

• 研究论文 •

DNA 与 5-氟尿嘧啶相互作用的电化学和谱学研究

葛存旺^a 王南平^{*,a} 顾宁^b

(^a南通大学化学化工学院 南通 226007)

(^b东南大学分子与生物分子电子学国家重点实验室 南京 210096)

摘要 以电位控制共价组装法制得的 DNA 修饰电极为工作电极, 采用循环伏安和方波脉冲伏安法, 以亚甲蓝(MB)为电活性指示剂, 研究了非电活性抗癌药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)与 DNA 的相互作用, 还结合紫外-可见光谱进一步研究了这种相互作用. 循环伏安测试结果表明: 5-FU 与 DNA 在电极表面反应的过程为可逆电化学反应-化学反应偶合(EC)过程. 当扫描速度较低时, EC 反应是扩散控制过程; DNA 与电活性物质 MB 通过静电吸附相互结合, 抗癌药物 5-FU 与 DNA 通过插入作用相互结合. 本研究对于遗传工程中以 DNA 为靶标的药物设计有重要的意义.

关键词 DNA 自组装; 电位控制; 金电极; 5-氟尿嘧啶

Electrochemical and Spectroscopic Studies on Interaction between DNA and 5-Fluorouracil

GE, Cun-Wang^a WANG, Nan-Ping^{*,a} GU, Ning^b

(^a School of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong 226007)

(^b State Key Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096)

Abstract The primary object is to investigate the interaction between DNA and 5-fluorouracil (5-FU) in the light of DNA modified electrode based on covalent assembly by the potential control. The cyclic voltammetry and square wave voltammetry, along with ultraviolet-visible absorption spectrometry, proved to be a powerful technique for the elucidation of interaction between DNA and 5-fluorouracil with methylene blue (MB) as electroactive indicator. The results indicated that the peak potential shifts negatively with the increase of the scanning rate. The ratio of anodic current to the cathodic current decreased with the decrease of the scanning rate. The mechanism of the electrode is coupling electrochemistry-chemistry. The interaction between MB and DNA is electrostatic interaction, while the interaction between 5-FU and DNA is intercalative. These studies are very important for the design of DNA-targeting drugs in the hereditary engineering.

Keywords DNA self-assembly; potential control; gold electrode; 5-fluorouracil

脱氧核糖核酸(DNA)是生物体遗传信息的载体, 具有储存和传递信息的功能. 继 Bard 等^[1]用电化学方法对溶液中的电活性物质与 DNA 相互作用进行研究之后, DNA 与其靶向分子间相互作用的研究在药物设计与合成及药物作用机理等方面具有十分重要的意义, 一直是化学和生命科学中一个比较活跃的领域^[2]. 把某些抗癌

药物作为一种 DNA 的靶向分子, 研究其与 DNA 之间的相互作用, 不论对阐明小分子对核酸的复制和转录的影响, 还是从基因水平上理解疾病的发病机理, 尤其是对建立抗癌药物体外筛选的简便方法都有着潜在的研究价值^[3,4].

关于 DNA 与其靶向分子间相互作用的电化学研究,

* E-mail: bobow56@163.com; Tel.: 0513-85753518; Fax: 0513-85015809.

Received August 17, 2005; revised March 14, 2006; accepted May 29, 2006.

国家自然科学基金(No. 60571055)和江苏省教育厅自然科学基金(Nos. 03KJD150170, JHB04-024)资助项目.

主要有化学修饰电极法和溶液法^[1,5], 化学修饰电极法中又有 DNA 修饰电极^[6,7]和靶向分子修饰电极^[8]等. 基于 DNA 修饰电极发展起来的表面电化学方法^[6,7]具有简便、可靠、DNA 用量少等优点, 并且还可获得许多相互作用的热力学及动力学参数; 而常规的溶液电化学方法, 需用数百毫克的 DNA, 并且一些参数无法得到. DNA 修饰电极的制备是研究 DNA 与其它分子相互作用较为关键的一步, 其制备方法较多, 如(1)化学吸附法: Wang 等^[9,10]发展了一种用控制电势吸附的 DNA 修饰碳糊电极方法; 庞代文等^[6]发展了一种简便制备 DNA 修饰电极的方法. (2)静电组装的方法: 即利用异种电荷间的静电作用固定的方法, 如林仲华^[11]在金基底上用阳离子聚电解质聚二烯丙基二甲胺氯化物自组装膜固定长链 DNA 的方法. (3)生物素-亲合素免疫膜固定法: 利用生物素-亲合素间极强的专一性亲合力, 将生物素标记的单链 DNA 分子固定到修饰有亲合素的固体表面^[12], 这种方法得到的 ss-DNA 修饰电极是以端基连接, 所以杂交活性位点多, 信号响应大, 选择性好, 该方法在生物分子的固定化中有重要的意义. (4)共价组装法: 采用含有氨基、羟基或羧基的硫醇或硅烷在电极表面形成自组装单分子层(SAM), 再利用活化剂活化氨基或羟基后, 烷基胺的氨基或羧基与 DNA 5'端的磷酸基结合形成磷酸酰胺键或磷酸酯键, 而将 DNA 连接在 SAM 上, 庞代文^[13]、方禹之^[14]等用该方法组装了 DNA 单分子层. 也可以将巯基修饰后的 DNA 通过形成 Au—S 键直接固定在金表面^[15], 但巯基修饰工艺复杂, 操作繁琐, 所以价格昂贵, 巯基化合物结合 DNA 后, 其体积大幅度增加, 这种巯基修饰的单链 DNA 的杂交反应取决于 DNA 在表面的覆盖面积, 而覆盖面积受溶液体系的影响, 很难控制组装的条件, 在组装过程中, DNA 上标记的巯基容易形成二硫键, 在储存液中需要加入还原剂^[16]. (5)电位控制组装法: 我们结合了化学吸附法和共价组装的优点, 研究了在电位控制下的 DNA 共价组装^[17,18], 制备了共价组装的 DNA 修饰电极; DNA 的自组装与电位控制条件有关, 负电位抑制 DNA 的自组装, 而正电位则有利于 DNA 的自组装, 因此可以通过改变电位实现 DNA 的控制组装. 通过该方法制备的 DNA 修饰电极能够实现 p16^{INK4A} Gene 的单碱基错配检测^[19], 本文将采用电位控制方法制得 DNA 修饰电极.

采用电化学方法研究 DNA 与其靶向分子的相互作用, 最理想的情况是靶向分子具有电化学活性; 对于 5-氟尿嘧啶(5-FU)等没有电化学活性的靶向分子, 或一些吸收光谱较弱, 或由于电子跃迁谱带与 DNA 的吸收产生重叠而无法用紫外-可见等方法研究的分子, 可以通过在电解液中加入具有电化学活性的指示剂, 研究靶向

分子加入后伏安特性的变化间接地研究 DNA 与靶向分子的相互作用. 自上世纪 50 年代后期 5-FU 首次应用于临床以来, 由于其副作用较小, 所以一直是常用的抗癌药物. 它对消化道肿瘤治疗效率较高, 还被用于治疗宫颈癌、肺癌、乳腺癌和头颈部癌^[20]. 5-FU 能够抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶的作用, 阻断脱氧嘧啶核苷酸转换成胸腺嘧啶核苷酸, 干扰 DNA 的合成, 但其与 DNA 作用的机理尚不甚清楚, 因而研究 DNA 与 5-FU 的相互作用具有重要的实际意义. 本文将用电位控制组装法制备的 DNA 修饰电极研究非电活性分子 5-氟尿嘧啶与 DNA 的相互作用, 进一步拓展电化学方法在其它分子与 DNA 相互作用研究中的应用, 对遗传工程中以 DNA 为靶标的药物设计具有重要的意义.

1 实验部分

1.1 实验试剂及仪器

1.1.1 实验试剂

小牛胸腺 DNA 为 Sigma 公司产品; 半胱胺(氨基乙硫醇)(AET)和 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)为 Sigma 公司产品; *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为 Acros 产品, 三羟基甲基氨基甲烷(Tris)为上海新兴化工试剂研究所产品, 电活性指示剂亚甲蓝(MB)为上海试剂三厂产品, 5-氟尿嘧啶(5-FU)为南通制药总厂产品; 其它试剂均为分析纯, 实验用二次蒸馏水均为 Milli-Q plus 设备制备, 实验前所有溶液均进行氮气除氧.

1.1.2 实验仪器

循环伏安和方波脉冲伏安测定在 CHI 660A 上进行, 用恒温槽控制测试温度为(25±1) °C, 采用传统的三电极体系, 三电极系统为: 工作电极为 Φ 2.0 mm 的金电极(CHI 101, CH Instrument Co Austin, TX)或表面修饰金电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE), 对电极为铂片电极. 电化学测试前所有溶液均用氮气除去游离氧. TU-1800SPC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司).

1.2 DNA 修饰电极的制备

金电极的处理和金电极上单分子层的组装方法同文献^[17], 即将处理好的金电极浸入用氮气除去游离氧的 1 mmol·L⁻¹氨基乙硫醇(AET)乙醇溶液中, 在低温避光条件下组装 12 h; 取出后, 用无水乙醇浸泡 10 min 左右, 除去物理吸附的氨基乙硫醇(AET), 得到修饰了单分子层的金电极(AET/Au); 然后再将 AET/Au 电极在含有 5 mmol·L⁻¹ EDC 和 8 mmol·L⁻¹ NHS 活化液(pH 7.0 的 PB 缓冲液配置), 活化 20 min; 再将活化的 AET/Au 电极放入浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的小牛胸腺 DNA 溶液中

(pH 7.1 Tris-HCl 溶液配置), 最后以该电极为工作电极在 +0.2 V 的电位下控制组装 30 min, 取出后用 pH 7.1 Tris-HCl 溶液淋洗, 去除物理吸附的 DNA, 即得 DNA 修饰电极(DNA/AET/Au).

1.3 循环伏安和方波脉冲的测定

用循环伏安法测试各电极在不同扫描速度下的峰电流和峰电位, 再用方波脉冲伏安法测试不同扫描方向的峰电流和峰电位, 脉冲参数的选择以测定的峰形和灵敏度高为宜; 测试的电解质溶液为含 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MB 溶液和不同浓度的 5-FU 的溶液(用 pH 7.1 的 Tris-HCl 缓冲液配制).

1.4 紫外光谱的测定

以 Tris-HCl 缓冲液为空白试剂, 进行参比调零; 测试 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNA 溶液的最大吸收波长; 测试 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNA 溶液与不同浓度 5-FU 混合液的最大吸收波长.

2 结果与讨论

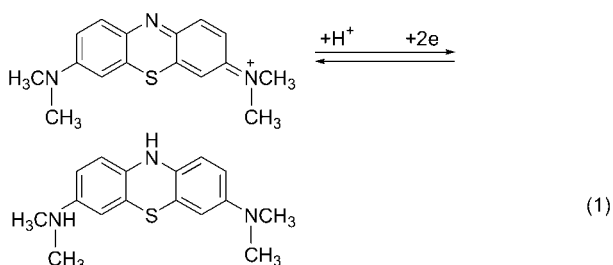
2.1 DNA 与 5-FU 相互作用的循环伏安研究

2.1.1 缓冲体系的选择

本实验用氨基乙硫醇(AET)在金电极上组装单分子层(SAM), 利用共价键合将 DNA 固定到单分子层上制得 DNA 修饰电极. 循环伏安测量支持电解质溶液的选择: 一方面要能够使 DNA 稳定存在, 选用含 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.1); 另一方面要使 CHI660 控制软件能够识别 CV 曲线上的氧化-还原峰, 减小手工作图的误差, 经实验, 电活性指示剂 MB 的浓度以 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜. 活化液缓冲体系的选择^[21]: EDC 和 NHS 能够活化羟基和氨基, 为了不影响活化的效率, 不能选用 Tris-HCl 缓冲液, 应该使用由 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 配制的 pH 7.0 的磷酸缓冲液(PB).

2.1.2 MB 与 DNA 的相互作用

MB 是一类具有平面结构的吩噻嗪类染料, 在 pH 7.1 的条件下, 电极反应为两电子一质子过程, 电化学反应方程为:



在 25°C 时, 循环伏安图中氧化峰电位($E_{a,p}$)和还原

峰电位($E_{c,p}$)差($E_{a,p} - E_{c,p}$)的理论值应为 $59/n \text{ mV}$ (n 为电极反应的电子转移数). 图 1 为 AET/Au (标记为 1 号)电极和 DNA/AET/Au(标记为 2 号)修饰电极在 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 扫描速度下的循环伏安图. 由图 1 可见, AET/Au 的氧化峰和还原峰电位分别为 -0.209 和 -0.239 V , DNA/AET/Au 的氧化峰和还原峰电位分别为 -0.225 和 -0.258 V , 氧化峰和还原峰电位差在 30 mV 左右, 由此可以说明 MB 的电化学过程为两个电子的转移过程.

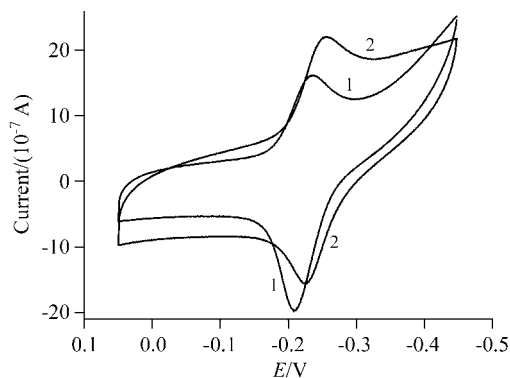


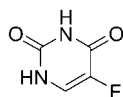
图 1 扫描速度为 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 的不同组装电极的循环伏安图
Figure 1 The cyclic voltammetry measurement for differently modified electrode at the scanning rate of $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$
 The supporting electrolyte is $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MB solution of $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.1 Tris-HCl buffer. 1—AET modified gold electrode; 2—DNA modified gold electrode

电化学方法研究其它分子与 DNA 的相互作用是基于 DNA 存在与否时体系伏安特性的差别. 图中 AET/Au 电极的氧化还原峰电流 i_{pa} 和 i_{pc} 分别为 1.459×10^{-6} 和 $1.148 \times 10^{-6} \text{ A}$ (根据电化学工作站 CHI 的应用软件直接读出), 氧化还原峰电流之比为 1.271; DNA/AET/Au 电极的氧化还原峰电流 i_{pa} 和 i_{pc} 分别为 9.151×10^{-7} 和 $1.352 \times 10^{-6} \text{ A}$, 氧化还原峰电流之比变为 0.677. 还原峰电流 i_{pc} 变大, 说明电极表面 MB 氧化态增多, 根据 MB 的结构, 其氧化态带正电荷, 还原态不带电荷, DNA 是带负电荷的, 故 MB 的氧化态和还原态与 DNA 的作用方式不同, 氧化态的 MB 与 DNA 结合能力较强, 使得还原峰电流变大, 说明 MB 分子与 DNA 链骨架上的磷酸基团间是通过静电作用相互结合. 从循环伏安谱的式电位 E_0' 可以看出, 在 AET/Au 电极上式电位为 -0.224 V , 而修饰了 DNA 后式电位负移 18 mV 后变为 -0.242 V , DNA 修饰电极的式电位发生了负移, 根据文献[6]的研究结果, 式电位的负移进一步说明 MB 分子与 DNA 链骨架上的磷酸基团间是通过静电作用相互结合.

2.1.3 5-FU 与 DNA 的相互作用

我们测定了 DNA 修饰电极在不同 5-FU 浓度下的循环伏安谱, 在 $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 的扫描速度下, 随着 5-FU 浓度由 0 增加到 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其还原峰电流从 $2.944 \times 10^{-6} \text{ A}$

逐渐降低到 1.329×10^{-6} A, 氧化峰电流从 -1.857×10^{-6} A 增加到 -1.166×10^{-6} A, 式电位 E_0' 则从 -0.242 V 逐渐移动至 -0.199 V, 即峰电位发生了正移; 氧化还原峰电流之比由无 5-FU 时的 0.631 上升到 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU 时的 0.840.



图式 1 5-FU 的结构
Scheme 1 Structure of 5-FU

这说明随着 5-FU 浓度的增加, 还原态物质的浓度越来越大, 氧化态的浓度则越来越小, 即电活性亚甲蓝由氧化态逐渐向还原态转变, 这正是插入作用的特征^[6]; 根据 5-FU 的结构(如图式 1), 5-FU 是平面型的分子, 可以插入到 DNA 分子双螺旋的碱基之间; 由此可以推断, 5-FU 以插入模式与 DNA 结合.

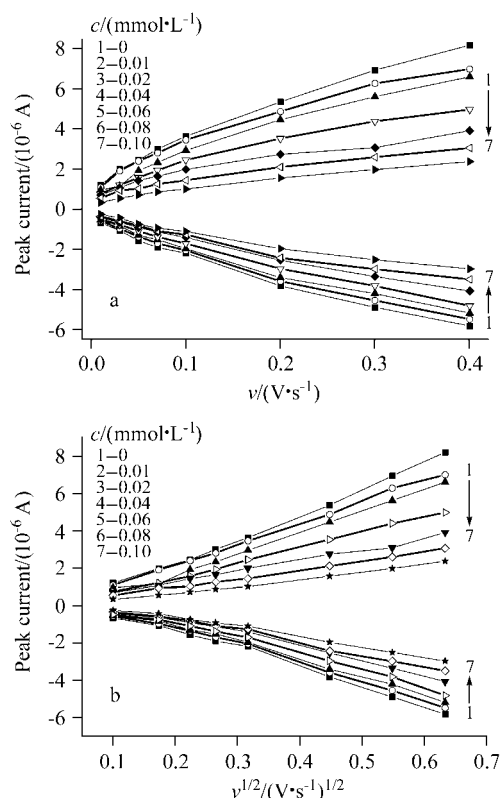


图 2 DNA 修饰电极在不同 5-FU 浓度下循环伏安氧化峰电流 i_{pa} , 还原峰电流 i_{pc} 与扫描速度 v (a) 和扫描速度平方根 $v^{1/2}$ (b) 的关系

Figure 2 Anodic peak current i_{pa} and cathodic peak current i_{pc} versus the scanning rate v (a) and the root of scanning rate $v^{1/2}$ (b) for DNA modified electrode at different concentration of 5-FU

如图 2 所示, (a) 为 DNA 修饰电极在不同 5-FU 浓度时, 循环伏安氧化峰电流 i_{pa} 、还原峰电流 i_{pc} 与扫描速度 v 的关系; (b) 为循环伏安氧化峰电流 i_{pa} 、还原峰电流 i_{pc} 与扫描速度平方根 $v^{1/2}$ 的关系. 由图 2(a) 可见, 在相同浓度的 5-FU 下扫描速度与峰电流并不呈线性关系. 随着扫描速度的增加, 氧化还原峰电流也相应随之增大, 但还原峰电流 $i_{pc} \sim v$ 曲线却呈向下弯曲的趋势. 在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-FU 浓度和 $0.4 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速度下, 氧化峰和还原峰的峰电流分别为 -5.498×10^{-6} 和 7.002×10^{-6} A; 而在 $0.01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速度下, 氧化峰和还原峰的峰电流分别为 -5.731×10^{-7} 和 1.081×10^{-6} A. 氧化还原峰电流之比随扫描速度 v 的降低而减小; 峰电位则随着扫描速度的增加向阴极方向移动. 根据电极反应机理的判据^[22], 此电极反应应属可逆电化学反应-化学反应偶合 (EC) 机理. 由图 2(b) 可见, 在扫描速度较低时 $i_{pc} \sim v^{1/2}$ 关系接近为直线, 说明在 5-FU 与 DNA 作用时, EC 反应是扩散控制过程.

根据电极可逆性的判据, 其峰电流 i_p 与电位扫描速度存在如下的关系:

$$i_p = 0.4463 \times n^{\frac{3}{2}} F^{\frac{3}{2}} \cdot (RT)^{-\frac{1}{2}} c_0 A \cdot D_0^{\frac{1}{2}} \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

其中 i_p 为峰电流(A), A 为电极的面积(cm^2), c_0 为氧化物的本体浓度($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$), D_0 为扩散系数($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), v 为扫描速度($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$).

25 °C 时, 氧化还原反应峰电流可以表示成:

$$i_p = 2.686 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} c_0 A \cdot D_0^{\frac{3}{2}} \cdot v^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

以上关系式说明: 若反应物在电极上不发生吸附时, $i_p \sim v^{1/2}$ 应成一直线; 若反应物在电极上存在吸附, 则 $i_p \sim v^{1/2}$ 曲线弯曲. 从图 2(b) 可以看出: 随着扫描速度的增加, $i_p \sim v^{1/2}$ 弯曲程度越来越大, 说明 5-FU 在电极上并不是单纯的由扩散作用控制, 而是同时存在富集效应^[12,23]. 且在扫描速度较大时, 曲线弯曲程度较大.

由公式(3)可以求得, 在扫描速度较低时 MB 在 DNA 修饰电极表面的扩散系数

$$D_0 = 1.382 \times 10^{-11} (i_p / v^{\frac{1}{2}})^2 / (c_0^2 \cdot A^2) \quad (4)$$

根据文献方法^[24]测得 DNA 修饰电极的面积为 $(0.029 \pm 0.004) \text{ cm}^2$, 代入(4)式求得 MB 在不同 5-FU 浓度下在 DNA 修饰电极表面的扩散系数, 结果列于表 1 中.

表 1 不同 5-FU 浓度时 DNA 修饰电极的对 MB 的扩散系数
Table 1 The diffusion coefficient of MB at the DNA modified electrode

$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
$(i_p/v^{1/2})/(10^{-6}\text{A}\cdot\text{s}^{1/2}\cdot\text{V}^{-1/2})$	28.38	39.27	51.36	69.19	81.39	91.14	100.25
$\Delta(i_p/v^{1/2})/(10^{-6}\text{A}\cdot\text{s}^{1/2}\cdot\text{V}^{-1/2})$	0.193	0.296	0.385	0.427	0.385	0.384	0.404
$\Delta D_0/(10^{-6}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1})$	4.48	6.85	8.92	9.89	7.84	8.91	9.36
$D_0/(10^{-6}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1})$	23.33	32.28	42.22	56.87	66.90	74.92	82.41

从表 1 可以看出当 5-FU 浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其扩散系数是不加 5-FU 时的 4 倍, 即随着 5-FU 浓度的增加, 扩散系数逐渐增加; 由 DNA 的结构特征及其与靶向分子相互作用的三种模式^[25], 我们可以推测: 5-FU 随着浓度的增加, 更多地插入到 DNA 螺旋结构中, 可以归结为插入作用。

2.2 DNA 与 5-FU 相互作用的方波脉冲伏安的讨论

本实验通过多次测试比较, 确定方波脉冲伏安的参数为: 扫描范围: $-0.5\sim 0.1\text{ V}$ 和 $0.1\sim -0.5\text{ V}$; 扫描频率为 20 Hz , 在该条件下氧化峰和还原峰的峰形比较对称. 图 3 为 DNA 修饰电极在不同 5-FU 浓度时的方波脉冲伏安图。

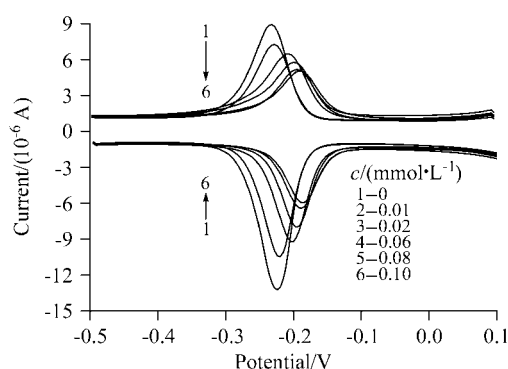


图 3 DNA 修饰电极在不同 5-FU 浓度时的方波脉冲伏安图

Figure 3 Square wave voltammetry measurement of DNA modified electrode at different concentration of 5-FU

The scanning scopes are from -0.5 to 0.1 V and from 0.1 to -0.5 V , respectively. The supporting electrolyte is $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.1 Tris-HCl buffer containing $0.05\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MB

从图 3 可以看出, 随着 5-FU 浓度的增加, 其还原峰电流从 $7.907\times 10^{-6}\text{ A}$ 逐渐降低到 $3.917\times 10^{-6}\text{ A}$, 氧化峰电流则从 $-1.219\times 10^{-5}\text{ A}$ 增加到 $-4.688\times 10^{-6}\text{ A}$, 峰电位则从 -0.224 V 逐渐移动到 -0.188 V , 即峰电位发生了正移. 该结果表明方波脉冲伏安的测量所得的峰电位和峰电流的变化规律与循环伏安测量的结果完全

表 2 DNA 的最大吸光波长随 5-FU 浓度的变化

Table 2 The maximum absorption wavelength of DNA in the presence of different concentration of 5-FU

$c/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	0	0.04	0.06	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40
无 DNA 时 $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	—	203	204	204	206	208	209	210
有 DNA 时 $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	203	206	208	210	212	214	215	216

一致, 这进一步说明 5-FU 和 DNA 间的相互作用是插入作用。

2.3 DNA 与 5-FU 相互作用的紫外光谱的讨论

为了进一步研究 5-FU 和 DNA 相互作用的模式, 我们用溶液法测定了加入 DNA 前后 5-FU 不同浓度的紫外吸收光谱. 图 4(a)为 5-FU 在不同浓度下的紫外吸收光谱, 图 4(b)为 DNA 与不同浓度 5-FU 相互作用后的紫外吸收光谱. 如图 4(a)所示, 在未加入 DNA 时, $0.04\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 的最大吸收峰在 203 和 265.5 nm; 203 nm 附近的吸收峰随着 5-FU 浓度的增加逐步向长波方向移动, 由 $0.04\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 203 nm 红移到 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 209.3 nm; 而 265.5 nm 附近的吸收峰不随 5-FU 的浓度的变化而变化. 如图 4(b)所示, 在无 5-FU 存在时 DNA 在 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下有两个吸收峰, 分别在 203 和 260 nm; 随着 5-FU 浓度的增加, 203 nm 附近的吸收峰逐步向长波方向移动, 由 $0.04\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 206 nm 红移到 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 216 nm, 与相同浓度的纯 5-FU 的吸收峰相比也发生了红移, 红移的幅度由 $0.04\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 3 nm 增加到 $0.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 6 nm, 5-FU 在 203 nm 附近的吸收峰位列于表 2 中; 而 260 nm 附近的吸收峰在加入了 5-FU 后由 $0.04\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的 262 nm 变化到 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 265 nm, 当 5-FU 的浓度大于 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 吸收峰位于 264 nm 处, 不随 5-FU 浓度的变化而移动. 从 DNA 紫外光谱的变化中可以看出, 当 5-FU 与 DNA 共同存在时, 紫外吸收光谱并不是 5-FU 和 DNA 单独存在时吸光度的简单加和, 加入 DNA 后吸光度有所增加. 根据 Long 提出的判据^[26], 当小分子与 DNA 发生插入作用时, 因为 5-FU 的 π 轨道和 DNA 碱基 π 轨道相互耦合, 最大吸收峰发生红移, 且减色性增加, 即吸光度增加; 当小分子与 DNA 发生静电作用时, 峰位置不变, 只有强度改变. 因此, 紫外-可见吸收光谱进一步证明了 DNA 与 5-FU 之间的相互作用是插入作用。

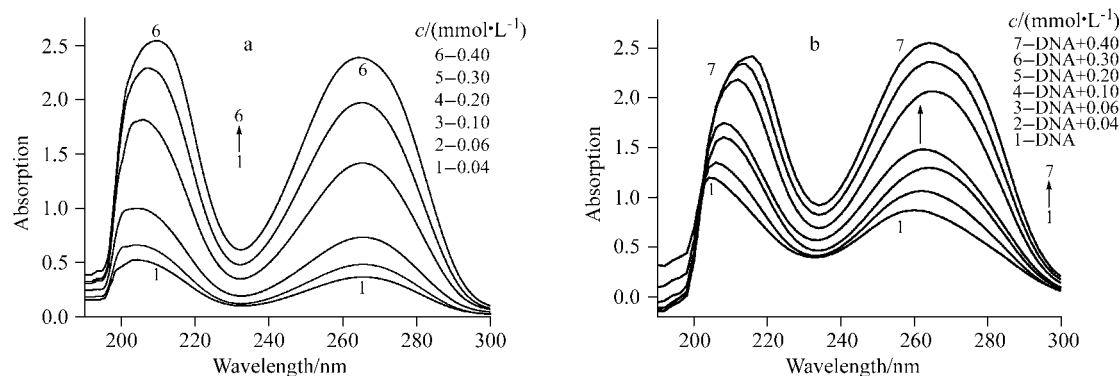


图4 5-FU在不同浓度下的紫外吸收光谱和DNA与不同浓度的5-FU相互作用的紫外吸收光谱

Figure 4 Ultraviolet-visible absorption spectrometry of 5-FU at different concentration in absence of DNA (a) and presence of DNA (b)

3 结论

本文采用循环伏安和方波脉冲伏安法,以MB为电活性指示剂研究了药物5-FU与DNA的相互作用,并计算了电极表面的扩散系数;同时结合紫外-可见光谱研究了DNA与5-FU相互作用.结果表明,DNA与电活性物质MB有静电吸附作用,而DNA分子与药物5-FU小分子间通过插入作用结合.循环伏安测试表明,5-FU与DNA在电极表面的过程为可逆电化学反应-化学反应偶合过程,在扫描速度较低时偶合反应是扩散控制过程.本研究对于遗传工程中的以DNA为靶标的药物设计有重要的意义,进一步的研究工作尚在进展之中.

References

- Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901.
- Ji, L. N.; Zhang, Q. L. *Sci. China, Ser. B* **2001**, *44*, 246.
- Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P. N.; Sawyers, C. L. *Science* **2001**, *293*, 876.
- Chaires, J. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 314.
- Wang, S. F.; Peng, T. Z.; Li, J. P. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 310 (in Chinese).
(王素芬, 彭图治, 李建平, 化学学报, **2002**, *60*, 310.)
- Pang, D. W.; Abruña, H. D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3162.
- Pang, D. W.; Lu, Q.; Zhao, Y. D.; Zhang, M. *Acta Chim. Sinica* **2000**, *58*, 524 (in Chinese).
(庞代文, 陆琪, 赵元弟, 张敏, 化学学报, **2000**, *58*, 524.)
- Wang, J.; Ozsoz, M.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraiishi, H.; Grant, D. H.; Chicharro, M.; Fernandes, J.; Palecek, E. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *45*, 33.
- Wang, J.; Chicharro, M.; Rivas, G.; Cai, X.; Dontha, N.; Farias, P. A. M.; Shiraiishi, H. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2251.
- Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraiishi, H.; Farias, P. A. M.; Dontha, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2629.
- Zhou, J. Z.; Wu, L. L.; Dong, L. Q.; Lin, Z. Y.; Yan, J. W.; Dong, P.; Bao, Y.; Lin, Z. H. *Electrochemistry* **2001**, *7*, 276 (in Chinese).
(周剑章, 吴玲玲, 董丽琴, 林种玉, 颜佳伟, 董平, 包烨, 林仲华, 电化学, **2001**, *7*, 276.)
- Alfonta, L.; Singh, A. K.; Willner, I. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 91.
- Zhao, Y.; Pang, D. W.; Hu, S.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K.; Dai, H. P. *Talanta* **1999**, *49*, 751.
- Sun, X. Y.; He, P. G.; Liu, S. H.; Ye, J. L.; Fang, Y. Z. *Talanta* **1998**, *47*, 487.
- Li, J. H.; Hu, J. B. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 2081 (in Chinese).
(李金花, 胡劲波, 化学学报, **2004**, *62*, 2081.)
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, **1992**.
- Ge, C. W.; Liao, J. H.; Yu, W.; Gu, N. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 53.
- Ge, C. W.; Liao, J. H.; Wang, Y. H.; Chen, K. J.; Gu, N. *Biomed. Microdevices* **2003**, *5*, 157.
- Ge, C. W.; Miao, W. J.; Ji, M. J.; Gu, N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 651.
- Parag, V. S.; William, H. G. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5981.
- Desai, M. C.; Linda, M.; Stramiello, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7685.
- Yang, H.; Lu, W. Q. *Applied Electrochemistry*, Science Press, Beijing, **2001**, p. 37 (in Chinese).
(杨辉, 卢文庆, 应用电化学, 科学出版社, 北京, **2001**, p. 37.)
- Gao, X. X. *Introduction to Electroanalytical Chemistry*, Science Press, Beijing, **1984**, p. 310 (in Chinese).
(高小霞, 电分析化学导论, 科学出版社, 北京, **1984**, p. 310.)
- Oesch, U.; Janata, J. *Electrochim. Acta* **1983**, *28*, 1237.
- Graves, D. E.; Velea, L. M. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 915.
- Long, E. C.; Barton, J. K. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 271.