

琼脂糖电泳中核酸染料 Genefinder 的最佳使用方法建立

张海燕,王捷[△],洗江(广州军区广州总医院医学实验科,广州 510010)

【摘要】目的 确定琼脂糖凝胶电泳中使用核酸染料 Genefinder 的最适方法,以期找到染色效果理想的染色方法。**方法** 在琼脂糖凝胶电泳中,采用预染样品法、胶内染色法以及两者相结合的 3 种方法,使用核酸染料 Genefinder 进行染色,对染色结果进行比较分析。**结果** 使用胶内染色法染色效果较好,预染样品法次之,胶染及样品染色法结合效果最差。**结论** 核酸染料 Genefinder 会影响 DNA 的迁移效率,使用 Genefinder 进行胶内染色是一种较好的染色方法。

【关键词】 Genefinder; 样品预染法染色; 胶内染色

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.21.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)21-3184-02

Establishment of optimal use method of nucleic acid dyes Genefinder in agarose gel electrophoresis ZHANG Hai-yan, WANG Jie[△], XIAN Jiang (Department of Medical Experiment, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

【Abstract】Objective To determine a optimal method for using nucleic acid dyes Genefinder in agarose gel electrophoresis in order to find out a staining method with ideal dyeing effect. **Methods** The pre-dyeing sample method, gel staining method and their combination staining method were adopted to perform the staining with nucleic acid dyes in agarose gel electrophoresis. The staining results were performed the comparative analysis. **Results** The Genefinder staining had better effect, the pre-dyeing sample method took the second place and the combination staining method had the worst effect. **Conclusion** Nucleic acid dyes Genefinder has an effect on the mobility of nucleic acid in agarose gel electrophoresis, therefore staining nucleic acid with Genefinder is a better staining method in agarose gel electrophoresis.

【Key words】 Genefinder; staining with preparative dye liquor; staining in agarose gel electrophoresis

溴化乙锭(EB)曾是琼脂糖凝胶电泳中最为常用的核酸染料,被广泛应用于观察、检测 DNA/RNA。但作为一种强诱变剂,EB 可插入核酸相邻碱基平面之间,引起基因突变,具有中等毒性,对人体有潜在的危害性^[1-3]。Genefinder 是一种新型核酸染料,与强致癌性的 EB 不同,Genefinder 属于花青类染料,毒性低,使用安全,可以代替 EB 作为各种核酸电泳的染色剂。那么,新型核酸染料是预染样品法、胶内染色法还是两者相结合的染色方法检测灵敏度最高,最实用呢? 本文在 3 种染色方式下使用 Genefinder 核酸染料对凝胶中的 DNA 进行染色,对染色结果进行比较分析,为实验中选择合适的 Genefinder 染色方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验使用的核酸样品为本实验室扩增获得的 EGFR 基因 20 号外显子的 PCR 产物(约 110 bp)。

1.1.2 试剂 核酸染料 Genefinder(10 000×)(百维信生物科技有限公司);6×loading buffer[宝生物工程(大连)有限公司];DNA Marker DL2000[宝生物工程(大连)有限公司];琼脂糖胶 Agarose gels(Oxoid, England)。

1.1.3 仪器 蓝盾 552 可见光凝胶电泳透射仪(百维信生物科技有限公司,厦门),621 蓝盾可见光透射仪(百维信生物科技有限公司,厦门),微量移液器(eppendorf, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 胶染法 配制 1.5% 的琼脂糖溶液,加热溶解,冷却至 60℃ 左右,按比例加入 10 000×Genefinder 染料,使染料在胶中的终浓度为 1×(即如果制备 50 mL 凝胶,加入 5 μL 的 10 000×Genefinder 染料),然后倒胶。待凝胶液冷却凝固后,

加入 DL2000 核酸标准物及 PCR 产物进行电泳。使用 5 V/cm 的电压进行电泳,最后用 621 蓝盾可见光透射仪进行观察拍照。

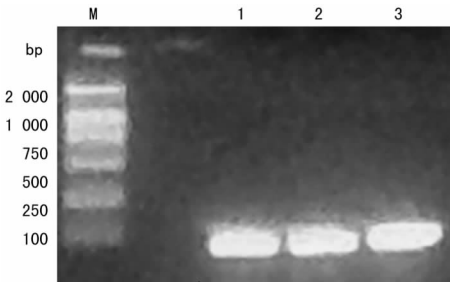
1.2.2 预染样品法 按照常规方法配制 1.5% 琼脂糖凝胶,制胶过程中不加入 Genefinder 染料。配制 loading buffer 预染液:将 10 000×Genefinder 染料和 6×loading buffer 按照 1:9 的比例混合(如 5 μL 染料和 45 μL 的 6×loading buffer 混合)。将需要进行电泳检测的 PCR 产物及 DL2000 核酸标准物与配置好的 loading buffer 预染液按照 5:1 混合,室温静置 3 min 后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm,电泳结果用 621 蓝盾可见光透射仪进行观察拍照。

1.2.3 胶染法+预染样品法 配制 1.5% 的琼脂糖溶液,加热溶解,冷却至 60℃ 左右,按比例加入 10 000×Genefinder 染料,使染料在胶中的终浓度为 1×Genefinder 染料,然后倒胶。将需要进行电泳检测的 PCR 产物及 DL2000 核酸标准物与配置好的 loading buffer 预染液按照 5:1 混合,室温静置 3 min 后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 5 V/cm,电泳结果用 621 蓝盾可见光透射仪进行观察拍照。

2 结果

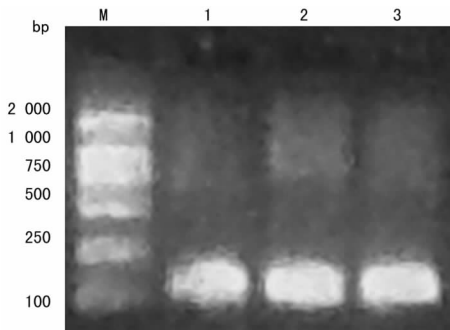
3 种染色方法电泳后进行染色效果的比较,见图 1~3。图 3 中电泳条带模糊、不整齐,且有较明显的拖尾现象,DL2000 MARK 中分子大小不同的 DNA 片段不能清晰分辨;图 2 中条带模糊的问题稍有改善, DNA 样品仍有少量的拖尾现象, DL2000 MARK 中分子大小不同的 DNA 片段能进行区分,但清晰度不佳;图 1 的染色效果明显比前两者染色的效果好得多,结果中核酸分子的条带清晰、整齐,背景低,信噪比相对高,条带边缘锐利,便于显示实验结果(图 1)。电泳中使用的核酸

样品是同一批样品,但是比较胶法染色(图 1)、预染样品法染色(图 2)及两者相结合的染色方法(图 3),发现 3 种方法显示的核酸分子的大小不完全一致。这可能是样品加入染料后,影响了样品的迁移速率,以致不能准确地判断 DNA 条带的大小。



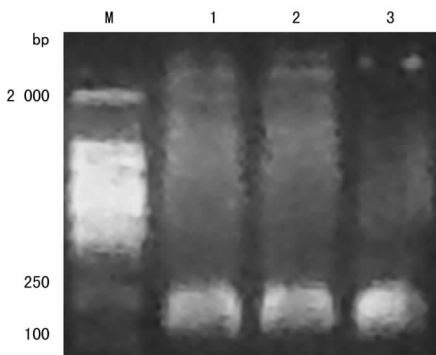
注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 1 胶染法染色



注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 2 预染样品法染色



注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 3 胶染法+预染样品法

3 讨论

EB 因其在核酸电泳中有着条带边缘清晰、背景低、灵敏度高的优点,曾经是实验室用于检测核酸的常规染料。但由于 EB 是一种强诱变剂并具有一定的致癌性而逐渐减少使用。Genefinder 是近几年推出的新型荧光核酸染料,属于花青类染料,毒性低,使用安全,可有效保护操作者和环境。Genefinder 与核酸结合后的最大吸收峰为 490 nm,与染料结合的核酸在紫外线下呈现绿色荧光。但该染料同样能引起有机体突变,在使用时要采取适当的保护措施^[4-6]。有报道表明,新型荧光核

酸染料在成本、灵敏度、安全性方面都具有较大优势,适合实验室的常规核酸检测,可以作为 EB 的替代品^[7]。但是,不同的染色方式下,检测效果有很大差异,通过比较图 1~3 可以看出,使用胶染法染色 Genefinder 对 100~2 000 bp 的核酸分子,其显色效果条带清晰,平直,边缘整齐;预染样品法和两者相结合的染色方法都会导致核酸条带模糊拖尾及 DNA MARK 分辨率不高的现象。这个结果与刘阳等^[8]的研究结果是一致的,不论是对于 EB 还是新型核酸染料,使用胶染法的灵敏度较高。此外,在实验过程中还发现,当 Genefinder 在上样前与 DNA 混匀后再电泳时,DNA 片段的电泳迁移率会有一定程度的降低,因此,不能用于准确地判断 DNA 条带的大小,只适用于简单的电泳试验,如胶回收、简单 PCR 产物分析等。上述结果提示,对于 PCR 产物而言,条带大小的不同可能是 PCR 产物的大小不同或同一 PCR 产物的染料浓度不同所致^[8-10]。

综上所述,Genefinder 是花青素类的染料,安全、环保,灵敏度高,对琼脂糖凝胶中的 DNA/RNA 进行染色,可以作为 EB 的替代品用于实验室的常规检测;在实验条件相同的情况下,使用胶染法进行染色可以得到清晰整齐的染色条带,与预染样品法及胶染法+预染样品法相比较,是比较理想的染色方式,而且可以减少电泳中 Genefinder 对核酸迁移率的影响。

参考文献

- [1] Bensaude O. Ethidium bromide and safety-readers suggest alternative solutions[J]. Trends Genet,1988,4(4):89-90.
- [2] Lunn G,Sansone EB. Ethidium bromide;destruction and decontamination of solutions[J]. Anal Biochem,1987,162(2):453-458.
- [3] Lunn G. Decontamination of ethidium bromide spills [J]. Trends Genet,1990,6(2):31-34.
- [4] 张全波,冉黎,陆长青,等. 四种核酸荧光染料在琼脂糖凝胶中染色特性的比较分析[J]. 四川解剖学杂志,2007,15(3):11-13.
- [5] 王洪梅,李艳霞,王福德,等. Genefinder 和 Goldview 两种核酸染料的灵敏度比较[J]. 林业科技,2012,37(6):1-3.
- [6] 赵伟,方炳雄,牛宇杰,等. 3 种常见核酸染料的安全性和灵敏度研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(22):2954-2958.
- [7] 崔成德,王克林,李滨,等. Genefinder 和 EB 在 DNA 电泳谱带定量分析中的比较[J]. 安徽农业科学,2008,36(2):452-453.
- [8] 刘阳,杨淑霞,李敏惠,等. 三种染色方式下四种核酸染料的灵敏度比较[J]. 成都医学院学报,2008,3(1):20-23.
- [9] 常冰梅,张栋,李美宁,等. 一种新型核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的应用[J]. 现代预防医学,2010,37(19):3717-3718.
- [10] 娄静,刁保卫,李伟,等. 三种核酸染料应用于细菌脉冲场凝胶电泳染色的比较研究[J]. 疾病监测,2011,26(5):388-391.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-07-06)

(上接第 3183 页)

[13] Brinker JP, Herrmann JE. Comparison of three monoclonal antibody-based enzyme immunoassays for detection of herpes simplex virus in clinical specimens [J]. Eur

J Clin Microbiol Infect Dis,1995,14(4):314-317.

(收稿日期:2015-04-29 修回日期:2015-06-24)