

近红外荧光探针法测定核酸的研究

郑洪¹, 朱昌青², 陈小兰¹, 陈秋影¹, 李东辉¹, 许金钩¹

(1. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; 2. 安徽师范大学化学系, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 以阳离子花菁染料为荧光探针, 依近红外荧光猝灭测定核酸. 最大激发及发射波长分别为 765、790nm. 核酸测定的线性范围为 0.08 ~ 1.2 μ g/mL (CT DNA 及 SM DNA), 0.1 ~ 1.6 μ g/mL (yeast RNA).

关键词: 近红外荧光; 核酸; 荧光法; 花菁

中图分类号: O657

文献标识码: A

近红外染料因其吸收及荧光光谱均处于近红外区, 且摩尔吸光系数高, 而生物分子在这个波段几乎没有荧光发射, 因而具有背景干扰小, 灵敏度高等优点^[1]. 基于以上考虑, 本文建立了以阳离子型近红外花菁染料做为荧光探针, 在近红外区测定核酸的新方法.

1 仪器与试剂

760CRT 型紫外 - 可见分光光度计(上海第三分析仪器厂). Hitachi 650 - 10S 荧光分光光度计. 脱氧核糖核酸(DNA)溶液, 上海华美生化试剂公司生产. 阳离子近红外花菁染料, 系本实验室依照文献 [2] 合成. 其余试剂均为分析纯.

2 实验方法

于 10mL 容量瓶中依次加入 0.5mL 0.1mol/L 的六次甲基四胺 - HCl 缓冲溶液(pH6.0), 一定量的标准 DNA 溶液或样品液, 以二次去离子重蒸水稀释至刻度, 混合均匀; 然后再加入 0.3mL 近红外花菁染料的二甲亚砜(0.1mmol/L)溶液, 混合均匀. 放置 25min 后, 以 765nm 为激发波长, 790nm 为发射波长测定荧光强度.

3 DNA 或 RNA 对近红外花菁染料体系的荧光光谱的影响

在 DNA 或 RNA 存在条件下, 该近红外花菁阳离子染料的激发波长与发射波长保持不变, 但峰的荧光强度降低.

4 实验条件的优化

结果表明, pH 在 5.0 ~ 8.0 范围内, 近红外花菁染料浓度为 3.0 μ mol/L, 温育时间为 30min 时, F_0/F 值最大且稳定. 参照实验方法测定核酸的工作曲线, 结果见表 1. 结果还表明, 外加物质, 如常见无机离子、氨基酸、碱基等对反应体系没有大的影响, 但蛋白质影响较为显著, 须除去后方可测定. 合成样品回收率实验结果见表 2.

收稿日期: 1999 - 06 - 17

作者简介: 郑洪 (1967 -), 男, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29775021)

表 1 核酸测定工作曲线

核酸	线性范围/ ng · mL ⁻¹	线性方程	检测限/ ng · mL ⁻¹	线性相关系数
CT DNA	80 ~ 1 200	$F_0/ F = 0.815 9 + 1.916 1 C$	30	0.9948
SM DNA	80 ~ 1 200	$F_0/ F = 0.788 4 + 2.475 2 C$	25	0.9983
Yeast RNA	100 ~ 1 600	$F_0/ F = 1.025 3 + 0.851 3 C$	70	0.9963

表 2 合成样品回收实验结果

(n = 5)

合成样测得值 ¹⁾ / ng · mL ⁻¹	加入量/ ng · mL ⁻¹	测得量/ ng · mL ⁻¹	回收率/ %
SM DNA (372)	400	762	97.5
Yeast RNA (383)	400	756	93.3

1) 合成样品组成: Salmon Sperm DNA 400 ng/mL: 腺嘌呤, 鸟嘌呤, 胞嘧啶 150 ng/mL, 胸腺嘧啶 100 ng/mL; Mg²⁺ 0.1 μmol/L; Ca²⁺ 50 nmol/L. Yeast RNA 400 ng/mL: 腺嘌呤, 鸟嘌呤, 胞嘧啶 150 ng/mL, 胸腺嘧啶 100 ng/mL; H₂PO₄²⁻ 0.1 μmol/L

参考文献:

- [1] Patonay G, Antonie M D. Near - infrared fluorogenic labels: new approach to an old problem [J]. Anal Chem, 1991, 63: 321A.
- [2] Narayanan N, Patonay G. A new method for the synthesis of heptamethine cyanine dyes: synthesis of new near - infrared fluorescent labels [J]. J Org Chem, 1995, 60: 2391 ~ 2395.

A Cationic Cyanine as a Near - IR Fluorescent Probe for Determination of Nucleic Acids

ZHENG Hong¹, ZHU Chang - qing², CHEN Xiao - lan¹, CHEN Qiu - ying¹, LI Dong - hui¹, XU Jin - gou¹

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry, Anhui Normal University, Anhui Wuhu 241000, China)

Abstract: A method with an cationic near - IR cyanine as a fluorescent probe was developed for the determination of nucleic acids. The near - IR cyanine shows the maximum excitation and emission wavelengths at 765 and 790 nm, respectively, in aqueous solution. The method is based on the fluorescence decrease of near - IR cyanine in the presence of nucleic acids. Under optimal conditions, the ratio value of fluorescence intensity in the absence and presence of nucleic acids was proportional to the concentration of nucleic acids over the range of 0.08 ~ 1.2 μg/mL for CT DNA or SM DNA, and 0.1 ~ 1.6 μg/mL for Yeast RNA. The detection limits were 30 ng/mL for CT DNA, 25 ng/mL for SM DNA and 70 ng/mL for Yeast RNA. The relative standard deviation (n = 6) were 2.1 % for 500 ng/mL CT DNA level.

Keywords: near infrared (Near - IR); nucleic acids; fluorometric method; cyanine