



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108699589 B

(45) 授权公告日 2021.08.13

(21) 申请号 201780012761.0

C12N 15/09 (2006.01)

(22) 申请日 2017.06.07

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103782174 A, 2014.05.07

申请公布号 CN 108699589 A

WO 2012109157 A3, 2013.11.14

(43) 申请公布日 2018.10.23

Silvia Zoppis等.《DNA fingerprinting secondary transfer from different skin areas:Morphological and genetic studies》.《Forensic Science International: Genetics》.2014,第11卷第137-143页.

(30) 优先权数据

Silvia Zoppis等.《DNA fingerprinting secondary transfer from different skin areas:Morphological and genetic studies》.《Forensic Science International: Genetics》.2014,第11卷第137-143页.

PCT/JP2016/070343 2016.07.08 JP

Titia Sijen.《Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers》.《Forensic Science International: Genetics》.2015,第18卷第21-32页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 田园

2018.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据

权利要求书1页 说明书10页

PCT/JP2017/021040 2017.06.07

序列表2页 附图4页

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/008319 JA 2018.01.11

(73) 专利权人 花王株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 井上高良 八谷辉

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

11322

代理人 龙淳 尹明花

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

(54) 发明名称

核酸样品的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种以微创方式从被检测体采集核酸样品的方法。本发明提供制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法，包括从被检测体采集的皮肤表层脂质中分离核酸的步骤。

1. 一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法,其特征在于,
包括采集被检测体的皮肤表层脂质的步骤、和
从所述被检测体采集的皮肤表层脂质中分离核酸的步骤,
所述来自被检测体的皮肤细胞的核酸是来自表皮、皮脂腺、毛囊和汗腺中的所有部位的核酸,
所述核酸为RNA。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,
在所述采集被检测体的皮肤表层脂质的步骤中,使用皮肤表层脂质吸收性材料、皮肤表层脂质粘附性材料、或是从皮肤刮下皮肤表层脂质的工具。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,
所述皮肤表层脂质不包括手掌、背部、脚底、或者手指的皮肤上的皮肤表层脂质。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,
所述RNA的长度为200nt以上。
5. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,
所述RNA是选自mRNA以及lincRNA中的至少1种。
6. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,
所述被检测体是需要或希望对皮肤中的基因表达进行分析、或对皮肤或皮肤以外部位的状态进行分析的人类或非人类哺乳动物。
7. 一种核酸的分析方法,其特征在于,
包括对通过权利要求1~6中的任意一项所述的方法制备的核酸进行分析的步骤,
所述方法用于非疾病诊断目的。
8. 一种选择指定的疾病或状态的核酸标志物的方法,其特征在于,包括:
将具有指定的疾病或状态或其风险的群体作为被检测体,通过权利要求1~6中的任意一项所述的方法制备核酸的步骤;以及
比较所制备的核酸与对照组的表达的步骤。
9. 一种检测指定的状态的核酸标志物的方法,其特征在于,
包括:
通过权利要求1~6中的任意一项所述的方法制备被检测体的核酸的步骤;以及
由所制备的核酸检测指定的状态的核酸标志物的步骤,
所述方法用于非疾病诊断目的。

核酸样品的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸样品的制备方法。

背景技术

[0002] 近些年,伴随着分析技术的迅猛发展,已经能够对各种各样生物体样品中的分子(核酸、蛋白质、代谢物等)进行详细分析。而且,利用这些分子分析对人体内现在、甚至将来的生理状态进行调查的技术也在发展当中。其中,对于使用核酸分子进行的分析,已经建立了全面的分析方法,具有如下优点:通过一次分析就能获得丰富信息,而且基于许多单核苷酸多态性或RNA功能的研究报告能够很容易对分析结果建立功能性的联系。

[0003] 全世界的许多研究机构都在开发使用以微创方式或非侵入的方式采集的生物体样品中的核酸分子进行如疾病等的诊断和预测的技术,该技术在应用化方面取得了飞速的进展。其中,常用的是使用DNA或RNA的诊断技术。使用DNA的诊断技术是通常采集唾液或口腔内的细胞,对其中包含的基因组DNA的单核苷酸多态性进行分析,由此对将来的疾病风险或自身的体质进行诊断的方法。另一方面,使用RNA的诊断技术是根据血液、尿等生物体样品中含有的RNA表达情况,对现在生物体内疾病的有无进行诊断的方法(非专利文献1)。

[0004] 生物体的各种各样的组织中,因为皮肤是与外界接触的组织,所以皮肤作为一种能够以微创性的方式采集的生物体样品组织引起了人们的注意。现有技术中,作为从皮肤以非侵入的方式或微创方式采集核酸的方法,报道有使用胶带剥离角质层或拔出的毛发的方法(非专利文献2、专利文献1)。然而,通过剥离角质层采集核酸的缺点是:必须要使用专用的胶带;采集量为微量;以及,从采集的核酸只能获得来自表皮的表达信息等。此外,从拔出的毛发采集核酸的缺点是:拔毛时伴有疼痛;以及,从采集的核酸只能获得来自毛囊的表达信息等。此外,作为以非侵入的方式从皮肤采集核酸的方法,还有如下方法:使用湿润的药棉拭子(棉球)在皮肤表面擦拭以采集人皮肤样本,然后进行RNA特征分析(非专利文献3)。对于该报道中采集的人皮肤样本而言,从其采集方法来看,不存在皮肤表面上的脂质。

[0005] (专利文献1)特开第2005-192409号

[0006] (非专利文献1)《临床检验科学评论》(Crit Rev Clin Lab Sci),2014,51,200-231

[0007] (非专利文献2)《皮肤病学研究期刊》(J Invest Dermatol),2006,126,2234-2241

[0008] (非专利文献3)《国际法医学:遗传学》(Forensic Sci Int Genet),2012,6(5):565-577

发明内容

[0009] 一方面,本发明提供一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法,其中,包括从被检测体采集的皮肤表层脂质中分离核酸的步骤。

[0010] 另一方面,本发明提供一种核酸的分析方法,其中,包括对通过上述方法制备的核酸进行分析的步骤。

[0011] 另一方面,本发明提供一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的试剂盒,其中,包括被检测体的皮肤表层脂质的采集工具。

附图说明

- [0012] [图1]各种生物体样品中包含的RNA。
- [0013] [图2]来自各种生物体样品的RNA中mRNA的表达。
- [0014] [图3]SSL中表皮、汗腺、毛囊、真皮和皮脂腺的标志物基因的表达量。
- [0015] [图4]下一代测序仪和实时PCR的表达量结果的相关性分析。

具体实施方式

[0016] 本领域中希望开发一种不用考虑采集者或场所,并且能够以微创性的方式从被检测体采集核酸样品的方法。而且希望从得到的核酸样品能够获得来皮肤和其他各种各样的组织或器官的信息。

[0017] 本发明的发明人发现:存在于皮肤表面的脂质中包含来自被检测体的皮肤细胞的核酸,并且发现该核酸不仅反映了表皮中的基因表达,而且还反映了皮脂腺、毛囊等其他组织中的基因表达情况。因此,本发明的发明人发现:通过对所述脂质中的核酸进行分析,能够简便地并且以非侵入方式、并且更全面地对被检测体进行基因分析或状态诊断等。

[0018] 本发明提供以简便且非侵入的方式制备被检测体的核酸的方法以及用于该方法的工具。根据本发明能够简便地并且以非侵入的方式从被检测体采集核酸样品。通过本发明制备的核酸能够作为进行如下分析的样品是有用的,这些分析包括:对被检测体的皮肤相关的遗传基因表达分析以及其他基因信息的分析、被检测体的皮肤相关的功能分析、被检测体的皮肤状态的分析(例如皮肤癌症的诊断)、进一步对被检测体的皮肤以外的部位或全身的状态的分析(例如各种疾病的诊断)。

[0019] (核酸的制备方法)

[0020] 一方面,本发明提供一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法。在一个实施方式中,根据本发明的制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法包括从被检测体采集的皮肤表层脂质中分离核酸的步骤。

[0021] 本说明书中的“皮肤表层脂质(Skin Surface Lipids;SSL)”是指存在于皮肤表面的脂溶性组分,有时也被称为皮脂。一般来说,SSL主要包含位于皮肤表面的皮脂腺等外分泌腺分泌的分泌物,分泌物覆盖在皮肤表面形成薄薄的一层。

[0022] 本说明书中,在没有特别的限定的情况下,“皮肤”是指包括体表的表皮、真皮、毛囊、以及汗腺、皮脂腺和其它的腺体等组织的总称。

[0023] 对于本发明的方法中的被检测体而言,其只要是皮肤上具有SSL的生物即可。作为被检测体的例,可以举出包括人类和非人类哺乳动物的哺乳动物,优选为人类。所述被检测体优选为需要或者希望对自身的核酸进行分析的人类或非人类哺乳动物。此外,所述被检测体优选为需要或希望对皮肤中的基因表达进行分析、或利用核酸对皮肤或皮肤以外部位的状态进行分析的人类或非人类哺乳动物。

[0024] 从被检测体采集的SSL中包括在所述被检测体的皮肤细胞中表达的核酸,优选为包括在所述被检测体的表皮、皮脂腺、毛囊、汗腺和真皮中的任意一个中表达的核酸,更优

选为包括在所述被检测体的表皮、皮脂腺、毛囊和汗腺中的任意一个中表达的核酸。因此，对于根据本发明的方法制备的来自被检测体的皮肤细胞的核酸而言，优选为来自从被检测体的表皮、皮脂腺、毛囊、汗腺和真皮中选择的至少1个部位的核酸，更优选为来自从表皮、皮脂腺、毛囊和汗腺中选择的至少1个部位的核酸。

[0025] 对于根据本发明的方法制备的来自被检测体的皮肤细胞的核酸而言，包括DNA和RNA，但是并不限于此，优选为RNA。作为RNA，可以列举：mRNA、tRNA、rRNA、低分子量RNA (Small RNA) (例如，微RNA (microRNA:miRNA)、小干扰RNA (Small interfering RNA: siRNA)、Piwi-相互作用RNA (Piwi-interacting RNA:piRNA) 等)、长链基因间非编码RNA (long intergenic non-coding RNA: (linc) RNA) 等。mRNA为编码蛋白质的RNA，大部分长度为1000nt以上。miRNA、siRNA、piRNA和lincRNA为不编码蛋白质的非编码RNA (non-coding RNA: (nc) RNA)。miRNA为ncRNA中长度在19~30nt程度的小RNA。lincRNA与mRNA一样，是具有poly-A的长链非编码RNA，其长度为200nt以上(非专利文献1)。更优选：根据本发明的方法制备的核酸是长度为200nt以上的RNA。更优选：根据本发明的方法制备的核酸是从mRNA和lincRNA中选择的至少1种。

[0026] 在一个实施方式中，本发明的方法可以进一步包括采集被检测体的SSL的步骤。作为采集SSL的皮肤的部位，可以列举：头、脸、颈、躯干、手足等身体的任意部位的皮肤，和患有过敏、粉刺、炎症、肿瘤等疾病的皮肤，以及创伤的皮肤等，对其没有特别的限定。此外，作为采集SSL的皮肤的部位，优选不包括手掌、背部、脚底、或手指的皮肤。

[0027] 在从被检测体的皮肤采集SSL时，能够使用从皮肤采集或除去SSL的所有方法。优选使用后面提到的SSL吸收性材料、SSL粘附性材料、或是从皮肤刮下SSL的工具。对于SSL吸收性材料或SSL粘附性材料没有特别的限定，只要是对SSL具有亲和性的材料即可，例如可以列举聚丙烯、纸浆等。关于从皮肤采集SSL的操作的更加详细的例，可以列举：用吸油纸、吸油膜等使SSL被片状材料吸收的方法；向玻璃板、胶带等粘附SSL的方法；用抹刀 (spatula)、刮刀等挂下SSL并收集的方法，等。另外，为了提高SSL的粘附性，可以使用预先含有高脂溶性溶剂的SSL吸收性材料。另一方面，如果SSL吸收性材料含有高水溶性溶剂或水分，则会阻碍SSL的粘附，因此不优选。优选以干燥状态使用SSL吸收性材料。

[0028] 从采集的SSL中分离核酸时，能够采用从生物体样品提取核酸时或者纯化核酸时常用的方法，例如：酚-氯仿法 (phenol/chloroform method) , AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction:酸-异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法) 法，或使用TRIzol (注册商标) 或RNeasy (注册商标) 等柱子的方法，使用涂覆二氧化硅的特殊的磁性体颗粒的方法，使用固相载体可逆化固定 (Solid Phase Reversible Immobilization) 磁珠的方法，通过ISOGEN等市售的DNA或RNA提取试剂进行提取的方法等。

[0029] (核酸的分析方法)

[0030] 通过本发明的方法制备的来自被检测体的皮肤细胞的核酸能够用于使用核酸的各种分析或诊断中。因此，本发明进一步提供一种核酸的分析方法，其包括：对通过上述本发明的制备核酸的方法制备得到的核酸进行分析的步骤。作为使用通过本发明制备的SSL中的核酸而能够进行的分析或诊断的例子，可以列举如下：

[0031] (i) 对被检测体的皮肤的基因表达分析以及其它的遗传信息分析，以及基于这些分析进行的对被检测体的功能分析；

[0032] (ii) 对被检测体的皮肤状态的分析,例如,皮肤的健康状态的评价或将来预测、皮肤疾病的诊断或预后诊断、皮肤外用剂的疗效评价、皮肤癌症的诊断或预后诊断、皮肤的细微变化的评价等;

[0033] (iii) 对被检测体的皮肤以外的部位或全身的状态的分析,例如,全身的健康状态的评价或将来预测,以及神经疾病、心血管疾病、代谢性疾病、癌症等各种疾病的诊断或预后诊断等。

[0034] 下面给出使用SSL中的核酸进行的分析或诊断的更详细的例子。

[0035] 基因表达分析

[0036] 如后面的实施例所述,SSL含有丰富的来自被检测体的mRNA等高分子量RNA,另一方面,过去通常使用的尿、血清、唾液、角质层等生物体样品中几乎不存在高分子量的RNA(实施例1~3)。SSL是能够以非侵入的方式从被检测体采集的mRNA供给源,作为用于基因表达分析的生物体样品是有用的。而且,SSL中的mRNA能够反映皮脂腺、毛囊以及表皮的基因表达特征(实施例4),所以,SSL适合用作用于分析皮肤、特别是皮脂腺、毛囊以及表皮的基因表达的生物体样品。

[0037] 病理学诊断

[0038] 最近的研究发现,癌细胞中其表达发生变化的RNA群中的约63%为编码蛋白质的mRNA(《肿瘤研究》(Cancer Res).2016,76,216-226)。因此,认为:通过测定mRNA的表达状态,能够更加忠实地掌握癌症等疾病引起的细胞生理状态的变化,并且能够更加准确地诊断身体状态。SSL含有丰富的mRNA,并且还包括与癌症具有关联性的SOD2的mRNA(《生理基因组学》(Physiol Genomics),2003,16,29-37;Cancer Res,2001,61,6082-6088)。因此,SSL作为用于对皮肤癌症等癌症进行诊断或预后诊断的生物体样品是有用的。

[0039] 近年来,有报道称:对于患有肥胖、阿尔兹海默症、乳腺癌、心脏病等的皮肤以外的组织上的疾病的患者而言,这些患者的皮肤中的分子表达会发生变化,因此,可以说“皮肤是体内健康状态的窗户(window to body's health)”(《欧洲药物科学杂志》(Eur J Pharm Sci).2013,50,546-556)。因此,通过对SSL中的mRNA的表达状态进行测定,能够分析被检测体的皮肤以外的部位的生理状态,或者全身的生理状态。

[0040] 非编码RNA (non-coding RNA) 分析

[0041] 近年来,细胞的基因表达中的miRNA、lincRNA等非编码RNA (non-coding RNA; (nc) RNA) 的参与引起了人们的关注,并且目前对它的研究非常活跃。此外,现有技术中开发了使用尿或血液中的miRNA的、以非侵入方式或微创方式检测癌症的方法(例如,《美国国家科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci USA),2008,105,10513-10518;Urol Oncol,2010,28,655-661)。由SSL制备的miRNA、lincRNA等ncRNA可以用作用于上述研究或诊断的样品。

[0042] 核酸标志物的筛选或检测

[0043] 可以将由SSL制备的核酸作为样品而进行疾病或状态的核酸标志物的筛选或检测。本说明书中,“疾病或状态的核酸标志物”是指,其表达成为判断指定的疾病或状态或其风险的指标的核酸。核酸标志物优选为RNA标志物,所述RNA优选为mRNA、miRNA或lincRNA。所述核酸标志物针对的疾病或状态包括各种皮肤疾病、皮肤的健康状态(光老化、干燥、水分或油分量、皮肤的紧致度、迟钝等);以及所述“病理学诊断”项目中提到的皮肤癌症等癌症、以及肥胖、阿尔兹海默症、乳腺癌和心脏病等的皮肤以外的组织上的疾病,但并不限定

于这些。核酸表达的分析可以根据已知的方法进行,例如使用实时PCR(Real-time PCR)、微阵列、下一代测序仪的RNA表达分析等。

[0044] 一个例子是选择疾病或状态的核酸标志物的方法。在该方法中,将具有指定疾病或状态或其风险的群体作为被检测体,按照本发明的核酸的制备方法,制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸。比较由该群体制备的核酸的表达(表达水平等)与对照组的表达。作为所述对照组,可以列举:没有指定疾病或状态或其风险的群体,以及基于这些得到的统计学数据等。表现出与对照组不同的表达的核酸可作为该指定疾病或状态的标志物或作为指定疾病或状态的候补。

[0045] 另一个例子是检测疾病或状态的核酸标志物的方法,或者,基于所述标志物的检测来判断疾病或状态、或其风险的方法。该方法中,从希望或者需要对指定的疾病或状态、或其风险进行判断的被检测体,根据本发明的核酸的制备方法,制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸。接着,从制备的核酸中检测出指定疾病或状态的核酸标志物。根据该核酸标志物的有无或表达量,对被检测体的疾病或状态、或其风险进行判断。

[0046] (核酸制备试剂盒)

[0047] 另一方面,本发明提供一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的试剂盒,其包括被检测体的SSL的采集工具。作为SSL的采集工具,可以列举例如SSL吸收性或粘附性材料、从皮肤刮取SSL的工具等。所述SSL吸收性材料优选是使用聚丙烯等材料制造的、具有弹性的片状材料。作为该SSL吸收性材料的优选例,可以列举吸油纸、吸油膜等。优选该SSL吸收性材料是不含有水溶性溶剂或水分的干燥状态。优选所述SSL粘附性材料为片状或板状,可以根据需要在其表面涂布用于使SSL粘附的多聚-L-赖氨酸(poly-L-Lysine)等粘附剂。作为所述SSL粘附性材料的优选例,可以列举玻璃板、胶带等。作为刮取该SSL的工具的优选例,可以列举抹刀(spatula)、刮刀(scrapers)等。

[0048] 本发明中的核酸制备试剂盒还可以进一步包含用于从上述采集工具采集到的SSL中分离核酸的试剂。作为该试剂,可以使用通常用于提取或纯化生物体样品中的DNA或RNA的试剂。

[0049] 作为本发明的示例性的实施例,本说明书中进一步公开以下的物质、制造方法、用途、方法等。但是,本发明并不限定于这些实施方式。

[0050] (1) 一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的方法,其中,包括从被检测体采集的皮肤表层脂质中分离核酸的步骤。

[0051] (2) 如(1)所述的方法,其中,优选为进一步包括采集所述被检测体的皮肤表层脂质的步骤。

[0052] (3) 如(1)或(2)所述的方法,其中,优选所述核酸是来自表皮、皮脂腺、毛囊、汗腺和真皮中选择的至少1个部位的核酸,更优选所述核酸是来自表皮、皮脂腺、毛囊和汗腺中选择的至少1个部位的核酸。

[0053] (4) 如(1)~(3)中的任意一项所述的方法,其中,所述核酸为RNA。

[0054] (5) 如(4)所述的方法,其中,优选所述RNA的长度为200nt以上。

[0055] (6) 如(4)或(5)所述的方法,其中,优选所述RNA是从mRNA以及lincRNA中选择的至少1种。

[0056] (7) 如(1)~(6)中的任意一项所述的方法,其中,优选:使用皮肤表层脂质吸收性

材料、皮肤表层脂质粘附性材料、或从皮肤刮取皮肤表层脂质的工具来进行所述皮肤表层脂质的采集。

[0057] (8) 如(1)～(7)中的任意一项所述的方法，其中，优选：所述皮肤表层脂质为头、脸、颈、躯干、手足的皮肤、具有疾病的皮肤、或具有创伤的皮肤上的皮肤表层脂质。

[0058] (9) 如(1)～(8)中的任意一项所述的方法，其中，优选：所述皮肤表层脂质不包括手掌、背部、脚底、或者手指的皮肤上的皮肤表层脂质。

[0059] (10) 一种核酸的分析方法，其中，包括对通过(1)～(9)中的任意一项所述的方法制备的核酸进行分析的步骤。

[0060] (11) 一种选择指定的疾病或状态的核酸标志物的方法，其中，包括：将具有指定的疾病或状态或其风险的群体作为被检测体，通过(1)～(9)中的任意一项所述的方法制备核酸的步骤；以及，比较所制备的核酸与对照组的表达的步骤。

[0061] (12) 一种检测指定的疾病或状态的核酸标志物的方法，其中，包括：通过(1)～(9)中的任意一项所述的方法制备被检测体的核酸的步骤；以及，由所制备的核酸检测指定的疾病或状态的核酸标志物的步骤。

[0062] (13) 一种制备来自被检测体的皮肤细胞的核酸的试剂盒，其中，包括被检测体的皮肤表层脂质的采集工具。

[0063] (14) 如(13)所述的试剂盒，其中，优选所述采集工具是皮肤表层脂质吸收性材料、皮肤表层脂质粘附性材料、或从皮肤刮取皮肤表层脂质的工具。

[0064] (15) 如(13)或(14)所述的试剂盒，其中，优选进一步包括用于从采集的皮肤表层脂质中分离核酸的试剂。

[0065] (16) 如(13)～(15)中的任意一项所述的试剂盒，其中，所述核酸优选为来自表皮、皮脂腺、毛囊、汗腺和真皮中选择的至少1个部位的核酸，更优选为来自表皮、皮脂腺、毛囊和汗腺中选择的至少1个部位的核酸。

[0066] (17) 如(13)～(16)中的任意一项所述的试剂盒，其中，优选所述核酸为RNA。

[0067] 实施例

[0068] 下面基于实施例对本发明进行进一步详细的说明，但是这不是对本发明的限定。

[0069] 实施例1：各种生物体样品中的RNA的分析

[0070] 对皮肤的角质层、皮肤表层脂质(SSL)、血清、尿和唾液中的RNA进行了分析。

[0071] 按照非专利文献2中所述的方法，使用丙烯酸胶带(2.5cm×3.0cm)从被检测者的额头的角质层的同一部位，沿着深度方向连续采集4块角质层后，提取RNA。

[0072] 使用吸油膜(3M日本公司)，从被检测者的整个脸部收集SSL。接着，将吸油膜裁剪成适当大小，使用Trizol(注册商标)试剂(日本生命科技有限公司(Life Technologies Japan Ltd.))，按照附带的操作规范提取RNA。

[0073] 从cosmobio公司购入人血清、尿和唾液。对于唾液以15000rpm条件进行5分钟离心，以除去混合于其中的粘液素和口腔内细胞，将上清液转移至新的试管中并用作样品。从这些血清、尿、唾液样品，使用Trizol(注册商标)LS试剂(日本生命科技有限公司(Life Technologies Japan Ltd.))，按照附带的操作规范提取RNA。

[0074] 接着，对于提取的RNA使用Agilent RNA 6000Pico Kit(安捷伦科技日本有限公司(Agilent Technologies Japan Ltd.))进行分析。

[0075] 结果如图1所示。SSL中的RNA包括来自细菌23S和16S的rRNA、来自人的28S rRNA、以及来自真菌和人的18S rRNA。在角质层中没有观察到峰值，因此，推测几乎不存在RNA。从血清、尿、唾液提取的RNA中确认到低分子量RNA (Small RNA) 的峰，这说明血清、尿、唾液中存在miRNA等低分子量RNA，这与过去的报道(非专利文献1)一致。

[0076] 实施例2:SSL中包含的来自各物种的RNA比例

[0077] 为了计算SSL中所含有的来自各物种的RNA的比例，按照使用实时PCR (Real-time PCR) 的绝对定量法，分别对SSL中的细菌中共同存在rRNA序列、真菌中共同存在rRNA序列、以及人的rRNA的序列的拷贝数进行计算。

[0078] 对于细菌的16S rRNA，将表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) JCM2414 株的16S rRNA区域克隆至pUC118中。对于真菌的26S rRNA，将球形马拉色菌 (*Malassezia globosa*) CBS7874株的26S rRNA克隆至pUC118中。对于人的18S rRNA，将人的18S rRNA区域克隆至pcDNA3.1中。将这些的质粒DNA用作实时PCR (Real-time PCR) 的标准样品。细菌的PCR引物是基于16S rRNA的通用序列(《应用和环境微生物学》(Appl Environ Microbiol), 2012, 78, 5938-5941)的信息来设定；真菌的PCR引物是基于26S rRNA的通用序列(《公共科学图书馆》(PLoS One), 2012, e32847)的信息来设定；人的PCR引物是基于18S rRNA的序列的信息来设定(表1)。

[0079] 表1

引物名称	序列 (5'-3')	序列 ID :No.	探针类型	目的基因
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1	SYBR 绿色	所有细菌
519R	GWATTACCGCGGCKGCTG	2	(SYBR Green)	(16S rRNA)
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG	3	SYBR 绿色	所有真菌
NL-4	GGTCCGTGTTCAAGACGG	4	(SYBR Green)	(26S rRNA)
TaqMan 探针 (Hs99999901_s1)	未知		FAM	人 (18S rRNA)

[0081] 对于从3名被检测者采集的SSL中的RNA，使用用于RT-PCR的SuperScript III第一链合成系统 (SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR) (日本生命科技有限公司 (Life Technologies Japan Ltd.)) 进行反转录，通过以获得的cDNA为模板的实时PCR (Real-time PCR) 而计算出SSL中的各种物的rRNA的拷贝数。其结果，与实施例1的结果相同地，SSL的RNA中包括来自细菌 (bacteria)、真菌 (fungi) 和人 (human) 的rRNA，其中，人的rRNA明显占据了最大的比例(表2)。

[0082] 表2

对象 [0083]	拷贝数		
	细菌 (16S rRNA)	真菌 (26S rRNA)	人 (18S rRNA)
	No.1	2.9E+05	n.d.
No.2	2.7E+06	5.6E+04	3.7E+07
No.3	2.0E+06	1.4E+04	9.4E+06

[0084] 实施例3:各种生物体样品中的mRNA的检测

[0085] 将普遍表达的GAPDH和SOD2的mRNA作为指标,对实施例1中使用的各种生物体样品中的mRNA的有无进行评价。

[0086] 对于实施例1中提取的各种生物体样品的RNA,使用用于RT-PCR的SuperScript III第一链合成系统(SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR)(日本生命科技有限公司(Life Technologies Japan Ltd.))进行反转录,以得到的cDNA为模板进行RT-PCR。将从人表皮细胞单独分离的RNA作为阳性对照组。进行RT-PCR时,使用Advantage 2PCR Kit(Takara Bio Inc.)和表3中表示的引物,按照PCR程序:(95℃、5分钟→[95℃、15秒→60℃、30秒→72℃、30秒]×35个循环→72℃、7分钟),使GAPDH和SOD2的cDNA得到扩增。PCR后,使用2%琼脂糖凝胶和TrackIt1Kb Plus DNA Ladder(日本生命科技有限公司(Life Technologies Japan Ltd.))进行电泳,检测目标条带(target bands)。

[0087] 表3

引物名称	序列 (5'-3')	序	列	产物大小
		ID: No.	(bp)	
GAPDH-F	CCCTTCATTGACCTCAACTAC	5		349
GAPDH-R	AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT	6		
SOD2-F	CCCTTCATTGACCTCAACTAC	7		257
SOD2-R	AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT	8		

[0089] 结果如图2所示。在SSL中,对于GAPDH和SOD2的任意一个,均在与阳性对照组相同的位置检测到条带,证实了mRNA的存在。因此,显示出:SSL包含mRNA,能够作为用于分析皮肤的基因表达的生物体样品使用。另一方面,在角质层、血清、尿和唾液中,均没有确认到GAPDH和SOD2中的任何一个条带。

[0090] 而且,SSL中的被检测到mRNA的SOD2是一种将对细胞有害的超氧化物阴离子(super oxide anion)转变为过氧化氢的酶,据报道其与癌症相关。据报道:缺失该基因的杂合小鼠在全身组织中有大量的DNA损伤积累,在诱导氧化应激时死亡率比野生型高,而且癌症的发生率也比野生型高(《生理基因组学》(Physiol Genomics),2003,16,29-37)。另一方面,据报道:在皮肤中过量表达SOD2的小鼠即使在对皮肤持续施加氧化应激的情况下,皮肤癌症的发生率也比野生型低(《肿瘤研究》(Cancer Res),2001,61,6082-6088)。因此,期待含有SOD2mRNA的SSL也能够用作用于诊断皮肤癌症等癌症的发病风险或预后的生物体样品。

[0091] 实施例4:使用下一代测序仪对SSL中RNA的基因表达进行全面分析

[0092] (1)对于用SSL作为样品而进行全面的基因表达分析的实施可能性,进行了验证。使用吸油膜从3名被检测者的脸部采集SSL,为了验证技术误差将样品平均分成两份后,分别提取RNA。使用提取的RNA,通过下一代测序仪Ion Proton系统(日本生命科技有限公司)进行基因表达的全面分析。也就是说,由采集的RNA使用Ion AmpliSeqTranscriptome人类基因表达试剂盒(Ion AmpliSeqTranscriptome Human Gene Expression Kit)(日本生命科技有限公司),按照操作规范制作了库(library),并使用该库通过Ion chef系统(日本生命科技有限公司)进行乳液PCR。将得到的PCR产物装载至Ion PI芯片,使用Ion Proton系统进行测序,计算定位在表皮、汗腺、真皮、毛囊、皮脂腺的每个标志物基因的读数。标志物基因的选择参考文献报道(《国际分子医学杂志》(Int J Mol Med),2014,34,997-1003;《皮肤病学研究杂志》(J Invest Dermatol),1997,108,324-329;《皮肤病学研究杂志》(J Invest Dermatol),2002,119,1137-1149;《进化》(Development);2013,140,4870-4880)。

[0093] 结果如图3所示。从SSL中检测到了表皮、汗腺、毛囊和皮脂腺的标志物基因。此外也检测到了少量真皮标志物基因。这说明:SSL中主要包含来自表皮、汗腺、毛囊和皮脂腺的RNA分子,也包含少量的来自真皮的RNA分子。

[0094] (2)通过mRNA定量方法中可靠性最高的实时PCR来验证上述(1)中通过下一代测序仪得到的分析结果的可靠性。由(1)制备的RNA样品使用SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR合成cDNA,通过实时PCR对用下一代测序仪检测到的代表性基因IL-8、GAPDH和PLIN2的基因表达进行定量,与(1)中通过测序仪得到的分析结果进行比较。对于IL-8、GAPDH和PLIN2中的任意一个的基因表达,均显示出在下一代测序仪分析和实时PCR分析之间存在显著的正相关性,证实了通过下一代测序仪得到的分析结果具有可靠性(图4)。

[0095] 实施例5:皮肤表层脂质中的RNA分析

[0096] 对上述非专利文献3中报道的使用湿润棉签采集到的人类皮肤样本与本发明的皮肤表层脂质进行比较。

[0097] (样品采集)

[0098] 将从额头正中央起的左右侧3cm×5cm的范围作为采集范围,在一侧使用吸油膜(聚丙烯,3cm×5cm,3M日本公司),在另一侧使用用PBS浸渍和湿润的培养棉签(培养棉签EZ,聚氨酯,日本BD公司),一边在采集范围内全面施加一定的力量,一边重复进行3次擦拭,由此采集皮肤表层物质。

[0099] (脂质量的评价)

[0100] 对采集到的样品中的脂质量,以皮肤表层脂质的主要成分即甘油三酯的量作为指标进行评估。将采集中使用的吸油膜裁剪成适当大小,另一方面,收集采集中使用的培养棉签的尖端部分,分别采用Bligh-Dyer法提取脂质。具体而言,将氯仿、甲醇、磷酸盐缓冲液(PBS (phosphate buffered saline))加入到样品中后,充分振荡,以提取脂质。接着,向抽出物中加入氯仿和PBS,充分振荡后,使用离心机分离有机相和水相,收集有机相。将有机相在30℃的温度下使用氮气气体吹干后,溶解在含有1%Triton X-100(Sigma Aldrich公司)的PBS溶液1mL中,由此制得样品溶液。此外,对没有用于上述采集的吸油膜和培养棉签进行相同的处理,从而制备空白样品溶液。使用血清甘油三酯定量试剂盒(Serum Triglyceride

Quantification Kit) (CELL BIOLABS, INC), 按照附带的操作规范测定570nm处的吸光度, 对每个样品溶液的甘油三酯量进行定量。

[0101] 甘油三脂的定量结果如表4所示。使用吸油膜采集皮肤表层脂质时, 样品溶液中的甘油三脂浓度为100μM以上, 相对于此, 使用湿润的药棉拭子采集皮肤表层物质时, 样品溶液中的甘油三脂浓度为检测限10μM以下, 与空白没有区别。因此, 说明: 用湿润的药棉拭子采集的皮肤表层物质中实质上不含有来自皮肤表层脂质的成分。

[0102] 表4

试样	吸光度 (570nm)	甘油三酯浓度 (μM)
吸油膜 (空白)	0.047	<10
吸油膜 (试样)	0.1655	117.8
培养棉签 (空白)	0.055	<10
培养棉签 (试样)	0.055	<10

[0104] (人类RNA分子的分析)

[0105] 如上所述, 从额头的左右侧使用吸油膜或者用PBS湿润的培养棉签采集皮肤表层物质。将吸油膜裁剪为适当的大小, 另外, 收集培养棉签的前端部分, 分别使用RNeasy脂质组织微型试剂盒(RNeasy Lipid Tissue Mini Kit) (Qiagen公司), 按照附带的操作规范提取RNA。将提取的RNA使用乙醇沉淀, 用10μL的水进行溶解。使用提取的RNA, 通过下一代测序仪Ion S5/XL系统(日本生命科技有限公司)对基因表达进行全面分析。也就是说, 由采集的RNA使用Ion AmpliSeqTranscriptome人类基因表达试剂盒(Ion AmpliSeqTranscriptome Human Gene Expression Kit) (日本生命科技有限公司)按照操作规范制作了库(library), 并使用该库通过Ion chef系统(日本生命科技有限公司)进行乳液PCR。将得到的PCR产物装载至Ion 540芯片(Chip), 使用Ion S5/XL系统进行测序。

[0106] 对吸油膜和培养棉签采集的皮肤表面物质的RNA进行全面分析的结果表明:一个基因中能够检测到读数为10以上的序列片段的人类基因的数量, 仅在吸油膜采集物中确认到的基因为5294个, 仅在培养棉签采集物中确认到的基因为132个, 在吸油膜采集物和培养棉签采集物中共同确认到的基因为625个。该结果表明:与培养棉签采集到的实质上不含有皮肤表层脂质的皮肤表层物质相比, 吸油膜采集的皮肤表层脂质中包含多种多样的RNA分子, 皮肤表层脂质在被检测体的基因分析或状态诊断方面非常有用。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 花王株式会社
- [0003] <120> 核酸样品的制备方法
- [0004] <130> KS1514
- [0005] <150> PCT/JP2016/070343
- [0006] <151> 2016-07-08
- [0007] <160> 8
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 20
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 人工的
- [0013] <220>
- [0014] <223> 寡核苷酸引物 27F
- [0015] <400> 1
- [0016] agagtttgat cmtggctcag 20
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 18
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工的
- [0021] <220>
- [0022] <223> 寡核苷酸引物 519R
- [0023] <400> 2
- [0024] gwattaccgc ggckgctg 18
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 23
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工的
- [0029] <220>
- [0030] <223> 寡核苷酸引物 NL-1
- [0031] <400> 3
- [0032] gcatatcaat aagcggagga aag 23
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 19
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工的
- [0037] <220>
- [0038] <223> 寡核苷酸引物 NL-4

- [0039] <400> 4
- [0040] ggtccgttt tcaagacgg 19
- [0041] <210> 5
- [0042] <211> 21
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> 人工的
- [0045] <220>
- [0046] <223> 寡核苷酸引物 GAPDH-F
- [0047] <400> 5
- [0048] cccttcattt acctcaacta c 21
- [0049] <210> 6
- [0050] <211> 20
- [0051] <212> DNA
- [0052] <213> 人工的
- [0053] <220>
- [0054] <223> 寡核苷酸引物 GAPDH-R
- [0055] <400> 6
- [0056] agtgagcttc ccgttcagct 20
- [0057] <210> 7
- [0058] <211> 21
- [0059] <212> DNA
- [0060] <213> 人工的
- [0061] <220>
- [0062] <223> 寡核苷酸引物 SOD2-F
- [0063] <400> 7
- [0064] cccttcattt acctcaacta c 21
- [0065] <210> 8
- [0066] <211> 20
- [0067] <212> DNA
- [0068] <213> 人工的
- [0069] <220>
- [0070] <223> 寡核苷酸引物 SOD2-R
- [0071] <400> 8
- [0072] agtgagcttc ccgttcagct 20

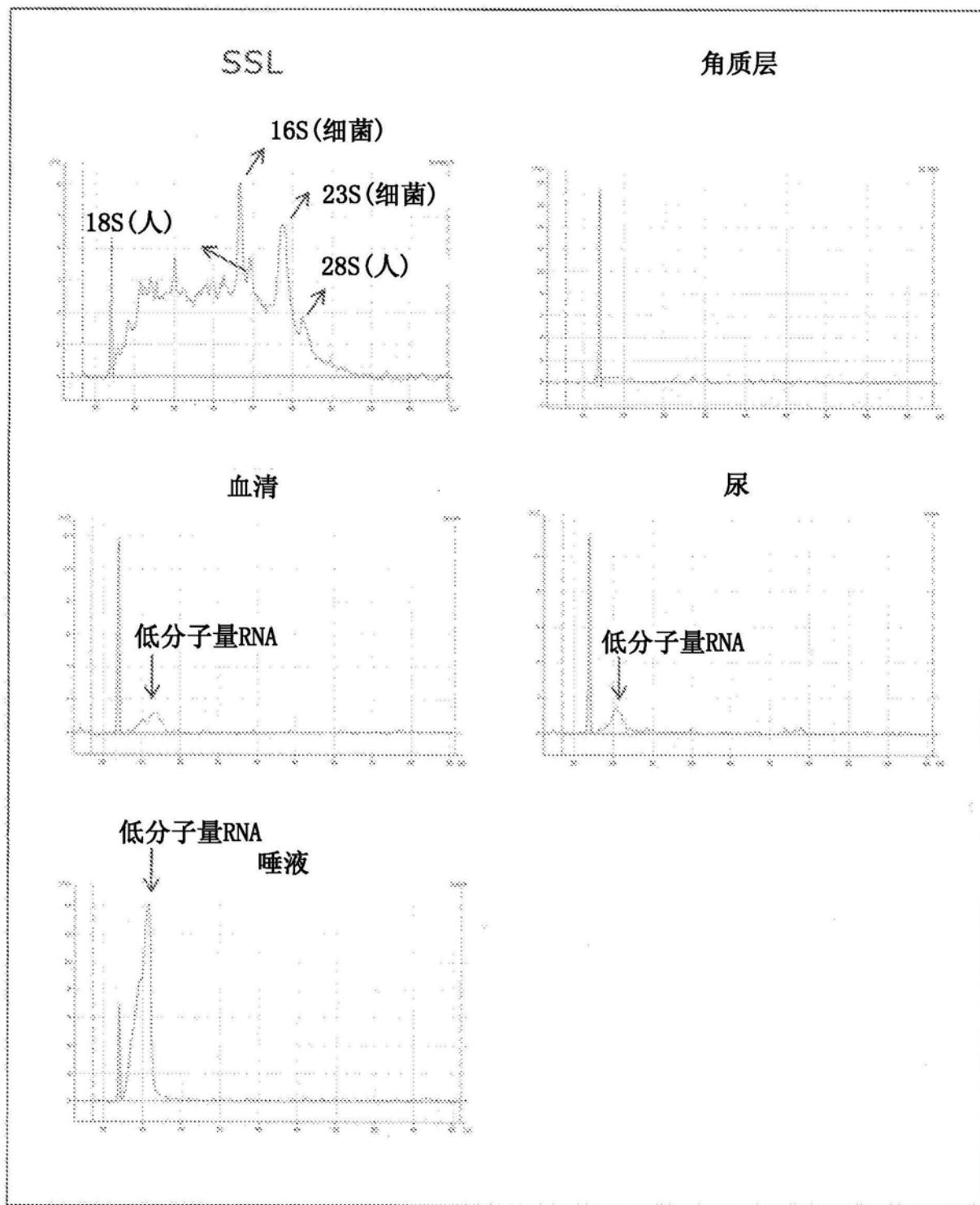


图1

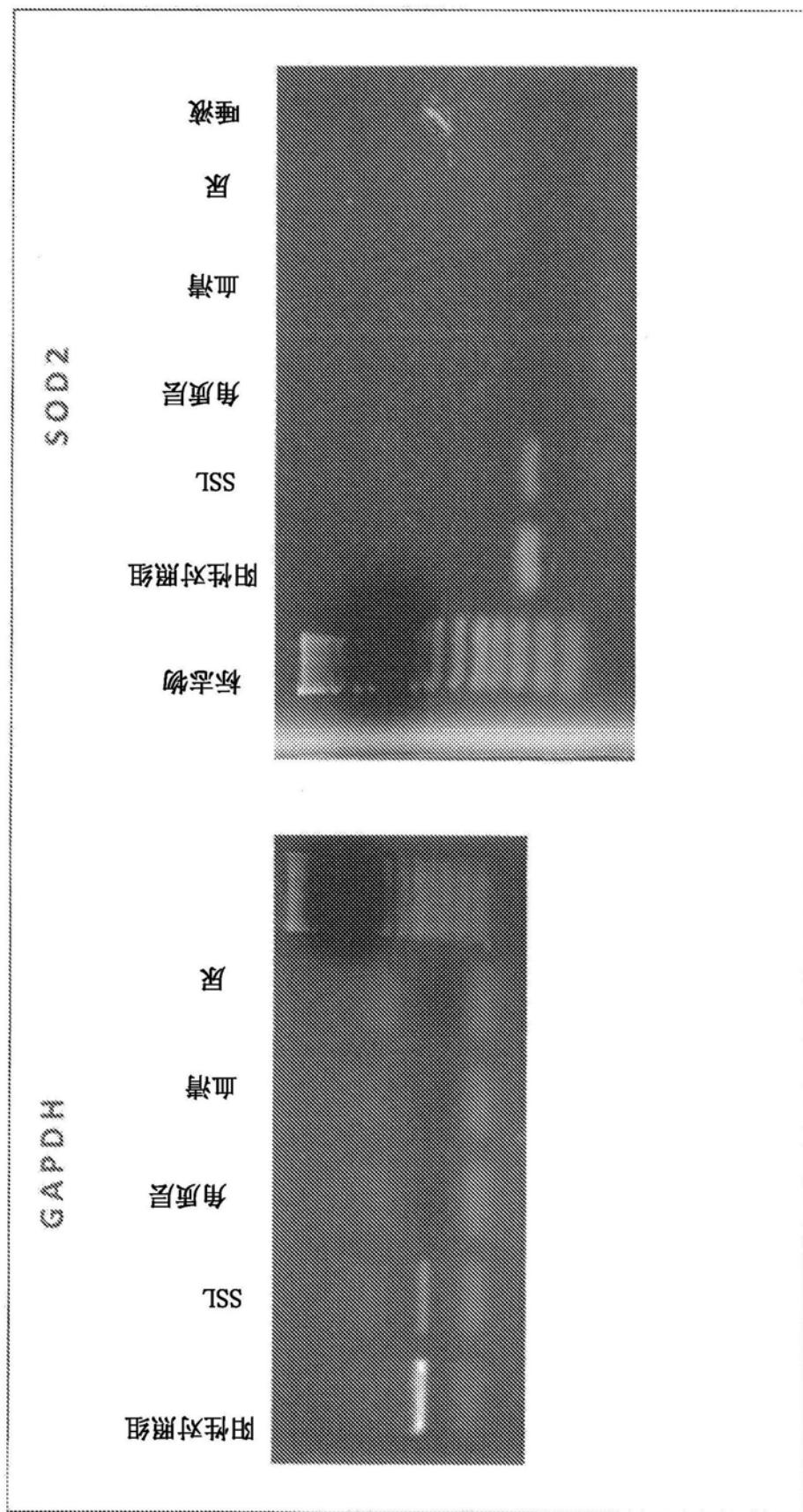


图2

		No.1	No.2	No.3		
KRT1	11	5	654	632	48	117
KRT10	123	64	12406	10273	1608	752
FLG	305	412	19539	14853	1307	744
IVL	156	241	22111	34504	1361	1484
KRT7	8	12	0	0	101	82
KRT8	38	63	102	33	72	56
KRT14	792	625	12269	8612	3887	3296
KRT15	65	33	166	1363	128	176
KRT18	4	14	311	98	15	22
KRT19	12	0	0	141	145	125
KRT17	3573	3587	132437	112625	14693	15910
KRT75	23	16	762	166	74	89
KRT79	262	213	14203	14838	1791	784
KRT16	1044	467	17549	10389	4022	3169
COL1A1	32	20	0	0	54	30
ELN	0	0	0	0	0	0
COL3A1	0	0	0	0	0	0
FBN1	38	20	9	1	0	3
ACSL1	28221	27112	6525	2666	12416	11829
PPARD	1492	2070	3406	4886	2077	2409
PLIN2	2729	3047	9543	8372	5518	4950
ELOVL5	5099	6610	2538	2412	4414	4490
FASN	58	78	1396	544	268	251

图3

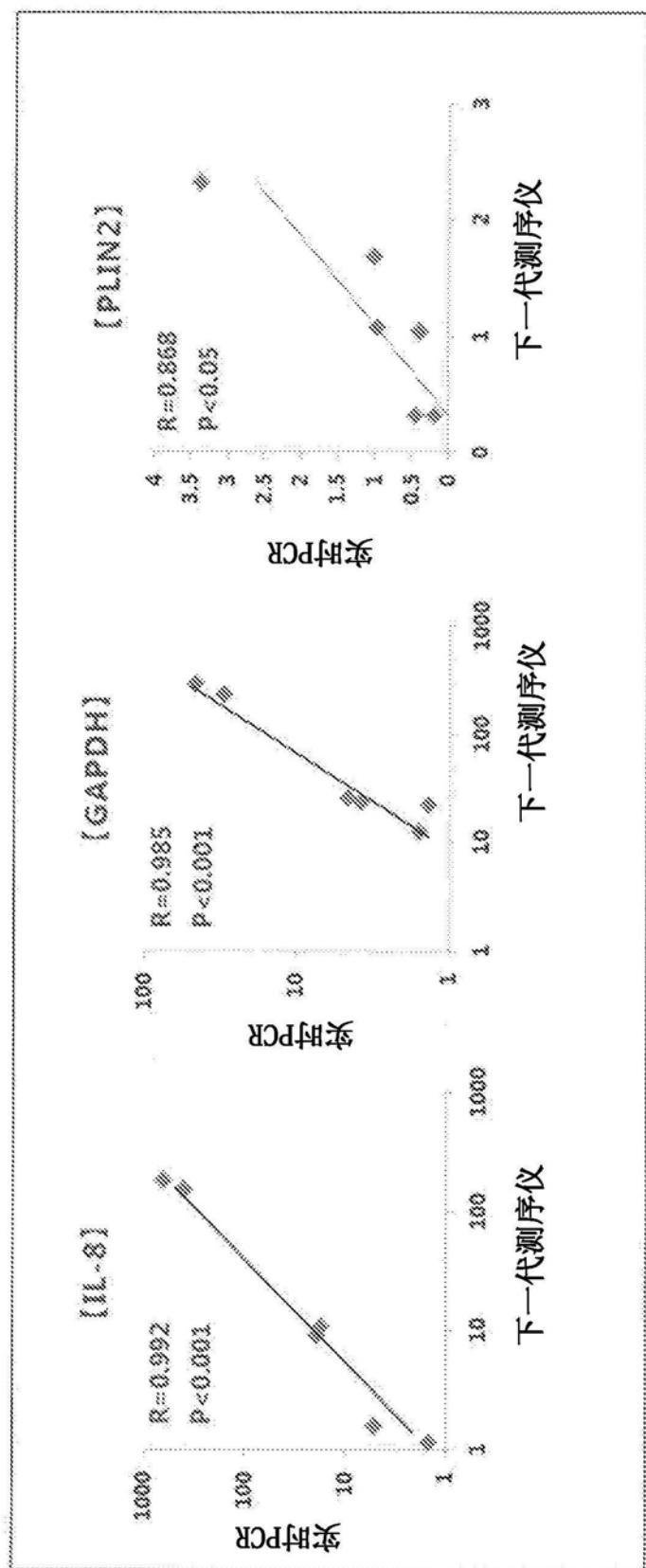


图4