

# 在 SDS 存在下以利凡诺为荧光探针测定 DNA

李文友, 许金钧, 朱庆枝, 郭祥群

(厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了在 SDS 存在下, 以利凡诺 (RVN) 为荧光探针测定 DNA 的新方法. 在适量 SDS 存在下, RVN 的荧光被强烈地猝灭直至最低值. 但于上述 RVN- SDS 体系中加入 DNA 后, 体系的荧光强度增强, 且荧光光谱发生移动. 在一定条件下, 荧光强度增强值与加入 DNA 的量在一定浓度范围内呈现良好的线性关系.

关键词: 利凡诺; DNA; 测定; 荧光探针

中图分类号: O657. 39

文献标识码: A

测定核酸比较常用的荧光探针有溴化乙锭<sup>[1]</sup>、Hoechst 33258<sup>[2]</sup>、4', 6- 二咪基- 2 苯吡啶<sup>[3]</sup>、分子内二聚体如噻唑橙二聚体<sup>[4]</sup>等. 利凡诺水溶液呈现出很强的荧光, 在适宜量的阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠存在下, 形成几乎不发荧光的体系. 在 CT DNA 存在下, 该体系的荧光强度随着 CT DNA 浓度的增大而增强. 基于上述实验现象, 本文建立了在十二烷基硫酸钠 (SDS) 存在下以利凡诺为荧光探针测定 DNA 的新方法.

## 1 实验方法

于 10mL 容量瓶中加入 1.0mL pH6.0 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液, 一定量的 RVN、SDS 和 CT DNA 溶液, 稀释至刻度, 摇匀. 温育 5 min 后, 在  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 369 \text{ nm}/492 \text{ nm}$  下测定其荧光强度  $F$ , 同时测定试剂空白  $F_0$ , 并计算出  $\Delta F$  ( $\Delta F = F - F_0$ ).

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 对 RVN- SDS 体系荧光光谱的影响

DNA 的存在使 RVN- SDS 体系 (RVN 的浓度为  $14 \mu\text{mol/L}$ , SDS 的浓度为  $0.15 \text{ mmol/L}$ ) 的最大激发波长红移至  $369 \text{ nm}$ , 最大发射波长蓝移至  $492 \text{ nm}$ . 故本实验选择测定波长为  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 369 \text{ nm}/492 \text{ nm}$ .

### 2.2 pH 值的影响

当 RVN 为  $14 \mu\text{mol/L}$ , CT DNA 为  $2.0 \mu\text{g/mL}$ , SDS 为  $0.15 \text{ mmol/L}$ , 缓冲液为  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$  ( $\text{pH} 4.0 \sim 5.6$ );  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\text{pH} 5.8 \sim 7.2$ ), 各缓冲液浓度皆为  $0.10 \text{ mol/L}$  时, pH 值对  $\Delta F$  的影响见图 1. 可见 pH 在  $5.4 \sim 6.0$  之间时,  $\Delta F$  最大且稳定. 本文实验选择缓冲溶液的 pH 值为  $6.0$ .

### 2.3 RVN 溶液用量的影响

RVN ( $0.14 \text{ mmol/L}$ ) 溶液的用量在  $0.80 \sim 1.5 \text{ mL}$  范围内,  $\Delta F$  值最大且稳定. 本实

验选择 0.14mmol/L 的 RVN 溶液用量为 1.0mL.

### 2.4 SDS 用量的影响

SDS (1.5 mmol/L) 溶液的用量在 0.90~ 1.1mL 范围内,  $\Delta F$  值最大且稳定. 本实验选择 1.5mmol/L 的 SDS 溶液用量为 1.0mL.

### 2.5 温育时间的影响

温育时间在 3~ 40min 之间时,  $\Delta F$  最大且稳定. 本实验选择温育时间为 5min.

### 2.6 工作曲线、检出限及精密度

以  $\Delta F$  对 DNA 浓度作图得工作曲线. 曲线的线性范围、检出限及精密度见表 1.

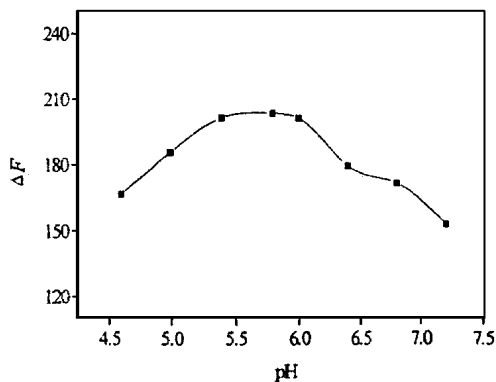


图 1 pH 值对  $\Delta F$  的影响

表 1 本文方法的分析参数

测取物	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$r^{(1)}$	LOD <sup>(2)</sup> / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD <sup>(3)</sup> (n=7) / %
CT DNA	0~ 3.0	0.999 2	62	1.1
	3.0~ 10.0	0.999 3		1.0

注: 1)  $r$  = 相关系数; 2) LOD 为检出限; 3) RSD 表示 7 次测量 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  或 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA 的相对标准偏差

### 参考文献:

[1] LePecq J B, Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination [J]. Anal Biochem, 1966 (17): 100.

[2] Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure [J]. Anal Biochem, 1980, 102: 344.

[3] Kapuscinski J, Skoczylas B. Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay [J]. Anal Biochem, 1977, 83: 252.

[4] Rye H S, Daborn J M, Quesada M A, et al. Fluorometric assay using dimetric dyes for double and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity [J]. Anal Biochem, 1993, 208: 144.

## Determination of DNA using Rivanol as the Fluorescent Probe in the Presence of SDS

LI Wen-you, XU Jin-gou, ZHU Qing-zhi, GUO Xiang-qun  
(Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The quantitative method for DNA using rivanol (RVN) as the fluorescent probe in the presence of SDS was proposed. Under proper conditions, addition of DNA to a mixture of RVN and SDS resulted in enhanced fluorescence and spectral shifts of RVN-SDS system. The calibration graph was linear in the range of 0~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the limit of detection was 62 $\text{ng}/\text{mL}$  CT DNA.

**Keywords:** rivanol; DNA; determination; fluorescent probe