

財團法人演譯基金會

美兆健康資源中心



美兆人體生物資料庫
DNA 檢體品質檢驗與分析

MJHRF

技術報告編號：MJHRF-TR-02

2016/05/19



財團法人演譯基金會
美兆健康資源中心

引用本文參考文獻格式：

王櫟倫(2016)。美兆人體生物資料庫 DNA 檢體品質檢驗與分析。財團法人演譯基金會技術報告(編號：MJHRF-TR-02)

美兆人體生物資料庫 DNA 檢體品質檢驗與分析

一、前言

自 2002 年起，美兆人體生物資料庫便開始進行檢體採集與儲存，捐贈之檢體包含血清、血漿與血沉棕黃層（Buffy Coat）三種檢體。其中血沉棕黃層的主要用途為提供研究學者萃取基因體 DNA（genomic DNA 或 gDNA），而後可從事如 DNA 定序（DNA sequencing）、單核苷酸多型性基因型鑑定（SNP Genotyping）等後續實驗，用以分析基因與疾病之間的關聯性。

由於美兆人體生物資料庫存有之檢體已保存多年，經過長時間的低溫儲存，確實可能會影響既有檢體的純度與品質，因此針對既有檢體品質的檢測極具重要性。從使用者的角度來考量，如果血沉棕黃層內萃取出來的 DNA 的品質數據符合後續實驗的要求，即代表檢體品質可被接受，所以針對既有之血沉棕黃層檢體的品質，將進行 DNA 萃取而後做定量與純度等品質分析，進一步評估美兆人體生物資料庫儲存之檢體品質。

二、初步採樣

進行檢體品質分析時，我們做了實驗組與控制組的設計，從而比較檢體品質，分組與採樣的步驟如下：

1. 實驗組：母群體為 2002 至 2008 年間曾捐贈檢體，但只捐贈 1 次、無罹患癌症記錄者。接著，將這些人的檢體根據捐贈年度自不同冰箱內挑選出來進行品質實驗，藉以確認不同的檢體採集年度與存放位置之檢體品質。總共提取 16 管檢體。
2. 控制組：控制組為取得血液檢體後在最短時間內離心分裝，完成後不經過 -80°C 低溫儲存，而是先暫存於 4°C 的環境下，接著直接進入品質流程，總共提取 2 管檢體。
3. 實驗組採樣流程：
 - 1) 自 2014/10/07 至 2015/9/23 為止，所有拒絕重簽同意書的名單做為篩選實驗組的樣本，共計有 917 筆。
 - 2) 排除捐贈超過 1 次或具癌症記錄的捐贈者，共計 642 筆。

- 3) 找出 642 位捐贈者的檢體存放位置。
- 4) 同一捐贈年度至少須選出 2 管檢體做代表，且同年度捐贈之 2 管（或 2 管以上）檢體存放位置必須位於不同冰箱¹，最後共計篩選出 16 管檢體（見表 1）。

表 1：品管檢體列表

檢體編號	冰箱編號	捐贈年度	檢體編號	冰箱編號	捐贈年度
1	1	2003	9	9	2005
2	2	2002	10	10	2005
3	2	2002	11	11	2006
4	3	2003	12	12	2006
5	3	2004	13	17	2006
6	4	2004	14	18	2006
7	5	2008	15	19	2007
8	6	2008	16	20	2007

三、實驗流程

透過 DNA 粹取套組（DNA Extraction Kit）來執行基因體 DNA 之萃取實驗。萃取出之 DNA 會做 1% Agarose 電泳，同時計算 A260/A280 與 A260/A230 之比值，並根據以下標準來評估檢體是否通過品管測試：

1. 純度檢測與定量：UV/Vis 光譜法（UV/Vis Spectrophotometry）
如 $1.8 \leq A260/A280 \leq 2.0$ 且 $A260/A230 > 2.0$ ，則 DNA 檢體視為通過純度檢測（Lee et al., 2012）。另外亦會透過光密度（Optical Density）來換算 DNA 總量。
2. 電泳：1%瓊脂凝膠電泳（1% Agarose Gel Electrophoresis）
如電泳結果只顯示清楚的高分子量的基因體 DNA 亮帶（genomic DNA band），而無其它分子量的亮帶或漸層，代表基因體 DNA 結構完整，後續將可用於定序等之相關實驗。

四、品管實驗執行廠商

基龍米克斯生物科技股份有限公司。

¹ 2002 至 2008 每一年度捐贈的檢體，須從不同冰箱內抽選 2 管，其中 1 號冰箱內符合篩選條件之 2002 年度檢體已被取出使用，因此改由 2 號冰箱內針對 02 年度進行採樣。

五、實驗器材與方法摘要

1. 基因體 DNA 萃取：

DNA 粹取套組：QIAGEN Genra Puregene Blood Kit 158389。

2. 光密度 (Optical Density)：

分光光譜儀 (Spectrophotometer)：NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer by Thermo Scientific。

3. 電泳 (Gel Electrophoresis)：

1) 凝膠電泳檢體濃度 (Gel Sample Concentration)：100 ng/ μ L。

2) gDNA 樣本在每一孔洞中之容量 (gDNA Volume per well)：2 μ L。

3) 電泳圖譜： λ DNA/Hind III。

4) 電壓：100V。

5) 實驗時間：45 分鐘。

6) 緩衝液種類：TAE。

7) 電泳染劑：Genomics/6x loading dye。

8) 凝膠比例：1%。

六、實驗結果分析

1. 光密度分析

美兆人體生物資料庫的檢體品管標準值為，UV/Vis 分光光譜儀分析出之數據，落在以下合理純度範圍內：

1) $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.0$ ；

2) $A_{260}/A_{230} > 2.0$ 。

過低的 A_{260}/A_{280} 值代表萃取出之基因體 DNA 檢體內含有萃取過程後所殘餘之蛋白質或苯酚 (phenol)，或者 DNA 量不足。另一方面，過低之 A_{260}/A_{230} 則代表碳水化合物殘留 (carbohydrate carryover，通常發生在植物樣本)，萃取 DNA 流程本身所造成之苯酚、胍 (guanidine) 或肝糖 (glycogen) 殘留 (Thermo Scientific, 2016)。

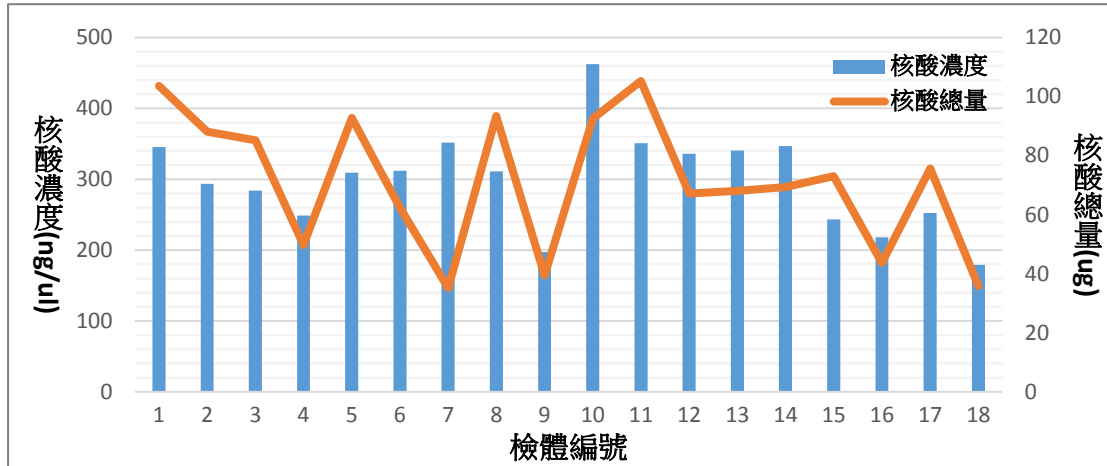
根據表 2，基龍米克斯所提供之檢體光密度分析的數據顯示，18 管送驗之所有檢體其 A_{260}/A_{230} 值皆大於 2.0，但有 6 管之 A_{260}/A_{280} 值小於 1.8，未達檢體品管之標準，代表檢體疑似有少量蛋白質或苯酚的殘留。

表 2：檢體光密度分析結果

組別	檢體 編號	捐贈 年度	核酸濃度 (ng/μl)	A260	A280	A260/A280	A260/A230	Factor	Total Volume (μl)	核酸總量 (μg)	存放冰箱 編號	品管結果
實驗組	1	2003	345.5	6.909	3.822	1.81	2.32	50	300	103.65	1	○
	2	2002	293.7	5.874	3.239	1.81	2.26	50	300	88.11	2	○
	3	2002	284.1	5.683	3.106	1.83	2.20	50	300	85.23	2	○
	4	2003	248.7	4.974	2.761	1.80	2.34	50	200	49.74	3	○
	5	2004	309.3	6.186	3.521	1.76	2.17	50	300	92.79	3	未達標準
	6	2004	311.9	6.239	3.516	1.77	2.10	50	200	62.38	4	未達標準
	7	2008	351.7	7.035	3.845	1.83	2.32	50	100	35.17	5	○
	8	2008	311.3	6.226	3.427	1.82	2.34	50	300	93.39	6	○
	9	2005	197.2	3.943	2.153	1.83	2.84	50	200	39.44	9	○
	10	2005	462.6	9.252	5.151	1.80	2.09	50	200	92.52	10	○
	11	2006	350.9	7.019	3.903	1.80	2.25	50	300	105.27	11	○
	12	2006	335.9	6.717	3.737	1.80	2.35	50	200	67.18	12	○
	13	2006	340.4	6.808	3.758	1.81	2.34	50	200	68.08	17	○
	14	2006	346.7	6.935	3.826	1.81	2.36	50	200	69.34	18	○
	15	2007	243.6	4.873	2.723	1.79	2.36	50	300	73.08	19	未達標準
	16	2007	218.1	4.363	2.432	1.79	2.36	50	200	43.62	20	未達標準
控制組	17	2015	252.3	5.047	2.840	1.78	2.34	50	300	75.69	未存放於	未達標準
	18	2015	179.1	3.583	2.038	1.76	2.59	50	200	35.82	-80°C 冰箱	未達標準
平均值			299.06	5.981	3.322	1.80	2.33		238.89	71.14		

下圖 1 則顯示各檢體所產出之 gDNA 濃度與總量分佈。自實驗結果可知，18 管送驗的檢體皆產出了至少 30 ug 的 gDNA。從濃度上看來，除了第 9 號實驗組檢體與第 18 號之控制組檢體以外，其餘檢體所產出之 gDNA 濃度皆超過 200 ng/uL。

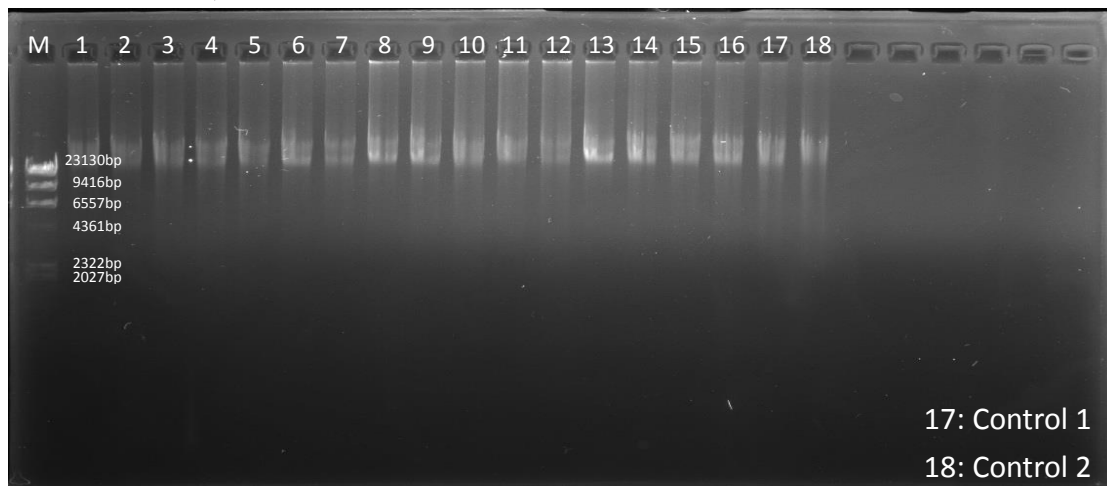
圖 1：各檢體產出之 genomic DNA 濃度與總量分佈圖



2. 電泳分析 (Gel Electrophoresis)

光密度分析只能顯示萃取出之 gDNA 樣本中核酸的量與濃度，並無法分析 gDNA 本身結構的完整性。gDNA 的結構需透過電泳來檢查。電泳分析結果如圖 2 所示，M 代表電泳圖譜 (λDNA/Hind III Marker)，其餘為自 18 管送驗之血沉棕黃層內萃取出之 gDNA。雖然 gDNA 品質在可接受範圍內，亮帶大小也大致正確，但拖尾 (smear) 的出現代表仍有少量的降解 (degradation) 存在。根據基龍米克斯的報告，主亮帶 (major band) 以上有少量拖尾為正常現象，且於主亮帶以下之 4000bp 處並無亮帶，表示 gDNA 品質沒問題，可以做後續之定序或單核苷酸多型性基因型鑑定之實驗。

圖 2：電泳分析



七、總結

本次檢體品管為抽樣檢查，依據不同年度從不同冰箱內抽取血沉棕黃層檢體後執行gDNA之萃取，電泳以及光密度分析實驗。實驗結果顯示血沉棕黃層檢體在-80°C 低溫環境下儲存多年後，萃取出之 gDNA 量足，結構完整，仍可用於後續如次世代定序（NGS sequencing）等實驗。高品質的 DNA 也代表檢體儲存環境多年來相對穩定。

八、參考文獻：

1. Lee J-E, Kim J-H, Hong E-J, Yoo HS, Nam H-Y, Park O. National Biobank of Korea: Quality control Programs of Collected-human Biospecimens. Osong Public Health and Research Perspectives. 2012;3(3): 185-189
2. Thermo Scientific. T042-Technical Bulletin, NanoDrop Spectrophotometers, Assessment of Nucleic Acid Purity. Retrieved March 10, 2016, from <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>