DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.057

3.2 锯条的选择与调试

为了保持锯面平整,层片厚薄均匀,笔者选用锯齿小、锯路窄、锯口锋利的薄锯条,从而减少锯路损耗,降低局部结构的失真度。切锯前仔细调整锯条的张力,如张力过高,易致锯条毁损;张力过低,锯条摆动度较大,易致切面不平或层内厚薄不均。作者以废弃肢体冰冻后试锯,一方面检验锯口的利钝,一方面调试锯条的张力,取得满意效果后再正式切锯。已切锯的10余具尸体未因此出现明显的锯面不平、倾斜或层间厚薄不均等情况。

3.3 切锯

切锯是断层标本制作的中心环节,是决定标本质量高低的关键,因而要求尸体摆放必须与锯条垂直,切锯中的推进力相对均恒。为此,我们经过实验探索,将带锯机的载物台改装滑轨,既减轻了操作者的体能消耗、缓解疲劳,又消除了载物台与尸体间因磨擦力所产生的不确定因素,从而能以较恒定的推进力进行切锯,确保尸体与锯条垂直。值得注意的是在室温较高的情况下切锯时要密切注视尸体解冻软化的情况,一旦软化,立刻复冻,切勿勉强切锯。切锯中根据切锯部位不同要适时微调锯条张力,如切锯头颅、骨盆等骨组织较多部位,要适当调高张力,保证切锯质量。

3.4 固定

切锯好的断层标本,因冻冰的融解,一些细小结构如肠袢等极易移位,甚至脱离遗失,导致断面结构失真,降低标本质量,严重者甚至完全失去原有结构特征。因此,在较高室温条件下切锯时,将切下的断层用塑料袋包装后立刻复冻,达到临时固定目的,待切锯完毕后,有计划地逐层解冻,解冻到一定程度(以能顺利进针为宜)进行原位缝合固定,缝合点不宜过多、过紧,以免组织器官移位、变形,导致失真。我们认为以流动自来水清洗解冻为佳,这样在解冻过程中同时清除锯末、胃肠内污物等,达到事半功倍的效果。

关键词:断层解剖;标本;制作技术

中图法分类号:R322-34 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 刘树伟.断面解剖学[M].北京:人民卫生出版社,1989.1-5.

[2] 李忠华,王兴海 主编.解剖学技术[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1997.92-96.

[3] 秦登友,王震寰,赵 莉.人体断层解剖标本制作法[J].解剖科学进展,1997,3(2):189-190.

(编辑 郭建秀)

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)08-0992-02

荧光定量PCR与普通PCR检测HBV DNA的对照分析

Contrast analysis of HBV DNA detection between FQ-PCR and common PCR

黄燕萍,王宇明 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:**目的** 比较普通PCR(Common PCR)和实时荧光定量PCR(Real time fluorescence quantitative PCR,FQ-PCR)检测人血清HBV DNA结果之间的相互关系,为临床提供最有效的诊断方法。**方法** 对117份血清标本用两种方法同时进行检测,分析其相关性,比较其差异。**结果** 荧光定量PCR不仅能几乎100%检测出普通PCR阳性的标本,还能在其阴性的76份标本中检测出36份阳性,其拷贝数均在较低水平。在不同的血清标志物模式下,定量方法的阳性率均明显高于定性方法。**结论** 荧光定量PCR具有一定优势,尤其适合于使用抗病毒药物的病人的疗效观察和病情预测。

目前,慢性乙型肝炎病人最常用的抗病毒治疗药物是重组干扰素(rIFN)和拉米夫定(Lamivudine 3TC)。观察这些药物疗效最有效和最必要的指标是病人体内的HBV DNA含量。临床通常采用普通PCR技术检测体内HBV DNA,优点是快速,灵敏,缺点是只能定性不能定量,且易引起PCR产物的交叉污染。近年来实时荧光定量PCR技术开始被采用,它具有很高的敏感性,准确性和重复性[1]。二种方法关系如何,是否荧光定量PCR已成为普通PCR的换代技术[2],现就此作初步的探讨。

作者简介:黄燕萍(1972-),女,四川省简阳市人,医师,主要从事分子生物学方面的研究。电话:(023)68754289

收稿日期:2001-01-14;**修回日期**:2001-04-11

1 材料和方法

1.1 材料

标本来源于本院肝炎专科门诊病人,共117份;普通PCR仪(美国PE公司),Light Cycler荧光定量PCR仪(罗氏公司);HBV-M ELISA试剂盒购自山东潍坊3V公司,HBV DNA定性试剂盒购自河南华美公司,HBV DNA荧光定量试剂盒购自上海复星公司。

1.2 方法

HBV-M按试剂盒说明操作。HBV DNA普通PCR按试剂盒说明操作。荧光定量PCR按以下条件扩增:50 ℃ 2 min灭活尿嘧啶糖基化酶(Uracil-glycosylase,UNG酶)[3],94 ℃ 2 min预变性,然后双温(93 ℃ 2 s,60 ℃ 20 s)循环40次。最后软件分析计算定量结果。单位采用 Copy/ml。 0 Copy/ml为阴性,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

> 0 Copy/ml 为阳性。

1.3 统计学处理

采用 t 检验，χ^2 检验和 Spearman 秩和相关分析。

2 结果

普通 PCR 法与荧光定量 PCR 法同时检测 117 份肝炎门诊标本，普通 PCR 检测的阳性率为 35.04%，FQ-PCR 检测的阳性率为 63.25%。若以 FQ-PCR 为金标准，则普通 PCR 假阳性为 1 份，假阴性为 34 份。二者差异显著（$\chi^2 = 31.97$、$P < 0.01$），见表 1。

表 1　普通 PCR 法与荧光定量 PCR 法检测结果比较

PCR 定量	PCR 定性		合计
	−	+	
−	42	1	43
+	34	40	74
合计	76	41	117

$\chi^2 = 31.97$、$P < 0.01$

关于两种 PCR 检测与血清标志物的关系、见表 2。

表 2　两种 PCR 检测与血清标志物的关系

血清标志物	PCR 定性			PCR 定量		
	−	+	阳性率(%)	−	+	阳性率(%)
HBsAg(+)/HBeAg(+)/HBcAb(+)	17	18	51.4	2	33	94.3*
HBsAg(+)/HBeAb(+)/HBcAb(+)	22	6	21.4	14	14	50.0
HBsAg(+)/HBcAb(+)	7	5	41.6	3	9	75.0
HBsAb(+)/HBcAb(+)	3			3		
HBeAb(+)/HBcAb(+)	2			2		
全阴性	5					

*：该阳性率不代表临床检测实际阳性率。其中有人为挑选的 17 份标本。

在普通 PCR 与定量 PCR 中均为阳性的 40 份标本，如果将其普通 PCR 检测中琼脂糖凝胶电泳的肉眼粗略估计结果分为 +、++、+++ 3 个等级，与定量检测结果的相互关系见表 3。

表 3　普通 PCR 与定量 PCR 的相关性

	PCR 定性			
	−	+	++	+++
PCR 定量(Copy/ml)	$10^{3.24\pm1.18}$	$10^{4.19\pm1.76}$*	$10^{6.50\pm1.60}$*#	$10^{6.44\pm1.82}$*#

*：$P < 0.05$ 与(−)比较；#：$P < 0.05$ 与(+)比较

3 讨论

普通 PCR 与荧光定量 PCR 相比较，后者的灵敏度明显高于前者。两种方法均阳性的 40 例（平均拷贝数 $10^{5.58\pm1.96}$ Copy/ml）样本与仅定量阳性的 34 例（平均拷贝数 $10^{3.24\pm1.18}$ Copy/ml）样本相比较病毒水平差异有显著性（$P < 0.05$）。

从表 2 可知，无论何种乙型肝炎血清学模式，定量 PCR 对 HBV DNA 的检出明显高于普通 PCR。由于每种模式的例数较少，不能轻率得出不同病程与病毒拷贝数的准确关系。大致可以看出，“大三阳”的 18 份（去掉 17 份特意挑选的）标本的拷贝数为 $10^{5.94\pm1.43}$；“小三阳”的 28 例标本拷贝数为 $10^{3.36\pm1.69}$；只有 HBsAg 和 HBcAb 阳性组的 12 份标本的拷贝数为 $10^{3.67\pm2.12}$。经 t 检验“大三阳”模式的病毒水平明显高于后两种模式。而后两种模式间没有差异。此外，值得一提的是，在“大三阳”模式的 35 例样本中，有 17 例定性检测为阴性。近年来这种模式有增多的趋势，故从保存的这类血清标本中随机抽取 17 份进行定量 PCR 检测，结果表明 15/17（88.2%）为阳性，但病毒含量均在较低水平（拷贝数 $10^{3.73\pm1.03}$ Copy/ml），确在普通 PCR 检测的范围之外[4]。但有个问题，该比例并非 100%，由于这些标本多来自使用抗病毒药物一段时间后的病人，故提示除去病毒变异外，无论普通 PCR 还是荧光定量 PCR，可能其实验过程还直接受到药物的干扰。该问题我们正在继续探讨。

在最后一个实验结果中，经统计学分析，+ 组的定量结果与 ++ 组和 +++ 组差异均有显著性（$P < 0.05$），而 ++ 组与 +++ 组的定量结果之间差异无显著性。这一结果在一定程度上解释了为何临床检测中常常出现某病人的普通 PCR 结果短时间内会在阴性和弱阳性之间波动，甚至同份标本的重复性也达不到 100%。原因就在于其血清中的病毒含量处于较低水平，恰是定性检测的低限——10^5[4]。当普通 PCR 的各种条件达到最佳时才能得到弱阳性结果。再经 Spearman 秩和相关分析，$r_s = 0.8$，$P > 0.05$，结论是不能认为肉眼估计的阳性强度与定量结果之间存在相关关系。即通过定性 PCR 的阳性结果强度来粗略定量是不可靠的。

我们比较了普通 PCR 和荧光定量 PCR 间的种种，总的来说，荧光定量 PCR 能显著提高人血清中 HBV DNA 的检出率，能对抗病毒药物使用者的疗效做出准确、及时的判断并预测病情发展。这是普通 PCR 无法做到的。同时需考虑到荧光定量 PCR 的花费甚高，所以我们认为，不是所有病人必须采用定量方法检测，即普通 PCR 不必完全被荧光定量 PCR 替代。如果保证有严格的实验室管理，训练有素的操作人员，有效的室内质控方法以及室间质评系统[5]，普通 PCR 也能给临床提供有用的资料。但是，只要条件允许，荧光定量 PCR 为临床带来的将是更有价值的实验结果。

关键词：HBV DNA；普通 PCR；荧光定量 PCR
中图法分类号：R373.21；R446.9　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Abe A, Inoue K, Tanaka T, *et al*. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(9): 2 899 – 2 903.
[2] 傅君芬．感染性疾病的分子生物学诊断进展[J]．国外医学：流行病学传染病学分册，1999，26(6)：248 – 251.
[3] Holland P M, Abramson R D, Watson R, *et al*. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′to 3′exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(16): 7 276 – 7 280.
[4] 李金明，邓　巍，王露楠．PCR 测定乙型肝炎病毒 DNA 弱阳性质控血清的适用性研究[J]．临床检验杂志，2000，18(1)：6 – 7.
[5] 李金明．聚合酶链反应的质量控制[J]．国外医学：临床生物化学与检验学分册，1996，17(6)：241 – 244.

（编辑　汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net