

• 临床检验研究论著 •

荧光定量 PCR 法检测 HCV-RNA 质控物的制备及质控图的绘制*

邓演超, 李全双, 沈红艳, 徐湛, 任思坡

(徐州市临床检验中心, 徐州市医学科学研究所, 徐州市中心医院, 江苏徐州 221006)

摘要:目的 自制 HCV-RNA 荧光定量 PCR 室内质控物, 利用 Excel 绘制质控图。方法 取某一浓度 HCV-RNA 阳性血清, 稀释至一定浓度, 分装数管, -70 ℃ 保存。首次分两批(A组: 第1批在最佳条件下检测; B组: 第2批在常规条件下检测)连续检测 20 次, 计算均值的对数值、标准差和变异系数, 绘制常规条件下质控图, 进行室内质控动态监测; 第2次(C组: 第3批在常规条件下检测)标本 -70 ℃ 保存 12 月后, 连续检测 20 次, 计算均值的对数值、标准差和变异系数。结果 HCV-RNA 室内质控常规条件下及标本 -70 ℃ 保存 12 个月后, 均值的对数值分别为 5.023、5.041; 标准差分别为 0.228、0.231; 变异系数分别为 4.54%、4.58%; 经两组均数对数的显著性 t 检验, 均值的对数值之间无统计学差异($P > 0.05$); 标准差、变异系数之间相差很小。结论 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 质控物的制备方法简单, 性能稳定, 质控图绘制方便, 适合 PCR 实验室对 HCV-RNA 荧光定量的室内质控。

关键词:肝炎病毒; 聚合酶链反应; 室内质控; 质控图

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.006

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)03-0271-03

Preparation of internal quality control substance of real-time PCR to quantitative analysis of hepatitis C virus RNA and the quality control chart*

Deng Yanchao, Li Quanshuang, Shen Hongyan, Xu Zhan, Ren Sipo

(Xuzhou Centre for Clinical Laboratory, Xuzhou Institute of Medical Sciences, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: Objective To prepare an internal quality control substance of hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) used in real time quantitative PCR, and prepare quality control chart with Microsoft Office Excel software. **Methods** HCV-RNA positive serums were prepared, subpackaged into several centrifuge tubes and saved at -70 ℃. For the first time, all samples were continuously detected for 20 times in two tranches (group A: the first batch was detected under optimal conditions; group B: the second batch was detected under routine conditions). The logs of mean value (\bar{x}), standard deviation (s) and coefficient of variability (CV) were calculated and quality control chart was plotted. For the second time, the serums were stored at -70 ℃ for 12 months (group C: the third batch was detected under routine conditions). The logs of \bar{x} , s and CV were calculated. **Results** The logs of \bar{x} of HCV-RNA internal quality control were 5.023 and 5.041, s were 0.228 and 0.231, and CV were 4.54% and 4.58%. The difference in the logs of \bar{x} had no significance ($P > 0.05$). There was also no statistical difference of s and CV. **Conclusion** Internal quality control substance of HCV-RNA used in real-time quantitative PCR might be very stable and applicable in clinical laboratory, and quality control chart could be plotted easily.

Key words: hepatitis viruses; polymerase chain reaction; internal quality control; quality control chart

随着《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》和《临床基因扩增检验实验室工作规范》的贯彻实施, 全国各地陆续规范地开展荧光定量 PCR 检测技术, 江苏省 2010 年也出台了《江苏省临床基因扩增检验技术管理规范(试行)》。荧光定量 PCR 技术与常规 PCR 技术相比, 具有特异性强, 能有效解决 PCR 产物污染, 自动化程度高等特点^[1-2]。目前, 还很少有实验室对 HCV-RNA 室内质控物制备及使用进行探讨, 唯有卫生部临检中心对其标准物质进行了探索^[3], 而且标准物质数量有限, 现在国内尚未有商品化的 HCV-RNA 质控品, 国家暂时还没有出台相关标准。笔者在总结近年临床 PCR 工作经验的基础上, 针对 PCR 实验室工作的实际情况, 制备 HCV-RNA 检测室内质控物, 并利用 Excel 绘制质控图, 对实验室 HCV-RNA 检测进行动态观察。

1 材料与方法

1.1 质控物的制备

1.1.1 质控物来源 血清来自医科所临床部门诊患者新鲜血清, 经 HCV-Ab 检测 HCV-Ab 为阳性, 所选血清标本乙型肝炎病毒血清标志物检测 HBsAg、HBeAg、抗-HBc、HAV-Ab、HIV-Ab 和梅毒抗体均为阴性, 均无黄疸、无脂血、无溶血的样本 5 例, 将血清充分混匀, 预期 HCV-RNA 检测病毒载量在 1.0×10^6 IU/mL 左右; 另取经 HCV-RNA、HCV-Ab 及乙型肝炎病毒标志物检测全阴性且 HAV-Ab、HIV-Ab 和梅毒抗体均为阴性, 无黄疸、无脂血、无溶血的新鲜样本 20 例, 充分混匀。

1.1.2 质控品制备 将上述两组血清分别进行 56 ℃ 30 min 灭活, 将两组血清按适当比例混合, 使其检测预期浓度大约在 10^5 IU/mL 左右。

1.1.3 质控品分装、保存及复融 将质控品充分混匀, 保证其均一性, 取高压灭菌的 0.5 mL 离心管数只, 将上述质控品每管 320 μL 分装至离心管中, 瞬时离心数秒, 盖上盖, 留取若干管进行下述实验, 其余用封口膜将其封口后直立放入 -70 ℃

* 基金项目: 徐州市科学技术局科技项目(项目编号 XF11C031)。

作者简介: 邓演超, 男, 主任检验技师, 主要从事生物化学与分子生物学

临床诊断及实验室管理。

冰箱冷存。临实验时取出后使其达到或复融至室温,充分震荡混匀,低温瞬时离心数秒后使用。

1.2 仪器与试剂 HCV-RNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒、DA-7600 型实时荧光定量 PCR 仪(中山大学达安基因公司),低温高速离心机、超低温冰箱、加样器等。

1.3 质控品的检测 每批次实验严格按操作规程,同时做强阳性对照和阴性对照各一份,HCV-RNA 临界阳性质控一份,空白对照一份,阳性定量参考品 4 份,分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 和 1.0×10^8 IU/mL。实验结果均显示,阴性质控品:增长的曲线不呈 S 型曲线或 Ct 值为 30;阳性质控品:增长曲线呈 S 型曲线;阳性定量参考品:增长曲线呈 S 型曲线,Ct 值小于 27,且 $0.97 \leq |r| \leq 1$;以上要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

1.3.1 第1批(A组) 最佳条件下的变异(optimal conditions variance, OCV):在仪器和试剂均为最佳状态下,由经过培训的熟练的实验室技术人员进行操作,连续测定上述阳性质控品 20 次,得到一组质控数据,定为 A 组,经计算可得到其均值的对数(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV),此变异系数即为 OCV,检测结果见表 1。

1.3.2 第2批(B组) 常规条件下的变异(routine conditions variance, RCV):在仪器和试剂均为常规状态下,由经过培训的普通的实验室技术人员进行操作,连续测定上述阳性质控品 20 次,得到一组质控数据,定为 B 组,经计算可得到其均值的对数(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV),此变异系数即为 RCV。检测结果见表 1。

1.3.3 第3批(C组) 标本 -70°C 保存 12 个月后,在仪器和试剂均为常规状态下,由经过培训的普通的实验室技术人员进行操作,连续测定上述阳性质控品 20 次,得到一组质控数据,定为 C 组,经计算可得到其均值的对数(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV),检测结果见表 1。

1.3.4 瓶间差异分析 按照上述最佳条件下的测定方法随机抽取自制 HCV-RNA 质控品 10 支,每支检测 3 次取平均值,分别计算 10 支自制质控品的病毒载量平均值及平均值的对数值 \bar{x} 、 s 、 CV ,分别为 1.059×10^5 IU/mL、 5.025 、 0.178 和 3.55% ,符合一般规范要求^[3]。

1.4 绘制质控图

1.4.1 质控图绘制方法

1.4.1.1 新建 Excel 表格 将 B4 到 B23 输入 B 组 20 次质控结果的对数值;将 C4~G4 和 C23~G23 依次输入 A 组的 $\bar{x} - 2s$ 、 $\bar{x} + 2s$ 、 $\bar{x} - 3s$ 、 $\bar{x} + 3s$ 的数值,用鼠标从 B4 拖到 G23,按工具栏中的“图表向导”点击“折线图”,按“完成”可得到质控图的基本轮廓,点右键去除数值轴网络线,进行其他项目的添加及设置。

1.4.1.2 失控线和警告线的绘制 以 $\bar{x} \pm 3s$ 为失控线,以 $\bar{x} \pm 2s$ 为警告线。将鼠标移至 $\bar{x} \pm 3s$ 上的任意一个点,右击后选择“添加趋势线”,选择“线性 L”,按“确定”键,两端点连成直线,即成失控线。用相同的方法绘制出警告线和均值线。

1.5 统计学处理 B、C 两组实验数据计算均数的对数后,用均数的 $\bar{x} \pm s$ 表示,标准差、变异系数分别用 s 、 $CV\%$ 来表示;同时用 SPSS 13.0 统计软件包进行两组均数显著性 t 检验。

2 结 果

2.1 最佳条件下、常规条件下及标本保存 12 月后检测结果见表 1。结果显示:B 组与 A 组 RCV 与 OCV 接近并 $RCV < 2OCV$,则认为 RCV 可以接受^[1];B 组与 C 组均值的对数相比 t 值为 1.654,小于 $t_{0.05(38)} = 2.024$,因此 $P > 0.05$ 。

表 1 3 组标本检测结果

组别	\bar{x}		s	$CV\%$
	病毒载量(IU/mL)	对数值		
A 组	1.059×10^5	5.025	0.205	4.01 (OCV)
B 组	1.054×10^5	5.023	0.228	4.54 (RCV)
C 组	1.098×10^5	5.041	0.231	4.58

2.2 应用 Excel 绘制 Levey-Jennings 质控图 依据 RCV 计算出 \bar{x} 和 s 确定质控限,依 $\bar{x} \pm 2s$ 为警告限, $\bar{x} \pm 3s$ 为失控限(图 1),同时用鼠标右键点击质控线,点击“趋势线格式”,选择并添加黄色表示警告限($\bar{x} \pm 2s$),红色表示失控限($\bar{x} \pm 3s$)。将每批次实验所做质控结果取对数值后直接输入相应 Excel 单元格中,按回车键,右边将自动生成本次质控结果所在位置的质控图并可以判断其质控趋势,见图 1。

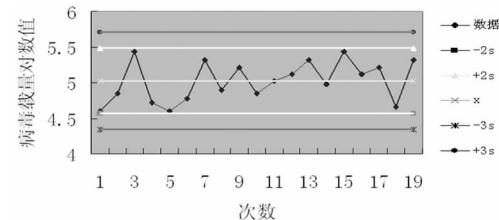


图 1 Levey-Jennings 质控图

3 讨 论

目前中国 HCV 的感染率也有逐年上升的趋势^[4],HCV 感染患者血清 HCV-RNA 载量的高低对肝脏损害的程度密切相关^[5],HCV-RNA 是反映 HCV 感染的可靠指标,也是目前对 HCV 感染的唯一指标。在国内丙型肝炎的报道逐渐增多,HCV 感染所带来的严重后果正日益显现,控制 HCV 传播,提高丙型肝炎的治疗效果,需要依赖于及时、准确的实验室诊断。HCV-RNA 荧光定量检测被认为是诊断 HCV 感染的“金标准”^[6-7],HCV-RNA 定量检测有助于诊断急性 HCV 感染。在 HCV 在感染 1 周内即可检测到 HCV-RNA 载量,大大缩短了 HCV 感染诊断的“窗口期”,HCV-RNA 定量检测已成为明确 HCV 感染诊断的重要手段^[8]。此方法具有敏感性和特异性高、定量准确、重复性好等特点,有助于动态反映病毒复制、突变情况,预测抗病毒治疗效果,是了解病情严重程度、病情转归及预后的有效手段之一^[9]。

目前,临床基因扩增实验室的室内质控的管理日益受到重视。大部分市级检验科还没有把荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 的室内质控开展起来。若要开展室内质量评价工作,必须要有良好的质控品及其相应的质控措施,但是目前国内尚未有商品化的 HCV-RNA 检测质控品。因此,作为临床 PCR 实验室有必要自制室内质控品。

用于临床 PCR 实验室质控的质控品应具备以下几个条件:(1)基质与检测标本一致。(2)在样品保存条件下,有良好的稳定性,并可单批大量获得。(3)无已知的生物传染危险性。(4)样品浓度与试验的临床应用相适应^[10]。本研究 HCV-RNA 质控品病毒载量选择在 10^5 IU/mL 左右,是充分考虑临床 PCR 实验室测定时,在质控工作中使用合适的弱阳性质控样品同时检测,既可以保证每次测定的有效性,也可以监测测定的重复性^[11]。另外质控品在制作过程中必须充分混匀,尽量缩小瓶间差异;RNA 作为 HCV 的遗传物质是一类极容易降解的物质,因此实验室对血清标本的保存应严格,随用随取,

实验后质控物不要保留。

本文对 HCV-RNA 检测的质控物制备及利用 Excel 绘制质控图,可以作为 PCR 实验室 HCV-RNA 检测室内质控的重要手段。由于各单位标本量不同,每月做不到 20 批次,应及时将每批次质控结果绘成质控图便于动态观察。本单位每月不足 20 批次,一方面将质控结果绘成质控图,另一方面将标本放入 -70 ℃ 冰柜中保存 12 个月后,集中检测 HCV-RNA 来评价其稳定性,这样便于消除批间误差。表 1 显示 RCV 与 OCV 接近,并 $RCV < 2OCV$,则认为 RCV 可以接受^[1];B 组与 C 组均值的对数无显著性差异,同时可以看出 s、CV 相差很小,表明自制 HCV-RNA 质控物在 -70 ℃ 保存稳定性至少可达 1 年,能够满足临床要求;所绘质控图能有效地帮助我们判断质控情况。本文 RCV 为 4.54%,小于临床允许误差;20 次质控结果均在 $\pm 2s$ 范围内,且符合 Westgard 质控规则的 1_{ss} 、 2_{ss} 和 4_{ss} ,此图可以用做“管理用质控图”,对检验过程进行控制。同时此质控图标示出了警告线和失控线,将给判断质控结果是否在控提供方面,实用性强,作图简单,判断清晰,值得推广应用。

同时,自制质控物可以与国家标准物质进行比对,这样自制物就有了溯源性,将极大地改善不同实验室间检验结果的可比性,从而逐步实现不同实验室间检验结果有条件互认^[12]。

参考文献

- [1] 申子瑜,李金明. 临床基因扩增检测技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:147-148.
- [2] Jardi R, Rodriguez F, Buti M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence

(上接第 270 页)

列;His6 标签序列方便后续的蛋白质纯化;可以有效用于大肠杆菌的原核表达环境^[9-10]。本研究利用了 His6 融合蛋白的特异性染料进行目的蛋白的检测,该染料只对含有 His6 标签序列的蛋白质染色^[11-12],而且和总蛋白的染料兼容(可以先后染色同一块蛋白电泳胶),尤其适用于没有特异性抗体的蛋白质和蛋白质结构域的检测;和 His6 的抗体相比,该染料的使用省去了 Western Blotting 的过程,合理简化了实验流程。在本研究中,利用 His6-SUMO 融合蛋白表达系统,在低温诱导时可以保证 Siglec-9-V 可溶性表达,从而有助于进一步研究其如何通过分子间相互作用实现生物学功能。

参考文献

- [1] Angata T, Varki A. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs[J]. J Biol Chem, 2000, 275(29):22127-22135.
- [2] Aalto K, Autio A, Kiss EA, et al. Siglec-9 is a novel leukocyte ligand for vascular adhesion protein-1 and can be used in PET imaging of inflammation and cancer[J]. Blood, 2011, 118(13):3725-3733.
- [3] Varki A, Angata T. Siglecs the major subfamily of I-type lectins [J]. Glycobiology, 2006, 16(1):1R-27R.
- [4] Cao H, Crocker PR. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation[J]. Immunology, 2011, 132(1):18-26.
- [5] Pillai S, Netravali IA, Cariappa A, et al. Siglecs and immune regu-

PCR assay[J]. J Viral Hepat, 2001, 8:465-471.

- [3] 王露楠,吴健民,李金明,等.丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研制[J].中华检验医学杂志,2006,29(4):354-357.
- [4] 魏来,杨瑞峰.丙型肝炎病毒实验室诊断的现状与存在的问题[J].中华检验医学杂志,2008,31(8):845-848.
- [5] Neum UP, Berg T, Bahra M, et al. Fibrosis progression after liver-transplantation in patients with recurrent hepatitis C[J]. J Hepatol, 2004, 41(5):830-836.
- [6] 陈作芬,曹水平.丙肝患者治疗前后 HCV-RNA 与抗 HCV 及丙氨酸氨基转移酶水平的分析[J].临床医学与检验,2010,7(12):1175-1177.
- [7] 钟海军,唐孝亮,曾刚毅,等.核酸纯化柱提取核酸定量检测丙型肝炎病毒 RNA 的临床应用[J].检验医学与临床,2008,5(13):783-798.
- [8] 周薇薇,马鑫,周洪明.123 例抗-HCV 阳性患者 HCV-RNA 定量检测结果分析[J].黑龙江医药科学杂志,2010,33(6):89.
- [9] 王虹,许霄霄.荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 的研究进展[J].国际检验医学杂志,2006,27(1):74-76.
- [10] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:942.
- [11] 李金明,邓巍,王露楠,等.PCR 测定乙型肝炎病毒 DNA 弱阳性质控血清的适用研究[J].临床检验杂志,2000,18(1):6-7.
- [12] 李金明.临床实验室分子诊断折标准化[J].中华检验医学杂志,2006,29(6):483-486.

(收稿日期:2012-10-09)

lation[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30(3):357-392.

- [6] Foussias G, Yousef GM, Diamandis EP. Identification and molecular characterization of a novel member of the siglec family[J]. Genomics, 2000, 7(2):171-178.
- [7] Mary K, O'Reilly J, Paulson C. Siglecs as targets for therapy in immune cell mediated disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(5):240-248.
- [8] Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, et al. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes[J]. Methods Mol Biol, 2011, 705:15-30.
- [9] Saitoh H, Uwada J, Azusa K. Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in Escherichia coli[J]. Methods Mol Biol, 2009, 497:211-221.
- [10] Wang Z, Li H, Guan W, et al. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility[J]. Protein Expr Purif, 2010, 73(2):203-208.
- [11] Williams NK, Prosselkov P, Liepinsh E, et al. In vivo protein cyclization promoted by a circularly permuted synechocystis sp. PCC6803 DnaB mini-intein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(10):7790-7798.
- [12] Smallwood ND, Hausman BS, Wang X, et al. Involvement of NH2 terminus of PKC-delta in binding to F-actin during activation of Calu-3 airway epithelial NKCC1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(4):C906-912.

(收稿日期:2012-10-06)