

紫外-可见分光光度法在核酸分析中的应用

学生： 吕震

指导教师： 罗川南 夏方詮

摘要 综述紫外-可见分光光度法测定核酸总量的方法，总结紫外-可见分光光度法研究核酸与小分子之间的相互作用机理。

关键词 核酸 紫外可见分光光度法 小分子

1. 引言

核酸是遗传信息的载体，在生物的生长、发育及繁殖等生命过程中起着十分重要的作用。它是以核苷酸为基本组成的生物信息大分子。天然存在的核酸可以分为脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 两大类。1953 年watson和crick^[1]提出DNA的双螺旋结构模型，从分子水平上阐述了生命遗传信息通过DNA的半保留复制进行代代遗传的机理，从此生物学进入了分子生物学的新时代。

核酸在酶的催化作用下水解为核苷酸。核苷酸完全水解可释放出等量的含氮碱基、戊糖和磷酸。构成核苷酸的五种碱基分别为腺嘌呤(adenine, A)，鸟嘌呤(guanine, G)，胞嘧啶(cytosine, C)，胸腺嘧啶(thymine, T) 和尿嘧啶(uracil, U)。

其中，腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶存在于DNA和RNA分子中，胸腺嘧啶仅存在于DNA分子中，尿嘧啶仅存在于RNA分子中。DNA存在于细胞核和线粒体内，携带遗传基因，决定着细胞和个体的遗传性；RNA存在于细胞质、细胞核和线粒体中，参与遗传信息的复制和表达^[2]。因此，它在生命科学的研究中有着无与伦比的重要，其测定具有重要意义。

核酸是遗传信息的载体，是基因表达的物质基础。核酸在生物的生长、发育及繁殖等生命过程中起着十分重要的作用。许多药物小分子能与核酸发生相互作用，破坏其模板作用，使核酸链断裂，进而影响基因调控和表达功能^[3]。从生物学角度来看，DNA的化学环境就是指DNA周围存在的小分子化合物，研究这些小分子物质与DNA的相互作用，对于认识小分子物质的活性及药物、污染物或毒物在生物体内的作用机理有着极其重要的意义。早在 60 年代，意大利、法国、日本及美国的一些实验室就开展了有关DNA。蒽环抗生素道诺霉素(daunomycin,

DMN)加合物的研究,发现蒽环化合物通过其带正电荷的糖残基与DNA之间的静电作用及蒽环平面与DNA的嵌入结合而形成加合物。道诺霉素的抗癌作用,与其能够和DNA形成加合物也是密切相关的。分子生物学和分子药理学的发展使人们能够从基因水平上理解某些疾病的发病机理,并通过分子设计来寻找有效的治疗药物。DNA靶向化合物成为很重要的药物选择对象。虽然DNA靶向化合物的数量非常之大,但与DNA的结合方式归纳起来可分为非共价结合、共价结合和剪切作用^[4,5]三类。

(1). 非共价作用(可逆相互作用)。这种作用方式受到介质的酸度、离子强度、小分子与DNA的摩尔比等条件的影响,当条件发生改变时,两者作用形式也随之改变,称为可逆的相互作用。A. 静电作用。核酸的电负性磷酸根骨架可同阳离子发生静电作用,导致小分子在DNA表面堆积,这种作用是无选择性的。B. 沟槽结合模式。DNA双链结构中大沟宽度为 1.2nm,小沟宽度为 0.6nm,故一些小分子能与DNA大沟或小沟的碱基对边缘直接发生作用。由于大、小沟模区在电势能、氢键特征、立体效应、水合作用上有很大不同,故大分子蛋白质常与DNA的大槽沟结合,而大多数小分子则与小槽沟结合,小分子往往通过腺嘌呤碱基N-3 上的氮或胸腺嘧啶碱基C-2 上的碳基氧形成氢键而与碱基对结合^[6]。C. 嵌插结合模式。这种结合模式是指具有平面或几乎平面结构的芳香环嵌入DNA碱基对之间,它的作用力来自芳环的离域 π 体系之间的 π - π 相互作用以及疏水相互作用。它是药物小分子与DNA发生作用的重要形式之一。当小分子嵌入碱基对之后,可直接抑制DNA复制与转录。

(2). 共价作用(不可逆相互作用)及剪切作用。共价结合是指小分子化合物与分子中的原子通过形成共价键而结合的相互作用方式。当小分子与DNA结合形成共价键后,经过一系列化学反应,最终导致DNA断裂,这种现象称为剪切作用。

2. 用紫外可见分光光度法测定核酸的量

核酸、核苷酸及核苷的组成成分中均含有嘌呤、嘧啶碱基,这些碱基都具有共轭双键,因而它们都具有吸收紫外光的特性,能吸收250-290 nm波段的紫外光,最大吸收波长在260nm波长处。利用紫外分光光度法定量测定核酸时,规定在260 nm波长下,每毫升含1微克DNA溶液的吸光度为0.020,而每毫升含1微克RNA溶

液的吸光度为0.022。利用分光光度法还可以定性鉴定核酸的纯度。蛋白质的最大吸收波长值于280 nm。测出样品的 A_{260} 与 A_{280} ，从 A_{260}/A_{280} 的比值即可判断样品的纯度。纯DNA的 A_{260}/A_{280} 应大于1.8，纯RNA的 A_{260}/A_{280} 应达到2.0^[7]。通常当A值为1时相当于50 $\mu\text{g/mL}$ 双链DNA。为增强紫外分光光度法测定核酸的准确度，很多人使用有机染料与核酸作用，通过核酸对吸光度的减色作用来测定核酸。作用机理是有机阳离子试剂以静电引力的方式与DNA上带负电荷的磷酸基相互作用，使有机阳离子发生电荷跃迁的几率减小，导致吸光度减小。目前作为标记物测定的阳离子试剂有以下几种：

(1) 甲基紫^[8]

当pH值为7.0时，甲基紫的 λ_{max} 位于579 nm处，随着DNA的加入，溶液的紫外吸收减小，据此建立了测定微量DNA的方法。

(2) 甲基胺蓝^[9]

甲基胺蓝的水溶液在628nm处有一最大吸收峰，当有痕量DNA存在时，与甲基胺蓝形成复合物，游离的试剂减少，导致最大吸收波长处吸光度值减小。吸光度值的变化程度与浓度成正比，从而用于测定。

(3) 乙基紫^[10]

在pH值6.4-7.4的条件下，乙基紫的 λ_{max} 位于595nm。向该溶液中加入DNA后，乙基紫的吸光度值明显下降，这一反应可用于的定量测定。

(4) 甲基绿^[11]

在pH值为7.9的Tris-HCl缓冲液中，甲基绿与DNA混合，加热至45℃，逐步形成蓝绿色复合物，最大吸收波长为630nm。吸光度值与一定浓度DNA成正比，因此体系可测量DNA的含量。

(5) 喹哪啶蓝^[12]

在pH值为5.0-8.2的水溶液中，喹哪啶蓝可以在DNA的表面发生堆集。随着DNA的加入，598处的吸光度值明显降低，据此建立了定量测定DNA的方法。

3. 紫外-可见分光光度法研究小分子与核酸的作用

利用紫外-可见吸收光谱法是研究小分子与核酸相互作用机理最常用、方便的方法。由于DNA分子中的碱基具有光学活性，在260nm附近有吸收，许多DNA靶向分子或本身具有光学活性，或与DNA分子结合后产生光学活性，因此用光

谱方法通过考察DNA结合其靶向分子后结构上的变化来研究结合机理，是非常有效和应用最为广泛的方法，其中紫外/可见吸收光谱更是研究DNA与其靶向分子相互作用的一种最方便，最常用的技术。增色、减色效应是DNA特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质。通常其它分子与DNA以嵌入方式结合后会导致其吸收谱带变宽，吸收峰红移及减色效应；而盐类离子可与DNA骨架的磷酸基团结合使DNA收缩而产生减色效应；酸碱可与DNA分子中的碱基作用破坏DNA的双螺旋结构而产生增色效应^[13]。通过研究不同条件时的紫外吸收光谱，胡华^[14]对除草剂苯噻草胺使狗尾草DNA变性和吸光度发生变化的机理做出了合理解释：苯噻草胺分子含有苯并噻唑环，它与嘌呤的结构十分相似，可以嵌入狗尾草DNA分子双螺旋结构的碱基对中，同时引起DNA构象发生变化，原本紧密刚性的双螺旋结构开始变得松散，链上碱基外露，苯噻草胺的噻唑环上S的电负性大于嘌呤碱基中的N，可以破坏DNA碱基间的氢键，使双链DNA解开，造成紫外吸收光值增加。石艳红^[11]用紫外光谱法和伏安法证实，苯噻草胺可在水田植物DNA表面堆积，抑制DNA的复制，从而除草。刘晨^[15]从灿烂甲酚蓝(BCB)-DNA体系紫外-可见吸收光谱的最大吸收波移动的角度阐述了灿烂甲酚蓝分子和DNA的作用机理。随DNA浓度增大，吸收减小，波长紫移，其原因应归结为BCB在DNA分子表面的聚集^[16]，即BCB在DNA表面发生了堆积^[17]。而当BCB与DNA的质量比小于一定值后，吸收又开始增大，伴随有波长红移的现象，其原因可能是BCB单体与DNA作用，使BCB在溶液中的二聚平衡向单体方向移动，使二聚体浓度下降而单体浓度相应增大所致。由于BCB满足“嵌入模型”^[18]的结构特征，即平面结构和正电性，而波长红移又是发生嵌入作用的标志之一^[19]。由此推测，随DNA浓度的升高，BCB与DNA的作用可能经历了由表面聚集方式为主到以嵌入方式为主的转变。

参考文献:

- [1] Cao Kai-Ming, Li Bi-Yu, Peng Ze-guo. An Introduction to the Chemistry of Nucleic Acids. Shanghai: Fudan University Press, 1991.
- [2] 周爱儒, 查锡良. 生物分析[M]. 北京:人民卫生出版社. 2006, 34.
- [3] 刘金凯. 喹诺酮类药物与核酸、蛋白质的相互作用研究及其分析测定[D]. 山东师范大学硕士学位论文, 2003.

- [4] 张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀. DNA 与其靶向分子相互作用研究进展[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(8): 1210-1217.
- [5] 卢继新, 张贵珠, 黄志娜, 等. 巯嘌呤金属配合物与小牛胸腺 DNA 的作用[J]. 化学学报, 2002, 6: 967-976.
- [6] Bromley S D, Ward B, Dabrowjak J C. Cationic porphyrins as probes of DNA structure. *Nucleic Acid Res*, 1986, 14(22): 9133-9148.
- [7] 刘箭. 生物化学实验教程[M]. 北京: 科学出版社. 2005, 53.
- [8] 宋功武, 方光荣, 冯健. 甲基紫-核酸分子相互作用的紫外-可见光谱及其分析应用[J]. 分析化学, 2000, 28(1): 128.
- [9] Killeen A A. Visible Spectrophotometric Assay for Submicrogram Quantities of DNA[J]. *Microchem*, 1995, 52(3): 333-340.
- [10] 李天剑, 沈含熙, 罗云敬. 乙基紫标记分光光度法测定脱氧核糖核酸[J]. 分析化学, 1998, 26(11): 1372-1375.
- [11] 石艳红. 早熟禾和黄豆 DNA 的提取及与苯噻草胺的相互作用研究[D]. 湖南大学硕士毕业论文, 2003.
- [12] 吴会灵, 李文友, 何锡文. 喹哪啶蓝与核酸作用的光谱研究及分析[J]. 应用化学, 2002, 19(7): 672-676.
- [13] 曹瑛, 何锡文. 吩嗪染料与 DNA 分子相互作用的紫外-可见光谱研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, 19(5): 714-716.
- [14] 胡华. 溶栓剂基因的克隆与载体构建及苯噻草胺与旱地植物 DNA 相互作用的研究[D]. 湖南大学硕士论文, 2003.
- [15] 刘晨. 共振光散射法与荧光法测定 DNA 的研究与应用[D]. 湘潭大学硕士毕业论文, 2001.
- [16] 赵一兵, 王冬媛, 许可慰, 等. 自猝灭荧光探针法测定 DNA[J]. 高等学校化学学报, 1997 (18): 691-695.
- [17] Liu Xiao-jing, Li Yuan-zong, Ci Yun-xiang. Time-resolved Florescence studies of interaction of the Eu^{3+} complex of Tetracycline analogues with DNA, *Anal Chim Acta*, 1997 (345): 213-217.
- [18] 宋功武, 成耀鹏, 何治柯. 小柴碱与核酸作用荧光光谱及其分析应用[J]. 分析化学, 1999, 1 (27): 44-46.

- [19] 曹瑛, 何熙文. 吩嗪染料与 DNA 相互作用的紫外-可见光谱研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, 5(19): 714-716.

