

文章编号: 1000-5013(2011)06-0646-06

阴离子聚电解质诱导硫代黄素 T 激基缔合物的形成因素分析

唐琪, 孙向英, 李芳

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 研究在水溶液中阴离子聚电解质聚乙烯磺酸钠(PVS)诱导阳离子型染料硫代黄素 T(ThT)激基缔合物的形成,考察在 PVS 存在下, ThT 在水溶液中形成激基缔合物的影响因素. 通过光谱实验及量化理论计算方法,比较 ThT 与 PVS, PSS 和 PAA 聚电解质之间的相互作用. 结果表明:溶液 pH 值、溶剂和电解质的浓度对 ThT 激基缔合物的形成均有显著的影响;PSS, PVS 可诱导 ThT 形成激基缔合物,而 PAA 则无法诱导形成缔合物;通过静电吸引作用, PVS 可以增加 ThT 的局部浓度,从而显著地促进 ThT 激基缔合物的形成.

关键词: 硫代黄素 T; 激基缔合物; 荧光分析; 聚电解质; 量子化学

中图分类号: O 631.3; O 657.3

文献标志码: A

激基缔合物^[1-2]是指一个处于基态的荧光团和另一个处于激发态且具有同样结构的荧光团之间发生相互作用形成的复合物. 在大多数情况下,可以观测到单体和激基缔合物的双重荧光发射峰. 激基缔合物特有的发光特征可用作探针,在一些科学研究中已经获得应用^[3-5]. 由于激基缔合物的形成或破坏所引起的光谱行为变化是其作为探针应用的重要依据,所以研究激基缔合物形成的基本条件和有关的热力学数据,对其充分发挥探针的作用是十分重要的. 聚电解质^[6-11]是指主链或侧链带有可电离基团的高分子,在水溶液或强极性溶剂中可电离为聚离子和反离子,由于分子链上电离基团之间强的长程静电相互作用,导致其有许多与中性高分子不同的特性. 硫代黄素 T(ThT)是一种阳离子荧光试剂,多用于检测 DNA 和淀粉质体^[12-14]. 本文研究水溶液中聚阴离子电解质聚乙烯磺酸钠(PVS)诱导阳离子型染料硫代黄素 T 激基缔合物的形成,并考察 PVS 存在下, ThT 在水溶液中形成激基缔合物的影响因素.

1 实验部分

1.1 试剂

硫代黄素 T(ThT, 比利时 Acros 公司), 聚苯乙烯磺酸钠(PSS, 比利时 Acros 公司); 聚乙烯磺酸钠(PVS, 北京百灵威化学技术有限公司), 聚丙烯酸(PAA, 北京百灵威化学技术有限公司); 实验用水为 Milli-Q 基础型(美国 Millipore 公司)纯化水系统提供的二次水.

1.2 仪器

Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国 Varian 公司); UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计(美国 Unico 公司).

2 结果与讨论

2.1 硫代黄素 T 浓度对其荧光光谱的影响

取一系列 10 mL 的比色管,各加入 1.00 mL 的 10.0 mmol · L⁻¹的硫代黄素 T 溶液和不同体积的

收稿日期: 2011-05-11

通信作者: 孙向英(1965-),女,教授,主要从事光化学和电化学传感分析的研究. E-mail:sunxy@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20955001; 20575023); 福建省自然科学基金资助项目(D0810016); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2008 年度)

0.10 mg · L⁻¹ 聚阴离子电解质 (PVS, PSS 和 PAA), 定容到 10 mL. 固定荧光激发波长为 335 nm, 狭缝为 5.0 nm/10 nm, 分别扫描 ThT 溶液在荧光池中的荧光光谱, 如图 1 所示. 由图 1 可见: 硫代黄素 T 荧光强度 (I) 随硫代黄素 T 浓度的变大先增大后减小, 在 0.100 mmol · L⁻¹ 时荧光强度达到最大. ThT 荧光光谱随着自身浓度的增大发生红移, 形成二聚体, 但是始终没有激基缔合物的荧光峰出现.

不同浓度硫代黄素 T 的紫外可见吸收光谱曲线, 如图 2 所示. 图 2 中: D 为光密度. 从图 2 可知: 低浓度时, ThT 主要以单体形式存在, 在 412 nm 处有吸收峰; 随着 ThT 浓度的增大, 在 255 nm 处出现明显的吸收峰, 该峰可能归属于硫代黄素 T 二聚体的形成. 412 nm 处的特征吸收峰强度随着 ThT 溶液浓度的增大而增强.

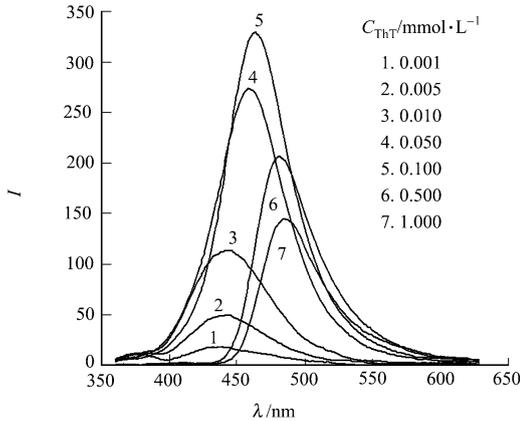


图 1 不同浓度 ThT 水溶液的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of ThT aqueous solution with different concentration

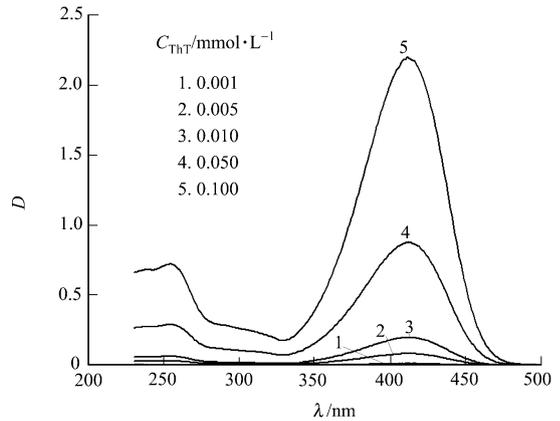


图 2 不同浓度 ThT 水溶液的紫外可见吸收光谱

Fig. 2 Ultraviolet-visible absorption spectra of ThT aqueous solution with different concentration

2.2 PVS 诱导 ThT 激基缔合物的形成

在 1.00 mmol · L⁻¹ 的 ThT 各溶液中加入不同浓度的聚乙烯磺酸钠 (PVS) 溶液, 稳定后测定溶液的荧光光谱, 如图 3 所示. 从图 3 可知: 当 ThT 水溶液没有 PVS 时, ThT 主要以二聚体形式存在, 荧光发射峰 $\lambda_{em} = 484$ nm; 加入少量 PVS 引起二聚体荧光强度降低, 同时在长波长方向出现一个新的相对较宽的激基缔合物的荧光发射峰 ($\lambda_{em} = 556$ nm). 此外, 随着 PVS 浓度的增加, 484 nm 处的二聚体荧光峰强度逐渐减弱后不变, 556 nm 处的激基缔合物荧光峰强度逐渐增强.

聚乙烯磺酸钠 (PVS) 在诱导不同浓度的 ThT 时形成激基缔合物的情况不相同. 在 0.100 mmol · L⁻¹ 的 ThT 各溶液中加入聚乙烯磺酸钠溶液形成荧光强度较弱的激基缔合物, 而 1.00 mmol · L⁻¹ 的 ThT 与 PVS 能形成荧光强度较强的激基缔合物. 因此, 以 1.00 mmol · L⁻¹ 的 ThT 与 PVS 作用形成的激基缔合物为例, 研究 PVS 诱导 ThT 形成激基缔合物的影响因素.

2.3 PVS 诱导 ThT 形成激基缔合物的影响因素

2.3.1 溶液 pH 值 ThT 分子是通过静电吸引作用局部浓缩在 PVS 大分子周围形成激基缔合物的, 所以硫代黄素 T 分子是否质子化应该是形成激基缔合物的一个关键条件. 为了证明它们之间的静电吸引作用对形成激基缔合物的重要性, 研究了溶液 pH 值对 ThT 分子形成激基缔合物的影响. 当溶液呈酸性时, ThT 分子易质子化带正电荷. 在 0.03 g · L⁻¹ PVS 和 1.00 mmol · L⁻¹ ThT 的混合溶液中, 不同 pH 值的 ThT 水溶液的荧光光谱, 如图 4 所示.

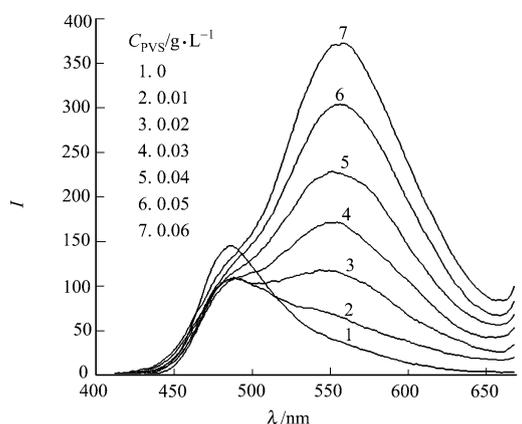


图 3 PVS 存在下 ThT 水溶液的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of ThT aqueous solution at various concentration of PVS

从图 4 可以看出: ThT 为酸性和中性条件下, 其在 484 nm 处出现二聚体峰, 并且在长波方向 556

nm 处也有一个无精细结构的激基缔合物的荧光峰出现;当 ThT 分子在 pH 值为 12.4 的碱性条件时,仅在 430 nm 处出现单体的荧光峰. 这是因为碱性条件下,ThT 分子没有质子化,不能通过静电吸引作用聚集在 PVS 大分子周围,从而不利于硫代黄素 T 的激发态分子和基态分子相互作用形成激基缔合物并产生荧光. 当 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ThT 为酸性和中性时,其在 484 nm 处有一个二聚体峰,但在强碱条件下只在 430 nm 处出现单体的荧光峰.

2.3.2 溶剂性质 分别配制了 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ThT 的水、乙醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜溶液,再加入 $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的聚电解质 PVS,测定其荧光光谱,如图 5 所示. 从图 5 可知:在 ThT 的水溶液中有二聚体和激基缔合物的双重荧光峰出现,而在乙醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜溶液中,只有二聚体的荧光峰. 这是因为聚电解质的溶液性质与所用溶剂性质关系很大.

在离子化溶剂中,聚电解质^[15]容易发生离解,在溶液中形成高分子离子和小分子反离子,表现出电解质的性质,它不仅和普通高分子的溶液性质不同,而且还表现出低分子电解质没有的特殊行为. 但是若采用非离子化溶剂,则其溶液性质与非电解质相似. 因此,聚电解质 PVS 在水中容易离解成高分子阴离子,能够静电吸引带正电荷的 ThT 分子,促使 ThT 在 PVS 大分子周围的局部浓度增大,有利于 ThT 的激发态分子和基态分子相互作用形成激基缔合物并产生荧光;而聚电解质 PVS 在乙醇、丙酮、乙腈、二甲亚砜溶液中却不容易离解,很难与 ThT 键合使其形成激基缔合物.

2.3.3 电解质 由于 ThT 激基缔合物的形成是由于正负离子间的静电作用引起的,因此加入电解质肯定会影响 ThT 与聚电解质分子 PVS 之间的键合. 在 $0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVS 和 $1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ThT 的混合溶液中,电解质氯化钠对 ThT 二聚体及其激基缔合物荧光光谱的影响,如图 6 所示.

从图 6 可知:逐渐加入氯化钠会导致激基缔合物荧光强度逐渐降低,而二聚体荧光逐渐增强;当 NaCl 浓度达到 $0.100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,激基缔合物荧光峰基本上消失,只能观察到二聚体的荧光峰;再继续增加盐的浓度,IE/IM 变化不大. 这是因为电解质氯化钠可以“屏蔽”PVS 的负离子和 ThT 正离子之间的静电吸引作用^[16],从而在 PVS 大分子周围不再出现 ThT 分子的“局部浓缩”现象,因而不再形成激基缔合物.

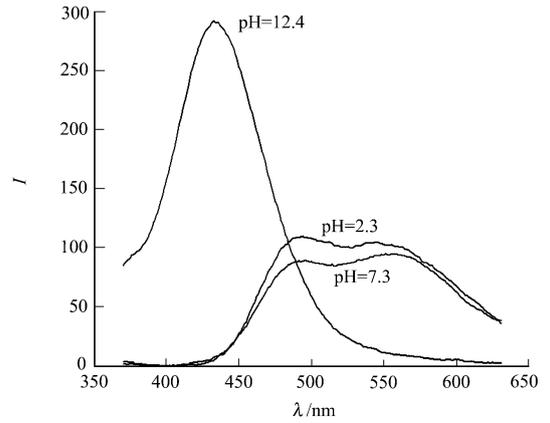


图 4 不同 pH 值的 ThT 水溶液的荧光光谱
Fig. 4 Fluorescence spectra of ThT aqueous solution at different pH value

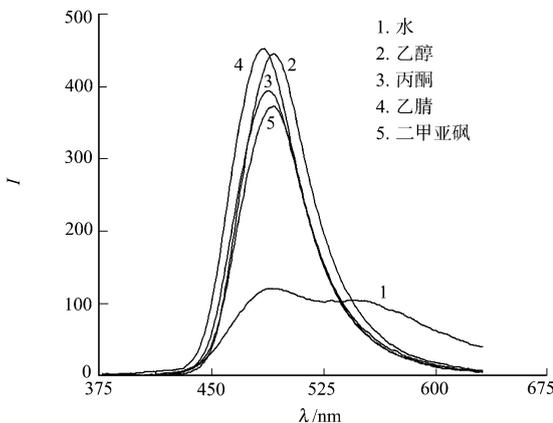


图 5 ThT 在不同溶剂中的荧光光谱
Fig. 5 Fluorescence spectra of ThT in different solvents

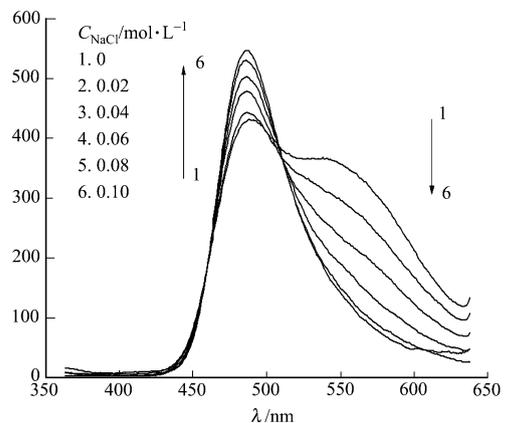


图 6 NaCl 对 ThT 水溶液荧光光谱的影响
Fig. 6 Effects of NaCl to fluorescence spectra of ThT aqueous solution

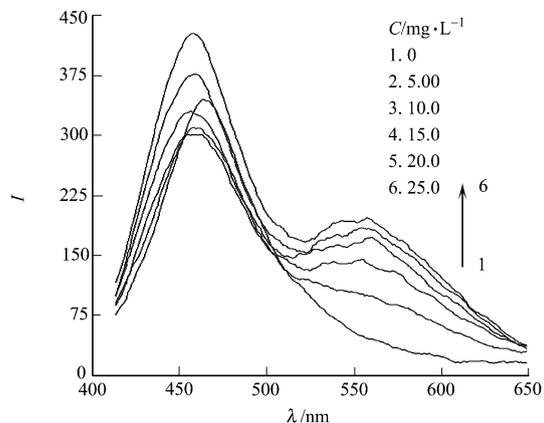
2.4 ThT 与不同聚阴离子的作用比较

2.4.1 荧光光谱和紫外可见吸收光谱分析 在 $0.100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ThT 溶液中,加入不同浓度的聚

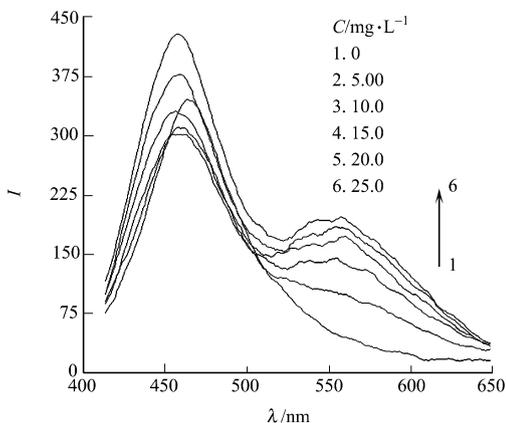
乙烯磺酸钠(PVS)、聚苯乙烯磺酸钠(PSS)和聚丙烯酸(PAA)溶液, 稳定后测定溶液的荧光光谱, 结果如图 7 所示. 从图 7 可知: 当 ThT 水溶液没有聚阴离子电解质时, 只有单体的荧光峰($\lambda_{em} = 463 \text{ nm}$), 而当加入聚阴离子电解质 PVS 和 PSS 溶液后, 单体荧光强度降低, 同时在长波长方向出现一个新的宽而无精细结构的激基缔合物的荧光峰. 随着 PSS 加入量的增加, 463 nm 处的荧光峰逐渐减弱, 556 nm 处的荧光峰逐渐增强. 当 PSS 浓度达到一定值时, 556 nm 处的荧光最强.

从图 7(a), (b) 可知: 增大聚阴离子的浓度, PSS 诱导 ThT 形成的激基缔合物的荧光强度超过了单体峰, 单体峰基本消失, 而 PVS 诱导的缔合物的荧光强度无法超过单体峰, 单体峰仍然存在.

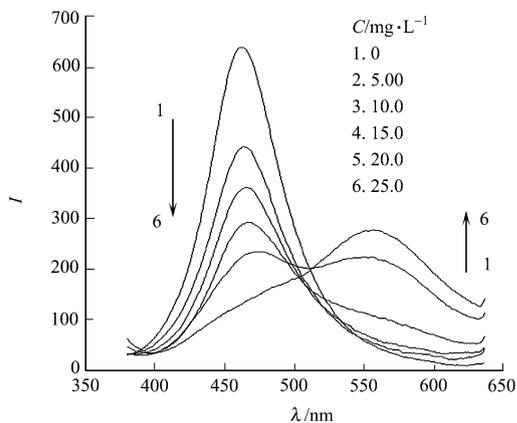
从图 7(c) 可知: 当 ThT 水溶液没有 PAA 时, 只有单体的荧光峰, 加入少量 PAA 引起单体荧光强度降低, 并没有激基缔合物的荧光峰出现. 随着 PAA 加入量的增加, 463 nm 处的荧光峰逐渐减弱. 当 PAA 浓度达到一定值时, 继续增大 PAA 浓度, 在 463 nm 处单体荧光强度不再变化. 实验表明, PAA 不能诱导 ThT 激基缔合物形成.



(a) PVS



(b) PSS



(c) PAA

图 7 不同聚阴离子电解质诱导 ThT 水溶液的荧光光谱

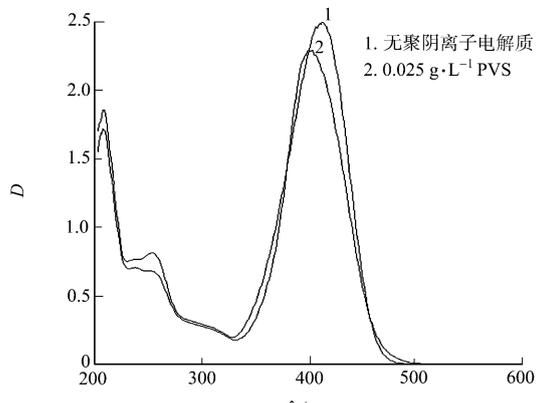
Fig. 7 Effects of NaCl to fluorescence spectra of ThT aqueous solution

在 $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚阴离子电解质和无聚阴离子电解质存在条件下, $0.100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ThT 水溶液的紫外可见吸收光谱, 如图 8 所示. 由图 8(a) 可见: 在没加入 PVS 之前, ThT 溶液在 412, 255 nm 处存在很明显的吸收峰, 而加入 PVS 之后, 255 nm 处吸收峰强度明显减弱, 412 nm 吸收峰位有所蓝移, 吸光强度变化不大.

前面曾推测 255 nm 处吸收峰可能归属为硫代黄素 T 二聚体的形成. 由图 8(a) 表明: 加入 PVS 后不利于硫代黄素 T 二聚体的形成, 才导致 255 nm 处吸收峰强度明显减弱, 此时硫代黄素 T 在溶液中主要以激基缔合物的形式和少量的单体形式存在.

和图 8(a) 相似, 图 8(b) 中 255 nm 处的吸收更小. 这可能是因为 PSS 比 PVS 对阳离子染料硫代黄素 T 的作用力更强, 更有利于缔合物的生成.

图 8(c) 在加入 PAA 前后, ThT 溶液在 412, 255 nm 处存在很明显的吸收峰, 而且加入前后的强度相



(a) PVS

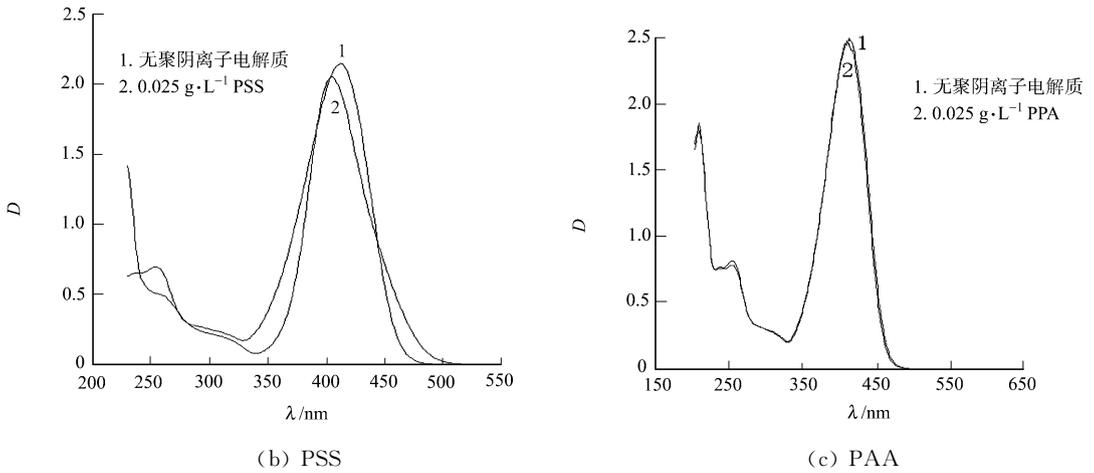


图8 不同聚阴离子电解质诱导 ThT 水溶液的紫外吸收光谱

Fig. 8 UV absorption spectra of ThT aqueous solution at various concentration of anionic

差不多,几乎没有变化.这主要是因为 PAA 的加入没有诱导 ThT 生成激基缔合物,溶液中 ThT 仍以单体和二聚体的形态存在,与荧光光谱分析的结果相吻合.

2.4.2 理论计算法分析 量子化学可以在分子、电子水平上对体系进行精细的理论研究,是其他理论研究方法所难以替代的.采用高斯软件中 G09, B3lyp 机组采用的是 6-311⁺⁺g** 并进行 BSSE 校正,计算 ThT 与 PSS, PVS 及 PAA 等 3 个阴离子聚合物的链接之间的相互作用.选取 ThT 的最稳定构象,分别与 1 个功能单体分子的链接最稳定构象形成可能的复合物,优化得到各复合物的稳定构型,找出最稳定构型;然后,根据下式计算复合物的结合能,即

$$\Delta E^{\text{CP}}(R) = E^{\text{AB}}(R) - E^{\text{A}(\text{AB})}(R) - E^{\text{B}(\text{AB})}(R).$$

最后,根据结合能的大小,判断复合物的稳定性.由各组分的稳定构象,计算得到各复合物的结合能,如表 1 所示.表 1 中: $\Delta E^{\text{CP}}(R)$ 为经零点能校正的结合能.

从表 1 可知:ThT 与 PSS, PVS 的结合能较之与 PAA 的更负,即 PSS, PVS 与 ThT 的作用力比 PAA 与 ThT 的作用力强,所以, PSS, PVS 可诱导 ThT 形成激基缔合物,而 PAA 则无法诱导形成缔合物. ThT 与 PSS 的结合能比 ThT 与 PVS 的结合能更负,故 ThT 与 PSS 作用力更强.由此可知, PSS 诱导 ThT 形成激基缔合物的能力更强.量子化学理论计算法所得结果与光谱法实验结果一致.

表 1 各稳定构象体系的结合能

Tab. 1 Energies of various stable conformation systems and their binding energies $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

体系	$E^{\text{AB}}(R)$	$E^{\text{A}(\text{AB})}(R)$	$E^{\text{B}(\text{AB})}(R)$	$\Delta E^{\text{CP}}(R)$
ThT+PSS	-2 101.290	-1 166.942	-934.298	-0.050
ThT+PVS	-1 909.509	-1 166.942	-742.523	-0.044
ThT+PAA	-2 197.926	-1 166.952	-1 030.960	-0.014

3 结束语

研究了阴离子聚电解质聚乙烯磺酸钠(PVS)诱导阳离子型染料硫代黄素 T(ThT)形成激基缔合物,并考察了 PVS 存在下, ThT 在水溶液中所形成激基缔合物的各种影响因素.结果表明:ThT 依靠自身浓度的增大是很难形成激基缔合物的,但是在 PVS 存在下却可以形成激基缔合物,而且溶液 pH 值、溶剂和电解质浓度对 ThT 激基缔合物的形成均有显著的影响.

参考文献:

- [1] OKAMOTO A, ICHIBA T, SAITO I. Pyrene-labeled oligodeoxynucleotide probe for detecting base insertion by excimer fluorescence emission[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(27): 8364-8365.
- [2] PATEL A B, KHUMSUPAN P, NARAUANASWAMI V. Pyrene fluorescence analysis offers new insights into the conformation of the lipoprotein-binding domain of human apolipoprotein E. [J]. Biochemistry, 2010, 49(8): 1766-

- 1775.
- [3] LI Zhe,ZHANG Jing-ping. An efficient theoretical study on host-guest interactions of a fluoride chemosensor with F^- , Cl^- , and Br^- [J]. *Chemical Physics*,2006,331(1):159-163.
- [4] TONG Hui,WANG Li-xiang,JING Xia-bin,et al. "Turn-On" conjugated polymer fluorescent chemosensor for fluoride ion[J]. *Macromolecules*,2003,36(8):2584-2586.
- [5] CHIAL L,SRINIVASAN S,JIM M F,et al. Pyrenol[2,1-b]pyrrole and bis(pyrenol[2,1-b]pyrrole) as selective chemosensors of fluoride ion: A mechanistic study[J]. *J Org Chem*,2007,72(9):3537-3542.
- [6] MEI Ming-hua,WU Shi-kang. Fluorescence chemical sensor of naphthylmethyl polyethylenepolyamide[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*,2000,16(6):559.
- [7] 王雯霏,郑强. PS-b-PAA 两性嵌段聚电解质在水溶液中的聚集行为及其流变特性[J]. *高分子学报*,2008(4):361-365.
- [8] 彭采宇,全维璠,韩宝三,等. 不同表面性质聚电解质多层膜的制备及蛋白质吸附和血液相容性能[J]. *高等学校化学报*,2009,30(11):2311-2318.
- [9] TIAN Wen-de,MA Yu-qiang. Complexation of a linear polyelectrolyte with a charged dendrimer: Polyelectrolyte stiffness effects[J]. *Macromolecules*,2010,43(3):1575-1582.
- [10] LEE Sang-hun,TIRUMALA V R,NAGAO M,et al. Dynamics in multicomponent polyelectrolyte solutions[J]. *Macromolecules*,2009,42(4):1293-1299.
- [11] JOANA F P,ANJA R,ASTRID K,et al. Polyelectrolyte-coated unilamellar nanometer-sized magnetic liposomes [J]. *Langmuir*,2009,25(12):6793-6799.
- [12] ILANEHELIAN M,RAMARAJ R. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA[J]. *J Photochem Photobiol (A): Chemistry*,2004,162(1):129-137.
- [13] LAKATOŠ B, KALIŇAKOVÁ B, HUDECOVÁ D, et al. New effects and applications of thioflavins[J]. *Central European Journal of Biology*,2010,5(2):143-150.
- [14] BIANCALANA M,KOIDE S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*,2010,1804(7):1405-1412.
- [15] 张鹏,钱锦文. 聚电解质溶液性质、层层自组装膜的构筑及渗透汽化性能研究[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [16] 刘颢颢,叶建平,寿涵森. 聚电解质对离子型染料形成激基缔合物和能量传递的增强作用[J]. *化学学报*,1987,45(10):943-948.

Formation of Thioflavin T Excimer Induced by Anionic Polyelectrolyte and Its Influencing Factors

TANG Qi, SUN Xiang-ying, LI Fang

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: In this paper, we have studied the formation of thioflavin T (ThT) excimer induced by anionic polyelectrolyte sodium polyethylene sulfonate (PVS). The influencing factors of the formed Thioflavin T excimer in the presence of PVS were investigated. Furthermore, we have made a study on the interaction of ThT with three kinds of anionic polyelectrolyte (PVS, PSS and PAA) by spectroscopic techniques as well as computational approach of quantum chemistry. Results showed that pH of solution, concentration of solvent and electrolyte affect the formation of ThT excimer significantly. PSS and PVS can promote the formation of excimer, but PAA can not. PVS can increase partial concentration of ThT by electrostatic attraction process, markedly promoting the formation of excimer.

Keywords: thioflavin T; excimer; fluorescence analysis; polyelectrolyte; quantum chemistry

(责任编辑:钱筠 英文审校:陈国华)