·论 著·

两种磁珠法核酸提取试剂在病原靶向二代测序中的性能

程建军　萧尔雅　邹珍珍　韩清珍　王琳

【摘要】目的　比较两种磁珠法核酸提取试剂在病原靶向二代测序（ptNGS）检测肺泡灌洗液（BF）和外周血（PB）样本的实验参数及检测结果差异，选择较优的核酸提取试剂并评估其在ptNGS检测中的适用性，为不同样本类型选择适用的核酸提取试剂提供参考。**方法**　选择两种代表性磁珠法核酸提取试剂盒KitA和KitB，对已知培养或实时荧光定量PCR（qPCR）结果的12例BF和8例PB样本分别取相同体积进行ptNGS检测，流程主要包括核酸提取、文库构建、上机测序和结果分析。采用Wilcoxon配对秩检验系统比较KitA与KitB在样本（BF和PB）检测过程中的实验参数（包括核酸提取总质量、吸光度（A）$_{260/280}$、文库浓度、样本测序数据质量指标Q30等）和病原检出拷贝数，以明确更适用于BF与PB样本ptNGS检测的磁珠法提取试剂。通过ptNGS检测的准确度、精密度、检出限和常规抗干扰能力进一步评估提取试剂盒的适用性。**结果**　KitA在BF的核酸提取总量显著高于KitB（(W=－66、P=0.001），而在PB的核酸提取总量与KitB差异无统计学意义（W=19、P=0.063）。KitB在BF和PB样本核酸的吸光度$A_{260/280}$显著优于KitA（BF：W=54、P=0.014，PB：W=21、P=0.031）。KitA与KitB提取核酸构建的文库浓度和片段大小差异均无统计学意义；KitA与KitB测序数据在Q30、引物二聚体百分比和Real align百分比等差异均无统计学意义（P均＞0.05）。KitA与KitB病原体检出数量和种类一致；KitA提取的BF检出病原体拷贝数显著高于KitB（W=－301、P ＜ 0.001），但两者在PB中病原拷贝数差异无统计学意义（W=－3、P=0.844）。进一步选择更适用的核酸提取试剂盒KitA评估其在ptNGS检测BF和PB中的适用性，使用KitA进行ptNGS检测的阳性符合率为97.14%，漏检率为2.86%，总体符合率为95%；批内精密度和批间精密度均＜10%；细菌和真菌检出限均为100拷贝/ml，病毒检出限均为1 000拷贝/ml；样本中的非靶标核酸（包括人源核酸）对ptNGS定性结果无干扰。**结论**　KitA提取方式在BF的ptNGS检测中整体优于KitB，KitA和KitB在PB的ptNGS检测中整体实验参数如核酸提取总质量、文库浓度和测序数据质量指标Q30等基本一致，KitA在ptNGS检测中准确度、精密度、检出限和常规抗干扰能力的性能评估中均满足临床检测需求。

【关键词】病原体靶向二代测序；核酸提取；磁珠法

Performance comparison and evaluation of two magnetic bead-based nucleic acid extraction reagents for pathogen-targeted next-generation sequencing

Cheng Jianjun, Xiao Erya, Zou Zhenzhen, Han Qingzhen, Wang Lin. Clinical Laboratory Center, The Fourth Affiliated Hospital of Soochow University (Suzhou Dushu Lake Hospital), Suzhou 215123, China

Corresponding author: Wang Lin, Email: 13962504512@163.com

【Abstract】Objective　To evaluate and compare the experimental parameters and resultant differences of two magnetic bead-based nucleic acid extraction reagents in pathogen-targeted next-generation sequencing (ptNGS) for the detection of bronchoalveolar lavage fluid (BF) and peripheral blood (PB) samples, and to identify the more effective nucleic acid extraction reagent and assess its applicability in ptNGS detection, in order to offer guidance for the selection of appropriate nucleic acid extraction reagents

DOI：10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2025.04.004

基金项目：苏州工业园区医疗卫生创新研究项目（No. CXYJ2024A08）；苏州姑苏卫生人才计划重点人才[No.（2024）108]；苏州工业园区卫生人才支持计划[No.（2024）55]

作者单位：215123 苏州市，苏州大学附属第四医院（苏州市独墅湖医院）临床检测中心

通信作者：王琳，Email：13962504512@163.com

tailored to various sample types. **Methods** Two representative magnetic bead-based nucleic acid extraction kits, designated as KitA and KitB were employed to conduct ptNGS detection on 12 BF samples and 8 PB samples, all of which had established culture or real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) results. An equal volume was utilized for each sample. The methodology encompassed several key stages, including nucleic acid extraction, library construction, sequencing and subsequent result analysis. The experimental parameters, including total nucleic acid extraction mass, absorbance (A) $_{260/280}$, library concentration and sample sequencing data quality index Q30; and pathogen detection copy numbers between KitA and KitB during the detection process of samples (BF and PB) were systematically compared by Wilcoxon signed-rank tests, and the magnetic bead extraction reagent which was more suitable for ptNGS detection of BF and PB samples were clarified. The suitability of the extraction kit was further evaluated by the accuracy, precision, detection limit and conventional anti-interference ability of ptNGS detection. **Results** The total amount of nucleic acid extracted in BF by KitA was significantly higher than that of KitB (W = −66, P = 0.001), but without significant difference in PB (W = 19, P = 0.063). However, the absorbance $A_{260/280}$ of KitB nucleic acid in BF and PB samples were significantly better than those of KitA (BF: W = 54, P = 0.014; PB: W = 21, P = 0.031). But the library concentration and fragment size of the libraries constructed by KitA and KitB nucleic acid were not significantly different; sequencing data quality metrics including Q30 scores, primer dimer percentage and percentage of Real aligne were not significantly different between the two extraction methods (all P > 0.05). The number and species of KitA and KitB detected in the pathogen were consistent. The pathogen copy number detected by KitA in BF was significantly higher than that of KitB (W = −301, P < 0.001), however, there was no statistically significant difference in pathogen copy number in PB between the two extraction methods (W = −3, P = 0.844). Further, a more suitable nucleic acid extraction kit KitA was selected to evaluate its suitability for ptNGS detection in BF and PB. The positive concordance rate of ptNGS detected by KitA was 97.14%, the missed detection rate was 2.86%, and the overall concordance rate was 95%. Both intra-batch and inter-batch precision exhibited coefficients of variation below 10%. The limit of detection (LOD) was established at 100 copies/ml for bacterial and fungal targets, and 1 000 copies/ml for viral targets. Notably, non-target nucleic acids (including human-derived DNA/RNA) in the samples did not interfere with the qualitative results of ptNGS analysis. **Conclusions** For ptNGS detection in BF samples, Kit A demonstrated overall superior performance compared with Kit B across all evaluated parameters. In PB samples, both kits were consistent in overall experimental parameters, including total nucleic acid yield, library concentration and sequencing data quality indicators Q30. KitA meets the requirements of clinical testing in terms of accuracy, precision, detection limit and routine anti-interference capability in the performance evaluation of ptNGS detection

【Key words】 Pathogen-targeted next-generation sequencing; Nucleic acid extraction; Magnetic bead method

病原体靶向二代测序（pathogen-targeted next-generation sequencing，ptNGS）技术通过靶向富集、靶向降解或探针捕获等方式富集目标序列，结合二代测序对预设的病原靶标进行检测，以明确临床潜在感染性样本中的病原体。相较于病原体宏基因组（metagenomic Next-Generation Sequencing，mNGS），ptNGS不易受宿主核酸干扰，被认为是一种新的、广谱、快速、准确和经济的感染性疾病诊断方法[1]，目前在呼吸道感染（灌洗液和痰液）、血流感染（外周血）、中枢神经系统感染（脑脊液）和人工关节感染（关节液）等均有应用和报道[2-6]。多项研究显示ptNGS在关节感染、免疫功能低下或正常人群呼吸道感染中临床诊断价值与mNGS相当[7-10]，在病毒DNA检测和脑脊液样本检测中甚至优于mNGS[11-12]。ptNGS既能满足临床对病原检测的高通量需求，同时成本较mNGS更低，其临床应用是感染性疾病诊断技术进步的体现，病原NGS检测与传统检测的普遍性和高特异性相结合，可提供准确和快速的病原学依据[13-14]。然而，病原NGS在结果解读、技术流程完善和优化方面，如样本的核酸提取等均存在问题和挑战[1, 15-16]。有关病原NGS检测的专家共识均认为核酸提取是保证

检测结果准确的重要环节，实验室需要对核酸提取试剂盒进行验证，并根据样本来源和实验目的选择适用方法和试剂[17-19]。磁珠法是包括ptNGS在内的病原体NGS检测应用最多的核酸提取方法，一项国内多中心调查研究也佐证了这一现状[20-21]。虽然目前国内外关于NGS技术、生物信息学分析和临床应用等多角度出台了专家共识，但仍然没有公认的行业标准，且关于不同类型样本的核酸提取仅有高质量的核酸判断标准，缺乏具体的验证方案与评估标准。因此，本实验室在常规开展ptNGS前，结合本院送检的样本类型，比较两种具有代表性的磁珠法核酸提取在不同类型样本的差异，并通过ptNGS全流程的性能评估以进一步明确其适用性，指导实验室运用ptNGS技术开展临床检测并选择更适用的核酸提取方法，现报道如下。

材料与方法

一、样本来源

1. 临床样本：收集苏州大学附属第四医院2024年1月至5月临床送检进行微生物培养和实时荧光定量PCR（real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR）检测的样本，以上两种方法简称“常规方法”。样本共计20例，其中肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BF）12例（9例单一/多种病原检出、3例未检出病原体，代表含宿主细胞和病原体颗粒的样本类型），外周血（peripheral blood，PB）8例（6例单一/多种病原体检出、2例均未检出，代表含宿主细胞少，以病原体游离核酸为主的样本类型）。

微生物培养主要鉴定临床常见的细菌和真菌，qPCR检测的呼吸道病原体包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、肺炎支原体以及人鼻病毒。

2. 模拟样本：向不同核酸浓度的阴性样本中加入定量的病原体标准品或质控品制备成模拟样本共计20例，其中BF基质10例编号为1～3、7～11和17～18，PB基质10例编号为4～6、12～16和19～20。8、9、15为低非靶标核酸基质模拟样本（BF和PB核酸浓度＜ 2 ng/μl阴性样本作为基质），7、10、12为含有高非靶标核酸基质的模拟样本（BF核酸浓度＞ 30 ng/μl，PB核酸浓度＞ 5 ng/μl阴性样本作为基质），在以上基质中加入包括金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、白色念珠菌、腺病毒B和人偏肺病毒等病原体的标准品。

二、主要仪器和试剂

1. 仪器：华大智造MGISEQ-200测序仪，因恩普NanoPhotometer® N50紫外分光光度计，赛默飞Qubit4.0，博日基因扩增仪，天能凝胶成像系统以及昨非加热型恒温混匀仪。

2. 试剂：核酸提取试剂盒分别是诺维赞DNA/RNA磁珠法共提取试剂盒RM601-01（KitA）（代表玻璃珠破壁 + 酶裂解 + 无片段偏好磁珠的提取方式）和天根磁珠法大体积游离核酸提取试剂盒DP710-T2A（KitB）（代表酶裂解 + 磁珠偏好小片段的模式）。文库构建试剂包括Multiplex PCR Kit、Vazyme和PM101-01。赛默飞Qubit试剂、华大智造测序试剂盒、安特无水乙醇和翌圣分选磁珠等。

三、研究方法

1. 核酸提取：按400 μl每管进行取样，分别用KitA与KitB对相同样本按说明书进行提取，两种试剂盒均采用酶消化法进行裂解，其中KitA在1管内进行DNA和RNA共提取，增加了玻璃珠破壁的步骤，加70 μl无酶水常温洗脱，其磁珠无片段偏好性；KitB分两管分别进行DNA和RNA提取，核酸洗脱时加35 μl无酶水并加热到55 ℃，其磁珠偏好小片段，也能吸附大片段；BF样本主要提取基因组核酸，PB样本主要提取血浆游离核酸。

2. 文库构建：KitA试剂盒提取的核酸使用诺维赞的gWiper试剂去除核酸中的基因组DNA，将获得的RNA进行逆转录成cDNA。KitB试剂盒提取的RNA直接进行逆转录获得cDNA。将上述获得的cDNA和提取的核酸共同加入八连管，使用超多重PCR扩增体系进行一轮扩增，扩增完成后对体系进行纯化，对产物进行二轮扩增即加接头，反应结束后再次纯化，加25 μl无酶水洗脱文库，对文库进行质量检测后备用。

3. 测序与结果计算：每个样本按照给定理论数据量计算加样体积，根据上样量对文库进行pooling混合后进行DNA纳米球（DNA nanoball，DNB）制备，上机测序选择单端测序，读长为50 bp的测序模式，测序后对数据进行分析，获得各样本的数据质量和检出结果。对于检测读段数高的病原体结果，通过引入已知拷贝数的定量内参和数学计

算模型将其转化为以拷贝/ml为单位，对于读段数较低而不能转化为拷贝数的病原体结果采用读段数表示。

4. 性能评估：参考mNGS本地化性能确认专家共识[22]，对本实验室ptNGS更换使用的核酸提取试剂盒进行性能评估，评估内容包括准确度、阴阳性符合率、检出限、精密度、抗干扰能力等。实验采用KitA对20例临床样本和20例模拟样本进行核酸提取，分析评估KitA在ptNGS检测中的适用性。

四、统计学处理

应用Graphpad prism 8软件统计分析，核酸提取总质量、吸光度（A）$_{260/280}$、$A_{260/230}$、文库浓度、测序数据量、测序数据质量指标Q30、测序数据的引物二聚体占比、比对到参考序列的Real aglin占比和病原体拷贝数及其对数为不符合正态分布的计量资料，采用中位数（四分位数）[M（P_{25}，P_{75}）]表示，配对样本使用Wilcoxon符号秩检验，以P < 0.05为差异有统计学意义。

结　果

一、核酸质量

比较临床样本KitA与KitB提取核酸总质量、吸光度$A_{260/280}$和$A_{260/230}$监测纯度，通过琼脂糖凝胶电泳查看核酸片段完整性。

Wilcoxon符号秩检验结果显示，在BF样本中，KitA提取核酸总质量显著高于KitB（Qubit 4.0：W = −66、P = 0.001，NanoPhotometer® N50：W = −64、P = 0.002）；KitB吸光度$A_{260/280}$显著优于KitA（W = 54、P = 0.014），KitA与KitB吸光度$A_{260/230}$差异无统计学意义（W = −10、P = 0.700）。在PB样本中，KitA与KitB取核酸总质量差异无统计学意义（Qubit 4.0：W = 19、P = 0.063，（NanoPhotometer® N50：W = 2、P > 0.05）；KitB吸光度$A_{260/280}$优于KitA，差异有统计学意义（W = 21、P < 0.05），KitA与KitB吸光度$A_{260/230}$差异无统计学意义（W = −17、P = 0.094）。

琼脂糖凝胶电泳结果显示，KitA与KitB提取核酸均完整，无降解拖尾。

二、文库质量

用KitA与KitB提取的核酸建库，所构建文库的浓度在BF（W = 32、P = 0.175）和PB（W = −7、P = 0.563）样本中差异均无统计学意义；KitA与KitB提取核酸构建的文库经琼脂糖电泳分析，片段在200～350 bp，符合后续实验对文库质量的要求。

三、测序数据质量

应用KitA与KitB提取进行实验的过程参数除BF样本中测序数据量（M）外（W = −56、P = 0.015），测序数据质量指标Q30、引物二聚体占比和Real algin占比差异均无统计学意义（P均> 0.05），见表1～2。

四、病原体检出

分析KitA和KitB提取的核酸进行ptNGS所检出病原体的差异，并与常规方法检出结果和一致性进行比较。20例样本送检微生物培养、qPCR结果阳性的病原体共计14种，其中9例BF样本中检出12种病原体，3例阴性样本、6例PB样本中检出2种病原体，2例阴性样本；经KitA和KitB核酸提取试剂盒的ptNGS检出病原体种类和数量一致，BF样本中检出29种病原体、PB样本中检出6种，与常规方法比较，ptNGS检出种数更多，除1例多育结荚孢霉外，ptNGS对培养和qPCR阳

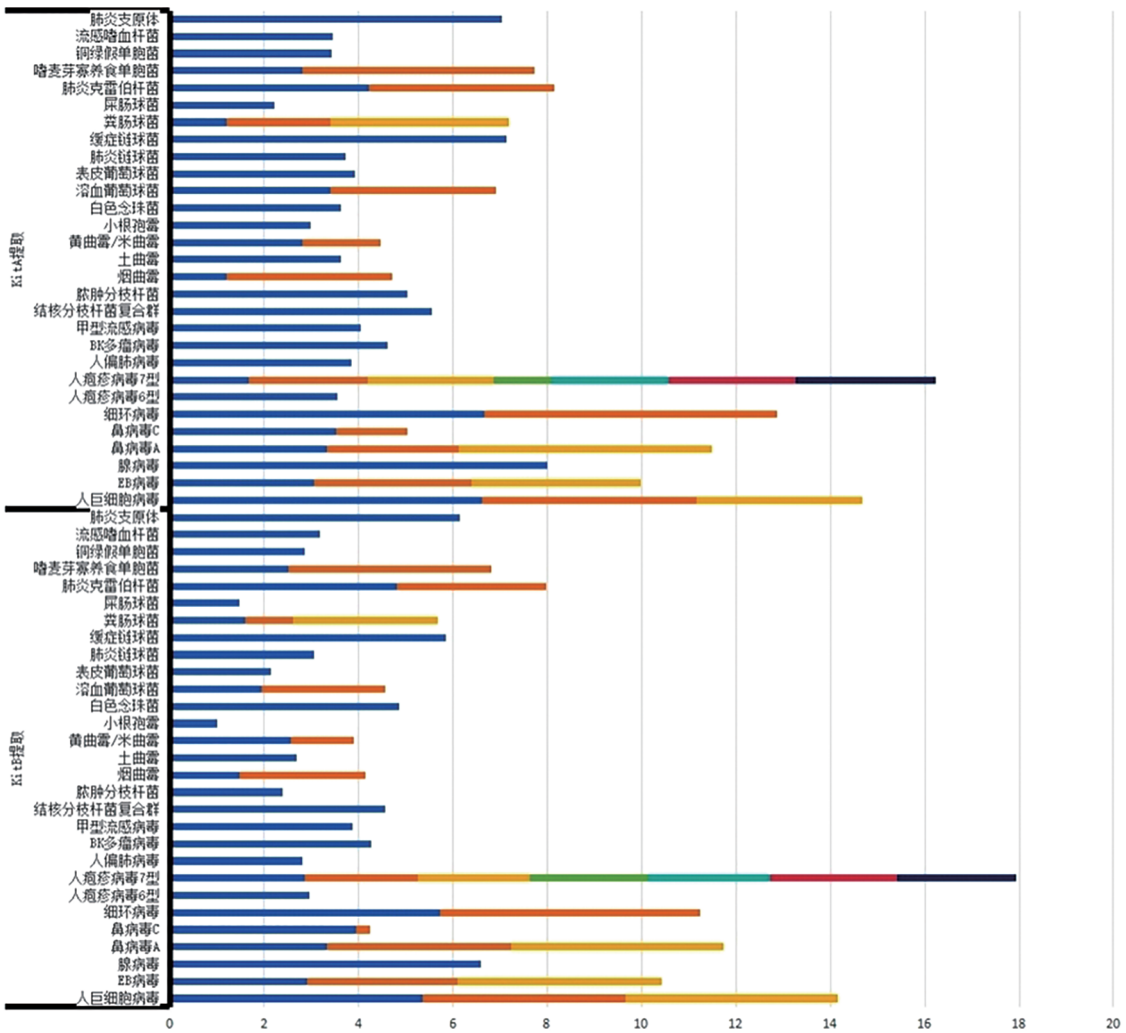
表1　KitA 和 KitB 在 ptNGS 检测 BF 样本中提取核酸质量及实验过程参数 [M（P_{25}，P_{75}）]

过程参数	KitB（n = 12）	KitA（n = 12）	W 值	P 值	试剂盒
Qubit 4.0 核酸质量（ng）	805.0（367.5，1 008.0）	3 528.0（686.0，9 828.0）	−66	0.001	KitA
NanoPhotometer® N50 核酸质量（ng）	1 897.0（1 016.8，2 552.5）	4 560.5（1 277.5，1 9442.5）	−64	0.002	KitA
$A_{260/280}$	1.9（1.8，1.9）	1.8（1.6，1.8）	54	0.014	KitB
$A_{260/230}$	1.6（1.2，1.9）	1.7（1.4，2.1）	−10	0.700	KitA 与 KitB
文库浓度（ng/μl）	20.5（10.6，32.3）	11.4（8.5，32.7）	32	0.175	KitA 与 KitB
测序数据量（M）	42.8（30.2，70.1）	55.1（35.2，73.0）	−56	0.015	KitA
Q30（%）	94.72（93.75，96.53）	93.84（93.62，94.03）	26	0.292	KitA 与 KitB
引物二聚体占比（%）	2.87（1.09，10.15）	1.72（1.45，2.03）	42	0.061	KitA 与 KitB
Real aglin 占比（%）	83.63（71.35，90.06）	78.19（73.23，89.13）	34	0.146	KitA 与 KitB

性样本均检出。比较KitA与KitB提取后ptNGS检测病原拷贝数（拷贝/ml），KitA提取BF样本的病原检出拷贝数显著高于KitB（$W=-301$、$P<0.001$），而PB样本的病原拷贝数与KitB基本一致（$W=3$、$P=0.844$）。ptNGS详细病原体检出见图1和图2。

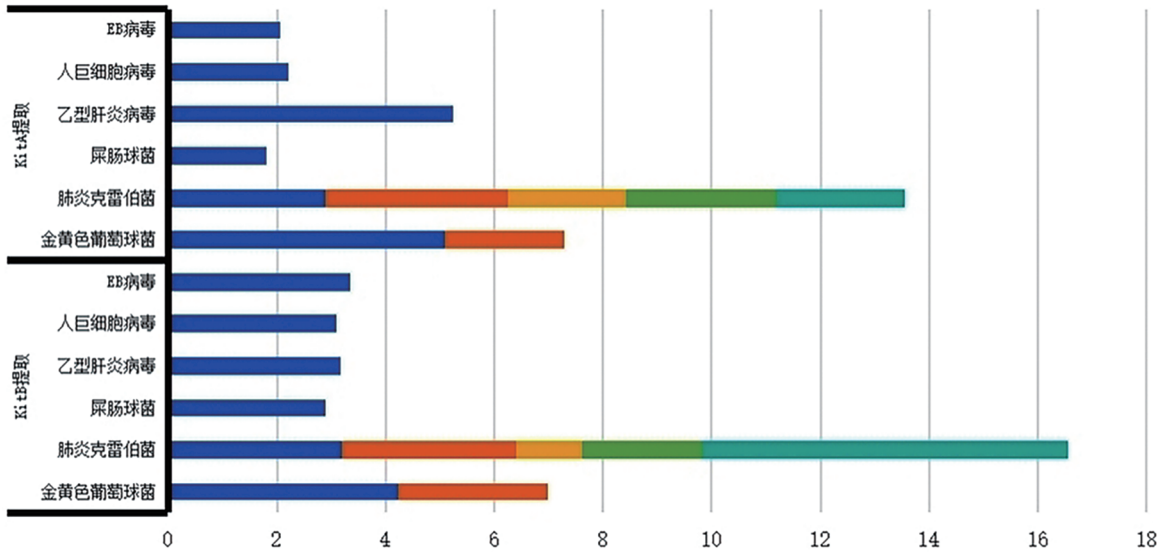
表 2　KitA 和 KitB 在 ptNGS 检测 PB 样本中提取核酸质量及实验参数 [M（P_{25}，P_{75}）]

过程参数	KitB（n = 8）	KitA（n = 8）	W 值	P 值	试剂盒选择
Qubit 4.0 核酸质量（ng）	12.3（6.4，1435.0）	7.0（7.0，770.0）	19	0.063	KitA 与 KitB
NanoPhotometer® N50 核酸质量（ng）	684.3（614.3，3 713.5）	700.0（633.5，1 673.0）	2	0.945	KitA 与 KitB
$A_{260/280}$	1.8（1.6，2.0）	1.4（1.3，1.6）	21	0.031	KitB
$A_{260/230}$	0.6，（0.3，0.8）	1.1（0.4，1.7）	−17	0.094	KitA 与 KitB
文库浓度（ng/μl）	5.9（2.1，6.3）	6.1（5.2，6.4）	−7	0.563	KitA 与 KitB
测序数据量（M）	42.7（29.4，54.7）	37.5（32.9，54.1）	5	0.688	KitA 与 KitB
Q30（%）	93.43（87.28，95.43）	93.65（92.87，94.58）	−9	0.438	KitA 与 KitB
引物二聚体占比（%）	0.17（0.02，0.37）	0.41（0.02，0.52）	−3	0.813	KitA 与 KitB
Real aglin 占比（%）	70.93（20.91，84.05）	57.55（20.00，90.60）	3	0.844	KitA 与 KitB



注：两栏分别表示 KitA 和 KitB 提取 BF 样本的 ptNGS 检出病原体种类、数量及病原的 lg（拷贝数），上方为 KitA 提取的 ptNGS 检出结果，下方表示 KitB 提取的 ptNGS 检出结果。柱形颜色的种类数表示某病原物种在所有样本中被检测到的频数，柱形的长度表示病原的 lg（拷贝数）。Wilcoxon 符号秩检验结果显示：KitA 在 BF 样本的提取检出病原拷贝数显著高于 KitB（$W=-301$、$P<0.001$）

图 1　KitA 与 KitB 在 BF 样本中病原检出（lg 拷贝数）差异堆积图



注：两栏分别表示 KitA 和 KitB 提取 PB 样本的 ptNGS 检出病原体种类、数量及病原的 lg（拷贝数），上方为 KitA 提取的 ptNGS 检出结果，下方表示 KitB 提取的 ptNGS 检出结果。柱形颜色的种类数表示某病原物种在所有样本中被检测到的频数，柱形的长度表示病原的 lg（拷贝数）。Wilcoxon 符号秩检验结果显示，KitA 在 PB 样本的提取检出病原拷贝数总体上与 KitB 相当（$W=3$、$P=0.844$）

图 2　KitA 与 KitB 在 PB 样本中病原检出（lg 拷贝数）差异堆积图

五、KitA 性能评估

1. 准确度：通过对20例临床样本和20例模拟样本进行ptNGS检测，评价其准确度。1例临床样本微生物培养检出多育结荚孢霉，ptNGS未检出；1例临床样本微生物培养阴性，ptNGS检出屎肠球菌3.2 × 10^2拷贝/ml；其余ptNGS检出结果与常规方法一致。因此，ptNGS与常规方法总体符合率为95%，阳性符合率为97.14%，漏检率为2.86%。

2. 精密度：采用4例不包含标准品中病原的阴性基质，包括2例BF基质编号17和18，2例PB基质编号19和20。分别向编号17和19的样本加入细菌、真菌标准品使其理论拷贝数100拷贝/ml，病毒1 000拷贝/ml；向18和20号样本加入细菌、真菌标准品使其理论拷贝数为500拷贝/ml，病毒拷贝数为5 000拷贝/ml进行ptNGS检测，评价其精密度。将每个样本等分为5份，编号为A～E。第1天检测17A～17C、18A～18C、19A～19C、20A～20C，用以计算批内精密度；第2天和第3天分别检测17D～20D、17E～20E，结合第1天用以计算批间精密度。检测结果经计算为拷贝/ml后取lg对数进行批内、批间精密度评价。所检测8种病原体批内精密度≤ 10%，批间精密度≤ 10%，见表3。

表 3　KitA 在 ptNGS 检测中精密度和检出限的性能评估

病原体（8 例）	精密度（20 例）			检出限（20 例）		
	批内精密度（CV%）	批间精密度（CV%）	判断	检测（lg 拷贝数）[M（P_{25}，P_{75}）]	理论（lg 拷贝数）	合格率（%）
金黄色葡萄球菌	≤ 7.8	≤ 7.4	合格	2.86（2.68，3.16）	≥ 1.8	95
粪肠球菌	≤ 2.8	≤ 6.6	合格	3.35（3.05，3.72）	≥ 1.8	100
大肠埃希菌	≤ 2.2	≤ 4.2	合格	3.84（3.46，4.03）	≥ 1.8	95
肺炎克雷伯菌	≤ 4.0	≤ 4.0	合格	2.81（2.51，3.11）	≥ 1.8	95
鲍曼不动杆菌	≤ 2.3	≤ 5.1	合格	3.16（2.81，3.25）	≥ 1.8	95
白色念珠菌念	≤ 7.2	≤ 9.8	合格	2.51（2.20，2.68）	≥ 1.8	95
腺病毒 B	≤ 3.1	≤ 6.1	合格	3.44（3.11，3.75）	≥ 2.7	95
人偏肺病毒	≤ 3.9	≤ 5.7	合格	3.40（3.16，3.98）	≥ 2.7	95
合计	＜ 10	＜ 10	合格	非病毒：[3.05（2.68，3.35）] 病毒：[3.41（3.16，3.80）]	非病毒≥ 1.8； 病毒≥ 2.7	95

注：每种病原体的精密度采用数值范围表示

3. 检出限：通过向BF和PB样本基质加入8种已知细菌、真菌标准品使其理论拷贝数为100拷贝/ml，病毒拷贝数为1 000拷贝/ml并进行ptNGS检测，评价其检出限，样本编号为1～16、17和19，其中1～6用于检出限预实验，17和19号各重复检测5次，经评估细菌和真菌检出限均为100拷贝/ml，病毒检出限均为1 000拷贝/ml，见表3。

4. 抗干扰能力：选择8、9和15号模拟样本为低非靶标核酸样本（提取的核酸浓度分别为0.89 ng/μl、0.97 ng/μl和0.12 ng/μl），7、10和12号为高非靶标核酸样本（提取的核酸浓度分别为87.80 ng/μl、33.60 ng/μl和5.20 ng/μl）。通过Wilcoxon符号秩检验比较高非靶标核酸组与低非靶标核酸组的8种病原检出（lg病原拷贝数）情况，结果显示8种病原体在两组中均被检出，且拷贝数差异无统计学意义（$W=-66$、$P=0.356$）。因此，在ptNGS检测中高占比的非靶标核酸对病原体的定性和半定量结果无显著干扰。

讨　论

临床样本可能包含宿主细胞和代谢物，细菌、真菌、病毒和寄生虫等病原体颗粒，也可能仅包含宿主和上述病原体的游离核酸，例如BF、穿刺脓液和组织样本可能含宿主细胞多，同时含有病原体颗粒；PB血浆、部分脑脊液和胸腹水等样本可能含宿主细胞少，以病原体游离核酸为主。核酸提取是ptNGS检测流程中的关键环节，可能会直接影响文库质量和病原体检出或病原拷贝数，从而对性能评估中的准确度、检出限等造成影响[20, 22]。从复杂的临床样本中充分获取病原体核酸是应用ptNGS检测技术帮助临床准确判断病原体的前提之一。目前核酸提取试剂盒种类较多，但缺乏用于ptNGS核酸提取的体外诊断试剂，如何选取核酸提取试剂，以满足临床对ptNGS检测不同样本类型的需求是开展该类项目在技术层面首先需要考虑的问题。

核酸提取基本步骤包括细胞裂解、核酸分离和纯化等。细胞裂解方面，有研究比较了不同裂解方式对肠道菌群16S rNA测序结果的影响，其中增加玻璃珠机械破壁能更好地保留菌群物种多样性，单独酶裂解不能完全释放部分病原核酸[23]。基于扩增子的ptNGS通过对靶标的PCR扩增和纯化进行文库构建，不易受人源核酸干扰，但对核酸模板完整性要求更高，在选取裂解方法时应兼顾裂解的充分性和温和性，避免过多的靶标核酸模板在引物中间位置断裂；增加玻璃珠机械破壁对ptNGS检测的影响需通过实验进行确认。核酸分离与纯化方面，磁珠法因操作简便、适用性强、能高效富集核酸且易于实现高通量和自动化被广泛地应用在病原NGS检测领域；但临床样本异质性较大，可能包含的病原体与核酸类型各异[1, 15-16]，不同提取试剂盒及磁珠对核酸吸附的片段偏好性存在差异[24]，这可能也是不同实验室病原NGS检测存在差异的重要因素[18]，实验室在应用核酸提取试剂盒前也需评估其磁珠片段吸附偏好性能否满足临床检测需求。通常，核酸中可能残留的干扰物质如血红蛋白、免疫球蛋白能通过相应机制抑制PCR扩增反应[25]，对基于扩增子的ptNGS检测可能会造成影响，故要求核酸提取试剂盒在纯化过程中能较好地减少干扰物质的残留。有研究比较了不同核酸提取方法对痰液样本ptNGS检测的影响，结果显示磁珠法提取痰液样本的核酸用于靶向高通量测序的无效读段数较其他两种方法少，比对到参考序列的读段数仅次于柱提法；研究中三种提取方法在痰液样本的ptNGS定性结果一致，在微生物组和抗性基因检测丰度上有差异[26]，该研究通过实验过程参数和检测结果评估了磁珠法在痰液样本ptNGS检测中的适用性。此外，核酸提取方法的比较在肠道微生态研究[27]、乳业生产的细菌DNA检测和基于纳米孔测序的长读长测序模式的宏基因组检测[28-29]中均有报道，其中基于酶裂解病原体的方法更适用于长读长测序模式的宏基因组测序，这可能与酶裂解法较化学或单独机械裂解更加温和，使提取的核酸完整性更佳有关。通过上述研究可知酶裂解+磁珠吸附的提取方法在ptNGS检测中可能也具有一定优势，但具体磁珠法试剂盒吸附核酸的片段偏好性和增加物理破壁对ptNGS检测的影响需进行评估。

本实验室综合核酸提取试剂适用范围、可接收成本与可操作性等，选择两款具有代表性的磁珠法提取试剂盒KitA与KitB。KitA采用酶裂解方式并增加了玻璃珠破壁步骤，磁珠对核酸片段大小不具偏好性；KitB仅采用酶裂解方式，磁珠偏好小片段，也能吸附大片段。研究中选取BF和PB血浆两种代表性临床样本，在核酸提取质量、ptNGS检

测的实验过程参数如文库质量、文库片段、测序数据量、Q30、引物二聚体等及病原检测结果、检测性能等方面对核酸提取试剂盒进行比较与评估，从细胞裂解、核酸分离与纯化角度为选择与ptNGS检测试剂适配的磁珠法提取试剂盒提供依据。病原NGS相关专家共识及标准对提取的高质量DNA和RNA定义分别为$A_{260/280}$在1.7～1.9和1.8～2.0，核酸片段完整无降解等[19, 30]。依据此标准，KitA提取的高质量核酸占比低于KitB，但经后续实验的过程参数和病原体的定性和定量检测结果的比较，以KitA为代表的核酸提取方式可能更适用于BF样本，同时也能满足PB样本的临床ptNGS检测。KitA与B在ptNGS检测中的性能比较和评估仅局限于本实验室所用的ptNGS检测的试剂盒与方法，其提取在其他不同实验原理的ptNGS检测试剂中的比较和性能评估结果可能会有差异。

综上，本研究通过对试剂盒在检测体系的性能评估，以KitA为代表的核酸提取方式在本实验室ptNGS检测中的准确度、检出限、精密度、抗干扰能力等均能满足实验室对BF和PB样本的检测要求。核酸提取的比较和评估对ptNGS检测体系的建立具有重要意义，病原NGS检测实验室在建立或优化ptNGS检测方法的过程中关注高质量核酸占比的同时，可能也需要结合提取产物在后续实验中的结果综合评价核酸提取试剂盒的适用性。

参 考 文 献

[1] Yin Y, Zhu P, Guo Y, et al. Enhancing lower respiratory tract infection diagnosis: implementation and clinical assessment of multiplex PCR-based and hybrid capture-based targeted next-generation sequencing[J]. EBio Medicine,2024,107:105307.

[2] 赵聪琳, 刘凯, 周永召. 靶向二代测序技术与宏基因组二代测序技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中华预防医学杂志,2024,58(1):114-121.

[3] 张彩霞, 叶黎文, 黄春艳. 病原体靶向测序技术在疑似肺部感染患者中的应用价值分析[J]. 解放军医学杂志,2024,49(9):1022-1028.

[4] Zhang P, Liu B, Zhang S, et al. Clinical application of targeted next-generation sequencing in severe pneumonia: a retrospective review[J]. Crit Care,2024,28(1):225.

[5] Huang C, Huang Y, Wang Z, et al. Multiplex PCR-based next generation sequencing as a novel, targeted and accurate molecular approach for periprosthetic joint infection diagnosis[J]. Front Microbiol,2023,14:1181348.

[6] Gao D, Hu Y, Jiang X, et al. Applying the pathogen-targeted next-generation sequencing method to pathogen identification in cerebrospinal fluid[J]. Ann Transl Med,2021,9(22):1675.

[7] Li S, Tong J, Liu Y, Shen W, et al. Targeted next generation sequencing is comparable with metagenomic next generation sequencing in adults with pneumonia for pathogenic microorganism detection[J]. J Infect,2022,85(5):e127-e129.

[8] Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar lavage fluid specimens[J]. J Clin Microbiol,2022,60(7):e0052622.

[9] Wei M, Mao S, Li S, et al. Comparing the diagnostic value of targeted with metagenomic next-generation sequencing in immunocompromised patients with lower respiratory tract infection[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob,2024,23(1):88.

[10] Hong HL, Flurin L, Thoendel MJ, et al. Targeted versus shotgun metagenomic sequencing-based detection of microorganisms in sonicate fluid for periprosthetic joint infection diagnosis[J]. Clin Infect Dis,2023,76(3):e1456-e1462.

[11] Sun W, Zheng L, Kang L, et al. Comparative analysis of metagenomic and targeted next-generation sequencing for pathogens diagnosis in bronchoalveolar lavage fluid specimens[J]. Front Cell Infect Microbiol,2024,14:1451440.

[12] Chen W, Liu G, Cui L, et al. Evaluation of metagenomic and pathogen-targeted next-generation sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis in adults: A multicenter prospective observational cohort study in China[J]. J Infect,2024,88(5):106143.

[13] 李倩, 邓莉平, 陈果, 等. 宏基因组二代测序在获得性免疫缺陷综合征合并中枢神经系统感染中的临床应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2023,17(1):24-31.

[14] Chen Q, Yi J, Liu Y, et al. Clinical diagnostic value of targeted next-generation sequencing for infectious diseases (Review)[J]. Mol Med Rep,2024,30(3):153.

[15] 赵建玉, 周倩倩, 鲁辛辛, 等. 高通量测序技术在确认病原微生物中存在的问题与挑战[J]. 临床检验杂志,2021,39(1):6-11.

[16] 刁振丽, 李金明. 宏基因组高通量测序技术的临床应用: 现状, 挑战与前景[J]. 协和医学杂志,2023,14(5):905-910.

[17] 何军. 宏基因组测序技术检测感染性病原体江苏专家共识(2020版)[J]. 临床检验杂志,2020,38(9):641-645.

[18] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志,2021,44(2):107-120.

[19] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(12):1181-1195.

[20] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会. 靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识[J]. 中华医学杂志,2024,104(48):4375-4383.

[21] Han D, Diao Z, Lai H, et al. Multilaboratory assessment of metagenomic next-generation sequencing for unbiased microbe detection[J]. J Adv Res,2021,38:213-222.

[22] 中国药师协会, 中华医学会细菌感染与耐药防治分会, 国家卫生健康委临床抗微生物药物敏感性折点研究和标准制定专家委员会. 病原宏基因组高通量测序临床本地化检测规范专家共识[J]. 中

华预防医学杂志,2024,58(4):454-465.

[23] Sinclair J, West NP, Cox AJ. Comparison of four DNA extraction methods for 16s rRNA microbiota profiling of human faecal samples[J]. BMC Res Notes,2023,16(1):169.

[24] 应超, 蔡燕宁, 郝淑文, 等. 三种游离核酸提取试剂盒对血浆cfDNA提取性能的比较[J]. 实用医学杂志,2023,39(12):1556-1563.

[25] Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR[J]. Anal Bioanal Chem,2018,410(10):2569-2583.

[26] Benčič A, Toplak N, Koren S, et al. Metrological evaluation of DNA extraction method effects on the bacterial microbiome and resistome in sputum[J]. mSystems,2024,9(9):e0073524.

[27] Corcoll N, Österlund T, Sinclair L, et al. Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing[J]. FEMS Microbiol Lett,2017,364(14):10. 1093/femsle/fnx139.

[28] Cremonesi P, Severgnini M, Romanò A, et al. Bovine milk microbiota: comparison among three different DNA extraction protocols to identify a better approach for bacterial analysis[J]. Microbiol Spectr,2021,9(2):e0037421.

[29] Zhang L, Chen T, Wang Y, et al. Comparison analysis of different DNA extraction methods on suitability for long-read metagenomic nanopore sequencing[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:919903.

[30] 中华预防医学会. 基于高通量测序的病原体筛查通用准则(T/CMPA 010-2020)[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(6):738-740.

（收稿日期：2024-11-19）

（本文编辑：孙荣华）

程建军，萧尔雅，邹珍珍，等 . 两种磁珠法核酸提取试剂在病原靶向二代测序中的性能 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版),2025,19(4):214-222.