

# $\beta$ -actin实时荧光PCR法的建立和在临床试验中的应用

权娅茹<sup>1</sup>, 陈震<sup>1</sup>, 吉尚志<sup>2</sup>, 邱平<sup>1</sup>, 李长贵<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 北京万泰生物药业股份有限公司, 北京 102206)

**摘要** **目的:** 建立 $\beta$ -actin实时荧光聚合酶链反应(PCR)法, 用于水痘减毒活疫苗和带状疱疹减毒活疫苗临床试验中样本采集有效性的判定, 为临床试验中疫苗安全性判定和保护率的准确计算提供保障。**方法:** 以 $\beta$ -actin质粒、水痘-带状疱疹病毒(VZV)为模板进行 $\beta$ -actin实时荧光PCR法体系的优化和灵敏度、特异性和重复性的验证及Cutoff值的确定。**结果:** 建立的 $\beta$ -actin实时荧光PCR法特异性和重复性好, 灵敏度为 $10 \text{ cps} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。临床样本 $\beta$ -actin扩增成功率99.9% (1746份样本中只有1份 $\beta$ -actin扩增阴性)。**结论:** 建立的 $\beta$ -actin实时荧光PCR法可满足临床试验中样本采集有效性的判定。

**关键词:** 聚合酶链反应;  $\beta$ -actin质粒; 灵敏度; 特异性; 样本采集有效性; 水痘减毒活疫苗; 带状疱疹减毒活疫苗

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)05-0535-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.05.007

## Establishment of $\beta$ -actin Real-time Fluorescence PCR and Its Application in Clinical Trials

Quan Yaru<sup>1</sup>, Chen Zhen<sup>1</sup>, Ji Shangzhi<sup>2</sup>, Qiu Ping<sup>1</sup>, Li Changgui<sup>1\*</sup> (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Beijing Wantai Biological Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing 102206, China)

**Abstract Objective:** To establish a  $\beta$ -actin real-time fluorescence PCR in order to determine the validity of sample collection in clinical trials of live attenuated varicella vaccine and live attenuated herpes zoster vaccine and to guarantee vaccine safety and accurate calculation of vaccine protection rate in clinical trials. **Methods:** The  $\beta$ -actin real-time fluorescence PCR system was optimized, and the sensitivity, specificity and repeatability were verified, and the Cutoff value was determined by using the  $\beta$ -actin plasmid and varicella zoster virus (VZV) as templates. **Results:** The established  $\beta$ -actin real-time fluorescence PCR method has demonstrated good specificity and reproducibility, and the sensitivity was  $10 \text{ cps} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . The success rate of  $\beta$ -actin amplification in clinical samples reached 99.9% (only 1  $\beta$ -actin amplification was negative among 1746 samples). **Conclusion:** The established  $\beta$ -actin real-time fluorescence PCR method can satisfy the confirmation of the validity of sample collection in clinical trials.

**Keywords:** PCR;  $\beta$ -actin plasmid; sensitivity; specificity; validity of sample collection; live attenuated varicella vaccine; live attenuated herpes zoster vaccine

水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 为水痘 (Varicella, Chickenpox) 和带状疱疹 (Herpes Zoster) 两种疾病的病原体。水痘是该病毒原发感染的临床表现, 是儿童时期常见的一种急性、高传染性疾病。带状疱疹是原发感染后病毒长期在宿主脊髓后根神经节、脑神经节及肠道神经节的神经细胞中潜伏, 当受到某些因素影响, 如机体抵抗力降低, 潜伏的病毒被激活所致<sup>[1-3]</sup>。

水痘减毒活疫苗是预防水痘的有效手段, 带状疱疹减毒活疫苗是预防带状疱疹的有效手段, 两者生产工艺相同, 差异主要在病毒滴度上<sup>[4-6]</sup>。目前, 我国已有上市的水痘减毒活疫苗, 随着人们接种意识的增强, 水痘减毒活疫苗的需求量逐年增加, 国内水痘减毒活疫苗的研发企业也在增加。我国带状疱疹减毒活疫苗还处在研发阶段, 目前国内无上市疫苗。

疫苗在上市前需要进行 I 期、II 期和 III 期临床试验。水痘减毒活疫苗和带状疱疹减毒活疫苗的临床试验中, 需要对疫苗的安全性和有效性进行探索, 这就需要对临床期间发生的疑似病例进行收集和鉴定, 确认是否为疫苗目标疾病, 从而进一步对疫苗安全性进行分析, 进一步对疫苗保护效力进行统计。国内外对疑似病例的鉴定主要是通过聚合酶链反应 (PCR) 法确定从疑似病例身上采集的样本中是否含有 VZV 病毒<sup>[7-12]</sup>。在鉴定的过程中, 常常会出现 VZV 扩增阴性的样本, 这些阴性标本的判定直接关系到后续疫苗安全性和保护率的确定, 因此对扩增前样本的采样有效性进行确认就显得非常重要。目前, 未发现有关扩增阴性的样本采样有效性判定这方面的文献报道。 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 是肌动蛋白家族的一员, 肌动蛋白是细胞的一种重要骨架蛋白。在不同物种之间高度保守。作为管家基因,  $\beta$ -actin 在所有组织中相对持续稳定表达, 是 PCR 研究常用的对照基因<sup>[13-15]</sup>, 适合用来作为样本采样有效性判定的对照基因。为了解决临床采样是否有效的判定问题, 本研究选择  $\beta$ -actin 作为参照基因, 研究建立了  $\beta$ -actin 实时荧光 PCR 法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 样品

由于 2 种疫苗均为同一个病毒, 所以建立方法时仅选择了 1 种疫苗: 2 个厂家的水痘减毒活疫苗;  $\beta$ -actin 质粒; 1746 份疱疹、斑丘疹、结痂、唾液

样本。

### 1.2 试剂与仪器

荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 7500), 紫外分光光度计 (HITACHI), 核酸提取仪 (Thermo), 万泰核酸提取试剂盒 (批号: 20190101), Premix (Takara, AIF2314A)。

## 2 方法

### 2.1 $\beta$ -actin 质粒构建

以 NCBI 中公布的人源  $\beta$ -actin (NG\_007992.1) 基因序列为模板, 委托天一辉远公司进行  $\beta$ -actin 质粒的构建。构建的  $\beta$ -actin 质粒中包含连续 6 个左右的 DNA 序列突变, 用于体系的建立, 也方便在临床疱疹液鉴定试验中作为阳性对照, 鉴别体系是否有污染。阳性对照引入突变位点, 是为了和样本中含有的  $\beta$ -actin 基因进行区分, 这样通过检测阳性对照的序列就可以监测样本在处理 and 扩增中是否发生了污染。如果有污染, 则在阳性对照中会出现不含突变位点的  $\beta$ -actin 基因序列。

### 2.2 引物和探针考察

用 Premier 5.0 软件设计  $\beta$ -actin 的 PCR 扩增引物和探针。引物分别为 actin-F: TGCTGTGGAAGCTAAGTCCTG, actin-R: TGGATGTGACAGCTCCCA。探针分别为 actin-P1: 5'FAM-CCACGAACTACCTTCAACTCC-3'BHQ1, actin-P2: 5'FAM-GACACCCACCTTGATCTTCATT-3'BHQ1。

用无菌注射用水将水痘减毒活疫苗分别稀释至 10、1、0.1 PFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 病毒滴度, 然后进行病毒基因组提取, 提取的水痘-带状疱疹病毒基因组作为扩增模板。唾液样本作为临床样本, 无菌注射用水作为阴性对照。病毒和临床样本各扩增 2 次, 阴性对照扩增 4 次。

PCR 扩增体系: Premix 15  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1  $\mu$ L, actin-P1 (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, actin-F (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, actin-R (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, DNA 模板 10  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C, 5 min; 95  $^{\circ}$ C, 15 sec; 55  $^{\circ}$ C, 30 sec; 72  $^{\circ}$ C, 1 min; 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 2.3 PCR 扩增体系优化

用无菌注射用水将水痘减毒活疫苗分别稀释至 1  $\times$  10<sup>4</sup>、1  $\times$  10<sup>2</sup>、1 PFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 病毒滴度, 核酸提

取后,用无touchdown程序“95℃ 5 min; 95℃ 15 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 共40个循环; 72℃延伸10 min”和有touchdown程序“95℃ 5 min; 95℃ 15 sec, 64→55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 10个循环, 每个循环下降1℃; 95℃ 15 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃延伸10 min”分别进行扩增,对Ct值进行考察。

2.4 灵敏度考察

用无菌注射用水将合成的β-actin质粒稀释50倍后进行OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>检测,再根据得到的浓度将β-actin质粒稀释至30、10、5 cps·μL<sup>-1</sup>。每个浓度扩增3次。

2.5 性能验证与Cutoff值确定

质控品组成见表1。灵敏度质控品每个浓度各

准备20份。特异性质控品1准备1份,特异性质控品2~4各准备4份。重复性质控品准备6份。将所有样品核酸提取后用于后续的PCR扩增。

每轮试验的扩增样本数量为40份,分别为20份灵敏度质控品,1份特异性质控品1,特异性质控品2~4各4份,6份重复性质控品,阳性对照为β-actin(1000 cps·μL<sup>-1</sup>)。共进行3轮PCR扩增。

2.6 临床试验应用

用建立的β-actin荧光PCR扩增法对1家企业生产的水痘减毒活疫苗I期临床试验和2家企业生产的带状疱疹减毒活疫苗III期临床试验中收集的1746份疱疹、斑丘疹、结痂、唾液样本进行了PCR扩增,检验其临床适用性。

表1 质控品组成

分类	编号	组成	浓度 / (cps·μL <sup>-1</sup> )	稀释液
灵敏度质控品	1	β-actin	10	无菌注射水
	2	β-actin	30	无菌注射水
特异性质控品	1	唾液	/	唾液保存液
	2	无菌注射水	/	/
	3	A企业病毒稳定剂	/	/
	4	B企业病毒稳定剂	/	/
重复性质控品	1	β-actin	1000	无菌注射水

注:唾液保存液由北京万泰生物药业股份有限公司友情提供。

3 结果与分析

3.1 引物和探针考察结果

保持PCR扩增体系其余成分不变,对合成的探针actin-P1和actin-P2进行考察。扩增模板为不同浓度的水痘-带状疱疹病毒、唾液和无菌注射

水,结果见表2。阴性对照的扩增结果显示2条探针的特异性良好。对病毒和唾液的扩增,actin-P1相对于actin-P2的Ct值均提前2~3个循环,故选择actin-P1。

表2 -actin体系探针法PCR结果

样本浓度 / (PFU·mL <sup>-1</sup> )	Ct均值		Δ Ct (P2-P1)
	actin-P1	actin-P2	
0.1	36.19	38.54	2.35
1	32.79	35.46	2.67
10	29.45	32.14	2.69
唾液	22.26	25.07	2.81
阴性	No Ct	No Ct	/

### 3.2 扩增体系优化结果

选择了A和B家企业的水痘减毒活疫苗提取核酸,作为扩增模板。touchdown程序的主要目的是提高PCR的特异性。结果见表3,无touchdown和有touchdown的程序,阴性样本扩增结果均无Ct,说明特异性良好。从 $1 \times 10^4$  PFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>样本检测结

果看,在相同含量的初始模板浓度,得到的Ct值是相对稳定的,有touchdown的程序比无touchdown的程序到达阈值的Ct值要提前8~9个循环。说明有touchdown程序的扩增效率要好于无touchdown的程序。因此,从特异性和扩增效率两个角度考虑,选择有touchdown程序进行后续试验。

表3 扩增程序优化考察结果

序号	样本	浓度 / (PFU $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	无 touchdown 的 Ct	有 touchdown 的 Ct	$\Delta$ Ct
1	A	$1 \times 10^4$	30.31	21.95	8.36
2	A	$1 \times 10^2$	38.60	26.91	11.69
3	A	1	No Ct	No Ct	/
4	B	$1 \times 10^4$	29.96	21.05	8.91
5	B	$1 \times 10^2$	No Ct	No Ct	/
6	B	1	No Ct	No Ct	/
7	阴性	/	No Ct	No Ct	/
8	阴性	/	No Ct	No Ct	/

注: A 表示 A 家企业的水痘减毒活疫苗核酸样本; B 表示 B 家企业的水痘减毒活疫苗核酸样本。

### 3.3 灵敏度考察结果

试验共重复了3次。由表4可知, 10 cps  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>

的质粒检出率达到了3/3, 初步判定灵敏度为10 cps  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>, 此结果会在后续的性能验证时再确认。

表4 灵敏度考察结果

样本	Ct 均值	检出率
30 cps $\cdot$ $\mu$ L <sup>-1</sup> 质粒	29.94	3/3
10 cps $\cdot$ $\mu$ L <sup>-1</sup> 质粒	31.21	3/3
5 cps $\cdot$ $\mu$ L <sup>-1</sup> 质粒	No Ct	0/3
阴性对照	No Ct	0/3

### 3.4 性能验证与Cutoff值确定

灵敏度、特异性和重复性验证结果总结在表5中。对于灵敏度质控品1, 每轮试验有20个样本, 扩增了3轮, 得到了60个扩增结果, Ct值比较稳定, 均值为30.53, CV为2.17%。取(Ct均值+1.96SD)作为Cutoff值, 即31.83, 取整数为32。即Ct值 $\leq$ 32的样本可判定为 $\beta$ -actin阳性, Ct值 $>$ 32的样本可判定为 $\beta$ -actin阴性。特异性质控品1为唾

液, 3次均稳定检出; 其余特异性质控品均没有检出, 说明体系特异性良好。

对于重复性质控品1, 每轮试验有6个样本, 扩增了3轮, 得到了18个Ct值, Ct均值为23.46, CV为1.70%, 小于5%, 符合要求。阳性对照的Ct均值为23.68, 同样取(Ct均值+1.96SD)作为Cutoff值, 即24.41, 取整数为25, 即阳性对照的Ct值应不超过25。

表5 性能验证结果

轮次	Ct 均值						阳性对照
	灵敏度 1	重复性 1	特异性 1	特异性 2	特异性 3	特异性 4	
1	30.55	23.42	23.30	No Ct	No Ct	No Ct	23.26
2	30.84	23.95	23.82	No Ct	No Ct	No Ct	23.96
3	30.21	23.06	22.78	No Ct	No Ct	No Ct	23.82
mean	30.53	23.46	23.30	No Ct	No Ct	No Ct	23.68
检出率	60/60	18/18	3/3	0/12	0/12	0/12	3/3
SD	0.66	0.40	/	/	/	/	0.37
1.96SD	1.30	0.78	/	/	/	/	0.73
CV/%	2.17	1.70	/	/	/	/	1.56

注：“/”表示不纳入统计。

### 3.5 临床试验应用

水痘减毒活疫苗 I 期临床和带状疱疹减毒活疫苗 III 期临床中收集的共计 875 份唾液样本 VZV 病毒扩增阴性， $\beta$ -actin 扩增阳性，表明样本采样是有效的，说明疫苗的注射不会引起 VZV 病毒排毒风险，疫苗是安全的。871 份疱疹、斑丘疹、结痂样本中有 61 份 VZV 病毒扩增阴性，这 61 份样本中有 60 份  $\beta$ -actin 扩增阳性，说明采样是有效的，60 份样本判定为非疫苗目标疾病，其中 1 份  $\beta$ -actin 扩增阴性，说明采样无效，无法进行后续的判定。

## 4 讨论

水痘减毒活疫苗和带状疱疹减毒活疫苗均属于活苗，安全性方面关注点之一是受种者接种疫苗后是否发生排毒，给生态环境及人类健康带来潜在影响。有效性方面主要关注的是疫苗的保护率。疫苗的保护率，就是在一定时间内通过比较接种组和对照组人群，观察登记两组疫苗目标疾病的发病情况，比较组的发病率来计算的。在安全性的监测中，要对采集的唾液样本是否含有 VZV 病毒进行确认。在有效性的监测中，需要对采集的疱疹、斑丘疹、结痂样本中是否含有 VZV 病毒进行确认。国内外采用的实验室判定方法均是 PCR 法。原理是通过 PCR 检测样本中是否含有 VZV 病毒基因。在确认的过程中会碰到 VZV 病毒基因阴性的样本，这些样本如何界定会直接影响安全性和有效性判定的正确

性。为了解决这个问题，笔者引入了  $\beta$ -actin 基因的扩增来对样本是否有效进行确认。

试验结果显示，用建立的  $\beta$ -actin 实时荧光 PCR 法扩增临床样本，875 份唾液样本和 871 份疱疹、斑丘疹、结痂样本中只有 1 份扩增阴性，说明  $\beta$ -actin 作为对照基因是合适的，建立的  $\beta$ -actin 扩增体系的灵敏度是符合要求的；提高了 61 份 VZV 病毒扩增阴性样本判定的正确性，从而进一步提高实验室判定结果的可靠性。

### 参考文献：

- [1] Latasa P, Gil de Miguel A, Barranco Ordoñez MD, et al. Effectiveness and Impact of a Single-dose Vaccine Against Chickenpox in the Community of Madrid Between 2001 and 2015[J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(9): 2274-2280.
- [2] Tunbridge AJ, Breuer J, Jeffery KJ, et al. Chickenpox in Adults—Clinical Management[J]. J Infect, 2008, 57(2): 95-102.
- [3] Volpi A, Boccalini S, Dari S, et al. The Potential Public Health Impact of Herpes Zoster Vaccination in the 65 Years of Age Cohort in Italy[J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16(2): 327-334.
- [4] Gelb LD. Preventing Herpes Zoster through Vaccination[J]. Ophthalmology, 2008, 115(2 Suppl): S35-42.

- [5] Woolery WA. Herpes Zoster Virus Vaccine[J]. *Geriatrics*, 2008, 63 ( 10 ) : 6-9.
- [6] Keating GM. Shingles (Herpes Zoster) Vaccine (zostavax®): A Review of Its Use in the Prevention of Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia[J]. *Drugs*, 2013, 73 ( 11 ) : 1227-1244.
- [7] Mols JF, Ledent E, Heineman TC. Sampling of Herpes Zoster Skin Lesion Types and the Impact on Viral DNA Detection[J]. *J Virol Methods*, 2013, 188 ( 1-2 ) : 145-147.
- [8] 陈哲文, 金于兰, 瞿爱东, 等. 水痘-带状疱疹病毒Oka株与临床分离株可变区基因的序列分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 11 ( 25 ) : 1468-1471.
- [9] Leung J, Harpaz R, Baughman AL, et al. Evaluation of Laboratory Methods for Diagnosis of Varicella[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51 ( 1 ) : 23-32.
- [10] Higashimoto Y, Kawamura Y, Kuboshiki A, et al. Reliability of Direct Varicella Zoster Virus Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of Breakthrough Varicella[J]. *J Clin Virol*, 2019, 119: 53-58.
- [11] Weinmann S, Chun C, Mullooly JP, et al. Laboratory Diagnosis and Characteristics of Breakthrough Varicella in Children[J]. *J Infect Dis*, 2008, 197 ( Suppl 2 ) : S132-138.
- [12] Takayama M, Takayama N. Long PCR Amplification of Varicella-Zoster Virus DNA in Clinical Specimens from the Patients with Varicella and Herpes Zoster[J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 2002, 76 ( 5 ) : 347-354.
- [13] Nazari F, Parham A, Maleki AF. GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ 2-microglobulin, as Three Common Reference Genes, are not Reliable for Gene Expression Studies in Equine Adipose- and Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells[J]. *J Anim Sci Technol*, 2015, 57: 1-8.
- [14] Choudhary I, Chimanpure V, Patil A, et al. Single Step Detection of HIV-1 Proviral DNA and Housekeeping  $\beta$ -actin Gene from Dried Blood Spots by a Monoplex Polymerase Chain Reaction[J]. *J Virol Methods*, 2013, 187 ( 1 ) : 203-206.
- [15] Li Y, Zhang AL, Li GD, et al. Cloning of  $\beta$ -actin Gene in *Psammophilus tunicoides* and Its Role as a Reference Gene[J]. *Zhong Yao Cai*, 2016, 39 ( 9 ) : 1971-1974.

( 收稿日期 2022年1月25日 编辑 王雅雯 )