

环丙沙星-铽络合物的荧光特性及其应用研究

何 华¹, 王羚邴¹, 刘旭辉², 焦庆才³, Chuong Pham-Huy⁴, 王广基^{1*}

1. 中国药科大学基础部, 江苏 南京 210009
2. 法国癌症和免疫基因研究所, 巴黎 94807
3. 南京大学生命科学学院药物生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093
4. 法国巴黎第五大学药学院, 巴黎 75006

摘 要 中性条件下, 铽(Ⅲ)与环丙沙星反应极易形成络合物。该络合物与小牛胸腺 DNA 分子作用后荧光强度显著增强, 据此建立了简单、快速、灵敏的 DNA 测定方法, 并优选出反应的最佳条件为: 25 ℃, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 325/545 \text{ nm}$, Tb^{3+} 浓度 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 环丙沙星浓度 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl 缓冲溶液, pH 7.0。结果表明, 在 $4.3 \times 10^{-7} \sim 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内 DNA 与其荧光强度呈良好的线性关系, 其线性方程为 $F_1 - F_0 = 10^7 c + 48.00$ ($r = 0.9988$, $n = 8$), 检出限为 $2.8 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此法同时用于临床近 20 例全血 DNA 提取样本的检测, 经 t 检验, 两组在 545 nm 所得的荧光强度有差异 ($P < 0.05$)。

主题词 环丙沙星-铽络合物; 脱氧核糖核酸; 荧光分光光度法; 荧光探针; 全血

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)08-1516-04

引 言

脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)是生物体内重要的遗传物质, 但由于天然荧光微弱, 使得直接利用其荧光进行生物特性研究受到很大限制。在 DNA 的双螺旋结构中, 高密度的带负电的磷酸基团使 DNA 极易与带正电的基团形成稳定结构, 某些正电基团作为有效的荧光探针已用于研究 DNA 的结构、构象、作用机制以及特殊 DNA 的定量^[1-4]。以铽和镱为代表的过渡金属络合物的研究以其丰富的发射光谱、较大的 Stokes 位移、稳定的性质、较长荧光寿命成为该领域十分活跃的研究课题^[5-7]。在适当的条件下, 镧系金属络合物能够与 DNA 发生反应。作为廉价、有效、非放射性的新型生物探针, 它的研究对从分子水平上了解抗癌药物的作用, 探讨小分子抗癌活性不同的成因以及与 DNA 作用方式之间的联系^[8-10], 设计低毒高效的抗癌药物提供了理论和实验基础^[11-15]。

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)为代表的氟喹诺酮类药物是一类发展迅速并广泛使用于临床的新一代广谱抗菌药。中性条件下, 铽(Ⅲ)与环丙沙星反应极易形成络合物^[16]。目前对于环丙沙星-铽络合物与 DNA 相互作用的研究主要集中在组织染色^[17]。本文以环丙沙星-铽络合物作为荧光探针, 建

立了简单、快速、灵敏的 DNA 测定新方法。该络合物与小牛胸腺 DNA 分子作用后于 545 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$) 处荧光发射峰强度显著增加, 并与 DNA 的浓度呈线性关系; 在最优的实验条件下, 线性范围 $4.3 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 检出限 $2.8 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此方法具有较高的灵敏度和选择性, 用于临床近 20 例全血 DNA 提取样本的检测, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司); UV-2100 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); FA-1004 电子天平(上海天平仪器厂); pHs-2C 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

盐酸环丙沙星(市售)。称取一定量的环丙沙星, 先用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶解后加入缓冲溶液, 配制成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; Tb_4O_7 购自上海跃龙有色金属有限公司, 精密准确称取 0.9347 g, 加入少量浓盐酸, 和少量 H_2O_2 , 加热使其溶解, 并挥发至近干, 再用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 稀释至 500 mL, 得 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 使用时用水稀释; 小牛胸腺 DNA(ct DNA)购自华美生物工程公司, 纯度以 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 1.8$ 衡量; 浓度由 260 nm 处的吸

收稿日期: 2005-04-28, 修订日期: 2005-09-13

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2003080)资助项目

作者简介: 何 华, 1963 年生, 中国药科大学基础部副教授 * 通讯联系人

光度确定 ($\epsilon_{260\text{ nm}} = 6\ 600\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 为 $9.35 \times 10^{-4}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。用 Tris(三羧甲基氨基甲烷)与 HCl 配成 $0.05\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液, pH 7.0。全血基因组 DNA 小量制备试剂盒购自 V-gene Biotechnology CO., Ltd。其他试剂均为分析纯; 实验用水为本实验室自制的重蒸水。

1.2 实验步骤

于 10 mL 比色管中依次加入 $0.1\ \text{mL}\ 5.0 \times 10^{-3}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{Tb}^{3+}$ 溶液, $1.0 \times 10^{-4}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CIP 溶液各 $0.1\ \text{mL}$ 。再加入 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液 $0.8\ \text{mL}$ 和一定量的 DNA 溶液, 稀释至刻度, 摇匀。 $25\ ^\circ\text{C}$ 条件下静置 30 min 后置于 $1\ \text{cm}$ 的石英池中, 以 $325\ \text{nm}$ 为激发波长, 在 $350 \sim 650\ \text{nm}$ 范围内进行荧光扫描, 记录在 $545\ \text{nm}$ 处的荧光强度, 同时做试剂空白。

2 结果与讨论

2.1 激发波长和测定波长的选择

按照实验方法测定 CIP, Tb^{3+} , 络合物以及络合物与 DNA 相互作用后的荧光光谱。环丙沙星与 Tb^{3+} 生成络合物在加入 DNA 后, 最大激发波长峰位没有位移, 只是强度有所增大, 见图 1。若以 $271\ \text{nm}$ 作为激发波长, 溶液中存在的没有与 DNA 结合的 CIP, Tb^{3+} 离子同时被激发, 产生较强的发射光谱, 对 Tb^{3+} -CIP-DNA 的发射光谱产生干扰。故而放弃最大激发波长 $271\ \text{nm}$ 作为实验激发波长。而在 $315 \sim 330\ \text{nm}$ 处的激发谱平稳, 实验最终选择 $325\ \text{nm}$ 作为激发波长。

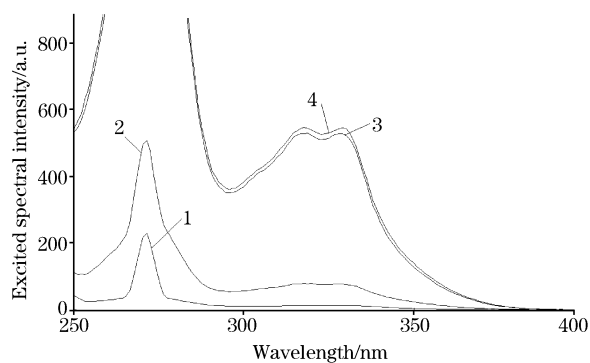


Fig. 1 The fluorescence excitation spectra of CIP, Tb^{3+} , Tb^{3+} -CIP and Tb^{3+} -CIP-DNA

$c_{\text{CIP}} = 1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Tb}^{3+}} = 5.0 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{DNA}} = 1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0.

1: CIP; 2: Tb^{3+} ; 3: Tb^{3+} +CIP; 4: Tb^{3+} +CIP + DNA

由图 2 的发射光谱可见, 在 $545\ \text{nm}$ 处游离的铽离子和环丙沙星的发射光谱对 Tb^{3+} -CIP-DNA 的干扰小, 且 Tb^{3+} -CIP-DNA 较 Tb^{3+} -CIP 体系荧光强度增加明显, 故以 $545\ \text{nm}$ 作为测定波长。

2.2 最佳酸度的选择

对 DNA 的测定研究只有在 DNA 的天然结构不被破坏的酸度下进行。实验研究了在 pH 4~10 条件下 Tb^{3+} -CIP 络

合物与 DNA 分子相互作用的荧光强度变化(见图 3), 发现在较低或较高的 pH 介质里, $545\ \text{nm}$ 处荧光都比较弱, 这可能是因为强酸时, $-\text{COOH}$ 难以电离, 不易形成络合物; 在碱性条件下, Tb^{3+} 易水解, 生成铽的氢氧化物沉淀, 此外环丙沙星的 $-\text{COOH}$ 的 pK_a 为 6.09, 从理论上讲, pH 值 > 8.0 , 也可能产生沉淀。当介质 pH 在 7.0 时, 体系的荧光强度达到最大并且稳定, 故本实验选用 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

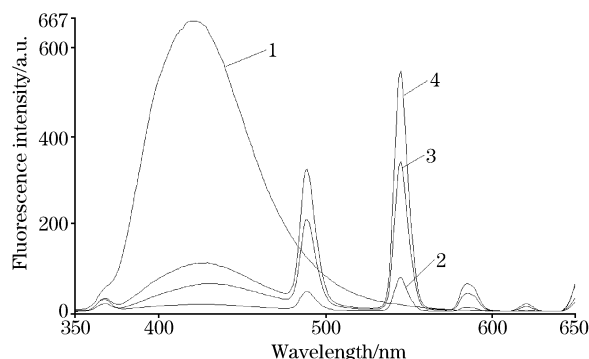


Fig. 2 The fluorescence emission spectra of CIP, Tb^{3+} , Tb^{3+} -CIP and Tb^{3+} -CIP-DNA

$c_{\text{CIP}} = 1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Tb}^{3+}} = 5.0 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{DNA}} = 1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0.

1: CIP; 2: Tb^{3+} ; 3: Tb^{3+} +CIP; 4: Tb^{3+} +CIP + DNA

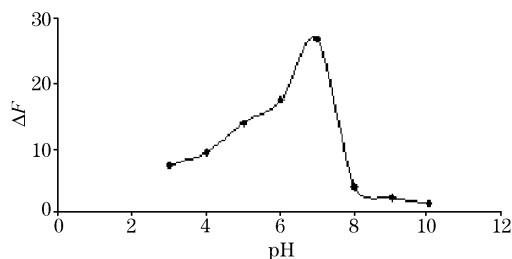


Fig. 3 The effect of pH

$c_{\text{Tb}^{3+}} = 2.0 \times 10^{-4}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{CIP}} = 1.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{DNA}} = 1.0 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 Tb^{3+} -CIP 离子配比的影响

实验固定环丙沙星浓度, 改变 Tb^{3+} 浓度。随着 Tb^{3+} 离子浓度逐渐增加, 在 $545\ \text{nm}$ 处 Tb^{3+} 的特征荧光强度逐渐增大。当 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{CIP}] = 200 \sim 250$ 时, 体系荧光强度趋于恒定, 随着 Tb^{3+} 浓度的进一步增大, 体系荧光强度逐渐减小, 见图 4。

在较低的配比时 Tb^{3+} 浓度的增大有利于络合物的形成, 使 Tb^{3+} -CIP 体系与 DNA 作用的荧光强度增大, 但随 Tb^{3+} 浓度的进一步增大, 溶液的离子强度增大, 这可能会使 DNA 发生构象变化, 不利于与络合物作用, 因而体系的荧光强度下降。当 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{CIP}] = 50$ 时, Tb^{3+} -CIP-DNA 体系与 Tb^{3+} -CIP 体系比较有最大且稳定的荧光值变化, 利于 DNA 的检测, 故本实验选择 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{CIP}] = 50$ 。

2.4 Tb^{3+} -CIP 离子浓度的影响

固定 DNA 的浓度, $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{CIP}] = 50$, 依次为加入

CIP 的浓度分别为 1.6×10^{-9} , 4×10^{-9} , 8×10^{-9} , 8×10^{-8} , 8×10^{-7} , 2×10^{-6} , 4×10^{-6} mol · L⁻¹, 加入相应浓度的 Tb³⁺ 溶液, 摇匀静置 30 min。在荧光分光光度计上测定荧光强度。另取比色管加入同体积的 Tris-HCl 缓冲溶液和相应的体积的络合物储备液做为空白, 同样条件下测得荧光值, 如图 5。

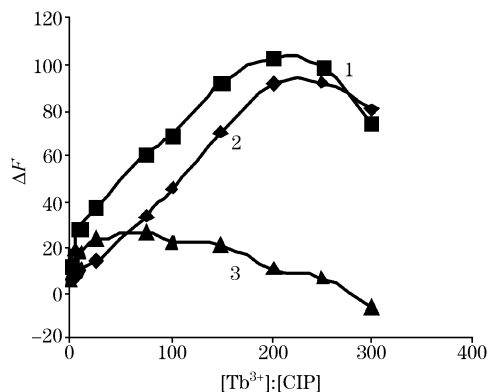


Fig. 4 The effect of the matching of CIP to Tb³⁺

1: CIP+Tb³⁺ (F₀);

2: CIP+Tb³⁺+DNA(1.0×10^{-5} mol · L⁻¹)(F); 3: F-F₀

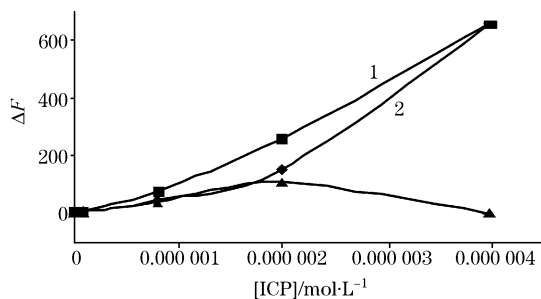


Fig. 5 The effect of the concentration of Tb³⁺-CIP

1: CIP+Tb³⁺+DNA(1.0×10^{-5} mol · L⁻¹)(F);

2: CIP+Tb³⁺ (F₀); 3: F-F₀

实验发现较大的离子强度不利于 DNA 与 Tb³⁺-CIP 络合物的相互作用。在 Tb³⁺ 浓度 10×10^{-5} mol · L⁻¹, CIP 浓度 2.0×10^{-6} mol · L⁻¹ 时, F-F₀ 有最大的荧光变化值。故在该实验条件下测定 DNA 的含量。

2.5 体系的稳定性

在 Tb³⁺ 浓度 10×10^{-5} mol · L⁻¹, CIP 浓度 2.0×10^{-6} mol · L⁻¹ 中加入一定量的 DNA, 每隔一定时间测其荧光强度, 结果表明: 25 °C 放置, 在 20~100 min 内体系荧光强度最大且稳定, 本文选用放置时间为 30 min。

2.6 干扰离子的影响

在实验的最佳条件下用 4.0×10^{-6} mol · L⁻¹ DNA 做干扰实验, 在相对误差 ±5% 范围内, 对生物流中常见的一些蛋白和金属离子允许浓度分别为 BSA($0.013 2$ mg · L⁻¹); HAS($0.533 0$ mg · L⁻¹)Cu²⁺ (1.66×10^{-7} mol · L⁻¹); Fe²⁺ (1.80×10^{-8} mol · L⁻¹); Mn²⁺ (1.20×10^{-6} mol · L⁻¹);

Zn²⁺ (2.25×10^{-6} mol · L⁻¹); Mg²⁺ (3.35×10^{-7} mol · L⁻¹); Ca²⁺ (4.28×10^{-7} mol · L⁻¹); Co³⁺ (5.27×10^{-7} mol · L⁻¹)。其中, Fe²⁺, Cu²⁺ 对实验测定的干扰较大, 但仍然高于生物流中同种离子的浓度, 因而该方法适用于体内样品的检测。

2.7 标准曲线与检测限

配制一系列含不同浓度 DNA 溶液, 按实验方法分别测定 545 nm 处的荧光强度, 发现 DNA 的浓度在 $4.3 \times 10^{-7} \sim 3.0 \times 10^{-5}$ mol · L⁻¹ 范围内与荧光强度呈良好的线性关系, 其线性回归方程为: $F_1 - F_0 = 10^7 c + 48.00$ ($n = 8$)。式中 F₀ 为 Tb³⁺-CIP 的荧光强度, F₁ 为加入 DNA 后的荧光强度, c 为 DNA 的浓度 (mol · L⁻¹); 线性相关系数 $r = 0.998 8$, 可用于测定 DNA 浓度。在所选的最佳实验条件下, 取 20 份空白液, 测定其荧光强度, 以 3 倍标准偏差计算其检测下限为 2.8×10^{-9} mol · L⁻¹ ($n = 20$)。

3 全血 DNA 分析

取 10 例肿瘤病患者和 10 例非肿瘤患者外周血各 2 mL, 按全血基因组 DNA 小量制备试剂盒 (V-gene Biotechnology Co., Ltd) 方法提取 DNA, 以 0.05 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶解, 定容至 10 mL。在 Tb³⁺-CIP 溶液中分别加入 4 mL 样本 DNA 溶液, 30 min 后测其在 545 nm 处的荧光强度。经研究发现, 肿瘤组在 545 nm 处荧光强度平均值为 347.43 ± 22.37 , 这明显高于非肿瘤组的荧光值平均值 (250.98 ± 18.14), 经 *t* 检验, 两组间存在差异 ($p < 0.05$)。实验正在扩大样本量, 进一步的研究结果将另文报道。

4 机理讨论

环丙沙星的荧光峰位于 435 nm 处, 但当它与 Tb³⁺ 离子结合后, 除环丙沙星自身 435 nm 处的荧光峰外, 而在 490, 545, 590 和 620 nm 处产生了 Tb³⁺ 的特征荧光峰, 峰形较窄, 它们分别对应于 Tb³⁺ 的 $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ 和 $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ 跃迁。由 Tb³⁺ 水溶液的荧光光谱可知, Tb³⁺ 的荧光强度极弱。由此可见 Tb³⁺ 的特征荧光峰是由于盐酸环丙沙星将吸收的能量传递给 Tb³⁺, 从而敏化了 Tb³⁺ 的发光, 与 Tb³⁺ 水合离子相比较极大地提高了 Tb³⁺ 的发光强度。在 DNA 的双螺旋结构中, 高密度的带负电的磷酸基团使 DNA 极易与带正电的基团通过静电作用形成稳定结构。在 DNA 的存在下, Tb³⁺-CIP 络合物的荧光强度增加, 发射峰位没有发生变化, 产生了明显的增色效应。增色效应是由于 DNA 刚性比较强, 当小分子插入其间后相互作用, DNA 能够很好的保护其发光。这与已知的一些插入试剂在 DNA 存在时荧光强度增加的现象一致^[18-20]。

环丙沙星-钷络合物作为荧光探针, 是具有较高的灵敏度和选择性的 DNA 测定新方法。该法简单、快捷且测定结果的重现性高及其无毒和无放射性的优点, 成为临床 DNA 检测的新型探针。

参 考 文 献

- [1] Shawn D W, David O W, Jeremy S L. *J. Inorg. Biochem.*, 2003, 94: 94.
- [2] Vasil B, Irene K, Jemal C, et al. *Inorg. Chim. Acta*, 2002, 339: 145.
- [3] Song Yumin, Kang Jingwan, Zhou Jing, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, 2000, 56: 2491.
- [4] BIAN Wei, WEI Yu-xia, WEI Yan-li(卞 伟, 魏玉霞, 卫艳丽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(1): 125.
- [5] Geyer C Ronald, Dipankar S. *J. Mol. Biol.*, 1998, 275: 483.
- [6] Bohuslav R, Alena S, Martin F, et al. *J. Chromatogr. B*, 2004, 800: 169.
- [7] Alla Y, Alexander K, Axel D, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, 2005, 61: 109.
- [8] Zhou Jing, Wang Liu-fang, Wang Jin-yi, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 83: 41.
- [9] Andoh T. *Biochimie.*, 1998, 80: 235.
- [10] Andrew J G, Ian S B. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 22: 849.
- [11] Shelley R M, Clive L G. *Radiat. Phys. Chem.*, 2005, 72: 287.
- [12] Mark A S, Scott W M. *J. Mol. Biol.*, 1997, 266: 927.
- [13] Takashi E, Naoki S, Isao T, et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, 290: 546.
- [14] Anatoly I D, Janet K, Christopher R, et al. *J. Mol. Biol.*, 2003, 331: 795.
- [15] Elizebeth C T, Charlotte H C, Chris J W, et al. *Chem. Biol.*, 2004, 11: 69.
- [16] WU Shu-qing, CAO Qiu-e, ZHAO Yun-kun, et al(吴淑清, 曹秋娥, 赵云昆, 等). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, 2000, 28(12): 1462.
- [17] YANG Jun, REN Yu, XU Yi-zhuang, et al(杨 军, 任 宇, 徐怡庄, 等). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2004, 25: 243.
- [18] LONG Yun-fei, CHEN Xiao-ming, CAI Tie-jun(龙云飞, 陈小明, 蔡铁军). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(5): 610.
- [19] Polyanychko A M, Andrushchenko V V, Chikhirzhina E V, et al. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(3): 989.
- [20] SONG Gong-wu, HE Zhi-ke, ZENG Yun-peng, et al(宋功武, 何治柯, 曾云鹏, 等). *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)*, 1999, 27(10): 1183.

Fluorescence Characteristic of Terbium-Ciprofloxacin Complex and Its Application

HE Hua¹, WANG Ling-li¹, LIU Xu-hui², JIAO Qing-cai³, CHUONG Pham-Huy⁴, WANG Guang-ji^{1*}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. INSERM U-602, Institut du Cancer et d'Immunogénétique (ICIG), Hopital Paul Brousse, 94807, Villejuif, France

3. Pharmaceutic Biotechnology Key Laboratory, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

4. Faculty of Pharmacy, University of Paris V, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006, Paris, France

Abstract On binding to deoxyribonucleic acid, the complex of terbium-ciprofloxacin (Tb^{3+} -CIP) increases its fluorescence quantum efficiency. Based on this, an easy, rapid and sensitive method for the determination of DNA was developed. Like ethidium bromide (EB), the complex can be intercalated into DNA bases, but it is non-poisonous. Determination can be made at pH 7.0, where the native structure of DNA is not disrupted. The maximum emission is at 545 nm with excitation at 325 nm. This method has good sensitivity ($2.8 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of ctDNA), high selectivity and a wide linear range (4.3×10^{-7} - $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of ctDNA). This complex was also employed for the clinical examination of DNA in whole blood of tumor patients. Ten tumor patients and 10 normal persons were enrolled in this study. It was showed that significant difference existed between control group and tumor group ($p < 0.05$).

Keywords Terbium-ciprofloxacin complex; DNA; Spectrofluorometry; Fluorescence probe; Whole blood

* Corresponding author

(Received Apr. 28, 2005; accepted Sep. 13, 2005)