

• 检验技术与方法 •

沉淀煮沸法不同提取条件对血清 HBV-DNA 扩增结果的影响

崔海丽¹, 张全意²

(山东省滨州医学院附属医院:1. 中心实验室;2. 麻醉科 256603)

摘要:目的 探讨沉淀煮沸法不同提取条件对血清 HBV-DNA 扩增结果的影响,筛选出适合临床实验室提取样本 DNA 的方法。方法 分别比较将沉淀煮沸不同时间、沉淀打散与否以及蒸气浴和沸水浴 3 种不同操作条件下提取的 DNA 对荧光扩增结果的影响。结果 将沉淀分别煮沸 5、10、15 min,其所提取的 DNA 的扩增结果之间无显著性差异, $P > 0.05$; 将沉淀打散后所提取的 DNA,其扩增结果明显高于沉淀未打散的扩增结果, $P < 0.01$; 蒸气浴 10 min 提取的 DNA 的扩增结果明显低于沸水浴 10 min 提取的 DNA, $P < 0.01$ 。结论 在提取血清 HBV-DNA 时,在加入提取液 2 后应将沉淀打散,并且应将 Eppendorf 管的管底置于沸水中加热,煮沸时间在特殊情况下可以缩短,5 min 即可。

关键词: 肝炎病毒,乙型; DNA; 提取法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0459-02

血液中乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)DNA 的含量是乙型病毒性肝炎(简称乙肝)判断患者病情和治疗效果的重要指标^[1-2],对临床上抗病毒药物的选择和判断疾病的预后具有一定的临床价值^[3]。血清中 HBV-DNA 模板的提取方法有多种^[4],其中沉淀煮沸法是常用的方法之一。该方法需要在血清标本中加入等量的提取液 1,混匀后高速离心 10 min,然后吸走上清液,留下沉淀再加入提取液 2 进行 DNA 提取。该方法的优点是提取率高^[5-6],但是因为操作步骤较多,不同的提取条件有可能对 DNA 扩增结果产生影响。本文分别比较了不同煮沸时间、沉淀打散与否以及蒸气浴与沸水浴 3 种不同操作条件下提取的 DNA 对荧光扩增结果的影响,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本 本实验室自制标准血清,靶值为 5.0×10^5 copy/mL。

1.2 试剂 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒由深圳匹基生物工程股份有限公司提供。

1.3 仪器 恒温水浴箱, ROTOR-GENE3000 扩增仪。

1.4 血清 HBV-DNA 提取 (1)常规提取 DNA:取 100 μ L 的血清样本,加入等量的提取液 1,混匀,13 000 r/min 离心 10 min。去上清液,沉淀中加入 25 μ L 提取液 2,沸水浴 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,上清液备用。(2)不同煮沸时间提取 DNA:取 3 份血清样本,沸水浴时间分别为 5、10、15 min,其余同方法(1)。(3)沉淀打开后提取 DNA:取 1 份血清样本,将沉淀在试管架上划动 5 次后再加入提取液 2,其余同方法(1)。(4)蒸气浴提取 DNA:取 1 份血清样本,加入提取液 2 后将 Eppendorf 管置于沸水蒸气中 10 min,管底不接触水,其余同方法(1)。以上各种不同提取条件的样本各重复进行 10 次。

1.5 数据分析 将 HBV-DNA 含量的拷贝数转换成对数值后以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 常规提取 DNA 的扩增结果的平均值为 5.32×10^5 copy/mL。

2.2 不同煮沸时间提取的 DNA 的扩增结果见表 1。三者两两比较,其结果之间差异均无统计学意义, $P > 0.05$ 。

2.3 在加入提取液 2 后,若将沉淀打散,其扩增结果与沉淀未

打散的扩增结果相比具有显著性差异, $P < 0.01$,结果见表 2。

表 1 不同煮沸时间提取的 DNA 的扩增结果

方法	煮沸时间		
	5 min	10 min	15 min
扩增结果	5.68±0.13	5.71±0.12	5.73±0.07

表 2 沉淀打散与否提取的 DNA 的扩增结果

方法	沉淀	
	打散	不打散
扩增结果	6.11±0.19	5.71±0.12

2.4 蒸气浴与沸水浴各 10 min 所提取的 DNA 的扩增结果见表 3,其结果之间具有显著性差异, $P < 0.01$ 。

表 3 蒸气浴与沸水浴提取的 DNA 的扩增结果

方法	沉淀	
	蒸气浴	沸水浴
扩增结果	5.50±0.07	5.71±0.12

3 讨论

本实验结果表明,加入提取液 2 后将沉淀分别煮沸 5、10、15 min,其结果之间两两比较,差异均无统计学意义。这说明,在 5~15 min 这个范围内,煮沸时间对 DNA 模板的提取影响不大,这与王家银^[7]的研究结果一致。煮沸 5 min 已经能够将 DNA 提取得比较完全。

将沉淀打散后再加入提取液 2,液体将较容易地渗入沉淀内部,使二者充分接触,这样也利于 DNA 的充分提取。

本实验中蒸气浴 10 min 提取的 DNA 的扩增结果要低于沸水浴 10 min 的结果。同样是 100 °C 的环境,但结果却相差很大,原因在于,蒸气浴是将 Eppendorf 管置于沸水蒸气中,热量的传导介质是空气,而沸水浴是水与管底直接接触,热量的传导介质是水。而空气的导热能力要远低于水的导热能力,所以蒸气浴时 Eppendorf 管中的沉淀升温较慢,在 10 min 的时间内,沉淀不能得到充分的加热,因而提取的 DNA 也不够

完全。

实时荧光定量 PCR 检测有较高的灵敏度和特异性^[8],是目前检测 HBV-DNA 最常采用的方法^[9-10]。除了适宜的检测方法,恰当的 DNA 提取方法也是对体内病毒进行准确定量的关键因素。应用沉淀煮沸法提取 DNA 时因操作步骤较多,所以影响因素也较多,只有把握好每一步的操作原则,消除各影响因素,才能得到准确的检测结果。

参考文献

[1] 张韶斌,陈斯亮,罗莞超,等. 200 例 HBeAg 阳性血清样本的 HBV-DNA 分析[J]. 广东医学院学报,2008,26(4):447-448.

[2] Rokuhara A, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen; a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment [J]. J Viral Hepat, 2003, 10(4): 324.

[3] 周丹. 乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 检测在临床诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2271-2272.

[4] 李成德,黄晓佳,陈雄毅. 不同核酸提取方法在 HBV-DNA 荧光定量检测中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1361-

1363.

[5] 陈晓东,陶志华. 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(2): 212-214.

[6] 郭龙华,董长垣,高婧,等. 一种从血清标本中快速提取 HBV DNA 方法的建立[J]. 武汉大学学报(医学版), 2005, 26(3): 332-335.

[7] 王家银. 沉淀煮沸提取方法对血清 HBV DNA 荧光定量检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1165.

[8] Jordi R, Rodriguez F, Buti M, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay[J]. J Viral Hepat, 2001, 8(3): 465-471.

[9] 程钢,何蕴韶,周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(2): 135-138.

[10] Ho SK, Yam WC, Leung et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(2): 397.

(收稿日期:2011-10-04)

• 检验技术与方法 •

高危人乳头瘤病毒检测在实时多重荧光核酸扩增技术中的意义

杜娟,李晓强[△],刘跃

(湖北医药学院附属太和医院检验部,湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨实时多重荧光聚合酶链反应(PCR)检测宫颈脱落细胞内高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染的临床意义,建立快速、准确、适于推广的检测方法。**方法** 采用实时多重荧光 PCR 技术检测 1 560 例宫颈脱落细胞高危型 HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)感染状况。**结果** 1 560 例患者高危型 HPV 阳性率为 21%(327/1 560)。其中宫颈炎、湿疣、LSIL、HSIL、鳞状细胞癌患者的高危型 HPV 阳性率分别为 10.3%、28.4%、21.6%、35.2%和 88.9%。**结论** 实时多重荧光 PCR 技术检测宫颈脱落细胞内高危型 HPV 感染,具有快速、简便、灵敏、不易污染等优点,适用于大规模筛查和高危型 HPV 持续感染监测。

关键词:人乳头瘤病毒; 聚合酶链反应; 宫颈脱落细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0460-02

人乳头瘤病毒(HPV)是一种双链小 DNA 病毒(约 8kb),目前已鉴定出 100 余种亚型,其中感染生殖道的亚型有近 30 种,依其致病性不同分为高危型(HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 等)和低危型(HPV6、11、42、44 等)两大类^[1]。高危型 HPV 持续感染与宫颈上皮内瘤变(CIN)及宫颈癌发病密切相关,检测高危型 HPV 对宫颈癌的筛查和预防具有十分重要的意义^[2-3]。我们采用实时多重荧光聚合酶链反应(PCR),检测宫颈脱落细胞高危型 HPV 感染,以便建立一种快速、准确、适于推广的高危型 HPV 检测方法,为临床提供一种有效的辅助诊断依据,实现宫颈癌的早期筛查、及时治疗,提高治愈率。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 该我院妇科门诊患者共 1 560 例,年龄 17~69 岁。

1.1.2 仪器与试剂 罗氏 Lightcycle 实时荧光 PCR 仪(瑞

士), HPV 荧光 PCR 检测试剂盒由港龙生物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞标本收集 检查前 3 天不做阴道冲洗,不使用阴道内药物,24 h 内禁止性行为,并在非经期检查。检查时无菌棉拭子置于宫颈口处逆时针转 3 圈,停留 10 秒,取得脱落细胞,放入含 1 mL 无菌生理盐水的样品管中,充分漂洗后,棉拭子贴壁挤干丢弃。13 000r/min 离心 10 min,弃去上清液,保留管底沉淀提取 DNA。

1.2.2 DNA 提取 在标本沉淀物中加入 DNA 提取液 50 μL,振荡混匀,100 °C 加热 10 min,13 000 rpm 离心 10 min,取上清液用于 PCR 检测。

1.2.3 PCR 扩增 每次实验必须设阴性、临界阳性及强阳性对照,处理方法同标本。PCR 反应体系为 25 μL,其中待检上清液 2 μL。按以下条件扩增:50 °C 2 min;94 °C 10 min;93 °C 10 s,52 °C 30 s,62 °C 40 s,共做 45 个循环;最后 40 °C 1 min。

[△] 通讯作者, E-mail: bluewhale27@hotmail.com.