

对比使用ORAc collect®•DNA (OCR-100) 与使用口腔拭子采集的样本DNA

R. Panford-Walsh, E. Doukhanine, A. Bouevitch
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

前言

DNA基因检测日益成为标准医学实践的一部分。因此,迫切需要可靠、方便、高质量且具有成本效益的DNA来源。过去,血液或口腔拭子样本被用作DNA来源,但这些样本类型有独特的问题。对于血液,侵入性样本采集加上特殊处理要求(如静脉穿刺、立即处理和冷藏/运输)降低供者依从性并增加后勤成本,导致费用高昂。对于口腔拭子,较低的样本采集成本被较差的DNA质量而抵消,经常导致重复采样,从而影响便利性和患者护理并增加成本。

ORAc collect•DNA (OCR-100)经过优化,通过提供易于使用、具有以下优势的高质量本来克服这些问题:

- 可在没有医疗监督的情况下进行微创样本采集,从而提高供者依从性和便利性
- 具有标准管格式的液体样本,可提高实验室工作流程效率并自动提取DNA
- ORAc collect•DNA样本中的DNA在采集时在室温下稳定化,无需采集后昂贵的冷藏并降低样本降解的可能性
- ORAc collect•DNA化学试剂具有抑菌作用,可在样本采集到处理过程中抑制细菌的生长。

所有这些因素使ORAc collect•DNA口腔样本成为可用于PCR等基因组技术的有吸引力的DNA来源。本技术公告描述了与口腔拭子相比,使用ORAc collect•DNA套件采集的口腔样本DNA的质量、产量和性能。

材料与方法

DNA指标研究

使用ORAc collect•DNA套件或标准无菌棉签(AMG Medical Inc., Montreal, QC)从44位供者获得口腔样本。按照ORAc collect•DNA方案采集ORAc collect•DNA样本,采用 prepIT®•L2P方案¹(OCR-100,按比例缩小至250 μ L)纯化DNA。采集颊部样本时,使用无菌棉签擦两侧颊部各

20秒。用Qiagen® Blood Mini Spin 试剂盒(Qiagen Sciences, Maryland, USA)并按照颊部样本旋转方案纯化DNA。对于ORAc collect•DNA样本,样本对洗脱体积的起始比例为250:50(起始化学试剂/口腔样本体积为250 μ L,洗脱体积为50 μ L)。对于棉签样本,按照方案说明处理整个拭子。使用Pico® Green 1染料(Invitrogen)和TECAN Infinite® M200酶标仪进行荧光检测来确定DNA产量。简言之,首先将纯化的DNA在1 \times TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5)中1:50稀释。用1X TE 倍增稀释制备浓度范围为10至0.156ng/ μ L的Lambda DNA标准品。将5 μ L稀释的DNA(标准品和未知DNA)与95 μ L 1X PicoGreen®在96孔黑色微孔板中混合,并在室温下孵育5分钟。使用TECAN Infinite® M200酶标仪,在485nm处激发样本,并在535nm处读取荧光发射值。采用260nm、280nm和320nm紫外吸光度来评估DNA纯度。将纯化DNA的一部分(100ng)在0.8%琼脂糖凝胶上电泳以评估DNA质量。

样本稳定性研究

使用ORAc collect•DNA套件或标准无菌棉签从18位供者获得口腔样本。从每位供者采集两个棉签样本供后续处理。如上所述纯化DNA。按照方案PD-PR-065²确定细菌DNA含量。将样本在室温下储存,并在1个和2个月后处理等分试样(ORAc collect•DNA)或整个样本(口腔拭子)。

下游应用中DNA的性能

从DNA 指标研究中随机选择三个样本(ORAc collect•DNA 或口腔拭子),通过长程PCR分析性能。使用序列特异性引物扩增人CYP2D6(细胞色素P450 2D6)基因的3.6kb片段。PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶上电泳以评估DNA性能。

用于体外诊断用途

PD-WP-00062 (ZH - Chinese) Issue 1/2019-05
©2019年DNA Genotek Inc.

DNA Genotek Inc.是OraSure Technologies, Inc.的一家公司。保留一切权利。

www.dnagenotek.com • support@dnagenotek.com

结果

与口腔拭子相比，ORAc collect•DNA提供高质量、高量的DNA

使用ORAc collect•DNA样本或口腔拭子样本获得的DNA产量如图1所示。与口腔拭子(0.87µg)相比，ORAc collect•DNA样本(4.07µg)的平均DNA产量显著更高，其中95%的ORAc collect•DNA样本的DNA产量超过1.1µg。中等产量分别为3.9µg和0.7µg(见表1)。与口腔拭子相比，从ORAc collect•DNA样本中采集的DNA也具有更高的纯度和完整性。进行紫外吸光度分析作为初始评估(表2)。由于浓度极低，口腔拭子DNA与ORAc collect•DNA样本的读数相当；由于DNA含量不足，必须排除5份口腔拭子样本。0.8%琼脂糖凝胶电泳条带分析也显示，与来自ORAc collect•DNA样本的DNA相比，来自口腔拭子的DNA基本降解。代表性凝胶图像在图2中显示。

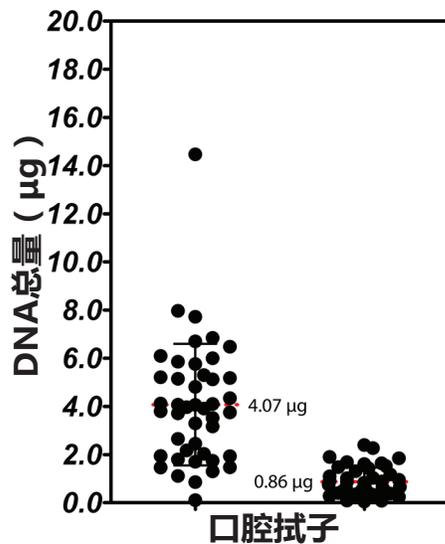


图1：从口腔样本获得的DNA总量。

ORAc collect•DNA和口腔拭子样本中DNA总量散点图。红色虚线表示平均产量。黑线表示标准偏差。44例

	OCR-100	口腔拭子
平均值	4.07	0.86
中值	3.9	0.7
最小值	0.11	0.05
最大值	14.47	2.40
第5个百分位数	1.14	0.16

表1：OCR-100和口腔拭子DNA总量(µg)比较概述。

	OCR-100	口腔拭子 [†]
平均值	1.7	1.8
中值	1.8	1.8
最小值	1.5	1.4
最大值	1.9	2.6
标准偏差	0.07	0.23

表2：ORAc collect•DNA和口腔拭子纯化DNA的紫外吸光度比例(A_{260}/A_{280})。

测量的吸光度读数的平均值、中值、最小值和最大值与标准偏差一起列出。44例

[†]由于DNA量不足，分析中未包括五份口腔拭子样本。

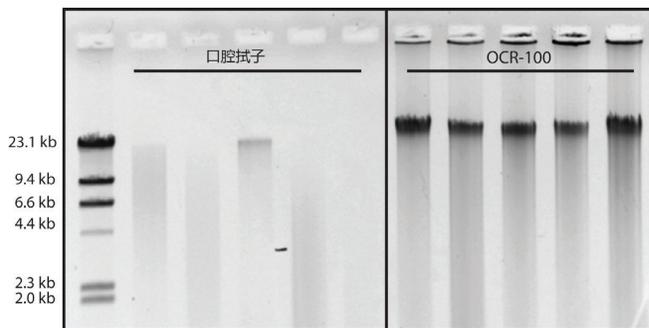


图2：ORAc collect•DNA和口腔拭子样本DNA完整性的琼脂糖凝胶分析。

口腔拭子(左)和ORAc collect•DNA套件(右)纯化DNA的琼脂糖凝胶电泳分析。每份样本的上样量为100ng。使用Lambda-Hind III消化产物作为泳道1中的标记物(DNA阶梯)。

用于体外诊断用途

ORAc collect•DNA 稳定样本并防止细菌生长

在不同时间点监控口腔样本中细菌DNA的比例。在ORAc collect•DNA样本中,在室温下储存60天后细菌DNA含量没有显著增加(图3,左图)。这归功于ORAc collect•DNA化学试剂的抑菌性质。但在口腔拭子样本中,在室温下储存仅30天后细菌DNA含量就显著增加(图3,右图)。OCR-100和口腔拭子样本中细菌DNA含量概述见表3。

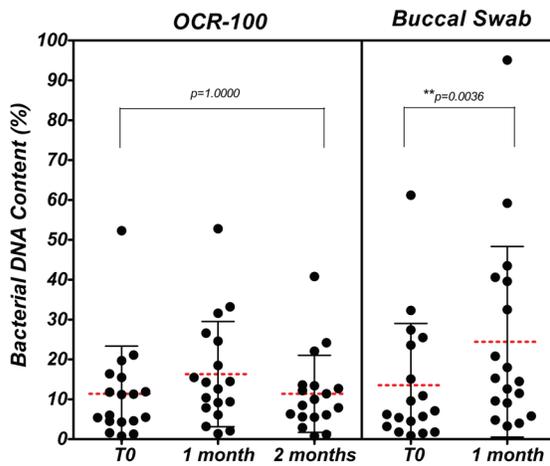


图3：口腔样本中细菌DNA含量。

ORAc collect•DNA和口腔拭子样本中细菌DNA比例的散点图。在1个月和2个月时通过PCR分析样本(仅ORAc collect•DNA)。红色虚线表示平均细菌DNA含量。黑线表示标准偏差。18例

	OCR-100	口腔拭子
平均值时间 ₀	11%	14%
平均值时间=1个月	16%	24%
平均值时间=2个月	11%	不适用 [‡]

表3：OCR-100和口腔拭子细菌DNA含量(%DNA)比较概述。

[‡]无数据

参考文献

- Laboratory protocol for manual purification of DNA from 0.5 mL of sample. DNA Genotek. PD-PR-006.
- Bacterial DNA assay. DNA Genotek. PD-PR-065.

ORAc collect•DNA尚未在美国上市。某些DNA Genotek产品可能并非在所有地区都提供。
*ORAc collect和prepIT是DNA Genotek Inc.的注册商标。此处包含的所有其他品牌和名称均为其各自所有者的财产。
所有DNA Genotek方案、白皮书和应用说明均在网站www.dnagenotek.com的支持部分提供。

ORAc collect•DNA可提供适合复杂下游应用的DNA

使用ORAc collect•DNA或口腔拭子采集的DNA用作模板,用于长程PCR扩增CYP2D6基因的3.2kb片段。所有ORAc collect•DNA样本都清楚地显示预期大小的条带(图4,右图)。所有口腔拭子样本都没有显示扩增产物。

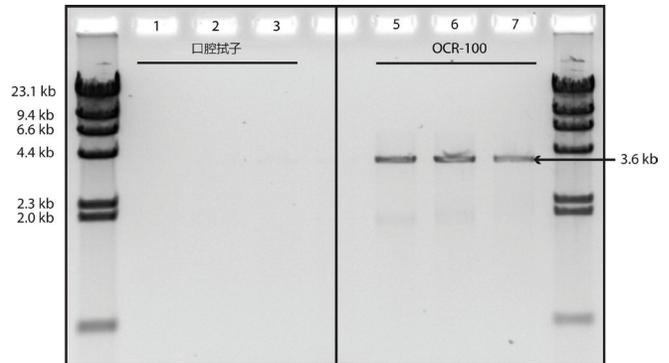


图4：长程PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳。

泳道1-3使用从口腔拭子中提取的8uL扩增DNA。泳道5-7使用从ORAc collect•DNA/唾液中提取的8uL扩增DNA。泳道4中没有样本。

结论

ORAc collect•DNA是一种非侵入性DNA自行采集套件,可用于从口腔样本中获得高质量的DNA。ORAc collect•DNA提供的DNA产量、质量和下游性能优于口腔拭子。