

# 荷叶碱与 ct-DNA 相互作用的光谱法研究

单 斌<sup>1,2</sup>, 邓泽元<sup>1,\*</sup>, 谢建华<sup>1</sup>, 邓胜国<sup>1</sup>

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学高等研究院, 江西 南昌 330047;

2.韶关学院食品科学系, 广东 韶关 512005)

**摘 要:** 本实验采用荧光光谱、紫外-可见光谱和盐效应等手段研究荷叶碱与小牛胸腺 DNA(ct-DNA)之间的相互作用, 并在 pH7.4 的 Tris - HCl 介质中, 以中性红为荧光探针, 对其作用机理进行研究。结果表明: 在生理条件下 (pH7.4), 荷叶碱与 DNA 发生作用方式为混合方式, 嵌插与沟槽作用是两种主要作用方式, DNA 对荷叶碱荧光猝灭属于静态猝灭, 测得其结合常数为  $1.396 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。

**关键词:** 荷叶碱; 小牛胸腺 DNA; 中性红探针; 荧光光谱; 嵌插方式

## Spectrometric Analysis of Interaction between Nuciferine and Calf Thymus (ct)-DNA

SHAN Bin<sup>1,2</sup>, DENG Ze-yuan<sup>1,\*</sup>, XIE Jian-hua<sup>1</sup>, DENG Sheng-guo<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Institute for Advance Studies, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Department of Food Science, Shaoguan College, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** The interaction between nuciferine and ct-DNA was determined by the means of fluorescence spectrometry and UV-VIS spectrometry, and the effects of NaCl and KI on the interaction were investigated. The mechanism of the interaction was also discussed by fluorescence spectroscopy using neutral red (NR) as a spectral probe in Tris-HCl buffer solution (pH 7.4). The results suggested that under physiological condition (pH 7.4) nuciferine could interact with DNA duplexes in a minor-groove binding mode or an intercalative mode. Fluorescence quenching studies revealed the presence of a static component in the quenching mechanism. The quenching constant for the interaction between nuciferine and ct-DNA was  $1.396 \times 10^6 \text{ L/mol}$ .

**Key words:** nuciferine; ct-DNA; neutral red probe; fluorescence spectrometry; intercalation

中图分类号: O657.39

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)13-0018-04

荷叶碱作为荷叶中极具开发价值的一种生物活性物质, 引起了人们的极大兴趣和关注<sup>[1]</sup>。研究表明, 荷叶碱对细菌、酵母菌和霉菌都有较强的抑制作用<sup>[2]</sup>。柏田良树<sup>[3]</sup>首次确认荷叶中的苜基喹啉生物碱具有抗 HIV 活性。Kashiwada 等<sup>[4]</sup>研究了荷叶中主要生物碱的抗 HIV 活力, 结果表明, 衡州乌药碱、O-去甲基衡州乌药碱、荷叶碱这三种荷叶生物碱可以进一步发展成为抗艾滋病病毒的新前导物。Boustie 等<sup>[5]</sup>认为荷叶碱在体外具有显著的抗脊髓灰质炎病毒的活力。

药物分子与 DNA 的相互作用, 会影响到 DNA 的生理和物理化学性质, 改变 DNA 的转录和复制<sup>[6]</sup>。研究 DNA 与小分子之间的相互作用有助于深刻理解 DNA 与识别分子的反应机理以及 DNA 与药物分子的作用机理, 因此引起了人们的极大兴趣和广泛关注<sup>[7]</sup>。研究荷叶碱

与 DNA 的相互作用机理, 有助于人们对荷叶碱与 DNA 相互作用方式及药物动力学的认识, 同时也为以 DNA 为靶标的药物分子设计提供有价值的信息。本实验采用紫外可见光谱法和荧光光谱法, 研究荷叶碱与 DNA 的相互作用机理及模式, 测定其结合常数, 旨在为荷叶碱作用机理的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

荷叶碱标准品(nuciferine, NUC, 纯度 98%) 西安天园生物制剂厂; 小牛胸腺 DNA(ct-DNA, 用 0.05mol/L 的 NaCl 溶液配制成 0.5mg/ml 的贮备液, 浓度由 260nm 下测定的  $\xi_{260} = 6600 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$  来确定, 保存于 4℃ 的冰箱中备用) 北京华美生物工程有限公司; pH7.4 Tris-

收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 江西省教育厅 2003 年重点项目(20030058); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540)

作者简介: 单斌(1976—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为功能与保健食品。E-mail: shanlibbr@hotmail.com

\* 通讯作者: 邓泽元(1963—), 男, 教授, 研究方向为食品营养学与功能食品开发。E-mail: dengzy28@yahoo.com.cn

HCl 缓冲溶液; 中性红(neutral red, NR); 氯化钠; 碘化钾; 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

F-2500 型荧光光度计 日本日立公司; UV-2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; pHs-3C 型酸度计 上海雷磁仪器厂; Finn timer 可调式移液器等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 NUC 及 ct-DNA-NUC 的紫外吸收光谱的测定

在 10ml 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0ml, 0.10g/L 荷叶碱甲醇溶液 2.0ml, 分别加入 0、30、60、90、120、150、180、210  $\mu\text{l}$  浓度为  $9.77 \times 10^{-4}$  mol/L 的 ct-DNA 溶液, 定容混匀, 静置 10min。以试剂空白对应相同浓度的 ct-DNA 溶液作为参比溶液。准确移取上述溶液 3.0ml 于 1cm 比色皿中, 测量其 240~330nm 处的紫外光谱。

### 1.2.2 NUC 及 ct-DNA-NUC 的荧光光谱的测定

在 10ml 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0ml,  $1.471 \times 10^{-3}$  g/L 荷叶碱甲醇溶液 2.0ml, 分别加入 0、30、60、90、120、150、180、210  $\mu\text{l}$  浓度为  $6.14 \times 10^{-6}$  mol/L 的 ct-DNA 溶液, 定容混匀, 静置 10min。准确移取上述溶液 3.0ml 于 1cm 比色皿中, 测量其荧光发射光谱。经测定, 各溶液的最佳激发波长为 275nm, 扫描荧光发射光谱(荧光激发和发射狭缝均为 5nm, 测量电压 700V), 得最大荧光发射波长为 370nm, 进行荧光发射光谱的测定。

### 1.2.3 盐效应

在 10ml 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0ml, 0.1g/L 荷叶碱甲醇溶液 2.0ml, 分别加入 0、15、30、45、60、75、90、105、120  $\mu\text{l}$  浓度为 0.44mol/L 的 NaCl 溶液, 定容混匀, 静置 10min, 此为第一组溶液; 第二组溶液在上述溶液配制基础上, 各管分别加入 120  $\mu\text{l}$  浓度为  $8.79 \times 10^{-4}$  mol/L 的 ct-DNA 溶液, 定容混匀, 静置 10min。准确移取上述溶液 3.0ml 于比色皿中, 测量其荧光发射光谱。上述荧光测定条件均为: 最佳激发波长 275nm, 最大荧光发射波长 370nm, 荧光激发和发射狭缝 5nm, 测量电压 700V。

### 1.2.4 阴离子效应

在 10ml 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0ml,  $1.175 \times 10^{-2}$  g/L 荷叶碱甲醇溶液 2.0ml, 分别加入 0、15、30、45、60、75、90、105、120  $\mu\text{l}$  浓度为  $1.12 \times 10^{-3}$  mol/L 的 KI 溶液, 定容混匀, 静置 10min, 此为第一组溶液; 第二组溶液在上述溶液配制基础上, 各管分别加入 80  $\mu\text{l}$  浓度为  $8.79 \times 10^{-4}$  mol/L 的 ct-DNA 溶液, 定容混匀, 静置 10min。准确移取上述溶液 3.0ml 于比色皿中, 测量其荧光发射光谱。上述荧光测定条件均为: 最佳激发波长 275nm, 最大荧光发射波长 370nm,

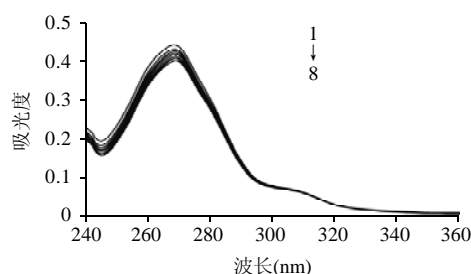
荧光激发和发射狭缝均为 5nm, 测量电压 400V。

### 1.2.5 荷叶碱对 NR-ct-DNA 的同步荧光光谱的影响

于 10ml 比色管中加入 Tris-HCl 缓冲溶液 2.0ml, 加入  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的中性红溶液 1.0ml 和  $1.758 \times 10^{-3}$  mol/L 的 ct-DNA 溶液 150  $\mu\text{l}$ , 定容混匀。准确移取该溶液 3.0ml 于比色皿中, 测量其荧光光谱后再逐次加入 10  $\mu\text{l}$  浓度为 2g/L 的荷叶碱甲醇溶液(累加总体积小于 0.10ml), 混合均匀后放置 10min, 进行同步荧光光谱测定( $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ , 发射光谱的扫描范围 220~620nm, 荧光激发和发射狭缝均为 5nm, 测量电压 700V)。

## 2 结果与分析

### 2.1 ct-DNA 对 NUC 的紫外吸收光谱的影响



$c(\text{NUC})=2 \times 10^{-2}$  g/L; 1 → 8 表示(ct-DNA)的浓度( $\times 10^{-5}$  mol/L)分别为: 0.000、0.293、0.586、0.879、1.172、1.465、1.758、2.051。

图1 ct-DNA 对荷叶碱紫外吸收光谱的影响

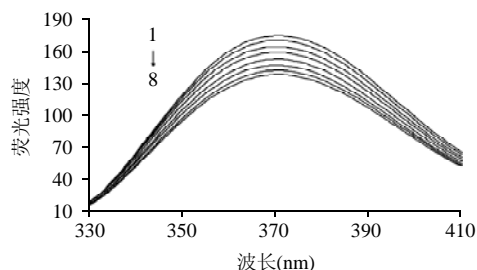
Fig.1 Effects of ct-DNA on absorbance of nuciferine

图 1 为不同浓度的 ct-DNA 溶液与荷叶碱相互作用的紫外光谱图。曲线从 1 到 8, ct-DNA 浓度逐渐升高, 而荷叶碱的最大特征吸收光谱 270nm 处的吸光度逐步降低, 即发生减色效应, 最大特征吸收光谱发生了约 3~4nm 的红移。可推断, 荷叶碱嵌入插入 ct-DNA 分子碱基对中或结合在 ct-DNA 分子的小沟槽中, 从而使紫外吸收光谱受到了屏蔽而使吸光度降低。

### 2.2 ct-DNA 对 NUC 的荧光光谱的影响

图 2 为不同浓度的 ct-DNA 与荷叶碱相互作用产生的荧光猝灭谱图。曲线从 1 到 8, ct-DNA 浓度逐渐升高, 最大荧光波长处的强度逐渐降低, 同时也伴随着一定程度的红移, 即发生了荧光猝灭现象。可假设荷叶碱与 ct-DNA 形成了动态猝灭, 遵循 Stern-Volmer 方程  $F_0/F = 1 + K_{q0}[Q] = 1 + K_{sv}[Q]$ 。采集荷叶碱于 370 nm 处各曲线的荧光强度数据, 作  $F_0/F \sim [Q]$  图, 经线性拟合得其线性方程为  $y=2.236 \times 10^6 x + 0.983 (R^2 = 0.9980)$ , 由方程斜率求得猝灭速率常数为  $K_q = 2.236 \times 10^{14}$  L/mol  $\cdot$  s。由  $K_q > 10^{12}$  L/mol  $\cdot$  s, 可知猝灭应为静态猝灭。静态猝灭所导致荧光体荧光强度减弱, 荧光强度(F)、猝灭剂浓度(Q)与结合常数( $K_D$ )之间的关系式可用 Lineweaver-Burk 双

倒数方程 $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1}$ 来描述<sup>[8]</sup>, 取相应的荧光强度数据以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $c(\text{ct-DNA})^{-1}$ 作Lineweaver-Burk双倒数图, 得图3, 经线性拟合得线性方程:  $y = 4.08 \times 10^{-9}x + 0.0095 (R^2 = 0.9962)$ , 根据斜率及 $F_0$ 求得结合常数  $K_D = 1.396 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。



$c(\text{NUC}) = 2.942 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ ; 1 → 8 表示 DNA 浓度 ( $\times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ): 0.000、0.184、0.368、0.552、0.736、0.920、1.104、1.288。

图2 ct-DNA 对荷叶碱的荧光光谱影响

Fig.2 Fluorescence quenching spectra of nuciferine and different concentrations of ct-DNA

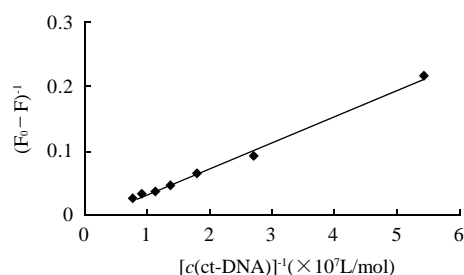


图3 ct-DNA 与 NUC 的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.3 Lineweaver-Burk plot for dynamic quenching with ct-DNA as a quencher

### 2.3 盐效应

由于 $\text{Na}^+$ 等盐类阳离子能中和 ct-DNA 上带负电荷的磷氧基, 所以当供试物与 ct-DNA 相互作用模式是静电作用时,  $\text{Na}^+$  离子强度的增加必将与供试物发生竞争, 从而减弱荧光猝灭程度。

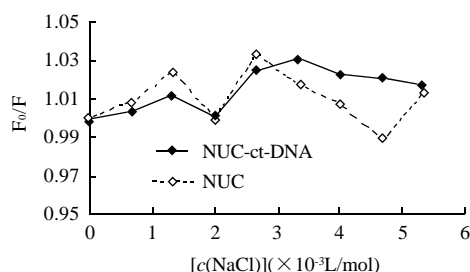


图4 NaCl 对荷叶碱、荷叶碱-ct-DNA 的荧光光谱影响的  $F_0/F \sim [Q]$  图

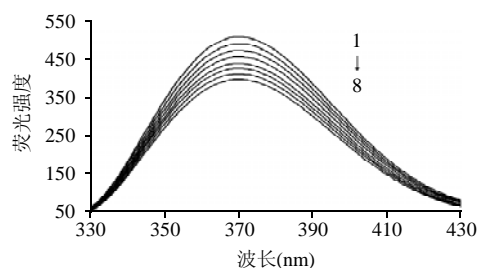
Fig.4 Effects of concentration of NaCl solution on fluorescence quenching of nuciferine and nuciferine/ct-DNA complex

从图4可以看出, 随着 NaCl 浓度的增大, 荷叶碱自身及其与 ct-DNA 复合体系的荧光强度比值均无明显变

化, 表明离子强度对体系的荧光无影响。说明荷叶碱与 ct-DNA 之间不是以静电结合方式相互作用的。

### 2.4 阴离子效应

$\text{I}^-$  是一种动态猝灭剂, 当有机小分子以沟槽模式与 DNA 结合时, 有机小分子作用于 DNA 的沟槽上, 暴露溶剂分子中, 这样有机小分子不仅受不到 DNA 的保护, 而且更容易受到阴离子猝灭剂的进攻, 因而  $\text{I}^-$  对有机小分子荧光猝灭程度比不加 DNA 时大<sup>[9]</sup>。如图5~6所示, 用 Stern-Volmer 方程对两图进行处理, 经线性拟合后, 得图7与表1。可以看出, 荷叶碱在加入 DNA 后的 KI 猝灭常数数值都要明显大于不加 DNA 时的数值(表1中  $K'_q > K_q$ ), 可以推测荷叶碱与 DNA 的相互结合方式中存在有沟槽式。

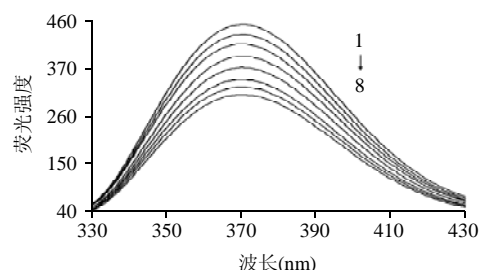


$c(\text{NUC}) = 2.350 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ ; 1 → 8 表示 KI 浓度 ( $\times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ):

0.167、0.333、0.500、0.667、0.833、1.000、1.167、1.333。

图5 KI 对荷叶碱的荧光光谱影响

Fig.5 Fluorescence quenching spectra of nuciferine in the presence of different concentration KI solutions



$c(\text{NUC}) = 2.350 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ ;  $c(\text{ct-DNA}) = 7.032 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ; 1 → 8 表示 KI 浓度 ( $\times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ): 0.167、0.333、0.500、0.667、0.833、1.000、1.167、1.333。

图6 KI 对荷叶碱-ct-DNA 的荧光光谱影响

Fig.6 Fluorescence quenching spectra of nuciferine/ct-DNA complex in the presence of different concentration KI solutions

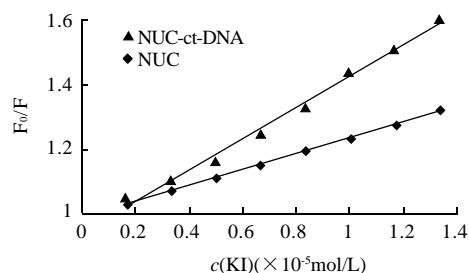


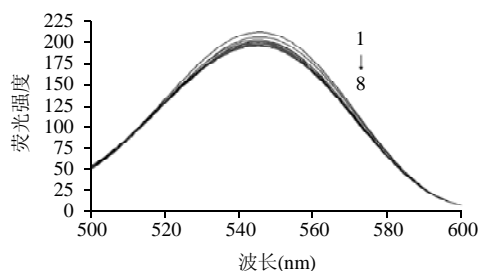
图7 KI 对荷叶碱、荷叶碱-ct-DNA 的荧光猝灭 Stern-Volmer 方程  
Fig.7 Stern-Volmer equation curves for fluorescence quenching of nuciferine and nuciferine/ct-DNA complex in the presence of different concentration KI solutions

表1 KI对荷叶碱和荷叶碱-DNA荧光光谱的影响

Table 1 Parameters of two Stern-Volmer equation curves shown in Fig.7

供试物	线性方程	R <sup>2</sup>	猝灭常数(L/g·s)	常数的比较	标示图
荷叶碱	$y=2.464 \times 10^4 x + 0.987$	0.9988	$K_q = 2.464 \times 10^{12}$	$K'_q > K_q$	图7
荷叶碱-ct-DNA	$y=4.839 \times 10^4 x + 0.940$	0.9923	$K'_q = 4.839 \times 10^{12}$		

## 2.5 荷叶碱对NR-ct-DNA的同步荧光光谱的影响



$c(\text{NR})=1 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ ;  $c(\text{ct-DNA})=2.637 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ; 1 → 8 表示 NUC 浓度 ( $\times 10^{-2} \text{ g/L}$ ): 0.000、0.667、1.333、2.000、2.667、3.333、4.000、4.667。

图8 荷叶碱对NR-ct-DNA同步荧光光谱的影响

Fig.8 Synchronous fluorescence quenching spectra of NR/ct-DNA compound in the presence of different concentration nuciferine solutions

NR 是以嵌插结合方式与 ct-DNA 发生作用<sup>[10]</sup>。当往 NR 溶液中依次加入一定量的 ct-DNA 溶液后, 使其复合物的荧光强度不断增强, 并能产生一定程度的红移。假设供试物也是以嵌插模式与 ct-DNA 发生结合, 那么在 NR-ct-DNA 复合物中加入供试物后, 将与 NR 发生竞争作用, 使得与 ct-DNA 结合的 NR 部分地被置换出来, NR-ct-DNA 的荧光发射峰强度将有明显的降低。

从图8中可见, 供试物使 NR-ct-DNA 复合物在 540 nm 处的同步荧光峰强度有所降低, 表明荷叶碱与 NR 发生了竞争作用, 可推断荷叶碱与 ct-DNA 的相互结合方式中存在有嵌插式。

## 3 结论

研究结果表明, ct-DNA 对荷叶碱的荧光猝灭属于形成了新的复合物的静态荧光猝灭, 荷叶碱与 ct-DNA 发生作用方式为混合方式, 嵌插与沟槽作用是两种主要作用方式, 测得其结合常数为  $K_D = 1.396 \times 10^6 \text{ L/mol}$ 。

## 参考文献:

- [1] 肖文军, 胡祥文, 胡云铃, 等. 荷叶生物碱柱分离纯化技术研究[J]. 食品科学, 1999, 20(8): 64-66.
- [2] 纪丽莲. 荷叶中抑菌成分的提取及其抑菌活性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 120-124.
- [3] 柏田良树. 抗 HIV 天然物的研究(5): 荷叶的抗 HIV 成分[J]. 国外医学 中医中药分册, 1997, 19(6): 45.
- [4] KASHIWADA Y, AOSHIMA A, IKESHIRO Y, et al. Anti-HIV benzylo-quinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbonucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13 (2): 443-448.
- [5] BOUSTIE J, STIGLIANI J L, MONTANHA J, et al. Antipoliiovirus structure -activity relationships of some aporphine alkaloids[J]. J Nat Prod, 1998, 61(4): 480-484.
- [6] MICHEL C, KRAVTCHENKO T P, DAVID A. In vitro prebiotic ejects of Acacia gums onto the human intestinalmicrobiota depends on both botanical origin and environmental pH[J]. Anaerobe, 1998(4): 257-266.
- [7] 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.
- [8] LABUDA J, BUCKOVA M, JANTOVA S, et al. Modified screen-printed electrode for the investigation of the interaction of non-electroactive quinazoline derivatives with DNA[J]. J Anal Chem, 2000, 367(4): 364-368.
- [9] KUMAR C V, TURNER R S, ASUNCION E. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix[J]. Photo-chem Photobiol A: Chem, 1993, 74(2/3): 231-238.
- [10] NI Y N, LIN D Q, KOKOT S. Synchronous fluorescence and UV-vis spectrometric study of the competitive interaction of chlorpromazine hydrochloride and Neutral Red with DNA using chemometrics approaches [J]. Talanta, 2005, 65(5): 1295-1302.