

## · 基础研究论著 ·

## 3 种常见核酸染料的安全性和灵敏度研究\*

赵 炜<sup>1,2</sup>, 方炳雄<sup>1,3</sup>, 牛宇杰<sup>1,2</sup>, 赵 彤<sup>4</sup>, 何金勇<sup>4</sup>, 刘新光<sup>1,2</sup>(1. 广东医学院衰老研究所, 广东东莞 523808, 2. 广东省医学分子诊断学重点实验室, 广东东莞 523808;  
3. 普宁市人民医院检验科, 广东普宁 515300; 4. 广东医学院医学检验学院, 广东东莞 523808)

**摘要:**目的 探讨 Gold View、溴化乙锭(EB)、SYBR Green I 3 种实验室常用核酸染料的安全性与灵敏度, 筛选出具有较高安全性和灵敏度的核酸染料。方法 采用正常人胚肾细胞为研究对象, 对比研究 Gold View、EB、SYBR Green I 对细胞增殖和细胞周期的影响; 分别使用 3 种核酸染料对凝胶中的 DNA 进行染色, 比较其灵敏度。结果 SYBR Green I 对 HEK-293 细胞的周期与增殖影响最小, Gold View 的影响最大。SYBR Green I 和 Gold View 对 DNA 染色的灵敏度相当, 略低于 EB。结论 SYBR Green I 具有较高安全性和较高的灵敏度。

**关键词:**核酸染料; Gold View; 溴化乙锭; SYBR Green I; 安全性; 灵敏度

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.005

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)22-2954-02

## The biological safety and sensitivity of three kinds of nucleic acid dyes\*

Zhao Wei<sup>1,2</sup>, Fang Bingxiong<sup>1,3</sup>, Niu Yujie<sup>1,2</sup>, Zhao Tong<sup>4</sup>, He Jinyong<sup>4</sup>, Liu Xinguang<sup>1,2</sup>(1. Institute of Aging Research, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan, Guangdong 523808, China;  
3. Department of Clinical Laboratory, Puning People's Hospital, Puning, Guangdong 515300, China;  
4. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the biological safety and sensitivity of Gold View, EB and SYBR Green I, so as to choose the most sensitivity and safety one. **Methods** HEK293 cells were used as the model. The nucleic acid dye's influence to the cell proliferation and cell cycle had been valued through staining the nucleic acid by Gold View, EB, and SYBR Green I respectively and detecting the sensitivities of staining DNA. **Results** SYBR Green I had the minimal influence to HEK-293 cells' cycle and proliferation. Gold View had the worst influence. The detection sensitivities of DNA stained by SYBR Green I and Gold View were the same, but less than that of DNA stained by EB. **Conclusion** SYBR Green I has high safety and sensitivity of staining DNA.

**Key words:** nucleic acid stain; Gold View; EB, SYBR Green I; safety; sensitivity

荧光核酸染料主要运用于 RNA/DNA 电泳凝胶染色。溴化乙锭(EB)曾是实验室最常用的荧光染料, 它含有一个可以嵌入 DNA 堆积碱基之间的三环平面基团, 这个基团的固定位置与碱基十分接近, 导致 EB 与 DNA 结合呈现荧光<sup>[1]</sup>。正因如此, EB 也是一种强诱变剂, 并有中等毒性<sup>[2]</sup>, 对实验操作人员与周围环境都有较大危害<sup>[3-4]</sup>。因此, 近些年陆续出现了 EB 的替代物。例如 Gold View(GV)、SYBR Green I、Genfinder<sup>[5]</sup>等, 都是目前比较常见的核酸染料。由于这些 EB 替代物都可以与 DNA 结合, 例如, SYBR Green I 荧光染料与双链 DNA 结合从而产生荧光<sup>[6]</sup>, 因此也存在一定的安全隐患。

长期在实验室里的工作人员、检验技师等, 经常与这些染料接触, 因此身体健康存在一定的威胁。对几种常用的核酸染料 GV、EB、SYBR Green I 的安全性与灵敏度研究, 对实验者在核酸荧光染料的选择和安全防范上有着重要的指导意义。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人胚肾细胞(HEK293)为本实验室保存。

**1.2 仪器与试剂** 倒置相差显微镜(Leica), CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Scientific), 酶标仪(Biotech), 流式细胞仪(BD), DNA 电泳系统(BIORAD), 凝胶成像系统(UVP)。Gold View、EB 购自广州博奥生物技术有限公司, SYBR Green I 购自北京索莱宝科技有限公司, 按照试剂使用说明, 工作浓度都为

1:10 000; CCK-8 试剂盒(WST-8), 购自同仁化学; DMEM 培养基、新生牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; 碘化丙啶(PI) 购自 Sigma 公司, 电泳级琼脂糖、DNA 上样缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司, DNA 电泳样品为本实验纯化保存的 PCR 产物, 大小为 525 bp。

## 1.3 方法

**1.3.1 人胚肾细胞(HEK293)细胞的培养** 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下用 DMEM 完全培养基(含 10% 新生牛血清、青霉素终浓度为 200 U/mL, 链霉素终浓度为 250 U/mL)培养。每 2 天传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

**1.3.2 流式细胞仪测细胞周期** 取对数生长期细胞, 计数, 等量接种于 12 孔板中, 培养过夜后, 分别加入 Gold View、EB、SYBR Green I 各 3 孔, 使三者的浓度为说明书推荐工作浓度的十倍, 并且保持每孔的终体积一致。对照组中不加任何核酸染料, 体积用 PBS 补齐。继续培养 24 h 后用流式细胞仪对细胞进行细胞周期分析。

**1.3.3 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖** 取对数生长期细胞, 计数, 等量接种于 12 孔板, 培养过夜后, 分别加入 Gold View、EB、SYBR Green I 各 3 孔, 使它们的终浓度为说明书推荐工作浓度的 10 倍, 并且保持每孔的终体积一致, 对照组中不加任何核酸染料, 体积用 PBS 补齐。继续培养 10 h 后每孔加入等量

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101051); 广东医学院大学生创新实验项目(2010ZYDC005)。 作者简介: 赵炜, 男, 助理研究员, 主要从事细胞增殖与衰老的分子机制研究。

CCK-8 继续培养。然后连续测定 10 个时间点(0、1、2、3、5、7、9、11、13、24 h)的吸光度(A)值。

**1.3.4 Gold View、EB、SYBR Green I 的灵敏度对比** 配置 3 份 1% 的琼脂糖凝胶, 分别加入 EB、SYBR Green I、GV, 使它们的终浓度为说明书推荐工作浓度。待凝胶冷却凝固后, 放入电泳槽中, 分别将 50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.34 ng 的 DNA 与上样缓冲液混匀后于不同泳道加入。在 110 V 恒压条件下同时进行电泳, 最后用凝胶成像系统在同一曝光条件下观察拍照。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理, 采用独立样本 *t* 检验进行显著性分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 流式细胞仪检测细胞周期结果**  $G_1$  期变化为: 相对于对照组(62.2%), Gold View 组(83.8%)增加了 21.6% ( $P < 0.01$ , 差异有统计学意义), EB 组(46.4%)降低 15.8% ( $P < 0.05$ , 差异有统计学意义), SYBR Green I 组(56.9%)降低 5.3%。 $G_2/M$  期变化为: 相对于对照组(11.9%), Gold View 组(16.2%)增加 4.3%, EB 组(15.2%)增加 3.3%, SYBR Green I 组(15.4%)增加 3.5%。S 期变化为: 相对于对照组(25.9%), Gold View 组(0.0%)几乎检测不到处于 S 期的细胞 ( $P < 0.01$ , 差异有统计学意义); EB 组(38.4%)增加 12.5% ( $P < 0.05$ , 差异有统计学意义), SYBR Green I 组(27.7%)增加 1.8%。可见, Gold View 对细胞周期造成的变化最大, EB 次之, SYBR Green I 对细胞周期造成的变化最小。

**2.2 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖** 通过连续监测细胞培养物的吸光度(A)值, 发现添加了 Gold View、EB 的细胞增殖情况速度明显低于 SYBR Green I, SYBR Green I 组和对照组之间的差异不大, 见图 1。

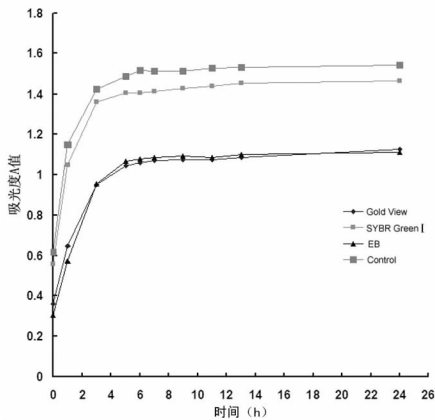


图 1 3 种核酸染料对细胞增殖的影响比较

**2.3 Gold View、EB、SYBR Green I 的灵敏度对比** Gold View、EB、SYBR Green I 这 3 种核酸染料对 DNA 染色的灵敏度对比, 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。结果表明 3 种核酸染料中灵敏度最高的是 EB, 能检测到的 DNA 是 0.78 ng, SYBR Green I 与 Gold View 的灵敏度大致相当, 能够检测到的 DNA 是 1.56 ng。3 种染料染出的 DNA 条带边缘清晰、锐利, 背景清楚, 无明显拖尾现象。条带亮度差异符合 DNA 各条带本身含量差异, 条带迁移速率基本一致, 但 SBRY Green I 染色的背景较深, EB 的背景最浅。

**3 讨论**

EB 是一种常规核酸染料, 被广泛用于观察、检测琼脂糖凝胶与聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA/RNA, 它与 DNA 的结合几乎

没有碱基序列特异性。在高离子强度的饱和溶液中, 大约每 2.5 个碱基插入 1 个溴化乙锭分子。当染料分子插入后, 其平面基团与螺旋的轴线垂直并通过范德华力与上下碱基相互作用。这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近, 导致染料与 DNA 结合并在紫外线激发下呈现荧光<sup>[2]</sup>。然而, EB 具有强烈的致突变能力和中度致癌性, 对实验操作人员和环境都有较大的危害性, 而且作为实验室废弃物处理的步骤比较复杂。因此许多实验室都致力于研发更加安全高效的核酸染料。

SYBR Green I 属花青类染料, 是几年前推出的一种高灵敏度且不具有强致突变性的核酸染料<sup>[7-8]</sup>, 它的作用机制是结合于双链 DNA 的小沟, 最大吸收波长约为 497 nm, 最大发射波长约为 520 nm。但其价格较高限制了它的广泛使用。Gold View 是国内较早使用的新型核酸染料, 它的灵敏度比 EB 略低, 价格是这 3 种染料中最便宜的, 但是目前国内对 Gold View 的安全性存在一定的疑问, 认为其含有致突变的吡啶橙<sup>[9]</sup>。

通过实验发现, 相对于不添加任何染料的对照组, 10 倍工作浓度的 Gold View 严重影响了细胞周期的 S 期。S 期是细胞内 DNA 复制的时期, 因此分析 Gold View 很可能影响了参与细胞 DNA 复制相关蛋白的表达, 也有可能对 DNA 的物理结构造成直接的损伤, 进而导致 DNA 复制发生阻滞。Gold View 同时也显著影响了细胞的  $G_1$  期, 有大量细胞阻滞在  $G_1$  期,  $G_1$  期是细胞有丝分裂到 DNA 复制前的一段时期, 此时期主要合成 RNA 和核糖体, 为下阶段 S 期的 DNA 复制作好物质和能量的准备。这和本实验没能检测到 S 期细胞的结果相吻合。在显微镜下观察也发现, Gold View 处理细胞 24 h 之后, 细胞形态明显变圆, 出现空泡状结构, 透光性变差。

相对于对照组, 10 倍工作浓度的 EB 同样也显著影响了细胞的  $G_1$  期和 S 期, 使处于 S 期的细胞比例上升。这提示 Gold View 和 EB 很可能通过不同的途径影响了细胞周期的不同时期。

为了进一步探讨这 3 种核酸染料是否会影响细胞的增殖和代谢情况, 本研究利用 CCK8 试剂盒, 检测 3 种核酸染料对细胞增殖活动的影响。CCK8 的工作原理为: 在电子耦合试剂存在的情况下, CCK8 可以被线粒体内的脱氢酶还原生成高度水溶性的橙黄色的甲臞产物。颜色的深浅与细胞的增殖成正比, 与细胞毒性成反比。使用酶标仪测定吸光度值, 可以间接反映活细胞数量, 提示细胞生理代谢活动的旺盛与否。

结果显示, 相对于不添加任何染料的对照组, Gold View、EB 显著降低了细胞增殖(代谢)速率, SYBR Green I 对细胞的增殖无显著影响。这和细胞周期检测的结果大致相同。

本研究还同时检测了 3 种核酸染料检测 DNA 的灵敏度, 结果显示 EB 的灵敏度最好, 背景清晰。Gold View、SYBR Green I 的灵敏度大致一样, 略低于 EB, 只是 SYBR Green I 的背景相对较深。汪姝等<sup>[10]</sup>、黄庆等<sup>[11]</sup>也报道, SYBR Green I 的灵敏度略低于 EB。但是也有报道称 SYBR Green I 的灵敏度比 EB 高 24~100 倍<sup>[12]</sup>。造成这些不同结论的原因可能有以下几点: (1) 可能与 DNA 染色的方法有关, 通常有 3 种染色方法, 把染料与 DNA 样品混匀后直接电泳; 制胶时把染料加入; DNA 电泳结束之后对凝胶进行染色。采用不同的染色方法可能会造成结果的差异。(2) 与电泳使用的 DNA 样品相对分子量有关, 通常 DNA 片段越大, 更易着色。(3) 与产品的组成成分有关, 不同公司的产品配方可能不同, 进而造成产品的稳定性、灵敏度存在差异。

在以上 3 种核酸染料中, SYBR Green I (下转第 2958 页)

结果显示, AS 组患者 BsmI 的基因频率、等位基因频率分布均与对照组健康者有显著性差异, AS 组患者中 Bb 基因型、B 等位基因频率均高于健康对照组, 提示 VDR BsmI 基因多态性与 AS 有一定的相关性, B 等位基因可能增加 AS 的易感性。本文通过对 AS 患者的研究提示: AS 的发生发展可能与 VDR 基因型有关, 如能早期进行 VDR 基因型检测, 及早干预, 对于预防 AS 的发生有重要意义。但是 VDR 基因多态性在 AS 的发病中所起的作用需要进一步阐明。

参考文献

[1] Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, et al. ANKH and susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis[J]. J Rheumatol, 2012, 39(1): 131-134.

[2] Özbas H, Tutgun Onrat S, Özdamar K. Genetic and environmental factors in human osteoporosis[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 11289-11296.

[3] Horst-Sikorska W, Dytfeld J, Wawrzyniak A, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and fractures in postmenopausal women with osteoporosis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(1): 383-390.

[4] Reveille JD. Recent studies on the genetic basis of ankylosing spondylitis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11(5): 340-348.

[5] Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(1): 58-67.

[6] Monticicli OA, Teixeira Tde M, Chies JA, et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(10): 1411-1421.

[7] Feng M, Li H, Chen SF, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-anal-

ysis[J]. Endocrine, 2013, 43(2): 318-326.

[8] El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Marzouk S, et al. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2013, 73(1): 75-81.

[9] Laczmanski L, Milewicz A, Lwow F, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and cardiovascular risk variables in elderly Polish subjects[J]. Gynecol Endocrinol, 2013, 29(3): 268-272.

[10] Barbara M, Uwe L, Gerwig F, et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism, bone density and inflammatory activity of patients with ankylosing spondylitis[J]. Osteoporos Int, 2003, 14(12): 995-1000.

[11] 王秀玲, 朱秀英, 聂英昆, 等. 地区部分汉族人群维生素 D 受体 BsmI 基因多态性与骨质疏松性骨折关系的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(10): 692-695.

[12] 郑敏, 罗建明. 广西地区儿童维生素 D 受体基因 BsmI 和 Tru9I 酶切位点多态性分别[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(7): 513-515.

[13] Kang TJ, Jin SH, Yeum CE, et al. Vitamin D Receptor Gene TaqI, BsmI and FokI Polymorphisms in Korean Patients with Tuberculosis[J]. Immune Netw, 2011, 11(5): 253-257.

[14] Mostowska A, Lianeri M, Wudarski M, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 803-810.

[15] Fedirko V, Riboli E, Tjønneland A, et al. Prediagnostic 25-hydroxyvitamin D, VDR and CASR polymorphisms, and survival in patients with colorectal cancer in western European populations [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(4): 582-593.

(收稿日期: 2013-05-20)

(上接第 2955 页)

是一种简便、安全、灵敏度较高的 EB 替代核酸染料, 能够很好地用于琼脂糖凝胶中核酸的常规染色。Gold View 虽然灵敏度可以达到实验室的常规检测需求, 价格也很便宜, 但是从影响细胞周期和增殖代谢的角度来讲, 存在一定的安全隐患。

由于本实验中所检测的 3 种核酸染料都是来源于市场上的即用型商品, 不了解其详细的配方和成分, 若要进一步研究核酸染料的致癌、致畸性, 则需要从其详细成分着手, 进一步通过动物实验确认, 例如通过裸鼠皮下注射试验、Ames 试验<sup>[13]</sup>、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变等试验来确定其生物安全性。

应当指出的是, 核酸染料使核酸着色的机制都是要特异地与核酸结合, 从这个角度来讲, 核酸染料或多或少都存在一定的风险, 尤其是实验室工作人员、医院检验技师等与核酸染料长期接触的工作者, 要注意采取防护措施, 并且妥善处理废弃核酸染料和凝胶, 将核酸染料对环境的影响降到最低。

参考文献

[1] 蒋玲艳, 王林果. 核酸染料的应用研究进展[J]. 玉林师范学院学报: 自然科学, 2006, 27(3): 131-133.

[2] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 1995: 304-315.

[3] Bensaude O. Ethidium bromide and safety-readers suggest alternative solutions[J]. Trends Genet, 1988, 4(4): 89-90.

[4] Lunn G, Sansone EB. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions[J]. Anal Biochem, 1987, 162(2): 453-458.

[5] 陈云娇, 陈莉敏, 美亮, 等. 核酸染料 Genefinder 使用方法的比较[J]. 生物技术, 2011, 21(5): 66-68.

[6] 刘歆, 徐根明, 郭江峰, 等. 基于 SYBR Green I 的双链 DNA 定量法[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 55-56.

[7] Karlsen F, Steen HB, Nesland JM. SYBR Green I DNA staining in creases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2002, 55(1): 153-156.

[8] Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)[J]. Mutat Res, 2002, 439(1): 37-47.

[9] Martin SE, Adams GH, Schillaci M, et al. Antimutagenic effect of selenium on acridine orange and 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene in the Ames Salmonella/microsomal system[J]. Mutat Res, 1981, 82(1): 41-46.

[10] 汪姝, 李彪, 刘惠民. 四种核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性[J]. 吉林农业, 2011, 261(11): 74.

[11] 黄庆, 府伟灵, 赵渝徽, 等. 核酸荧光染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(11): 1316-1318.

[12] 李丽. 高灵敏度荧光染料 SYBR 的性质及应用[J]. 实用医技杂志, 2012, 19(8): 868-869.

[13] Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test[J]. Mutat Res, 1975, 31(6): 347-3641.

(收稿日期: 2013-05-15)