

利用 TLS 提取染色体 DNA

沈 岩 刘 毅 罗 格 王申五 张 平* 李希儒 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

本文报告利用三乙醇胺月桂基硫酸盐代替蛋白酶提取组织、细胞及外周血 DNN。方法简便、快速、经济。DNA 产率、纯度、分子量等标准均不低于蛋白酶水解法,可以满足基因分析的要求。

基因分析的方法已日益深入到生物、医学研究的各个领域。从不同组织、细胞或外周血中制备高分子 DNA 是进行分子水平研究的先决条件。DNA 以核蛋白形式存在于细胞核中,制备 DNA 的原则是既要使蛋白质、脂类、多糖及小分子杂质分离干净,又要得到高分子量 DNA。近年来采用蛋白酶水解的方法使这一问题得到较好解决^[1]。本文报告利用一种新型蛋白质溶解剂——三乙醇胺月桂基硫酸盐(TLS)^[2]直接作用于细胞或组织匀浆。该化合物可迅速溶解细胞膜、核膜,将 DNA 从核蛋白中分离出来。不经蛋白酶水解即可直接提取 DNA。本法不受蛋白酶反应条件的限制,操作更加简便、快速、经济。所提 DNA 质量可满足基因分析的要求, DNA 产率高。适用于微量外周血、培养细胞及活检组织 DNA 的提取。此方法在国内外尚未见报道。

材 料 与 方 法

本实验所用血液样品取自临床血液学检查剩余的抗凝全血。4℃保存,一周内使用。常规方法进行白细胞计数。体外培养的成纤维细胞经胰酶适度消化后,将细胞打散,离心收集细胞,生理盐水洗净,计数。绒毛组织取自人工流产胎儿的新鲜绒毛组织。TLS 系我们自行合成,用蒸馏水溶解,加三乙醇胺调至 pH8.0。TLS 终浓度为 1%。

1. TLS 溶解细胞

取生理盐水悬浮的白细胞(9000 白细胞/ mm^3) 40 μl 7 份。依次加入蒸馏水 40 μl , 1% TLS 40 μl , 20 μl , 10 μl , 5 μl , 2 μl , 0.5 μl 。混匀后在倒置显微镜下连续观察。

2. 微量血与培养细胞 DNA 提取

取 10—50 μl 全血或 $1-5 \times 10^5$ 成纤维细胞(悬浮于 100 μl 生理盐水),放在 1.5ml 塑料离心管中,加等体积 1% TLS 混匀。5—10 分钟后加等体积饱和酚抽提。离心,取上清液加等体积氯仿抽提。最后用 100 μl 乙醚提一次。离心去上层的乙醚。敞开管口,37℃水浴 30 分钟,赶净乙醚。

3. 常量血及培养细胞 DNA 的提取

取 0.5ml—5ml 抗凝全血或 10^6-10^8 培养细胞 ($1-5 \times 10^7$ 细胞/ml),加 1/10 体积 1% TLS 混匀。0℃,30 分钟。加等体积饱和酚抽提 2 次,氯仿抽提 2 次。上清液加 3 倍体积 95% 冷乙醇,冰浴 5—10 分钟,可见丝状纤维样沉淀。用玻璃棒捞出,70% 乙醇洗涤沉淀。真空抽干去乙醇。沉淀溶于 TE(10mmol/L Tris·Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 缓冲液。

4. 微量绒毛组织 DNA 提取

取新鲜绒毛组织湿重 10—30mg,在 1.5ml 塑料离心管中用玻璃棒研碎。加生理盐水 100

* 北京医科大学血液病研究所。

μl, 1% TLS 100μl, 0℃, 1 小时。以下操作同方法 3。

5. DNA 限制酶水解, 凝胶电泳及凝胶原位杂交技术 见文献[3]。

结果与讨论

1. TLS 对细胞的溶解作用

白细胞经 TLS 充分作用后细胞形态消失(图 1), 细胞悬液变粘稠, 可拉出丝。而同样时间内对照组细胞形态则未见明显改变。表 1 为不同浓度 TLS 对白细胞溶解时间的影响。

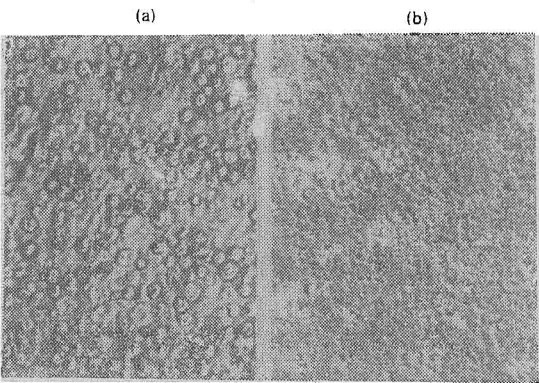


图 1 TLS 对白细胞的溶解作用
(a) 未经 TLS 处理的白细胞 (b) 0.05% TLS 处理 7 分钟后的白细胞

表 1 TLS 对白细胞的溶解作用

编号	细胞悬液(μl)	1% TLS (μl)	TLS 终浓度 (%)	细胞完全溶解时间
1	40	—(40μlH ₂ O)	0	(细胞膨大, 但不破碎)
2	40	40	0.5	4 分钟 30 秒
3	40	20	0.3	6 分钟
4	40	10	0.2	6 分钟
5	40	5	0.1	6 分钟
6	40	2	0.05	15 分钟
7	40	0.5	0.01	15 分钟时 60% 细胞破碎

从表 1 中可以看出 0.5% TLS 可使白细胞在 5 分钟内完全溶解。当 TLS 浓度在 0.05% 以上时白细胞可在 15 分钟内完全溶解。而当浓度降为 0.01% 时, TLS 对白细胞的破坏作用不显著。因此我们在提取微量组织, 细胞及血 DNA 时选用 0.5% TLS, 作用 5 分钟—1 小时。在提取常量血细胞及组织 DNA 时选用

0.1% TLS 作用 30 分钟至 1 小时。TLS 是一种作用较强的表面活性剂。与 TLS 结合的蛋白质即失去对核酸的结合。再经酚、氯仿等提取, 即可将核酸分离出来。

2. TLS 法提取 DNA 的得率与其质量

TLS 法提取 DNA 的产率一般可达 600 μg DNA/10⁸ 细胞。每 10mg 绒毛组织(湿重)可获得 8—15 μg DNA (表 2)。从 10μl 全血中提取到的 DNA 多于 0.1 μg (图 2)。

表 2 TLS 法提取 DNA 的产率

编号	材 料	DNA 产量 (μg)	产 率
1	1.5ml 全血 (5000 白细胞/mm ³)	44	586μg/10 ⁸ 白细胞
2	5ml 全血 (5300 白细胞/mm ³)	149	562μg/10 ⁸ 白细胞
3	5ml 全血 (6200 白细胞/mm ³)	196	634μg/10 ⁸ 白细胞
4	6×10 ⁵ 成纤维细胞	4	660μg/10 ⁸ 成纤维细胞
5	1.2×10 ⁶ 成纤维细胞	7	583μg/10 ⁸ 成纤维细胞
6	10mg 绒毛组织	9	9μg/10mg 绒毛组织
7	20mg 绒毛组织	16	8μg/10mg 绒毛组织
8	30mg 绒毛组织	47	15μg/10mg 绒毛组织



图 2 TLS 法制备的 DNA 凝胶电泳图谱
1. 10μl 全血经 TLS 法制备的人基因组 DNA;
2. 0.1μg 人基因组 DNA (蛋白酶水解法制备)

用 TLS 法制备的 DNA 其紫外吸收光谱呈标准的 DNA 吸收光谱曲线(图 3)。在 260 nm 波长处呈一吸收高峰。用此法制备的 DNA

A_{260}/A_{280} 比值在 1.7—2.0 之间,平均高于 1.8。表明基本上无蛋白质污染。从图 2 还可以看出 TLS 法制备的 DNA 与蛋白酶水解法制备的 DNA 分子量基本相当。本工作通过控制沉淀条件去除 RNA,结果尚满意。对于微量样品一般不采用沉淀手段,针对下一步研究的要求考虑是否去除 RNA 及去除方法。

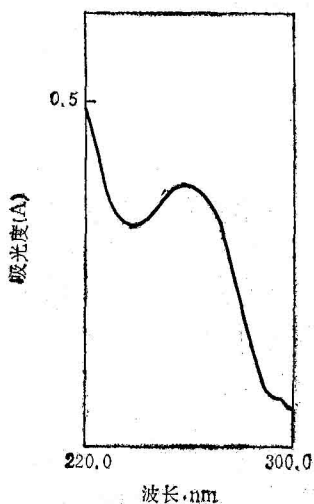


图 3 TLS 法制备 DNA 的吸收光谱曲线

图 4 显示 TLS 法制备的 DNA 经限制酶水解后的凝胶电泳图谱和凝胶原位杂交结果。从电泳结果上看, TLS 法制备的 DNA 可被限制酶完全降解。杂交结果也得到 DNA 被完全降解时才能产生的特异区带。上述结果表明经酚、氯仿、乙醇或乙醚处理后样品中已不再含有 TLS,不会影响下一步的酶促反应。

用蛋白酶水解法制备 DNA 一般要 1—2 天时间。由于 TLS 与蛋白质作用速度快,一般 2—3 小时内即可完成全部制备过程。 TLS

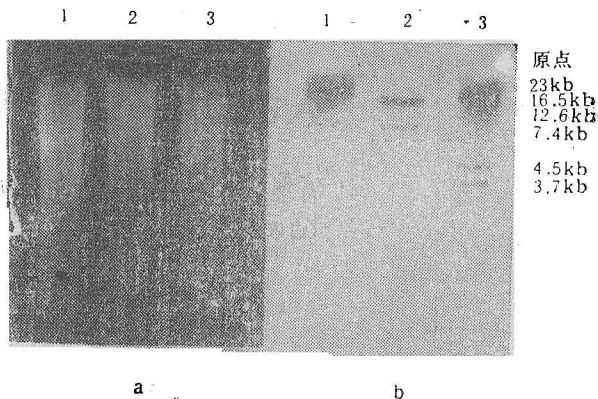


图 4 TLS 法制备的 DNA 限制酶图谱 (a) 及凝胶原位杂交放射自显影结果 (b)

1. EcoRI 水解; 2. Egl II 水解; 3. Hind III 水解经 α - ^{32}P 标记的人 α -珠蛋白基因探针杂交

法所需设施、试剂亦较蛋白酶水解法简单和经济。该法广泛适用于从外周血、组织、培养细胞、羊水细胞等组织、细胞中提取 DNA。尤其适用于直接从微量血,细胞及活检组织中提取 DNA。对于基因筛查、产前基因诊断,法医物证的基因分析及实验动物医学等研究有实际应用价值。并有可能推广到病毒、微生物基因的提取。在医学生物学研究领域中有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 王德宝等:《核酶——结构与功能与合成》(下册)。科学出版社,北京,1987,387。
- [2] 罗 格等:《中国医学科学院学报》1987,9(6),401。
- [3] 沈 岩等:《中国医学科学院学报》1987,9(6),402。

[本文于 1988 年 4 月 15 日收到]

(上接第 217 页)

- [6] Chernajovsky. Y. et al.: *DNA*, 1984, 3(4), 279.
- [7] 肖成祖等:《中华微生物和免疫学杂志》,1985,5(3), P20—23。
- [8] 侯云德主编:《病毒基因工程的原理与方法》,人民卫

生出版社,1985,151—158。

- [9] Graham. F. L. et al.: *Virology*, 1973, 52, 456.

[本文于 1988 年 1 月 4 日收到]