

DNA-based 感測器作為中草藥及食用植物有效成份篩選平台之研究 (2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2313-B-034 -001-MY3

執行期間： 98年 8月 1日至 99年 7月 31日

計畫主持人：蔡文琦

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國文化大學

中華民國 99年 5月 27日

一、中文摘要

本研究以生物分析(bioassay)及光譜法(Spectroscopic method)平行驗證 DNA-based 感測器作為中草藥及食用植物有效成份篩選平台之可行性。首先以小檗鹼標準品與不同濃度的 DNA 作用，記錄小檗鹼的螢光光譜圖。結果顯示隨著 DNA 濃度的上升，小檗鹼的螢光強度有下降的趨勢。此結果顯示，小檗鹼與 DNA 之間有交互作用的產生。而黃連各萃取液區分，初步結果也顯示與 DNA 有交互作用的產生。在 MTT 呈色法所做的細胞毒性作用及形態變化觀察中，顯示在 5 mg/ml 的濃度處理下，小檗鹼具有與時間相關的細胞生長抑制活性。本研究結果提供 DNA 感測器作為篩選能與 DNA 結合的小分子之可行性的另一證據。

關鍵詞： DNA 感測器；生物分子交互作用；小檗鹼；螢光光譜。

Abstract

In this study, bioassay and spectroscopic method were used in parallel to verify the applicability of using the proposed DNA-based biosensor as a screening platform for bioactive substances in medicinal plants. First, the fluorescence spectra of berberine alone and in the presence of various concentrations of DNA were obtained. The fluorescence quenching experiments confirmed the interaction between berberine and DNA. Besides, the preliminary data showed that the results obtained by spectroscopic method and those by sensor-based analysis agreed well. This work provided another proof about the possibility of applying the biosensor approach in the search for DNA-binding molecules.

Keywords: DNA biosensor; Biomolecular interaction; Berberine; fluorescence spectra.

二、緣由與目的

本計劃結合分子交互作用的分析(Biomolecular interaction analysis; BIA)與 DNA 為基礎(DNA-based)的生物感測器，進行植物中能與 DNA 結合的小分子物質的快速篩選，以期能發展抗病毒、抗腫瘤的藥物。在之前的研究顯示以混合式自組單層膜修飾金表面，可以成功的將 DNA 固定於金表面(Tsai and Lan, 2010)，並且以黃連中的小檗鹼為研究對象，確認此技術平台應用於小分子化合物與 DNA 交互作用探討的可行性。本報告進一步以生物分析(Bioassay)及光譜法(Spectroscopic method)來平行驗證此技術平台的有效性。小檗鹼類化合物是存在於許多中草藥如黃連的活性成分，過去許多研究報告指出，這類化合物具有抗菌，

降血壓, 抗發炎反應與抗癌等生物活性(Yang et al., 2005)。本研究是針對生物鹼類的小分子作探討, 分析其單獨存在或與DNA共同存在下之螢光光譜圖, 藉以提供DNA與小分子之間是否產生交互作用的另一個證據。

三、材料及方法

3.1 試劑

Biotin 標記的人類免疫不全病毒(Human immunodeficiency type 1 virus, HIV1)長端點重覆序列(long terminal repeat, LTR)的 NF- κ B 結合位置的序列, 簡稱為 Biotin-NF- κ B, 由 Sigma-Genosys 代製。小檗鹼(Berberine)、亞甲基紫 (methylene violet)均購自 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)。

3-2 以光譜法驗證 DNA 與小檗鹼的交互作用

首先紀錄各區分萃取液的螢光光譜, 找出適當的激發(excitation)波長及放射(emission)波長。而後加入寡核苷酸探針溶液, 紀錄各區分萃取液與寡核苷酸探針溶液同時存在的螢光光譜圖。基於 DNA 鹼基對螢光會有消光(quench)的影響(Dong et al., 2005), 預期可以看到螢光波峰的紅位移(red shift)及強度的減弱, 因而可以做為兩者間產生交互作用的證據。

3-3 細胞培養

細胞株購自食品工業研究所, 以 RPMI-1640 為培養液, 外加 10%胎牛血清, Penicillin(100 U/ml)及 Streptomycin(100 μ g/ml), 放置在 37°C 恆溫箱通以氣體 95% air/5% CO₂, 每 2-3 天換一次培養液, 待細胞長滿後, 以 1:3-1:4 的比例做繼代培養或相關實驗。

(3-4) 細胞存活率分析(MTT assay)

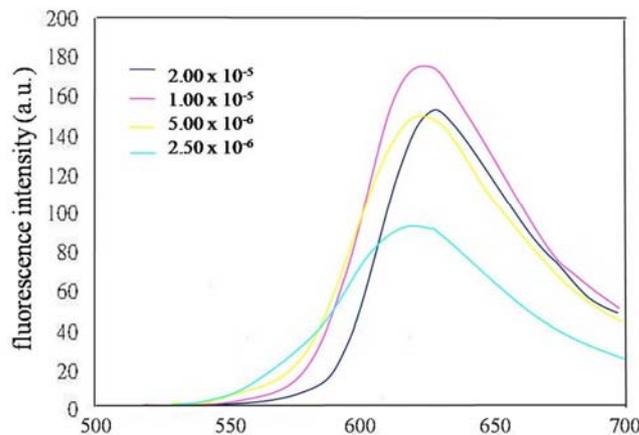
MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay 是一種快速呈色方法, 常用在細胞活性試驗。其原理為利用粒線體中的琥珀去氫酶(Succinate dehydrogenase)將黃色水溶性的 MTT 作用分解, 產生非水溶性的藍紫色結晶, 再以 DMSO 溶劑將此藍紫色結晶溶解後測量 570 nm 的吸光值。由於細胞還原 MTT 的能力代表了粒線體的活性, 因此可作為細胞活性的指標。

以正常免疫細胞 (PBMCs)及 B 淋巴癌細胞 (CA 46)為試驗對象, 在 96 孔盤中接種細胞, 每孔接種 1×10^4 個細胞, 培養一天後再加入各區分萃取液, 共同培養 48 小時後, 吸除孔內培養液, 每孔只留 100 μ l 的培養液, 再加入 10 μ l 的 MTT(5mg/ml)溶液, 置於培養箱中反應 4-8 小時, 吸除孔內培養上清液, 再加入 DMSO 溶解沉澱物, 使用 ELISA reader 讀取 570 nm 的吸光值。以未與各區分萃取液作用的細胞作為對照組, 計算出細胞相對存活百分比。

四、結果與討論

4.1 小檉鹼螢光光譜分析

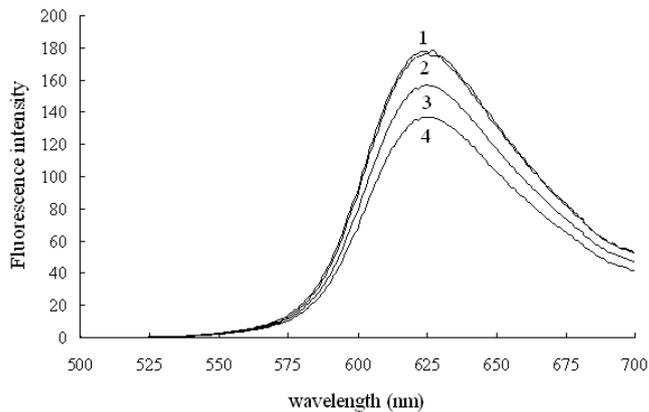
首先確立小檉鹼的激發(excitation)波長及放射(emission)波長及最佳濃度。由圖一所示，當小檉鹼濃度為 0.25×10^{-5} M 時，螢光強度約為 80 a.u.，小檉鹼濃度為 0.5×10^{-5} M 時螢光強度約為 150 a.u.，當小檉鹼濃度達 10^{-5} M 時，螢光強度約為 180 a.u.，但是當小檉鹼濃度再升高一倍到 2×10^{-5} M 時，螢光強度卻下降到 80 a.u.，因此發現小檉鹼在高濃度下，會產生濃度消光 (concentration quench) 的現象。因而後續實驗小檉鹼濃度採用 10^{-5} M。



圖一、不同濃度小檉鹼的螢光光譜圖。

4.2 以光譜法驗證 DNA 與小檉鹼的交互作用

光譜法可以提供 DNA 與小分子之間是否產生交互作用的另一個證據，本試驗藉由紫外光-可見光吸收光譜 (UV-vis absorption spectrum) 及螢光光譜 (Fluorescence spectrum) 分析來探討分子間結合情形。本研究是針對生物鹼類的小分子作探討，而生物鹼類所具有的環狀結構，在 UV-vis 會有一些特定的吸收峰，這些吸收峰在 DNA 分子的存在下會有吸收峰位移、吸收強度改變的情形 (Wang et al., 2006)，觀察這些改變可以代表交互作用的發生。而螢光光譜分析則是觀察生物鹼類小分子的螢光強度在 DNA 分子的存在下會有消滅 (quench) 的現象 (Dong et al., 2005)，此乃因為測試物質與 DNA 的鹼基之間產生能量傳遞 (energy transfer) 的現象，而此能量傳遞現象是否發生取決於兩者之間的距離，距離愈近才愈有可能發生能量傳遞。圖二為小檉鹼與不同濃度 DNA 作用後之螢光圖譜，隨著 DNA 濃度的增高，小檉鹼的螢光強度隨之下降，此結果顯示，小檉鹼與 DNA 之間產生交互作用，而其可能的機制一般認為是嵌合作用 (intercalate)。



圖二、以不同濃度 DNA 滴定小檗鹼(10^{-5} M)的螢光光譜圖。DNA 濃度：「1」：0；「2」： 10^{-6} M；「3」： 10^{-5} M；「4」： 10^{-4} M。

4.3 細胞存活率分析(MTT assay)

小檗鹼類化合物是存在於許多中草藥如黃連的活性成分，具有抗菌，降血壓，抗發炎反應與抗癌等生物活性。以 B 淋巴癌細胞 (CA 46) 為試驗對象，加入不同濃度的小檗鹼處理後，在 MTT 所做的細胞毒性作用及形態變化觀察中，顯示在 5 mg/ml 的濃度處理下，小檗鹼具有與時間相關的細胞生長抑制活性。(Inga et al., 2002; Shen et al., 2005)。

四、計畫成果自評

本研究結果顯示生物鹼類小分子的螢光強度，在 DNA 分子的存在下會有消滅(quench)的現象。此結果證實這些小分子與 DNA 結合，導致小分子與 DNA 的鹼基之間產生能量傳遞(energy transfer)的現象。以螢光光譜法分析黃連各萃取區分，所得的結果與感測平台之結果有一致性，進一步證實此技術平台應用於小分子化合物與 DNA 交互作用探討的可行性。

五、參考文獻

Dong, C., Wei, Y. and Wei, Y. (2005) Study on the interaction between methylene violet and calf thymus DNA by molecular spectroscopy. *J. Photochemistry and Photobiology A* 174, 15-22.

Inga K., Kristina J-S., Carola K., Karsten S., Daniel A., Ulrich B. and Eckart E. (2002) Herbal remedies traditionally used against Malaria in Ghana: Bioassay-guided fractionation of *Microglossa pyrifolia* (Asteraceae). *Z. Naturforsch* 57c, 1022-1027.

Shen, C-C., Yang, H-C., Huang, R-L., Chen, J-C. and Chen C-C. (2005) Anti-HBN

principle from the culture broth of *Antrodia camphorota* (strain # CCRC-35396). *J Chin Med* 16, 57-61.

Tsai, W-C. and Lan, Y-C. (2010) Study of the interaction of methylene violet with calf thymus DNA using an SPR-based DNA sensor. *Anal. Letters* (article in press)

Wang, L., Lin, L. and Ye, B. (2006) Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 42, 625-629.

Yang, Y., Huang, S., Zhao, Y., Zhao, Q., Sun, H. (2005) Alkaloids from the Bulbs of *Lycoris aurea*. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 2550-2559.