

第五章 临床基因扩增检 验标本的处理、保存及核 酸提取方法



在临床基因扩增检验中，由于临床标本中常含有蛋白和脂类等干扰核酸扩增的物质，因而核酸提取是进行核酸扩增前不可或缺的一个步骤。



核酸分离纯化技术起源于20世纪50年代，在70年代和80年代中得到了普遍的应用和推广。但传统的核酸提取方法常涉及去垢剂裂解、蛋白酶处理、有机溶剂提取及乙醇沉淀等步骤，在RNA检测时易出现假阴性；使用PCR及体外转录扩增系统检测时易得到假阳性结果；一些挥发性有机试剂对操作人员健康也有一定影响。因此，简单高效又无需使用酚和氯仿的核酸提取方法对克服上述缺点有重要意义。



此外，由于标本的处理及保存对DNA和RNA（尤其是RNA）的影响较大，因此，在核酸测定时，标本的处理及适当保存，对保证测定的准确有效尤为重要。临床基因扩增检验中常涉及的标本有血清（浆）、全血、新鲜组织等，这些临床标本的处理和保存方法各有不同。



第一节 临床标本的处理和保存

- 血清（浆）标本

在某些病原体如HBV，HCV和HIV等的PCR临床测定中，标本的获取和保存，对于DNA测定，可能按照一般的血清标本处理程序，对测定影响不大。但对于RNA测定，标本的获取和保存方式对测定结果，可能有决定性的影响。

有研究表明，用于RNA测定最好是使用EDTA抗凝（严禁使用肝素，因其对PCR扩增有抑制，且很难在核酸提取过程中完全去除）全血标本，抗凝后6小时内分离血浆，如使用血清标本，则需尽快（2小时内）分离血清，标本的短期（1~2周）保存可在-20℃下，较长期保存应在-70℃下。



- 全血标本

以全血标本为待测标本时，必须注意抗凝剂的选择，一般使用EDTA- Na_2 或枸橼酸钠，不可以使用肝素。全血样本如用于DNA提取检测，可4°C下短期保存，如用于RNA检测，则应在取血后，尽快提取RNA。



- 组织

组织有新鲜组织块和石蜡切片。新鲜组织块的处理步骤首先用生理盐水洗两次，然后将其捣碎或切碎，加入生理盐水后剧烈震荡混匀，离心，弃上清，再用蛋白酶K消化后提取核酸。



新鲜组织最好是保存于50%乙醇中，具体作法是，先用生理盐水将组织洗一次，切成宽度小于1cm的小片，加入适量的生理盐水，然后，边摇边加入无水乙醇至终浓度为50%。这样固定的组织标本室温下可保存数日，4°C可保存6年。

石蜡切片用于核酸提取，需先用辛烷或二甲苯脱蜡，再用蛋白酶K消化后即可进行DNA提取。

第二节 核酸的提取方法

- 酚-氯仿提取法

DNA提取的经典方法，这种方法提取的DNA纯度高，效果好，缺点是较为繁琐。我们所用的试剂盒是在此基础上的改良，主要由三种试剂组成。

GenTLE Solution I 在破坏血细胞的同时，与核酸形成电中性的复合体。将该复合体离心收集并用GenTLE Solution II清洗后，在沉淀中加入GenTLE Solution III，将DNA分离出来，然后再加入异丙醇将DNA沉淀回收。

全血→加入GenTLE Solution I →振荡数秒，
室温10分钟以上，12000rpm离心 5min→除
上清，加GenTLE Solution II →轻轻颠倒
2、3次，12000rpm离心2min→除上清，加
GenTLE Solution III →振荡10秒，
12000rpm离心5min→取上清，加入等量异
丙醇→充分颠倒混合，12000rpm4℃离心
5min→除上清→70%乙醇清洗，简单干燥，
用TE等溶解→纯化DNA

- RNA的提取

由于临床标本及实验室环境中，存在大量对RNA具有强烈降解作用的RNase，而RNase较耐高温，不易失活，因此在提取RNA时，如何避免RNase对标本的污染及防止RNase对提取的RNA的降解，是保证RNA成功提取的关键之所在。



- **RNA**提取所用器皿的处理及溶液的准备
经高压灭菌的一次性使用的塑料制品如试管，离心管等可以不经预处理直接用于制备和贮存**RNA**。实验室用的普通玻璃器皿经常有**RNase**污染，使用前必须与180℃干烤8小时以上，或用0.1%焦碳酸二乙酯（**DEPC**）的水溶液浸泡。



DEPC是RNase的强烈抑制剂。灌满DEPC的器皿于37℃下放置2小时，然后用灭菌水淋洗数次，并于100℃干烤15分钟，最后高压蒸汽下15分钟。上述处理可除去器皿上痕量的DEPC，以防止DEPC通过羧甲基化作用对RNA的嘌呤碱基进行修饰。

要注意的是，DEPC有致癌性，操作时须小心。



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/377025104154006104>