

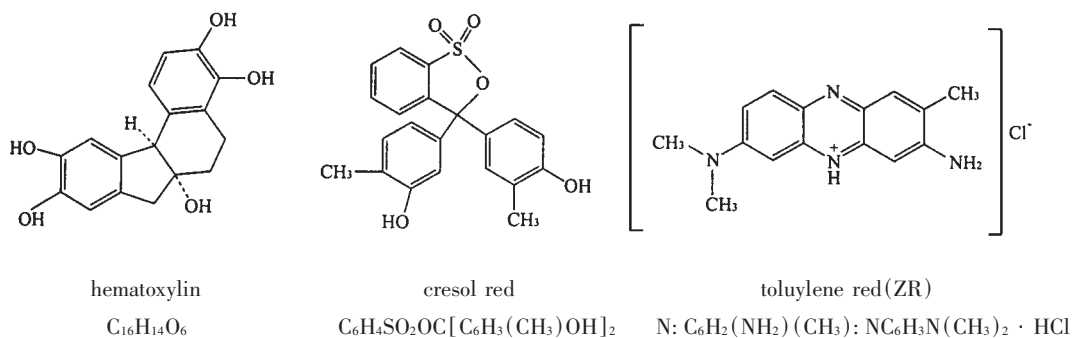
荧光染料探针与脱氧核糖核酸作用机理研究

席小莉 杨曼曼 韩小见 杨 频*
(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

核酸与各类物质的相互作用与探测核酸的结构与功能密切相关, 是揭示核酸的生物功能和一些药物的作用机制的重要途径。本文研究了染料 ZR、甲酚红、苏木色精等与 DNA 的作用, 给出它们在不同结合数下的生成常数。此外, 还求取了它们的能量转移效率、给体 - 受体之间的距离。

关键词: 荧光染料 脱氧核糖核酸 给体与受体
分类号: O629.7

配体同生物大分子的作用是研究生命现象和药物作用机理的一个基本问题。荧光探针是研究上述问题简单易行的方法。一些染料小分子可与生物大分子结合, 且其光谱呈现出能量转移特征, 即发生荧光的加强或淬灭。从这种现象可以得到许多信息, 特别是可用来测定生物大分子与某些基团(如蛋白质的芳香氨基酸到配体)之间的距离, 因此常被称为“光谱尺”^[1]。我们曾用此法研究了染料与多种蛋白的作用机理^[2, 3]; 本文则采用 UV 光谱法、荧光光谱法, 研究了中性红(ZR)、甲酚红、苏木色精(它们的结构式、化学式如图式1)等与 DNA 的作用, 发现在 pH = 7 ~ 8 的缓冲溶液中, DNA 分别与 ZR、苏木色精、甲酚红等作用, 生成不同的缔合物, 进而观察了 DNA 与 ZR 溶液中酸度、温度、时间、离子强度等对它们的影响及其表观摩尔吸光系数^[4], 给出它们在不同结合数下的生成常数。此外, 还可以应用下述原理求取它们的能量转移效率、给体 - 受体之间的距离。



图式 1

Graphic formula 1

1 基本原理^[3]

收稿日期 2001-04-17。收修改稿日期: 2001-06-21。

国家自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

第一作者: 席小莉, 女, 28 岁, 硕士生, 研究方向: 生物无机化学。

1.1 染料与 DNA 的键合生成常数

当 DNA 同某些染料小分子共存时, 可以观察到荧光强度的变化。对此我们定义:

$$\Delta F = F - F_D \quad (1)$$

其中 F 是在 DNA 溶液中加入染料后体系的荧光强度, F_D 是自由 DNA 的荧光强度; 当 DNA 与配体只有一类成键位置时可得

$$\Delta F = (1 - X) F_A + X F_b \quad (2)$$

式中 X 是键合在 DNA 上的染料浓度与染料总浓度之比; F_A 是自由染料的荧光强度; F_b 是键合到 DNA 上的染料对荧光的贡献。设染料总浓度为 M_t , 键合到 DNA 上的染料浓度为 M_b , 则由式(2)可得

$$M_b = M_t (\Delta F - F_A) / (F_b - F_A) \quad (3)$$

设 DNA (P) 与染料 (M) 成键时有 n 个相互独立且等同的键合位置, 则对下述反应:



(其中 K_A 为生成常数, K_D 为解离常数) 其 K_A 值应由下式表出:

$$K_A = [nM_nP] / [M]^n [nP] \quad (5)$$

设 P_t 为 DNA 的总浓度, 生成物 M_nP 的浓度可表为 M_b/n , 以及 $M = M_t - M_b$ 和 $P = P_t - M_b/n$, 代入式(5)可得

$$M_t / M_b = 1 / K_A (nP_t - M_b) + 1 \quad (6)$$

合并式(3)和式(6)可得

$$(\Delta F - F_A)^{-1} = (F_b - F_A)^{-1} (1 + 1 / K_A (nP_t - M_b)) \quad (7)$$

根据式(6)和式(7)可以测得 n 和 K_A 。

1.2 能量给体 - 受体间距离的测定

根据 Forster 型偶极 - 偶极无辐射能量转移机理^[3], 转移效率 E 与给体 - 受体间距离 r 及临界能量转移距离 R_0 有关:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (8)$$

其中 R_0 是能量转移效率为 50% 时的临界距离:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} (K^2 n^{-4} J \Phi_D) \quad (9)$$

式中 K^2 为偶极空间的取向因子, n 为介质的折射指数, Φ_D 为给体的光量子产率, J 为给体 (DNA) 的荧光发射光谱与受体 (染料) 的吸收光谱间的光谱重叠积分, 可表示为

$$J = \sum F_D(y) \varepsilon_A(y) y^{-4} \Delta y / \sum F_D(y) \Delta y \quad (10)$$

其中 $F_D(y)$ 为荧光给体 (DNA) 在波数为 y 的荧光强度, $\varepsilon(y)$ 为受体 (染料) 在波数为 y 的摩尔消光系数, 能量转移效率亦可由下式测定:

$$E = 1 - F / F_0 \quad (11)$$

其中 F 和 F_0 分别为能量接受体存在和不存在时能量给予体的荧光发射强度, 显然, 只要得知 E , K^2 , Φ_D 和 n 并通过实测光谱求出积分 J , 就可算出 R_0 和 r 。

2 实验部分

2.1 主要试剂与仪器

LS-50B(PE 公司) 荧光 - 磷光光谱仪, M-700(HP 公司) 紫外 - 可见 - 近红外分光光度计, BEKMAN 酸度计。配制小牛胸腺 DNA(生化试剂, 华美公司) $3 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液, 分别配制 ZR(北京化工厂)、甲酚红(北京化工厂) 和苏木色精(上海化学试剂采购供应站试剂厂) 的 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。B-R 缓冲液: 在 100mL 三酸混合液(磷酸、乙酸、硼酸, 浓度均为 $0.04 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 加入指定体积的 $0.2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液即得相应值的缓冲溶液。以上试剂均以三蒸水配溶液, 配制后放置冰箱中备用。

2.2 实验方法

(1) 固定 ZR 及 B-R 的浓度, 分别逐次加入一定量的 DNA 溶液, 测其吸光度; 改变酸度、温度、时间、离子强度, 测其吸光度; (2) 分别固定甲酚红、苏木色精及 B-R 的浓度, 分别逐次加入一定量的 DNA 溶液, 测其吸光度; (3) 取三蒸水 1mL, 0.5mL B-R 缓冲液, 分别逐次加入一定量 DNA 溶液, 在不同激发波长下, 扫描其荧光发射谱, 得知在 374nm, 其最大相对发射强度为 577.7, 表明 DNA 在一定激发波长下有较强的荧光; (4) 取染料溶液 1mL, 0.5mL B-R 缓冲液, 分别逐次加入一定量 DNA 溶液, 在一定激发波长下扫描其荧光发射谱; (5) 测定与 DNA 分子比为 1:1 的染料的紫外吸收谱。

3 结果处理

3.1 DNA 与染料的吸收光谱

在 $\text{pH} = 7.42$ 的 B-R 缓冲溶液中, 定量加入染料, 在一定波长范围内测定其紫外吸收谱; 进而向体系中加入一定浓度的 DNA, 再测定其紫外吸收谱, 如图 1a、b、c。每个图谱中最上面的线是不加 DNA 的线。当向 ZR 溶液中加入 DNA 时, 溶液由黄色变为红色, 最大吸收波长向短波方向移动, 且吸光度值下降; 而苏木色精、甲酚红溶液中加入 DNA 后, 最大吸收波长不变、但吸光度值下降。

(1) pH 值对 ZR 溶液加入 DNA 反应体系的影响: 实验表明, 在 $\text{pH} = 2.6 \sim 5.95$ 范围内, 其吸光度呈上升, $\text{pH} = 5.95 \sim 7.49$ 范围内, 吸光度达最高值并呈平稳, $\text{pH} = 7.5 \sim 10$ 范围内, 其吸光度呈下降趋势。表明在中性条件下 ZR 与 DNA 的结合达最大值。

(2) 反应温度及时间对 ZR 溶液加入 DNA 反应体系的影响: 在 $\text{pH} = 7.42$ 的 B-R 缓冲体系中, 该反应体系有以下特点: (1) 反应速度快, 向 ZR 溶液中加入 DNA, 溶液立即变为红色, 3min 以内吸光度达到最大值并稳定; (2) 反应体系稳定, 在测定范围内其吸光度值变化不大, 相对误差小于 5%; (3) 反应

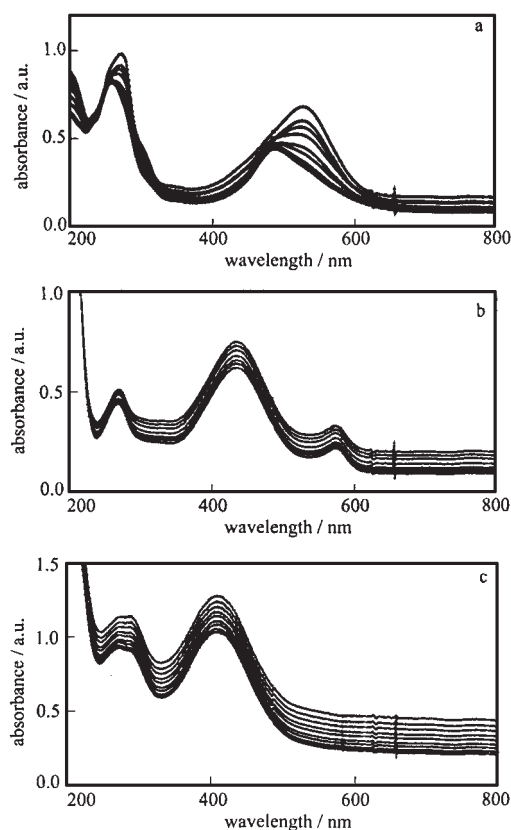


图 1 染料和 DNA 作用的紫外光谱

Fig. 1 UV spectrum of action of dyes with DNA
(a): ZR + DNA, (b): cresol red + DNA,
(c): hematoxylin + DNA

体系对温度的适应性强,从 10℃ 到达 35℃,其温度的变化为 25℃,吸收谱无明显变化,表明此反应对温度变化不敏感。

(3) 离子强度对 ZR 溶液加入 DNA 反应体系的影响: 分别将不同浓度 (重量%)、一定体积 $V(\text{mL})$ 的 NaCl 溶液加到浓度为 $C_{\text{ZR}} = 3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $C_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二元溶液体系 (B-R, pH = 7.42) 中, 分别测定这些不同离子强度的体系的紫外吸收光谱, 结果见图 2。在固定体积下, 随着体系的离子强度的增大, 其吸光度呈规律性下降, 标准工作曲线的斜率也规律性减小, 这表明当体系中离子强度增大时, Na^+ 和 Cl^- 分别对 ZR 和 DNA 的结合有竞争和屏蔽作用。因此, 离子强度的增大对体系灵敏度的影响也越大。

3.2 摩尔吸光度与最大结合数

采用摩尔比法, 测定最大结合数, 结果见图 3。当曲线斜率发生变化、两切线直线交点处为与 DNA 结合的 ZR 数目 (最大), 从交点座标所对应的 DNA 浓度和 ZR 的浓度 (已知), 求出 $n = 303$, 依据 Beer 定律, DNA-ZR 在溶液中的吸光度为 $A = \varepsilon bc$ ($b = 1 \text{cm}$), 式中 ε 代表 DNA-ZR 配合物的摩尔吸光系数, C_{DNA} 代表 DNA 的浓度, 从图可得表观摩尔吸光系数: $\varepsilon = 1.5 \times 10^6 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

3.3 DNA 与染料在不同结合数下的生成常数

向染料溶液中逐次加入 DNA 后得到荧光强度 F_n 值 (第一个点为 F_A ; 最高点为 F_b), 然后逐点减去向空白 B-R 溶液中加入 DNA 得到的荧光强度 F_D , 由式 (3) 及染料浓度 M_t , 可求得不同 F_n 值下的 M_b , 求出加入不同量 DNA 溶液后的 P_t 值。按式 (7), 以 $(nP_t - M_b)^{-1}$ 作横轴变量, $(\Delta F - F_A)^{-1}$ 作纵轴变量, 并设 $n = 2$ 和 4 作图, 得到良好的直线, 线性相关系数 C 如表 1。直线斜率为 $(F_b - F_A)^{-1} \times K_A^{-1}$, 算得染料与 DNA 的生成常数 K_A 如表 1。

3.4 给体 - 受体间的距离

最大激发波长 ZR 选 445nm、甲酚红选 436nm、苏木色精选 374nm, 测定它们的荧光发射光谱, 观察了染料在加入 DNA 时荧光强度的变化, 结果表明加入 DNA 后出现荧光加强效应。

为了论证给体 - 受体间是否发生了能量转移, 我们固定激发波长, 测定了 DNA 与 3 种染

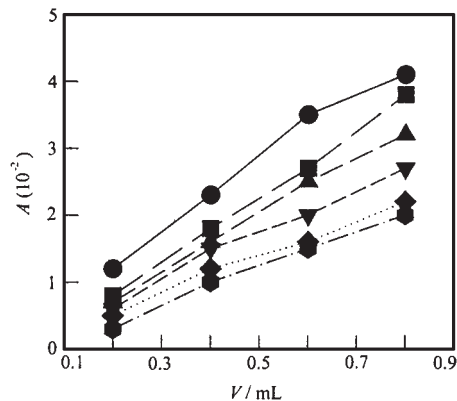


图 2 离子强度对 ZR/DNA 紫外吸光度的影响

Fig. 2 Effect of ion strength on UV absorption of ZR/DNA
 $C_{\text{ZR}} = 3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $C_{\text{DNA}} = 3 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
B-R, pH = 7.42

● 0.000% NaCl, ■ 0.001% NaCl,
▲ 0.005% NaCl ▼ 0.01% NaCl,
◆ 0.05% NaCl, × 0.1% NaCl

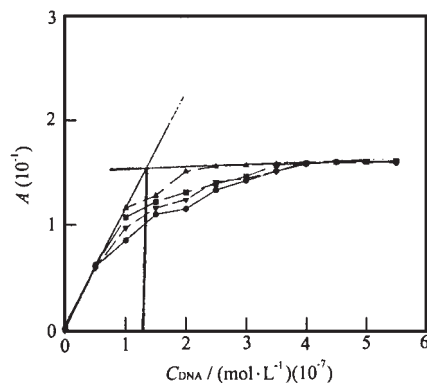


图 3 ZR/DNR 摩尔比的测定

Fig. 3 Mole ratio determination of ZR/DNA

$C_{\text{ZR}} = 3.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; B-R, pH = 7.42

料分别为 1:1 (摩尔比) 时缔合物的荧光发射光谱和染料的吸收光谱。将测得的缔合物的荧光发射谱和染料的吸收光谱绘在同一图中 (如图 4), 两者间发生了重叠, 可知给体 - 受体间发生了能量转移^[3]。结合式 (10), 把光谱重叠部分分割成极小的矩形面积求积分, 分别算得 DNA 与 3 种染料相互对应的重叠积分 J 值如表 1。

表 1 三种染料与 DNA 的生成常数、结合位置数、作用距离、能量转移效率和线性相关系数

Table 1 Association Constant (K_A), Binding Site Numbers (n), Action Distance (r), Energy-Transferring Efficiency (E), and Linear Correlation Coefficient (C) of three Kinds of Dyes with DNA

dye	$K_A (n=2)$	C	$K_A (n=4)$	C	$K_A^{(2)} / K_A^{(4)}$	$J (10^{-14})$	$R_0 (\text{\AA})$	E	$r (\text{\AA})$
ZR	0.708×10^5	0.9985	0.220×10^5	0.9987	3.22	9.85	35.8	0.800	28.42
cresol red	1.482×10^5	0.9984	1.920×10^5	0.9984	0.77	5.42	32.4	0.189	41.3
hematoxylin	2.773×10^5	0.9987	3.214×10^5	0.9986	0.86	6.22	33.2	0.730	28.13

以色氨酸为标准物 ($\Phi_D = 0.14^{[5]}$)、用相同的激发波长和仪器参数, 用相对法测定 DNA 的量子产率 $\Phi_D = 0.118$, 折射参数 n 取水和有机物的平均值 1.336, 取向因子取给体 - 受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ 。以上各量代入式 (9), 分别得到 DNA 和 3 种染料相互间的能量转移距离 R_0 如表 1。能量转移效率的测定, 利用前面测定的 DNA 与染料摩尔比为 1:1 的缔合物的荧光强度, 按式 (11) 算得能量转移效率 E 值如表 1, 于是, 由 R_0 和 E 、按式 (8) 分别得到 DNA 与染料分子的距离 r 如表 1。

4 讨 论

从表 1 数据可见, 甲酚红与 DNA 的给体 - 受体作用距离 $r(\text{\AA})$ 明显大于 ZR 和苏木色精与 DNA 的相应距离; 而能量转移效率 E 前者明显小于后二者, 表明给体 - 受体作用距离的增加, 会大大降低能量转移效率。而能量转移效率的大小, 与药剂对生物大分子的影响、两者间的作用强度有直接关系, 因而, 这两个参数的求取, 对药剂功能的研究有参考价值。

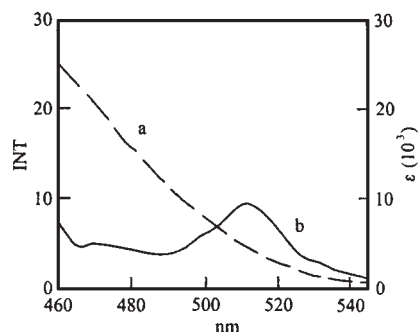


图 4 DNA 的荧光光谱与甲酚红紫外吸收谱的重叠

Fig. 4 Overlapping of fluorescence spectrum of DNA and UV spectrum of Cresol Red

a: UV spectrum of cresol red

b: fluorescence spectrum of DNA

参 考 文 献

- [1] Stryer L., Hauland R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1967**, **58**, 719.
- [2] YANG Man-Man (杨曼曼), YANG Pin (杨 频), ZHANG Li-Wei (张立伟) *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, 1994, 39, 31.
- [3] YANG Man-Man (杨曼曼), YANG Pin (杨 频), XI Xiao-Li (席小莉) *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, **1997**, **42**, 1276.
- [4] ZHUANG Jia, CHI Yan-Hua, LI Ke-An, LI Na, TONG Shen-Yang *Acta Chimica Sinica*, **1998**, **56**, 827.
- [5] Chen R. F. *Anal. Lett.*, **1967**, (1), 35.

Study on the Interaction Mechanism of Fluorescence Dyes with DNA

XI Xiao-Li YANG Man-Man HAN Xiao-Jian YANG Pin*

(*Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006*)

Interaction of nucleic acid with various substances is closely related to detecting the structure and function of nucleic acid, which is an important way of discovering biological function of nucleic acid and action mechanism of some drugs. In this article, the interactions of dye ZR, cresol red, and hematoxylin etc with DNA have been studied, and the association constant with different binding numbers has also been obtained; Furthermore, we have also got the energy transferring efficiency and the distance of donor and acceptor.

Keywords: fluorescence dyes DNA donor and acceptor