

磁珠法半自动提取全血基因组 DNA 条件的优化

凌洁¹, 王昊², 张帅², 张丹丹², 来茂德², 朱益民¹

(1. 浙江大学医学院流行病与卫生统计学系, 浙江 杭州 310058;

2. 浙江大学医学院病理学与病理生理学系, 浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**探讨磁珠法提取基因组 DNA 的影响因素,建立快速、高效、批量提取全血基因组 DNA 的优化方案。**方法:**使用磁珠法核酸自动提取系统从全血中提取基因组 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度。采用正交试验设计分析裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度 4 个因素的主效应和全血量与裂解时间、磁珠量,裂解时间与磁珠量的二阶交互作用对所提取 DNA 浓度和纯度的影响。**结果:**裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度 4 个主效应对 DNA 浓度的影响均存在统计学差异($P < 0.05$),当裂解时间为 15 min,全血量为 100 μl ,磁珠量为 80 μl ,乙醇浓度为 80% 时, DNA 平均浓度最高。磁珠量、裂解时间和全血量的交互作用对 DNA OD260/OD280 的比值有影响($P = 0.008$ 和 $P = 0.013$)。当磁珠量为 40 μl ,裂解时间为 15 min,全血量为 100 μl 时,OD260/OD280 的比值较好。磁珠量和乙醇浓度影响 DNA OD260/OD230 的比值($P = 0.017$ 和 $P < 0.05$),磁珠量为 40 μl ,乙醇浓度为 80% 时,OD260/OD230 的比值更好。**结论:**当 DNA 得率优先考虑时,可以选择裂解时间 15 min、全血量 100 μl 、磁珠量 80 μl 、乙醇浓度 80% 的提取条件;而对 DNA 纯度要求较高时,可以将磁珠量改为 40 μl ,以获得最优 DNA 提取效果。

[关键词] 自动化;磁石;DNA/分离和提纯;血液;基因组文库;正交试验;乙醇;细胞,培养的
[中图分类号] R 394-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)03-0320-07

Optimization of genomic DNA extraction with magnetic bead-based semi-automatic system

LING Jie¹, WANG Hao², ZHANG Shuai², ZHANG Dan-dan², LAI Mao-de², ZHU Yi-min¹ (1. Department of Epidemiology and Biostatistics; 2. Department of Pathology and Pathophysiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 31005, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid and effective method for genomic DNA extraction with magnetic bead-based semi-automatic system. **Methods:** DNA was extracted from whole blood samples semi-automatically with nucleic acid automatic extraction system. The concentration and purity of samples was determined by UV-spectrophotometer. Orthogonal design was used to analyze the main effect of lysis time, blood volume, magnetic bead quantity and ethanol concentration on the DNA yield; also the 2-way interaction of these factors. **Results:** Lysis time, blood volume, magnetic bead quantity and ethanol

收稿日期:2011-07-13 修回日期:2012-01-30

基金项目:国家科技支撑项目(2009BAI80B02);中央高校基本科研业务费专项资金(2010QNA7022)。

作者简介:凌洁(1985-),女,硕士研究生。

通讯作者:朱益民(1968-),男,博士,教授,从事复杂性疾病的分子流行病学研究;E-mail:zhuym@zju.edu.cn

concentration were associated with DNA yield ($P < 0.05$), but no interaction existed. DNA yield was higher under the condition with 15 min of lysis time, 100 μl of blood volume, 80 μl of magnetic beads and 80% of ethanol. A significant association was found between the magnetic bead quantity and DNA purity OD260/OD280 ($P = 0.008$). Interaction of blood volume and lysis time also existed ($P = 0.013$). DNA purity was better when the extracting condition was 40 μl of magnetic beads, 15 min of lysis time and 100 μl of blood volume. Magnetic beads and ethanol concentration were associated with DNA purity OD260/OD230 ($P = 0.017$ and $P < 0.05$), the result was better when magnetic beads was 40 μl and ethanol concentration was 80%. **Conclusion:** The results indicate that the optimized conditions with 40 μl magnetic beads will generate higher quality of genomic DNA from the whole blood samples.

[**Key words**] Automation; MAGNETITUM; DNA/isolation & purification; Blood; Genomic library; ORTHOGONAL TEST; Ethanol; Cells, cultured

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012, 41(3):320-326.]

随着分子生物学技术的发展,基因组水平上的研究已成为热点。在分子遗传学和分子流行病学中,无论是全基因组关联分析(GWAS)、候选SNP位点基因分型,还是基因组文库的建立,都需要从大批量血液样本中提取基因组DNA。所抽提得到的DNA浓度、纯度和一级结构的完整性都会影响到后续的研究,因此高效、可靠的高通量DNA提取方法是分子遗传学基础研究迫切需要的^[1]。

DNA的抽提方法有很多,包括传统的酚-氯仿法、盐析法、滤膜离心柱法等。这些方法各有优缺点,但都只能用于人工提取,不适用于自动化操作。磁珠法利用磁性硅胶对DNA的特异性吸附,在磁场作用下分离并获取DNA,无需离心和有机溶剂,适合于自动化操作^[2]。基于磁珠法提取原理的DNA半自动提取仪,可节约时间和人力,减少人工操作误差,保证DNA质量均衡性,适用于大批量DNA的提取。磁珠法的缺点是所得DNA纯度易受磁珠残留影响,裂解时间、全血量和乙醇浓度等因素也都有可能影响DNA提取效果。这些因素既能产生独立效应,也可能通过交互作用产生影响。正确分析影响因素的作用,才能获得最佳提取效果。利用正交设计方法可成倍地减少试验次数,且方法简单,在影响因素较多的情况下,能有效防止遗漏或重复,适用于快速高效地摸索试验条件,建立DNA提取最优方案。

TACO核酸自动提取系统以磁珠法为提取原理,利用磁性硅胶对DNA的特异性吸附,在磁场作用下分离DNA,经过多次洗涤和溶解,可获得较为理想的DNA。本研究应用TACO核酸自动提取系统和TOYABO磁珠法DNA提取试剂盒,探讨上述不同因素对DNA提取效果的影响,为快速批量提取基因组DNA方法提供最佳方案。

1 材料与方法

1.1 材料 取6份成人EDTA抗凝全血标本,每份标本体积1.5 ml。

1.2 试剂 TOYABO磁珠法基因组DNA提取试剂盒(日本TOYABO公司);无水乙醇(分析纯,10009218,国药集团化学试剂有限公司);TE溶液(10 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。

1.3 仪器 TACO核酸自动提取系统(台湾GeneReach Biotech公司);微量紫外分光光度计(Nano drop 2000,美国Thermo公司);离心机(美国Thermo公司)。

1.4 试验方法 影响DNA提取效果的因素主要有裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度,每个因素各有2个水平(表1)。为探讨上述4因素主效应和全血量与裂解时间、磁珠量,裂解时间与磁珠量的二阶交互作用对DNA浓度和纯度的影响,采用 $L_8(2^7)$ 正交试验设计(表2)。

表 1 影响 DNA 提取效果的因素水平表

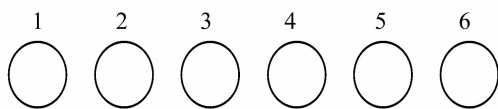
Table 1 Factors and levels of effect on DNA extraction

水平	试验因素			
	裂解时间/min	全血量/ μl	磁珠量/ μl	乙醇浓度/%
1	15	100	40	70
2	30	200	80	80

表 2 $L_8(2^7)$ 正交试验设计表Table 2 $L_8(2^7)$ orthogonal layout of DNA extraction

试验序号	试验因素						
	1	2	3	4	5	6	7
	裂解时间	全血量	全血量 × 裂解时间	磁珠量	裂解时间 × 磁珠量	全血量 × 磁珠量	乙醇浓度
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

液和 100 μl /200 μl 全血,第 2 孔/第 8 孔加入 900 μl 洗净液和 40 μl /80 μl 磁珠,第 3 孔/第 9 孔加入 900 μl 洗净液,第 4、5 孔/第 10、11 孔各加入 70% (或 80%) 乙醇 900 μl ,第 6 孔/第 12 孔加入 TE 溶液 50 μl (图 1)。



1:750 μl 裂解液 + 全血(100 μl /200 μl); 2:900 μl 洗净液 + 磁珠(40 μl /80 μl); 3:900 μl 洗净液; 4:900 μl 乙醇(70%/80%); 5:900 μl 乙醇(70%/80%); 6:50 μl 溶解液。

图 1 96 孔 U 型板加样示意图

Fig. 1 The order of sample application in U shape 96 well plate

1.5 DNA 提取步骤 将每个全血样本分为 8 份,按表 2 正交设计方案进行 8 种不同条件下的 DNA 提取试验。6 个样本共重复 6 次。在每种条件下加做 1 孔不加血样的空白对照,以去除磁珠和试剂对 DNA 提取效果的影响。

1.5.1 加样 按照仪器操作说明将裂解液、全血、洗净液、磁珠、乙醇和 TE 溶液依次加入 U 型 96 孔板内,第 1 孔/第 7 孔加入 750 μl 裂解

“START”键后系统按照设定程序自动运行。程序结束后,DNA 溶解于 50 μl TE 溶液中,将 DNA 溶液转移至 0.5 ml 的 EP 管中。

1.6 DNA 浓度和纯度的测定 将 DNA 样本在 10 000 r/min 离心 2 min,取 2 μl 上清加入 Nano drop 2000 微量紫外分光光度计,测定样本 OD260、OD280 和 OD230 吸光度。测定前用空白对照调零。DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$) = 50 ($\text{ng}/\mu\text{l}$) $\times$ OD260;DNA 的纯度以 OD260/OD280 比值和 OD260/OD230 比值表示。

1.7 统计学分析 DNA 浓度和纯度以均值和标准差表示。采用多因素方差分析分析裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度 4 个因素的主效应,以及裂解时间和全血量、全血量和磁珠量、裂解时间和磁珠量的交互作用。所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。

2 结果

采用正交设计的 6 个标本,每个标本按 8

1.5.2 上机 将 96 孔板和磁套按仪器使用说明书要求放入 TACO 核酸自动提取系统,按

种不同条件试验,结果见表 3。

2.1 不同试验条件对 DNA 浓度的影响 多因素方差分析显示,裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度 4 个主效应对 DNA 浓度的影响均存在统计学差异 ($P < 0.05$),而裂解时间和全血量、裂解时间和磁珠量、全血量和磁珠量之间则未见交互作用(表 4)。比较各变量不同水平下的平均 DNA 浓度可见,当裂解时间为 15 min,全血量为 100 μl 时,磁珠量为 80 μl ;乙醇浓度为 80% 时,样本的平均 DNA 浓度最高(表 5)。

表 3 DNA 浓度和纯度的正交试验结果

Table 3 Results of DNA concentration and purity by orthogonal experiment

DNA 浓度和纯度	标本 编号	试验序号							
		1	2	3	4	5	6	7	8
DNA/(ng · μl^{-1})	1	39.5	62.2	43.8	45.1	49.1	46.1	31.0	47.8
	2	34.4	48.5	33.2	33.1	40.7	46.7	29.0	30.4
	3	30.2	38.6	26.2	32.4	34.5	28.3	21.7	32.9
	4	38.7	58.1	47.7	46.0	49.9	43.7	23.7	39.4
	5	38.6	52.8	41.1	49.2	35.6	41.7	30.9	41.8
	6	35.3	47.5	42.1	51.2	37.6	37.1	35.2	51.4
OD260/OD280	1	1.81	1.82	1.78	1.76	1.80	1.81	1.76	1.79
	2	1.84	1.82	1.78	1.75	1.79	1.81	1.75	1.78
	3	1.88	1.80	1.86	1.74	1.79	1.73	1.88	1.75
	4	1.83	1.81	1.84	1.76	1.77	1.80	1.90	1.75
	5	1.82	1.82	1.77	1.80	1.78	1.75	1.79	1.78
	6	1.79	1.83	1.79	1.76	1.79	1.75	1.78	1.77
OD260/OD230	1	2.38	2.22	2.26	1.71	2.12	2.07	2.03	1.81
	2	2.32	2.24	2.05	1.83	2.19	2.03	1.52	1.90
	3	2.13	1.92	2.42	1.28	1.94	1.65	2.08	1.80
	4	2.21	2.27	2.16	1.85	2.12	1.97	2.05	2.15
	5	1.86	2.33	2.32	1.97	2.26	1.66	1.66	2.33
	6	1.93	2.24	2.27	1.87	2.08	1.84	2.10	2.18

表 4 DNA 浓度方差分析表

Table 4 ANOVA of DNA concentration

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	<i>F</i>	<i>P</i>
裂解时间	248.885	1	248.885	5.181	0.028
全血量	247.975	1	247.975	5.162	0.028
磁珠量	692.360	1	692.360	14.412	0.000
乙醇浓度	432.600	1	432.600	9.005	0.004
误差	2065.809	43	48.042		

2.2 不同试验条件对 DNA 纯度的影响

2.2.1 不同试验条件对 OD260/OD280 比值 的影响 表 6 可见,磁珠量的主效应、裂解时间和全血量的交互作用对 OD260/OD280 的比值

有影响($P=0.008$ 和 $P=0.013$)。磁珠量为 40 μl 时 OD260/OD280 的平均比值为 1.807, 高于磁珠量为 80 μl 时的平均比值 1.781 (表 7)。裂解时间和全血量对 OD260/OD280 比值的交互作用见表 8, 当裂解时间为 15 min, 全血量为 100 μl 时, OD260/OD280 的比值优于其它条件。

2.2.2 不同试验条件对 DNA OD260/OD230 的影响 磁珠量和乙醇浓度的主效应对 OD260/OD230 比值的影响存在统计学差异 ($P=0.017$ 和 $P=0.000$), 各变量间的交互作用则未见统计学差异 (表 9)。磁珠量为 40 μl , 乙醇浓度为 80% 时, OD260/OD230 平均比值较高 (表 10)。

表 6 DNA 纯度(OD260/OD280) 方差分析表

Table 6 ANOVA of DNA purity(OD260/OD280)

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	<i>F</i>	<i>P</i>
裂解时间	0.004	1	0.004	3.235	0.079
全血量	0.003	1	0.003	2.634	0.112
磁珠量	0.008	1	0.008	7.638	0.008
乙醇浓度	2.083E-6	1	2.083E-6	0.002	0.965
裂解时间和全血量的交互作用	0.007	1	0.007	6.699	0.013
误差	0.045	42	0.001		

表 7 不同水平磁珠量对 DNA 纯度(OD260/OD280) 的影响

Table 7 Effect of different levels of magnetic bead for DNA purity(OD260/OD280)

变量	水平	OD260/280 均值
磁珠量	40 μl	1.807 $\pm$ 0.041
	80 μl	1.781 $\pm$ 0.030

表 9 DNA 纯度(OD260/OD230) 方差分析表

Table 9 ANOVA of DNA purity(OD260/OD230)

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	<i>F</i>	<i>P</i>
裂解时间	0.130	1	0.130	3.392	0.072
全血量	0.118	1	0.118	3.074	0.087
磁珠量	0.232	1	0.232	6.055	0.018
乙醇浓度	0.649	1	0.649	16.900	0.000
误差	1.650	43	0.038		

表 5 各变量不同水平对 DNA 浓度的影响

Table 5 Effect of different levels of variables for DNA concentration

变量	水平	DNA/(ng $\cdot \mu\text{l}^{-1}$)
裂解时间	15 min	42.313 $\pm$ 8.928
	30 min	37.758 $\pm$ 8.355
全血量	100 μl	42.308 $\pm$ 8.395
	200 μl	37.763 $\pm$ 8.892
磁珠量	40 μl	36.238 $\pm$ 7.445
	80 μl	43.833 $\pm$ 8.649
乙醇浓度	70%	37.033 $\pm$ 8.000
	80%	43.038 $\pm$ 8.805

表 8 裂解时间与全血量对 DNA 纯度(OD260/OD280) 的交互作用

Table 8 Interaction of lysis time and blood volume for DNA purity (OD260/OD280)

全血量	裂解时间	
	15 min	30 min
100 μl	1.823	1.781
200 μl	1.783	1.790

表 10 各变量不同水平对 DNA 纯度(OD260/OD230)的影响

Table 10 Effect of different levels of variables for DNA purity(OD260/OD230)

变量	水平	260/230 均值
磁珠量	40 μ l	2.103 $\pm$ 0.212
	80 μ l	1.963 $\pm$ 0.256
乙醇浓度	70%	1.917 $\pm$ 0.253
	80%	2.149 $\pm$ 0.169

3 讨 论

核酸自动提取仪因其自动化和高通量性,适用于大批量 DNA 的提取工作。同一台核酸自动提取仪,使用不同的试剂盒,可以从多种生物材料中提取 DNA 或 RNA^[3]。已有研究者利用核酸自动提取仪,探索从全血中批量提取基因组 DNA 的方法^[4-5],其中磁珠法的效果较为理想^[5]。本次试验通过对磁珠法提取 DNA 过程中不同条件的优化,建立最佳提取方案。实验结果提示,DNA 提取过程中,裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度均可影响 DNA 浓度和纯度,其中影响较大的因素为磁珠量和乙醇浓度,其次为裂解时间和全血量。

3.1 磁珠量和全血量 在 DNA 提取过程中,磁珠可特异性吸附 DNA,使之分离并纯化。磁珠的用量与全血量成正比。一般来说,全血量增加,则需要的磁珠量也增加,磁珠量不足时无法完全吸附 DNA,过量则可能超过磁棒对磁珠的吸附能力,导致大量磁珠残留,影响 DNA 提取效果,从经济角度考虑会造成不必要的浪费。TOYOBO 试剂说明中推荐用量为 100 μ l 全血加入 40 μ l 磁珠,即全血量和磁珠量比例为 5:2,全血为 200 μ l 时需加入 80 μ l 磁珠。考虑到 96 孔板的单孔体积,单孔全血量以不超过 200 μ l 为宜。因此,本实验将全血量两水平定位 100 μ l 和 200 μ l,相应的磁珠两水平定为 40 μ l 和 80 μ l。本试验磁珠量和全血量对 DNA 的浓度均存在影响,当磁珠量为 80 μ l、全血量为 100 μ l 时, DNA 平均浓度最高。该结果提示 TOYOBO 试剂说明的推荐用量中磁珠量可能不足。但是,对 DNA 纯度来说,当磁珠量为 40 μ l

时,其纯度要优于 80 μ l。

在后续验证试验中,我们调整了磁珠用量,当全血量为 100 μ l 时,磁珠量为 80 μ l,全血量为 200 μ l 时,磁珠量为 120 μ l。结果显示,两种条件下 DNA 平均浓度没有统计学差异。全血量的增加并不能提高 DNA 的得率。

综合考虑认为,100 μ l 全血和 80 μ l 磁珠量可获得较为理想的得率,而 100 μ l 全血和 40 μ l 磁珠可得到较为理想的纯度。

3.2 乙醇浓度 不同浓度的乙醇在 DNA 提取过程中所起的作用不同。高浓度乙醇(无水乙醇或 95% 乙醇)主要起到沉淀 DNA 的作用,而稍低一点的浓度(70% ~ 80%)则可纯化 DNA。磁珠法过程中不依靠高浓度乙醇沉淀 DNA,因此在本试验中乙醇主要起纯化作用。

紫外分光光度法检测 DNA 纯度,判断指标为 OD260/OD280 比值和 OD260/OD230 比值。纯 DNA OD260/OD280 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 OD260/OD280 比值范围为 1.6 ~ 2.0 时,样本纯度基本符合要求。OD260/OD230 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 OD260/OD230 比值没有特殊要求,但在全基因组关联分析(GWAS)研究中,过多的小分子盐类混杂会影响芯片的结果,因此要求 DNA 的 OD260/OD230 比值大于 1.8。以往的实验中大多采用 70% 的乙醇洗脱 DNA 中的杂质盐离子,提高 DNA 纯度^[6]。TOYOBO 试剂说明中用的也是 70% 的乙醇,但在 TACO 核酸自动提取系统厂家的试剂说明中用的则是 80% 的乙醇。以此为依据,我们在试验中对两种浓度的乙醇作用作了探索。结果显示,两种浓度的乙醇洗脱后的 OD260/OD280 比值均符合要求。但是 80% 乙醇洗脱后的 OD260/OD230 比值要大于 70% 乙醇的比值,更适合进行 GWAS 等对 DNA 纯度要求较高的后续实验。从 DNA 得率角度看,80% 乙醇洗脱的 DNA 得率也高于 70% 乙醇。因此,我们认为 80% 乙醇洗脱后的 DNA 提取效果优于 70% 的乙醇。

3.3 裂解时间 在 TACO 核酸自动提取系统的设定操作程序中,DNA 裂解的时间大约是 15

min, 为了提高 DNA 得率, 考虑适当延长血液与裂解液的作用时间, 使裂解作用更充分。一般 DNA 提取法中裂解的时间大约是 15 ~ 30 min, 因此我们取裂解时间 30 min 与 15 min 作对比。但试验结果显示, 延长裂解时间并不能提高 DNA 得率。系统设定的 15 min 已足够使血细胞裂解完全。以往的研究认为, 增加裂解时间可提高 DNA 的纯度^[7], 但在本次试验中没有观察到这样的结果。裂解时间和全血量的交互作用对 DNA 纯度有影响(表 8), 但在 4 种条件下的 DNA 纯度均符合要求, 因此这种交互作用没有实际意义。

3.4 磁珠残留 磁珠法的缺点是提取操作结束后, 难免有少量磁珠残留。磁珠残留会影响 DNA 吸光度, 导致所测浓度和纯度的不准确。因此在 DNA 样品测定吸光度前, 必须离心使残留磁珠沉淀, 必要时可转移上清溶解液, 以去除残留磁珠影响。

在本次试验中, 裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度对 DNA 纯度均存在主效应, 磁珠量和乙醇浓度对 DNA 纯度存在主效应。除了裂解时间和全血量对 DNA 纯度存在交互作用外, 没有观察到其他因素之间的交互作用。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。

本试验采用的核酸自动提取系统操作简单, 实验员只需负责加样和上机, 系统即可根据设定程序自动提取 DNA。一般来说, 加样时间大约 10 min, 系统一次运行 50 min, 1 h 内即可完成 16 个样本的提取工作。在系统自动运行过程中, 可进行下一批次的加样操作。当进行大批量 DNA 提取工作时, 运用该提取系统并合理安排工作时间, 可大大节约时间和人力。与传统的人工提取方法相比, 自动提取法的成本相对较高, 但可以通过选用合适的试剂盒来降低成本。一些进口试剂盒 DNA 提取效果较好, 但价格昂贵。本试验使用了一种较为经济的试剂盒, 通过优化试验条件, 同样获得了理想的 DNA 提取效果, 却大大降低了每个样本的提取成本。

在 DNA 提取最优条件的选择上, 需综合考虑裂解时间、全血量、磁珠量和乙醇浓度 4 个因

素对 DNA 浓度和纯度的影响。当需要较多数量的 DNA 而对纯度无特殊要求时, 可以选择的提取条件为裂解时间 15 min、全血量 100 μ l、磁珠量 80 μ l、乙醇浓度 80%; 而当对 DNA 纯度要求较高时, 可以选择将磁珠量改为 40 μ l, 其余条件不变, 以获得最优 DNA 提取效果。

References:

- [1] SUSAN R COYNE, P D C, DAVID A NORWOOD, et al. Comparative analysis of the Schleicher and Schuell IsoCode stix DNA isolation device and the Qiagen QIAamp DNA mini kit [J]. **Clin Microbiol**, 2004, 42: 4859 - 4862.
- [2] CUI Ya-li, LI Zheng, FANG Yu, et al (崔亚丽, 李铮, 房喻, 等). The application of magnetic particles used in nucleic acid research [J]. **ACTA Universitatis Agricolae Borealioccidentalis** (西北农业大学学报), 2000, 28: 80-85. (in Chinese)
- [3] POURAHMAID F, T M, KOVACS G, et al. Toward a rapid, integrated, and fully automated DNA diagnostic assay for chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae [J]. **Clin Chem**, 2000, 46: 1511.
- [4] CHEN Chang-rong, PEI Bin, XIE Jin-zhen (陈长荣, 裴斌, 谢金镇). Estimate a method of automatic extracting genomic DNA from large numbers of whole blood samples [J]. **Chin J Blood Transfusion** (中国输血杂志), 2005, 18: 376-377. (in Chinese)
- [5] WANG Da-ming, DENG Zhi-hui, TANG Si, et al (王大明, 邓志辉, 唐斯, 等). Establishment of a volume automatically extracting genomic DNA from whole blood samples and its application in HLA genotyping [J]. **Jiangxi J Med Lab Sci** (江西医学检验), 2007, 25: 109-110. (in Chinese)
- [6] J SAMBROOK, D W RUSSELL. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual** [M]. America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006: 4.
- [7] ZHOU Xuan, WANG Li, XIA Shu-hua, et al (周旋, 王丽, 夏曙华, 等). The modified method of whole blood DNA extraction kit [J]. **J Lab Med Clin Sci** (检验医学与临床), 2005, 2: 168-169. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]