

荷叶中紫云英苷和 DNA 相互作用的光谱学研究

邓胜国, 邓泽元*, 范亚苇, 单 斌, 熊冬梅

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学高等研究院, 江西 南昌 330047

摘 要 在 pH 7.4 的 Tris-HCl 的缓冲溶液中, 采用紫外及荧光光谱法研究了荷叶中紫云英苷 (AST) 与 DNA 之间的相互作用, 探讨了离子强度和阴离子猝灭剂 KI 对紫云英苷及紫云英苷-DNA 体系荧光强度的影响, 同时考察了紫云英苷和中性红与 DNA 结合的竞争性。结果表明 DNA 通过静态猝灭作用机制猝灭紫云英苷的荧光, 并测得其在 298 及 308 K 时的猝灭速率常数 (K_q) 分别为 3.120×10^{12} 和 $2.630 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 结合常数 (K_d) 分别为 3.412×10^4 和 $1.762 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数 (n) 分别为 1.007 和 0.962; DNA 的存在使紫云英苷的紫外吸收光谱发生减色效应且吸收波长产生红移; 发现离子强度的改变对紫云英苷及紫云英苷-DNA 体系的荧光强度影响不大; KI 对结合形式存在的紫云英苷的荧光猝灭效率明显小于自由形式存在的紫云英苷的荧光猝灭效率; 紫云英苷可插入 DNA 中置换出与 DNA 结合的中性红。这些结果说明荷叶中紫云英苷以嵌插模式与 DNA 进行结合。

关键词 相互作用; 紫云英苷; DNA; 荧光光谱; 嵌插

中图分类号: TQ464.3, Q523 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0476-05

引 言

脱氧核糖核酸(DNA)是遗传信息的承担者, 具有储存和传递信息的功能, 药物分子与 DNA 的相互作用, 会影响到 DNA 的生理功能和物理化学性质, 改变 DNA 的转录和复制^[1], 因此研究药物小分子与 DNA 的作用机理, 有助于人们对药物与 DNA 相互作用方式及药代动力学的认识, 同时也为以 DNA 为靶标的药物分子设计提供有价值的信息^[2, 3]。荷叶主要的活性成分是黄酮类化合物, 具有解暑清热、生发清阳、散瘀止血等功效, 已成为研究、利用的热点^[4-6]。有关黄酮类化合物与 DNA 的作用已有研究^[7], 但是目前国内尚无研究紫云英苷(从荷叶中分离纯化得到的一种黄酮苷类化合物)与 DNA 相互作用的文献报道。本实验采用紫外及荧光光谱法研究紫云英苷与 DNA 的相互作用, 探讨它们之间的结合方式, 并根据实验处理相关的光谱数据, 求得 DNA 对紫云英苷的猝灭速率常数 K_q 、结合常数 K_d 及结合位点数 n , 力求从分子水平探讨紫云英苷与 DNA 相互作用的机制。以期为进一步探讨和研究具有生物活性的黄酮类药效小分子的药用机理及新型药物的设计提供一定的理论参考和依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器及试剂

F-2500 型荧光光度计(日本日立公司); UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); pH S-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂); DK-98-II 型恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); Finn pipette 可调式移液枪(美国芬兰雷勃公司)。

小牛胸腺 DNA(ct-DNA, DNA, 北京华美生物工程有限公司产品), 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的贮备液, 纯度用 UV 光谱检测 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$) 合格, 浓度用 260 nm 处的摩尔消光值 ($\epsilon_{260} = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 来确定, 溶液保存于 277 K 的冰箱中备用; 紫云英苷 (AST, 本实验室从荷叶中分离纯化获得, 含量大于 95%) 用甲醇溶解供试; pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液; $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的中性红 (NR); $4.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液; $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KI 溶液, 其他所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

(1) DNA 与紫云英苷作用的荧光光谱及其紫外吸收光谱的测定

收稿日期: 2009-01-29, 修订日期: 2009-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20562008)以及教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540)资助

作者简介: 邓胜国, 1970 年生, 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室博士研究生 e-mail: dengsg-009@163.com

* 通讯联系人 e-mail: dengzy28@yahoo.com.cn

在 10 mL 的平底小容量瓶中, 分别加入 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3 mL, 0.05 mol · L⁻¹ 的 NaCl 溶液 3 mL, 固定量的 AST 及不同量的 DNA, 定容摇匀后在一定温度下恒温。准确移取 3.0 mL 该溶液于石英荧光池中, 在激发波长为 226 nm (荧光激发和发射狭缝均为 5 nm, 测量电压 400 V) 下, 测定并记录 AST 的荧光光谱及 DNA 对 AST 的荧光猝灭光谱, 同时测定其相应的紫外光谱。

(2) 离子强度、阴离子猝灭剂 KI 与紫云英苷-DNA 体系作用的荧光光谱的测定

在 5 mL 的比色管中加入 1.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 固定 AST 及 DNA 的量, 同时加入不同量的 NaCl 或 KI, 定容摇匀后放置 10 min。准确移取该溶液 3.0 mL 于比色皿中, 分别进行荧光光谱的测定。

(3) 紫云英苷与 NR-DNA 作用的同步荧光光谱的测定

于 15 mL 比色管中加入 4.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 固定 NR 及 DNA 的量, 加入不同量的 AST, 定容摇匀后放置 10 min。准确移取该溶液 3.0 mL 于比色皿中, 进行同步荧光光谱的测定。

2 结果与讨论

2.1 DNA 对紫云英苷荧光光谱猝灭机制的探讨及结合常数的测定

紫云英苷本身具有一定的荧光, 其最大激发波长及发射波长分别为 226 和 338 nm。由图 1 可知, 随着 DNA 浓度的增加, 紫云英苷的荧光强度显著降低, 表明紫云英苷所处环境的疏水性增强有利于其与 DNA 分子发生相互作用, 而其最大荧光发射波长略有蓝移(从 338 nm 蓝移至 336 nm), 则进一步说明紫云英苷可能与 DNA 分子以嵌插模式相互作用, 且作用较强, 这与相关文献报道基本一致^[8, 9]。一般来讲, 荧光猝灭可分为静态猝灭和动态猝灭 2 大类^[10], 为了确定 DNA 对紫云英苷荧光猝灭的类型, 先假设他们之间相互作用的类型为动态猝灭, 根据 Stern-Volmer 方程^[11]

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

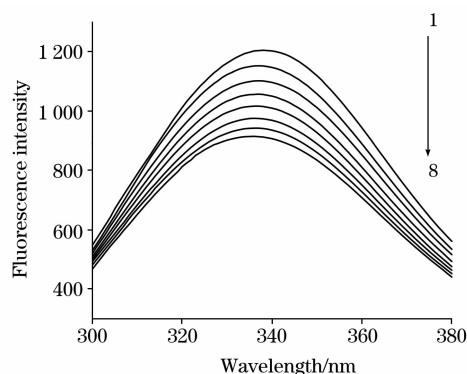


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of AST in the presence of DNA at different concentration

$c_{DNA} = 0.000, 0.147, 0.292, 0.440, 0.586, 0.733, 0.879$ and $1.026 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for curves 1-8, and $c_{AST} = 0.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

由图 2 可得到线性方程 $Y = 3.120 \times 10^4 X + 1.002$, $R = 0.9995$ ($T = 298 \text{ K}$) 及 $Y = 2.630 \times 10^4 X + 1.001$, $R = 0.9988$ ($T = 308 \text{ K}$)。结果发现不同温度下的 Stern-Volmer 图均呈现良好的线性关系 ($T = 298 \text{ K}$, $R = 0.9995$; $T = 308 \text{ K}$, $R = 0.9988$)。这表示 DNA 对紫云英苷的猝灭形式只能是静态猝灭或是动态猝灭^[12]; 它们的动态猝灭常数 ($T = 298 \text{ K}$, $K_{SV} = 3.120 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $T = 308 \text{ K}$, $K_{SV} = 2.630 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 与温度呈负相关, 表明 DNA 对紫云英苷的猝灭方式可能主要是静态猝灭过程而不是动态猝灭; 而相应的双分子猝灭过程速率常数 ($T = 298 \text{ K}$, $K_q = 3.120 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $T = 308 \text{ K}$, $K_q = 2.630 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 均大于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散碰撞猝灭速率常数 ($K_q = 2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 2 个数量级^[13, 14], 这进一步证明 DNA 对紫云英苷的猝灭属于静态猝灭。

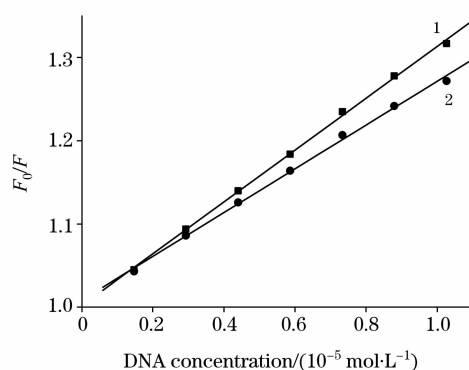


Fig. 2 Stern-Volmer curves for the binding of AST to DNA at 298 and 308 K

$c_{AST} = 0.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda = 226 \text{ nm}$; 1: 298 K; 2: 308 K

由静态猝灭而导致荧光体荧光强度减弱的过程, 其荧光强度 F 、猝灭剂浓度 $[Q]$ 、结合常数 K_d 及结合数 n 之间的关系式可表示如下^[15, 16]

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_d + n \lg [Q] \quad (2)$$

由图 3 可得到不同温度下 DNA 与紫云英苷的结合常数及结合位点数。结果表明结合位点数近似等于 1 ($T = 298 \text{ K}$, $n = 1.007$; $T = 308 \text{ K}$, $n = 0.962$) 表明每一个 DNA 分子可与 1 个紫云英苷分子结合形成复合物, 同时结合常数 ($T = 298 \text{ K}$, $K_d = 3.412 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $T = 308 \text{ K}$, $K_d = 1.762 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 随着温度的增加而减少, 这种变化趋势和上面实验计算得出的动态猝灭常数 (K_{SV}) 及相应的双分子猝灭过程速率常数 (K_q) 的变化趋势一致, 这表明紫云英苷分子与 DNA 相互作用可能形成了不稳定的复合物, 并且当温度升高时这种复合物会部分分解而导致结合常数下降。

2.2 DNA 对紫云英苷的紫外吸收光谱的影响

由图 4 可知, 紫云英苷在紫外区存在两个主要特征吸收峰 ($\lambda_1 = 266 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 352 \text{ nm}$)。随着 DNA 的逐渐加入, 紫云英苷中峰带 I (300~390 nm) 和峰带 II (230~280 nm) 的吸收值都变弱, 发生减色效应, 且峰带 I 较峰带 II 的减色幅度更明显, 同时其在 $\lambda_1 = 266 \text{ nm}$ 处的吸收峰发生约 2~3 nm 的红移。由此推测可能是紫云英苷的 π^* 共轭体系与 DNA 碱

基的大 π 共轭体系之间发生了相互作用, 产生 π 电子堆积, 使 π 电子跃迁概率减少, 从而导致紫云英苷的紫外吸收光谱受到了屏蔽而改变或降低。该结论与 Long 等提出的理论依据相吻合^[17], 表明紫云英苷分子可以嵌插方式插入到 DNA 的双螺旋碱基对间并与其发生相互作用。

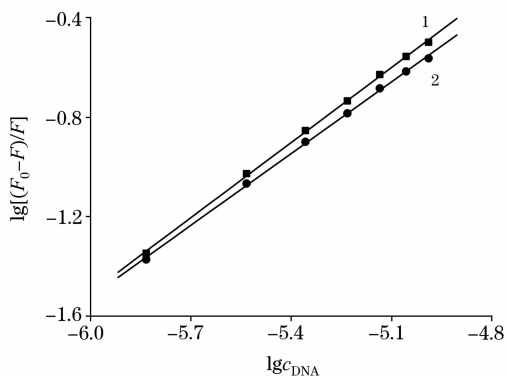


Fig. 3 Double logarithmic regression curves of AST fluorescence quenching caused by DNA at 298 and 308 K

$c_{AST} = 0.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\lambda = 226 \text{ nm}$; 1: 298 K; 2: 308 K

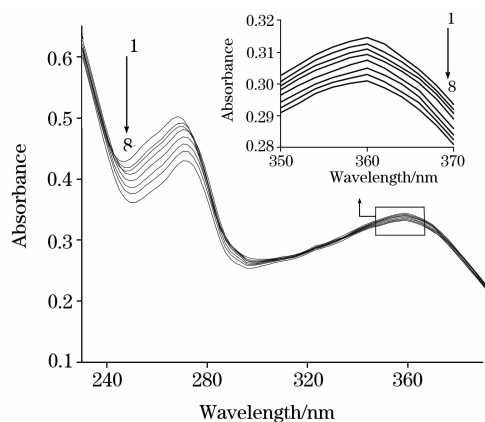


Fig. 4 UV absorption spectra of AST in the presence of DNA at different concentration

$c_{DNA} = 0.000, 0.293, 0.586, 0.879, 1.172, 1.465, 1.758$ and $2.051 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for curves 1-8, and $c_{AST} = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 离子强度及阴离子猝灭剂 KI 对紫云英苷及紫云英苷-DNA 体系荧光光谱的影响研究

由图 5 可知, 随着离子强度(Na^+)的增加, 紫云英苷及紫云英苷-DNA 两体系的荧光强度均无明显的变化, 这说明紫云英苷不与 DNA 的磷酸基发生作用, 即紫云英苷与 DNA 的相互作用不是静电作用模式。

由图 6 可知紫云英苷及紫云英苷-DNA 两体系的荧光强度随 KI 的增加而显著降低, 且没有 DNA 存在时比有 DNA 存在时下降更明显, 经计算得到 KI 对紫云英苷及紫云英苷-DNA 两体系的动态猝灭常数分别为 3.65×10^4 和 $1.88 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。这表明紫云英苷可以嵌入 DNA 双链中, 受到磷

酸基团的保护而使其荧光猝灭变慢。

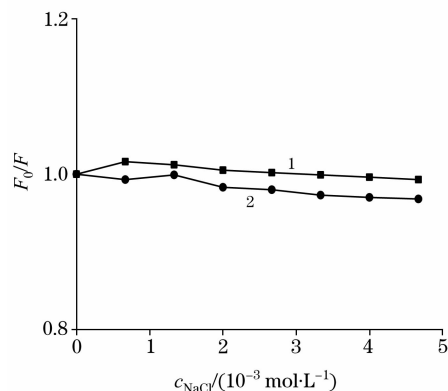


Fig. 5 Influence of NaCl concentration on the fluorescence intensity

1: In the absence of DNA; 2: In the presence of $1.172 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA, $c_{AST} = 0.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

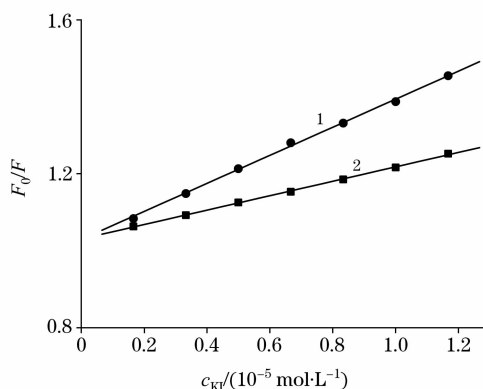


Fig. 6 Influence of KI concentration on the fluorescence intensity

1: In the absence of DNA; 2: In the presence of $0.032 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA, $c_{AST} = 0.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 紫云英苷对 NR-DNA 的同步荧光光谱的影响研究

NR 可作为研究药物小分子与 DNA 相互作用的荧光探针, 并且相关文献^[18, 19]已证明其与 DNA 是以嵌插结合方式发轫作用。由图 7 可知, 纯中性红(NR)的荧光强度较弱, 随着 DNA 的不断加入, NR 在其同步荧光发射特征峰 535 nm 处的荧光强度显著增强且其最大发射波长有一定程度的红移(约为 8 nm), 表明 NR 已嵌插到 DNA 碱基内, 导致其复合物的荧光强度不断增强。从图 8 中可发现, 在 NR-DNA 复合物中加入紫云英苷后, NR-DNA 复合物在 543 nm 处的同步荧光峰强度明显降低, 且最大发射波长有一定程度的蓝移(约 3 nm)。这表明紫云英苷与 NR 发生了竞争作用, 使得与 DNA 结合的 NR 分子部分地被置换出来, 导致 NR-DNA 体系的荧光猝灭及发射峰强度降低, 由此可进一步推断紫云英苷与 DNA 是以嵌插方式发生结合的。

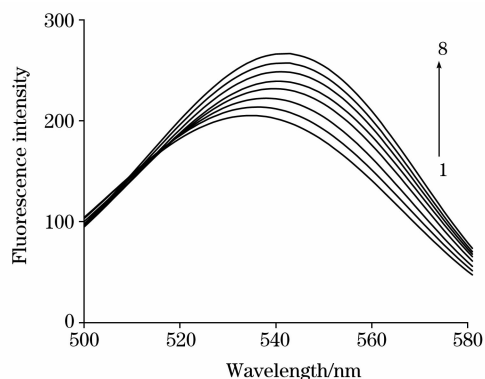


Fig. 7 Synchronous fluorescence quenching spectra of NR with the addition of DNA

$c_{\text{DNA}} = 0.000, 0.293, 0.852, 0.879, 1.172, 1.465, 1.758$
and $2.051 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for curves 1-8,
and $c_{\text{NR}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

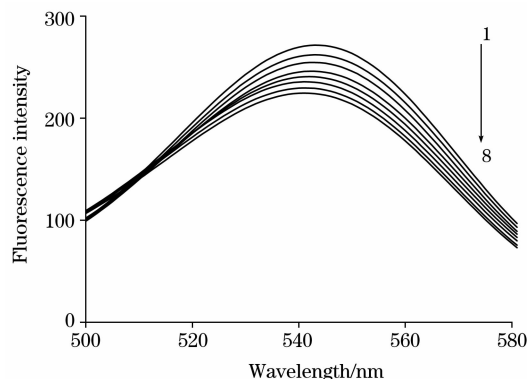


Fig. 8 Synchronous fluorescence quenching spectra of the competition between AST of NR

$c_{\text{AST}} = 0.000, 0.134, 0.268, 0.402, 0.536, 0.670, 0.804, 0.938$
and $1.072 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for curves 1-8, $c_{\text{NR}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
and $c_{\text{DNA}} = 2.051 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

3 结 论

实验结果表明, 在 pH 7.4 的生理条件下, DNA 通过静态猝灭机制对紫云英苷产生强烈的荧光猝灭, 298 K 时测得

其结合常数为 $K_d = 3.412 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数为 1.007, DNA 的引入导致紫云英苷的紫外吸收光谱产生减色效应且吸收波长产生红移, 紫云英苷分子通过嵌插模式与 DNA 产生相互作用。

参 考 文 献

- [1] Lindahl T, Wood R D. Science, 1999, 286: 1897.
- [2] Geoffrey W C, Alex R D, Lawrence M H, et al. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120: 3641.
- [3] ZHANG Rong-ying, PANG Dai-wen, CAI Ru-xiu(张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀). Chemical Journal of Chinese Universities(高等化学学报), 1999, 20(8): 1210.
- [4] JI Li-lian(纪丽莲). Food Science(食品科学), 1999, 20(8): 64.
- [5] DU Li-jun, SUN Hong, LI Min, et al(杜力军, 孙虹, 李敏, 等). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药), 2000, 31(7): 526.
- [6] Wu M J, Wang L, Weng C Y, et al. Am. J. Chinese Medicine, 2003, 31: 687.
- [7] Sun Y T, Bi Sh Y, Song D Q, et al. Sensor. Actuat. B, 2008, 129: 799.
- [8] TONG Xiao-qing, LÜ Jian-quan, SUN Juan, et al(童晓青, 吕鉴泉, 孙娟, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(12): 2538.
- [9] Chou J, Qu X G, Lu T H, et al. Microchem. J., 1995, 52(2): 159.
- [10] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 119.
- [11] Eftink M R, Ghiron C A. Anal. Biochem., 1981, 114: 199.
- [12] Wang Y Q, Zhang H M, Zhang G Ch, et al. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(1-2): 243.
- [13] Gerbanowski A, Malabat C, Rabiller C, et al. J. Agric. Food Chem., 1999, 47: 5218.
- [14] Kandagal P B, Seetharamappa J, Shaikh S M T, et al. J. Photochem. Photobiol. A, 2007, 185: 239.
- [15] Feng X Z, Lin Zh, Yang L J, et al. Talanta, 1998, 47: 1223.
- [16] Kandagal P B, Ashoka S, Seetharamappa J, et al. J. Pharmaceutical and Biomedical Anal., 2006, 41: 393.
- [17] Long E C, Barton J K. Accounts of Chem. Res., 1990, 23: 271.
- [18] Ni Y N, Lin D Q, Kokot S. Talanta, 2005, 65: 1295.
- [19] Ni Y N, Du S, Kokot S. Anal. Chim. Acta, 2007, 584: 19.

Spectroscopic Investigation on the Interaction between Astragalin from Lotus Leaf and DNA

DENG Sheng-guo, DENG Ze-yuan*, FAN Ya-wei, SHAN Bin, XIONG Dong-mei

State Key Lab of Food Science and Technology, Institute for Advanced Study, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract The interaction between astragalin (AST) from lotus leaf and deoxyribonucleic acid (DNA) in Tris-HCl buffer (pH=7.4) was investigated by the application of fluorescence spectroscopy and ultraviolet absorption spectroscopy, the effects of ionic strength and anion quencher KI on the fluorescence intensity of AST from lotus leaf and the system of AST-DNA were explored, and the competitive binding to DNA between AST from lotus leaf and Neutral Red(NR)dye was also studied. The results demonstrated that AST could bind to DNA and the formed complex quenched the intrinsic fluorescence of AST from lotus leaf through static quenching mechanism. The quenching rate constants of biomolecule(K_q) of the reaction of DNA with AST from lotus leaf were calculated to be 3.120×10^{12} and 2.630×10^{12} $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ by Stern-Volmer equation, the corresponding binding constants(K_d) were computed to be 3.412×10^4 and 1.762×10^4 $L \cdot mol^{-1}$ and the number of binding sites(n) was counted to be 1.007 and 0.962 between AST from lotus leaf and DNA at 298 and 308 K, respectively. When bound to DNA, the AST from lotus leaf showed hypochromic effect and red shift in the absorption spectra. It was also found that different ionic strength had little or no effect on the fluorescence intensity of AST and AST-DNA, but the fluorescence intensity of AST-DNA quenched by anionic quencher KI was much less than that of free AST. AST could be intercalated into DNA and displaced the NR from the NR-DNA complex. It was showed that AST from lotus leaf could combine with DNA in the mode of intercalation.

Keywords AST; DNA; Interaction; Fluorescence spectroscopy; Intercalation

(Received Jan. 29, 2009; accepted May 3, 2009)

* Corresponding author