

从组织样品中提取高分子量基因组 DNA

简介

组织样品中含有丰富的 DNA，是分子生物学研究，法医检测和遗传病检测等的重要来源。从组织样品中提取 DNA 的流程有两个最重要的过程：裂解和纯化。裂解过程是指组织样品经研磨或匀浆打散后（这一步可省略），加入 SDS/Tris/EDTA 裂解液和蛋白酶 K 消化，让 DNA 从染色质/核小体的复合物中完全解离出来，形成游离的 DNA。纯化过程只指去除样品消化液中的各种蛋白质、细胞碎片、碳水化合物、脂类等杂质、从而得到高纯化的 DNA，以满足下游的应用。目前纯化方法有许多，常用的方法有酚氯仿提抽，硅胶柱纯化，二氧化硅磁粒子纯化(磁性纯化)，离子交换层柱，以及盐析法等等。但是这些方法往往会造成基因组 DNA 的断裂。如采用硅胶柱纯化得到的基因组 DNA 一般只有 20-60Kb。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，通过加入一种高浓度盐溶液(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，对组织用量没有限制，可灵活调整用量，操作过程无毒安全，而且得到的基因组 DNA 片段完整，可达到 150kb，脉冲场电泳检测表明，使用盐析法得到的 DNA 片段约为 30-150Kb。Magen 公司将盐析法进行创新和改良，发展出更稳定更高效的盐析法试剂盒：SolPure DNA Kits 系列产品。其中 SolPure Tissue DNA Kit 就是专门为动物组织，培养细胞而设计的。为进一步比较和检测该方法的稳定性，我们选择 7 种动物组织，并用 SolPure Tissue 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 3 次。

- 哺乳类：人类唾液 (100 ul)，漱口水 (5 ml)，猪肝 (10mg)；
- 禽类：鸡脑(10mg)，鸡肝(10mg)，鸡肺(10mg)；
- 两栖类：蛙肝(10mg)，蛙皮(10mg)，蛙肺(10mg)；
- 鱼类：草鱼鱼肝(10mg)。

漱口水的预处理：采用 5ml 李施德林漱口水含入口中，漱口 1 分钟，收集漱口液。室温，5,000 x g 离心 5 分钟收集细胞，倒弃上清液，用 1ml Buffer TE 重悬后，取 100 ul，按下述进行提取。

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

1. 取 10mg 动物组织，加入 300 ul Cell Lysis Buffer，用玻璃匀浆器进行匀浆。取 100 ul 唾液或漱口水重悬液，加入 200 ul Cell Lysis Buffer，涡旋混匀；
2. 加入 2 ul Proteinase K(20mg/ml)，60°C 处理 3 小时；
3. 加入 2 ul RNase A，37°C 放置 30-60 分钟；
4. 冰上放置 1 分钟让裂解液恢复至室温；
5. 加入 100 ul Protein Precipitate Solution，涡旋混匀 30 秒；
6. 室温，13,000 xg 离心 3 分钟；
7. 取上清液，加入 300 ul 异丙醇。颠倒 30-50 次混匀；
8. 室温，13,000 xg 离心 3 分钟；
9. 小心倒弃上清液，加入 300 ul 70% 乙醇。颠倒几次混匀；
10. 室温，13,000 xg 离心 1 分钟；

11. 小心倒弃上清液，把离心管反扣于吸水纸上干燥 5-10 分钟；
12. 加 100 ul Elution Buffer，涡旋 10 秒；65°C 放置 1 小时；
13. 转移至 4°C 冰箱放置过夜，让 DNA 充分溶解。

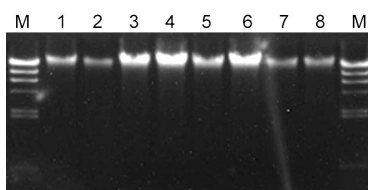
实验结果

1. **DNA 的纯度：**取纯化的 DNA 用 Buffer TE 稀释 11 倍后，在 Beckmen DU640 测量 OD260, OD280, OD230, OD320，然后取三个数值的平均数，列表如下。测量结果表明，得到的 DNA，OD260/OD280 约为 1.7-1.9 之间，OD260/OD230 约 1.8-2.5 之间，OD320 读数很低，表明纯化得到的 DNA 纯度高。其中肝脏 DNA 产量约为 20-60ug/10mg；皮肤/肌肉类样品 DNA 产量约为 4-10ug/10mg；人类唾液产量也达至 8-15ug/100ul。

组织 (10mg)	A260	A280	A230	A260/280	产量 ug
猪肝	0.2296	0.1223	0.1145	1.9	25
蛙皮	0.0737	0.398	0.469	1.9	8
蛙肺	0.359	0.1848	0.1509	2	39
鸡肺	0.4895	0.2564	0.185	1.9	54
鱼肝	0.2257	0.1255	0.2128	1.8	25
蛙肝	0.3604	0.2014	0.0393	1.8	40
鸡脑	0.0819	0.0449	0.0418	1.9	9
唾液	0.108	0.0653	0.0855	1.7	12

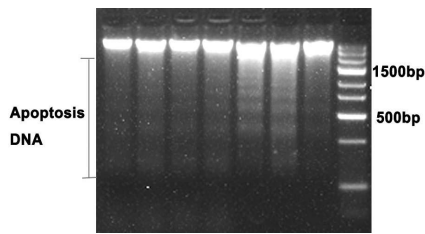
(注：鸡脑，鱼肝，蛙肝中 OD320 读数比较高，表中列出的 OD260、OD280、OD230，未列出 OD320)

2. **DNA 完整性：**取 2ul 纯化的 DNA，点样于 0.7% 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。



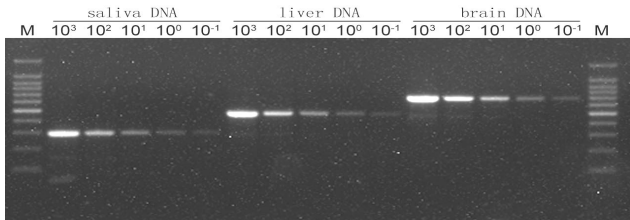
泳道 1-8 分别是猪肝、唾液、鸡肺、鸡脑、蛙肺、蛙皮、蛙肝和鱼肝用本公司试剂盒提取得到的 DNA 电泳图。M 是入-HindIII DNA Marker。

3. **小片段 DNA 的回收情况。**某些组织样品中常常含有游离的 DNA 或小片段的 DNA。如唾液样品中存在许多凋亡 DNA 片段。为进一步证明 SQ Tissue DNA Kit 能否提取得到这些凋亡细胞的 DNA，取 5ul 纯化的唾液 DNA，点样于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中分析其 DNA 带型，以验证是否其备经典的凋亡带型。以图中可知，使用 SQ Tissue DNA Kit 可成功提取得到小片段的凋亡细胞 DNA。



PCR 验证

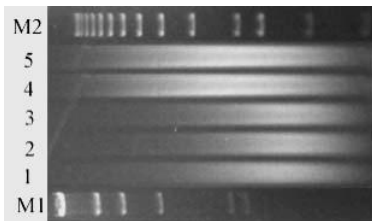
为进一步验证 DNA 的纯度，选择人类唾液 DNA 和鸡肝，鸡脑，鸡肺 DNA，进行一系列的稀释后作为模板，PCR 扩增相应的基因。



图：各种组织 DNA 的模板由 1ug 稀释至 100pg, 进行 PCR 扩增后的电泳图。

酶切验证

为进一步验证 DNA 的纯度，选择纯化的 DNA 进行限制性内切酶切 EcoR I，结果如下。由图可知，纯化的 DNA 酶切图谱正常，效果好。



相关问题回答

1. 影响 DNA 纯度的关键因素是什么？

答：盐析法操作简单，对组织量的控制或试剂的用量很敏感。试剂用量宁多勿少是最为关键的。处理某些富含蛋白质的样品，可提高 Cell Lysis Buffer 和 Protein Precipitate Solution 的用量，以提高纯度和产量。

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。对于唾液，肌肉样品，因 RNA 含量不丰富，RNase 作用时间一般在 15-20 分钟内即可；对于肝脏，肾脏，脾脏等富含 RNA 的样品中，RNase 作用时间最好为 1 小时。只有 RNase 充分作用让 RNA 降解成极少的片段，异丙醇才不会沉淀 RNA，得到的 DNA 才不会有 RNA 的污染。

3. 处理微量样品时，如何提供产量和稳定性？

答：由于盐析法采用异丙醇沉淀，而异丙醇沉淀很难沉淀回收微量的 DNA，因此处理微量的 DNA 时，加入糖原(20mg/ml)来可明显提高产量以及稳定性。处理拭子，干燥血迹，或组织样品中 DNA 含量比较低时，都建议采用加入糖原。

4. 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 30-150kb。

5. 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。建议加入 Elution Buffer/Buffer TE 后，放置 65°C 处理 1 小时后，转移至 4 度冰箱过夜才能让 DNA 充分溶解。一般来说，当 DNA 产量比较低时(<0.1ug/ul)，65°C 处理 30 分钟后即可充分溶解。

6. 如何提高水生生物组织 DNA 的纯度？

答：由于水生生物组织中富含多糖类和脂类（鱼油/DHA 等）物质，如鱼类的肝脏，虾的肝脏都富含多糖类和脂类物质，这些物质比较难于去除。我们建议一方面要加倍试剂用量，另一方面，可在 RNase 消化处理后，冰上放置 10 分钟，加入 Protein Precipitate Solution，涡旋 30 秒后冰上再放置 20 分钟；4°C, 13,000xg 离心 10 分钟，取上清液再按试剂盒进行操作，可有效地去除水生生物中特有的多糖类和脂类物质，大大提高 DNA 的纯度。

7. 试剂盒可适合处理哪些样品？

答：该试剂盒适合各种动物组织样品，培养细胞，细菌(革兰氏阳性细菌需自配溶菌酶)，唾液，拭子，漱口水，棉签，石蜡包埋组织等。

8. 为什么 OD320 读数比较高？计算比值和产量如何进行？

答：处理多糖类的样品时，如两栖类，鱼类的肝脏样品时，得到的 DNA，OD320 读数一般都比较高，这主要是因为样品中富含多糖类杂质。计算比值时应该是： $(OD260-OD320)/(OD280-OD320)$ ，或 $(OD260-OD320)/(OD230-OD320)$ ，这样得到的比值才是正确的。计算 DNA 浓度也应该是： $C=(OD260-OD320) \times 50 \times$ 稀释倍数