

## · 技术方法 ·

## 从冻藏凝血块中制备 DNA 技术

赵庆伟 申 萍 周梦玲 张 华 余铭鹏

中国协和医科大学基础医学院病理学教研室,  
(中国医学科学院基础医学研究所病理学研究室, 北京 100005)

## DNA Preparation from Frozen Blood Clots

ZHAO Qing-Wei, SHEN Ping, ZHOU Meng-Ling,  
ZHANG Hua and SHE Ming-Peng

(Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

## ABSTRACT

In order to extract genomic DNA from frozen blood clots, a new exclusive method was established. Long time application of it indicates that this method is easy, stable and expeditious. About 30  $\mu$ g DNA is obtained from 1  $\text{cm}^3$  clot. It is very suitable to prepare genomic DNA from large samples of blood gotten in epidemic fields survey.

**KEY WORDS** DNA preparation; Blood clot

**摘要** 从凝血块中分离 DNA 技术在现有分子生物学实验技术参考书中没有具体的叙述。本文归纳出一套自冻藏凝血块中制备高分子量基因组 DNA 技术, 经长期应用表明该方法简便可靠, 易于掌握, 可快速地进行大量标本的 DNA 制备, 尤其适用于流行病学现场调查采集的血液标本的处理。

现代分子生物学实验技术的主要参考书中所介绍的从血液标本中制备 DNA 技术主要是从加有抗凝剂的血液中提取, 有关如何从凝血块中制备 DNA 没有详细介绍。然而在某些情况下并不能及时处理血样, 或者由于实验设计

的特殊要求不能加抗凝剂。此时, 只好将凝血块冻存, 留待以后处理。本文在长期大量实验基础上, 结合常用的真核细胞 DNA 制备方法总结归纳出一套简便易行而结果可靠、稳定的自冷冻凝血块中提取 DNA 的技术, 现报告于此, 谨供参考。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器设备

高速低温离心机, 恒温水浴箱, 紫外分光光度仪。

## 1.2 试剂及应用液

1.2.1 细胞裂解液 0.32 mol/L 蔗糖, 10 mol/L TrisCl (pH 7.6), 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1% Triton X-100。

1.2.2 蛋白酶 K 反应缓冲液 10 mmol/L TrisCl (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 20 mg/L 胰 RNA 酶。

1.2.3 20 g/L 蛋白酶 K 贮存液。

1.2.4 TE 溶液 10 mmol/L TrisCl (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

1.2.5 酚氯仿提取液 酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1 (V/V)。

1.2.6 无水乙醇。

## 1.3 操作步骤(小量制备)

1.3.1 取 1  $\text{cm}^3$  冷冻凝血块放入 1.5 mL 离心管中;

1.3.2 加入适量冷却裂解液, 充分溶解;

1.3.3 在 4℃ 时, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清;

1.3.4 重复步骤 1.3.2 和 1.3.3 三至四次, 至上清为淡红色;

1.3.5 弃上清, 悬浮沉淀于 400  $\mu$ g 蛋白酶 K 缓冲液中 (使细胞充分发散, 充分混匀);

1.3.6 加入蛋白酶 K, 使终浓度为 100 mg/L, 混匀; 置恒温水浴箱中, 55℃ 消化 2 h。

- 1.3.7 加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V)提取液,充分混匀,再静置 10 min;
- 1.3.8 在 4℃低温下以 12 000 r/min 离心 10 min;
- 1.3.9 转移上层水相至一干净的 1.5 mL 离心管中;
- 1.3.10 重复 1.3.7、1.3.8 和 1.3.9 步骤两次;
- 1.3.11 加 2.5 倍于上清体积的无水乙醇,在 -20℃ 条件下过液沉淀;
- 1.3.12 12 000 r/min 于 4℃离心 5 min,弃上清,让酒精挥发干净,但不要让 DNA 彻底干燥;
- 1.3.13 用适量(30~50 µg)TE 溶液重新悬浮 DNA 沉淀(轻振荡),于 -20℃ 贮存;
- 1.3.14 测定 DNA 的 260/280 nm 光密度值,估计所制备 DNA 的纯度和含量。
- 1.3.15 电泳检测 DNA 分子量。

## 2 结果与讨论

上述操作步骤是以小量制备为例加以叙述的,可在只有台式高速低温离心机的条件下完成,以同样的方法也可大量制备。按此方法制备的 DNA 的 260/280 nm 光密度值一般在 1.9 以上。每 1 cm<sup>3</sup> 凝血块可获得大约 30 µg 的 DNA,所得的分子量多在 100 kb 左右,完全可以满足基本分子生物学实验要求。图 1(Figure 1)和图 2(Figure 2)是本实验室以应用该方法所制备的人类基因组 DNA 为模板,经聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增得到的 DNA 片断,结果颇佳。

此法简便可靠,易于掌握,可快速地进行大量标本的 DNA 制备,并且因没有加抗凝剂从而不干扰血浆各成份的测定,尤其适用于通过流行病学现场调查采集的血液标本的处理。在操作过程中需要特别注意的是步骤 1.3.3 至 1.

3.5 弃上清时,要适量保留浓稠部分,以免有核细胞及细胞核的丢失。另外,在裂解和消化时要充分混匀,使凝血块充分散开。

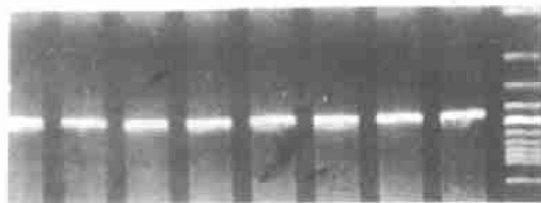


Figure 1. The 432 bp DNA products of PCR amplified from apo AI gene promoter.

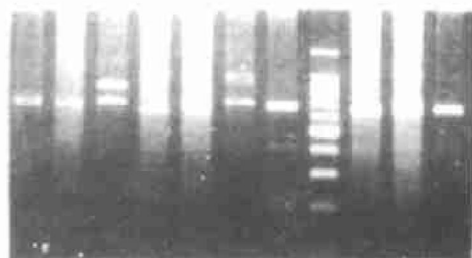


Figure 2. The various length DNA fragments of PCR amplified from apo B gene 3' VNTR.

## 参考文献

- 1 Buttone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem*. 1985; 31: 164.
  - 2 Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, et al. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. *Nucleic Acid Res*. 1990; 18: 5 908.
  - 3 Erlich HA. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, 1989; 35.
- (1998-07-13 收到。编辑:胡必利)