doi: 10. 3969/j. issn. 1007-8096. 2015. 02. 015

· 技术交流 ·

介绍一种新型的核酸染料 DuRed

时姗姗，章如松，马恒辉，王建东，周晓军
（南京军区南京总医院 病理科，南京　210002）

［关键词］　核酸；　GoldView；　EB；　DuRed
［中图分类号］　R446　［文献标识码］　B　［文章编号］1007－8096（2015）02－0122－02

随着分子生物学技术的广泛应用，聚合酶链反应（PCR）已成为实验室最常用的核酸检测技术，其结果的判读依赖于显示 DNA 的染色方法。荧光测定法是测定 DNA 浓度最敏感的分子技术。本文介绍一种新型的核酸染料 DuRed，并用聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 产物进行染色效果的比较，目的在于介绍一种敏感、安全、便捷的核酸染料。

1　材料与方法

1.1　材料　人肠癌细胞株 SW-620（本室冻存）；细胞 DNA 提取试剂（QIAGEN 公司）；PCR 试剂盒（Takara 公司）；GoldView 染料（Labset 公司）；EB 染料（武汉中健发展有限公司）；DuRed（Tianwei 公司）；PCR 仪（ABI 公司）；凝胶图象处理系统（上海天能公司）。

1.2　方法　用试剂提取 SW-620 细胞总 DNA，以此为模板，用上下游引物进行 PCR 扩增，PCR 引物（GRPDH）由本室自行设计。反应为 25 μl 体系：含 PCR master 12. 5 μl，引物各 0. 5 μl（10 mmol/L），cDNA 75 ng，用水补足至 25 μl。94℃ 5 min 预变性后，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，最后 72℃ 延伸 10 min，进行 25、30、35 循环，以检测 3 种染料的敏感性。

10 μl PCR 产物进行聚丙烯酰胺电泳分离（电压 100 V），50～60 min 后将胶置于 GoldView、DuRed 和 EB 终浓度均为 0. 5 μg/ml 溶液中静置 10 min。通过凝胶图象处理系统对电泳条带进行光密度分析，Quantity One 将样本中 GRPDH 条带的平均光密度值作为 GRPDH 表达的相对量。

2　结果

DuRed、GoldView 和 EB 染色结果显示，DuRed、GoldView 和 EB 染色均于 25 个循环出现可见扩增物条带（250 bp），带型清楚（图 1），EB 和 DuRed 在普通紫外凝胶成像系统中无明显差异，Goldview 扩增产物与背景差异不明显，分析不同染料条带差异。

3　讨论

聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法，其分辨率高，可以分离仅有 1bp 差别的不同 DNA 片段，广泛应用于 DNA 序列测定等研究。而荧光测定法是最敏感的 DNA 分析检测方法，在荧光染料与扩增产物结合后，所激发的荧光强度与扩增产物成正比[1]。目前最常用染色方法是 EB（溴化乙锭）染色[2]，嵌入 DNA 双链的配对碱基之间，形成 EB-DNA 复合物，在紫外线激发下发出红色

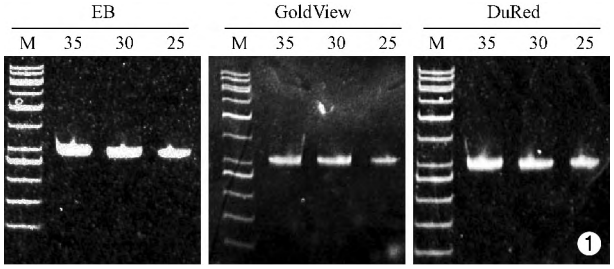

图 1　不同循环数 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳 EB、GoldView 和 DuRed 染色

荧光，从而显示 DNA 的位置。EB 的分子质量小，易挥发，不易生物降解，是一种强诱变剂，具有高致癌性[3]。目前，已报道有更安全的核酸染色方法，如 SYBR Gold、SYBR Green、GoldView、Gene Finder 和 GoldStar 等[4]。GoldView 的主要成分为吖啶橙，是一种煤焦油提取物，在紫外透射光下双链 DNA 呈绿色，单链 DNA 呈红色荧光，不同于 EB 染色下单双链均呈红色荧光。但其也是一种高毒、致癌、高诱变剂[5]，并且需要使用 254 nm 激发的紫外凝胶投射仪或可见光凝胶投射仪观察。本文推荐的 DuRed 是一种独特的油性大分子，不易挥发，不能穿透细胞膜进入活体细胞内，安全无毒[6]，性能稳定，室温可长期保存。艾姆斯测试结果表明，DuRed 在凝胶染色浓度下完全没有诱变剂，因此没有致癌毒性。而且它与 EB 具有相同的光谱特性，无需改变滤光片及观察装置，标准的 EB 滤光片可以适用，使用观察 EB 相同的普通紫外凝胶投射仪观察。

实验中，GoldView、DuRed 与 EB 均可在 25 个循环时检测出扩增产物，30、35 个循环带型清晰，3 种染料在 35 个循环时所测光密度值均明显低于理论值。推断在 30～35 个循环区域已达平台期。比较不同 PCR 循环下的基因产物 GoldView、DuRed 与 EB 染色结果，发现在相同条件下，无论在清晰程度、条带亮度及相邻条带的区分能力等，EB 和 DuRed 染色差异并不明显，DuRed 完全可以取代其他核酸染料。

本实验通过对不同 PCR 循环下的基因扩增带不同染料光密度值进行分析，证实 DuRed 是一种敏感的 DNA 染料，可以检测低浓度 DNA 以及低循环次数的 DNA 扩增产物，与 EB、Goldview 相比，背景、带型清晰度及光密度值均无明显差

（下转第 124 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

化合物，不易挥发，安全无毒，无异味[7]。为加强其透明脱蜡效果，可以增加 1 ~ 2 缸环保透明脱蜡液。⑥当室温较低时可将第一道脱蜡缸放入烤箱内进行脱蜡。

3.4　试剂更换　①为保证染色质量，每天开机后检查试剂量，不足部分及时添加。②根据切片染色效果，失效试剂及时更换。③环保透明脱蜡液不必全部更换，可以废弃前面第一道，后面依次前移，最后一道用新液补充即可。④去脱蜡液的梯度乙醇则需全部更换。⑤分化液及蓝化液应每周更换。脱水透明试剂也可采用部分更换的方法。

3.5　仪器维护　①染色机：除了每日机器外部清洁外，内部不锈钢内壁也应定期清洁，值得注意的是机械臂内含电子部件，不能使用液体清洗。每天应将水洗缸内水放尽，将苏木精水洗缸取出用毛刷清洗，防止长霉。每周取出所有水洗缸进行清洁，防止进水口堵塞。染色机后部排水管在安装时不可平放，避免长期积水长霉，堵塞管道。每半年更换活性炭滤网或取出后暴晒，保证吸附效果。②封片机：封片机更为精密，也更容易出现问题。每天使用前将树胶针头从二甲苯中取出，用后及时放回，防止树胶干结堵塞针头，并每周更换二甲苯。每天完成封片或出现故障后应及时清理玻片，收集盘内和传送轨道上的碎玻璃，必要时打开机器左侧的维护门后取出。盖玻片盒内保持干燥，防止盖片粘连。由于湿封载玻片盒插入槽内难免会沾到树胶，有时会出现插不进玻片的现象，应定期将其稍加温后投入二甲苯内浸泡数分钟，取出后擦拭晾干再用。封片完成后染色架从右侧导轨上滑下，当导轨上出现 2 个染色架时应及时取出染色架，避免后面染色架卡死损坏机器。

参考文献：

[1] 王伯沅，李玉松，黄高昇，等. 病理学技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 132.

[2] Migalkin NS, Iríanov IuM. Modified method of staining semi-thin sections with hematoxylin and eosin[J]. Arkh Patol, 1983, 45(8): 88 – 89.

[3] 龚志锦，詹镕洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海：上海科技出版社，1994. 50 – 51.

[4] 章栽良，魏　萍，李晓虹. 介绍一种改良分化液[J]. 诊断病理学杂志，2008，15(2): 158.

[5] 王永军，刘世正，杨会钗，等. 常规 HE 染色中蓝化方法的改进[J]. 诊断病理学杂志，2005，12(6): 475 – 476.

[6] The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition[M]. 2006: Official Monographs 1043

[7] 马锡慧，石炳毅，韩　永，等. 环保脱蜡液替代二甲苯在肝肾标本病理制片中的应用[J]. 现代检验医学杂志，2012，27(4): 119 – 120.

收稿日期：2013 – 10 – 06

(上接第 122 页)

异，同时具有安全无毒[7]的特点且价格低廉。因此，在试验及临床运用中，DuRed 可以凭借无毒性、灵敏度高、稳定性强、操作简便、适用范围广、无需特殊装置等优势，替代 EB 成为实验室核酸染色的首选。

参考文献：

[1] 丁振若，苏明权. 临床 PCR 基因诊断技术[M]. 西安：世界图书出版公司，1998. 15.

[2] Lunn G. Decontamination of et hidium bromide spills[J]. Trends Genet, 1990, 6(2): 31.

[3] Ouchi RY, Manzato AJ, Ceron CR. Evaluation of the effects of a single exposure to ethidium bromide in drosophila melanogaster (diptera-drosophilidae)[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2007, 78(6): 489 – 493.

[4] Huang Q, Fu WL. 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] Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonel la/ mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)[J]. Mutat Res, 1999, 439(37): 37 – 47.

[6] Huang Q, Baum L, Fu WL. Simple and practical staining of DNA with gelRed in agarose gel electrophoresis[J]. Clin Lab, 2010, 56(3-4): 149 – 152.

[7] 蒲韵竹，王　卓，李春杰. 核酸染料 Goodview、Gelred 和 Gelsafe 对斑马鱼胚胎发育的毒性作用[J]. 国际药学研究杂志，2012, 39(3): 232 – 237.

收稿日期：2013 – 12 – 23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net