

实时荧光定量 PCR 检测乙肝病毒 DNA 方法在绒促性素和尿促性素生产中的应用

吴利红, 王灿, 邵泓, 陈钢*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 验证实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 检测绒促性素(HCG) 和尿促性素(HMG) 生产工艺中尿液、粗品和原料药中乙肝病毒 DNA(HBV DNA) 的方法, 并用该方法对 HCG 和 HMG 生产工艺中关键点进行控制。方法: 在不同浓度的乙肝阳性血中添加 HCG 或 HMG 的尿液、粗品和原料药, 用 Real-time PCR 方法检测添加前后不同浓度乙肝阳性血中 HBV DNA 的浓度, 计算出 HBV DNA 回收率, 同时验证该方法的线性、重复性和灵敏度; 用 Real-time PCR 方法对尿液、粗品和原料药样品进行 HBV DNA 检测, 将检测出阳性的样品用 ELISA 方法检测, 比较 2 种方法的检测结果差异。结果: Real-time PCR 检测 HBV DNA 在 $10^4 \sim 10^7 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, $r^2 = 0.9969$; HCG 或 HMG 尿液、粗品和原料药中添加不同浓度乙肝阳性血, HBV DNA 回收率为 94.9% ~ 103.8%; 3 次重复实验相对标准偏差(RSD) 均小于 5%; 最低检出限为 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Real-time PCR 检测出阳性的样品用 ELISA 方法检测乙肝表面抗原(HBsAg) 均为阴性。结论: Real-time PCR 可用于 HCG 和 HMG 生产工艺中尿液、粗品和原料药中 HBV DNA 的检测, 同时也是用 ELISA 检测 HCG 和 HMG 中 HBsAg 的一种补充手段。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 乙肝病毒 DNA; 绒促性素; 尿促性素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)10-1914-04

Application of Real-time fluorescence PCR detecting HBV DNA during the production flow of HCG and HMG

WU Li-hong, WANG Can, SHAO Hong, CHEN Gang*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To verify the method of Real-time fluorescence PCR to detect HBV DNA during the production flow of HCG and HMG. **Methods:** HCG or HMG was added into positive blood containing different concentration HBV, and the Real-time fluorescence PCR was used to detect the concentration of HBV DNA. The recovery was calculated, and the linear range, repetition and sensitivity of the method were verified. The positive results detected by Real-time PCR would be detected by ELISA again, and the results of two methods would be compared. **Results:** The coefficient of linear relation was 0.9969 (the range of $10^4 - 10^7 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$), and the recovery of HBV was 94.9% - 103.8%. Besides, the minimum value was $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD < 5%. The positive samples detected by Real-time PCR showed negative HBsAg by ELISA. **Conclusion:** Real-time PCR can be used to detect HBV DNA during the production flow of HCG and HMG, and also can be used as the complement method of ELISA.

Key words: real-time fluorescence PCR; HBV; HCG; HMG

HCG 主要是从孕妇尿液中提取, 孕妇尿经苯甲酸钠吸附、洗脱和干燥后得 HCG 粗品, 再进一步纯化为 HCG 原料药。HMG 为从绝经期妇女尿中提取精制, 绝经期妇女尿经高岭土吸附, 氨水脱附和干燥后得 HMG 粗品, 再进一步纯化后为 HMG 原料药。

目前 HCG 和 HMG 原料生产企业均不是以人尿液作为起始原料, 而是从市场上收购粗品, 这种生产模式使 HCG 和 HMG 的安全性存在一定问题。且我国是乙型病毒性肝炎高发区, 乙型肝炎病毒(HBV) 携带者有 1.3 亿, 其中孕妇产前检出 HBsAg 携带率

* 通讯作者 Tel: (021) 50798175; E-mail: chengang@smda.gov.cn

为 6% ~ 15%^[1], HBV 主要存在于机体的血液和体液(尿液、汗液、唾液、乳汁等)中,因此对收集到的尿以及以尿为原料生产的中间产品和成品进行 HBV 检测很有必要。目前还没有已批准的用于 HCG 和 HMG HBV 检测的方法,寻找一种合适的检测方法非常必要。2010 年版中国药典二部对来源于人尿的生化药增加了 HBsAg 检测项目,我们曾用不同厂家生产的 HBsAg ELISA 诊断试剂盒检测 HCG 和 HMG 时发现,并不是所有的试剂盒均适用于任何厂家生产的 HCG 和 HMG 中 HBsAg 的检测^[2], Real-time PCR 可作为 HBV 检测的补充方法。目前市场上批准的乙肝病毒核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒是用于血液中 HBV DNA 的检测,本文对 Real-time PCR 检测 HCG 和 HMG 生产过程中的尿液、粗品和原料药中 HBV DNA 的方法进行验证,并用该方法对 HCG 和 HMG 生产工艺中的关键点进行控制。

1 仪器与材料

荧光定量 PCR 仪 Roche Lightcycler 2.0。

用于方法学验证的 HCG 原料药(批号:080701)和 HMG 原料药(批号:070802); HCG 粗品(批号:LS-HCG09002A)和 HMG 粗品(批号:LS-HMG09010A); HCG 和 HMG 尿液均由生产厂家提供。HBV 阳性血和不含 HBV 的阴性血均由上海科华生物技术有限公司提供。乙肝病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒购自深圳匹基生物工程有限公司。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒(酶联免疫法)购自上海科华生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 检测方法 Real-time PCR 检测方法:严格按仪器和乙肝病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒说明书操作。

ELISA 检测方法:严格按乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断试剂盒(酶联免疫法)说明书操作。

2.2 线性验证 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 IU · mL⁻¹ HBV DNA 作为标准品(试剂盒附带),按试剂盒说明书进行 Real-time PCR,以 HBV DNA 标准品实测浓度的常用对数值 X 为横坐标,循环数(Ct 值) Y 为纵坐标进行线性回归,计算回归方程的 r² 值 r² ≥ 0.99 说明其线性关系好。得回归方程为:

$$Y = -3.497X + 45.815 \quad r^2 = 0.9969$$

表明在 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ IU · mL⁻¹ 范围内线性良好。

2.3 回收率验证

2.3.1 粗品和原料药回收率验证方法

取 10⁸ IU · mL⁻¹ 浓度 HBV 阳性血,用不含 HBV 的阴性血将其稀释成不同的浓度(10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ IU · mL⁻¹),在不同浓度的 HBV 阳性血中分别添加 HCG 或 HMG 的粗品及原料药,检测 HBV 阳性血添加前后及 HCG 或 HMG 的粗品及原料药中 HBV DNA 的浓度。根据公式计算其回收率。

$$\text{回收率} = \log(\text{添加后 HBV DNA 的浓度} - \text{添加物中 HBV DNA 的浓度}) / \log \text{添加前 HBV DNA 的浓度} \times 100\% (\text{添加物指 HCG 或 HMG 的粗品及原料药})$$

2.3.2 尿液回收率验证方法

取 10⁸ IU · mL⁻¹ 浓度 HBV 阳性血,用不含 HBV 的阴性血将其稀释成不同的浓度(10⁷, 10⁶, 10⁵ IU · mL⁻¹),在不同浓度的 HBV 阳性血中分别添加 HCG 或 HMG 尿液和不含 HBV 的阴性尿。分别检测添加后 HCG 或 HMG 尿液和阴性尿液,及 HCG 或 HMG 尿液中 HBV DNA 的浓度。根据公式计算其回收率。

$$\text{回收率} = \log(\text{添加后 HCG 或 HMG 尿液 HBV DNA 的浓度} - \text{添加物中 HBV DNA 的浓度}) / \log \text{添加后阴性尿液 HBV DNA 的浓度} \times 100\% (\text{添加物指 HCG 或 HMG 尿液})$$

2.3.3 回收率验证结果 结果见表 1。

表 1 回收率结果
Tab 1 The results of recovery

样品 (sample)	不同浓度 HBV 阳性血 (positive blood containing different concentration HBV) / IU · mL ⁻¹	回收率 (recovery) /%
HCG 原料药(HCG API)	10 ⁷	100.3
	10 ⁶	98.7
	10 ⁵	103.8
	10 ⁴	99.9
HCG 粗品(crude HCG)	10 ⁷	99.2
	10 ⁶	96.0
	10 ⁵	101.6
	10 ⁴	100.9
HCG 尿液(HCG urine)	10 ⁷	99.2
	10 ⁶	99.3
	10 ⁵	100.2
HMG 原料药(HMG API)	10 ⁷	101.2
	10 ⁶	97.8
	10 ⁵	96.3
	10 ⁴	94.9
HMG 粗品(crude HMG)	10 ⁷	100.9
	10 ⁶	99.8
	10 ⁵	103.0
	10 ⁴	100.1
HMG 尿液(HMG urine)	10 ⁷	99.5
	10 ⁶	100.2
	10 ⁵	99.4

2.4 重复性验证 HCG 或 HMG 原料药、粗品和尿液分别添加到 $10^5 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度 HBV 阳性血, 1 份样品重复配制 3 次, Real-time PCR 测定 3 次的结果, 计算 3 次实验结果的 RSD。结果见表 2。

2.5 灵敏度验证 本文使用的匹基公司乙肝病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒的最低检出限为 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 HBV DNA 阳性血稀释到 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, HCG 或 HMG 原料药和粗品添加到 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ HBV 阳性血中; 对于 HCG 或 HMG 尿液, 将 HBV 阳性血稀释到 $1000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 等量 HCG 或 HMG 尿液添加到 $1000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ HBV 阳性血中, 该试剂盒和 PCR 仪器是否能检测出 HBV DNA, 以此确定用该试剂盒和仪器检测 HCG 和 HMG 的原料药、粗品和尿液的最低检出限。验证结果是该试剂盒仍能检测出 HCG 或 HMG 原料药、粗品和尿液中的 HBV DNA。因此, 我们认为该试剂盒对尿制剂 HBV 病毒的最低检出限为 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 样品检测 用乙肝病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒对生产厂家提供的 HCG 或 HMG 原料药、粗品及尿液进行测定, 测定结果见表 3, 检测到 HBV DNA 样品的 HBV 浓度见表 4。

表 2 重复性验证结果
Tab 2 The results of repetition

样品 (sample)	测定次数 (numbers of the determination)	实测 HBV 浓度 (measured HBV concentration) /IU · mL ⁻¹	RSD /%
HCG 原料药 (HCG API)	1	1.67×10^5	1.26
	2	1.24×10^5	
	3	1.42×10^5	
HMG 原料药 (HMG API)	1	5.16×10^4	4.43
	2	9.04×10^4	
	3	1.41×10^5	
HCG 粗品 (crude HCG)	1	7.91×10^4	1.75
	2	1.16×10^5	
	3	1.07×10^5	
HMG 粗品 (crude HMG)	1	2.25×10^5	1.48
	2	1.93×10^5	
	3	1.57×10^5	
HCG 尿液 (HCG urine)	1	5.71×10^4	0.66
	2	5.89×10^4	
	3	5.13×10^4	
HMG 尿液 (HMG urine)	1	5.10×10^4	0.88
	2	5.95×10^4	
	3	6.09×10^4	

表 3 样品 HBV DNA 检测结果
Tab 3 The results of HBV DNA in samples

样品名称 (sample name)	样品数量 (sample number) /batch	结果 (result)	阳性检出率 (positive detection rate) /%
HCG 原料药 (HCG API)	4	均为阴性 (all were negative)	0
HCG 粗品 (crude HCG)	21	均为阴性 (all were negative)	0
HCG 尿液 (HCG urine)	21	1 份阳性, 其余均为阴性 (one was positive, the rest were negative)	4.8
HMG 原料药 (HMG API)	4	均为阴性 (all were negative)	0
HMG 粗品 (crude HMG)	15	4 份阳性, 其余均为阴性 (four were positive, the rest were negative)	26.7
HMG 尿液 (HMG urine)	3	均为阴性 (all were negative)	0

表 4 阳性样品中 HBV DNA 浓度

Tab 4 The concentration of HBV DNA in positive samples

样品名称 (sample name)	编号 (number)	浓度 (concentration) /IU · mL ⁻¹
HMG 粗品 (crude HMG)	1	1200
HMG 粗品 (crude HMG)	2	1000
HMG 粗品 (crude HMG)	3	890
HMG 粗品 (crude HMG)	4	<500
HCG 尿液 (HCG urine)	5	<500

ELISA 方法对 Real-time PCR 检测出的阳性样品检测结果: 将表 4 中的 HBV DNA 阳性样品用 ELISA 方法检测 HBsAg, 结果均为阴性。

3 讨论

HBV 对人类的健康带来了极大危害, 可以通过尿液、唾液、乳汁等污染周围环境, 威胁人类健康。因此, 由血液和体液提取的生物制品都应该对 HBV 进行检测, 以提高用药安全。我国对血液来源的血液制品进行了严格监控, 但由人尿提取的尿制剂则

缺乏相应的监管措施。

近几年,尿制剂用药安全越来越引起人们的重视。中国药典 2010 年版二部对来源于人尿的生化药增加了 HBsAg 检测项目。我们曾用不同厂家生产的 HBsAg ELISA 诊断试剂盒检测 HCG 和 HMG 时发现,有些厂家生产的 HCG 和 HMG 对 HBsAg ELISA 检测存在干扰^[2],因此寻找 ELISA 的补充方法十分必要。Real-time PCR 方法通过 PCR 仪实时采集荧光信号,动态检测扩增产物,可定量检测原始模板数,不但准确、敏感、快速,而且闭管分析避免了 PCR 产物的污染。Real-time PCR 目前已成为定量检测靶核酸的常用方法^[3-5]。

本研究验证了用 Real-time PCR 检测 HCG 和 HMG 生产过程中尿、粗品及原料药中 HBV DNA 的方法,验证结果为 HCG 和 HMG 尿、粗品及原料药对 HBV DNA 扩增荧光检测均无干扰,用该方法检测 HCG 和 HMG 尿、粗品和原料药中 HBV 线性关系良好,回收率均高于 94%,结果重复性好,RSD 均较低,灵敏度高。表明 Real-time PCR 方法可用于 HCG 和 HMG 生产过程中尿、粗品和原料药中 HBV DNA 的控制。进一步用 Real-time PCR 方法对生产厂家提供的 HCG 和 HMG 原料药、粗品和尿液样品进行 HBV DNA 检测,结果发现了 4 份不同来源的 HMG 粗品和 1 份 HCG 尿液 HBV DNA 为阳性,这些数据表明 HCG 和 HMG 粗品加工点现有的生产模式存在安全性方面的潜在风险,对人尿和粗品等生产过程关键点的 HBV DNA 进行控制很有必要。

本研究对用 Real-time PCR 方法检测出 HBV DNA 阳性的 5 份样品,用 ELISA 方法检测其 HBsAg 结果均为阴性,这一结果也表明 Real-time PCR 可作为 ELISA 方法检测 HCG 和 HMG 中 HBV 的 1 种补充方法。

参考文献

- 1 BAO Mei-juan(鲍美娟),LU Yan(陆艳),WANG Xiao-ling(王小玲) et al. The survey about health knowledge condition in HBV-positive pregnant women(乙肝病毒携带孕妇健康知识状况调查分析). *Chin J Pract Nurs*(中国实用护理杂志) 2009 25(8):34
- 2 WU Li-hong(吴利红),WANG Can(王灿),SHAO Hong(邵泓), et al. The standardization of enzyme-linked immunosorbent assay detecting the HBsAg in HCG and HMG(酶联免疫法检测绒促性素和尿促性素中乙肝表面抗原的规范化). *Drug Stand China*(中国药品标准) 2011 12(4):295
- 3 Wan K, Yousef AE, Schwartz et al. Rapid, specific, and sensitive detection of spoilage molds in orange juice using a real-time Taqman PCR assay. *J Food Prot* 2006 69(2):385
- 4 XU Xuan(徐璇),ZHONG Li-li(钟礼立),ZHANG Bing(张兵), et al. Development and evaluation of fluorescence real-time quantitative PCR for detecting pseudomonas aeruginosa(荧光实时定量 PCR 检测铜绿假单胞菌方法建立及价值). *J Chin Phys*(中国医师杂志) 2006 8(12):1614
- 5 CHENG Ying(程颖),WEI Dian-jun(魏殿军),SHEN Peng(沈鹏) et al. Investigation on the dental instruments contaminated with HBV-DNA by PCR and real-time PCR(应用 PCR 和时间分辨 PCR 对口腔器械乙肝污染的调查). *Mod Prev Med*(现代预防医学) 2008 35(18):3588

(本文于 2010 年 8 月 31 日收到)

《药物分析杂志》继续被评为 2011 年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了 2010 年度精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目总结验收及 2011 年度精品科技期刊新增示范项目评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为 2011 年度精品科技期刊示范项目 C 类项目。评选分 A、B、C 三类,各类项目资助额度分别为每项 25 万、15 万、5 万元/年。中国科协从 2006 年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续 6 年被评为中国科协精品科技期刊示范项目(C 类)。