·基础研究·

碱裂解法快速提取口腔拭子DNA对*CHRNA*3基因多态性的研究*

朱伟锋[1,2]，刘卓琦[1,2]，吴金兰[1]，余乐涵[2]，万福生[2,3△]

(南昌大学：1.研究生院医学部；2.医学院生物化学与分子生物学教研室；3.实验动物科学部，江西南昌 330006)

摘　要：目的　建立一种快速的从口腔拭子中提取DNA的方法，研究其在尼古丁乙酰胆碱受体α3(CHRNA3)基因多态性分析中的应用。**方法**　以NaOH和乙二胺四乙酸(EDTA)配制碱裂解液，以三羟甲基氨基甲烷-EDTA(TE)为中和液，经加热裂解和中和两步提取口腔拭子DNA。以提取的DNA为模板，用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析对*CHRNA*3基因的rs6495309进行分型。对不同基因型的样本测序验证。**结果**　PCR扩增和酶切的靶带清晰，无非特异性条带。酶切结果与测序结果吻合。**结论**　碱裂解法提取口腔拭子DNA具有快速、简便、经济、可靠的特点，可以用于*CHRNA*3基因多态性的分析。

关键词：多态性，限制性片段长度；序列分析，DNA；口腔拭子；尼古丁乙酰胆碱受体α3；碱裂解

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.014　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2012)08-0764-02

Rapid DNA extraction from buccal swabs by alkaline lysis method for study of *CHRNA*3 gene polymorphism*

Zhu Weifeng[1,2], *Liu Zhuoqi*[1,2], *Wu Jinlan*[1], *Yu Lehan*[2], *Wan Fusheng*[2,3△]

(1. *Faculty of Medical Sciences*, *Graduate School*; 2. *Department of Biochemistry and Molecular Biology*, *School of Medicine*; 3. *Department of Laboratory Animal Science*, *Nanchang University*, *Nanchang*, *Jiangxi* 330006, *China*)

Abstract: Objective　To establish a rapid method for DNA extraction from buccal swabs and investigate its application in analysis of cholinergic receptor nicotinic alpha3(CHRNA3) gene polymorphism. **Methods**　Lysis solution was made from NaOH and ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), and tris(hydroxymethyl)aminomethane-EDTA(TE) was served as neutralizing solution. DNA was extracted from buccal swabs via two steps: heating and neutralizing. rs6495309 in *CHRNA*3 gene was genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) assay using templates of extracted DNA. The samples of different genotypes were confirmed by direct sequencing analysis of PCR products. **Results**　The target DNA bands obtained by PCR amplification and enzyme digestion were clear, and no nonspecific band was detected. The results of PCR-RFLP agreed well with the results of direct sequencing. **Conclusion**　The alkaline lysis method for preparation of DNA from buccal swabs is rapid, simple, economical, reliable, and can be used for analysis of *CHRNA*3 gene polymorphism.

Key words: polymorphism, restriction fragment length; sequence analysis, DNA; buccal swab; cholinergic receptor nicotinic alpha3; alkaline lysis

随着人类基因组计划的完成，越来越多的研究开始关注基因多态性在医学方面的应用。要分析基因多态性，首先要得到DNA。经典的DNA提取方法是用酚-氯仿法提取血液中白细胞的DNA。但收集血液样品有较高的拒绝率[1]。研究表明，从同一个体的口腔黏膜上皮细胞和血液细胞中提取的DNA，在进行多态性分析时结果完全一致[2]，而口腔黏膜上皮细胞的收集具有简便、安全、成本低、无创伤的优点。因此，相对于全血细胞，脱落的口腔黏膜上皮细胞是理想的替代物。目前从人体口腔黏膜上皮细胞提取DNA的方法主要有酚-氯仿法[3-4]、Chelex-100法[5-6]及试剂盒法[7-9]等。这些方法有的操作较为复杂，使用试剂较多，有的所需时间较长，有的成本较高。尼古丁乙酰胆碱受体α3(cholinergic receptor nicotinic alpha3, CHRNA3)为尼古丁乙酰胆碱受体的一个亚单位，Wu等[10]的研究表明该基因上启动子区的一个单核苷酸多态性(rs6495309 T>C)通过影响*CHRNA*3的表达而与患肺癌的风险和吸烟行为相关。本文介绍一种快速的从口腔拭子提取DNA的方法及其在*CHRNA*3基因多态性研究中的应用。

1　材料与方法

1.1　主要试剂　裂解液[0.2 mol/L NaOH、2 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)]由1 mol/L NaOH、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)和无菌去离子水配制而成，三羟甲基氨基甲烷-EDTA[tris(hydroxymethyl)aminomethane-EDTA, TE]缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 8.0)由1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)和无菌去离子水配制而成，其中1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)和0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)购于北京索莱宝科技有限公司。SinoBio 2×Taq master mix购于上海欣百诺生物科技有限公司，DNA Marker Ⅰ购于天根生化科技(北京)有限公司，限制性核酸内切酶NlaⅢ购于富酶泰斯生物技术(深圳)有限公司。

1.2　研究对象　10支口腔拭子由在南昌大学医学院生物化学与分子生物学研究室做实验的老师和学生提供，其中，男5例，女5例；年龄20～38岁；均知情同意。提供者温开水漱口后，用无菌棉签在颊黏膜轻擦10次，其中8支口腔拭子为得到后立即行DNA提取，2支口腔拭子(1号和9号)干燥后室温保存1个月后再提取DNA。另取1支棉签作为阴性对照。

1.3　DNA提取　将拭子头部约绿豆大小剪入1.5 mL离心管(剪取不同样本时用70%乙醇擦拭剪刀)，加入裂解液60 μL，瞬

*　**基金项目：**江西省科技支撑计划资助项目(2009BSB09502)。　△　**通讯作者**，Tel:(0791)86360581；E-mail:wanfs01@163.com。

时离心，75 ℃加热10 min，吸取液体40 μL到新的离心管，加入中和液TE 100 μL，混匀，取1 μL作为模板进行扩增。

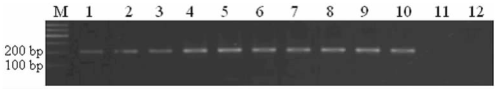
1.4 PCR扩增　根据*CHRNA*3基因的rs6495309位点序列，使用Primer3软件设计一对引物，由上海英骏生物技术有限公司合成。上游引物：5′-TCA ATG GTA AGA AAA CGA ACA A-3′，下游引物：5′-ATT TTG CAA TCC CAC CAA AG-3′，扩增片段长度为208 bp。PCR反应体系总体积20 μL，包含SinoBio 2 × Taq master mix 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL，模板1 μL，去离子水8.2 μL。充分混匀，瞬时离心后放入PCR仪进行扩增。反应条件：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，53 ℃退火30 s，72 ℃延伸15 s，共35个循环；最后72 ℃延伸5 min。取4 μL PCR产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳，溴化乙锭染色，凝胶成像系统照像。

1.5 酶切分型　取PCR产物10 μL，加入10×缓冲液1 μL，限制性核酸内切酶NlaⅢ 0.5 μL，去离子水4 μL，37 ℃水浴箱酶切2 h。酶切产物经2%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统照像。

1.6 DNA测序　取酶切后判断为不同基因型的样本扩增后送北京诺赛基因组研究中心测序。

2 结　　果

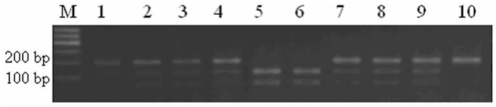
2.1 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳　从图1可知，从10支口腔拭子提取的DNA经PCR扩增后都得到了单一清晰的目的条带，而阴性对照(包括棉签和扩增用去离子水)没有获得PCR产物。



M：DNA MarkerⅠ；1～10：1～10号样本；11：棉签阴性对照；12：去离子水阴性对照。

图1　rs6495309 PCR产物电泳图

2.2 酶切结果　NlaⅢ的识别序列为CATG(其中T为多态性位点)，不能对CACG进行切割，故rs6495309的PCR产物经NlaⅢ消化，TT纯合基因型有137 bp和75 bp 2个片段，CT杂合基因型有208、137、75 bp 3个片段，CC纯合基因型只有1个208 bp的片段，见图2。



M：DNA MarkerⅠ；1～4、7～9：CT基因型；5、6：TT基因型；10：CC基因型。

图2　rs6495309酶切产物电泳图

2.3 DNA测序结果　在rs6495309的扩增片段中存在polyA结构，此polyA结构位于多态性点前，故正向测序无法显示多态性点的序列变化。封2图3为rs6495309 PCR产物反向测序结果，其中左图为5号样本测序结果，中图为10号样本测序结果，右图为4号样本测序结果，与酶切结果相符。

3 讨　　论

肺癌是当今世界常见的恶性肿瘤之一，病死率居各类恶性肿瘤之首[11-12]。病因学研究表明肺癌是环境因素和遗传因素交互作用的结果。在高加索人群分别进行的3个独立、大样本的全基因组关联研究都发现位于*CHRNA*3基因上的rs1051730与肺癌的发生密切相关[13-15]。但rs1051730在中国人群中的多态性不高，Wu等[10]的研究未能发现其与肺癌的发生相关，但发现位于该基因启动子区的rs6495309与患肺癌的风险和吸烟行为相关。杨磊等[16]的研究认为rs6495309(T＞C)遗传变异可显著增加国内被动吸烟人群肺癌发病的危险性。聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP)分析是目前常用的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism，SNP)分型技术之一，具有操作简便、快速、判断准确的优点。目前本研究小组正在采用PCR-RFLP技术研究rs6495309与江西汉族人群肺癌患病风险的相关性。

由于从口腔拭子提取口腔脱落细胞DNA进行分析的优势，近年来，从口腔拭子提取DNA已被越来越多地用于法医学、群体遗传学、临床疾病的遗传学及分子流行病学的研究[4-9]。就目前常用的从口腔拭子提取DNA的方法来说，酚-氯仿法操作较为复杂，使用试剂较多，且酚、氯仿对操作者存在一定危害[17]。Chelex-100法比较简单，但所需时间较长[5]。试剂盒法所需时间也较长，要经过多次离心，成本较高。应用常规PCR缓冲液、$MgCl_2$溶液和蛋白酶K配制的裂解液，杨建强和徐生新[17]建立了一种简单、高效、快速、低成本的从口腔拭子中提取DNA的方法，提取DNA所需时间在1 h左右。

本文介绍的提取DNA碱裂解法是利用碱性、高温对细胞进行处理，使细胞膜溶解、蛋白变性，基因组DNA游离出来。在裂解液与中和液中都加入了EDTA，从而有利于保持DNA的完整性。采用本研究组建立的碱裂解法提取口腔拭子DNA，只需要2种试剂，成本低，操作简单，在15 min内即可得到基因组DNA进行PCR扩增，所需时间远远低于其他方法，对需要快速得到结果的检测特别有利。PCR产物的琼脂糖凝胶电泳都得到单一、清晰的目的条带，无非特异性条带出现。按每次PCR反应需要1 μL计算，一次提取的DNA可以进行100多次PCR反应。酶切显示10个样本的rs6495309都得到了清楚分型，酶切结果与测序结果吻合，表明该方法提取DNA用于多态性分析的可靠性。

总的说来，本方法提取口腔拭子DNA具有快速、简便、经济、可靠的特点，可以用于多态性的分析。

参考文献：

[1] Lum A，Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，1998，7(8)：719-724.

[2] 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.

[3] 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.

[4] van Wieren-de Wijer DB，Maitland-van der Zee AH，de Boer A，et al. Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples[J]. Eur J Epidemiol，2009，24(11)：677-682.

[5] 安娜，欧阳翔英，曹采方，等.Fcγ受体ⅢA基因多态性与牙周炎易感性关系[J].北京大学学报：医学版，2009，41(1)：40-43.

[6] 孙书昱，靳安民，范卫华，等.环氧化酶-2启动子区基因多态性与慢性牙周炎及冠心病的相关性[J].

(下转第768页)

分子标记物，提出血清中触珠蛋白-2水平对肺鳞癌诊断可能具有一定的参考价值[15]；同样一项对胰腺癌患者与健康人血清的蛋白质组学研究显示在胰腺癌组中共有78个蛋白点有显著性改变，其中，成功鉴定55个蛋白点，29个蛋白点在胰腺癌组高表达，其中含触珠蛋白[16]。不过国内有学者在肾母细胞瘤患儿血清蛋白质标记物的筛选及鉴定的研究中发现触珠蛋白在肾母细胞瘤患儿血清中低表达，在术后及正常小儿血清中高表达，提示肾母细胞瘤对肝脏合成触珠蛋白可能有抑制作用[17]。

本实验对口腔鳞癌患者血清蛋白中表达明显的7个蛋白点进行质谱鉴定，根据数据库的搜索结果，成功鉴定了其中2个蛋白质点，分别为触珠蛋白及其同型前原蛋白，它们在口腔鳞癌患者血清中均呈高表达，这表明触珠蛋白可能成为口腔鳞癌的血清肿瘤标记物之一，但其机制及特异性研究还远远不够，口腔鳞癌蛋白质组学研究任重道远。

（本研究中LC-MS/MS质谱分析及检索由中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室完成。特别志谢！）

参考文献：

[1] 刘婷.肿瘤标志物的检测及临床应用[J].当代医学，2009，15(24)：24-25.
[2] 何伟伟，陈海泉.蛋白质组学技术和肺癌诊断[J].肿瘤，2007，27(4)：327-329.
[3] 聂赣娟，李茂玉，张鹏飞，等.肺鳞癌患者和健康人血清的差异蛋白质组学研究[J].国际病理科学与临床杂志，2007，27(6)：470-475.
[4] Hu S，Arellano M，Boontheung P，et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery[J]. Clin Cancer Res，2008，14(19)：6246-6252.
[5] Schaaij-Visser TB，Graveland AP，Gauci S，et al. Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas[J]. Clin Cancer Res，2009，15(24)：7666-7675.
[6] 王文梅，郑春兰，胡勤刚，等.口腔鳞癌组织与口腔正常黏膜组织蛋白质差异表达的初步研究[J].实用口腔医学杂志，2009，25(4)：540-543.
[7] Mlynarek AM，Balys RL，Su J，et al. A cell proteomic approach for the detection of secretable biomarkers of invasiveness in oral squamous cell carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg，2007，133(9)：910-918.
[8] 谭丽娜，黄进华.结合珠蛋白的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志，2006，26(1)：43-47.
[9] 王平，刘红，李一石，等.触珠蛋白基因型与糖尿病患者心血管并发症的关系[J].基础医学与临床，2011，31(8)：949-950.
[10] 王冯滨，杨海英，欧强，等.乙型肝炎患者血浆中触珠蛋白和补体B因子的检测及临床意义[J].肝脏，2009，14(4)：313-314.
[11] 赵群，段微，吴玉梅，等.CA125阴性卵巢癌血清标志物差异蛋白质组学的研究[J].现代妇产科进展，2008，17(5)：337-341.
[12] 邓洪宇.血清触珠蛋白检测在卵巢癌诊断中的意义[J].河北医药，2011，33(15)：2356-2357.
[13] 李玉华，杨留才，孙炯，等.卵巢癌组织的差异蛋白质研究[J].苏州大学学报：医学版，2009，29(3)：483-486.
[14] 王春玉，钱采韻，黎明，等.触珠蛋白可能是阿尔茨海默病患者血清生物标志[J].中华神经科杂志，2006，39(8)：559-561.
[15] 聂赣娟，周建华，李茂玉，等.肺鳞癌患者与健康人血清的差异蛋白质组学研究[J].生物化学与生物物理进展，2008，35(3)：349-355.
[16] 徐树建，徐泽宽，王富强，等.应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌血清肿瘤标志物[J].南京医科大学学报：自然科学版，2009，29(4)：534-538.
[17] 王家祥，杨少波，刘秋亮，等.肾母细胞瘤患儿血清蛋白质标志物的筛选及鉴定[J].中华医学杂志，2009，89(18)：1259-1263.

（收稿日期：2011-04-03 修回日期：2011-12-19）

（上接第765页）

中国医学科学院学报，2010，32(3)：347-351.
[7] 梁祚仁，刘长晖，刘超.广西3个少数民族17个Y-STR位点的遗传多态性[J].基础医学与临床，2009，29(5)：488-494.
[8] 霍婧，刘全华，华丽，等.RANTES和Eotaxin-3基因单核苷酸多态性与儿童哮喘的关系[J].上海交通大学学报：医学版，2010，30(2)：129-131.
[9] Kennedy MJ，Loehle JA，Griffin AR，et al. Association of the histamine N-methyltransferase C314T (Thr105Ile) polymorphism with atopic dermatitis in Caucasian children[J]. Pharmacotherapy，2008，28(12)：1495-1501.
[10] Wu C，Hu Z，Yu D，et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations[J]. Cancer Res，2009，69(12)：5065-5072.
[11] Jemal A，Siegel R，Xu J，et al. Cancer statistics，2010[J]. CA Cancer J Clin，2010，60(5)：277-300.
[12] 段纪俊，陈万青，张思维.中国恶性肿瘤死亡率的国际比较[J].中国社会医学杂志，2009，26(6)：377-378.
[13] Hung RJ，McKay JD，Gaborieau V，et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25[J]. Nature，2008，452(7187)：633-637.
[14] Thorgeirsson TE，Geller F，Sulem P，et al. A variant associated with nicotine dependence，lung cancer and peripheral arterial disease[J]. Nature，2008，452(7187)：638-642.
[15] Amos CI，Wu X，Broderick P，et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1[J]. Nat Genet，2008，40(5)：616-622.
[16] 杨磊，吕潇潇，凌晓璇，等.尼古丁受体3基因启动子多态与被动吸烟者发生肺癌的易感性研究[J].中华肿瘤防治杂志，2010，17(13)：972-975.
[17] 杨建强，徐生新.一种从口腔拭子中提取DNA的简易方法[J].第三军医大学学报，2010，32(7)：731-732.

（收稿日期：2011-11-14 修回日期：2011-12-20）