

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.07.010

自制复合质控品在 α 、 β -地中海贫血基因检测中的应用价值^{*}

汪文明¹, 马 玲², 周 靖¹, 陈 林^{1△}

1. 重庆市南川区人民医院检验科, 重庆 408400; 2. 重庆市南川区妇幼保健院检验科, 重庆 408400

摘 要:目的 探讨自制复合质控品在 α 、 β -地中海贫血基因检测中的应用价值。方法 将 2017 年 9 月至 2018 年 12 月检测出 α 、 β -地中海贫血基因的阳性标本等比例混匀, 分装, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。试验前将自制复合质控品取出, 室温复溶 20 min, 和待测标本一起检测, 评价其 DNA 水平及纯度、稳定性、阳性预测值、阴性预测值。结果 共检测 126 次, 自制复合质控品 DNA 水平及纯度均满足试剂盒要求, 阳性预测值为 100.0%, 阴性预测值为 0, 稳定性良好。结论 自制复合质控品制备方法简单, 成本低, 稳定性良好, 可用于 α 、 β -地中海贫血基因检测室内质控。

关键词:室内质控; α -地中海贫血; β -地中海贫血; 基因检测

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)07-0899-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Application of self-made composite control products in gene detection of α 、 β -thalassemia^{*}

WANG Wenming¹, MA Ling², ZHOU Jing¹, CHEN Lin^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Nanchuan, Chongqing 408400, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Nanchuan District, Chongqing 408400, China

Abstract: **Objective** To evaluate the self-made composite control products in gene detection of α 、 β -thalassemia. **Methods** The positive samples of α 、 β -thalassemia gene were mixed in equal proportions, dispensed, and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. The self-made composite control product was taken out before the experiment, melted at room temperature for 20 mins, detected together with the sample to be tested. The DNA concentration and purity, stability, positive predictive value and negative predictive value of the self-made control products were evaluated. **Results** The DNA concentration and purity of the self-made composite control products met the requirements of the kit. The positive predictive value was 100.0%, the negative predictive value was 0, and the stability was good. **Conclusion** The self-made composite quality control product has simple preparation method, low cost and good stability, and could be used for indoor quality control of α 、 β -thalassemia gene detection.

Key words: quality control; α -thalassemia; β -thalassemia; genetic testing

地中海贫血(以下简称“地贫”)是全球最大的单基因遗传病之一,我国南方高发地区人群携带率为 1%~23%^[1]。基因检测是诊断该病和确定基因型的准确方法^[2]。目前临床应用最为广泛的基因检测方法是反向斑点杂交技术,该方法成本低,通量高,适合在基层实验室开展,但检测过程烦琐,手工操作步骤多,检测周期长,缺少阳性质控品,是该方法不可忽视的问题。《医学实验室质量与能力认可准则在基因扩增检验领域的指南》要求,基因扩增实验室的内部质量控制至少需做阴阳性质控^[3]。目前,分子检测的商品化质控物有限,且存在检测位点单一,无法覆盖全部突变位点,不能参与整个检测过程等问题,较多实验室使用自制质控品^[4]。在病原微生物核酸检测方

面,葛燕梅等^[5]使用已确认的解脲支原体阳性标本作为单一质控物;另外,部分实验室使用商品化试剂自制复合质控品^[6-8]。在遗传性疾病的基因检测项目中,自制复合质控品的使用鲜有报道。本研究探讨使用阳性标本混合制作复合质控品,以期覆盖更多的突变位点,并对该方法的可行性进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2017 年 9 月至 2018 年 12 月在南川区人民医院行 α 、 β -地贫检测的阳性标本,标本类型为枸橼酸钠抗凝的外周全血。日常检测工作中,选取 DNA 水平为 20~40 ng/ μL ,纯度 A_{260}/A_{280} 值为 1.5~2.5 的单一突变类型的杂合子标本,于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,建立阳性标本库。本研究经过南川区人民

^{*} 基金项目:重庆市南川区科技计划项目(CX201707)。

作者简介:汪文明,男,副主任技师,主要从事临床医学检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 2575054277@qq.com。

医院伦理委员会批准,受检者知情同意。

1.2 仪器与试剂 α 、 β -地贫基因检测试剂盒(潮州凯普公司),NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计(赛默飞公司),Veriti 热循环仪(美国应用公司),HB-2012A 型医用核酸分子快速杂交仪(潮州凯普公司)。

1.3 方法

1.3.1 阳性标本的选择 选择阳性标本时,应根据实验室使用的检测方法 & 检测基因位点而定,应尽可能覆盖 PCR 产物的所有片段。南川区人民医院检验科(以下称“本实验室”)采用潮州凯普公司生产的 α 、 β -地贫基因检测试剂,该试剂使用单管法,使用 3 对半引物扩增 α -地贫的 3 种突变位点和 3 种缺失型位点(图 1)及 1 对引物扩增 β -地贫的 17 个位点的 19 种突变类型。因此,本研究制备的复合质控品,使用 2 种不同的 α -地贫突变位点和 2 种不同的 β -地贫突变位点。在制备质控品时,可使用不同的突变位点自由组合,以达到同一批次试剂覆盖所有常见突变位点的目的。

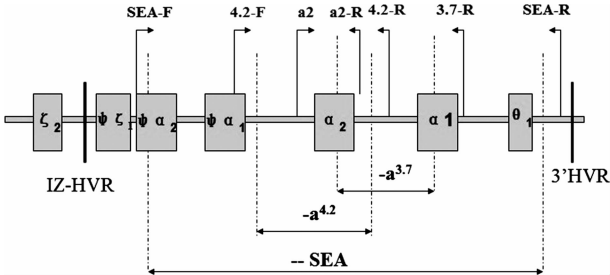


图 1 α -地贫基因引物位置模式图(潮州凯普公司提供)

1.3.2 复合质控品制备 按照上述要求,从 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 阳性标本库中,选取 4 种不同突变类型的阳性标本,室温充分融化。分别取 1 mL 加入 10 mL 无菌离心管内,震荡混匀,瞬时离心,制成复合质控品,分别分装 $200\text{ }\mu\text{L}$ 于 1.5 mL EP 管内, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。每次试验前,取 1 支在室温下复融 20 min,充分混匀后,与待测标本一起检测。

根据 α 、 β -地贫基因试剂的检测要求,全血标本加

样量为 $200\text{ }\mu\text{L}$ 时,提取 DNA 的水平为 $20\sim 40\text{ ng}/\mu\text{L}$,DNA 纯度 A_{260}/A_{280} 的值为 $1.5\sim 2.5$,且试剂盒的 DNA 最低检出限为 $2\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。通过等比例混合 4 种不同突变类型阳性标本的方法,制备复合质控品,每种突变类型阳性标本的加样量为 $50\text{ }\mu\text{L}$,混合后总体积为 $200\text{ }\mu\text{L}$,理论上每种突变的 DNA 水平为 $5\sim 10\text{ ng}/\mu\text{L}$,此水平符合弱阳性质控品的水平要求(最低检测量的 $2\sim 5$ 倍)^[6-8]。

1.3.3 自制质控品检测及结果判读 自制复合质控品与待测标本一起,按照试剂盒说明书要求,使用离心柱法提取 DNA,使用 NanoDrop 2000 紫外-可见分光光度计检测 DNA 提取液的水平 and 纯度(试剂盒要求水平为 $20\sim 40\text{ ng}/\mu\text{L}$,纯度 A_{260}/A_{280} 比值为 $1.5\sim 2.5$)。PCR 反应体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, $45\text{ }\mu\text{L}$ PCR 混合液, $5\text{ }\mu\text{L}$ DNA 提取液。使用 Veriti 热循环仪行基因扩增。使用 HB-2012A 型医用核酸分子快速杂交仪对扩增产物行导流杂交,扩增产物和杂交膜条上的不同突变类型的探针杂交,通过化学显色对结果进行判读,见图 2。因 α 、 β -地贫基因突变位点较多,1 个复合质控品最多可监控 4 个突变位点,为监控更多的突变位点,下次检测可改用与上次不同的复合质控品。

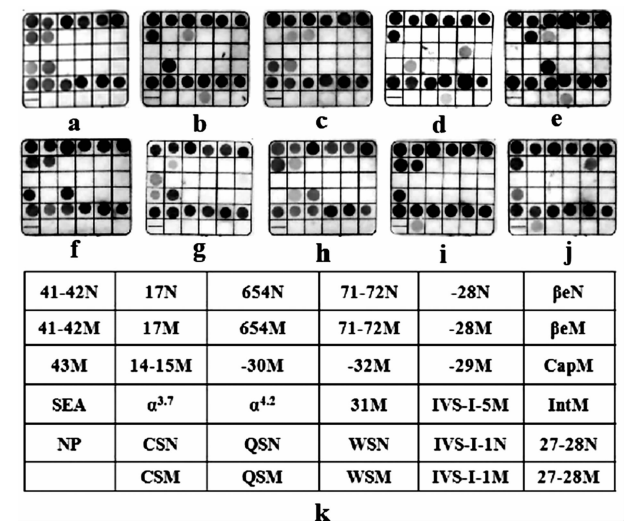
1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel2010 对数据进行整理。

2 结 果

使用自制复合质控品监控 126 次,同时使用含有单一突变位点($-\alpha^{3.7}$)的阳性标本进行对照。126 次检测中,使用自制复合质控品和单一突变阳性标本提取的 DNA,其水平及纯度均满足试剂盒要求,见表 1。反向斑点杂交结果中,每阳性位点对应的斑点均成功显色,见图 2。126 次检测中,共监测阳性位点数 504 次,检出率为 100.0% ,阳性预测值为 100.0% ,阴性预测值为 0。检测阳性位点基本覆盖本地区所有常见突变位点,见表 1。

表 1 自制复合质控品检测结果

编号	复合质控品所含突变位点	检测次数	纯度 A_{260}/A_{280}	水平	阳性预测值	阴性预测值
		(n)	($\bar{x}\pm s$)	($\text{ng}/\mu\text{L}, \bar{x}\pm s$)	(%)	(%)
a	CD17(A-T)、CD41/42 (-TCTT)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$	24	1.69 ± 0.27	36.42 ± 2.01	100.0	0.0
b	CD41/42 (-TCTT)、IVS-II-654(C-T)、 α^{WS} 、 $-\alpha^{3.7}$	16	1.65 ± 0.12	33.91 ± 3.04	100.0	0.0
c	CD17(A-T)、IVS-II-654(C-T)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$	20	1.75 ± 0.26	36.58 ± 4.44	100.0	0.0
d	CD41/42 (-TCTT)、-29(A-G)、 α^{WS} 、 $-\alpha^{3.7}$	8	1.86 ± 0.12	40.46 ± 5.34	100.0	0.0
e	CD17(A-T)、IVS-II-654(C-T)、 α^{WS} 、 $-\alpha^{4.2}$	16	1.71 ± 0.19	38.19 ± 3.42	100.0	0.0
f	CD17(A-T)、CD41/42 (-TCTT)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{4.2}$	8	1.77 ± 0.11	39.31 ± 2.63	100.0	0.0
g	CD43(G-T)、CD17(A-T)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{3.7}$	14	1.82 ± 0.25	32.29 ± 4.61	100.0	0.0
h	CD17(A-T)、CD41/42 (-TCTT)、 $-\alpha^{4.2}$ 、 $-\alpha^{3.7}$	8	1.85 ± 0.17	31.88 ± 6.03	100.0	0.0
i	CD17(A-T)、CD41/42 (-TCTT)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{\text{CS}}$	4	1.72 ± 0.15	29.63 ± 4.61	100.0	0.0
j	CD41/42 (-TCTT)、-28(A-G)、 $-\text{SEA}$ 、 $-\alpha^{\text{CS}}$	8	1.62 ± 0.14	45.31 ± 2.44	100.0	0.0
k	含单一突变($-\alpha^{3.7}$)标本	126	1.74 ± 0.20	37.42 ± 3.68	100.0	0.0



注:k 为杂交膜条上不同探针的分布示意图,图中每个小方格内的含有 1 种探针,左下角 1 个小方格无探针分布,第 1 行和倒数第 2 行有“N”标记的小方格,代表野生型探针,其中“NP”为“-SEA、α^{3.7}、α^{4.2}”共用的野生型对照点,“M”标记的小方格代表突变型探针;a~j 为 10 种自制复合质控品对应的 10 张不同的杂交膜条,蓝色斑点代表质控品扩增产物与相应的探针反向斑点杂交的结果。

图 2 自制复合质控品反向斑点杂交结果

3 讨 论

室内质控的目的在于监控检测过程,评价检验结果是否可靠,以排除所有阶段中导致不满意的原因。分子检测技术飞速发展,越来越多的医院开设有分子检测项目,然而分子检测的室内质控却未完善^[9-10],特别是室内质控物质的缺少,给实验室开展分子检测带来困难。吕荣钰等^[11]对反向斑点杂交法检测为阴性的地贫疑似病例,再进一步行基因检测,发现有 1.8% 的漏诊率,对于漏诊的原因,文章并未详述,笔者认为该方法缺少阳性质控对实验全过程进行有效监控,是该方法存在的缺陷。在缺乏商品化阳性质控品情况下,实验室多采用已确认的阳性标本进行质控,也有部分实验室在进行基因型检测时,常年仅使用一个基因型室内质控品,未对其他有临床决策价值的基因突变进行监控^[9]。李艳等^[12]提出当同时检测多个突变基因时,可设立 2 个或 3 个突变基因的阳性对照,下次改用与上次不同的突变基因,以便覆盖更多突变位点。笔者受到以上研究的启发,结合本实验室积累的质控经验,以 α、β-地贫基因检测为例,通过混合阳性标本,自制复合质控品的方法,对检测全过程进行监控。结果显示,2017 年 9 月至 2018 年 12 月使用自制质控品检测 126 次,检测阳性位点数 504 次,检出率为 100.0%,阳性预测值为 100.0%,阴性预测值为 0。检测阳性位点基本覆盖本地区所有常见突变位点。

与商品化质控品相比,自制质控品原料有限,且每个标本间也存在差异,不同批次质控品间也会存在差异,因此,需要对纳入阳性标本库的标本进行严格的质控,不得使用 DNA 水平及纯度低,含有凝块等不合格的标本。应用过程发现以下缺陷:(1)质控品 4 个阳性位点的显色,有时会出现深浅不均一的情况,

可能与某一标本产生微小凝块,或冻存标本未完全融化有关。因此,在制备质控品时,每个标本要充分融化,若遇到有较小凝块时,可参考文献^[13]的方法,使用无菌小木棍,将凝块捣碎,震荡混匀,然后再与其他不同突变类型的阳性标本混合。(2)阳性标本经冻存、室温溶解、混匀、震荡等操作后,标本物理性状发生较大改变,显微镜下观察,无完整细胞结构,DNA 呈游离状态,易降解。因此,选择阳性标本时,建议使用近 1~2 个月内检出的标本。(3)4 元复合质控品,每个阳性标本的加样量约为常规加样量的 1/4,若某一阳性标本 DNA 水平较低,或者因为标本凝集等原因,导致 DNA 的提取量减少,若低于试剂盒检测下限时,可能会遇到某一位点未检出的情况。若同一批次同一位点多次出现未检出的情况,应属于质控品原因导致的失控。因此,在制备质控品时,可增加同种突变的阳性标本数,等比例混匀后,再与其他不同突变类型的阳性标本混合,以弥补因单一标本的质量不佳造成的影响。(4)多重 PCR 不同引物间存在着竞争作用^[14],某些潜在扩增效率低的引物其扩增效率会有所降低,导致某个突变未检出,或检出比例降低的情况。本研究还未发现未检出的情况,可能与本研究数据较少有关,有待进一步观察。(5)与商品化质控品相比,自制质控品的配置过程相对比较粗糙,在稳定性、瓶间差等方面,无法达到标准化的要求^[15],因此,在发现自制质控品未检出等情况时,应首先排除自制质控品本身的原因。(6)因区域性阳性标本类型的限制^[16],无法获取一些稀有型突变的标本,本方法仅可监控本地区常见突变类型。

我国 α、β-地贫发病率较高,阳性标本易获得,本研究制备的复合质控品,制备方法简单,成本低,可有效监控更多突变位点。本实验室使用该方法进行质控,稳定性良好,在商品化质控品不太成熟的情况下,实验室可根据实际情况自行制备。

参考文献

[1] XU X M, ZHOU Y Q, LUO G X, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassemia in Guangdong Province; implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.

[2] 徐湘民. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京:人民军医出版社, 2011: 16-20.

[3] 刘维薇, 关明. 2013 版《医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明》改版解读[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2013, 1(1): 36-40.

[4] 毛源, 王晶, 汪钦. 临床基因扩增实验室的质量控制[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(23): 3031-3032.

[5] 葛燕梅, 张娣, 樊苏逸, 等. 解脲支原体 DNA 检测室内质控物的制备及质控方案的设计[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(8): 1070-1071.

- 的病原菌分布特点[J]. 中国艾滋病性病, 2016, 22(5): 317-319.
- [7] 谢雅利, 李园园, 胡成平, 等. HIV 抗体阴性的马尔尼菲青霉菌病患者的易感因素及免疫状态分析[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(3): 174-177.
- [8] 赵亮, 唐秀文, 王梅竹, 等. 中国南方地区马尔尼菲青霉菌分子流行病学初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1), 36-39.
- [9] BULTERY S P L, LE T, QUANG V M, et al. Environmental predictors and incubation period of AIDS-associated *Penicillium marneffei* infection in Ho Chi Minh City, Vietnam[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(9): 1273-1279.
- [10] MA T, CHEN R, LI X, et al. The in vitro fungicidal activity of human or macrophages against *Penicillium marneffei* is suppressed by dexamethasone[J]. Microb Phthog, 2015, 86: 26-31.
- [11] BRUCE R D, MERLIN J, LUM P J, et al. 2017 HIV Medicine Association of Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Management of Chronic Pain in Patients Living With Human Immunodeficiency Virus[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(10): 1601-1606.
- [12] MONTEIRO J T C, LIMA K V B, BARRETTO A R, et al. Clinical aspects in patients with pulmonary infection caused by mycobacteria of the *Mycobacterium abscessus* complex, in the Brazilian Amazon[J]. J Bras Pneumol, 2018, 44(2): 93-98.
- [13] CHOI H, JHUN B W, KIM S Y, et al. Treatment outcomes of macrolide-susceptible *Mycobacterium abscessus* lung disease[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 90(4): 293-295.
- [14] OSMANI M, SOTELLO D, ALVAREZ S, et al. *Mycobacterium abscessus* infections in lung transplant recipients: 15-year experience from a single institution[J]. Transpl Infect Dis, 2018, 20(2): e12835.
- [15] LAENCINA L, DUBOIS V, L E MOIGNE V, et al. Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(5): E1002-E1011.
- [16] SUMMERS N A, KEMPKER R, PALACIO F. *Mycobacterium abscessus* subspecies *massiliense* infection after skin graft and cholecystectomy in a burn patient[J]. Int J Infect Dis, 2018, 76: 29-31.
- [17] LEE M C, SUN P L, WU T L, et al. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium abscessus* complex isolated from patients with skin and soft tissue infections at a tertiary teaching hospital in Taiwan[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(10): 2782-2786.
- [18] MYOJIN S, FUKUOKA K, KANEMARU A, et al. Chronic otitis media caused by *Mycobacterium abscessus* spp. *massiliense* treated with tigecycline in a 10-year-old child[J]. Int J Infect Dis, 2018, 74: 10-12.
- [19] RAVNHOLT C, KOLPEN M, SKOV M, et al. The importance of early diagnosis of *Mycobacterium abscessus* complex in patients with cystic fibrosis[J]. APMIS, 2018, 126(12): 885-891.
- [20] GIOVANNENZE F, STIFANO V, SCOPPETTUOLO G, et al. Incidental intraoperative diagnosis of *Mycobacterium abscessus* meningeal infection; a case report and review of the literature[J]. Infection, 2018, 46(5): 591-597.
- [21] 刘爱玲, 葛瑛, 王澎, 等. 人免疫缺陷病毒抗体阴性播散性非结核分枝杆菌病合并马尔尼菲青霉菌病一例并文献复习[J]. 中国医学科学院学报, 2017, 40(1): 131-135
- [22] 中华医学会结核病学分会, 《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8): 572-580.
- [23] 王澎, 翟丽慧, 范洪伟, 等. 9 例非 HIV 感染患者马尔尼菲蓝状菌播散感染的回顾性分析报告[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(5): 261-264.

(收稿日期: 2019-07-20 修回日期: 2019-11-12)

(上接第 901 页)

- [6] 吴亚玲, 祝宏, 董杰, 等. 血液核酸筛查室内质控品浓度选择的探讨[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(2): 170-171.
- [7] 陈少彬, 何子毅, 余霖, 等. 多标记室内质控品在血液核酸筛查的应用分析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(4): 423-426.
- [8] 高加良, 王欢, 李文, 等. 血站核酸检测实验室的质量管理[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(7): 551-552.
- [9] 胡丽涛, 何法霖, 王薇, 等. 分子诊断质量控制面临的问题[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(6): 466-467.
- [10] 肖艳群, 王华梁. 临床分子诊断质量管理问题及思考[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(2): 85-87.
- [11] 吕荣钰, 文飞球, 陈小文, 等. 常规基因检测阴性的地中海贫血疑似病例再行进一步基因检测仍有 7% 的阳性发现[J]. 中国循证儿科杂志, 2014, 9(4): 274-277.
- [12] 李艳, 李金明. 个体化医疗中的临床分子诊断[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 168-169.
- [13] 任来峰. 两种血凝块基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 基层医学论坛, 2009, 13(8): 249-250.
- [14] LOW H C, SILVER M I, BROWN B J, et al. Comparison of hybridization array and roche human papillomavirus (HPV) linear array for HPV genotyping in anal swab samples[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 550-556.
- [15] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 237-240.
- [16] 杨夕, 汪文明, 安刚, 等. 南川地区地中海贫血基因分型的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(21): 2830-2831.

(收稿日期: 2019-07-23 修回日期: 2019-12-03)