

RT-PCR 法微量加样操作优化

莫巧璇,张劲丰,苏 荣,黄声淳,吴 英
广东省佛山市中医院检验科,广东佛山 528000

摘 要:**目的** 比较 3 种不同的内标加样方式对多重实时荧光反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测新型冠状病毒核酸的试验结果及内标异常率的影响,评价 3 种微量液体加样操作方式对试验结果监控的有效性,以便选择合适的微量液体加样操作方案。**方法** 针对核酸提取环节中试剂和内标的加样,采取 3 种不同的方式把试验分成 3 组,每组各检测 30 批次标本,每批次检测的标本量为 42~94 份,分别计算 3 组内标正常和内标异常的标本数,对各组因内标异常而导致的复检进行统计学分析。**结果** 在各组的 30 个批次检测结果中,A 组共检测 2 644 份标本,其中 20 个批次共 62 份标本出现内标异常,总复检率为 2.24%,B 组共检测 2 641 份标本,其中 21 个批次共 83 份标本出现内标异常,总复检率为 3.14%;C 组共检测 2 723 份标本,其中 9 个批次共 11 份标本出现内标异常,总复检率为 0.40%。C 组内标异常的标本数较 A、B 组明显减少,复检率较 A、B 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 基于内标多重实时荧光 RT-PCR 法进行核酸检测,对于微量的内标加样,使用合适的稀释液进行倍数稀释,放大加样量,可减少微量加样的操作误差,提高检测结果的有效性。

关键词:新型冠状病毒; 多重实时荧光 RT-PCR 法; 核酸检测; 内标; 微量加样

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)17-2479-03

目前,我国多个地区及境外多个国家均有新型冠状病毒肺炎疫情报告^[1]。新型冠状病毒肺炎对感染者的健康危害极大,是世界范围内的一个公共卫生问题。我国对新型冠状病毒肺炎疫情实施全面科学的防控措施,高度重视新型冠状病毒核酸检测工作。全国多家医疗机构加强实验室建设,已陆续开展基于聚合酶链反应(PCR)技术的新型冠状病毒核酸检测,对实施该技术的操作人员有较高的要求。采用多重实时荧光反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测新型冠状病毒核酸阳性可作为新型冠状病毒肺炎的确诊依据^[2]。核酸检测技术如 PCR 目前应用较为广泛^[3],新型冠状病毒核酸检测多采用多重实时荧光 RT-PCR 法检测,采用 TaqMan 探针,建立监控内标可同时检测新型冠状病毒多个基因片段,内标同步参与样品核酸的提取,不仅能够有效地监控标本中的抑制物,还能避免操作误差所造成的假阴性^[4-5]。检测图谱可显示内标检测是否符合要求,因此,可作为判断试验结果有效性的依据之一。事实上,在实际工作中存在一定比例的因为内标不符合要求而必须重新检测的标本。本研究根据新型冠状病毒核酸检测的实践经验,对检测操作细节进行了优化,有效减少了因内标不符合要求产生的复检率,具体方案如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来源于 2020 年 3—12 月到本院进行新型冠状病毒核酸检测者。用无菌拭子在受检者两侧咽扁桃体及腭垂稍微用力来回擦拭至少 3 次,然后再在咽后壁擦拭至少 3 次,充分接触,迅速将拭子浸入含有上海之江生物科技公司生产的病毒裂解液(含胍盐)(RVR02)标本采集管中,旋紧管盖,颠

倒混匀 3 次,使标本充分灭活,并促进病毒的裂解及核酸的释放;采集管竖直放置,以便后续的核酸提取检测。

1.2 仪器与试剂 上海之江生物科技股份有限公司生产的 EX3600 核酸提取仪及其配套的核酸提取试剂(磁珠法)、耗材,上海之江生物科技股份有限公司生产的新型冠状病毒核酸检测试剂盒(多重实时荧光 RT-PCR 法);美国 life 公司生产的 ABI 7500 核酸扩增仪;德国 eppendorf 公司手动 0.5~10.0、100.0~1 000.0 μL ,以及电动 5.0~100.0 μL 量程移液器及配套吸头。

1.3 试验分组及操作 根据厂家的操作说明书,在预装板 A 排 1~12 孔加入 300 μL 标本、20 μL 蛋白酶 K、6 μL 助沉剂、1 μL 内标。厂家未明确推荐各试剂的先后加样顺序或加样方式。本试验采用不同的试剂加样方式,分成以下 A、B、C 3 组:A 组,按顺序先后加入 20 μL 蛋白酶 K、6 μL RNA 助沉剂、1 μL 新型冠状病毒内标及 300 μL 标本;B 组,按 20 μL 蛋白酶 K、6 μL RNA 助沉剂、1 μL 新型冠状病毒内标的比例混合后,再每孔加入 27 μL 上述混合液及 300 μL 标本;C 组,20 μL 蛋白酶 K 和 6 μL 的助沉剂先加入预装板 A 排孔,内标使用焦碳酸二乙酯(DEPC)水作 1:10 倍稀释,按稀释后的内标 10 μL 的量加入预装板 A 排孔,再加入 300 μL 标本。

1.3.1 核酸提取 选择程序“RNA Isolation2”运行核酸提取仪进行核酸提取和纯化。

1.3.2 反应试剂配制及 PCR 扩增 取新型冠状病毒核酸多重实时荧光 RT-PCR 检测混合液与多重实时荧光 RT-PCR 酶,按 19:1 的比例混匀,振荡数秒

瞬时离心。取上述混合液 20 μL 分配于八连管中,分别加入阳性质控、提取后的标本和阴性质控 5 μL ,盖好管盖,瞬时离心,立即置于 PCR 仪进行扩增反应。

1.3.3 质量控制 核酸提取时每孔加入内标,每批做阴、阳性对照,试验正常结果必须内标有 S 型扩增曲线,阴性对照孔除内标外的其他通道无起线,阳性对照 Ct 值 ≤ 30 且具有 S 型扩增曲线;对于内标 Ct 值 >43 或无数值的标本,内标不符合要求,表明试验操作存在问题,判定为该标本试验结果无效,该标本须复检处理。

1.4 试验方案 A、B、C 每组各检测 30 批,每批的标本量为 42~94 份,分别计数 3 组标本数和内标扩增异常的标本数,以及各组因内标扩增异常而导致复检的复检率。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以例数或百分率表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在各组的 30 个批次检测结果中,A 组共检测 2 644 份标本,其中 20 个批次共 62 份标本出现内标异常,总复检率为 2.24%;B 组共检测 2 641 份标本,其中 21 个批次共 83 份标本出现内标异常,总复检率为 3.14%;C 组共检测 2 723 份标本,其中 9 个批次共 11 份标本出现内标异常,总复检率为 0.40%。C 组内标异常数较 A、B 组明显减少,复检率较 A、B 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 30 个批次标本 3 组间的试验数据比较

批次	A 组			B 组			C 组		
	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)
1	94	3	3.19	94	0	0.00	94	0	0.00
2	88	1	1.14	84	1	1.19	94	0	0.00
3	93	1	1.08	72	4	5.56	94	0	0.00
4	90	5	5.56	94	0	0.00	94	0	0.00
5	69	3	4.35	62	2	3.23	80	0	0.00
6	87	4	4.60	94	0	0.00	94	0	0.00
7	94	0	0.00	94	6	6.38	71	1	1.41
8	94	0	0.00	94	3	3.19	94	0	0.00
9	94	1	1.06	93	1	1.08	94	0	0.00
10	92	5	5.43	94	0	0.00	94	0	0.00
11	94	2	2.13	94	0	0.00	94	0	0.00
12	90	1	1.11	94	2	2.13	94	0	0.00
13	94	12	12.77	71	12	16.90	94	0	0.00
14	80	0	0.00	94	10	10.64	94	0	0.00
15	86	0	0.00	93	1	1.08	93	1	1.08
16	86	2	3.03	93	1	1.08	94	0	0.00
17	94	1	1.06	94	0	0.00	94	0	0.00
18	94	4	4.26	94	0	0.00	94	0	0.00
19	90	0	0.00	42	1	2.38	80	0	0.00
20	50	0	0.00	94	0	0.00	94	1	1.06
21	94	6	6.38	57	3	5.26	94	0	0.00
22	94	0	0.00	94	2	2.13	50	1	2.00
23	68	2	2.94	94	3	3.19	94	3	3.19

续表 1 30 个批次标本 3 组间的试验数据比较									
批次	A 组			B 组			C 组		
	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)	总数 (n)	异常数 (n)	复检率 (%)
24	94	0	0.00	94	20	21.28	93	1	1.08
25	94	0	0.00	94	3	3.19	94	1	1.06
26	93	5	5.38	94	3	3.19	94	0	0.00
27	94	1	1.06	94	1	1.06	94	0	0.00
28	80	2	2.50	94	3	3.19	94	1	1.06
29	94	0	0.00	94	0	0.00	94	0	0.00
30	86	1	1.16	94	1	1.06	94	1	1.06
合计	2 644	62	2.34	2 641	83	3.14	2 723	11	0.40

3 讨论

采用多重实时荧光 RT-PCR 法进行核酸检测,试验操作步骤繁多,关键步骤包括试剂配制、标本加样、核酸提取、纯化和 PCR 扩增等,国内不同的试剂生产厂家一般会在试剂盒内配套内标检测系统,内标同步参与样品核酸的提取,不仅能够有效地监控标本中的抑制物^[6],还能避免操作误差所造成的假阴性^[7-9],用以辅助判断试验结果的有效性^[10]。

本研究中 3 组标本检测均由同一工作人员执行操作,除了加试剂方式的不同外,其他可能对试验有影响的因素都是一致的,排除了其他因素对不同组检测结果的影响。结果显示,C 组内标异常数较 A 组减少,复检率明显降低,原因可能是内标通常为微量加样,以本试验的试剂盒为例,内标的加样量只有 1 μL ,而 A 组在试验操作过程中难以保证 1 μL 的微量液体加样量准确,且因为使用手动加样枪对大批量标本操作存在一定程度的漏加概率。基于以上操作的难点,C 组对微量加样的操作方法进行了改进,先用 DEPC 水对内标进行 10 倍稀释以放大加样量,再以电动移液器分液加样,简化加样操作,可有效降低漏加风险,减少微量加样操作造成的试验误差。C 组与 B 组操作的差异主要在于 B 组采用了蛋白酶 K 按适当比例与内标混合,同样能简化加样操作流程,降低漏加风险,但 B 组的内标异常数较 C 组明显增加,复检率较 C 组明显升高,可能是蛋白酶 K 较 DEPC 水黏稠,不利于与内标充分混匀分散于体系中,造成分样时各孔内标加入量不一致而导致内标异常数增加。

本研究 C 组经过在核酸提取中,优化内标的微量液体加样操作流程,可见试验结果更理想,可举一反三地应用于其他基于内标多重实时荧光 RT-PCR 法进行核酸检测的项目上,对于内标微量的加样,可使用适当的稀释液进行倍数稀释,放大加样量,以减少微量加样的操作误差,提高检测结果的有效性。

另外,试剂加样过程中,建议使用电动加样枪或八联排孔加样枪,可以有效避免操作过程出现人为疏忽以造成试剂漏加的发生。

新型冠状病毒核酸检测对实验室的检测能力有较高的要求,检测机构应为检测对象提供高效、快速、准确的结果。从新型冠状病毒肺炎疫情暴发至今,国

内陆续有不少的厂家已取得针对新型冠状病毒核酸检测(多重实时荧光 RT-PCR 法)的试剂盒国家医疗器械注册证,可用于临床开展新型冠状病毒核酸检测,其中有的厂家不断对试剂的检测限进行了优化,比如上海之江生物科技股份有限公司,早期该公司旧批号试剂的最低检测限为 1×10^3 copies/mL,而目前生产的新批号试剂最低检测限为 200 copies/mL;有的厂家设计内源性内标检测系统,除了与外源性添加的内标一样能监控核酸提取过程及 PCR 扩增过程的有效性外,还能监控标本的采集有效性,例如中山大学达安基因股份有限公司、上海伯杰医疗科技有限公司等。

本研究结果显示,C 组经优化后的 RT-PCR 法微量加样操作流程可明显减少因内标不符合要求导致的标本复检,可有效减少复检的标本量,提高新型冠状病毒核酸检测报告的及时性,减少技术操作问题对检测结果准确性、可靠性的影响。检测人员提升核酸检测能力,既有利于巩固防控成果,维护群众健康,又有助于人员合理流动,推动全面复工、复产、复学,是“外防输入、内防反弹”的重要措施。

参考文献

[1] 杨海燕,徐洁,李岩,等.新冠肺炎聚集性疫情特征初步分析[J].中华流行病学杂志,2020,41(5):623-628.
[2] 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制综合临床实验室检测技术专题·临床探讨 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.17.006

组.关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第八版)的通知:联防联控机制综发〔2021〕51 号(EB/OL). (2021-05-14) [2021-06-01] <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202105/6f1e8ec6c4a540d99fafef52fc86d0f8.shtml>.
[3] 李金明,林尊慧,王露楠,等.基于日常检测结果的核酸扩增检测假阳性统计室内质量控制方法[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):275-277.
[4] 王海宝,汪德清,骆群,等. HBV-HCV-HIV 三联荧光 PCR 检测的内标浓度选择研究[J]. 检验医学,2008,23(6):630-632.
[5] 曾劲峰,李活,许晓娟,等.核酸血液筛查试剂内标质控效果研究[J].中国输血杂志,2009,22(12):1001-1003.
[6] 肖性龙,何雅青,余以刚,等.内标多重实时荧光 RT-PCR 同时检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型[J].微生物学报,2009,49(1):98-104.
[7] 姜文灿,岳素文,江洪,等.分子信标-TapMan 探针法实时荧光定量 PCR 新型探针及引物[J].生物技术通报,2016,32(11):107-114.
[8] 何晓华,史贤明.扩增内标及其在食源性致病菌 PCR 检测中的应用[J].微生物学报,2010,50(2):141-147.
[9] 刘斌,史贤明.扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用[J].微生物学通报,2006,33(2):156-161.
[10] 但现龙,刘斌,李小玲,等.添加有扩增内标的沙门氏菌荧光定量 PCR 检测体系的建立与评价[J].微生物学报,2011,51(8):1119-1127.

(收稿日期:2021-06-20 修回日期:2021-06-30)

高速离心法消除脂血对临床常规生化检测项目的干扰分析

李宜铮,李丽莉,薛云松[△],周林华,李增安,王芳,罗翔燕
云南省第二人民医院检验科,云南昆明 650000

摘要:目的 分析高速离心法对消除脂血干扰临床常规生化检测项目结果的价值。方法 收集 50 份脂血标本,常规离心法离心后使用雅培 C-16000 全自动生化分析仪检测 19 项常规生化项目,包括总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、前清蛋白(PA)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、γ-谷氨酰转氨酶(GGT)、尿素氮(UREA)、尿酸(UA)、肌酐(CREA)、葡萄糖(GLU)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 A1(APOA1)、载脂蛋白 B(APOB)、脂蛋白 a(LPa)。分离血清高速离心后取下层清亮血清再次检测上述项目。比较两次结果差异。结果 高速离心法离心后,APOA1、APOB、LPa、TP、ALB、PA、DBIL、UA、CREA、GLU 的检测方法与常规离心法离心后检测结果比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而两种不同离心方法离心后的 HDL-C、LDL-C、AST、ALT、GGT、ALP、TBIL、TBA、UREA 检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 脂血对部分常规生化检测项目结果有干扰,对使用免疫比浊法或单试剂检测时干扰很明显,使用高速离心法能简便快速地减弱干扰,提高检测结果的可靠性。

关键词:脂血; 常规生化; 干扰; 高速离心法
中图分类号:R446.1 **文献标志码:**A

文章编号:1672-9455(2021)17-2481-03

影响临床生化实验室检测结果失真的常见检验前因素有标本溶血、脂血(乳糜血)、标本稀释、标本类

型错误等,及时识别出检测的干扰因素并采取合适的应对措施对保证检测结果的可靠性具有重要意义。

[△] 通信作者,E-mail:wjy801113@qq.com.
本文引用格式:李宜铮,李丽莉,薛云松,等.高速离心法消除脂血对临床常规生化检测项目的干扰分析[J].检验医学与临床,2021,18(17):2481-2483.