

文章编号:1673-0062(2009)01-0092-04

钕-肉桂酸-邻菲罗啉三元配合物与 DNA体系荧光光谱研究及其应用

于军晖,杨慧仙,杨胜园,黄弦,姜乐

(南华大学公共卫生学院,湖南衡阳421001)

摘要:研究了DNA对钕-肉桂酸-邻菲罗啉三元配合物的荧光敏化作用,并在此基础上建立了荧光法测定DNA的新方法。pH=8.0的Tris缓冲液中,DNA在0.23~5.68 μg/mL浓度范围内,稀土配合物-DNA体系的荧光强度值(F)与DNA浓度(C_{DNA})具有良好的线性关系,线性回归方程 $F=22.40C_{DNA}+83.88$,相关系数 $r=0.997$,检出限为0.07 μg/mL,加标回收率为92.6%~103.2%,RSD=1.85%~3.42%。结果表明,由于DNA的加入,使体系荧光强度增强,且加入DNA浓度和体系荧光强度间存在线性关系,表明配合物和DNA间存在插入作用。

关键词:DNA;钕;肉桂酸;邻菲罗啉;荧光敏化作用

中图分类号:R123.1 文献标识码:B

Studies on Interaction Between Ternary Rare Earth Complexes of Cinnamic Acid and Phenanthroline with DNA by Fluorescent Spectrum and Its Application

YU Jun-hui, YANG Hui-xian, YANG Sheng-yuan, HUANG Xian, JIANG Le

(School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: A new Fluorescent Spectrum method for the determination of DNA with Ternary Rare Earth Complexes has been established under the special condition. The Fluorescent intensity was proportional to the concentration of DNA in the range of 0.23 ~ 5.68 μg/mL with the detection limit of 0.07 μg/mL. The average recovery was 92.6% ~ 103.2%, the RSD was 1.85% ~ 3.42%. The fluorescence intensity value of complex of DNA and [Nd(phen)(cin)₃(H₂O)] has be heightened. That shows the effect of insert can be proved between DNA and the rare earth complexes.

Key words: DNA;Nd;Cinnamic Acid;Phenanthroline;fluorescence sensitization;effect

收稿日期:2008-12-20

基金项目:湖南省教育厅基金资助项目(03C418)

作者简介:于军晖(1974-),男,湖南慈利人,南华大学公共卫生学院讲师。主要研究方向:环境中毒有害物质检测。

0 引言

近年来通过荧光光谱等光谱学手段探讨金属离子和有机小分子与DNA或蛋白质等生物大分子的作用机制已有许多报道^[1-2]. 作为遗传信息载体的DNA在生命活动中有着不可代替的作用, 由于稀土金属离子与核酸相互作用可产生稀土金属离子的特征荧光, 因此可提供有关核酸结构及组成的信息^[3-4].

肉桂酸(cinnamic acid)即 β -苯丙烯酸, 是植物内源信号分子水杨酸在植物体内合成的前提物质^[5]. 肉桂酸具有广泛的抗实体肿瘤活性, 能抑制肿瘤的增殖并诱发其分化^[6]. 本文在无水乙醇中合成了钆-肉桂酸-邻菲罗啉三元稀土配合物, 通过荧光分析研究了DNA对配合物荧光的敏化作用. 实验表明三元稀土配合物和DNA作用中产生了“配体间相互作用”, 在与DNA结合时存在静电和插入两种作用模式.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

970CRT型荧光分光光度计(上海仪器有限公司), PB-20型酸度计(德国赛多利斯公司). 鱼精DNA(上海源聚生物有限公司), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), NaCl, 肉桂酸(Hcin), 氧化钆, 邻菲

罗啉(Phen), 6 mol/L 盐酸, 4 mol/L NaOH.

实验所用化学试剂均为分析纯. 实验用水为二次蒸馏水.

1) 稀土配合物溶液: 按文献[7]合成稀土配合物 $[\text{Nd}(\text{Phen})(\text{Hcin})_3(\text{H}_2\text{O})]$, 溶于1.0%乙醇溶液中, 配成浓度为 1.00×10^{-4} mol/L三元稀土配合物溶液.

2) DNA溶液: 将鱼精DNA溶解在50 mmol/L NaCl溶液中, 浓度为1.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DNA浓度用光度法以260 nm处的吸光度测定. 将配制好的DNA溶液放于冰箱中, 保持其生物学活性.

1.2 实验方法

在10 mL比色管中, 依次加入0.5 mL 1.00×10^{-4} mol/L稀土配合物溶液, 2.0 mL pH = 8.0 Tris缓冲液, 再加入一定量1.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA溶液, 用双蒸水定容, 混匀, 放置30 min, 进行荧光扫描, 得荧光光谱. 在 $\lambda_{\text{ex}} = 292$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 362$ nm处测定体系荧光强度, 激发和发射狭缝宽度均为5 nm.

2 结果与讨论

2.1 光谱特征

按照实验方法1.2, 于250~500 nm波长范围进行激发光谱和荧光光谱扫描(图1). 由图1确定 $\lambda_{\text{ex}} = 292$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 362$ nm.

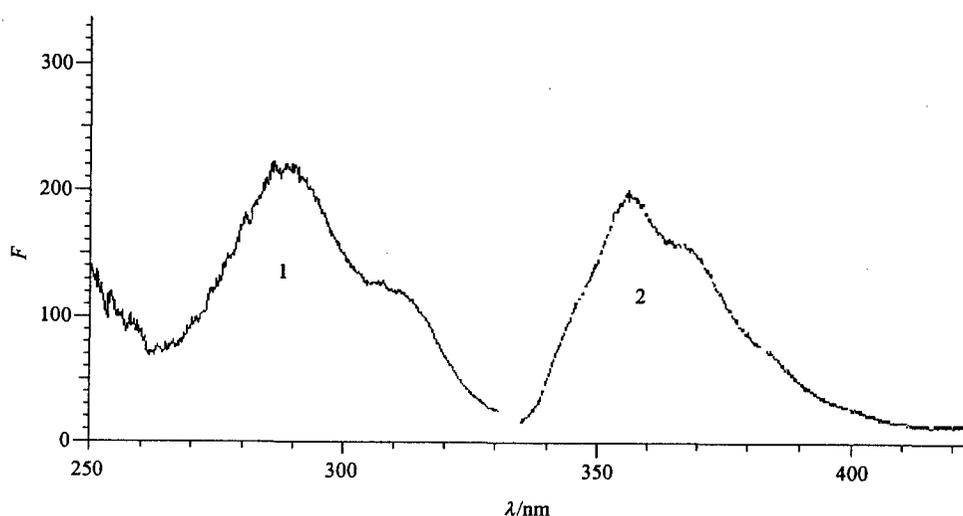


图1 稀土配合物-DNA体系激发光谱(1)和荧光光谱(2)

Fig. 1 The excitation spectra(1) and fluorescence spectroscopy(2) of rare earth complexes - DNA system

2.2 稀土配合物-DNA体系的荧光光谱性质

按照实验方法1.2, 测定稀土配合物-DNA

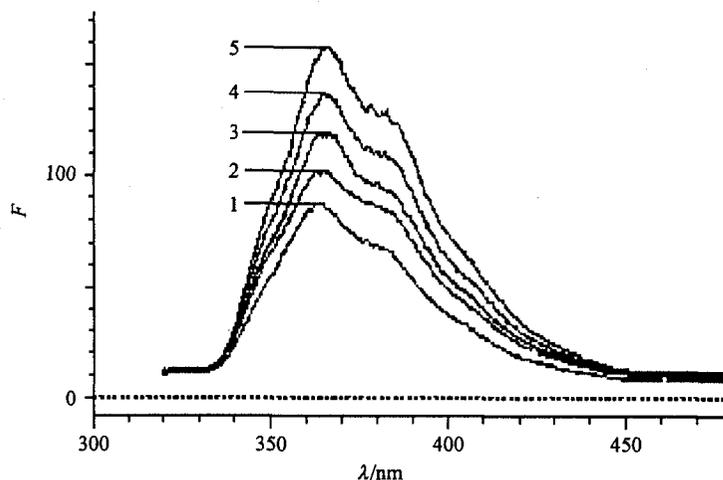
体系的荧光光谱(图2).

图2显示随着DNA浓度增大, 体系荧光强度

增强,表明 DNA 对配合物荧光具有敏化作用,并在一定浓度范围内存在线性关系。

据文献[4]报道 DNA 与三元配合物结合存在着插入和静电作用。DNA 的大量存在使其与稀

土配合物作用更加充分,配体结构更加稳定,致使 F 增强。实验结果说明了配合物的插入作用随配合物的稳定性增强而增强。



1-5: $V_{\text{DNA}} = 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00$ mL

图2 稀土配合物-DNA体系的荧光光谱

Fig. 2 The fluorescence spectroscopy of rare earth complexes - DNA system

2.3 条件实验

2.3.1 酸度及缓冲液用量对体系 F 的影响

试验了多种缓冲液对体系 F 的影响。结果表明,在 Tris-HCl 缓冲液中 F 值最大且最稳定。酸度试验结果显示,当 $4 \leq \text{pH} \leq 7$ 时,荧光强度平缓上升; $8 \leq \text{pH} \leq 10$ 时,荧光强度急剧下降, pH 在 7~8 之间时,体系 F 最大且较稳定。

结果表明在酸性或碱性条件下,配体稳定性受到影响,反应体系的插入作用不能进行完全,且强碱比强酸对反应体系的干扰作用更为明显。

研究了缓冲液用量对体系 F 的影响。结果表明缓冲液用量 2.00 mL 时,荧光强度趋于稳定,即该条件可使配合物稳定存在,有利于反应的进行。

实验选择加入 2.00 mL $\text{pH} = 7.6$ Tris-HCl 缓冲液。

2.3.2 配合物用量对体系 F 的影响

试验结果显示,体系 F 值随稀土配合物溶液用量增加而增大。当加入稀土配合物溶液 0.5 mL 时,体系 F 值达到最大且保持稳定。实验选择加入稀土配合物溶液 0.5 mL。

2.3.3 体系反应时间及体系稳定性

试验结果表明,体系荧光强度随时间逐渐增大,在反应 30 min 时达到最大值并保持稳定,2 h 内 F 值基本稳定。实验选择配制好溶液放置

30 min 后测定。

2.4 共存离子的影响

按照实验方法配制 DNA 含量为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测液,相对误差控制在 $\pm 5\%$ 以内,考察共存物的干扰:常见阴离子、碱金属、碱土金属离子不干扰测定,但 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{2+} 等干扰较为严重。

2.5 线性范围、检出限与精密度

在实验确定的优化条件下,绘制出稀土配合物-DNA 标准曲线(图3)。多次实验结果($n=7$)表明,DNA 含量在 0.23~5.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, F 与 C_{DNA} 之间呈良好的线性关系,DNA 含量大于 5.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,荧光强度变化不明显,表明三元配合物和 DNA 的作用已接近饱和状态。

回归方程为 $F = 22.40C_{\text{DNA}} + 83.88$, $r = 0.997$,多次测定空白溶液的 F 值($m=6, n=11$), $S_b = 0.52$,计算方法检出限 $3S_b/k = 0.07 \mu\text{g}/\text{mL}$,测定下限 $10S_b/k = 0.23 \mu\text{g}/\text{mL}$,测定范围为 0.23~5.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

在线性范围内选择 0.50、1.50、3.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三组浓度进行精密度实验,结果分别为 3.11%、2.35%、1.92%。

2.6 样品分析

在模拟 DNA 样品中,加入 DNA 标准溶液,测定配合物体系荧光强度,根据回归方程计算出测

定值,每个样本重复测定 5 次,计算回收率如表 1 所示.

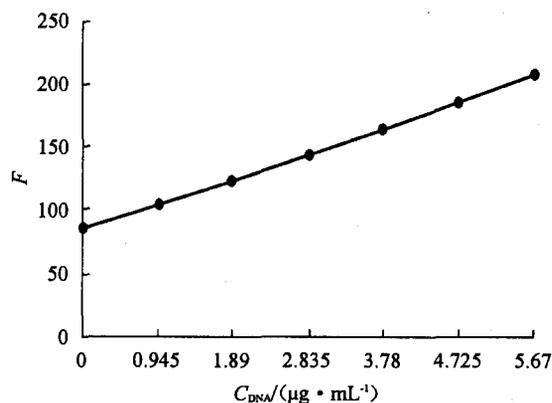


图 3 稀土配合物 - DNA 体系标准曲线

Fig. 3. Standard curve of rare earth complexes - DNA system

3 结论

实验研究了 DNA 对稀土配合物荧光的敏化作用,结果表明稀土配合物与 DNA 间存在插入作用.由于 Phen 具有较大范围的共轭 π 键和较好的刚性平面,其稀土发光配合物的荧光较强.实验结果显示随 DNA 浓度增大,荧光增强,并发现在实验中相应的荧光光谱发生了红移,说明配合物中的配体 phen 插入到 DNA 的双螺旋结构中, DNA 大分子对插入的疏水性分子 phen 起到了保护作用,从而使配合物 $[\text{Nd}(\text{cin})_3(\text{phen})]$ 的荧光增强,同时配体(phen)的 π^* 轨道和碱基的 π 轨道发生偶合使能量降低,导致 $\pi - \pi^*$ 能量缩小,产生红移现象.这些都进一步说明稀土配合物是以插入方式和 DNA 键合.

表 1 合成样的测定

Table 1 Determination of synthetic samples

样品	DNA 量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	加标量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
1	1.89	0.95	2.78	93.7	3.42
2	1.89	1.89	3.74	97.9	1.85
3	1.89	2.83	4.81	103.2	2.08

注: $c_{DNA} = 1.89 \mu\text{g}/\text{L}$

参考文献:

- [1] 杨 睿,刘绍璞.某些分子光谱分析法测定蛋白质的进展[J].分析化学,2001,29(2):232-241.
- [2] 梁 宏,刑本刚. $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$ 与人血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J].化学通报,1999,57(7):161-165.
- [3] 周柏玲,刘力宏.钽离子与 DNA 的荧光反应及 DNA 测定的研究[J].山西大学学报(自然科学版),1999,22(2):154-158.
- [4] 雷 鸣,黄德盈. $\text{La}(\text{III})$ 与脱氧核糖核苷酸的相互作用[J].中南民族学院学报,1998,17(4):19-22.
- [5] 张迎红.桂皮酸及其衍生物与肿瘤[J].肿瘤研究与临床,2001,13(5):535.
- [6] 慈云祥,胡晓雷,李元宗,等. DNA 荧光探针的研究进展[J].分析化学,1992,20(9):1083.
- [7] 郭东方,何 疆,曾正志.肉桂酸-邻菲罗啉-稀土三元配合物对 DNA 作用的光谱研究[J].中国稀土学报,2004,22(1):55-56.

(上接第 91 页)

- [5] 张海民,任守信.方波吸收溶出伏安法同时测定水样中痕量铜和镉[J].理化检验化学分册,2003,39(4):198-201.
- [6] 朱理智.光度法测定水中微量镉[J].工业水处理,2002,19(4):47-48.
- [7] 杨慧仙,李贵荣,何爱桃,等. $\text{Cd}^{2+} - \text{I}^- - \text{CV}$ 三元缔合物共振瑞利散射法测定镉[J].中国卫生检验杂志,2007,17(8):1366-1367.