

## 光谱法研究硫酸酯化壳聚糖与 DNA 的作用机理

张海容<sup>1,2</sup>, 郭祀远<sup>2</sup>, 李琳<sup>2</sup>, 蔡妙颜<sup>2</sup>, 郑必胜<sup>2</sup>

1. 忻州师院生化分析技术研究所, 山西 忻州 034000

2. 华南理工大学轻工食品学院, 广东 广州 510640

**摘要** 以荧光光谱法、吸收光谱法、碱变性曲线、离子强度和荧光猝灭等方法研究了两种硫酸酯化壳聚糖与 DNA 的相互作用机理。结果表明, 硫酸酯化壳聚糖与荧光探针 DNA/EB 的作用存在嵌插和静电作用两种模式。高取代度硫酸酯化壳聚糖(CT-H)与低取代度硫酸酯化壳聚糖(CT-L)存在下, DNA 的紫外吸收光谱产生不同的增色效应和减色效应; 碱变性 pH 增大、发光体系稳定性增加; 金属阳离子  $Mg^{2+}$  可与 DNA 的磷酸基团产生弱静电相互作用。极微量硫酸酯化壳聚糖存在下, 荧光被有效地猝灭, 证明在 EB、CT-H 或 CT-L 和 DNA 之间产生了强的竞争键合作用, 表明不同硫酸酯化壳聚糖是一种有希望的基因治疗靶向分子。

**关键词** 硫酸酯化壳聚糖; 光谱分析; DNA; 嵌插作用

**中图分类号**: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)11-2294-05

### 引言

以核酸为靶分子的药物设计研究中, EB 是应用最早、最广泛的荧光探针<sup>[1-4]</sup>。由于 EB 与 DNA 的相互作用是以 DNA 为靶子的各种物质生物效应的分子基础, 其键合状态一方面可能是导致癌变、基因突变及细胞死亡的重要环节, 另一方面能够与 DNA 结合的物质分子正好是临床上广泛使用的抗癌药物。所以, 以 DNA 为靶分子的临床药物研究、结合其与 DNA 的作用机制的深入分析, 以期对药物分子的合理修饰、改造和抗癌药物设计方面有其特殊意义。

硫酸化多糖类药物抗病毒作用的研制始于 20 世纪 60 年代, 这些多糖除已发现的抗凝血作用外, 近年来不断发现具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗病毒作用等多种生理活性<sup>[5-8]</sup>, 其作用机制与干扰病毒和细胞的吸附、阻止病毒进入细胞、抑制逆转录酶活性、抑制合胞体有关。特别是 1987 年由联邦德国 Bayer 与 Hoechst 公司联合研制的抗爱滋病毒活性药物硫酸化木聚多糖( $M_r = 6\ 000$ )引起许多研究者极大兴趣, 使硫酸化多糖的研究成为多糖领域内的一个新热点。甲壳素广泛存在于甲壳纲动物的甲壳, 蟑螂等昆虫的表皮和藻类、菌类的细胞壁中, 年产量超过亿吨, 是仅次于纤维素的第二大天然高分子多糖。壳聚糖(CT)是甲壳素脱乙酰化产物, 临床医学实践表明, 低聚 CT 具有许多优于 CT

大分子的功能性质。有关药物与 DNA 作用机理已有少量报道, 但用光谱法研究硫酸酯化多糖与 DNA 相互作用机理至今未见报道。本文通过合成两种取代度不同的硫酸酯化壳聚糖, 研究了它们与 DNA 的相互作用机理, 可为临床药物设计及硫酸酯化多糖的开发提供一定的理论依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 主要仪器与试剂

F-4500 荧光光度计(日本日立公司); 756MC 型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器总厂), 722 型光栅可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂), PHS-3TC 精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司)。

CT-H, CT-L 本实验室制备, 鱼精 DNA, Sigma 公司产品, 紫外测定  $A_{260}/A_{280}$  大于 1.8, 符合要求, 未进一步纯化; EB 购自 Sigma 公司; 壳聚糖(DD 82%,  $\eta_{sp}/c = 1\ 500$  CP), 湖北宜昌东泰生物有限公司; 其他试剂皆为分析纯, 水为二次水。Britton-Robison 缓冲溶液: 取一定体积  $H_3PO_4$ , HAc,  $H_3BO_3$  (浓度相同, 均为  $0.04\ mol \cdot L^{-1}$ ) 混合溶液, 加入一定体积的  $0.2\ mol \cdot L^{-1}$  NaOH 调节至所需 pH。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 不同取代度硫酸酯化壳聚糖制备

低取代度硫酸酯化壳聚糖(CT-L, 取代度 0.49)制备<sup>[9]</sup>:

收稿日期: 2006-08-08, 修订日期: 2006-10-28

基金项目: 教育部博士点专项基金项目(20050561014), 山西省教委高等学校科技开发项目(20041245)和教育部归国留学人员科研启动基金(2005383)资助

作者简介: 张海容, 1957 年生, 忻州师范学院生化分析技术研究所教授 e-mail: biochem@xztu.edu.cn

15 mL 95% 浓硫酸, 加含 0.25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的正丁醇 5 mL 混合, 冷却到 0。加入 CT 粉末 0.5 g 保持 30 min。形成的产物为褐黄色糊状物, 用 NaOH 调至中性, 蒸馏水透析 2 d, 浓缩, 用乙醇沉淀, 真空干燥。

高取代度硫酸酯化壳聚糖(CT-H 取代度 0.92)制备<sup>[10]</sup>: (1) 磺化试剂, 4.5 mL  $\text{HClSO}_3$  在 0、氮气保护下, 滴加到 100 mL 二甲基甲酰胺中, 反应过程始终磁力搅拌。产物保存冰箱备用。(2) 取 0.304 0 g CT 于 20 mL 甲酰胺中, 搅拌 1 h 加入 8 g 磺化试剂, 50 反应 4 h, 20% NaOH 中和至 pH 6, 蒸馏水透析 3 d, 5 倍乙醇沉淀, 丙酮洗涤, 真空干燥。

### 1.2.2 DNA 和 EB 的配制

用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 配制  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  DNA 溶液( ) ; 用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液配制  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  DNA 溶液( )。用二次水配制  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  EB 溶液, 配制好的溶液置 4 冰箱保存备用。

### 1.2.3 CT-H, CT-L 对 DNA 紫外吸收光谱的影响

取 DNA 溶液( ) 1 mL, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.32) 2 mL 依次加入 10 mL 比色管中, 加入一定量的 CT-H, CT-L, 二次水稀释至刻度(定容后  $c_{\text{CT-H}}$ ,  $c_{\text{CT-L}}$  与  $c_{\text{DNA}}$  之比以  $R$  表示, 即  $R = c_{\text{CT-H}}/c_{\text{DNA}}$  或  $R = c_{\text{CT-L}}/c_{text{DNA}}$ ), 反应 2 h, 相应试剂空白作参比, 于 756MC 型紫外-可见分光光度计上扫描其紫外吸收光谱。

### 1.2.4 CT-H, CT-L 对碱变性曲线的影响

依次加入 10 mL 比色管中 DNA 溶液( ) 0.5 mL, EB 溶液 0.1 mL, 不同 pH 三酸缓冲液 5 mL, 二次水定容至刻度。固定最佳激发波长和最佳发射波长( $\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 593 \text{ nm}$ )测荧光强度。用相对荧光强度  $F_0/F$  ( $F_0$  表示不存在硫酸酯化壳聚糖时体系的荧光强度,  $F$  表示存在不同浓度硫酸酯化壳聚糖时体系的荧光强度)对 pH 作图, 得碱变性曲线。

### 1.2.5 DNA 和 EB 对 EB/DNA 体系吸收光谱的影响

取 DNA 溶液( ) 1 mL, EB 溶液 0.2 mL, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.32) 2 mL 依次加入 10 mL 比色管中, 分别加入  $R = 10$  的 CT-H, CT-L, 稀释至刻度, 反应 2 h, 相应试剂空白作参比, 在 722 可见分光光度计测不同波长时吸光度值。

### 1.2.6 CT-H, CT-L 对 EB/DNA 体系荧光强度的影响

取 DNA 溶液( ) 0.5 mL, EB 溶液 0.1 mL, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.32) 2 mL, 分别加入不同  $R$  的 CT-H, CT-L 溶液, 稀释至 10 mL 刻度, 反应 2 h, 在激发波长  $\lambda_{\text{ex}} = 522 \text{ nm}$ , 激发和发射带通均为 10 nm 的条件下, 扫描其发射光谱, 由 Stern-Volmer 方程作图, 观察 CT-H, CT-L 存在下, EB/DNA 体系荧光猝灭情况。

### 1.2.7 离子强度对硫酸酯化壳聚糖存在时 EB/DNA 体系荧光强度( $I_f$ )的影响

在 10 mL 比色管中, 加入 DNA 溶液( ) 0.5 mL, EB 溶液 0.1 mL, Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.32) 2 mL, 依次加入不同浓度的  $\text{MgCl}_2$  溶液, 二次水定容至刻度; 在 F-4500 上测定相应的  $I_f$  值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CT-H, CT-L 对 DNA 紫外光谱的影响

加入 CT-H, CT-L 后, DNA 体系的吸收光谱如图 1。CT-H, CT-L 对 DNA 吸收光谱产生了明显的增色效应, 同时最大吸收波长发生红移。根据 Long 理论, 增色效应, 最大吸收波长发生红移是该物质与 DNA 发生嵌插作用的标志<sup>[4]</sup>。明显的增色效应说明 CT-H, CT-L 与碱基对之间的距离很近, 即 CT-H, CT-L 可能插入到 DNA 的碱基对中, 从而引起 DNA 碱基对与嵌插的 CT-H, CT-L 分子间产生较强的电子相互作用。

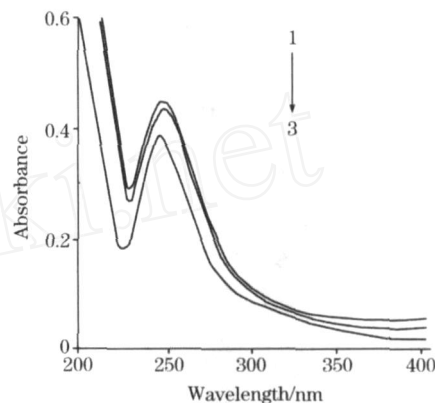


Fig 1 Effects of CT-H and CT-L on ultraviolet spectra of DNA

1: CT-H ( $R = 20$ ); 2: CT-L ( $R = 20$ ); 3: DNA

### 2.2 CT-H, CT-L 对碱变性曲线的影响

DNA 是双螺旋的大分子化合物, 既具有一定的刚性, 亦有一定柔性的不规则线型分子。分子中的两条链之间的碱基对通过氢键相互作用, 这种作用使 DNA 分子紧缩在一起。EB 本身的荧光很弱, 但能平行地插入双螺旋 DNA 内部碱基之间, 从而使荧光显著增强。当 DNA 分子处于碱性环境时, 互补碱基之间的氢键作用减弱而发生开链, 双螺旋结构被破坏, 成为两条单链, EB-DNA 刚性环境减弱, 荧光强度降低, 这就是 DNA 的碱变性。通常把 DNA 的双螺旋结构失去一半时的 pH 值称为该 DNA 的碱变性 pH 值(以  $\text{pH}_b$  表示)。当 CT-H, CT-L 与 DNA 发生嵌插结合时, 这种作用能使双螺旋结构稳定性增加, 并使  $\text{pH}_b$  增大。在 CT-H, CT-L 存在和不存在情况下, EB/DNA 碱变性曲线如图 2。由图 2 可见, 在 CT-H, CT-L 不存在情况下, DNA 的碱变性  $\text{pH}_b$  为 13.12, 而在 CT-H 存在下, 碱变性的  $\text{pH}_b$  增大为 13.27, 而 CT-L 存在对 DNA 的碱变性  $\text{pH}_b$  影响不大。这种现象说明 CT-H 与 DNA 的嵌插作用优于 CT-L, 使 DNA 双螺旋结构稳定性增加,  $\text{pH}_b$  增大。

### 2.3 DNA 和 EB 对 EB/DNA 体系吸收光谱的影响

体系中存在 CT-H, CT-L 时, EB/DNA 吸收光谱发生蓝移, 且 CT-H 有一定的增色效应(见图 3)。结果证实 CT-H 主要以嵌入方式与 DNA 结合<sup>[3]</sup>, CT-L 与 DNA 的作用方式

不同于 CT-H。

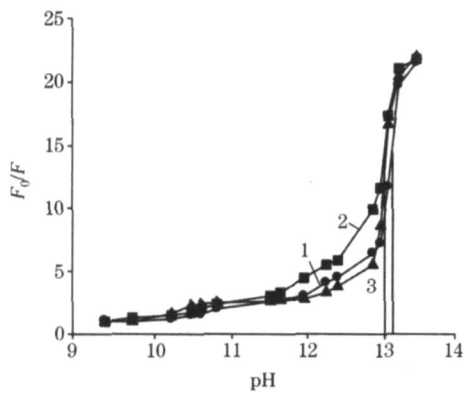


Fig 2 The alkaline denaturation curves of DNA in the presence of CT-H and CTF  
1: CT-H; 2: CT-L; 3: EB/DNA

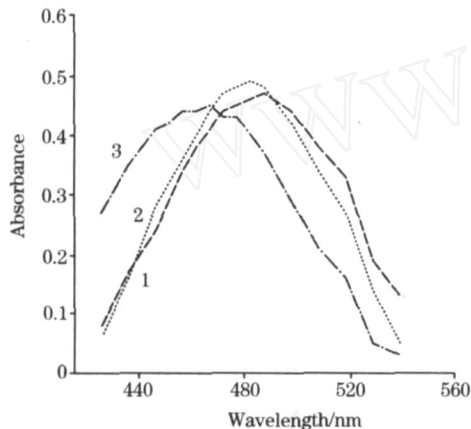


Fig 3 Absorption spectra of EB/DNA in the absence of and in the presence of CT-H ( $R=10$ ) and CTF ( $R=10$ )  
1: EB/DNA; 2: CT-H; 3: CTF

#### 2.4 CT-H, CTF 对 EB/DNA 体系荧光强度的影响

EB 是常用的 DNA 荧光探针, 能够显著增加体系的荧光强度。CT-H, CT-L 在  $\lambda_{ex} = 522 \text{ nm}$  处无荧光, 但在 EB/DNA 体系中加入 CT-H, CT-L, 荧光强度随 CT-H, CT-L 浓度的增加而迅速降低, 如图 4 所示。荧光强度减弱说明体系中加入少量的 CT-H, CT-L 时, 它们和 EB 争夺与 DNA 的结合位点或者使 DNA 的二级结构破坏。通常, EB/DNA 的荧光强度减弱 50%, 且  $R < 100$  时 ( $IC_{50}$ ), 就认为多糖与 DNA 发生了类似于 EB 的嵌插作用<sup>[3]</sup>。多糖存在与不存在时, EB/DNA 体系的最大发射波长没有发生变化, 其荧光强度随 R 的变化结果见图 4。

#### 2.5 $Mg^{2+}$ 及离子强度对 CT, CT-H 和 CTF 存在时 EB/DNA 体系 $I_f$ 的影响

图 5 是离子强度对 EB/DNA 荧光强度的影响。可见随离子强度的增加, EB/DNA 体系  $I_f$  明显减小。这种现象说明在 DNA 与小分子、离子之间的相互作用中, 静电引力仍是

主要的作用力。荧光减弱可能是由于阳离子  $Mg^{2+}$  容易与 DNA 的负离子磷酸基团作用, 静电引力使得 DNA 收缩, 同时结构特征发生变化, 其理化性质及生理功能发生相应的变化<sup>[2]</sup>。这种收缩使 DNA 分子不足以容纳 EB 分子, 结果 EB 便从 DNA 分子中游离出来, 荧光强度迅速降低。壳聚糖及其衍生物分子中有大量  $-NH_2$ ,  $-OH$  和  $-NHCO$  活性基团, 与  $Mg^{2+}$  配位后<sup>[11]</sup>, 对体系  $I_f$  的影响不同。实验进一步证实了静电作用是二者的作用模式之一。

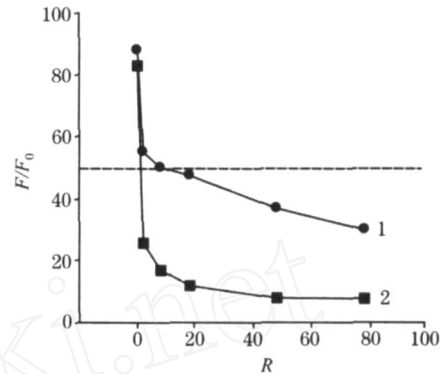


Fig 4 Effect of CT-H and CTF on fluorescence intensity of EB/DNA  
1: CT-H; 2: CTF

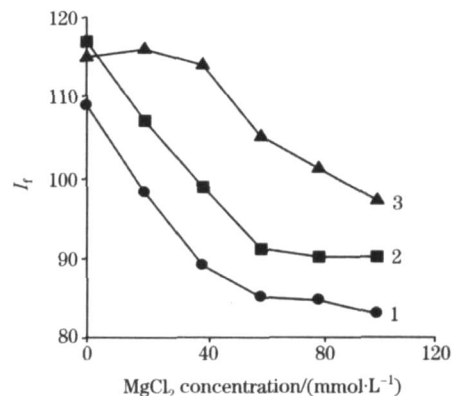


Fig 5 Salt effect of  $Mg^{2+}$  on the fluorescence intensity of EB/DNA in the absence of and in the presence of CT-H or CTF respectively  
1: CT-H; 2: CTF; 3: EB/DNA

#### 2.6 CT-H, CTF 对 EB/DNA 体系荧光猝灭

在一系列 EB/DNA 溶液中分别加入不同浓度的 CT-H, CT-L, 以相对荧光强度  $F_0/F$  对  $[CT-H]$  或  $[CT-L]$  作图, 得一直线。根据经典的荧光猝灭理论, 无论动态猝灭, 还是静态猝灭, 由 Stern-Volmer 方程作图均应得一直线, 而 CT-H, CT-L 对 EB/DNA 体系荧光猝灭均得一直线, 见图 6 (a) 和 (b)。因此, 我们认为 CT-H, CT-L 对 EB/DNA 体系荧光猝灭不是单纯的动态猝灭或静态猝灭, 这说明修饰多糖对 DNA 的作用方式可能不止一种, 除嵌插作用外还有静电作用<sup>[1]</sup>, 是二者共同作用的结果。

### 3 结 论

通过荧光光谱、吸收光谱、碱变性和荧光猝灭作用证实了两种硫酸酯化壳聚糖与 DNA 之间结合作用的复杂性,既有嵌插作用,又有静电作用。它们与 EB 和 DNA 之间存在较强烈的竞争反应。CT-H, CT-L 作用的结果使 EB 从 DNA 中

游离出来,导致体系荧光减弱。碱变性引起 CT-H p<sub>H<sub>b</sub></sub> 增加,表明 CT-H 对 DNA 构象产生一定的影响,并可以增加其稳定性。该工作为进一步筛选硫酸酯化多糖抗病毒、抗癌临床药物奠定了基础,从分子水平上探索药物与核酸作用机理提供了一项实验依据。

有关药物与 DNA 作用的研究,还可参阅文献[12-19]。

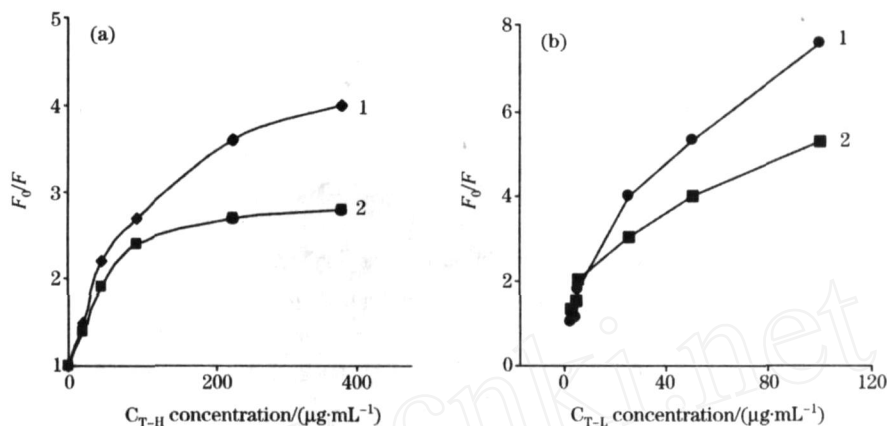


Fig 6 Fluorescence quenching of EB/DNA with CT-H (a) and CT-L (b)

1: 25 ; 2: 50

### 参 考 文 献

- [1] JIN Lan, YANG Pin, LI Qing-shan (靳 兰, 杨 频, 李青山). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 1996, 17 (9): 1345.
- [2] LI Lai-sheng, HUANG Wei-dong, WANG Li-ping, et al (李来生, 黄伟东, 王丽苹, 等). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2002, 60(1): 98.
- [3] LI Wen-you, ZHU Shou-tian, HE Xi-wen, et al (李文友, 朱守田, 何锡文, 等). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2002, 60(1): 105.
- [4] HE Ji-xiang, JIANG Chong-qiu, WANG Jin-shan (贺吉香, 江崇球, 王金山). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2002, 22(1): 103.
- [5] Chirkov S N. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002, 38(1): 1.
- [6] Xue C H, Fang Y, Lin H, et al. Journal of Applied Phycology, 2001, 13: 67.
- [7] Keisuke K. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59: 117.
- [8] Krishna A Gopala, Kumar D Vijay, Khan B M, et al. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1381: 104.
- [9] ZHANG Wei-jie (张惟杰). Biochemical Research Technology of Sugar Compound, 2nd ed. (糖复合物生化研究技术, 第2版). Hangzhou: Zhejiang University Press (杭州: 浙江大学出版社), 1999. 291.
- [10] Gamzazade A, Sklyar A, Nasibov S, et al. Carbohydrate Polymers, 1997, 34: 113.
- [11] WANG Ai-qin, ZHAO Pei-qing, GAO Xiao-jun, et al (王爱勤, 赵培庆, 高小军, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1999, 19(6): 817.
- [12] HU Min, ZHANG Zhen-xi, SHEN Guo-li, et al (胡 敏, 张镇西, 沈国励, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1668.
- [13] SHEN Jing-shan, SUN Dan-dan, FU Lian-chun, et al (沈景山, 孙丹丹, 付连春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 232.
- [14] JIA Mu-xin, QU Wen-wen, CHEN Guang-ju, et al (贾木欣, 曲文文, 陈光巨, 等). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2004, 25(8): 1481.
- [15] HUANG Su-lan, HAO Lan, TAN Hong-wei, et al (黄素兰, 郝 兰, 谭宏伟, 等). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2006, 27(3): 531.
- [16] ZHANG Hai-rong, WU Xiao-yan (张海容, 武晓燕). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 346.
- [17] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, et al (张海容, 郭祀远, 李 琳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 711.

- [18] WANG Ping-hong, ZHANG Qi, YUAN Wen-bing, et al(王平红, 张 歧, 袁文兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1298.
- [19] ZHANG Xiao-ming, LI Guo-xue, LI Dong-hao, et al(张晓明, 李国学, 李东昊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 517.

## Study on the Binding Mode of Sulfated Chitosans with Nucleic Acids Using Spectral Analysis

ZHANG Hai-rong<sup>1,2</sup>, GUO Si-yuan<sup>2</sup>, LI Lin<sup>2</sup>, CAI Miao-yan<sup>2</sup>, ZHENG Bi-sheng<sup>2</sup>

1. Institute of Biochemical Analysis, Xinzhou Teachers University, Xinzhou 034000, China

2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

**Abstract** The interaction of two kinds of sulfated chitosans with DNA was investigated using fluorescence spectra, absorption spectra, alkaline denaturation curves, ionic strength, fluorescence quenching etc. The results showed that there were two modes of the interaction between sulfated chitosans and DNA/ ethidium bromide (EB): intercalative and electrostatic binding. Hyperchromic and bathochromic effects in the absorption spectra were observed when sulfated chitosans with a low degree of substitution (CT-L) or a high degree of substitution (CT-H) were bound to herring sperm DNA. The stability of DNA/ EB was increased with the increase in alkaline denaturation pH in the presence of CT-H and CT-L. Meanwhile, a weak interaction of cationic  $Mg^{2+}$  and phosphate groups of DNA by electrostatic force binding was observed. The fluorescence was efficiently quenched in the presence of a micro-amounts of sulfated chitosans, which confirmed that there was a strong competitive binding interaction among EB, CT-H or CT-L and DNA. All of these demonstrated that different sulfated chitosans can be used as a type of hopeful target-pointed molecule of gene therapy.

**Keywords** Sulfated chitosans; Spectral analysis; DNA; Intercalative binding

(Received Aug. 8, 2006; accepted Oct. 28, 2006)