A549 细胞凋亡[3]，并完成了相关的临床前药学、药效学及毒理研究[4-5]。目前，该溶瘤病毒正在国内开展关键性Ⅲ期临床试验。

在溶瘤病毒临床试验过程中，需要对其生物分布及病毒脱落进行准确定量分析。实时荧光定量 PCR 技术在多种病原体(包括病毒、细菌及寄生虫)检测中应用广泛。如针对乙肝病毒(HBV)检测，除实现定量外，还可以进行基因分型和 YMdd 突变检测，结果和直接测序法符合率较高，操作相对简单[6]。在细菌全身感染的诊断中，尽管血培养是金标准，但其结果常受到样本处理和培养条件的影响导致误诊[7]。因此，首次建立针对 OH2 病毒的 TaqMan qPCR 定量检测方法，并开展系统方法学验证，为临床试验样本检测提供标准化技术工具。TaqMan qPCR 法广泛用于针对病毒、细菌的定量检测[8]。随着科技的发展，检测更准确、更迅速的 PCR 扩增仪将不断被推出，TaqMan 探针法将得到进一步的推广和应用[9]。根据“The MIQE Guidelines：Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”[10]，本研究旨在建立针对溶瘤病毒 OH2 的 TaqMan qPCR 检测方法，并对该方法的特异性、线性、定量限等进行研究，为对溶瘤病毒 OH2 临床试验样品的生物分布研究奠定了基础。

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 xProbe Dpcr Unimix (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以及 pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF 标准质粒由武汉滨会生物友情提供；RNase-free ddH_2O 和 Taq Pro U^+ Multiple Probe qPCR Mix 来自 Vazyme；DH5α 感受态、质粒小提试剂盒由滨会生物实验室提供；DMEM/F12 培养基来自 Cytiva；病毒基因组提取试剂盒采购于 QiAGEN。

2 实验方法

2.1 引物和探针

参考 GenBank 序列，设计靶向 OH2 的引物和探针。引物和探针的序列见表 1。

[收稿日期] 2024－03－24

[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。

[通信作者] 刘滨磊(1962－)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

表 1 引物和探针的序列

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 制备标准质粒

按标准流程提取质粒，该质粒将用于后续方法线性、检测限（LOD）及定量下限（LLOQ）的验证。取 pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF 质粒 1 μL 加入 100 μL 大肠杆菌感受态细胞中冰浴 30 min 后，42℃ 热激 90 s′立即放置冰上冰浴 2 min；加入 900 μL LB 培养基，于 37℃ 220 r/min 摇床震荡培养60 min，5000 g 离心 5 min 弃去 900 μL 上清混匀后，滴加至含有氨苄青霉素（100 μg/mL）的 LB 固定培养基上，37℃倒置培养过夜。翌日，挑取单克隆于 20 mL 含氨苄青霉素（1∶1000）LB 培养基中，37℃ 220 r/min 过夜培养。使用小提试剂盒提取质粒并测定质粒浓度。

2.3 TaqMan qPCR

使用微滴式数字 PCR（ddPCR）对提取的质粒进行绝对定量，确定其基因组拷贝数浓度，以此作为标准品进行后续验证。制备 8 个浓度的标准曲线样品于 RNase-free ddH_2O 中：5.00×10^6 copies/μL、5.00×10^5 copies/μL、5.00×10^4 copies/μL、5.00×10^3 copies/μL、5.00×10^2 copies/μL、5.00×10^1 copies/μL、5.00×10^0 copies/μL。设置空白样品（0 copies/μL，RNase-free ddH_2O）。OH2-Primer-F/R、OH2 TaqMan Probe 工作液的配制：分别取 5 μL OH2-Primer-F（100 μmol/L）加入至 45 μL RNase-free ddH_2O 中，混匀。以 400 nmol/L 的终浓度添加上下游引物，探针终浓度 250 nmol/L。反应总体系 20 μL 由 10μL 2×Taq Pro U^+ Multiple Probe qPCR Mix、0.8 μL 上下游引物混合物、0.5 μL 探针混合物、0.4 μL 50×ROX Reference Dye1、5 μL DNA 和 2.5 μL 无核酸酶水组成。将 20 μL 系加入 GSBIO 八联管中，放于 qPCR 仪（Applied biosystems StepOnePlus Real-Time PCR）中根据以下程序扩增样品：37℃ 2 min（污染消化），95℃ 30 s（预变性），40 个循环的 95℃ 10 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s（荧光采集）。

2.4 标准曲线验证验收标准

根据国际公认的 MIQE[10]（minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments），qPCR 的验证必要信息：1）标准曲线的斜率－3.58～－3.10 和 y 轴截距；2）标准曲线的扩增效率（可选）；3）标准曲线的 $R^2>0.980$；4）qPCR的标准曲线样品至少 75%（6 个不同浓度水平包括 ULOQ、LLOQ）满足：a）复孔 Ct 值变异系数≤2%；b）偏差不超过±25%（LLOQ 的标曲样品偏差不超过±45.0%）。

2.5 样品验证通过条件

1）阴性对照的 Ct 值大于 LLOQ 的 Ct 值，或空白样品不出现扩增峰（undeterminated）；

2）复孔测定浓度值均不超过定量范围：变异系数（%CV）≤25%（2 倍 LLOQ 浓度以下≤45%），则取均值，符合 2.4 节验收标准。

2.6 数据分析

采用 Applied biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System 进行数据采集、标准曲线的回归和测试样品浓度计算。

标准曲线拟合方式为半对数回归拟合，回归公式

$$y = a \cdot \lg(x) + b$$

式中：y 为复孔扩增 Ct 值均值，x 为 OH2 浓度，a 为标准曲线斜率（slop），b 为标准曲线截距（Y-intercept）。

变异系数（coefficient of variation）和偏差（bias）的计算公式：变异系数＝（标准偏差/测定均值）×100%；偏差＝[（测定浓度均值－理论浓度值）/理论浓度值]×100%。

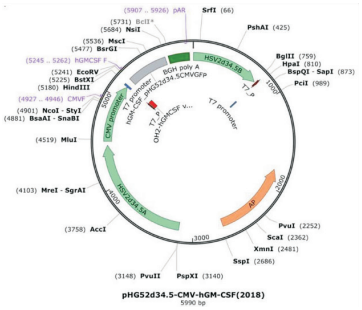
样品浓度的计算公式：样品浓度（copies/μL）＝lg[（Ct 值－截距）/斜率]。

3 结果

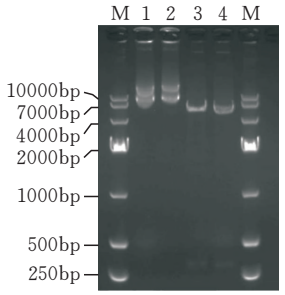
3.1 标准曲线验证

提取并验证了表达 hGM-CSF 的标准质粒 pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF（图 1a）。该质粒理论长度为 5990 bp。提取含目的扩增靶基因的该质粒后，进行凝胶电泳验证（图 1b）；随后采用数字 PCR（ddPCR）技术对提取的质粒进行定量分析，测得其浓度为 1.1×10^7 copies/μL。将该质粒母液稀释至 5.00×10^6 copies/μL，再以此为基础进行连续 10 倍梯度稀释，获得系列标准品（浓度依次为 5.00×10^5、5.00×10^4、5.00×10^3、5.00×10^2、5.00×10^1、5.00×10^0 copies/μL）。以该系列标准品为模板进行 qPCR，构建的标准曲线（图 1c）显示，Ct 值与拷贝数对数之间呈良好线性关系，相关系数（R^2）大于

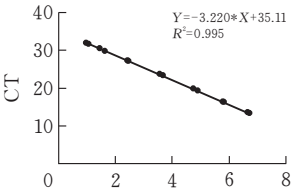
0.980。图 1c 所示为实验重复 4 次后，以各浓度标准品实际测得的平均拷贝数的对数值为纵坐标（y 轴）、循环阈值（Ct 值）为横坐标（x 轴）建立的线性相关曲线。



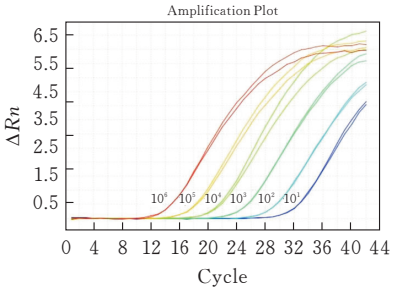
(a) pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF 载体图谱



(b) M：DL 10000 DNA Marker



(c)线性验证标准曲线



(d) TaqMan qPCR扩增曲线

泳道 1—2：pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF 质粒；泳道 3—4：pHG52d34.5-CMV-hGM-CSF 质粒经 EcoRV、Ncoi 双酶切后电泳

图 1　TaqMan qPCR 标准质粒和标准曲线线性关系验证

3.2　定量限和检测限

根据 TaqMan qPCR 标准曲线，对检出限（LOD）进行了探索。制备了浓度为 4.0 copies/μL、2.0 copies/μL、1.0 copy/μL 3 个浓度的标准质粒进行 LOD 的测定，结果如表 2 所示。

表 2　检出限实验数据　　copies/μL

理论拷贝数	样本							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4	10.9	8.5	6.8	6.5	5.3	4.4	3.7	2.3
	6.5	4.4	6.8	2.3	10.9	8.5	3.7	5.3
	1.2	3.8	9.9	7.1	3.2	3.1	5.6	12.6
2	4.5	3.5	2.9	2.3	1.7	1.4	0.7	0.5
	2.3	4.5	0.7	3.5	2.9	0.5	1.4	1.7
	1.1	0.9	0.9	0.7	0.6	0.2	—	—
1	2.3	2.0	5.7	—	1.8	3.7	—	1.4
	—	—	—	—	0.6	0.6	0.4	0.4

“—”表示未检测到信号。

对 4.0 copies/μL 浓度标准品进行 24 次重复检测，阳性检出率达 100%。针对浓度为 2.0 copies/μL 的标准质粒进行了 24 次测定，有 22 次获得阳性扩增，检出率为91.7%。针对浓度为 1.0 copy/μL 的标准质粒进行了 16 次测定，有 10 次获得阳性扩增，检出率为62.5%。因此，确定建立的 TaqMan qPCR 检测方法的检出限为 4.0 copies/μL。

在确定检出限（LOD）为 4.0 copies/μL 后，进一步对该方法的定量下限（LLOQ）进行了测定，使用浓度为 50.0 copies/μL 的标准质粒进行了定量下限的测定。TaqMan qPCR 定量下限测定的判断标准为偏差（%Bias）在±45.0%之内，变异系数（%CV）<2.0%[10]。结果见表 3，针对浓度为 50.0 copies/μL 的标准质粒进行检测时，其偏差（%Bias）范围为−39.4%～43.0%，变异系数（%CV）范围为 0.3%～1.3%。符合定量下限判断标准。因此，确定建立的 TaqMan qPCR 检测方法的定量下限为 50.0 copies/μL。

表 3　TaqMan qPCR 定量下限（LLOQ）测定结果

实际测得浓度平均值/copies·μL^{-1}	标准差（SD）	偏差*（%Bias）	变异系数**（%CV）
34.8	0.4	−30.4	1.1
39.8	0.1	−20.4	0.3
35.6	0.1	−28.8	0.3
40.1	0.2	−19.8	0.5
41.1	0.2	−17.8	0.5
71.5	0.5	43.0	0.7
44.9	0.6	−10.2	1.3
30.3	0.2	−39.4	0.7
41.8	0.2	−16.4	0.5
33.9	0.3	−32.2	0.9
69.7	0.3	39.4	0.4
32.6	0.1	−34.8	0.3
34.8	0.4	−30.4	1.1

3.3 特异性验证

为验证本研究建立的 TaqMan qPCR 方法的特异性，以多种病毒基因组为模板开展验证实验，所用模板包括：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、巨细胞病毒（Cytomegalovirus，CMV）及 oHSV2-PD-L1/CD3-BsAb 病毒的基因组[11]。实验过程中设置了阳性对照、阴性对照及无模板对照以保障结果可靠性。特异性验证结果见图 2。数据显示：HSV-117＋毒株、HSV-2MS 毒株、CMV 及 oHSV2-PD-L1/CD3-BsAb 的基因组模板均未出现阳性扩增信号，仅阳性对照出现预期扩增。上述结果表明，本研究建立的 TaqMan qPCR 方法具有良好的特异性。

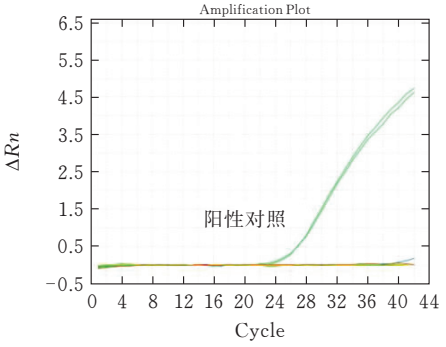


图 2 TaqMan qPCR 引物特异性验证

3.4 基因提取回收率及外周血中病毒检出限和定量下限的验证

使用浓度为 2.0×10^3 copies/μL 的溶瘤病毒 OH2 基因组，验证其在外周血中的基因提取回收率。在健康志愿者的 1 mL 外周血中，加入 20 μL 理论拷贝数为 2.0×10^3 copies/μL 的 OH2 基因组样品，采用 QiAamp MinElute Virus Kits 试剂盒提取病毒基因组。本研究中的 TaqMan qPCR 使用 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR 系统进行，

$$\text{回收率}=\frac{\text{提取后实测病毒拷贝数}}{\text{添加病毒拷贝数}}\times100\%$$

结果如表 4 所示，TaqMan qPCR 测得的提取回收率为 70%。

表 4 TaqMan qPCR 检测外周血中病毒基因组提取回收率

理论拷贝数/（copies·μL^{-1}）	实际测得浓度平均值/（copies·μL^{-1}）	提取回收率/%
2.0×10^3	14.1×10^2	70.5
	14.4×10^2	72.0
	14.7×10^2	73.5

本方法建立的 TaqMan qPCR 的检出限（LOD）为 4.0 copies/μL，定量下限（LLOQ）为 50.0 copies/μL。使用 QiAamp MinElute Virus Kits 试剂盒从 1 mL 外周血中提取基因组后，以 100 μL 缓冲液重悬，取其中 10 μL 进行 TaqMan qPCR 扩增。综合考虑基因提取回收率及样品稀释等因素，所建立的 TaqMan qPCR 针对血液样品中 OH2 病毒拷贝数的理论检出限（LOD）为

4 copies/μL×10 μL（反应体积）×10（稀释倍数）×1.4（1/回收率）＝560 copies/mL

定量下限（LLOQ）为

50 copies/μL×10 μL（反应体积）×10（稀释倍数）×1.4（1/回收率）＝7000 copies/mL

为验证该方法对外周血中病毒拷贝数检测的检出限，使用 10 份健康志愿者的外周血，在每份 1 mL 血样中加入 56 μL 浓度为 10 copies/μL 的 OH2 病毒基因组，提取后进行 TaqMan qPCR 检测。10 次检测结果均为阳性，证实该方法的检出限（LOD）为 560 copies/mL。

表 5 TaqMan qPCR 检测外周血中病毒拷贝数定量下限（LLOQ）测定

理论拷贝数/（copies·μL^{-1}）	实际测得浓度平均值/（copies·μL^{-1}）	标准差（SD）	偏差（%Bias）	变异系数（%CV）
7.0×10^3	6650	73.2	−5.0	1.1
	6850	68.5	−2.1	1.0
	6500	78.0	−7.1	1.2
	6750	67.5	−3.6	1.0
	6850	68.5	−2.1	1.0
	6850	68.5	−2.1	1.0
	6700	80.4	−4.3	1.2
	6500	117.0	−7.1	1.8
	6550	91.7	−6.4	1.4
	6700	107.2	−4.3	1.6

4 讨论与结论

本研究建立的 TaqMan qPCR 检测方法，针对 OH2 病毒基因组的检出限为 4.0 copies/μL，定量下限为 50.0 copies/μL；在外周血中病毒基因组的检出限为 560 copies/mL，定量下限为 7000 copies/

mL(表 5)。该方法特异性良好，对Ⅰ型单纯疱疹病毒(HSV-1)、Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-2)、CMV、oHSV2-PD-L1/CD3-BsAb 等病毒基因组均无法扩增，而对溶瘤病毒 OH2 基因组能够有效扩增。

与传统的 PCR 扩增方法相比，TaqMan 探针法荧光定量 PCR 具有更高的特异性与灵敏度，并能对样品实现精准定量检测[12-13]。本研究建立的针对溶瘤病毒 OH2 的 TaqMan qPCR 检测方法，适用于 OH2 临床样品的检测，包括生物分布及病毒脱落分析。在诸多 qPCR 数据分析策略中，本研究采用的基于标准曲线的绝对定量方法，能够提供高精度和稳健的 DNA 定量结果[14-15]。

相比于普通 PCR，实时荧光定量 PCR(qPCR)在 PCR 基础上结合荧光检测技术，实现了从定性到定量的跨越，具有灵敏度高、特异性强的优点，同时有效避免了普通 PCR 易污染环境及检测结果易出现假阳性的问题。将 TaqMan qPCR 或 ddPCR 与 TCID50 方法结合，可在测定感染性滴度的过程中，通过定量检测不同时间点病毒基因组拷贝数的增殖情况，即使未出现细胞病变，也能判断是否存在活病毒复制。这也是临床判定活病毒存在的方法之一[16]。

基于本研究，后续将针对临床试验中产生的尿液样本和拭子样本开展 TaqMan qPCR 检测方法的建立与优化研究。尿液和拭子是临床试验中潜在的病毒脱落来源。在已建立的病毒基因组检测方法基础上，通过优化尿液及拭子样本的 DNA 提取流程，提高 DNA 回收率，从而实现对这两类样本的可靠定量检测。此外，还需在不同操作人员、不同操作时间条件下，对本研究建立的 TaqMan qPCR 检测方法进行组内与组间精密度验证，这也是后续需要开展的工作。

[参 考 文 献]

[1] MACEDO N, MILLER D M, HAQ R, et al. Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020[J]. J immunother Cancer, 2020, 8(02): e001486.

[2] 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.

[3] WANG Y, ZHANG H, ZHOU Q, et al. VP5 protein of oncolytic herpes simplex virus type 2 induces apoptosis in A549 cells through TP53i3 protein[J]. Virology, 2024, 595: 110093.

[4] WANG Y, ZHOU X, WU Z, et al. Preclinical safety evaluation of oncolytic herpes simplex virus type 2[J]. Human gene therapy, 2019, 30(05): 651-660.

[5] WANG Y, JIN J, LI Y, et al. NK cell tumor therapy modulated by UV-inactivated oncolytic herpes simplex virus type 2 and checkpoint inhibitors[J]. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine, 2022, 240: 64-86.

[6] 刘兴祥，徐云芳，李桂珍，等. Taqman MGB 探针技术在乙型肝炎病毒基因分型检测中的应用[J]. 中华传染病杂志，2010，28(07)：433-435.

[7] BOOL M, BARTON M J, ZiMMERMAN P A. Blood culture contamination in the emergency department: An integrative review of strategies to prevent blood culture contamination [J]. Australasian emergency care, 2020, 23(03): 157-165.

[8] KARLEN Y, MCNAIR A, PERSEGUERS S, et al. Statistical significance of quantitative PCR[J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 131.

[9] 姜文灿，岳素文，江洪，等. TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展[J]. 临床检验杂志，2015，4(01)：797-805.

[10] WITTWER C T, VANDESOMPELE J, SHIPLEY G L, et al. The MiQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(04): 611-622.

[11] 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.

[12] 何蕴韶. 荧光探针定量 PCR 技术[J]. 中国医药导刊，2001，(04)：307-308.

[13] 严菊英，卢亦愚，冯燕，等. TaqMan 荧光定量 RT-PCR 快速检测甲 3 型流感病毒[J]. 中国人兽共患病杂志，2005 (02)：169-172.

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

[15] 曾渊君，李廷栋，鄢小琼，等. 一种通用的基于 NSP5 基因的 A 组轮状病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 病毒学报，2017，33(02)：258-264.

[16] GUSTAFSSON R K, ENGDAHL E E, FOGDELL-HAHN A. Development and validation of a Q-PCR based TCiD50 method for human herpesvirus 6[J]. Virol J, 2012, 9: 311.

(下转第 137 页)