



## 使用Oragene®自行采集套件采集的唾液样本的人类基因组DNA含量†

C. James, R.M. Iwaszow, H.C. Birnboim  
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

估计口腔样本中人类基因组DNA的含量很重要，因为正常口腔样本（与血液样本相比）含有不同含量的细菌DNA。我们确定，在一系列50份Oragene®/唾液样本中，中位细菌DNA含量占总DNA含量的11.8%，表明88.2%是人类来源。TaqMan® RNase P检测被用作人类DNA含量的独立测定方法。使用来自同一供者的无细菌血液DNA校正效率后，确定人类DNA含量为80%。因此，这两种互补的方法得出相同的结论，即Oragene®/唾液样本中绝大多数DNA是人类来源。

### 前言

对于任何类型的基因分析（如临床基因检测、亲子鉴定、药物基因组学检测、群体研究），都优选非侵入性方法和自行采集技术。因此，Oragene®/唾液样本通常被用作高质量DNA的便利来源。虽然除人类基因组DNA以外，Oragene®/唾液样本还含有少量细菌DNA，但此细菌DNA含量的实际意义非常小。大量研究表明，对于PCR、SNP基因分型、微阵列和新一代测序等应用而言，Oragene®/唾液样本DNA可提供与血液DNA相同的结果<sup>1, 2, 3</sup>。此外，在所有口腔采集方法（如、拭子、漱口水、细胞刷）中，Oragene®套件提供产量和质量都最高的人类基因组DNA<sup>4</sup>，而细菌DNA含量最低。本技术公报提供了有关Oragene®/唾液样本中人类基因组DNA含量（通过两种不同的方法估计）的定量信息。

### 材料与amp;方法

#### 样本采集

从50位供者采集配对的血液和唾液样本。在提供知情同意后，首先要求每位供者根据套件中包含的使用说明将2mL唾液采集到Oragene®套件中。唾液采集过程无人监督。采集后不久，将Oragene®/唾液样本摇动混合15秒，然后在室温下储存。然后，抽血人员从每位供者采集8mL静

脉血，并放入BD Vacutainer EDTA试管中（BD目录号36643）。立即将血液样本置于摇动器上并混合>10分钟，避免形成微血块。

#### DNA纯化

**唾液：**采集后几天，使用prepIT™•L2P（DNA Genotek; 0.5 mL）<sup>5</sup>按照优化的Oragene®纯化方案纯化一份500µL的唾液等分试样。

**血液：**采集后立即将采集的样本以2500×g旋转10分钟来制备血沉棕黄层，然后弃去血浆，将血沉棕黄层转移到微量离心管中。根据制造商的说明，使用Qiagen的QIAamp Blood Mini试剂盒（目录号51106）从血沉棕黄层中纯化DNA。

将来自两种来源的纯化DNA都储存在-20°C。

#### DNA定量

将来自血液和唾液的纯化DNA的等分试样在室温下解冻，然后在50°C温育30分钟以确保完全溶解高分子量DNA。根据DNA Genotek的DNA定量检测方案<sup>6</sup>，使用SYBR® Green I染料（Invitrogen，目录号S-7563）和Rotor-Gene™ 6000实时热循环仪（Corbett Life Science）通过荧光测定DNA总浓度。

然后，将DNA在TE中稀释至7.5ng/µL，并通过DNA定量检测验证最终浓度。

**TaqMan RNase P检测测定人类基因组DNA：**使用随TaqMan RNase P检测试剂提供的人类基因组DNA绘制标准曲线。通过倍增稀释（每个反应5ng至30ng）绘制标准曲线。

**实时PCR：**使用TaqMan™ RNase P检测试剂（FAM）（ABI，目录号4316831）和TaqMan Universal PCR Mastermix（无AMPErase UNG）（ABI，目录号4324018）直接测定血液和唾液样本中人类DNA的含量。按照制造商的说明，操作实时PCR。向每个反应中加入15ng（2µL，7.5ng/µL）总DNA，并将人类DNA的含量

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

(通过TaqMan检测确定)除以加入反应的DNA总量(通过DNA定量检测确定)来确定人类DNA含量的比例。

### 细菌DNA检测

使用由DNA Genotek开发的细菌DNA检测。详细方案可应要求提供。

标准曲线:纯化大肠杆菌对照DNA来自Sigma(大肠杆菌菌株B,目录号D4889)。通过倍增稀释(每个反应0.31ng至20ng)绘制标准曲线。

实时PCR:PCR引物选自已知在多种微生物中保守,但不存在于真核生物中的一个16S rRNA基因区域<sup>7</sup>。使用Rotor-Gene 6000实时热循环仪通过实时定量PCR测试血液和唾液DNA中是否存在16S rRNA基因。每个反应使用15 ng (2 $\mu$ L, 7.5 ng/ $\mu$ L)总DNA,并通过同时运行掺入了5ng大肠杆菌对照DNA的第二份15ng样本等分试样来确定反应效率。通过将校正后的细菌DNA含量(通过细菌DNA检测确定)除以加入到每个反应中的DNA总量(通过DNA定量检测确定)来确定细菌DNA含量的比例。

### 结果

比较掺入和未掺入大肠杆菌对照DNA的DNA样本,结果表明实时PCR的反应效率不到100%。如果不进行校正,将低估细菌DNA的真实含量。对50份血液样本进行的细菌DNA检测表明,总DNA中细菌DNA含量的中位比例为0.03% (0%至0.48%)。从50份唾液样本中纯化的总DNA中,细菌DNA含量的中位比例为11.8% (2.0%至39.9%) (表1,图1)。

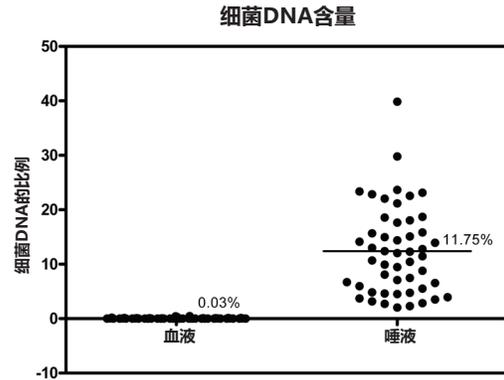


图1: 50份Oragene/唾液或血液样本中细菌DNA占总DNA的比例。水平线代表中值。

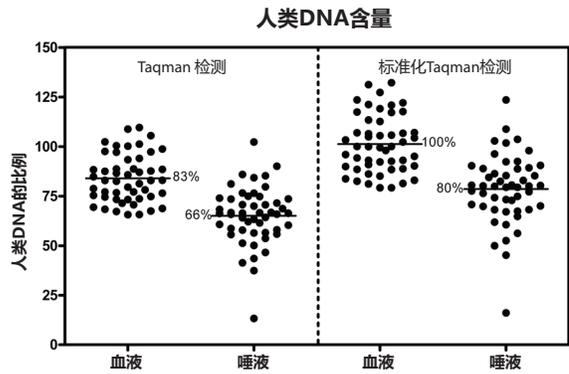


图2: 50份Oragene/唾液或血液样本中人类DNA占总DNA的比例。左图总结了TaqMan检测结果,右图显示了将血液样本中人类DNA的含量标准化为100%后的数据。水平线代表中值。

供者	细菌DNA的比例		人类DNA的比例	
	血液	唾液	血液	唾液
1	0.04%	22.04%	109.62%	61.48%
2	0.04%	5.53%	98.73%	70.69%
3	0.03%	11.47%	88.74%	71.51%
4	0.03%	9.47%	108.80%	85.86%
5	0.04%	13.01%	93.39%	66.25%
6	0.03%	3.16%	88.69%	85.24%
7	0.04%	21.16%	105.53%	66.44%
8	0.04%	10.70%	100.46%	102.31%
9	0.03%	14.39%	100.19%	76.49%
10	0.03%	2.83%	102.41%	84.32%
11	0.17%	4.52%	75.36%	64.28%
12	0.48%	9.91%	82.50%	56.43%
13	0.06%	2.29%	68.81%	55.55%
14	0.31%	14.12%	82.95%	41.39%
15	0.12%	15.84%	70.58%	50.15%
16	0.45%	15.10%	76.48%	46.57%
17	0.12%	23.36%	97.17%	63.32%
18	0.09%	12.03%	97.58%	81.16%
19	0.12%	18.70%	82.96%	65.84%
20	0.09%	18.04%	94.03%	74.82%
21	0.05%	29.79%	67.26%	60.34%
22	0.06%	17.63%	82.90%	73.98%
23	0.04%	6.72%	65.66%	62.07%
24	0.06%	7.46%	71.44%	60.71%
25	0.02%	10.44%	81.31%	79.72%
26	0.02%	12.77%	73.64%	63.99%
27	0.02%	3.94%	65.68%	69.95%
28	0.03%	8.79%	76.75%	57.81%
29	0.08%	3.52%	77.15%	13.33%
30	0.09%	22.84%	74.83%	53.67%
31	0.01%	12.41%	73.37%	68.72%
32	0.01%	8.08%	88.46%	73.60%
33	0.00%	4.60%	87.03%	73.48%
34	0.01%	39.86%	88.30%	51.27%
35	0.01%	12.30%	87.49%	66.36%
36	0.00%	2.04%	84.79%	68.31%
37	0.01%	2.72%	79.57%	66.76%
38	0.01%	23.66%	86.57%	55.85%
39	0.01%	23.13%	68.40%	58.03%
40	0.01%	14.98%	78.83%	66.69%

供者	细菌DNA的比例		人类DNA的比例	
	血液	唾液	血液	唾液
41	0.02%	18.58%	101.22%	74.99%
42	0.02%	7.09%	87.66%	56.54%
43	0.01%	6.54%	67.52%	65.83%
44	0.01%	3.72%	77.14%	90.11%
45	0.01%	13.94%	73.31%	70.60%
46	0.01%	15.66%	78.14%	66.59%
47	0.01%	4.74%	69.40%	76.59%
48	0.01%	22.55%	97.33%	58.62%
49	0.01%	4.84%	85.70%	37.44%
50	0.01%	5.98%	74.53%	43.53%
中值	0.03%	11.75%	82.92%	66.30%

表1：每位供者的详细结果，显示Oragene/唾液或血液样本中计算出的细菌或人类DNA占总DNA的比例。

## 讨论

先前一些研究报道，由于存在大量细菌DNA，口腔样本中人类基因组DNA的含量仅占总DNA的一小部分。例如，Feigelson等(2001)发现漱口水中细菌DNA占总DNA的中位比例为66%。

同样，Garcia-Closas等(2001)发现，细菌DNA的中位比例在漱口水样本中为50.5%，在细胞刷样本中为88.5%(表2)。

采集方法	细菌DNA的中位比例	参考文献
漱口水	66.0%	Feigelson等(2001)
漱口水	50.5%	Garcia-Closas等(2001)
细胞刷	88.5%	Garcia-Closas等(2001)
Oragene/唾液	11.8%	

表2：使用各种口腔采集技术获得的细菌DNA的中位比例的比较。

与这些报告相反，我们报告Oragene/唾液样本中绝大多数DNA来自人类，中位细菌含量仅为11.8%。关于我们的结果和使用其他采集方法的报告之间的差异，可以通过以下事实来解释：Oragene套件含有抗菌剂，可以防止在采集后直至DNA纯化前细菌生长。

在本报告中，我们使用了两种互补方法来评估从唾液样本中纯化的总DNA中人类DNA的含量。首先，我们使用由DNA Genotek开发的细菌DNA检测，使用针对高度保守的细菌16S rRNA基因区域的实时PCR直接测定细菌DNA含量。检测时

