

二步法检出阳性 25 例,漏检率为 1.16%。其中 23 例经化学发光法定量检测为(0.13~0.84) IU/mL,提示样本中 HBsAg 浓度极低,2 例超过 250 IU/mL,提示样本中 HBsAg 浓度过高,导致一步法因灵敏度较低和“HOOK”现象(钩状效应)^[5-6]而呈假阴性结果。从其检测原理分析^[7-8],一步法由于血清和酶标抗体同时加入,若血清中 HBsAg 浓度过高,分别与酶标抗体和固相抗体形成免疫复合物,不形成夹心复合物,产生钩状效应而呈假阴性。二步法为向反应微孔先加入血清,经长时间(1 h)温育,高浓度 HBsAg 与包被的固相 HBsAb“饱和”性结合,再与酶标抗体结合形成夹心复合物而呈阳性^[9-10]。同时,不同浓度质控血清检测结果显示一步法最低检测浓度为 1 IU/mL,而二步法为(0.1~0.2) IU/mL,二步法灵敏度显著提升,从而有效提高 HBsAg 检出率,与李艳霞^[11]和姜标、常秋月^[12]的报道较为一致。

综上所述,ELISA 一步法检测 HBsAg 虽时间较短,操作简便,但确实存在灵敏度相对较低及钩状效应,造成检验结果一定程度的不可靠,建议使用 ELISA 二步法,虽操作时间长,但能明显提高检出率,减少漏检率,为临床提供更加客观准确的 HBsAg 检测结果。

参考文献

[1] 陈桂山,张秀明. 酶联免疫技术检测乙肝表面抗原的分析性能评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):932-933.
 [2] 马伟军,董萍. 浅谈降低我国全人群乙肝发病率探讨[J]. 中国卫

生检验杂志,2009,19(2):451.
 [3] 张善弟,黄宁. 酶联免疫吸附试验法检测乙型肝炎病毒表面抗原的质量保证[J]. 检验医学与临床,2009,6(1):48.
 [4] 李凤侠,范亚敏,范永丽. 酶联免疫吸附试验一步法检测 HBsAg 的分析体会[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(16):3875-3876.
 [5] 谭显清,李骏. 酶免疫一步法检测乙型肝炎表面抗原影响因素探讨[J]. 检验医学与临床,2009,6(3):380-381.
 [6] 蒋玉莲,朱浩稳,等. 酶联免疫吸附试验显色与样本含量的关系[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(1):123-124.
 [7] 王颖. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒表面抗原的影响因素[J]. 检验医学与临床,2009,6(1):59-60.
 [8] 陈佑明,黄敬,刘京平,等. 两种方法检测乙型肝炎病毒表面抗原的比较[J]. 检验医学与临床,2009,6(3):495-496.
 [9] 土亚婷,包名家,唐晓红,等. 体检人群的 HBV 血清标志物反应模式调查[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(12):3022-3023.
 [10] 陈金超,刘涤瑕,王丽,等. 免疫学检测方法中的干扰因素和对策[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(21):2575-2576.
 [11] 李艳霞. 时间分辨荧光免疫分析和酶联免疫吸附实验检测乙型肝炎病毒血清标志物结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(11):1218-1219.
 [12] 姜标,常秋月. HBsAg 酶联免疫法诊断试剂的质量评价[J]. 中华全科医学,2009,7(3):309-310.

(收稿日期:2011-10-13)

• 检验技术与方法 •

不同方法提取血清总 RNA 的性能评价

邱 方,陈子祥[△],杨清玉,刘 晨,董 亮,李 星
 (江苏省南京迪安医学检验所 210007)

摘要:目的 评价 3 种方法提取血清总 RNA 的性能。方法 分别用 Trizol 法、磁珠总 RNA 提取法(磁珠法)、柱式总 RNA 提取法(柱式法)提取血清总 RNA。通过测定样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值评价提取的总 RNA 纯度、产量;通过设计引物及 TaqMan 探针扩增总 RNA 的管家基因(GAPDH),以观察各方法提取的总 RNA 用于 RT-PCR 的效果。**结果** 3 种方法提取总 RNA 纯度分别为 Trizol 法(1.83±0.19)、磁珠法(1.94±0.11)、柱式法(1.92±0.12);扩增管家基因 GAPDH,其 Ct 值分别为 Trizol 法(19.37±3.51)、磁珠法(18.33±1.11)、柱式法(18.85±1.20)。**结论** 磁珠法、柱式法明显优于 Trizol 法,磁珠法与柱式法结果差异无统计学意义(P>0.05)。

关键词:RNA; 聚合酶链反应; Trizol 法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0457-02

分子生物学技术已经渗透到生物学、医学、遗传学和动物学等各个领域。在分子生物学实验中,提取基因组 RNA 是一项基础工作,能否获得高纯度、一定浓度的模板,是后续实验成败的关键之一。现在用于提取总 RNA 的商品试剂盒很多,根据原理不同归纳起来主要有 Trizol 法、磁珠法和柱式法 3 种,各试剂盒提取效果如何,本文设计实验对上述方法进行评价,现详述如下。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 日本岛津 UV-2501 可见紫外分光光度计、罗氏 Light cycle 480 荧光定量 PCR 分析仪。Trizol 提取试剂由 invitrogen 公司提供,磁珠总 RNA 提取试剂及 PCR 试

剂由上海之江公司提供,柱式总 RNA 提取试剂由上海科华公司提供。GAPDH 扩增引物及 TaqMan 探针由上海生工提供。

1.2 标本来源 20 例血清样本来源于本所临床送检样本。

1.3 方法

1.3.1 Trizol 法 向灭菌的 1.5 mL eppendorf 管中加入 Trizol 及血清各 100 μL,充分混匀,室温静置 10 min,再加入 200T 的氯仿,用力震荡 15 s;4 ℃,以离心半径 8 cm,13 000 r/mim 离心 15 min,取上层液相至另一灭菌 1.5 mL eppendorf 管,加入等体积异丙醇,轻轻颠倒混匀,室温静置 10 min;4 ℃,13 000 r/mim 离心 15 min,弃上清液,加入 500 μL 75%乙醇,颠倒混匀;4 ℃,8 000 r/mim 离心 5 min,弃上清液,干燥 5

[△] 通讯作者,E-mail:chenzx@dagene.net.

min, 加入 50 μL DEPC 水溶解总 RNA, -20 °C 保存, 备用。

1.3.2 磁珠法 向灭菌的 1.5 mL eppendorf 管中加入含磁珠的结合液 526 μL 及血清 140 μL, 震荡 10 s, 室温静置 3 min, 吸取上述混匀液至亲和柱中, 4 °C, 13 000 r/mim 离心 1 min, 弃废液, 分别用 500 μL A、B 液各洗涤 1 次, 13 000 r/mim 离心 2 min, 将套管转移至另一灭菌的 1.5 mL eppendorf 管, 加入 50 μL DEPC 水, 13 000 r/mim 离心 1 min, -20 °C 保存, 备用。

1.3.3 柱式法 向灭菌的 1.5 mL eppendorf 管中加入含 Carrier 的 300 μL 裂解液及 100 μL 血清, 用枪头反复吹打混匀, 再加入 320 μL 无水乙醇, 震荡混匀 5 s, 低速离心数秒, 将上述混合液转入核酸提取柱, 4 °C, 13 000 r/mim 离心 1 min, 弃收集柱中液体, 分别用 500 μL WA、WB 液各洗涤 1 次, 13 000 r/mim 离心 1 min, 干燥 5 min, 加入 50 μL DEPC 水溶解总 RNA, -20 °C 保存, 备用。

1.4 总 RNA 的鉴定

1.4.1 纯度、产量计算 用可见紫外分光光度计测定 RNA 样本的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 值, 纯度以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为依据, 总 RNA (μg/mL) 产量计算公式 = OD 值 × 40 × N (N 为稀释倍数)。

1.4.2 引物设计与管家基因扩增 依据 GAPDH (NM002046), 利用生物软件 Primer5.0 设计引物和 TaqMan 探针, GAPDH 扩增引物为 G1: 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC-3', G2: 5'-CGT TCT CAG CCT TGA CGG T-3', TaqMan 探针为 FAM-TTT GGT CGT ATT GGG CGC CTG-TAMRA。总反应体系 25 μL, 其中模板 5 μL, 设阴、阳性对照。扩增程序为: 45 °C、30 min; 95 °C、15 min; 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 40 个循环; 37 °C、1 s, 荧光采集通道选 FAM 和 HEX, 采集温度 60 °C。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件计算各组提取的总 RNA 纯度、浓度及 GAPDH 基因扩增 Ct 值的(±s), 组间数据比较采用 t 检验分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 纯度、产量 用 3 种方法分别提取 20 例血清样本的总 RNA, 经可见紫外分光光度计测定样品在 260 nm、280 nm 处吸光度值, 如表 1 所示, 磁珠法和柱式法提取的总 RNA 纯度和产量均无显著性差异 (P > 0.05), 但两法提取的总 RNA 纯度和产量均高于 Trizol 法, 并具有统计学意义 (P < 0.05)。

表 1 3 种方法提取血清总 RNA 纯度和产量的比较

项目	Trizol 法	磁珠法	柱式法
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.83 ± 0.19	1.94 ± 0.11	1.92 ± 0.12
总 RNA 产量 (μg/mL)	11.12 ± 3.19	16.31 ± 2.10	17.11 ± 1.98

2.2 GAPDH 体外扩增 用 3 种方法提取 20 例血清样本的总 RNA, 分别进行管家基因 GAPDH 的体外扩增, 结果表明磁珠法及柱式法 Ct 值较 Trizol 法低 1 个循环, 提示磁珠法及柱式法提取总 RNA 产量是 Trizol 法的 1 倍左右, 磁珠法及柱式法提取总 RNA 效果较 Trizol 法稳定, 见表 2、图 1。

表 2 3 种方法提取血清 RNA 的 Ct 值比较

项目	Trizol 法	磁珠法	柱式法
Ct 值	19.37 ± 3.51	18.33 ± 1.11	18.85 ± 1.20

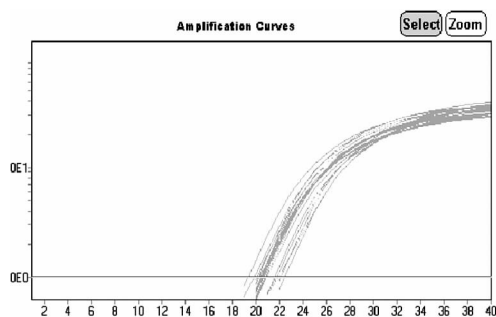


图 1 GAPDH 基因扩增曲线图

3 讨论

总 RNA 提取极易受到提取方法的影响^[1], 同时, 亦受实验室环境的影响^[2-3], 标本应及时分离血清, -20 °C 保存, 实验室环境、耗品应避免 RNA 酶污染。Trizol 法提取总 RNA 是经典的方法, 其原理是 Trizol 中的异硫氰酸胍可使病毒及核蛋白体裂解, 使 RNA 与蛋白质分离, 释放入液相, 而氯仿可提取 Trizol 中苯酚, 从而使苯酚中总 RNA 进入水相, 经离心、纯化得到总 RNA; 柱式法主要利用碱基配对原理, 采用寡聚 T 结构作为亲和柱材料, 当总 RNA 流经寡聚 T 柱时, RNA 即被特异结合到柱子上, 从而达到分离提取的目的; 而磁珠法则利用 A 与 T 碱基间的强配对性, 结合链菌素抗生素与生物素间强免疫作用及磁铁与顺磁性物质间的强磁性作用, 来进行分离、提取总 RNA。从本实验可以看出, 与柱式及磁珠法相比 Trizol 法耗时长, 大量使用有机溶剂, 且总 RNA 得率、纯度相对低。原因在于病毒裂解、RNA 分离需要一定时间, 同时, 所使用苯酚及异硫氰酸胍如果提取不尽, 将直接影响总 RNA 的纯度, 重复性不佳, 与吕娜等^[4]、武荣等^[5]、周立等^[6]和穆龙龙等^[7]报告相同。而柱式法和磁珠法操作简便、重复性相对好, 整个操作约 20 min 左右, 适合临床各级实验室使用。

参考文献

- [1] 张磊, 陆小军, 应斌武, 等. 3 种 RNA 提取方法在血清丙型肝炎病毒 RNA 定量检测中的性能评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 22(19): 3027-3029.
- [2] 陈朝霞, 闽保华, 延平. 影响 HCV-RNA 荧光定量 PCR 检测的因素及其对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(2): 175-176.
- [3] 徐皖苏, 杨公炜, 王丽, 等. 不同保存条件下血清荧光定量检测 HCV RNA 的研究[J]. 预防医学文献信息, 2004, 10(1): 60-61.
- [4] 吕娜, 张玲, 刘宁. 提取血液总 RNA 两种方法的比较分析[J]. 东北农业大学报, 2008, 8(1): 110-112.
- [5] 武荣, 张俊涛, 赵霞, 等. Trizol 与 Fast1000 试剂盒提取外周抗凝血总 RNA 的方法比较[J]. 中国医疗前沿, 2011, 5(1): 60-61.
- [6] 周立, 孙爱平, 王志勇. 两种提取心肌 RNA 的方法比较[J]. 医学信息(内、外科版), 2009, 9(5): 626-631.
- [7] 穆龙龙, 赵志英, 朱立. 全血标本保存条件对人总 RNA 提取效率的影响[J]. 北京医学, 2010, 10(7): 837-840.

(收稿日期: 2011-10-02)