

从组织样品中快速提取高纯度 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抽提，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。这些方法各有各的优缺点，如酚氯仿抽提，虽然可在实验室中简单配制以达到节省经费的目的，但是却存在使用危险化学品情况，以及得到的 DNA 纯度低等不良因素。Magen 公司的 HiPure Tissue DNA Kits 是专门动物组织等生物样品而设计的。该系列是基于硅胶柱的纯化方式，可快速地从各种用量的动物组织样品提取高纯化的总 DNA，整个过程无需接触酚氯仿，也无需用到醇类沉淀。DNA 带型单一完整性好，片段长度约为 20-60kb。DNA 纯度高，可直接用于 PCR，酶切，Southern 杂交等。HiPure Tissue DNA Kits 系列包括有：

名称	组织用量	结合力	编号
Tissue DNA Micro Kit	≤5mg	50μg	D3125
Tissue DNA Mini Kit	≤30mg	100μg	D3121
Tissue DNA Midi Kit	≤200mg	1000μg	D3122
Tissue DNA Maxi Kit	≤1g	5000μg	D3123
DNA Nano Kit	≤10mg	50μg	D3120

实验结果

◆ HiPure Tissue DNA Mini Kit

1. DNA 的产量和纯度

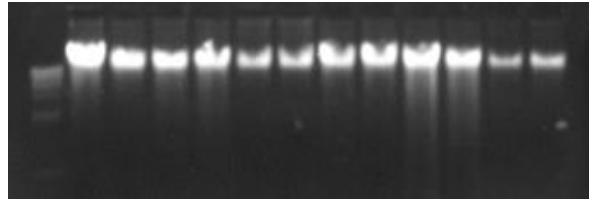
取各种动物组织(每一种组织重复做 3 份抽提)，用 HiPure Tissue DNA Kit 进行提取，提取后采用 Nanodrop 2000 测量其 OD 值，结果如下。由数据可知，试剂盒得到的 DNA，OD260/280 约 1.70-1.90，表明 DNA 纯度高。由产量可知，3 个重复的抽提，产量波动都在 10%，得率稳定。

组织(10mg)	用量	A260/280	产量μg
鼠耳	25mg	1.88-1.89	34.4-36.4
鼠尾	20mg	1.86-1.89	21.9-33.8
鸡肾	10mg	1.79-1.81	12.91-14.49
鸡脑	10mg	1.82-1.86	5.8-6.4
蛙脾	5mg	1.83-1.90	31.7-35.6
蛙皮	20mg	1.80-1.90	13.96-20.98
蛙肺	10mg	1.81-1.89	37.6-40.7
蛙趾	10mg	1.80-1.81	13.73-16.60
鱼肝	5mg	1.82-1.85	13.5-17.4
鱼心	10mg	1.80-1.85	7.36-9.36
鱼肉	20mg	1.84-1.90	5.66-7.98

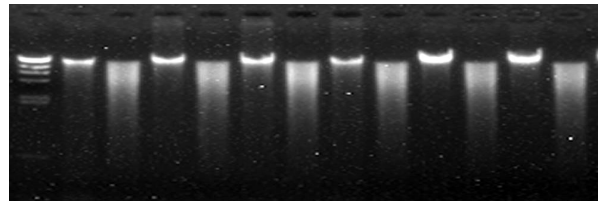
2. DNA 完整性及酶切效果：

取上述纯化得到的基因组 DNA(1μg)经 Hind III 酶切 16 小时，将酶切产物和原始的基因组 DNA 上样于 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析，结果如下。由图可知，基因组 DNA 条带单一，完整性好。经 HindIII 酶切 16 小时，酶切效果好。(M: lambda-HindIII DNA Marker)

M | Liver| Kidney|Heart|Lung| Spleen|Muscle|

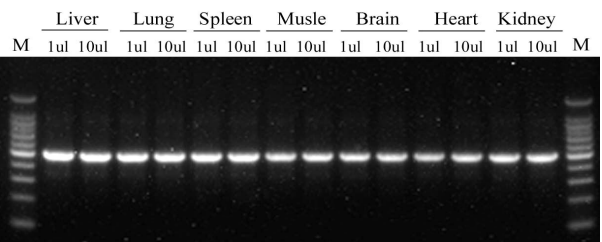


M |Liver| Kidney|Heart | Lung | Spleen| Muscle|



3. PCR 扩增效率

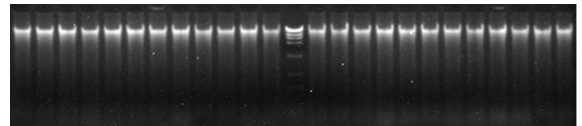
取 20mg 鸡的各种组织样品，经试剂盒纯化后，用 400μl Elution Buffer 洗脱出 DNA。取 1μl 和 10μl 纯化的得到的 DNA，用 PCR，35 循环扩增 1000bp B-actin 基因片段。得到的 PCR 产物上述于 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析，结果如下。由图可知，使用试剂盒得到的 DNA 可直接用于 PCR 扩增，不抑制 PCR。



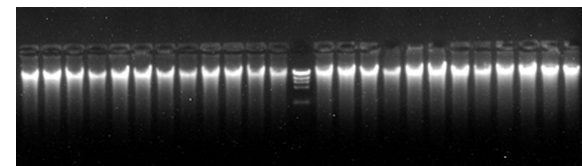
● Tissue DNA 96 Kit 抽提结果

取 24 只老鼠的尾巴和耳朵，用 Tissue DNA 96 Kit 提取 DNA。取 10% DNA 上述于 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析，结果如下。

小鼠尾巴



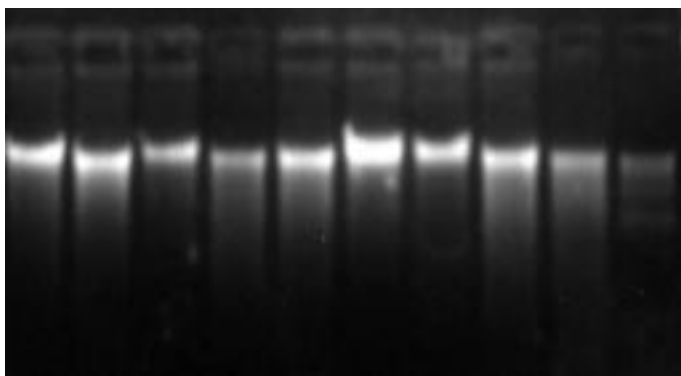
小鼠耳朵



● Tissue DNA Midi Kit 抽提结果

组织	用量	A260/280	A260/230	产量 μg
鸡肾	200mg	1.86	2.2	250
鸡脑	200mg	1.88	2.19	112
鸡脾	50mg	1.8	1.92	366
鸡皮	200mg	1.81	1.85	208
鸡肺	100mg	1.86	2.14	370
鸡肝	100mg	1.78	1.76	274
鸡心	200mg	1.87	2.29	150
鸡肉	200mg	1.79	2.08	70
脂肪	200mg	1.79	2.08	99

肾 脑 脾 皮 肺 肝 心 肌 脂肪 M



相关问题回答

1. 提取基因组 DNA 是否需要液氮研磨样品?

一般情况下不需要使用液氮研磨。虽然液氮研磨可打散样品而加速裂解消化,但液氮研磨处理非常耗时且危险。其它方法也都可以达到同样的效果,如机械匀浆器匀浆,玻璃匀浆器匀浆,或把组织块尽量剪成小碎片都可以达较好的效果,而且这些方法简单方便,处理多个样品时优势更加明显。

2. 试剂盒获得的 DNA 片段有多大?

该方法得到的基因组 DNA 一般约为 20-60Kb。提取高分子量基因组 DNA(50-150KB)时,推荐使用 SolPure Tissue DNA Kit。

3. DNA 的洗脱体积与次数

由于基因组 DNA 片段大,较难从硅胶柱的滤膜上洗脱出来。研究表明,把洗脱液预热至 65°C 后,转移至滤膜上静置 3-5 分钟再进行洗脱,可明显提高洗脱效率。当产量较高时,推荐进行 2-3 次的洗脱。若需要获得较高浓度时,建议每次最低的洗脱体积为 50 μl ,洗脱 2-3 次。该方法得到的 DNA 浓度一般在 100-600ng/ μl 。

4. 如何提高 DNA 的产量

处理基因组 DNA 丰富的样品,如肝脏,肾脏,脾脏,肺等组织 10mg 样品就能获得高产量的 DNA(20-90 μg)。处理基因组 DNA 含量低的样品,如肌肉,皮肤,骨头等,10mg 样品一般只能获得 2-10 μg ,此时可加大组织用量,并按比例扩大 Buffer ATL, Proteinase K, RNase A, Buffer DL 和乙醇的用量,然后用一个柱子多次过滤吸附 DNA。Buffer GW1 和 Buffer GW2 无需增加。研究表明,处理鱼类肌肉

时,组织用量可高达 60mg,而不会引起柱子的堵塞。

5. 如何检测基因组 DNA 的完整性

基因组 DNA 的完整性可通过电泳检测。检测基因组 DNA 的完整性时,一般采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,并加入 Lambda DNA/HiBind III DNA Marker 为对照。完整性的基因组 DNA 电泳表现为:条带单一,在 DNA Marker 最大的条带(23kb)附近。如果电泳时条带显弥散现象,无明显主带,表明 DNA 发生降解。由于 PCR 只需检测一小部分基因组(100-2kb),这种降解并不会影响 PCR。研究表明基因组 DNA 降解成 1kb 以下,仍然可以用于 PCR 检测。

6. 试剂盒可适合处理的样品

答:该试剂盒适合各种动物组织样品,培养细胞,细菌,唾液,拭子,漱口水,棉签,石蜡包埋组织等。

7. 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,这主要是因为样品中富含多糖类杂质。计算比值时应该是: $(\text{OD}260-\text{OD}320)/(\text{OD}280-\text{OD}320)$, 或 $(\text{OD}260-\text{OD}320)/(\text{OD}230-\text{OD}320)$,这样得到的比值才是正确的。计算 DNA 浓度也应该是: $C=(\text{OD}260-\text{OD}320) \times 50 \times \text{稀释倍数}$

8. 进行 96 孔板操作时,组织样品如何匀浆会比较方便?

答:处理 96 个样品时,如果每个样品都要进行液氮研磨或匀浆,其工作量是非常巨大的,我们不推荐使用这些方法操作。处理 96 个样品时,最简单的操作就是:是剪刀或刀片将样品剪成小片(一份样品剪 3-10 次),然后转移至含有裂解液的 96 孔板中;处理第二份样品,用干净的吸水纸擦去组织块,用灭菌水清洗剪刀/刀片和镊子一次,用 70%乙醇清洗一次,在酒精灯上烤 10-30 秒,在灭菌水清洗一次后,再进行操作。