

γ -环糊精-达旦黄包合物与鲑鱼精 DNA 的作用机理

费丹¹, 王兴明¹, 阮开敏¹, 于婷婷¹, 欧阳昌伟¹,
赵学全¹, 刘胜男¹, 戴亚堂¹, 董发勤¹, 丁立生²

(1. 西南科技大学 材料科学与工程学院, 四川 绵阳, 621010;
2. 中国科学院 成都生物研究所, 四川 成都, 610041)

摘要: 在生理 pH=7.4 环境下, 用摩尔比法测定 γ -环糊精(γ -CD)与达旦黄(TY)的包合比(摩尔比) $n_{\gamma\text{-CD}}:n_{\text{TY}}=1:1$, 直线法测定包合常数 $K_f=495.23$ L/mol。以中性红(NR)作分子探针, 用紫外光谱法、荧光光谱法、电化学法、化学热力学法和黏度法等研究包合物 γ -CD-TY 与鲑鱼精 DNA 的作用, 得到 γ -CD-TY 包合物与鲑鱼精 DNA 作用的结合比 $n_{\gamma\text{-CD-TY}}:n_{\text{DNA}}=6:1$, 结合常数为 $K_{298.15\text{K}}^{\ominus}=1.12 \times 10^5$ L/mol, $K_{310.15\text{K}}^{\ominus}=2.72 \times 10^5$ L/mol。热力学函数 $\Delta_r G_m^{\ominus}=-2.82 \times 10^4$ J/mol, $\Delta_r H_m^{\ominus}=5.67 \times 10^4$ J/mol, $\Delta_r S_m^{\ominus}=284.78$ J/(mol·K), 说明 γ -CD-TY 包合物与 DNA 作用为熵驱动。确定 γ -CD-TY 与鲑鱼精 DNA 的作用方式为混合作用, 同时存在部分嵌插和非嵌插作用方式。

关键词: γ -环糊精; 达旦黄; 包合物; 鲑鱼精 DNA; 作用方式

中图分类号: O629.74

文献标识码: A

文章编号: 1672-7207(2009)02-0367-08

Functionary mechanism between inclusion complex of titan yellow with γ -cyclodextrin and herring sperm DNA

FEI Dan¹, WANG Xing-ming¹, RUAN Kai-min¹, YU Ting-ting¹, OUYANG Chang-wei¹,
ZHAO Xue-quan¹, LIU Sheng-nan¹, DAI Ya-tang¹, DONG Fa-qin¹, DING Li-sheng²

(1. School of Materials Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology,
Mianyang 621010, China;
2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: Under the condition of physiological environment pH 7.4, the binding ratio $n_{\gamma\text{-CD}}:n_{\text{TY}}=1:1$ and binding constant $K_f=495.23$ L/mol were confirmed by mole ratio method and linear method. NR was used as molecule probe, and the interaction between γ -CD-TY and herring-sperm DNA was studied by UV spectra, fluorescence spectra, electrochemistry, thermodynamic method and viscosity method, etc. A series of thermodynamic functions such as $\Delta_r G_m^{\ominus}=-2.82 \times 10^4$ J/mol, $\Delta_r H_m^{\ominus}=5.67 \times 10^4$ J/mol, $\Delta_r S_m^{\ominus}=284.78$ J/(mol·K) were obtained, and $\Delta_r S_m^{\ominus}$ is the primary driven power of this interaction, the binding ratio is $n_{\gamma\text{-CD-TY}}:n_{\text{DNA}}=6:1$, the binding constants are $K_{298.15\text{K}}^{\ominus}=1.12 \times 10^5$ L/mol, $K_{310.15\text{K}}^{\ominus}=2.72 \times 10^5$ L/mol. The interaction mode between γ -CD-TY and herring-sperm DNA is a mixed binding, consisting of partly intercalation and dis-intercalation.

Key words: γ - cyclodextrin; titan yellow; inclusion complex; herring-sperm DNA; interaction mode

超分子化学是一门迅速发展起来的新兴学科, 超分子作用是一种具有分子识别能力的非共价键分子间

作用力。环糊精(Cyclodextrin, 简称 CD), 是一种重要的超分子主体, 是由环糊精葡萄糖基转移酶(CGT)作

收稿日期: 2008-02-18; 修回日期: 2008-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572254)

通信作者: 王兴明(1955-), 男, 四川广汉人, 教授, 从事化学生物学研究; 电话: 0816-6089371; E-mail: xmwang_xkd@126.com

用于淀粉所产生的,由 D(+)-葡萄糖单元通过 α -(1, 4)糖苷键连接起来的环状寡糖。环糊精分子中包含众多化学反应性相同的羟基,这些可修饰和可生成氢键的基团与邻近的疏水空腔共存,可以包含各种有机、无机客体,还可以表现出特殊的吸附性能^[1],因而可以进行各种模型设计。这种包合作用能明显改善客体分子的状态、稳定性、溶解度等理化特性^[2-3]。在医药方面,环糊精可促进药物稳定性,增加药物溶解度,提高药物生物利用度,作为药物缓释剂^[4]。目前,有关金属配合物用于抗肿瘤药物、DNA 探针、荧光免疫分析等领域的研究较多^[5],而关于环糊精超分子包合物与 DNA 之间作用机理的研究还比较少。本实验模拟人体生理 pH 值,用 γ -环糊精包含一种常用的血液离子诊断用药——达旦黄(Titan yellow, 简称 TY)。用 UV-Vis、荧光光谱和热力学等多种方法研究 γ -环糊精-达旦黄二元包合物与鲑鱼精 DNA 的相互作用,探讨其作用方式,得到了一系列有价值信息。此外,传统的光谱探针 EB 具有强烈的致癌性,且放置不稳定,实验废水难处理,易污染环境。本实验中采用相对环保,弱毒性,且对 DNA 有专一嵌插作用^[6-7]的新一代光谱探针中性红(Natrure red, 简称 NR)进行相关研究。

1 实验

1.1 试剂和仪器

试剂为:鲑鱼精 DNA (A.R, Sigma 公司生产);达旦黄(TY, A.R, 上海化学试剂厂生产); γ -环糊精(γ -CD, A.R, 成都科龙化工试剂厂生产);中性红(NR, A.R, 成都科龙化工试剂厂生产);三羟甲基氨基甲烷(A.R, 天津科密欧化学试剂开发中心生产);Tris (0.05 mol/L)-HCl 缓冲溶液,为临时配制;其他试剂均为分析纯,水为二次重蒸水。

仪器为:UV-3400 分光光度计(日本日立);RF-540 荧光仪(日本岛津);CHI 760C 型电化学工作站(CH Instruments, USA);三电极系统:以玻碳电极(GCE, d 0.03 cm)为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂片电极作对电极;pHS-2C 型酸度计(成都方舟科技开发公司制造);恒温水浴槽(成都方舟科技开发公司制造);乌贝路德黏度计。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外光谱法

使用 Tris-HCl 缓冲溶液(pH=7.4)为作用介质,配制好待测包合物溶液,静置 5 min。用 1 cm 比色皿,在参比池加入 3.00 mL 空白试剂,在样品池中加入

3.00 mL 待测溶液,以试剂空白作参比,扫描吸收光谱。然后,向两池中每次分别依次加入 0.01 mL DNA 溶液,充分搅拌,混合均匀,使 DNA 和包合物的浓度比不断增加,同时,扫描吸收光谱。

1.2.2 荧光光谱法

在 1 cm 比色皿中加入 3.00 mL 待测包合物溶液,放入样品池中,扫描发射光谱。然后,向样品池每次加入 0.01 mL DNA 溶液,充分搅拌,使 DNA 和包合物的浓度比不断增加,扫描发射光谱。荧光激发波长为 412 nm。

1.2.3 电化学法

对电极进行预处理。将玻碳电极在麂皮上依次用 Al_2O_3 的悬浊液抛光,然后,用蒸馏水在超声波清洗仪中清洗干净。配制不同摩尔比的 DNA 和 γ -CD-TY 包合物溶液,定容,摇匀,在 CHI 760C 型电化学工作站上以 0.05 V/s 的扫描速度记录 -0.1~0.8 V 的循环伏安曲线。

三电极系统:工作电极为碳纳米管修饰玻碳电极(GCE);参比电极为饱和甘汞电极(SCE);对电极为铂丝电极。

1.2.4 黏度法

用 Tris-HCl 缓冲溶液配制 NR-DNA 和 γ -CD-TY 包合物-DNA 溶液,放置 24 h,在 297.15 K 恒温水浴槽中用乌贝路德黏度计测其黏度。

2 结果与讨论

2.1 γ -环糊精与达旦黄的包合作用及包合比的确定

γ -环糊精结构如同一个中空的面,内径为 0.78~0.83 nm,高为 0.79 nm。内侧的糖苷键上的氧原子处于—CH 键屏蔽下,有疏水作用,而外腔却具有很多亲水作用的羟基。从 TY 分子(如图 1 所示)结构看,TY 分子是有 3 个苯环结构的化合物,形成 3 个 p- π 共轭体系,理论上这类基团易被 CD 环包合。紫外光谱法是研究环糊精与有机客体之间相互作用最常用的方法。当客体与环糊精的包合物形成时,由于其富电子基团会全部或部分嵌入环糊精分子空腔中,环糊精分子腔中的高电子密度诱导客体分子电子发生转移,所以,最大吸收峰的位置、强度或者峰形会发生某些变化^[8]。单独的 TY 分别在波长为 322 nm 和 400 nm 处存在紫外吸收峰,随着 γ -CD 的不断加入,在低浓度时(图 2(a)),体系的紫外吸收强度呈规律性地上升;在高浓度时(图 2(b)),体系的紫外吸收强度呈规律性

地下降;而这2种情况都同时伴随着紫外吸收峰的红移,由400 nm移至410 nm。该现象说明TY客体所在的化学微环境随着主体 γ -CD的加入而发生变化,即由极性环境进入到环糊精疏水空腔的非极性环境而形成了包合物。

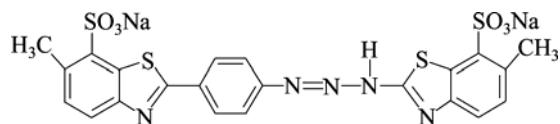
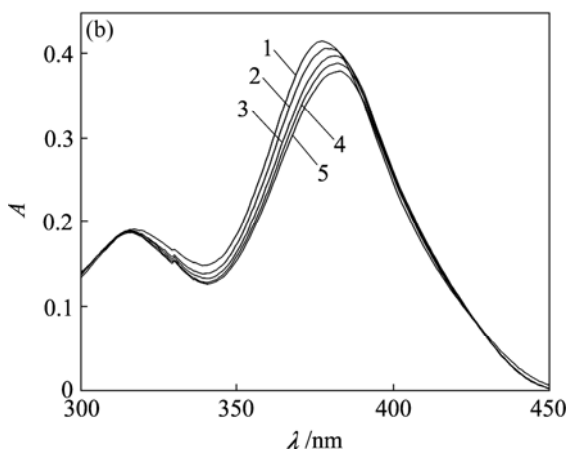
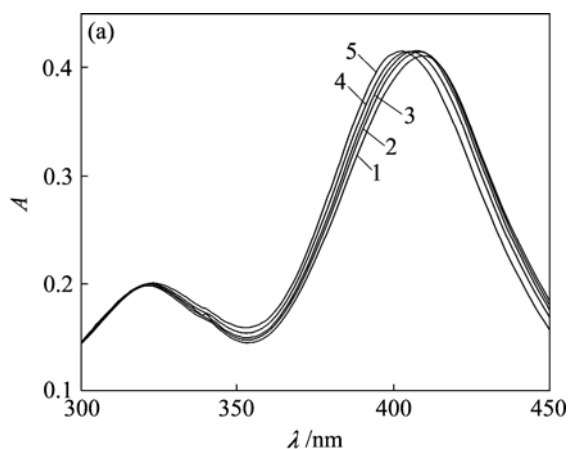


图1 达旦黄分子结构

Fig.1 Molecule structure of titan yellow



$c_{TY} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

- (a) 1— $c_{\gamma\text{-CD}}=0$; 2— $c_{\gamma\text{-CD}}=0.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;
- 3— $c_{\gamma\text{-CD}}=1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; 4— $c_{\gamma\text{-CD}}=1.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;
- 5— $c_{\gamma\text{-CD}}=2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
- (b) 1— $c_{\gamma\text{-CD}}=0$; 2— $c_{\gamma\text{-CD}}=1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;
- 3— $c_{\gamma\text{-CD}}=2.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; 4— $c_{\gamma\text{-CD}}=3.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;
- 5— $c_{\gamma\text{-CD}}=4.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

图2 γ -CD对TY吸收光谱的影响

Fig.2 Effects of γ -CD on absorption spectra of TY

固定TY浓度,改变 γ -CD浓度,在波长为412 nm时平行测定吸光度,根据摩尔比法作图,结果如图3

所示。测得 γ -CD与TY的包合比(摩尔比)为 $n_{\gamma\text{-CD}}:n_{TY}=1:1$ 。根据Benesi-Hildebrand观点^[9],如果 γ -CD与TY形成摩尔比为1:1包合物,在 $[CD]>[TY]$ 的情况下,TY吸收强度的变化值 ΔA 与 γ -CD浓度的关系式为

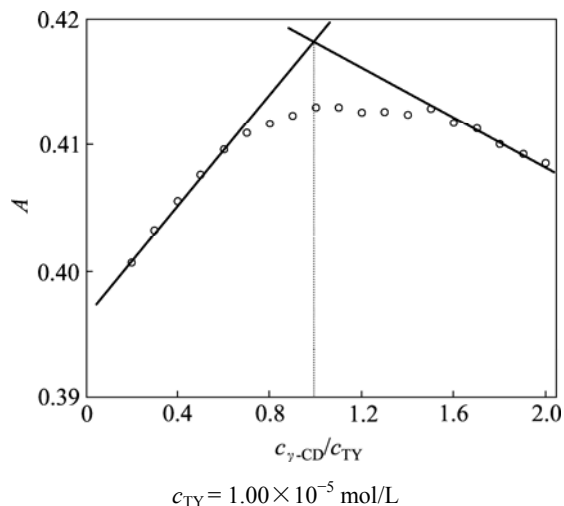


图3 在波长为412 nm时TY- γ -CD的浓度比

Fig.3 Mole ratio plots of TY- γ -CD at 412 nm

$$1/\Delta A = 1/(A_0 - A) = [1/(\alpha \cdot K_f)] \cdot (1/c_{\gamma\text{-CD}}) + (1/\alpha) \cdot c_{TY}$$

式中: A_0 和 A 分别为 γ -CD存在和不存在时溶液的吸光强度; α 为常数; $c_{\gamma\text{-CD}}$ 为 γ -CD的浓度; K_f 为包合常数。

因此,若以 $1/c_{\gamma\text{-CD}}$ 对 $1/\Delta A$ 作图为直线,表明主、客体形成1:1包合物。由图4可见, $1/c_{\gamma\text{-CD}}$ 与 $1/\Delta A$ 呈线性关系,表明 γ -CD与TY形成1:1包合物。由上式和图4计算得到包合常数 $K_f = 495.23 \text{ L/mol}$ 。

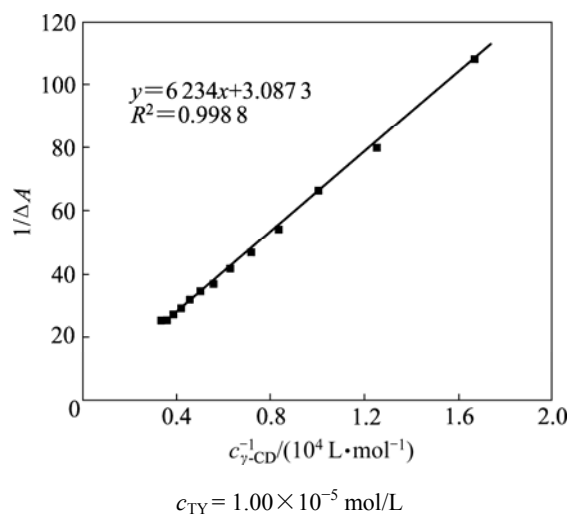


图4 γ -CD-TY的双倒数曲线(405 nm)

Fig.4 Double reciprocal curve of γ -CD-TY

2.2 包合物与 DNA 的相互作用

2.2.1 紫外-可见光谱法

向 γ -CD-TY 包合物溶液中等量滴加 DNA 溶液, 扫描 γ -CD-TY 与 DNA 体系的紫外光谱。通过实验发现, 单独的 DNA 溶液在波长为 400~800 nm 的可见区吸光度为 0, 但当 DNA 加入到 γ -CD-TY 溶液中后, 却使得 γ -CD-TY 的吸光度在 350~500 nm 范围内有规律地逐渐上升。此现象表明, 包合物与 DNA 之间不是发生简单的吸光度加合现象, 而是生成了新物质。根据文献报道^[10], 当小分子以嵌入方式结合于 DNA 双螺旋碱基对之间时, 其吸收光谱表现出减色效应; 当小分子以静电方式结合于 DNA 时, 其吸收光谱表现出增色效应。因此, γ -CD-TY 与 DNA 之间存在一定的静电作用。为了进一步定量分析包合物与 DNA 作用, 通过摩尔比法在 410 nm 处作图(图 5)得到包合物与 DNA 的结合比: $n_{\gamma\text{-CD-TY}}:n_{\text{DNA}}=6:1$ 。根据 Lambert-Beer 定律:

$$A = \varepsilon bc,$$

得到包合物-DNA 的摩尔吸光系数:

$$\varepsilon = A/(bc) = 2.53 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm}).$$

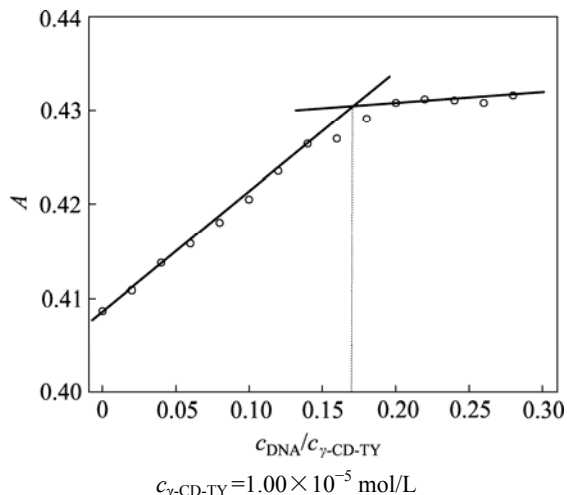


图 5 在波长为 410 nm 时 DNA- γ -CD-TY 包合物的浓度比
Fig.5 Molar ratio plots of DNA- γ -CD-TY at 410 nm

式中: A 为包合物与 DNA 结合达饱和后的吸光度; ε 为包合物-DNA 的摩尔吸光系数; c 为包合物-DNA 浓度; 即结合形成此复合物的 DNA 的浓度; b 为比色皿厚度。

采用热力学方法分析 γ -CD-TY 与 DNA 的相互作用, 可以更深刻地理解它们的作用方式。分别在 298.15 K 和人体温度 310.15 K 下测定 DNA 对 γ -CD-TY 包合物的作用, 并作出双倒数图(图 6)。根据双倒数公式^[11]:

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

得到 γ -CD-TY 与 DNA 结合常数为 $K_{298.15\text{K}}^\ominus = 1.12 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$, $K_{310.15\text{K}}^\ominus = 2.72 \times 10^5 \text{ L}/\text{mol}$ 。式中: A_0 和 A 分别为加入 DNA 前后包合物的吸光度; K 为结合常数。再联用公式:

$$\ln K_2^\ominus / K_1^\ominus = -\Delta_r H_m^\ominus (1/T_2 - 1/T_1) R; \quad (1)$$

$$\Delta_r G_m^\ominus = -RT \ln K^\ominus; \quad (2)$$

$$\Delta_r G_m^\ominus = \Delta_r H_m^\ominus - T \Delta_r S_m^\ominus. \quad (3)$$

得到 $\Delta_r H_m^\ominus = 5.67 \times 10^4 \text{ J}/\text{mol}$, $\Delta_r H_m^\ominus$ 为正值, 说明反应吸热, 温度升高有利于反应的进行; $\Delta_r G_m^\ominus = -2.82 \times 10^4 \text{ J}/\text{mol}$, 推测 γ -CD-TY 包合物与 DNA 的相互作用有自发进行的可能; $\Delta_r S_m^\ominus = 284.78 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$, 由此可知, γ -CD-TY 包合物与 DNA 的相互作用为熵所驱动。

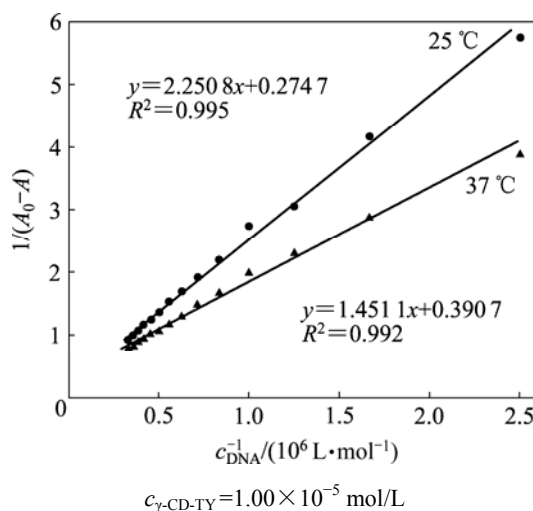
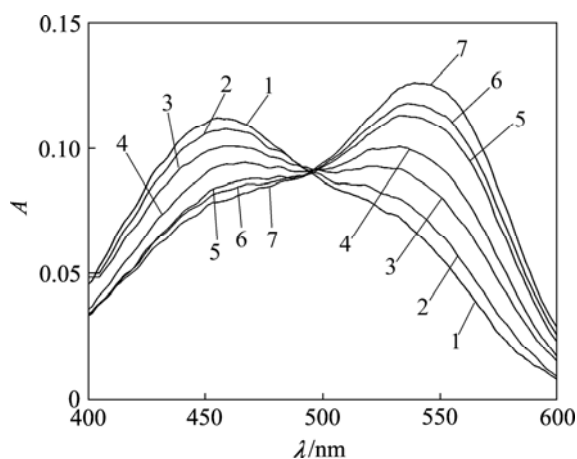


图 6 波长为 260 nm 时 DNA 对 γ -CD-TY 的双倒数曲线
Fig.6 Double reciprocal curves of DNA to γ -CD-TY at 260 nm

吩嗪染料中性红(NR)可与 DNA 发生嵌插作用, 因此, 可用作分子探针研究包合物与 DNA 的作用方式。向 NR 中加入 DNA 溶液的电子吸收光谱表明, NR 与 DNA 的嵌插作用对应于 NR 在 453 nm 的吸光度降低和 537 nm 吸光度升高并红移(图 7)。按照 1:1 的比例配制 NR-DNA 的混合溶液, 静置, 待反应完全, 在 NR-DNA 的混合溶液系统中滴加 γ -CD-TY 包合物溶液(图 8), 随着 γ -CD-TY 的加入, NR 在 407 nm 的吸光度明显升高, 弱峰变强峰。造成这种变化的原因, 一方面是 γ -CD-TY 在该波长范围内与 NR-DNA 混合体系出现吸光度加合作用; 另一方面, 也可能是 γ -CD-TY 与 NR 之间嵌插竞争作用, 使得一部分 NR

小分子从 DNA 中游离出来,而引起该波长范围内吸光度增加。同时,原本在 553 nm 处无吸收的 γ -CD-TY 包合物,却引起 NR-DNA 混合溶液系统在该波长范围内吸光度有规律性地微量增加,这证明了嵌插竞争作用的存在。不过该增加值相当微弱,这是由于 γ -CD 的超分子包裹作用,使得客体分子 TY 与 DNA 间的嵌插作用相当微弱。



$$c_{\text{NR}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$1 - c_{\text{DNA}} = 0; 2 - c_{\text{DNA}} = 0.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

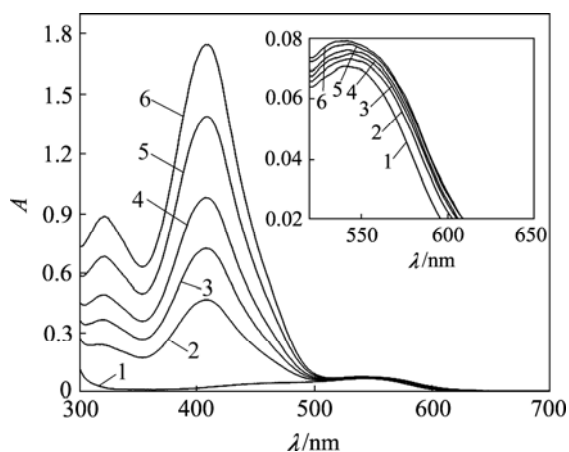
$$3 - c_{\text{DNA}} = 0.40 \times 10^{-5} \text{ mol/L}; 4 - c_{\text{DNA}} = 0.60 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

$$5 - c_{\text{DNA}} = 0.80 \times 10^{-5} \text{ mol/L}; 6 - c_{\text{DNA}} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

$$7 - c_{\text{DNA}} = 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

图7 DNA对NR吸收光谱的影响

Fig.7 Effects of absorption spectra of DNA on NR



$$c_{\text{DNA-NR}} = 0.20 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$1 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0; 2 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.10 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

$$3 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}; 4 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.30 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

$$5 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.40 \times 10^{-5} \text{ mol/L}; 6 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

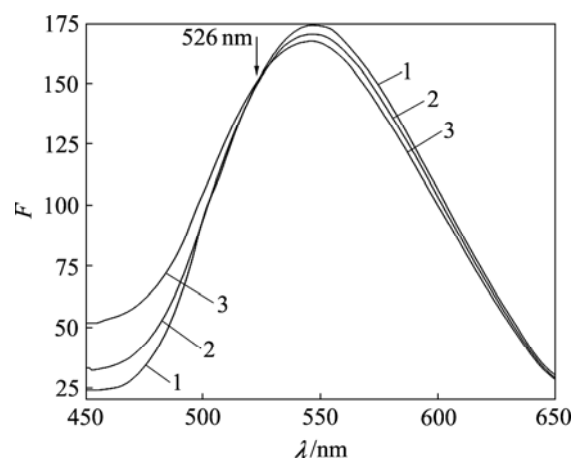
$$7 - c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 1.20 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

图8 γ -CD-TY对DNA-NR吸收光谱的影响

Fig.8 Effects of absorption spectra of γ -CD-TY on DNA-NR

2.2.2 荧光光谱法

向 γ -CD-TY 包合物中等量滴加 DNA 溶液,通过扫描得到的荧光发射光谱如图 9 所示。结果表明,随着 DNA 的加入 γ -CD-TY 包合物的发射峰发生了部分猝灭,并且在 526 nm 处出现了 1 个等荧光强度点。这是因为包合物与 DNA 作用后,包合物与 DNA 之间可能存在微弱的嵌插作用,部分插入 DNA 碱基对中,



$$c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.10 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$1 - c_{\text{DNA}} = 0; 2 - c_{\text{DNA}} = 0.20 \times 10^{-7} \text{ mol/L};$$

$$3 - c_{\text{DNA}} = 0.40 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

图9 DNA对 γ -CD-TY荧光光谱的影响

Fig.9 Effects of emission spectra of DNA on γ -CD-TY

因而受到 DNA 的保护,使之免受水分子的猝灭,因此,一部分荧光强度增加。同时,环糊精包合物中的疏水基团受到了 DNA 分子中疏水基团的吸附,通过氢键或疏水作用结合在 DNA 的沟面,因此,包合物受 DNA 保护程度不大,出现了部分猝灭现象^[12]。以上荧光强度的改变,证实包合物与 DNA 之间存在相互作用,但作用程度不大,因此,推测包合物与 DNA 之间的作用是一种混合作用。

同样,也可用中性红作为荧光探针分子研究 γ -CD-TY 包合物与 DNA 的作用方式。当有 DNA 和 γ -CD-TY 包合物存在时, NR 的荧光强度会大大增强,当加入同样对 DNA 具有嵌插作用的药物分子时,会使 DNA-NR 混合溶液发生荧光猝灭现象^[6]。而向 NR-DNA 的混合溶液系统中加入 γ -CD-TY 包合物溶液,并没有观察到荧光猝灭现象,说明包合物与 DNA 之间的嵌插作用不存在或十分微弱,包合物与 DNA 之间可能存在静电方式或沟结合等非嵌插作用方式。

用经典的 Scatchard 法研究 γ -CD-TY 包合物与 DNA 的作用方式, γ -CD-TY 与 NR-DNA 相互作用的 Scatchard 图如图 10 所示。NR 与 DNA 作用的特

点可用 Scatchard 方程阐述^[13]:

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

式中: r 为每个核苷酸结合 NR 的分子数; c 为 NR 游离浓度; n 为 r 的最大值; K 为单个位点固有的结合常数。

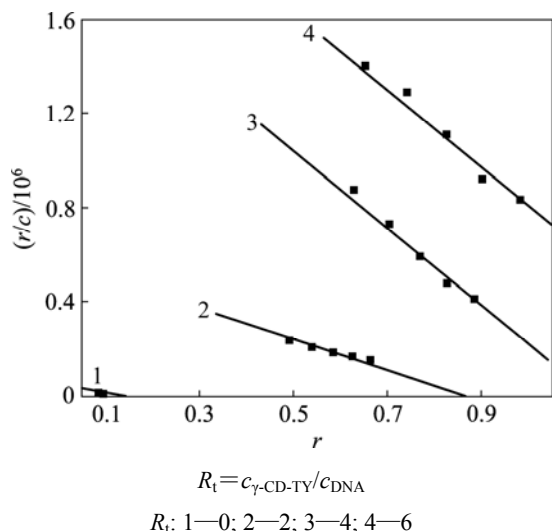


图 10 γ -CD-TY 与 NR-DNA 作用的 Scatchard 曲线

Fig.10 Scatchard plots of interaction between γ -CD-TY and NR-DNA

γ -CD-TY 包合物与 NR-DNA 混合溶液的 Scatchard 方程如表 1 所示。若包合物存在与不存在时 NR 的 Scatchard 图有相同的 n , 则包合物与 DNA 的作用方式为嵌插方式; 若与 NR 的 Scatchard 图有相同的 K , 则包合物与 DNA 的作用为非嵌插方式; 若该直线与 NR 的 Scatchard 图中的 K 和 n 均不同, 则包合物与 DNA 的作用为混合方式^[14]。表 1 中, γ -CD-TY 与 DNA 作用的 K 和 n 均不同, 表明它们之间为混合作用方式, 即同时存在嵌插作用和非嵌插作用。

表 1 包合物 γ -CD-TY 与鲑鱼精 DNA 的相互作用的 Scatchard 方程

Table 1 Data of Scatchard Equation of interaction between γ -CD-TY and DNA

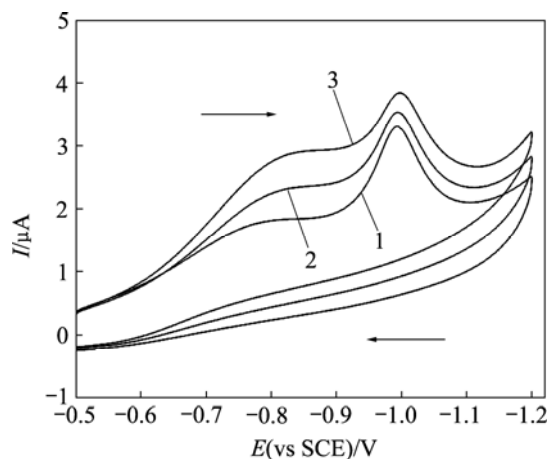
Curve No.	$c_{\gamma\text{-CD-TY}}/c_{\text{DNA}}$	Scatchard 方程	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n
1	0	$r/c=5.46\times 10^4-4.78\times 10^5r$	4.78×10^5	0.114
2	2.00	$r/c=4.73\times 10^4-4.87\times 10^5r$	4.87×10^5	0.097
3	4.00	$r/c=2.04\times 10^4-1.86\times 10^5r$	2.04×10^4	0.110
4	6.00	$r/c=2.61\times 10^4-1.82\times 10^5r$	2.61×10^4	0.143

2.3 电化学方法

天然 DNA 分子, 其碱基的电还原活性位点深藏于双螺旋中, 一般不能参与电极过程。而变性后的单链 DNA 分子的碱基虽然能发生化学还原和氧化, 但还原电位较负($<-1.20\text{ V (vs.SCE)}$)^[15]。采用循环伏安法研究了小分子与 DNA 的作用方式, 认为峰电位正移则表明小分子与 DNA 为疏水的相互作用即嵌入结合, 而峰电位负移时小分子与 DNA 之间的作用为静电作用^[16]。以玻碳电极为工作电极, 以 $\text{pH}=7.40$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液为支持电解质, 在 $-0.50\sim-1.20\text{ V}$ 电位窗口内以 0.05 V/s 的扫描速度对 γ -CD-TY 在有或无 DNA 存在时进行循环伏安(CV)测试, 得到其循环伏安曲线, 见图 11。可见, 在不存在 DNA 时, 包合物的还原峰为 -0.993 V , 为不可逆电化学还原过程。由于峰电位易受到空气中氧气峰电流位置(约为 -0.800 V)的影响, 在实验过程中每次测试均先通入 10 min 氮气。实验结果表明, 当体系中加入 DNA 后, 峰电流增加, 峰电位负移至 -0.998 V , 证明 DNA 与包合物之间存在静电作用。同样, 在 $-0.90\sim-1.10\text{ V}$ 电位窗口范围进行微分脉冲伏安(DPV)测试, 得到其微分脉冲伏安曲线, 见图 12。得到的结果与采用循环伏安法所得结果相同, 包合物的峰电流增加, 峰电位负移了 0.022 V , 由 -0.958 V 移动到 -0.980 V 。

2.4 黏度法

黏度法是一种对 DNA 长度变化敏感的流体力学方法。一般来讲, 当小分子配合物以插入模式与 DNA



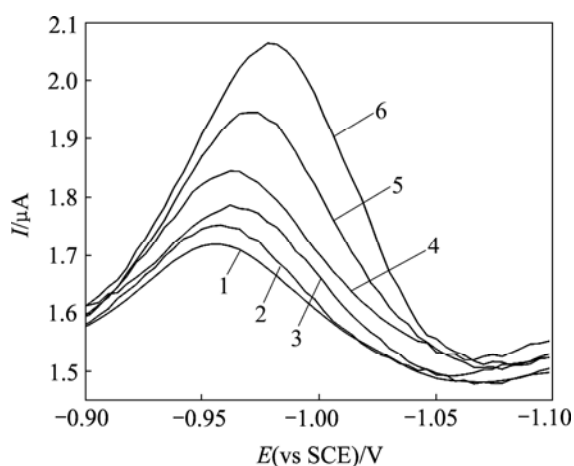
$$c_{\gamma\text{-CD-TY}}=1.00\times 10^{-4}\text{ mol/L}$$

$$1-c_{\text{DNA}}=0; 2-c_{\text{DNA}}=0.05\times 10^{-4}\text{ mol/L};$$

$$3-c_{\text{DNA}}=0.10\times 10^{-4}\text{ mol/L}$$

图 11 DNA 对 γ -CD-TY 循环伏安曲线的影响

Fig.11 Effects of cyclic voltammograms of DNA on γ -CD-TY



$$c_{\gamma\text{-CD-TY}} = 0.50 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

1— $c_{\text{DNA}}=0$; 2— $c_{\text{DNA}}=0.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$;

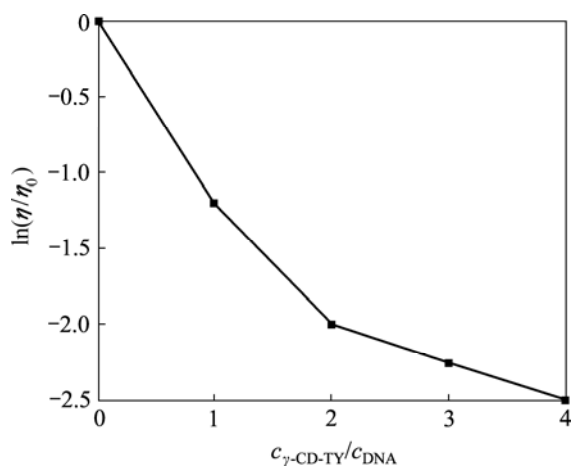
3— $c_{\text{DNA}}=0.50 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; 4— $c_{\text{DNA}}=0.75 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$;

5— $c_{\text{DNA}}=1.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; 6— $c_{\text{DNA}}=1.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$

图 12 DNA 对 γ -CD-TY 微分脉冲伏安曲线的影响

Fig.12 Effects of differential pulse voltammograms of DNA on γ -CD-TY

作用时, DNA 的相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体, 因而导致 DNA 双螺旋伸长, DNA 溶液的黏度增加; 当配合物以静电或沟面结合等非插入模式与 DNA 作用时, DNA 溶液的黏度无明显变化; 而以部分插入方式与 DNA 作用时, 则可能使 DNA 的双螺旋扭结, 使其黏度减小^[12]。 γ -CD-TY 对 DNA 黏度的影响如图 13 所示, 可见, 由于 γ -CD 的包合作用阻碍了 TY 的插入, 使 γ -CD-TY 与 DNA 只有部分插入作用, 而且这种嵌插作用是微弱的, 因此, 表现出黏度减小的现象。



$$c_{\text{DNA}} = 2.00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

图 13 γ -CD-TY 对 DNA 黏度的影响

Fig.13 Effect of viscosity of γ -CD-TY on DNA

3 结论

a. 通过摩尔比法和直线法, 测得 γ -CD 与 TY 在生理 pH=7.40 时形成 1:1 包合物, 结合常数为 $K_f = 495.23 \text{ L/mol}$ 。

b. 由热力学实验测定和计算得到 γ -CD-TY 包合物与鲑鱼精 DNA 相互作用的结合比(摩尔比)为 $n_{\gamma\text{-CD-TY}}:n_{\text{DNA}} = 6:1$, 结合常数为 $K_{298.15\text{K}}^{\ominus} = 1.12 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $K_{310.15\text{K}}^{\ominus} = 2.72 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $\Delta_r G_m^{\ominus} = -2.82 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r H_m^{\ominus} = 5.67 \times 10^4 \text{ J/mol}$, $\Delta_r S_m^{\ominus} = 284.78 \text{ J/(mol}\cdot\text{K)}$, 说明 γ -CD-TY 包合物与鲑鱼精 DNA 的相互作用为吸热反应, 可自发进行, 并为 $\Delta_r S_m^{\ominus}$ 所驱动。

c. 荧光光谱、紫外光谱和电化学等多种方法的研究结果表明, 该包合物 γ -CD-TY 与鲑鱼精 DNA 之间的作用方式是一种以沟槽作用和静电作用为主, 嵌插作用为辅的混合作用方式。由于 γ -CD 通过疏水作用对达旦黄的包合, 以及 TY 分子相对较长(约为 $21.26 \times 10^{-10} \text{ m}$), 使得 γ -CD-TY 包合物中只有处于 γ -CD 圆筒外的 TY 分子的端基部分与 DNA 才有插入作用, 即嵌插作用十分微弱。

参考文献:

- [1] 陈晓青, 喻红竹, 曹佐英. 化学修饰 β -环糊精接枝壳聚糖及其对水溶液中酚的吸附[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2007, 38(1): 112-115.
CHEN Xiao-qing, YU Hong-zhu, CAO Zuo-ying. Chemical modification of β -cyclodextrin chitosan and its adsorption on phenol, *n*-Nonylphenol and resorcinol[J]. Journal of Central South University: Science and Technology, 2007, 38(1): 112-115.
- [2] Masson M, Loftsson T, Masson G, et al. Cyclodextrins as permeation enhancers: Some theoretical evaluations and in vitro testing[J]. J Control Release, 1999, 59(1): 107-118.
- [3] 何华, 汤瑶, 孙成, 等. 光谱法及热力学法研究环糊精与三氟氯氟菊酯的包合作用[J]. 化学学报, 2006, 64(2): 175-181.
HE Hua, TANG Yao, SUN Cheng, et al. Study on inclusion complexes of β -cyclodextrins with cyhalothrin by spectral analysis and thermodynamics[J]. Acta Chimica Sinica, 2006, 64(2): 175-181.
- [4] 龙琪, 陈昌云, 马美华, 等. β -环糊精与左氧氟沙星超分子配合物的合成表征及其与 DNA 的结合性质[J]. 光谱实验室, 2007, 24(1): 23-27.

- LONG Qi, CHEN Chang-yun, MA Mei-hua, et al. Synthesis, characterization and DNA affinity of the supermolecule between β -cyclodextrin and levofloxacin[J]. *Chin J Spectroscopy Laboratory*, 2007, 24(1): 23–27.
- [5] 杨青, 赵强, 魏琦峰, 等. 吡啶-2, 6-二甲酰胺衍生物及其 Tb(III)和 Eu(III)配合物的合成与荧光性质[J]. *中南大学学报: 自然科学版*, 2007, 38(4): 696–700.
- YANG Qing, ZHAO Qiang, WEI Qi-feng, et al. Synthesis of Eu(III) and Tb(III) complexes with novel pyridine dicarboxylic acid derivatives and their fluorescence properties[J]. *Journal of Central South University: Science and Technology*, 2007, 38(4): 696–700.
- [6] 曹瑛, 李一峻, 何锡文. 中性红作为 DNA 作用方式光谱探针的研究[J]. *高等学校化学学报*, 1999, 20(5): 709–712.
- CAO Ying, LI Yi-jun, HE Xi-wen. Studies on neutral red as interacting mode spectroscopic probe of DNA[J]. *Chem J Chinese Universities*, 1999, 20(5): 709–712.
- [7] 叶芳贵, 谢增鸿, 林旭聪, 等. DNA 荧光探针-荧光素-中性红体系的研究[J]. *分析测试技术与仪器*, 2003, 9(2): 74–79.
- YE Fang-gui, XIE Zeng-hong, LIN Xu-cong, et al. Fluorescein-neutral red-pair as a new donor acceptor set for fluorescence energy transfer study of DNA[J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2003, 9(2): 74–79.
- [8] 陈小燕, 刘万毅, 张境. β -环糊精-双二茂铁基烯酮包合物的特征及微环境效应研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(7): 1265–1263.
- CHEN Xiao-yan, LIU Wan-yi, ZHANG Jing. Study on the characterization of β -cyclodextrin-diferrocenylenone inclusion complex and micro-environmental effects[J]. *Chin J Spectroscopy Laboratory*, 2006, 26(7): 1265–1263.
- [9] Botsi A, Yannakopoulou K, Hadjoudis, et al. Calculations on inclusion complexes of cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) with 1, 7-dioxaspiro [5, 5] undecane and nonanal[J]. *J Carbohydr Res*, 1996, 283: 1.
- [10] Widom J, Baldwin R L. Cation-induced toroidal condensation of DNA: Studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ [J]. *J Mol Biol*, 1980, 144: 431–434.
- [11] Purcell M, Neault J F, Riahi T. Interaction of taxol with human serum albumin[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1478(1): 61.
- [12] 张黔玲, 刘剑洪, 任祥忠, 等. 新型双核配合物的形成及荧光性质研究[J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(10): 1805–1810.
- ZHANG Qian-ling, LIU Jian-hong, REN Xiang-zhong, et al. Formation and luminescent properties of new heterobimetallic complexes[J]. *Chem J Chinese Universities*, 2006, 27(10): 1805–1810.
- [13] Lepecq J B, Paoletti C J. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids[J]. *J Mol Biol*, 1967, 27: 87–106.
- [14] 王兴明, 黎泓波, 胡亚敏, 等. 苏木素与 DNA 相互作用的光谱研究[J]. *化学学报*, 2007, 65(2): 140–146.
- WANG Xing-ming, LI Hong-bo, HU Ya-ming, et al. Study on the interaction between hematoxylin and DNA by spectrometry [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2007, 65(2): 140–146.
- [15] 沈鹤柏, 康玉专, 杨海峰, 等. 稀土离子对 DNA 作用的循环伏安法和光谱法研究[J]. *电化学*, 1998, 4(4): 400–405.
- SHEN Hei-bai, KANG Yu-zhuan, YANG Hai-feng, et al. Study of the effect of rare earth ions on DNA using cyclic voltammetry and spectroscopy[J]. *Electrochemistry*, 1998, 4(4): 400–405.
- [16] 彭娟, 高作宁. 多巴胺-Al(III)配合物 DNA 相互作用的电化学和光谱学研究[J]. *化学研究与应用*, 2007, 19(6): 615–621.
- PENG Juan, GAO Zuo-ning. Studies on interaction between dopamine-Al (III) complex and DNA by electrochemistry and spectroscopy[J]. *Chem Res Application*, 2007, 19(6): 615–621.