



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献

在线投稿 | 稿件查询 | 期刊阅读

搜索: 请输入您想要的信息 | 搜索 | 高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献 >> 血液内科

血液内科

改良盐酸胍法提取脐血DNA用于HLA基因分型

发表时间: 2011-10-9 10:33:10 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 汤雪薇,廖灿,李焱,谢杏梅,黄以宁 作者单位: 广州市妇婴医院广州脐血库, 广州 510180

【摘要】 为了比较经典的盐酸胍(Gu•HCl)抽提DNA法和改良盐酸胍抽提DNA法在提取脐血DNA的效果, 探讨这两种方法在脐血组织相容性抗原(HLA)基因分型中的应用, 使用盐酸胍抽提DNA法和改良盐酸胍抽提DNA法提取72例脐血标本的DNA, 并分别测定其DNA的浓度和纯度, 采用序列特异性引物聚合酶反应方法(PCR-SSP)比较这两种方法所提取的DNA。 结果表明: 两种方法提取脐血DNA均获成功;根据对DNA的质量监测发现, 用改良盐酸胍抽提DNA在质量上较盐酸胍法好;用于HLA基因分型时, 改良盐酸胍抽提DNA法可减少非特异性条带的出现。 结论: 改良盐酸胍抽提DNA法不但操作简便, 成本下降, 而且在最少血量中能提取出高纯度的DNA, 减少非特异性条带的出现。该方法完全可以满足脐血库的日常脐血样品DNA的提取以及脐血

HLA基因分型的要求。

【关键词】 DNA提取

Abstract To compare two different methods for extracting genomic DNA from cord blood and to evaluate their applications for HLA genotyping, the genomic DNA from 72 samples was extracted by guanidine hydrochloride (Gu•HCl) and modified guanidine hydrochloride, the DNA yield and purity were evaluated by spectrophotometry and detected by PCR with sequence-specific primers. The result showed that the genomic DNA was successfully isolated from whole blood by both methods. The modified Gu•HCl method used was better than Gu•HCl method as the modified method produces better quality of DNA and less ambiguous bands in PCR. It is concluded that modified Gu•HCl method has the advantages of low-cost, simple operation, high quality output and clear positive bands in HLA-genotyping, the modified method is optimal for extracting DNA from multiple samples of cord blood bank.

Key words DNA extraction; guanidine hydrochloride method; modified guanidine hydrochloride method; HLA genotype

高产量和高纯度的真核细胞DNA分离技术是进行PCR, Southern blot等分子生物学研究的前提条件, 而在HLA基因分型中, 模板DNA的质量是分型结果准确性的重要保证。Bowtell等[1]报道的盐酸胍法是一种较酚-氯仿法简易的可进行大量样本DNA提取的较好方法, 我们对相关方法做了改进, 结果表明适于脐血库HLA基因分型。

材料和方法

材料

标本

特色服务

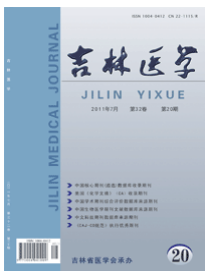
- 论文推荐
- 著书代理
- 统计学分析
- 学分获取
- 专业修稿
- 专业审稿
- 英文翻译
- 写作辅导

期刊约稿

- 中国社区医师
- 医学信息
- 吉林医学
- 按摩与康复医学
- 临床合理用药杂志

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

职称晋升政策汇总

让您的晋升不留下半点遗憾

我要立即投稿

--最便捷的绿色通道

在线客服...

QQ留言 1254635326
QQ交谈 4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

来自广州脐血库中的72份脐血标本, 为CPD-A抗凝血, -20℃保存。

主要试剂

蛋白酶K(德国 Merck产品), 盐酸胍(美国Sigma产品), Micro SSPTM试剂盒(美国莱姆德公司产品)。

主要仪器

高速冷冻离心机(Hermle ZK380)、紫外分光光度仪(Pharmacia Gene Quat II)、PE-9600 PCR仪(Perkin Elmer), 自动凝胶成像仪(Pharmacia)。

DNA提取

盐酸胍法[1]

取200 μl脐血标本用生理盐水洗3-4次, 离心至上层液体清晰, 弃去上清液后, 加入 6 mol/L盐酸胍200 μl和0.1 mol/L醋酸钠200 μl(pH 5.5), 充分混匀, 至少1小时。取以上液体至5 ml冰冷无水乙醇中, 小心吸放, 使絮状物缠绕成团。将絮状DNA吸至新的1.5 ml离心管中, 离心, 加70%乙醇洗1次, 离心。室温干燥后加无菌水溶解。-20℃保存。

改良盐酸胍法

取600 μl脐血标本用生理盐水洗3-4次, 离心至上层液体清晰, 弃去上清液后加入6 mol/L盐酸胍300 μl和0.1 mol/L醋酸钠300 μl(pH 5.5), 充分混匀, 至少1小时。在原1.5 ml离心管立即加入氯仿, 颠倒混匀, 离心, 取上清液平分到2个新的1.5 ml离心管中, 分别加入等量的异丙醇, 颠倒混匀至有絮状DNA沉淀出现, 离心, 弃上清。用70%乙醇洗1次, 离心。室温干燥后, 一管加无菌水溶解, 另一管为干粉状。-20℃保存。

DNA质量测定

72份经-20℃保存的CPD-A抗凝脐血标本分别采用以上2种方法进行DNA抽提, 所得的DNA经Pharmacia Gene Quat II紫外分光光度计测定浓度和纯度(A280/A260)。

HLA基因配型

采用PCR-SSP方法。随机挑选不同方法的不同脐血按操作方法按美国莱姆德公司的Micro SSPTM试剂盒(HLA-DRB)说明书进行HLA基因配型。PCR产物经常规琼脂糖电泳后, EB染色, 自动成像仪照相。利用人工和电脑软件同时判读实验结果。

结果

DNA的提取结果和纯度测定

受测试的72份脐血标本, 用盐酸胍法和改良的盐酸胍法提取DNA, 两种方法均全部成功, 但后者优于前者。

HLA基因分型

盐酸胍法和改良盐酸胍法提取的DNA基因分型结果, 除内参条带和阳性条带外, 在电泳孔附近出现非特异性条带及拖尾现象, 以及在最后一孔出现弱的假阳性条带, 这是由于DNA的纯度不足所致, 在判断结果时会产生不良影响, 由于DNA的质量改进, 以上的现象大有改善, 这样增加了基因分型的准确性。

讨论

HLA基因分型随着在临床移植中应用的开展, 发展迅速, 相继建立了各种的DNA分型方法。这些方法可以检测出仅相差几个碱基的HLA等位基因, 如PCR-SSOP方法能探测出1-2个碱基的差异[2]。在引物的选择与设计, 酶的质量都稳定可行的情况下, 各种DNA分型方法的关键在于模板DNA的制备。

传统的模板DNA提取方法是采用去垢剂如SDS等来破坏细胞组分, 溶解细胞膜, 使蛋白质变性, 再用蛋白酶K来消化去除蛋白质, 尤其是与DNA结合的蛋白质, 再用酚-氯仿抽提, 然后用乙醇或异丙醇沉淀核酸, 供PCR实验用。最早的分离方法是由Blin等[3]根据Gross-Bellard等提出的原始方案改良并建立的酚抽提法。而标准酚-氯仿法是目前最常用最可靠的方法之一, 所获的DNA纯度高, 可满足临床各种检测需要, 但操作繁琐, 耗时较长, 重蒸饱和酚处理复杂, 有污染和毒性作用。常规粗提如煮沸法等所提取的DNA质量难以满足HLA基因分型的要求, 而盐析法不可避免地要处理蛋白酶K, 要经过水浴步骤。盐酸胍法最初应用于有核细胞的RNA提取, Bowtell等[1]报道, 盐酸胍法可应用于有核细胞的DNA提取, 是一种可快速简便地提取完整的DNA, 可适用于范围广泛的各种组织细胞, 进行大量样本提取DNA的理想方法。该法操作较为简便, 没有重蒸饱和酚处理复杂, 没有污染和毒性作用, 适合脐血库的大量样本DNA的提取, 并可用于HLA基因分型。由于脐血库的日入库标本量大, 因此提取DNA要求方法操作简便, 易于掌握, 同时要求方法可用于陈旧血样的DNA提取。在应用盐酸胍法提取脐血DNA的一段时间后, 我们发现此法存在一些问题需要改进, 因此针对其操作较为繁琐、技术不易掌握等缺点, 进行了改良, 建立了适合脐血库中

应用盐酸胍法，在用乙醇沉淀DNA的过程中，不易观察到DNA的析出，用玻棒或加样枪吹吸过程中，容易将DNA打散，使DNA不缠绕成团，造成DNA的损失。此步骤技术不易掌握。脐血入库有一定的标准，白细胞数都在比较恒定的范围内，理论上同一方法所提取的各DNA的质量应较为恒定。由本研究结果可知，此法所提的DNA质量不稳定，其原因主要是这个步骤不易掌握。针对此种情况，在改良盐酸胍法中，改用氯仿抽提后，再用异丙醇沉淀DNA，这样就避免上述的技术问题的发生。

脐血经冷冻保存后，红细胞破裂后所形成的碎片中有大量脂肪、蛋白质，且呈不均匀块状的分布，造成抽提困难，难以得到高纯度的DNA。在改良盐酸胍法中，增加氯仿抽提后，再用异丙醇沉淀DNA，这样可减少因标本不新鲜所致的蛋白质和脂肪增多的影响，增加DNA的纯度和浓度。

在脐血库中，因为脐血本身将保存备用，提供给HLA配型的血量相对较少，而且需要备份脐血的DNA样本供日后复查核对。改良盐酸胍法对增加3倍血量所用的试剂只需1.5倍，这样不仅备份了脐血DNA，而且减少了工作量和试剂，耗材的费用也降低。

用异丙醇沉淀DNA可使所有实验步骤在1.5 ml离心管中进行。因为用乙醇沉淀要5倍体积于待沉淀物的乙醇，而异丙醇则为1:1，这有利于大量样品的提取。

盐酸胍法和改良盐酸胍法进行HLA基因分型都获成功。盐酸胍法所提取的DNA所扩增出来的产物有少量的非特异性条带出现，对HLA基因分型有一定的影响，而改良盐酸胍法使DNA的纯度和浓度有了很大的提高，所提取的DNA扩增产物在增加特异性方面有很大的改进。

因此，改良盐酸胍法不但操作简便，成本下降，而且在最少血量中提取出高纯度的DNA，完全能满足脐血库内HLA基因分型技术的要求。

【参考文献】

- 1 Bowtell DD. Rapid isolation of eukaryotic DNA. Anal Biochem, 1987;162: 463-465
- 2 Charron D, Fauchet R. Twelfth international histocompatibility workshop handbook. Pairs: 12th IHWC Secretariat, 1995:17-21
- 3 Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res, 1976; 3: 2303-2308

最热点



创新之冠花落谁家?



医学编辑中心成立了



考试第一练兵平台



看视频学在线投稿

相关文章

- ▶ 改良盐酸胍法提取脐血DNA用于HLA基因分型 2011-10-9
- ▶ 用碱性裂解法提取人血凝块中基因组DNA 2009-5-27



- ★ 加入收藏夹
- 👤 复制给朋友
- 🌐 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论

重置

▲ 上一页

当前第1页, 共1页

▼ 下一页



创新医学网
www.yixue360.com

[关于我们](#) | [合作伙伴](#) | [特色服务](#) | [客户留言](#) | [免责声明](#) | [学术团队](#) | [学术动态](#) | [项目合作](#) | [招贤纳士](#) | [联系方式](#)

电话: 400-6089-123 029-68590970 68590971 68590972 68590973 传真: 029-68590977

服务邮箱: vip@yixue360.com QQ: 1254635326 (修稿) QQ: 545493140 (项目合作)

Copyright © 2007 - 2012 www.yixue360.com , All Rights Reserved 陕ICP备:08003669号



匿名交谈