

# 从石蜡包埋组织中获取高质量基因组DNA的方法改进

刘水平

(中南大学 生物科学与技术学院 分子生物学研究中心, 中国湖南 长沙 410078)

**摘要:** 从石蜡包埋组织中制备基因组 DNA(gDNA)难度大、获取样本量很少。传统方法为二甲苯脱蜡法。为了简化操作, 获得更高质量的 gDNA, 我们采用水浴法替代二甲苯进行脱蜡, 亲和层析纯化石蜡包埋肝细胞癌(HCC)组织标本中基因组 DNA, 以纯化 gDNA 为模板 PCR 扩增看家基因。结果显示改良水浴法提取的 gDNA 质量、数量均显著高于传统二甲苯脱蜡法, PCR 产物量也得到显著提高。与传统方法相比, 改良水浴法简单、快捷, 可以更有效的回收石蜡包埋组织中的 gDNA。

**关键词:** 石蜡包埋组织; 聚合酶链反应; gDNA 提取  
**中图分类号:** R737.31      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1007-7847(2009)04-0343-03

## An Improved Method of Extracting High Quality Genomic DNA from Paraffin-embedded Tissues

LIU Shui-ping

(Research Center of Molecular Biology, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

**Abstract:** It is hard to extract genomic DNA from paraffin-embedded tissues. The classical extraction method is combination of xylene dewaxing and DNA affinity column purification. But it is hard to extract enough DNA for detection using. In order to simplify the procedure and obtain high quality gDNA, we alternate water-bath to dewax, extract gDNA from hepatocellular carcinoma (HCC) embedded by paraffin, and amplify gene using HCC gDNA. Results showed that much more gDNA was obtained by the water-bath extraction, and the PCR products of water-bath way were significant more than the classical way. Therefore, water-bath is a more convenient way for extracting high quality gDNA from paraffin-embedded tissues.

**Key words:** paraffin-embedded tissues; PCR; genomic DNA extraction

(Life Science Research, 2009, 13(4) 343~345)

肿瘤发病机理的基因组学或表观遗传学研究对临床标本的数量、质量提出了很高的要求。由于在短期内难以获得大量的新鲜肿瘤组织标本, 故临床上收藏的石蜡包埋组织标本已成为宝贵的研究材料。但是, 从石蜡包埋组织中制备基因组 DNA 的难度大, 以往文献报道的制备方法可重复率低, 只能获取微量 DNA 样本, 无法满足对 DNA 质量和含量的需求<sup>[1]</sup>。据报道, 从石蜡包埋组织中提取 DNA 的方法, 一般主要包括脱蜡、消化和纯化等 3 个步骤<sup>[2,3]</sup>。石蜡组织 DNA 提取法过程中, 国内外研究者多采用二甲苯脱蜡方法, 但所得 DNA 量较少, 并易出现

DNA 链的降解 (小片段的 DNA)<sup>[4]</sup>。笔者拟建立一种从石蜡包埋组织中获取高质量基因组 DNA 的快速简便的方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

随机选取湘雅医院 2008 年手术切除的 10% Formalin 固定、石蜡包埋的 HCC 组织 10 例, 切取 10  $\mu\text{m}$  厚切片, 每 2~4 片放入一个 1.5 mL 的灭菌 Ep 管中。

#### 1.2 试剂

二甲苯、乙醇、蛋白酶 K(20 g/L), TES 溶液

收稿日期: 2009-03-16 修回日期: 2009-06-20

作者简介: 刘水平(1966-), 女, 湖南醴陵人, 实验师, 主要从事分子生物学研究, Tel: 0731-86119896, E-mail: lsp660315@tom.com.

(10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, 0.5% SDS)、TET 溶液 (100 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, 1% TritonX-100)、TE(1×)缓冲液、DNA 纯化试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); Taq 聚合酶、10×Buffer、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 均购自 TAKaRa 生物工程公司;  $\beta$ -actin 引物序列: 上 5'-TGA CGG TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA TGA-3'; 下 5'-TTG ATC TTC ATG GTG ATA GGA GCG AGG GCA-3', 由上海博亚生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.3 仪器

台式低温高速离心机 (Eppendorf 德国), 紫外分光光度计 (BECKMAN 美国), PCR 仪 (BIORAD 美国), 凝胶成像仪 (SYNGENE 英国), 电泳仪 (北京市六一仪器厂), 电热恒温水箱 (天津泰斯特仪器有限公司)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 经典的脱蜡-试剂盒法

组织切片 (10  $\mu$ m) 2~4 张, 装入 1.5 mL 的灭菌 Ep 管中; 加入 1 mL 二甲苯, 充分混匀 10 s, 全速离心 14 000 r/min 2 min, 弃上清, 加入 1 mL 无水乙醇, 充分混匀, 离心 14 000 r/min 2 min, 弃上清, 打开 Ep 管, 室温孵育 10 min 以上, 直到残余的乙醇全部挥发; 加入 180  $\mu$ L Buffer ATL 和 20  $\mu$ L Proteinase K, 充分混匀, 56  $^{\circ}$ C 水浴过夜; 次日 90  $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, 短暂离心 1.5 mL Ep 管, 迅速加入 200  $\mu$ L Buffer AL 和 200  $\mu$ L 无水乙醇, 充分混匀, 短暂离心; 小心转移全部消化物至 QIAamp 层析柱 (放在 2 mL 收集管) 中, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管。小心打开柱子, 加入 500  $\mu$ L Buffer AW1, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管, 小心打开柱子, 加入 500  $\mu$ L Buffer AW2, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管, 4  $^{\circ}$ C 全速离心 14 000 r/min 3 min, 使膜完全干燥; 将柱子放入 1 个 1.5 mL 干净的 Ep 管中, 弃去原先的收集管。小心打开柱子, 加入 50  $\mu$ L Buffer ATE, 室温下盖上盖子孵育 5 min, 4  $^{\circ}$ C 全速离心 14 000 r/min 1 min, 离心所得产物 -20  $^{\circ}$ C 冻存备用。

#### 1.4.2 改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法

组织切片 (10  $\mu$ m) 2~4 张, 装入 1.5 mL 的灭菌 Ep 管中; 加入 1 mL TES 溶液, 充分振荡, 65  $^{\circ}$ C

水浴 30 min, 再次充分振荡, 4  $^{\circ}$ C 离心 14 000 r/min 15 min, 弃上清再加 1 mL TES 溶液水浴溶蜡, 重复 3 遍; 在已脱蜡的组织切片管内加入 500  $\mu$ L TET 溶液, 加蛋白酶 K 15~45  $\mu$ L (根据 Ep 管中的组织量而定), 55  $^{\circ}$ C 水浴过夜; 次日短暂离心 1.5 mL Ep 管, 迅速加入 200  $\mu$ L Buffer AL 和 200  $\mu$ L 无水乙醇, 充分混匀, 短暂离心; 小心转移全部消化物至 QIAamp 层析柱 (放在 2 mL 收集管) 中, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管, 小心打开柱子, 加入 500  $\mu$ L Buffer AW1, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管, 小心打开柱子, 加入 500  $\mu$ L Buffer AW2, 盖上盖子, 4  $^{\circ}$ C 离心 8 000 r/min 3 min, 将柱子放入 1 个干净的收集管中, 弃去原先的收集管。4  $^{\circ}$ C 全速离心 8 000 r/min 3 min, 使膜完全干燥; 将柱子放入 1 个 1.5 mL 干净的 Ep 管中, 弃去原先的收集管, 小心打开柱子, 加入 50  $\mu$ L Buffer ATE, 室温下盖上盖子孵育 5 min, 4  $^{\circ}$ C 全速离心 14 000 r/min 3 min, 离心所得产物 -20  $^{\circ}$ C 冻存备用。

#### 1.4.3 gDNA 质量的鉴定

取 5  $\mu$ L DNA 加 1  $\mu$ L 的 loading buffer 混匀上样, Maker (Lambda DNA / Hind + EcoR Marker) 5  $\mu$ L, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 40 min, 在凝胶成像仪下观察所提取 DNA 基因组的质量。

#### 1.4.4 DNA 纯度鉴定

各取 2  $\mu$ L DNA 样品, 加水至 100  $\mu$ L 混匀后, 转入分光光度计的石英比色杯中, 先用 100  $\mu$ L 水校正零点, 于 260 nm 和 280 nm 分别读出吸光度 (OD) 值, 检测 DNA 的 OD 值。

#### 1.4.5 PCR 扩增

配制 PCR 的扩增反应体系 (1  $\mu$ L gDNA 模板, 5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer, 1  $\mu$ L 上游引物, 1  $\mu$ L 下游引物, 1  $\mu$ L 10 mmol/L dNTPs, 1  $\mu$ L Taq 酶 (5U/ $\mu$ L), 40  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O)。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 94  $^{\circ}$ C 30 s、56  $^{\circ}$ C 30 s 和 72  $^{\circ}$ C 30 s (共 30 个循环), 72  $^{\circ}$ C 5 min 延伸。

#### 1.4.6 PCR 扩增产物的鉴定

取 PCR 扩增产物 8  $\mu$ L 加 2  $\mu$ L 的 loading buffer 混匀及 Maker (100 bp DNA Ladder) 5  $\mu$ L 同时上样, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中 100 V 电泳

30 min, 凝胶成像仪下观察 PCR 扩增产物的片段大小。

## 2 结果

### 2.1 两种不同方法提取的基因组 DNA 质量比较

比较两种不同方法, 发现采用改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法所获取的基因组 DNA 质量要明显优于经典脱蜡-试剂盒法, 从图 1 可见采用改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法可获得量多, 且片段大的基因组 DNA, 经典脱蜡-试剂盒法提取的基因组 DNA 量少且多为小片段 DNA (DNA 降解)。

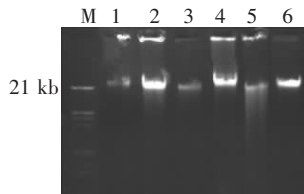


图 1 gDNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳的图谱

M: Marker ( $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*RI)

1, 3, 5 泳道为经典脱蜡-试剂盒法提取的 gDNA;

2, 4, 6 泳道为改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法提取的 gDNA。

### Fig.1 0.8% gel electrophoresis of gDNA

M: Marker ( $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*RI)

Lane 1, 3, 5: gDNA extracted by classical xylene dewaxing;

Lane 2, 4, 6: gDNA extracted by water-bath dewaxing.

### 2.2 两种不同方法提取的基因组 DNA 纯度检测

改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法提纯 DNA 的吸光度比值( $A_{260/280}$ )为  $1.88 \pm 0.15$ , 经典试剂盒法提纯 DNA 的吸光度比值( $A_{260/280}$ )为  $1.73 \pm 0.12$ , 前者明显高于后者( $P < 0.01$ )。

### 2.3 PCR 片段大小的鉴定

分别取经两种方法提取的基因组 DNA 做模板, 采用内参照引物对进行 PCR 扩增, 扩增片段为 260 bp, 经 1.5% 的琼脂糖电泳鉴定 (图 2), DNA 扩增条带基本都可见, 其中改良法的扩增结果更清晰明亮。

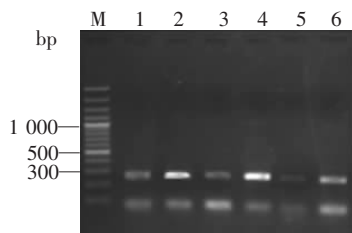


图 2 PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳的图谱

M: Marker(100 bp DNA Ladder);

1, 3, 5 泳道为经典脱蜡-试剂盒方法所得 PCR 产物;

2, 4, 6 泳道为改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒所得 PCR 产物。

### Fig.2 PCR products in 1.5% gel electrophoresis

M: Marker(100 bp DNA Ladder);

Lane 1, 3, 5: PCR products from xylene dewaxing gDNA;

Lane 2, 4, 6: PCR products from water-bath dewaxing gDNA.

## 3 讨论

本研究从实用的角度, 选择了两种方法 (经典脱蜡-试剂盒方法和改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法), 对石蜡组织提取的 DNA 质量进行了比较。由以上结果可以看出, 改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法可获得较完整的基因组 DNA, 经 DNA 琼脂糖电泳后可见 DNA 条带清晰, 亮度较强, 基本无降解和拖尾现象, 而经典脱蜡-试剂盒方法中的溶蜡试剂为二甲苯, 有拖尾现象, 基因组 DNA 已基本降解为小片段的 DNA, 说明对石蜡组织标本进行 TES 水浴脱蜡可获得浓度及纯度均较为满意的完整的基因组 DNA, 这是由于 TES 溶液中的 Tris 和 EDTA 均可起到保护 DNA 作用, 0.5% SDS 有较强的脱蜡作用, TET 溶液中的 TritonX-10 可通过其疏水的苯环与膜结合, 使细胞膜的理化性质改变, 导致破膜, 从而提高 DNA 获得率<sup>[5-7]</sup>。另外, 从采用两种方法提取的基因组 DNA 中选择一对看家基因引物进行 PCR 扩增, 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中 DNA 扩增条带基本都可见, 其中改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法获得的 DNA 扩增的目的片段较经典脱蜡-试剂盒方法的更清晰明亮。实验证明改良 TES 水浴脱蜡-试剂盒法提取的基因组 DNA 质量明显高于经典脱蜡-试剂盒方法, 更能满足科研和临床的需求。在本实验笔者还采用了 QIAamp 层析法(QIAamp DNA Stool Mini Kit) 进一步对方法进行优化, QIAamp 是一种硅胶, 它能选择性结合 DNA 而分离糖类和蛋白质, 消除 PCR 抑制物, 能使抽提的 DNA 纯度更高<sup>[8,9]</sup>。

### 参考文献(References):

- [1] 齐宗利, 韩西群, 黄宏宇, 等. 石蜡包埋淋巴组织三种微量 DNA 提取方法的比较[J]. 中国实验诊断学(Qi Zong-li, HAN Xi-qun, HUANG Hong-yu, *et al.* Comparison study of three DNA extraction methods from lymphoid paraffin-embedded tissues[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis), 2006, 10(4) 351-355.
- [2] SATO Y, SUGIE R, TSUCHIYA B, *et al.* Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues[J]. Diagn Mol Pathol, 2001, 10(4) 265.
- [3] BIELAWSKI K, ZACZED A, LISOWSKA U, *et al.* The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis[J]. Int J Mol Med, 2001, 8(5) 573.

(下转第 365 页)

- coupled receptors[J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12 : 961-969.
- [19] REEVES P J, KLEIN S J, GETMANOVA E V, *et al.* Expression and purification of rhodopsin and its mutants from stable mammalian cell lines : application to NMR studies[J]. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27 : 950-955.
- [20] BRIAN L C, KARIN E E, HYEYOUN C, *et al.* Study of a synthetic human olfactory receptor 17-4 : Expression and purification from an inducible mammalian cell line[J]. *PLoS One*, 2008, 3 (8) : e2920.1-9.
- [21] LUNDSTROM K. Semliki forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1610 : 90-96.
- [22] KAISER L, GRAVELAND B J, STEUERWALD D. Efficient cell-free production of olfactory receptors : Detergent optimization, structure, and ligand binding analyses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(41) : 15726-15731.
- [23] SPIRIN A S, BARANOV V I, RYABOVA L A, *et al.* A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield[J]. *Science*, 1988, 242 : 1162-1164.
- [24] MARULLO S, DELAVIER K C, GUILLET J G, *et al.* Expression of human  $\beta 1$  and  $\beta 2$  adrenergic receptors in *E. coli* as a new tool for ligand screening[J]. *Biotechnol*, 1989, 7 : 923-927.
- [25] REN H, YU D Y, GE B S, *et al.* High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(2) : e4509.
- [26] 刘娟, 朱建航, 范杰平. 去污剂聚合物双水相体系在膜蛋白分离中的应用[J]. *江西科学(LIU Juan, ZHU Jian-hang, FAN Jie-ping. Application of detergent/polymer aqueous two phase systems for purification of membrane protein[J]. Jiangxi Science)*, 2008, 26(3) : 416-420.
- [27] EVERBERG H, GUSTAVSSON N, TJERNELD F. *Methods in Molecular Biology[M]*. New York : Humana Press, 2008. 2 : 403-412.
- [28] SEDDON A M, CURNOW P, BOOTH P J. Membrane proteins lipids and detergents : not just a soap opera[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1666 : 105-117.
- [29] MIRZABEKOV T, BANNERT N, FARZAN M, *et al.* Enhanced expression native purification and characterization of CCR5 a principal HIV-1 coreceptor[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 28745-28750.
- [30] BABCOCK G J, MIRZABEKOV T, WOJTIWICZ W, *et al.* Ligand binding characteristics of CXCR4 incorporated into paramagnetic proteoliposomes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 : 38433-38440.
- [31] TUCKER J, GRISSHAMMER R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*[J]. *J Biochem*, 1996, 317 : 891-899.
- [32] SARRAMEGNA V, MILON M A, TALMONT F. Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation : a challenge towards structure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63 : 1149-1164.
- [33] LIITTI S, MATIKAINEN M T, SCHEININ M, *et al.* Immunoaffinity purification and reconstitution of human alpha (2)-adrenergic receptor subtype C2 into phospholipids vesicles[J]. *Protein Expr Purif*, 2001, 22 : 1-10.
- [34] ZHAO X J, NAGAI Y, REEVES P J, *et al.* Design short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (47) : 17707-17712.
- [35] WALIAN P, CROSS T, JAP B. Structural genomics of membrane proteins[J]. *Genome Biology*, 2004, 7(5) : 431-439.
- [36] ROSENBAUM D M, CHEREZOV V, HANSON M A, *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta 2$ -adrenergic receptor function[J]. *Science*, 2007, 318 : 1266-1273.
- [37] RASMUSSEN S F, CHOI H J, ROSENBAUM D M, *et al.* Crystal structure of the human  $\beta 2$  adrenergic G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2007, 450 : 383-387.
- [38] CHEREZOV V, ROSENBAUM D M, HANSON M A, *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta 2$ -adrenergic G protein-coupled receptor[J]. *Science*, 2007, 318 : 1258-1265.
- [39] MURAKAMI M, KOUYAMA T. Crystal structure of squid rhodopsin[J]. *Nature*, 2008, 453 : 363-368.
- [40] WARNEL T, SERRANO M J, BAKER J G, *et al.* Structure of a  $\beta 1$ -adrenergic G-protein coupled receptor[J]. *Nature*, 2008, 454 : 486-492.
- [41] JAAKOLA V P, GRIFFITH M T, HANSON M A, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist[J]. *Science*, 2008, 322 (5905) : 1211-1217.

(上接第 345 页)

- [4] 屠其华, 郭晓君, 张行, 等. 改良的石蜡包埋组织中提取高质量基因组 DNA[J]. *中国实验诊断学(TU Qi-hua, GUO Xiao-jun, ZHANG Xing, et al. Improved method of high quality genomic DNA extraction from paraffin-embedded tissues[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis)*, 2006, 10(9) : 1001-1003.
- [5] MOERKERK P T, KESSELS H J, TEN KATE J, *et al.* Southern and dot blot analysis of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from colonic carcinomas[J]. *Vichows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990, 58(5) : 351.
- [6] 刘德莉. 一种石蜡包埋组织 DNA 提取方法[J]. *上海医学检验杂志(LIU De-li. A DNA extraction method from paraffin-embedded tissues[J]. Shanghai Journal of Medical Laboratory Science)*, 2000, 15(2) : 128.
- [7] 贾怡, 周斌, 吕梅励, 等. TritonX-10 快速提取甲醛固定、石蜡包埋组织内 DNA 的方法[J]. *刑事技术(JIA Yi, ZHOU Bin, LÜ Mei-li, et al. A rapid method of DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues by using Triton X-100[J]. Forensic Science and Technology)*, 2003, 6 : 6-8.
- [8] COLLINS E, GLENNON M, HANLEY S, *et al.* Evaluation of a PCR/DNA probe colorimetric membrane assay for identification of *Campylobacter* spp. in human stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 : 4163-4165.
- [9] 王松梅, 郝志勇, 马景臣, 等. PCR 检测与细菌培养方法在细菌性痢疾监测中的应用比较[J]. *复旦学报(医学版)(WANG Song-mei, HAO Zhi-yong, MA Jing-chen, et al. Underestimated incidence rate of shigellosis : comparison of PCR and coproculture methods in a surveillance study[J]. Journal of Fudan University(Medical Sciences))*, 2006, 33 : 766-769.