

运用 Identifiler 试剂盒对硅珠法提取石蜡包埋组织 DNA 质量的评估

林 旭¹, 王建文¹, 尹雅莎², 谢素梅¹, 冀 强^{1*}

(¹南京医科大学法医学系, ²数学计算机教研室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:运用硅珠法从石蜡包埋的组织中提出 DNA, Identifiler 试剂盒评估 DNA 质量。方法:南京医科大学第一附属医院病理科 2009~2011 年石蜡包块 49 例,运用硅珠法提取石蜡包埋组织 DNA,通过紫外分光光度计测定 DNA 纯度和 Identifiler 试剂盒 PCR 后 3130 型毛细管电泳仪分析提取 DNA 片段的完整性。结果:经紫外分光光度计测定胃癌组织 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 均值为 1.84 ± 0.02 , 肺癌组织为 1.85 ± 0.02 , 甲状腺癌组织为 1.82 ± 0.02 , 3 组间比较 $P > 0.05$, 因此硅珠法提取石蜡包埋组织 DNA 不会因组织差异而影响提取效果; Identifiler 试剂盒 PCR 后毛细管电泳显示其提取效果, 46 例(93%) 得出完整的 16 个基因座 STR 峰型。结论:硅珠法可应用于多种组织的 DNA 提取, 并保证提取 DNA 样品的纯度和完整性。

[关键词] 石蜡包埋组织; 硅珠法; Identifiler 试剂盒; DNA

[中图分类号] R361.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-577-05

Using Identifiler Kit evaluates silica extracting DNA from paraffin-embedded tissue

LIN Xu¹, WANG Jian-wen¹, YIN Ya-sha², XIE Su-mei¹, JI Qiang^{1*}

(¹Department of Forensic Medicine, ²Department of Mathematics and Computer Science, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To extract DNA from paraffin-embedded tissue by silica-extraction. **Methods:** The DNA samples were obtained via silica-extraction method from 49 cases of paraffin-embedded tumor tissues from Department of Pathology in the First Affiliated Hospital of NJMU. The 16 STR gene loci of PCR-DNA fragments were identified with Identifiler Kit. The purity of DNA extracted was analyzed by ultraviolet spectrophotometer. **Results:** The mean $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ of DNA extracted from gastric carcinoma was 1.84 ± 0.02 , from pulmonary carcinoma is 1.85 ± 0.02 , from thyroid carcinoma was 1.82 ± 0.02 . There was no significant difference in $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ among three carcinoma type groups ($P > 0.05$). The 46/49 cases (93%) showed the full peaks of all the 16 STR gene loci of PCR-DNA fragment. **Conclusion:** Silica-extraction may be used to various kinds of paraffin-embedded tissues and extract DNA with high purity and high integrity.

[Key words] paraffin-embedded tissue; silica-extraction; Identifiler Kit; DNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 577-581]

有研究认为能从包埋 30 年的蜡块中提取出 DNA^[1]。医院及法医的病理实验室有大量福尔马林固定后石蜡包埋的组织,这对于回顾性研究尤其肿瘤的发生发展机制探讨有很好的应用价值;而且法医临床工作遇到的医疗纠纷案例中,鉴定人怀疑医疗错误时常要求对送检的病理蜡块组织是否为本人进行再次鉴定,因此在实际工作与科学研究中,从石蜡包埋组织中提取 DNA 逐渐受到重视。但文献也报道 10%福尔马林固定的组织固定时间超过 1

周,蛋白与 DNA 的交联作用就会使核酸破坏^[2],固定剂类型、固定持续的时间、蜡块的保存时间、PCR 的 DNA 分子量大小^[3]及固定液的 pH 值改变会使核酸中嘌呤基的 β 糖苷键容易发生水解而使 DNA 断裂破坏^[4];由于 DNA 会因固定时间延长而降解^[5],因此提取大分子量及高质量的 DNA 会有一些的技术困难。本实验欲从获取高纯度的 DNA 方面进行研究,提取后的 DNA 经 PCR 后就可获得大量所需目的基因。

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 江苏省教育厅科学基金资助(05KJD310140)

*通讯作者, E-mail: jiqiang1821@163.com

二甲苯(上海实意化学试剂有限公司),蛋白酶 K(Merck 公司,德国),十二烷基磺酸钠(SDS,上海实意化学试剂有限公司),二硫苏糖醇(DTT,Merck 公司,德国),乙二胺四乙酸二钠(EDTA,南京国药集团),Tris-Base(BIOSHARP 公司,美国),二氧化硅(SiO_2 ,Sigma-Alicrich 公司,美国),硫氰酸胍(Promega 公司,美国),Triton X-100(南京国药集团),Tris-饱和平衡酚(中国医科学院生物工程研究所),氯仿(江苏永华精细化学品有限公司),异戊醇(上海凌峰化学试剂有限公司),紫外分光光度计(Amersham-Biosciences GeneQuant, 美国),Identifiler Kit [16 个短串联重复序列(STR)等位基因位点]、DNA 标准样本 9947A (阳性对照)(Applied Biosystems 公司,美国),PCR 仪(Eppendorf 公司,德国),3130 型毛细管电泳仪、DataCollectingV3.0、GeneMapperIDV3.2 (AB 公司,美国),所需试剂均用去离子水配置。

2009~2011 年南京医科大学第一附属医院病理科石蜡包埋的组织共 49 例,分别为胃癌 17 例、肺癌 16 例、甲状腺癌 16 例。

1.2 方法

1.2.1 样品准备

每块石蜡切取 10 μm 厚切片,每 4 片放入 1 个 EP 管,加入 1 ml 二甲苯去除石蜡,56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,12 000 r/min 离心 3 min,弃上清,重复 2 次,再顺序加入 95%、75%、25% 的乙醇梯度水化以去除二甲苯,室温挥干乙醇后加入 200 μl 的 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0),10 μl 的蛋白酶 K(20 mg/ml),10 μl 的 1 mol/L DTT,10 μl 的 10% SDS,10 μl 的 0.5 mol/L EDTA,涡旋混匀后 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,间隙涡旋震荡数次,数小时后再加入 5 μl 的蛋白酶 K(20 mg/ml),涡旋混匀后 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

1.2.2 DNA 提取

硅珠法提取: SiO_2 悬液:0.06 g SiO_2 加入 1 ml 去离子水涡旋混匀,硫氰酸胍吸附液:12 g 硫氰酸胍溶于 10 ml 0.1 mol/L Tris-HCl(pH6.4),加入 0.8 ml 0.5 mol/L EDTA,0.5 ml Triton X-100 涡旋混匀^[6]。消化后的组织,涡旋震荡 5 s,加入 3 倍体积的硫氰酸胍吸附液,涡旋震荡 5 s,加入 1/5 体积 SiO_2 。涡旋震荡 5 s 后室温静置 30 min,期间间隙震荡 2 次。30 min 后涡旋混匀 5 s,12 000 r/min 30 s,弃上清后 70% 冰乙醇洗,12 000 r/min 20 s 弃上清,重复 1 次,弃上清后室温挥干乙醇,加 80 μl 1 mol/L TE,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,12 000 r/min 3 min,上清含有 DNA 备用。

有机法^[6]提取:消化后的组织,涡旋震荡数秒后,

加入等体积的 Tris-饱和平衡酚,涡旋震荡后,12 000 r/min 15 min,吸取上清加入到等体积的 Tris-饱和平衡酚/氯仿(1:1),涡旋震荡数秒后,12 000 r/min 15 min,吸取上清加入到等体积氯仿/异戊醇(24:1),涡旋震荡数秒后 12 000 r/min 15 min,吸取上清加入到 2.5 倍体积的冰无水乙醇和 10 μl 的 3 mol/L 的无水醋酸钠,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min,12 000 r/min 15 min 弃上清,沉淀 DNA 中加入 70% 乙醇漂洗,12 000 r/min 3 min,弃上清重复 1 次,弃上清后室温挥干乙醇,加入 80 μl 1 mol/L TE 溶解 DNA 备用。

1.2.3 紫外分光光度计对 DNA 提取的纯度检测和定量

取 5 μl 粗提产物加入 90 μl 1 mol/L TE,混匀后加到比色杯中,紫外分光光度计测定 $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 的光密度值(OD),计算 DNA 浓度。

1.2.4 提取 DNA 样品的 PCR 扩增及毛细管电泳分析

取 1 μl 粗提产物加入 10 μl 的 Identifiler Kit 体系进行 PCR。10 μl PCR 体系配置:Identifiler PCR Reaction Mix 4 μl ,Gold Taq Polymerase (5 U/ μl) 0.2 μl ,Identifiler Primer Set 2 μl ,DNA 提取物 1 μl ,加入去离子水至总体积 10 μl 。扩增程序为:①95 $^{\circ}\text{C}$ 11 min;②94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 28 个循环;③60 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;④4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 产物 1 μl 进行 3130 毛细管电泳,最后运用 DataCollectingV3.0 收集数据,GeneMapperIDV3.2 软件分析数据结果,其阳性对照为 DNA 标准样本 9947A,阴性对照为 Identifiler Kit 试剂。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,胃癌、肺癌、甲状腺癌 3 组比较采用单因素方差分析,硅珠法与有机法比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫外分光光度计测定的 OD 值及 DNA 浓度

分别对硅珠法和有机法提取的胃癌、肺癌、甲状腺癌组织 DNA 的 OD 均值进行比较,结果显示两种方法所提取 DNA 的 OD 值在 3 组间差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

硅珠法与有机法提取样本总体均值间比较差异有统计学意义,有机法提取 DNA 的 OD 值高于硅珠法(1.93 \pm 0.04 vs 1.84 \pm 0.09, $P < 0.05$)。

硅珠法与有机法提取胃癌、肺癌、甲状腺癌 3 种

组织 DNA 浓度比较, 有机法提取 DNA 浓度均大于硅珠法, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

表 1 硅珠法、有机法各自提取 3 种组织 OD 值比较

Table 1 Compared the OD vaules of DNA extracted among gastric, pulmonary and thyroid carcinoma by silica-extraction and phenol-chloroform-extraction methods ($\bar{x} \pm s$)

	胃癌($n = 17$)	肺癌($n = 16$)	甲状腺癌($n = 16$)	P
硅珠法	1.84 ± 0.02	1.85 ± 0.02	1.82 ± 0.02	> 0.05
有机法	1.92 ± 0.02	1.93 ± 0.01	1.92 ± 0.01	> 0.05

表 2 硅珠法提取 3 种组织 DNA 浓度分别与有机法提取同种组织 DNA 浓度的比较

Table 2 Compared the DNA concentration of gastric, pulmonary and thyroid carcinoma between Silica-extraction and phenol-chloroform-extraction methods ($\text{ng}/\mu\text{l}, \bar{x} \pm s$)

	($\text{ng}/\mu\text{l}, \bar{x} \pm s$)		P
	硅珠法	有机法	
胃癌($n = 17$)	1.77 ± 0.10	12.24 ± 1.62	< 0.05
肺癌($n = 16$)	2.06 ± 0.23	11.56 ± 1.58	< 0.05
甲状腺癌($n = 16$)	1.44 ± 0.08	4.08 ± 0.44	< 0.05

2.2 Identifiler 试剂盒 PCR 后 3130 毛细管电泳 GeneMapperIDV3.2 分析结果

Identifiler 试剂盒含有 16 个等位基因位点, 每个基因位点上纯合子显示 1 个峰, 杂合子显示 2 个峰。16 个位点全部显示为电泳完整, 无锯齿峰。硅珠法分别提取 3 种组织 DNA 电泳结果见图 1~3, 有机法见图 4。

3 讨 论

本研究结果显示, 硅珠法提取肺癌、胃癌及甲状腺癌 3 组之间 OD 值无统计学差异, 提取的 DNA 纯度不因组织差异而变化, 效果相同; 有机法亦是如此。硅珠法与有机法提取相同 49 例组织的 DNA 纯度存在差异, 有机法提取的 DNA 纯度高于硅珠法; 但是硅珠法与有机法 OD 数值均符合 DNA 标准纯度范围 1.8~2.0, 因此纯度方面, 两者对 PCR 的影响都较小。按浓度比较, 有机法获得的 DNA 质量高于硅珠法。3130 毛细管电泳分析结果显示, 硅珠法 46 例 (93.878%) 组织 16 个 STR 基因位点全部出峰, 只是其峰高并不是很均匀, 大分子片段的峰高偏矮, 余下 3 例标本组织 16 个 STR 位点并未完全电泳出, 丢失位点肺癌 0922671 样本为 D7S820、CSF1PO; 0911787 样本为 CSF1PO; 甲状腺癌 092271 样本为 CSF1PO; D7S820 和 CSF1PO 分子量在 256~

345 bp, 均为大分子片段(图 3)。未电泳出位点的原因可能是癌组织也有实质与间质细胞, 若癌组织的间质细胞过多, 所获得的核酸含量就会很低, 再加上提取过程中丢失、剪切力破坏等因素使大分子 DNA 片段 PCR 失败, 导致 3130 毛细管电泳图谱未泳出。本研究结果也显示在失败的图谱中丢失的峰基本为大分子量片段; 另一种原因可能是蜡块常温储存、年限长, 其 DNA 会有一定程度的降解或破坏, 从而不能电泳出峰型, 有研究表明蜡块在 -80°C 情况下储存 10 周提取的 DNA 并没有明显差异^[7]; 此外, 肿瘤对于此试剂盒 STR 位点的影响尚不清楚, 峰型的不均及片段的丢失是否与肿瘤有关目前还不清楚, 可能也会存在一定影响。有机法提取相同 49 例组织的 DNA 经毛细管电泳分析, 只有 6 例得到 16 个 STR 完整峰型, 其余样本 DNA 呈锯齿状峰型, 断成多个小片段如图 4, 这正是硅珠法优于有机法之处。有机法提取 DNA 丢失位点因素除上述硅珠法提到的外, 最重要的是有机法提取步骤多且剧烈震动, 大分子 DNA 片段易被破坏, 导致电泳失败。

以前提取组织中 DNA 多采用经典有机法提取, 研究表明^[7]经典有机法提取 DNA 后经紫外分光光度计测定 OD 值提示, 此种方法提出的 DNA 纯度较高, $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 基本在 1.8 左右, 本实验为 1.93 ± 0.04 , 但有机法提取的试剂有毒性^[8], 对人具有一定的危害; 且步骤繁多, 频繁更换离心管耗时长且增加了 DNA 丢失和破坏几率, 不利于实践操作, 本实验也发现大部分有机法提取的 DNA 没有完整峰型, 所以虽然该法所提取 DNA 浓度高于硅珠法, 但是并不能获取电泳结果, 不具使用价值。研究也表明 DNA 会因温湿度、光、器官组织性质不同发生降解^[9]。实验证明硅珠法尤其对于微量检材、腐败检材等高难度检材的提取效果得到肯定^[10-13], 但运用硅珠法提取石蜡包块组织 DNA 的文献报道并不多。经 10% 福尔马林固定后组织的蛋白与 DNA 交联作用是不可避免的, 而本实验切片脱蜡后经蛋白酶 K 消化, 以 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 作为缓冲液, 此缓冲液的 pH 值及成分满足 DNA 存在环境, 且不存在金属离子的干扰作用, 不激活 DNA 酶从而保护了 DNA; 蛋白酶 K 的作用是使膜蛋白及与 DNA 结合的蛋白质降解, 使 DNA 充分游离, 在蛋白酶 K 消化蛋白同时可最大程度地减少与蛋白交联的 DNA 耗损; DTT 的用途之一是作为巯基化 DNA 的还原剂和去保护剂, 在消化 DNA 的溶

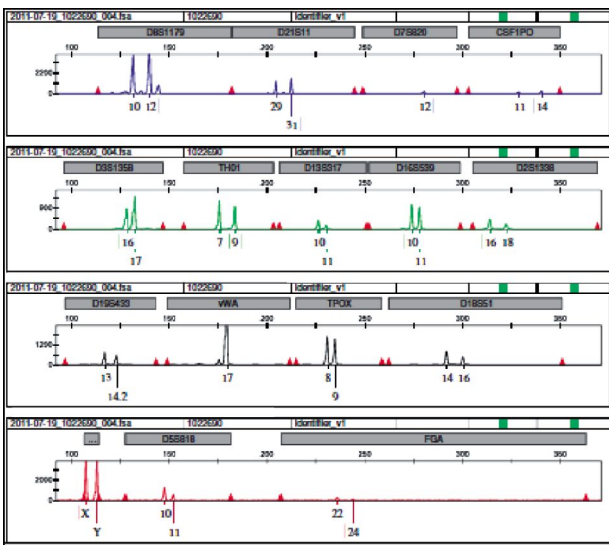


图 1 肺癌组织 STR 分型

Figure 1 STR of pulmonary carcinoma

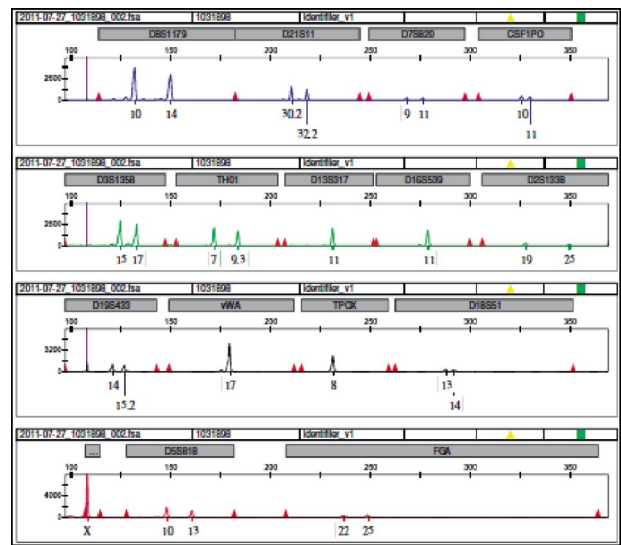


图 2 胃癌组织 STR 分型

Figure 2 STR of gastric carcinoma

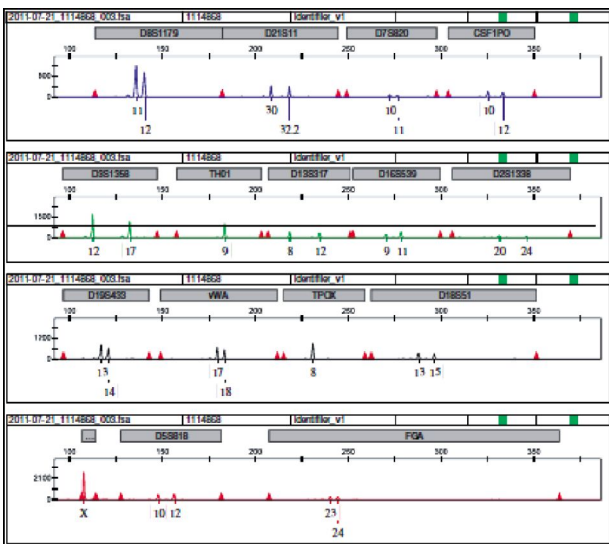


图 3 甲状腺癌组织 STR 分型

Figure 3 STR of thyroid carcinoma

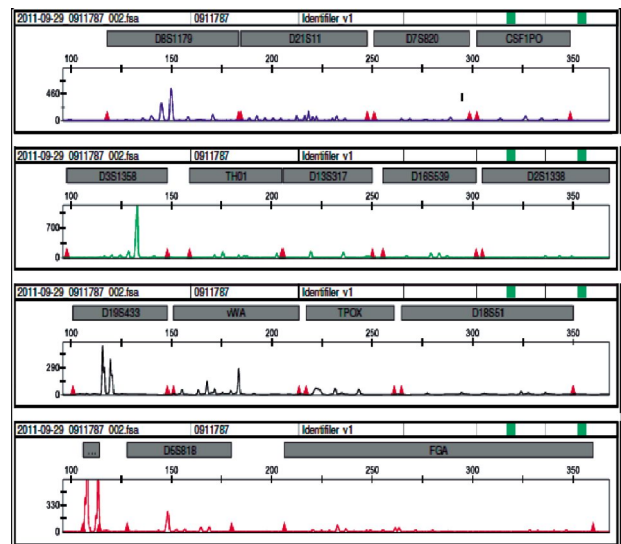


图 4 有机法提取 STR 分型

Figure 4 STR of phenol-chloroform extraction

液中加入DTT,可以降低DNA的二聚化;SDS是去垢剂,DNA提取过程中使蛋白质变性后与DNA分开;EDTA可螯合Ca²⁺、Mg²⁺,有助于细胞间的分散,并将蛋白从DNA分子上拉开,这时EDTA能与DNA酶密切接触而抑制其活性^[14],从而增加DNA的产量。提取过程中,硅珠法提取的步骤少,不需移动离心管因此减少样本之间的污染及DNA破坏;且高浓度的硫氰酸胍也是一种蛋白变性剂,进一步减少了交联蛋白的影响;在高浓度硫氰酸胍条件下,SiO₂强效特异地吸附DNA保证了DNA的高纯度,以致PCR后毛细管电泳得出完整峰型。Identifiler Kit试剂盒为美国AB公司2001年推出的法医物证的5色荧光试剂盒,包含16个STR等位基

因位点[含CODIS(Combined DNA Index System)的13个核心基因座],联合扩增无关个体的平均随机匹配率大于万亿分之一,其可检测分子量为100~360 bp的DNA片段^[15]。值得注意的问题是本实验Identifiler试剂盒选用的16个等位基因STR位点,经大量实验证实为染色体位置上相距较远,确保无连锁,低突变率的位点^[15],但对于法医个体识别案例中,有的肿瘤疾病会导致STR位点的峰型异常^[16],位点丢失或突变,因此必须获得此个体的正常组织作为对照才有可靠的结果。本实验运用AB公司的3130型号毛细管电泳仪,其灌胶、分离、检测的步骤完全自动化,每道毛细管长36 cm,每次电泳4道,约40 min完成4道样本的检测,96孔板可

在无人看管情况下电泳,减少了人为因素的影响,其最大的优势为 DNA 样本不会被全部消耗,可在需要时再次使用。

综上所述,蜡块条件保存完善,如冷冻保存可减少温度等人为因素导致 DNA 的破坏,硅珠法以其高效吸附 DNA、获取高纯度 DNA 优点可用于石蜡包埋组织提取 DNA 的相关研究。

[参考文献]

- [1] Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, et al. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM [J]. BMC Cancer, 2009, 9:453-464
- [2] 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
- [3] 王丹妹,莫燕娜,吉丽敏,等. 浅谈从石蜡包埋组织中提取 DNA 的方法及体会 [J]. 卫生职业教育, 2008, 3: 119-120
- [4] Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR [J]. Clin Pathol, 2004, 57(6):654-656
- [5] Ferruelo A, Assar ME, Lorente JA, et al. Transcriptional profiling and genotyping of degraded nucleic acids from autopsy tissue samples after prolonged formalin fixation times[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4(2):156-161
- [6] 郑秀芬. 法医 DNA 分析[M]. 北京:中国人民公安大学出版社, 2002:43-47
- [7] Cao W, Hashibe M, Rao JY. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells [J]. Cancer Detection and Prevention, 2003, 27 (5):397-404
- [8] CRiveroa ER, Nevesb AC, Silva-Valenzuela MG, et al. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues [J]. Pathology Research and Practice, 2006, 202(7):523-529
- [9] Bender K, Farfán MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions [J]. Forensic Sci Int, 2004, 139(2-3):135-140
- [10] Davoren J, Vanek D, Konjhodzić R, et al. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves [J]. Croat Med J, 2007, 48(4):478-485
- [11] 姚建,贾东涛,张玉红,等. 检材量对硅珠法提取脱落细胞 DNA 的影响 [J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(5): 333-334
- [12] 王林生, 苏勇, 林岗. 硅珠法提取 PCR 模板 DNA [J]. 中国法医学杂志, 2000, 15(1):36-37
- [13] 杨百全, 李晨旭, 付伟东, 等. 硅珠法在纯化污染检材中的应用[J]. 刑事技术, 2003, 5:10-12
- [14] 张晓萍, 刘辉, 袁健, 等. 两种石蜡包埋组织 DNA 提取方法的比较[J]. 兰州大学学报(医学版), 2009, 35 (1):35-37
- [15] Butler JM. 法医 DNA 分型, STR 遗传标记的生物学, 法学及遗传学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2007:64
- [16] Liu Y, Li L, Li C, et al. Allelic alterations of STRs in archival paraffin embedded tissue as DNA source for paternity testing [J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2009, 2:12-13

[收稿日期] 2011-11-29