

两种核酸提取法对不同程度溶血标本 HBV-DNA 检测结果的比较

龙幼敏,雷秀霞,明凯华,陈英姿(广州医学院附属广州市第一人民医院检验科 510180)

【摘要】 目的 探讨一步核酸提取法和两步核酸提取法对不同程度溶血标本乙型肝炎病毒(HBV) DNA 检测结果影响的差异。**方法** 收集 22 例临床随机患者全血标本,离心并于当天用一步和二步核酸提取法试剂检测 HBV-DNA 含量后,将全血标本放 4℃ 冰箱保存,每隔 2~3 d 取出分别用两种试剂检测 HBV-DNA 的含量。**结果** 22 例标本随着存放时间和溶血程度的增加,其 HBV-DNA 含量有下降趋势;一步法在标本存放 3 d 后结果显著低于首次检测结果($t_{3d}=3.981, P<0.01$);二步法在标本存放 19 d 后结果显著低于首次检测结果($t_{3d}=3.642, P<0.01$);标本于 4℃ 存放 3 天后一步法 HBV-DNA 的检测结果显示显著低于二步法($t_{3d}=4.91, P<0.001$)。**结论** 溶血标本对二步核酸提取法试剂检测 HBV-DNA 含量的影响作用远低于一步法,对于临床由于特殊原因无法及时获得合格血标本时,可考虑使用二步核酸提取法试剂检测 HBV-DNA 的含量。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 荧光定量 PCR; 溶血; 标本

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.12.036 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)12-1483-02

Research on the detection of HBV-DNA in different hemolysis sample by two kinds of nucleic acid extraction methods

LONG You-min, LEI Xiu-xia, MING Kai-hua, CHEN Ying-zi (Department of Clinical Laboratory, Guangzhou First Municipal People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China)

【Abstract】 Objective To discuss the difference between one-step nucleic acid extraction and two-step nucleic acid extraction for HBV-DNA in different degrees of hemolysis sample. **Methods** 22 Whole blood samples were collected from clinical patients randomized, centrifuged and we detected the content of HBV-DNA by one-step and two-step PCR method separately on that day. With 4℃ preservation, the content of HBV-DNA was tested every 2-3 days using two reagents. **Results** As the storage time and hemolysis increased, the contents of HBV-DNA decreased. The HBV-DNA content of samples preserved 3 days detected by one-step significantly was lower than that of the first detection($t_d=3.981, P<0.01$), in the same way, the HBV-DNA content of samples preserved in 19 days detected by two-step significantly was lower than that of the first detection ($t_d=3.642, P<0.01$). Moreover, the HBV-DNA content of samples preserved 3 days in 4℃ detected by one-step was significantly lower than that of two-step($t=4.91, P<0.001$). **Conclusion** The effect of hemolysis sample on the detection of HBV-DNA by two-step method is more lower than that of one-step method. It is better to use two-step method to detect HBV-DNA in samples which is not acquired normally in some cases.

【Key words】 hepatitis B virus; FQ-PCR; hemolysis; sample

乙型肝炎病毒(HBV)DNA 定量能客观反映 HBV 感染复制情况,在临床用药、疗效监测及预后判断方面具有较高的指导价值^[1]。诸多因素如标本采集、处理、保存等因素对保证 HBV-DNA 检测结果的有效性尤为重要^[2]。在日常 HBV-DNA 检测标本的接收和处理时会碰到标本出现不同程度溶血的情况,而造成溶血的原因有很多:标本送检不及时(包括客观原因和主观原因)、采血技术不熟练、患者血液循环不好、婴幼儿抽血不顺利、标本离心操作不当等,而破碎红细胞释放出来的血红蛋白对聚合酶链反应(PCR)扩增有明显的抑制作用。为了探讨溶血标本对一步和二步核酸提取法试剂荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 结果影响的大小,尽可能减少患者重抽血而带来的痛苦,本文将 22 例临床随机患者全血标本放 4℃ 冰箱保存不同时间从而造成不同程度的溶血标本进行 HBV-DNA 定量分析,探讨溶血标本对 HBV-DNA 定量结果的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 22 例临床随机患者标本均来自本院肝炎病科门诊患者,男 10 例,女 12 例,年龄(35.2±14.3)岁,均为临床确诊为乙型肝炎患者并进行抗病毒治疗者。

1.2 实验方法 受试者早晨空腹抽取静脉血 4 mL,置于真空促凝管中待血液凝固后,3 000 r/min 离心 10 min 离心取上清液作 HBV-DNA 检测;剩余原血液标本直接放 4℃ 冰箱保存,每隔 2~3 d 检测 HBV-DNA 含量,并与首次检测结果进行比较分析。

1.3 试剂及仪器 一步核酸提取法 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)试剂由广州某知名试剂公司提供;二步核酸提取法 HBV-DNA FQ-PCR 试剂由上海某知名试剂公司提供;HBV-DNA FQ-PCR 检测使用德国罗氏公司提供的 Light-Cycler 480 FQ-PCR 仪进行检测。

1.4 方法

1.4.1 一步核酸提取法 加入 DNA 提取液和待测样品各 50 μL 于 0.5 mL 灭菌离心管中,充分混匀,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 干浴 10 min 后于冷冻离心机中 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 2 μL 点样上 PCR 仪扩增,循环参数为:93 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 2 min 共 1 个循环;预变性:94 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 45 s 共 10 个循环;变性:94 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 30 s,退火和延伸:55 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 45 s 共 30 个循环。

1.4.2 二步核酸提取法 加入样品处理液 A 和待测样品各 100 μL 于 0.5 mL 灭菌离心管中,振荡摇匀,于冷冻离心机中 13 000 r/min 离心 10 min,吸弃上清,再加入 25 μL 样品处理液 B,振荡摇匀,2 000 r/min 离心数秒,100 $^{\circ}\text{C}$ 干浴 10 min 后于冷冻离心机中 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2 μL 点样上 PCR 仪扩增,循环参数为:50 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 2 min 一个循环;预变性:94 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 2 min 一个循环;变性:94 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 10 s,退火和延伸:60 $^{\circ}\text{C}$ $\times$ 30 s 共 40 个循环。

1.5 统计学方法 HBV-DNA 定量结果均换算成对数后使用 SPSS17.0 统计软件进行配对资料 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种核酸提取法试剂首次 HBV-DNA 检测结果经比较,差异无统计学意义 ($t_{3d} = 1.923, P > 0.05$)。结果表明:正常血清标本两种核酸提取试剂 HBV-DNA 的检测结果有较好的一致性。

2.2 标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 3 d 一步核酸提取法试剂 HBV-DNA 结果与首次检测结果比较,差异有统计学意义 ($t_{3d} = 3.981, P < 0.01; t_{3d} = 5.871, P < 0.01$)。结果表明:该一步核酸提取法试剂全血标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 3 d 导致的溶血程度已不适合 HBV-DNA 的检测。

2.3 标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 3 d 后一步与二步核酸提取法试剂 HBV-DNA 结果比较,差异有统计学意义 ($t_{3d} = 4.91, P < 0.001; t_{3d} = 7.165, P < 0.001$)。结果表明:该一步核酸提取法试剂全血标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 3 d 后血红蛋白含量对 PCR 扩增已有明显的抑制作用,导致 HBV-DNA 的检测结果明显降低。

2.4 标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 17 d 二步核酸提取法试剂 HBV-DNA 结果与首次检测结果比较,差异无统计学意义 ($t_{3d} = 0.928, P > 0.05$)。结果表明:该二步核酸提取法试剂全血标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 17 d 导致的溶血程度仍适合 HBV-DNA 的检测。

2.5 标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 19 d 后二步核酸提取法试剂 HBV-DNA 结果与首次检测结果比较,差异有统计学意义 ($t_{3d} = 3.642, P < 0.01; t_{3d} = 3.151, P < 0.05$)。结果表明:该二步核酸提取法试剂全血标本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 19 d 后 Hb 含量对 PCR 扩增已有明显的抑制作用,导致 HBV-DNA 的检测结果明显降低。

3 讨论

目前国内检测 HBV-DNA 较多采用构建在 TaqMan 技术上的 FQ-PCR,该检测方法灵敏、快速、特异性强。但 FQ-PCR 对实验的要求较高,操作繁琐,在样本处理各步骤中以提取核酸作为扩增反应模板是诸多重要前期步骤中最关键的一步,不

同的处理方法可直接影响 PCR 的扩增效果与实验检测结果的准确性^[3]。影响 PCR 准确性的因素除反应体系中引物、耐热酶、 Mg^{2+} 等浓度比例外,标本因素的影响不容忽视,按卫生部相关 PCR 标准操作规程要求^[2],为了避免标本因素对 PCR 结果造成影响,抗凝血标本必须在抗凝 6 h 内分离血浆、血清标本则需于 2 h 内分离血清,而日常工作中会出现由于配送环节等出问题无法严格执行或由于特殊原因无法获得合格血标本(例如溶血)等实际情况,那么由于上述各种原因导致延迟送检的样品或不合格的样品是否都要全部拒收呢?

本实验采用二步核酸提取法,在提取 DNA 之前,先用沉淀剂经高速离心沉淀获得 HBV 病毒颗粒并弃去上清,去除血红蛋白等大量干扰物质^[4],从而去除了大部分干扰物质对 PCR 扩增的抑制作用,而一步核酸提取法在提取 DNA 之前完全没有去除血红蛋白等干扰物质,若为溶血标本则 PCR 扩增体系中血红蛋白等含量很高,会严重影响 PCR 扩增效率,直接影响了 HBV-DNA 检测结果的准确性^[5-6]。

本实验结果显示,采用二步核酸提取法 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂检测全血标本在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放 17 d 血清仍适合作 HBV-DNA 的检测;而采用一步核酸提取法 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂检测全血标本在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放 3 d 血清已不适合作 HBV-DNA 的检测;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放 3 d 后同一时间段两种试剂 HBV-DNA 检测结果差异有统计学意义 ($P < 0.01$),一步核酸提取法 HBV-DNA 含量显著低于二步核酸提取法,故建议对于临床由于特殊原因无法及时送检的血液样品以及难以获得合格血液样品的待检测标本,可考虑使用二步核酸提取法检测 HBV-DNA 的含量,在保证结果准确的同时也减少了由于重抽血而给患者带来的痛苦。

参考文献

- [1] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 225-227.
- [2] 李金明. 实时荧光定量 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 63.
- [3] 陈晓东, 陶志华, 周武. 核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(4): 212-214.
- [4] 尹琦, 徐玉婵. 影响 HBV-DNA 测定的标本因素[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(2): 133-134.
- [5] 刘佳, 徐军, 王雪飞. 三种 HBV DNA 提取方法对荧光定量 PCR 检测结果影响的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(7): 780-783.
- [6] 喻晶, 曾南阳, 吴夏枫, 等. 溶血对检测不同含量乙肝病毒 DNA 干扰作用的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(6): 78-81.

(收稿日期: 2011-01-30)