

• 论 著 •

蛋白酶 K 预处理在 SARS-CoV-2 核酸提取中的应用探讨^{*}

王 念, 巫丽娟, 周 易, 宋兴勃, 叶远馨, 钟慧钰, 周汶静, 陶昕彤, 刘堂喻亨,
宋佳佳, 斯艳君, 陆小军, 应斌武[△]

四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041

摘 要:目的 探讨蛋白酶 K(PK)在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)不同类型标本中的应用价值。方法 通过对临床上确诊新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者核酸检测阳性的 50 份鼻咽拭子标本和 20 份粪便标本分别进行平行实验,向其中一份加入 PK 进行预处理(PK 组),而另外一份则不加入 PK(未处理组)。使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对标本进行 RNA 提取,提取的 RNA 经实时荧光定量 PCR(qPCR)进行 SARS-CoV-2 核酸检测。结果 对 50 份鼻咽拭子标本和 20 份粪便标本的 qPCR 结果中 ORF 基因和 N 基因的循环阈值进行分析,未处理组和 PK 组实验结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对 SARS-CoV-2 鼻咽拭子标本和粪便标本进行提取时,PK 的预处理对核酸检测结果没有影响。

关键词:新型冠状病毒; 蛋白酶 K; 核酸提取; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.007

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)01-0030-04

文献标志码:A

Application of protease K pretreatment in nucleic acid extraction of SARS-COV-2^{*}

WANG Nian, WU Lijuan, ZHOU Yi, SONG Xingbo, YE Yuanxin, ZHONG Huiyu, ZHOU Wenjing,
TAO Xintong, LIU Tangyuheng, SONG Jiajia, SI Yanjun, LU Xiaojun, YING Binwu[△]

Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University,
Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract:Objective To explore the application of protease K (PK) in different types of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Methods** Corona virus disease 2019 (COVID-19) patients with clinically confirmed 50 cases of nasopharyngeal swabs and 20 stool specimens were tested for parallel treatment. One group was pretreated with PK (group PK), while the other was not treated with PK (untreated group). RNA was extracted by NucliSENS easyMAG magnetic bead extraction system. The extracted RNA was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). **Results** The circulating thresholds of ORF gene and N gene in 50 nasopharyngeal swabs and 20 fecal samples were analyzed. There was no significant difference between untreated group and PK group ($P>0.05$). **Conclusion** The pretreatment of PK has no effect on the results of nucleic acid detection in the nasopharynx swab and fecal samples of SARS-CoV-2 by NucliSENS easyMAG magnetic bead extraction system.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; proteinase K; nucleic acid extraction; real-time fluorescence quantitative PCR

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的迅速传播,已严重危害人类健康。早期实验室诊断可及时隔离新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者及其密切接触者,打破传播链^[1-2]。同时,早期诊断和治疗可使患者有更好的结局^[3]。大多数临床实验室采用实时荧光定量 PCR(qPCR)对 SARS-CoV-2 进行核酸检测^[4]。然

而,SARS-CoV-2 核酸检测的阳性率并不高。其中,核酸提取效率是影响其检出率的重要因素之一。因为蛋白酶 K(PK)可对生物标本中的蛋白质进行消化,同时还可降解标本中的 RNA 核酸酶,阻止 RNA 被降解,对标本进行 PK 预处理可能会提高核酸的提取效率,从而降低其循环阈值(Ct 值),提高阳性检出率。

^{*} 基金项目:四川省科技厅新型冠状病毒科技攻关应急项目(2020YFS004);四川大学 nCoV 应急项目(2020scunCoV 应急 10003);四川大学华西医院新型冠状病毒肺炎疫情科技攻关项目(HX-2019-nCoV-008、HX-2019-nCoV-048)。

作者简介:王念,女,技师,主要从事疾病的分子诊断相关研究。 [△] 通信作者, E-mail:yingbinwu@scu.edu.cn。

本文引用格式:王念,巫丽娟,周易,等.蛋白酶 K 预处理在 SARS-CoV-2 核酸提取中的应用探讨[J].国际检验医学杂志,2021,42(1):30-33.

因此,本文就核酸提取前预处理是否需要加入 PK 进行探讨。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取本院 2020 年 1 月 25 日至 6 月 30 日临床上收集的 COVID-19 患者(根据 SARS-CoV-2 相关指南确诊)^[4]的核酸阳性标本共 70 份,其中包括 50 份鼻咽拭子标本和 20 份粪便标本。

1.2 仪器与试剂 鼻咽拭子含植绒拭子及 3 mL 保存液购自深圳海尔施生物医药股份有限公司;病毒 RNA 提取采用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统(购自法国生物梅里埃公司);PK 试剂购自瑞士罗氏公司;SARS-CoV-2 检测试剂购自湖南圣湘生物科技股份有限公司,采用 SLAN-96P 仪(购自上海宏石医疗科技有限公司)进行 qPCR 扩增。

1.3 标本处理与提取 所有标本先经过 56 ℃、30 min 灭活。鼻咽拭子标本:取出标本后混匀保存液,分别取 2 份 1 mL 待测标本于 1.5 mL 小型离心管中,其中 1 份加入 50 μL PK(20 mg/mL),56 ℃下孵育 30 min,另 1 份则直接在 56 ℃下孵育 30 min。粪便标本:取黄豆般大小的大便置于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 生理盐水充分振荡混匀,1 000 r/min 离心 5 min,分别取 2 份 1 mL 上清液于 1.5 mL 小型离心管中,其中 1 份加入 50 μL PK(20 mg/mL),56 ℃下孵育 30 min,另 1 份则直接在 56 ℃下孵育 30 min。所有标本的 SARS-CoV-2 核酸提取均采用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统进行裂解、吸附和洗脱,洗脱体积为 50 μL。

1.4 标本扩增 根据试剂盒说明书对 qPCR 扩增体系进行配制,于 qPCR 仪上进行 SARS-CoV-2 的 ORF 基因和 N 基因扩增检测。扩增循环参数设定:反转录 50 ℃ 30 min;cDNA 预变性 95 ℃ 1 min;变性 95 ℃ 15 s;退火、延伸及荧光采集 60 ℃ 30 s,45 个循环。

1.5 结果判读 首先,分析内标 VIC 通道是否有扩

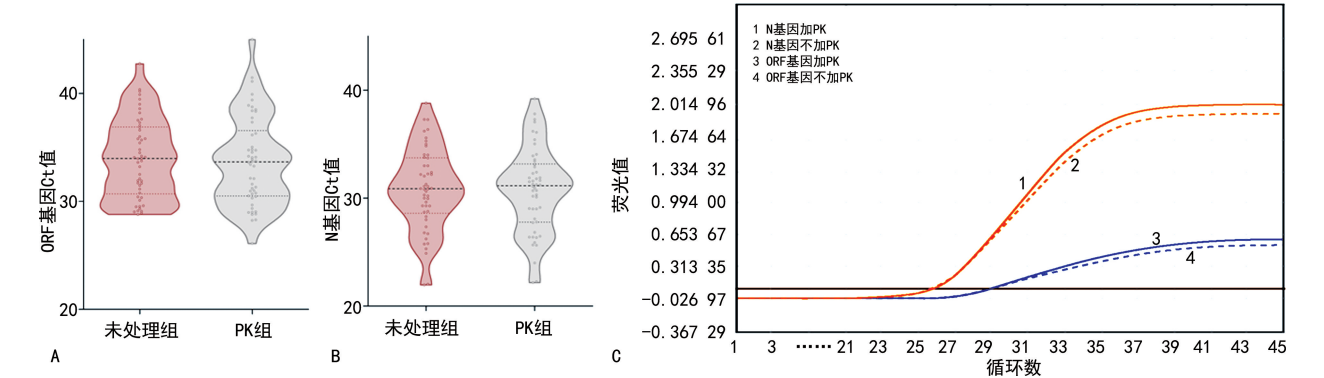
增曲线,且扩增产物的荧光信号是否达到设定的荧光阈值所对应的 Ct≤40。然后,再分析 FAM 或 ROX 通道是否检测到典型的 S 型扩增曲线。若 Ct≤40,则判定该结果为 SARS-CoV-2 核酸检测阳性;若 FAM 及 ROX 通道均未检测到典型的 S 型扩增曲线(未检测到 Ct),或 Ct>40,则表示 SARS-CoV-2 核酸检测阴性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对核酸检测结果中的 ORF 基因和 N 基因的 Ct 值进行数据处理,计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 t 检验进行比较分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

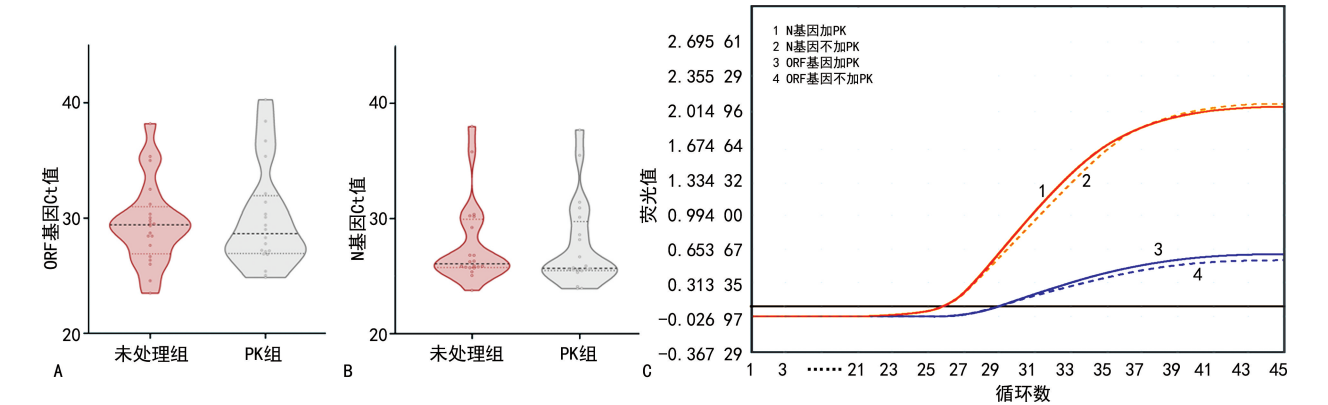
2.1 鼻咽拭子标本预处理的结果比较 在确诊 SARS-CoV-2 患者核酸阳性的 50 份鼻咽拭子标本中,结果显示,未处理组的 ORF 基因的 Ct 值为 33.92±4.42,PK 组的 ORF 基因的 Ct 值为 34.21±3.99,两组比较差异无统计学意义(P>0.05);未处理组的 N 基因的 Ct 值为 30.83±3.99,PK 组的 N 基因的 Ct 值为 31.12±4.31,两组比较差异无统计学意义(P>0.05)。因此,在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统提取 SARS-CoV-2 核酸时,增加 PK 预处理步骤对鼻咽拭子标本的检测结果没有影响。见图 1。

2.2 粪便标本预处理的结果比较 在确诊 SARS-CoV-2 患者核酸阳性的 20 份粪便标本中,结果显示,未处理组的 ORF 基因的 Ct 值为 31.37±5.90,PK 组的 ORF 基因的 Ct 值为 31.08±5.71,两组比较差异无统计学意义(P>0.05);未处理组的 N 基因的 Ct 值为 27.74±3.47,PK 组的 N 基因的 Ct 值为 27.80±3.29,两组比较差异无统计学意义(P>0.05)。因此,在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统提取 SARS-CoV-2 核酸时,增加 PK 预处理步骤对粪便标本的检测结果没有影响。见图 2。



注:A为鼻咽拭子 SARS-CoV-2 标本 ORF 基因 Ct 值分散情况;B为鼻咽拭子 SARS-CoV-2 标本 N 基因 Ct 值分散情况;C为同一鼻咽拭子标本经两组平行实验后 PCR 扩增曲线图。

图 1 鼻咽拭子标本结果图



注:A为粪便 SARS-CoV-2 标本 ORF 基因 Ct 值分散情况;B为粪便 SARS-CoV-2 标本 N 基因 Ct 值分散情况;C为同一粪便标本经两组平行实验后 PCR 扩增曲线图。

图 2 粪便标本结果图

3 讨 论

SARS-CoV-2 侵入人体宿主细胞是由细胞膜上血管紧张素转化酶 2 受体所介导,血管紧张素转化酶 2 受体广泛存在于呼吸道、口腔、回结肠等部位的上皮细胞中。呼吸道标本、消化道标本、血液标本均可作为实验室核酸检测的标本来源。由于 COVID-19 患者上呼吸道症状较弱,理论上下呼吸道标本(深部咳痰和气道抽取物)应作为核酸检测首选,但因多数患者咳嗽困难,下呼吸道标本不易获得且存在较大的生物安全操作风险,故临床病原体标本主要以较易获得的鼻拭子或口咽拭子标本为主。因 SARS-CoV-2 可在人肠道上皮细胞进行感染复制,且有研究提出粪便中 SARS-CoV-2 核酸检出持续时间更长^[5]。因此,粪便标本中病毒核酸检出率对于患者是否达到出院标准及是否存在传染性的判断具有重要意义。目前粪便也是主要的检测标本之一。因 qPCR 具有快速、简便、特异度高、灵敏度高、成本较低的特点,已成为 SARS-CoV-2 核酸检测的主要检测技术。目前,国内有上百家企业研发了 SARS-CoV-2 qPCR 检测试剂盒,其中有 9 个已经获得了国家药品监督管理局批准。在符合国家药品监督管理局批准程序的临床试验中,所有试剂盒与确诊病例标本的灵敏度均超过 90%。然而,在实际的临床检测中,患者的阳性检出率并不高,阳性检出率仅为 30%~50%^[6-8]。影响核酸阳性检出率的因素较多,其中核酸提取效率是主要因素之一。

虽然,影响核酸提取效率的因素较多,但可以从多方面进行改进,从而提高核酸阳性检出率。标本提取前预处理是临床上提高核酸提取效率的常用方法,其中,利用 PK 进行预处理最为常见。而关于 PK 预处理是否可以提高核酸提取效率,国内外所做研究报道较多,但结论并不一致。如在 KHELAIFIA 等^[9]对粪便标本中细菌 DNA 的提取一文中指出 PK 的预处理可提高 DNA 获得率,JIKUZONO 等^[10]指出 PK 预

处理可提高用液基细胞溶液固定的甲状腺细胞的 RNA 回收率,但 GOLDSCHMIDT 等^[11]则在对感染性病原体 DNA 提取的预处理一文中提出,在某些病原体的提取中,PK 的预处理没有必要。而造成这些结论不一的原因可能有如下几点:(1)可能是 PK 性能存在一定差异;(2)可能是寄生虫、细菌、病毒等不同病原体(尤其是 RNA 病毒)对 PK 的预处理效果存在差异;(3)不同的标本类型及提取方法可能影响 PK 的预处理效果等。

在本研究的两组平行实验中,经 PK 预处理的 50 份含有细胞保存液的鼻咽拭子标本的核酸检测结果差异无统计学意义($P>0.05$),且在此次研究的 20 份粪便标本中,其结果与鼻咽拭子标本一致,PK 的预处理在两组平行实验中差异无统计学意义($P>0.05$)。JEDDI 等^[12]关于利用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对寄生虫病和真菌病 DNA 提取优化的分子诊断研究中,提出利用 NucliSENS easyMAG 系统进行核酸提取时,由于 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统中裂解缓冲液具有高解离活性,使 PK 消化在大多数情况下是可有可无的,与本研究结果相符。但有研究表明在对甲型流感病毒、中东呼吸综合征冠状病毒的痰液标本进行预处理的研究中,其研究结果均显示 PK 的预处理较其他预处理方法有较高的提取效率^[13-14]。而导致这种结果差异的主要原因可能跟实验标本的类型不同有关。由于痰液标本中黏液丝的影响,标本可能不易裂解释放病原体,在操作过程中易导致取样不均,以及在进行磁珠提取时易堵塞枪头而无法进行自动提取进而造成结果的不准确。因此,在痰液标本中加入 PK 进行预处理尤为重要,可以提高 RNA 的提取效率。而在本研究中,大多数标本为含有保存液的鼻咽拭子标本,由于细胞保存液中缓冲剂的存在,能最大限度地保持细胞的完整性,并使之充分悬浮及分散,在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统提取病原体时很容易释放核酸。因此,对鼻

咽拭子标本进行 PK 预处理可能并不能提高其提取效率。而对于粪便标本,因本研究中粪便标本仅 20 份,其 PK 预处理的结论仍需大量标本进行验证。

目前对 SARS-CoV-2 检测方法的相关研究较少,其中仅有一篇文献[15]提到了 PK 预处理在“一步法”中的研究。而在实际情况下,因“一步法”检测阳性率较低,其仅用于提取试剂缺乏或一些紧急检测,在常规的 SARS-CoV-2 临床标本检测和筛查中,该方法已被禁止采用。而本研究则讨论 PK 预处理后,采用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对核酸提取效率的影响,具有一定的创新性。

本研究存在一定局限。首先,样本量有限,仍需扩大样本量进一步验证结论。本研究评估了鼻咽拭子标本和粪便标本,未对具有较高检出率的痰液标本进行研究,主要由于 COVID-19 患者上呼吸道症状较弱,痰液标本不易获得,且由于痰液标本中黏液丝的影响,可能导致研究过程中取样不均,从而影响研究结果的准确性。同时,PK 预处理在不同提取方法中的影响也应考虑。

综上所述,在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对含有细胞保存液的 SARS-CoV-2 鼻咽拭子标本和粪便标本进行核酸提取时,对加 PK 和不加 PK 预处理的两组平行实验进行比较,PK 的预处理对 SARS-CoV-2 的检测结果没有影响。因此,在使用 NucliSENS easyMAG 磁珠提取系统对 SARS-CoV-2 标本进行提取时,由于裂解缓冲液的高解离活性,可无需进行 PK 预处理,在一定程度上节省了时间和耗材。

参考文献

[1] CHENG V C C, WONG S C, TO K K W, et al. Preparedness and proactive infection control measures against the emerging novel coronavirus in China[J]. J Hosp Infect, 2020, 104(3): 254-255.

[2] PETO J. COVID-19 mass testing facilities could end the epidemic rapidly[J]. BMJ, 368: m1163.

[3] HUNG I F, LUNG K C, TSO E Y, et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial[J]. Lancet, 2020, 395(10238): 1695-1704.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知(国卫办医函[2020]184 号)[EB/OL]. (2020-03-04)[2020-04-06]. <http://www.nhc.gov.cn/zycj/s7653p/202003/46c9294a>

7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml.

[5] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-273.

[6] WONG S H, LUI R N, SUNG J J. COVID-19 and the Digestive system[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(5): 744-748.

[7] PAN Y, LONG L Y, ZHANG D T, et al. Potential false-negative nucleic acid testing results for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads[J]. Clin Chem, 2020, 66(6): 794-801.

[8] 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(5): 523-526.

[9] KHELAIFIA S, RAMONET P Y, BEDOTTO B M, et al. A semi-automated protocol for Archaea DNA extraction from stools[J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 186.

[10] JIKUZONO T, HORIKAWA A, ISHIKAWA T, et al. Proteinase K treatment improves RNA recovery from thyroid cells fixed with liquid-based cytology solution [J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 822.

[11] GOLDSCHMIDT P, DEGORGE S, MERABET L, et al. Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e94886.

[12] JEDDI F, PIARROUX R, MARY C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction; optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases[J]. Parasite, 2013, 20(2): 52.

[13] YU F, QIU T, ZENG Y, et al. Comparative evaluation of three preprocessing methods for extraction and detection of influenza A virus nucleic acids from sputum[J]. Front Med (Lausanne), 2018, 5(1): 56.

[14] SUNG H, YONG D, KIL C S, et al. Comparative evaluation of three homogenization methods for isolating middle east respiratory syndrome coronavirus nucleic acids from sputum samples for real-time reverse transcription PCR[J]. Ann Lab Med, 2016, 36(5): 457-62.

[15] CHU A W, CHAN W M, LP J D, et al. Evaluation of simple nucleic acid extraction methods for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and saliva specimens during global shortage of extraction kits[J]. J Clin Virol, 2020, 129(2): 104519.