

(2)促进吞噬细胞的吞噬作用;(3)递呈抗原,增强 T 淋巴细胞依赖性反应;(4)效应细胞样作用;(5)其他作用^[3-5]。本研究显示,死亡组患者的 RBC 持续下降,痊愈组的患者 RBC 水平较稳定。这可以说明 RBC 在抗感染的过程中起到了重要的免疫作用,患者 RBC 的水平有着较明确的预后意义。两组患者自发病至入院治疗的时间相近,合并基础病比例相近,患者病程都大于 48 h;不同的是死亡组平均年龄较大。一般随着年龄的增长,机体红细胞免疫功能降低^[4]。

死亡组患者 RBC 水平持续下降的可能原因:当遇到大量病毒感染时,RBC 参与免疫反应形成免疫复合物后被清除。病程初期由于患者的 RBC 天然免疫功能差,虽然消耗了大量的 RBC,但吞噬细胞并不能及时有效清除病毒;高龄患者自身合成 RBC 的生理功能下降,使机体未能及时更新补充消耗的 RBC;随着病程的延长,患者合并细菌感染的概率增加,病情更加恶化;虽然此时 WBC、中性粒细胞等也会升高增强机体抗感染的能力^[6],但由于缺少 RBC,其综合的抗感染能力持续下降,病情不能缓解,最终导致死亡。

研究发现高压氧治疗可使 RBC 天然免疫功能低下者 RBC 天然免疫黏附功能增强^[7],胸腺素可提高 RBC 的免疫功能,并能增强 RBC 与淋巴细胞之间的网络联系,还可增强 RBC 补体受体的活性^[4]。中药和针灸对 RBC 天然免疫有增强和调控作用^[3]。

本研究显示,RBC 在机体抵御甲型 H1N1 流感病毒的过程中有重要的作用,RBC 水平在甲型 H1N1 流感重症患者治

• 经验交流 •

疗和预后中有重要的意义。

在预防和临床治疗甲型 H1N1 流感时,是否可应用胸腺素促 RBC 生成素、补血活血的中药等,以及采取高压氧舱、输入新鲜 RBC、针灸等作为治疗方法,以增加红细胞的数量及增强其免疫功能,在感染早期尽快地清除病毒,不至于发展为危重病情,目前,在国内尚无相关文献报道,其实用价值有待于临床进一步确认。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第 3 版)[R]. 2009-10-12.
- [2] 杨学敏. 血液学检验质量控制[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12):1243-1244.
- [3] 郭峰. 红细胞天然免疫的研究和意义[J]. 深圳中西医结合杂志, 2001, 11(6):321-322.
- [4] 薛拥志,王爱华,利凯. 红细胞免疫研究进展[J]. 安徽农业学, 2007, 35(12):3558-3560,3664.
- [5] 胡金川,田亚平,江朝光. 红细胞免疫及其临床应用研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7):621-622.
- [6] 王久伶,王晶. 186 例甲型 H1N1 流感患者不同时期 C 反应蛋白及血白细胞检测分析[J]. 西南国防医药, 2010, 20(6):608-609.
- [7] 郭峰. 红细胞天然免疫与获得性免疫[J]. 自然杂志, 2001, 26(4):194-199.

(收稿日期:2011-01-07)

PCR-SSP 在 HLA 基因分型中的常见问题

段萃娟,刘元明,荣 然,杨晓莉[△]

(武警总医院检验科,北京 100039)

摘要:目的 通过对序列特异引物引导的聚合酶链反应(PCR-SSP)在人类白细胞抗原(HLA)基因分型中常见问题的分析和总结,提出解决措施,以提高 HLA 基因的分型质量和效率。**方法** 对武警总医院院内 2007~2009 年 1 298 例标本的 *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-DR*、*HLA-DQ* 基因分型中出现的问题进行总结分析。**结果** 1 298 例标本中,1 236 例可以直接判读结果,一次检出成功率为 95.22%;62 例标本无法直接判读出结果,在这 62 例出现问题的标本中无反应条带标本 8 例(12.90%)、阳性条带弱反应标本 21 例(33.87%)、漏检标本 9 例(14.52%)、假阳性及非特异性条带标本 24 例(38.71%)。**结论** HLA 基因分型中的常见问题的主要原因:抗凝剂使用不当、蛋白质污染、DNA 的浓度过高、*Taq* 酶的含量、加样后扩增板的放置时间等。这些主要是人为因素造成的,是可以找到原因并且避免的。

关键词:基因型; 聚合酶链反应; HLA 抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.040

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)09-0999-03

序列特异引物引导的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, sequence specific primer, PCR-SSP)随着国内器官移植工作的成熟和发展,人类白细胞抗原(HLA)基因分型方法也得到发展和完善。PCR-SSP 技术是目前应用最多的技术^[1],其分辨率高、特异性强、扩增后处理过程简单,且只需借助琼脂糖凝胶电泳判断结果。现对武警总医院内 2007~2009 年 1 298 例标本的 *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-DR*、*HLA-DQ* 基因分型中出现的问题进行了总结分析。

1 材料与方法

1.1 材料 武警总医院 2007~2009 年肾移植标本 1 298 例,其中乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血标本 1 147 例、脾脏标本 146 例、肝素抗凝血标本 5 例。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂

1.2.1.1 试剂 美国 Gentra DNA 提取试剂盒;德国 Protans PCR-SSP HLA 基因分型试剂盒(*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-DR* 在同一 12×8 的 96 孔扩增板上,*HLA-DQ* 为一单独 2×8 的 16 孔扩增板);*Taq* 酶。

1.2.1.2 仪器 德国 Eppendorf 5810 R 水平离心机, Sigma 3K15 离心机;上海 UNICO 公司 UV 2800 型紫外可见分光光度计;德国 Eppendorf Mastercycler 扩增仪;北京六一仪器厂 DYY-60 型电泳仪;柯达 GEL100 凝胶成像分析仪。

1.2.2 实验步骤

1.2.2.1 DNA 提取 取患者 EDTA 抗凝全血标本 4 000 r/min 离心 5~10 min,吸取白膜层,按试剂说明提取 DNA,测定其浓度和纯度。

[△] 通讯作者, E-mail: yangxiaolitwins@163.com。

1.2.2.1 PCR-SSP 按试剂说明将标本 DNA 缓冲液、*Taq* 酶混匀,每孔 10 μ L 加入扩增板,进行 PCR。

1.2.2.3 电泳 扩增产物用 2% 的琼脂糖[含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭(EB)]凝胶,1 $\times$ TAE 液、100V 电泳 10 min。照相并保存胶图。

1.3 结果判读 读出 *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-DR*、*HLA-DQ* 的阳性条带,按读板纸所示判定结果。

2 结 果

2.1 检测结果 1 298 例标本中,1 236 例可以直接判读结果,一次检出成功率为 95.22%。62 例标本无法直接判读出结果,在这 62 例出现问题的标本中无反应条带标本 8 例(12.90%)、阳性条带弱反应标本 21 例(33.87%)、漏检标本 9 例(14.52%)、假阳性及非特异性条带标本 24 例(38.71%)。其中假阳性及非特异性条带和阳性条带弱反应所占比例最高。引起假阳性及非特异性条带的主要原因:DNA 浓度过高、*Taq* 酶量过高,分别是 17 例和 3 例,占假阳性及非特异性条带标本的 70.83% 和 12.5%。阳性条带弱反应主要是 *HLA-DQ* 扩增板加样后放置时间过短引起的,有 15 例,占阳性条带弱反应标本的 71.43%。

2.2 常见主要原因分析

2.2.1 抗凝剂使用不当 DNA 定性结果当肝素浓度大于 500 U/mL 时为阴性,小于 100 U/mL 时为阳性^[2]。本医院 1 298 例标本中肝素抗凝的标本 5 例,3 例标本都直接用 Gen-*tra* DNA 提取试剂盒提取的 DNA,用紫外分光光度仪检测,浓度、纯度都符合标准,但是扩增后扩增产物无阳性带和内参照带出现,实验失败。对此,将 1 份肝素抗凝标本用淋巴细胞分离液分离提取较纯的淋巴细胞,降低了标本内肝素含量,然后按照常规方法提取 DNA、扩增产物电泳后得到清晰、明亮的阳

性条带,实验均取得成功。

2.2.2 蛋白质的污染 实验中提取 EDTA 抗凝标本 1 147 例,在有 5 例标本浓度、纯度都符合标准的情况下,扩增产物即无阳性带又无内参照带出现。重新提取 DNA 后扩增得到满意的结果,对比 2 次实验发现在白细胞裂解过程中存在差异。第 1 次在加入白细胞裂解液后,标本还很黏稠,用 100 μ L 的枪吹打,无法混匀,就加入蛋白沉淀剂进行下一环节;复查时由于标本白细胞的量减少,加入白细胞裂解液后很快就能吹打混匀,并无黏稠颗粒。可见第 1 次的过程中白细胞没有充分裂解,直接进行下一步使得某些蛋白成分在 DNA 中残留、沉淀,从而抑制了扩增。

2.2.3 DNA 的浓度过高 实验要求 DNA 的浓度在 50~100 ng/ μ L。本实验中比较了浓度分别为 29.2、96.1、120、142.3 ng/ μ L 的 DNA 实验结果。当提取的 DNA 浓度小于 100 ng/ μ L 时,得到的阳性条带清晰易辨,当 DNA 的浓度大于 100 ng/ μ L 时,会有假阳性条带出现。当浓度大于 100 ng/ μ L DNA 结果有不同程度的假阳性或非特异性条带出现,随 DNA 浓度的升高假阳性或特异性条带数目增多,另外 *HLA-A*、*HLA-B* 比 *HLA-DR*、*HLA-DQ* 易出现非特异性假阳性条带。

2.2.4 *Taq* 酶的量过多 在 PCR 中,DNA 聚合酶是最关键的因素之一。酶量过多,导致非特异性扩增产物^[3]。*HLA-DQ* 反应体系 *Taq* 酶的用量是 1.1 μ L,某次配液 *Taq* 酶的量按 *HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-DR* 的使用量 6.5 μ L 加入,比 *HLA-DQ* 所需 *Taq* 酶的量增大了大约 6 倍,电泳产物出现很多非特异性条带干扰了结果的准确判读。加入的酶量太少,会影响 PCR 产量^[4],在其他参数最佳时,每 100 μ L 反应液中加入 1~2.5 U *Taq* 聚合酶为佳^[5]。

2.3 HLA 基因常见原因和解决措施 见表 1。

表 1 PCR-SSP 在 HLA 基因分型中的常见问题、原因及解决措施

常见问题	原因	解决措施
无反应条带	凝胶中未加 EB。	重新进行实验或把凝胶放在混有 EB 的缓冲液中 3~5 min 后再照相。
	DNA 中存在肝素。	使用淋巴细胞分离液分离后提取 DNA,或者脾细胞代替。
	DNA 中蛋白质污染。	在蛋白裂解时加入足够的裂解液、吹打混匀无凝块。
	未加 <i>Taq</i> 聚合酶。	重新进行实验。
反应条带弱	扩增板引物未充分溶解、混匀。	扩增板加样后放置 5 min 后扩增。
	DNA 或 EB 量不足。	严格按照实验说明加 DNA 或 EB 的量。
漏检	PCR 反应液未混匀导致加样不均。	单孔复核。
	工作人员判读失误。	双人核对后报告。
	PCR 仪的盖子没有压紧以致样品孔与扩增板没有充分吻合发生蒸发。	调节 PCR 盖子高度,压紧扩增板。
假阳性及非特异性条带	DNA 过量、不纯、污染。	测定标本 DNA 浓度、纯度,使其符合要求后再进行下一步。
	DNA 浓度过高。	调节标本 DNA 浓度、纯度,使其符合要求后再进行下一步。
	<i>Taq</i> 酶的量过多。	严格按照实验说明加 <i>TAq</i> 酶的量。
条带弯曲变形	电泳过程中产热导致边缘弯向阳极。	电泳过程中设置合适的电压电流或放置冰块降温。
	凝胶密度不均或残破。	使用浓度 2.5% 的凝胶,加样注意避免穿透凝胶。

2.2.5 *HLA-DQ* 扩增板加样后放置时间过短 在急诊配型时 *HLA-DQ* 的阳性条带经常亮度弱、模糊、不宜辨别,分析原因觉得与时间有关,对此做一对比实验。将同一标本的两份加样后的 *DQ* 扩增板一份直接上机扩增,另一份放置 5 min 后再

上机扩增。前者得到的扩增产物阳性条带模糊、亮度弱,需仔细辨认,后者中阳性条带清晰、明亮,对此我们得出结论:*HLA-DQ* 扩增板只有 14 孔,加样后直接上机扩增不利于扩增板内包被冷藏的干粉特异引物的充分溶解,导致扩增产物弱反

应,特别在急诊配型时容易发生;放置 5 min 后引物充分溶解,使得扩增反应完全充分,电泳后得到阳性条带清晰、明亮。

3 讨 论

PCR-SSP 是一种简便易行的 HLA 基因分型方法,但是在实际实验过程中会遇到各种各样的问题,主要是抗凝剂使用不当、蛋白质污染、DNA 的浓度过高、*Taq* 酶的含量及加样后扩增板的放置时间等。本研究显示,这些问题都是人为因素造成的。加强操作人员对 PCR-SSP 方法的认知,严格执行实验室标准操作规程,PCR-SSP 在 HLA 基因分型中的常见问题都是可以在人的主观作用下避免的。另外,由于 PCR-SSP 的引物是针对已知基因设计的,所以此方法仅能检测已知多肽性序列,不能检测出新的等位基因。

总之,PCR-SSP 技术是近年来发展起来的基因检测技术,因具有简便、快速、经济等优点受到人们的青睐^[6]。本实验室通过长时间的摸索和总结,将常见问题和解决方法汇总,根据这些原因,修改和完善实验室操作规程,避免各种错误的出现,提高实验的准确性,充分发挥了 PCR-SSP 技术的优越性。

• 经验交流 •

A 群轮状病毒的检测对于婴幼儿腹泻的重要性研究

张 静¹,刘庆玲²,熊德栋¹,赵新惠¹

(1. 山东省滨州市中心医院检验科 251700;2. 山东省淄博市妇幼保健院检验科 255029)

摘 要:**目的** 对 794 例婴幼儿患者粪便进行检测,分析由 A 群轮状病毒引起的婴幼儿腹泻的感染情况。**方法** 采集腹泻婴幼儿新鲜粪便标本,采用 A 群轮状病毒诊断试剂盒,对儿科门诊及住院部腹泻婴幼儿的粪便标本进行 A 群轮状病毒的检测。**结果** 794 例腹泻婴幼儿中检出 371 例 A 群轮状病毒阳性标本,总阳性率为 46.7%。各个年龄段的感染阳性率构成比分别为:<6 个月组为 13.6%,6 个月至 2 岁组为 83.8%,2~5 岁组为 2.6%,表明 6 个月至 2 岁为 A 群轮状病毒的高发年龄段。男性患儿感染率为 47.7%,女性患儿感染率为 45.1%。男女患儿感染率比较无明显差异。**结论** A 群轮状病毒感染是导致婴幼儿腹泻的主要原因之一,6 个月至 2 岁为 A 群轮状病毒的高发年龄段和每年的 10 月至次年 1 月为感染高峰期,临床医生应重视腹泻病原体的检测。

关键词:腹泻;婴儿; 轮状病毒属; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.041

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)09-1001-02

A 群轮状病毒是引起婴幼儿腹泻的主要病原体,季节性 强,多发生在秋冬季节,是危害婴幼儿健康的常见病^[1-2]。为了解急性腹泻婴幼儿中轮状病毒感染的情况,本研究采用 A 群轮状病毒单克隆抗体检测方法,对 2009 年 5 月至 2010 年 5 月滨州市中心医院检验科儿科门诊及住院部腹泻婴幼儿的粪便进行 A 群轮状病毒抗原的检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 5 月至 2010 年 5 月滨州市中心医院儿科门诊及住院部急性腹泻婴幼儿 794 例,其中男性患儿 490 例,女性患儿 304 例,年龄在 2 个月至 5 岁之间,其中 6 个月以下的有 108 例,6 个月至 2 岁的有 666 例,2~5 岁的有 20 例。

1.2 方法

1.2.1 检测试剂与原理 试剂由北京万泰生物药业股份有限公司提供,采用胶体金免疫层析法来检测样本中 A 群轮状病毒抗原。测试卡是将羊抗 A 群轮状病毒多克隆抗体直接包被于硝酸纤维素膜上作为检测线,羊抗鼠 IgG 包被作为对照线。检测时样本中的轮状病毒与标记胶体金的轮状病毒单克隆抗体形成复合物。由于层析作用,复合物沿着膜移动,可与包被在检测区的单克隆抗轮状病毒形成双抗体夹心免疫复合物。

1.2.2 试验方法 取适量粪便放入试管,加入 9 倍生理盐水搅拌均匀,静置或低速离心后在加样处滴加 2~3 滴粪便上清液,室温 10 min 后判断结果。如为阳性标本,则可在检测区与

参考文献

[1] 吕世静. 临床免疫学检验[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004: 345.
[2] 郭华国,桂瑞丰,汪宏. 高血脂、肝素对乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 测定干扰机制的探讨[J]. 现代检验医学杂志,2007, 22(1):58-60.
[3] 谭建明,周永昌,唐孝达. 组织配型技术与临床应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:221.
[4] 许飞,吴强,张建伟. *Taq* 酶浓度对 HLA 基因分型结果的影响[J]. 临床输血与检验,2006,8(1):39-40.
[5] Carl W. PCR primer:a laboratory manual[M]. 2nd ed. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1995.
[6] 董浙清,黄永禄,范剑. PCR-SSP 技术在 HLA 分型中的应用[J]. 中国高等医学教育杂志,2010(5):144-146.

(收稿日期:2010-12-23)

对照区各凝集成一条红色线,如为阴性,则只在对照区形成一条红色线。

1.3 统计学处理 使用 χ^2 检验和 *U* 检验做统计学处理。

2 结 果

2.1 794 例腹泻婴幼儿粪便中 A 群轮状病毒的检测结果 总的阳性率为 46.7%,男患儿阳性率为 47.7%,女患儿阳性率为 45.1%,男女患儿感染率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 794 例腹泻患儿粪便中 A 群轮状病毒检测阳性率

性别	检测例数(<i>n</i>)	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
男	490	234	47.7
女	304	137	45.1
合计	794	371	46.7

表 2 各年龄段婴幼儿轮状病毒抗原检测阳性率及构成比

年龄	检测例数(<i>n</i>)	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)	构成比(%)
<6 个月	108	42	38.8	13.6
6 个月至 2 岁	666	322	48.8	83.8
>2~5 岁	20	7	35.0	2.6
合计	794	371	46.7	100.0