

Triton X-100 敏化鱼精蛋白共振能量转移荧光猝灭法 测定尿中 8-羟基脱氧鸟苷

米贤文^{1,3}, 王永生^{1,2*}, 薛金花¹, 欧阳运富¹, 杨胜园¹, 王 英¹

1. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001
2. 南华大学化学化工学院, 湖南 衡阳 421001
3. 怀化医学高等专科学校, 湖南 怀化 418000

摘 要 研究了 8-羟基脱氧鸟苷与鱼精蛋白之间的共振能量转移的最佳条件, 建立了鱼精蛋白共振能量转移荧光猝灭法测定 8-羟基脱氧鸟苷的新方法。在 301 nm, pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 鱼精蛋白的荧光猝灭强度与 8-羟基脱氧鸟苷的浓度成正比, 工作曲线的线性范围为 $0.50 \sim 7.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r=0.9967$, 方法的检出限为 $0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{RSD}=6.2\%$, 平均加标回收率为 104% ($n=6$)。

关键词 8-羟基脱氧鸟苷; 鱼精蛋白; 荧光猝灭; 共振能量转移

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)08-1570-04

引 言

8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 被公认为是 DNA 氧化损伤的一种主要标志物^[1-4]。这种 DNA 氧化损伤产物被机体的特异性 DNA 修复酶剪切清除而经肾脏随尿排泄, 如果 DNA 氧化损伤产物 8-OHdG 不被机体有效清除, 会进而引起 DNA 复制过程的碱基配对错误而引起基因的点突变以致癌变。研究表明, 癌症患者尿中的 8-OHdG 含量明显高于正常人^[5]。因此, 测定尿中 8-OHdG 含量对评价、预警个体癌变危险或诊断与氧自由基相关的疾病方面是一种十分有用的标志物, 在临床上具有重要意义和推广价值。目前, 测定 8-OHdG 含量采用 HPLC-EC 法、HPCE 法和 GC/LC-MS 法等^[6-15]。利用共振能量转移荧光猝灭法测定 8-OHdG 尚未见文献报道。本文基于 8-OHdG 与鱼精蛋白硫酸盐 (Protamine sulfate, Ps) 之间的共振能量转移而导致 Ps 荧光猝灭作用的原理, 建立了 Triton X-100 敏化 Ps 共振能量转移荧光猝灭法测定 8-OHdG 的新方法, 该法具有快速简便、费用低廉、适于大批量分析的优点, 已成功应用于加标尿样的分析, 结果满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Hitachi F-4500 荧光分光光度计 (日本日立公司), UV8500 紫外-可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司), PB-20 标准酸度计 (德国赛多利斯有限公司), AB204-S 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), Dionex P680 高效液相色谱仪。

8-OHdG (Sigma) 标准使用液: $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Ps (上海第一生化药业有限公司): $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液; $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液; $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液; 1.0% PVA; 1.0% Tween; 1.0% Triton X-100; 以上缓冲液均用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 或 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 在酸度计上调到所用的 pH 值。实验用水为二次蒸馏水, 所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

移取 $0.75 \text{ mL } 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ps 于 5.00 mL 比色管中, 加 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 0.50 mL 、不同体积 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-OHdG, $0.2 \text{ mL } 1.0\%$ Triton X-100, 加 Tris-HCl 缓冲液至刻度, 摇匀。将溶液置于 F-4500 荧光分光光度计上, $\lambda_{\text{ex}}=273 \text{ nm}$, 进行 em 扫描, 得到 Ps 荧光发射光谱。按实验方法配制反应管, 在 301 nm 处定点测量溶液的荧光强度记为 F ; 同时测量试剂空白的荧光强度, 记为 F_0 ; $\Delta F = F_0 - F$ 。激发和发射的狭缝宽度均为 5.0 nm , 光电倍增管负电压为 400 V 。同时做 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 的同步荧光扫描, 并用紫外可见分光光度计扫描其吸收光谱。

收稿日期: 2006-06-27, 修订日期: 2006-10-09

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (03JJY3030) 资助

作者简介: 米贤文, 1967 年生, 南华大学公共卫生学院硕士

* 通讯联系人 e-mail: yongsheng.w@tom.com

2 结果与讨论

2.1 8-OHdG~Ps 体系的荧光光谱

图 1 为不同浓度的 8-OHdG~Ps 体系的荧光光谱。由图可见,最大发射波长在 301 nm。Ps 由组蛋白-中间蛋白(T)转变而来^[16], T 有两种结构变体 T₁ 和 T₂, 它们又分别由两个结构域——氨基末端结构域(氨基酸残基 1~21)和羧基末端结构域(氨基酸残基 22~77 或 78)组成, 羧基末端结构域含有 5 个酪氨酸残基; T₁ 羧基末端序列相应于 Ps1, T₂ 羧基末端序列相应于 Ps2。Ps 的 5 个酪氨酸残基全部暴露在其外部, Ps 荧光即由这 5 个酪氨酸残基产生。从图 1 可以看出, 随着 8-OHdG 浓度的增加, Ps 的荧光强度有规律的下降, 并且其最大发射波长红移了 4.4 nm, 这说明在 8-OH-dG 和 Ps 之间有非辐射能量转移过程, 并且 Ps 的构象发生了改变, Ps 的氨基酸残基所处环境的极性增加^[17]。当 8-OHdG 阴离子与 Ps 阳离子结合后发生能量转移, 引起 Ps 的酪氨酸残基的内源荧光猝灭。

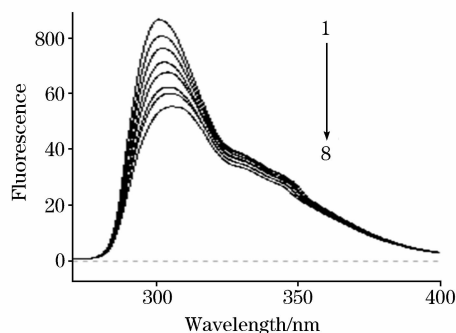


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of Ps in the presence of 8-OHdG at different concentration

$c_{Ps} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{8\text{-OHdG}} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 1: 0.0; 2: 1.25×10^{-6} ; 3: 2.50×10^{-6} ; 4: 3.75×10^{-6} ; 5: 5.00×10^{-6} ; 6: 6.25×10^{-6} ; 7: 7.50×10^{-6} ; 8: 8.75×10^{-6}

2.2 Ps 与 8-OHdG 之间的共振能量转移

根据 Förster 能量理论, 分子间发生能量转移的必要条件是给体(Doner, D)的发射光谱与受体(Acceptor, A)的吸收光谱要有足够的重叠。由图 2 可见, 在 Triton X-100 存在下, Ps 的最大荧光发射波长在 301 nm, 8-OHdG 的吸收峰波长为 293 nm, 两者相差 8 nm, 这样就为 Ps 作为能量给体, 8-OH-dG 作为能量受体的共振能量转移提供了前提条件。根据 Förster 非辐射能量转移理论, 可以求出结合位置与蛋白质分子中产生荧光基团之间的距离, 其转移效率与给体-受体间距离(r)、临界能量转移距离(R_0)有关, 且给体与受体间能量转移效率 E 为^[18]:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (2)$$

式中 R_0 为 $E=50\%$ 能量转移时供体-受体的临界距离, 其中 K^2 为偶极空间取向因子, n 为介质的折射指数, Φ 为荧光供体的荧光量子产率, J 为供体的荧光发射光谱与受体的吸

收光谱间的光谱重叠积分, 可表达为:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \cdot \epsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \cdot \Delta\lambda} \quad (3)$$

通过计算我们得出 J 值为 $J = 7.57 \times 10^{-15} (\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$, $R_0 = 2.87 \text{ nm}$, D 与 A 之间的距离 $r = 3.47 \text{ nm}$ 。在 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液中, 8-OHdG 以阴离子状态存在; 而 Ps 带正电荷, 在静电引力的作用下, 可以形成偶极-偶极复合物, Ps 酪氨酸残基发射的荧光的能量与 8-OHdG 分子的基态和第一激发态的能级差相当, Ps 荧光发射光谱与 8-OHdG 的吸收光谱重叠, Ps 的荧光强度下降。综上所述, 我们认为 8-OHdG 对 Ps 发生偶极-偶极耦合作用的共振能量转移而导致荧光猝灭。

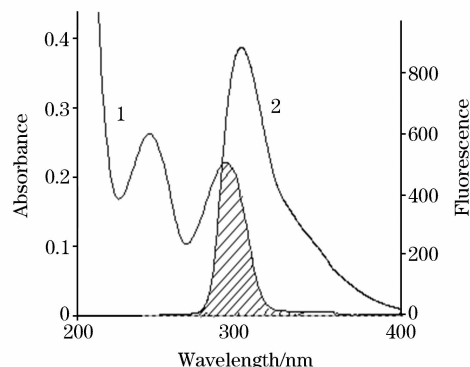


Fig. 2 Overlap of the fluorescence spectrum of Ps and the absorption spectrum of 8-OHdG

1: Absorption spectrum of 8-OHdG;
2: Fluorescence spectrum of Ps

2.3 表面活性剂对体系共振能量转移的影响

给体与受体分子间发生能量转移的条件除了给体的发射光谱与受体的吸收光谱间有足够的重叠外, 还须两分子间的距离足够接近(一般为 2~5 nm)。本文探讨了十二烷基磺酸钠(SLS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、溴代十六烷基吡啶(CPB)、氯代十六烷基吡啶(CPC)、溴代十六烷基三甲基铵(CTMAB)、聚乙烯醇(PVA)、Tween-20、Triton X-100 等对体系能量转移的影响。其中, 阴离子表面活性剂 SLS, SDBS 与 Ps 作用导致 Ps 荧光猝灭; 阳离子表面活性剂 CPB, CPC, CTMAB 对共振能量转移增敏不明显; 而非离子表面活性剂中以 Triton X-100 对敏化 8-OHdG~Ps 体系的共振能量转移效果最好(见图 3)。从图 3 可见, Triton X-100 可使 8-OHdG~Ps 体系的荧光猝灭强度增加一倍。在 Triton X-100 用量达到 0.45‰ 的浓度(CMC 为 0.2‰)时, 其酪氨酸荧光最大发射波长红移了 4 nm(见图 1), 提示加入 Triton X-100 后, Ps 的酪氨酸的溶剂环境疏水性减弱^[18], 引起分子构象的改变, 从而拉近 Ps 的酪氨酸残基与 8-OHdG 分子间的距离。

2.4 Ps 浓度对体系能量转移的影响

取不同浓度的 Ps 测定其荧光强度, 实验表明, Ps 的荧光强度与浓度并不成线性关系, Ps 浓度大于 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 它有较强的荧光自熄灭现象, 大量无荧光指示功能的荧光物质分子与 8-OHdG 结合降低反应体系的灵敏度; 当选择 Ps 浓度小于 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 虽然反应的灵

敏度较高,但反应的线性范围太窄。综合两方面考虑,本实验选择反应体系中的 Ps 浓度为 $7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

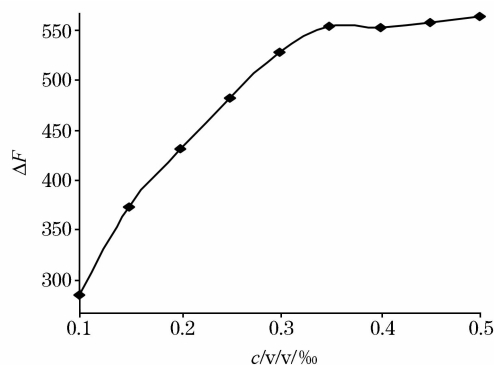


Fig. 3 The effect of Triton X-100 on the resonance energy transfer of 8-OHdG~Ps system

$c_{\text{Ps}} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{8\text{-OHdG}} = 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.5 pH 值对体系共振能量转移的影响

Ps 分子中富含碱性氨基酸,这些碱性氨基酸基团中含有易接受质子的氨基、胍基,Ps 等电点 $pI = 10.0 \sim 12.0$ 。在 $pH < 12.0$ 时,Ps 成为聚阳离子肽蛋白质。Ps 酪氨酸残基上的酚羟基的 pK_a 为 10.07,当环境的 $pH > 10.0$ 时,酪氨酸以解离状态为主,解离后的酪氨酸残基荧光消失。既要让 Ps 带正电荷,又要保持 Ps 的荧光特性,则 Ps 必须在 $pH < 10.0$ 的缓冲液中。8-OHdG 在 $pH > 6.5$ 的环境中带负电荷。因此,要保证 Ps 的聚阳离子状态和荧光特性,以及 8-OHdG 的阴离子状态,溶液的 pH 值应该在 6.5~10.0 之间。通过比较 pH 7.6~8.8 的 Tris-HCl, RB, HBO_3 和磷酸盐缓冲体系的荧光猝灭曲线,发现在 pH 8.0~8.6 Tris-HCl 缓冲液中 ΔF 值最大,能量转移效率最佳。故本实验选择 pH 8.2 的酸度。

2.6 温度对体系共振能量转移的影响

按实验方法测定不同温度下体系的荧光猝灭强度 ΔF ,结果见图 4。由图可见,从 10~25 °C,荧光猝灭的强度随

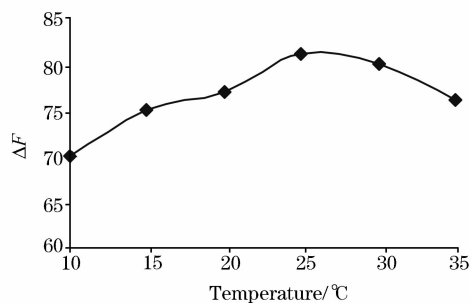


Fig. 4 Effect of temperature on the resonance energy transfer of 8-OHdG~Ps system

$c_{\text{Ps}} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{8\text{-OHdG}} = 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

温度上升而上升;在 25~30 °C 之间 8-OHdG~Ps 体系的荧光猝灭作用最强。在 30 °C 后,荧光猝灭强度随温度上升而明显下降。

2.7 试剂加入顺序对体系共振能量转移的影响

按实验方法,设计了 4 种加入顺序:(1) Ps + Tris-HCl + 8-OHdG + Triton X-100; (2) Ps + Tris-HCl + Triton X-100 + 8-OHdG; (3) Ps + Triton X-100 + 8-OHdG + Tris-HCl; (4) Ps + Triton X-100 + Tris-HCl + 8-OHdG。实验表明,以第一种加入顺序为优。本文选用 Ps, Tris-HCl, 8-OHdG, Triton X-100 的加入顺序。

2.8 线性范围、精密度和检出限

当 Ps 浓度为 $7.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,按实验方法测定 8-OHdG 的线性范围为 $0.16 \sim 7.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;线性回归方程为 $\Delta F = 8.7 + 70c (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$; $r = 0.9967$ 。配制浓度 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-OHdG 的标准溶液进行方法的精密度实验, $\text{RSD} = 6.2\%$ 。11 次空白样品的平行实验,按 $c_L = 3S/b$ (S 表示空白溶液的荧光强度标准差, b 表示直线回归方程的斜率)公式计算检出限为 $0.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.9 共存离子的影响

在最佳实验条件下,对 $2.83 \mu\text{g}/5.0 \text{ mL}$ 的 8-OHdG 的荧光猝灭值进行了测定,当相对误差不大于 $\pm 5\%$ 时,下列离子(物质)相对 8-OHdG 的允许量(mg):葡萄糖 0.6 mg、鸟嘌呤 0.3 mg、甲醇 1.0 mg、乙腈 1.1 mg、草酸 4.0 mg、甲酸 0.28 mg、HSA 1.6 mg、DNA 0.36 mg、尿素 0.65 mg、柠檬酸 1.7 mg、 Na^+ 6.5 mg、 K^+ 7.5 mg、 Ca^{2+} 2.0 mg、 F^- 2.0 mg、 Cl^- 2.0 mg、 I^- 2.0 mg。

3 样品分析

为了排除尿中其他成分对检测的干扰,用 C_{18} 柱对尿样进行固相萃取。用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 调节尿样 pH 为 4.0~5.0, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。常温解冻, $1000 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。柱子用 10 mL 甲醇活化后用 10 mL 二次蒸馏水洗柱,尿样过柱后,用 5.0 mL 水淋洗,然后用 30% 甲醇水 3.0 mL 洗脱,收集洗脱液 $39 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴除去溶剂,定容至 3.0 mL。用荧光猝灭法测定 8-OHdG 的含量,用高效液相色谱法作对照。结果见表 1。经统计学处理分析, $t < t_{0.05(10)} = 2.228$,两方法间无显著性差异。

Table 1 Determination result of spiked urine sample ($n=6$)

Added $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Found $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery	HPLC $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$S_{x_1 - x_2}$	t
0.70	0.73	104	0.69	0.039	1.02
2.83	2.93	103	2.84	0.090	1.01

参 考 文 献

- [1] Au W W, Oberheitmann B, Harms C. *Mutat. Res.*, 2002, 509(1-2): 153.
- [2] Shigana MK, Ames BN. *Free Radic. Bio. Med.*, 1991, 10: 211.
- [3] Wu L L, Chiou C C, Chang P Y, et al. *Clin. Chim. Acta*, 2004, 339(6): 1.
- [4] Lodovici M, Casalini C, Cariaggi R, et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28(1): 13.
- [5] Chiou CC, Chang P Y, Chan E C, et al. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 334: 87.
- [6] Helbock H J, Beckman K B, Shigenaga M K, et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 288.
- [7] MEI Su-rong, CAI Ling-shuang, YAO Qing-hong(梅素容, 蔡凌霄, 姚庆红). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2003, 24(11): 1987.
- [8] Zeisig M, Hofer T, Cadet J. *Carcinogenesis*, 1999, 20(7): 1241.
- [9] Hua Y S, Wainhaus S B, Yang Y N, et al. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2000, 12: 80.
- [10] Samcova E, Marhol P, Opekar F, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 516: 107.
- [11] Svoboda P, Kasai H. *Anal. Biochem.*, 2004, 334: 239.
- [12] Xu G W, Yao Q H, Weng Q F, et al. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 2004, 36: 101.
- [13] XI Zhu-ge, CHAO Fu-huan, SUN Yong-mei, et al(袭著革, 晁福寰, 孙咏梅). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2001, 29(7): 765.
- [14] MEI Su-rong, XU Guo-wang, WU Cai-ying(梅素容, 许国旺, 吴采樱). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2001, 29(12): 1394.
- [15] Kvasnicova V, Samcova E, Jursova A, et al. *J. Chromatogr., A*, 2003, 985: 513.
- [16] Wouters-Tyrou D, Chartier-Harlin M C, Martin-Ponthieu A, et al. *J Biol. Chem.*, 1991, 266(26): 17388.
- [17] WEI Xiao-fang, DING Xi-ming, LIU Hui-zhou(魏晓芳, 丁西明, 刘会州). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(8): 556.
- [18] XU Tong-kuan, LI Na, SHEN Xing-hai, et al(徐同宽, 李娜, 沈兴海). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(9): 1143.

Determination of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Urine with Protamine Using Resonance Energy Transfer Fluorescence Quenching by Sensitizing Effect of Triton X-100

MI Xian-wen^{1,3}, WANG Yong-sheng^{1,2*}, XUE Jin-hua¹, OUYANG Yun-fu¹, YANG Sheng-yuan¹, WANG Ying¹

1. College of Public Health, Nanhua University, Hengyang 421001, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Nanhua University, Hengyang 421001, China

3. Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China

Abstract The optimum conditions for the resonance energy transfer between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) and protamine were studied, and a novel method for the determination of 8-OHdG has been developed based on the resonance energy transfer fluorescence quenching effect of protamine. The fluorescence quenching intensity of Ps at 301 nm was proportional to the concentration of 8-OHdG. The linear range of the calibration curve was 0.50-7.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the pH 8.2 Tris-HCl buffer solution with the detection limits of 0.18 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The relative standard deviation was 6.2% and the average recovery was 104% ($n=6$). The proposed method is simple and sensitive, and has succeeded in analyzing the spiked urine sample with satisfactory results.

Keywords 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine; Protamine; Fluorescence quenching; Resonance energy transfer

(Received Jun. 27, 2006; accepted Oct. 9, 2006)

* Corresponding author