

人血清中游离色氨酸、苯丙氨酸 和酪氨酸的微量测定

——附我国健康成人测定值报告

蔡祝辉 赵琼蕊 金月仙 戎大妹*

(上海第一医学院中山医院)

陈 远 聪

(中国科学院上海生物化学研究所)

测定人血清中游离氨基酸、特别是某些特殊氨基酸含量的变化,作为研究蛋白质代谢的指标,在临床医学研究方面已有很多报道。目前从测定生物体液和组织中,个别或某些氨基酸浓度的变化,已能诊断六十余种先天性氨基酸代谢缺陷的疾病,从而指导治疗。如患苯酮尿症的婴儿,血清中游离苯丙氨酸浓度可高出常人数倍,游离酪氨酸浓度则减低,如能在出生后短期内作出诊断并限制食物中苯丙氨酸含量,常能有效地防止智力缺陷的严重发展^[1]。此外,在某些病理状态下,如高碳酸血症、缺氧、中风、急性脑水肿、急性脑炎、巴比妥中毒、肝肾综合症、糖尿病高血糖等病因引起的昏迷,在血清、红细胞和脑脊液中的游离氨基酸量都出现异常值,氨基酸总含量和多数氨基酸的含量明显降低,而少数氨基酸则明显增多^[2,3]。在肝性脑病,血清和脑组织中游离色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸均明显增多^[4],对此进行深入研究不但有助于了解中枢神经活动的病理过程,还可能提供新的治疗方法。

由于临床上的迫切需要,大大推动了测定生物体液和组织中氨基酸方法的研究。以往所用的分析方法普遍存在着灵敏度不高,操作麻烦,血清用量较大等缺点。目前先进的氨基酸自动分析仪具有快速、微量、灵敏等优点,适用于全部氨基酸分析。但由于仪器复杂,价格昂

贵,操作维修均不容易,用于临床仍很不普遍。而采用荧光分光光度法对特定几个氨基酸进行分析,因为试剂专一,灵敏度高,干扰较少,严格地掌握实验条件可取得相当精确的结果,每次仅需血清 10 微升,方法也较简便,适用于同时对大量样品进行检验。

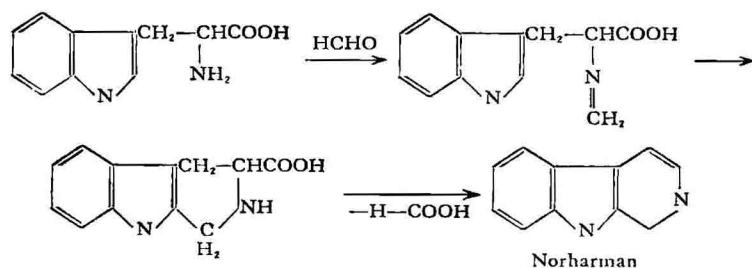
我国正常人血清的游离氨基酸浓度,尚未见报道。我们曾采用荧光分光光度法测定了我国健康成人血清中游离氨基酸含量^[5]。本文继续报道采用荧光分光光度法测定我国健康成人血清中的游离色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸浓度。现将实验方法和结果报道于后。

三种氨基酸的测定

(一) 色氨酸的测定

1959 年 Hess 等^[6]曾用荧光法测定生物体液中的色胺,并认为可用类似的方法测定色氨酸。1967 年 Denkla 等^[7]报道,用荧光法测定血清、尿和组织中的游离色氨酸,但由于所述实验条件下产生的荧光物质不稳定,易造成误差。1974 年 Bloxam 等^[8]研究造成误差的原因并改进了实验条件。生成荧光物质的作用原理是色氨酸与甲醛缩合成环状,经三氯化铁氧化成去甲哈尔曼(Norharman)。其反应式如下:

* 戎大妹 上海第一医学院药系。



我们对此法的实验条件进行了探讨。

1. 测定方法

试剂 均用分析纯试剂和玻璃器重蒸馏水配制。

(1) 标准色氨酸溶液 A) 1mM 贮存液: 精确称取色氨酸(分子量 204.23 上海东风生化试剂厂)20.4 毫克,溶于水,加入氢氧化铵(25—28%) 0.76 毫升,加水至 100 毫升配成 1mM 色氨酸-0.1N 氢氧化铵溶液,冰箱内贮存。B) 0.01mM 工作液: 精确吸取贮存液 1 毫升加水至 100 毫升。

(2) 0.6N 三氯醋酸(TCA)溶液 称取 TCA(分子量 163.39) 98 克溶于 1 升水,临用前在冰箱内或冰水浴冷却。

(3) 2% 甲醛溶液 量取甲醛(36—38%) 5.5 毫升,加水至 100 毫升。

(4) 6mM 三氯化铁-0.6N TCA 溶液 称取三氯化铁(分子量 270.32) 162 毫克,用 0.6N TCA 100 毫升溶解。

血清的处理 精确吸取新鲜血清 50—100 微升(如不立即检验应放置于 -20℃ 冰箱保存)和等容积 0.6N TCA 混匀,静置 10 分钟后离心 4,000 转/分钟约 10 分钟,吸取上清液用水精确稀释 5 倍,即得稀释 10 倍的血清上清液。

仪器 日立(Hitachi) MPF 4 型荧光分光光度计,用 4 毫升石英样品池测定荧光。

操作 吸取: A, 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升两份; B, 标准色氨酸工作液 100 微升两份; C, 水 100 微升作空白对照。分别加于无塞的 12 × 150 毫米玻璃试管内,试管先用 3.5 毫升水银精确量出容积并用铜红扩散印泥划线烘烤标度。分别在各试管加入冰冷的 0.6N TCA 2.5 毫升、2% 甲醛 0.2 毫升及 6mM FeCl₃-

0.6N TCA 0.1 毫升,并立即置于煮沸的 8 ± % 食盐水中,试管内保持 102 ± 1℃,历时 90 分钟。以上几个步骤应迅速进行,不宜久置,以防止色氨酸在操作过程中分解。保温过程水浴不可加盖以免蒸气凝成水滴污染样品。应经常用沸水补充水浴内因蒸发散失的水份。保温毕取出冷却,需加水至标度线然后测定荧光。激发光 304 毫微米,发射光 448 毫微米。

2. 结果

荧光光谱 测定标准色氨酸和血清中游离色氨酸所生成的荧光物质的荧光光谱,两者十分接近;和文献中去甲哈尔曼的荧光光谱比较,也基本相同(图 1)。

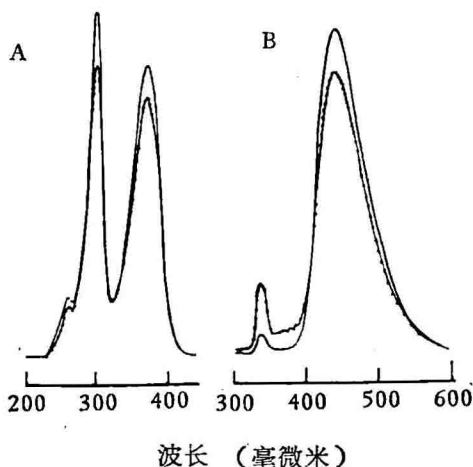


图 1 色氨酸荧光物质的荧光光谱

A. 激发光谱; B. 发射光谱
— 标准色氨酸 ···· 血清游离色氨酸

标准曲线 根据 15 个不同含量的标准色氨酸 276 个测定值计算(含量范围为 0—9.8 毫克分子),在本实验条件下相当于血清游离色氨酸浓度 0—0.98 毫克分子/升,最高点为正常含量 20 倍左右,色氨酸含量和相对荧光成直

线关系(回归方程式为 $\hat{y} = 10.07x - 0.37$, $\hat{y}$ 为相对荧光估计值, x 为色氨酸含量, 相关系数 $r = 0.99995$)。

反应温度和时间 Denkla 等报道 99—101℃ 水浴 1 小时荧光物质产量达最高值, 低于 99℃ 严重影响产量, 97℃ 开始剧降, 94℃ 产量下降至 25%, 15 磅/平方英寸高压加热 1 小时产量和沸水浴相似。这与我们的实验结果不符。我们采用煮沸的 8±% 食盐浴, 用无塞的普通试管代替玻璃塞试管沸水浴或油浴, 以简化操作和提高荧光物质产量, 在 102℃ 左右保温 90 分钟相对荧光比 100℃ 高 8% 左右, 测定值也较稳定。保温时间在 90 分钟左右, 荧光值最大, 超过 180 分钟有下降趋势。

荧光物质的生成及其稳定性 色氨酸在碱性条件下较稳定, 在酸性条件下极易分解, 因此加 TCA 应在低温下进行, 并须尽快地加入甲醛, 后者对色氨酸有一定保护作用, 三氯化铁有促使色氨酸分解的作用, 应在水浴前顷刻加入。保温完毕后所生的荧光物质相当稳定, 室温下避光放置一个月仍然变化甚微。

回收试验 根据下列公式测定回收率

$$\text{回收率} = \frac{\text{标准色氨酸加血清混合测定值}}{\text{标准色氨酸测定值} + \text{血清测定值}} \times 100$$

46 次回收试验的回收率为 98.92 ± 3.11 (S.D)%

重复性试验 取血清两份分别重复测定 10 次, 结果为 0.074 ± 0.0027 (S.D) 毫克分子/升及 0.066 ± 0.0033 (S.D) 毫克分子/升。

测定值计算 根据下式计算出血清中游离色氨酸浓度。

$$\text{血清中游离色氨酸} = \frac{\text{血清测定值} - \text{空白值}}{\text{标准测定值} - \text{空白值}} \times 0.1 \text{ 毫克分子/升}$$

本法不受血清中组氨酸、酪胺、苯丙氨酸等的干扰。人体中色氨酸代谢产物色胺所产生的荧光仅为色氨酸的十分之一, 而血清中色胺含量又极低, 因此可以不计。其他的色氨酸代谢产物如 5-羟色氨酸、吲哚醋酸等产生的荧光极微。5-羟色胺不产生荧光。它们对测定的干扰

不显著或无干扰。

(二) 苯丙氨酸的测定

1962 年 McCaman 等^[9] 根据 L-亮氨酸-L-丙氨酸二肽能促使苯丙氨酸-茚三酮-铜盐复合物产生荧光的原理, 采用荧光分光光度法测定血清中的游离苯丙氨酸, 并使血清用量减至 5—10 微升。1964 年 Wong 等^[10] 对实验进一步改进, 采用浓度加倍的琥珀酸盐缓冲溶液, 并在标准苯丙氨酸溶液中加入 7.5% 牛血清白蛋白, 使血清和标准溶液的氢离子浓度稳定。1969 年 Ambrose^[11] 为了缩短反应时间, 用 pH 5.0 的邻-苯二甲酸盐缓冲溶液代替 pH 5.8 的琥珀酸盐缓冲溶液, 并将反应温度从 60℃ 提高至 85℃, 从而将保温时间从 120 分钟缩短至 16 分钟, 但随后还需 30℃ 及 85℃ 或 60℃ 反复保温。我们参照 McCaman 及 Wong 的方法进行实验和探讨。

1. 测定方法

试剂 均用分析纯试剂和玻璃器重蒸馏水配制。

(1) 标准苯丙氨酸溶液 A) 1mM 贮存液: 精确称取 L-苯丙氨酸(分子量 165.19 上海东风生化试剂厂)16.5 毫克溶于 100 毫升水, 冰箱内贮存, B) 0.04mM 工作液: 吸取贮存液 2 毫升加水至 50 毫升。

(2) 二肽-茚三酮试剂 A) 5mM 亮丙二肽溶液: 称取 L-亮氨酸-L-丙氨酸二肽(分子量 202.25, 参照 Vanghan 法^[12] 合成) 1 毫克溶于 1 毫升水, 临用时配制。B) 30mM 茚三酮溶液: 称取茚三酮($C_{15}H_{13}O_3$, 分子量 178.15, 上海试剂厂) 534 毫克溶于 100 毫升水, 冰箱内贮存。C) 0.6M 琥珀酸盐缓冲溶液: 称取琥珀酸 [$(CH_2CO_2H)_2$, 分子量 118.1] 7.086 克加水约 25 毫升, 加入 4.8N 氢氧化钠(分子量 40.00, 称取 9.6 克溶于 50 毫升水) 约 22 毫升, 调节至 pH 5.88, 加水至 100 毫升, 冰箱内贮存。临用前将 A, B, C 三种溶液按 1:2:5 容积比混合。

(3) 铜试剂 A). 25mM 碳酸钠-0.4mM 酒石酸钾钠溶液: 称取无水碳酸钠(Na_2CO_3 , 分

子量 105.99) 2.66 克, 另称取酒石酸钾钠 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 分子量 282.23) 113 毫克加水至 1 升。B). 0.8M 硫酸铜溶液: 称取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 分子量 249.68) 100 毫克, 溶于 500 毫升水。临用前将 A, B 两种溶液按 3:2 容积比混匀。

(4) 0.6N TCA 同前。0.06N TCA 取 0.6N TCA 稀释 10 倍。

血清的处理和仪器 同色氨酸测定。

操作 分别吸取: A). 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升两份: B). 标准苯丙氨酸工作液 25 微升两份并加入 0.06N TCA 100 微升; C). 0.06N TCA 100 微升作空白对照, 将以上各份溶液分别置于 10 或 15 毫升普通玻璃试管, 用水补充容积至 200 微升。在各试管内加入 0.3 毫升二肽-茚三酮试剂混匀。放在 75℃ 水浴中保温 80 分钟(或 65—70℃ 保温 140 分钟左右)。保温完毕将试管下半部浸于自来水中冷却, 加入 2.5 毫升铜试剂, 振摇混匀在 90 分钟内测定荧光。激发光 385 毫微米, 发射光 472 毫微米。

2. 结果

荧光光谱 测定标准苯丙氨酸和血清中游离苯丙氨酸与二肽-茚三酮-铜盐复合物的荧光光谱, 其激发光谱和发射光谱均十分相似(图 2)。

标准曲线 根据 14 个不同含量的标准苯丙氨酸 312 个测定值计算(含量 0—12 毫微克分子/升, 相当于血清浓度 0—1.20 毫克分子/升, 最高点约为正常值的 12 倍), 测定结果符合直线关系 ($\hat{Y} = 8.28x + 0.29, r = 0.9995$)。

温度、时间和相对荧光 反应的温度、时间对荧光物质的生成有显著的影响。A) 根据 McCaman 等采用 60℃ 保温 120 分钟所得相对荧光值较低, 苯丙氨酸含量略高时, 测定值容易参差不齐, 低于 60℃ 相对荧光值更低, 实验更加不稳定; B) 将温度提高至 65—70℃ 相对荧光值增高, 保温约 140 分钟以后荧光值不再显著增高, 此时的测定值约为 60℃ 保温 120 分钟时的两倍; C) 将温度提高至 75℃, 相对荧

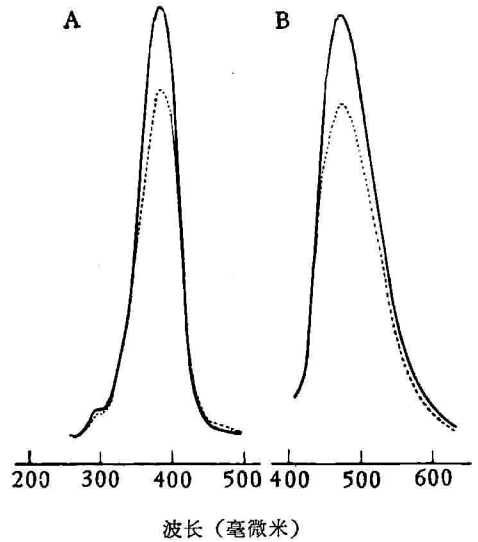


图 2 苯丙氨酸复合物的荧光光谱

A. 激发光谱 B. 发射光谱

—— 标准苯丙氨酸复合物 ---- 血清游离苯丙氨酸复合物

光最高值提前在 80 分钟左右出现, 维持半小时左右然后逐渐减退; D). 将温度提高至 80℃ 以上相对荧光值显著降低, 最高值更早出现(图 3)。

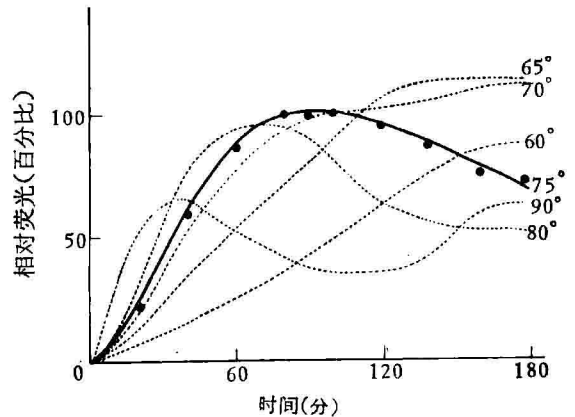


图 3 温度、时间和相对荧光

茚三酮和血清中的氨基酸反应产生紫蓝色化合物可能干扰苯丙氨酸复合物的荧光测定, 而且此反应可能因温度增高而加强。测定 75℃ 保温 80 分钟的无肽对照(血清加不含二肽的茚三酮-琥珀酸盐缓冲液和铜试剂)的相对荧光值, 和试剂空白的荧光值比较, 两者相当接近, 因而说明上述的反应在本实验条件下并无显著

地影响实验的结果。

荧光物质的稳定性 从保温完毕加入铜试剂后算起,相对荧光值约稳定 90 分钟,以后逐渐下降。

回收试验 42 次测定的平均回收率为 101.44 ± 2.71 (S.D.) %。

重复性试验 取血清两份,分别重复测定 10 次,结果为 0.084 ± 0.0021 (S.D.) 毫克分子/升及 0.142 ± 0.0068 (S.D.) 毫克分子/升。

测定值计算 计算方法同色氨酸测定。

苯丙氨酸和茚三酮、铜盐作用的产物,如果没有二肽存在几乎没有荧光产生。能促使产生荧光的二肽甚多,但都不如 L-亮-L-丙二肽强。以 L-亮-L-丙二肽的荧光值为 100%,其余二肽的相对值是:甘-L-丙为 95%,甘-dL-苯丙为 75%,L-丙-L-丙为 70%,L-丙甘为 30%,甘-L-色为 28%。这些二肽单独和茚三酮作用都不显荧光,在 pH 5.8 时,除苯丙氨酸外,只有亮氨酸和精氨酸产生荧光,相当于等当量苯丙氨酸的 4%,除此以外其他氨基酸均小于 0.5%,可以认为对苯丙氨酸有较好的专一性。如果反应溶液的 pH 低于 5.8,产生的荧光较低, pH 大于 5.8 荧光增加,在 pH 6.8 时达最高值,但专一性下降^[9]。由于血清蛋白沉淀剂 TCA 对 pH 有较大的影响,所以应严格限制其用量,在实际操作中血清用量应限于 10 微升,用量过大会使 TCA 用量也相应增多,除非用适量的氢氧化钠中和,势必使荧光值降低甚至完全消失。

(三) 酪氨酸的测定

酪氨酸能和 1-亚硝基-2-萘酚反应成为有色化合物,曾被用于比色测定生物体液和组织中酪氨酸和酪胺的含量,但不灵敏,也不稳定。1957 年 Waalkes 和 Udenfriend^[13] 报道此化合物在硝酸和亚硝酸钠存在条件下加热,可以产生稳定的荧光物质,使测定酪氨酸的灵敏度大大提高,但血清用量仍在 1 毫升左右。1964 年 Wong 等^[10]进行微量改良,降低血清用量至数十微升。其后又经不同程度的改进^[14]。我们根据上述的方法原理进行实验和探讨。

1. 测定方法

试剂 均用分析纯试剂和玻璃器重蒸馏水配制。

(1) 标准酪氨酸溶液

A). 1mM 贮存液: 精确称取 L-酪氨酸(分子量 181.19,上海东风试剂厂) 18.1 毫克,先加入数滴浓盐酸,微热待完全溶解后加水数十毫升,用氢氧化钠中和至接近中性,加水至 100 毫升。在冰箱内贮存。

B). 0.04mM 工作液: 精确吸取贮存液 2 毫升,加水至 50 毫升。

(2) 亚硝基苯酚试剂

A). 1-亚硝基-2-萘酚乙醇溶液: 称取 1-亚硝基-2-萘酚 ($C_{10}H_7NO_2$, 分子量 173.16) 200 毫克,溶于 100 毫升无水乙醇。

B). 3N 硝酸: 吸取浓硝酸 (65—68%) 20 毫升加水至 100 毫升。

C). 0.1N 亚硝酸钠: 称取亚硝酸钠 ($NaNO_2$, 分子量 69.00) 690 毫克,溶于 100 毫升水。

临用前顷刻将 A、B、C 三种溶液按 2:3:3 容积混合。

(3) 0.6N TCA、0.06N TCA: 同前。

(4) 二氯乙烷: 1.2 二氯乙烷 ($ClCH_2CH_2Cl$, 分子量 98.96)。

血清的处理和仪器 同色氨酸测定。

操作 吸取: A). 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升两份; B). 标准酪氨酸工作液 25 微升两份,并加入 0.06N TCA 100 微升; C). 0.06N TCA 100 微升作空白对照。将上述各份溶液分别置于 15 毫升磨砂玻璃塞长试管内,用水补充容积至 200 微升。将试管置于 55℃ 水浴数分钟,加入新鲜配制的亚硝基萘酚试剂 0.3 毫升,充分摇匀,55℃ 保温 20 分钟。保温毕加入水 2.5 毫升,充分摇匀后再加入二氯乙烷 3 毫升。再次充分振摇以便将多余的试剂抽提入二氯乙烷中,离心 4,000 转/分钟约 10 分钟,将上层水溶液移置于另一试管内,在 180 分钟内测定荧光。激发光 468 毫微米,发射光 555 毫微米。

2. 结果

荧光光谱 测定标准酪氨酸和血清中酪氨酸

酸所生成的荧光物质的光谱,其激发和发射光谱都十分相似(图 4)。

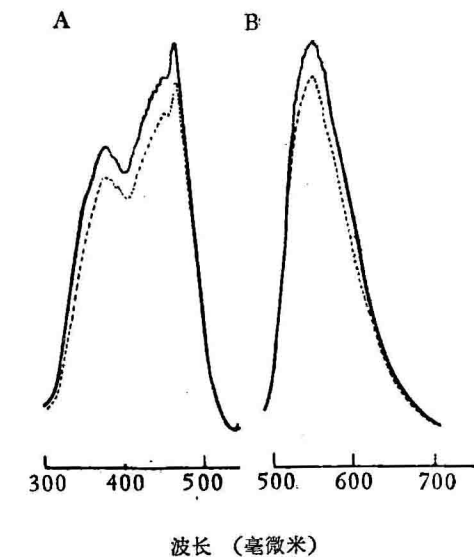


图 4 酪氨酸荧光物质的光谱
A 激发光谱 B 发射光谱
—— 标准酪氨酸荧光物 —— 血清酪氨酸荧光物

标准曲线 根据 9 个不同含量的标准酪氨酸 180 个测定值计算 (含量 0—10 毫微克分子相当于血清浓度 0—1.0 毫克分子/升, 最高点为正常值的 10—20 倍), 酪氨酸量和相对荧光符合直线关系

$$(\hat{Y} = 9.95x + 0.41, r = 0.9998)。$$

反应温度和时间 观察 35—70℃ 不同反应温度和相对荧光的关系。55℃ 保温 20 分钟相对荧光达最高值以 100% 计, 35℃ 保温 20 分钟仅 20.3%, 且不稳定, 将血清用量加倍也无济于事, 此一结果和 Wong 等的报道不符。高于 55℃ 相对荧光值逐渐下降, 70℃ 保温 20 分钟降低至 75.1%。观察 55℃ 不同保温时间的相对荧光值、结果表明在 20—40 分钟之间相对荧光值最高且较稳定, 少于 20 分钟或多于 40 分钟均明显下降。

荧光物质的稳定性 从保温完毕算起, 相对荧光值在 180 分钟内平均减少 2% 左右。

回收试验 43 次测定的平均回收率为 99.90 ± 2.72 (S.D)%。

重复性试验 取血清两份, 分别重复测定 10 次, 结果为 0.073 ± 0.0015 (S.D) 毫克分子/升及 0.079 ± 0.0029 (S.D) 毫克分子/升。

测定值计算 计算方法同色氨酸测定。

酪氨酸荧光分光光度测定法也和比色法一样, 不能区别酪氨酸和酪胺, 但因为组织中和血清中酪胺含量极为轻微, 一般不造成困难。其他生化物质如色氨酸、苯丙氨酸、色胺、5-羟色氨酸、5-羟吲哚醋酸的荧光值均很轻微, 也不足以明显干扰酪氨酸的测定值。

我国健康成人的测定值

测定我国 25 岁以上体检和肝功能正常人血清中的游离色氨酸, 苯丙氨酸和酪氨酸浓度, 结果见表 1。

表 1 我国健康成人血清中游离氨基酸浓度

游离氨基酸	测定人数	浓 度	
		平均值±S.D. 毫克分子/升	平均值±S.D. 毫克%
色氨酸	106	0.056 ± 0.010	1.14 ± 0.20
苯丙氨酸	106	0.103 ± 0.022	1.70 ± 0.36
酪氨酸	111	0.068 ± 0.013	1.22 ± 0.24

以上数值和 Denkla、Wong 等的测定值接近。作者等^[6]曾用荧光分光光度法测定我国健康成人 α -氨基酸含量, 结果为 2.83 ± 0.45 (S.D) 毫克分子/升, 也和国外报道数值相近。这说明种族和食物种类的差异, 对血清中这些游离氨基酸浓度的影响并不显著。

本实验的回收、重复性试验等均较满意。同时由于用血量小, 方法也较简便, 能够在数小时内完成数百份样品的大批检验, 因此值得推荐用于科研和临床。

本实验所用的 L-亮-L 丙二肽系由中国科学院上海生化研究所黄惟德同志协助合成, 特此致谢。

参 考 文 献

[1] Bell, G. H. et al.: Textbook of Physiology and Biochemistry, 9th Ed. 229, 1976.

- [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,