



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MARISI AIDAR

**EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS
EPITELIAIS BUCAIS UTILIZANDO ACETATO DE
AMÔNIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, Área de Histologia e Embriologia.

Piracicaba
2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MARISI AIDAR
(Cirurgiã – Dentista)

**EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS
EPITELIAIS BUCAIS UTILIZANDO ACETATO DE
AMÔNIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, Área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Ai21e	<p>Aidar, Marisi. Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio. / Marisi Aidar. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Sérgio Roberto Peres Line Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. DNA. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Mucosa oral. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: DNA purification from buccal epithelial cells by ammonium acetate method

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. DNA. 2. Polymerase chain reaction. 3. Mouth mucosa

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Sérgio Roberto Peres Line, Edmilson Ricardo Gonçalves, Ricardo Della Coletta

Data da Defesa: 05-06-2006

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco- Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Deus, este Ser Onisciente, que por Teu mistério nos torna Seres mais curiosos e vivazes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 05 de Junho de 2006, considerou a candidata MARISI AIDAR aprovada.

Ao meu marido Elis (em memória) que ainda muito jovem me amparava em tudo e tenho certeza continua torcendo por mim.

Ao meu filho, Filipe, sempre me apoiou em meus desafios, me ensinando que ao me deparar com obstáculos devo olhar para eles e entender - são apenas consequências.

PROF. DR. SÉRGIO ROBERTO PERES LINE

A minha querida sogra Marion, mulher forte, um exemplo para todos nós.

Aos meus irmãos Telma, Edmilson, Elson e Cheila, pela amizade que nos une.

PROF. DR. EDMILSON RICARDO GONÇALVES

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

A **Deus**, este Ser Onisciente, que por Teu mistério nos torna Seres mais curiosos e vivazes.

A minha mãe, **Theresa** (em memória) por ter sempre acreditado em mim, ao meu pai **Chafique**, por ter transmitido-me esta alegria de viver.

Ao meu marido **Elis** (em memória) que ainda muito jovem me amparava em tudo e tenho certeza continua torcendo por mim.

Ao meu filho, **Filipe**, que sempre me apoiou em meus desafios, me ensinando que ao me deparar com obstáculos devo olhar para eles e entender - são apenas consequências de novas trilhas! Te amo filho!!!

A minha querida sogra **Marion**, mulher forte, um exemplo para todos nós.

Aos meus irmãos **Telma**, **Edázima**, **Edson** e **Cheila**, pela amizade que nos une.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. ***Sérgio Roberto Peres Line***, esta pessoa iluminada, que a natureza privilegiou com uma inteligência que impressiona a todos que o rodeiam, porém maior que este predicado que o torna um cientista nato e cheio de idéias é seu lado simples de ser e viver!

Meu muitíssimo obrigada, querido professor!

A minha auxiliadora,

Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos. Imaginar o que um ser humano possa fazer ao outro, de uma forma incondicional, com um sorriso nos lábios, disposição, dedicação e não pensar na Crica, só vai acontecer para quem ainda não a conheceu.

Querida amiga, bem aventurados serão teus alunos! Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da UNICAMP, Prof. Dr. José Tadeu Jorge. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP – UNICAMP, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, instituição onde me graduei e que mais uma vez me acolheu, proporcionando-me a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, pelo idealismo.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, pela atenção.

Aos professores do departamento de Morfologia, Área de Histologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP – UNICAMP, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello, Prof. Dr. José Merzel exemplos de pesquisadores e dedicação á vida acadêmica, pelo acolhimento.

Aos funcionários do departamento de Morfologia Suzete, Eliene, Gustavo, Cidinha e Ivani pelo carinho e à Eli Cristina pela disposição em me atender quando necessário.

Aos amigos alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP – UNICAMP, Adriana, Marcelo, Mayra, Alexandre, Lisa, Eduardo, Fábio, Tiago, Daniel, Marco Antônio, Maria Isabela, Nádia, Juliana, Gláucia e Isabel pela amizade e alegrias no laboratório.

Ao casal Cristiane Borges e Daniel Saito, pela convivência agradável e companhia nos créditos cursados no CENA.

A querida Regina, hoje atuando em outro Departamento, pela valiosa participação em meus primeiros passos no laboratório.

A Cristiane Salmon por me apoiar com tanto carinho em minha qualificação.

A Margareth, minha companheira de consultório, pela paciência e dedicação.

A querida Ana, sempre cuidando de mim como sua “finha”, pela disposição.

As minhas amigas, Vera e Maria Aparecida (Dinha), pelos momentos de descontração que passamos juntas.

A Raquel, Érica e Tatiane, secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, sempre prontas a nos prestar esclarecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq que permitiu a execução desta pesquisa, pela concessão da bolsa de formação de pesquisador - processo de mestrado nº 134177/2005-3.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

EPÍGRAFE

*"O conhecimento não representa necessariamente sabedoria,
mas com certeza a ignorância nunca é uma opção razoável".
Marcelo Gleiser.*

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. PROPOSIÇÃO.....	6
3. ARTIGO.....	7
4. CONCLUSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXO 01 - Certificado do Comitê de Ética.....	29
ANEXO 02 - Carta de submissão.....	30

RESUMO

Células bucais são fontes convenientes de DNA para diagnóstico e estudos epidemiológicos. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um método simples e prático para obter células epiteliais, através de bochechos, a fim de serem usadas como fonte de DNA, avaliar a estabilidade do DNA na solução de bochecho no decorrer do tempo e analisar a eficácia deste método na amplificação por PCR de fragmentos de diferentes comprimentos. Os procedimentos usados neste estudo evitam o uso de solventes orgânicos permitindo uma prática laboratorial mais segura. Isto é alcançado pela remoção das proteínas celulares por desidratação e precipitação com uma solução de acetato de amônio 8 M. Bochechos com 5 mL de dextrose 3% foram coletados de 65 indivíduos. Adicionados a cada amostra 3 mL de solução TNE [17 mM Tris-HCL (pH 8,0), 50 mM NaCl, 7 mM EDTA] diluído em etanol 66%. O conteúdo das amostras de bochechos de 20 indivíduos foi dividido em 4 tubos. Um tubo foi usado para extração imediata (igualmente às demais 45 amostras) e os três tubos restantes foram mantidos em temperatura ambiente por períodos de 2, 15 e 30 dias, seguidos pela extração do DNA. As células bucais foram centrifugadas e ressuspensas em solução contendo 10 mM Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, 5 mM EDTA e proteinase K (20 mg/mL). Após incubação a 55°C durante toda a noite as proteínas foram removidas pela adição de acetato de amônio 8 M seguida por centrifugação. O DNA foi precipitado com isopropanol e ressuspendido em 10 mM Tris (pH 7.8) e 1 mM EDTA. Foram realizadas reações de PCR com primers específicos para fragmentos dos seguintes genes: PAX9 (202 pb); KLK (555 pb); MMP20 (1434 pb). Nossas análises fornecem evidências consistentes de que o produto de DNA extraído por esta metodologia é suficiente para diversas amplificações por PCR. Fragmentos grandes de DNA (1434 pb) puderam ser obtidos com sucesso. Além disso, com a adição de TNE/Etanol o DNA é eficientemente preservado na solução de bochecho, a qual pode ser estocada em temperatura ambiente por até trinta dias, o que possibilita a coleta em campo e contribui para o aumento da amostragem. Este protocolo permite a extração de maneira rápida, simples, econômica e garante o processamento de várias amostras ao mesmo tempo.

ABSTRACT

Buccal cells provide a convenient source of DNA for diagnosis and epidemiological studies. The goal of this study was to develop a convenient method to obtain buccal cells from mouthwash samples to be used as a source of DNA, and to evaluate the stability of the DNA in the mouthwash solution over time. Finally, we analysed if the methodology could be used for PCR amplification of high molecular mass fragments. The procedures used in this paper avoid the use of any organic solvent. This is achieved by salting out the cellular proteins by dehydration and precipitation with a 8 M ammonium acetate solution. A group of 65 consenting subjects undertook a mouthwash containing 5mL of 3% dextrose solution. Three mL of TNE solution [17 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl and 7 mM EDTA] diluted in 66% ethanol, was added to the tube. The mouthwash solution of 20 individuals was divided into 4 tubes. One tube was used for immediate extraction (equally to the others 45 samples) and the three remaining were kept at room temperature for periods of 2, 15 and 30 days, followed by DNA isolation. Buccal cells were pelleted and resuspended in a solution containing 10 mM Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, 5 mM EDTA, and proteinase K (20 mg/mL). After overnight incubation at 55°C proteins were removed by adding 8 M ammonium acetate followed by centrifugation. DNA was precipitated with isopropanol and resuspended in 10 mM Tris (pH 7.8) and 1 mM EDTA. PCR amplifications were performed. Three pairs of primers were used: PAX9 (202 pb); KLK (555 pb); MMP20 (1434 pb). Our analyses provided consistent evidences that DNA yield extracted by this methodology is sufficient for several PCR amplifications. Large size products (1434 bp) could be successfully obtained. Additionally, dilution of the mouthwashes in TNE/ethanol prevented DNA degradation at room temperature for periods of up to 30 days, allowing safe storage and transport of field specimens collected in isolated communities, distant from the laboratory. On conclusion, the protocol described here is quick, simple to perform, sensitive, economical and several samples can be processed at the same time.

1. INTRODUÇÃO

O seqüenciamento do genoma humano aliado ao custo relativamente baixo da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia pela Polimerase) tornou a análise de DNA um procedimento comum em medicina clínica e ciências básicas.

Nos últimos anos milhares de publicações científicas abordam estudos moleculares de antropologia, epidemiologia e associações de mutações/polimorfismos com doenças humanas, requerendo uma eficiente extração de DNA. Devido a grande importância desses estudos acredita-se que muitos outros trabalhos nessa linha de pesquisa serão desenvolvidos em um futuro próximo. Tendo isso em vista, o procedimento de obtenção do DNA cada vez mais ganha relevância científica.

A coleta de amostras para a extração de DNA é um procedimento crítico, uma vez que exige tempo e envolve aspectos éticos. A busca por protocolos alternativos visa otimizar as condições de trabalho dos pesquisadores, de modo que os mesmos possam optar por reagentes que estejam mais disponíveis, de baixo custo e que ofereçam menos riscos à saúde, bem como menor dano ao meio ambiente quando descartados.

A análise do DNA é usualmente feita pela amplificação por PCR de vários marcadores ou haplótipos. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA, usando uma fita como molde para síntese de novas cadeias complementares, desse modo requer quantidades pequenas de DNA. Entretanto, com a rapidez no avanço das descobertas de novas seqüências gênicas, os estudos moleculares tornam-se cada vez mais completos, incluindo inúmeras análises por PCR e assim necessitando de suficiente quantidade de DNA. Portanto, faz-se importante que o procedimento de extração produza uma grande quantidade de DNA, visto que a coleta das amostras nem sempre pode ser facilmente repetidas.

Distintas amostras biológicas são utilizadas como fontes de DNA dentre elas urina, sêmen, bulbos capilares, sangue e saliva. Na maioria dos casos a fonte de eleição é o sangue periférico, pela qualidade e quantidade de DNA obtido. Entretanto, o

número de amostras necessário para uma pesquisa científica ter credibilidade tem sido cada vez maior, o que torna o procedimento de coleta de sangue difícil de ser realizado e oneroso.

Além disso, a coleta de sangue pode ser problemática em situações de doenças extremas, idosos, crianças, bebês e pessoas relutantes em se submeter a este procedimento invasivo. Por esta razão o desenvolvimento de protocolos alternativos para obtenção de DNA é de grande importância.

A obtenção de células através de bochechos é um método não invasivo e prático de coleta de DNA. Além disso, parece fornecer um produto com quantidade superior a muitos outros métodos (Cozier *et al*, 2003). Adicionalmente, o resultado diagnóstico obtido com DNA de células bucais é compatível com os de células sanguínea (de Vries *et al*, 1996), convalidando a eficiência da extração a partir da saliva.

Diversas abordagens têm sido desenvolvidas para purificar DNA a partir de bochechos. As mais freqüentemente usadas são: (1) Método de Lise por fervura, (2) Método fenol-clorofórmio, (3) Kits disponíveis no mercado, não tóxicos e simples de usar (Feigelson *et al*, 2000; Heath *et al*, 2001; Garcia-Closas *et al*, 2001; London *et al*, 2001; King *et al*, 2002; Saftlas *et al*, 2004; Mulot *et al*, 2005).

As duas primeiras abordagens trazem grandes desvantagens e começam a cair em desuso. O Método de Lise por fervura produz DNA de baixa qualidade (Holding *et al*, 1993; Merryweather-Clark *et al*, 1997), tornando essa metodologia ineficaz. Por outro lado o Método fenol-clorofórmio, apesar de produzir DNA de qualidade, é laborioso e faz uso de reagentes tóxicos (Trevilatto and Line, 2000; Hayney *et al*, 1995; Lawton *et al*, 1992), o que torna o método inconveniente.

Embora o uso de Kits de extração seja prático, seu custo elevado representa uma desvantagem significativa. Sabe-se que os principais Kits comercialmente disponíveis são produzidos sobretudo em países industrializados, podendo não estarem prontamente disponíveis e acessíveis em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, seja por seu elevado custo ou tramites de transportes.

Os diagnósticos e levantamentos epidemiológicos baseados na análise de DNA são fatores chaves no planejamento e estabelecimento de tratamentos de patologias e

programas preventivos de doenças comunitárias. A grande importância do desenvolvimento de pesquisas utilizando análise de DNA, inclusive em países não produtores dos referidos Kits, torna substancial a elaboração de metodologias alternativas visando tornar a extração de DNA mais simples, econômica e acessível.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs a desenvolver uma metodologia rápida, simples e econômica para extração de DNA a partir da saliva, usando Acetato de amônio, uma solução de baixa toxicidade. Propôs-se também avaliar a eficiência desta metodologia ser aplicada não só para extrações imediatamente após a coleta das amostras, mas também para amostras armazenadas em temperatura ambiente por até 30 dias, além de avaliar sua eficácia na amplificação de fragmentos de diferentes comprimentos.

3. ARTIGO

Esta tese está baseada na resolução CCPG/001/98/UNICAMP que regulamenta o formato alternativo para teses de Mestrado e Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo saliva e seres humanos, este estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), em 15/08/2005 (protocolo nº 068/2005) (ANEXO1). Desta forma, esta tese será composta do seguinte artigo:

Capítulo 1: “ A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells ”. Artigo submetido à revista *Clinical Biochemistry*. (Carta de envio ANEXO 2).

A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells

Marisi Aidar^a, Sergio R. P. Line^{a*}

^aDepartment of Morphology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Cx. Postal 52, 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil.

*** Author for correspondence:**

Sérgio Roberto Peres Line

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Avenida Limeira, 901, Areião

CEP: 13.414-903

Caixa Postal: 52

Piracicaba – SP, Brasil

Phone: +55-19-3412-5333

Email:serglin@fop.unicamp.br

Abstract

Objectives: To develop a convenient method to obtain buccal cells from mouthwash samples to be used as a source of DNA, and to evaluate the stability of the DNA in mouthwash solution over time.

Design and methods: The subjects rinsed their mouth with a 3% dextrose solution. A solution containing Tris/HCl (pH 8.0), NaCl and EDTA (TNE) diluted in 66% ethanol was added to the mouthwash. Buccal cells were pelleted and resuspended in a solution containing 10 mM Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, 5 mM EDTA, and proteinase K (20 mg/mL). After overnight incubation at 55°C proteins were removed by adding 8 M ammonium acetate followed by centrifugation. DNA was precipitated with isopropanol and resuspended in 10 mM Tris (pH 7.8) and 1 mM EDTA. The integrity of DNA was tested by polymerase chain reactions (PCR).

Results: The total DNA yield ranged from 5 to 93 µg (median 15 µg, mean 20.71 µg). DNA can be extracted and amplified by PCR after storage of mouthwash solution at room temperature for periods of up to 30 days.

Conclusions: The protocol described here is quick, simple to perform, sensitive and economical. Several samples could be processed at the same time, and the DNA yield obtained by this methodology was sufficient for many rounds of PCR.

Keywords: Buccal cells, DNA extraction, Ammonium Acetate.

Introduction

The sequencing of the human genome allied with the relatively low costs of DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) have made the analysis of DNA a common procedure in clinical medicine and basic sciences. In the past few years thousands of scientific papers have been published on molecular epidemiology/anthropology studies and on the association of mutation/polymorphisms with human diseases. Many more will certainly be published in a near future.

The collection of samples for DNA extraction is a critical procedure as it is time-consuming and may involve ethical aspects. It is, therefore, desirable that this procedure becomes more simple and inexpensive. The analysis of DNA is usually made by PCR amplification of several markers or haplotypes. It is also desirable that the procedure yields fairly large amounts of DNA, as sampling can not always be easily repeated. In most cases the preferred source of material is peripheral blood. Blood sampling, however, may be problematic in cases such as extreme illness or elderly people, babies and people that are unwilling to be submitted to this invasive procedure. For this reason several protocols have been developed to obtain DNA from buccal cells. Also, collection of buccal cells by mouthwash seems to give higher yields than many other methods [1]. The diagnostic results obtained with DNA from buccal cells are compatible with whole blood [2]. Several approaches have been developed to isolate DNA from mouthwashes. The more frequently used are: (1) boiling lysis method, yielding poor-quality DNA [3,4] (2) phenol-chloroform, which is laborious and uses toxic reagents [5-7] (3) commercially available kits, which are non-toxic and simple to use [8-14]. Although the use of kits is more straightforward they may be quite expensive. Commercially available DNA isolation kits are mainly produced in industrialized countries, and may not be readily available at affordable prices in developing and underdeveloped countries, where diagnosis and epidemiological surveys based on DNA analysis may be a key factor in planning and establishing disease treatment and community disease-prevention programs.

In this study we describe a simple and inexpensive protocol to obtain high-quality genomic DNA from buccal cells using a single mouthwash. DNA yield obtained by this methodology is sufficient for many rounds of PCR amplifications.

Materials and Methods

Sampling

At least 1 hour after tooth brushing, the consenting subjects of this experiment were asked to vigorously rinse their mouths with a 5mL solution of dextrose (3%) for 60 seconds. The individuals were oriented to rub their tongue on the oral mucosa and teeth. Each individual's mouthwash was collected in a 15 mL centrifuge tube. Three mL of TNE solution [17 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl and 7 mM EDTA] diluted in 66% ethanol, was added to the tube. In order to assess the DNA integrity over time, the mouthwash solution was divided into 4 tubes. One tube was used for immediate extraction and the three remaining were kept at room temperature for periods of 2, 15 and 30 days, respectively (Figure 1) followed by DNA isolation. Ethical approval for the study was granted by the Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP's Ethical Committee for Human Research.

DNA Purification

The tubes containing the epithelial cells were centrifuged for 10 min at 3000 rpm at room temperature to pellet the buccal cells and debris. The supernatant was poured off immediately to avoid pellet slippage. For the second washing, 1 mL of TNE was added to resuspend the cells. The tubes were centrifuged at 2000 rpm for 5 min, and the supernatant was poured off. The cell pellet was vortexed vigorously for 5 seconds and a volume of 1.3 mL of lysis solution [10 mM Tris (pH 8,0), 0.5% SDS, 5 mM EDTA] and 10 µl of proteinase K (20 mg/mL) was added. The mixture was vortexed for 5 seconds at medium speed, followed by an overnight incubation at 55°C. After incubation, 1.4 mL of the mixture was transferred to a 2 mL micro centrifuge tube. Proteins and other

contaminants were removed by adding 500 µl of a solution containing 8 M ammonium acetate and 1 mM EDTA, followed by overtaxing at high speed for 5 seconds, and centrifuging at 17000 g for 10 min. Nine hundred µl of supernatant was poured carefully into two clean 1.75 mL micro centrifuge tubes containing 540 µl of isopropanol (2-propanol). The solutions were mixed by inverting the tube gently 20 times and centrifuged at 17000 g for 5 min. The supernatant was poured off, and each tube was inverted and left to drain briefly on clean, absorbent paper. A volume of 2 mL of 70% ethanol was added, and each tube was inverted several times to wash the DNA pellet. After centrifugation at 17000 g for 5 min the ethanol was poured off carefully. Each tube was inverted and drained on clean, absorbent paper, then allowed to air dry during 45 to 60 min. The DNA was resuspended in 100 µl of TE buffer [10 mM Tris (pH 7.8) and 1 mM EDTA].

Concentration measurements

The amount and purity of the DNA was determined by spectrophotometry. The DNA concentration was obtained by readings at 260 nm. The ratio of readings at 260nm/280nm was used to estimate the DNA purity.

Polymerase chain reaction (PCR)

Amplification reactions were performed with 500 ng DNA in a volume of 50 µl in reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCL, 4 mM MgCl₂, deoxyribonucleotides (200 µM each), 1 µM each primers, 2U *Taq* DNA polymerase. Three pairs of primers were used as shown in Table 1.

The samples were heated initially to 95°C for 5 min, each cycle comprising denaturation at 95°C for 50 seconds. Primer annealing was performed at the specific temperature for each set of primers (Table 1) for 1 min and polymerization at 72°C for 2

min. The samples were subjected to 35 cycles of amplification followed by a final extension of 72°C for 7 min. Amplification was carried out in a *Perkin-Elmer GeneAmp 2400 thermal cycler*.

Amplification products were visualized by electrophoresis on vertical 5% (KLK and MMP20) and 10% (PAX9) polyacrylamide gels in 1 X TBE (89 mM Tris-Borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), followed by silver staining [15]. Electrophoretic analysis of the extracted DNA showed detectable levels of high molecular weight of genomic DNA in all samples.

Results

The total DNA yield as measured by spectrophotometry, ranged from 5 to 93 μg [median 15 μg , mean 20.71 μg (Figure 2)] and was compatible with results obtained in other studies using commercially available kits [16,10,17]. The mean OD 260/280 ratio was 1.84 (range = 1.16-2.23), indicating that in most cases the bulk of proteins was removed by ammonium acetate precipitation. Figure 3 illustrates typical PCR products from DNA obtained from mouthwashes processed immediately after collection and also from mouthwashes stored at room temperature for periods of 2, 15 and 30 days. Large size products (1434 bp) can be successfully obtained by PCR amplification of DNA purified from mouthwashes stored for 30 days.

Discussion

Buccal cells are an excellent source of DNA for diagnosis and large-scale molecular epidemiological studies. Several protocols have been developed to obtain DNA from buccal cells, but cell collection by mouthwash seems to give higher yields than many other methods [1]. We noted that the rubbing of the tongue on the teeth and oral mucosa permitted a great increase in the amount of epithelial buccal cells collected. This procedure, however, increases the viscosity of the mouthwash solution, making it difficult, in some cases, to pellet the cells. This probably occurs due to high concentrations of salivary mucins in the mouthwash, which can hinder the collection of buccal cells after centrifugation. We have found that the addition of TNE reduces significantly the viscosity of the mouthwash. In fact, salivary viscosity is believed to occur due to the entanglement of long, high molecular weight oligomeric mucins [18]. The interaction of mucins seems to be mediated by calcium ions, and the removal of these ions by chelating agents can drastically reduce salivary viscosity [18]. Therefore, the reduction of the viscosity of mouthwash after the addition of TNE-ethanol mixture can be imparted not only by the dilution of salivary mucins but also by the decrease of the interactions between mucins caused by the chelating action of EDTA. Additionally, EDTA also helps to preserve the integrity of DNA [19] since most enzymes that participate in the degradation of nucleic acids require divalent ion cofactors, usually magnesium, to promote activity [20]. Due to these properties EDTA was added to all the solutions used for DNA purification in our protocol. The addition of ethanol in the mouthwash had two main purposes. It helped prevent bacterial growth during long-term room temperature storage and it also prevented mouthwash freezing when stored at low temperatures (0 to -20°C). This procedure may prevent damage in the long strands of chromosomal DNA when the samples are frozen and thawed repeatedly. We have successfully extracted DNA for PCR analysis from mouthwashes stored at -20°C for periods of up to 2 years (not shown).

The procedures used in the method described in this paper avoid the use of organic solvents. This was achieved by salting out the cellular proteins with 8 M ammonium acetate solution. Ammonium acetate precipitation of proteins has been used for DNA purification of seeds [21,22], bacteria, protozoarium, and white blood cells [23], buccal swabs [24] and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections [25]. This reagent has also been used in commercially available Kits [8-13].

In summary, the method described here is cheap and simple to be performed. Several samples can be processed at the same time, and the DNA extracted by this methodology yields sufficient DNA for many rounds of genotype analyses. Additionally, incubation of mouthwashes in TNE/ethanol prevents DNA degradation allowing safe storage and transport of field specimens collected in isolated communities, distant from the laboratory. DNA can be extracted and PCR amplified after storage in mouthwash solution at room temperature for periods of up to 30 days.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq-Brazil.

References

- [1] Cozier YC, Palmer JR, Rosenberg L. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the Black Women's Health Study. *Ann Epidemiol* 2004;2:117-22.
- [2] de Vries HG, Collee JM, van Veldhuizen MH, Achterhof L, Smit Sibinga CT, et al. Validation of the determination of deltaF508 mutations of the cystic fibrosis gene in over 11 000 mouthwashes. *Hum Genet* 1996;3:334-6.
- [3] Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M, Mathew C. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1993;11:903-9.
- [4] Merryweather-Clarke AT, Liu YT, Shearman JD, Pointon JJ, Robson KJ. A rapid non-invasive method for the detection of the haemochromatosis C282Y mutation. *Br J Haematol* 1997;2:460-3.
- [5] Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;1:6-9.
- [6] Hayney MS, Dimanlig P, Lipsky JJ, Poland GA. Utility of a "swish and spit" technique for the collection of buccal cells for TAP haplotype determination. *Mayo Clin Proc* 1995;10:951-4.
- [7] Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* 1992;6:265-9.
- [8] Feigelson HS, Rodriguez C, Robertson AS, Jacobs EJ, Calle EE, et al. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;9:1005-8.
- [9] Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, et al. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Arch Pathol Lab Med* 2001;1:127-33.
- [10] Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;6:687-96.

- [11] London SJ, Xia J, Lehman TA, Yang JH, Granada E, et al. Collection of buccal cell DNA in seventh-grade children using water and a toothbrush. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;11:1227-30.
- [12] King IB, Satia-Abouta J, Thornquist MD, Bigler J, Patterson RE, et al. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;10 Pt 1:1130-3.
- [13] Saftlas AF, Waldschmidt M, Logsdon-Sackett N, Triche E, Field E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. *Am J Epidemiol* 2004;1:77-84.
- [14] Mulot C, Stucker I, Clavel J, Beaune P, Lorient MA. Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *J Biomed Biotechnol* 2005;3:291-6.
- [15] Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;5:914-21.
- [16] Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;8:719-24.
- [17] Le Marchand L, Lum-Jones A, Saltzman B, Visaya V, Nomura AM, et al. Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;6:701-3.
- [18] Raynal BD, Hardingham TE, Sheehan JK, Thornton DJ. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus. *J Biol Chem* 2003;31:28703-10.
- [19] Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 1993;7-8:321-8.
- [20] Cowan JA. Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. *Chem Rev* 1998;3:1067-1088.

- [21] Benito C, Figueiras AM, Zaragoza C, Gallego FJ, de la Pena A. Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. *Plant Mol Biol* 1993;1:181-3.
- [22] Krishna TG, Jawali N. DNA isolation from single or half seeds suitable for random amplified polymorphic DNA analyses. *Anal Biochem* 1997;1:125-7.
- [23] Ikuta N, Kimura EA, Taque J, Lunge VR, Da Silva LP, et al. Non-phenolic method of DNA purification from bacteria, blood samples and other biological sources for restriction enzyme assays and the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;4:589-91.
- [24] Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JF, Kanetsky PA, et al. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environ Health Perspect* 1999;7:517-20.
- [25] Neves AC, Rivero ERC, Silva -Valenzuela MG et al. Método de extração de DNA de material de arquivo pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. *Pesqui Odontol Brás* 2002; 16 (supl): 210.

FIGURES

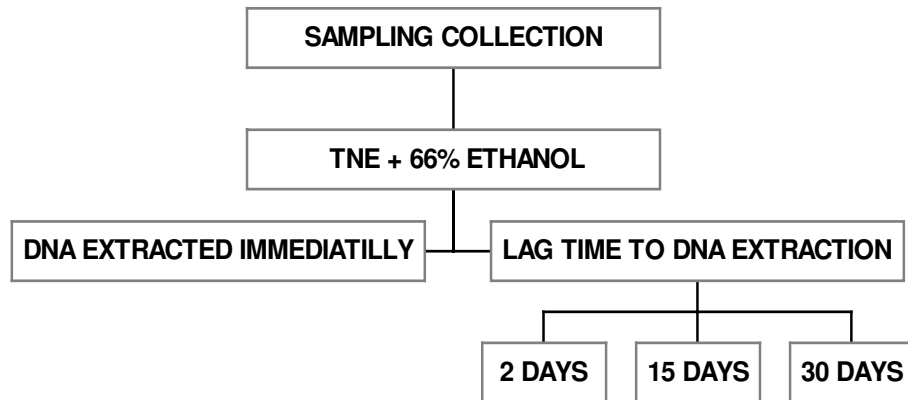


Figure 1: Scheme showing the sampling and storage of the mouthwashes.

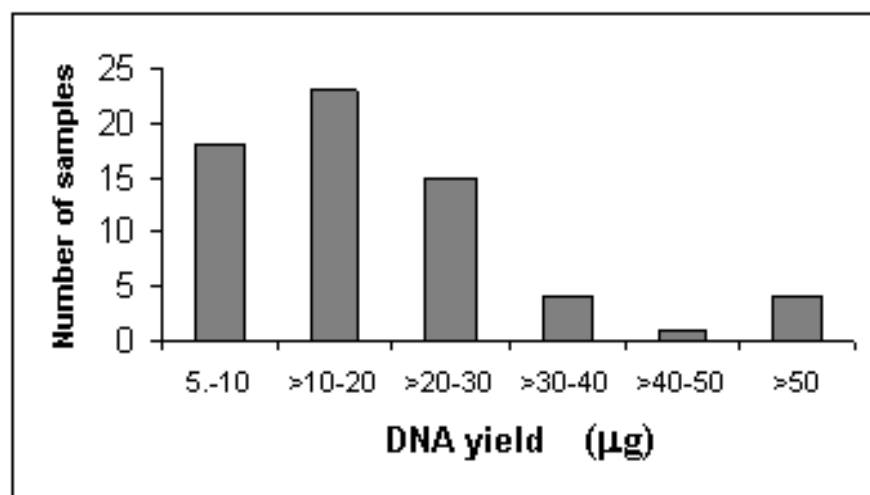


Figure 2: Distribution of DNA yield (µg) obtained from mouthwashes

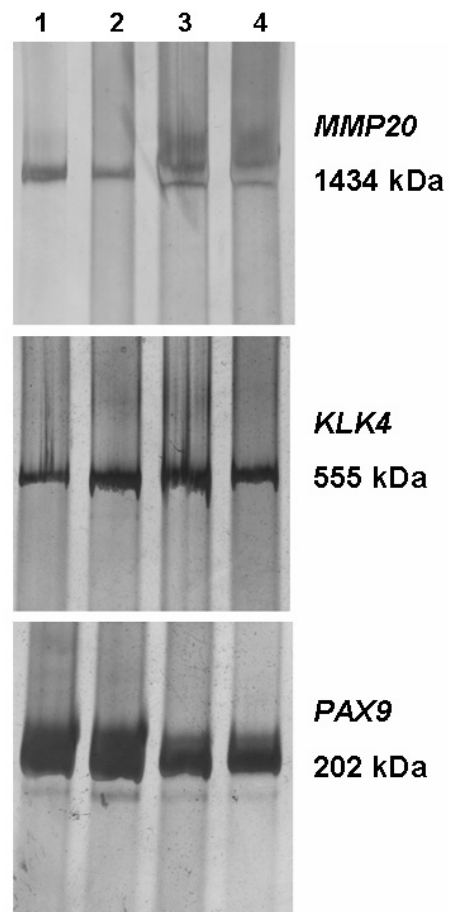


Figure 3: Polyacrylamide gel electrophoresis showing PCR products from total genomic DNA obtained from mouthwashes. 1. DNA extracted immediately after mouthwash. 2. DNA extracted 2 days after mouthwash. 3. DNA extracted 15 days after mouthwash. 4. DNA extracted 30 days after mouthwash.

Table 1. Primers used for PCR. F=forward, R=reverse

<i>Gene Target</i>	<i>Primer (5'-3')</i>	<i>Annealing temperature</i>	<i>Product size (bp)</i>
<i>MMP-20</i>	F:GTAAATCAATCATTGATCTTG R:AAATAAAGATAGATAGTAAAAAGG	56°C	1434
<i>KLK-4</i>	F:TGCCACAAAAGTACCTGCC R:CCTCTTCAAGGAGGTCCTCT	58°C	555
<i>PAX-9</i>	F:AGCCTGAATCCTGTGTGCAC R:CTAATCTAAAGTGTACCGTATGC	54°C	202

4. CONCLUSÃO

No presente estudo desenvolveu-se um protocolo simples, rápido, eficiente e econômico para obtenção de DNA com alta qualidade a partir de células epiteliais bucais, agilizando assim os procedimentos laboratoriais.

Além disso, o DNA é eficientemente preservado na solução de bochecho, a qual pode ser estocada em temperatura ambiente por até 30 dias, o que possibilita a coleta em campo e contribui para o aumento da amostragem.

O sucesso na amplificação de uma extensa região (1434 pares de bases) a partir dos DNAs genômicos extraídos por essa metodologia proporcionou base suficiente para que a técnica utilizada possa ser empregada na amplificação de fragmentos de diferentes comprimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benito C, Figueiras AM, Zaragoza C, Gallego FJ, de la Pena A. Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. *Plant Mol Biol* 1993;21(1):181-3.

Cowan JA. Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. *Chem Rev* 1998;98(3):1067-1088.

Cozier YC, Palmer JR, Rosenberg L. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the Black Women's Health Study. *Ann Epidemiol* 2004;14(2):117-22.

de Vries HG, Collee JM, van Veldhuizen MH, et al. Validation of the determination of deltaF508 mutations of the cystic fibrosis gene in over 11 000 mouthwashes. *Hum Genet* 1996;97(3):334-6.

Eça, L.P *et al.* Biología Molecular-Guia Prático e Didático. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2004. 260p.

Feigelson HS, Rodriguez C, Robertson AS, et al. Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(9):1005-8.

Farah, S. B. DNA: segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.

Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from buccal swabs recruited by mail: evaluation of storage effects on long-term stability and suitability for multiplex polymerase chain reaction genotyping. *Behav Genet* 2003;33(1):67-72.

Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, et al. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(6):687-96.

Glaser JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995;18(1):62-3.

Hayney MS, Dimanlig P, Lipsky JJ, Poland GA. Utility of a "swish and spit" technique for the collection of buccal cells for TAP haplotype determination. *Mayo Clin Proc* 1995;70(10):951-4.

Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, Strom DA. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125(1):127-33.

Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M, Mathew C. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1993;30(11):903-9.

Ikuta N, Kimura EA, Taque J, et al. Non-phenolic method of DNA purification from bacteria, blood samples and other biological sources for restriction enzyme assays and the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(4):589-91.

King IB, Satia-Abouta J, Thornquist MD, et al. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10 Pt 1):1130-3.

Krishna TG, Jawali N. DNA isolation from single or half seeds suitable for random amplified polymorphic DNA analyses. *Anal Biochem* 1997;250(1):125-7.

Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 1993;31(7-8):321-8.

Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* 1992;21(6):265-9.

Le Marchand L, Lum-Jones A, Saltzman B, Visaya V, Nomura AM, Kolonel LN. Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(6):701-3.

London SJ, Xia J, Lehman TA, et al. Collection of buccal cell DNA in seventh-grade children using water and a toothbrush. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(11):1227-30.

Lum A, Le Marchand L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(8):719-24.

Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques* 1995;19(2):208-10.

Merryweather-Clarke AT, Liu YT, Shearman JD, Pointon JJ, Robson KJ. A rapid non-invasive method for the detection of the haemochromatosis C282Y mutation. *Br J Haematol* 1997;99(2):460-3.

Meulenbelt I, Droog S, Trommelen GJ, Boomsma DI, Slagboom PE. High-yield noninvasive human genomic DNA isolation method for genetic studies in geographically dispersed families and populations. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1252-4.

Mulot C, Stucker I, Clavel J, Beaune P, Lorient MA. Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card. *J Biomed Biotechnol* 2005;2005(3):291-6.

Neves AC, Rivero ERC, Silva -Valenzuela MG et al. Método de extração de DNA de material de arquivo pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. *Pesqui Odontol Brás* 2002; 16 (supl): 210.

Nussbaum, R.L.;McInnes,R.R.;Willard,H.F. Thompson & Thompson Genética Médica.6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2002. 387p.

Pereira, L.V. Seqüenciaram o Genoma Humano...e agora?.São Paulo: Moderna, 2001. 111p.

Raynal BD, Hardingham TE, Sheehan JK, Thornton DJ. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus. *J Biol Chem* 2003;278(31):28703-10.

Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, et al. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 1993;2(2):159-63.

Saftlas AF, Waldschmidt M, Logsdon-Sackett N, Triche E, Field E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. *Am J Epidemiol* 2004;160(1):77-84.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994;17(5):914-21.

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18(1):6-9.

Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JF, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reaction-based biomarker assays. *Environ Health Perspect* 1999;107(7):517-20.

Watson, J.D; Berry,A. DNA: o segredo da vida. São Paulo: Companhia das Letras, 2005. 470p.

Anexo 1

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Extração do DNA genômico a partir de células epiteliais bucais utilizando acetato de amônio", protocolo nº 068/2005, dos pesquisadores SERGIO ROBERTO PERES LIME e MARISE AIDAR, sob as orientações do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/08/2005.</p>		
<p>The Research Ethics Committee of the School of Dentistry at Piracicaba – State University of Campinas, certify that project "DNA purification from buccal epithelial cells by ammonium acetate method", register number 068/2005, of SERGIO ROBERTO PERES LIME and MARISE AIDAR, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 15/08/2005.</p>		
 Cintia Pereira Machado Tabchouy Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p><small>Não. O título do projeto não aparece como título de projeto, sem qualquer edição.</small> <small>Notas: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		

Anexo 2

----- Original Message -----

From: "CLB (ELS)" <clbi@elsevier.com>

To: <serglin@fop.unicamp.br>

Sent: Thursday, December 15, 2005 12:04 PM

Subject: Clinical Biochemistry Submission Confirmation

Title: A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells

Corresponding Author: Sergio Roberto Peres Line

Authors: Marisi Aidar; Sergio Roberto Peres Line

Dear Sergio Roberto Peres Line,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Clinical Biochemistry.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Clinical Biochemistry as an author:

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Clinical Biochemistry. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Rowena Prasad

Journal Manager

Clinical Biochemistry

Phone: (619) 699-6746

E-mail: clbi@elsevier.com