



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109517876 A

(43)申请公布日 2019.03.26

(21)申请号 201811267085.4

(22)申请日 2018.10.29

(71)申请人 吉林金域医学检验所有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新开发区光
谷大街1977号办公楼二、三、四层

(72)发明人 朱爱丽 周婷婷 许友强 李雨艳
刘明珠 张馨月

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 刘微

(51)Int.Cl.

C12Q 1/24(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法

(57)摘要

本发明公开了一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法,属于体外检测技术领域,解决了含血样本在检测时会受到血细胞的影响,抑制HPVDNA的提取,导致结果假阴性的技术问题。本发明按照含红细胞的多少对宫颈脱落细胞样本进行分类,并加入脱落细胞保存液进行预处理,在保持宫颈脱落细胞形态和核酸完整的前提下,使红细胞充分悬浮及分散,洗去样本中的红细胞,样本的Globin的信号值大于150,保证实验成功率,避免假阴性结果的产生,提高了检测结果的准确性。

1. 一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 采集宫颈脱落细胞,将宫颈脱落细胞样本进行分类:

红细胞数量小于 0.01×10^{12} 个/每升的样本为A类样本;

红细胞数量在 $(0.01 \sim 0.1) \times 10^{12}$ 个/每升的样本为B类样本;

红细胞数量在 $(0.1 \sim 3) \times 10^{12}$ 个/每升的样本为C类样本;

红细胞数量大于 3×10^{12} 个/每升的样本为D类样本;

(2) 样本分类后,按照红细胞的多少加入脱落细胞保存液进行预处理,处理方法:

A类样本直接用于实验;

B类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述B类样本与所述脱落细胞保存液的体积比为550~650:350~450;

C类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述C类样本与所述脱落细胞保存液的体积比为350~450:550~650;

D类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述D类样本与所述脱落细胞保存液的体积比为150~250:750~850。

2. 根据权利要求1所述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,红细胞的计数方法为:待测样本震荡混匀后用等渗稀释液稀释,滴入血细胞计数板,在显微镜下计数红细胞数量,换算得到样本中含有的红细胞数量。

3. 根据权利要求1所述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,其特征在于,所述的脱落细胞保存液为含异丙醇的醋酸盐缓冲液,pH值为5~6。

4. 根据权利要求3所述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,其特征在于,所述的脱落细胞保存液为上海透景生命科技有限公司生产的脱落细胞保存液。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,其特征在于,将预处理后的样本按如下步骤进行检测:

S1、取含有宫颈脱落细胞样本的EP管,13200rpm高速离心5~10min,吸弃上清;

S2、加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴15~20min;

S3、13200rpm高速离心10~15min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1.5h;

S4、吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min;

S5、加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育15~20min,采用流式分析仪进行检测。

6. 根据权利要求5所述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,其特征在于,步骤S2所述的脱落细胞核酸释放剂为上海透景生命科技有限公司生产的脱落细胞核酸释放剂。

一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,尤其涉及一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法。

背景技术

[0002] 宫颈癌位于我国女性恶性肿瘤发病和死亡率的第二位,每年有465000的新发癌患者。研究发现在90%左右宫颈癌患者中可检测到HPV,HPV是人乳头瘤病毒(human papilloma virus),是导致宫颈癌的病原体,HPV分为27种亚型(6、11、16、18、26、31、33、35、39、40、42、43、44、45、51、52、53、55、56、58、59、61、66、68、81、82、83),其中,HPV-16和HPV-18是高危型,易致阴道下段侵入性肿瘤,因此,开展HPV分型检测能很好的预防宫颈癌。

[0003] 现有技术中,普遍采用流式荧光杂交技术检测27种HPV亚型,如果有任何HPV亚型探针的信号大于150,即可判断该探针对应的亚型阳性,否则为阴性。然而,当宫颈脱落细胞样本状态含有血时,这种含血样本在检测时会受到血细胞的影响,抑制HPV DNA的提取,导致结果假阴性,轻则实验失败,患者需重新采样,造成人员和试剂成本的浪费,增加患者采样的痛苦,重则造成结果的误判,延误患者最佳治疗时机。

发明内容

[0004] 本发明针对上述技术问题,提供一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法,减少红细胞对HPV分型检测结果的影响,提高实验的成功率和准确率。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种HPV分型核酸检测血样标本处理方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 采集宫颈脱落细胞,将宫颈脱落细胞样本进行分类:

[0008] 红细胞数量小于 0.01×10^{12} 个/每升的样本为A类样本;

[0009] 红细胞数量在 $(0.01 \sim 0.1) \times 10^{12}$ 个/每升的样本为B类样本;

[0010] 红细胞数量在 $(0.1 \sim 3) \times 10^{12}$ 个/每升的样本为C类样本;

[0011] 红细胞数量大于 3×10^{12} 个/每升的样本为D类样本;

[0012] (2) 样本分类后,按照红细胞的多少加入脱落细胞保存液进行预处理,处理方法:

[0013] A类样本直接用于实验;

[0014] B类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述B类样本与脱落细胞保存液的体积比为550~650:350~450;

[0015] C类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述C类样本与脱落细胞保存液的体积比为350~450:550~650;

[0016] D类样本与脱落细胞保存液混匀后用于实验,所述D类样本与脱落细胞保存液的体积比为150~250:750~850。

[0017] 优选地,红细胞的计数方法为:待测样本震荡混匀后用等渗稀释液稀释,滴入血细胞计数板,在显微镜下计数红细胞数量,换算得到样本中含有的红细胞数量。

- [0018] 优选地,所述的脱落细胞保存液为含异丙醇的醋酸盐缓冲液,pH值为5~6。
- [0019] 优选地,所述的脱落细胞保存液为上海透景生命科技有限公司生产的脱落细胞保存液。
- [0020] 上述的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,将预处理后的样本按如下步骤进行检测:
- [0021] S1、取含有宫颈脱落细胞样本的EP管,13200rpm高速离心5~10min,吸弃上清;
- [0022] S2、加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴15~20min;
- [0023] S3、13200rpm高速离心10~15min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1.5h;
- [0024] S4、吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min;
- [0025] S5、加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育15~20min,采用流式分析仪进行检测。
- [0026] 优选地步骤S2所述的脱落细胞核酸释放剂为上海透景生命科技有限公司生产的脱落细胞核酸释放剂。
- [0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:
- [0028] 本发明的HPV分型核酸检测血样标本处理方法,按照含红细胞的多少宫颈脱落细胞样本进行分类,并加入脱落细胞保存液进行预处理,在保持宫颈脱落细胞形态和核酸完整的前提下,使红细胞充分悬浮及分散,洗去样本中的红细胞,样本的Globin的信号值大于150,保证实验成功率,避免假阴性结果的产生,提高了检测结果的准确性。

具体实施方式

[0029] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面将结合实施例对本发明作进一步的详细介绍。本发明所采用的脱落细胞保存液和脱落细胞核酸释放剂均采用上海透景生命科技有限公司生产的产品。

[0030] 实施例1

[0031] 取16例分布四类血样HPV标本,按照含血细胞多少进行分类,样本分类后,按照红细胞的多少加入透景细胞保存液进行预处理,处理方法:A类宫颈脱落细胞样本取1000 μ l加入1.5mlEP管内直接用于实验,B类宫颈脱落细胞样本取650 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液350 μ l混匀后用于实验,C类宫颈脱落细胞样本取450 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液550 μ l混匀后用于实验,D类宫颈脱落细胞样本取250 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液750 μ l混匀后用于实验。

[0032] 取四类血样EP管,13200rpm高速离心5min,吸弃上清,加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴15min,13200rpm高速离心10min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1h30min,吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min,加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育15min,Luminex200流式分析仪进行检测。

[0033] 结果分析:通过透景HPV结果计算分析软件直接得到各样本结果,样本的Globin的信号值大于150,整个实验成功,如果有任何HPV亚型探针的信号大于150,即可判断该探针对应的亚型阳性,否则为阴性。

[0034] 实施例2

[0035] 另外选取16例分布四类血样HPV标本,按照含血细胞多少进行分类,样本分类后,

按照红细胞的多少加入透景细胞保存液进行预处理,处理方法:A类宫颈脱落细胞样本取1000 μ l加入1.5mlEP管内用于实验,B类宫颈脱落细胞样本取600 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液400 μ l混匀后用于实验,C类宫颈脱落细胞样本取400 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液600 μ l混匀后用于实验,D类宫颈脱落细胞样本取200 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液800 μ l混匀后用于实验。

[0036] 取以上四类血样EP管,13200rpm高速离心10min,吸弃上清,加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴20min,

[0037] 13200rpm高速离心15min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1h30min,吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min,加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育20min,Luminex200流式分析仪进行检测。

[0038] 结果分析:通过透景HPV结果计算分析软件直接得到各样本结果,样本的Globin的信号值大于150,整个实验成功,如果有任何HPV亚型探针的信号大于150,即可判断该探针对应的亚型阳性,否则为阴性。

[0039] 实施例3

[0040] 再另外选取16例分布四类血样HPV标本,按照含血细胞多少进行分类,样本分类后,按照红细胞的多少加入透景细胞保存液进行预处理,处理方法:A类宫颈脱落细胞样本取1000 μ l加入1.5mlEP管内用于实验,B类宫颈脱落细胞样本取550 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液450 μ l混匀后用于实验,C类宫颈脱落细胞样本取350 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液550 μ l混匀后用于实验,D类宫颈脱落细胞样本取150 μ l加入1.5mlEP管内并加入脱落细胞保存液750 μ l混匀后用于实验。

[0041] 取以上四类血样EP管,13200rpm高速离心10min,吸弃上清,加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴20min,

[0042] 13200rpm高速离心15min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1h30min,吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min,加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育20min,Luminex200流式分析仪进行检测。

[0043] 结果分析:通过透景HPV结果计算分析软件直接得到各样本结果,样本的Globin的信号值大于150,整个实验成功,如果有任何HPV亚型探针的信号大于150,即可判断该探针对应的亚型阳性,否则为阴性。

[0044] 对比例1

[0045] 另外取16例分布四类血样HPV标本,各吸取1000 μ l宫颈脱落细胞样本加入1.5mlEP管内,13200rpm高速离心5min,吸弃上清,加入200 μ l脱落细胞核酸释放剂,充分振荡混匀,放置100 $^{\circ}$ C干浴15min,13200rpm高速离心10min,取5 μ l上清加入扩增反应管内,上机扩增1h30min,吸取3 μ l上清加入22 μ l微球杂交液中,杂交40min,加入75 μ l链霉亲和素-藻红蛋白溶液,48 $^{\circ}$ C孵育15min,Luminex200流式分析仪进行检测。

[0046] 结果分析:通过透景HPV结果计算分析软件直接得到各样本结果,含有血的样本的Globin的信号值全部小于150,整个实验失败。

[0047] 综上,经过本发明的处理方法处理后血样本进行检测试验,样本Globin的信号值大于150,实验成功,而未处理的血样本实验结果样本Globin的信号值小于150,实验失败。通过对比实验结果得出,处理后的实验成功率高,操作简单,避免因样本含有血液而造成实

验抑制,减少患者重新采样的痛苦,避免重复试验试剂浪费,节约成本,保证了检测结果的准确性。

[0048] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换,但这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。