

福尔马林保存鱼类标本中大片段DNA的提取

夏颖哲¹ 张春光² 陈宜瑜³ 盛 岩⁴ 孙悦华²

(1. 北京师范大学,北京 100875; 2. 中国科学院动物研究所,北京 100080;
3. 中国科学院,北京 100864; 4. 中国人民大学,北京 100082)

摘要:从福尔马林保存的鱼类标本中获得高质量DNA是比较困难的。我们对前人的方法进行了如下改进:1)在标本的前处理过程中,通过长时间的缓冲液浸泡、短暂的加温、真空干燥来消除福尔马林对样品的影响;2)在样品消化过程中,加入相对过量的蛋白酶K和还原剂;3)提取DNA后立即进行PCR反应,并增加反应的循环次数和提高退火温度。通过这些改进,我们成功地从福尔马林保存的鱼类标本中提取出了高质量DNA;通过对比不同方法(福尔马林、酒精及冰冻)处理过的标本的DNA测序结果,表明该方法是值得信赖的;标本从死亡到用福尔马林处理之间的时间延搁可能是影响所提取的DNA质量的重要因素。

关键词:福尔马林;DNA;固定标本

中图分类号:Q-31 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)04-0485-07

福尔马林既是一种防腐剂,又对很多生物标本的形态有良好的保持作用,因此被广泛应用于鱼类标本的保存。目前,许多生物物种处于被保护甚至濒危的状态,为了减少对野生动物种群的人为干扰,同时又能获得丰富的遗传信息,如何从馆藏标本中获得需要的遗传信息日益受到人们的关注。在生物进化、系统发育、濒危物种保护、种群遗传学等多种学科的研究中,从福尔马林保存标本中成功提取大片段DNA进行分析有着越来越重要的意义^[1-3]。但是,从福尔马林保存标本中提取的DNA质量可能会受到多种因素的影响。福尔马林导致的DNA与蛋白质之间、蛋白质与蛋白质之间、DNA与DNA之间的交联,福尔马林保存标本的保存时间和温度,保存样本的大小和部位等都可能导致提取的标本DNA质量下降,进而使PCR扩增产物的生成及后续的生物学分析变得相当困难^[4,5]。但也有研究者认为,福尔马林保存标本中含有的核酸数量实际上要明显多于酒精保存的标本^[6]。原位杂交实验表明核酸并没有由于福尔马林的影响而消解,只是变得难以提取^[7]。为了使标本DNA的质量达到PCR成功扩增的要求,许多研究者试图完善和优化从福尔马林保存标本中提取DNA的方法^[8-12]。

本文介绍了一种可以从福尔马林保存的鱼类标本中提取大分子DNA片段并成功用于PCR扩增的方法。为了检验这种方法的可行性和可信性,我们使用了多条引物对提取的DNA进行PCR扩增,并且把福尔马林保存标本的PCR扩增产物同新鲜冰冻标本和酒精保存标本的PCR扩增产物的序列进行了对比。最后,我们还探讨了福尔马林处理标本延搁时间对保存标本DNA提取质量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验材料来源于中国科学院动物研究所标本馆的鱼类标本(室温,5%福尔马林水稀释液保存)。对照组标本的保存条件分别为95%酒精和-70℃冰冻(见表1)。

1.2 样品DNA的提取 具体的实验步骤如下:

(1)用消毒镊子或剪子从固定标本上取下2g左右的背部肌肉组织;(2)将组织浸入10mL的1×GTE(100mmol/L氨基乙酸;10mmol/LTris,pH8.0;1mmol/LEDTA)缓冲液中,用来置换出组织中的福尔马林液^[7]。每隔24h换GTE缓冲液一次,浸泡72h;(3)用消毒剪刀将样品剪成小碎块,将剪碎的

收稿日期:2005-06-15;修订日期:2006-12-14

基金项目:国家基础科学人才培养基金(NSFC-J0030092);中国科学院院长基金(A2901046)资助

作者简介:夏颖哲(1975—),男,吉林四平人;博士后;研究方向为系统生物学。Tel:010-68334530, E-mail: xiayz@gefcchina.org.cn

通讯作者:盛岩,女,吉林四平人;博士后;主要从事生态学和系统学的研究。Tel:010-62595731, E-mail: shengyan@yuc.edu.cn

表 1 实验材料标号、种名、标本保存部位和尺寸、采集时间、处理方式及时间

Tab. 1 Fish species numbers, name, storage part and size, storage time and the treatments

材料标号 ^a Number ^a	种名 Species	样本保存部位 Part	标本保存尺寸 Size (cm)	采集时间 Collection time	处理方式 Treatment	处理时间 Treatment time
1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	背部肌肉	4 × 2 × 1 ^b	2001	5% 福尔马林	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	95% 酒精	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	-70 冰冻	4 个月
2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	背部肌肉	同上	2001	5% 福尔马林	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	95% 酒精	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	-70 冰冻	4 个月
3	<i>Oncorhynchus keta</i>	背部肌肉	同上	2001	5% 福尔马林	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	95% 酒精	4 个月
		背部肌肉	同上	2001	-70 冰冻	4 个月
4	<i>Hucho taimen</i>	整体保存	28 ^c	1978	5% 福尔马林	24 年
5	<i>Brachymystax lenok</i>	整体保存	22	1952	5% 福尔马林	50 年
6	<i>Brachymystax lenok</i>	整体保存	20 ^c	2002	95% 酒精	4 个月
7	<i>Thymallus arcticus</i>	整体保存	15 ^c	2002	95% 酒精	4 个月
8	<i>Thymallus arcticus</i>	整体保存	28 ^c	1957	5% 福尔马林	44 年

注:^a样品 1、2、3 分别放置不同的延搁时间(0.1, 1, 3, 6, 10, 22, 26, 29, 45, 51h), 然后分别在 5% 福尔马林、95% 酒精和 -70℃ 冰冻条件下保存 4 个月, 用于对福尔马林浸泡标本 DNA 的序列可信性进行检验; ^b为体积; ^c为体长

Notes: ^a Fish species No. 1, 2, and 3 were deposited at different pre-fixation time (0.1, 1, 3, 6, 10, 22, 26, 29, 45, 51 hours), and then were kept for four months in 5% formalin, 95% ethanol, and frozen at -70℃, respectively. These species are used to examine the credibility of the DNA sequences extracted from formalin fixed samples; ^b volume; ^c length of the whole body

组织块放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 700 μL 70% 酒精, 然后将离心管放置在摇床振荡(80 r/min)24h(在第 12h 更换酒精一次); (4) 在 3000r/min 下离心 2min, 倒掉上清液后加入 700 μL 100% 酒精, 摆床振荡(80 r/min)24h(在第 12h 更换酒精一次); (5) 在 3000r/min 下离心 2min, 倒掉上清液后加入 700 μL GTE 缓冲液, 摆床振荡(80r/min)24h(在第 12h 更换酒精一次); (6) 在 3000r/min 下离心 2min, 倒掉上清液后在真空机中干燥 20min^[13]; (7) 加入 500 μL GTE 缓冲液后, 95℃ 左右水浴中加热 15min, 然后在室温下冷却 5min^[14]; (8) 在 3000r/min 下离心 2min, 倒掉上清液后加入 100 μL 蛋白酶 K (50 mg/mL), 50 μL 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 50 μL 1mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)。在 60℃ 下消化 24h, 期间手动摇匀消化液几次^[15, 16]; (9) 再加入 100 μL 蛋白酶 K (50 mg/mL) 和 20 μL 1mmol/L DTT。然后在 60℃ 下再消化 24h, 期间混匀消化液几次。如果组织在 48h 后仍未完全消化, 加入 25 μL 蛋白酶 K (50 mg/mL) 继续消化 24h; (10) 当所有组织消化后, 冷却样品至室温, 然后将样品放入冰中 5min; (11) 在消化液中加入

500 μL 苯酚, 振荡混匀 10min, 11000r/min 下离心 10min, 然后将上清液转移到另一个 1.5 mL 离心管中, 重复此步骤 2—3 次; (12) 加入 2.5 倍体积无水乙醇和 0.5 倍体积 1mol/L NH₄Ac, 轻轻振荡混匀, 在 -20℃ 下沉淀 24h; (13) 6000r/min 下离心 10min 后, 倒掉上清液; (14) 用 50 μL 70% 酒精清洗, 在真空离心机中干燥 20min; (15) 加入 40 μL TE 缓冲液 (500 mmol/L Tris; 200 mmol/L EDTA; 10 mmol/L NaCl, pH 8.0) 溶解 DNA。

1.3 提取 DNA 的质量的检验 选用一对线粒体 DNA 细胞色素 b 通用引物 L14724 和 H15149、一对自行设计的线粒体 DNA 细胞色素 b 引物 S2U 和 S2D, 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增检验(表 2)。PCR 反应体系为 50 μL, 包括 10 × Taq 缓冲液 5.0 μL, dNTPs (2.5 μmol/L) 4.0 μL, 引物各 (25 μmol/L) 3.0 μL, Taq 酶 2.5 个单位, 模板 DNA 3—4 μL。反应过程为 94℃ 下 5min; 94℃ 下 30s, 复性 30s(温度见表 2), 72℃ 下 1min, 共 40 个循环; 72℃ 下 30min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 纯化和测序工作由上海生工公司完成。

表2 用于分析的引物序列及退火温度

Tab. 2 Primers for DNA amplification and their annealing temperature

引物	引物序列	退火温度
Primer	Sequence	Annealing temperature
S2U	5' AACCAACCGITGTATTCA3'	56
S2D	5' GCTCATTGGAGGCCTTA3'	
L14724	5' GATATGAAAAACCATCGTG3'	54
H15149	5' CTCAGAATGATAATTGICCTCA3'	

1.4 延搁时间对DNA质量影响的检验 标本处理的延搁时间是指从样品死亡到用福尔马林浸泡保存前的时间。我们首先将新鲜样本(标本1—3)分别放置不同的延搁时间(0.1, 1, 3, 6, 10, 22, 26, 29, 45, 51h);然后,把样品分别保存在5%福尔马林、95%酒精和-70℃冰冻4个月;为了检验延搁时间和提取DNA质量的关系,用分光光度计测量DNA的OD值,并通过SPSS统计分析软件对OD₂₆₀/OD₂₈₀比值与延搁时间进行回归分析。

2 结果

通过上述实验,我们从所有标本中成功地提取了400 bp或以上长度的DNA片段,图1表明经过不同处理的1—3号标本中提取的DNA片段的电泳结果。利用两对引物对所提取的DNA进行扩增,图2

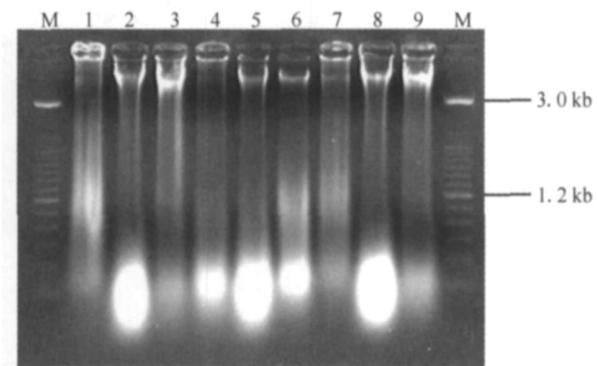


图1 不同处理标本中提取DNA的电泳图谱

Fig. 1 DNA extracted from specimens with different treatments
泳道1—3代表第1号标本在不同的保存条件下提取的DNA(福尔马林, 酒精, -70℃冰冻);泳道4—6代表第2号标本在不同的保存条件下提取的DNA(福尔马林, 酒精, -70℃冰冻);泳道7—9代表第3号标本在不同的保存条件下提取的DNA(福尔马林, 酒精, -70℃冰冻);M为DNA标记
Lane 1—3 respectively represented the DNA extracted from specimen 1 that separately fixed in formalin, ethanol and frozen at -70℃. Lane 4—6 respectively represented the DNA extracted from specimen 4 that separately fixed in formalin, ethanol and frozen at -70℃. Lane 7—9 respectively represented the DNA extracted from specimen 3 that separately fixed in formalin, ethanol and frozen at -70℃

列举了部分扩增结果,值得注意的是,我们从用福尔马林保存50年的标本(5号样本)的DNA中扩增出了1000 bp左右的片段。

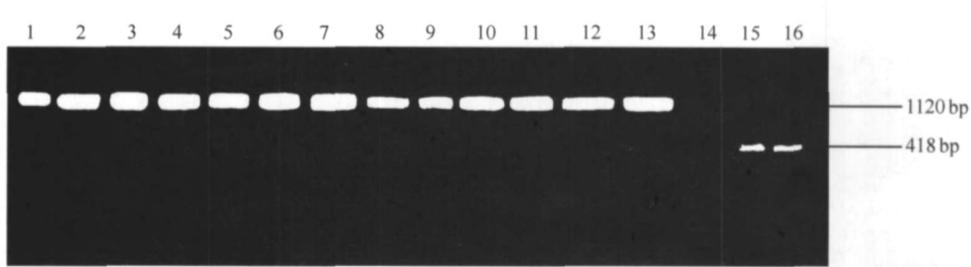


图2 对不同处理标本中提取的DNA进行PCR扩增的结果

Fig. 2 PCR products amplified from genomic DNA extracted from samples with different treatments

泳道1—14用引物S2进行扩增,泳道15—16用引物L14724和H15149进行扩增。泳道1—3分布代表标本1经三种不同保存方式(福尔马林, 酒精, -70℃)的PCR产物;泳道4—6分别代表标本2经过三种不同保存方式的PCR产物;泳道7—9分别代表标本3经过三种不同保存方式的PCR产物;泳道10—12分别代表标本4—6的PCR产物;泳道13和15代表标本7的PCR产物;泳道14和16代表标本8的PCR结果

Lane 1—14 represented the PCR products using primer S2, whereas lane 15—16 represented the PCR products using primer L14724 and H15149. Lane 1—3 respectively represented the PCR products of specimen 1 that separately stored in frozen at -70℃, ethanol and formalin. Lane 4—6 respectively represented the PCR products of specimen 2 that separately stored in frozen at -70℃, ethanol and formalin. Lane 7—9 respectively represented the PCR products of specimen 3 that separately stored in frozen at -70℃, ethanol and formalin. Lane 10—12 respectively represented the PCR products of specimen 4—6 that separately stored in frozen at -70℃, ethanol and formalin. Lane 13 and lane 15 represented the PCR products of specimen 7. Lane 14 and lane 16 represented the PCR products of specimen 8

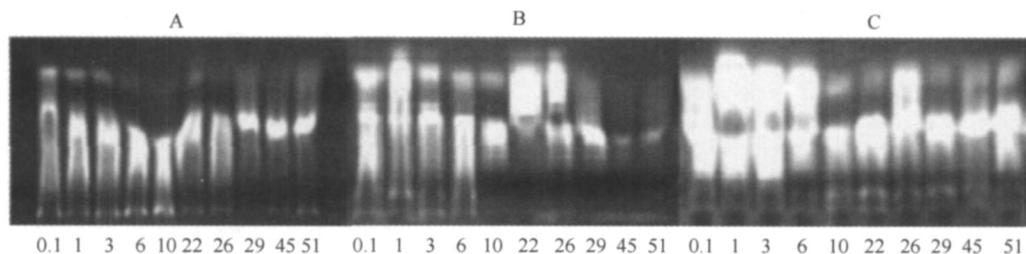


图 3 不同的固定延搁时间下(0.1, 1, 3, 6, 10, 22, 26, 29, 45, 51h)从标本 1 提取的 DNA 的电泳图谱

Fig. 3 DNA extracted from specimen 1 at different pre-fixation time (0.1, 1, 3, 6, 10, 22, 26, 29, 45, 51 hours)

A、B、C 分别代表经福尔马林、酒精和冰冻处理的标本

A represented DNA extracted from formalin fixed samples; B represented DNA extracted from ethanol fixed samples; C represented DNA extracted from fresh frozen samples

图 3 表明了不同的延搁时间对同一标本经过 3 种处理后提取的 DNA 质量的影响, 从图 3 可以看出, 随着延搁时间的增加, 3 种处理方法的 DNA 大分子片段产量均不断降低。

通过 OD_{260}/OD_{280} 比值与标本处理延搁时间的回归分析表明(表 3, 图 4), 用 3 种不同方法处理标本的 OD_{260}/OD_{280} 均随着延搁时间的增加而显著降低(R^2 在 0.4 至 0.7 之间)。

表 3 OD_{260} 与 OD_{280} 值及其比值

Tab. 3 The ration of OD_{260} to OD_{280}

处理方法 Treatment	OD	固定延搁时间 Pre-fixation time (h)									
		0.1	1	3	6	10	22	26	29	45	51
福尔马林保存 Formalin-fixed	OD_{260}	0.53	0.500	0.28	0.38	0.32	0.17	0.20	0.19	0.57	0.66
	OD_{280}	0.31	0.29	0.17	0.23	0.20	0.10	0.11	0.11	0.36	0.43
	OD_{260}/OD_{280}	1.73	1.69	1.69	1.66	1.62	1.70	1.68	1.64	1.59	1.53
酒精保存 Ethanol-fixed	OD_{260}	0.48	0.50	0.22	0.36	0.19	0.59	0.28	0.49	0.71	0.64
	OD_{280}	0.27	0.29	0.14	0.22	0.19	0.38	0.17	0.31	0.49	0.44
	OD_{260}/OD_{280}	1.75	1.76	1.60	1.62	1.58	1.58	1.65	1.59	1.46	1.48
- 70 冰冻 Frozen at - 70	OD_{260}	0.71	0.29	0.29	0.67	0.81	0.21	0.47	0.57	0.55	0.77
	OD_{280}	0.40	0.16	0.16	0.42	0.51	0.12	0.28	0.35	0.35	0.47
	OD_{260}/OD_{280}	1.80	1.84	1.78	1.62	1.59	1.68	1.67	1.63	1.59	1.64
处理方法 Treatment		回归方程式 Regression equation						R^2		p	
福尔马林保存		$y = -0.0212\ln(x) + 1.6956$						0.4816		< 0.05	
酒精保存		$y = -0.04111\ln(x) + 1.6892$						0.6852		< 0.05	
- 70 冰冻		$y = -0.0362\ln(x) + 1.7566$						0.6156		< 0.05	

3 讨 论

3.1 DNA 提取和扩增方法的可行性和可信性

福尔马林对 DNA 分子可能有 4 种化学修饰作用: 1) 核酸甲基化作用, 2) 由于甲基化作用而形成的交联, 3) 诱导形成嘌呤的二聚体, 4) 导致核酸中的磷酸二脂键断裂^[17-19]。一般从福尔马林保存的标本中提取 DNA 的基本步骤包括材料的准备、前处理、蛋白质消化、酚氯仿抽提和酒精沉淀。在提取过程

中由于福尔马林对蛋白质水解酶的抑制作用, 以及福尔马林诱导的蛋白交联本身固有的耐火性, 蛋白消化的效果被大大降低。大部分 DNA 在酚氯仿抽提过程中随着蛋白质一同丢失了, 从而使提取的 DNA 含量显著降低。因此, 如何避免或降低福尔马林对标本的影响是标本 DNA 成功提取和扩增的关键。

从中性福尔马林缓冲液保存标本中提取的 DNA 质量要优于没有缓冲液的标本^[20]。为了置换

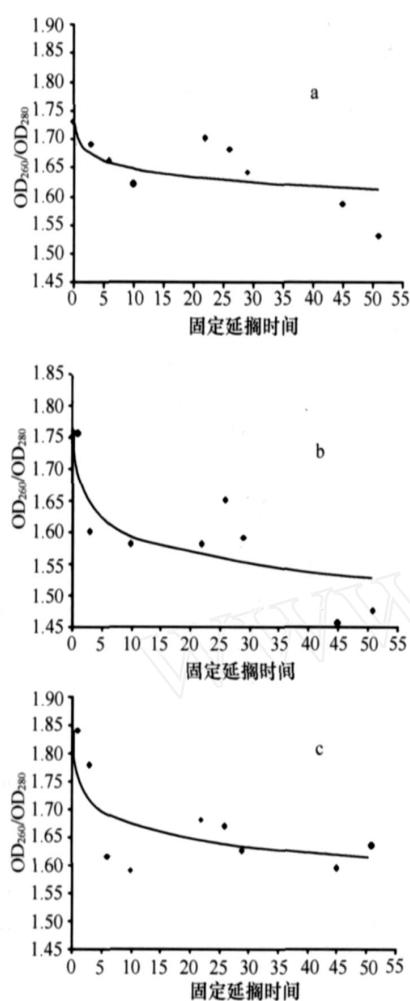


图 4 不同处理方式下 DNA 的 OD 比值与固定延搁时间之间的回归关系

Fig. 4 Regression of the ratio value of OD₂₆₀ to OD₂₈₀ against pre-fixation time

a 代表福尔马林保存的样本;b 代表酒精保存的样本;c 代表保 -70℃ 下的样本

a represented DNA extracted from formalin fixed samples; b represented DNA extracted from ethanol fixed samples; c represented DNA extracted from fresh frozen samples

出标本中的福尔马林,在消化之前,我们用缓冲液长时间地浸泡标本,并且将标本放置在真空管中干燥以促进福尔马林的置换和挥发;对标本进行适度加热(95℃左右)会促使某些交联松解^[14],从而提高蛋白酶K的消化效果;在一定范围内,蛋白酶K加入量与DNA的产量成正比,加入过量的蛋白酶K会增加DNA产量^[21-23],而适量加入还原剂(DTT)也有利于提高DNA产量^[16]。通过这些改进,我们成功地从绝大部分福尔马林保存标本中提取出了高质量的DNA。

有实验表明,提取结束后立即进行PCR扩增,其效果要明显优于把DNA在冰冻状态下放置一段

时间后再进行扩增反应。这可能是由于反复的冻融过程会导致DNA链的断裂^[24]。为了达到理想的扩增效果,我们对反应过程进行了调整:反应过程中循环次数适当地延长到35—40次,并且相应地延长每一步反应时间^[25];同时,适当地提高反应的退火温度。Sato等^[26]认为较高的退火温度会减少福尔马林保存标本DNA扩增产物中的非特异性条带的产生。

为了验证我们从福尔马林保存标本中提取和扩增的DNA的可信性,我们对同一样品的同一部位经过不同的处理后所提取的DNA,进行了PCR扩增产物的测序和序列对比。结果表明,同一标本经过3种方式处理后的DNA扩增产物序列是一致的,说明我们的提取和扩增方法是值得信赖的。

3.2 样品处理的延搁时间对DNA提取结果的影响

虽然在我们的实验中大部分福尔马林保存标本的DNA都能进行成功扩增,但在第8号福尔马林标本(保存44年)的模板DNA中,我们不能扩增出大片段的PCR产物(见图1L14)。造成扩增失败的原因可能有以下两个方面:一是标本的保存年限,另一个是处理标本的延搁时间^[27]。标本保存年限会影响DNA扩增的成功率,但如果福尔马林保存的标本状态很好,保存时间长短对标本DNA的影响不特别显著^[28],我们从第5号福尔马林保存标本(保存时间为50年)中扩增出1000 bp的PCR产物就很好地证明了这一点。根据我们的实验结果,我们认为处理标本的延搁时间对提取DNA的质量和后续的PCR扩增可能起了相当重要的作用。同时,在相同的延搁时间内从福尔马林和酒精固定的标本中提取的DNA大分子含量均少于冰冻保存样品,反映出保存液内保存标本的DNA含量相对冰冻样品会有不同程度的损耗^[29]。

OD₂₆₀/OD₂₈₀值可以反映出DNA的降解程度^[23]。我们的实验结果表明,处理延搁时间对于不同处理条件下标本的DNA产量和质量均有显著影响。通过OD₂₆₀/OD₂₈₀值和处理延搁时间的回归曲线,我们认为当标本的处理延搁时间在6h以内时,从标本中提取的DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值呈迅速下降趋势,也就是说标本中DNA的降解程度也随之加速;而处理延搁时间在6h以上时,标本中DNA的降解程度趋缓,直至完全降解。我们还注意到,处理延搁时间在22—26h之间时,样品DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值有小幅上升,这种现象可能与DNA自身水解(特别是DNA水解酶活性的变化)和核酸链的断裂有一定关系^[37]。所以我们建议,野外采集标本时采集者应争

取在活体状态下或在标本死亡后最短的时间内处理标本,这样才会获得高质量的DNA片段。

4 结 论

基于肌肉组织较其他组织含有更高质量DNA的研究结果,我们在实验材料取样时选取鱼类的肌肉组织作为提取DNA的材料。在标本的前处理过程中,长时间的缓冲液浸泡、短暂的加温、真空干燥等对于置换出标本中的残余福尔马林,以及消除DNA与蛋白之间的交联起到了关键作用。相对过量的蛋白酶K和还原剂(DTT)的加入和消化时间的延长会有利于高质量的DNA的提取。PCR反应的迅速进行、循环次数的增加和退火温度的提高保证了扩增的成功机率。总而言之,我们借鉴前人的研究结果,针对从福尔马林保存标本中提取和扩增DNA的多数步骤提出了具体的行之有效的改进办法,继而综合成一种从福尔马林保存的鱼类标本中提取和扩增DNA的可行方法。尽管这种方法包括许多复杂的步骤,实验中耗费的时间较长,但它确实能够获得理想的DNA大分子片段和可信的扩增结果。

在以往实验中,从福尔马林浸泡的标本中提取的DNA质量偏低,所以有研究者认为福尔马林会引起DNA双链的断裂,进而导致产生相对较小的片段。而应用本方法提出了相对较大的DNA片段,这说明福尔马林并不会引起DNA双链的断裂。尽管福尔马林会导致DNA与蛋白之间的交联,这种交联会使大部分的大片段DNA在抽提过程中随蛋白质一起被抛弃,造成提取的DNA浓度较低和片段较短。但这种交联反应是一个可逆的过程,当采用置换、加热和干燥等方法消除福尔马林的影响时,会使交联解开,进而得到大片段DNA。而造成DNA双链断裂的原因可能主要有两个方面:一是由于实验中DNA的反复冻融过程会导致DNA链的断裂,这个原因我们可以采用提取DNA后立即进行PCR扩增的方法来避免;二是由于保存的延搁时间过长所导致的降解。DNA的化学性质极不稳定,在活体组织中,DNA的受损可以迅速而自动修复,而机体死亡后发生的水解或氧化作用会导致DNA双链断裂,这个过程是不可逆的。所以,当我们从标本馆中筛选用于分子生物学分析的福尔马林保存的标本时,一定要考虑到固定延搁时间对DNA的影响,挑选固定效果和保存状态良好的标本作为取样材料,才可以提高实验成功的机率。

致谢:

感谢中国科学院水生生物研究所何舜平研究员、浙江大学生命科学学院方盛国教授和饶刚博士、万秋红博士对该项研究给予热情的帮助,并对相关研究过程提出宝贵意见。同时,作者对中国科学院微生物研究所王丽娟博士在实验方法上的建议表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Freifelder D, Davison P F. Physicochemical studies on the reaction between formaldehyde and DNA [J]. *J. Biophys*, 1963, **3**: 49—63
- [2] Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent [J]. *Cell*, 1978, **15**: 945—954
- [3] Yu F M, Chaw L, Crane E, et al. Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids [J]. *Biochem*, 1980, **19**: 5525—5531
- [4] Orlando V, Paro R. Mapping polycomb-repressed domains in the bithorax complex using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin [J]. *Cell*, 1993, **75**: 1187—1198
- [5] Kaufman B A, Newman S M, Hallberg R L, et al. In organello formaldehyde crosslink of protein to mtDNA: identification of bifunctional proteins [J]. *J. Proc. Natl. Acad. Sci*, 2000, **97**: 7772—7777
- [6] Sheldock A M, Haygood M G, Pietsch T W, et al. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens [J]. *Biotechniques*, 1997, **22**: 394—400
- [7] Masuda N, Kawamoto S, Monden M, et al. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**: 4436—4443
- [8] Arrighi F E, Bergendahl J, Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues [J]. *Exp. Cell Res*, 1968, **50**: 47—53
- [9] Wiegand P, Domhöver J, Brinkmann B, et al. DNA-degradation in formalinfixierten geweben [J]. *Pathologe*, 1996, **17**: 451—454
- [10] He S P, Chen Y J, Zhang Y P. Preliminary study on mitochondrial cytochrome b DNA sequences and phylogeny of formalin fixed sisid fishes [J]. *Zool. Res*, 1999, **20**: 81—87 [何舜平,陈永久,张亚平. 犀科鱼类细胞色素b基因片段的序列测定及其系统发育的初步研究. 动物学研究,1999, 20: 81—87]
- [11] Fang S G, Wan Q H, Fujihara N. Formalin removal from archival tissue by critical point drying [J]. *Biotechniques*, 2002, **33**: 604—611
- [12] Xu L X, Zhang Z B, Song M J, et al. A method of extracting genomic DNA from animal specimen preserved in formalin [J]. *Acta Zool. Sin*, 2002, **48**(2): 264—269 [徐来祥,张知彬,宋铭晶,等. 福尔马林保存的动物标本基因组DNA的提取方法. 动物学报,2002, 48(2): 264—269]
- [13] Jevon G P, Dimmick J E. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study [J]. *Pediatr. Dev. Pathol*, 1999, **2**: 11—14

- [14] Wu L , Patten N , Yamashiro C , Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues [J]. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2002, **10**: 269—274
- [15] Paboo S , Irwin D M , Wilson A C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification [J]. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**: 4718—4721
- [16] Houze T A , Gustavsson B. Sonification as a means of enhancing the detection of gene expression levels from formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies [J]. *Biotechniques*, 1996, **21**: 1074—1082
- [17] Brutlag D , Schlehuber C , Bonner J. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone [J]. *Biochem.*, 1969, **8**: 3214—3218
- [18] Chaw Y F M , Crane L E , Lange P , et al. Isolation and identification of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids [J]. *Biochem.*, 1980, **19**: 5525—5531
- [19] Douglas M P , Rogers S O. DNA damage caused by common cytological fixatives [J]. *Mutation Res.*, 1998, **401**: 77—88
- [20] Gelz S E , Hamilton S R , Vogelstein B. Purification of DNA formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, **130**: 118—126
- [21] Kösel S , Graeber M B. Use of neuropathological tissue for molecular genetic studies: parameters affecting DNA extraction and polymerase chain reaction [J]. *Acta Neuropathol.*, 1994, **88**: 19—25
- [22] Diaz-cano S J , Brady S P. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for re-
- trieval of high-quality DNA [J]. *Diagn. Mol. Pathol.*, 1997, **6**: 342—346
- [23] Savioz A , Blouin J-L , Gudi S , et al. A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years [J]. *Acta Neuropathol.*, 1997, **93**: 408—413
- [24] Crisan D , Mattson J C. Retrospective DNA analysis using fixed tissue specimens [J]. *DNA Cell Biol.*, 1993, **12**: 455—464
- [25] Wright P A , Manos M M. Sample preparation from paraffin-embedded tissues [A]. In: Innis M A , et al. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, 1990, 153—158
- [26] Sato Y S , Sugie R , Tsuchiya B , et al. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues [J]. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2001, **10**: 265—271
- [27] Coombs N J , Gough A C , Primrose J N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**: e12
- [28] Dubeau L , Chandler L A , Gralow J R , et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens [J]. *Cancer Res.*, 1986, **46**: 2964—2969
- [29] Bramwell N H , Burns B F. The effects of fixative type and fixation time on the quantity and quality of extractable DNA for hybridization studies on lymphoid tissue [J]. *Exp. Hematol.*, 1988, **16**: 730—732

DISCUSSING ON THE FEASIBILITY OF LARGE FRAGMENTS DNA EXTRACTION FROM FORMALIN-FIXED FISH SPECIMENS

XIA Ying-Zhe¹ , ZHANG Chun-Guang² , CHEN Yi-Yu³ , SHENG Yan⁴ and SUN Yue-Hua²

(1. Beijing Normal University , Beijing 100875; 2. Institute of Zoology , the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080, China ;
3. Chinese Academy of Sciences , Beijing 100864, China ; 4. Renmin University of China Beijing 100082)

Abstract : Formalin-fixed specimens were of profound importance to the study of evolution, systematic, phylogeny and genetic structure of populations. However, the PCR analysis of DNA isolated from formalin-fixed tissue could be difficult because of the inherently poor quality of template DNA available for amplification. As a consequence of fixation process, DNA was complex with proteins and is often nicked, giving relatively short fragments. Such samples were often of low DNA concentration and poor quality. Formalin-fixation had a profound effect on the molecular arrangement of nucleic acids in the tissue and resulted almost invariably in DNA degradation of various degrees. Extraction, purification and amplification of DNA from formalin-fixed tissues were influenced by a multitude of factors. In this report, we introduced a method of DNA extraction and PCR amplification of relatively large target fragments from formalin-fixed, fluid-preserved tissues. Main modifications include: long-time preservation in buffer, short-time heating, and drying in a vacuum centrifuge during pre-disposal; more proteinase K and sodium SDS during extraction; performing PCR immediately after digestion, prolonging annealing time, and increasing the number of cycles. The feasibility of this method was tested by PCR amplification. The nucleotide DNA of cloned products from formalin-fixed specimens were sequenced and the results were compared with the sequences obtained from fresh and ethanol-fixed tissue and published data. Comparison of the DNA sequence data from the formalin-fixed tissues with that from the frozen and ethanol-fixed tissues demonstrated this method is reliable. We also found that the pre-fixation time could be an important factor determining the quality of DNA.

Key words : Formalin ; DNA ; Fixed specimens