

DNA 提取方法的比较及改良

童大跃, 伍新尧, 陆惠玲, 蔡贵庆, 区敬华, 陈 勇, 曾艳红
(中山大学法医学教研室, 广东 广州 510080)

关键词: DNA 分离和提纯; 聚合酶链反应; 序列分析; DNA

中图分类号: Q33 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2003)04-0411-02

用于处理 DNA 检材以分离和提取 DNA 的方法很多。不同的方法有不同的优缺点, 其适用的分析技术也不同^[1-5]。在法医检案的实际应用过程中经常会遇到不少的问题, 如微量检材的 DNA 提取, 既要纯度高, 又要回收率高; 常用的几种方法单独进行时则很难达到这样的要求。本文就几种常用的方法进行了改良及它们效果比较。

1 材料与方 法

1.1 血液及血痕的酚-氯仿提取法

取枸橼酸钠抗凝血 80 μL (血痕样品取 1 cm^2 血纱), 其它操作同一般文献报道^[4]。

1.2 血液或血痕 5% Chelex-100 处理法

取混匀的枸橼酸钠抗凝血 50 μL (上机取样 3.0 μL) 或剪取血痕同“1.1” (上机取样 5 mm^2), 置于 0.5 mL 离心管中; 加超纯水浸泡 10~15 min, 使红细胞溶解或血纱血液溶解, 10 000 r/min 离心 5 min ($r=8$ cm), 弃上清, 保留 20 μL 左右液体和载体; 重复上述操作 1 次, 当浸泡液变为浅红色, 或当血纱色较浅时, 进入下一步骤; 以下步骤按 PE 公司用户操作手册的 DNA 提取部分 (PE Biosystems User's Manual: DNA extraction protocols) 进行。

1.3 碱裂解法

全血 DNA 提取: 取 30 μL 血液于 0.5 mL 离心管中, 加 500 μL 水混匀, 室温放置 1~2 min, 8 000 r/min 离心 ($r=8$ cm) 7 min, 去上清液; 或剪取血纱约 2 mm^2 , 置于 0.5 mL 离心管中, 以下步骤见参考文献^[5]。

1.4 改良方法

将 Chelex-100 血液或血痕处理法、碱裂解法处理的模板用等体积饱和酚-氯仿 (1:1) 处理 1 次, 冷无水乙醇沉淀, 待干后, 加适量纯水溶解。

1.5 电泳及银染

将经过酚-氯仿提取法、Chelex-100 处理法、碱裂解法和 Chelex-100 法结合酚-氯仿提取法处理的模板经 PCR 扩增 TPOX 位点, 产物经 300 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色。

1.6 DNA 测序

将经过酚-氯仿提取法、Chelex-100 处理法、碱裂解法 3 种方法及改良法处理的模板进行 PCR, 用 Promega 16 system 进行常染色体短串联重复序列 (short tandem repeat STR) 扩增, 产物用 377 DNA 测序仪荧光分析, 仪器操作按说明书进行。

2 结 果

2.1 DNA 序列仪荧光分析

5 种方法处理模板的分析结果见图 1。由图可以看到, Chelex-100 处理法、酚-氯仿提取法处理模板结果均较好, 碱裂解法结果较差。将经 Chelex-100 处理法和碱裂解法处理的模板分别用酚-氯仿提取法再处理一次, 其效果良好。

2.2 银染法比较 5 种模板的电泳结果

不同方法处理检材对银染结果影响不同 (图 2)。酚-氯仿提取法处理模板按本室常规模板用量未扩出产物, 说明此法需要较多的标本用量。Chelex-100 处理模板扩出的产物含量高, 电泳染色条带较碱裂解法的条带浓。Chelex-100 改良法处理模板, 二次溶解模板含量高, 扩增产物较多。

收稿日期: 2002-06-12

基金项目: “211 工程”重点学科建设课题基金资助项目 (4209008)

作者简介: 童大跃 (1961-), 男, 湖北武汉人, 医学硕士, 讲师。

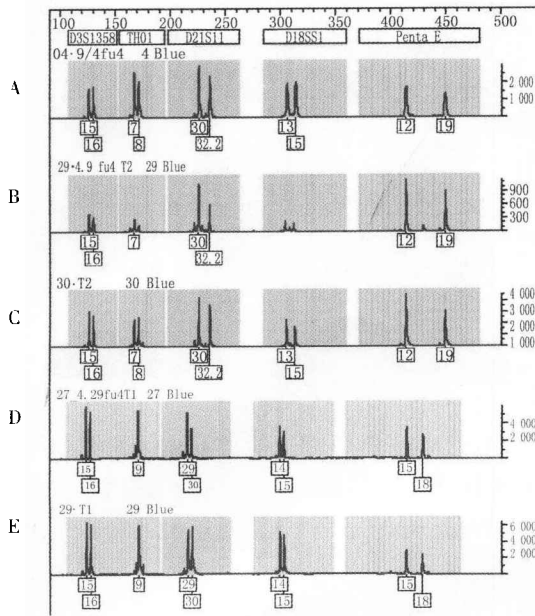


图 1 DNA 序列仪荧光分析 5 种方法提取的 DNA

Fig. 1 The fluorescent results of five different methods

A, B, C: the templates are extracted by Chelex-100, alkaline lyses and Phenol-chloroform, respectively. The results of A, C are fine. D: the template is extracted by combining alkaline lyses with phenol-chlorofome method; E: the template is extracted by combining Chelex-100 with phenol-chlorofome method

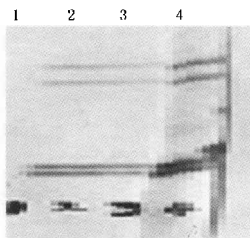


图 2 4 种模板经银染的结果

Fig. 2 Silver staining results of four different methods

1 ~ 4 lane are results of locus TPOX that template was extracted with phenol-chlorofome, Chelex-100, alkaline lyses and improvement method, respectively

3 讨论

不同方法处理的模板用在不同的分析上,其优缺点不同。碱裂解法用于银染结果比较稳定,方法简单,快速,特别是本实验工作量较大,时间要求紧,尤其适合本法,但是此法处理的模板存放时间较短。Chelex-100 法用于银染,377DNA 测序仪荧光分析,方法简单,所需时间也较短,用量少(3.0 μL),结果也较碱裂解法稳定,但较碱裂解法需时

间长,模板放置时间也不长久。而酚-氯仿方法提取的模板质量最好,保存时间长,结果较好,但是操作过于繁琐,费时间,标本需要量较大。将两种方法结合即经 Chelex-100 处理法和碱裂解法处理的模板,分别再用酚-氯仿方法提取方法再处理 1 次,操作简单,模板质量也高,扩增效果优,这种模板可放置较长久,半年内使用这些模板作不同的分析检测,效果仍然满意。这一方法的最大优点是操作较酚-氯仿提取法简单,扩增效果较 Chelex-100 处理法和碱裂解法处理的模板好,模板保存时间长,特别是微量检材经过处理,在再溶解时可以将模板浓缩,值得推广。法医学微量检材以此法处理模板,在 2 次溶解时可以根据其要求稀释,使浓度提高,达到理想效果,是一个值得推广的方法。

同一种方法处理模板,标本越陈旧,效果越差^[6]。如何保存标本呢?在实验中我们也进行研究,标本取回马上处理模板,存放 DNA 呢?还是存放血液?我们比较 3 周内用 Chelex-100 处理法的效果,即血液抽取后当天分离 DNA 和将血液放置 3 周后提取 DNA,其 PCR 产物经分析比较结果差别不大。故在实验结果中未列出,如果希望长时间保存模板,放置血液的效果会比放置模板的效果差。

参考文献:

- [1] Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, *et al.* The suitability of DNA extracted from formalin fixed, paraffin embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis[J]. *Int J Mol Med*, 2001, 8(5): 573.
- [2] Chan P K, Chan D P, To K F, *et al.* Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA[J]. *J Clin Pathol*, 2001, 54(5): 401.
- [3] Roy R, Steffens D L, Gartside B, *et al.* Producing STR locus patterns from bloodstains and other forensic samples using an infrared fluorescent automated DNA sequencer [J]. *J Forensic Sci*, 1996, 41(3): 418.
- [4] 伍新尧,罗超权,杨英浩. 基因诊断原理与临床[M]. 广州: 中山大学出版社, 1995. 8 ~ 22.
- [5] 刘翠兰, 胡家伟. 碱性裂解法提取法医生物检材 DNA 及其法医学应用[J]. *中国法医学杂志*, 2001, 16(2): 102.
- [6] Smith L J, Braylan R C, Nutkis J E, *et al.* Extraction of cellular DNA from human cell and tissue fixed in ethanol [J]. *Anal Biochem*, 1987, 160(1): 135.

(编辑 黄小延)