

聚阳离子海美溴铵与 DNA 之间相互作用的光谱分析

廖杰¹ 于冰² 丛海林² 刘虎威² 曹维孝²

(1 解放军总医院医学实验测试中心 北京 100853)

(2 北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 本文用紫外光谱、显微傅立叶变换红外光谱和圆二色光谱对聚阳离子海美溴铵(PB)和 DNA 之间的相互作用进行研究。以溴化乙锭作为与 DNA 结合的荧光探针,考察 PB 对其结合体系的影响。荧光分析结果显示, PB 与 DNA 的相互作用可能对 DNA 二级结构的构型产生影响。IR 光谱表明, PB 通过磷酸基团和 DNA 碱基与 DNA 发生相互作用, DNA/PB 复合物的形成引起 DNA 二级结构的构型变化,这一点也在 CD 光谱分析中得到验证。

关键词 海美溴铵 DNA 相互作用 构型 光谱分析

寻找一种有效的基因转移载体,在基因治疗技术的研究中非常重要。阳离子多聚物载体具有结构灵活(易调整其分子量、聚合物合成、多聚物形状等)的特点,可以通过引入侧链和特异靶向性基团来修饰多聚物骨架,进而调整和改善载体的性能,因此具有较大的发展空间,已逐渐成为研究的热点^[1]。海美溴铵(Polybrene, PB)是一种作为基因转移载体材料的线型聚阳离子(结构式见图 1),本文首次借助核酸荧光探针的光谱分析、显微傅立叶变换红外光谱(FTIR)、荧光光谱和圆二色谱(CD)研究 DNA 与 PB 之间的相互作用。

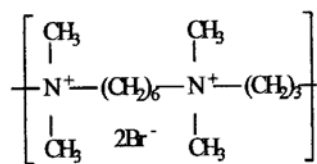


图 1 海美溴铵(Polybrene, PB)的结构式

1 实验部分

1.1 试剂

DNA 溶液:用水溶解适量鲑鱼精 DNA(hsd-DNA)于电磁搅拌器温和搅拌至完全溶解,置冰箱中,4℃条件保存。其准确浓度用分光光度剂在 260 nm 测定,并用碱基的摩尔浓度来表示(DNA: $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

热变性 DNA 溶液:将天然的 DNA 置于沸水中加热 20 min 后直接于冰水浴中冷却而制得。

PB 溶液:称取一定量的 PB(购于美国 Aldrich

公司,平均分子量 15000),用水溶解,配得浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 。(若无特别指明,聚阳离子溶液的浓度均指的是单体的浓度)。

荧光染料溶液:溴化乙锭(EB,北京华美生物工程公司)直接配成水溶液。

其它所有试剂均为分析纯,实验用水为双蒸去离子水。

1.2 仪器和实验方法

将一定量的 PB 溶液逐步加入 DNA/EB 复合物的水溶液中,用紫外分光光度计(Shimadzu, UV-2100,日本)进行监测,观察 PB 对 DNA/EB 复合物紫外可见光谱的影响。

荧光光谱和荧光强度在 F-4500(Hitachi, Japan)荧光光谱仪上获得的。将一定量的 PB 溶液(单体浓度为 1 mol/L)逐渐加入到 DNA/EB 复合物的水溶液中。在 535 nm 处激发,测定 595 nm 的荧光强度,观察体系荧光强度随 PB 浓度的变化。

用 Nicolet MAGNA-IR 750 光谱仪进行显微红外检测。DNA 粉末直接用于实验,从而获得 DNA 的显微 FTIR。而对于 PB 或 DNA/EB 复合物的显微 FTIR,将它们的水溶液分别滴在载玻片上,等溶液干后在载玻片上形成薄膜。从薄膜中即可获得微量的粉末用于红外光谱的测定。天然 DNA,变性 DNA 和 DNA/EB 复合物的 CD 光谱是在 1 cm 光程的比色池中用 JOBIN YVON-SPEX CD 6(France Groupe Instruments S A)仪器测定的。

2 结果和讨论

2.1 PB 对 DNA/EB 复合物之间相互作用的影响

图2为DNA/EB体系的吸收光谱随着PB加入的变化情况。可以看出,EB自身的吸收光谱在480nm有一最大吸收峰,表明EB自身微弱的聚集趋势^[3](见图2a)。随着DNA的加入(DNA与EB的浓度比为4.0),最大吸收峰红移至500nm,同时伴随着吸光度的降低(见图2b)。当PB逐步加入此溶液中时,可以看出光谱的最大吸收峰又逐渐向低波长方向移动,并且吸收值逐渐增大(见图2c~e)。这种光谱图的渐渐复原说明DNA与PB之间的相互作用有可能使EB从DNA/EB复合物中解离出来。然而,即使在较高浓度的PB存在下,光谱图也没有完全复原成EB单独存在时的光谱图,这可能是由于大量疏水型DNA/PB复合物的聚集,导致溶液出现混浊,引起整个吸收曲线的基线上扬所致(见图2f)。

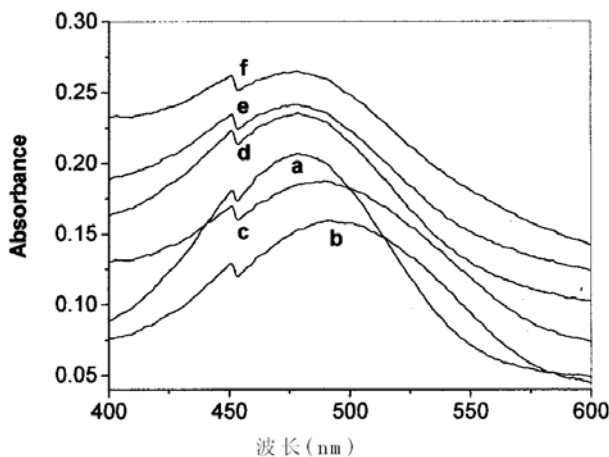


图2 DNA/EB体系的吸收光谱随着PB加入的变化情况
a 30.0 μmol/L EB在0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.3)中的吸收光谱;
b 加入120.0 μmol/L hsdNA;
c~f 为PB的浓度分别增加到30、60、90、120 μmol/L。

图3是PB对DNA/EB体系荧光强度的影响曲线。DNA的浓度为40.0 μmol/L, EB为10.0 μmol/L。可以看出,曲线呈现反S型,体系的荧光强度在PB的浓度为5~30 μmol/L范围内变化最明显,此范围对应N:P值(聚合物单体的浓度与DNA磷酸基团的浓度比)为0.12~0.80。对应此范围,荧光强度由最初荧光强度的95%降至75%;在此范围之外, PB浓度的变化使得体系荧光强度的变化十分缓慢。根据文献报道^[4],在某一范围内荧光强度的明显淬灭说明PB的加入不利于DNA与EB之间的相互作用。

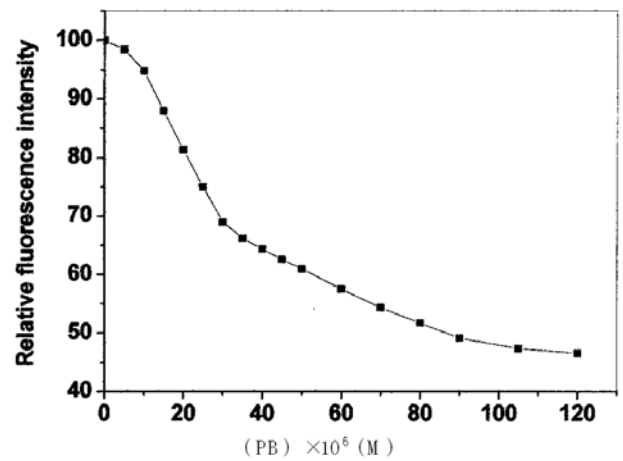


图3 PB对EB-DNA荧光强度的影响

0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.3 中含 10.0 μmol/L EB 和 40.0 μmol/L DNA。

2.2 显微FTIR

图4是DNA、PB和DNA/PB复合物的显微FTIR。DNA的主要红外吸收是:1063 cm⁻¹, 对应于磷酸基团的对称伸缩振动;1222 cm⁻¹, 磷酸基团的非对称伸缩振动;1017 cm⁻¹, 核糖的C=N振动;1693 cm⁻¹, 鸟嘌呤的C₆=O振动和胸腺嘧啶的C₄=O振动(137)。PB自身仅在1486 cm⁻¹有一吸收峰, 对应于CH₂弯曲振动。由图4可以看出, PB的加入明显地改变DNA的光谱。这些变化可以从DNA光谱中磷酸、碱基的特征吸收谱带的位移看出, 由最初的1063 cm⁻¹, 1222 cm⁻¹, 和1693 cm⁻¹分别移至1062 cm⁻¹, 1234 cm⁻¹, 1658 cm⁻¹, 这表明PB与DNA磷酸基团和碱基均发生作用^[5]。而且, PB的作用在一定程度上改变DNA的B构型, 这一点可以从1017 cm⁻¹处的B构型的特征峰的消失看出。

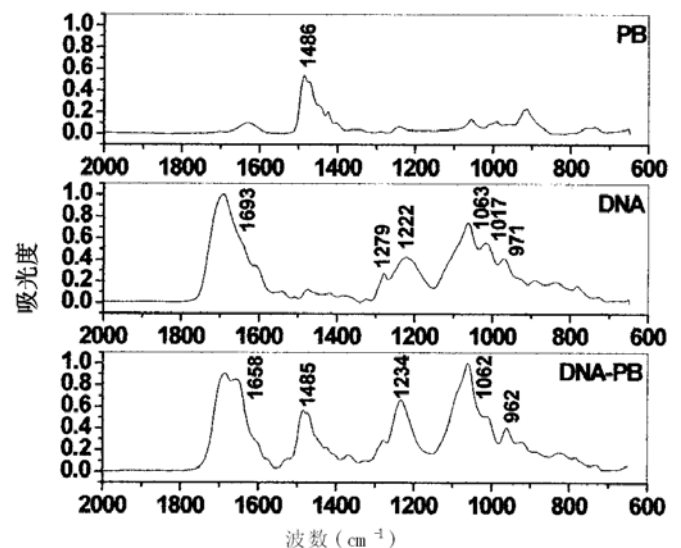


图4 DNA、PB和DNA/PB混合物的显微FTIR光谱

2.3 圆二色光谱

圆二色光谱(Circular dichroism, CD)以高频变换的左旋或右旋偏振光作为入射光,为DNA的绝对

构型、构象和反应机理的研究提供很多信息,是研究有机化合物和生物大分子的构型、构象和三维空间结构强有力的工具。核酸的圆二色光谱由聚合链及生色基团(核酸碱基)高的不对称手性所引起。近紫外区 CD 光谱常被看成是不同类型双螺旋 DNA 的特征,特别是适合于检测核酸双螺旋构型的转化。许多化合物(如药物及染料)在近紫外区具有吸收,但由于不含手性中心而不具备 CD 信号,但是当它们与 DNA 的螺旋结构结合时便会产生强的 CD 吸收带,所以便可获得有关其结构的间接信息。

PB 对 DNA 构型变化的影响可以通过测定在不同浓度 PB 存在下 $80 \mu\text{mol/L}$ 的 DNA 溶液的 CD 谱图来获得。光谱范围为 $220 \sim 320\text{nm}$ 。从图 5 可以看出, DNA 在 276nm 有一正峰,这是由于碱基的堆积而产生;在 248nm 有一负峰,由 B-DNA 的螺旋结构产生的 (134)。而对于变性 DNA,仅存在 276nm 的正峰。当溶液中 PB 的浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, DNA 的 CD 谱图的正峰和负峰均向高波长方向位移(分别移至 285nm 和 254nm),同样伴随着峰值的减少,

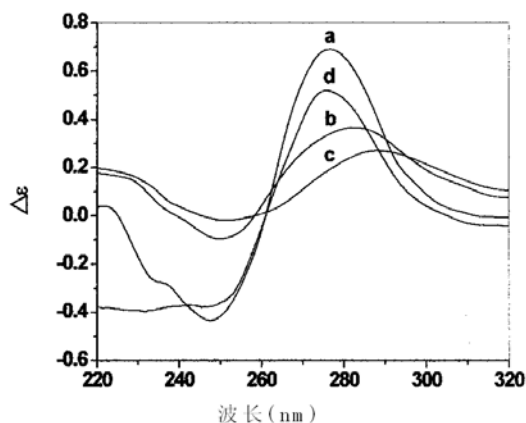


图 5 PB 对 DNA 溶液 (0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.3) CD 光谱的影响

a $80 \mu\text{mol/L}$ DNA; b $80 \mu\text{mol/L}$ DNA + $50 \mu\text{mol/L}$ PB;
c $80 \mu\text{mol/L}$ DNA + $100 \mu\text{mol/L}$ PB; d 热变性 DNA, $80 \mu\text{mol/L}$ 。

这说明 DNA 二级结构发生从 B-到 C-构型的转变。

Studies on the interaction between polybrene and DNA by spectral methods

Liao Jie¹ Yu Bing² Cong Hailin² Liu Huawei² Cao Weixiao²

(1 Medical Experiment Analysis Center, PLA General Hospital, Beijing 100853)

(2 Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract The interaction of polybrene (PB) with hsDNA has been studied by spectroscopic analysis, microscopic IR- and CD-spectroscopy. Using ethidium bromide (EB) as a fluorescent probe, the binding of PB with DNA was studied. The fluorescence analysis shows that the interaction of DNA with PB may have effect on the conformation of secondary structure of DNA. IR-spectra show that PB interacts with DNA through both the phosphate groups and the bases of DNA and the formation of DNA/PB complex causes the change of the conformation of the DNA secondary structure, which is further proved by CD-spectra.

Key words Polybrene DNA Interaction Conformation Spectral methods

PB 浓度的进一步增加引起 CD 峰的进一步红移和峰值减少,逐渐变得不明显,这可能也是由于大量疏水复合物发生聚集沉积的结果。可以看出, DNA/PB 复合物的 CD 谱与变性的 DNA 的不同,进一步证实了在荧光实验中得到结论, PB 与 DNA 的作用不会使 DNA 变性,仅仅是改变 DNA 的二级结构。

3 结论

从实验中可以看出,当将 DNA 与 PB 混合后, DNA/PB 复合物很容易形成,这种复合物的形成可能在基因转染中有实际用途。PB 与 DNA 中的磷酸基团和碱基作用,导致 DNA 构型发生 B-到 C-构型的转变。这种构型的变化改变嵌入剂 EB 与 DNA 之间的相互作用。

参考文献

- 1 Leong K W, Mao H Q, Truong-Le V L, Roy K, Walsh S M, August JT (1998) DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release* 53:183~193
- 2 Asayama S, Akaike T, Maniyama A (2001) Bi-phasic polycation for the DNA carrier responding to endosomal pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 22:183~191
- 3 Zhou Y L, Li Y Z (2004) The interaction of poly(ethyleneimine) with nucleic acids and its use in determination of nucleic acids based on light scattering. *Spectrochimica Acta Part A* 60: 377~384
- 4 Zhou Y, Li Y, Studies of the interaction between poly(diallyldimethylammonium chloride) and DNA by spectroscopic methods. *Colloids and Surfaces A*, 2004, 233 (2): 129~135
- 5 Hackl E V, Komilova S V, Kapinos L E, Andrushchenko V V, Galkin V L, Grigoriev D N, Blagoy Y P, Study of Ca^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} binding to DNA in solution by means of IR spectroscopy. *J Mol Struct* 1997, 408: 229~232