

[研究简报]

自猝灭荧光探针法测定 DNA*

赵一兵 王冬媛 许可慰 郭祥群 许金钧

(厦门大学化学系、国家教委材料和生命过程分析科学开放研究实验室, 厦门, 361005)

关键词 自猝灭, 荧光探针, DNA

分类号 O657.39

随着现代分子生物学和分子生物技术的发展, 体内重要的遗传物质——脱氧核糖核酸(DNA)越来越引起人们的重视, 对于 DNA 探针的研究也日渐深入. DNA 探针作为研究 DNA 的有力工具, 在 90 年代取得了长足的进展, 新的靶扩增技术(PCR)已日臻完善, 发光标记探针也已经与放射性同位素标记具有同等重要的地位, 而且已应用于 DNA 杂交研究、疾病诊断和食品微生物检测等方面^[1~5]. 但是, 研究开发新的、灵敏度高的 DNA 探针仍然是十分迫切和有意义的工作. 本文报道了一种新的基于水杨酸、邻氨基苯甲酸荧光自猝灭的 DNA 探针技术, 这对筛选灵敏度高、选择性好的新一类 DNA 探针有重要的指导意义.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 UV-240 分光光度计和 RF-5000 荧光分光光度计(日本, 岛津); 水杨酸(HBA)、邻氨基苯甲酸(ABA, 上海化学试剂采购供应站, 分析纯); 小牛胸腺(CT) DNA、鲑鱼(SM) DNA 和鲑鱼精子(HS) DNA(华美生物工程公司). 其它试剂均为分析纯, 水为去离子亚沸水.

1.2 实验方法 取一定量的水杨酸或邻氨基苯甲酸溶液, 分别加入不同量的 DNA, 稀释到 10 mL 混匀. 以 400 nm 为发射波长进行激发光谱扫描, 记录从 220 nm 到 380 nm 的荧光激发光谱, 激发、发射狭缝分别为 1.5 nm 和 3 nm. 荧光光谱不受实验条件下 pH 值的微小变化影响, 因而不必控制酸度.

2 结果与讨论

2.1 水杨酸或邻氨基苯甲酸及其二聚体的荧光光谱 实验发现, 水杨酸的荧光激发光谱随浓度不同发生较大的变化(图 1). 在一定浓度范围内, 随浓度增大, 体系的荧光强度增加, 荧光光谱轮廓不改变; 但当浓度达到一定值时, 荧光激发峰分裂为 2 个峰, 浓度越大, 分裂越严重, 而荧光发射光谱除强度减弱外, 峰

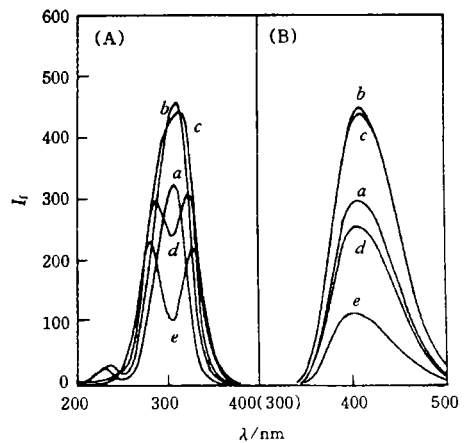


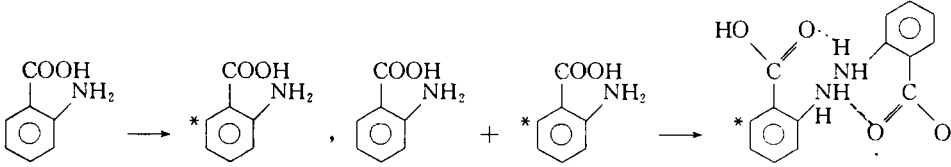
Fig. 1 Fluorescence excitation (A) and emission (B) spectra of *o*-hydroxybenzoic acid (HBA)
 $c_{\text{HBA}}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$: a. 0.04; b. 0.08; c. 0.16; d. 0.32; e. 0.49. $\lambda_{\text{ex}} = 305 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 407 \text{ nm}$.

收稿日期: 1996-12-12. 联系人及第一作者: 赵一兵, 男, 34 岁, 博士, 副教授.

* 国家教育委员会博士点基金资助课题.

轮廓和峰位置不变. 结合水杨酸在相应的浓度下紫外-可见吸收光谱轮廓和峰位置不变的事实, 说明高浓度的水杨酸在激发光照射下形成了非荧光的激基缔合物, 从而发生自猝灭.

进一步考察了 16 种不同取代的类似化合物, 结果表明, 邻位取代的邻氨基苯甲酸在高浓度下也具有这种自猝灭现象, 而间位和对位取代的类似物不具备这种性质. 研究表明, 水杨酸或邻氨基苯甲酸荧光自猝灭是由于激发态和基态分子通过分子间氢键形成非荧光的二聚体而引起的(见下式).



随着浓度的增加, 形成二聚体的几率增大, 激发态单体浓度减小, 自猝灭更趋严重. 由此可以预期, 具有氢键作用力的分子将对上述自猝灭现象产生影响.

2.2 DNA 的测定 比较 DNA 结构可知, 4 种碱基、磷酸基和戊糖组分均具有可形成氢键的基团, 在与水杨酸或邻氨基苯甲酸分子共存时发生竞争反应, 破坏二聚体的分子间氢键, 使荧光性的单体量增加, 荧光强度增强. 实验表明, 在体系中加入不同量的 DNA、水杨酸和邻氨基苯甲酸的自猝灭荧光光谱发生明显改变(图 2), 短波长的荧光激发峰发生红移, 且荧光强度随 DNA 的加入缓慢降低, 直至消失; 长波长的荧光激发峰发生蓝移, 且荧光强度随 DNA 的加入而显著增加. 但是不管是在短波长激发还是在长波长激发, 荧光发射峰位置都不发生变化. 鉴于 DNA 浓度改变时荧光激发波长发生变化, 采用 $\lambda_{em}=407\text{ nm}$ 时的荧光激发光谱的积分信号测定. 结果表明, 以高浓度水杨酸为探针, 小牛胸腺 DNA、鲑鱼 DNA 和鲑鱼精子 DNA 在一定浓度范围内与水杨酸的荧光强度增强值呈良好的线性关系(表 1).

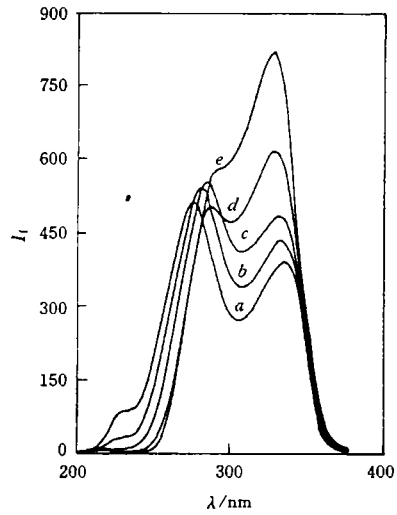


Fig. 2 Effect of DNA on the excitation spectrum of HBA

0.36 mg/mL HBA, $\lambda_{em} = 407\text{ nm}$, $c_{CT DNA}/(\text{mg/mL})$: a. 0; b. 0.10; c. 0.20; d. 0.40; e. 0.60.

考察了各种因素对 DNA 测定的影响, 结果表明, 牛血清白蛋白、人血清白蛋白、鸡蛋白蛋白以及卵磷脂不影响 DNA 测定, 加入不同量的丙

Table 1 Determination of DNA by the self-quenching fluorescence of HBA

DNAs	Linear range/(ng · mL ⁻¹)	Relative coefficient	LOD/(ng · mL ⁻¹)
CT DNA	25~6 000	0.996	6.0
SM DNA	25~6 000	0.996	6.0
HS DNA	15~3 000	0.995	5.0

三醇改变体系的粘度对体系的荧光光谱也不产生影响; 而极性溶剂如乙醇、丙酮和乙腈的加入均对荧光光谱产生影响, 尤其是强的氢键受体乙腈的加入显著影响 DNA 的测定.

参 考 文 献

1 Keller G. H., Manak M. M.. DNA Probe(2nd edition), New York: Stockton Press, 1993

- 2 YANG Pin(杨 频), YANG Bin-Sheng(杨斌盛). Introduction to Ion Probe Technique(离子探针方法导论). Beijing: Science Press, 1994
- 3 Slavik J. . Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, London; CRC Press, 1994
- 4 Lakowicz J. R. . Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York; Plenum Press, 1983; 258
- 5 CHEN Guo-Zhen(陈国珍). Fluorescence Analysis(2nd)(荧光分析法, 第二版), Beijing: Science Press, 1990; 93, 134

Determination of DNA by a Self-quenching Fluorescence Probe

ZHAO Yi-Bing*, WANG Dong-Yuan, XU Ke-Wei, GUO Xiang-Qun, XU Jin-Gou

(Department of Chemistry, The Research Laboratory of SEDC of Analytical Science
for Material and Life Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract This paper describes a new fluorescence probe technique for the determination of DNA, which is based on a self-quenching course of high concentration of *o*-hydroxybenzoic acid or *o*-aminobenzoic acid. Studies involving calf thymus(CT) DNA, salmon(SM) DNA and herring sperm(HS) DNA revealed that the differential value of fluorescence intensity in the presence and absence of nucleic acid was proportional to the concentration of nucleic over the range of about 15 ng/mL~6.0 μg/mL.

Keywords Self-quenching, Fluorescence probe, DNA

(Ed. : Z, G)

第六届全国分析化学年会在山西大学隆重召开

由中国化学会主办的第六届全国分析化学年会暨第五届全国无机微量技术及痕量分析学术会议于1997年7月16~22日在山西大学隆重召开。来自全国28个省市自治区的300余名代表汇聚一堂,以21世纪的分析化学为中心议题,探讨分析化学的前沿和发展问题。

大会于7月17日在山西大学科学会堂举行开幕式。首先由本届大会筹委会负责人潘景浩教授向大会汇报了会议筹备情况及日程安排。开幕式由汪尔康院士主持,黄本立院士致开幕词,山西大学校长彭堃焯教授致欢迎词,山西省教委副主任代表省政府王昕副省长宣读了贺信,彭少逸院士和申泮文院士分别讲了话。开幕式上还颁发了第二届梁树权分析化学奖,中青年学术带头人杨芑原教授和朱果逸研究员获此殊荣。开幕式后汪尔康院士、俞汝勤院士、黄本立院士分别做了十分生动的大会报告。

会议录用论文636篇,已编入山西科技出版社出版的《分析化学新进展》一书。此次会议论文内容十分丰富,涉及面很广,与生命科学、环境科学、材料科学相关的分析化学选题遍布各分支学科,不少研究论文达到了国际先进水平,并形成可参与国际竞争的具有我国优势和特色的新领域,同时还显示出分析化学在我国国民经济发展中的突出和不可代替的重要作用。会议还评选出20篇青年优秀论文。

会议期间,还分别召开了分析化学学科委员会会议、《分析化学》编委会议、《高等学校化学学报》分析化学学科分编委会议,国家教委分析科学开放实验室学术委员会会议等,就分析化学的发展、任务、出版等问题进行了认真的讨论。

山西大学化学系为本次会议的顺利召开做了充分的准备工作,代表们对本次会议的精心安排深表满意,并向筹委会的全体同志表示衷心的感谢。

会议决定于2000年在重庆市由西南师范大学负责筹办第七届分析化学年会。