

荧光猝灭光谱法测定 DNA^①

韩木先 李小芬 邹欣平^②

(湖北师范学院化学与环境工程学院 湖北省黄石市磁湖路 11 号 435002)

摘要 利用荧光光谱法对 5-邻氯乙酰氧基苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉与脱氧核糖核酸(DNA)在不同条件下的荧光光谱特征进行了研究。实验表明,在低离子强度下,小牛胸腺 DNA 导致卟啉的荧光强度猝灭。在 pH4.4 的 B-R 缓冲介质中,荧光猝灭程度与小牛胸腺 DNA 的浓度呈线性关系,线性方程为 $\Delta F = 29.8C(\mu\text{g}/\text{mL}) - 1.17$,线性范围为 0—10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检出限为 1.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相关系数为 0.9949。对提取的植物基因组总 DNA 进行测试,由线性方程求得样品中的 DNA 含量。

关键词 5-邻氯乙酰氧基苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉;脱氧核糖核酸;荧光光谱法

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)03-1187-04

1 引言

卟啉是血红素、细胞色素和叶绿素等生物大分子的核心部分,卟啉金属配合物具有切割 DNA 和核酸酶的活性^[1,2],卟啉化合物还是 DNA 结构和动力学研究的非常好的探针。近年来,卟啉化合物与 DNA 作用成为研究的热点,主要原因是其连接的两个基本模式(内部催化和外部键合)可以作为抗癌药物与 DNA 作用的模型;很多抗病毒及抗细菌药物是通过切割细胞中病变的 DNA 起作用的,因此对卟啉化合物与 DNA 相互作用的认识有助于将卟啉及其金属配合物应用于医学上,如抑制艾滋病毒、流感病毒,以及光动力学治疗癌症等^[3]。

本文研究了 5-邻氯乙酰氧基苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉(简称 CIAOTPP)与 DNA 的相互作用, CIAOTPP 作为荧光探针,根据其荧光光谱的改变,研究了 CIAOTPP 与 DNA 相互作用机理,建立了通过荧光猝灭光谱法测定 DNA,并测定了植物样品中的 DNA 含量。

2 实验部分

2.1 实验仪器

970 CRT 型荧光分光光度计(上海仪器分析总厂);pH-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);AG 245 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);J-801 型圆二色谱仪(日本分光社)。

2.2 试剂药品

卟啉储备液(9.2×10^{-4} mol/L),置于 0—4℃ 冰箱内保存;DNA 储备液置于 0—4℃ 冰箱内保存;B-R 缓冲溶液(pH 2.1—5.0);TE 缓冲液(1.0×10^{-3} mol/L 的 Tris-HCl, 1.0×10^{-3} mol/L 的 EDTA, pH 8.0);N,N-二甲基甲酰胺(DMF,分析纯),所用试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏

① 湖北师范学院研究生启动基金(2007D37)

② 联系人,手机:(0)15072074352;E-mail:nicexh@163.com

作者简介:韩木先(1977—),女,湖北省黄冈市人,实验师,硕士,主要从事光谱分析及其他仪器分析方法的研究和应用工作。

水。经检验均无荧光本底值。

3 结果与讨论

3.1 CIAOTPP 的激发光谱和发射光谱

在 10.0mL 比色管中加入 1.0mL CIAOTPP 溶液,用 1.0mL DMF 稀释,再加入 1.0mL DNA 溶液、1.0mL B-R 缓冲溶液,最后用 DMF 定容至 5.0mL,静置 15min 后,在 970 CRT 荧光分光光度计上,于室温条件下,用 1cm 石英比色皿,光谱通带宽度 $E_x/E_m = 10\text{nm}/10\text{nm}$ 进行发射光谱和激发光谱的扫描,测量其荧光强度,测得发射波长为 656nm,激发波长为 519nm。CIAOTPP 的激发光谱(E_x)和发射光谱(E_m)见图 1。

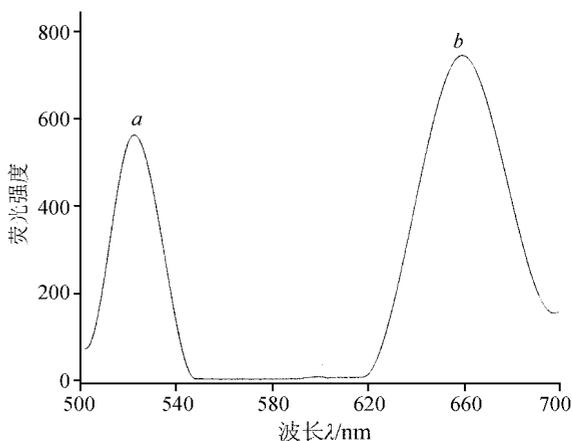


图 1 CIAOTPP 的激发光谱和发射光谱
a——激发光谱($\lambda = 519\text{nm}$); b——发射光谱($\lambda = 656\text{nm}$)。

3.2 圆二色谱的研究

将小牛胸腺 DNA 与叶啉在 0—4℃ 冰箱中存放 12h 后,测 CD 谱,结果见图 2。由图 2 可知,在 DNA 与 DNA + CIAOTPP 体系中,当加入 CIAOTPP 后,小牛胸腺 DNA 的 CD 谱基线向负移动,正峰由 236.7nm 处的 26.2 降低为 237.9nm 处的 23.4,负峰由 238.8nm 处的 -12.0 升高为 238.7nm 处的 -7.8,正负峰之间的差值减小,由 38.2 减小到 31.2,但波峰的位移几乎不变,这说明 DNA 的结构没有发生变化, CIAOTPP 在 DNA 表面长距组装,引起 CIAOTPP 荧光强度的猝灭。

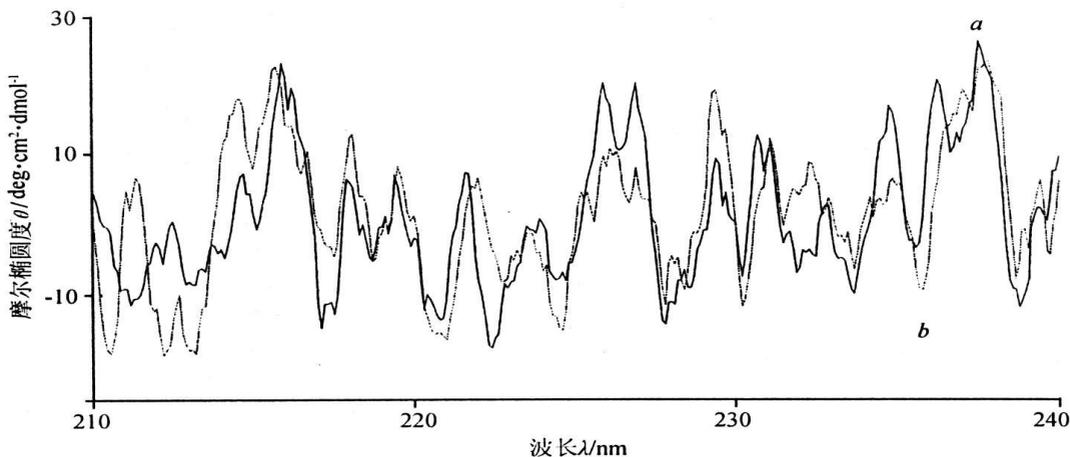


图 2 CIAOTPP 与 DNA 相互作用的 CD 图谱
a——DNA; b——DNA + CIAOTPP。

3.3 酸度对 CIAOTPP 荧光强度的影响

实验了不同缓冲体系及 pH 值对 CIAOTPP 的荧光强度的影响。结果发现,当 pH 值大于 7.0 时,所配溶液中有沉淀出现,当 pH 值在 2.1—5.0 时, CIAOTPP 的相对荧光强度比较稳定,荧光值相差不大,且在碱性条件下 CIAOTPP 会析出沉淀。这是因为在碱性条件下, CIAOTPP 在 DMF 和 B-R 溶液中的溶解度很小,故以分子形式析出。这说明, CIAOTPP 只有在酸性条件下才能表现出它的荧光光谱特征。

3.4 酸度对 CIAOTPP 和 DNA 体系荧光强度的影响

实验了一系列 pH 2.1—5.0 的 B-R 缓冲介质中的 CIAOTPP, 当加入 DNA 后, 发现 CIAOTPP 的荧光强度减弱。用一系列的 B-R 缓冲溶液进一步实验酸度对 CIAOTPP-DNA 体系荧光强度的影响, 只有当 pH 4.4 时, 随着 DNA 浓度的增加, 其荧光强度呈线性减弱且最佳激发波长和发射波长不变, 基于此建立了具有较高准确度和操作简单的 DNA 定量的分析方法。

3.5 缓冲溶液用量的影响

实验了 B-R 缓冲溶液对体系的影响。在选定激发波长为 519nm, 发射波长为 656nm 处, 固定 CIAOTPP 和 DNA 浓度, 改变 B-R 缓冲溶液的用量, 研究发现, B-R 缓冲溶液用量超过 2.0mL 时, CIAOTPP 即会沉淀析出。实验根据需要选 1.0mL 作为实验用量。

3.6 体系的稳定性检验及溶液加入顺序的影响

在室温下, CIAOTPP 与 DNA 之间的反应能较快的发生, 15min 内荧光强度达到稳定, 至少稳定 24h, 本实验均在溶液配制放置 15min 后测定其荧光强度。在上述最佳实验条件下, 研究了试剂添加顺序对体系荧光强度的影响, 结果表明, 按缓冲溶液、CIAOTPP、DNA 的加入顺序和按缓冲溶液、DNA、CIAOTPP 的加入顺序时, 体系荧光强度变化甚微, 当按 CIAOTPP、DNA、缓冲溶液的加入顺序时, 荧光强度明显大于前两者, 实验过程中采用 CIAOTPP、DNA、缓冲溶液的加入顺序。

3.7 金属离子对 CIAOTPP-DNA 体系荧光强度的影响

在 pH 4.4 的条件下, 测定了加入金属离子对 CIAOTPP-DNA 体系荧光强度的影响。在 4 支 10.0mL 比色管中分别加入等量的 CIAOTPP、DNA 溶液以及 B-R 缓冲溶液, 其中 1 支比色管不加金属离子溶液, 另 3 支比色管中分别加入 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Na^+ , 110.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 K^+ , 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cu^{2+} 溶液各 1.0mL, 然后用 DMF 稀释至 5.0mL, 摇匀, 在 $E_m = 656\text{nm}$, $E_x = 519\text{nm}$ 处进行荧光扫描。结果表明, 加入 Na^+ 时, 荧光强度几乎不变, K^+ 则使体系荧光增强, 而 Cu^{2+} 则导致体系荧光强度降低。这是因为金属离子与卟啉配位后, 卟啉环电子云密度分布有所改变, 使某些能级位置发生偏移, 导致其相对荧光强度有所改变。荧光强度的改变多少与卟啉中心体系和中心离子之间相互作用的强弱有关。

3.8 背景值和校准曲线

移取一定量的 CIAOTPP 溶液并用缓冲溶液调节 pH 值到 4.4, 再用 DMF 定容至 5.0mL, 测定其背景值, 平行测定 6 次。取 6 支 10.0mL 比色管并编号, 移取 1.0mL 的缓冲溶液, 按照一定的梯度往 6 支比色管中加入不同浓度体积的 DNA 溶液, 再分别加入 1.0mL CIAOTPP 溶液, 用 DMF 定容至 5.0mL。调节 $\lambda_{ex} = 519\text{nm}$, $\lambda_{em} = 656\text{nm}$, 狭缝通带宽度 $E_x/E_m = 10\text{nm}/10\text{nm}$, 放大倍率为 100, 作校准曲线。回归方程: $\Delta F = 29.8C(\mu\text{g}/\text{mL}) - 1.17$, 线性范围为 0—10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 1.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相关系数为 0.9949。

3.9 实际样品的测定

对提取的植物基因组总 DNA 进行测试。利用本方法在最佳实验条件下, 做干扰实验, 根据 K^+ 、 Na^+ 实验允许量和最佳实验条件, 选择测定实际样品的工作条件为: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白 (BSA), 22.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ K^+ , 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Na^+ 。

根据文献[4]提取出植物基因组总 DNA 作为测试的样品。测试时, 用 0.05mol/L 的氯化钠溶液溶解配制溶液, 在选择测定实际样品的工作条件下, 测定样品中的荧光强度 I_F , 由线性方程求得样品中的 DNA 含量, 结果见表 1。

表 1 样品的测定结果

样品	加入的核酸量 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$ 与 干扰成分	测量值 ($n=5, \mu\text{g}/\text{mL}$)					相对标准偏差 (%)
植物基因组总 DNA	—	5.65	5.59	5.55	5.55	5.62	0.8
ctDNA	2.0/A	2.01	2.01	2.06	2.10	2.03	1.8

注: $C(\text{卟啉}) = 1.1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$; $\text{pH} = 4.4$; A: $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, K^+ 为 $22.0 \mu\text{g}/\text{mL}$; Na^+ 为 $20.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4 结论

生物体系中存在不同种类的 DNA, 研究 DNA 与卟啉化合物的相互作用有助于寻求特殊功能的卟啉化合物。通过圆二色谱, 初步探讨了 DNA 对 CIAOTPP 荧光猝灭的反应机理、结合模式。探讨了金属离子对 CIAOTPP-DNA 体系荧光强度的影响, 得出了 DNA 对 CIAOTPP 荧光猝灭的线性回归方程、检出限、相关系数。对提取的植物基因组总 DNA 进行测试, 相对标准偏差在误差范围内。

参考文献

- [1] Li D, Etemad-Moghadam G, Meunier B. Oxidative Cleavage of DNA Mediated by Hybrid Metalloporphyrin-Ellipticine Molecules and Functionalized Metalloporphyrin Precursors[J]. *Biochemistry*, 1990, **29**(34): 7868—7875.
- [2] Fiel R J, Beerman T A, Mark E H *et al.* DNA Strand Scission Activity of Metalloporphyrins[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, **107**(3): 1067—1074.
- [3] 冀海伟, 刘道杰. 卟啉试剂 DNA 检测中的应用[J]. *化学试剂*, 2005, **27**(2): 83—87.
- [4] 王建波, 方呈祥, 鄢慧民等. 遗传学实验教程[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004. 123—124.

Determination of DNA by Fluorescence Quenching Spectrometry

HAN Mu-Xian LI Xiao-Fen ZOU Xin-Ping

(College of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, P. R. China)

Abstract The fluorescence spectral characteristics of 5-*o*-chloroavetylonylphenyl-10, 15, 20-triphenylporphyrin and DNA were investigated under different conditions by fluorescence spectrometry. The results indicated that under the low ion strength condition, calf thymus DNA (ctDNA) quenched the fluorescent intensity of porphyrin. In the pH 4.4 B-R buffer solution, there was linear relationship between the degree of fluorescence quenching and the concentration of ctDNA, and the linear equation was $\Delta F = 29.8C(\mu\text{g}/\text{mL}) - 1.17$ with the relative coefficient of 0.9949. The linear range was 0— $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, and the limit of detection (LOD) was $1.22 \mu\text{g}/\text{mL}$. The extraction of total DNA of plant was determined, then the contents of DNA in samples were obtained from linear equation.

Key words 5-*o*-Chloroavetylonylphenyl-10, 15, 20-Triphenylporphyrin; DNA; Fluorescence Spectrometry