

3 种禽血抗凝剂效果及其对 DNA 提取质量的影响

王敏强 曹俊辉 刘晓玲 (烟台大学化学生物理工学院, 山东烟台 264005)

摘要 通过3种不同血液抗凝剂对禽血抗凝, 提取新鲜的和经冷冻保存一段时间后的抗凝血DNA, 运用紫外分光法、凝胶电泳和PCR扩增技术检测提取的DNA样品质量, 探讨不同抗凝剂的抗凝效果及其对提取DNA质量的影响。结果表明:3种抗凝血提取的DNA纯度和浓度相近。新鲜抗凝血比冷冻保存一段时间后的抗凝血提取的DNA质量好。ACD抗凝血在冷冻一段时间后出现凝血块, EDTA抗凝血放置时间过长也影响抗凝效果, 但两者在加入裂解液后可长时间保存。75%乙醇抗凝剂抗凝效果较好, 可长时间保存, 适合远距离采血。由3种抗凝禽血提取的DNA分子片段完整, 能满足常规分子生物学试验研究。

关键词 禽血; 抗凝剂; DNA提取

中图分类号 Q504 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6124-02

Effect of Three Anticoagulants on Chicken's Blood and the Quality of DNA Extraction

WANG Min-qiang et al (College of Chemistry, Engineering and Biological Science, Yantai University, Yantai, Shandong 264005)

Abstract Three chicken blood anticoagulants were used and the quality of the DNAs extracted from fresh and frozen/melt anticoagulant blood samples were detected with ultraviolet absorption, Agarose Gel electrophoresis and PCR amplification. The results demonstrated that concentration and purity of the DNAs extracted were comparable among the 3 anticoagulant treatments. The quality of the DNA extracted from fresh anticoagulant blood sample was better than that from frozen/melt ones. 75% alcohol was suitable for long distance sample collection, and was the best one in storing the anticoagulant bloods for long time in homogenization liquid status after frozen/melt compared with the ACD and EDTA treatments. All the DNAs extracted from the 3 kinds of anticoagulant bloods can be applied for further normal manipulation of molecular biologic analysis.

Key words Chicken blood; Anticoagulants; DNA extraction

目前, 随着分子生物学和基因工程、基因组学的研究不断深入发展, 对试样提取的DNA质量和纯度要求也更高。从血液中提取优质的基因组DNA不必杀死动物, 操作也很简便。但是新鲜血液若不经处理则不宜长期保存。在一般条件下, 远距离采血必须加入血液抗凝剂保存备用。不同血液抗凝剂的抗凝效果将会影响所提取的DNA样品的质量。对不同抗凝剂的抗凝效果研究已有不少报道^[1-3], 主要有肝素、EDTA、ACD和75%的乙醇等。比较ACD、EDTA和75%乙醇的抗凝效果, 对认识抗凝剂的性质和制备符合要求的DNA样品具有重要的参考价值。笔者以鸡血为材料, 用不同的抗凝剂抗凝后, 提取其DNA样品, 通过测紫外吸光度、琼脂糖凝胶电泳和PCR微卫星扩增, 检测、验证和比较各抗凝剂的抗凝效果及其对DNA提取样品的影响, 为提取高质量禽血DNA及开展后续的生物实验研究提供借鉴资料。

1 材料与方法

1.1 材料 血样采自烟台引进的海兰鸡。血液抗凝剂为ACD溶液:0.48g柠檬酸, 1.37g柠檬酸钠, 1.48g葡萄糖用60ml纯水溶解后, 定容至100ml。4℃保存。EDTA溶液:0.5ml/L。75%乙醇。

细胞裂解液终浓度:2mol/L尿素、100mmol/L Tris·Cl、1%SDS、100mmol/L EDTA。加样缓冲液(6×缓冲液):0.25%的溴酚蓝、0.25%二甲苯青、40%(w/v)的蔗糖水溶液。PCR扩增基因为鸡脂蛋白酯酶基因第3外显子LPL3。上游引物:F5'TAG CAG AAG CTG AGA TGA AT 3';下游引物:R5'ATG CCA CCC TTT TCT TCT TA 3'。由上海基康生物技术有限公司合成。扩增长度为191bp。

1.2 方法

1.2.1 血液抗凝与细胞裂解。 血液抗凝。采用翼下静脉采血法采集鸡血样, 参考相关报道^[1-3], 新鲜血液抗凝

剂为ACD 6:1, EDTA 9:1, 75%乙醇 1:4。细胞裂解。细胞裂解液与抗凝血比例为10:1。直接使用1.5ml Eppendorf管提取DNA时, 为使所取血样中血细胞的量相同, 可根据各抗凝剂稀释比例, 取不同的抗凝血量。管1(ACD):取抗凝血0.01ml+0.1ml裂解液;管2(EDTA):0.0096ml+0.096ml;管3(75%乙醇):0.0429ml+0.429ml。

1.2.2 DNA提取及DNA样品质量的检测。 按照酚-氯仿抽提法提取血样DNA^[4]。通过2000UV型紫外可见分光光度计分光测定DNA的OD值, 选取OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8左右, OD₂₆₀/OD₂₇₀比值在1.2左右的样品进行稀释, 于4℃保存备用。用0.8%琼脂糖凝胶电泳法检测DNA质量。

1.2.3 PCR扩增。 PCR体积20μl。经梯度PCR, 最终筛选的对试样鸡LPL3的PCR反应程序为:95℃预变性5min;95℃变性40s, 56.8℃退火40s;72℃延伸50s, 30个循环;72℃后延伸8min, 4℃保温。获得的PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 试验结果

2.1 抗凝效果 3种抗凝剂对新鲜血液均有良好的抗凝作用。血液经75%乙醇抗凝后呈绛红色的抗凝态血样, 而经ACD和EDTA抗凝后, 血液呈紫黑色状态。经冷冻保存一段时间后解冻, 75%乙醇仍然保持较好的液态状态, 而ACD抗凝血在解冻后出现固体状血块或稠状物, 经EDTA抗凝血效果居中。

2.2 提取的DNA样品的检测结果

2.2.1 DNA的紫外吸收值。 分别提取经3种抗凝剂处理的新鲜抗凝血和冷冻后的抗凝血, 每种处理1个重复。将所提取的样品DNA稀释15倍, 测其在260、270、280nm的吸光度值, 取其平均值, 结果见表1、2。

2.2.2 DNA样品(0.8%)琼脂糖凝胶电泳。 用冷冻血样提取的DNA样品(0.8%)琼脂糖凝胶电泳检测上样量为:2μl上样缓冲液+2μl 15倍稀释的DNA样品液。结果见图1。

2.2.3 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳。 对冷冻解冻后

基金项目 山东省科技厅自然科学基金项目。

作者简介 王敏强(1957-), 男, 陕西渭南人, 副教授, 从事分子标记与动物育种的教学与研究工作。

收稿日期 2006-09-10

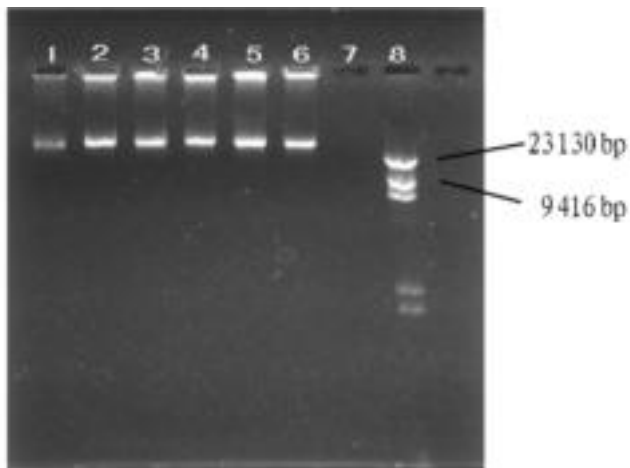
的 DNA 进行常规 PCR 扩增, 扩增产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳。上样量: 2 μ 上样缓冲液(上样缓冲液配制: 0.25% 的溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青和 40% (w/v) 的蔗糖水溶液) + 4 μ PCR 扩增产物。检测结果见图 2。

表1 新鲜抗凝血液提取的 DNA 吸光度检测结果

样品	A ₂₆₀	A ₂₇₀	A ₂₈₀	A ₂₇₀ /A ₂₆₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀	浓度 μg/ ml
75% 乙醇	0.217	0.180	0.119	1.207	1.832	325.50
ACD	0.233	0.193	0.125	1.211	1.873	349.50
EDTA	0.246	0.203	0.133	1.190	1.816	362.25

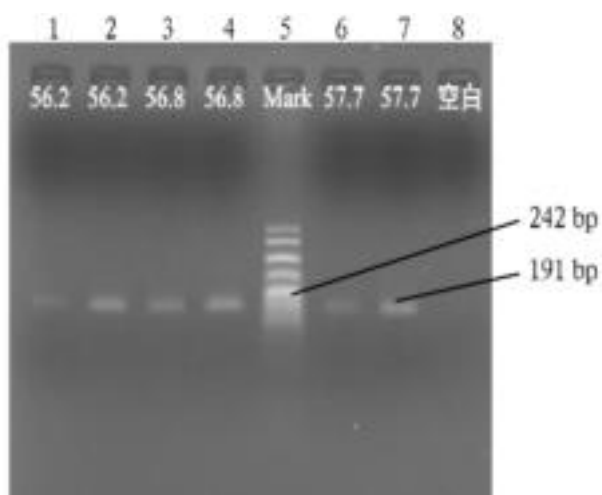
表2 冷冻保存后的抗凝血液提取的 DNA 吸光度检测结果

样品	A ₂₆₀	A ₂₇₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₇₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	浓度 μg/ ml
75% 乙醇	0.145	0.124	0.084	1.166	1.728	216.8
ACD	0.098	0.082	0.056	1.197	1.760	146.3
EDTA	0.120	0.128	0.067	1.194	1.803	180.0



注: 列号 1、4 为 75% 乙醇抗凝样品, 2、5 为 ACD 抗凝样品, 3、6 为 EDTA 抗凝样品, 7 为空白对照, 8 为 Marker - DNA Hnd。

图1 冷冻血样提取的 DNA 样品凝胶电泳



注: 泳道 1、4 为 75% 乙醇抗凝, 2、6 为 ACD 抗凝, 3、7 为 EDTA 抗凝, 8 为空白对照。5 为 Marker pBR322 DNA/ Msp I。

图2 琼脂糖电泳- 鸡 LPL3 引物退火温度的筛选

3 分析与讨论

3.1 不同抗凝剂的抗凝效果比较 3 种抗凝剂对新鲜血液均能有效发挥抗凝作用。血液凝固的多个环节中需要 Ca^{2+} 的参与, 柠檬酸、柠檬酸钠、草酸铵、草酸钾、枸橼酸钠等作为体外抗凝剂可与 Ca^{2+} 结合而除去血液中的 Ca^{2+} 离子, 从而发挥抗凝作用^[5]。在经过一段时间的冷冻保存后, ACD 抗凝血和 EDTA 抗凝血从外观上不如 75% 乙醇好, 其原因与两者的化学性质发生变化、对血中 Ca^{2+} 结合能力下降有关。如果在冷冻前, 对经 ACD 和 EDTA 抗凝的血样加入细胞裂解液(10:1), 经冷冻保存一段时间, 解冻后则会保持较

好的液态状态。用经冷冻保存的 3 种抗凝处理提取的禽血 DNA 作 PCR 扩增鸡 LPL 基因外显子 3, 产物琼脂糖电泳条带清晰易读, 片段长度与预期的 191 bp 吻合, 说明完全能满足常规分子生物学研究需要。

3.2 用新鲜抗凝血与冷冻后抗凝血提取的 DNA 质量的比较 根据 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{270} 判断样品的纯度, 纯的样品其 OD_{260}/OD_{280} 应为 1.8, 若 OD_{260}/OD_{280} 大于 1.9, 说明样品中含有 RNA 杂质, 小于 1.6 说明样品中蛋白质没有抽提干净, 蛋白质含量超标; OD_{260}/OD_{270} 的值为 1.2 时较纯, 太小则说明样品中酚含量较高^[6]。试验结果显示, 新鲜抗凝血提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 在 1.816 ~ 1.873、 OD_{260}/OD_{270} 在 1.2 左右, 没有 RNA 等分子的干扰, 蛋白质、酚等杂质含量也正常。不同抗凝剂对提取的 DNA 质量影响不大, DNA 一级结构均保持完整。但经冷冻后的抗凝血提取的 DNA 其 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{270} 不如新鲜的抗凝血好, 与冷冻保存后血液性质及抗凝剂对血液组分的影响有关。

3.3 抗凝剂的用量及配制质量 使用的抗凝剂只有在一定的比例范围内才能有效发挥其抗凝作用。抗凝剂使用量太少, 可能使血液不抗凝, 或者不能保存, 过一段时间后仍然发生凝固。而使用量太多, 又会改变血液中的固有成分, 容易对 DNA 提取造成一定影响, 破坏 DNA 的完整性或降低各种活性试剂的效率, 使所提取的 DNA 样品质量降低。试验结果表明, 采用的新鲜血液与抗凝剂的用量(ACD 6:1、EDTA 9:1、75% 乙醇 1:4) 比例适宜, 抗凝效果正常。另外, 抗凝剂最好现配现用, 如 ACD 在配制后 1 周内使用较好, 否则易产生白色絮状沉淀物, EDTA 放置时间过长, 会与溶液中的各种离子结合, 使其对血中 Ca^{2+} 等金属离子的螯合能力下降, 而 75% 乙醇具有挥发作用, 必须密封保存, 使其浓度保持相对稳定。

3.4 提高禽血抗凝效果的其他措施 经 ACD 和 EDTA 抗凝的禽血若长时间保存会出现血凝块, 但是给新鲜的抗凝血加入细胞裂解液后则可以长期保存。乙醇对酶有一定的抑制作用, 在提取 DNA 时加蛋白酶 K 之前若用生理盐水进行处理离心, 则会去掉这一影响, 使所得的结果更理想一些^[1]。在使用各种抗凝剂时应先摇动使其混匀, 血液加入抗凝剂之后也应先将其充分混合均匀后, 再放到冰盒中保存, 否则极易因混合不均使局部产生小凝血块, 影响使用。经裂解液处理后的血液样品呈现为粘稠状液体, 使用时不易分开, 容易将 DNA 拉断。改用在 1.5 ml eppdorf 管中加入一次性用量的抗凝血和裂解液, 使用时直接进行抽提不失为一种方便、快捷的方法。

参考文献

- [1] 刘长国. 家禽血样固定及其 DNA 的提取[J]. 西北农业学报, 2003, 12(3): 33-35.
- [2] 苗永旺, 霍金龙, 李莲军, 等. 从鸡血中快速提取高质量基因组 DNA 方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(12): 10-12.
- [3] 鲁云凤, 文祯中. 3 种血液抗凝剂的抗凝效果及对 RAPD 反应影响的研究[J]. 南阳师范学院学报, 2004(12): 55-57.
- [4] J 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1992.
- [5] 姚泰. 生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [6] 哈伍德 A.J. DNA 及 RNA 基本实验技术[M]. 盛小禹, 译. 北京: 科学出版社, 2002.