

在干细胞药物临床前研究中动物样品基因组DNA高通量提取的固相萃取法和磁珠筛选法初探

张 臣, 谭锦绣, 李 薇*

天津天诚新药评价有限公司 国家释药技术及药代动力学重点实验室, 天津 300310

摘 要: 干细胞药物临床前研究中, 常需要以干细胞特定基因片段为靶点追踪其体内的分布过程, 需要提取动物样品基因组DNA, 涉及到心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、骨髓、血、脂肪、肌肉、性腺、胃和肠等多种组织类型。为实现临床前样品的高通量检测, 总结动物组织基因组DNA提取方法, 并就如何高效高质提取样品基因组DNA进行讨论, 提出间充质干细胞临床前研究中样品处理的一种可行的方案: 通过生物样品制备仪获取稳定均一的组织裂解液, 利用固相萃取法和磁珠筛选法配合使用获得高质量高浓度的动物样品DNA。

关键词: DNA提取; 固相萃取; 磁珠筛选; 干细胞

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2372-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.002

Preliminary study of high-throughput animal samples genomic DNA extraction scheme by solid phase extraction and magnetic bead screening in preclinical research of stem cell drugs

ZHANG Chen, TAN Jinxiu, LI Wei

Tianjin Tianchen New Drug Evaluation Research Co. LTD, State key laboratory of drug release technology and pharmacokinetics, Tianjin 300031, China

Abstract: In preclinical research of stem cell drugs, it was often necessary to track the distribution process of stem cell specific gene fragments *in vivo*, and extract genomic DNA of animal samples, involving heart, liver, lung, spleen, kidney, brain, bone marrow, blood, fat, muscle, gonad, stomach and intestine. For such a special purpose of DNA extraction, there was no systematic report. In this paper, the methods of extracting genomic DNA from animal tissues were summarized, and how to extract genomic DNA from samples with high efficiency and high quality was discussed. A feasible scheme for sample treatment in preclinical research of mesenchymal stem cells was proposed: stable and uniform tissue lysate was obtained by biological sample preparation apparatus, and high quality and high concentration animal sample DNA was obtained by solid phase extraction and magnetic bead screening.

Key words: DNA extraction; solid phase extraction; magnetic bead screening; stem cells

利用定量PCR(qPCR)进行干细胞药物临床前评价分析时^[1-2],从实验动物样品中稳定地提取高浓度、高质量的基因组DNA,对临床前研究的顺利完成至关重要。传统基因组DNA的提取方法大多适用于固定的动物组织、植物组织、临床样本、细胞、病毒或者细菌,同时操作样品种类多较单一。传统的生物样本DNA提取目的在于鉴定动物种属、刑事鉴定、转基因研究等,而在干细胞药物临床前研究

中,常需要以干细胞特定基因片段为靶点追踪其体内的分布过程^[3],所以需要提取动物样品基因组DNA,同时还会涉及到多种组织类型,例如心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、骨髓、血、脂肪、肌肉、性腺、胃和肠,样品不仅种类复杂,数量也相对较大。对于这样的特殊的DNA提取目的,目前尚无系统的研究报道。本研究将从DNA提取等几个方面提出一个高通量高效提取动物基因组DNA的方案,来解

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 天津市科技计划项目(17ZXXYSY00020)

第一作者: 张 臣(1994—),研究方向为细胞药物临床前研究。Tel:(022)84845243 E-mail: zhangchen@tipr.com.cn

*通信作者: 李 薇(1982—),研究方向为细胞药物临床前研究。Tel:(022)84845243 E-mail: liw@tipr.com.cn

决干细胞药物临床前研究中提取样本种类复杂,数量大的现实问题。

1 动物组织样品匀浆

动物组织基因组DNA的提取步骤大致分为4个步骤:组织的有效破坏、核蛋白复合体的变性、核酸酶的失活、基因组DNA的纯化。组织的有效破坏是提取基因组DNA的第一步,传统的DNA提取方式通常采用液氮研磨或者玻璃粉末研磨的方式获取较为细腻的组织裂解液,但研磨效率低下、样品容易交叉污染,对于磁珠筛选法和固相萃取法这样的组织裂解液不能满足使用要求。为了高效地提取DNA,推荐采用一次性铅珠组织破碎管配合生物样品制备仪,每个样品使用单独的破碎管避免了样品之间的污染,同时快捷高效,提取的基因组DNA产率和纯度稳定一致。

2 基因组DNA分离及纯化

提取的DNA需要保证其一级结构的完整性;尽量减少提取液中对酶有抑制作用的有机溶剂及过高浓度的金属离子;尽量去除其他生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染;其他核酸分子,如RNA,也应尽量去除;同时要远离核酸酶的污染。核酸的质量和完整性将直接影响后续科学研究的结果^[4]。

1869年瑞士医生完成了第一次DNA分离纯化,最初常规的实验室DNA提取都是基于密度梯度离心原理发展而来的^[5]。之后大多利用核酸和其他物质在碱性或盐溶液中溶解度的差异分离提取DNA^[6]。至今已经发展出许多提取方法,例如:氯仿萃取法、碱提法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取法、固相核酸提取和磁珠筛选提取。传统的基因组DNA提取方法可以满足实验室的基础研究通量,但是面对临床前研究的大量动物样品显得不够高效。固相核酸提取法或者磁珠筛选提取法能快速提纯核酸,满足中、高通量提取高质量高浓度的组织DNA的要求,同时也能避免液液萃取的相分离不完全等问题。使用磁珠筛选法和固相萃取法高效高质量高通量提取DNA的前提是将组织样品破碎后使用裂解液裂解成均匀澄清液体,释放细胞内的核酸。在使用磁珠法筛选时组织匀浆液的DNA含量不宜太高,过多的DNA吸附在磁珠上会使磁珠聚集不易分散,造成DNA洗涤不充分,从而降低提取DNA的质量。

2.1 固相核酸提取

固相体系在缓冲液环境下,萃取过程中会特异

性吸附核酸DNA。目前可以用于制作固相萃取柱的材料有硅胶基质、玻璃颗粒、硅藻土和阴离子交换载体。固相提纯通常需要使用离心机,通过离心力分离DNA和其他物质,能快速提纯核酸。固相萃取法的4个关键步骤是细胞裂解、核酸吸附、洗涤和洗脱。商品化的固相核酸提取试剂盒品牌有QIAGEN、THERMO、PROMEGA等,可以直接将裂解的样品匀浆液通过固相萃取柱。在缓冲液高pH和高盐条件下,萃取柱上的硅胶膜会特异性吸附核酸^[7]。而蛋白质等其他物质也可能与膜表面有很强的特异性结合,通过使用含有竞争剂的缓冲液洗涤硅胶膜,去除蛋白质及其他物质。通过乙醇洗涤后,使用洗脱缓冲液洗脱,获得纯化后的DNA溶液,通常使用离心机快速洗涤和纯化。

2.2 磁珠筛选提取

磁珠筛选法:采用具有独特分离作用的磁珠和独特的缓冲液系统,从动物组织等样品中分离纯化高质量基因组DNA。使用一些大比表面积的无磁性材料包裹可被磁化的核心材料,大比表面积的材料更适合与核酸结合,如不同的合成聚合物、生物聚合物、多孔玻璃;同时磁性材料作为分离过程的载体。独特包埋的磁珠在一定条件下对核酸具有很强的亲和力,而当条件改变时,磁珠释放吸附的核酸,能够达到快速分离纯化核酸的目的。通常与高通量自动工作站配合使用可以提高DNA产率、纯度和一致性,同时样品之间可以避免交叉污染。整个提取过程从开始到结束大约需要60 min,因为只需要3个简单的步骤:(1)将液体样品添加到试剂盒中;(2)将试剂盒放入机器中;(3)按下启动按钮。自动化仪器运行结束后即可获得高质量高浓度的DNA的缓冲盐溶液^[8]。

3 提取液的检测结果

紫外分光光度计检测固相核酸提取法和磁珠筛选提取法提取的不同动物组织基因组DNA的浓度和质量,对比260 nm处吸光度值(A_{260})/1 mm、 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 3个参数。 A_{260} 是核酸最高吸收峰的吸收波长, A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 是核酸纯度的指示值, A_{260}/A_{280} 代表蛋白或者酚类物质对纯度影响,一般在1.7~2.0即可满足后续qPCR试验要求, A_{260}/A_{230} 代表多肽、芳香基团、苯酚和一些碳氢化合物的影响,较纯净的核酸 A_{260}/A_{230} 大于2.0。针对2种提取方法的提取参数及不同动物组织的特点,使用固相核酸提取法与磁珠筛选提取法互相配合提取动物不同组织的DNA。

在干细胞临床前研究中,将同一实验组的大鼠安乐死后采集抗凝全血、心脏、肝脏、肺脏、脾脏、肾脏、脑、骨髓、脂肪、肌肉、性腺、胃和肠组织,分别使用2种提取方式提取相同质量的动物样品基因组DNA,对比DNA样品参数。部分DNA提取数据如表1、2所示。

表1 磁珠筛选提取法($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Magnetic bead screening and extraction method ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组织	$A_{260}/1\text{ mm}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
肌肉	0.330±0.025	1.913±0.008	1.736±0.058
胃	1.343±0.552	1.873±0.020	1.733±0.239
肠	0.867±0.208	1.800±0.033	1.765±0.161
脂肪	0.404±0.085	1.828±0.025	0.801±0.097
心	1.029±0.129	1.856±0.016	1.813±0.052
肺	1.218±0.119	1.820±0.006	1.717±0.102
脑	0.918±0.150	1.909±0.016	1.737±0.091
肾	1.307±0.153	1.863±0.005	1.741±0.028
脾	1.890±0.251	1.825±0.012	1.439±0.047
肝	1.811±0.234	1.917±0.006	1.714±0.121
骨髓	2.045±0.509	1.784±0.011	1.155±0.301
性腺	1.214±0.232	1.852±0.021	1.734±0.052
血	0.321±0.124	1.878±0.092	1.865±0.376

表2 固相核酸提取法($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Solid phase nucleic acid extraction ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组织	$A_{260}/1\text{ mm}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
肌肉	0.339±0.067	1.974±0.008	2.493±0.040
胃	1.368±0.229	1.950±0.010	2.366±0.026
肠	1.291±0.208	1.997±0.018	2.386±0.026
脂肪	0.619±0.120	1.976±0.016	2.369±0.029
心	0.365±0.114	1.970±0.025	2.521±0.103
肺	1.371±0.163	1.887±0.010	2.383±0.016
脑	0.431±0.076	1.986±0.011	2.470±0.043
肾	1.089±0.224	1.962±0.021	2.372±0.026
脾	0.757±0.163	1.861±0.014	2.395±0.037
肝	1.119±0.277	1.950±0.022	2.078±0.260
骨髓	1.010±0.117	1.826±0.009	2.403±0.014
性腺	1.301±0.134	1.934±0.009	2.394±0.008
血	0.457±0.300	1.890±0.088	1.760±0.437

同样条件下,骨髓、脾和脂肪在磁珠筛选提取法中DNA提取液的纯度很低,而在固相核酸提取法中DNA提取液的纯度很高。结合表1和表2的 $A_{260}/1\text{ mm}$ 、 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 参数,在磁珠筛选提取法中提取质量不足的组织种类可以使用固相核酸提取法替代,同时磁珠筛选提取法可以提供高效高通量的提取模式,这样就可以解决干细胞药物临床前研究中提取样本种类复杂,数量大的现实问题。

4 讨论

1869年Friedrich Miescher首次成功提取了DNA,自1958年Meselson和Stahl利用密度梯度离心法首次提取DNA以来,生物分子纯化技术已经有

了长足的发展。目前针对提取种类繁多的动物组织样品,特别是大量的临床前动物样品,通过固相萃取和磁珠法提取不同种类的样品,可以快速处理产生的大量生物样品,提高检测效率。

磁珠筛选法的优点是可以选用高通量自动核酸提取工作站,可以显著提升提取效率同时稳定的提供高质量和高浓度的基因组DNA。对于一些特殊的动物组织的提取,磁珠法提取的DNA质量并不能满足qPCR的要求。对于骨髓、脾脏和脂肪组织DNA的提取可以使用离心柱固相萃取,因为这些组织含有会吸附在磁珠上的杂质,严重影响洗涤试剂的洗涤效果。对不同的组织,选择合适的提取方式提取,才能获得高质量高浓度的DNA提取液。

为了在干细胞药物临床前研究中高效获取高质量的基因组DNA提取液,本课题组建立了一种切实可行的方案:利用生物样品制备仪制备稳定均一的组织裂解液,利用高通量自动化DNA提取纯化仪器获得高质量高浓度的动物样品DNA,同时配合使用固相核酸提取法处理部分动物样品。

参考文献

- [1] Gong M, Yu B, Wang J, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (28): 45200-45212.
- [2] Toupet K, Maumus M, Peyrafitte J A, et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(7): 1786-1794.
- [3] 韩立,惠利健,潘国宇.细胞的命运:间充质干细胞的药代动力学[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 6: 857-866.
- [4] Michael W. *An Introduction to Molecular Biotechnology: Molecular Fundamentals, Methods and Applications in Modern Biotechnology* [M]. Hoboken: Wiley, 2011.
- [5] Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA [J]. *Dev Biol*, 2005, 278(2):274-288.
- [6] Seabolt, John P. A Review of molecular diagnostics: fundamentals, methods, & clinical applications [J]. *ASCLS*, 2008, 21(3): 184.
- [7] Gjerde D T, Hoang L, Hornb D, et al. *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography* [M]. Hoboken: Wiley, 2009.
- [8] Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, 73(3): 495-504.