

从血清/血浆等样品中提取循环 DNA

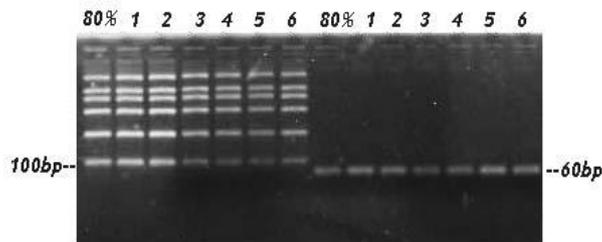
简介

循环 DNA 是存在于血液(血浆或血清)、脑脊液等体液中的细胞外 DNA, 其主要是由单链或双链 DNA 以及单链与双链 DNA 的混合物组成, 以 DNA 和蛋白质复合物或游离 DNA 两种形式存在。早在 1947 年 Mandel 和 Metais 就发现了循环核酸; 30 年后 Leon 等人的研究表明肿瘤患者外周血清 DNA 水平大大高于正常人; 1989 年 Stroun 等发现血液游离 DNA 具有肿瘤细胞 DNA 的一些特征; 5 年后研究者在肿瘤患者的血浆和血清中检测到了癌基因突变, 并且与原发肿瘤相一致。随着肿瘤分子生物学研究的进展, 循环血游离 DNA 的检测及其生物学指标的研究, 将为临床肿瘤的早期诊断、预后判断及跟踪随访等提供一系列方便、快捷、特异、无创或微创和分子生物学检测手段。在肺癌, 乳腺癌中, 以血清循环 DNA 的点突变和用药方案已经取得临床的相关应用。Magen 公司 HiPure Circulating DNA Kits 是专门为血清, 血浆的游离 DNA 抽提而设计的, 试剂盒采用硅胶柱纯化技术, 可处理 0.1-5ml 的样品, 纯化的 DNA 可直接用于荧光定量, SNP 检测, 液相芯片分析, 基因芯片分析等。

实验结果

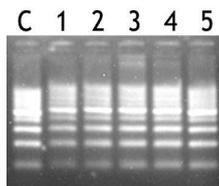
1. 不同的片段的 DNA 回收效果

取 20 μ l 100bp DNA Marker 和 20 μ l 60bp PCR 产物, 用血清稀释至 500 μ l, 按 HiPure Circulating DNA Micro Kit 进行抽提, 最后用 20 μ l Elution Buffer 洗脱出 DNA。取原始产物(80%)与回收后的产物于 2%琼脂糖凝胶电泳分析回收效果。由图可知, 试剂盒可高效地回收多种大小的 DNA 片段, 片段的回收效率超过 80%。



2. 大体积样品 DNA 回收效果

取 20 μ l 100bp DNA Marker 用血浆稀释至 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 和 5ml, 按 HiPure Circulating DNA Midi Kit 进行抽提, 最后用 20 μ l Elution Buffer 洗脱出 DNA。取原始产物与回收后的产物于 2%琼脂糖凝胶电泳分析回收效果。由图可知, 当 DNA 浓度不断变低的情况下, 该试剂盒对不同片段的回收效率仍然可达到 80%。

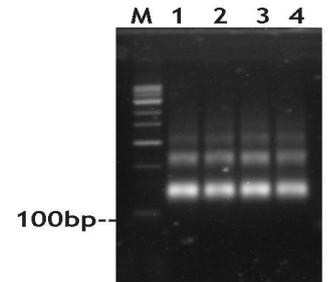


3. 鸡血液游离 DNA 抽提

取 3 ml 鸡血清, 按 HiPure Circulating DNA Midi Kit 进行抽提, 最后用 50 μ l Elution Buffer 洗脱出游离 DNA。得到的 DNA 经 NaNodrop 2000 测量其 OD 值, 结果如下。由结果可知, 从 3ml 鸡血清可获得大量的游离核酸, 约 9-13 μ g。纯化得到的 DNA 纯度高, OD260/OD280 约为 1.8-1.9。

样品	Conc. ug/ul	A260	A280	260/280	260/230	产量 ug
1	277.9	5.558	2.879	1.93	2.09	13.90
2	280.7	5.613	2.903	1.93	2.12	14.04
3	204.4	4.088	2.193	1.86	1.46	10.22
4	197	3.94	1.811	1.87	2.18	9.85

取 5 μ l 纯化的鸡血清 DNA 上样品于 2%琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如下。由图可知, 鸡血清游离 DNA 的片段大小约 150bp-1000bp 之间。



注: 鸡血清含有丰富的游离核酸, 主要是因为鸡血中红细胞也是带核的。研究表明, 人体血清中游离 DNA 含量较别非常低, 1ml 人体血清游离 DNA 含量约 1ng-100ng。