

加提取液后不同振荡混匀时间对 HBV DNA 检测结果的影响

彭 强

(重庆市铜梁县中医院检验科 402560)

摘要:目的 探讨在 PCR 定量检测 HBV DNA 过程中,加入提取液后的振荡混匀时间对检测结果的影响,以选择适当的混匀时间。**方法** 选择 10 份 HBV DNA 阳性标本,分为 4 组,在加入提取液后,每组标本分别混匀 0 s(不混匀)及 10、60、180 s,其他步骤完全按说明书操作,对不同混匀时间组 HBV DNA 定量结果进行统计分析。**结果** 在加入提取液后,分别混匀 10、60、180 s,其 HBV DNA 检测结果差异无统计学意义($P>0.05$);加提取液后不混匀组检测结果最低,与其他各组检测结果差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** HBV DNA 定量检测中,加入提取液后必须振荡混匀,混匀时间在 10 s 左右即可,不必将沉淀完全混匀。

关键词:聚合酶链反应; 肝炎病毒,乙型; 提取; DNA; 振荡混匀时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.062

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2012)06-0762-02

乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)是 HBV 检测最直接、敏感、特异的指标。血循环中 HBV DNA 水平与 HBV 感染者病情和预后的关系密切,HBV DNA 定量检测能反映 HBV 载量及复制状况,对鉴别 HBV 感染,判断 HBV 传染性强弱及指导临床抗病毒治疗都具有重要意义^[1]。在 HBV DNA 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测过程中,样本核酸的浓缩提取是关键步骤,对结果影响最大,直接关系到检测结果的准确性^[2]。核酸提取方法一般有一步法、煮沸法和磁珠法,3 种方法在 HBV DNA 荧光定量检测中的提取效率、重复性、抗干扰性及对扩增试剂的兼容能力不尽一致^[3]。目前临床较为常用的是浓缩煮沸(或干浴)法,笔者在实际工作中发现,在第一步浓缩离心后,不同样本产生的沉淀有多有少,弃去上清液,在沉淀物中加入 DNA 提取液 20 μ L,按照试剂盒说明书剧烈振荡 5~10 s,沉淀物无法完全混匀。如需将沉淀完全混匀,一般要剧烈振荡 3 min(180 s)左右,或更长时间。沉淀物混匀的程度要求及其对检测结果的影响未见相关报道。本研究探讨了沉淀物混匀时间对检验结果影响,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 选取 HBV DNA 检测结果在 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$ IU/mL 的临床血液标本 10 份。

1.2 仪器与试剂 Rotor-Gene 3000 实时荧光定量 PCR 分析仪,VTX-3000L 旋涡振荡器等。HBV DNA 检测试剂由广州中山大学达安基因股份有限公司提供,批号:2010016,线性范围: $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ IU/mL。

1.3 方法 将每份标本分作 4 份对比试验,先进行浓缩、离心,移去上清液,加入提取液后,第 1 份不混匀,另 3 份分别振荡混匀 10、60、180 s,其他操作步骤完全一致,按仪器及试剂盒说明书进行操作。

1.5 统计学处理 对检测结果取常用对数值(保留两位小数)进行统计分析。统计分析采用 SPSS10.0 软件,组间比较采用单因素方差分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

混匀时间 10、60、180 s 各组间 HBV DNA 检测结果无统计学差异($P>0.05$);未混匀组检测结果低于其他 3 组($P<0.05$),详见表 1。

表 1 不同振荡混匀时间下 HBV DNA 检测结果

混匀时间(s)	HBV DNA 测定结果										和值	平方和	平均值	方差
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
0	3.33	5.46	5.18	5.69	6.77	4.94	4.70	4.58	7.04	6.94	54.63	311.14	5.46	1.41
10	4.03	5.62	5.35	5.92	7.23	5.68	5.62	5.66	7.91	7.61	60.63	380.13	6.06	1.39
60	3.80	5.99	5.50	6.22	7.39	5.57	5.62	5.56	7.96	7.61	61.22	388.67	6.12	1.54
180	4.11	5.49	5.61	6.15	7.19	5.67	5.50	5.62	7.86	7.82	61.02	384.94	6.10	1.40

3 讨 论

实时荧光 PCR 分析仪检测 HBV DNA 具有全封闭单管扩增,简便快速,重复性好,无扩增后处理步骤等优点,可避免产物污染^[4-5]。在样本和试剂质量合格及 PCR 分析仪性能稳定的情况下,核酸提取质量是扩增试验是否成功及检测结果是否准确的重要影响因素^[6-11]。核酸提取完全是手工操作,因此需严格确保操作规范化和标准化,包括样本制备、加样器调校、器材清洁及温度、时间、离心力、振荡速度。本研究结果表明沉淀物未混匀时,HBV DNA 检测结果低于混匀标本($P<0.05$),可能与提取液和沉淀物未充分接触有关。混匀时间为 10、60、180 s 时,检测结果无统计学差异($P>0.05$),说明沉淀物是否

完全混匀对检测结果没有明显影响。因此,在实际工作中,加入提取液后振荡混匀 10 s 即可,无需将沉淀完全混匀,这与试剂盒说明书要求的混匀 5~10 s 相符,既可保证质量,也可简化操作、节省时间。新型免核酸提取 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂已在临床中应用,具有良好的扩增效率、线性关系和精密度,与需进行核酸提取的检测试剂相比,线性范围更宽、操作更简便,具有更大的临床应用价值,值得期待^[12]。

参考文献

[1] 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,2006:964.
[2] 申子瑜,李金明.临床基因扩增检验技术[M].北京:人民卫生出

版社, 2004; 34.

[3] 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.

[4] 付蕾. HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(10): 960-961.

[5] 马兰花, 任君, 刘利, 等. 探讨实时荧光 PCR 法检测乙肝病毒 DNA 在临床中的应用[J]. 西南国防医药, 2009, 19(8): 815-817.

[6] 覃庆开, 何忠发, 曾光, 等. HBV-DNA 测定标本处理的探讨[J]. 医学信息: 中旬刊, 2011, 24(9): 4288-4289.

[7] 王聪, 陈之遥, 武海萍, 等. 三种核酸共提取试剂盒对血液病毒提取效能的比较研究[J]. 临床误诊误治, 2011, 24(8): 6-9.

[8] 王蔚青, 王彤, 孟玲, 等. 实时定量 PCR 法测定乙肝病毒脱氧核糖

核酸[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(2): 149-151, 155.

[9] 胡兴文, 王维鹏, 石祖亮. 血清中游离乙型肝炎病毒 DNA 检测分析[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(4): 555-557.

[10] 张耀辉, 刘志锋, 吴健玲. 血清 HBV-DNA 模板不同提取方法的比较和选择[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(1): 40-41, 43.

[11] 陈志坚. DNA 浓缩液在 HBV DNA 检测中的价值[J]. 应用预防医学, 2007, 13(4): 253-253.

[12] 龙幼敏, 明凯华, 陈英姿, 等. 一种免核酸提取 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒临床应用价值的评估[J]. 临床医学工程, 2011, 5(5): 652-653.

(收稿日期: 2011-10-09)

• 经验交流 •

BNP 在糖尿病肾病患者血浆中的变化

崔奕文, 周 健, 王 青, 李 严

(辽宁省大连市中心医院检验科 116033)

摘要:目的 探讨糖尿病肾病(DN)患者血浆脑钠肽(BNP)水平及其与 DN 的关系。方法 随机选择 2 型糖尿病(DM)患者 196 例,按尿微量清蛋白排泄率(UAER)分为大量清蛋白尿组(UAER>200 μg/min)36 例、微量清蛋白尿组(UAER 20~200 μg/min)98 例、非清蛋白尿组(UAER<20 μg/min)62 例;70 例体检健康者作为健康组。电化学发光法测定血浆 BNP 水平。结果 微量清蛋白尿组、大量清蛋白尿组血浆 BNP 水平高于非清蛋白尿组[分别为(192.1±72.5)、(429.9±165.3)和(101.3±46.7) pg/mL, P<0.05],非清蛋白尿组高于健康组[分别为(101.3±46.7)和(57.6±43.4) pg/mL, P<0.05];血浆 BNP 水平与 UAER 呈正相关(r=0.83, P<0.05)。结论 DN 患者血浆 BNP 水平显著升高,可能与 DN 的发生、发展密切相关。

关键词:利钠肽,脑; 糖尿病肾病; 尿微量清蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.063

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2012)06-0763-02

脑钠肽(BNP)是钠尿肽家族成员之一,具有利尿利钠效应,能够舒张血管,抑制醛固酮的分泌和肾素的活性,在调节体液容积、血管压力和电解质平衡方面起着重要作用,能引起机体血流动力学的变化^[1-5]。肾小球血流动力学改变是糖尿病肾病(DN)发生和发展的主要病理机制。本研究检测了不同阶段 DN 患者血浆 BNP 水平,探讨血浆 BNP 水平与 DN 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006 年 7 月至 2007 年 9 月本院内分泌科收治的糖尿病(DM)患者 196 例,男 114 例、女 82 例,年龄(76.2±6.0)岁,DM 病程 4~12 年;均口服降糖药,部分使用胰岛素,未服用肾素-血管紧张素转换抑制剂及其受体阻断剂;血压正常、无心功能不全。DM 诊断与分型参照世界卫生组织 1999 年颁布的相关标准;DN 诊断与分期参照《希氏内科学(第 19 版)》。DM 患者根据 24 h 清蛋白排泄率(UAER)分为 3 组:非 DN 组(即非清蛋白尿组)62 例,男 40 例、女 22 例,年龄(76.0±6.2)岁,病程(6.1±1.72)年,6 个月内连续 2 次检测 UAER<20 μg/min;早期 DN 组(即微量清蛋白尿组)98 例,男 53 例、女 45 例,年龄(76.2±6.0)岁,病程(7.9±1.8)年,6 个月内连续 2 次检测 UAER 在 20~200 μg/min;临床 DN 组(即大量清蛋白尿组)36 例,男 21 例、女 15 例,年龄(76.3±5.7)岁,病程(8.1±1.4)年,6 个月内连续 2 次检测 UAER>200 μg/min。健康组为体检健康者 70 例,男 37 例、女 33 例,年龄(59.2±7.1)岁,经排除 DM、冠心病、原发性高血压、高脂血症、肺心病、肾脏疾病等。

1.2 标本采集 采集受试者晨起空腹卧位静脉血 3 mL,EDTA 抗凝,离心后分离血浆;留取 24 h 尿液,二甲苯防腐,离心收集上清液。血浆 BNP 检测采用瑞士 Roche Elecsys2010 电化学发光免疫分析仪(电化学发光法);尿微量清蛋白检测采用

美国 Beckman Coulter Immage 生化分析仪(速率散射比浊法)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计学软件进行单因素方差分析和简单相关分析,显著性检验水准为 α=0.05。

2 结 果

各组受试对象血浆 BNP 及 UAER 检测结果见表 1。相关性分析显示各患者组血浆 BNP 水平与 UAER 呈正相关(r=0.83, P<0.05)。

表 1 各研究组血浆 BNP 及 UAER 检测结果(̄x±s)

组别	n	BNP(pg/mL)	UAER(μg/min)
健康组	70	57.6±43.4	4.2±3.0
非清蛋白尿组	62	101.3±46.7*	9.4±3.6
微量清蛋白尿组	98	192.1±72.5**	81.0±43.2
大量清蛋白尿组	36	429.9±165.3*	965.2±103.5

*:与健康组比较, P<0.05; #:与非清蛋白尿组比较, P<0.05。

3 讨 论

BNP 主要是由心室合成、分泌的心脏激素,具有排钠和利尿两种特性,通过增加肾小球滤过率和抑制钠的重吸收而提高钠和水的排泄,并通过减少醛固酮和肾素的分泌抵消肾素-血管紧张素的作用^[6]。

DN 是最严重和最常见 DM 慢性并发症之一;除遗传因素外,血压、血糖、血管紧张素 II 等升高与 DN 发病有关。本研究检测了 196 例 DM 患者血浆 BNP 水平,结果显示有清蛋白尿者血浆 BNP 水平高于无清蛋白尿者,而后者又高于健康者;血浆 BNP 水平与 UAER 呈正相关;提示 DN 患者血浆 BNP 水平高于肾功能正常的 DM 患者,与相关报道一致^[7-8]。另有研究证实继发肾衰竭的 DM 患者血浆 BNP 水平高于肾功能正