

分子醫學檢測之優良操作

黃莉萍^{1,2}、曾嶽元^{1,2}

¹國泰綜合醫院分子醫學科，台北，台灣

²社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

摘要

運用於腫瘤、傳染病、遺傳疾病、法醫的臨床分子檢測 (molecular testing)，不外乎是以核酸作雜交 (hybridization) 或擴增 (amplification)。在這過程中每一個細節都有可能出差錯而造成重大的影響，因此每個實驗室都必須撰寫一套符合自己的操作手冊 (procedure manual)，每一過程都需有以書面記載的標準作業程序。其內容至少應涵蓋檢體之採集與處理、核酸之萃取、檢驗的方法如聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 等。此外，尤其在DNA定序 (sequencing) 或定量檢測 (quantitative assay) 這兩種常見的檢測上，更要防止錯誤的發生，否則受影響的案例會很多。實驗室在提供定量檢測前需要先建立校正 (calibration) 並定期作校正確認 (calibration verification) 和分析測量範圍 (analytical measurement range; AMR) 確效。不論是何種分子檢測操作，都應以嚴謹的態度面對，每一步驟都必須根據事先訂定的標準作業程序進行，並記錄每一檢體的資訊，以便事後可以依循追溯。(生醫 2010;3(1):318-323)

關鍵字：分子檢測 (molecular testing)、操作手冊 (procedure manual)、DNA定序 (sequencing)、定量檢測 (quantitative assay)

前言

所謂分子檢測 (molecular testing) 指的就是以DNA或RNA作探針雜交 (probe hybridization) 或擴增 (amplification)。它常運用在腫瘤學、血液學、傳染病、遺傳疾病、人類白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 型別鑑定、法醫及親子鑑定等方面。因檢測結果攸關受試者的後續醫療處置，甚至對其法律權益也影響甚鉅，因此，不僅操作人員須以嚴謹的態度面對每一個細

微的步驟環節，實驗室主管亦應制定出標準化流程，且嚴格要求操作人員徹底執行。以避免標準不一，不但操作人員茫然無所適從，主管亦無法建立管理制度以貫徹品管稽核工作。

操作手冊

實驗室為達到一定的檢測水準，最基本的要求就是要有一套操作手冊 (procedure manual)。此操作手冊的樣式可由實驗室之主管決定，其內

通訊作者：曾嶽元教授；國泰綜合醫院分子醫學科主任

電話：886-2-2690-7965 ext 2308

傳真：886-2-2691-9800

地址：221 台北縣汐止市建成路160巷32號分子醫學科

電子郵件：jeffbucknell@gmail.com

2009年10月26日來稿；2009年11月16日修改；2009年11月17日同意刊登

容必須包括：檢測名稱、檢測原理、臨床意義、檢體樣式、所需試劑、校正方法、品質管理、操作步驟、計算方法、參考值、判讀等部分。手冊中還必須要說明每項檢查的適應症，以及如何應用於臨床處置，並附上相關文獻佐以參考。

工作站必須有一本最新版本而且內容詳實完整的操作手冊，實驗室主管也要有一套系統用以審核技術者是否瞭解所負責之檢測項目。技術者必須完全遵照手冊操作，任何改變都必須事先經主管或合格的管理者同意，且必須在手冊中留有記錄。主管或其指定之合格人員每年至少必須對所有的政策重新審視一次，以確定其新穎性與完整性。為了避免一年一度的大整理影響例行工作，可以將此任務分成12份，每個月完成一份。如果主管換人，新任主管在合理的時間內要重新確認所有的操作，並執行年度的審視。如果某檢測品項已不再提供，該項目操作之書面或電子版本至少必須保留2年，並註明啟用日及停用日；而對於嬰幼兒之檢測項目，其文件至少要保留23年之久，以涵蓋出生前到21歲這段時間。

實驗室需有書面記載的手冊，記錄可以手寫或是電子版本保留，以描述符合優良實驗室規範 (good laboratory practice; GLP) 的作業程序。不僅對檢體之標識 (labeling) 確認、檢體保存方法¹⁻⁴，甚至於防止檢體遺失、改變或污染等流程都應詳加規範。對於檢驗的步驟要詳實記錄，包括核酸的質與量、耗材 (如限制內切酶、引子) 的批號、結果 (如電泳膠照片、原位雜交玻片) 之標示等。實驗室也必須有一機制，可以主動地管理在分析過程之各層面上所有的檢體，這包括檢體之收件以及核酸之萃取、定量、雜交、偵測、記錄和貯存，此機制可以用文字、數字或條碼的方式管理。總之，必須可以讓實驗室追溯每一檢體的資訊。

檢體之處理 (Specimen handling)

檢體之採集及處理的標準作業程序不外乎：受試者之準備、從所有相關的來源作適當的收集、以及對檢體給予適當的標識與編碼、適當的傳送和保存⁵⁻⁶。而對於親子鑑定之檢體採樣人，應由不具利害關係的第三者擔任；受試者身分可由國民身分證 (即貼有照片之證件) 確認外，還可以當場拍照及附上其他證件取代。除檢體外還要包括：採樣日期及地點、當事人之有關資訊 (包括姓名、種族及關係) 之簽名記錄、小孩之出生日、個案簡史及樣本來源。此外，還需有知情同意書，當事人或其監護人必須確認個案資料及檢體標識的正確性。

收到檢體時要注意標識是否有被竄改的跡象及標籤是否牢固。對於無法接受或可能被混淆或污染的檢體，實驗室必須有書面的退件標準；銷毀不合格的檢體時，必須在報告及品質管理記錄上註明。如果檢體必須分裝，那麼需有書面記載的流程以預防交互污染；如果檢體不夠，實驗室必須立即通知送檢者。檢體的保存亦必須合乎法規，其保留期限至少應為報告發出後半年；保存中的檢體亦必須能夠方便取出，以便有必要時可作進一步的檢驗。而親子和法醫鑑定之檢體，則必須保存在管制區，也需要有樣本交接監管表。

核酸之萃取

核酸之萃取及純化方式，可以根據文獻記載之方法、使用被認可之商品化套組或儀器、或者使用經過確認 (validation) 之自製 (in-house) 方法來操作。不管使用那一種萃取方法，當情況許可時，所萃取之核酸都應加以定量。有時因檢體太小或太少，例如切片 (biopsy) 或刑事證物，那麼與其消耗檢體用於核酸定量，不如全用於基因檢測。如果情況許可時，所萃取之核酸也應以電泳或類似的方法確保高分子量DNA的完整性 (intactness)。另外，對於有關RNA之檢驗，我們應先評估所萃取之RNA品質是否良好，一個常用的方法就是檢驗檢體內含之「管

家 (housekeeping) 信使核糖核酸 (messenger RNA; mRNA)。而當情況不允許時，實驗室則需有偽陰性比率 (false negative rate) 之數據，但如果萃取出來的核酸量不足，實驗室必須立即通知送檢者。

從解剖病理科之檢體中萃取核酸是一大挑戰，因為所有的檢體可能以各式各樣的固定液來保存，而這卻不利於核酸的萃取。固定液以兩種原理來固定標本，甲醛、戊二醛等是利用固定液鏈鎖的反應 (cross-linking) 原理來固定標本；酒精、甲醇、乙二醇等則是利用沉澱反應 (precipitation) 原理來固定標本。有一些含有福馬林、酒精等成份的固定液，其對於核酸的破壞程度是低於其他的固定液。至於含有飽和苦味酸 (picric acid)、汞等成份的固定液或脫鈣劑 (decalcifiers) 是不適合用於分子檢測的。現在已發展出許多替代的方法來快速固定檢體並將其包埋於石蠟中，包括微波、超音波處理，並已有研究證實這些方式可以採取到較高品質的DNA和RNA。然而，還需要更多的研究告訴我們這些新的處理方法是否適用於分子生物研究。

最廣泛用於分子檢測的固定液是10%的中性福馬林。雖然福馬林在光學顯微鏡檢查中是一個很好的保存劑，但是福馬林的固定作用卻會使組織蛋白 (histone) 與DNA的氨基群 (amino group) 形成亞甲基 (methylene) 鍵橋，這使得DNA不容易從固定後的檢體萃取出來，也使得DNA容易斷裂成小片段。因此，從福馬林固定的石蠟包埋的組織中萃取DNA片段大約在300至400個鹼基對 (base pair)。而RNA也可從福馬林固定及石蠟包埋的檢體中萃取出來，一般從新鮮組織萃取的RNA片段長度大約在1000個鹼基對，但從福馬林固定的檢體中萃取的RNA，大約在100至500個鹼基對。

其他有關從福馬林固定之組織中萃取核酸的常見問題是：

- 一. 鋅緩衝的福馬林 (zinc buffered formalin) 保全DNA和RNA的特性很好，但緩衝的中性福馬林 (buffered formalin) 不能保全DNA和RNA，而未緩衝的福馬林 (unbuffered formalin) 最糟糕。
- 二. 固定時間要避免過與不及的問題。12至24小時是最佳的固定時間，固定時間越長DNA的品質越差，檢體在福馬林中固定超過一星期，其DNA被破壞程度愈顯著。
- 三. 攝氏四度是保存DNA和RNA的良好溫度，可惜絕大多數蠟塊是貯存於室溫的。
- 四. 一般而言，蠟塊的存放時間不會影響後續所做的分子研究，但從庫存十年以上的蠟塊要萃取核酸是一項很大的挑戰。

至於其他的固定液對核酸萃取的影響大致如下：

- 一. 保全DNA和RNA良好者：methacarn (主成份為甲醇、冰醋酸及氯仿)、70-100%的乙醇、Carnoy's固定液 (主成份為乙二醇、冰醋酸及氯仿)、HOPE固定液 (德國漢堡DCS公司的產品)、UMFIX固定液 (美國加州Sakura Finetek公司的產品)。
- 二. 保全DNA和RNA不良者：B-5固定液 (主成份為氯化汞和醋酸鈉)、Bouin's固定液 (主成份為飽和苦味酸、冰醋酸及緩衝的中性福馬林)、Hollande's固定液 (主成份為飽和苦味酸、冰醋酸、緩衝的中性福馬林、蒸餾水及醋酸銅)、Zenker's固定液 (其主成份為氯化汞、重鉻酸鉀和硫酸鈉)、酸性脫鈣劑、Histochoice固定液 (Amresco公司的產品)、Prefer固定液 (Anatech公司出產的產品)。

實驗室對於RNA的檢測或使用RNA探針的檢驗，必須確保工作環境無核糖核酸酶 (ribonuclease) 的污染。核酸一旦萃取後，必須儘早檢測或適當地貯存，以避免核酸崩解⁶。核酸之質與量的檢查為南方浸漬法 (southern blot)

和北方浸漬法 (northern blot) 所必要的條件，而限制內切酶為南方浸漬法必用之酵素，良好的實驗室必須能夠確定限制內切酶的作用完全而且正確。另外，電泳必須使用已知分子量的標記 (marker)，而且能涵蓋所欲檢測之標的物的分子量；而對於電泳的終點 (end-point) 的辨識，必須使用肉眼可見或螢光的標記。

聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)

PCR為當今分子醫學實驗室必備之核酸擴增技術。但愈是敏感的方法就愈易受汙染的影響。因此，良好的實驗室以PCR來擴增核酸時，必須採取適當的物理隔離 (physical containment) 和程序管控 (procedural controls) 以減少偽陽性的結果。PCR儀器不但每一槽 (well) 都要定期校正，當即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 以最適融化溫度 (melting temperature; T_m) 產生測量數據時，更必須將溫度範圍限制定義在正負 2.5°C 之間，必須嚴格要求校準結果都落在特定的範圍內並且持續加以監控。

從實務面來看，擴增前後之樣本必須在不同的空間操作以減少汙染。乾淨的區域是指進行PCR之前的實驗區域，其中包括從蠟片切取、核酸萃取直到PCR設定為止。骯髒的部分除了PCR之後的產物，也包括了PCR後續處理流程中所產生的廢物，這些都必須與前述的乾淨區域作區隔。人員訓練內容之一必須包括教導他們所有的試劑、儀器、防護器具均不可由骯髒區域帶回乾淨區域。而實體區隔的部分，最好能有正壓，以降低汙染的機率。操作人員必須常換手套、使用特殊的吸注器 (pipette, 如positive displacement type 或aerosol barrier tips)、於PCR試劑中使用人脫氧尿三磷酸 (dUTP)、以及避免試管內容物彈入空氣中。

每當新的寡核苷酸試劑批號進到實驗室後，不論是否含螢光，都必須用已知的對照標的測試，通過測試後才可用作臨床使用。檢驗時，除了待測之檢體外，也必須同時有陽性對照及陰性對照。此外，也應含有內在對照 (internal control)，以便檢驗結果出現陰性時，判讀者得以知道陰性結果並非核酸萃取失敗或PCR反應中有抑制物所造成的。而在定量時，也要注意部分抑制 (partial inhibition) 所造成的數值偏低。

DNA定序 (sequencing)

定序檢測 (sequencing assay) 和偵測定點之基因突變不同。前者例如檢測受試者之乳癌基因BRCA1是否有任何臨床上重要的突變；後者例如偵測大腸癌組織是否有密碼子 (codon) 12和13的突變。在定序檢測時，必須調整到最佳狀態，因此整個標的區段 (target region) 之訊號讀出 (readout) 是可判讀的；尤其是要避免異合子 (heterozygous) 的序列變異因訊號太低或背景雜訊太高而被忽略的情況。而實驗室對於序列數據的判讀標準，尤其是訊號與雜訊的比值 (signal-to-noise ratio) 是否可被接受，必須有一定的準則。

為了確保序列數據之品質，有義 (sense) 及反義 (antisense) 兩股DNA都須加以定序。必須兩者都檢測到相同的突變或序列變異，才可考慮其真實性。如果正反兩股之結果不同時，必須重作以確保品質。然而即便正反兩股之結果相同，仍然不能排除在PCR過程中產生的錯誤。理想的情況是，由兩組人員以不同的引子作檢測，再相互比對。

定量檢測 (quantitative assay)

所謂「校正 (calibration)」就是透過一套步驟以建立試劑和儀器度量的關係，從而得知

分析物之濃度或活性。校正步驟 (calibration procedure) 通常是由廠商所提供，也可由自己的實驗室建立，但前提它必須是完善的，且校正結果需要有書面記錄。一般來說，品管材料 (QC materials) 不應用來當作「校正物 (calibrator)」，如果非得如此不可的話，這兩者也要分開備製，例如將不同批號的校正物和對照分別用於校正和品管。

至於「校正確認 (calibration verification)」指的就是確認目前使用的方法其校正步驟是有確效的 (valid)。只要證明某方法有「校正確認」，那麼就不必對該檢測方法實施一套完整的「校正」動作或重新校正 (recalibration)。實驗室必須遵照廠商所提供的校正步驟作確認，也可將校正物當作不明樣本一般來檢測，看看是否能測出該有的量。如果未通過「校正確認」的話，系統就得重新校正。

定量檢測要明確地定義測量的動態範圍 (dynamic range)，而且每次檢測都必須含有對照樣本在內，包括陰性、低陽性、高陽性的對照樣本。所謂「分析測量範圍 (analytical measurement range; AMR)」就是樣本不經過稀釋、濃縮或其他前處理而直接檢測所得之分析物測量值 (analyte value) 的範圍。「AMR 確效 (AMR validation)」指的是一種確認的 (confirming) 過程，於其中檢測系統 (assay system) 可正確地在分析測量範圍內測出分析物的濃度或活性。測試樣本所含之分析物測量值起碼要有三種：接近 AMR 之最低值、中間值、和最高值。每一實驗室都需訂出「接受或拒絕 (accepting or rejecting)」AMR 確效測驗的最低標準。

分析物以溶解 (dissolved) 或懸浮 (suspended) 狀態所處的環境謂之「樣本的基質 (matrix)」。由於樣本的基質可能會影響到分析物之測量，所以廠商需要建議適用於確效之

材料 (material)。常見的材料如病患之剩餘檢體、對照樣本、校正物。不論如何，實驗室都必須使用基質及方法皆宜 (matrix- and method-appropriate) 的高品質材料作校正確認和 AMR 確效。實驗室對所有的校正材料必須適當地標示其內容物、校正值、啟用日及末效期。而所謂「標示」不是非得在瓶子上貼標籤不可，只要有清楚的指示即可，即便是電子檔也可。

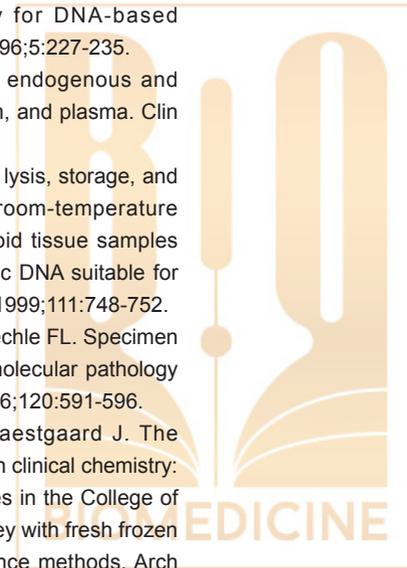
實驗室主管須決定何時要進行重新校正、校正確認、和 AMR 確效，通常是按照製造商的說明書進行。若根據 CLIA-88 規範 42CFR493.1255 (b) (3) 的話，至少必須每 6 個月進行一次。這裡指的時程 (interval) 是兩次之間不得超過 6 個月，而非平均 6 個月。此外，只要是系統有改變 (如大維修或保養) 或更換實用試劑 (active reagents)，都必須進行一次重新校正、校正確認、和 AMR 確效；除非實驗室能證明更換試劑批號，不會影響檢測結果之範圍。如果實驗室使用多種儀器測量同一分析物，那麼每年必須進行兩次以上的平行測試⁷。

結語

臨床分子醫學實驗室在台灣如雨後春筍般的成立，所招聘的工作人員絕大多數來自原先從事基礎實驗的研究人員。雖然臨床分子檢測與研究實驗的方法極為類似，但因為目的不同，所以在操作層面上自然也不同。尤其是以微小解剖病理標本作分子檢測時挑戰更大，因為樣本可能小到不足以重作確認，而檢測結果卻又會重大影響到病人的治療決策或受試者的法律權益。因此，分子醫學實驗室技術人員在操作檢測時，不僅從收到檢體開始就必須按步就班的操作，且直到報告發行和後續的檢體保存，都必須嚴格遵守標準作業程序，嚴謹地為品質把關。唯有如此，才能真正地落實分子醫學檢測的實驗室品管。

引用文獻

1. Schultz CL, Akker Y, Du J, Ratech H. A lysis, storage, and transportation buffer for long-term, room-temperature preservation of human clinical lymphoid tissue samples yielding high molecular weight genomic DNA suitable for molecular diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1999;111:748-752.
2. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 2002;48:1883-1890.
3. Farkas DH, Drevon AM, Kiechle FL, DiCarlo RG, Heath EM, Crisan D. Specimen stability for DNA-based diagnostic testing. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:227-235.
4. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;48:1647-1653.
5. Schultz CL, Akker Y, Du J, Ratech H. A lysis, storage, and transportation buffer for long-term, room-temperature preservation of human clinical lymphoid tissue samples yielding high molecular weight genomic DNA suitable for molecular diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1999;111:748-752.
6. Farkas DH, Kaul KL, Wiedbrauk DL, Kiechle FL. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:591-596.
7. Ross JW, Miller WG, Myers GL, Praestgaard J. The accuracy of laboratory measurements in clinical chemistry: a study of 11 routine chemistry analytes in the College of American Pathologists Chemistry Survey with fresh frozen serum, definitive methods, and reference methods. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:587-608.



生物醫學
BIOMEDICINE JOURNAL