

# 番红花红 T 与表面活性剂的作用 及其在标记 DNA 中的应用\*

郭祥群 李 芳 赵一兵 王冬媛 许金钧

(厦门大学化学系, 材料和生命过程分析科学开放研究实验室, 厦门, 361005)

**摘要** 对阳离子染料番红花红 T(ST)在阴离子表面活性剂存在时的溶液状态的吸收光谱和荧光光谱进行了研究. 结果表明, 低浓度阴离子表面活性剂与 ST 形成缔合物, 导致 ST 的吸收与荧光强度降低; 增大表面活性剂的浓度, 其分子胶束前预聚集促使染料形成非荧光二聚体, 导致荧光急剧猝灭, 吸收光谱出现新的特征吸收峰; 当表面活性剂浓度大于临界胶束浓度(CMC)时, 染料二聚体离解, ST 单体增溶于胶团中形成新的高量子产率荧光体. 本文还对染料分子在表面活性剂分子胶束前预聚集过程中形成的非荧光二聚体用作脱氧核糖核酸(DNA)的荧光探针的可行性进行了初步的研究.

**关键词** 番红花红 T, 阴离子表面活性剂, DNA, 吸收光谱, 荧光光谱

荧光染料作为分子探针化合物, 可对微环境的极性、粘度、pH 值、电位和温度等因素的变化作出响应, 因此可用于研究特殊环境如胶束及生物膜的性质, 在核酸的定量测定和构象分析方面的应用也越来越广泛<sup>[1,2]</sup>. 近年来, 一类新的荧光探针引起了人们的极大兴趣, 这就是二聚体荧光染料. 用噻唑黄衍生物二聚体 YOYO 和噻唑橙衍生物二聚体 TOTO 标记核酸具有很高的灵敏度<sup>[3]</sup>, 分子内二聚体用于抗原、抗体的测定也获得成功<sup>[4]</sup>. 本文对阳离子荧光染料番红花红 T 在阴离子表面活性剂存在时溶液状态下的光谱进行了研究, 并对染料分子在表面活性剂分子胶束前预聚集过程中形成的染料二聚体用作 DNA 荧光探针的可行性进行了研究. ST 二聚体对双螺旋 DNA 表现出强的亲和力, 与 DNA 作用后引起荧光性质显著变化, 可望成为一种良好的 DNA 探针.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA(CT DNA, 北京百泰生化技术公司)生化试剂, UV 谱测定  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ , 置 4 °C 冰箱备用. DNA 浓度以 DNA(p)表示, 并利用  $\epsilon_{260} = 6\,600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  确定. ST 为生物染色剂(上海试剂三厂), 其余试剂均为分析纯, 所用水为二次去离子亚沸水.

Shimadzu RF-5000 型荧光分光光度计用于荧光光谱测定. Shimadzu UV-240 型紫外-可见分光光度计用于吸收光谱测定. 样品池均为 1 cm, 室温下测定.

### 1.2 实验方法

移取一定量的 ST 及表面活性剂溶液于 10 mL 容量瓶中, 加入一定量的 CT DNA 溶液, 用二次水定容后室温下放置 5 min, 测量其荧光强度或吸收光谱.

收稿日期: 1995-08-17. 联系人及第一作者: 郭祥群, 女, 40 岁, 博士, 副教授.

\* 国家自然科学基金资助课题.

## 2 结果与讨论

### 2.1 ST 与阴离子表面活性剂的作用及吸收光谱

表面活性剂对荧光染料性质的影响显著且复杂,在表面活性剂的作用下,荧光染料通常形成多种具有不同光化学物理特征的分子配合物.

ST 溶液在 520 nm 有一最大吸收峰,其摩尔吸收系数为  $28\ 457\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (295 K)<sup>[5]</sup>. 在阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)存在时,随着表面活性剂浓度的变化,ST 呈现出 3 种不同的吸收光谱. 固定 ST 浓度为  $5.68 \times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ , 当 SDS 浓度小于  $1.20 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  时,ST 在 520 nm 的吸光度随着 SDS 的浓度的增大而降低,且吸收光谱蓝移,在 504 nm 出现一新的吸收带,当 SDS 的浓度大于  $1.20 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  时,504 nm 的吸光度迅速降低,光谱红移,在 530 nm 出现一新的吸收带;至 SDS 的 CMC 时,吸收出现平台,吸光度不再随 SDS 浓度的增大而变化(如图 1).

阴离子表面活性剂十二烷基磺酸钠(SLS)和十二烷基苯磺酸钠(DBSS)具有相似的作用. 当 504 nm 的吸收出现最大值时,SLS、SDS 和 DBSS 的浓度分别为  $2.0 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ 、 $1.2 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  和  $6.8 \times 10^{-4}\ \text{mol/L}$ , 与 CMC 呈现一致的变化趋势(SLS、SDS 和 DBSS 的 CMC 分别为  $9.7 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ 、 $8.7 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  和  $1.2 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ <sup>[6]</sup>).

考察 3 个吸收峰比值随 DBSS 浓度的变化,所得结果如图 2 所示. 3 条吸收峰的比值曲线皆呈现 2 个拐点,显示出 3 种型体的存在. 有趣的是,DBSS 浓度在较高的区域出现的拐点正好与 DBSS 的 CMC 相符合. 考察 3 个峰比值分别与 SDS 和 SLS 的浓度的变化规律,得到

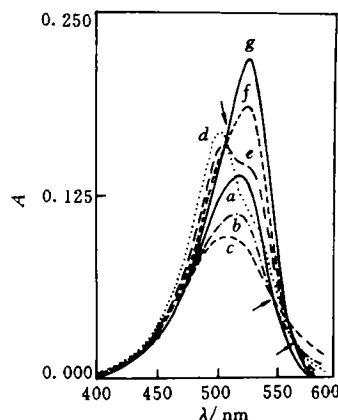


Fig. 1 The visible spectra of ST-SDS system

The concentration of ST at  $5.68\ \mu\text{mol/L}$  and SDS at (mmol/L):  
a. 0; b. 0.040; c. 0.20; d. 1.2;  
e. 2.0; f. 2.8; g. 12.0.

同样的结果,表明此法可有效地指示表面活性剂的 CMC.

染料溶液中,通常存在着单体、二聚体及寡聚体(oligomer, 聚集数大于 2 的型体)<sup>[7]</sup>. 固定 ST 的浓度,当 SDS 浓度从零增大到  $1.20 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  时,吸收光谱中有一等吸收点(图 1),这一等吸收点表明体系中存在着单体与二聚体之间的平衡;当 SDS 的浓度大于  $1.20 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$  时,光谱中出现 2 个等吸收点(图 1),表征着二聚体与胶团中单体的平衡. 事实上,文献上也曾报道其它荧光染料在表面活性剂溶液中存

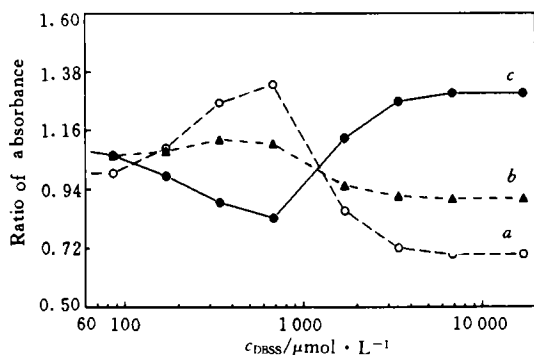


Fig. 2 The ratio of absorbance

The concentration of ST at  $5.68\ \mu\text{mol/L}$ .

a.  $A_{504\ \text{nm}}/A_{530\ \text{nm}}$ ; b.  $A_{520\ \text{nm}}/A_{530\ \text{nm}}$ ;

c.  $A_{520\ \text{nm}}/A_{504\ \text{nm}}$ .

在单体与二聚体的平衡<sup>[8]</sup>.

我们认为, ST 随阴离子表面活性剂浓度变化而出现的 3 种特征吸收光谱分属于纯水溶剂中的 ST 单体的吸收带(520 nm)、水-表面活性剂混合溶剂中的 ST 二聚体的吸收带(504 nm)和胶团中的 ST 单体的吸收带(530 nm). 在低浓度时, 阴离子表面活性剂以单分子的形式与 ST 形成离子缔合物导致吸收强度降低. 随着阴离子表面活性剂浓度的逐渐增大, 表面活性剂的分子自相接触, 憎水基靠扰形成胶束前的预聚集. 水分子在表面活性剂分子或胶束预聚集分子周围形成有序的区域, 即所谓的“冰山结构”(iceberg 结构)<sup>[6,9]</sup>, 导致溶剂的性质向着有利于 ST 二聚体形成的方向变化. ST 由单体向二聚体转化, 出现了二聚体的特征吸收峰. 这与二聚体在纯水介质中易于分解的现象相符合<sup>[3]</sup>. 当表面活性剂的浓度增大到 CMC 时, 由于胶团的形成将 ST 单体增溶于胶团中而使二聚体向着包藏于胶团中的单体转化, 出现新的特征吸收峰.

## 2.2 阴离子表面活性剂对 ST 荧光性质的影响

ST 的水溶液呈现出很强的荧光( $\lambda_{ex}=533.0$  nm,  $\lambda_{em}=577.6$  nm, 仪器未做波长校准). SDS 的加入使 ST 荧光强度及光谱呈现出明显的变化(图 3、图 4).

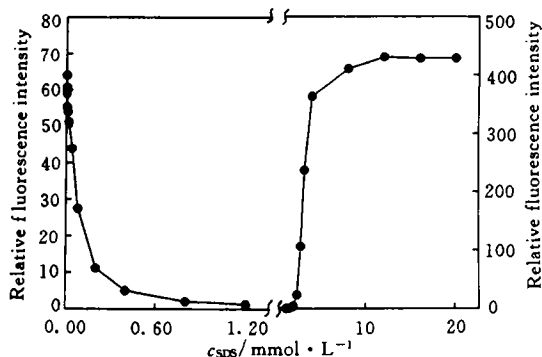
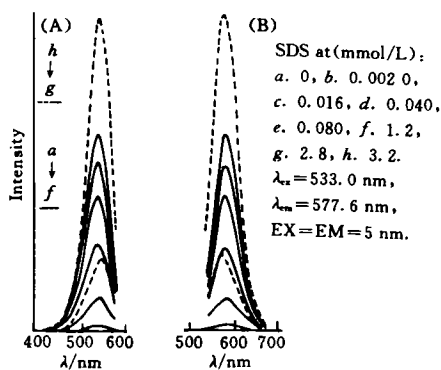


Fig. 3 The fluorescent excitation (A) and emission (B) spectra of ST-SDS systems

The concentration of ST at  $5.68 \mu mol/L$ .

Fig. 4 The influence of the concentration of SDS on the fluorescence intensity of ST

在 SDS 浓度较低时, ST 与 SDS 形成离子缔合物, 导致荧光猝灭, 其猝灭程度满足 Stern-Volmer 方程(表 1).

Table 1 The regression equations for ST fluorescence quenching

Surfactant	$c_{ST}/mol \cdot L^{-1}$	Equations( $c$ in $mol \cdot L^{-1}$ )	Correlation coefficients
SDS	$5.72 \times 10^{-6}$	$F_0/F=1.0+1.4 \times 10^4 c$	0.980 ( $n=7$ )
DBSS	$5.72 \times 10^{-6}$	$F_0/F=1.0+1.4 \times 10^4 c$	0.978 ( $n=7$ )
SLS	$5.72 \times 10^{-6}$	$F_0/F=1.0+5.9 \times 10^3 c$	0.954 ( $n=8$ )
SLS	$2.86 \times 10^{-5}$	$F_0/F=1.0+7.8 \times 10^3 c$	0.972 ( $n=8$ )
SLS	$1.42 \times 10^{-6}$	$F_0/F=1.0+1.5 \times 10^3 c$	0.944 ( $n=6$ )

当表面活性剂的浓度大于  $1.0 \times 10^{-4} mol/L$  时, 荧光猝灭严重偏离 Stern-Volmer 方程.

随着 SDS 浓度的增大, 荧光强度急剧下降, 直到最低值. 这可以理解为是由于形成了几乎无荧光的染料二聚体. 随着 SDS 浓度的继续增大至 CMC 时, 荧光强度急剧增强, 直至出现平台, 荧光激发光谱红移至 540 nm, 而荧光发射光谱蓝移至 568 nm. 这是由于 ST 单体增溶于胶团中, 促使 ST 二聚体离解, 导致荧光显著增强. 阴离子表面活性剂 SLS 和 DBSS 均

有相似的作用. 将 ST 的浓度在  $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \sim 2.9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  的范围内变化时, 荧光猝灭至最低点所需的 SLS 的浓度为  $1.1 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \sim 1.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ , 并无显著的变化(图 5), 这进一步揭示了表面活性剂胶束前的预聚集导致溶剂性质的变化是促使二聚体形成的主要因素.

2.3 染料二聚体与双螺旋 DNA 的作用

2.3.1 双螺旋 DNA 对染料二聚体吸收光谱和荧光光谱的影响 实验结果表明, 在 ST 染料二聚体形成的适宜的表面活性剂浓度的介质中, 体系的荧光强度随着 CT DNA 浓度的增大而增大(图 6、7), 荧光强度与 DNA 在较大的浓度范围内有良好的线性关系(表 2).

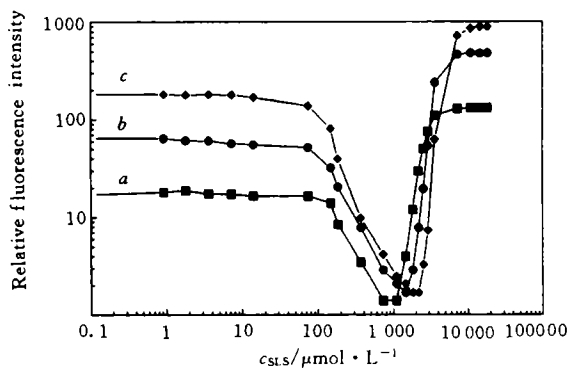


Fig. 5 The influence of the concentration of SLS on the fluorescence intensity of ST

The concentration of ST ( $\mu\text{mol/L}$ ): a. 1.42, b. 5.72, c. 28.0.  $\lambda_{ex}=533.0 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=577.6 \text{ nm}$ .

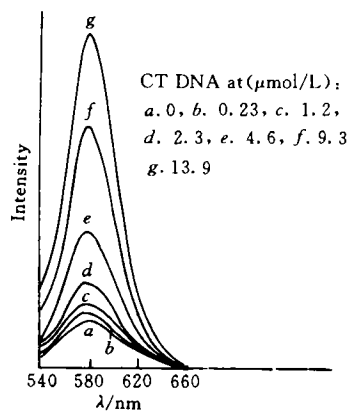


Fig. 6 The fluorescent spectra of the ST-SDS-CT DNA system

The concentration of ST at  $5.68 \mu\text{mol/L}$  and SDS at  $1.2 \text{ mmol/L}$ ,  $\lambda_{ex}=520 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=577.6 \text{ nm}$ , EX=10 nm, EM=3 nm.

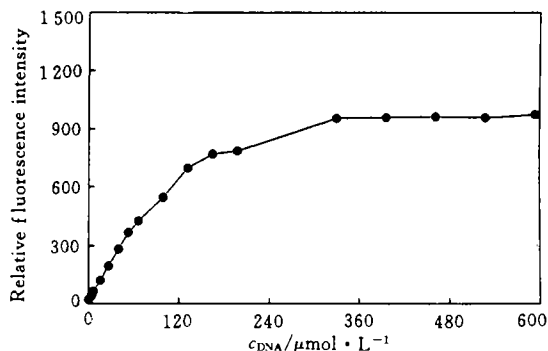


Fig. 7 The dependency of fluorescence intensity on CT DNA concentration

The concentration of ST at  $2.86 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ .

Table 2 The regression equations for double strands CT DNA

Surfactant/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c_{ST}/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Equations( $c$ in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Correlation coefficients
SLS( $1.47 \times 10^{-3}$ )	$1.29 \times 10^{-5}$	$\Delta F = -1.1 + 1.7 \times 10^6 c$	0.997
DBSS( $6.80 \times 10^{-4}$ )	$5.72 \times 10^{-6}$	$\Delta F = -1.4 + 9.2 \times 10^5 c$	0.996
SDS( $1.20 \times 10^{-3}$ )	$5.72 \times 10^{-6}$	$\Delta F = -1.0 + 4.7 \times 10^7 c$	0.999
SLS* ( $1.47 \times 10^{-3}$ )	$2.86 \times 10^{-6}$	$\Delta F = 1.1 + 8.2 \times 10^5 c$	0.999

\* In the media of  $10 \text{ mmol/L}$  Tris.

这一性质无疑优于商品化的合成染料二聚体 DNA 荧光探针, 后者在 DNA 浓度大于  $2.1 \mu\text{g/mL}$  时, 出现染料诱导的 DNA 聚集而沉淀<sup>[3]</sup>. 染料二聚体的特征吸收峰随 CT DAN 的浓度增大而降低(图 8), 且在 538 nm 出现一个新的吸收峰.

2.3.2 实验条件的影响 pH 值的影响: DNA 与 ST 染料二聚体的作用在  $\text{pH} < 3$  和  $\text{pH} > 11$  时显著减弱, 这可以理解为 DNA 的双螺旋结构在强酸强碱介质中受到破坏所致。

盐效应的影响: 在 DNA-ST-SDS 和 ST-SDS 体系中, 分别加入不同量的 NaCl, 所得结果表明: NaCl 浓度低于 10 mmol/L 时, 随着盐的浓度的增大, 空白体系的荧光强度不变, DNA 与染料二聚体的作用则减弱, 表现出荧光强度降低, 这与溴化乙锭等其它 DNA 荧光探针所观察到的现象一致<sup>[10]</sup>; 当 NaCl 浓度大于 10 mmol/L, 由于盐效应使表面活性剂的 CMC 降低<sup>[6]</sup>, 二聚体易于向胶团中单体转化, 结果使空白体系的荧光显著增强, DNA 与染料的作用显著降低。

温育时间的影响: 将溶液配制好后, 倒入液池中, 将液池置于配有循环恒温水的池架中, 监测荧光强度随时间的变化, 经实验表明, 在 20 °C 时, DNA-ST-SDS 体系的荧光在 5 min 后达到平衡, 而空白体系的荧光则不随时间而变化。

2.3.3 DNA 与染料二聚体的作用机制 从图 8 中可以看到, 随着 DNA 浓度的增大, 吸收光谱发生红移, 且出现一个较为明显的表明体系存在着 2 个吸收型体的平衡的等吸收点. 这可以有两种解释: 一种可能是染料二聚体与 DNA 作用后, 由于 DNA 的特殊构象和特殊环境, 导致染料二聚体的吸光、发光及其它性质发生了显著的变化. 另一种可能是 ST 单体嵌入双螺旋 DNA 中, 使二聚体离解, 嵌入双螺旋 DNA 中的 ST 单体, 由于双螺旋结构的固定, 荧光量子产率增大, 无论是哪一种作用方式, ST 染料在特殊环境下形成的二聚体都可望成为一种良好的核酸探针, 用以获取核酸的结构和质量信息. 这也为选择新的生物大分子荧光探针开辟了新的路径. 当然, 作为一种探针分子, 其与核酸的作用方式、结合位点及环境因素的影响, 还有待于作进一步的研究。

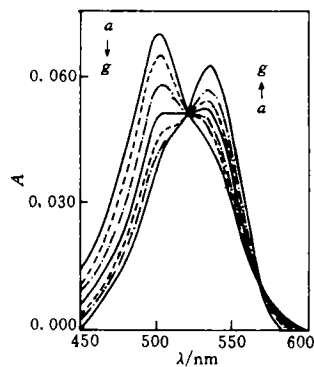


Fig. 8 The visible spectra of the ST-SDS-CT DNA system

The concentration of ST at 2.86  $\mu\text{mol/L}$  and SDS at 1.2 mmol/L. CT DNA ( $\mu\text{mol/L}$ ): a. 0, b. 6.60, c. 15.8, d. 26.4, e. 39.6, f. 52.8, g. 99.0.

### 参 考 文 献

- 1 CHEN Yong(陈 勇), LI Yuan-Zong(李元宗), CHANG Wen-Bao(常文保) *et al.*. J. Anal. Sci. (分析科学学报), 1994, **10**: 67
- 2 Shealy D. B., Lipowska M., Lipowski J. *et al.*. Anal. Chem., 1995, **67**: 247
- 3 Rye H. S., Dabora J. M., Quesada M. A. *et al.*. Anal. Biochem., 1993, **208**: 144
- 4 Ai-Ping Wei, Blumenthal D. K. Herron J. N., Anal. Chem., 1994, **66**: 1 500
- 5 Bhattacharya S. C., Das H., Moulik S. P. J. Photochem. Photobio. A: Chem., 1993, **74**: 239
- 6 ZHAO Guo-Xi(赵国玺). Physical Chemistry of Surfactant(表面活性剂物理化学), 2nd Ed., Beijing: Peking University Press, 1991: 165
- 7 Robinson B. H., Loffler A., Schwarz G. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1973, **69**: 56
- 8 HE Xi-Wen(何锡文), FENG Xi-Zeng(冯喜增), ZHANG Gui-Zhu(张贵珠) *et al.*. Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 1994, **22**: 565
- 9 Frank H. S., Evans M. W. J. Chem. Phys., 1945, **13**: 478
- 10 LePecq J. B., Paoletti C. J. Mol. Biol., 1967, **27**: 87

## The Interaction of Safranin T with Anionic Surfactant and Its Application in Labelling DNA

GUO Xiang-Qun\*, LI Fang, ZHAO Yi-Bing, WANG Dong-Yuan, XU Jin-Gou

(Department of Chemistry, Xiamen University, The Research Laboratory of SEDC of Analytical Science for Material and Life Chemistry, Xiamen, 361005)

**Abstract** The study of the properties of the visible spectra and fluorescent spectra of safranin T (ST) in the solution of anionic surfactants (AS) was reported. The results showed that ST formed complex with AS molecule when the concentration of AS was low, and the absorbance and fluorescence intensities of ST, therefore, decreased. A non-fluorescent dimeric dye was formed on the formation of premicellar aggregation of AS when the concentration of AS was made higher, and thus the fluorescence intensity decreased dramatically, and a new peak in visible spectra appeared. When the surfactant concentration was increased above the critical micelle concentration (CMC), the dimeric dye dissociated, and a new fluorophore with a high quantum yield was formed. The possibility of using the non-fluorescent dimeric dye as a fluorescent probe for deoxyribonucleic acid was also studied. The dimeric dye showed a highly DNA binding constant and significant change of fluorescent behaviour was observed when the dimeric dye interacted with double strands DNA. It was obvious that the dimeric dye may be used as a good DNA probe.

**Keywords** Safranin T, Anionic surfactant, DNA, Visible spectra, Fluorescent spectra

(Ed.: Z, S)

### 会 讯

#### 第一届全国微波化学会议在长春召开

由中国电子学会微波分会发起、吉林大学主办的第一届全国微波化学会议于1996年7月15日至17日在长春市吉林大学召开。出席会议的代表来自全国十个省市。大会开幕式由四川联合大学黄卡玛教授主持,大会主席吉林大学金钦汉教授致开幕词,吉林大学副校长李树家教授和吉林大学化学系主任吴通好教授出席了开幕式并讲了话。

会议期间进行了热烈的学术讨论,学术论文涉及微波化学基本理论研究、微波合成化学、微波等离子体分析化学、微波高分子化学、微波石油化学、微波化学反应装置等方面。与会代表一致认为,这次会议的论文反映了我国微波化学的研究现状,有较高的学术水平和应用价值,同时大会还评选了优秀青年学术论文。

会议期间正式成立了电子学会微波分会第一届微波化学专业委员会,选举金钦汉教授为主任委员,黄卡玛教授、戴树珊教授、季天仁教授、胡之德教授为副主任委员。会议还决定出版《微波化学》专著,第二届微波化学会议将于1998年在云南举行。