

外周血细胞 DNA、RNA 及血红蛋白同时提取法

李西平,钱新华,刘志杰(第一军医大学南方医院儿科,广东 广州 510515)

摘要:采用淋巴细胞分离液分离外周血中的有核细胞,经细胞裂解液处理,上清提取 RNA,沉淀提取 DNA,用分离液分离所得红细胞沉淀制备血红蛋白溶液。经对抽提物质量进行评价,发现 3 种提取物质量均高。本法能从少量外周血中同时分离 DNA、RNA 及血红蛋白,高效易操作,值得推广。

关键词:提取;外周血;DNA;RNA;血红蛋白

中图分类号:Q813.6 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2002)01-0051-03

DNA RNA and hemoglobin extraction from one sample of peripheral blood

LIXi-ping, QIANXin-hua, LIUZhi-jie

Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract Nucleated cells were isolated from peripheral blood of healthy normal adults, dissolved and centrifuged to acquire the supernatant for RNA and the deposit for DNA extraction. Hemoglobin was extracted from the deposit formed by the red blood cells. Property assessment of the extracts indicated high quality products, demonstrating that this method is highly efficient and operable in DNA, RNA and hemoglobin extraction from the same blood sample of limited volume.

Key words extraction; peripheral blood; DNA; RNA; hemoglobin

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 Du640 型紫外分光光密度仪(Beckman), PE-480 型 DNA 扩增仪(PE 公司)。BioFocus3000 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 1ml (EDTA·K₂ 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。10ml 试管 1 支,加入 1ml 淋巴细胞分离液,取上述稀释过的血液 2ml

小心加在细胞分离液上,注意保持界面。2000g 离心 20min。小心分别吸出中间细胞层,置 1.5ml 微量离心管(注意保留红细胞沉淀)。500g 离心 3min。弃上清。用 PBS 清洗细胞 2 次,500g 离心 2min。

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),140mmol/L NaCl,1.5mmol/L MgCl₂,0.5% TritonX-100]0.2ml,2 μl 的 2-巯基乙醇,混匀,置冰上 3min,500g 离心 3min。小心移取上清,置另一 1.5ml 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,10000g,4℃,离心 10min。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。10000g,4℃,离心 10min,取上清。再加入 200 μl 氯仿/异戊醇,混匀,10000g,4℃,离心 20min。取上清。向上清中加入 3mol/L 的乙酸钠 40 μl,及 -20℃ 的无水乙醇 1ml,混匀,-20℃ 至少 1h,4℃,10000g 离心 20min。弃上清。75%乙醇清洗沉淀 3 次,室温下干燥 20min。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 6V/cm,电泳时间 30min)。另 1 μl 用于紫外分光光度仪测 D₂₆₀ 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 3h。然后加入 200 μl Tris-HCl 饱和酚,混匀,10000g,4℃,离心 10min。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℃,10000g,离心 10min。取上清,加入

收稿日期:2001-05-28

基金项目:国家自然科学基金(39770784)

作者简介:李西平(1969-),女,河南洛阳人,2000年毕业于第一军医大学,在读博士,医师,电话 020-85141925

200 μ l 氯仿 / 异戊醇 , 充分混匀 , 4 \times 10000g, 离心 10min。取上清 , 加入 20 μ l 3mol/L 乙酸钠 , 混匀 , 加入 1ml 无水乙醇 , 混匀 , -20 $^{\circ}$ C 静置 1h。4 \times 10000g, 离心 20min。弃上清 , 室温下干燥 20min。加入三蒸水 5 μ l, 使充分溶解。4 μ 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 30min)。另 1 μ l 用于紫外分光光度仪测定 D() 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 0.5ml 生理盐水 , 混匀。取 200 μ l, 用生理盐水洗涤 3 次 , 3000g, 离心 5min。最后一次离心 10min。尽量吸去上清。向洗涤后的红细胞中加入 1ml 的双蒸水和 0.5ml 的四氯化碳 , 剧烈振荡 3min, 使彻底溶血。3000g 离心 10min。留取血红蛋白上清液 , 进行毛细管电泳 [5]。

2 结果

2.1 RNA 电泳及 D() 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 100~1000bp), 泳道 2 显示三条清晰的 RNA 带型 , 自下而上依次为 5S、18S、28S, 18S 较 28S 产量高。D₂₆₀/D₂₈₀ 为 1.95。

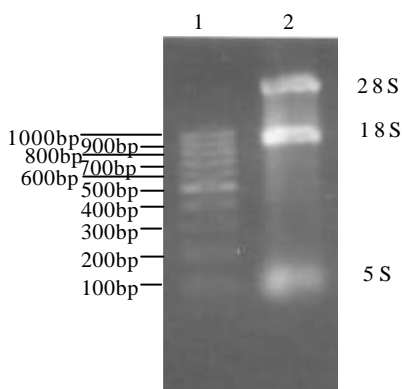


图 1 RNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of the RNA extract
Lane1: 100bp DNA ladder; Lane2: RNA

2.2 DNA 电泳及 D() 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 DNA/H ind 标记物 , D₂₆₀/D₂₈₀ 为 1.81。

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 α 、 β 、 δ 峰 , 分别代表 3 种相应的珠蛋白肽链。未见杂峰。

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

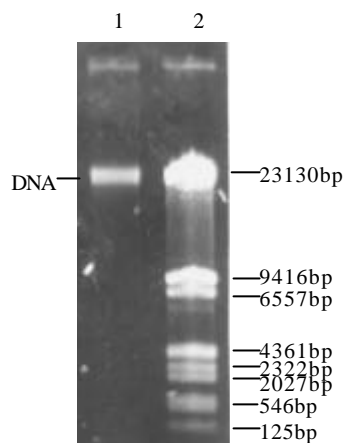


图 2 DNA 电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of the DNA extract
Lane1: DNA; Lane2: DNA/H ind markers

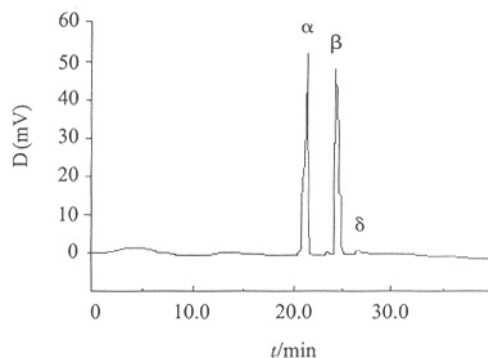


图 3 珠蛋白肽链毛细管电泳图

Fig.3 Capillary eletrophoresis of the globin chains

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 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): 1196-200.
- [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- γ 、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- γ and IL-4 and their protein 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, Gyparakis M, et al. Fetal hemoglobin expression in the compound heterozygous state for -117 (G A) A gamma HPFH and IVSII-745 (C G) beta-thalassemia: a case study [J]. Am J Hematol, 1999, 61(2): 139-43.

头孢三嗪治疗早期梅毒的疗效评价

Therapeutic effect of ceftriaxone on early-stage syphilis

孙乐栋, 周再高, 曾抗, 贺凤姣, 江丽芬 (第一军医大学南方医院皮肤科, 广东 广州 510515)

关键词: 梅毒; 头孢曲松; 头孢三嗪

中图分类号: R759.1; R978.11 文献标识码: B 文章编号: 1000-2588(2002)01-0053-01

梅毒是由苍白螺旋体引起的一种慢性传染病, 主要通过性接触传播。近年来, 其发病率呈高速持续递增的趋势^[1]。目前, 该病的治疗仍以青霉素为主。1999年1月~1999年5月间, 我们采用上海罗氏制药有限公司生产的头孢三嗪[商品名罗氏芬, 批准文号: 1998卫药准字 XF-0129(1)]治疗早期梅毒, 并与卞星青霉素 G 治疗对照, 进行临床及血清学比较分析, 现将结果报道如下。

1 病人与方法

1.1 病例来源

63例患者均为本院性病科就诊的初发病人, 将其随机分成治疗组与对照组。治疗组31例, 男17例、女14例, 年龄18~45岁, 平均26.9岁, 其中I期梅毒7例, II期梅毒21例, 潜伏梅毒3例; 对照组32例, 男17例、女15例, 年龄20~46岁, 平均25.6岁, 其中I期梅毒8例, II期梅毒20例, 潜伏梅毒4例。

1.2 病例纳入标准

血清快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)及梅毒螺旋体被动颗粒凝集试验阳性; 有或无临床症状, 病程在2个月~1年; 发病以来无药物治疗史、无青霉素及头孢三嗪过敏史, 能

够配合追踪随访者。

1.3 治疗方法

治疗组: 头孢三嗪 0.25g, 肌肉注射, 1次/日, 15d为1疗程。对照组: 卞星青霉素 G 240万 U, 分两侧臀部肌肉注射, 每周1次, 3周为1疗程。为预防吉海反应, 均于开始治疗前加服强的松片 5mg, 4次/d, 4d。

1.4 疗效判定标准^[2]

临床治愈: 临床症状及体征消失或在原皮损处残留浅表瘢痕或色素沉着斑, 3个月内 RPR 滴度下降4倍以上。血清学治愈: 临床症状与体征消失, RPR 每3月检查1次, 连续3次阴性。

2 结果

2.1 临床结果

治疗组临床治愈29例, 治愈率为93.5%, 其中6例遗留有色素沉着斑; 对照组治愈31例, 治愈率为96.9%, 8例遗留色素沉着。两者临床疗效无显著性差异 ($P > 0.05$)。两组患者一般均于用药后2~3d硬下疳干燥、收敛, 全部病例硬下疳7~10d内愈合。II期梅毒疹用药后2~3d颜色变暗, 2周内消失。

2.2 血清学结果

治疗组与对照组患者均进行1年以上血清学随访。治疗组31例中, 血清 RPR 转阴27例 (87.1%), 对照组32例中 RPR

(下转 58 页)

收稿日期: 2001-05-26

作者简介: 孙乐栋 (1976-), 男, 安徽萧县人, 2000年毕业于第一军医大学, 硕士, 医师, 助教, 电话: 020-85141888-87138