

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2017.00947

基于 FLUOstar 平台的小麦 dsDNA 荧光定量与基因型分析

肖永贵¹ Susanne DREISIGACKER² Claudia NUÑEZ-RÍOS² 胡卫国³
夏先春¹ 何中虎^{1,4,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 国家小麦改良中心, 北京 100081; ² International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 06600 México, DF México; ³ 河南省农业科学院小麦研究所, 河南郑州 450002; ⁴ CIMMYT 中国办事处, 北京 100081

摘要: 双链 DNA (dsDNA) 定量分析是植物分子生物学研究的基础, 对基因型分析尤为重要。本研究以 λ 噬菌体 dsDNA 为标准样品, 建立了荧光定量标准曲线, 探讨荧光核酸定量通量性及其与紫外法定量的差异, 并分析荧光染料在基因分型中的应用。结果表明, 荧光染料能够对 dsDNA 进行高效微量定量分析 ($<1.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 但因鉴定核酸的浓度较低, 对小麦籽粒和叶片全基因组 DNA 定量时稀释倍数较大, 易增大浓度误差。降低反应体系量导致标准曲线决定系数降低, 影响测量准确性。精确定量 dsDNA 浓度时, 总反应体系应大于 $200 \mu\text{L}$; 对 PCR 产物进行基因分型时, 总反应体系应不低于 $40 \mu\text{L}$ 。相同 DNA 模板浓度下, FLUOstar 平台可以对抗秆锈病基因显性标记 *csSr32#1* (*Sr32*) 和 *IB-267* (*Sr50*) 的 PCR 产物进行基因型分型, 判断准确率为 100%。对特异性强且等位基因片段差异大 ($>100 \text{ bp}$) 的共显性标记, 如抗叶锈病基因标记 *We173* (*Yr26*) 等, 用荧光染料同样可以进行基因分型。与琼脂糖凝胶电泳相比, 荧光染料鉴定等位基因价格略高, 但方法简单、准确快速、重现性好, 可用于分子育种中世代材料快速筛选。

关键词: 普通小麦; dsDNA; 荧光定量; 显性标记; 分子育种

dsDNA Fluorescent Quantification and Genotyping in Common Wheat by FLUOstar System

XIAO Yong-Gui¹, Susanne DREISIGACKER², Claudia NUÑEZ-RÍOS², HU Wei-Guo³, XIA Xian-Chun¹, and HE Zhong-Hu^{1,4,*}

¹ Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) / National Wheat Improvement Center, Beijing 100081, China; ² International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 06600 México, DF México; ³ Wheat Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; ⁴ CIMMYT China Office, c/o CAAS, Beijing 100081, China

Abstract: Quantitative analysis on double-stranded DNA (dsDNA) lays a foundation in molecular biology research in plants, particularly important for genotyping in molecular breeding. The objective of this study was to establish standard curve for fluorescence quantitative analysis by lambda DNA, to compare the difference between dsDNA value in fluorescence system and ultraviolet spectrophotometry, and to identify the allelic variations of rust resistance genes in wheat. The fluorescent dye could be efficiently performed in the quantitative analysis with micro dsDNA concentration ($<1.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). However, the fluorescent dye could lead to uncertainty of original concentrations of wheat leaf and grain genome DNA, due to more fold serial dilutions for higher DNA concentration. A downward tendency was happened in fluorescent intensity when fluorescent reaction volume was tapered, which influenced the accuracy of DNA concentration. The volume of reaction system mixed nucleic acid and fluorescent dye should be more than $200 \mu\text{L}$ for accurate determination of micro dsDNA. For genotyping on PCR products, the volume of fluorescent reaction system should be more than $40 \mu\text{L}$. FLUOstar could be used for identifying the dominant marker, for instance

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0101804-6), 国家自然科学基金项目(31671691), 国家科技支撑计划项目(2014BAD01B05)和科技部国际合作项目(2013DFG30530)资助。

This study was supported by the Key Project of the National Research and Development Program (2016YFD0101804-6), the National Natural Science Foundation of China (31671691), the National Key Technology R&D Program of China (2014BAD01B05), and the International Science & Technology Cooperation Program of Ministry of Science and Technology (2013DFG30530).

* 通讯作者(Corresponding author): 何中虎, E-mail: zhhecaas@163.com

第一作者联系方式: E-mail: xiaoyonggui@caas.cn

Received(收稿日期): 2016-09-08; Accepted(接受日期): 2017-03-02; Published online(网络出版日期): 2017-03-30.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20170330.0837.002.html>

csSr32#1 (*Sr32*) and *IB-267* (*Sr50*), its accuracy was 100% in correspondence with that from agarose gel electrophoresis. Co-dominant marker with the characteristic of peculiarity and major difference in amplified fragment length (≥ 100 bp), such as *We173* (*Yr26*), could also be identified by fluorescent analysis. Compared with agarose gel electrophoresis method, fluorescent method have a simple, convenient, and rapid operation with high repeatability, and can be used for segregating generations in marker-assisted breeding.

Keywords: Common wheat; dsDNA; Fluorescent quantitative analysis; Dominant marker; Molecular breeding

核酸定量相关技术在生物遗传学研究中应用比较广泛,如微量 DNA 残留检测、深度测序技术、量化 PCR 产物和转基因产物等^[1-2]。随着分子生物学技术的快速发展,核酸定量相关技术也得到相应发展,常用定量方法包括放射免疫法、紫外分光光度计、荧光染料法和物质谱法等。因放射免疫法涉及同位素,物质谱易受其他杂质干扰,使用较少^[3-4]。紫外分光光度法虽然是实验室常用的 DNA 定量方法,操作简单,对设备要求低,但灵敏度低,只能测定总核酸浓度高于 $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 的样品,且测定过程中无法区分单(ssDNA)、双链 DNA (dsDNA)及其他核酸类型,容易导致吸收峰偏差,准确度较低。随着研究需求和仪器的发展,核酸定量的精确度也得到提高,经济高效的荧光定量方法逐渐得到广泛应用^[1,5-6]。

核酸荧光染料是一种能够与特异核酸分子结合发光的染料,属于内嵌染料,信号强度与结合的核酸分子数成正比^[7]。DNA 荧光染料具有通用性好、灵敏度高、所需样品量少、重复性高等优点,广泛用于定量基因表达和基因突变等^[8]。常用的 DNA 染料包括溴化乙锭、PicoGreen、Hoechst 33258、QuantiFluor 等^[3]。溴化乙锭与 DNA 和 RNA 均具有较强的结合性,但无法区分单一类型核酸,并具有较强毒性,最低检测核酸量为 $0.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 。Hoechst 33258 与 dsDNA 的 A-T 碱基对具有较强的特异性,最低检测核酸量为 10 ng mL^{-1} ^[9]。PrcoGreen 和 QuantiFluor 均对 dsDNA 具有特异性^[7,10-11],前者最低检测 250 pg mL^{-1} ,精度高,但试剂价格较高;后者最低检测量为 $0.01 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$,价格相对较低。

分子标记在小麦辅助选择育种中已开始发挥作用,国内已育成中麦 998、中麦 1062、济麦 23 等的品种。具体做法是,在合理选配亲本的基础上,对分离世代的单株进行农艺性状选择,并采用与目标基因紧密连锁的标记或基因特异性标记,结合 PCR 和凝胶电泳技术筛选入选单株的优异等位变异,以提高选择的准确性。入选单株在进行基因型检测过程中,因受 DNA 提取、PCR 和凝胶电泳耗时、费工的技术限制,通常辅助选择基因数目较少。就分子标记辅助选择而言,任何提高目标基因鉴定的技术,

均利于提高分子标记检测速度,加快育种进程。本研究拟分析 FLUOstar 平台下 dsDNA 定量在分子育种中的应用价值,并根据荧光定量原理,探索荧光染料在基因分型中的可行性,为提高分子标记检测效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)正开展聚合主要病害的抗病基因的分子育种项目,拟通过多个抗病基因型亲本杂交,将抗条锈、秆锈、叶锈、赤霉病的主效/微效基因聚合到优异高产品种中,以提高育种材料的持久抗病性和兼抗性。本研究以该项目分子聚合材料中的 2 个 F_2 群体(*Sr32/Baj#1*, 44 个株系; *Reedling#1/Sr50*, 66 个株系)和 1 个 BC_1F_3 群体(*Avocet/Yr26//Avocet*, 59 个株系)作为基因型分析试材,用于分子标记检测。以硬粒小麦 *Alar 84* 和普通小麦 *Berkut* 的籽粒 DNA 为材料,分析籽粒 DNA 与叶片 DNA 定量差异。

2015 年 6 月,将上述 3 个群体种植于 CIMMYT 总部的 El Batan (19.52°N , 98.85°E , 海拔 2275 m),采用单株点播,株距 10~15 cm。拔节期剪取每个单株 1~2 g 叶片,置 2 mL 离心管中,采用 CTAB 法提取全基因组 DNA (<http://www.diversityarrays.com/>),检测并稀释 DNA 浓度至 $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$,用于 PCR。

1.2 扩增引物及分子标记检测

Sr32 源于拟斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*),是秆锈生理小种 Ug99 的有效抗病基因,其与普通小麦杂交创制的 2D-2S#1 易位系,同样具有良好的抗秆锈性,该基因标记 *csSr32#1* (F: 5'-GGT TTGGTGGCAACTCAGGT-3'; R: 5'-CATAAGCCAA AGAGGCACCA-3')为显性标记^[12]。*Sr50* 来自普通小麦与帝国黑麦(*Imperial Rye*)杂交创制的 1BL/1RS 或 1DL/1RS 易位系,定位在 1RS 染色体上,目前对 Ug99 仍具有良好的抗性,该基因标记 *IB-267* (F: 5'-GCAAGTAAGCAGCTTGATTTAGC-3'; R: 5'-AATGGATGTCCCGGTGAGTGG-3')为显性标记^[13]。*Yr26* 在墨西哥是一个有效的抗条锈病基因,位于

1BL 染色体长臂, 该基因标记 *We173* (F: 5'-GGG ACAAGGGGAGTTGAAGC-3'; R: 5'-GAGAGTTCC AAGCAGAACAC-3') 为共显性标记^[14]。

PCR 体系 10 μL , 包括 1 \times Green Go*Taq* Flexi buffer (Promega, 美国, # M891A)、1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol L⁻¹ dNTPs、每条引物 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、0.5 U *Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA 80 ng。反应程序为 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 55 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 36 个循环; 72 延伸 8 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。40 μL 荧光反应体系用于基因分型, 即 PCR 体系 4 μL 、1 \times TE (pH 7.5) 16 μL 和 1 \times QuantiFluor 荧光溶液 20 μL 。

1.3 FLUOstar 系统参数设置及数据处理

采用 FLUOstar Omega 全自动多功能酶标仪 (BMG LABTECH, 德国) 进行荧光测定, 测定温度控制在 18~25 $^{\circ}\text{C}$, 扫描 dsDNA 样品的激发波长为 485 nm, 发射波长为 510 nm。测定时, 增益调节的目标值 (Target value) 为 90%, 原始增益值 (Raw result) 为自动获取。对每个样品扫描一次, 进行 dsDNA 定量和标记检测分析。使用 QuantiFluor dsDNA 反应系统 (Promega, Madison, WI, 美国), 包括 TE 缓冲液 (pH 7.5)、dsDNA 荧光染料和 λ 噬菌体 DNA 标准样 (100 ng μL^{-1})。用 NanoDrop 8000 分光光度计 (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, 法国) 鉴定小麦叶片初始基因组 DNA 浓度, 样品使用量为 2 μL 。

以荧光值为 x 轴, 以 dsDNA 浓度为 y 轴, 通过线性回归绘制标准曲线。将 dsDNA 样品的荧光值直接载入定标软件 Omega MARS, 根据标准曲线对样品定量分析, 在 Microsoft Excel 中绘图。

2 结果与分析

2.1 荧光反应体系与标准曲线建立

分别按照 1/4 倍 (标准样品 A) 和 1/2 倍 (标准样品 B) 稀释 λ 噬菌体 dsDNA 的标准样品, 并设置 7 个浓度梯度, 分别为 0.00024、0.00098、0.00391、0.01563、0.06250、0.25000 和 1.00000 ng μL^{-1} (图 1-A) 和 0.01563、0.03125、0.06250、0.12500、0.25000、0.50000 和 1.00000 ng μL^{-1} (图 1-B)。在 200 μL 反应体系下, 标准样品 A 和 B 的 dsDNA 实际浓度与荧光值之间均具有较好的相关性 ($R^2 > 0.999$, 表 1)。本研究后续 dsDNA 浓度定量计算均采用 200 μL 体系标准样品 A 的标准曲线。

为减少样品使用量, 降低成本, 在 96 孔平底微

量板上分别使用 200 μL (dsDNA 溶液和荧光染料按 1:1 等体积混合)、100 μL 、40 μL 、20 μL 和 10 μL 反应体系进行定量分析。如图 1 和表 1 所示, 随着反应体系降低, 回归曲线斜率逐渐减小。虽然 100 μL 和 40 μL 体系的标准曲线 R^2 也呈下降趋势, 但测定的荧光值波动较小, 较 20 μL 和 10 μL 体系稳定。在 20 μL 和 10 μL 反应体系的低 dsDNA 浓度 (0.0002~0.0040 ng μL^{-1}) 区间, 荧光值时常出现波动, 易产生较大误差。可见, 在进行 dsDNA 定量分析时, 200 μL 反应体系的荧光值最稳定, 建议使用该标准曲线精细定量分析。在对不同基因型间等位基因差异的定性分析时, 可以考虑选择试剂量少且稳定的反应体系, 如 100 μL 或 40 μL 体系。本研究后续基因型分析均采用 40 μL 体系。

2.2 荧光和紫外可见光定量 dsDNA 差异分析

QuantiFluor 染料嵌入 dsDNA 后可发出较强的荧光, 受 ssDNA、RNA 和蛋白质影响较小。由于 DNA 和 RNA 的紫外吸收峰值相同 (均为 260 nm), 紫外分光光度计很难区分 dsDNA、ssDNA 和 RNA。在荧光和紫外可见光两种定量系统下, 对小麦叶片 DNA (图 2-A) 和籽粒 DNA (图 2-B) 的定量分析表明, 紫外可见光测定的 DNA 浓度略高于荧光定量的浓度值, 二者具有较好的相关性 ($P < 0.01$), 而叶片 DNA 浓度相关系数高于籽粒 DNA 相关系数, 与预期一致。因为籽粒 DNA 易受胚乳和糊粉层中蛋白质和多糖污染, dsDNA、ssDNA、RNA、蛋白质等其他吸光物质均对紫外光具有吸光性, 易造成吸收光值偏大, DNA 浓度测定值偏高。

本研究小麦叶片 dsDNA 浓度范围为 500~1200 ng μL^{-1} , 籽粒 dsDNA 浓度范围为 60~900 ng μL^{-1} , 20 ng μL^{-1} 模板 DNA 经过 PCR 扩增后 dsDNA 浓度范围为 5~23 ng μL^{-1} (图 3)。紫外可见光系统 (如 NanoDrop 8000) 测定范围为 2~150 000 ng μL^{-1} , 基本涵盖叶片、籽粒和 PCR 产物 DNA 浓度范围, 但实际测定时, NanoDrop 在低浓度测定值范围内波动较大, 难以获得准确的 PCR 产物 dsDNA 浓度值。QuantiFluor 荧光虽然容易测定低浓度 dsDNA 值 (如 PCR 产物), 但在估测叶片和籽粒 dsDNA 浓度时, 需要对样品原液进行大倍数稀释, 增加定量误差, 降低工作效率。

2.3 荧光强度与基因分型

利用 *Sr32* 和 *Sr50* 基因的显性标记, 分别对两个 F_2 群体的单株进行基因分型。在 *Sr32/Baj#1* 群体的

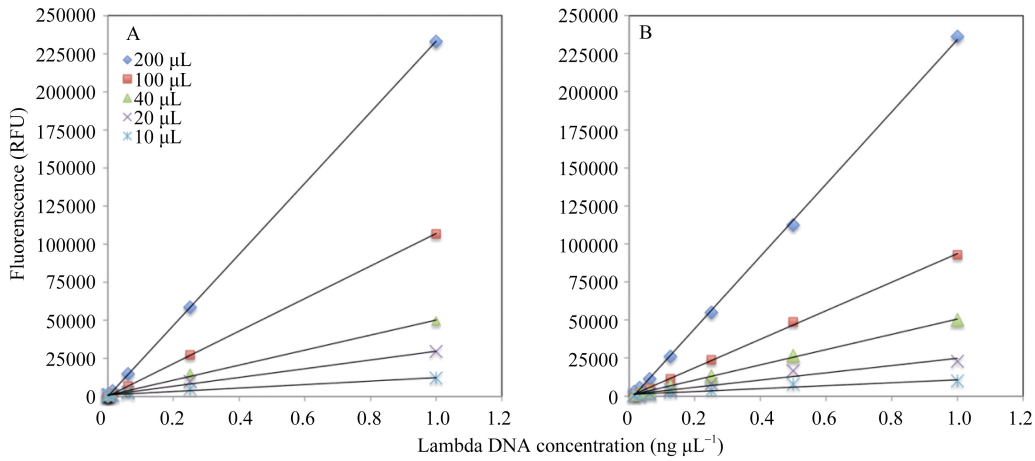


图 1 λ 噬菌体 dsDNA 样品 A 和 B 制作的标准曲线及不同反应体系间的荧光差异

Fig. 1 Lambda dsDNA standard curve in sample A and sample B and the fluorescence differences among four reaction systems

表 1 不同反应体系下 λ 噬菌体 dsDNA 标准浓度 A 和 B 的回归方程

Table 1 Regression equations of lambda dsDNA standard sample A and B under five reaction systems

反应体系 Reaction volume	标准样品 A Standard sample A			标准样品 B Standard sample B		
	回归方程 Regression equation	R^2		回归方程 Regression equation	R^2	
200 μL	$y = 233216x - 41.18$	1.0000		$y = 237280x - 2987.30$	0.9995	
100 μL	$y = 106818x + 143.52$	0.9999		$y = 93735x - 54.23$	0.9992	
40 μL	$y = 49355x + 792.28$	0.9974		$y = 50187x + 545.71$	0.9989	
20 μL	$y = 28697x + 978.69$	0.9954		$y = 23842x + 1095.70$	0.9478	
10 μL	$y = 11364x + 959.20$	0.9810		$y = 9664x + 1131.60$	0.9450	

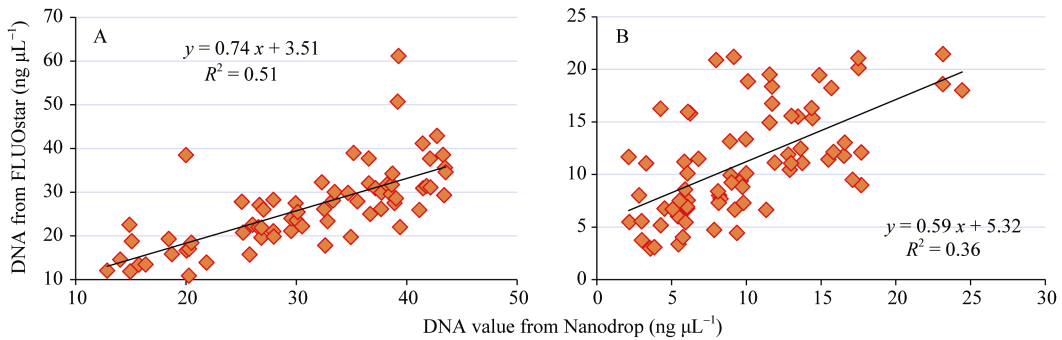


图 2 小麦叶片 DNA(A)和籽粒 DNA(B)分别在荧光和紫外可见光下定量差异

Fig. 2 Difference of DNA quantification in wheat leaf DNA (A) and seed DNA (B) between FLUOstar and NanoDrop

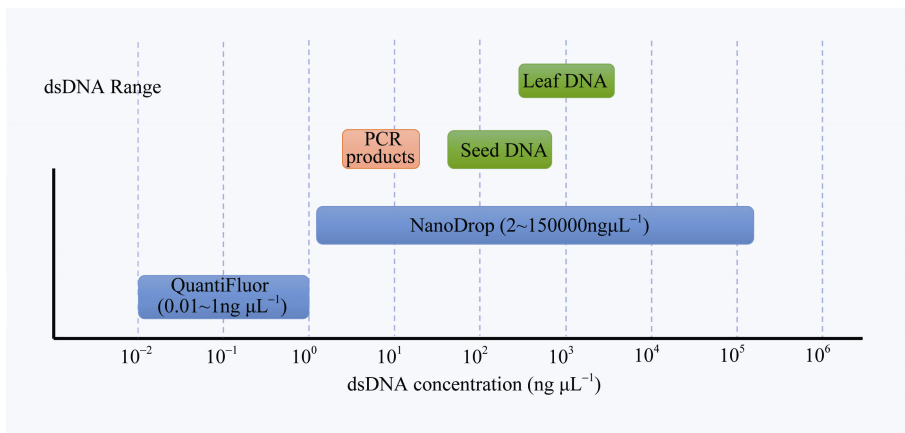


图 3 QuantiFluor 和 NanoDrop 测定的 DNA 浓度范围

Fig. 3 dsDNA measurement range of QuantiFluor and NanoDrop

44 个单株中, 19 个检测到 *Sr32* 扩增片段(图 3-B), 其荧光值为 192 349~259 557 RFU, 而未检测出 *Sr32* 扩增片段的 25 个单株的荧光值仅为 61 899~117 679 RFU (图 3-A), 二者差异极显著 ($P < 0.01$)。在 Reedling#1/Sr50 群体的 66 个单株中 28 个携带 *Sr50* 基因, 其荧光值为 187 571~249 682 RFU, 远高于未携带 *Sr50* 基因的 38 个单株的荧光值(62 117~120 528 RFU)。可见, 荧光染料完全可以对显性标记进行基因分型。

利用共显性标记 *We173*, 对 59 个 BC₁F₃ 单株进行 *Yr26* 基因分型鉴定。琼脂糖凝胶电泳发现 38 个单株可扩增出 189 bp 特异片段, 21 个单株可扩增出 318 bp 特异片段(图 4-B)。这 2 种基因型的荧光值分别为 145 213~176 907 RFU 和 238 685~256 794 RFU, 差异非常明显(图 4-A), 能够有效区分 *Yr26* 基因型。我们尝试用琼脂糖凝胶电泳和荧光染料两种方法, 分析定量等位片段差异小或引物特异性较差的标记 (*Vrn-A1* 和 *Xgwm540*), 结果表明, 前者能够有效分

辨出扩增产物的等位变异, 但等位变异间的荧光强度无显著差异, 无法用后者进行基因分型。

2.4 荧光染料和琼脂糖电泳基因分型的实用性比较

基因鉴定的成本和效率是评价分子育种技术实用性的关键。正常条件下, 每个样品使用荧光染料体系 20 μ L, 分析单个微孔板(96 个样品)的成本约 4.1 美元, 耗时 8 min。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 每个微孔板的琼脂糖试剂(不包括常规化学试剂)成本约 3.0 美元, 耗时 90 min。可见荧光定量分析的最大优势在于节省时间, 非常适合高通量样本检测。虽然荧光染料较琼脂糖电泳成本略高, 但基因分型耗时短, 效率提高近 10 倍。但值得说明的是, 琼脂糖凝胶电泳方法在共显性标记分型中相对稳定, 且能够区分共显性标记的杂合基因型; 荧光定量分析方法对显性标记分型非常有效, 但对共显性标记分型时, 要求引物特异性高、等位变异的片段差异大, 一般应超过 100 bp。

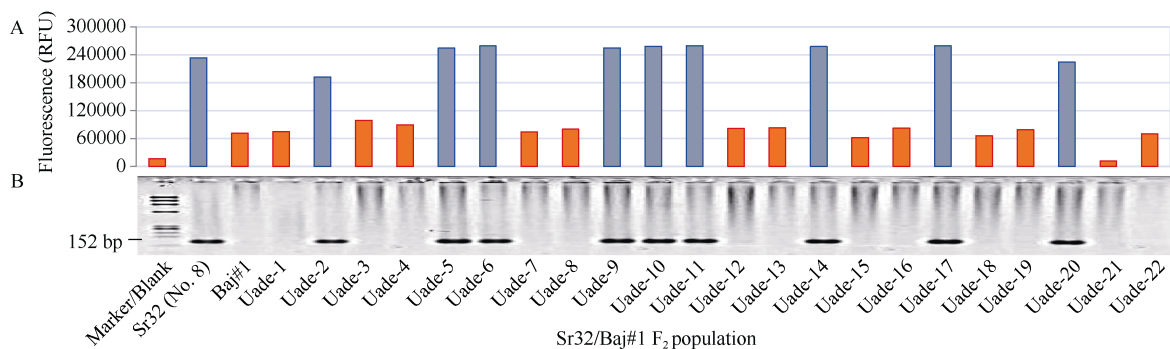


图 4 显性标记 *csSr32#1* 扩增产物的荧光定量分析(A)和琼脂糖凝胶电泳检测(B)

Fig. 4 Amplification products of the dominant *csSr32#1* marker determined by QuantiFluor dye (A) and agarose gel electrophoresis (B)

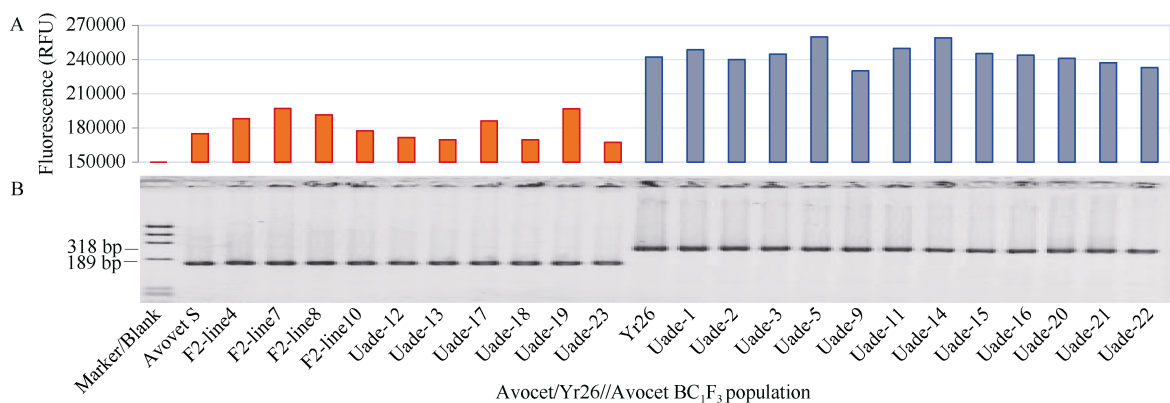


图 5 共显性标记 *We173* 扩增产物的荧光定量分析(A)和凝胶电泳检测结果(B)

Fig. 5 Amplification products of the co-dominant *We173* marker determined by QuantiFluor dye (A) and agarose gel electrophoresis (B)

表 2 琼脂糖电泳与荧光染料的经济效益差异分析

Table 2 Comparing the efficiency difference of genetic typing between agarose gel and QuantiFluor dye reagents

试剂 Reagent	包装量 Amount per kit	价格 Price (USD)	96 孔样品量 96 samples per microplate			标记类别 Marker type
			使用量 Amount	费用 Cost (USD)	耗时 Time (min)	
琼脂糖 Agarose	100 g	152	2 g	3.0	90	CD/D
荧光染料 QuantiFluor	1000 μ L (200 \times)	408	1920 μ L	4.1	8	CD/D

试剂报价来自 Promega (Madison, WI, 美国)。耗时计算, 琼脂糖胶电泳方法包括制胶 10 min、点样 5 min、电泳 60 min、EB 染色 10 min、成像 5 min; 荧光定量分析法包括配置反应试剂 3 min、分样 2 min、检测 3 min。标记类别, CD 和 D 分别表示共显性和显性标记, 荧光定量分析法检测共显性标记受等位基因片段差异大小的限制。

The prices of reagents were from Promega (Madison, WI, USA). Time estimation for the agarose gel electrophoresis method is 10 min of agarose gel preparation, 5 min of sample loading, 60 min of electrophoresis, 10 min of ethidium bromide staining, and 5 min of fluorescence imaging. Time estimation for the QuantiFluor dye method is 3 min of reaction reagents preparation, 3 min of sample loading, and 3 min of fluorescence detection. Marker types CD and D stand for co-dominant and dominant markers, respectively. The QuantiFluor dye method with co-dominant marker is limited by the amplified fragment differences between alleles.

3 讨论

提高基因标记检测效率是加速分子育种进程的关键。荧光染料是一种操作安全、简便快捷、高效的核酸分析试剂, 但因成本略高, 目前主要用于活细胞和实时核酸定量研究^[2-3]。本研究基于 FLUOstar 多功能酶标仪平台建立了 QuantiFluor 染料的标准曲线(图 1 和表 1), 可有效分析 0.1~1.0 ng μ L⁻¹ 的 dsDNA 浓度。尽管荧光染料可对 dsDNA 准确定量, 但在常规分子实验中, 我们不推荐使用荧光染料测定从小麦叶片和籽粒直接提取的 DNA 浓度, 主要原因是原液 DNA 浓度较高, 稀释倍数较大, 容易增加实验操作误差^[15], 换算出的原液 DNA 偏离实际浓度。在精量 dsDNA 实验时, 建议先使用 NanoDrop 测定核酸总浓度, 估算 DNA 稀释浓度处于荧光测定范围内后, 再用荧光染料定量, 避免因 dsDNA 浓度过高造成荧光强度超过仪器所承载的阈值(<260 000 RFU)^[9,16-18]。

减少样品和试剂使用量, 节约成本, 是高通量实验的基本要求^[7]。随着荧光染料反应体系量的减少, 相同浓度 dsDNA 的荧光信号也逐渐下降, 标准曲线斜率呈下降趋势(图 1)。其主要原因是反应体系 dsDNA 总量降低, 嵌入双链间的染料随之减少, 入射激发光激发的荧光燃料所产生的总荧光强度相对减弱^[5,7,19]。因此, 控制反应体系和样品使用量是荧光定量技术的关键^[6,19-20]。通常情况下, 在一定范围内增加 dsDNA 模板和荧光染料的浓度, 荧光强度也会增加^[2,18,21], 但过多增加染料浓度, 荧光染料分子间会相互作用形成缔合分子, 产生荧光淬灭团^[4,10,22]。从经济角度考虑, 我们推荐精量 dsDNA 浓度实验使用 200 μ L 反应体系, 染料使用适量。dsDNA 定性分析

时(如基因分型), 可以减少样品量, 40 μ L 反应体系已可满足实验要求。值得注意的是, 每种荧光染料有其最适的 pH 值, 改变反应体系的 pH 值易造成染料与核酸双链嵌合不牢固, 加速染料淬灭, 影响荧光吸收强度^[11,22-23]。

传统凝胶电泳的检测手段能够准确有效检测 PCR 产物, 但操作繁琐, 耗时费工, 效率低^[3,24]。从理论上讲, 对 dsDNA 特异性染料均可进行 PCR 产物定性分析, 通过判断荧光强度计算 PCR 产物的多寡, 鉴别等位基因。研究表明, 以荧光强度可有效鉴定显性标记的 PCR 产物量, 进行等位基因分型。因使用 40 μ L 反应体系存在微量波动, 对共显性基因标记鉴定时, 需要满足 4 个条件, 一是不同基因型品种的 DNA 模板量相对均一, 以减少模板差异对荧光值的影响; 二是被检测等位基因片段的差异尽可能大, 差异至少 100 bp; 三是引物特异性好, 只有单个扩增片段, 无其他杂带; 四是尽可能使用精确的移液器, 并保证荧光反应体系中 PCR 产物的进样量一致。

4 结论

以荧光染料可精确定量微量 dsDNA, 在定量小麦叶片和籽粒提取的全基因组 DNA 原液时, 过多倍数稀释原溶液会大大降低 dsDNA 浓度的精确性, 建议选择紫外可见光设备进行高浓度核酸测定。反应体系量对荧光强度有重要影响, 实验过程中应根据研究目的进行调整, 最终达到经济高效的目的。荧光染料可有效区分显性标记或特异性强的共显性标记的等位基因型。尽管荧光定量分析法的成本略高于琼脂糖凝胶电泳方法, 但其操作简单、检测效率

高且稳定性好, 值得推广应用。

References

- [1] Bhat S, Curach N, Mostyn T, Bains G S, Griffiths K R, Emslie K R. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal Chem*, 2010, 82: 7185–7192
- [2] 聂晓静, 赵筱萍, 王毅. 基于荧光图像的抗肿瘤细胞迁移药物筛选方法. *药学报*, 2011, 46: 793–797
Nie X J, Zhao X P, Wang Y. Development of fluorescence imaging based assay for screening compounds with anti-migration activity. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46: 793–797 (in Chinese with English abstract)
- [3] 王宇, 刘景晶. 核酸的定量技术研究进展. *药学进展*, 2006, 30: 385–390
Wang Y, Liu J J. Recent advances in research on quantification of nucleic acids. *Prog Pharmac Sci*, 2006, 30: 385–390 (in Chinese with English abstract)
- [4] Lyu Z Z, Liu J C, Zhou Y, Guan Z, Yang S M, Li C, Chen A L. Highly sensitive fluorescent detection of small molecules, ions, and proteins using a universal label-free aptasensor. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49: 5465–5467
- [5] Rengarajan K, Cristol S M, Mehta M, Nickerson J M. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis*, 2002, 8: 416–421
- [6] Lucena-Aguilar G, Sánchez-López A M, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila J A, López-Guerrero J A, Aguilar-Quesada R. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreserv Biobank*, 2016, 14: 264–270
- [7] Haque K A, Pfeiffer R M, Beerman M B, Struewing J P, Chanock S J, Bergen A W. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol*, 2003, 3: 20
- [8] Georgiou C D, Papapostolou I. Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Anal Biochem*, 2006, 358: 247–256
- [9] Marie D, Vaulot D, Partensky F. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1 and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl Environ Microb*, 1996, 62: 1649–1655
- [10] 桂海姿, 金庆日, 张亚军, 王晓杜, 杨永春, 邵春艳, 程昌勇, 卫芳芳, 杨扬, 杨梦华, 宋厚辉. 基于荧光染料 PicoGreen 和核酸适配体的伏马毒素 B1 检测方法. *生物工程学报*, 2015, 31: 1393–1400
Gui H L, Jin Q R, Zhang Y Z, Wang X D, Yang Y C, Shao C Y, Cheng C Y, Wei F F, Yang Y, Yang M H, Song H H. Development of an aptamer/fluorescence dye PicoGreen-based method for detection of fumonisin B1. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31: 1393–1400 (in Chinese with English abstract)
- [11] 曾国平, 向东山, 何治柯. 基于 Hoechst33258 荧光染料检测单链 DNA 的方法研究. *化学学报*, 2011, 69: 1450–1456
Zeng G P, Xiang D S, He Z K. Fluorimetric method for the determination of sequence-specific DNA with the fluorescent dye Hoechst 33258. *Acta Chim Sin*, 2011, 69: 1450–1456 (in Chinese with English abstract)
- [12] Mago R, Verlin D, Zhang P, Bansal U, Bariana H, Jin Y, Ellis J, Hoxha S, Dundas I. Development of wheat-*Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and a new stem rust resistance gene on the 2S#1 chromosome. *Theor Appl Genet*, 2013, 126: 2943–2955
- [13] Mago R, Bariana H S, Dundas I S, Spielmeyer W, Lawrence G L, Prior A J, Ellis J G. Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 496–504
- [14] Zhang X, Han D, Zeng Q, Duan Y, Yuan F, Shi J, Wang Q, Wu J, Huang L, Kang Z. Fine mapping of wheat stripe rust resistance gene *Yr26* based on collinearity of wheat with *Brachypodium distachyon* and rice. *PLoS One*, 2013, 8: e57885
- [15] Huang H, Shi S, Gao X, Gao R, Zhu Y, Wu X, Zang R, Yao T. A universal label-free fluorescent aptasensor based on Ru complex and quantum dots for adenosine, dopamine and 17 β -estradiol detection. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79: 198–204
- [16] Leung K, He B, Yang C, Leung C H, Wang H D, Ma D. Development of an aptamer-based sensing platform for metal ions, proteins, and small molecules through terminal deoxynucleotidyl transferase induced G-Quadruplex formation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 24046–24052
- [17] Lisanti S, Omar W A W, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, Mathers J C, Langie S A S. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One*, 2013, 8: e79044
- [18] Fraga M F, Uriol E, Borja D L, Berdasco M, Esteller M, Cañal M J, Rodriguez R. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 2002, 23: 1677–1681
- [19] Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grander D, Schalling M, Bakalkin G, Lyko F, Larsson C, Ekström T J. LUMA (LUMinometric Methylation Assay): a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp Cell Res*, 2006, 312: 1989–1995
- [20] Kuo K C, McCune R A, Gehrke C W, Midgett R, Ehrlich M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4763–4776
- [21] Burns M J, Nixon G J, Foy C A, Harris N. Standardization of data from real-time quantitative PCR methods-evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol*, 2005, 5: 31
- [22] Wilfinger W W, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 1997, 22: 474–481
- [23] Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minank G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*, 2013, 15: 5
- [24] Hollegaard M V, Grove J, Grauholm J, Kreiner-Møller E, Bønnelykke K, Nørgaard M, Benfield T L, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen P B, Mors O, Sørensen H T, Harboe Z B, Børglum A D, Demontis D, Ørntoft T F, Bisgaard H, Hougaard D M. Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spot samples as a DNA source. *BMC Genet*, 2011, 12: 58