

文章编号: 1000-5862(2014)02-0180-07

# DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 复合物相互作用的研究

黄 梅, 叶树虹, 宋永海\*

(江西师范大学化学化工学院, 江西 南昌 330022)

**摘要:** 采用荧光光谱、原子力显微镜、琼脂糖凝胶电泳等技术探究 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 的相互作用. 研究发现, 小粒径的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 除了有特异性结合, 还发生非特异性结合. DNA 相对浓度比较大以及恒温孵育时间较短时, 以特异性结合为主; 而随着 DNA 相对浓度的减小以及恒温孵育时间的延长, 会伴有非特异性结合.  $\text{Ca}^{2+}$  存在时, 可以通过延长孵育时间“激活”酶切反应, 使得 DNA 被剪切. 因此可以通过改变 DNA 相对浓度和孵育时间来调控 EcoRI 对 DNA 的剪切.

**关键词:** CdS-COOH; EcoRI; DNA; CdS-COOH-EcoRI 复合物; 荧光光谱; 原子力显微镜; 琼脂糖电泳

**中图分类号:** Q 523; TB 383.1

**文献标志码:** A

## 0 引言

纳米生物技术是纳米技术和分子生物学的融合, 是当今热点课题之一, 被广泛地应用于生物医药领域<sup>[1]</sup>. 其中基于该技术的传感器, 可以用来监测人体的健康状况<sup>[2]</sup>. 由于这些生物纳米粒子的生物相容性以及对生命体的安全性需要得到保障, 生物纳米粒子与生命体内的生物大分子之间的相互作用的研究则显得至关重要. 对纳米粒子与蛋白质形成的复合物与 DNA 之间相互作用的研究, 仍是纳米生物领域的重点研究课题. 本文主要探索固载在 CdS 纳米粒子表面的限制性内切酶 EcoRI 与 DNA 之间的相互作用.

EcoRI 是一种限制性内切酶, 是生物体内非常重要的一种酶, 同时又被广泛研究, 已有数据可直接为本研究提供参考. 它具有特异性作用, 即它能够特异性地切割 DNA 的 GAATTC 序列<sup>[3-4]</sup>.

本这通过原子力显微镜、琼脂糖电泳等表征手段研究了 2 种粒径的 CdS-EcoRI 复合物分别与不同序列、长度、形状的 DNA 的相互作用. 然后选用其中 1 种 DNA (pBR322DNA) 根据结合数量的柱状分布图统计分析, 研究了 DNA 相对浓度大小、孵育时间

对小粒径 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 结合方式的影响, 并在  $\text{Ca}^{2+}$  离子存在下探究了 CdS-COOH-EcoRI 中 CdS-COOH 纳米粒子在 EcoRI 对 DNA 酶切作用的影响. 研究发现 CdS-COOH-EcoRI 复合物粒径、CdS-COOH-EcoRI 复合物中 CdS-COOH 纳米粒子、恒温孵育时间以及 DNA 相对浓度大小对 EcoRI-DNA 酶切作用都有一定的影响.

## 1 实验

### 1.1 仪器和实验

Perkin-Elmer LS 55 luminescence 荧光分光光度计; AJ-III 原子力显微镜 AFM (上海爱建纳米科技); Mini-PROTEAN 电泳仪 (美国伯乐); Anke TGL-48C-C 离心机 (上海安亭科学仪器); 79-1 磁力加热搅拌器 (江苏中大仪器); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); DKB-501A 超级恒温水槽 (上海森信实验仪器有限公司).

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CdCl}_2$  (上海阿拉丁), 巯基十一酸 (MUA, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 95%),  $\lambda$ -DNA、pBR322DNA (4 361 bp)、 $\lambda$ -Hind III digest DNA Marker、琼脂糖 (宝生物工程 (大连) 有限公司), EcoRI (宝生物工程 (大连) 有限公司), 大肠杆菌,

收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 国家自然科学基金 (20905032, 21065005), 江西省教育厅科技项目 (GJJ10389) 和电分析化学国家重点实验室基金 (2008003) 资助项目.

通信作者: 宋永海 (1974-), 男, 吉林蛟河人, 教授, 博士, 主要从事表/界面扫描探针显微分析、生物电化学研究.

RY13) ,10 × TAE 缓冲液( 2.42 g Tris ,571 μL 醋酸 ,0.372 g EDTA ,8 mL 3 次蒸馏水) ,GelRed Nucleic Acid Gel stain( 美国 Biotium 公司) . 其他试剂购买于中国北京化学试剂公司 ,为分析纯 ,使用前未经纯化. 云母(  $KAl_2(AlSi_3)O_{10}(OH)_2$  ) 购买于中国长春.

## 1.2 实验过程

1.2.1 CdS-COOH-EcoRI 复合物的制备 取适量  $CdCl_2$  和  $Na_2S \cdot 9H_2O$  制得  $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  水溶液 ,在氮气氛围中于  $30^\circ C$  恒温搅拌 15 min ,随后逐滴滴加 pH 值为 10.0 的 MUA 的 NaOH 溶液. 在搅拌的条件下 ,向溶液中缓慢加入与  $CdCl_2$  等量  $Na_2S$  溶液 ,于  $75^\circ C$  反应 6 h. 通过调节 MUA 与  $Cd^{2+}$  物质的量之比来控制 2 种粒径 CdS-COOH 纳米粒子的大小.

将  $Na_2HPO_4$  和  $NaH_2PO_4$  按 123: 877 的体积比混合配制 pH 值约为 6.0 的  $0.2 \text{ mol} \cdot L^{-1}$  磷酸缓冲溶液( PBS 溶液) . 将已制得的 2 种 CdS-COOH 纳米粒子与 EcoRI 按所需的浓度比混合于 500 μL 以上 PBS 溶液中 ,于  $4^\circ C$  条件下孵育 1 h 后取出 ,进行离心操作 ,转速和时间分别设为  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  ,10 min ,接着去除上层清液 ,得到 CdS-COOH-EcoRI 复合物溶液. 制得的 CdS-COOH-EcoRI 粒径分别为 4.3 nm 和 2.6 nm.

1.2.2 荧光光谱分析 配制 EcoRI 溶液(  $0.025 \text{ U} \cdot \mu L^{-1}$  )、CdS-COOH-EcoRI 溶液( 两者浓度配比分别为  $0.1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  和  $0.025 \text{ U} \cdot \mu L^{-1}$  ) . 使用 1 cm 石英比色皿 ,在 280 nm 的激发波长下测试 200 ~ 700 nm 范围的荧光光谱. 使用 PBS 溶液做背景校正.

1.2.3 原子力 AFM 表征 本实验使用原子力显微镜( AFM) 来表征 DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 结合后的形貌特征. 操作在室温下进行 ,采用标准硅探针并选用轻敲模式 ,其共振频率为 60 ~ 150 kHz. 将基底云母剪切至约  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$  ,使用前将其正反两面黏黏数次直至云母表面抛光无明显可见裂纹.

将  $\lambda$ -DNA 溶液分别与 2 种粒径的 CdS-COOH-EcoRI 溶液混合 ,pBR322DNA 溶液分别与 2 种粒径的 CdS-COOH-EcoRI 溶液混合 ,制得 DNA-CdS-COOH-EcoRI( 三者浓度分别  $2.0 \text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$  , $0.1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  , $3.6 \text{ U} \cdot \mu L^{-1}$  ) 溶液. 在制得的混合溶液中分别加入  $1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  醋酸钙溶液 ,于  $37^\circ C$  恒温孵育一定长时间. 取约 30 μL 上述 DNA-CdS-COOH-EcoRI

溶液滴于新制的云母片上 ,吸附约 13 min 后依次用体积比为 1: 1 的超纯水/无水乙醇、无水乙醇漂洗 5 次 ,然后放入干燥器中干燥即可.

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳测试 琼脂糖凝胶电泳是鉴定核酸的一种有力手段 ,如 DNA 检测、DNA 限制性内切酶图谱制作等<sup>[5-6]</sup> . 实验所用琼脂糖浓度为 1% . 实验时需将配制的 10 × TAE 缓冲液稀释至 1/10 使用. 配制 40 ng Marker ,pBR322DNA 溶液(  $4 \text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$  ) ,CdS-COOH(  $1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  )-EcoRI( 1 U) -pBR322DNA(  $4 \text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$  ) 溶液 ,以上电泳试液都需在  $37^\circ C$  条件下恒温孵育相应的时间. 分别取以上试液 10 μL 于琼脂糖电泳泳道 ,在 120 V 电压下进行约 30 min 的琼脂糖电泳测试 ,电泳结束后用 2 μL GelRed 进行染色.

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 的结合作用

图 1( A) 为 CdS-COOH 与 EcoRI 相互作用示意图. 本文首先采用荧光光谱法探究其相互作用. 图 1( B) 为 280 nm 激发波长下 305 nm 处 EcoRI 的荧光发射峰( CdS-COOH 纳米粒子的荧光发射峰不在此处) . 向 EcoRI 中加入 CdS-COOH 纳米粒子后 EcoRI 的荧光峰强度明显减弱 ,即出现猝灭现象 ,此现象表明 EcoRI 与 CdS-COOH 纳米粒子发生了相互作用. 图 1( C) 、图 1( D) 是 CdS-COOH-EcoRI 复合物的 AFM 形貌表征图 ,粒径分别约为 4.3 nm 和 2.6 nm.

图 2( A) 、图 2( C) : 粒径约为 4.3 nm CdS-COOH-EcoRI 分别与 pBR322DNA、 $\lambda$ -DNA 结合的形貌图. 图 2( B) 、图 2( D) 分别为 CdS-COOH-EcoRI 与 pBR322DNA 结合数量、结合数量的柱状分布图. 由图 2 能够清晰看出 CdS-COOH-EcoRI 与 DNA 发生了结合.

指标准条件下 EcoRI 能够识别进而结合 DNA 分子序列中的 5' GAATTC3' 位点 ,这一过程构成了 EcoRI 对 DNA 的特异性结合. EcoRI 对 pBR322DNA 和  $\lambda$ -DNA 的识别位点分别为 1 个和 5 个<sup>[7-8]</sup> . 根据柱状图 2( B) 、图 2( D) 统计分析得出 ,1 个  $\lambda$ -DNA 分子( 分子长度约 16 μm) 大约结合 4 ~ 5 个 CdS-COOH-EcoRI 复合物 ,而 1 个 pBR322DNA 分子( 分子长度约 1.48 μm) 大约结合 1 个 CdS-COOH-EcoRI 复合物 ,这与 EcoRI 在这 2 种 DNA 分子链上

的特异性识别位点数一致. 结果表明粒径该粒径的 异性结合.  
CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 发生了有效的特

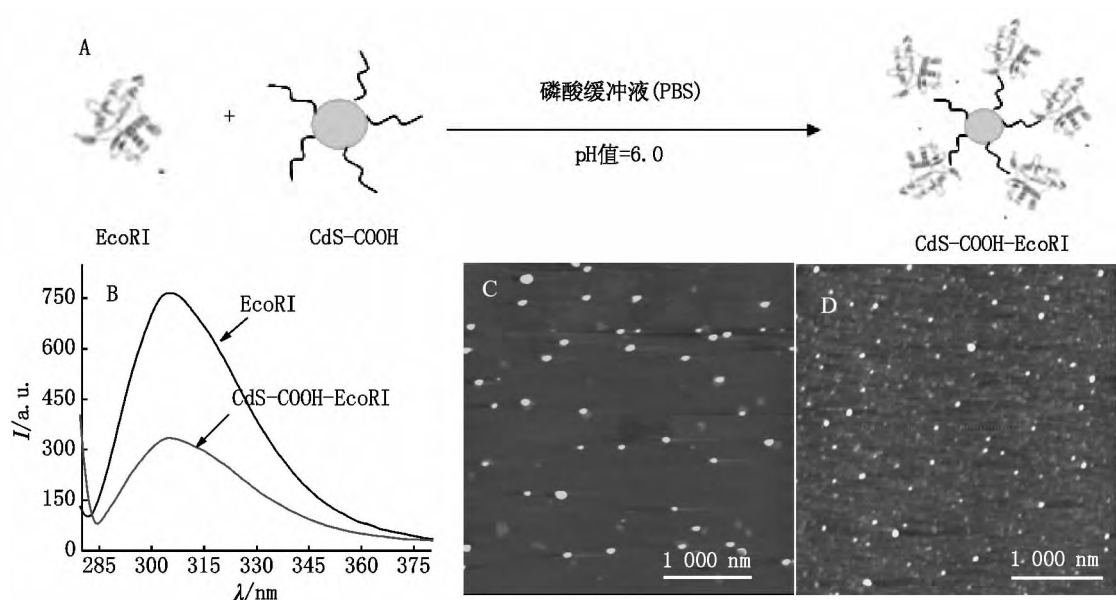


图1 (A) CdS-COOH-EcoRI 复合物合成示意图. (B) EcoRI ,EcoRI-CdS-COOH 的荧光光谱图  $\lambda_{ex} = 280\text{ nm}$ .  
(C) 粒径约 4.3 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物 AFM 形貌表征图. (D) 粒径约 2.6 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 AFM 形貌表征图

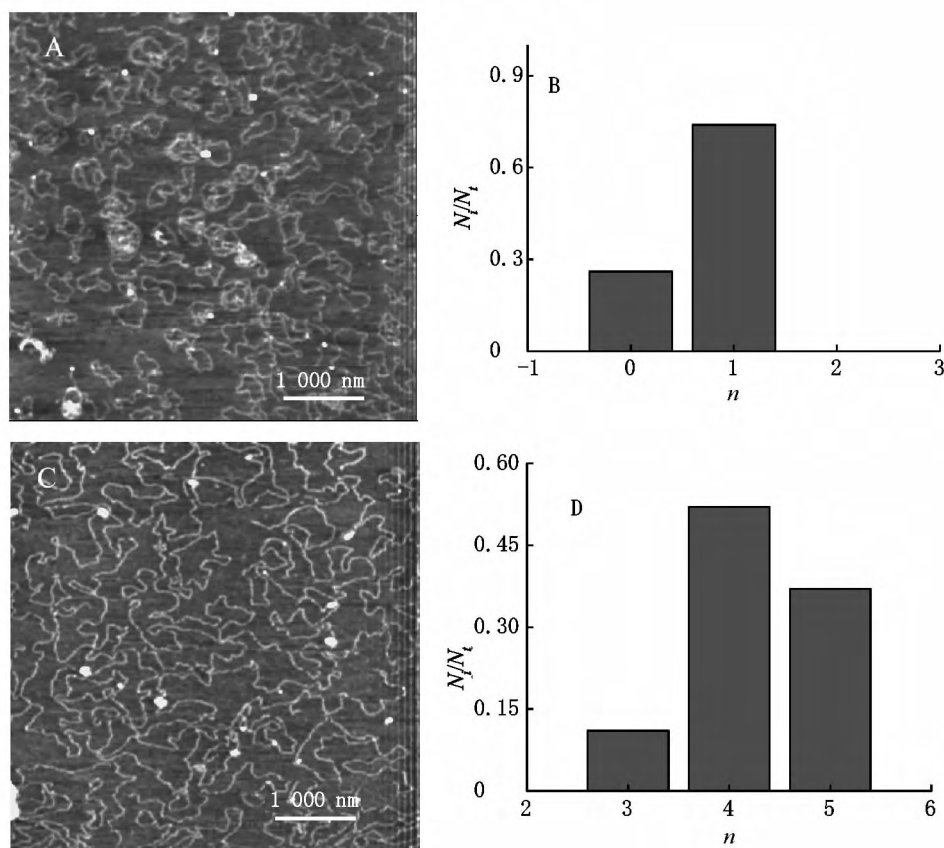


图2 粒径约 4.3 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 的 AFM 形貌表征图及柱状分布图

同理, 粒径约为 2.6 nm CdS-COOH-EcoRI 复合物分别与 pBR322DNA、 $\lambda$ -DNA 结合, 并进行 AFM 形貌表征, 得到相应的 AFM 形貌图以及结合数量的柱状分布图. 3(A)、图 3(C) 显示 CdS-COOH-EcoRI

与 DNA 发生了结合. 对比图 2, 图 3 柱状图显示 CdS-COOH-EcoRI 与 DNA 的结合数量超出了特异性识别位点数. 在一些特殊条件下, 会出现星号活动现象<sup>[9]</sup>, 即限制性内切酶的识别能力和特异性下降, 结合位点数增加. 如在体积浓度超过 5% 的甘油

中, EcoRI 也可识别结合 5' PuPuATPyPy3' 或者 5' AATT3' 等实验现象表明该粒径的 CdS-COOH 纳米粒子与 EcoRI 形成复合物之后, 一定程度上影响了 EcoRI 对 DNA 序列的特异性识别能力, 同时存在特异性结合和非特异性结合.

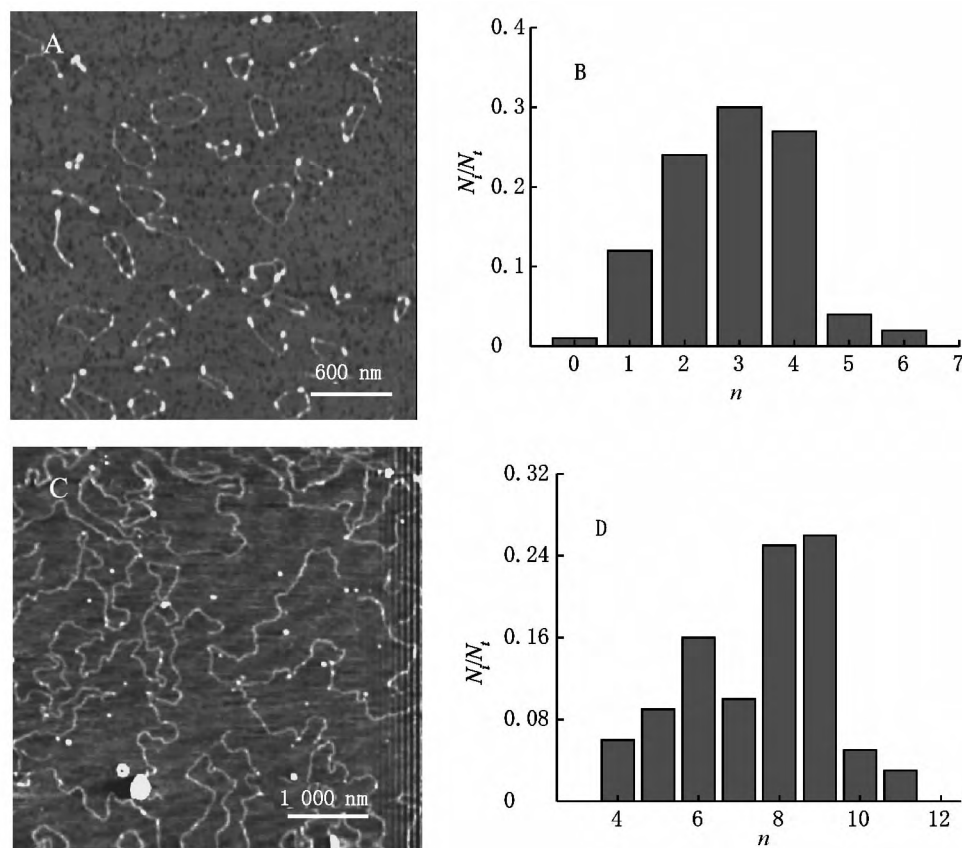


图3 粒径约 2.6 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 的 AFM 形貌表征图及柱状分布图

## 2.2 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 结合方式的研究

由上述结论可知, 小粒径 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 之间除了有效的特异性结合外, 还有非特异性结合. 接下来主要探讨粒径约 2.6 nm CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 在不同条件下的结合方式.

**2.2.1 DNA 浓度对结合方式的影响** 此处探讨小粒径 CdS-COOH-EcoRI 与不同浓度 pBR322DNA 相互作用的结合方式. 由图 4(B)、图 4(D) 可知, 1 分子 pBR322DNA ( $1.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 约结合 3~4 个 CdS-COOH-EcoRI 复合物, 而 pBR322DNA 浓度为  $2.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时, 结合数量为 1 个左右. 结果表明, 在有足够的 DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 结合的情况下, DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 主要表现为特异性结

合; 而当 DNA 浓度较小时, CdS-COOH-EcoRI 浓度相对过剩, 则还会进一步与 DNA 发生非特异性结合. 由此可推断, CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 结合时首先发生的是特异性结合.

**2.2.2 不同孵育时间对结合方式的影响** 接着探讨了 DNA 与 CdS-COOH-EcoRI 在不同孵育时间下相互作用的结合方式. 图 5 为  $1.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  pBR322DNA 与粒径约 2.6 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物在恒温  $37^\circ\text{C}$  条件下经过不同孵育时间的结合情况的形貌表征图. 其中 (A) 孵育 0.5 h, (B) 孵育 1.0 h, (C) 孵育 1.5 h. EcoRI 与 DNA 的特异性结合方式是移动式, 即 EcoRI 随机的接触到 DNA 分子链后会沿着 DNA 双螺旋链移动, 当找到特异性位点或者最终与 DNA 分离时, 移动停止<sup>[10-11]</sup>.

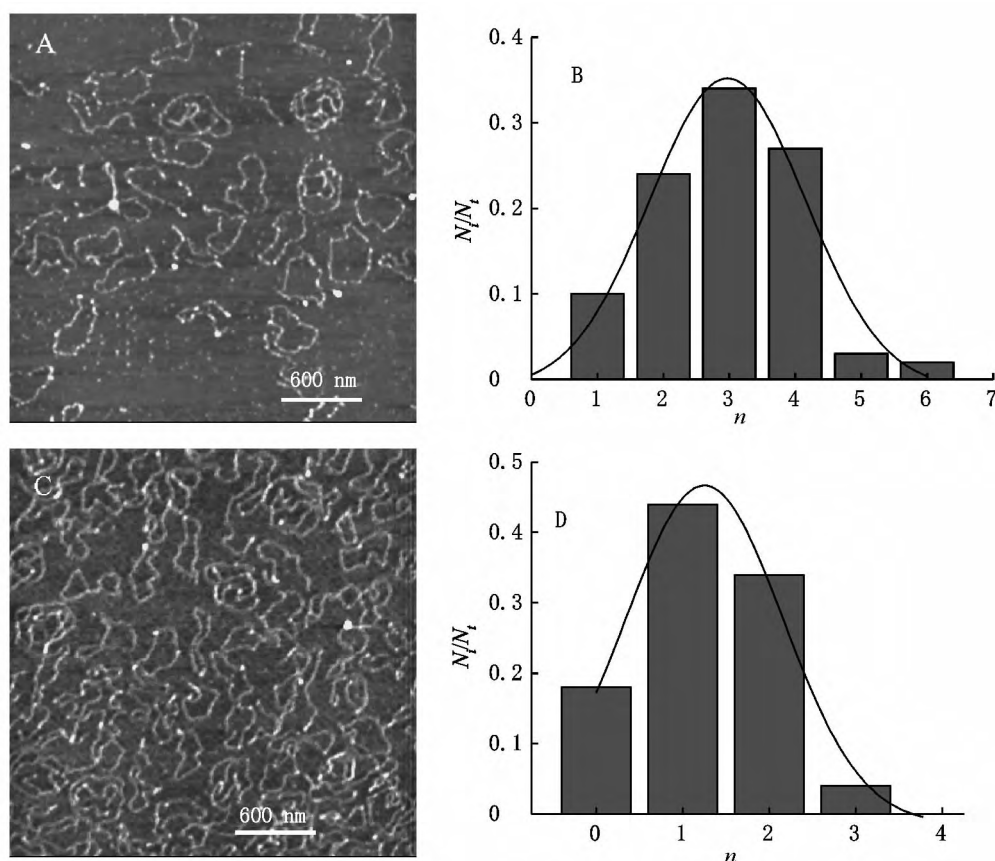


图4 粒径约 2.6 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与不同浓度 pBR322DNA 结合的 AFM 形貌表征图及柱状分布图

由图 5 可知,在其它实验条件相同时,恒温 0.5 h CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 的结合位点较少,这是由于 EcoRI 对 DNA 的特异性识别位点,从识别到结合需要一定的过程,恒温时间较短特异性识别结合不充分.随着孵育时间增加到 1.0 h, pBR322DNA 上结合的 CdS-COOH-EcoRI 复合物数量相应增多.这与 CdS-COOH-EcoRI 复合物首先与 DNA 发生特异性结合,剩余的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 发生非特异性结合的推断一致. EcoRI 对 DNA 的酶切作用需在  $Mg^{2+}$  等二价离子存在时完成,当溶液中的二价离子为  $Ca^{2+}$  时,它只结合到 GAATTC 序列而不能将 DNA 切割<sup>[12]</sup>. 图 5 (C) 显示,当恒温孵育时间继续增加到 1.5 h 左右,即使溶液中的二价离子为  $Ca^{2+}$ , pBR322DNA 仍被剪切成环.说明除了  $Ca^{2+}$  还存在由 CdS-COOH-EcoRI 复合物中游离出来的  $Cd^{2+}$ .

将恒温孵育不同时间的 CdS-COOH-EcoRI-DNA 混合液进行琼脂糖凝胶电泳分析测试,泳带 1 ~ 5 分别是: Marker, pBR322DNA, CdS-COOH-EcoRI-

pBR322DNA 恒温孵育 0.5 h, CdS-COOH-EcoRI-pBR322DNA 恒温孵育 1.0 h, CdS-COOH-EcoRI-pBR322DNA 恒温孵育 1.5 h. 如图 5 (D) 所示,恒温孵育 1.5 h 后,在缓冲液中的二价阳离子为  $Ca^{2+}$  (DNA 不会被 EcoRI 剪切) 条件下 DNA 仍然被剪切,这与图 4 AFM 的形貌表征图所得的实验结果相一致.这可能是由于在  $Ca^{2+}$  离子“关闭”了 EcoRI 的酶切作用基础上,较长的恒温孵育时间能够使 CdS-EcoRI 复合物中有  $Cd^{2+}$  离子游离出来,“激活”EcoRI 剪切 DNA 这一酶切反应,从而剪切 pBR322DNA.

结合图 5 (B) 和图 5 (D), 1 个 pBR322DNA 分子上结合了多个 CdS-COOH-EcoRI 复合物,但是电泳过程中 pBR322DNA 并没有被剪切成多个片段,表明 CdS-COOH-EcoRI 复合物是按照特异性识别的位点对 DNA 进行剪切的.由于 CdS-COOH-EcoRI 复合物中的 CdS-COOH 纳米粒子一定程度上会影响复合物对 DNA 的酶切作用,所以需要控制与 DNA 的结合作用时间来控制特异性结合的剪切作用.

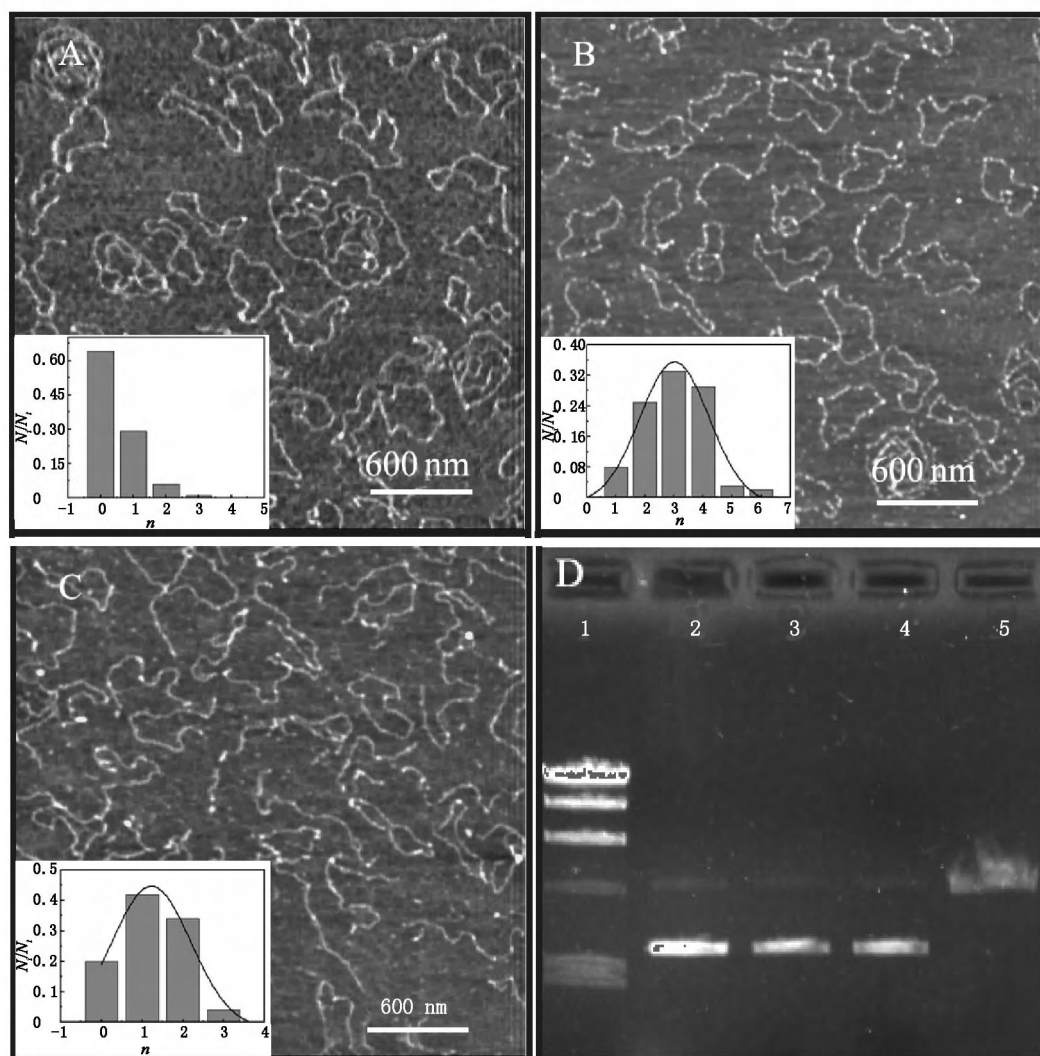


图5 (A) (B) (C) 粒径约 2.6 nm 的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 pBR322DNA ( $1.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 在不同孵育时间下结合的 AFM 形貌表征图; (D) 琼脂糖电泳图

切作用的程度.

### 3 结论

利用荧光光谱、原子力显微镜、琼脂糖电泳等表征手段统计分析得出, CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 之间发生了有效的特异性结合, 另外, 小粒径的 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 之间还存在非特异性结合. 当 DNA 浓度比较大以及混合孵育时间较短时以特异性结合为主. DNA 的相对浓度较小以及较长反应时间时则同时存在特异性结合和非特异性结合. 由于 CdS-COOH 与 EcoRI 结合形成复合物后, 能对 EcoRI 的酶活性产生一定的影响, 此时即使溶液中有  $\text{Ca}^{2+}$ , 较长的孵育时间也能使复合物中的离子游离出来“激活”酶切反应, 从而剪切 DNA. 由此, 可以通过调节 CdS-COOH-EcoRI 复合物与 DNA 作用的相对浓度和反应时间来控制结合的过程和酶

### 4 参考文献

- [1] Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications [J]. *Angew Chem Int Ed* 2004; 43: 6042-6108.
- [2] Niemeyer C N. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science [J]. *Angew Chem Int Ed* 2001; 40: 4128-4158.
- [3] Allison D P, Kerper P S, Doktycz M J, et al. Direct atomic force microscope imaging of EcoRI endonuclease site specifically bound to plasmid DNA molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8826-8829.
- [4] Allison D P, Kerper P S, Doktycz M J, et al. Mapping individual cosmid DNAs by direct AFM imaging [J]. *Genomics* 1997; 41: 379-384.
- [5] Costa F O, Neuparth T, Helena Costa M, et al. Detection of

- DNA strand breakage in a marine amphipod by agarose gel electrophoresis: exposure to X-rays and copper [J]. *Bio-markers* 2002 7(6): 451-463.
- [6] 潘伟明. 琼脂糖凝胶电泳装置及方法的改进 [J]. *中山大学学报: 自然科学版* 2004 24(1): 241-244.
- [7] Lu A L, Jack W E, Modrich P. DNA determinants important in sequence recognition by EcoRI endonuclease [J]. *J Biol Chem* 1981 256(24): 13200-13206.
- [8] Allison D P, Kerper P S, Doktycz M J, et al. Direct atomic force microscope imaging of EcoRI endonuclease site specifically bound to plasmid DNA molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 93: 8826-8829.
- [9] Sidorova N Y, Rau D C. Differences between EcoRI non-specific and "Star" sequence complexes revealed by osmotic stress [J]. *Biophys J* 2004 87: 2564-2576.
- [10] Jeltsch A, Alves J, Wolfes H, et al. Pausing of the restriction endonuclease EcoRI during linear diffusion on DNA [J]. *Biochemistry* 1994 33: 10215-10219.
- [11] Sun J, Viadiu H, Aggarwal A K, et al. Energetic and structural considerations for the mechanism of protein sliding along DNA in the nonspecific BamHI-DNA complex [J]. *Biophys J* 2003 84: 3317-3325.
- [12] Vipond I B, Baldwin G S, Halford S E. Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI Restriction [J]. *Biochemistry* 1995 34: 697-704.

## The Study on the Interaction between DNA and CdS-COOH-EcoRI Complex

HUANG Mei, YE Shu-hong, SONG Yong-hai\*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

**Abstract:** In this work, the interaction between CdS-COOH-EcoRI complex and DNA were studied with a combination of fluorescence spectroscopy, atomic force microscopy, agarose gel electrophoresis technology. In the study, it was found that in addition to specific combination there also exists nonspecific combination. Specific combination is dominant in the condition of relatively low DNA concentration and short thermostatic incubation time. However, non-specific combination also occurs with the decrease of the relative DNA concentration and thermostatic incubation time. If there exists  $\text{Ca}^{2+}$  cationic in the solution, the incubation time can be prolonged to "activate" enzyme reaction, thus making the DNA sheared. From this, the relative DNA concentration and incubation time were allowed to alter so as to control the shearing of DNA by EcoRI.

**Key words:** CdS-COOH; EcoRI; DNA; CdS-COOH-EcoRI complexes; fluorescence spectroscopy; atomic force microscopy; agarose electrophoresis

(责任编辑: 刘显亮)