

- ed. by Razin, S. and J. G. Tully pp. 186—188 Academic Press, New York.
- [6] McGarrity, G. J. et al. 1979, *In Vitro*. 15: 73—81.
- [7] Del Giudice, R. A. et al. 1980, *Current Microbio.* 4: 75—80.
- [8] Del Giudice, R. A. and R. S. Gardella 1984, *In Vitro monograph No. 5* pp. 104—115 Tissue Culture Association Gaithersburg, Md.
- [9] Chen, T. R. 1977, *Exp. Cell Res.* 104: 255—262.
- [10] Richard, A. et al. 1978, In: *Mycoplasma Infection on cell culture* ed. by McGarrity, G. J. et al. Plenum Press. New York.
- [11] 何大澄等, 1984, *细胞生物学杂志*, 6 (4): 153—156.
- [12] Amikam, D. et al. 1984, *J. Bacteriol.* 153—156 158: 376.
- [13] Kotani, H. et al. 1987, *Isr. J. Med. Sci.* 23: 752.

从固定的细胞和组织中分离 DNA 研究人 tk 基因多态性

乔守怡 刘 阳 孙光荣 蔡新中 赵寿元

(复旦大学遗传和遗传工程系 200433)

目前从 DNA 水平上开展人类遗传学和医学遗传学的研究受到人们的重视。例如: 调查人群中某些基因座位 DNA 片段长度多态性的出现频率以探讨种群之间进化上的亲缘关系、分析 RFLP 与某些疾病之间的连锁关系作为疾病诊断指标、研究遗传病患者的基因结构的特征等都是当前十分活跃的研究领域。这些研究往往需要采集许多 DNA 样品, 包括遗传病患者的 DNA。由于我国幅员广阔, 所需调查的对象有些处于边远地区, 鲜血或组织材料中的 DNA 极易降解, 不便长途携带, 这给研究工作带来很大困难。本文介绍用固定液固定人体组织块或白细胞, 从中抽提 DNA, 用于研究 tk 基因的 RELP, 取得了令人满意的结果, 解决了上述困难问题。

材料与方 法

一、材料

1. 人体胃癌及癌旁非癌胃组织(由第二军医大学附属长海医院手术室提供), 在手术后立即用 TE 缓冲液洗涤后固定。

2. 取 5 ml 人静脉血, 1000 rpm 离心 10 分钟,

取中间白细胞层, 用 PBS(pH 7.4)洗涤一次, 1000 rpm 再离心 10 分钟, 收集沉淀。低渗去除红细胞后, 1000 rpm 离心 10 分钟, 收集白细胞后固定。

二、固定液

人体组织块、白细胞和培养细胞分别加入固定液甲醇:冰醋酸(3:1)或乙醇:冰醋酸(3:1), 置 4℃冰箱保存数天至数月。

三、DNA 的抽提

固定的细胞先离心弃去固定液, 用 TE 洗涤细胞 3—5 次, 准备抽提 DNA。固定的组织块 1.0—1.5 克, 离心弃去固定液。用 TE 反复洗涤后, 将组织块剪碎, 放入不锈钢电动组织捣碎器中, 加入液氮, 捣碎成粉状。待液氮挥发后, 再用 TE 洗涤, 准备抽提 DNA。这些经预处理的材料用 0.5% SDS 处理, 而后加 150 μg/ml 蛋白酶 K 处理, 37℃过夜。次日用酚、氯仿各抽提一次, 透析过夜。加 RNaseA 至 100 μg/ml, 37℃ 3 小时, 再加 SDS、蛋白酶 K, 37℃处理过夜。重复用酚及氯仿抽提, 用 TE 缓冲液(pH 8.0)透析, 隔日取出。乙醇沉淀 DNA, 用玻璃棒挑出絮状 DNA, 溶解在 TE 中, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

四、酶的消化与分子杂交

将收集到的 DNA 用 KpnI 酶消化。10 μg DNA 样品加入 5—8 μl KpnI(上海华美公司产品, 16 u/ul),



图 1 固定材料 DNA 电泳图

1. 用甲醇:冰醋酸(3:1)固定, 保存 1 天的胃癌组织 DNA。
2. 用甲醇:冰醋酸(3:1)固定, 保存 17 天的胃癌组织 DNA。
3. 用乙醇:冰醋酸(3:1)固定、保存 7 天的人白细胞 DNA。
4. 用乙醇:冰醋酸(3:1)固定, 保存 61 天的人白细胞 DNA。

消化 30 小时, 经酶切后的 DNA 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。最后进行 Southern 印迹杂交实验, 探针为人的 tk 基因的一个 1.25 kb 片段。

结 果

从固定的人体组织块或白细胞所抽提到的 DNA 用电泳鉴定(图 1), 再用 KpnI 酶切(图 2), 可见到重复顺序的带型(箭头指示处)。这与未经固定的材料中所抽提的 DNA 酶切后的结果是一样的(图 3)。酶切后的 DNA 转移到硝酸纤维膜上, 与 1.25 kb 的 tk 基因探针

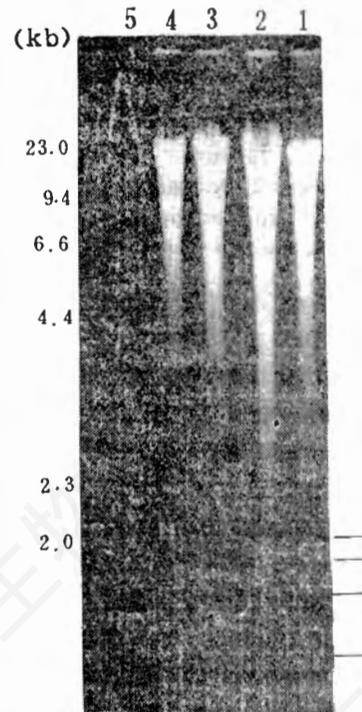


图 2 限制性内切酶 KpnI 消化不同固定材料 DNA 样品电泳图

1, 2, 3, 4 同图 1。

5. 分子量标记: 入 DNA/HindIII 横线示重复顺序的条带。

杂交, 出现了清晰的杂交条带, 大小为 3.1 kb 和 2.6 kb(图 4)。

本实验共做了上海地区 26 名汉族人员的 DNA 样品, tk 基因的 KpnI 片段长度有 3.1 kb 和 2.6 kb, 多态性分布见表 1。

讨 论

实验结果表明, 从固定的哺乳类的细胞抽提 DNA 的方法是有效的, 这样得到的 DNA

表 1 人 tk 基因 KpnI 限制位点多态性的分布

基因型	观察数(个)	基因型频率	基因频率
A A	2	0.08	等位基因 A 的频率 = $0.08 + \frac{1}{2}(0.31) = 0.235$
A B	8	0.31	
B B	16	0.61	等位基因 B 的频率 = $0.61 + \frac{1}{2}(0.31) = 0.765$
合计	26	1	

A: 低频等位基因(3.1 kb), B: 高频等位基因(2.6 kb)。

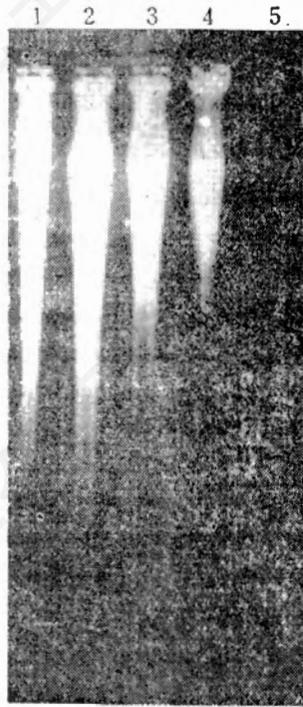


图 3 未经固定材料 DNA 电泳图

1, 2. 为未固定胃癌组织 DNA。3, 4. 为未固定人白细胞 DNA。5. 为分子量标记: 入 DNA/Hind III。

与未固定材料 DNA 一样, 可被限制性内切酶酶解。通过 Southern 印迹杂交分析, 证明固定数月的细胞能产生与非固定样品中的 DNA 相同的杂交带。说明按此法抽提的 DNA 未因固定而降解。在实验中我们也发现, 抽提固定的体外培养细胞或白细胞 DNA, 比抽提固定组织块的 DNA 效果要好些。推测可能是对分散细胞的固定作用要强于细胞的组织块。在本实验所分析的 26 份样品中 3.1 kb 和 2.6 kb 片段出现的频率约分别为 0.235 与 0.765, 这与用非固定材料得出的频率十分吻合。所以用甲醇(或乙醇):冰醋酸(3:1)固定的组织块或白细胞, 完全可以用于 DNA 分析。这对于从边远地区采集人体 DNA 样品, 在分子水平上开展人类遗传学研究提供了一个便利可行的方法。

摘 要

本文采用 乙醇:冰醋酸(3:1)和 甲醇:冰

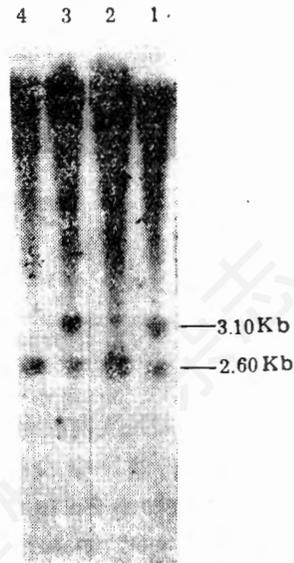


图 4 Southern 印迹杂交和放射自显影
KpnI 酶切, 探针 pHK 1.25 1, 2, 3, 4 同图 1。

醋酸(3:1)两种固定液固定人的细胞和组织, 时间从几天至几周不等, 从中抽提 DNA, 并用限制性内切酶酶切后作 Southern 印迹杂交研究人的 tK 基因的 RFLP, 探针为 pHK 1.25, 得到了清晰的杂交带, 与未固定材料的杂交带型完全相同。26 名汉族人员中 tk 基因的 KpnI 限制性片段为 3.1 kb 和 2.6 kb, 频率分别是 0.235 和 0.765, 也与用未固定材料研究的结果一致。这种固定后抽提的方法有利于保存和采集 DNA 样品, 对于从边远地区采集 DNA 样品进行分子遗传学研究提供了一个便利可行的研究方法。

参 考 文 献

- [1] Richard Asciono, Nicoletta Sacchi, 1986, *Gene Analysis Techniques.*, 3: 25—39.
- [2] McKuick, V. A., 1986, *Clinical Genetics.*, 29: 545—588.
- [3] Leonard G. Davis, et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology.* Eisevier Science Publishing Co., Inc.
- [4] Sharp, P., Sugden, B., and Sambrook, J., 1973, *Biochemistry.*, 12: 3055.
- [5] 赵寿元等, 1985, 遗传学报, 12(6): 416—423.
- [6] 赵寿元等, 1988, 遗传学报, 15(1): 61—67.
- [7] 赵寿元、张 钰. 1989, 科学通报, 5: 398—399.