

纳米磁珠提取法在手足口病病原 RNA 提取中的应用

祝俭平, 廖礼梅, 郑敏华, 王庆元, 马秋林 (广东省东莞市妇幼保健院产前诊断中心 523002)

【摘要】 目的 介绍纳米磁珠提取手足口病病原 RNA 的方法。方法 手足口病患儿临床肛拭标本 240 份, 分别以纳米磁珠提取法和经典的 Trizol 提取法提取 RNA, 以实时荧光反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)特异核酸片段。结果 纳米磁珠法检测 EV71 阳性率 27.5%, CA16 阳性率 23.3%; Trizol 法 EV71 阳性率 26.6%, CA16 阳性率 22.1%, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 纳米磁珠提取法操作简单, 快速高效, 适合临床实验室应用于手足口病快速诊断。

【关键词】 纳米磁珠提取; 手足口病; 核酸提取; 实时荧光反转录-聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.08.058 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2013)08-1017-02

手足口病(HFMD)是由肠道病毒引起的急性传染病, 引起手足口病的肠道病毒包括肠道病毒 71 型(EV71)和 A 组柯萨奇病毒(CA)、埃可病毒(Echo)的某些血清型。实时荧光反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)具有高灵敏度和高特异性, 并且快速, 是临床实验室诊断常用方法。周围环境中广泛存在的 RNase(RNA 酶)能快速降解 RNA, 对核酸提取提出更高要求, 提取方法越复杂, RNA 降解就越多, 容易造成假阴性结果。纳米磁珠法能够做到核酸提取过程自动化, 减少人为 RNase 污染, 作者对其和传统的 Trizol 抽提法进行对比, 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2012 年 5 月本院手足口病高峰期, 取门诊及住院临床诊断为手足口病患儿发病 7 d 内的肛拭标本 240 例, 患儿年龄 6 个月至 10 岁。

1.2 仪器设备 Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪及上海之江 EX2400 核酸自动提取仪。

1.3 试剂来源 EV71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)核酸实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒和 Trizol 提取试剂均购自中山大学达安基因股份有限公司, 纳米磁珠 RNA 提取试剂盒购自上海之江公司。

1.4 RNA 提取方法

1.4.1 纳米磁珠自动提取法 肛拭标本溶解于适量生理盐水中, 振荡混匀, 备用。取出一块预装板, 撕开铝箔, 分别加入 6 μ L RNA 助沉剂及 200 μ L 标本于预装板对应的 A1-A12 孔, 将预装板放入核酸自动提取仪的卡槽内, 安装好磁套, 选择程序“RNA Isolation”运行。运行结束后, 弃磁套, 于核酸自动提取仪内取出预装板, E1-E12 对应孔中的液体即为提取好的 RNA, 可直接用于检测。

1.4.2 Trizol 提取法 肛拭标本加入 300 μ L 生理盐水, 振荡洗脱, 洗脱液加入 Trizol 和氯仿, 静置 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min; 样品即分成水样层、中间层和有机层, 收集水样层通过 SiO₂ 沉淀 RNA 来还原, 离心取沉淀加入 75% 乙醇液洗涤, 离心沉淀, 自然干燥, 加入 30 μ L DEPC 水混匀, 待用。

1.5 实时荧光 RT-PCR 检测 肠道病毒 EV71、CA16 特异核酸片段严格按试剂说明书操作。

1.6 统计学处理 SPSS12.0 软件对结果进行分析处理, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

240 例临床标本提取 EV71 和 CA16 病毒核酸, 纳米磁珠法检测 EV71 阳性率 27.5%, CA16 阳性率 23.3%; Trizol 法 EV71 阳性率 26.6%, CA16 阳性率 22.1%, 见表 1。经 SPSS

12.0 统计分析, EV71 和 CA16 两种方法检测对比阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$), 显示纳米磁珠提取法可以用于临床诊断实验。

表 1 两种 RNA 提取方法对 240 例肛拭标本实时荧光 RT-PCR 检测结果[n(%)]

方法	EV71 阳性	CA16 型阳性
纳米磁珠法	66(27.5)	56(23.3)
Trizol 法	64(26.6)	53(22.1)

3 讨 论

手足口病毒属小 RNA 病毒科、肠病毒属, 其中最常见为 EV71 和 CA16 型。柯萨奇病毒是多种疾病的致病原, 不仅可以引起呼吸道感染, 还可引起心肌炎、心肌病及神经系统疾病。柯萨奇病毒分为 A、B 两大组, A 组 23 个型, B 组 6 个型, 能引起手足口病的主要为 A 组的 16 型, A 组的 4、5、9、10 型及 B 组的 5 型亦可引起该病。新肠道病毒包括 4 个血清型(68、69、70、71), 只有 71 型可引起手足口病^[1]。EV71 型常引起重型病例, 造成中枢神经系统感染和心肌炎等, 临床出现致死病例, 迫切需要对 EV71 进行快速检测。临床常用检测方法为实时荧光 RT-PCR, 其具有高度灵敏度和高特异性, 与病毒学培养结果一致^[2]。核酸提取的原理主要分为 3 个部分: 第一部分是利用裂解液促使细胞破碎, 使细胞中的核酸释放出来; 第二部分是把释放的核酸特异性地吸附在特定的载体上, 当然这种载体只对核酸有较强的亲和力和吸附力, 而对其他的生化组分如蛋白质、多糖、脂类则既不亲和也不吸附; 第三部分是把吸附在特定载体上的核酸洗脱下来, 从而得到纯化的核酸。现今核酸提取有各种方法, 主要是针对第二部分使用特定载体的不同而区分, 常见的有 Trizol 提取法、旋转离心柱提取法、玻璃粉吸附法、纳米磁珠提取法等^[3]。其中纳米磁珠提取法可应用于全自动核酸提取仪, 提取自动化, 不但大大降低提取的劳动强度, 而且减少了核酸手工提取中容易出现的操作失误, 增加核酸提取的一致性和重复性。

纳米磁珠法中使用的磁性微球在 1996 年开始出现, 是将无机磁性粒子与高分子材料结合形成的一种复合微球, 是新型功能材料。由于其自身兼具高分子微球和磁性粒子的众多特性, 故无外增加磁场时在溶液中分散均匀、稳定; 增加外磁场则可简单快速分离, 可以通过共聚、表面改性赋予其表面多种反应性功能基团, 具有良好的生物相容性, 使传统繁重的核酸提取过程变为自动化^[4]。目前大多数全自动核酸提取仪都是采用硅吸附法, 把二氧化硅等成分吸附到磁珠表面对 RNA 进行

提取。本文对纳米磁珠法和 Trizol 法提取手足口病 RNA 病毒进行对比,结果两种方法效果接近,差异无统计学意义。EV71 和 CA16 阳性率用纳米磁珠法测定分别为 27.5% 和 23.3%,和广东省内其他医院基本相同^[5]。

经典的 Trizol 提取法,提取 RNA 纯度高,缺点是操作较为烦琐,抽提和沉淀等操作都可能引起 RNA 的损失。而全自动核酸提取仪法利用磁性颗粒从样品裂解物中捕获总 RNA,对总 RNA 的破坏较小,同时自动化核酸提取也避免了交叉污染的可能性^[6]。本次实验中,纳米磁珠法有 5 例检出阳性,而在 Trizol 法中为阴性,可能是因为 Trizol 法核酸提取处理时间较长,操作较为烦琐,周围环境中广泛存在的 RNase(RNA 酶)能快速降解 RNA,造成标本假阴性结果。在处理大批量标本时,纳米磁珠法应用于自动分析仪总耗时少,提取效率高,具有明显的优势。

参考文献

[1] 倪语星,尚红.临床微生物学与检验[M].4版.北京:人民

卫生出版社,2009:436-438.

[2] 李金明,熊德琴,齐晓彤,等.实时荧光定量 PCR 在手足口病病原体检测中的应用[J].实验与检验医学,2011,29(2):129-130.
 [3] 李金明.实时荧光 PCR 技术[M].北京:人民军医出版社,2011:75-80.
 [4] 刘晓红,布和巴特尔,黄波,等.生物提取用磁性微球的制备及其性能[J].化学工程师,2010,24(9):64-66.
 [5] 黄建国,吴立文,骆志辉,等.手足口病肠道病毒 EV71 和 CoxA16 感染的检测分析[J].实验与检验医学,2011,29(3):328-330.
 [6] 傅松哲,倪贤生,夏文,等.3 种核酸提取方法检测甲型 H1N1 流感病毒的比较[J].中国热带医学,2010,10(7):783-785.

(收稿日期:2012-10-04 修回日期:2012-12-12)

美创 AMAX-200 血凝分析仪性能的初步评价

张鸿伟¹,刘 斌²(1.昆明市第一人民医院检验科 650011;2.楚雄医药高等专科学校检验系医学检验专业 2007 级 5 班,云南楚雄 675005)

【摘要】 目的 初步探讨已在实验室使用两年的德国美创 AMAX-200 血凝分析仪性能是否满足临床需要。**方法** 运用国际血液学标准委员会(ICSH)公布的专业技术方案,用新鲜混合血浆和定值参比血浆来测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(Fib)项目,进行精密度、准确度、携带污染率、抗干扰能力等试验。**结果** PT(s)、APTT(s)、TT(s)和 Fib(g/L)的批内精密度为 1.01%~5.22%,批间精密度为 3.47%~4.71%,携带污染率为 0.4%~3.4%,均小于 5.0%。抗黄疸能力强,在加入总胆红素浓度 0~3 198 μmol/L 时 Fib、TT、APTT 影响度小于 5.00%,但 PT 影响度相比较其他项目增大(为 7.09%),均在美国 CLIA'88 规定的允许偏差范围之内;加入三酰甘油含量 0~5.64 mmol/L 时,PT、TT、Fib、APTT 受干扰小,但三酰甘油含量大于 5.64 mmol/L 时,PT 相比较其他项目影响度增大(影响度在 9%~10%);而溶血标本,Fib 在血红蛋白含量大于或等于 4.8 g/L 时干扰增大(影响度为-10.69%~-11.64%)。故在实际工作中应尽量避免溶血和重度黄疸标本,以保证检测质量。**结论** 德国美创 AMAX-200 血凝分析仪在使用两年后仍具有较高的精密度和准确度,也具有较好的抗干扰能力,可继续适用于检验科的正常使用。

【关键词】 全自动血凝仪; 血液凝固; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.08.059 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2013)08-1018-03

本院检验科急诊化验室引进 AMAX-200 凝血分析仪使用已两年,并且为 24 h 运转,为了更好地了解该仪器的性能,根据《医学实验室质量与能力认可准则》的要求,设备在常规使用中应显示出能够达到规定的性能标准,亦需进行性能评估^[1]。根据国际血液学标准委员会(ICSH)和美国国家临床实验室标准委员会(CLSI)的有关文件要求^[2-3],并参考了部分文献资料^[4-6],作者用新鲜血浆和质控血浆从精密度、准确度、携带污染率、抗干扰能力(以影响度作为评价指标)等方面对美创 AMAX-200 凝血分析仪磁珠凝固法检测的常规凝血项目进行性能初步评估,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器 德国美创 AMAX-200 血凝分析仪,仪器操作和维护保养遵循仪器使用说明书。

1.2 试剂 (1)凝血酶原时间(PT):天津美创太平洋科技有限公司生产,批号 T-812,ISI 值为 1.04。(2)凝血酶时间(TT):上海太阳生物技术有限公司生产,批号:122041。(3)活化部分凝血活酶时间(APTT):德国美创(北京美创公司)生产,批号:

TE09835。(4)纤维蛋白原(Fib):德国美创(北京美创公司)生产,批号:TOC031。

1.3 混合血浆的准备

1.3.1 样本采集方法 抗凝全血标本用真空负压采血管采集 2.7 mL 静脉血,枸橼酸钠(109 mmol/L)抗凝剂 0.3 mL 抗凝,抗凝比例为 1:9,充分混匀。

1.3.2 正常混合血浆的制备 收集健康体检人员血浆 20 份,男女各半,采血后半小时内 3 000 r/min 离心 10 min 后每管收集 1.5 mL 至干净容器内,总共约 30 mL 充分混匀,分装后密封放置于-80℃冰箱保存待用。

1.3.3 异常混合血浆的制备 收集肝移植患者及肝病患者异常血浆 20 份,男女各半,采血后半小时内 3 000 r/min 离心 10 min 后每管收集 1.5 mL 至干净容器内,总共约 30 mL 充分混匀,分装后密封放置于-80℃冰箱保存待用。

1.4 干扰物的准备

1.4.1 溶血物的准备 用血常规管采集静脉血 3 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上层血浆,留下红细胞层,加入蒸馏水