

荧光及吸收光谱法研究 β -环糊精-硫堇包合物与 DNA 的相互作用

童晓青^{1,2}, 吕鉴泉^{1*}, 孙娟¹, 龚仲红¹

1. 湖北师范学院生化分析技术湖北省重点实验室, 湖北 黄石 435002

2. 华中师范大学化学学院, 湖北 武汉 430074

摘要 用荧光及可见光谱方法研究了 β -环糊精对硫堇的包合以及 β -环糊精-硫堇包合物与 DNA 的相互作用。在 pH 7.2 的 PBS 缓冲液中, β -环糊精以 1:1 包合硫堇, 包合常数为 $527 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (可见光谱法)、 $444 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (荧光法); DNA 的引入使环糊精-硫堇包合物的吸收波长红移, 吸光峰强度降低; 环糊精-硫堇包合物的荧光发生蓝移并有猝灭现象, 猝灭常数为 $6.12 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。荧光及可见光谱数据表明, 环糊精-硫堇包合物以嵌入方式与 DNA 发生相互作用, 其结合比是 1:1。

关键词 相互作用; 硫堇; β -环糊精; 包合物; DNA

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)12-2538-04

引言

生命科学研究中, DNA、蛋白质等生物大分子的结构与生理功能是其核心内容, 包括药物在内的活性分子与它们的相互作用成为的令人关注的前沿研究领域之一^[1, 2]。

作为一种药物和活性探针, 具有平面刚性芳环结构的喹吩类小分子—硫堇, 与 DNA^[3-5]、蛋白质^[6] 相互作用、结构与功能等已经引起了化学家、生物学家和医学家的关注^[7, 8]。鉴于硫堇类药物与 DNA 的相互作用是在生理条件下发生的, 生命体内大量存在的多糖物质可能对药物的形态有影响。因此, 在生命体内生物分子具有超分子的特征, 借助于环糊精的模拟酶功能, 将药物筑构成超分子体系并用于研究它们与生物分子的作用, 有可能从药物的定向释放以及作用机制方面获得一些新认识。

本文尝试性地用荧光及可见紫外光谱技术探讨 β -环糊精与硫堇的包合反应以及 β -环糊精-硫堇包合物与 DNA 的相互作用, 并就作用模式及性质进行了总结。目前, 该方面的研究尚未见有文献报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日立公司产 F-4500 荧光分光光度计和 U-3010 紫外-可见分光光度计。

小牛胸腺 DNA(ct-DNA, Sigma 公司): 使用前未作进一步处理, 摩尔浓度由紫外分光光度计标定, $\epsilon = 6\ 600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 硫堇(Thionine, TH, Sigma 公司); β -环糊精(β -CD, Fluka 公司); 其余试剂均为国产分析纯试剂, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在含 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 的 PBS 缓冲溶液中, 分别加入适量的 β -CD 和 ct-DNA, 定容, 摇匀。紫外-可见吸收光谱研究时, 以 pH 7.2 的 PBS 缓冲液为参比测量 190~700 nm 内的光吸收, 荧光光谱研究时, 以 550 nm 为激发波长, 测量 570~750 nm 范围的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 β -环糊精对硫堇的包合

图 1 为不同 β -CD 浓度存在下 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫堇的荧光光谱。从图可见, 随 β -CD 浓度的增大, 硫堇的荧光强度随之逐渐增加; 当 β -CD 的浓度达到 $3.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 硫堇的荧光强度不再有明显的增强。荧光增强的原因可能是 β -CD 的疏水空腔提供的非极性环境有利于对硫堇的包合作用, 从而增大了硫堇的荧光量子产率。

根据 Benesi-Hildebrand 改进方程^[9], 用荧光方法就 β -CD 包合硫堇的反应进行了计算。结果显示, 两者以 1:1 形成包合物, 包合常数为 $444 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

收稿日期: 2006-08-08, 修订日期: 2006-11-16

基金项目: 教育部科学研究重点项目(206096)和湖北省教育厅重大项目(Z200522002)资助

作者简介: 童晓青, 1979 年生, 湖北师范学院硕士研究生 * 通讯联系人 e-mail: jianquanlu@eyou.com

同样,用紫外-可见吸收光谱研究了 β -CD 存在下硫堇的光谱变化。从图 2 可以看出,硫堇在 599 nm 处有最大吸收峰,随着加入 β -CD 浓度的增加,硫堇的吸光度也逐渐增大,并且其最大吸收波长有红移现象出现,从而证实了 β -CD 对硫堇的包合。用 Benesi-Hildebrand 改进方程计算的包合比也为 1:1,包合常数为 $527 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

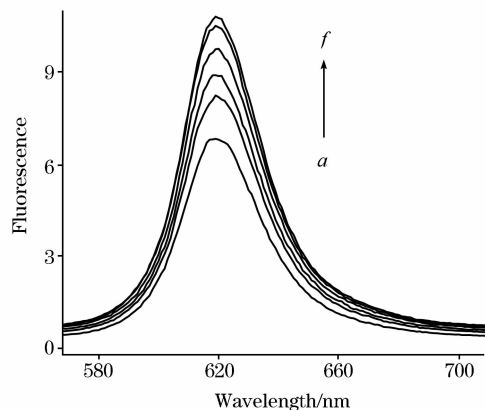


Fig. 1 Fluorescence spectra of thionine in the presence of β -CD

$c_{\text{TH}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\beta\text{CD}}$;
 $a \sim f$: $0, 4, 12, 24, 28 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

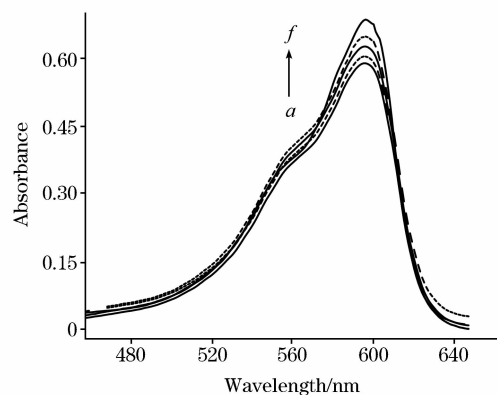


Fig. 2 Visible absorption spectra of thionine in the presence of β -CD

$c_{\text{TH}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\beta\text{CD}}$;
 $a \sim f$: $0, 4, 12, 24, 28, 32 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 荧光法研究 β -CD-TH 与 DNA 的相互作用

考查了在 pH 7.2 的 PBS 缓冲液中 DNA 对硫堇及 β -CD-硫堇包合物荧光的影响。图 3 中显示, DNA 的加入使两者的荧光强度降低,即 DNA 对硫堇及 β -CD-硫堇包合物都有荧光猝灭作用,证实 DNA 与硫堇及其 β -CD 包合物存在着相互作用。图 4 表明,随着 DNA 浓度的增大,包合物的荧光波长发生蓝移(从 622 nm 处蓝移至 616 nm),并且峰强逐渐降低。实验发现,尽管硫堇与 DNA 的相互作用也存在波长蓝移和峰强降低现象,但包合物与 DNA 作用后的波长蓝移和峰强降低更加显著。这些数据表明,硫堇所处环境的疏水性增强有利于它与 DNA 的相互作用,该结论与文献报道^[10]基本一

致。

采用 Stern-Volmer 方程^[11]计算了 DNA 对包合物和硫堇的荧光猝灭常数。DNA 对硫堇包合物和硫堇的猝灭常数分别为 $6.12 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $5.84 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

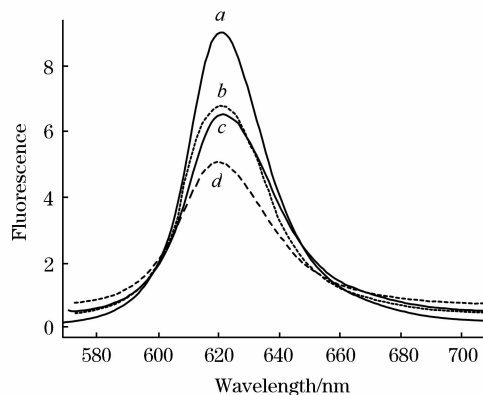


Fig. 3 Fluorescence spectra of β -CD-thionine inclusion complex in the presence of DNA

$c_{\text{TH}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{DNA}} = 1.02 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $c_{\beta\text{CD}} = 3.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 a : β -CD-TH; b : β -CD-TH-DNA; c : TH; d : TH-DNA

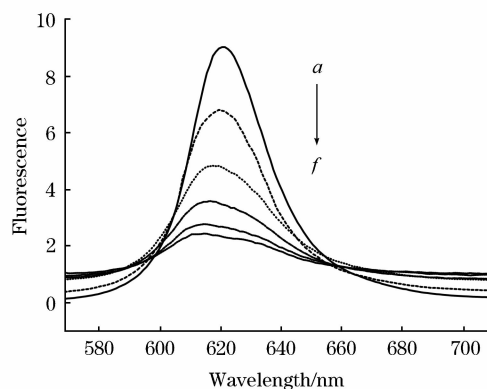


Fig. 4 Effect of concentration of DNA on fluorescence spectra of β -CD-thionine inclusion complex

$c_{\text{TH}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\beta\text{CD}} = 3.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{DNA} ;
 $a \sim f$: $0, 1.02, 2.04, 3.06, 4.08, 5.11 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

一般说来,物质的荧光猝灭主要有猝灭剂与荧光物质之间的碰撞引起的动态猝灭,基态复合物的形成而引起的静态猝灭,荧光物质的激发态与基态猝灭剂之间的电子转移及能量转移等机理^[12]。

实验中分别采用静态、动态等模式就 DNA 对硫堇和硫堇包合物猝灭机理进行了探讨。按静态模式处理,发现温度的变化对硫堇-DNA 和包合物-DNA 的猝灭曲线斜率没有明显的影响,因此该体系不可能为静态猝灭。按动态模式^[13]计算, DNA 对包合物及硫堇的猝灭速率常数分别为 $6.12 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $5.84 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远大于小分子与生物大分子之间的最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[14], 说明 DNA 对两者的猝灭也不是动态的。

同时, 由于没有新荧光峰的出现, 能量转移引起研究体系荧光猝灭的可能性很小。Gavin^[15] 等用飞秒荧光技术研究了硫堇与 DNA 的相互作用, 发现硫堇能嵌入到 DNA 的 G-C 富集区(硫堇激发态与碱基 G 间的距离很近, 约 0.34 nm), 提出了硫堇-DNA 间发生快速电子转移致使硫堇的荧光猝灭。本研究中的实验数据与 Gavin 的基本规律相同, 因此可以认为硫堇包合物以嵌插模式与 DNA 相互作用。

2.3 可见光度法研究 β -CD-TH 与 DNA 的相互作用

采用光度法研究了 β -CD-硫堇包合物与 DNA 的相互作用, 图 5 给出了 DNA 存在下 β -CD-硫堇包合物的可见光谱。实验表明 β -CD 在紫外可见区无吸收, 从图中可以看到, 硫堇在 599 nm 处有最大吸收峰; β -CD 包合硫堇后对硫堇的吸收波长无明显影响, 而是峰强有了明显的增大(见图 5); DNA 加入 β -CD-硫堇包合体系后, 包合物的最大吸收波长发生了明显的红移(从 599 nm 红移到 605 nm), 并且其吸光度有明显的降低(即存在减色效应)。同时, 随着 DNA 浓度的增大,

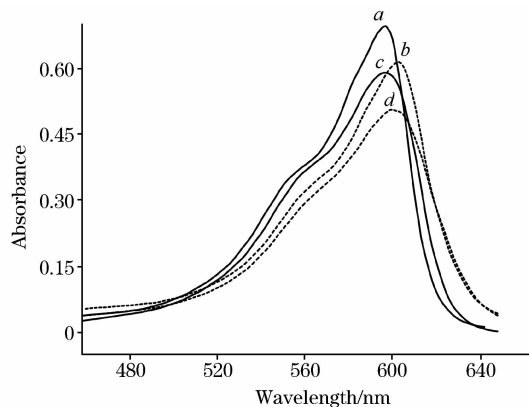


Fig. 5 Visible absorption spectra of β -CD-thionine inclusion complex in the presence of DNA

$c_{\text{TH}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\beta\text{CD}} = 3.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 $c_{\text{DNA}} = 3.23 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 a: β -CD-TH; b: β -CD-TH-DNA; c: TH; d: TH-DNA

硫堇包合物的吸光度也不断降低(见图 6)。该结论完全符合 Long 等提出的判据^[16], 据此认为包合物是以嵌插模式与 DNA 相互作用的。

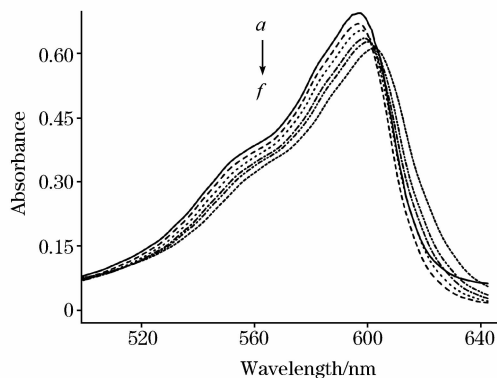


Fig. 6 Effect of concentration of DNA on visible absorption spectra of β -CD-thionine inclusion complex

$c_{\text{TH}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\beta\text{CD}} = 3.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{DNA} ;
 a~f: 0, 0.54, 1.08, 1.61, 2.15, $2.69 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

根据 DNA 对包合物的滴定电子吸收光谱, 采用文献公式^[17] 求算了硫堇包合物与 DNA 的表观形成常数。结果显示, 硫堇包合物与 DNA 以 1:1 结合, 表观结合常数为 $3.47 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

从以上可以看出, 化合物与 DNA 的相互作用是当前比较热门的课题, 这也可以从卡伟的工作^[18] 看出。

3 结 论

本文用可见和荧光光谱研究了 β -CD-硫堇包合物与 DNA 的作用。结果表明, β -CD-硫堇包合物通过嵌插模式与 DNA 发生相互作用, 结合比为 1:1, 结合常数为 $3.47 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

参 考 文 献

- [1] Oliveira-Brett A M, Diculescu V C. *Bioelectrochemistry*, 2004, 64: 143.
- [2] Zhang N, Zhang X L, Zhao Y F. *Talanta*, 2004, 62: 1041.
- [3] DU Jiang-yan, HUANG Xiao-hua, XU Fei, et al(杜江燕, 黄晓华, 徐 飞, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1435.
- [4] YE Xian-bao, LIU Ling-fang, QI Xiao-hua, et al(冶献保, 刘灵芳, 齐小花, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2003, 19(1): 51.
- [5] DU Jiang-yan, HUANG Xiao-hua, XU Fei, et al(杜江燕, 黄晓华, 徐 飞, 等). *Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报)*, 2003, 19(11): 1064.
- [6] Rickus J L, Chang P L, Tobin A J, et al. *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108: 9325.
- [7] Long X F, Tao X C, Wang Y Z, et al. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2004, 60(1-2): 455.
- [8] Xu Y, Yang L, Ye X Y, et al. *Electroanalysis*, 2006, 18(9): 873.
- [9] Benesi H A, Hildebrand J H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71: 2703.
- [10] Chou J, Qu X G, Lu T H, et al. *J. Microchem.*, 1995, 2: 159.
- [11] Pyle A M, Rehmann J P, Meshoyrer R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111(8): 3051.
- [12] Kumar C V, Asuncion E H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115(19): 8547.
- [13] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓). *Fluorescence Analysis(Second Edition)(荧光分析法, 第 2 版)*. Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.
- [14] Ware W R. *J. Phys. Chem.* 1962, 66: 455.
- [15] Gavin D R, Douglas J W, Mark A D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 6953.
- [16] Long E C, Barton J K. *Accounts of Chemical Research*, 1990, 23: 271.
- [17] CAO Ying, HE Xi-wen(曹 瑛, 何锡文). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 1998, 26(10): 1165.
- [18] BIAN Wei, WEI Yu-xia, WEI Yan-li, et al(卞 伟, 魏玉霞, 魏艳丽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(1): 125.

Fluorescence and Visible Spectroscopic Studies on Interaction of β -Cyclodextrin-Thionine Inclusion Complex with DNA

TONG Xiao-qing^{1, 2}, LÜ Jian-quan^{1*}, SUN Juan¹, GONG Zhong-hong¹

1. Hubei Key Laboratory of Bioanalytical Technology, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China

2. Department of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract The inclusion of β -cyclodextrin (CD) for thionine (TH) and the interaction of DNA with CD-TH inclusion complex were investigated by fluorescence and visible absorption spectrometry. TH with β -CD formed a 1 : 1 inclusion complex with the stability constant of $527 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (visible spectrometry)/ $444 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (fluorescence) in the pH 7.2 PBS buffer solutions. The addition of DNA makes the absorbance of the inclusion complex decrease and the absorption spectrum shift toward long wavelengths. The fluorescence experiments indicated that the presence of DNA makes the emission peak of CD-TH shift toward short wavelengths and the fluorescence of inclusion complex quench, and the quenching constant was calculated to be $6.12 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ by Stern-Volmer method. All the data confirmed that CD-TH reacted with DNA in intercalative mode, and the binding numbers and the binding constant were estimated to be 1 and $3.47 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ by spectrophotometry.

Keywords Interaction; Thionine; β -cyclodextrin; Inclusion complex; DNA

(Received Aug. 8, 2006; accepted Nov. 16, 2006)

* Corresponding author