

核糖核酸与中性红作用机理及含量测定的研究

司文会

苏州农业职业技术学院, 江苏 苏州 215008

摘 要 研究了在弱酸性介质中小分子中性红与生物大分子核糖核酸强烈相互作用, 导致分子构象的变化, 引起分子光谱最大吸收波长和吸光度的变化。应用光谱法研究了反应体系酸度、缓冲溶液用量、中性红用量、反应时间对反应速度的影响, 确定了实验最佳条件, 提出并建立了测定核糖核酸的新方法。线性范围为 $0 \sim 9.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检出限为 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相关系数 r 为 0.9998。实际样品测定, 结果满意。初步探讨了反应机理, 认为静电缔合作用使中性红分子与凝聚在 RNA 分子链上的反离子交换, 然后, 以协同方式与 RNA 分子发生键合, 使中性红平面共轭芳香结构受到破坏, π 电子叠合程度降低, 吸光度降低, 最大吸收波长紫移。

关键词 核糖核酸; 中性红; 光谱法; 静电缔合

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)06-1181-04

引 言

核糖核酸(RNA)的研究是近年来生命科学研究的重点和热点^[1], RNA的研究成果将成为制服病毒和癌症的强大工具^[2-4]。定量方法是研究RNA的基础, 见诸报道的有紫外分光光度法^[5]、显微分光光度法^[6]、定磷法^[7]和地衣酚法^[8]等。应用阳离子染料定量测定DNA含量的方法较多^[9-12], 但据此测定RNA含量的研究甚少。研究RNA与阳离子染料作用机理对改进生理学中基因传输载体、提高转染效率十分重要。由于RNA常为单链结构, 与某些阳离子染料作用表现出与DNA双螺旋结构不同的光谱行为。实验发现, 中性红与RNA作用溶液有沉淀生成, 在显微镜下可看到圆球状晶体, 在535 nm处紫移程度在一定范围内随RNA量的增加而增大, 535 nm处的最大吸光度与RNA的含量呈良好的线性关系, 提出并建立了测定RNA含量的新方法, 检测限量 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围 $0 \sim 9.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相关系数 r 为 0.9998。方法简便、快速、灵敏度高, 实际样品分析, 结果满意。初步探讨了反应机理, 认为静电缔合作用使中性红分子与凝聚在RNA分子链上的反离子交换, 然后, 以协同方式与RNA分子发生键合, 使中性红平面共轭芳香结构受到破坏, π 电子叠合程度降低, 吸光度降低, 最大吸收波长紫移。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

UV-756 紫外-可见光度计(上海精密科学仪器有限公司), 722S 光栅光度计(上海精密科学仪器有限公司), FA2004 电子天平(上海精科天平厂), pH-3C 数显酸度计(上海雷磁仪器厂), 生物显微镜(江南光学仪器厂), SYZ-550 型石英亚沸高纯水蒸馏器(江苏金坛金城实验仪器厂)。

核糖核酸标准溶液(中国医药集团上海化学试剂公司): $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液, 冰箱内保存, 用时逐级稀释; 伯瑞坦-罗比森(B-R)缓冲溶液^[13]: 在 100 mL 三酸混合液(磷酸+乙酸+盐酸, 浓度均为 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 加入指定量的 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液, 调整所需 pH, 用酸度计测定; 中性红溶液: $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液; 活性干酵母(湖北安琪酵母股份有限公司); 实验用水为二次石英亚沸蒸馏水, 试剂均为 A.R 级或 G.R 级。

1.2 实验方法

在 25 mL 的比色管中依次加入 pH 5.2 的 B-R 缓冲溶液 1.2 mL, 中性红溶液 3.0 mL 和 RNA 标液 1.0 mL, 稀释至刻度, 摇匀, 放置 5 min 后, 以水为参比, 在设定波长范围 200~1000 nm 扫描吸收光谱, 并测定 535 nm 处样品溶液吸光度 A 、试剂空白吸光度 A_0 , 并计算吸光度差值 $\Delta A(A_0 - A)$ 。

收稿日期: 2006-02-13, 修订日期: 2006-05-26

基金项目: 苏州农业职业技术学院自然科学研究基金项目(ZR20040014)资助

作者简介: 司文会, 1967年生, 苏州农业职业技术学院副教授

e-mail: swhe@mail.suai.com

©1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果与讨论

2.1 光谱特征和作用机理

吸收光谱如图 1。由图可知: 中性红分子中不饱和基团发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 或 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁, 270 和 535 nm 处有吸收峰; 中性红和 RNA 相互作用后, 535 nm 处的吸收峰强度随 RNA 量的增加而降低产生显著的减色效应, 下降程度与加入的 RNA 的量呈线性关系, 且 535 nm 处最大吸收波长紫移, 其程度随 RNA 量的增加而增大; 同时在 273 nm 处出现一肩峰, 其强度随 RNA 量的增加而减小, 表明中性红和 RNA 相互作用使中性红有结构的变化。进一步测其吸光度 A , 同时测定试剂空白的吸光度 A_0 , 结果波长 535 nm 处 ΔA 最大, 所以实验选择最佳波长 535 nm。中性红为吩噻嗪类杂环分子, 具有平面共轭芳香结构, 在 pH 5.2 的弱酸性溶液中, 中性红分子中吸电子基 $=NH$ 质子化使中性红分子带正电荷, 供电子基 $-N(CH_3)_2$ 仲胺基进一步质子化, 使助色作用

消退, 中性红分子带正电荷增强; RNA 常以单链的形式存在, 分子中有磷酸基和碱基, pK_{a1} 为 0.85, pK_{a2} 为 6.0, 磷酸基解离使 RNA 带负电荷; 静电缔合作用使中性红分子与凝聚在 RNA 分子链上的反离子交换, 然后, 以协同方式与 RNA 分子发生键合, 使中性红平面结构受到破坏, π 电子叠合程度降低, 颜色变浅, 吸收值降低, 最大吸收波长紫移。结构式如图 2 所示。

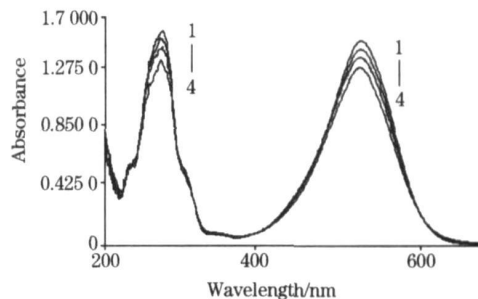


Fig 1 Absorption spectra

c_{RNA} —1: 0.0; 2: 50.0; 3: 100.0; 4: 150.0

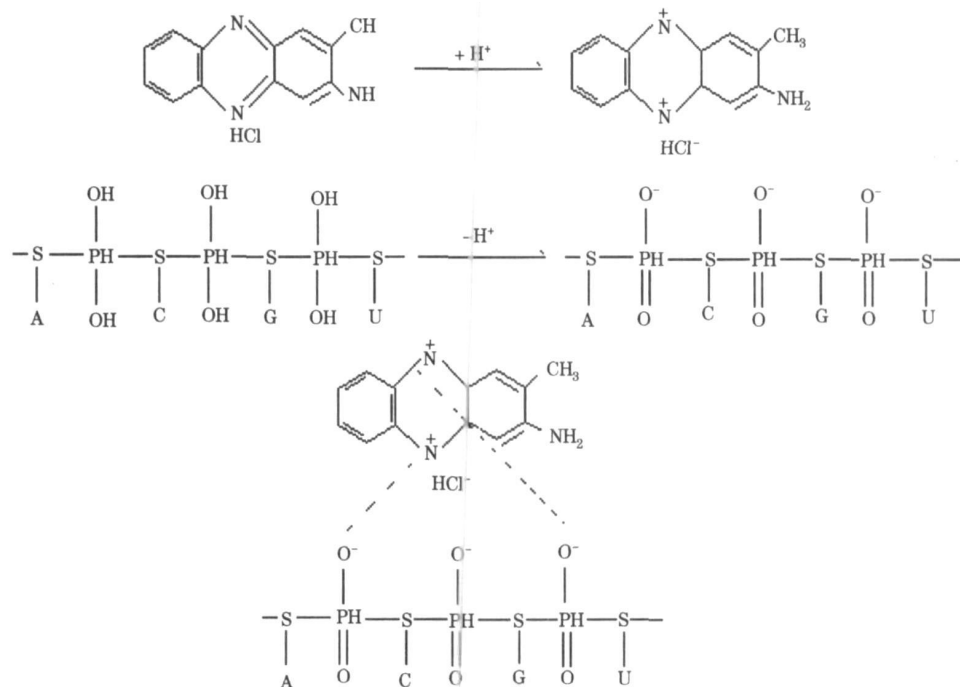


Fig 2 Schematic presentation of the interactions between RNA and neutral red

2.2 体系 pH 值与缓冲溶液用量的选择

改变 pH 值和缓冲溶液用量, 以试剂空白作参比, 在最大吸收波长处测定吸光度。实验表明, 在 pH 5.2、缓冲溶液 1.2 mL 时 ΔA 最大, 如图 3 和图 4 所示。故本实验选用 pH 值 5.2 的缓冲溶液 1.2 mL 体系。

由图 3 可知, ΔA 随着溶液 pH 的变化先增后减, 表明开始体系随着溶液 pH 增加 RNA 解离程度增大, 静电作用增强, 在 pH 4.0~9.0 范围内, pH 值为 5.2 时与 RNA 第二磷酸基解离的 pK_{a2} 值接近, RNA 解离接近最大值与中性红作用最强, 这时不仅存在静电作用, 并存在键合作用; pH 大于

5.2 后 RNA 随着溶液 pH 增加解离程度增加缓慢, 但中性红的质子化受到愈来愈强的抑制, 使静电作用减小、键合作用减弱, ΔA 减少。

2.3 中性红用量的影响

改变中性红溶液的用量, 结果见图 5, 当中性红溶液用量为 3.2 mL 时 ΔA 最大。从中性红的结构上看, 它含有配位能力较强的氮原子, 与 RNA 分子中碱基上的氢结合, 吸收发生紫移, 助色作用消失, 使溶液颜色变浅。

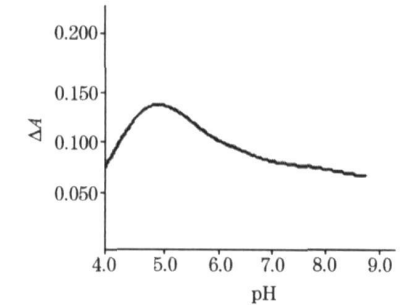


Fig 3 Effect of pH

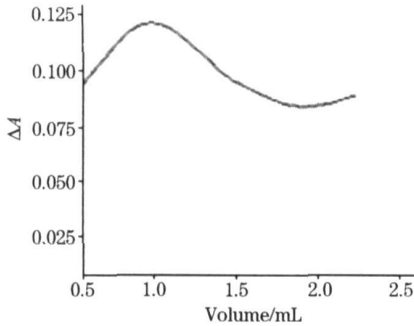


Fig 4 Effect of amount of buffer

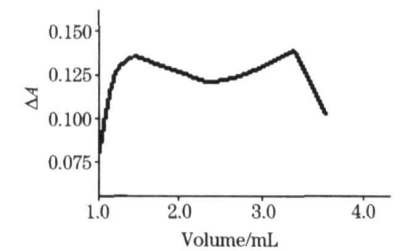


Fig 5 Effect of amount of neutral red

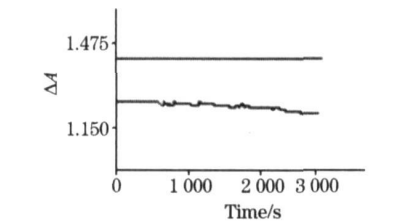


Fig 6 Effect of time

2.4 反应时间的影响

在优化实验条件下配制溶液，于 535 nm 处进行时间扫描，按同样方法对试剂空白进行时间扫描，结果如图 6。从时间扫描结果分析，中性红与 RNA 反应随着时间增加，吸光度稍微下降，而空白溶液吸光度在近 1 h 内保持稳定不变，是供电子仲胺基—N(CH₃)₂ 进一步质子化而降低了供电子能力，使助色作用消退，但对实验产生的影响不大。

2.5 试剂加入顺序和离子强度的影响

考察了三种不同的试剂加入顺序对体系的影响，发现试

剂加入顺序对体系无影响；在实验条件下用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaCl 水溶液调节体系的离子强度，考察其对吸光度的影响，结果 ΔA 受离子强度的影响很小。实验表明，在弱酸性介质中质子化的中性红与带负电荷的 RNA 不是发生静电吸附作用，而是静电缔合作用。

2.6 干扰实验

在相对误差 ±5% 时，按优化实验条件研究了可能共存的生物大分子以及 Ca²⁺、Fe³⁺ 和 K⁺ 等金属离子对体系的影响，最大允许浓度分别为溶菌酶 0.7 μg·mL⁻¹、DNA 4.5 μg·mL⁻¹、胃蛋白酶 4.0 μg·mL⁻¹、牛血清蛋白 2.4 μg·mL⁻¹、Ca²⁺ 4.6 μg·mL⁻¹、Fe³⁺ 5.0 μg·mL⁻¹ 以及 K⁺ 10.0 μg·mL⁻¹。在这些干扰成分中，DNA 和溶菌酶的干扰较大，当不含 RNA 时溶菌酶对中性红颜色变化影响很小，但与 RNA 共存时对体系的干扰很大，可能发生了协同效应；中性红与 DNA 可能发生类似与 RNA 的反应。

2.7 工作曲线

依本法，绘制工作曲线，如图 7 所示。由图 7 可知，体系吸光度差与 RNA 浓度的线性回归方程为 ΔA = -0.0056 + 0.3022c(μg·mL⁻¹)，相关系数为 0.9998。

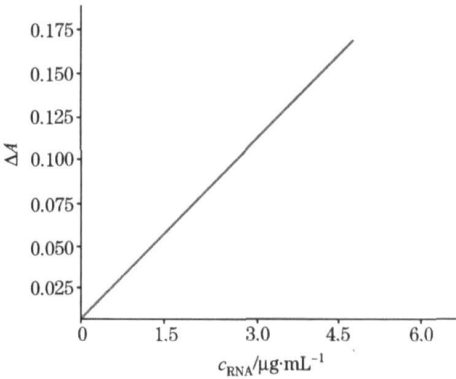


Fig 7 Standard curve

2.8 样品分析

取不同生产日期活性干酵母(湖北安琪酵母股份有限公司)1.0 g，用去离子水溶解稀释定容于 100 mL 容量瓶中，静置 24 h(控温在 0~4 ℃)，取上层清液进行加标回收实验并计算回收率，结果见表 1。

Table 1 Content of RNA in samples and recovery of RNA (μg·mL⁻¹, n=5)

样品	样品含量	加标量	测定值	RSD/%	回收率/%
1	0.56	5.00	5.58	1.14	103.57
2	0.44	5.00	5.44	2.29	100.00
3	0.60	5.00	5.58	1.56	96.67

3 结 论

在弱酸性介质中中性红以质子化正离子形式与 RNA 静电缔合，然后，以协同方式与 RNA 分子键合，使中性红平面

结构受到破坏, π 电子叠合程度降低, 颜色变浅, 吸收值降低, 最大吸收波长紫移。中性红与 RNA 的反应机理仅依据

紫外-可见吸收光谱的变化进行了初步探讨, 有待进一步研究, 但此法测定 RNA 灵敏度较高, 方法准确, 操作简单。

参 考 文 献

- [1] GUO Pei-xuan(郭培宣). Progress in Natural Science(自然科学进展), 2003, 13(8): 785.
- [2] LIAO Rong-xia, ZHOU Xin-jian(廖容霞, 周新建). Journal of Chemistry of Life(生命的化学), 2002, 22(4): 324.
- [3] Jacque J, Triques K, Stevenson M. Nature, 2002, 418: 435.
- [4] Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, et al. Oncogene, 2002, 21(37): 5716.
- [5] LU Sheng-dong(卢圣栋). Experimental Techniques of Modern Molecular Biology(现代分子生物学实验技术, 第2版). Beijing: Chinese Union Medical College Press(北京: 中国协和医科大学出版社), 1999. 69.
- [6] LI Liang-zhu, LI Ming-hua, et al(李良铸, 李明哗, 等). The Newest Technology to Make Biological Chemistry Medicine(最新生化药物制备技术). Beijing: Chinese Medicine Press of Science and Technology(北京: 中国医药科技出版社), 2002. 220.
- [7] XU Jian-qiu(许剑秋). Journal of Grain and Forage Industry(粮食与饲料工业), 1997, (9): 40.
- [8] YU AN Yu-sun(袁玉荪). Experiment of Biological Chemistry(生物化学实验, 第2版). Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1988. 130.
- [9] FANG Guang-rong, SONG Gong-wu, LI Ling(方光荣, 宋功武, 李玲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 631.
- [10] WANG Jing-wu, ZHU Xia-ping, SUN Hua, et al(汪敬武, 朱霞萍, 孙华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 899.
- [11] HUANG Xin-hua, LI Yuan-fang, FENG Ping, et al(黄新华, 李原芳, 奉萍, 等). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学), 2000, 28(6): 682.
- [12] ZHOU Min, MA Yong-jun, ZHANG De-yi, et al(周敏, 马永钧, 张德懿, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1656.
- [13] CHANG Wen-bao, LI Ke-an(常文保, 李克安). Concise Analytical Chemistry Handbook(简明分析化学手册). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1981. 264.

Studies on the Interaction between RNA with Neutral Red and Determination of RNA by Spectrophotometry

SI Wen-hui

Suzhou Agriculture College, Suzhou 215008, China

Abstract An analytical method for the determination of ribonucleic acid by spectrophotometry was established. At the maximum absorption wavelength for neutral red in B-R buffer solution, and under the best conditions, the decrease in the absorbance was linear with the amount of ribonucleic acid. The linearity range was $0.0-9.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the detection limit was $0.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the correlation coefficient was 0.9998. This method was simple, rapid, and selective. So its application to the determination of ribonucleic acid was satisfactory. The reaction mechanism was that the electrostatic interaction leads to molecular association of RNA with neutral red, resulting in anti-ion permutation and bonding reaction.

Keywords RNA; Neutral red; Spectroscopy; Electrostatic association

(Received Feb. 13, 2006; accepted May 26, 2006)