

文章编号: 1000-7032(1999)04-0358-05

溴乙锭的化学发光性质研究

庄惠生, 陈国南, 黄金陵

(福州大学化学系, 福建 福州 350002)

摘要: 首次研究了溴乙锭的化学发光性质, 发现在强酸性介质中, RNA 能增强溴乙锭与高锰酸钾反应的化学发光强度. 在 EC-KMnO₄-RNA 体系中获得化学发光强度与 RNA 浓度在一定范围内成线性关系, 因此, 建立了一种测定 RNA 的化学发光分析新方法, 并用于合成样品中的 RNA 含量的测定. 方法的线性范围为 0.10~10.0 μm/mL, 检测限为 0.060 μg/mL, 测定浓度为 3.5 μg/mL 的 RNA 溶液 12 次, 求得相对标准偏差为 3.8%; 具有较高的精密度, 准确度和选择性.

关键词: 化学发光; 溴乙锭; RNA

中图分类号: O644.19 **文献标识码:** A

1 引 言

核酸是生物体内重要的生物大分子之一, 在生物体的生长、发育、繁殖、遗传变异等基本生命过程中起着重要作用. 其化学结构是由许多单核苷酸通过 3', 5'-磷酸二酯键依次连接成的线性大分子. 根据其糖组分的不同, 可将核酸分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两大类. 测定核酸的常见方法有紫外光谱法、定糖法、定磷法和荧光法等. 在荧光法中, 常用溴乙锭(Ethidium Bromid, 简称 EB) 作为荧光探针^[1~3], EB 通过嵌入形式结合到双链核酸中, 具有特异结合的能力, 不但能检测核酸的量, 而且还能检测核酸的结构变化. 1964 年发现它与核酸结合后, 荧光显著增强, 随即被广泛使用^[4~6]. 化学发光分析法是一种高灵敏的微量分析技术, 应用范围日益广泛, 近几年在分子生物学中的应用也引起广大科学工作者的极大关注. 已有不少文献报道了 DNA、RNA 的化学发光分析研究^[7~10], 但未见文献报道过溴乙锭和溴乙锭-RNA 结合物的化学发光性质及其用于 RNA 的化学发光分析研究. 此文首次研究了溴乙锭和溴乙锭-RNA 结合物的化学发光性质, 建立了一种测定 RNA 的化学发光分析新方法, 该方法的线性范围为 0.10~10.0 μm/mL, 检测限为 0.06 μg/mL, 测定浓度为 3.5 μg/mL 的 RNA 溶液 12 次, 求得相对标准偏差为 3.8%. 方法简单、分析速度快、干扰小、灵敏度较高、精密度好.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

FG83-1 型化学发光仪(福州大学化学系研制), XWT-104 型台式自动平衡记录仪

收稿日期: 1998-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(29675003)、福建省科技基金资助项目

作者简介: 庄惠生(1955-), 男, 福建古田人, 副教授, 获硕士学位, 主要从事化学发光分析、免疫分析及分析试剂合成研究.

(上海大华仪表厂制造)。

溴乙锭(Ethidium Bromide 简称 EB, 上海化学试剂公司进口分装), 酵母 RNA(LR. B. D. H, England), KMnO_4 (AR., 上海化学试剂一厂), HCl (AR., 上海化学试剂一厂)。

2.2 实验方法

取 1mL RNA-EB-HCl 混合溶液(RNA 浓度为 $10.0\mu\text{g}/\text{mL}$, EB 浓度为 $10.0\mu\text{g}/\text{mL}$, HCl 浓度为 $0.010\text{mol}/\text{L}$)或 1mL EB-HCl 混合溶液(EB 浓度为 $10.0\mu\text{g}/\text{mL}$, HCl 浓度为 $0.010\text{mol}/\text{L}$), 置于暗室. 然后启动记录仪, 打开光门, 注射 $0.20\text{mL } 5.0 \times 10^{-4}\text{mol}/\text{L}$ KMnO_4 溶液, 记录发光强度, 以发光强度定量测定 RNA 浓度。

3 结果与讨论

3.1 溴乙锭的化学发光性质

溴乙锭的化学名称为溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶, 它的母体菲啶是吡啶的同分异构体, 人们对吡啶衍生物的化学发光性质及其分析应用进行了较广泛的研究^[11~13]; 但是未见文献报导过溴乙锭的化学发光性质的研究. 作者最初模拟吡啶衍生物的化学发光反应条件, 即在碱性过氧化氢介质中研究溴乙锭的化学发光性质, 结果表明溴乙锭在该条件下几乎不产生化学发光反应, 这可能是碱性过氧化氢的氧化性还不够强. 因此, 作者在酸性介质中, 使用 KMnO_4 和 KIO_4 强氧化剂, 对溴乙锭的化学发光性质进行了研究. 结果表明, 溴乙锭在酸性 KMnO_4 和酸性 KIO_4 介质中都可产生化学发光反应, 然而, 化学发光强度较弱; 为了提高化学发光强度, 我们在该化学发光体系中分别加入牛血清白蛋白, 苯丙氨酸、色氨酸、甘氨酸、谷氨酸、精氨酸、亮氨酸、组氨酸、天冬酰胺等氨基酸, 酵母 RNA, 核黄素, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Bi^{3+} 等金属离子, 研究它们对溴乙锭在酸性 KMnO_4 和酸性 KIO_4 介质中的化学发光反应的催化增强效应. 结果表明, 在上述被研究的生物活性物质及金属离子中, 酵母 RNA 具有最强的催化增强效应, 而且酵母 RNA 在一定浓度范围内, 与酸性 KMnO_4 -EB-RNA 或酸性 KIO_4 -EB-RNA 的化学发光反应体系的发光强度成线性关系. 据此, 建立一种测定 RNA 含量的化学发光新方法。

3.2 测定 RNA 的化学发光反应体系选择

进一步比较了酸性 KMnO_4 -EB-RNA 和酸性 KIO_4 -EB-RNA 的化学发光反应性质, 结果表明前者的化学发光强度大于后者, 而且用于测定 RNA 含量时, 前者的空白小, 灵敏度高. 因此, 基于酸性 KMnO_4 -

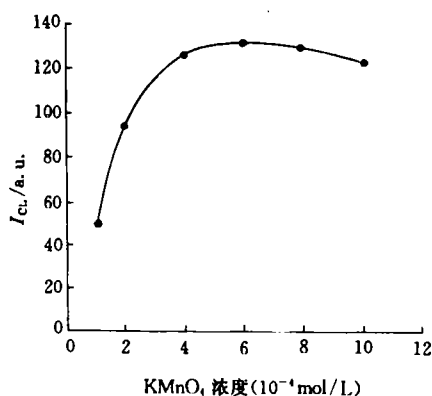


图1 KMnO_4 浓度对化学发光反应影响

Fig. 1 Effect of KMnO_4 concentration on chemiluminescent reaction. $[\text{RNA}] = 10\mu\text{g}/\text{mL}$, $[\text{EB}] = 10\mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{pH} = 2.0$.

EB-RNA 化学发光反应体系, 建立了一种测定 RNA 含量的化学发光分析新方法.

3.3 KMnO_4 浓度对化学发光反应影响

KMnO_4 浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围, 发光强度达峰值且平稳, 大于 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时发光强度降低, 选择 KMnO_4 浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

3.4 HCl 浓度对化学发光反应影响

HCl 浓度在 $0.0030 \times 0.10 \text{ mol/L}$ 范围内, 随着 pH 增大化学发光强度先增强, pH 在 $1.8 \sim 2.3$ 范围发内光强度达峰值且变化较小, $\text{pH} > 2.5$ 时化学发光强度减弱, 最佳 pH 值为 2.0.

3.5 EB 浓度对化学发光反应影响

EB 浓度为 $5.0 \sim 20.0 \mu\text{g/mL}$ 时, EB-RNA 复合物的化学发光强度达峰值且稳定, 测定体系中选择 EB 浓度为 $10.0 \mu\text{g/mL}$.

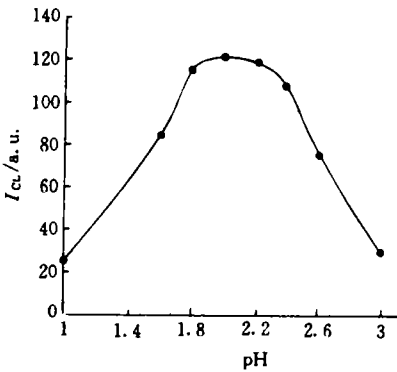


图 2 pH 值对化学发光反应的影响

$[\text{RNA}] = 10 \mu\text{g/mL}$, $[\text{KMnO}_4] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $[\text{EB}] = 10 \mu\text{g/mL}$

Fig. 2 Effect of pH on chemiluminescent reaction.

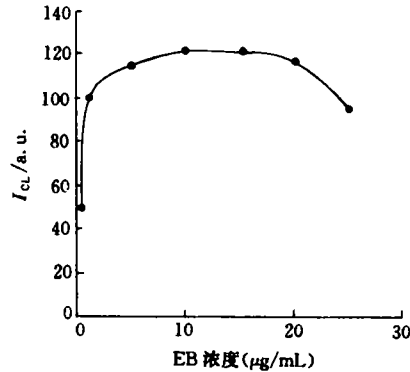


图 3 EB 浓度对化学发光反应的影响

$[\text{RNA}] = 10 \mu\text{g/mL}$, $[\text{KMnO}_4] = 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 2.0$

Fig. 3 Effect of EB concentration on chemiluminescent reaction.

3.6 干扰实验

取浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 的 RNA 溶液, 以标准加入法进行共存物质的干扰试验, 结果表明: 120 倍的牛血清白蛋白、苯丙氨酸和色氨酸; 200 倍的甘氨酸、谷氨酸、精氨酸、亮氨酸、组氨酸和天冬酰胺; 500 倍的抗坏血酸, 核黄素; 800 倍的 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ; 200 倍的 Ni^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Bi^{3+} ; 1000 倍的 CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- 不干扰测定. 由此可见该方法选择性好.

3.7 线性范围、检测限和精密度

取一系列不同浓度的 RNA 标准溶液, 按实验方法测定其发光强度, 绘制校正曲线, 结果表明: RNA 浓度在 $0.10 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 范围与 EB-RNA 复合物的化学发光强度成线性关系, 检测限为 $0.060 \mu\text{g/mL}$; 测定浓度为 $3.5 \mu\text{g/mL}$ 的 RNA 溶液 12 次, 求得相

对标准偏差为 3.8%。

3.8 合成样品的分析

采用此文拟定的方法测定了两个含有某些生物活性物质、金属离子和酸根阴离子的合成样品。合成样品(1)组成为: RNA(2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)牛血清白蛋白(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 苯丙氨酸(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 色氨酸(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 甘氨酸(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 谷氨酸(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 精氨酸(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 抗坏血酸(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 核黄素(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Ca^{2+} (1.00 mg/mL), Mg^{2+} (1.00 mg/mL), Zn^{2+} (1.00 mg/mL), Fe^{3+} (1.00 mg/mL), Cu^{2+} (1.00 mg/mL); CO_3^{2-} (1.50 mg/mL), SO_4^{2-} (1.00 mg/mL), PO_4^{3-} (2.00 mg/mL), NO_3^- (1.00 mg/mL)。合成样品(2)组成为: RNA(5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 牛血清白蛋白(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 苯丙氨酸(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 色氨酸(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 甘氨酸(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 谷氨酸(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 精氨酸(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 抗坏血酸(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 核黄素(350 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Ca^{2+} (1.50 mg/mL), Mg^{2+} (1.50 mg/mL), Zn^{2+} (1.50 mg/mL), Fe^{3+} (1.50 mg/mL), Cu^{2+} (1.50 mg/mL); CO_3^{2-} (2.00 mg/mL), SO_4^{2-} (1.50 mg/mL), PO_4^{3-} (2.50 mg/mL), NO_3^- (1.50 mg/mL)。测定结果见表 1。

表 1 合成试样中 RNA 含量的测定结果(5)

Table 1 Measuring results of RNA contents in the samples.

试样 Sample No.	测得平均值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得总量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率		相对标准偏差 %
				($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%	
1	2.08	2.00	4.14	2.13	103	3.9
2	4.95	5.00	9.86	4.91	98.2	3.0

参 考 文 献

- [1] Blackburn M J, Andrews T M. *Anal. Biochem.*, 1973, **51**:1.
- [2] Kashiwake M, Imai K. *Applied Fluorescence Technology*, 1991, **11**(1):3.
- [3] Hiroji A, Tomoya B, Kouji H *et al.*, *DNA Res.*, 1996, **3**(6):363.
- [4] Lepeeq J, Paolett C. *Anal. Biochem.*, 1966, **17**:100.
- [5] Letizia P, Cristina F M, Gianluca A *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1997, **248**(1):190.
- [6] ULF D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **17**(13):1743.
- [7] Jiang G, Qu W, Buan H *et al.*, *Biotechniques*, 1995, **19**:566.
- [8] Shunji H, Hitomi F. *Anal. Biochem.*, 1996, **243**(2):277.
- [9] Lin H J, Tanwandee T, Hollinger F B. *J. Med. Virol.*, 1997, **51**(1):56.
- [10] Schukert F, Kluetsch T, Cech D. *Nucleosides, Nucleotides*, 1997, **16**(3):277.
- [11] Rauhut M M, Sheehan D, Clarke R A *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1965, **30**:3587.
- [12] Weeks I, Beheshti I, McCapra F *et al.*, *Clin. Chem.*, 1983, **29**(8):1474.
- [13] Zhuang Huisheng, Wang Qiong'e, Chen Guonan *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **26**(11):1324 (in Chinese).

STUDY ON THE CHEMILUMINESCENT PROPERTIES OF ETHIDIUM BROMIDE

ZHUANG Huisheng, CHEN Guonan, HUANG Jinling

(Department of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract

In this work, we first investigated the chemiluminescent properties of ethidium bromide, and find that RNA can enhance the chemiluminescent intensity of reaction between ethidium bromide and KMnO_4 in a strong acid medium. There is a linear relationship between the chemiluminescent intensity obtained in the system of EB- KMnO_4 -RNA and RNA concentration, therefore, a new chemiluminescent analytical method for the determination of RNA is established and used to determine RNA in synthetic samples. The linear calibration ranges is $0.10\sim 10.0\mu\text{g/mL}$ and the detection limit is $0.06\mu\text{g/mL}$ for RNA, the relative standard deviation is 3.8% for $3.5\mu\text{g/mL}$ RNA. Interference ions were examined. The precision, accuracy and selectivity of the method are satisfactory.

Key words: chemiluminescence; ethidium bromide; RNA