

多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法的建立及验证

赵丹华, 刘晶晶, 刘欣玉, 曹守春, 李玉华, 吴小红^{*}(中国食品药品检定研究院虫媒病毒疫苗室, 北京 102629)

摘要: 目的 建立多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法并进行验证。方法 以不同新型冠状病毒变异株 mRNA 为靶基因, 选取各自保守序列设计引物和探针, 建立多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法, 并进行了线性范围、重复性、准确度、中间精密度、耐用性和适用性等方法学验证。结果 mRNA 浓度在 1~150 pg·mL⁻¹ 内线性良好; 重复性变异系数(coefficient of variation, CV)<10%; 准确度回收率 84%~114%, CV<10%; 中间精密度和耐用性 CV 均<5%; 并且 4 种不同二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗组分比例检测结果 CV 均≤5%。结论 建立的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法灵敏度高, 稳定性好, 特异性强, 适用于多价新型冠状病毒 mRNA 疫苗进行组分比例和含量检测。

关键词: 多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗; 组分比例; ddPCR; 质量控制

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)23-3202-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20232644

引用本文: 赵丹华, 刘晶晶, 刘欣玉, 等. 多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法的建立及验证[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(23): 3202-3207.

Establishment and Validation of ddPCR Method for Component Proportion of Multivalent Mutant COVID-19 mRNA Vaccine

ZHAO Danhua, LIU Jingjing, LIU Xinyu, CAO Shouchun, LI Yuhua, WU Xiaohong^{*}(Division of Arboviral Vaccines, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish and verify a ddPCR method to determinate the proportion of mRNA components in multivalent mutant COVID-19 mRNA vaccine. **METHODS** Different types of coronavirus mRNA were used as target genes, and their conserved sequences were selected to design primers and probes. The ddPCR method for measuring the proportion of multivalent mutant COVID-19 mRNA vaccine components was established, and the linear range, repeatability, accuracy, intermediate precision, durability and applicability of the method were verified. **RESULTS** When the total mRNA concentration ranged from 1 to 150 pg·mL⁻¹, the linearity was good. Repeatability coefficient of variation(CV) was within 10%. The recoveries of accuracy verification were 84%~114%, CV<10%. The intermediate precision and durability coefficient of variation CV were all< 5%, and the CV of the proportion of components in the four different bivalent COVID-19 mRNA vaccines was all≤5%. **CONCLUSION** The ddPCR method established for detecting the component proportion of multivalent mutant COVID-19 mRNA vaccine has high sensitivity, good stability and strong specificity, which is suitable for detecting the component proportion and content of multivalent COVID-19 mRNA vaccine.

KEYWORDS: multivalent mutant COVID-19 mRNA vaccine; component proportion; ddPCR; quality control

新型冠状病毒的出现加速了 mRNA 疫苗的研发和应用进程^[1]。作为一种全新类型的疫苗, mRNA 疫苗由于其安全性高, 有效性好^[2], 研发及生产周期短^[3-6]等特点, 迅速成为预防性和治疗性等疫苗研发的热点^[7]。mRNA 疫苗是将编码外源目的基因序列通过体外转录, 采用递送系统包裹后, 经过一系列稀释、纯化等工艺制备的疫苗。

它通过特定递送系统将 mRNA 导入机体细胞, 利用机体细胞蛋白质合成机制表达目的蛋白, 刺激机体产生特异性免疫反应, 获得免疫保护^[8]。2020 年 BNT162b2 和 mRNA-1273 mRNA 疫苗获批使用, 2 款疫苗均显示出>90% 的有效性, 将 mRNA 疫苗的研究推向新高度^[9]。2023 年 3 月石药集团新型冠状病毒 mRNA 疫苗(SYS6006)在中国纳入

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2302404)

作者简介: 赵丹华, 女, 博士, 助理研究员 E-mail: zhaodanhua@nifdc.org.cn

^{*}通信作者: 吴小红, 女, 硕士, 副研究员 E-mail: wuxiaohong@nifdc.org.cn

紧急使用, 中国也迎来首款国产新型冠状病毒 mRNA 疫苗。但是, 新型冠状病毒变异非常快, 变异株的免疫逃逸比较严重。新变异株的不断出现, 增加了通过疫苗免疫防控疾病的难度。为了应对这快速变异的毒株给人类健康带来的危害, 疫苗防控成为必不可少的手段。多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗是将不同变异株以一定比例混合配制成的多价疫苗, 相较于单价疫苗对原始毒株和变异流行株具有更广谱的中和抗体反应。但是如何评价多价新型冠状病毒 mRNA 疫苗中不同毒株的 mRNA 比例是多价疫苗研发的难点。

数字微滴 PCR(ddPCR)在 PCR 扩增前即对样品进行微滴化处理, 将扩增反应分为数以万计独立分区, 每个独立分区包含一个目标分子或者不包含目标分子。经过 PCR 扩增放大之后, 逐一对每个微滴进行检测, 根据阳性微滴数和泊松分布原理, 可计算出目标分子的拷贝数^[10]。ddPCR 方法的定量方式不依赖于标准曲线和 Ct 值, 可实现绝对定量, 敏感性和准确性均比传统 qPCR 方法高。

本研究在破坏脂质颗粒提取 mRNA 之后, 采用 ddPCR 方法研究多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例, 以为多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗的质量控制提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 样品

组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 B(Beta 株和 BA.4/5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 C(BA.4/5 株和 XBB.1.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 D(BA.2/4/5 株和 Alpha/Beta 株)。

1.2 试剂及仪器

PureLink RNA Mini Kit(invitrogen 公司, 货号: 12183025); One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes(Bio-Rad 公司, 货号: 1864022)。

QX200 Auto DG 微滴式数字 PCR 系统、C1000 Touch PCR 仪均购自 Bio-Rad 公司。

1.3 引物与探针

根据不同新型冠状病毒变异株 mRNA 序列, 选择非同源序列设计特异性引物和荧光探针, 由于 4 种二价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗的序列各不相同, 故而分别有各自特异性探针引物。8

组上下游引物和荧光探针(荧光报告基因为 FAM, 荧光猝灭基因为 BHQ1)均由生工生物合成。

1.4 mRNA 提取

由于 mRNA 分子在脂质纳米颗粒中无法直接检测, 需要进行前处理。按照 PureLink RNA Mini Kit 试剂盒说明书操作: 首先, 400 μL 样本加入 400 μL 裂解液(含 DTT)和 400 μL 无水乙醇混匀, 室温震荡 30 min, 然后通过核酸吸附膜纯化和提取 mRNA, 最后加入 50 μL 无酶水洗脱并收集 mRNA, 置 -80°C 备用。

1.5 ddPCR 方法的建立

按照 One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes 试剂盒说明书操作: 反应体系含 supermix 5 μL , Reverse transcriptase 2 μL , 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 1 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上、下游引物各 1.8 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 探针 0.5 μL , 水 2.9 μL , 模板 5 μL 。于自动微滴生成仪生成微滴。封膜后置 PCR 仪进行扩增。扩增程序为逆转录 42°C 60 min; 酶激活 95°C 10 min; 变性 95°C 30 s, 退火 58°C 1 min, 40 个循环; 酶灭活 98°C 10 min 后结束反应。扩增完成后, 在 QX200 Droplet Reader 微滴读取仪上读取微滴数据。

1.6 方法的验证

1.6.1 线性范围考察 将已知组分比例为 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)提取 mRNA 后分别稀释至 150, 100, 50, 25, 5, 2, 1 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 用多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法检测, 并进行线性范围分析。

1.6.2 重复性和准确度考察 取组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株), 使用已建立的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法进行检测, 在同样的反应条件下进行 6 次独立试验, 计算其结果、变异系数(coefficient of variation, CV)和回收率, 评价该方法的重复性和准确度。

1.6.3 中间精密度考察 取组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株), 使用已建立的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法进行检测, 3 位人员在同样的反应条件下各进行 1 次独立试验, 计算其结果和 CV, 评价该方法的中间

精密度。

1.6.4 耐用性考察 取组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株), 使用已建立的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法, 分别在 PCR 扩增完成后 0, 12, 24 h 进行检测, 计算其结果和 CV, 评价该方法的耐用性。

1.7 方法的适用性

取组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 B(Beta 株和 BA.4/5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 C(BA.4/5 株和 XBB.1.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 D(BA.2/4/5 株和 Alpha/Beta 株), 3 位人员使用已建立的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法各进行 3 次独立检测, 计算其结果和变异系数, 评价该方法的适用性。

2 结果

2.1 方法的验证

2.1.1 线性范围考察 将已知组分比例为 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)提取 mRNA 后稀释至 7 个不同的浓度, 再进行 ddPCR 检测。以总 mRNA 浓度为横坐标(x), 拷贝数为纵坐标(y)绘制标准曲线。梯度扩增图见图 1, 标准曲线见图 2。Delta 株 ddPCR 的标准曲线为 $y=11.357x-33.428$, $R^2=0.9956$, BA.5 株 ddPCR 的标准曲线为 $y=30.651x-103.68$, $R^2=0.9932$, 且回收率在 95%~115%, 表明该方法在 1~150 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内具有良好的线性关系。结果见表 1。

2.1.2 重复性和准确度考察 对组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)分别进行 6 次平行检测, 结果见表 2, CV 值均<10%, 表明该方法重复性较好。6 次不同比例的检测结果回收率均在 84%~114%, 表明该方法准确度较高, 见表 3。

2.1.3 中间精密度考察 3 名不同人员对组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)分别进行检测, CV 值均<5%, 表明该方法中间精密度良好。结果见表 4。

2.1.4 耐用性考察 使用已建立的 ddPCR 方法对组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的二价新型冠

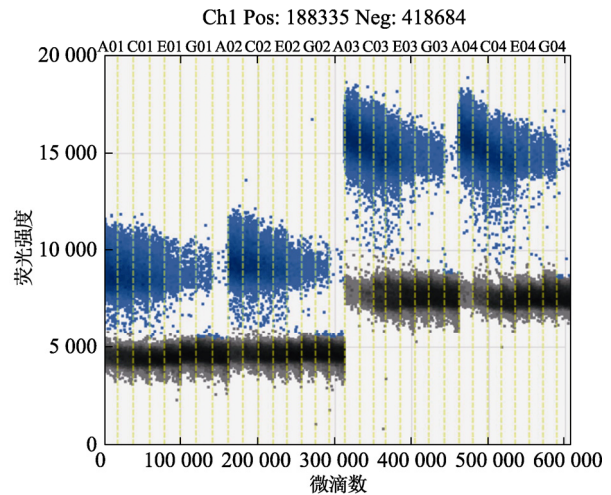


图 1 梯度扩增图

Fig. 1 Gradient amplification diagram

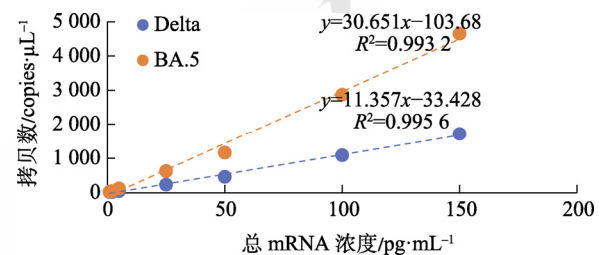


图 2 Delta 株和 BA.5 株标准曲线

Fig. 2 Standard curve of Delta strain and BA.5 strain

表 1 线性范围验证结果

Tab. 1 Result of verification for linear range

名称	总 mRNA 浓度/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Delta 株			BA.5 株		
		拷贝数/ $\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	占比/%	回收率/%	拷贝数/ $\text{copies}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	占比/%	回收率/%
S1	150	1 714	27	108	4 648	73	97
S2	100	1 080	27	109	2 870	73	97
S3	50	454	28	113	1 158	72	96
S4	25	234	27	109	626	73	97
S5	5	40	26	106	113	74	98
S6	2	17	29	115	43	71	95
S7	1	10	28	113	24	72	96

表 2 重复性验证结果

Tab. 2 Result of verification for repeatability %

检测 次数	Delta 株占比			BA.5 株占比		
	理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75
1	43	31	23	57	69	77
2	46	30	21	54	70	79
3	49	29	22	51	71	78
4	43	32	25	57	68	75
5	45	30	23	55	70	77
6	51	36	25	49	64	75
CV/%	7	8	7	6	4	2

状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)分别在 PCR 扩增后不同时间进行检测, CV 值均<5%, 表明该方法在不同检测时间条件下耐用性良好。结果见表 5。

表 3 准确度验证结果

Tab. 3 Result of verification for accuracy %

检测 次数	Delta 株回收率			BA.5 株回收率		
	理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75
1	86	93	92	114	104	103
2	92	90	84	108	105	105
3	98	87	88	102	107	104
4	86	96	100	114	102	100
5	90	90	92	110	105	103
6	102	108	100	98	96	100
CV/%	7	6	8	4	7	2

表 4 中间精密度验证结果

Tab. 4 Result of verification for intermediate precision %

实验 人员	Delta 株占比			BA.5 株占比		
	理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75
人员 1	51	34	25	49	66	75
人员 2	53	35	27	47	65	73
人员 3	49	33	25	51	67	75
CV/%	4	3	4	4	2	2

表 5 耐用性验证结果

Tab. 5 Result of verification for durability %

检测时 间/h	Delta 株占比			BA.5 株占比		
	理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75
0	51	36	26	49	64	74
12	52	35	27	48	65	73
24	50	36	25	50	64	75
CV/%	2	2	4	2	1	1

2.2 方法适用性考察

使用已建立的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法对组分比例分别为 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 的二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 A(Delta 株和 BA.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 B(Beta 株和 BA.4/5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 C(BA.4/5 株和 XBB.1.5 株)、二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗 D(BA.2/4/5 株和 Alpha/Beta 株)进行检测, 结果见表 6~9, CV 值均≤5%, 回收率在 84%~124%, 表明该方法检测多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例适用性良好。

表 6 疫苗 A 适用性验证结果

Tab. 6 Result of verification for applicability of vaccine A %

实验 人员	检测 次数	Delta 株占比/回收率						BA.5 株占比/回收率					
		理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75
人员 1	1	51	102	34	102	25	100	49	98	66	99	75	100
	2	50	100	34	102	25	100	50	100	66	99	75	100
	3	48	96	33	99	26	104	52	104	67	101	74	99
人员 2	1	53	106	35	105	27	108	47	94	65	98	73	97
	2	53	106	37	111	28	112	47	94	63	95	72	96
	3	52	104	36	108	27	108	48	96	64	96	73	97
人员 3	1	49	98	33	99	25	100	51	102	67	101	75	100
	2	52	104	35	105	27	108	48	96	65	98	73	97
	3	52	104	35	105	28	112	48	96	65	98	72	96
CV/%		3	4	5	4	2	2	4	2	2	2	2	2

表 7 疫苗 B 适用性验证结果

Tab. 7 Result of verification for applicability of vaccine B %

实验 人员	检测 次数	Beta 株占比/回收率						BA.4/5 株占比/回收率					
		理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75
人员 1	1	49	98	34	102	26	104	51	102	66	99	74	99
	2	50	100	33	99	24	96	50	100	67	101	76	101
	3	51	102	34	102	25	100	49	98	66	99	75	100
人员 2	1	51	102	34	102	26	104	49	98	66	99	74	99
	2	51	102	34	102	26	104	49	98	66	99	74	99
	3	50	100	33	99	25	100	50	100	67	101	75	100
人员 3	1	48	96	32	96	26	104	52	104	68	102	74	99
	2	50	100	31	93	24	96	50	100	69	104	76	101
	3	48	96	31	93	26	104	52	104	69	104	74	99
CV/%		2	4	3	2	2	1	2	2	2	1	1	1

表 8 疫苗 C 适用性验证结果

Tab. 8 Result of verification for applicability of vaccine C %

实验 人员	检测 次数	BA.4/5 株占比/ 回收率						XBB.1.5 株占比/ 回收率					
		理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75
人员 1	1	54	108	36	108	28	112	46	92	64	96	72	96
	2	53	106	35	105	28	112	47	94	65	98	72	96
	3	53	106	37	111	29	116	47	94	63	95	71	95
人员 2	1	53	106	39	117	27	108	47	94	61	92	73	97
	2	54	108	37	111	26	104	46	92	63	95	74	99
	3	51	102	36	108	29	116	49	98	64	96	71	95
人员 3	1	51	102	37	111	27	108	49	98	63	95	73	97
	2	53	106	39	117	31	124	47	94	61	92	69	92
	3	53	106	35	105	28	112	47	94	65	98	72	96
CV/%		2	4	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2

表9 疫苗D适用性验证结果

Tab. 9 Result of verification for applicability of vaccine D %

实验 人员	检测 次数	BA.2/4/5 株占比/回收率						Alpha/Beta 株占比/回收率					
		理论值 50	理论值 33	理论值 25	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75	理论值 50	理论值 67	理论值 75
人员 1	1	47	94	30	90	23	92	53	106	70	105	77	103
	2	47	94	30	90	24	96	53	106	70	105	76	101
	3	47	94	30	90	24	96	53	106	70	105	76	101
人员 2	1	47	94	31	93	23	92	53	106	69	104	77	103
	2	46	92	30	90	21	84	54	108	70	105	79	105
	3	47	94	31	93	23	92	53	106	69	104	77	103
人员 3	1	47	94	31	93	22	88	53	106	69	104	78	104
	2	49	98	32	96	23	92	51	102	68	102	77	103
	3	47	94	30	90	23	92	53	106	70	105	77	103
CV/%		2	2	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1

3 讨论

关于多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例和含量检测,各指导原则及草案均建议采用基于紫外分光光度法或者 PCR 技术方法^[11-13]。利用紫外分光光度法可以直接测定总 mRNA 浓度,基于紫外吸收的 RiboGreen 染料法需通过绘制标准曲线测定溶液中总 mRNA 含量。然而,基于紫外吸收的方法缺乏特异性,无法实现对多价 mRNA 疫苗中多个抗原的 mRNA 单一含量进行定量分析,需要联合基于 PCR 技术的 qPCR 法或 ddPCR 法,对多价 mRNA 疫苗中的不同组分进行比例和含量检测。ddPCR 相比 qPCR 具有明显的优势,可以不依赖标准曲线而实现绝对定量。qPCR 的相对定量,需要将样品的 Ct 值与扩增后不同浓度标准品的 Ct 值进行比较,拟合曲线来达到定量的目的,由标准品和实验操作引入的误差较大。而 ddPCR 不依赖于标准品对样品进行绝对定量,操作相对简单,提高了不同实验室和操作人员之间的准确性和一致性。相比 qPCR 的实时扩增定量,ddPCR 使用终点定量,受到样品中可能存在的扩增抑制剂的影响较少^[14-15],受到较差扩增效率的影响也较少^[16-18]。因此 ddPCR 法在多价 mRNA 疫苗的单一组分比例和含量检测中具有较大的优势。

本研究根据中国药典 2020 年版三部通则和指导原则中 9101 分析方法验证指导原则建立及验证了多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 检测方法。验证结果显示,该方法在 1~150 pg·mL⁻¹ 内具有良好的线性,且重复性、准

确度、中间精密度和耐用性良好。使用该方法对组分比例分别为 1:1, 1:2, 1:3 的 4 种二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗各进行 3 次独立检测,结果显示 3 个不同人员对 4 种二价新型冠状病毒 mRNA 疫苗(不同配置比例)的检测结果都比较一致且与理论值相当, CV 均 ≤ 5%,回收率在 84%~124%,表明该方法适用于不同配置比例的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗。

综上所述,本研究建立了多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗组分比例 ddPCR 方法,该方法简单快速,灵敏度好,特异性强,重复性好,检测结果准确可靠,适用于目前不同配置比例的多价新型冠状病毒变异株 mRNA 疫苗产品,对新型冠状病毒 mRNA 疫苗的质量控制具有重要意义。

REFERENCES

[1] HUANG Q R, ZENG J W, YAN J H. COVID-19 mRNA vaccines[J]. J Genet Genomics, 2021, 48(2): 107-114.

[2] RAMACHANDRAN S, SATAPATHY S R, DUTTA T. Delivery strategies for mRNA vaccines[J]. Pharmaceut Med, 2022, 36(1): 11-20.

[3] XING S X, XU F J W, ZHANG Y T. Research progress of mRNA vaccine delivery system[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(21): 2109-2113.

[4] PARDI N, HOGAN M J, PORTER F W, et al. mRNA vaccines-a new era in vaccinology[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(4): 261-279.

[5] IRWIN A. What it will take to vaccinate the world against COVID-19[J]. Nature, 2021, 592(7853): 176-178.

[6] RAUCH S, JASNY E, SCHMIDT K E, et al. New vaccine technologies to combat outbreak situations[J]. Front Immunol, 2018(9): 1963.

[7] SAHIN U, DERHOVANESEAN E, MILLER M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer[J]. Nature, 2017, 547(7662): 222-226.

[8] 国家药品监督管理局. 国家药监局药审中心关于发布《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则(试行)》等 5 个指导原则的通告(2020 年第 21 号)[EB/OL]. (2020-08-14) [2022-07-13]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20200814230916157.html>.

[9] SAHIN U, MUIK A, DERHOVANESEAN E, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses[J]. Nature, 2020, 586(7830): 594-599.

[10] 龚永平, 郝中香, 陈珍容, 等. 微滴式数字 PCR 绝对定量应用研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(8): 686-690.

[11] Medicines & Healthcare products Regulatory Agency. Vaccine BNT162b2-conditions of authorisation under regulation 174[EB/OL]. (2020-12-02) [2022-07-07]. <https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/>

- attachment_data/file/1022642/Conditions_of_authorisation_for_Pfizer_BioNTech_vaccine_27_Sept.pdf.
- [12] World Health Organization. Evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA-based prophylactic vaccines for infectious diseases: Regulatory considerations[EB/OL]. (2020-12-22) [2022-07-13]. https://www.who.int/docs/default-source/biologicals/ecbs/reg-considerations-on-rna-vaccines_1st-draft_pc_tz_22122020.pdf?sfvrsn=c13e1e20_3.
- [13] ZHANG H, LIU J Y, MAO Q Y, et al. Advances in quality control of mRNA vaccine[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2022, 46(10): 745-750.
- [14] DINGLE T C, SEDLAK R H, COOK L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances[J]. Clin Chem, 2013, 59(11): 1670-1672.
- [15] SEDLAK R H, KUYPERS J, JEROME K R. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 80(4): 285-286.
- [16] VYNCK M, TRYPSTEEN W, THAS O, et al. The future of digital polymerase chain reaction in virology[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(5): 437-447.
- [17] 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]. J Clin Microbiol, 2017, 55(2): 442-449.
- [18] STRAIN M C, LADA S M, LUONG T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e55943.
- 收稿日期: 2023-09-07
(本文责编: 沈倩)