

[Cu(dien)Cl]⁺与 DNA 及多核苷酸作用的平衡透析研究

赵 刚 汤宝祥 管荫桐 唐雯霞

(南京大学, 配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

用平衡透析法研究了 37℃、pH=6.00, 离子强度为 0.005 条件下的[Cu(dien)Cl]⁺与 DNA、多聚腺苷酸、多聚鸟苷酸以及多聚胞苷酸之间的相互作用。用 McGhee 和 von Hippel 法对实验数据进行了分析, 求得其结合常数、反映键合过程中[Cu(dien)Cl]⁺间相互作用的协同参数以及每个[Cu(dien)Cl]⁺所键合的核苷酸残基数。

关键词: 铜(II) DNA 多核苷酸 平衡透析

金属离子在 DNA 复制、RNA 转录及翻译过程中有重要作用, 因此金属离子与 DNA 的相互作用一直是生物无机化学领域中一个重要研究课题^[1-6], 其中以 Cu²⁺和 DNA 的作用研究最多。研究表明, Cu²⁺与 DNA 的磷酸根结合, 使 DNA 的熔解温度升高^[5,6], 也有报道 Cu²⁺能与 DNA 的碱基结合使 DNA 稳定^[4]。此外不同作者测出的 Cu²⁺与 DNA 的结合常数差别亦很大, 最大可相差四个数量级^[4]。为了弄清 Cu²⁺与 DNA 及多核苷酸的键合行为和键合亲力, 我们继用¹H、³¹P NMR 法研究了含有一个易取代氯离子的[Cu(dien)Cl]⁺(dien—二亚乙基三胺)与核苷酸的作用后^[7], 本文用平衡透析法研究了[Cu(dien)Cl]⁺和 DNA、polyG(多聚鸟苷酸)、polyC(多聚胞苷酸)、polyA(多聚腺苷酸)的键合作用, 求出了结合常数、结合比及协同参数, 并进行了讨论。

实 验 部 分

多核苷酸钾盐为 Sigma 公司产品, 分子量大于 100,000。DNA 样品为新疆化学所生化试剂厂提供的小牛胸腺脱氧核糖核酸, 按文献[8]法提纯后再使用。[Cu(dien)Cl]⁺按文献[9]方法合成。

20 号透析管为 Union Carbide 公司产品, 可透过分子量小于 30,000 的分子, 而不能透过分子量大于 45,000 的分子。透析管用 5%的 NaHCO₃ 溶液煮沸半小时, 再用二次蒸馏水煮沸半小时, 然后浸泡在二次水中, 每 10 小时换一次水, 共换四次, 最后将其取出, 凉干备用。

取 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 或多聚核苷酸溶液 5ml, 移入一端扎紧的透析管中, 再扎紧另一端, 然后放入大试管中, 在大试管中先加入 20ml 含有不同浓度 $(0.5-40 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 的 [Cu(dien)Cl]⁺ 溶液。塞上磨口塞子, 放入恒温振荡器中, 振荡速度为 110-130 次/分, 温度为 $37^\circ\text{C} \pm 1\%$, 透析实验进行了 48 小时, 使配合物与多核苷酸的作用充分达到平衡, 取出透析管, 即可分离出膜内外溶液。透析管内是膜内溶液, 大试管中即所谓膜外溶液。

DNA、多核苷酸浓度均用日立 UV-240 紫外可见分光光度计测定。配合物与多核苷酸作用平衡后, 膜内外铜浓度均用日立 180-80 型原子吸收分光光度计, 采用石墨炉原子吸收

法测定。

实验过程中所用容量瓶、移液管等均用称量法校正过。玻璃器皿洗净后,置于120℃烘箱中干燥4小时。所有溶液均用pH=6.00,离子强度为0.005的缓冲溶液(含0.0025mol·l⁻¹KClO₄和0.0025mol·l⁻¹二甲基亚砷酸钠)配制。

结 果 和 讨 论

McGhee 和 von Hippel 将金属离子或其他分子(金属配合物、蛋白等)与生物大分子的作用看作配基和格子间的相互作用^[10]。考虑到配基和格子中一个以上重复单元结合的可能性,根据条件概率推导出描述任何大小配基(金属离子等)与均匀格子(如polyN等)存在协同结合的方程式(1):

$$\frac{v}{L} = K(1-nv) \left[\frac{(2\omega-1)(1-nv)+v-R}{2(\omega-1)(1-nv)} \right]^{n-1} \left[\frac{1-(n+1)v+R}{2(1-nv)} \right]^2 \quad (1)$$

其中 $R = \{[1-(n+1)v]^2 + 4\omega v(1-nv)\}^{1/2}$

和非协同结合的方程式(2):

$$\frac{v}{L} = K(1-nv) \left[\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right]^{n-1} \quad (2)$$

式中 K 为结合常数, L 为游离配基浓度, v 为键合密度(即每摩尔晶格残基所结合配基的摩尔数), n 为配基键合部位的大小(即每个配基所结合的晶格残基数), ω 为反映键合过程中配基间相互作用的协同参数, $\omega > 1$ 表示存在正协同作用, $\omega < 1$ 表示存在负协同作用, $\omega = 1$ 表示无协同作用,此时式(1)退化为(2)。

因此只要用实验测出游离配基浓度 L (即膜外[Cu(dien)Cl]⁺浓度), 键合密度 v

$$v = \{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{管内}} - [\text{Cu}^{2+}]_{\text{管外}}\} / [\text{polyN}]$$

即可用最小二乘法将这些数据对式(1)或式(2)进行拟合, 求出金属离子(或其他分子)和生物大分子的结合常数(K)、配基键合部位的大小(n)以及确定是否有协同作用存在。

[Cu(dien)Cl]⁺与DNA、polyG、polyC及polyA作用的体系符合McGhee和von Hippel的模型, 因此我们用这一方法处理所得的实验数据, 将实验数据对式(1)或(2)拟合, 所得的 K 、 n 和 ω 值列于表1, 拟合曲线见图1。

表1 [Cu(dien)Cl]⁺与DNA及多核苷酸作用的结果

Table 1 Results of [Cu(dien)Cl]⁺ Binding to DNA and Polynucleotides

polyN	pH	K	n	ω	F^*
DNA	6.00	2.04×10^4	2.01	0.36	0.018
polyG	6.00	4.59×10^4	1.98	0.38	0.006
polyC	6.00	4.98×10^3	2.18	0.42	0.014
polyA	6.00	1.77×10^3	2.39	1.0	0.033

$$^* F = \Sigma(Y_{\text{实}} - Y_{\text{计}})^2 / \Sigma Y_{\text{实}}^2, Y = v/L$$

结果表明, [Cu(dien)Cl]⁺与DNA、polyG、polyC及polyA键合时, n 值都约为2, 即DNA及多核苷酸中的二个核苷酸单元与一个[Cu(dien)Cl]⁺键合, 形成金属大分子配合物。由于[Cu(dien)Cl]⁺中氯离子是一个较弱的配体, 较易为别的配体所取代, 而二亚乙基三胺与Cu²⁺的螯合很牢固, 因此我们认为[Cu(dien)Cl]⁺与DNA及多核苷酸作用时, 一个核苷酸单元取代

了弱配体 Cl^- , 另一个核苷酸单元直接与 Cu^{2+} 结合, 可能形成了四方锥形配合物。

比较 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ 与 DNA 及多核苷酸的键合常数 K 可以看出, $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyG 体系的 K 值最大, 然后依次为 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -DNA 体系、 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyC 体系和 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyA 体系。这说明 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ 与鸟嘌呤的键合最强, 与腺嘌呤的键合较弱。

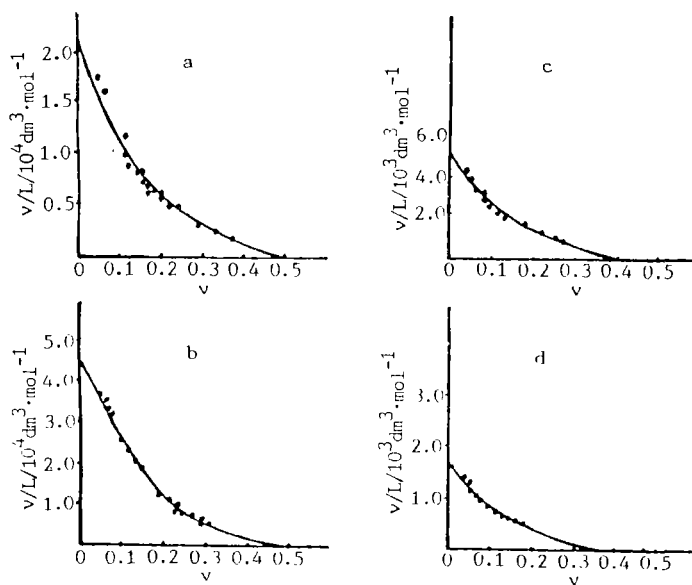


图 1 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ 与 DNA 及多核苷酸作用的拟合曲线

Fig.1 Scatchard plots of $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ binding to DNA and polynucleotides

a. $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -DNA

b. $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyG

c. $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyC

d. $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ -polyA

实验结果 ω 值还告诉我们, $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ 与 DNA、polyG、polyC 作用时, 都存在有负的协同效应, 即已键合的配合物分子不利于后继配合物分子与多核苷酸大分子的键合。而 $[\text{Cu}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ 与 polyA 作用时, $\omega = 1$, 说明已键合的配合物分子不影响后继配合物分子与多核苷酸大分子的键合, 即无协同效应。

参 考 文 献

- [1] Eichhorn, G.L., *Nature*, **194**, 474 (1962).
- [2] Zimmer, Ch., *Z. Chem.*, **11**, 441 (1971).
- [3] Förster, W., Bauer, E., Schütz, H., Berg, H., Akimenko, M., Minchenkova, L.E., Evdokimov, Yu.M., Varshavsky, Ya.M., *Biopolymers*, **18**, 625 (1979).
- [4] Sorokin, V.A., Blagoi, Y.P., Valeev, V.A., Kornilova, S.V., Gladchenko, G.O., Reva, I.D., Sokhan, V.I., *J. Inorg. Biochem.*, **30**, 87 (1987).
- [5] Eichhorn, G.L., Shin, Y.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 7323 (1968).
- [6] Shin, Y.A., Heim, J.M., Eichhorn, G.L., *Bioinorg. Chem.*, **1**, 149 (1972).
- [7] 赵刚、吴仲岩、管荫桐、唐雯霞, 无机化学学报, **9**(1), (1993).
- [8] 沈同、王镜岩、赵邦悌, 生物化学, 上册, 人民教育出版社, P.208, (1980).
- [9] Curtis, N.F., Powell, H.K.J., *J. Chem. Soc.*, (A) 3070 (1968).
- [10] McGhee, J.D., von Hippel, P.H., *J. Mol. Biol.*, **86**, 469 (1974).

EQUILIBRIUM DIALYSIS STUDIES OF INTERACTION OF [Cu(dien)Cl]⁺ WITH DNA AND HOMOPOLYNUCLEOTIDES

Zhao Gang Tang Baoxiang Guan Yintong Tang Wenxia

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008)

The binding of [Cu(dien)Cl]⁺ to DNA, polyG, polyC and polyA has been studied by equilibrium dialysis at pH 6, 37°C, and an ionic strength of 0.005. Using the treatment of McGhee and von Hippel, the magnitude of the intrinsic binding constant, the degree of cooperativity exhibited in the binding process, and the number of nucleotide residue bound with each [Cu(dien)Cl]⁺ have been obtained.

Keywords: copper(II) DNA polynucleotide equilibrium dialysis