

应用煮沸法、磁珠法、离心柱法对 HPV-DNA 提取的临床对比研究

杨 柳, 崔玉凤, 崔诗晗

四平市中心人民医院检验科 吉林四平

【摘要】目的 探究应用煮沸法、磁珠法、离心柱法对 HPV-DNA 提取的临床对比价值。**方法** 选取 2024 年 1 月-2024 年 9 月在我院体检中心、病房、门诊 61 例经检测 HPV 结果为阳性的宫颈脱落细胞样本, 分别用于煮沸法、磁珠法、离心柱法进行 DNA 提取, 并进行实时荧光定量 PCR 扩增, 三种提取方法结果一致为阳性样本, 比较其扩增后的循环阈值 (Ct) 差异和核酸提取效率。**结果** 三种提取方法经扩增后结果一致为阳性的样本为 53 例。对三组结果一致为阳性的 53 例样本结果进行统计学分析, ct 值进行统计学分析无差异, DNA 浓度和 DNA 纯度之间统计学有显著差异, 煮沸法提取 DNA 浓度最高, 离心柱法提取 DNA 纯度较好。**结论** 通过对比分析, 煮沸法提取 DNA 浓度最高, 但 DNA 纯度稍差, 而离心柱法提取 DNA 纯度较好, 但操作相对复杂, 需要反复离心, 不适合大批量提取, 但其检出率较好, 适合复查、样本量少的检测机构, 磁珠法操作简单, 适合大批量检测, 但本实验采用的磁珠法 CT 值较其他两种方法学偏高, 检出率偏低。

【关键词】 煮沸法; 磁珠法; 离心柱法; HPV-DNA

【收稿日期】 2025 年 10 月 16 日 **【出刊日期】** 2025 年 11 月 18 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijmd.20250080

Clinical comparative study of HPV-DNA extraction by boiling method, magnetic bead method and centrifugal column method

Liu Yang, Yufeng Cui, Shihan Cui

Siping city Central People's Hospital, Clinical Laboratory, Siping, Jilin

【Abstract】Objective To explore the clinical comparative value of boiling method, magnetic bead method and centrifugal column method in the extraction of HPV-DNA. **Methods** Sixty-one cervical exfoliated cell samples with positive HPV test results from the physical examination center, wards and outpatient department of our hospital from April 2021 to September 2024 were selected. DNA extraction was carried out by boiling method, magnetic bead method and centrifugal column method respectively, and real-time fluorescence quantitative PCR amplification was performed. The results of the three extraction methods were consistent and positive samples were identified. Compare the differences in the amplified circulation threshold (Ct) and the efficiency of nucleic acid extraction. **Results** A total of 53 samples showed consistent positive results after amplification by the three extraction methods. Statistical analysis was conducted on the results of 53 samples with consistently positive results in the three groups. Statistical analysis of ct values showed no difference. There was a significant statistical difference between DNA concentration and DNA purity. The concentration of DNA extracted by boiling method was the highest, and the purity of DNA extracted by centrifugation column method was better. **Conclusion** Through comparative analysis, it is found that the boiling method has the highest DNA concentration, but the DNA purity is slightly lower. The centrifugation column method has better DNA purity, but the operation is relatively complex, requiring repeated centrifugation, and is not suitable for large-scale extraction. However, its detection rate is better, and it is suitable for re-examination and testing institutions with small sample volumes. The magnetic bead method is simple to operate and suitable for large-scale detection. However, the CT value of the magnetic bead method adopted in this experiment was higher than that of

the other two methods, and the detection rate was lower.

【Keywords】 Boiling method; Magnetic bead method; Centrifugal column method; HPV-DNA

人乳头瘤病毒 (HPV), 隶属于乳多空病毒科, 迄今为止, 已鉴定出超过 140 种不同的 HPV 基因型^[1]。HPV 根据其致病风险的差异, 被划分为低危亚型 (LR-HPV) 与高危亚型 (HR-HPV) 两大类, 其中 HR-HPV 则具有其强大的致癌能力, 诱发包括宫颈癌、外阴癌、等多种恶性病变。HPV 基因检测成为现代医学预防、早期诊断这类疾病不可或缺的一环, 不仅能为高危人群提供个性化的预防策略, 还能在疾病初期便精准识别, 为制定科学合理的治疗方案奠定坚实基础。在 HPV 分型的研究中, HPV-DNA 的高效提取是关键, 其提取效率的高低更是直接关联到检测结果的准确性与临床诊疗的有效性^[2]。为探索最优的提取方法, 本研究引入磁珠法、煮沸法、离心柱法三种不同的提取方法, 通过深入对比分析, 为 HPV 的检测与分型提供更为可靠的技术支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2024 年 1 月-2024 年 9 月在我院就诊的 61 例经检测 HPV 结果为阳性的宫颈脱落细胞样本, 样本保存在 -80 度低温冷冻冰箱, 充分融化后备用。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

严格遵循医疗伦理与患者隐私保护原则, 所有标本的采集工作均是在患者充分知情并明确表示同意的前提下进行。

1.2.2 磁珠法提取

先将粘在铝膜及孔壁上的磁珠样本甩至孔底, 撕开磁珠提取试剂, 静止 3-5 分钟, 撕开铝膜加入 15UL 蛋白酶 K 和 300UL 震荡混匀后的样本, 加样后, 试剂盒放入半自动提取仪上, 插入搅拌棒进行核酸提取。

1.2.3 煮沸法提取

对标本进行混匀操作, 移液器取 700μL, 转移至 EP 管中并离心, 以 13000r/min 的转速进行离心 5min。完成后, 用移液枪吸弃上清液, 去除杂质。向 EP 管中加入 50μL 的核酸裂解液, 并立即进行充分的振荡混匀。随后, 将 EP 管置于干式恒温器中, 设定温度为 100℃, 进行 10min 高温裂解处理。裂解完成后, 再次将 EP 管放入离心机, 以 13000r/min 转速离心

10min。然后取上清液, 用于后续的 PCR 扩增反应。

1.2.4 离心柱法提取

对标本进行充分混匀, 移液器取 200μl 加入 3 倍体积裂解液溶液, 充分混匀 3-5 分钟; 吸入柱提管中, 1 分钟后 12000 转离心 1 分钟, 弃滤出液; 继续加入 600μl 清洗液 I, 12000 转离心 1 分钟, 弃滤出液; 继续加入 800μl 清洗液 II, 12000 转离心 1 分钟, 弃滤出液; 重复加入清洗液 II 步骤, 最后再次离心空转 1 分钟, 取出, 将离心柱放入新的 1.5ml 离心管中, 吸取 40μl ddH₂O 置于离心柱中, 12000 转离心 1 分钟, 吸取 40 μL 洗脱液, 准备进行 PCR 扩增反应。

1.2.5 HPV-DNA 扩增

取 3 μL HPV-DNA 模板, 并加入到扩增试剂中进行荧光定量 PCR 法扩增。扩增程序以 95℃运行 10min, 解开 HPV-DNA 的双链结构。随后, 进入扩增循环阶段, 进行 45 个循环, 包括 95℃变性 15s、60℃退火和延伸 60s, 通过这样的多重 PCR 扩增, 最后得出 ct 值和扩增曲线, 通过扩增曲线和 ct 值进行结果判读, ct 值 ≤ 36 判定为阳性。

1.3 观察指标

1.3.1 三种提取方法阳性检出结果比较。

1.3.2 三种提取方法 CT 值、DNA 浓度、DNA 纯度比较。

1.4 统计学方法

采用 SPSS26.0 进行统计学处理, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA 检验)。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

三种提取方法煮沸法提取的阳性 58 例, 磁珠法提取的阳性 55 例, 离心柱法提取的阳性 59 例, 三种提取方法经扩增后结果一致为阳性的样本为 53 例, 见表 1。

53 例样本结果进行 CT 值、DNA 浓度、DNA 纯度比较分析, 采用 spss26.0 进行统计学处理后, CT 值统计学分析无差异 (P > 0.05), DNA 浓度和 DNA 纯度之间统计学分析有显著差异 (P < 0.05), 煮沸法提取 DNA 浓度最高, 离心柱法提取 DNA 纯度较好, 见表 2。

表 1 三种提取方检出结果

	阳性检出	阴性检出	合计（例）
煮沸法	58	3	61
磁珠法	55	6	61
柱提法	59	2	61

表 2 三种提取方法阳性结果 CT 值、DNA 浓度、DNA 纯度比较（53 例）

	ct 值	DNA 浓度（ug/ml）	DNA 纯度（A260/A280）
煮沸法	28.27±4.36	76.29±51.17	1.46±0.19
磁珠法	28.81±4.49	30.62±23.01	2.75±1.88
柱提法	29.41±4.57	18.21±21.29	1.92±0.33
F 值	0.864	41.311	18.237
P 值	0.424	<0.01	<0.01

3 讨论

随着公众健康意识的显著提升，HPV 筛查项目的重要性逐渐被重视，高效且高准确性的检测方式十分必要。对此，本研究聚焦于提升核酸提取技术的纯度与浓度，针对当前检验工作中遇到的实际难题，以煮沸法、离心柱法以及磁珠法开展比较研究。煮沸法是一种传统的、成本较低的 DNA 提取方法，其利用高温使细胞壁和细胞膜破裂，从而释放细胞内的核酸物质^[3]。煮沸法不需要复杂的设备和昂贵的试剂，操作简便，适合资源有限的地区或初步筛查。由于煮沸法能较彻底地破坏细胞并释放核酸，因此提取得到的 DNA 浓度往往较高，有利于后续的检测分析。然而，煮沸法虽然能有效破坏细胞并释放核酸，但同时也会释放出大量的蛋白质和其他杂质，难以完全去除，导致提取的 DNA 纯度较低，可能会影响后续检测的准确性和敏感度^[4]。另外，由于操作过程相对开放，煮沸法更容易受到外界环境的污染，如空气中的微生物、操作人员的手部污染等，增加假阳性或假阴性的风险。煮沸法的效果受加热温度、时间等多种因素影响，操作难度较大，不同批次之间的提取效果可能存在较大差异。

磁珠法是一种基于磁性纳米颗粒的核酸提取技术，是利用磁珠表面的官能团与核酸分子之间的亲和力，实现核酸的高效捕获与纯化^[5]。磁珠法通过特异性结合与洗涤步骤，能有效去除蛋白质、脂质等杂质，提取得到的 HPV-DNA 纯度较高，有利于提高检测的敏感度和特异性。且操作简便、规范，能够

减少人力、物力成本，提取速度快，提高工作效率能够在较短时间内完成大量标本的提取工作，适合临床大批量检测的需求^[6]。然而，核酸提取系统需要专业的设备和试剂支持，相对于煮沸法和离心柱法而言，设备成本较高。在某些特定情况下，如标本中 HPV-DNA 含量极低时，磁珠法的敏感度可能略低于其他方法。

离心柱法是一种基于固相吸附原理的核酸提取方法，试剂价格成本最为低廉，利用离心柱内填充的特定吸附材料（如硅胶膜、玻璃纤维等）对核酸的亲和力进行高效捕获与纯化^[7-8]。离心柱法通过特异性吸附与洗涤步骤，能有效去除杂质，提取得到的 HPV-DNA 纯度较高。由于离心柱法对核酸的特异性捕获能力较强，因此提取结果具有较高的特异性。由于每个样本都需要单独处理并通过离心柱进行纯化，过程耗时长，且劳动密集，不适合进行大规模、高通量的样本处理。但特别适合单个样本复查，因为试剂是单个柱体，医疗机构常用磁珠法提取试剂多为每板 16 人份，相比较于磁珠法复查单个样本则需浪费整板试剂，离心柱法节约了有效成本。

综上所述，通过对比分析，煮沸法提取 DNA 浓度最高，但 DNA 纯度稍差，而离心柱法提取 DNA 纯度较好，但操作相对复杂，需要反复离心，不适合大批量提取，但其结果特异性较好，适合复查、样本量少的检测机构，磁珠法操作简单，适合大批量检测，但敏感度相比较其他两种稍低，医疗机构可根据实验室客观需求合理选用检测方法。

参考文献

- [1] 刘红丽,刘智荣,赵淑芳,等.HPV-E6/E7-mRNA 和 HPV-DNA 检测在宫颈病变筛查中的应用价值[J].分子诊断与治疗杂志,2023,15(2):205-208.
- [2] 李慧敏,汪洋,王楠希,等.DNA 提取方法对实时荧光定量 PCR 检测花生过敏原 Ara h 2 基因的比较研究[J].中国粮油学报,2023,38(7):221-227.
- [3] 许琼,李文静,田芯瑗,等.磁珠法和煮沸法核酸提取在 HPV-DNA 分型中的比较[J].检验医学与临床,2018,15(6): 764-767.
- [4] 马贞丽,田玉玲,戴芳,等.探讨磁珠法与煮沸法对乙型肝炎病毒基因分型检出率及其与 HBV DNA 定量的关系[J].中国社区医师,2021,37(27):119-120.
- [5] 唐苗苗,宾雅棣,赵蓝波,等.基于免疫磁珠法的不同筛选方案对胎儿有核红细胞富集效果的比较[J].重庆医科大学学报,2023,48(2):155-161.
- [6] 周艳萍,卢佳,李茜,等.磁珠法结合实时定量 PCR 检测新型冠状病毒灭活疫苗中宿主细胞残留 DNA 的验证及应用[J].中国生物制品学杂志,2022,35(6):711-717.
- [7] 陈艳梅,谢冰洁,韩素桂,等.凝集素微量离心柱法检测甲胎蛋白异质体联合血清巨噬细胞抑制因子 1 对原发性肝癌的诊断价值[J].生命科学仪器,2020,18(3):83-87.
- [8] 梁柱良,王瑞深.热提取法和离心柱吸附法提取 DNA 病原的比较[J].今日畜牧兽医,2018,34(3):11-12.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS