

鼻咽癌病人外周血 EBV DNA 最低检出限与不同核酸抽提试剂关系的分析

周予婧¹, 许雍峰², 冯斯斯², 唐发清³

1. 长郡中学, 湖南 长沙 410001;

2. 中南大学湘雅医院检验科分子生物室; 3. 暨南大学附属珠海医院检验科

摘要: **目的** 探讨两种核酸提取方法与鼻咽癌患者外周血 EBV DNA 最低检出限的关系。 **方法** 收集 40 例 EB 病毒感染鼻咽癌患者全血, 分别采用核酸释放剂法与柱提法抽提 DNA, 检测 EBV DNA 载量, 比较两种核酸提取方法检测的检出率, 并确认其对应最低检出限。 **结果** 40 例携带 EBV 鼻咽癌患者全血, 使用核酸释放剂法检测 EBV DNA 其检出率为 90.0% 明显高于柱提法的检出率 62.6%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.352, P = 0.008$)。按国家行业标准验证的核酸释放剂法检测最低检出限为 400 copies/ml; 采用柱提法最低检出限为 900 copies/ml。 **结论** 选用核酸抽提试剂检测鼻咽癌病人外周血 EBV DNA 时, 所选择试剂应该满足或优于 EBV DNA 试剂盒最低检测限的性能要求。选用合适的核酸抽提试剂与 EBV DNA 检测试剂能够客观的反映鼻咽癌患者体内 EB 病毒的变化, 为临床的诊断及治疗提供准确可靠的数据。

关键词: 鼻咽癌; EBV DNA; 核酸抽提; 最低检出限; 检出率

中图分类号: R739.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2016)12-1409-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.12.001

Relationship between the minimum detection limit of peripheral blood EBV-DNA and different nucleic acid extraction kits in NPC patients

ZHOU Yu-jing*, XU Yong-hao, FENG Si-si, TANG Fa-qing

* Changjun High School, Changsha, Hunan 410001, China

Corresponding author: TANG Fa-qing, hnxyzh66@163.com

Abstract: **Objective** To explore the relationship of two different nucleic acid extraction methods with the minimum detection limit of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** The nucleic acid release agent method and spin columns method were used to measure EBV-DNA load in 40 peripheral blood specimens from NPC patients, their detection rates were compared, and their minimum detection limits were identified. **Results** Among the 40 whole blood samples detected, the EBV-DNA-positive detection rate of the nucleic acid release agent method was significantly higher than that of the spin columns method, with a statistically significant difference (90.0% vs. 62.6%, $\chi^2 = 8.352, P = 0.008$). The national professional standard verified that the minimum detection limits of EBV-DNA load by the nucleic acid release agent method and spin columns method were 400 copies/ml and 900 copies/ml respectively. **Conclusions** Quantification of EBV in peripheral blood of NPC patients should use the nucleic acid extraction kit by which the requirement of the minimum detection limit can be reached or surpassed. The appropriate reagent can objectively reflect the change of EBV in the blood, and provide exact and reliable data for clinical diagnosis and treatment of EBV-associated NPC.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; EBV-DNA; Nucleic acid extraction; Minimum detection limit; Detection rate

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方地区常见的恶性肿瘤。鼻咽癌与 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 关系密切, 有文献报道在几乎所有的未分化型鼻咽癌病人都能监测到 EB 病毒的存在^[1]。鼻咽癌的早期诊断、早期治疗可以大幅度提高其生存率。目前, 在早期诊断、监测疗效、预后判断等方面常用 EBV DNA 等 EB 病毒相关的指标来评价^[2]。

放疗是鼻咽癌治疗的主要手段, 临床也常用 EBV DNA 作为放疗以后疗效的监测指标, 故 EBV DNA 的检出率对鼻咽癌的临床诊断、治疗均具有重要的临床意义^[3]。但目前检测 EBV DNA 的不同厂家所用的核酸提取方法不同, 所用标本量也不同, 其检出率也不一致。本研究采用两种核酸提取方法抽提 DNA, 结合荧光定量 PCR 分析两者 EBV DNA 检出率, 同时按国家相关标准对两种核酸提取方法的 EBV DNA 最低检出限进行确认, 分析不同核酸提取方法对鼻咽癌病人外周血 EBV DNA 最低检出限的影响。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81372282)

指导老师: 许雍峰, 冯斯斯。

通讯作者: 唐发清, E-mail: hnxyzh66@163.com。

1 对象与方法

1.1 对象 根据病史、临床表现、实验室 EBV 检测结果等收集 2015 年 10 月-2016 年 3 月中南大学湘雅医院肿瘤科收治的 40 例 EBV 感染鼻咽癌患者放疗前抽取的血液样本,诊断参照美国 CDC EBV 感染诊断标准及相关文献^[4]。其中男 34 例,女 6 例,年龄 33~70 岁。此研究获医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 所有患者均抽取静脉血 4 ml,ED-TA 抗凝,用于全血 EBV DNA 载量检测。

1.2.2 试剂与仪器 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);MX3005P Real Time PCR(美国安捷伦公司);不同量程的移液器(法国 Gilson 公司);EB 病毒核酸定量检测试剂盒(湖南省圣湘生物科技有限公司,国食药监械(准)字 2013 第 3400973 号);核酸释放剂法提取 DNA 试剂盒;柱提法提取 DNA 试剂盒。

1.2.3 DNA 提取 全血标本充分混匀后,分别按相应试剂盒说明书使用核酸释放剂法与柱提法提取 DNA,分别获取 400 μl 和 200 μl 的模板。-80 ℃冰箱保存备用,按下列扩增条件检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 反应体系 反应液 38 μl,混合酶(包括 Taq 酶和 UNG 酶)2 μl,内标 1 μl,模板 DNA10 μl。实时荧光定量 PCR 循环条件:50 ℃,2 min,1 循环;94 ℃,5 min,1 循环;94 ℃,15 s;57 ℃,30 s,45 循环,重复检测 3 次取均值。

1.2.5 不同样本量最低检出限确认 选取 EBV DNA 浓度为 5.02×10^6 copies/ml 的全血标本,进行系列稀释,分别稀释终浓度为 1.0×10^4 copies/ml; 1.0×10^3 copies/ml; 9.0×10^2 copies/ml; 8.0×10^2 copies/ml; 7.0×10^2 copies/ml; 6.0×10^2 copies/ml; 5.0×10^2 copies/ml; 4.0×10^2 copies/ml; 3.0×10^2 copies/ml,覆盖理论可能的出现的最低检出限和厂家声明的最低检出限。根据中华人民共和国医药行业标准(YY/T 1182-2010)《核酸扩增检测用试剂(盒)》6.8.2 的要求^[5],检测生产企业声称浓度值或最低检出限待确认的样本 25 次,至少 22/25 以上的检出即表明在本实验室条件下可以确认试剂的最低检出限。

1.3 统计学分析 应用 SPSS19.0 软件对实验结果进行统计分析。计量资料呈正态分布,以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用配对 *t* 检验。组间计数资料比较采用 χ^2 检验或精确概率检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种核酸提取方法检测一致性分析 分别采用

核酸释放剂法与柱提法提取 DNA,检测 EBV DNA 含量并进行相关分析,二者的相关系数为 0.951,*P*=0.000。见图 1。

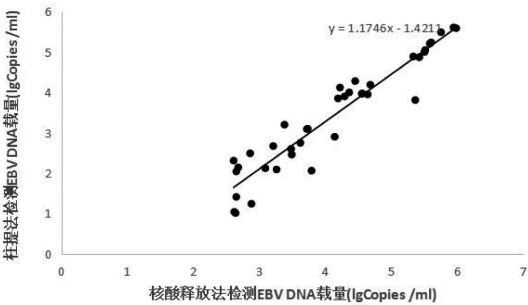


图 1 两种核酸提取方法检测结果相关性比较

2.2 临床应用评价 按 EBV DNA 检测试剂盒临界值 400 copies/ml 进行两种核酸提取方法检测的一致性分析,≥400 copies/ml 的标本为阳性,<400 copies/ml 的标本为阴性。

在 40 份全血样本中,以核酸释放剂法提取 DNA,检测 EBV DNA 阳性率为 90%,以柱提法提取 DNA,阳性率为 62.5%,两组全血 EBV DNA 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=8.352$,*P*=0.008)。见表 1。

使用两种核酸提取方法提取 DNA,均检出 EBV DNA 为阳性的 25 例鼻咽癌患者全血中,使用核酸释放剂法提取 DNA 检测出其 EBV DNA 载量为 (4.71 ± 0.84) lg copies/ml 明显高于柱提法 (4.19 ± 0.91) lg copies/ml,EBV DNA 载量差异有统计学意义(*t*=8.170,*P*=0.000)。

表 1 两种核酸提取方法检测 EBV DNA 阳性率比较

核酸释放剂法	柱提法		合计
	阳性	阴性	
阳性	25	11	36
阴性	0	4	4
合计	25	15	40

2.3 两种核酸提取方法检测最低检出限比较 以 EBV DNA 浓度为 5.02×10^6 copies/ml 全血稀释后进行试验的结果见表 2。根据中华人民共和国医药行业标准(YY/T 1182-2010)《核酸扩增检测用试剂(盒)》6.8.2 的要求,可以确认采用核酸释放剂法检测 EBV DNA 最低检出限为 400 copies/ml;采用柱提法最低检出限为 900 copies/ml。

表 2 两种核酸提取方法最低检出限的测定

梯度浓度	检出率	
	核酸释放剂法	柱提法
1.0×10^4 copies/ml	25/25	25/25
1.0×10^3 copies/ml	25/25	25/25
9.0×10^2 copies/ml	25/25	23/25
7.0×10^2 copies/ml	25/25	19/25
6.0×10^2 copies/ml	25/25	-
5.0×10^2 copies/ml	25/25	-

续表 2

梯度浓度	检出率	
	核酸释放剂法	柱提法
4. 0×10 ² copies/ml	24/25	-
3. 0×10 ² copies/ml	20/25	-
2. 0×10 ² copies/ml	-	-

3 讨 论

鼻咽癌与 EB 病毒感染密切相关,EBV DNA 量的变化对鼻咽癌的早期诊断和放疗后疗效的评估有重要的临床意义。目前,运用荧光定量 PCR 技术检测 EBV DNA 采用的标本类型一般有血清、血浆、单个核细胞、全血标本,不同的标本类型检出率不同。据文献报道血清和血浆的敏感性最差,全血标本敏感性最好,单个核细胞不方便定量,一般认为全血样本更适合 EBV DNA 的检测^[6]。外周血浆游离的 DNA 的检测是当前大家关注的热点,目前报道血清、血浆样本 EBV DNA 敏感性差应该与其采用的检测方法有关^[7],引用合适的外周血浆游离的 DNA 专用提取试剂以及数字 PCR 技术应该能够客观的反映鼻咽癌患者血浆游离的 EBV DNA 的变化,是值得关注和有待进一步探讨的。

同样的标本采用不同的核酸提取试剂,因各厂家采用的样本量及方法原理不同,其 EBV DNA 检出率也不相同^[8]。在使用没有配套核酸抽提试剂或选用全自动核酸提取仪的 EBV DNA 检测试剂时,应该考虑其适用性。本研究采用的试剂是没有配套核酸提取的试剂。病毒核酸检测是临床诊断和治疗的重要工具,核酸的提取是核酸检测的关键步骤,直接影响到检测结果的检出率和可靠性。随着自动化核酸提取仪器逐步进入临床实验室,很多的实验室放弃了试剂盒传统的核酸提取方法。但在选用核酸提取试剂或方法时,应该考虑 EBV DNA 检测试剂盒本身的最低检出限等性能指标,选用的核酸抽提试剂要满足或优于检测试剂盒的性能要求^[9]。本研究分别采用两种不同的核酸抽提试剂,用同样的 EBV DNA 检测试剂检测 40 例鼻咽癌 EB 病毒携带者。核酸释放剂法提取 DNA,检测 EBV DNA 阳性率为 90%,以柱提法提取 DNA,阳性率为 62. 6%,两组全血 EBV DNA 阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 8. 352, P = 0. 008$),可见不同的核酸提取试剂其阳性检出率有差异。引起差异的因素很多,样本量是影响因素之一。PCR 总反应体积一般是限定的,通常不超过 50 μ l,其中经过核酸提取后样本的加入量一般不超过 10 μ l。因此不同的样本量对标本的最低检出限有差异。但样本量过大会引起外源非相关 DNA 增多,可能影响测定的敏感性^[10]。因此,本研究按国家行业标准进一步对两种核酸提取试剂的

最低检出限进行检测。

最低检出限反映一个检测技术的敏感程度的一个方面。检测不到的时候并不意味着没有或是为零,而是被测样品中,目标物的含量低于这个最低检出限^[11]。本研究按国家行业标准分别对核酸释放剂法和柱提法的 EBV DNA 最低检出限进行了验证和检测,核酸释放剂法的最低检出限为 400 copies/ml,柱提法的最低检出限为 900 copies/ml。其中核酸释放剂法的最低检出限与 EBV DNA 试剂盒的最低检出限基本一致,能够满足 EBV DNA 试剂盒的最低检测限性能要求。所以,本研究选用该法作为实验室鼻咽癌患者 EBV DNA 检测的核酸提取试剂。

综上所述,在选用核酸提取试剂的时候要考虑该试剂是否能够满足或优于 EBV DNA 检测试剂的相关性能参数,特别是试剂的最低检出限,其结果直接影响鼻咽癌病人 EBV DNA 的检出率。因此,在选用核酸提取试剂或自动化核酸提取仪时应该做相应试剂的性能验证。选用合适的核酸提取试剂以及相应的 EBV DNA 检测试剂可以客观的检测鼻咽癌患者外周血 EBV DNA 的变化,满足临床的诊断和治疗的要求。

参考文献

[1] Hu L, Lin Z, Wu Y, et al. Comprehensive profiling of EBV gene expression in nasopharyngeal carcinoma through paired-end transcriptome sequencing[J]. Front Med, 2016, 10(1): 61-75.

[2] Zhao FP, Liu X, Zhong ZM, et al. Positivity of both plasma Epstein-Barr virus DNA and serum Epstein-Barr virus capsid specific immunoglobulin A is a better prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma[J]. BBA Clin, 2014, 2: 88-93.

[3] Zhao FP, Liu X, Chen XM, et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncol Lett, 2015, 10(5): 2888-2894.

[4] Klutts JS, Ford BA, Perez NR, et al. Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(10): 3204-3210.

[5] 国家食品药品监督管理局, 中华人民共和国医药行业标准. YY/T1182-2010 核酸扩增检测用试剂(盒)[S]. 2012: 4.

[6] 刘涤瑕, 王丽, 董凤珍, 等. 荧光定量 PCR 检测鼻咽癌患者全血和血浆标本 EB 病毒 DNA 的比较研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 93-95.

[7] 曹素梅, 闵华庆, 高劲松, 等. 血浆 EB 病毒游离 DNA 检测对监测鼻咽癌患者预后的意义[J]. 癌症, 2003, 22(2): 302-306.

[8] Germi R, Lupo J, Semenova T, et al. Comparison of commercial extraction systems and PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA load in whole blood[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1384-1389.

[9] Laus SI, Kingsley LA, Green M, et al. Comparison of QIA-symphony automated and QIAamp manual DNA extraction systems for measuring Epstein-Barr virus DNA load in whole blood using real-time PCR[J]. J Mol Diagn, 2011, 13(6): 695-700.

[10] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 64-65.

[11] Tholen DW. EP17-A protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Statistical Approved Guideline [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.