

· 论 著 ·

自制大容量扣式负压抽提装置应用于 RNA 抽提的性能评价^{*}

庄健海, 何 娴, 卓雪芽, 郑文标
(广东省佛山市中医院检验科 528000)

摘 要:目的 对自制大容量扣式负压抽提装置进行扩增前性能评价。方法 采用配套负压抽提装置(对照组装置)和自制大容量扣式负压抽提装置(实验组装置)对 67 份白细胞(WBC)大于 2.0×10^9 /L 的新鲜全血进行核酸(RNA)提取并进行扩增前性能评价,验证实验组的工作效率、提取 RNA 的浓度、纯度及完整性。结果 67 份 RNA 标本采用对照组装置 69 min 完成抽提,处理效率平均为 0.97 份/分;实验组装置 41 min 完成抽提,效率为 1.63 份/分。对照组抽提标本 RNA 浓度为 $(248.8 \pm 21.4) \mu\text{g/mL}$,实验组为 $(260.3 \pm 21.8) \mu\text{g/mL}$ 。对照组抽提标本 OD260/OD280 和 OD260/OD230 分别为 (1.995 ± 0.095) 和 (2.020 ± 0.082) ,95%CI 分别为 1.964~2.025 和 2.001~2.040,实验组分别为 (2.093 ± 0.092) 和 (2.071 ± 0.120) ,95%CI 分别为 2.075~2.113 和 2.044~2.103;2 组比较差异有统计学意义($t=24.570, P<0.001$),线性回归方程 $Y=0.950X+0.039, R^2=0.903$ 。2 组装置提取 RNA 后完整性均较好,电泳条带整齐、清晰。结论 自制大容量扣式负压抽提装置具有更高的抽提工作效率,且能保证 RNA 浓度、纯度及完整性,更符合实验室实际情况,具有更优的临床价值。

关键词:负压抽提装置; 核酸; RNA 提取

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2723-03

Performance evaluation of the one self-developed device for transmitting negative pressure in RNA extraction^{*}

ZHUANG Jianghai, HE Xian, ZHUO Xueya, ZHENG Wenbiao

(Department of Clinical Laboratory, Foshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract:Objective To evaluate the self-developed device for transmitting negative pressure with large capacity before propagating. **Methods** Totally 67 ribonucleic acid(RNA) of $WBC>2.0 \times 10^9$ /L fresh whole blood were extracted with the intrinsic device(control) and the self-developed device for transmitting negative pressure with large capacity(test) in parallel. The difference of the performance including efficiency, concentration, purity and integrity of RNA extraction were evaluated between the two groups. **Results** In 67 specimens of RNA extraction, efficiency, concentration, purity and integrity of the control device were 0.97 (portion/minute), $(248.8 \pm 21.4) \mu\text{g/mL}$, (1.995 ± 0.095) (OD260/OD280), (2.020 ± 0.082) (OD260/OD230), 1.964—2.025 (95% confidence interval for mean) (OD260/OD280), 2.001—2.040 (95% confidence interval for mean) (OD260/OD230) and complete. Those of test device were 1.63 portion/minutes, $(260.3 \pm 21.8) \mu\text{g/mL}$, (2.093 ± 0.092) at OD260/OD280, (2.071 ± 0.120) at OD260/OD230, 2.075—2.113 for 95% confidence interval for mean at OD260/OD280, 2.044—2.103 for 95% confidence interval for mean at OD260/OD230 and complete. The t value was 24.570 ($P<0.001$) in paired t -test, and the linear regression equation was $Y=0.950X+0.039, R^2=0.903$ for the two groups data of RNA concentration. **Conclusion** The self-developed device for transmitting negative pressure with large capacity is excellent in the work efficiency, concentration, purity, integrality and of the RNA in extracting. It is better than the intrinsic device in the clinical value for situation of lab.

Key words: device for transmitting negative pressure; ribonucleic acid; RNA extraction

核酸提取是下游检测、基因分型的起点,是分子生物学最关键的基本方法之一,已经广泛渗透到生物学、遗传学、医学等各个生命领域。抽提所分离的核酸质量直接影响后续的检测效率及准确性,起着承前启后的关键作用^[1-3]。

本科室日均处理 RNA 提取标本量大,使用的配套负压抽提装置存在压力易泄漏,不稳定,处理工作效率低,容量小等缺陷。为此现研制一款大容量扣式负压抽提装置,通过平行使用配套负压抽提装置和自制大容量扣式负压抽提装置进行扩增前性能评价,比较两者工作效率、提取 RNA 的纯度及完整性,为自制装置的使用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取该院已检测的白细胞(WBC)大于 $2.0 \times$

10^9 /L 的新鲜全血 67 份作为标本,排除严重脂浊、溶血、黄疸标本,采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝。

1.2 仪器与试剂

1.1.1 RNA 抽提的柱式抽提法 (1)对照组 RNA 提取装置:采用配套的美国 AXYGENT 公司生产的负压抽提装置(型号 AP VM II)AP VM II 可容纳 16 支柱子。(2)实验组 RNA 提取装置:采用自制大容量扣式负压抽提装置。本实验室从 3 个方面进行改进:第一,将负压抽提装置改为四面蝶形的扣环,启动时完全取代人力,也可克服装置使用时间长后,上下两部分间隙逐渐加大的弱点。第二,将衔接处改为螺旋接口,支持单个衔接处更换,不用时用螺旋盖帽封闭,避免因个别泄露导致整个装置漏压。第三,将装置改为 8×12 阵列形式,容纳 96

^{*} 基金项目:广东省科技厅科技计划项目(2013-137-06)。

作者简介:庄健海,男,主任技师,主要从事临床免疫及分子生物学研究。

支柱子,较市面普遍使用的负压抽提装置容纳柱量增加 6 倍以上,完美衔接下游的 PCR 扩增仪。

1.1.2 RNA 纯度检测 采用 eppendorf bioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪, RNA 完整性检测使用北京六一仪器厂生产的 DYY-4C 型电泳仪与 UVI 凝胶电泳成像仪,抽提柱子及抽提试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供。

1.3 方法 将标本 3 500 r/mL 离心 15 min,吸取标本中白细胞层,装至试管中,再往试管中加入红细胞溶血素-SYS-SLS,由兰桥医疗医学科技有限公司提供,比例为 1:5,冰上孵育 10 min,期间涡旋振荡 2 次,然后 4 ℃ 2 100 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 500 μ L 红细胞溶血素,重悬沉淀 WBC,重复上一步骤,最后加入 400 μ L 配套提取试剂里的裂解液,振荡重悬沉淀, WBC 平均分成 2 份(A、B),各 200 μ L,并分装至试管,并作编号。所有处理标本的吸头、吸嘴及试管皆用 0.1 焦碳酸二乙酯(DEPC)室温浸泡 2 h,无菌水淋洗数次,100 ℃ 干烤 15 min, 1.034×10^5 Pa 高压灭菌 15 min,备用。

1.4 标本 RNA 提取 同时使用对照组装置和实验组装置对 67 份标本进行 RNA 抽提,其中 A 标本使用对照组装置抽提, B 标本使用实验组装置。

1.5 性能评价 (1)提取工作效率:记录对照组装置和实验组装置完成 67 份标本 RNA 抽提所需时间。(2)浓度及纯度检测:标本 4 倍稀释后,直接使用 eppendorf bioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪测定标本的 OD260、OD260/OD280 及 OD260/OD230。可分别反映标本抽提总 RNA 浓度、蛋白质干扰及有机溶剂残留情况。(3)完整性检测:取 10 μ L 提取标本与 2 μ L 上样缓冲液混匀,点样于 1% 琼脂糖凝胶, 0.5 TBE 电泳缓冲液环境下,110 V 恒压电泳 15 min,然后 0.5 μ g/mL 溴化乙锭(EB)染色 5 min,最后凝胶电泳成像系统拍照检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并对数据进行单样本 KS 检验,验证数据正态性分布规律。组间比较应用配对 t 检验,对 2 组数据的相关性使用线性回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 种装置工作效率结果比较 对照组装置处理 67 份 RNA 标本抽提用时 69 min,处理效率平均为 0.97 份/分;实验组装置用时 41 min,效率平均为 1.63 份/分,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 2 种装置 RNA 浓度及纯度检测结果比较 对照组标本检测 OD260 为 (1.555 ± 0.134) ,实验组为 (1.627 ± 0.136) 。计算 2 组 RNA 浓度分别为 $(248.8 \pm 21.4) \mu\text{g/mL}$ 和 $(260.3 \pm 21.8) \mu\text{g/mL}$ 。对照组 OD260/OD280 及 OD260/OD230 比值分别为 (1.995 ± 0.095) 和 (2.020 ± 0.082) ,实验组分别为 (2.093 ± 0.092) 和 (2.071 ± 0.120) 。2 种装置抽提 RNA 浓度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 种装置抽提标本 RNA 蛋白质干扰及有机溶剂残留, RNA OD260/OD280 95%CI 为 1.80~2.00, OD260/OD230 95%CI 大于 2.00。相关性分析显示, $Y = 0.950X + 0.039$, $R^2 = 0.903$, 2 组数据相关性良好。

2.3 2 种装置 RNA 完整性结果比较 凝胶电泳成像系统拍照检测,电泳结果显示,2 种设备提取的总 RNA 有 2 条整齐、清晰条带(18S、28S),说明 2 种设备在 RNA 提取过程中, RNA 降解少,完整性较好,2 组完整性均符合要求。见图 1、2。

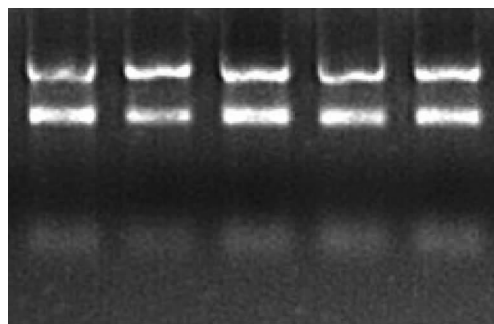


图 1 自制装置提取 RNA(A13-A17)

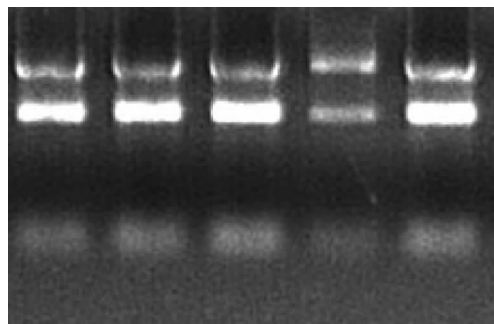


图 2 配套装置提取 RNA(B13-B17)

3 讨 论

方法学评价通过实验途径测定分析方法的技术性能,确认其是否满足临床使用要求或验证是否达到厂家声明的技术性能指标^[4-6]。血液中提取 RNA 是分子生物学研究中常用的重要实验技术^[7-8]。RNA 分子结构极不稳定,可受较多因素改变而降解^[9-10]。本研究 RNA 提取采用柱式分离技术^[11]。

本研究结果表明, RNA 提取工作效率上,对照组装置为 69 min,处理效率平均为 0.97 份/分;实验装置为 41 min,平均为 1.63 份/分,实验组远高于对照组。对照组装置每次只能处理 16 份标本,当标本大于 16 份时,需多次处理,67 份标本须下柱 4 次及装柱 5 次;实验组装置可一次性完成 67 份标本处理。本实验室日均处理 RNA 抽提标本在 125 份以上,可节约时间近 60 min,提示标本量越大,优势越明显。使用实验组装置降低等待下游检测时间太长所致的 RNA 降解风险^[12-13]。2 组抽提标本 RNA 浓度结果显示,对照组装置为 $(248.8 \pm 21.4) \mu\text{g/mL}$,实验组装置为 $(260.3 \pm 21.8) \mu\text{g/mL}$,实验组装置抽提标本 RNA 浓度较高,差异有统计学意义($t = 24.570$, $P < 0.001$)。相关性分析表明, $Y = 0.950X + 0.039$, $R^2 = 0.903$, 2 组数据相关性良好。

OD280 nm 和 OD230 nm 的吸光度分别代表蛋白质和有机溶剂含量, OD260/OD280 和 OD260/OD230 比值可考察上述物质在 RNA 进行下游检测时的干扰程度,即反映抽提的 RNA 纯度^[14]。对照组装置的 OD260/OD280 和 OD260/OD230 分别为 (1.995 ± 0.095) 和 (2.020 ± 0.082) , 95%CI 为 1.964~2.025 和 2.001~2.040;实验组装置为 (2.093 ± 0.092) 和 (2.071 ± 0.120) , 95%CI 分别为 2.075~2.113 和 2.044~2.103,说明 2 组 OD260/OD280 的 95%CI 为 1.80~2.00, OD260/OD230 的 95%CI > 2.00 ,证明 2 种装置提取 RNA 纯度均较好,但实验组装置的 OD260/OD280 和 OD260/OD230 比值较对照组大,纯度更好,可能与抽提过程中扣式装置传递和维持负压更稳定有关。RNA 完整(下转第 2727 页)

(30.86%),与其他研究报道一致^[5,10-11]。文化程度类别以文盲的阳性率最高(16.08%),其次是小学文化人群(14.62%),仍与有关学者的研究一致^[7,10-11]。提示钦州市钦南区 HIV 感染者以离异或丧偶、文化程度低、老年、农民居多,可能是老年人文化低下,自我保护意识差,易发生不安全的性行为,也反映出该地区 AIDS 流行特征^[12-13]。说明老年人群性需求不减,更需加强防治 AIDS 的健康教育。

本研究 HIV 抗体检测标本结果表明,VCT 人群尽管阳性率不是最高,但呈逐年增高的趋势,说明该地区通过广泛开展健康教育与健康促进活动,加强了当地人群的自我保护和自我防范意识。自愿咨询和主动检测,对及早发现 HIV/AIDS 病例具有临床价值。

参考文献

- [1] Wu Z, Sun X, Sullivan SG, et al. Public health, HIV testing in China[J]. Science, 2006, 312(5779): 1475-1476.
- [2] 唐任光, 农乐根. 人类免疫缺陷病毒检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(6): 356-359.
- [3] Owens DK, Nease RF, Harris RA. Cost-effectiveness of HIV screening in acute care settings[J]. Arch Inter Med, 1996, 156(4): 394-404.
- [4] 周月姣, 谭广杰, 于丽, 等. 2008~2011 年广西艾滋病自愿咨询检测结果分析[J]. 中国艾滋病性病, 2012, 18(11): 770-772.
- [5] 陈洁, 韦正亚, 孙琳. 2010~2012 年扬州市艾滋病自愿咨询检测门诊求询者资料分析[J]. 预防医学论坛, 2013, 19(11): 878-879.

(上接第 2724 页)

性分析显示,2 种设备提取的 RNA 在 28S 及 18S 处有 2 条明显的条带,且 28S 亮度大于 18S,说明 2 种设备在 RNA 提取过程中, RNA 降解少,完整性较好。

综上所述,实验组装置 RNA 抽提质量稍好于对照组,能保证 RNA 的浓度、纯度及完整性,可在临床实验室使用,且工作效率提高较大,解决了负压抽提装置普遍存在需借助人手按压启动、压力易泄露、易损坏及柱子容纳数量少等缺点,实用性增强,具有更优的临床价值。

参考文献

- [1] 刘洪波, 刘晓雷, 罗小铭. 核酸提取方法进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(16): 3187-3190.
- [2] 章林华, 王丰园. 核酸提取方法的改进[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(5): 591.
- [3] 张杰, 武晶晶, 赵飞飞, 等. 不同温度和不同放置时间对总 RNA 提取浓度和纯度的影响[J]. 实验技术与管理, 2013, 30(11): 79-82.
- [4] 辛运超. 细菌生物膜 RNA 提取方法研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2): 244-246.
- [5] 何松哲, 何慧, 陈懿, 等. 不同保存和处理方式对全血标本总 RNA 提取的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27

- [6] 沈平, 黄毅毅, 蒋丽萍, 等. 钦州市钦南区防治艾滋病健康教育与健康促进效果评价[J]. 中国热带医学, 2015, 15(12): 1456-1459.
- [7] 刘红新, 郭松洋, 王会松, 等. 2009~2013 年北京市昌平区艾滋病自愿咨询检测情况分析[J]. 中国健康教育, 2014, 30(10): 937-939.
- [8] 梁章琴, 林世清, 韦克波, 等. 2011 年河池市艾滋病自愿咨询检测资料分析[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(12): 934, 936.
- [9] 车晓文, 吴桂萍, 梅林, 等. 2011~2012 年太原市艾滋病自愿咨询检测资料分析[J]. 预防医学论坛, 2014, 20(4): 288-289.
- [10] 郑敏, 申莉梅, 姚永明, 等. 贵州省 2009~2011 年艾滋病咨询检测情况分析[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(5): 682-683.
- [11] 方清艳, 张强, 杨志芳, 等. 2008~2010 年云南省 CDC 艾滋病自愿咨询检测情况分析[J]. 皮肤病与性病, 2011, 33(5): 295-297.
- [12] 沈平, 黄毅毅, 徐静, 等. 钦州市钦南区 2000~2012 年老年人艾滋病流行病学特征分析[J]. 中国农村卫生事业管理, 2013, 33(4): 423-426.
- [13] 沈平, 黄毅毅, 蒋丽萍, 等. 艾滋病防治攻坚工程下钦州市钦南区艾滋病流行特征分析[J]. 中国农村卫生事业管理, 2015, 35(9): 1170-1173.

(收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-04-21)

(2): 223-226.

- [6] 王惠民, 王清涛. 临床实验室管理学[M]. 6 版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 68-97.
- [7] J· 萨姆布鲁克, D· W· 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 北京科学出版社, 2002: 516-522.
- [8] 孟浩, 彭贞, 王闯, 等. 血液总 RNA 提取方法的比较[J]. 塔里木大学学报, 2014, 26(1): 46-49.
- [9] Jiang Z, Uboh CE, Chen J, et al. Isolation of RNA from equine peripheral blood cells: comparison of methods[J]. Springerplus, 2013, 2(1): 478-479.
- [10] 邱方, 陈子祥, 杨清玉, 等. 不同方法提取血清总 RNA 的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 457-458.
- [11] 刘学敏, 陈丽茹, 马冬雪, 等. 丙肝病毒 RNA 提取方法优化研究[J]. 现代仪器与医疗, 2015, 21(5): 50-52.
- [12] 邱方, 陈子祥, 杨清玉, 等. 不同方法提取血清总 RNA 的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 457-458.
- [13] 黄培堂, 俞炜源, 陈天弥. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998: 75-81.
- [14] 穆龙龙, 赵志英, 朱立. 全血标本保存条件对人总 RNA 提取效率的影响[J]. 北京医学, 2010, 32(10): 837-840.

(收稿日期:2016-03-01 修回日期:2016-04-23)