

racycline resistance among methicillin-resistant staphylococcus aureus strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia[J]. Indian J Med Microbiol, 2012, 30(2): 203-207.

[30] MARKHAM P N, NEYFAKH A A. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11): 2673-2674.

[31] HUET A A, RAYGADA J L, MENDIRATTA K, et al. Multidrug efflux pump overexpression in Staphylococcus aureus after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes[J]. Microbiology, 2008, 154(10): 3144-

3153.

[32] 冯俊明, 夏培元, 肖光夏, 等. 烧伤创面耐药金黄色葡萄球菌的分离及其 norA 基因突变分析[J]. 中华创伤杂志, 2011, 27(3): 275-279.

[33] SAIFUL A J, MASTURA M, ZARIZAL S, et al. Efflux genes and active efflux activity detection in Malaysian clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) [J]. J Basic Microbiol, 2008, 48(4): 245-251.

(收稿日期:2017-08-20 修回日期:2017-10-26)

· 综述 ·

实时荧光定量 PCR 检测临床标本的前处理方法研究进展

王 玮, 鲁清月, 李振红, 高利飞, 杜 美, 付光宇

(郑州安图生物工程股份有限公司, 河南郑州 450016)

摘要:PCR 检测技术中, 生物标本的前处理单靠一种方法也往往难以实现全覆盖、快速分析的要求, 需要多种前处理方法相结合来满足 PCR 检测的需求。目前, 临床 PCR 检测标本前处理研究缺乏统一的标准操作规程, 大多数都是根据商品 PCR 检测试剂盒厂家提供的说明书要求进行操作。各个常见病原体的实时荧光定量 PCR 检测项目采用了不同类型临床标本, 本文对这些不同标本的检测前处理方法进行了总结。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 检测前处理; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.022

文章编号: 1673-4130(2018)03-0333-04

中图法分类号: R446.1

文献标识码: A

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 与常规 PCR 相比, 它具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、自动化程度高、全封闭反应等优点, 现已成为分子生物学研究中的重要工具^[1]。近年来, 实时荧光定量 PCR 技术在临床病原体检测领域的应用越来越广泛, 但多种类型临床标本中存在的 PCR 抑制物可能影响检测结果的准确性, 如粪便标本中的胆盐、多聚糖, 血液标本中的亚铁血红素、血红蛋白、IgG, 尿液中的尿酸、尿素等都具有抑制 PCR 的作用。目前, 临幊上一般对 PCR 检测标本进行预处理, 以减少 PCR 抑制物对检测结果的影响。多种类型临床标本的不同前处理方式对后续 PCR 检测结果的影响较大, 如何在降低对 PCR 的抑制的同时保持检测的特异性至关重要。实时荧光定量 PCR 检测常常被用在临幊常见传染性性疾病的检测中, 不同检测项目对应不同类型的标本, 见表 1。本文对这些不同标本的检测前处理方法进行了总结。

1 血液前处理方法

血液是实时荧光定量 PCR 检测中重要的体液标本, 较其他标本类型成分更为复杂。血液标本类型包括血清、血浆和全血, 目前临幊应用定量 PCR 法检测

病毒性肝炎, 如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)等均采用血清或血浆标本。利用多种荧光定量 PCR 法可同时检测血清、血浆中 HBV、HCV 病毒水平^[2]。针对检测项目的不同血清、血浆标本类型对应的采血管也不同, 共分为普通血清管、促凝管、分离胶管、EDTA 管、枸橼酸钠管 5 种采血管, 不同采血管对应的标准前处理方式见表 2。

由于肝素是一种非特异的核糖核酸酶抑制剂, 不能通过核酸提取过程将其去除, 所以对后续 PCR 扩增检测有严重干扰。研究发现, 1 000 U/ml 肝素对荧光定量 PCR 检测确实有明显的抑制作用^[3], 所以肝素钠采血管对于定量 PCR 标本不适用。

现代医学技术快速发展, 核酸 PCR 扩增技术在我国血站中的应用也越来越广泛, 该技术能让酶免疫检测方式的窗口期有效缩短, 有效检出各种因素引起的漏检, 让输血感染病毒的概率降低^[4]。一般情况下, 在血液筛查传染病检测中, 针对传统的核酸提取方法, 例如氯仿抽提, 醇试剂沉淀等方法, 对全血标本直接病毒核酸提取, 不对标本进行前处理, 但血液中的胆红素、血红蛋白对后续扩增有一定的影响^[5], 特别是脂血、溶血对定量 PCR 检测低浓度病原体标本影响很大^[6]。所以文献中也报道了不同病毒核酸提

取,血液标本前处理过程。蔡桂君等^[7]报道利用淋巴细胞分离液分离全血中淋巴细胞提取人类疱疹病毒4型(EB病毒)核酸,处理过程为取1mL全血标本加入等量无菌生理盐水稀释,加入2mL淋巴细胞分离液,按试剂操作说明书,2500r/min离心15min,小心吸取全部红细胞表面的白色细胞层,将白细胞层直接用于核酸提取。张姝等^[8]报道向全血标本加入5倍体积红细胞裂解液,10min后离心,弃上清,重复裂解1次,收集白细胞于200μL生理盐水成白细胞悬液后,提取白细胞中人巨细胞病毒(HCMV)病毒核酸。两种全血标本前处理方法均与全血血浆定量PCR检测结果对比,发现处理后明显高于未处理标本结果,且两种前处理过程中均能有效消除胆红素与血红素对定量PCR的影响。

2 痰液标本前处理方法

目前临幊上痰液标本主要用于检测结核分枝杆菌,痰液成分较复杂,主要包含黏液、异物、病原微生物,各种炎症细胞及坏死脱落的黏膜上皮细胞等成分,由于痰中黏蛋白、酸性糖蛋白、Ca²⁺水平高,导致痰液黏稠度很高,所以痰液在参与核酸提取前需要进

行特殊的前处理,才能够参与后续PCR扩增。

表1 常见传染性疾病实时荧光定量PCR检测的主要标本类型

主要标本类型	项目
血清/血浆	HBV HCV 人免疫缺陷病毒(HIV)
全血	血液筛查
分泌物拭子	人乳头瘤病毒(HPV) 淋球菌(CT) 沙眼衣原体(NG) 解脲支原体(UU) 呼吸道病毒 B族链球菌(GBS)
尿液、全血、血清/血浆、乳汁	HCMV
全血、血清/血浆	EB病毒
痰液	结核分枝杆菌(MTB)
粪便	肠道病毒(EV71、CA16)

表2 临床不同采血管的标准前处理方法

采血管类型	标本前处理方法
普通管	静置60min或放置于37℃温箱或水浴锅30min,离心(离心机有效半径15cm,3000r/min,10min)
促凝管	轻轻颠倒混匀5次,静置30min,离心(离心机有效半径15cm,3000r/min,10min)
分离胶管	轻轻颠倒混匀5次,采样后静置30min,离心(离心机有效半径15cm,3000r/min,10min)
EDTA管	轻轻颠倒混匀6~10次,离心(离心机有效半径15cm,3500r/min,10min)
枸橼酸钠管	轻轻颠倒混匀3~4次,离心(离心机有效半径15cm,3500r/min,10min)

有研究报道,痰液前处理方法在PCR检测技术上多种多样。邬小薇报道^[9]向收集的痰液标本中加入等体积的4%NaOH碱溶液,37℃液化30min左右,取一定体积液化后的痰液标本进行离心,弃上清留沉淀,用1mL生理盐水清洗沉淀2次后,沉淀直接用于病原体核酸提取,后续参与PCR扩增检测。有学者报道了4种对痰液处理的方法,其中除了NaOH液化痰液方法外,还提到:(1)将Saccomanno溶液(每50mL固定液中含50%乙醇48mL,2%PEG1mL,0.3%利福平1mL)和二硫苏糖醇(DTT)液(0.1gDTT、0.78gNaCl、0.02gKCl、0.112gNa₂PO₄、0.02gKH₂PO₄,加水至2L,使DTT浓度为0.005%)等体积混合,1~2倍体积加入到痰液中,振摇液化30min后备用;(2)痰液用1~2倍体积液化剂(0.5%N-乙酸-L半胱氨酸、1.45%枸橼酸钠、2%氢氧化钠)振摇液化30min,经过PBS缓冲液清洗2遍后,离心弃上清,沉淀直接参与DNA核酸提取^[10]。同时文岚等^[11]报道,利用10%DTT法、0.25%Trypsin法

和400 U/mL Chymotrysin法对临床痰液进行前处理,处理过程简单为痰液标本加入1~2倍体积处理液,37℃孵育30min,离心弃上清,沉淀直接用于DNA核酸提取。

除了文献报道的关于痰液处理液及前处理过程外,多项专利中也提到多种痰液处理液配方。迟大利等^[12]申请专利中提到,痰液处理液成分为1%(w/v)PEG,0.6 mmol/L DTT、13.4 mmol/L NaCl、0.3 mmol/L KCl、1 mmol/L Na₂HPO₄、1 mmol/L KH₂PO₄、50 mmol/L EDTA、0.1% (v/v) TritonX-100、10 mmol/L Tris-HCl(pH值为8.0)。何拥军等^[13]申请的痰液处理液主要由醇类、双蒸水、氯化钠、磷酸盐、灭菌剂苯酚和黏液分解剂组成,醇类占处理液总体积的15%~30%,双蒸水补充不足的处理液体积。按100mL计算,痰液处理液中氯化钠0.5~2.5g,磷酸盐0.1~3.0g,苯酚1.0g,黏液分解剂1.0~3.0g。其中黏液分解剂描述为从动物气管、软组织中提取的一种中性黏多糖肽,此种黏多糖肽

85% 为 B 型, 其余 10% 为 A 型和 C 型。黏液分解肽为白色结晶性粉末、无臭, 理化性质稳定, 其药理功能为加速呼吸道黏液的分解, 缓解症状。郭严等^[14]专利中描述痰液处理液由两种溶液 A、B 按照 7 : 12 混合搅拌 10 min 后使用, 其中 A 液取蒸馏水 65 mL, 放入量杯中, 量取硼酸 0.6 g、EDTA 二钠 0.1 g、SDS 0.1 g, 分别加入量杯中搅拌 10 min 充分溶解; B 液取无水乙醇 10 mL、异丙醇 20 mL、黏液溶解剂 5 mL 加入量杯中搅拌 10 min 混匀。

综合文献及专利报道, 不同前处理试剂及方法处理痰液对于 PCR 检测结核杆菌 DNA 核酸效果各不相同, 提取的 DNA 模板浓度和纯度只能作为参考的指标而不应作为决定性的指标, 最终的扩增结果在评价中将起着更为重要的作用。

3 分泌物拭子标本前处理方法

分泌物拭子标本一般用于临床性传播疾病病原体的检测, 如单纯疱疹病毒Ⅱ型、HPV、NG、UU、奈瑟淋病双球菌等。临床对分泌物拭子标本处理过程较为简单, 基本过程为向采取后的拭子标本中加入 0.5~1 mL 无菌生理盐水, 涡旋震荡混匀后, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 取沉淀参与后续核酸提取及 PCR 扩增过程^[15]。

4 体液(尿液、乳汁、胸腔积液、腹水、脑脊液、肺泡灌洗液)标本前处理方法

体液标本类型较多, 临床常见标本类型有尿液、乳汁、胸腔积液、腹水、脑脊液、肺泡灌洗液等, 常见检测项目为 MTB、HCMV、HBV、呼吸道病原体(肺炎支原体、军团菌等)及其他细菌类等。并且根据文献中的报道, 将收集到的体液标本经过离心, 弃上清, 留取沉淀直接参与核酸提取^[16~20]。根据核酸提取试剂厂家或原理的不同, 体液也可直接抽取标本用于核酸提取, 然后经 PCR 扩增进行检测^[18]。但是一些特殊标本例如乳汁, 由于乳汁中成分较为复杂, 富含脂肪、蛋白质及乳糖, 需要经过离心后, 选取中层乳清为检测标本参与核酸提取及 PCR 扩增过程^[19]。

5 粪便标本前处理方法

临床 PCR 技术利用粪便标本在细菌及肠道病毒检测比较常见, 但是粪便标本中的胆盐、多聚糖对 PCR 具有一定的抑制作用。通常情况下, 获取的粪便标本需要经过前处理后, 才能够进行核酸提取。多篇文献报道了关于核酸提取前粪便标本的前处理过程, 一般采集获取后的粪便加入生理盐水或 PBS 缓冲液制备成重悬液后提取核酸^[21], 也可离心后留取沉淀^[22]或上清^[23], 甚至配合厂家试剂直接取粪便标本进行核酸提取^[24]。其中也有特殊的前处理过程, 李万水等^[25]报道, 方法 1: 取 100 mg 粪便, 悬于 1 mL TNE (10 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA pH8.0) 溶液中, 13 000 r/min 离心 3 min, 不要搅动沉淀物, 小心地吸去上清, 用刀片

或吸头刮取固体残渣表面的一层白色物质, 移入干净的离心管中, 按照厂家试剂盒说明书进行核酸提取。方法 2: 取 100 mg 粪便, 悬于 500 μL 磁珠裂解液中, 56 °C 保温 1 h, 13 000 r/min 离心 3 min, 吸取上清, 移入干净的离心管中, 再加入等体积的裂解液, 加入 7 μL 磁珠, 最后用 50 μL 去离子水洗脱, 之后直接进行 PCR 扩增检测。

6 小 结

总之, 临床生物标本所含化合物种类繁多、极性跨度大, 既有高浓度的血红蛋白、黏蛋白、尿素等, 也有低极性的脂类、胆固醇类等成分。在提取核酸前不仅需要除去或减少对实时荧光定量 PCR 扩增的干扰和污染物质, 同时还要保证核酸高纯度, 高浓度的提取。相信随着前处理技术的不断创新, 前处理条件的不断优化以及不同厂家 PCR 检测试剂盒的创新及自动化的发展, 生物标本的前处理会更简便、全面、高效。

参考文献

- [1] 钟江华, 张光萍, 柳小英. 实时荧光定量 PCR 技术的研究进展与应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2011, 33(2): 68~72.
- [2] 何英, 吴正林, 吴润香, 等. 多重 PCR 技术检测病毒性肝炎相关病毒的研究[J]. 中国热带医学, 2011, 11(5): 536~539.
- [3] 陶志华, 谢耀盛, 周武, 等. 不同标本对荧光实时定量 PCR 法测定 HBV-DNA 结果的影响[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(6): 345~346.
- [4] 彭小华, 李丽平, 欧阳刚, 等. 核酸检测技术在血液筛查中的应用研究[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(6): 717~720.
- [5] 崔蕾蕾, 邵可可, 左月媛. 胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(3): 283~285.
- [6] 刘小敏, 唐恒锋, 李文郎, 等. 高脂血、溶血标本对荧光定量聚合酶链反应测定低水平 HBV-DNA 的影响[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(21): 3217~3218.
- [7] 蔡桂君, 王瑞莲, 赵崇泉, 等. 淋巴细胞与血浆 EB 病毒核酸检测定量结果的关系[J]. 广东医学, 2014, 35(17): 2704~2706.
- [8] 张姝, 胡娅莉, 石佳靓, 等. 巢式 PCR 检测外周血血浆和白细胞中人巨细胞病毒核酸[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5): 11~14.
- [9] 邬小微. 3 种方法检测结核分枝杆菌的比较[J]. 重庆医学, 2005, 34(10): 1506~1507.
- [10] 张军力, 托娅, 王育民. 不同的液化方法对痰液 DNA 提取效果比较[J]. 检验医学, 2009, 24(6): 456~458.
- [11] 文岚, 张兵, 郭彦昌, 等. 5 种前处理方法对痰中结核分枝杆菌 DNA 提取的影响[J]. 实用预防医学, 2013, 20(9): 1056~1059.
- [12] 迟大利, 吴大治, 夏懿, 等. 一种用于检测痰液中细菌的探针、试剂盒和方法: CN105483251A[P]. 2016-04-13.
- [13] 何拥军, 谢敏浩, 戴军, 等. 一种痰液液基处理液: CN101988875A[P]. 2011-03-23. (下转第 379 页)

其父亲、儿子的 ABO 等位基因第 7 外显子在 B₁₀₁ 基础上发生 695T>C 突变。比对人类血型抗原基因突变数据库,该等位基因为 B_{w11}。ABO 亚型的变异基础是基因改变,本研究发现不同的基因类型可表现出不同的血清学类别,同种血清学类别中都可包含了多种不同的基因类型。根据家系遗传背景分析证实先证者的 B 基因的突变来源于父亲,并遗传给儿子。学者们研究发现同种血清学类别中都可包含了多种不同的基因类型,如 B_x 可有不同的突变位点 905A>G、695T>C、588C>G 等^[9-10]。因为血清学表现存在个体差异,所以相同的基因型可产生略有不同的血清学结果。另外血清学检测也容易受主观因素的影响,因此单纯用血清学方法确定 ABO 亚型无法做到精确。向东^[8]建议最好能够应用基因定型方法进行确认,进行核苷酸测序可直接获知特定亚型基因。但分子生物学检测具有费用昂贵、耗时长等缺点,随着检测技术的发展和提高,相信分子生物学检测会越来越多应用在临床。谭淑玲等^[4]学者对如何提高对 B 亚型的正确鉴定提出了 6 点建议。这几点建议适用于 ABO 血型及亚型的鉴定中,需要强调的是必须严谨对待实验结果,当实验结果与标准有丝毫相异时应寻找更先进的检测手段去确证,如分子生物学手段进行鉴定。

先证者的交叉配血结果因与 B 型红细胞相合容易让临床输注 B 型红细胞,但亚型患者输血原则是在没有不规则抗-A 或抗-B 的情况下,尽可能选择同型输注;如果难以找到同亚型血源,或患者血浆中含有不规则抗-A 或抗-B,则选择 O 型洗涤红细胞进行输注。ABO 亚型受血者输入血浆及冷沉淀时应选择 AB 型或亚型对应的正常血型,但输入血小板时,只能

(上接第 335 页)

- [14] 郭严,顾兵,沈翰,等.一种用于结核杆菌检测的痰液处理液:CN105274185A[P]. 2016-01-27.
- [15] 蔡兰,邹先进,罗凯.实时荧光定量 PCR 检测常见性传播疾病病原体基因[J].中国优生与遗传杂志,2001,9(1):27-28.
- [16] 葛蕾,王进雅,诸留珍,等.荧光定量 PCR 法检测儿童肺泡灌洗液肺炎支原体 DNA 的临床意义[J].江苏医药,2016,42(10):1177-1178.
- [17] 袁春,黄长形,连建奇. PCR 测肝硬化腹水中细菌 DNA 的研究[J].透析与人工器官,2007,18(1):20-24.
- [18] 李国玉,陈勇,陈金弟,等.乳汁前处理对乙型肝炎病毒 DNA 检测结果的影响[J].国际检验医学杂志,2011,32(7):802-803.
- [19] 祝兴元,覃亚斌,刘云花,等.巨细胞病毒潜伏感染在母婴及乳汁传播中的影响[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(9):36-37.
- [20] 洪玲,魏艳.荧光定量 PCR 法与涂片抗酸染色检测胸水

选择亚型对应的正常血型,因为输入血小板的同时会有较多血浆(每治疗量约 200 mL)输入,输入 O 型或 AB 型分别可能致血浆中的抗体或血小板上 AB 抗原与受血者不相容。为确保输血的安全,正确分析血型是关键的步骤。当出现正反定型不符时,应该结合血清学及分子生物学方法正确判定血型,进而保障患者的输血安全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部.中国输血技术操作规程(血站部分)[M].天津:天津科学技术出版社,1997.
- [2] 骆宏,林健伟,林树德,等.类孟买血型两例的分子遗传机制研究[J].中华检验医学杂志,2012,35(9):815-819.
- [3] 胡丽华.临床输血血检验[M].北京:人民卫生出版社,2015.
- [4] 谭淑玲,周先果,申卫东.B 亚型血型 9 例血清学特征及鉴定方法[J].广西医学,2012,34(8):1004-1005.
- [5] 孙晓琳,关晓珍,于洋,等.36 例 ABO 血型亚型检测及血清学分析[J].临床输血与检验,2012,14(3):215-218.
- [6] 郭俊勇,郭如华,刘玉振,等.罕见的 Bel 亚型及其家系调查[J].中国输血杂志,2007,20(1):60-61.
- [7] 陈尚良,曾月婷,廖扬勋,等.Bel 亚型伴冷凝集误判为 O 型 1 例[J].临床输血与检验,2011,13(2):180-182.
- [8] 向东.ABO 亚型的检测[J].中国输血杂志,2010,23(8):577-580.
- [9] 苏宇清,喻琼,梁延连,等.罕见 B 放散型分子遗传背景的分析[J].中国输血杂志,2009,22(6):446-449.
- [10] 韩斌,刘培燕,刘晓华,等.三例 Bx02 亚型的血清学及分子生物学研究[J].中华医学遗传学杂志,2017,34(1):65-67.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)

结核杆菌方法比较[J].大家健康,2014,8(11):54.

- [21] 贾力.实时荧光定量 PCR 检测 EV71 肠道病毒在不同类型样本中检测率的分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(5):1092-1094.
- [22] 黄慧谦,吴驰,陈建波,等.实时荧光 PCR 检测儿童肺结核粪便中 Mtb-DNA 的效果评价[J].中国防痨杂志,2012,34(5):315-318.
- [23] 戴二黑,李京湘,杜宗敏,等.逆转录套式 PCR 检测粪便样本中的 SARS 冠状病毒[J].微生物学免疫学进展,2004,32(4):22-25.
- [24] 王海,周蕾,张永乐,等.实时荧光定量 PCR 检测手足口病肠道病毒 71 型与柯萨奇病毒 16 型临床分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(24):6074-6075.
- [25] 李万水,陈松,涂政.粪便 DNA 提取及检验[J].中国法医学杂志,2004,19(4):219-221.

(收稿日期:2017-08-20 修回日期:2017-10-26)