УДК 543.426: 546.661: 541.49

Ю. В. Скрипинец, Д. И. Александрова, А. В. Егорова
Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ЗОНДА КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ТЕРБИЯ С ЭНРОФЛОКСАЦИНОМ

Установлено увеличение интенсивности 4*f*–люминесценции тербия(III) в его комплексе с энрофлоксацином в присутствии двуспиральной ДНК. В оптимальных условиях интенсивность люминесценции тербия пропорциональна концентрации ДНК в интервале 1,0–1500 нг/мл (предел обнаружения 0,5 нг/мл).
Ключевые слова: люминесценция, тербий, энрофлоксацин, ДНК.

Определение микроколичеств нуклеиновых кислот относится к актуальным задачам биоаналитической химии [1]. Для их решения используют люминесцирующие органические красители: этидий бромид [2], Hoechst 33258 [3], YOYO и TOTO [4, 5]. Наиболее чувствительными из органических красителей являются Oli Green и Pico Green [6, 7]. Необходимо отметить, что большинство органических красителей, применяемых для люминесцентного определения ДНК, относятся к весьма дорогостоящим веществам, а некоторые из них (этидий бромид) обладают канцерогенными свойствами.

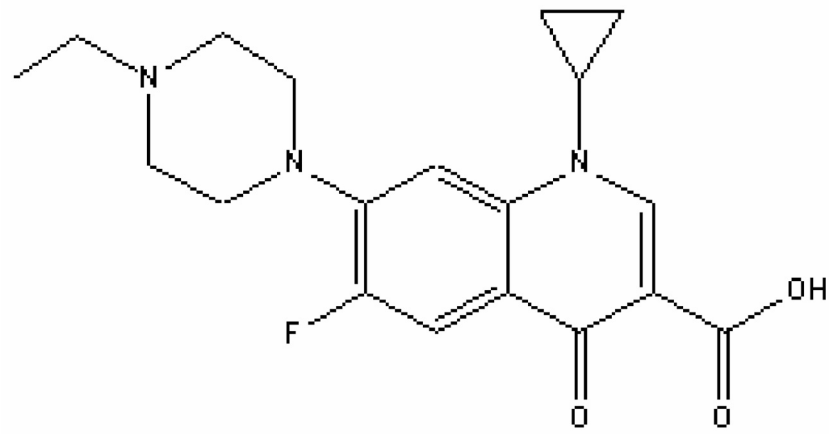
Наряду с органическими зондами для люминесцентого определения ДНК применяют металлокомплексы [8, 9], в том числе комплексные соединения лантанидов [10–14], люминесценция которых является результатом эффективной внутримолекулярной передачи энергии с возбужденного триплетного уровня органической части молекулы на возбужденный уровень центрального иона. Для этих комплексов характерно наличие узких полос в спектрах люминесценции, большое стоксовское смещение, длительное время жизни, что позволяет уменьшить влияние биоматрицы.

Известно, что в комплексах Eu(III) и Tb(III) с рядом антибиотиков фторхинолонового ряда, обладающих аффинитетом к молекулам ДНК, реализуется сенсибилизированная 4f-люминесценция лантанидов. Известны работы по люминесцентному определению ДНК с использованием комплексных соединений Tb(III) с норфлоксацином [15], эноксацином [16] и дифлоксацином [17]. Нами в предварительных экспериментах было обнаружено, что комплекс Tb(III) с энрофлоксацином по чувствительности детекции ДНК не уступает лучшей аналитической форме среди лантанидных комплексов (Tb(III) –дифлоксацин). В данной работе показана возможность применения комплексного соединения Tb(III) с энрофлоксацином для высокочувствительного определения ДНК.

Предлагаемый люминесцентный зонд Tb-Энрофлоксацин (Tb-ЭФ) характеризуется высокой кинетической устойчивостью, растворимостью в воде, получением оптимального аналитического сигнала при физиологическом значении pH без применения мицеллярных сред, простотой приготовления.

Цель данной работы состояла в разработке методики люминесцентного определения ДНК с помощью водорастворимого комплексного соединения тербия с энрофлоксацином.

© Ю. В. Скрипинец, Д. И. Александрова, А. В. Егорова, 2008



Энрофлоксацин (1-циклопропил-7-(4-этил-1-пиперазинил)-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-3-хинолонкарбоновой кислоты)

Материалы и методы

Все растворы готовили с использованием бидистиллированной воды.

Использовали стандартный раствор (0,01 М) хлорида тербия (III), который готовили из оксида высокой чистоты (Sigma, 99,99%) растворением в хлористоводородной кислоте. Концентрацию тербия (III) в полученном растворе стандартизовали комплексонометрически. Исходный раствор энрофлоксацина (1мМ) (Riedel-de-Haen, Seelze) готовили растворением точной навески в воде и хранили при температуре 4°С. Рабочие растворы готовили соответствующим разбавлением водой. Буферный раствор (10 мМ) 3-(N-морфолино)пропансульф оновой кислоты (MOPS) (Sigma) готовили растворением 2,093 г MOPS в 900 мл воды с последующим добавлением 0,1 М NaOH до pH 7,4 и разбавлением раствора до 1000 мл водой.

Исходный раствор высокополимерной двуспиральной ДНК тимуса теленка (Sigma) (1,0 мг/мл), готовили растворением точной навески в воде и хранили при температуре 4 °С. Все использованные реактивы были квалификации ч.д.а. или х.ч. Спектры люминесценции и возбуждения, а также времена жизни регистрировали с помощью люминесцентного спектрометра Aminco – Bowman Series 2 (SLM – Aminco, Rochester, NY) с ксеноновой лампой 150W. Для измерения времени жизни возбужденного состояния ионов тербия(III) использовали возбуждение образца импульсами света длительностью до 5 мс, с временным разрешением 10 мкс и 30 повторами. Для вычисления значений времени жизни обсчитывали кривые затухания с использованием программы Microcal Origin 6.0 software (1991–1999, Northampton, USA).

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu).

Значения pH растворов измеряли на pH-метре Lab 850 (Schott Instruments GmbH, Germany) со стеклянным электродом, калибровку которого проводили с помощью стандартных буферных растворов. Все измерения проводили при комнатной температуре (21–23°С).

Результаты и их обсуждение

Спектр поглощения энрофлоксацина в водном растворе характеризуется наличием двух интенсивных полос в УФ-области спектра с максимумами при 276 нм ($\varepsilon = 3{,}70\times10^4$ л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$) и 316 нм ($\varepsilon = 1{,}13\times10^4$ л×моль$^{-1}$×см$^{-1}$). Триплетный уровень лиганда (Т), рассчитаный из спектров фосфоресценции его комплекса с гадолинием при 77°К, составляет 21050 см$^{-1}$ и превышает энергию уровня первого возбужденного состояния ионов Tb^{3+} ($^5D_4$; 20500см$^{-1}$), что определяет возможность внутримолекулярной передачи поглощенной энергии лиганда на энергетический уровень лантанида.

Спектры люминесценции (а, б) и возбуждения (в) комплекса тербия с ЭФ в присутствии ДНК представлены на рис. 1.

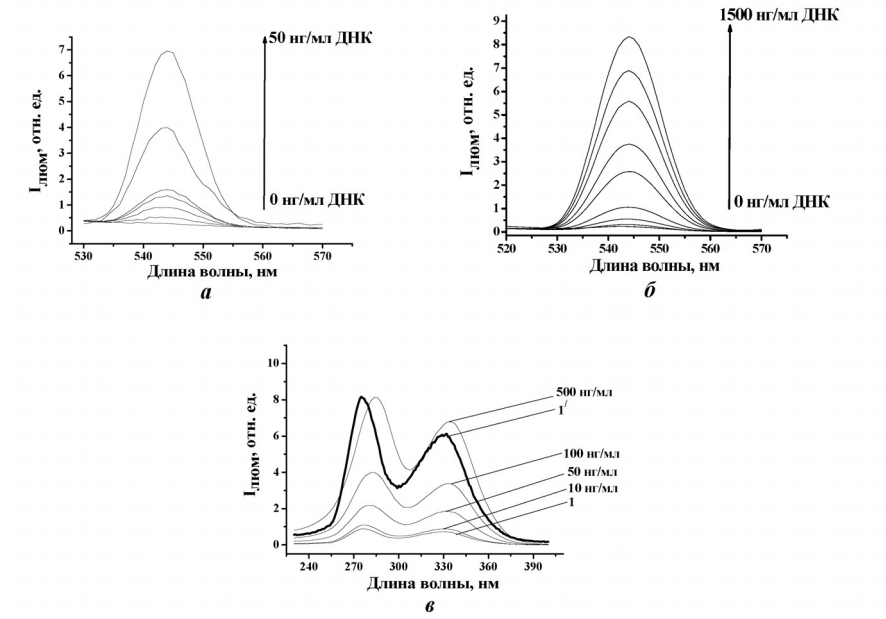


Рис. 1. Спектры люминесценции (*а*, *б*) и возбуждения (*в*) комплекса Tb – ЭФ в присутствии ДНК (pH 7,4), записанные при разных усилениях и щелях прибора: *а* — $C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-7}$ М; $C_{ДНК}$ = 1–50 нг/мл; *б* — $C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-6}$ М; $C_{ДНК}$ = 50–1500 нг/мл; *в* — $C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-6}$ М; $C_{ДНК}$ =10–500 нг/мл; 1'-холостая проба при 10-кратном увеличении; $\lambda_{эмис}$ = 545 нм

Установлено, что при добавлении раствора ДНК (рис. 1 *а*, *б*) к комплексу Tb – ЭФ происходит резкое увеличение интенсивности люминесценции по сравнению с $I_{люм}$ двойного комплекса Tb –ЭФ. В спектре возбуждения комплекса Tb – ЭФ в присутствии двуспиральной ДНК наблюдается батахромный сдвиг на 10 нм по сравнению с комплексом Tb – ЭФ (рис. 1 в), что подтверждает взаимодействие в системе Tb – ЭФ – ДНК.

Увеличение времени жизни возбужденного состояния $^5D_4$ ионов Tb(III) в тройных системах является свидетельством уменьшения безызлучательной потери энергии возбуждения в тройной системе, что приводит к увеличению ин-

тенсивности люминесценции ионов Tb(III). Время жизни двойного комплекса Tb – ЭФ (52 мкс) резко увеличивается при добавлении 1500 нг/мл ДНК до 725 мкс (рис. 2).

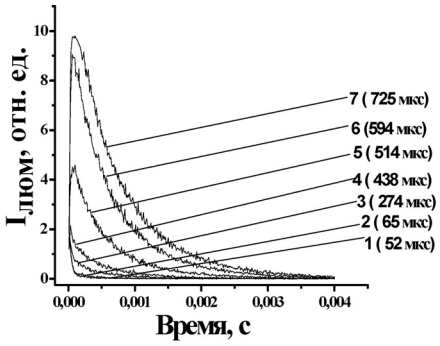


Рис. 2. Кривые затухания люминесценции комплекса Tb-ЭФ в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (нг/мл): 2 – 10; 3 – 50; 4 – 100; 5 – 500; 6 – 1000; 7 – 1500 ($C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-6}$ моль/л, pH 7.4)

Изучены спектры поглощения комплекса Tb – ЭФ в отсутствие и в присутствии ДНК. Установлено, что при добавлении раствора ДНК к комплексу Tb – ЭФ одновременно происходит гипохромный сдвиг двух полос поглощения ЭФ, а так же батохромный сдвиг на 5 нм (с 276 нм до 281 нм), что подтверждает интеркаляционный механизм взаимодействия данного зонда с молекулами ДНК (рис. 3).

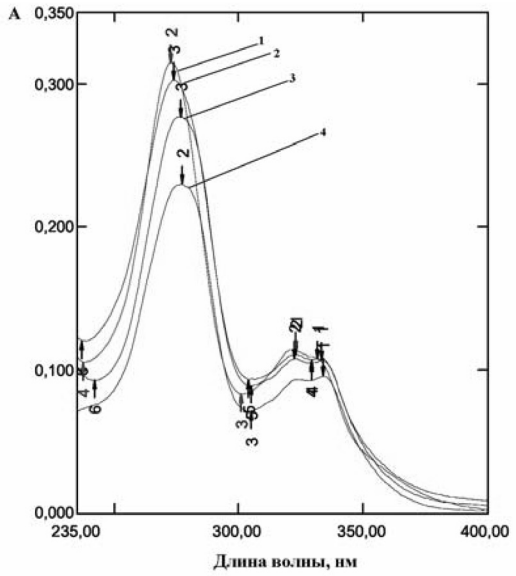


Рис. 3. Изменение спектра поглощения комплекса Tb – ЭФ в отсутствие (1) и в присутствии ДНК (2 – 2×10^{-5} М, 3 – 5×10^{-5} М, 4 – 1×10^{-4} М; $C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-5}$ М)

Интенсивность люминесценции комплекса Tb–ЭФ–ДНК зависит от pH среды и максимальна в интервале pH 7,0-8,0. Для получения оптимального значения pH использовали 2 мл буферного раствора MOPS.

Максимальное увеличение $I_{люм}$. Tb-ЭФ-ДНК наблюдается при равных концентрациях Tb(III) и ЭФ (1×10^{-6} М и 1×10^{-7} М для определения ДНК в интервалах концентраций 1–50 нг/мл и 50–1500 нг/мл, соответственно).

Изучено влияние на люминесценцию Tb – ЭФ и Tb – ЭФ – ДНК органических растворителей, поверхностно-активных веществ (ПАВ), ТОФО. Установлено, что в обеих системах ПАВ разной природы и ТОФО практически не влияют на $I_{люм}$, а органические растворители её уменьшают на 40% (ацетон, изопропанол) и на 10–15% (метанол, этанол, диметилформамид, диметилсульфоксид). Максимальная люминесценция наблюдается в водной среде.

Влияние посторонних веществ

Для изучения влияния посторонних веществ на интенсивность люминесценции комплекса Tb – ЭФ – ДНК использовали раствор (контрольный образец), содержащий 500 нг/мл ДНК и 1,0 мкМ комплекса Tb – ЭФ, который смешивали с различными количествами посторонних веществ. $I_{люм}$ измеряли согласно стандартной процедуре и сравнивали с $I_{люм}$ контрольного образца. Как видно из таблицы 1, ионы металлов, в основном присутствующие в биообъектах (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}), незначительно влияют на $I_{люм}$, в то время как $H_2PO_4^-$ -ионы значительно понижают $I_{люм}$ при концентрации › 10 мкМ. Это исключает применение фосфатного буфера для изучения взаимодействия в системе Tb – ЭФ – ДНК.

Таблица 1

Влияние посторонних веществ на $I_{люм}$ комплекса Tb – ЭФ – ДНК ($C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-6}$ М, $C_{ДНК}$ = 500 нг/мл, pH = 7,4)

Постороннее вещество	Концентрация (10^{-6} М)	Относительное изменение $I_{люм}$ системы Tb - ЭФ- ДНК (%)
NaCl	100	–4,3
KCl	100	–5,8
$CaCl_2$	50	–4,7
NH_4NO_3	100	–5,6
$MgCl_2$	100	–5,1
$A1_2(SO_4)_3$	10	+2,3
NaH_2PO_4	10	–9,5
HSA*	0,5	+3,1
Глюкоза	500	–4,2
Лактоза	400	+5,8
L-лизин	200	+2,2
L-аланин	200	+2,3
Додецилсульфат Na	0,1	–7,6

*сывороточный альбумин человека, мкг/мл

Из приведенных в таблице 1 данных следует, что влияние рассматриваемых посторонних веществ на интенсивность люминесценции комплекса Tb – ЭФ – ДНК незначительно, а соответствующие отклонения сопоставимы с погрешностью измерения.

Люминесцентное определение ДНК

Интенсивность люминесценции тербия в системе Tb-ЭФ-ДНК пропорциональна концентрации ДНК в интервалах 1–50 нг/мл и 50–1500 нг/мл (рис. 4, *а* и 4, *б*). Уравнение градуировочных графиков для соответствующих концентрационных интервалов: $(I-I_0)/I_0 = 0.041 + 0.489c$ ($R = 0.9995$) и $(I-I_0)/I_0 = -0.291 + 0.022c$ ($R = 0.9993$), где c – концентрация ДНК (нг/мл). Предел обнаружения ДНК предлагаемым методом, рассчитанный с использованием 3σ-критерия, составляет 0,5 нг/мл.

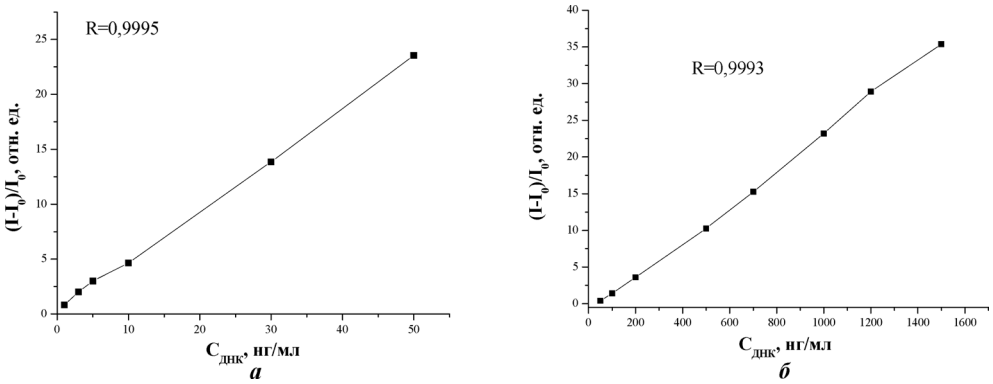


Рис. 4. Градуировочные графики для определения ДНК в концентрационных интервалах: *а* — 1–50 нг/мл; ($C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-7}$ М); *б* — 50–1500 нг/мл ($C_{Tb^{3+}} = C_{ЭФ} = 1\times10^{-6}$ М)

Сравнение чувствительности определения ДНК с помощью комплекса Tb-ЭФ и других известных флуоресцентных зондов представлено в таблице 2. Предложенный в данной работе зонд по пределу обнаружения превосходит в 20 раз наиболее широко используемый для люминесцентного определения ДНК этидий бромид, не являясь канцерогенным в отличие от последнего.

Таблица 2

Пределы обнаружения нуклеиновых кислот с использованием флуоресцентных проб

Флуоресцентные пробы	Нуклеиновая кислота	Предел обнаружения, нг/мл	Литература
Этидий бромид	ДНК	10	[2]
Hoechst 33258	ДНК	5,6	[3]
YOYO,TOTO	ДНК	0,5	[4, 5]
PicoGreen	ДНК	0,025	[6, 7]
OliGreen	ДНК	0,1	[6, 7]

Окончание таблицы 2

Флуоресцентные пробы	Нуклеиновая кислота	Предел обнаружения, нг/мл	Литература
Al^{3+}-8-гидроксихинолин	ДНК / РНК	13 / 130	[8]
Y^{3+}- БФМПГД-ЦТМАБ	ДНК / РНК	14 / 21	[9]
Tb^{3+}-Тирон	ДНК / РНК	1 / 0,6	[10]
Eu^{3+}– тетрациклин	ДНК	10 / 3	[11]
Tb^{3+}–1,10- фенантролин	ДНК / РНК	100 / 200	[12]
EDTA-Eu-β-дикетон	ДНК	6,0 (пМ)	[13]
Tb- БФМПГД-ЦТМАБ	ДНК / РНК	9 / 5	[14]
Tb^{3+}-норфлоксацин	ДНК / РНК	0,9 / 0,6	[15]
Tb^{3+}-эноксацин	ДНК	5,0	[16]
Tb^{3+}-дифлоксацин	ДНК	0,5	[17]
Tb^{3+}-энрофлоксацин	ДНК	0,5	Данная работа

Методика определения

Растворы соответствующих концентраций помещали в мерные колбы объемом 10 мл в следующем порядке:

а) для интервала концентраций ДНК 1,0–50 нг/мл: 0,1 мл рабочего раствора Tb^{3+} (10^{-5} М), 0,1 мл рабочего раствора энрофлоксацина (10^{-5} М) и 2,0 мл буферного раствора (MOPS); далее к смеси добавляли различные объемы от 0,1 до 0,5 мл рабочих растворов ДНК (100 нг/мл, 1мкг/мл).

б) для интервала концентраций ДНК 50–1500 нг/мл: 1,0 мл рабочего раствора Tb^{3+} (10^{-5} М), 1,0 мл рабочего раствора энрофлоксацина (10^{-5} М) и 2,0 мл буферного раствора (MOPS); далее к смеси добавляли различные объемы от 0,5 до 1,5 мл рабочих растворов ДНК (1мкг/мл, 10 мкг/мл).

После доведения водой пробы до метки, растворы выдерживали 10 мин. при комнатной температуре. Интенсивность люминесценции измеряли в 1см кварцевой кювете при $\lambda_{возб.}$ = 340 нм и $\lambda_{эмис.}$ = 545 нм.

Количественное определение ДНК в модельных образцах, содержащих смесь сывороточного альбумина человека (HSA), аминокислот и нескольких ионов металлов (табл. 3), проводили методом «введено – найдено» по градуировочным графикам, которые получали в оптимальных условиях. Измеряли интенсивность люминесценции при 545 нм, в каждой точке вычисляли $(I-I_0)/I_0$, где I_0 – интенсивность люминесценции контрольной пробы (двойной комплекс), а I – интенсивность люминесценции комплекса в присутствии ДНК. Полученные результаты, приведенные в таблице 3, указывают на возможность люминесцентного определения ДНК в широком интервале концентраций с удовлетворительными метрологическими характеристиками.

Таким образом, разработана высокочувствительная простая методика определения ДНК, основанная на значительном увеличении интенсивности люминесценции комплекса Tb – ЭФ в присутствии двуспиральной ДНК.

Таблица 3

Результаты определения ДНК методом «введено–найдено» (P = 0.95, n = 5)

Посторонние вещества	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	s_r
HSA, Na^+, K^+, Ca^{2+},	10	10,5±0,6	0,047
Глюкоза, L-Аланин	100	95,3±3,9	0,033
	500	482,6±14,4	0,024

C_{HSA} =0,5 мкг/мл; $C_{Me}{}^{n+} = 1\times10^{-5}$ M; $C_{Глюкоза} = 1\times10^{-5}$ M; $C_{L\text{-}Аланин} = 5\times10^{-6}$ M

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. О. Вольфбайсу (Регенсбургский университет) за предоставленную возможность регистрации спектров люминесценции.

Литература

1. *Frank J., Pompella A., Biesalski H.* Histochemical visualization of oxidant stress // Free Radical Biology & Medicine. – 2000. Vol. 29. – P. 1096–1105.
2. *DNA* bifunctional intercalators. Fluorescence properties and DNA dinding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer / Gaugain B., Barbet J., Capelle N., Roques B., Le Pecq J., Le Bret M. // Biochem. 1978. – Vol. 17. – P. 5078–5088.
3. *Improved* fluorometric DNA determination based on the interaction of the DNA/polication complex with Hoechst 33258 / Zhou Y., Mao S., Li Y., Chang W. // Microchim. Acta. – 2004. – Vol. 144. — P. 191–197.
4. *Fluorometric* assay using dimeric dyes for double - and singl - sternd DNA and RNA with picogram sensitivity / Rye H. S., Jonathan M. D., Quesada M. A., Mathies R. A., Glazer A. N. // Anal. Biochem. — 1993. — Vol. 208. — P. 144–150.
5. *Kirschstein O., Sip M., Kittler L.* Quantitative and sequence specific analysis of DNA-ligand interaction by means of fluorescent intercalator probes // J. Mol. Recognit. – 2000. – Vol. 13. – P. 157–163.
6. *Characterization* of pico green reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation / Singer V., Jones L., Yue S., Haugland R. // Anal. Biochem. – 1997. — Vol. 249. — P. 228–238.
7. *Haugland R. P.* (editor). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9 ed. Molecular Probes. — 2003. — P. 301.
8. *Huang C. Z., Li K. A., Tong S. Y.* Spectrofluorimetric determination of nucleic acids with aluminium(III)/8-hydroxyquinoline complex // Anal. Lett. — 1997. – Vol. 30, № 7. — P. 1305–1309.
9. *Study* of the reaction between nucleic acid and Y-BPMPHD – CTMAB complex and its analytical application / Wu X., Sun S., Yang J., Wang Y., Li Y., Su B. // J. Fluorescence. – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 113–118.
10. Determination of DNA and RNA by their quenching effect on the fluorescence of the Tb3+ - Tiron complex / Zhao Y.-B., Wang D.-Y., Guo X.-Q., Xu J.-G. // Anal. Chim. Acta. – 1997. — Vol. 353. — P. 329–335.
11. *Ci Y. X., Li Y. Z., Liu X. J.* Selective Determination of DNA by its enhancement effect on the fluorescence of the Eu-tetracycline complex // Anal. Chem. — 1995. — Vol. 67. — P. 1785–1788.
12. *Ci Y. X., Li Y. Z., Chang W. B.* Fluorescence reaction of terbium (III) with nucleic acids in the presence of phenanthroline // Anal. Chim. Acta. — 1991. — Vol. 248. — P. 589–594.
13. *Homogeneous* time – resolved fluorescence DNA hybridization assay by DNA-mediated formation of an EDTA-Eu(III)-β-diketonate ternary complex / Wang G. L., Yuan J. L., Matsumoto K., Hu Z. D. // Anal. Biochem. – 2001. — Vol. 299. – P. 169-172.
14. Study of the reaction between nucleic acids and Tb-BPMPHD-CTMAB complex and its analytical application / Wu X., Yang J., Huang F., Wang M., Sun L., Xu G. // Anal. Lett. — 1999. – Vol. 32, № 12. – P. 2417–2425.
15. Tong Ch., Hu Zh., Liu W. Sensitive determination of DNA based on the interaction between norfloxacin-Tb3+ complex and DNA // J. Agric. Food Chem. – 2005. — Vol. 53. — P. 6207–6212.

16. *Tong Ch., Hu Zh., Liu W.* Enoxacin–Tb^{3+} complex as an environmentally friendly fluorescence probe for DNA and its application // Talanta. – 2007. — Vol. 71, № 2. – P. 816–821.
17. Sensitive luminescent determination of DNA using the terbium(III)–difloxacin complex / A. V. Yegorova, Y. V. Scripinets, A. Duerkop, A. A. Karasyov, V. P. Antonovich, O. S. Wolfbeis // Anal. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 584. — P. 260–267.

Ю. В. Скрипинець, Д. І. Александрова, А. В. Єгорова
Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,
вул. Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ У ЯКОСТІ ЗОНДУ КОМПЛЕКСНОЇ СПОЛУКИ ТЕРБІЮ З ЕНРОФЛОКСАЦИНОМ

Резюме
Встановлено посилення інтенсивності 4*f*–люмінесценції тербію (III) у його комплексі з енрофлоксацином у присутності двоспіральної ДНК. В оптимальних умовах інтенсивність люмінесценції тербію пропорційна концентрації ДНК в інтервалі 1,0–1500 нг/мл (межа виявлення 0,5 нг/мл).

Ключові слова: люмінесценція, тербій, енрофлоксацин, ДНК.

Y. V. Scripinets, D. I. Aleksandrova, A. V. Yegorova
A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorfskaya doroga, 86, 65080, Odessa, Ukraine

LUMINESCENT DETERMINATION OF DNA USING TERBIUM COMPLEX WITH ENROFLOXACIN AS A PROBE

Summary
It was found that the presence of DNA enhanced the 4*f* luminescence of terbium(III) in its complex with enrofloxacin. Under optimum conditions, the luminescence intensity of terbium was proportional to the concentration of DNA over the range 1,0–1500 ng/mL (the limit of detection is 0,5 ng/mL).

Keywords: luminescence, terbium, enrofloxacin, DNA.