

• 研究论文 •

## 磁性纳米氧化铁与小牛胸腺 DNA 相互作用研究

杨芹芹 郭强 梁建功 韩鹤友\*

(华中农业大学理学院 化学生物学研究所 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘要** 以微波辅助共沉淀法合成磁性纳米氧化铁(MNPs), 分别采用紫外-可见吸收光谱(UV-vis)、拉曼光谱(Raman)及琼脂糖凝胶电泳(GE)研究其与小牛胸腺 DNA (ct DNA)的相互作用. UV-vis 显示出明显的增色效应, 这是由 DNA 分子受 MNPs 的干扰碱基外露而引起的; Raman 研究表明 DNA 分子碱基、脱氧核糖以及磷酸骨架均受到 MNPs 一定程度的干扰; 而 GE 证实了 MNPs 并未使 DNA 分子发生断裂、双链解开等本质性变化. 该研究对 MNPs 在生物医学领域的安全应用具有重要意义.

**关键词** 磁性纳米氧化铁; 小牛胸腺 DNA; 微波辅助; 增色效应; 拉曼光谱

## Study on the Interaction between Magnetic Iron Oxide Nanoparticles with Calf Thymus DNA

Yang, Qinqin Guo, Qiang Liang, Jianguo Han, Heyou\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Institute of Chemical Biology, College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** Magnetic iron oxide nanoparticles (MNPs) were synthesized by microwave-assisted coprecipitation. The effects of MNPs on the calf thymus DNA (ct DNA) were investigated by UV-vis spectra, Raman spectra and Agarose gel electrophoresis, respectively. UV-vis spectra revealed the hyperchromic effect on ct DNA due to the exposure of basic group that induced by MNPs. Raman spectra indicated that the basic group, ribodesose and backbone were disturbed in the presence of MNPs. However, Agarose gel electrophoresis confirmed that DNA melting or DNA strand break have not occurred under the influence of MNPs. The research had great significance for the safety application of MNPs in bio-medical field.

**Keywords** magnetic iron oxide nanoparticles; calf thymus DNA; microwave-assisted; hyperchromic effect; Raman spectra

磁性纳米氧化铁(MNPs)以其独特的磁性和生物相容性通过结合各种生物功能分子如酶、抗体、细胞、核酸等, 广泛应用于靶向药物、免疫测定、DNA 和细胞的分离与纯化等领域<sup>[1,2]</sup>. 磁性纳米粒子结合量子点、纳米药物、荧光染料等制备磁性纳米多功能探针在药物分析、疾病诊断、细胞及活体成像等方面具有广阔的应用前景<sup>[1,3]</sup>. 然而 MNPs 粒子的细胞毒性如何, 在应用过程

中对生物体是否会产生负面影响更是决定 MNPs 应用前景的关键所在. Pisanic 等<sup>[4]</sup>研究发现负电性磁性纳米粒子随着浓度逐渐增大明显地降低了 PC12 细胞的发育能力及细胞活性. Mahmoudi 等<sup>[5]</sup>研究表明 PVA 包裹的超顺磁纳米氧化铁粒子 (SPION) 在较高浓度时 ( $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 造成 L929 细胞凋亡和细胞周期停滞于 G1 期, 原因是它对 DNA 造成了不可逆转的损伤. 本课题组<sup>[6]</sup>

\* E-mail: hyhan@mail.hzau.edu.cn

Received December 23, 2010; revised March 18, 2011; accepted April 27, 2011.

国家自然科学基金(No. 20975042)、转基因科技重大专项(No. 2009ZX08012-015B)、武汉市青年科技晨光计划(No. 200850731359)和中央高校基本科研业务费专项资金(No. 2010 PY 009)资助项目.

研究并报道了 MNPs 与牛血清白蛋白(BSA)相互作用,发现 MNPs 与 BSA 分子通过静电作用自发结合,并改变了 BSA 分子二级结构,表明 MNPs 对蛋白质类生物大分子有一定程度的影响. DNA 是对生物的遗传和变异起决定性作用的生物大分子,有害物质通过与 DNA 直接或间接的作用,对其结构及稳定性产生影响从而导致 DNA 交联、双链断裂、碱基修饰等化学损伤,进而引起突变、畸变、癌变等遗传毒性<sup>[7]</sup>. 因此研究 MNPs 与 DNA 的相互作用具有重要的意义,将从分子水平层面考察 MNPs 的生物安全效应.

采用微波辅助共沉淀法合成 MNPs,以紫外可见吸收光谱(UV-vis)、琼脂糖凝胶电泳(GE)及拉曼光谱(Raman)研究了 MNPs 与小牛胸腺 DNA(ct DNA)的相互作用,研究结果将为 MNPs 在生物医学领域的安全应用进一步提供重要依据.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (AR), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (AR), NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (AR), C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (CP), CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (AR), HCl (AR), 以上试剂购自国药集团化学试剂有限公司, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NOH 购自上海晶纯试剂有限公司, 以上试剂直接使用; 小牛胸腺 DNA 购自北京鼎国生物技术有限公司, 使用前未经任何处理, 用超纯水配制并于 4 °C 冰箱内保存.

APEX 型微波化学工作站(上海屹尧微波化学技术有限公司); TG209 型热重分析仪(德国 NETZSCH 公司); JEOL-JEM-2010 型透射电子显微镜(日本电子公司); D/Max-3B 型 X 射线衍射仪(日本理学公司); TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); inVia 激光共聚焦显微拉曼光谱仪(英国 Renishaw 公司); DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂).

### 1.2 MNPs 的合成与表征

称取 1.39 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 2.70 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 于 100 mL 微波化学工作站专用三口烧瓶中, 加入 50 mL 超纯水溶解, 置于微波化学工作站, 氮气保护下 30 °C 搅拌反应 30 min 后迅速滴加 25% 氨水于上述溶液中, 调 pH 至 10.0 左右, 继续反应 30 min 后升温至 70 °C, 通过滴液漏斗加入油酸约 9.5 mL, 氮气保护下搅拌 30 min 后即停止反应, 丙酮洗涤数次后于 60 °C 真空箱内干燥 5 h, 即得油酸修饰 MNPs. 有关反应方程式:



通过 TEM, XRD 和 TGA 对合成的 MNPs 进行表征. 然后将 MNPs 分散于 0.01 mol/L 四甲基氢氧化铵

(TMAH)<sup>[8]</sup>溶液制备成 MNPs 水溶液, 计算其浓度为  $c_{\text{MNPs}} = 8.83 \times 10^{-4}$  g/mL.

### 1.3 MNPs 与 ct DNA 相互作用研究

#### 1.3.1 紫外-可见吸收光谱分析

配制 ct DNA 溶液, 测定其浓度为  $c_{\text{ct DNA}} = 2.97 \times 10^{-4}$  mol/L. 将 ct DNA 与 MNPs 作用前后样品( $c_{\text{MNPs}} = 8.83 \times 10^{-6}$  g/mL,  $c_{\text{ct DNA}} = 5.94 \times 10^{-5}$  mol/L,  $T = 293$  K)作 UV-vis 光谱扫描. 1.0 cm × 1.0 cm 石英样品池, 扫描范围 190~800 nm.

#### 1.3.2 拉曼光谱分析

将 ct DNA 与 MNPs 作用前后样品( $c_{\text{MNPs}} = 8.83 \times 10^{-5}$  g/mL,  $c_{\text{ct DNA}} = 5.94 \times 10^{-5}$  mol/L,  $T = 293$  K)点样于铝箔上晾干后做 Raman 光谱扫描. 扫描范围 500~2000 cm<sup>-1</sup>, He-Ne 灯光源, 10% 激光功率, 发射波长为 633 nm.

#### 1.3.3 琼脂糖凝胶电泳分析

将 ct DNA 与 MNPs 作用前后样品( $c_{\text{MNPs}} = 8.83 \times 10^{-5}$  g/mL,  $c_{\text{ct DNA}} = 1.188 \times 10^{-4}$  mol/L,  $T = 293$  K)作 GE 分析. 0.5% TAE 琼脂糖凝胶, EB 染色, Trans 15K DNA marker.

## 2 结果与讨论

### 2.1 透射电子显微镜表征

将合成的 MNPs 分散于 0.01 mol·L<sup>-1</sup> TMAH 溶液作 TEM 测试. 从图 1 中可以看出, MNPs 形貌接近于球形, 分散性较好. 通过 Photoshop CS3 软件的标尺测量 100 个粒子的近似直径, 对这 100 组数据按粒径范围分类统计, 计算每个粒径范围内粒子所占百分比, 作粒径分布图. 从图上可看出, MNPs 粒径分布集中在 10 nm 至 18 nm, 平均粒径为 14 nm.

### 2.2 X 射线衍射表征

图 2 是 MNPs 的 X 射线衍射图, 图中 X 射线衍射峰出现的位置与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 标准 XRD 比较, 各谱线均在(220), (311), (222), (400), (422), (511)和(440)处出现衍射峰, 结果与 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 标准图谱相一致, 大小和位置完全吻合, 为反尖晶石结构特征峰<sup>[9]</sup>. 由于 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 吸收微波少量粒子结构发生改变, 变为 γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 结构<sup>[10,11]</sup>, 所以微波辅助合成的磁性纳米粒子以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为主, 掺杂少量 γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

### 2.3 热重分析表征

油酸作为一种表面修饰试剂包覆于 MNPs 粒子表面是为了有效阻止 MNPs 粒子之间的团聚, 控制 MNPs 的粒径在较窄的范围, 同时增强 MNPs 的稳定性. 对油酸包覆的 MNPs 进行热重分析, MNPs 失重百分数为

45.75%, 即 MNPs 表面油酸的含量约为 45.75%.

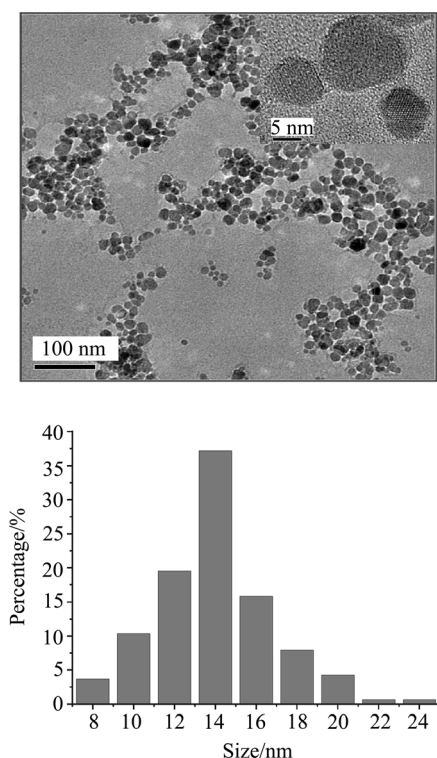


图 1 MNPs 的 TEM 照片及粒径分布柱形图

Figure 1 TEM image and particle size distribution of MNPs

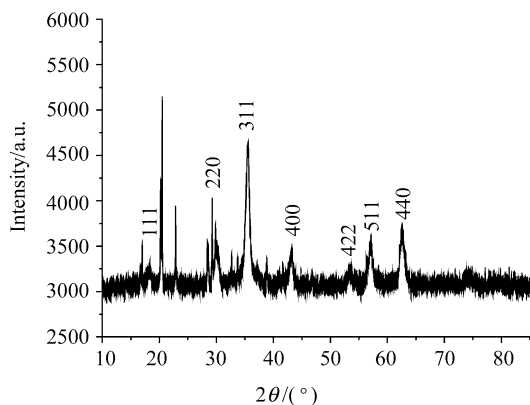


图 2 MNPs 的 XRD 图

Figure 2 XRD patterns of MNPs

## 2.4 紫外-可见吸收光谱研究 MNPs 与 ct DNA 相互作用

在生物化学中, 增色效应是指 DNA 在紫外 260 nm 处吸光值增加的现象, DNA 分子之所以具有紫外吸收是因为存在嘧啶碱基和嘌呤碱基, 而变性会使在 DNA 双螺旋内侧的碱基暴露, 因此其吸光值更高<sup>[12]</sup>. 如图 3 所示, ct DNA 与 MNPs 相互作用前后 UV-vis 峰相对强度发生明显变化, 二者作用后 260 nm 处 UV-vis 吸光值(4)明显高于同浓度条件下 MNPs (2)和 ct DNA (1)的 UV-vis

图谱的叠加, 即二者反应前的 UV-vis 吸光值(3), 这是因为 MNPs 表面包裹油酸分子, 其空间位阻较大, 较难与 DNA 中的磷酸基团结合, 但可与 DNA 中的碱基结合, 因此增色效应的产生是由于 MNPs 与 DNA 碱基的配位作用导致 DNA 双螺旋内侧的碱基外露<sup>[13]</sup>. MNPs 与变性 ct DNA 相互作用具有类似的结果, 即 MNPs 也在一定程度上干扰变性 ct DNA 的分子结构.

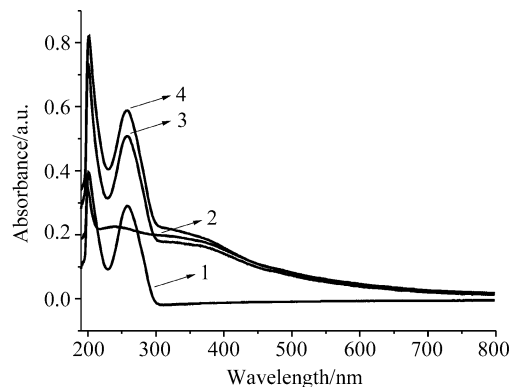


图 3 ct DNA 与 MNPs 相互作用的 UV-vis 图 (1) ct DNA; (2) MNPs; (3) 1 和 2 的叠加, 即 ct DNA 与 MNPs 作用前; (4) ct DNA 与 MNPs 作用后

Figure 3 UV-vis spectra of the (1) ct DNA, (2) MNPs, (3) the sum of the absorbance of ct DNA and MNPs, (4) the absorption spectrum of the mixture (ct DNA and MNPs)

## 2.5 拉曼光谱研究 MNPs 与 ct DNA 相互作用

ct DNA 在  $600\text{ cm}^{-1}$  至  $1800\text{ cm}^{-1}$  范围内的拉曼谱线分别表示腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、脱氧核糖和整个 DNA 骨架的振动和转动. 如图 4 所示, a, b, e, f, g, h, i, j 箭头标示处为碱基特征峰形, c, d 箭头标示处为脱氧核糖的特征峰形<sup>[14]</sup>.  $620\sim 685\text{ cm}^{-1}$  (a)区间拉曼峰归属于 ct DNA 糖基扭转和 dG 残基的糖基折叠构型;  $729\text{ cm}^{-1}$  (b)拉曼峰对应于 A;  $800\sim 1100\text{ cm}^{-1}$  (c, d)区间是 ct DNA 的几何骨架及二级结构的特征峰,  $834\text{ cm}^{-1}$  是 B-DNA 的结构特征峰(一般认为 DNA 在水溶液中呈 B 型);  $1092\text{ cm}^{-1}$  (e)拉曼峰归属于磷酸基;  $1200\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  (f, g, h, i)区间的拉曼峰分别归属于嘌呤和嘧啶的振动;  $1489\text{ cm}^{-1}$  (i)归属于 G;  $1258\text{ cm}^{-1}$  (g)附近拉曼峰归属于 C; 拉曼峰在  $1240\text{ cm}^{-1}$  (f)附近拉曼峰归属于 B-DNA 分子中的 T; 以  $1668\text{ cm}^{-1}$  (j)为中心的拉曼峰是 dT, dG 和 dC 的共轭 C=O 伸缩振动及 N-H 形变的拉曼峰的叠加<sup>[15]</sup>. ct DNA 与 MNPs 作用后碱基、脱氧核糖以及磷酸骨架拉曼峰相对强度均发生了变化, MNPs 的干扰引起 ct DNA 分子中的碱基外露, 但对不同碱基之间干扰程度不同, 对腺嘌呤(A 和 G)影响相对较明显, 同时对脱氧核糖和磷酸骨架也有一定程度干扰, 但并未使 ct DNA 发生双链解开、断裂等本质性变

化.

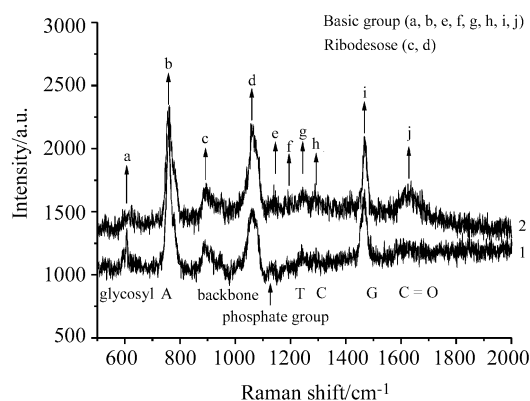


图4 ct DNA 与 MNPs 作用前(1)后(2)的拉曼光谱

Figure 4 Raman spectra of ct DNA before (1) and after (2) adding MNPs

## 2.6 琼脂糖凝胶电泳分析 MNPs 与 ct DNA 相互作用

琼脂糖凝胶电泳是常用的分离、纯化和鉴定 DNA 分子片段的方法,以琼脂糖作为支持物,借助其分子筛作用, DNA 核酸片段因其分子量或分子形状不同,电泳移动速度的差异而分离.理论依据是 DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷,在电场中向阳极移动;当电场强度恒定时, DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应,即分子的大小和构型是其迁移速度的重要影响因素.如图 5 所示, 1, 2, 3 泳道中 ct DNA 分子的迁移速度基本相同,说明 ct DNA 分子大小和构型均未发生明显变化,即 MNPs 并未导致 ct DNA 分子双螺旋结构的断裂、损伤<sup>[16]</sup>.

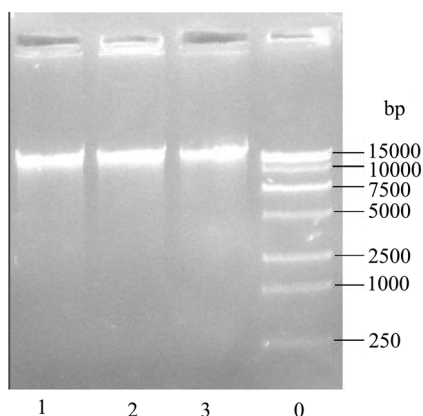


图5 ct DNA 与 MNPs 作用前(1)后(2)的凝胶电泳图

(1) 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液中的 ct DNA 溶液; (2) 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液中的 ct DNA 与 MNPs 混合液; (3) ct DNA 水溶液; (0) DNA marker

Figure 5 Agarose gel electrophoresis of ct DNA before (1) and after (2) interaction with MNPs

(1) The ct DNA in 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl buffer solution, (2) the mixture of ct DNA and MNPs in 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl buffer solution, (3) the ct DNA in ultrapure water, (0) the 15K DNA marker

## 3 结论

以微波辅助共沉淀法合成了平均粒径 14 nm, 表面油酸含量为 45.75%, 反向尖晶石结构的球形 MNPs. 采用 UV-vis, GE 和 Raman 光谱研究了 MNPs 与 ct DNA 的相互作用: (1)通过 UV-vis 研究发现 MNPs 与 ct DNA 碱基配位结合导致碱基外露而引起明显的增色效应; (2) Raman 光谱研究进一步证实 MNPs 对 ct DNA 分子的碱基、脱氧核糖以及磷酸骨架均有一定程度的干扰作用; (3)而 GE 研究表明与 MNPs 作用前后 ct DNA 并未发生双链解开或断裂为多个分子片段等本质性的变化. 研究结果对 MNPs 在靶向药物、免疫测定、疾病诊断、活体成像等生物医学领域的应用安全性具有重要的意义.

致谢 感谢武汉大学分析测试中心在样品 TEM 测试方面提供的帮助.

## References

- Gao, J. H.; Gu, H. W.; Xu, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1097.
- Corchero, J. L.; Villaverde, A. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 468.
- Liu, X.; Zheng, C.-Z.; Yang, Y.-X.; Liang, J.-G.; Han, H.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2010**, *68*, 793 (in Chinese). (刘欣, 郑成志, 杨逸仙, 梁建功, 韩鹤友, 化学学报, **2010**, *68*, 793.)
- Pisanic II, T. R.; Blackwell, J. D.; Shubayev, V. I.; Fiñones, R. R.; Jin, S. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2572.
- Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 9573.
- Yang, Q. Q.; Liang, J. G.; Han, H. Y. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10454.
- Tong, S.-L.; Hu, Z.; Liu, W.-P. *Acta Chim. Sinica* **2010**, *68*, 1404 (in Chinese). (童裳伦, 胡洲, 刘维屏, 化学学报, **2010**, *68*, 1404.)
- Cheng, F. Y.; Su, C. H.; Yang, Y. S.; Yeh, C. S.; Tsai, C. Y.; Wu, C. L.; Wu, M. T.; Shieh, D. B. *Biomaterials* **2005**, *26*, 729.
- Jiang, W.; Wen, X.-T.; Wang, W.; Wu, Y.; Gu, Z.-W. *Chinese J. Inorg. Chem.* **2009**, *24*, 727 (in Chinese). (江雯, 温贤涛, 王伟, 吴尧, 顾忠伟, 无机化学学报, **2009**, *24*, 727.)
- Zhong, L. S.; Hu, J. S.; Liang, H. P.; Cao, A. M.; Song, W. G.; Wan, L. J. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2426.
- Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273.
- Li, W.-Y.; Zhu, S.-T.; He, X.-W.; Liang, H. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 105 (in Chinese). (李文友, 朱守田, 何锡文, 梁宏, 化学学报, **2002**, *60*,

- 105.)
- 13 Zhang, Z.-H.; Zang, S.-L.; Su, X.; Wu, L.-Y.; Geng, B. *Chinese J. Spectrosc. Lab.* **2005**, *22*, 819 (in Chinese).  
(张朝红, 臧树良, 苏欣, 吴林友, 耿兵, 光谱实验室, **2005**, *22*, 819.)
- 14 Duguid, J.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J.; Thomas, Jr. G. *J. Biophys. J.* **1993**, *65*, 1916.
- 15 Duguid, J. G.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J. M.; Thomas, Jr. G. *J. Biophys. J.* **1995**, *69*, 2623.
- 16 Křizová, J.; Španová, A.; Rittich, B.; Horák, D. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1064*, 247.

(A1012236 Cheng, B.)