



唾液和血液中DNA产量的比较

C. James, R. Panford-Walsh, H.C. Birnboim, R. Iwasiow
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

在Oragene®/唾液样本[†]中采集的唾液可产生大量高质量基因组DNA, 相当于从血液中提取的DNA。

前言

采集血液用于提取基因组DNA存在许多缺点: 对于供者来说具有侵入性而且很不方便、需要训练有素的医疗专业人员抽血、必须冷藏运输和储存血液样本, 而且难以跨境运输。所有这些因素都会显著增加基因研究的成本并影响依从率。

唾液采集提供用于基因分析的基因组DNA的非侵入性替代来源。Oragene自行采集套件专门设计用于采集和在室温下长时间保存唾液中的DNA。可以在无人监督的情况下进行采集, 而且可以在环境温度下储存和运输采集的样本, 使Oragene套件成为各种基因分析项目的有吸引力的选择。

因此, 需要与从血液中提取的DNA相比, 评估用Oragene自行采集套件采集的唾液样本中提取的基因组DNA的产量和质量。本技术公告提供了与从血液中提取的DNA相比, 有关从Oragene/唾液样本中提取的人类基因组DNA的产量和质量的定量信息。

材料与方法

样本采集

从100多位供者中采集配对的血液和唾液样本。在获得同意后, 首先要求每位供者根据随套件提供的标准说明将2mL唾液采集到Oragene采集装置中。唾液采集过程无人监督。然后, 抽血人员使用BD Vacutainer EDTA试管(BD目录号36643)从每位供者抽取约8mL血液。

DNA纯化

唾液

采集后, 将Oragene/唾液样本手动摇动混合15秒并将样本储存在室温下。几天后, 根据prepit®•L2P(0.5 mL)手动纯化方案¹纯化每份样本的500µL等分试样。

血液

采集后立即将血液样本置于摇动器上并混合30分钟以避免形成微血块。以2500×g旋转采集的样本10分钟来制备血沉棕黄层, 然后弃去顶部血浆层并将血沉棕黄层转移到微量离心管中。使用Qiagen® QIAamp® Blood Mini试剂盒(目录号51106)纯化血沉棕黄层。

将来自血液和唾液的纯化DNA储存在-20°C。对小部分配对样本进行RNA酶消化和DNA分析, 以显示从血液和唾液中纯化的DNA之间的差异和相似性。

双RNA酶消化

如前所述进行RNA酶消化²。简言之, 将来自5位供者的配对血液和唾液样本解冻, 并从每份样本中取出2×25µL等分试样的DNA。用TE缓冲液将等分试样稀释至250µL。向一份血液和一份唾液中加入RNA酶A和RNA酶T1, 终浓度分别为10µg/mL和25单位/mL。将所有样本都在37°C下孵育30分钟。然后, 加入NaCl至终浓度为0.1M, 用500µL(2体积)的95%乙醇沉淀DNA。离心采集DNA并重悬于25µL的TE缓冲液中。样本在室温下静置过夜, 以确保DNA完全溶解。

[†]使用Oragene®•DNA或Oragene®•DISCOVER采集唾液样本

DNA分析

使用Varian Cary 1E分光光度计测量220至320nm的吸光度谱。从 A_{260} 和 A_{280} 值中减去 A_{320} 值,从而校正 A_{260}/A_{280} 比例。使用校正后的 A_{260} 值确定核酸浓度,其中1 ODA A_{260} 单位等于50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据DNA Genotek相对荧光(RFL)检测³,使用SYBR® Green I (Invitrogen, 目录号S-7563)和Rotor-Gene® 6000实时热循环仪(Corbett Research)通过荧光测定DNA浓度。通过凝胶电泳测定DNA的分子量并确定是否存在RNA。将共50、100、200和400ng的DNA(通过RFL测定)在0.8%琼脂糖凝胶上电泳,并通过溴化乙锭染色以及紫外透射照射观察核酸。如前所述,使用从血液或唾液中分离的50ng DNA作为模板进行PCR分析(使用釉原蛋白基因特异性引物)。通过1%琼脂糖凝胶电泳测定PCR产物的分子量。

结果

校正后的 A_{260} 读数是样本中总核酸的度量。校正后的 A_{260}/A_{280} 比例是样本纯度的度量。从唾液和血液中分离的DNA的 A_{260}/A_{280} 比例都在1.8和2.0之间(表1),表明溶液中主要含有核酸。

对于一些供者,从唾液中分离的DNA也可能含有一些降解的RNA。与DNA一样,唾液中RNA的浓度可能因供者而异。当直接比较通过吸光度和荧光测定的DNA浓度时,这一点很明显(表2)。

对于从血液中纯化的DNA,从吸光度和荧光计算的DNA浓度之间几乎没有差异,但对于未经处理的唾液DNA,差异很显著。用RNA酶A/T1处理唾液DNA后,通过吸光度测量的DNA浓度显著降低,而且与经处理和未处理的唾液样本的荧光测定的浓度相当。

	A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{280}
B53-	1.9	S53-	2.0	S53+	1.8
B54-	1.9	S54-	2.0	S54+	1.8
B59-	1.9	S59-	2.0	S59+	1.8
B65-	1.8	S65-	1.8	S65+	1.8
B73-	1.9	S73-	1.9	S73+	1.8

表1: 5对配对血液(B)/唾液(S)样本校正后的 A_{260}/A_{280} 比例。未用RNA酶A/T1处理: (-); 经RNA酶A/T1处理: (+)。

供者	血液, -RNA酶ng/ μL		唾液, -RNA酶ng/ μL		唾液, +RNA酶ng/ μL	
	吸光度	荧光	吸光度	荧光	吸光度	荧光
53	73.50	73.24	636.11	170.20	201.82	194.29
54	28.60	30.21	389.99	121.31	183.48	171.85
59	29.19	30.31	391.83	87.17	89.99	85.51
65	35.81	36.76	56.71	40.62	43.79	44.41
73	16.66	22.00	369.71	288.84	301.19	277.64

表2: 通过吸光度和荧光测定的未处理(-)血液和未处理(-)/经RNA酶处理(+)的唾液DNA的原始DNA浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)。请注意,这些结果来自相同的血液和唾液样本量。

在琼脂糖凝胶上也可以观察到从血液和唾液中分离的DNA中存在的RNA量的差异。当DNA样本中存在大量RNA时,通常可在约560碱基对以下处看到“云雾状”。对于从血液中分离的DNA,当运行超过400ng的总DNA时,只能看到微弱的条带(图1A)。但对于同一供者,运行从唾液中分离的相同量的DNA,可见一条大的亮带(图1C)。用RNA酶A/T1处理DNA后,该条带消失,表明该条带是部分降解的RNA(图1D)。

在某些DNA样本中存在大量降解的RNA不会影响DNA的质量,但会影响量化方法。来自血液和唾液样本的DNA都具有高分子量(> 23kb)。

