

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.034

• 技术与方法 •

两种外周血 DNA 提取方法的比较

王 丹 邓春青[△] 赵龙凤

(山西医科大学第一附属医院感染科 山西 太原 030001)

摘要 目的: 外周血 DNA 的提取是研究乙型肝炎病毒相关临床疾病的基础, 所提取 DNA 的质与量直接关乎下游研究的成败, 经济、高效、便捷的外周血 DNA 提取方法对于疾病分子水平的研究尤为重要, 本实验旨在比较两种外周血 DNA 提取方法, 从而为临床研究提供有力的参考。 **方法:** 以外周抗凝血为试验样本, 分别采用改良盐析法和 DNA 提取试剂盒法(硅胶柱纯化)进行基因组 DNA 的提取, 通过分光光度计测量 DNA 浓度和纯度, 并进行 PCR 扩增及电泳实验。比较改良盐析法与试剂盒提取法(硅胶柱纯化)的效果。 **结果:** 试剂盒提取法(硅胶柱纯化)标本用量甚微, 省时, 提取 DNA 纯度高, 步骤繁琐, PCR 条带单一、亮度差; 改良盐析法操作步骤少, 提取 DNA 浓度高, PCR 条带亮度佳、杂带多, 耗时长。 **结论:** 两组方法各有优缺点, 试剂盒提取法(硅胶柱纯化)可靠、快速, 但所获 DNA 量少、极易降解, 改良盐析法耗时, 但所获 DNA 浓度高、量多, 可根据实验时间与经费, 实验所需的 DNA 纯度与浓度, 提供的样本体积等不同的临床研究需求及条件来综合选择适宜的提取方法。

关键词: 基因组 DNA; 提取; 外周血

中图分类号: R446.11 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2015)06-1138-03

Comparison of Two Kinds of Peripheral Blood DNA Extraction Methods

WANG Dan, DENG Chun-qing[△], ZHAO Long-feng

(Shanxi Medical University First Affiliated Hospital Infection, Taiyuan, Shanxi, 030001, China)

ABSTRACT Objective: Extracted DNA from peripheral blood of hepatitis B virus-related clinical disease is the basis of researching, the quality and quantity of DNA extracted directly related to the success of downstream research. Economic, efficient and convenient peripheral blood DNA extraction method for the study of disease at the molecular level is particularly important. Our study was designed to compare the two kinds of peripheral blood DNA extraction method, thereby providing a strong reference for clinical research. **Methods:** Anticoagulation was used for the test sample. Improved salting-out method and DNA extraction kit method (purification by silica gel column) were used for genomic DNA extraction respectively, by spectrophotometer meter measured the DNA concentration and purity, PCR amplification and electrophoresis experiment was carried on. Comparison of the effect of improved salting-out and DNA extraction kit. **Results:** Kit (purification by silica gel column), which saved time, with higher DNA-purity and better DNA single PCR bands, had little dosage of extraction specimens. Improved salting-out method had easier operation and higher DNA-yield, but the PCR band included many impurity bands. **Conclusions:** Both the two methods had advantages and disadvantages, kit (purification by silica gel column) was reliable and fast, but received less DNA which was degraded easily, improved salting was time-consuming, but received higher DNA concentrations and the amount. According to different clinical research needs and conditions, for example, the experimental time and money, DNA purity and concentration required for the experiment, different volumes of the sample to provide comprehensive selection of suitable extraction method.

Key words: Genomic DNA; Extraction; Peripheral blood

Chinese Library Classification(CLC): R446.11 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1138-03

前言

随着生命科学研究的不深入, 基因水平的研究已覆盖医学各个领域, 尤其是临床相关疾病发病机制的研究。作为分子生物学实验的基础, 基因组 DNA 的提取尤为重要^[1,2]。在探

高迁移率族蛋白 B1 的基因多态性与乙型肝炎病毒引起的相关肝癌的关联性时, 如何快速有效的从肝癌患者外周血标本中提取高质量的人类基因组 DNA, 已经成为整个实验迫切需要解决的头号问题。提取 DNA 的纯度及浓度直接影响着 PCR、限制性片段长度多态性分析及基因测序等下游实验的成败^[19]。目前 DNA 的提取方法主要有: 酚 / 氯仿抽提法^[3,4]、碘化物法^[5,6]、固相吸附法^[7]、尿素提取法^[8]、TKM 提取法^[9]、异硫氰酸胍法^[10]、改良盐析法^[11,12]、基于各种原理的试剂盒提取法^[13-15]等多种方法^[16,17], 但考虑到酚氯仿等多种试剂对人体有害、醇类沉淀耗时、

作者简介: 王丹(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乙肝宿主遗传易感性, 电话: 15635373021, E-mail: wangdan10050@163.com

[△]通讯作者: 邓春青, E-mail: 06dengchunqing@163.com

(收稿日期: 2014-05-06 接受日期: 2014-05-30)

部分方法需要特殊的仪器及试剂、抽提 DNA 不理想等诸多因素, 现今临床实验室主要运用后两种方法进行人类基因组 DNA 的提取, 本文对改良盐析法和基于硅胶柱纯化方式的试剂盒提取法分别获取的 DNA 的浓度、纯度、相应的 PCR 产物条带进行比较, 以评价各自的优缺点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验标本 选择山西医科大学第一附属医院感染科门诊患者 10 例, 抽取外周静脉血 5 mL, EDTA 抗凝混匀, 备用。

1.1.2 试剂及设备 外周血 DNA 提取试剂(OMEGA); 分光光度计: 德国艾本德公司; PCR 扩增仪: ABI 公司 9600; 离心机: 中佳 HC-2516; 电泳仪: 北京六一公司 DYY-6C; 紫外凝胶成像仪: 美国 Bio-Rad 公司 Gel.Doc2000。

1.2 外周血 DNA 提取方法

1.2.1 试剂盒提取 DNA(硅胶柱纯化) (1)取 700 μ L EDTA 抗凝全血及 2100 μ L 1 $\times$ ERL Buffer 入 15 mL EP 中, 摇匀, 室温放置 5 min, 2000 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, 重复操作至沉淀为白色止。(2)重悬白细胞沉淀, 加 230 μ L WTL Buffer, 高速振荡, 使溶液变粘稠, 加 2 μ L RNase A 混匀, 室温静置 10 min, 加 250 μ L Buffer BL 振荡混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 适当摇匀, 加 250 μ L 无水乙醇, 振荡混匀。(3)将溶液全部转入套有收集管的 DNA 柱, 9000 $\times$ g 离心 1 min, 弃滤液, DNA 柱套入新收集管内, 加 500 μ L HB Buffer, 9000 $\times$ g 离心 1 min, 弃液。(4)DNA 柱装回收集管, 加 650 μ L DNA wash Buffer, 9000 $\times$ g 离心 1 min, 弃液, 重复操作一次。(5)DNA 柱套入收集管, 14000 $\times$ g 离心 2 min, 柱子装入 1.5 mL EP 管中, 加 65 μ L 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer, 室温静置 5 min, 10000 $\times$ g 离心 1 min 洗脱 DNA。(6)计算 DNA 纯度与浓度。

1.2.2 改良盐析法提取 DNA (1)收集 3 mL EDTA 抗凝血, 3000 rpm 离心 10 min, 用一次性塑料吸管吸出上层血浆, 分装

于 1.5 mL EP 管中, 将样品转移至 15 mL EP 管中, 加入红细胞裂解液 7 mL, 翻转混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。4500 rpm 离心 10 min, 去除红细胞。(2)充分振荡至沉淀消失, 加蛋白酶 K 20 μ L (浓度 20 mg/ml), 再加入 5 mL 白细胞裂解液, 充分抽打至溶液无稠性, 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。(3)放入 -20 $^{\circ}$ C 冰浴 5 min, 加入冷却蛋白沉淀剂 2.2 mL, 高速振荡 1 min, 4500 rpm 离心 10 min, 可见底部有褐色沉淀。(4)另取 15 mL EP 管, 加入 5 mL 异丙醇, 将上清液转移至其中, 轻摇, 可见云絮状 DNA 漂浮物。4500 rpm 离心 15 min, 弃上清, 避免将 DNA 倒出, 加 1 mL 75% 乙醇, 4500 rpm 离心 15 min, 保留沉淀。(5)室温下干燥 DNA, 加 0.5 mL TE 溶解 DNA, 放在 4 $^{\circ}$ C 恒温摇床中速振荡。(6)计算 DNA 纯度与浓度。

1.3 PCR 扩增 HMGB1 基因

上游: 5'-3'CCT TTG CCC AGT GTA TC, 下游: 5'-3'TGT ATG CCA AGC CAT TTG^[8]。PCR 反应体系 (25 μ L): 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mix (各 2.5 mM) 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 补充 ddH₂O 至总体积 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环次数 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延迟 5 min 结束 PCR 反应^[9]。

1.4 统计分析

两种提取方法的比较用 t 检验, 以 P<0.05 表示差异有统计学意义^[10], 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 UV 计测定结果

对所有 DNA 结果均用紫外分光光度测 A₂₆₀/A₂₈₀, 改良盐析法 DNA 浓度高于试剂盒提取法 (P<0.001), 差值的 95% 可信区间为 (16.57-25.67); 试剂盒提取 DNA 的吸光度比值高于改良盐析法 (P=0.042), 差值的 95% 可信区间为 (0.01-0.32) (表 1)。

表 1 两种方法提取 DNA 的浓度及纯度

Table 1 Both methods of extracting DNA concentration and purity

Subgroup	n	DNA Concentration(μ g/ml)	OD(260 nm/280 nm)
Improved salting-out	10	41.0 $\pm$ 10.6	1.96 $\pm$ 0.24
DNA extraction kit	10	19.8 $\pm$ 1.5	1.79 $\pm$ 0.09

2.2 2%琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)

2.3 PCR 扩增结果

扩增片段与预计片段大小一致 (图 2), 改良盐析法所获 PCR 产物明显亮于试剂盒提取法, 但拖带现象较为明显。

3 讨论

传统的基因组 DNA 提取方法存在操作步骤繁多、耗时长、标本需要量大、DNA 纯度低等诸多不足, 酚和氯仿等试剂长期接触对人体有害, 而碘化物法提取的 DNA 中的蛋白质难以除去, 可影响后续实验, 尿素法耗时长, 提取的 DNA 量不稳定。较为研究人员接受的基因组 DNA 提取方法主要有改良盐析法和

基于不同原理的各种试剂盒提取法。本研究将改良盐析法和采用硅胶柱纯化方式的试剂盒提取法进行比较, 发现两组间存在显著差异, 改良盐析法获得 DNA 浓度高于试剂盒提取法, 但 DNA 纯度却低于后者, 这与 Zhang^[11]在实验中指出采用醇类沉淀法得到的 DNA 产量与纯度均显著高于 DNA 分离柱纯化法的结果部分一致。改良盐析法所获得的模板 DNA 经 PCR 扩增后获得的产物条带较亮且存有拖尾现象, 试剂盒提取法获得的 PCR 产物条带单一、无拖尾, 但亮度不如前者, 与 Li^[12]的研究结果相似。对于后续基因多态性的实验结果, 试剂盒提取法不如改良盐析法理想, 与 Li^[12]的结果相反, 考虑可能与所使用的试剂盒种类、操作步骤、实验设备、样本等多种因素有关。改良盐

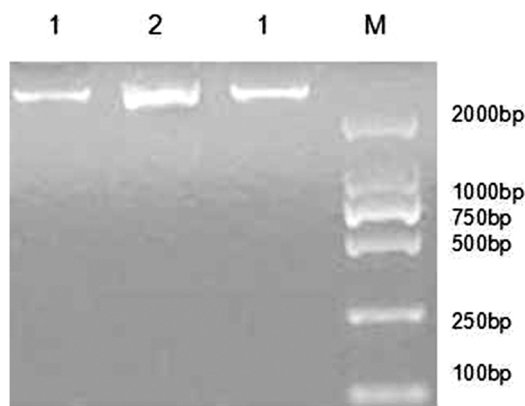


图1 基因组 DNA 凝胶电泳图

Fig.1 Genomic DNA gel electrophoresis

注:1:试剂盒提取 DNA;2:改良盐析法提取 DNA;M:DL2000 marker

Note:1:DNA extraction kit; 2:DNA by improved salting-out; 3:Marker: DL2000

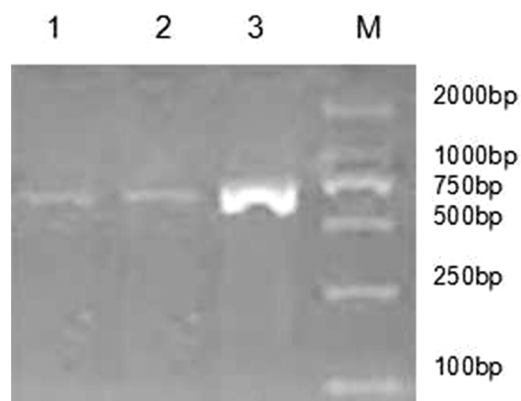


图2 PCR 扩增片段电泳图

Fig. 2 PCR amplified fragment electrophoresis

注:1、2:试剂盒提取法扩增 PCR;3:改良盐析法扩增 PCR;M:DL2000 marker

Note: 1, 2: PCR Amplification by Kit; 3: PCR amplification by improved salting; M: DL2000 marker

析法耗时较长,不适于小样本研究,试剂盒提取法操作步骤繁琐、成本高,不适于大批量样本研究。

改良盐析法与试剂盒提取法(硅胶柱纯化)各自存有优缺点,可通过实验要求的时间、提供的研究设备与经费,对 DNA 纯度与浓度的需求,样本的体积、批量等多方面的临床需求及条件综合考虑,选择合适的实验方法。

参考文献(References)

- [1] Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, et al. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine [M]. USA: CRC Press, 2004: 1-20
- [2] Sambrook J, Fritsh EF, Mantitatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual(The Third Edition) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 463-471
- [3] Wang Yun, Xu Dong-dong. Study of improved phenol-chloroform method to extract genomic DNA from human whole blood[J]. J Mod Med Health, 2013, 29(2): 161-162
- [4] Song Jie-yun, Liu Fang-hong, Ma Jun, et al. Comparison of phenol choroform method and salting out method for genomic DNA extraction[J]. Chin J Lab Diagn, 2013, 17(5): 802-805
- [5] Liu Jun, Hu Xiang-peng, Ma Sheng-gao, et al. Use of potassium iodide to extract genomic DNA from cryopreserved peripheral blood [J]. The Journal of Practical Medicine, 2010, 26(6): 917-918
- [6] Wei Jun, Zhang Zhen-zhen, Zhu Hui-lian, et al. Potassium iodide method: a quick way of genomic DNA extraction from human blood clotting[J]. Chin J Public Health, 2011, 27(4): 519-520
- [7] Zhang Bao-hua, Wang Hong, Chen Kun, et al. Comparison of three kinds of hepatitis C virus RNA extraction method [J]. Int J Lab Med, 2013, 34(20): 2736-2737
- [8] Zhu De-hua. Rapid purification of genomic DNA from whole blood[J]. J Henan Scie & Tech Univ (Medical Report), 2003, 21(1): 7-8
- [9] Zhao Jia-hun, Zhang Hua-ping, Comparison and improvement of peripheral blood DNA extraction methods [J]. J Shanxi Med Univ, 2006, 37(1): 12-14
- [10] Xu Wei-li, Du Ming, Li Qi-ming, et al. Comparison of the effects of two methods for four animal muscular tissue DNA extraction [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 81-84
- [11] Zhang Shuai, Xu Rui, Zhang Qiang, et al. Influencing factors on genomic DNA extraction from whole blood using modified salting-out method [J]. China Journal of Modern Medicine, 2012, 22(35): 42-46
- [12] Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, et al. Modified salting-out method:high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent[J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19(6): 229-232
- [13] Chacon-Cortes D, Haupt LM, Lea RA, et al. Comparison of genomic DNA extraction. techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(5): 5961-5966
- [14] Abd El-Aal AA, Abd Elghany NA, Mohamadin AM, et al. Comparative study of five methods for DNA extraction from whole blood samples[J]. Int J Health Sci, 2010, 3(1): 285-287
- [15] Podnecky NL, Elord MG, Newton BR, et al. Comparison of DNA extraction kits for detection of Burkholderia pseudomallei in spiked human whole blood using real-time PCR [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e58032
- [16] Zhang Dong-hui, Shi Ying-qin, Zhang Wen-jie. Peripheral blood DNA extraction methods and characteristics [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11(11): 2167
- [17] Li Xiao-xiao, Zhao Huan-ying, Yang Yun-ting, et al. Comparing the Three Methods to Extract Human Genomic DNA from Whole Blood [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(27): 5221-5225
- [18] You Chao, Zhao Da-qiu, Liang Cheng-bang, et al. Methods of PCR primer design [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011, 17: 48-51
- [19] Deng Chun-qing, Deng Guo-hong, Wang Yu-ming, HMGB1 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. World Gastroenterol, 2013, 19(31): 5144-5149
- [20] Zhao Nai-qing. Clinical study design and data analysis[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2005: 134