

• 论 著 •

基于 DTT-结晶紫的 DNA 定量方法的建立^{*}

叶玉钦^{1,2}, 曹 璜³, 吴绪峰², 谭 尧⁴, 马全富^{2△}

1. 武汉科技大学医学院, 湖北武汉 430065; 2. 湖北省妇科恶性肿瘤临床医学研究中心, 湖北武汉 430070; 3. 湖北省妇幼保健院医学遗传中心, 湖北武汉 430070; 4. 湖北省妇幼保健院产科, 湖北武汉 430070

摘 要:目的 建立一种基于二硫苏糖醇(DTT)-结晶紫的 DNA 定量方法。方法 将 DTT 用于结晶紫的脱色处理后,与不同浓度的 λ -DNA 和鱼精 DNA 标准品或标准样本混合,利用酶标仪在 595 nm 波长读取吸光度,并与紫外吸光法的结果进行比较。DTT-结晶紫法和紫外吸光法对质粒样本浓度及宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度进行测量比较。以牛血清白蛋白(BSA)模拟蛋白杂质评价两种方法对蛋白杂质的耐受性。结果 在测定 λ -DNA 和鱼精 DNA 时,DTT-结晶紫法在 595 nm 处的吸光度与 DNA 浓度之间有良好的线性关系($r^2 > 0.95$)。DTT-结晶紫法测量标准样本浓度与所配制的标准样本理论浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。DTT-结晶紫法和紫外吸光法测量质粒样本浓度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。紫外吸光法与 DTT 结晶紫法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度呈正相关($r = 0.94, P < 0.01$)。紫外吸光法测量含 BSA 为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 DNA 标准样本浓度显著高于对照样本浓度,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 DTT-结晶紫法并未受到 BSA 的显著影响($P > 0.05$)。结论 DTT-结晶紫法相较于现有的 DNA 定量方法具有明显优势,适用于科研和临床中的 DNA 定量分析。

关键词:二硫苏糖醇; 结晶紫; DNA 定量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.13.007

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2025)13-1575-06

文献标志码:A

Establishment of a DNA quantitation method based on DTT-crystal violet^{*}

YE Yuchin^{1,2}, CAO Huang³, WU Xufeng², TAN Yao⁴, MA Quanfu^{2△}

1. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430065, China; 2. Hubei Clinical Medical Research Center for Gynecologic Malignancy, Wuhan, Hubei 430070, China; 3. Center for Medical Genetics, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430070, China; 4. Department of Obstetrics, Maternal and Child Health Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract: **Objective** To establish a DNA quantitation method based on dithiothreitol (DTT) -crystal violet. **Methods** DTT was used to decolorize crystal violet, mixed with different concentrations of λ -DNA and salmon sperm DNA standard samples or concentration standard samples, and the absorbance was read at 595 nm wavelength by microplate reader, and compared with the results of ultraviolet absorbance method. DTT-crystal violet method and ultraviolet absorbance method were used to compare the concentration of plasmid samples and the concentration of genomic DNA samples of cervical exfoliated cells. The protein tolerance of the two methods was assessed by simulating protein contaminants with bovine serum albumin (BSA). **Results** In the quantification of λ -DNA and salmon sperm DNA, the DTT-crystal violet method had a robust linear correlation between the absorbance at 595 nm and DNA concentration ($r^2 > 0.95$), and the measured concentrations of the standard samples were not significantly different from the theoretical concentrations of the prepared standard samples ($P > 0.05$). There was no significant difference in the concentration of plasmid samples measured by DTT-crystal violet method and ultraviolet absorption method ($P > 0.05$). The concentration of DNA samples from cervical exfoliated cells measured by ultraviolet absorption method was positive-

^{*} 基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2023AFB1064)。

作者简介:叶玉钦,女,在读硕士研究生,主要从事妇科肿瘤基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: maquanfu@hbby.com。

ly correlated with that by DTT-crystal violet method ($r=0.94, P<0.01$). The concentration of the standard sample containing BSA $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ measured by ultraviolet absorption method was higher than that of the control sample, and the difference was statistically significant ($P<0.01$), whereas the DTT-crystal violet method was not significantly affected ($P>0.05$). **Conclusion** DTT-crystal violet method has obvious advantages over the existing DNA quantitation method, and is suitable for DNA quantitative analysis in scientific research and clinic.

Key words: dithiothreitol; crystal violet; DNA quantitation

在基因克隆、测序和表达分析等实验过程中常常要进行 DNA 定量分析,常用的定量方法有紫外吸光法和荧光法^[1]。紫外吸光法的原理是通过在特定波长(260 nm)的光下测量样品对紫外光的吸收程度来确定样品的量。传统的紫外吸光法用比色皿来盛装液体样品,其测量时样品消耗大、测量浓度范围小、需要花费时间来稀释样品^[2]。NanoDrop 是一种常用的分光光度计,操作较为简便,但其对 DNA 的定量没有特异性,易受到蛋白质、多酚等物质污染的影响而导致测量结果偏高^[3-4]。另外, NanoDrop 还存在对低浓度核酸的定量不准确、仪器价格较高等缺点^[1]。荧光法是通过检测与核酸结合的荧光物质发出的荧光信号变化来测量核酸浓度,主要依赖于高灵敏度的荧光染料^[5]。但是目前含有荧光染料的试剂盒价格通常较高,限制了其在检测中的广泛应用。因此,亟需一种特异度较好,同时价格较低的新的 DNA 定量方法。结晶紫是一种三苯基甲烷染料,可以进行细胞核染色,被用于细胞增殖、细胞毒性测定及细胞集落形成等实验^[6-9]。有研究证实,结晶紫可以作为核酸染料,结合 DNA,在凝胶电泳实验中用于直接可视化和识别 DNA 条带^[10]。隐性结晶紫是结晶紫的还原形式,在水溶液中不稳定,会转化为结晶紫,二者形成一个动态平衡。使用还原剂可使结晶紫还原为隐性结晶紫,在加有 60 倍摩尔量的还原剂亚硫酸钠时,结晶紫浓度极低,结晶紫溶液则变成浅紫色或接近无色,但是这些浓度极低的结晶紫和双链 DNA 结合后变得稳定而不易被还原,通过光谱分析来测定 DNA 浓度。在含有还原剂的结晶紫溶液中加入双链 DNA 后,吸收峰在 592 nm 处显著增加^[11-13]。因此,基于上述原理,采用二硫苏糖醇 (DTT) 代替危害较大的还原剂亚硫酸钠,探索了 DTT-结晶紫法用于 DNA 定量分析。DTT 含有 2 个强还原性巯基,与亚硫酸钠还原价相同,其通常被用作抗氧化剂和广谱的三苯基甲烷染料脱色剂,可以漂白结晶紫、碱性品红等染料^[14-15]。为评估该方法在 DNA 浓度测定上的性能,将其与紫外吸光法进行对比分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源 DNA 样本:质粒样本 1、质粒样本 2、质粒样本 3 均是以 pcDNA3.1(+) 为载体骨架构

建的质粒样本。临床样本来自于湖北省妇幼保健院宫颈脱落细胞提取的基因组 DNA。

1.2 仪器与试剂 BIO-RAD 美国伯乐 iMark 酶标仪、Implen NanoPhotometer[®] C40、NanoDrop 2000 超微量分光光度计。0.5% 结晶紫染色液:0.5 g 结晶紫粉末[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:A600331-0025]中加入 20 mL 无水乙醇促溶,完全溶解后继续加水至 100 mL,室温保存;2 mol/L DTT 储存液:5 g 包装的 DTT 粉末[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:A620058-000]全部溶解于 16 mL 真空脱气过的超纯水中,分装后置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存;1×TE 缓冲液:由粉剂[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:B040106-0005]配制;100 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)溶液:1 g BSA 固体[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:A600332]完全溶解于 10 mL 超纯水中,分装后置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存;标准样本:鱼精 DNA $75\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 。1×隐性结晶紫-二硫苏糖醇(LCV-DTT)工作液的配制:1×LCV-DTT 工作液含有 0.1 mmol/L 结晶紫和 6 mmol/L DTT,根据结晶紫的相对分子质量算出所需的 0.5% 结晶紫染色液是 8.16 μL ,2 mol/L DTT 储存液需 3 μL ,用 1×TE 缓冲液配制至 1 mL。使用时每孔 190 μL 。

1.3 方法

1.3.1 DTT-结晶紫法测量样本浓度 鱼精 DNA 由粉末(源叶生物,货号 S18133-1g)配制成 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶液; λ -DNA 为 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶液 (TaKaRa, 货号:3010);分别以 DNA 稀释液[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:B639270]配制不同浓度的标准品。鱼精 DNA 标准液浓度为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,配制标准曲线时终体积为 0.5 mL,即在 0、3、6、9、12、15 μL 鱼精 DNA 中分别加入 500、497、494、491、488、485 μL DNA 稀释液; λ -DNA 标准液浓度为 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,配制标准曲线时终体积为 0.35 mL,即在 0、30、60、90、120、150 μL λ -DNA 中分别加入 350、320、290、260、230、200 μL DNA 稀释液。使用时每孔 10 μL 。

U 型 96 孔板中加入 10 μL 待测 DNA,190 μL LCV-DTT 工作液,室温孵育 10 min,酶标仪读取在波长 595 nm 时的吸光度(A),计算时使用 λ -DNA 或鱼精 DNA 制作标准曲线,参考文献[11]中亚硫酸钠-

结晶紫的数据,设置标准曲线:0、30、60、90、120、150 ng/ μ L,每孔使用 10 μ L 标准品,即每孔 0、300、600、900、1 200、1 500 ng 标准 DNA。计算得到样本浓度。

1.3.2 紫外吸光法测量样本浓度 比色皿测量样本浓度:取 50 μ L 超纯水加入超微量石英比色皿,测量空白样品管的 A,再加入 1 μ L 样本,反复吹吸混匀 7 次,将稀释倍数调成 51 倍,使用 Implen C40 的双链 DNA 程序读取样本 A 并记录。NanoDrop 2000 超微量分光光度计测量样本浓度:选择 DNA Measurement 模式,取 1 μ L Qiagen AE 缓冲液加入样品台,选择“Blank”选项,测量空白样本的 A,用医用棉签擦拭干净后选择“Sample”选项,取 1 μ L 样本加入样品台,测量样本的 A 并记录。

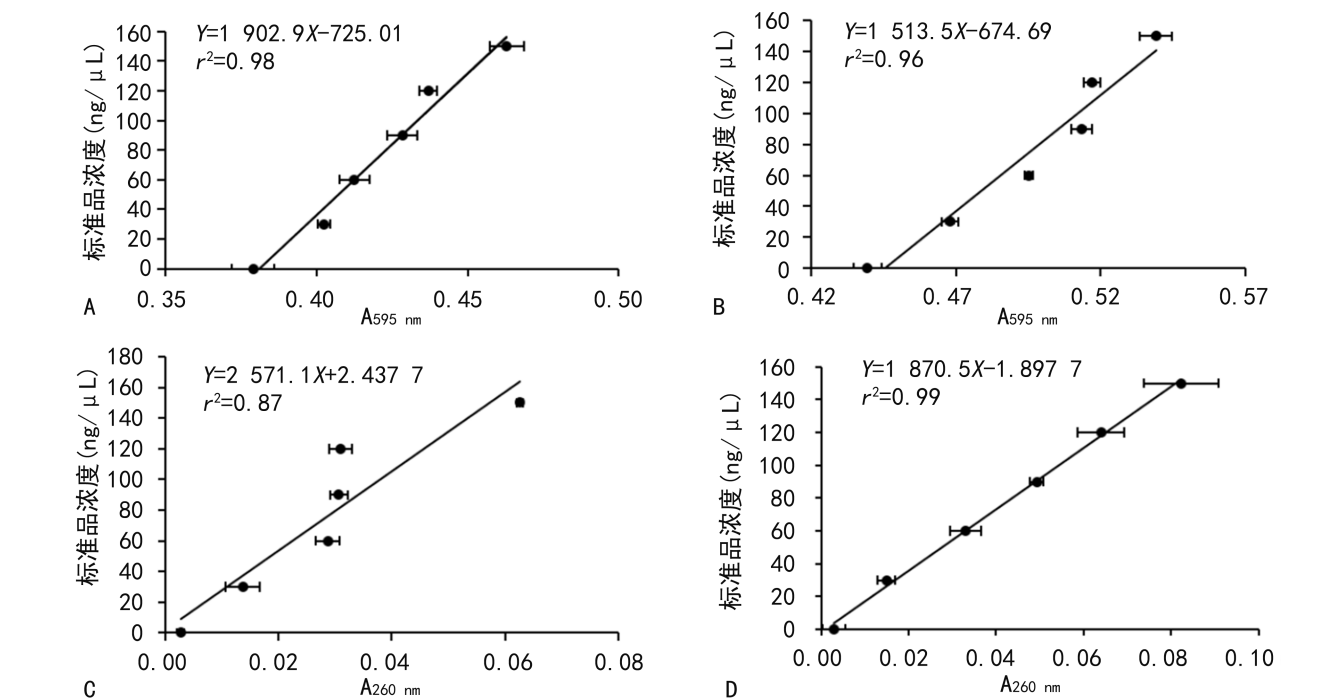
1.3.3 以 BSA 模拟蛋白杂质 待测 DNA 标准样本中加入 BSA,配制成含不同浓度的蛋白杂质的标准样本,依次为标准样本+10 ng/ μ L BSA、标准样本+100 ng/ μ L BSA、标准样本+1 μ g/ μ L BSA,同时配制了不含蛋白杂质的标准样本作为对照样本。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 及 GraphPad Prism 8 分析数据并绘制统计图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。DTT-结晶紫法测定 λ -DNA 和鱼精 DNA 的结

果采用线性拟合, $r^2>0.95$ 表示线性关系良好。两种方法测量标准样本浓度并分别与理论浓度对比采用单样本 t 检验;组间均数的比较采用 t 检验,包括配对 t 检验和两独立样本 t 检验。两种方法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度的相关性分析采用 Pearson 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DTT-结晶紫法和紫外吸光法测定 DNA 标准品和标准样本时 A 与 DNA 浓度的关系 本研究使用不同浓度的 λ -DNA 和鱼精 DNA 作为标准品,分别采用 DTT-结晶紫法和紫外吸光法的测量结果进行线性拟合。在进行线性拟合时,以 DNA 标准曲线参照物浓度为 Y 轴,实际测得的 A 为 X 轴。图 1A、图 1B 使用 DTT-结晶紫法,线性拟合后作出的标准曲线 r^2 为 0.98 和 0.96,均大于 0.95。图 1C、图 1D 使用紫外吸光法,线性拟合后作出的标准曲线 r^2 为 0.87 和 0.99。结果显示,紫外吸光法和 DTT-结晶紫法在测量鱼精 DNA 时 A 与 DNA 浓度线性关系均良好($r^2>0.95$);DTT-结晶紫法测量 λ -DNA 时 A 与 DNA 浓度呈现出更好的线性关系($r^2=0.98>0.87$)。



注: A 为 DTT-结晶紫法测定 λ -DNA 时 A 与 DNA 浓度的线性关系;B 为 DTT-结晶紫法测定鱼精 DNA 时 A 与 DNA 浓度的线性关系;C 为紫外吸光法测定 λ -DNA 时 A 与 DNA 浓度的线性关系;D 为紫外吸光法测定鱼精 DNA 时 A 与 DNA 浓度的线性关系。

图 1 不同方法测量 DNA 时 A 与 DNA 浓度的线性关系

本研究使用 DTT-结晶紫法和紫外吸光法分别对标准样本进行测量。图 2 中虚线为所配制标准样本理论浓度(75 ng/ μ L),使用 DTT-结晶紫法测量标准样本浓度为(77.05 $\pm$ 2.73) ng/ μ L,与标准样本理论

浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$);紫外吸光法测量标准样本浓度为(98.60 $\pm$ 5.31)ng/ μ L,高于标准样本理论浓度,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

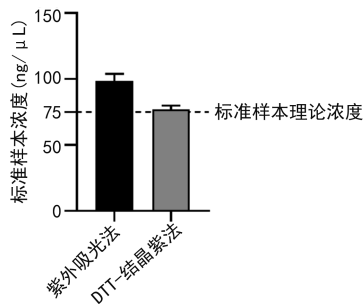
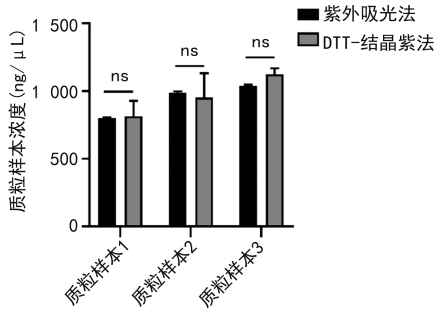


图 2 DTT-结晶紫和紫外吸光法测量标准样本浓度

2.2 DTT-结晶紫法和紫外吸光法测量质粒样本浓度比较 DTT-结晶紫法以 λ -DNA 作标准曲线计算出质粒样本浓度,紫外吸光法以比色皿进行测量得出质粒样本浓。DTT-结晶紫法测量质粒样本 1 浓度为 $(812.57 \pm 115.24) \text{ ng}/\mu\text{L}$,紫外吸光法测量质粒样本 1 浓度为 $(800.67 \pm 6.43) \text{ ng}/\mu\text{L}$,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);DTT-结晶紫法测量质粒样本 2 浓度为 $(953.03 \pm 179.26) \text{ ng}/\mu\text{L}$,紫外吸光法测量质粒样本 2 浓度为 $(988.33 \pm 9.02) \text{ ng}/\mu\text{L}$,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);DTT-结晶紫法测量质粒样本 3 浓度为 $(1\,123.06 \pm 44.36) \text{ ng}/\mu\text{L}$,紫外吸光法测量质粒样本 3 浓度为 $(1\,037.67 \pm 8.96) \text{ ng}/\mu\text{L}$,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。



注:ns 表示差异无统计学意义。

图 3 DTT-结晶紫和紫外吸光法测量质粒样本浓度

2.3 DTT-结晶紫法和紫外吸光法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度比较 DTT-结晶紫法以鱼精 DNA 作为标准曲线计算出宫颈脱落细胞基因组

DNA 样本的浓度,紫外吸光法以 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测量得出样本浓度。共 7 个宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本,采用这两种方法对每个样本均测量 1 次。DTT-结晶紫法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度分别为 244、168、148、102、102、125、102 $\text{ ng}/\mu\text{L}$,紫外吸光法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度分别为 235、174、164、112、143、126、146 $\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。紫外吸光法与 DTT 结晶紫法测量宫颈脱落细胞 DNA 样本浓度呈正相关 ($r = 0.94$, $P < 0.01$)。见图 4。

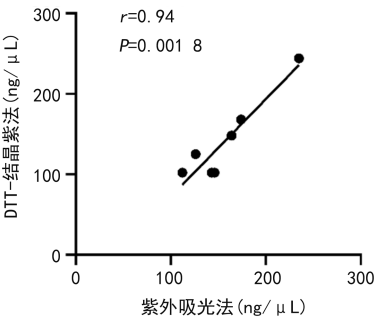
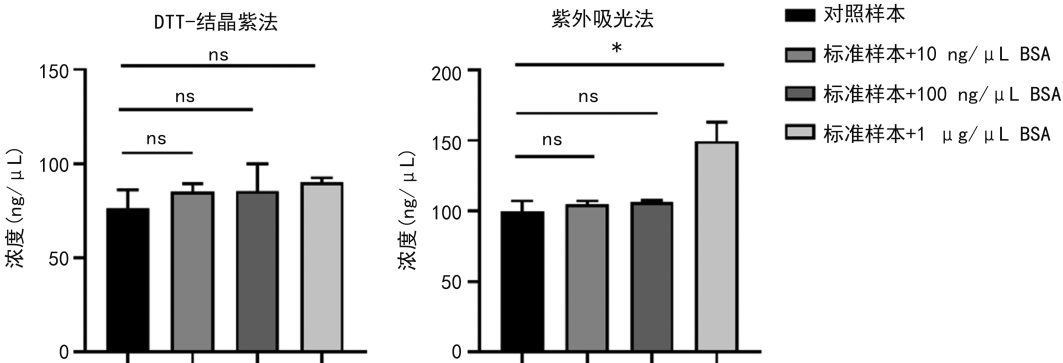


图 4 DTT-结晶紫和紫外吸光法测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度

2.4 DTT-结晶紫法和紫外吸光法对蛋白杂质耐受性比较 DTT-结晶紫法以鱼精 DNA 作为标准曲线计算出样本浓度,紫外吸光法通过比色皿直接测量 A 得出样本浓度。DTT-结晶紫法测量对照样本及 3 种含 BSA 的标准样本浓度分别为 (76.33 ± 9.92) 、 (85.03 ± 4.42) 、 (85.50 ± 14.44) 、 $(90.08 \pm 2.38) \text{ ng}/\mu\text{L}$,对照样本浓度与含不同 BSA 的标准样本浓度比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。紫外吸光法测量对照样本浓度和含 BSA 10 $\text{ ng}/\mu\text{L}$ 和 100 $\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的标准样本浓度为 (99.45 ± 7.65) 、 (104.55 ± 2.55) 、 $(106.43 \pm 1.15) \text{ ng}/\mu\text{L}$,对照样本浓度与这两种标准样本浓度比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。当紫外吸光法测量含 BSA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的标准样本浓度为 $(149.60 \pm 13.09) \text{ ng}/\mu\text{L}$,显著高于对照样本浓度,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。



注:ns 表示差异无统计学意义;与对照样本浓度比较,* $P < 0.05$ 。

图 5 DTT-结晶紫法与紫外吸光法对 BSA 的耐受性分析

3 讨 论

本研究探讨基于 DTT-结晶紫的 DNA 定量方法,该方法与传统的紫外吸光法比较显示,DTT-结晶紫法 A 和 DNA 浓度之间呈现出更好的线性相关性,更能准确测定标准样本的浓度。在测定质粒样本时,DTT-结晶紫法与紫外吸光法测量结果无显著性差异。此外,该方法也可以用于临床宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本浓度的测量,并且对蛋白杂质的耐受性更高,在 DNA 定量过程中更为可靠。

本研究结果显示,DTT-结晶紫法以 λ -DNA 和鱼精 DNA 测量的两种标准曲线均为线性,且拟合度较好。紫外吸光法测量 λ -DNA 标准曲线偏差较大,其主要原因可能是石英(成分为二氧化硅)比色皿壁对高纯度的 λ -DNA 标准品有微量吸附,导致测得的吸光值偏低,从而影响了标准曲线的拟合度^[16];相比之下,DTT-结晶紫法采用塑料 U 型 96 孔板对 λ -DNA 标准品无吸附作用,因此所获得的标准曲线具有较好的拟合度。紫外吸光法测定鱼精 DNA 标准曲线时,观察到较高的拟合度,这可能归因于鱼精 DNA 中含有的杂质,这些杂质可能有助于封闭微量 DNA 在石英比色皿壁上的吸附。本研究结果显示,使用 DTT-结晶紫法测量标准样本浓度与标准样本理论浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而紫外吸光法测量标准样本浓度高于标准样本理论浓度,差异有统计学意义($P < 0.05$),进一步以紫外吸光法测量的鱼精 DNA 标准曲线计算出标准样本浓度,结果显示仪器测量值更接近其理论浓度,主要原因可能是标准样本鱼精 DNA(纯度 98%)并非完全由双链 DNA 组成,可能含有蛋白或 RNA 等其他杂质,因此不适合使用仪器预设的双链 DNA 程序来读取浓度。然而,鉴于在实际操作中,紫外吸光法通常直接读取浓度而非通过标准曲线计算,这表明紫外吸光法可能不适用于某些样本的精确定量。本研究结果显示,DTT-结晶紫法和紫外吸光法测量质粒样本浓度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究对宫颈脱落细胞基因组 DNA 样本的测量,利用鱼精 DNA 作为标准曲线的参照,鉴于临床实践中通常只进行单次测量,模拟这一操作流程,对多个样本进行了单次测量,并将 DTT-结晶紫法与紫外吸光法的结果进行了对比,观察到二者的拟合度较好。

测定不同的 DNA 样品选择不同标准曲线的原因在于标准品本身的特性不同。 λ -DNA 来源于大肠埃希菌噬菌体 λ 的基因组 DNA,通常用作克隆载体,长度约为 48.5 kbp(千碱基对)^[17],是线性双链 DNA,通过 12 个碱基单链黏性末端成环。鱼精 DNA 是从鲑鱼精子中提取的天然高相对分子质量的 DNA,其纯

度较高,是超螺旋形式的双链 DNA,常用作分子生物学实验中的非特异性 DNA 对照^[18]。本研究所使用的质粒样本与通过黏性末端形成环状的 λ -DNA 在性质上具有相似性;另一方面人类宫颈脱落细胞基因组 DNA 与源自高等脊椎动物的鱼精 DNA 在性质上有相似性。因此,本研究选择 λ -DNA 作为测量质粒 DNA 浓度的标准曲线参照,采用鱼精 DNA 作为测量宫颈脱落细胞基因组 DNA 浓度的标准曲线参照。

有研究表明,结晶紫可对蛋白进行染色^[6]。因此,本文也评价了 DTT-结晶紫法对蛋白杂质的耐受性。本研究通过使用 BSA 模拟蛋白杂质掺入,探讨了 DTT-结晶紫法在 DNA 样本中存在蛋白杂质时的适用性。结果显示,即使标准样本中 BSA 浓度增加至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,DTT-结晶紫法的测量结果仍未受到显著影响,相比之下,该浓度 BSA 可显著影响紫外吸光法的测量结果。这些结果表明,DTT-结晶紫法比起紫外吸光法对 DNA 样品中的蛋白杂质具有更好的耐受性。这可能是因为 DTT-结晶紫法测定 DNA 的过程不是一个简单的染料吸附或结合过程,而是一个涉及结晶紫与还原性(隐性)结晶紫之间化学平衡的变色反应。这种变色反应对蛋白杂质的存在不敏感,从而使得 DTT-结晶紫法在存在蛋白杂质的情况下仍能保持测量的准确性。

本研究探索了一种新型的 DNA 定量分析的方法。与紫外分光光度法和荧光法相比,DTT-结晶紫法无需昂贵的仪器投资,操作简便,仅凭低成本耗材即可获得可靠的测量结果。该方法适用于分子生物学实验的 DNA 定量分析及教学实验。在教学实验中,传统的二苯胺法测定 DNA 含量需使用浓硫酸或高氯酸等化学品,以及乙醛等有毒试剂,并需沸水浴加热,而 DTT 和结晶紫则安全性高,成本低廉,且可在室温下进行测量,无需恒温设备。此外,DTT-结晶紫法与二苯胺法使用相同的仪器,提示 DTT-结晶紫法有望替代后者。在没有酶标仪的情况下,DTT-结晶紫法的变色反应可通过普通分光光度计甚至智能手机配合色度分析应用程序进行测量^[19-22]。从测量结果上看,此方法适用的测量范围不仅是文献[11]报道的线性范围,可能与 DTT 的还原能力优于亚硫酸钠有关。因此,该方法在资源有限的实验室具有广阔的应用前景。

此外,在应用 DTT-结晶紫法进行浓度测定过程中,精准移液至关重要。无论是在稀释样本阶段,还是将 DTT-结晶紫工作液加入 U 型 96 孔板的过程中,精准移液是降低实验变异性的关键。这种精确性有助于提高标准曲线的拟合度,进而优化曲线的线性关系,从而确保定量结果的准确性。

综上所述,基于 DTT-结晶紫的 DNA 定量方法是一种新颖且有效的 DNA 定量技术,具有低成本、高安全性和良好的准确性,适用于科研和临床实践,具有重要的应用价值和推广潜力。

参考文献

[1] KHETAN D, GUPTA N, CHAUDHARY R, et al. Comparison of UV spectrometry and fluorometry-based methods for quantification of cell-free DNA in red cell components[J]. Asian J Transfus Sci, 2019, 13(2):95-99.

[2] DESJARDINS P, CONKLIN D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids[J]. J Vis Exp, 2010, 22(45):2565.

[3] BRUIJNS B, HOEKEMA T, OOMENS L, et al. Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods[J]. Analytica, 2022, 3(3):371-384.

[4] MASAGO K, FUJITA S, OYA Y, et al. Comparison between fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of DNA and RNA extracted from frozen and FFPE tissues from lung cancer patients: a real-world use of genomic tests[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(12):1375.

[5] RENGARAJAN K, CRISTOL S M, MEHTA M, et al. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores[J]. Mol Vis, 2002, 8(1):416-421.

[6] KRAUSE R, GOLDRING J. Crystal violet stains proteins in SDS-PAGE gels and zymograms[J]. Anal Biochem, 2019, 566(1):107-115.

[7] VIWATPINYO K, MUKDA S, WARINHOMHOUN S. Effects of mitragynine on viability, proliferation, and migration of C6 rat glioma, SH-SY5Y human neuroblastoma, and HT22 immortalized mouse hippocampal neuron cell lines[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 166:115364.

[8] NILLES J, WEISS J, THEILE D. Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization[J]. Biotechniques, 2022, 73(3):131-135.

[9] RAJENDRAN V, JAIN M V. In vitro tumorigenic assay: colony forming assay for cancer stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1692(1):89-95.

[10] RAND K N. Crystal violet can be used to visualize DNA bands during gel electrophoresis and to improve cloning efficiency[J]. Tech Tips Online, 1996, 1(1):23-24.

[11] MIYAMOTO S, SANO S, TAKAHASHI K, et al. Meth-

od for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes[J]. Anal Biochem, 2015, 473(1):28-33.

[12] KUROZUMI T, KURIHARA K, HACHIMORI Y, et al. Interaction of methyl green with deoxyribonucleic acid as observed by a new method of using hydrogen peroxide[J]. J Biochem, 1963, 53(2):135-142.

[13] SCHULTE E K, LYON H O, HOYER P E. Simultaneous quantification of DNA and RNA in tissue sections: a comparative analysis of the methyl green-pyronin technique with the gallocyenin chromalum and feulgen procedures using image cytometry[J]. Histochem J, 1992, 24(6):305-310.

[14] WANG Y, MISTO M, YANG J, et al. Toxicity of dithiothreitol (DTT) to drosophila melanogaster[J]. Toxicol Rep, 2021, 8(1):124-130.

[15] 潘涛, 刘大伟, 任随周, 等. DTT 对三苯基甲烷染料脱色的研究[J]. 环境科学, 2012, 33(3):866-870.

[16] BAG S, RAUWOLF S, SCHWAMINGER S P, et al. DNA binding to the silica: cooperative adsorption in action[J]. Langmuir, 2021, 37(19):5902-5908.

[17] KIM Y, DE LA TORRE A, LEAL A A, et al. Efficient modification of lambda-DNA substrates for single-molecule studies[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):2071.

[18] SQUADRITO F, BITTO A, IRRERA N, et al. Pharmacological activity and clinical use of PDRN[J]. Front Pharmacol, 2017, 8(1):224.

[19] BALBACH S, JIANG N, MOREDDU R, et al. Smartphone-based colorimetric detection system for portable health tracking[J]. Anal Methods, 2021, 13(38):4361-4369.

[20] GEE C T, KEHOE E, POMERANTZ W, et al. Quantifying protein concentrations using smartphone colorimetry: a new method for an established test[J]. J Chem Educ, 2017, 94(7):941-945.

[21] ELAGAMY S H, ADLY L, ABDEL H M. Smartphone based colorimetric approach for quantitative determination of uric acid using image J[J]. Sci Rep, 2023, 13(1):21888.

[22] CIACCHERI L, ADINOLFI B, MENCAGLIA A A, et al. Smartphone-enabled colorimetry[J]. Sensors (Basel), 2023, 23(12):5559.

(收稿日期:2024-10-10 修回日期:2025-03-29)