DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.013

3种保存血样方法对猪总 DNA制备的影响*

刘中禄** 王 勇 朱富旭 吴丰春 魏 泓 (第三军医大学实验动物中心教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 探索不同保存血样方法对猪全血中总 DNA制备的影响。方法: 采取全血 4℃保存 (方法Ⅰ)、沉淀白细胞加消化液室温保存 (方法Ⅱ)和全血加 SDS-EDTANa2缓冲液室温保存 (方法Ⅲ)等 3种方法保存血样,用常规方法制备总 DNA并对其效果进行评价。结果: 方法Ⅰ、Ⅱ均能得到较纯净、完整的 DNA,方法Ⅲ得率高、简便,但 DNA有一定降解。结论: 因方法Ⅱ勿需低温冷藏,可作为野外远距离采血的首选方法。

关键词 血样保存;猪全血;总 DNA制备
中图法分类号 R446.11

野外远距离采血制备总 DNA,如果血样保存不当,必然严重影响 DNA的质量。为解决野外远距采血血样保存问题,根据课题实际,本研究采取 3种方法保存血样,常规方法制备总 DNA,分别以总 DNA的得率、纯度、完整性以及基因组 DNA的 RAPD和 mtDNA的 D-loop PCR为指标,对其效果进行评价,以达到优选适合野外远距离采血血样保存方法的目的。

1 材料和方法

1.1 样品来源

来自同一头杂交长白猪 (由第三军医大学实验动物中心提供)的前腔静脉血 200 ml, ACD抗凝。

1.2 血样的保存

1.2.1 全血 4℃保存 (方法Ⅰ) 分别取 10 ml抗凝血于 4支 50 ml离心管中,置 4℃存。

1.2.2 沉淀白细胞加消化液室温保存 (方法Ⅱ) 分别取 10 ml抗凝血于 4支 50 ml离心管中,加入等体积 2× ST(0.64 mol/L蔗糖、0.02 mol/L Tris-HCl pH7.6、0.01 mol/L $MgCL_2$、2% TritonX-100),充分振荡混匀,冰浴 15 min,破碎红细胞,加 10 ml 1× ST洗 1~2次。每管加入消化液: STE(10 mmol/L Tris-HCl pH8.0、25 mmol/L $EDTANa_2$、100 mmol/L NaCl) 5 ml和 SDS、蛋白酶 K(终浓度分别为 1%和 0.1 mg/ml),充分振荡,室温保存。

1.2.3 全血加 SDS-$EDTANa_2$缓冲液室温保存 (方法Ⅲ) 分别取 10 ml抗凝血于 4支 50 ml离心管中,加入等体积的 SDS-$EDTANa_2$缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH8.0、100 mmol/L $EDTANa_2$、2% SDS)和蛋白酶 K(终浓度为 0.1 mg/ml),充分振荡混匀,室温保存。

1.3 总 DNA的制备

3组样品分别在 0 d和 8 d各取 2管,于 37℃消化过夜,其中方法Ⅰ须先沉淀白细胞和加消化液 (同方法Ⅱ)。按常规酚、氯仿、异戊醇抽提,乙醇沉淀 DNA, 12 000× g离心, TE溶解。

1.4 总 DNA质量评估

应用 752型紫外光栅分光光度计测定其得率和纯度, 1%琼脂糖凝胶电泳和 RAPD检查基因组 DNA的完整性,以 mtDNA D-loop PCR检查 mtDNA的存在。

2 结果

2.1 DNA得率和纯度

3种血样保存方法制备的总 DNA纯度 (D_{260}/D_{280})在 1.4~1.7之间。各组得率比较,方法Ⅰ与方法Ⅱ无差别,方法Ⅲ在 0 d和 8 d均显著高于方法Ⅰ、Ⅱ。

2.2 总 DNA琼脂糖凝胶电泳结果,见图 1

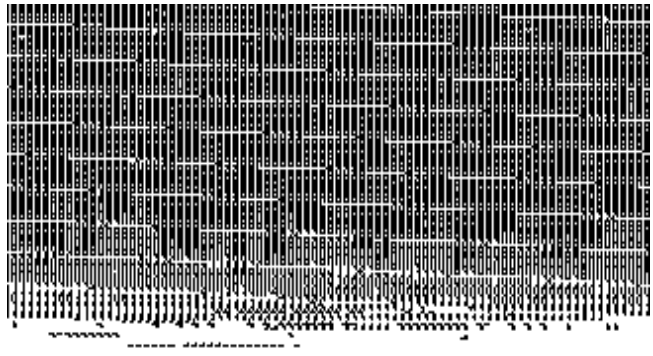


图 1 1%琼脂糖凝胶检测总 DNA的电泳结果
Fig 1 Total DNA of detection by agarose gel electrophoresis
1, 8: method Ⅲ 0 d; 2, 3: method Ⅱ 8 d; 4: method Ⅱ 0 d; 5, 6: method Ⅰ 8 d; 7: method Ⅰ 0 d; 9, 10: mehtod Ⅲ 4℃ 8 d; 11~14: method Ⅲ 8 d

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39770398 国家"九五"重点科技攻关项目, 96-A23-06-01
** 刘中禄,男,32岁,讲师,硕士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方法Ⅰ、Ⅱ 0 d和 8 d以及方法Ⅲ的 0 d制备的总 DNA谱带清晰一致, DNA较完整,而方法Ⅲ 8 d,出现拖尾现象。

2.3 mtDNA D-loop PCR结果,见图 2

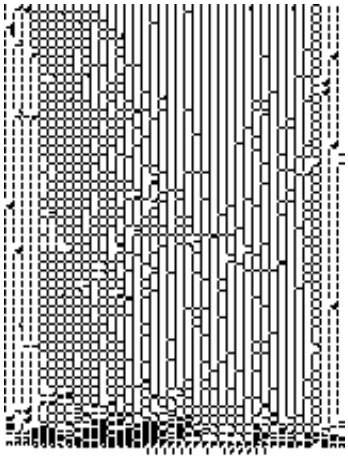


图 2 猪 mtDNA D-loop的扩增

Fig 2 Amplification of the porcine mtDNA D-loop

1: method Ⅰ 0 d; 2 method Ⅰ 8 d; 3 method Ⅱ 0 d; 4: method Ⅱ 8 d; 5 method Ⅲ 0 d; 6 method Ⅲ 8 d

3种方法在 0 d和 8 d所制备的总 DNA,均能得到 mtDNA D-loop区域的清晰的扩增带。

2.4 基因组 DNA RAPD分析结果,见图 3

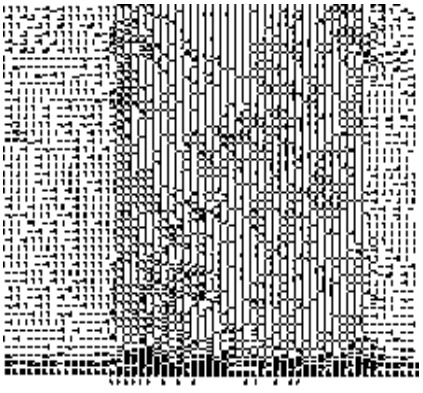


图 3 猪总 DNA的 RAPD分析

Fig 3 Analysis of porcine total DNA by RAPD

1: method Ⅰ 0 d; 2 method Ⅰ 8 d; 3 method Ⅱ 0 d; 4: method: Ⅱ 8 d; 5: method Ⅲ 0 d; 6 method Ⅲ 8 d

3种方法在各天所制备的总 DNA,进行 RAPD分析,均得到一致的谱带。

3 讨论

3.1 关于总 DNA的得率和纯度

3种保存方法制备的总 DNA纯度在 1.4~ 1.7之间,表明有一定量未抽提净的蛋白质存在,这与抽提过程有关,若增加酚抽提步骤即可有效去除蛋白质。但该纯度已能达到常规分子生物学实验要求。方法Ⅲ得率较高,是因为省略了先沉淀白细胞步骤,直接破裂全血中的白细胞,减少了白细胞的丢失。

3.2 总 DNA完整性比较

琼脂糖凝胶电泳结果表明,方法Ⅰ、Ⅱ谱带完整、一致,而方法Ⅲ 8 d出现拖尾现象,说明 DNA有一定降解,可能是因为 SDS-EDTANa2或蛋白酶 k浓度低,未能较好地抑制核酸酶的活性,为证实这一点,本实验将方法Ⅲ血样置 4℃保存 8 d作对照,使核酸酶在低温下活性变低,得到与方法Ⅰ、Ⅱ一致的结果。

基因组 DNA RAPD分析和 mtDNA D-Loop PCR分析结果显示, 3种方法所得总 DNA均能得到较好的扩增结果,证明所制备的总 DNA较完整,符合常规分子生物学实验要求。

3.3 3种血样保存方法综合评价

在野外条件下采血,应用方法Ⅰ需要低温冷藏,方法Ⅱ需离心分离设备,方法Ⅲ最为简便,但 DNA有一定程度的降解。笔者认为方法Ⅱ较好,通过对南宁(300头),贵阳(250头)和西双版纳(250头)共计 800头猪血样的野外采集,远距离运输和实验室制备总 DNA,得到满意效果,进一步证实方法Ⅱ(沉淀白细胞加消化液)是保存血样中总 DNA的实用方法。

参考文献

1 Boyum A. Separation of white blood cell. Nature, 1964, 204 (2): 794

2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. 304~ 314, 463~ 468

3 方福德,周 吕,于 濂,等.现代医学实验技巧全书.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995. 586~592

4 乔守怡.从固定白细胞中分离 DNA研究人的 TK基因多态性.细胞生物学杂志, 1992, 14(2): 91

5 陈俊杰,游乐然,张秋萍,等. 3种提取血细胞基因组 DNA方法的比较.遗传与疾病, 1988, 4(5): 230

6 方福德.两种提取血细胞 DNA方法的比较.中华血液学杂志, 1985, 6(7): 432

(收稿: 1998-06-04;修回: 1998-10-07)

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of three sample preservation methods on total DNA preparation of porcie whole blood*

Liu Zhonglu, Wang Yong, Zu Fuxu, Wei Hong (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of different blood sample preservation methods on total DNA preparation of porcine whole blood. Methods: The three methods used in the study were as followings: 1) Method I—the blood sample was stored at 4℃. 2) Method II —leukocyte sediment was added to the digestive solution and then stored at room temperature. 3) Method III —the blood sample was mixed with SDS-EDTANa2 and then stored at room temperature. Total DNA was purified by Phenol/Chloroform extraction and ethanol precipitation. Results: Pure and intact total DNA was obtained with all the three methods. Though the use of method III resulted in more DNA, DNA was destroyed to some extent. Conclusion: Method II does not need low temperature storage condition. Therefore, it is the best way to store blood samples for outdoor sample collection.

Key words porcine whole blood; total DNA; preparation; preservation

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39770398

双眼视乳头小凹伴黄斑部脱离 1例

A case report pit of the optic disc with bilateral macula detachment

刘少章* 谢 琳 袁容娣 (第三军医大学附属大坪医院眼科) 重庆, 400042

1 临床资料

患者男, 27岁。因双眼视力逐渐下降一月于 1997年 1月 10日就诊。眼部检查: 视力右 0.5/ 右 0.6/ 双角膜透明, KP (-), 前房 (-), 虹膜瞳孔未见异常。三面镜检查: 右视乳头颞上方可见一 1/6DD大小黄白色小凹深约 4D 左眼视乳头颞上方可见一 1/8DD大小黄白色小凹深约 2D 小凹边缘呈峭壁状, 其底部偏颞侧边缘可见一只血管。双眼颞侧视网膜水肿, 黄斑部脱离。诊断: 双眼视乳头小凹伴黄斑部脱离。

荧光血管造影: ① 静脉早期小凹呈弱荧光, 1 min后小凹内逐渐有荧光漫延, 17 min后小凹内荧光染料外溢形成强荧光区。② 静脉早期双眼后极部有窗样缺损区, 其形态大小无变化, 随背景荧光消退而逐渐减弱。诊断: ① 双眼视乳头小凹; ② 双眼后极部色素上皮损害。

视野: 双眼生理盲点扩大, 中心暗点。

2 讨论

视乳头小凹是视盘上的小凹陷, 属先天性视盘异常, 是一种较少见的神经外胚叶发育缺陷[1]。小凹多位于视盘颞侧, 数量多为一个。多系单眼发病, 约 10% ~ 15% 为双侧性。50% 以上的病例在小凹底部或边缘可见一只或两只视网膜睫状血管。约有 25% ~ 75% 的患者于 20~ 40岁左右发生浆液性黄斑脱离[2]。当合并黄斑部视网膜脱离时出现视力障碍。荧光血管造影显示: 早期低荧光, 静脉期后染料由小凹边缘逐渐漫延到小凹内, 晚期可见染料向小凹外溢形成高荧光, 荧光素不向视网膜下间隙扩展至黄斑部[3]。视野常有生理盲点扩大, 中心或旁中心暗点, 牛角形暗点。本病不需治疗, 合并黄斑部网脱离时尚无理想疗法, 但其常有自愈倾向, 近年来有报道用玻璃体切出、注气, 眼内光凝可增进远期视力[2]。

本例患者双眼视乳小凹伴双眼黄斑部脱离实属罕见, 同时也提醒临床医生, 对双眼黄斑浆液性脱离的病人, 应注意有无视乳头小凹的存在。另外, 本例患者的双眼色素上皮损害是否与视乳头小凹有关, 有待进一步观察和探讨。

关键词 视乳头小凹, 黄斑脱离

中图法分类号 R774.5

参考文献

1 李凤鸣 主编. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 3063

2 李雪非. 先天性视盘异常. 国外医学: 眼科分册, 1996, 1(20): 50

3 扬 钧 主编. 现代眼科手册. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 519

(收稿: 1998-03-29; 修回: 1998-11-06)

(编辑 张大春)

* 刘少章, 女, 44岁, 副教授, 副主任医师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net