

1 000 mIU/mL 时,就有可能超出了试剂检测的线性范围,这时就要选择合适的稀释倍数,稀释不足,超过检测范围,无法显示结果,稀释过度仪器也不显示结果,结合表 1 和表 2,根据 HCG 浓度的高低和孕周的不同选择合适的稀释倍数,对临床来说是一种比较实用快捷经济的方法。当发生异位妊娠时,血清中 HCG 的水平约为正常怀孕妇女的 1/3~1/2 或者无差别,则稀释方法与正常妊娠类似^[4]。

另外滋养层细胞肿瘤如葡萄胎、恶性葡萄胎、绒毛膜上皮癌等患者血清中 HCG 明显升高,多大于 10 000 mIU/mL,甚至可达每毫升十万至数百万国际单位。根据以上试验结果,对于葡萄胎妊娠 12 周以前可进行 1:500 稀释,妊娠 12 周以后 1:250 稀释,而对于绒毛膜上皮癌进行 1:100~1:2 048 稀释。但由于此类患者在测定之前无法估计 HCG 的可能水平,也可将标本进行相应比例的稀释后,先用 HCG 试纸条进行初测的方法,结果呈阳性,再进行定量检测,最多会用掉 2~3 个试纸条,也很方便,结果也更有保证^[5]。实验室使用此稀释方法用于临床实践几个月来,均得到了良好的结果。因此作者认为

• 经验交流 •

沉淀煮沸裂解法煮沸时间对乙型肝炎病毒 DNA 检测结果的影响

梅玉峰,魏宝珍,危艳顺

(湖北省鄂州市鄂钢医院检验科,湖北鄂州 436000)

摘要:目的 探讨沉淀煮沸裂解法中的煮沸时间对实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测乙型肝炎病毒 DNA 结果的影响,规范试验操作。**方法** 采用沉淀煮沸裂解法提取乙型病毒性肝炎(以下简称乙型肝炎)DNA,煮沸时间为 5、7、9、10、11、13、15 min,实时荧光定量 PCR 技术检测乙型肝炎 DNA,比较不同煮沸时间检测乙型肝炎 DNA 的结果。**结果** 煮沸时间在(10±5)min 内检测乙型肝炎 DNA 的结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 沉淀煮沸裂解法中的煮沸时间煮沸时间在一定范围内对乙型肝炎 DNA 检测结果无影响。

关键词:沉淀煮沸裂解法; 煮沸时间; 实时荧光定量聚合酶链反应; 乙型肝炎 DNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.065

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2015)02-0281-02

乙型病毒性肝炎(以下简称乙型肝炎),每年约有 100 万人死于乙型肝炎病毒(HBV)感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[1]。国内现有的慢性 HBV 感染者约 9 300 万人,是国内当前流行最为广泛、危害性最严重的一种传染病^[2]。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测乙型肝炎 DNA 具有特异性强、快速、灵敏度高优点,故目前作为 HBV 增殖复制的主要检测方法^[3]。影响检测 HBV-DNA 的因素有很多,除了试验室因素、标本因素外^[4],标准操作程序(SOP)文件也非常重要,而 SOP 文件核心内容来源于试剂或仪器说明书。在检测 HBV-DNA 过程中,相关仪器和试剂说明书规定煮沸时间为(10±1)min。若因某种原因造成煮沸时间延长或缩短,检测结果是否会受影响,是否需要重复试验?本研究就煮沸时间对 HBV-DNA 检测的影响进行探讨。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 鄂钢医院住院、门诊乙肝患者标本,HBV-DNA 水平分别为 3.52×10^3 、 2.16×10^5 、 5.73×10^7 copy/mL。经对数转换后 HBV-DNA 水平分别为 3.55、5.33、7.76 IU/mL 每标本分 7 次分装。

该稀释方法准确可靠、简便易行,不仅节省时间且降低成本,是值得临床推广使用的方法。

参考文献

- [1] 吕汝华,黄燕,龙兴黎.磁酶免技术检测不同浓度血 HCG 稀释倍数的选择[J].中国社区医师·医学专业,2010,26(8):142.
- [2] 曾庆洋,姜朝新,曾令恒,等.CP 化学发光仪检测 HCG 适用稀释液及稀释倍数的选择[J].国际检验医学杂志,2012,33(14):1736-1737.
- [3] 张知,黄昌艳,张裕芳,等.血 HCG 检测先天性再稀释、定量的探讨[J].实验与检验医学,2011,29(6):682-683.
- [4] 胡士玉,王海清,程正江,等.自制稀释液在化学发光定量检测 HCG 浓度的应用[J].标记免疫分析与临床,2013,20(3):192-193.
- [5] 李燕,许庆元.胶体金早早孕试纸条在定量检测 β -HCG 筛查作用探讨[J].检验医学与临床,2013,10(4):461-462.

(收稿日期:2014-11-10)

1.2 仪器与试剂 达安 DA7600 实时荧光定量 PCR 仪,新康医疗 XK98-A 电子石英计时计,杭州博日 HB-100 恒温金属浴;达安 HBV-DNA 试剂(批号:201312)。

1.3 检测方法 取 100 μ L 血清标本,加入 DNA 浓缩液 100 μ L,振荡器振荡混匀,12 000 r/min 离心 10 min,弃上层血清,再加入 DNA 提取液 20 μ L 振荡器振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸(时间分别为 5、7、9、10、11、13、15 min),12 000 r/min 离心 5 min,取上清血清 2 μ L 做 PCR 试验;质控如血清标本一样进行处理,质控血清由北京金豪提供。PCR 扩增:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 60 s,先做 10 个循环,最后按 93 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 45 $^{\circ}$ C 60 s,做 30 个循环。HBV DNA $\leq 1.0 \times 10^2$ copy/mL 为低于检出限,($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)copy/mL 为线性范围。以上各种不同浓度不同煮沸时间的标本各重复进行 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

同一标本煮沸时间为 5、7、9、11、13、15 min 与煮沸时间为 10 min 检测 HBV-DNA 的结果比较差异均无统计(下转插 I)

(上接第 281 页)

学意义($P>0.05$)。同一煮沸时间,3 个不同浓度标本的检测

结果比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同浓度不同煮沸时间乙肝 DNA 检测结果($\bar{x}\pm s$, IU/mL)

浓度	煮沸时间						
	5 min	7 min	9 min	10 min	11 min	13 min	15 min
3.55	3.54±0.14	3.58±0.15	3.50±0.10	3.55±0.13	3.57±0.12	3.49±0.16	3.51±0.15
5.33	5.38±0.09	5.40±0.12	5.29±0.08	5.33±0.10	5.31±0.09	5.35±0.13	5.34±0.11
7.76	7.77±0.07	7.80±0.10	7.69±0.09	7.76±0.07	7.70±0.07	7.65±0.10	7.85±0.09

3 结 论

乙肝患者和携带者的传染性高低,主要取决于血液中 HBV DNA 水平,而与血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)或胆红素水平无关^[5]。HBV DNA 定量检测可反映病毒复制水平,主要用于慢性 HBV 感染的诊断、治疗方案的选择及抗病毒疗效的判断^[6]。故 HBV DNA 定量检测准确性影响乙肝患者预防、诊断分型分期、治疗、临床应用。

实时荧光定量 PCR 技术是将荧光能量传递技术(FRET)应用于常规 PCR 仪中,具有灵敏度高、特异性强、无污染和准确性高等优点,是核酸浓度检测的首选方法^[7]。核酸提取效率对 PCR 法检测 HBV-DNA 水平的准确性有很大的影响,核酸提取方法有磁珠核酸提取法、沉淀煮沸裂解法、直接煮沸裂解法等,但沉淀煮沸裂解法性价比最高^[8]。沉淀煮沸裂解法操作步骤较多,所以影响因素也较多,如煮沸方式、裂解液成分、裂解液用量等。崔海丽等^[9]的研究结果显示,蒸气浴提取的 DNA 扩增结果低于沸水浴提取的结果。裂解液的用量是影响核酸提取的关键因素,浓度过低,将导致沉淀效率低,影响获得效率;浓度过高,去除杂质的过程复杂且不彻底,导致纯度下降^[10]。

但是煮沸时间对 HBV-DNA 检测结果有无影响,是否应该严格按说明书的(10±1)min 执行,目前这方面的相关报道还较少见。本研究结果显示,同一浓度标本煮沸时间不同(5~15 min)检测 HBV-DNA 的水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。这是由于沉淀煮沸裂解法是在低离子强度、碱性及 100℃煮沸条件下,金属离子可以辅助脱氧核糖核酸酶降解 DNA,并使与 DNA 结合的蛋白质变性,变性的蛋白质沉淀下去,游离 DNA 于上清液中,即煮沸目的是促进蛋白变性,游离 DNA^[11]。Hearn 等^[12]的研究表明在 100℃煮沸条件下煮沸时间对 DNA 提取结果无影响,这与本研究结果一致。同时本研究还发现,HBV-DNA 浓度的高低,煮沸时间对 HBV-DNA 检测结果均无影响。所以本研究认为在一定范围内,煮沸时间不影响裂解效率,不影响 HBV-DNA 检测结果。

随着仪器的不断改进及商品化试剂盒的研发,现阶段 PCR 影响扩增阶段的技术已非常成熟,其检测结果也比较稳定。这也要求试剂供应商对参数提出更高的要求,每一参数必

须经过充分的验证。在 HBV-DNA 检测中规定煮沸时间为 10 min,误差不超过 1 min,作者认为是不合理的,会造成不必要的时间和试剂浪费。

参考文献

- [1] Seto WK, Lai CL, Ip PP, et al. A large population histology study showing the lack of association between ALT elevation and significant fibrosis in chronic hepatitis B[J]. PLoS One, 2012, 7(2): 32622.
- [2] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(1): 3-4.
- [3] 林森, 易荣. 实时荧光定量对乙型肝炎检测的影响因素[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(1): 127-128.
- [4] 张筱华, 林碧, 刘保林, 等. HBV-DNA PCR 检测 HBsAg 阴性献血人群中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 672-674.
- [5] Lin X, Guo Y, Zhou A, et al. Immunoprophylaxis failure against vertical transmission of hepatitis B virus in the Chinese population: a hospital-based study and a meta-analysis[J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33(9): 897-903.
- [6] Güzelbulut F, Övünc AO, Oetinkaya ZA, et al. Comparison of the efficacy of entecavir and tenofovir in chronic hepatitis B[J]. Hepato-gastroenterol, 2012, 59(114): 477-480.
- [7] 付春华, 陈孝平, 余龙江. 实时荧光定量 PCR 的应用和进展[J]. 激光生物学报, 2005, 41(6): 466-471.
- [8] 梅玉峰, 黄敏, 危艳顺. 浓缩裂解煮沸法在荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 中的应用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(6): 359-360.
- [9] 崔海丽, 张全意. 沉淀煮沸法不同提取条件对血清 HBV-DNA 扩增结果的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 459-460.
- [10] 任时好, 张天星, 李春丽, 等. 不同 Tris-Cl 及 SDS 质量浓度对小鼠 DNA 提取的影响[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(2): 192-195.
- [11] Hawash Y. DNA extraction techniques for use in education[J]. Biochem Mol Biol Educ, 2010, 38(3): 161-166.
- [12] Hearn RP, Arblaster K. DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR[J]. Korean J Parasitol, 2014, 52(3): 263-271.

(收稿日期: 2014-12-15)