

坏、放置时间的长短等都对结果有影响,人为干扰因素较多。样本含量的高低都对结果有影响(即浆细胞分泌免疫球蛋白抗体的多少都有影响)。毛细管免疫固定电泳技术相比较而言,则操作简便、全自动化操作,结果快速准确、准确率高,检出单克隆抗体含量仅为 50 mg/dL。缺点是结果判断上需要有丰富的临床知识经验,对电泳技术图谱较为了解。曲线图没有电泳带直观,虽然同样为抗原抗体反映,曲线图出现窄而高的峰即可判断,峰值出现同样有主客观因素的影响。客观的原因是偶尔少数的交叉反映,这主要是由于免疫学的同一性:单克隆免疫球蛋白具有同样的抗原决定簇,主要有 3 种即为同种型、同种异型和单独型。偶尔可见它们具有同样的抗体反映,在 γ 球蛋白区会出现多克隆增殖免疫球蛋白区形成较宽区带(例如某些肾病综合征、自身免疫性疾病、红斑狼疮)或寡克隆蛋白带,对结果的判断带来影响;人为主观判断为阳性或阴性。另外由于免疫固定电泳只是定性的分析,所以结果上没有一个客观的定量指标,比如什么区带即为单克隆抗体阳性,区带多宽、多高

• 检验技术与方法 •

即可判断为某一类型的单克隆抗体增多,游离的 κ 、 λ 抗体轻链是否确定,因为本方法无法检测 IgD、IgE(琼脂糖凝胶固定电泳技术亦存在上述问题),虽然它们含量极低且少见,但并不排除。本文中有一例 λ 型轻链骨髓瘤患者后用其他方法证实为 IgE λ 型免疫球蛋白增多,这些都是今后工作、研究中值得探讨、商榷之处。另外,毛细管电泳技术的试剂成本较高也是这一技术在临床不易推广普及原因之一。

参考文献

- [1] 李伟. 毛细管蛋白电泳临床应用中的体会[J]. 检验医学与临床, 2011,8(13):1627-1628.
- [2] 顾志冬,徐汝明,王颖智,等. 应用高效毛细管电泳筛检和鉴定血清中 M 蛋白[J]. 诊断学理论与实践,2005,4(4):303-307.

(收稿日期:2013-01-11)

溶血和黄疸标本对不同核酸提取方法影响的比较

林志芳,李成德,梁结玲

(肇庆市第一人民医院,广东肇庆 526021)

摘要:目的 比较溶血和黄疸标本对磁珠法、一步法和沉淀煮沸法三种不同核酸提取方法 HBV DNA 检测结果的影响。方法 制备含有不同浓度梯度血红蛋白或总胆红素的血清,使其 HBV DNA 浓度相同;检测过程中除核酸提取方法不同外,其余操作完全相同,进行实时荧光定量 PCR 检测,比较三种核酸提取方法对不同程度的溶血和黄疸标本的抗干扰能力。结果 当 $Hb \leq 0.5$ g/L 时,3 种方法均不受影响, $Hb = 5.0$ g/L 时,一步法与沉淀煮沸法呈假性升高,磁珠法受影响不明显; $Hb = 50.0$ g/L 时,3 种方法均受影响明显,一步法与沉淀煮沸法可被抑制呈阴性。不同浓度的总胆红素对磁珠法与沉淀煮沸法无明显影响,对一步法产生的影响显著,其检测结果可通过调整结果判断部分参数得到修正。结论 在相同检测条件下,磁珠法对溶血和黄疸的抗干扰能力最好,沉淀煮沸法次之。

关键词:核酸提取; 磁珠法; 一步法; 沉淀煮沸法; 溶血; 黄疸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)10-1272-03

临床血液标本中,溶血和黄疸标本十分常见,研究表明血红蛋白及其代谢产物可能与 Taq 酶相互作用,进而抑制 Taq 酶的活性,使 PCR 扩增效率明显降低,导致定量测定结果偏低^[1]。在核酸提取过程中,抑制物清除能力的大小将直接影响检测结果的质量。溶血和黄疸是临床实验室常见的干扰因素,为此,笔者采用磁珠法、一步法和沉淀煮沸法 3 种方法提取不同程度的溶血和黄疸标本核酸,在相同条件下扩增检测,比较 3 种核酸提取方法的抗干扰能力,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本制备

1.1.1 溶血血清 取体检正常者(HBsAg 阴性)EDTA-K₂ 抗凝血 1 支,离心去上清,用生理盐水洗涤 3 次后与 HBV DNA 阴性血清混合,经血细胞分析仪 CD-1700 测定 Hb 浓度 3 次取均值,再取适量稀释用血清(取自本院体检正常者,HBV DNA 阴性且总胆红素小于 17.0 μ mol/L)将 Hb 浓度分别稀释至 100.0 g/L、10.0 g/L、1.0 g/L 和 0.1 g/L,置 -20 $^{\circ}$ C 冻融成溶血标本。

1.1.2 黄疸血清 选取非乙肝患者的高浓度黄疸标本数份混匀,取稀释用血清将总胆红素浓度稀释至 352.0 μ mol/L、176.0 μ mol/L、88.0 μ mol/L 和 44.0 μ mol/L。

1.1.3 实验血清 (1)取适量阳性血清(购自中国药品生物制品检定所的 HBV DNA 标准血清稀释至 1.5×10^7 IU/mL)与稀释用血清等体积混匀作为实验对照。(2)取适量阳性血清分别与含干扰成分的血清等体积混匀成分别含 0.05 g/L、0.5 g/L、5.0 g/L 和 50.0 g/L Hb 和含 22.0 μ mol/L、44.0 μ mol/L、88.0 μ mol/L 和 176.0 μ mol/L 总胆红素的阳性血清。

1.2 仪器与试剂 试剂包括一步法和磁珠法核酸提取试剂及 HBV DNA 定量扩增试剂;磁珠分离器由湖南圣湘生物科技有限公司提供;沉淀煮沸法提取试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司;实时荧光 PCR 扩增仪 M JOPTICON II 购自美国 MJ 公司。

1.3 方法

1.3.1 一步法 吸取 5.0 μ L 血清与 5.0 μ L 提取试剂混合,加入 PCR 扩增试剂即可进行扩增,总反应体系 50 μ L。

1.3.2 沉淀煮沸法 50 μ L 实验血清与 HBV DNA 阴性血清 50 μ L 混匀与等体积浓缩液混合离心,弃上清液,加入 100 μ L 裂解液震匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后离心,取 10 μ L 上清液与 40 μ L 扩增试剂混匀。

1.3.3 磁珠法 取 50 μ L 实验血清与 HBV DNA 阴性血清 150 μ L 按试剂说明提取后,加 100 μ L 洗脱液洗脱,取 10 μ L

上清液与 40 μL PCR 反应试剂混匀。

1.3.4 扩增 实验对照血清用上述 3 种方法各提取 10 次;含干扰成分血清处理同实验对照各提取 2 次,然后均取等量模板与湖南圣湘生物科技有限公司提供的 HBV DNA 定量反应液试剂混匀,在同一扩增仪上同时扩增。扩增程序:50 ℃ 温育 2 min;95 ℃,5 min;95 ℃,15 s;57 ℃,30 s;57 ℃ 采集荧光,共 45 个循环。

1.4 结果判断参数设置 选择“扣除空白”,“扣除背景”,“设定循环范围内的平均值”,为比较调整部分参数对实验结果的影响,“设定循环范围”采用两种方式:方式 1,选择 2 至 10,“阈值”选择“设定循环范围内的背景×1.20”;方式 2,选择 8 至 15,“阈值”选择“设定循环范围内的背景×1.80”。

1.5 统计学处理 所有实验结果转换成对数值后取平均值,含干扰成分标本与对照以及结果判断时设定不同参数的实验结果比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种核酸提取方法对溶血标本的抗干扰能力 见表 1,当 Hb<0.5 g/L 时,3 种方法均无明显影响;Hb=5.0 g/L 时,一步法与沉淀煮沸法呈假性升高,磁珠法无明显影响;Hb=50.0 g/L 时,3 种方法均有明显影响,一步法与沉淀煮沸法可被抑制呈阴性。3 种方法采用上述两种方式判断结果差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 溶血对 3 种方法提取的核酸扩增荧光曲线的影响 见图 1~3(图为结果判断参数方式 1 设定),Hb<0.5 g/L 时,3 种方法的扩增荧光曲线均无明显影响,Hb=5.0 g/L 时,一步法与沉淀煮沸法扩增荧光曲线明显向左飘移,磁珠法无明显影响;Hb=50.0 g/L 时,磁珠法扩增荧光曲线右移,一步法与沉淀煮沸法可被抑制成为阴性曲线。

表 1 3 种核酸提取方法提取不同浓度血红蛋白溶血标本的检测结果

血红蛋白 浓度(g/L)	一步法		沉淀煮沸法		磁珠法	
	方式 1	方式 2	方式 1	方式 2	方式 1	方式 2
对照	6.85	6.89	6.18	6.36	6.45	6.72
0.05	6.88	6.88	6.20	6.36	6.48	6.80
0.5	6.91	6.90	6.32	6.54	6.65	6.88
5.0	8.28	7.29	6.92	6.90	6.65	6.83
50.0	0*	0*	0*	0*	6.15	6.17

*:标本未得到阳性扩增曲线。

表 2 3 种核酸提取方法提取不同浓度总胆红素标本检测的结果

不同浓度总胆 红素(μmol/L)	一步法		沉淀煮沸法		磁珠法	
	方式 1	方式 2	方式 1	方式 2	方式 1	方式 2
对照	6.85	6.89	6.18	6.36	6.45	6.72
22.0	8.36	7.18	6.36	6.65	6.58	6.82
44.0	8.63	7.24	6.32	6.47	6.67	6.76
88.0	8.62	7.21	6.18	6.48	6.85	6.89
176.0	8.77	7.25	6.13	6.17	6.91	6.88

2.3 3 种核酸提取方法对黄疸标本的抗干扰能力 见表 2,黄疸对一步法影响明显,通过调整“设定循环范围”,结果可更接

近对照值,但仍有随着总胆红素浓度增加而呈升高趋势,对磁珠法与沉淀煮沸法无明显影响。经统计分析,通过两种判断方式设定的结果间比较:一步法在黄疸干扰下差异有统计学意义(*t*=11.32,*P*<0.01);采用方式 1 和方式 2 所得结果比较,一步法与磁珠法、一步法与沉淀煮沸法结果间差异均有统计学意义(*P*<0.01),沉淀煮沸法与磁珠法间结果差异亦有统计学意义(*P*<0.05)。

2.4 黄疸对 3 种方法提取的核酸扩增所得荧光曲线的影响 见图 4~6(图为结果判断参数方式 1 设定),4 个异常浓度总胆红素对磁珠法与沉淀煮沸法的扩增荧光曲线均无明显影响,而对一步法均有明显影响,向左飘移。

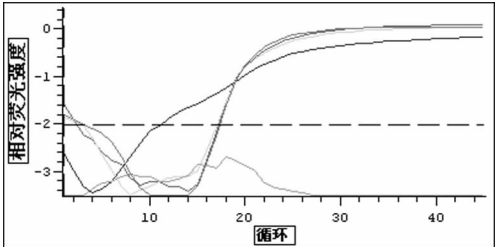


图 1 溶血对一步法检测 HBV DNA 的影响

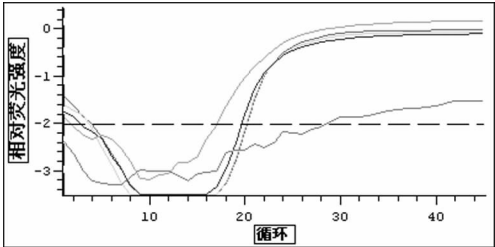


图 2 溶血对沉淀煮沸法检测 HBV DNA 的影响

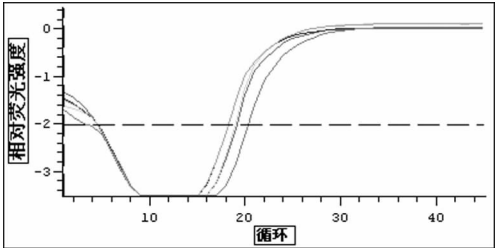


图 3 溶血对磁珠法检测 HBV DNA 的影响

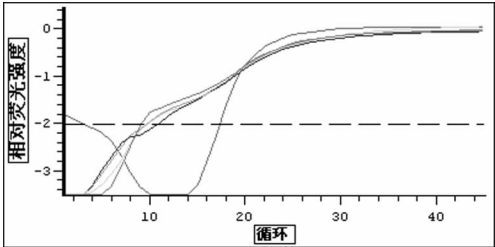


图 4 黄疸对一步法检测 HBV DNA 的影响

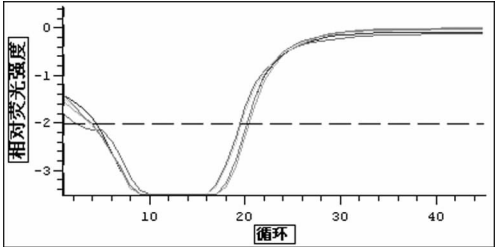


图 5 黄疸对沉淀煮沸法检测 HBV DNA 的影响

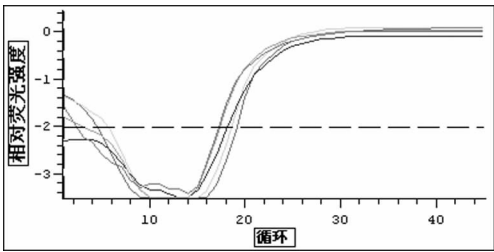


图 6 黄疸对磁珠法检测 HBV DNA 的影响

3 讨 论

抽血及标本离心均可致标本溶血,这在临床上经常遇到,黄疸在肝病中更是十分常见,HBV DNA 检测主要用于 HBV 感染的诊断及治疗效果和抗病毒药物的疗效评价,其对象主要是肝炎患者,临床肝病血清标本不但含有各种离子、而且还有总胆红素、血红蛋白和药物等干扰 PCR 扩增的有机物,不同核酸提取方法去除 PCR 干扰物质能力如何,将对荧光 PCR 定量结果产生重要影响^[2]。目前,血清中 HBV DNA 的提取方法有多种,在提取核酸过程中,不同的提取、检测方法 & 不同来源的试剂,对临床标本 HBV DNA 定量检测结果影响的程度可能不一样^[3]。陈晓东等^[4]比较肝素对 4 种核酸提取方法的影响,发现对磁珠法的影响最小,本实验结果表明磁珠法对溶血和黄疸的抗干扰能力最好,提示磁珠法提取核酸纯度高,去除干扰成分的能力非常强。

为保证实验结果的可比性,本研究在实验设计上采用除核酸提取过程不同外,其余操作包括模板上样量及扩增试剂均相同,并在同一扩增仪上同时检测。结果显示:当 Hb≤0.5 g/L 时,3 种方法均无明显影响,表明 3 种方法对微量溶血的抗干扰能力无差异;Hb=5.0 g/L 时,仅磁珠法不受影响;Hb=50.0 g/L 时,3 种方法均有较明显影响,一步法与沉淀煮沸法可被抑制呈阴性,这些与扩增模板溶液中存在或未除尽的高浓度的 Hb 及其变性后的衍生物对 Taq 酶的抑制作用有关^[5];实验中不同程度黄疸均对一步法有明显影响,扩增荧光曲线及检测结果显示:不同浓度的总胆红素对一步法的影响大致接近,与 Neumaier 等^[5]的结果不一致,有待进一步研究;而对磁珠法与沉淀煮沸法均无明显影响,说明磁珠法与沉淀煮沸法清除胆红素十分有效。

由于标本成分直接或衍生的干扰,这些干扰可实时反映在

• 检验技术与方法 •

扩增荧光曲线上,从而对实验结果造成影响。为比较在结果判断过程中调整部分参数对实验结果的影响,在允许的范围内,本文对“设定循环范围”及“设定循环范围内的背景倍数”作了适当调试,通过两种方式判断的结果表明:除一步法在总胆红素干扰下差异有统计学意义外其余两种取提法均无统计学意义,调整后结果显示更接近对照值;提示在允许的范围内总胆红素所致的干扰通过调整部分结果判断参数可得到一定程度的修正。

值得一提的是一步法只需将血清和提取试剂混匀后即可与反应液混合直接进行扩增,其操作程序快捷,但标本中的干扰成分几乎全部参与扩增反应,抗干扰能力相对较差。该产家提供的 PCR 反应试剂中含有 ROX 荧光染料,ROX 荧光染料可提高定量数据的精度和重现性,使实验结果数据之间的更具可比性,可降低干扰因素的影响,但要求检测仪器具备多色检测能力。由于本科室使用的扩增仪为双色检测,不能应用并发挥 ROX 荧光的归一作用,这是本研究中一步法对黄疸抗干扰力较差的重要因素。一步法操作简便快捷,从试剂研发推广角度而言,解决了干扰的问题,具有很好的推广应用价值。

参考文献

[1] 黄翔,王晖,周志明,等.溶血和脂血标本中乙肝病毒 DNA 提取方法的选择与评价[J].中华医学杂志,2004,28(2):123-124.
[2] Legendre LA,Bienvenue JM,Roper MG,et al. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples[J]. Anal Chem, 2006,78(5):1444-1451.
[3] 刘佳,徐军,王雪飞,等.三种 HBV DNA 提取方法对荧光定量 PCR 检测结果影响的比较[J].中华检验医学杂志,2008,31(7):780-783.
[4] 陈晓东,陶志华,周武.核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J].中华检验医学杂志,2002,25(4):212-214.
[5] Neumaier M,Braun A,Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplifications in clinical diagnostics[J]. Clin Chem,1998,44(1):1-26.

(收稿日期:2013-01-16)

胶体金法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的研究

白广红¹,李耀军²,焦向阳¹

(1. 陕西省结核病防治院,陕西西安 710100;2. 西安医学院第二附属医院,陕西西安 710038)

摘要:目的 应用结核分枝杆菌(TB)抗原胶体金法快速检测 TB 和非结核分枝杆菌(NTM)。方法 用 TB 抗原胶体金法鉴定培养、抗酸染色双阳性标本,对鉴定为 NTM 的标本与罗氏培养鉴别法比较。结果 342 例标本抗原胶体金法检出 284 例 TB(83.0%);检出 58 例 NTM(17.0%)。对 42 例标本重复检测结果符合率为 100%。对 58 例 NTM 标本用传统的罗氏培养鉴别法(PNB、TCH)比较符合率为 91.4%,两者之间差异无统计学意义($\chi^2=3.34, P>0.05$)。结论 TB 抗原胶体金法可快速鉴别 TB 和 NTM,有利于指导临床制定针对性的治疗方案,开展有效的化疗。

关键词:抗原胶体金法; 结核分枝杆菌; 非结核分枝杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.034 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)10-1274-03

结核病是结核分枝杆菌(TB)感染引起的严重危害人类健康的传染病。自 20 世纪 90 年代以来,结核病疫情出现“复燃”趋势^[1]。结核病防治面临两大难题,一是结核耐多药(MOR)的产生与传播,二是非结核分枝杆菌(NTM)发病率的增加。