

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 13. 021

4 种不同核酸提取试剂在自建新型冠状病毒核酸检测系统中性能比较

黄裕游,何雪芳

广东省汕尾市人民医院检验科,广东汕尾 516600

摘要:**目的** 比较不同品牌核酸提取试剂盒在自建新型冠状病毒核酸检测中的性能差异,为临床实验室自建新型冠状病毒核酸检测系统提供参考依据。**方法** 将第 3 方新型冠状病毒核酸检测质控品稀释成 4 种浓度,采用上海之江生物科技股份有限公司(A)、重庆中元生物技术有限公司(B)、广州和信生物科技有限公司(C)及杭州博日科技有限公司(D)4 个不同厂家核酸提取试剂组成的 4 种自建检测系统进行检测,比较其阳性检出率及批内重复性。**结果** 在不同浓度样本中,D 品牌提取试剂盒提取的样本结果阳性率最高,靶基因检出率最高;B 品牌扩增结果的 Ct 值最小,提取产物浓度最高。**结论** 不同品牌核酸提取试剂的提取性能在自建检测系统中存在一定差异,实验室在自建核酸检测系统时,选择核酸提取试剂盒时应进行充分验证,以保证检测结果的准确性。

关键词:新型冠状病毒; 核酸提取; 试剂盒
中图分类号:R446. 1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)13-1813-04

Performance comparison of four different nucleic acid extraction reagents in self-built
SARS-CoV-2 nucleic acid detection systems

HUANG Yuyou, HE Xuefang

Department of Clinical Laboratory, Shanwei People's Hospital of Guangdong Province,
Shanwei, Guangdong 516600, China

Abstract: Objective To compare the performance differences of different brands of nucleic acid extraction kits in self-built SARS-CoV-2 nucleic acid detection, and to provide reference for clinical laboratories to build their own SARS-CoV-2 nucleic acid detection systems. **Methods** The third-party SARS-CoV-2 nucleic acid detection quality control material was diluted to 4 concentrations. Nucleic acid extraction reagents from 4 different manufacturers were used: Shanghai Zhijiang Biotechnology Co., Ltd. (A), Chongqing Zhongyuan Biotechnology Co., Ltd. (B), Guangzhou Hexin Biotechnology Co., Ltd. (C), and Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. (D). It consisted of 4 self-built detection systems for detection. The positive detection rate and intra-assay repeatability of 4 self-built detection systems were compared. **Results** Among the samples of different concentrations, the samples extracted by the D brand extraction kit had the highest positive rate and the highest target gene detection rate. The Ct value of the amplification result of B brand was the smallest, and the concentration of the extracted product was the highest. **Conclusion** There are certain differences in the extraction performance of different brands of nucleic acid extraction reagents in the self-built detection systems. When laboratories build their own nucleic acid detection systems, the selection of nucleic acid extraction kits should be fully verified, to ensure the accuracy of the detection results.

Key words: SARS-CoV-2; nucleic acid extraction; kit

新型冠状病毒核酸检测是确诊新型冠状病毒肺炎的首要标准^[1],核酸提取作为实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)的预处理步骤,提取产物的质量对扩增结果有很大影响。根据《分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-GL039:2019》^[2],提取试剂的验证需要进行核酸纯度、核酸提取产率及核酸完整性验证。本研究因条件限制,采用一种间接方法,即使用已知浓度的验证样本用待评价提取试剂进行提取,然后进行扩增检测,比较分析所得到的结果,从而对待评价试剂盒进行评价分析。

1 材料与方法

1.1 仪器 选用广州和信生物科技有限公司提供的

新型冠状病毒室内质控品作为验证样本,该质控品由国家卫生健康委临床检验中心研发,广州和信生物科技有限公司生产,并通过数字 PCR 技术对质控品进行定量,选用的标准物质为新型冠状病毒核酸标准物质 GBW(E)091090,检测试剂使用上海之江生物科技股份有限公司的新型冠状病毒核酸检测试剂,待评价提取试剂盒为市面上 4 种品牌的磁珠法核酸提取试剂盒,包括上海之江生物科技股份有限公司(A)、重庆中元生物技术有限公司(B)、广州和信生物科技有限公司(C)及杭州博日科技有限公司(D)。提取仪器使用提取试剂盒专用或厂家配制仪器,产物扩增使用杭州博日科技有限公司 LineGene 9600 Plus 荧光定量

PCR 仪。

1.2 判断标准 根据检测试剂说明书,靶基因荧光通道 Ct 值 ≤ 43 ,且扩增曲线呈典型 S 型,则判断为靶基因阳性,结果判断见表 1。有研究证明,Ct 值大小与样本中的原始拷贝数呈反比^[3],Ct 值越小可反映出提取液中靶基因模板浓度越高。

表 1 扩增结果判断	
试验结果	结果判断
ORF1ab 基因、N 基因和 E 基因均为阳性	SARS-CoV-2 阳性
ORF1ab 基因、N 基因和 E 基因中任意 2 个基因阳性	SARS-CoV-2 阳性
ORF1ab 基因、N 基因和 E 基因中任意 1 个基因阳性	结果可疑,重新取样复查
ORF1ab 基因、N 基因和 E 基因均为阴性	SARS-CoV-2 阴性

1.3 方法 根据《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)》^[4]要求,检测试剂的检出限为 ≤ 500 copy/mL,弱阳性质控为试剂检测限的 1.5~3.0 倍,故本研究样本最高浓度设定为文件要求弱阳性的最高浓度 1 500 copy/mL,最低浓度设定为本研究使用的检测试剂的检出限为 200 copy/mL,中

间取 1 000 copy/mL 及 500 copy/mL 两种浓度梯度。用去离子水对 1 500 copy/mL 的质控原液按一定比例稀释至 1 000、500、200 copy/mL,每种浓度梯度配置成 5 个样本进行提取,再将每份提取产物平行进行 3 次扩增,得到 15 个扩增结果,最后将结果进行分析处理。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较方差具有齐性采用 LSD-*t* 检验,方差不具有齐性采用 Tamhane's 检验。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 种品牌在不同浓度样本中检测结果比较 按检测试剂说明书检测结果的判定方法对所有检测结果进行判定,见表 2。A 品牌在 500 copy/mL 及 200 copy/mL 的样本中均有可疑阳性结果;B 品牌在 500 copy/mL 的样本中出现可疑阳性结果;C 品牌在各种浓度样本中均有可疑阳性结果,在 1 500 copy/mL 及 200 copy/mL 的样本中出现阴性结果;D 品牌在各种浓度样本中结果均为阳性。

表 2 4 种品牌在不同浓度样本中检测结果比较(%)												
品牌	1 500 copy/mL			1 000 copy/mL			500 copy/mL			200 copy/mL		
	阳性	可疑	阴性	阳性	可疑	阴性	阳性	可疑	阴性	阳性	可疑	阴性
A	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	93.33	6.67	0.00	86.67	13.33	0.00
B	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	93.33	6.67	0.00	100.00	0.00	0.00
C	73.33	20.00	6.67	73.33	26.67	0.00	93.33	6.67	0.00	60.00	20.00	20.00
D	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00

2.2 4 种品牌在不同浓度样本中基因检出率比较 使用 A、B、D 品牌提取试剂提取核酸后扩增结果中,ORF1ab 基因检出率最高,均在 93.33% 以上;随着样本浓度降低,A、B、D 3 个品牌总基因检出率均有所下降,但均在 80.00% 以上;D 品牌结果中,各靶基因漏检不超过 2 个;C 品牌结果中,不同靶基因漏检率均较高,检出率均小于或等于 80.00%。见表 3。

表 3 不同提取试剂提取不同浓度样本基因检出率比较(%)					
品牌	靶基因	1 500 copy/mL	1 000 copy/mL	500 copy/mL	200 copy/mL
A	ORF1ab 基因	100.00	100.00	100.00	93.33
	N 基因	100.00	80.00	66.67	73.33
	E 基因	100.00	100.00	73.33	73.33
	总基因	100.00	93.33	80.00	80.00
B	ORF1ab	100.00	100.00	93.33	93.33
	N 基因	100.00	93.33	80.00	80.00
	E 基因	100.00	100.00	80.00	100.00
	总基因	100.00	97.78	84.44	91.11

续表 3 不同提取试剂提取不同浓度样本基因检出率比较(%)					
品牌	靶基因	1 500 copy/mL	1 000 copy/mL	500 copy/mL	200 copy/mL
C	ORF1ab	73.33	60.00	80.00	53.33
	N 基因	53.33	66.67	66.67	40.00
	E 基因	66.67	73.33	80.00	53.33
	总基因	64.44	66.67	75.56	48.89
D	ORF1ab	100.00	100.00	100.00	100.00
	N 基因	100.00	100.00	93.33	93.33
	E 基因	100.00	100.00	100.00	93.33
	总基因	100.00	100.00	97.78	95.56

2.3 扩增结果 Ct 值比较 A、B、D 品牌在 1 500 copy/mL 浓度样本中基因检出率均为 100.00%,故选取此浓度样本的扩增结果进行 Ct 值分析。A、B、D 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 ORF1ab 基因扩增结果 Ct 值比较,差异有统计学意义($F = 22.29$, $P < 0.05$);A 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 ORF1ab 基因扩增结果 Ct 值均大于 B、D 品牌,差异

均有统计学意义($P<0.05$);C 品牌各浓度样本均存在靶基因漏检,故不列入比较;B 品牌批内重复性最佳(CV 最小)。见表 4。A、B、D 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 N 基因扩增结果 Ct 值比较,差异有统计学意义($F=3.73,P<0.05$);A 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 N 基因扩增结果 Ct 值大于 B 品牌,差异有统计学意义($P<0.05$);D 品牌批内重复性最佳(CV 最小)。见表 5。A 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 E 基因扩增结果 Ct 值大于 D 品牌,D 品牌大于 B 品牌,D 品牌与 A、B 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 E 基因扩增结果 Ct 值比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);D 品牌批内重复性最佳(CV 最小)。见表 6。

表 4 A、B、D 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 ORF1ab 基因扩增结果 Ct 值比较

品牌	Ct 值($\bar{x}\pm s$)	CV(%)
A	37.42±1.15	3.08
B	35.17±0.76	2.15
D	35.76±0.91	2.56

表 5 A、B、D 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 N 基因扩增结果 Ct 值比较

品牌	Ct 值($\bar{x}\pm s$)	CV(%)
A	37.26±1.29	3.47
B	36.05±1.38	3.84
D	36.62±0.92	2.52

表 6 A、B、D 品牌提取 1 500 copy/mL 浓度样本后 E 基因扩增结果 Ct 值比较

品牌	Ct 值($\bar{x}\pm s$)	CV(%)
A	36.42±1.79	4.91
B	33.22±1.06	3.18
D	34.03±0.46	1.34

3 讨 论

自 2019 年新型冠状病毒肺炎疫情暴发以来,国内疫情已基本得到控制,但由于全球疫情的肆虐,国内疫情防控依然严峻。2021 年来,广州、南京、张家界、郑州等地仍出现小规模疫情暴发,而大规模人群核酸筛查在疫情防控中起非常重要的作用。RT-PCR 目前作为新型冠状病毒核酸检测的常规检测手段之一,是灵敏度和特异度平衡较好的检测技术^[5]。核酸的提取与纯化是 RT-PCR 的关键步骤之一,不同核酸提取方法提取质量有一定差异。吴永彬等^[6]研究结果显示,磁珠法较裂解法和柱提法有更好的性能;杨超杰等^[7]研究发现,手工过柱提取法耗时较长,无法有效节约时间和人力成本,不推荐用于大规模样本的筛查;张云丽等^[8]研究显示,免提取样本释放剂得到的结果重复性不如磁珠法好。磁珠法是近年来比较常用的核酸提取方法,具有简便、高效、提取浓度及纯度较高等优势^[9],而且可以配套全自动提取仪实现自

动化提取,极大地节约了时间及人力成本。

马雯等^[10]通过不同浓度的验证样本,对市面上 4 种核酸提取试剂进行性能验证,研究不同提取试剂盒提取的核酸产物对扩增结果的影响。本研究结果显示,A、B、D 品牌的提取试剂提取浓度较高的样本,虽然扩增结果的 Ct 值有一定差异,但对结果判断的影响相对较小,不会出现可疑或阴性结果,而在浓度较低的样本中,虽出现漏检率,但依然没有出现阴性结果,在实际工作中,通过复查即可得出阳性结果。在 1 500 copy/mL 浓度样本的 Ct 值比较中,B 品牌各靶标 Ct 值总体上低于 A 品牌,可认为 B 品牌提取产物浓度较 A 品牌要高,提取产物浓度越高,靶基因的检出率就越高,这也是 B 品牌在低浓度样本靶基因检出率高于 A 品牌的原因;B 品牌与 D 品牌中 ORF1ab 及 N 基因的 Ct 值差异无统计学意义($P>0.05$),但 D 品牌结果的 CV 总体上要小于 B 品牌,使低浓度样本中 D 品牌检出率更高,结果更稳定。C 品牌的结果漏检率非常大,在高、低浓度样本中均有阴性结果出现,低浓度样本检出率高于高浓度样本,可能是由于 C 品牌的提取试剂盒提取后的核酸模板并不适合使用上海之江生物科技股份有限公司检测试剂进行扩增,使多数扩增结果落在灰区从而影响靶基因检出率。国内有研究显示,不同提取试剂与新型冠状病毒核酸检测试剂搭配使用,其结果存在差异,实验室应选择合适提取试剂和检测试剂搭配使用^[10-13]。

《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)》^[4]中提到,应选用扩增检测试剂盒指定的核酸提取试剂和扩增仪。而在现实工作中,由于许多基层实验室自身条件的限制,无法全部实现使用指定的检测系统,这就使实验室使用自建检测系统用于临床样本检测前,对于由提取试剂、提取仪、扩增试剂、扩增仪等组成检测系统进行系列性能验证显得十分必要。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案:试行第八版修订版[EB/OL]. [2021-11-27]. <http://www.nhc.gov.cn/zwygj/s7653p/202104/7de0b3837c8b4606a059-4aeb0105232b.shtml>.

[2] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-GL039:2019[S]. 北京:中国标准出版社,2019.

[3] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2014:85-88.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册:试行第二版[EB/OL]. [2021-11-28]. <http://www.nhc.gov.cn/zwygj/s7659/202012/b89bcd0813da4178-8688eb14787b3c72.shtml>.

[5] 张喆傲,高钟镐,黄伟. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 检测分析技术研究进展[J]. 药物分析杂志,2020,40(10):1715-1726.

[6] 吴永彬,万颖,蒋红玲,等. 新型冠状病毒核酸提取方法的性能评价及临床应用[J]. 检验医学与临床,2021,18(6):725-728.

(下转第 1820 页)

参考文献

[1] PELLMAN J, SHEIKH F. Atrial fibrillation: mechanisms, therapeutics, and future directions [J]. Compr Physiol, 2015, 5(2): 649-665.

[2] 阿丽屯古丽·库尔班, 阿斯亚·吾甫尔. 高血压合并房颤的危险因素[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(91): 86.

[3] ANDREW N E, THRIFT A G, CADILHAC D A. The prevalence, impact and economic implications of atrial fibrillation in stroke: what progress has been made [J]. Neuroepidemiology, 2013, 40(4): 227-239.

[4] 周珊珊. 红细胞分布宽度与心血管疾病关系的研究进展 [J]. 养生保健指南(医药研究), 2015, 2(12): 31.

[5] 张梅花, 于海丽, 苏艾云, 等. 血清 PCT 与 hs-CRP 对低出生体重儿高胆红素血症并发感染的联合诊断效果研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(7): 1099-1101.

[6] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nat Genet, 2006, 38: 8228-8233.

[7] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟(中国, 中华医学会心血管病学分会中国医师协会高血压专业委员会). 中国高血压防治指南: 2018 年修订版 [J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(1): 24-56.

[8] CRAIG T, JANUARY L, SAMUEL W, et al. 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA /ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation [J]. Heart Rhythm, 2019, 16 (8): e66-e93.

[9] LAM A, GOULOUTI E, ROTEN L. The search for atrial fibrillation and its impact on public health [J]. Swiss Med Wkly, 2017, 147: 14447.

[10] WOLF P A, ABBOTT R D, KANNEL W B. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke; the framingham study [J]. Stroke, 1991, 35(5): 427-437.

[11] JIANG C, THOMAS G N, LAM T H, et al. Cohort pro-

file; the Guangzhou Biobank Cohort Study, a Guangzhou-Hong Kong-Birmingham collaboration [J]. Int J Epidemiol, 2006, 35(4): 844-852.

[12] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228-233.

[13] JIA X, ZHENG S, XIE X, et al. MicroRNA-1 accelerates the shortening of atrial effective refractory period by regulating KCNE1 and KCNB2 expression; an atrial tachypacing rabbit model [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85639.

[14] 缪薇. 脑缺血后适应 micro RNA 保护作用机制的研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.

[15] 顾芸, 李石营, 王星辉, 等. MicroRNA-1 对施万细胞增殖的调节作用 [J]. 交通医学, 2012, 26(4): 309-311.

[16] 于海荣, 王国宏. 红细胞分布宽度对急性心肌梗死患者预后评价的应用价值 [J]. 心血管康复医学杂志, 2019, 28(6): 12-16.

[17] 郑汝杰, 王越, 江耀辉, 等. 红细胞分布宽度与老年心力衰竭合并心房颤动患者预后关系的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(9): 938-941.

[18] LIU T, SHAO Q, KORANTZOPOULOS P, et al. Relation of red blood cell distribution width with CHADS2 and CHA2DS2-VASc score in Chinese patients with non-valvular atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2017, 228: 861-864.

[19] WANG Z, KORANTZOPOULOS P, ROEVER L, et al. Red blood cell distribution width and atrial fibrillation [J]. Biomark Med, 2020, 14(13): 1289-1298.

[20] SALIBA W, BARNETT-GRINNESS O, ELIAS M, et al. The association between red cell distribution width and stroke in patients with atrial fibrillation [J]. Am J Med, 2015, 128(2): 192-196.

(收稿日期: 2021-11-25 修回日期: 2022-04-06)

(上接第 1815 页)

[7] 杨超杰, 刘威, 瞿良, 等. 新型冠状病毒样本核酸检测及核酸提取方法效果评价 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(6): 424-429.

[8] 张云丽, 王鑫, 邵玲, 等. 不同核酸提取方法 SARS-CoV-2 核酸检测性能比较 [J]. 检验医学, 2021, 36(5): 530-534.

[9] YERA H, FILI SETTI D, BASTIEN P, et al. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3881-3886.

[10] 马雯, 张伟宏, 马瑛龙, 等. 不同核酸提取试剂盒在新型冠状病毒核酸检测中的比较研究 [J]. 分子诊断与治疗杂

志, 2020, 12(5): 552-556.

[11] 于河山, 任峰, 张艺凡. 六种新型冠状病毒核酸检测试剂的性能评价及其与核酸提取试剂匹配性分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9): 841-848.

[12] 刘应芬, 余昌秀, 曹玲, 等. 新型冠状病毒核酸提取与扩增试剂匹配的检测结果分析 [J]. 实用医院临床杂志, 2020, 12(2): 29-30.

[13] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析 [J]. 重庆医学, 2020, 49(15): 2435-2439.

(收稿日期: 2021-12-08 修回日期: 2022-04-08)