DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.038

平下降，而TSH水平上升，说明脑梗死后首先影响下丘脑和垂体激素功能，这一结果支持脑梗死对下丘脑及垂体有间接或直接损伤这一结论[5]，我们推测脑梗死对下丘脑及垂体的直接影响，一发面与颅内压升高脑血液循环紊乱脑损伤有关，另一方面可能与脑梗死后脑肿胀压迫垂体有关。

急性脑梗死过程中甲状腺轴功能异常是脑损伤本身相应引起的机体特异性变化。其病理、生理作用可作为一种代偿保护作用，通过降低血清T3浓度而减少氧消耗、降低组织代谢，也可破坏凝血与抗凝血系统的平衡而加重脑组织血液循环的障碍。

关于甲状腺功能异常与并发脑梗死的发病机制或二者之间的相互关系，研究资料所见甚少，从目前的资料来看，脑梗死后引起甲状腺功能改变的机制尚不明确。复习晚近文献可能与下列因素有关：①甲状腺功能异常时甲状腺素分泌过多，交感神经兴奋性增加，血中儿茶酚胺浓度上升，致使小动脉痉挛，血黏度增高，这是发生高血压和脑血管病的重要因素之一。②甲状腺功能异常可引起蛋白质、脂肪及糖代谢紊乱，必将影响细胞膜的通透性以及红细胞变形性，血小板粘附作用也随着增加，从而导致脑灌注量和脑循环下降。③甲状腺功能异常病人常有心脏瓣膜和心肌受累改变，可造成心律失常和附壁栓子形成或脱落而发生脑栓塞。④甲状腺功能异常曾被认为是一种自身免疫疾病，而近来的研究表明脑血管病中也存在免疫功能异常改变。Shaw等[6]指出，自身免疫性甲状腺疾病可有脑病表现。⑤甲状腺功能异常时甲状腺肿大或血流量增加致中枢神经系统静脉血回流淤滞。总之，甲状腺功能异常并发脑梗死可能与多种因素有关，并可能是脑梗死高危因素之一，在临床上应引起重视。故在治疗上出除常规治疗脑血管病外，注意及早发现甲状腺功能是否异常，及时抗甲状腺治疗不宜忽略。

所以，我们主张脑梗死病人及脑梗死高危者，应当常规甲状腺功能监测，可能会发现更多的甲状腺功能异常者，可以尽早给予药物干预，以达到预防、改善预后的目的。

关键词：下丘脑-垂体-甲状腺轴；急性脑梗死；危险因素
中图法分类号：R743.330.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王颖慧，张茂林，段建平，等. 脑梗死患者血清T3、T4、TSH测定及临床意义[J]. 新医学，1994，26(5)：247－248.
[2] 陈家伦. 内科疾病中血甲状腺素和淋巴细胞T3受体的变化[J]. 中华内科杂志，1987，26(5)：501.
[3] 侯熙德. 神经病学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，1990. 108－118.
[4] 刘俊艳. 急性脑血管患者下丘脑-垂体-甲状腺轴功能改变[J]. 中华神经精神科杂志，1993，26(1)：31－34.
[5] Rudman D, Fleischer A S, Kutner M H, *et al*. Suprahypophyseal hypogonadism and hypothyroidism during prolonged coma after head trauma[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1977, 45(4): 747－754.
[6] Shaw P J, Walls T J, Newman P K, *et al*. Hashimoto's encephalopathy: a steroid-responsive disorder associated with high anti-thyroid antibody titers－report of 5 cases[J]. Neurology, 1991, 41(2(Pt1)): 228－233.

（编辑 薛国文）

经验交流

文章编号：1000-5404(2004)04-0368-02

介绍一种从全血中抽提DNA的方法

A new method for extracting DNA from human whole blood

冯 凯，刘 兴，蒋建新 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室，创伤烧伤复合伤国家重点实验室，重庆 400042）

在分子生物学实验中，DNA样本的质量往往是决定实验是否成功的关键因素。很多实验手册中都介绍过DNA抽提法[1,2]，而且目前市场上有多家生物公司生产DNA抽提试剂盒。但对于实验室而言，重要的是建立一种产率稳定，既满足实验要求又快速、经济的方法。

目前我室正在从事创伤后脓毒症相关基因的SNPs发掘和大规模的基因分型工作，需要大量的DNA抽提的抽提工作，因此建立一个稳定的、经济的，适合大规模的方法是十分重要的。现将我室采用方法介绍如下。

基金项目：国家重点基础研究发展规划资助项目（"973"项目）(G1999054200)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054200)
作者简介：冯 凯(1970－)，男，北京市人，博士研究生，主治医师，主要从事脓毒症相关基因多态性方面的研究。电话：(023)68757474
收稿日期：2001-10-19；修回日期：2001-12-30

1 材料与方法

1.1 试剂

PBS：1 mmol/L KH_2PO_4，154 mmol/L NaCl，5.6 mmol/L Na_2HPO_4，pH 7.4。

TE：10 mmol/L Tris-Cl，pH 8.0，50 mmol/L EDTA。

20 mg/ml 蛋白酶等体积分装于－20 ℃。

酚：以10 mmol/L Tris，1 mmol/L EDTA，pH 8.0饱和的酚。

氯仿异戊醇溶液：氯仿∶异戊醇(24∶1)。

ACD：枸橼酸3.2 g/L，枸橼酸钠26.3 g/L，葡萄糖46.4 g/L，NaH_2PO_4 2.51 g/L，腺嘌呤0.072 g/L。

1.2 仪器

BACKMAN蛋白/核酸分析。BIOLAB电泳仪。

1.3 方法

ACD(1∶6)抗凝的全血，1 300×g离心15 min，吸去血浆，用

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

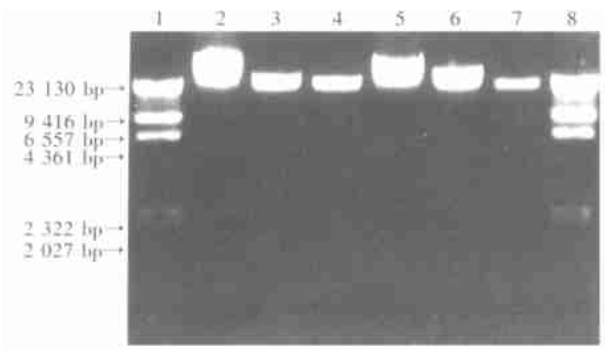
巴斯德吸管小心吸取上面淡黄层物质, 并转移到一新的聚丙烯管中。如果吸取物中混杂的红细胞和血浆超过全血体积的 15%, 则重新离心分离淡黄层物质。

以 0.6 倍全血体积的 TE 重悬细胞。或取出冰冻保存的全血, 于室温的水中融化后, 移入一新的聚丙烯管中, 加 1 倍体积的 PBS 稀释, 颠倒混匀。

1 300× *g* 离心 15 min, 小心弃掉上层。以 0.6 倍全血体积的 TE 重悬白细胞沉淀。打散白细胞团, 加蛋白酶 K 至终浓度 500 μg/ ml, 颠倒混匀数次。加 10%SDS 至终浓度 0.6%, 反复颠倒混匀, 37 ℃水浴 2 h。加等体积酚用手混匀约 150 r/ min, 3 min。3 400× *g*, 23 ℃离心 10 min。吸上层水相入另一试管。重复用酚抽提。加等体积氯仿于水相, 混匀, 3 min。3 400× *g*, 离心 15 min。吸上层水相入另一试管。加 NaCl 至终浓度 0.1 mol/ L。加两倍体积－20 ℃预冷的 95% 乙醇, 颠倒混匀。－70 ℃置 15 min 或 20 ℃直至可见白色沉淀出现, 一般至少 30 min 以上。3 400× *g*, 4 ℃离心 10 min, 沉淀 DNA。小心倒掉上清。70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀。并使冻干。以 1/ 10 体积的 TE (10 mmol/ L Tris/ 1 mmol/ L EDTA) 重悬 DNA 沉淀。旋转样品至少 30 min 以使 DNA 完全溶解。

2　结果

2.1　以 0.6% 的琼脂糖凝胶对 DNA 进行电泳分析电泳结果 (图 1)



1, 8: λ 噬菌体/ *Hind* Ⅲ marker; 2～7: 不同血样本基因组 DNA。血量不同其亮度不同

图 1　基因组 DNA 电泳图

电泳条带清晰, 无断裂造成的杂带, 无降解。片段长度> 20 kb。

2.2　对 112 份抽提样本进行核酸定量, 见表 1

表 1　核酸纯度, 平均浓度和平均产率分析

平均 260/ 280	平均浓度(μg/ ml)	平均产率(μg/ ml 全血)
1.8868	69.554	8.024

以 BACKMAN 蛋白/ 核酸分析仪进行纯度及定量分析, 其 A_{260}/A_{280} 大于 1.8 符合分子生物学实验对纯度的要求。其产量随血量的不同而有所变动。一般血量为 3～5 ml。产率低于国外报道, 见讨论部分。

3　讨论

本法使用的抗凝剂是 ACD, 在实践过程中效果比较好, 能较长期地保存全血, －70 ℃保存 6 个月, 并不影响产率和 DNA 质量。我室曾采用过肝素抗凝, 其缺点是, 保存血样时间有限, 且抽提出的 DNA 有部分降解, 在后续实验中效果不理想。

与其它方法比较, 本法快速, 适于大样本操作, 血量少, 仅要 3～5 ml, DNA 纯度高, 能满足常规分子生物学实验要求。缺点是需要应用有机溶剂。我们曾尝试采用过无机盐沉淀法[2], 但是 DNA 纯度低, 蛋白含量很高, 沉淀后的 DNA 还需酚-氯仿再抽提 1 次, 整个抽提过程时间需要 2 d。虽然目前大多数生物试剂公司都能提供效果较好的 DNA 抽提试剂盒, 操作步骤也较为简单, 但价格往往很高, 对于一般实验室而言, 若用于抽提大样本 DNA, 其费用是相当可观的。本法除蛋白酶 K 和 Tris 饱和酚为外购, 其余试剂均为实验室常规配制, 可节约大量宝贵经费。

本法产率平均为 8 μg/ ml 全血, 低于文献[1] 报道。我们的经验是在第 1 次酚抽提时, 在水相中含有大量胶状物, 造成吸取水相困难, 通过离心处理仍不理想。我们曾将其分离开, 与水相对照同时以后续步骤抽提, 结果表明胶状物中含有一定量的 DNA, 主要为变性蛋白质, 国外报道要将此胶状物回收抽提, 但我们的经验是其蛋白含量高, 会影响核酸的纯度, 故在第 1 次抽提时, 以剪去部分尖头的 Tip 头吸取并弃掉此胶状物, 虽然牺牲了一些核酸, 但保证了 DNA 的质量。

DNA 样本于－70 ℃可长期保存, 而在－20 ℃我们作过实验, 保存 2 个月以上并不影响其质量。

综上所述, 本法适于分子生物学实验室常规使用, 成本较低, 适于大样本抽提, 是一种较好的从全血中抽提 DNA 的方法。

关键词: DNA 抽提; ACD 抗凝剂

中图法分类号: Q781　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Gustafson S, Proper J A, Bowie E J W, *et al*. Parameters affecting the yield if DNA from human blood[J]. Anal Biochem, 1987, 165(2): 294—299.

[2] Miller S A, Dykes S S, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(3): 1215.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net