



# 组织DNA制备

## Tissue DNA Extraction

<http://www.shsmu.edu.cn/>



# 一、提取DNA总的原则：

- 1 保证核酸一级结构的完整性；
- 2 其他生物大分子如蛋白质、多糖和脂类 分子的污染应降低到最低程度；
- 3 核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子；
- 4 其他核酸分子，如RNA，也应尽量去除。

2009年3月

上海交通大学医学院





## 二、样本来源(Specimen):

- ❖ 理论上所有有核真核细胞、细菌、病毒都可以提取**DNA**
- ❖ 样本选择取决于试验目的
- ❖ 全血是基因组提取最常见的样本



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 血清、血浆、外周血有核细胞、痰液、体液、棉拭子采集的各种分泌物、组织（包括骨髓）和羊水等都是分子诊断的检验材料，其中全血、血浆（血清）标本占分子诊断的**60%以上**

2009年3月

上海交通大学医学院



# DNA提取前样本采集、预处理和保存:



## (一) 全血

### 1. 抗凝剂

**EDTA-Na<sub>2</sub>**

或枸橼酸钠

作为抗凝剂

不宜使用肝素

	抗凝剂处理血		
	肝素	柠檬酸*	EDTA*
-80℃	保存2个月, 第10天收率90%		
4℃	第四天收率90%		
	第10天提取效果差	第十天收率85%	
室温	提取效果差		第四天收率90%
			第十天提取效果差

2009年3月

上海交通大学医学院



## (二) 血浆和血清(plasma and serum)

❖ 血浆和血清是检测释放入血的游离核酸最主要的标本来源，用来检测病毒、细菌，以及肿瘤细胞等等释放出来的游离核酸和蛋白质产物，在临床上被广泛应用于病原微生物和肿瘤标志基因的检测中



2009年3月

上海交通大学医学院



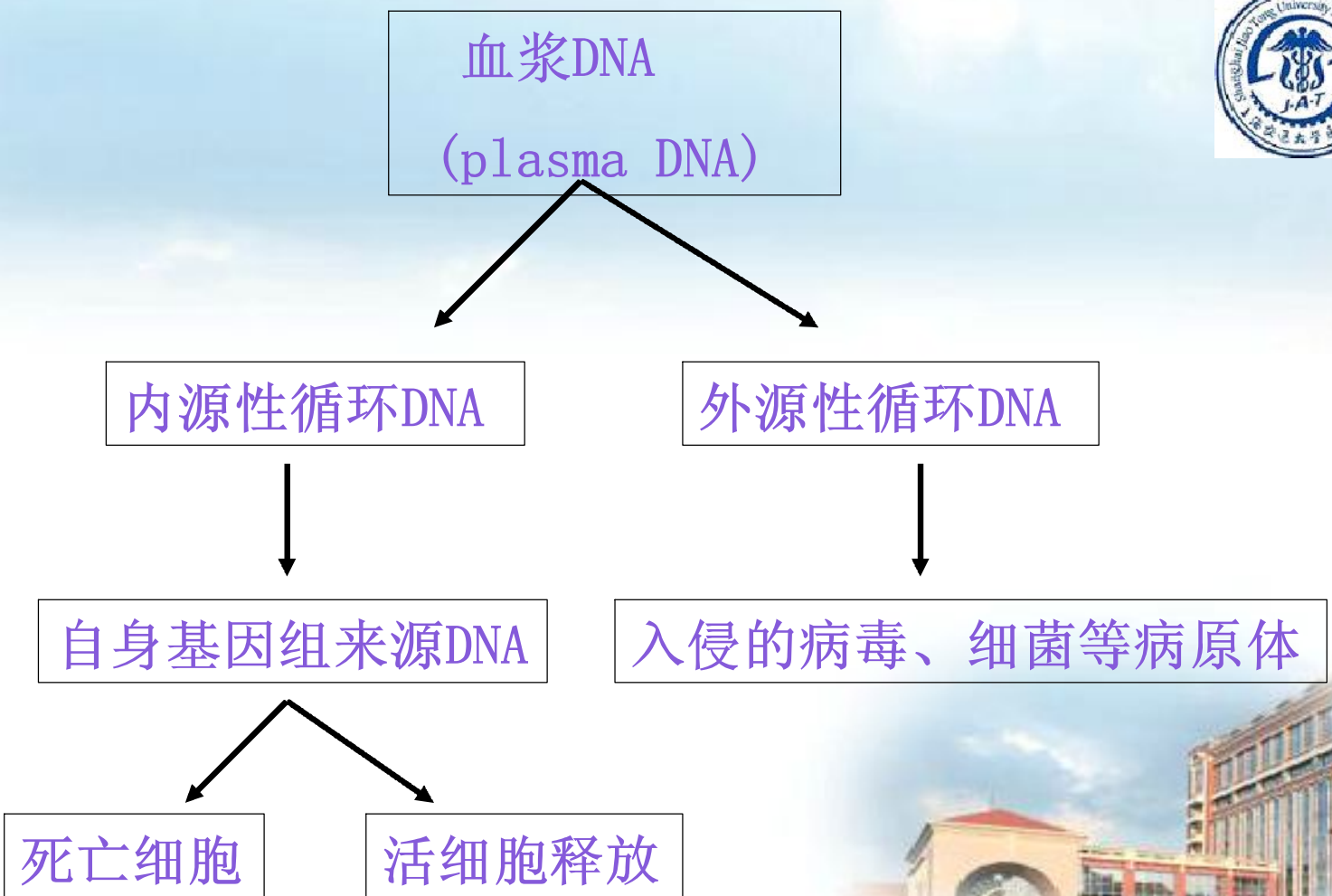


- ❖ 血浆DNA又称为循环DNA，是一种无细胞状态的胞外DNA，主要是游离的单链、双链DNA或DNA-蛋白质的混合物
- ❖ 它在未来分子诊断的应用中具有广阔前景
- ❖ 血浆DNA成分的来源分为内源性和外源性两个部分，其中入侵的病毒、细菌等病原体释放入血液的核酸是外源性血浆DNA最重要的成分



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院





### (三) 体液

- ❖ 尿液、胸水、腹水和脑脊液等标本离心后取沉淀提取体液中细胞的核酸
- ❖ 对释放入体液中的病毒或细菌的游离核酸，采用超高速离心或体液浓缩后再提取核酸



2009年3月

上海交通大学医学院



## (四) 分泌物

(以痰液为例)

- ❖ 痰液是检测呼吸道病原体核酸的主要样本，深部咳痰，患者采集早晨起床后的第一口痰，采集前应先漱口，以避免混入大量的口腔脱落的上皮细胞和唾液等影响检测结果



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 结核分枝杆菌的检测，可以用NaOH液化痰液去除粘液和蛋白质；非结核分枝杆菌的核酸，使用生理盐水后取上清液
- ❖ 痰液检测病原体核酸不适宜作定量分析，检测时尽可能提高痰液中细胞成分的回收率



2009年3月

上海交通大学医学院



## 三、DNA提取的基本步骤

### 1、核酸的释放(DNA release):

破裂细胞 → 释放核酸

机械法与非机械法

(非机械法中溶胞法是最广泛的方法)



2009年3月

上海交通大学医学院

# 各种组织细胞破碎方法



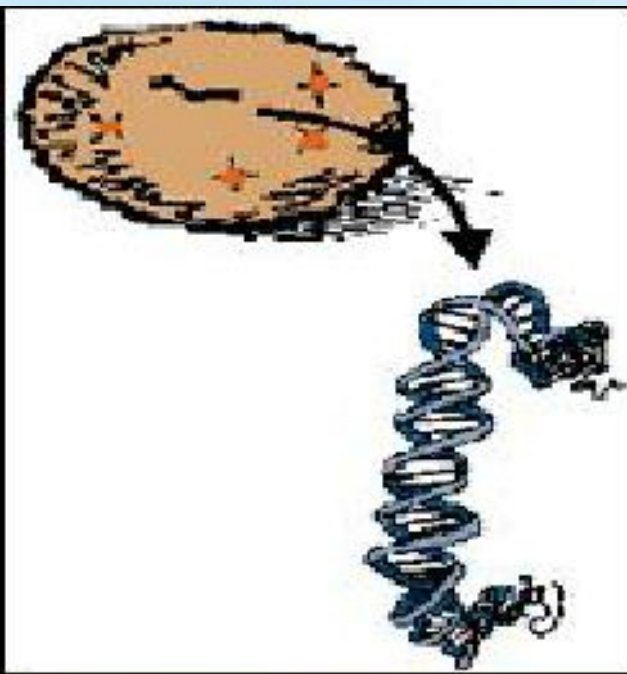
	细胞破碎方法	应用
I 机械法	1匀浆法	机体软组织
	2捣碎法	动物韧性组织
	3研磨法	细菌、酵母
II 物理法	1超声法	细胞混悬液
	2反复冻融法	培养细胞
	3冷热交替法	细菌、病毒
	4低渗裂解	红细胞
III 化学法	1有机溶剂	细菌、酵母
	2去垢剂	组织、培养细胞
	3酶解法	细菌、酵母

2009年3月

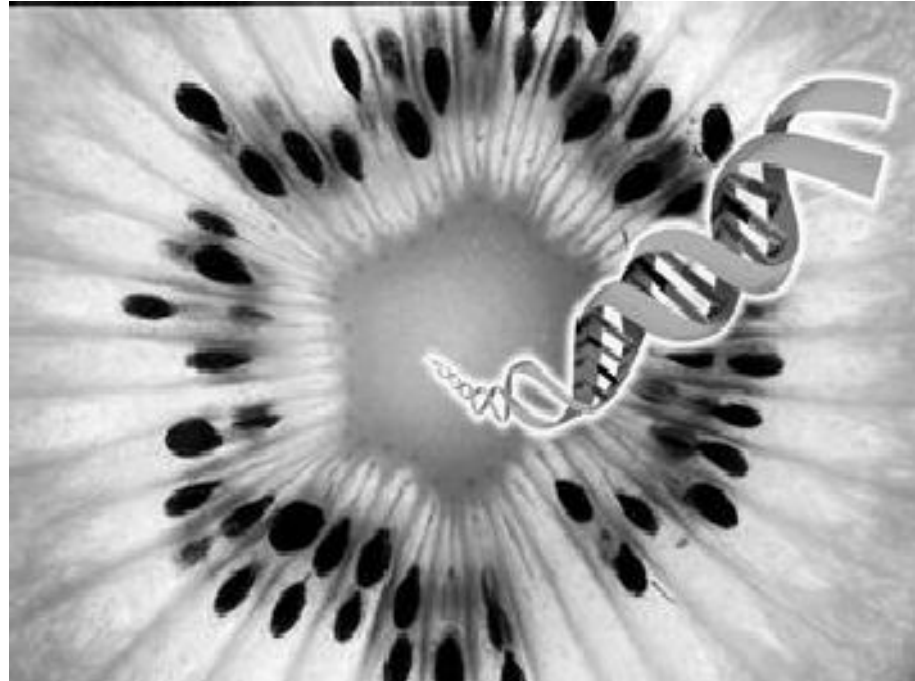
上海交通大学医学院



## 破裂细胞、释放核酸



Extracting DNA from  
and organism.



2009年3月

上海交通大学医学院



## 2、核酸的分离与纯化(isolation and purity):

将含有核酸分子复杂复合物中，将核酸与其他物质分离

非核酸的大分子污染物（蛋白质、多糖和脂类分子）、非需要的核酸分子、试剂和溶液



2009年3月

上海交通大学医学院





### 3、核酸的浓缩、沉淀与洗涤

沉淀可去除部分杂质与某些盐离子

加入一定的盐类（醋酸钠、氯化钠等）后使用有机溶剂  
（如乙醇、异丙醇等）

少数盐类可使用70-75%的乙醇洗涤



2009年3月

上海交通大学医学院



## 4、DNA鉴定(DNA identification)

### DNA的鉴定

浓度鉴定(concentration)

纯度鉴定(purity)

完整性鉴定(integrity)



2009年3月

上海交通大学医学院

# 浓度鉴定 (concentration identification)



## 1) 紫外分光光度法 (ultraviolet spectrophotometry)

测定DNA在 $A_{260\text{nm}}$ 的光吸收值。

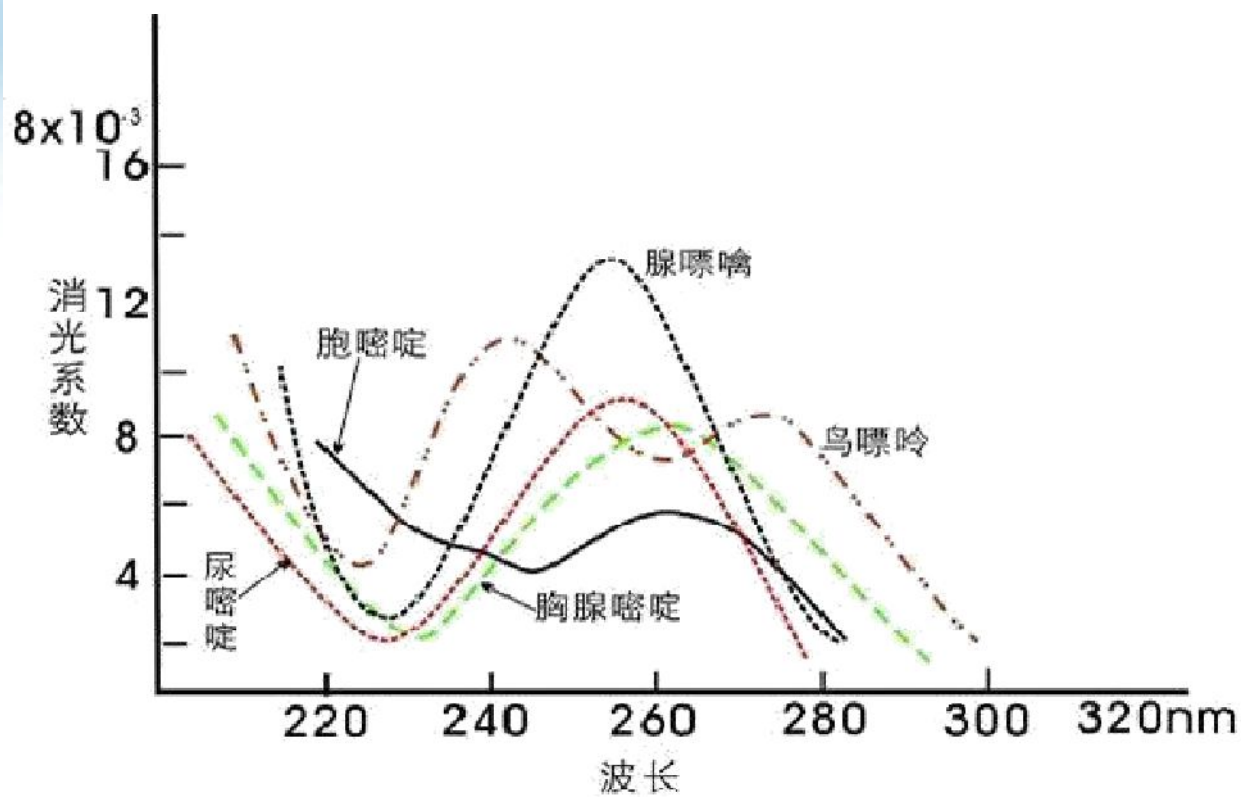
$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

(A值等于1时，相当于 $50 \mu\text{g/ml}$ 双链DNA， $40 \mu\text{g/ml}$ 单链DNA或RNA， $20 \mu\text{g/ml}$ 单链寡核苷酸)

紫外分光光度法只用于测定浓度大于**0.25ug/ml**的核酸溶液。

2009年3月

上海交通大学医学院



各种碱基的紫外吸收光谱

2009年3月

上海交通大学医学院



## 2) 荧光光度法

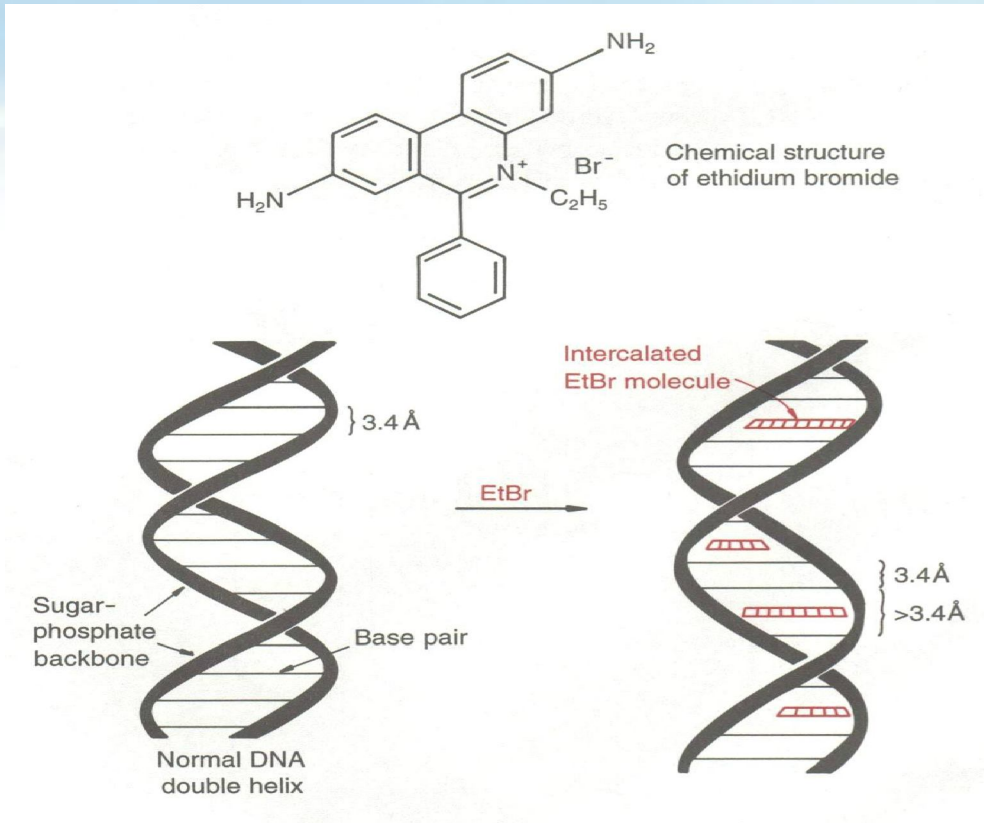
荧光染料溴化乙锭，可嵌入到碱基平面，而发出荧光，  
且荧光强度与核酸含量呈正比。

适用于低浓度核酸溶液的定量分析。（1-5ng）



2009年3月

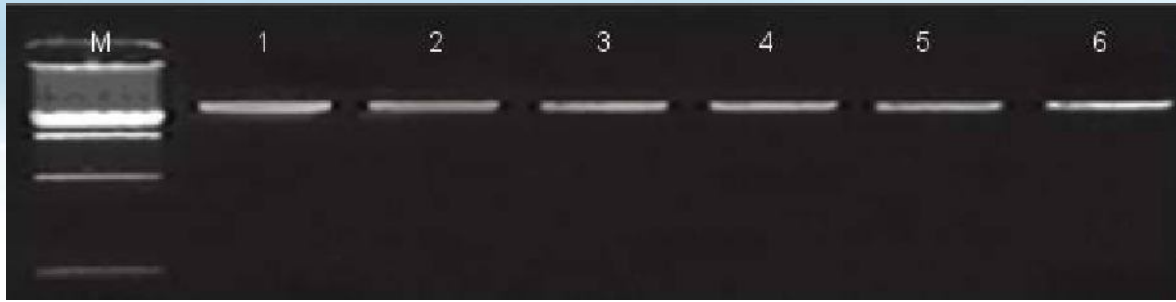
上海交通大学医学院



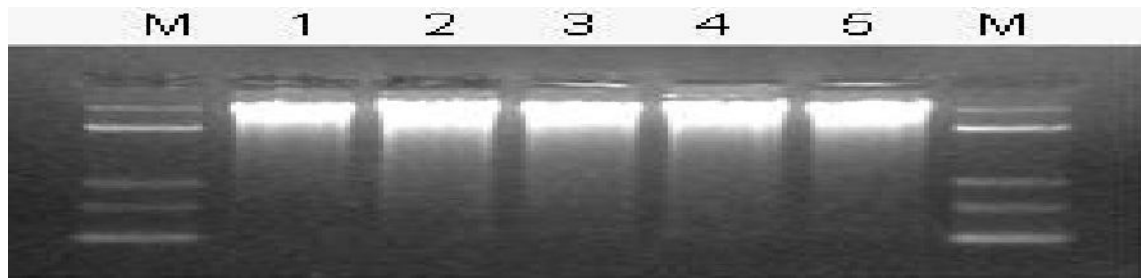
## EB与DNA的结合

2009年3月

上海交通大学医学院



500 $\mu$ l全血提取的基因组DNA电泳



动物组织提取基因组DNA

2009年3月

上海交通大学医学院





# 纯度鉴定(purity identification)

## 紫外分光光度法:

在260nm和280nm处测定DNA溶液的光吸收，纯的DNA，低于此值表明制备物中留有蛋白质成份。高于此值表明有RNA的残留量。

$A_{260}$ 与 $A_{280}$ 之比应在1.80；纯的RNA  $A_{260}$ 与 $A_{280}$ 之比应在2.0。

**A260/A280比值是纯度检测的重要指标。**

2009年3月

上海交通大学医学院

# 完整性鉴定(integrity identification)



## 凝胶电泳法:

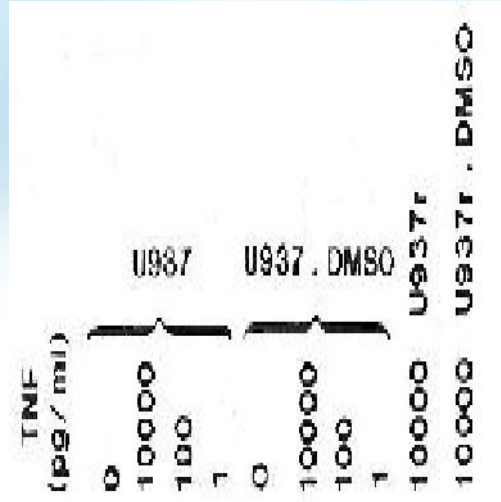
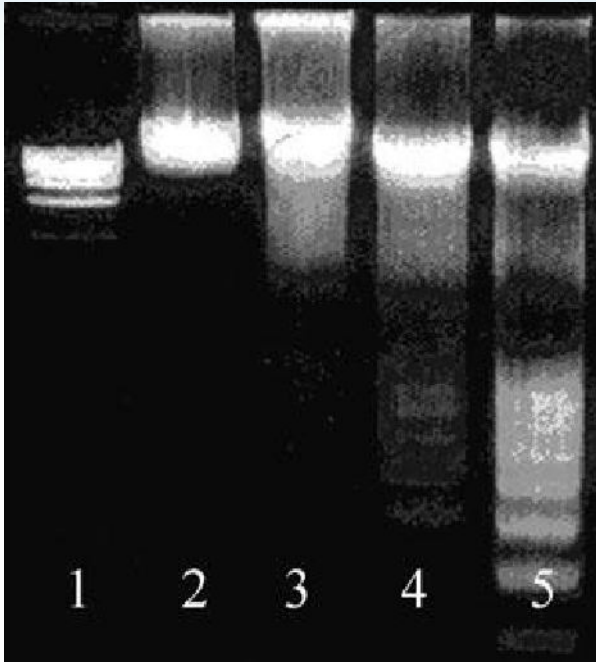
基因组DNA电泳，在电场中泳动慢，如果发生降解，可出现电泳图谱脱尾现象；

总RNA电泳，观测各条带的含量，提示是否存在RNA降解；如加样槽中存在条带，可能是DNA污染。

2009年3月

上海交通大学医学院





2009年3月

上海交通大学医学院



## 5、核酸的贮存——DNA保存 (storage)

### 1) 短期贮存:

4°C或-20°C存放于TE (tris和EDTA) 缓冲液中。

TE缓冲液的PH与DNA 贮存有关, PH为8时, 可减少DNA脱氨反应, PH低于7.0时DNA容易变性。

### 2) 长期贮存:

TE缓冲液中-70°C保存数年; 在DNA溶液中加入一滴氯仿可有效防止细菌和核酸的污染。

2009年3月

上海交通大学医学院



## 第二部分 基因组DNA的分离与纯化

<http://www.shsmu.edu.cn/>



# 一、DNA样品准备 (specimen preparation)

常见的标本:

血液、尿液、唾液、组织及培养细胞等

生物组织:

最好新鲜组织, 若不能马上提取, 应贮存

—  $-70^{\circ}\text{C}$  或液氮



2009年3月

上海交通大学医学院





## 二、DNA提取

### (一) 酚抽提法:

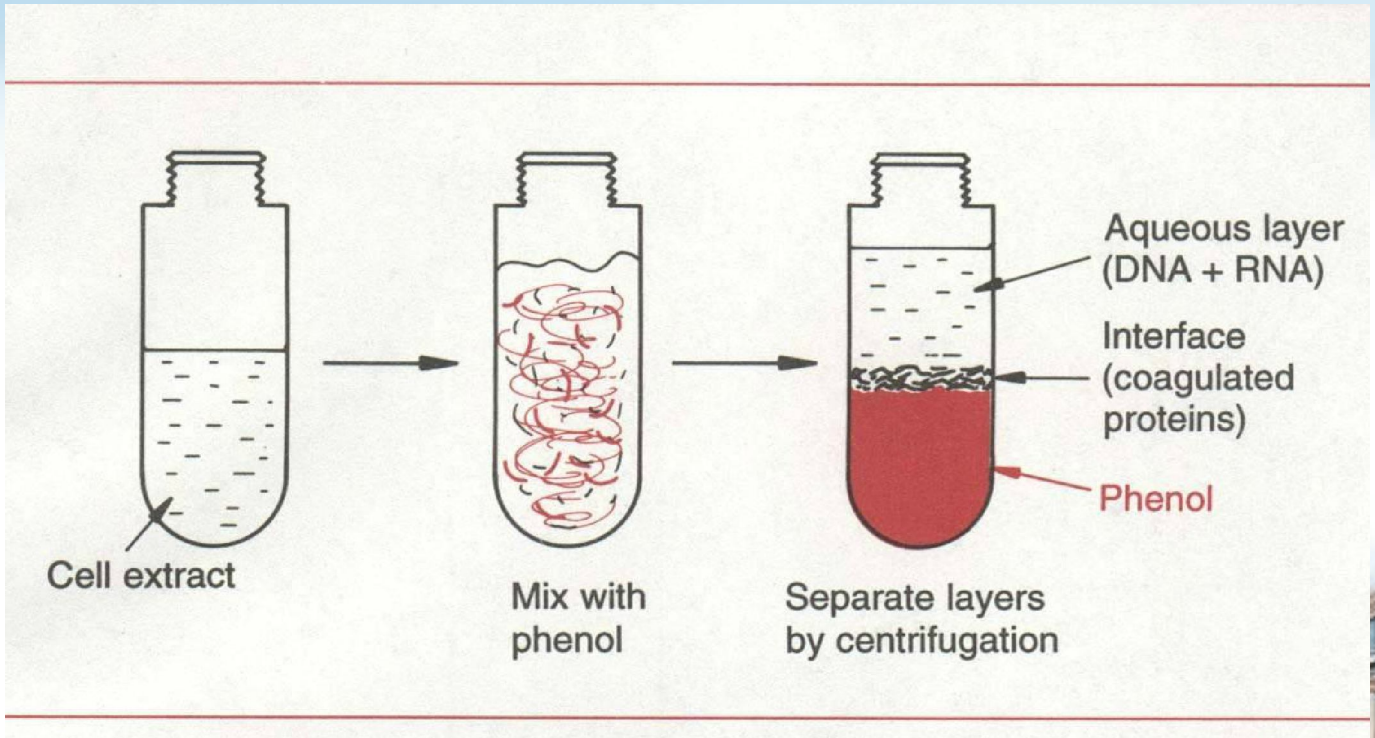
先用EDTA、 SDS 、蛋白酶K破碎细胞，消化蛋白，然后用pH8的Tris饱和酚或酚-氯仿抽提DNA，最后乙醇或异丙醇进行沉淀。获DNA大小为100—150kb。



2009年3月

上海交通大学医学院





## DNA酚抽提法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院



## 主要试剂的作用:

- EDTA: 1 二价金属螯合剂, 抑制核酸酶;
- 2 降低细胞膜的稳定性



2009年3月

上海交通大学医学院



## SDS的作用:

- 1 溶解膜蛋白和脂肪，从而是细胞膜破裂
- 2 溶解核膜和核小体，使其解聚，将核酸释放出来
- 3 对RNA、DNA酶有抑制作用
- 4 与蛋白质形成R-O-SO<sub>3</sub> .... R蛋白质复合物，使蛋白质变性

2009年3月

上海交通大学医学院



## 蛋白酶K (protease K):

- ❖ 水解蛋白质的作用，消化DNA酶和细胞中的蛋白质
- ❖ 蛋白酶K与其他蛋白酶相比，它具有更强的水解能力，而且在SDS、EDTA存在时仍保持较高活性，可同时使用

2009年3月

上海交通大学医学院





## 苯酚 (phenyl hydroxide ) 的特点:

- ❖ 蛋白质强变性剂、抑制DNA酶活性
- ❖ 苯酚溶于有机溶剂，微溶于水
- ❖ 提取DNA前苯酚用Tris-HCl饱和，防止吸收过多DNA，降低DNA的损失率
- ❖ 氧化苯酚会破坏DNA



2009年3月

上海交通大学医学院

## 为什么苯酚要重蒸饱和后才能用于DNA的分离？



苯酚在空气中经常被氧化生成醌，它能够产生自由基，直接用于DNA分离，会使磷酸二酯键断裂，造成DNA降解。

氧化苯酚需要经过高温重蒸以除去氧化物，并用Ttis-Hcl饱和酚，并调节至中性。



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ PH8.0的Tris溶液可以似的抽提出的DNA进入水相，减少在蛋白质层滞留。
- ❖ 在酚或酚-氯仿中加入少许的异戊醇，是可以减少实验中的气泡的产生，而且利于分相，保持分相的稳定性。



2009年3月

上海交通大学医学院





# DNA的沉淀

## 1) 无水乙醇沉淀(ethanol )

沉淀前往往加入**NaCl**等盐离子，作用是中和核酸分子表面的负电荷，有助于分子之间的聚集。

无水乙醇可以吸收分子之间的水，使**DNA**沉淀析出，无水乙醇使用前冰冻，可以减少**DNA**沉淀析出过程释放热量对**DNA**的损伤。

## 2) 异丙醇沉淀(isopropanol )

除了使**DNA**沉淀外，还可以溶解少量的小的**RNA**分子



2009年3月

上海交通大学医学院



## (二) 甲酰胺解聚法:

- ❖ 破碎细胞同上，然后用高浓度甲酰胺解聚蛋白质与DNA的结合，再透析获得DNA。高浓度甲酰胺可以裂解蛋白质与DNA的复合物，可以使蛋白质变性。减少了酚多次抽提的步骤
- ❖ 甲酰胺解聚法适用于从标本中制备高分子量的DNA样品。可得DNA 200kb左右。



2009年3月

上海交通大学医学院



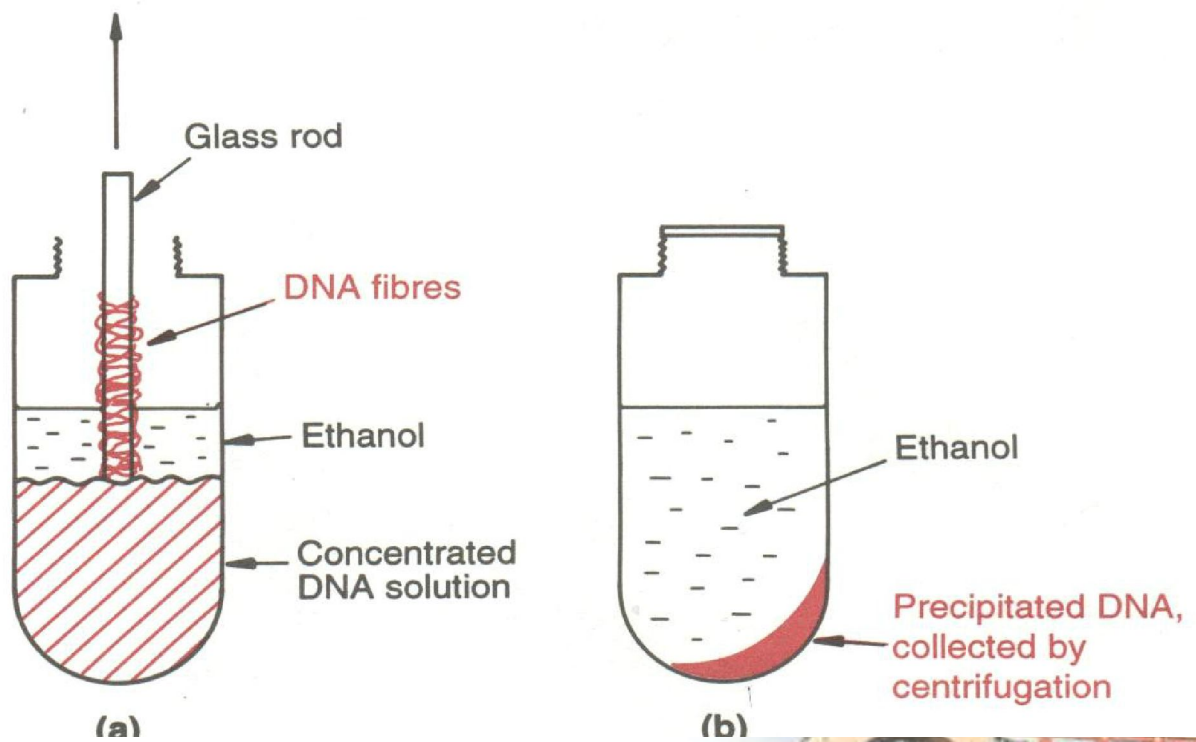
### (三) 玻璃棒缠绕法:

- ❖ 用盐酸胍裂解细胞，将裂解物铺于乙醇上，然后用带钩或U型玻璃棒在界面轻搅，DNA沉淀液绕于玻棒。生成DNA约80kb



2009年3月

上海交通大学医学院



DNA玻璃棒缠绕法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院

# Extracting DNA Glop from Wheat Germ

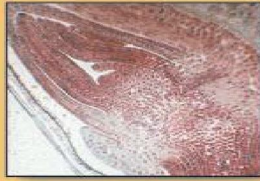
Extract

# DNA

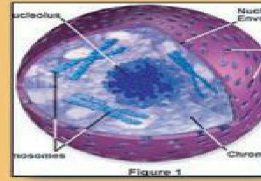
Extract



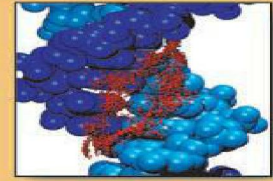
Wheat



Cells



Nucleus



DNA

1. Take a tube with one gram of wheat germ. Find the 20 mark on the tube.

2. Pour water into the tube up to the 20 mark on the tube.



3. Shake the tube for three minutes.



4. Add one soap tube into the big tube.



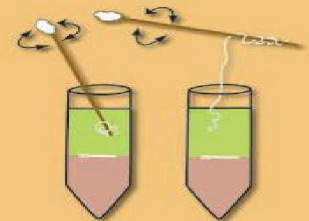
5. Gently rock the tube for three minutes. Try not to make any bubbles.



6. With the tube at an angle, gently pour alcohol into the tube up to the 35 line. Do not shake!!!!



7. Do you see some white glop in the top layer? Take a swab and try to remove the glop with the wooden end.



8. Put some glop into a clear tube. You may keep the tube as a souvenir.



The glop is DNA along with some carbohydrates and protein.



# DNA提取试验中常遇到的问题



## ❖ 基因组DNA收率较低或无基因组DNA

样本材料太少

细胞破裂不够充分，DNA释放不完全

离心力偏小

两相分离不完全.....



2009年3月

上海交通大学医学院



## ❖ DNA降解的原因

样本不够新鲜，采集材料过陈旧

样本本身存在大量DNA酶

## ❖ 提取DNA的生物活性差的原因？

提取的基因组DNA盐浓度过高

基因组DNA中乙醇未清除净

基因组DNA中可能存在其他抑制因素

## ❖ 提取基因组DNA，有时加入蔗糖的原因

加入多糖，保护DNA长度

2009年3月

上海交通大学医学院







## 实验步骤

- 1** 2.5 ml 兔肝组织匀浆，加入等体积苯酚-氯仿，旋紧缓慢颠倒混匀5 min.
- 2** 2500rpm离心10分钟。
- 3** 取水相置干净离心管中。
- 4** 加入等体积氯仿-异戊醇,旋紧缓慢颠倒混匀5 min.
- 5** 2500rpm离心10分钟。



2009年3月

上海交通大学医学院



6. 吸上清液至新离心管中，加入**5mol/L NaCl**至终浓度**0.3mol/L**,加入**2.5**体积冰无水乙醇，紧缓慢颠倒混匀，**2500rpm**离心**10**分钟，见白色沉淀。
7. **70%~75%**乙醇洗涤，**2500rpm**离心**5**分钟。
8. **DNA**沉淀溶解于**2 ml TE**中，得到**DNA**原液。
9. 测定**DNA**浓度和纯度(**1:30**稀释)。

2009年3月

上海交通大学医学院

