

介绍一种快速提取胎鼠基因组 DNA 进行基因型分析的改良方法

杨 瑞 麻献华 唐君仪 章卫平 谢志芳

摘 要 **目的** 建立一种快速提取胎鼠基因组 DNA 进行基因型分析的简便方法。**方法** 先对胎鼠组织进行碱裂解,然后通过盐析纯化 DNA,经琼脂糖凝胶电泳判断 DNA 大小,检测 A260/A280 的比值判断其纯度,最后将抽提的 DNA 进行 PCR 扩增和基因型分析,检测其作为 PCR 模板的稳定性。**结果** 在 2h 内能分离到胎鼠基因组 DNA,片段完整没有明显的降解现象,A260/A280 比值 >1.77 ,能稳定用于 PCR 基因型鉴定分析。**结论** 该方法简便、快速、经济,能得到 PCR 级的高质量胎鼠基因组 DNA,为准确和快速地进行胎鼠的基因型分析提供保证,具有很好的稳定性、可靠性和实用性。

关键词 基因组 DNA 分离 胎鼠 PCR 基因型鉴定

Rapid Preparation of High Quality Genomic DNA from Mouse Embryo for Genotyping. Yang Rui, Ma Xianhua, Tang Junyi, Zhang Weiping, Xie Zhifang. College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To develop a rapid method for the extraction of high quality genomic DNA from mouse embryo for genotyping. **Methods** Genomic DNA was prepared using alkaline lysis followed by high-salt extraction from mouse embryonic tissue. The integrity and purity of the DNA was assessed by performing agarose gel electrophoresis and ratio absorbance measurements at A260/A280. The DNA samples were then subjected to PCR amplification using two primer pairs. **Results** The genomic DNA was extracted from mouse embryonic tissue within 2h using the new method. There was no sign of degraded DNA during preparation and the purity of the DNA determined from the A260/A280 ratio averaged >1.77 . The DNA produced a reproducible PCR product pattern. **Conclusion** The new method is time-saving, economic and reproducible for the preparation of high-quality genomic DNA from mouse embryo for genotyping.

Key words Extraction of genomic DNA; Mouse embryo; PCR; Genotyping

目前转基因和基因敲除实验技术在生物学和医学研究中的应用日益广泛,在该实验体系中,涉及大量的小鼠基因型鉴定和筛选工作^[1,2]。目前,对于出生后的小鼠,常剪取一小段尾巴,采用 SDS-蛋白酶 K 过夜消化后异丙醇沉淀法粗提基因组 DNA,然后进行 PCR 鉴定小鼠基因型^[3]。该方法简便而稳定,但笔者将该方法应用于胎鼠组织时,却发现得到的基因组混有大量蛋白质,影响后续 PCR 反应的稳定性。虽然可用酚、氯仿抽提法进一步纯化,但这两种试剂具有一定的毒性^[3]。也可用柱纯化的方法,但费用较贵,不适合大面积筛选工作^[4]。有报道用碱裂法快速溶解组织后可直接用作 PCR 的模板,该方法虽然简便,但对于胎龄 >12 天的胎鼠,也同样会由于所

制备的 DNA 中含过多的蛋白质而影响后续 PCR 反应的稳定性^[5]。为此,笔者以碱裂法为基础,结合盐析纯化法,能稳定获得纯度较高的基因组 DNA,为保证后续 PCR 反应的稳定性提供了优质的 DNA 模板,该方法适用于各种胎龄的胎鼠^[6]。

材料与方法

1. 胎鼠组织的获取:将孕鼠麻醉后处死,取出胎鼠,夹取脚指或尾巴(需要保存整体骨架的胎鼠可剪取少量脐带)放入 1.5ml 离心管内。组织要控制在约 2mm 长度(米粒大小),避免取胎肝等含血量多的组织,以免干扰后续的 PCR 反应。每只胎鼠来源的组织分成多份,分别用以下 3 种不同的方法抽提基因组:(1)方法 1(SDS-蛋白酶 K 过夜消化法):将每份组织加入 500 μ l SDS-蛋白酶 K 溶液(含 400 μ g/ml 蛋白酶 K 和 0.2% SDS),55 $^{\circ}$ C 消化 5~16h,然后用酚、氯仿抽提后,异丙醇沉淀,70% 乙醇洗 1 遍后,溶解在 200 μ l TE 溶液中^[3]。(2)方法 2(碱裂法):每份胎鼠组织中加入 100 μ l 的 25mmol/L NaOH/2mmol/L EDTA,煮沸 10 min 后查看所有组织是否裂解完全,若未裂解完全可延长煮沸时间,直至看不到组织块。然后加入 100 μ l 的 40mmol/L Tris HCl(pH 约为 5,配制时无需调 pH 值),取 1 μ l 直接用于 PCR^[5]。(3)方法 3(碱裂解结合

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31270814)

作者单位:200433 上海,第二军医大学基础部病理生理学教研室(杨瑞、麻献华、章卫平),细胞生物学教研室(谢志芳),研究生管理大队学员二队(唐君仪)

通讯作者:谢志芳,电子信箱: xiezf@smmu.edu.cn

盐析法): 每份胎鼠组织中加入 200 μ l 的 25mmol/L NaOH/2mmol/L EDTA 和 50 μ l 的 10% SDS, 煮沸 10min, 然后加入 200 μ l 的 40mmol/L Tris HCl, 300 μ l 的 6mol/L NaCl 和 100 μ l 的 10% SDS, 混匀后看到白色的沉淀。4 $^{\circ}$ C 离心 (13500r/min) 20min 后将上清转移至干净的 1.5ml 离心管内, 加入等体积的冷 (-20 $^{\circ}$ C) 异丙醇, 混匀后放置在 -20 $^{\circ}$ C 30min, 4 $^{\circ}$ C 离心 (13500r/min) 8min, 此时可在管底见到很少的白色沉淀。去上清后用 1ml 70% 乙醇洗 1 遍, 在空气中晾干后加入 200 μ l TE。将上述 3 种方法制备的 DNA 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳以检测其片段大小, 用紫外分光光度计检测 A260 和 A280, 计算 A260/A280 的比值判断其纯度。

2. PCR 反应体系: 在 20 μ l 的反应体系中含 1 μ l 上述制备好的 DNA 模板, 两对引物 (0.25 μ mol/L), 一对引物用于扩增 LoxP 位点, 另一对引物用于扩增 Cre 酶基因; 1 $\times$ PCR Mix-ture (含 0.025U/ μ l Taq Polymerase, 2mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 北京艾德莱生物科技有限公司)。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环最后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的大小。

结 果

用上文提及的 3 种抽提基因组的方法抽提的基因组 DNA, 经紫外分光光度计检测发现 A260/A280 的比值分别为 1.79 ~ 1.85, 1.10 ~ 1.51, 1.77 ~ 1.82, 说明方法 1 和方法 3 得到的 DNA 纯度较高, 而单纯碱裂法制备的 DNA 中含有蛋白质使得 A260/A280 的比值下降。经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳发现 3 种方法制备的基因组 DNA 较完整, 没有明显的降解现象 (图 1A)。用方法 1 制备的 DNA 作为模板进行 PCR 反应能扩增出两条清晰的目标条带, 其中 800bp 左右的条带为引物 1 扩增出的 LoxP 位点, 而引物 2 扩增出的为 400bp 左右的 Cre 酶基因片段, 扩增特异性好。用方法 3 制备的 DNA 为模板进行 PCR, 得到了与方法 1 同样的结果。以方法 2 制备的 DNA 为模板进行 PCR 后, 有时能扩增出与方法 1 相同的条带, 而有时会出现假阴性的结果 (图 1B), 提示未纯化的模板中含有一些能抑制 PCR 反应的物质, 会影响某些引物的扩增效率, 导致假阴性结果。用方法 3 提取不同胎龄 (胚胎 12 ~ 18 天) 的胎鼠基因组 DNA, 发现都能稳定用于 PCR 反应, 以进行基因型鉴定分析 (图 2)。

讨 论

用碱裂法结合盐析纯化法去除蛋白质, 得到了纯度较高的基因组 DNA, 保证了 PCR 反应的有效扩增, 避免了假阴性结果的产生。整个过程只需 2h, 而且不需特殊试剂和材料, 具有简便、快速、安全、经济和

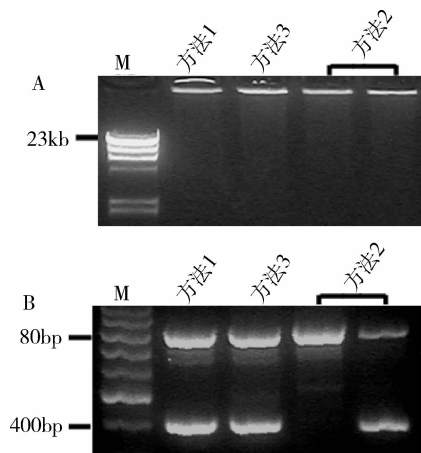


图 1 胎鼠基因组 DNA 和 PCR 产物电泳

A. DNA; B. PCR 产物电泳

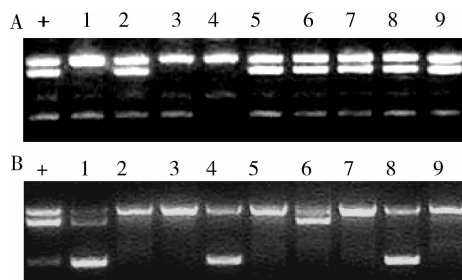


图 2 用方法 3 提取不同胎龄的胎鼠基因组 DNA 进行 PCR 鉴定基因型

A. E14.5 天胎鼠; +. 阳性对照, 基因型为 F/+cre; 1 和 3. 基因型为 F/Fcre; 4. 基因型为 F/F; 其余为 F/+cre; B. E17.5 天胎鼠; +. 阳性对照, 基因型为 F/+cre; 1. 基因型为 F/+cre; 4 和 8. 基因型为 F/Fcre; 6. 基因型为 F/+; 其余为 F/F

稳定的特点。该方法已在本实验室应用 3 年多, 一直非常稳定, 为成功分析基因敲除小鼠的胚胎发育表型奠定了基础^[7]。

虽然理论上组织和细胞粗提物可直接用作 PCR 的模板, 但组织中的某些非核酸成分会在一定程度上抑制 PCR 的扩增效率, 影响某些产物的扩增效果^[8]。这种情况在组织量较多时会经常发生, 主要原因是非核酸成分太多, 抑制了 PCR 反应。所以若用细胞或组织裂解液直接进行 PCR, 需严格控制组织量。但在实际操作中, 往往不易掌握组织的获取量, 特别是没有经验的学生更倾向于过多剪取组织, 导致了 PCR 的不稳定性。而将组织裂解液用盐析法纯化后, 就可有效避免这个问题, 即使组织稍多一些, 经纯化后就能得到较纯的 DNA 模板, 保证了结果的稳定性。盐析纯化 DNA 与酚/氯仿抽提法相比更安全、无毒, 也更经济。此外, 笔者在碱裂裂解溶液中加入阴离子去

垢剂 SDS,促使蛋白变性,加速了组织的裂解速度,避免基因组 DNA 在强碱溶液中暴露过久而断裂。总之,用碱裂法结合盐析纯化法能稳定提取到纯度较高的胎鼠基因组 DNA,为 PCR 提供高质量的 DNA 模板,确保了基因型鉴定和筛选工作的稳定性。

参考文献

- 1 Baron RM, Choi AJ, Owen CA, *et al.* Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(6):L485-497
- 2 Belizario JE, Akamini P, Wolf P, *et al.* New routes for transgenesis of the mouse[J]. *J Appl Genet*, 2012, 53(3):295-315
- 3 Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3e, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd 2001:461
- 4 Rajput SK, Dave VP, Rajput A, *et al.* A Column based rapid method

for the simultaneous isolation of DNA, RNA, miRNA and proteins [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(9):779-783

- 5 Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, *et al.* Preparation of PCR - quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(1):52, 54
- 6 Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt - extraction of high quality genomic DNA for PCR - based techniques [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(22):4692-4693
- 7 Xie Z, Ma X, Ji W, *et al.* Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(14):6510-6515
- 8 唐恩洁. PCR 影响因素初探(二)模板 DNA 质量对 PCR 结果的影响[J]. *川北医学院学报*, 1997, 12(2):1-3

(收稿日期:2012-11-05)

(修回日期:2012-11-21)

SD 大鼠腹腔注射及尾静脉注射¹⁸F-FDG PET/CT 成像对比研究

安 备 杜湘珂 霍天龙 张维涛 姚 玮 伊险峰

摘 要 目的 观察 Sprague Dawley (SD) 大鼠腹腔注射¹⁸F-FDG 和尾静脉注射¹⁸F-FDG 在颅脑、心脏、肝脏及肾脏等器官代谢的异同。**方法** 8 只 8 周龄健康雄性 SD 大鼠, 每只大鼠经尾静脉注入¹⁸F-FDG, 注射后即行 PET/CT 检查采集数据收集图像信息。4 天后, 每只大鼠用同样的剂量经大鼠腹腔注入¹⁸F-FDG 即行 PET/CT 检查。分别在数据采集 10、30、50、70min 测量两种注射方法不同组织器官¹⁸F-FDG 的标准化摄取值 (standard uptake value, SUV), 并比较是否有统计学差异。**结果** 10、30min 腹腔注射组大脑、哈德腺、心脏、肝脏的 SUV 值均小于尾静脉注射组 ($P < 0.05$), 具有明显统计学意义的差异; 在 50、70min 腹腔注射组大脑、哈德腺、心脏、肝脏及肾脏的 SUV 值与尾静脉注射组无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论** 有关大鼠的 PET/CT 实验。经由腹腔注射显像剂¹⁸F-FDG 代替尾静脉注射是可行的。

关键词 PET/CT ¹⁸F-FDG 标准化摄取值

Comparison of Intraperitoneal Injection and Intravenous Injection of ¹⁸F-FDG PET/CT Imaging in SD Rats. An Bei, Du Xiangke, Huo Tianlong, Zhang Weitao, Yao Wei, Yi Xianfeng. The Radiology Department of Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Abstract Objective To compare the PET/CT imaging of SD rat between intraperitoneal injection of ¹⁸F-FDG and tail vein injection of ¹⁸F-FDG. **Methods** Eight healthy SD rats about 8-week-old were studied in the experiment. Each rat was injected into ¹⁸F-FDG by tail vein. PET/CT scanning was done immediately after injection of ¹⁸F-FDG. The similar PET/CT scanning was done by intraperitoneal injection of ¹⁸F-FDG after 4 days following the first PET/CT scanning. We compared the SUV of different organs in SD rats at 10min, 30min, 50min, 70min after scanning between the two injection methods. **Results** The intraperitoneal injection group had slower SUV of ¹⁸F-FDG in brain, harderin gland, heart, liver and kidney than tail vein injection at 10min, 30min after scanning, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The SUV of organs in SD rats was same between the two groups, There was also an important staistical meaning ($P > 0.05$). **Conclusion** It is available to inject ¹⁸F-FDG by intraperiton injection instead of tail vein injection, when PET/CT scanning of rats was done.

Key words PET/CT; ¹⁸F-FDG; Standard uptake value

基金项目:国家自然科学基金资助项目(800967)

作者单位:100044 北京大学人民医院放射科

通讯作者:霍天龙,电子邮箱:huotianlong@yahoo.cn