

三链DNA $(dA)_{10} \cdot 2(dT)_{10}$ -溴乙锭的能量转移

白春礼 方 晔* 曹恩华^① 张平城 何裕建^① 唐有祺

(中国科学院化学研究所, 北京 100080; ^①中国科学院生物物理所, 北京100101)

关键词: 三链DNA 溴乙锭 能量转移

在水溶液中, 由两条互补的单链 DNA 构成的双螺旋沿着大沟有额外的氢键受体和给体, 这些给体和受体暴露于周围环境, 从而可以和专一性的结合分子(如蛋白)发生相互作用, 形成特异性的复合物, 也可以与另外的单链 DNA 分子结合形成三链 DNA。近年来, 由于越来越多的证据表明: 三链 DNA 能在细胞体内形成, 并具有多种生物学功能而引起了人们的广泛关注, 成为生物化学、分子生物学和基因工程领域的一个前沿课题^[1, 2]。通过三链 DNA 的形成, 寡聚核酸可以参与基因转录过程, 但是在生理条件下, 三链 DNA 的稳定性似乎是有限的, 这个限制的存在导致需要寻找能增加三链稳定性的小分子配基, 一些嵌入剂有可能提供额外的结合能^[3]。与双螺旋相反, 对于三链 DNA 与配基间的相互作用知之甚少。因此研究三链 DNA 与小分子配基间的相互作用, 对于检测三链 DNA 的形成、了解三链 DNA 的结构特征和影响其稳定性的因素以及寻找专一性结合三链的配基都有相当重要的意义。本文采用荧光能量转移技术, 研究了溴乙锭(以下简称 EB)和三链 DNA $(dA)_{10} \cdot 2(dT)_{10}$ 间的相互作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

寡聚核酸 $(dA)_{10}$ 和 $(dT)_{10}$ 按磷酸三脂法, 在 ABI-381A 型 DNA 合成仪上合成, 纯化按文献^[4]进行。实验过程中除 EB 为 Bio Rad 进口产品外, 其它化学试剂均为国产分析纯试剂, 使用前均未进一步纯化。寡聚核酸^[5]和 EB^[6]的浓度在日立 Hitachi U3200 分光光度计上测定, 荧光光谱的测定在日立 M850 型荧光光谱仪上进行。

为了制备 $(dA)_{10}$ 和 $(dT)_{10}$ 的双螺旋和三螺旋溶液, 使用无菌水, 在适当的缓冲溶液中, 将两种寡聚核酸按 1:1 或 1:2 的摩尔比混合(对双螺旋用含 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $30\mu\text{mol base/L}$ $(dT)_{10}$ 和 $(dA)_{10}$ 、pH7.1 的磷酸缓冲溶液, 对三螺旋则采用含 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $20\mu\text{mol base/L}$ $(dA)_{10}$ 和 $40\mu\text{mol base/L}$ $(dT)_{10}$ 、pH7.1 的磷酸缓冲液), 经 70°C 水浴加热 15 分钟, 后缓慢降至 10°C 保存, 供进一步实验用。配制含 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、pH7.1 的磷酸缓冲溶液的

自由EB溶液.实验时,三种溶液中都含有相同浓度的EB($6.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和相同浓度的KCl($100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱的测定

取激发与发射波长依次为 $\lambda_{\text{ex}} = 520\text{nm}$ 及 $\lambda_{\text{em}} = 620\text{nm}$,分别得荧光发射光谱和荧光激发光谱.实验过程中,控制温度为 $10.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

1.2.2 荧光能量转移研究

从DNA向EB的能量转移研究,是通过测定EB-DNA复合物在220—310nm范围内的激发光谱强度和相应范围的吸收光谱而进行^[7].为了尽量减少内过滤效应,采用的EB和相应核酸的浓度较低,同时对每一波长处的内过滤效应进行了校正(采用的校正因子为 $\exp(a/2)$, a 为该波长处的吸光度).同时选择310nm作为标准化波长(因为在此波长处DNA的吸光度相当低),对每一波长处的 $Q = q_b/q_f$ (q_b 和 q_f 分别为键合和自由EB的量子产率),采用下式进行计算:

$$\begin{aligned} Q_\lambda/Q_{310} &= [I_b \cdot E_f / (I_f \cdot E_b)]_\lambda / [I_b \cdot E_f / (I_f \cdot E_b)]_{310} \\ &= [I_\lambda \varepsilon_{310} / (I_{310} \varepsilon_\lambda)]_b \cdot [I_{310} \varepsilon_\lambda / (I_\lambda \varepsilon_{310})]_f \end{aligned}$$

式中, I 为荧光强度; ε 为摩尔消光系数.根据计算结果,对 Q_λ/Q_{310} 一波长作图,得能量转移图.

2 结果与讨论

DNA的最大吸收峰位置在260nm附近,在310nm以上的长波区吸收非常弱,而EB在480nm附近还存在一明显吸收,因此可以选择性地激发EB.图1为DNA-EB体系典型的荧光发射光谱,结合荧光激发光谱(图2),根据文献^[8,9]可以认为在实验条件下, $(dA)_{10}$; $(dT)_{10}$ 为

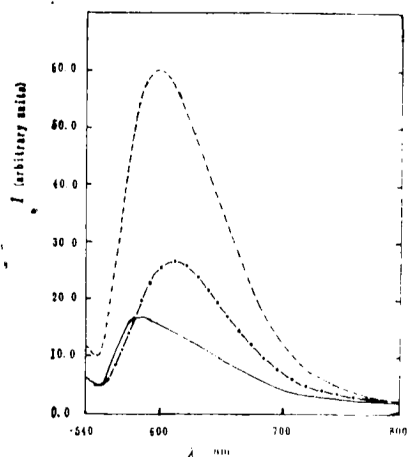


图1 荧光发射光谱

Fig.1 Emission of ethidium bromide with excitation at 520nm, in the absence of DNA(—), in the presence of dA_{10} . dT_{10} (--), and $dA_{10} \cdot dT_{10}$ (·)

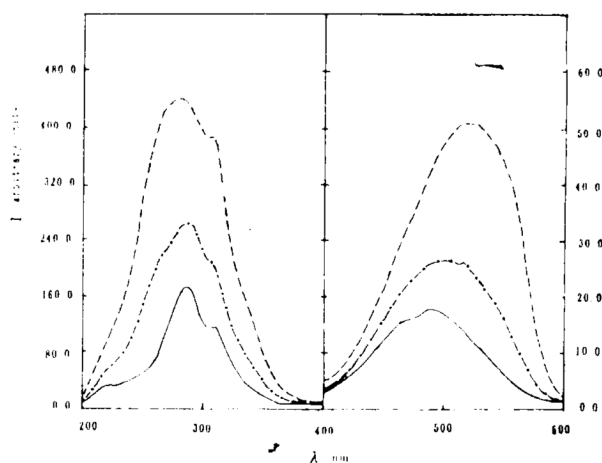


图2 荧光激发光谱

Fig.2 Excitation of ethidium bromide with emission at 620nm, in the absence of DNA(—), in the presence of dA_{10} . dT_{10} (--), and $dA_{10} \cdot dT_{10}$ (·)

1:1和1:2的两种体系分别形成了双螺旋和三螺旋DNA。从图1中可看到双螺旋和三螺旋DNA的存在都导致EB的荧光发射峰发生了红移,而且荧光强度都明显增加,其中相同的EB碱基摩尔数比(均为1:10)的两种溶液,其荧光强度增加量不同,前者明显大于后者。

图2是采用620nm作为检测波长而得到的荧光激发光谱。从图中可以看到DNA的存在也显著增加了EB的荧光强度,且其变化趋势同荧光发射光谱的变化一致,这说明存在DNA向EB的能量转移过程。

能量转移现象是溴乙锭分子嵌入到DNA分子内的基本性质。我们采用紫外和荧光相结合的方法研究了在DNA的吸收波长范围内,结合配基的荧光量子产率随波长的变化情况。图3为实验条件下的能量转移图。从图中,可以看到在DNA的吸收波长范围内,双螺旋和三螺旋DNA的存在都增加了溴乙锭的量子产率,而且前者增加较大。研究认为在碱基对和嵌入到双螺旋DNA分子内的溴乙锭分子间的能量转移是通过单重态-单重态转移产生的^[10,11]。根据Förster理论^[12],这种偶极-偶极相互作用所引起的能量转移几率依赖于 $1/r^6$,而DNA碱基对或三碱基体的荧光量子产率相当低(10^{-4} 或更低),这样只有当碱基对或三碱基体和结合EB分子间的Förster距离相当近时,亦即只有当配基分子以与DNA碱基对或三碱基体平行的方式,嵌入到DNA分子中,和DNA分子发生相互作用(此时溴乙锭和碱基间的Förster距离最近)时,才能有效地产生能量转移^[10,11]。因此在实验条件下,荧光量子产率对波长的依赖性,说明同双螺旋DNA一样,EB是通过一个嵌入机理与三链DNA发生相互作用的,但是双螺旋DNA所产生的能量转移效率比三螺旋DNA的要高。

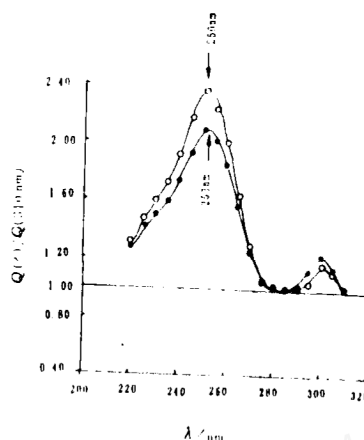


图3 荧光量子产率随激发波长变化图
Fig.3 Variation of the relative fluorescence quantum yield of ethidium bromide in the presence of dA_{10} , dT_{10} (\circ) and $dA_{10}.2dT_{10}$ (\bullet), as a function of excitation wavelength at 10.0°C (See text for details)

参 考 文 献

- 1 Moffat A S. *Science*, 1991, 252: 1374
- 2 方晔, 白春礼, 张平城. 自然杂志, 1993(2): 6
- 3 Merny J L, Duval-Valentin G, Nguyen C H, et al. *Science*, 1992, 256: 1681
- 4 马尼阿蒂斯 T, 弗里奇 E F, 萨姆布鲁马 J (著), 沈桂芳, 毛江森 (译). 分子克隆实验手册, 浙江科学技术出版社, 1988, 107-109
- 5 Griswold B L, Humoller F L, McIntyre A R. *Anal. Chem.*, 1951, 23: 192
- 6 Winkle S A, Rosenberg L S, Krugh T R. *Nucl. Acids Res.*, 1982, 10: 8211
- 7 Le Pecq J B, Paoletti C. *J. Mol. Biol.*, 1967, 27: 87
- 8 Lee J S, Johnson D A, Morgan A R. *Nucl. Acids Res.*, 1979, 6: 3073
- 8 Kan L S, Callahan D E, Trapane T L, et al. *J. Biomol. Struct. & Dyn.*, 1991, 8: 911
- 10 Morgan J P, Daniels M. *Photochem. Photobiol.*, 1980, 31: 101
- 11 Sari M A, Battioni J P, Mansuy D, Le Pecq J B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 141: 643
- 12 Förster T. *Ann. Phys.*, 1948, 2: 55

THE ENERGY TRANSFER FROM TRIPLEX $dA_{10} \cdot 2dT_{10}$ TO THE BOUND ETHIDIUM BROMIDE

Bai Chunli Fang Ye* Cao Enhua^①
Zhang Pingcheng He Yujian^① Tang Youqi
(*Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080,*
^①*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

ABSTRACT

The energy transfer from triplex $dA_{10} \cdot 2dT_{10}$ or duplex $dA_{10} \cdot dA_{10}$ to ethidium bromide in the $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer ($\text{pH} \approx 7.1$) has been investigated. The apparent relative fluorescence quantum yield as a function of excitation wavelength is observed, but the increase in quantum yield in case of the triplex is lower than that for the duplex. This result not only provides strong evidence for intercalative binding of ethidium to both duplex and triplex forms of dA_{10} and dT_{10} , but also indicates that binding to the triplex form results in substantially smaller energy transfer than binding to the duplex.

Keywords: Triplex $dA_{10} \cdot 2dT_{10}$, Ethidium bromide, Energy transfer