

chological intervention for Syrians residing in a refugee camp[J]. Eur J Psychotraumatol, 2021, 12(1):1932295.

[14] 程煜,袁淑娟,郑阳,等. 团体心理干预对脑卒中偏瘫病人肢体运动功能及照料者心理状态的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(19):3323-3325.

[15] 陈涛,石瑾,周叶. 团体心理干预在社区失智失能老人照护者中的应用效果评估[J]. 上海医药, 2021, 42(10):52-85.

[16] SMEETH D, BECK S, KARAM E G, et al. The role of epigenetics in psychological resilience[J]. Lancet Psychiatry, 2021, 8(7):620-629.

[17] 方英,林丽红,李霞. 家庭尊严干预对阿尔茨海默症患者主要照顾者心理状态的影响研究[J]. 护理管理杂志, 2021, 21(2):118-122.

[18] 万金,潘堃婷,李琼,等. 医务人员抗逆力团体辅导有效性及其后效研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2022, 30(4):557-561.

[19] 刘晓华,赵晓霞,景彩丽,等. 团队积极心理干预对护士遭受生活事件冲击后心理状态和应对方式的影响[J]. 中华现代护理杂志, 2021, 27(23):3092-3096.

(收稿日期:2022-09-20 修回日期:2022-12-20)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.09.030

不同方法处理核酸片段的对比研究*

黄小晔,彭丽,梁剑琦,陈伟[△]

湖南省娄底市中心医院检验科,湖南娄底 417000

摘要:目的 探讨不同处理方法对核酸片段的清除效果,为核酸检测实验室尤其是基层实验室寻求简单方便又行之有效的实验室污染处理方法。**方法** 分别用 75%乙醇、含氯消毒剂、紫外线处理 2 种不同长度(120 bp 和 1 600 bp)的高水平核酸片段,利用琼脂糖电泳技术及凝胶成像技术验证核酸片段的完整性,比较 3 种方法对核酸片段的清除效果。**结果** 75%乙醇、紫外线对核酸片段的清除无明显效果,含氯消毒剂在有效氯终水平 $\geq 2\,500\text{ mg/L}$ 时能有效清除核酸片段。**结论** 84 消毒液是最常见的含氯消毒剂,配置适合水平的 84 消毒液能有效处理实验室的核酸污染,值得在基层实验室大力推广应用。

关键词:核酸检测; 实验室污染; 含氯消毒剂; 75%乙醇; 紫外线

中图分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2023)09-1313-03

新型冠状病毒(以下简称新冠病毒)感染的症状不同于典型肺炎,且对常规抗病毒治疗无效。在我国最新版本诊疗方案中,新冠病毒核酸检测仍为诊断提供直接证据^[1],现在最常用的是实时荧光定量反转录 PCR 法,它是一种灵敏度和特异度高且已在临床广泛使用的感染性病原体核酸检测技术^[2-3]。尽管核酸检测技术有诸多优点,但由于其超高的灵敏度,一旦实验室出现极微量的核酸污染,很容易导致假阳性,从而影响检测的准确性。有数据显示,实验室假阳性的发生率达 9%~57%^[4]。假阳性的结果跟实验室污染有非常紧密的联系,而实验室污染主要出现在标本处理环节的抽提核酸、检测环节的扩增产物和阳性质控的泄露等,这些情况均会导致严重的实验室污染。目前主要通过严格的带负压分区的物理隔绝方法及实验室标准操作规程防止核酸污染^[5-6],但是这种方法只能延缓污染不能清除已经发生的污染。如何能够避免实验室污染的产生及污染产生后如何快速地消除,对于基层实验室来说是十分重要而且紧急的任务。本研究选取 3 种常见处理方式(75%乙醇、紫外线、含氯消毒剂)分别对 2 种不同长度(120 bp 和

1 600 bp)的高水平($>10^{13}\text{ copy/mL}$)核酸片段进行清除,以 2 种核酸片段的混合液作为阳性对照,利用实时荧光定量 PCR 和琼脂糖电泳及凝胶成像技术,比较不同处理方法对核酸的清除效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪和 E-Gel Imager 凝胶成像系统购自赛默飞世尔公司,电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司,西班牙琼脂糖、荧光定量 PCR 试剂盒、标志物、引物探针购于大连宝生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 75%乙醇清除核酸 将 100 μL 混有 2 种核酸片段的混合液与等体积 75%乙醇混匀,处理时间分别为 0.5、2.0、6.0 h,每隔半小时振荡混匀一次,取 5 μL 为模板进行实时荧光定量 PCR 验证降解效果,同时取 5 μL 模板采用凝胶电泳(1%琼脂糖)验证核酸片段的完整性。

1.2.2 紫外线清除核酸 将 100 μL 混合液暴露在紫外线下(紫外强度 $\geq 90\text{ }\mu\text{W/cm}^2$),暴露时间分别为 0.5、2.0、6.0 h,加入适量纯水使暴露后最终体积仍为

* 基金项目:湖南省娄底市中心医院院级课题项目(Y2021-05)。

[△] 通信作者, E-mail: chenweiwxcx@sina.com。

100 μ L,取 5 μ L 为模板进行实时荧光定量 PCR 验证降解效果,同时取 5 μ L 模板采用凝胶电泳(1%琼脂糖)验证核酸片段的完整性。

1.2.3 含氯消毒剂清除核酸 将 100 μ L 混合液分别与等体积有效氯水平(分别为 500、1 000、2 500、5 000 mg/L)的 84 消毒液混匀,处理 2 h,期间每隔半小时振荡混匀一次,采用凝胶电泳(1%琼脂糖)鉴定不同水平下 84 消毒液对核酸片段的影响。

选取有效氯水平 2 500 mg/L 的 84 消毒液,将

100 μ L 混合液与其等体积混匀,分别处理 15、30、60 min,采用凝胶电泳(1%琼脂糖)鉴定此水平下 84 消毒液处理不同时间对核酸片段的影响。

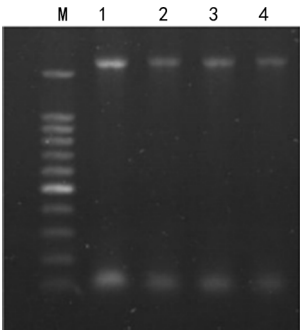
2 结 果

2.1 不同方法处理核酸片段的效果 75%乙醇和紫外线处理 6 h 以后,对高水平核酸片段清除无效,有效氯终水平 $\geq 2\,500$ mg/L 可以有效降解核酸片段。见表 1。

表 1 不同方法处理 2 种核酸片段的效果

核酸类型	75%乙醇时间(h)			紫外线时间(h)			含氯消毒剂水平(mg/L)			
	0.5	2.0	6.0	0.5	2.0	6.0	500	1 000	2 500	5 000
短片段	无效	无效	无效	无效	无效	无效	无效	无效	有效	有效
长片段	无效	无效	无效	无效	无效	无效	无效	无效	有效	有效

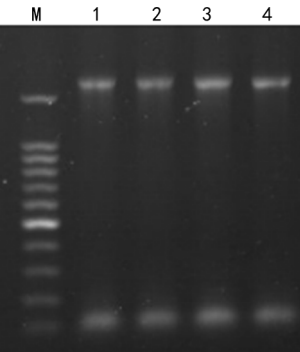
2.2 75%乙醇对核酸片段的清除效果 75%乙醇处理 0.5、2、6 h 后,琼脂糖凝胶电泳显示核酸片段完整性相对于阳性对照无明显改变,实时荧光定量 PCR 的 CT 值(15.32 ± 0.10)亦无明显差别。见图 1。



注:M 为 100 bp~1 500 bp DNA 标志物;1 为阳性对照;2 为处理 0.5 h 的混合液;3 为处理 2.0 h 的混合液;4 为处理 6.0 h 的混合液。

图 1 75%乙醇对核酸清除效果电泳图

2.3 紫外线对核酸片段的清除效果 紫外线分别照射 0.5、2.0、6.0 h 后,琼脂糖凝胶电泳显示核酸片段完整性无明显变化,荧光定量 PCR 的 CT 值(14.75 ± 0.06)无明显差别。见图 2。

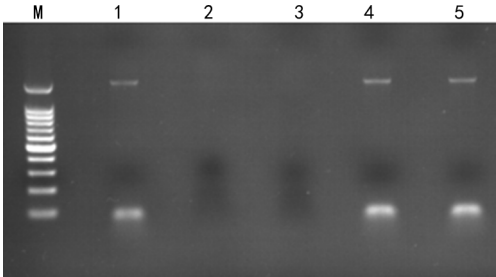


注:M 为 100 bp~1 500 bp DNA 标志物;1 为阳性对照;2 为照射 0.5 h 的混合液;3 为照射 2.0 h 的混合液;4 为照射 6.0 h 的混合液。

图 2 紫外线对核酸清除效果电泳图

2.4 含氯消毒剂对核酸片段的清除效果

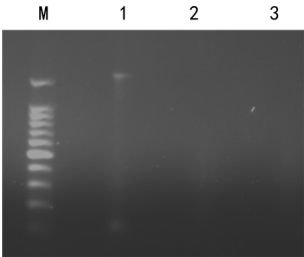
2.4.1 水平因素 有效氯终水平 $\geq 2\,500$ mg/L 的含氯消毒剂能有效去除 2 种不同长度的核酸片段,而终水平 $\leq 1\,000$ mg/L 时,对高水平核酸没有清除能力。见图 3。



注:M 为 100 bp~1 500 bp DNA 标志物;1 为阳性对照;2 为 5 000 mg/L 含氯消毒剂的混合液;3 为 2 500 mg/L 含氯消毒剂的混合液;4 为 1 000 mg/L 含氯消毒剂的混合液;5 为 500 mg/L 含氯消毒剂的混合液。

图 3 鉴定含氯消毒剂对核酸的清除效果电泳图

2.4.2 时间因素 有效氯终水平为 2 500 mg/L 的含氯消毒剂在处理 30 min 及以上时,可有效降解高水平核酸片段。见图 4。



注:M 为 100 bp~1 500 bp DNA 标志物;1 为处理 15 min 的混合液;2 为处理 30 min 的混合液;3 为处理 60 min 的混合液。

图 4 2 500 mg/L 含氯消毒剂处理不同时间对核酸清除效果电泳图

3 讨 论

由于核酸检测的广泛、快速普及,大量基层实验室开展了核酸检测,伴随出现的最突出问题便是核酸污染导致的假阳性结果,因为 PCR 产物拷贝量一般

为 10^{13} copy/mL, 远高于试剂所提供的 500 copy/mL 的检测限, 所以极微量的 PCR 产物污染, 就可造成假阳性。严格的物理分区及逐级负压, 能最大限度地减少污染的产生, 但是无法彻底避免。而且大量基层实验室没有条件做到严格物理分区, 负压实验室更加困难, 因此, 防止和清除核酸污染是基层实验室迫切需要考虑的问题。实验室检测完成后采用房间固定和(或)可移动紫外灯紫外照射 2 h 以上, 用 0.2% 含氯消毒剂或 75% 乙醇对实验台面、地面、生物安全柜等消毒处理, 若有渗漏污染则用 0.55% 含氯消毒剂处理^[7]。

乙醇通过使蛋白质脱水、变性凝固达到灭活病毒的效果, 它不会直接破坏 DNA^[8]。实验室常通过喷洒乙醇对气溶胶进行物理沉降再联合含氯消毒剂或核酸去除剂等清除核酸污染^[9]。本研究结果证明 75% 乙醇独立使用时对清除核酸片段无明显效果。清除核酸污染主要是通过双链间的氢键断开变成单链结构和形成光化产物如嘧啶二聚体等, 从而改变 DNA 的生物活性, 使微生物自身不能复制而致死。郭灵安等^[10]研究表明, 低强度的紫外线 $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 对小片段核酸污染的消除效果并不理想, 本研究结果显示普遍存在于各实验室的紫外灯(紫外强度 $\geq 90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)对清除核酸片段并无明显效果, 该研究结果与上述文献结果相似。含氯消毒剂产生的次氯酸和新生态氧能氧化蛋白质并直接裂解核酸, 它在分子诊断实验室的使用价值已经得到证实^[11], 但含氯消毒剂的具体适宜水平和作用时间并不明确。陈茂义等^[12]发现 500 mg/L 的有效氯水平作用 30 min 不能破坏存在于完整新冠病毒内的核酸成分, 但是 1 000 mg/L 及以上的有效氯水平作用 30 min 后可以破坏。安超等^[13]研究发现 2 000 mg/L 的含氯消毒剂能有效去除单独存在的核酸片段, 但并未说明具体作用时间。由于本研究采用的是高水平的核酸片段($>10^{13}$ copy/mL), 明显高于标本内病毒含量或单独的阳性质控品(10^5 copy/mL), 且因过高的有效氯水平会破坏 PCR 反应试剂成分如酶类, 故采用琼脂糖凝胶电泳鉴定其效果, 得出的最低可清除高水平核酸的含氯消毒剂水平是 2 500 mg/L, 且至少需要 30 min 才能完全清除。

综上所述, 有效氯终水平 $\geq 2 500$ mg/L 的含氯消毒剂处理至少 30 min 后能有效清除不同长度的高水平核酸片段, 但是 75% 乙醇和紫外线处理 6 h 后对高水平核酸片段的清除效果不明显。84 消毒液是一种廉价并广泛使用的含氯消毒剂, 它在灭活病毒和清除

核酸污染方面都具备非常明显的效果, 在基层实验室大力推广的同时必须要关注它的使用水平和时间, 以达到预期效果。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2022, 49(2): 73-80.
- [2] KLUNGTHONG C, CHINNAWIROTPISAN P, HUSEM K, et al. The impact of primer and probe-template mismatches on the sensitivity of pandemic influenza A/H1N1/2009 virus detection by real-time RT-PCR[J]. J Clin Virol, 2010, 48(2): 91-95.
- [3] YANG J, QI X M, WU Y G. The application analysis of multiplex real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic bacterium in peritoneal dialysis-associated peritonitis[J]. Blood Purif, 2019, 47(4): 337-345.
- [4] ASLANZADEH J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory[J]. Ann Clin Lab Sci, 2004, 34(4): 389-396.
- [5] 闫彩虹, 金文杰, 羊扬, 等. 第三方检验检测机构 PCR 检测室防核酸污染措施[J]. 科技视界, 2019(28): 49-50.
- [6] 薛秀荣, 来祝橦, 韩惠云. 浅谈核酸检测实验室防污染措施[J]. 中国卫生产业, 2018, 15(26): 144-145.
- [7] 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制医疗救治组. 医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)[J]. 中国病毒学杂志, 2021, 11(3): 163-167.
- [8] 庞宏兵, 丁鑫泽, 王万旭. 不同消毒方式对现场 DNA 检出影响研究[J]. 中国法医学杂志, 2021, 36(1): 78-81.
- [9] 李云龙, 张健, 魏艳秋, 等. 分子诊断实验室去除核酸污染的方法学研究[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 673-679.
- [10] 郭灵安, 雷绍荣, 宋君. 紫外线清除实验室转基因物质污染的效果研究[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(5): 437-439.
- [11] MELINA F, NATHALIE R, BARBARA T, et al. Efficacy assessment of nucleic acid decontamination reagents used in molecular diagnostic laboratories[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159274.
- [12] 陈茂义, 胡婕, 毛春林, 等. 含氯消毒剂对新型冠状病毒核酸破坏效果研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(3): 22-24.
- [13] 安超, 施嘉楠, 何瑞芬, 等. 应用不同消毒方法清除新型冠状病毒核酸污染的效果观察[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2022, 43(2): 273-277.

(收稿日期: 2022-09-13 修回日期: 2022-12-30)