

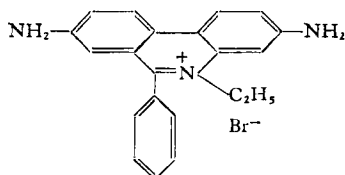
核酸的荧光染料——菲啉溴红

中国科学院生物物理研究所一室二组

菲啉溴红是近年来应用较为广泛的一种荧光染料,它与核酸有特异的结合能力,对体内核酸(DNA和RNA)的合成以及与核酸有关的多聚酶和转录酶都有抑制作用,并具有抗病毒活性和诱发突变的性能。最初菲啉溴红是一种抗锥虫药物,后来观察到它有抑制蛋白质合成的功能。1964年Le Pecq等人发现菲啉溴红与核酸结合后,其荧光强度显著增高,引起人们的重视。此后对菲啉溴红-核酸的物理化学性质进行了一系列的研究,七十年代开始它得到越来越广泛的应用。本文着重介绍菲啉溴红-核酸的反应特性以及它在分子生物学、细胞生物学和临床医学中的应用。

一、菲啉溴红的性质

菲啉溴红为3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啉溴盐(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium Bromide),简称 Ethidium Bromide,或 EthBr,或 EB,或 EtBr。其结构式为:



菲啉溴红为暗红色棒状结晶,熔点 249—251℃,味苦,可溶于水、乙醇和氯仿。分子式为 $C_{21}H_{20}N_2^+ Br^-$, 分子量为 349.33。水溶液在紫外区和可见区的最高吸收峰分别为 285 毫微米和 479 毫微米,具有微弱荧光。

二、菲啉溴红与核酸的反应特性

1. 吸收光谱特点

菲啉溴红-核酸溶液的吸收光谱与菲啉溴红溶液

提取的“相干活性”(John, 1967)。

上面介绍了光学全息术与神经生理范畴之间的若干共性。当然还可以举出一些来。我们应该运用毛主席阐明的关于共性、个性的辩证法来认识这些共同的本质。毛主席说:“这一共性个性、绝对相对的道理,是关于事物矛盾的问题的精髓,不懂得它,就等于抛弃了辩证法。”脱离个性的共性,不包含共性的个性都是不存在的。共性与个性的联接和转化,生动地体现在认

识的吸收光谱相比,波形类似,在紫外区的吸收值均比可见区约大 10 倍,但前者的最高峰向长波方向移动(如在可见区从 480 毫微米位移到 518 毫微米),尽管菲啉溴红与核酸比率不同,但在 300,392 和 512 毫微米处均出现三个等消光点。等消光点的出现说明在菲啉溴红-核酸溶液中,菲啉溴红是以两种不同形式存在:一种是游离的菲啉溴红,一种是结合的菲啉溴红(菲啉溴红与核酸结合)。利用透析或离子交换树脂等方法,结合的菲啉溴红又可重新分开为游离的菲啉溴红和核酸,由此可见菲啉溴红与核酸结合生成的是菲啉溴红-核酸络合物。

2. 菲啉溴红-核酸结合特点

据 Scatchard 方程:

$$\frac{r}{c} = K(n - r)$$

式中, r 是与每个核苷酸结合的菲啉溴红分子数, n 是每个核苷酸可提供的结合位置数(以下简称结合数), K 是结合常数, c 是游离菲啉溴红浓度;在测定结合常数 K 与结合数 n 时发现,在低盐浓度时,以 r/c 对 r 作图,得到一条曲线,这条曲线是由两条具有不同 K 和 n 的直线组成,说明菲啉溴红与核酸是以两种结合位置进行络合。在高盐浓度(0.1M NaCl)时,以 r/c 对 r 作图,得到一条直线,说明在此条件下只出现一个结合位置(见图 1),我们称它为第一结合位置(荧光位置)。而另一个随盐浓度增高而消失的位置,称它为第二结合位置。

3. 第一结合位置

用 X 光衍射、能量转移或流动双折射等实验证明,这个位置是一个插入位置,即菲啉溴红的菲啉环插入到核苷酸的碱基对之间,它的平面与碱基平面平行,形

识的辩证过程中。

正如毛主席所指出的:“当着人们已经认识了这种共同的本质以后,就以这种共同的认识为指导,继续地向着尚未研究过的或者尚未深入地研究过的各种具体的事物进行研究,找出其特殊的本质,这样才可以补充、丰富和发展这种共同的本质的认识,而使这种共同的本质认识不致变成枯燥的和僵死的东西。”所以,只一般地看到了光全息与神经生理中若干现象的相似性,还只是这一认识运动的开始。

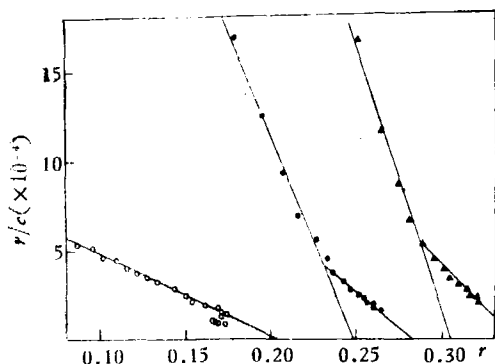


图1 盐浓度对非啉溴红与核酸结合的影响

- ▲ 0.001M 二甲胂酸钠;
- 0.01M NaCl + 0.001M 二甲胂酸钠;
- 0.1M NaCl + 0.001M 二甲胂酸钠

成夹心面包样结构。以这种方式结合的非啉溴红荧光量子效率显著增加,约为游离非啉溴红的20—25倍。荧光强度与量子效率和消光系数成正比,用公式

$$V = \frac{Q_b}{Q_f} \frac{\epsilon_b}{\epsilon_f}$$

来表示结合非啉溴红与游离非啉溴红的荧光强度之比, V 值能反映结合非啉溴红荧光强度增加的程度;式中 Q_b , Q_f 和 ϵ_b , ϵ_f 分别为结合非啉溴红与游离非啉溴红的量子效率和消光系数。实验证明,量子效率之比 Q_b/Q_f 在300毫微米后不随波长而变,因此选择一个适当的激发波长使 ϵ_b/ϵ_f 达到最大值(一般在365毫微米和545毫微米),那么非啉溴红-核酸的荧光强度要比游离非啉溴红增加80—100倍。

由于非啉溴红插入到核酸碱基对之间,因此它只能与双链核酸结合。如非啉溴红与多聚A混合,荧光不增加;当加入多聚U后,由于形成多聚A-U的双链多聚核苷酸,结果荧光增强。非啉溴红还能插入单链核酸折叠成发夹型的双链区以及三链核苷酸的双链区而增强荧光。如在相同条件下,假定以小牛胸腺DNA与非啉溴红结合的荧光增量作为100,那么大鼠肝核糖核蛋白体RNA为46,而dAMP与dCMP只有0.03。可见荧光增量是非啉溴红与双链核酸的专一性反应。

此外,在低盐浓度时,非啉溴红与双链多聚核苷酸的结合常数 K 约为 $10^6 M$,结合数为0.2,结合后密度有所改变。

4. 第二结合位置

在低离子强度,特别是对链状多聚核苷酸来说,会出现第二个结合位置。这个位置由带负电荷的磷酸根与带正电荷的非啉溴红间的静电引力形成,其吸收光谱与第一结合位置没有区别,但量子效率非常之小,与荧光位置相比是微不足道的。结合常数随离子浓度增加而迅速下降,因此离子浓度为0.1M时, K 接近于

零,从而排除了这个结合位置。非啉溴红与单链多聚核苷酸在第二结合位置的亲和力大于双链多聚核苷酸,它的结合数接近于1。

三、影响非啉溴红-核酸荧光强度的几个因素

1. 不同类型的核酸

(1) 共价闭合环状DNA和线形或带缺口的环状DNA 实验证明,共价闭合环状DNA(简称I)与非啉溴红的结合数小于线形或带缺口的环状DNA(简称II),而I的结合常数则大于II,产生这种差异的原因可能是由于I的特殊构型造成的。当相同浓度的I或II与低浓度(不过量的)非啉溴红络合,生成EthBr-DNA络合物的浓度受结合常数支配,结合常数大,生成的络合物多,荧光强度相应增大,因此I的荧光强度大于II;如与高浓度(过量的)非啉溴红络合(DNA全部被非啉溴红饱和),则EthBr-DNA络合物的生成受结合数支配,结合数大,所结合的非啉溴红分子就多,因此在此条件下,II的荧光强度就大于I。

(2) RNA和DNA 在室温时,非啉溴红与DNA或RNA结合,其荧光增量不同。如以365毫微米和546毫微米为激发波长,则与DNA结合的荧光强度之比(V 值)为80和100,与RNA结合的 V 值为100和60。

(3) 碱基组成 各种不同来源的DNA(G+C含量为35—72%)与相同浓度的非啉溴红结合,其结合常数 K (4×10^7 — 7×10^7)与结合数(0.18—0.22)基本不变,可见碱基组成对荧光强度影响不大。

(4) 分子量 不同分子量的小牛胸腺DNA(分子量 1.6×10^6 — 8×10^6)与相同浓度非啉溴红结合,荧光增量在90—100范围内,荧光强度基本不变。

2. 环境等因素

(1) 温度 结合常数随温度而变,在相同条件下,荧光强度随温度升高而降低,故测定时应在恒温下进行。

(2) pH值 pH值过高或过低,皆会破坏核酸双链结构,降低荧光强度。pH在4—10范围内,对非啉溴红-核酸络合物的荧光强度影响不大。

(3) 离子强度 盐浓度对荧光强度的影响比较复杂。在低盐浓度时,两种结合位置互相竞争。盐浓度提高,排除了第二结合位置;但浓度过高又会降低第一结合位置的结合常数,影响测量灵敏度。一般将盐浓度固定在0.1M。不同的阳离子对荧光强度也有影响,二价阳离子的影响大于一价的。某些阴离子如 ClO_4^- 能沉淀非啉溴红。

(4) 仪器 一般来说,非啉溴红-核酸的吸收光谱最高峰在590毫微米。当仪器光电倍增管的光谱响应

曲线不同时,发射光谱的最高峰会位移(580—600毫微米)。如采用对红区较灵敏的光电倍增管,发射光谱的最高峰在600毫微米出现,但由于光电倍增管灵敏度的相对值与绝对值降低,仪器的灵敏度也相对降低。此外,激发光源不同也会影响测量灵敏度。

3. 蛋白的干扰

干扰非啭溴红-核酸络合物荧光的物质很少,这是荧光染料非啭溴红的一个特点。但是蛋白的存在对荧光是有影响的。实验证明,虽然EthBr-DNP与EthBr-DNA的吸收光谱形状没有什么变化,但结合常数与结合数均随蛋白含量增加而降低(图2),荧光强度也随之减弱。

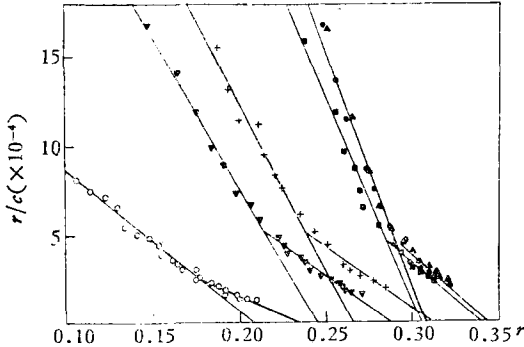


图2 蛋白对非啭溴红与核酸结合的影响

曲线(1) -○- 脱氧核糖核蛋白(DNP);
曲线(2) -▼- 经0.6M NaCl萃取的DNP;
曲线(3) -+- 经1.0M NaCl萃取的DNP;
曲线(4) -■- 经2.0M NaCl萃取的DNP;
曲线(5) -●- 经3.0M NaCl萃取的DNP;
曲线(6) -▲- 脱氧核糖核酸(DNA)

由图可见, EthBr-DNP与EthBr-DNA的结合常数和结合数差异较大。DNP经0.6M NaCl溶液萃取,除去的蛋白量(主要成份为组蛋白 f_1)为总蛋白量的24%时,得到的曲线(2)与曲线(1)比较,其斜率明显增大;用1.0M NaCl除去的蛋白(其中包括组蛋白 f_1 , $f_{1(a)}$, $f_{1(b)}$)为总蛋白量的49%时,得到的曲线(3)的斜率略大于曲线(2)。用3.0M NaCl萃取,除去的蛋白量为总量的95%时,曲线(5)的斜率与曲线(6)毫无区别。可见蛋白会影响核酸与非啭溴红的结合,干扰DNA荧光强度的测定。但最近也有报道当溶液的pH为6.6—8.0,盐浓度为0.1M时,就可排除这种干扰。一般在测定生物样品时,多用可见光激发(545毫微米),可避免一些物质的干扰。

从目前的研究资料来看,还不足以说明为什么蛋白会降低EthBr-DNP的结合常数与结合数,这个问题尚需进一步深入研究。

四、非啭溴红的应用

1. 测定微量核酸

非啭溴红与核酸结合,荧光量子效率增加。在合

适的条件下(pH、温度、离子浓度等),一定浓度的非啭溴红溶液的荧光增量与加入的核酸浓度成正比(恰当的说,是与加入核酸的双链区成正比):

$$I_1 - I_0 = KC$$

式中, I_1 是非啭溴红-核酸的荧光强度, I_0 是非啭溴红的荧光强度, C 是核酸浓度, K 是比例常数。根据这个基本原理,已用来测定DNA和RNA,以及在DNA和RNA混合物中分别测定DNA和RNA的量,灵敏度达到0.01微克/毫升。

七十年代已开始用这方法测定活体组织的核酸。如测定大肠杆菌和在葡萄糖、蔗糖中生长之St. Mectans的DNA。与常用的二苯胺反应方法相比较,测定结果彼此颇为接近。实验表明由细菌或不溶性的多糖引起的混浊,并不影响EthBr-DNA的荧光强度。本方法能测出的DNA最低含量为50毫微克/毫升。另外还利用非啭溴红的荧光性质定量测定组织中的核酸,据报道,如在足够的高盐浓度(0.1—0.2M)并使蛋白带负电荷的pH值(6.6—8.0)条件下测定,就可克服蛋白干扰,测定的结果与采用Schmidt-Thaunhauser法(由Munro和Fleck改进)测定结果比较如下:

表1 两种方法测定结果的比较

组 织	含 量 方 法	微克DNA/毫克组织		微克RNA/毫克组织	
		EthBr	ST	EthBr	ST
肝		3.3±0.2	3.1±0.2	11.5±0.3	11.7±0.3
肾		5.0±0.9	4.5±0.4	5.3±0.6	4.8±0.4
睾丸		2.2±0.6	2.2±0.5	6.3±0.6	6.1±0.7
胸腺		28.9±4	26.6±4	10.2±2.4	9.7±0.4
脑		1.6±0.4	1.5±0.3	1.9±0.2	2.3±0.4

Blackbur等人用超声波破碎细胞后,利用非啭溴红测定外周血粒细胞中DNA含量,得到的灵敏度为7.5微克DNA/毫升,相当于 10^4 个细胞中DNA的含量。

利用荧光染料非啭溴红测定活体细胞中核酸含量的荧光方法,是七十年代发展起来的一门新技术,它的优点是专性强,灵敏度高,操作简便快速。

2. 分离核酸

非啭溴红与双链核酸结合是一个专一性反应,但它与不同构型的核酸的结合数不一样。如与共价闭合环状DNA的结合数为0.11—0.13,与线形DNA的结合数是0.2。据报道,在高浓度氯化铯溶液中,在非啭溴红过量的情况下, EthBr-DNA络合物的浮力密度有所改变,改变的大小与非啭溴红结合量成反比。因此用氯化铯密度梯度超速离心法,可分离双链RNA与单链RNA,可分离共价闭合环状DNA与线形或带缺口环状DNA。例如将含有线形和环状DNA混合物的多瘤病毒置于密度为1.566克/毫升的CsCl溶

液中(其中含有非啉溴红 100 微克/毫升),由于环状 DNA 和线形 DNA 与非啉溴红结合后的浮力密度分别为 1.588 克/毫升和 1.553 克/毫升,因此在 20℃ 离心 24 小时(4 千转/分),就可将这两种 DNA 非常清楚的分开;所得的非啉溴红-核酸络合物用水饱和的丁醇溶液洗脱非啉溴红,即可收回所需的核酸。同样用这个方法,可从 Hela 细胞线粒体中分离共价闭环环状 DNA,和从噬菌体 PM₂ 中制备纯化 DNA。在同样条件下,如用非啉溴红同系物 3,8-二氨基-5-二乙胺基丙基-6-苯基非啉碘盐(3,8-diamino-5-diethylaminopropyl-6-phenyl phenanthridinium iodide)代替非啉溴红,则分辨率提高 1.8 倍。

值得提出的是共价闭环环状 DNA 是核酸的一种特殊构型,它广泛分布在自然界中,很多肿瘤病毒如多瘤病毒、SV₄₀、兔和人的乳头病毒,以及各种细胞线粒体中都有这种 DNA 存在。利用非啉溴红就可可在一个复杂的 DNA 混合物中,制备纯化微量的共价闭环环状 DNA,为深入研究其性质与构型创造条件。

3. 研究核酸有关的酶的活性与反应机理

天然核酸经一定浓度的有关的核酸酶处理,被破坏的双链数与反应时间成正比。酶的活性越大,破坏双链的速度也越快。如前所述,荧光强度与双链数成正比,因此根据荧光强度随时间变化的速度就可比较出核酸酶活性的大小。例如 DNA 多聚酶能使单链 DNA 形成双链 DNA,连接酶可使缺口环状 DNA 闭合修复,它们的活性皆可从荧光强度的变化速度求得。此外利用非啉溴红研究酶催化的动力学作用机理,特别是带缺口的环状 DNA,其缺口数目不止一个,修复速度各不相同;据报道,从测定不同时间的荧光强度,可推导出复杂条件下的修复速度。应该指出,这种方法在实验技术上还存在很大困难,因为要制成一个具有一定数量标准的带缺口的环状 DNA 是很不容易的。

4. 测定核酸结构

(1) 利用荧光强度研究多聚核苷酸构象 研究多聚核苷酸的杂交反应与取代反应时,由于形成的多聚 A-U 仅出现微弱的增色效应,用测定吸收值的方法很难准确测量。如加入非啉溴红,则通过荧光强度的显著变化,可以观察单链结构向双链或三链结构的转变,从而利用这个特征测定多聚 A 和多聚 U 溶液中双链结构的形成。图 3 示出在核苷酸总量保持不变的情况下,溶液中多聚 A 和多聚 U 按不同比率混合时的紫外吸收光谱(图 3a)和加入非啉溴红后荧光增量的特征(图 3b)。

(2) 利用其它荧光性质研究核酸结构 一种物质的荧光性质,可以用它的激发光谱、发射光谱、荧光寿命和偏振率等来表示。对应用于研究结构来说,测定荧光寿命、偏振率等更为有用。目前利用非啉溴红作为

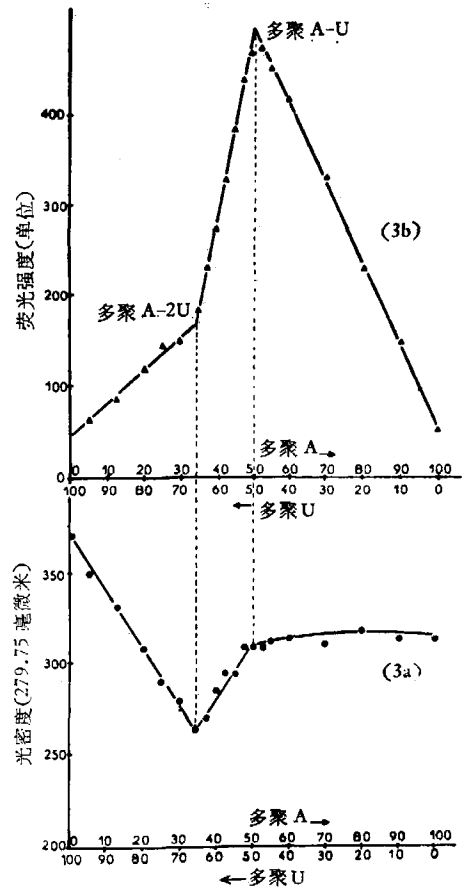


图 3 多聚 A、U 混合时的紫外吸收光谱和荧光光谱

荧光探针研究核酸结构尚处在初始阶段。

据最近的报道,研究处在接近体液条件下的非啉溴红-核酸络合物,发现其荧光寿命随温度升高而显著缩短。一般来说,荧光寿命并不随温度变化,因此这个变化可能是由于核酸构型改变而引起的;但目前实验数据太少,尚不能作此定论。

根据 Förster 理论,供体和受体的能量转移速度与距离的六次方成反比,并与它们之间的方位因素成正比。所谓方位因素简单的讲就是两个相邻非啉溴红分子的跃迁矩之间的夹角。测出能量转移速度的差异,就有可能反映出两个生色团之间距离的微小差异所引起的构象变化。已有报道,测定酵母 tRNA 苯丙氨酸 Y 碱基和非啉溴红之间的能量转移速度,当改变溶液中盐浓度时,能量转移速度有很大变化。作者解释这种现象是由于环境的改变,导致 tRNA 分子构象的变化。同样,也可以测出结合在 DNA 上的两个非啉溴红分子之间能量转移速度,来算出供体与受体之间的距离;通过能量转移求出其夹角大小,并推导出非啉溴红插入后 DNA 双螺旋扭力的变化,但这个结果与其它方法得到的结果有矛盾,尚需进一步研究。

EthBr-DNA 络合物的荧光寿命比较长,达 24 毫微秒,通过偏振率的测定并用 Perrin 公式,可准确算出旋转弛豫时间,这是研究 DNA 动态结构的一个重要参数。目前对小分子的内旋转问题的研究已有许多有效的办法,如拉曼光谱、中子散射等,但对大分子动态结构的研究还没有什么有效的工具。据初步估计,分子量为 3,000 道尔顿的球形分子的旋转弛豫时间大约为 1 毫微秒;因此利用非啉溴红可研究 10^5 道尔顿的分子的内旋转。DNA 是个很大的分子,过去曾假定它的旋转弛豫时间很长。目前用非啉溴红方法测定它的旋转弛豫时间为 28 毫微秒,与 EthBr-DNA 的荧光寿命为相同数量级,这是一个测定 DNA 动态结构的有用工具。

5. 细胞荧光标记

荧光染料非啉溴红进入细胞后就与细胞中核酸结合,如选择合适的激发光和发射光滤片,在荧光显微镜下可以观察到经非啉溴红标记的部位具有橙色荧光。由于核酸表面的蛋白会阻碍非啉溴红与核酸的反应性能,因此非啉溴红与细胞中的游离核酸、核糖体或染色体中核酸结合后的荧光特征(偏振率、荧光寿命等)也不一样,所以非啉溴红作为细胞内荧光探针有它特殊的优越性。也有人尝试用非啉溴红作为染色体荧光区带标记物,但这方面的工作尚处于探索阶段。

此外, Wolfgang Göhde 用脉冲细胞光度计定量测定细胞中的 DNA,他将细胞(如白细胞、骨髓、皮肤、艾氏腹水瘤等细胞)先用 95% 乙醇固定,用 RNase 处理,用非啉溴红染色后通过脉冲细胞光度计测量。一分钟内测定 50,000 个细胞的 DNA 含量,将所得的脉冲数作图,得到 G_1 , S 和 $G_2 + M$ 时相的相对含量,这样便可快速测定细胞群体组成的变化。例如用中子照射(900 拉得、300 拉得两组)艾氏腹水瘤细胞,并在照射后不同时间收集细胞,用脉冲细胞光度计测量,发现 900 拉得照射组在照射后 24 小时,有丝分裂开始受到抑制,并持续几天未见恢复;而 300 拉得照射组,细胞有丝分裂在短期内(24 小时)受到抑制,在 96 小时又重新合成 DNA。因此利用非啉溴红的荧光性质可以观察射线对细胞中 DNA 的损伤与恢复过程。

6. 肿瘤的诊断和治疗

大量实验结果表明,非啉溴红对核酸是专一性的结合,能抑制细胞中 DNA 合成与反转录过程。根据这种现象,人们开始探讨以非啉溴红治疗和诊断肿瘤的可能性。

近年来有关研究报道表明,相对低浓度的非啉溴

红能选择性地抑制 HeLa 细胞中与线粒体结合的 RNA 合成,如 4S RNA。5 微克/毫升非啉溴红能有效抑制 L1210 细胞的 RNA 和 DNA 的合成,1 微克/毫升非啉溴红能抑制 50% 的 RNA 合成。非啉溴红对 L1210 细胞可有中等程度选择性的抑制核仁 45S RNA 合成,但不能使 RNA 链长缩短。对白血病 6C3HED-OG, 6C3HED-RG, L5178Y 和 EL4 的核酸合成,非啉溴红都有一定的抑制作用。非啉溴红比其它利福霉素(Rifampicin)的衍生物,对 Rausher 和 Moloney 灰鼠白血病病毒的 DNA 多聚酶等,是一种更有效的抑制剂。

对小白鼠和大白鼠几种可移植的肿瘤,非啉溴红具有一定疗效。例如将白血病 6C3HED-OG 和 L5178Y 移植到小白鼠,然后腹腔注射非啉溴红(8 毫克/公斤/天 $\times$ 5),经此治疗的小白鼠分别延长生命 200% 和 83%。例如将稀释 800 倍的 FLV 白血病病毒注射到小白鼠后,腹腔注射非啉溴红(8 毫克/公斤/天 $\times$ 9),结果治疗组脾病灶为零,脾重 0.07 克,第 60 天存活率为 76%;对照组脾病灶多于 100 个,脾重 0.31 克,存活率为 31%。如果在移植 FLV 后第九天一次大量给药 20 毫克/公斤,那么治疗组第 60 天存活率为 70%,对照组为 32%。此外对一些乳腺癌、肉瘤和白血病 L1210,非啉溴红都具有一定治疗效果;但对艾氏癌无效。小白鼠腹腔肿瘤的初步研究表明,非啉溴红可能是一种有效的化学治疗药物。

应用脉冲荧光计测定细胞中 EthBr-DNA 荧光分布情况,可以快速测定颈部和头部肿瘤,以最大细胞数的四倍体和二倍体之比为 0.2 作为恶性肿瘤的判断标准,那末患恶性肿瘤的有 50% 是阳性结果,感染的和良性瘤的假阳性结果分别为 12% 和 0%。这个实验有待进一步的工作来证实。

五、结 束 语

以上扼要地介绍了荧光染料非啉溴红与核酸结合的一般理化特性,以及它在测定核酸含量和结构上的应用。在不到十年的时间内,非啉溴红在核酸的研究中已经开始获得广泛的应用,目前应用于研究离体核酸比较深入和成熟。今后的课题将是把非啉溴红应用于活体组织(染色体和细胞等),特别是研究体内核酸的结构和功能,将是一项十分有意义的工作。此外,搞清楚非啉溴红对核酸和核酸多聚酶的抑制机理,是了解肿瘤的发生和发展的途径之一,对治疗和诊断肿瘤病变将具有一定的理论与实际意义。