

文章编号: 1000-5013(2007)01-0034-04

TAPP 与 DNA 作用的共振光散射光谱校正

杨传孝¹, 黄承志²

(1. 华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 用吸收装置改变荧光分光光度计入射光的光路, 获得光源的强度光谱和样品的透光光谱, 并在同一台仪器上建立一种简单的分离表观吸收光谱中吸收和散射成分的方法. 通过对 TAPP(2,6-二(对三甲氨基苯基)吡啶)与 DNA 作用的共振光散射光谱进行校正, 结果表明, 校正表观分子吸收后, 灵敏度提高了 2 倍左右. 校正仪器影响后, 从 F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计获得表观吸收光谱中分离出的 TAPP 与 DNA 作用的散射成分, 其形状基本一致.

关键词: 共振光散射; 光谱校正; 2,6-二(对三甲氨基苯基)吡啶; 小牛胸腺 DNA (ctDNA)

中图分类号: O 657.31; Q 520.3; O 433.4

文献标识码: A

用普通荧光分光光度计建立起来的共振光散射(RLS)技术, 可以十分方便的表征分子的组装或聚集. 在化学和生化分析中得到了广泛的应用^[13]. 在用 RLS 技术表征分子的散射光谱时, 大的摩尔吸光系数、分子间强的电子偶合, 以及分子聚集产生的大颗粒将导致 RLS 光谱具有特殊的形状. 但荧光分光光度计的仪器条件会使 RLS 光谱发生畸变, 分子的摩尔吸光系数越大, 分子对激发光和散射光吸收得越多, 进而导致测定的灵敏度降低, 因此有必要对 RLS 强度^[4-5]和形状进行校正. 为了估计表观吸收光谱中的散射成分, 文[5-6]分别提出了校正 RLS 光谱及分离吸收和散射的方法. 然而, 这些方法都是不同仪器上进行的, 且文[5]要考虑散射体的结构因素和极化效应, 文[6]要把 $I_0(\lambda)$ 假定为常数. 为了消除仪器因素对 RLS 光谱形状和介质吸收对检测灵敏度的影响, 我们用吸收装置改变 F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计入射光的光路, 直接测定体系的分子吸收. 在同一台荧光分光光度计上对 TAPP-DNA 体系的 RLS 信号进行校正, 并把散射成分从表观吸收光谱中分开.

1 实验部分

1.1 仪器

F-2500 和 F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司), 吸收装置(F-2500 型荧光分光光度计附件), PHS-3C 酸度计(上海大分析仪器厂), MVS-1 型旋涡混合器(北京北德科学仪器公司).

1.2 试剂

聚羧酸酯微球; 小牛胸腺 DNA (ctDNA), 中国科学院北京北泰生物化学有限公司; 鱼精子 DNA (fsDNA, 中国科学院上海生物化学研究所), 酵母 RNA (yRNA, 中国科学院上海生物化学研究所) 直接溶于水中配成. 其准确浓度由 260.0 nm 处的吸光度值确定, 并于 04℃ 冰箱保存, 操作溶液浓度为 20 mg · L⁻¹. 2,6-二(对三甲氨基苯基)吡啶(TAPP)为本实验室自行合成, 并通过 IR 和¹H NMR 鉴定, 其浓度使用 Soret 带的吸收来标定. 操作溶液浓度为 53 μmol · L⁻¹, tris-HCl 缓冲溶液 (pH 值为 7.48) 被用来控制溶液的酸度. 使用二次蒸馏水, 所用试剂均为分析纯.

1.3 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 0.4 mL ctDNA 和 0.3 mL TAPP, 旋涡混合后再加入 1.0 mL tris-

收稿日期: 2006-07-11

作者简介: 杨传孝(1970-), 男, 讲师, 主要从事生化环境分析的研究. E-mail: cxyang@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20425517, 20575023); 福建省自然科学基金资助项目(2006J0261); 华侨大学科研基金资助项目(06HZR15)

HCl 缓冲溶液,旋涡混合,最后用二次蒸馏水稀释至刻度配制成 TAPP-ctDNA^[2]溶液.把配制好的溶液置于 F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计上,在 $\lambda_{em} = \lambda_{ex}$ 处进行同步扫描,获得表观 RLS 光谱,荧光分光光度计的激发和发射狭缝始终保持为 5.0 nm. 改用吸收装置后,在 $\lambda = 0$ 处进行同步扫描,获得光源的强度光谱 ($I_0(\lambda)$) 和样品的透光光谱 ($I_t(\lambda)$),用荧光分光光度计上的函数把 $I_0(\lambda)$ 和 $I_t(\lambda)$ 相除,可以得到 $I_0(\lambda)/I_t(\lambda)$ 的值.然后,把表观 RLS 光谱和 $I_0(\lambda)/I_t(\lambda)$ 的数据用 Excel Microsoft 处理,便可得表观吸收光谱中的散射成分 ($S(\lambda)$).

2 结果与讨论

2.1 表观吸收光谱中散射成分的分离

当一束强度为 $I_0(\lambda)$ 的入射光通过散射体系时,由于介质的吸收和散射使入射光强减弱,其强度衰减为 $I_t(\lambda)$. 即

$$I_t(\lambda) = I_0(\lambda) e^{-2.303E(\lambda)}, \quad E(\lambda) = A(\lambda) + S(\lambda). \quad (1)$$

在普通的荧光分光光度计上收集到的 RLS 信号 I_{RLS} 校正吸收后,RLS 强度 I_{cor} 可表示为^[4]

$$I_{cor}(\lambda) = I_{RLS}(\lambda) \{ (2.303 \log I_0(\lambda)/I_t(\lambda)) / [1 - I_t(\lambda)/I_0(\lambda)] \}^2, \quad (2)$$

若只考虑散射对入射光强度减少 ($I_t(\lambda)$) 的贡献,在普通荧光分光光度计上获得的 RLS 强度与 $I_t(\lambda)$ 之间的关系为

$$I_{cor}(\lambda) = I_0(\lambda) (1 - e^{-2.303S(\lambda)}) = I_0(\lambda) (2.303S(\lambda) - \frac{1}{2!}(2.303S(\lambda))^2 + \frac{1}{3!}(2.303S(\lambda))^3 - \dots). \quad (3)$$

当 $S(\lambda) = s(\lambda)bc < 0.05$ 时, $I_{cor}(\lambda) = 2.303 I_0(\lambda) s(\lambda)bc$. 其中, $s(\lambda)$ 为散射系数, b 为吸收池的厚度, C 为样品浓度. 可见,在样品浓度较小时,RLS 强度与溶液浓度之间呈很好的线性关系. 当 $s(\lambda)bc > 0.3$ 时,忽略式(3)第 2 项以后各项,相对误差在微量、痕量分析允许误差 $\pm 10\%$ 范围内,式(3)可变形为

$$I_{cor}(\lambda) = I_0(\lambda) (2.303S(\lambda) - \frac{1}{2}(2.303S(\lambda))^2). \quad (4)$$

在非吸收散射小球体系中, $I_t(\lambda)$ 主要是由散射引起,因此, $E(\lambda) = S(\lambda)$. 我们用吸收装置改变 F-2500 荧光分光光度计的光路,获得非吸收散射小球体系的表观吸光度 ($\log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere}$). 由此,在聚羧酸酯散射小球体系的 RLS 强度 I_{RLS}^{sphere} 与 $\log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere}$ 之间的关系为

$$I_{RLS}^{sphere}(\lambda) = I_0(\lambda) (2.303 \log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere} - \frac{1}{2} (2.303 \log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere})^2). \quad (5)$$

不同波长处的二次函数拟合曲线,如图 1 所示. 这与 Collings 等^[5]得出的聚苯乙烯散射小球体系的 RLS 强度与表观吸光度(分光光度计上获得)之间符合二次函数拟合的结论一致. 从图 1 可以看出,不同波长处的 I_{RLS} 和 $\log (I_0/I_t)$ 的二次函数拟合曲线差别很大,这主要是由于不同波长处的 $I_0(\lambda)$ 不同,如图 2 曲线 3 所示. 为了消除 $I_0(\lambda)$ 对 RLS 光谱的影响,将式(4)除以式(5),可得

$$\frac{[S(\lambda) - 1.152S(\lambda)^2] / [\log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere}]}{1.152(\log [I_0(\lambda)/I_t(\lambda)]_{sphere})^2} = I_{cor} / I_{RLS}^{sphere}. \quad (6)$$

由此可求出 $S(\lambda)$, 于是有 $A(\lambda) = \log I_0(\lambda)/I_t(\lambda) - S(\lambda)$.

2.2 RLS 强度的校正

如图 2 所示, F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计上直接获得 TAPP 和 ctDNA 作用的表观 RLS 光谱形状明显不同. F-2500 荧光分光光度计上获得的表观 RLS 光谱,如图 2(a) 曲线 1 所示,在 285 nm 和 432 nm 处,RLS 峰的强度相差不大. 但 F-4500 荧光分光光度计上获得的表观 RLS 光谱,如图 2(b) 曲线 1 所示,在 302 nm 处,RLS 峰的强度明显的低于 437 处的 RLS 峰强度. 图中, TAPP 浓度 (C_T) 为 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

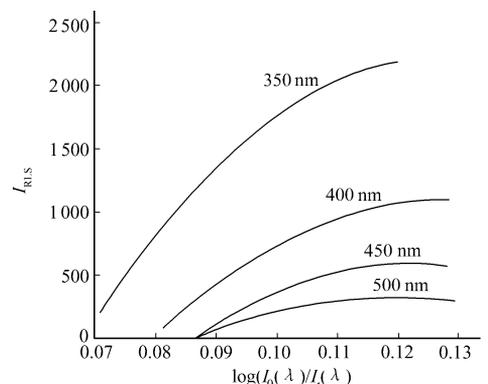
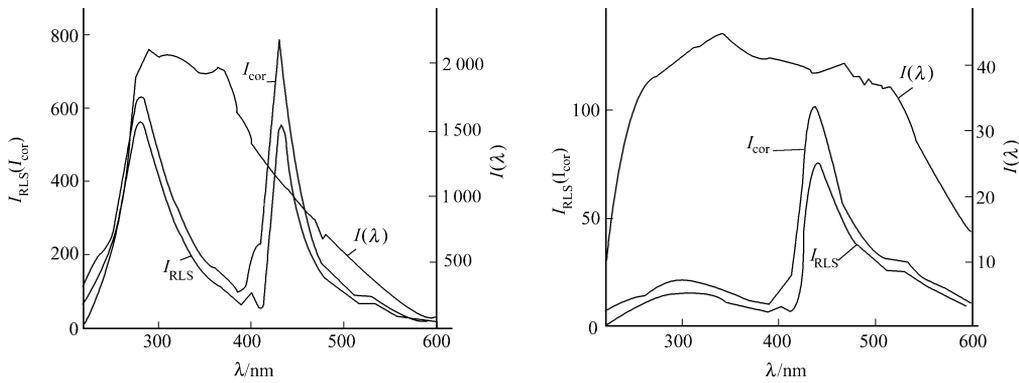


图 1 I_{RLS} 和 $\log (I_0/I_t)$ 的二次函数拟合曲线
Fig. 1 Least-squares quadratic fits between I_{RLS} and $\log (I_0/I_t)$



(a) F-2500 荧光分光光度计

(b) F-4500 荧光分光光度计

图2 TAPP与ctDNA作用的RLS光谱

Fig. 2 The RLS spectra of interaction of TAPP and ctDNA

ctDNA 的质量浓度 (C_D) 为 $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 7.48. 根据式 (2) 校正表观吸收后 RLS 光谱(图 2 曲线 2) 形状基本不变, 但 RLS 强度明显增强. 在 F-2500 荧光分光光度计上校正表观吸收后, TAPP 测定 DNA 的灵敏度可以提高 2 倍左右, 如表 1 所示, 且 TAPP 的浓度越大, 灵敏度增加倍数 (n) 越多. 表 1 中, r 为相关系数, n 为相同条件下校正表观吸收前后线性方程斜率之比, pH = 7.48, $\lambda = 432 \text{ nm}$; 线性拟合方程中, C 的单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

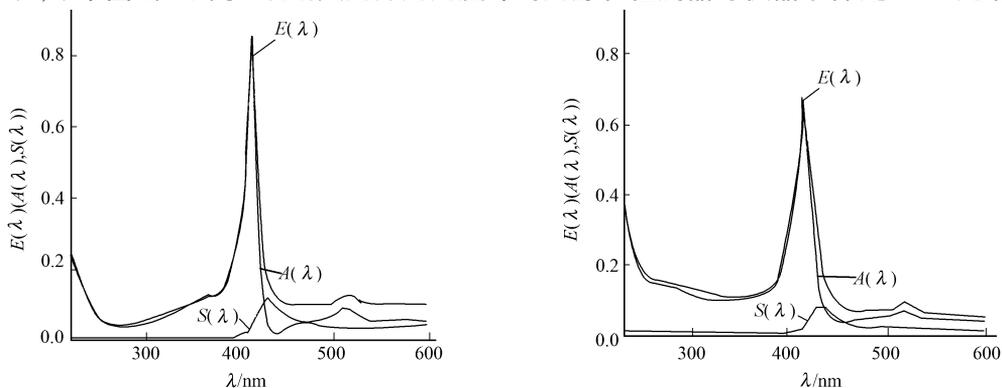
表 1 测定 DNA 的分析参数

Tab. 1 Analytical Parameters for the determination of DNA

$C_T / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_D / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	线性拟合方程 1	r_1	线性拟合方程 2	r_2	n
1.6	0.031.00(ctDNA)	$I = 15.1 + 579.7C$	0.990 3	$I_{cor} = -15.2 + 940.2C$	0.994 8	1.62
2.7	0.061.40(ctDNA)	$I = -53.6 + 479.8C$	0.997 4	$I_{cor} = -194.3 + 969.4C$	0.997 2	2.02
4.2	0.051.60(ctDNA)	$I = -74.8 + 466.1C$	0.996 2	$I_{cor} = -204.6 + 979.6C$	0.994 3	2.10
1.6	0.021.20(fsDNA)	$I = -4.4 + 783.8C$	0.994 0	$I_{cor} = -91.7 + 1353.9C$	0.996 2	1.72
1.6	0.071.20(yRNA)	$I = -17.5 + 256.6C$	0.995 4	$I_{cor} = -33.2 + 370.9C$	0.996 3	1.46

2.3 仪器条件影响的校正

F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计的光源发出的入射光强度光谱 ($I_0(\lambda)$) 有较大的差别, F-2500 荧光分光光度计的 $I_0(\lambda)$ 在 290 nm 左右出现最大峰, 在 360 nm 以后迅速减弱, 如图 2(a) 曲线 3 所示; 而 F-4500 荧光分光光度计的 $I_0(\lambda)$ 出现一个宽峰, 在 260 nm 至 510 nm 之间, $I_0(\lambda)$ 的强度变化较为平缓, 340 nm 处的强度最大, 如图 2(b) 曲线 3 所示. 在同图 2 相同实验条件下, 根据式 (6) 消除 $I_0(\lambda)$ 的影响后, 在 F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计上, 所获得的表观吸收光谱中的散射成分 ($S(\lambda)$) 形状基本一致, 如图 3(a, b) 中曲线 3 所示. 说明荧光分光光度计的光源和检测器等仪器条件是 RLS 光谱形状发生



(a) F-2500 荧光分光光度计

(b) F-4500 荧光分光光度计

图3 荧光分光光度上获得的散射成分

Fig. 3 Scattering components obtained from spectrofluorometer

畸变的主要因素.如图 3 所示,校正 RLS 光谱形状后,TAPP 和 ctDNA 作用的 $S(\lambda)$ 光谱只在分子吸收带(最大吸收在 412 nm 处)的长波方向出现一个 RLS 峰(432 nm 处),说明 TAPP 在 DNA 分子上发生聚集,在分子最大吸收的长波区产生了 Pasternack^[1]等提出的共振光散射效应.图 3 中, $S(\lambda)$ 的强度明显低于表观吸收光谱 $E(\lambda)$ 和吸收光谱 $A(\lambda)$,说明 TAPP 和 ctDNA 作用的 $S(\lambda)$ 对 $I(\lambda)$ 的贡献远远小于 $A(\lambda)$ 的贡献.

3 结束语

校正表观分子吸收对 RLS 光谱的影响后,TAPP 测定 DNA 的灵敏度有了显著的提高.F-2500 和 F-4500 荧光分光光度计上获得的表观吸收光谱中分离出 TAPP 和 DNA 作用的散射成分,其形状基本一致,表明分子吸收和荧光分光光度计的仪器条件是影响 RLS 方法灵敏度及光谱形状的主要因素.本方法操作简单,且在同一台仪器上进行,减少了因仪器不同而带来的误差,可为 RLS 光谱产生机理的研究提供一种新的表征手段.

参考文献:

- [1] PASTERNAK R F, BUSTAMANTE C, COLLINGS P J, et al. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light scattering technique[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115:5 393-5 399.
- [2] HUANG Chengzhi, LI Ke-an, Tong Sherr-yang. Determination of nucleic acids by a resonance light-scattering technique with $\text{Co}(\text{TPAPP})^{2+}$ -tetrakis-[4-(trimethylammoniumyl) phenyl] porphine[J]. Anal Chem, 1996, 68(13): 2 259-2 260.
- [3] 杨传孝,李原芳,黄承志. 丽春红 G 用于血清总蛋白的共振光散射测定[J]. 分析化学, 2003, 31: 148-152.
- [4] YANG Chuan-xiao, LI Yuan-fang, HUANG Cheng-zhi. Determination of proteins with fast red VR by a corrected resonance light scattering technique[J]. Anal Sci, 2003, 19: 211-215.
- [5] COLLINGS P J, GIBBS E J, STARR T E, et al. Resonance light scattering and its application in determination the size, shape, and aggregation number for supramolecular assemblies of chromophores[J]. J Phys Chem B. 1999, 103:8 474-8 481.
- [6] NORBERTO M, FRANCESCO M, MARIANGELA C, et al. Separation of scattering and absorption contributions in UV/visible spectra of resonant systems[J]. Anal Chem, 2001, 73:4 958-4 963.

Studies on the Interaction of $\text{Co}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Cu}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Ni}(\text{TPAPP})^{2+}$ -Tetrakis [4-(Trimethylammoniumyl) Phenyl] Porphine with DNA by Corrections of Resonance Light Scattering Spectra

YANG Chuan-xiao¹, Huang CHEN G-zhi²

(1. College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. College of Chemistry and Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: By changing the propagation direction of the incident light beam of a common spectrofluorometer through an absorption cell holder, the incident light spectrum and the transmitted light spectrum are directly measured through a spectrofluorometer. A simple corrected resonance light-scattering technique was established to separate absorbance and scattering components from apparent absorption spectrum. With measurement of the resonance light scattering signals, after which the molecular effect was corrected, the interaction of $\text{Co}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Cu}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Ni}(\text{TPAPP})^{2+}$ -Tetrakis[4-(trimethylammoniumyl) phenyl] porphine (TAPP) with DNA, the detection sensitivity could be improved about two fold and the shape of scattering components separated from F-2500 and F-4500 spectrofluorometer was identical when the instrumental effect was corrected.

Keywords: resonance light scattering; spectrum correction; $\text{Co}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Cu}(\text{TPAPP})^{2+}$, $\text{Ni}(\text{TPAPP})^{2+}$ -tetrakis (4-(trimethylammoniumyl) phenyl) porphine; calf thymus DNA

(责任编辑: 黄仲一)