

• 论 著 •

改良碘化钠法提取人类微量全血基因组 DNA 的探索^{*}

郭 瑶,李巧红,袁淳珏,周雯锦,谢惠君,刘 湘[△],曾 嵘,张胜威

(湖北中医药大学检验学院,武汉 430065)

摘 要:目的 通过改良碘化钠(NaI)法,建立一种简单、快速、经济的从人微量全血中提取基因组 DNA 的方法。方法 采用经典 NaI 法和改良 NaI 法分别从人微量全血中提取基因组 DNA,并进行常规和荧光定量聚合酶链反应(PCR),比较两种方法 DNA 提取的效果。结果 采用改良 NaI 法从人外周全血中提取的 DNA 浓度和纯度与经典 NaI 法相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),并且可以在较短时间内获得满意的常规和荧光定量 PCR 结果,且耗时较短。结论 改良 NaI 法是一种简便、快速的提取人微量全血基因组 DNA 的方法,在临床和基础研究中具有较大的应用价值。

关键词:人微量全血; 碘化钠法; 改良; 基因组 DNA; 提取

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0289-03

Exploration on modified NaI method for extracting genomic DNA from human trace whole blood^{*}

GUO Yao, LI Qiaohong, YUAN Chunjue, ZHOU Wenjin, XIE Huijun, LIU Xiang[△], ZENG Rong, ZHANG Shengwei

(School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China)

Abstract: **Objective** To establish a simple, rapid and economic method for extracting genomic DNA from human trace whole blood by improving the sodium iodide (NaI) method. **Methods** The classical and modified NaI methods were used to extract the genomic DNA from human trace whole blood. Then polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence quantitative (FQ)-PCR were carried out and the extraction effects were compared between the two methods. **Results** There was no statistical difference in DNA concentration and purity between the classical and modified NaI methods for extracting genomic DNA from human trace whole blood ($P>0.05$). The satisfactory results of routine and conventional FQ-PCR was obtained in a short time, moreover time-consuming was shorter. **Conclusion** The modified NaI method is a simple and rapid method for extracting genomic DNA from human trace whole blood and has a greater application value in the clinical and basic research.

Key words: human trace whole blood; sodium iodide method; improvement; genomic DNA; extraction

随着医学技术的日益发达,对许多疾病的研究都深入到基因水平,为获得高水平研究结果,基因组 DNA 提取显得尤为重要。人外周血标本由于取材方便,易于反复多次检测,常常作为首选基因组 DNA 提取材料。目前已经发展出许多全血基因组 DNA 的提取方法,如传统的酚/氯仿提取法、硅胶膜吸附法、盐析法、碘化物法等,但操作方法均较复杂、耗时较长^[1-5]。本研究在经典碘化钠(NaI)法的基础上,进行改良合并相关步骤,缩减提取时间,以建立一种简单、快速、经济的从人外周全血中提取基因组 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 标本采集 取静脉全血 2 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,共计 52 份,来自湖北中医药大学 2016 研究生新生入学体检学生中的健康志愿者。

1.2 仪器与试剂 TGL-16B Centrifuge 离心机(由常州丹瑞实验仪器设备有限公司提供)、涡旋振荡仪(由美国 SCILOGEX 提供)、凝胶电泳分析系统(由北京君意东方有限公司提供)、ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(由美国 Life Technologies 提供)、PCR 仪(由德国 Biometra 提供)、UV2550 紫外分光光度计(由日本岛津提供)等。DNA 提取试剂:6 mol/L 溶液、氯仿/异戊醇(24:1)、异丙醇、70%乙醇、去离子水等;PCR 试剂:灭菌 ddH₂O、缓冲液(buffer)、MgCl₂ (25 mmol/L)、底物 dNTPs、上游引物(P1)、下游引物(P2)、TaqDNA 聚合酶、DNA

模板等;琼脂糖凝胶电泳试剂:琼脂糖、0.5×TBE 和 5×TBE(54 g Tris-HCl, 27.5 g 硼酸, 20 mL 500 mmol/L EDTA)、上样缓冲液(BPB)、DNA 标志物(100~600 bp)、溴化乙锭(EB)等。

1.3 方法

1.3.1 NaI 法 经典 NaI 法提取人全血基因组 DNA 参照陈雪梅等^[6]实验方案。改良 NaI 法提取人全血基因组 DNA 根据《分子克隆试验指南》的方案,参照陈丽霞等^[2]实验对传统实验进行适当改良,具体方法为以下几点:(1)取 EDTA 抗凝全血 100 μL 于 EP 管中,加入 100 μL NaI,涡旋振荡 2~3 min,相比经典 NaI 法,省却了离心抗凝全血去上清及加蒸馏水低渗溶血的步骤,极大简化了操作过程并缩短了操作时间;(2)加入 200 μL 氯仿/异戊醇,抽提 3 min,13 000 r/min 离心 5 min,增加了抽提液量,可提高抽提效果;(3)取上清液至新 EP 管,加入 200 μL 异丙醇,摇匀,13 000 r/min 离心 5 min,增加了异丙醇的量,可缩短 DNA 沉淀时所用的时间;(4)弃上清,加入 1 mL 70%乙醇,13 000 r/min 离心 5 min,乙醇由 75%降到了 70%,有利除去 DNA 中的盐离子,可提高纯度;(5)弃上清液、干燥,加 20 μL ddH₂O 溶解 DNA。

1.3.2 紫外分光光度法检测提取的 DNA 样品 吸取 DNA 样品 5 μL,稀释至 1.0 mL,测定样品在 260、280 和 310 nm 处的吸光度(OD)值,估算每个 DNA 样品浓度和并鉴定其纯度^[2]。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31500135)。

作者简介:郭瑶,女,在读本科生,主要从事分子生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: liuxiang20022301@163.com。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 取 6 μL DNA 样品和 1 μL 上样缓冲液,充分混匀后加入至 1.25% 琼脂糖凝胶的点样孔中,以 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液,100 mV/cm 的电压电泳 30~40 min,在凝胶成像仪中观察结果。

1.3.4 PCR 扩增 以上述 2 种方法提取的基因组 DNA 为模板,对管家基因(β 球蛋白)片段进行常规和荧光定量 PCR 扩增,其中上游引物(P1):5'-CTT CAT CCA CGT TCA CCT-3';下游引物(P2):5'-TAC GGC TGT CAT CAC TTA GAC-3',PCR 产物大小为 248 bp。常规 PCR 反应体系为 $10\times\text{buffer}$ (含 Mg^{2+})2.0 μL ,P1、P2 各 0.4 μL ,dNTP 0.4 μL ,加双蒸水调至 18.4 μL ,加入提取好的 DNA 模板 1.6 μL 使总反应体系为 20 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。荧光定量 PCR 反应体系为 SYBR 绿色荧光染料 10 μL ,P1、P2 各 0.6 μL ,DNA 模板 50 ng,加双蒸水至 20 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,45 个循环,读取 Ct 值。

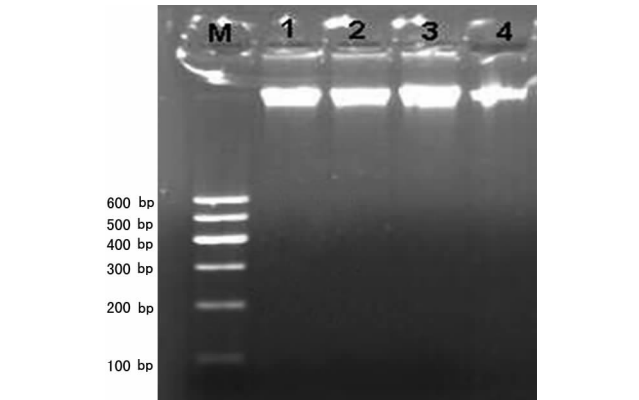
1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,计量资料比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 紫外分光光度法检测 改良 NaI 法与经典 NaI 法分别提取 52 份全血基因组 DNA 纯度、浓度见表 1。两种方法提取的基因组 DNA 纯度和浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$),但改良 NaI 法所用时间(约 18 min)明显少于经典 NaI 法(约 40 min)。

方法	DNA 纯度($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)	DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)
改良 NaI 法	1.66 ± 0.13	63.31 ± 14.64
经典 NaI 法	1.70 ± 0.10	62.22 ± 17.20
P	0.085	0.687

2.2 琼脂糖凝胶电泳 同一样本用经典 NaI 法和改良 NaI 法提取外周血基因组 DNA 经过琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中进行分析,结果显示,两种方法在各自泳道上均出现单一条带,清晰明亮且均无明显拖尾及降解条带,见图 1。

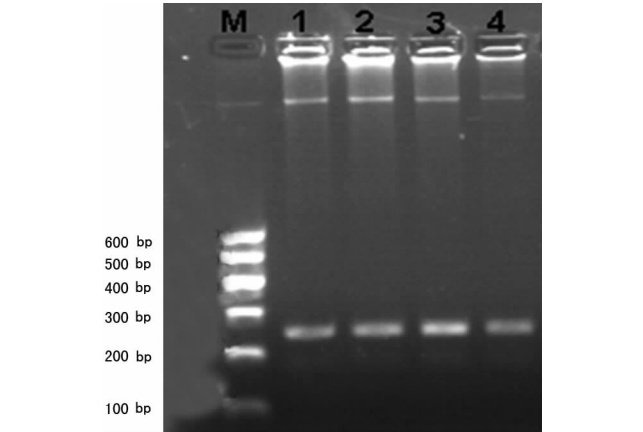


注:M 表示 DL600 DNA 标志物;1~2 表示改良 NaI 法提取的基因组 DNA 产物;3~4 表示经典 NaI 法提取的基因组 DNA 产物。

图 1 2 种方法提取的基因组 DNA 电泳图

2.3 PCR 扩增 用经典 NaI 法和改良 NaI 法提取同一 DNA 样本作为模板进行 β 球蛋白基因片段的常规 PCR 扩增,均可在约 248 bp 处见单一特异性条带,见图 2。2 种方法提取的基因组 DNA 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增 β 球蛋白基因片

段时,经典 NaI 法平均 Ct 值为 17.67 ± 0.77 ,和改良 NaI 法平均 Ct 值为 17.96 ± 0.63 ,差异无统计学意义($P=0.577$)。结果表明两种方法所提取基因组 DNA 均可用作常规和荧光定量 PCR 的模板,可作为分子生物学实验的后续材料。



注:M 表示 DL600 DNA 标志物;1~2 表示改良 NaI 法 PCR 结果;3~4 表示经典 NaI 法 PCR 结果。

图 2 PCR 产物电泳图

3 讨 论

DNA 制备总原则是保证核酸一级结构的完整并尽量排除其他分子污染^[1],临床上常用外周 EDTA 抗凝全血作为提取基因组 DNA 的材料,需去除红细胞及蛋白质,尽量简化操作步骤、缩短操作时间,避免剧烈的溶液震荡、搅拌和反复冻融等机械剪切力引起的 DNA 降解。目前提取全血基因组 DNA 的方法很多,为建立高效、快速的 DNA 提取方法,不少学者在常规方法的基础上尝试着进行改进。如用含有 NH_4Cl 的等渗溶液破碎去除红细胞,避免了用苯酚等剧毒试剂^[7];探讨用 Chelex-100 法提取 DNA 时,56 $^{\circ}\text{C}$ 保温时间、100 $^{\circ}\text{C}$ 保温时间长短对 STR 扩增的影响^[8];赵嘉惠等^[9]摸索的一种 TKM-血液 DNA 提取法,在去污剂 NP-40 存在下破坏红细胞,经多次清洗除血卟啉和血红蛋白,利于后期的基因体外扩增;采用含有 NH_4Cl 裂解液和含三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)的核裂解液对样本进行处理,用蛋白酶 K 消化后,采用氯化钠高盐沉淀法提取外周血基因组 DNA,结果稳定可靠等^[10]。然而,这些方法有的操作繁杂,耗时较长,有的存在较多蛋白质杂质,有的需蛋白酶 K 消化,增加了成本等。

NaI 法是常用外周血 DNA 制备方法之一,其提取基因组 DNA 的原理简单易懂^[11],在低渗的双蒸馏水中,血中红细胞膜及白细胞膜被破坏,放出血红蛋白及胞核。加入 NaI 后,破坏核膜并解离 DNA-蛋白质复合物,使 DNA 以游离形式存在,易于摄取;再以氯仿/异戊醇抽提使蛋白质变性,沉淀并溶解脂质,离心后 DNA 存在于上层水相中;用 37% 异丙醇沉淀 DNA,去上清液,即可得到 DNA。改良 NaI 法和血细胞裂解液是主要含胍盐、阴离子去污剂、非离子去污剂等物质的试剂盒法相比,用 6 mol/L NaI 溶液替代试剂盒中的细胞裂解液,可以在短时间内直接裂解白细胞膜且价格低廉适于大规模基因组 DNA 的提取^[12]。

在此基础上,本研究考虑 NaI 溶液为水溶液,亦有溶血作用,因此在经典 NaI 法原理的基础上进行了改进,将溶血破细胞膜和 NaI 破核膜解离 DNA-蛋白质复合物两步合为一步,没有先加双蒸馏水,而是直接加入 NaI,在震荡作用下使其直接发生溶血,使得 DNA 被释放出来。同时加入(下转第 294 页)

- tin signaling in placenta from gestational diabetic subjects [J]. *Horm Metab Res*, 2016, 48(1): 62-69.
- [2] Basraon SK, Mele L, Myatt L, et al. Relationship of early pregnancy waist-to-hip ratio versus body mass index with gestational diabetes mellitus and insulin resistance[J]. *Am J Perinatol*, 2016, 33(1): 114-122.
 - [3] Hernandez TL, Van Pelt RE, Anderson MA, et al. Women with gestational diabetes mellitus randomized to a higher-complex carbohydrate/low-fat diet manifest lower adipose tissue insulin resistance, inflammation, glucose, and free fatty acids; a pilot study[J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(1): 39-42.
 - [4] Wojcik M, Zieleniak A, Zurawska-Klis M, et al. Increased expression of immune-related genes in leukocytes of patients with diagnosed gestational diabetes mellitus (GDM) [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(5): 457-465.
 - [5] Ma Q, Fan J, Wang J, et al. High levels of chorionic gonadotrophin attenuate insulin sensitivity and promote inflammation in adipocytes[J]. *J Mol Endocrinol*, 2015, 54(2): 161-170.
 - [6] Cabia B, Andrade S, Carreira MC, et al. A role for novel adipose tissue-secreted factors in obesity-related carcinogenesis[J]. *Obes Rev*, 2016, 17(4): 361-376.
 - [7] 潘宝龙, 马润玫. 脂肪因子 omentin-1、chemerin 与妊娠期糖尿病的相关性[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(9): 1231-1236.
 - [8] Wei YM, Yan J, Yang HX, et al. Identification of severe gestational diabetes mellitus after new criteria used in China[J]. *J Perinatol*, 2016, 36(2): 90-4.
 - [9] 李晓红. 脂肪组织 Omentin, Vaspin, Chemerin 与 GDM 胰岛素抵抗的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
 - [10] Ren C, Zhang Y, Cui W, et al. A polysaccharide extract of mulberry leaf ameliorates hepatic glucose metabolism and insulin signaling in rats with type 2 diabetes induced by high fat-diet and streptozotocin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72(4): 951-959.
 - [11] Yang RZ, Lee MJ, Hu H, et al. Identification of Omentin as a novel depot specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 290(6): 1253-1261.
 - [12] Sun N, Wang H, Wang L, et al. Vaspin alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 482-489.
 - [13] 林园梅. 华南汉族 2 型糖尿病人群 Omentin 基因 SNPs 扫描及与高甘油三酯腰围关联[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
 - [14] 张漫漫, 班博, 陈京, 等. 初发 2 型糖尿病合并肥胖患者血清网膜素及脂联素水平的变化[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(5): 1153-1155.
 - [15] Kim C, Christophi CA, Goldberg RB, et al. Adiponectin, C-reactive protein, fibrinogen and tissue plasminogen activator antigen levels among glucose-intolerant women with and without histories of gestational diabetes[J]. *Diabet Med*, 2016, 33(1): 32-38.

(收稿日期: 2016-09-06 修回日期: 2016-10-26)

(上接第 290 页)

氯仿/异戊醇(24:1)的量增加到了 200 μ L, 使得裂解液与有机相充分混旋, 更有利于分离 DNA 上清液; 加入异丙醇的量也增加到 200 μ L, 使得多糖等物质溶解于异丙醇中, 利于 DNA 快速沉淀; 最后加入 70% 乙醇漂洗, 利于除去 DNA 中的盐离子, 可使 DNA 纯度更高。结果显示, 经典 NaI 法和改良 NaI 法所提取 DNA 浓度和纯度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 均可用作常规和荧光定量 PCR 反应模板, 但改良 NaI 法明显缩短了提取时间, 使提取效率大大提高, 是一种简单、快速、经济的从人微量外周全血中提取基因组 DNA 的方法, 可用于临床大量血样本的批量提取、流行病学调查等, 具有较高的实用价值。

参考文献

- [1] Sambrook J, Fritsh EF, Mantitatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 463-471.
- [2] 陈丽霞, 张振昶, 谢小冬, 等. 3 种提取全血基因组 DNA 的方法比较[J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 3(5): 1110-1113.
- [3] 张帅, 徐锐, 张强, 等. 改良盐析法提取全血基因组 DNA 的影响因素研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(35): 42-46.
- [4] 张志, 王龙武. 全血基因组 DNA 快速提取法[J]. *湘南学院学报(自然科学版)*, 2005, 7(1): 12-14.
- [5] 范俊丽, 郑芳, 付小曼, 等. 三种方法提取外周血 DNA 比较分析[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(23): 3933-3935.
- [6] 陈雪梅, 余劲聪. 碘化钠法提取牦牛基因组 DNA 的研究[J]. *西南民族大学(自然科学版)*, 2006, 32(5): 963-965.
- [7] 霍金龙, 罗古月, 张娟, 等. 从猪血中提取高质量基因组 DNA 的研究[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2004, 20(3): 22-23.
- [8] 戴文申, 徐银龙, 叶健, 等. 关于 Chelex 100 提取 DNA 方法的进一步研究——延长保温时间对 Chelex 100 提取 DNA 的影响[J]. *河北公安警察职业学院学报*, 2006, 6(4): 41-43.
- [9] 赵嘉惠, 张华屏. 外周血 DNA 提取方法的比较及改良[J]. *山西医科大学学报*, 2006, 37(1): 12-13.
- [10] 吴清敏, 刘巧红, 滕云, 等. 外周血 DNA 提取方法的比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(7): 445-446.
- [11] Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents [J]. *J Virol Methods*, 1991, 34(1): 105-112.
- [12] 吕晓岩, 肖蓓. 一种提取全血基因组 DNA 的改良方法[J]. *生物技术通讯*, 2015, 26(6): 852-853.

(收稿日期: 2016-07-28 修回日期: 2016-10-18)