

# 人精细胞基因组 DNA 的分离提纯方法 及其含量测定

彭宪生 赵建升 王平

(四川省计划生育科研所,成都 610041)

虽然很容易从低等脊椎动物、哺乳动物的一些细胞,甚至鱼的精子中分离得到 DNA,但从哺乳动物精细胞分离 DNA 则极为困难<sup>[1,2]</sup>,直至 1988 年 Bahnak 等才提出一个有效的方法<sup>[3]</sup>,但费用既高耗时又多,需用超速离心机及贵重药品氯化铯,故无此仪器的实验室就无法引用。由于工作需要,我们建立了一个不用超速离心机的新方法,突破了精子头难破及破后 DNA 又被大量蛋白质紧密缠绕很难分离的双重困难。

## 材料和 方法

### (一) 精液样品

按 WHO 的标准方法收集人精液<sup>[4]</sup>,在 37℃ 液化后测精子密度。正常人 25 例,不育病人 30 例。

### (二) 药品及试剂

NP-40 购自 LKB,蛋白酶 K 自 E. Merck, SDS 为 Serva 进口分装,其余药品均为国产分析试剂。

1. 精子洗涤液<sup>[5]</sup> 0.15mol/L NaCl, 10mmol/L Tris 及 1mmol/L EDTA, 高压灭菌。

2. 精子裂解液 4mmol/L 盐酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠, 高压灭菌, 用前加 NP-40 达 1% 及 2-巯基乙醇达 2%。

3. -20℃ 无水乙醇。

4. 20% SDS 溶液。

5. -20℃ 70% 乙醇。

6. 蛋白酶 K, 储存液 20mg/ml。

7. 用 Tris (pH,8.0) 及 EDTA 饱和的重蒸酚。

8. 3mol/L 乙酸钠。

9. 1 × TE 缓冲液。

### (三) 方法

将已液化的精液,于 3 500rpm 离心 10 分钟分离精子与精浆,用精子洗涤液充分洗精子 3 次以上,以尽量除去含 DNAase 的精浆,将精子悬浮于同精液原体积的精子洗涤液中,加入二体积的精子裂解液于此悬浮液中,37℃ 水浴保温直至溶液清彻,加二倍体积的-20℃ 无水乙醇以沉淀 DNA (粗品),仔细混匀,-20℃ 放置 2 小时以上,倾去乙醇,以-20℃ 70% 乙醇洗沉淀,真空干燥,浸泡此沉淀于适量的 1 × TE 缓冲液中,加 20% SDS 直至终浓度为 0.5%<sup>[6]</sup>,然后加蛋白酶 K 至终浓度约为 200—400 μg/ml,充分混合,置 65℃ 水浴中至沉淀全部散开。用酚氯仿(1:1)及氯仿提取 DNA,直至水相清晰,轻轻吸出水相,加 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠及二倍体积-20℃ 无水乙醇,混合,放-20℃ 2 小时以上,仔细吸出 DNA 沉淀,并用-20℃ 70% 乙醇洗沉淀,倾去乙醇,真空干燥 DNA 后,溶于适量的 1 × TE 液中,储 4℃ 冰箱备用。并用紫外分光光度法定量。

Peng Xian sheng et al.: The Method of Isolation and Purification of Human Sperm Genomic DNA and Its Content

本文于 1991 年 5 月 29 日收到。

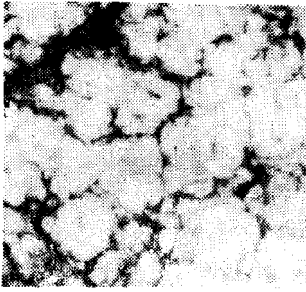


图1 人精细胞裂解后用 Feulgan 反应显示的 DNA 丝

## 结果和讨论

### (一) 分离提纯的 DNA 质量的鉴定

在精子裂解后,用 Feulgan 反应可显示 DNA 丝(图 1),所分离的人精细胞 DNA,经 0.8% 琼脂糖(含溴乙锭)凝胶电泳,在紫外灯下可见到典型的真核细胞高分子 DNA 带,位于

表 1 人精细胞 DNA 含量

含量 (pg/精细胞)	例数	测定方法	文献来源
2.2-2.6	/	/	Mann, T. & C. L. Mann <sup>[7]</sup>
1.35±0.29	/	Ceriotti 分光光度法	同上
1.1±0.53	55*	UV 分光光度法	本文

\* 正常 25 例,不明原因不育病人 30 例。

63kb(图 2)。用它进行 Southern 杂交实验时,结果是符合要求的。

### (二) 用 RNAase 除去 RNA 的问题

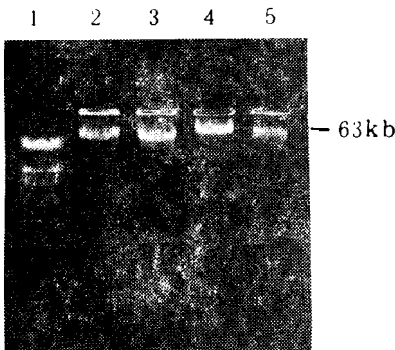


图 2 分离纯化的人精细胞基因组 DNA 电泳(含溴乙锭的 0.8% 琼脂糖凝胶板, 2V/cm, 12 小时)后显示的典型真核细胞大分子 DNA 带。1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III 标志物; 2-5. 人精细胞基因组 DNA。

文献记载“在生精过程中 RNA 逐渐消失”<sup>[6]</sup>。Abraham 等也指出成年水牛精子中 RNA 的含量最多,是总精细胞 DNA 的 0.2%<sup>[1]</sup>,在我们实验过程中也未见到存在 RNA,与文献记载符合,故我们认为不必用 RNAase 来除去 RNA。

### (三) 人精细胞 DNA 含量

关于正常人精细胞 DNA 含量,国际上发表的数据及本文数据均不相同(见表 1),可能是由于测定方法的不同所致,另外,人种,抽样等的差异也不能忽视。

文献报道 13 例少精不育者,其含量为正常人的两倍,寡育及不育男性精细胞 DNA 含量,有的比正常人高,有的比正常人低<sup>[7]</sup>,我们则未见到正常人(25 例)与不明原因不育病人(即精液常规正常的不育病人)的精细胞 DNA 含量有显著差异,故合并其数据如表 1。

### (四) 分离提纯中应强调的问题

1. 开始洗精子时,务必去尽精浆,因其中含 DNAase,为此洗涤液中必须含 EDTA,否则分离将失败。2. 我们配制的精子裂解液,优于文献介绍,所用试剂在我国既好找又便宜,经摸索用 4mmol/L 盐酸胍即可。3. 分离 DNA 与包绕它的蛋白质是最关键的环节,所用 SDS 及蛋白酶 K 的浓度等均应注意,否则分离出的 DNA 纯度将受影响。

### 参 考 文 献

- [1] Abraham, K. A. and P. M. Bhargava: 1963. *Biochem. J.*, 86: 298.
- [2] Borenfreund, E. et al.: 1961. *Nature*, 4796: 13475-77.
- [3] Bahnak, B. R. et al.: 1988. *Nucleic Acid Res.*, 16(3): 1208.
- [4] Belsey, M. A. et al.: 1980. *In: Laboratory Manual for the Examination of Human Semen-Cervical Mucus Interaction (WHO)*, Singapore pp. 9-12.
- [5] Gate Wood J. N. et al.: 1987. *Science*, 236: 885-1029.
- [6] Mann, T. and C. L. Mann: 1981. *In: Male Reproduction Function and Semen*, p. 241.
- [7] Mann, T. and C. L. Mann: 1981. *ibid.*, p. 237.
- [8] Sambrook, J. et al.: 1989. *In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. B. 16.