

核酸染料 GeneGreen 可影响 DNA 琼脂糖凝胶电泳条带的质量

马强^{1,2,3}, 蔡燕^{1,2,3}, 徐磊³, 廖何斌³, 邹江², 孙茹², 郭晓兰^{1,2,3,△}

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系, 四川南充 637000;

3. 川北医学院转化医学研究中心, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨 DNA 琼脂糖凝胶电泳条带扭曲、“拖尾”的原因。方法 采用“胶染法”和“后染法”2 种方法, 检测含 2 种核酸染料(GeneGreen 和溴化乙锭)的琼脂糖凝胶中 3 种 DNA Marker 条带形态。结果 采用“胶染法”的方式电泳, 与相同浓度的溴化乙锭相比, 含 1:10 000 和 1:5 000 2 种浓度的 GeneGreen 琼脂糖凝胶中 3 种 DNA Marker 条带呈现明显的扭曲和“拖尾”现象。而采用“后染法”的方式后, 两种核酸染料所染的琼脂糖凝胶中 3 种 Marker 的条带均呈单一、无扭曲和“拖尾”现象。**结论** 核酸染料 GeneGreen 可以影响琼脂糖凝胶电泳时 DNA 条带的质量。在排除 DNA 本身质量、琼脂糖凝胶质量、电泳液质量以及电压等因素后, 若采用“胶染法”进行 DNA 核酸电泳时出现条带扭曲或“拖尾”时, 应考虑到核酸染料质量的问题。采用“后染法”或更换核酸染料的种类可改善 DNA 电泳条带的质量。

关键词:凝胶电泳; 溴化乙锭; DNA 条带

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.11.002

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)11-1286-03

文献标识码:A

Nucleic acid dye GeneGreen can influence the quality of DNA bands in agarose gel electrophoresis

MA Qiang^{1,2,3}, CAI Yan^{1,2,3}, XU Lei³, LIAO Hebin³, ZOU Jiang², SUN Ru², GUO Xiaolan^{1,2,3,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Translational Medicine Research Center of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To explore the causes of twisted or tailed DNA bands in agarose gels after electrophoresis. **Methods** Prestained and poststained methods were employed to exam 3 kinds of DNA marker bands in agarose gel with GeneGreen and Ethidium Bromide, respectively. **Results** Three kinds of DNA marker bands in agarose gel with 1:10 000 and 1:5 000 concentration of GeneGreen showed obvious distortions and trailing phenomena compared with the same concentration of Ethidium Bromide when the prestained method was used for electrophoresis, which were improved when the poststained method was used in agarose gel with GeneGreen and Ethidium Bromide, respectively. **Conclusion** Nucleic acid dye GeneGreen can affect the quality of DNA bands in agarose gel electrophoresis. When the quality of DNA itself, agarose gel quality, electrophoretic fluid quality and voltage are excluded, the quality of nucleic acid dye should be taken into consideration if the bands twisting or tailing occurs when the DNA nucleic acid electrophoresis is carried out by prestained method. The quality of DNA electrophoresis bands can be improved by using poststained method or replacing nucleic acid dye.

Key words: gel electrophoresis; ethidium bromide; DNA bands

核酸琼脂糖凝胶电泳是现代分子生物学的重要技术,但由于步骤繁多,研究人员可能会遇到各种各样的问题。DNA 琼脂糖凝胶电泳所需要的试剂包括琼脂糖粉末、核酸染料、电泳缓冲液等,琼脂糖粉末溶解的质量、电泳缓冲液的质量、电压的大小、PCR 产物的质量、加样孔的大小以及上样过程等都可以影响 DNA 电泳条带的质量^[1]。溴化乙锭是应用比较广泛的核酸染料,具有染色效果好、易储存、性质稳定、价格便宜和操作简便等优点,但相比于新的核酸染料

Gelgreen、GelRed、SYBRGreen 和 GeneGreen,溴化乙锭具有遗传毒性大、灵敏度低等缺点^[2],近年已被多种新型的核酸染料所替代^[3-4]。笔者团队在实验过程中发现,用天根生化科技有限公司生产的 GeneGreen 核酸染料,采用“胶染法”的方式进行电泳, DNA Marker 较大相对分子质量的 DNA 条带出现弯曲且有“拖尾”现象,在排除电泳液、琼脂糖凝胶质量和电压等原因后仍未获得较好的条带;而用“后染法”后可获得较好质量的 DNA 电泳图。现报道如下。

作者简介:马强,男,主管技师,主要从事肿瘤分子遗传学基础研究。△ **通信作者,**E-mail:alan5200@hotmail.com。

本文引用格式:马强,蔡燕,徐磊,等.核酸染料 GeneGreen 可影响 DNA 琼脂糖凝胶电泳条带的质量[J].国际检验医学杂志,2018,39(11):1286-1288.

1 材料与方法

1.1 试剂 DNA Marker II (800、900、1 000、1 100、1 200、1 300、1 400、1 500、1 600、1 700 bp)、DNA Marker III (200、500、800、1 200、2 000、3 000、4 500 bp)、DM10000 (250、500、1 000、2 000、4 000、7 000、10 000 bp) 均购自北京康为世纪公司。琼脂糖粉末 (西班牙)、核酸染料 GeneGreen 10 000× (天根生化科技有限公司)、溴化乙锭、TBE (0.5×)。

1.2 仪器 主要仪器包括电泳仪 (北京六一仪器厂)、凝胶成像系统 (FusionFX7 Spectra)、电子天平。

1.3 方法

1.3.1 制胶 1% 琼脂糖凝胶 (含核酸染料): 取 2 个 200 mL 锥形烧瓶。分别量取 40 mL 0.5× TBE 电泳缓冲液于锥形烧瓶中, 称取 0.4 g 琼脂糖凝胶粉末, 倒入烧瓶, 摇匀。在微波炉中加热沸腾至琼脂糖粉末完全溶解, 冷却。待冷却到约 50 °C 时分别加入 4 μL 和 8 μL 的 GeneGreen (终浓度 1× 和 2×), 摇匀后倾倒入至胶模中, 冷却。按照同样的方法再制备 2 块含溴化乙锭的琼脂糖凝胶 (终浓度 1× 和 2×)。

1% 琼脂糖凝胶 (不含核酸染料): 取 2 个 200 mL 锥形烧瓶。分别量取 40 mL 0.5× TBE 电泳缓冲液于锥形烧瓶中, 称取 0.4 g 琼脂糖凝胶粉末, 倒入烧瓶, 摇匀。在微波炉中加热沸腾至琼脂糖粉末完全溶解。待温度降低到约 50 °C 时倾倒入至胶模中, 冷却。

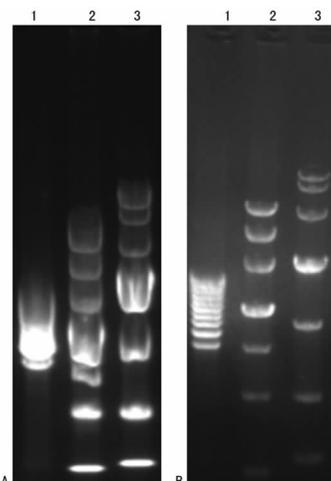
1× GeneGreen 溶液和 1× 溴化乙锭溶液: 取 40 mL 的 TBE 缓冲液至胶模中, 加入 4 μL 的 GeneGreen (10 000×), 配成 1× 的 GeneGreen 溶液。另取 40 mL 的 TBE 缓冲液至胶模中, 加入 4 μL 的溴化乙锭储存液 (10 000×), 配成 1× 的溴化乙锭溶液。

1.3.2 电泳、染色及拍照 用 10 μL 的移液器分别取 5 μL DNA Marker II、DNA Marker III 和 DM10000 的 Marker, 垂直加入凝胶的加样孔里, 恒压 5 V/cm 电泳 30 min, 加入核酸染料的凝胶直接在凝胶成像系统中观察, 拍照。未加入核酸染料的凝胶分别在 1× 的 GeneGreen 溶液和 1× 溴化乙锭溶液中染色 30 min 后, 于凝胶成像系统中观察并拍照。

2 结果

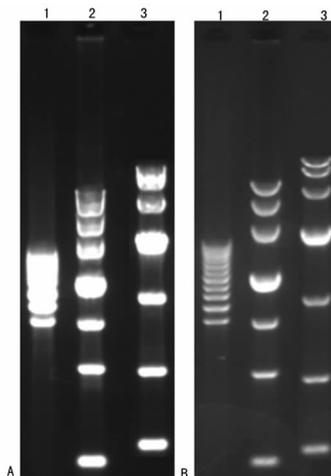
2.1 1× GeneGreen 和 1× 溴化乙锭对 DNA Marker 条带形状的影响 在含 1× GeneGreen 的琼脂糖凝胶中, 3 种 DNA Marker 的较大条带均不单一, 呈“拖尾”现象; 而最小的 Marker 条带单一, 无扭曲和“拖尾” (图 1A)。在含 1× 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中, 3 种 DNA Marker 的条带均呈现单一的条带 (图 1B)。

2.2 2× GeneGreen 和 2× 溴化乙锭对 DNA Marker 条带形状的影响 在含 2× GeneGreen 的琼脂糖凝胶中, 3 种 DNA Marker 较大相对分子质量的条带均不单一, 而较小相对分子质量的条带无扭曲和“拖尾”, 但总体质量较 1× 核酸染料的凝胶好; 而在 2× 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中, 3 种 DNA Marker 的条带均呈现单一的条带, 与 1× 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中的条带质量无明显差异 (图 2)。



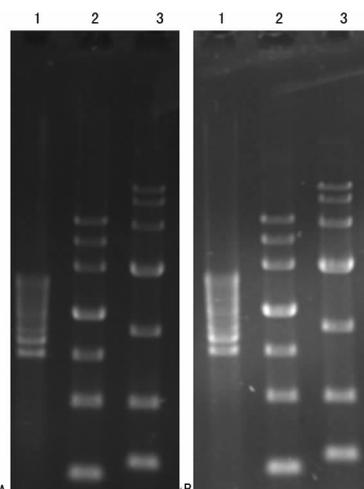
注: A 为 1× GeneGreen; B 为 1× 溴化乙锭; 1 为 DNA Marker II; 2 为 DNA Marker III; 3 为 DM10000

图 1 含 1× GeneGreen 和 1× 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中 DNA Marker 条带形状



注: A 为 2× GeneGreen; B 为 2× 溴化乙锭; 1 为 DNA Marker II; 2 为 DNA Marker III; 3 为 DM10000

图 2 含 2× GeneGreen 和 2× 溴化乙锭的琼脂糖凝胶中 DNA Marker 条带形状



注: A 为 1× GeneGreen; B 为 1× 溴化乙锭; 1 为 DNA Marker II; 2 为 DNA Marker III; 3 为 DM10000

图 3 电泳后核酸染料染色的琼脂糖凝胶中 DNA Marker 条带形状

2.3 “后染法”对 DNA Marker 条带形状的影响 采

用核酸电泳后琼脂糖凝胶染色的方式, $1 \times$ GeneGreen (图 3A) 和 $1 \times$ 溴化乙锭 (图 3B) 两种核酸染料的琼脂糖凝胶中均可以见条带单一、无扭曲的 DNA 条带。

3 讨 论

核酸染料可以和核酸分子结合, 在激发光的照射下发射荧光, 从而指示核酸的位置及大致的含量。高质量 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果是亮度适中、无“拖尾”或弥散现象、条带单一的信号。由于 DNA 琼脂糖凝胶电泳所需的步骤和试剂多, 任何一个环节出错均可能导致电泳失败。

笔者团队在前期 PCR 产物电泳时发现, DNA 分子呈条带扭曲、不同相对分子质量的 DNA 条带分界不清和出现“拖尾”现象。在降低电压、重新配制电泳缓冲液、更换电泳仪和电泳槽、更换新批次的琼脂糖粉末并且请经验丰富的科研人员重复电泳过程后, 均未得到良好的 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果。在更换核酸染料后, 所有的 PCR 产物呈现出单一、亮度适中、扭曲现象不明显的条带。

本研究发现, 采用胶染法的方式电泳, 在含 $1 \times$ GeneGreen 的琼脂糖凝胶中, DNA Marker 较大相对分子质量的条带扭曲并且出现明显的“拖尾”现象, 而最小相对分子质量的条带 (200 bp; 250 bp) 单一、无扭曲; 将 GeneGreen 的浓度提高到 $2 \times$ 后, 3 种 DNA Marker 的条带的质量有所改善, 较小的 DNA 分子 (800 bp; 250、500、1 000 bp; 200、500、1 000 bp) 均呈现单一的条带, 较大的 DNA 分子依然存在“拖尾”现象。而用含相同浓度溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳后, 不同相对分子质量 Marker 中的 DNA 条带均呈现较单一的条带, 扭曲现象不明显。同时, 将 2 种核酸染料采用“后染法”的方式对琼脂糖凝胶染色时, 均观察到条带单一、无扭曲、亮度适中的 DNA 条带。这些结果提示核酸染料的质量可能影响了 DNA 条带的形态。

溴化乙锭含有一个可以嵌入 DNA 堆积碱基之间的一个三环平面基团, 它与 DNA 的结合没有碱基序列特异性, 直接嵌入 DNA 碱基对之间, 大约每 2.5 个碱基插入一个溴化乙锭分子, 这种结构对 DNA 的空间结构影响不大^[5]。GeneGreen 核酸染料是一种以花青素母体为基础, 将苯环改良成链式结构的油性大分子。该染料不能穿透细胞膜进入活体细胞内, 不易挥发而被吸入人体, 且诱变性远远低于溴化乙锭, 是一种安全无毒、高灵敏的全新核酸染料。GeneGreen 含阳离子基团, 可以与 DNA 的阴离子基团非共价结合, 在激发光照射下发出荧光, 从而指示 DNA 的位置。从实验结果分析, GeneGreen 与较短 DNA 分子结合后, 电泳过程中不会出现 DNA 条带扭曲或“拖尾”现象; 而在与较长 DNA 分子结合后, 能够影响 DNA 条带的形态。在提高 GeneGreen 的浓度后, 这

种现象有所改善, 但是大相对分子质量的 DNA 分子依然呈弯曲和“拖尾”的现象。推测由于 GeneGreen 分子含阳离子基团, 与 DNA 分子结合后改变了 DNA 在琼脂糖凝胶中的迁移速率。由于较小相对分子质量的 DNA 分子可以完全饱和地结合 GeneGreen 分子, 所以相同相对分子质量的 DNA 在电场中泳动速率一致, 不出现“拖尾”现象; 而较大相对分子质量的 DNA 分子不能完全饱和地结合 GeneGreen 分子, 结合不同量的 DNA 分子泳动速度不一致而出现“拖尾”的现象。这种推测也在提高 GeneGreen 浓度后的琼脂糖凝胶电泳中得到证实。而在“后染法”中, DNA Marker 中的 DNA 分子在琼脂糖凝胶中电泳后, GeneGreen 和溴化乙锭均可以与凝胶中的 DNA 分子结合, 不会影响 DNA 分子的迁移, 所有的 DNA 分子条带均呈现出单一、无扭曲、无“拖尾”的信号。“后染法”的结果也进一步证明了笔者的假设, 在 DNA 分子泳动的过程中, 确实是 GeneGreen 质量的改变导致了 DNA 条带的扭曲和“拖尾”。

本研究结果显示, 在核酸电泳时若出现 DNA 或 RNA 分子条带扭曲或出现“拖尾”后, 在排除电压过高、琼脂糖凝胶不均一、电泳液离子强度不适中、PCR 产物本身质量的前提下, 应该考虑到核酸染料的质量问题, 更换核酸染料或可解决。由于“胶染法”对 DNA 条带可以产生不良的影响^[6-7], 此时也可以选择“后染法”来取代“胶染法”从而获得良好的电泳结果。

参考文献

- [1] SAMBROOK J, DW 拉塞尔 著; 黄培堂 等译. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2015.
- [2] HAINES A M, TOBE S S, KOBUS H J, et al. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2015, 36(6): 941-944.
- [3] HUANG Q, BAUM L, FU W L. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis [J]. *Clin Lab*, 2010, 56(3/4): 149-152.
- [4] HUANG Q, FU W L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(8): 841-842.
- [5] 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*, 2006, 27(3): 131-133.
- [6] KONSCHAK R, TINHOFER I. Prestaining of PCR products with SYBR Green for agarose gel electrophoresis: advantages and limitations [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(6): 1069-1071.
- [7] 刘阳, 杨淑霞, 赖翼, 等. 影响琼脂糖凝胶电泳条带扭曲程度的因素 [J]. *生物学杂志*, 2009, 26(2): 70-72.

(收稿日期: 2017-12-04 修回日期: 2018-02-14)