

2 种卤代荧光素滤纸基质室温磷光特性 及其与 DNA 作用的研究^①

李建晴^a 侯晓丽 魏玉霞 董川^②

(山西大学化学化工学院 太原市 030006)

^a(山西晋中学院化学化工系 山西省晋中市 030600)

摘要 对四溴荧光素(TBF)、四氯四溴荧光素(TTF)两种卤代荧光素滤纸基质室温磷光光谱(PS-RTP)特性及其与 DNA 的作用进行了研究。结果表明: TBF 和 TTF 的 PS-RTP 的最大 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 为 526/652nm 和 557/699nm; 酸度实验表明: 两种物质在碱性范围内有强发射。小牛胸腺(DNA)的存在会使 TBF 和 TTF 的 PS-RTP 强度发生变化; 偏振实验表明: TBF、TTF 与 DNA 的作用方式有嵌插作用; TBF 和 TTF 的磷光寿命分别为 136.4ms 和 131.0ms 属长寿命磷光。

关键词 四溴荧光素, 四氯四溴荧光素, DNA, 滤纸基质室温磷光。

中图分类号: O657.39

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)02-0295-05

1 引言

DNA 是药物设计时很重要的作用靶之一, 小分子物质与 DNA 主要通过嵌插作用、沟槽键合、外部静电作用^[1]发生相互作用。荧光素类化合物可以呈现强烈的荧光发射, 用做指示剂和生物染色剂。在光度分析中已用于有机分子, 蛋白质研究及金属离子的测定^[2,3]。有关四溴荧光素(TBF)和四氯四溴荧光素(TTF)的滤纸基质室温磷光(PS-RTP)光谱特性及其与 DNA 相互作用的研究尚未见文献报道。

四溴荧光素(TBF)和四氯四溴荧光素(TTF)属卤代荧光素, 其结构如图 1 所示。本文对其滤纸基质室温磷光(PS-RTP)光谱及其与 DNA 作用的特性进行了考察, 为此两种化合物的进一步研究提供了理论依据。

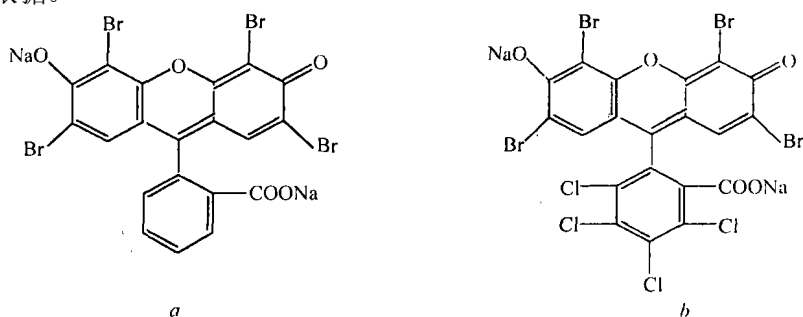


图 1 TBF(a) 和 TTF(b) 的结构

① 国家自然科学基金(20575037), 山西省自然科学基金(20051012)资助项目

② 联系人, 电话: (0351) 7011322(办); 手机: (0) 13934152695

作者简介: 董川(1963—), 男, 山西省交城县人, 山西大学化学化工学院教授, 博士生导师, 主要从事药物分析的研究。

李建晴(1963—), 女, 山西省晋中市, 晋中学院化学化工系副教授, 从事分析化学的教学和实验研究。

收稿日期: 2005-11-06; 接受日期: 2005-11-20

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

日立 F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司),附磷光配件。激发/发射狭缝:10/20nm;固体基质室温磷光样品架和红外灯干燥装置(实验室自制);偏振附件;

5 μ L 无存液微量进样器(上海医用激光仪器厂);滤纸(杭州新华纸业);

四溴荧光素(TBF):上海试剂三厂,四氯四溴荧光素(TTF):北京化工厂;用二次水配制 1×10^{-3} mol/L 的储备液,使用时用 Britton-Robison 缓冲溶液适当稀释;

小牛胸腺(DNA),用 0.1mol/L 的 NaCl 配制成 1mg/mL 的溶液,于 0—4 $^{\circ}$ C 保存,使用时适当稀释,准确浓度由 260nm 处的吸光度测定。UV 测定 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 。

其余试剂均为国产分析纯;实验用水为亚沸二次蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 滤纸基质室温磷光(PS-RTP)光谱测量

将中速定量滤纸裁成 17mm $\times$ 14mm 的长方形纸条,在相应于光斑照射处用刀片刻划间距为 4mm 的平行线,并记录点样位置。对 TBF 直接用微量进样器取试样溶液 5 μ L,一次加在点样位置;对 TTF 第一步先用微量进样器吸取重原子 Pb(Ac)₂溶液(浓度为 1mol/L)5 μ L,一次加在点样位置,在红外灯下(温度为 89 $^{\circ}$ C)预烘烤 10s 取出,再在同一位置点加试样溶液 5 μ L;烘烤一定时间(TBF:85 $^{\circ}$ C 60s, TTF 为 89 $^{\circ}$ C 90s)后取出,装上石英片立即置于室温磷光样品架上,测量其磷光光谱或强度。

2.2.2 偏振测量

在 10mL 比色管中依次加入一定量的 TBF 或 TTF 溶液、缓冲溶液、不同体积的 DNA 溶液,后用二次蒸馏水定容,混匀后在室温下测定其偏振值。磷光偏振可用下式计算:

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad (1)$$

式中: I_{VV} 和 I_{VH} 分别为垂直偏振光激发后的垂直偏振和水平偏振的发射强度; G 为仪器的校正因子, $G = I_{HV}/I_{HH}$ 。 I_{HV} 和 I_{HH} 分别为水平偏振光激发下的垂直偏振与水平偏振光的发射光强度。

3 结果与讨论

3.1 TBF 和 TTF 的 PS-RTP 光谱

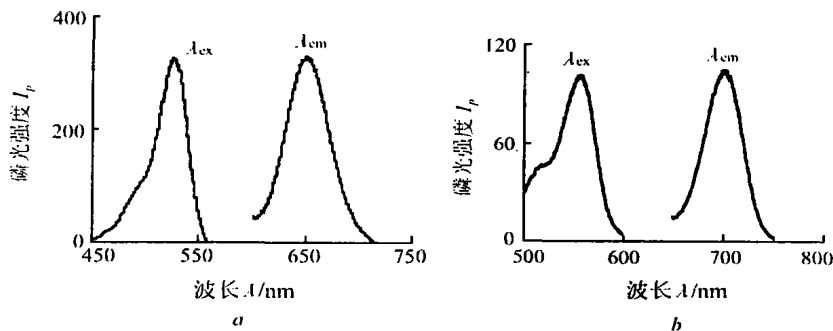


图 2 TBF(a)和 TTF(b) 的滤纸基质磷光光谱

按实验方法分别扫描 TBF 和 TTF(浓度均为 1×10^{-4} mol/L) 的 PS-RTP 光谱,结果见图 2 所示。© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.c>

结果表明: 尽管 2 种卤代荧光素有不同内重原子, 由于结构中都有共同的荧光母体环, 其光谱特征较相似。TBF 和 TTF 的最大 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 为 526/652nm 和 557/699nm。其磷光发射有较大的 Stokes 位移。磷光的激发和发射处于长波区, 避免了生物样品的干扰, 因此可进一步用于生物样品分析。

3.2 PS-RTP 条件的确定

3.2.1 基质的选择

不同种类滤纸的 PS-RTP 背景强度不同且致密程度各异, 对磷光体的磷光强度有较大的影响。本文考察了快、中和慢速三种定量滤纸基质对 TBF 和 TTF 磷光发射的影响。结果表明, 中速定量滤纸做基质时, TBF 和 TTF 的磷光强度信号高且背景低。这可能是因为中速定量滤纸致密度适中, 有利于磷光体在其干燥蒸发时的 Behlode 效应^[4]和对滤纸深层磷光体的激发。因此, 本文选择中速定量滤纸做基质进行磷光测定。

3.2.2 重原子的选择

带有高电荷的重原子能增强磷光体的 $S_1 \rightarrow T_1$ 系间窜越过程, 增强轨道偶合作用从而诱导强磷光发射^[5,6]。实验发现, 由于内重原子的作用, TBF 可以发射较强的磷光, TTF 也能发射磷光, 但强度很弱。因此, 实验考察了外加重原子对 TTF 的 PS-RTP 的诱导作用, 在所考察的无机盐中, $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 能显著增强 TTF 的磷光发射。可能是因为醋酸根有助于磷光体与滤纸表面氢键的形成, 从而为磷光体提供了保护性的刚性环境, 提高了磷光强度^[4]。进一步考察 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 的浓度对磷光强度的影响, 选择 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ 的浓度为 1mol/L 进行后续实验。

3.2.3 酸度的影响

荧光素类化合物有可解离的羧基和酚羟基, 是一类二元酸。用 Britton-Robison 缓冲溶液调节体系的 pH 值, 研究了酸度对两种荧光素 PS-RTP 的影响, 见图 3。

结果表明: TBF 和 TTF 在较宽的 pH 范围内均能产生磷光发射, 且在碱性条件下发光较强。pH < 3 时两种荧光素的发光强度较小, pH > 4 后, 随 pH 的增大, TBF 和 TTF 的发光强度略有增加, 但变化不大。本文选择 pH = 7—7.5 范围内作为实验的测量酸度。

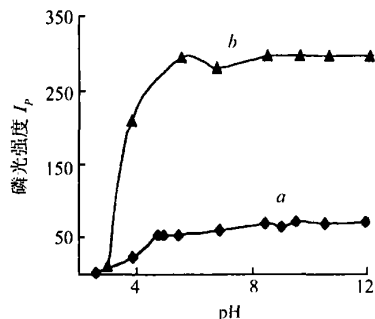


图 3 pH 对 TBF (a) 和 TTF (b) 磷光强度的影响

[TBF] = 1×10^{-5} mol/L;

[TTF] = 5×10^{-4} mol/L。

3.2.4 干燥温度、预烘烤、烘烤时间和稳定性的测定

最佳的烘干温度^[7]应该是保证滤纸不变性, 磷光物质不分解、不挥发的最高温度。本文选择烘烤温度 TBF 为 85℃, TTF 为 89℃。

点样之前滤纸上的水份对磷光分子的刚性化有一定的影响^[4]。实验表明: TTF 的最佳预烘烤时间为 10s。最佳烘烤时间 TBF 为 60s, TTF 为 90s。

稳定性测定结果表明: 2 种荧光素在空气中放置 5min 之内, 磷光强度下降小于 1%。实验中测量一个样品数据只需 1—2min, 因此稳定时间足以满足实际分析要求。

3.3 磷光寿命的测量

发光寿命在猝灭、能量转移、光化学反应等研究中是一个重要参数^[8]。从发光寿命的研究中可得到发光体与固体基质之间相互作用机理, 三线态的失活几率等微环境的信息^[9]。根据发光寿命的不同, 利用时间分辨技术和相分辨技术可以区别混合物中的不同组分。

其中, τ 是发光寿命, I_0 和 I_t 分别是 $t=0$ 和 $t=t$ 时的发光强度。作 $\ln I_t-t$ 的关系曲线, 由该直线的斜率即可得到寿命值。固定激发狭缝和发射狭缝为 10/20nm, 测得 TBF 和 TTF 的发光寿命分别为 TBF: 136.4ms, TTF: 131ms。

3.4 TBF 和 TTF 与 DNA 的作用

3.4.1 TBF 和 TTF 与 DNA 作用后的 PS-RTP

在 TBF 和 TTF 中加入不同浓度的 DNA, 按实验方法扫描 2 种物质的 PS-RTP 光谱, 如图 4。

图 4(a) 结果表明, TBF 的磷光强度一开始由于 DNA 的加入而减小, 到 DNA 与 TBF 的浓度比达到 26 时开始增大, 而 λ_{em} 没有移动。

图 4(b) 表明, TTF 的磷光强度一开始由于 DNA 的加入而增大, DNA 与 TTF 的浓度比达到 0.346 时, 磷光强度开始减小, 浓度比达到 0.462 时, TTF 的磷光强度不在随 DNA 浓度的变化而改变。 λ_{em} 没有发生移动。

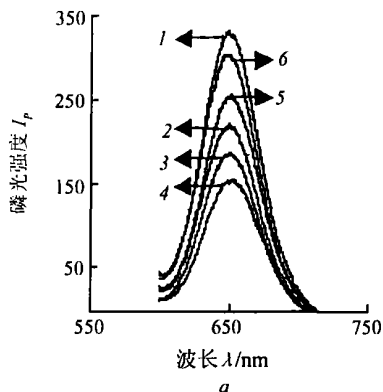


图 4(a) TBF 在不同 DNA 浓度溶液中的 PS-RTP 光谱

[TBF] = 5.00×10^{-6} mol/L; [DNA] = 1 — 0;
2 — 1.63×10^{-5} mol/L; 3 — 3.25×10^{-5} mol/L;
4 — 1.14×10^{-4} mol/L; 5 — 1.30×10^{-4} mol/L;
6 — 1.63×10^{-4} mol/L。

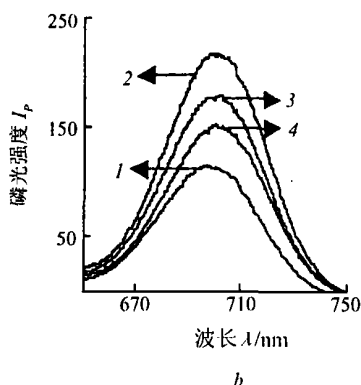


图 4(b) TTF 在不同 DNA 浓度溶液中的 PS-RTP 光谱

[TTF] = 2.00×10^{-4} mol/L; [DNA] = 1 — 0;
2 — 4.62×10^{-5} mol/L; 3 — 6.92×10^{-5} mol/L;
4 — 9.24×10^{-5} mol/L。

3.4.2 磷光偏振实验

在粘度小的溶剂(如水)中, 由于小分子旋转扩散很快, 其偏振值一般较小。而当小分子荧光体嵌入到 DNA 碱基对中时, 其转动受阻, 导致小分子转动速度变慢, 从而使偏振值增大。Ku-mar^[10] 等认为仅与磷酸根作用或仅产生沟槽键合是不会引起磷光偏振值增大的。本文考察了体系中不同 DNA 浓度时, TBF 和 TTF 的磷光偏振值的变化情况。结果见图 5。

结果表明: DNA 的加入使得 TBF 和 TTF 偏振值有所增大, 这说明 TBF 和 TTF 可插入 DNA 的碱基对之间。偏振实验表明 DNA 与 TBF 和 TTF 之间存在嵌入作用方式。

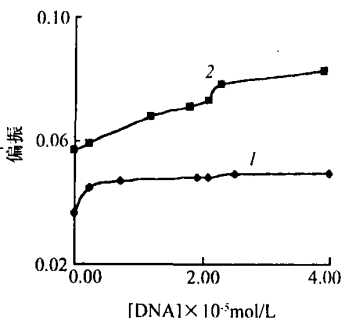


图 5 TBF (1) 和 TTF (2) 在 DNA 存在时的磷光偏振

[TBF] = [TTF] = 1×10^{-5} mol/L

参考文献

- [1] 杨铭. 药物研究中分子的识别[M]. 北京: 北京医科大学, 协和医科大学联合出版社, 1999.
- [2] 李建平, 张彦斌, 魏小平. 表面活性剂增敏动力学光度法测定酚[J]. 分析化学, 1998, 5(26): 586.
- [3] 王海人, 肖忠柏, 宋功武, 詹红菊. 荧光素与牛血清蛋白作用的光谱研究与分析应用[J]. 分析测试学报, 2001, 20(4): 45.

- [4] 李建晴, 董川, 卫艳丽, 杨频. 黄嘌呤甲基衍生物滤纸基质室温磷光光谱的研究[J]. 光谱实验室, 2001, **18**(1): 22.
- [5] Vo-Dinh T. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*[M]. New York: Wiley, 1984.
- [6] Hurtubise R J. *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications*[M]. New York: VCH, 1992.
- [7] 李建晴, 董川, 冯小花. 4 种喹诺酮类药物滤纸基质室温磷光法研究[J]. 分析化学, 2003, **30**(6): 716—718.
- [8] 卫艳丽, 姚建国, 杨频, 董川. 黄嘌呤甲基衍生物的发光特性研究[J]. 光谱实验室, 2003, **20**(5): 650.
- [9] Li J F, Wei Y X, Xu Z C, Dong C, Shuang S M. Studies on the Spectroscopic Behavior of Cryptotanshinone, Tanshinone IIA, and Tanshinone I[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, **60**: 751.
- [10] Kumar C V, Asuncion E H. DNA-Binding Studies and Site Selective Fluorescence Sensitization of an Anthryl Probe[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**: 8574.

Study on Phosphorescence Characteristics of Two Halogenated Fluoresceins in Paper Substrate at Room Temperature and Their Interaction with DNA

LI Jian-Qing^a HOU Xiao-Li WEI Yu-Xia DONG Chuan

(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)

^a(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Jinzhong College, Jinzhong, Shanxi 030600, P. R. China)

Abstract The phosphorescence characteristics of two halogen fluoresceins of tetrabromofluorescein(TBF) and tetrachlorotetrabromofluorescein(TTF) in paper substrate at room temperature and their interaction with DNA were studied. The maximal excitation and emission wavelengths were 526nm/652nm for TBF and 557nm/699nm for TTF, respectively, and they can emit strong RTP in basic medium with lifetime of 136.4ms and 131.0ms, respectively. The PS-RTP intensities of TBF and TTF are changed in the presence of DNA with TBF and TTF intercalations.

Key words Tetrabromofluorescein, Tetrachlorotetrabromofluorescein, DNA, Paper Substrate Room Temperature Phosphorescence.

《光谱实验室》实际售价连续 3 年下降

由于投稿数量不断增加, 为了保证出版周期, 《光谱实验室》从 2006 年第 1 期开始, 在 2005 年的基础上, 每期正文增加页码 16 页, 而售价保持不变:

2003 年售价: 20 元/册, 页码为 160 页/册, 平均 0.125 元/页;

2004 年售价: 25 元/册, 页码为 208 页/册, 平均 0.120 元/页。

2005 年售价: 25 元/册, 页码为 224 页/册, 平均 0.112 元/页。

2006 年售价: 25 元/册, 页码为 240 页/册, 平均 0.104 元/页。

因此, 实际售价连续 3 年下降。

《光谱实验室》编辑部