

1003 - 7713/2001/06 - 0737 - 8

探针体耐尔蓝(NB)与 DNA 结合反应研究*

郜洪文^{a**}, 李玉成^b, 江俊^a

(a. 安徽大学化学化工学院, 合肥 230039;

b. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039)

摘要: 应用微相吸附-光谱修正(MPASC)新技术研究 DNA 与耐尔蓝(NB)探针分子间的相互作用, 分析生物大分子内静电场的形成与 Langmuir 吸附的关联性, 测定了结合产物结合比、平衡常数等。通过在 pH = 10.38 介质中对 DNA-NB 反应的光谱分析, 结果表明产物结合比 $NB/DNA-P = 31$ 、平衡常数 $K = 3.33 \times 10^5$, 摩尔吸收系数 $\epsilon^{660\text{nm}} = 4.81 \times 10^3 \text{ L/mol cm}$ 。样品分析表明 DNA 回收率 95.6%~108% 相对标准偏差 $RSD = 2.8\%$ 。

关键词: 微相吸附-光谱修正(MPASC)技术; DNA; 耐尔蓝; 微静电场

中图分类号: O657.32 文献标识码: A

1 引言

超分子化学是化学家和生物学家感兴趣的前沿研究领域, 超分子含量性质测定、结构识别等常用方法包括分光光度法^[1,2]、荧光法^[3,4]、圆二色谱分析法^[5]等。近年来, 共振光散射光谱技术(RLS)发展起来, 并已有效地用于生物大分子的识别和结构研究、物理化学性质测定、与小分子的结合形式和性质研究等^[6-13]。然而, 生物大分子与小分子探针间结合仍存在许多尚未解决的问题, 如 Pesavento 方程^[14]和 Scatchard 模型^[15]尚需要合理解释。

生物大分子拥有复杂的立体构象, 折叠、螺旋、盘绕等使大分子产生大量的沟壑和孔穴, 而且由于支持大分子立体结构的多种次级极性键极为接近, 同性电荷相互靠近形成很多微电场谷^[16]。由于电场力作用, 带有电荷的小分子探针被吸附到微相(microphase)电场表面, 由于微相空间狭小, 探针分子只能单分子层排列在微相界面上, 即符合 Langmuir 吸附^[17](如图 1)。在大分子-色体反应体系中, 由于结合物和探针的吸收光谱常常靠近, 使用光谱修正技术^[18-21]能够测定结合体系中自由配体和结合物各自的响应信号。将 Langmuir 单分子层吸附理论和光谱修正技术结合起来研究生物大分子溶液物理化学性质的方法称微相吸附-光谱修正(MPASC)技术。本文详细研究了 DNA 与耐尔蓝(NB)的相互作用, 测定了反应产物的结合比、结合常数、摩尔吸光系数以及建立样品 DNA 定量测定方法。结果表明: 在 pH = 10.38 溶液中, DNA 与 NB 反应灵敏, 温度、离子强度和离子型表面活性剂对结合反应影响较大。实验条件下, 吸附产物结合比为 $DNANB = 13$, 结合常数为 3.33×10^5 , 在 660 nm 波长下的摩尔吸收系数 $\epsilon(P)$ 为 $4.81 \times 10^3 \text{ L/mol cm}$ 。用于样品中 DNA 测定, 结果满意。

* 国家自然科学基金资助项目(40073030)和安徽省自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人, Tel & Fax: 0551-5106110, Email: gaohongw@mail.hf.ah.cn

收稿日期: 2001-04-16; 修回日期: 2001-07-30。

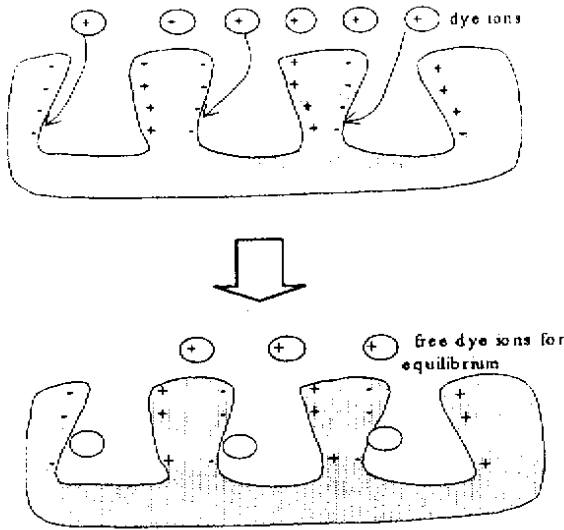


图 1 微静电场中染料吸附过程

Fig. 1 The adsorption process of dye ions in microelectrostatic fields

2 MPASC 技术理论

2.1 光谱修正技术

讨论如下生物大分子 (M) 与小分子有机探针 (L) 间的生化反应过程：



箭头前为反应开始状态, 箭头后为反应平衡状态, 括号内是各个状态下 M、L、 ML_N 的摩尔浓度。由于反应体系中 L 始终是过量的, 生化产物的真实吸光度 (A_c) 应由下式计算^[18]

$$A_c = \frac{\Delta A - \beta \Delta A'}{1 - \alpha \beta} \quad (1)$$

这里, ΔA 、 $\Delta A'$ 分别为反应平衡体系在峰吸收波长 λ_2 和谷吸收波长 λ_1 下的测量吸光度; α 、 β 为修正系数, 一般是常数, 但是如果配体 L 本身容易发生二聚或多聚反应^[22, 23], β 将随 L 浓度变化。反应结合比 (γ) 由下式求得^[21]:

$$\gamma = \eta \frac{C_{L0}}{C_M} \quad (2)$$

$$C_L = (1 - \eta) C_{L0} \quad (3)$$

其中

$$\eta = \frac{A_c - \Delta A}{A_0} \quad (4)$$

η 为 L 的有效反应分率; A_0 为空白试剂在波长 λ_2 下测量的吸光度 (水参比)。当体系 L 加到一定浓度时, 结合比 γ 达到最大值 N 。生化反应溶液中结合产物的实际摩尔吸光系数 $\epsilon_r^{\lambda_2}$ (非表观 $\epsilon_a^{\lambda_2}$) 由下式计算:

$$\epsilon_r^{\lambda_2} = \frac{NA_c}{\delta \gamma C_M} \quad (5)$$

δ 为比色皿厚度 (cm)。

2.2 微相吸附理论(Microphase Adsorption)

Langmuir 早期从动力学观点出发,提出了具有理论意义的气-固和液-固界面吸附理论^[17],这一经典理论之后得到了快速发展和完善^[24]。他认为吸附质在吸附剂表面的吸附是单分子层的排列,被吸附的分子间无作用力,当吸附和脱附速度相等时,吸附达到动态平衡。生物大分子内部形成微静电场,吸附质 L 在微表面存在如下吸附平衡: L(水相, C_L) \leftrightarrow ML_N(大分子相, C_M)。平衡遵守 Langmuir 吸附方程^[17]:

$$\gamma = \frac{KNC_L}{1 + KC_L} \quad (6)$$

K 为结合常数或称反应平衡常数。在通过式(3)得出最大结合比 N 后,即可绘制 γ 随 C_L 的变化曲线,观察与 Langmuir 方程(6)回归曲线的一致性。由回归曲线的 O 点切线斜率 S 可以计算结合常数 K 值: $K = S/N$ 。方程(6)与 Pesavento 两相分配经验方程和 Scatchard 模型是一致的,因此说,生物大分子与探针小分子间的反应实际上就是微相单分子层吸附平衡。

3 实验部分

3.1 仪器、试剂

UV/VIS-265 双光束扫描分光光度计(日本岛津), UV/VIS-120-02 分光光度计(日本岛津), pHS-2C 酸度计(上海雷磁仪器厂); 116R 型恒温水浴锅(通江长江实验仪器厂); DDS-11A 型电导仪(天津第二分析仪器厂); DJS-1 型电导电极(电极常数 0.98, 上海天光仪器厂)。

小牛胸腺 DNA(ctDNA, 中国医药集团上海化学试剂公司购买, 美国 Sigma 公司生产), 0.500 g/L(用离子交换水配制), 溶解于 1.0 mmol/L pH 7 磷酸盐和 1.0 mmol/L NaCl 溶液中^[25], 置于 4℃ 下保存, 其磷摩尔浓度按照 260 nm 下吸光度计算($\epsilon_{\text{ctDNA}} = 6600 \text{ L/mol cm}$)^[26]是 1.13 mmol/L; Britton-Robinson(B-R)系列缓冲溶液, 使用磷酸、硼酸、冰醋酸和 NaOH 按比例配制, pH = 2.2111.58。0.100 mmol/L NB 溶液配制: 准确称取 0.1754 g 耐尔蓝(购自中国医药集团上海化学试剂公司)溶解于 500 mL 纯水, 置于 4℃ 下保存。2.0 mol/L NaCl 溶液。5% Na₂-EDTA 溶液。表面活性剂溶液配制: 曲通(Triton)X-100、溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)均 1% 水溶液。

上述试剂配置使用新生产的 0.51 $\mu\text{S/cm}$ 去离子水配制。

3.2 试验方法

在 10 mL 比色管中加入 1 mL B-R 缓冲溶液、0.500 mL DNA 溶液和一定量 NB 溶液, 稀释到 10 mL 刻度, 混匀后放置 10 min, 用 1 cm 比色皿在 490、660 nm 波长下测定吸光度, 分别计算 α 、 β 、 A_c 、 η 、 γ 等。

样品分析: 在 5 mL 中性样品溶液中, 先后加入 1 mL B-R 缓冲溶液、0.5 mL Na₂EDTA 溶液和 0.50 mL NB 溶液, 稀释到刻度, 混匀放置 20 min 后, 在 490、660 nm 波长下测定吸光度, 计算 A_c 值和样品中 DNA 浓度。

4 结果与讨论

4.1 吸收光谱分析和 pH 影响

NB 溶液及其与 DNA 反应溶液在各 pH 条件的吸收光谱如图 2 所示。由曲线 1 可知, NB 在 pH = 10.38 溶液中最大吸收位于 490 nm, 由曲线 2 可知, NB-DNA 结合物(无游离 NB)最大吸收位于 660 nm。结合物吸收光谱红移 170 nm。由曲线 3、4、5 可见, 曲线 3 给出最高灵敏

度。相对于 NB 溶液, NB - DNA 反应液峰、谷吸收分别位于 490 和 660 nm 波长处,因此此二波长选为工作波长。而由图 3a 也可以看出溶液酸度越高,结合比 γ 变小,这是由于在碱性溶液中, NB 以 NB^- 形式存在,带有负电荷,更容易被微电场的正电荷表面吸附。本研究使用 $pH = 10.38$ 缓冲溶液作为工作介质,因为 $pH = 10.38$ 可给出最高灵敏度。由光谱曲线 2 计算 $\alpha = 0.034$,由图 3b 可见, NB 溶液的 β 值随 NB 浓度的升高而增大,这是由于 NB 溶液发生二聚或多聚反应所引起的。

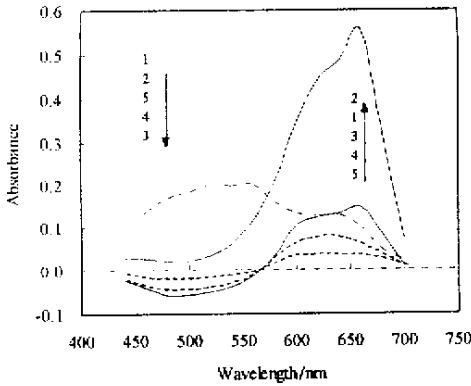


图 2 NB, NB - DNA 溶液吸收光谱

1. 0.200 μmol NB, $pH = 10.38$,
2. 0.100 μmol NB, 6 μmol DNA (P), $pH = 10.38$,
3. 0.200 μmol NB, 0.250 mg DNA, $pH = 10.38$,
4. 0.200 μmol NB, 0.250 mg DNA, $pH = 9.62$,
5. 0.200 μmol NB, 0.250 mg DNA, $pH = 11.21$.

Fig. 2 Absorption spectra of NB and its DNA (0.250 mg) solution

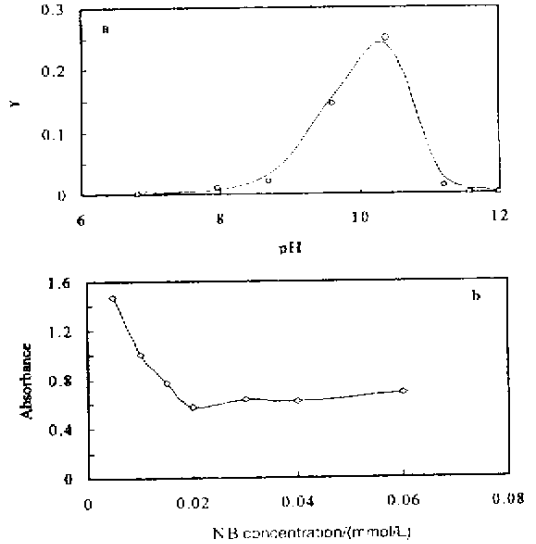


图 3 a: pH 对 NB - DNA 结合物结合比影响
b: β 值随 NB 浓度变化

Fig. 3 a. Effect of pH on the binding ratio of NB (0.200 μmol) to DNA (0.25 mg) and b. variation of β with NB concentration at $pH = 10.38$

4.2 离子强度、表面活性剂和温度影响

改变 2 mol/L NaCl 溶液加入量,反应液离子强度的变化对 NB - DNA 结合物的结合比的影响如图 4a。可以看出,溶液离子强度对结合反应影响明显,结合比 γ 随离子强度的升高而减小,这是由于 Na^+ 、 Cl^- 易被 DNA 分子中微电场所吸附,占据了部分微相表面,因此结合比随溶液离子强度增大出现减小。NB - DNA 吸附结合物在非离子表面活性剂 Triton X - 100、阳离子表面活性剂 CTMAB 和阴离子表面活性剂 SDBS (1% 各加入 0.5 mL) 存在下的结合比变化如图 4b 所示。可以看出,离子型表面活性剂胶束大分子也可以吸附 NB^- ,从而降低了结合比,而特别是阳离子活性剂 CTMAB 对 NB^- 的吸附比 DNA 对 NB^- 的吸附更强,导致 NB 从大分子微相界面脱离。分别在 2060°C 下测定 NB - DNA 结合反应液吸收,结果如图 4c,可见结合比随温度升高显著减小,温度每升高 10°C,结合比下降约 20%。这是由于温度升高,加快了 DNA 分子上吸附的 NB 解离,造成溶液本体 NB 浓度升高,这一现象符合固体表面单分子层吸附一般规律。

4.3 NB 浓度影响和 DNA 溶液性质测定

固定 DNA 加入量,改变 0.100 mmol/L NB 溶液加入量,计算各溶液 A_c 、 η 、 γ 、 C_L 等, γC_L 曲线如图 5 所示,虚线代表 Langmuir 等温吸附曲线。可以看出虚、实线有较好的重合,因此 NB-DNA 反应符合 Langmuir 单分子层吸附。由曲线可以看出,当 C_L 大于 0.015 mmol/L 时,结合比趋于最大值 0.32,且保持稳定。因此,该生化反应结合物的结合比 $NBDNA(-P)=31$ 。从曲线的 0 点切线斜率计算结合物的结合常数为 $K_{DNA-NB} = 3.18 \times 10^4$ (20℃)。另外,通过对 NB(0.100 μmol)-DNA(0.250 mg)结合溶液进行 6 次平行测定,由(6)和(5)式分别计算结合物的结合常数、摩尔吸收系数(660 nm),平均结果为 $K_{DNA-NB} = 3.33 \times 10^4$ (20℃), $\epsilon^{660\text{ nm}} = 4.81 \times 10^3 \text{ L/mol cm}$ 。可见重复单点计算结合常数与 0 点斜率法基本吻合。应用该方法测定计算结合比和结合常数,比传统摩尔比^[27]、连续变化^[28]、平衡移动^[29]和 Scatchard^[15]等方法原理易懂、操作简单、结果可靠。

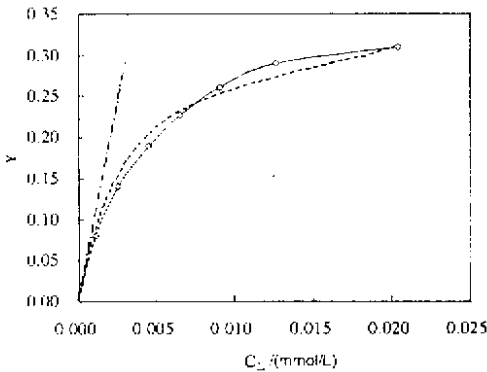


图 5 C_L γ 变化曲线

实线:测量值;虚线:Langmuir 吸附回归线;点划线:虚线原点切线

Fig.5 The relationship between C_L γ

Solid line : measurement curve ,
Dashed line : regressed Langmuir adsorption curve ,
Dotted - dashed line : tangent line at 0 point .

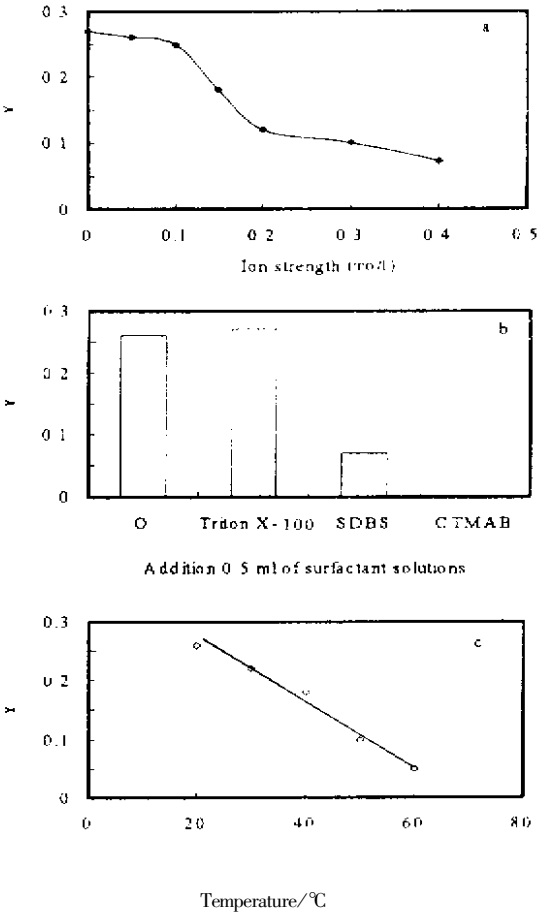


图 4 离子强度(a)、表面活性剂(b)和温度(c)对 NB-DNA 结合比的影响

Fig.4 Effect of ionic strength (a), various surfactants (b) and temperature (c) on the binding ratio of NB (0.200 μmol) to DNA (0.25mg) at pH = 10.38

4.4 标准溶液试验和标准曲线

配制 DNA 标准系列,按照“试验方法-样品分析”进行显色和测量,计算每一个标准溶液的 A_c 值,回归 A_x 标准曲线,如图 6。DNA 在 075 $\mu\text{g/L}$ 内,结合物吸收是线性的,比较其与普通方法的线性斜率和线性相关性,可以看出光谱吸收修正技术使分析灵敏度和准确度有所提高。

4.5 精密度和检出限

分别对 0.500 mg DNA 标准溶液各进行 7 次平行测定,结果为: 0.541 ± 0.010 相对标准偏差(RSD)等于 1.8%。以吸光度为 0.01 计算分光光度分析方法的检出限, DNA 最低测定浓度为 30 $\mu\text{g/L}$ 。

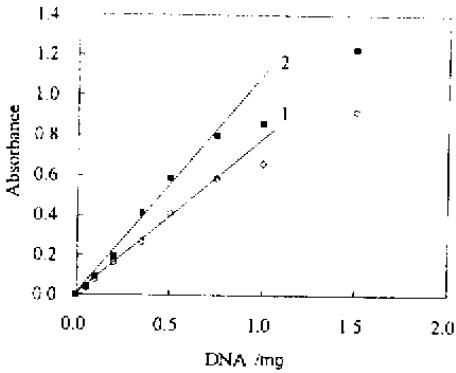


图6 DNA测定标准曲线
($\text{pH} = 10.38$ 和 EDTA 存在下)
1. 测量值, 2. 真实值。

Fig. 6 Standard curve for the determination of DNA at $\text{pH} = 10.38$ and in EDTA

1. Measurement absorbance, 2. Real absorbance.

4.6 干扰试验

在掩蔽剂 EDTA 存在下, 通过在结合反应体系中加入其他有机物、金属离子和阴离子, 对 0.500 mg DNA 进行测定, 结果如下(误差 10%): 1 mg K^+ 、 NH_4^+ 、 $\text{Ca}(\text{II})$ 、 Cl^- 、 F^- 、 PO_4^{3-} 、 SO_3^{2-} 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 、葡萄糖、蛋白质、氨基酸、乙醇, 0.2 mg $\text{Mg}(\text{II})$ 、 $\text{Al}(\text{III})$ 、 $\text{Mn}(\text{II})$, 0.1 mg $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{II})$ 、 $\text{Zn}(\text{II})$ 、 $\text{Pb}(\text{II})$ 、 $\text{Ni}(\text{II})$ 、 $\text{Cd}(\text{II})$ 、 $\text{Co}(\text{II})$, 0.05 mg $\text{Hg}(\text{II})$ 。阳离子表面活性剂有负干扰。

4.7 合成样品测定

分别以饮用水和湖水为底液介质(含有大量的 $\text{Ca}(\text{II})$ 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 和一定量的 F^- 、 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 、悬浮物等), 分别加入 1 mg $\text{Ca}(\text{II})$ 、 $\text{Mg}(\text{II})$ 丙酮、葡萄糖、0.1 mg 蛋白质、 $\text{Fe}(\text{III})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Cd}(\text{II})$ 、 $\text{Pb}(\text{II})$ 以及一定量的 DNA, 按照“试验方法—样品分析”显色和测量, 计算结果列于表 1。样品中 DNA 回收

率 95.6% 108%, 方法回收完全。

表1 制备样品中 DNA 测定结果

Table 1 Determination of DNA in synthetic samples with NB as reactant at $\text{pH} = 10.38$ and in the presence of EDTA)

Sample	Added DNA/mg	Found DNA/mg					
Synthetic sample 1# with drinking water as background	0.000	0.652	0.657	0.645	0.666	0.662	0.650
		0.655 ± 0.008 RSD 1.2%					
	0.500	1.13	1.16	1.11			
		1.13 ± 0.005 Recovery 95.6%					
Synthetic sample 2# with lake water as background	0.000	0.186	0.191	0.179	0.192	0.188	0.181
		0.186 ± 0.005 RSD 2.8%					
	0.200	0.401	0.392	0.412			
		0.402 ± 0.010 Recovery 108%					

5 结论

NB-DNA 反应溶液的研究支持了生物大分子内微电场假设。微相吸附-光谱修正技术虽然没有如 RLS 法^[8]有更高的测量灵敏度, 但是它却可以用简单分析方法做出准确的结果, 对于进一步研究生物大分子链长、组成和排序以及环境污染物在生物大分子上结合与毒性作用等也有重要意义。当然, 此新技术也可以嫁接到其他测试方法如荧光分析上以提高微量分析灵敏度并发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Bradford M M. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**: 245
- [2] Li N, Tong S Y. *Talanta*, 1994, **41**: 1657
- [3] Pasternack R F, Gibbs E J, Villafranca J J. *Biochemistry*, 1983, **22**: 2406
- [4] Li N, Li K A, Tong S Y. *Anal. Biochem.*, 1996, **233**: 151
- [5] Carvlin M J, Fiel R J. *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**: 6121
- [6] Lutz E S M, Irth H, Tjaden U R, et al. *Anal. Chem.*, 1997, **69**: 4878
- [7] Arlinghaus H F, Kwoka M N. *Anal. Chem.*, 1997, **69**: 3747
- [8] Robert F Pasternack, Peter J Collings. *Science*, 1995, **269**: 935
- [9] Robert F Pasternack, Carlos Bustamante, Peter J Collings, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**: 5393
- [10] Robert F Pasternack, Esther J Gibbs, Joseph J Vallafranca. *Biochem.*, 1983, **22**: 5409
- [11] Huang C Z, Li Y F, Mao J G, et al. *Analyst*, 1998, **123**: 1401
- [12] Huang C Z, Li Y F, Luo H Q, et al. *Anal. Lett.*, 1998, **31**: 1149
- [13] Huang C Z, Li K A, Tong S Y. *Anal. Chem.*, 1996, **68**: 2259
- [14] Pesavento M, Profumo A. *Talanta*, 1991, **38**: 1099
- [15] Scatchard G, Scheinerg I H, Armstrong S H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**: 535
- [16] Gao H W, Jiang J, Yu L Q. *Analyst*, 2001, **126**: 528
- [17] Langmuir I. *J. Am. Chem. Soc.*, 1918, **40**: 1361
- [18] Gao H W. *Recl. Trav. Chim. Pays - Bas*, 1995, **114**: 61
- [19] Gao H W. *Talanta*, 2000, **52**: 825
- [20] Gao Hongwen(郜洪文). *Huanjing Kexue(环境科学)*, 1995, **16(3)**: 53
- [21] Zhang P F, Gao H W, Li Y. *Talanta*, 1998, **47**: 355
- [22] Zhang X F, Ma J S, Xie P J, et al. *Sci. China Series B*, 1992, (3): 225
- [23] Cao Ying(曹瑛), He Xiwen(何锡文). *Chem. J. Chin. Univ.(高等学校化学学报)*, 1998, **19**: 714
- [24] Xu Tongwen(徐铜文), Fan Guangneng(范广能), Liu Ning(刘宁), et al. *Chin. J. Chem. Phys.(化学物理学报)*, 1999, **12**: 375
- [25] Pasternack R F, Gibbs E J, Villafranca J J. *J. Biochem.*, 1983, **22**: 2406
- [26] Pachter J A, Huang C H, Duvermay V H, Prestayko A W, Crooke S T. *Biochemistry*, 1982, **21**: 1541
- [27] Tikhonov V N. *Zh. Anal. Khim.*, 1975, **30**: 1501
- [28] Likussar W. *Anal. Chem.*, 1973, **45**: 1926.
- [29] Laearev A I. *Zavod. Lab.*, 1975, **41**: 534.

Langmuir Aggregation of Nile Blue (NB) on DNA and Application *

Gao Hongwen^{a**} , Li Yucheng^b , Jiang Jun^a

(a. School of Chemistry and Chemical Engineering , Anhui University , Hefei 230039 ,

b. School of Life Science , Anhui University , Hefei 230039)

Abstract The study on the interaction of a stain with nucleic acids makes to understand the function of the genetic macromolecules and analyze the transmission of the genetic information. The combination of both the Langmuir adsorption and the spectral correction technique will provide a very helpful experimental strategy for study of chromophore or its metallic complex's adsorption in surfactant solution. This method is named Micro Phase Adsorption - Spectral Correction (MPASC) was described. It provides a very helpful experimental strategy for study of aggregation of a stain on biomacromolecules. Commonly, nucleic acid molecule contains complex spatial structure. The helix, winding and folds lead of many holes, gulies and grooves. Many polar bonds are near to each other to form many microelectrostatic fields. They will selectively attract charged organic compounds in only monolayer till kinetic equilibrium. So the property constants of the aggregate may be determined such as equilibrium constant, binding ratio, etc. The adsorption of NB on DNA has been investigated at pH = 10.38 and it obeyed the langmuir monolayer adsorption. Results show that the adsorption ratio of NB to DNA (- P) is 31, adsorption constant 3.33×10^5 and real absorptivity 4.81×10^3 L/molcm at 660 nm. By varying the operation condition, we observed that the adsorption ratio of NB to DNA decreased with increase of ionic strength and temperature and addition of ionic surfactant e.g. CTAB and SDBS. This indicates the interaction is an adsorption reaction not a complexation. This interaction has been applied to the quantitative determination of DNA in samples. In the presence of EDTA, many ions or compounds such as $C_2O_4^{2-}$, protein, acetone, alkali earths, $Mn(II)$, $Cu(II)$, $Fe(II)$, $Zr(II)$, $Pb(II)$, $Ni(II)$, $Co(II)$, $Cd(II)$ and $Hg(II)$ did not interfere the direct determination of DNA. For analysis of samples, the recovery of DNA is between 95.6% and 108% and relative standard deviation 2.8%.

Keywords MPASC technique, Microelectrostatic field, Langmuir adsorption, Determination of DNA, Nile blue (NB)

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (40073030) and the Natural Science Foundation of Anhui province.

** To whom correspondence should be addressed, Tel. : 0551 - 5106110, Email : gaohongw@mail.hf.ah.cn