



专家指南： 如何从 FFPE 样品中提取 DNA？

生物通编者按：世界上绝大多数的组织样品是使用福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE)的方法处理的。要想提取出其中的核酸信息，相当有难度，因为 FFPE 样品中的 DNA 和 RNA 已经部分降解了，且 DNA 往往与组蛋白紧密交联。但是这个领域的科学家们也不是等闲之辈，他们近几年已经摸索出了更有效的方法。在此，生物通编译收集了多位专家在这方面的建议和小窍门，供您参考。现在，让我们来听听专家是如何说的。如果您在这方面有独特的心得体会，也欢迎与我们分享。

我们要讨论的四个问题如下：

Q1: Do you pre-treat your samples prior to extraction?

Q2: What extraction method do you use to isolate DNA from the tissue? How long do you incubate and what buffer do you use?

Q3: How do you optimize the efficiency of DNA extraction? What do you consider a good yield?

Q4: How do you determine the quality of the DNA extracted? What degree of fragmentation is acceptable?

问题一：在提取前需要预处理样品吗？

Sunil Badve 印第安那大学药学院

除了在最低温度融化石蜡外，我们什么也不做。

MARK Bouzyk 爱默里大学 (EMORY UNIVERSITY) 药学院

我们通常收集 5um 切片，放入 2ml 螺旋管中。一般每次处理 3-6 个切片。有时候我们也用 1mm 组织芯。开始，我们用二甲苯在 50 度处理 3 分钟，去除切片上的石蜡，然后

用乙醇洗涤两次去除二甲苯。

Susan Long 俄亥俄州立大学医学院
玻片用二甲苯脱蜡，再用乙醇漂洗后，取 10um 未染色切片。风干后用手术刀刮下来浸在消化液中，然后放入装有 Qiagen ATL 缓冲液和蛋白酶 K 溶液的试管中。

Jeffrey Mason 美国国防病理中心

对于 FFPE 组织切片，有两种预处理方法。第一种方法是，将这些组织（10-50mm 切片）用二甲苯孵育，再用浓度逐步降低的乙醇洗涤（100%、90%、70%），再用 PBS 缓冲液水合。这个步骤也略有不同，比如乙醇的浓度或 1M 硫氰酸钠水合过夜。第二种方法是，将这些组织（10-20mm 切片）置于缓冲液中，在 120 度孵育 20 分钟，然后冷却到室温。缓冲液包含 28.6mM 的柠檬酸、磷酸钾、硼酸和巴比妥，用 NaOH 调节 pH 值到 9。这种预处理的方法还能使你省去下面 DNA 提取过程中的酶消化步骤。

问题二：你使用哪种方法从组织中提取 DNA？孵育多久？使用的是哪种缓冲液？

Sunil Badve 印第安那大学药学院

我们用的是 Qiagen 的 DNeasy，或类

似的产品。

Carol Barone 杜邦儿童医院

我们将 FFPE 样品切割成 10um 大小，放在 Eppendorf 管中，而不是把样品磨碎。分子诊断实验室向管中加入 300ul histo-clear 来脱蜡（室温 5-10 分钟），并离心。重复三次，抛弃 histo-clear 和石蜡。用 100%乙醇室温水合。离心，倒出乙醇，重复三次。再加入 300ul 裂解液、1.5ul 蛋白酶 K，孵育 3 小时。在必要时重复或孵育过夜。分子诊断实验室用的是 Gentra 的操作步骤，唯一的不同是切割样品而非磨碎。

Mark Bouzyk 爱默里大学（EMORY UNIVERSITY）药学院

样品脱蜡后，我们会消化 DNA 上的结合蛋白。由于 DNA 往往会与组蛋白紧密交联，我们推荐用 Ambion 的蛋白酶和消化液在 50 度孵育至少 48 小时。我们试过许多试剂盒和操作步骤，觉得还是 Ambion 的 RecoverAll Total Nucleic Acid Extraction Kit 比较好用。对于 DNA 的分离和纯化，我们利用的是 Ambion 专利的分离液和过滤器，洗涤和洗脱液，并按照它们的步骤操作。整个手工操作过程约为 45 分钟。如果是高通量分析，RecoverAll MagMAX Custom Kit 可能更为理想。

Susan Long 俄亥俄州立大学医学院

我用的是 Qiagen 的 QiaAMP DNA Micro Kit 来分离 DNA。首先用 QiaAMP ATL 消化液和蛋白酶 K 溶液在 65 度孵育样品，至少是过夜，最长可达 48 小时。然后在提取前再加入一定量的蛋白酶 K，并孵育几小时。

Jeffrey Mason 美国国防病理中心

从 FFPE 样品中提取 DNA 的最关键步骤就是消化蛋白。蛋白酶 K 是最常用的蛋白酶。消化/裂解缓冲液中通常是含有 10-20 mg/ml 蛋白酶 K 的 Tris 缓冲液。一般还会添加 10% 的 SDS。组织置于消化液中，在 55 度孵育 24 小时，然后 95 度 5 分钟失活蛋白酶。

再将酚/氯仿/异戊醇（25/24/1）加入消化液中，通过离心回收上清。然后再在上清中加入氯仿，并离心，小心去除上层的水相。再加入小体积的 3M 醋酸钠和异丙醇沉淀 DNA。如果 DNA 的量很少，还可以加入糖原帮助沉淀。沉淀的 DNA 用乙醇洗涤，干燥，用 20ul 或 50ul 水或缓冲液来溶解。要想使 DNA 完全溶解，可能需要孵育过夜。

**问题三：你如何优化 DNA 提取的效率？
你认为怎样才算是好的产量？**

Sunil Badve 印第安那大学药学院

延长蛋白水解酶的作用时间。大于 100 ng/ul 就算是好的产量吧。

Mark Bouzyk 爱默里大学（EMORY UNIVERSITY）药学院

提取过程的关键是蛋白酶消化要持续 2-3 天。我们发现如果只消化几小时的话，提取的效果就不大好。根据我们的经验，好的产量是从 3 个 5um 切片中得到 1-3ug 的 DNA。当然，这在很大程度上是由切片本身的质量来决定的。

Susan Long 俄亥俄州立大学医学院

你必须确保这些组织在上 QiaAmp 柱之前，已经消化完全了。从 10-20 个小的组织切片（小于 5mm²）一般能得到 5-10ug 的 DNA，而 3-5 个大的组织切片（大于 5mm²）的 DNA 产量一般在 40ug 或更多。

Jeffrey Mason 美国国防病理中心

提取效率与蛋白酶 K 消化步骤密不可分。延长消化时间能改善 DNA 的回收率以及片段的平均长度。蛋白酶 K 的消化步骤最多可延长到 5 天，每天加入新的消化液。如果组织还没有完全溶解的话，就要继续消化。最后结果应该是表面光滑的半透明溶液，看不到任何微粒。孵育时间也取决于组织。例如，低密度组织(肺)所需的孵育时间就比高密度组织(心脏)少。

我认为好的产量应在 200-500 mg/ml。DNA 浓度可以通过吸光度或荧光分析来测量。

问题四：你如何确定提取的 DNA 的质量？你可以接受的片段化程度？

Sunil Badve 印第安那大学药学院
A260/A280 在 1.7 与 1.9 之间。我们没有考虑它的片段化程度。

Mark Bouzyk 爱默里大学 (EMORY UNIVERSITY) 药学院

我们通常使用 PicoGreen 来测定 DNA 的数量和质量。我们大部分的下游分析是 Taqman 或单碱基延伸基因分型，所以 500bp 左右的片段都是可以接受的。但有时可能需要更长的片段（比如 Illumina Infinium 就需要 2kb），我们推荐用 Agilent 的生物分析仪来测量片段化大小，与常规的凝胶电泳相比，它需要的样品量很少。

Susan Long 俄亥俄州立大学医学院

我是通过 Nanodrop 分光光度计来检测浓度和 260/280 比值的，然后进行 PCR。通常我只需要能扩增出 200-400bp 的片段就行了。

Jeffrey Mason 美国国防病理中心

我们利用两种方法来估计 DNA 的质量。第一种是在 70 度变性 DNA，然后取 200ng 去跑 1% 的琼脂糖胶，来确认大小分布。大小应该是分布在 100bp 到 3000bp 之间。如果用蛋白酶 K 消化 6 天以上，还可以看到更长的片段。第二种方法是通过实时定量 PCR 来估计 DNA 的质量。我们会用 3-4 套引物及 1-2 个探针来扩增看家基因 GAPDH 或 b2 微球蛋白。

对于实时定量 PCR 而言，100bp 到 3000bp 的 DNA 片段就能得到一个理想的结果。如果是要做芯片研究的话，可能需要更长的片段。

从上面他们的谈话中，你可以看到样品不同，下游的分析不同，从 FFPE 样品中提取 DNA 的步骤也会有所差异。希望你能从他们的经验中汲取精髓，摸索出最适合你的 DNA 提取方法。我们还挑选了一些相关文献，帮助你优化实验。

(生物通 余亮)