

## • 论 著 •

## HBV-DNA 定量检测核酸提取过程中影响因素的探讨

彭瑛,温先勇,邓正华

(泸州医学院附属医院检验科,四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨浓缩液剂量、沉淀混匀方式和裂解煮沸时间等前处理因素对实时荧光定量 PCR 法检测乙型肝炎病毒 DNA(HBV-DNA)的影响。**方法** 在浓缩液分别为 90、95、105、110  $\mu\text{L}$ ;混匀方式分别为:漩涡混匀 15 s 组和 30 s 组,56 °C 预热 120 s 再漩涡混匀 15 s 组和 56 °C 预热 180 s 再漩涡混匀 15 s 组;裂解煮沸时间分别为:6,8,12,14 min 等条件下对 80 例自配的低值质控品,浓度在  $10^3 \sim 10^4 \text{ IU/mL}$  进行测定,并与标准操作即浓缩液 100  $\mu\text{L}$ ,镊子敲打混匀 15 s,裂解煮沸时间 10 min 比较。**结果** 漩涡混匀 15 s 组和 56 °C 预热 180 s 再漩涡混匀 15 s 与标准组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );煮沸裂解时间 6 min 组与 10 min 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 在一定范围内适当改变浓缩液剂量、混匀方式和煮沸裂解时间,不会影响检测结果。但经过一定时间预热处理后再振荡混匀的方式更容易使沉淀混匀和核酸的释放。

**关键词:**聚合酶链反应; 浓缩液; 振荡时间; 煮沸时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2156-02

## Explore the influence factors of hepatitis B virus DNA quantitative testing in nucleic acid extraction process

Peng Ying, Wen Xianyong, Deng Zhenghua

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the concentrated liquid doses, oscillation intensity and cracking boiling time to the influence of pre-treatment HBV-DNA. **Methods** The concentrate doses was 90, 95, 105, 110  $\mu\text{L}$  respectively; mixing methods: vortex mixing 15 seconds group and 30 seconds group, 56 °C preheated 120 seconds and then vortex mix 15 seconds group, 56 °C preheated 180 seconds and then swirl mix 15 seconds group; cracking boiling time was 6, 8 min, under 12 min, 14 min respectively. Under the above conditions, 80 samples prepared by the laboratory were measured, comparing with standard operating, concentrate 100  $\mu\text{L}$ , beat mix 15 seconds, cracking boiling 10 min, which HBV-DNA concentration was  $10^3 \sim 10^4 \text{ IU/mL}$ . **Results** Vortex mixing 15 s group and 56 °C preheat 180 s then swirl mixing 15 s were both a significant difference( $P < 0.05$ ) in the mix mode groups, comparing with the standard operating group. There were significant differences between the groups boiling lysis time of 6 min and 10 min group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Within a certain range, changing the dose of the concentrated solution, mixing mode and the time of boiling lysis in extraction process of HBV-DNA does not affect the test results. But mixing ways after a certain period preheating make it easier to mix precipitation and release nucleic acid.

**Key words:** polymerase chain reaction; concentrate dose; the time of oscillation; boiling time

我国属乙型肝炎病毒(HBV)感染高流行区,一般人群的 HBsAg 阳性率为 9.09%<sup>[1]</sup>。荧光定量 PCR 技术把 PCR、杂交及光谱技术融合,通过对荧光采集和分析达到了对原始模板定量的目的<sup>[2]</sup>。核酸 DNA 模板的提取过程是影响定量结果的关键环节,尤其对病毒水平较低的样本影响会更明显。针对临幊上普遍采用的沉淀煮沸提取核酸的方法,本实验拟用一组低浓度的样本对浓缩液剂量,振荡强和裂解煮沸时间等因素对测定结果的影响作一定探讨。

## 1 材料与方法

1.1 材料 80 例室内自配的低值质控品,浓度为  $10^3 \sim 10^4 \text{ IU/mL}$ 。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI7500fast 实时荧光定量 PCR 仪; SORVALL Biofuge PrimoR 低温高速离心机; XH-B 型漩涡混合器。HBV-DNA 定量检测试剂盒由凯杰生物工程有限公司提供。

## 1.3 方法

1.3.1 不同浓缩液 标准组(100  $\mu\text{L}$ )、90  $\mu\text{L}$  组、95  $\mu\text{L}$  组、105  $\mu\text{L}$  组、110  $\mu\text{L}$  组分别以 A0、A1、A2、A3、A4 表示,除浓缩液剂量不同外,其他均按说明书操作。

1.3.2 沉淀混匀方式 标准组(直接敲打混匀 15 s)、漩涡振

荡仪振荡 15 s 组和 30 s 组、56 °C 预热 120 s 再漩涡振荡 15 s 组,56 °C 预热 180 s 再漩涡振荡 15 s 组分别以 B0、B1、B2、B3、B4 表示,除混匀方式不同外,其他均按说明书操作。

1.3.3 裂解煮沸时间 标准组(10 min)、6 min 组、8 min 组、12 min 组、14 min 组分别以 C0、C1、C2、C3、C4 表示,除裂解煮沸时间不同外,其他均按说明书操作。

1.4 统计学处理 使用 SPSS17.0 进行配对 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 不同剂量浓缩液与标准方法测定结果 见表 1。不同浓缩液组定量结果分别与标准组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 不同剂量浓缩液测定结果比较表

组别	<i>n</i>	lg HBV-DNA( $\bar{x} \pm s$ )	<i>t</i>	<i>P</i>
A0	80	4.197 $\pm$ 0.193	—	—
A1	80	4.193 $\pm$ 0.152	0.121	0.904
A2	80	4.198 $\pm$ 0.138	-0.039	0.969
A3	80	4.199 $\pm$ 0.154	-0.053	0.958
A4	80	4.164 $\pm$ 0.176	1.180	0.242

—:无数据。

**2.2 不同混匀方式与标准方式测定结果** 见表 2。高速漩涡震荡混匀 15 s 组和 56 °C 预热 180 s 后再振荡 15 s 组分别与标准组比较, 差异都具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 其他组与标准组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 不同混匀方式与标准方式测定结果比较表

组别	<i>n</i>	lg HBV-DNA(±s)	<i>t</i>	<i>P</i>
B0	80	4.179±0.174	—	—
B1	80	4.124±0.187	2.063	0.042
B2	80	4.137±0.189	1.554	0.124
B3	80	4.200±0.163	-0.740	0.462
B4	80	4.232±0.160	-2.100	0.039

—: 无数据。

**2.3 不同裂解时间与标准方法测定结果** 见表 3。6 min 组和标准组煮沸裂解提取 HBV-DNA 扩增结果有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 3 不同裂解时间与标准方法测定结果比较表

组别	<i>n</i>	lg HBV-DNA(±s)	<i>t</i>	<i>P</i>
C0	80	4.204±0.154	—	—
C1	80	4.133±0.161	3.217	0.002
C2	80	4.196±0.137	0.365	0.716
C3	80	4.231±0.166	-1.107	0.272
C4	80	4.220±0.170	-0.659	0.512

—: 无数据。

### 3 讨 论

实时荧光定量 PCR 技术能正确反映患者体内的 HBV 感染和治疗恢复情况, 指导临床医生诊疗<sup>[3]</sup>。该方法采用完全闭管检测, 不需 PCR 后处理, 避免了交叉污染, 定量准确性极高, 是检测 HBV 和其他传染病的新技术<sup>[4]</sup>。但其影响 PCR 因素很多, 除了原理及反应体系外, 核酸提取、标本因素(如溶血、黄疸、脂血)对检测结果产生一定影响<sup>[5]</sup>。较多研究结果显示, 标本溶血、黄疸、脂血对荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 均无干扰( $P > 0.05$ )<sup>[6-9]</sup>。本实验本着结果准确、方便操作的原则, 探讨浓缩液量、沉淀混匀方式、煮沸裂解时间等核酸提取的关键因素对 HBV-DNA 检测结果的影响。现分别做以下分析。

**浓缩液量:**浓缩液由于本身比较黏稠, 如果加样枪使用不标准或不熟练, 在加入检测管的过程中往往造成加入量的不足或者增加, 这一情况常常发生在刚进入临床实习学生或刚进入临床的工作者身上, 由此而造成的结果影响目前尚不知道, 因此本实验在其他条件不变的情况下, 改变浓缩液的剂量进行样本测试。在标准操作管中加入 100  $\mu$ L 浓缩液和 90、95、105、110  $\mu$ L 浓缩液四个组分别进行测定, 检验结果经统计学分析, 结果在 90~110  $\mu$ L 范围内, 减少和增加浓缩液的量(±10  $\mu$ L)对测定结果造成的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但从结果发现增加和减少 5  $\mu$ L 组与标准组的均值最接近。该结果提示在保证严格按照说明书操作的情况下, 适当增减浓缩液的剂量不会造成结果的影响。

**混匀方式:**虽然敲打混匀容易让沉淀彻底溶解, 但是该方法容易使 EP 管破裂造成污染等缺陷, 且敲打力度和敲打时间在不同操作技术人员间有较大差异, 不利于操作的规范化。而利用高速漩涡振荡仪是克服这一缺陷的可行方法之一, 且时间

和强度可控, 检测管底部受力均匀。但在工作中发现往往在沉淀水平比较高的情况下该方法很难让沉淀完全溶解。所以本实验依据加热可使物质的溶解度增加的原理, 选择了 56 °C 这个温度点, 不会造成蛋白质变性, 而且有利于沉淀的裂解。采用了在 XH-B 型高速漩涡混合器上振荡 15 s、30 s、56 °C 预热 120 s 再振荡 15 s、56 °C 预热 180 s 再振荡 15 s 四组, 与标准组敲打混匀测定结果比较, 结果发现漩涡混匀 15 s 结果比敲打混匀组偏低( $P < 0.05$ ), 延长漩涡混匀时间或者 56 °C 预热后再漩涡混匀能加强沉淀的溶解, 56 °C 预热 180 s 再振荡 15 s 组, 沉淀溶解更完全, 有利于核酸的释放, 与标准组比较均值增大( $P < 0.05$ )。故可以认为该组操作可作为敲打混匀的替代操作之一。

**煮沸时间:**在工作中, 由于某些原因往往会发生煮沸时间不够或煮沸时间过长的现象, 其对结果有无影响及影响的程度还不清楚。因此选择了金属浴裂解 6、8、12、14 min 四组标本, 与标准测定组 10 min 比较, 6 min 组的结果普遍偏低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 与王家银<sup>[10]</sup>报道的结果不一致, 可能是由于标本量或反应环境不一致造成的。该实验说明了煮沸时间不够, 病毒量释放不完全, 会使检测结果偏低。同时也说明适当延长煮沸裂解时间有利于 HBV-DNA 的裂解, 但是煮沸时间太长, 会导致液体的蒸发, 带走一定的病毒量, 也会造成结果降低。

综上所述, 由凯杰生物工程有限公司提供的 HBV-DNA 定量检测试剂盒的核酸提取过程中, 浓缩剂量减少或增加±10  $\mu$ L, 金属浴裂解煮沸 8~14 min, 不会造成结果的影响。对于混匀方式, 56 °C 预热后再漩涡混匀能使沉淀完全溶解和病毒的释放。但由于经费的原因, 本实验在选取材料方面采用自制低值质控品来评价核酸提取方法, 不能评价各种方法的正确度, 所以存在存在一定的缺陷。如经费允许, 宜采用标准品进行试验更好些。

### 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. 肝脏, 2005, 10(4): 348-357.
- [2] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [3] 周维霞, 陈红艳, 马瑞宣. PCR 体外扩增法和 SPRIA 法在乙肝病毒检测中的运用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(5): 305.
- [4] 韩梅, 侯佩强, 张雪峰. 三种乙肝病毒检测方法相互关系的研究 [J]. 医学检验与临床, 2008, 19(5): 69-70.
- [5] 郑建中, 王青, 王凤华. 标本因素对荧光定量 PCR 法测定乙肝病毒 DNA 的影响 [J]. 医学检验与临床, 2008, 19(5): 58-59.
- [6] 郝维敏, 刘杰, 杨晓春. 标本因素对荧光定量 PCR 检测 HV-DNA 的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 2011, 36(3): 295-297.
- [7] 喻晶, 曾南阳, 吴夏枫, 等. 溶血对检测不同含量乙肝病毒 DNA 干扰作用的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(6): 78-81.
- [8] 尹琦, 徐玉蝉. 影响 HBV DNA 测定的标本因素 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26(2): 133-134.
- [9] 高峰, 高慧华, 杨学文. 脂血因素对荧光定量 PCR 乙型肝炎病毒 DNA 的影响及解决措施 [J]. 临床检验杂志, 2007, 25(5): 359-360.
- [10] 王家银. 沉淀煮沸法提取方法对血清 HBV-DNA 荧光定量检测的影响 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1165-1167.