

• 研究论文 •

利福霉素类抗生素-Cu(II)-核酸体系的 RRS 光谱研究

杨季冬^{a,b} 曹团武^b 刘绍璞^{*a}

(^a 西南大学化学化工学院 重庆 400715)

(^b 长江师范学院化学系 重庆 408003)

摘要 在 Britton-Robinson (B-R) 缓冲溶液中, 利福霉素类药物与 ctDNA 反应的适宜的 pH 范围是 1.9~2.1. 此类药物本身有微弱 RRS 峰, 它们具有相似的光谱特征, 其散射峰均在 290 和 370 nm 附近; 而 ctDNA 的 RRS 峰在 310 nm 处. 两者反应形成结合产物后其 RRS 明显增强, 并在 375 nm 左右出现最大散射峰, 且有不同程度的红移和散射增强, 说明两者结合成新的产物; 加入 Cu²⁺ 离子后, Cu²⁺ 与利福霉素抗生素及 DNA 形成三元复合物, 此时将导致 RRS 进一步剧增, 而且 RRS 光谱增强值与 DNA 浓度呈正比, 因而可用于 DNA 测定具有较高的灵敏度, 实验对 ctDNA 的检出限为 9.7 ng/mL (RFSV-Cu²⁺-ctDNA 体系). 文中研究了三元配合物反应的适宜条件和影响因素, 基于此反应发展了一种用 RRS 技术测定 DNA 的新方法.

关键词 共振 Rayleigh 散射; 核酸; 利福霉素类药物; 氯化铜

Resonance Rayleigh Scattering Spectra of Rifamycins Antibiotics-Cu(II)-Nucleic Acid System

YANG, Ji-Dong^{a,b} CAO, Tuan-Wu^b LIU, Shao-Pu^{*a}

(^a College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest China University, Chongqing 400715)

(^b Department of Chemistry, Yangtze Normal College, Chongqing 408003)

Abstract In the pH 1.9~2.1 Britton-Robinson (B-R) buffer solution, rifamycin drugs such as Rifamycin SV (RFSV), Rifapentine (RFPT) and Rifampicin (RFP) could react with ct-DNA. These rifamycin drugs themselves had slight resonance Rayleigh scattering (RRS) spectral peaks and analogical spectral characteristics with RRS peaks at around 290 and 370 nm; meanwhile, ctDNA had a faint peak at 310 nm. The RRS intensity was enhanced obviously after the drugs and DNA reacting with each other, which indicated the formation of new products for the maximum peak appeared at around 375 nm with slight red shift. Then the Cu(II) ion was added into the system to form a ternary system, and the RRS intensity was enhanced significantly, when the enhanced spectral value was directly proportional to the concentration of the DNA. Thus a highly sensitive method could be obtained for determining DNA and the detection limit of the experiment reached 9.7 ng/mL for the RFSV system. In this work, the optimum reaction conditions and influencing factors were investigated and a new method for the determination of DNA has been developed by the RRS spectral technology.

Keywords resonance Rayleigh scattering; nucleic acid; rifamycin drugs; copper dichloride

药物分子与核酸的相互作用是分子药理学研究的一个重要领域, 药物在体内的主要靶向作用对象是核

酸^[1], 形成 DNA 靶向化合物的作用方式、过程和结果都对研究药物具有重要价值. DNA 靶向化合物成为很重要

* E-mail: liusp@swu.edu.cn

Received February 24, 2008; revised May 4, 2008; accepted June 12, 2008.

国家自然科学基金(No. 20875078)、重庆市教委科研基金(No. KJ051303)资助项目.

的药物选择对象,临床上使用的许多抗癌药物都以 DNA 为作用的主要靶点,通过与癌细胞 DNA 发生相互作用破坏其结构,进而影响基因调控与表达的功能,表现出抗癌活性^[2]. 对于某些化学药物导致的基因疾病,也可以通过研究药物与核酸的相互作用得到有用的信息. 而对药物分子和金属离子协同作用于核酸的三元体系的体外研究,有助于弄清楚多种因素对体内组织的综合作用,也有益于了解核酸等内源物质在多种外来分子影响下的生理变化.

利福霉素类(Rifamycins)药物是一种利福霉素类广谱抗生素,它是治疗结核病的重要药物. 此类药物有三种常见的衍生物,即利福霉素 SV (Rifamycin SV, 简称 RFSV)、利福喷丁(Rifapentin, 简称 RFPT)和利福平(Rifampicin, 简称 RFP). 其抗菌机理是抑制受 DNA 指导的 RNA 聚合酶(转录酶)的复制功能,使菌体 mRNA 合成受阻,达到杀菌作用^[3]. 关于药物与核酸等生物大分子相互作用的研究已为生命科学、临床医学、药物药理和毒理、核酸检验等领域所关注^[4-6]. 其研究方法常有紫外-可见吸收光谱法^[7]、荧光法^[8]、圆二色谱法^[9]、共振瑞利散射法^[10]、红外光谱法^[11]、拉曼光谱法^[12]、核磁共振法^[13]和电化学方法^[14]等. 尤其用分子光谱法研究药物分子与核酸的结合反应,以及有金属离子介入的相互作用可以探索核酸和药物的光谱变化、能量转移及其实验条件影响等方面的信息^[15,16]. 而对利福霉素类药物和金属 Cu(II)离子与核酸形成三元体系的相互作用,以及对共振瑞利散射(RRS)光谱的影响及其分析应用的研究目前尚未见报道. 利福霉素 SV(RFSV)、利福喷丁(RFPT)和利福平(RFP)三者的基本结构相似,仅在双苯环上的衍生基不同,在 RFSV 上为 H 原子,而在 RFPT 和 RFP 两者的均为三氮偶联基团,且在结尾氮上连接甲基(RFP)或环戊基(RFPT),故后两者的结构上更为相似,其理化性能相近,水溶性都较差,光谱差异较小,两者与 RFSV 的光谱差异较大. 利福霉素类药物本身无荧光,它们与核酸反应后也难于观察到吸收光谱的明显变化,因此难于用常规的紫外-可见分光光度法和荧光分光光度法进行研究. 近年来,RRS 光谱为研究药物分子与核酸之间的相互作用提供了新的途径^[17-19]. 由于某些药物分子借静电引力、疏水作用、氢键等弱结合力组装于核酸模板上时,又加入金属离子后形成三元体系,将引起核酸体积增大和核酸构象发生改变^[20],这种变化对于吸收光谱影响甚微^[21],却能引起 RRS 的急剧增强和 RRS 光谱的改变. 因此 RRS 的这一变化也为研究利福霉素类药物与核酸或有金属离子参加的三元体系的相互作用创造了条件. 研究表明 RFSV, RFPT 和 RFP 本身有微弱的 RRS 光谱,当它们在酸性介质中与核酸反应

形成结合产物时,能引起共振瑞利散射增强并产生新的 RRS 光谱;当加入 Cu^{2+} 形成三元体系后,观察到 RRS 剧增,说明三元体系中的相互作用更为强烈,由吸收光谱可以推测,利福霉素与 DNA 形成的二元体系是药物在核酸上聚集,没有新的化学结合,而加入 Cu^{2+} 则形成三元复合物,其结果导致 RRS 剧增,且增强的 RRS 光谱强度与 DNA 浓度成正比. 本文考察了利福霉素和金属离子与核酸发生反应的影响因素,探讨了三元体系 RRS 光谱增强的原因. 研究不仅有助于探讨药物、金属离子与核酸的作用机理,还有助于从分子水平上了解药物的药理作用提供更多的信息. 而且以 RFSV 加 Cu^{2+} 用作探针试剂,利用 RRS 光谱法测定核酸具有很高的灵敏度和良好的选择性,因此也为核酸的定量测定提供了一种新的灵敏、简便、快速的新方法.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计(Hitachi 公司,日本), U-3010 紫外/可见分光光度计(Hitachi 公司,日本), PHS-25C 型数显酸度计(上海宇隆仪器有限公司).

核酸溶液: 鲑鱼 DNA (Salmon DNA, 华美公司)、小牛胸腺 DNA (ctDNA, 华美公司)溶于二次蒸馏水,准确浓度由 260.0 nm 处吸光度确定,操作液浓度 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于 1~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存.

B-R 缓冲溶液: 0.04 mol/L H_3PO_4 , H_3BO_3 和 HAc 与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合,配成不同 pH 值的缓冲溶液,用酸度计校正其 pH 值. 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液控制体系的离子强度.

利福霉素 SV(Rifamycin SV, 中国药品生物制品检定所,标准品 99.9%)溶于二次蒸馏水,操作液浓度 3.5×10^{-3} mol/L; 利福平(Rifampin)和利福喷丁(Rifapentine) (河北欣港药业公司,纯品 99.8%)均溶于少量的甲醇溶液中,再用水稀释. 储备液浓度为 5.0×10^{-3} mol/L. 氯化铜(CuCl_2 , 分析纯,重庆化学试剂公司)用水配制成 0.1 mol/L 浓度的储备液. 以上储备液均在使用时再用水稀释至所需浓度. 上述试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

在 10.0 mL 比色管中,依次加入 2.0×10^{-5} mol/L 利福霉素类药物 1.00 mL, pH 1.9 的 B-R 缓冲溶液 1.50 mL 和 2.0×10^{-5} mol/L Cu^{2+} 1.00 mL,以及适量核酸溶液,用水稀释至刻度,摇匀,于荧光分光光度计上以 $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$ 方式进行同步扫描,然后在最大散射波长处测定样品和试剂空白的散射强度 I_{RRS} 及 I_0 , $\Delta I = I_{\text{RRS}} - I_0$.

2 结果与讨论

2.1 利福霉素类药物和 Cu^{2+} 与 DNA 三元体系的 RRS 光谱特征

2.1.1 DNA 和利福霉素类药物(RFSV, RFP 和 RFPT)的 RRS 光谱

ctDNA 溶液无色, RFSV, RFP 和 RFPT 等利福霉素类药物的水溶液显棕黄色. 在 pH 1.9 时, DNA 和利福霉素类药物均有微弱的 RRS 光谱, 如图 1 所示, ctDNA 有较强的单峰的 RRS 光谱, 而利福霉素类药物均有双峰的 RRS 光谱, 其峰位和光谱强度(I_{\max})列于表 1 中.

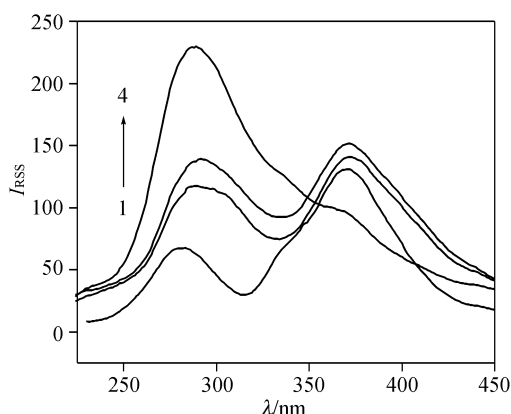


图 1 利福霉素类药物及 ctDNA 的 RRS 光谱

Figure 1 RRS spectra of rifamycins drugs and ctDNA

Concentration of ctDNA is $1.0 \mu\text{g/mL}$; of drugs are $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 1. RFSV, 2. RFP, 3. RFPT, 4. ctDNA

2.1.2 利福霉素类药物与 DNA 二元体系的 RRS 光谱

在 pH 1.9 时, 当利福霉素类药物与 DNA 作用形成二元复合物时, DNA 的 RRS 光谱峰消失, 药物的 RRS 光谱有所增强, 峰位移动, 说明产生了新的 RRS 光谱(见图 2). 此类药物与 DNA 二元体系的 RRS 光谱特征亦列于表 1 中. 实验表明, 体系增强的 RRS 光谱强度与 ctDNA 的浓度增强呈线性相关, 据此可应用于测定 DNA 的浓度, 但其灵敏度不高.

2.1.3 利福霉素类药物-Cu(II)-DNA 三元体系的 RRS 光谱

在 pH 1.9 时, Cu^{2+} 与 DNA 或与利福霉素类药物都

不能引起 RRS 光谱有所改变, 而当 Cu^{2+} 加到利福霉素类药物与 DNA 的二元体系中时, 体系的 RRS 光谱急剧增强, 并产生新的 RRS 光谱, 说明三者相互作用形成了三元复合物, 见图 2. 由图可以看出, RFSV, RFP 和 RFPT 和 Cu^{2+} 与 DNA 形成三元复合物时, 其 RRS 强度随 DNA 浓度增大而增强, 增强的顺序是 $\text{FSV-Cu(II)} > \text{RFPT-Cu(II)} > \text{RFP-Cu(II)}$ 体系, 由于三元复合物体系的 RRS 较二元体系具有更高的灵敏度, 因此更有利于对痕量 DNA 的测定.

2.1.4 利福霉素类药物- Cu^{2+} -DNA 三元体系的吸收光谱

图 3 为利福霉素类药物利福霉素 SV、利福霉素 SV-DNA 二元体系和利福霉素 SV- Cu^{2+} -DNA 三元体系的吸收光谱. 从图中可知, RFSV 的吸收光谱在 310 和 450 nm 处各有一峰, 前一峰较强; 而 RFSV-DNA 二元体系的吸收光谱其峰形峰位与 RFSV 吸收光谱相同, 同样具有双峰, 但其吸光度均减弱. 这说明二元体系为松散聚集体, 并无新的物质产生. RFSV- Cu^{2+} -DNA 三元体系的吸收光谱不同于前二者的, 单峰蓝移至 290 nm 处, 说明三元体系有新物质产生, 其三元之间存在化学结合.

2.2 反应条件的优化

2.2.1 溶液酸度的影响

分别试验了 B-R(Britton-Robinson) 缓冲液、HCl-NaAc、酒石酸-酒石酸钠、乙酸-乙酸钠四个缓冲体系对反应体系 RRS 强度的影响, 结果表明 B-R 缓冲溶液效果最好, 所以实验选用 B-R 缓冲体系.

以 B-R 缓冲溶液为反应介质, 试验了不同 pH 值条件对三元体系的 RRS 的影响, 结果表明适宜的 pH 范围是 1.9~2.1, 当 $\text{pH} < 1.85$ 时, DNA 的双螺旋结构在酸性介质中受到破坏, 空白值升高, ΔI_{RRS} 降低; 当 $\text{pH} > 2.1$ 时, 溶液中 H^+ 减小, 利福霉素类物质质子化程度降低, 不利于复合物的形成. 由图 4 结果表明: Cu(II)-RFSV-ctDNA, Cu(II)-RFP-ctDNA 和 Cu(II)-RFPT-ctDNA 体系的适宜的 pH 范围分别是 1.9~2.1, 1.9~2.0 和 1.8~2.0 之间, 故三种体系均可选用 pH 1.9 的 BR

表 1 RRS 光谱特征

Table 1 Spectral character of RRS

	DNA	RFSV	RFSV-DNA	RFSV- Cu^{2+} -DNA	RFPT	RFPT-DNA	RFPT- Cu^{2+} -DNA	RFP	RFP-DNA	RFP- Cu^{2+} -DNA
Max peak	288	370	370	373	372	369	374	371	368	375
Other peak	—	278	292	295	291	289	303	292	292	303
I_{\max}	233	131	579	2476	152	519	1613	141	390	1303

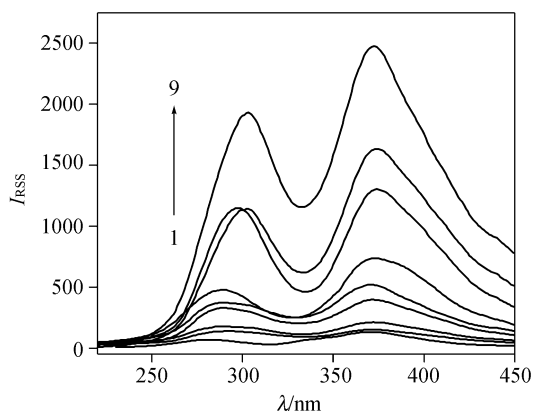


图2 药物体系在不同状况下的RRS光谱

Figure 2 RRS spectra of the drugs systems in different conditions

1. RFSV, 2. RFP, 3. RFPT, 4. RFP-ctDNA, 5. RFPT-ctDNA, 6. RFSV-ctDNA, 7. RFP-Cu²⁺-ctDNA, 8. RFPT-Cu²⁺-ctDNA, 9. RFSV-Cu²⁺-ctDNA. Concentration of DNA is 1.0 μg/mL, of drugs and Cu²⁺ are 2.0 × 10⁻⁵ mol/L

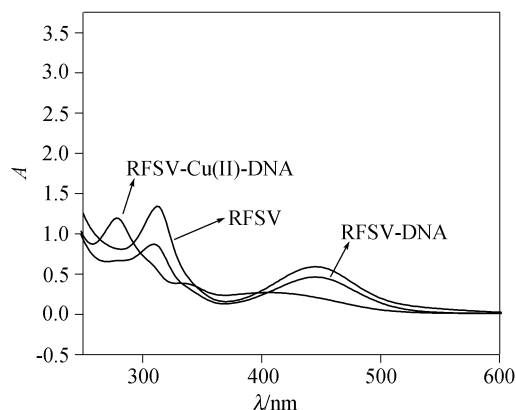


图3 利福霉素SV体系的吸收光谱

Figure 3 Absorption spectra of rifamycin SV systems

1. RFSV, 2. RFSV-DNA, 3. RFSV-Cu²⁺-DNA

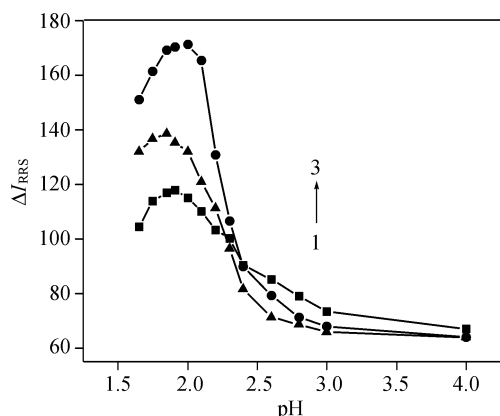


图4 pH对三元体系的RRS光谱强度的影响

Figure 4 Effect of pH on the intensity of RRS spectra of ternary system

1. RFPT, 2. RFP, 3. RFSV

缓冲溶液作为反应介质。

在适宜的 pH 条件下, 试验了缓冲溶液用量对三元体系的 RRS 强度的影响, 结果表明最佳的缓冲溶液用量为 1.0~2.0 mL, 所以试验采用 B-R 缓冲溶液 1.5 mL.

2.2.2 药物浓度的影响

当固定 Cu²⁺ 离子的浓度为 2 × 10⁻⁵ mol/L 和固定 DNA 在一定浓度时, 实验利福霉素类药物浓度对体系的 RRS 光谱强度的影响. 结果表明, 药物本身的 RRS 光谱存在双峰(290 和 370 nm 左右), 在三元体系中, 其药物双峰的较长波长处(370 nm 左右)的峰受药物浓度影响较大. 当药物浓度较低时, 由于与 DNA 反应不完全, RRS 强度较低, 信号不稳定; 随着药物浓度的增大, ΔI_{RRS} 逐渐增大, 但当药物浓度超过一定浓度范围时, 散射强度又降低, 对于不同的核酸, 适宜的药物浓度范围分别为: RFPT: (1.5~3.5) × 10⁻⁵ mol/L (ctDNA), (1.25~3.0) × 10⁻⁵ mol/L (sDNA); RFP: (1.5~3.5) × 10⁻⁵ mol/L (ctDNA), (1.25~3.0) × 10⁻⁵ mol/L (sDNA); RFSV: (1.5~3.5) × 10⁻⁵ mol/L (ctDNA), (1.25~3.0) × 10⁻⁵ mol/L (sDNA).

所以, 实验选用 RFPT, RFP 和 RFSV 的浓度为 2.0 × 10⁻⁵ mol/L.

2.2.3 离子强度的影响

图5显示了离子强度对散射强度的影响. 结果表明, 强电解质 NaCl 的加入, 对药物本身的共振散射强度影响不大, 但对三元复合物的散射强度影响很大, 随着离子强度的增大 I_{RRS} 迅速下降. 这是由于在较高浓度的强电解质存在下, DNA 的构象发生了变化, 由 B 型转变成了 Z 型^[23], 从而影响复合物的形成. 此外加入的 Na⁺ 以静电引力的方式与核酸上带负电荷的磷酸基作用, 削弱

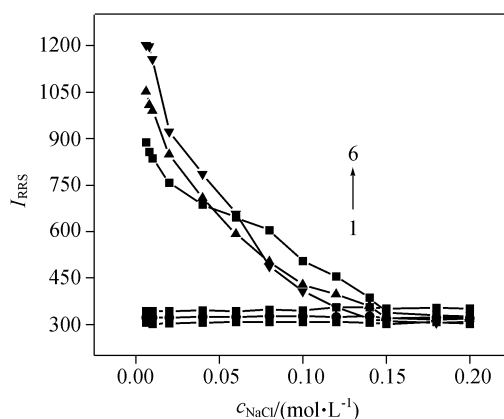


图5 离子强度对三元体系的RRS光谱强度的影响

Figure 5 Effect of the ionic intensity on the intensity of RRS spectra of ternary system

1. RFSV, 2. RFP, 3. RFPT, 4. RFSV ternary system, 5. RFP ternary system, 6. RFPT ternary system

了药物与核酸相互作用中静电引力所起的重要作用. 因此, 在测定过程中应避免高浓度强电解质的存在.

2.2.4 Cu(II)离子对体系 RRS 的影响

实验了 Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Pd(II), Ag(I), Au(III), Ga(III)等几种金属离子对体系 RRS 的影响, 结果表明, 除 Cu(II)以外的金属离子对利福霉素类药物的 RRS 光谱几乎不产生影响, 但 Cu(II)对 DNA 及药物与 DNA 共存的二元体系的 RRS 光谱有较明显的增强作用, 散射峰未发生改变, 却使 DNA 及二元体系的 RRS 光谱更加稳定, 结果显示 Cu(II)离子的效果最好. 为此在固定足够量的 DNA 溶液中, 让药物浓度保持为 2.0×10^{-5} mol/L 时, 试验不同浓度的 Cu(II)离子对体系的 RRS 光谱的影响, 发现 Cu(II)离子浓度为 2.0×10^{-5} mol/L 时, 体系的 RRS 信号达最大值. 所以实验中 Cu(II)离子的使用量为 2.0×10^{-5} mol/L. 由此推测在三元体系 RFSV-Cu(II)-DNA 中 Cu(II)离子与 RFSV 的结合比为 $[Cu^{2+}] : [RFSV] = 1 : 1$.

2.2.5 体系的稳定性实验和试剂添加顺序

试验结果表面, 药物或 DNA 与金属离子在室温下反应快速, 2 min 后测试, 其 RRS 光谱强度可达到最大值, 5 h 后仍可保持稳定; 而药物和 Cu^{2+} 与 DNA 的三元体系中试剂的添加顺序为: 药物 \rightarrow buffer \rightarrow Cu^{2+} \rightarrow DNA, 实验选定在 5 min 后测定 RRS 光谱强度.

2.3 三元体系的 RRS 光谱响应的标准曲线

在确定的最佳反应条件下, 配制不同浓度的 ctDNA 或 sDNA 与三种利福霉素(RFSV, RFP 和 RFPT)和 Cu^{2+} 反应, 分别测量其 RRS 的最大散射波长处的散射强度 I 和空白散射强度 I_0 , 并以 $\Delta I_{RRS} = I - I_0$, 对 DNA 浓度绘制标准曲线. 并以 DNA 浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 平行测定 7 次计算得到相对标准偏差. 表 2 列出利福霉素与 DNA 二元

体系和利福霉素- Cu^{2+} -DNA 三元体系的标准曲线方程、相关系数、线性范围、检出限和 RSD.

2.4 反应机理的探讨

利福霉素类药物无荧光, 有很弱的散射; ctDNA 和 sDNA 有荧光, 也有较弱的散射, 当两者结合后其体系的散射并无多大增强; 利福霉素药物与 Cu^{2+} 离子反应, 其中的一OH 和 N 原子与 Cu^{2+} 离子可能生成四配位的螯合物^[23], 但其散射亦无明显增强; ctDNA 和 sDNA 与 Cu^{2+} 也可能反应生成配合物, 因 DNA 中的碱基 N 原子和磷酸根—OH 可与之结合. 但却使 DNA 的荧光和散射均有所减弱; 而当利福霉素类药物- Cu^{2+} -DNA 形成三元结合产物时, 其 RRS 光谱大大增强, 这可能与 Cu^{2+} 离子与 DNA 和利福霉素类药物之间形成三元复合物有关, 或利福霉素-Cu(II)配离子可能与 DNA 形成的离子缔合物有关. 如前面 2.2.2 节和 2.2.4 节所述, 实验发现利福霉素药物分子与 Cu^{2+} 离子的结合比 $[Cu^{2+}] : [RFSV] = 1 : 1$, 这种结合可能是利福霉素药物分子占据 Cu^{2+} 离子的 1 至 2 个螯合价位, 同时 Cu^{2+} 离子还空有 2 至 3 个价位可以结合多个 DNA 分子. 三元结合产物形成后, 分子体积大大增加, 因而 RRS 光谱显著增强.

2.5 方法的选择性和分析应用

2.5.1 共存物质的影响

在最佳的实验条件下, 实验了共存物质对测定浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 的 ctDNA 的影响. 结果见表 3. 从表中可知, 除 Fe^{3+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} 等离子是允许存在的, 而且有较大量的 Na^+ , K^+ , NH_4^+ 无机酸根、糖类和氨基酸不干扰, 因此方法应有较好的选择性, 在分析应用时, 可以化学方法进行预处理除掉少数干扰离子.

表 2 标准曲线的相关参数和 DNA 的检出限

Table 2 The related parameters of the calibration graphs and the detection limit for the DNA

System	Detected wavelength/ nm	Linear equation/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Correlation coefficient	Linear range/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Detection limit (3σ)/(ng·mL ⁻¹)	RSD/% ($n=7$)
RFSV-ctDNA	370	$\Delta I = 14.6 + 590.3C$	0.9987	0.01~6.0	17.5	3.7
RFSV-sDNA	368	$\Delta I = 18.9 + 581.2C$	0.9982	0.01~6.0	18.1	3.2
RFP-ctDNA	368	$\Delta I = 12.8 + 337.1C$	0.9984	0.01~6.0	23.2	3.5
RFP-sDNA	366	$\Delta I = 25.2 + 335.5C$	0.9981	0.01~6.0	24.5	3.4
RFPT-ctDNA	369	$\Delta I = 22.1 + 480.8C$	0.9986	0.01~6.0	20.4	3.6
RFPT-sDNA	367	$\Delta I = 24.2 + 457.5C$	0.9987	0.01~6.0	20.1	3.4
RFSV- Cu^{2+} -ctDNA	373	$\Delta I = 22.7 + 932.8C$	0.9997	0.01~6.0	9.7	2.8
RFSV- Cu^{2+} -sDNA	370	$\Delta I = 22.1 + 880.8C$	0.9994	0.01~6.0	10.2	2.6
RFP- Cu^{2+} -ctDNA	375	$\Delta I = 21.7 + 889.5C$	0.9994	0.01~6.0	11.3	2.9
RFP- Cu^{2+} -sDNA	372	$\Delta I = 20.7 + 857.5C$	0.9996	0.01~6.0	12.7	3.0
RFPT- Cu^{2+} -ctDNA	374	$\Delta I = 21.8 + 893.9C$	0.9997	0.01~6.0	10.5	2.5
RFPT- Cu^{2+} -sDNA	371	$\Delta I = 20.5 + 862.8C$	0.9996	0.01~6.0	10.9	2.3

表3 共存物质的影响
Table 3 Effect of coexistent substances

Foreign ion	Coexisting concentration/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Relative error/ %	Foreign ion	Coexisting concentration/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Relative error/ %
Fe^{3+}	3.5	-1.9	葡萄糖	80	2.1
Mn^{2+}	105	-3.7	纤维素酶	150	2.2
Al^{3+}	2.5	-1.6	维生素 C	140	-1.3
Na^+	400	-3.6	果糖	350	-3.5
K^+	339	-3.8	尿素	25	-1.6
Ni^{2+}	4.0	-1.8	麦芽糖	126	-4.2
Zn^{2+}	5.5	-1.9	L-色氨酸	200	-3.8
Ca^{2+}	110	-2.0	甘氨酸	200	-4.1
Mg^{2+}	120	-1.9	L-苯丙氨酸	250	-3.5
NH_4^+	113	2.0	L-酪氨酸	220	-3.5
Br^-	0.25	1.6	淀粉	60	4.2
CO_3^{2-}	260	-3.8	β -环糊精	50	4.2
NO_3^-	339	-3.8	维生素 C	80	4.0
SO_4^{2-}	28.4	-3.5	BSA	30	3.5

2.5.2 分析应用

以 RFSV-Cu(II)-ctDNA 为例, 根据表 3 中共存组分干扰允许量合成了四个样品, 测定结果见表 4. 可见此方法测定核酸, 准确性高, 重复性好.

表4 合成样品的测定

Table 4 Determination of synthesis samples

合成样品/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	共存物质/ ($\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($n=5$)	回收率/ % ($n=5$)	RSD ($n=5$)
ctDNA 2.0	Al^{3+} 1.0, Fe^{3+} 0.5, Mg^{2+} 50, Zn^{2+} 0.8, Ni^{2+} 20	2.03	101	2.8
ctDNA 2.0	Ca^{2+} 20, Zn^{2+} 0.8, Fe^{3+} 0.5, Ni^{2+} 25, NH_4^+ 5	1.98	99	2.3
ctDNA 2.0	β -CD 10, 尿素 50, 果糖 55 维生素 C 10, L-色 氨酸 50	2.04	102	2.4
ctDNA 2.0	BSA 0.8, 淀粉 10, 甘氨酸 20 葡萄糖 30, L-酪氨 酸 50	2.05	103	2.5

References

- Yang, M. *J. Beijing Med. Univ.* **1998**, *30*, 97 (in Chinese). (杨铭, 北京医科大学学报, **1998**, *30*, 97.)
- Zhang, R.-Y.; Pang, D.-W.; Cai, R.-X. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, *20*, 1210 (in Chinese). (张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀, 高等学校化学学报, **1999**, *20*, 1210.)
- Wang, R.-L.; Yuan, Z.-P. *The Handbook of Chemical Products. Drugs*, Chemical Industry Press, 3rd ed., Beijing, **1999**, p. 136 (in Chinese). (王汝龙, 原正平, 化工产品手册, 药物, 化学工业出版社(第三版), 北京, **1999**, p. 136.)
- Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- Bullock, T. L.; Sherlin, L. D.; Perona, J. J. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 497.
- Wu, H.; Wang, Y. *Transact. Nanjing Aeronaut. Astronaut.* **2002**, *19*, 94.
- Ling, L.-S.; Yang, X.; He, Z.-K.; Zeng, Y.-E. *Chin. J. Anal. Sci.* **2001**, *17*, 11 (in Chinese). (凌连生, 杨洗, 何治柯, 曾云鹗, 分析科学学报, **2001**, *17*, 11.)
- Chen, K.-H.; Zheng, X.-F.; Guo, M.; Cao, H.-Y.; Tang, Q.; Yang, Y.-J. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 1887 (in Chinese). (陈克海, 郑学仿, 郭明, 曹洪玉, 唐乾, 杨彦杰, 化学学报, **2007**, *65*, 1887.)
- Zinchenko, A. A.; Sergeyev, V. G.; Yamabe, K.; Murata, S.; Toshikawa, K. *Chembiochem* **2004**, *5*, 360.
- Yang, J. D.; Cao, T. W.; Liu, Z. F.; Kong, L.; Liu, S. P. *Chin. J. Chem.* **2008**, *26*, 795.
- Zhou, Y. L.; Li, Y. Z. *Colloids Surf. A* **2004**, *233*, 129.
- Nabiev, I.; Chourpa, I.; Manfait, M. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1344.
- Vogtherr, M.; Fiebig, K. *EXS* **2003**, *93*, 183.
- Long, D.-W.; Liu, C.-Y.; Zhao, H.-Y.; Lu, G.-H. *Chin. J. Anal. Chem.* **2002**, *30*, 1250 (in Chinese). (龙德武, 刘传银, 赵鸿雁, 陆光汉, 分析化学, **2002**, *30*, 1250.)
- Chen, Q.; Li, G.; Zhao, Y.; Yang, H.; Zhu, Z.; Xu, J. *Analyst* **1999**, *124*, 901.
- Zheng, H.; Chen, X. L.; Zhu, C. Q.; Li, D. H.; Chen, Q. Y.;

- Xu, J. G. *Microchem. J.* **2000**, *64*, 263.
- 17 Liu, S.-P.; Fan, L.; Hu, X.-L.; Liu, Z.-F.; Chen, Y.-H. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 1635 (in Chinese).
(刘绍璞, 范莉, 胡小莉, 刘忠芳, 陈粤华, 化学学报, **2004**, *62*, 1635.)
- 18 Yang, J. D.; Deng, S. X.; Liu, Z. F.; Kong, L.; Liu, S. P. *Luminescence* **2007**, *22*, 559.
- 19 Liu, S.-P.; Wang, F.; Liu, Z.-F.; Hu, X.-L. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 962 (in Chinese).
(刘绍璞, 王芬, 刘忠芳, 胡小莉, 化学学报, **2007**, *65*, 962.)
- 20 Mel'nikov, S. M.; Sergeev, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2401.
- 21 Liu, S.-P.; Hu, X.-L.; Luo, H.-Q.; Fan, L. *Sci. China, Ser. B-Chem.* **2002**, *32*, 18 (in Chinese).
(刘绍璞, 胡小莉, 罗红群, 范莉, 中国科学•B 辑-化学, **2002**, *32*, 18.)
- 22 Sheardy, R. D.; Winkel, S. A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 720.
- 23 Ji, J.-H. *Chin. J. Appl. Chem.* **2000**, *17*, 115 (in Chinese).
(季君晖, 应用化学, **2000**, *17*, 115.)

(A0802243 SUN, H. P.)