

• 研究论文 •

苏木素与 DNA 相互作用的光谱研究

王兴明* 黎泓波 胡亚敏 杨定明 费丹

(西南科技大学材料科学与工程学院化学系 绵阳 621010)

摘要 以吖啶橙(AO)作探针研究了苏木素(HE)与 DNA 的相互作用. 吸收光谱和荧光光谱研究表明, 苏木素与 DNA 发生作用生成了复合物. 其结合比 $n_{\text{HE}} : n_{\text{DNA}} = 3 : 1$, 22 °C 时苏木素与 DNA 的结合常数 $K = 5.96 \times 10^4 \text{ L/mol}$. 同时研究了酸度、盐效应和温度等对苏木素与 DNA 相互作用的影响以及它们之间的作用方式, 确定了苏木素与鲑鱼精 DNA 之间为混合作用方式.

关键词 苏木素; 吖啶橙; DNA; 作用方式

Study on the Interaction between Hematoxylin and DNA by Spectrometry

WANG, Xing-Ming* LI, Hong-Bo HU, Ya-Min YANG, Ding-Ming FEI, Dan

(Department of Chemistry, Material Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

Abstract The interaction of hematoxylin (HE) with DNA was studied by using acridine orange (AO) as a probe. The results indicated that there was a complex of hematoxylin and DNA, which has been confirmed by absorption, fluorescence spectra and viscometry. The binary complex ratio of $n_{\text{HE}} : n_{\text{DNA}} = 3 : 1$, the binding constant of HE interacting with DNA is $5.96 \times 10^4 \text{ L/mol}$. At the same time, the influence of acidity, salt effect and temperature on the interaction of hematoxylin with DNA was studied. The results suggested that the intercalation and electrostatic binding should be the two major modes for interaction between hematoxylin and herring sperm DNA.

Keywords hematoxylin; acridine orange; DNA; action mode

DNA 是生物遗传信息的载体, 它的分子结构和特性与温度、pH 值、溶液的盐浓度等环境因素密切相关, 当环境条件改变时, DNA 碱基的堆积、氢键相互作用以及磷酸基团之间的斥力都将随之改变, 从而导致药物分子与 DNA 的相互作用发生改变. DNA 与小分子相互作用的研究对于阐明小分子对核酸的复制和转录的影响、DNA 靶标药物与 DNA 的相互作用机制以及疾病的起源具有重要意义, 为寻找抗肿瘤和抗病毒药物研究提供了理论和物质基础^[1]. 由于光谱探针 EB 有强烈的致癌性, 所以我们实验中采用毒性弱的探针吖啶橙. 吖啶橙(AO)是一种碱性染料, 在生物化学方面作为核酸的光

谱探针, 可以进行核酸的定量^[2,3]、结构分析^[4~6]、肿瘤诊断^[7]、抗癌药物的筛选^[8]. 我们通过以吖啶橙为探针, 应用紫外-可见和荧光光谱等方法初步研究了苏木素(HE)与 DNA 相互作用的机理及作用方式, 得到了一系列很有价值的信息.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

鲑鱼精 DNA (AR)为 Sigma 公司产品; 苏木素(HE,

* E-mail: xmwang_xkd@126.com

Received June 23, 2006; revised July 20, 2006; accepted September 20, 2006.

国家自然科学基金(No. 40072020)资助项目.

AR)为成都科龙化工试剂厂产品; 吡啶橙(AO, AR)为中国医药集团上海化学试剂公司产品; 三羟甲基氨基甲烷(AR)为天津科密欧化学试剂开发中心产品; Tris (0.05 mol/L)-HCl 缓冲溶液为临时配制; 其它试剂均为分析纯, 水为二次重蒸水.

UV-3400 分光光度计, RF-540 荧光仪, pHS-2C 型酸度计, 乌贝路德粘度计, 恒温水浴槽.

1.2 实验方法

1.2.1 紫外-可见光谱法

在一系列 10 mL 比色管中, 分别加入一定量的 HE 溶液, DNA 溶液, HE-DNA 溶液(三种溶液均分别用系列 Tris-HCl 缓冲溶液配制), 以相应 Tris-HCl 缓冲溶液定容, 摇匀, 放置 5 min, 以试剂空白为参比, 扫描吸收光谱, 选定适当的 pH 缓冲溶液.

在 1 cm 比色皿中加入 3.50 mL HE 溶液, 用 DNA 溶液进行滴定, 或在比色皿中加入 3.5 mL DNA 或 HE-DNA 溶液, 用 AO 溶液进行滴定(各种溶液均用 pH=7.80 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制), 摇匀, 放置 5 min, 以试剂空白为参比, 扫描吸收光谱或测定吸光度. 滴定时每次加入体积为 10 μ L, 因此可忽略体积效应.

1.2.2 荧光光度法

在 1 cm 比色皿中, 加入 3.50 mL DNA 或 HE 溶液, 用 AO 溶液进行滴定, 摇匀, 放置 5 min, 扫描荧光光谱或测定荧光强度. 滴定时每次加入体积为 10 μ L, 因此可忽略体积效应. 激发和发射光谱扫描狭缝宽度均为 5.0 nm.

在 7 只 25 mL 容量瓶中加入等量 DNA 溶液和等量 AO 溶液后, 分别加入不同量的 HE 溶液, 摇匀, 放置 5 min, 测定荧光强度.

用 Tris-HCl 缓冲溶液配 DNA, AO-DNA 和 HE-DNA 配合物溶液, 放置在恒温水浴槽中, 在 25~100 $^{\circ}$ C 每间隔 5 $^{\circ}$ C 测其荧光强度.

1.2.3 粘度法

用 Tris-HCl 缓冲溶液配制 AO-DNA 和 HE-DNA 配合物溶液, 放置 48 h, 在 25 $^{\circ}$ C 恒温水浴槽中用乌贝路德粘度计测其粘度.

2 结果与讨论

2.1 紫外-可见光谱

2.1.1 吸收光谱与结合比

苏木素的分子结构见图 1.

在 pH=7.80 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 扫描苏木素与 DNA 作用的吸收光谱, 随着苏木素中 DNA 的加入,

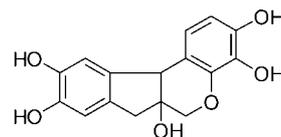


图 1 苏木素的分子结构

Figure 1 Molecular structure of HE

在 652 nm 附近出现了新的 HE-DNA 复合物的吸收峰. 同时 563 nm 附近的特征吸收峰逐渐减小, DNA 对苏木素在 563 nm 处具有明显的减色效应, 在波长 495 和 580 nm 两处出现了等色点. 如图 2 所示, 说明苏木素与 DNA 之间发生了作用, 形成了新的复合物^[9]. 增色、减色效应和等色点是 DNA 特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质^[10]. 吸收光谱的变化规律是由苏木素插入到 DNA 双螺旋碱基中而发生了 π 电子堆砌作用, 致使 DNA 双螺旋结构中堆积的碱基之间的电子相互作用增强, 而降低了对紫外-可见光的吸收.

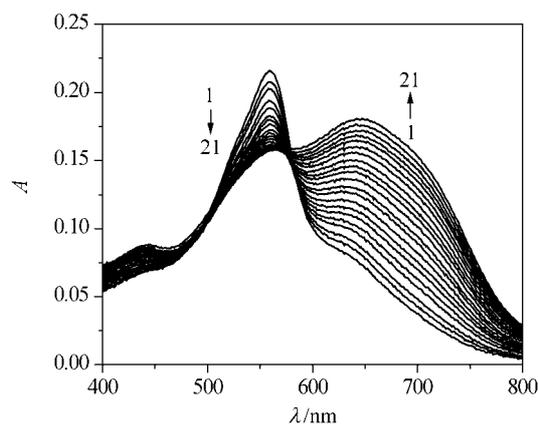


图 2 DNA 对苏木素的吸收光谱

Figure 2 The absorption spectra curve of the DNA to HE (pH=7.80)

CHE=1.40 $\times 10^{-5}$ mol/L; $c_{DNA}=2.45\times 10^{-4}$ mol/L (10 μ L per scan), 1~21: 0~200 μ L

固定苏木素的浓度, 改变 DNA 的浓度, 在 563 nm 处经 5 次平行测定吸光度, 平均结果如图 3 所示. 即实验测得苏木素与 DNA 的结合比 $n_{HE} : n_{DNA}=3 : 1$. 根据 Beer 定律, HE-DNA 溶液中的吸光度可表达为 $A=\epsilon bc$. 式中 ϵ 代表 HE-DNA 的摩尔吸光系数, c 代表 HE-DNA 的浓度, 即结合形成此复合物的 DNA 的浓度, b 代表比色皿的厚度. 由图 3 计算求得 HE-DNA 的表现摩尔吸光系数 $\epsilon=3.76\times 10^4$ L/(mol \cdot cm).

2.1.2 以吡啶橙为探针研究苏木素与 DNA 的相互作用

向 DNA 中加入 AO 后, 溶液的吸光度增加, 随着 AO 的加入, 弱峰变成了强峰, 如图 4 所示, 这是 AO 嵌插于 DNA 的碱基对中所致. 向 HE-DNA 溶液中加入

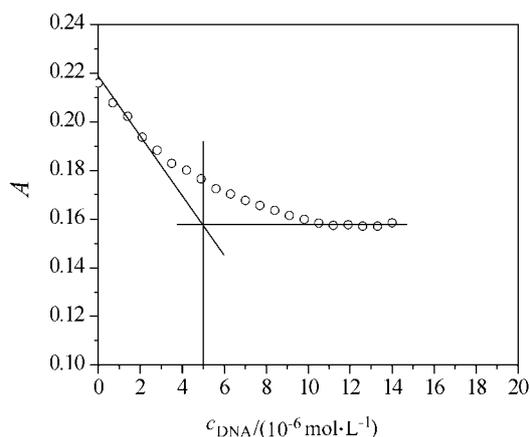


图3 单波长物质的量比法

Figure 3 Unity wavelength substantial amount ratio method (pH = 7.80)

$$c_{\text{HE}} = 1.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

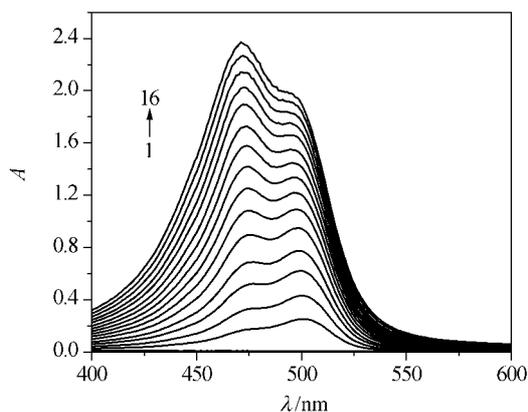


图4 吡啶橙对DNA体系的吸收光谱

Figure 4 The absorption spectra curves of the AO to DNA (pH = 7.80)

$c_{\text{DNA}} = 6.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{AO}} = 2.10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ (10 μL per scan), 1~16: 0~150 μL

AO后,如图5所示,与DNA中加入AO相比较,AO-DNA在450~540 nm的最大吸收也是增加的,但峰形发生了变化且出现了2个等色点,说明HE与DNA之间存在嵌插作用,AO可部分地取代与DNA结合的HE.这是由于DNA的碱基对中存在氢键,而苏木素分子中平面结构的2个苯环联接着4个酚羟基,在碱性条件下容易形成酚氧基负离子,与氨基相比形成的氢键更稳定.因此除了苯环 π 电子堆集因素之外,苏木素分子还能破坏DNA的碱基对间的氢键,使DNA分子部分解螺旋.

2.1.3 双倒数法

紫外-可见吸收光谱法是研究小分子与核酸相互作用的最常用、方便的方法.在温度为22 $^{\circ}\text{C}$ 时,固定苏木

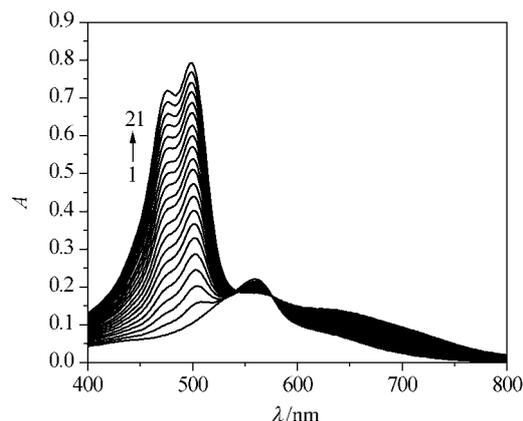


图5 吡啶橙对DNA-HE体系的吸收光谱

Figure 5 The absorption spectra curves of the AO to DNA-HE (pH = 7.80)

$c_{\text{DNA}} = 5.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c_{\text{HE}} = 1.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; $c_{\text{AO}} = 4.38 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ (10 μL per scan), 1~21: 0~200 μL

素浓度,改变DNA浓度,在559 nm处测定吸光度.根据双倒数公式^[11]:

$$1/(A_0 - A) = 1/A_0 + 1/(K \times A_0 \times c_{\text{DNA}})$$

式中 A_0 和 A 分别为加入DNA前后药物的吸光度, K 为结合常数.实验结果如图6-1所示,计算得到22 $^{\circ}\text{C}$ 时结合常数 $K^{\ominus} = 5.96 \times 10^4 \text{ L/mol}$.同样测定35 $^{\circ}\text{C}$ 时体系吸光度,如图6-2所示,得结合常数 $K^{\ominus} = 2.58 \times 10^4 \text{ L/mol}$.再根据热力学方程计算反应的焓变 $\Delta_r H_m^{\ominus}$,自由能 $\Delta_r G_m^{\ominus}$ 和熵变 $\Delta_r S_m^{\ominus}$.

$$\lg K^{\ominus} = -\Delta_r H_m^{\ominus} / (2.303RT) + \Delta_r S_m^{\ominus} / (2.303R) \quad (1)$$

$$\Delta_r G_m^{\ominus} = -RT \ln K^{\ominus} = \Delta_r H_m^{\ominus} - T \Delta_r S_m^{\ominus} \quad (2)$$

通过计算求得苏木素与DNA相互作用的 $\Delta_r H_m^{\ominus}$ 为 $-4.87 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r S_m^{\ominus}$ 为 $-3.56 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$,22 $^{\circ}\text{C}$ 时的 $\Delta_r G_m^{\ominus}$ 为 $-2.70 \times 10^4 \text{ J/mol}$.因此推测苏木素与DNA之间可以相互作用^[12], $\Delta_r H_m^{\ominus}$ 和 $\Delta_r S_m^{\ominus}$ 中起主导作用的因素为 $\Delta_r H_m^{\ominus}$.

2.2 荧光光谱研究

2.2.1 荧光猝灭法

测定不同浓度苏木素存在下的DNA-AO体系的荧光强度,根据Stern-Volmer方程:

$$F_0/F - 1 = K_q \cdot [Q]$$

其中 K_q 是Stern-Volmer猝灭常数,[Q]为猝灭剂浓度.以 F_0/F (F_0 与 F 分别为猝灭剂不存在和存在时体系的荧光强度)对猝灭剂浓度[Q]作图,得到了对苏木素在

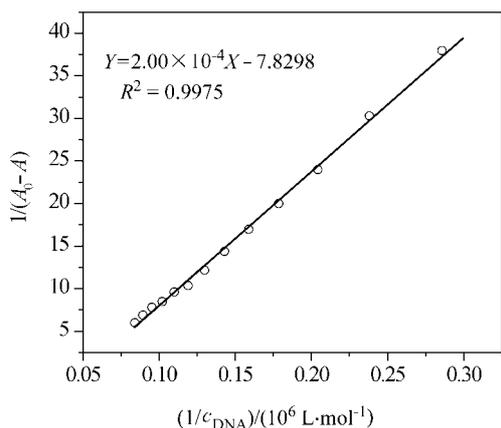


图 6-1 HE-DNA 体系的双倒数图

Figure 6-1 Double reciprocal plot of HE-DNA system (pH=7.80, 35 °C)

$$c_{HE} = 1.45 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

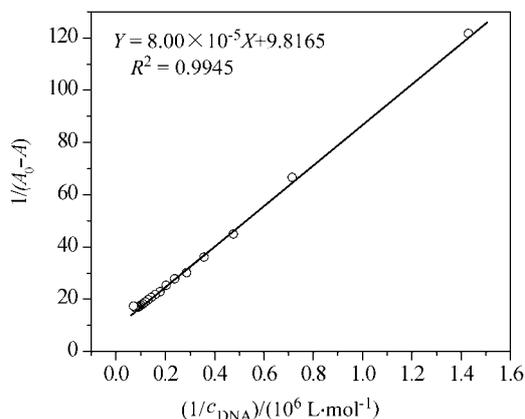


图 6-2 HE-DNA 体系的双倒数图

Figure 6-2 Double reciprocal plot of HE-DNA system (pH=7.80, 22 °C)

$$c_{HE} = 1.45 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

DNA-AO 中的荧光猝灭曲线. 根据经典的荧光猝灭理论^[13], 无论静态猝灭或动态猝灭 F_0/F 对猝灭剂浓度作图均应得到一条直线; 若不是直线, 则为混合猝灭方式. 由图 7 看出, 以苏木素的浓度对 DNA-AO 体系的荧光强度作图, 得到的猝灭曲线符合经典的猝灭理论, 因此认为猝灭剂对 DNA-AO 体系荧光猝灭不是单纯的动态或静态猝灭, 即两种作用模式共同存在.

2.2.2 热变性实验

配制 DNA, DNA-AO 和 DNA-苏木素-AO 溶液, 水浴加热, 从 25 °C 升温至 100 °C, 每隔 5 °C 测定体系的荧光强度, 并以 $F_t/F_{25^\circ\text{C}}$ 对 t 作热变性实验曲线并找出 T_m . T_m 即 DNA 的熔点, 是使 DNA 的双螺旋结构解旋一半时的温度, 它是衡量 DNA 分子稳定性的一个指标. 由图 8 可见, 在 pH=7.80 的缓冲溶液中, 单独 DNA 的

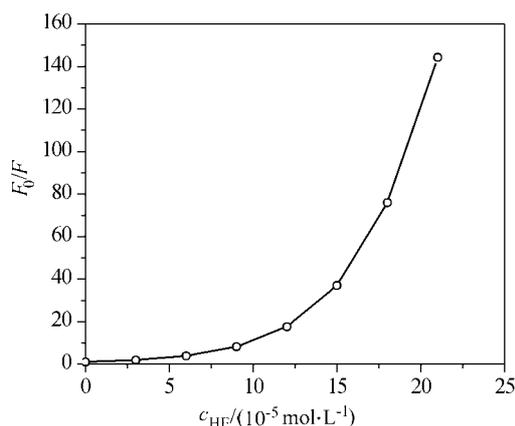


图 7 苏木素对 AO-DNA 体系的荧光猝灭曲线

Figure 7 The fluorescence quenching curve of HE to AO-DNA (pH=7.80)

$$c_{DNA} = 5.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}; c_{AO} = 2.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

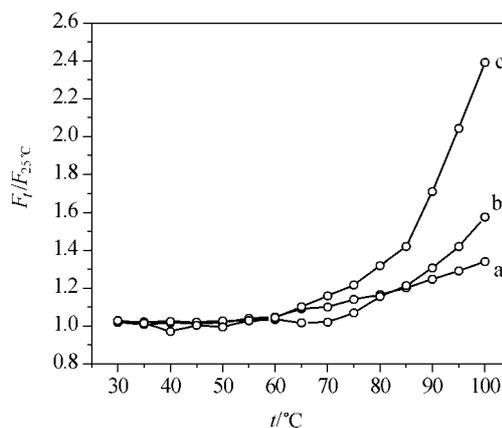


图 8 AO 和苏木素对 DNA 热变性曲线

Figure 8 The effects of AO and HE on melting temperature (pH=7.80)

$$c_{DNA} = 5.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}; c_{AO} = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}; c_{HE} = 1.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

a, DNA; b, AO-DNA; c, HE-AO-DNA

变性温度 T_m 约为 77.5 °C, DNA 与 AO 结合, DNA 的变性温度 T_m 约为 85 °C, 而在 AO-DNA 体系中加入小分子苏木素后, T_m 升高至约 90 °C. 根据 DNA 热变性研究推测, 由于苏木素嵌入试剂的作用能增加 DNA 双螺旋构象的稳定性, 并使 DNA 的变性温度 T_m 值显著上升, 说明苏木素具有破坏 DNA 遗传复制模板的作用.

2.2.3 Scatchard 法研究苏木素与 DNA 的作用方式

AO 可以作为研究苏木素与 DNA 作用方式的荧光探针, 因为 AO 能嵌入到双螺旋 DNA 链的碱基对之间, 使荧光强度增加. 在 HE-DNA 体系中滴加 AO, 引起荧光强度变化, 因此利用 AO 存在下苏木素与 DNA 作用的 Scatchard 图可判别配合物与 DNA 的作用方式. 通过实验研究溶液中有和无 NaCl 两组实验进行对照, 结果

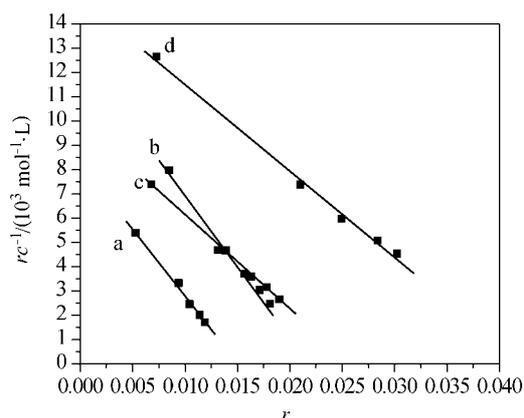


图9 苏木素与 AO-DNA 体系相互作用的 Scatchard 图(无 NaCl)

Figure 9 Scatchard plot of the interaction between HE and AO-DNA (pH=7.80)

$c_{HE}=1.50 \times 10^{-5}$ mol/L; $c_{DNA}=5.00 \times 10^{-6}$ mol/L; $c_{AO}=5.00 \times 10^{-4}$ mol/L (10 μ L per scan); $R_i=c_{HE}/c_{DNA}$; a, $R_i=0.00$; b, $R_i=0.20$; c, $R_i=0.40$; d, $R_i=0.60$

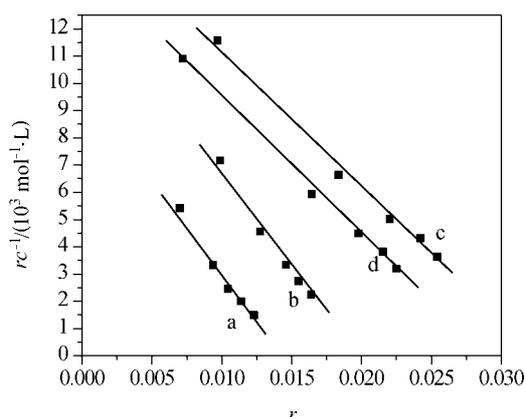


图10 苏木素与 AO-DNA 体系相互作用的 Scatchard 图(有 NaCl)

Figure 10 Scatchard plot of the interaction between HE and AO-DNA (pH=7.80)

$c_{HE}=1.50 \times 10^{-5}$ mol/L; $c_{DNA}=5.00 \times 10^{-6}$ mol/L; $c_{AO}=5.00 \times 10^{-4}$ mol/L (10 μ L per scan); $R_i=c_{HE}/c_{DNA}$; a, $R_i=0.00$; b, $R_i=0.20$; c, $R_i=0.40$; d, $R_i=0.60$

如图9和10所示. AO与DNA作用的特点可用 Scatchard 方程阐述^[22]:

$$r/c=K(n-r)$$

式中 r 为每个核苷酸结合 AO 的分子数, c 为 AO 游离浓度, n 为 r 最大值, K 为单个位点固有的结合常数. 以 r/c 对 r 作图, 得一直线. 若该直线与不存在苏木素下 AO 的 Scatchard 图有相同的 n 值, 则该物质与 DNA 的作用方式为嵌插方式; 若与 AO 的 Scatchard 图有相同的 K 值, 则该物质与 DNA 的作用为非嵌插方式; 若该直线与 AO 的 Scatchard 图的 K 和 n 均不同, 则该物质与 DNA 的作用为混合方式.

两组对照实验 K 值和 n 值的变化表明(见表 1), 苏木素无论在高浓度还是在低浓度时, 其 K 和 n 值都发生改变, 表明其与 DNA 之间的作用为混合作用模式, 即非嵌插和一定的嵌插方式两种作用方式. 同时, 离子强度的增加改变了 AO-DNA 的结合常数 K 和结合数 n , 特别是使 n 值稍有所减小, 说明苏木素与 DNA 间确实存在一定的静电作用. 这是因为 Na^+ 离子在 DNA 的磷酸基负离子周围形成了阳离子氛, 削弱了苏木素与 DNA 的静电作用.

2.3 粘度法对小分子与 DNA 相互作用的研究

在研究小分子苏木素与 DNA 相互作用时, 粘度法最能支持药物与 DNA 的键合方式^[14-17]. 粘度法是一种对 DNA 的长度变化比较敏感的流体力学方法, 通常认为它是检测溶液状态下药物与 DNA 作用模式的有效手段之一^[18]. 当药物以静电作用模式与 DNA 结合时, DNA 溶液的粘度无明显变化, 当药物以插入模式与 DNA 作用时, DNA 的相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体, 从而导致 DNA 双螺旋增长, DNA 溶液的粘度增大^[19-21]. 为进一步确定苏木素与 DNA 的键合方式, 在 25 $^{\circ}C$ 下测定了 DNA 分别在 AO 和苏木素存在时的粘度变化, 结果如图 11 所示. DNA 分别在 AO 和苏木素

表1 苏木素与鲑鱼精 DNA 的相互作用的 Scatchard 方程

Table 1 Scatchard equation of the interaction between hematoxylin and DNA

Curve	c_{HE}/c_{DNA}	NaCl/%	Scatchard 方程	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
a	0.00	5.00	$1.05 \times 10^4 - 7.47 \times 10^5 r$	7.47×10^5	0.014
		0	$8.46 \times 10^3 - 5.65 \times 10^5 r$	5.65×10^5	0.015
b	0.20	5.00	$1.44 \times 10^4 - 7.53 \times 10^5 r$	7.53×10^5	0.019
		0	$1.25 \times 10^4 - 5.56 \times 10^5 r$	5.56×10^5	0.022
c	0.40	5.00	$1.44 \times 10^4 - 4.99 \times 10^5 r$	4.99×10^5	0.029
		0	$1.01 \times 10^4 - 3.91 \times 10^5 r$	3.91×10^5	0.026
d	0.60	5.00	$1.63 \times 10^4 - 5.02 \times 10^5 r$	5.02×10^5	0.032
		0	$1.51 \times 10^4 - 3.58 \times 10^5 r$	9.14×10^5	0.042

存在时的粘度变化趋势相似, 而 AO 与 DNA 的作用是插入模式, 由此我们认为苏木素与 DNA 的作用也存在着经典插入模式。

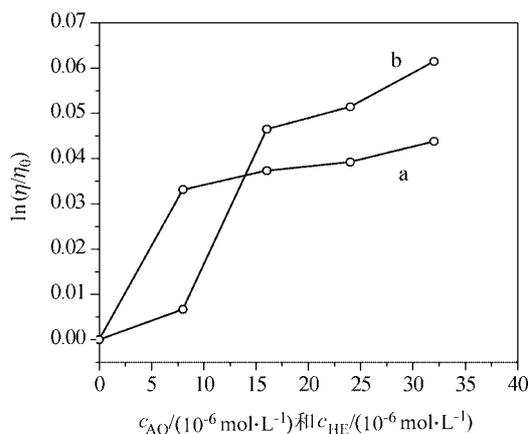


图 11 不同物质及不同浓度对 DNA 粘度的影响

Figure 11 Effect of the concentration on DNA viscosity (pH=7.80)

$c_{\text{DNA}}=5.32 \text{ mg/mL}$; a, AO-DNA; b, HE-DNA

3 结论

运用多种实验方法对苏木素与 DNA 的相互作用机理进行了初步探讨。实验结果表明, 苏木素在 DNA 存在时的一些光谱性质类似 AO 嵌入试剂, 苏木素分子可以引起 DNA 粘度的增加和热变性温度升高, 这是苏木素分子与 DNA 发生嵌插作用时引起 DNA 重要物理参数变化的反映之一^[21~24]。实验表明, 苏木素与 DNA 作用主要是通过平面的二元酚环结构破坏碱基对而与 DNA 的碱基形成氢键, 同时, 溶液状态下的苏木素分子的结构受环境影响容易逐渐发生变化, 例如失去水分子形成如图 12 的结构, 这种共轭二元稠氧杂环平面结构(图 12 中 c, d 二稠环的 c 环具有单同芳性)可能是苏木素分子与 DNA 发生嵌插作用的结构原因(苏木素分子的变异结构及其构效关系研究将另文报道), 从而能引起 DNA 遗传信息的复制、转录发生变异。

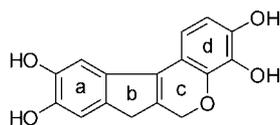


图 12 苏木素分子的变异结构

Figure 12 Aberrant structure of hematoxylin

References

1 Liu, J.; Luo, G.-A.; Wang, Y.-M.; Sun, H.-W. *Acta Pharm.*

Sinica **2001**, *36*, 74 (in Chinese).

(刘军, 罗国安, 王义明, 孙汉文, *药学报*, **2001**, *36*, 74.)

2 Cao, Y.; He, X.-W.; Gao, Z.; Peng, L. *Talanta* **1999**, *49*, 377.

3 Guo, X.-Q.; Zhang, Z.-L.; Zhao, Y.-B.; Wang, D.-Y.; Xu, J.-G. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 1002.

4 Feng, X.-Z.; Lin, Z.; Yang, L.-J.; Li, Q.; Wang, C.; Bai, C.-L. *J. Anal. Sci.* **1999**, *15*, 177 (in Chinese).

(冯喜增, 林璋, 杨林静, 李清, 王琛, 白春礼, *分析科学学报*, **1999**, *15*, 177.)

5 Feng, X.-Z.; Lin, Z.; Ma, J.; Wang, C.; Bai, C.-L. *Chem. J. Chin. Univ.* **1998**, *19*, 1498 (in Chinese).

(冯喜增, 林璋, 马金, 王琛, 白春礼, *高等学校化学学报*, **1998**, *19*, 1498.)

6 Gherghi, I. C.; Girousi, S. T.; Voulgaropoulos, A. N.; Tzimou-Tsitouridou, R. *Talanta* **2003**, *61*, 103.

7 Chen, B.; Tang, H.-W.; Chen, G.-Q.; Ye, Y.; Zeng, Y.-E. *J. Anal. Sci.* **1997**, *13*, 1 (in Chinese).

(陈蓓, 唐宏武, 陈观铨, 叶勇, 曾云鄂, *分析科学学报*, **1997**, *13*, 1.)

8 Tang, H.-W.; Chen, B.; Chen, G.-Q.; Zeng, Y.-E. *Chem. J. Chin. Univ.* **1997**, *18*, 1960 (in Chinese).

(唐宏武, 陈蓓, 陈观铨, 曾云鄂, *高等学校化学学报*, **1997**, *18*, 1960.)

9 Gao, E.-J.; Liu, Q.-T. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 674 (in Chinese).

(高恩君, 刘祁涛, *化学学报*, **2002**, *60*, 674.)

10 Yang, P.; Zhou, C.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 1455 (in Chinese).

(杨频, 周春琼, *化学学报*, **2003**, *61*, 1455.)

11 Purcell, M.; Neault, J. F.; Riahi, T. *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, *1478*, 61.

12 Ross, D. P.; Sabramanian, S. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3096.

13 Chen, G.-Z.; Huang, X.-Z.; Zheng, Z.-Z.; Xu, J.-G.; Wang, Z.-B. *Fluorescence Analytical Method*, Science Press, Beijing, **1990**, p. 263 (in Chinese).

(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 许金钩, 王尊本, *荧光分析方法*, 科学出版社, 北京, **1990**, p. 263.)

14 Zhou, Q.-H.; Yang, P. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 71 (in Chinese).

(周庆华, 杨频, *化学学报*, **2005**, *63*, 71.)

15 Yang, P.-J.; Sun, K.; Su, X.; Wang, L.-F. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 2153 (in Chinese).

(杨培菊, 孙坤, 苏雪, 王流芳, *化学学报*, **2005**, *63*, 2153.)

16 Wang, L.-F.; Song, Y.-M.; Feng, Y.-F. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 2277 (in Chinese).

(王流芳, 宋玉民, 冯亚非, *化学学报*, **2004**, *62*, 2277.)

17 Jiang, C.-W. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 692 (in Chinese).

(蒋才武, *化学学报*, **2004**, *62*, 692.)

18 David, S. S.; Abhijit, M.; David, M. P. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.

19 Yang, G.; Wu, J. Z. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *66*, 141.

- 20 Cusumano, M.; Di Pietro, M. L.; Giannetto, A. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 1754.
- 21 Han, G.-Y.; Yang, P. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2001**, 22, 1993 (in Chinese).
(韩高义, 杨频, 高等学校化学学报, **2001**, 22, 1993.)
- 22 Lepecq, J. B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87.
- 23 Chaires, J. B. *Biochemistry* **1986**, 25, 8364.
- 24 Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8547.

(A0606233 DING, W. F.; LING, J.)