

前 言

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种在体外特异性扩增靶 DNA 序列的技术。其基本过程为模板双链 DNA 的变性、引物与模板 DNA 的退火和在 DNA 聚合酶引导下的链延伸反应三个阶段的多次循环。每一次循环后的扩增产物均可作为下一轮循环的模板,理论上,扩增产物量呈指数形式上升,即经 n 个循环后,产物量增加到 2^n 倍。

PCR 操作简单,短时间内在体外可获得数百万个特异靶 DNA 序列的拷贝,为临床疾病的诊断、治疗监测和预后评估提供了一种极有帮助的实验室辅助手段。

本标准的附录 A、附录 B 都是标准的附录。

本标准从 2002 年 7 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准由北京大学人民医院肝病研究所负责起草。

本标准主要起草人:陶其敏、全文斌、范涛。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

临床诊断中聚合酶链反应
(PCR)技术的应用

Guidelines for use of polymerase chain reaction
(PCR) technique in clinical diagnosis

WS/T 230—2002

1 范围

本标准规定了临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用准则。
本标准适用于各级、各类的医疗、卫生、保健机构应用 PCR 技术进行临床诊断。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 引物 primer

与待扩增靶 DNA 片段两端互补的寡核苷酸,其本质是单链 DNA(ssDNA),在 DNA 聚合酶的作用下能进行延伸,从而合成新的互补链。

2.2 模板 template

待扩增的靶 DNA 或 RNA 链,包括人类基因组 DNA、质粒 DNA、噬菌体 DNA、cDNA 和 mRNA、扩增后的 DNA 产物等几乎所有形式的 DNA 或 RNA。

2.3 变性 denaturation

DNA 或 RNA 由双链转变为单链状态,加热、提高 pH 或加入甲酰胺、脲等试剂都可使双链 DNA 或 RNA 发生变性。

2.4 退火 annealing

引物与互补的核苷酸序列在合适的温度下通过氢键形式相互结合的过程。

2.5 延伸 extension

在合适的条件下,由 DNA 聚合酶(如:Taq 酶)催化引导引物 DNA 链延伸的合成过程。

2.6 污染 contamination

由来源于非待测样品的核酸所引起的一个样品、一系列样品或试剂的非特异性扩增或扩增后在产物分析过程中造成的样品之间的污染,污染通常引起假阳性结果。

2.7 遗留污染 carry-over contamination

同一类靶序列上一次 PCR 扩增产物对以后扩增反应的后续污染。

2.8 内对照 internal control

在同一反应混合物体系中与待测靶核酸同时进行扩增反应的已知对照物。

2.9 Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase

一种耐热的 DNA 聚合酶,最初是从美国黄石国家公园温泉中存在的水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)中分离获得,Taq 酶最适活性温度在 70℃~80℃,能耐受 PCR 变性过程中的高温,是目前 PCR 扩增反应中经常使用的 DNA 聚合酶。

中华人民共和国卫生部 2002-04-20 批准

2002-07-01 实施

2.10 抑制物/干扰物 inhibition/interference

临床样品中能导致假阳性或假阴性扩增的内源性物质(如血液中的某些成分、痰液中的酸性多糖、尿液、体液等)和外源性物质(如滑石粉、抗凝剂等)。

2.11 dNTP deoxynucleotide triphosphate

三磷酸脱氧核苷,包括 dATP、dUTP、dCTP、dGTP、dTTP 等。在 PCR 扩增反应中,作为反应底物聚合形成新的 DNA 链。

2.12 热循环仪 thermocycler

在 PCR 或其他需要在反应过程中转换温度的体系中用来保证温度准确快速转换的设备。

3 用途

对目前已有稳定、可靠的微生物学和免疫学方法检测的疾病或病原体,不推荐应用 PCR 进行检测。例如,大多数的细菌感染通过细菌培养 3~4 天即可报告并明确药敏结果;对甲型肝炎病毒等的感染,通过对其抗原或/和抗体的检测也可明确诊断。对于目前尚无其他实验室诊断技术或现有的诊断技术不成熟、敏感性太低、不能及时准确地反映感染情况的疾病,可推荐应用 PCR 技术进行检测。如丙型肝炎病毒的感染,检测其抗体不能做到早期诊断、也不能表明血清中有无病毒的存在;又如结核杆菌的感染,培养需 2~3 个月,耗时太长,影响诊断,对此类病原体,PCR 检测有其独到的优点。

PCR 临床实验根据其应用的不同可分为三个互相交叉的类型:“过筛实验”、“诊断实验”、“验证实验”。

3.1 过筛实验

过筛实验适用于数目较大的群体,可能大部分无症状(疾病的流行性可能很低),一个阳性结果并不能确定病原微生物的流行或反映某种疾病状态,它只能提示有必要作进一步的检测。较高的诊断敏感性和阴性可信度是过筛实验最重要的特性。

3.2 诊断实验

诊断实验用于当地某种疾病流行率很高、疑诊患有某种疾病(或特异性感染)的群体,特异性靶基因(或病原体)的有无对诊断和治疗有重要意义。因此,要求在保证实验特异性的情况下,敏感性尽可能地高。

3.3 验证实验

对于过筛实验或诊断实验为阳性的情况,验证实验可作为其补充实验,用于确诊。特异性和阳性可信度是验证实验最重要的特性。

4 方法

4.1 引物序列的选择

引物的设计是在模板序列中挑选出两段寡核苷酸片段,使其能有效地扩增模板。模板序列的选择随着检测的不同而不同,但也有一些共同之处,如:1)模板序列应是特异的,即不存在和其他序列同源的序列(尤其是在引物部分),模板序列的选择应避免核苷酸重复片段区;2)模板序列在某些情况下需要的是种属内部的保守区、非保守区(尤其是引物部分)或属内特异区。

选择合适的引物是保证 PCR 扩增特异性和敏感性的关键。首先,对应用于临床诊断的 PCR,在设计引物时,其靶核酸的序列一定是已知的,这些基因序列信息可从基因数据库(如 GenBank)中获得。虽然引物的设计在一定程度上依靠经验,尤其是目前已有多种计算机软件可应用于核苷酸的序列分析和 PCR 引物的设计,但引物的适用性尚需通过实验性研究加以确定。PCR 引物设计一般遵循以下基本原则:

- a) 引物的长度一般为 15~30 个碱基;
- b) 两引物相距的距离以 100~300 核苷酸为最优,这样可获得较佳的扩增效果;

- c) 引物内碱基应尽可能随机分布,避免出现嘌呤或嘧啶堆集现象,引物中 G+C 含量宜在 40%~60%左右;
- d) 引物内部不应有二级结构,两个引物之间、尤其在 3' 端的序列不应互补;
- e) 引物 3' 端与模板一定要互补,末端碱基不要出现多个 A。

4.2 常规 PCR 实验方案

4.2.1 材料

模板 DNA ($10^2 \sim 10^5$ 拷贝)

上游引物

下游引物

Taq DNA 聚合酶和浓缩反应缓冲液

氯化镁 ($MgCl_2$)

无 DNA 酶 (DNase) 的水

无 DNase 矿物油

dNTP 混合物 (含 dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

4.2.2 扩增反应 (一般情况下,每 50 μL 反应体积所含组分如下):

成分	终浓度
无 DNase 的水	将反应体积补足至 50 μL
浓缩反应缓冲液	1 \times 工作浓度
dNTP 混合物	各 0.2 mmol/L
Taq DNA 聚合酶	0.5~1.0 U/50 μL
氯化镁 ($MgCl_2$)	1.5 mmol/L
上游引物	1 $\mu mol/L$
下游引物	1 $\mu mol/L$
模板	$10^2 \sim 10^5$ 拷贝/50 μL

每个反应管加 1~2 滴 (20 $\mu L \sim 40 \mu L$) 无 DNase 的矿物油,根据适合各个 PCR 反应的扩增参数,按变性、退火、延伸三步骤的热循环程序进行扩增反应。

4.3 PCR 扩增产物的分析

扩增产物的分析,根据研究对象和目的的不同可采用不同的分析方法。琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶电泳等可帮助判断扩增产物的大小,有助于扩增产物的鉴定;点杂交还有助于对扩增产物进行基因分型 (如 HLA-DQ 分型); Southern 杂交分析可从非特异扩增产物中鉴定出特异性产物的大小,因此,可增加检测的特异性和敏感性。其他一些方法,如微孔板杂交、PCR-酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等均有助于产物的精确分析。

4.3.1 凝胶电泳

这种方法是根据带负电的 DNA 可以在 pH 中性的缓冲液中向阳极迁移的原理而建立的。凝胶基质可以是琼脂糖或聚丙烯酰胺等,核酸的迁移率与琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶的浓度、电流、离子强度以及温度等因素有关。电泳后,通过溴化乙啶 (EB) 染色,在紫外下可以清晰地观察到 PCR 扩增产物条带,但扩增产物的特异性必须用探针杂交等方法加以鉴定。

4.3.2 点杂交法

点杂交法的基本过程是:首先将扩增产物固定到尼龙膜或硝酸纤维素膜上,再用核素或非核素标记的探针进行杂交,由于核素有较大的放射危害性,现在多用非核素进行探针标记,如生物素、荧光素、酶及化学发光剂等;也可在反应时直接掺入地高辛或生物素标记的单核苷酸,然后将扩增产物固定,再用抗地高辛抗体或亲和素进行反应来检测靶序列。

4.3.3 微孔板夹心杂交法

该方法是通过固定于微孔板的捕获探针与 PCR 产物的某一区域进行特异性杂交,使扩增产物间接地固定于微孔板上,然后,再用生物素等非核素标记的检测探针与扩增产物的另一区域杂交,漂洗、显色后即可判断结果。

4.3.4 PCR-ELISA

将引物的 5' 端用生物素或异硫氰酸荧光素 (FITC) 等修饰后并不影响其扩增特异性靶核酸的特性,因此,可以通过修饰其中一个引物的 5' 端使其携带便于 PCR 产物被捕获、固定的功能基团(如生物素),而通过另一引物 5' 端的修饰(如 FITC)使产物便于检测,这样避免了电泳和杂交等步骤,适于常规检测。

4.3.5 其他

如限制性内切酶长度多态性分析 (Restriction-fragment-length-polymorphism, RFLP)、核苷酸序列分析等。

5 样品的收集、运输、处理和存放

正确的样品收集、运送和保存是十分重要的。虽然 PCR 检测对上述环节的要求与传统的微生物培养和血清学检测基本相同,但在许多情况下仍有其特殊性,即无论在什么情况下都至少应保持靶核酸的完整性,样品中的干扰物应能被充分稀释,使其不致于干扰检测。

5.1 样品的收集

实验室对每项特定的 PCR 检测都应制定并为临床提供详细的样品收集规则。

5.1.1 样品收集的时间

在某一疾病的病程中,样品收集过早或过迟都会导致假阳性或假阴性结果,因此,要注意样品收集的时限性或时效性。

5.1.2 收集场所的准备

样品的收集场所应要求避免细菌污染并去除可能造成污染的物质,样品的收集需由经过专门培训的工作人员来完成。

5.1.3 样品的类型和数量

样品的类型、数量应是一定的,它们可能与常规微生物学、血清学实验的要求相同或不同,这是由疾病病原体的不同特性决定的。一般而言,如果所收集的样品可以进行培养,那么提取核酸进行扩增分析也是可行的。

5.1.4 样品的质量

样品的质量可根据以下一种或几种方法进行评估:肉眼观察、显微镜检查或化学分析,评估其细胞组成、细胞数目、核酸总量等。

5.1.5 样品的收集/运输装置

样品的收集需采用一次性材料,样品的收集材料(如拭子、试纸)或试剂(如防腐剂、抗凝剂或其他常规添加剂)必须不会干扰扩增或检测过程,抗凝剂一般采用乙二胺四乙酸盐 (EDTA) 或枸橼酸盐,肝素对扩增反应有一定的抑制作用而且在以后的靶核酸提取中不易除去,应尽量避免使用;对游离的核酸,需灭活核酸酶使其稳定。靶核酸(如 DNA) 应从收集装置中释放出来,另外,收集、运输过程中某些介质可能会稀释样品,因此,必须考虑稀释对测定结果的影响。

5.1.6 样品的核对

收到样品后,应对病人姓名、样品类型、收集时间等进行详细核对。

5.2 样品的运输

样品收集后应尽快送至实验室进行检测,运输过程中,特别是在需要保持细胞的完整性时,应注意避免样品的过冷或过热,并尽量减少细菌等污染物的生长,而且必须保证样品中的靶核酸免受内源性或外源性核酸酶的破坏与降解;游离核酸需经稳定化处理,靶核酸为 RNA 时要求更为严格(如对靶核酸

为 RNA 的样品可加入异硫氰酸胍盐灭活其中的核酸酶),不同的实验对运输方法都有其特殊要求,应明确加以规定。

5.3 样品的处理

样品中的许多杂质能抑制 Taq DNA 聚合酶的活性,从而干扰扩增反应,样品的处理可去除这些干扰杂质,增加 PCR 扩增的成功率和可重复性,有利于检测的标准化。纯化样品中的核酸(DNA 或 RNA),可使待测核酸暴露,有利于与引物的退火。

5.3.1 靶核酸的释放

待扩增的靶核酸可能来源于不同的临床样品,如血液、体液、尿液、粪便、游离的细胞或组织块等。靶核酸可有不同的存在形式和存在部位,如病原微生物的靶核酸可存在于宿主细胞内与宿主 DNA 整合在一起、游离于宿主细胞核中或以各种形式存在于宿主细胞质中。而且,临床样品中常含有蛋白、脂类等干扰物质,因此,在进行 PCR 扩增前,必须对样品进行预处理,实验中应根据靶核酸不同的存在状态,采取相应的处理方法。

5.3.2 靶核酸的分离

经典的核酸提取方法包括去垢剂裂解、蛋白酶处理、有机溶剂提取及醇类沉淀等步骤。利用玻璃粉、二氧化硅及硅藻等具有吸附核酸特性的固体颗粒建立的核酸提取方法可以简单、快速、高效地提取适合于 PCR 扩增的靶核酸,目前已有许多商品化的核酸分离试剂盒可供选择。

5.3.3 靶核酸的质量

用于扩增的靶核酸序列必须是完整的,将制备的样品与标准品通过凝胶电泳进行比较即可初步判断靶核酸的完整性和含量;也可通过测定 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度确定提取的靶核酸的浓度和纯度。

5.3.4 处理过程的复杂性

样品的处理应尽量简化,以减少样品的交叉污染或丢失靶核酸的机会。

5.3.5 样品的生物安全性

样品中可能含有对人体有害的生物因子,处理过程中应注意防止其危害操作人员;对临床样品的处理,可参照实验室对临床样品的常规处理方法进行。

5.4 样品的存放

临床用于 PCR 测定的 DNA 靶核酸样品应在一定的缓冲液(如 $1\times\text{TE}$)中 4C 保存;RNA 靶核酸样品应在一定缓冲液中 -80C 或液氮中存放。用乙醇或异丙醇等沉淀的靶核酸样品存放在 -20C 即可。

6 污染的预防和控制

由于 PCR 的扩增高效性和检测的高敏感性,极微量的污染即可导致假阳性结果,因此,必须特别注意避免样品 DNA 的污染所导致的假阳性结果。PCR 的污染途径主要有三个:

- a) 来自其他待测样品 DNA 的交叉污染;
- b) 来自其他实验材料如克隆质粒或菌体 DNA 的污染;
- c) 来自同一靶序列上次 PCR 扩增产物的污染。

其中由同一靶序列上次 PCR 扩增产物所引起的污染(遗留污染)最为常见,必须制定严格的实验室标准操作规程(standard operation procedure, SOP)以减少污染所致的假阳性结果。

6.1 划分不同的操作区

PCR 的前处理和后处理应在不同的隔离工作台(生物安全柜)或房间内,整个操作流程要在不同的隔离区进行:1) 试剂准备和储存区;2) 样品处理区;3) PCR 扩增区;4) 产物分析区。虽然上述操作是分开的,但是还要注意仪器设备和耗材的专用及操作人员、物流的单方向流动。如使用扩增反应和产物检测同时完成的荧光定量 PCR 方法或全自动 PCR 分析仪时,3)、4)两个区可以合并。

6.2 分装试剂

试剂的分装是预防、控制 PCR 污染的一项重要措施。PCR 所用的去离子水和缓冲液均应经过高压灭菌,由于引物和 dNTP 不能高压,一定要用高压过的去离子水进行配制。所有这些试剂均应在无待测样品和 PCR 扩增产物的试剂准备和储存区进行制备,分装贮存;同样,用于 PCR 检测的引物也应在以上环境中进行稀释、分装,每管标记批次。

6.3 改进实验操作

尽管上次 PCR 扩增产物的遗留污染是大多数假阳性反应的原因,但样品之间的交叉污染也是污染的原因之一。因此,不仅要在进行扩增反应时谨慎操作,在样品处理的所有环节(从样品收集到靶核酸提取)都应注意,下面几点应格外引起重视:

- a) 加样器最易受样品核酸或扩增产物气溶胶的污染,试剂准备、样品准备和扩增产物分析等各步骤中的加样器应严格分开使用;
- b) 戴一次性手套进行操作,在进出不同的隔离区时都要换手套;
- c) 避免反应液的飞溅,开盖时尤应注意,可于开盖前离心几秒钟使壁上和盖上的反应液集于管底,一旦飞溅,应立即更换手套;
- d) 用一次性移液器或吸头进行操作,吸头不要暴露于空气,以预防扩增产物气溶胶的污染;
- e) 在操作多份样品时,要制备反应混合液,先加可混合的组分(dNTP、缓冲液、引物和酶等),混合后再分装到不同的反应管,这样可以减少操作,避免污染,增加反应的重复性;
- f) 最后加入模板,加入后立即盖紧反应管;
- g) 用过的加样器吸头必须放入专门的消毒(如含次氯酸钠溶液)的容器内,实验桌椅表面每次工作后都应进行清洁,实验材料如出现外溅则必须作出记录。

6.4 设立阳性与阴性对照

选择阳性对照时,应选择特异性扩增条带较弱、重复性较好的样品;阴性对照应最后配制,这样可以反映扩增反应的基本状况。此外,每次扩增均应设立包括 PCR 体系各试剂的空白对照,空白对照中应含有除模板核酸外的所有组分。

6.5 环境污染

常见的污染源包括:加样器、离心机、真空瓶、电泳装置、紫外灯箱、水浴锅、冰箱门把手、门把手和实验台面(生物安全柜)、空气气溶胶等。各区的工作台面工作前可先用 0.5% 次氯酸钠、再用 70% 乙醇擦拭。

6.6 扩增产物的灭活及污染的处理

尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UNG)法:该法是在 PCR 反应中用脱氧尿嘧啶碱基(dU)置换脱氧胸腺嘧啶(dT),这样,扩增产物中含有几十或几百的 dU,这种产物与 UNG 一起孵育后,因 UNG 可裂解尿嘧啶碱基和戊糖磷酸骨架间的 N-糖苷键,可除去 dU,产生数十或数百的无 dU 碱基位点,无 dU 的位点阻止 Taq DNA 聚合酶的链延伸作用,使其失去再扩增的能力,而且,这样的位点是热不稳定的,在热循环中会发生断裂,防止再次扩增的发生,PCR 扩增产物越长,UNG 抗污染的效率就越高。UNG 对不含 dU 的模板无任何影响,对 RNA 中的尿嘧啶和单一尿嘧啶分子也无任何作用。

光化学灭活:灭活 PCR 扩增产物另一个可选择的方法是应用可溶性的补骨脂素衍生物,这些化合物具有热稳定性,对引物退火和 Taq DNA 聚合酶的活性无影响。扩增前,将补骨脂素衍生物加入到 PCR 反应混合液中,扩增后,在打开反应管盖之前,用长波紫外线照射,紫外线能穿透聚丙烯管,激活补骨脂素衍生物,补骨脂素衍生物随后形成环丁烷,与扩增产物 DNA 上的嘧啶作用,形成带有嘧啶碱基的环戊烷,阻止 Taq DNA 聚合酶对这一分子的进一步扩增,其效率取决于扩增产物的长度和核苷酸的碱基组成,一般而言,产物长度超过 300bp、碱基 G+C 含量大于 50% 时,本法几乎可灭活所有的扩增产物。和酶法灭活不同,该方法不仅可灭活扩增产物,而且可灭活原始的靶核酸。

7 质量控制

进行 PCR 检测的实验室应经过检查并符合国家行政部门的相关认证要求,由经过培训的合格上岗人员进行操作。有条件的实验室还应积极参加各级质控机构和组织的室间质评活动,这样,有利于对不同实验室之间的检测结果进行同比分析。

7.1 扩增反应的质量控制

7.1.1 样品准备的质量控制

设计一个样品处理方法最先应考虑的问题是:能够最有效地分离出靶核酸并避免导入抑制因子和污染物,避免靶核酸被核酸酶降解并除去干扰检测的物质,设立这部分的对照必须能够反映以下问题,即在样品中是否有靶核酸以及核酸的分离方式是否影响 PCR 反应。当验证一个实验系统的样品处理方法时,需要用含靶核酸的整个有机体、以接近预期的检测极限浓度添加至阴性样品基质中,这样,所设立的对照可提供有关靶有机体溶解及靶核酸提取回收是否成功的有关信息,如果靶核酸存在于细胞内(如淋巴细胞),就应以整个细胞作为验证样品加入阴性基质中作为对照。

7.1.2 设立外对照

每次实验至少应设有弱阳性对照和一份阴性对照,以确定扩增的有效性。

7.1.3 设立内对照

利用内对照可验证每个单份样品中是否含有核酸,例如人类的 HLA-DQA1、 β -微球蛋白基因和其他一些保守序列,这些基因存在于样品的有核细胞中,可将其与靶核酸扩增体系一起扩增。在设计扩增和检测基因突变时,可在突变区之外,同时扩增保守区序列作为对照。

7.1.4 设立平行组

两份病人样品,其中一份加入已知的核酸作为副本,加入量应临近可检测到的极限浓度,如果正本 PCR 结果为阴性,而副本为阳性,则可确定其阴性结果是真实的。

7.1.5 样品的稀释

对制备的样品进行几个稀释度的稀释,来检测抑制因子的存在,当样品稀释后,检测到的信号持续变强,说明有抑制因子存在。只要样品中存在有抑制因子,就应考虑进行样品稀释。但样品稀释后靶核酸也被同时稀释,因此,必须注意确保稀释过程中靶核酸仍保持在具有临床检测意义的范围之内。

7.2 抑制因子和干扰物的质控

在临床样品中有多种成分通过与 PCR 反应组分发生作用,从而抑制 PCR 扩增反应。已知血红素及其代谢物可抑制 DNA 聚合酶的活性,脑脊液、尿液中也含有成分尚未确定的 DNA 聚合酶的抑制因子,痰液中的酸性多糖、糖蛋白组分是聚合酶的抑制因子;临床样品中含有的核酸酶,会降解靶核酸。另外,许多分子生物学研究中常用的试剂,如乙二胺四乙酸、去污剂(如十二烷基硫酸钠)、破膜剂(如盐酸胍)等对 DNA 聚合酶的活性也有一定抑制作用,从而导致假阴性结果。

扩增反应的抑制因子可通过应用对照模板来进行检测,必要时,这种对照模板可在样品准备过程中加入(如内对照),因此也可作为靶核酸提取过程的对照(见 7.1.3)。设立内对照来监测是否存在抑制反应应根据实际需要而定,因为建立和应用这些内对照有相当的技术难度,并且可能会影响到整个实验。

7.2.1 同源内对照

同源内对照基因与扩增的目的靶基因有相似的序列,它们通过分子大小的差别或内部序列的不同相互区别。同源内对照可以与目的靶基因一起应用相同的引物进行扩增,对照模板先加入到反应混合液中,每个反应提供 10 到 1 000 个拷贝,用同源引物进行扩增。但必须注意保证同源内对照的存在不能降低扩增体系的敏感性,假如一起扩增的内对照模板量太多的话,往往会降低目的基因扩增的敏感性。含抑制物的样品,如不支持对内对照的扩增,那么很可能也不会支持对靶核酸序列的扩增,样品就应被视为不适于进行 PCR 扩增,或需要进一步处理以减少或清除抑制因子。通常简单地将样品稀释就会降低抑制因子的影响,此时要注意样品不能过度稀释,以致靶核酸被稀释到检测限度之下。

7.2.2 异源内对照

异源内对照不包含靶序列,需要用另一组独立的引物来扩增对照基因。异源内对照通常采用人类 HLA-DQA1 和人类 β -微球蛋白位点基因,任意靶核酸一般都可满足需要。对照组扩增产物的分子量应与目的靶基因大小相同或更大,以保证更小分子量的任何产物都能被成功扩增。

7.3 仪器的质量控制

所有的仪器设备都必须保持清洁并进行定期维护,所有的水浴装置、培养箱都应贴有适当温度范围的质量控制表,记录每天的温度。在实验室的质量保证(Quality Assurance,QA)手册中应有仪器校对的操作方法。

a) 加样枪:加样枪必须保证每年校正两次,校正方法可参考生产厂商推荐的方法或采取吸样称重法;

b) 水浴箱:实验前用温度计进行校准;

c) 离心机:离心机的速度每年应检查两次,离心机可能是污染的重要来源,应注意采取必要的预防措施;

d) 酶标仪:每年进行两次校准;

e) 热循环仪:目前各实验室使用的热循环仪有许多不同的种类和型号,可根据生产厂商推荐的方法进行校正,一年内至少对仪器校正两次;除仪器的自检功能外,应进一步进行循环参数的校正和功能性扩增实验,对不同部位的加热孔应保证其温度的均一性。

7.4 校正测试

校正测试是用来确保临床实验的可重复性和评价临床实验室的操作技能。每一个检测临床样品的实验室都需要作校正测试,并以此来确定实验室能够进行某一特定实验的能力。每年应至少进行两到三次校正测试,每次实验的间隔要相等,每个实验至少 5 个样品,所提供的样品必须覆盖整个反应范围,从强阳性反应到阴性反应,由实验室日常进行 PCR 检测的实验人员按实验室的常规要求进行操作。一般来说,校正实验所用样品与临床实验室常规检测样品的类型应相同或组成成份相似,即全血、血浆、血清、尿、脑脊液或组织样品等。校正测试样品可以从相关部门(如各级室间质评机构和组织)获得,如果没有标准的校正测试样品,已有的商品试剂盒中的对照样品是一个重要来源。

8 结果的判读、报告和解释

8.1 一般考虑

与其他检测方法相比,PCR 的检测下限很低,因此,应当明确如此低的检测限度的临床意义及结果的解释标准,应对该疾病已经做过的其他实验室检测结果与 PCR 检测结果之间的一致性和差异性进行比较,阐明 PCR 技术相对于其他实验方法的优越性和 PCR 技术的合理应用等。例如,临床样品中结核杆菌的直接 PCR 检测,仍需进行常规的涂片显微镜镜检和细菌培养来确定 PCR 检测的敏感性,并鉴定不同种群的重叠感染。

8.2 不能确定的结果

PCR 实验和其他临床实验一样,可能有不能确定的结果,这些结果将反映出样品的质量以及实验方法的影响。因此,对 PCR 扩增产物的检测应当有一个明确的结果判读方式,并对不能确定结果的样品有适当的解释和处理方法,例如,重复取样、重复实验或反向实验等。在任何诊断实验中,都会有很小百分率的健康人群的检验结果表现为阳性或异常,因此,重复实验是一个经常应用的重要策略。

8.3 结果的报告

虽然扩增实验有严格的自身控制,但如果没有经过细致的审查,错误结果还是会报告出来,审查人员应仔细检查每一个待报告的结果。实验步骤中必须包括结果的解释标准,包括对不可确定结果的解释标准,对已商品化的 PCR 诊断试剂盒,有关信息必须由生产厂商提供。临床实验室负责对本医疗机构内受试人群实验结果的及时报告和解释;临床医生在综合考虑其他可利用的临床信息后,负责对实验结果

的临床解释。临床和实验室的沟通对于实验结果合理、有效的应用是十分重要的。

8.4 对不合格样品的处理

如果实验室收到的样品不宜用于检测,必须马上通知样品呈送单位;对运送方法不当、送达时间过迟及数量不足的样品应拒绝接收。

8.5 结果回报时间

实验室应制定回报时间的规定,并对延误报告的原因进行分析。

附录 A
(标准的附录)
定量 PCR 技术

定量 PCR 技术是在常规 PCR 原理的基础上发展起来的新的核酸扩增技术,通过对靶核酸进行量化检测来反映靶核酸量的变化与临床疾病的关系,并可用于检测疾病的发生、发展,考察治疗药物的疗效等。

A1 定量 PCR 技术的方法学

定量 PCR 技术一般通过定量分析扩增产物的量的多少来判断待测样品中初始靶核酸模板的拷贝数,目前常用以下几种方法对扩增产物进行量化检测。

A1.1 竞争性聚合酶链反应量化检测核酸技术

基本原理:具有相同引物结合区的两种模板在同一管中扩增可得到几乎相同的扩增效果,初始含量多的模板,其扩增产物就多,两种 PCR 扩增产物量与二者初始核酸模板含量的比值有相关性;其中一种核酸为已知含量的内参照模板,而另一种核酸为待测样品,同时进行竞争性聚合酶链反应扩增,因为待测核酸与内参照扩增产物片段的大小或序列不同,因此可通过凝胶电泳或探针杂交等方法进行检测,从而得到两种核酸扩增产物的比值,而初始内参照的模板量是已知的,根据这些数据可以推算出待测核酸的初始含量。本方法将内参照模板与样品靶核酸模板放在同一个试管内同时进行扩增,保证两者在同等的反应条件下,避免了管与管之间的差异,是一种灵敏度较高、能比较客观反映样品初始状态时靶核酸模板含量的方法;但该方法由于存在内参照模板与样品模板长度的差异以及最小二级结构不完全相同等影响因素,因此二者的扩增效率不可能完全一致。

A1.2 自动化荧光检测法

扩增体系所采用的引物除具有退火、延伸功能外,还包含有两段额外基因,一段为信号基因(reporter),单独存在时可以发光;另一段为抑制基因(quencher),其存在时可抑制信号基因的功能,不产生发光现象。在进行核酸扩增反应时,由于 Taq 酶具有一定的 5' 端外切酶活性,可将引物上的信号基因切下、失去抑制基因的抑制作用而产生荧光,每当一次扩增中一条引物被退火、延伸后,整个体系就会增加一个单位的荧光。该扩增仅在每一次扩增循环结束后都要通过荧光光度计进行扫描,由此可得出每一次扩增循环结束后产物的量。

A1.3 固相杂交酶免疫法量化检测核酸扩增产物

使用酶免疫法(EIA)量化检测核酸的扩增产物,是目前应用较为普遍的核酸量化检测手段,如应用生物素标记引物,这样在 PCR 反应结束后,扩增产物带有生物素成分,随后通过包被于酶标微孔板上的链亲和素(包被蛋白)将 PCR 扩增产物捕获到固相载体上,解链变性后加入 FITC 标记的特异性探针杂交成 DNA 双链,再加入辣根酶标记的 FITC 抗体使底物显色,通过显色反应颜色的深浅来量化反映样品中核酸模板的情况。或将特异性探针包被于固相载体上(包被探针),通过杂交反应将标记有生物素的产物固定在酶标微孔板上,再加入辣根酶标记的链亲和素,利用显色反应显示待测样品中核酸模板的情况。这两种方法灵敏度较高、特异性好、可以避免因 PCR 非特异扩增引起的假阳性,结果准确可靠、成本不高,更有利于推广和普及。但由于 PCR 体系不同管之间不同的模板提取效率、逆转录效率、扩增效率等因素的影响,酶标结果并不能完全客观地表示模板含量,而且酶免疫显色反应的线性测定范围狭窄,也会影响真正的量化检测结果。

A1.4 液相杂交酶免疫法量化检测核酸扩增产物

这种方法同固相杂交酶免疫法量化检测核酸扩增产物的原理大致相同,只是将反应体系换为液相环境。在 PCR 扩增时通过掺入法使产物上挂有地高辛分子,再通过液相杂交与标记有生物素的探针结合后,被包被有链亲和素的酶标微孔板捕获,利用辣根酶标记的地高辛抗体使底物显色。据报道,核酸扩增产物

与特异性探针在液相中的杂交效率要高于在酶标微孔板上的结合,液相杂交的灵敏度通常是固相杂交的10~20倍,可以检测到pg水平。

A2 方法的优化

应用PCR扩增技术,大大提高了对靶核酸的检测灵敏度,但由于存在提取、扩增过程中的效率不同,而且扩增过程中产物的累积并非以单纯指数的形式增长,从而导致这类方法并不能很客观准确地反映待测模板的真实情况;而且在这类方法中还存在这样一个问题:为了提高灵敏度,人们普遍象常规PCR一样尽可能使用较多的循环数(30或35个循环),但循环数过多,随着dNTP、引物的消耗以及Taq酶的损耗,很可能使扩增反应进入“平台期效应”,因而产物不再以指数形式增长,这样也就无法通过产物的量化检测准确反映初始模板的含量。因此,应该对所选择的扩增条件进行优化,选择合适的扩增参数,只有这样,才能使检测结果更加准确可靠。

附录 B

(标准的附录)

对生产厂商的要求和建议

B1 对PCR试剂盒研究和生产厂商的要求

每一个商品化PCR试剂盒的操作说明书应包括以下几方面的内容:

- a) 说明书应明确指出实验的应用方向,明确实验的特异性和灵敏性,说明待检测群体的性质,明确阳性结果和阴性结果的预期值,包括疾病在受试人群中的流行情况等;
- b) 说明书应明确待测样品的性质,在不侵犯专利的情况下,应尽可能多地提供靶核酸的有关信息和该试剂盒的技术信息;
- c) 实验步骤应清楚、明了,以便实验时不再需要参考其他资料,实验过程中的关键步骤应重点强调、详细说明;
- d) 实验步骤中应清楚地标明实验前如何处理标本,包括:采集、运输、储存、温度的影响以及必要时用稀释液进行稀释的条件和方法等;
- e) 实验步骤中要确定某些已知或可能的物质或实验条件对实验方法的干扰,并提出避免或检测这些干扰物质和实验条件的方法;
- f) 实验步骤中应包括对实验结果的解释标准和说明,以及对结果尤其是不可确定结果的重复实验和补充实验的建议;
- g) 说明书应清楚地表明待测样品是否可一次性获得可靠结果,还是需要重复实验来保证实验结果的准确性和精确性;
- h) 说明书应提供该方法与标准实验或其他实验进行比较实验的结果,与标准方法进行比较评估时,应说明对不可确定结果的处理,包括不可确定结果的百分率;
- i) 当改变实验步骤时,应以适当的方式通知试剂盒的使用者,这些改变应在包装说明上清楚标明。

B2 对PCR试剂盒研究和生产厂商的建议

- a) 为了确保PCR在临床诊断中的正确应用,生产厂商应及时与试剂盒的使用人员进行技术交流,协助使用者解决操作中的技术问题,同时不断改进产品;
- b) 生产厂商应在试剂盒中尽可能多地应用各种新发展的技术,如核酸分子杂交、内对照、抗污染等,以提高PCR检测的灵敏度和特异性,同时,尽量避免假阴性和假阳性扩增反应。