

DNA 荧光定量测定的新方法

黄 琦

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

摘 要: 利用 DNA 对帕珠沙星的荧光猝灭作用建立 DNA 定量测定的新方法,CT-DNA,smDNA 和 hsDNA 响应线性范围分别为 $0.65\sim33.3\ \mu\text{g/mL}$ 、 $0.78\sim46.3\ \mu\text{g/mL}$ 和 $1.07\sim48.1\ \mu\text{g/mL}$,检测限分别为 $0.07\ \mu\text{g/mL}$ 、 $0.02\ \mu\text{g/mL}$ 和 $0.02\ \mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 帕珠沙星;DNA;定量测定

中图分类号: O657.31

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2006)01-0016-03

A New Method for Fluorescence-Quantitative Determination of DNA

HUANG Qi

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023,China)

Abstract: On the basis of fluorescence quenching of pazufloxacin by DNA, a new fluorometric method for DNA determination was proposed. The effects of experimental conditions on fluorescence quenching were discussed. Under optimum conditions, the calibration graph are linear over the range of $0.65\sim33.3\ \mu\text{g/mL}$ for CT-DNA, $0.78\sim46.3\ \mu\text{g/mL}$ for smDNA, $1.07\sim48.1\ \mu\text{g/mL}$ for hsDNA with the detection limit being $0.07\ \mu\text{g/mL}$, $0.02\ \mu\text{g/mL}$ and $0.02\ \mu\text{g/mL}$, respectively.

Key words: pazufloxacin; DNA; quantitative determination

帕珠沙星(Pazufloxacin)是新一代氟喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广,抗菌活性高,副作用小和耐受性好等特点。目前普遍认为:小分子药物与DNA以非共价键的作用主要有静电结合、沟槽键合和嵌插键合三种方式^[1]。已利用光谱法确定帕珠沙星与CT-DNA之间以沟槽键合方式发生相互作用,根据DNA对帕珠沙星荧光的猝灭作用建立DNA定量测定的新方法。DNA的定量测定对于疾病早期诊断及药物分子机理研究具有重大意义。目前常用的测定方法有紫外吸收法,但灵敏度相对较低;有

一些荧光染料由于与DNA作用后自身的荧光增强或减弱而被用来测定DNA的浓度,但是这些荧光染料大都有毒而未予推广。本文建立的DNA定量测定的新方法,具有灵敏度高,操作简便和重现性好等优点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 RF-5301 荧光光谱仪,岛津 UV-3100 紫外-可见分光光度计,pHS-25 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

收稿日期:2005-09-19

作者简介:黄 琦(1980—)女,河南开封人,助教,主要从事药物分析方面的研究。

帕珠沙星储备溶液浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 使用前用二次蒸馏水稀释至所需浓度; 小牛胸腺 DNA (CT-DNA, Sigma 公司), 鲑鱼 DNA (smDNA, Sigma 公司), 鲐鱼 DNA (hsDNA, Sigma 公司)。取适量 DNA 溶于含 5.0 mmol/L 的 NaCl 溶液中, 经 UV 光谱检验 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 表明纯度符合要求^[2], DNA 储备液置于冰箱中 4°C 保存。小牛胸腺 DNA 浓度以 $\epsilon(p)_{260} = 6\ 600$ 确定^[2]。缓冲液均为 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 溶液 ($\text{pH}=7.0$); 其他试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 1.00 cm 石英比色皿中准确加入 3.00 mL 浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 的帕珠沙星溶液, 逐渐滴加微升量的 CT-DNA 溶液, 混合平衡后, 记录荧光光谱, $\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$, 扫描范围为 $350 \sim 450 \text{ nm}$ 。

利用荧光光谱考察帕珠沙星浓度、离子强度、溶液 pH 值对帕珠沙星与 DNA 作用的影响及溶液稳定性, 利用 DNA 对帕珠沙星的荧光猝灭作用建立 DNA 定量测定的新方法。

2 结果和讨论

2.1 帕珠沙星和 DNA 相互作用的荧光光谱

只有在很稀的溶液中荧光强度才与溶液的浓度呈线性关系, 对于较浓的溶液, 荧光强度不仅不随溶液浓度的加大而增大, 且常常随溶液浓度的增大而下降。这种由浓度效应而导致溶液的荧光强度下降的原因是多方面的。因此, 笔者首先研究了帕珠沙星的荧光强度与浓度的关系, 得到其线性范围, 找到最佳的实验条件。图 1 为根据测定结果绘制的工作曲线, 可知在 $2.0 \times 10^{-7} \sim 6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 范围内线性关系良好。因此, 选择帕珠沙星的实验浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。

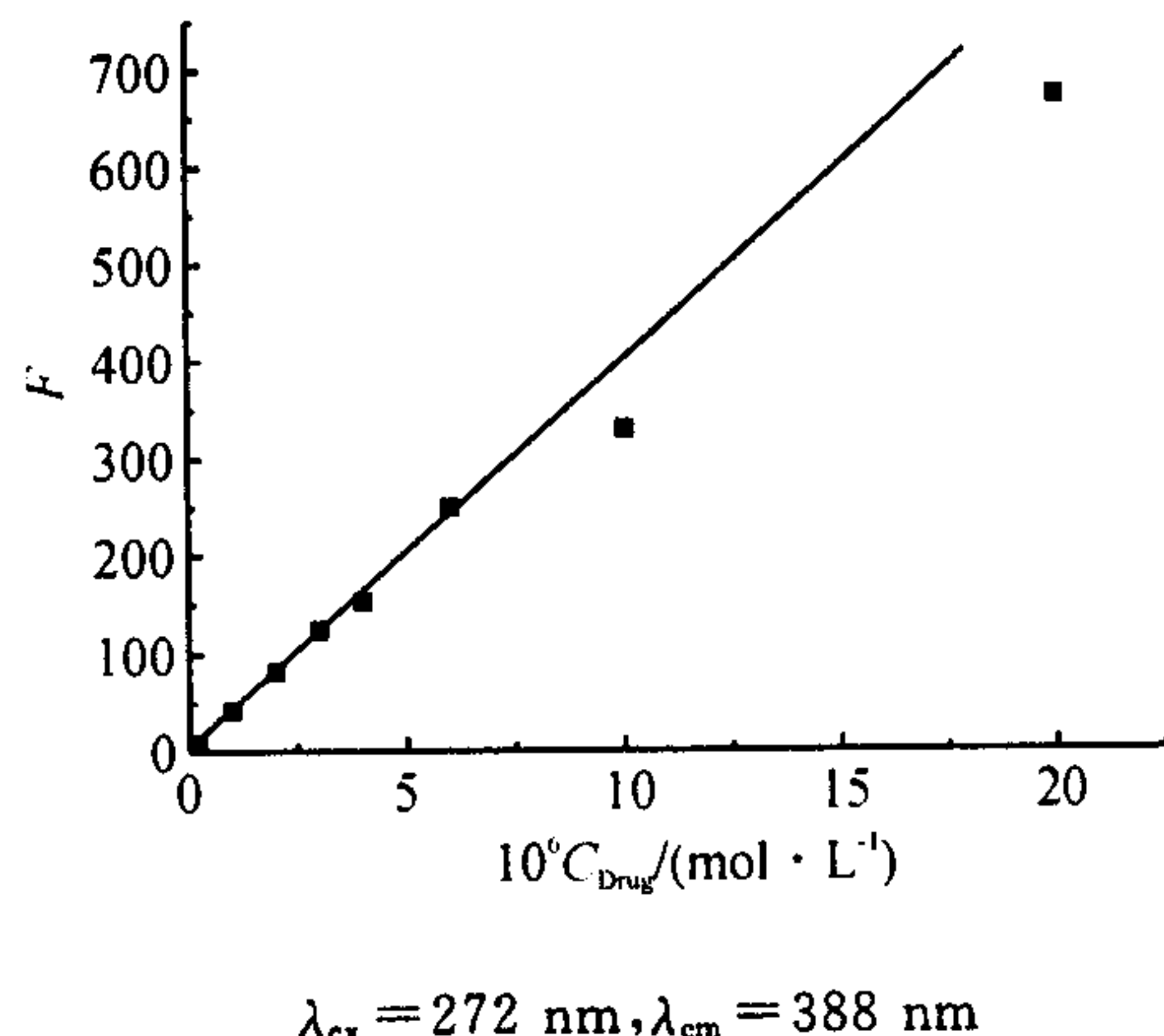


图 1 帕珠沙星的荧光强度和浓度的关系

图 2 为在帕珠沙星溶液中滴加微升量的 CT-DNA 溶液所观察到的荧光光谱变化情况。从图 2

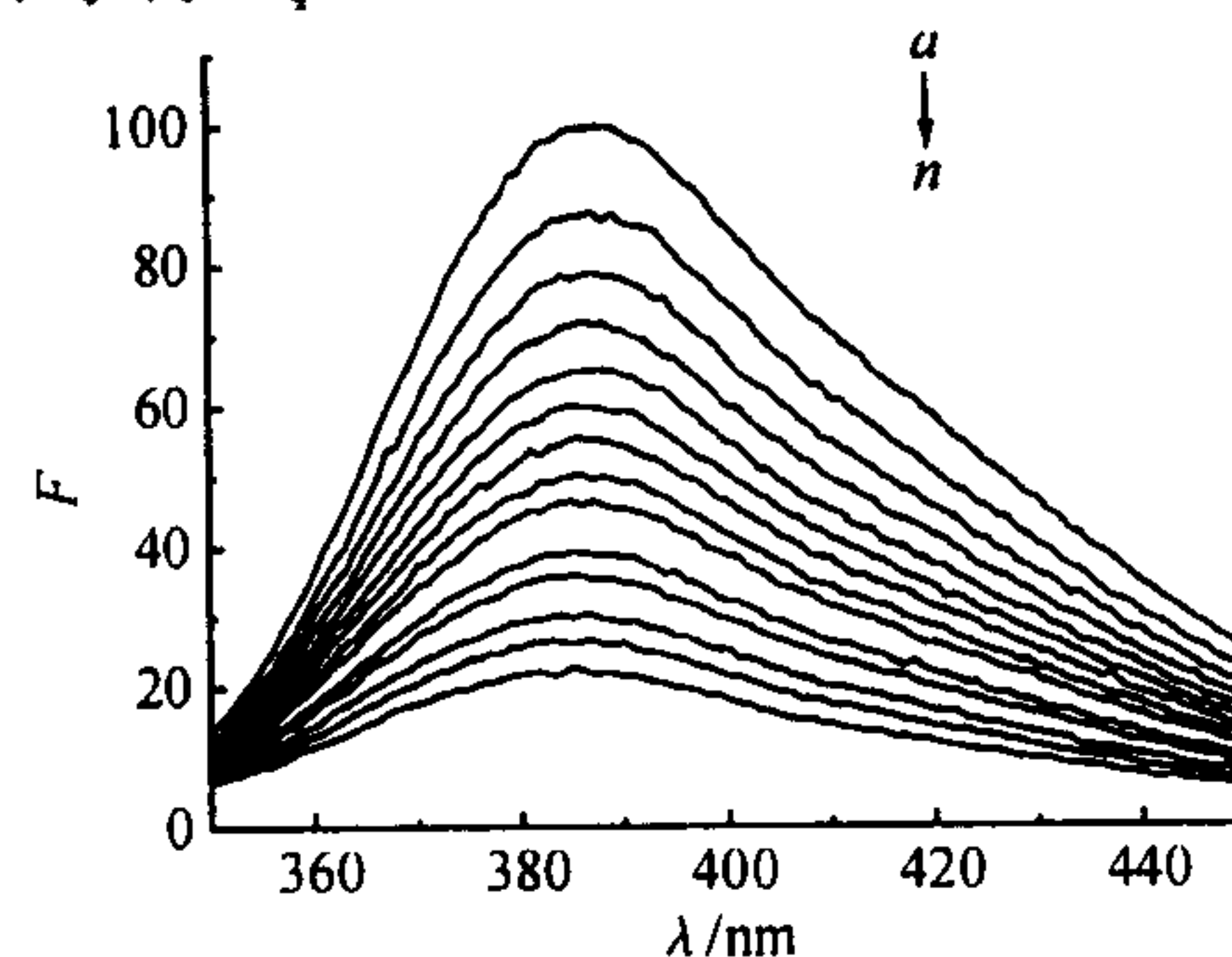
中可以看出, 随着 CT-DNA 浓度的增大, 帕珠沙星的荧光强度被强烈猝灭, 猝灭程度达 77.3% 。根据 Stern-Volmer 方程^[3]:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[\text{DNA}] \quad (1)$$

式(1)中, F_0 和 F 是 DNA 不存在和有 DNA 存在时的荧光强度, K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, 它代表 DNA 对药物荧光的猝灭效率。引起荧光物质猝灭的原因有两个方面: 动态猝灭和静态猝灭。以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图 (图 3a), CT-DNA 猝灭帕珠沙星荧光的 Stern-Volmer 图为一曲线, 说明 CT-DNA 对帕珠沙星的猝灭并非单纯的动态猝灭或静态猝灭, 而可能是两种猝灭方式共同作用的结果。因此, 用修正的 Stern-Volmer 方程^[4]:

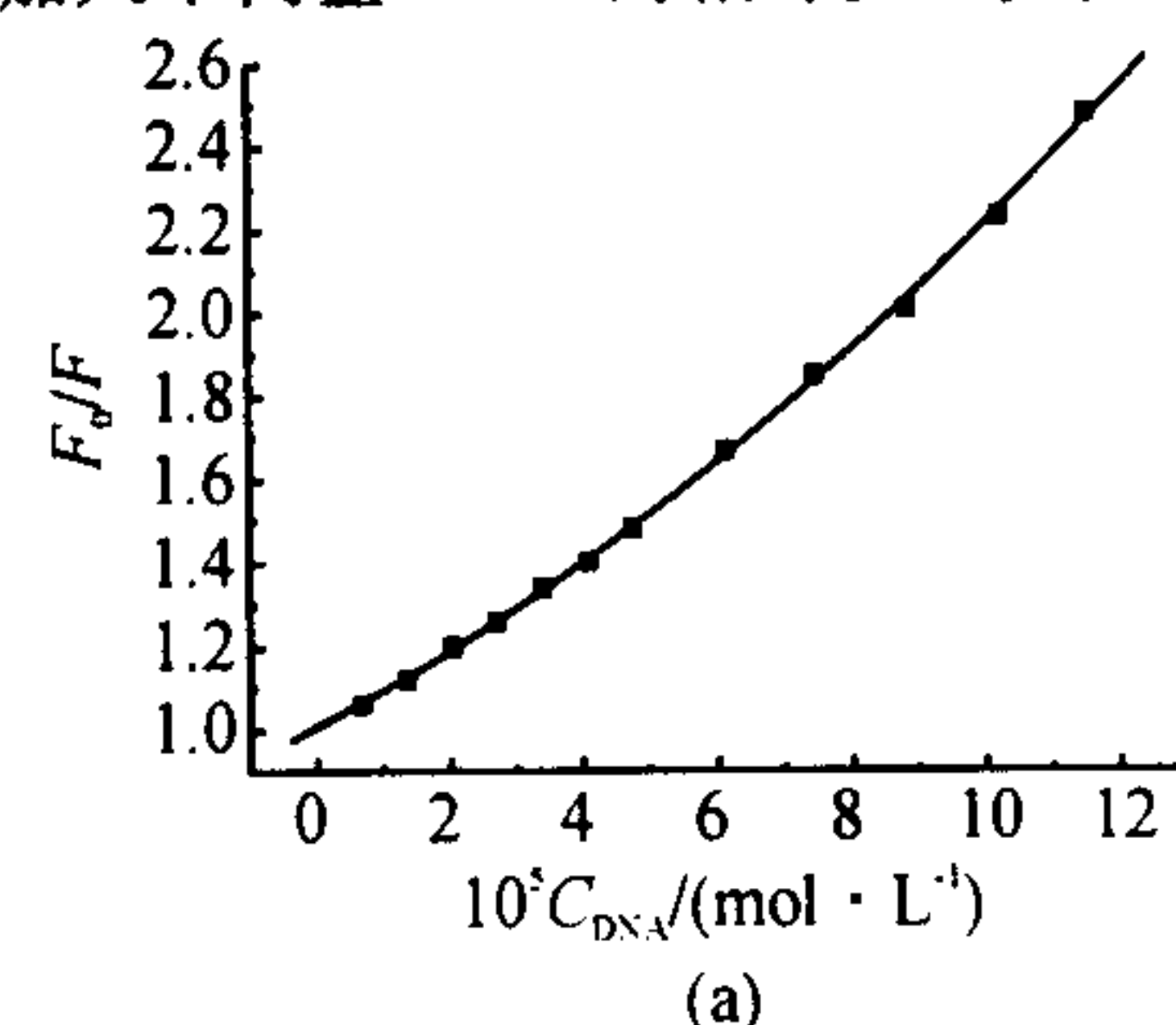
$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_q^{-1} F_0^{-1} c^{-1} \quad (2)$$

式(2)中, F_0 和 F 分别为加入 DNA 前后的荧光强度, K_q 为猝灭常数, 以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 c^{-1} 作图 (图 3b), 由斜率与截距求得 $K_q = (9.86 \pm 0.39) \times 10^3 \text{ L/mol}$ (293 K)。

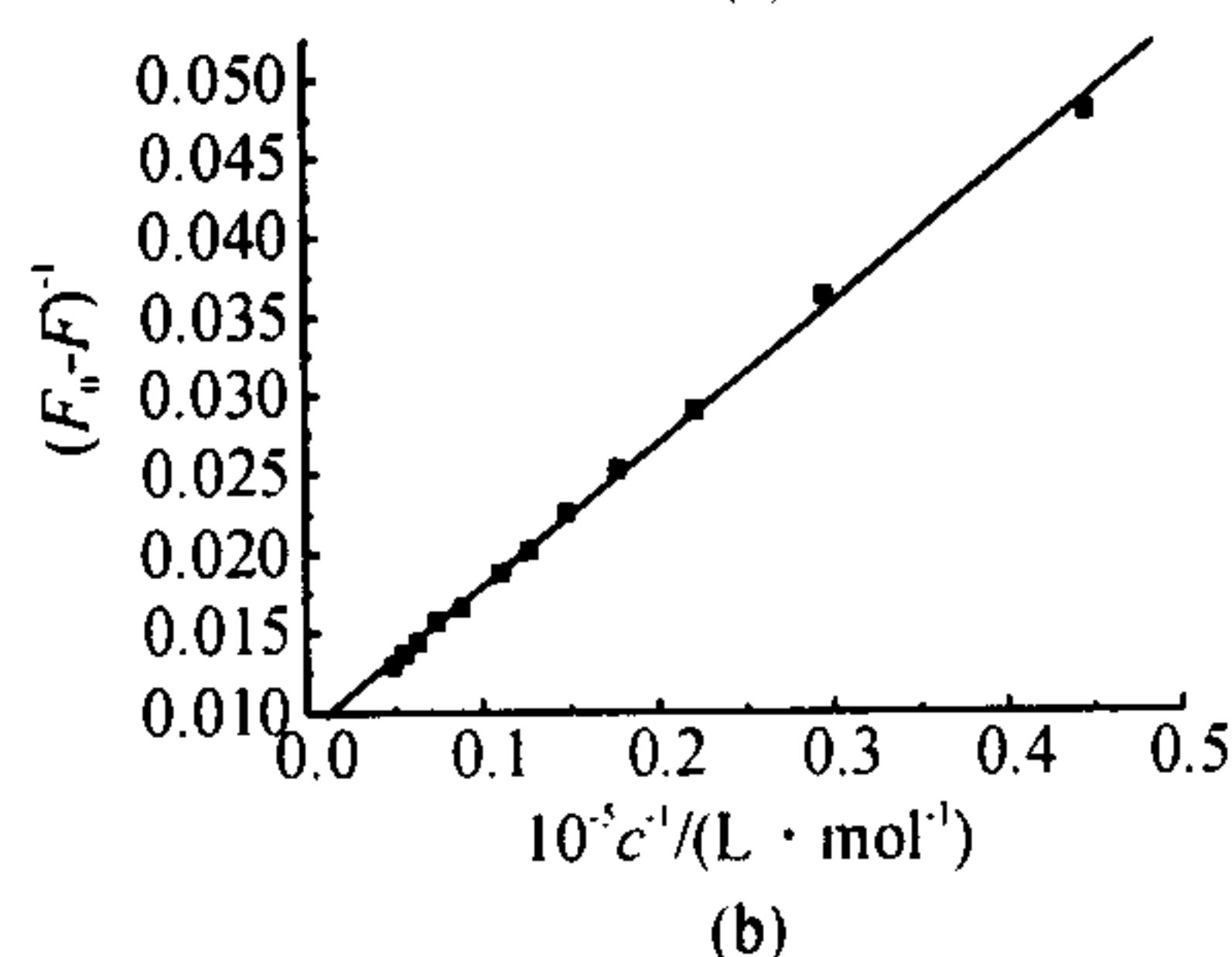


$C_{\text{DNA}}: 0 \sim 0.2 \text{ mmol/L}$ (从上到下),
 $\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 388 \text{ nm}$

图 2 加入不同量 DNA 的帕珠沙星荧光光谱图



(a)

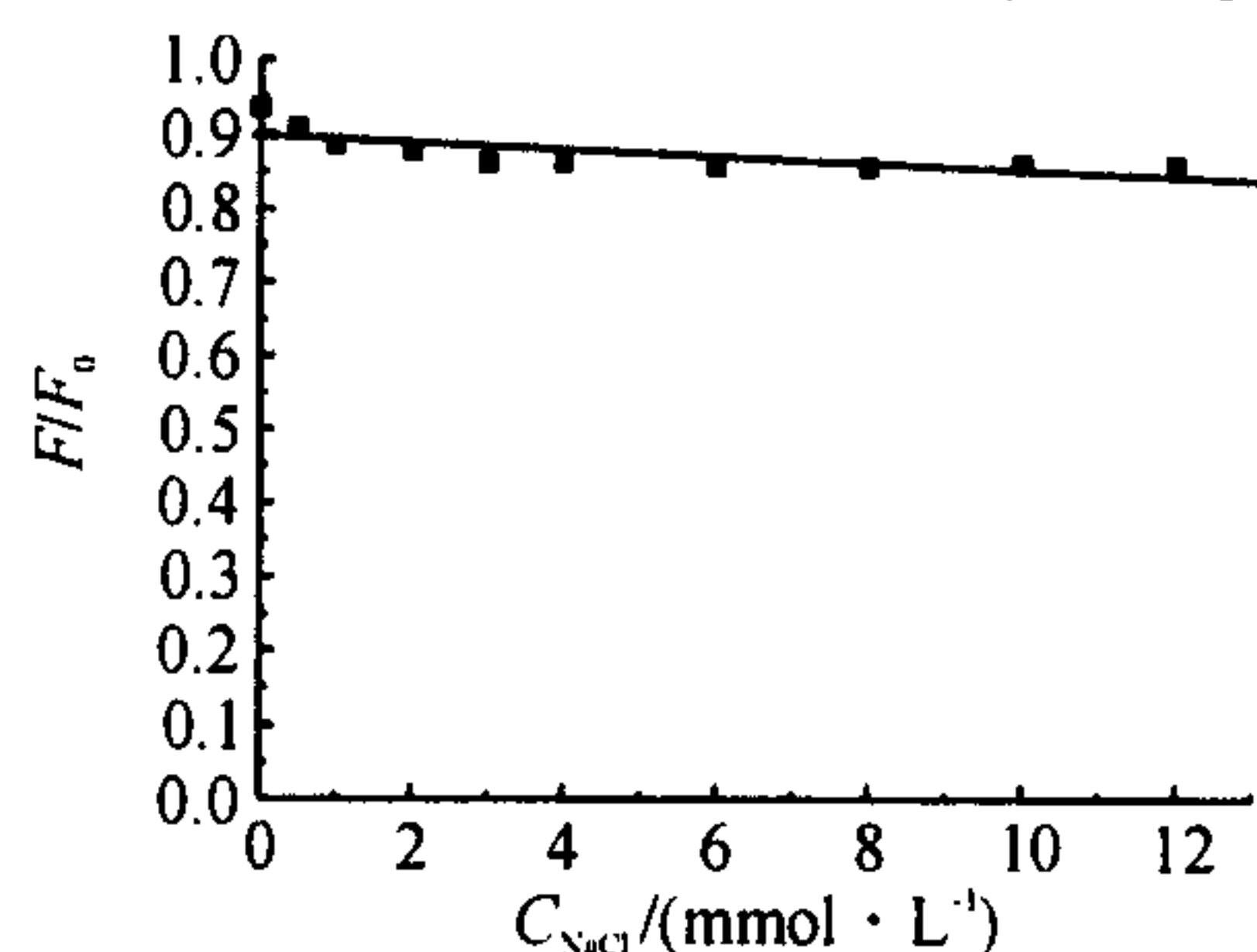


(b)

图 3 帕珠沙星荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线和修正后的 Stern-Volmer 曲线

2.2 DNA 荧光定量测定

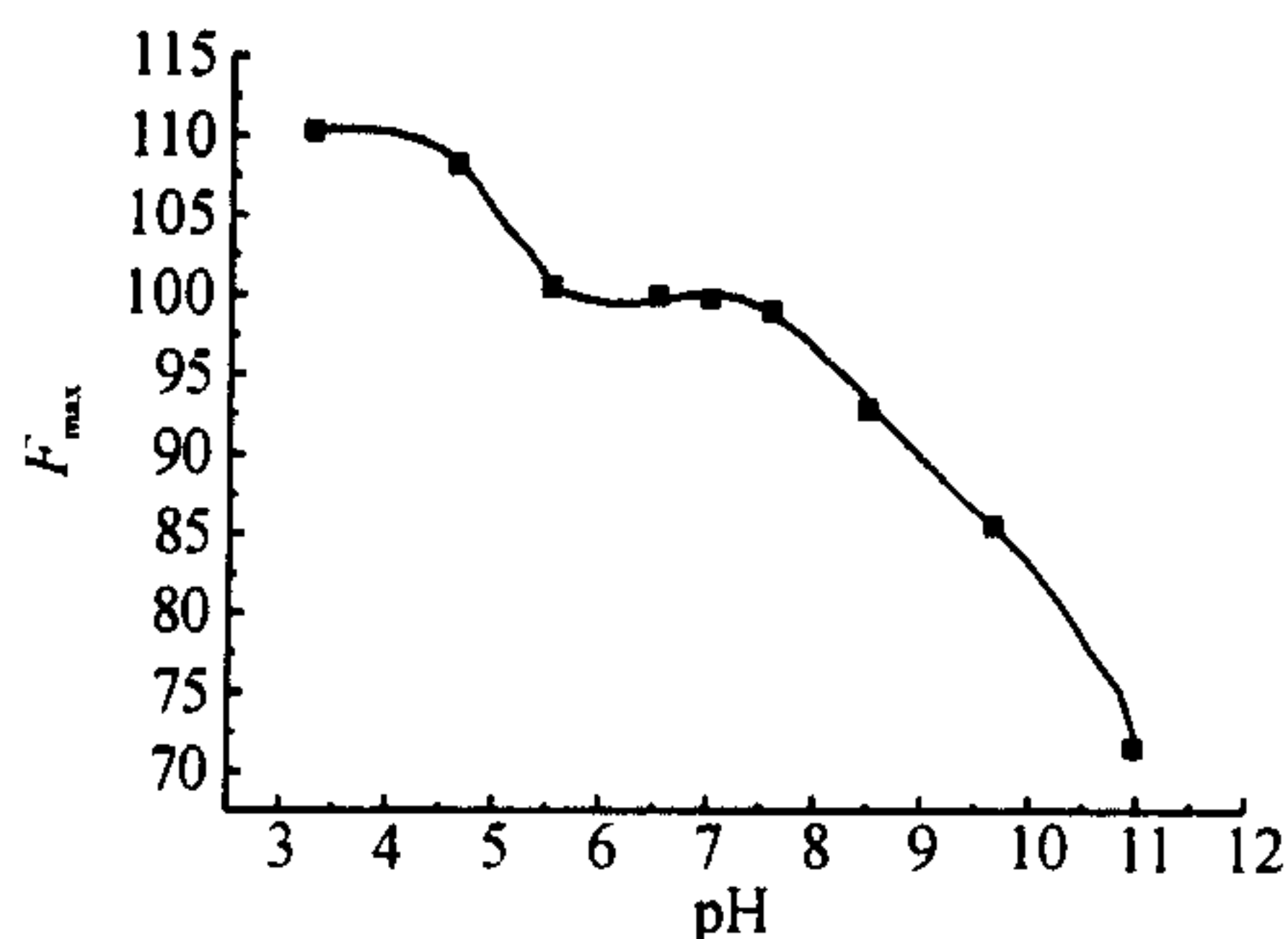
2.2.1 离子强度的选择 选择 NaCl 来改变体系的离子强度。随着离子强度的升高,显然 CT-DNA 对帕珠沙星猝灭程度 F/F_0 并无多大变化(如图 4)。也就是说离子强度的改变对帕珠沙星-DNA 体系几乎没有影响。笔者在 DNA 定量实验中选择 10.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液维持溶液的离子强度和酸度。



($C_{\text{drug}} = 2.0 \mu\text{mol/L}$, $C_{\text{DNA}} = 16.3 \mu\text{mol/L}$)

图 4 离子强度对荧光强度的影响

2.2.2 酸度条件的选择 图 5 为帕珠沙星-DNA 体系在不同 pH 下的荧光发射光谱的最大荧光发射强度 F_{max} 对 pH 作图。从图中可以看出,在 pH6.5~7.5 之间,荧光发射强度相对稳定。考虑到荧光发射强度的稳定性和人体 pH 的微环境,选择 pH7.0 的磷酸盐缓冲液作为支持介质。



($C_{\text{drug}} = 2.0 \mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 388 \text{ nm}$)

图 5 酸度对荧光强度的影响

2.2.3 溶液稳定性 293K, pH7.0 含 10.0 mmol/L 磷酸盐,浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 的帕珠沙星溶液,于 8 h 内每 30 min 测定其荧光强度。结果表明,在 8 h 内荧光强度稳定。

2.2.4 荧光定量检测方程 由修正的 Stern-Volmer 方程(式 2), $(F_0 - F)^{-1}$ 与 c^{-1} 在一定浓度范围内呈良好的线性关系,以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 c^{-1} 作图,建立新的准确测定 DNA 的方法。通过以上实验,最后确定的优化的实验条件是帕珠沙星浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 的 10.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0),在此溶液中滴加微升量的 DNA 溶液,记录荧光光谱的变化。

依实验方法测定 DNA 工作曲线,如图 6 所示,CT-DNA, smDNA 和 hsDNA 的线性响应范围分别为: $0.65 \sim 33.3 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.78 \sim 46.3 \mu\text{g/mL}$ 和

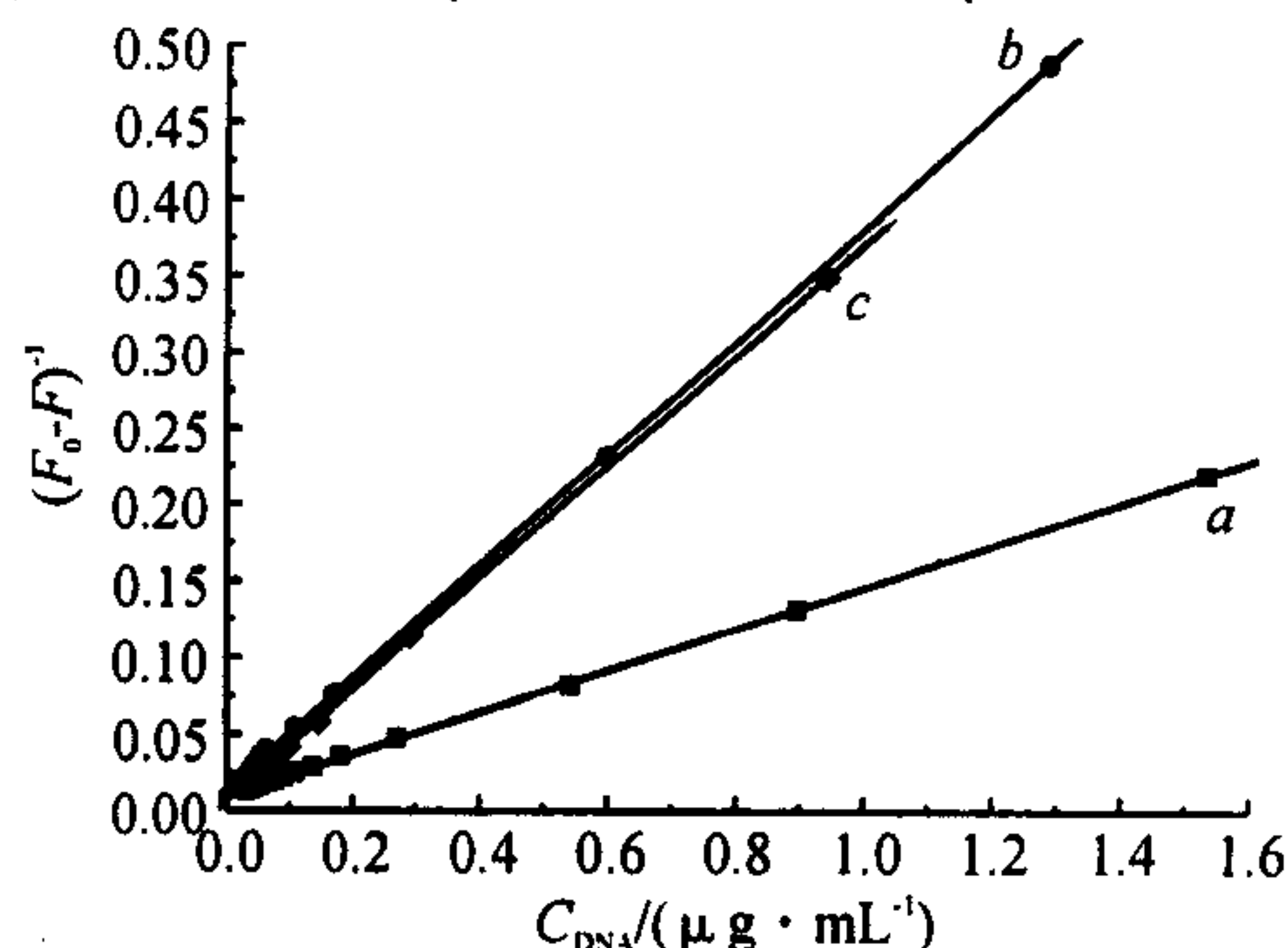
$1.07 \sim 48.1 \mu\text{g/mL}$, 回归方程分别为:

$$(F_0 - F)^{-1} = 0.0098 + 0.1367c^{-1}, r = 0.9994;$$

$$(F_0 - F)^{-1} = 0.00131 + 0.3695c^{-1}, r = 0.9993;$$

$$(F_0 - F)^{-1} = 0.0065 + 0.3659c^{-1}, r = 0.9994;$$

CT-DNA, smDNA 和 hsDNA 的检测限分别为 $0.07 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.02 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.02 \mu\text{g/mL}$ 。



a. CT-DNA; b. smDNA; c. hsDNA ($C_{\text{drug}} = 2.0 \mu\text{mol/L}$)

图 6 不同种类 DNA 的工作曲线

3 与经典方法的比较

该定量方法的灵敏度高于较常用的紫外光谱法,且帕珠沙星是常用药物,毒性小,比常用的染料荧光探针如溴化乙锭、吖啶等更优越。表 1 是一些测定 DNA 的经典方法^[5]与本方法的比较。

表 1 与经典方法的比较

测定方法	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
溴化乙锭	540/590	0.01	—
Hoechst33258	256/492	0.01	0~15.0
Tb ³⁺ -phenanthroline	298/543.5	0.10	0.4~15.0
本方法(CT-DNA)	272/388	0.07	0.65~33.3

与经典方法相比,本方法具有操作简便,线性范围宽和无毒性等优点。

参考文献:

- [1] 刘军,罗国安,王义明,等. 小分子与核酸相互作用的研究进展[J]. 药学学报,2001,36(1):74-78.
- [2] ZHONG W Y, YU J S, HUANG W L, et al. Spectroscopic Studies of Interaction of Chlorobenzylidene with DNA[J]. Biopolymers,2001,62(6):315-323.
- [3] 陈国珍,黄贤智,郑朱梓,等. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社,1990:120.
- [4] 叶宝芬,朱永林,鞠煌先. DNA 与苯胺红 T 的相互作用与荧光定量检测[J]. 高等学校化学学报,2002,23(12):2253-2255.
- [5] 俞英,周震涛,吴霖. 铝试剂荧光光谱法测定核酸[J]. 分析实验室,2005,24(3):31-35.