· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.06.009

磁珠法和煮沸法核酸提取在 HPV-DNA 分型中的比较*

许琼¹,李文静^{1△},田芯媛²,徐红星¹,吴冬生¹,许华英¹

(1.南京医科大学附属苏州市立医院本部检验科 215168;2.苏州大学医学院医学检验技术专业,江苏苏州 215000)

摘要:目的 比较基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的磁珠法与基于手工的煮沸法核酸提取在人乳头瘤病毒(HPV)-DNA 分型中的应用。方法 收集 96 份宫颈脱落细胞标本用于两种 DNA 提取方法检测结果的对比;利用同一混合阳性标本分装后加入系列水平的血红蛋白(Hb),评价抗 Hb 干扰能力;收集 30 份临床棉拭子标本,分析两种方法对皮肤破溃或男性生殖道分泌物 DNA 的提取效率。结果 96 份临床标本,两种方法检测结果一致率为 91.7%(88/96);磁珠法内参 Globin 及 HPV 各亚型的信号值均显著高于煮沸法($t=8.807, 4.676, P<0.05$)。Hb 水平 >17 g/L 时煮沸法 HPV-DNA 分型失败,而磁珠法信号值不受 Hb 干扰。30 份棉拭子标本,磁珠法和煮沸法检测成功率均为 80.0%,阳性率分别为 54.2%、41.7%($P=0.564$)。结论 相比手工提取的煮沸法,基于 Pre-NAT 全自动病毒核酸提取系统的磁珠法具有操作简便、规范、通量高等优点。两种方法具有一定可比性,磁珠法核酸提取效率高于煮沸法,且不受 Hb 干扰,更适于临床应用。

关键词:人乳头瘤病毒;核酸;提取;磁珠法;煮沸法

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)06-0764-04

Comparison of magnetic beads method and boiling method for nucleic acid extraction in HPV-DNA genotyping*

XU Qiong¹, LI Wenjing^{1△}, TIAN Xinyuan², XU Hongxing¹, WU Dongsheng¹, XU Huaying¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Suzhou Municipal Hospital, Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215168, China; 2. Faculty of Medical Laboratory Technology, Medical College, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: Objective To compare the application of magnetic beads method based on Pre-NAT automatic nucleic acid extraction system and the manual boiling method in HPV-DNA genotyping. **Methods** Ninety-six clinical exfoliated cells samples were collected for the comparison between the two nucleic acid extraction methods; the same mixed positive sample was used after subpackage and serial levels of hemoglobin(Hb) were added for evaluating the anti-interference ability; 30 clinical cotton swab specimens were collected for analyzing the DNA extraction efficiency of skin lesion or male genital tract secretions. **Results** Among 96 clinical samples, the concordance rate of detection results by two methods was 91.7%(88/96); the signal values of Globin and HPV subtypes in the magnetic beads method were significant higher than those in the boiling method($t=8.807, 4.676, P<0.05$). HPV-DNA genotyping failed in boiling method when the Hb level >17 g/L, while the signal values of magnetic beads were free from the Hb interference. The detection success rates of 30 cotton swab specimens were 80.0%, and the positive rates were 54.2% and 41.7% respectively($P=0.564$). **Conclusion** Compared to manual extraction boiling method, the magnetic beads method based on Pre-NAT automatic nucleic extraction system has the advantages of simple operation, normalization and higher throughput. The two methods have certain comparability. Magnetic beads method has higher nucleic acid extraction rate than the manual boiling method without Hb interference and is more suitable for clinical application.

Key words: human papillomavirus; nucleic acid; extraction; the magnetic beads method; the boiling method

人乳头瘤病毒(HPV)是乳多空病毒科的一组 DNA 病毒,目前已鉴定出 140 多种 HPV 基因型^[1]。

人类是 HPV 唯一宿主,男女老少皆可被感染。除低危亚型(LR-HPV)主要感染手、足皮肤,口腔黏膜和

* 基金项目:江苏省苏州市科技计划指导性项目(SYSD2016112)。

作者简介:许琼,女,技师,主要从事临床常规检验研究。△ 通信作者,E-mail:lwjsky1314@126.com。

泌尿生殖道上皮细胞等引起疣变外,高危亚型(HR-HPV)致癌性较强,可引起包括宫颈癌、口咽部和口腔舌鳞状细胞癌^[2]、外阴癌^[3]、头颈癌等在内的恶性病变^[4]。因此,HPV 基因分型检测对于高危人群疾病的预防、早期诊断、治疗方案制订和疫苗的开发应用等具有重要指导意义。

HPV-DNA 的提取是各种基于核酸技术进行 HPV 分型的基础,其提取效率的高低直接影响检测结果和临床诊疗。本研究采用成熟的流式荧光杂交技术进行多重聚合酶链反应(PCR)后续的杂交分型^[5-6],借助临床常规宫颈脱落细胞标本及棉拭子标本,体外模拟溶血环境进行了基于手工提取的煮沸法和基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的磁珠法在核酸提取中的比较,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来源于南京医科大学附属苏州市立医院妇科、宫颈门诊、皮肤性病科、泌尿及生殖科门诊患者。收集 96 份常规宫颈脱落细胞标本、30 份皮肤及男性生殖道拭子标本进行试验。采集血红蛋白(Hb)水平为 136 g/L 的患者血常规标本,用未采样脱落细胞保存液分别稀释至 68.00、34.00、17.00、8.50、4.25、2.13、1.06 及 0.53 g/L 备用。

1.2 仪器与试剂 磁珠法核酸提取试剂来自上海浩源生物科技有限公司;煮沸法 HPV 核酸提取试剂、HPV 核酸扩增试剂、流式荧光杂交法 HPV 分型试剂盒及宫颈脱落细胞保存液来自上海透景生命科技有限公司;酚抽提法试剂盒来自江苏泰州硕世生物科技有限公司。仪器主要有 Pre-NAT 全自动核酸提取系统(美国 Perkin Elmer 公司)、Verriti 96 孔梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司)、Luminex200 流式荧光点阵仪(上海透景生命科技有限公司)、Bioer 恒温金属浴等。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有标本采集均经医师征得患者同意并承诺保护患者隐私。宫颈脱落细胞标本:先用棉拭子轻轻拭去宫颈口分泌物,再用专用采样刷插入宫颈内 1~2 cm,紧贴宫颈口,稍用力转动 3 圈,将采样刷放入标本保存液中,轻摇洗涤数次,以便得到尽可能多的宫颈脱落细胞;皮肤脱落细胞采用无菌棉拭子,反复擦拭病变部位获得;泌尿生殖系统标本采用无菌棉拭子插入阴茎内 1~2 cm,轻轻旋转 2 圈停留 1~2 min 以获得足够多的分泌物。

1.3.2 HPV-DNA 提取 (1)磁珠法:将标本充分混匀,转移 500 μ L 至标本管,置于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统标本架(标本需要量 300 μ L,一次可检测 96 份标本)。标本首先经过抽提液的裂解释放 HPV-DNA,再在磁珠的吸附作用和电磁场作用下,经过 2 次洗涤充分去除杂质,最后经洗脱液使 HPV-DNA 与磁珠分离,含有 HPV-DNA 的洗脱液用于 PCR 扩增。(2)煮沸法:将标本充分混匀,取 300 μ L 至 EP 管,

13 000 r/min 离心 5 min 吸弃上清液,加核酸提取液 200 μ L 充分振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 裂解 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,上清液用于 PCR 扩增。(3)酚抽提法:将标本充分混匀,取 300 μ L 至 EP 管,13 000 r/min 离心 5 min 吸弃上清液,加 400 μ L 裂解液反复抽打,利用吸附柱 2 次洗涤去除杂质,换新收集管,加 50 μ L 洗脱液洗脱吸附柱上的 DNA 用于 PCR 扩增。

1.3.3 HPV-DNA 扩增 取 5 μ L HPV-DNA 模板加入分装好的扩增试剂,总体积 20 μ L,按下列条件进行多重 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 30 s 5 个循环;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 30 s 30 个循环。

1.3.4 杂交与检测 将扩增后的 DNA 产物与探针进行杂交,不同型别的 HPV 结合到不同的探针上去,待测的 DNA 产物再与荧光物质藻红蛋白标记的链霉亲和素(SA-PE)结合,进行流式分析检测。通过判断何种编码微球及荧光强度,得到数字化结果,通过专用软件分析确定 HPV 型别。条件:取扩增产物 3 μ L,加入 22 μ L 微球杂交液 95 $^{\circ}$ C 5 min,48 $^{\circ}$ C 30 min;加入 SA-PE 75 μ L,48 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。Globin 信号值低于 150 表示试验失败,信号值为 150~<300 为弱阳性,信号值 $\geq$ 300 为阳性。

1.3.5 抗 Hb 干扰试验 将 4 份无 Hb 污染的 HPV-58 型阳性患者标本混合并分装成 18 管(磁珠法与煮沸法各 9 管,每管 300 μ L),13 000 r/min 离心 5 min 吸弃上清液后分别加入上述 9 种不同水平的 Hb 保存液 300 μ L,-20 $^{\circ}$ C 反复冻融后进行 HPV-DNA 提取。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,计数资料以率表示,组间比较用 Fisher's 精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种核酸提取方法结果比较 将 96 份临床标本混匀后各取 300 μ L 用磁珠法和煮沸法进行核酸提取。两种核酸提取方法检测结果一致率为 91.7% (88/96),8 份标本检测不一致,采用酚抽提法进行验证,结果与磁珠法一致,均为弱阳性(信号值为 150~<300)。磁珠法内参 Globin 及阳性标本 HPV 亚型信号值均显著高于煮沸法($t = 8.807, 4.676, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两种核酸提取方法检测结果比较(*n*)

煮沸法	磁珠法		总计
	阳性	阴性	
阳性	64	0	64
阴性	8	24	32
总计	72	24	96

2.2 抗 Hb 干扰试验 体外模拟不同 Hb 水平的血性标本,采用两种方法进行核酸提取,检测结果及信号值见表 2,当 Hb 水平大于 17 g/L 时,煮沸法 HPV-58 分型失败;而磁珠法不受 Hb 干扰。

表 2 不同 Hb 水平下两种核酸提取方法的检测结果(信号值)

标本号	Hb(g/L)	煮沸法		磁珠法	
		Globin	HPV-58	Globin	HPV-58
1	136	<150.0	<150.0	2 999.0	1 562
2	68	1 367.0	<150.0	3 292.0	1 814
3	34	3 120.0	<150.0	2 972.0	3 005
4	17	3 029.0	485.5	3 697.0	2 623
5	8.5	2 320.0	2 050.0	4 356.0	3 037
6	4.25	1 984.0	2 035.0	3 731.0	2 562
7	2.125	2 032.0	1 827.0	4 325.0	2 685
8	1.062 5	3 122.5	2 786.0	4 496.0	2 784
9	0.531 25	3 765.0	2 920.0	4 263.0	2 870

2.3 30 份棉拭子标本检测结果 将 30 份棉拭子浸泡在 700 μL 生理盐水中 10 min 充分洗脱细胞,混匀后各取 300 μL 进行检测。两种方法均成功检出内参 Globin 24 份标本(80.0%),5 份标本均检测失败。另外,磁珠法 HPV 阳性率为 54.2%,而煮沸法为 41.7%($P=0.564$)。见表 3。

表 3 30 份棉拭子标本检测结果(n)

煮沸法	磁珠法			总计
	阳性	阴性	检测失败	
阳性	10	0	0	10
阴性	2	11	1	14
检测失败	1	0	5	6
总计	13	11	6	30

3 讨 论

随着人们健康意识的增强,HPV 筛查项目得到普及,检查量与日俱增。迄今为止,HPV 筛查不仅应用于女性妇科疾病^[7]、皮肤性病检查^[8],还广泛应用于男性泌尿及生殖系统疾病检查^[9]。多重 PCR-流式荧光杂交技术检测 HPV-DNA 分型在临床中已广泛应用^[5-6],但在实际工作中,影响因素较多,如实验室条件、实验人员技术、标本状态等。日常工作中发现,虽然严格遵循采样操作程序或避开经期取样,相当部分患者的脱落细胞标本仍带有明显血性,这可能是采样不慎,或更多由于采样部位发生病变所致。而皮肤科患者及男性患者所采集的棉拭子标本通常细胞含量较少。血性标本、细胞量少的标本可通过影响核酸提取的质和量导致检测失败,因此采用纯度好、效率高的核酸提取技术至关重要。为此,本研究对基于手

工提取的煮沸法和基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的磁珠法的核酸提取效率进行了比较,旨在解决检验工作中的实际问题,更好地服务临床。

D' SOUZA 等^[10]指出,尽管是来源于同一份 HPV 标本,前处理方法的不同也会导致 HPV 分型的差异。为使结果具有可比性,本研究在试验设计上除核酸提取过程不同外,其余操作包括标本量、模板上样量、扩增试剂、扩增程序及结果读取均相同。对比试验显示,两种方法结果一致性为 91.7%,说明两种核酸提取方法具有可比性;而 8 份结果不一致的标本,经酚抽提法验证,其结果与磁珠法一致,均为弱阳性,说明磁珠法对于病毒表达量低的标本更敏感。磁珠法内参 Globin 及 HPV 亚型信号值均显著高于煮沸法也支持上述观点。

通过体外模拟不同程度溶血环境发现,Hb 对以煮沸变性为原理的核酸检测技术存在干扰,而对以磁珠法为提取原理的检测则无干扰,并且各种 Hb 水平下的信号值相差不大。研究表明,标本中的红细胞可通过血红素的卟啉环与 Taq 酶产生不可逆结合而抑制 Taq 酶的活性,导致 PCR 反应受到抑制。溶血血清和非溶血血清其乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 荧光定量 PCR 检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$)^[11]。而谢秋华等^[12]研究得出,HPV-DNA 扩增检测结果不受溶血标本影响,可能与其实验的最高 Hb 水平仅为 10 g/L 有关。

本课题组认为,溶血会抑制 PCR 反应毋庸置疑,不同学者得出的不同结论主要取决于所用核酸提取方法是否能有效去除各种抑制物。本研究中的煮沸法操作简便,但提取过程无纯化步骤,黏蛋白、免疫球蛋白、蛋白酶和多糖等内源性 PCR 抑制物无法去除,通过干扰核酸提取过程的细胞裂解或者通过抑制 DNA 聚合酶活性而干扰 PCR 反应^[13]。而磁珠法首先将游离的核酸分子特异地吸附到磁性颗粒表面,与蛋白质等杂质分离,在磁场作用下经过 2 次洗涤,血红素中的卟啉环和黏蛋白等干扰物均能被有效去除,从而保证核酸提取的高纯度。酚抽提法则是以吸附柱为纯化介质,其亦能有效去除杂质,检测结果支持磁珠法。

对于棉拭子标本,实际工作中检测失败的概率较高,本研究中 30 份标本有 5 份标本采用两种方法均检测失败,说明采样失败的可能性极大,结果报告为内对照信号低。而成功检测的 24 份标本中,磁珠法的阳性率高于煮沸法,虽然差异无统计学意义($P > 0.05$),仍可说明在细胞含量较少的情况下,磁珠法能够更加充分地提取标本核酸,从而提高检测的敏感度和结果准确度。

美国 Perkin Elmer 公司生产的 Pre-NAT 全自动核酸提取系统,是由美国 Janus 全自动加样平台和德国 Chemgic 磁珠提取技术综合而成,一次性可处理 96

份标本,实现了磁珠法提取的全自动化,顺应了实验室检测自动化的发展趋势。该平台还可进行血清 DNA 的提取用于 HBV-DNA 定量检测^[14],用途广泛。

与煮沸法相比,磁珠法提取的核酸纯度更高,提取效率更高,能够提高下游检测敏感度,在临床常见血性标本和皮肤、泌尿生殖道棉拭子标本 HPV 的核酸检测中具有明显优势。全自动平台的使用能减少人力、物力成本,避免人为失误,提高工作效率。综上所述,基于 Pre-NAT 全自动核酸提取系统的磁珠法操作简便、规范,检测通量高,抗干扰能力强,更适用于临床。

参考文献

[1] ZHANG S K, GUO L W, CHEN Q, et al. The association between human papillomavirus 16 and esophageal cancer in Chinese population: a meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 99-104.

[2] BLUMBERG J, MONJANE L, PRASAD M, et al. Investigation of the presence of HPV related oropharyngeal and oral tongue squamous cell carcinoma in Mozambique [J]. Cancer Epidemiol, 2015, 39(6): 1000-1005.

[3] HILL-DANIEL J, ROETT M A. Genital cancers in women; vulvar cancer[J]. FP Essent, 2015, 438(1): 31-43.

[4] GILLISON M L, RESTIGHINI C. Anticipation of the impact of human papillomavirus on clinical decision making for the head and neck cancer patient[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2015, 29(6): 1045-1060.

[5] 陈昭华, 赵星, 徐红星. 流式荧光杂交法检测人乳头瘤病

毒的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(6): 658-686.

[6] 俞钱, 徐红星, 朱琴芳. 流式荧光杂交法检测人乳头瘤病毒基因型的临床应用[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 262-263.

[7] AGORASTOS T, CHATZISTAMATIOU K, KATSA-MAGKAS T, et al. Primary screening for cervical cancer based on High-Risk human papillomavirus(HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119755.

[8] 何泳洁, 曹碧兰, 汪治国, 等. 132 例皮肤疣组织人乳头瘤病毒分型检测[J]. 中华皮肤科杂志, 2012, 45(7): 515-516.

[9] 吕兴, 马兰芳, 杨书红. 男性 HPV 感染的流行病学研究进展[J]. 现代预防医学, 2015, 42(15): 2701-2703.

[10] D'SOUZA G, SUGAR E, RUBY W, et al. Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5526-5535.

[11] 刘小敏, 唐恒锋, 李文郎, 等. 高脂血、溶血标本对荧光定量聚合酶链反应测定低水平 HBV-DNA 的影响[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(21): 3217-3218.

[12] 谢秋华, 有军. 溶血及宫颈黏液对人乳头状瘤病毒 DNA 检测结果的影响[J]. 中国卫生产业, 2014, 11(4): 8-10.

[13] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 70-71.

[14] 李文静, 徐红星, 陈昭华, 等. 基于 Pre-NAT 全自动核酸检测系统的 HBV-DNA 超敏检测试剂方法学性能验证[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(7): 532-534.

(收稿日期: 2017-08-28 修回日期: 2017-12-14)

(上接第 763 页)

触镜应用于单眼白内障摘除联合人工晶状体植入术后屈光参差患者的研究[J]. 临床眼科杂志, 2016, 24(1): 74-76.

[2] 贺贵云, 段国平, 李东伟, 等. 高度近视白内障患者多焦点人工晶体植入的临床效果观察[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(2): 67-70.

[3] 何守志. 白内障及其现代手术治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 1993: 18-21.

[4] 何吕福, 余相均, 赵士鑫, 等. 后发性白内障患者行后囊膜切开术后视觉相关生活质量的评价[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(4): 346-349.

[5] 高蓉蓉, 郭燕, 陈海丝, 等. 中国版视功能指数量表的修订及其在白内障患者生活质量评估中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(9): 823-828.

[6] 付书华, 刘菲, 张倩, 等. AcrySof ReSTOR 及 Tecnis ZMB00 多焦点人工晶状体植入术后视觉质量的比较[J]. 眼科新进展, 2015, 35(6): 572-575.

[7] 罗艳, 鲁铭, 王晋瑛, 等. Tecnis ZMB00 多焦点人工晶状

体的临床应用疗效分析[J]. 眼科新进展, 2015, 35(3): 279-282.

[8] 付书华, 刘桥生, 彭灵, 等. Tetrafle 可调节人工晶状体与 ZMB00 多焦点人工晶状体植入术后视功能的比较[J]. 广东医学, 2016, 37(19): 2899-2901.

[9] 赵晓彬, 马清敏, 贾志旸. 白内障术后不同全眼球差对视觉质量的影响[J]. 国际眼科杂志, 2014, 14(10): 1793-1796.

[10] 曾强, 傅小进. 单焦点 IOL 植入术后 RGPCL 诱导屈光参差后的视觉质量[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2016, 18(1): 45-49.

[11] 郭沃文, 张子峰, 源静华, 等. 超声乳化联合植入不同非球面人工晶体治疗白内障术后视觉及对比敏感度的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2015, 40(7): 883-885.

[12] 赵阳, 赵世强, 谷去非, 等. 两种非球面衍射型多焦点人工晶状体植入术后的短期视觉质量比较[J]. 眼科, 2015, 8(6): 369-372.

(收稿日期: 2017-08-19 修回日期: 2017-11-02)