

甲苯胺蓝荧光猝灭法测定核酸

郭良洽, 叶芳贵, 林旭聪, 谢增鸿*

福州大学化学化工学院化学系, 福建 福州 350002

摘要 以甲苯胺蓝为荧光探针, 基于 DNA 对甲苯胺蓝的荧光猝灭作用, 建立了一种定量测定 DNA 的新方法。在 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 测定小牛胸腺 DNA 的线性范围为 $0.1 \sim 6.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 检测限为 $27 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该方法应用于实际样品樟树嫩叶中的 DNA 含量的测定, 获得了满意结果。

主题词 核酸; 甲苯胺蓝; 荧光探针

中图分类号 O657.3

文献标识码 A

文章编号 1000-0593(2006)01-0121-04

引言

核酸作为重要的遗传物质, 其研究内容是化学、生物等诸多学科中最为活跃的领域之一, 而核酸的定量测定是研究核酸的基础。测定核酸的方法主要是紫外-可见分光光度法、荧光法、共振散射法等。荧光光谱法具有选择性好和灵敏度高的优点, 日益成为研究核酸等生物大分子的重要手段。但是由于核酸自身的荧光很弱, 利用内源荧光无法进行定量测定或结构分析, 这就需要引入一种荧光分子或离子, 即利用外源荧光获得有用的信息。溴乙锭方法的提出受到人们的关注, 但是由于溴乙锭的致癌性, 使它们的进一步应用受到了很大的限制, 人们开始寻找新的探针。迄今为止, 人们常用于核酸研究的荧光探针主要包括有机染料^[1-3]、金属离子^[4-5]、金属离子配合物^[6-9]、能量转移体系^[10]、半导体纳米粒子^[11]等。

甲苯胺蓝属于吩噻嗪类染料, 已用于共振散射法^[12]和分光光度法^[13]测定 DNA, 而用甲苯胺蓝为荧光探针来测定核酸未见报道。本文研究了甲苯胺蓝(TB)与核酸相互作用的荧光体系, 在 pH 8.5 Tris-HCl 缓冲溶液中, 体系的荧光随着核酸的加入而被猝灭, 其猝灭的程度与 DNA 的浓度在一定范围内有良好的线性关系。据此, 建立了一种操作简单、灵敏度高、干扰少的测定核酸的荧光分析体系。已用于实际样品樟树嫩叶中的 DNA 含量的测定, 结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光分光光度计(Varian 公司), pH-3C 型精密酸度计(上海大普仪器有限公司), UV-1100 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司), 旋涡混合器 QI-901(江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

小牛胸腺 DNA(α DNA)(AR, Sigma), 配制成 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 使用液; 樟树嫩叶 DNA 浓缩液, 由福建师范大学生物工程中心提供; 甲苯胺蓝(TB)(AR, 上海化学试剂公司), 配制成 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液; Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.5), 由 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 溶液与 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液按一定比例混合。其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

移取 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲苯胺蓝溶液 1.0 mL, pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液 1.0 mL 和适量 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ α DNA 溶液于 10 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀。在适当的测量参数下, 在荧光分光光度计和分光光度计进行测定。

2 结果与讨论

2.1 光谱研究

图 1 为在 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.5)中不同浓度的 α DNA 存在时体系的荧光光谱图。在 Tris-HCl 缓冲溶液中, 荧光染料 TB 的最大激发波长为 624 nm, 最大发射波长为 658 nm。从图中可知, 随着 α DNA 的加入, TB 的荧光强度明显降低, 且最大激发波长和最大发射波长的位置没有发生改变。图 2 为不同浓度的 α DNA 存在时体系的吸收光谱图。随着 α DNA 的加入, TB 的最大吸收波长 624 nm 处的吸收强度降低, 但当 α DNA 浓度达到一定量时, 随着 α DNA 浓度的继续增加, 最大吸收波长 624 nm 处的吸收反而升高。这一现象与文献[13]

收稿日期: 2004-06-26, 修订日期: 2004-11-15

基金项目: 福建省自然科学基金(E0310014, D0310010), 福建省教育厅科研项目(JB03010)和福建省科技计划项目(2002Y51)资助

作者简介: 郭良洽, 1975 年生, 福州大学化学化工学院讲师 * 通讯联系人

报道一致。由于 DNA 加入后荧光强度显著下降, 且对紫外吸收光谱具有减色效应, 表明 DNA 对 TB 的猝灭为静态猝灭。

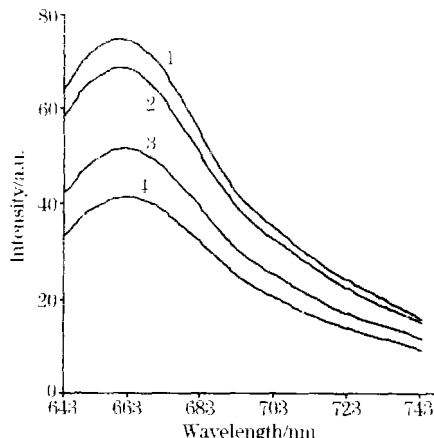


Fig 1 The fluorescence spectra of TB DNA in the presence of different concentration of DNA

$c_{\text{DNA}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.0; 3, 1.2; 4, 1.5

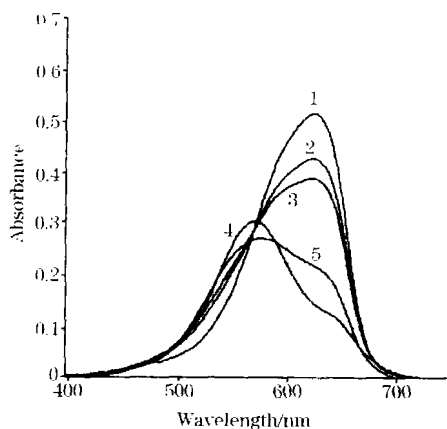


Fig 2 The absorption spectra of TB DNA in the presence of different concentration of DNA

$c_{\text{DNA}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$: 1, 0; 2, 1.5; 3, 2.0; 4, 4.0; 5, 6.0

the concentration of TB was $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.2 温度的影响

温度对荧光猝灭的影响是判定体系是否静态猝灭的重要依据。测定温度分别恒定在 4, 20, 40 °C 下, 测定体系荧光猝灭随 αDNA 浓度的变化情况。 F_0 , F 分别为无 αDNA 和有 αDNA 情况下体系的荧光强度, 根据荧光猝灭方程: $F_0/F = 1 + k_q[Q]$, 以荧光强度猝灭比值 F_0/F 对猝灭剂 αDNA 的浓度作图, 如图 3 所示。从图中可见随着温度的升高, 猝灭常数降低。结果表明本体系荧光猝灭模式是静态猝灭。4, 20, 40 °C 时, αDNA -TB 结合常数分别为 2.75×10^5 , 2.047×10^5 , $5.96 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

2.3 缓冲溶液 pH 的选择

调节缓冲溶液的 pH 值, 测定体系的荧光猝灭比值随 pH 的变化情况。实验表明, 缓冲溶液的 pH 在 6.5~9.5 之间, 随着 pH 的升高, αDNA 对 TB 的荧光猝灭程度增大, 当 pH

8.5 时, 猝灭强度达到最大, 然后随着 pH 的升高, 其猝灭强度逐渐降低。因此, 缓冲溶液的最佳 pH 值为 8.5。实验还考察了缓冲溶液的用量对体系荧光猝灭强度的影响, 实验结果表明, 当缓冲液(pH 8.5)的用量为 1.0 mL 时, 体系的荧光猝灭比值 F_0/F 最大。

2.4 TB 浓度的影响

固定 αDNA 的浓度为 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 考察 TB 浓度对体系的荧光强度猝灭比值 F_0/F 的影响, 如图 4 所示。TB 的浓度在 $3.0 \times 10^{-7} \sim 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 随着 TB 浓度增加, αDNA 对体系的荧光猝灭程度也增大, 当 TB 浓度在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 达到最大。而后随着 TB 浓度的增加, 其荧光猝灭强度反而减小。因此, 本实验选择 TB 的最佳浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

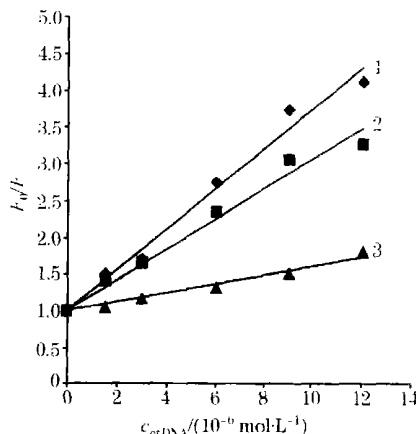


Fig 3 Effect of incubation temperature on fluorescence quenching of TB by DNA

1, 4 °C; 2, 20 °C; 3, 40 °C

the concentration of TB was $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

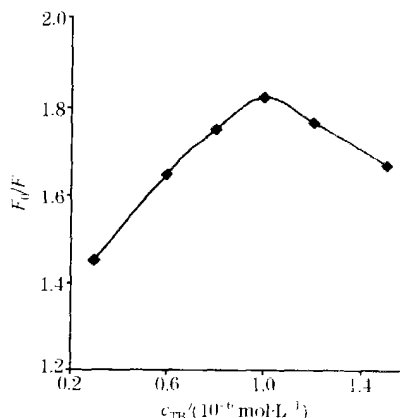


Fig 4 Effect of concentration of TB on the value of F_0/F

the concentration of DNA was $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.5 线性范围及检测限

在最佳实验条件下, αDNA 的浓度在 $0.10 \sim 6.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时, 荧光猝灭程度与 αDNA 浓度呈线性关系, 其线性回归方程为: $F_0/F = 0.4456c + 1.0922$, 相关系数

Table 1 Tolerance of foreign substances (pH 8.5, $c_{TB} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{dDNA}} = 1.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

干扰物质	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	相对误差/ %	干扰物质	存在浓度	相对误差/ %
K^{2+} (KCl)	5.0×10^{-5}	- 3.5	H_2PO_4^- (NaH_2PO_4)	$8.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.9
Cu^{2+} ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$)	1.0×10^{-5}	- 2.2	Fe^{3+} (FeCl_3)	$2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	- 2.5
Mg^{2+} ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$)	6.0×10^{-6}	- 6.5	腺嘌呤	$2.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.7
Zn^{2+} (ZnCl_2)	2.0×10^{-6}	- 1.3	鸟嘌呤	$2.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.3
Ca^{2+} (CaCl_2)	4.0×10^{-6}	5.6	胞嘧啶	$1.8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	- 2.8
Al^{3+} (AlCl_3)	4.0×10^{-6}	- 3.0	胸腺嘧啶	$4.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.8
Pb^{2+} ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	2.0×10^{-6}	- 3.4	牛血清白蛋白	$4.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.2

r 为 0.996 0, 检测限为 $27 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。敏, 重现性较好。

2.6 共存物质的影响

试验了各种金属离子、碱基、及蛋白质的加入对核酸测定的影响, 结果见表 1。实验结果表明, 该体系对大部分常见金属离子、碱基、蛋白质等都具有较好的抗干扰能力。

2.7 样品测定

本法应用于实际样品樟树嫩叶 DNA 的测定, 结果见表 2, 回收率在 103.35% ~ 105.54% 之内。本法测定较为灵

Table 2 Determination of DNA in camphor leaf DNA ($n = 3$)

样品	DNA 加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DNA 测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
樟树嫩叶 DNA	-	1.782 1	-
	1.0	2.836 3	105.42
	2.0	3.855 3	103.66
	3.0	4.886 9	103.35

参 考 文 献

[1] CHEN Fang, ZHOU Fei, HE Zhirke(陈芳, 周飞, 何治柯). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(12): 1450.

[2] WANG Jingwu, ZHU Xierping, SUN Wei, XUE Jiar guo, WANG Zhaor xi, et al(汪敬武, 朱霞萍, 孙, 薛建国, 王兆喜, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 899.

[3] LI Werr you, WU Hui ling, HE Xi wen, et al(李文友, 吴会灵, 何锡文). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(10): 1787.

[4] Prat O, Lopez E, Mathis G. Analytical Biochemistry, 1991, 195: 283.

[5] HUANG Cheng zhi, LI Ke an, TONG Sherr yang(黄承志, 李克安, 童沈阳). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1997, 25(7): 768.

[6] Ci Yunxiang, Li Yuanzong, Liu Xiaojing. Analytical Chemistry, 1995, 67(11): 1785.

[7] WANG Xing min, SONG Yr min, TENG Xier lan, GENG Zhr yuan, YANG Pei ju, et al(王兴民, 宋玉民, 滕秀兰, 耿志远, 杨培菊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(3): 339.

[8] LUO Li, JIANG Chong qiu, LI Lei(罗黎, 江崇球, 李磊). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(12): 1504.

[9] ZHU Zhaor cai, WANG Jing, ZHU Hong bin(朱展才, 汪静, 朱红斌). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2002, 30(11): 1319.

[10] GAO Feng, ZHU Chang qing, WANG Lun(高峰, 朱昌青, 王伦). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 85.

[11] WANG Le yu, GUO Chang, LI Maor guo, et al(汪乐余, 郭畅, 李茂国, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(1): 83.

[12] XIAO Xi lin, WANG Yong sheng, LI Guir ong, LÜ Chang yin(肖锡林, 王永生, 李贵荣, 吕昌银). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 190.

[13] Killeen Anthony A. Microchemical Journal, 1995, 52(3): 333.

Determination of Nucleic Acids Using Toluidine Blue as a Fluorescence Probe

GUO Liang qia, YE Fang gui, LIN Xu cong, XIE Zeng hong*
Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

Abstract A new fluorimetric method has been developed for the determination of deoxyribonucleic acid (DNA) with toluidine blue(TB) as a fluorescence probe. It is based on the fluorescence quenching of toluidine blue in the presence of DNA. In Tris-HCl buffer solution (pH 8.5), the calibration graph was linear over the range $0.10 \sim 6.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for ctDNA, and the detection limit was $27 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The result of the de

termination of DNA of camphor tree's leaf by this method was satisfactory.

Keywords Nucleic acids; Toluidine blue; Fluorescence probe

(Received Jun. 26, 2004; accepted Nov. 15, 2004)

* Corresponding author

《光谱学与光谱分析》投稿简则

《光谱学与光谱分析》是由中国科协主管,中国光学学会主办,钢铁研究总院、中国科学院物理研究所、北京大学、清华大学共同承办的专业学术期刊。国内外公开发行,从 2004 年起为月刊,大 16 开,2005 年起,改为月刊每期 160 页,2006 年仍为月刊,每期 192 页。《光谱学与光谱分析》主要报道我国光谱学与光谱分析领域内具有创新性科研成果,及时反映国内外光谱学与光谱分析的进展和动态;发现并培育人才;推动和促进光谱学与光谱分析的发展。为科教兴国服务。读者对象为从事光谱学与光谱分析的科研人员、教学人员、分析测试人员和科研管理干部。

栏目设置和要求

1. 研究报告 要求具有创新性的研究成果,一般文章以 8000 字(包括图表、参考文献、作者姓名、单位和中文、英文摘要,下同)为宜。

2. 研究简报 要求在前人研究的基础上有重大改进或阶段性研究成果,一般不超过 5000 字。

3. 评述与进展 要求评述国内外本专业的发展前沿和进展动态,一般不超过 10000 字。

4. 新仪器装置 要求介绍新型光谱仪器的研制、开发、使用性能和应用,一般不超过 5000 字。

5. 来稿摘登 要求测试手段及方法有改进并有应用交流价值,一般以 3000~4000 字为宜。

稿件要求

1. 投稿者请经本刊编委(或历届编委)一人或本专业知名专家推荐,并附单位保密审查意见及作者署名顺序,主要作者介绍。文章有重大经济效益或有创新者,请说明,同时注明受国家自然科学基金或省部级基金资助情况。

2. 来稿要观点明确、数据真实可靠、层次分明、言简意明、重点突出。来稿必须字迹清晰(含各种符号和外文字母大写、小写、正体、斜体;希腊字母、拉丁字母;上角、下角标位置应标清楚)。中文摘要以 300 字为宜,英文摘要以 1500 字符为宜;另附主题词。要求来稿应达到“齐、清、定”,中文、英文文字通顺,方可接受送审。投稿时请写明联系电话和 E-mail。

3. 来稿务请用 A4 开纸计算机单面(用 4 号字,行距一倍)打印,一式两份。等待通知再行修改,请勿“一稿两投”,一经发现一稿两投,作者要付本刊审校排费。

4. 文中插图请用墨笔精绘,插图黑白反差要大。坐标用铅笔准确标明,图幅大小:单栏图 7.5cm(宽)×6cm(高);双栏图:14cm(宽)×6cm(高);图中数字、图题、表题全部用中文、英文对照,图中数字、中文、英文全用 6 号字。在文中留出该图大小一致的空白(另请备一份合格的图附在文章的后边)。

5. 文中出现的单位必须按“中华人民共和国计量标准”及有关 GB 标准规定缮写。物理量符号一律用斜体,单位符号和词头用正体字母。

6. 名词术语,请参照全国科学技术名词规定缮写。

7. 参考文献,采用顺序编码制,只列主要文献;内部资料、私人通讯、未经公开发表的一律不能引用。日文、俄文等非英文文献,请用英文表述;中文文献和中文图书采用中英文对照表述,文献缮写格式请参照本刊。

稿件处理

1. 自收到稿件之日起,二个月内作者会收到编辑部的录用通知。请根据录用通知中所提出的要求认真修改,希望修改稿在 40 天内寄回编辑部,若三个月内编辑部没收到修改稿,将视为自行撤稿处理。

2. 有重大创新并有基金资助者可优先发表;不录用的稿件,编辑部将尽快通知作者,底稿一律不退,请自留底稿。

3. 来稿一经发表将酌致稿酬并送样书二本,本人文章两份抽页。

4. 遵照“中华人民共和国著作权法”,投稿作者须明确表示,该文版权(含各种媒体的版权)授权给光谱学与光谱分析期刊社。国内外各大文献检索系统免费摘录本刊刊出的论文;凡不同意被检索刊物无稿酬摘引者,请在投稿时事先声明,否则,本刊一律认为已获作者授权认可。

5. 来稿请寄:100081 北京海淀区魏公村学院南路 76 号,《光谱学与光谱分析》期刊社

电话:010 62182998 或 62181070

传真:010 62181070

E-mail: chngpxygpfx@vip.sina.com