

安全可靠的全血 DNA 抽提试剂盒

简介

血液样品中含有丰富的 DNA 信息，包括有白细胞中的线粒体 DNA、基因组 DNA、循环 DNA(多数由肿瘤细胞凋亡后，其 DNA 游离到血液中)，还有寄生的病毒 DNA 或微生物 DNA，这些 DNA 是临床检测或诊断的重要参数，也是医学研究的极为宝贵的材料。从血液样品中提取 DNA 主要存在三个问题：

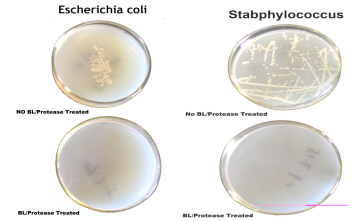
1. 样品传染性强，对操作者和环境存在极大的危害；
2. 样品中 DNA 来源复杂，操作流程中可能会丢失其中的一部分的核酸，如病毒 DNA，或游离 DNA，而导致下游的检测失败；
3. 血液中含有大量的杂质和抑制因子。

目前从全血样品中提取 DNA，有许多种方法可以采用。如酚氯仿抽提、盐析法等。但是这些方法都需要对血液进行预处理，即先去除不带核的红细胞，分离得到白细胞后再进行提取。由于去除红细胞的过程中不能失活或杀死病原体，其得到的废液(红细胞裂解液)和接触的耗材都可能被病原体污染而具有传染性，对整个实验室的环境和操作者来说都是危险的。此外去除红细胞过程中，病毒，微生物，或循环 DNA 等有用的核酸信息也被丢失，而导致实验或检测失败。Magen 公司提供的 HiPure Blood DNA Kits 系列采用硅胶柱纯化技术，可直接裂解全血样品，无需分离白细胞的过程。全血样品直接同裂解液和蛋白酶相混合，各种病原被失活，因而大大降低血液的传染强，减少对环境污染以及操作者被感染的机会。由于试剂盒直接裂解消化样品，除淋巴细胞 DNA 外，其它循环 DNA 以及病毒和微生物的 DNA 也可以被回收。该产品系列适合于从全血样品，血清，血浆，唾液，体液等液体样品中提取总 DNA。HiPure Blood DNA Kits 系列包括有：

产品名称	样品类型	处理量	柱子
Blood DNA Mini Kit	抗凝血/血	250µl	1.5ml 柱
Blood DNA Midi Kit I	清，血浆/	1ml	15ml 柱
Blood DNA Midi Kit II	唾液/细胞	2 ml	15ml 柱
Blood DNA Midi Kit III	培养液，体	3 ml	15ml 柱
Blood DNA Maxi Kit	液等	10ml	50ml 柱
Blood DNA 96 Kit		200µl	96 孔板

裂解液/Proteinase K 快速失活病毒及细菌

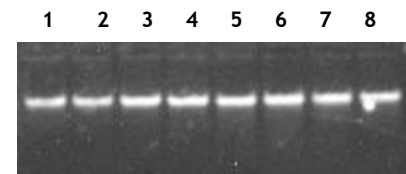
取 2ml 培养过夜的大肠杆菌 *E.coli* 和金黄色葡萄球菌的菌液，以及 2ml Lambda 噬菌体培养液，加入 2ml Buffer AL 和 100µl Proteinase K，70℃处理 10 分钟。取 50µl 细菌消化液，加入 0.5ml 灭菌水稀释后，倒入 LB 平板后，培养 12-16 小时。取 50µl 噬菌体培养液，加入 0.5ml 灭菌水稀释后，感染大肠杆菌并铺制噬菌斑平板，培养 12 小时。结果表明，经过 Buffer AL/Proteinase K 处理 10 分钟后，大肠杆菌 *E.coli* 以及极难裂解的的葡萄球菌都被杀死失活(见下图)；Lambda 噬菌体也被杀死，无噬菌斑的出现。



1. HiPure Blood DNA Mini Kit 提取效果 (D3111)

1.1. 健康人体抗凝全血 DNA 抽提

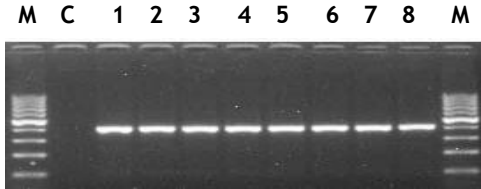
取 8 个 250 µl 健康抗凝全血样品，用 HiPure Blood DNA Mini Kit 进行抽提。抽提后用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计测量其纯度和产量，结果如下。测量结果表明，得到的 DNA，OD260/OD280 约为 1.80-1.88，OD260/OD230 约 1.4-2.2，表明纯化的 DNA 纯度高。人血的 DNA 产量约为 6-10ug/0.25ml。取 3µl 纯化的 DNA，点样于 0.8% 琼脂糖凝胶 80V 电泳 30 分钟拍照。电泳结果表明，该方法得到的 DNA 带型单一、完整、不降解。



样品	Conc. µg/µl	A260	A280	260/280	260/230	产量 µg
1	0.0625	1.25	0.678	1.84	1.97	6.25
2	0.0682	1.363	0.751	1.81	1.61	6.82
3	0.0933	1.865	0.998	1.87	2.07	9.33
4	0.091	1.82	0.994	1.83	1.67	9.1
5	0.0871	1.742	0.939	1.85	2.04	8.7
6	0.0954	1.907	1.059	1.8	1.38	9.5
7	0.0683	1.367	0.748	1.83	1.79	6.83
8	0.0718	1.436	0.788	1.82	1.88	7.18

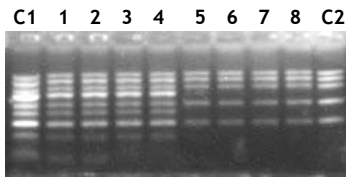
1.2 携带 HBV 的血清 DNA 提取及标测:

取 8 个 0.25ml 乙肝病毒携带者的血清样品, 用 HiPure Blood DNA Mini Kit 进行提取。选取乙肝病毒的一对特异性引物(大小约为 400bp), 取 10% DNA 作 PCR 模板, 35 循环检测乙肝病毒。2%琼脂糖凝胶电泳结果如下。由图可知, HiPure Blood DNA Mini Kit 可高效地回收病毒 DNA。



1.3 血清、血浆、血液中的循环 DNA 提取:

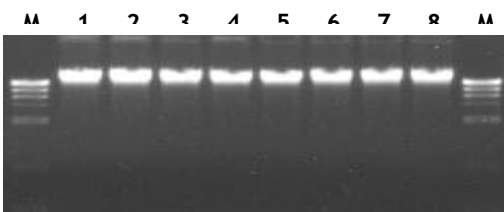
血液样品中经常循环 DNA, 这些循环 DNA 一般来源的肿瘤凋亡细胞或正常的凋亡细胞, 这些 DNA 是肿瘤检测极好的来源。取 10 μ l CL5000 DNA Marker (C1)和 HT II DNA Marker(C2), 用血清稀释至 250 μ l, 然后按 HiPure Blood DNA Mini Kit 进行操作提取。由图可知, 该方案可高效地回收各种 DNA 片段, 目前可检测最少的片段为 100bp。



2. HiPure Blood DNA Midi Kit II 提取效果 (D3113)

2.1 健康人体抗凝全血 DNA 抽提:

取 8 个 2 ml 健康抗凝全血样品, 用 HiPure Blood DNA Midi Kit II 进行抽提。抽提后用 DU640 紫外分光光度计测量其纯度和产量, 结果如下。测量结果表明, 得到的 DNA, OD260/OD280 约为 1.7-1.9, OD260/OD230 约 1.8-2.2 之间, 表明纯化得到的 DNA 纯度高。人血的 DNA 产量约为 40-60 μ g/2ml。取 10 μ l 纯化的 DNA, 点样于 0.8%琼脂糖凝胶 80V 电泳 30 分钟, 并用 Lambda DNA/Hind III Marker 作为对照, 电泳, 拍照。由图可知, 使用该试剂盒得到的基因组 DNA 完整性好, 无拖尾现象, 片段都大于 23KB 以上。



样品	A260	A280	A230	A260/280	产量 ug
1	0.1403	0.0773	0.0851	1.82	61.73
2	0.1386	0.0745	0.1123	1.86	60.98
3	0.0875	0.0456	0.0564	1.92	38.50
4	0.0956	0.0503	0.0843	1.90	42.06
5	0.1045	0.0610	0.0785	1.71	45.98
6	0.1058	0.0563	0.0548	1.88	46.55
7	0.1024	0.0563	0.0647	1.82	45.05
8	0.1151	0.0596	0.0896	1.93	50.64

常见问题回答

1. 该产品通过何种机理减少传染性?

答: 该试剂盒不需对血液进行任何预处理, 只需将血液和 Buffer BL 和蛋白酶进行混合。Buffer BL 和蛋白酶可快速裂解和失活病毒和微生物, 让血液的传染性大大降解, 因而对操作者来说更加安全, 更加快捷。此外, 产生的废液和收集管可一起丢弃, 减少某些超难失活的真菌类, 孢子类微生物的传染性。

2. 该试剂盒能够回收最低的片段是多少? 能否用来提取血液中游离的核酸?

答: 实验表明, 该试剂盒可结合低至 100bp 的 DNA 片段。可以用于从血液, 血清, 血浆等样品中回收游离的核酸。若需要回收血液样品中更小的游离核酸, 请联系我们。

3. 该试剂盒处理 2ml 血液时, DNA 的产量如何?

答: 一般处理 2ml 健康人体的全血样品, 得到的 DNA 产量约为 45-65 μ g。某些病人的血液样品可高达 90 μ g。

4. 血清, 血浆中 DNA 的产量如何?

答: 由于血清, 血浆中只含有微量的核酸, 这些核酸来自于凋亡细胞形成的游离核酸, 所以血清, 血浆中的 DNA 产量很低。处理 2ml 的血清, 血浆时, 一般只有 1-500ng/ml 左右。

5. 影响 DNA 纯度的因素是什么?

答: 加入 Buffer BL 后, 必须充分涡旋混匀; 蛋白酶的活性非常重要, 溶解后的蛋白酶必须分装保存, 反复冻融会降低其活性; 血液的保存条件必须正常。不要在室温放置超过 1 天, 在 2-8 $^{\circ}$ C 不要超过一个星期。不正常的保存会导致血液样品存在小凝块, 影响纯度。

6. 该方法能得到寄在血液的病毒 DNA 和细菌 DNA?

答: 可以。该方法采用直接裂解法处理血液, 可得到血液样品的总 DNA。