

• 论著-临床研究 •

4 种全自动核酸提取系统对新型冠状病毒假病毒提取效果的比较

耿帜¹ 徐远东¹ 包一熙¹ 陈凤花¹

[摘要] 目的:应用 4 种全自动核酸提取仪及其配套试剂提取新型冠状病毒(2019-nCoV)假病毒核酸,并用同 1 种商品化 RT-PCR 扩增试剂盒进行检测,探讨检测结果的差异以评估其提取效果,有助于选择合适的核酸提取平台。方法:将 2019-nCoV 假病毒连续梯度稀释成不同浓度,用 4 种不同厂家的核酸提取系统(包括全自动核酸提取仪及其配套提取试剂)A、B、C 和 D 提取核酸,再用同 1 种 2019-nCoV 核酸检测试剂盒进行检测,比较其检出率和循环阈值(Ct)的差异。结果:在 2019-nCoV 假病毒原浓度、1:5、1:10 和 1:100 稀释度时,A、B 和 D 提取的核酸中均能 100%检测到 ORF1ab 和 N 基因,进一步分析发现这 3 种平台提取的核酸中检测所得的 ORF1ab ($F=0.061, P=0.941$)和 N 基因($F=0.038, P=0.963$) Ct 值差异均无统计学意义;但 C 在 2019-nCoV 假病毒 1:100 稀释时所提取的核酸中 ORF1ab 和 N 基因的阳性检出率分别为 95%和 80%。结论:平台 C 与其他 3 种平台 A、B、D 的核酸提取效果间存在差异。核酸提取平台的不同可能影响 2019-nCoV 核酸检测的灵敏度,并且可能对病毒载量低的样本产生假阴性结果。

[关键词] 核酸;提取;新型冠状病毒假病毒

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.10.001

[中图分类号] R446.1 **[文献标志码]** A

Comparative evaluation of four automated nucleic acid extraction platforms using 2019-nCoV pseudovirus

GENG Zhi XU Yuandong BAO Yixi CHEN Fenghua

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: CHEN Fenghua, E-mail: chfh100@126.com

Abstract Objective: To compare and evaluate four different automated magnetic bead-based nucleic acid extraction instruments and paired kits for purifying nucleic acids from 2019-nCoV pseudovirus. **Methods:** Nucleic acids were extracted from serial dilutions of 2019-nCoV pseudovirus using four nucleic acid extraction platforms A, B, C and D, and detected by the commercial 2019-nCoV nucleic acid detection kit. **Results:** Both ORF1ab and N genes were detected in the nucleic acids extracted from 2019-nCoV pseudovirus and serial dilutions including 1:5, 1:10 and 1:100 by A, B and D, and there was no significant difference between cycle threshold(Ct) values of ORF1ab ($F=0.061, P=0.941$) and N genes ($F=0.038, P=0.963$) detected by the same amplification kit in the nucleic acids extracted by A, B and D; but the positive detection rates of ORF1ab and N genes in the nucleic acids extracted from 1:100 dilution of 2019-nCoV pseudovirus using C were 95% and 80%, respectively. **Conclusion:** The platform C was different from the other three platforms A, B and D in the nucleic acid extraction. The nucleic acid extraction platform may influence the sensitivity of detecting 2019-nCoV and have the potential to generate false-negative results especially in the samples with low viral load.

Key words nucleic acid; extraction; 2019-nCoV pseudovirus

新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测是新型冠状病毒肺炎(COVID-19)诊断、治疗、监测以及筛查无症状感染者的重要手段之一,可能受到患者病程、标本采集、核酸提取仪器及试剂、核酸扩增试剂性能及实时荧光 PCR 仪等多种因素的影响^[1]。应用不同的核酸提取方法所得到的核酸,其浓度、纯

度及完整性对于 2019-nCoV 核酸检测的分析性能至关重要^[2]。手工柱提取方法所得到的核酸纯度和产量高,但是费时、费力且通量较小,不适合大规模临床样本的核酸提取;磁珠法提取病毒核酸,具有自动化、快速、方便、高通量、节省人力等特点^[3],有助于提高核酸检测结果的准确性和重复性,是临床实验室处理大量临床样本的主要方法。磁珠法是通过磁性颗粒捕获结合核酸,然后通过应用洗涤缓冲液洗涤、去除杂质,最后应用洗脱液从磁性颗

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)

通信作者:陈凤花, E-mail: chfh100@126.com

粒上洗脱出核酸。目前市面上有多种磁珠法全自动核酸提取仪,均配套各自对应的核酸提取试剂,不同的全自动核酸提取平台的提取效果可能存在差异^[4],从而影响 2019-nCoV RT-PCR 检测的分析灵敏度,可能导致低病毒载量的无症状感染者漏检。本研究通过比较市面上 4 种常用的磁珠法国产全自动核酸提取仪及其配套试剂对 2019-nCoV 假病毒的提取效果,以便选择合适的全自动核酸提取平台。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

4 种全自动核酸提取系统包括,A:Smart32 全自动核酸提取仪和核酸提取试剂(粤穗械备 20170583)(中山大学达安基因股份有限公司);B:GeneRotex96 全自动核酸提取仪和 Ex-DNA/RNA 病毒核酸提取试剂(苏苏械备 20151030)(苏州天隆生物科技有限公司);C:EX3600 全自动核酸提取仪和核酸提取试剂(沪闵械备 20190492)(上海之江生物科技股份有限公司);D:SSNP-9600A 全自动核酸提取仪和核酸提取试剂(苏泰械备 20150256)(江苏硕世生物科技股份有限公司)。2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法,国械注准 20203400063)(中山大学达安基因股份有限公司);ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.2 2019-nCoV 假病毒的稀释

将达安的 2019-nCoV 核酸检测试剂盒内的阳性对照(即 2019-nCoV 假病毒)用生理盐水进行梯度稀释成不同浓度,包括 1:5、1:10、1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:5000 和 1:10 000,每

种浓度分别用 A、B、C 和 D 系统重复提取 10~22 次不等。

1.3 2019-nCoV 假病毒核酸提取

全自动核酸提取系统 A、B、C 和 D 分别取 200 μL、200 μL、300 μL 和 200 μL 2019-nCoV 假病毒稀释液,应用各自的核酸提取试剂在相应的全自动核酸提取仪上提取核酸,具体步骤严格按照试剂和仪器说明书进行。

1.4 实时 RT-PCR 扩增检测

PCR 反应体系包括 17 μL PCR 反应液 A、3 μL PCR 反应液 B 和 5 μL 核酸模板,总体积为 25 μL,在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增,扩增条件为:50℃ 15 min;95℃ 15 min;94℃ 15 s,55℃ 45 s 检测荧光(通道为 FAM、VIC 和 Cy5),45 个循环。检测的靶基因为 2019-nCoV 的开放读码框 lab(Open reading frame lab,OR-Flab)基因和核壳蛋白(Nucleocapsid,N)基因。阳性判定标准为:明显 S 型扩增曲线,Ct<45。

1.5 统计学分析

实验数据均采用 SPSS 21.0 软件行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素 ANOVA 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种全自动核酸提取仪的参数比较

本研究选择了市面上 4 种常用的自动化核酸提取仪,在进行样本裂解之前,这 4 种提取仪都需要操作者对液态样本进行手动加样到深孔板内,因而都是半自动;这 4 种提取仪的加样体积、样本通量、是否裂解加热、是否加热洗脱、洗脱液体积等均有差异,见表 1。

表 1 本研究中所用的 4 种全自动核酸提取系统的概况

全自动核酸提取系统	A	B	C	D
提取仪型号	Smart32	GeneRotex96	EX3600	SSNP-9600A
配套的核酸提取试剂	核酸提取试剂	核酸提取试剂	核酸提取试剂	核酸提取试剂
试剂批号	2020051	E0120070281	P20200104	20191208
方法	磁珠法	磁珠法	磁珠法	磁珠法
自动化程度	半自动	半自动	半自动	半自动
一次处理样本通量	32	96	36	96
加入蛋白酶 K	有	有	有	无
加入 Carrier RNA	无	无	有	无
加样体积/μL	200	200	300	200
上机后的提取时间/min	47	41	21	50
裂解加热	是,70℃	是,120℃	否	否
加热洗脱	是,70℃	是,100℃	否	是,70℃
所提的核酸	DNA 和 RNA	DNA 和 RNA	DNA 和 RNA	DNA 和 RNA
洗脱液体积/μL	80	100	70	80

2.2 4 种提取平台对不同浓度 2019-nCoV 假病毒阳性检出率的影响

研究 4 种全自动核酸提取系统 A、B、C 和 D 结合同一种 2019-nCoV 核酸扩增试剂对不同浓度 2019-nCoV 假病毒阳性检出率的影响,在 2019-nCoV 假病毒原浓度、1 : 5 和 1 : 10 稀释度时,A、B、C 和 D 提取的核酸中都能 100% 检测到 2019-nCoV 靶基因 ORF1ab 和 N;在 2019-nCoV 假病毒

1 : 100 稀释度时,A、B 和 D 提取核酸中也能 100% 检测到 ORF1ab 和 N 基因,但 C 提取的核酸中 ORF1ab 和 N 基因的阳性检出率分别为 95% 和 80%;在 2019-nCoV 假病毒 1 : 500 和 1 : 1000 稀释度时,A、B、C 和 D 提取核酸的阳性检出率不同,其中 B 的 ORF1ab 基因阳性检出率稍高,A 和 B 的 N 基因阳性检出率接近,见表 2。

表 2 4 种全自动核酸提取系统在 2019-nCoV 假病毒不同稀释度中的检出阳性率 例/例(%)

提取系统	靶基因	原浓度	1 : 5	1 : 10	1 : 100	1 : 500	1 : 1000	1 : 2000	1 : 5000	1 : 10 000
A	ORF1ab	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	12/22 (54.5)	9/20 (45)	5/20 (25)	0/20	0/20
	N	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	6/22 (27.3)	6/20 (30)	0/20	0/20	0/20
B	ORF1ab	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	17/22 (77.3)	14/20 (70)	7/20 (35)	1/20 (5)	2/20 (10)
	N	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	6/22 (27.3)	5/20 (25)	2/20 (10)	0/20	0/20
C	ORF1ab	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	19/20 (95)	11/22 (50)	13/20 (65)	4/20 (20)	1/20 (5)	2/20 (10)
	N	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	16/20 (80)	3/22 (13.6)	1/20 (5)	1/20 (5)	0/20	0/20
D	ORF1ab	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	10/22 (45.5)	10/20 (50)	6/20 (30)	2/20 (10)	0/20
	N	10/10 (100)	10/10 (100)	20/20 (100)	20/20 (100)	6/22 (27.3)	1/20 (5)	0/20	0/20	0/20

2.3 4 种提取平台对不同浓度 2019-nCoV 假病毒靶基因 Ct 的影响

研究 4 种全自动核酸提取系统 A、B、C 和 D 结合同一种 2019-nCoV 核酸检测试剂对不同稀释度 2019-nCoV 假病毒靶基因 ORF1ab 和 N Ct 的影响,见表 3。在 2019-nCoV 假病毒原浓度、1 : 5、1 : 10 和 1 : 100 稀释时,A、B 和 D 提取的核酸中检测到 ORF1ab 和 N 的 Ct 均值的变异系数(CV)

均小于 5%,进一步应用单因素方差分析不同提取平台的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值差异,发现 ORF1ab($F = 0.061, P = 0.941$)和 N 基因($F = 0.038, P = 0.963$) Ct 值差异均无统计学意义;而 C 提取的核酸中检测到 ORF1ab 和 N 的 Ct 均值的变异系数(CV)高于其他 3 种平台(包括 A、B 和 D),有的大于 5%,不符合本研究中所用的 2019-nCoV 核酸检测试剂说明书中声称的“不大于 5%”。

表 3 4 种全自动核酸提取系统在 2019-nCoV 假病毒不同稀释度检测的 Ct 值

提取系统	靶基因	原浓度		1 : 5		1 : 10		1 : 100	
		$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%
A	ORF1ab	29.27 ± 0.50	1.71	31.68 ± 0.15	0.47	32.63 ± 0.23	0.70	35.59 ± 0.54	1.52
	N	27.47 ± 0.44	1.60	30.69 ± 0.14	0.46	31.61 ± 0.27	0.85	35.16 ± 0.42	1.19
B	ORF1ab	30.00 ± 0.61	2.03	32.18 ± 0.34	1.06	33.43 ± 0.31	0.93	36.02 ± 0.77	2.14
	N	28.03 ± 0.62	2.21	31.14 ± 0.36	1.16	32.40 ± 0.33	1.02	35.88 ± 0.61	1.70
C	ORF1ab	30.99 ± 0.52	1.68	32.54 ± 1.61	4.95	35.12 ± 2.11	6.01	37.97 ± 1.76	4.64
	N	28.62 ± 0.64	2.24	31.65 ± 1.92	6.07	33.75 ± 2.26	6.70	37.36 ± 1.29	3.45
D	ORF1ab	29.77 ± 0.23	0.77	31.44 ± 0.29	0.92	33.39 ± 0.32	0.96	36.71 ± 0.95	2.59
	N	27.71 ± 0.27	0.97	30.33 ± 0.29	0.96	32.08 ± 0.30	0.94	35.72 ± 0.72	2.02

3 讨论

应用实时荧光 RT-PCR 检测 2019-nCoV 核酸的灵敏度受多种因素如核酸模板的质量、引物与探针的特异性等影响,尤其是当病毒载量非常低时能否成功检测到病毒核酸,这些因素特别是核酸模板的质量极其重要,直接影响检测结果的准确性。核酸提取的质量不佳,可能导致后续 RT-PCR 产生假阴性结果。自动化核酸提取平台的通量高、手工操作少、稳定,非常适合用于临床实验室各种样本的核酸提取。不同的自动化核酸提取平台所用的技术可能存在差异,提取核酸的效率可能不同,因此最终检测结果可能也有差异。研究发现,即使同一厂家的基于磁珠法不同核酸提取平台,其提取效率也是不同的,而且这些不同提取平台的相对效率因肝炎病毒类型而异,即对一种类型肝炎病毒有效的提取平台不一定对另一种类型肝炎病毒也能很好地发挥作用^[4]。研究发现美国疾病控制与预防中心推荐的 2019-nCoV 核酸检测方法的分析灵敏度为 85~499 copies/mL,取决于所用的核酸提取方法和实时荧光 PCR 仪^[5]。因此,应用 RT-PCR 方法检测 2019-nCoV 核酸,选择高效、稳定的核酸提取平台极其重要。

由于全球 COVID-19 疫情的持续蔓延,导致核酸提取平台和 2019-nCoV 核酸检测试剂的短缺。另外,还受原有仪器设备等的影响,目前大多数临床实验室所用的核酸提取平台和 2019-nCoV 核酸检测试剂并非完全配套,即核酸提取平台并不是扩增试剂说明书中所推荐的核酸提取系统。本研究应用 2019-nCoV 假病毒评估了 4 种基于磁珠法不同厂家自动化核酸提取系统的提取效果,发现 A、B 和 D 3 种核酸提取平台结合扩增试剂检测 2019-nCoV 假病毒原浓度、1:5、1:10 和 1:100

稀释度时所得的阳性检出率均为 100%,三者 Ct 值差异均无统计学意义;但平台 C 在 1:100 稀释时所提取的核酸中 ORF1ab 和 N 基因的阳性检出率分别为 95%和 80%。这些提示 B 和 D 的核酸提取效果与该扩增试剂配套的 A 相当;而平台 C 的核酸提取效果欠佳,可能导致低病毒载量的样本漏检。

总之,本研究发现平台 C 与其他 3 种平台 A、B、D 的核酸提取效果间存在差异;核酸提取平台的不同可能影响 2019-nCoV 核酸检测的灵敏度,并且可能对病毒载量低的样本产生假阴性结果。本研究的局限性在于应用 2019-nCoV 假病毒而非临床 2019-nCoV 阳性样本比较不同平台的核酸提取效果。

参考文献

- [1] 肖圣达,耿帆,徐远东,等. HBV DNA 超敏定量检测试剂盒的性能验证[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(2):81-85.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL039-2019 分子诊断检验程序性能验证指南[S]. [2019-02-15]. <https://www.renrendoc.com/paper/91928241.html>.
- [3] 王成彬. 核酸检测用于确诊新型冠状病毒肺炎阳性率低的原因分析[J]. 中华医学杂志, 2020, (13):961-964.
- [4] Pauly MD, Kamili S, Hayden TM. Impact of nucleic acid extraction platforms on hepatitis virus genome detection[J]. J Virol Methods, 2019, 273:113715.
- [5] Fung B, Gopez A, Servellita V, et al. Direct Comparison of SARS-CoV-2 analytical limits of detection across seven molecular assays[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(9):e01535-1520.

(收稿日期:2021-03-15)