文章编号:1000-5404(2010)07-0731-02

技术方法

一种从口腔拭子中提取DNA的简易方法

杨建强[1],徐生新[2] (313000 浙江 湖州,浙江省湖州师范学院医学院门诊部[1];230032 合肥,安徽医科大学皮肤病研究所[2])

[摘要] **目的** 应用简便方法提取口腔拭子中DNA,并用特异引物扩增,评估该方法的应用价值。**方法** 用1×PCR缓冲液、$MgCl_2$及蛋白酶K混合裂解液在PCR仪上对口腔拭子进行消化,并以该产物为模板,应用角蛋白5基因1号外显子及1号染色体上2个微卫星标记特异性引物扩增,目的片段分别用于测序和毛细管电泳。**结果** 通过上述方法可获得用于PCR反应及后续基因测序及微卫星标记毛细管电泳分型的足量DNA。**结论** 利用PCR缓冲液、$MgCl_2$及蛋白酶K混合裂解液从口腔拭子中提取DNA是一种简单、高效、快速、低成本的方法,更是一种无创的采样方法。

[关键词] 口腔拭子;口腔黏膜;上皮细胞;DNA;聚合酶链反应;电泳,琼脂凝胶
[中图法分类号] R394-33; R446 **[文献标志码]** B

口腔黏膜为复层鳞状上皮,具有代谢旺盛、更新快、易脱落的特点。它由多层细胞组成,基底层具有旺盛分裂能力,其上皮脱落细胞虽然细胞核固缩,但与其他组织细胞一样具有完整的基因组DNA,从而成为法医学和遗传学DNA多态性检测分型的生物性检验材料[1]。既往多采用酚氯仿法或Chelex-100等方法,存在酚、氯仿污染或收获率低,纯度不高等缺点[2]。现介绍一种简便而有效的从口腔拭子提取DNA的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

用1×PCR缓冲液(50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris·HCl,0.01%明胶),加$MgCl_2$至2 mmol/L,蛋白酶K至20 mg/L配制裂解液,并置于-20 ℃保存。募集1名身体健康幼儿(2.5岁),并征得家长同意和小孩配合。准备无菌拭子4支备用。角蛋白5(KRT5)基因1号外显子B(因1号外显子较大,不便于测序,因此分两段设计引物,分别称为A和B。简称KRT5-1B)的引物序列为:上游:5′-TTGTGGAGTGGGTGGCTA-3′,下游:5′-AGGGCACAGAAACAAACG-3′,扩增长度为533 bp。用于扩增1号染色体上微卫星标记D1S498的引物序列为:上游:5′-TTGCTGAAGGGACATAGTG-3′,下游:5′-TGCTGGGTTATATC-CAATATC-3′,扩增长度为183~205 bp。D1S2635的引物序列上游:5′-TAGCAGATCCCCCGTC-3′,下游:5′-TGAATCCTACCC-CTAAGTAGAAT-3′,扩增长度为135~159 bp。为便于毛细管电泳和荧光分型,在每个STR正向引物5′端均添加M13序列(5′-CACGACGTTGTAAAACGAC-3′,19 bp),同时扩增时加用M13加尾的通用荧光引物(19 bp)。扩增产物会相应增加19 bp。

1.2 方法

1.2.1 提取口腔拭子DNA的方法 ①采集前用清水漱口1次。②取4支口腔拭子,其中3支分别轻刮颊侧黏膜5、10、15次。另1支作为阴性对照。③剪取口腔拭子的头端1/4并分别放入4个200 μl PCR管中,将其置于PCR管底部。分别对应标注为A、B、C和阴性对照PCR管标注为D。④在每个PCR管中加入50 μl裂解液。⑤在PCR仪上设置一个单循环程序:65 ℃ 30 min,95 ℃ 15 min,4 ℃ 10 min。并将PCR管放入预热PCR仪中运行。⑥程序结束后,将PCR管10 000 r/min离心3 min,取2.5 μl作为PCR模板,并将剩余部分上清转移到另一PCR管中置于-20 ℃保存。

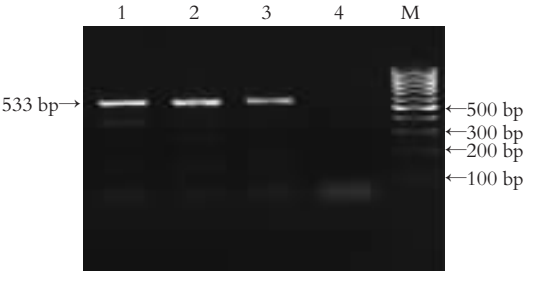
1.2.2 PCR体系 KRT5-1B的反应体系为10 μl,包含10×PCR反应缓冲液1.0 μl;$MgCl_2$(25 mmol/L)0.6 μl;dNTP(2.5 mmol/L)1.0 μl;正反向引物(20 μmol/L)各0.2 μl;*Taq*酶(5 U/μl)0.2 μl;模板2.5 μl;ddH_2O 4.3 μl。PCR反应在Perkin Elmer 9700热循环仪上完成。在扩增STR时调整正反向及M13加尾引物(均为3 μmol/L)的液量分别为0.50、0.50、0.12 μl,调整相应ddH_2O的液量,其余成分液量不变。

1.2.3 PCR条件 KRT5-1B的扩增条件为Touchdown模式:95 ℃ 5 min,前14个循环(95 ℃ 30 s,64 ℃~57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min),其中每个循环退火温度降低0.5 ℃;后20个循环(95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min),72 ℃ 10 min。D1S498和D1S2635的扩增条件为95 ℃ 5 min,30个循环(95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s),72 ℃ 10 min。

2 结果

2.1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳

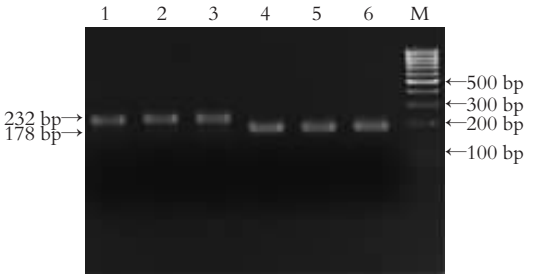
PCR结束后,取2.0 μl产物和适量的上样缓冲液混合后上样于1.0%琼脂糖凝胶。紫外线凝胶成像仪观察并摄像。KRT5-1B及1号染色体上2个STR(D1S498和D1S2635)的PCR产物电泳结果见图1、2。



M:DNA标准;1~4:分别为A、B、C管提取的DNA为模板KRT5-1B扩增产物和阴性对照

图1 KRT5-1B引物扩增产物电泳结果

[通信作者] 杨建强,电话:(0572)2321539,E-mail:yjq@hutc.zj.cn



M:DNA 标准;1~3:分别为 D1S498 的 3 管(A、B、C)扩增产物;4~6:分别为 D1S2635 的 3 管(A、B、C)扩增产物

图 2 D1S498 和 D1S2635 扩增产物电泳结果

在上述的扩增条件下,通过 PCR 可得到单一清晰的目的条带。可见以 3 支口腔拭子(分别擦拭 5、10、15 次)中提取的 DNA 为模板扩增,均可获得微卫星标记扩增产物和大于 500 bp 的 KRT5-1B 的 PCR 扩增产物,且 3 支拭子获取的 DNA 为模板作扩增产物量无明显差异。

经凝胶电泳证实获得目的片段后,将 KRT5-1B 作产物纯化和测序前 PCR(单向引物延伸),利用 ABI3730 测序仪测序,并得到满意的序列。1 号染色体上的 2 个 STR 扩增片段经 CEQ8800 测序仪作毛细管电泳,得到满意的分型效果。

3 讨论

获得某个个体的 DNA 的经典方法是抽取静脉血,用酚-氯仿法抽提可以获得高纯度的 DNA[3]。但此法操作较为复杂,使用试剂较多,且酚、氯仿试剂对操作者存在一定程度的健康危害。因需要采集外周血样,某些个体不容易采集或不愿接受。从微量样本中提取 DNA 的方法已有不少报道。徐艳春等[4]利用蛋白酶 K 消化和酚-氯仿抽提的方法从毛囊中得到纯度较高的 DNA,但该方法需要较多毛囊,且操作过程长,在酚-氯仿抽提和乙醇沉淀过程中 DNA 损失较多。张源明等[5]和杨电等[6]用 Chelex-100 法从颊黏膜拭子提取 DNA 并用于基因分型。Chelex-100 是一种金属离子螯合树脂,能与促使核酸降解的二价金属阳离子螯合,从而防止 DNA 在抽提过程中被降解成小片段。Projic 等[7]利用 Qiagen Dnaeasy™ Tissue Kit(Qiagen, Germany)从口腔拭子中提取 DNA 并成功用于 STR 分型。但上述方法操作较为繁琐,或需要特殊的工作条件,或提取成本较高。

本方法以分子生物学实验常用的 PCR 缓冲液、$MgCl_2$溶液(部分 PCR 缓冲液中已包含 $MgCl_2$溶液)和蛋白酶 K 配制裂解液,其中蛋白酶 K 的浓度极低,只需极少量的蛋白酶 K,因此试剂成本较低。整个 DNA 的获取过程可在 PCR 仪上进行,操作步骤简单,耗时短。由于该裂解液组分和 PCR 体系相兼容,经离心沉淀后获得的上清液可直接作为模板用于 PCR 扩增。在 PCR 仪上运行的单循环程序(65 ℃ 30 min,95 ℃ 15 min,4 ℃ 10 min),首先可使蛋白酶 K 在较高的温度下(65 ℃)消化裂解口腔上皮细胞,使之释放 DNA;PCR 缓冲体系中各组分又可稳定 DNA。随后,95 ℃高温使蛋白酶 K 变性灭活,避免该组分对下游 PCR 反应的影响。在对口腔拭子进行 DNA 的提取中,每支拭子加入的裂解液为 50 μl,经充分离心沉淀后所得上清液为 20~30 μl(除去拭子本身体积),以每个 PCR 反应所需模板量 2.5 μl 计算,该方法获得的 DNA 可满足多次 PCR 扩增。

利用该方法提取的 DNA 为模板作扩增后产物作琼脂糖凝胶电泳分析,可见条带单一清晰,说明目的基因和微卫星标记片段获得特异性扩增,未出现明显的非特异性扩增现象。说明该方法提取的 DNA 片段较为完整。尽管口腔中存在细菌、病毒等微生物,但它们与人类 DNA 的同源性较少,况且,由于扩增引物序列的特异性也可排除口腔微生物对目的基因或片段扩增的影响[5]。本研究中 KRT5-1B 片段 533 bp 长度成功扩增,其产物的产量和纯度能满足测序的要求并得到该外显子全长序列。2 个微卫星标记扩增长度为 100~300 bp,其产物产量和纯度也可满足后续的毛细管电泳并得到满意的分型效果。

采用口腔拭子法提取口腔脱落上皮细胞是一种非介入、无痛苦、无创伤的方法。因此,可应用于新生儿、婴幼儿[8]或老弱病残者等不便采血人群。应用常规 PCR 缓冲液、$MgCl_2$溶液和蛋白酶 K 配制的裂解液,从口腔拭子中提取 DNA 的整个过程所需仪器设备和材料简单,操作步骤少且容易掌握,获取的 DNA 可满足 PCR 及下游的测序和基因分型等应用。因此,该方法具有遗传学和法医学的应用价值。

参考文献:

[1] 张越, 梅善宗. 微量口腔黏膜脱落细胞检材 STR 位点的法医学检测分型[J]. 皖南医学院学报, 2005, 24(1): 74-76.

[2] 朱晔一, 刘启昆, 闫鹏荣, 等. 一种用于口腔黏膜细胞 DNA 高效简便提取的方法研究[J]. 中国优生优育, 2007, 13(2): 87-90.

[3] 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(1): 12-13.

[4] 徐艳春, 马立新, 白素英, 等. 应用 PCR 方法通过毛发进行哺乳动物性别鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(6): 73-77.

[5] 张源明, 钟良军, 陈晓涛, 等. Chelex-100 法从颊黏膜拭子提取 DNA 进行基因型分析的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(5): 430-431.

[6] 杨电, 李越, 刘超, 等. 口腔拭子 DNA 检验的实时定量研究[J]. 刑事技术, 2007, (4): 23-25.

[7] Projic P, Skaro V, Samija I, *et al*. Allele frequencies for 15 short tandem repeat loci in representative sample of Croatian population[J]. Croat Med J, 2007, 48(4): 473-477.

[8] Pawlowski M, Kouklinos A, Jopp-Petzina G, *et al*. G/A polymorphism at -258 of the hepatic glucokinase promoter is not associated with decreased birth weight in preterm neonates[J]. Neonatology, 2008, 94(2): 71-74.

(**收稿**: 2009-10-23;**修回**: 2009-11-28)

(编辑 吴培红)