• 研究论文 •

柯楠因诱导寡聚腺嘌呤核苷酸双螺旋结构增强赛博绿 I 荧光及柯楠因的高灵敏和高选择荧光检测

周亚文^a 李春梅^a 熊祖洪^b 黄承志^{*,a,c}

(^a 西南大学化学化工学院 发光与实时分析教育部重点实验室 重庆 400715)

(^b 西南大学物理科学与技术学院 重庆 400715)

(^c 西南大学药学院 重庆 400716)

摘要 柯楠因是原小檗碱类生物碱类似物。研究发现,在近生理酸度下柯楠因与寡聚腺嘌呤核苷酸(poly A₁₆)形成双链结构,明显增强 DNA 嵌入染料赛博绿 I (SG I)的荧光。在优化条件下,530 nm 处荧光增强与 60~600 nmol/L 的柯楠因呈线性关系,检测限(3 σ)为 30 nmol/L。方法选择性好,同倍含量的小檗碱类似物不产生干扰。将所建立的方法用于柯楠因合成样的测定,回收率在 92.5%~105%之间,相对标准偏差 RSD 小于 3.1% ($n=3$)。

关键词 柯楠因;寡聚腺嘌呤核苷酸;赛博绿 I; 荧光分光光度法

Investigations on the Enhanced Fluorescence of Sybr Green I by Coralyne-induced Double-stranded Structure of Adenine Oligonucleotides and a Sensitive and Selective Spectrofluorimetry of Coralyne

Zhou, Yawen^a Li, Chunmei^a Xiong, Zuhong^b Huang, Chengzhi^{*,a,c}

(^a Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715)

(^b College of Physics and Technology, Southwest University, Chongqing 400715)

(^c College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract Coralyne is one of the protoberberine alkaloids analogues. It was found that coralyne could induce adenine oligonucleotides (poly A₁₆) to form a double strand DNA under quasi-physiological conditions, greatly enhancing the fluorescence of Sybr Green I (SG I), a DNA intercalative dye. With the enhanced fluorescence signals of SG I, a new method for the determination of coralyne has been developed in linear range of 60~600 nmol/L, with the detection limit (3 σ) of 30 nmol/L. This proposed method is highly selective and other analogues have no interfering effects on the determination, which has been successfully applied for analysis of synthetic samples with the recovery from 92.5% to 105%, and the RSD lower than 3.1%.

Keywords coralyne; adenine oligonucleotides; Sybr Green I; fluorescence spectrometry

* E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

Received April 25, 2011; revised September 27, 2011; accepted October 25, 2011.

Project was supported by the National Creating New Drug Program of China (No. 2010ZX09401-306-1-4), National Natural Science Foundation of China (No. 21035005) and Scientific Research Foundation of Southwest University (No. XDJK2009A001).

国家重大新药创制(No. 2010ZX09401-306-1-4)、国家自然科学基金(No. 21035005)和西南大学基本科研业务费专项基金项目(No. XDJK2009A001)资助项目。

抗癌药物的发现和广泛应用, 为人类治疗癌症提供了强有力的武器, 但不合理用药导致了病原耐药性不断出现. 因此, 有效、准确地检测抗癌药物含量, 对药物用量、药品质量控制、提高用药合理性和减少药物滥用具有重要意义. 柯楠因(coralyn)为原小檗碱类生物碱类似物, 是以拓扑异构酶 I 为靶点的治疗药物^[1]. 由于含有较大的共轭芳香环(其结构如图 1 所示), 它能像小檗碱一样嵌入 DNA 链中^[2], 具有良好的抗癌活性而常作为抗肿瘤药物使用^[3]. 当与 DNA 作用时, 柯楠因分子中的 N 原子能诱导 A 碱基形成 A-A 碱基对^[4], 两者之间很强的结合力使得柯楠因对寡聚腺嘌呤核苷酸(poly A₁₆)能形成稳定的双螺旋结构^[5], 其表观结合常数(K_a)达到 $1.8 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[6], 每个柯楠因分子结合 4 个碱基^[7]. 有关柯楠因的研究目前主要集中在其抗癌机理^[5,8,9]和利用柯楠因与 DNA 的作用进行纳米颗粒定向组装^[10], 并以此为基础建立了柯楠因的可视化分析方法^[11,12]. 不过, 这些可视化分析方法灵敏度不高, 因此建立一种高灵敏度和选择性的新方法对其含量进行测定具有重要意义.

图 1 荧光增强法测定柯楠因的示意图

Figure 1 The schematic of fluorescence enhanced assay of coralyn

赛博绿 I (Sybr Green I, SG I) 是高灵敏、低毒性的 DNA 荧光染料, 结合双链 DNA 分子后荧光显著增强^[13], 灵敏度比吡啶类染料如溴乙锭(EB)高, 毒性却更低^[14]. 使用 SG I 还克服了不对称花菁类染料如 TOTO (噻唑橙同型二聚体), YOYO (噻唑黄同型二聚体) 的光漂白、水溶性差、价格昂贵等问题^[15,16]. 研究发现, SG I 荧光染料与其它染料不同之处是与 DNA 双螺旋结构中的小沟结合, 具有序列选择性, 而已报道的其它染料则是通过嵌入到序列碱基之间或静电作用, 表现为序列非特异性^[17]. 因此, 基于其 DNA 序列的高选择性、高效率

荧光增强、低毒、对温度稳定、无光漂白等优良性质, SG I 已广泛应用于分子生物学中如核酸含量测定^[18,19]、酶活性^[20]、流式细胞计数分析^[21]、毛细管电泳及生物芯片^[22]、实时 PCR 反应体系^[23,24]和环境监测^[25]等领域.

本工作期望建立一种简单、快速的抗癌药物分析方法, 使之能在药品质量控制、合理的药物用量以及体内代谢等方面获得应用. 研究表明, 在近生理酸度下, 柯楠因能与 poly A₁₆ 序列形成 A-柯楠因-A 的双链结构, 此结构使嵌入双链中的 SG I 荧光显著增强, 且增强荧光信号与柯楠因浓度在一定范围内呈良好的线性关系. 与其它方法相比, 此法操作简单, 分析速度快, 价格便宜而且避免了昂贵仪器的使用与操作.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.0 $\mu\text{mol/L}$ 柯楠因操作液由其 98% 的水合物 (ACROS Organics, 美国) 配制而成, DNA 购于上海生工 (上海), 其余药品由钛新试剂厂 (重庆北碚) 提供. 赛博绿 I (Sybr Green I, SG I) 购于 Invitrogen 公司 (美国), 使用时稀释 800 倍, PB 缓冲溶液 (pH 7.6) 用于控制溶液酸度. 所有试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水.

使用 F-2500 型荧光分光光度计 (日本日立公司) 和 J-810 圆二色光谱仪 (日本分光公司) 分别测定溶液的荧光以及圆二色特性. 根据需要使用了 HH-2 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), QL-901 型漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), H1650-W 台式微量高速离心机 (湘仪离心仪器有限公司).

1.2 实验方法

在 1.5 mL 离心管中, 依次加入 30 μL pH=7.6 的 PB 缓冲溶液和一定量的柯楠因储备液, 再加入 poly A₁₆ 储备液 30 μL , 漩涡混匀后用煮沸二次水定容至 300 μL , 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 60 min, 最后加入 24 μL 的 SG I 溶液, 在 F-2500 型荧光分光光度计上以 490 nm 为激发波长扫描溶液 500~650 nm 范围内的荧光光谱.

2 结果与讨论

2.1 光谱特征

图 1 是我们工作的基本思路. SG I 本身有很弱的荧光发射, 但与溶液中的 poly A₁₆ 通过静电作用后, 荧光微有增强^[13]. 当其嵌入到柯楠因与 poly A₁₆ 形成 A-柯楠因-A 的双链结构的小沟时, 其荧光显著增强. 图 2 的实验结果表明, 随着柯楠因浓度的增加, 与 poly A₁₆ 形成的双链数目也逐渐增加, SG I 的荧光强度继续增大.

图2 不同柯楠因浓度下 SG I 的荧光光谱

Figure 2 Fluorescence spectra of SG I in the absence and presence of different concentrations of coralyne

a, SG I; b~g, SG I+poly A₁₆+coralyne; c(coralyne): 0, 0.06, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 μmol/L; c(poly A₁₆): 0.1 μmol/L; SG I, diluting 10000 folds; pH=7.6

2.2 柯楠因与寡聚腺嘌呤核苷酸作用的序列选择性

为了讨论柯楠因与 poly A₁₆ 形成双链结构的作用机制及形成条件, 我们考察了不同寡聚核苷酸包括 poly A_n, poly C_n 和 poly T_n 与柯楠因的相互作用. 由于 G 碱基容易形成四折叠结构并能猝灭溶液荧光^[26], 因而不能使用 poly G_n 进行相关的实验研究. 如图 3 所示, 柯楠因只有与 poly A_n 作用, 才能使 SG I 在 530 nm 处的荧光得到显著增强. 为了进一步考察不同长度的 A_n 对溶液形成双链的影响, 我们保持 A 碱基总浓度一定, 其余条件不变. 结果如图 3 所示, 随着核苷酸链长度的增加, 530 nm 处荧光强度也出现了明显增强的趋势, 且荧光增强程度(ΔF)与腺嘌呤核苷酸个数(N)成如下函数关系:

$$\Delta F = 371.48 - \frac{353.48}{1 + e^{(N-13)/1.57}}$$

图3 寡聚核苷酸序列对荧光增强的影响[插图: SG I 530 nm 处荧光增强程度(ΔF)与腺嘌呤核苷酸个数(N)的拟合曲线(n=6)]

Figure 3 The relationship between ΔF and DNA sequences [Inset: the fit curve of ΔF and N]

pH, 7.6; c(coralyne): 0.4 μmol/L; c(μmol/L): poly C₆, poly T₆, poly A₆, 0.27; poly A₉, 0.18; poly A₁₂, 0.13; poly A₁₆, 0.10; poly A₁₈, 0.090; poly A₂₃, 0.067

$R^2=0.9988$. 为了减少实验过程中碱基出现自折叠情况, 实验选择 poly A₁₆ 进行进一步试验.

2.3 柯楠因在形成双螺旋结构中的作用

为了探讨柯楠因与 poly A₁₆ 作用后导致 SG I 荧光增强的原因, 我们同时考察了柯楠因及其类似物, 如盐酸小檗碱 (Berberine)、巴马汀 (Palmatine)、药根碱 (Jatrorrhizine), 嵌入试剂亚甲基蓝 (Methylene Blue)、罗丹明 B (Rhodamine B) 和 DNA 嵌入药物阿霉素 (Daunomycin)^[27] 与 poly A₁₆ 作用后的圆二色光谱.

从图 4 可以看出, poly A₁₆ 溶液在加入柯楠因及其类似物前后的圆二色光谱图差异明显, 主要体现在 208, 220, 245, 275, 330 nm 等几处. 其中, 208 nm 的负峰表示 DNA 的 α-螺旋结构, 245 nm 处的峰是 DNA 双螺旋结构, 275 nm 处的正峰是 DNA 碱基堆积作用^[28,29], 330 nm 附近的正峰表明柯楠因与 poly A₁₆ 作用后使得 DNA 手性发生了变化^[30]. 因此, 圆二色光谱图证明柯楠因与 poly A₁₆ 形成了双螺旋结构, 由此导致 SG I 的荧光增强.

图4 poly A₁₆ 与柯楠因及类似物作用前后的圆二色光谱

Figure 4 CD spectra of poly A₁₆ before and after the interaction with coralyne and analogues

pH=7.6; poly A₁₆, 1 μmol/L; c(coralyne): 0.4 μmol/L; concentrations of Jatrorrhizine, Palmatine, Methylene Blue, Rhodamine B, Daunomycin, Berberine are 0.4 μmol/L

上述圆二色信号展示的柯楠因能选择性地与 poly A₁₆ 结合, 同时还可通过荧光增强数据来说明. 如图 5 表明, 在同等浓度下只有加入柯楠因才能使 SG I 荧光明显增强, 而加入其它类似物使 SG I 的荧光增强程度较小或呈现降低. 可见, 柯楠因在使 poly A₁₆ 形成双螺旋结构导致 SG I 荧光增强的实验中呈现出良好的特异性.

在有柯楠因存在下, 我们进一步探讨了一些常见金属离子、糖类、氨基酸等共存物质对反应体系的影响, 实验结果如表 1 所示. 可以看出多数物质如糖类、无机盐在较高浓度下对实验不存在干扰, 而氨基酸的允许量相对较小. 因此, SG I 荧光探针用于柯楠因与寡聚腺嘌呤

图5 柯楠因的选择性检测

Figure 5 The selectivity assay of coralyne

pH=7.6; Concentration of Coralyne and analogues are 0.4 $\mu\text{mol/L}$; $c(\text{poly A}_{16})$: 0.1 $\mu\text{mol/L}$

核苷酸的高选择性结合能进一步应用于柯楠因的含量测定.

2.4 校正曲线、精密度及样品的测定

在最优实验条件下, 我们研究了逐渐加入柯楠因后

表1 共存物质的影响

Table 1 Effect of coexistent substances

Coexistent substance	Tolerance/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Relative error/%	Coexistent substance	Tolerance/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Relative error/%
葡萄糖	40	7.1	Na^+ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	20	0.1
麦芽糖	40	-6.9	Ba^{2+} , Cl^-	4	7.8
蔗糖	20	5.4	苯丙氨酸	20	5.1
乳糖	20	-1.8	亮氨酸	2	-8.9
果糖	20	3.0	赖氨酸	2	9.3
Ca^{2+} , Cl^-	20	-2.6	丙氨酸	2	-0.8
Na^+ , Cl^-	20	1.5	谷氨酸	2	8.1
K^+ , Cl^-	20	3.7			

$c(\text{coralyne}) = 0.4 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{A}_{16}) = 0.1 \mu\text{mol/L}$.

表2 样品分析结果及回收率

Table 2 Results of the determination for coralyne and recovery

Sample	Coralyne added/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Coralyne found/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	RSD/% ($n=3$)
1	0.20	0.21	105	3.1
	0.40	0.37	92.5	2.2
2	0.20	0.20	100	2.7
	0.40	0.38	95	2.2

Sample 1: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, BaCl_2 , phenylalanine, glucose; Sample 2: BaCl_2 , lactose, alanine, glutamic acid. The concentrations of coexistent substances are the same as coralyne.

References

- Wang, L. K.; Rogers, B. D.; Hecht, S. M. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 75.
- Wilson, W. D.; Gough, A. N.; Doyle, J. J.; Davidson, M. W. *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 1261.
- Zee-cheng, K. Y.; Cheng, C. C. *J. Pharm. Sci.* **1973**, 62, 1572.
- Joung, I. S.; Çetinkol, Ö. P.; Hud, N. V.; Cheatham, T. E. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 7715.
- Xing, F.-F.; Song, G.-T.; Ren, J.-S. *Chin. J. Appl. Chem.* **2006**, 23, 1404 (in Chinese).

SG I 荧光强度的变化. 实验发现溶液在 530 nm 处荧光强度的增加值与 60~600 nmol/L 的柯楠因浓度范围呈良好线性关系, 线性回归方程是 $\Delta F = 9.2 + 924.4c$ ($n=6$, $r=0.9984$), 检出限(3σ)为 30 nmol/L. 为了验证此方法的可行性, 我们对人工合成样品进行了柯楠因标准加入回收实验(表 2), 得到的回收率在 92.5%~105%之间, 相对标准偏差 RSD 小于 3.1% ($n=3$). 从实验结果来看, 该方法具有良好的准确度和精密度.

3 结论

基于柯楠因与 poly A₁₆ 形成的双螺旋结构使 SG I 的荧光强度增大, 建立了荧光增强定量测定柯楠因的方法. 此法具有操作简单, 灵敏度高等特点, 对于抗癌药物的检测有一定意义, 希望能在控制药品质量和药物用量等方面获得应用.

- (邢菲菲, 宋广涛, 任劲松, 应用化学, **2006**, 23, 1404.)
- 6 Xing, F. F.; Song, G. T.; Ren, J. S.; Chaires, J. B.; Qu, X. G. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 5035.
- 7 Polak, M.; Hud, N. V. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 983.
- 8 Giri, P.; Kumar, G. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 474, 183.
- 9 García, B.; Ibeas, S.; Ruiz, R.; Leal, J. M.; Biver, T.; Boggioni, A.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 188.
- 10 Song, G. T.; Chen, C.; Qu, X. G.; Miyoshi, D.; Ren, J. S.; Sugimoto, N. *Adv. Mater.* **2008**, 20, 706.
- 11 Lü, Z. Z.; Wei, H.; Li, B. L.; Wang, E. K. *Analyst* **2009**, 134, 1647.
- 12 Xu, X. W.; Wang, J.; Yang, F.; Jiao, K.; Yang, X. R. *Small* **2009**, 5, 2669.
- 13 Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e103.
- 14 García-Cañas, V.; González, R.; Cifuentes, A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4479.
- 15 Benson, S. C.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 5720.
- 16 Kanony, C.; Åkerman, B.; Tuite, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7985.
- 17 Chen, X.-Y.; Peng, X.-J. *Chemistry* **2004**, 67, w68 (in Chinese).
- (陈秀英, 彭孝军, 化学通报, **2004**, 67, w68.)
- 18 Vitzthum, F.; Geiger, G.; Bisswanger, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J. *Anal. Biochem.* **1999**, 276, 59.
- 19 Rengarajan, K.; Cristol, S. M.; Mehta, M.; Nickerson, J. M. *Mol. Vision* **2002**, 8, 416.
- 20 Wege, H.; Chui, M. S.; Le, H. T.; Tran, J. M.; Zern, M. A. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, e3.
- 21 Barbesti, S.; Citterio, S.; Labra, M.; Baroni, M. D.; Neri, M. G.; Sgorbati, S. *Cytometry* **2000**, 40, 214.
- 22 Webster, J. R.; Burns, M. A.; Burke, D. T.; Mastrangelo, C. H. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1622.
- 23 Gupta, M.; Yates, C. R.; Meibohm, B. *Anal. Biochem.* **2005**, 344, 292.
- 24 Mondal, S.; Venkataraman, V. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, 70, 773.
- 25 Wang, J.; Liu, B. *Chem. Commun.* **2008**, 4759.
- 26 Williamson, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90, 3124.
- 27 Bagalkot, V.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; Jon, S. Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 8149.
- 28 Rosa, M.; Dias, R.; Miguel, M. D. G.; Lindman, B. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2164.
- 29 Mou, T. C.; Shen, M. C.; Terwilliger, T. C.; Gray, D. M. *Biopolymers* **2003**, 70, 637.
- 30 Persil, Ö.; Santai, C. T.; Jain, S. S.; Hud, N. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8644.

(A1104252 Zhao, C.)