

罗氏 LightCycler Nano 荧光定量 PCR 仪性能评价*

张 宇¹, 李 冬¹, 戴 燕¹, 郑为超², 万海英^{1△} (1. 同济大学附属同济医院检验科, 上海 200065; 2. 安徽理工大学医学院, 安徽淮南 232001)

【摘要】 目的 对美国罗氏公司 LightCycler Nano 32 孔荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪的主要性能指标进行评价。**方法** 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的评价标准, 评价仪器精密度、准确度、灵敏度、可报告范围、仪器间比对等指标。**结果** LightCycler Nano 精密度批内变异系数(CV)为 2.63%、1.51%, 批间 CV 为 6.2%、4.15%; 准确度与室间质控物比较, 5 个标本均在靶值区间内; 灵敏度检测 CV≤10%; 可报告范围为最大稀释比例 1:100; 与比对仪器的比对结果偏差结果均小于 15%。**结论** 罗氏 LightCycler Nano 荧光定量 PCR 仪 5 项性能经验证后与厂家提供的性能参数相符, 可以用于临床检测。

【关键词】 LightCycler Nano; PCR; 性能评价; 精密度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)02-0145-02

Performance evaluation of Roche LightCycler Nano fluorogenic quantitative PCR instrument* ZHANG Yu¹, LI Dong¹, DAI Yan¹, ZHENG Wei-chao², WAN Hai-ying^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China; 2. Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the major performance indexes of American Roche LightCycler Nano 32 holes fluorogenic quantitative PCR instrument. **Methods** According to the evaluation standard formulated by the Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI), the precision, accuracy, sensitivity, reportable range and comparison between the instruments were evaluated. **Results** The coefficients of variation(CV) for within-run assays were 2.63% and 1.51% respectively; CV for between-run assays were 6.2% and 4.15% respectively; comparing the accuracy with the between-run quality control material, the five samples were within the target value range; CV for sensitivity was ≤10%; the reportable range of the maximum dilution was 1:100; the bias of the comparison results with the comparative instrument was less than 15%. **Conclusion** The verified 5 items of performance in the Roche LightCycler Nano fluorogenic quantitative PCR instrument conform to the performance parameters provided by the manufacturer, indicating that this instrument can be applied in clinical testing in our laboratory.

【Key words】 LightCycler Nano; PCR; performance evaluation; precision

目前聚合酶链反应(PCR)定量检测技术在各级实验室中使用越来越广泛^[1], 其中 ABI 公司 7700、7500 型 96 孔 PCR 仪应用较为广泛, 但很多实验室对通量要求不高^[2], 同时大部分省市级检验科 PCR 结果报告时间为 3 d 左右, 原因之一为积攒足够批量标本后进行检测, 大大降低了报告及时率, 一定程度上影响患者就诊效率, 增加医疗开支, 罗氏新推出的 LightCycler Nano 32 孔荧光定量 PCR 仪, 具有中等通量, 高精度, 支持快速 PCR, 软件分析直观, 价格为常规 PCR 的一半, 体积小等特点, 能够在大大缩短运转周期的同时减低实验室成本消耗, 同时能为科研个体化、低通量、快速提供一个个人化的定量平台^[3]。同济医院检验科在使用 LightCycler Nano 后, 对其主要性能指标进行评价分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 主要仪器: LightCycler Nano 荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司), 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司), 生物安

全柜等。试剂: 乙型肝炎病毒(HBV)-PCR 荧光定量检测试剂盒(日本 Takara 公司)。标准血清, 上海临床检验中心提供。检测标本来源: 收集足够量的患者血清 20 份。

1.2 方法

1.2.1 精密度检测 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的评价标准 EP15A 要求收集两个水平(Level 2 低值、Level 1 高值)的患者血清, 批内精密度一天各测定 20 次, 计算平均值和变异系数(CV)值; 批间精密度, 每日各测一次, 连续 20 d, 计平均值和 CV 值。

1.2.2 准确度检测 使用参加上海市临检中心下发的 5 份室间质控品进行检测, 按照 CLSI-EP15A 规则, 检测本室检测值是否落在靶值范围内或靶值在 TEa(CLIA'88)允许范围内。

1.2.3 灵敏度验证 使用低值定值质控品, 若高于检测下限, 可用稀释液稀释到下限(不能高于下限值)。将标本上机后连续检测 10 次, 检测数据统计平均值(\bar{x})、标准偏差(s)、偏倚

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273777); 国家自然科学基金资助项目(81272603); 上海市浦江人才计划项目(13PJ1407300); 安徽省自然科学基金项目(11040606M203)。

作者简介: 张宇, 女, 检验技师, 硕士研究生, 研究方向是分子免疫、检验医学、中医药免疫。△ 通讯作者, E-mail: whysz@163.com。

(CV)。根据厂家提供的检测下限值(HBV-DNA 1.00×10^3 IU/mL),检测 CV 是否在厂家要求范围内($\leq 10\%$)。

1.2.4 可报告范围 收集高值即检测上限(HBV-DNA 1.00×10^7 IU/mL)患者标本。将患者标本用厂家指定的稀释液按比例进行稀释后上机检测,检测其最高稀释倍数是否高于厂家指定值(1:100)。计算测试均值与理论值的比值,如在 80%~120% 之内的最大稀释度,为本室可接受的最大稀释度。

1.2.5 仪器间比对 准备 5 份标本,浓度覆盖医学决定水平。在基准仪器和比对仪器(ABI 7700)上检测这 5 份标本,每份标本检测 2 次取均值计算比对仪器和基准仪器之间的结果偏差(CV)百分比。5 份标本 CV $\leq 15\%$ 为符合要求。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS17.0 进行统计学处理,计量资料采用 *t* 检验,两变量间线性关系分析采用直线相关及回归分析。

2 结 果

2.1 仪器精密度检测结果 批内精密度:低值均值 $\pm s$ 为 4.45 ± 0.12 , CV 为 2.63%,高值均值 $\pm s$ 为 6.52 ± 0.1 , CV 为 1.51%。批间精密度:低值均值 $\pm s$ 为 4.41 ± 0.32 , CV 为 6.2%,高值均值 $\pm s$ 为 6.39 ± 0.2 , CV 为 4.15%。本室检测值均落在厂家提供的 CV 范围内或在 TEa (CLIA'88) 允许范围内。

2.2 准确度检测结果 本室检测值 0、4.76、5.71、3.56、6.74 均落在靶值范围内或靶值在 TEa (CLIA'88) 允许范围内(0~0.4.39~5.39、5.34~6.34、3.42~4.42、6.38~7.38)。

2.3 灵敏度验证结果 本室检测结果为 3.543, *s* 为 0.165, CV 为 4.67%,符合厂家要求范围内(CV $\leq 10\%$)。

2.4 可报告范围验证结果 按照厂家最大稀释倍数 1:100 后,测试均值为 5.98,理论值为 5.81,测试均值与理论值的比值为 102.84%,在 80%~120% 之内。1:100 为本科室可接受的最大稀释度,符合厂家提供的最高稀释倍数。

2.5 仪器间比对结果 5 份标本比对仪器和基准仪器之间的结果偏差(CV)百分比分别为 0.0%、0.1%、2.1%、0.3%、2.5%均小于 15%符合要求。

3 讨 论

经验证罗氏 LightCycler Nano 32 孔荧光定量 PCR 仪,精密度、准确度、灵敏度、可报告范围、仪器间比对 5 个项目的各项性能指标与厂家提供的性能参数相符。定量 PCR 仪主要借助标本及标准品之间对比来实现定量^[4-5],对于定量 PCR 系统,重要性能除了传统 PCR 的升温速度及温控稳定性、精确性外,更重要的在于标本孔之间均一性,大大减少孔间差异造成的指数级放大^[6]。罗氏 LightCycler Nano 32 孔荧光定量 PCR 仪,采用 Thermo-Base™ 热循环专利技术和先进的光学检测系统,彻底消除边缘效应,可靠的光学装置提供了完整的光谱信息,保持稳定优异的检测结果^[7]。荧光检测系统,多色多通道检测是当今的主流^[8]。支持所有常用的检测染料,不需要 DOX。该仪器外形小巧,其体积为常规 PCR 仪体积的 1/4,可随意搬动,不受实验室的空间限制。便于经常要开展实时定量 PCR 分析,但通量中等的实验室。

目前在临床上 PCR 主要用于检测各种细菌及病毒 DNA,为实验诊断提供分子生物学依据。其中乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 检测在各级实验室检测中最为常用。我国属 HBV 感染高流行区,一般人群的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性率为

9.09%^[9],目前临床上常用荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA,荧光定量 PCR 技术把 PCR、杂交及光谱技术相融合,达到了对原始模板量定量的目的。HBV-DNA 是 HBV 的遗传质,HBV-DNA(PCR)是从血清中检测 HBV 存在的灵敏而直接的方法^[10]。LightCycler Nano 32 孔荧光定量 PCR 仪可作为一种快速、准确的分子生物学检测仪器,其结果可以直接反映体内 HBV 感染状态及病毒载量情况,有利于判断疾病的严重程度和传染性,更有利于临床治疗的药物选择和疗效观察。

此外,LightCycler Nano 软件设计更为直观,分析设计及数据分析一体化,大大提高了检测效率,同时小通量、支持快速 PCR 的设计,便于每日操作,降低检测成本,缩短报告周期。符合当今临床检验实验室,横向联合科研型实验室发展的趋势。本实验经过验证该仪器的主要性能指标,符合厂家提供的性能参数相符,可以在实验室应用于临床检测。

参考文献

- [1] 张弛宇,徐顺高,黄新祥.一种新颖简便的荧光实时 RT-PCR 相对定量方法的建立[J].生物化学与生物物理进展,2005,32(9):883-888.
- [2] Odreman-Macchioli M, Vielma S, Atchley D, et al. Analysis of real time PCR amplification efficiencies from three genomic region of dengue virus[J]. Invest Clin, 2013, 54(1):5-19.
- [3] 谷金莲,于洋,梁争论.3 种国产丙型肝炎病毒核酸定量与罗氏试剂检测性能的初步评价[J].中国病毒病杂志,2013,6(3):445-449.
- [4] 郑传浩,姚磊,李毅.两种分析 miRNA 相对表达量方法的比较研究[J].检验医学与临床,2013,22(10):2937-2942.
- [5] 张世婷,王哈,吕珀,等.实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应型内鉴定脊髓灰质炎病毒方法的应用[J].中国公共卫生杂志,2013,12,29(6):828-830.
- [6] Watanabe S, Sawada H, Naito S, et al. Simulation of collaborative studies for real-time PCR-based quantitation methods for genetically modified crops[J]. J AOAC Int, 2013, 96(2):357-368.
- [7] Samsonraj RM, Raghunath M, Hui JH, et al. Telomere length analysis of human mesenchymal stem cells by quantitative PCR[J]. Gene, 2013, 519(2):348-355.
- [8] Zhong CY, Cheng AC, Wang MS, et al. Quantitative real-time PCR study of the expression and regulation of the tetracycline resistance gene in *Riemerella anatipestifer* [J]. Poult Sci, 2013, 92(6):1552-1559.
- [9] Zhang F, Fan YC, Mu NN, et al. Rapid. Exportin 4 gene expression and DNA promoter methylation status in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepat, 2014, 21(4):241-250.
- [10] 倪艳,蒋凤,徐华,等.四环素调控表达肿瘤坏死因子 α 抗乙型肝炎病毒的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2014,22(3):213-218.