技术方法

文章编号:1000-5404(2007)18-1824-02

快速提取冻存外周血中线粒体DNA及其纯化的方法学研究

翟 羽,柳君泽,高文祥 (第三军医大学高原军事医学系病理生理与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨并建立从少量冻存外周血中快速、简便提取高纯度线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的技术途径。**方法** 冻存外周血复温后,经破碎红细胞,裂解白细胞,去除细胞膜和核DNA(nuclear DNA, nDNA)后获得mtDNA;再去除蛋白和RNA,利用紫外光谱分析及凝胶电泳鉴定,获得高纯度mtDNA。**结果** 能获得无蛋白质及nDNA污染,纯度较高的mtDNA样品。**结论** 该方法能快速、可靠地从外周血中提取较高纯度的mtDNA,满足常规分子生物学、遗传学和生物信息学等研究领域需要,具有一定的方法学意义。

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是独立于核DNA(nuclear DNA, nDNA)具有母系遗传特点的遗传物质。它在遗传性疾病、肿瘤、世系迁移、能量代谢等方面起重要的作用[1]。提取mtDNA是直接关系到线粒体研究成败及结果的可靠性的首要步骤。目前提取mtDNA的方法主要是利用差速离心分离线粒体并进行酶解的传统方法[2]及利用碱性裂解法快速获得的改进方法[3-5]。前者经典而实用,但是需要的标本量大、耗时长、成本较高;后者因对标本需求量小,提取步骤快速而简便,已经逐步替代前者,成为mtDNA提取的主要方法,但采用碱性裂解法提取外周血中mtDNA需先分离白细胞,再行提取。这样对冻存外周血会因为不可避免的溶血而难以实施白细胞的有效分离,使这项技术的应用受到一定的局限。

在实际工作中,采集的外周血往往可采量少,现场条件不足而需先冷冻储藏。为此,我们结合相关的研究工作,针对碱性裂解法的局限性,探索出一种能快速、简便地从少量冻存外周血中获取高纯度mtDNA的方法。通过初步鉴定,表明这种新方法快速、可靠。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 主要材料 正常人外周血加肝素抗凝,-70 ℃低温冻存。

1.1.2 主要仪器 复日FR-980生物电泳图像分析系统,NanoDrop ND-1000微量核酸蛋白测定仪,Eppendorf 5810R低温高速离心机,DYY211型电泳仪。

1.2 试剂与溶液配制

①溶液Ⅰ:0.25 mol/L蔗糖,1 mmol/L EDTA,2.5 mmol/L $MgCl_2$,30 mmol/L Tris-HCl,0.015% Triton-X100,pH 7.5;②溶液Ⅱ:含25 mmol/L Tris-HCl,30 mmol/L EDTA-Na_2,50 mmol/L葡萄糖,pH 8.0;③溶液Ⅲ:含0.2 mol/L NaOH,1%十二烷基硫酸钠(SDS)(临用前用5 mol/L NaOH和10% SDS贮存液配制);④溶液Ⅳ:含3 mol/L乙酸钾溶液,pH 5.4,含5 mol/L乙酸根离子;⑤溶液Ⅴ:Tris饱和酚(pH>7.6):氯仿:异戊醇体积比为25:24:1。

1.3 mtDNA的提取

取1 ml冻存抗凝血,37 ℃水浴复温后加入4 ml溶液Ⅰ后震荡10 min,4 ℃ 1 000×g离心4 min,吸取上清后4 ℃ 12 000×g离心10 min,弃上清,加入150 μl溶液Ⅱ,冰浴中吹吸混匀,依次加入300 μl溶液Ⅲ,冰浴变性8 min,再加入225 μl溶液Ⅳ冰浴复性25 min。裂解产物以10 000×g离心6 min,取上清,加入等体积溶液Ⅴ温和振荡10 min,10 000×g离心10 min,取水相,加2倍体积无水乙醇冰浴30 min,15 000×g离心10 min,用70%乙醇(0 ℃)洗涤,15 000×g离心2 min,彻底去上清,自然干燥,加入TE液50 μl溶解,-20 ℃保存。

1.4 mtDNA的纯化

在mtDNA样品中加入无DNA酶的RNase A,使其终浓度为20 mg/L,室温消化30 min,加入等体积溶液Ⅴ萃取,10 000×g离心10 min,取上层水相,加入3 mol/L乙酸钠(pH 5.4),使其终浓度为0.3 mol/L,再加入2倍体积无水乙醇混匀后冰浴30 min,15 000×g离心10 min,用70%乙醇(0 ℃)漂洗沉淀,15 000×g离心2 min,去上清,室温干燥纯化的mtDNA,用适量TE液溶解,-20 ℃保存。

1.5 mtDNA的鉴定

1.5.1 紫外吸收光谱分析 将所获得的mtDNA样品经适当稀释,用NanoDrop ND-1000微量核酸蛋白测定仪进行自动紫外吸光度扫描(230、260、280 nm)。

作者简介:翟 羽(1978-),男,天津市人,讲师,主要从事高原生理、线粒体及生物信息学方面的研究。电话:(023)68752340-8210

通讯作者:柳君泽,电话:(023)68752336

收稿日期:2007-03-14;修回日期:2007-04-09

1.5.2　琼脂糖凝胶电泳　　制备 1% 琼脂糖凝胶（含 EB 0.05 mg/L）。取 5 μl mtDNA 样品并加入 1 μl 上样缓冲液混匀后点样，以 λDNA *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ为标准。100 V，60 min 电泳，复日 FR-980 生物电泳图像分析系统成像并拍照。

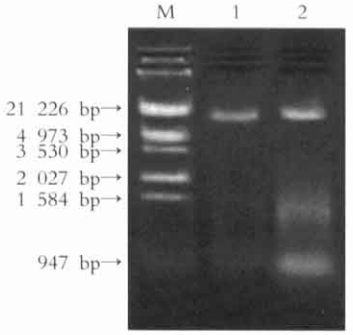
2　结果

2.1　紫外吸收光谱分析结果

mtDNA 紫外吸收光谱分析结果显示，呈现出典型的核酸紫外吸收光谱曲线。mtDNA 样品的最大吸光度值在 260 nm 处，最小吸光度值在 230 nm 处，$D(260)/D(280)$ 值为（1.83 ±0.01），$D(260)/D(230)$ 值为（1.56 ±0.01），浓度为（253.4 ±0.2）ng/μl。

2.2　mtDNA 的琼脂糖凝胶电泳分析结果

电泳结果可见图 1，16.5 kb 大小的清晰的 mtDNA 条带，无大分子量的 nDNA 条带，未进行 mtDNA 纯化的可见 RNA 污染条带，加入 RNAase A 纯化后，RNA 污染条带消失。



M：λDNA *Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ；1：经 RNAase A 纯化后的样品；2：用本方法制备未经纯化的样品

图 1　mtDNA 琼脂糖凝胶电泳图

3　讨论

mtDNA 是存在于线粒体内的闭环双链分子，人 mtDNA 由 16 569 bp 组成，参与编码 13 个与氧化磷酸化有关的蛋白质、2 个 rRNA 以及 22 个 tRNA。由于 mtDNA 无组蛋白的保护，处在高自由基的环境内，而且缺乏 DNA 修复系统，线粒体的错配修复机制也不健全，因此 mtDNA 的突变率较高，是 nRNA 的 10 ~ 100 倍[6]。现已经发现神经退行性疾病、衰老、遗传性疾病和肿瘤发生等与 mtDNA 突变有关，同时，线粒体是有氧氧化的重要场所，故研究 mtDNA 的结构及其表达对研究其功能及能量代谢具有重要的价值[7,8]。在工作中，测试样品往往可采量少，或现场采集的血标本有时不能及时提取 mtDNA 而需先冻存，因而建立从冻存外周血样中提取 mtDNA 的快速简易方法具有重要的意义。

目前多用细胞内总 DNA（nDNA 和 mtDNA 的混合物）进行线粒体的研究，在研究中不可避免地受到核基因组的干扰，因此需要单独制备 mtDNA。经典的差速离心法分离线粒体后，用蛋白酶 K 裂解线粒体膜后酚/氯仿/异戊醇抽提 mtDNA。该方法对样本需求量较大、操作繁琐、耗时长。除此之外，由于线粒体在外周血有核细胞中类似于质粒在大肠杆菌中的情况，可根据分子生物学中最常用的碱裂解法破碎细菌细胞膜获得质粒 DNA 的原理来提取 mtDNA 样品。此方法需要将白细胞从外周血标本中分离后再进行 mtDNA 的提取，而冻存血标本常有较严重的溶血而使白细胞分离困难。本研究中首先破碎红细胞，再对白细胞进行碱性裂解释放 mtDNA，能够快速、简易地从少量冻存血中提取 mtDNA，并避免 nDNA 和蛋白质的干扰，获得较高纯度的 mtDNA。实验证实，该方法十分适合于冻存血、血液黏度极高或外周血白细胞显著减少的血样本中的 mtDNA 提取，同时也适用于从微量血标本中提取 mtDNA，与常规方法相比，该方法省时、经济，而且 mtDNA 产量高、重复性好，所得 mtDNA 样品完全可以满足分子生物学、分子遗传学和生物信息学等研究领域，特别是在快速医学检测工作的需要。

关键词：线粒体 DNA；冻存外周血；提取技术；纯化

中图法分类号：R394-33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Rossignol R, Faustin B, Rocher C, *et al*. Mitochondrial threshold effects[J]. Biochem J, 2003, 370(Pt 3): 751 - 762.

[2] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290(5806): 457 - 465.

[3] 贾立明，叶明福，刘丽红，等. 改良一步法制备人外周血白细胞线粒体 DNA[J]. 第三军医大学学报，2004，26(15)：1407 - 1409.

[4] 朱克军，汪振诚，王学敏，等. 一种改进的提取人外周血和组织线粒体 DNA 的方法[J]. 第二军医大学学报，2004，25(4)：444 - 446.

[5] 陆　雪，封江彬，陈德清，等. 一种快速分离纯化外周血细胞线粒体 DNA 方法的建立[J]. 中国优生与遗传杂志，2005，13(12)：8，15 - 16.

[6] Paabo S. Mutational hot spots in the mitochondrial microcosm[J]. Am J Hum Genet, 1996, 59(3): 493 - 496.

[7] 梁伟波，吕梅励，贾　怡，等. 中国成都汉族群体线粒体 DNA 控制区序列多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志，2004，21(2)：144 - 148.

[8] 冯　强，席焕久，温有锋，等. 那曲地区藏族 mtDNA D-环区高变区Ⅰ序列多态性[J]. 解剖学杂志，2006，29(2)：150 - 152.

（编辑　王小寒）