

石蜡包埋淋巴瘤组织线粒体 DNA 的提取及 PCR 扩增

马 佳¹, 宋文庆², 杨清玲¹, 王 惠³

[摘要] **目的:**探讨从石蜡包埋组织标本获取线粒体 DNA(mtDNA)并进行 PCR 扩增的有效方法。**方法:**选取 27 例石蜡包埋的淋巴瘤组织,分别使用二甲苯/乙醇和 0.5% Tween-20 进行脱蜡,改进裂解缓冲液的成分及浓度,酚/氯仿抽提以获取 mtDNA 并进行电泳和 PCR 分析。**结果:**0.5% Tween-20 法获取 mtDNA 纯度及浓度含量明显高于二甲苯/乙醇法($P < 0.01$);二甲苯/乙醇法和 0.5% Tween-20 法获取的 mtDNA PCR 扩增成功率分别为 11.1% 和 40.7%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**二甲苯/乙醇和 0.5% Tween-20 两种方法都可以扩增出 mtDNA 的目的片段,但 0.5% Tween-20 法操作简便,PCR 扩增成功率高,不用接触二甲苯等有毒化学试剂,是一种较为理想的 mtDNA 提纯方法。

[关键词] DNA 复制;线粒体 DNA;聚合酶链反应;淋巴瘤;石蜡包埋组织

[中国图书资料分类法分类号] R 349.61 **[文献标识码]** A

Extraction and PCR amplification of mitochondrial DNA from paraffin-embedded lymphoma tissue

MA Jia¹, SONG Wen-qing², YANG Qing-ling¹, WANG Hui³

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, 2. Department of Pathology,

3. Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore an effective method for extraction and PCR amplification of mitochondrial DNA from paraffin-embedded lymphoma tissue. **Methods:** Twenty seven paraffin-embedded lymphoma tissue specimens were selected. The two methods: Xylene/ethanol method and 0.5% Tween-20 method were used for deparaffinisation. The component and concentration of lysis buffer were modified, and mitochondrial DNA was extracted by phenol and chloroform. The obtained mitochondrial DNA was analyzed by PCR amplification. **Results:** The DNA purity and concentration which extracted by 0.5% Tween-20 deparaffinisation method was obviously higher than that by Xylene/ethanol deparaffinisation method. The successrate of PCR amplification was 11.1% by Xylene/ethanol method and 40.7% by 0.5% Tween-20 method, respectively. There was significant statistical difference($P < 0.05$). **Conclusions:** Both the Xylene/ethanol deparaffinisation method and 0.5% Tween-20 deparaffinisation method can extract mitochondrial DNA. But the 0.5% Tween-20 method is simple, the success rate is high, and can reduce the contact chance from poisonous chemical reagents such as dimethylbenzene. So the 0.5% Tween-20 deparaffinisation method is an ideal method for extraction of mitochondrial DNA from paraffin-embedded tissues.

[Key words] DNA replication; mitochondrial DNA; polymerase chain reaction; lymphoma; paraffin-embedded tissue

近年来,线粒体 DNA(mtDNA)突变在人类肿瘤发生中的作用受到学者们的关注,如核 DNA(nDNA)的异常改变一样,mtDNA 的异常改变也在肿瘤的发生中起重要作用^[1-2]。对于 mtDNA 与这些疾病的研究,多是从新鲜组织或血液中获得 DNA 再进行 mtDNA 扩增。医院病理科积存的大量石蜡包埋组织,是一个可靠的分子生物学研究的材料来源。而对于从石蜡包埋组织中获得并扩增 mtDNA 的相关报道较少。本文对石蜡包埋组织获取 DNA 的传统方法加以适当改进,成功地扩增出约 500 bp

mtDNA 片段,从而为 mtDNA 的研究提供一个相对简便、成本低廉的可行方法。

1 材料与方法

1.1 材料 收集我院病理学教研室 2005~2007 年 27 例石蜡包埋淋巴瘤组织,均经病理组织学及免疫组织化学检查确诊为恶性淋巴瘤。显微镜下观察确保组织结构清晰,无自溶、坏死和大片出血后,切取 10 μm 厚切片,每 10 片放入 1 支 1.5 ml Eppendorf 管中。

1.2 主要试剂和仪器 蛋白酶 K(Amresco 公司)、Tris-饱和酚(上海生工生物工程有限公司),琼脂糖(西班牙),PCR 扩增试剂盒(MBI 公司),PCR 引物(上海生工生物工程有限公司合成)。梯度 PCR 仪、紫外凝胶成像仪、电泳仪(BIO RAD 美国),SMARTSPEC 3000 分光光度计(美国)。

[收稿日期] 2009-06-26

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2007B198)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室, 2. 病理学教研室, 3. 临床检验诊断实验中心, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 马 佳(1977-),女,硕士,讲师。

1.3 方法

1.3.1 脱蜡步骤 (1)二甲苯/乙醇脱蜡:取 2 片 10 μm 切片组织,加入 500 μl 二甲苯,37 °C 水浴 30 min,15 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,重复 2 次,100%、95% 及 75% 乙醇分别在室温下放置 15 min,15 000 r/min 离心 15 min,最后室温下干燥组织碎片。(2)0.5% Tween-20 脱蜡:取 2 片 10 μm 切片组织,加入 500 μl 0.5% Tween-20,70 °C 水浴 15 min,15 000 r/min 离心 15 min,去除上面蜡块,弃上清,重复 2 次,室温下干燥组织碎片。

1.3.2 消化及纯化步骤 消化组织碎片按文献 [3] 方法,具体如下:向上述 2 种方法获得的干燥组织碎片中,加入裂解缓冲液 850 μl (100 mmol/L Tris-Hcl,400 mmol/L NaCl,20 mmol/L EDTA,0.5% Tween-20,pH 8.0),10% SDS 100 μl,蛋白酶 K 终浓度达 1 mg/ml,56 °C 水浴 72 h,水浴期间,每隔 2 h 轻柔混匀 1 次,蛋白酶 K 每隔 24 h 分次等量加入。向裂解液加入等体积酚:氯仿:异醇(25:24:1),温和振荡,10 000 r/min 离心 10 min,取上层水相重复该过程抽提 1 次,轻取上层水相。加入 2 倍体积冰乙醇和 1/5 体积醋酸胺(10 mol/L),冰浴 30 min,15 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 75% 冰乙醇漂洗沉淀,15 000 r/min 离心 2 min,彻底去上清。沉淀于空气中自然部分干燥。加入 20 μl TE 液溶解。贮于 4 °C。

1.3.3 DNA 定量计算及大小分布 通过上述 2 种方法提取的 DNA 分别用 SMARTSPEC 3000 分光光度计检测其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值鉴定纯度及浓度。提取的 DNA 各取 4 μl 用 1.5% 琼脂糖凝胶(EB 染色)电泳观察提取 DNA 的大小分布。

1.3.4 PCR 检测 用于扩增 mtDNA D-LOOP 区基因的引物:F15574 5'-CGC CTA CAC AAT TCT CCG ATC-3',R16084 5'-CGG TTG TTG ATG GGT GAG TC-3',扩增片段长度约为 511 bp。扩增 PCR 反应体系为 25 μl,按 PCR 扩增试剂盒操作说明书使用,PCR Master Mix 12.5 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl,模板 1 μl,ddH₂O 9.5 μl。循环条件为 95 °C 5 min,94 °C 45 s,53 °C 45 s,72 °C 45 s,从第二步开始 36 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物各取 4 μl 用 1.5% 琼脂糖凝胶(EB 染色)电泳分离。

1.3.5 PCR 产物测序 将 511 bp 的 PCR 扩增产物片段送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.4 统计学方法 采用配对 *t* 检验和配对 χ^2 检验。

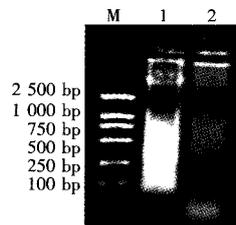
2 结果

2.1 DNA 定量计算及大小分布 用紫外分光光度

仪检测 2 种方法获得的 DNA 样品,0.5% Tween-20 法获取 DNA 的纯度及浓度均高于二甲苯/乙醇法 ($P < 0.01$) (见表 1)。凝胶电泳观察显示,0.5% Tween-20 法获取的 DNA 条带明显比二甲苯/乙醇法明亮,且获得的 DNA 样品分布范围也较宽,可达到 200 ~ 1 000 bp (见图 1)。

表 1 二甲苯/乙醇法和 0.5% Tween-20 法获取 DNA 质量的比较 ($n = 27; \bar{x} \pm s$)

检测方法	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA (μg/ml)
二甲苯/乙醇法	1.63 ± 0.09	0.14 ± 0.08
0.5% Tween-20 法	1.68 ± 0.13	0.51 ± 0.06
$\bar{d} \pm s_d$	0.05 ± 0.05	0.37 ± 0.10
<i>t</i>	5.20	19.23
<i>P</i>	<0.01	<0.01



M: Marker; 1: 0.5% Tween-20 法; 2: 二甲苯/乙醇法

图 1 石蜡包埋淋巴瘤组织提取的 mtDNA 琼脂糖凝胶结果

2.2 PCR 检测 二甲苯/乙醇法脱蜡获取 DNA 片段较小,27 例标本中仅有 3 例通过 PCR 扩增出 511 bp 目的片段,PCR 扩增成功率为 11.1%,扩增条带也较为微弱。0.5% Tween-20 法脱蜡的 27 例标本中有 11 例扩增出目的片段,PCR 扩增成功率达 40.7%,明显高于二甲苯/乙醇法 ($P < 0.01$),条带也明显比第一种方法明亮 (见表 2 和图 2)。

表 2 二甲苯/乙醇法和 0.5% Tween-20 法 PCR 扩增结果的比较 (n)

二甲苯/乙醇法 PCR 扩增	0.5% Tween-20 法 PCR 扩增		合计	χ^2	<i>P</i>
	成功	不成功			
成功	3	0	3	6.13	<0.05
不成功	8	16	24		
合计	11	16	27		

2.3 PCR 产物测序 测序后的序列经核苷酸序列同源性分析 (BLAST),并与 Cambridge 标准 mtDNA 对比确系人 mtDNA 序列 (见图 3)。

3 讨论

线粒体是人体细胞独特而重要的细胞器,是迄今发现的人类细胞核外唯一具有自身基因组,且能不依赖 nDNA 进行复制、转录和翻译的细胞器,其主



图2 石蜡包埋淋巴瘤组织提取的PCR产物琼脂糖凝胶结果

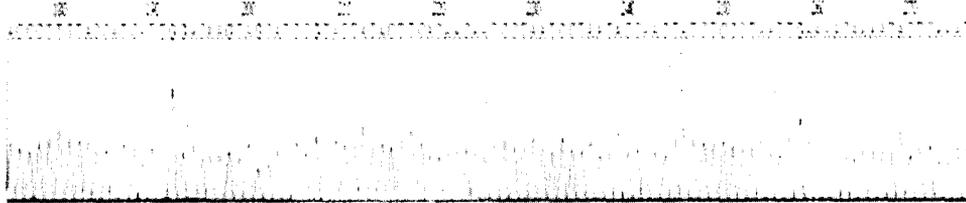


图3 PCR产物测序结果

要功能是在细胞内部进行生物氧化和能量转换,除此以外,线粒体还与反应性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生、启动细胞凋亡有关。mtDNA存在于线粒体的内膜上,编码参与氧化磷酸化和ATP生成所必需的多肽,呈双链闭环结构,全长16 569 bp,有轻链(L链)和重链(H链)之分,2条链均具有独立编码功能。与核基因组相比,mtDNA缺乏组蛋白保护,加之自身又缺乏有效的损伤修复系统,而且mtDNA又暴露于由氧化磷酸化过程产生高浓度的ROS中,故mtDNA的突变率比nDNA高10倍以上^[3],且与细胞凋亡和肿瘤形成都有密切的关系,因此对mtDNA的研究受到越来越多的关注。mtDNA的提取多见于从新鲜组织或血液中获取,而对于从石蜡包埋组织中获取并扩增mtDNA的相关报道较少。与一般的标本如新鲜组织或血液相比,石蜡包埋组织提取的DNA断片化和化学修饰严重,质量较差。不同的石蜡包埋组织标本因受固定剂的种类、作用时间等因素的影响使其DNA获取的质量和数量表现出一定的差异^[4]。本研究用石蜡包埋组织作为材料,首先在选用石蜡标本时,剔除了有自溶、退变或组织结构不清、大片出血等改变的蜡块,以免影响提取DNA的量;其次每个标本切成10 μm厚度的切片备用,分别使用2种方法对每个标本进行对比,且在提取DNA时选取切片的数量也相同,从而避免不同的标本及标本的数量对DNA提取质量的影响。大多数石蜡包埋组织提取DNA的技术包括脱蜡、消化和纯化3个步骤。脱蜡及纯化的过程是影响PCR成功的重要因素,离子型去垢剂Tween-20分子中含有较多的亲水基团,运用于脱蜡

过程,有利于组织的彻底脱蜡;去污剂Tween-20还可以裂解细胞,改变细胞膜表面的张力,有利于蛋白酶K对蛋白质的降解作用,使DNA完整地分离出来;此外,Tween-20还可以中和SDS对TaqDNA聚合酶的抑制作用有利于PCR的成功^[5]。本实验还通过参考改进消化的缓冲液成分及浓度以提高提取DNA的质量。高盐沉淀有利于DNA的提取,高浓度的SDS能促进细胞膜和线粒体膜的碎裂,蛋白酶K的反复加入,长时间裂解保证消化裂解充分,DNA能充分释放出来^[6]。高浓度EDTA能抑制细胞中DNA酶的活性,防止DNA的降解。

[参 考 文 献]

- [1] Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, *et al.* ROS-Generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis [J]. *Science*, 2008, 320(5876): 661 - 664.
- [2] Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer [J]. *PNAS*, 2005, 102(3): 719 - 724.
- [3] Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 44: 239 - 267.
- [4] Jacobs L, Gerards M, Chinnery P, *et al.* mtDNA point mutations are present at various levels of heteroplasmy in human oocytes [J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(3): 149 - 154.
- [5] Serth J, Kuczyk MA, Paeslack U, *et al.* Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4): 1189 - 1196.
- [6] Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, *et al.* A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification [J]. *PCR Methods Appl*, 1995, 4(6): 368 - 370.