

- [2] Bondoli, A. et al.: *Resuscitation*, 4, 131, 1975.
 [3] Bondoli, A. et al.: *Resuscitation*, 4, 235, 1975.
 [4] Record, C. O.: Artificial liver Support, Williams R. (Ed), 27, 1975.
 [5] 作者等: 待发表。
 [6] Hess, S. M. & Udenfriend, S.: *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 127, 175, 1959.
 [7] Denkla, W. D. & Dewey, H. K.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 69(1); 160, 1967.
 [8] Bloxam, D. L. & Warren, W. H.: *Anal. Biochem.*, 60, 621, 1974.
 [9] McCaman, M. W. & Robins E.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 59, 885, 1962.
 [10] Wong, P. W. K. et al.: *Clin. Chem.*, 10, 1098, 1964.
 [11] Ambrose, J. A.: *Clin. Chem.*, 15, 15, 1969.
 [12] Vanghan, J. R.: *J. A. C. S.*, 76, 2474, 1954.
 [13] Waalkes, T. P. & Udenfriend, S.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 50, 733, 1957.
 [14] Robins, E.: *Methods of Biochemical Analysis*, 17, 287, 1969.

[本文于 1978 年 9 月 4 日收到]

荧光探针菲啉溴红 (Ethidium Bromide) 测定微量核酸的方法

陈逸诗 严国范 曹恩华 袁志安

(中国科学院生物物理研究所)

一、前言

核酸是重要的生物大分子,是现代生物学、医学等研究的主要对象之一。在核酸的研究中,常采用比色法和紫外分光光度法测定核酸的含量,这些方法步骤繁琐,灵敏度不高。

本文探讨六十年代后期由 Le Pecq 等^[1]提出的,并由 S. P. Ananda^[4]应用到生物组织样品中的一种新的测定核酸的荧光方法。常温下核酸自身荧光很弱,不能直接探测到。利用荧光探针——菲啉溴红(简称 Eth Br)插入核酸的双链区时,其量子产率大大增高,它和核酸形成一种较强的荧光络合物。在一定条件下,这种络合物的荧光强度和核酸的浓度成正比。利用核酸酶处理,就能确定样品中 DNA 和 RNA 的含量。利用这种方法可检测核酸的最小含量为 0.02 微克/毫升。

本实验采用我们自己合成的荧光染料 Eth Br^[2],寻找测定核酸的各种最佳条件和探讨生物样品核酸含量的测定方法。结果表明,这种荧光方法比经典的核酸测定法简便、快速、灵敏和专一。

二、材料和方法

1. 试剂

菲啉溴红,本组合成。

脱氧核糖核酸, DNA (小牛胸腺) 本组提纯,蛋白含量 1.2%。

核糖核酸钠盐, RNA (酵母) 含磷量大于 7%,上海生化所。

脱氧核糖核酸酶 I, DNase I (牛胰), 英, B. D. H。

核糖核酸酶, RNase (牛胰), 上海生化所。

广谱蛋白酶, Pronase E 德, E. Merck。

三羟甲基氨基甲烷, Tris, Fluka。

氯化钠, A. R., 北京化工厂。

盐酸, A. R., 北京化工厂。

氯化镁 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), A. R., 北京化工厂。

2. 溶液配制

Eth Br 溶液: 贮备液, 1.0 毫克/毫升缓冲液配制, 4°C 暗处保存。工作液, 20 微克/毫升缓冲液稀释。

Tris-HCl 缓冲液: 0.2M Tris; 0.1M NaCl,

用 HCl (比重 1.18) 调 $\text{pH} = 7.2$ 。

DNA 标准液: 0.50 毫克/毫升缓冲液配制, 4°C 可保存 1 月。

RNA 标准液: 0.50 毫克/毫升缓冲液新鲜配制。

DNase I, 20 微克/毫升缓冲液新鲜配制。

RNase, 20 微克/毫升缓冲液新鲜配制。

MgCl_2 溶液, 25mM, 双重蒸馏水配制, NaOH 中和。

生理盐水, 0.9% NaCl 溶液。

所有溶液皆由双重蒸馏水配制。

3. 生物组织样品的制备

性成熟, 雄性大白鼠, 体重 180—200 克, 健康。活体解剖。迅速取出脏器, 剥离、清洗, 吸干后新鲜称重, 取组织块 0.10 克, 加入少许生理盐水, 匀浆(冰浴), 组织匀浆按组织: 生理盐水 = 1:400 比例稀释。

4. 仪器

国产 405 荧光分光光度计, 中国科学院生物物理所研制^[1]。

MPF-4 型荧光分光光度计

组织匀浆器

5. 测定步骤

核酸标准曲线的测定:

吸取 DNA 标准液, 用缓冲液配成 0.5、1、2、3 和 4 微克/毫升的测定液, Eth Br 最终浓度 10 微克/毫升; 吸取 RNA 标准液, 用缓冲液配成 1、2、3、4 和 5 微克/毫升的测定液, Eth Br 最终浓度 10 微克/毫升; 空白管的缓冲液中含 Eth Br 最终浓度 10 微克/毫升。

测定液的荧光强度减去空白管的荧光强度即为该核酸浓度的荧光强度。将荧光强度对相应的核酸浓度作图, 绘制核酸标准曲线。

组织匀浆核酸的测定:

(1) 总核酸荧光强度的测定:

均匀地吸取不同组织匀浆稀释液 1 毫升(脾脏为 0.5 毫升)置于试管中, 加入 Eth Br 工作液 2.5 毫升, 再加入缓冲液, 使最终体积到 5.0 毫升, 摇匀, 测定荧光强度。

空白管: 2.5 毫升 Eth Br 工作液, 加 2.5 毫

升缓冲液。

将样品管的荧光强度减去空白管的荧光强度即是样品中总核酸的荧光强度。

(2) DNA 荧光强度的测定:

吸取不同组织匀浆稀释液 1 毫升(脾脏为 0.5 毫升)置于试管中, 加入 Eth Br 工作液 2.5 毫升, 加入新鲜配制的 RNase 溶液 50 微升, 再加缓冲液, 使最终体积到 5.0 毫升, 摇匀, 37°C 保温 30 分钟, 取出测定荧光强度。

空白管: 2.5 毫升 Eth Br 工作液, 加入 50 微升 RNase 溶液, 再加缓冲液到 5.0 毫升, 37°C 保温 30 分钟。

将样品管的荧光强度减去空白管荧光强度便是样品中 DNA 的荧光强度。

(3) RNA 荧光强度的测定:

因为样品中总核酸的荧光强度是 DNA 荧光强度与 RNA 荧光强度之和, 因此 RNA 荧光强度 = 总核酸的荧光强度 - DNA 的荧光强度。

查核酸标准曲线, 得到每毫升测定液中 DNA 和 RNA 的含量(微克), 按照稀释比例, 换算成每毫克新鲜组织中 DNA 或 RNA 的含量(微克)。

三、实验结果

1. Eth Br-核酸测定的最佳条件

(1) Eth Br-核酸的激发波长和荧光发射波长为了测定 Eth Br-核酸络合物的荧光强度, 首先必须选择合适的激发和发射波长。图 1, 2 给出 Eth Br-DNA 的激发光谱和发射光谱(未校正)。

Eth Br-DNA 的激发光谱是由二个激发峰组成, 一个在紫外区, 波峰是 303 ± 3 毫微米, 另一个在可见光区, 由 470、475、484 和 493 毫微米四个小峰组成。当 DNA 浓度在微克水平时, 随 DNA 浓度增加, Eth Br-DNA 激发峰值和峰形略会出现位移和畸变, 尤以紫外区为甚。Eth Br-DNA 荧光强度和 DNA 浓度之间线性关系较好的激发波长区域是 330—350 毫微米和 520—550 毫微米(发射波长在 600 毫微米)。要获得较高的荧光强度, 线性又好的 Eth Br-核酸

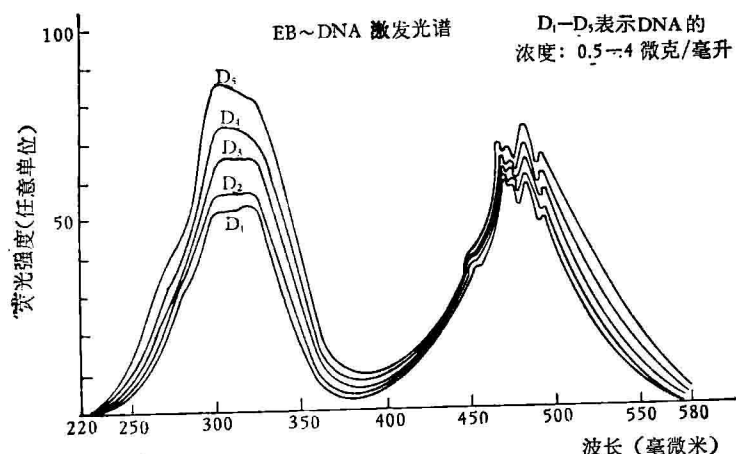


图1 Eth Br-DNA 激发光谱(未校正)

$\lambda_{ex} = 220-580$ 毫微米, $\lambda_{em} = 600$ 毫微米, DNA 浓度: D_1-D_5 , 0.5, 1, 2, 3 和 4 微克/毫升, Eth Br 浓度: 10 微克/毫升

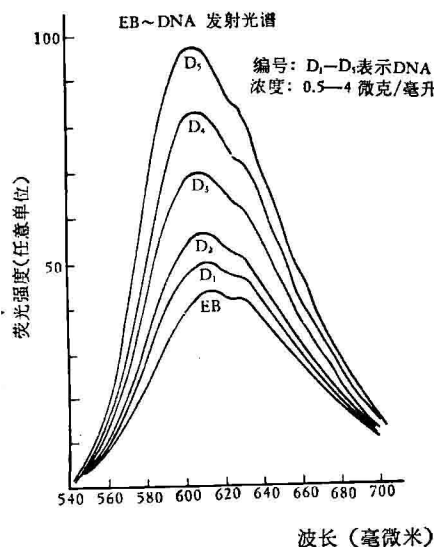


图2 Eth Br-DNA 发射光谱(未校正)

$\lambda_{ex} = 520$ 毫微米, $\lambda_{em} = 540-700$ 毫微米
DNA 浓度: D_1-D_5 , 0.5, 1, 2, 3 和 4 微克/毫升, Eth Br 浓度: 10 微克/毫升

络合物荧光, 考虑到核酸样品中常存在一些蛋白质等干扰因素对紫外线有吸收, 影响测定结果, 所以本实验选择可见光区激发波长 520 毫微米。

Eth Br-DNA 的发射光谱由一个峰和一个肩组成, 当 DNA 浓度在微克水平时, 发射谱峰值在 605 毫微米, Eth Br-DNA 发射峰值随 DNA 浓度递增略有蓝移。荧光强度和核酸浓

度线性关系较好区是 570—600 毫微米 (激发波长 520 毫微米)。本实验选择的发射波长为 600 毫微米。

(2) Eth Br-核酸的标准曲线

要测试样品中未知核酸含量, 必须绘制核酸标准曲线。表 1 给出不同浓度标准 DNA 和 RNA 的荧光强度。

图 3 为核酸的标准曲线, 线性较好, 相关系数 $r = 1.00$ 。

图中 RNA 直线斜率比 DNA 直线低, 在一定时期内, 仪器条件固定时, 测定各次核

酸标准曲线其离差范围不大, 见图 4。

绘制核酸标准曲线时应注意如下几点: ① 选择合适的核酸浓度, 因为 Eth Br-核酸的激发

表 1 核酸标准曲线

DNA	浓度 微克/毫升	0.5	1	2	3	4
	荧光强度 (任意单位)	5.5	12.0	23.5	36.5	48.0
RNA	浓度 微克/毫升	1	2	3	4	5
	荧光强度 (任意单位)	5.5	11.0	17.0	22.5	28.5

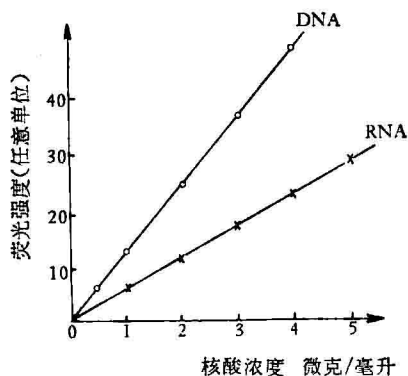


图3 核酸标准曲线

$\lambda_{ex} = 520$ 毫微米 $\lambda_{em} = 600$ 毫微米
DNA 浓度: 0.5—4 微克/毫升,
RNA 浓度: 1—5 微克/毫升,
Eth Br 浓度: 10 微克/毫升

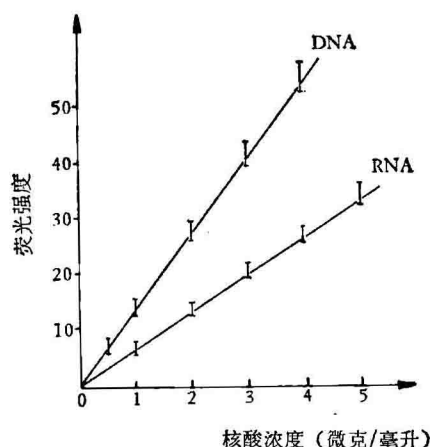


图 4 核酸标准曲线离差范围

$\lambda_{ex} = 520$ 毫微米 $\lambda_{em} = 600$ 毫微米

DNA 浓度 0.5—4 微克/毫升,

RNA 浓度 1—5 微克/毫升,

Eth Br 浓度 10 微克/毫升

$n = 5$

和发射谱峰值和峰形均会随核酸浓度增加发生位移和畸变。核酸浓度范围过大会破坏线性关系。本实验选择核酸的浓度 DNA: 0.5—4 微克/毫升, RNA: 1—5 微克/毫升。②待测样品核酸的大致含量要落在标准曲线的核酸浓度范围中。③ RNA 标准溶液要新鲜配制, 迅速测定。④溶液 pH 值据文献[1]报道在 1—10 范围内对 Eth Br-DNA 测定影响不大。本实验选择 pH = 7.2。

由于荧光测定影响因素很多, 因而必须每次实验绘制一次标准曲线。

(3) 核酸酶的消化条件

采用 RNase 消化 RNA 的条件是 10 微克/毫升 RNase, pH = 7.2, 37℃ 保温 30 分钟, 消化后剩余荧光 1—2%。RNase 对 Eth Br-DNA 的荧光强度没有影响。采用 DNase I 消化 DNA 时产物为寡核苷酸, 剩余荧光在 6% 左右, 酶解条件为 50℃, 2 小时, Mg^{++} 。由于 Mg^{++} 能降低 Eth Br-核酸的荧光, 使分析过程复杂化, 一般采用 RNase 消化 RNA 的方法来确定 DNA 和 RNA 的含量。

(4) Eth Br 浓度的选择

Eth Br 的浓度必须和核酸的浓度相适宜才不会影响荧光的测定。据文献[1]报道, 在一

定盐浓度下, 5 微克/毫升的 Eth Br 对 0.01—0.1 微克/毫升核酸测定是适宜的; 10 微克/毫升的 Eth Br 对 1—10 微克/毫升核酸的测定是适宜的。本实验选择 Eth Br 的浓度为 10 微克/毫升。

2. 组织匀浆核酸的测定条件

组织匀浆核酸的测定步骤如下:

0.1 克新鲜组织 → 匀浆 → 稀释 → $\begin{cases} \text{吸样 1} \rightarrow \\ \text{吸样 2} \rightarrow \end{cases}$

(匀浆: 生理盐水 = 1:400)

加 Eth Br 工作液 → 测定总核酸的荧光强度

加 RNase 消化 → 加 Eth Br 工作液 →

测定 DNA 荧光强度

总核酸荧光强度 - DNA 荧光强度 =

RNA 荧光强度

荧光强度测定条件同 1。下面是组织匀浆核酸测定的条件选择:

(1) 组织块匀浆时间

18,000 r.p.m 匀浆速度, 匀浆时间分别为: 肝脏 30 秒钟, 睾丸 45 秒和脾脏 4 分钟为宜。匀浆稀释后核酸分布比较均匀。随机取 10 份样品测定, 离差不大, 变差系数小于 9%。

(2) 匀浆量的选择

匀浆量选择条件是使其核酸含量落在标准曲线的范围内。结果表明大鼠肝、睾丸匀浆均取 1 毫升, 脾脏核酸含量高, 故取 0.5 毫升为宜 (测量总体积为 5 毫升)。

(3) 核糖核酸酶的消化条件

200 微克/毫升 RNase, 37℃, 保温 30 分钟将匀浆中的 RNA 消化完。组织匀浆中加入足够量的 RNase 和 DNase I 消化后残余荧光为 6% 左右。

(4) 组织保存时间

组织块冰冻保存 24 小时对核酸测定无影响。

(5) 核酸回收率试验

多次进行试验 DNA 的回收率为 82—97%; RNA 的回收率为 89—103%。

(6) 同一组织不同部位核酸含量稍有差别, 因此组织块取材部位要相对固定。

表2 大白鼠组织核酸含量

组 织	内 容 项 目	总荧光强度(任意单位)		DNA 微克/毫克鲜重		RNA 微克/毫克鲜重	
		$\bar{x} \pm t_{0.05} d / \bar{x}$	cv%	$\bar{x} \pm t_{0.05} d / \bar{x}$	cv%	$\bar{x} \pm t_{0.05} d / \bar{x}$	cv%
肝		22.5 $\pm$ 2.5	10.9	1.3 $\pm$ 0.1	10.9	8.7 $\pm$ 0.1	1.2
脾		30.0 $\pm$ 3.0	9.5	10.0 $\pm$ 1.5	15.0	10.0 $\pm$ 1.0	10.0
辜丸		16.9 $\pm$ 2.1	12.4	1.6 $\pm$ 0.3	17.7	4.9 $\pm$ 0.6	11.9

注 cv% 为变差系数。 $n = 10$

(7) 大白鼠肝、辜丸、脾脏器中核酸含量测定结果如表2

从我们实验测得肝脏RNA含量与文献[4]值接近;但DNA含量就低于文献值,可能与动物品系差别有关。脾脏中DNA含量与RNA含量的比例是1:1。辜丸中DNA和RNA含量的比例为1:3,与S. P. Ananda^[4]测定结果一致。辜丸组织核酸含量的变差系数比较大,可能与不同动物辜丸中精子含量的不均匀有关。

四、讨 论

利用非啶溴红测定微量核酸已寻找到最佳测定条件。这种荧光方法可直接在生物组织匀浆中测定DNA和RNA的含量,方法简便、迅速。

根据Eth Br染料插入核酸结合的原理是非啶溴红的非啶环插入核酸的碱基对之间,形成一种镶嵌的结构。以这种方式结合的非啶溴红荧光量子产率显著增加。Eth Br-核酸络合物的荧光强度比游离Eth Br荧光强度增加50—100倍。荧光增强与核酸的双链区的数目成正比,但与核酸的碱基组份、分子量大小无关^[5]。因此,用Eth Br来测定核酸的含量,实质上是测定核酸双链区的数目,在某种意义上反映了核酸

二级结构的状态。目前已用Eth Br对染色质的结构进行研究^[6]。

这种方法也有一定的局限性,如荧光测定实验条件严格;不能测定失去双链区的核酸;匀浆样品中若干扰物质(如蛋白质等)的含量大大超过核酸含量时,对于结果有影响。但是,利用这种荧光方法测定微量核酸具有明显的优点;简便、快速、灵敏和专一性强。自1972年以来国外应用它测定各种生物组织中核酸的含量,如外周血粒细胞^[7];乳腺^[8];血浆^[9];脑下垂体^[10]等。非啶溴红测定核酸的方法将在核酸研究的其他方面得到更广泛地应用。

参 考 文 献

- [1] Le peeq J. B. et al.: *Anal. Biochem.*, **17**, 100, 1966.
- [2] 中国科学院生物物理所一室二组:《生物化学与生物物理进展》, 1975年, 第2期, 第47页。
- [3] 中国科学院生物物理所四室五组:《生物化学与生物物理进展》, 1976年, 第3期, 第13页。
- [4] Ananda S. P.: *J. Lab. and Clinical Medicine*, **80**, 4, 1972.
- [5] Le peeq J. B.: *J. Mol. Biol.*, **27**, 87, 1967.
- [6] Paoletti J.: *Biochemistry*, **16**, 3, 1977.
- [7] Blackburn Mary J.: *Anal. Biochem.*, **51**, 1, 1973.
- [8] Philip C. B.: *Anal. Biochem.*, **63**, 2, 1975.
- [9] Richard C.: *Clinical Chemistry*, **18**, 6, 1972.
- [10] Boer G. J.: *Anal. Biochem.*, **65**, 225, 1975.

[本文于1978年12月27日收到]