· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.13.017

不同抽提方式在流行性感病毒检测中的抽提效率研究*

张相猛,周志豪,潘俊锋,徐秋芳[△]

上海市青浦区疾病预防控制中心微生物检验科,上海 201700

摘要:目的 比较普通抽提法和快速抽提法对实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测流行性感(流感)病毒结果的影响。方法 采用同一品牌快速核酸抽提试剂和普通核酸抽提试剂抽提经稀释不同倍数的流感病毒毒株,采用实时荧光定量 PCR 测定抽提核酸的 Ct 值,比较两种方法的抽提效率和重复性。结果 普通抽提法在不同稀释倍数下 Ct 值均值均小于快速抽提法;普通抽提法在原液至 10^7 稀释倍数下 Ct 值变异系数(CV)均小于快速抽提法;原液至 10^6 稀释倍数,普通抽提法和快速抽提法检出率均为 100%; 10^7 稀释倍数下,普通抽提法和快速抽提法检出率分别为 100%、50%; 10^8 稀释倍数下,普通抽提法和快速抽提法检出率分别为 75%、0;稀释至 10^9 稀释倍数后,两者检出率均为 0。结论 普通抽提法较快速抽提法抽提效率高、重复性好、检出率高,在抽提高病毒含量标本时两种方法均可使用,抽提低病毒含量标本或复杂标本中推荐使用普通抽提法。

关键词:流行性感病毒; 核酸抽提; 实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)13-1900-04

Extraction efficiency of different extraction methods in detection of influenza viruses*

ZHANG Xiangmeng, ZHOU Zhihao, PAN Junfeng, XU Qiufang[△]

Department of Microbiological Testing, Qingpu District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201700, China

Abstract: Objective To compare the effects between the common extraction method and rapid extraction method on the results of real-time fluorescence quantitative PCR in detecting influenza virus. **Methods** The same brand of rapid nucleic acid extraction reagent and common nucleic acid extraction reagent were used to extract the influenza strains diluted in different multiples. The Ct value of the extracted nucleic acid was determined by the real-time fluorescence quantitative PCR. The extraction efficiency and repeatability were compared between the two methods. **Results** The average Ct value under different dilution ratios in the common extraction method was smaller than that in the rapid extraction method. The coefficient of variation (CV) of Ct value under the stock solution to 10^7 dilution ratios in the common extraction method was smaller than that in the rapid extraction method; the detection rates of stock solution to 10^6 dilution ratios by the common extraction method and rapid extraction method were 100%, the detection rates under the 10^7 dilution ratios in the common extraction method and rapid extraction method were 100% and 50% respectively, which under the 10^8 dilution ratios were 75% and 0 respectively, and which under 10^9 dilution ratios all were 0. **Conclusion** The common extraction method has higher extraction efficiency, better repeatability and higher detection rate than the rapid extraction method. Both methods could be used when extracting the high virus content, and the common extraction method is recommended when extracting the sample with low virus content or complex samples.

Key words: influenza virus; nucleic acid extraction; real-time fluorescence quantitative PCR

流行性感(流感)病毒以呼吸道为入侵门户,在呼吸道黏膜上皮细胞中增殖,引起呼吸道局部感染或导致呼吸道以外组织器官病变。作为最常见的呼吸道病毒,流感病毒的肆虐每年造成巨大的经济损失。目前,至少还有 200 多种病毒可以引起呼吸道感染,

如呼吸道合胞病毒、冠状病毒等^[1-2]。新型冠状病毒感染疫情是由新型冠状病毒引起的全球应急事件。流感病毒实验室常规检测方法为实时荧光定量聚合酶链反应(PCR),其具有灵敏度高,特异性强的优势^[3]。但是在实验室检测过程中多种因素可导致假

* 基金项目:上海市青浦区卫生健康委员会科研课题(W2021-43)。

作者简介:张相猛,男,主管技师,主要从事病毒学研究。 [△] 通信作者, E-mail:39850233@qq.com。网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230329.1756.006&uniplatform=NZKPT\(2023-03-30\)](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230329.1756.006&uniplatform=NZKPT(2023-03-30))

阴性结果,尤其是在对弱阳性标本进行检测时更为明显。

其中核酸抽提是病毒核酸检测的重要环节,核酸抽提结果直接影响核酸检测的灵敏度和特异度^[4]。传统的核酸抽提方法为沉淀离心手工抽提法,手工抽提对实验人员操作要求较高,且耗时较长。随着磁珠分离技术在生物科学领域不断普及和广泛应用,该技术逐步用于核酸自动抽提,不仅大大提高了核酸抽提的效率,还减少了人工操作的误差^[5-6]。其原理为特殊包被的磁珠对样品中的核酸具有很强的吸附力,从而达到抽提、纯化标本中核酸的效果^[7-8]。为了进一步提高检测效率,一些生物公司研制的全自动核酸抽提仪推出了快速抽提和普通抽提两种模式。二者的主要差异在于组分和结合时间不同^[9],快速抽提法所需时间较普通抽提法短,但是抽提时间及程序的不同会影响到核酸检测的质量,出现漏检情况,从而影响到疫情的早期研判、导致疫情扩散。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取本中心核酸检测阳性流感患者临床标本分离到的乙型流感病毒 Victoria 型毒株作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 全自动核酸抽提仪(江苏硕世科技股份有限公司)、Light Cycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。乙型流感病毒 Victoria 型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法,上海之江生物科技股份有限公司,批号:20220403),核酸快速抽提试剂盒(磁珠法,硕世生物科技股份有限公司,批号:202205174),核酸普通抽提试剂盒(磁珠法,硕世生物科技股份有限公司,批号:20220276)。

1.3 方法

1.3.1 菌株处理 将流感病毒毒株高速离心去除杂质后留取上清液,将上清液按照 1:10、1:100 倍比稀释至 1:10⁹。

1.3.2 核酸抽提 采用同一台核酸抽提仪按以下步骤对本标本进行核酸抽提。快速抽提法参数设定为 90℃裂解 0 s,磁珠重悬 10 s,结合 400 s,洗涤 30 s,90℃洗脱 120 s,弃磁珠。普通抽提法参数设定为 90℃裂解 5 min,磁珠重悬 1 min,结合 10 min,洗涤 8 min,90℃洗脱 3 min,弃磁珠。

1.3.3 核酸检测 采用全自动核酸检测仪对抽提后的核酸进行核酸检测,按照乙型流感病毒 Victoria 型核酸检测试剂盒要求配制好核酸检测体系。加样后置于 Light Cycle 480 II 实时荧光定量 PCR 仪,参数设定为 45℃、10 min,95℃、15 min,95℃、15 s,60℃、60 s,循环次数设定为 40 次。在 60℃时进行荧光检测,检测通道为 FAM 通道。

1.3.4 结果判定 靶标检测结果判定标准:扩增曲线不呈 S 型,Ct 值>39 或 Ct 值空白为阴性;扩增曲线呈 S 型,且 Ct 值≤39 为阳性。

1.4 观察指标

1.4.1 检出率 采用两种抽提方法将各稀释倍数标本平行检测 4 次,实时荧光定量 PCR 检测后 Ct 值≤39 为检出病毒基因,比较各稀释倍数下不同抽提方法平行检测的检出率。

1.4.2 重复性 采用两种抽提方法将各稀释倍数标本平行检测 4 次,得到各稀释倍数 Ct 值均值($\bar{x} \pm s$),计算两种方法各稀释倍数 Ct 值变异系数(CV),比较两种方法的重复性。

1.4.3 线性 以稀释倍数的对数为横坐标,各稀释倍数平行检测 4 次 Ct 值均值为纵坐标,比较两种方法稀释倍数与 Ct 值的线性关系。

1.5 统计学处理 荧光定量 PCR 仪检测所得的 Ct 值数据使用 SPSS20.0 软件进行分析。阴性结果按照 Ct 值>39 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同方法结果之间的比较采用 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种抽提方法检测结果 采用两种方法对各稀释倍数标本进行平行核酸抽提后,经实时荧光定量 PCR 检测,结果显示快速抽提法在原液至 10⁶ 稀释倍数均能检出,稀释至 10⁷ 倍后 4 次平行检测检出率为 50%,稀释至 10⁸ 倍后不再检出。普通抽提法在原液至 10⁷ 稀释倍数均能检出,稀释至 10⁸ 倍后 4 次平行检测检出率为 75%,稀释至 10⁹ 倍后不再检出。两种方法在不同稀释倍数的检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两种抽提方法不同稀释倍数检测的 Ct 值

稀释倍数	快速抽提法				普通抽提法			
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4
原液	14.05	16.54	17.15	14.16	14.94	14.82	14.08	14.67
10	17.41	20.58	21.31	17.90	19.34	18.71	17.89	18.20
10 ²	22.86	23.94	24.57	21.66	22.67	21.87	22.44	23.08
10 ³	26.80	28.91	25.40	25.46	24.82	25.82	26.42	26.14
10 ⁴	29.73	31.93	28.21	29.82	28.76	28.69	29.38	29.22
10 ⁵	32.45	34.84	31.49	32.36	31.41	30.97	31.37	32.21
10 ⁶	35.69	37.65	34.77	34.48	33.62	33.32	34.43	33.82
10 ⁷	40.00	40.00	37.36	36.79	35.94	35.81	36.02	36.45
10 ⁸	40.00	40.00	40.00	40.00	37.98	38.05	38.28	40.00
10 ⁹	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00

注:Ct 值>39 表示该基因为阴性,当计算均值时该基因阴性的 Ct 值设定为 40。

2.2 两种抽提方法重复性比较 对本标本平行检测 4 次,核酸抽提后各稀释倍数实时荧光定量 PCR 检测结果 CV 值见表 2。结果显示,不同稀释倍数下普通抽提法 CV 值均低于快速抽提法。两种方法在原液至 10⁷ 稀释倍数的 CV 值差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两种抽提方法线性比较 采用两种方法对各稀

- [3] 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2018 版)[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(12):1266-1282.
- [4] PILCHER C D, JOAKI G, HOFFMAN I F, et al. Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection[J]. AIDS, 2007, 21(13):1723-1730.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2015 年修订版)[J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6(6):401-427.
- [6] 张媛媛, 黄为, 刘华, 等. 重庆 2017—2019 年 HIV 抗体筛查有反应性样本确证检测结果分析[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(13):2161-2165.
- [7] 罗小莉, 王顺东, 林忠荔, 等. 对 2011—2015 年达州市 5 478 份 HIV 抗体初筛阳性的血液标本进行复检和确证试验情况的分析[J]. 当代医药论丛, 2020, 18(5):6-8.
- [8] 朱丹, 刘杨, 朱厚宏, 等. 2015—2018 年成都市 HIV 抗体确证实验结果分析[J]. 医学动物防制, 2020, 36(6):522-526.
- [9] 田润芳, 傅卓华, 雅雪蓉, 等. 苏州市 HIV 抗体初筛阳性标本复核及确证试验结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(9):1116-1119.
- [10] LI Y C, YANG F, JI X Y, et al. False human immunodeficiency virus test results associated with rheumatoid factors in rheumatoid arthritis[J]. Chin Med Sci J, 2014, 29(2):103-106.
- [11] 陈敏, 黎美君, 黄秀琳, 等. 2014—2019 年重庆市主城区无偿献血者 HIV 感染人群流行病学特征及趋势分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(20):2950-2953.
- [12] WESOŁOWSKI L G, DELANEY K P, LAMPE M A, et al. False-positive human immunodeficiency virus enzyme immunoassay results in pregnant women[J]. PLoS One, 2011, 6(1):e16538.
- [13] 陈宗良, 周超, 张维, 等. 重庆市主城区 50 岁以上 HIV/AIDS 患者特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2018, 22(12):1278-1282.
- [14] 宁欣, 赵秀萍, 傅卓华. 2012—2018 年苏州市 ≥50 岁艾滋病流行病学特征及趋势研究[J]. 江苏预防医学, 2019, 30(5):545-546.
- [15] 秦毅, 柏兴建, 刘柏林, 等. 重庆市合川区大于或等于 50 岁人群艾滋病影响因素研究[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(6):938-942.
- [16] 农丽萍, 何波, 农全兴, 等. 中老年艾滋病高危人群及其高危行为影响因素分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(6):641-644.
- [17] 常铃, 姚恩龙, 王维佳, 等. 红河州医疗机构 2010—2017 年 HIV 抗体检测及病例发现情况分析[J]. 中国初级卫生保健, 2019, 33(8):77-79.
- [18] 钱应群, 周玲旭, 孟小容. 艾滋病自愿咨询检测 3 470 人次结果分析[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(2):223-225.
- [19] 赵东辉, 王召乾, 郑钰, 等. 移动互联网数据技术在艾滋病防控中的应用[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(7):551-554.
- [20] 马迎华. 中国青少年学生艾滋病防控的关键要素[J]. 中国学校卫生, 2020, 41(12):1761-1766.
- [21] 朱亚鑫, 曲波. 社区参与研究在艾滋病防控中的应用[J]. 中国社会医学杂志, 2021, 38(3):293-296.

(收稿日期:2022-09-22 修回日期:2023-03-16)

(上接第 1902 页)

- [5] 易勇, 敬华. 免疫磁珠分离技术在医学检验中的应用[J]. 总装备部医学学报, 2010, 12(4):239-241.
- [6] 刘建礼, 刘翌, 焦艳丽, 等. 三种核酸抽提方法在甲型流感病毒临床样本检测中的效果对比[J]. 口岸卫生控制, 2019, 24(2):13-16.
- [7] 耿帆, 徐远东, 包一熙, 等. 4 种全自动核酸抽提系统对新型冠状病毒假病毒抽提效果的比较[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(10):685-688.
- [8] 肖兴玉, 张永哲, 张凯华, 等. 基于磁珠法的肉制品 DNA 快速抽提方法研究[J]. 食品安全导刊, 2022, 16(17):65-67.
- [9] 赵升, 姬艳芳, 张璐, 等. 一种快速核酸抽提试剂在流感病毒检测中的应用评价[J]. 中国病毒病杂志, 2019, 9(2):135-138.
- [10] 郭彦彤, 刘仲明, 张海燕, 等. 极速热循环荧光定量 PCR 系统检测流感病毒的效果评价[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(20):2113-2119.
- [11] 王舒婷, 马振男, 李玲玉, 等. 基于功能化磁珠快速抽提植物病毒 RNA 方法的建立与优化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(1):127-134.
- [12] WANG C H, LIEN K Y, WANG T Y, et al. An integrated microfluidic loop-mediated-isothermal-amplification system for rapid sample pre-treatment and detection of viruses[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26(5):2045-2052.
- [13] WANG C H, CHANG C J, WU J J, et al. An integrated microfluidic device utilizing vancomycin conjugated magnetic beads and nanogold-labeled specific nucleotide probes for rapid pathogen diagnosis[J]. Nanomedicine, 2014, 10(4):809-818.
- [14] 厉彦鑫, 杨永新, 于忠娜, 等. 细菌中蛋白质样品制备方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(6):1903-1909.
- [15] 罗英. 磁珠法核酸自动抽提仪在分子生物学领域的应用[J]. 蚕学通讯, 2013, 33(2):22-28.
- [16] 张云丽, 王鑫, 邵玲, 等. 不同核酸抽提方法 SARS-CoV-2 核酸检测性能比较[J]. 检验医学, 2021, 36(5):530-534.
- [17] 黄维, 赵正荣, 黄玲娟, 等. 两种常规核酸提取法对非洲猪瘟 qPCR 检测敏感度的影响[J]. 广西畜牧兽医, 2022, 38(4):162-163.

(收稿日期:2022-09-20 修回日期:2023-03-19)