

石蜡包埋组织提取DNA不同条件下的PCR扩增*

马丽丽, 艾力江·吐尔逊, 张 莉

PCR amplification of the DNA extracted from paraffin-embedded tissues in different conditions

Ma Li-li, Ailijiang·Tuerxun, Zhang Li

Abstract

BACKGROUND: Because of the damage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue to DNA in the process of its production and preservation, it is difficult to extract high quality and sufficient DNA for PCR.

OBJECTIVE: To analyze the influencing factors of the DNA extracted from paraffin-embedded tissue for PCR.

METHODS: Genomic DNA was extracted from paraffin-embedded esophageal carcinoma tissue sections of 10.0 $\mu\text{m}\times 2$, 10.0 $\mu\text{m}\times 4$ and 10.0 $\mu\text{m}\times 5$. Template DNA amount of 0.05, 0.1, 0.2 μg was used to amplify gene β -actin, respectively. PCR cycle times were set as 35, 40 and 45. The influencing factors of PCR were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: The analysis of agarose gel electrophoresis showed that when paraffin-embedded esophageal carcinoma tissue section amount was 10.0 $\mu\text{m}\times 2$, the PCR cycle times were 40; when the template DNA amount was 0.05 μg , the obtained target DNA was of the highest quality. It shows that reducing the amount of paraffin-embedded tissue and DNA template can be help to require high quality PCR strips; PCR cycle times should be more than 40 and less than 45, and if it increases beyond this range there is meaningless.

Ma LL, Ailijiang·Tuerxun, Zhang L. PCR amplification of the DNA extracted from paraffin-embedded tissues in different conditions. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(11): 1973-1976. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 在甲醛固定石蜡包埋组织的制作及保存过程中会对 DNA 造成损害, 提取的 DNA 在用于 PCR 扩增时部分结果并不理想。

目的: 比较分析石蜡包埋组织中提取 DNA 应用于 PCR 反应的影响因素。

方法: 从 10.0 $\mu\text{m}\times 2$ 、10.0 $\mu\text{m}\times 4$ 和 10.0 $\mu\text{m}\times 5$ 石蜡包埋食管癌组织切片中提取 DNA, 以 0.05, 0.1, 0.2 μg 模板 DNA 量扩增内参基因 β -actin, PCR 反应循环次数分别为 35, 40, 45 次, 分析影响 PCR 反应的因素。

结果与结论: 琼脂糖凝胶电泳结果显示以 10.0 $\mu\text{m}\times 2$ 组织切片量, PCR 反应循环次数 40 次, PCR 反应模板 DNA 量 0.05 μg 扩增取得的目的基因 DNA 的质量最高。说明减少石蜡包埋组织用量和减少模板 DNA 量有助于获得高质量的 PCR 反应条带, 且 PCR 反应循环次数应大于 40 次, 小于 45 次, 再增加循环次数, 则意义不大。

关键词: 石蜡包埋组织; 提取 DNA; PCR 反应; 循环次数; 模板 DNA

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.11.017

马丽丽, 艾力江·吐尔逊, 张莉. 石蜡包埋组织提取 DNA 不同条件下的 PCR 扩增[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 1973-1976. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

病理科保存的甲醛固定石蜡包埋组织是组织工程实验研究材料的可靠来源。目前, 国内外已有不少文献报道从石蜡包埋组织中成功取出DNA分子, 进行分子病理学研究^[1-3], 但所提取的DNA在用于PCR扩增时, 部分结果并不理想, 为了获得满意的PCR扩增效果, 实验进一步研究了影响PCR反应的因素, 探索获得满意的PCR扩增效果的条件。

1 材料和方法

设计: 分子生物学实验。

时间及地点: 于2011-11在新疆医科大学第一附属医院分子生物研究室完成。

材料:

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
蛋白酶 K	Merck 公司
Tris 碱、乙二酸四乙酸、十二烷基硫酸钠、二甲苯、乙醇、氯仿、异戊醇、醋酸钠	北京天根生化公司
QIA quick Gel Extraction Kit DNA 纯化试剂盒	德国 QIA-GEN 公司
PCR 仪	Biometra 公司
XMTD-6000 型水浴箱	北京博医康实验仪器有限公司
台式低温离心机	BECKMEN 公司
电泳仪、紫外分光光度计、紫外凝胶成像系统	BIORAD 公司

标本来源: 选用新疆医科大学第一附属医院病理科保存的2年前手术切除的食管癌组织(患

Cancer Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Ma Li-li★, Studying for master's degree, Cancer Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China 1215147959@qq.com

Corresponding author: Zhang Li, Doctoral supervisor, Professor, Chief physician, Cancer Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China Zhangli9514@126.com

Received: 2012-01-05
Accepted: 2012-02-02

新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

马丽丽★, 女, 1984年生, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 回族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事食管癌的个体化治疗研究。1215147959@qq.com

通讯作者: 张莉, 博士生导师, 教授, 主任医师, 新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011 zhangli9514@126.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2012)11-01973-04

收稿日期:2012-01-05
修回日期:2012-02-02
(20111126013 / WLM·T)

者术前未接受过放、化疗)。组织块全部为癌组织,质地均一,经体积分数10%中性甲醛固定12 h后石蜡包埋,室温存档至今。标本保存完整,常规切片,进行苏木精-伊红染色,镜下观察未见组织自溶、坏死、大片出血等现象,见图1。

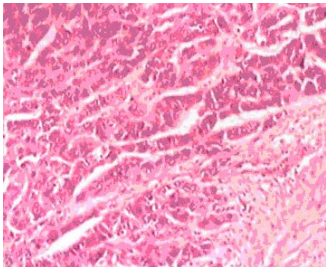


Figure 1 Pathology images of low differentiated squamous cell carcinoma of the esophagus (Hematoxylin-eosin staining, x40)
图1 食管低分化鳞癌病理图片(苏木精-伊红染色, x40)

将石蜡包埋组织块切10 μm厚切片,分装于1.5 mL离心管中,每管2~5片不等。

方法:

设定条件:提取DNA所用石蜡包埋组织用量分为10.0 μm×2、10.0 μm×4和10.0 μm×5; PCR反应使用模板DNA量分别为0.05, 0.1, 0.2 μg。PCR反应循环次数分别设定为35, 40, 45次。根据设定条件不同排列组合出27种不同条件。DNA提取采用Yuan等^[4]所述改良TES水域脱蜡-试剂盒提纯DNA法。

PCR扩增:引物β-actin序列:上游5'-TGA CGG TCA GGT CATCAC TAT CGG CAA TGA-3'; 下游5'-TTG ATC TTC ATG GTG ATA GGA GCG AGG GCA-3', 由上海博亚生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系为25 μL, 其中模板DNA分别为0.05, 0.1, 0.2 μg、10×PCR Buffer 5 μL, 1 μL上游引物, 1 μL下游引物, 1 μL 10 mmol/L dNTPs, 1 μL Taq酶(5 U/μL)。反应条件: 95 °C预变性5 min以后,扩增温度94 °C 30 s、62 °C 60 s、72 °C 60 s循环,循环次数分别为35, 40, 45次,最后72 °C延伸7 min。

PCR扩增目的基因DNA的检测:取10 μL PCR产物进行2.0%琼脂糖凝胶电泳。与Marker比较,切取目的基因DNA条带处琼脂糖凝胶,以QIAGEN纯化试剂盒提取琼脂糖凝胶中的DNA片段,分光光度计检测纯化后的DNA含量。

主要观察指标:不同条件下扩增的目的基因DNA的质量。

统计学分析:所有实验取重复3次,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同条件所得的DNA含量值应用SPSS 16.0进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同条件下目的基因DNA纯化后DNA含量 见表1。

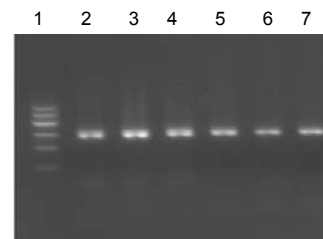
表1 不同条件下目的基因含量比较
Table 1 The comparison of target DNA contents in different conditions ($\bar{x}\pm s$, mg/L)

Condition	35 cycles	40 cycles	45 cycles
10.0 μm×2			
A	9.85±18.04	48.33±1.17 ^a	42.37±1.02 ^a
B	9.87±12.04	38.42±21.25 ^a	35.06±27.95 ^a
C	11.02±0.67	45.37±2.93 ^b	39.10±0.90 ^a
10.0 μm×4			
A	8.75±24.70	45.78±5.19 ^b	40.43±4.51 ^b
B	9.12±0.61	38.07±1.11	32.90±1.76 ^a
C	14.83±1.23	29.20±1.06	29.97±0.93
10.0 μm×5			
A	7.29±17.50	9.56±17.37	14.52±20.07
B	6.45±18.09	5.33±14.54	0.69±4.81
C	-	-	-

“-”: Without amplification strip; Template content 0.05 (A), 0.1 (B), 0.2 μg (C). ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. 35 cycles

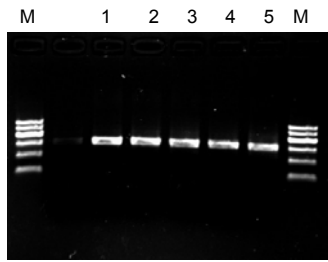
由表1可见,随着提取DNA所用石蜡包埋组织用量的增加,获得目的基因含量反之依次减少。甚至当组织用量为10.0 μm×5,模板0.2 μg时,3种循环次数均未出现扩增条带。所用石蜡包埋组织用量为10.0 μm×2时,PCR反应循环次数40次,PCR反应模板DNA量0.05 μg扩增取得的目的基因DNA的质量最高。

2.2 PCR扩增结果 在27种不同排列条件组合下所得DNA经PCR琼脂糖凝胶电泳分析显示,35次DNA扩增的条带较40次和45次组差。其他条件相同时40与45次组比较无明显差异,但是随着石蜡包埋组织用量和模板DNA用量增加,扩增的条带亮度反而呈下降趋势,见图2~5。



1: Marker; 2, 3: 40 cycles; 4, 5: 45 cycles; 6, 7: 35 cycles

Figure 2 Electrophoresis pattern of PCR product at paraffin-embedded tissue of 10.0 μm×2, template DNA amount of 0.05 μg
图2 石蜡包埋组织 10.0 μm×2, 模板 0.05 μg 时的 PCR 扩增产物电泳图



M: Marker; 1, 2: 40 cycles; 3-5: 45 cycles

Figure 3 Electrophoresis pattern of PCR product at paraffin-embedded tissue of $10.0 \mu\text{m} \times 2$, template DNA amount of $0.1 \mu\text{g}$

图3 石蜡包埋组织 $10.0 \mu\text{m} \times 2$, 模板 $0.1 \mu\text{g}$ 时的 PCR 扩增产物电泳图

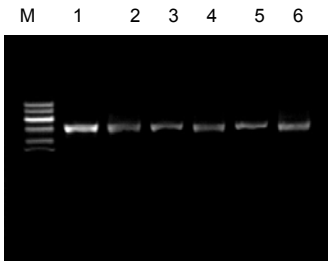
M: Marker; 1: $0.1 \mu\text{g}$, 40 cycles; 2: $0.05 \mu\text{g}$, 40 cycles; 3: $0.2 \mu\text{g}$, 40 cycles; 4: $0.2 \mu\text{g}$, 45 cycles; 5: $0.2 \mu\text{g}$, 35 cycles

Figure 4 Electrophoresis pattern of PCR product at paraffin-embedded tissue of $10.0 \mu\text{m} \times 4$

图4 石蜡包埋组织 $10.0 \mu\text{m} \times 4$ 时的 PCR 扩增产物电泳图

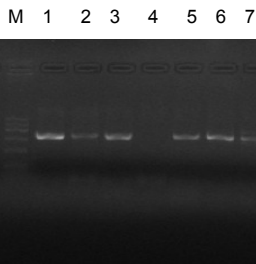
M: Marker; 1: $0.05 \mu\text{g}$, 40 cycles; 2: $0.05 \mu\text{g}$, 35 cycles; 3: $0.05 \mu\text{g}$, 45 cycles; 4: $0.2 \mu\text{g}$, 35 cycles; 5: $0.1 \mu\text{g}$, 35 cycles; 6: $0.1 \mu\text{g}$, 40 cycles; 7: $0.1 \mu\text{g}$, 45 cycles

Figure 5 Electrophoresis pattern of PCR product at paraffin-embedded tissue of $10.0 \mu\text{m} \times 5$

图5 石蜡包埋组织 $10.0 \mu\text{m} \times 5$ 时的 PCR 扩增产物电泳图

和4种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖DNA聚合酶的酶促反应^[7]。在实验中影响PCR的因素很多,如标本或核酸纯化过程中出现扩增反应抑制物、扩增仪孔间温度的差异以及核酸提取中的随机误差。实验中经常出现两种情况:一种是没有找到最佳扩增条件(如模板DNA量,引物浓度及退火温度)导致产生大量非特异性产物;另一种情况是没有扩增出任何产物。PCR反应体系和反应条件的设置,均影响PCR扩增的结果。因此,若想获得较为良好的PCR扩增效果,要采取相应的质量保证措施^[8-10]。实验分别从石蜡包埋组织用量、模板DNA含量、及PCR反应循环次数3个方面,利用正交设计组合出27种不同条件进行PCR反应,以纯化后的目的基因含量和蛋白电泳条带的明暗度作对比,找出最优方案。

实验结果发现, $10.0 \mu\text{m} \times 2$ 组织切片量, PCR反应循环次数40次, PCR反应模板DNA量 $0.05 \mu\text{g}$ 扩增取得的目的基因DNA的质量最高。此条件下,经DNA琼脂糖电泳后可见距加样孔下方处的DNA条带清晰,亮度较强,基本无降解和拖尾现象。当组织用量为 $10.0 \mu\text{m} \times 5$,模板 $0.2 \mu\text{g}$ 时,3种循环次数均未出现扩增条带。分析可能有以下两点原因:①甲醛具有较高的反应活性,可以和带有-OH、-SH、-NH₂基团的分子发生亲核加成反应,最终作为亚甲基(-CH₂-)的提供者,与上述基团中的两个基团反应,使自由的分子链被交联起来,从而发挥对组织固定的作用,同时也对DNA分子产生不利的影响^[11]。②石蜡可阻碍消化液对组织的渗透,从而抑制蛋白酶K与组织内蛋白的接触,影响组织消化和DNA释放。在DNA提取过程中,如未能有效去除石蜡,形成的DNA-石蜡混合液,不利于PCR扩增。

实验通过摸索PCR反应条件,最终确定从石蜡组织中提取DNA应用于PCR反应时实验室最优条件是:减少石蜡包埋组织用量和减少模板DNA量,且反应循环次数40次最佳,再增加次数则意义不大。结果与Zhao等^[12]的结果相似,不同之处在于,该文纯化后的DNA进行基因测序来确定PCR的特异性,然而实验则将纯化后的DNA含量及PCR扩增反应条带明暗度2个方面进行综合分析比较,得出以上结果。如今,对于石蜡包埋组织中客观存在的PCR扩增抑制因子的研究并不明朗,大片的PCR扩增的成功率不是很高^[13]。因此,合理调整制定PCR扩增反应条件,还有待进一步加大样本量深入研究。

3 讨论

从甲醛固定-石蜡包埋组织中提取DNA的方法已有多篇文献报道^[5-6],目前可以从石蜡包埋组织中提取出高质量的DNA,但是这些高质量的DNA进行PCR反应后,结果却差强人意。PCR是在模板DNA、设计引物、MIX

4 参考文献

- [1] Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, et al. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 2006;202(7):523-529.
- [2] Gai BD, Fang XD, Jin ZT, et al. Jilin Duxue Xuebao: Yixue Ban. 2003;29(1):115-118. 盖宝东,房学东,金仲田,等.提高石蜡包埋组织中提取DNA质量的实验研究[J].吉林大学学报:医学版,2003,29(1):115-118.

[3] Gillio-TosA, DeMarcoL, FianoV, et al. Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology*. 2007;39(3):345-348.

[4] Yuan YT, Jiang YX, Yin XW, et al. Comparison of four methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(24):4430-4434.

[5] Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol*. 1997;12:595-601.

[6] Li DC, Wang ZY, Liu TH, et al. Jichu Yixue yu Linchuang. 1993; 13(1):72-73.
李德春,王志永,刘彤华,等.石蜡包埋组织DNA的提取[J].基础医学与临床,1993,13(1):72-73.

[7] Lu SD. Beijing: Zhongguo Xiehe Yike Daxue Chubanshe. 2004. 卢圣栋.现代分子生物学实验技术[M].2版.北京:中国协和医科大学出版社,2004.

[8] Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:337-348.

[9] Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing--where do we stand? *J Clin Virol*. 2002;25 Suppl3:S13-21.

[10] Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a preventand destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:289-299.

[11] Tan ZY, Ding M. DNA Extraction from Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissues. *Journal of Forensic Medicine*. 2006;22(6): 455-458.

[12] Zhao JS, Gai BD, TaKahiro M, et al. Factors that influence PCR of the DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *Chin J Lab*. 2003;11(7):330-331.

[13] 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. *Diagn Mol Pathol*. 2001;10(4):256-271.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 张莉进行实验设计, 实验实施为马丽丽, 实验评估为艾力江·吐尔逊, 资料收集为马丽丽, 马丽丽成文, 张莉审核, 张莉对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会的批准。

本文创新性: 为了获得较为满意的 PCR 扩增效果, 实验进一步研究了影响 PCR 反应的影响因素。分别从提取 DNA 所用石蜡包埋组织用量、PCR 反应使用模板 DNA 量及 PCR 反应循环次数, 根据设定条件不同排列组合出 27 种不同条件, 经改进后得到良好效果, 目前, 这类研究较少。

SCI 收录的 Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy (《矫形与运动疗法杂志》)介绍

<p>英文刊名: Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy</p> <p>中文刊名: 《矫形与运动疗法杂志》</p> <p>ISSN: 0190-6011</p> <p>影响因子: 2.482</p> <p>出版周期: 月刊</p> <p>出版数据: 76 篇</p> <p>创刊年份: 1979 年</p> <p>出版单位(或出版地): JOSPT</p> <p>期刊网址: http://www.jospt.org/aboutus/</p> <p>主编: Guy G. Simoneau, PT, PhD, ATC</p> <p>投稿平台: guy.simoneau@marquette.edu</p> <p>收录数据库:</p> <p>Science Citation Index</p> <p>Science Citation Index Expanded</p> <p>Current Contents - Clinical Medicine</p> <p>发稿范围: Research Report; Literature Review; Case Report; Resident's Case Problem; Clinical Commentary; Musculoskeletal Imaging; Technical Note; Letter to the Editor-in-Chief; Invited Commentary.</p> <p>栏目: 研究原著, 文献综述, 病例报告等。</p>	<p>英文简介:</p> <p>The mission of the <i>Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy</i> is to publish an exemplary, scholarly, peer-reviewed journal for physical therapists and others in the healthcare and research communities to advance musculoskeletal and sports-related best practice. Now in its 31st year, the Journal strives to be the premier international source of clinical, basic, and translational science to optimize musculoskeletal and sports-related rehabilitation, health, and wellness.</p> <p>The monthly JOSPT is the official journal of its publishers, the Orthopaedic Section and the Sports Physical Therapy Section of the American Physical Therapy Association (APTA). Through the print and electronic Journal, the publishers seek to offer high-quality research, immediately applicable clinical material, and useful supplemental information in a variety of formats.</p> <p>中文简介:</p> <p>《矫形与运动疗法杂志》是一本同行评议的学术性专业期刊, 发表基础、临床及转化医学方面与骨骼及运动相关的康复和健康的文章。</p>
--	--