

硫堇与 DNA 分子作用机理的光谱研究

杜江燕^{1,2}, 黄晓华², 徐 飞², 冯玉英², 邢 巍¹, 陆天虹^{1,2*}

1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022
2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097

摘 要 用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱和光电子能谱等光谱方法研究了硫堇(TH)与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)的作用机理。实验结果表明,在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中,TH 与 CT-DNA 之间的作用方式以嵌入作用为主,嵌入作用使 TH 的紫外最大吸收峰强度减小,且峰位发生红移。由紫外光谱实验结果线性拟合求得 TH 与 CT-DNA 的表现结合常数 $K = 1.45 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。荧光光谱实验结果表明:TH 与 CT-DNA 的嵌入作用使 TH 的荧光发生强烈猝灭,猝灭常数 K_{sv} 为 $1.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。嵌入作用位点主要发生在 CT-DNA 的鸟嘌呤(G)-胞嘧啶(C)碱基序列富集区。通过对 TH 的光电子能谱中 N, S 原子的结合能变化分析,TH 分子以杂环上 S 原子端与 CT-DNA 的 G-C 碱基对结合,两者的相互作用对 CT-DNA 的二级结构构象产生影响。

主题词 紫外-可见吸收光谱; 荧光光谱; 圆二色谱; 光电子能谱; 硫堇; DNA

中图分类号: O614.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)09-1435-04

引 言

核酸(DNA)是生物体的重要组成物质,研究其与小分子的相互作用对进一步认识 DNA 结构以及它们的选择性作用机理,寻找灵敏检测 DNA 的分子探针,并从基因水平上理解某些疾病的发病机理,从而通过分子设计寻找有效的治疗药物均具有重要意义^[1-6],DNA 与小分子化合物的作用方式大致分 3 种,即静电作用、沟面结合和嵌入结合。嵌入结合作用状态被认为是诱变与致癌作用的一个重要因素,同时也是许多抗癌药物与 DNA 作用的模式,药物的活性与 DNA 嵌入作用的结合位点及结合强度有直接关系^[7]。因此研究和开发具有特定序列选择性和作用位点专一性的药物,对提高药物疗效,尤其是降低由低特异性结合产生的毒副作用已引起了越来越多的关注^[8,9]。目前有关药物分子与 DNA 作用的序列选择性的研究报道较少。最近程圭芳等^[8]报道了柔红霉素与 DNA 作用序列特异性的研究,Stefania 等^[9]研究了蒽环类药物的抗肿瘤活性及毒副作用与药物结构及作用位点的关系。

由于吩噻嗪类染料小分子在获得 DNA 的碱基序列和识别 DNA 的结构,以及用于药物分子与 DNA 作用方式的光谱探针等方面有特别的价值^[10-13],本文以属于此类化合物的硫堇(Thionine)作为嵌入剂小分子,用紫外-可见吸收光谱、荧

光光谱、圆二色谱和光电子能谱等光谱方法对硫堇(TH)与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)的作用方式及作用位点进行了研究,探讨了作用机理。结果表明:由于 TH 具有平面刚性芳香环结构,所以其与 CT-DNA 之间的作用是通过嵌入作用方式嵌入于 DNA 双螺旋链中,且嵌入作用位点有较高的序列选择性,主要位于 DNA 的 GC 区域。TH 分子以杂环上 S 原子端与 CT-DNA 的 G-C 碱基对结合,两者的相互作用对 CT-DNA 的二级结构构象产生影响。由于 TH 与 CT-DNA 之间通过嵌入作用方式结合,且特异地与 GC 碱基序列结合,因此 TH 有望在 DNA 生物传感器的杂交指示剂以及检测特定序列 DNA 片段研究方面发挥独特的作用。此外,TH 分子的杂环结构与许多药物中间体的基本骨架结构相类似,通过其与 DNA 作用后紫外-可见吸收光谱、荧光光谱等发生的明显变化,可以将其作为研究药物分子与 DNA 相互作用的光谱探针分子,对药物分子与 DNA 的相互作用研究提供有用的信息。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

L17 型紫外-可见分光光度计,LS50B 型荧光光谱仪(均为美国 P-E 公司);J715 型圆二色谱仪(日本松下公司);X 射线光电子能谱仪(英国 VG 公司)。

收稿日期:2004-04-09, 修订日期:2004-07-13

基金项目:国家“211”工程重点项目和江苏省教育厅自然科学基金(02KJB150006)资助

作者简介:杜江燕,女,1962年生,南京师范大学化学与环境科学学院副教授 * 通讯联系人

CT-DNA(42% GC 含量, 北京华美生物工程公司), 使用前未经进一步提纯(摩尔浓度由紫外分光光度计标定, $\epsilon = 6\,600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[14]; 巯基(上海化学试剂公司)和其他试剂均为分析纯。所有的溶液均用 3 次蒸馏水配制。

1.2 实验方法

紫外-可见光谱及荧光光谱测量溶液为 $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TH + $0.025\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.2 的磷酸盐缓冲液及在该溶液中加入不同量的 CT-DNA。在进行吸收光谱测量时, 参比溶液为 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液, 扫描范围为 190~700 nm。荧光光谱测量时, 激发波长为 550 nm, 发射光谱扫描范围为 570~800 nm。圆二色谱(CD 光谱)测量用的样品池厚度为 0.2 cm, 测得的数值以摩尔椭圆度 $\theta(\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1})$ 表示, 扫描范围为 200~700 nm。X 射线光电子能谱(XPS)测量用 Mg 靶, K_{α} 线(1 253.6 eV), 测量前将样品滴在 5 mm × 8 mm 载样片上, 真空干燥 12 h。结合能测定值以 C_{1s} 结合能(284.6 eV)校正。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

图 1 曲线 *a* 为 TH 的 UV-Vis 吸收光谱, 由图可见其最大吸收峰位于 598 nm 处。当向溶液中加入 CT-DNA 后, TH 的最大吸收峰强度减小, 且峰位发生红移(图 1 曲线 *b*, *c*)。如当 CT-DNA 的浓度为 $1.14 \times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, TH 最大吸收峰位于 616 nm(图 1, 曲线 *c*), 红移了 18 nm。根据文献报道^[15], 当小分子以嵌入方式结合于 CT-DNA 双螺旋碱基对之间时, 其吸收光谱表现出峰位的红移及减色效应, 因此, 此时 TH 与 CT-DNA 之间的相互作用应以嵌入作用为主。根据文献^[14], 可按照方程(1)计算 TH 与 CT-DNA 的结合常数

$$c/\Delta\epsilon_{ap} = c_{\text{DNA}}/\Delta\epsilon + 1/(\Delta\epsilon K) \quad (1)$$

式中, c_{DNA} 为 CT-DNA 浓度, $\Delta\epsilon_{ap} = (\epsilon_a - \epsilon_f)$, ϵ_a 是 TH 的表观摩尔吸光系数, ϵ_f 是 TH 单独存在的摩尔吸光系数, $\Delta\epsilon = (\epsilon_b - \epsilon_f)$, ϵ_b 是与 CT-DNA 结合的 TH 的摩尔吸光系数。根据方程, 以 $c_{\text{DNA}}/\Delta\epsilon_{ap}$ 对 CT-DNA 浓度 c_{DNA} 作图, 直线的斜率为 $1/\Delta\epsilon$, 在 Y 轴上的截距为 $1/(\Delta\epsilon K)$, 由斜率与 Y 轴截距之比可求得 TH 与 CT-DNA 的结合常数 K 。将实验数据代入方程(1)中, 得到如下方程

$$c_{\text{DNA}}/\Delta\epsilon_{ap} = -1.86 \times 10^{-4} c_{\text{DNA}} - 1.28 \times 10^{-8} \quad (r = 0.995\,6)$$

线性拟合结果见图 2, 求得 TH 与 CT-DNA 的表观结合常数 $K = 1.45 \times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

2.2 荧光光谱

由 TH 的荧光激发光谱图可知: TH 在 250 和 550 nm 有两个荧光激发峰, 当选择 550 nm 作为激发光时, 得到 TH 的荧光发射光谱图(图 3 曲线 *a*), 其特征发射峰位于 615 nm 处。当在 TH 溶液中加入不同浓度的 CT-DNA 后, 得到的 TH 的荧光光谱图如图 3 曲线 *b*~*e* 所示。由图可见, 随着 CT-DNA 浓度的增加, TH 在 615 nm 处的荧光峰峰强度逐步降低。当 CT-DNA 量足够大时, 615 nm 处的荧光峰几乎完全

猝灭。

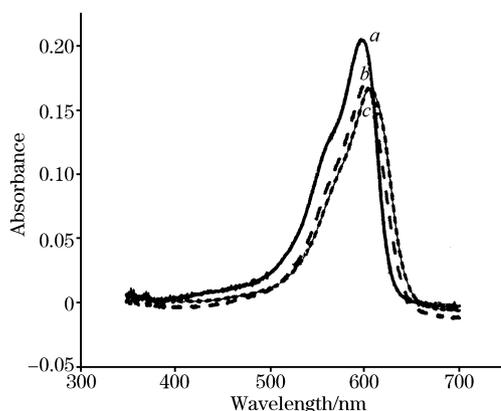


Fig.1 UV-Vis absorption spectra

[TH]: $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; buffer solution: pH 7.2
a, TH; *b*, TH + $7.6 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA;
c, TH + $11.4 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA

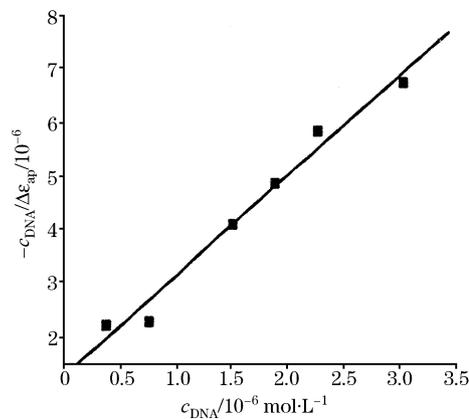


Fig.2 The plot of $c_{\text{DNA}}/\Delta\epsilon_{ap}$ versus c_{DNA}

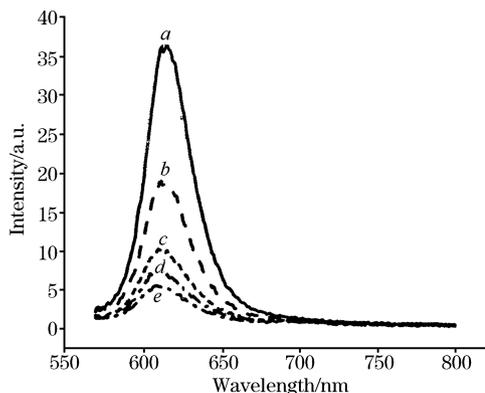


Fig.3 Fluorescence spectra

[TH]: $1.0 \times 10^{-4}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; buffer solution: pH 7.2
a, TH; *b*, TH + $0.76 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA;
c, TH + $1.52 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA;
d, TH + $3.04 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA;
e, TH + $6.08 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA

猝灭常数可由 Stern-Volmer 方程求得^[14]

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[\text{DNA}] \quad (2)$$

式中, I_0 及 I 分别是无 CT-DNA 及有 CT-DNA 时 TH 的荧光强度, K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数。将实验数据代入方程 (2), 求得猝灭常数 K_{SV} 为 $1.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

天然 DNA 的碱基排列序列除了一部分为随机排列序列区外, 还含有 A-T 序列富集区和 G-C 序列富集区。当荧光分子嵌入到 DNA 双链中的 G-C 序列富集区时, 常会引起荧光分子的荧光猝灭。这种猝灭作用通常认为是^[16]: 当荧光分子嵌入到 DNA 双螺旋链的碱基对中, 其激发态与鸟苷 G 之间的距离非常接近 ($\sim 0.34 \text{ nm}$), 由于 G 有较强的给电子能力, 两者之间容易发生电子转移。例如: Reid^[17] 等报道了硫堇与鸟苷 G 之间发生的快速电子转移反应, 认为鸟苷与 TH 激发态之间发生的电子转移导致了硫堇的荧光发生强烈猝灭。

2.3 圆二色谱

图 4 中的曲线 *a* 为 CT-DNA 溶液的 CD 谱图, 正峰及负峰分别位于 275 及 246 nm, 对应于 B 型 CT-DNA 的二级结构构象^[18]。图 4 中的曲线 *b* 为在 CT-DNA 溶液中加入 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH 后 CT-DNA 溶液的 CD 谱图。当加入 TH 后, 曲线 *b* 显示其正负峰振幅减小, 正峰减小了约 40.9%, 负峰减小了约 49.4%, 说明 CT-DNA 的二级结构构象发生了变化, CT-DNA 二级结构的变化必然导致其三级和四级等高级结构的改变, 从而引起生物功能的改变。TH 加入后 CT-DNA CD 谱峰位未发生变化, 说明 TH 的加入只影响 CT-DNA 二级构象, 未引起 CT-DNA 双螺旋链的解链。

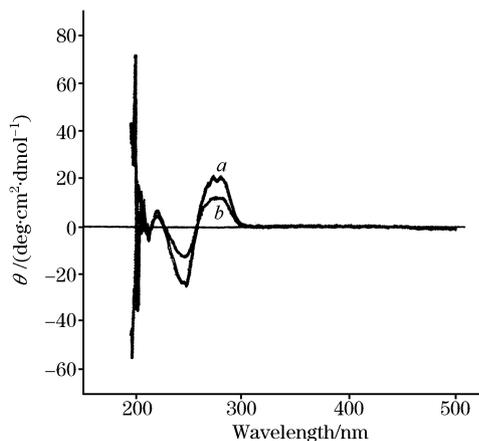


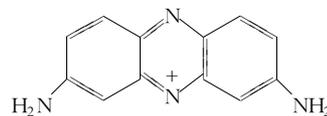
Fig. 4 CD spectra

[DNA]: $7.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; buffer solution: pH 7.2

a, DAN; *b*, DNA + $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH

2.4 光电子能谱

TH 的 N_{1S} 光电子能谱如图 5 所示, 其最大结合能位于 399.5 eV (实线)。该峰可被分解为两个小峰 (虚线)^[19], 结合能分别为 399.7 eV (曲线 *a*) 和 400.6 eV (曲线 *b*), 两个峰的峰面积比值大约为 2:1, 分别对应于氨基和杂环中的氮原子, 表明 TH 溶液中有两种不同的氮原子状态存在。TH 结构式见 Scheme 1。



Scheme 1 The structure of thionine (TH)

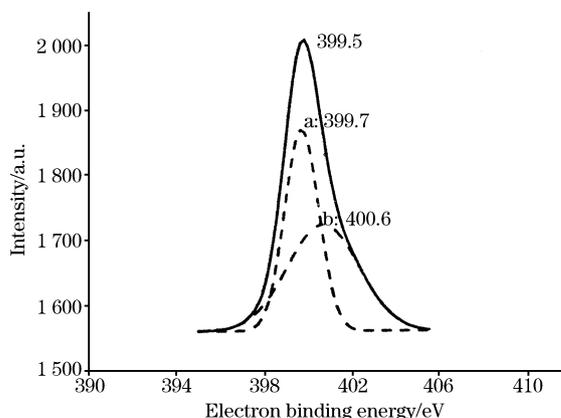


Fig. 5 XPS spectra

[TH]: $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; buffer solution: pH 7.2

当向 TH 溶液中加入 CT-DNA 后, TH 的 N_{1S} 结合能未发现有明显改变, 然而其 S_{2P} 结合能却明显地增大, 见表 1。从表中数据看出, TH 与 CT-DNA 作用后, S_{2P} 结合能增大了 3.9 eV。由此我们推测 TH 与 CT-DNA 发生嵌入作用时, 是以 S 原子一端与 CT-DNA 的 G-C 碱基对结合。由于 S 原子与鸟嘌呤 (G) 上的 N, O 原子作用使其电子云密度减小, 因而使 S_{2P} 结合能增大。

Table 1 The binding energies of N_{1S} and S_{2P} of TH from XPS

Condition	N_{1S} / eV	S_{2P} / eV
In the absence of CT-DNA	399.5	164.0
In the presence of CT-DNA	399.4	167.9

参 考 文 献

- [1] Mudasir K, Wijaya N, Yoshioka H I. J. Inorg. Biochem., 2003, 94: 263.
- [2] Wang Z X, Liu D J, Dong S J. Biophysical Chem., 2000, 87: 179.
- [3] Mahadevan S, Palaniandavar M. Inorg. Chem., 1998, 37: 3927.
- [4] HE Ji-xiang, JIANG Chong-qiu, GAO Ming-xia(贺吉香, 江崇球, 高明霞). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 755.
- [5] SHI Qiao-cui, PENG Tu-zhi, WANG Su-fen(时巧翠, 彭图治, 王素芬). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学), 2003, 31(10): 1212.
- [6] SHEN Jing-shan, SUN Dan-dan, FU Lian-chun, et al(沈景山, 孙丹丹, 付连春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 232.
- [7] ZHANG Li-he, ZHUO Ji-cang, MA Ling-tai, et al(张礼和, 卓济苍, 马灵台, 等). Study on the Mechanism of the Drugs Aimed at DNA(以核酸为作用靶的药物研究). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1997. 11.
- [8] CHENG Gui-fang, ZHANG Dong-mei, DING Min, et al(程圭芳, 张冬梅, 丁敏, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24(8): 1395.
- [9] Stefania M, Rosanna M, Enzio R. J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1998, 2: 1983.
- [10] YANG Zhou-sheng, YU Jun-sheng, CHEN Hong-yuan(杨周生, 于俊生, 陈洪渊). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2002, 23(8): 1457.
- [11] Joseph W, Mehmet O, Xiaohua C. Bioelectrochem. Bioenerg., 1998, 45: 33.
- [12] XI Xiao-li, YANG Man-man, HAN Xiao-jian, YANG Pin(席小莉, 杨曼曼, 韩小见, 杨频). Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报), 2001, 17(6): 781.
- [13] Koji H, Keiko I, Yoshio I. Anal. Chem. Acta, 1994: 286.
- [14] Kumar C V, Emma H A. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(19): 8547.
- [15] Long E C, Barton J K. Acc. Chem. Res., 1990, 23: 271.
- [16] Claus A M, Seidel A S, Markus H M. J. Phys. Chem., 1996, 100: 5541.
- [17] Reid G D, Douglas J W, Mark A D. J. Am. Chem. Soc., 2001, 123(28): 6953.
- [18] Zhang Z L, Huang W M, Tang J L, et al. Biophysical. Chem., 2002, 97: 7.
- [19] Yang R, Ruan C M, Dai W L, et al. Electrochimica Acta, 1999, 44: 1585.

Spectral Study on the Interaction Mechanism between Thionine and Calf Thymus DNA

DU Jiang-yan¹, HUANG Xiao-hua², XU Fei², FENG Yu-ying², XING Wei¹, LU Tian-hong^{1,2*}

1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

2. Department of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

Abstract The interaction mechanism of thionine (TH) and calf thymus DNA (CT-DNA) was studied with UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). It was demonstrated that in the pH 7.2 phosphate buffer solution, the interaction of TH and CT-DNA is in the intercalative mode. The absorbance of the absorption peak of TH decreases and the peak position shifts to the red direction. The binding constant (K) of TH with CT-DNA is $1.45 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The fluorescence intensities of TH decrease drastically with increasing the concentration of CT-DNA. The Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}) was calculated to be $1.01 \times 10^4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The intercalative sites are mainly located at the G-C sequences of the CT-DNA molecule through the S atom in the TH molecule according to the experimental data obtained from the fluorescence spectra and XPS analysis. The secondary structure conformation of CT-DNA is changed due to its interaction with TH.

Keywords UV-Vis absorption spectrum; Fluorescence spectrum; Circular dichroism; X-ray photoelectron spectroscopy; Thionine; CT-DNA

(Received Apr. 9, 2004; accepted Jul. 13, 2004)

* Corresponding author