

磁珠提取 DNA 改良法在 HLA 测序分型中的应用*

夏家安¹ 李王霞² 马严²

[摘要] **目的:**建立并改良磁珠提取基因 DNA 的方法,以应用于 HLA 常规测序分型。**方法:**使用磁珠法自动提取系统从全血中提取基因组 DNA,利用 DNA 定量仪测定 DNA 浓度与纯度,利用测序仪对 PCR 扩增产物进行测序及相关的分析软件进行 HLA 分型结果分析。比较改良前后 DNA 浓度与纯度、HLA 分型结果成功率、信噪比及测序胶图的反应格局。**结果:**改良后 96 份 DNA 浓度的均一性、纯度均优于改良前;32 份 HLA 分型结果中 HLA-A、B 位点成功率改良后高于改良前,差异有统计学意义($P<0.01$);改良后 32 人份 HLA-B 第二外显子信噪比(N/S)合格率均高于改良前,差异有统计学意义($P<0.01$);改良后 32 份分型胶图反应格局均优于改良前。**结论:**改良磁珠提取 DNA 法能稳定、可靠地应用于 HLA 测序分型,具有快速、高通量化的特点和广泛的应用前景。

[关键词] 脱氧核糖核酸;标本;基因分型;测序分型

doi: 10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.04.005

[中图分类号] Q343.1 **[文献标志码]** A

Application of an improved DNA gene extraction method based on magnetic beads in conventional HLA sequence-based typing

XIA Jia'an¹ LI Wangxia² MA Yan²

(¹Medical Treatment Center of Wuhan, Wuhan, 430023, China; ² Wuhan Blood Center)

Abstract Objective: To establish and improve the DNA gene extraction method based on magnetic beads for HLA sequence-based typing. **Method:** Genomic DNA was extracted from the whole blood samples using magnetic beads method through automatic extraction system. The concentration and purity of DNA were determined through the DNA quantitative instrument; the PCR amplified products were sequenced through the sequencer. HLA typing results were analyzed by the related analysis software. **Result:** The homogeneity of concentration and purity of DNA extracted by the improved method in 96 copies, were better than those extracted by the traditional DNA gene extraction method. Both the success rate of the HLA genotyping on HLA-A, B locus and the experiment's qualified rate based on HLA-B Exon2 signal-to-noise ratio(N/S) in 32 copies were higher than those using normal DNA gene extraction method statistically($P<0.01$). The reaction patterns of the PCR products' electrophoretogram were also improved than the novel method. **Conclusion:** This improved DNA gene extraction method based on magnetic beads is proved to be a more stable, reliable and high throughput DNA gene extraction method for HLA sequence-based typing, which will be meaningful for DNA genotyping.

Key words Deoxyribonucleic acid; specimen; genotyping; sequence-based typing

随着基因组学、单核苷酸多态性等分子生物学技术的发展,以核酸为基础的 PCR 扩增、核酸杂交等技术已逐渐成为包括疾病检测、流行病学调查、遗传分析等在内的生物医学领域非常重要的诊疗手段。血液作为一种常用的临床检测材料,如何从血液中快速、高效、高质量提取基因组 DNA,对于临床血液检验与分析非常重要^[1-2]。

DNA 的提取方法很多,传统的酚氯法、盐析法、过柱法都只能是手工提取,无法自动化。磁珠法利用包裹磁珠的纤维素对 DNA 的特异性吸附,在磁场和洗脱液的作用下分离并获取 DNA,易于

自动化^[3]。DNA 磁珠提取法优点很多,但此方法提取的 DNA 浓度和纯度易受磁珠的残留量、裂解时间、全血量及酶量的影响,这些因素通过交互作用产生影响^[4]。合理地处理好影响因素才能获得最佳的提取效果。本研究对 DNA 磁珠提取法进行改良,并建立一套成熟的 DNA 提取方法,可稳定地应用于 HLA 测序分型中,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

抽取 96 人份合格的 EDTA 抗凝全血标本, -20℃ 冻存。

1.2 仪器及试剂

核酸纯化工作站 MicroLab STAR5409 (瑞士 Hamilton); Gene Quant proDNA 定量仪; DNA 提取试剂盒 (GENEONE 批号: PM-MK04-12204),

* 基金项目: 武汉市卫计委临床医学科研项目 (No: WX2013D07)

¹ 武汉医疗救治中心 (武汉, 430023)

² 武汉血液中心

ABI3730 型序列分析仪(美国 ABI 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取方法 方法一严格按照操作说明书进行,方法二是在方法一的基础上对以下几个步骤进行了改良:①在细胞裂解前增加了一步红细胞裂解,并 $4\,700\times g$ 离心 25 min,除去上清液;②全血量由 300 μl 改为 240 μl ,磁珠量由 40 μl 改为 24 μl ;③蛋白酶 K 2 倍稀释,但加入的总酶量不变;④细胞裂解过程由吹打混匀 10 次后 56℃孵育并震荡 25 min 改为吹打混匀 3 次后,56℃孵育并震荡 2 min,静止 5 min,孵育的同时震荡、静止交替进行 3 个循环。

1.3.2 HLA-A、B、DRB1 基因测序分型 分别从改良前后 2 组 DNA 中按照标本顺序各挑取 32 人份采用 SBT 方法对其进行 HLA-A、B、DRB1 基因分型,为了排除测序试剂及方法的干扰,每批测序试验均启用质控。

1.4 DNA 的检测方法

①利用 DNA 定量仪对 DNA 进行浓度与纯度(A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230})的测定。②对 2 组 DNA 进

行 SBT 分型结果的成功率、胶图信噪比(N/S)的比较。

1.5 统计学处理

根据基因测序(SBT)对 DNA 要求:DNA 浓度 $>10\text{ ng}/\mu\text{l}$ 且纯度 A_{260}/A_{280} 介于 1.6~2.0、 A_{260}/A_{230} 比值大于 1.8,三者同时满足才定义为合格。成功率与合格率均采用 $R\times C$ 表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 DNA 浓度与纯度

从图 1 看出,改良后 96 份样本 DNA 浓度的均一性、纯度、合格率均优于改良前,改良后散点均位于三维空间内,合格率 100%。

2.2 SBT 分型结果

32 份 HLA 分型结果中 HLA-A、B 位点成功率改良后高于改良前,差异有统计学意义($P<0.01$),HLA-DRB1 位点改良前后虽有差异,但无统计学意义,见表 1。32 人份 HLA-B 第二外显子信噪比(N/S)合格率改良后高于改良前,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 1 方法改良前后 32 人份 HLA-A、B、DRB1 分型成功率比较 人份(%)

时间	A 位点		B 位点		DRB1 位点	
	成功	未成功	成功	未成功	成功	未成功
改良前	14(43.75)	18(56.25)	2(6.25)	30(93.75)	27(84.38)	5(15.62)
改良后	31(96.88)	1(3.12) ¹⁾	30(93.75)	2(6.25)	32(100.00)	0

与改良前比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

表 2 方法改良前后 32 人份 HLA-B 第二外显子信噪比(N/S)合格率比较人份 人份(%)

时间	合格	未合格
改良前	1(3.13)	31(96.88)
改良后	28(87.50) ¹⁾	4(12.50)

与改良前比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

2.3 SBT 分型胶图

从图 2 和图 3 对比来看,改良后的杂峰明显少于改良前,进而信噪比也低于改良前。

3 讨论

DNA 提取是基因分型的第一个步骤,也是实验成功与否的关键点之一。DNA 的评价标准:均匀的含量,在工作浓度范围,纯度好,一级结构完整。DNA 磁珠提取法有以下优点:易于自动化,从而提高加样速度与效率,减少操作人员劳动强度,使传染机会最小化,通过减少人为差错和改善加样精确度与准确性来改善检测分析质量。核酸提取的自动化,已有很多研究,但只有磁珠法较为理想^[3]。本研究通过对 DNA 磁珠提取法进行改良,建立最佳提取方案。实验过程发现红细胞裂解程

度、全血量、磁珠量、蛋白酶、裂解过程对 DNA 的浓度和纯度影响很大。

3.1 红细胞裂解程度

红细胞裂解液能将红细胞膜破坏,通过离心去掉上液,能有效的去掉血红蛋白,初步减少 DNA 的蛋白污染。

3.2 全血量和磁珠量

原操作说明中血量与磁珠的比值是 15 : 2,改良后其比值是 15.0 : 1.5,减少了全血和磁珠的使用量,同时,也减少了磁珠的相对量。在 DNA 的提取过程中,磁珠特异性吸附 DNA,但也非特异性地吸附蛋白及杂质,特别是磁珠过剩时,非特异性吸附增加,导致 DNA 纯度降低,影响 DNA 的质量,同时,在实验过程中我们发现把单孔磁珠量从 40 μl 降低到 24 μl ,大大降低了洗涤及 DNA 洗脱时的堵针次数,从而也降低了磁珠的残余量,提高了 DNA 的纯度,从经济角度来讲,也节省了试剂成本。

3.3 蛋白酶 K

在 DNA 的提取过程中,蛋白酶 K 的作用的是使膜蛋白降解,使与 DNA 结合的蛋白质降解,使

DNA 充分游离^[5]。蛋白酶 K 有一定的黏稠性,如果稀释度不够会导致其有一定的挂壁现象,造成无效添加,在实验过程中,我们采取保持总量不变的情况下,稀释降低其黏稠度。

3.4 裂解过程

裂解过程是 DNA 提取成功与否的关键,实验中由原来吹打混匀 10 次后 56℃ 孵育并震荡 25 min 改为吹打混匀 3 次后,56℃ 孵育并震荡 2 min,静止 5 min,孵育的同时震荡、静止交替进行 3 个循环。吹打只能混匀试剂与细胞,不能打散成片的磁珠,静止有利于体系的接触反应时间,震动有利于成片磁珠的散开,从而增加了磁珠的接触面积和体系的反应时间。

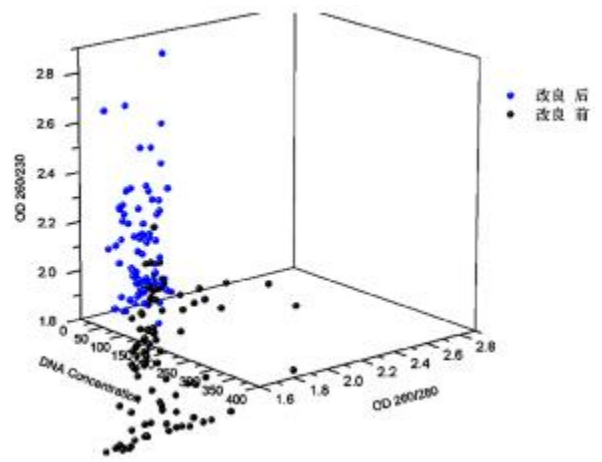


图 1 改良前后 DNA 参数散点三维图

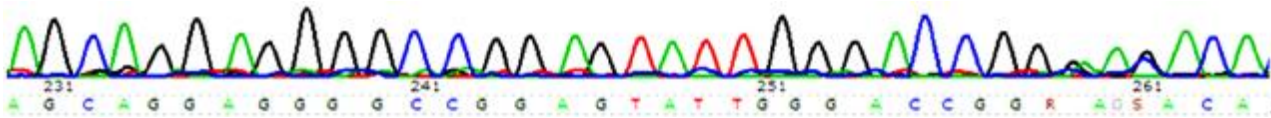


图 2 改良前 SBT 分型分型胶图(N/S>5%)

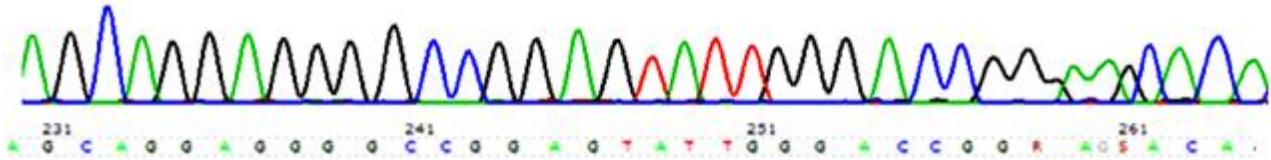


图 3 改良后 SBT 分型分型胶图(N/S<5%)

从以上分析来看,改良后 DNA 浓度的均一性、纯度均优于改良前,HLA 分型结果中 HLA-A、B 位点成功率改良后高于改良前,差异有统计学意义,HLA-DRB1 位点改良前后虽有差异,但无统计学意义,这就说明了 HLA-A、B 位点对 DNA 的要求高于 DRB1 位点。因此在信噪比与测序胶图比较时,特别选取了 B 位点的第二外显子,结果表明,改良后均优于改良前。

纯 DNA A_{260}/A_{280} 比值约为 1.8,该比值小于 1.6 时,提示有蛋白质污染,大于 2.0 时,提示有 RNA 污染。当 A_{260}/A_{280} 比值范同为 1.6~2.0 时,样本纯度基本符合要求。 A_{260}/A_{230} 比值提示有无小分子盐类污染。一般的后续实验(如 PCR 扩增等)对 A_{260}/A_{230} 比值没有特殊要求,但在 SBT 研究中,过多的小分子盐类混杂会影响毛细管电泳测序的结果,因此要求 DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值大于 1.8。另外,以上的这些影响因素是一个交互作用。在整个 DNA 提取体系中,每个步骤都有一定的条件,单

个条件的改变可能影响不大,但对一个整体来说,却可能对最终的提取效果产生明显影响。

参考文献

[1] 王大明,邹红岩,程良红,等. DNA 工作站在 HLA 测序分型中的应用[J]. 国际输血及血液学杂,2009,32(2):111-113.

[2] 李金璐,王硕,于婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报,2013,48(1):72-78.

[3] 张琼予,丁梅,王保捷,等. DNA 提取自动化工作站在法医学领域的应用[J]. 中国法医学杂志,2010,25(1):40-42.

[4] 凌洁,王昊,张帅,等. 磁珠法半自动提取全血基因组 DNA 条件的优化[J]. 浙江大学学报,2012,41(3):320-326.

[5] 贾二娟,朱伟锋,余乐涵. 蛋白酶 K 对盐析法提取全血 DNA 的影响[J]. 实验与检验医学,2011,29(3):263-264.

(收稿日期:2015-08-11)