

0614.12/ Q523.02  
四氮大环铜配合物和 DNA 的相互作用周井炎\* 李庆祥<sup>✓</sup> 刘长林 徐辉碧

(华中理工大学化学系, 武汉 430074)

本文合成了四氮大环铜配合物, 以紫外和溴化乙锭荧光法研究了它和 DNA 的相互作用, 以琼脂糖凝胶电泳就它作为化学核酸酶的可能性进行了初步研究。

关键词: 四氮大环铜配合物 DNA 紫外光谱 溴化乙锭荧光法  
化学核酸酶

## 0 前言

在生理条件下借助于氧化或光活化显示出与天然核酸酶相同或类似生物活性的过渡金属配合物及其载体衍生物称为化学核酸酶<sup>[1]</sup>, 有报道, 四氮大环铜配合物为有抗艾滋病活性的化合物<sup>[2]</sup>, 我们参考有关文献合成大环配体<sup>[3]</sup>, 用它与铜离子反应形成终产物, 合成了四氮大环铜配合物(下称大环铜配合物)通过紫外、荧光光谱研究了大环铜配合物和 DNA 的相互作用, 并用琼脂糖凝胶电泳观察到了大环铜配合物的化学核酸酶性质, 这将为大环铜配合物的药物应用提供有用的参考资料。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

#### 1.1.1 仪器

紫外可见分光光度计(日本岛津 UV-240 型)

荧光分光光度计(日本岛津 RF-540 型)

电泳仪(北京六一仪器厂)

紫外反射透射分析仪(上海康华生化仪器制造厂)

电子自旋共振仪(日本 JEOL, JES-FE3XG)

#### 1.1.2 试剂

$\lambda$  DNA 溶液(0.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、 $\lambda$  DNA-EcoRI 溶液(0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )华美公司产品, CTDNA, Sigma 产品, 其他均为国产分析纯试剂, 实验用水为二次蒸馏水。

收稿日期: 1996-10-28。 收修改稿日期: 1997-07-21。

国家自然科学基金资助课题。

\* 通讯联系人。

第一作者: 周井炎, 男, 57 岁, 教授, 研究方向: 生物无机化学。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 大环铜配合物的制备

1.2.1.1 制备大环配体 5,7,7,12,14,14-六甲基-1,4,8,11-四氮杂环十四-4,11-二烯二碘化氢

0.2 mol 乙二胺与 10 ml 甲醇在冰浴混合后,缓慢加入 0.2 mol 氢碘酸,再加入 30 ml 丙酮,在冰浴中进一步冷却,放置数小时或过夜,可析出白色晶体,抽滤并用少量丙酮洗涤数次,可得到配体。

### 1.2.1.2 制备大环铜配合物

0.01 mol 配体与 0.01 mol 乙酸铜在加热回流状态下完全溶解在约 40 ml 甲醇中,然后加入配体,继续加热搅拌 1 小时,趁热过滤后在水浴中加热浓缩至晶体开始形成,然后放在冰浴中冷却 1 小时或更长时间,抽滤可得紫色的大环铜配合物,所得的配合物在无水乙醇中重结晶(大环铜配合物的结构见图 1)。

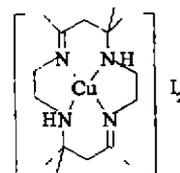


图 1 大环铜配合物的结构

Fig. 1 Structure of macrocyclic copper complex

### 1.2.2 DNA 溶液的配制

紫外测定用 DNA 溶液用柠檬酸-氯化钠缓冲液配制(pH=7.0),荧光测定用 DNA 溶液用 *tris*-HCl 缓冲液配制(pH=8.0),配制  $\lambda$ DNA 溶液用磷酸缓冲液(pH=7.4)。

### 1.2.3 配合物的紫外和红外光谱以及 ESR 谱测定

以水为溶剂测定大环铜配合物的紫外光谱,KBr 压片测定大环铜配合物的红外光谱,在液氮温度下测定大环铜配合物的 ESR 谱。

### 1.2.4 大环铜配合物与 DNA 的相互作用

#### 1.2.4.1 温度的影响

在升温 and 降温的条件下测定 DNA 溶液在 260 nm 处的吸光度。

#### 1.2.4.2 大环铜配合物的影响

在 DNA 溶液中加入大环铜配合物,测 ESR 谱,在升温条件下测定 DNA 溶液在 260 nm 的吸光度,改变大环铜配合物的浓度,测定 DNA 在 260 nm 的吸光度。

#### 1.2.4.3 溴化乙锭荧光强度测定

在一定范围内观察大环铜配合物对溴化乙锭-DNA 荧光强度的影响(激发波长 546 nm,发射波长 600 nm)。

#### 1.2.4.4 琼脂糖凝胶电泳<sup>[1]</sup>

1% 琼脂糖凝胶电泳,pH8.3 的 *tris*-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-EDTA 缓冲溶液作为电极缓冲液,溴酚蓝作为电泳过程的指示标志,以  $\lambda$ DNA-EcoRI 为标准,设  $\lambda$ DNA-EcoRI、 $\lambda$ DNA、 $\lambda$ DNA+大环铜配合物、 $\lambda$ DNA+大环铜配合物+巯基乙醇、 $\lambda$ DNA+大环铜配合物+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、 $\lambda$ DNA+大环铜配合物+巯基乙醇+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 各组研究大环铜配合物对 DNA 的切割作用。([ $\lambda$ DNA])=2.22 $\times$ 10<sup>-4</sup> mol/L, [ $\lambda$ DNA+大环铜配合物]=6.67 $\times$ 10<sup>-4</sup> mol/L, [巯基乙醇]=[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=3.33 $\times$ 10<sup>-3</sup> mol/L, 电压 155 V, 电泳 8 小时 35 分。电泳后,以溴化乙锭为显色剂,染色并在紫外透射反射分析仪中观察,以全色胶卷加红色滤光镜在暗箱中拍摄电泳图。由  $\lambda$ DNA-EcoRI 已知分子量的片断估算断裂后主要产物的分子量。

## 2 结果与讨论

2.1 通常大环配体在 220 nm 有 K 吸收带, 红外谱图在  $3200\text{ cm}^{-1}$  附近有 N-H 伸缩振动吸收,  $1665\text{ cm}^{-1}$  附近有 C=N 伸缩振动吸收,  $1500\text{ cm}^{-1}$  有 N-H 弯曲振动吸收,  $1370\text{ cm}^{-1}$  有偕二甲基的吸收谱带, 配体的季铵谱带在  $2000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  的区域内造成光谱基线倾斜,  $2300\text{ cm}^{-1}$  附近有季铵谱带, 大环配体形成金属配合物后 280 nm 处有由于亚胺基  $\pi$  电子向中心离子的电荷迁移造成的吸收峰。

本文合成的配体在 220 nm 有吸收峰, 红外谱图在 3180, 2300, 1665, 1500,  $1370\text{ cm}^{-1}$  附近有吸收谱带, 大环铜配合物在 220 nm、280 nm 有吸收峰, 红外谱图在 3180, 1665, 1500,  $1370\text{ cm}^{-1}$  附近有吸收谱带, 而配体的季铵吸收谱带则在配合物中消失, 这与文献报导的结果相同。

ESR 谱表明在高场方向有超精细分裂, 是铜离子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 与四个氮配位的特征九重峰,  $g_{\perp} = 2.053$ ,  $g_{\parallel} = 2.331$ ,  $A_{\parallel} = 14.84\text{ mT}$ ,  $A_{\perp} = 1.51\text{ mT}$ 。

### 2.2 在 DNA 溶液中加入大环铜配合物, 升温曲线发生位移 (如表 1)

表 1 在升温条件下, 大环铜配合物对 DNA 吸光度的影响

Table 1 Influence of Macrocyclic  $\text{Cu}(\text{I})$  on Absorption of DNA with the Increasing of Temperature

	20℃	25℃	30℃	35℃	40℃	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	70℃
1#	0.381	0.381	0.382	0.421	0.433	0.443	0.441	0.442	0.443	0.443	0.440
2#	0.684	0.686	0.706	0.709	0.719	0.722	0.718	0.727	0.729	0.730	0.733
3#	1.313	1.477	1.565	1.686	1.738	1.813	1.846	1.894	1.904	1.920	1.936

1# = DNA, 2# = DNA +  $1 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$  macrocyclic copper complex, 3# = DNA +  $5 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$  macrocyclic copper complex

随着大环铜配合物的浓度增大, 吸光度增大, 这表明大环铜配合物与 DNA 发生了相互作用, 大环铜配合物加 DNA 的 ESR 谱为 11 重峰  $g_{\perp} = 2.056$ ,  $g_{\parallel} = 2.295$ ,  $A_{\perp} = 14.90\text{ mT}$ ,  $A_{\parallel} = 1.44\text{ mT}$ , 表明  $\text{Cu}(\text{I})$  与来自碱基的第五个氮有了配位作用, 大环铜配合物可能通过沟结合和插入与 DNA 发生相互作用而影响双螺旋结构的稳定性 (实验结果均扣除了大环铜配合物自身的紫外吸收)。

2.3 溴化乙锭荧光法测定结果表明, 在一定浓度范围内随着大环铜配合物浓度的增加, 荧光强度减少。大环铜配合物与 EthBr 对 DNA 双螺旋竞争插入作用如图 2。

从图 2 可看出, EthBr 在未与 DNA 结合时, 本身产生的荧光强度很低, 一旦与 DNA 结合后, 荧光强度大大增加, 在加入大环铜配合物后, 其荧光强度又降低, 且随大环铜配合物浓度的增加, 其荧光强度降低的程度变大。结合 ESR 谱 11 重峰的佐证, 说明大环铜配合物对 DNA 双链有一定的结合或插入作用, 正是由于大环铜配合物与 EthBr 对双链 DNA 的竞争结合, 从而取代下来了部分 EthBr, 才使荧光强度降低, 并且随大环铜配合物对核苷酸浓度比 ( $r_1$ ) 的增大, 它取代下来的 EthBr 越多, 故荧光强度降低得多。在我们所研究的浓度范围内, 比 ( $r_1$ ) 的增大, 它取代下来的 EthBr 越多, 故荧光强度降低得多。在我们所研究的浓度范围内大环铜配合物在 ( $r_1$ ) 等于 0.6 时, 使荧光强度降低得最多。

2.1 电泳图表明  $\lambda$ DNA + 大环铜配合物、 $\lambda$ DNA - 大环铜配合物 - 巯基乙醇、 $\lambda$ DNA - 大环铜配合物 +  $H_2O_2$  各组 和  $\lambda$ DNA 组一样没有发生切割作用。在巯基乙醇和  $H_2O_2$  同时存在时,大环铜配合物可切割  $\lambda$ DNA 生成较原来的  $\lambda$ DNA 分子量小的片断,表现为电泳迁移率增大,分子量大小可与  $\lambda$ DNA-EcoRI 的片断相对应。即根据 DNA 的分子量与其凝胶电泳的迁移率成一定的对应关系。用 EcoRI 切  $\lambda$ DNA 后的已知分子量片断 ( $13.7 \times 10^6$ 、 $4.74 \times 10^6$ 、 $3.73 \times 10^6$ 、 $3.48 \times 10^6$ 、 $3.03 \times 10^6$ 、 $2.13 \times 10^6$ ) 的分子量对数对泳动距离作一标准图,然后在标准图上找出其它作用后的泳动距离对应的分子量对数值,从而可估算出作用后产物的分子量,在巯基乙醇和  $H_2O_2$  同时存在时,大环铜配合物对  $\lambda$ DNA 有切割作用,可能大环铜配合物以适当方式结合在  $\lambda$ DNA 的某特定位置上(大环铜配合物在 DNA 中的识别位置的选择性),在巯基乙醇和  $H_2O_2$  存在时,由于活性氧的产生而产生切割作用,断裂后主要产物的分子量为  $6.68 \times 10^6$ 。其作用的可能动力学机理见图 3。在我们的电泳图上,没有观察到其他的片断。

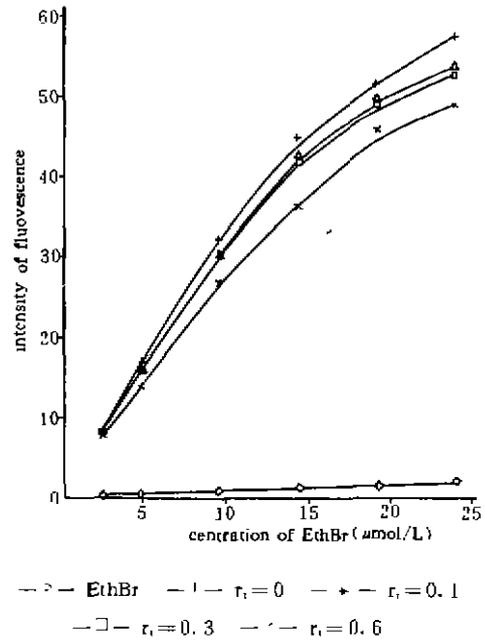


图 2 大环铜配合物与 EthBr 对 DNA 的竞争结合  
Fig. 2 Competitive bound of macrocyclic copper complex and EthBr on DNA

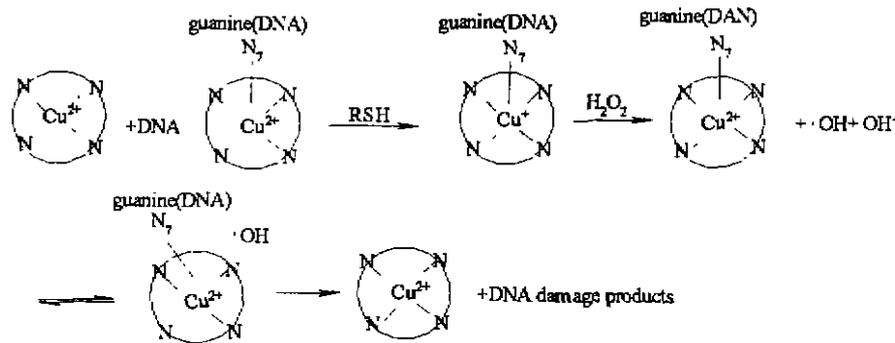


图 3 动力学机理  
Fig. 3 Mechanism of dynamics

图 4 电泳图

Fig. 4 Electrophoresis

1.  $\lambda$ DNA-EcoRI
2.  $\lambda$ DNA + macrocyclic Cu( II )
3.  $\lambda$ DNA + macrocyclic Cu( II ) + sulfhydryl alcohol
4.  $\lambda$ DNA + macrocyclic Cu( II ) +  $H_2O_2$
5.  $\lambda$ DNA
6.  $\lambda$ DNA + macrocyclic Cu( II ) + sulfhydryl alcohol +  $H_2O_2$



我们的实验结果初步证实了大环铜配合物作为化学核酸酶的可能性,也许这正是大环铜配合物作为抗艾滋病的原因所在。

## 参 考 文 献

- [1] Sigman, D. S. *Biochemistry*, 1990, 29(39), 9097.
- [2] Shionoya, M.; Kimura, E. *化学*, 1992, 47(12), 878.
- [3] Merrell, P. H.; Urbach, F. L.; Arnold, M. *J. Chem. Educ.*, 1977, 54(9), 581.
- [4] 蔡良琬主编. 核酸研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987.

## INTERACTION BETWEEN MACROCYCLIC COPPER COORDINATION COMPOUND AND DNA

Zhou Jingyan Li Qingxiang Liu Changlin Xu Huibi

(*Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074*)

In this paper, macrocyclic copper coordination compound was synthesized. Interaction of this complex with DNA was studied by means of UV-Visible, fluorescence spectroscopy. In addition, the cleavage of DNA induced by this complex studied by agarose gel electrophoresis showed the activity of chemical nuclease of this complex, it has been estimated the molecular weight of products.

**Keywords:** tetraazacyclotetradeca copper complex DNA UV-visible  
EthBr fluorescence spectroscopy chemical nuclease