

基因扩增技术分析前质量控制的相关环节*

阴斌霞,罗超,刘少棠,李刚,王博,纪少云

(陕西佰美医学检验所/国家微检测系统工程技术研究中心,西安 710069)

摘要 基因扩增技术(polymerase chain reaction 简称 PCR)是近年来分子生物学水平的一种新的疾病检测手段,具有灵敏、特异、微量、简便、快速等优点,操作中影响因素颇多,质量控制难以掌控,尤其是分析前质量控制涉及环节较多,是目前实验室质量控制中最薄弱也是最需要重视的环节。控制好这些环节,对提高 PCR 检验的准确度、可信度,提高分子生物学诊治水平,提高检验人员的业务水平,减少医患纠纷以及对 PCR 实验室的技术准入、验收都是非常重要的,也是非常必要的。笔者从 PCR 检验申请单正确填写,患者的准备,标本的采集、处理、运送、储存、不合格标本的拒收,实验室技术人员的要求,仪器设备的校准、维护,试剂、耗材的质检,标准化操作程序(SOP)的编写和执行、实验室安全等分析前的相关环节对 PCR 检验质量的影响予以阐述,供同行参考。

关键词: 基因扩增技术,质量控制,相关环节

中图分类号:R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)03-074-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.021

Related Links of Quality Control before Polymerase Chain Reaction Analysis

YIN Bin-xia, LUO Chao, LIU Shao-tang, LI Gang, WANG Bo, JI Shao-yun

(Shaanxi Baimei Medicine

Laboratory/ National Micro Detection System Engineering Research Center, Xi'an 710069, China)

Abstract: Polymerase Chain Reaction (PCR) in recent years is a new disease detection methods based on molecular biology level. It has the advantage of sensitive, specific, trace, simple, fast, but in the operation due to multiple factors, quality control is not easy to control. Especially in the first stage of quality control, it engages a lot of operations and is the weakest stage such as needs most concern. It is necessary and important to have a good quality control; it not only improve the reliability and accuracy of PCR testing, treatment of molecular biology, the professional level of work staff, but also reduce patient disputes and increase technology access, acceptance of the PCR laboratory. In this paper, the author from the factors which influence the first stage of PCR: whether correctly fill PCR test application form, patient preparation, handling, transportation, storage of good sample, unqualified specimen rejection, the requirement of laboratory technicians, calibration and maintenance on the instruments; quality check on reagents, consumables quality inspection, standard operating procedures (SOP) writing, and laboratory safety. Hope this paper can do a good reference for other same profession.

Keywords: polymerase chain reaction; quality control; related links

基因扩增技术(polymerase chain reaction, PCR)是近年来分子生物学水平的一种新的疾病检测手段^[1],具有灵敏、特异、微量、简便、快速等优点,操作中影响因素颇多,质量控制难以掌控,尤其是分析前质量控制涉及环节较多,是目前实验室质量控制中最薄弱也是最需要重视的环节^[2]。笔者按照 ISO15189 医学实验室质量和能力要求,结合有关文献报道及本单位 PCR 实验室在准备验收过程中的具体做法,从 PCR 检验申请单正确填写,患者的准备,标本的采集、处理、运送、储存、不合格标本的拒收,实验室技术人

员的要求,仪器设备的校准、维护,试剂、耗材的质检,标准化操作程序(SOP)的编写和执行、实验室安全等分析前的相关环节对 PCR 检验质量的影响予以阐述,供同行参考。

1 检验申请单的正确填写 检验申请单是临床与实验室相互沟通的桥梁,完整的检验申请单应包括以下内容:①患者基本信息:包括姓名、性别、年龄、临床诊断、病程、病史,临床用药等情况。②申请的检验项目、标本类型、标本采集时间、送检时间。③医生的签名,联系方式。准确提供这些信息,使检验人员在结果回顾对比、结果审核时参考,也使

* 作者简介:阴斌霞(1958—),女,副主任技师,研究方向:检验医学准确性及质量控制研究, Tel:88303446, E-mail:IYYBX@126.com。

通讯作者:罗超。

于检验人员发现问题时及时与临床沟通。

2 患者的准备 由于标本溶血、脂血及药物等因素的存在,或成为PCR抑制物,或干扰PCR反应,导致荧光信号强度变化,对PCR检测结果产生影响,因此,患者检测前的准备很重要。①患者饮食的准备,对于需要抽血进行PCR检测的患者应叮嘱其清淡饮食,空腹采血,防止患者高脂肪饮食导致脂血对PCR检测的干扰作用。②对于采集阴道或宫颈分泌物的患者需要避开生理月经期,防止红细胞中血红蛋白对PCR反应的抑制。③药物的干扰,某些治疗药物影响病原体的检测,如工作中会碰到临床用干扰素治疗时,有些敏感的患者,停药后PCR结果会回升;静脉输入脂肪乳造成患者血液浑浊,也会影响PCR结果。因此,在进行这些药物治疗时,需要在检验申请单及报告单中注明,以供疾病诊治时参考。

3 标本的采集、处理、运送、储存 规范的标本采集、处理、运送、储存是保证PCR检验结果准确、及时的前提条件。

3.1 标本采集 用于PCR检验的标本大多有血清(血浆)、抗凝全血、骨髓、痰、尿液、胸腹腔积液、脑脊液、分泌物、组织等。①采集血液等标本时,应使用一次性密闭容器,如真空采血管,若采集抗凝的标本,应选择不含肝素的抗凝管。②使用非密闭采样系统采集骨髓、尿液、胸腹腔积液、脑脊液等标本时,必须用密封、清洁、干燥、无菌的容器装载标本,防止采集者的皮屑、毛发及一次性手套粉末污染标本。③采集痰标本,取清晨深部痰,防止唾液混入。④采集尿液标本以清晨浓缩尿为好。⑤取分泌物标本时,一定要取到上皮细胞。⑥若为组织标本最好选用新鲜组织,其次是冰冻组织,若为石蜡组织,需先脱蜡后提取核酸检测。

3.2 标本处理 ①采集的血标本应尽快分离血清或血浆,按检测项目做适当储存。②用于RNA扩增的标本,若不能及时送检,需加入稳定剂进行稳化处理。一般按1:4比例将标本加至含有5 mol/L的异硫氰酸胍(GITC)试管中^[3],使核酸酶失活。③做结核杆菌DNA检测的痰标本需用NaOH或变性剂液化进行初处理,去除痰标本中的黏蛋白和杂质,再进行核酸提取;用于非结核杆菌PCR检测的痰标本,则应在室温悬浮于生理盐水中,待大块黏状物下沉后,取上清离心,用离心后沉淀物进行核酸提取。④取分泌物的棉拭子需置于适量生理盐水中充分震荡,室温静置5~10 min待大块物沉淀后,取上清液离心,用离心后沉淀进行核酸提取。

3.3 标本运送 ①标本采集后应尽快送检,若不能及时送检应在2~8℃暂时保存,若需长途运送,则要求速冻(全血标本不能速冻)后放干冰中运送。若已做稳化处理,可在常温下运送。②运送标本时,应注意标本的安全性;选择不易破碎的容器装载标本,防止标本运送途中过度震荡,标本容器破损,标本外溢污染,标本唯一性标志丢失或不清晰以及标本水分蒸发等。

3.4 标本储存 标本储存对于核酸扩增的有效性极为重要,储存期间,禁止反复冻融。①用于DNA扩增的标本,4℃ 1~3天暂时保存,-20℃ 1~2周短期保存,-70℃较长期保存。用于RNA扩增(HCV-RNA)的标本,-20℃ 1~2周短期保存,-70℃较长期保存。②已纯化核酸样本:进行DNA检测可在10 mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA缓冲液(pH7.5~8.0)中4℃保存;进行RNA检测则在该缓冲液中-80℃或液氮下保存。③乙醇沉淀的核酸样本需在-20℃储存。④经GITC处理的RNA标本室温可储存7天。⑤初处理后的痰标本或棉拭子及其他体液标本如不及

时进行核酸检测,则需保存于-70℃^[4]。

4 不合格标本的拒收 检验标本是否合格是分析前质量控制的重要内容之一。PCR实验室对检测标本有严格的要求,不合格标本有相应的拒收程序,接收人员要仔细核对、严格审查。以下情况为不合格标本:①检验单与标本不符合,患者信息与检验单不吻合。②送检标本超出规定时间,未按要求低温保存、运送,标本量不足。③采集容器不符合要求或破损,标本外溢污染。④抗凝血有凝块或用肝素抗凝等。不合格标本均应拒收,并做拒收记录,详细记录拒收原因、处理方法、拒收责任人等,特殊情况如果接收了脂血、黄疸、溶血等异常标本,需要注明,利于结果解释。

5 仪器设备的校准、维护 PCR检验需要校准、维护的仪器设备主要有扩增仪、生物安全柜、恒温金属浴、高速离心机、移液器、温度计等。

5.1 仪器设备的校准 仪器设备的校准是实验室质量控制的基础,是实验室质量管理体系的重要组成部分^[5],是先于检验而进行的分析前质量控制的一部分,实验室应建立维护和校准仪器设备的标准操作程序(SOP),以消除仪器设备造成的误差。①PCR扩增仪、生物安全柜每年由仪器厂家对其进行校准,PCR扩增仪校准应包括光学系统、温度模块、荧光本底的校准^[6],校准后需进行验证。②恒温金属浴,每半年进行一次校准,主要是对恒温金属浴孔间温度的波动性、均匀性和准确性进行校准。③高速离心机由仪器厂家或计量部门每年进行一次校准。④移液器、温度计由计量部门每年进行一次校准,移液器也可按照中华人民共和国国家计量检定规程《移液器检定规程》(JJG 646-2006)标准进行自校,如果使用频繁,建议每半年校准一次。

5.2 仪器设备的维护保养 仪器设备的维护保养在延长仪器设备的使用寿命、降低运行成本、提高经济效益、减少医疗纠纷等方面有着重要意义^[7]。对仪器设备进行良好的维护保养,保证其最佳运行状态,才能做出准确的检验结果。①PCR扩增仪,目前大多数实验室应用的是实时荧光PCR仪,平时做好仪器的清洁工作,定期清洁维护热盖、反应槽、光路部分及仪器内壁,使其保持较好的工作性能。②生物安全柜,每次使用后,需对安全柜进行清洁、消毒,保持安全柜内、外清洁干净。经常检查送风及排风过滤器是否正常。定期(每半年1次)检查紫外灯、报警系统、空气洁净等级、风机风速、风量、高效过滤网是否在要求的技术参数范围。③恒温金属浴:定期清洗模块上的锥孔,以保证离心管与锥孔壁接触充分,导热良好,定期(每半年1次)观察模块温度,保证孔间温度的准确性、均匀性。④离心机应经常观察离心机的水平、离心速度、相对离心力等参数是否在标准范围。定期(每月)对其外壳、离心室、转子进行清洁维护,对离心室内的橡胶密封圈清洁后用甘油润滑,以延长转子寿命。若为冷冻离心机,离心完毕及时用干软布拭去离心室的冷凝水,防止结霜,影响温控效果。⑤移液器使用完毕,将移液器量程调至最大值,垂直悬挂于移液器架上,如有液体进入活塞室应及时清除。经常检查移液器鼻头部是否有污垢、堵塞,并及时清理,检查移液器活塞、O型圈、密封圈是否渗漏,及时更换,保证移液器清洁、移液准确。

所有仪器设备在使用、校准、维护保养、故障维修后要

做好相应记录,保证仪器设备的最佳工作状态。

6 试剂质检 试剂的质量直接影响PCR检测结果的准确性^[8]。试剂从厂家到实验室需要经历运输及运输中的储存,任一环节的不当都会影响实际的临床使用质量,因此,新的试剂必须通过质检,方可应用。

6.1 目视检查 ①外包装检查(厂名、厂址、检测项目、批准文号、批号、有效期等);②内包装检查(试剂瓶完整性、真空包装完整性、试剂品种完整性、是否有使用说明书等);③试剂运输中是否按要求放置于干冰上低温运输。

6.2 性能质检 一般在前批次试剂存量尚可维持常规实验一周时进行性能质检:①定性测定性能质检:采用血清(样品)盘(Panels)质检。PCR试剂血清盘由一定数量的原血清阴、阳性样本、2~3份纯化核酸(DNA或RNA或cDNA)样本以及3~5份系列稀释阳性样本组成。原血清样本用于判断试剂盒对特定病原体核酸检出的特异度、灵敏度和符合率,纯化核酸样本用于判断DNA扩增或逆转录及cDNA扩增的有效性,系列稀释阳性样本用于判断试剂的检测下限。②定量测定性能质检:用已知浓度的高、中、低三种浓度质控物,检测试剂的测定重复性、测定范围和抗干扰能力。

试剂质检合格后,填写质检记录,粘贴质检合格标签,按要求低温储存待用。

7 实验耗材质检 基因扩增检验中使用的实验耗材主要是离心管和带滤芯吸头。质量好坏同样影响到PCR检测结果的准确性,需要进行质检。

7.1 离心管质检 包括目测检查(检查离心管有无畸形、破损、不能闭盖等情况)和实验检测。实验检测需进行:①爆管检查;②高速离心时完整性检查;③PCR抑制物检查。

7.2 带滤芯吸头质检 包括目测检查(检查吸头有无畸形、破损、是否带有滤芯)和实验检测。实验检测需进行:①检查吸头有无吸孔堵塞、漏气现象;②检查滤芯密封性;③检查PCR抑制物。

质检合格填写质检记录并做标记,方可应用。

8 实验室技术人员的要求 PCR检验作为一种全新的实验室检测手段,目前在核酸提取、扩增反应液准备、扩增前加样、上机、产物分析和结果分析报告等方面仍以手工操作为主^[9]。手工操作繁杂,干扰因素颇多,操作因素直接影响PCR检验结果的可信度。因此,对实验室技术人员要求:①定点培训,定期考核,持证上岗。②从业人员应具备较高的素质,较强的专业知识。既要具有基本的分子生物学知识,还需具有相关的检验医学基础知识及质量控制相关知识。③有较强的责任心,较丰富的实践经验,能够解决PCR检验乃至数据分析、结果判断中的疑难问题,把好质量控制关,保证PCR检验结果的准确、可靠。

9 标准化操作程序(SOP)的编写和执行 SOP标准操作程序是基因扩增技术审核重点关注的内容之一,是确保实验室质量的基本条件,也是实验室检测工作的操作指南,其实施程度直接影响实验结果和最终报告的每个参数。实验室应根据自身的具体情况编写切合实际的、可操作性的SOP标准操作程序,并对实际操作中存在的问题及时修改、不断完善、持续改进。SOP一旦成文,工作人员严格执行、规范操作,不得随意更改。使实验过程有章可循、实验记录有据可查。

10 注重实验室安全 实验室安全是实验室工作的重中之重,是实验工作正常进行的基本保证,与质量管理息息相关,不容忽视。PCR实验室的安全包括实验室生物防护、实验室清洁消毒、实验室污染的处理、实验废弃物的处理及紧急情况应急预案等。实验室应防止生物危害及污染,确保实验室安全,为PCR技术提供良好、安全的实验平台,以保证PCR检验的质量。

综上所述,基因扩增技术分析前质量控制涉及的人员

有医生、患者、护士、标本运送人员及检验人员,是检验结果可靠、有效的重要内容,贯穿于分析前的各个环节中,严格控制好这些环节,对提高PCR检验的准确度、可信度,提高分子生物学诊治水平,提高检验人员的业务水平,减少医患纠纷以及对PCR实验室的技术准入、验收都是非常重要的,也是非常必要的。

参考文献:

- [1] 李 莲,田彩霞,廖冬梅,等. 临床实验室核酸扩增分析前的质量控制[J]. 西部医学,2011,23(4):786,790.
Li L, Tian CX, Liao DM, et al. The quality control before clinical laboratory analysis of nucleic acid amplification[J]. Medical Journal of West China, 2011, 23(4):786,790.
- [2] 林南清,王 勤. 如何加强检验科分析前质量管理[J]. 检验医学与临床,2011,8(9):1144-1145.
Lin NQ, Wang Q. How to strengthen the laboratory analysis before quality management[J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2011, 8(9):1144-1145.
- [3] 于宗霞. 基因扩增实验室分析前质量控制要素及实施[J]. 医学动物防制,2013,29(4):405-407.
Yu ZX. Gene amplification before the laboratory analysis of implementation and factors of quality control[J]. J Medical Pest Control, 2013, 29(4):405-407.
- [4] 李金明. 实时荧光PCR技术[M]. 北京:人民军医出版社,2014:65-70.
Li JM. Real-time fluorescence PCR technology[M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2014:65-70.
- [5] 王志伟. 临床实验室仪器设备的校准与校准验证[J]. 中国医疗设备,2012,27(6):66-68.
Wang ZW. Instrument calibration and system verification of clinical laboratory[J]. China Medical Devices, 2012, 27(6):66-68.
- [6] 曾艳芬,陈发林. 临床基因扩增检验实验室技术审核中存在的问题分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(19):2711-2712.
Zeng YF, Chen FL. Clinical gene amplification testing laboratory technical audit the problems existing in the analysis[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2014, 35(19):2711-2712.
- [7] 陈 翼. 浅谈医疗仪器设备的维护与保养[J]. 科技资讯,2014,12(10):130.
Chen Y. Talking about the care and maintenance of medical equipment[J]. Science & Technology Information, 2014, 12(10):130.
- [8] 刘 贺. 荧光RT-PCR准确性的影响因素及控制策略[J]. 中国动物检疫,2013,30(11):26-28.
Liu H. Factors affecting the accuracy of fluorescent RT-PCR and control strategies[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2013, 30(11):26-28.
- [9] 李金明. 我国临床分子诊断试剂发展:问题及思考[J]. 检验医学,2014,29(3):199-201.
Li JM. Problems and thinking of reagents for clinical molecular diagnosis in China[J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(3):199-201.

收稿日期:2015-01-23

修回日期:2015-04-03