

的思路。

参考文献

- 1 张运克. 补阳还五汤及拆方对脑缺血再灌注 SD 大鼠模型细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(6): 404-407.
- 2 Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-KDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes [J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6067-6070.
- 3 Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia[J]. Ann Neurol, 1982, 11(5): 491-498.
- 4 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 55-57.
- 5 Das A, Guyton MK, Matzelle DD, et al. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(13): 2992-3001.
- 6 He A, Wang JA, Gui C, et al. Changes of mitochondrial pathway in hypoxia reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(4): 397-400.
- 7 Bratton SB, Macfarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascade in death receptor and stress-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 27-33.
- 8 Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, et al. Schizandrin protects primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(1): 21-31.
- 9 Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of Caspase-9 [J]. Structure, 2002, 10(3): 285-288.
- 10 Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, Procaspase-9 binding, and activation[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 423-432.
- 11 冯涛. 血管性痴呆的诊断、影像学和治疗[J]. 中国全科医学, 2004, 7(4): 276-279.
- 12 Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death [J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2665-2672.
- 13 Zhu C, Wang X, Hagberg H, et al. Correlation between Caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. J Neurochem, 2000, 75(2): 819-829.
- 14 Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 811-829.

[收稿日期 2013-02-12][本文编辑 刘京虹 吕文娟]

课题研究·论著

两种不同方法提取人粪便进行 DNA 检测的有效性研究

何纯刚, 黄沁园, 陈利生, 吴鸿根, 邓洪强, 潘云

基金项目: 广西教育厅科研课题(编号:201012MS043); 广西卫生厅科研课题(编号:Z2012246)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院普外儿外科(何纯刚, 吴鸿根, 邓洪强, 潘云); 530021 南宁, 广西医科大学护理学院(黄沁园); 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科(陈利生)

作者简介: 何纯刚(1979-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 胃肠肿瘤的诊治。E-mail: chunganghe@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 分析两种不同方法提取人粪便进行 DNA 检测的效果。方法 收集 108 例研究者的粪便, 采用粪便 DNA 提取试剂盒及酚-氯仿法提取 DNA, 比较两种方法提取 DNA 的效果。结果 采用酚-氯仿的方法及试剂盒提取的 DNA 浓度分别为 $(232.51 \pm 41.24) \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、 $(67.35 \pm 13.17) \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($P < 0.01$); 试剂盒提取粪便 DNA 在纯度 (OD₂₆₀/280)、溶液澄清度及电泳结果等方面, 均高 (优于) 酚-氯仿提取的 DNA ($P < 0.01$)。酚-氯仿及试剂盒首次提取的 DNA 能进行 PCR 扩增的阳性率分别为 5% (1/20) 和 91.67% (99/108) ($P < 0.01$)。另有 9 例采用试剂盒未能提取足够的 DNA 量, 加大粪便量后, 再次提取的 DNA 能够满足实验要求。结论 试剂盒提取的 DNA 质量较高, 能满足 DNA 甲基化检测的条件。酚-氯仿的提取方法有待进一步研究才可能获得质量较高的 DNA。

[关键词] 结直肠癌; 早期诊断; 粪便 DNA 提取

[中图分类号] R 735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)05-0408-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.05.03

Research on the effectiveness of two methods for fecal DNA extraction and detection HE Chun-gang, Huang Qin-yuan, Chen Li-sheng, et al. Department of General and Pediatric Surgery, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To analyze the effectiveness of two methods for fecal DNA extraction and detection. **Methods** In 108 patients who were investigated, fecal samples were collected. The fecal DNA was extracted by QIAamp DNA Stool Mini Kit and phenol/chloroform method. The DNA quality extracted by the two methods was compared with each other. **Results** The concentrations of DNA extracted by phenol/chloroform method and kit were $(232.51 \pm 41.24) \text{ ng}/\mu\text{l}$ and $(67.35 \pm 13.17) \text{ ng}/\mu\text{l}$, respectively ($P < 0.01$). The fecal DNA extracted by kit outweighed than phenol/chloroform method when compared on the indexes of purity ($\text{OD}_{260/280}$), clarity of DNA solution and electrophoresis results (all $P < 0.01$). There were 91.67% (99/108) samples of fecal DNA extracted by kit can be amplified by PCR, while only 5% (1/20) samples of fecal DNA extracted by phenol/chloroform method can be amplified ($P < 0.01$). There was not enough concentration of DNA got from another 8.33% (9/108) samples of stool at the first time extracted by kit, but can achieve the requirements by improving the method at last. **Conclusion** The fecal DNA may be got higher quality extracted by kit when compared with phenol/chloroform method, and can achieve the requirements of bisulfite modification and PCR. Improving the phenol/chloroform method may also get high qualitative DNA.

[Key words] Colorectal cancer; Early diagnosis; Fecal DNA extraction

近年对于粪便基因突变的检测发现其对结直肠癌的早期筛查有较高的灵敏度和特异度^[1-3]。从粪便中提取高质量的 DNA 是粪便 DNA 检测技术首要解决的关键问题。因此,本研究对从粪便 DNA 提取方法作初步探讨,为研究粪便提取 DNA 甲基化检测用于结直肠癌的早期筛查奠定研究基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料 108 例研究对象中散发性结直肠癌 61 例,进展期结直肠腺瘤 27 例;非癌和非癌前病变者及正常人志愿者 20 例。粪便标本均取自于首次住院的患者,术前均经电子肠镜及病理证实。61 例散发性结直肠癌患者中,男性 37 例,女性 24 例;年龄 16~89 岁,中位年龄 58 岁。27 例进展期结直肠腺瘤患者中,男性 15 例,女性 12 例;年龄 18~78 岁,中位年龄 54 岁;病变部位位于结肠 8 例,直肠 19 例,直径均 $> 2 \text{ cm}$;其中绒毛状腺瘤 9 例,管绒毛状腺瘤 14 例,管状腺瘤 4 例。20 例非癌和非癌前病变住院者及正常人志愿者均行电子肠镜检查证实结直肠黏膜无异常,其中包含 10 例痔疮患者,3 例肛痿患者,2 例便秘患者,5 例正常人志愿者。

1.2 方法

1.2.1 粪便留取 每例研究对象取粪便约 10 g 置于干净标本盒内,粪便留取后立即收集于 1.5 ml 的冻存管内,置于 -80°C 超低温冰箱冻存备用。

1.2.2 酚-氯仿法粪便脱落细胞 DNA 常规提取

(1)取 20 例患者粪便(其中肠癌 12 例,进展期腺瘤 5 例,对照组 3 例),称重 180~220 mg 粪便放于 2 ml

微量离心管,直接加入 TE buffer 600 μl ,充分振荡混匀;(2)加 10% SDS 200 μl ,震荡或搅拌混匀并使细胞充分裂解;(3)全速离心样本(14 000 rpm)1 min,吸取上清液加入一新的 2 ml 离心管;(4)蛋白酶 K (10 mg/ml)25 μl ,混匀,55 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h;(5)加等体积饱和酚至上述样品处理液中,倒转混匀 3 min;(6)12 000 rpm 离心 5 min,取上层水相到另一 1.5 ml 离心管中;(7)加等体积酚、氯仿、异戊醇(25:24:1),充分倒转混匀,12 000 rpm 离心 5 min,取上层水相到另一离心管中,重复操作一次;(8)加 1/10 体积的 3M 醋酸钠(pH 5.2)和 2.5 倍体积的无水乙醇,轻轻倒置混匀;(9)待絮状物出现后,用移液器枪头吸捞出絮状物;(10)用 1 ml 70% 乙醇洗涤沉淀,12 000 rpm 离心 5 min,弃上清液;(11)再次短暂离心管壁水珠,吸去残余液体,室温下放置数分钟晾干,加 200 μl TE buffer 溶解。

1.2.3 试剂盒 DNA 提取 108 例患者所有粪便标本 DNA 采用 DNA 提取试剂盒“QIAamp DNA Mini Kit”提取:(1)称取 200 mg 粪便放于 2 ml 离心管,置冰面上;(2)加 1.6 ml ASL 裂解液,充分振荡直到粪便样本彻底混匀;(3)全速离心(14 000 rpm)3 min;(4)吸 1.4 ml 的上清液加入一个新的 2 ml 微量离心管内,并丢弃其下层粪便;(5)每个样品中加 1 片抑制剂 Inhibit EX(加前先磨碎),充分混匀,室温孵育 1 min;(6)全速离心(14 000 rpm)3 min;(7)将上清液吸入一个新的 1.5 ml 离心管内,全速离心(14 000 rpm)3 min;(8)吸 600 μl 的上清液加入一个新的 2 ml 离

心管内,加 25 μl 蛋白酶 K;(9)加 600 μl 缓冲液 AL 并振荡 15 s;(10)70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min;(11)水浴后加 600 μl 无水乙醇,并充分混匀;(12)每次吸 600 μl 的混合溶液加入 QIAamp 柱中,全速离心(12 000 rpm)1 min 后倒掉收集管的废液,再重复 2 次,将所有液体离心过柱;(13)加 500 μl 缓冲液 AW1 入 QIAamp 柱中,全速离心(12 000 rpm)1 min;(14)加 500 μl 缓冲液 AW2 入 QIAamp 柱中,全速离心(12 000 rpm)1 min;(15)QIAamp 柱放入一个新的 2 ml 收集管中,全速离心(12 000 rpm)1 min;(16)转移 QIAamp 柱入一个新标记的 1.5 ml 离心管上,向 QIAamp 柱加入 200 μl AE 缓冲液,室温孵育 1 min;(17)全速离心(12 000 rpm)1 min,收集洗脱的 DNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

1.2.4 DNA 溶液浓度及纯度测定 取 5 μl DNA 溶液,去离子水 20 倍稀释混匀,紫外分光光度计测 OD260、OD280,根据 OD260 计算 DNA 浓度及 OD260/OD280 比值检测 DNA 纯度。

1.2.5 DNA 电泳分析 取 DNA 5 μl 与 1 μl (6 $\times$ Loading buffer)混匀,采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,电压 10 V/cm,约 30 min。凝胶成像分析仪观察并照相。比较两种方法所提 DNA 条带的完整性。

1.2.6 提取 DNA 的 PCR 有效性分析 本实验引用文献^[4]可扩增 p33ING1b 基因启动子部分序列的引物,比较两种方法所提 DNA 进行 PCR 的有效性分析。引物由上海生物工程技术有限公司合成,引物序列 p33ING1b (forward): 5-CTCGGGCCTATC-CACCTCTTCTG-3; p33ING1b (reverse): 5-ACCAC-CACTCCCAGCAGCCTAG-3,扩增产物片段为 157 bp。PCR 反应体系 (25 μl): ddH₂O, 19.2 μl ; 10 $\times$ Long Taq Buffer, 2.5 μl ; 2.5 μM dNTPs, 1 μl ; Forward primer (10 μM), 0.5 μl ; Reverse primer (10 μM), 0.5 μl ; Long Taq (2.5 U/ μl), 0.3 μl ; DNA, 1 μl 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 59 $^{\circ}\text{C}$ 45 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec (35 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。将 PCR 产物采用 2.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,用凝胶成像分析系统观察并照相分析。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用两个独立样本 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法提取的 DNA 色泽、浓度及纯度的比较 本次实验采用酚-氯仿的方法提取的粪便 DNA

浓度为 (232.51 $\pm$ 41.24) ng/ μl , 采用试剂盒提取粪便 DNA 浓度为 (67.35 $\pm$ 13.17) ng/ μl , 两者差异有统计学意义 ($t = 17.744$, $P < 0.01$)。在提取的 DNA 色泽上,试剂盒提取的 DNA 溶液均无色透明,酚-氯仿提取的 DNA 溶液仅 3/20 例澄清,其余均为淡黄色液体 ($\chi^2 = 105.860$, $P < 0.01$)。酚-氯仿提取的 DNA OD260/280 (1.31 $\pm$ 0.26) 明显低于试剂盒提取的 DNA OD260/280 (1.84 $\pm$ 0.12) ($t = 8.942$, $P < 0.01$)。

2.2 两种方法提取 DNA 的电泳分析结果 酚-氯仿提取的 DNA 量大,均包含有人基因组 DNA 的信息,但大部分条带弥散 (见图 1); 20 例样品中仅 3 例所提的 DNA 条带单一。采用试剂盒首次提取的粪便 DNA 中,有 91.67% (99/108 例) DNA 样品电泳可见清晰、单一条带,弥散现象较少,另有 8.33% (9/108 例) 未见明显人基因组 DNA 条带 (见图 2)。

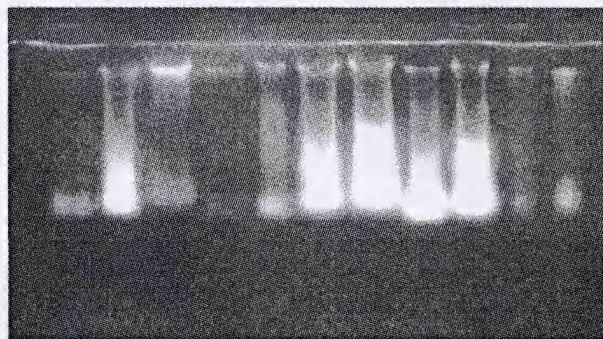


图 1 酚-氯仿提取的粪便 DNA 电泳分析图

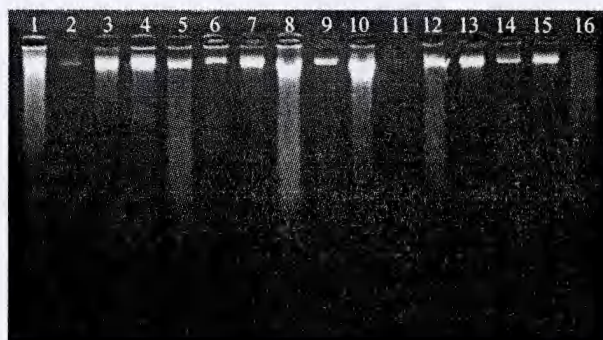


图 2 试剂盒提取的粪便 DNA 电泳分析图

2.3 两种方法提取粪便 DNA 的 PCR 有效性分析结果 采用酚-氯仿法提取的 DNA 样品仅 5% (1/20 例) 扩增出条带,而试剂盒提取的 DNA 中有 91.67% (99/108 例) 可扩增出特异性条带,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对 9 例首次未扩增出条带的样品 (均为粘液便) 经加大提取粪便量至 400 mg,重新采用试剂盒提取后,再次行 PCR 检测能扩增出条带 (见图 3)。



1~8:PCR 模板为酚-氯仿抽提的 DNA; 9~19:PCR 模板为试剂盒提取的 DNA

图3 两种方法提取粪便 DNA 的 PCR 有效性分析结果图

3 讨论

3.1 研究发现,每天有大量上皮细胞(约 10^{10} 个)更新并脱落入肠腔随粪便排出体外,粪便中大量的肿瘤细胞 DNA 能稳定存在。通过检测粪便 DNA 来发现遗传学及表观遗传学的改变,为结直肠癌的筛查诊断提供了新的选择途径^[5]。目前关于以粪便 DNA 突变检测^[1-3] 及 DNA 甲基化检测^[5-8] 来诊断结直肠癌的文献也已经证明了该方法的有效性,其对结直肠癌的诊断方面具有比粪便潜血试验更高的敏感度和特异度,且粪便 DNA 甲基化检测较 DNA 突变的检测具有更高的敏感度。因此,通过粪便 DNA 甲基化检测来筛查结直肠癌是一项很有前景的检测方法。

3.2 本实验对粪便 DNA 的提取进行了探讨,结果表明酚-氯仿及试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit)均能从少量粪便(200 mg)中提取 DNA。其中酚-氯仿方法提取的 DNA 总量和浓度均高于试剂盒提取的 DNA ($P < 0.01$)。虽然试剂盒提取的 DNA 量较少,但提取的 DNA 平均浓度能满足 DNA 甲基化检测的条件^[9]。

3.3 电泳分析结果发现,试剂盒首次提取的 DNA 中有 91.67% 的样本明显可见人基因组 DNA 的电泳条带,且条带单一,提示细菌 DNA 含量较少,该方法能有效分离人基因组 DNA 与细菌 DNA。而酚-氯仿提取的 DNA 电泳条带中也含有人基因组 DNA 的信息,还可见另一条较弥散的电泳亮带,提示除人 DNA 信息外,还包含了其他核酸信息如大量细菌 DNA,这也是酚-氯仿提取的 DNA 浓度及量均比试剂盒提取的浓度和量大的原因。

3.4 通过对比两种提取方法所提 DNA 溶液的质量发现,试剂盒提取的 DNA 溶液在色泽(澄清度)、纯度(OD260/OD280)等方面均优于酚-氯仿提取的

DNA ($P < 0.01$)。本研究还发现,在酚-氯仿提取过程中,对不清亮的 DNA 即使反复用酚-氯仿抽提也不能使之澄清,可能是其中含有的胆汁及其他混杂成分不溶于酚-氯仿中所致。但如果针对存在的问题加以改进,有可能提出高纯度的 DNA,从而避免使用相对昂贵的试剂盒,使粪便 DNA 检测技术更具有廉价性。

3.5 为了探讨粪便提取 DNA 的 PCR 有效性,本实验通过 PCR 扩增 p33ING1b 启动子区域的部分序列发现,酚-氯仿提取的 DNA 中,仅 1/20 例可进行 PCR 扩增;试剂盒提取的 DNA 中,均能经 PCR 扩增出目的条带(其中有 9 例为二次提取后进行 PCR 扩增出条带)。以上结果表明,少量粪便 DNA 的提取及进行 PCR 检测均具有可行性,为我们今后进行粪便 DNA 甲基化检测用于结直肠癌早期筛查研究奠定了基础。

参考文献

- Whitney D, Skoletsky J, Moore K, et al. Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test[J]. J Mol Diagn, 2004, 6(4): 386-395.
- Tagore KS, Lawson MJ, Yucaitis JA, et al. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia[J]. Clin Colorectal Cancer, 2003, 3(1): 47-53.
- Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population[J]. N Engl J Med, 2004, 351(26): 2704-2714.
- Shen DH, Chan KY, Khoo US, et al. Epigenetic and genetic alterations of p33ING1b in ovarian cancer[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(4): 855-863.
- Abbaszadegan MR, Tarasoli A, Velayati A, et al. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(10): 1528-1533.
- Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, et al. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1203-1209.
- Lenhard K, Bommer GT, Asutay S, et al. Analysis of promoter methylation in stool: a novel method for the detection of colorectal cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3(2): 142-149.
- Huang ZH, Li LH, Fan Y, et al. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(6): 950-954.
- 何纯刚, 陈利生, 曹云飞, 等. p33 生长抑制基因 1b 启动子甲基化检测方法的建立与评价[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(7): 131-132.

[收稿日期 2013-01-16][本文编辑 宋卓孙 蓝斯琪]