

# 荧光染料离子缔合作用在荧光法测定 微量 DNA 中的应用

陈小兰, 李东辉, 郑洪, 陈秋影, 许金钧

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 建立了高灵敏荧光分光光度测定 DNA 和 RNA 的新方法. 方法的线性范围分别为  $0.04 \sim 1.20 \mu\text{g}/\text{mL}$  (鲑鱼精子 SMDNA 和小牛胸腺 CTDNA),  $0.10 \sim 1.20 \mu\text{g}/\text{mL}$  (酵母 RNA), 检测限分别为  $17 \text{ng}/\text{mL}$  (SMDNA),  $24 \text{ng}/\text{mL}$  (CTDNA),  $98 \text{ng}/\text{mL}$  (RNA). 将方法用于实际样品金黄色葡萄球菌中 DNA 含量的测定, 结果满意.

**关键词:** 四磺基铝酞菁; 核酸; 染料; DNA

**中图分类号:** O657.3

**文献标识码:** A

近年来, 染料自缔合或诱导缔合用于 DNA 测定引起了人们的极大兴趣<sup>[1~3]</sup>. 我们观察到阴离子荧光染料四磺基铝酞菁 (Tetrasulfonated aluminum phthalocyanine,  $\text{AlS}_4\text{Pc}$ ) 与阳离子荧光染料的缔和作用使四磺基铝酞菁荧光猝灭, 而当微量的 DNA 存在时, 缔合平衡发生移动, 四磺基铝酞菁的荧光恢复. 基于这个原理, 建立了高灵敏荧光分光光度测定 DNA 和 RNA 的新方法.

## 1 主要仪器与试剂

Hitachi 650 - 10s 荧光分光光度计; Shimadzu UV - 240 紫外可见分光光度计; 鲑鱼精子 DNA (SMDNA), Sigma; 小牛胸腺 DNA (CTDNA), 酵母 RNA (Yeast RNA) 均为华美生物工程公司产品; 四磺基铝酞菁, 参考文献合成.

## 2 方法与条件

于 10 mL 容量瓶中依次加入  $100 \mu\text{L}$   $10^{-4} \text{mol}/\text{L}$  的四磺基铝酞菁、 $0.8 \text{mL}$   $10^{-5} \text{mol}/\text{L}$  的吡啶橙溶液、 $1 \text{mL}$   $\text{pH} = 7.6$  的六次甲基四胺 - 盐酸缓冲溶液和一定量的 SMDNA (或 RNA), 用水稀释至刻度, 摇匀, 室温下放置 5 min 后, 于  $615 \text{nm}/688 \text{nm}$  下分别测定空白及试样溶液的荧光强度  $F_0$  和  $F$ , 以  $F - F_0$  值对 DNA 或 RNA 浓度作图.

对不同的 pH 缓冲体系、四磺基铝酞菁浓度、吡啶橙浓度的影响进行考查. 结果表明, 在含  $1 \text{mL}$   $\text{pH} = 7.6$  的六次甲基四胺 - 盐酸缓冲溶液、 $100 \mu\text{L}$   $10^{-4} \text{mol}/\text{L}$  四磺基铝酞菁和  $0.8 \text{mL}$   $10^{-5} \text{mol}/\text{L}$  吡啶橙的溶液中, 荧光增强程度最大. 本实验选其作为测试条件.

收稿日期: 1999 - 06 - 17

作者简介: 陈小兰 (1971 - ), 女, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29775021)

### 3 结果与讨论

按实验方法, 以  $F - F_0$  值对鲑鱼精子 DNA (SMDNA)、小牛胸腺 DNA (CTDNA) 和酵母 RNA 浓度作图, 得工作曲线的线性范围、方法的检测限及相关系数见表 1.

考查了一些常见无机离子、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、葡萄糖等共存物质对测定的干扰. 结果表明: 除汞离子、表面活性剂 CTAB、SDS、Trixon - 100 干扰较严重外, 其余物质基本上不干扰测定. 实际样品测定结果见表 2.

吸收光谱、发射光谱、盐效应、荧光偏振、热变性及温度等实验的结果表明, 四磺基铝酞菁与吡啶橙形成离子缔合物, 导致自身荧光猝灭, 当 DNA 存在该体系时, 吡啶橙与核酸发生了强相互作用, 破坏了四磺基铝酞菁与吡啶橙之间的缔合平衡, 导致酞菁的荧光恢复.

表 1 本法的分析参数

核酸	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	检测限/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	相关系数
SMDNA	0.040 ~ 1.20	17	0.996
CTDNA	0.040 ~ 1.20	24	0.991
RNA	0.10 ~ 1.20	98	0.994

表 2 实际样品的测定结果

金黄色葡萄球菌	本法所测值 ( $n=6$ )	紫外吸收法
DNA/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	59.2	51.0

#### 参考文献:

- [1] GUO X Q, ZHANG Z L, ZHAO Y B, et al. DNA - dye fluorescence enhancement based on shifting the dimer - monomer equilibrium of fluorescent dye [J]. Appl Spectrosc, 1997, 51: 1002.
- [2] GUO X Q, LI F, ZHAO Y B, et al. 番红花红 T 与表面活性的作用及其在标记 DNA 中的应用 [J]. 高等学校化学学报, 1996, 17: 1361.
- [3] Nakamura J, Igarashi S. Highly sensitive spectrofluorometric determination of nucleic acid based on the aggregation of two oppositely charged kinds of water soluble porphyrins [J]. Anal Lett, 1996, 29 (14): 2 453 ~ 2 461.

## Association of Dyes Bearing with Opposite Charges and Its Application in the Determination for Micro Amounts of Nucleic Acids

CHEN Xiao - lan, LI Dong - hui, ZHENG Hong, CHEN Qiu - ying, XU Jin - gou  
(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

**Abstract:** It has been found that the fluorescence of tetrasulfonated aluminum phthalocyanine was obviously quenched by cationic dyes, but recovered in the presence of nucleic acid. Based on this phenomenon, a novel method for the determination of nucleic acids was investigated. The method presented is sensitive and with simplicity in manipulation. Besides, since a fluorescent dye emitting at long wavelength region is employed, this method has the advantage of effectively reducing the interference from background fluorescence and scattering light.

**Keywords:** tetrasulfonated aluminum phthalocyanine; nucleic acids; dyes; DNA