

盐析法 DNA 提取—大体积血液 DNA 提取

简介

血液是人类样品中取材最为广泛的样品。血液样品中含有大量的基因组 DNA，是分子生物学、疾病研究、检测理想的材料来源。从血液样品提取基因组 DNA 是研究者经常碰到的任务。目前提取血液中基因组 DNA 的方法有许多，常用的方法有酚氯仿抽提，硅胶柱纯化，二氧化硅磁粒纯化，离子交换层析，以及盐析法等等。这些方法各有各的优缺点。如酚氯仿抽提，虽然可在实验室中简单配制以达到节省经费的目的，但是却存在使用危险化学品，以及得到的 DNA 纯度低等不良因素。又如商品化的硅胶柱，磁珠纯化或离子交换的试剂盒，虽然可快速地得到稳定良好的产量，但往往是价格不菲，给研究者带来压力，特别是处理大体积血液样品(1-10ml)时，一次样品就需要 30-200 元不等，这对大规模筛选的研究者来说，是一笔相当大的开销。Magen 公司提供的 SolPure Blood DNA Kit 采用改良盐析法技术，是提取大体积血液样品 DNA 最为经济节省的选择。

盐析法 DNA 提取方法，是于 1988 年，Miller 建立的一种安全而经济的提取技术。它的原理是在组织裂解液中，通过加入高浓度盐溶液(KI, KAC, NaCl, NH₄Cl 等)，来盐析去除蛋白质，脂类和碳水化合物等杂质，达到分离纯化 DNA 的目的。该方法是完全基于溶液型的抽提方式，对样品用量没有限制，可灵活调整用量，而且操作过程无毒安全，是大量样品 DNA 提取非常好的选择。Magen 公司将该方法进行创新和改良，发展出更稳定更高效的盐析法试剂盒：SolPure DNA Kits 系列产品。SolPure Blood DNA Kit 是专门为血液 DNA 而设计的。为进一步比较和检测该方法的稳定性，我们选择人体抗凝血液，并用 SolPure Blood DNA Kit 提取其 DNA，然后电泳，测 OD 值，PCR 来检测 DNA 的纯度和完整性。

实验方法

选择以下不同组织样品进行 DNA 提取实验，每个样品重复 2 次。

- 1ml 人体抗凝血液
- 10ml 人体抗凝血液
- 3 ml 抗凝的长期放置的血液(-20℃保存三年)
- 5 ml 猪的抗凝血液
- 1 ml 凝固的猪血液

凝固的猪血液的处理：取 2g 的凝固的猪血液放置于 50ml 离心管中，用机械匀浆器匀浆 30 秒两次，使凝固的猪血液重新分散。(也可以用玻璃匀浆器进行匀浆)，取 1ml 匀浆的血液按正常血液进行操作。

操作方法(按 SolPure Blood DNA Kit 进行)，简单描述以下：

1. 取一定体积的血液样品，放置于 15ml 或 50ml 离心管中；
2. 加入 3 倍体积 RBC Lysis Buffer，涡旋混匀；
3. 室温放置 5 分钟，其间颠倒混匀一次；
4. 2,000 x g 离心 5 分钟。小心倒弃上清液。(处理 3ml 过期血液时，吸弃上清液，余下 1ml 的溶液和沉淀物)
5. 涡旋重悬白细胞；
6. 加入与血液体积相等的 Cell Lysis Buffer，涡旋混匀；
7. 37℃水浴 10-120 分钟。(处理过期血液时放置 120 分钟)

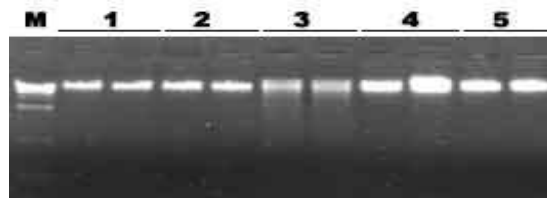
8. 加入 RNASE，37℃水浴 30 分钟；
9. 加入 1/3 体积的 Protein Precipitate Solution，剧烈涡旋混匀 30 秒；
10. 室温，2,000 x g 离心 5 分钟；
11. 取上清液，加入等体积的异丙醇(过期血液加入 40ul Glycogen)。颠倒 30-50 次混匀；
12. 室温，2,000 x g 离心 5 分钟；
13. 小心倒弃上清液，加入 70% 乙醇。颠倒几次混匀；
14. 室温，2,000 x g 离心 5 分钟；
15. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上干燥 5-10 分钟；
16. 加入 Elution Buffer，涡旋 10 秒；65℃放置 1 小时；
17. 转移至 4℃冰箱放置过夜，让 DNA 充分溶解。

实验结果

1. **DNA 的纯度：**取纯化的 DNA 用 Buffer TE 稀释 11 倍后，在 Beckman DU640 测量 OD260, OD280, OD230, OD320，列表如下。测量结果表明，得到的 DNA 纯度均可达到 1.8 以上。(溶解体积表中未列出)

样品	260	280	230	纯度	产量 ug
1ml 人体血液	0.1412	0.0796	0.1049	1.8	38.8
	0.1415	0.0804	0.0881	1.8	38.9
10ml 人体血液	0.1511	0.0851	0.1289	1.8	332.4
	0.1763	0.0894	0.1504	2.0	387.9
3ml 过期血液	0.1889	0.0989	0.1412	1.9	155.8
	0.1921	0.0952	0.1443	2.0	158.5
5ml 猪血	0.2894	0.1529	0.1281	1.9	397.9
	0.2999	0.1703	0.1412	1.8	412.4
1ml 凝固血液	0.2332	0.1312	0.1741	1.8	64.1
	0.2294	0.1219	0.1702	1.9	63.1

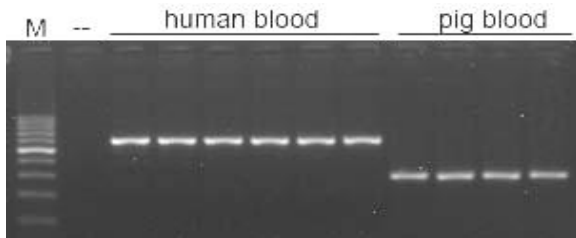
2. **DNA 完整性：**取 2ul 纯化的 DNA 上样于 0.8% 琼脂糖凝胶 80V 电泳 30 分钟，并用 Lambda DNA/Hind III Marker 作为对照，电泳，拍照。由图可知，使用该试剂盒得到的基因组 DNA 完整性好，无拖尾现象，片段都大于 23KB 以上。



M: Lambda DNA/Hind III Marker, 1: 1 ml 人体抗凝血液, 2: 10 ml 人体抗凝血液, 3: 3 ml 抗凝过期血液(-20℃保存三年), 4: 5 ml 猪的抗凝血液, 5: 1 ml 凝固的猪血液

3. PCR 验证

选取人类 PP1 引物(大小约为 600bp)和猪特异性引物(大小约为 300bp)上述纯化产物进行 PCR 验证，电泳图结果如下：



—: 阴性对照

M: 100bp Marker

相关问题回答

1. 影响 DNA 纯度的关键因素是什么？

答：由于盐析法操作非常简单，因而对血液用量或试剂的用量很敏感。试剂用量 (Cell Lysis Buffer 和 Protein Precipitate Solution) 宁多勿少是最为关键的。其次是加入 Protein Precipitate Solution 之后，必须剧烈涡旋 30 秒，让蛋白质充分地盐析出来。不充分的涡旋混匀会明显影响纯度。

2. RNase A 消化时间以及 RNA 的污染？

答：异丙醇沉淀回收核酸，对 DNA 和 RNA 没有选择性，因而 RNASE 的作用时间非常重要。RNASE 作用时间一般在 15-40 分钟内即可；只有 RNASE 充分作用让 RNA 降解成极小的片段，异丙醇才不会沉淀 RNA，得到的 DNA 才不会有 RNA 的污染。

3. 该试剂盒获得的 DNA 片段有多大？

答：使用该方法可获得大分子的基因组 DNA，脉冲电泳表明，该方法得到的 DNA 约为 50-150kb。

4. DNA 的溶解时间？

答：该方法得到的 DNA 分子量很大，会导致 DNA 很难溶解。我们建议加入 Elution Buffer/Buffer TE 后，放置 65℃ 处理 1 小时后，转移至 4℃ 冰箱过夜才能让 DNA 充分溶解。一般来说，当 DNA 产量比较低时 (<0.1ug/ul)，65℃ 处理 30 分钟后即可充分溶解。

5. 加入异丙醇沉淀 DNA 时，为什么有些样品有絮状沉淀，有些样品却没有絮状沉淀？

答：这主要跟血液贮藏条件有关。正常贮藏的血液一般都会有絮状沉淀出现。贮藏过久的血液，如贮藏于 -20℃ 超过 1 个月，或 4℃ 超过 1 个星期的血液，因 DNA 发生降解，一般不会出现絮状沉淀。

6. 处理过期血液样品时，如何提高产量和稳定性？

答：过期血液样品，因贮藏条件不妥，造成溶血或 DNA 降解损失，得到的 DNA 产量会比正常血液少 2-10 倍。由于盐析法采用异丙醇沉淀，而异丙醇沉淀很难沉淀回收少量的 DNA，因此处理贮藏过期或保存不当的血液时，加入糖原 (20mg/ml) 来可明显提高产量以及稳定性。

7. 该试剂盒能否处理鸟类、鱼类的血液样品？

答：可以。由于鸟类、鱼类血液样品中，红细胞也是带核的，不

需要裂解去除红细胞的过程，血液用量须大大减少。实验表明，10 ul 鸡血样品的 DNA 产量就有 20-30ug。

8. 该试剂盒能否从凝固的血液样品中提取 DNA？

答：可以。处理凝固的血液样品时，必须先利用匀浆器把血液充分打散后，再按正常操作进行。

9. 血液的正常贮藏条件？

答：一般 4℃ 保存不超过 1 星期；若要长时间保存可放于 -70℃，但基因组提取的质量会随着保存时间增长而降低。

10. 处理传染性的样品，采用盐析法，还是硅胶柱法？

答：处理大批量的血液样品时，选用盐析法可以节约大量的经费，但是由于盐析法需要进行白细胞分离过程，这个分离过程无法灭活传染性的病毒和微生物，如乙肝、金黄色葡萄球菌等。产生的红细胞裂解液，接触过的离心管都可能有一定的传源性，对操作者和实验环境都带来危险。使用硅胶柱纯化方式 (如 HiPure Blood DNA Midi Kit, HiPure Blood DNA Maxi Kit)，虽然价格比较昂贵，但不需对白细胞分离过程，血液可以同裂解液和蛋白酶一起混合，能快速灭菌病毒和其它传源性微生物，不产生传源性的废液，对操作者和实验环境更加友好。客户可根据血液的来源、传染性，以及经费的丰足程度来选择。