DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.022

技术与方法

从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 的研究

王俊茹 刘为纹 邓国仁* 吕有勇* 李吉友* (第三军医大学西南医院消化科)630038

从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 可望解决分子生物学研究中难以得到大量标本的难题。本文对几种不成熟的从石蜡包埋组织中提取 DNA 的方法进行了比较,建立了一种简单、有效的方法;并对石蜡包埋组织中的 DNA 进行了 ras 基因点突变的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌组织标本:42 例(1983 年~1985 年)经福尔马林固定、石蜡包埋的胃癌组织来自北京市肿瘤研究所病理科。

1.1.2 10 例正常人血标本来自北京医科大学附属一院正常献血员。

1.1.3 工具酶 Hpa Ⅱ、Msp Ⅰ、BstN1、Hph1 购自美国 BRL 公司。

1.2 方法

1.2.1 从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA:将石蜡包埋的组织切成 5μm 的切片,分别加入 4 个 1.5ml Eppendorf 管内。

1.2.1.1 直接水煮法[1,2]:将 1 号管内加入二甲苯,弃除上液后加乙醇,弃除乙醇,加入去离子水煮沸 10min 后用于 PCR 扩增。

1.2.1.2 蛋白酶 K 消化法[3,4]:将 2 号管内依次加入辛烷、乙醇。真空抽干后加入消化缓冲液及蛋白酶 K 在 55℃孵育 3 h,然后用于 PCR 扩增。

1.2.1.3 氯仿-异戊醇抽提法[5]:将 3 号管内的切片用二甲苯洗 3 次,然后依次用 100%、90%、80%、75%乙醇洗。洗淀物再用二甲苯洗、无水乙醇沉淀,SSC 溶解。去掉 SSC,加入溶液 A(2×SSC、1% SDS 和蛋白酶 K),保温 6 h,离心后去上清加入溶液 A 继续保温。氯仿-异戊醇抽提、乙醇沉淀。沉淀物加 RNaseA 继续保温至组织溶解,分别用酚、酚-氯仿、氯仿-异戊醇抽提。

1.2.1.4 将 4 号管内加入二甲苯,去除上液后加入乙醇,沉淀物中加入裂解缓冲液和蛋白酶 K,保温后用酚-氯仿抽提。

1.2.2 新鲜胃癌组织 DNA 和白细胞 DNA 按常规方法提取[6,7]。

1.2.3 多聚酶 DNA 链延伸反应(PCR)按 Saiki 法[8]加以改进。PCR 扩增的产物用相应的限制性内切酶消化,酶消化产物用 4%聚丙烯酰胺电泳分离。

2 结果

2.1 用不同方法从石蜡包埋组织中提取 DNA 进行 PCR 扩增的结果

用直接水煮法 10 个标本有 6 个被扩增出来;用蛋白酶 K 消化法 10 例中 7 个被扩增出;用酚-氯仿和(1.2.1.4)法 10 例标本全被扩增出。

2.2 从新鲜胃癌组织和从石蜡包埋组织中提取 DNA 的比较

从石蜡包埋组织中提取的 DNA 经 0.8%琼脂糖电泳显示组织有较明显的降解;而从新鲜胃癌组织提取的 DNA 片断多在 23kb 以上。

2.3 三种不同组织来源的 DNA PCR 扩增结果

分别取新鲜胃癌组织 DNA、正常人白细胞 DNA、石蜡包埋组织 DNA 用 PC1A 和 PC2B 进行 PCR 扩增(图 1、图 2、图 3)。从图中可以看出,尽管从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取的 DNA 有明显降解,但仍能有效地扩增。

* 北京市肿瘤研究所

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

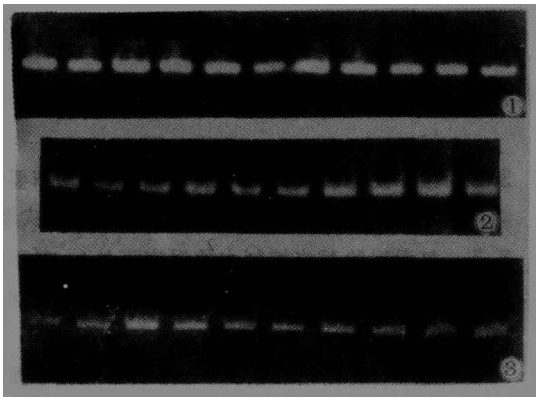


图 1 新鲜胃癌组织 DNA PCR 扩增后产物
图 2 正常人白细胞 DNA PCR 扩增后产物
图 3 从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 进行 PCR 扩增后产物

2.4 ras 基因点突变的研究

用(1.2.1.4)法从石蜡包埋组织中提取的 DNA 分别用分析 ras 基因点突变的引物进行扩增，42 例标本均能扩增出来。对 PCR 扩增的产物分别用相应的限制性内切酶消化，4%聚丙烯酰胺电泳分离，其结果和从新鲜胃癌组织中提取 DNA 进行 ras 基因点突变的研究结果一致。

3 讨论

从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 是近年来随着分子生物学的发展而开始的。几种方法均不十分成熟。本文对几种方法进行了比较，发现直接水煮法和蛋白酶 K 消化法扩增率较低(60%～70%)，这可能是由于标本中蛋白质和残留的固定剂等成分对 Taq DNA 多聚酶的抑制所致。酚-氯仿抽提法虽能有效地扩增，但步骤繁多，不适合大批样本的检测。在以上几种方法的基础上我们建立了一种简单、有效 DNA 提取的方法，即二甲苯脱蜡→乙醇水化→蛋白酶 K 消化→酚-氯仿一次抽提。

关键词 石蜡包埋组织；DNA 提取；胃癌；ras 基因点突变

参考文献

1. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. New Engl J Med, 1990; 323: 561
2. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, et al. K-ras codon 12mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. Nucleic Acid Res, 1988; 16: 7773
3. Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, et al. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequences specific oligonucleotides. Biochem Biophys Res Communs, 1987; 142: 710
4. Brice SL, Suard Y, Fasano O, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in cutaneous lesions of erythemis multiforme. J Invest Dermatol, 1989; 93: 183
5. Dubean L, Chandler LA, Gralow JR, et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. Cancer Res, 1986; 46: 2964
6. Shih C, Weinbery RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell, 1982; 29: 61
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J, et al. Molecular coloning. New York: 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9.17
8. Saiki RK, Sharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985; 230: 1350
9. Haselkorn R, Doty D. The reaction of formaldehyde with polynucleotides. J Biol Chem, 1960; 236: 2738
10. Jackson V, Chalkey R. Separation of newly synthetized nucleohistone by equilibrium centrifugation in cesium chloride. Biochemistry, 1974; 13: 3952

(收稿：1992-08-27；修回：1993-03-18)

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