

凝胶电泳法及荧光光度法测定 siRNA 阳离子脂质体的含量和包封率

沈 雁, 涂家生*, 庞 卉, 朱家璧*

(中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 建立 siRNA 含量测定方法, 用于阳离子脂质体中 siRNA 的含量和包封率测定。利用荧光染料 SYBR Gold 和 Ribogreen 与 siRNA 结合后能发出强烈荧光的原理, 分别采用电泳法和荧光分光光度法测定脂质体中的 siRNA 含量, 计算阳离子脂质体的包封率。SYBR Gold 电泳法的检测线性范围为 $0.2 \sim 2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R=0.993\ 0$), 高、中、低 3 个浓度的回收率分别为 96.35%、96.92% 和 100.74% ($n=3$); 日内日间精密度的 RSD 均小于 5% ($n=5$)。Ribogreen 荧光分光光度法的检测线性范围为 $10 \sim 50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R=0.997\ 1$), 高、中、低 3 个浓度的回收率分别为 98.22%、99.88% 和 99.64% ($n=3$); 日内日间精密度的 RSD 均小于 5% ($n=5$)。利用这两种方法所测得 3 批阳离子脂质体中 siRNA 平均含量分别为 98.52% 和 97.85%, 平均包封率分别为 99.20% 和 96.45%, 经方差分析, 两种方法无显著性差异。两种方法准确可靠、稳定性高和方便实用, 均可用于阳离子脂质体中 siRNA 的含量和包封率测定。

关键词: 电泳法; 荧光分光光度法; siRNA; 阳离子脂质体

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0430-06

Electrophoresis and fluorospectrophotometry methods to determine the content and entrapment efficiency of siRNA in cationic liposomes

SHEN Yan, TU Jia-sheng*, PANG Hui, ZHU Jia-bi*

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To develop different methods for determining siRNA content and the entrapment efficiency of siRNA loaded liposomes, SYBR Gold electrophoresis method and Ribogreen fluorospectrophotometry method were used respectively. SYBR Gold electrophoresis method has a good linear relation in a range at $0.2 - 2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R = 0.993\ 0$), and the recovery at the high, middle and low concentrations were 96.35%, 96.92%, and 100.74%, respectively ($n = 3$). The intra-day and inter-day RSD were far below 5% ($n = 5$). Ribogreen fluorospectrophotometry method has a good linear relation in a range at $10 - 50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R = 0.997\ 1$), and the recovery at the high, middle and low concentrations were 98.22%, 99.88% and 99.64%, respectively ($n = 3$). The intra-day and inter-day RSD were far below 5% ($n = 5$). The content and the entrapment efficiency of three batches of siRNA cationic liposomes were 98.52%, 97.85% and 99.20%, 96.45%, respectively, with these two methods. And there is no significant difference by ANOVA. Both of the two methods are accurate, sensitive, convenient method for determination of the siRNA content and the entrapment efficiency of siRNA loaded cationic liposomes.

Key words: electrophoresis; fluorospectrophotometry; siRNA; cationic liposome

收稿日期: 2008-12-01.

基金项目: 国家科技支撑计划(2008BA155B03).

*通讯作者 Tel: 86-25-85338217, E-mail: Zhujiabi001@yahoo.com;

Tel: 86-25-85332352, E-mail: jiazhengtu@yahoo.com.cn

RNA 干扰 (RNAi) 技术是最近几年发展起来的一门在转录水平上的基因阻断技术, 具有序列特异性、时效性、高效性和易操作性等优势。最新的研究结果显示, 小分子干扰 RNA (siRNA) 是 RNAi 的最

主要作用因子。最有效的 siRNA 抑制靶基因表达效率可达 90%以上, 甚至达 99%。因此, siRNA 作为基因组功能研究的有利工具给基因治疗带来新希望。脂质体在所有已用于临床试验的基因载体中仅次于病毒载体, 是最有发展前景的非病毒载体。

基因的包封率是脂质体的制备工艺和质量评价中的重要指标, 这就需要制剂中的 siRNA 含量进行测定。目前成熟的基因定量方法主要有紫外分光光度法、荧光分光光度法和电泳法。脂质体材料约在 260 nm 处有吸收, 因此紫外分光光度法不适用于非病毒基因载体中 siRNA 的定量, 此外, 紫外分光光度法检测限不能满足要求^[1,2]。国外^[3]用荧光涨落谱 (fluorescence fluctuation spectroscopy, FFS) 和荧光相关谱 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 技术测定载体中 siRNA 的含量和包封率, 这种方法耗时短, 往往只需几秒, 且不受血浆的干扰, 适合 siRNA 的测定。但这种方法需要特殊的仪器设备, 耗费较多, 不利于该法的普及使用。荧光分光光度法凭借其较高的选择性和灵敏度, 近年来被广泛应用。荧光染料的选择是荧光分光光度法的关键。孙逊等^[4]报道了 Hoechst 染料-荧光分光光度法测定脂质体中 DNA 的含量, 但 Hoechst 是一种选择性高的染料, 能与纳克级的 DNA 特异性地结合, 几乎无 RNA 亲和性, 因此不适用于 siRNA 的定量测定。用于 RNA 定量研究的荧光染料主要有: 溴化乙啶 (EB)、SYBR Green II、SYBR Gold 及 Ribogreen。EB 是一种常用的凝胶染色荧光染料, 由于其自身有较高的本底荧光, 与 RNA 及单链 DNA 也都有较强的结合能力, 因此不适用于特异性 siRNA 准确定量研究^[5]。SYBR Green II 已被研究者证实是一种经济的核酸荧光染色, 并且这种使用方法已被大部分实验室用于常规实验中。但是, 它对于 < 50 bp 基因片段染色能力的缺失及其对 < 100 bp 基因片段的低灵敏度是其常规使用的最大障碍, 因此并不适合于 21 bp 的 siRNA 含量测定研究。SYBR Gold 对小片段的基因染色能力较强, 且具有较高的热稳定性, 故可用于电泳法中 siRNA 的含量测定研究^[6]。Ribogreen 是一种嵌入型荧光染料, 可以检测到皮克级的 RNA^[7], 受 DNA 及蛋白影响较小, 故可用于非病毒基因载体中 siRNA 的含量测定。因此, 选用荧光染料 SYBR Gold 和 Ribogreen, 分别采用 SYBR Gold—定量电泳法和 Ribogreen—荧光分光光度法测定制剂中 siRNA 的含量, 国内尚未见报道。

材料与方法

仪器与药品 RF-5000 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech, 美国); 电泳仪 (DYCZ-24A, 北京六一仪器厂); NIH Image J 图像处理软件 (Macintosh 公司, 美国); Ribogreen (invitrogen, USA); 注射用大豆磷脂 (上海太伟药业有限公司); 3 β [N-(N',N'-二甲基氨基乙基) 氨甲酰基-胆固醇 (DC-Chol, 参照文献[8]由本室合成); 肝素钠 (江苏万邦生化医药股份有限公司); SYBR Gold (Eugene 分子探针公司, USA); siRNA (上海吉玛公司); 实验用水均为 Mili-Q 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

空白阳离子脂质体的制备 称取 DC-Chol 和大豆磷脂各约 10 mg, 氯仿为溶剂; 有机相与水相 (5% 葡萄糖溶液) 的比例为 2.5 : 1, 在水浴超声仪中处理 20 min 得到初脂质体混悬液。充氮气、探头超声、过 0.22 μ m 聚碳酸酯膜, 得空白阳离子脂质体。

载基因阳离子脂质体的制备 siRNA 和阳离子脂质体分别用去离子水稀释, 将稀释的空白阳离子脂质体 (DC-Chol 浓度为 250 μ mol·L⁻¹) 2 mL 逐滴加入 500 μ L siRNA (25 μ mol·L⁻¹) 溶液中, 使得 +/— 电荷比约为 1 : 1。室温下混合后放置 15~20 min, 即形成载药的阳离子脂质体。其中 siRNA 和空白阳离子脂质体的相对量以 +/— 电荷比表示: 正电荷以脂质体中 DC-Chol 的含量计算, 即每摩尔 DC-Chol 带 1 个单位的正电荷; 负电荷以 siRNA 中的碱基数量计算, 每摩尔碱基带 1 个单位的负电荷, 每摩尔的 siRNA 约带有 40 个单位的负电荷。

SYBR Gold—定量电泳法

荧光染料 (SYBR Gold) 配制 将 SYBR Gold 荧光染料用 TBE (10.8 g·L⁻¹ Tris 碱, 5.5 g·L⁻¹ 硼酸和 0.58 g·L⁻¹ EDTA) 缓冲液稀释 10 000 倍。

标准曲线 取 5 μ mol·L⁻¹ siRNA 溶液, 分别吸取 1.0、2.0、4.0、5.0、8.0 和 10.0 μ L 于聚乙烯离心管中, 分别加入 Hepes 缓冲液 19.0、18.0、16.0、15.0、12.0 和 10.0 μ L, 充分混合后得一系列 siRNA 标准溶液。于各离心管中加入上样缓冲液 (50% 蔗糖-溴酚兰溶液) 5 μ L, 涡旋离心后分别在 20% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 各泳道中加入上述溶液 5 μ L, 100 V 电压下电泳 2 h 后, 将凝胶放入 SYBR Gold 荧光染料中染色 20 min 后在凝胶成像系统中 (254 nm) 观察 siRNA 条带并拍照。用 ImageJ (Wayne Rasband 编写) 软件对电泳条带图谱进行光密度曲线的数字化转换, 以样品浓度为横坐标, 图像分析软件计算出的样品条带的光密度曲线积分面积为纵坐标作标准曲线^[9]。

回收率实验 取空白脂质体胶体溶液 10 μL , 分别加入高、中、低 3 个浓度的 siRNA 标准溶液 5 μL , 静置 15 min 后, 加入 0.1 mol·L⁻¹ Triton X-100 溶液和 0.1% 肝素溶液各 2 μL ^[10], 使 siRNA 从阳离子脂质体中完全释放。再加入 RNA 提取试剂 (氯仿: 苯酚: 异戊醇=25:24:1) 25 μL , 平衡 15 min 后, 在 10 000×g, 4 °C 条件下离心 20 min。收集含 siRNA 的水相部分, 并加入上样缓冲液 6 μL , 充分混合后吸取 5 μL 于凝胶加样孔中, 并按凝胶电泳步骤观察 siRNA。按照标准曲线方程求出 siRNA 的浓度, 计算回收率。

精密度实验 按“标准曲线的绘制”项下操作方法, 于日内及日间 (5 日) 测定高、中、低 3 种浓度的 siRNA 含量, 计算精密度。

阳离子脂质体中 siRNA 的含量测定 精密量取载基因阳离子脂质体胶体溶液 10 μL , 按以上操作方法, 求出 siRNA 的浓度。

载基因阳离子脂质体包封率测定 被阳离子脂质体包裹的 siRNA 会滞留在凝胶孔中, 而游离的 siRNA 会随着电泳过程在凝胶中形成条带, 使得游离的 siRNA 与载基因脂质体分离。精密量取载基因阳离子脂质体胶体溶液 15 μL , 加入上样缓冲液 5 μL 后充分混合, 取 5 μL 加入到凝胶孔中, 电泳完毕后观察游离 siRNA 的条带并按标准曲线项下的方法计算游离 siRNA 浓度 (C_{free}); 同时精密量取载基因阳离子脂质体胶体溶液 10 μL , 按含量测定项下方法计算阳离子脂质体中 siRNA 的总浓度 (C_{total}), 则包封率 = $(C_{\text{total}} - C_{\text{free}}) / C_{\text{total}} \times 100\%$ 。

Ribogreen—荧光分光光度法

荧光扫描 取 25 nmol·L⁻¹ siRNA 溶液与 Ribogreen 染液 2 mL 均匀混合。参照文献[9], 先固定激发波长在 500 nm 处, 扫描发射波长。再在最大发射波长处, 扫描激发波长 (激发和发射狭缝宽度为 5 nm, 荧光池厚度为 1.0 cm)。

标准曲线 分别吸取 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ siRNA 溶液 0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40 和 0.45 mL 于聚乙烯离心管中, 加 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 0.5 mL, 充分混合后, 分别加入 0.4、0.35、0.30、0.25、0.2、0.15、0.1 和 0.05 mL 的 TBE 溶液, 使得终体积为 2 mL。固定最大激发和发射波长, 测定荧光强度。

回收率实验 取空白脂质体胶体溶液在 10 000×g (4 °C) 条件下离心 1.5 h, 取上清液 250 μL , 分别加入高、中、低 3 个浓度的 siRNA 标准溶液 250 μL , 再加入 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 0.5 mL, 用 TBE 缓冲液定容到 2.0 mL, 测定荧光强度值。空白对照液用

上清液 250 μL 与 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 250 μL 充分混合后, 用 TBE 缓冲液定容到 2 mL 制得。按照标准曲线方程求出 siRNA 的浓度, 计算回收率。

重复性实验 取载基因脂质体胶体溶液超速冷冻离心后的上清液 250 μL , 加入 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 0.5 mL, 用 TBE 缓冲液定容到 2.0 mL, 测定荧光强度值。按照标准曲线方程求出 siRNA 的浓度, 连续测定 5 d。

样品稳定性 荧光样品在放置过程中其荧光强度会发生衰减, 给样品的测定带来误差, 因此需要进行 Ribogreen-siRNA 样品的稳定性考察。于 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 和 24.0 h 测定其荧光强度, 以考察放置时间对荧光强度的影响。

阳离子脂质体中 siRNA 的含量测定 精密吸取载基因脂质体 500 μL , 加入 0.1 mol·L⁻¹ Triton X-100 溶液 250 μL , 涡旋 2 min 后, 加入 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 0.5 mL, 用 TBE 缓冲液定容到 2.0 mL, 测定荧光强度值。带入标准曲线方程, 计算载基因载体中 siRNA 总浓度 (C_{total})。

载基因阳离子脂质体的包封率测定 取载基因阳离子脂质体溶液 500 μL , 在 10 000 × g (4 °C) 条件下离心 1.5 h, 精密量取上清液 250 μL 于离心管中, 加入 Ribogreen ($\times 200$) 荧光染料 0.5 mL, 用 TBE 缓冲液定容到 2.0 mL, 测定荧光强度值。带入标准曲线方程, 计算载基因载体中游离 siRNA 的浓度 (C_{free})。则包封率 = $(C_{\text{total}} - C_{\text{free}}) / C_{\text{total}} \times 100\%$ 。

结果

1 SYBR Gold—定量电泳法

1.1 标准曲线的绘制 按标准曲线项下操作方法所得凝胶成像图如下 (图 1), 将各 siRNA 条带标记后, 用 ImageJ 软件将条带亮度转化成光密度曲线, 以积分后得到的数量值 (Area) 为纵坐标, siRNA 样品浓

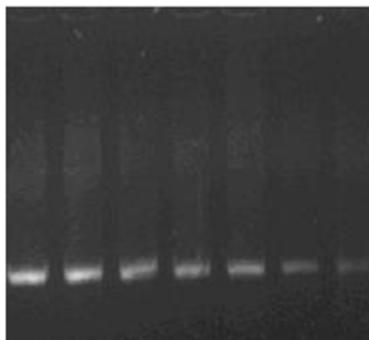


Figure 1 Gel assay of different concentrations of siRNA

度 ($C, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标, 得到标准曲线。Area = $1\,160.9 \times C + 105.19$, $R^2 = 0.986\,9$ 。线性关系良好。

1.2 回收率实验 结果表明, 高、中、低 3 种浓度的回收率在 95.0%~101.0%, RSD<2.0% (表 1), 符合方法学要求。

Table 1 Results of recovery experiments for electrophoresis method

Added/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Measured/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
0.21	0.198	94.286	96.35	1.99
	0.203	96.667		
	0.206	98.095		
1.05	0.996	94.857	96.92	1.95
	1.022	97.333		
	1.035	98.571		
1.98	1.974	99.697	100.74	0.96
	1.998	100.91		
	2.012	101.62		

1.3 精密度实验 结果表明, 高、中、低 3 种浓度的日间和日内变异均小于 5.0% (表 2), 符合方法学要求。

Table 2 Precision of the determination for electrophoresis method ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Added/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Intra-day		Inter-day	
	Measured/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	Measured/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
0.21	0.199 ± 0.004	2.01	0.204 ± 0.002	1.13
1.02	1.012 ± 0.016	1.58	1.018 ± 0.011	1.08
1.97	2.021 ± 0.022	1.08	1.992 ± 0.032	1.61

2 Ribogreen—荧光分光光度法测定 siRNA 含量方法学考察

2.1 最大激发波长和最大发射波长的确定 按标准曲线项下操作方法, 得到 Ribogreen 结合 siRNA 的最大激发波长和最大发射波长见图 2。由图可见,

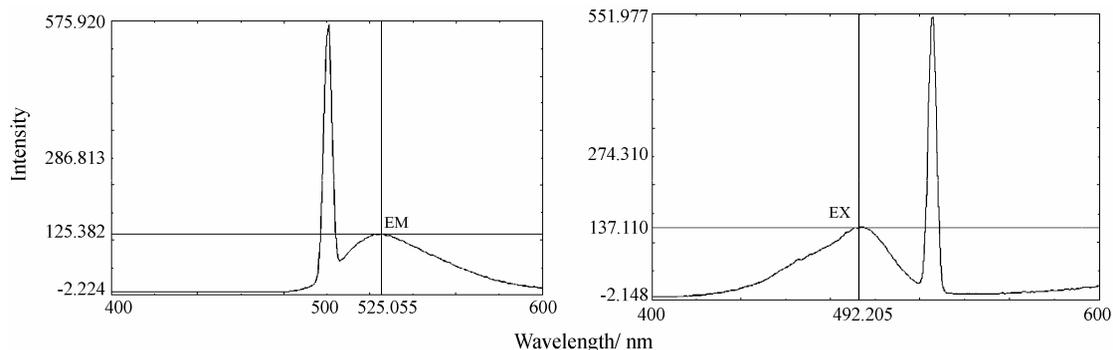


Figure 2 The max fluorescence emission (EM) and excitation spectrum (EX) of Ribogreen-siRNA solution

Ribogreen 结合 siRNA 的最大激发波长和最大发射波长分别是 492 和 525 nm。

2.2 标准曲线 在 $10\sim 50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时荧光强度和浓度成良好的线性关系, 其线性方程为 $F_i = 2.761C + 2.694$, $R^2 = 0.994$ 。

2.3 回收率实验 结果表明, 相对回收率在 95.0%~101.0%, RSD<2.0% (表 3), 符合方法学要求。

Table 3 Results of recovery experiments for flurospectrophotometry method

Added/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Measured/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
10.52	10.21	97.05	98.22	1.09
	10.43	99.14		
	10.36	98.48		
25.31	25.19	99.53	99.88	0.48
	25.23	99.68		
	25.42	100.4		
48.76	48.65	99.77	99.64	0.13
	48.59	99.65		
	48.52	99.51		

2.4 精密度实验 结果表明, 高、中、低 3 种浓度的日间和日内变异均小于 5.0% (表 4), 符合方法学要求。

Table 4 Precision of the determination for flurospectrophotometry method ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Added/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Intra-day		Inter-day	
	Measured/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	Measured/ $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
10.32	10.19 ± 0.34	3.36	10.14 ± 0.26	2.56
25.64	25.55 ± 0.26	1.03	25.46 ± 0.57	2.24
49.48	49.32 ± 0.062	0.12	49.34 ± 0.22	0.45

2.5 样品稳定性 由表 5 可以看出, 室温条件下荧光样品可以放置 2 h 左右, 因此, Ribogreen 荧光测试液必须临用现配。

Table 5 The stability of Ribogreen-siRNA samples at room temperature (25 °C, $\bar{x} \pm s$)

Time/h	<i>F</i> ₁	Time/h	<i>F</i> ₁
0	96.43 ± 2.67	4	85.78 ± 3.43
0.5	95.74 ± 3.12	8	76.31 ± 2.18
1	95.01 ± 2.64	12	54.32 ± 3.47
2	93.63 ± 1.87	24	26.74 ± 2.66

3 两种方法测定载基因阳离子脂质体中 siRNA 含量和包封率

分别按前述两种含量测定和包封率测定方法操作, 测得 3 批载基因脂质体中 siRNA 含量和包封率见表 6。经 *t* 检验, 两种方法无显著性差异 ($P > 0.05$)。

Table 6 The content and entrapment efficiency (EE%) of siRNA liposomes ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

	SYBR-Gold	Ribogreen
Content/%	98.52 ± 2.64	97.85 ± 3.71
EE/%	99.20 ± 1.38	96.45 ± 2.65

讨论

以计算机技术直接分析电泳图谱不仅是该检测技术的发展方向, 也是现代化高科技检测手段的标志。ImageJ 是由 Wayne Rasband 编写的 Mac 图像分析应用程序, 可对图像面积、平均密度、重心及用户定义的多边形区域的分析, 自动进行点的分析、测定路径长度和角度等。用 ImageJ 分析电泳图谱具有良好的剂量-密度/亮度线性关系、灵敏度高、重复性好、操作简捷、测定无损、取样量少和电泳图谱可长久保存等优点。图像分析准确迅速, 而且可以集中分析多个电泳图谱, 可大大降低工作人员的劳动强度, 提高工作效率。

为了使 siRNA 从阳离子材料中释放, 必须加入去缩合剂^[8]。本实验中分别选用 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 聚天冬氨酸, 0.1% (w/v) 肝素溶液, 4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠溶液, 最终确定 0.1% (w/v) 肝素溶液作为阳离子脂质体的去缩合剂。

紫外分光光度法是利用所有的核酸在 260 nm 波长处都有最大吸收峰的特点, 用分光光度计检测样品在该波长的吸光值, 从而对核酸进行直接定量。但蛋白质或酚也能在此波长吸收紫外光, 故核酸样品中的蛋白质对核酸的定量具有较大影响。紫外吸收法具有简便、快速、灵敏度高等特点, 可检测到 3 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品。但此法要求核酸样品的纯度相当高, 而且在检测 RNA 过程中环境因素使得 RNA 降解速度太快, 很难达到精确的定量。

ImageJ 处理电泳图谱时, 其条带形状对处理的结果有较大影响。一般来说, 扭曲的条带会造成 RSD 的增大。因此, 为了确保条带呈水平, 在电泳时需注意以下几点: ① 胶时的缓冲液需要和电泳缓冲液同时配制。电泳时缓冲液高过液面 1~2 mm 即可。② 经常更换新鲜电泳缓冲液, 否则缓冲能力减弱, 影响电泳条带的清晰。③ 电泳时电压不要太高, 在电泳前 15 min 用较低电压 (3 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$), 待条带出孔后再调电压, 电泳时电压不应超过 20 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$, 温度低于 30 °C。④ 上样时尽量缓慢加样, 待样品自然沉降后再加电压, 上样量在 1~3 μL 。

Ribogreen 荧光分光光度法的灵敏度为 0.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著高于 SYBR-Gold 电泳法的灵敏度 (0.625 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且 Ribogreen 荧光分光光度法测定一个样品的时间仅为 2 min, 而 SYBR-Gold 电泳法则需要 1~2 h, 故 Ribogreen 荧光分光光度法可用于释放度考察中 siRNA 的含量测定。但 Ribogreen 价格昂贵且用量较大, 相对而言, SYBR-Gold 电泳法的成本较低, 适合大量样品的含量测定。

siRNA 与 Ribogreen 荧光染料结合需一定的时间, 其混合液应在室温下, 避光 5 min 后才能进行荧光测定^[11]。由样品稳定性实验可知, siRNA 与荧光染料结合后发射的荧光随着时间的延长会有一定程度的衰减, 所以荧光测试液必须临用现配。

随着分子生物学的广泛应用, 核酸的研究已由定性发展到定量阶段, 在核酸的定量研究过程中, 近年发展起来的具有高灵敏度、高通量和具有自动化分析能力的核酸定量方法, 如: 定量聚合酶链式反应技术、基因表达系列分析 (serial analysis of expression, SAGE)、微阵列技术 (microarrays)、差异显示等^[12, 13], 这些技术成为目前研究的热点。但这些新技术存在精密度差、需要确定靶基因的序列且费用昂贵等缺点, 难以推广使用。因此在药剂学领域对于基因载体中核酸的定量测定, 荧光凝胶电泳和荧光染料分光光度法已逐渐成为替代紫外分光光度法的最佳方法。

References

- [1] Maitani Y, Igarashi S, Sato M, et al. Cationic liposome (DC-Chol / DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression [J]. Int J Pharm, 2007, 342: 33-39.
- [2] Ye JS, Zhang N, Ma CH, et al. SYBR Green I - fluorometry determination of content and entrapment efficiency of protamine-pDNA complex loaded solid lipid nanoparticles [J]. Chin J

- Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 1769–1772.
- [3] Buyens K, Lucas B, Raemdonck K, et al. A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum [J]. *J Control Release*, 2008, 126: 67–76.
- [4] Sun X, Wang Y, Qiao XR, et al. Determination of DNA in nonviral vectors for gene therapy by fluorospectrophotometry [J]. *West Chin J Pharma Sci (华西药理学杂志)*, 2003, 18: 412–415.
- [5] Liu X, Xu GM, Guo JF, et al. A method for quantification of double strand DNA using SYBR green I dye [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2008, 28: 55–60.
- [6] Miller SE, Taillon-Miller P, Kwok PY. Cost-effective staining of DNA with SYBR green in preparative agarose gel electrophoresis [J]. *Biotechniques*, 1999, 27: 34–36.
- [7] Yuan YC, Yi XR, Yang J, et al. Preparation of DC-Chol and its adjuvant effect on HBsAg [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2007, 42: 998–1002.
- [8] Wang YG. Application in medical image analysis with Image J [J]. *Chin J Lab Med (中华检验医学杂志)*, 2005, 28: 747–748.
- [9] Xiong XB, Uludağ H, Lavasanifar A. Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 242–253.
- [10] Penketh PG, Shyam K, Santorelli AC. Fluorometric assay for determination of DNA-DNA cross-links utilizing Hoechst 33258 at neutral pH values [J]. *Anal Biochem*, 1997, 252: 210–213.
- [11] Junghans M, Kreuter J, Zimmer A. Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544: 177–188.
- [12] Ding C, Cantor CR. Quantitative analysis of nucleic acids — the last few years of progress [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37: 1–10.
- [13] Cook SA, Rosenzweig A. DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine [J]. *Circ Res*, 2002, 91: 559–564.