

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.11.1444

## 全基因组关联研究中 NanoDrop 检测 $D_{260}/D_{230}$ 值在 DNA 质检中的意义

郭倩<sup>△</sup>, 王赓<sup>△</sup>, 殷健, 李梦梦, 黄少兰, 姜磊, 徐沪济\*

第二军医大学长征医院风湿免疫科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨 NanoDrop 检测  $D_{260}/D_{230}$  值对全基因组关联研究(GWAS)中 DNA 标本质检的意义。

**方法** 收集 1 494 例强直性脊柱炎(AS)患者的血液 DNA 样本, 分别用 NanoDrop 和 PicoGreen 检测样本浓度。第一阶段, 对 24 例 NanoDrop 和 PicoGreen 浓度  $>50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的 DNA 样本行 Omni 中华 8 芯片检测, 比较 16 例芯片成功样本与 8 例失败样本的  $D_{260}/D_{280}$  值及  $D_{260}/D_{230}$  值。第二阶段, 选取 1 122 例 NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度均大于  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  DNA 样本行管家基因 *GAPDH* 的 PCR 检测, 并对 PCR 反应成功的样本行 Omni 中华 8 芯片检测。采用 Mann-Whitney *U* 检验比较 PCR 反应成功与失败 DNA 样本的  $D_{260}/D_{230}$  值, 采用受试者工作特征(ROC)曲线评价  $D_{260}/D_{230}$  值对 PCR 结果的鉴别效率。**结果** 第一阶段中, 芯片成功与失败样本的  $D_{260}/D_{280}$  值差异无统计学意义 ( $P=0.444$ ), 而  $D_{260}/D_{230}$  值差异有统计学意义 ( $Z=-3.920, P<0.001$ ); 第二阶段中, PCR 成功的 DNA 样本基因分型检测成功率为 100%, PCR 成功与失败组的  $D_{260}/D_{230}$  值比较差异有统计学意义 ( $Z=-5.983, P<0.01$ )。  $D_{260}/D_{230}$  值预测 PCR 结果的曲线下面积(AUC)为 0.727; 最佳诊断点的  $D_{260}/D_{230}$  值为 0.89; 特异度为 0.95 时的  $D_{260}/D_{230}$  值为 2.305。**结论** 在进行 GWAS 时, 浓度及  $D_{260}/D_{280}$  值均较好而  $D_{260}/D_{230}$  值较低的 DNA 样本可能含有较多杂质, 需联用 PCR 检测以确保样本质量;  $D_{260}/D_{230}$  值  $\geq 2.305$  时, 样本纯度满足 GWAS 芯片检测的要求, 可省略 PCR 检测。

**[关键词]** 全基因组关联研究;  $D_{260}/D_{230}$  值; NanoDrop; PicoGreen; 质量控制; 聚合酶链反应; 管家基因

**[中图分类号]** R 349.8

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2017)11-1444-05

## Significance of $D_{260}/D_{230}$ ratio of NanoDrop detection in quality assay of DNA in genome wide association study

GUO Qian<sup>△</sup>, WANG Geng<sup>△</sup>, YIN Jian, LI Meng-meng, HUANG Shao-lan, JIANG Lei, XU Hu-ji\*

Department of Rheumatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the significance of  $D_{260}/D_{230}$  ratio of NanoDrop detection in quality assay of DNA in genome wide association study (GWAS). **Methods** Blood samples from 1 494 patients with ankylosing spondylitis (AS) were collected and the DNA was extracted. The concentrations of DNA samples were detected by NanoDrop and PicoGreen methods. In first stage, 24 DNA samples with concentrations  $>50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  were detected by Omni ZhongHua-8 microarray. Among the samples, 16 cases of chip reaction were successful and 8 were failure, and then the ratios of  $D_{260}/D_{280}$  and  $D_{260}/D_{230}$  were compared between the two groups. In second stage, 1 122 DNA samples with a concentration greater than  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  according to NanoDrop and PicoGreen tests were selected for PCR detection of house-keeping genes. Samples with successful PCR reaction were detected by Human Omni ZhongHua-8 microarray. The 1 122 samples are divided into two groups according to the results of PCR (successful and failure groups). Mann-Whitney *U* test was used to compare the ratio of  $D_{260}/D_{230}$  between the two groups, and receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the predictive efficiency of  $D_{260}/D_{230}$  value in PCR results. **Results** In the first stage, there were no significant differences in  $D_{260}/D_{230}$  values between DNA samples with successful chip reaction and failure chip reaction ( $P=0.444$ ), while the  $D_{260}/D_{230}$  value of the former samples was significantly lower than that of the latter ( $Z=-3.920, P<0.001$ ). In the second stage, the success rate of genotyping of DNA samples with positive PCR results was 100%. There were significant differences in  $D_{260}/D_{230}$  values between the DNA samples with positive and negative PCR results ( $Z=-5.983, P<0.01$ ). The area under curve of  $D_{260}/D_{230}$  value predicting the PCR results was 0.727;

**[收稿日期]** 2017-08-21 **[接受日期]** 2017-11-06

**[作者简介]** 郭倩, 硕士, 住院医师. E-mail: drguoqian@163.com; 王赓, 硕士, 住院医师. E-mail: wanggeng@smmu.edu.cn

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885511, E-mail: xuhuji@smmu.edu.cn

the  $D_{260}/D_{230}$  values of the best diagnostic point and the point of specificity 95% were 0.89 and 2.305, respectively.

**Conclusion** In GWAS, when DNA sample has better concentration and  $D_{260}/D_{280}$  value and has lower  $D_{260}/D_{230}$  value, PCR test should be performed to ensure the quality of the samples; when  $D_{260}/D_{230}$  value is higher than 2.305, the samples are pure enough for microarray detection and the PCR detection can be omitted.

[**Key words**] genome wide association study;  $D_{260}/D_{230}$  value; NanoDrop; PicoGreen; quality control; polymerase chain reaction; housekeeping gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(11): 1444-1448]

自 1953 年 DNA 双螺旋结构被发现以来,遗传学领域取得了突飞猛进的发展。近年来,随着全基因组关联研究 (genome wide association study, GWAS)、二代测序、三代测序等技术的问世,遗传学研究成为探索复杂性疾病致病机制的有力工具<sup>[1-3]</sup>。而高品质的 DNA 样本是遗传学实验成功与否的重要影响因素,进行有效的 DNA 样本质检更是控制实验成本的关键措施。以 GWAS 为例,各研究平台均需要 200 ng 的 DNA,且要求 DNA 最低浓度为 50 ng/ $\mu\text{L}$ <sup>[4]</sup>。NanoDrop 和 PicoGreen 是检测 DNA 样本质量较为合适的方法,NanoDrop(如 ND-1000)是一种全波长紫外/可见光扫描分光光度计,可检测 DNA、RNA、蛋白质和染料等的光密度( $D$ )值,自动识别的光谱范围为 220~750 nm<sup>[5]</sup>;PicoGreen 为一种选择性结合双链 DNA 的荧光染料,作用与 SYBR-Green I 相似<sup>[6]</sup>。然而,研究获得的 DNA 等样本中存在杂质时,通过上述方法很难被检测出来,因此需要一种更加可靠的方法评估 DNA 样品的质量。本研究通过分析 24 例 GWAS 芯片失败样本在质量控制过程中的详细情况,发现失败样本的  $D_{260}/D_{230}$  值偏低,进而在更大样本中明确  $D_{260}/D_{230}$  值与 DNA 质量的关系,旨在寻找更可靠的 DNA 质检手段,降低芯片检测失败风险。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 1 494 例第二军医大学长征医院收治的强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 患者的全血样本,AS 诊断均符合 1984 年修订的 AS 美国纽约的诊断标准<sup>[7]</sup>。本研究通过第二军医大学长征医院医学伦理委员会审批,所有入组患者均签署知情同意书。使用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒提取所有患者血液样本 DNA,用于后续检测。

1.2 NanoDrop 检测 检测样本前先对 ND-1000 (NanoDrop, USA) 进行校正,取 Lambda DNA 原液 (310 ng/ $\mu\text{L}$ , 日本 TaKaRa 公司),用 TE 缓冲液稀释成 3.1、38、78、155、310 ng/ $\mu\text{L}$  5 个浓度梯度,

使用 ND-1000 检测各浓度样品在 260 nm 下的  $D$  值并绘制曲线,根据曲线拟合度判断仪器精确性。校正后取待测 DNA 样品 1  $\mu\text{L}$ ,上机检测样品浓度及  $D_{280}$ 、 $D_{260}$ 、 $D_{230}$  等值。

1.3 PicoGreen 检测 (1)DNA 待测样品的准备:取 1  $\mu\text{L}$  DNA 样品加入到 349  $\mu\text{L}$  的 TE 缓冲液中振荡混匀,另取 3 个空移液管,每管加入 100  $\mu\text{L}$  样品混匀液;(2)绘制标准曲线:取  $\lambda\text{DNA}$  原液 (310 ng/ $\mu\text{L}$ , 日本 TaKaRa 公司)用 TE 缓冲液稀释至 2 ng/ $\mu\text{L}$ ,然后再稀释成 0 (不含 DNA)、0.125、0.25、0.5、1 ng/ $\mu\text{L}$  5 个浓度梯度,检测并绘制标准曲线。(3)DNA 样品检测:取 DNA 待测样品室温避光孵育 5 min,应用 FlexStation<sup>®</sup> 3 酶标仪 (Molecular Devices, USA) 以 480 nm 为激发波长测定各样品在 520 nm 下的  $D$  值,并使用 SoftMax<sup>®</sup> Pro 软件进行分析。每组设 3 个复孔。

1.4 PCR 检测管家基因 选取 NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度均大于 50 ng/ $\mu\text{L}$  的 DNA 样品行管家基因 (*GAPDH*) 的 PCR 检测。*GAPDH* 引物 (452 bp) 序列:上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游 5'-ATG TCG TTG TCC CAC CAC CT-3'。20  $\mu\text{L}$  PCR 体系:5  $\mu\text{L}$  DNA 模板 (浓度 10 ng/ $\mu\text{L}$ ),10  $\mu\text{L}$  Premix TAQ 酶,上、下游引物各 2  $\mu\text{L}$ ,1  $\mu\text{L}$  去离子水。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、60  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 25 s,共 33 个循环;循环结束后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。取 10  $\mu\text{L}$  PCR 反应产物行带有 GoldView 染料 (上海赛百盛基因技术有限公司) 的琼脂糖凝胶电泳,验证是否出现 452 bp 的扩增条带。

1.5 基因分型 采用 Illumina 公司的 Human Omini ZhongHua-8 BeadChip 芯片行基因分型检测,基因组 DNA 经过质控检测后,取合格样品稀释至浓度为 50 ng/ $\mu\text{L}$ 。第一阶段:选取 24 例 NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度 > 50 ng/ $\mu\text{L}$  的 DNA 样品行芯片检测,有 8 例芯片反应失败,比较 16 例成功样本与 8 例失败样本的 NanoDrop 检测的

$D_{260}/D_{280}$  值及  $D_{260}/D_{230}$  值。第二阶段:对 NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度  $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  且 PCR-管家基因扩增成功的 DNA 样品行基因分型检测,并使用 HD 超微阵列和 iScan 系统(Illumina 公司)进行扫描。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件行统计分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,呈非正态分布的计量资料以中位数(最小值~最大值)表示。 $D_{260}/D_{230}$  值两组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验,采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价  $D_{260}/D_{230}$  值对 PCR 结果的鉴别效率,并确定最佳诊断点(敏感度和特异度最大)。为达到最严格的芯片质量控制,选取特异度为 0.95 的点为参考点;同时选取 PicoGreen 检测浓度  $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的样本再计算 ROC 曲线以排除浓度对 PCR 结果的影响。使用曲线下面积(area under curve, AUC)评价  $D_{260}/D_{230}$  值对 PCR 结果的预测能力。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 NanoDrop 与 PicoGreen 检测结果 1 494 例 DNA 样品的 NanoDrop 检测浓度为  $(131.3 \pm 116.2) \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $D_{260}/D_{280}$  值为  $1.815 \pm 0.868$ ,  $D_{260}/D_{230}$  值为  $1.37(0.08 \sim 18.61)$ ; PicoGreen 检测浓度为  $(123.0 \pm 97.5) \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度均大于  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的样本有 1 122 例。

2.2 24 例 DNA 样品芯片检测结果 第一阶段 24 例 NanoDrop 和 PicoGreen 检测浓度  $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的 DNA 样品检测结果见表 1。24 例样本中 16 例芯片检测成功,8 例失败。芯片成功样本与失败样本的  $D_{260}/D_{280}$  值分别为  $1.860 \pm 0.063$  与  $1.841 \pm 0.825$ , 差异无统计学意义( $P = 0.444$ ); 而两组的  $D_{260}/D_{230}$  值分别为  $2.37(0.91 \sim 4.95)$ 、 $0.23(0.15 \sim 0.45)$ , 差异有统计学意义( $Z = -3.920$ ,  $P < 0.001$ )。

表 1 24 例 DNA 样本浓度及芯片检测结果

Tab 1 Concentrations and microarray detection results of 24 DNA samples

Sample ID	Concentration by PicoGreen $c_B/(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	Concentration by NanoDrop $c_B/(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	$D_{260}/D_{280}$ value	$D_{260}/D_{230}$ value	Call rate
1	90.3	79.13	1.83	0.20	0.475 6
2	83.3	68.32	1.78	0.27	0.494 8
3	95.9	150.46	1.75	0.25	0.506 6
4	212.1	273.05	1.91	0.45	0.508 8
5	95.2	99.72	1.73	0.18	0.531 6
6	57.4	104.84	1.96	0.15	0.572 7
7	63.0	63.80	1.90	0.16	0.575 3
8	200.2	157.70	1.87	0.33	0.595 3
9	104.3	121.80	1.96	4.95	0.998 7
10	104.3	77.39	1.89	0.97	0.998 7
11	107.1	83.02	1.92	1.26	0.998 8
12	179.9	131.81	1.86	0.91	0.998 8
13	85.4	84.79	1.78	2.68	0.998 8
14	128.1	79.29	1.75	1.21	0.998 8
15	86.8	77.36	1.89	4.91	0.999 0
16	65.8	127.04	1.86	1.99	0.999 0
17	53.9	53.90	1.91	1.52	0.999 0
18	52.5	52.12	1.78	3.10	0.999 0
19	94.5	60.26	1.89	2.68	0.999 1
20	361.2	341.09	1.86	1.94	0.999 1
21	118.0	128.40	1.84	2.22	0.999 0
22	86.2	112.09	1.95	3.22	0.999 0
23	79.8	99.08	1.83	2.99	0.999 0
24	96.4	96.90	1.82	2.52	0.999 0

Call rate  $< 0.9$  indicates failure results of microarray detection

2.3 PCR 及基因分型结果 第二阶段 1 122 例 NanoDrop 及 PicoGreen 检测浓度均大于  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的

DNA 样品中 979 例 PCR 成功,143 例失败。对 979 例 PCR 成功的 DNA 样本行基因分型检测,结果显示其

Call rate 值达标率为 100%。将 1 122 例样品按照 PCR 结果分为两组, 非参数检验结果显示, PCR 成功与失败两组 DNA 样品的  $D_{260}/D_{230}$  值分别为 1.45 (0.09~18.61) 和 0.54 (0.08~15.17), 差异有统计学意义 ( $Z = -5.983, P < 0.01$ )。

2.4  $D_{260}/D_{230}$  值对 PCR 结果的鉴别能力 通过绘制 ROC 曲线评估  $D_{260}/D_{230}$  对 PCR 结果的鉴别能力, 结果(图 1)显示, ROC 曲线的 AUC 为 0.727; 其中最佳诊断点(敏感度和特异度最大)的  $D_{260}/D_{230}$  值为 89% (敏感度为 82%, 特异度为 61%)。ROC 曲线中特异度为 95% (敏感度 16%) 时对应的  $D_{260}/D_{230}$  值为 2.305。

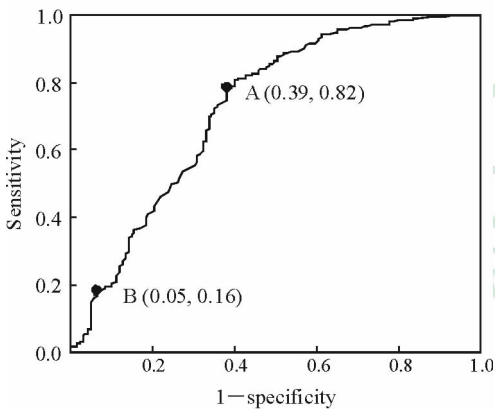


图 1  $D_{260}/D_{230}$  预测 PCR 结果的 ROC 曲线

Fig 1 ROC curve of PCR results predicted by  $D_{260}/D_{230}$

Point A: Best diagnostic point; Point B: Point of specificity 95%.  
PCR: Polymerase chain reaction; ROC: Receiver operating characteristic

### 3 讨论

GWAS 及二代测序实验的影响因素有多种, 如诊断明确的病例和对照组、多项检测的控制、人群分层的控制<sup>[8]</sup>、有明确表型的研究人群的特点<sup>[9]</sup> 以及 DNA 样品的数量和质量等<sup>[10]</sup>。以 GWAS 为例, 由于芯片非常昂贵, 所以在进行芯片检测之前确保 DNA 样本的质量非常重要。

目前遗传学研究大多采用 NanoDrop 和 PicoGreen 检测 DNA 样品的质量。NanoDrop 检测方法简单、经济。DNA 在波长 260 nm 左右有最大吸收峰, 而蛋白质的吸收峰在 280 nm 左右<sup>[5]</sup>, 因此可通过  $D_{260}/D_{280}$  值及  $D_{260}/D_{230}$  值检测 DNA 浓度; 但 RNA、单链 DNA (ssDNA) 和双链 DNA (dsDNA) 均在 260 nm 处有最大吸收峰, 导致整体

的  $D_{260}$  值可能偏高, 影响检测结果。PicoGreen 是一种选择性结合 dsDNA 的荧光染料, 与 dsDNA 结合时其荧光急剧增强, 而未结合染料几乎不发出荧光, 因此被用来检测 DNA 浓度; 且 PicoGreen 稳定不易脱色, 允许暴露较长的时间<sup>[6]</sup>。PCR-扩增管家基因 (GAPDH) 的方法常被用于确定样本基因组 DNA 的完整性及纯度<sup>[8,11]</sup>, 因此本研究利用 PCR-扩增管家基因以提高 DNA 芯片检测的成功率。

NanoDrop 和 PicoGreen 测定 DNA 浓度时, 纯度高的核酸其  $D_{260}/D_{280}$  值一般为 1.8~2.0。但该比值受 pH 和离子浓度影响, 酸性溶液一般会使其降低 0.2~0.3, 而碱性溶液则可能使其上升 0.2~0.3; 异常的  $D_{260}/D_{280}$  值表示样品中可能含有蛋白质、苯或其他在 280 nm 附近有吸收的污染物。 $D_{260}/D_{230}$  值是另一用于检测 DNA 纯度的指标, 纯度高的核酸其  $D_{260}/D_{230}$  值一般为 1.8~2.2, 此值明显偏小时表明样品可能被碳水化合物(糖类)、盐类或有机溶剂污染, 需要纯化样品或进一步优化核酸提取方法<sup>[12]</sup>。大多数研究中, 一般使用  $D_{260}/D_{280}$  值评价 DNA 的纯度, 而  $D_{260}/D_{230}$  值则被认为是次要的<sup>[13]</sup>。但近年来, 涉及到 DNA 质控的遗传学研究越来越强调  $D_{260}/D_{230}$  值的价值。Solomon 等<sup>[14]</sup> 提取海水微生物 DNA 时发现, 采用新的提取方法后, 样品的  $D_{260}/D_{230}$  值可改善 2.3%~45%, 而  $D_{260}/D_{280}$  值未见明显改变, 抽提样本可降低 22.5%~34.5% 的蛋白质污染, DNA 合格率及 16S RNA 的 PCR 成功率均显著提高。本研究第一阶段中 PCR 结果阳性与阴性两组的  $D_{260}/D_{280}$  值差异无统计学意义, 而  $D_{260}/D_{230}$  值差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。造成这种差异的原因可能是抽提的部分 DNA 样本中含有较多的碳水化合物(糖类)、盐类等污染物, 这些污染物对 230 nm 的波段吸收较好而对 280 nm 波段吸收不佳, 即表现为  $D_{260}/D_{280}$  值无明显变化而  $D_{260}/D_{230}$  值偏低。表明在衡量样本纯度时  $D_{260}/D_{230}$  值可能有重要意义, 在检测样本时忽视该值也可能无法确保样本的质量。

本研究中, ROC 曲线的 AUC 为 0.727, 表明所建立的  $D_{260}/D_{230}$  值对 PCR 结果模型有较好的预测效能。本研究得到的最佳诊断点  $D_{260}/D_{230}$  值为 0.89, 低于正常的  $D_{260}/D_{230}$  值范围 (1.8~2.2), 推测原因可能为当 DNA 混有一定程度的杂质时 PCR

仍可成功。但芯片对 DNA 纯度要求较高,故在芯片基因分型前的质检阶段,特异度(即  $D_{260}/D_{230}$  值预测 PCR 成功的可靠性)较敏感度更为重要,它可以避免因样本质量问题而导致的芯片浪费。因此本研究选择并推荐特异度为 95% 的诊断点( $D_{260}/D_{230}$  值为 2.305)为衡量标准, $D_{260}/D_{230}$  值  $\geq 2.305$  且浓度合格的样本,其 PCR-扩增管家基因成功的可能性超过 95%,样本纯度较高,基本满足芯片检测要求。

在本研究第一阶段,即使样本经过 NanoDrop 及 PicoGreen 检测显示浓度已达到 50 ng/ $\mu$ L,但仍有部分芯片检测失败。而第二阶段中经过 NanoDrop、PicoGreen 及 PCR 质检的样本芯片检测成功率为 100%,表明与单用 NanoDrop 或 PicoGreen 的质检方法相比,其联合应用 PCR 检测能更大程度地确保 GWAS 的成功。

综上所述,在 GWAS 的 DNA 质检过程中,尽管 NanoDrop 检测中  $D_{260}/D_{230}$  值的正常范围为 1.8~2.2,但当  $D_{260}/D_{230} < 2.305$  时,DNA 样本仍可能有污染,有可能导致后续遗传学研究失败,此时应进行 PCR-扩增管家基因质检以确保 GWAS 芯片检测成功;当  $D_{260}/D_{230} \geq 2.305$  时则可认为 PCR 成功率超过 95%,样本纯度基本满足芯片检测要求,故不需再进行 PCR 质检,可提高样本质检效率。本研究不足之处在于样本量有限,且 PCR 成功组与失败组的数量差异较大,仍需更大的多中心数据予以支持。

## [参考文献]

[1] JIANG L, YIN J, YE L, YANG J, HEMANI G, LIU A J, et al. Novel risk loci for rheumatoid arthritis in Han Chinese and congruence with risk variants in Europeans[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66: 1121-1132.

[2] OKADA Y, WU D, TRYNKA G, RAJ T, TERAOKA C, IKARI K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery[J]. *Nature*, 2014, 506: 376-381.

[3] DAVIDSON S I, JIANG L, CORTES A, WU X, GLAZOV E A, DONSKOI M, et al. Brief report: high-throughput sequencing of IL23R reveals a low-frequency, nonsynonymous single-nucleotide polymorphism that is associated with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population[J]. *Arthritis*

*Rheum*, 2013, 65: 1747-1752.

- [4] LAURIE C C, DOHENY K F, MIREL D B, PUGH E W, BIERUT L J, BHANGALE T, et al. Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies[J]. *Genet Epidemiol*, 2010, 34: 591-602.
- [5] LEE J H, PARK Y, CHOI J R, LEE E K, KIM H S. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory[J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51: 104-110.
- [6] AHN S J, COSTA J, EMANUEL J R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 2623-2625.
- [7] VAN DER LINDEN S, VALKENBURG H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria[J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27: 361-368.
- [8] PEARSON T A, MANOLIO T A. How to interpret a genome-wide association study[J]. *JAMA*, 2008, 299: 1335-1344.
- [9] MARIAN A J. Molecular genetic studies of complex phenotypes[J]. *Transl Res*, 2012, 159: 64-79.
- [10] STEINBERG K, BECK J, NICKERSON D, GARCIA-CLOSAS M, GALLAGHER M, CAGGANA M, et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices [J]. *Epidemiology*, 2002, 13: 246-254.
- [11] USMAN T, YU Y, LIU C, FAN Z, WANG Y. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk [J]. *Genetics Mol Res*, 2014, 13: 3319-3328.
- [12] HANSEN H M, WIEMELS J L, WRENSCH M, WIENCKE J K. DNA quantification of whole genome amplified samples for genotyping on a multiplexed bead array platform[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16: 1686-1690.
- [13] DESJARDINS P, CONKLIN D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids[J/OL]. *J Vis Exp*, 2010; e2565. doi: 10.3791/2565.
- [14] SOLOMON S, KACHIPRATH B, JAYANATH G, SAJEEVAN T P, BRIGHT SINGH I S, PHILIP R. High-quality metagenomic DNA from marine sediment samples for genomic studies through a preprocessing approach[J/OL]. *3 Biotech*, 2016, 6: 160. doi: 10.1007/s1205-016-0482-y.