

# 低浓度 O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤荧光检测的研究

庄大奎 刘亚淑  
(中国科学院上海光学精密机械研究所)

瞿永华 吴一迁  
(上海市肿瘤研究所)

## 提 要

本文报道了一种采用荧光光谱测定 O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤的方法。该法具有灵敏度高、选择性好等优点,检测灵敏度已达到 0.01 fM/ml,比国内外常用的放射免疫法高一个量级。  
关键词: 荧光光谱; 检测灵敏度。

## 引 言

据目前公认的发生肿瘤的体细胞突变学说,细胞中 DNA 受到攻击损伤是癌肿始发的基础,若采用高灵敏方法测定人类暴露于化学致癌以后导的 DNA 损伤,即 DNA 加成物,就可能从目前国际上关注的分子流行病学角度研究癌肿发病机制。目前有四种测定这类加成的方法,它们是:同位素标记、放射免疫、<sup>32</sup>P 后标记以及荧光光谱法<sup>[1~3,5]</sup>。受损伤和正常的 DNA 鸟嘌呤的结构在第 6 位上不同(见图 1),前者多接了一个甲基,因而它们的发光情况也不同。蒸馏水溶剂中鸟嘌呤吸收峰在 275, 240nm, 荧光峰在 322 nm, 而 O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤的吸收峰在 282nm, 荧光峰在 354nm。由于受攻击的 DNA 加成物含量极少,我们采用了示差光谱法,用 Perkinelmer LS-5 型谱仪进行测试,并以微机进行数据处理分析,获得了较高灵敏度的检测结果。

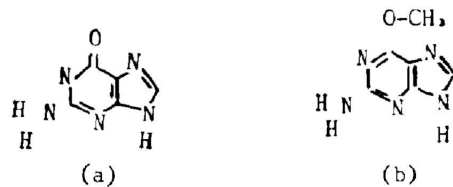


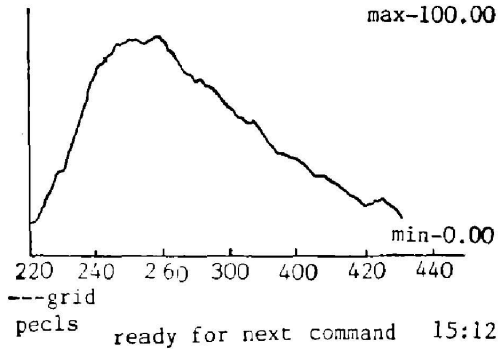
Fig. 1 The structure of DNA guanine (a) & O<sup>6</sup>-methylguanine (b)

## 二、测量结果与分析

O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤标准品是英国 Paterson 实验室 Saffhill 博士所赠,以双重蒸馏水或 0.1 M 不同 pH 值的多种 aminoformate 缓冲剂配制成 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、...、10<sup>-15</sup> M 等不同浓度梯度溶液。观测 DNA 加成物的发光情况。激发光波长为 282 nm, 波长的测量精度为 ±2 nm。重复测量精度为 ±1 nm, 狭缝的光谱宽度为 10 nm, 仪器灵敏度信噪比为 1:70。

1. 当 O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤随浓度梯度下降时,分子间的作用力减弱,从而有利于电子从激

发态的最低振动能级向基态的低振动能级跃迁,因此荧光峰逐渐移。当溶液浓度为  $10^{-7} M$  以下时,最终稳定于  $354 nm$  处。由于  $O^6$  甲基鸟嘌呤具有平面结构,属发荧光有机分子。当



溶液很稀时分子间的作用力已不再影响能级间的跃迁,荧光峰也逐渐稳定。溶液浓度低于  $10^{-7} M$  时荧光强度随  $O^6$  甲基鸟嘌呤的浓度下降而减弱,作者对不同浓度梯度作了测试,目前最低检测极限为  $0.024 \sim 0.01 fm/ml$ 。图 2 为其荧光曲线图形。

Fig. 2 Emission spectrum of  $O^6$ -MEG (concentration:  $0.0024 fmol/ml$ ; Excitation wavelength  $282 nm$ )

2. 溶液的 pH 值对荧光的影响颇大,作者对 pH 值分别为 2.05, 3.09, 4.45, 3.58, 4.97, 5.48, 6.75 等 aminoformate 缓冲液条件进行观测。发现

仅当 pH 值为 2.05, 6.75 时荧光较强,其它条件下荧光较弱。但是  $O^6$  甲基鸟嘌呤在分子状态下的荧光强度随浓度梯度的变化比较离子化状态下缓慢。图 3 示出了 pH 值为 2.05, 6.75 缓冲液与双重蒸馏水下溶液荧光随浓度梯度变化的情况,其强度与浓度呈对数线性关系。

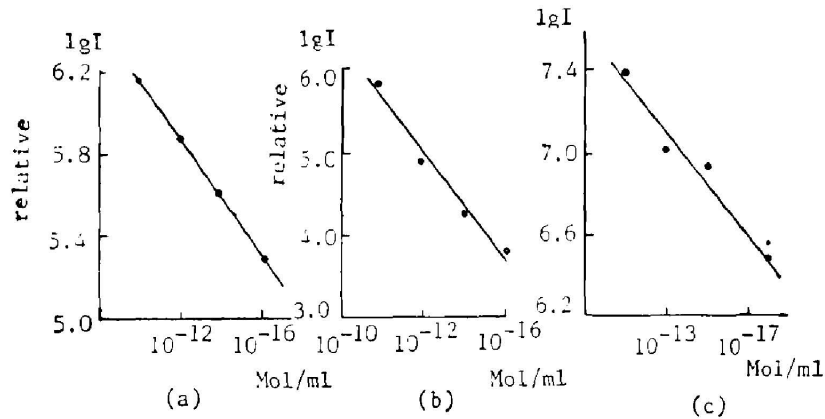


Fig. 3 Relative intensity of  $O^6$ -MEG vs. concentration gradient an double distilled water (a) aminoformate buffer with pH 2.05 (b) and pH6.75 (c)

3. 如上所述,该法目前最低检出极限已达  $0.01 fm/ml$ (而国际上现已报道的仅能测出  $0.3 fmol^{[4]}$  的苯( $\alpha$ )芘——DNA 加成物)。免疫印吸技术的极限为  $0.2 fm/3mg DNA$ ,放射免疫法为  $100 fm/mg DNA$ ,可见该法敏感度比后二者高一个数量级。由于该法不必使用同位素标记化合物和单克隆抗体,所以是一个很有希望的可推广的测定技术,我们正在探讨其实用可能性。

## 参 考 文 献

- [1] Junyan Hong, Chung S. Yang; *Carcinogenesis*, 1985, **6**, No. 12, 1805~1809.  
[2] K. Vahakangas *et al.*; *Carcinogenesis*, 1985, **6**, No. 8, 1109~1115.  
[3] C. Harris, K. Vahakangas *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, 1985, **82** (Oct), 6672~6676.  
[4] Curtis C. Harris *et al.*; *Cancer Research*, 1986, **46** (July), 3249~3253.  
[5] Tuan Vo-Dinh; *Applied Spectroscopy*, 1982, **36**, No. 5, 576~581.

## Fluorescence spectrophotometric assay of O<sup>6</sup>-methylguanine in low concentration

ZHUANG DAKUI, LIU YASHU

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

QU YONGHUA, WU YIQLAN

(Shanghai Cancer Institute)

(Received 20 February 1987; revised 18 May 1987)

### Abstract

The determination of chemical carcinogen-DNA adducts is necessary for research of molecular epidemiology and mechanism of chemical carcinogenesis. A method is presented in this paper for the detection of putative adducts by using fluorescence spectroscopy. The main advantages include high sensitivity and high selectivity. The minimum detectable amount of O<sup>6</sup>-MEG is 0.01 fmol/ml. The sensitivity of detection is an order of magnitude higher than that of radioimmunoassay.

**Key words:** Fluorescence spectroscopy; sensitivity of detection.