

• 检验技术与方法 •

巢式 PCR 检测滤纸血片 CMV DNA 方法的建立及评价^{*}

孟璐璐¹, 王琳琳², 宋亚玲³, 刘菊芬², 靳 蕾², 任爱国^{2△}

(1. 北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系 100191; 2. 北京大学生育健康研究所/卫生部生育健康重点实验室 100191; 3. 北京协和医院检验科 100730)

摘要:目的 建立巢式 PCR 检测滤纸血片标本巨细胞病毒核酸(CMV DNA)的实验方法,并对其灵敏度、最低检测限、稳定性等进行评价。方法 采集医院确诊 CMV 阳性的血液样品,分别制备成全血和滤纸血片标本。选取 5 份滤纸血片标本,分别打取 3 个或 6 个直径 3 mm 的圆片用于 DNA 提取,并对所得 DNA 溶液的浓度和纯度进行测定。采用巢式 PCR 对 12 份滤纸血片和全血标本进行检测,获得该方法的灵敏度和最低检测限数据。将滤纸血片标本储存于 -20 ℃ 3 个月后重新进行检测,以判断巢式 PCR 方法的稳定性。结果 将 DNA 提取时所用圆片数由 3 个增加到 6 个后, DNA 溶液浓度提高 2~8 倍,巢式 PCR 的灵敏度升高;与全血检测结果相比,巢式 PCR 检测滤纸血片标本 CMV DNA 方法的灵敏度为 100%,最低检测限为 75 copy/mL。滤纸血片标本在 -20 ℃ 放置 3 个月,实验的灵敏度未下降。结论 使用巢式 PCR 检测滤纸血片标本 CMV DNA 能够获得准确、可靠、稳定的结果。与 3 个圆片相比,使用 6 个圆片进行滤纸血片标本 DNA 的提取,可使 DNA 溶液浓度大大增加,因而有助于提高检测的灵敏度。

关键词:巨细胞病毒; 聚合酶链反应; DNA, 病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)16-1990-03

先天性巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染是最常见的宫内病毒感染^[1]。85%~90%先天性巨细胞病毒感染的新生儿出生时无症状,其中约 17% 在儿童期才表现出异常,通常为神经系统疾病,如感音神经性耳聋和神经发育迟滞。巨细胞病毒已经被认为是引起儿童非遗传性感音神经性听力丧失的最常见原因^[2]。巨细胞病毒也是目前已经确认的人类致畸物^[3],其所致缺陷可发生在几乎全身各个器官系统^[4]。由于巨细胞病毒感染后多无症状,因而需要建立巨细胞病毒感染的实验室诊断方法^[5],以便能够从无症状新生儿中检出感染者。Shibata 等^[6]首先报道使用新生儿滤纸血片(dried blood spot, DBS)提取 CMV DNA,并采用 PCR 方法对 CMV DNA 进行检测。国外文献报道使用滤纸血片标本检测巨细胞病毒感染的方法灵敏度为 95%~100%,特异度为 98%~100%^[7-8]。国内目前尚无关于此类方法的研究报道。本研究旨在建立一种使用滤纸血片标本检测 CMV DNA 的实验方法,并对其灵敏度、最低检测限、稳定性等进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 采用美国 Schleicher & Schuell 903 滤纸片。DNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Mini Kit。巢式 PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,Taq DNA 聚合酶为 Fermentas 产品,电泳试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司。其他仪器包括 BioTek Synergy2 多功能酶标仪、ABI Veriti® 96-Well Thermal Cycler、CAVOY Mini SC 水平电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像仪等。

1.2 标本采集与处理 血液标本来自北京协和医院检验科分子室,该血液样本为 EDTA 抗凝血,经北京协和医院对每份样本的 100 μL 血浆所提取的 CMV DNA 进行基因扩增检测,选取 12 份阳性样本入组。将其余下的全血样本作为本次实验样本。

1.3 纸血片干血斑的制备与储存 在滤纸片的每个圆圈内滴注 60 μL 全血,血斑两面渗透、无重叠、无污染,直径 1 cm,室温下自然干燥,晾干后放入装有干燥剂的自封口塑料袋中,并

存储在 -20 ℃ 冰箱内备用。

1.4 全血标本 DNA 提取 每份标本取 200 μL 全血,严格按照 QIAamp DNA Mini Kit 的使用说明进行操作。

1.5 滤纸血片标本 DNA 提取 选取 5 份滤纸血片标本,每份标本选取 2 个干血斑,分别打取 3 个或 6 个直径 3 mm 圆片。除在恒温摇床进行样品孵育、将 DNA 溶解体积降至 50 μL 且纯化两次外,其余操作与试剂盒使用说明相同。使用多功能酶标仪检测提取的 DNA 溶液的浓度和纯度。

1.6 滤纸血片标本阴性对照 为避免滤纸血片标本间的交叉污染,每次使用打孔钳之前,先用酒精灯灼烧,然后用 70% 乙醇冲洗,并在一张洁净的滤纸片上至少打 10 个孔,直至残留的乙醇干燥为止。每次实验时,将最后由空白滤纸片获得的圆片作为阴性对照,与标本一起进行检测。

1.7 巢式 PCR 引物与反应条件 参考国外文献资料^[9-11],根据 CMV IE-1 基因设计巢式 PCR 引物,外引物序列为:上游 5'-TGAGGATAAGCGGGAGATGT-3'、下游 5'-ACT GAG GCA AGT TCT GCA GT-3',目的片段的大小为 242 bp;内引物序列为:上游 5'-AGC TGC ATG ATG TGA GCA AG-3'、下游 5'-GAA GGC TGA GTT CTT GGT AA-3',目的片段的大小为 146 bp。第 1 轮 PCR 反应使用热启动技术,反应体系为 50 μL:10×buffer 5 μL,MgCl₂ 20 μL,dNTP 2 μL、外侧上下游引物各 5 μL、模板 DNA 5 μL、Taq DNA 聚合酶 1 U。反应条件:93 ℃ 预变性 5 min、91 ℃ 变性 30 s、56 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环后,经 72 ℃ 延伸 10 min。第 2 轮 PCR 反应未使用热启动技术,取第 1 轮产物 5 μL 作为模板,除 dNTP 4 μL、内侧上下游引物各 0.4 μL 外,其他条件均与第 1 轮相同。每个样品重复 2 次。第 2 轮 PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测,采用凝胶成像仪进行分析。

1.8 灵敏度实验

1.8.1 不同提取方法的灵敏度比较 对使用 3 个或 6 个直径 3 mm 圆片提取的 5 份滤纸血片标本的 DNA 样品进行巢式

* 基金项目:北京大学医学部新教师启动基金项目(BMV20100089)。 △ 通讯作者,E-mail:renag@bjmu.edu.cn。

PCR 检测，并比较两者的灵敏度。

1.8.2 滤纸血片和全血标本 CMV DNA 检测结果的比较 同时检测同一标本的全血 DNA 样品和使用 6 个圆片提取的滤纸血片 DNA 样品，以全血样品的扩增结果为标准，计算巢式 PCR 检测滤纸血片标本 CMV DNA 的灵敏度。

1.9 最低检测限实验 使用无菌去离子水对全血标本的 DNA 样品进行倍比稀释，并将稀释样品作为模板进行扩增，以获得实验的最低检测限。

1.10 稳定性实验 将滤纸血片标本置于 -20 ℃ 冰箱内储存 3 个月后重新进行 DNA 提取和巢式 PCR 检测，以判断该方法的稳定性。

1.11 实验结果判定 至少有 1 次出现 146 bp 扩增条带的样品即为阳性。

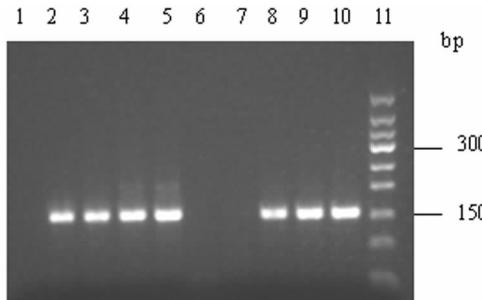
2 结 果

2.1 滤纸血片标本阴性对照 空白滤纸片的检测结果全部为阴性。由此可知，经过酒精灯灼烧和 70% 乙醇冲洗可有效避免样品间的交叉污染。

2.2 不同提取方法的灵敏度比较 使用 3 个或 6 个直径 3 mm 圆片提取的 5 份滤纸血片标本的巢式 PCR 结果显示，以医院血浆定量检测结果为参照，用 3 个圆片提取的 5 份 DNA 样本中，巢式 PCR 检出 3 份阳性；用 6 个圆片提取的 5 份 DNA 样本中，巢式 PCR 全部检出。提取的 DNA 溶液的浓度和纯度检测结果显示，与 3 个圆片相比，6 个圆片的 DNA 溶液浓度提高 2~8 倍，DNA 纯度 1.7~1.9。

2.3 滤纸血片和全血标本 CMV DNA 检测结果的比较 12 份标本的滤纸血片 DNA 样品和全血 DNA 样品检测结果均为阳性，以全血标本检测结果为标准，滤纸血片标本的灵敏度为 100%。部分样品两次检测结果不一致，可能与标本 CMV DNA 拷贝数较低有关。

2.4 最低检测限 使用无菌去离子水稀释的两个全血标本的医院血浆 CMV DNA 定量检测结果分别为 2.10×10^4 和 7.48×10^4 copy/mL，图 1 为其巢式 PCR 检测的电泳图。由图 1 可知，该方法能够检测出样品 CMV DNA 的最低拷贝数为 74.8 copy/mL。



11:50 bp DNA ladder; 1、6:阴性对照；2~5 号样品的 CMV DNA 拷贝数依次为： 7.48×10^1 、 7.48×10^2 、 7.48×10^3 、 7.48×10^4 copy/mL；7~10 号样品的 CMV DNA 拷贝数依次为： 2.10×10^1 、 2.10×10^2 、 2.10×10^3 、 2.10×10^4 copy/mL。

图 1 巢式 PCR 最低检测限实验电泳图

2.5 稳定性 3 个月后对 12 份滤纸血片标本重新进行 DNA 提取和巢式 PCR 检测，所得结果与之前检测结果一致，实验灵敏度未下降。

3 讨 论

先天性巨细胞病毒感染在全球分布广泛，世界各地新生儿的先天感染率为 0.2%~2.5%。国内新生儿巨细胞病毒平均感染率为 1.0%~2.4%^[12]。传统检测方法需采集受检者血液或尿液标本，采样繁琐且不易储存。滤纸血片标本具有采样简单、运输方便、易于存储等优点，但也存在标本易交叉污染、提取 DNA 量少和检测灵敏度低等问题，本研究从这几方面对所建立实验方法进行评价。

在滤纸血片标本的处理过程中，需要注意不同样品间的交叉污染。本研究采用酒精灯灼烧和 70% 乙醇冲洗等措施对打孔钳进行处理，实验结果显示该方法可有效避免样品间的交叉污染，保证实验结果真实可信。DNA 溶液检测结果显示，采用改良后的 DNA 提取方法可使 DNA 溶液浓度提高 2~8 倍，巢式 PCR 灵敏度升高。滤纸血片标本的 DNA 提取方法还包括酚-氯仿提取、热提取以及使用自动核酸提取仪进行提取等^[11]。其中，酚-氯仿法的 DNA 产率最高，但该方法中有机溶剂挥发对身体有害，且提取时间较长。采用试剂盒提取的 DNA 纯度高，且操作简单、所需时间短，适用于大规模样品的检测。

本次研究所采用的巢式 PCR 结果显示，该方法检测滤纸血片标本 CMV DNA 的灵敏度为 100%，最低检测限为 75 copy/mL，与 Binda 等^[13]的研究结果一致。该方法所得 PCR 扩增产物的特异性已通过 Southern 杂交和直接测序的方法得到验证。邹广发^[14]的研究显示，保存时间较长的滤纸血片标本，由于受到微生物的污染以及样品 DNA 降解，易出现 PCR 扩增失败。然而 Soetens 等^[15]使用在常温下平均储存 72.9 个月的滤纸血片标本仍可获得可靠的结果。本研究结果证明，在 -20 ℃ 存放 3 个月后滤纸血片标本中 CMV DNA 仍能检出，实验结果稳定。更长保存时间的滤纸血片标本检测结果的稳定性，需要进一步研究。

本研究建立的巢式 PCR 检测滤纸血片标本 CMV DNA 的实验方法能够获得准确、可靠、稳定的结果，为滤纸血片标本用于大规模流行病学研究提供了科学依据。另外，由于目前新生儿疾病筛查均采集足跟血滤纸片，滤纸血片标本 CMV DNA 检测方法的建立，也为开展新生儿巨细胞病毒的早期筛查提供了可能性。

参 考 文 献

- Simonazzi G, Guerra B, Bonasoni P, et al. Fetal cerebral periventricular halo at midgestation: an ultrasound finding suggestive of fetal cytomegalovirus infection[J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 202(6): 591-595.
- Yilmaz Ciftdogan D, Vardar F. Effect on hearing of oral valganciclovir for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection[J]. J Trop Pediatr, 2011, 57(2): 132-134.
- Shepard TH, Lemire RJ. Catalog of Teratogenic Agents 12th edition[M]. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007, 18(1): 56-58.
- 刘菊芬,任爱国.先天性巨细胞病毒感染所致出生缺陷和健康损害[J].中国生育健康杂志,2010,21(3):189-193.
- 李行勇,邓赞章.合格献血者活动性人类巨细胞病毒感染情况调查[J].国际检验医学杂志,2011,32(14):1601-1603.
- Shibata M, Takano H, Hironaka T, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper[J]. J Virol Methods, 1994, 46(2): 279-285.
- Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns

先天性巨细胞病毒感染在全球分布广泛，世界各地新生儿

- using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(5): 575-581.
- [8] Pass RF. Dried blood spots and universal newborn screening for congenital cytomegalovirus infection[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(5): 582.
- [9] Brytting M, Wahlberg J, Lundeberg J, et al. Variations in the cytomegalovirus major immediate-early gene found by direct genomic sequencing[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 955-960.
- [10] Jiwa N, Van Gemert G, Raap A, et al. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction[J]. Transplantation, 1989, 48(1): 72.
- [11] Gohring K, Dietz K, Hartleif S, et al. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot(DBS) filter cards[J]. J Clin Virol, 2010, 48(4): 278-281.
- [12] 陈智平,蔡豪斌,何雨,等.人巨细胞病毒在广西不同人群中的感染情况及其与肾脏疾病关系的初步研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(3):196-198.
- [13] Binda S, Mammoliti A, Primache V, et al. Pp65 antigenemia, plasma real-time PCR and DBS test in symptomatic and asymptomatic cytomegalovirus congenitally infected newborns[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 24.
- [14] 邹广发. AGCU 免提取 STR 荧光检测试剂盒的验证[J]. 刑事技术, 2010, 12(3): 23-25.
- [15] Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, et al. Evaluation of different cytomegalovirus(CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 943-946.

(收稿日期:2011-12-03)

• 检验技术与方法 •

HPLC 法测定人血中阿莫西林的方法学研究

肖正华, 刘明, 郭嘉伟, 曹文轩, 管瀟, 张莉, 张惠静

(第三军医大学药物分析与分析化学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 建立一种实用的 HPLC 法用于人血中阿莫西林含量测定。方法 采用含 1% 磷酸的甲醇溶液沉淀蛋白, 高效液相色谱法测定。以替硝唑为内标, 色谱柱为 Waters XBridge C18, 150 mm × 4.6 mm, waters 保护柱; 流动相为: 甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾(pH2.3)=16:84, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长为 225 nm。结果 血浆内源性物质对样品测定没有干扰。阿莫西林的线性范围为 0.25~32.0 μg/mL($r=0.999\bar{9}$)。阿莫西林以及替硝唑各浓度点的稳定性实验的 RSD 均小于 15%。结论 该方法样品处理简便, 结果准确, 灵敏度较高, 可用于人血浆中阿莫西林含量的测定以及阿莫西林药代动力学研究。

关键词:阿莫西林; 色谱法, 高压液相; 血浆; 药代动力学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)16-1992-02

阿莫西林(amoxicillin, Am)为 β 内酰胺类抗菌药物, 对革兰阳性菌和阴性菌都有高效杀菌作用。近年来, 对阿莫西林制剂、血样中含量测定的方法屡有报道^[1-5], 人血中阿莫西林的含量测定多采用 HPLC 法, 运用阿莫西林具有酸碱两性的特点, 在 HPLC 测定中, 酸碱两性流动相都曾有人采用^[4]。但随着抗菌药物的应用泛滥, 人体中残留的各种抗菌药物严重影响血浆中阿莫西林的含量测定, 以前可用的测定方法很难再用。本实验拟建立一种实用的准确、简便、快速的 HPLC 法, 用于测定血浆中阿莫西林的血药浓度, 为阿莫西林药代动力学研究提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 LC-20AB 高效液相色谱仪, SPD-M20A 紫外检测器, CTO-10AS 柱温箱皆为日本岛津公司生产; Simplicity 纯水仪(密理博); HC-254 高速离心机(科大创新); XS-205 分析天平(梅特勒, 德国)。

1.2 试药 阿莫西林对照品, 批号 130409-201011, 中国药品生物制品检定所; 替硝唑对照品, 批号 100336-200703, 中国药品生物制品检定所; 甲醇, 色谱纯, MERCK 公司(德国); 磷酸、磷酸二氢钾皆为分析纯, 成都科龙化工试剂厂; 水为密理博超纯水。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBridge C18, 4.6 mm × 150 mm, waters 保护柱; 流动相为: 甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾(pH2.3)=16:84, 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样

量: 20 μ L; 检测波长为 225 nm。

1.3.2 标准溶液的配制 精密称取阿莫西林对照品适量, 用 5% 甲醇溶液溶解, 配制成 1280 μ g/mL 标准溶液, 再用 5% 甲醇倍比稀释成 320、160、80、40、20、10、5、2.5 μ g/mL 系列标准溶液。精密称取替硝唑对照品适量, 用 5% 甲醇溶液溶解, 配制成 800 μ g/mL 标准溶液, 再稀释成 80 μ g/mL 标准溶液备用。

1.3.3 血浆样品的处理 精密量取血浆样品 450 μ L 于 1.5 mL 离心管中, 再加入阿莫西林标准溶液和 80 μ g/mL 替硝唑标准溶液各 50 μ L, 旋涡混匀, 再加入 450 μ L 含 1% 磷酸的甲醇溶液, 旋涡振荡 1 min, 18 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 20 μ L 进样。用内标法计算阿莫西林的含量。

2 结 果

2.1 专属性 在上述色谱条件下, 测得空白人血浆、阿莫西林+内标+血浆等色谱图, 见图 1。由图 1 可见血浆中杂质不干扰阿莫西林和内标的测定。阿莫西林保留时间约为 6.23 min; 内标替硝唑的保留时间约为 7.69 min。

2.2 标准曲线 将 1.3.2 所配阿莫西林系列标准溶液各取 50 μ L, 与 450 μ L 空白血浆混合, 即得 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μ g/mL 的阿莫西林系列标准血浆样品, 每个浓度平行 3 份, 按“1.3.3”项下处理, 测定。得标准曲线 $Y = 0.1958X - 0.02253$, 0.25~32.0 μ g/mL 范围内线性关系良好($r=0.999\bar{9}$)。