

钴(III)配合物与 DNA 作用的研究

宋玉民 康敬万* 高锦章

(西北师范大学化学系, 兰州 730070)

冯亚非

(兰州师范高等专科学校化学系, 兰州 730070)

为了考察金属配合物中配体分子平面大小对金属配合物与 DNA 作用模式的影响, 用荧光法和光度法对乙二胺合钴(III) ($[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$)、联吡啶合钴(III) ($[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$) 和邻菲咯啉合钴(III) ($[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$) 与 DNA 的作用进行了研究。结果表明 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 与 DNA 作用时除存在静电作用模式外, 还存在插入作用, 而 $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 主要以静电作用与 DNA 结合。插入作用的强弱与配合物中配体分子平面大小有关。

关键词: 钴(III)配合物 小牛胸腺 DNA 插入作用 静电作用

分类号: O641.4

DNA 是生物体中重要的一类生物大分子, 对于生命遗传密码的翻译、转录、复制起着非常重要的作用。为了进一步探索和认识 DNA 的性质、结构、行为、形态, 揭露生命之奥秘, 人们研究了大量金属配合物与 DNA 的反应^[1~6], 探测 DNA 的结构和构象, 探讨金属配合物与 DNA 作用的反应机理, 进而研究金属配合物的分子结构和与 DNA 反应机理的关系, 为筛选出新的生物学研究工具, 设计合成出具有应用前景的低毒、高效、抗菌、抗肿瘤药物提供一定的科学研究基础及理论根据。

Barton 等人^[1~3,7]研究了 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ 与各种 DNA 的反应后, 提出 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ 与 DNA 作用时有插入和静电作用两种模式。Norden 等人^[8]则认为 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ 与 DNA 作用时只存在静电作用一种模式。插入作用是否存在, 插入作用的强弱与金属配合物中配体分子性质、结构之间有无联系? 本文合成了配体分子平面不同的 $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ 、 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 三个配合物, 并用荧光法和光度法研究了这些配合物与 DNA 的作用。结果表明, 在 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 与 DNA 的作用中, 存在插入作用, 插入作用的强弱与配体分子结构的平面性有关。插入作用的存在与否, 插入作用影响因素的研究工作对进一步探索和认识金属配合物分子结构与 DNA 作用机理之间的关系是很有意义的, 也为一些金属配合物分子在生物体内的药理作用研究提供了实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器

PHS-3C 型酸度计。

收稿日期: 1999 03 11。收修改稿日期: 1999 05 12。

甘肃省中青年基金资助课题(ZQ-95011)。

* 通讯联系人。

第一作者: 宋玉民, 女, 48 岁, 硕士, 副教授, 研究方向: 过渡金属配合物化学。

UV-3400 日立近红外可见紫外分光光度计(日本)。

NB-2400 CHN 元素分析仪(USA)。

RF-540 荧光光谱仪(日本)。

1.2 试剂

小牛胸腺 DNA 为北京华美公司产品, 分子量大于 30000, 用前未作进一步处理, 纯度以 260nm 处吸光度与 280nm 处吸光度的比值检测($A_{260}/A_{280} = 1.9$)^[4]。其它试剂均为分析纯。

1.3 配合物的合成

按文献^[9,10]的方法合成了 $[\text{Co}(\text{en})_3]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $[\text{Co}(\text{bpy})_3](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 三个配合物, 元素分析和 UV 吸收光谱与文献^[9,10]报道一致。

1.4 实验过程

研究配合物与 DNA 的作用时, 样品均溶解在含 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris(三羟甲基氨基甲烷) 和 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的二次蒸馏水缓冲液 (pH= 7.10) 中, 小牛胸腺 DNA 的浓度以 $\epsilon_{260} = 6600 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 确定^[4]。

2 结果与讨论

2.1 DNA 对配合物发光强度的影响

当配合物与 DNA 结合、特别是以插入方式结合后, 疏水性的大分子 DNA 的保护作用, 可

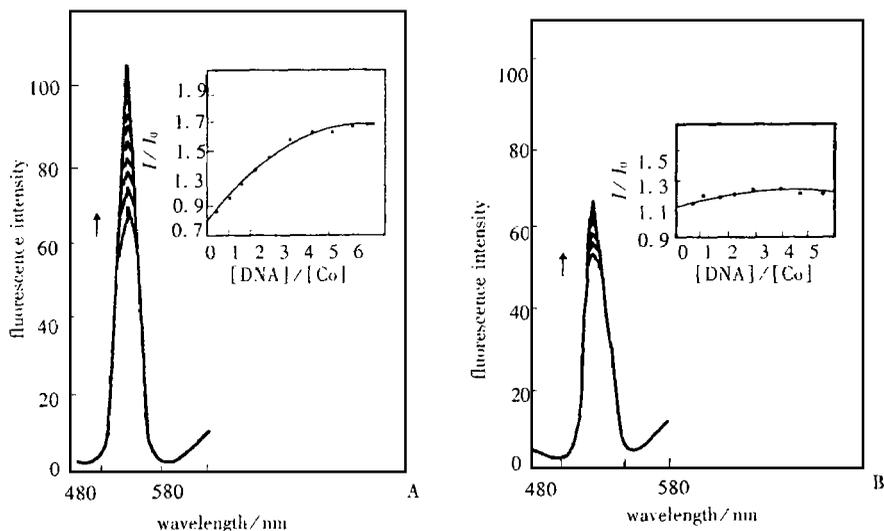


图 1 不同 DNA 浓度下配合物的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of complex with various concentration of calfthymus DNA in pH = 7.10

The insert shows the emission enhancement of DNA to complex

A: $[\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}] = 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{nm}$

B: $[\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}] = 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{nm}$

以使配合物的发光增强^[11]。图 1 为不同 DNA 浓度下, 配合物的荧光光谱。由配合物的相对发光强度(I/I_0 , 相对于未加 DNA) 随 DNA 的加入的变化曲线看出, 邻菲咯啉与钴(III)形成的配合物的荧光强度随着 DNA 浓度的增加, 先是增大, 而后再不再随 DNA 浓度的变化而变化。而联

吡啶与钴(III)形成的配合物的荧光强度几乎不随 DNA 浓度的增大而改变。显然, 邻菲咯啉与钴(III)形成的配合物与 DNA 插入结合的能力强于联吡啶与钴(III)形成的配合物的插入能力。比较二者的分子平面性、平面面积、疏水性、 π 电子扩展程度, 邻菲咯啉均大于联吡啶, 故导致了插入能力的不同。由于联吡啶与钴(III)形成的配合物的荧光强度几乎不随 DNA 浓度的增加而变化, 可以认为联吡啶几乎没有对碱基对的插入能力。

2.2 配合物对 EB-DNA 复合物荧光发射谱的影响

溴化乙锭(EB)是一种荧光染料。这种扁平分子可以嵌入 DNA 双链的配对碱基之间, 在紫外线激发下, 发出红色荧光。EB-DNA 复合物中, EB 发出的荧光比游离的 EB 本身发射的荧光强度大 10 倍^[12]。当有其它也能嵌入 DNA 碱基之间的分子存在时, 会将 EB 从 DNA-EB 复合物中挤出, DNA-EB 的荧光强度将显著降低, 因而 EB 可作为 DNA 结构的荧光探针。为了考查 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 与 DNA 的作用机理和结合模式, 将 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 的溶液滴加到 DNA 浓度与 EB 浓度比值大于 20 的溶液中, 发现 EB-DNA 复合物的荧光逐步猝灭, 说明配合物作用后, 使 EB 从 DNA 分子中游离出来。由此推测 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 可能插入了 DNA 碱基对之间, 将 EB 从 EB-DNA 复合物中挤出, 导致了荧光强度逐渐降低。说明 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 与 DNA 的作用存在插入式结合的方式。 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 不存在和存在时的 EB-DNA 复合物的荧光光谱和相对发光强度 (I_0/I) 与 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 浓度的关系如图 2 所示。

2.3 配合物与 DNA 溶液体系的发光猝灭

由于 DNA 磷酸骨架带有负电荷, 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 有强烈的排斥作用。而插入结合的阳配离子较深入 DNA。受保护程度大, 被 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭发光的可能性小, 而沿沟表面结合的配离子则比较容易受到 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的进攻^[11]。由未加入对加入猝灭剂 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 时 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ -DNA 复合物的相对发光强度 (I_0/I) 随 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 浓度变化曲线(图 3) 看出, 没有 DNA 时, 配合物的发光减弱与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的浓度增加成简单的线性关系, 这是由于配合物此时只以水合状态存在。加入 DNA 时, 直线弯曲, 发光减弱的程度减少, 说明在 DNA 的存在下, 阳配离子确实受到了一定程度的保护, 发光猝灭减弱。

2.4 DNA 对 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 、 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ 的 MLCT 的减色效应

配合物的 MLCT (中心离子与配体之间的电荷跃迁) 吸收峰的强度在有 DNA 存在时有一定的减小, 这通常被认为是插入作用的特征之一^[13]。产生减色效应的原因是 DNA 碱基对与插入配体间发生 π 电子堆积, 使后者的 π^* 空轨道上也有一定的电子填充, 从而使 MLCT 跃迁的几率减小。表 1 给出了 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 、 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ 配合物减色效应的数据。而

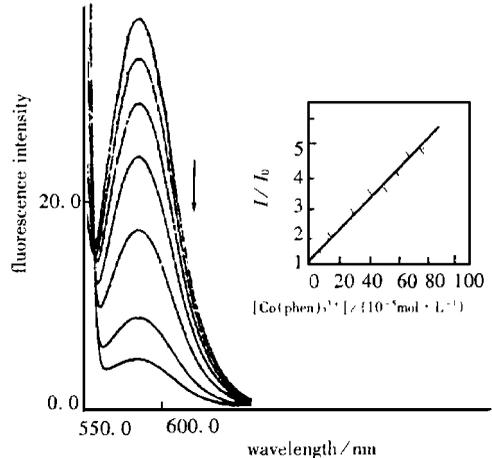


图 2 不同 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 浓度下, EB-DNA 复合物的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of EB-DNA system with various concentration of $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in $\text{pH} = 7.10$, $\lambda = 535\text{nm}$. The insert shows the effects of $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ on the emission of EB-DNA system

减色效应的强弱,也能反映插入能力的大小,插入能力越强,减色效应越强。

表 1 DNA 对配合物 MLCT 减色效应

Table 1 Hypochromic Effect of MLCT on Hinding to DNA ($[Co] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

complex	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$		a_{max}		hypochroism/%
	free	bound	free	bound	
$[Co(\text{phen})_3]^{3+}$	449	451	0.2057	0.1573	20
$[Co(\text{bpy})_3]^{3+}$	460	460	0.3462	0.3160	9
$[Co(\text{en})_3]^{3+}$	470	470	0.420	0.410	2

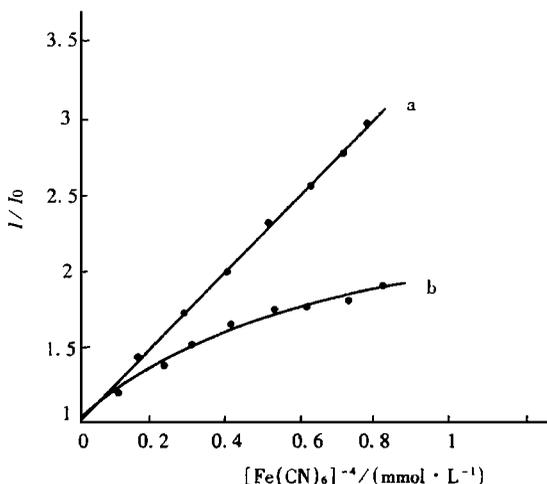


图 3 $[Fe(CN)_6]^{4-}$ 浓度对 $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ 和 $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ -DNA 复合物的荧光强度的影响

Fig 3 Effects of $[Fe(CN)_6]^{4-}$ on the emission of $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ and $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ -DNA system (pH = 7.10, $\lambda_{\text{ex}} = 450\text{nm}$)

a: $[Co(\text{phen})_3]^{3+} + [Fe(CN)_6]^{4-}$ b: $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ -DNA + $[Fe(CN)_6]^{4-}$

配合物的可见光谱在加入 DNA 后,红移与否也反映出配合物与 DNA 的作用方式。红移的程度反映出插入能力的大小。插入能力强的配合物,红移较大,插入能力弱的配合物,红移较小。据文献^[7]报道,邻菲咯啉类的配合物在过量 DNA 存在下的红移 $\leq 2\text{nm}$,联吡啶类配合物在过量 DNA 存在下,可见光谱一般不发生红移,实验结果和文献^[7]报道一致。对 $[Co(\text{phen})_3]^{3+}$ 、 $[Co(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 $[Co(\text{en})_3]^{3+}$ 与 DNA 的作用进行研究后,认为后两种配合物主要以静电作用与 DNA 结合,而前者除静电作用外,还存在插入式结合模式。

参 考 文 献

[1] LIU Chang-Lin (刘长林), ZHOU Jing-Yan(周井炎), XU Hui-Bi(徐辉碧) *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1998**, **14**(3), 253.
 [2] YE Yong (叶勇), HU Ji-Ming(胡继明), ZENG Yun-E(曾云鹄) et al *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1998**, **14**(1), 84.
 [3] Baton J. K., Goldherg J. M., Kumar C. V. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, **108**(81), 2081.
 [4] Michael T. C., Marisol Rodriguez, Allen J. Bard *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(24), 8901.
 [5] Eriksson M., Leijon M., Hiort C. et al *Biochemistry*, **1990**, **29**(7), 1701.
 [6] ZHOU Jing-Yan(周井炎), LI Qing-Xiang(李庆祥), LIU Chang-Lin (刘长林) et al *Wuji Huaxue Xuebao*

- (*Chinese J. Inorg. Chem.*), **1997**, **13**(4), 390.
- [7] Pyle A. M., Rehmann J. P., Eshoyter R. M. et al *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(8), 3051.
- [8] Hiort C., Norden B., Rodger R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**(5), 1971.
- [9] FENG Ya-Fei(冯亚非), SONG Yu-Min(宋玉民) *Gansu Kexue Xuebao (Journal of Gansu Sciences)*, **1996**, **8**(4), 86.
- [10] Chemical Society of Japan(日本化学会) Ed., Translated by CAO Hu-Min(曹惠民) *Handbook of the Synthesis of Inorganic Compounds(无机化合物合成手册)*, Beijing: Chemical Industry Press, **1988**, p211.
- [11] WU Jiar-Zhong(吴建中), WANG Lei(王雷), YANG Guang(杨光) et al *Gaodan Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J. Chinese University)*, **1996**, **17**(7), 1010.
- [12] LU Sheng-dong(卢圣栋) *Current Protocols for Molecular Biology(现代分子生物学实验技术)*, Beijing: High Education Press, **1993**.
- [13] Tysoe S. A., Baker A. D., Streckas T. C. *J. Phys. Chem.*, **1993**, **97**(8), 1707.

Studies of the Interaction of Co(III) Complex with DNA

SONG Yu-Min KANG Jing-Wan GAO Jir-Zhang

(*Department of Chemistry, Northwest Normal University, Lanzhou 730070*)

FENG Ya-Fei

(*Department of Chemistry, Lanzhou Teacher's College, Lanzhou 730070*)

In order to understand how the size of the ligands' planarities can effect the complexes of binding to DNA, the binding of the complexes $[Co(en)_3]^{3+}$, $[Co(bpy)_3]^{3+}$ and $[Co(phen)_3]^{3+}$ to calf thymus DNA was investigated with spectroscopic and fluorometric methods. The three complexes bind to DNA by electrostatic fashion, for $[Co(phen)_3]^{3+}$ also exists intercalation mode. The intercalate binding affinities was consistent with the ligands's planarities.

Keyword: cobalt(III) calf thymus DNA intercalative binding
electrostatic binding