四种方法获取 DNA 用于检测 IL-1 基因多态性的比较分析

段海燕 章锦才 黄 萍 张蕴惠

摘要 **目的**:寻求一种能方便、简捷、有效地获取患者 DNA 的方法,以用于检测患者基因多态性。**方法**:采用 4 种方法获取患者 DNA,即静脉血中用酚 - 氯仿法抽提,指尖血血痕中用 Chelex-100 法抽提,颊粘膜拭子中用 Chelex-100 法抽提及直接用干燥血痕作为 PCR 扩增的 DNA 模板。对同一个体分别用 4 种来源的 DNA 检测其 IL-1 基因多态性,比较结果的特异性和敏感性。**结果**:颊粘膜拭子抽提 DNA 作基因多态性分析特异性高、敏感性强,优于静脉血酚 - 氯仿法抽提 DNA,且取颊粘膜拭子无创、方便。Chelex-100 法抽提 DNA 比酚 - 氯仿法更简单、快速。**结论**:颊粘膜拭子结合 Chelex-100 法抽提 DNA 适于对牙周炎患者作基因多态性分析。

关键词 基因多态性 聚合酶链反应—内切酶片断长度多态性 IL-1 基因 牙周病

Buccal Swab: A Convenient Source of DNA for Analysis of IL-1 Gene Polymorphisms

Duan Haiyan, Zhang Jincai, Huang Ping, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: PCR-RFLP based techniques have become standard procedures for gene polymorphism screening. Peripheral venous blood is currently the most commonly employed source of DNA for human genome analysis. However, it has many practical disadvantage and inherent limitations to use blood as DNA source. Blood sampling is invasive, painful and involves a potential risk of contamination with hepatitis. The classic procedure to extract genomic DNA from whole blood is phenol/chloroform technique, which is relative complicated and time consuming. Therefore, this study was performed to try an alternative instead of using blood as DNA source for gene polymorphism analysis. **Methods:** Four methods were employed to obtain DNA from the same subject including DNA from venous blood through phenol/chloroform extraction, DNA from dried blood spot through Chelex 100 technique, DNA from buccal swab through Chelex 100 technique and the dried blood spot directly as DNA template for PCR. Then, these various forms of DNA were used in PCR RFLP procedure to analyze IL-1 gene polymorphisms, and their specificity and sensitivity were evaluated. **Results:** Our results indicate that both the buccal swab and the blood based assays reached complete concordance in typing the IL-1 gene polymorphisms, while the Chelex 100 procedure for extracting DNA from buccal swab is much simpler and more rapid. It is non-invasive to get buccal swab. The amount of DNA obtained through one buccal swab is 63.8μg ±18.7μg, which is enough for 10 PCR reactions. **Conclusion:** Buccal swab appears to be an excellent source of DNA for detection of polymorphisms of human IL-1 gene.

Key words: gene polymorphism PCR-RFLP IL-1 gene periodontitis

为检测患者基因多态性需获得患者的 DNA,经典的方法是抽取静脉血,用酚—氯仿法抽提,获得高纯度的 DNA。此法操作繁杂耗时,使用试剂较多,不便在临床检验中推广,而且此法采血量较多,患者不易接受。寻求能方便、简捷、有效、准确地获取患者 DNA 的方法具有重要的实用价值。本实验采用 4 种方法获取患者 DNA,即静脉血中用酚—氯仿法抽提,指尖血血痕中用 Chelex-100 法抽提,颊粘膜拭子中用 Chelex-100 法抽提及直接用干燥血

本课题为国家教委跨世纪人才培养计划基金资助项目(1996)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院

痕作为 PCR 扩增的 DNA 模板。通过对同一个体分别用 4 种来源的 DNA 检测其 IL-1 基因多态性,比较检测结果的特异性和敏感性,寻找一种操作简单、快捷、价廉、特异性和敏感性均更优于传统方法,对患者创伤小、需样量少的获取 DNA 的方法。

1 材料和方法

1.1 样本收集

选 10 名志愿者,每人分别收集以下 3 种标本:①抽取前臂静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,-20 ℃保存;②取指尖血 1 滴于消毒滤纸上,室温下自然干燥过夜,形成血痕,4 ℃保存;③取颊粘膜拭子,室温下自然干燥,4 ℃保存。

1.2 DNA 模板

①静脉血样本抽提 DNA,取静脉血样本,室温解冻,PBS 洗涤 2 次,离心 15min,取底部沉淀物备用。加 DNA 抽提缓冲液和 RNA 酶,混匀,37 ℃水浴 1 h,再加蛋白酶 K,55 ℃水浴 3 h。加等体积饱和酚,混匀,离心 15 min,取上清液并移管,重复此步骤,酚抽提 2 次。加等体积饱和酚:氯仿:异戊醇(25∶24∶1,v/v),混匀,离心 15 min,取上层粘稠液并移管。加氯化锂(4mol/L)1/10 体积,及 2 倍体积预冷乙醇,混匀,见白色絮状沉淀,钩出絮状物,自然干燥,加 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl,1mmol/L EDTA,pH8.0)复溶 DNA,4 ℃保存。用 UV-240 紫外分光光度自动记录仪测定 DNA 样品在 260nm 和 280nm 处的吸光度(OD 值),计算 DNA 含量和判断 DNA 纯度。

②血痕抽提 DNA[1],加 Chelex-100 200 μl,浸没血痕。再加蛋白酶 K(20 mg/ml)10μl,混匀,55 ℃水浴 3 h。煮沸 8 min,灭活蛋白酶 K。标本置于冰上 3 min,使 DNA 复性。离心 2 min,取上清,-20 ℃保存。测 DNA 含量。

③颊粘膜拭子抽提 DNA,剥取拭子表层,浸于 Chelex-100 中,其余步骤同②。

④不专门抽提 DNA 的干燥血痕本身。

1.3 引物

共 3 对引物,由美国生命技术公司合成。①IL-1A-889/NcoI 多态性目的基因引物[2]:引物 A 为 5′-AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC-3′,引物 B 为 5′-TTACATATGAGCCTTCCATG-3′。②IL-1B + 3953/TaqI 多态性目的基因引物[3]:引物 C 为 5′-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3′,引物 D 为 5′-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3′。③IL-1RN 内含子 II VNTR 多态性目的基因引物[4]:引物 E 为 5′-CTCAGCAACACTCCTAT-3′,引物 F 为 5′-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3′。

1.4 试剂和设备

10 ×PCR 缓冲液,BSA、dNTP、Taq DNA 聚合酶,Nco I 限制性内切酶,Taq I 限制性内切酶由宝灵曼公司提供。PCR 扩增仪(Hema 480,USA),高速台式离心机(TCL-16G)。

1.5 目的基因扩增和酶切分析

静脉血和颊粘膜拭子所抽提的 DNA,PCR 反应条件为:总反应体积 20 μl,引物 A、B,或 C、D,或 E、F 各 0.6 μmol/L,dNTPs 350 μmol/L,10 ×PCR 缓冲液 2 μl,TaqDNA 聚合酶 1.25 U,模板 DNA 3 μl,用无菌去离子水补足总体积至 20 μl,混匀,加入无菌石蜡油 30 μl 覆盖反应液。

血痕抽提 DNA 或干燥血痕本身作为 DNA 模板,PCR 反应体系需加入 1%牛血清白蛋白(BSA)2μl,干燥血痕大小约 1mm^2,其余条件同上。

循环参数:94 ℃预变性反应 5 min,94 ℃变性 1 min,48 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min,5 个循环;94 ℃变性 1 min,46 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min,25 个循环;72 ℃保温 5 min,4 ℃保存。

IL-1A-889 目的基因扩增片段长度为 99bp,NcoI 酶切后出现 83bp + 16bp 两个片段,即存在酶切位点者为等位基因 I;若只出现 99bp 片段,即酶切位点变异者为等位基因 II。

IL-1B + 3953 目的基因扩增片段长度为 194bp,TaqI 酶切后出现 85bp + 97bp + 12bp3 个片段,即存在 2 个酶切位点者为等位基因 I;若只出现 182bp + 12bp 2 个片段,即只有一个酶切位点者为等位基因 II。

IL-1RN 内含子 II中含有 86bp 重复单元,扩增出 240bp、326bp、412bp、498bp 和 584bp 的片段,分别代表等位基因 II、IV、I、III、V。

2 结 果

2.1 DNA 定量检测

1 支颊粘膜拭子所获取 DNA 约为 63.8μg ± 18.7μg,相当于 2～3ml 静脉血中抽提的 DNA 量。每次 PCR 反应只需约 200ng DNA,所以 1 支颊粘膜拭子中抽提的 DNA 量已足够作数十次 PCR。

2.2 3 个位点的基因型分析

同一个体分别用 4 种形式的 DNA 作 PCR 扩增和酶切,其结果一致。其中静脉血抽提 DNA 和颊粘膜拭子抽提 DNA 作 PCR 扩增的敏感性最高,靶带最明亮清晰;血痕抽提 DNA 次之;血痕直接扩增的效果不稳定,仅部分个体扩增出靶带。静脉血抽提 DNA 和颊粘膜拭子抽提 DNA 的特异性最好,杂带最少。血痕提取 DNA 的杂带较多,但离靶带距离远,不影响基因型分析;血痕直接扩增的杂带最多,且与靶带邻近,易混淆结果(图 1)。

3 讨 论

静脉血和血痕中的 DNA 来自白细胞,颊粘膜拭子中的 DNA 来自颊粘膜上皮细胞及少量唾液中

的白细胞[5]。由于口腔内定植了数百种微生物,从颊粘膜拭子中抽提的 DNA 里肯定含有相当数量的细菌、霉菌或病毒 DNA。但 Baechtel 等[6] 证明细菌和霉菌 DNA 并不干扰人类 DNA 模板的 PCR 反应。本实验结果也表明,颊粘膜拭子 DNA 与静脉血 DNA 扩增出的基因带型完全吻合,这与 van Schie 等[7] 的结果一致。van Schie 等收集患者的全唾液,用从中提取的 DNA 检测患者 FcγR ⅡA 和 FcγR ⅢB 基因多态性,结果全唾液 DNA 扩增出的基因带型特异性很高,未见任何杂带。这可能是因为口腔微生物的基因组 DNA 与人类 IL-1 基因几乎无同源性,不会发生交叉反应。所以,颊粘膜拭子中口腔微生物的存在不会干扰基因分型结果。

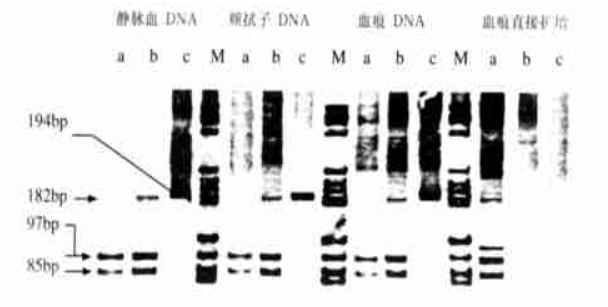

图 1 4 种来源 DNA 作 IL-1B + 3953/ TaqI 基因型分析电泳结果
a、b:酶切产物,a 为纯合子,b 为杂合子;
c: PCR 产物;M: Marker 为 pBR 322/ Hae Ⅲ

酚—氯仿法抽提 DNA 的纯度最高,但步骤繁多,在抽提过程中损失了较多 DNA,所以 2ml 静脉血中获得的 DNA 量仅与 1 支颊粘膜拭子中抽提的 DNA 量相当。Chelex-100 是一种金属离子螯合剂,能与 Mg^{++}、Ca^{++} 等核酸反应必需的二价金属阳离子螯合,从而保护 DNA,防止基因组 DNA 在抽提过程中降解成小片段,故有利于靶 DNA 片段的扩增,并减少由降解的 DNA 片段形成的杂带[1]。由于此方法没有专门用酚将 DNA 从上清液中抽提出来,所以 DNA 纯度不高,但是 PCR 反应对模板 DNA 纯度的要求不象基因克隆那样高,少量蛋白质或其它杂质对 PCR 反应并无太大影响,只要有特异性引物,就能从 Chelex-100 法抽提的 DNA 模板中扩增出特异的靶基因片段,所以用 Chelex-100 法处理颊粘膜拭子后,残留的蛋白质对 PCR 反应完全无影响,用这种 DNA 检测患者基因型的特异性和敏感性均可与酚—氯仿法抽提的高纯度 DNA 相媲美,其结果是可靠的。

曾有报道[8] 直接将干燥血痕置于 PCR 反应体系中,经过加热,可释出足量 DNA,并可通过 PCR 扩增出所需的靶基因片段。但本实验结果表明,直接用干燥血痕作 PCR 扩增结果不稳定,仅部分样品扩增出靶带;结果的特异性也不高,常在靶带附近见到明亮的非特异性片段,干扰基因型的分析。这是由于没有加入任何保护剂,经过加热后,血痕中 DNA 大部分已降解;而且血痕成份复杂,其中大量的血卟啉蛋白及多种杂质就可能抑制 PCR 反应。所以,虽然直接用血痕作 PCR 扩增的方法是目前报道的最简单的方法,不必经过任何提纯 DNA 的步骤,但其效果在本实验中未得到证实,不宜用于基因多态性的检测。

本研究结果显示:颊粘膜拭子中抽提 DNA 作基因多态性分析特异性高、敏感性强,优于经典的静脉血酚氯仿法抽提 DNA,取颊粘膜拭子无创、方便,Chelex-100 法抽提 DNA 比酚氯仿法更为简单、快速、价廉。所以该方法适宜于对牙周炎患者作基因多态性分析,易于普及,具有广泛的临床应用价值及发展前景。

参考文献

1 吴梅筠主编. 法医物证学. 北京:人民卫生出版社,1998:202
2 McDowell TL, Symons JA, Ploski R, et al. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1A polymorphism. Arthritis Rheum, 1995, 38(2): 221～228
3 Pociot F, Molvig J, Wogensen L, et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1(IL-1B) gene correlates with IL-1β secretion in vitro. Eur J Clin Invest, 1992, 22(6): 396～402
4 Tarlow JK, Blakemore AIF, Lennard A, et al. Polymorphism in the human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. Hum Genet, 1993, 91(4): 403～404
5 Hagerman RJ, Wilson P, Staley LW, et al. Evaluation of school children at high risk for fragile X syndrome utilizing buccal cell FMR-1 testing. Am J Med Genet, 1994, 51(4): 474～481
6 Baechtel FS, Presley KW, Smerick JB. D1S80 typing of DNA from simulated forensic specimens. J Forensic Sci, 1995, 40(4): 536～545
7 van Schie RCAA, Wilson ME. Saliva: a convenient source of DNA for analysis of bi-allelic polymorphisms of Fcγ receptor ⅡA (CD32) and Fcγ receptor ⅢB (CD16). J Immunol Methods, 1997, 208(1): 91～101
8 Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol, 1997, 24(1): 72～77

(1999-09-08 收稿,2000-12-05 修回)
(本文编辑 王 晴)