

石蜡切片（FFPE）DNA 和 RNA 提纯的关键问题解答及操作技巧

当今广泛存档的福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）组织切片是珍贵有价值的生物医学研究材料。越来越多的研究人员对 FFPE 样品的进行分子生物基因分析来探讨各种疾病与分子表达及遗传关系。怎样从石蜡切片中提纯高质量和高产量的 DNA 和 RNA，是能有效进行各种基因分子分析的关键，下面是我们从多年的对石蜡切片处理的经验及心得介绍。

RNA 的长度 (FFPE RNA Size Distribution)

一般来讲, 从 FFPE 组织提纯 RNA 都是断裂的（片段化）. 长度范围是 50 bases 到 5000 bases. 从一个保存较好的 FFPE 石蜡组织提纯的 RNA, 大多数的 RNA 的长度是分布在 400 bases 到 1500 bases 之间. 如果从比较老的石蜡组织提纯 RNA, 短片段的 RNA 的就会更多, 大部分的 RNA 的长度是在 100 bases 到 300 bases 长. 这是因为, 组织在固定前的处理, 以及组织固定, 组织包埋, 石蜡组织的储藏不当, 都会照成 RNA 分子的片段化(fragmentation). 如果有及时固定前的组织处理, 以及适当的组织固定, 包埋和储藏. RNA 的长度会超过 5000 bases.

RNA 的完整性 (FFPE RNA Integrity)

实验人员对于 RNA 的完整性, 常常是用 Agilent 2100 Bioanalyzer 来检测 RNA Integrity Number (RIN)值. 总的来讲, FFPE 的 RNA 的质量是非常差的, 其 RIN 是远达不到 10 的. 从多类 FFPE 样本的 RNA 检测结果看, 大多 RIN 值是在 1 – 6 之间.

影响 FFPE RNA 的产量和质量 的因数(The factors affecting FFPE RNA yield and quality)

石蜡组织切片的 RNA 的产量和质量, 是由组织切片的组织类型, 组织样品的质量和组织量的多少来决定的. 而在进行组织样品的保存过程中的每一个步骤, 都会对其组织样品的质量造成影响. 具体因数包括有: 1. 组织取样方法和步骤, 可根据不同的组织类型, 其特定的生理功能, 尽快进行切取收集 2. 从取样后到将组织样品放入固定保存液的的间隔时间, 这个组织固定前的操作时间应当越短越好 3 在固定保存液的固定时间, 我们发现这个时间非常重要, 在组织块小于 0.5 cm 厚的时候, 固定时间 6 到 12 小时就即可, 一般是固定时间越短, 得到的 RNA 可扩增片段越长. 使用 5 : 1 到 10 : 1 (固定保存液体积: 组织块的体积) 中性的福尔马林缓冲溶液 进行固定 4. 包埋过程, 5. 石蜡组织块的储藏环境. 建议在 4° C 下保存。 以上是 5 种 常见影响提纯的 RNA 的质量和产量的因数.

如要了解更详细的关于更好地保存石蜡组织核酸的信息, 请查阅以下文章:

1. Chung J.Y. et al. (2008), J. of Histochemistry & Cytochemistry. 56 (11), 1033 – 1042.
2. Leyland-Jones B.R. et al. (2008), J. Clin. Oncol. 26 (34), 5638 – 5644.
3. van Maldegem F. et al. (2008), Diagn Mol Pathol. 17 (1), 51-58.
4. Castiglione F. et al. (2007), Appl Immunohistochem Mol Morphol. 15 (3), 338 – 342.

怎么估计石蜡切片的重量 (How to estimate the weight of a paraffin section)

对于石蜡切片, 一个 10 μm 厚的切片, 在面积是 1 cm X 1 cm 的大小情况下, 其重量大约是 1mg. 当然, 各种组织的密度不一样, 同样大小的石蜡切片组织的确切重量可能有些不同.

FFPE RNA 为什么要进行 DNase 的消化处理? 两种常用方法的优缺点?

提纯的 RNA 内常常含有 gDNA. 而这些 DNA 会影响下游的 RNA 的实验. 要确切可靠定量检测 RNA 的表达 (RNA expression), 完全干净的去掉污染的 DNA 是必须的! 那就是要用 DNase 的消化 (DNase Digestion). 现在, 主要有 2 种方法进行 DNase 的消化:

(1) 小柱膜上 DNase 的消化 (DNase on-column digestion)

这种方法是在用硅膜小柱提纯 FFPE RNA 过程中, 将 DNase 酶直接加在提纯小柱的硅膜上, 降解污染的 DNA. 这个方法的优点是因为整个 DNase 的消化过程是和 RNA 提纯的过程是整和在一起, 所以方法简单, 提纯的 RNA 中没有残留的 DNase 酶和盐分. 但缺点是: DNase 酶在小柱硅膜上消化 DNA, 效果没有在溶液中好, 常常还有很多残留的没有消化的 DNA.

(2) 溶液 DNase 的消化 (DNase Digestion in solution)

这种方法是传统的 DNase 酶消化方法. 就是在 RNA 提纯后, 将 DNase 酶和辅助的缓冲液加进 RNA 样品中, 进行 DNA 的消化降解. 这个方法的优点是, DNA 的降解过程有效彻底, 几乎没有残留的 DNA. 比小柱膜上 DNase 的消化效果好多了! 缺点是, 提纯的 RNA 中混有了灭活的 DNase 酶和缓冲液. 一般来讲, 这些 DNase 反应的残留物质 (主要是灭活的 DNase 酶), 不会影响下游的实验, 如 RT, RT-qPCR. 所以, 在灭活了 DNase 酶后, 不需要再纯化, 即可进行下游的 RT 实验. 如果需要, 可将 DNase 消化过的 RNA 溶液再进行一次提纯, 去掉 DNase 反应的残留物质.

但有一点应特别注意, 在应用 DNase 处理 FFPE RNA 样品时, 市场上有很多不同纯度的 DNase 酶, 一定要用 RNase-free 的 DNase 酶, 因为在市场上的 DNase 有很多不同的质量, 有很多的厂家的 DNase 酶含有 RNase 的污染.

武汉昌美生物独创的小管法结合小柱法提纯石蜡 RNA, 克服小柱法的还有很多残留的没有消化的 DNA 的缺点, 完全充分的去取残留的 DNA, 并且可以将整个 DNase 的消化过程是和 RNA 提纯的过程是整和在一起, 方法简单, 提纯的 RNA 中没有残留的 DNase 酶和盐分, 使提纯的 RNA 更纯, 产量更高.

怎么判断提纯的 DNA 和 RNA 的质量

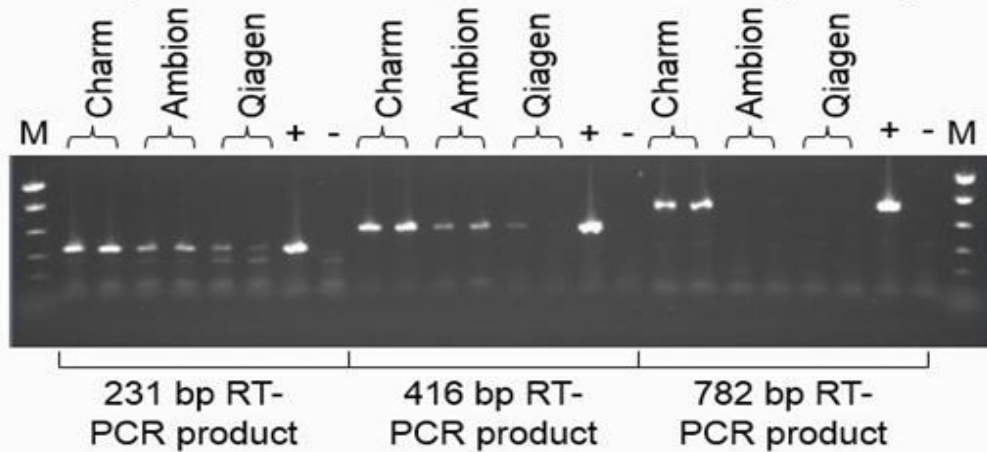
由于在福尔马林的固定和石蜡包埋过程中, 可以造成严重的核酸片段化, 核酸碱基的羟甲基的修饰, 以及 RNA-RNA, RNA-DNA, 以及 RNA/DNA-蛋白质的交联, 这些都会影响提纯的核酸的在下游应用结果. 特别是核酸分子的修饰和交联的结构变化, 影响 DNA 聚合酶和 RNA 转录酶对核酸的认识和结合, 使提纯的核酸不能成为真正能扩增的模板, 如仅仅只用常规的 OD 和电泳方法来判断提纯的核酸的质量, 是很难真正全面判断提纯的核酸质量好坏的. 我们推荐, 第一, 先用常规方法, 检测 OD 值, 得到提纯核酸的产量和 OD260/OD280 值, OD260/OD280 的值可以在 1.6 到 2.0 之间. 第二, 进行电泳或者 Agilent Bioanalyzer 实验, 观察降解的核酸片断的大小分布, 大部分提纯的核酸片段是在 50 到 5000 bases 之间. 第三, 根据 OD 值, 用同等量的核酸作为模板, 进行 qPCR 或者 qRT-PCR 实验, 检测提纯核酸的 Ct 值, Ct 值越小, 证明在同等量的核酸中, 可作为模板的 DNA 或者 RNA 分子越多, 具有正常核酸结够的分子越多, 提纯的核酸质量越高. 武汉昌美生物开发的独特石蜡核酸提纯试剂盒, 能有效逆转核酸的羟甲基的修饰, 去取核酸分子的各种交联, 使核酸恢复本身正常分子结够. 能使提纯的核酸被 DNA 聚合酶和 RNA 转录酶认识 and 结合, 使提纯的核酸成为可扩增的真正模板. (请见下表); 第四, 设计不同大小 PCR 片段的引物, 如 200 bp, 400bp, 600 bp 和 800 bp, 用提纯的核酸作为模板, 用这些不同引物分别

做 PCR，一般可以得到 200 bp 和 400 bp 长度的 PCR 产物，如果能得到 600 bp 和 800 bp 长度的 PCR 产物，提示所获得的核酸质量高！（请见下图）；

Ct value comparison of qRT-PCR from the same mouse liver RNA samples isolated from FFPE tissues and frozen tissues		
RNA Template Used	M-MLV RT-qPCR	SuperScript III RT-qPCR
Ambion's RNA	40.86 (\pm 3.24)	37.54 (\pm 0.69)
Charm Biotech's RNA	34.13 (\pm 0.26)	33.57 (\pm 0.44)
Qiagen's RNA	36.43 (\pm 0.81)	35.49 (\pm 0.46)
RNA From Frozen Tissue	25.46 (\pm 0.12)	24.94.46 (\pm 0.19)

Note: The same mouse liver was used to prepare for FFPE sample and frozen sample. RNA samples were isolated from the FFPE samples with indicated methods Six replicates from each method were used for qRT-PCR.

Gel Analysis of Mouse PKC-1 RT-PCR Product
(RT-PCR comparison of RNAs from FFPE tissues using three protocols)



* The RNA isolated from Charm Biotech protocol has longer transcribed RNA molecules than the RNA from Ambion and Qiagen's protocol.