

姜黄素-La³⁺-CTMAB-核酸体系的荧光增强效应及其应用

王峰*¹ 黄薇¹ 唐波²

¹(枣庄学院化学化工系, 枣庄 277160)

²(山东师范大学化学化工与材料科学学院, 济南 250014)

摘要 研究了镧离子(La³⁺)-姜黄素(CU)-十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)-核酸荧光增强体系。建立了测定核酸的新方法。体系的最优条件为: 六次甲基四胺(HMTA)-HCl缓冲溶液(pH 5.80)中, 1.00 × 10⁻³ mol/L 阳离子表面活性剂CTMAB存在下, 姜黄素浓度为2.00 × 10⁻⁵ mol/L, La³⁺的浓度为1.40 × 10⁻⁴ mol/L时, 核酸能增强La³⁺-CU络合物的荧光强度, 而且体系荧光的增强程度与核酸的加入量在一定范围内呈线性关系。fs-DNA, ctDNA和yRNA线性范围分别为7.00 × 10⁻⁴ ~ 10.00 mg/L, 4.00 × 10⁻⁴ ~ 10.00 mg/L和7.00 × 10⁻⁴ ~ 10.00 mg/L; 检出限分别为0.17 μg/L和0.14 μg/L。与已报道的核酸的分析方法相比, 本方法具有较宽的线性范围和较高的灵敏度。研究表明, 核酸对体系荧光的增强源于DNA主链上PO₄³⁻与CU之间的静电结合, 以及通过氢键和疏水力进行的沟槽式结合, 为探针分子提供了疏水性的微环境, 降低了体系的非辐射能量损失, 使体系的荧光强度增加。

关键词 姜黄素; 镧; 核酸; 十六烷基三甲基溴化铵; 荧光

1 引言

核酸是重要的遗传物质, 对其研究是生物学、医学等学科中最活跃的领域之一。核酸的定量测定在核酸生物化学、药学及食品等学科中有重要意义。探针技术是研究核酸的重要手段。目前, 对核酸的定量分析方法有分子光谱(吸收光谱^[1]、荧光光谱^[2~4]、化学发光^[5,6]和共振光散射^[7]等)探针、电化学探针^[8,9]等。其中研究最多、应用最广的是分子光谱探针, 特别是荧光分析法由于其方法简单、灵敏度高等优点已成为研究生物大分子的重要手段^[10]。

姜黄是传统常用中药, 是姜科植物姜黄的根茎, 是一种酚性色素。姜黄素(Curcumin, CU)是其主要成分, 也是咖喱、芥末的主要黄色色素, 生活中可作为调料、食品染色剂等。它的药理作用广泛, 主要特性为抗炎、抗氧化和抗肿瘤, 是有效的抗致突变剂和抗致癌剂^[11,12]。其结构式为:



采用荧光探针检测多种核酸已有较多的报道^[13~17]。本实验研究发现, 在pH = 5.80的六次甲基四胺(HMTA)-HCl溶液中, 阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)存在下, 核酸能明显增强La³⁺-CU络合物的荧光强度。在最佳实验条件下, 其荧光增强程度与核酸的浓度在一定范围内呈线性关系。本方法简单易操作, 灵敏度高, 是一种快速检测痕量核酸的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-4600 荧光分光光度计(日本日立公司); UV-2401PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); pHS-3C 型酸度计(上海雷磁公司)。

0.1 g/L 酵母核糖核酸储备液(yRNA, 中科院上海生物化学研究所, UV光谱测定 $A_{260}/A_{280} = 2.1$): 准确称取yRNA 0.0100 g于小烧杯中, 用0.05 mol/L NaCl溶解, 转至100 mL容量瓶中, 用0.05 mol/L NaCl定容。使用时用水逐级稀释。

鲑鱼精子脱氧核糖核酸(fsDNA), 小牛胸腺脱氧核糖核酸(ctDNA), 均购自北京华美生物工程公

2011-06-29 收稿; 2011-08-24 接受

本文系山东省自然科学基金资助项目(No. Y2008B36)

* E-mail: wf3786621@163.com

司, 浓度 0.1 g/L, 配制同 yRNA。

1.00 mmol/L 姜黄素 (CU) 溶液: 准确称取姜黄素 0.0368 g 于小烧杯中, 用无水乙醇溶解后转移至 100 mL 容量瓶中, 定容。

1.00 × 10⁻² mol/L La³⁺ 标准溶液: 准确称取 0.1629 g La₂O₃ (含量大于 99.99%, 中国医药集团上海化学试剂公司), 用适量 HCl (1: 1) 溶解, 并小心加热至近干, 再用蒸馏水稀释, 转移至 100 mL 容量瓶中定容。使用时用水稀释至所需浓度。以上试剂置于 0 ~ 4 °C 冰箱中保存。

HMTA 缓冲溶液: 0.15 mol/L 六次甲基四胺溶液与 0.50 mol/L HCl 按一定比例混合, 配成不同 pH 值的缓冲溶液。

1.00 × 10⁻² mol/L 十六烷基三甲基溴化铵 (CTMAB): 准确称取 0.9113 g CTMAB 于小烧杯中, 用水溶解后转移至 250 mL 容量瓶中, 定容。所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入 1.00 mL HMTA-HCl 缓冲溶液 (pH 5.80)、0.20 mL 1.00 mmol/L 姜黄素溶液、适量核酸溶液、1.40 mL 1.00 mmol/L La³⁺ 标准溶液、1.00 mL 0.01 mol/L CTMAB 溶液, 以水稀释至刻度并摇匀, 放置 15 min 后, 以 λ_{ex}/λ_{em} = 416 nm/499 nm 在荧光分光光度计上测量体系加入核酸前后的荧光强度 (ΔI_f = I_f - I₀)。I₀ 和 I_f 分别表示加入核酸前后的荧光强度 (狭缝宽度为 10 nm)。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱

从图 1 可见, 姜黄素在 530 nm 处有微弱的荧光, La³⁺ 和 CTMAB 的加入可使姜黄素的荧光增强, 且发射波长发生蓝移。而核酸能使 CU-La³⁺-CTMAB 体系的荧光强度发生较大的增强, 并且最大发射波长蓝移至 499 nm。此现象表明, CU-La³⁺, CTMAB 和核酸之间发生了相互作用。本实验选择 fsDNA 为代表, 激发波长为 416 nm, 发射波长为 499 nm 进行研究。

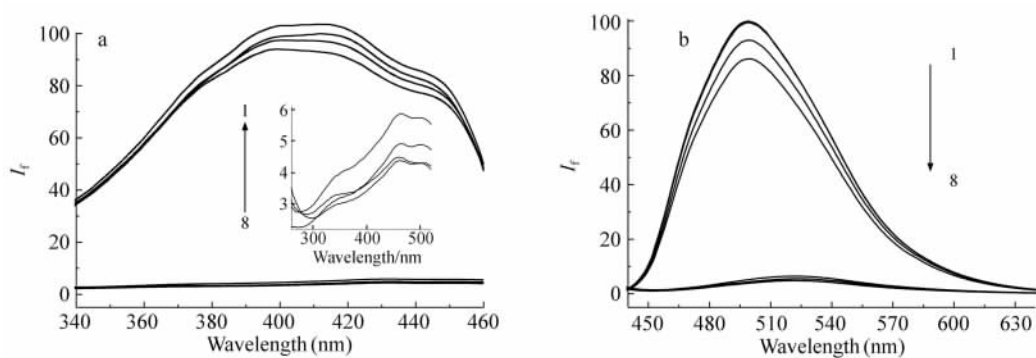


图 1 体系的荧光光谱 (a 激发光谱 (λ_{em} = 499 nm) 和 b 发射光谱 (λ_{ex} = 416 nm))

Fig. 1 Excitation spectra (a) (λ_{em} = 499 nm) and emission spectra (b) (λ_{ex} = 416 nm)

1. Curcumin (CU)-CTMAB-fsDNA; 2. CU-La³⁺-CTMAB-fsDNA; 3. CU-CTMAB; 4. CU-La³⁺-CTMAB; 5. CU-fsDNA; 6. CU-La³⁺-fsDNA; 7. CU-La³⁺; 8. CU. pH 5.80; fsDNA: 2 mg/L; CU: 2.00 × 10⁻⁵ mol/L; CTMAB: 1.00 × 10⁻³ mol/L; La³⁺: 1.40 × 10⁻⁴ mol/L.

3.2 溶液酸度与缓冲溶液的影响

溶液 pH 值对体系荧光强度的影响见图 2, 当溶液 pH = 5.80 时, 体系的荧光增强程度达到最大。

固定 pH = 5.80, 研究了不同种类的缓冲溶液 HMTA-HCl, Tris-HCl, BR, Na₂HPO₄-柠檬酸, KH₂PO₄-NaOH 和柠檬酸-柠檬酸钠对体系荧光增强程度的影响分别为 100, 66.5, 80.7, 73.9, 61.0 和 84.4。结果表明, HMTA-HCl 缓冲的效果最好。本研究采用 1.00 mL HMTA-HCl 缓冲溶液。

3.3 金属离子的选择

研究了不同金属离子对体系荧光增强程度的影响如表 1 所示。在本体系中分别加入各种金属离子, 发现 La³⁺, Sm³⁺, Dy³⁺, Y³⁺ 和 Gd³⁺ 都能促进体系荧光的增强, 其中 La³⁺ 的增强效应最大。因而选择

La^{3+} 作为荧光增强离子。

表1 金属离子对体系荧光增强程度的影响

Table 1 Effects of metal ions on the enhancement fluorescence intensity

Metal ions	La^{3+}	Sm^{3+}	Dy^{3+}	Y^{3+}	Gd^{3+}	无 Without
ΔI_f	100	54.84	45.16	63.23	32.90	34.98

La^{3+} 的浓度对体系荧光强度的影响如图3所示。当 La^{3+} 的浓度为 1.40 mmol/L 时,体系的荧光增强程度达到最大值。

3.4 姜黄素、表面活性剂的影响

姜黄素的浓度对体系荧光强度的影响如图4所示, CU 的浓度在 2.00×10^{-5} mol/L 时体系的荧光增强程度最大。

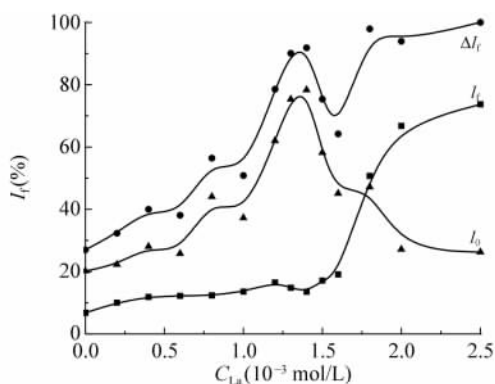


图3 La^{3+} 浓度对体系荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of concentration of La^{3+} on fluorescence intensity

CU: 2.00×10^{-5} mol/L; CTMAB: 1.00×10^{-3} mol/L; pH = 5.80 hexamethylenetetramine(HMTA)-HCl; fsDNA: 2 mg/L.

不同表面活性剂对体系的荧光强度的影响如表2所示。结果表明,CTMAB 能使体系的荧光强度增强最大并具有较好的稳定性。

表2 不同表面活性剂对体系荧光增强程度的影响

Table 2 Effect of surfactants on fluorescence intensity

Surfactants	CTMAB	SDBS	SDS	CPB	OP
ΔI_f	100	27.2	24.4	34.4	26.1

CTMAB 的浓度对体系荧光强度的影响如图5所示。当 CTMAB 的浓度在 1.00 mmol/L 时,体系的荧光增强程度最大。故实验中选取 1.00 mmol/L CTMAB 作进一步研究。

在最佳实验条件下,对体系的荧光强度在 2 h 内基本保持不变。结果表明,本体系不需要孵育,体系具有很好的稳定性。

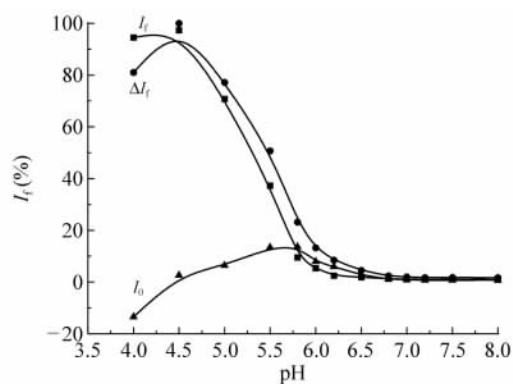


图2 溶液 pH 值对体系荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of pH on fluorescence intensity

CU: 2.00×10^{-5} mol/L; La^{3+} : 1.40×10^{-4} mol/L; CTMAB: 1.00×10^{-3} mol/L; fsDNA: 2 mg/L.

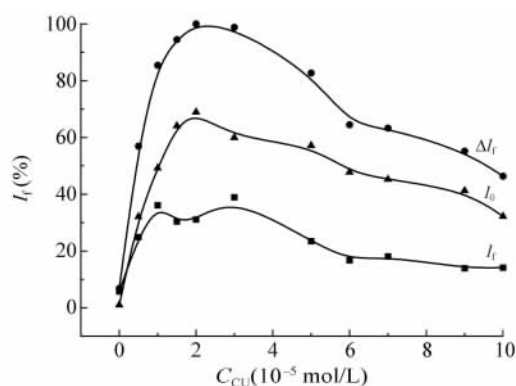


图4 CU 浓度对体系荧光强度的影响

Fig. 4 Effect of concentration of CU on fluorescence intensity

La^{3+} : 1.40×10^{-4} mol/L; CTMAB: 1.00×10^{-3} mol/L; pH = 5.80 HMTA-HCl; fsDNA: 2 mg/L.

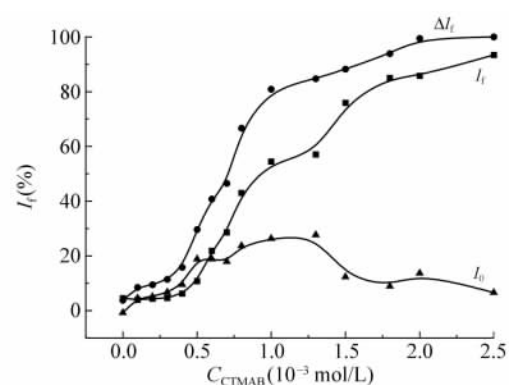


图5 CTMAB 浓度对体系荧光强度的影响

Fig. 5 Effect of concentration of CTMAB on fluorescence intensity

La^{3+} : 1.40×10^{-4} mol/L; CU: 2.00×10^{-5} mol/L; pH = 5.80 HMTA-HCl; fsDNA: 2 mg/L.

3.5 干扰离子的影响

在最佳实验条件下, 固定 fsDNA 的浓度为 0.01 mg/L, 对体系可能共存的阳离子、阴离子、氨基酸等多种物质的干扰情况进行了考察, 结果如表 3 所示。除了 BSA 和 L-色氨酸外, 大部分的氨基酸和常见离子对体系的荧光强度基本无影响。

表 3 常见离子和氨基酸对体系荧光强度的影响

Table 3 Interference from foreign substances

Foreign substances	Concentration (10 ⁻⁷ mol/L)	ΔI _f (%)	Foreign substances	Concentration (10 ⁻⁷ mol/L)	ΔI _f (%)	Foreign substances	Concentration (10 ⁻⁷ mol/L)	ΔI _f (%)
NH ₄ ⁺ , Cl ⁻	10	-4.6	K ⁺ , NO ₃ ⁻	10	-3.7	葡萄糖 Glucose	10	+3.1
Ca ²⁺ , Cl ⁻	20	-2.2	α-Leucine	10	-1.4	蔗糖 Sucrose	10	-5.0
Fe ³⁺ , SO ₄ ²⁻	20	+3.8	L-α-Alacine	10	+1.8	果糖 Fructose	20	-1.0
Mn ²⁺ , SO ₄ ²⁻	20	-2.4	L-Arginine	20	-5.0	BSAa	5	-4.6
K ⁺ , Cl ⁻	10	-5.0	α-Proline	20	-2.7	Adenosine diphosphate	10	-5.0
Zn ²⁺ , Cl ⁻	10	+1.7	L-Tryptophane	0.02	-4.2	Uridine triphosphate	5	-3.7
Na ⁺ , SO ₄ ²⁻	40	-4.6	L-Asparagine	2	-3.2	Disodium 5'-guanylate	10	-4.1
Cu ²⁺ , Cl ⁻	20	+1.1	L-Glutamic acid	4	+1.2	核糖 Ribose	5	4.9

Conditions: pH=5.80; HMTA: CU: 2.00 × 10⁻⁵ mol/L; CTAB: 1.00 × 10⁻³ mol/L; La³⁺: 1.40 × 10⁻⁴ mol/L; fsDNA: 1.00 × 10⁻² mg/L.

3.6 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下, 按照操作步骤测定核酸的工作曲线和检出限, 其结果如表 4 所示。与其它大多数传统检测核酸的荧光法相比^[11-17], 本方法具有较高的灵敏度。

表 4 本方法的分析参数

Table 4 Analytical parameters of this method

核酸 Nucleic acids	线性范围 Linear range (mg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit (μg/L)
fsDNA	7.00 × 10 ⁻⁴ ~ 10.00	ΔI _f = 116.9C + 65.21	0.9983	0.17
yRNA	7.00 × 10 ⁻⁴ ~ 10.00	ΔI _f = 177.1C + 121.5	0.9989	0.02
ctDNA	4.00 × 10 ⁻⁴ ~ 10.00	ΔI _f = 71.97C + 72.50	0.9989	0.14

3.7 实际样品分析

实际样品是在酵母菌液中用稀碱法制得。在酵母菌液中加入适量 NaOH 溶液, 使细胞壁变性, 将 RNA 从细胞内释放出来, 以酸中和, 除去菌体。用标准加入法对其含量进行了测定, 并将结果与利用紫外吸收法测得的含量相比较, 本方法和紫外吸收法检测结果分别为 33.1 g/L (RSD = 2.2%, n = 5) 和 32.5 g/L (RSD = 2.2%, n = 5)。两种方法的结果相符。

3.8 体系反应机理探讨

3.8.1 共振光散射光谱 共振光散射是源于等波长入射光束激发散射粒子而产生的, 其强度与颗粒大小成正比。体系的共振光散射光谱 (RLS) 如图 6 所示。当 La³⁺, fsDNA 和 CTMAB 加入到 CU 体系时, 体系的共振光散射强度明显增加, 并且 La³⁺-CU-CTMAB-fsDNA 体系的共振光散射强度远大于其它体系的共振光散射强度, 这表明在这 4 种物质之间存在较强的相互作用, 可通过静电引力和疏水作用形成大的 La³⁺-CU-CTMAB-fsDNA 络合物。从姜黄素的分子结构可见, 其链中带 2 个羰基, 2 个苯环上各含有 1 个甲氧基和 1 个羟基, 属于 β-二酮类化合物, 因

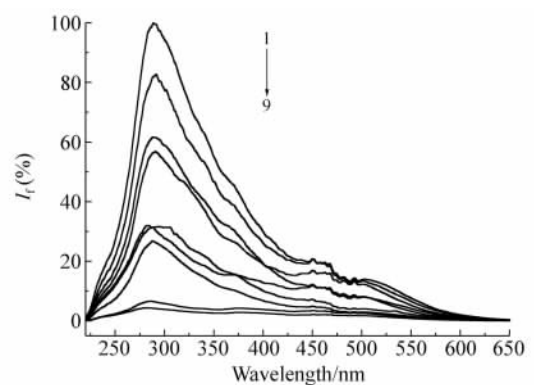


图 6 共振光散射光谱

Fig. 6 Resonance light scattering spectra

1. La³⁺-CU-CTMAB-fsDNA; 2. La³⁺-CU-CTMAB-ctDNA; 3. La³⁺-CU-CTMAB-yRNA; 4. La³⁺-CU-fsDNA; 5. La³⁺-CU-CTMAB; 6. La³⁺-CU; 7. CU-CTMAB-fsDNA; 8. CU-fsDNA; 9. CU.

此可与稀土金属离子 La^{3+} 配位形成 La^{3+} -CU 配合物。由等摩尔比法测定络合物中 La^{3+} -CU 的组成为 1 : 1。因此,本体系中 CU 与 La^{3+} 结合成了 1:1 的络合物,导致荧光增强。

3.8.2 离子强度的影响 小分子探针与核酸的非共价结合主要包括静电式、插入式和沟槽式 3 种结合方式。静电式结合会随着盐浓度的增大而静电作用被屏蔽,作用力减小;在插入式结合中,小分子插入到 DNA 相邻碱基对之间;而在沟槽式结合中,小分子探针结合在 DNA 双螺旋的沟槽内。由于碱基的屏蔽作用,插入式结合的小分子探针相对沟槽式结合来说,对环境条件的变化不敏感^[18]。本实验测定了溶液的盐浓度对体系荧光强度的影响,如图 7 所示。结果表明,随着 NaCl 浓度的增大,体系的荧光强度逐渐升高;当 NaCl 的浓度为 0.5 mol/L 时,荧光最强;随后浓度增加反而下降。由于盐浓度的变化对本体系的荧光强度有明显影响,故 La^{3+} -CU 与 fsDNA 之间可能存在着沟槽式结合。NaCl 中的 Na^+ 能与 DNA 主链上的 PO_4^{3-} 通过静电作用形成阳离子氛,从而使 La^{3+} -CU 分子远离 fsDNA 双螺旋的沟槽,并导致体系荧光强度的降低。此外,盐浓度的升高将会引起 DNA 结构紧缩,使 DNA 双螺旋沟槽的疏水性增加,导致 La^{3+} -CU-fsDNA 体系的荧光强度升高^[19]。从图 7 可知,NaCl 浓度在 0.01 ~ 0.5 mol/L 之间时,后者的影响大于前者,因而体系的荧光强度随盐浓度的升高而增大。而高浓度的 NaCl (>0.5 mol/L) 则对 La^{3+} -CU-fsDNA 体系的荧光有猝灭作用,因而体系的荧光反而降低。

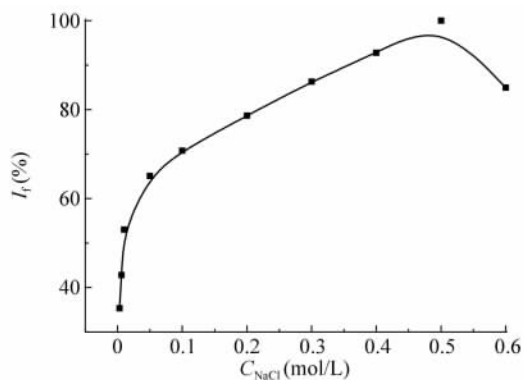


图 7 盐浓度对体系荧光强度的影响

Fig. 7 Effect of salt concentration on fluorescence intensity
pH=5.80; CU: 2.00×10^{-5} mol/L; La^{3+} : 1.40×10^{-4} mol/L;
CTMAB: 1.00×10^{-3} mol/L; fsDNA: 2 mg/L.

References

- SHEN Tong, WANG Jing-Yan. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 1990: 347
沈 潼, 王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990: 347
- Rye H S, Dabora J M, Quesada M A, Mathies R A, Glazer A N. *Anal. Biochem.*, 1993, 208(1): 144 ~ 150
- ZHANG Ying-You, LI Hai-Long, SUN Xu-Ping. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2011, 39(7): 998 ~ 1002
张瑛洵, 李海龙, 孙旭平. 分析化学, 2011, 39(7): 998 ~ 1002
- Kumar C V, Asuncion E H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115(19): 8547 ~ 8553
- Yi L, Zhao H C, Sun C Y, Chen S V, Jin L P. *Spectrochim. Acta A*, 2003, 59(11): 2541 ~ 2546
- Li Y X, Zhu C Q, Wang L, Li D H, Xu J G. *Mikrochimica Acta*, 2003, 143(1): 19 ~ 24
- Pastmack R F, Colling P J. *Science*, 1995, 269(5226): 935 ~ 939
- Wang H S, Ju H X, Chen H Y. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461(2): 243 ~ 250
- Ye B X, Wang C H, Jing A H. *J. Chinese Chemical Society*, 2003, 50(3A): 457 ~ 464
- CHEN Zhen-Zhen, ZHANG Ning, ZHANG Wen-Shen, TANG Bo. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2006, 34(9): 1341 ~ 1347
陈蓁蓁, 张 宁, 张文申, 唐 波. 分析化学, 2006, 34(9): 1341 ~ 1347
- Huang M T, Lou Y R, Ma W, Newmark H L, Reuhl K R, Conney A H. *Cancer Res.*, 1994, 54(22): 5841 ~ 5847
- Mehta K, Pantazis P. *Anticancer Drugs*. 1997, 8(5): 470 ~ 481
- Li D H, Chen X L, Fang Y, Xu J G. *Analyst*, 2001, 126(4): 518 ~ 522
- Juskowiak B, Grzybowski I, Galezowska E, Takenaka S. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 512(1): 133 ~ 139
- Lin C G, Yang J H, Wu X, Zhang G L, Lin R T, Cao X H, Han R J. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 403(1-2): 219 ~ 224
- Ling L S, He Z K, Song G W, Yuan D, Zeng Y E. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 403(1-2): 209 ~ 217
- Wang G L, Yuan J L, Matsumoto K, Hu Z D. *Anal. Biochem.*, 2001, 299(2): 169 ~ 172

