

文章编号: 1000- 2243 (1999) S0- 0105- 02

耐尔蓝荧光探针法测定核酸

陈秋影, 杨黄浩, 李东辉, 郑洪, 朱庆枝, 许金钧

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 基于 DNA 或 RNA 对耐尔蓝荧光的猝灭效应, 建立一种新的 DNA 或 RNA 的测定方法. 在最优条件下, 测定小牛胸腺 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲱鱼精子 DNA 和酵母 RNA 的线性范围分别为: $3.0 \sim 2.0 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ 、 $9.0 \sim 2.0 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ 、 $5.4 \sim 5.0 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ 和 $27 \sim 10 \times 10^3 \text{ ng/mL}$. 检测限分别是 3.0 ng/mL 、 9.0 ng/mL 、 5.4 ng/mL 和 27 ng/mL , 相对标准差 ($n=6$) 是 2.1%. 本文还讨论了干扰物质的影响.

关键词: 荧光探针; 耐尔蓝; 核酸; 红区

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

1 实验方法

于 10mL 容量瓶中加入 1.0mL 六次甲基四胺(HT) - HCl (含 0.1mol/L 六次甲基四胺) 缓冲溶液和一定量的 CTDNA (或 RNA) 溶液和 1.0mL 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 NB, 稀释至刻度, 摇匀, 室温下放置 5min 后, 在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 630\text{nm}/673\text{nm}$ 下分别测定试样及空白溶液的荧光强度 F 和 F_0 , 以 $F_0 - F$ 值对 CTDNA 或 RNA 浓度作图.

2 DNA (或 RNA) 对耐尔蓝荧光光谱的影响

在 DNA (或 RNA) 存在条件下, 耐尔蓝的最大激发波长发生红移(633nm), 而发射波长不发生变化, 只是峰的荧光强度降低.

3 分析条件优化

对 pH 和不同缓冲液的影响进行了考察. 实验结果表明, 在 pH= 6.2 时, DNA 对 NB 荧光的猝灭程度最大. 对于 tris-HCl、HT-HCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 和 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$ 4 种缓冲体系, 在 HT-HCl 缓冲体系中荧光猝灭最大. 另外, 发现 NB 的浓度越大, 在 DNA 作用下的猝灭程度也越大, 当 NB 浓度在 $0.8 \sim 2.0 \mu\text{mol/L}$ 范围内, 荧光猝灭达到最大. 在本实验中, 我们选择 NB 浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$.

4 工作曲线、检出限及精密度

以 $F_0 - F$ 的值对小牛胸腺 DNA (CTDNA)、鲑鱼精子 DNA (SMDNA)、鲱鱼精子 DNA (FSDNA) 和酵母 RNA (yeast RNA) 浓度作图, 得工作曲线. 工作曲线的线性范围、方法的检测限及线性相关系数见表 1.

收稿日期: 1999- 06- 17

作者简介: 陈秋影 (1973-), 女, 博士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29775021)

5 合成样的测定

一定量的 DNA 或 RNA 在干扰物质存在下测回收率, 结果见表 2.

表 1 本法的分析参数

核酸	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	检出限/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	线性相关系数
CTDNA	0.0~0.4	3.0	0.998
	0.4~2.0		0.999
SMDNA	0.0~0.4	9.0	0.999
	0.4~2.0		0.995
	0.0~0.3		0.993
FSDNA	0.3~1.0	5.4	0.995
	1.0~5.0		0.995
Yeast RNA	0.0~4.0	27	0.994
	4.0~10		0.999

表 2 合成样的测定

核酸加入量 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	加入的干扰物	核酸回收量 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率/%
CTDNA 100	BSA, PO_4^{3-} , Mn^{2+} , Ca^{2+}	97.87	97.9
SMDNA 400	A, T, C, G, PO_4^{3-} , Mn^{2+} , Ca^{2+}	384.74	96.2
Yeast RNA 500	Mg^{2+} , Pb^{2+} , IgG, Cu^{2+} , Mn^{2+} , A, T, C, G	500.19	99.7

注: 干扰物质浓度: BSA 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; PO_4^{3-} 1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$; IgG 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; A, T, C 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; G 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Mn^{2+} , Ca^{2+} 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$; Mg^{2+} 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$; Cu^{2+} 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Application of a Red-Region Fluorescence Dye, Nile Blue, in Nucleic Acids Assay

CHEN Qiu-ying, LI Dong-hui, YANG Huang-hao, ZHENG Hong, ZHU Qing-zhi, XU Jin-gou

(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: A novel fluorimetric method was proposed for the rapid determination of DNA and RNA based on their quenching effect on the cationic red-region fluorescent dye, Nile blue. Under optimum conditions, the calibration curves for the determination of Calf thymus DNA (CT DNA), Salmon DNA (SM DNA), Herring sperm (HS DNA) and yeast RNA were linear over the range of 3.0–2.0 $\times 10^3$ ng/mL, 9.0–2.0 $\times 10^3$ ng/mL, 5.4–5.0 $\times 10^3$ ng/mL and 27–10 $\times 10^3$ ng/mL, respectively. The detection limits were 3 ng/mL for CT DNA, 9.0 ng/mL for SM DNA, 5.4 ng/mL for HS DNA and 27 ng/mL for RNA, respectively. The relative standard deviation ($n = 6$) was within 2.1% in the middle of linear range. Interference concerning some interesting coexisting substances with the determination of DNA was also examined.

Keywords: fluorescent probe; Nile blue; nucleic acid; red-region