

简单,无需特殊的设备,有较高的特异性但灵敏度低^[3],容易漏检。ELISA 法具有操作简便、快速、有仪器的自动化、结果易于判断的特点,适于大批量标本检测^[4]。FQ-PCR 是近年来发展应用的新技术,它融合了 PCR 的高敏感性和 DNA 杂交技术的高特异性以及光谱技术的高精确定量为一体,在全封闭下操作而避免污染造成假阳性,达到简便、快速、准确的检测病原体,还可以通过定量检测病原体的变化进行疗效观察^[5]。本文结果显示,三种方法的特异性高,均在 98.5% 以上,说明它们对真阴性标本检出能力高;三种方法的 PPV 高,均在 93.5% 以上,说明它们的假阳性率低;ICA 的灵敏度明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的灵敏度($P < 0.01$),说明其对真阳性标本检出能力低,容易发生阳性漏检;ICA 的约登指数明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的约登指数($P < 0.01$),说明其发现阳性和阴性标本的总能力都较低;ICA 的 NPV 明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的 NPV($P < 0.01$),说明其假阴性率较高。

综上所述,ELISA 和 FQ-PCR 作为临床 CT 感染的实验室检测方法,其灵敏度、特异性均接近理想诊断方法的标准,两者的诊断符合率十分接近,均可为临床治疗和监测 CT 提供可靠的依据;ICA 的灵敏度低,作为实验诊断 CT 感染的方法不太理想^[6]。因此,笔者建议有条件的实验室采用 FQ-PCR,标本

• 检验技术与方法 •

单管巢式 PCR 结合测序技术检测 HBV YMDD 突变

唐 彦

(重庆市中医骨科医院检验科,重庆 400010)

摘要:目的 为了进一步提高 HBV 低载量标本 YMDD 突变检测灵敏度,建立一种快速检测方法。方法 分别采用单管巢式 PCR、双管巢式 PCR 和单管 PCR 对临床选择的 35 例标本进行 PCR 扩增,然后进行 Sanger 测序验证,对几种方法进行比较。结果 实验结果显示,单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR 的吻合度一致,阳性率均为 [91.4% (32/35)],而单管 PCR 的阳性率 [54.3% (19/35)] 显著低于单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 单管巢式 PCR 不仅能够显著提高 HBV YMDD 突变检测灵敏度,而且相比于双管巢式 PCR,具有显著降低污染、缩短实验时间的优点,为一种高效、安全的检测方法。

关键词:单管巢式 PCR; YMDD 突变; 肝炎病毒,乙型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1419-03

拉米夫定是当前应用最为广泛的核苷酸类药物之一。它能显著降低 HBV DNA 水平,但拉米夫定的长期应用,常因 HBV P 基因的 YMDD 基因发生变异而对其产生耐药性。治疗 1 年的耐药率为 17%~46%,治疗 3~4 年的耐药率可达 67%~75%^[1-2]。产生耐药的主要机制是由于拉米夫定作用位点 YMDD 位点的突变,如能迅速、及时检测到 HBV YMDD 突变,可以帮助医生及时改变用药方案。目前检测 YMDD 突变的方法很多,有实时定量 PCR 法、芯片法、测序法等,但灵敏度均较低,尤其是对于 HBV DNA 载量低于 10×10^4 copies/mL 的标本,各种方法的检测均很难 100% 检出^[3-4],所以希望寻找一种快速、高效的方法用于检测这些低病毒载量的标本。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取乙型肝炎患者血清标本 35 例。所有标本经过达安基因公司 HBV 定量检测试剂盒进行过载量检测,均为阳性,HBV 载量为 100~108 copies/mL,诊断均按照中华医学会传染病与寄生虫病学分会 2000 年西安会议修订的诊断标准。其中男性 13 例,女性 22 例,年龄 20~67 岁,平均年龄 44.8 岁。

量大的实验室采用 ELISA,最好不用 ICA。

参考文献

- [1] 王千秋. 重视生殖道沙眼衣原体感染的防治[J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(5): 257-259.
- [2] Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 160-184.
- [3] Yin YP, Peeling RW, Chen XS, et al. Clinic-based evaluation of Clearview Chlamydia MF for detection of Chlamydia trachomatis in vaginal and cervical specimens from women at high risk in China[J]. Sex Transm Infect, 2006, 82(suppl 5): v33-37.
- [4] 薛耀华, 郑和平, 薛秀娟, 等. 酶联免疫吸附试验和直接免疫荧光检测沙眼衣原体的方法学比较[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, 16(1): 38-40.
- [5] 廖启洪, 梁志东. 实时定量 PCR 和细胞培养及金标法检测不孕妇女沙眼衣原体[J]. 广东医学, 2006, 27(1): 81-82.
- [6] 乐宏元, 张振国, 刘晓虹, 等. 四种检测沙眼衣原体方法的诊断符合率分析[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(6): 566-567.

(收稿日期: 2013-02-03)

1.2 仪器与试剂 DNA 纯化回收试剂盒(北京天根公司); HS Taq 酶(北京天根公司); dNTP(北京天根公司); PCR 及测序用引物来源于文献或使用 Primer5 软件设计,并由生工生物工程(上海)有限公司合成; ABI3130 型遗传分析仪(美国 Life Technologies 公司), HBV 定量检测试剂盒采购于广州达安基因检测公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计 根据 NCBI 的 HBV 序列,进行 HBV 耐药区引物设计,其中包括外侧引物 F1/R1,和内侧引物 F2/R2,引物由上海生工技术服务有限公司进行合成。见表 1。

1.3.2 标本收集 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 1 mL,注入无菌的干燥玻璃管,1 500 r/min 离心 3 min,吸取上层血清,转移至 1.5 mL 灭菌离心管中。标本可立即用于处理,也可以保存于 -20 °C 储存备用。

1.3.3 HBV DNA 提取 采用裂解液煮沸法进行 DNA 提取^[5],略有修改,裂解液配制(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L NaCl, 1% SDS, pH9.5), 100 μL 待测样本加入 50 μL 裂解液,煮沸 10 min, 1 2000 × g 离心 10 min, 该上

清液即纯化的 DNA 溶液。

1.3.4 PCR 反应 (1)单管巢式 PCR,反应体系(50 μL),包括 1 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL),5 μL 10 PCR 缓冲液,4 μL dNTP(2.5 mmol/L),3 μL F1 引物(0.2 μmol/L),3 μL R1 引物(0.2 μmol/L),3 μL F2 引物(10 μmol/L),3 μL R2 引物(10 μmol/L),4 μL HBV DNA 模板,用去离子水补齐至 50 μL。反应条件:预变性 95 °C 3 min,变性 94 °C 30 s,退火 68 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,共 20 个循环;再次变性 94 °C 30 s,退火 53 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,共 35 个循环;最后仪器冷却 25 °C 1 min。(2)双管巢式 PCR,反应体系(50 μL),包括 1 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL);5 μL 10 PCR 缓冲液,4 μL dNTP(2.5 mmol/L);3 μL F1 引物(10 μmol/L)、3 μL R1 引物(10 μmol/L),4 μL HBV DNA 模板,用去离子水补齐至 50 μL。反应条件:预变性 95 °C 3 min,变性 94 °C 30 s,退火 65 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,共 30 个循环;PCR 结束后,取 1 μL PCR 产物,引物换做 3 μL F2 引物(10 μmol/L)、3 μL R2 引物(10 μmol/L);扩增条件为 95 °C 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环。(3)单管 PCR,反应体系(50 μL),包括 1 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL),5 μL 10 PCR 缓冲液,4 μL dNTP(2.5 mmol/L),3 μL F2 引物(10 μmol/L)、3 μL R2 引物(10 μmol/L),4 μL HBV DNA 模板,用去离子水补齐至 50 μL。扩增条件为 95 °C 3 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 45 个循环。采用 Chromas2.23 软件对测序结果进行分析。

表 1 HBV 耐药区引物

引物	序列(5'~3')	Tm(°C)
外正向引物 F1	GCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGG	68.1
内正向引物 F2	GCCATTGTTCAGTGGT	47.9
外反向引物 R1	AGGTCTATTTACAGGCAGTTTTTCGAAAACA	66.7
内反向引物 R2	CAITGCTTGAGTTTCAGTAC	47.0
测序引物 CF	CCCAACTTCCAATTACATATCC	57.4

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 单管巢式 PCR、双管巢式 PCR 和单管 PCR 的对比情况 单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR 的吻合度一致,阳性率均为 91.4%(32/35),单管 PCR 的阳性率[54.3%(19/35)]显著低于单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 3 种方法检测结果比较[n(%)]

HBV 载量 (copies/mL)	n	单管巢式 PCR	双管巢式 PCR	单管 PCR
$\geq 10^8$	2	2(100.0)	2(100.0)	2(100.0)
$10^7 \sim < 10^8$	4	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)
$10^6 \sim < 10^7$	6	6(100.0)	6(100.0)	6(100.0)
$10^5 \sim < 10^6$	6	5(83.3)	5(83.3)	4(66.7)
$10^4 \sim < 10^5$	4	4(100.0)	4(100.0)	2(50.0)
$10^3 \sim < 10^4$	8	7(87.5)	7(87.5)	1(12.5)
$< 10^3$	5	4(80.0)	4(80.0)	0(0.0)

2.2 测序结果分析 单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR 测序 YMDD 突变的吻合度一致,检出率均为 28.6%(10/35),而单管 PCR 的检出率[14.3%(10/35)]显著低于单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 种方法检测 YMDD 突变的结果比较[n(%)]

HBV DNA 载量 (copies/mL)	n	单管巢式 PCR	双管巢式 PCR	单管 PCR
$\geq 10^8$	2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
$10^7 \sim < 10^8$	4	2(50.0)	2(50.0)	2(50.0)
$10^6 \sim < 10^7$	6	2(33.3)	2(33.3)	2(33.3)
$10^5 \sim < 10^6$	6	2(33.3)	2(33.3)	1(16.7)
$10^4 \sim < 10^5$	4	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)
$10^3 \sim < 10^4$	8	2(25.0)	2(25.0)	0(0.0)
$< 10^3$	5	1(20.0)	1(20.0)	0(0.0)

3 讨 论

通过本实验,单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR 有着相同的扩增效率,而与普通 PCR 法相比,具有如下优点:(1)具有更高的灵敏度。单管巢式 PCR 结合测序分析 YMDD 突变能有效提高点突变检测能力,通过两轮的扩增,显著提高了目的片段的产物量,本文结果显示,其灵敏度可提高 10~100 倍,这对于低载量 HBV 的标本具有重要意义^[6-8]。(2)具有更高的特异性。普通 PCR 电泳时常出现拖尾或条带及其浅等现象,本文通过 2 对特异性的引物,其中一个外侧引物在初始扩增中显著扩增了目的片段,内侧引物在此基础上进行特异性的扩增,强化了 PCR 检测的特异性。巢式 PCR 使扩增产量极大地增多,电泳时呈现的条带也更清晰、整齐等^[9-11]。

综上所述,本文建立的单管巢式 PCR 对于早期检测 HBV YMDD 突变具有重要的参考价值,对于临床指导用药具有参考意义。

参考文献

- [1] 霍红,赵书民,蔡雄,等. YMDD 自然变异毒株流行病学调查[J]. 肝脏,2006,11(4):232-234.
- [2] 闵晓春. 应用引物特异性实时荧光 PCR 法检测 HBV YMDD 自然变异的研究[D]. 上海:第二军医大学,2007.
- [3] 许莉莉,蒋卫民,韩丽红,等. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎产生 YMDD 变异及其处理[J]. 实用医学杂志,2005,21(9):995-997.
- [4] 田德英,许东,邢铭友,等. 拉米夫定耐药与 HBV YMDD 变异关系的研究[J]. 临床肝胆病杂志,20(3):161-162.
- [5] 梁伟峰,杨丹红,沈月洪,等. 拉米夫定抗乙型肝炎病毒感染中 YMDD 变异类型及时间研究[J]. 中华肝病杂志,2003,11(5):302-304.
- [6] 胡盈莹,江家骥,李丹,等. 不同实验方法在监测拉米夫定耐药突变中的应用价值[J]. 中华肝病杂志,2003,11(7):427-430.
- [7] Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, et al. A rapid real time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus[J]. Virol Methods,2001,93(1):105-113.
- [8] Ho SK, Yam WC, Leung ET, et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using fluorescent hybridization probes[J]. Med Microbiol,2003,52(5):397-402.
- [9] Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus car-

riers[J]. J Hepatol, 2001, 34(4): 584-586.

药物治疗杂志, 2006, 4(5): 38.

[10] 任永强. HBV YMDD 变异检测方法的建立及临床应用的初步研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.

(收稿日期: 2013-01-30)

[11] 冯燕, 徐利华. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的常见问题[J]. 临床

• 检验技术与方法 •

紫外分光光度法测定血液中的百草枯

白云, 范川鹏, 李素燕, 杜书明

(白求恩国际和平医院检验实验科, 河北石家庄 050082)

摘要:目的 建立百草枯中毒患者血清百草枯定性定量的紫外分光光度法测定。方法 血清经 20% 三氯醋酸沉淀蛋白, -20 ℃ 冰箱放置 10 min, 12 000 r/min 高速离心, 取上清液, 采用 50 μL 微量比色池, 紫外分光光度法测定。结果 血清中百草枯浓度在 0.05~40 μg/mL 范围内呈线性, 回归方程 $Y=0.084 2X+0.013 6$, 其相关系数为 0.999 6, 回收率为 92.5%~103.0%, RSD 为 3.6%~4.7%。日内、日间相对标准差分别为 2.8%~4.8% 和 2.2%~4.6%, 最低检出限为 0.02 μg/mL。结论 该方法操作简便、分析快速, 结果准确。为临床百草枯中毒的定性定量检测提供了一种简便准确的检测方法, 适合对血液灌流前、后的百草枯浓度的测定。

关键词:血清; 百草枯; 紫外分光光度法; 定性; 定量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1421-02

百草枯是一种广泛使用的吡啶类除草剂, 因近年来百草枯中毒病例不断增多^[1], 临床上迫切需要简便、准确、快速的血液百草枯测定的试验方法。目前测定血液中的百草枯主要采用高效液相色谱法^[2], 一般实验室很难开展。笔者参考有关文献^[2-4], 探讨了将患者血清除蛋白, 冷冻后高速离心, 取上清液用紫外分光光度法扫描测定血液中百草枯的方法, 取得了满意的效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康人血清, 百草枯中毒患者血清均由本院提供。

1.2 仪器与试剂 UV-2600 双光速紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), 配置 50 μL 微量比色池; LG16B 型台式离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)。百草枯标准品(纯度为 99%, 由国家农业质量监督检验中心提供); 20% 三氯醋酸, 无水乙醇, 碳酸氢钠, 连二亚硫酸钠(保险粉)均为分析纯试剂。

1.3 方法 取 2 支带盖的塑料试管标明 V 管和 B 管, V 管加百草枯中毒患者血清 0.6 mL, B 管加健康人混合血清 0.6 mL, 分别加入 20% 三氯醋酸 0.2 mL, 充分振荡混匀 5 min, 置冰箱(-20 ℃)冷冻 10 min, 然后以 12 000 r/min(离心半径为 6 cm)离心 10 min, 取 B 管(空白)上清液 50 μL 做基线测量, 取 V 管(患者)上清液扫描。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测波长的确定 用百草枯标准品配制 10 μg/mL 的百草枯标准水溶液, 以蒸馏水为空白对照做基线测量, 然后对 10 μg/mL 的百草枯标准水溶液进行扫描。结果百草枯在 257 nm 处有最大吸收峰, 因此确定 257 nm 为百草枯检测波长。

2.2 空白实验 取健康人混合血清 0.6 mL, 分别加入 3 个带盖的塑料试管中, 用其中 1 份上清液 50 μL 做基线扫描, 然后再扫描其他 2 份空白上清液。空白实验表明: 采用本试验方法进行检测, 一旦在 257~262 nm 处出现最大吸收峰, 应考虑血清中有百草枯的存在。

2.3 线性范围与检出限 配制 50 μg/mL 的百草枯标准水溶液, 将其用健康人混合血清稀释为 40.0、20.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0.05、0.02 μg/mL 的百草枯血清样本, 在 257 nm 测得吸光度值(Y)并对质量浓度(X)进行回归, 得到线性回归方程为 $Y=0.084 2X+0.013 6$, 其相关系数为 0.999 6, 线性范围为 0.05~40 μg/mL, 检出限为 0.02 μg/mL。

2.4 回收率试验 采用加入回收法, 用健康人混合血清配制浓度分别为 4.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL 的百草枯血清样品, 采用紫外分光光度法进行扫描测定, 回收率为 92.5%~103.0%, RSD 为 3.6%~4.7%, 见表 1。

表 1 血清中百草枯浓度的回收试验结果(n=5)

配制浓度(μg/mL)	实测浓度(μg/mL)	RSD(%)	回收率(%)
4.00	3.70	4.7	92.5
10.00	10.30	3.6	103.0
20.00	19.2	4.2	96.0
40.00	38.8	3.9	97.0

2.5 精密度试验 用健康人混合血清配制浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 μg/mL 百草枯样品, 采用紫外分光光度法进行扫描测定, 分别在日内各测定 5 次; 然后 4 ℃ 冰箱保存, 并隔日对每个浓度样品连续各测定 5 次。分别计算日内与日间 RSD, 见表 2。

表 2 血清中百草枯浓度的精密度实验结果(n=5)

百草枯浓度(μg/mL)	日内		日间	
	\bar{x} (μg/mL)	RSD(%)	\bar{x} (μg/mL)	RSD(%)
0.5	0.48	2.8	0.51	2.2
1.0	1.05	3.4	0.97	3.8
2.0	1.97	3.1	1.98	4.4
4.0	4.07	4.8	4.02	4.6

2.6 血清标本品百草枯定量与尿液百草枯定性 分别取本院