

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.004

一种从 PAXgene 全血 RNA 管内提取基因组 DNA 的方法*

杨莎莎 韩晓杰 周姗姗 王文倩 刘佳缘 徐玉东[△] 杨永清[△]

(上海中医药大学 上海市针灸经络研究所 上海 200030)

摘要 目的:从同一生物样本同步提取 RNA 和 DNA,能提高样本的利用率,而且对于基因组学、转录组学和表观遗传学检测数据之间的比对和匹配分析也十分重要。本研究在不影响 RNA 样品制备的前提下,建立一种从 PAXgene 全血 RNA 管内提取基因组 DNA 的方法。**方法:**取一定量 PAXgene 全血 RNA 管血液样本,使用 QIAamp DNA 试剂盒提取血细胞基因组 DNA,系统优化提取过程中的离心参数、洗脱量以及初始血液样本量等实验参数,并对提取的基因组 DNA 质量进行检测。**结果:**用 PAXgene 全血 RNA 管 3 mL 血液样本能够提取出 $8.918 \pm 1.100 \mu\text{g}$ 基因组 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 样品的 OD 260/280 比值为 1.89 ± 0.09 ,琼脂糖凝胶电泳结果显示 DNA 样品完整无降解。**结论:**利用本方法提取的 DNA 样品能够满足下游 DNA 芯片、DNA 甲基化测序等实验要求。该方法有助于从有限的临床血液样本中获取全面的遗传信息,并且提高后续不同实验方法所生成数据之间的可比性和匹配度。

关键词:PAXgene 全血 RNA 管;基因组 DNA;提取方法

中图分类号:Q751;R-331;R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)09-1615-04

A Method for Extracting Genomic DNA from PAX gene Blood RNA Tube*

YANG Sha-sha, HAN Xiao-jie, ZHOU Shan-shan, WANG Wen-qian, LIU Jia-yuan, XU Yu-dong[△], YANG Yong-qing[△]

(Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: Simultaneous extraction of RNA and DNA from the same biological sample can improve the utilization of the sample, and it is also very important for the comparison and analysis of the data of genomics, proteomics and epigenetic detection. This study established a method for extracting genomic DNA from PAXgene blood RNA tube without affecting the preparation of RNA samples. **Methods:** A certain amount of blood samples was taken and gDNA was extracted from blood cells using the QIAamp nucleic acid purification kit. The centrifugal parameters including centrifugal speed and time, elution volume and initial blood sample volume were optimized in the process of extraction and then the quality of the extracted gDNA was detected. **Results:** We could extract $8.918 \pm 1.100 \mu\text{g}$ (mean $\pm$ SD) gDNA from 3 mL tube-sample with an OD 260/280 ratio of 1.89 ± 0.09 (mean $\pm$ SD). The agarose gel electrophoresis analysis showed that the extracted gDNA was of high molecular weight and integrity. **Conclusion:** The extracted gDNA is generally able to meet the requirements of downstream experiments such as DNA chip, DNA methylation sequencing. This method is helpful to obtain comprehensive genetic information from the limited clinical blood samples, and improve the comparability and the matching degree between the data generated by different experimental methods.

Key words: PAXgene Blood RNA tube; Genomic DNA; Extraction method

Chinese Library Classification (CLC): Q751; R-331; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1615-04

前言

生命活动是一个由不同组织层面的 DNA、RNA 和蛋白质与外界环境信息在时间-空间维度内相互作用、相互影响,形成的极其复杂的生物学过程。系统生物学能够通过基因组学、转录组学、表观遗传学、蛋白质组学以及代谢组学等的整合分析,全面地理解细胞、组织及生物体在生理和病理状态下的生

物信息调控网络^[1]。完成上述分析研究必须从细胞、组织、或体液等标本中提取不同生物学组分,而从同一生物标本中同时提取 DNA、RNA 等核酸组分并完成同步检测,一方面能够实现少量珍贵样本的高效利用;另一方面由同步提取样品产生的基因组学、转录组学和表观遗传学数据之间更易于进行比对和匹配分析,尤其是当样本之间生物学差异细微的情况下;同时还能较大程度地降低样品提取的时间和费用成本^[2-4]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81574058,81473760);上海市中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-CCCX-3-3005,ZYSNXD-CC-ZDYJ039);上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201640133)

作者简介:杨莎莎(1991-),硕士研究生,主要研究方向:针刺效应物质基础研究,电话:021-54592134, E-mail: shashastella@163.com

[△] 通讯作者:徐玉东,博士,副研究员, E-mail: xydong0303@126.com;

杨永清,博士生导师,研究员, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn

(收稿日期:2016-10-21 接受日期:2016-11-19)

在临床上,相对于其他组织样品全血样品较为方便获得,而且全血的基因组表达谱变化可以反映出机体器官或远端组织的病理状态,成为临床试验和疾病分子诊断中核酸样品的主要来源^[9]。RNA 相对于 DNA 而言更易降解,在临床采样过程中应该选择能够保护 RNA 不被降解的试管。PAXgene Blood RNA Tube(PAXgene 全血 RNA 管)是目前临床研究中应用最广泛的采血管之一^[6],管内含稳定体内基因转录性状的添加剂,能够减少体外 RNA 降解并将基因诱导减少到最小。由于 PAXgene 全血 RNA 管主要用于提取血细胞中的 RNA,在实验过程中 DNA 被生物物理和生物化学的方法去除,从而丢失了 DNA 遗传信息。如果要同步获取更为全面的遗传信息并提高后续不同实验检测数据之间的匹配度,就需要从 PAXgene 全血 RNA 管同时提取 DNA 和 RNA。

目前同步提取 DNA 和 RNA 的方法虽有不少研究^[7,8],但各有侧重和适用面。本文通过关键实验参数的系统优化结合 DNA 样品质量检测,建立一种快速、可靠、安全以及能够有效利用珍贵的生物样本的血液核酸提取方法,同时也为临床试验采样提供一种可行的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 全血样品来源

健康志愿者肘静脉采血 2.5 mL,收集于 PAXgene 全血 RNA 管内,-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

QIAamp DNA Blood Midi 试剂盒(德国 Qiagen 公司);QIAamp DNA Blood Max 试剂盒(德国 Qiagen 公司);无水乙醇(国药集团);DNA marker(美国 NEB 公司);10× loading buffer;GelRed 核酸染料(10000×,美国 Biotium 公司);TAE buffer;琼脂糖(Biowest,基因公司进口分装);DNA 标准品(来源于大肠杆菌菌株 B 的脱氧核糖核酸钠盐,美国 Sigma 公司)。

1.3 主要仪器

台式离心机(Allegra X-30R,美国 Beckman 公司);微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000,美国 Thermo 公司);高速微流体分光光度计(QIAxpert,德国 Qiagen 公司);电热恒温水槽(DK-8D,上海一恒科技公司);荧光计(Qubit 2.0,美国 Thermo 公司);微型电泳仪(DYCP-31BN,北京六一仪器厂);微波炉(WP900S,格兰仕公司);电子天平(JA3003,上海舜宇恒平科学

仪器公司);凝胶成像仪(Amersham Imager 600,GE 公司)。

1.4 全血基因组 DNA 提取方法

PAXgene 全血 RNA 管从 -80℃冰箱取出后室温静置 2 小时,取 1 mL 样品,加入蛋白酶和 Buffer AL,之后在 70℃水浴锅内孵育 10 min,然后加入无水乙醇混匀后进行离心。进入清洗步骤,分别依次加入 Buffer AW1 和 Buffer AW2,加入 Buffer AW2 之后离心参数的设定极为关键,会影响最终的 DNA 得率,因此本实验设置了 4500 rpm× 15 min 和 4500 rpm× 20 min 两种离心参数,以期得到最优离心参数。在最后洗脱步骤中为得到最优洗脱量,本实验设置了 100 μL、200 μL、300 μL 三个洗脱量进行比较。考虑到不同血液样本之间的差异,本实验中使用了 4 个不同人的样品重复实验。

另外,取普通抗凝采血管收集外周血,并使用相同参数进行提取 DNA,最终提取的样品作为本实验的阳性对照。

1.5 DNA 质量检测

1.5.1 DNA 浓度与纯度检测 使用 Nanodrop 2000 分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,用试剂盒中的 Buffer AE 测定空白值, DNA 标准品作为阳性对照,每个 DNA 样品取 1 μL 进行检测。

1.5.2 琼脂糖凝胶电泳 本实验中相关参数:琼脂糖浓度为 0.5%,电压为 100 V,电泳时间为 30 min,每孔上样量为 10 μL,电泳液使用 1× TAE buffer,染色剂为 GelRed 核酸染料,最后使用凝胶成像仪进行拍照。

1.6 统计学分析方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,所有实验结果均以平均数± 平均数标准误差的形式表示。多样本间分析采用单因素方差分析(ANOVA),两样本均数比较采用 t 检验, P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同离心参数对 DNA 得率的影响

在对离心参数进行优化的实验中样本量均为 1 mL,洗脱量为 100 μL,结果显示离心转速 4500 rpm,离心时间 20 min 条件下,DNA 得率与纯度均优于 4500 rpm× 15 min 的离心参数。前者 DNA 总量为 0.508± 0.127 μg,260/280 比值为 1.86± 0.20;而后者 DNA 总量为 0.166± 0.043 μg,260/280 比值为 1.62± 0.37。见表 1。

表 1 不同离心参数下 DNA 得率
Table 1 DNA yields with different centrifugal parameters

Centrifugal speed and time	No. of samples	gDNA yields (μg)	OD 260/280
4500 rpm, 15 min	4	0.166± 0.043	1.62± 0.37
4500 rpm, 20 min	4	0.508± 0.127*	1.86± 0.20

Note: Expected OD 260/280 values of pure DNAs are commonly in the range of 1.8-2.0. *P<0.05 VS. the yield of 4500 rpm, 15 min.

2.2 不同洗脱参数对 DNA 得率的影响

QIAamp DNA 提取试剂盒最后使用单次洗脱收集 DNA 样品,但是我们发现再次洗脱仍可回收部分 DNA 样品,说明在首次洗脱后滤膜上仍有残存 DNA。在离心参数进行优化之后,为得到最优洗脱量,本实验将洗脱量增加至 200 μL 和 300

μL,结果显示洗脱量为 200 μL 时 DNA 得率最优,可得到 DNA 总量为 1.627± 0.157 μg,同时不影响 DNA 的纯度(OD 260/280=1.86± 0.05)。见表 2。

2.3 初始样本血量对 DNA 总量的影响

使用以上优化之后的参数提取的 DNA 总量还不能满足下

游 DNA 甲基化测序所需的 DNA 用量,在不影响 RNA 样品提取的前提下,将初始样本血量提高至 3 mL 进行 DNA 提取,结果显示 3 mL 样本量最终可将 DNA 总量提高至 8.918 ± 1.100

μg ,纯度 OD 260/280 为 1.89 ± 0.09 ,完全能够满足下游相关实验需求。见表 3。

表 2 不同洗脱量下 DNA 得率

Table 2 DNA yields with different elution volume

Elution volume	No. of samples	gDNA yields (μg)	OD 260/280
100 μL	4	0.508 ± 0.127	1.86 ± 0.20
200 μL	4	$1.627 \pm 0.157^*$	1.86 ± 0.05
300 μL	4	$1.425 \pm 0.513^*$	2.07 ± 0.55

Note: Expected OD 260/280 values of pure DNAs are commonly in the range of 1.8-2.0. * $P < 0.05$ VS. the yield of 100 μL elution volume.

表 3 不同样本量下 DNA 得率

Table 3 DNA yields with different sample volume

Blood sample volume	No. of samples	gDNA yields (μg)	OD 260/280
1 mL	4	1.627 ± 0.157	1.86 ± 0.05
3 mL	4	$8.918 \pm 1.100^*$	1.89 ± 0.09

Note: Expected OD 260/280 values of pure DNAs are commonly in the range of 1.8-2.0. * $P < 0.05$ VS. the yield of 1mL sample volume.

2.4 琼脂糖凝胶电泳结果

将使用上述参数提取的 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性,结果显示,PAXgene 全血 RNA 管提取

的 DNA 样品和 DNA 标准品以及普通抗凝采血管提取的 DNA 样品分子量一致(约 20 kb 位置),且无明显拖尾现象,表明提取的 DNA 样品完整无降解。见图 1。

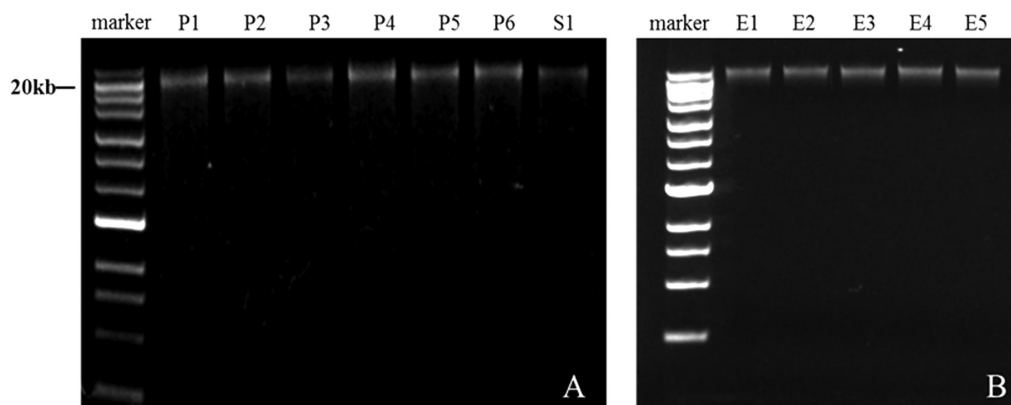


图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Results of agarose gel electrophoresis

Note: Lane P1-P6 are the DNA samples extracted from the PAXgene blood RNA tube, S1 is the standard, lane E1-E5 are the DNA samples extracted from the EDTA tube

3 讨论

3.1 DNA 提取方法

核酸是生物遗传信息的载体,为基因复制和转录提供了模板,也是生命遗传的物质基础和个体生命活动的信息基础。生物学活动中,DNA 在转录以及表观遗传调控中扮演着极其重要的角色^[9]。DNA 提取是进行相关 DNA 研究的基础和前提^[10],DNA 样品质量直接影响下游实验和分析。

传统从血样中提取 DNA 的方法包括酚抽法、甲酰胺解聚法以及异丙醇沉淀法等,上述方法要求初始血样是抗凝血或新鲜血液^[11-14]。临床中的血液样本比较珍贵,在将患者痛苦降低到最小的前提下,如何充分利用有限的样本提取出可用于下游实验研究的高质量生物学样品是临床试验在设计方案之初需要

考虑的重要问题。本研究中所使用的 PAXgene 全血 RNA 管其主要功能是保护血液中的 RNA 不被降解,且能够长期保存,优势在于能够从少量血样中提取出满足下游实验要求的 RNA^[6],但其中的 DNA 被视为杂质通过特制的离心柱以及酶处理膜选择性去除,从而丢弃了宝贵的 DNA 样品。本研究通过改进现有方法,同步从 PAXgene 全血 RNA 管中提取 RNA 和 DNA 样品,有利于减少采血量和实验成本,而且对于不同组学实验方法所生成实验数据之间的比对、匹配分析也十分重要。

QIAamp DNA 提取试剂盒提取 DNA 的原理是利用硅胶膜离心吸附柱法,相对于传统提取方法,其不含苯酚、氯仿等有害物质,操作方便,联合蛋白酶 K 消化和漂洗,确保了高纯度的可能性,是目前所有方法中,纯度最高的一种全血 DNA 的提取方法^[15,16]。Kruhøffer 等^[17]研究表明从 PAXgene 全血 RNA 管

内可以提取出 DNA,但是文章内没有对提取 DNA 的实验参数进行系统优化,且没有对 DNA 进行质检就直接进行下游实验,存在质量风险。此外,其 DNA 的提取总量低于 1.5 μg ,不能满足下游 DNA 甲基化测序等实验。

为此,本研究对提取 DNA 的离心参数、洗脱量、样品量进行了优化:① 在加入 Buffer AW2 之后需离心以去除样品中的杂质,以免影响最终洗脱液中 DNA 的质量,在本研究中经过多次实验发现转速为 4500 rpm,离心 20 min 为最优离心参数,但是可能实验室条件以及实验人员操作上的略微不同会导致该离心速度及时间存在差异;② 使用 1 mL 初始样品量进行提取时为得到最大洗脱量,试剂盒操作手册建议洗脱两次,每次使用 200 μL 进行洗脱,最终洗脱量为 400 μL 。本研究中分别使用 100 μL 、200 μL 、300 μL 洗脱液进行洗脱,每次重复洗脱两次,结果显示使用 200 μL 洗脱液重复洗脱得到的 DNA 总量最多,纯度最优;③ 使用 1 mL 样品量进行提取最终得到 DNA 总量为 $1.627 \pm 0.157 \mu\text{g}$,不能满足下游 DNA 甲基化测序等实验要求用量^[18-20],一般甲基化测序实验要求 DNA 总量至少在 3 μg 以上,因此需要增加初始样品量。本研究发现使用 3 mL 初始样品量最终可得到 DNA 总量为 $8.918 \pm 1.100 \mu\text{g}$,能够满足下游相关实验研究所需,且不会影响 RNA 得率,使用剩余 6 mL 样品能够提取出的 RNA 总量为 6 μg 左右。

3.2 DNA 质量鉴定

为了验证提取的 DNA 样品可用于下游实验,本研究分别使用紫外分光光度计检测 DNA 样品的浓度及纯度(OD 260/280 比值),琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性。由于从 PAXgene 全血 RNA 管内提取的 DNA 浓度较低(15 ng/ μL 左右),Nanodrop 检测结果可能会出现偏差,因此我们还利用 QIAxpert 对最终提取的 DNA 样品进行重复检测。QIAxpert 基于独特的全谱图扫描程序能够精确地定量样本成分,区分 DNA、RNA 及其他杂质,对于低浓度样品能够准确定量。QIAxpert 检测结果显示 DNA 总量为 $9.126 \pm 0.933 \mu\text{g}$,OD 260/280 比值为 1.82 ± 0.06 ,而 Nanodrop 检测 DNA 总量为 $8.918 \pm 1.100 \mu\text{g}$,OD 260/280 比值为 1.89 ± 0.09 ,两种检测方法结果差异不大,说明本研究中 DNA 检测结果可信。从图 1 中可看出从 PAXgene 全血 RNA 管内提取的 DNA 样品与从 EDTA 抗凝管内提取的 DNA 样品分子量一致,提示从 PAXgene 全血 RNA 管内提取的 DNA 样品和抗凝管内提取的 DNA 样品无差别。

总之,本研究通过优化 DNA 提取实验相关参数从 PAXgene 全血 RNA 管内提取基因组 DNA,并使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳实验进行质检,结果显示 DNA 的纯度高,完整性较好,说明使用 QIAamp DNA 提取试剂盒可以从 PAXgene 全血 RNA 管内提取出合格的基因组 DNA。该方法可以从 3 mL 初始血样中提取出总量为 $8.918 \pm 1.100 \mu\text{g}$ 的基因组 DNA,能够满足下游 DNA 芯片、DNA 甲基化测序等实验要求。该方法有助于从有限的临床血液样本中获取全面的遗传信息,从而提高样本的利用效率,同时也提高了后续不同实验方法所生成数据之间的可比性和匹配度。

参考文献(References)

[1] Kitano H. Systems biology: Toward System-level Understanding of

Biological Systems[M]. Foundations of Systems Biology, Cambridge, MA: The MIT Press, 2001: 1-36

[2] Huancamamani W, Riveracabello D, Maitamaita J. A simple, fast, and inexpensive CTAB-PVP-silica based method for genomic DNA isolation from single, small insect larvae and pupae[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2015, 14(3): 8001-8007

[3] Roume H, Heintz-Buschart A, Muller E E L, et al. Sequential Isolation of Metabolites, RNA, DNA, and Proteins from the Same Unique Sample[J]. Methods in Enzymology, 2013, 531: 219-236

[4] Tolosa J M, Schjenken J E, Civiti T D, et al. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the same sample[J]. Biotechniques, 2007, 43(6): 799-804

[5] Yang S, Fahs A, Feldman C, et al. A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards [J]. Springerplus, 2012, 2(1): 1-7

[6] Carrol E D, Salway F, Pepper S D, et al. Successful downstream application of the Paxgene Blood RNA system from small blood samples in paediatric patients for quantitative PCR analysis[J]. BMC Immunology, 1983, 8(1): 1-8

[7] Radpour R, Sikora M, Grussenmeyer T, et al. Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Proteins for Genetic, Epigenetic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8 (11): 5264-5274

[8] Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples [J]. Biotechniques, 1993, 15(3): 536-537

[9] Fujii H, Fujita T. Isolation of Specific Genomic Regions and Identification of Their Associated Molecules by Engineered DNA-Binding Molecule-Mediated Chromatin Immunoprecipitation (enChIP) Using the CRISPR System and TAL Proteins [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21802-21812

[10] Soriano-Tárraga C, Jiménez-Conde J, Giralt-Steinhauer E, et al. DNA isolation method is a source of global DNA methylation variability measured with LUMA. Experimental analysis and a systematic review [J]. Plos One, 2013, 8(4): 1-8

[11] 张宁,王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(2): 40-46

Zhang Ning, Wang Feng-shan. Advances of DNA extraction methods [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2004, 23(2): 40-46

[12] 李王霞,刘光箭,陆华新,等. 标本因素对全自动磁珠法全血 DNA 提取的影响[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(1): 29-31

Li Wang-xia, Liu Guang-jian, Lu Hua-xin, et al. The quality of automatic extracted DNA associated with blood sample status[J]. Chinese Journal of Blood, 2014, 27(1): 29-31

[13] 韩芬霞,杨丽芬. 全血 DNA 提取方法的改进及 PCR 检测[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 56-57

Han Fen-xia, Yang Li-fen. Improvement of whole blood DNA extraction method and PCR detection [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(8): 56-57

[14] 陈辉,王云云,刘艳. 两种自动化全基因血液样本 DNA 提取效果的比较[J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(2): 114-115

Chen Hui, Wang Yun-yun, Liu Yan. Comparison of DNA extraction effects of two kinds of automated whole gene blood samples[J]. Infection; Inflammation; Repair, 2013, 14(2): 114-115 (下转第 1609 页)

- of Mice with Chronic Asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 155(suppl 1): 6-11
- [5] Diamant Z, Sidharta PN, Singh D, et al. Setipiprant, a selective CRTH2 antagonist, reduces allergen-induced airway responses in allergic asthmatics [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2014, 44 (8): 1044-1052
- [6] Liu H, Zheng M, Qiao J, et al. Role of prostaglandin D2 /CRTH2 pathway on asthma exacerbation induced by *Aspergillus fumigatus* [J]. *Immunology*, 2014, 142(1): 78-88
- [7] Dhawale VS, Amara VR, Karpe PA, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 306: 17-26
- [8] Kim SG, Lee E, Park NY, et al. Britanin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in a murine asthma model [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(7): 1006-1012
- [9] Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, et al. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016
- [10] Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, et al. Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients [J]. *Journal of Inflammation*, 2015, 12: 25
- [11] Hardy CL, Nguyen HA, Mohamud R, et al. The activin A antagonist follistatin inhibits asthmatic airway remodelling [J]. *Thorax*, 2013, 68 (1): 9-18
- [12] Park CS, Bang BR, Kwon HS, et al. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(12): 1660-1670
- [13] Pettipher R, Vinall SL, Xue L, et al. Pharmacologic profile of OC000459, a potent, selective, and orally active D prostanoid receptor 2 antagonist that inhibits mast cell-dependent activation of T helper 2 lymphocytes and eosinophils [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 340(2): 473-482
- [14] 应延凤, 李睿淳, 毛宇飞, 等. 大鼠支气管哮喘模型中前列腺素 D2 水平和嗜酸粒细胞上受体改变研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30 (23): 1417-1420
- Ying Yan-feng, Li Rui-chun, Mao Yu-fei, et al. Study on the changes of prostaglandin D2 levels and receptors on eosinophils in rat bronchial asthma model [J]. *International Journal of respiratory*, 2010, 30(23): 1417-1420
- [15] Subhashini, Chauhan PS, Dash D, et al. Intranasal curcumin ameliorates airway inflammation and obstruction by regulating MAPK kinase activation (p38, Erk and JNK) and prostaglandin D2 release in murine model of asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 200-206
- [16] Shiraishi Y, Asano K, Nakajima T, et al. Prostaglandin D2-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH2 receptor [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 954-960
- [17] Paruchuri S, Jiang Y, Feng C, et al. Leukotriene E4 activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and induces prostaglandin D2 generation by human mast cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (24): 16477-16487
- [18] Nittner-Marszalska M, Cichocka-Jaros E, Sanak M, et al. 9α , 11β -PGF₂, a Prostaglandin D2 Metabolite, as a Marker of Mast Cell Activation in Bee Venom-Allergic Patients [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2015, 63(4): 317-325
- [19] Maher SA, Birrell MA, Adcock JJ, et al. Prostaglandin D2 and the role of the DP1, DP2 and TP receptors in the control of airway reflex events [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(4): 1108-1118
- [20] Pettipher R, Hunter MG, Perkins CM, et al. Heightened response of eosinophilic asthmatic patients to the CRTH2 antagonist OC000459 [J]. *Allergy*, 2014, 69(9): 1223-1232

(上接第 1618 页)

- [15] Wu H, de Gannes M K, Luchetti G, et al. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA [J]. *Biotechniques*, 2015, 58 (6): 293-300
- [16] Keshavarz Z, Moezzi L, Ranjbaran R, et al. Evaluation of a Modified DNA Extraction Method for Isolation of Cell-Free Fetal DNA from Maternal Serum [J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2015, 7(2): 85-88
- [17] Kruhøffer M, Dyrskjøl L, Voss T, et al. Isolation of Microarray-Grade Total RNA, MicroRNA, and DNA from a Single PAXgene Blood RNA Tube [J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, 9(4): 452-458
- [18] Soto J, Rodriguez-Antolin C, Vallespín E, et al. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research [J]. *Translational Research*, 2015, 169: 1-18
- [19] Zhou Y, Xu LY, Derek M Bickhart, et al. Reduced representation bisulphite sequencing of ten bovine somatic tissues reveals DNA methylation patterns and their impacts on gene expression [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 779-790
- [20] Brisotto G, Gennaro A D, Damiano V, et al. An improved sequencing-based strategy to estimate locus-specific DNA methylation [J]. *Bmc Cancer*, 2015, 15(1): 1-10