

• 论 著 •

人类口腔黏膜上皮细胞提取基因组 DNA 方法的初步研究*

孙佳蕊, 马行川, 陈仲翔, 易柳, 刘湘[△], 宁勇

(湖北中医药大学检验学院, 湖北武汉 430065)

摘要:目的 探索从人类口腔黏膜上皮细胞中提取基因组 DNA 方法的可行性。方法 分别采用煮沸法和碱裂解法从人类口腔黏膜上皮细胞提取基因组 DNA, 然后与临床常用的碘化钠(NaI)法提取的人全血基因组 DNA 进行比较。结果 煮沸法和碱裂解法 2 种方法均能从口腔黏膜上皮细胞抽提到 DNA, 提取的 DNA 浓度虽低于 NaI 法, 但用 2 种方法提取到的 DNA 样品进行聚合酶链反应, 均能获得满意效果, 与常规 NaI 法无明显差异。结论 从人类口腔黏膜上皮细胞提取基因组 DNA 简便、快捷、无损, 在临床上具有潜在的应用价值。

关键词:口腔黏膜上皮细胞; 基因组 DNA; 提取

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1513-03

Primary study on methods of extracting genomic DNA from human oral epithelial cells*

Sun Jiarui, Ma Xingchuan, Chen Zhongxu, Yi Liu, Liu Xiang[△], Ning Yong

(School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei, 430065, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of methods of extracting genomic DNA from human oral epithelial cells. Methods The alkaline lysis and boiling were used to extract the genomic DNA from human oral mucosal epithelial cells. Then the methods were compared with the traditional method of sodium iodide (NaI), in which DNA was extracted from human whole blood. Results The genomic DNA could be extracted from oral mucosal epithelial cells by both methods, which had a lower concentration. But the polymerase chain reaction amplification were successful and there was no significant differences among all methods. Conclusion The methods of extracting genomic DNA from the human oral mucosal epithelial cells is simple, efficient and harmless, which has potential value of clinical applications.

Key words: oral mucosal epithelial cell; genomic DNA; extraction

基因组 DNA 的提取是分子生物学检验工作的最基本技术。临床常用的方法有碘化钠(NaI)法、酚-氯仿法、Chelex-100 法和试剂盒法等^[1-3]。这些方法大多使用人全血作为提取 DNA 标本, 采样存在一定困难, 如安全隐患和患者拒绝率较高等, 同时这些方法成本比较高, 操作较繁琐, 试剂对人体具有一定的毒性^[4]。因此, 探索一种取材简便、操作快捷、成本较低的方法来采集、提取 DNA 具有重要的临床意义。口腔黏膜上皮细胞的采集十分简便、快捷, 不仅方便易得, 而且无创, 患者易于接受。已有研究表明, 漱口液中提取到的 DNA 数量与质量较理想^[5-6], 且口腔洗液及口腔黏膜上皮细胞的基因多态性检测结果与全血标本的 DNA 分析结果完全一致^[7-8]。因此, 本研究采用碱裂解法与煮沸法 2 种简易方法提取口腔黏膜上皮细胞基因组 DNA^[9-10], 并将提取到的 DNA 进行聚合酶链反应(PCR), 比较其与 NaI 法的优缺点, 以探讨 2 种简易方法从口腔黏膜上皮细胞提取基因组 DNA 的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本采集

1.1.1 血液标本 取静脉全血 5 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中, 共计 50 份, 来自 50 例湖北中医药大学体检学生中的健康志愿者。

1.1.2 口腔黏膜上皮细胞的提取 口腔拭子均由上述 50 例健康志愿者提供。提供者使用温开水漱口后, 用医用消毒棉签在颊黏膜两侧轻刮多次, 置于装有生理盐水 1.5 mL 的 EP 管

中, 多次搅动使棉签上的细胞尽可能多地脱落入生理盐水中。

1.2 仪器与试剂 TGL-16B 台式离心机购自上海安亭科学仪器厂, Catalog # 186-1096 PCR 扩增仪购自 Bio-Rad 公司, JY600C 电泳仪购自北京君意东方有限公司, BioCapt 凝胶成像分析系统购自法国 Vilber Lourmat 公司。6 mol/L NaI 溶液、氯仿/异戊醇(24:1)、异丙醇、70%乙醇、生理盐水、5×TBE (54 g Tris-HCl, 27.5 g 硼酸, 20 mL 500 mmol/L EDTA)、细胞裂解液(1 mL 0.2 mol/L NaOH、4 μL 2 mmol/L EDTA 混匀)、Taq DNA 聚合酶、5×Taq 缓冲液、10 mmol/L dNTP、DNA 标记物(100~600 bp)、上样缓冲液、琼脂糖等。

1.3 方法

1.3.1 NaI 法提取人全血基因组 DNA 取自愿者血液 200 μL 于 EP 管中, 编号, 加入 200 μL NaI, 振荡 2~3 min; 加入 400 μL 氯仿/异戊醇, 摇匀, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清 400 μL 至新 EP 管, 加入 200 μL 异丙醇, 摇匀后 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 mL 70%乙醇, 离心 10 min, 弃上清; 加入 ddH₂O, 取 5 μL 进行 PCR 或电泳。

1.3.2 煮沸法提取人类口腔黏膜上皮细胞基因组 DNA 将装有口腔黏膜上皮细胞标本的 EP 管室温下 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 再加入 500 μL 生理盐水, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清; 用生理盐水反复清洗 3 次以上, 加入 50 μL 5×TBE, 置于沸水中 5 min; 取出后振荡 2~3 min, 再加 50 μL TBE, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清于新 EP 管中备用。

* 基金项目:中国博士后科学基金面上项目(2014M552023);湖北省自然科学基金面上项目(2014CFB220)。 作者简介:孙佳蕊,女,在读本科生,主要从事分子生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail:liuxiang20022301@163.com。

1.3.3 碱裂解法提取人口腔黏膜上皮细胞基因组 DNA^[9]

口腔黏膜上皮细胞标本的处理同上,再用生理盐水反复清洗 3 次以上后,加入 60 μL 细胞裂解液,振荡 2~3 min。将 EP 管置于 75 °C 恒温水浴箱加热 10 min,取上清 40 μL 至新 EP 管,加入 100 μL ddH₂O,混匀备用。

1.3.4 紫外分光光度法测定样品纯度和浓度 吸取 5 μL 的 DNA 样品,加水稀释至 1.0 mL,混匀,260 nm 和 280 nm 处读取吸光度(OD)值,计算样品 DNA 浓度并鉴定其纯度。

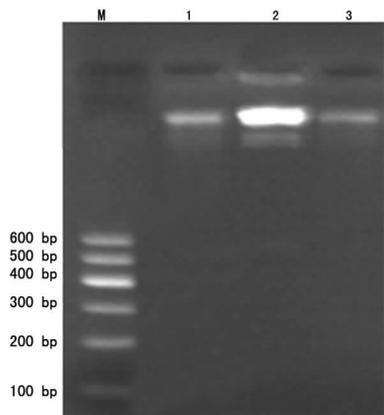
1.3.5 琼脂糖凝胶电泳 取 5 μL PCR 产物和 1 μL 上样缓冲液,充分混匀后加入至 1.5% 琼脂糖凝胶的点样孔中,以 0.5×TBE 缓冲液,100 mV/cm 的电压电泳 40 min,在凝胶成像仪中观察结果。

1.3.6 PCR 反应 选取一段 200 bp 的 CYP2D6 基因片断为标志 DNA 进行 PCR 扩增,其中上游引物(P1):CCA TTT GGT AGT GAG GCA GGT AT,下游引物(P2):TGG TCG AAG CAG TAT GGT GT,反应总体积为 50 μL,包括:ddH₂O 32 μL,10×缓冲液 5 μL,MgCl₂(25 mmol/L) 5 μL,dNTPs(10 mmol/L) 1 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,Taq 酶(1 U/μL) 2.5 μL,DNA 模板 2.5 μL。扩增程序为 95 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 45 s,进行 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,方法同前。

1.3.7 比较 3 种方法的优缺点 从试剂种类、试剂毒性、提取时间、标本来源、标本提取造成伤害、提取 DNA 浓度等方面比较 3 种方法的优缺点。

2 结 果

2.1 不同方法所得 DNA 样品浓度和纯度的比较 煮沸法和碱裂解法从口腔黏膜细胞中提取的 DNA 浓度分别为 0.11~0.15、0.15~0.19 μg/μL,产率分别为 5~10 微克每次和 10~15 微克每次,而 NaI 法(全血)提取的 DNA 浓度和产率分别为 0.3~0.4、30~35 μg/mL,均高于前二者,但 3 种方法的 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 均约为 1.7。从 NaI 法提取全血 DNA 条带最亮,浓度较高;另 2 种方法提取的口腔细胞 DNA 条带较暗,浓度较低,但是从全血提取的 DNA 泳道可见微弱降解带,而从口腔黏膜上皮细胞提取的 DNA 无明显降解带。凝胶电泳结果见图 1。

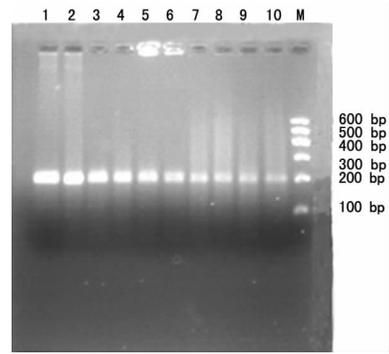


M:DL600 DNA 标记物;1:碱裂解法提取的基因组 DNA 产物;2:NaI 法提取的基因组 DNA 产物;3:煮沸法提取的基因组 DNA 产物。

图 1 3 种方法提取的基因组 DNA 电泳图

2.2 不同方法 DNA 样品 PCR 结果 在紫外灯下观察各样品 PCR 产物电泳结果,可见 200 bp 单一特异性条带,表明以 3 种方法提取的基因组 DNA 分别作模板进行 PCR 均获得成功。

见图 2。



M:DL600 DNA 标记物;1,2:NaI 法 PCR 结果;3,4,5,6:碱裂解法 PCR 结果;7,8,9,10:煮沸法 PCR 结果。

图 2 PCR 产物电泳图

2.3 3 种方法的优缺点比较 碱裂解法与煮沸法具有操作简便,药品用量少,快速,无损,危险性低等优势。见表 1。

表 1 3 种方法的优缺点比较

方法	NaI 法 (全血)	煮沸法(口 腔黏膜细胞)	碱裂解法(口 腔黏膜细胞)
试剂种类	多	少	少
试剂毒性	有	无	无
提取时间	约 40 min	约 18 min	约 20 min
标本来源	较难得到	容易得到	容易得到
标本提取造成伤害	有	无	无
提取 DNA 浓度	多	较少	较多

3 讨 论

NaI 法是一种快速、经济、高效提取人血基因组 DNA 的方法,可广泛应用于大规模人群基因组学研究^[3]。但该方法所用 NaI 易分解,氯仿有一定的挥发性和毒性,且有多步离心过程。在本研究中,尽管 NaI 法提取全血中细胞基因组 DNA 的电泳图像条带最亮,但其操作却在 3 种方法中最复杂,耗时最多,试剂消耗最多,且所用试剂中含有不稳定的药品与多种易挥发物及有毒物质,另外,静脉采血会对人体造成一定的损伤,受试者会有一定的抵触性。本研究将 3 种方法的方法学特点进行了简单总结,碱裂解法与煮沸法具有操作简便,药品用量少,快速,无损,危险性低等优点。

需要注意的是,因煮沸法裂解细胞仅通过沸水水浴,而口腔拭子中含杂质较多,故进行煮沸前应对标本进行清洗,减少杂质对所提取 DNA 浓度的影响;由于沸水温度已达到使 DNA 分子变性所需温度,故煮沸时间也不可过久,一般以 5 min 左右为宜。该方法所需试剂单一,操作简单快捷,适合批量标本 DNA 提取。碱裂解法用碱液(或细胞裂解液)、高温(75 °C)对口腔黏膜上皮细胞进行处理,使细胞中的 DNA 游离出来,加入的中和液(TE 缓冲液)和裂解液中的 EDTA 均能在一定程度上保护游离出来 DNA 的完整性,因此该法除具有煮沸法的优点外,提取的 DNA 浓度略高,但不能过久放置,这与 DNA 所在的碱性环境有一定关系,当改变碱裂解液的酸碱度,将其碱性降低甚至变为弱酸性,则所提取的 DNA 储存时间可明显延长。此外,2 种方法在采集口腔黏膜上皮细胞时,都需注意要求受试者漱口,保证口腔的洁净度,防止取(下转第 1517 页)

3 讨论

GFR 是评价 CKD 患者病情、演变、转归、随访的重要手段,然而,准确及时地测量 GFR 在临床上并不现实,目前认为测定 GFR 的金标准是菊粉清除率法,但其测定时程序繁琐,不适用于临床应用。核素检查虽然准确但因价格较贵而不适合门诊随访。

有研究证实,利用 Cr、年龄、性别等指标,计算得出的 eGFR,能较好地反映 GFR 水平^[3-4]。故各种基于 Cr 的 eGFR 估算方程相继被提出以弥补 GFR 本身监测不便的不足,本文以 2008 年美国 CKD-EPI 开发方程计算 GFR,同 CKD 患者生化指标比较,并与通过简化 MDRD 和中国人校正的 MDRD 方程估算的 GFR 比较。结果显示:(1)CKD 患者中,其 EPI-GFR 与 Cr、UA、CysC、P、24 hUP 呈显著负相关($P < 0.05$),与 Hb 差异有统计学意义($P < 0.05$),呈显著正相关,随着病程进展,GFR 逐渐下降,患者贫血也逐渐加重,ALB、Ca 出现不同程度的下降,与文献报道一致^[5-9]。Cr、UA、CysC、ALB、Ca、P、Hb、UP 等这些指标与 GFR 的联合分析,提高了对 CKD 早期损伤的检出率及对病程进展的判断,使对患者的诊治更加全面合理。(2)简化-GFR 和校正-GFR 与 EPI-GFR 的相关性均较好(r 分别为 0.997 和 0.995, $P < 0.05$),提示由 3 种公式计算所得的 eGFR 一致性好。EPI-GFR 比简化-GFR 平均值高约 0.49 mL/(min × 1.73 m²),比校正-GFR 平均值低约 0.81 mL/(min × 1.73 m²)。提示简化 MDRD 公式总体高估了 CKD 的患病率,而校正 MDRD 公式则低估了 CKD 的患病率,EPI-GFR 正好弥补了前者过度治疗和后者降低诊断的缺陷。(3)简化-GFR、校正-GFR 与 EPI-GFR 对 CKD 分期的一致性较好($Kappa$ 值分别为 0.908、0.904),有部分肾病患者通过 CKD-EPI 方程得到的分级,比通过简化 MDRD 方程和校正 MDRD 方程得到的 GFR 分级早期要低,晚期则高。

因此以 CKD-EPI 开发方程计算 GFR,对 CKD 患者肾功能的损伤评价有较好相关性及较好的预测能力,能进行更好的风险预期,与传统的 GFR 的相比测定简便易行,可弥补其它评估方程导致的过度治疗或降低诊断的缺陷,为 CKD 分期提供

了极大便利,可在临床常规肾功能检测中推广使用,为临床治疗提供及时、方便、准确的参考。

参考文献

- [1] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Work-Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2013, 3(1):1-150.
- [2] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate[J]. *Ann Intern Med*, 2009, 150(9):6U7-604.
- [3] 全国 eGFR 课题协作组. MDRD 方程在我国慢性肾脏病患者中的改良和评估[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006, 22(10):589-595.
- [4] 贾珂珂,杨硕,乔蕊,等. 6 种基于肌酐的肾小球滤过率估算公式在健康人群中的应用评估[J]. *检验医学*, 2013(12):1077-1082.
- [5] 国秀芝,秦岩,郑可,等. 基于肌酐和胱抑素 C 的四个 CKD-EPI 方程对我国慢性肾脏病患者的适用性研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(9):798-804.
- [6] 李萍,冷峰,徐维家. 改良 MDRD 公式、血清肌酐、胱抑素 C、 β_2 微球蛋白及甲状旁腺素在慢性肾病早期诊断中的临床应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(22):3013-3014.
- [7] 庄兴,张琦. 不同肾小球滤过率预估公式的评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(2):162-165.
- [8] 孟立强,王玉,张路霞,等. 中晚期慢性肾脏病患者肾功能进展危险因素—单中心慢性肾脏病专业门诊队列研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(8):555-560.
- [9] 王学晶,徐国宾,李海霞,等. 血清肌酐和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 及估算的肾小球滤过率在评价慢性肾病患者肾小球滤过功能中的比较研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(4):415-418.

(收稿日期:2015-02-10)



(上接第 1514 页)

到过多杂质。

综上所述,本研究结果表明碱裂解法与煮沸法均能从口腔黏膜上皮细胞中抽提到足够量的 DNA 进行后续实验分析,具有简易、方便、对人体无创,采样容易等优势,可应用于大规模流行病学研究中提取基因组 DNA,其抽提方法如能标准化,将在临床上大批量标本分析时具有较大的应用价值。

参考文献

- [1] 范海荣,夏永静,孙福成,等. 四种全血基因组 DNA 提取方法的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(6):535-536.
- [2] 畅晶晶,张素华,李莉. 全血中 DNA 6 种提取方法的比较[J]. *法医学杂志*, 2009, 25(2):109-111.
- [3] 范俊丽,郑芳,付小曼,等. 三种方法提取外周血 DNA 比较分析[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(23):3933-3935.
- [4] 阎宏伟,胡靖,袁洪,等. 四种微量全血 DNA 提取方法的比较[J]. *中国医学工程*, 2004, 12(5):43-45.
- [5] Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtain-

ing genomic DNA in molecular epidemiological studies[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998, 7(8):719-724.

- [6] 刘海军,秦雪娇,张林娜,等. 由漱口液提取人基因组 DNA 量与质的分析[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(6):678-681.
- [7] de Vries HG, Collèe JM, van Veldhuizen MH, et al. Validation of the determination of deltaF508 mutations of the cystic fibrosis gene in over 11 000 mouthwashes[J]. *Hum Genet*, 1996, 97(3):334-336.
- [8] 程家蓉,关赛芳,王学励,等. 从口腔细胞获取基因组 DNA 作基因多态性分析的可行性[J]. *癌症*, 2005, 24(7):893-897.
- [9] 朱伟锋,刘卓琦,吴金兰,等. 碱裂解法快速提取口腔拭子 DNA 对 CHRNA3 基因多态性的研究[J]. *重庆医学*, 2012, 41(8):764-765.
- [10] 李华,梁东春,郭刚,等. 自口腔黏膜上皮脱落细胞中快速提取人基因组 DNA 的方法比较[J]. *中国检验医学与临床*, 2002, 3(2):61-62.

(收稿日期:2015-01-25)