



## 外周血细胞DNA、RNA及血红蛋白同时提取法

人类基因分析所用的DNA多从外周血中提取,而研究白细胞或红细胞功能状况时又需分析外周血细胞RNA,在研究血红蛋白异常性疾病时,更需同时对血红蛋白进行分析。本文介绍一种简单可行的从少量外周血中同时提取DNA、RNA及血红蛋白的方法。

### 1 方法介绍

#### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 试剂 淋巴细胞分离液(上海生化一厂);N-三羟甲基氨基甲烷(Tris)、TritonX-100、十二烷基硫酸钠(SDS)及2-巯基乙醇均为Sigma公司产品;焦碳酸二乙酯(DEPC),逆转录酶抑制剂(华美生物技术公司);AG501-X8树脂(Bio-Rad公司);其他均为国产试剂。

1.1.2 仪器 Du 640型紫外分光光密度仪(Beckman),PE-480型DNA扩增仪(PE公司)。BioFocus 3000自动毛细管电泳仪(Bio-Rad公司)。

1.1.3 样品 健康成年人新鲜外周血1 ml(EDTA·K<sub>2</sub>抗凝)。

#### 1.2 方法

1.2.1 分离外周血有核细胞[1] 外周血1 ml,用等量磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,混匀。10 ml试管1支,加入1 ml淋巴细胞分离液,取上述稀释过的血液2 ml小心加在细胞分离液上,注意保持界面。2 000 g离心20 min。小心分别吸出中间细胞层,置1.5 ml微量离心管(注意保留红细胞沉淀)。500 g离心3 min。弃上清。用PBS清洗细胞2次,500 g离心2 min。

1.2.2 提取RNA 采用细胞质RNA提取法[2](略作改进)提取,即向细胞沉淀中加入裂解液[含5 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),140 mmol/L NaCl,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.5% TritonX-100]0.2 ml,2 μl的2-巯基乙醇,混匀,置冰上3 min,500 g离心3 min。小心移取上清,置另一1.5 ml微量离心管。留细胞沉淀待提取DNA。继续向上清中加入200 μl水饱和酚及50 μl氯仿/异戊醇(体积比24:1),混匀,10 000 g,4℃,离心10 min。移取上清。向上清中加入氯仿/异戊醇及水饱和酚各100 μl,混匀。10 000 g,4℃,离心10 min,取上清。再加入200 μl氯仿/异戊醇,混匀,10 000 g,4℃,离心20 min。取上清。向上清中加入3 mol/L的乙酸钠40 μl,及-20℃的无水乙醇1 ml,混匀,-20℃至少1 h。4℃,10 000 g离心20 min。弃上清。75%乙醇清洗沉淀3次,室温下干燥20 min。以0.1% DEPC水5 μl溶解。取4 μl用于2%琼脂糖凝胶电泳(电泳缓冲液1' TAE,电压6 V/cm,电泳时间30 min)。另1 μl用于紫外分光光度仪测D(λ)值。

1.2.3 抽提DNA[1] 向前述的细胞碎片沉淀中加入STE 200 μl吹打混匀,再加入10% SDS 20 μl,混匀。55℃水浴3 h。然后加入200 μl Tris-HCl饱和酚,混匀,10 000 g,4℃,离心10 min。取上清,加入100 μl Tris-HCl饱和酚及100 μl氯仿/异戊醇(体积比49:1),充分混匀,4℃,10 000 g,离心10 min。取上清,加入200 μl氯仿/异戊醇,充分混匀,4℃,10 000 g,离心10 min。取上清,加入

20  $\mu\text{l}$  3 mol/L 乙酸钠, 混匀, 加入1 ml无水乙醇, 混匀,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置1 h。4  $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 g, 离心20 min。弃上清, 室温下干燥20 min。加入三蒸水5  $\mu\text{l}$ , 使充分溶解。4  $\mu\text{l}$  2%琼脂糖凝胶电泳(电泳缓冲液1' TAE, 电压6 V/cm, 电泳时间30 min)。另1  $\mu\text{l}$  用于紫外分光光度仪测定 $D(\lambda)$ 值。

1.2.4 血红蛋白溶液的制备 向淋巴细胞分离液分离后的下层红细胞沉淀中加入0.5 ml 生理盐水, 混匀。取200  $\mu\text{l}$ , 用生理盐水洗涤3次, 3 000 g, 离心5 min。最后一次离心10 min。尽量吸去上清。向洗涤后的红细胞中加入1 ml的双蒸水和0.5 ml 的四氯化碳, 剧烈振荡3 min, 使彻底溶血。3 000 g 离心10 min。留取血红蛋白上清液, 进行毛细管电泳[3]。

## 2 结果

### 2.1 RNA电泳及 $D(\lambda)$ 值

电泳结果见图1。泳道1为100 bp ladder 的DNA分子量标准(自下而上依次为100~1 000 bp), 泳道2显示三条清晰的RNA带型, 自下而上依次为5S、18 S、28 S, 18 S较28 S产量高。 $D_{260}/D_{280}$ 为1.95。

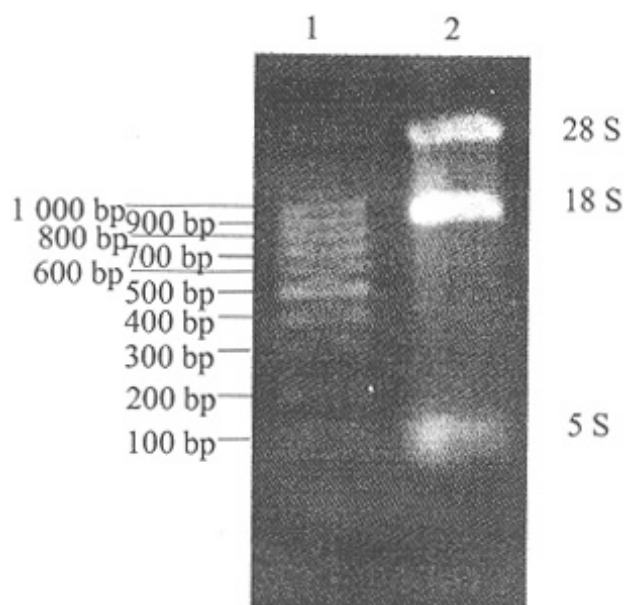


图1 RNA电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of the RNA extract  
Lane 1: 100 bp DNA ladder; Lane 2: RNA

### 2.2 DNA电泳及 $D(\lambda)$ 值

电泳结果见图2。泳道1为DNA, 可见一清晰的带型, 泳道2是 $\lambda$ DNA/HindIII标记物,  $D_{260}/D_{280}$ 为1.81。

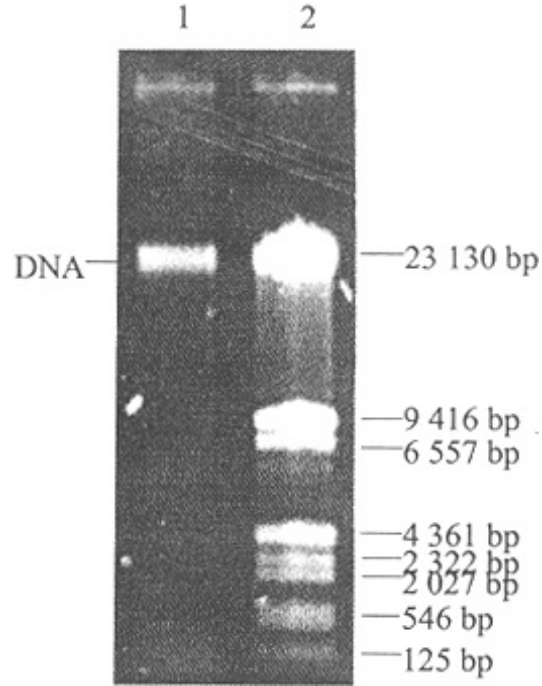


图2 DNA电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of the DNA extract  
Lane1: DNA; Lane2:  $\lambda$ DNA/Hin dIII markers

### 2.3 珠蛋白肽链毛细管电泳结果

图3可见自左向右出现3个波峰，依次为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 峰，分别代表3种相应的珠蛋白肽链。未见杂峰。

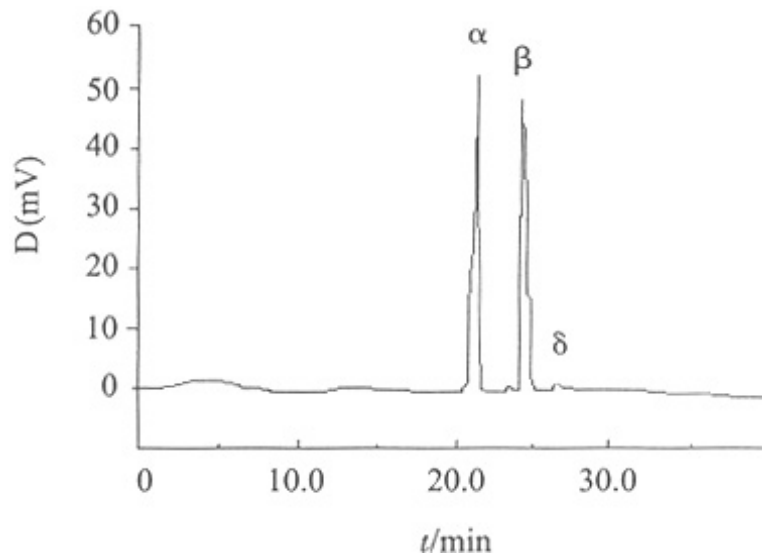


图3 珠蛋白肽链毛细管电泳图

Fig.3 Capillary eletrophoresis of the globin chains

## 3 讨论

RNA的提取方法较多[2][4]，由于细胞质RNA提取法相对省时，且价廉，提取的RNA产量较高，已被许多RNA提取试剂盒采用。而且，我们分析认为，有效地控制细胞裂解时间，使裂解仅发生于细胞膜，既可使细胞

质RNA释放出来,又可得到相对完整的细胞核,从而可从裂解后的细胞碎片提取DNA。实验结果证实了我们的推测, RNA提取的同时也得到了质量较高的DNA。由于采集儿童,特别是婴儿外周血标本量的限制,要求我们尽可能有效地利用标本。我们将分离细胞后得到的红细胞沉淀清洗后提取血红蛋白,并经珠蛋白肽链毛细管电泳验证了其质量。认为在临床上可用于异常血红蛋白疾病的蛋白水平筛查[5][6]。本文介绍的方法,可从小量的外周血标本提取DNA用于遗传性疾病的基因诊断, RNA可用于白细胞功能基因的转录水平的监测或红细胞特异功能蛋白的mRNA水平的定性及定量[7]。此方法尤其可有效地应用于地中海贫血等异常血红蛋白疾病的研究中[8][9]。

#### 参考文献:

- [1] 吴冠云, 方福德. 基因诊断技术及应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992. 176-8.
- [2] 方福德, 周 吕, 丁 濂, 等. 现代医学实验技巧全书[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 597-8.
- [3] 廖云星, 钱新华, 徐湘民. 毛细管区带电泳分离珠蛋白肽链[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(3): 180-4.
- Liao YX, Qian XH, Xu XM. Capillary free zone electrophoresis of globin chains[J]. Chin J Med Genetics, 1999, 16(3): 180-4.
- [4] Leonard D, Michael K, James B. Basic methods in molecular biology[M]. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1993. 322-8.
- [5] Kirk CM, Papadea CN, Lazarchick J. Laboratory recognition of a rare hemoglobinopathy: hemoglobins SS and SG (Philadelphia) associated with alpha-thalassemia-2 [J]. Arch Pathol Lab Med, 1999, 123(10): 963-6.
- [6] Sabo G, Brodbeck U, Cardile N, et al. Diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC (high performance liquid chromatography): study of 627 patients[J]. Schweiz Med Wochenschr, 1999, 129(34): 1 196-200.
- [7] 国 红, 孙 宏, 许贤豪, 等. 重症肌无力胸腺和外周血抗原特异性单个核细胞IFN- $\gamma$ 、IL-4的转录及表达[J]. 中国神经免疫学和神经病杂志, 1999, 6(2): 67-71.
- Guo H, Sun H, Xu XH, et al. Study on mRNA expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 and their proteins secretion of thymocytes and peripheral blood mononuclear cells in patients with myasthenia gravis[J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 1999, 6(2): 67-71.
- [8] Huang SZ, Zeng FY, Chen MJ, et al. The delta-globin RNA transcript level in beta-thalassemia carriers[J]. Acta Haematol, 1999, 102(1): 1-6.
- [9] Dedoussis GV, Sinopoulou K, Gyparakaki M, et al. Fetal hemoglobin expression in the compound heterozygous state for -117 (G $\rightarrow$ A) Agamma HPPFH and IVSII-745 (C $\rightarrow$ G) beta+ thalassemia: a case study[J]. Am J Hematol, 1999, 61(2): 139-43.

#### 参考文献:

- [1] 吴冠云, 方福德. 基因诊断技术及应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992. 176-8.
- [2] 方福德, 周 吕, 丁 濂, 等. 现代医学实验技巧全书[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995. 597-8.
- [3] 廖云星, 钱新华, 徐湘民. 毛细管区带电泳分离珠蛋白肽链[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(3): 180-4.
- Liao YX, Qian XH, Xu XM. Capillary free zone electrophoresis of globin chains[J]. Chin J Med Genetics, 1999, 16(3): 180-4.

[4] Leonard D, Michael K, James B. Basic methods in molecular biology[M]. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1993. 322-8.

[5] Kirk CM, Papadea CN, Lazarchick J. Laboratory recognition of a rare hemoglobinopathy: hemoglobins SS and SG (Philadelphia) associated with alpha-thalassemia-2 [J]. Arch Pathol Lab Med, 1999, 123(10): 963-6.

[6] Sabo G, Brodbeck U, Cardile N, et al. Diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC (high performance liquid chromatography): study of 627 patients[J]. Schweiz Med Wochenschr, 1999, 129(34): 196-200.

[7] 国红, 孙宏, 许贤豪, 等. 重症肌无力胸腺和外周血抗原特异性单个核细胞IFN- $\gamma$ 、IL-4的转录及表达[J]. 中国神经免疫学和神经病杂志, 1999, 6(2): 67-71.

Guo H, Sun H, Xu XH, et al. Study on mRNA expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 and their proteins secretion of thymocytes and peripheral blood mononuclear cells in patients with myasthenia gravis[J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 1999, 6(2): 67-71.

[8] Huang SZ, Zeng FY, Chen MJ, et al. The delta-globin RNA transcript level in beta-thalassemia carriers[J]. Acta Haematol, 1999, 102(1): 1-6.

[9] Dedoussis GV, Sinopoulou K, Gyparaki M, et al. Fetal hemoglobin expression in the compound heterozygous state for -117 (G $\rightarrow$ A) Agamma HPFH and IVSII-745 (C $\rightarrow$ G) beta+ thalassemia: a case study[J]. Am J Hematol, 1999, 61(2): 139-43.

---

[回结果列表](#)