DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.030
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)15-1407-03

技术方法

改良一步法制备人外周血白细胞线粒体DNA

Improved one-step method for extraction and purification of mitochondrial DNA from human peripheral white blood cells

贾立明[1],叶明福[2],刘丽红[1],孙玉兰[1],孙恒文[1],谢启超[1],李军果[1],钱桂生[3],房殿春[4],胡义德[1] (第三军医大学新桥医院:[1]肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,[2]病理科,[3]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[4]西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 建立从少量外周血中提取白细胞线粒体DNA(mtDNA)的快速、简便方法。方法 58份抗凝血静置后取白细胞层,采用碱变性法裂解细胞,酚/氯仿/异戊醇抽提,RNA酶消化后再抽提及沉淀,PCR扩增产物电泳鉴定。结果 获得的mtDNA样品不存在蛋白质等污染,用特异性mtDNA PCR引物从58例核酸样品中均能扩增出1 528 bp的mtDNA基因片段。结论 改良一步法是一种省时、经济、实用、重复性好、能满足常规分子生物学和遗传学分析需要的mtDNA制备新方法。

线粒体DNA(mtDNA)的常规制备方法存在所需细胞量大、设备及试剂昂贵、操作程序复杂、mtDNA产量低等缺点。胡义德等[1]根据闭环双链mtDNA的变性与复性特点,建立了从完整单细胞或组织细胞中直接制备mtDNA的一步法,此方法已被广泛应用。但在应用中发现一步法对血量很少、白细胞含量极低、血粘度极高的样本较难得到质量可靠的mtDNA样品,而且白细胞分离试剂Percoll较昂贵。因此,在一步法基础上又发展了直接从抗凝血的白细胞层制备mtDNA的技术方法,称为改良一步法。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 仪器 台式常温高速离心机、紫外分光光度仪、电泳仪为国产,PTC-100型PCR仪为美国产。

1.1.2 试剂 PCR核心试剂盒、RNA酶购自罗氏公司,λDNA/*Hind* Ⅲ购自北京鼎国生物公司,其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 溶液配制

1.2.1 TBS液含25 mmol/L Tris,0.136 mol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,pH 7.4。

1.2.2 STE液含0.1 mol/L NaCl,10 mmol/L Tris·HCl,1 mmol/L EDTA$Na_2\cdot 2H_2O$,pH 7.6。

1.2.3 TE液含10 mol/L Tris·HCl,1 mmol/L EDTA$Na_2\cdot 2H_2O$,pH 8.0。

1.2.4 溶液Ⅰ含50 mmol/L葡萄糖,25 mmol/L Tris·HCl,30 mmol/L EDTA$Na_2\cdot 2H_2O$,pH 8.0。

1.2.5 溶液Ⅱ含0.2 mol/L NaOH和1% SDS(临用前用5 mol/L NaOH和10% SDS贮存液配制)。

1.2.6 溶液Ⅲ含3 mol/L醋酸钾溶液,5 mol/L醋酸根离子,pH 5.4。

1.3 mtDNA的制备及纯化

1.3.1 白细胞的分离与洗涤 选健康成人献血者24例,我院住院肺癌患者34例。各抽取肝素抗凝外周静脉血1~3 ml,静置30 min或低速离心5 min后取白细胞层,用TBS液5 ml洗涤两次,再用适量STE液洗涤1次,将细胞悬液转移至Eppendorf管中,1 500× *g* 离心5 min,彻底去上清,获得纯净的白细胞,立即进行mtDNA的提取。

1.3.2 白细胞、线粒体的裂解及mtDNA的变性与复性 以每10^7细胞数为例,加入150 μl溶液Ⅰ,冰浴中吹吸混匀,依次加入300 μl溶液Ⅱ,冰浴变性8 min,再加入225 μl溶液Ⅲ冰浴复性25 min。

1.3.3 mtDNA的酚/氯仿/异戊醇抽取及纯化 裂解产物以10 000× *g* 离心6 min,取上清,加入半体积Tris饱和酚(pH>7.6),温和振荡10 min,再加半体积的氯仿/异戊醇(24∶1),振荡5 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%乙醇洗涤,15 000× *g* 离心2 min,彻底去上清,自然干燥,适量TE液溶解,加入无DNA酶的RNA酶A,使其终浓度为20 μg/ml,室温消化30 min,等体积Tris饱和酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)重抽提1次,经沉淀、室温干燥纯化的mtDNA,用适量TE液溶解,-20 ℃保存。

1.4 mtDNA样品的鉴定

1.4.1 紫外分光光度法测定 用UV-754型紫外分光光度仪测定A_{230}、A_{260}、A_{280}值,计算A_{230}/A_{260}、A_{260}/A_{280}比值,绘制核酸紫外吸收光谱曲线,按公式:mtDNA浓度(μg/ml)=A_{260}×稀释倍数×50计算mtDNA浓度。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080030);全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z075);第三军医大学校管课题(2001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30080030), and the Key Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z075), and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2001)

作者简介:贾立明(1964-),男,山西省太原市人,硕士研究生,主治医师,主要从事线粒体基因组相关疾病方面的研究。电话:(0351)6133236
通信作者:胡义德,电话:(023)68774701,E-mail:liumingm@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-09-08;修回日期:2004-02-15

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

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳 用 0.8% 琼脂糖制胶，含溴化乙锭 0.5 μg/ml。mtDNA 样品点样后以 3 V/cm 恒压电泳 2～3 h，紫外灯下自动扫描。

1.4.3 PCR 检测 以抽提样品为模板，扩增定位于 mtDNA 上的 1 528 bp 目的基因片段。引物：5′-ATTCTAACCT-GAATCGGAGG-3′，5′-GATGCTTGCAT GTGTAATC T-3′。按 PCR 核心试剂盒操作说明加入各成分后混匀稍加离心，置 PCR 基因扩增仪上，94 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃变性 1 min、55 ℃退火 1 min、72 ℃延伸 2 min、35 个循环后于 72 ℃延伸 7 min 结束。产物鉴定同步骤 1.4.2。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，行描述统计。

2 结果

2.1 mtDNA 的紫外光谱分析

结果显示，mtDNA 样品的最大光吸收值在 260 nm 处，最小光吸收值在 230 nm 处，呈现出典型的核酸紫外吸收光谱曲线，见图 1。mtDNA 的纯度及产量分析见表 1。

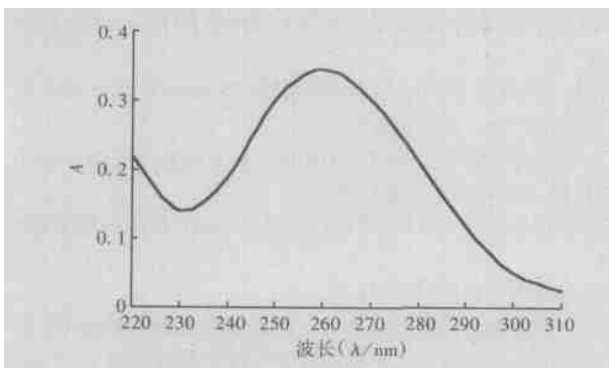


图 1 **mtDNA** 样紫外光谱分析曲线

表 1 **mtDNA** 样品的纯度及产量分析

MtDNA 来源	例数	mtDNA 粗制品		纯化 mtDNA 样品		mtDNA 产量
		A_{260}/A_{280}	A_{230}/A_{260}	A_{260}/A_{280}	A_{230}/A_{260}	
肺癌组	34	2.16±0.23	0.45±0.05	1.82±0.07	0.44±0.06	90±17 ng/10⁷ 白细胞
健康组	24	2.13±0.21	0.43±0.07	1.83±0.06	0.41±0.08	84±15 ng/10⁷ 白细胞

2.2 mtDNA 的琼脂糖凝胶电泳分析

结果可见 16.5 kb 大小的清晰 mtDNA 条带。mtDNA 粗制品中含有较多 RNA。经纯化后 RNA 被消除，未见蛋白质污染（图 2）。

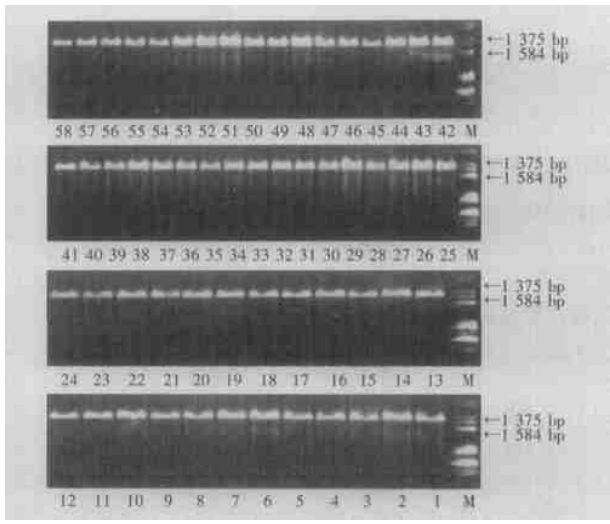


M：Marker；1～2：肺癌患者；3～4：健康成人

图 2 人白细胞 **mtDNA** 纯化制品琼脂糖凝胶电泳

2.3 PCR 产物分析

本方法所获得的 58 份 mtDNA 样品，均能扩增出包括 mtDNA Cytb、12SrRNA 基因以及 1 120 bp 非编码区序列在内的 1 528 bp 片段，见图 3。



1～24：肺癌患者；24～58：健康成人；M：Marker

图 3 人白细胞 **mtDNA** 模板 **PCR** 扩增产物电泳图

3 讨论

真核细胞拥有两种类型 DNA。一种是核 DNA（nDNA），它是目前受到高度重视的研究对象。另一种是 mtDNA，它位于线粒体内，仅占细胞总 DNA 量的百万分之一到百分之一。与 nDNA 相比，mtDNA 具有不同的遗传密码和分子结构。人类 mtDNA 是一个闭合、环状的双链 DNA 分子，由 16 569 个碱基对（base pair，bp）构成，其核苷酸序列已完全清楚[2]。研究表明，人类神经退行性疾病、糖尿病以及衰老的发病与 mtDNA 突变密切相关[3,4]。恶性肿瘤细胞 mtDNA 分子结构及表达调控研究已逐渐成为研究的热点[5,6]。因此，建立一个简便、快速的 mtDNA 制备方法，对从事该领域科研具有重要价值。

目前，制备真核细胞 mtDNA 大致有两种方法：①先提取细胞总 DNA，然后，通过氯化铯（CsCl）密度梯度离心或柱层析法分离纯化 mtDNA[7]；②先将细胞充分匀浆，通过蔗糖不连续梯度超速离心分离出线粒体，并通过 DNA 酶降解 nDNA 而纯化线粒体，然后用 SDS/或碱裂解线粒体而提取 mtDNA[8]。这些方法尽管能获得纯度较高的 mtDNA，但所需实验设施及试剂昂贵，操作程序复杂，且对微量组织、细胞难以获得可供分析使用的 mtDNA 量。1997 年胡义德[1] 建立了从完整细胞或组织块中直接提取 mtDNA 的一步法。但在应用中发现一步法对血量很少、白细胞含量极低、血粘度极高的样本较难得到质量可靠的 mtDNA 样品，而且白细胞分离试剂 Percoll 较昂贵。因此，在一步法基础上又发展了直接从抗凝血白细胞层制备 mtDNA 的改良技术

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

方法。

研究结果显示，改良一步法获得的 mtDNA 样品不存在蛋白质和 nDNA 的污染，纯度较高。用特异性 mtDNA PCR 引物从样品中扩增出 1 528 bp 的 mtDNA 基因片段，也进一步证实了所得样品为 mtDNA。密度梯度离心、柱层析或纯化线粒体等方法分离纯化真核细胞 mtDNA 至少需要 48 h 才能完成，其成功率约为 60%[7,8]。就本次实验来源一步法分离纯化完整细胞 mtDNA 需 6 h 可完成整个实验操作，改良一步法仅需 4 h 就可完成，经过 58 例次重复性试验，成功率为 100%。实验证实，该方法尤其适合于血量很少、血液粘度极高或癌患者经化疗、放疗后外周血白细胞显著减少的血样本 mtDNA 模板的制备。因此，与常规方法相比，改良一步法是一种省时、经济实用、mtDNA 产量高、对实验设备和试剂要求不高且重复性好的方法，所得 mtDNA 样品完全可以满足常规分子生物学和分子遗传学如 PCR 分析、DNA 探针的制备、DNA 杂交以及限制酶谱的构建等研究工作的需要。

关键词：线粒体 DNA；白细胞；抽提

中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] 胡义德，钱桂生，陈维中，等. 人白细胞线粒体 DNA 的快速分离与鉴定[J]. 中华血液学杂志，1997，11(18)：605－606.

[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] Castellani R, Hirai K, Aliev G, *et al*. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res, 2002, 70(3): 357－360.

[4] Maassen J A, Janssen G M, Lemkes H H. Mitochondrial diabetes mellitus [J]. J Endocrinol Invest, 2002, 25(5): 477－484.

[5] Migliore L, Coppede F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases[J]. Mutat Res, 2002, 512(2-3): 135－153.

[6] 杨世昕，韩 泉，卞修武. 寻找以线粒体为靶点的抗癌新药[J]. 第三军医大学学报，2003，25(11)：1022－1023.

[7] Hwang L L, Blamire J, Cottrell S F. A rapid procedure for the isolation of yeast mitochondrial DNA suitable for restriction fragment analysis[J]. Anal Biochem, 1983, 128(1): 47－53.

[8] 曹本宁，王均衡. 人血白细胞线粒体 DNA 的分离提纯[J]. 哈尔滨医科大学学报，1988，22(1)：72－73.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)15-1409-02

个案与短篇

超选择性肾动脉栓塞术在肾损伤中的临床应用

Clinical application of super-selective renal artery embolization in renal injuries

罗香国，张伟国，严景恩 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科，重庆 400042）

1997 年 6 月至 2002 年 6 月对 17 例肾损伤伴肉眼血尿经内科保守治疗无效，采用超选择性肾动脉栓塞术治疗，效果满意，现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组 17 例，男 16 例，女 1 例；年龄 36～57 岁，平均 44 岁。左侧 7 例，右侧 10 例。均为外伤性损伤，其中刀刺伤 9 例，坠落伤 2 例，车祸伤 2 例，撞击伤 4 例。所有病人均经 B 超、CT 等检查确诊为肾损伤，3 例合并腹膜后血肿，2 例合并肝包膜下少量积液，肋骨骨折 4 例，骨盆骨折 2 例，四肢脊柱骨折 5 例，排除各种其它脏器的急诊外科情况，IVU 检查提示肾脏功能良好，未发现严重造影剂外溢。临床均有不同程度的肉眼血尿，经绝对卧床休息、内科补液、输血、止血、预防感染等保守治疗，血压、脉搏等生命体征平稳，但肉眼血尿仍持续存在，血红蛋白及红细胞压积仍趋下降。

1.2 方法

本组 17 例患者均采用超选择性肾动脉栓塞术治疗。病人平卧在检查床上，常规消毒、铺单，采用 Seldinger 穿刺技术经右侧股动脉穿刺，成功后插入 4F 或 5F Cobra 导管至第一腰椎水平，旋转导管，首先插入正常侧肾动脉造影，证实血管及肾功能正常后，再将导管头转向受伤侧，上下移动，滑入肾动脉，经导管手推少量造影剂（优维显 300～350 mgI/ml），证实导管头在肾动脉后，用高压注射器，以 3 ml/s、总量 12 ml 行 DSA 造影。明确诊断后在超滑导丝的引导下作超选择性插管，直至导管头端达损伤部位的肾动脉分支，并再造影证实。根据动脉的情况，选择合适的弹簧栓子，在透视引导下经导管用导丝推入。15 min 后再造影，如果治疗不彻底，根据情况再用弹簧圈或明胶海绵栓塞，直至损伤动脉的分支完全栓塞。于术后 1 周内连续观察尿液性状、尿常规、血常规及生命体征等，术后 1 个月至 2 年复查 B 超或/和 CT 检查。

2 结果

本组 17 例病例的特点是血尿比较严重，经内科保守治疗

（下转 1416 页）

作者简介：罗香国（1966－），男，河北省石家庄市人，主治医师，主要从事临床介入治疗及螺旋 CT 诊断方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：(023)68757527

收稿日期：2003-02-01；修回日期：2003-09-19

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