

[研究简报]

DNA 与苯胺红 T 的相互作用与荧光定量检测

叶宝芬, 朱永林, 鞠先

(南京大学化学系, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

关键词 DNA; 苯胺红 T; 荧光; 荧光猝灭

中图分类号 O 657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2002)12-2253-03

荧光染料作为分子探针用于核酸的定量测定和构象分析一直备受关注^[1]。已有数十种荧光染料被应用^[2,3], 如溴化乙锭早期常用作 DNA 探针^[4,5], 因其有很强的致癌性, 目前已很少采用, 而那些无毒性或含有可被衍生的活性基团的探针分子越来越受到青睐^[6~8]。苯胺红 T (ST) 是一种阳离子型荧光染料, 它既可很容易地与 DNA 双螺旋结构发生插入作用, 又可由带正电的吩嗪环与 DNA 上带负电的磷酸基发生强烈的静电吸附作用, 还可利用其氨基与 DNA 或其它生物分子进行交联。He 等^[9]曾研究了它与小牛胸腺 DNA 之间的作用, 得到的结合位点数为 7, 并证实静电吸附是它们之间相互作用的重要因素。本文用紫外吸收光谱与荧光光谱两种方法研究了 ST 与酵母 DNA 之间的相互作用, 并根据 DNA 对 ST 的荧光猝灭作用建立了定量测定 DNA 的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 LS-50B 型荧光/发光光谱仪 (Perkin-Elmer 公司), UV-240 型紫外-可见分光光度计 (Shimadzu 公司)。酵母 DNA (上海长阳制药厂), UV 光谱测定 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, DNA 浓度由 260 nm 处的吸光度 ($\epsilon = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 来计算, 于 0~4 °C 冰箱中干燥保存。苯胺红 T (上海中西药房, 试剂级)。其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次亚沸蒸馏水。

1.2 实验方法 将 ST 溶液与适量的 DNA 溶液混合定容, 使 ST 的浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (考察 ST 浓度影响时例外)。用 520 nm 光激发, 测量 570 nm 处的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 苯胺红 T 与 DNA 作用的紫外-可见吸收光谱研究 图 1(A) 为 DNA 浓度对 ST 的紫外-可见吸收

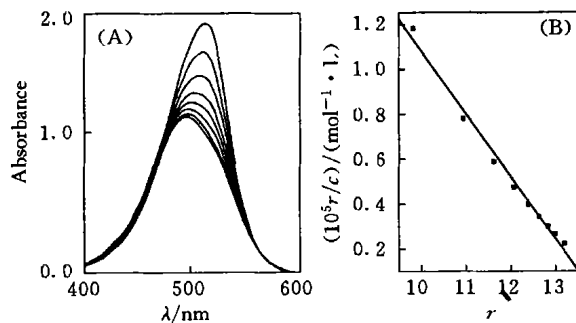


Fig 1 UV-Vis spectra of ST-DNA system (A) and Scatchard plot of ST absorption titration by DNA (B)

$c(\text{CT}) = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. $c(\text{DNA}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.0, 8.0, 16.0, 24.0, 32.0, 40.0, 48.0$ and 56.0 from the top to the bottom.

光谱的影响。随着 DNA 的加入, ST 的特征吸收峰明显蓝移, 且峰强度明显减小。随着 DNA 的浓度继续增大, 峰强度趋于稳定, 表明苯胺红 T 与 DNA 间有强烈的作用, 吸收强度的变化是由于平面型吩嗪环嵌入 DNA 双螺旋结构引起的^[10]。通过物质的量比法, 可测定不同 DNA 浓度下体系的吸光度 A , 以 A 对 $c(\text{DNA})$ 作图 [图 2(A)], 求得 ST 与 DNA 之间的结合位点数 n 为 15.3 ± 1.0 。

利用 Scatchard 方程的简化形式^[11,12]

$$r/c_f = K(1 - nr) \quad (1)$$

可以求得 ST 与 DNA 结合时每个位点固有的结合常数 K 。式中, c_f 为游离的 ST 浓度, r 表示已结合

收稿日期: 2001-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 29975013, 29835110), 江苏省社会发展基金(批准号: BS2001063), 教育部博士学科点基金(2000028403)和中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放课题资助

联系人简介: 鞠先(1964 年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生化分析与电分析化学研究

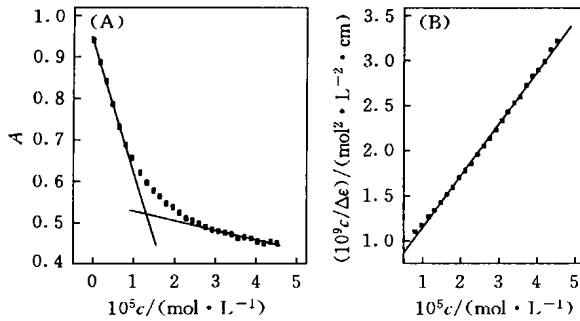


Fig 2 Dependence of absorbance of ST at 520 nm on DNA concentration (A) and plot of $c(\text{DNA})/\epsilon$ vs $c(\text{DNA})$ (B)

到每个DNA 分子上的平均 ST 分子数, 即

$$r = c_b / c(\text{DNA}) \quad (2)$$

n 是 r 的最大值 c_b 为与 DNA 结合部分的浓度, 可由吸光度 A ($A = A_f + A_b = \epsilon c_f + \epsilon c_b$) 的变化求得

$$c_b = (\epsilon c - A) / (\epsilon_b - \epsilon) \quad (3)$$

式中, ϵ 与 ϵ_b 分别为溶液中游离与结合状态的 ST 的摩尔吸光系数, 由吸光度求得 ϵ 为 $3.76 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. ST 与 DNA 结合前后摩尔吸光

系数的变化 $\Delta \epsilon = \epsilon_b - \epsilon$, 可根据

$$c / \Delta \epsilon = c / \Delta \epsilon + 1 / \Delta \epsilon K \quad (4)$$

以 $c / \Delta \epsilon$ 对 c 作图来计算^[13]. 其中, $\Delta \epsilon = \epsilon_b - \epsilon$ 是

表观摩尔吸光系数 $c / \Delta \epsilon$ 与 c 的关系如图 2(B) 所示, 由直线的斜率求得 $\epsilon_b = 9540 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. 进一步以 r/c_f 对 r 作图[图 1(A)]得到结合常数 $K = (2.81 \pm 0.11) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 结合位点数 $n = 14.0 \pm 1.0$. 用 Scatchard 方程求得的结合位点数与量比法基本一致. 结合常数 K 与文献[9]报道的 $1.53 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 相近.

2.2 苯胺红 T 与 DNA 作用的荧光光谱 不同 DNA 浓度下, ST 与 DNA 体系的荧光光谱如图 3(A) 所示. 当激发波长为 520 nm 时, 最大发射波长为 570 nm. 随着 DNA 浓度的增加, 出现了 DNA 对 ST 的荧光猝灭作用. 进一步增加 DNA 的浓度, 没有出现紫外吸收光谱中的饱和现象, 因此荧光猝灭现象不仅仅是由于荧光分子与 DNA 的碰撞引起的^[14], ST 的插入作用是荧光猝灭的重要因素, 它导致了电荷转移, 改变了 ST 激发态的电子态. 根据经典的荧光猝灭理论, 如果 DNA 对 ST 的荧光猝灭是静态猝灭过程^[9], F_0/F 对 DNA 浓度作图应得到一条直线^[14,15]. 然而, 实验结果显示, 这一关系不能成立, 因而 DNA 对 ST 的荧光猝灭不是单纯的动态或静态猝灭^[15]. 这时, 猝灭常数与 ST 和 DNA 的结合常数有关, 并可由修正的 Stern-Volmer 方程求得^[9]

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_q^{-1} F_0^{-1} c^{-1} \quad (5)$$

式中, F_0 和 F 分别为加入 DNA 前后的荧光强度, K_q 为猝灭常数. 以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 c^{-1} 作图[图 3(B)], 由斜率与截距求得 $K_q = (1.52 \pm 0.19) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 线性回归方程为 $(F_0 - F)^{-1} = 0.0147 + 0.0679 c^{-1}$, 相关系数为 0.997 1, 检测下限为 $0.069 \mu\text{mol/L}$, 相对标准偏差为 0.3%.

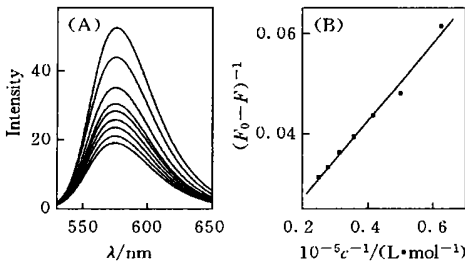


Fig 3 Fluorescence emission spectra of ST in presence of DNA (A) and fluorescence quenching plot of ST by DNA (B)

$\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$. $c(\text{CT}) = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. $c(\text{DNA}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0$ and 4.0 from the top to the bottom.

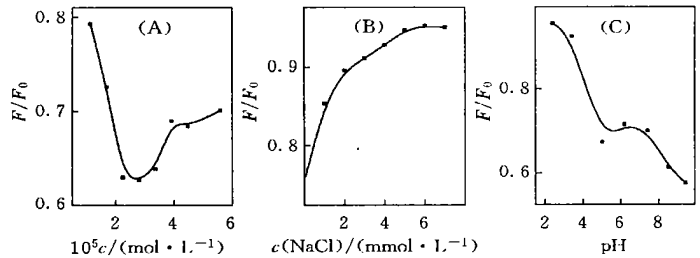


Fig 4 The influence of the concentration of ST(A), ionic strength(B) and the pH value(C) on quenching efficiency

(A) $c(\text{DNA}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$; (B) and (C) $c(\text{ST}) = 25 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{DNA}) = 4.0 \mu\text{mol/L}$.

2.3 实验条件对 ST 与 DNA 作用的影响 图 4(A) 为 ST 浓度对体系荧光强度的影响. 在较低 ST 浓度下, 荧光猝灭程度随 ST 浓度的增加而增加, 在 ST 浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时达到最大. 因而选用 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的苯胺红 T 作为研究荧光猝灭的实验浓度.

当体系中含有 10^{-3} mol/L NaCl 时, NaCl 浓度对荧光猝灭的影响如图 4(B) 所示。离子强度的增加减弱了 DNA 对苯胺红 T 的荧光猝灭作用。由于 Na^+ 等盐类阳离子能以静电引力的方式与 DNA 上带负电荷的磷酸基相互作用, 中和 DNA 上所带的负电荷。这一现象证明 ST 与酵母 DNA 之间除了有插入作用外, 也存在着强烈的静电吸引作用。

图 4(C) 为 ST-DNA 体系荧光猝灭程度随 pH 值的变化曲线。实验中选择 pH = 7 的体系, 这时具有较大的荧光猝灭程度, 且 pH 的较小改变对荧光猝灭程度的影响较小。

参 考 文 献

- [1] CHEN Yong(陈勇), LI Yuan-Zong(李元宗), CHANG Wen-Bao(常文保) *et al.* J. Anal. Sci. (分析科学学报) [J], 1994, **10**: 67—74
- [2] MA Li-Ren(马立人), JIANG Zhong-Hua(蒋中华). Biochips(生物芯片) [M], Beijing: Chemical Industry Press, 1990: 10
- [3] Metzker M. L., Lu J., Gibbs R. A. Science [J], 1996, **271**: 1420—1422
- [4] Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S. *et al.* Bio. Technology [J], 1992, **10**: 413—417
- [5] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G. *et al.* Bio. Technology [J], 1993, **11**: 1026—1030
- [6] Turro C., Bossmann S. H., Jenkins Y. *et al.* J. Am. Chem. Soc. [J], 1995, **117**: 9026—9032
- [7] Ci Y. X., Li Y. Z., Liu X. J. Anal. Chem. [J], 1995, **67**: 1785—1788
- [8] GUO Xiang-Qun(郭祥群), LI Fang(李芳), ZHAO Yi-Bing(赵一兵) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 1996, **17**(9): 1361—1366
- [9] Cao Y., He X. W. Spectrochim. Acta, Part A [J], 1998, **54**: 883—892
- [10] Dougherty G., Prigman W. J. Crit. Rev. Biochem. [J], 1982, **12**: 103—132
- [11] Lepecq J. B., Paoletti C. J. Mol. Biol. [J], 1967, **27**: 87—106
- [12] Howe G. M., Wu K. C., Bauer W. R. Biochem. [J], 1976, **15**: 4339—4346
- [13] Kumar C. V., Auncion H. E. J. Am. Chem. Soc. [J], 1993, **115**: 8547—8553
- [14] CHEN Guo-Zhen(陈国珍), HUANG Xian-Zhi(黄贤智), XU Jin-Gou(许金钩) *et al.* Fluorescence Analysis(荧光分析法) [M], Beijing: Science Publisher, 1990: 118
- [15] LI Lai-Sheng(李来生), HUANG Wei-Dong(黄伟东), WANG Rui-Qiong(王瑞琼) *et al.* Acta Chimica Sinica(化学学报) [J], 1999, **57**: 572—577

Interaction Between Safranin T and Yeast DNA and Fluorescence-quantitative Determination of DNA

YE Bao-Fen, ZHU Yong-Lin, JU Huang-Xian*

*Department of Chemistry, State Key Laboratory of Coordination Chemistry,
Nanjing University, Nanjing 210093, China*

Abstract The interaction between safranin T (ST) and yeast DNA was studied by means of UV absorption and fluorescence spectrometry. The wavelengths of fluorescence excitation and emission of ST were 520 nm and 570 nm, respectively. The maximum absorption of UV spectrum was at 520 nm. Two kinds of interaction between ST and DNA, intercalation and electrostatic interaction, were confirmed. The binding site size in DNA base pairs was 14.5 ± 1.5 and the apparent binding constant was $(2.81 \pm 0.11) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. The fluorescence quenching constant of DNA to ST was $(1.52 \pm 0.19) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. A novel fluorescence analysis for DNA determination was presented and the effects of experimental conditions on the fluorescence quenching were discussed.

Keywords DNA; Safranin T; Fluorescence; Fluorescence quenching

(Ed: K, G)