

溴化乙锭探针研究劳氏青莲与脱氧核糖核酸的相互作用

刘雪平, 冯素玲*, 潘自红, 樊 静

河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007

摘 要 用光谱探针溴化乙锭对劳氏青莲与脱氧核糖核酸的作用机制进行了研究。通过对体系的荧光光谱、吸收光谱及共振光散射光谱等方面的研究, 结果表明, 在 pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 劳氏青莲与脱氧核糖核酸之间存在着嵌插作用, 其结合常数为 $1.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

主题词 荧光光谱; 吸收光谱; 共振光散射光谱; 劳氏青莲; 溴化乙锭探针; DNA

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)10-1895-04

引 言

脱氧核糖核酸(DNA)是人体内重要的遗传物质。小分子与 DNA 作用后将会不同程度地引起 DNA 分子结构和功能的变化, 进而影响基因的调控与表达功能, 因此研究小分子与 DNA 的作用对于理解它们的作用机理, 寻求灵敏检测 DNA 分子的探针及进行药物体外筛选具有十分重要的意义。Kumar 等^[1]通过系统研究某些抗生素、杂环阳离子染料及金属离子配合物与 DNA 作用, 揭示了分子结构及电子云分布影响小分子与 DNA 结合的强度及结合位点。Porschke 等^[2]发现小分子的疏水性能、所带正电荷、配位金属活性中心、平面杂环阳离子及氢键基团对小分子与 DNA 的结合也有较大的影响。通常小分子与 DNA 的非共价键结合有如下 3 种方式^[3]: 静电结合、沟式结合及嵌插结合。目前, 研究小分子与 DNA 作用的方法及技术有荧光光谱法^[3,5]、圆二色谱^[6]及电化学方法^[7]等。

劳氏青莲是许多染料及药物分子的基本骨架, 有 $\pi-\pi$ 共轭体系, 结构对称, 对 DNA 分子具有诱导突变作用。同时它还是一种生物染料, 荧光极其微弱, 因此, 本文采用溴化乙锭(EB)探针示踪劳氏青莲与 DNA 分子的相互作用, 结果表明: 劳氏青莲与 DNA 之间存在嵌插作用, 其结合常数为 $1.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

FP-6200 荧光分光光度计(日本分光公司); PERKIN-

ELMER LAMBDA 17 紫外-可见分光光度计(美国 PE 公司); pH5.3C 型数字酸度计(杭州东星设备仪器厂)。

小牛胸腺 DNA(ctDNA)(华美生物工程公司, 北京)配制成 $2.6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0 \sim 4^\circ \text{C}$ 保存, 经 UV 光谱测定 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 纯度符合要求, ctDNA 浓度利用 $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}$ 计算而得; 劳氏青莲(Thionine), 用热水配制成 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 溴化乙锭(EB)(华美生物工程公司, 北京)配制成 $6.16 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 避光保存; Tris-HCl 缓冲溶液, 由 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷与 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 混合而成, 调 pH 为 7.4。实验所用水均为 2 次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 吸收光谱

于 10 mL 比色管中加入 2 mL pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液、一定量的劳氏青莲和 ctDNA 溶液, 稀释至刻度, 摇匀, 以相应的试剂空白作参比, 在紫外-可见分光光度计上进行扫描, 绘制吸收光谱。

1.2.2 劳氏青莲对 EB-DNA 荧光光谱的影响

采用荧光滴定法, 在一定量的 Tris-HCl 缓冲溶液、DNA 溶液及 EB 溶液中滴加不同量的劳氏青莲, 观察其荧光强度的变化。

1.2.3 EB-DNA 结合常数的测定

采用荧光滴定法, 在一定量的 Tris-HCl 缓冲溶液和 DNA 溶液中滴加不同量的溴化乙锭, 观察其荧光强度的变化。

1.2.4 劳氏青莲对 EB-DNA 结合常数的影响

采用荧光滴定法, 在一定量的 Tris-HCl 缓冲溶液、劳氏青莲和 DNA 溶液中滴加不同量的溴化乙锭, 记录每次滴加

收稿日期: 2005-05-07, 修订日期: 2005-10-29

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0511021200)资助

作者简介: 刘雪平, 1974 年生, 平顶山学院化学系教员, 硕士 * 通讯联系人

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

后的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 劳氏青莲与 DNA 的吸收光谱和共振光散射光谱

由图 1 可知, 劳氏青莲在 598 nm 处有较大的吸收。当 DNA 与劳氏青莲作用后, 劳氏青莲在 598 nm 处的吸收强度降低, 且峰位红移。根据 Long 理论^[8]: 减色效应、红移现象是该物质与 DNA 发生嵌插作用的标志。明显的减色效应说明劳氏青莲与 DNA 碱基对之间的距离很近, 即劳氏青莲可能嵌入到 DNA 的碱基对中, 从而引起碱基对与嵌入有机小分子之间产生较强的电子相互作用。

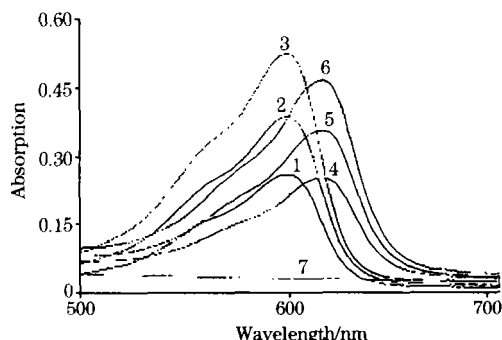


Fig 1 The absorption spectra of thionine-ctDNA

1, 2, 3: Tris-HCl+ thionine; 4, 5, 6: Tris-HCl+ thionine+ ctDNA; 7: Tris-HCl+ ctDNA; thionine, 1, 4: $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2, 5: $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 3, 6: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ctDNA, 4, 5, 6, 7: $1.04 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 是 DNA 与劳氏青莲体系的共振光散射光谱。由图 2 可知, 随着 DNA 浓度的增加, 体系的共振光散射强度增大, 表明 DNA 与劳氏青莲之间发生了相互作用, 形成了更大的粒子。

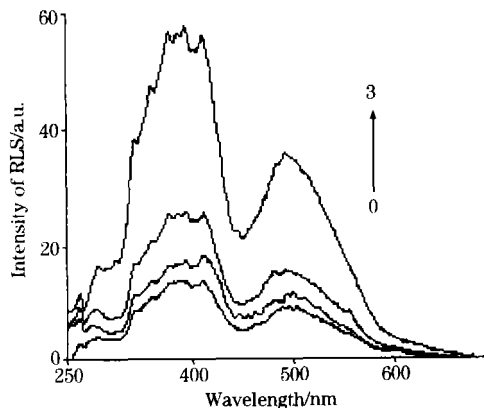


Fig 2 Resonance light scattering spectra of ctDNA-thionine system

ctDNA ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0→3): 0 0; 0 26; 1 3; 5 2; Thionine: $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 劳氏青莲对 EB-DNA 荧光光谱的影响

溴化乙锭是一种经典的嵌入式荧光探针, 它本身的荧光很弱, 但与 DNA 作用后, 其生色团嵌入碱基对中使荧光强度增加。劳氏青莲几乎没有荧光, 由图 3 可见, 在 DNA-EB 体系中加入劳氏青莲后, 荧光强度随着劳氏青莲浓度的增加而降低, 且荧光峰位略有蓝移。这是由于劳氏青莲竞争结合 EB-DNA 中的 DNA, 使溴化乙锭分子从疏水环境进入亲水环境, 从而引起荧光强度降低。

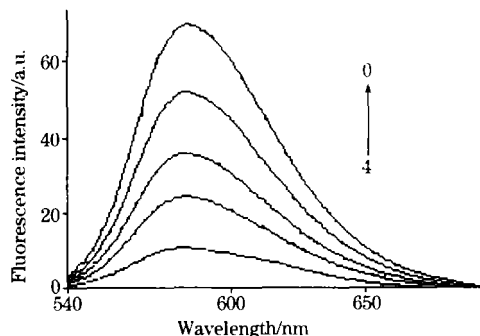


Fig 3 Influence of thionine on the fluorescence spectra of ctDNA-EB system

Thionine ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0→4): 0 00, 0 38, 0 91, 1 38, 2 42; EB: $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ctDNA: $9.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 劳氏青莲对 DNA-EB 荧光猝灭方式的判断

在一系列 EB-DNA 溶液中加入不同浓度的劳氏青莲, 以 $F_0/F \sim [T]$ (为劳氏青莲的浓度) 作图, 其中 F_0 为不存在劳氏青莲时的荧光强度, F 为存在劳氏青莲时的荧光强度。根据经典的荧光猝灭理论^[9], 无论动态猝灭还是静态猝灭, F_0/F 与猝灭剂的浓度总是呈线性关系。而劳氏青莲对 EB-DNA 体系的猝灭为一条曲线 (图 4), 随着劳氏青莲浓度的增加, 其猝灭效率也增大, 因此, 劳氏青莲对 EB-DNA 体系的荧光猝灭并非单纯的动态猝灭或静态猝灭, 很可能是两种猝灭方式共同作用的结果。

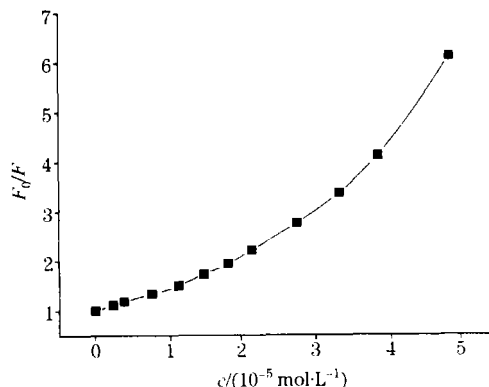


Fig 4 The fluorescence quenching curve of thionine with ctDNA-EB system

EB: $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ctDNA: $9.8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (c : concentration of thionine)

2.4 介质及酸度的影响

考察了 Britton-Robinson 及 Tris-HCl 两种介质对劳氏青

莲猝灭作用的影响,发现在这两种介质中,劳氏青莲对 EB-DNA 的荧光都有猝灭作用,且猝灭程度相当。在酸性较强的溶液中,溴化乙锭结构发生变化,与 DNA 作用后荧光强度几乎保持不变。本实验选用 pH 为 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

2.5 劳氏青莲对 EB-DNA 的 Scatchard 曲线的影响

溴化乙锭是一种菲啶类染料,当它嵌入 DNA 碱基对中对后其荧光强度大大增强。溶液中总的荧光强度为游离的 EB 的荧光强度与发生嵌插作用的 EB 的荧光强度之和,即

$$I_{\text{obs}} = I_{\text{b}} + I_{\text{f}} = K_{\text{b}}c_{\text{b}} + K_{\text{f}}c_{\text{f}} = K_{\text{b}}c_{\text{b}} + K_{\text{f}}(c_{\text{t}} - c_{\text{b}})$$
$$c_{\text{b}} = \frac{I_{\text{obs}} - K_{\text{f}}c_{\text{t}}}{K_{\text{b}} - K_{\text{f}}}$$

I_{obs} —溶液总的荧光强度; I_{f} —游离的 EB 产生的荧光强度; I_{b} —与 DNA 结合的 EB 产生的荧光强度; c_{t} —溶液中 EB 的总浓度; c_{f} —游离的 EB 的浓度; c_{b} —与 DNA 结合的 EB 的浓度。

K_{f} , K_{b} 分别为 EB、EB-DNA 的荧光强度系数,可通过实验测得。EB 与 DNA 的结合常数及结合位点可由 Scatchard 方程求得

$$\frac{Y}{c_{\text{f}}} = nK - YK$$
$$Y = c_{\text{b}}/[ctDNA]$$

Y —平均每个核苷酸已结合的 EB 分子数; K 为 EB 与 DNA 的结合常数; n —每个核苷酸最多能结合的 EB 分子数。

劳氏青莲存在与不存在条件下 EB-DNA 的 Scatchard 方程曲线如表 1 所示。由表 1 可知,随着劳氏青莲浓度的增加,结合常数 K 明显减小,而结合位点 n 基本不变,进一步说明劳氏青莲与 DNA 之间存在着嵌插作用;溴化乙锭与 DNA 的结合常数 K 为 $9.4 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,结合位点 n 为 4.5,与文献数据^[8,10]基本一致;溴化乙锭与 DNA 的表观结合常数 (K_{obs})随着劳氏青莲浓度的增加有所降低。

Table 1 The Scatchard equation of EB-ctDNA

劳氏青莲/ $10^{-5}(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Scatchard 方程	相关系数	结合常数 $K / 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$	结合位点(n)
0	$Y/c_f = 2.07 \times 10^5 - 9.41 \times 10^5 Y$	0.982	9.41	4.5
0.8	$Y/c_f = 1.05 \times 10^5 - 4.93 \times 10^5 Y$	0.986	4.93	4.7
1.6	$Y/c_f = 8.48 \times 10^4 - 3.73 \times 10^5 Y$	0.989	3.73	4.4

根据文献^[11]有下列关系式

$$K_{\text{obs}} = \frac{K}{1 + K'c_{\text{f}}}$$
$$\frac{1}{K_{\text{obs}}} = \left(\frac{K'}{K} \right) c_{\text{f}} + \frac{1}{K}$$

K' 为劳氏青莲与 DNA 的结合常数, c_{f} 为游离的劳氏青莲的浓度。以 $1/K_{\text{obs}} \sim c_{\text{f}}$ 作图,可求得劳氏青莲与 DNA 的结合常数为 $1.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.6 结论

通过引入 DNA 荧光探针溴化乙锭(EB),研究了劳氏青莲与 DNA 之间的相互作用。结果表明,劳氏青莲与 DNA 之间存在嵌插作用,其结合常数为 $1.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。劳氏青莲是许多药物的基本骨架,这对于从分子水平上了解药物与 DNA 的作用机理,设计并合成新的药物具有十分重要的意义。从以上可以看出,本文得到一些新的研究成果,很有应用价值,近年来,还有类似的工作报道^[12]。

参 考 文 献

[1] Kumar C V, Raphael A L, Barton J K. *Biomol. Stereodyn.*, 1986, 3: 85.
[2] Porschke D. In *DNA-Ligand Interactions, Specificity and Dynamics of Protein-Nucleic Acid Interactions*, Guschlbauer W, Saenger W (eds.). New York: Plenum, 1986. 85.
[3] Kumar C V, Asuncion E H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115(19): 8547.
[4] JIANG Chong-qiu, HE Ji-xiang, WANG Jie-shan(江崇球, 贺吉香, 王金山). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2002, 22(1): 103.
[5] LI Lai-sheng, HUANG Wei-dong, YAN Yuan(李来生, 黄伟东, 郦远). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(5): 685.
[6] Liu F, Kelley A M, David R M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115(15): 6699.
[7] Carter M T, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109(24): 7528.
[8] Long E C, Barton J K. *Account Chem. Res.*, 1990, 23(9): 271.
[9] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). *Fluorimetric Analysis 2nd ed(荧光分析法·第2版)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 115.
[10] Reinhardt C G, Krugh T R. *Biochemistry*, 1978, 17(23): 4845.
[11] LePecq J B, Paoletti C. *J. Mol. Biol.*, 1967, 27(1): 87.
[12] PENG Jun-feng, LING Jian-ya, ZHANG Hui-li, et al(彭俊峰, 凌建亚, 张哈里, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(7): 858.

Studies on the Interaction between Thionine and Deoxyribonucleic Acid by Ethidium Bromide Probe

LIU Xue-ping, FENG Su-ling*, PAN Zi-hong, FAN Jing

College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract The interaction between thionine and deoxyribonucleic acid was studied with ethidium bromide probe in Tris-HCl buffer solution at pH 7.4 by fluorescence spectra, electronic absorption spectra, and resonance light scattering spectra. From the obtained results, it was found obviously that the planar structure of thionine can be intercalated into the stacked base pairs of DNA, which is the major controlling factor. The binding constant was found to be $1.0 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Keywords Fluorescence spectra; Absorption spectra; Resonance light scattering spectra; Thionine; Ethidium bromide probe; DNA

(Received May 7, 2005; accepted Oct. 29, 2005)

* Corresponding author

《中国学术期刊文摘》中文版和英文版 2007 年征订启事

《中国学术期刊文摘》分中文版(简称 CSAC)和英文版(简称 CSAE)两种,各自收录了我国高水平学术期刊中基础科学、医学、农业科学和工程技术领域约 40 个学科的论文文摘,全景展现我国的科研成果与进展。

作为综合性科技类检索刊物,《中国学术期刊文摘》致力于将我国科学技术各领域的原创性学术成果全面、快速地向科技工作者交流、传播,其中 CSAE 是我国第一份综合性英文版科技类学术检索刊物。

《中国学术期刊文摘》由中国科学技术协会主管,科技日报社主办并负责编辑、出版、发行,对科研单位、高等院校、图书馆以及广大科技工作者检索和了解我国的科技研究成果、学术研究动向具有重要的参考价值。

《中国学术期刊文摘(中文版)》刊号为 CN 11-3501/N, ISSN 1005-8923, 2007 年为半月刊,大 16 开,国内定价 38.00 元/册,全年定价 912 元,邮发代号:82-707。

《中国学术期刊文摘(英文版)》刊号为 CN 11-5411/N, ISSN 1673-4084, 2007 年改为月刊,大 16 开,国内定价 15.00 元/册,全年定价 180 元,邮发代号:80-487。

欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆订阅。

通讯地址:北京市海淀区学院南路 86 号科技日报社(邮编 100081)

联系电话:010-62103122

联系人:姚玉琴

征订信箱: wzhjb@cast.org.cn

单位主页: <http://www.csac.org.cn>

户名: 科技日报社

账号: 0200001409089017271

开户银行: 工商银行百万庄支行