

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01370

盐析法快速提取口腔拭子 DNA

朱伟锋, 罗达亚, 涂 硕, 张霞丽, 揭克敏, 万福生*

南昌大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 南昌 330006

[摘要] **目的** 建立盐析法快速从口腔拭子中提取基因组 DNA 的方法。**方法** 首先以细胞裂解液和蛋白酶 K 消化口腔上皮细胞, 然后用 5 mol/L NaCl 沉淀蛋白质, 用异丙醇沉淀 DNA, 最后用 70% 乙醇洗涤得到的 DNA 并将其溶于 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中。用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 TP53 基因的 rs1042522 和 CHRNA3 基因的 rs12910984 位点进行分型。对不同基因型的样本测序验证。**结果** 单支口腔拭子提取得到的 DNA 量在 0.68~2.56 μg 之间, D_{260}/D_{280} 比值在 1.77~1.94 之间。经 PCR 扩增和酶切消化, 10 个样本的两个单核苷酸多态性都得到了清楚分型。酶切结果与测序结果吻合。**结论** 本实验所建立的盐析法可以快速、简便、经济地从口腔拭子得到高质量的基因组 DNA。

[关键词] 盐析; 口腔拭子; DNA 提取; 单核苷酸多态性

[中图分类号] Q 503 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)12-1370-05

A rapid salting out method for DNA extraction from buccal swabs

ZHU Wei-feng, LUO Da-ya, TU Shuo, ZHANG Xia-li, JIE Ke-min, WAN Fu-sheng*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

[Abstract] **Objective** To establish a rapid salting out method for extraction of genomic DNA from buccal swabs. **Methods** Buccal epithelial cells were digested with cell lysate solution and proteinase K solution. Then the proteins were removed by salting out and centrifugation and DNA was precipitated with isopropyl alcohol. Finally, the precipitations of DNA were washed with 70% ethanol and were resuspended in TE. The rs1042522 loci of TP53 gene and rs12910984 loci of CHRNA3 gene were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The samples with different genotypes were confirmed by direct sequencing analysis. **Results** The DNA yield of single buccal swab ranged from 0.68 to 2.56 μg ; the D_{260}/D_{280} value ranged from 1.77 to 1.94. After PCR amplification and enzyme digestion, two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 10 samples were clearly genotyped. The results of PCR-RFLP agreed well with the results of direct sequencing. **Conclusion** The present salting out method is rapid, simple, and economical for DNA extraction from buccal swabs. The obtained genomic DNA is of high quality.

[Key words] salting out; buccal swabs; DNA extraction; single nucleotide polymorphisms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(12):1370-1374]

口腔黏膜细胞是分子流行病学、遗传学和法医学研究中重要的 DNA 来源^[1-3], 其收集具有取样简便、安全、成本低、无创伤的优点^[1]。目前从人体口腔黏膜上皮细胞提取 DNA 的方法主要有酚-氯仿法^[1]、Chelex-100 法^[4-6]、试剂盒法^[3,7]等。酚-氯仿法提取 DNA 的操作较为繁杂, 效率不稳定, 且酚和氯仿均有挥发毒性, 长期使用严重危害人体健康^[8]。Chelex-100 法操作比较简单, 但得到的 DNA 纯度不高^[9], 黄晓晶等^[10]认为用此法提取的 DNA 保存时间不宜过长, 超过 12 个月可能会影响 PCR 的忠实性。试剂盒法得到的 DNA

质量较好, 但成本较高^[11]。盐析法是全血基因组 DNA 提取常用的方法之一, 具有快速、简便、可靠的特点^[12]。目前国内尚无盐析法提取口腔拭子 DNA 的报道。我们以志愿者提供的口腔拭子为标本, 建立了盐析法提取口腔拭子 DNA 的方法, 并用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术对得到的 DNA 的 2 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点 (TP53 基因的 rs1042522 和 CHRNA3 基因的 rs12910984) 进行了分析。

[收稿日期] 2011-05-10 **[接受日期]** 2011-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30860319), 江西省科技支撑计划 (2009BSB09502). Supported by National Natural Science Foundation of China (30860319), and Technology R & D Program of Jiangxi Province (2009BSB09502).

[作者简介] 朱伟锋, 博士生, 讲师. E-mail: zwf100@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0791-88602572, E-mail: wanfs01@163.com

1 材料和方法

1.1 样本与试剂 10 支口腔拭子由志愿者(均知情同意, 男性 5 名, 年龄 20~38 岁, 女性 5 名, 年龄 20~34 岁)提供, 温开水漱口后无菌棉签在颊黏膜轻擦 10 次, 室温下过夜干燥。另取 1 支棉签作为阴性对照。所用试剂包括: 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L EDTA, 0.4 mol/L NaCl, 1% SDS, pH 8.0), 20 mg/ml 蛋白酶 K, 5 mol/L NaCl, 异丙醇, 70% 乙醇和 TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。SinoBio 2×Taq master mix 购于上海欣百诺生物科技有限公司, λDNA/Hind III、DNA Marker I 购于天根生化科技(北京)有限公司, 限制性核酸内切酶 *Bsh*1236 I、*Alu* I 购于 Fermentas 公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 提取口腔拭子 DNA 的方法 (1)取 1.5 ml 离心管 11 个, 标记为 1~11, 将 1~10 号拭子头部剪入相应离心管, 在 11 号离心管剪入阴性对照棉签。加入细胞裂解液 400 μl, 蛋白酶 K 20 μl, 振荡, 置 65℃ 30 min, 期间振荡 2 次。(2)取出离心管, 瞬时离心, 加入 200 μl 5 mol/L NaCl, 混匀, 将离心管中液体尽量转移到新的标记好的相应离心管。(3)15 106×g 离心 5 min, 将上清转移到新的标记好的相应离心管。加入等体积异丙醇, 充分混匀, 15 106×g 离心 5 min, 弃上清。(4)沉淀加入 70% 乙醇 1 ml, 15 106×g 离心 5 min, 弃上清。(5)瞬时离心, 将离心管管底乙醇吸出, 振荡培养箱 37℃ 放置 5 min, 加入 TE 50 μl。

1.3 DNA 浓度和纯度检测 用 PUEX 紫外分光光度计检测 DNA 的紫外吸收值, 计算 DNA 的量和纯度。根据计算结果将 DNA 稀释为 10 ng/μl。

1.4 DNA 分子质量检测 4 μl DNA 与 2 μl 上样缓冲液混合, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统照相。

1.5 SNPs 检测 引物由 Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)软件设计, 上海英骏生物技术有限公司合成。rs1042522 位点上游引物: 5'-CAA TGG ATG ATT TGA TGC TG-3', 下游引物: 5'-TGG TAG GTT TTC TGG GAA GG-3', 扩增产物长度为 196 bp。rs12910984 位点上游引物: 5'-GCT GGT CTT GAA CTC CCA AC-3', 下游引物: 5'-GGG CTA GTT CAC CAC TTT GC-3', 扩增产物长度为 315 bp。PCR 反应体系均为 20 μl, 包含 SinoBio 2×Taq master mix 10 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.4 μl, 模板 1 μl(10 ng), ddH₂O 8.2 μl。rs1042522 位点 PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 15 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。rs12910984 位点 PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。取 4 μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统照相。2 个 SNPs 位点酶切总反应体积均为 15.5 μl, 其中缓冲液 1 μl, PCR 产物 10 μl, 内切酶 0.5 μl(5 U), ddH₂O 4 μl。37℃ 水浴过夜, 2% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像系统照相。

1.6 DNA 测序 取 2 个 SNPs 位点酶切后判断为不同基因型的样本扩增后送北京诺赛基因组研究中心测序。

2 结果

2.1 DNA 浓度和纯度检测结果 紫外吸收值测定结果显示单支口腔拭子提取得到 DNA 的量在 0.68~2.56 μg 之间, 均值为 1.06 μg。D₂₆₀/D₂₈₀ 比值在 1.77~1.94 之间, 均值为 1.83。

2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 DNA 琼脂糖凝胶电泳显示 DNA 的大小在 23 kb 左右, 部分样品有凋亡条带出现(图 1)。

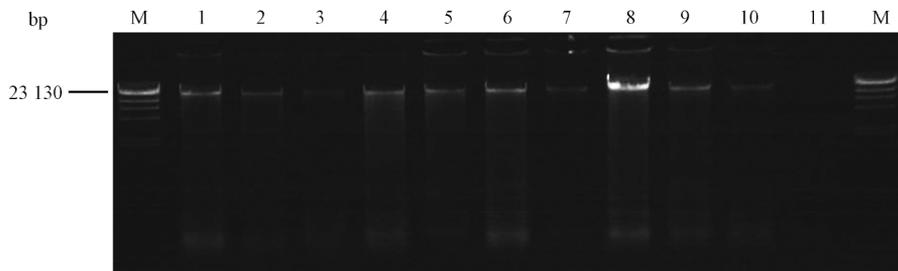


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of DNA

M: λDNA/Hind III; 1-10: Samples of 1 to 10; 11: Negative control of swab

2.3 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳 从图 2 和图 3 可知, 10 支口腔拭子的 2 个 SNPs 位点的 PCR 产物都得到了单一清晰的目的条带, 而阴性对照(包括棉签和扩增用去离子水)没有 PCR 产物。

2.4 酶切结果 从图 4 和图 5 可知, 10 支口腔拭子的 2 个 SNPs 位点都得到了清楚分型。

2.5 DNA 测序结果 图 6 为 rs1042522 位点的测序结果, 其中 A 为 1 号样本测序结果, B 为 4 号样本测序结果, C 为 10 号样本测序结果, 与酶切结果相符。图 7 为 rs12910984 位点的测序结果, 其中 A 为 8 号样本测序结果, B 为 9 号样本测序结果, C 为 10 号样本测序结果, 与酶切结果相符。

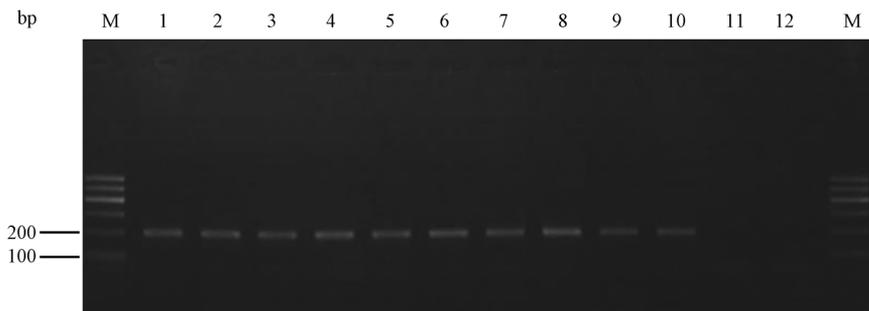


图 2 rs1042522 PCR 产物电泳图

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of rs1042522

M; DNA Marker I ; 1-10; Samples of 1 to 10; 11; Negative control of swab; 12; Negative control of water

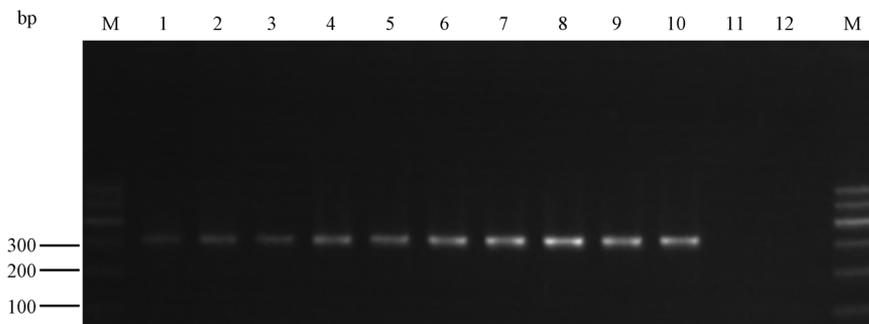


图 3 rs12910984 PCR 产物电泳图

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of rs12910984

M; DNA Marker I ; 1-10; Samples of 1 to 10; 11; Negative control of swab; 12; Negative control of water

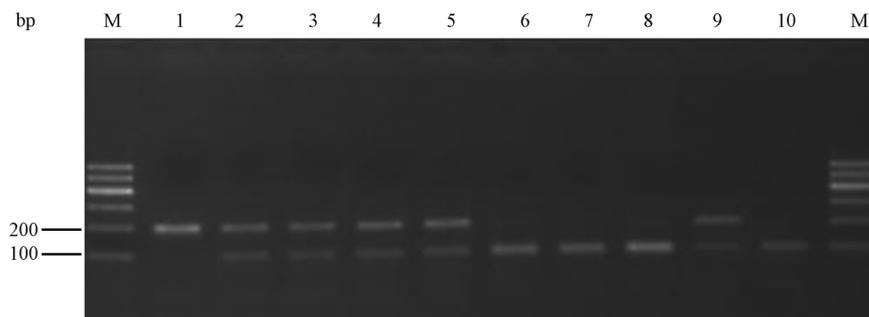


图 4 rs1042522 酶切产物电泳图

Fig 4 Genotyping results of rs1042522 by PCR-RFLP

M; DNA Marker I ; 1; Pro/Pro genotype; 2-5,9; Pro/Arg genotype; 6-8,10; Arg/Arg genotype

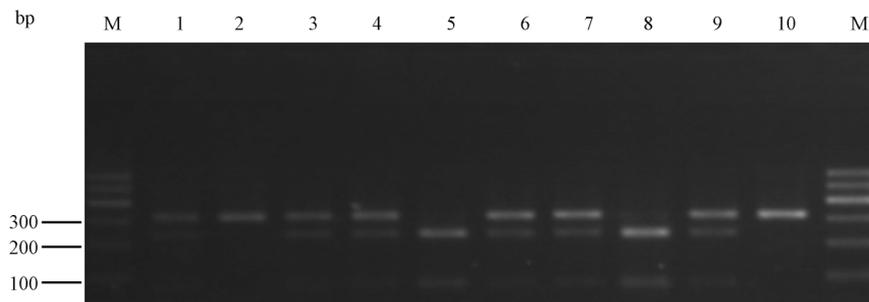


图 5 rs12910984 酶切产物电泳图

Fig 5 Genotyping results of rs12910984 by PCR-RFLP

M; DNA Marker I ; 1,3,4,6,7,9; AG genotype; 2,10; AA genotype; 5,8; GG genotype

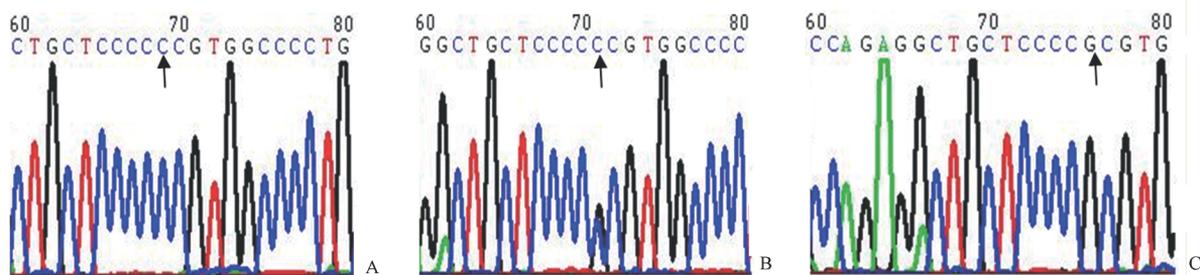


图 6 rs1042522 PCR 产物测序图

Fig 6 DNA sequence chromatograms of rs1042522

A: Homozygous CC; B: Heterozygous CG; C: Homozygous GG

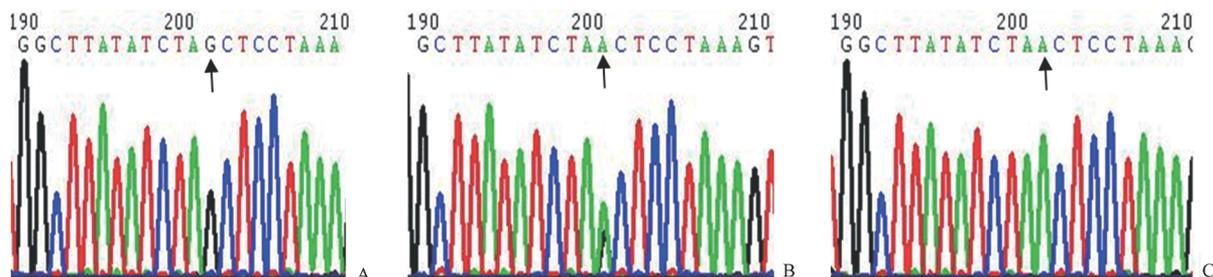


图 7 rs12910984 PCR 产物测序图

Fig 7 DNA sequence chromatograms of rs12910984

A: Homozygous GG; B: Heterozygous AG; C: Homozygous AA

3 讨论

TP53 基因是迄今发现的与人类恶性肿瘤相关性最密切的基因之一,其第 72 密码子具有 CGC/CCC 单核苷酸多态性(rs1042522),编码的氨基酸残基分别为精氨酸(arginine, Arg)和脯氨酸(proline, Pro)^[13]。研究表明,TP53 基因外显子 4 上密码子 72 的多态性与细胞周期调节、凋亡、肿瘤易感性、化疗药物敏感性、生殖、免疫和炎症等密切相关^[14-19]。CHRNA3 为尼古丁乙酰胆碱受体的一个亚单位,位于该基因的 rs12910984 位点与肺癌的风险和吸烟行为相关^[20]。目前我们正在用 PCR-RFLP 研究这两个 SNPs 位点与非小细胞肺癌易感性之间的关系。

本研究以普通实验室具有的试剂为基础,建立了盐析提取口腔拭子 DNA 的方法。首先用细胞裂解液和蛋白酶 K 消化裂解口腔黏膜上皮细胞,使其释放 DNA,然后用浓盐沉淀蛋白质并通过离心去除蛋白质,再用异丙醇沉淀 DNA,最后经 70%乙醇洗涤后得到高质量 DNA。van Wieren-de Wijer 等^[1]用有机溶剂法提取口腔拭子 DNA,经过 5 次离心(含 70%乙醇洗涤 2 次)和 1 次冰浴,用到了 7 种试剂,时间在 3 h 以上。本研究对口腔拭子 DNA 的提取均在室温下进行,不需要特殊设备,经过 5 次离心(含瞬时离心 2 次),用到了 6 种试剂,时间在 1 h 左右,低于有机溶剂法提取口腔拭子 DNA 所需的时间,也低于 Chelex-100 法^[4,6]和试剂盒法提取口腔拭子 DNA 所用的时间。本方法所需试剂除蛋白酶 K 价格较

高外,其余试剂均较便宜,提取单支口腔拭子 DNA 的全部费用不超过 1.50 元,低于试剂盒法提取 DNA 所需费用。紫外吸收值测定显示 D_{260}/D_{280} 比值在 1.77~1.94 之间,琼脂糖凝胶电泳显示 DNA 的大小在 23 kb 左右,表明得到 DNA 的质量较高。单支口腔拭子得到的 DNA 量在 0.68~2.56 μg 之间,与国内试剂盒单支拭子样本得率在 0.5~3.5 μg 相当。不同拭子得到的 DNA 量有较大差别,可能与不同拭子上细胞数目的多少不同有关。按 1 次 PCR 反应需要 10 ng DNA 计算,单支口腔拭子得到的 DNA 至少可以完成数十次的 PCR 反应。部分 DNA 电泳有凋亡条带出现,可能是上皮细胞离开口腔后发生凋亡所致,但并不影响后续的 PCR 扩增和酶切。酶切显示 10 个样本的 2 个 SNPs 都得到了清楚分型,测序结果与酶切结果吻合,证明了该方法得到的 DNA 用于多态性分析的可行性。目前,在研究生的实验教学中,我们应用盐析法提取口腔拭子 DNA 用于胸苷酸合酶基因多态性的分析,取得了良好效果。

本研究初步证明盐析法可以快速、简便、经济地从口腔拭子中得到高质量的基因组 DNA,进一步的应用效果尚需在大样本量的标本中进行验证。

[参考文献]

- [1] van Wieren-de Wijer D B, Maitland-van der Zee A H, de Boer A, Belitser S V, Kroon A A, de Leeuw P W, et al. Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples[J]. Eur J Epidemiol, 2009, 24: 677-682.

- [2] Mulot C, Stücker I, Clavel J, Beaune P, Lorient M A. Collection of human genomic DNA from cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2005, 2005: 291-296.
- [3] 冯冬亮, 刘长晖, 梁祥仁, 刘超. 广西4个少数民族17个Y-STR基因座的多态性分析[J]. *遗传*, 2009, 31: 921-935.
- [4] 李灵敏, 曹志中. TNF-A-863和CGRP基因多态性与中国汉族人重度慢性牙周炎易感性的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 541-544.
Li L M, Cao Z H. Association of TNF-A-863 and CGRP979 gene polymorphisms with susceptibility to severe chronic periodontitis in Chinese Han nationality[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 541-544.
- [5] 孙书昱, 曾雄群, 靳安民, 范卫华, 章锦才. 环氧化酶2启动子区基因多态性与慢性牙周炎的关系[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30: 1134-1137.
- [6] 张璇, 龙钢, 李红燕, 李晓娟, 丁寅. 雌激素受体基因多态性与慢性牙周炎相关性研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28: 139-144.
- [7] 戴红, 刘全华, 华丽, 霍婧, 鲍一笑. 上海地区儿童哮喘与单核苷酸多态性关系研究[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28: 1039-1042, 1046.
- [8] 赵嘉惠, 张华屏. 外周血DNA提取方法的比较及改良[J]. *山西医科大学学报*, 2006, 37: 12-13.
- [9] 欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 王红, 陈思礼, 王朝元, 等. PCR-RFLP中Chelex-100制备DNA模板的方法建立及其条件优化[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2009, 28: 38-41.
- [10] 黄晓晶, 刘天佳, 蔡志宇. 用Chelex法制备AP-PCR细菌DNA模板[J]. *福建医科大学学报*, 2002, 36: 221-223.
- [11] Aidar M, Line S R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells[J]. *Braz Dent J*, 2007, 18: 148-152.
- [12] 焦鹏, 叶文静, 常起, 崔英杰, 赵晓民. 人血细胞DNA无酚提取法[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27: 918-920.
- [13] Matlashewski G J, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford L V. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53[J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 961-963.
- [14] Salvioli S, Bonafé M, Barbi C, Storci G, Trapassi C, Tocco F, et al. p53 codon 72 alleles influence the response to anticancer drugs in cells from aged people by regulating the cell cycle inhibitor p21WAF1[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4: 1264-1271.
- [15] Sansone P, Storci G, Pandolfi S, Montanaro L, Chieco P, Bonafé M. The p53 codon 72 proline allele is endowed with enhanced cell-death inducing potential in cancer cells exposed to hypoxia[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96: 1302-1308.
- [16] Xu B, Xu Z, Cheng G, Min Z C, Mi Y, Zhang Z Z, et al. Association between polymorphisms of TP53 and MDM2 and prostate cancer risk in southern Chinese[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202: 76-81.
- [17] Tominaga T, Iwahashi M, Takifuji K, Hotta T, Yokoyama S, Matsuda K, et al. Combination of p53 codon 72 polymorphism and inactive p53 mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 1691-1701.
- [18] Kang H J, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy M E, Rebbeck T R, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 9761-9766.
- [19] Frank A K, Leu J I, Zhou Y, Devarajan K, Nedelko T, Klein-Szanto A, et al. The codon 72 polymorphism of p53 regulates interaction with NF- κ B and transactivation of genes involved in immunity and inflammation[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 1201-1213.
- [20] Wu C, Hu Z, Yu D, Huang L, Jin G, Liang J, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 5065-5072.

[本文编辑] 孙岩

· 消息 ·

《第二军医大学学报》入选“百种中国杰出学术期刊”和“中国精品科技期刊”

2011年12月2日,中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心召开了2010年中国科技论文统计结果发布会,大会公布了2011年度“百种中国杰出学术期刊”和“中国精品科技期刊”评选结果。《第二军医大学学报》入选2010年“百种中国杰出学术期刊”和2011年“中国精品科技期刊”。

中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》(核心版)定期公布中国科技论文与引文数据库(CST-PCD)收录的中国科技论文统计源期刊科学计量指标。1999年开始,采用层次分析法,由专家打分确定了重要指标的权重,并分学科对每种期刊进行综合评定。2002年公布了第一届“百种中国杰出学术期刊”名单。2011年根据中国学术期刊的变化趋势和实际状况,重新核定了期刊的指标权重,在此基础上对2010年中国学术期刊的总被引频次、影响因子、即年指标、平均引文率等多项指标进行评价,综合评定而推出了2010年“百种中国杰出学术期刊”。这是《第二军医大学学报》首次入选“百种中国杰出学术期刊”。国家科技部自2000年以来,先后立项进行了“中国精品科技期刊战略研究”和“中国精品科技期刊服务与保障系统”的研究工作,提出了打造精品科技期刊的概念,以提升中国科技期刊的整体水平。中国精品科技期刊遴选指标由定量指标和定性指标两部分组成,遴选时以定量指标为主,定性指标为辅。定量指标主要包括学术质量水平指标和国际竞争力水平指标。定性指标主要是指期刊的可持续发展潜力指标。《第二军医大学学报》继2008年被评为首届“中国精品科技期刊”后,2011年又被评为第二届“中国精品科技期刊”。