

两种病毒核酸提取方法 在流行感冒诊断中的比较

刘亚楠¹ 李琚² 华文浩¹ 宋淑静¹ 马小亮¹ 董建平² 宋蕊³

【摘要】目的 探讨离心柱法与Trizol法在流感病毒核酸提取中的差异,以找到提高阳性检出率的方法。**方法** 对592例临床流行感冒(流感)疑似患者采集咽拭子标本,采用离心柱法与Trizol法分别提取病毒核酸,采用巢式PCR进行扩增,扩增产物行1%琼脂糖凝胶电泳,以2 000 bp Marker为标准,在564 bp区域出现阳性条带者为流感阳性。**结果** 592例临床流感疑似患者咽拭子标本中,应用离心柱法提取核酸222例(37.5%)阳性,甲型流感患者212例,乙型流感患者10例。Trizol法提取核酸显示66例(11.1%)患者呈阳性,其中甲型和乙型流感患者分别为63例和3例。自2014年12月至2015年4月,北京地区流感病毒流行以甲型流感病毒为主,乙型流感病例较少。流感的发病与季节相关,集中暴发时期在12月份左右,高发感染人群的年龄段为21~40岁,与性别无关。在病毒提取效率上,离心柱法阳性率显著高于Trizol法,差异具有统计学意义($\chi^2 = 111.66, P < 0.01$)。**结论** 北京地区流感病毒的流行以甲型流感为主。离心柱法提取核酸效率要高于Trizol法,有利于早期进行病原学诊断。

【关键词】 流感病毒;离心柱法;Trizol法;核酸提取;提取效率

Comparison of two nucleic acid extraction methods in detecting influenza Liu Ya'nan¹, Li Jun², Hua Wenhao¹, Song Shujing¹, Ma Xiaoliang¹, Dong Jianping², Song Rui³. ¹Department of Clinical Laboratory, ³Department of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ²Department of Infectious Diseases, Beijing Haidian Hospital, Beijing Haidian Section of Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

Corresponding author: Song Rui, Email: songrui@hotmail.com

【Abstract】 Objective To compare and evaluate the efficacy of the two different nucleic acid extraction methods for influenza determination. **Methods** There were 592 clinical suspected cases pharynx samples were collected. There were two methods were used to extract nucleic acid, such as column extraction and Trizol manual method. After extraction, RNA Nucleic acid were used in the RT-PCR and test with the electrophoresis. When there was a 564 bp marker positive, the sample would be sent to be tested. **Results** From December 2014 to April 2015, the influenza A was the main epidemic in Beijing; and less influenza B in Beijing. There were 66 (11.1%) Trizol positive while 222 (37.5%) positive for the column extraction. **Conclusions** The main epidemic influenza virus is the influenza A in Beijing. Column extraction is more efficient than the Trizol manual method. Use the column extraction, the diagnosis correction could be improved.

【Key words】 Influenza; Column extraction; Trizol manual method; Nucleic acid extraction

流行性感冒(流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,流感病毒属于正粘病毒科,分为甲、乙、丙三型,其中以甲型流感病毒最为常见。

每年流感的发病率和病死率均较高,尤其对婴幼儿、老年人群等高危人群造成很大的危害^[1],被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为全球性监测的疾病^[2-3]。患者表现为发热,重症肺炎,白细胞和淋巴细胞减少,感染性休克,急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)等严重症状^[4]。相对于传统的实验室病毒培养等方法,通过分子生物学方法建立的PCR检测技术在流

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.05.010

基金项目:首都医学发展科研专项项目(No.2014-4-2175)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院检验科¹、感染科³;100083 北京,北京市海淀区医院(北京大学第三医院海淀区区)感染科²

通信作者:宋蕊,Email: songrui@hotmail.com

感病毒实验室快速检测中发挥着重要作用^[5-6]。如何进行准确的核酸检测,避免出现假阴性造成治疗延误便成为临床检验工作的重点和难点。流感病毒为RNA病毒,结构上为单链核酸,在试验中比较容易降解,因此,对不同提取方法进行比较,评价其提取效率以及对RNA酶的移除效率,选择合适的提取方式具有十分重要的意义^[7]。本研究收集流感疑似患者咽拭子标本,采用不同的提取方法进行平行检测,比较其阳性率来挑选出效率更高的方法,为临床诊疗做出更好的保障,现报道如下。

资料与方法

一、标本来源

2014年12月至2016年4月于海淀医院发热门诊采集的有流感样症状共592例患者咽拭子,其中男性272例,女性320例,年龄为13~87岁,平均年龄为38.5岁。

二、试剂和仪器

1. Trizol法试剂: 试剂、氯仿、异丙醇、无水乙醇、DEPC水。

2. 离心柱法试剂: 凯杰公司QIAamp Viral RNA Mini Kit (250) 试剂盒。

3. 电泳试剂: 琼脂糖、Marker 2000。

4. 主要仪器: ABI公司Veriti 96 well Thermal cycler扩增仪、北京市六一仪器厂DYY-6C型电泳仪、上海欧翔科学仪器有限公司GelX 1520型凝胶成像分析仪、电子天平。

三、方法

1. Trizol法: 取一洁净Eppendorf管,加入800 μ l Trizol液,再加入200 μ l标本,充分混匀,静置5~10 min; 于Eppendorf管中加入250 μ l氯仿,上下摇匀,静置3~5 min; 13 000 g、离心15 min; 吸取上清400~500 ml,尽量洗净,避免吸入蛋白层; 加入等体积异丙醇,上下轻轻颠倒混匀; -20 $^{\circ}$ C放置10 min; 13 000 g、离心12 min; 弃上清,加入1 ml 70%乙醇,上下颠倒混匀; 13 000 g、离心8 min; 弃上清、静置、风干; 加入30 μ l DEPC水^[8]。

2. 离心柱法: 按照试剂说明书配置洗液WB1、WB2与病毒裂解液; 取洁净Eppendorf管,加入560 μ l病毒裂解液,再加入200 μ l标本,充分混匀后盖上,于室温静置10 min; 加入500 μ l无水乙醇,充分混匀; 吸取630 μ l液体,加入新离心柱

内, 13 000 g、离心1 min; 倒掉套管内液体,加入剩下630 μ l液体, 13 000 g、离心1 min; 倒掉套管内液体,加入WB1, 13 000 g、离心1 min; 倒掉套管内液体,加入WB2, 13 000 g、离心1 min; 倒掉套管内液体,空转离心柱、13 000 g、离心3 min; 将离心柱放置一新套管内,向离心柱中心加入30 μ l DEPC水; 室温静置5 min后, 8 000 g、离心1 min。上清液即为提取的流感病毒RNA。

3. PCR扩增: 以中国疾病预防控制中心提供的特异性引物和扩增条件。试剂应用PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2试剂盒,宝生物公司的Taq酶,分别对两种方法进行PCR扩增。

(1) 第一轮扩增:

①PCR反应体系: 详见表1。

②扩增条件: 50 $^{\circ}$ C、30 min, 1 cycle; 94 $^{\circ}$ C、3 min, 1个循环; 94 $^{\circ}$ C、45 s, 50 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 36个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min。扩增体系为10 μ l。取1 μ l扩增产物进行第二轮扩增。

(2) 第二轮扩增:

①PCR反应体系: 详见表2。

②扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、3 min, 1个循环; 94 $^{\circ}$ C、45 s, 53 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 36个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min。

4. 电泳: 配制1%浓度的琼脂糖凝胶,进行电泳,取3 μ l第二轮扩增产物,以2 000 bp Marker为标准,在120 V电压下,电泳10 min,于564 bp区域出现阳性条带者为阳性。

表1 第一轮 PCR 反应体系

| 试剂 | 剂量 (μ l) |
|------------------------------------|---------------|
| Prime Script 1 Step Enzyme Mix (酶) | 0.4 |
| 2 \times 1 Step Buffer | 5 |
| Primer F1 | 0.3 |
| Primer R1 | 0.3 |
| RNase Free dH ₂ O | 3 |
| 样本RNA | 1 |

表2 第二轮 PCR 反应体系

| 试剂 | 剂量 (μ l) |
|------------------------------|---------------|
| Taq酶 mix | 15 |
| Primer F2 | 1 |
| Primer R2 | 1 |
| RNase Free dH ₂ O | 11 |
| 第一轮PCR扩增产物 | 2 |

五、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。两种实验方法阳性效率进行比较,采用方差分析、 χ^2 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、离心柱法与Trizol法提取核酸特异性及灵敏度

592例流感疑似患者咽拭子标本的核酸提取后,经过PCR扩增后行1%琼脂糖凝胶电泳,于564 bp出现条带者为阳性。结果显示,离心柱法222例阳性,Trizol法66例阳性;另采用核酸基因测序方法对两种实验差异部分标本进行比对,经核实确为甲型流感病毒阳性,由此可比较两种实验的特异性及灵敏度,详见表3。

二、不同亚型流感病毒的流行概况

对流感阳性标本进行基因测序,甲型流感患者212例,其中甲型流感病毒中甲型H3N2亚型占其中200例,乙型流感病例有10例,提示多数患者为季节性流感。在592例流感疑似患者咽拭子标本中,离心柱法222例阳性,阳性率为37.5%(222/595)。Trizol法66例阳性,阳性率为11.1%(66/595)。两种方法差异具有统计学意义($\chi^2 = 111.66, P < 0.001$)。其中,离心柱法筛出甲型流感患者212例,乙型流感患者10例。Trizol法筛出甲型流感患者63例,乙型流感患者3例;甲型H3N2流感在这两年在2014年12月至2015年4月的流感监测

中发病率最高,为主要的流行型别。

三、两种不同工作方法的工作效率

试验时间方面,离心柱法平均每个标本需要操作30 min,Trizol法平均每个标本需要操作90 min。若每批实验90例标本,离心柱法所需时间为180 min,Trizol法所需时间为300 min。离心柱法工作效率显著高于Trizol法。

四、甲型流感病毒的流行病学情况

不同的年龄阶段和季节,甲型流感病毒的分布有一定的差异,流感病毒流行趋势受季节变化的影响^[9],本研究入组甲型流感患者年龄季节分布详见表4。每月阳性率以12月份为最高。在年龄范围内甲型流感疑似患者分布为:<20岁患者80例,阳性32例,阳性率40.0%(32/80),21~40岁患者283例,阳性118例,阳性率41.7%(118/283),41~60岁患者139例,阳性35例(阳性率为25.2%);>60岁患者90例,阳性36例(阳性率为40.0%)。本研究结果显示,21~40岁年龄段中甲型流感疑似患者和确认阳性患者的数量最多,分别占其总数的47.8%和53.2%,其既是患者也是传染源,应作为重点观察对象,详见表4。

讨 论

流感季节中流感病毒是最常见的呼吸道病毒^[10],其中甲型流感病毒流传最为常见^[11],据本研究结果显示,甲型流感患者显著多于乙型流感及其他亚型流感。流感病毒由于其传播途径的特点,受季节的影响比较大,在冬季通常会形成突击性的暴发^[12]。

表3 两种方法特异性及灵敏度的比较

| 方法 | 真阳性(例) | 真阴性(例) | 假阳性(例) | 假阴性(例) | 灵敏度(%) | 特异度(%) |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 离心柱法 | 222 | 370 | 0 | 0 | 100.0 | 100.0 |
| Trizol法 | 66 | 370 | 0 | 156 | 29.7 | 100.0 |

表4 甲型流感患者年龄季节分布(例)

| 时间 | <20岁 | | 21~40岁 | | 41~60岁 | | >60岁 | | 合计 | |
|----------|------|----|--------|-----|--------|-----|------|----|-----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| 2014年12月 | 23 | 11 | 53 | 28 | 13 | 8 | 12 | 5 | 101 | 52 |
| 2015年1月 | 5 | 20 | 33 | 35 | 15 | 24 | 16 | 16 | 69 | 95 |
| 2015年2月 | 2 | 4 | 18 | 41 | 6 | 27 | 8 | 17 | 34 | 89 |
| 2015年3月 | 2 | 10 | 13 | 55 | 1 | 39 | 1 | 13 | 17 | 117 |
| 2015年4月 | 0 | 3 | 1 | 6 | 0 | 6 | 0 | 2 | 1 | 17 |
| 合计 | 32 | 48 | 118 | 165 | 35 | 104 | 37 | 53 | 222 | 370 |

为研究相同采样条件下, 还有何种因素可影响阳性率, 将核酸提取方法进行比较, 比较两种实验方法对病原学诊断的影响。

经本研究数据分析, 流感疑似患者咽拭子标本的核酸提取试验中相比较, 离心柱法筛查出的总阳性率显著高于Trizol法, 提示离心柱法在提取阳性率上确实高于Trizol法。本研究选取2014年12月至2015年4月流感疑似患者咽拭子标本, 流感病毒高发期为12月至次年2月, 其中, 以12月阳性率为最高, 故在此期间应为预防甲型流感暴发的重点时期。此间气候多尘, 干燥, 易于疾病传播但是不利于RNA的提取。经结果分析, 易感人群集中在21~40岁年龄段, 甲流疑似患者和确认阳性患者分别占其总数的47.8%和53.2%, 此类人群活动范围广, 接触人群复杂, 利于流感病毒的传播, 对于临床的诊治和预防不利, 因此, 需要快速、灵敏的检测方法, 提高工作效率及准确率。

临床上采用含有病毒保存液的病毒采样管保存样本, 其病毒浓度不如传统的静脉血液标本稳定, 由于RNA单链结构的特性, 在提取过程中RNA受到环境、温度、湿度和人员操作等因素的影响非常大, 尤其与医护人员采样的手法有直接关系。根据文献报告, 流感核酸检测在感染早期效果更好, 而血清学的抗体检测多用在感染中后期(抗体产生), 显然核酸检测能更好地达到对患者的及早诊治的要求^[13], 故采用合适的RNA提取方法就非常的重要。不同的方法各有特点, 单从核酸提取效率来讲, 具有一定差异^[14-19]。本研究选择实验方法的原则就是稳定性高、操作步骤简便、试验时间短、试剂容易保存。尽管Trizol长期以来作为提取总RNA及蛋白质的经典方法, 但是目前从核酸提取的浓度和纯度来讲, 均不具备优势^[20]。因此, 在同一实验环境下采用Trizol法和离心柱法两种方法相比较, 结果显示离心柱法的核酸提取效率显著高于Trizol法。以下将从离心柱法和Trizol法的各方面阐述两种实验的优劣。

其一, 对环境的抗干扰能力。实验环境的RNA抽提的关键是纯度和完整性。Trizol实验中, 核酸凭借其易溶于水的特性存在于水样层中以便于与蛋白层等杂质分开, 但是从富含蛋白质的组织中抽提RNA时, 往往蛋白质抽提不净, 影响RNA质量^[21-22]。而且实验者需要多次将溶于水样层的RNA吸取并转入下一个EP管中, 使得RNA多次暴

露于开放的空气环境中, 干燥空气中的大量粉尘作为RNA酶的载体, 会随时漂落到实验管中降解RNA, 对实验的影响较大。而离心柱法的主要实验环境在层析柱中, 通过层析柱与核酸进行离子交换, 是一个相对封闭的环境, 受环境的影响会相对较小。经过结果分析, 笔者认为Trizol法的稳定性要逊于离心柱法。

其二, 试剂的稳定性。Trizol法试剂的种类较多, 且不容易保存。Trizol法中使用的氯仿和75%乙醇具有较强的挥发性, 而且氯仿对光很敏感, 遇光照会逐渐分解。一旦进行周期较长的实验, 试剂稳定性会逐渐下降。离心柱法的试剂相对简单, 主要为盐类洗液和无水乙醇, 试剂更易于保存。

其三, 实验操作时间。Trizol法平均每份标本耗时较长, 在操作过程中会不同程度的产生污染, 且不同人员之间操作产生的差异也较大^[23-24]。而离心柱法平均每份标本操作时间大大缩短, 受干扰的机会减少, 同时耗时短, 更适合大批量操作^[25]。在流感高发季节更加适合临床诊治需要。

最后, 核酸的收集。Trizol法中, RNA核酸溶于乙醇中, 需将乙醇挥发干净, 因为乙醇会影响PCR扩增而造成实验的假阴性, 但干燥时间过长会影响RNA的完整, 进而造成实验的假阴性。最后一步的DEPC水溶解RNA时, 需要用加样枪适当的吹打混匀, 吹打次数少可能使核酸溶解不充分, 吹打次数过多又可能造成RNA链断裂, 核酸的收集步骤中效率较低。在离心柱法的核酸收集步骤中, 核酸位于层析柱中, 充分干燥, 再用DEPC水溶解收集RNA时, 溶解时间在一定范围内其时间越长收集效率越高, 与Trizol法相比较, 操作简单易行。

同时, 还应注意离心柱法与Trizol法相比也有一定的不足。

实验成本方面, 离心柱法价格昂贵, 大规模的使用会产生较大的负担, Trizol法价格低廉, 成本较低, 应用单位比较广泛。

适用范围方面, 离心柱法最大的优势在于提取RNA效率很高, 但是仅能单一提取RNA, 无法提取蛋白, Trizol法可以同时提取蛋白质、DNA和RNA核酸, 可以在众多领域开展实验, 应用范围比较广泛。故应在特定的实验项目中选取合适的实验方法。

综上, 在RNA的提取过程中, 离心柱法与

Trizol法相比较,稳定性高、操作步骤简便、实验时间短、试剂易保存,因此更适用于流感病毒核酸提取,满足临床诊断和治疗的需求。

参 考 文 献

- [1] 陈玮. 老年流感及流感样患者临床特征分析[J]. 中医临床研究,2016,8(7):122-123.
- [2] 马鑫, 郑玉建. 流感病毒变异及流感监测技术[J]. 疾病监测,2008,23(8):518-512.
- [3] 胡云光, 徐兴丽, 王晶晶, 等. 2005-2012国内报道流感病毒发病情况的Meta分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2015,35(4):265-270.
- [4] Pan M, Gao R, Lv Q, et al. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinico findings[J]. J Infect,2016,72(1):52-59.
- [5] 章倩云, 刘丹丹, 焦永军, 等. 人季节性流感病毒H1, H3, B型PCR-ELISA分型检测方法的建立及应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(3):177-181.
- [6] Chen L, Tian Y, Chen S, et al. Performance of the cobas influenza A/B assay for rapid pcr-based detection of influenza compared to prodesse prodesse proflu + and viral culture[J]. Eur J Microbiol Immunol,2015,5(40):236-245.
- [7] 姜蕾. 两种丙型肝炎病毒核酸提取方法比较及评价[J]. 中国实用医刊,2016,43(7):94-95.
- [8] 武荣, 张俊涛, 赵霞, 等. Trizol与RNA Fast1000试剂盒提取外周抗凝血总RNA的方法比较[J]. 中国医疗前沿,2011,6(5):60-61.
- [9] 庞晶晶, 路燕, 胡三梅, 等. 2014年北京市西城区流感监测结果分析[J]. 职业与健康,2016,32(1):73-75, 79.
- [10] Arvia R, Corcioli F, Ciccone N, et al. Detection of 12 respiratory viruses by duplex real time PCR assays in respiratory samples[J]. Mol Cell Probes,2015,29(6):408-413.
- [11] 孙宇, 朱汝南, 王芳, 等. 北京地区2014-2015和2015-2016年流感流行季儿童流感流行特征分析[J]. 中华儿科杂志,2016,54(8):582-586.
- [12] Sharma R, Agarwal S, Mehta S, et al. Profiling the mortality due to influenza A (H1N1) pdm09 at a tertiary care hospital in Jaipur during the current season--January and February 2015[J]. J Assoc Physicians India,2015,63(4):36-39.
- [13] 李玉香, 汪杨, 高玉伟, 等. 甲型H1N1流感病毒流行病学调查[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(8):1098-1100.
- [14] 何晓清, 严伟泉, 王建. 两种核酸提取方法对HCV-RNA检测结果的影响[J]. 中国医药导刊,2015,17(2):184-186.
- [15] 范公忍, 陈天宝, 李冰, 等. 两种核酸提取方法对丙型肝炎病毒RNA检测效果的比较及应用评价[J]. 检验学与临床,2015,12(1):48-50.
- [16] 宋宇, 李昕, 苏艳丹. 探讨两种核酸提取方法对HCV-RNA检测结果的影响[J]. 中国保健营养,2016,1(2):371-371.
- [17] 王效红. 血清丙型肝炎病毒核酸二种提取方法的比较[J]. 山西医药杂志,2016,45(19):2310-2312.
- [18] 刘敏, 陈秀英, 梅少林, 等. 不同核算提取方法检测HIV病毒载量和耐药基因的研究[J]. 中国现代医生,2016,54(20):111-114.
- [19] 徐佳楠, 何树森, 李天舒, 等. 不同试剂盒对流感病毒提取效能的比较[J]. 医学前沿,2015,5(21):381-382.
- [20] 白颀, 郭慈浩, 罗智浩, 等. 四种提取诺如病毒和副溶血性弧菌总RNA方法的比较[J]. 中国现代医生,2016,54(29):127-130.
- [21] 张君诚, 魏彦飞, 唐荣华, 等. 花生幼胚RNA提取方法研究[J]. 福建农林大学学报自然科学版,2004,33(1):1-4.
- [22] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社,2002:57.
- [23] 秦娟娟, 路志勇, 焦章平, 等. 改良Trizol法同步提取血液RNA和DNA[J]. 法医学杂志,2013,29(3):209-211.
- [24] 汪军, 金凯舟, 王娟, 等. 一种高效同时提取微量组织中总RNA, DNA和蛋白的技术方法的改进[J]. 肝胆胰外壳杂志,2012,24(4):309-313.
- [25] 李永利, 刘立明, 廖华芳, 等. 甲型H1N1流感病毒荧光RT-PCR检测方法的优化及应用[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2011,5(17):5104-5106.

(收稿日期: 2016-12-27)
(本文编辑: 孙荣华)

刘亚楠, 李珺, 华文浩, 等. 医两种病毒核酸提取方法在流行感冒诊断中的比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017,11(5):474-478.