

一种从人血凝块中提取基因组 DNA 的方法

陈立* 姜莉 罗阳 张学

(中国医科大学医学基因组学研究室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 介绍了一种新的从人血凝块中提取基因组 DNA 的方法, 用该方法提取的 DNA 成功地应用于 PCR 和限制性酶切等后续实验中。基本过程为首先机械粉碎, 然后高盐高 EDTA 溶液处理, 含蛋白酶 K 和 SDS 的消化液变换温度消化, 苯酚氯仿抽提。

关键词 血凝块; DNA 提取; 聚合酶链反应

从外周血中提取基因组 DNA, 在取血时常加入枸橼酸钠或 EDTA 抗凝集, 但即使这样, 保存较长时间后, 也会产生血块, 给提取带来困难, 许多珍贵的临床血液标本就这样被弃掉, 也许以后很难再搜集到。我们在研究中历时 5 年积累了几百例癌症病人的血液标本, 这些病人绝大多数已去世。随着一些新基因的发现和许多已知基因新功能的确定, 需要重新研究这些癌症病人, 但相当一部分血液样本已成为血凝集块, 用常规方法提取产量低且不能很好用于 PCR 等后续实验。经过反复实验, 我们建立了一种新的有效的从血块中提取基因组 DNA 的方法, 用该方法提取的 DNA 成功地应用在 PCR 和限制性酶切等后续实验中。基本过程为首先机械粉碎, 然后高盐高 EDTA 溶液处理, 含蛋白酶 K 和 SDS 的消化液变换温度消化, 苯酚氯仿抽提。

1 材料与方法

1.1 材料

血液样本为本实验室保存的癌症病人的血液标本, 以及新鲜 EDTA 抗凝血, 血清分离管处理的正常人外周血, 均 -70°C 保存。

1.2 方法

1.2.1 血块的预处理 取含血块的血适量, 加 500 μl 生理盐水, 浸泡 10 min, 8000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。

1.2.2 提取基因组 DNA 将上一步的沉淀机械磨碎, 注意不要过度破碎。加含 80 g/L NaCl 和 10% EDTA 的溶液 500 μl , 颠倒混匀后静置 10 min, 8000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 加消化液 500 μl (含 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS,

300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K), 56°C 2 h, 其中每隔 0.5 h 颠倒混匀一次, 然后变换温度至 37°C 过夜。再加等体积的饱和酚, 充分混匀, 10 000 r/min 离心 5 min。将水相移入一新管, 再加等体积的饱和酚抽提两次。取水相加 1:1 饱和酚与三氯甲烷 500 μl 混匀, 10 000 r/min 离心 5 min。取水相, 加 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L, pH 5.2, 30 μl 左右), 混匀, 再加 2 倍体积的无水乙醇, 10 000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 加 75% 乙醇 (500 μl) 洗一次, 10 000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 尽可能吸干液体, 37°C 温箱, 放置 5 min。TE 溶解, 如有不溶物, 用蛋白酶 K 处理后再重新溶解。 -20°C 保存。

1.2.3 DNA 浓度检测 紫外分光光度法测定提取的 DNA 的紫外吸收峰, 计算 DNA 浓度。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体积为 20 μl , 其中含约 20 ng 基因组 DNA 模板, 2 μl $10\times$ PCR 缓冲液, 引物各 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶, dNTP 各 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。反应条件: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 30 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72°C 延伸 5 min。

1.2.5 PCR 产物鉴定 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化回收后进行双向直接 DNA 测序。

2 结果

表 1 列出了应用常规方法^[1]和本文方法提取几种血液样本的 DNA 提取量。结果显示, 常规方法提取血块 DNA 收率很低, 采用本方法提取基因组

收稿日期: 2004-03-02 接受日期: 2004-03-31

* 通讯作者。 Tel: 024-23256666-5532, Fax: 024-23265539, E-mail: chenlisy@yahoo.com

表1 各种血液样本的DNA提取量

血液样本	常规方法DNA提取量	本文方法DNA提取量
	(mg/L)	(mg/L)
新鲜EDTA抗凝血	41.2±10.7	40.7±9.7
新鲜加促凝剂的血块 ^a	13.2±7.0	32.5±8.2 [*]
保存1年的EDTA抗凝血块	9.4±4.8	20.7±3.8 [*]
保存2年的EDTA抗凝血块	5.0±3.2	15.6±3.1 [*]

^a新鲜加促凝剂的血块是指临床用的血清分离管(SST)采集的血,预加促凝剂,并含有惰性分离胶将血清与血细胞分开。计算时体积是指全血(包括其中的血凝块)的体积。^{*} $P < 0.01$ 。

DNA, 获得了较高的收率。对于新鲜EDTA抗凝血, 两种方法无差别。PCR反应选择我们正在研究的BTAK基因的一段长289 bp的序列进行扩增, 利用本方法提取的DNA均获得了良好的结果(见图1), 常规方法提取的血块DNA没有扩增出目的片段。我们提取了一百多例血块标本, 结果表明, 保存时间越长的样本其基因组DNA收率越低, 但对于PCR扩增反应没有影响, 并且被实验室其他人员用于扩增别的一些基因片段及进行酶切反应。

3 讨论

最初我们采用文献[1]的方法提取血块基因组DNA时, 大部分样本收率很低, 且用于PCR反应时扩不出产物, 我们分析原因可能是血凝集后红细胞不易破碎。红细胞中没有DNA, 提取的都是白细胞中的DNA, 但提取的效率取决于红细胞是否能

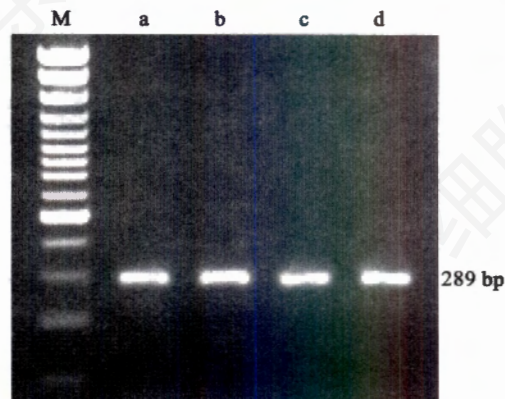


图1 本文方法提取DNA的PCR扩增产物检测

M: marker; a: 新鲜EDTA抗凝血; b: 新鲜加促凝剂的血块; c: 保存一年的EDTA抗凝血块; d: 保存二年的EDTA抗凝血块。

被完全裂解, 因为未裂解的红细胞在后续步骤中会与白细胞中的DNA一同被离心沉积, 从而影响DNA的收率和纯度质量。同时白细胞被红细胞包裹, 也影响DNA的提取。经过反复实验, 我们建立了高盐高EDTA溶液处理, 变换温度消化的提取血块中基因组DNA的方法。高盐高EDTA溶液对于破坏血块中的红细胞膜有显著的效果, 又因为Ca²⁺在凝集中起主导作用, 故高浓度EDTA溶液可以螯合Ca²⁺, 从而破坏凝集。我们通过实验确定了高盐高EDTA溶液的最佳浓度为80 g/L NaCl和10% EDTA。

参考文献 (References)

- [1] 李尹雄. 核酸的分离与纯化. 见: 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术(第二版), 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 102

A Simple Method for DNA Extraction from Human Blood Clot

Li Chen*, Li Jiang, Yang Luo, Xue Zhang

(The Research Center for Medical Genomics and Key Laboratory of Cell Biology Affiliated to Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract The method described here enables to extract DNA from human blood clots. The key procedures included: blood clots were homogenized with 80 g/L NaCl and 10% EDTA, the homogenized samples were lysed with 500 μ l of digestion buffer (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS, 300 μ g/ml proteinase K) and incubated for 2 h at 56 °C, then the homogenized samples were incubated overnight at 37 °C. This method was reliable for obtaining high quantities of DNA suited for PCR and restriction digest.

Key words blood clot; DNA extraction; PCR

Received: March 2, 2004 Accepted: March 31, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5532, Fax: 86-24-23265539, E-mail: chenlisy@yahoo.com