

着病程延长 DR 改变愈加显著。而脉络膜毛细血管的 TBM 和 TA 值在 2 个月时与对照组比较也出现了统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 提示 DC 开始发生, 并随病程发展, 出现了与 DR 类似的变化。因此初步推论 DC 的改变是存在的, 并且略迟于 DR 的改变。这与临床上通过 ICGA 和 FFA 的观察基本一致, Shiragami 等<sup>[4]</sup> 就认为 DC 的危险因数就是严重的 DR 以及未控制好的高血糖。

但也有学者通过 ICGA 观察认为 DC 早于 DR 的改变, 甚至 DC 出现在没有任何视网膜血管改变之前<sup>[5]</sup>。其中的差异可能与糖尿病的类型有关, 我们采用 STZ 小剂量多次注射诱导的糖尿病大鼠是 1 型糖尿病, 而临床资料中有的 2 型糖尿病或没有严格区分糖尿病类型。因此, 这还是一个值得进一步探讨的问题。

总之, DC 同 DR 一样是一个较复杂的过程, 本研究结果限

于样本量和方法的局限只能为该病的机制提供一个初步的线索, 更多的研究有待进行。

#### 4 参考文献

- 1 Amalric P. Evolution of the conceptualization of diabetic retinopathy. Bull Acad Natl Med, 1991, 175:1017-1032.
- 2 Saracco JB, Gastaud P, Ridings B, et al. Preliminary study on diabetic choroidopathy. Bull Soc Ophthalmol Fr, 1982, 82:451-454.
- 3 刘霆, 张桂珍, 卜丽莎, 等. STZ 小剂量多次注射诱导大鼠胰岛素依赖性糖尿病动物模型探讨. 白求恩医科大学学报, 2001, 27:578-580.
- 4 Shiragami C, Shiraga F, Matsuo T, et al. Risk factors for diabetic choroidopathy in patients with diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2002, 240:436-442.
- 5 阴正勤, 孟晓红, 余涛, 等. 1 型糖尿病患者吲哚青绿血管造影的观察. 中华眼底病杂志, 2000, 16:160-161.

(收稿日期: 2004-09-01)

(本文编辑: 朱敏)

## 脉络膜黑色素瘤蜡块组织中提取 DNA 方法的改良

吴宏 苏冠方 刘早霞

【关键词】 脉络膜肿瘤/病理学; 黑色素瘤/病理学; 脱氧核糖核酸; 病理学/方法

中图分类号: R739.7 R361.2

目前, 对于脉络膜黑色素瘤的分子生物学研究日新月异。但是, 脉络膜黑色素瘤新鲜组织来源有限, 制约了研究工作的发展。为了解决这一问题, 我们拟从蜡块组织中提取 DNA, 因为蜡块标本相对好保存, 来源充足。但是蜡块标本经过固定、石蜡包埋等步骤后, 对 DNA 会产生一些影响, 所以从蜡块组织中提取 DNA 有一定的难度。为此, 我们对于从石蜡包埋组织中提取 DNA 的方法进行了改良。

Su 等<sup>[1]</sup> 于 1999 年克隆出人类 TTC4 基因, 该基因存在于人类染色体 1p31, 共有 10 个外显子。由于 1 号染色体长臂经常于多种恶性肿瘤发生时呈现缺失改变, 因此, 极有可能有多个肿瘤抑癌基因存在于此区域。2000 年 11 月, 德国一家实验室使用 Su 等<sup>[1]</sup> 提供的多聚物酶链反应 (PCR) 引物, Poetsch 等<sup>[2]</sup> 于皮肤恶性黑色素瘤中发现 TTC4 基因突变的存在。因此, TTC4 基因很有可能为抑癌基因, 并且在黑色素瘤的形成中扮演重要角色<sup>[1,3]</sup>。本研究采用改良方法从脉络膜黑色素瘤蜡块组织中提取 DNA, 为探讨 TTC4 基因在脉络膜黑色素瘤形成中的作用奠定基础。

### 1 材料和方法

DNA Marker DL2 000 购自 Takara 公司。Silver Beads 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。蛋白酶 K 为 Merck 产品。Taq DNA Polymerase (MBI 产品) 购自上海生物工程技术有限公司。三羟甲基氨基甲烷 (tris) ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 及各种生化试剂均为华美公司产品。

1995 年以来由吉林大学第二医院病理科保存的脉络膜黑色素瘤蜡块标本中选取 21 例, 所有标本均经临床和病理检查而明确诊断。取 8  $\mu$ m 石蜡切片 3 片, 在解剖显微镜下, 去除瘤旁组织, 用刀片刮取肿瘤组织放入微量离心管中。刀片每操作一例标本后, 即用酒精棉球擦拭刀片, 在酒精灯上烧过再用。加入 1 ml TES [10 mmol tris-HCl, 1 mmol 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS)], 65  $^{\circ}$ C 下水浴 10 min, 不时振摇。冰浴 3 min, 10 000  $\times$  g 离心 3 min, 以切钝的加样器小心吸取沉淀组织入另管, 重复水浴脱蜡 2 次, 最后吸出的沉淀入另管。脱蜡后的组织加入 200  $\mu$ l TET (100 mmol tris-HCl, 1 mmol EDTA, 1% triton X-100), 8  $\mu$ l 蛋白酶 K (10 mg/ml), 45  $^{\circ}$ C 下水浴 36 h, 其间振摇数次; 12 000  $\times$  g 离心 5 min, 吸上清液入另管; 200  $\mu$ l 上清管内加入 800  $\mu$ l DNA 纯化溶胶液和 20  $\mu$ l 玻璃粉悬液, 置 55  $^{\circ}$ C 下水浴 10 min, 2~3 min 振摇一次, 使混悬; 冰浴冷却至室温, 10 000  $\times$  g 离心 1 min, 弃除上清液, 以溶胶液 500  $\mu$ l 悬浮玻璃粉沉淀, 10 000  $\times$  g 离心 1 min, 弃除上清液。以 DNA 回收试剂盒中洗液 500  $\mu$ l 悬浮玻璃粉沉淀, 10 000  $\times$  g 离心 1 min, 弃除上清液, 并重复此步骤 1 次; 玻璃粉沉淀真空干燥或室温下风干, 至玻璃粉呈白亮色, 内部无明显可见的液体; 以 30~40  $\mu$ l 灭菌四蒸水悬浮玻璃粉沉淀, 55  $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min, 其间振摇 3~4 次; 冰浴至室温后, 12 000  $\times$  g 离心 3 min, 小心吸取上清液即为 DNA 的水溶液, 冻存待用, 注意勿吸取下层玻璃粉。

提取的 DNA 溶液作为模板, 扩增 TTC4 基因 10 个外显子中的 6 个, 来检验 DNA 的提取效率。以 2  $\mu$ l DNA 溶液为模板, 在 1  $\mu$ mol/L 的引物下进行 PCR, 同时摸索反应条件。取 4~5  $\mu$ l PCR 产物, 在 1.5%~2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳观察, 具体

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170998)

作者单位: 130041 长春, 吉林大学第二医院眼科

通讯作者: 苏冠方, Email: sugf@yahoo.com

方法见文献[4]。

## 2 结果

脉络膜黑色素瘤的蜡块 21 例。19 例提取物经电泳鉴定 DNA 提取成功,PCR 扩增成功。为了证实改良方法的可信性,我们选择其中的一个样品,用 TTC4 基因中的 1~6 对引物<sup>[4]</sup>进行 PCR 反应,结果得到了相应长度的片段(图 1)。我们又用不同样品(A~D),选择同一引物(第 3 对引物)进行了 PCR 反应,结果得到了长度一致的片段(图 2)。其中 3 例标本的 DNA 提取产物经电泳鉴定未能成功,并且经 PCR 未能扩增成功,最终放弃了这些标本。

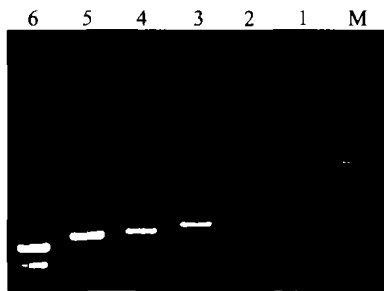


图 1 不同引物同一样品的 PCR 反应结果。1~6 引物序号; M:marker

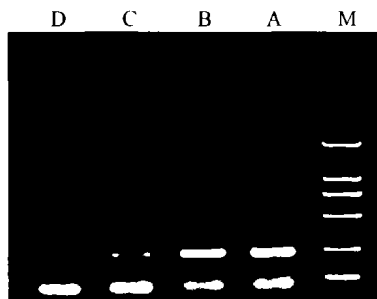


图 2 不同样品同一引物的 PCR 反应结果。A~D 样品序号; M:marker

## 3 讨论

1985 年 Goelz 等<sup>[5]</sup>首先从石蜡组织中提取 DNA,用机械的方法切碎组织,切掉多余的石蜡,放入 SDS 和蛋白酶的提取液中孵育,然后进行苯酚和氯仿抽提。所得到的 DNA 不完整,只适于点杂交,印迹杂交等分子生物学实验。Dubeau 等<sup>[6]</sup>作了改进,通过组织切片和二甲苯脱蜡,使组织保持了完整性,使 DNA 释放和蛋白质去除更加完全,又通过两次消化将降解的 DNA 小片断去处,保留了可螺旋化的完整 DNA 分子,提高了 DNA 的质量。

如果提取的 DNA 仅用于 PCR 目的,则还有更简单的直接水煮法、蛋白酶消化法等。由于 PCR 可在相对粗制的小片断 DNA 样本上进行,分析所需的 DNA 很少,0.5 μg 甚至更少即可。所以上述这些方法不经过酚-氯仿-异戊醇抽提、DNA 纯化等步骤,直接将组织放在去离子水中煮沸 10 min 或在蛋白酶 K 缓冲液中消化 4 h, DNA 即可释放出来。此提取物可直接用作模板,进行 PCR 扩增。但是,我们发现直接水煮法和蛋白酶法提取的 DNA,扩增效率较低,且特异性不好。可能是由于 DNA 附着的蛋白质去除不净而影响 DNA 变性后与引物的结合,也可能是由于标本中残留的固定剂等成分对 TaqDNA 多聚酶的

抑制作用所致。

为了提高石蜡包埋组织提取 DNA 的效率,我们从不同方面进行了探索:在切片厚度方面,福尔马林固定和石蜡包埋使组织变得坚韧,很难达到匀浆的效果。通常是将组织切成 3~5 μm 的切片,使每一细胞都被切开,但是,切片太薄容易过多地将 DNA 切断,影响高分子 DNA 的获得率。我们采用 8 μm 的厚切片,用高浓度蛋白酶 K 消化 36 h,使细胞充分破碎,蛋白被消化掉。在脱蜡方法方面,由于二甲苯、乙醇等有机溶剂脱蜡后,不易去除,干扰进一步实验,所以我们选择水浴法进行脱蜡。首先在解剖显微镜下,去除瘤旁组织及多余的石蜡之后,加入 TES 溶液,65℃水浴,不时振摇。所有这些步骤都是为了减少石蜡的残留,为下一步的工作打基础。另外, DNA 提取液主要是含有 SDS 和蛋白酶 K 的 TE 缓冲液。固定和包埋组织由于化学修饰作用,使得 DNA 与蛋白质不易分离。因此,增加 SDS 和蛋白酶 K 的浓度和作用时间,并注意不时振摇,使酶与组织充分接触。在 DNA 已经释放之后的过程中,操作要轻柔,尽量避免过多地移管,如果必须移管则选用大口吸管,避免人为造成 DNA 剪切。我们选择 DNA 回收试剂盒中的玻璃粉方法纯化 DNA,该回收试剂盒工作效率较高,避免了酚-氯仿-异戊醇抽提所带来的不良影响,以减少下一步 PCR 工作系统的干扰,取得了较好的结果。纯化的 DNA 4℃保存,如长期保存则需-20℃冻存,切忌反复冻融,增加 DNA 降解。

有 3 例最终放弃的标本可能是由于蜡块中仍存在导致 DNA 降解的因素。固定剂的类型直接影响提取 DNA 的质量。目前大多数实验室常用的中性缓冲福尔马林固定的标本, DNA 保存完好,可以获得高分子量 DNA。虽然理论上室温下福尔马林与 DNA 几乎不发生反应,但已发现碱基与组蛋白之间的甲基交联。这种由福尔马林介导的甲基化直接影响了 DNA 提取的效率。因此标本的固定时间是一个重要的变异因素。另外,组织的浸蜡和包埋温度过高或时间过长,均可导致 DNA 变性。

综上所述,要想从蜡块组织中提取出高质量 DNA 需进行认真的准备和精细的操作。由于蜡块标本比较珍贵,所以操作者应该有从新鲜组织中提取 DNA 的经验,需要有耐心,仔细认真的注意每一步操作,反复摸索实验条件及改进实验方法。

## 4 参考文献

- 1 Su G, Roberts T, Cowell JK. TTC4, a novel human gene containing the tetratricopeptide repeat and mapping to the region of chromosome 1p31 that is frequently deleted in sporadic breast cancer. *Genomics*, 1999, 55:157-163.
- 2 Poetsch M, Dittberner T, Cowell JK, et al. TTC4, a novel candidate tumor suppressor gene at 1p31 is often mutated in malignant melanoma of the skin. *Oncogene*, 2000, 19:5817-5820.
- 3 Su G, Casey G, Cowell JK. Genomic structure of the human tetratricopeptide repeat-containing gene, TTC4, from chromosome region 1p31 and mutation analysis in breast cancers. *Int J Mol Med*, 2000, 5:197-200.
- 4 SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 金冬雁,黎孟枫,译.分子克隆实验指南.第 2 版.北京:科学出版社,1992.16-68.
- 5 Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 130:118-126.
- 6 Dubeau L, Chanoler LA, Gralow JR, et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res*, 1986, 46:2964-2969.

(收稿日期:2004-06-14)

(本文编辑:朱敏)