

临床基因扩增检验在性病

实验诊断中的应用

广西壮族自治区人民医院
广西壮族自治区临床检验中心
广西医学检验质量控制中心
刘晓春

1

PCR技术简介

2

实时荧光定量PCR技术原理

3

实时荧光定量PCR结果分析

4

结果报告的要点分析

5

临床基因扩增检验在性病
实验诊断中的应用

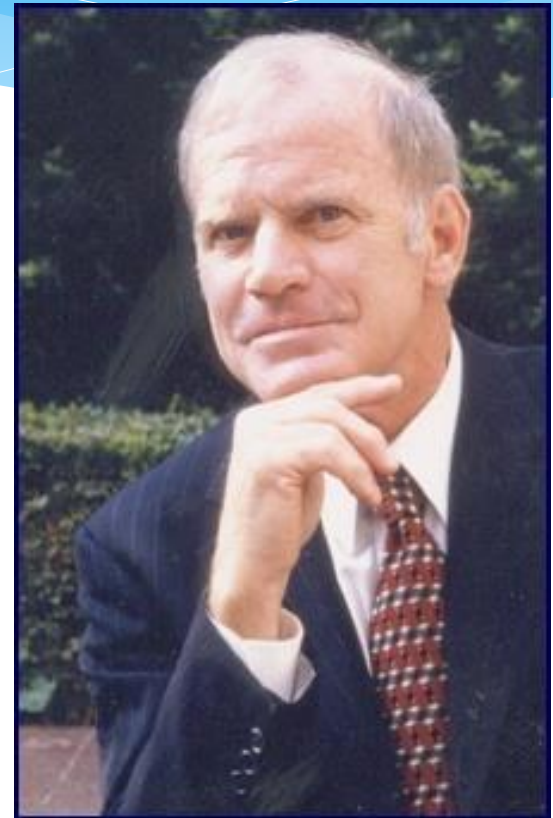
6

临床基因扩增检验管理

一、多聚酶链式反应

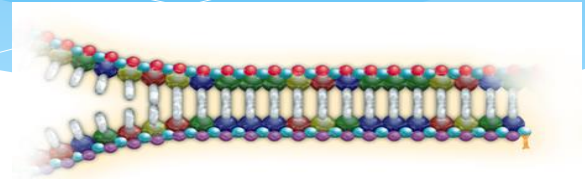
(PCR: Polymerase Chain Reaction)

- 1985年，Kary. B. Mullis教授发明了具有划时代意义的PCR技术。
- 1993年，Kary. B. Mullis因该技术的发明而获得诺贝尔化学奖。



PCR反应过程

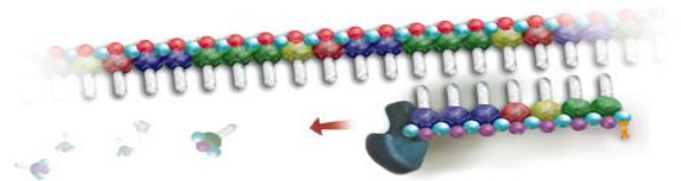
* 93 °C~98 °C变性：加热使双链DNA变为单链。



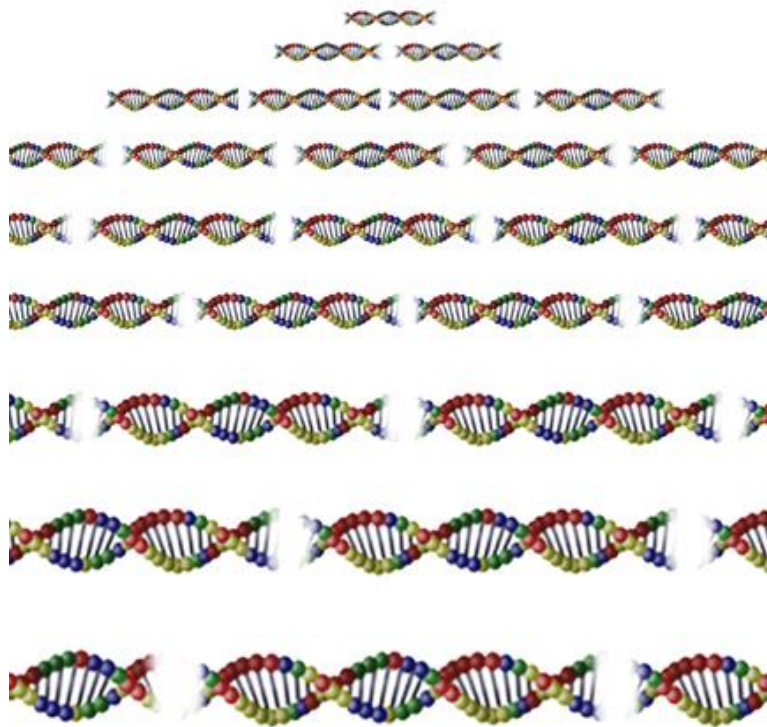
* 37 °C~65 °C退火：降温使引物和互补模板在局部形成杂交链。



* 70 °C~75 °C延伸：耐热DNA聚合酶按5'→3'方向催化以引物为起始点的延伸反应。



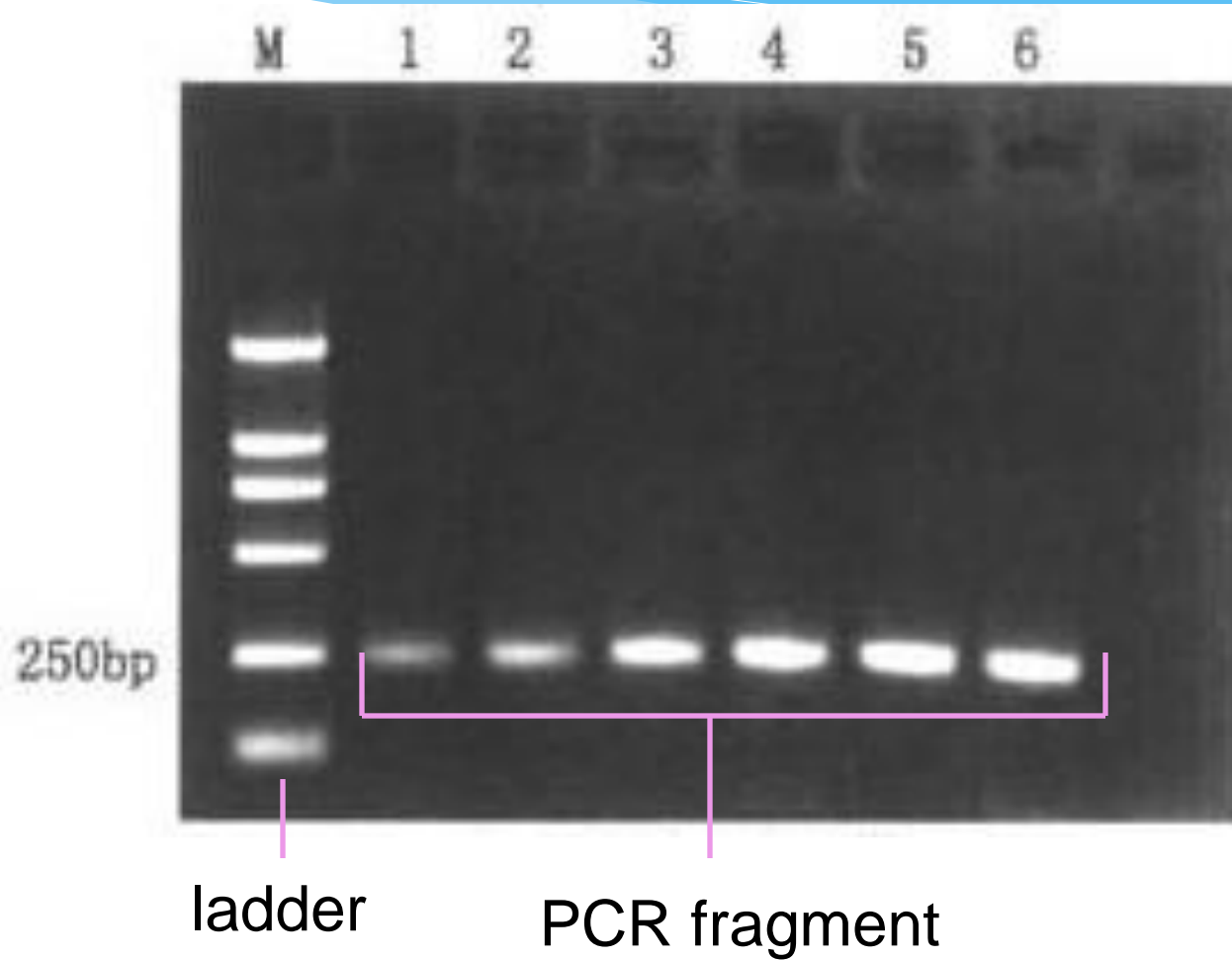
PCR技术原理



循环次数		DNA的链数
1	2^1	2
2	2^2	4
3	2^3	8
10	2^{10}	1024
20	2^{20}	1,048,576
30	2^{30}	1,073,741,824 10亿

PCR特点：高效扩增、忠实复制

PCR产物的电泳检测和分析



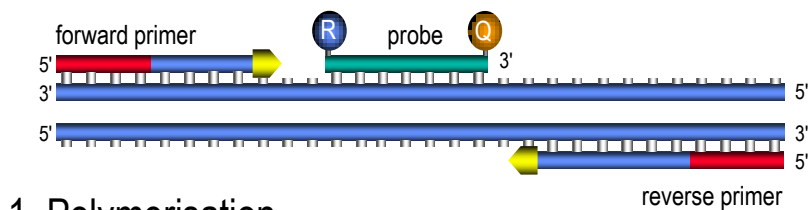
二、实时荧光定量PCR

(Real time Quantitative PCR)

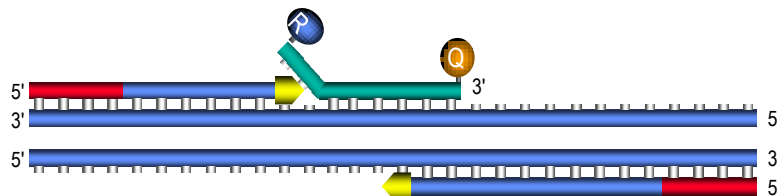
- * 定义：在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实时监测整个PCR进程，最后通过Ct值和标准曲线对未知模板起始浓度进行定量分析的方法。

TaqMan作用机理

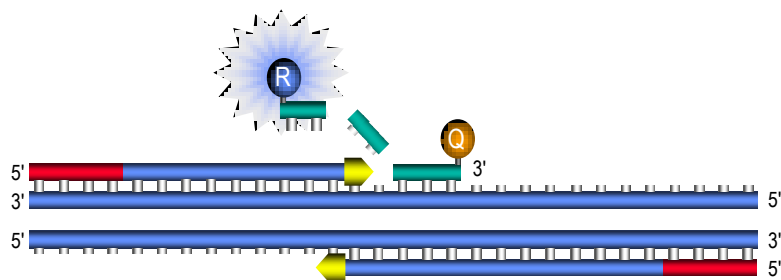
1. 每产生一条DNA链，就切断一条探针
2. 每切断一条探针，就产生一个单位信号
3. 信号强度与结合探针的DNA分子数成正比



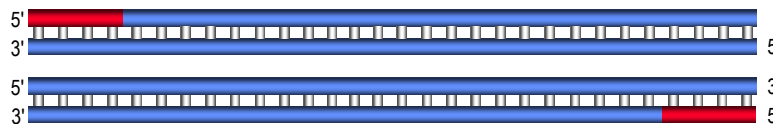
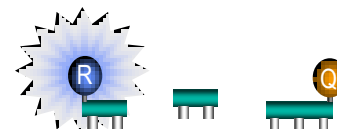
1. Polymerisation



2. Strand displacement



3. Cleavage



4. Polymerisation completed

与普通PCR的区别

普通PCR	实时荧光定量PCR
开管操作、需要后处理、易造成污染，假阳性率高。	闭管操作、无需后处理、避免了污染，防止假阳性。
PCR结束后，对终点产物进行分析，不能定量，重复性差。	实时监测PCR扩增，在指数扩增期对起始模板进行定量，重复性好。
人工分析结果，操作复杂，存在误差。	仪器自动分析，操作简单，增加了灵敏度和客观性。

实时荧光定量PCR应用

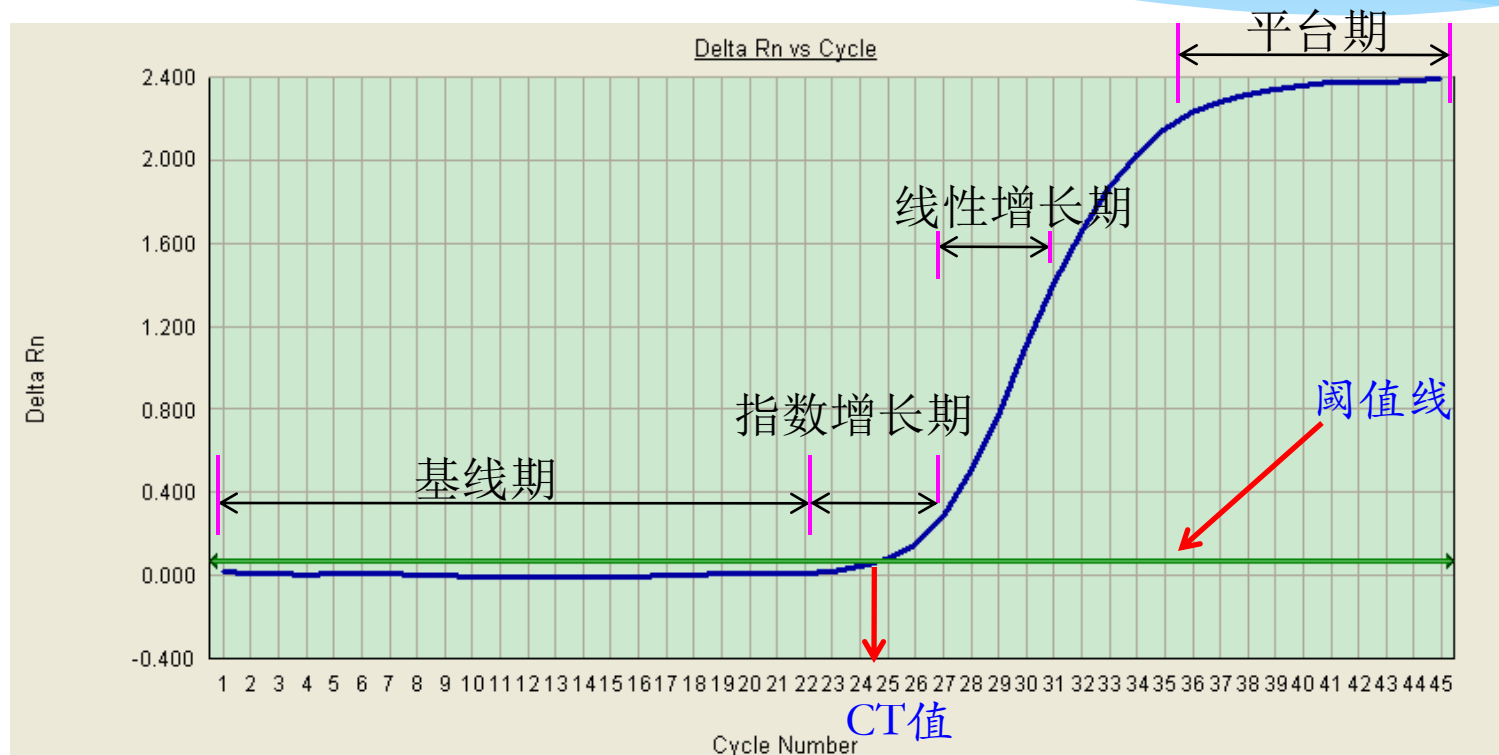
- 病原体检测
- 转基因食品检测
- 基因表达研究
- 基因表达差异分析
- 亲子鉴定、个体识别
- 基因分型

三、实时荧光定量PCR结果分析

➤ 扩增曲线的认识

➤ 结果分析时几个基本概念

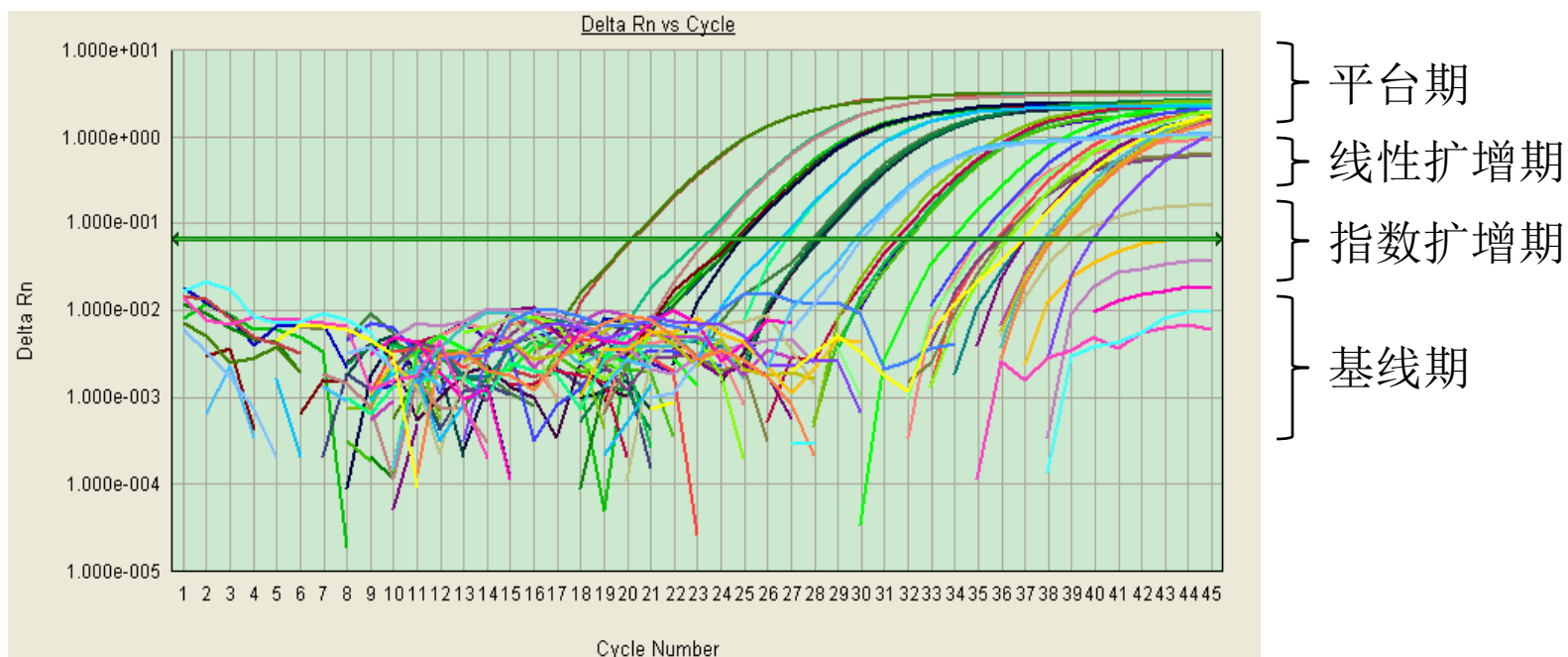
PCR扩增曲线线性图



扩增曲线线性图谱:

横坐标: 扩增循环数 (Cycle number); 纵坐标: 荧光强度 (Delta Rn)。

PCR扩增曲线对数图



扩增曲线对数图谱:

横坐标: 扩增循环数 (Cycle number); 纵坐标: 荧光强度 (Delta Rn)。

扩增曲线

S型曲线的四个特征性阶段

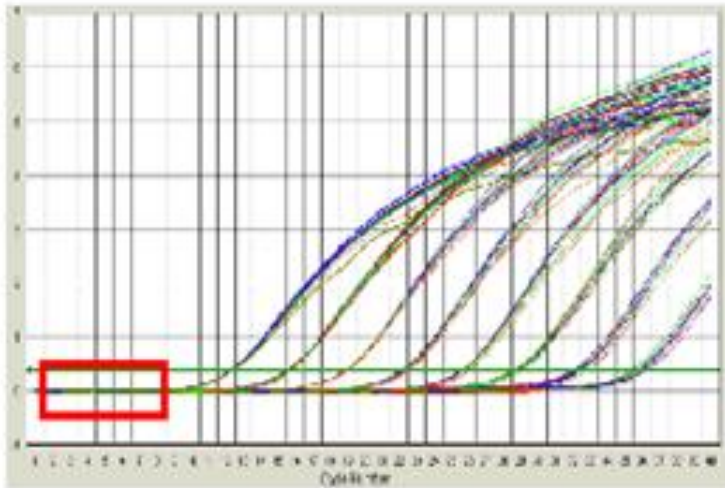
- **线性基线期：**指PCR反应处于起始阶段。此阶段，扩增产物很少，所产生的荧光信号很低，反应了系统背景情况。
- **指数增长期：**指PCR达到其最大的扩增阶段，理想条件下，每一循环后，PCR产物呈指数倍增加。
- **线性增长期：**指PCR达到稳定的线性扩增阶段，PCR产物呈几何倍数增加。
- **平台期：**由于原料消耗殆尽，扩增减缓，荧光信号不再随循环数增加而增加。

结果分析时的几个基本概念

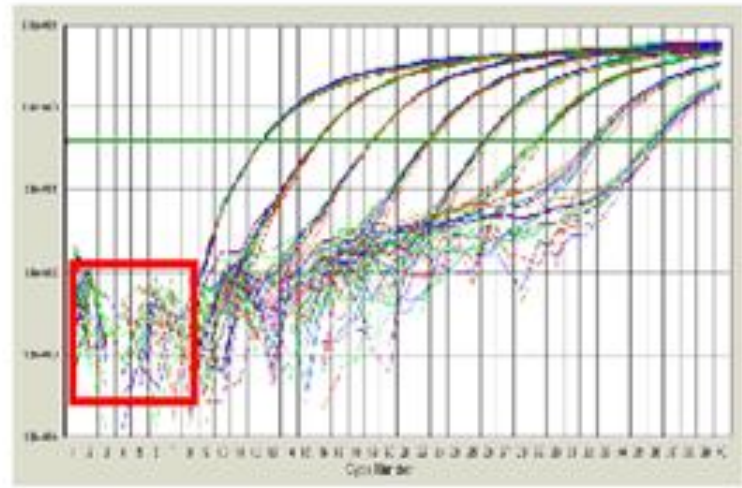
- 基线 (Baseline)
- 阈值线 (Threshold)
- Ct值 (Cycle threshold)

基线

* 基线 (Baseline)：扩增曲线中的水平部分。



线性图谱

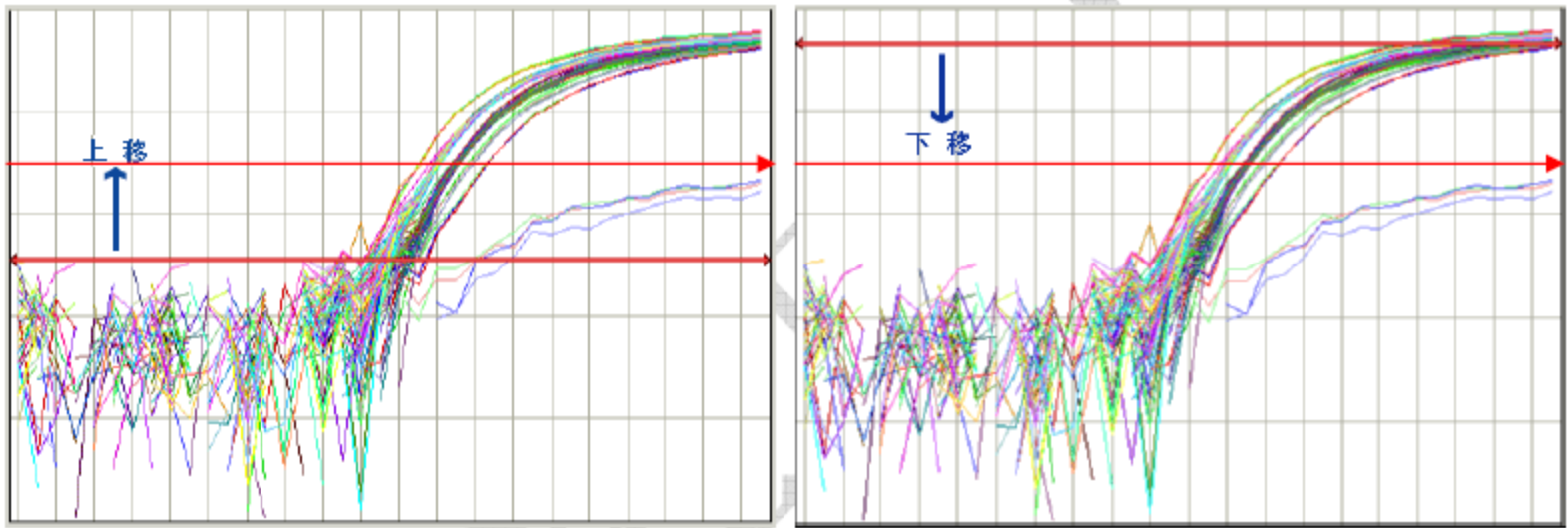


对数图谱

调整原则：如果Ct值 >18 ，不需调整，使用自动分析结果；
如果Ct值 <18 ，修改终点，再分析一次；
起点一般取3~6，终点一般取12~15。

阈值线

- * 阈值线 (Threshold)：荧光扩增曲线上人为设定的一个值，它可以设定在荧光信号指数扩增阶段任意位置上，但一般我们将荧光域值的缺省设置是 3-15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。



手动调节阈值线的原则：要大于样本的荧光背景值和阴性对照的荧光最高值，同时要尽量选择进入指数期的最初阶段，真正的信号是荧光信号超过域值。

Ct值

- * Ct (Cycle Threshold) 值：每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数被称为 Ct 值 (threshold value) 。
- * PCR扩增过程中，荧光信号开始由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环次数，是实时荧光定量PCR判断阴、阳性和进行定量分析的依据。

质量控制

- * 监测核酸提取、扩增及产物分析的有效性—弱阳性/阳性质控品
- * 监控核酸提取过程中是否发生污染、试剂是否存在污染—阴性质控品

失控的一般情况

阳性质控或样本失控的一般表现

- * 阳性质控或者样本没有典型的扩增；
- * 阳性质控Ct值或者定值偏差在 $\pm 2SD$ 之外
- * 阳性质控或者样本扩增曲线异常，不呈典型的“S”型，如直线倾斜扩增或者折线型；

失控的一般情况

阳性质控或样本失控的一般原因

- 核酸提取中的随机误差：如核酸提取过程中的丢失、有机溶剂的去除不彻底、标本中产生扩增抑制物的残留、所用耗材存在PCR抑制物等；
- 仪器问题：如扩增仪孔间温度的不均一性、孔内温度与所示温度的一致性等；
- 试剂问题：如Taq酶和（或）反转录酶的失活、探针的纯度及标记效率和核酸提取试剂的效率等；

失控的一般情况

阳性质控或样本失控的预防措施

- 纯化核酸：但不能完全避免来自标本核酸提取过程中所混入的去垢剂、有机溶剂的抑制作用；
- 重复性实验：对临床样本进行重复双份测定，避免由于操作的随机性导致结果的误差，同时也可以监测试剂的稳定性；
- 稀释标本：对于含有已知抑制物的标本如强溶血，则可对标本在扩增前进行稀释，再来测定；
- 使用“内质控”：即内标，可以避免由于试剂、扩增仪或标本处理不当所致的假阴性；

失控的一般情况

阴性质控或样本失控的一般原因

- 标本间的交叉污染：如在实验过程中，由于操作不当，或者样本采集不当造成的交叉污染；
- 产物污染：通常指扩增产物泄漏导致的气溶胶污染；
- 试剂污染：如在提取过程中或配制反应液时造成了试剂污染，从而使得检测结果出现污染；

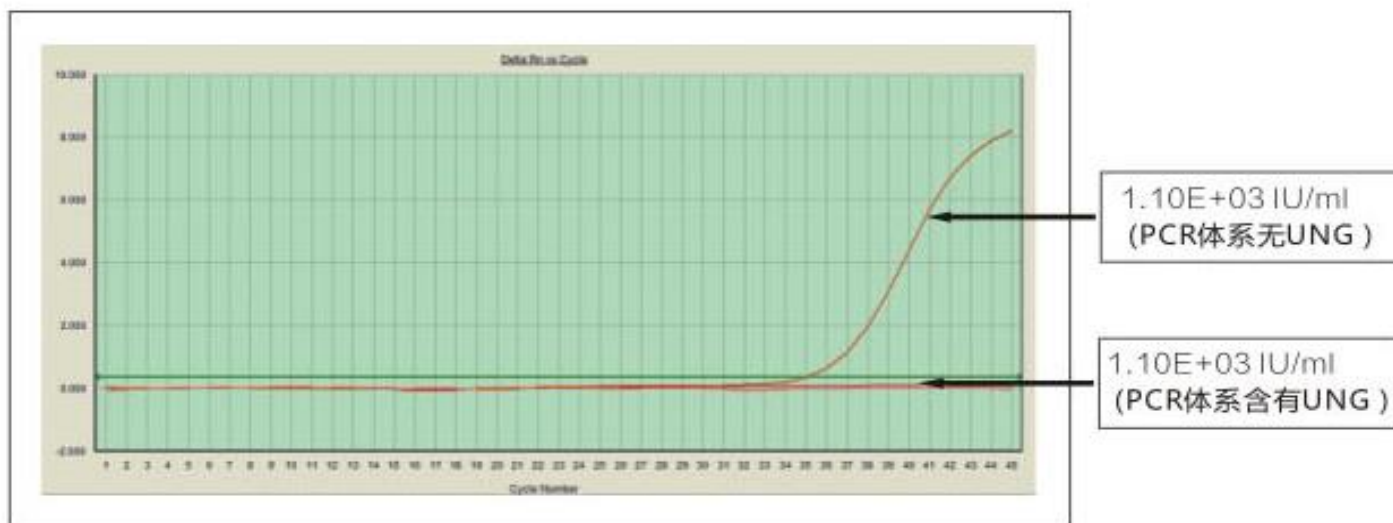
失控的一般情况

阴性质控或样本失控的预防措施

- 对实验室进行严格的分区
- 使用带“滤芯”的吸头
- 设立“阴性”质控（与标本同时处理）
- 使用防“污染”（含UNG）的PCR试剂

假阳性的控制—UNG酶+dUTP防污染体系

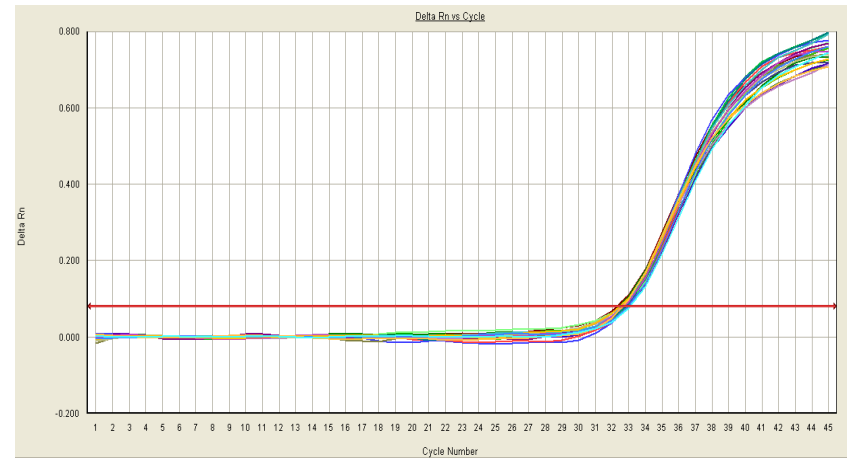
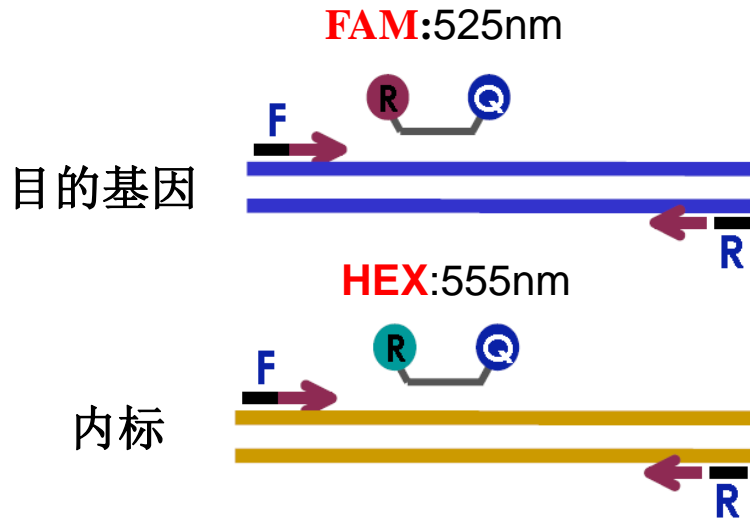
UNG酶的作用原理：在PCR产物或引物中用dU代替dT。dU化的PCR产物与UNG一起孵育，因UNG可裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架间的N-糖基键，可除去dU而阻止TaqDNA聚合酶的延伸，从而失去被再扩增的能力，其对不含dU的模板无任何影响。



○ 有/无UNG酶+dUTP体系对比实验结果

假阴性的控制—内标

内标：已知低含量的与模板扩增效率相似的一段DNA片段，将它加入PCR反应液中，与模板共同扩增，以反应每管真实得扩增情况如果内标和样品都未扩增出结果，则表示该管扩增无效，应重新做。



内标扩增曲线图

真阴性？！

四、结果报告的要点分析

- 报告的基本要求
- 报告结果：IU与拷贝的含义

报告的基本要求

- 检测结果的报告应准确、清晰和客观；
- 定性测定报告“阴性”或“阳性”，定量测定则以“拷贝数/ml”或“IU/ml”报告，避免二者之间的混淆；
- 每份报告应包括以下信息：标题、唯一标识、检测标本说明、标本特性和状态、标本接收日期和检测日期、检测方法、检测和审核人员签字及发出日期、参考结果或范围；
- 如对报告有效性有疑问，实验室应立即通知临床相关科室予以纠正；
- 病人要求用电话、传真或邮件报告结果时，注意保密性原则；

IU与拷贝

- IU (international units)：国际单位，其设立的主要目的是为测定提供一个通用的标准单位；WHO在经过统计学上的数据处理后，综合多中心多方法检测所得到的数据，主观的赋予候选标准物质一个数值，其表述单位为国际单位 (IU) ；
- 拷贝 (copies)：是各公司采用各自方法标准物质时，对检测结果的表述单位；
- IU与拷贝的关系：由于方法学的差异，不同方法检测同一标准物质的结果有所差别，甚至相差几倍，我们可直观的理解为，这其中的倍数关系就是不同方法间拷贝与IU的转换关系。

五、临床基因扩增检验在性病 实验诊断中的应用

常见性传播疾病病原体

淋球菌（NGH）

沙眼衣原体（CT）

解脲脲原体（UU）

梅毒螺旋体（TP）

单纯疱疹病毒（HSV）

乳头瘤病毒（HPV）

人类免疫缺陷病毒（HIV）

标本采集、存放及运输

样本采集、存放及运输

1. **采集：**采集生殖道拭子标本，要求病人在采样前 2 小时内不能排尿。
 - 1.1. 男性：先清洁尿道口，将棉拭子伸入男性尿道 1cm，旋转 3—5 次获得标本，将取样后的棉拭子放入 1.0ml 无菌生理盐水中漂洗片刻，在壁上挤干后丢弃。
 - 1.2. 女性：先用棉/麻拭子将宫颈口过多的分泌物擦去，用扩阴器扩阴，再换取样棉拭子伸入宫颈，通过上皮交界处，直到看不到拭子头，旋转 10—20 秒，取出拭子，别碰到阴道的鳞状上皮，以**保证取到更多的柱状上皮标本**，将取样后的棉拭子放入 1.0ml 无菌生理盐水中漂洗片刻，在壁上挤干后丢弃。
2. **存放：**

待测样本在 2-8℃ 保存不应超过 24 小时；-20℃ 保存不超过三个月；-70℃ 以下长期保存。应避免反复冻融。
3. **运输：**

采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

质量控制

- * 对于常规开展的项目应该定期进行室内质量控制。
- * 定量与定性

临床“假阳性”问题

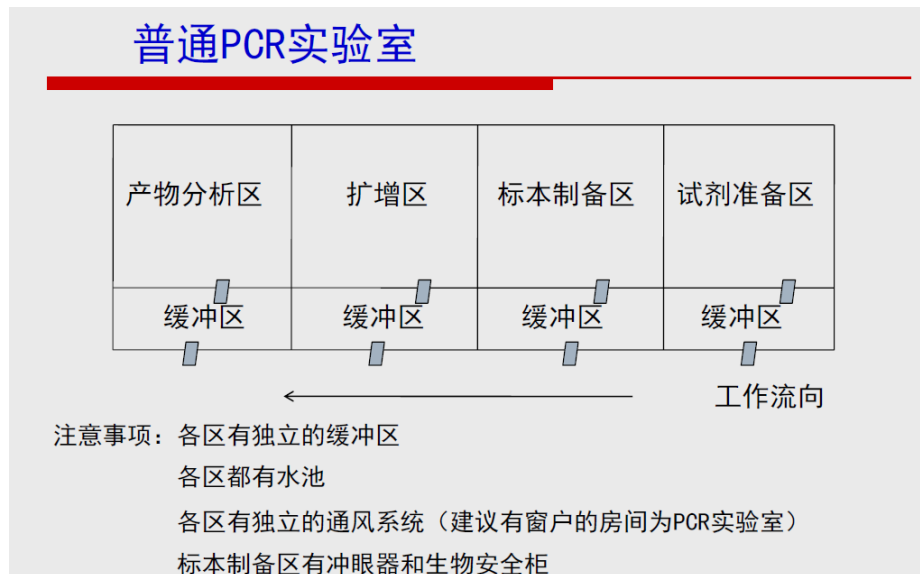
- * 病原微生物如淋球菌等经药物治疗后已死亡，但PCR仍可为阳性，故治疗结束后至少两周内不宜做PCR检测。

检验报告的问题

* 定性项目不能发定量报告 分泌物（拭子）样本

六、临床基因扩增检验管理

- * [医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法.doc](#)
- * [医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则.doc](#)



实验室人员管理

- * 临床基因扩增检验实验室人员应当经省级以上卫生行政部门指定机构技术培训合格后，方可从事临床基因扩增检验工作。

本证书持证于人于2016年8月20日至8月23日参加了广西壮族自治区临床检验中心组织的临床基因扩增技术人员上岗培训，经专业理论考试及实验操作考核合格。

证书编号：桂临检培2016075

姓名：

身份证号：

签发单位：

广西壮族自治区临床检验中心

签发日期：2016年8月25日

贴相片处

设备管理

* 校准：

* 温湿度计、移液器、离心机、恒温金属浴、PCR仪等需定期校准、保留校准报告并做好校准标识。

* 扩增仪校准参数至少包括：光路、背景荧光、温度精确度、温度均一性、升降温速率。


* 恒温金属浴的校准应覆盖常用的检测温度，应校准温度精确度、温度均一性。

* 移液器的校准应覆盖常用的测量量程，容量允许误差和测量重复性要求应符合国家标准JJG646-2006的要求。

* 需内部比对、校准的辅助设备，实验室应根据国家计量部门或生产厂商的规定制定内部校准操作规程和要求。

试剂耗材管理

- * 试剂和耗材有专人保管，应在有效期内使用，并按其规定的保存要求存放
- * 实验室应对关键耗材、不同批号试剂进行验收
- * • 外观检查：包装完整性、温度要求、有效期等
- * • 性能验证：不同批号试剂间的差异、重要耗材的抑制物（如使用不含抑制物免检，但应有注明）



谢谢