

[研究快报]

## 现场光化学荧光探针法测定 DNA \* ——以 9,10-蒽醌-2-磺酸钠为光化学荧光探针

李文友 许金钧 郭祥群 朱庆枝 赵一兵

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

关键词 DNA, 光化学荧光探针, 9,10-蒽醌-2-磺酸钠

光化学荧光分析是一种建立在光化学反应基础上的荧光分析技术, 它对于提高荧光分析的灵敏度和选择性, 扩大其应用范围<sup>[1]</sup>十分有利. DNA 的天然荧光很弱, 直接利用其研究 DNA 受到限制. 因此, 人们开始利用一些荧光探针来研究 DNA<sup>[2~4]</sup>, 但用光化学荧光探针研究 DNA 的工作目前尚未见报道. 本文报道了以具有光化学荧光活性的 9,10-蒽醌-2-磺酸钠(AQS)为光化学荧光探针测定 DNA 的新方法. 该方法灵敏度高、检出限低. 对 AQS 与 DNA 的作用机理进行的初步研究结果表明, AQS 可能以嵌入方式与 DNA 作用. 以具有光化学活性的非天然荧光物质作荧光探针, 可以扩大荧光探针的选择范围, 为研究生物大分子开拓了新的途径.

### 1 实验方法

于 10 mL 容量瓶中加入 2.0 mL pH=7.4 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH 缓冲溶液和一定量的 AQS、葡萄糖和 CT DNA 溶液, 稀释至刻度, 摇匀. 将上述混合溶液和试剂空白溶液温育 5 min 后, 分别用蠕动泵送至 18  $\mu\text{L}$  流通池中, 停泵, 计时. 以 335 nm 激发光源照射 9 min 后, 在  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=470/551$  nm 下分别测定其相应的荧光强度  $F$  和  $F_0$ , 以  $F_0/F$  对 CT DNA 浓度作工作曲线.

### 2 结果与讨论

2.1 DNA 对 AQS 光化学反应产物荧光光谱的影响 在 DNA 存在下, AQS 的光化学反应产物的最大激发波长(470 nm)和最大发射波长(551 nm)未发生改变, 但峰的荧光强度降低.

2.2 分析条件的选择 实验结果表明, 在波长为 335 nm、照射 8~15 min 时,  $F_0/F$  值最大且稳定, 故照射波长和照射时间分别选择为 335 nm 和 9 min.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH 缓冲溶液的 pH 值在 6.8~7.6 范围内,  $F_0/F$  值最大且稳定, 故选择缓冲溶液的 pH 7.4, 用量选择为 2.0 mL.  $3.2 \times 10^{-4}$  mol/L 的 AQS 溶液用量在 0.8~1.5 mL 范围内,  $F_0/F$  值最大且稳定. 因此, AQS 用量选择 1.0 mL. 作为氢原子给予体, 当葡萄糖的浓度为  $2.0 \times 10^{-2} \sim 4.0 \times 10^{-2}$  mol/L 时,  $F_0/F$  值最大且稳定. 故选择葡萄糖浓度为  $3.0 \times 10^{-2}$  mol/L (0.20 mol/L 的葡萄糖溶液用量选择 1.5 mL 即可). 温育时间在 20 min 之内,  $F_0/F$  值最大且稳定, 本文选择温育时间为 5 min.

2.3 工作曲线、检出限及精密度 以  $F_0/F$  对 DNA 浓度作图得工作曲线. 线性范围为 0~

收稿日期: 1996-05-13. 联系人: 许金钧. 第一作者: 李文友, 男, 30 岁, 博士研究生.

\* 国家自然科学基金资助课题.

80 ng/mL CT DNA, 线性相关系数为 0.999 1. 检出限为 3.2 ng/mL CT DNA, 比溴化乙锭荧光探针法<sup>[2]</sup>低 3 倍. 7 次平行测定 (CT DNA 的浓度为 50 ng/mL) 的相对标准偏差为 1.7%.

2.4 AQS 与 DNA 作用机理初探 在一定量 AQS 存在下, DNA 的紫外吸收光谱发生了明显的减色效应,  $A_{260}$  降低, 最大吸收峰明显红移. 这些光谱特性变化说明了 AQS 可能嵌入 DNA 的碱基对中<sup>[3]</sup>. 另外, 溴化乙锭和 AQS 与 DNA 的竞争结合实验结果表明,  $2.5 \times 10^{-7}$  mol/L 的溴化乙锭即可将  $3.2 \times 10^{-5}$  mol/L 的 AQS 从 AQS 与 DNA 的结合物中完全置换出来, 而溴化乙锭与 DNA 的结合是嵌入式的<sup>[4]</sup>, 因此, 这个实验结果支持上述 AQS 可能嵌入 DNA 碱基对中的结论.

### 参 考 文 献

- 1 GUO Xiang-Qun(郭祥群), XU Jin-Gou(许金钩), CHEN Guo-Zhen(陈国珍). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1991, 19, 244
- 2 LePecq J. B., Paoletti C.. Anal. Biochem., 1966, 17, 100
- 3 Kumar C. V., Asuncion E. H.. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 8 547
- 4 Wauer W., Vinograd J.. J. Mol. Biol., 1970, 47, 419

## Determination of DNA by Use of *in situ* Photochemical Fluorescence Probe

—— Sodium 9,10-Anthraquinone-2-sulfonate as a Photochemical Fluorescence Probe

LI Wen-You, XU Jin-Gou\*, GUO Xiang-Qun, ZHU Qing-Zhi, ZHAO Yi-Bing  
(The Research Laboratory of SEDC of Analytical Science for Material and Life Chemistry,  
Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**Abstract** An *in situ* photochemical fluorescence probe method for the determination of DNA with sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate (AQS) as a photochemical fluorescence probe was developed for the first time. It was based on the conversion of AQS into an intensively fluorescent product on irradiating with UV radiation. The photochemical reaction is decelerated by DNA. The determination can be carried out by measuring the fluorescence intensity at a fixed time. The calibration graph was linear in the range 0~80 ng/mL CT DNA ( $r=0.999 1$ ), the limit of detection was 3.2 ng/mL CT DNA ( $n=9$ ). The kinetic behaviour of the photochemical reaction and the effects of some experiment conditions were investigated and discussed in detail. The results of absorption spectra experiments and competitive binding experiments suggest that the interaction between AQS and DNA may be intercalative.

**Keywords** DNA, Photochemical fluorescence probe, Sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate

(Ed.: Z, A)