

# 一种国产磁珠核酸自动提取系统对人巨细胞病毒DNA检测的性能评价\*

毕昊<sup>1</sup> 吴岚<sup>2</sup> 郭秋<sup>1</sup> 张然迪<sup>1</sup> 夏剑波<sup>1</sup> 吴江<sup>3</sup> 柯斌<sup>4</sup> 尹合奎<sup>5</sup>

**[摘要]** 目的:评价一种国产核酸磁珠自动提取系统对人巨细胞病毒(HCMV)DNA检测的性能。方法:采用科华磁珠核酸自动提取仪提取血浆 HCMV DNA,经实时荧光定量 PCR 检测,分析其线性范围、灵敏度、精密度和抗干扰能力、8混养模式的检测效能。并利用30份含 HCMV 感染患者及20份健康人群血浆对该方法进行临床应用评价,其检测结果与沉淀离心提取法进行比较。结果:该方法检测 HCMV DNA 载量的线性范围为 $10^2 \sim 10^6$  copy/mL。检测灵敏度为100 copy/mL(单检)。测定值与理论值的相关性良好, $R^2 = 0.998, P < 0.01$ 。批内和批间变异系数(CV)均小于5%。临床应用评价发现,国产磁珠核酸自动提取法与沉淀离心提取法对临床样品的检测一致性较好( $Kappa = 0.839 \geq 0.75, P < 0.01$ ),磁珠自动提取法的阳性率高于沉淀离心提取法(100% vs 86.7%),但差异无统计学意义( $P = 0.125$ )。在 $10^2 \sim 10^3$  copy/mL 范围内,国产磁珠核酸自动提取法发现优于沉淀离心法。2法所获得的定量结果差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。8混养模式的检测灵敏度为 $10^3$  copy/mL,拆分结果与实际相符,未产生交叉污染。结论:基于国产磁珠自动核酸提取系统实现了快速、自动化提取 HCMV DNA,具有良好检测性能,适用于采供血机构 HCMV 的血液核酸检测及临床应用推广。

**[关键词]** 人巨细胞病毒;磁珠;核酸自动提取系统;性能评价

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.08.003

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

## Performance evaluation of HCMV DNA detection by a domestic magnetic bead nucleic acid automatic extraction system

BI Hao<sup>1</sup> WU Lan<sup>2</sup> GUO Qiu<sup>1</sup> ZHANG Randi<sup>1</sup> XIA Jianbo<sup>1</sup> WU Jiang<sup>3</sup>  
KE Bin<sup>4</sup> YIN Hekui<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>Department of Laboratory, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Tongji Medical College, Huazhong, University of Science and Technology, Wuhan, 430070, China; <sup>2</sup>Wuhan Eyegood Ophthalmology Hospital; <sup>3</sup>Department of Laboratory, Yangxin Maternal and Child Health Hospital; <sup>4</sup>Department of Pediatrics, Yangxin Maternal and Child Health Hospital; <sup>5</sup> Department of Surgery, Yangxin Maternal and Child Health Hospital)

Corresponding author: WU Jiang, E-mail: 2429139065@qq.com

**Abstract Objective:** To evaluate the performance of human cytomegalovirus(HCMV)DNA detection by a domestic magnetic bead extraction system. **Method:** The HCMV DNA was extracted from plasma by Kehua magnetic bead nucleic acid automatic extraction system and detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The clinical application of this system was further evaluated with 30 plasma samples from HCMV infected patients and 20 plasma samples from healthy people. **Result:** The linear range of HCMV DNA concentration detection by this system was  $10^2$  to  $10^6$  copy/mL. The detection sensitivity was 100 copy/mL(individual test). The correlation between the measured value and theoretical value was perfect,  $R^2 = 0.998, P < 0.01$ . The coefficient of variations(CV) within and between batches were all less than 5%. Clinical application evaluation found that the two nucleic acids extraction methods had good consistency( $Kappa = 0.839 \geq 0.75, P < 0.01$ ). Although the positive rate of magnetic beads automatic extraction group was higher than tha of the precipitation and centrifuge extraction group(100% vs 86.7%), which wasn't statistically significant difference( $P = 0.125$ ). It was should noted that within the scope of  $10^2$  to  $10^3$  copy/mL, the nucleic acids extraction method by domestic magnetic beads automatic nucleic acids system was found better than precipitation and centrifuge extraction method. The quantitative results of the two methods was different( $P < 0.05$ ). The detection sensitivity of the 8 pool mode was  $10^3$  copy/mL, the resolution re-

\*基金项目:武汉市卫计委重点科研项目(No:WG14A04)

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属湖北妇幼保健院检验科(武汉,430070)

<sup>2</sup>武汉艾格医院眼科

<sup>3</sup>湖北省阳新县妇幼保健院检验科

<sup>4</sup>湖北省阳新县妇幼保健院儿科

<sup>5</sup>湖北省阳新县妇幼保健院外科

通信作者:吴江, E-mail: 2429139065@qq.com

sults were consistent with the actual results, and there was no cross contamination. **Conclusion:** Basing on the domestic magnetic bead automatic nucleic acid extraction system, the rapid and automatic extraction of HCMV DNA could be achieved, with good detection performance. It is not only suitable for the nucleic acid test of HCMV in blood centers, but also for the laboratory diagnosis of HCMV in hospitals.

**Key words** human cytomegalovirus; magnetic bead; automatic nucleic acid extraction system; performance evaluation

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)在我国的感染率普遍较高,达到 90%<sup>[1]</sup>。HCMV 一旦侵入人体,将长期或终身存在。在健康人群一般无症状,但在孕妇或免疫缺陷患者可导致严重临床症状,甚至有致命的危险<sup>[2]</sup>。由于 HCMV 感染缺少典型的临床症状,仅依靠临床表现不能确诊,确诊主要依赖于实验室诊断。目前酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测患者血清的 HCMV-IgM/IgG 是大多数医院,特别是基层医院所采用的主要方法。该方法对设备和操作要求相对简单,具有诊断快速、廉价的优势。然而以往的数据显示, HCMV-IgM/IgG 准确度较低<sup>[3]</sup>。国内外研究显示,由于病毒 DNA 的出现通常早于病毒感染的临床症状或血清学反应,荧光定量 PCR 技术目前已成为了一种能早期并敏感地发现 HCMV 感染存在的诊断方法<sup>[3-5]</sup>。因此,近年来 HCMV 的实时荧光定量 PCR 技术在医院临床检验工作中普及很快。实时荧光定量 PCR 技术的样品前处理中,核酸的提取效率直接影响检测的灵敏度,模板的纯度和质量与扩增效果密切相关。目前,临床常用的 HCMV 核酸提取方法主要有沉淀离心法和磁珠法。磁珠法相对于沉淀离心法在核酸提取的纯度和自动化等方面显示出较好的优势。但磁珠法大多使用进口试剂,而进口试剂价格昂贵,给患者带来了高成本的诊断费用。本研究旨在评估一种国产核酸磁珠自动提取系统对 HCMV DNA 的检测性能,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 随机选取 2017-01—2017-12 我院门诊及住院患者 30 例为研究对象(HCMV DNA 阳性),其中男 18 例,女 12 例;平均年龄(3.30±1.45)岁。选择我院同期健康体检标本 20 例(HCMV DNA 阴性)为对照组,其中男 10 例,女 10 例;平均年龄(30.05±7.60)岁。剔除溶血及脂血标本;溶血和脂血干扰血清均来自自我科临床检测样品;稀释用阴性血清为 HCMV 荧光定量 PCR 检测阴性血清;HCMV DNA 标准品由人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒所含标准品稀释配置。

**1.1.2 仪器与试剂** 上海科华全自动核酸提取仪(上海科华生物工程有限公司);ABI7500 实时荧光

定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒(湖南圣湘公司)(批号:2018007,2018008,2018009);核酸提取试剂(上海科华生物工程有限公司)(批号:20180811,20180812,20180813)。

### 1.2 方法

**1.2.1 自动核酸提取** 核酸自动提取法按照试剂盒使用说明书进行,在各槽位加入相应试剂,包括裂解液、纳米磁珠、清洗液 A、B、C 及洗脱液,并按照说明书要求在自动化仪器上编辑程序后进行自动提取。主要步骤包括:血浆样本 1.44 mL,加入裂解液 1.7 mL 和去抑制剂 100  $\mu$ L,于 55 $^{\circ}$ C 加温裂解 30 min;加入纳米磁珠 200  $\mu$ L,降温(室温)结合 32 s 后磁珠吸附弃上清;加入 1 mL 洗液 A,孵育 20 s,然后 500 r/min 震荡 30 s 后磁珠吸附弃上清;加入 1 mL 洗液 B,孵育 50 s,然后 500 r/min 震荡 30 s 后磁珠吸附弃上清;加入 1 mL 洗液 C,孵育 30 s,然后 500 r/min 震荡 20 s 后磁珠吸附弃上清;加入 120  $\mu$ L 洗脱液,于 80 $^{\circ}$ C 加温孵育 5 s,然后 1 000 r/min 震荡 30 min 后吸取液体 120  $\mu$ L 作 PCR 模板。

**1.2.2 核酸手工提取** 核酸手工提取法按照人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒说明书进行传统的沉淀离心法提取。

**1.2.3 荧光定量 PCR 检测** 2 种方法所提取的 HCMV DNA,均取 10  $\mu$ L 分别加入相同体积的荧光定量 PCR 检测体系 40  $\mu$ L,在 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。荧光定量 PCR 的循环扩增条件设置为 50 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 5 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,45 次循环,荧光素设定为 FAM,荧光信号采集设在 57 $^{\circ}$ C,按照仪器说明进行结果判断。

**1.2.4 线性范围评价** 将已知高浓度的 HCMV DNA 标准品作倍比稀释(10 倍),配制成系列浓度的 HCMV DNA 血清( $10^2 \sim 10^6$  copy/mL),每一浓度梯度的样本取 1 440  $\mu$ L,然后采用国产磁珠法核酸自动提取系统提取 HCMV DNA,每次各样本平行提取 3 次,并重复 5 次,分别进行荧光定量 PCR 检测。以 CT 值的均值与模板 lg(copy/ml)绘制标准曲线。并以理论值为 X,各样本的实际测定值为 Y,观察该方法的线性范围及线性相关系数。

**1.2.5 精密度评价** 利用 1.2.2 所述的检测结果测定批内和批间的变异系数(coefficient of varia-

tion,CV)。

**1.2.6 最低检出限评价** 将 HCMV DNA 标准品,利用 HCMV DNA 阴性抗凝血浆稀释至浓度为  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10$  copy/mL,3 个浓度样本重复提取、检测 20 次,统计检出率。

**1.2.7 干扰试验** 以临床常见的干扰物溶血和脂血进行分析。经 ELISA 法检测血浆抗 HCMV-IgM、HCMV-IgG 抗体及荧光定量 PCR 检测 HCMV DNA 均阴性的患者血液样品,以冻融法制备溶血样品。自动血液分析仪 Sysmex KX21 测定溶血血清中的血红蛋白浓度;另外收集 HCMV 阴性的乳糜血清,全自动生化分析仪 HITACH 7060 酶法测定甘油三酯浓度。据此向已知浓度的 HCMV 阳性血清中定量加入溶血及脂血的阴性血清,再用国产磁珠法核酸自动提取系统提取 HCMV DNA,荧光定量 PCR 观察其抗干扰特性。

**1.2.8 混样模式检测评价** 将 HCMV DNA 标准品,利用 HCMV DNA 阴性抗凝血浆稀释至浓度为  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10$  copy/mL,采用 8 混样模式经科华全自动核酸提取仪提取核酸和荧光定量 PCR 检测。8 混样模式中设定为 1 份阳性标本与 7 份阴性标本混样,若混样模式中出现阳性,再通过拆分模式进行单检检测,拆分结果阳性,结果则为阳性。每个浓度样本重复提取,各检测 20 次,统计检出率。

**1.2.9 临床应用评价** 收集的 50 例标本(30 例 HCMV DNA 阳性标本和 20 例 HCMV DNA 阴性标本),分别采用科华全自动核酸提取仪(单检模式)和手工提取法提取核酸,然后在同一个 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上,使用人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒的试剂,相同扩增条件,分别扩增检测,对 2 种方法的检测结果进行比较,通过 McNemar 检验分析 2 种方法的差异,通过 Kappa 检验分析 2 种方法的一致性,并将 2 组数据进行配对资料的  $t$  检验分析。

### 1.3 统计学处理

应用 R 3.6.1 软件进行统计分析。HCMV DNA 浓度值转换为浓度对数值  $\lg(\text{copy/ml})$  后再进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各指标的相关性采用双变量相关分析,各指标的函数关系采用线性回归分析,计数资料以例数表示,2 种方法的一致性和差异性分别通过 Kappa 和 McNemar 检验分析。2 种方法的荧光定量结果的比较通过配对资料的  $t$  检验分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线

每一浓度梯度的样品平行提取 3 次,分别进行

荧光定量 PCR 检测,结果见表 1。以各样品理论浓度的对数值与其相应的检测 CT 值的均值进行线性回归,做定量检测标准曲线(图 1),发现线性拟合效果良好,标准线性方程为  $y = -0.299x + 12.170$ ,  $R^2 = 0.998$ ,  $P < 0.01$ 。

表 1 系列浓度的 HCMV DNA 血浆使用国产磁珠法自动化提取效果

浓度梯度(理论浓度)	CT 均值( $n=3$ )
$1 \times 10^6$ copy/mL	$20.095 \pm 0.695$
$1 \times 10^5$ copy/mL	$23.616 \pm 0.862$
$1 \times 10^4$ copy/mL	$27.278 \pm 1.077$
$1 \times 10^3$ copy/mL	$30.860 \pm 1.299$
$1 \times 10^2$ copy/mL	$34.024 \pm 1.589$

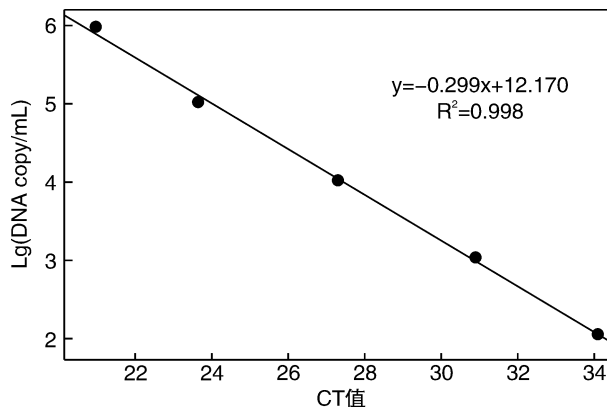


图 1 国产磁珠法自动化提取 HCMV DNA 定量检测标准曲线

### 2.2 线性范围

以理论值为  $X$ ,实际测定值为  $Y$ ,两者在  $10^2 \sim 10^6$  copy/mL 范围内相关性良好,线性回归方程为  $y = 1.032x - 0.352$ ,  $R^2 = 0.998$ ,  $P < 0.01$ 。

### 2.3 精密度试验

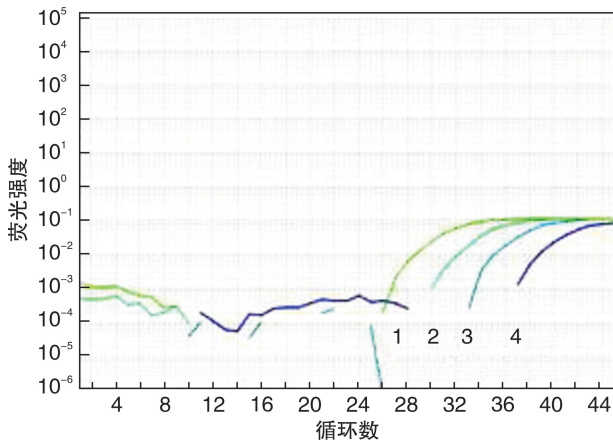
各样品平行提取 3 次,重复 5 次后,计算其批内 CV 为 3.47%~4.67%,均小于 5.00%;批间 CV 为 4.23%~4.87%,均小于 5.00%,说明精密度良好。

### 2.4 最低检出限评价

浓度为  $10^2$  和  $10$  copy/mL 的样本仍可被检出,见图 2。在浓度为  $10^3$ 、 $10^2$  和  $10$  copy/mL 水平,重复提取和检测 20 次,检出率分别为 100%、100%、75%,说明该方法的检出下限为  $10^2$  copy/mL。

### 2.5 干扰实验

结果显示当混合样品中血红蛋白浓度最高达到 11.0 g/L 时,对核酸提取及检测结果无影响。当甘油三酯浓度高达 9 mmol/L 时,对核酸提取及检测结果无影响。更高浓度的血红蛋白或甘油三酯将降低核酸提取效率,使检测结果偏低。



注:曲线 1~4 分别为  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  和 10 copy/mL 样本的扩增曲线。

图 2 国产磁珠法自动化提取 HCMV DNA 的荧光定量扩增曲线图

### 2.6 混样模式检测评价

在浓度为  $10^3$ 、 $10^2$  和 10 copy/mL 水平,采用 8 混养模式重复提取和检测 20 次,检出率分别为 100%、75%、35%,说明 8 混养模式的检出下限为  $10^3$  copy/ml。混样阳性样品经拆分后发现,拆分阳性标本与实际相符,阴性标本也未出现假阳性结果,说明混样检测过程未产生交叉污染。

### 2.7 临床应用评价

50 例血浆样本用 2 种方法提取核酸,然后进行实时荧光 PCR,2 种方法的阴、阳性结果见表 2。50 例样品中有 48 例样品采用 2 种方法的定性检测结果一致(含 26 例阳性样品和 20 例阴性样品);另有 4 例不一致的样品沉淀离心提取法结果为阴性,而国产磁珠提取法为弱阳性(定量结果均为临界值  $10^2$  copy/mL 上一点),说明科华国产磁珠自动提取法对低浓度( $10^2 \sim 10^3$  copy/mL)的 HCMV DNA 提取效果较沉淀离心提取法更好。2 种方法一致性较好( $Kappa = 0.839 \geq 0.75, P < 0.01$ );磁珠自动提取法的阳性率高于沉淀离心提取法(100% vs 86.7%),但差异无统计学意义( $P = 0.125$ )。2 种方法检测结果的 DNA 浓度分布见图 3,经配对资料的  $t$  检验分析, $P = 0.014$ ,显示 2 种方法的定量结果差异有统计学意义。

表 2 自动化磁珠提取法与沉淀离心提取法检测结果比较

自动化磁珠提取法	沉淀离心提取法		合计
	阳性	阴性	
阳性	26	4	30
阴性	0	20	20
合计	26	24	50

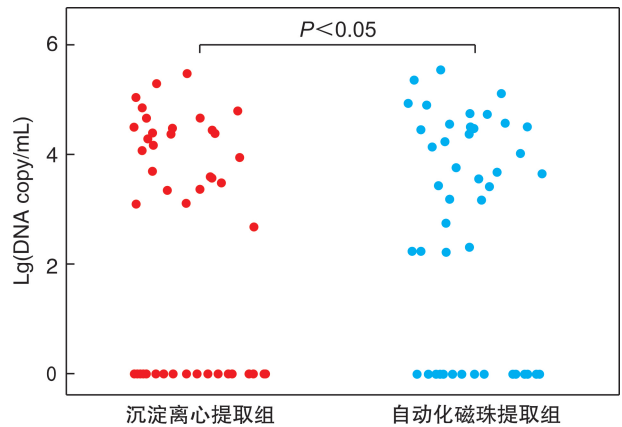


图 3 自动化磁珠提取法与沉淀离心提取法所获 DNA 浓度分布

### 3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术的样品前处理中,核酸的提取效率直接影响检测的灵敏度,模板的纯度和质量与扩增效果密切相关。目前,临床实验室特别是中小型医院实验室多采用传统的手工提取方法。手工提取法常利用煮沸或蛋白质裂解液直接将病毒 DNA 从病毒颗粒中释放出来,离心后的上清液中不仅含有病毒核酸,也含有少量血红蛋白等一些干扰 PCR 的抑制性杂质。手工提取法需多次离心沉淀,弃上清,核酸丢失多,提取效率低。并且在处理临床标本时易导致气溶胶的产生,存在生物安全等问题。相比传统的手工提取方法,基于磁珠微球的自动核酸提取法显示出明显的优势。自动化磁珠提取法的原理是利用生物磁珠在外磁场的作用下可以定向移动或集中,撤去外磁场后稍加振荡或抽吸又可均匀分散于液体中,从而使固液分离变得十分快捷方便。通过简单的洗脱能够除去大多数干扰 PCR 的抑制物,得到纯度很高的核酸。此外,自动化的操作避免了手工操作过程中的漏加、错加以及加样不准等人为因素的干扰,从而提高了检测准确度,同时减少了交叉污染风险,并极大减少人为操作环节,使得操作更简便,提高了提取效率,实现了检测的高通量。相对封闭的提取平台及平台内配置的紫外消毒功能,更大程度地减少了气溶胶的扩散与残存,从而提高了生物安全性能。因此,基于磁珠微球的自动核酸提取法能更好地保证检验结果的灵敏度、精确度和可重复性,并具有自动化程度高、通量大、生物安全性高的优势。目前基于磁珠微球的自动核酸提取设备已广泛应用于多家大型医院的病原体检测和血液中心(中心血站)的输血前乙肝、丙肝和艾滋病毒的筛查。随着我国自主研发自动核酸提取仪水平的不断发展,极大地推动了该类设备在基层医院中的应用。

本研究的国产磁珠法核酸自动提取系统同时

实现了方法的自动化和仪器试剂的国产化。研究显示该方法检测 HCMV DNA 载量的线性范围良好,相比手工提取法具有更广的线性范围和更高的检测灵敏度(手工提取法的线性范围为在  $10^3 \sim 10^6$  copy/mL,检测灵敏度为 500 copy/mL),并具有精密度、抗干扰能力强的特点。通过进一步比较发现,国产磁珠法核酸自动提取法,对  $10^2 \sim 10^3$  copy/mL 的样品提取效果优于传统的沉淀离心法。鉴于我国多家血液中心的国产磁珠法核酸自动提取系统多采用 8 混养模式<sup>[6]</sup>,本研究还考察了该方法 8 混养模式下对 HCMV DNA 的检测能力,结果显示发现 8 混养模式下仍可以检出  $10^2$  和 10 copy/mL 的低浓度样本,拆分结果正确,未产生交叉污染。

综上所述,国产磁珠法核酸自动提取系统的应用效果不逊于现在普遍采用的沉淀离心提取法,值得推广使用。同国外进口价格昂贵的同类仪器和磁珠试剂相比,仪器试剂的国产化能显著降低使用成本,有利于各医疗机构的推广应用、提高临床检测水平和工作效率。此外,该系统还显示出可应用于采供血机构的输血前巨细胞病毒核酸筛查的应用潜能。目前我国还没有适用于采供血机构的巨

细胞病毒的核酸筛查试剂盒,还需要进一步完善提取磁珠试剂的研制及优化提取程序,以进一步提高该系统混养模式的核酸提取效能,这对预防输血传播性巨细胞病毒感染具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 毕昊,余琴,余谨,等.中国献血人群人巨细胞病毒-IgG 阳性率的 Meta 分析[J].中国输血杂志,2017,30(12):1369-1374.
- [2] 万华,都莉.免疫低下状态群体感染人巨细胞病毒的研究进展[J].实验与检验医学,2012,30(6):573-575.
- [3] 谢利波,刘敏,王敏.荧光定量 PCR 检测在人巨细胞病毒-IgM 阴性婴儿巨细胞病毒感染诊断中的意义[J].中国中西医结合儿科学,2018,10(2):129-132.
- [4] 张慧华,方水晶.两种实验室检测方法在小儿巨细胞病毒感染诊断中的比较[J].中国妇幼保健,2018,33(13):3000-3002.
- [5] 毕昊,余谨,王志辉,等.一种定量 PCR 试剂盒通过血液诊断 HCMV 感染效能的 Meta 分析[J].中国输血杂志,2015,28(08):1040-1043.
- [6] 李莉华,韩卫,何路军,等.国产核酸检测试剂在不同检测系统中的应用[J].临床血液学杂志,2015,28(4):643-646.

(收稿日期:2019-08-07)

## 网上投稿注意事项

本刊采用远程投稿处理系统,请登录“<http://www.whuhzss.com>”投稿。注册用户名上传文章后,投稿系统一旦收到稿件,即自动发送“收稿回执”并通知编号。作者可根据此编号网上查询稿件处理情况。凡寄给个人的稿件,本刊一律不予受理。凡通过 E-mail 投寄的稿件均不算正式投稿(编辑部通知除外)。投稿时请注明第一作者和通信作者有效的联系方式(手机、邮箱),以便联系。

投稿完毕后请作者将一份纸质稿件(注明稿件编号)和单位介绍信及论文授权书一并寄至本刊编辑部(武汉市解放大道 1277 号《临床血液学杂志》编辑部,430022)存档。作者中如有外籍作者或论文系作者在国外进修、学习、工作后撰写,还应附有国外所属工作单位同意在本刊发表的函件。

本刊再次强调:在审阅中的稿件,作者如欲改投他刊,请立刻与本刊联系说明原因,如发现一稿两投的情况,视为学术不端,我们将严肃处理,通报所有相关杂志和该作者单位,并予以披露。本刊一般不退原稿,请作者自留底稿。

如有疑问,请拨打编辑部电话咨询,电话:(027)85726342-8806。

《临床血液学杂志》编辑部