

Oragene により唾液から採取された DNA の安定性

H.C.Birnboim

イントロダクション

無数のテーマを含む大きな集団ベースを対象とした研究は、複雑な病気の遺伝的診断の調査にしばしば利用される。

唾液は痛みを伴わずに安全に採取することができ、DNA 源として都合の良いものである。ロジスティックな理由から DNA 抽出より先に採取したサンプルを保存することができれば有用である。冷蔵や冷凍と言った通常の保存方法は余分なコストがかかり、また DNA 研究においても都合の悪い事でもある。更にこれらの方法は有効性が限られたものであり、例えば、Ng 氏ら(2004)は -70°C で1ヶ月唾液サンプルを保存した場合、PCR の生産量が 30%落ち込んだ事を観察している。

最適なプロトコールは唾液サンプルを室温で長期間保存ができ、その後の DNA 量や PCR に影響がないことである。Oragene は安全、容易に唾液からの DNA を採取、保存することのできるキットである。この技術情報は DNA を最高 50°C で長期安定した状態で保存できる Oragene の能力を裏付けるものである。

試料と方法

いくつかのサンプル唾液を Oragene に採取し、それぞれ 24°C 、 37°C 、 50°C で最長 187 日間保存した。様々な期間におけるサンプルは Oragene のプロトコールに従い分離され、それぞれのサンプルをアガロースゲル電気泳導に流しエチジウムブロマイドで染色し、分析の結果、200ng の DNA がそれぞれ得られた。分子量マーカーとして λ HindIII を使用した。

DNA 採取量は Fluorescence/DNase 法を用いて測定した。F/D 法は SYBR グリーン I 核酸発色と DNase 処理を使用して DNA 量を測定した。

結果

唾液サンプルを 24°C 、 37°C で保存した分子量 23,000bp 以上の DNA はどの期間でも、分解したりすることは見られなかった。(表 1) 50°C 、187 日と言う条件で保存したサンプルは僅かな分解が見られた。 24°C 、 37°C 、 50°C における DNA 採取量は F/D 法においては変化が見られなかった。

結論

典型的な化学反応の割合は、温度が 10℃下がる毎に半分に減少する。そのため、24℃における分解率は 50℃のそれに対して 5 倍以下になると思われたが、Oragene を使用した場合の DNA は 50℃、187 日の保存において安定に保たれており、これは 24℃であれば、約 5 倍の長さ 935 日間（約 30 ヶ月）安定した状態で保存できると考えられる。

50℃、187 日間保存後、サンプルから採取した DNA の分子量は 23,000bp 以上であった。PCR は分子量 23,000bp より小さい DNA テンプレートに対して効果的であるため、使用不可能な DNA の長さになるまで、室温で 30 ヶ月の保存が理論上必要になる。つまり、Oragene を使用すれば、室温で長期間安定した保存が可能と言うことになる。



(表 1)Oragene を使用して採取した DNA をアガロースゲル電気泳動に流した。左端にはλ Hind III のマーカーを流す。