



非侵入性地辅助采集幼儿唾液，用于提取大量高质量的基因组DNA

J.O. Niles, A. Jackson, S. Rabuka, and R.M. Iwasiov
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

摘要

数千名受试者的大型人群研究越来越多地被用于研究复杂疾病的遗传决定因素。唾液是基因组DNA的便利来源，因为可以无痛和非侵入性方式采集唾液。优选可自行采集的非侵入性方法和技术，因为有助于提高依从率并降低成本。出于这个原因，许多大规模研究现在都使用用Oragene®套件[†]采集的唾液中提取的DNA作为下游应用的基因组DNA来源。来自唾液的人类基因组DNA可用于基因分型、测序和微阵列分析。为了便于从所有年龄段人群(包括无法吐唾液的人)中非侵入性地采集基因组DNA，我们描述了一种使用海绵将唾液从供者口腔转移到Oragene套件中的新方法。与口腔拭子不同，这种方法将含有大量高质量DNA的唾液转移到Oragene套件中，该套件可保存DNA并防止细菌生长。我们报告该方法可用于采集中值产量为17.3µg的基因组DNA，中位A₂₆₀/A₂₈₀比例为1.8，分子量> 23kb。采集的样本在环境温度下稳定多年，可用于多种下游应用。

材料与方法

	<p>1 将一块海绵放在颊囊中。轻轻地沿着牙龈和颊部移动海绵30秒，以尽可能多地吸收唾液。</p>
	<p>2 海绵吸满唾液后，将海绵插入漏斗的V形缺口中。沿V形缺口内壁扭转和推动，从海绵中挤出唾液。唾液会流入试管中。</p>
	<p>3 使用同一海绵重复这些步骤(1到2)，直到液体唾液(不是气泡)到达填充线。每次都要检查海绵是否有损坏，然后再伸进供者口腔。如果第一块海绵有任何磨损迹象，使用另一块海绵。在硬表面上敲击试管底部以减少气泡数量。</p>
	<p>4 用一只手直立握住试管。用另一只手盖上试管盖(如图所示)，方式是用力按压试管盖，直到听到响亮的咔嚓声。试管盖中的液体将释放放入试管并与唾液混合。确保盖紧试管盖。</p>
	<p>5 保持试管直立。从试管上拧下漏斗。</p>
	<p>6 用小试管盖盖紧试管。</p>
	<p>7 试管盖好后，摇动5秒钟。丢弃或回收漏斗。丢弃海绵。</p>

图1：使用海绵和Oragene套件协助采集唾液。

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

结果

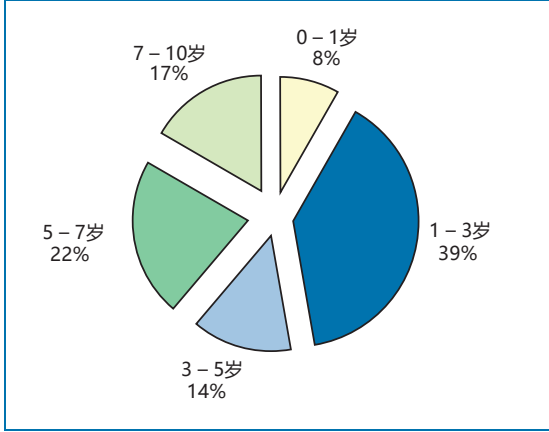


图2：供者年龄的分布

- 研究中招募了9个月至10岁的儿童。
- 儿童的中位年龄为3.5岁。
- 共分析了77名儿童的样本。

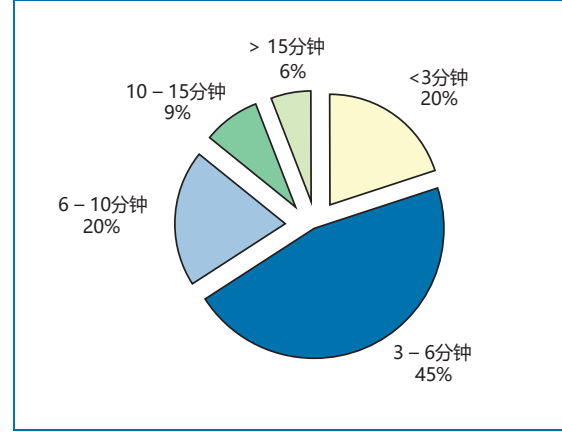


图3：采集唾液至填充线所需的时间

- 无论年龄大小, 所有供者中有65%能够在6分钟内完成唾液的采集。

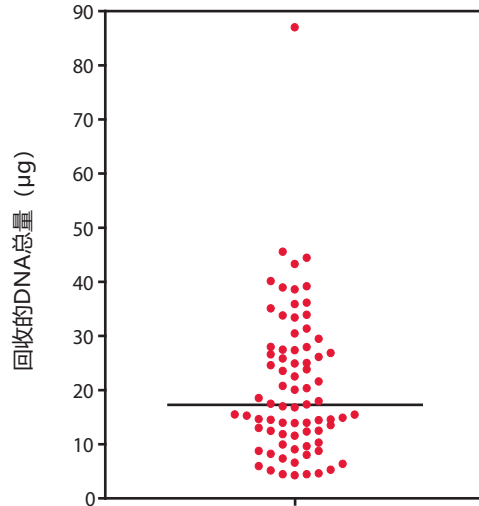


图4：回收的DNA总量。

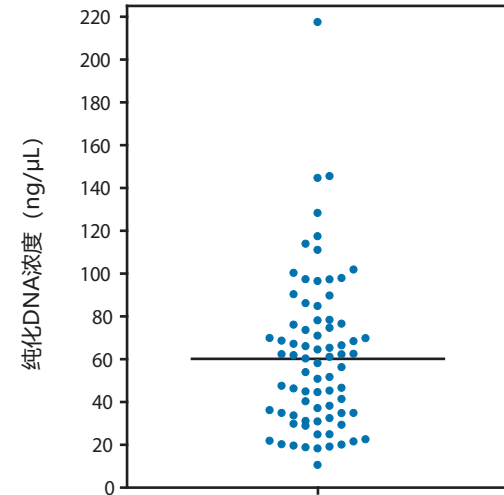


图5：从采集的唾液中纯化的DNA的浓度。

- 根据prepIT®•L2P (DNA Genotek) 纯化方案¹纯化采集的样本。
- 使用SYBR® Green I dye²通过荧光定量纯化的DNA。
- 图4显示了从每个孩子采集的DNA总量。回收的DNA中值为17.3 μg。
- 得到的纯化DNA的中值浓度为60.2 ng/μL。

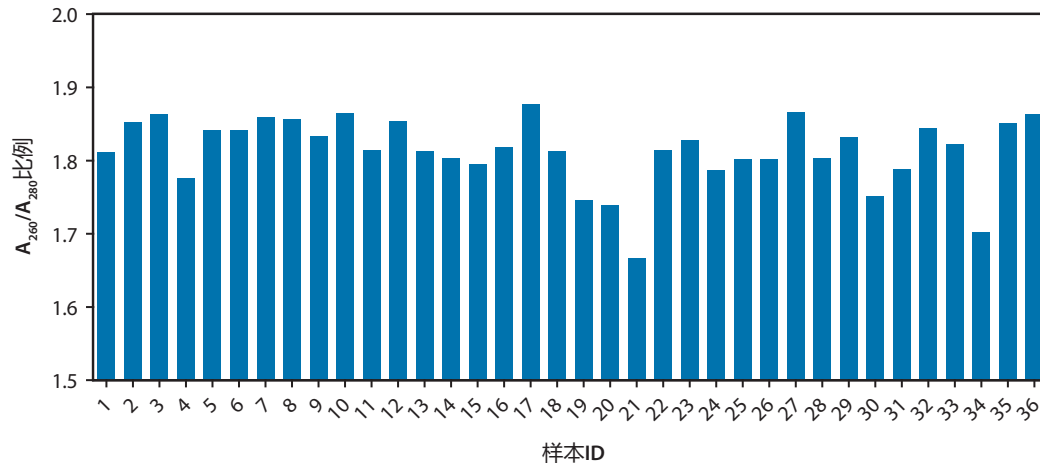


图6：纯化DNA校正后的A₂₆₀/A₂₈₀比例。

- 通过从A₂₆₀和A₂₈₀值中减去A₃₂₀值(代表由不溶性物质引起的散射光)来计算校正后的A₂₆₀/A₂₈₀比例。
- 纯化DNA经A₃₂₀校正的A₂₆₀/A₂₈₀中位比例为1.82。

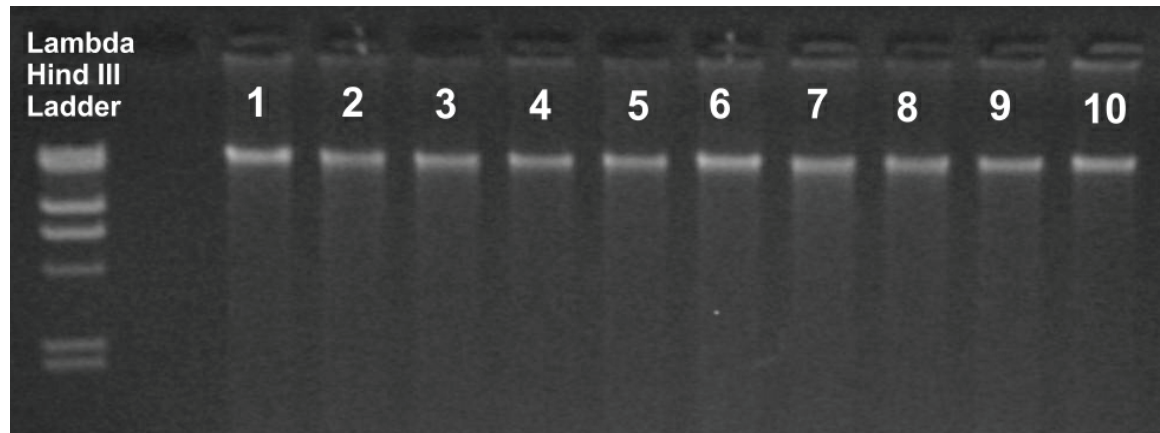


图7：显示高分子DNA的代表性琼脂糖凝胶电泳。

- 通过0.8%琼脂糖凝胶电泳评估纯化DNA的分子量。与Lambda-Hind III阶梯相比, 纯化的DNA始终具有>23kb的分子量。

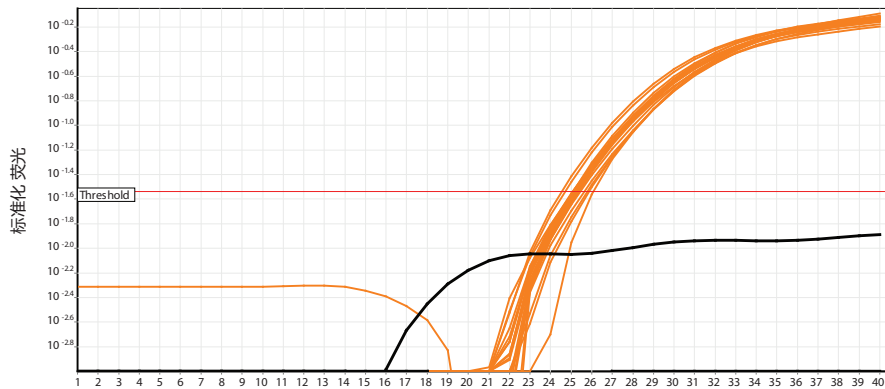


图8：人胸苷酸合成酶基因的实时PCR结果。

- 纯化的DNA适用于实时PCR。将纯化的DNA稀释至4ng/μL, 并将20ng用于PCR反应。
- 橙线代表测试的20份样本。每个样本的性能都同样好, 未观察到抑制。黑线代表无模板对照。

结论

- 本研究纳入了77名9个月到10岁的儿童。按照提供的说明, 一名成年人协助从每位供者采集唾液样本。使用海绵成功采集了所有77名参加者的唾液。
- 在使用prepIT纯化方案¹纯化样本后, 评估了样本的质量。各样本的分析指标在表1中总结。
- 本方法提供了一种简单的非侵入性技术, 用于采集适合下游应用的大量高质量基因组DNA。

供者年龄	3.5岁
DNA总量	17.3μg
纯化DNA的浓度	60.2ng/μL
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比例	1.82

表1：研究结果概要；报告中值。

参考文献

- ¹ Laboratory protocol for manual purification of DNA from 0.5 mL of sample. DNA Genotek. PD-PR-006.
- ² DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced with DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.

Oragene®-DNA尚未在美国上市。

Oragene®-DISCOVER仅供研究使用, 不得用于诊断程序。

*Oragene是DNA Genotek Inc.的注册商标, prepIT™是DNA Genotek Inc.的商标。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。

对于所有DNA Genotek方案、白皮书和应用说明, 详见www.dnagenotek.com的支持版块。