

# 荧光探针法研究铅离子对小牛胸腺 DNA 构象的影响

赵霞, 范阔海 (山西农业大学临床兽医实验室, 山西太谷 030801)

**摘要** [目的]利用荧光探针法研究铅离子与 DNA 的作用方式。[方法]采用紫外可见分光光度法检测了 DNA 的纯度,采用荧光滴定法研究了铅离子对 DNA 构象的影响。[结果]随着铅离子的加入, DNA-EB 复合物的荧光强度逐渐降低。在 DNA-EB 体系中加入铅离子后, 荧光强度随着铅离子浓度的增加而降低, 且荧光峰位略有红移。按生物分子的荧光寿命  $\tau_0$  为 10 ns 计算, DNA-EB 与铅离子的双分子猝灭常数分别为  $1.01 \times 10^{13}$  和  $4.0 \times 10^{14}$  L/(mol·s), 二者均大于生物分子的最大动态猝灭常数  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s), 说明由铅离子引起的 DNA-EB 的荧光猝灭属于静态猝灭。根据斜率和外推截距计算出 DNA-EB 与猝灭剂的解离常数为  $1.13 \times 10^{-5}$  mol/L。铅离子与 DNA-EB 的结合位点为 5.56, 结合常数为  $1.51 \times 10^{29}$ 。[结论]铅离子容易与 DNA 结合, 引起 DNA 构象的变化。

**关键词** 荧光探针; 小牛胸腺 DNA; DNA 构象

**中图分类号** Q5-33 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)34-16859-02

## Research on the Influences of Lead Ions on the Conformation of Calf-thymus DNA by Fluorescence Probe Method

ZHAO Xia et al (Laboratory of Clinical Veterinary, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

**Abstract** [Objective] The purpose was to research the action mode of lead ions and DNA by fluorescent probe method. [Method] The purity of DNA was detected by UV-vis spectrophotometry and the influence of lead ions on DNA conformation was researched by fluorescence titration. [Result] The fluorescence intensity of DNA-EB compound was decreased gradually along with the addition of lead ions. After the lead ions were added into DNA-EB system, the fluorescence intensity was decreased as the concn. of lead ions was increased and the fluorescent peak-position was a little red shifted. The fluorescence lifetime  $\tau_0$  of biological molecular was 10 ns, it was calculated out according to this that the double-molecular quenching constants of DNA-EB and lead ions were  $1.01 \times 10^{13}$  and  $4.0 \times 10^{14}$  L/(mol·s) resp., both of them were bigger than the maximum dynamic quenching constant, which was  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s), indicating that the fluorescent quenching induced by lead ions of DNA-EB belong to statistic quenching. According slope and extrapolation intercept, it was calculated out that the dissociation constant of DNA-EB and quencher was  $1.13 \times 10^{-5}$  mol/L. The binding site of lead ions on DNA-EB was 5.56 and their binding constant was  $1.51 \times 10^{29}$ . [Conclusion] It was easy for lead ions to combine with DNA and induce the change of DNA conformation.

**Key words** Fluorescence probe; Calf-thymus DNA; DNA conformation

DNA 是生物体的重要组成物质, 是基因表达的物质基础。DNA 与金属络合物相互作用的研究已引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。早在 20 世纪 80 年代中期, Barton 等在研究金属络合物与 DNA 的作用时, 发现  $Ru^{2+}$ 、 $Co^{3+}$  的八面手性金属络合物具有识别 DNA 二级结构的能力<sup>[2-3]</sup>, 从而发展了一种能识别 B 型 DNA 的手性络合物探针。靳兰等用溴化乙锭 (EB) 作探针研究了  $Fe(phen)_3Cl_2 \cdot 6H_2O$  等手性金属络合物与 DNA 的作用机理<sup>[4]</sup>。

EB 与 DNA 相互作用的方式可用 Scatchar 方程<sup>[5-6]</sup>来描述, 即  $r/c = K(n-r)$ ; 式中,  $r$  为 DNA 上平均每个核苷酸键合的 EB 分子数,  $n$  为每个核苷酸上的成键位点数,  $K$  为每一位点固有的结合常数,  $c$  为游离的 EB 浓度。据此, 笔者采用 EB 作为探针, 研究铅离子 ( $Pb^{2+}$ ) 与 DNA 的作用方式。

## 1 材料与与方法

**1.1 仪器与试剂** 荧光分光光度计 (F-2500, HITACHI), 紫外可见分光光度计 (UV-2100, UNICO), GDR 凝胶成像分析系统 (Syngene)。Tris、SDS、EB 为公司产品, 试验用水为去离子后的双蒸水。 $Pb^{2+}$  标准溶液为国家环境保护总局标准样品研究所提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 纯度的检测。**将购买得到的 DNA 用紫外法进行检测, 测定该 DNA 溶液的  $A$  值。 $A_{260}/A_{280} = 1.8$ 。

**1.2.2 DNA 浓度测定。**将提取得到的 DNA 溶于双蒸水溶液中, 于 4℃ 在冰箱中保存 7 d, 期间轻轻振荡使溶液充分混

匀。在 UV-2100 上测  $A_{260}$ , 通过朗伯-比尔定律, 利用  $\epsilon_{260} = 6600$  L/(mol·cm), 计算 DNA 浓度<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 荧光测定 (采用荧光滴定法)。**①DNA 与 EB 结合常数与位点计算。DNA 与 EB 结合常数实验是在某一固定浓度的 DNA 中用 EB 进行滴定。固定最佳激发波长 ( $\lambda_{ex} = 535$  nm) 和最佳发射波长 ( $\lambda_{em} = 595$  nm), 测定加入不同 EB 量时的荧光强度。② $Pb^{2+}$  对 DNA 构象的影响。首先在 DNA 溶液中滴加 EB 使 DNA 与 EB 全部结合, 最终形成 DNA-EB 复合物, 然后分别用  $Pb^{2+}$  进行滴定, 反应 3 min 后测定溶液的荧光强度, 记录数据并分析。

## 2 结果与分析

**2.1  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 荧光光谱的影响**  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 复合物体系荧光强度的影响如图 1、2 所示。结果显示, 随着  $Pb^{2+}$  的加入, DNA-EB 复合物的荧光强度逐渐降低。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<sup>[8]</sup>。 $Pb^{2+}$  几乎没有荧光, 在 DNA-EB 体系中加入金属离子后, 荧光强度随着  $Pb^{2+}$  浓度的增加而降低, 且荧光峰位略有红移。这是由于  $Pb^{2+}$  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。

**2.2  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 荧光猝灭方式的判断** 荧光猝灭机制主要包括动态猝灭和静态猝灭。一般情况下, 动态猝灭和静态猝灭可依据不同温度下的结果加以区别。对于动态猝灭, 随温度的升高, 将增加离子有效碰撞的数目, 加剧电子的转移, 使荧光物质的猝灭常数随温度的升高而增大, 若是静态猝灭则温度升高将降低复合物的稳定性, 使猝灭常数减小。当荧光体与猝灭体由于热运动等发生双分子碰撞时服从 Stern-Volmer 方程:  $F_0/F = 1 + Kq\tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$ <sup>[9]</sup>; 其

**作者简介** 赵霞 (1984 - ), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向: 中药调节动物免疫及分子机制。

**收稿日期** 2009-07-29

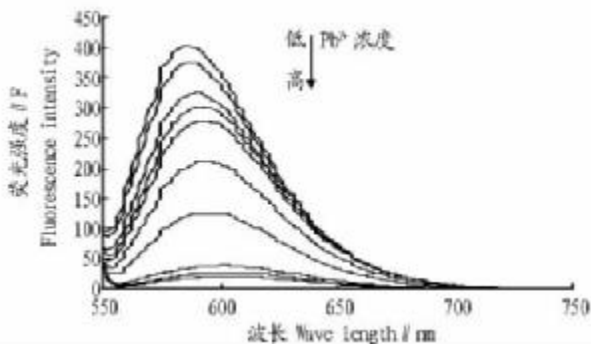


图1 不同浓度  $Pb^{2+}$  存在下 DNA-EB 复合物的荧光猝灭曲线  
Fig.1 The fluorescence quenching spectrum of DNA-EB under different  $Pb^{2+}$  concentrations

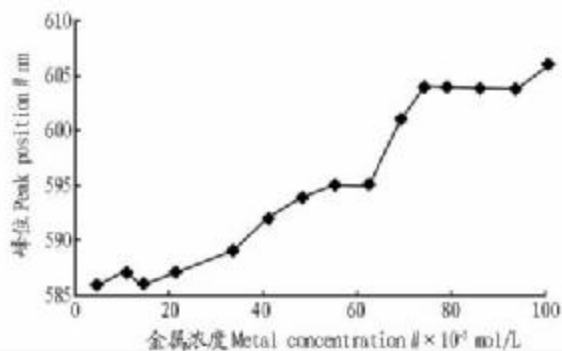


图2 不同浓度  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 复合物荧光的最大发射峰的影响  
Fig.2 Effects of different concentrations  $Pb^{2+}$  on the curve of the red shift of the maximum emission wavelength of DNA-EB

中,  $F_0$ 、 $F$  分别为 DNA-EB 与金属离子作用前后 DNA-EB 的荧光强度,  $[Q]$  为加入金属离子的浓度,  $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光体的寿命,  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $K_{SV}$  为动态猝灭常数。根据化学平衡可得由此引起的静态猝灭满足  $F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]$ 。根据试验, 以  $F_0/F$  与对应的  $[Q]$  作图 (图3)。按 Stern-Volmer 方法处理, 两直线区域 KSV 分别为  $1.01 \times 10^5$ 、 $4.0 \times 10^6$  L/mol。按生物分子的荧光寿命  $\tau_0$  为 10 ns 计算<sup>[10]</sup>, 双分子猝灭常数分别为  $1.01 \times 10^{13}$ 、 $4.0 \times 10^{14}$  L/(mol·s), 此两值大于生物分子的最大动态猝灭常数  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol·s), 说明两直线区域不是动态猝灭。因此,  $Pb^{2+}$  引起 DNA-EB 荧光猝灭属于静态猝灭。为了进一步说明这种静态猝灭行为, 按 Lineweaver-Burk 方程  $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D (F_0 [Q])^{-1}$ <sup>[11]</sup>, 以  $(F_0 - F)^{-1}$  对  $[Q]^{-1}$  作图可以得到一条直线, 通过斜率和外推截距可求出 DNA-EB 与猝灭剂的解离常数,  $K_D$  为  $1.13 \times 10^{-5}$  mol/L (图4)。

**2.3  $Pb^{2+}$  与 DNA-EB 结合位点的计算** 对于静态猝灭过程, 可按静态猝灭公式  $\lg(F_0 - F)/F = \lg K_A + n \lg [Q]$ <sup>[12]</sup>; 其中,  $F_0$ 、 $F$  分别为 DNA-EB 起始荧光强度、加入某一浓度  $Pb^{2+}$  时的荧光强度,  $K_A$  为结合常数,  $n$  为金属与 DNA 的结合位点。根据荧光强度按公式, 以  $\lg(F_0 - F)/F$  对  $\lg [Pb^{2+}]$  作图 (图5)。经线性拟合可得直线方程, 斜率和截距分别是结合位点数  $n$  及结合常数  $K_A$ 。根据线性拟合方程可知,  $Pb^{2+}$  与 DNA-EB 的结合位点为 5.56, 结合常数为  $1.51 \times 10^{29}$ 。

3 讨论

(1) 小分子与 DNA 的作用一般有 3 种基本模式: ①静电

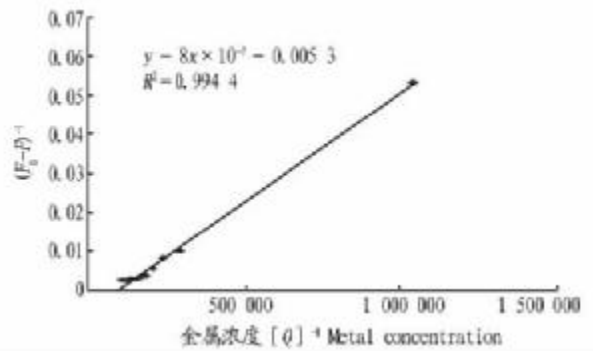


图3  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 复合物荧光猝灭的 Stern-Volmer 图  
Fig.3 Stern-Volmer Plots for the quenching of DNA-EB by  $Pb^{2+}$

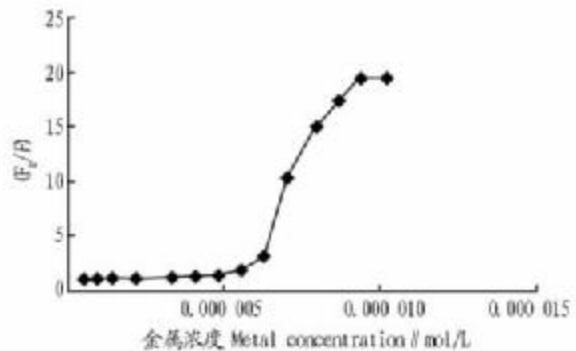


图4  $Pb^{2+}$  对 DNA-EB 复合物荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图  
Fig.4 Lineweaver-Burk Plots for the quenching of DNA-EB by  $Pb^{2+}$

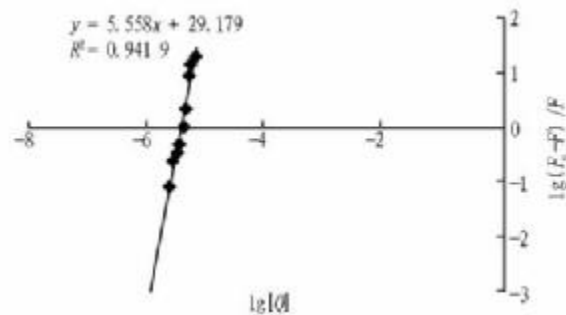


图5  $\lg(F_0 - F)/F$  对  $\lg [Pb^{2+}]$  作图结果

Fig.5 The plots of  $\lg(F_0 - F)/F$  versus  $\lg [Pb^{2+}]$

作用。即小分子带正电的部分与带负电的磷酸根骨架发生静电引力作用。②插入作用。具有平面结构的小分子插入到 DNA 双螺旋结构的碱基对中。③沟槽结合。小分子通过 DNA 分子中大沟槽及小沟槽与 DNA 的碱基发生作用<sup>[13]</sup>。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, 其生色团嵌入到碱基对中使荧光强度增加。金属离子几乎没有荧光, 在 DNA-EB 体系中加入金属离子后, 荧光强度随着金属离子浓度的增加而降低, 且荧光峰位略有红移, 这是由于金属离子竞争结合 DNA-EB 中 DNA, 使溴化乙锭分子从疏水环境进入亲水环境, 从而引起荧光强度的降低<sup>[14]</sup>。

(2) 金属离子及其配合物同 DNA 以多种方式结合, 包括强的共价作用及弱的非共价作用, 各种作用均会对核酸产生明显的影响, 并可获得位点特异性的反响。显然, 以配位化

(下转第 16866 页)

寻找出种与种之间的差异。

后翅基部及内缘基半部黑色,亚外缘内侧有镶黑边的红斑,其中红珠绢蝶后翅红斑中间无白色斑点。

小红珠绢蝶后翅内缘的黑斑沿中室的端横脉伸达中室

上缘,形成大钩状,这个特征非常明显,为该种独特的识别特征,有别与其他4种绢蝶。体形上阿波罗绢蝶最大,君主绢蝶次之,小红珠绢蝶最小。

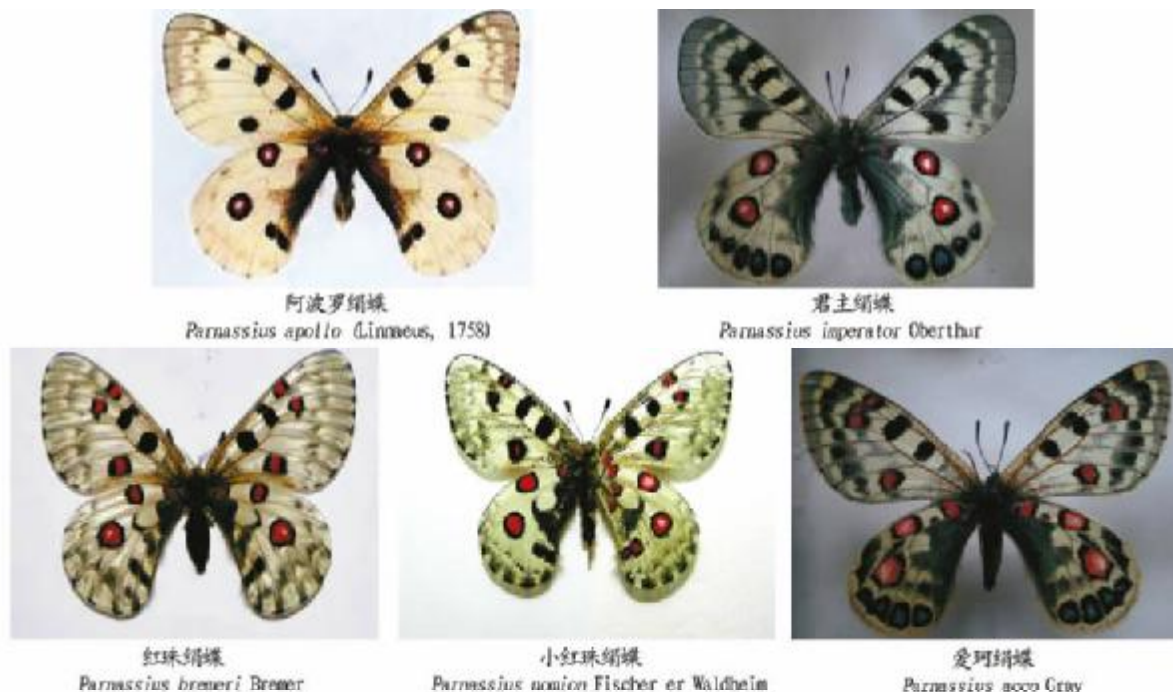


图1 5种绢蝶

Fig.1 Five kinds of parnassian butterflies

#### 参考文献

- [1] 潘鹏亮,沈佐锐,杨红珍,等.三种绢蝶翅脉数字化特征的提取及初步分析[J].动物分类学报,2008,33(3):566-571.
- [2] 丁亮,张彦周,朱朝东.铜凤蝶类和绢蝶类(鳞翅目,凤蝶科)分类地位及系谱关系初探[J].动物分类学报,2007,32(2):355-362.
- [3] 刘文萍.绢蝶属 *Parnassius* 述评[J].昆虫知识,1999,36(6):360-363.
- [4] 张如力,张如清,肖云峰.绢蝶在祁连山(北坡)寺大隆林牧区的垂直分布及物种多样性[J].草业科学,2005,22(9):9-13.
- [5] 武春生,孟宪林,王衡,等.中国蝶类识别手册[M].北京:科学出版社,2007:84-97.

(上接第16860页)

学原理为基础的许多结论在处理这些相互作用时非常重要。金属离子刚加入时首先与DNA发生配位结合,这时DNA-EB的荧光强度变化不大,随着金属离子浓度的加大,DNA上结合更多的金属离子使得DNA构象发生了变化,这时原本嵌入在双螺旋平面中的EB分子由于构型上的不合适而游离至溶液中,这使得体系的荧光强度发生了猝灭作用<sup>[15]</sup>。

(3)  $Pb^{2+}$  在DNA上结合位点为5.558,结合常数为  $1.51 \times 10^{20}$ ,这说明  $Pb^{2+}$  易与DNA结合,引起DNA构象变化,在碱基配对的双螺旋DNA中,只有嘌呤上的N7位置在大沟中是易于接近的,与这些位点发生配位作用,  $Pb^{2+}$  所形成的配合物符合配位化学的基本原理,反应活性比较高。  $Pb^{2+}$  在低浓度下还会与腺嘌呤A上的N3结合,而与A上的N3结合只对AT碱基对有轻微的扰动,当  $Pb^{2+}$  浓度增高可以打断GC间的氢键,从而破坏DNA构象的稳定性,这在荧光光谱也可见。当  $Pb^{2+}$  浓度较低时荧光猝灭不很明显,而达到一定阈值时荧光猝灭增强,说明外界环境毒素更易与DNA作用引起其结构变化,从而引起DNA构象的变化,这也证实了重金属离子  $Pb^{2+}$  更易引起遗传物质稳定性的变化。

#### 参考文献

- [1] 张蓉颖,庞代文,蔡汝秀. DNA与其靶向分子相互作用研究进展[J].高

- 等学校化学学报,1999,20(8):1210-1217.
- [2] BARTON J K. Metals and DNA: molecular left-handed complements [J]. Science, 1986, 233: 727-734.
- [3] BARTON J K, RAPHAEL A L. Photoactivated stereospecific cleavage of double-helical DNA by cobalt complexes [J]. J Am Chem Soc, 1984, 106: 2466-2468.
- [4] 靳兰,杨频,李青山. 荧光法研究手性金属配合物与DNA的作用机理[J]. 高等学校化学学报, 1996, 17(9): 1345-1348.
- [5] LEPECQ J B, PAOLETTI C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids [J]. J Mol Biol, 1967, 27: 97-106.
- [6] SCATCHARD G. The aggregation of proteins for small molecules and ions [J]. Ann N Y Acad Sci, 1949, 51: 660.
- [7] 刘雪平,冯素玲,潘自红,等. 溴化乙锭探针研究劳式青莲与脱氧核糖核酸的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(10): 1895-1898.
- [8] 林辉祥,毕琼斯,彭桦,等. 钨钼抗滴配合物初步筛选的荧光法研究[J]. 高等学校化学学报, 1992, 13(2): 443-446.
- [9] 陈国珍,黄贤智,郑朱梓,等. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社,1990.
- [10] LAKOWICA J R, WEBER G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules [J]. Biochemistry, 1973, 12: 4161-4170.
- [11] 杨曼曼,杨频,张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用[J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31.
- [12] 杨斌盛,杨频. 人血清白蛋白与金属离子作用的荧光光谱研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(2): 110-114.
- [13] 郑朝华,叶宝芬,杜迎翔,等. 左氧氟沙星与小牛胸腺DNA相互作用的荧光光谱研究[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(12): 740-743.
- [14] 干宁,葛从辛. 环丙氟沙星荧光探针与小牛胸腺DNA相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2276-2279.
- [15] 杨频,高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京:科学出版社,2002.