

• 研究论文 •

盐酸表柔比星与核酸相互作用的共振瑞利散射光谱研究及其分析应用

刘绍璞* 王 芬 刘忠芳 胡小莉

(西南大学化学化工学院 重庆 400715)

摘要 用共振瑞利散射光谱研究了盐酸表柔比星(EPI)与小牛胸腺 DNA(ctDNA)、鲑鱼 DNA(sDNA)、鲱鱼精 DNA(hsDNA)和酵母 RNA(yRNA)等核酸之间的相互作用. 实验表明在 pH 2.0 左右的酸性介质中, 表柔比星及核酸本身的共振瑞利散射(RRS)均十分微弱, 但是当它们相互作用形成结合产物时, 将导致 RRS 增强并出现新 RRS 光谱. 不同核酸与表柔比星结合产物的 RRS 光谱特征略有差异, 散射增强程度则各不相同, 其相对散射强度的顺序是 ctDNA \approx sDNA>hsDNA>yRNA. 在一定范围内核酸浓度与散射强度成正比, 据此可以建立一种新的用表柔比星测定 DNA 的 RRS 法, 方法具有高灵敏度, 对于不同 DNA 其检出限(3σ)在 24.0 ng/mL 至 28.0 ng/mL 之间, 用于合成样品分析, 结果满意. 文中还研究了适宜的反应条件, 影响因素和结合产物的分析化学性质. 结合吸收光谱和荧光光谱特征对表柔比星与 DNA 的反应机理进行了讨论.

关键词 共振瑞利散射; 盐酸表柔比星; DNA

Study on the Interaction between Epirubicin Hydrochloride and Nucleic acid and Its Analytical Application by Resonance Rayleigh Scattering Spectra

LIU, Shao-Pu* WANG, Fen LIU, Zhong-Fang HU, Xiao-Li

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest China University, Chongqing 400715)

Abstract The interaction between epirubicin hydrochloride and DNA such as calf thymus DNA(ct DNA), salmon DNA(sDNA), herring sperm DNA(hsDNA) was studied using resonance Rayleigh scattering (RRS) method. In pH 2.0 acidic medium, the RRS signal of epirubicin or nucleic acid alone was very weak, but it was enhanced greatly and new RRS spectra appeared when they interacted with each other to form a bound product. There was a little difference of RRS spectra of the bound products for a variety of DNA and their increments of RRS intensity were followed by this sequence, ctDNA \approx sDNA>hsDNA. Furthermore the RRS intensity is proportional to the concentration of DNA in a certain range, and so a new method for the determination of DNA with epirubicin by RRS technique was developed. The sensitivity of the method was high with detection limits of different DNA being between 24.0 ng/mL and 28.0 ng/mL and the results of determination of DNA in the synthetic samples with RRS method were satisfactory. The optimum conditions, influence effects and the properties of analytical chemistry of the bound products were also investigated and the reaction mechanism was discussed using RRS associated with absorption and fluorescence spectra.

Keywords resonance Rayleigh scattering; epirubicin hydrochloride; DNA

* E-mail: liusp@swu.edu.cn

Received September 13, 2006; revised and accepted December 4, 2006.

国家自然科学基金(No. 20475045)资助项目.

药物分子与核酸的作用是核酸研究的一个重要领域,它对研究药物的抗癌抗病毒作用机理、药物的体外筛选、一些疾病的诊断和治疗以及设计与合成新的药物具有重要意义.临床上使用的许多抗癌药物都以 DNA 为作用的主要靶点,通过与癌细胞 DNA 发生相互作用破坏其结构,进而影响基因调控与表达的功能,表现出抗癌活性.

盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride)是继盐酸柔红霉素、盐酸阿霉素之后临床上广泛使用的蒽环类抗癌药物.它主要用于治疗白血病和恶性淋巴瘤等,毒副作用较柔红霉素和阿霉素有所降低,因而得到了更多的应用.目前通常认为药物通过插入到 DNA 相邻的碱基对之间,以嵌入的形式与 DNA 双螺旋形成可逆的结合,从而使 DNA 与拓扑异构酶形成的复合物僵化,抑制 RNA 的合成,使 DNA 断裂而达到治疗肿瘤的目的^[1].而毒副作用也是在这个过程中产生的,药物嵌入 DNA 中,阻止转录过程,抑制拓扑异构酶,同时可产生自由基,引起心脏毒性^[2].因此为了提高药效和减少药物的毒副作用,需要对药物和 DNA 的作用机制进行更深入的研究.同时,核酸作为抗癌药物的作用靶点,研究抗癌药和 DNA 的作用机理也为研究设计新型抗癌药物开辟新的途径.

目前对于蒽环类抗癌药物与 DNA 的相互作用已进行了大量的研究,其中使用最多的研究方法是 X 射线晶体衍射方法. Wang 等先后于 1980 年和 1987 年用 X 射线晶体衍射实验研究了具有 d(CGTACG)顺序的 DNA 和柔红霉素复合物的结构,总结了蒽环类抗癌药物具有的立体化学结构以及它们和 DNA 的结合方式,解决了一些前人未解决的问题^[3,4]. Alain 等^[5]通过显微荧光分光光度法研究了蒽环类抗癌药物和 DNA 作用前后荧光光谱变化; Yuko 等^[6]也用同样的方法研究了柔红霉素和 DNA 作用时引起的 DNA 结构的变化情况.共振拉曼光谱法也是用于此类研究的一类重要的光谱方法^[7,8].近年来,电化学在这方面的研究也越来越多,Chu 等^[9]利用伏安法研究了柔红霉素和 DNA 的反应,测定了结合常数和结合数目; Erdem 等^[10]利用表柔比星和 DNA 的嵌入作用把表柔比星作为 DNA 的生物传感器进行了核酸的测定.

共振瑞利散射(RRS)或共振光散射(RLS)作为一种新的分析技术,因其高灵敏度和简易性引起了人们的关注.已在核酸^[11,12]、蛋白质^[13,14]、肝素^[15,16]等生物大分子、药物^[17,18]、表面活性剂^[19,20]以及金属^[21,22]和非金属离子^[23,24]等的测定中得到越来越多的应用. Pasternack 等^[25,26]曾指出,染料生色团在生物大分子上的聚集作用是共振光散射增强的重要原因,但是药物小分子在核酸

中的嵌入作用对于共振瑞利散射的影响则研究甚少.

我们的实验发现,小牛胸腺 DNA(ctDNA)、鲑鱼 DNA(sDNA)、鲱鱼精 DNA(hsDNA)和酵母 RNA(yRNA)等核酸与表柔比星反应前,两者的 RRS 均十分微弱.但是当表柔比星与核酸反应形成嵌入复合物时,在引起吸收光谱发生变化和荧光猝灭的同时,也观察到 RRS 的显著增强,并产生新的 RRS 光谱.不同 DNA 和 RNA 具有大体相似的光谱特征,但是它们的散射强度却有较大的差异,其中 ctDNA 和 sDNA 体系散射增强最大,其次是 hsDNA,而 yRNA 散射增强程度最低.本文用 RRS 法研究了表柔比星与核酸的相互作用,考察了适宜的反应条件、影响因素和分析化学性质,并结合吸收光谱和荧光光谱讨论了反应机理、结合模型以及药物分子在 DNA 中嵌入作用对于 RRS 的影响,并基于表柔比星与 DNA 的相互作用建立了以表柔比星 RRS 法测定 DNA 的新方法.方法具有高灵敏度,对于不同 DNA 的检出限(3σ)分别为 24.0 ng/mL(ctDNA 和 sDNA)和 28.0 ng/mL(hsDNA),比相应体系荧光猝灭法和分光光度法的灵敏度分别提高 1 至 2 个数量级,而且手续十分简便、快速.因此 RRS 法不仅可以作为研究药物分子在核酸中嵌入作用的有用手段,可为研究二者的相互作用提供一些新的信息,而且较分光光度法和荧光法更为灵敏,也为发展测定核酸的高灵敏新方法创造了条件.

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

F-2500 荧光分光光度计(日立公司,日本),UV-8500 型紫外-可见分光光度计(天美公司,中国),pHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司,中国).

盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride For Injection, 浙江海正药业股份有限公司):直接溶解于二次蒸馏水中配成 100 $\mu\text{g/mL}$.

小牛胸腺 DNA(Calf Thymus DNA, ctDNA, Sigma)、鲑鱼 DNA (Salmon DNA, sDNA, 华美生物工程公司)、鲱鱼精 DNA (Herring Sperm DNA, hsDNA, 华美生物工程公司)和酵母 RNA (RNA from yeast, yRNA, 华美生物工程公司):直接溶于 0.5% NaCl 溶液中,其准确浓度由 260 nm 处的吸光度来确定,并于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存.

Britton-Robinson (BR)缓冲溶液:用 0.04 mol/L H_3PO_4 , H_3BO_3 和 CH_3COOH 与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合,配成不同 pH 值的缓冲溶液,并用酸度计确定其 pH.

实验用水均为二次蒸馏水, DNA 和 RNA 为生化试

剂, 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

在 10 mL 的比色管中依次加入 1.0 mL BR 缓冲溶液, 0.75 mL 的表柔比星溶液和适量 DNA 溶液, 最后用二次蒸馏水稀释至刻度并摇匀, 15 min 后于荧光分光光度计以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 上进行同步扫描, 获得共振瑞利散射 RRS 光谱, 分别测定复合物的 RRS 强度 I 和空白的 RRS 强度 I_0 , $\Delta I_{\text{RRS}} = I_{\text{RRS}} - I_0$ 。同时记录表柔比星、核酸和结合产物的吸收光谱和荧光光谱。

2 结果和讨论

2.1 RRS 光谱

图 1 为反应体系的 RRS 光谱, 其中图 1A 为表柔比星与 ctDNA, sDNA, hsDNA 以及 yRNA 反应体系的 RRS 光谱, 表 1 为三个反应体系的 RRS 光谱特征。从图 1A 和表 1 可以看出, 不同核酸和表柔比星本身的 RRS 较弱, 它们的最大 RRS 峰分别位于 302.5 nm (ctDNA)、303

nm (sDNA)、307.5 nm (hsDNA)、305 nm (yRNA) 和 325 nm (EPI)。当它们反应形成结合产物后, 其 RRS 均明显增强, 但是光谱特征有一定差异。它们的最大 RRS 波长分别是: 313 nm (EPI-ctDNA), 285 nm (EPI-sDNA), 315 nm (EPI-hsDNA) 和 312 nm (EPI-yRNA)。它们的散射增强程度也不相同, 其顺序是 $\text{ctDNA} \approx \text{sDNA} > \text{hsDNA} > \text{yRNA}$ 。从图 1B 可以看出 RRS 强度随 ctDNA 浓度的增大而成比例的增大, 具有很好的线性关系, 为用表柔比星定量测定 DNA 创造了条件。由于 RNA 反应产物灵敏度显著低于 DNA, 故本文主要研究表柔比星与 DNA 的相互作用及其分析应用。

表 1 表柔比星-核酸反应体系的 RRS 光谱特征

Table 1 The RRS spectral characteristics of EPI-nucleic acid systems

system	λ_{max}	system	λ_{max}	λ_{other}
ctDNA	302.5	EPI-ctDNA	312.5	
sDNA	303	EPI-sDNA	285	307
hsDNA	307.5	EPI-hsDNA	315	285, 344
yRNA	305	EPI-yRNA	312	
EPI	325			

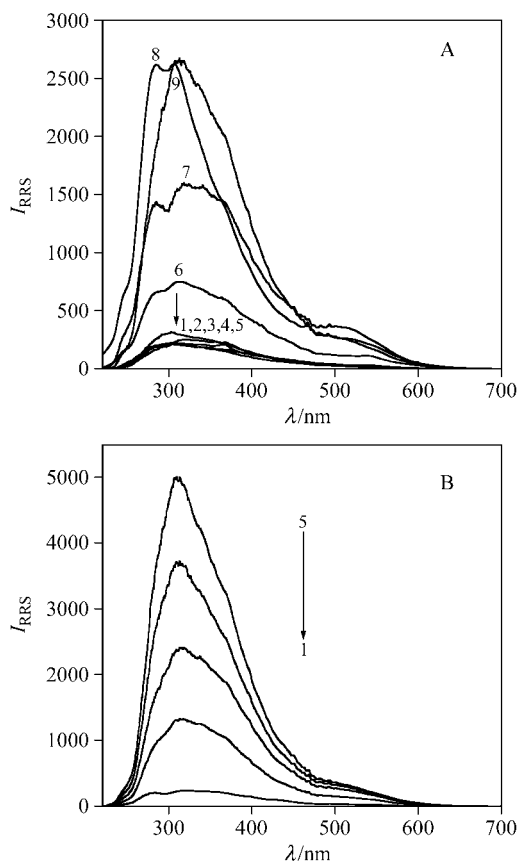


图 1 RRS 光谱图

Figure 1 RRS spectra

A. EPI- nucleic acid systems: 1—ctDNA; 2—sDNA; 3—hsDNA; 4—yRNA; 5—EPI; 6—EPI-yRNA; 7—EPI-hsDNA; 8—EPI-sDNA; 9—EPI-ctDNA; EPI: 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; nucleic acids: 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B. EPI-ctDNA systems: 1—EPI; 2—5—EPI-ctDNA; ctDNA (2—5, $\mu\text{g}/\text{mL}$): 0.88, 1.76, 2.64, 3.52; [EPI]: 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.2 反应条件的优化

2.2.1 溶液酸度的影响

实验了溶液 pH 值对 RRS 的影响, 结果显示最佳的反应酸度分别是 pH 1.8~2.0 (ctDNA 体系) 和 pH 2.0 (sDNA 和 hsDNA 体系)。低于或高于此 pH 范围, RRS 强度均明显降低。

2.2.2 表柔比星浓度的影响

实验了不同浓度表柔比星对反应体系 RRS 强度的影响, 表明当表柔比星的浓度在 7.0~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 3 个体系 RRS 强度达到最大值, 实验中选用表柔比星浓度为 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.3 离子强度的影响

用加入 NaCl 的方法控制体系的离子强度并实验了离子强度对溶液 RRS 的影响, 结果表明 NaCl 的浓度对表柔比星的散射强度几乎无影响; 但对反应产物的 RRS 强度影响较大, 随着 NaCl 浓度的增大, RRS 强度急剧降低。因此在溶液中应避免引入盐类。

2.2.4 反应速度及 RRS 强度的稳定性

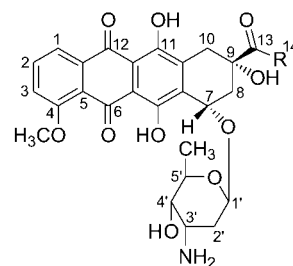
在选定的最佳实验条件下, 表柔比星与 DNA 反应完全需要 15 min 左右, 此后 RRS 强度在 12 h 内几乎无变化。

2.3 表柔比星与核酸的结合作用及其对光谱特征的影响

2.3.1 表柔比星与核酸的结合作用

药物小分子与核酸之间的作用可能通过三种形式:

(1)嵌入结合(2)静电作用(3)沟结合^[27]. 对于蒽环类抗癌药物与 DNA 的结合模式已作过许多研究, 并且认为药物分子与 DNA 反应时发生了嵌入作用, 此外静电引力、氢键作用也是十分重要的. Quigley 等^[4]通过 X 射线衍射方法, 观察柔红霉素-DNA 复合物的结合方式, 发现它主要嵌入 DNA 双螺旋的大沟内, 其结合点的解链角(unwinding angle)为 12° . 并认为柔红霉素分子结构中 B、C 环嵌入到 DNA 的 C-G 对层之间, 并与 DNA 碱基及磷酸骨架形成多对氢键. 柔红霉素的 B, C 环嵌入到 DNA 双螺旋结构中 C(1)-G12 和 G2-C(11)碱基对层之间, 而 D 环位于 DNA 的大沟槽内, A 环位于小沟槽内. 由于表柔比星与柔红霉素的基本结构相同, 仅 14 位的取代基(R)有所不同(图 2). 而 14 位 R 在药物与 DNA 的反应中无实质性的作用, 因此可以认为表柔比星与柔红霉素在中性介质中的作用模式是相同的. 但是我们的实验条件下, 酸度较高, 此时糖苷上的 NH_2 以及表柔比星 13 位羰基可能质子化, 而使表柔比星成为 2 价阳离子, 此时质子化羰基阳离子($=\text{OH}^+$)以及糖苷上的 NH_3^+ 不再通过水分子分别与碱基 C1 中的 O(2)、碱基 A4 的 N(3)形成水合物(在 $\text{pH}=2$ 时, 核苷磷酸酯失去一个质子, 变为 1 价阴离子^[28]), 因此表柔比星与 DNA 结合产物的可能的结构如图 3 所示.



柔红霉素 $\text{R}=\text{CH}_3$

表柔比星 $\text{R}=\text{CH}_2\text{OH}$

图 2 柔红霉素与表柔比星的分子结构

Figure 2 Diagram molecular structures of daunomycin and epirubicin

2.3.2 表柔比星与 DNA 结合作用对光谱特征的影响

(1)对吸收光谱的影响

表柔比星分子中的蒽环具有大的共轭体系, 因此有较强的光吸收, 它的最大吸收波长位于 478 nm , 摩尔吸光系数(ϵ)为 $1.2 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. DNA 本身的光吸收是由它的碱基产生的, 它们位于紫外区的 $260 \sim 280 \text{ nm}$. 当蒽环嵌入 DNA 的两个碱基对之间时, 表柔比星的蒽环与碱基之间主要是通过氢键作用和芳基堆积作用而产生影响, 这种作用是较弱的, 因此对于吸收光谱的影响

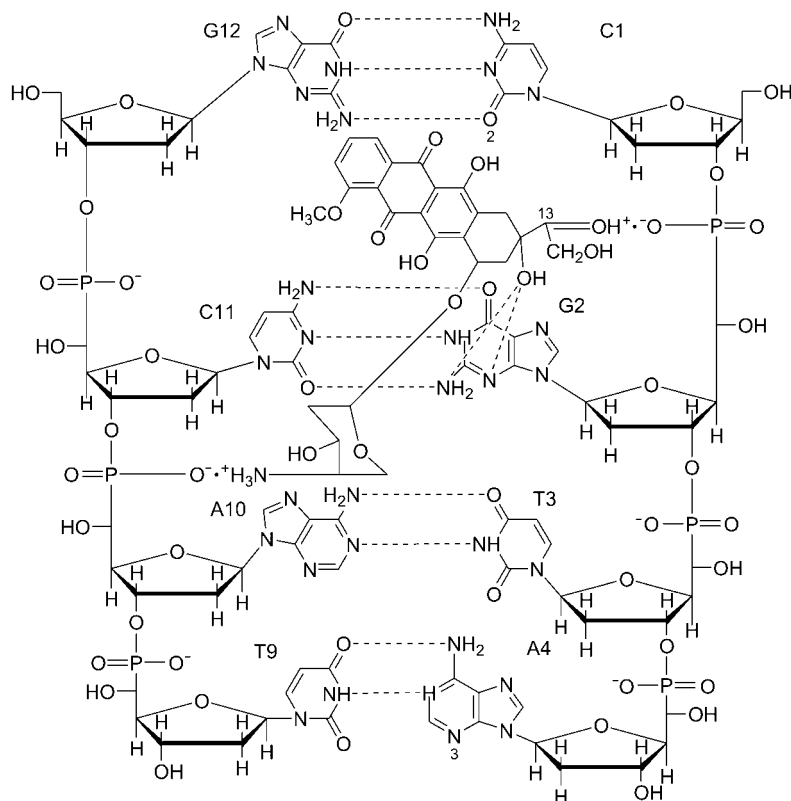


图 3 DNA 与表柔比星的结合模式

Figure 3 Binding mode of DNA and epirubicin in the acidic medium

响是较弱的. 结合产物的最大吸收波长分别位于 482 (ctDNA), 481 (sDNA)和 480 nm (hsDNA), 较反应前向长波方向移动 2~4 nm, 而且发生轻微的褪色反应, 吸光度有不同程度的降低, 其中 ctDNA > sDNA > hsDNA(图 4), 这种褪色作用也可能是由于葱环嵌入 DNA 的双螺旋结构中, 双螺旋结构对于光产生了一定的屏蔽作用, 影响了葱环对光的吸收, 而表柔比星与 RNA 反应对于吸收光谱的影响则更不明显.

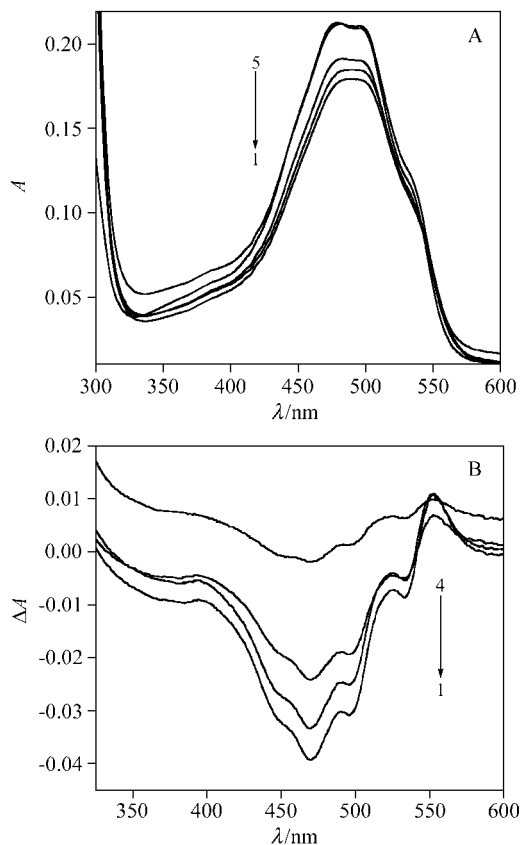


图 4 吸收光谱

Figure 4 The absorption spectra

A. EPI-nucleic acid systems (measured against the water): 1—ctDNA-EPI; 2—sDNA-EPI; 3—hsDNA-EPI; 4—yRNA-EPI; 5—EPI; B. EPI-nucleic acid systems (measured against the reagent blank): 1—ctDNA-EPI; 2—sDNA-EPI; 3—hsDNA-EPI; 4—yRNA-EPI; EPI: 10.0 μg/mL; nucleic acid: 52.8 μg/mL

(2)对荧光光谱的影响

表柔比星的葱醌具有大的共轭体系和较好的平面性, 因此它能发射荧光, 它的最大激发(λ_{ex})和最大发射(λ_{em})波长分别位于 467 和 588 nm(图 5). 核酸本身无荧光, 两者结合后荧光光谱特征(λ_{ex} 和 λ_{em})并未发生改变, 但使表柔比星的荧光发生不同程度的猝灭. 这种猝灭作用可能是表柔比星的葱环与碱基对的芳环之间的芳环堆积作用引起的. 由于葱环与碱基中的芳基之间的距离很近, π 电子容易在葱环和碱基芳环之间流动, 产生电荷转移作用, 这种电荷转移作用可能是导致荧光猝灭的重

要原因. 此外碱基对和葱环的氢键作用以及反应产物的吸光度降低, 也可能造成荧光猝灭. 反应产物荧光猝灭程度是不同的, 其顺序是: ctDNA > sDNA > hsDNA, yRNA 荧光猝灭程度最低. 荧光猝灭法研究表柔比星与核酸的反应较吸收光谱灵敏, 可用于表柔比星和 DNA 相互作用的研究.

我们实验了温度对于荧光猝灭作用的影响, 结果表明温度升高将降低荧光猝灭程度, 由吸收光谱发生的变化和温度对荧光猝灭的影响, 可以看出它是由表柔比星与 DNA 形成复合物而产生的一种静态猝灭作用. 根据静态猝灭的 Stern-Volmer 公式^[29]

$$F_0/F = 1 + K[Q]$$

其中 F_0 表示表柔比星的荧光强度, F 表示结合产物的荧光强度, $[Q]$ 为 DNA 的浓度, K 为复合物的形成常数. 我们的测定结果为表柔比星与不同 DNA 结合产物的结合常数(K)在 25 °C 分别为 2.2×10^4 (ctDNA), 2.1×10^4 (sDNA), 0.93×10^4 L/mol (hsDNA); 当温度升至 50 °C 时 K 值则分别降至 2.0×10^4 , 2.01×10^4 和 0.85×10^4 L/mol, 这与葱环类抗癌药物与核酸的结合常数大约为 1.0×10^4 L/mol 的报道基本一致^[27].

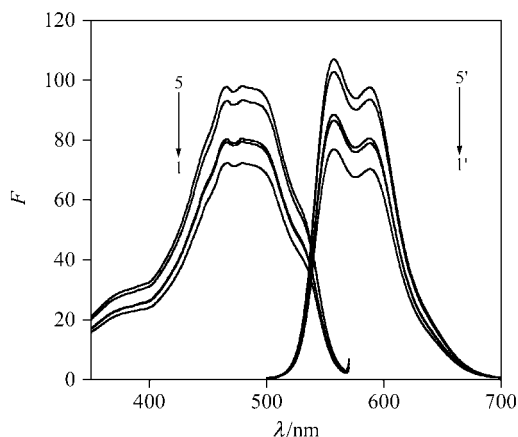


图 5 荧光光谱

Figure 5 Fluorescence spectra

1~5—Excitation spectra, 1'~5'—Emission spectra. 1,1'—ctDNA-EPI; 2,2'—sDNA-EPI; 3,3'—hsDNA-EPI; 4,4'—yRNA-EPI; 5,5'—EPI; EPI: 10.0 μg/mL; nucleic acid: 3.5 μg/mL

(3)对 RRS 光谱的影响

表柔比星与核酸(特别是 DNA)的相互作用会对 RRS 产生重要的影响, 使 RRS 显著增强并出现新的 RRS 光谱. 它不仅较吸收光谱和荧光光谱更为灵敏, 而且可为研究表柔比星与核酸的相互作用提供不少新的结构信息, 因而用这一种方法研究两者的相互作用具有更多的优点, 引起 RRS 增强的原因可能是:

(I)共振增强散射效应

共振 Rayleigh 散射是一种特殊的弹性光散射, 当

Rayleigh 散射的波长位于或接近于分子的吸收带时, 由于电子吸收电磁波的频率与其散射频率相同, 电子因共振而强烈吸收散射光的能量发生再次散射, 因此 RRS 的产生应当与吸收光谱密切相关. 图 6 为表柔比星-ctDNA 体系的 RRS 光谱与吸收光谱的比较. 由图 6 可知: 表柔比星和 ctDNA 结合产物的 RRS 峰主要位于 313 nm, 而它们的最大吸收峰位于 269 nm, 由图可见, RRS 光谱位于它的吸收带中, 因此可以因散射和光吸收之间发生共振而产生增强的瑞利散射. 这种共振增强效应使 RRS 强度明显提高.

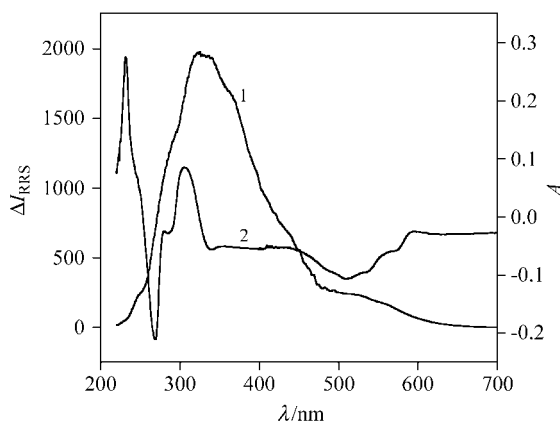


图 6 EPI-ctDNA 的 RRS 光谱与吸收光谱比较

Figure 6 Comparison of RRS and absorption spectra

1—RRS spectrum; 2—absorption spectrum; EPI: 10.0 $\mu\text{g/mL}$; ctDNA: 1.3 $\mu\text{g/mL}$

(II) 反应产物的体积增大

根据瑞利散射公式^[30], 当测定条件和溶液浓度固定时, 散射光强度和粒子体积的平方成正比, 因此化合物分子体积的增加会导致 RRS 增强. 当表柔比星与 DNA 结合以后由于多个表柔比星分子嵌入 DNA 中使得体积增大(分子量也大大增加), 引起 RRS 强度增大. 但是体积增大对于吸收光谱和荧光光谱影响甚微, 不能反映结合产物的这一变化. 这也是 RRS 法研究这类反应较吸收光谱和荧光光谱更为优越之处.

(III) 嵌入作用对于 DNA 分子构象的影响

当表柔比星的芳基嵌入 DNA 双螺旋结构与 DNA 碱基对产生芳基堆积作用时, 不仅会使碱基对之间的距离增大, 某些萘环类药物嵌入后会使得碱基对距离由原来的 0.34 \AA 增至 1.98 \AA ^[1], 从而导致 DNA 链伸长, 而且会使 DNA 双螺旋结构松散或变形, Wang 等^[3]以柔红霉素为例研究指出每一个柔红霉素分子使 DNA 双螺旋角伸长了 8°. 嵌入的这种构象和形状的改变也将有利于 RRS 增强. 由于 RNA 的双螺旋结构通常仅占 50% 左右, 因此表柔比星的芳基在 RNA 中的嵌入作用相对较弱, 而且 RNA 的分子也较 DNA 小, 所含碱基对数量较少, 因此

表柔比星与 RNA 反应, 其光谱信号的改变和增强程度均大大低于 DNA.

(IV) 疏水性的影响

从结合模型(图 3)可以看出, 在 pH 值较高时, 由于 13 位羰基和糖苷上的 NH_2 未质子化, 它可能通过水分子分别与碱基 C1 和 A4 之间形成氢键, 因而结合产物有较强的水合作用. 当 pH 值降低至 2.0 左右时, 13 位羰基和糖苷上的 NH_2 分别质子化, 它不再与水分子和 DNA 的碱基 C1、A4 形成氢键, 而是通过静电引力与 DNA 的磷酸骨架中的羟基氧结合, 两者的电荷被中和且不再与水分子形成水合物. 但是不论是否形成水合物对于吸收光谱和荧光光谱影响甚小, 实验表明在 pH 2.0~8.0 的范围内, 吸收光谱和吸光度, 以及荧光光谱和荧光猝灭几乎不变; 但是在较高的 pH 值时(例如 $\text{pH} > 3$), 由于形成水合物, 结合产物周围有一层水分子, 这种结构不利于 RRS 强度的提高, 此时 RRS 增强程度较低(图 7). 随着酸度增大, 表柔比星的 13 位羰基和糖苷上的 $-\text{NH}_2$ 逐渐质子化, 与 DNA 磷酸骨架的静电引力逐渐代替了与水分子的水合作用. 分子的疏水性增强, 在水分子和疏水分子之间可能产生一个液-固界面, 这种疏水界面的形成将产生一种表面增强的瑞利效应^[31,32], 使 RRS 增强仅在 pH 2.0 左右达到最大; 但是进一步提高酸度, 又会使 DNA 磷酸酯离解程度降低, 负电荷减少, 表柔比星与 DNA 之间的静电引力降低, 也不利于两者的结合作用而使 RRS 降低. 故 RRS 强度变化可对分子的疏水性大小和是否形成水合物提供新的信息, 有助于对分子结构研究.

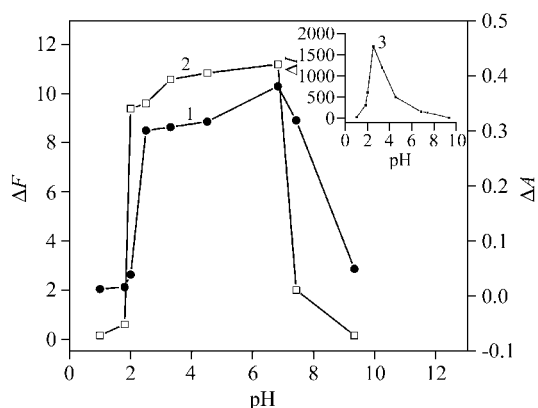


图 7 吸收、荧光和 RRS 光谱受酸度的影响

Figure 7 The effects of pH on the absorbance, fluorescence and RRS intensity

1—absorbance; 2—fluorescence intensity; 3—RRS intensity

由此可见, 虽然吸收光谱、荧光光谱与 RRS 光谱均可用于表柔比星与核酸相互作用的研究, 但是由于 RRS 光谱特征和强度除与吸收光谱有关外, 还受到分子体

积、分子形状和构象以及分子疏水性的强烈影响,而这些变化对于吸收光谱和荧光光谱影响甚微.因此 RRS 光谱可为研究药物分子与核酸的相互作用提供更多的新信息,对反应历程和结构模式提供更多的依据.并且 RRS 的灵敏度较吸收光谱和荧光光谱法分别提高 2 个和 1 个数量级,因此为发展高灵敏度和简便快速测定 DNA 的新方法创造了更好的条件.

3 RRS 法的分析应用

3.1 方法的灵敏度

分别在最佳条件下,用表柔比星作试剂,以 RRS 方法、分光光度法和荧光猝灭法测定了 DNA,它们的定量测定范围、线性回归方程、相关系数及检出限结果列于表 2 中.从表 2 可见,RRS 有低的检出限,其灵敏度较分光光度和荧光猝灭法分别提高了 2 个和 1 个数量级,因

而更有利于 DNA 的痕量分析.

3.2 方法的选择性

实验了某些金属离子、糖类、氨基酸、表面活性剂和蛋白质对反应体系的影响,结果如表 3 所示.常见金属离子如一定量的 Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} 等不影响测定(相对误差 $\leq 5.0\%$),而 Fe^{3+} , Fe^{2+} 允许量相对较小,它们与 DNA 的碱基结合^[33].表面活性剂 CTAB 和 SDS 对体系的影响很大,尤其是阳离子表面活性剂,因为它可以诱导 DNA 构象改变^[34,35],并能引起 RRS 增强^[12].人血清白蛋白和牛血清白蛋白与 DNA 大沟区结合^[36],阻碍了表柔比星在 DNA 中的嵌入作用,也对测定有影响,因此允许量较低.

3.3 分析应用

用 RRS 法测定了四个含有不同组分的合成样品中的 ctDNA,结果见表 4.由表 4 可见,方法是可行的.

表 2 RRS 法和荧光光谱法测定核酸的线性回归方程、线性范围和检出限

Table 2 Parameters of determination of DNA by RRS, spectrophotometric and fluorospectrophotometric method

体系	方法	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	线性回归方程	线性相关系数	检出限($\mu\text{g/mL}$)
EPI-ctDNA	Spectrophotometry	8.4~25.2	$\Delta A = -0.01 + 3.3 \times 10^{-3}C$	0.9977	2.54
	Fluorospectrophotometry	0.6~3.5	$\Delta F = -1.3 + 7.4C$	0.9994	0.19
	RRS	0.08~3.5	$\Delta I = -297.4 + 1409.5C$	0.9991	0.024
EPI-sDNA	Spectrophotometry	7.4~22.2	$\Delta A = -0.02 + 4.6 \times 10^{-3}C$	0.9950	2.42
	Fluorospectrophotometry	0.8~4.8	$\Delta F = -1.3 + 7.4C$	0.9964	0.25
	RRS	0.08~2.3	$\Delta I = -84.8 + 1443.2C$	0.9980	0.024
EPI-hsDNA	Spectrophotometry	19.0~44.5	$\Delta A = -0.02 + 1.5 \times 10^{-3}C$	0.9901	5.75
	Fluorospectrophotometry	0.9~3.5	$\Delta F = -1.3 + 7.4C$	0.9983	0.27
	RRS	0.09~4.2	$\Delta I = -334.8 + 1071.9C$	0.9963	0.028

表 3 共存物质的影响(ctDNA: 1.2 $\mu\text{g/mL}$)

Table 3 Effects of coexistent substance

共存物质	允许倍量	共存物质	允许倍量
DL-Aspartic acid	2.0	Fe^{3+}	0.6
DL-Threanine	5.0	Fe^{2+}	0.6
L-iso-Leucine	3.5	Cl^{3+}	8.0
L-Tyrosine	3.0	K^+	500.0
Amylum	45.0	Mn^{2+}	30.0
Maltose	30.0	Zn^{2+}	33.0
Lactose	400.0	Hg^{2+}	10.0
Glucose	60.0	Cu^{2+}	25.0
SO_4^{2-}	35.0	Ca^{2+}	33.0
Cl^-	40.0	SDS	0.01
Ni^{2+}	3.0	CTAB	0.003
Al^{3+}	2.5	BSA	0.01
Na^+	30.0	HSA	0.03

表4 合成样品的测定结果

Table 4 Results for the determination of ctDNA in synthetic samples

Sample	样品组成 Concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ctDNA/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Found/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recovery/%
1	Ca^{2+} (0.5), Mn^{2+} (0.9), BSA (0.05), 麦芽糖(3.6)	0.6	0.58	96.2
2	K^{+} (2.5), SDS (2.0), Zn^{2+} (0.2), DL-天冬氨酸(0.1)	1.2	1.11	91.5
3	yRNA (0.07), 淀粉(0.05), Ni^{2+} (5.0), Cr^{3+} (0.5)	1.8	1.92	106.7
4	Fe^{3+} (0.1), DL-苏氨酸(0.05), 葡萄糖(0.04), BSA (0.05)	2.4	2.48	103.7

4 结论

(1) 利用共振 Rayleigh 散射光谱并结合吸收光谱和荧光光谱研究了表柔比星与三种 DNA 和一种 RNA 的相互作用, 研究表明表柔比星与核酸反应在引起吸收光谱变化、吸光度降低和荧光猝灭的同时, 导致共振瑞利散射的显著增强, 并产生特定的 RRS 光谱。

(2) RRS 光谱不仅与吸收光谱有关, 还受分子体积大小、分子形状和构象以及分子疏水性的强烈影响。因此它对表柔比星和 DNA 的相互作用提供某些新信息、更有利于对两者反应机理和结合模式的研究。

(3) 研究表明, 不仅生色团在生物大分子上的聚集作用能引起 RRS 的增强^[25,26], 而且小分子在核酸中的嵌入同样可以导致 RRS 的显著增强, 因此 RRS 光谱也可作为研究嵌入作用的有用手段。

(4) RRS 法的灵敏度较相同体系的分光光度法和荧光猝灭法高 2 个数量级和 1 个数量, 据此发展了一种以表柔比星作试剂, 用 RRS 技术高灵敏和简便快速测定 DNA 的新方法。

References

- You, Q.-D. *Medicine Chemistry*, Chemical Industry Press, Beijing, **2003**, p. 527 (in Chinese).
(尤启东, 药物化学, 化学工业出版社, 北京, **2003**, p. 527.)
- Li, J. M. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23(6), 697.
- Wang, A. H. J.; Ughetto, G.; Quigley, G. J.; Rich, A. *Biochemistry* **1987**, 26, 1152.
- Quigley, G. J.; Wang, A. H. J.; Ughetto, G.; Marel, G. V. D.; Boom, J. H. V.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77(12), 7204.
- Alain, L.; Fiallo, M. M. L.; Arlette, G. S. *Chem.-Biol. Interact.* **1996**, 101, 49.
- Yuko, Y.; Kenichi, Y.; Toshio, K. *Biophys. Chem.* **1996**, 61, 93.
- Beljebbar, A.; Sockalingum, G. D.; Angiboust, J. F.; Manfait, M. *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, 51, 2083.
- Smulevich, G.; Mantini, A. R.; Feis, A.; Marzocchi, M. P. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, 32, 565.
- Chu, X.; Shen, G. L.; Jiang, J. H.; Kang, T. F.; Xiong, B.; Yu, R. Q. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 373, 29.
- Erdem, A.; Ozsoz, M. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 734(1), 107.
- Huang, C. Z.; Li, K. A.; Tong, S. Y. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 514.
- Liu, S. P.; Hu, X. L.; Luo, H. Q.; Fan, L. *Sci. China, Ser. B* **2002**, 45(2), 173.
- Liu, S.-P.; Fan, L.; Hu, X.-L.; Liu, Z.-F.; Chen, Y.-H. *Acta Chim. Sinica* **2004**, 62(17), 1635 (in Chinese).
(刘绍璞, 范莉, 胡小莉, 刘忠芳, 陈粤华, 化学学报, **2004**, 62(17), 1635.)
- Zhao, G. C.; Zhang, P.; Wei, X. W.; Yang, Z. S. *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 297.
- Liu, S. P.; Luo, H. Q.; Li, N. B.; Liu, Z. F. *Anal. Chem.* **2001**, 26(6), 3907.
- Luo, H. Q.; Liu, S. P.; Liu, Z. F. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 449 (1-2), 267.
- Hu, X.-L.; Liu, S.-P.; Luo, H.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2003**, 61(8), 1287 (in Chinese).
(胡小莉, 刘绍璞, 罗红群, 化学学报, **2003**, 61(8), 1287.)
- Wang, M.-X.; Liu, Z.-F.; Hu, X.-L.; Liu, S.-P. *J. Southwest China Normal (Nat. Sci.)* **2005**, 30(2), 304 (in Chinese).
(王明霞, 刘忠芳, 胡小莉, 刘绍璞, 西南师范大学学报(自然科学版), **2005**, 30(2), 304.)
- Liu, S. P.; Zhou, G. M.; Liu, Z. F. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 36, 651.
- Shi, Y.; Liu, Z.-F.; Liu, S.-P.; Hu, X.-L. *J. Southwest China Normal (Nat. Sci.)* **2004**, 29(1), 84 (in Chinese).
(石燕, 刘忠芳, 刘绍璞, 胡小莉, 西南师范大学学报(自然科学版), **2004**, 29(1), 84.)
- Liu, S. P.; Liu, Z. F.; Zhou, G. M. *Anal. Lett.* **1998**, 31(7), 1247.
- Liu, S. P.; Liu, Z. F.; Luo, H. Q. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 12, 255.
- Liu, S. P.; Liu, Z. F.; Huang, C. Z. *Anal. Sci.* **1998**, 14, 799.
- Goto, M. O. N.; Susanto, J. P.; Motomizu, S. *Analyst* **1996**, 121, 1085.
- Pasternack, R. F.; Bustamante, C.; Collings, P. J.; Giannetto, A.; Gibb, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5393.
- Pasternack, R. F.; Collings, P. J. *Science* **1995**, 269, 935.
- Chen, Y.; Li, Y.-Z.; Chang, W.-B.; Ci, Y.-X. *J. Anal. Soc.* **1994**, 10 (1), 67 (in Chinese).
(陈勇, 李元宗, 常文保, 慈云祥, 分析科学学报, **1994**, 10(1), 67.)
- Zhang, L.-R.; Yu, H.-W.; Zhang, L.-H. *Nucleic Acid Medicinal Chemistry*, Beijing Medical University and Peking

- Union Medical College Press, Beijing, **1997**, p. 22 (in Chinese).
(张亮仁, 于宏武, 张礼和, 核酸药物化学, 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 北京, **1997**, p. 22.)
- 29 Chen, G.-Z.; Huang, X.-Z.; Xu, J.-G.; Zheng, Z.-Z.; Wang, Z.-B. *Fluorescence Analysis*, 2nd ed., Science Press, Beijing, **1990**, p. 117 (in Chinese).
(陈国珍, 黄贤智, 许金钩, 郑朱梓, 王尊本, 荧光分析法, 第二版, 科学出版社, 北京, **1990**, p. 117.)
- 30 Zhang, Y.-H. *Physical Chemistry*, Shanghai Jiaotong University Press, Shanghai, **1988**, p. 538 (in Chinese).
(章燕豪, 物理化学, 上海交通大学出版社, 上海, **1988**, p. 538.)
- 31 Liu, S. P.; Jiang, Z. L.; Kong, L.; Liu, Q. *Sci. China, Ser. B* **2002**, 45(6), 616.
- 32 Liu, S. P.; Kong, L. *Anal. Sci.* **2003**, 19, 1055.
- 33 Yang, P. *Inorganic Chemistry Introduction*, Xi'an Jiaotong University Press, Xi'an, **1991**, p. 274 (in Chinese).
(杨频, 生物无机化学导论, 西安交通大学, 西安, **1991**, p. 274.)
- 34 Mel'nikov, S. M.; Sergeyer, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2401.
- 35 Mel'nikov, S. M.; Sergeyer, V. G.; Yoshikawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9951.
- 36 Ollis, D. L.; White, S. W. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 981.

(A0609137 ZHU, H. F.; ZHENG, G. C.)