

共振光散射法研究甲萘威与 DNA 的作用及其应用

饶震红, 刘世禄, 孙英*, 闵顺耕, 赵慧宇

中国农业大学应用化学系, 北京 100094

摘要 通过共振光散射光谱(RLS)和电子吸收光谱的特征, 探求了甲萘威与 ctDNA 的结合方式, 实验表明在 pH 1.97 的条件下, 甲萘威与 ctDNA 既有表面聚集又有嵌入式结合的双重作用, 结合形式与二者之间的浓度比有关。在此条件下, 甲萘威与 ctDNA 作用的 RLS 强度与 ctDNA 的浓度呈线性关系, 据此建立了一种简单快速测定 ctDNA 的新方法。ctDNA 的浓度在 $0.02 \sim 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的范围内与 RLS 强度呈良好的线性关系, 线性方程为 $I = 200.77c(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) + 118.91$, 相关系数 $r = 0.9989$ 。该方法已成功地用于人工混合样品的测定。

关键词 共振光散射光谱; 甲萘威; ctDNA; 相互作用; ctDNA 测定

中图分类号: O436.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)02-0399-04

引言

甲萘威(carbaryl)是生产和生活中广泛使用的氨基甲酸酯类高效杀虫剂。资料表明甲萘威具有环境激素效应, 对生物体的免疫系统、生殖内分泌系统有极大损害^[1], 已有报道证明甲萘威与 ctDNA 之间具有相互作用, 并且以扦插作用与 ctDNA 形成加合物^[2]。共振光散射法(RLS)对物质颗粒体积的变化非常敏感, 灵敏度高, 能够提供更丰富的信息^[3]。利用 RLS 以有机染料为探针研究蛋白质、核酸^[4]等生物大分子是非常活跃的研究课题。本文用 RLS 研究了离体条件下农药甲萘威与核酸的相互作用方式, 以期能进一步揭示其生物毒理学的内涵, 同时利用甲萘威与 ctDNA 作用的 RLS 强度与 ctDNA 的浓度呈线性关系, 建立了一种简单快速测定 ctDNA 的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计(日立公司), PHS-3C 型酸度计(上海雷磁), Lambda25 型紫外-可见分光光度计(美国 PE); MVS-1 旋涡混合器(北德科学仪器公司)。

小牛胸腺脱氧核糖核酸(ctDNA, sigma 公司), 储备液浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 低温保存。甲萘威(Carbaryl, 中国农业大学农业部农产品质检中心提供, 纯度 95%), 储备液浓

度 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以少量色谱级甲醇溶解, 并用 2:1 的甲醇溶液定容。实验用水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

1.2 实验方法

在一系列 10 mL 比色管中依次加入 H_2SO_4 ($0.2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.2 mL, 一定量的 ctDNA 溶液, 旋涡混合均匀后加入甲萘威($1.0 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL, 用超纯水定容至 10 mL, 混合均匀后在 40°C 水浴上加热 30 min, 于荧光光度计 $\lambda_{\text{em}} = \lambda_{\text{ex}}$ 处进行同步扫描, 得到共振光散射光谱。在最大共振散射峰 322.6 nm 处测定溶液的 RLS 强度。激发与发射狭缝宽度均为 10 nm。

2 结果与讨论

2.1 甲萘威与 ctDNA 作用的光谱特征

由图 1 可知, 在测定的条件下, 单纯的 ctDNA 和甲萘威都有共振光散射, 甲萘威的散射峰比 ctDNA 的散射峰强, 当甲萘威与 ctDNA 混合后, 体系的 RLS 强度增强, 可以观察到在 264~274 nm 峰值上升的平缓, 从 281 nm 开始峰值急剧增加, 在 322.6 nm 处产生一明显尖锐的 RLS 峰, 在 432~472 nm 处有较弱的 RLS 峰, 表明甲萘威与 ctDNA 发生了相互作用, 而且在一定范围内共振光散射强度 I_{RLS} 随 ctDNA 浓度增大而增大。混合体系的 I_{RLS} 在 322.6 nm 处共振光的散射强度最大, 因此选择 322.6 nm 为测量波长。

在通常的共振光散射光谱中, 最强的散射信号常位于分子吸收的低能区^[5], 从共振光散射光谱(见图 1)与电子吸收

收稿日期: 2006-11-02, 修订日期: 2007-02-06

基金项目: 教育部科学技术研究技术重点项目资助

作者简介: 饶震红, 女, 1968 年生, 中国农业大学应用化学系实验师

* 通讯联系人 e-mail: sunying@cau.edu.cn

光谱(见图 2)的对比可知, 甲萘威与 ctDNA 混合体系在 200~226 nm 处强的吸收带没有共振光散射信号, 在 280 nm 附近的吸收对应低强度的共振光散射, 而波长大于 314 nm 的分子吸收低能区对应增强的共振散射信号。

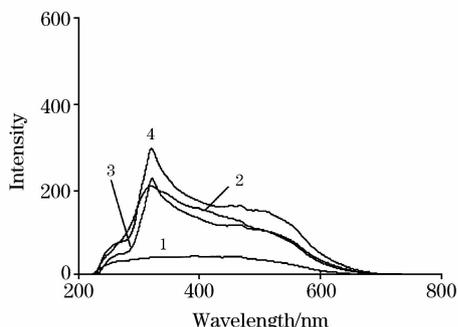


Fig. 1 Resonance light scattering spectra of carbaryl-ctDNA at pH 1.97

1: ctDNA: $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2: carbaryl: $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
3: Carbaryl: $(1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{ctDNA } 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;
4: Carbaryl: $(1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + \text{ctDNA } 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

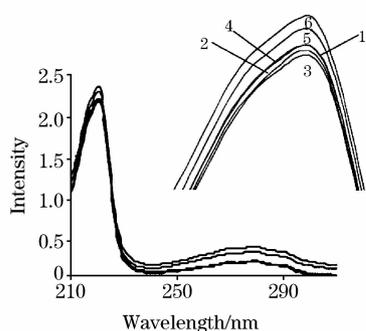


Fig. 2 Absorption spectra of carbaryl-ctDNA

Carbaryl: $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 1.97;
ctDNA/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$: 1: 0; 2: 0.05; 3: 0.1; 4: 0.3; 5: 7; 6: 10

2.2 甲萘威的自聚集现象

实验发现随着甲萘威浓度的增大, 体系的共振光散射强度也在增强(见图 3), 从单纯甲萘威的吸收光谱(见图 4)可知, 在实验酸度下, 甲萘威在 221 和 280 nm 处产生特征吸收峰, 随甲萘威浓度增大, 峰值不断增加, 当其浓度大于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 在 221 nm 处的特征吸收峰的吸光度已不遵守 Beer 定律, 而且在 221 nm 处的尖锐峰出现分裂和蓝移现象, 说明甲萘威在浓度大于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后即表现出自聚集现象^[6]。

2.3 甲萘威与 ctDNA 的作用机理

酸性条件下, 甲萘威将质子化, 成为带正电荷的阳离子, 而 ctDNA 本身是带负电荷的阴离子, 但核酸在酸性条件下会引起构象变化, 氢离子与碱基上的 N 原子结合, 破坏了碱基对之间的氢键, 使 ctDNA 的双螺旋结构解链^[7], 并且随着酸度的增加碱基上的 N 原子进一步质子化^[8], 使得 ctDNA 与甲萘威之间的静电作用降低。由甲萘威与 ctDNA 混合体系在 pH 1.97 下的吸收光谱(见图 2)可知, 混合体系在 221

nm 处的吸收随 ctDNA 浓度的增加而降低, 表现出减色效应, 说明甲萘威与 ctDNA 的磷酸根由于静电而结合, 使甲萘威在 ctDNA 表面聚集, 产生共振光散射信号^[9], 但这种静电结合作用较弱。

甲萘威是萘基与氨基甲酰的结合产物, 含有两个苯环, 为平面结构, 因此单链 ctDNA 上暴露出的碱基可以与萘基发生 $\pi-\pi$ 相互作用, 使得有自聚集能力的甲萘威以单链 ctDNA 为模板在其表面聚集, 产生大颗粒, 导致共振光散射强度增强。甲萘威在 221 和 280 nm 处自聚集产生的特征吸收峰(见图 4), 与在 ctDNA 作用下产生的特征吸收峰(见图 2)一致, 证明了 ctDNA 可以促使甲萘威在其表面聚集。由图 2 可知, 当 ctDNA 的浓度达到一定值时, 峰值开始缓慢增大, 波长未发生移动, 存在增色效应, 也体现出甲萘威与 ctDNA 的碱基发生作用^[10]。

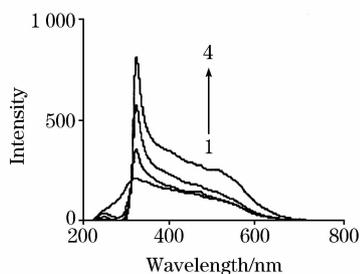


Fig. 3 Resonance light scattering spectra of carbaryl

$c(\text{carbaryl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 1~4 (1×10^{-5} ; 1×10^{-4} ;
 2×10^{-4} ; 1×10^{-3})

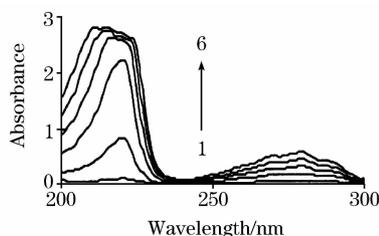


Fig. 4 Absorption spectra of carbaryl

$c(\text{carbaryl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 1~6 (1×10^{-6} ; 1×10^{-5} ;
 3×10^{-5} ; 5×10^{-5} ; 7×10^{-5} ; 9×10^{-5})

图 5 是甲萘威与 ctDNA 不同浓度比时吸收值的变化, 实验可知当浓度比大于 4.6 : 1, 曲线变化的非常平缓, 浓度比小于 4.6 : 1 时吸收值显著改变。弱的静电结合与 $\pi-\pi$ 堆积作用不能引起如此大的改变, 说明由于单链 ctDNA 本身可以回折收缩, 当 ctDNA 浓度增大时, 甲萘威不但可以和单链上的碱基作用, 也可以使互补的碱基相遇配对, 以氢键结合, 形成螺旋结构, 甲萘威嵌入 ctDNA 分子中。这种结合作用很强, 可以使共振光散射强度显著增加。

2.4 影响甲萘威与 ctDNA 作用的因素

2.4.1 酸度对体系的影响

酸度的变化影响核酸的构象, 因而介质 PH 值的改变影响甲萘威与 ctDNA 的作用方式。按实验方法, 以 H_2SO_4 溶液调节溶液的 PH 值, 测定混合体系的共振光散射强度, 见

图 6。发现当 pH 在 1.4~2.57 之间时,体系的 I_{RLS} 变化稳定,而且在 pH 1.97 处有极大值,因此实验选用 pH 1.97 为测定的酸度条件。

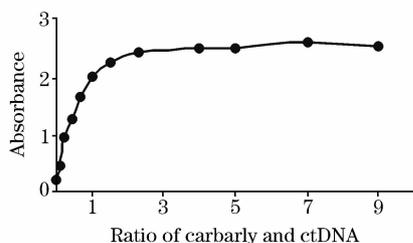


Fig. 5 Ratio of carbaryl and ctDNA

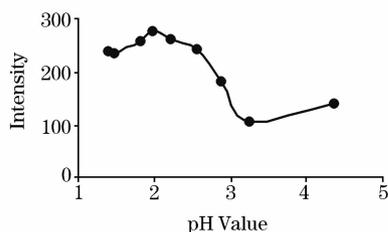


Fig. 6 Effect of pH on the intensity

ctDNA, $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Carbaryl, $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4.2 试剂加入顺序及反应温度

试剂的加入顺序对体系的共振光散射有影响,最好的加入方法是 H_2SO_4 -ctDNA-甲萘威,推测是 ctDNA 在不同酸度下构象有差异,使得甲萘威与 ctDNA 的结合方式不同,从而导致共振光散射光谱的稳定性不同。

实验表明在低温和反应时间小于 30 min 时,散射光谱重现性差,将溶液在 40°C 加热 30 min,可以获得稳定的共振光散射光谱,并且在 2 h 以内基本稳定。

2.4.3 甲萘威最佳用量的选择

由图 3 和图 4 可知,甲萘威在大于 $3 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表现出自聚能力,不同浓度的甲萘威本身具有不同的共振光散射强度。当甲萘威的浓度大于 $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,低浓度的 ctDNA 与其作用产生的 I_{RLS} 小,不成线性,影响对低浓度 ctDNA 的测定。所以实验中甲萘威的最佳用量应控制在 $3 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。

2.4.4 离子强度对体系的影响

向混合体系中加入不同浓度的 NaCl 溶液,随其浓度的增加,体系的共振光散射强度略有降低,但并不显著。一般认为控制离子强度的 Na^+ 与核酸表面的磷酸根发生静电作用,使共振光散射强度降低^[11],因此说明本实验中甲萘威与 ctDNA 分子之间存在较弱的静电结合。

2.4.5 共存物的干扰

在 ctDNA $0.5 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, carbaryl $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 1.97 的条件下,实验了金属离子、糖类和核苷酸对测定结果的影响,表明大多数的物质在本实验条件下对测定干扰不大(见表 1),但 Fe^{3+} 干扰严重,而且在 Fe^{3+} 存在时,

散射光谱的形状发生变化。

Table 1 Interference of foreign substance

干扰物质	存在浓度/ $\times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	相对误差/%
$\text{Ca}^{2+} (\text{Cl}^-)$	2	-2.93
$\text{Mg}^{2+} (\text{SO}_4^{2-})$	2	-2.41
$\text{Cu}^{2+} (\text{SO}_4^{2-})$	1	-7.8
$\text{Fe}^{3+} (\text{Cl}^-)$	1	18.16
$\text{Cd}^{2+} (\text{SO}_4^{2-})$	1	-6.3
$\text{Pb}^{2+} (\text{NO}_3^-)$	1	7.09
乳糖	10	-6.6
蔗糖	10	-9.54
葡萄糖	10	-7.76
尿素	10	-6.48
甘氨酸	$10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.12
DL-色氨酸	$10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	-7.04
DL-丙氨酸	$10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	-6.61
腺嘌呤	$1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	-2.03

2.5 线性范围、检出限与精密度

在确定的最佳实验条件下,测定了 ctDNA 的线性范围。当 ctDNA 的浓度在 $0.02 \sim 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围时,甲萘威与 ctDNA 作用表现出良好的线性。其线性方程为 $I = 200.77c (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) + 118.91$, 相关系数 $r = 0.9989$, 对 20 份空白样品进行测定,求得检出限为 $29.8 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} (3\delta)$, 对 10 份 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ctDNA 的标准溶液进行精密度检验,其相对标准偏差为 2.89%。

2.6 人工合成样品的测定

根据干扰实验的结果,在 ctDNA 的标准溶液中加入一定的干扰物质,合成 4 个样品,实验结果见表 2。

Table 2 Analytical results for synthetic samples

ctDNA 加入量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	检出值/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (n=5)$	回收率 /%	相对标准偏差/% ($n=5$)
0.02	0.019	98.4	1.75
0.5	0.53	107.3	2.21
1	0.91	90.7	1.38
1.5	1.38	92.2	3.25

混合样品中, pH 1.97 甲萘威 $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Ca^{2+} $2.0 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Cu^{2+} $1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 蔗糖 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; DL-丙氨酸 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 腺嘌呤 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

3 结论

通过研究共振光散射光谱和紫外吸收光谱,表明小分子甲萘威与大分子 ctDNA 因 pH 值和浓度比值不同存在不同的作用方式,既有甲萘威在 ctDNA 表面的聚集结合,又有嵌入式结合。由于混合体系共振光散射强度在一定范围内与 ctDNA 的浓度成正比,据此建立了一种简单快速测定痕量核糖核酸的方法。

参 考 文 献

- [1] LI Yan-nan, TAN Li-feng, SUN Xue-zhao, et al(李燕南, 谈立峰, 孙雪照, 等). Chinese J. Ind. Med. (中国工业医学杂志), 2005, 18(3): 163.
- [2] ZHANG Li-jin, MIN Shun-geng, SUN Ying, et al(张立金, 闵顺耕, 孙 英, 等). Environmental Chemistry(环境化学), 2004, 23(5): 520.
- [3] FENG Shou, LI Zheng-ping, ZHANG Shu-hong, et al(冯 硕, 李正平, 张淑红, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(12): 1676.
- [4] FENG Ning-chuan, HE Su-ping, ZHANG Juan, et al(冯宁川, 何苏萍, 张 娟, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 194.
- [5] LI Yuan-fang, HUANG Cheng-zhi, HU Xiao-li(李原芳, 黄承志, 胡小莉). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1998, 26(12): 1508.
- [6] HUANG Xin-hua, LI Yuan-fang, FENG Ping, et al(黄新华, 李原芳, 奉 萍, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2000, 28(6): 682.
- [7] SU Jie-shu, CHEN Xiao-ming, LUO He-an, et al(苏界殊, 陈小明, 罗和安, 等). Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报), 2005, 24(1): 60.
- [8] HUANG Cheng-zhi, LI Yuan-fang, LI Nian-bing, et al(黄承志, 李原芳, 李念兵, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1999, 27(11): 1241.
- [9] LIU Chen, CHEN Xiao-ming, XIANG Hai-yan, et al(刘 晨, 陈小明, 向海艳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(5): 697.
- [10] ZHANG Zhao-hong, ZANG Shu-liang, SU Xin, et al(张朝红, 臧树良, 苏 欣, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2005, 22(4): 819.
- [11] XING Hai-yan, CHEN Xiao-ming, ZHOU Di-wu(向海艳, 陈小明, 周迪武). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 1051.

Study on the Interaction of Carbaryl and ctDNA by Resonance Light Scattering Spectra and Its Application

RAO Zhen-hong, LIU Shi-lu, SUN Ying*, MIN Shun-geng, ZHAO Hui-yu
College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract Interaction modes of carbaryl and DNA were studied by resonance light scattering (RLS) spectra and absorption spectra. Experiments show that at pH 1.97, there are two interaction modes between carbaryl and ctDNA, namely surface assembly mode and intercalative mode. Interaction mode has a relation with the concentration ratio of carbaryl to ctDNA. Under this condition, the RLS intensity of carbaryl and ctDNA is proportional to the concentration of ctDNA. According to this, one new simple and rapid method of determining ctDNA was set up. The linear ranges of the concentration of ctDNA were $0.02\text{--}3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linear regression equation was $I=200.77c(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})+118.91$, and the correlation coefficient was $r=0.9989$. This method has successfully been used to determine the synthetic samples.

Keywords Resonance light scattering spectra; Carbaryl; ctDNA; Interaction; ctDNA determination

(Received Nov. 2, 2006; accepted Feb. 6, 2007)

* Corresponding author