



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104164417 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201410292018. 3

(22) 申请日 2014. 06. 26

(71) 申请人 北京圣谷同创科技发展有限公司

地址 100089 北京市海淀区东北旺西路 8 号
9 号楼二区 104、105 号

(72) 发明人 张丹丹 叶桦 陆庆宇 阎贺
张广春

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代
理事务所(普通合伙) 32257

代理人 伍见

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书2页

(54) 发明名称

一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法

(57) 摘要

本发明涉及一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法,包括 1)取孕妇外周血,离心取上清液;2)取步骤 1)得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,55~62℃ 孵育;3)把步骤 2)得到的样品在冰上冷却,沉淀蛋白,离心;4)转移步骤 3)上清液与 0.8 倍体积磁珠混悬液混合,室温孵育;5)将步骤 4)得到的样品置于磁力架上静置吸附后,吸取上清;6)将步骤 5)得到的上清与磁珠混悬液室温孵育,置于磁力架上静置吸附后,弃掉上清,75%酒精洗涤 2 次,即得磁珠-目的 DNA 复合体;7)采用 DNA 洗脱液,将步骤 6)获得的磁珠-目的 DNA 复合体在 DNA 洗脱液中旋涡振荡,置于磁力架上静置,吸取上清液,得到目的 DNA。

1. 一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法,其特征包括以下步骤:

1) 取 2~10ml 孕妇外周血,3~6℃ 1600g 离心 8-12min,将上清液于 3~6℃ 16000g 离心 8-12min 后再取上清液;

2) 取步骤 1) 中经 16000g 离心得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,55~62℃ 孵育 30min;

3) 把步骤 2) 得到的样品在冰上冷却,然后加入 NH₄AC 沉淀蛋白,并充分混匀,5000g 离心 4-6min;

4) 转移步骤 3) 上清液与 0.8 倍体积磁珠混悬液混合,室温孵育 10min;

5) 将步骤 4) 得到样品置于磁力架上静置吸附后,吸取上清;

6) 将步骤 5) 得到的上清与 1.5 倍体积磁珠混悬液室温孵育 10min,置于磁力架上静置吸附后,弃掉上清液,用 75% 酒精洗涤 2 次,即得磁珠-目的 DNA 复合体;

7) 采用 DNA 洗脱液,将步骤 6) 获得的磁珠-目的 DNA 复合体在 DNA 洗脱液中旋涡振荡,置于磁力架上静置,吸取上清液,得到目的 DNA。

2. 如权利要求 1 所述外周血胎儿游离 DNA 提取方法,其特征包括,所述步骤 1) 为:取 2~10ml 孕妇外周血,4℃ 1600g 离心 10min,将上清液于 4℃ 16000g 离心 10min 后再取上清液。

3. 如权利要求 1 所述外周血胎儿游离 DNA 提取方法,其特征包括,所述步骤 2) 为:取步骤 1) 中经 16000g 离心得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,60℃ 孵育 30min。

4. 如权利要求 1 所述外周血胎儿游离 DNA 提取方法,其特征包括,所述步骤 3) 为:把步骤 2) 得到的样品在冰上冷却,然后加入 NH₄AC 沉淀蛋白,并充分混匀,5000g 离心 5min。

一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核酸提取方法,具体上的涉及一种脱氧核糖核酸(DNA)的提取方法。

背景技术

[0002] 基因组 DNA 提取一般需遵循以下几个原则:1、保证提取的 DNA 具有一定的长度;2、排除有机溶剂和金属离子污染;3、蛋白质、多糖、脂类等降低到最低程度;4、排除其他核酸分子的污染。对于范围在 2-10ml 血样的基因组 DNA 提取,经典方法是用 SDS、蛋白酶 k 消化,再用酚氯仿反复抽提,此过程用到了有毒的苯酚、氯仿、异戊醇等溶剂,苯酚对皮肤有强烈的腐蚀作用,可抑制中枢神经系统;而氯仿易挥发,能分解出有毒气体,作用于中枢神经系统。吸入后对心、肾、肝有损害;异戊醇吸入或经皮肤吸收有麻醉作用,对皮肤和呼吸道有刺激,引起神经系统功能紊乱。酚氯仿法操作繁琐、耗时耗力,极易造成样本的丢失和污染。尤其应用于外周血胎儿游离 DNA 检测时,由于外周血中胎儿游离 DNA 含量较低,采用酚氯仿法时,需要的样本量较大,其有毒溶剂用量多,检测过程复杂,容易发生污染和样本丢失的问题更加突出,因此迫切需要无毒且操作步骤简单,提取时间段的提取试剂和方法。

[0003] 有鉴于上述的缺陷,本设计人,积极加以研究创新,以期创设外周血胎儿游离 DNA 提取方法,使其更具有产业上的利用价值。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法。

[0005] 本发明提供了一种外周血胎儿游离 DNA 提取方法,其特征在于包括以下步骤

1)、取 2~10ml 孕妇外周血,3~6℃ 1600g 离心 8-12min,将上清液于 3~6℃ 16000g 离心 8-12min 后再取上清液;

2) 取步骤 1) 中经 16000g 离心得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,55~62℃ 孵育 30min;

3) 把步骤 2) 得到的样品在冰上冷却,然后加入 NH₄AC 沉淀蛋白,并充分混匀,5000g 离心 4-6min;

4) 转移步骤 3) 上清液与 0.8 倍体积磁珠混悬液混合,室温孵育 10min;

5) 将步骤 4) 得到样品置于磁力架上静置吸附后,吸取上清;

6) 将步骤 5) 得到的上清液与 1.5 倍体积磁珠混悬液室温孵育 10min,置于磁力架上静置吸附后,弃掉上清液,用 75% 酒精洗涤 2 次,即得磁珠-目的 DNA 复合体。

[0006] 7) 采用 DNA 洗脱液,将步骤 6) 获得的磁珠-目的 DNA 复合体在 DNA 洗脱液中旋涡振荡,置于磁力架上静置,吸取上清液,得到目的 DNA。

[0007] 所述的外周血胎儿游离 DNA 提取方法,优选

步骤 1) 为:取 2~10ml 孕妇外周血,4℃ 1600g 离心 10min,将上清液于 4℃ 16000g 离心 10min 后再取上清液。

[0008] 步骤2)为:取步骤1)中经16000g离心得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,60℃孵育30min。

[0009] 步骤3)为:把步骤2)得到的样品在冰上冷却,然后加入NH₄AC沉淀蛋白,并充分混匀,5000g离心5min。

[0010] 本发明提供的外周血胎儿游离DNA提取方法,采用磁珠吸附方法将提取外周血DNA,与现有的酚氯仿法相比,避免了苯酚、氯仿、异丙醇等有毒试剂的使用,且操作步骤简单,磁珠通过静电作用能和DNA结合在一起,能吸附溶液中的DNA,且本发明提供的方法,针对胎儿游离DNA在外周血中含量较低的特点,采用了两次加入磁珠混悬液吸附的方法,能够更有针对性的提取外周血中的胎儿游离DNA。通过乙醇清洗,可以去除DNA中的其他小分子污染,DNA提取完全且纯度高,与酚氯仿法提取的DNA样品相比,本法提取的DNA样品,除了适用于巢式PCR扩增外,还可以适用于普通PCR扩增,显著的降低了后续检测的成本。

具体实施方式

[0011] 下面结合实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0012] 实施例1 外周血胎儿游离DNA提取方法

样品类型:新鲜外周血,取自孕周为12~37的健康妇女

一. 实验步骤

1) 取2ml孕妇外周血,4℃1600g离心10min,所得上清液于4℃16000g离心10min后再取上清液;

2) 取步骤1)经16000g离心得到的上清液于离心管中,加等体积消化液和蛋白酶复合物,60℃孵育30min;

3) 把步骤2)得到的样品在冰上冷却,然后加入NH₄AC沉淀蛋白,并充分混匀,5000g离心5min;

4) 转移步骤3)上清液与0.8倍体积磁珠混悬液混合,室温孵育10min;

5) 将步骤4)得到样品置于磁力架上静置吸附后,吸取上清,

6) 将步骤5)得到的上清液与1.5倍体积磁珠混悬液室温孵育10min,置于磁力架上静置吸附后,弃掉上清液,用75%酒精洗涤2次,即得磁珠-目的DNA复合体。

[0013] 7) 采用DNA洗脱液,将步骤6)获得的磁珠-目的DNA复合体在DNA洗脱液中漩涡振荡,置于磁力架上静置,吸取上清液,得到目的DNA。

[0014] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。