

经验交流

一种从少量细胞中高效制备 DNA 的简易方法*

朱元晓 陈 勇 刘 琛 白 炎

(军事医学科学院基础所,北京)

关键词 DNA, 高效提取, 蛋白酶, 低熔点胶

随着分子生物学技术对医学领域的渗透,利用 DNA 杂交技术进行基因诊断和研究,已逐渐进入临床各个学科。但常规提取细胞 DNA 的方法,不仅费力耗时,而且 DNA 在有机溶剂提取、透析和乙醇沉淀时丢失较多,因此不适合于临床大批标本制备 DNA 和标本量小的病例。本研究参照并改进 Waldmann 等人的方法^[1],建立了从少量细胞中提取 DNA 的方法。经与常规方法比较以及在 Southern 杂交中的效果观察,证明这是简单易行,制备效率高的方法。

材料与方法

1. 试剂 三羟甲基氨基甲烷 Tris 分析纯;十二烷基肌酸钠 Sarcosyl (Sigma); 蛋白酶 K; RNaseA; BSA (Sigma); 低熔点琼脂糖 (Bio-lab); 缓冲液 A(2×):100mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L EDTA, pH8.0, 1% Sarcosyl; STE: 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0, 100mmol/L NaCl; TE: 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0。

2. 细胞制备 先将细胞用生理盐水洗 2 至 3 次,再将细胞按 5×10^4 — 5×10^7 /管分装于 1.5ml 的离心管中。2500g 离心 5 分钟,尽量吸干细胞表面上清。将细胞置冰浴中继续提取 DNA 或贮于 -20°C 备用。本实验采用的细胞为白血病细胞株 Bri-8 和 HPB-A11。为了检测 DNA 的回收率,HPB-A11 细胞与 [甲基- ^3H]-TDR 共同孵育,使 DNA 被同位素标记。

3. 细胞 DNA 制备 (1) 微量细胞提取 DNA (微量法): 在装有微量细胞的离心管中,加含 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 蛋白酶 K 的 STE $5\mu\text{l}$, 在震荡器上震荡使细胞充分悬浮,加 $5\mu\text{l}$ 缓冲液 A(2×),震荡 3s, 4000g 离心 5s,置 50°C 水浴 2 小时,其间可离心一次,使蒸发水流至管底。加 $10\mu\text{l}$ 含 2% 低熔点琼脂糖胶的 TE,置 65°C 水浴 5min。用手指弹动管底使胶与 DNA 混匀,4000g 离心 5s。冰浴 10min 使胶凝固,缓缓加入 1ml 预冷的 TE,置 4°C 。于 1、3、5、7h 后各更换 TE1 次,8h 后

将 TE 倒出,离心,尽量吸干胶面残留 TE。此时 DNA 制备完毕,总体积为 $20\mu\text{l}$,可立即使用或于 -20°C 贮存。(2) 两种方法制备 DNA 的回收率检测: 常规组为 14 份 5×10^6 HPB-A11 细胞按常规方法提取的 DNA^[2],每份取出相当于 5×10^4 细胞提出的 DNA。微量法组为 9 份 5×10^5 HPB-A11 细胞按微量法提取的 DNA。对照组细胞直接用缓冲液 A 溶细胞膜,使 DNA 逸出,共 9 份,每份细胞数为 5×10^5 。将各组标本加至 49 号滤纸上,用 3% 三氯醋酸抽滤洗膜 3 次,无水乙醇固定。用液闪的方法测定各组每份标本的 β 计数率,求出 DNA 回收率。

4. 细胞 DNA 酶解及 Southern 印迹杂交 将微量法提取的 DNA 置 65°C 水浴 5min 使胶熔化,再置 37°C 5 分钟,依次加入 H_2O 、5 倍或 10 倍酶解缓冲液(含 BSA, 终浓度为 0.1%)、 $1\mu\text{l}$ RNase A($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$),使总体积为 $40\mu\text{l}$ 。 37°C 15 分钟,加限制性内切酶(20—30 U/ μl) $3\mu\text{l}$, 37°C 18 小时。 65°C 5 分钟,加溴酚蓝指示剂,点样电泳。分子量标记中加同等浓度的低熔点胶和 BSA。电泳、Southern 转移、预杂交和杂交均按 Ford 等人的方法^[3]。本实验所用探针为人 T 细胞抗原受体 β 链基因片段,含该片段的重组质粒由英国 Mike Owen 博士提供。探针用随机引物合成法标记^[4],同位素供体为 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$,探针平均比活大于 $3 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g DNA}$ 。

结果与讨论

1. DNA 的完整性和酶切效果

微量法制备的细胞 DNA 在电泳图上位于 λDNA 之后,无拖带现象。表明 DNA 分子量在 50kb 以上。用限制性内切酶消化时,每条 DNA 降解带头平、均匀,表明酶切完全适度(图略)。

2. 两种制备 DNA 方法的比较

* 本研究为国家自然科学基金资助项目

常规法提取 DNA 损失多,且由于染色体 DNA 粘稠,操作较困难。此外,需用大量 TE 透析,除去 DNA 中影响酶切的有机溶剂,所以耗时较长。微量法克服上述缺点,使提取过程简单快速(表 1)。

表 1 两种制备真核细胞 DNA 方法的比较

	细胞数	DNA 回收率 (%)	需时 (天)	操作
常规法	$5 \times 10^6 - 5 \times 10^8$	57.87 ± 16.9 ($n=14$)	3-7 *	复杂
微量法	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	88.46 ± 14.2 ($n=9$)	1-2	简单

3.微量法制备的 DNA 用于 T β 基因构型检测的效果观察

T β 基因是编码 T 细胞抗原受体 β 链的单拷贝基因,在 T 细胞分化过程中,可由胚系构型转变为重排构型。在非 T 细胞中,该基因通常为胚系构型。本研究检测了 B 细胞株 Bri-8 细胞中的 T β 基因构型,结果显示在 BamHI、EcoRI、Hind III 消化时出现的杂交

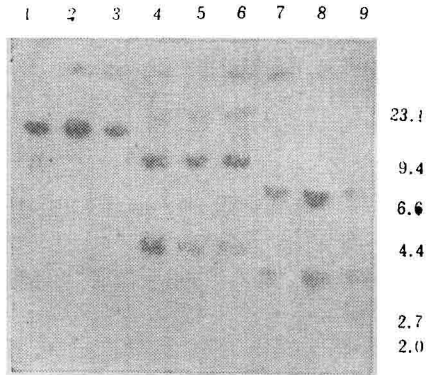


图 1 三种酶切条件下 Bri-8 细胞 DNA 与 T β 探针的杂交图

1-3 为 Bam HI 消化,4-6 为 EcoRI 消化,7-9 为 Hind III 消化,最右栏为 λ -Hind III,单位 kb。

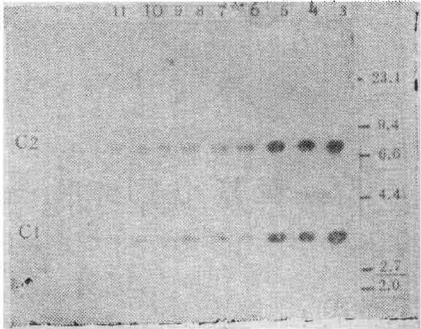


图 2 不同 Bri-8 细胞数提取的 DNA 在 Hind III 消化时与 T β 探针的杂交图

3-5 为 5×10^5 细胞,6-8 为 1×10^6 细胞,9-11 为 5×10^6 细胞,最右栏为 λ -Hind III,单位 kb。

片段大小与 Furly 等人报告的胚系基因大小相似^[1],图 1 表明 Bri-8 细胞的 T β 基因为胚型。本实验检测该基因的最少细胞数为 5×10^4 (图 2)。

本方法的主要特点是(1)用蛋白酶 K 消化细胞蛋白。(2)利用低熔点琼脂糖胶固着细胞 DNA,使去污剂等小分子物质扩散到 TE 中而被除去。(3)低熔点琼脂糖不影响限制性内切酶的作用,故本方法制备的 DNA 可用于 Southern 杂交中。鉴于本方法简单易行,DNA 回收率高,因此不仅对临床应用,而且对实验室检测少量细胞中的基因也有实用价值。

参 考 文 献

1 Wadlmann T A *et al. Gene*, 1987; 53: 121
2 James M *et al. Blood*, 1987; 69: 356
3 Ford A M *et al. EMBO J*, 1983; 2: 997
4 Feinberg A P *et al. Anal Biochem*, 1983; 132: 6
5 Furley A J *et al. Cell*, 1986; 46: 75

[本文于 1989 年 1 月 19 日收到]

(上接第 158 页)

参 考 文 献

1 Hayaishi O *et al. J Am Chem Soc*, 1955;77: 5450
2 Ramesh N *et al. Journal of Bacteriology*,1976;127 (1): 536
3 孟广震.生物工程学报,1985; 1(2): 1
4 李钦.生物工程进展,1986; 2: 30

5 李钦等.生物化学与生物物理进展; 1987;(5): 44
6 李钦等.微生物学报,1989;1: 39
7 Ornston L N, Stanier R Y. *J Bio Chem*, 1966; 241: 3776
8 沈同等.生物化学.上海: 高等教育出版社,1986:232-238

[本文于 1989 年 1 月 20 日收到]