

溶液 pH 对硫堇与 DNA 相互作用方式的影响*

杜江燕^{1,2} 黄晓华² 徐 飞² 邢 巍¹ 陆天虹^{1,2}¹ 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022; ² 南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

摘要 用电化学和光谱方法研究了溶液 pH 对硫堇 (TH) 与小牛胸腺脱氧核糖核酸 (CT-DNA) 相互作用方式的影响. 电化学测量结果表明, 在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中, TH 与 CT-DNA 之间的作用方式以嵌入结合为主, 在 pH 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中, TH 与 CT-DNA 之间的作用方式既存在嵌入结合也存在静电作用. 荧光光谱测量结果表明, TH 与 DNA 结合后其荧光发生猝灭, 通过 Stern-Volmer 方程计算得到 pH 6.5 时 TH-DNA 体系的猝灭常数高于 pH 7.2 时的值, 表明在 pH 6.5 的溶液中两者相互作用更强. 圆二色谱 (CD) 实验结果也证实了这一结论.

关键词: 硫堇, DNA, 电化学反应, 荧光光谱, 圆二色谱

中图分类号: O646

脱氧核糖核酸 (DNA) 是所有生物的基本遗传物质, DNA 与识别分子, 尤其是与药物分子相互作用的电化学和光谱研究是生物电化学研究中的前沿领域之一. 电化学研究可以得到 DNA 与识别分子相互作用的宏观信息, 而光谱研究则有助于从分子水平上理解两者的作用机理, 两种研究技术的有机结合对于深刻理解 DNA 与识别分子的电化学反应机理、识别机理以及 DNA 与药物分子的作用机理等均具有重要的意义. 由于许多抗癌药物的设计都是以 DNA 为作用靶, 而且, 药物的活性与相互作用的方式及作用强度有直接关系, 因此研究抗癌药物与 DNA 的作用方式, 对了解抗癌药物的作用机理, 从而通过分子设计寻找有效的治疗药物具有重要意义^[1-7]. 硫堇 (TH) 为吩噻嗪类杂环分子, 具有平面共轭芳香结构, 这类分子与 DNA 的作用模式主要是通过嵌入结合^[8], 这种作用方式被认为是许多药物分子与 DNA 的作用模式^[1-2]. 此外, 许多药物分子结构中都包含芳香杂环基本骨架, 因此, 许多与 DNA 发生嵌入作用的芳香杂环小分子被用于研究药物分子与 DNA 相互作用的探针分子^[9-11]. TH 具有电化学活性, 同时在可见光区有较强的吸收光谱和荧光光谱. 本文通过 TH 与 CT-DNA (其中 C 为胞嘧啶, T 为胸腺嘧啶) 相互作用的电化学及荧光光谱的研究, 探讨两者相互作用的方式及作

用位点, 以及溶液 pH 对作用方式及作用强度的影响. 通过不同溶液 pH 值 CT-DNA 与 TH 作用后圆二色谱的变化, 讨论溶液 pH 对两者相互作用所引起的 CT-DNA 构象变化的影响.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CT-DNA (北京华美生物工程公司产品, 42% GC 含量), 使用前未经进一步提纯. TH (上海化学试剂公司产品) 和其它试剂均为分析纯. 所有溶液均用三次蒸馏水配制.

M273 型恒电位仪 (美国 EG&G 公司)、LS50B 型荧光光谱仪 (美国 P-E 公司) 和 J715 型圆二色谱仪 (日本松下公司) 进行电化学和光谱的测量.

1.2 实验方法

循环伏安测量用 M273 型恒电位仪和传统的三电极电化学池进行. 铂电极为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 文中所用的电位均相对于 SCE, 工作电极为金电极. 工作电极依次用 03# 砂纸、0.3 和 0.05 μm Al_2O_3 粉末抛光至呈镜面, 在三次蒸馏水中超声和清洗. 电解液分别为 pH 4.5、5.6、6.5 或 7.2 的含不同浓度 CT-DNA 的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH + $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液. 电位扫描范围为 $-0.4 \sim 0.4 \text{ V}$. 在测量前, 通入高

2003-05-13 收到初稿, 2003-07-25 收到修改稿. 联系人: 陆天虹 (E-mail: tianhonglu@263.net; Tel: 025-3598031; Fax: 025-3735202).

*江苏省教育厅自然科学基金 (02KJB150006) 和国家 "211" 工程重点学科建设资助项目

纯氮气 15 min 以除去溶液中的氧,测量在氮气保护下进行.

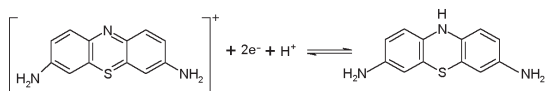
光谱测量溶液分别为 pH 6.5 和 7.2 的含不同浓度 CT-DNA 的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH + $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液. 在荧光光谱测量时,激发波长为 550 nm, 发射光谱扫描范围为 570 ~ 800 nm. CD 光谱测量用的样品池厚度为 0.2 cm, 测得的数值以摩尔椭圆度 $\theta(\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1})$ 表示, 扫描范围为 200 ~ 500 nm.

所有的实验都在 25 °C 下进行.

2 结果与讨论

2.1 TH 与 CT-DNA 体系的循环伏安研究

图 1 为在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中加入 DNA 前后 TH 的循环伏安曲线. 曲线 a 为 TH 在金电极上的循环伏安曲线. 由图可知, 其氧化还原峰电位分别位于 -170 和 -260 mV, 峰电位差 ΔE_p 为 90 mV, 氧化还原峰峰电流基本相等. 这表明 TH 在金电极上能进行准可逆的电化学反应, 其氧化还原式电位 E° 为 -220 mV. 该反应归属于 TH 中间杂环上 N 原子发生的氧化还原反应^[12], 其反应式如下:



曲线 b、c、d 为在 TH 溶液中加入不同浓度 CT-DNA 后, TH 在金电极上的循环伏安曲线. 在加入

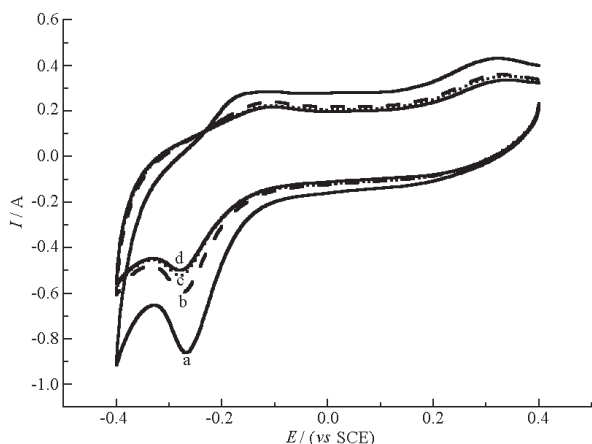


图 1 含不同浓度 CT-DNA 的 TH 溶液在金电极上的循环伏安图

Fig. 1 The cyclic voltammograms of the TH solutions with different concentrations of CT-DNA on the Au electrode

$10^6[\text{CT-DNA}]/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: a)0, b)3.8, c)7.6, d)11.4; pH of solution: 7.2; scan rate: $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

CT-DNA 后, TH 的 E° 比没有 CT-DNA 时的正移. 例如, 当 CT-DNA 浓度为 $1.14 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 (图 1, 曲线 d), TH 的 E° 为 -160 mV, 比没有 CT-DNA 时正移了 60 mV. 按照 Bard、Millian 等^[13-15] 对化合物与 DNA 的相互作用的电化学研究结果, 化合物与 DNA 发生嵌入结合使化合物的 E° 正移. 因此, 上述实验结果表明 TH 与 CT-DNA 之间的相互作用方式为嵌入结合. 此外, 图 1 表明在加入 CT-DNA 后, TH 的氧化还原峰峰电流明显减小 (曲线 b、c、d), 可能是由于 TH 的氧化还原活性中心在中间环的 N 原子上, 当 TH 分子嵌入到 CT-DNA 的双链中时, 其电活性中心被完全包埋^[16], 所以, 当溶液中加入 CT-DNA 后, TH 的氧化还原峰电流明显减小.

不含和含 $1.14 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CT-DNA 的 TH 在不同 pH 的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安曲线测量的结果发现, 当溶液的 pH 为 4.5 时, 加入 CT-DNA 后, TH 的 E° 比不加时负移了 40 mV, 即 ΔE° 为 -40 mV. 当 pH 为 5.6 时, E° 负移减小, $\Delta E^\circ = -36 \text{ mV}$. 当 pH 为 6.5 时, $\Delta E^\circ = -14 \text{ mV}$, 当 pH 为 7.2 时, 前面结果表明 E° 正移了 60 mV. ΔE° 随溶液 pH 变化的数据列在表 1 中. 上述的结果说明: 溶液的 pH 对 TH 与 CT-DNA 的作用方式有较大的影响. 按照 Bard、Millian 等^[13-15] 的研究结果, 化合物与 DNA 两者之间以静电作用结合, 作用后其 E° 负移, 负移程度与静电作用的大小成正比. 由表 1 数据可以看出, 随着溶液 pH 的降低, ΔE° 越负, 表明静电作用越强. 从 TH 的结构来看, 在酸性溶液中, TH 中间杂环上的 N 原子可以结合一个质子, 该带正电荷的物种与 CT-DNA 分子骨架上带负电荷的磷酸基团存在较强的静电作用, 所以在酸性溶液中 TH 与 CT-DNA 的作用方式应以静电作用为主. 从 pH 4.5 到 5.6, ΔE° 值变化不大, 表明在此 pH 范围内, TH 和 CT-DNA 作用方式没有发生大的改变, 以静电作用为主. 当溶液的 pH 为 6.5 时, ΔE° 负值明显减小, 说明静电作用减弱, 可能 TH 中间杂环上的 N 原子与 H^+ 的结合存在一个平衡过程, 一部分质子化的 TH 与 CT-DNA 以静电方式相互作用, 而没有质子化的

表 1 溶液 pH 与 ΔE° 的关系

Table 1		The relationship between pH and ΔE°			
pH	4.5	5.6	6.5	7.2	
$\Delta E^\circ / \text{mV}$	-40	-36	-14	60	

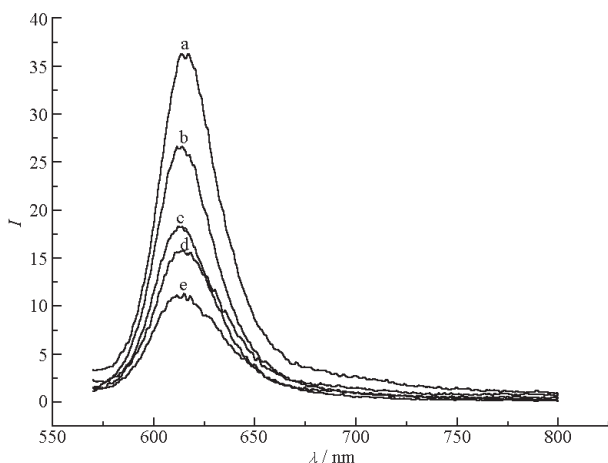


图2 含不同浓度 CT-DNA 的 TH 溶液 (pH = 7.2) 荧光光谱图

Fig. 2 The fluorescence spectra of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH + $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer solutions (pH = 7.2) with different concentrations of CT-DNA

$10^6 [\text{CT-DNA}] / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: a) 0; b) 0.76; c) 1.52; d) 3.04; e) 6.08

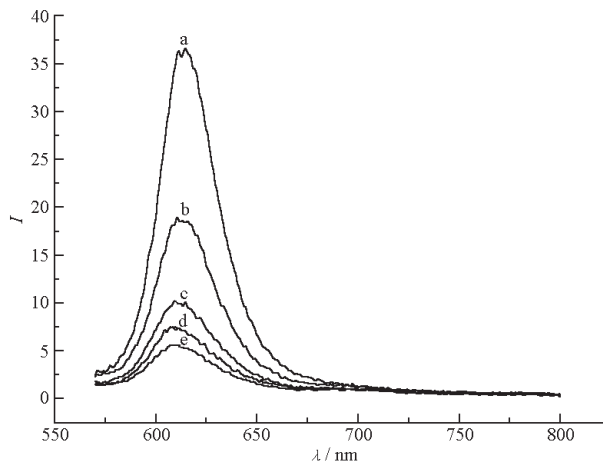


图3 含不同浓度的 CT-DNA 的 TH 溶液 (pH = 6.5) 荧光光谱图

Fig. 3 The fluorescence spectra of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH + $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer solutions (pH = 6.5) at different concentrations of CT-DNA

$10^6 [\text{CT-DNA}] / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: a) 0; b) 0.76; c) 1.52; d) 3.04; e) 6.08

TH 以嵌入结合方式与 CT-DNA 相互作用. 而当溶液的 pH 为 7.2 时, $\Delta E''$ 值变正, 说明此时的作用方式已由静电作用改变为嵌入结合.

当溶液的 pH > 8 时, 其还原峰电位发生很大的负移, 由 TH 的氧化还原反应方程式可知, TH 的还原过程需要 H^+ 的参与, 因而溶液 pH 的增加显然对其还原过程不利, 使还原电位变得更负.

2.2 TH 与 CT-DNA 体系的荧光光谱研究

图 2 为含不同浓度 CT-DNA 的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH 在 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中用 550 nm 作为激发光时的荧光发射光谱图. 由图可见, 当溶液中没有 CT-DNA 时, TH 的发射峰位于 615 nm 处 (曲线 a). 随着 TH 溶液中 CT-DNA 浓度的增加, TH 在 615 nm 处的荧光峰峰强度逐步降低 (曲线 b、c、d、e).

CT-DNA 对 TH 荧光的猝灭作用可能是 TH 嵌入到 CT-DNA 的 G-C 富集区, 碱基 G (鸟嘌呤) 与 TH 单重激发态之间发生了快速电子转移^[17-18]. 由 Stern-Volmer 方程求得猝灭常数^[19]:

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[\text{DNA}]$$

式中, I_0 及 I 分别是无 CT-DNA 及有 CT-DNA 时 TH 的荧光强度, K_{sv} 是 Stern-Volmer 猝灭常数. 将实验数据代入上述方程, 求得在 pH 为 7.2 的 TH-(CT-DNA) 溶液的猝灭常数, K_{sv} 等于 $1.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

当溶液的 pH 为 6.5 时, 在 TH 溶液中加入不同浓度的 CT-DNA 后, 荧光猝灭效应更明显 (图 3). 例如, 当加入 CT-DNA 的浓度为 $7.6 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 在 pH 为 7.2 的溶液中, 荧光强度减少了 28.1% (图 2, 曲线 b), 而在 pH 为 6.5 的溶液中, 荧光强度则减少了 49.5% (图 3, 曲线 b). 按上述方程, 求得在 pH 6.5 的溶液中 TH-(CT-DNA) 溶液的 K_{sv} 等于 $1.46 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 大于在 pH 7.2 的溶液中的 K_{sv} .

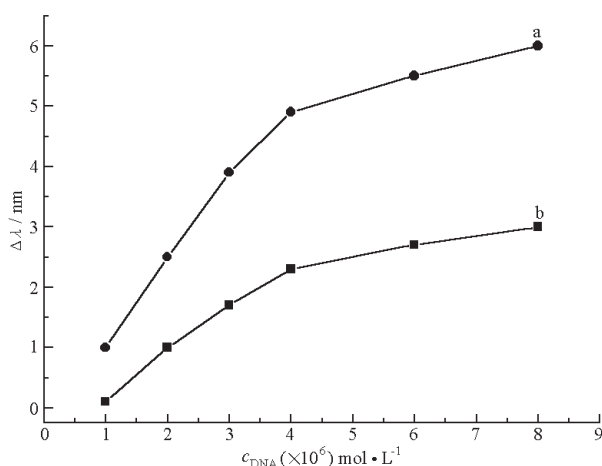


图4 不同 pH 溶液中 TH 荧光发射峰蓝移 $\Delta \lambda$ 与 $c(\text{CT-DNA})$ 的关系曲线

Fig. 4 The relationship between $\Delta \lambda$ and the concentration of CT-DNA

(a) pH = 6.5; (b) pH = 7.2

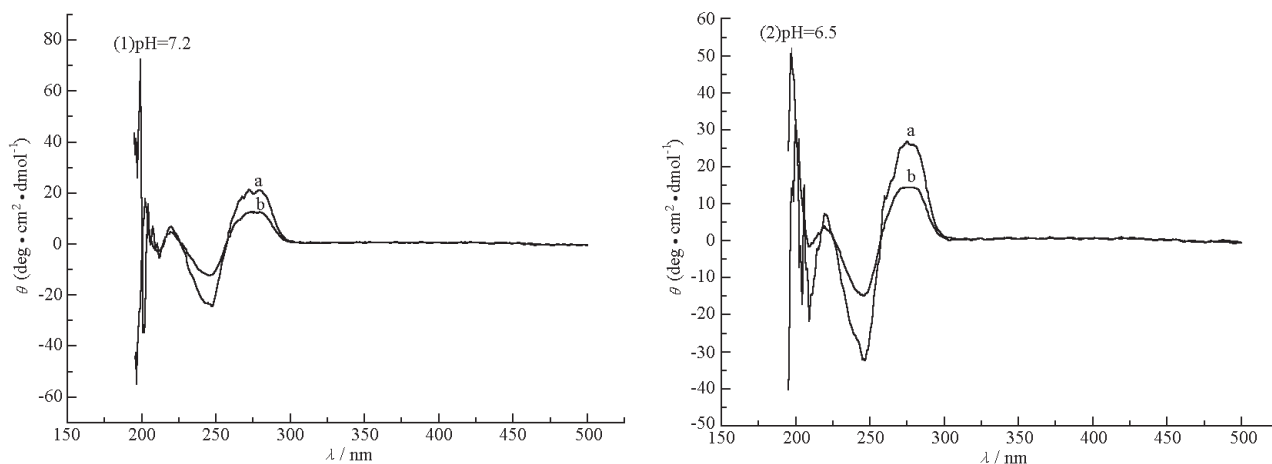


图5 不同 pH 时 DNA 溶液的 CD 谱图

Fig. 5 The CD spectra of DNA in (1)pH = 7.2; (2)pH = 6.5 phosphate buffer solution

[TH]/mol·L⁻¹: (a)0; (b)1.0 × 10⁻⁴

实验还发现,在 TH 溶液中加入 CT-DNA 后,荧光发射峰会发生蓝移,蓝移的程度随 CT-DNA 浓度的增加而增加.而且,荧光发射峰蓝移的程度与溶液 pH 值有关.例如,在 pH 6.5 的溶液中,没有 CT-DNA 时,TH 的荧光发射峰位于 614 nm 处,加入 $6.08 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CT-DNA 后,TH 的荧光发射峰位于 608 nm,峰位差 $\Delta\lambda$ 为 6 nm,即蓝移了 6 nm(图 4,曲线 a).而对于 pH 7.2 的溶液,当加入 CT-DNA 的浓度相同时,相应的荧光发射峰仅蓝移 3 nm(图 4,曲线 b).

荧光发射峰蓝移表明分子所处环境的疏水性增强^[20],说明在 pH 6.5 的溶液中,TH 更深地嵌入到 DNA 的双螺旋结构中,由此也可以解释图 3 所显示的在 pH 6.5 的溶液中荧光猝灭效应更强的现象.电化学的研究表明,在 pH 6.5 的溶液中,TH 和 CT-DNA 的作用为静电作用和嵌入结合两种方式,而荧光光谱的研究表明,静电作用使 TH 更深嵌入到 DNA 的双螺旋结构中.

2.3 TH 与 CT-DNA 体系的 CD 谱研究

图 5(1)和(2)分别为不含(曲线 a)和含 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TH(曲线 b)的 $7.6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA 溶液在 pH 7.2 和 pH 6.5 的溶液中的 CD 谱图.由图 5(1)曲线 a 可见,当 pH 为 7.2 的溶液中不含 TH 时,在 275 和 246 nm 处分别有一个正峰和一个负峰,对应于 B 型(即两条糖磷酸主链呈右手螺旋)CT-DNA 的二级结构构象^[21].当加入 TH 后,由曲线 b 可见,其正负峰强度减小,正峰减小了 40.9%,负峰减小了 49.4%,说明 TH 与 CT-DNA 的嵌入作用使 CT-DNA 的 B 型构象降低.

当溶液 pH 为 6.5 时(图 5(2)曲线 b),正负峰强度减小更明显,其中正峰减小了 46.1%,负峰减小了 53.9%,正负峰减小的幅度均比 pH 7.2 时增加了 ~5%.这也进一步说明在 pH 6.5 的溶液中,由于静电作用与嵌入作用同时存在,使 CT-DNA 的构象发生了更大的变化.

TH 加入后只改变 CT-DNA 体系的 CD 谱峰的强度而峰位及峰形未发生变化,说明 TH 的加入只影响 CT-DNA 的构象,未引起 CT-DNA 双螺旋链的解链^[21].

3 结论

本文研究结果表明,溶液的 pH 对 TH 和 CT-DNA 的相互作用方式有较大的影响.在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液中,TH 与 CT-DNA 之间的作用方式以嵌入结合为主,在 pH 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中,TH 与 CT-DNA 之间的作用方式既存在嵌入结合也存在静电作用.静电作用有利于 TH 与 CT-DNA 之间的嵌入作用,使两者之间的相互作用更强.所以,在 pH 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中 CT-DNA 的构象发生了更大的变化.

References

- Wang, B. H.; Zhang, K. J.; Li, Z. F.; Zhang, Y. M.; Yang, M.; Wang, K. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **1994**, *10*(3): 266 [王保怀,张开江,李芝芬,张有民,杨铭,王夔.物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **1994**, *10*(3): 266]
- Wang, B. H.; Zhang, Y. M.; Yang, M.; Miao, P.; Wang, K. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **1994**, *10*(1): 82 [王保怀,张有民,杨铭,苗培,王夔.物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **1994**, *10*(1): 82]

- 3 Xiong, Y.; Huang, S. Q.; Wu, D. Q.; Qu, S. S. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **1996**, **12**(6): 543 [熊亚, 黄素秋, 吴鼎泉, 屈松生. 物理化学学报 (*Wuli Huaxue Xuebao*), **1996**, **12**(6): 543]
- 4 Zhou, L.; Wang, B. H.; Li, Z. F.; Li, C.; Yang, M. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2000**, **16**(8): 729 [周力, 王保怀, 李芝芬, 李册, 杨铭. 物理化学学报 (*Wuli Huaxue Xuebao*), **2000**, **16**(8): 729]
- 5 Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Huang, X. H.; Feng, P. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2001**, **17**(3): 222 [黄承志, 李原芳, 黄新华, 奉萍. 物理化学学报 (*Wuli Huaxue Xuebao*), **2001**, **17**(3): 222]
- 6 Yang, Z. S.; Yu, J. S.; Chen, H. Y. *Chem. J. Chinese Universities*, **2002**, **23**(8): 1457 [杨周生, 于俊生, 陈洪渊. 高等学校化学学报 (*Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*), **2002**, **23**(8): 1457]
- 7 Joseph, W.; Mehmet, O.; Xiaohua, C.; Gustavo, R.; Haruki, S.; Douglas, H. G.; Manuel, C.; Joao, F.; Emil, P. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, **45**: 33
- 8 Eric, C. L.; Jacqueline K. B. *Acc. Chem. Res.*, **1990**, **23**: 273
- 9 Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, **115**(19): 8547
- 10 Cao, Y.; Li, Y. J.; Gao, Z.; He, X. W. *Acta Pharm. Sin.*, **1999**, **34**(4): 276 [曹瑛, 李一峻, 高志, 何锡文. 药理学报 (*Yaouxue Xuebao*), **1999**, **34**(4): 276]
- 11 Xi, X. L.; Yang, M. M.; Han, X. J.; Yang, P. *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2001**, **17**(6): 781 [席小莉, 杨曼曼, 韩小见, 杨频. 无机化学学报 (*Wuji Huaxue Xuebao*), **2001**, **17**(6): 781]
- 12 Bauldrey, J. M.; Archer, M. D. *Electrochimica Acta*, **1993**, **38**(12): 1619
- 13 Bard, A. J.; Cater, M. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**(24): 7528
- 14 Bard, A. J.; Rodoriguez, M. *Anal. Chem.*, **1990**, **62**(24): 2658
- 15 Millian, K. M.; Mikkelsen, S. R. *Anal. Chem.*, **1993**, **65**: 2317
- 16 Kumar, C. V.; Asuncion, E. H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**: 471
- 17 Gavin, D. R.; Douglas, J. W.; Mark, A. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, **123**: 6953
- 18 Beddard, G. S.; Kelly, J. M.; Wilhelm, J. M.; Vander, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**: 1346
- 19 Pyle, A. M.; Rehmann, J. P.; Meshoyrer, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(8): 3051
- 20 Chou, J.; Qu, X. G.; Lu, T. H.; Dong, S. J.; Wu, Y. *J. Microchem.*, **1995**, **2**: 159
- 21 Lu, J. X.; Zhang, G. Z.; Huang, Z. N. *Acta Chim. Sin.*, **2002**, **60**(6): 967 [卢继新, 张贵珠, 黄志娜. 化学学报 (*Huaxue Xuebao*), **2002**, **60**(6): 967]

Effect of pH on the Interaction Mode between TH and CT-DNA

Du Jiang-Yan^{1,2} Huang Xiao-Hua² Xu Fei² Xing Wei¹ Lu Tian-Hong^{1,2}

(¹Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022;

²College of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract The effect of pH of solution on the interaction between TH(thionine) and CT-DNA was studied using electrochemical and spectroscopic methods. The electrochemical results indicated that the interaction between TH and CT-DNA is in the intercalative mode in the pH 7.2 phosphate buffer solution, but both intercalative and electrostatic modes exist in the pH 6.5 phosphate buffer solution. Fluorescence spectroscopic results showed that the fluorescence intensity of TH is efficiently quenched by CT-DNA bases. The quenching constant, K_{SV} obtained from the Stern-Volmer equation for the pH 6.5 solution is larger than that for the pH 7.2 solution indicating that the interaction between TH and CT-DNA in the pH 6.5 solution is stronger than that in the pH 7.2 solution. The conclusion is confirmed by the results of CD spectroscopic measurements.

Keywords: Thionine, DNA, Electrochemical reaction, Fluorescence spectrum, Circular dichroism