

基于荧光法的DNA浓度测量方法研究

张振¹, 陈沁¹, 刘张桃¹, 曾媛², 李振庆^{1*}

¹上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海

²上海健康医学院分子影像学重点实验室, 上海

收稿日期: 2024年4月13日; 录用日期: 2024年5月3日; 发布日期: 2024年5月11日

摘要

DNA浓度测量在分子生物学中具有重要的应用价值。传统的基于吸光度法测量灵敏度低, 需要试剂量大, 为解决该问题, 本文构建了基于荧光检测的高灵敏度微型DNA浓度测量系统。选取光源为中心波长505 nm激光模组, 通过将SYBR Green I染料与DNA混合, 研究了荧光强度与DNA浓度之间的量化关系。结果表明, DNA浓度在1~16 ng/ μ L范围内, 与其荧光强度呈线性关系, 相关系数高达0.994。本研究为小型DNA浓度测量系统的开发奠定了实验基础。

关键词

DNA, 荧光染料, 浓度测量

Measurement of DNA Concentration Based on Fluorescence

Zhen Zhang¹, Qin Chen¹, Zhangtao Liu¹, Yuan Zeng², Zhenqing Li^{1*}

¹School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

²Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai

Received: Apr. 13th, 2024; accepted: May 3rd, 2024; published: May 11th, 2024

Abstract

DNA concentration measurement has important application value in molecular biology. The traditional absorbance-based measurement has low sensitivity and requires a large amount of reagents, in order to solve this problem, this paper constructed a highly sensitive micro DNA concen-

*通讯作者。

文章引用: 张振, 陈沁, 刘张桃, 曾媛, 李振庆. 基于荧光法的DNA浓度测量方法研究[J]. 分析化学进展, 2024, 14(2): 55-60. DOI: 10.12677/aac.2024.142007

tration measurement system based on fluorescence detection. The light source was selected as a laser module with a center wavelength of 505 nm, and the quantitative relationship between fluorescence intensity and DNA concentration was investigated by mixing SYBR Green I dye with DNA. The results showed that the DNA concentration was linearly related to its fluorescence intensity in the range of 1~16 ng/ μ L, and the correlation system was as high as 0.994. This study lays an experimental foundation for the development of a miniature DNA concentration measurement system.

Keywords

DNA, Fluorescent Dye, Concentration Measurement

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

DNA 浓度测量在基因组学研究中至关重要。因为它提供了关于 DNA 样品纯度和浓度的关键信息。随着科技的不断发展,我们目睹了多种先进技术的涌现。毛细管电泳[1]通过高分辨率的分离为我们提供了更为准确的浓度信息,而纳米孔测序技术则在实时监测 DNA 浓度方面取得了显著的突破。微流控芯片技术[2]的崛起使得在微小尺度上进行高通量的 DNA 测量成为可能,同时,结合人工智能和机器学习[3]的应用,研究人员能够更加智能地解析和利用庞大的测量数据[4]。这些创新性的技术不仅提高了测定的精度和敏感性,也为科学家们在基因组学、医学研究以及生命科学领域的各个方面提供了更全面的工具,推动着我们对生命基因的深入理解。传统实验室 DNA 浓度测量主要依赖紫外吸光度法[5],使用紫外分光光度计测量 DNA 在 260/280 nm 处的吸光度。然而,这种方法通常需要较多生物样品,并且对于提取的 DNA 样品较少的情况,传统的紫外分光光度计可能无法有效测量。

为了提高测量的灵敏度和减少所需样品量,Thermo Fisher Scientific 公司基于吸光度法推出了 Nanodrop 2000,通过改进光路结构实现了微量检测。然而,吸光度法的主要局限在于对 DNA 纯度[6]的要求较高,混入其他物质如 RNA 可能导致测量偏差。除了传统的吸光度法和荧光光谱法[7]之外,近年来的研究进展主要集中在提高测量精度、灵敏度,并减少所需样品量以及降低成本等方面。荧光光谱法作为一种新的 DNA 浓度测量方法逐渐在市场上得到应用。荧光光谱法利用 DNA 与荧光染料结合后在特定波长下产生荧光[8]的原理,通过检测荧光强度与 DNA 浓度的关系来进行测量。相比吸光度法,荧光光谱法[9]具有更高的灵敏度和特异性,能够有效解决混入杂质导致测量不准确的问题。美国国家标准与技术研究所使用 Pico Green 荧光染料对植物 DNA 进行染色,比较了紫外吸收和荧光光谱两种方法的相关性,结果显示荧光测量方法具有更高的可靠性。

尽管荧光光谱法在提高灵敏度和特异性方面具有优势,但市场上的荧光光谱仪通常体积较大,而且耗材成本较高。为解决这一问题,本文基于荧光光谱法搭建了核酸浓度测量微型光路系统,并开发了相应的算法,建立了 DNA 浓度和荧光强度之间的数学模型。这一创新为生物分子领域提供了低成本、快速、高效的 DNA 浓度测量方法。

2. 微型浓度检测系统的搭建

所构建的 DNA 浓度微型测量系统(图 1)由一个中心波长 505 nm 的激光模组作为光源、荧光光谱检测仪、样品位移台组成。SYBRGreenI 与 DNA 组成的混合物溶液[10],在该光源照射下,会产生中心波长为 520 nm

的荧光, 该荧光信号被微型光谱仪采集[11], 并记录不同浓度 DNA 对应的荧光强度通过测量荧光强度随被测 DNA 浓度[12]之间的变化关系。为避免收集的荧光信号受入射光干扰, 采用了正交光路收集荧光。

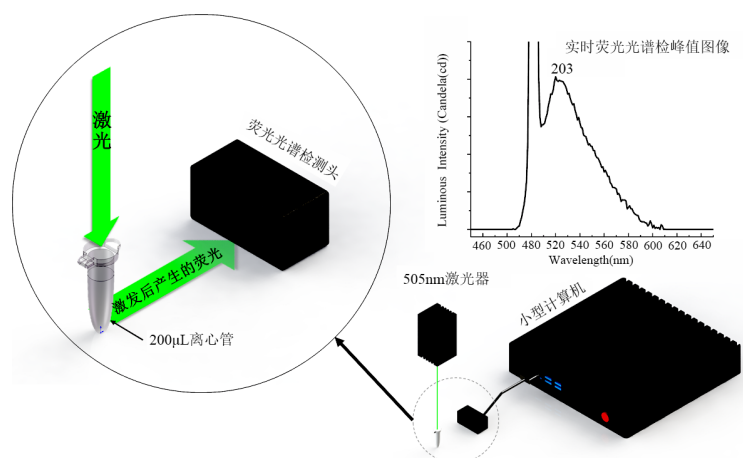


Figure 1. Schematic diagram of DNA concentration detection system

图 1. DNA 浓度检测系统原理图

3. 实验部分

10,000 × SYBR Green I 高浓缩荧光染料(上海瑞楚生物科技有限公司); 100 bp DNA Ladder (120 ng/µL)和 5 × Trisborate-EDTA (TBE) (北京索莱宝生物科技有限公司); 超纯水; TBE 储备液(0.5×): 将 5 × TBE 原液和超纯水按 1:9 比例稀释, 常温保存; SYBR Green I 储备液(100×): 将 10,000 × SYBR Green I 和超纯水按 1:99 比例稀释, 避光低温保存。

4. 结果和讨论

4.1. DNA 荧光强度与其浓度之间的变化关系

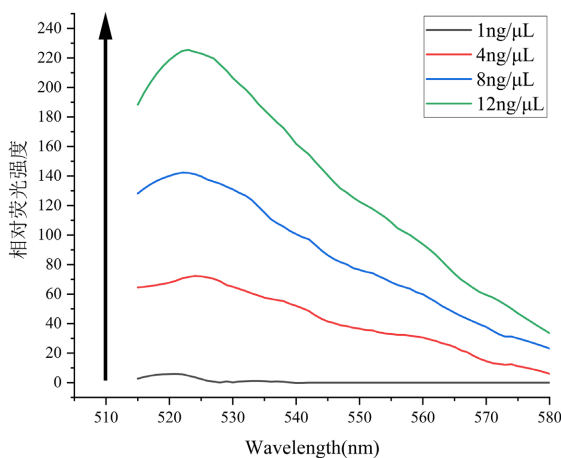


Figure 2. Fluorescence spectra of DNA and fluorescent dye mixtures in the range of 515~550 nm

图 2. DNA 与荧光染料混合物在 515~550 nm 范围内的荧光光谱

SYBR Green I 作为一种广泛用于核酸染色的荧光染料[13] [14], 与 DNA 结合后, 使用 505 nm 的激光对 DNALadder 的混合物进行照射后会产生荧光。为此, 以 0.5 × TBE 为背景液, 配制了 1~17 ng/µL 范

围内的 DNA 样品, 采用 SYBRGreenI 的浓度为 25×, 在构建的系统中获得了其荧光光谱(图 2)。可以发现, 荧光信号的峰值波长位于 522 nm 附近, 且随着 DNALadder 的浓度增加, 其荧光强度也随 DNA 浓度增加呈正相关关系, 这为通过荧光强度值测量 DNA 浓度建立了实验基础。

4.2. 荧光强度随荧光染料浓度的变化关系

SYBR Green I 是一种内嵌染料, 该染料结合于双链 DNA 双螺旋小沟区域。在游离状态下, SYBR Green I 发出微弱的荧光, 但一旦与双链 DNA 结合后, 荧光大大增强。然而, 被测样品中所含荧光染料过多, 也可能会导致荧光信号减弱, 为此, 以 24 ng/μLDNA 作为样品, 分别添加 1×、5×、10×、15×、20×、25×、30×和 35×等八种不同浓度的 SYBR Green I 试剂, 研究了 DNA 荧光强度随荧光染料的变化关系。结果表明, 当荧光染料由 1×增加至 25×时, 荧光强度随染料浓度增加而升高; 当荧光染料浓度高于 25×时, 荧光强度急剧减少(图 3)。为此, 采用 25 × SYBR Green I 荧光染料测量 DNA 浓度。

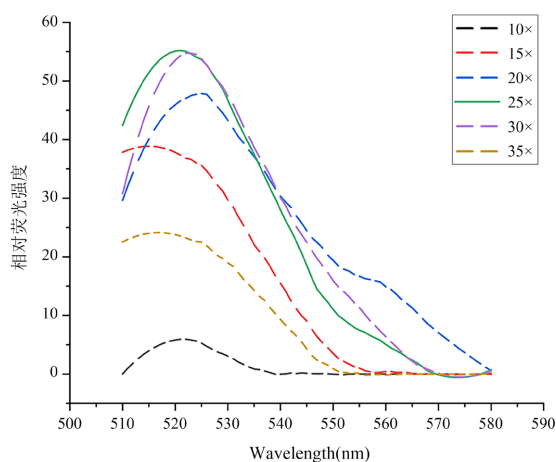


Figure 3. Effect of 1~35 ng/μL SYBR Green I on fluorescence spectra
图 3. 添加 1~35 ng/μL 不同浓度的 SYBR Green I 对荧光光谱的影响

4.3. DNA 浓度与其荧光强度之间的量化关系

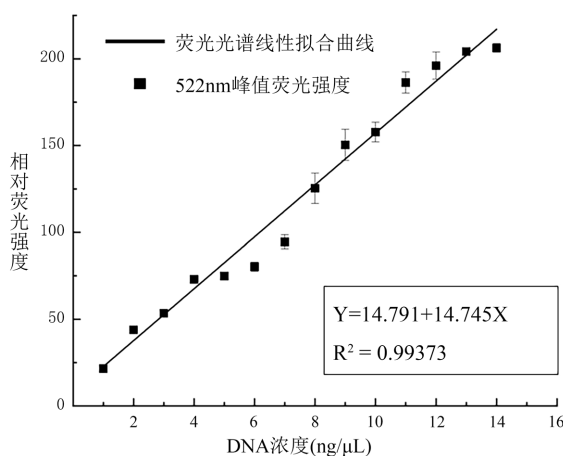


Figure 4. The relationship between different concentrations of DNA Ladder and fluorescence intensity
图 4. 不同浓度的 DNA Ladder 与荧光强度之间的线性关系

基于以上数据, 采用 $25 \times$ SYBR Green I 作为荧光染料, 采用了 $1\sim 14$ ng/ μ L 范围内 DNA 样品的荧光光谱, 并记录其 522 nm 处荧光强度, 每组实验重复 5 次, 并利用最小乘法对所绘数据进行曲线拟合, 绘制了 DNA 浓度与其荧光强度的关系(图 4), 结果表明, 二者之间具有较高的线性关系, 相关系数为 0.99。

进一步, 将特定浓度的 DNA 样品做与 $25 \times$ SYBR Green I, $0.5 \times$ TBE 背景液按一定比例混合, 配制成 $1\sim 16$ ng/ μ L 的检测液, 在构建的光学系统中测量 522 nm 处荧光强度值(表 1), 并依据所构建的荧光强度与浓度之间的量化关系计算其浓度值。结果表明, 在 $10\sim 100$ ng/ μ L 浓度范围内, 系统能在很小的误差内精确的预估出 DNA 的浓度数值。

Table 1. Fluorescence intensity and concentration measurements of DNA samples with different concentrations
表 1. 不同浓度 DNA 样品荧光强度值与浓度测量值

实际值(ng/ μ L)	荧光强度均值	预测值(ng/ μ L)	误差值(ng/ μ L)	相对偏差%
10	29.256	9.81	0.19	1.9%
20	45.48	20.87	0.87	4.35%
30	57.89	29.23	-0.77	2.57%
40	74.42	40.64	0.64	1.6%
50	91.232	51.74	1.74	3.48%
60	102.976	59.81	-0.19	0.32%
70	118.08	70.05	0.05	0.07%
80	134.496	81.18	1.18	1.48%
90	154.016	94.42	4.42	4.91%
100	169.12	104.67	4.67	4.67%

5. 结论

本文基于荧光光谱法, 构建微型核酸浓度测量系统, 通过优化 SYBR Green I 荧光染料浓度, 建立了 DNA 荧光强度与其浓度之间的量化关系。结果表明, 在 $1\sim 16$ ng/ μ L 范围内, DNA 浓度与其荧光强度呈线性关系, 相关系数高达 0.994。对于 $10\sim 100$ ng/ μ L 范围内的 DNA 样品, 浓度测量相对偏差小于 5%。从而为微型 DNA 浓度测量系统的开发提供了坚实的实验基础。

参考文献

- [1] Liu, F., Wang, J., Yang, L., Liu, L., Ding, S., Fu, M., *et al.* (2016) Developing a Fluorescence-Coupled Capillary Electrophoresis Based Method to Probe Interactions between QDs and Colorectal Cancer Targeting Peptides. *Electrophoresis*, **37**, 2170-2174. <https://doi.org/10.1002/elps.201600165>
- [2] 吴晓松, 李志刚, 朱灿灿, 等. 微流控聚合物链式反应芯片的多色荧光检测[J]. 光电子·激光, 2017, 28(8): 859-864. <https://doi.org/10.16136/j.joel.2017.08.0497>
- [3] Walczak, R., Kubicki, W. and Dziuban, J. (2017) Low Cost Fluorescence Detection Using a CCD Array and Image Processing for On-Chip Gel Electrophoresis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **240**, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.106>
- [4] 高小玲. DNA 浓度与其 Raman 光谱强度间的线性相关的分析[J]. 激光生物学报, 1998, 7(2): 142-145.
- [5] 周明辉, 廖春艳, 等. 表面增强拉曼光谱生物成像技术及其应用[J]. 中国光学, 2013, 6(5): 633-642.
- [6] 伍林, 欧阳兆辉, 等. 拉曼光谱技术的应用及研究进展[J]. 光散射学报, 2005, 17(2): 180-186.
- [7] 王亚伟. DNA 浓度与结构的光谱检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京大学, 2018.
- [8] 杨伟程, 李鹏. CMOS 相机控制及图像数据传输系统设计[J]. 电子设计工程, 2009, 17(4): 20-21.

- [9] 张学海, 刘冲, 梁超, 等. 应用于激光诱导荧光检测的微透镜阵列[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(8): 81-87.
- [10] Kapuściński, J. and Skoczylas, B. (1977) Simple and Rapid Fluorimetric Method for DNA Microassay. *Analytical Biochemistry*, **83**, 252-257. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90533-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90533-4)
- [11] 叶永康, 鞠焯先. DNA 浓度及序列检测的电化学传感器研究[J]. 分析科学学报, 2003, 19(5): 494-496.
- [12] Bhat, S., Curach, N., *et al.* (2010) Comparison of Methods for Accurate Quantification of DNA Mass Concentration with Traceability to the International System of Units. *Analytical Chemistry*, **82**, 7185-7192. <https://doi.org/10.1021/ac100845m>
- [13] Bruijns, B.B., Tiggelaar, R.M. and Gardeniers, J.G. (2016) Fluorescent Cyanine Dyes for the Quantification of Low Amounts of dsDNA. *Analytical Biochemistry*, **511**, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.022>
- [14] Arthanari, H., Basu, S., Kawano, T.L. and Bolton, P.H. (1998) Fluorescent Dyes Specific for Quadruplex DNA. *Nucleic Acids Research*, **26**, 3724-3728. <https://doi.org/10.1093/nar/26.16.3724>