

一步法分离石蜡切片 DNA 的改进与鉴定

彭剑桥¹, 雷平², 杨秦³, 朱敏^{3*}

(1. 湖南省人民医院检验科, 湖南长沙 410005; 2. 湖南省人民医院临床输血科;
3. 中南大学生命科学学院分子生物学研究中心)

摘要: **目的** 改进一种以含蛋白酶 K 的裂解液作用于石蜡包埋处理的细胞、分离 DNA 粗提液用于 PCR 扩增的实验方案。 **方法** 石蜡包埋组织切片经常规脱蜡处理, 用蛋白酶 K 裂解液洗脱细胞, 55 ℃ 消化 3 h 后离心, 吸取上清液; 分光光度法检测 DNA 酶裂解液质量和浓度; 以之为模板分别扩增人线粒体基因微卫星多态 D310 区、ATPase6 基因区和核基因 HBB、BRCA1 等的 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳检测分析 PCR 扩增情况, 并测序验证扩增产物。 **结果** 以石蜡切片的 DNA 裂解粗提液为模板, 扩增目的 DNA 片段阳性率可达 100%; 获得序列分析验证。 **结论** 改进的蛋白酶 K 裂解液一步洗脱消化法操作简单、过程快捷、费用低廉, 能快速有效地分离石蜡组织切片 DNA, 用于后续 PCR 扩增检测, 具有较高效率。

关键词: DNA 分离; 石蜡包埋组织切片; 线粒体 DNA; 核基因

中图分类号: R446 文献标识码: A

DNA Isolation from Paraffin Sections by an Adjusted One-Step Protocol and its Qualification Test by PCR

PENG Jianqiao, LEI Ping, YANG Qin, et al

(Clinical Laboratory, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: **Objective** To improve a simple method to extract DNA from tissues fixed in paraffin sections by direct digestion with proteinase K lysis buffer. **Methods** Formalin-fixed paraffin-embedded sections were routinely deparaffinized and then the tissues were washed off for the glass slides using digestion buffer with proteinase K and transferred into a 1.5 mL microtube for each sample. After incubation at 55 ℃ for 3 h, the supernatant containing DNA was transferred into a new tube. The DNA concentration and $A_{260/280}$ values of the lysate were assayed by ultraviolet spectrophotometry. Amplification of the mitochondrial DNA fragment flanking D310 microsatellite region, part of the ATPase6 gene as well as nuclear genes HBB and BRCA1 were performed, and PCR amplification following detection with agarose gel electrophoresis was analyzed. **Results** As shown by agarose gel electrophoresis and DNA sequence analysis, all the target mtDNA fragments were successfully amplified by PCR using the DNA lysate directly as template. **Conclusion** A simple-manipulation, rapid-procedure and low-cost method for DNA separation from paraffin sections was presented here, by which the DNA content was extracted by one-step digestion with proteinase K lysis buffer; its effectiveness were evidenced by PCR of mitochondrial DNA and nuclear DNA fragments.

Key words: DNA extraction; paraffin-embedded sections; mitochondrial DNA; nuclear gene

越来越多的研究表明, 人类多种复杂疾病如各种

肿瘤、糖尿病、高血压、AD、PD、心血管疾病等的发生发展均与多重遗传因素相关, 不仅包括核基因变异, 也包括线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 变异^[1], 同时, 这些关联在不同人群中可能存在差别。为确证基因变异与不同疾病的相关性及其人群差异性, 必须在人群中开展大规模的遗传学关联分析; 而

收稿日期: 2015-08-21; 修回日期: 2015-10-22

基金项目: 湖南省科技计划 (2010FJ3084); 中南大学学位与研究生教育教学改革研究 (2340-74333003019); 中南大学教师科研基金 (2013JSJJ042)。

* 通讯作者, E-mail: zhumin0678@yahoo.com.

如果能对医院病理科积存的大量石蜡包埋组织切片加以有效利用,将有助于规避相关工作中耗时长的标本收集阶段,从而缩短研究进程、提高研究效率。从石蜡包埋组织切片中分离 DNA 或 RNA 虽然已经建立了比较成熟的方法^[2-6],但大多程序繁琐,且试剂盒纯化系统价格不菲,对大样本处理而言劳动量大、费用高昂。本文根据文献[7]介绍的方法,运用含蛋白酶 K 的细胞裂解(消化)液直接洗脱和消化,对石蜡包埋处理的组织切片(包括新近制备和空气暴露 5 年以上的陈旧切片),分离其中细胞 DNA 成分,并进一步进行其 PCR 扩增应用的分析。

1 材料与方法

1.1 样本 石蜡包埋病理组织切片取自湖南省人民医院和中南大学湘雅三医院病理科。

1.2 试剂 二甲苯、无水乙醇、Tris 粉等购自上海国药集团;蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶、dNTP 等购自鼎国公司;DNA 裂解消化缓冲液含 0.5 mg/mL 蛋白酶 K、0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.5)、1 mmol/L EDTA 和 0.5% Tween-20^[1]。

扩增包含人 mtDNA D310 区(包含 poly C 微卫星多态)、部分 ATPase6 基因编码区(包含 mtDNA 单倍型特异性遗传标志 8701A/G SNP 位点)及核内的人乳腺癌易感风险基因 1 (breast cancer 1, early on-set, BRCA1) 和人 β -珠蛋白 (hemoglobin beta, HBB) 基因部分片段的引物序列及扩增产物大小见表 1。引物由北京鼎国公司合成。

表 1 PCR 扩增引物

基因名称	引物序列/退火温度	片段大小
mtDNA 微卫星多态 D310 区	5'-ACAATGAATGTCTTGCACAGC-CACTT-3'(上游)	109 bp
	5'-GGCAGAGATGTGTTTAAGT-GCTG-3'(下游)/60 ℃	
mtDNA ATPase6	5'-AAGATTAAGAGAACCAACAC-CTCT-3'(上游)	415 bp
	5'-GTGGCAATAAAAAATGATTAAG-GA-3'(下游)/58 ℃	
BRCA1	5'-CATCTGTGTAAGTCAGCA-CAAGAG-3'(上游)	105 bp
	5'-ACATGTCTTTTCTTCCCTAG-TATGT-3'(下游)/64 ℃	
HBB	5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGA-GA-3'(上游)	102 bp
	5'-CCTTGATACCAACCTGCCCAG-3'(下游)/58 ℃	

1.3 DNA 提取 在通风橱内将载玻片上的石蜡切片以二甲苯静置洗脱约 10 min,无水乙醇浸泡洗涤 5 min $\times$ 3 次;脱蜡后的组织片变得疏松,室温下水平放置至无水乙醇完全挥发,然后以约 180 μ L 消化液分次冲洗,将组织片转入 1.5 mL 离心管内,55 ℃ 消化 3 h 后沸水浴 10 min 以灭活蛋白酶 K;12 000 rpm 离心 10 min 后吸取上清液转入一洁净新离心管内,小心避免吸入沉淀残渣及悬浮的石蜡碎片;上清液即为所获 DNA 酶解溶液,各取 1 μ L 在 NanoDrop 仪上进行 DNA 浓度测定和质量检测;余样置 -20 ℃ 保存备用。

1.4 PCR 扩增 反应在 20 μ L PCR 混合物中进行,其中含模板 DNA 约 50 ng、200 μ mol/L 4 种 dNTP、上游和下游引物各 5 pmol、KCl 50 mmol/L、Tris-HCl (pH 8.3, 25℃) 10 mmol/L、MgCl₂ 1.5 mmol/L 及 0.2 U Taq DNA 聚合酶。扩增参数为 94 ℃ 变性 30 s、相应温度退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,循环 40 次,最后于 72℃ 充分延伸 10 min。

1.5 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测及其测序分析 取 5 μ L 扩增产物分别进行 2.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色后紫外灯下观察结果,照相保留。剩余 PCR 产物送至铂尚 (Biosune) 生物技术公司进行 DNA 序列分析。

2 结 果

2.1 DNA 粗提液的紫外分光光度法检测 通常如果在 A_{260 nm} 处有最大吸收峰值,A_{260/280} 值大于 1.8 而小于 2.0,表明样品 DNA 具有正常质量。部分石蜡切片样本 DNA 提取液质量检测结果显示:与对照(从正常人外周血白细胞分离的基因组 DNA)不同,绝大部分样品的 A_{260/280} 值仅为 1.0 左右,同时 A_{260/230} 值极低(图 1);此外,在吸收峰曲线中 A_{260 nm} 处未出现明显的锐峰。

进一步对上述各样品取约 100 ng 进行琼脂糖凝胶电泳,以从正常人外周血白细胞分离的基因组 DNA 为对照,可见较分子量标志物 23 130 bp 位置略高的 DNA 条带,但全部 10 例石蜡切片 DNA 样品在各自泳道上未呈现 DNA 区带(图 2)。

2.2 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳检测 经与 50 bp DNA 梯级分子量标志物比较,所获 mtDNA D310 区、ATPase6、HBB 和 BRCA1 基因的 PCR 扩增产物大小与预期吻合(图 3,表 1)。但 4 对引物的扩

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
control	175.4	ng/μl	1.677	0.932	1.8	2.41
1	36.1	ng/μl	0.721	0.714	1.01	0.32
2	57.3	ng/μl	1.147	1.115	1.03	0.29
3	38.5	ng/μl	0.77	0.82	0.94	0.29
4	76.1	ng/μl	1.522	1.397	1.09	0.4
5	9.3	ng/μl	0.185	0.548	0.34	0.08
6	42.7	ng/μl	0.854	0.938	0.91	0.24
7	64.6	ng/μl	1.292	1.348	0.96	0.32
8	43.9	ng/μl	0.879	0.92	0.96	0.3
9	75.9	ng/μl	1.519	1.608	0.94	0.26
10	47.4	ng/μl	0.949	0.927	1.02	0.46

图1 10例不同石蜡切片DNA粗提液的质量检测结果 “control”为1例外周血白细胞基因组DNA

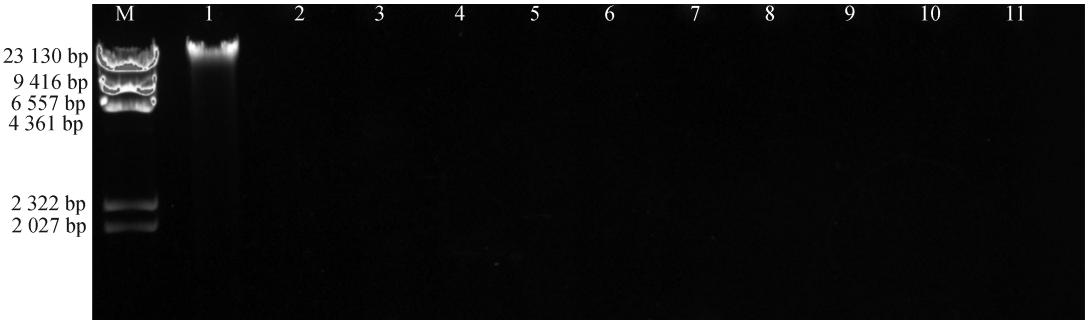


图2 10例不同石蜡切片DNA粗提液的琼脂糖凝胶电泳 M:λDNA/HindⅢ分子量标志物(小片段已电泳脱离凝胶);1:对照(外周血白细胞基因组DNA);2~11:10例不同石蜡切片标本DNA分离物(含DNA 100 ng)

增检测情况不尽相同,与BRCA1(图3D)相比,AT-Pase6(图3B)和HBB(图3C)的阳性率明显更高,而mtDNA D310区阳性率最低;此外,在标志物50 bp

位置处多呈现一致密区域,系引物二聚体。增加模板用量至100 ng后,mtDNA D310区扩增可见每个样本均获目的产物。

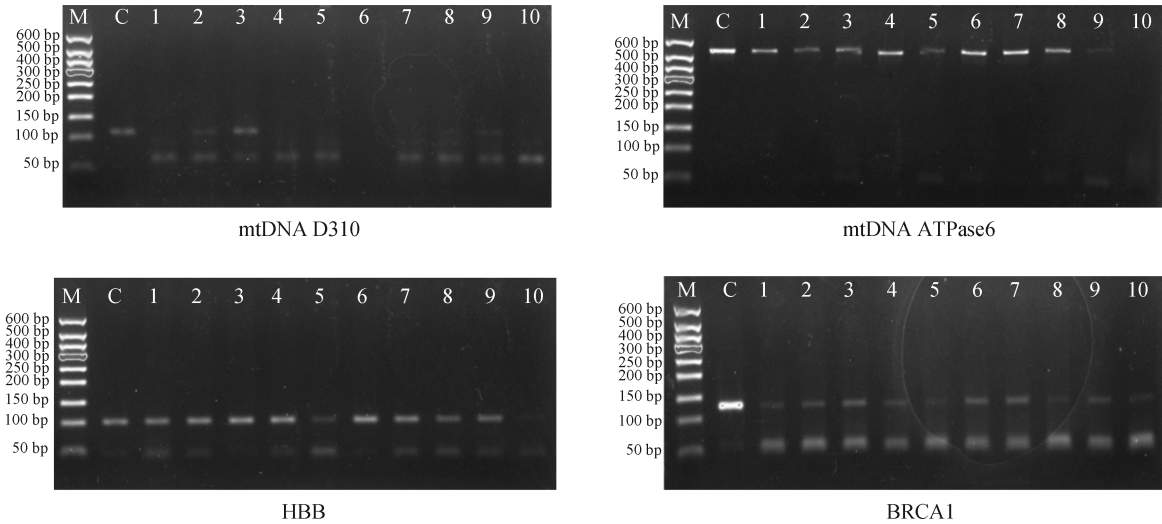


图3 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测 M:50 bp DNA 梯级分子量标志物;C:阳性对照;1~10:10个不同样本

2.3 PCR产物测序 PCR产物直接测序结果进一步表明所获扩增物与设计相吻合。对部分具有明显识别标志(如D310 polyC 微卫星多态区、mtDNA 8701A/G SNP位点)进行了搜索分析(图5)。

3 讨论

根据文献[1]配制的DNA消化液中未使用强去垢剂SDS,而是较为温和的Tween 20,因为后者同样具有极强的破坏细胞膜功能但对后续PCR反应

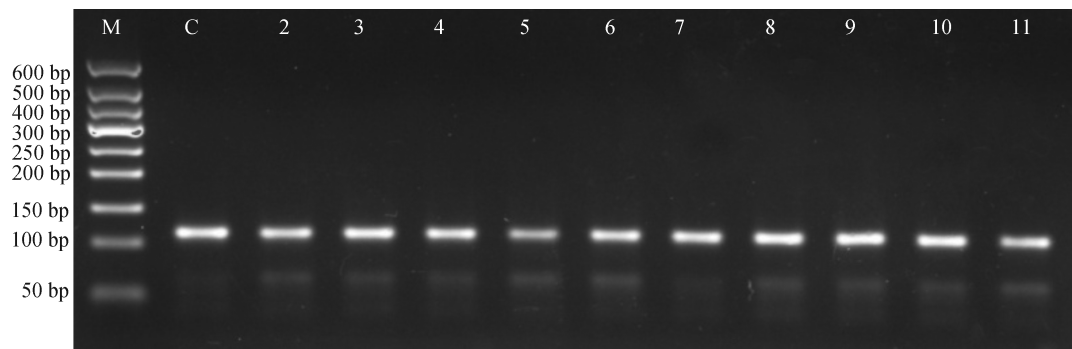


图 4 模板 DNA 增量(至 100 ng)后 mtDNA D310 区的 PCR 扩增检测 M;50 bp DNA 梯级分子量标志物;C;阳性对照;泳道 2~11: 10 个不同样本

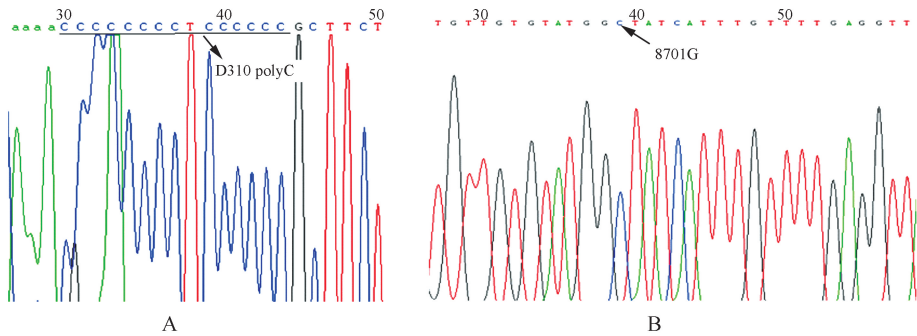


图 5 部分 PCR 产物的 DNA 序列分析结果 A;mtDNA D310 区(下划线部分为 poly C 微卫星多态部分);B;mtDNA ATPase6 基因(以下游引物测序结果,箭头所指处为 8 701 G,系 mtDNA 宏单倍型 M 的标志 SNP 基因型之一)

影响不大,同时,溶液中含有适当浓度蛋白酶 K,从而能一步完成甲醛固定细胞的裂解及蛋白消化,促进切片上细胞 DNA 的分离。

DNA 分离提取产率是制约石蜡包埋陈旧组织标本用于 PCR 扩增检测的难点之一。提取效率取决于两个方面:一是所用细胞数量,二是裂解消化的效率。最初在脱蜡处理后的玻片上直接滴加消化裂解液进行原位消化,结果在 55℃ 较高温度、3 h 较长时间处理过程中,因液体挥发严重,无法发生有效裂解和消化;因此改进为将脱蜡后组织片用消化裂解液洗脱并转移至离心管内,且每隔 1 小时低速瞬时离心富集液体,以补偿因水分挥发对细胞裂解和蛋白酶 K 消化作用的抑制。

针对切片上有限的细胞数量,为获得尽可能大的 DNA 产量,需用消化裂解液充分洗脱玻片上组织残片,尽量避免细胞的丢失。我们将 180 μ L 溶液分三次冲洗收集细胞,每次用 200 μ L 移液器吹出液体、冲击疏松的组织片,并使玻片一角伸入 1.5 mL 离心管管腔,使得液体汇聚后从角尖滴入管内。

由图 2 可以看出样本间浓度差别明显,这主要

是因为切片上固定的组织细胞数量相互间还存在差别。DNA 纯度根据 $A_{260/280}$ 比值判断,纯度高的 DNA 样品,其值在 1.8 左右,若比值高于 1.9,说明 DNA 样品中 RNA 未除尽;若比值低于 1.6,则表明样品中含有酚和/或蛋白质污染。本研究在组织消化后未进行纯化处理,因此 DNA 酶解分离液中含有大量蛋白质和有机类杂质,导致所有样本 $A_{260/280}$ 值均显著低于 1.6,同时 $A_{260/230}$ 值均远小于 2,提示高盐离子浓度;琼脂糖凝胶电泳中未出现 DNA 条带的原因在于切片 DNA 主体为片段化的核酸分子,大小不一,因此无法簇集形成致密区带。然后,由于后续 PCR 实验对模板 DNA 的纯度要求并不高,且所扩增多为小 DNA 片段(多为 100 bp 左右,不超过 500 bp),因此适用此方案;若对 DNA 样品有纯度要求,可用常规方法如酚/氯仿法、柱层析法等进一步抽提纯化,但推测将造成 DNA 得率的下降。

由图 3 可以看到,在 PCR 扩增验证实验中,绝大部分样品获得 4 对引物相应的扩增产物,虽然阳性率和强度不一;而部分样品扩增产物带极弱或呈阴性的原因,推测有二:①切片上细胞数量过少,导

致分离所获 DNA 产量极低下,如样品 5,浓度仅为 $9.3 \mu\text{g/mL}$,与其他样品相差达数倍至数十倍,故其 4 种 PCR 产物均相对较少,条带弱;②模板 DNA 降解,导致起始分子数过少、模板效用性过于低下所致。如样品 9 和 10,尽管表观测定浓度分别达到 $75.9 \mu\text{g/mL}$ 和 $47.4 \mu\text{g/mL}$,但扩增条带弱甚至呈阴性。但从总体来看,通过增加模板用量可提高扩增阳性率、增加产物量,如图 4 所示,针对相同条件下 mtDNA D310 区扩增阳性率偏小的情况,增加 1 倍的模板用量至 $100 \text{ ng}/20 \mu\text{L}$ 反应,结果全部样品均获得理想的扩增检测结果。

引起石蜡包埋组织细胞 DNA 降解的原因来自多个方面。在组织块经历甲醛固定和高热石蜡冷却包裹的过程中,细胞内 DNA 易受损伤,加之所用切片多在空气中曝露达 1 年以上,这可能是造成 DNA 严重降解、所提取多为碎片化较小 DNA 分子并导致其用于 PCR 扩增时模板效率下降的主要原因。但是,这种影响对细胞质中线粒体 DNA 和核基因有较大差别:每个细胞具有数十至数百个线粒体,每个线粒体可拥有 1 个以上 mtDNA 分子,因而细胞内 mtDNA 可达数百到上千个拷贝,同时分子尺寸较小—人类线粒体 DNA 为仅 $16\,569 \text{ bp}$ 的环状分子;而核基因多系细胞内单个拷贝,且为长链大分子,加之二甲苯法虽脱蜡较为彻底,但容易导致 DNA 长链断裂、降解;因 DNA 拷贝数量和分子大小的双重因素,mtDNA 在耐受降解上具有相对核基因的显著优势。当然,PCR 扩增效率并非完全取决于模板效用性,还与引物及待扩增区域的结构等有关,本文中 D310 区的扩增在其他条件一致的情况下反而较核基因如 HBB 更差可能属于后者。

本研究结果表明,改进的蛋白酶 K 裂解液“一步法”能快速从石蜡包埋组织切片中分离获得细胞 DNA,因不经纯化回收处理,不仅产率不致严重受损,且规避了繁琐的纯化处理过程和昂贵的试剂费用;即使来自陈旧标本 DNA 粗提液也可有效用于 PCR 扩增线粒体基因片段。因此,医院病理科历年

来所积存的病理组织包埋块或切片都可提供作为至少线粒体 DNA 疾病遗传学关联研究的重要标本来源,同时,mtDNA 序列表征人类母系遗传背景,对于个体鉴别等也具有重要意义,而犯罪现场或灾难事故现场来源的陈旧血迹、毛发等核酸包含材料,完全有可能视为石蜡切片的情况,可进行相似的高效、快速核酸分离。

综上,尽管石蜡切片上经高温和有机溶剂处理获取 DNA 数量有限、且质量难以控制,但用于某些定性研究工作如基于 PCR 短片段扩增的个体基因分型,尤其对线粒体 DNA 的相关工作,仍然提供了来源丰富而合理的优质资源。

参考文献:

- [1] Zhou WM, Zhu M, Gui M, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA copy number is associated with prostate cancer risk and tumor burden [J]. PLoS One, 2014 9 (10): e109470. doi: 10.1371/journal.pone.0109470. eCollection 2014.
- [2] Yuan YT, Jiang YX, Yin XW, et al. Comparison of four methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues [J]. J Clin Rehabilitative Tissue Engineering Res, 2010, 14(24): 4430-4434.
- [3] 张素娟, 赵彤, 董敬朋, 等. 石蜡切片提取方法的改良及其临床应用临床 [J]. 临床与实验病理学杂志, 1996, R446: 62-65.
- [4] 赵吉生, 盖宝东, 森隆弘, 等. 石蜡包埋组织中提取 DNA 应用于 PCR 反应影响因素的研究 [J]. 中国实验室诊断杂志, 2003, 7: 330-333.
- [5] 宋丽新, 高兴华, 张士发, 等. 石蜡包埋组织中 DNA 提取方法的对比研究 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(4): 268-269.
- [6] 白春英, 郝俊海, 白海花. 石蜡包埋组织中 DNA 的提取 [J]. 生物学杂志, 2002, 19(3): 35-36.
- [7] Aral C, Kaya H, Ataizi-Celikel C, et al. A novel approach for rapid screening of mitochondrial D310 polymorphism [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 21-25.

(此文编辑:朱雯霞)