DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.035
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0169-03

技术方法

从福尔马林固定-石蜡包埋淋巴组织抽提RNA的影响因素研究

Study on the factors involved in RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues

章 容[1],王 洪[2] (第三军医大学西南医院:[1]病理科,[2]全军传染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨从福尔马林固定-石蜡包埋(FFPE)淋巴组织提取RNA的影响因素。方法 以新鲜淋巴组织为对照,改变福尔马林固定时间及组织裂解方法,采用22对TCR Vβ CDR3区域特异性引物,观察从FFPE淋巴组织提取RNA的产量及其作为RT-PCR模板的扩增效率。结果 蛋白酶K法提取效率显著高于Trizol法,所提取RNA的可扩增性随福尔马林固定时间的延长而下降,TE 70 ℃孵育60 min去修饰处理可显著提高所提RNA的可扩增性。结论 从FFPE组织提取RNA完全可行,尽量短的固定时间、蛋白酶K消化及去修饰处理是必要的。

常规病理学标本均为福尔马林固定-石蜡包埋(formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE)组织,从FFPE组织提取基因组DNA的方法已基本成熟,我们也曾从淋巴瘤组织石蜡切片中提取基因组DNA,经PCR扩增后观察TCR Vβ和IgG重链基因重排[1]。从病理学档案标本提取足量、能有效扩增的RNA对基因组功能及多态性研究具有重要意义,提取方法值得探讨。最近几年,国外这方面出现诸多进展,但提取方法各异,所得RNA的产量及扩增效率也存在很大差异[2~5]。本研究以新鲜淋巴组织为对照,改变福尔马林固定时间及组织裂解方法,采用22对TCR Vβ CDR3区域特异性引物,观察从FFPE淋巴组织提取RNA的产量及其作为RT-PCR模板的扩增效率,确定一种合适的FFPE组织RNA提取方法。

1 材料与方法

1.1 淋巴组织来源及固定

淋巴组织来源于本院1例颈部淋巴结活检组织(男性,25岁),经组织学检查确诊为慢性淋巴结炎。

送检的淋巴组织切分为约100 mg大小的组织块,除常规病理学诊断取用之外,取2块迅速冻存于液氮,作为新鲜淋巴组织对照;4块置于磷酸盐缓冲的10%福尔马林(pH 7.0)中,于室温下分别固定16 h、7 d及30 d。福尔马林固定完毕后,按照常规方法脱水、透明、石蜡包埋。

作者简介:章 容(1974-),女,重庆市长寿县人,技师,主要从事病理学技术方面的研究。电话:(023)68752570, E-mail:zr52570@mail.tmmu.com.cn

通信作者:王 洪,电话:(023)68754289

收稿日期:2003-08-22;修回日期:2003-11-20

1.2 石蜡包埋组织的脱蜡

用灭菌处理的清洁刀片将石蜡块修剪至包埋组织大小,然后将FFPE淋巴组织全部切成厚度8~12 μm的切片,每块FFPE淋巴组织的所有切片小心放入50 ml高速尖底离心管(上海亚克曼塑料制品有限公司)。脱蜡步骤按Beaulieux F的方法进行:每管加入40 ml二甲苯,在振荡器上剧烈振荡2 min;4 ℃ 12 000× g离心2 min,弃上清,加入40 ml 95%乙醇,振荡器上振荡2 min,4℃ 12 000× g离心2 min,弃上清;重复以上步骤2次。最后一次弃去上清后,置通风橱自然晾干(约10~15 min)。

1.3 RNA提取及鉴定

所用器材、试剂和操作按常规RNA提取要求进行。

1.3.1 Trizol试剂盒方法 液氮冻存的100 mg新鲜组织块或步骤2脱蜡处理后按试剂盒说明进行操作。

1.3.2 蛋白酶K消化法 液氮冻存的100 mg新鲜组织块或步骤2脱蜡处理后的组织块置于匀浆器,加入1 ml蛋白酶K消化液(含200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 2%SDS, Merck公司蛋白酶K 800 μg, pH 7.5),匀浆,置Eppendorf管,45 ℃孵育1 h。经水饱和酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)抽提、乙醇沉淀后,自然干燥5~10 min,加入去RNA酶水200 μl溶解RNA。

上述两种方法所提RNA溶解后均取4 μl于1%琼脂糖电泳鉴定。

1.4 RNA的去修饰处理

参照Masuda[6]的方法,将溶于水的RNA 100 μl用乙醇沉淀,晾干后溶于TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA),70 ℃孵育60 min。

1.5 RT-PCR

采用Promega公司逆转录试剂盒进行cDNA合成。逆转录产物(cDNA)于-20 ℃冻存备用。根据文献[7]报道的TCR Vβ CDR3区域的22个亚家族特异序列分别合成22个Vβ引物(Vβ1-4, Vβ5.1, Vβ5.2, Vβ6-12, Vβ13.1, Vβ13.2, Vβ14-20)作为上游引物,以Cβ同源区共有序列合成下游引物。所有引物由上海生工合成。PCR体系为25 μl,其中含1 μl cDNA, 0.2 mmol/L

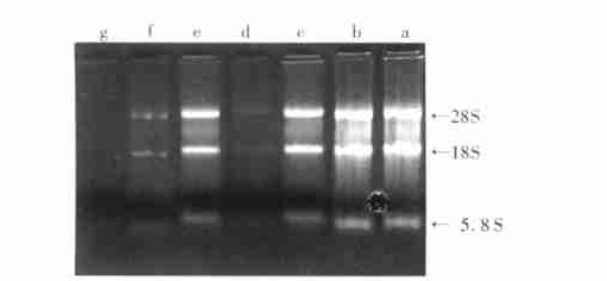
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

dNTP(dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP), 引物浓度为 0.4 μmmol/L(任一Vβ 引物和 Cβ 引物), 1 U ExTaq DNA 聚合酶(Takara 公司), 2.5 μl 10× PCR 缓冲液。95 ℃预变性 2 min, 随后的 PCR 参数为: 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min(末次为 6 min), 40 个循环, 循环结束后于 4 ℃保存。PCR 产物于 1%琼脂糖电泳、溴乙锭染色观察。

2 结果

2.1 两种 RNA 提取方法比较

我们采用最常用的两种方法提取 RNA: Trizol 试剂盒法和蛋白酶 K 消化法。新鲜淋巴组织和 FFPE 淋巴组织量均为 100 mg。所得 RNA 经 1%琼脂糖电泳图片见图 1。即使充分匀浆, Trizol 法也未能完全溶解 FFPE 组织(肉眼可见剩余组织残渣); 而 FFPE 组织经蛋白酶 K 45 ℃处理 1 h 后, 被完全消化(无肉眼可见残渣)。与此相应的是, 对于 FFPE 组织, 蛋白酶 K 法的 RNA 产量比 Trizol 法高 10 倍以上, 所提 RNA 的产量与完整性接近新鲜组织。两种方法提取新鲜组织 RNA 产量无明显差异。



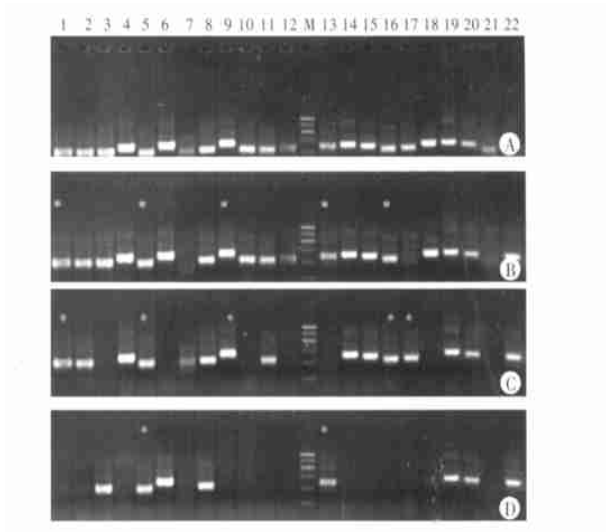
a: 新鲜淋巴组织(蛋白酶 K 法); b: 新鲜淋巴组织(Trizol 法); c: FFPE 淋巴组织(固定 16 h, 蛋白酶 K 法); d: FFPE 淋巴组织(固定 16 h, Trizol 法); e: FFPE 淋巴组织(固定 7 d, 蛋白酶 K 法); f: FFPE 淋巴组织(固定 30 d, 蛋白酶 K 法); g: 教学用福尔马林固定肝脏组织(固定 5 年, 蛋白酶 K 法)

图 1 提取 RNA 的电泳鉴定

采用蛋白酶 K 法对福尔马林固定不同时间(16 h、7 d、30 d)的 FFPE 组织进行 RNA 提取, 固定 7 d 与 16 h 相比, 所提 RNA 的产量与完整性变化不明显; 而固定 30 d 后 RNA 的产量与完整性明显降低。

2.2 RT-PCR 鉴定

为鉴定 FFPE 组织所提 RNA 作为模板的有效性, 我们对所提 RNA 进行逆转录, 用 22 对 TCR Vβ CDR3 区域特异性引物进行 PCR 扩增。各引物扩增片段在 170~250 bp 之间, 结果见图 2。新鲜淋巴组织 RNA 扩赠出 22 个片段, 固定不同时间(16 h, 7 d, 30 d) FFPE 组织 RNA 分别扩增出 16、10、6 个片段, 经 TE 70 ℃孵育 60 min 去修饰处理后分别扩出 19、15、8 个片段。可以看出, 所提 RNA 去修饰处理后 RT-PCR 的恢复程度随福尔马林固定时间的延长而降低。此外, 不同固定时间淋巴组织所提 RNA 经 RT-PCR 扩出的片段并不完全重合: TCR Vβ6 和 Vβ15 在 16 h 模板中无扩增, 但在 7 d 模板中有扩增; 而 TCR Vβ3、Vβ5.2 及 Vβ12 在 7 d 模板中无扩增, 但在 30 d 模板中有扩增。



胶图中泳道顺序依次为 Vβ1-4, Vβ5.1, Vβ5.2, Vβ6-12, Vβ13.1, Vβ13.2 和 Vβ14-20, 共 22 泳道。1%琼脂糖电泳, 溴乙锭染色。 *表示所提 RNA 经 TE 70 ℃孵育 60 min 去修饰处理后扩增出来的片段; A: 冰冻组织; B: FFPE 组织(RNA 经去修饰处理后)固定时间 16 h; C: FFPE 组织(RNA 经去修饰处理后)固定时间 7 d; D: FFPE 组织(RNA 经去修饰处理后)固定时间 30 d; 1: TCR Vβ1; 2: TCR Vβ2; 3: TCR Vβ3; 4: TCR Vβ4; 5: TCR Vβ5.1; 6: TCR Vβ5.2; 7: TCR Vβ6; 8: TCR Vβ7; 9: TCR Vβ8; 10: TCR Vβ9; 11: TCR Vβ10; 12: TCR Vβ11; 13: TCR Vβ12; 14: TCR Vβ13.1; 15: TCR Vβ13.2; 16: TCR Vβ14; 17: TCR Vβ15; 18: TCR Vβ16; 19: TCR Vβ17; 20: TCR Vβ18; 21: TCR Vβ19; 22: TCR Vβ20; M: Marker

图 2 RT-PCR 扩增鉴定电泳胶图

3 讨论

常规 Trizol 法以其简便、快速, 成为目前提取总 RNA 最常用的方法。但我们的实验结果表明, FFPE 淋巴组织对 Trizol 的耐受性比新鲜淋巴组织强, 蛋白酶 K 的消化处理是必要的。我们的提取实验还表明, 常温下福尔马林固定时间在 7 d 内对 RNA 产量无显著影响, 但固定 30 d 的样品 RNA 产量显著降低。我们对福尔马林固定 5 年的肝脏教学标本进行提取, 结果未能提出任何 DNA 或 RNA。因此, 常温下福尔马林固定时间最好不要超过 7 d, 标本长期浸泡于福尔马林可能会损坏核酸。

Lehmann 等[4] 认为 FFPE 组织提取的 mRNA 大多断裂为短片段状态, 平均约 200 bp 左右。我们选用的 TCR Vβ CDR3 区域特异性引物扩增产物长度较小, 在 170~250 bp 之间。因此, 本实验的 RT-PCR 检测考虑了 RNA 片段长度的限制, 能有效地反应模板 RNA 的可扩增性。

Masuda 等[6] 曾报道, 在福尔马林固定液中, RNA 碱基的氨基可发生甲羟基(N-CH2OH)化修饰, 因此, FFPE 组织提取的 RNA 直接作为模板的 RT-PCR 效率

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

不高,我们的结果也证实了这一点。所提 RNA 经 TE 70 ℃孵育 60 min 去修饰处理后,RT-PCR 效率得到相当程度的提高,其中福尔马林固定 16 h 的 FFPE 淋巴组织扩增出 19 个片段(总共 22 个预期片段)。但是,这种 RT-PCR 效率的恢复随福尔马林固定时间的延长而降低,表明不可逆修饰(相邻碱基二聚体形成)增加。由于碱基 A 的修饰率最高,形成相邻碱基二聚体的可能性增加,因此,寡聚(dT)作为逆转录引物与 mRNA 多聚 A 退火可能受到抑制。同时,不同固定时间淋巴组织所提 RNA 经 RT-PCR 扩出的片段并不完全重合,表明 RNA 的这些修饰是随机的。

综上所述,我们认为从 FFPE 组织提取 RNA 是可行的,但要注意 5 个要点:①宜采用蛋白酶 K 消化后提取;②用磷酸盐缓冲的 10%中性福尔马林固定,时间应限制在 24 h 以内;③提取的 RNA 最好经 TE 70 ℃孵育 60 min 去修饰处理;③所选择扩增的目的片段限制在 1 000 bp 以内,100 ~ 300 bp 片段的扩增效率更高。⑤综合应用寡聚(dT)和随机引物作为逆转录引物,可能有助于提高逆转录效率。

关键词:RNA;淋巴组织;RT-PCR
中图法分类号:R322.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 章 容,郭乔楠,麻 莉,等. PCR 检测非霍奇金淋巴瘤 IgH 和 TCRβ 基因重排[J]. 第三军医大学学报,2003,25(4):347—348.
[2] Korbler T, Grskovic M, Dominis M, *et al*. A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 74(3): 336—340.
[3] Ohe N, Saio M, Kijima M, *et al*. *In situ* detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase messenger RNA in paraffin-embedded human astrocytic tumor tissues by nested *in situ* RT-PCR is useful in predicting chemotherapy-resistance of tumors[J]. Int J Oncol, 2003, 22(3): 543—549.
[4] Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies[J]. Methods, 2001, 25(4): 409—418.
[5] Beaulieux F, Berger M M, Tcheng R, *et al*. RNA extraction and RT-PCR procedures adapted for the detection of enterovirus sequences from frozen and paraffin-embedded formalin-fixed spinal cord samples[J]. J Virol Methods, 2003, 107(2): 115—120.
[6] Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, *et al*. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(22): 4436—4443.
[7] Kurt R A, Park J A, Panelli M C, *et al*. T lymphocytes infiltrating sites of tumor rejection and progression display identical V beta usage but different cytotoxic activities[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3969—3974.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2004)02-0171-02

技术方法

微量元素硒、锰、氟对 SOD 活性的影响

Effects of microelements Se, Mn, and F on SOD activity

赵先英,刘毅敏,覃 军,王祥智,赵华文 (第三军医大学基础医学部化学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨微量元素硒、锰、氟对 SOD 活性的影响。方法 采用 Vit C 阻断法测定了不同浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性的影响。结果 ①Se 浓度由 0 μg/L 增加到 40.0 μg/L 时,SOD 活性由 5 100 U/mg 上升到 5 400 U/mg;Se 浓度继续增加到 60.0 μg/l,SOD 活性下降至 5 140 U/mg;②Mn 浓度由 0 μg/L 增加到 400 μg/L,SOD 活性由 5 100 U/mg 上升到 5 900 U/mg;Mn 浓度继续增加 500 μg/l,SOD 活性下降 5 200 U/mg;③F 浓度由 0 μg/L 增加到 100 μg/L,SOD 活性由 5 100 U/mg 上升至 5 280 U/mg;继续增加 F 浓度到 200 μg/L,SOD 活性下降为 5170 U/mg;再增加 F 浓度至 400 μg/l,600 μg/l,800 μg/L,SOD 活性基本维持在 5 200 ~ 5 180 U/mg 之间。结论 微量元素 Se、Mn、F 与抗氧化物酶 SOD 活性具有密切关系,低浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性起激活效应,高浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性起抑制效应。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一类重要的金属酶,能催化超氧阴离子自由基(O_2^-)发生歧化反应:$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ 从而将其清除。根据金属辅基的不同,可将其分为 3 类:Cu. Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD。文献[1, 2]证明,SOD 活性受微量元素 Cu、Zn、Fe 影响较大。而 SOD 活性与人体内其它重要微量元素 Se、Mn、F 关系如何,则少见详细体外实验报道。为此,本实验用 Vit C 阻断法测定了不同浓度 Se、Mn、F 对 SOD 活性的影响,并从得出了一些有意义的结论。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

SOD:Sigma 试剂;SOD 标准液:用 0.05 mol/L、pH 10.2 的 Na_2CO_3-$NaHCO_3$ 缓冲液配制,浓度为 0.04 mg/ml,比活力为 5 100 U/mg;Se 标准液:准确称取一定量的 Na_2SeO_3,用双蒸水配成含 Se 100 μg/L 的应用液备用;Mn 标准液:准确称取一定量 $MnCl_2$,

作者简介:赵先英(1966—),女,河南省郸城县人,硕士,副教授,主要从事微量元素方面的研究。电话:(023)68752216

收稿日期:2002-11-27;修回日期:2003-05-27

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