

四种全血基因组 DNA 提取方法的比较

范海荣¹, 夏永静², 孙福成¹, 何青¹

(1. 北京医院心内科, 2. 卫生部北京老年医学研究所; 北京市 100730)

[关键词] 基因组 DNA/提取方法; 盐析法; 酚-氯仿抽提法; 胍盐酸法

[摘要] 为比较酚-氯仿抽提法、经典 Miller 盐析法、改进的 Miller 盐析法及胍盐酸法提取人全血基因组 DNA 的方法, 分别测定所获 DNA 的效率和纯度。结果发现四种方法提取的 DNA 纯度分别为 1.62 ± 0.26 、 1.58 ± 0.28 、 1.61 ± 0.28 、 1.56 ± 0.27 , 各组间差异无显著性; 5 mL 全血所提 DNA 总量分别为 $64.0 \pm 33.0 \mu\text{g}$ 、 $30.3 \pm 26.9 \mu\text{g}$ 、 $11.1 \pm 9.2 \mu\text{g}$ 和 $65.2 \pm 24.0 \mu\text{g}$ 。酚-氯仿法和胍盐酸法提取的 DNA 总量明显高于其他两种方法。四种方法提取 DNA 的纯度相似, 酚-氯仿法和胍盐酸法的提取效率高, 胍盐酸法和盐析法的操作较简单、安全。胍盐酸法相对简单快速、安全、效率高, 为四种全血基因组 DNA 提取方法中之首选。

[中图分类号]

[文献标志码] A

分子生物学技术已经渗入到生物学、基础医学和临床医学多个方面, 人基因组 DNA 的提取是分子生物学研究的一项基础技术, 也是临床医生欲开展各种分子生物学相关研究的入门技术。了解一些基因组 DNA 提取方法的特点并掌握一种简单、安全、有效的 DNA 提取技术是很有必要的。为此, 我们比较了四种常用的全血基因组 DNA 提取方法, 评价它们各自的提取效果, 以方便初步开展分子生物学工作的临床医师选择。

1 材料和方法

1.1 血标本的提取

取空腹静脉全血 5 mL 于 EDTA 抗凝管中。

1.2 酚-氯仿法提取基因组 DNA^[1]

1.2.1 试剂 4% 葡聚糖溶液 (w/v); TES 溶液为 15 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 15 mmol/L EDTA (pH 8.0) + 15 mmol/L NaCl; 10% (W/V) 十二烷基硫酸钠; Tris 饱和酚; 氯仿: 异戊醇为 24: 1 (V/V); 蛋白酶 K 溶液 (20 g/L); TE 溶液为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); 1 mmol/L EDTA (pH 7.5~8.0)。

1.2.2 DNA 的提取 用葡聚糖悬浮法分离新鲜抗凝全血中的白细胞: 加 2.5 mL 4% 葡聚糖溶液于试管中, 将 5 mL 新鲜抗凝全血加于葡聚糖溶液之上, 净置 30 min 后, 吸取黄色上清 (白细胞悬液), 4°C 2 000 r/min 离心 10 min, 得到白细胞, 加双蒸水、

生理盐水各洗 1 次。在 5 mL 15 mmol/L TES 溶液中悬浮白细胞, 加蛋白酶 K 250~350 μg , 10% SDS 260 μL , 充分混匀, 置 37°C 过夜。冷却至 4°C , 加等体积 Tris 饱和酚, 充分混匀, 4°C 3 000 r/min 离心 30 min, 吸取上层溶液移至另一离心管。加等体积 Tris 饱和酚, 重复上一步 Tris 饱和酚抽提。加等体积氯仿/异戊醇, 充分混匀, 4°C 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取上层溶液移至另一离心管。加等体积氯仿/异戊醇, 充分混匀, 4°C 3 000 r/min 离心 5 min。吸取上层溶液至 2.5 倍体积冷 95% 乙醇中, 轻摇至 DNA 析出。用 70% 冷乙醇清洗 3~4 次。加适量 TE 溶液溶解 DNA。鉴定 DNA。

1.3 经典 Miller 盐析法提取基因组 DNA^[2]

1.3.1 试剂 STE 溶液为 20 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) + 0.2 mL 0.5 mol/L EDTA + 2 mL 5 mol/L NaCl, 加水至 1 000 mL; LYSE 溶液为 10 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.2) + 4 mL 0.5 mol/L EDTA + 80 mL 5 mol/L NaCl, 加水至 1 000 mL; 蛋白酶 K 溶液为 20 mL 0.5 mol/L EDTA + 10 mL 10% SDS + 100 mg 蛋白酶 K, 加水至 100 mL; 6 mol/L NaCl; TE 溶液为 0.121 g Tris + 0.2 mL 0.5 mol/L EDTA, 加水至 100 mL。

1.3.2 DNA 的提取 将冰冻抗凝全血置 37°C 水浴解冻。加 4 倍体积 STE 液, 颠倒混匀, 6°C 2 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 留细胞, 重复 3 次。加 1.5 mL LYSE, 0.5 mL 蛋白酶 K 溶液, 100 μL 10% SDS, 37°C 过夜。加 1.7 mL LYSE, 1.2 mL 6 mol/L NaCl, 6°C 2 000 r/min 离心 20 min。将上清加至 15 mL 冷无水乙醇中, 轻摇至 DNA 析出。用 70% 冷乙醇清洗 3~4 次, 加适量 TE 溶液溶解 DNA。鉴定 DNA。

1.4 改进的 Miller 盐析法提取基因组 DNA

[收稿日期] 2002-04-22

[修回日期] 2002-11-29

[作者简介] 范海荣, 女, 1975 年 3 月出生, 山东人, 在读研究生。夏永静, 女, 1967 年 1 月出生, 辽宁人, 博士, 副研究员, 从事心血管疾病发病机理研究。孙福成,

1.4.1 试剂 裂红液(RCLB)为 15.4 g NH₄Cl, 1.68 g NaHCO₃溶于 2 L 双蒸水中;裂白液(NLB)为 23.37 g NaCl+ 10 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.2)+ 20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),加水至 1 000 mL;NLB+SDS 缓冲液:300 mL NLB 加入 20 mL 10% SDS;6 mol/L NaCl;蛋白酶 K 溶液(20 g/L);TE 溶液为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)+ 1 mmol/L EDTA(pH 7.5~8.0)。

1.4.2 DNA 的提取 将冰冻抗凝全血置 37℃ 水浴解冻。加入 4 倍体积裂红液,混匀,4℃ 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,重复一次,至细胞团呈粉白色。加 8 倍体积的生理盐水并混匀,4℃ 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,得到白细胞。加 3 mL NLB+SDS 缓冲液,50 μL 蛋白酶 K 溶液,400 μL 10% SDS 溶液,混匀,37℃ 过夜。加入 1/4 体积 6 mol/L NaCl,颠倒混匀,4℃ 2 500 r/min 离心 20 min。吸上清于 2 倍体积冷无水乙醇中,轻摇至 DNA 析出。用 70% 冷乙醇洗 DNA 2~3 次,溶于 TE 溶液。鉴定 DNA。

1.5 胍盐酸法提取基因组 DNA

1.5.1 试剂 7.5 mol/L 胍盐酸液:72 g 胍盐酸,10 mL 1 mol/L Tris-HCl,加水至 100 mL;蛋白酶 K 溶液(10 g/L);10% (W/V) 十二烷基硫酸钠(SDS)。

1.5.2 DNA 的提取 用改进的 Miller 盐析法提取白细胞的方法得到白细胞,加入 400 μL 双蒸水,300 μL 10% SDS,40 μL 蛋白酶 K 溶液,300 μL 7.5 mol/L 胍盐酸液,放入 70℃ 水浴 30 min,不时地摇匀。10 000 r/min 高速离心 4 min。吸上清于 2 倍体积冷无水乙醇中,轻摇至 DNA 析出。用 70% 冷乙醇洗 DNA 2~3 次,溶于 TE 溶液。鉴定 DNA。

1.6 DNA 鉴定方法

应用紫外分光光度仪在 260 nm 和 280 nm 下测定 DNA 样本的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 吸光度值,计算所提样本的纯度和总量。DNA 纯度以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为依据;DNA (mg/L) = OD₂₆₀(50) 稀释倍数。

1.7 统计方法

所有数据输入计算机,使用 SPSS 软件包(SPSS 8.0 for Windows)。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用两两比较的 *t* 检验或方差检验, $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

四种方法提取基因组 DNA 的纯度和总量见表 1。可见四种方法所提取的 DNA 纯度相似,各方法

间差异无显著性。酚-氯仿法和胍盐酸法提取效率,高于其它两种方法(P 均 < 0.01)。四种方法所用白细胞数无统计学差异(表 1)。将所提取的 DNA 用于基因多态性分析,效果相同^[3-5]。

表 1. 四种方法提取的 DNA 的纯度与总量(μg)及所用全血白细胞数($\times 10^9/\text{L}$)比较($\bar{x} \pm s$)。

方 法	<i>n</i>	DNA 纯度	DNA 总量	白细胞数
酚-氯仿法	53	1.62 ± 0.26	64.0 ± 33.0	6.96 ± 1.93
经典 Miller 盐析法	26	1.58 ± 0.28	30.3 ± 26.9 ^a	6.97 ± 1.87
改进 Miller 盐析法	82	1.61 ± 0.28	11.1 ± 9.2 ^a	6.47 ± 1.65
胍盐酸法	70	1.56 ± 0.27	65.2 ± 24.0	6.70 ± 1.90

a: 分别与酚-氯仿法和胍盐酸法比较, P 均 < 0.01 ,余各组间的比较差异均无显著性。

3 讨论

通过对酚-氯仿抽提法、经典 Miller 盐析法、改进的 Miller 盐析法和胍盐酸法的比较,我们发现四种方法提取的 DNA 的纯度相似,酚-氯仿法和胍盐酸法提取 DNA 总量最多。相对于酚-氯方法而言,胍盐酸法与盐析法较简单、安全(有机溶剂的毒性),而胍盐酸法更加省时,更适合于临床研究使用。

此外,我们在全血样本采集时发现同样量的动脉血和静脉血提取 DNA 的量有差别,同样方法动脉血样本提取 DNA 的量低于同等量的静脉血,我们进一步比较了一组病人的动脉血和静脉血的白细胞数目,发现动脉血白细胞数目均低于相同量的静脉血,其原因有待进一步探讨。因此,静脉血仍然是提取基因组 DNA 的最好材料。

[致谢] 卫生部北京老年医学研究所遗传室提供改进的 Miller's 盐析法。卫生部北京老年医学研究所细胞室提供胍盐酸法。北京医院心内科导管室林颖、杨玉珍、沈月莉、王树华协助标本采集。

[参考文献]

- [1] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 677
- [2] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 1 215
- [3] 国汉邦, 唐蔚青, 秦斌, 等. 老年痴呆患者载脂蛋白 E 基因型分布. *中华老年医学杂志*, 1997, **16** (6): 193
- [4] 夏永静, 王抒, 沈霞. 北京上海地区载脂蛋白 E 血清浓度和基因型与血脂浓度关系的比较. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (5): 1-
- [5] 夏永静, 秦斌, 满永, 等. 四氢叶酸还原酶基因 C677T 突变与阿尔海默病有关. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2002, **9**: 230-234

(此文编辑 胡必利)