

邻二氮菲 - Cd^{2+} 与 DNA 的相互作用研究杨周生 于俊生* 陈洪渊
(南京大学化学系, 南京 210093)

本文以邻二氮菲作为分子探针, 在磷酸盐-氯化钠中性介质中 ($\text{pH}=7.2$), 用荧光光谱和吸收光谱法研究了邻二氮菲- Cd^{2+} 与 DNA 之间的相互作用。结果表明, Cd^{2+} 离子与邻二氮菲形成 1:2 型的配合物, 该配合物与 DNA 有较强的相互作用, 这是位于配合物中心的 Cd^{2+} 离子与 DNA 发生键合。实验发现, 在邻二氮菲- Cd^{2+} -DNA 体系中加入 EDTA 或柠檬酸, 邻二氮菲- Cd^{2+} 与 DNA 的相互作用减弱, 这表明 EDTA 或柠檬酸对 Cd^{2+} 的毒性有一定的缓解作用。

关键词: 邻二氮菲 Cd^{2+} DNA 荧光猝灭
分类号: O657.3

镉作为重金属元素, 对大多数生物体都是有毒的。世界粮农组织和世界卫生组织把镉列为继黄曲霉素和砷之后第三位优先研究的食品中的污染物。镉作为一种环境微量元素, 是通过呼吸、饮水和摄入的食物进入人体, 因此人的肺、肾、肝脏首先受到镉的毒害, 进而影响到骨骼和血液^[1]。研究发现某些肺癌及前列腺癌与镉的中毒有关。镉进入生物体后, 生物代谢周期较长, 它能与生物体内的生物大分子如蛋白质、核酸和生物膜结合, 改变它们的构象, 从而影响生物体的生长和发育^[2-4]。目前, 开展镉与蛋白质作用的研究工作较多, 而镉与 DNA 相互作用的有关研究工作较少^[5, 6]。但是某些疾病的发生与 DNA 的损伤有关。因此, 开展镉与 DNA 的相互作用研究对于阐明镉的中毒机理以及防病治病具有重要意义。Razmiafshari^[7]曾利用缩氨酸与 Cd^{2+} 离子形成的配合物间接研究 Cd^{2+} 与 DNA 的相互作用, 通过电泳方法, 发现 Cd^{2+} 离子能以高的亲和力结合到双螺旋 DNA 上。陈霞等^[8]使用圆二色光谱研究了 Cd^{2+} 离子诱导 DNA 构象的变化。本工作以邻二氮菲作为分子探针, 首先考察 Cd^{2+} 与邻二氮菲形成配合物的能力, 并进一步研究了邻二氮菲- Cd^{2+} 与 DNA 的键合相互作用。通过加入 EDTA 和柠檬酸到邻二氮菲- Cd^{2+} -DNA 三元体系中, 间接研究了 Cd^{2+} 与 DNA 的相互作用, 探讨了其相互作用的机理。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA (CT-DNA) 为 Sigman 公司产品, 溶解在含 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 水溶液中, 渗透 48 小时。利用紫外光谱获得 A_{260}/A_{280} 等于 1.87 表明 DNA 中无蛋白质, 并由 $\epsilon_{260}=6600$ 确定其浓度。 Cd^{2+} 溶液的制备是取高纯金属镉 0.1124g, 用 1:1 盐酸溶解完全, 转移至 100mL 容量瓶中, 定溶得 $1.0 \times 10^{-2}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液。邻二氮菲为分析纯, 称取 0.2253g, 用热水溶解转移至 250mL 容量瓶中, 定溶后为 $5.0 \times 10^{-3}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮备液。其它试剂均为分析纯。实验用水为二次亚沸蒸馏水。缓冲体系为 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐 ($\text{pH}=7.2$) 含 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl。

荧光测量在 Perkin-Elmer 公司的 LS50B 和 RF-540 (日本岛津公司) 荧光光谱仪上进行, UV-265 紫外分光光度计 (日本岛津公司) 用于记录吸收光谱。PXJ-1B 数字式离子计用于调节溶液的 pH。

1.2 实验方法

邻二氮菲与 Cd^{2+} 作用是在 10mL 容量瓶中固定邻二氮菲的浓度, 改变 Cd^{2+} 浓度配制系列溶液, 测量其荧光光谱和吸收光谱。邻二氮菲- Cd^{2+} 与 DNA 作用是固定邻二氮菲和 Cd^{2+} 浓度, 用滴定法记录两

收稿日期: 2001-11-12。收修改稿日期: 2002-01-14。

国家自然科学基金资助项目 (No. 29835110)、南京大学研究生院学科发展项目资助 (No. 2000)。

* 通讯联系人。E-mail: ndchemyu@public1.ptt.js.cn

第一作者: 杨周生, 男, 39 岁, 博士生; 研究方向: 光谱电化学。

种光谱。荧光激发和发射狭缝宽度均为 5nm, 扫描速率为 $500\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 邻二氮菲与 Cd^{2+} 的配位作用

图 1 是在不同浓度的 Cd^{2+} 离子存在下, 在 $\text{pH} = 7.2$ 的磷酸盐缓冲溶液中, $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻二氮菲的荧光光谱。使用的激发波长是 293nm, 荧光光谱的最大发射峰是在 363nm。在图中, 虚线是不存在 Cd^{2+} 离子时, 邻二氮菲的荧光光谱。由图 1 可以看出, 随 Cd^{2+} 离子浓度从 $1.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $6.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的荧光强度逐渐增强, 当 Cd^{2+} 离子浓度达到 $5.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的荧光强度趋于稳定。并且最大发射峰的位置稍有红移。这表明邻二氮菲与 Cd^{2+} 离子发生了配位作用。根据荧光强度随 Cd^{2+} 离子浓度变化的数据和计算公式^[9]: $K = (F/F_{\text{ext}}) / [1 - (F/F_{\text{ext}})]^{-1} \cdot C_R^n$, 式中 K 为结合常数, F 和 F_{ext} 分别是体系荧光强度随配合物浓度比变化转折点处实验测得的荧光强度和外推得到的荧光强度, C_R 是配体在转折点处的摩尔浓度, n 为配合物的组成比。求得二者的结合常数

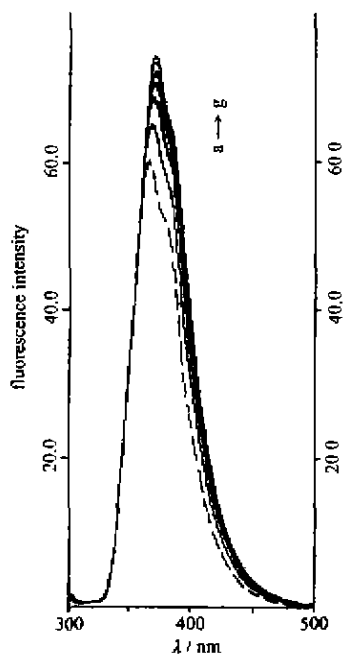


图 1 邻二氮菲的荧光光谱随 Cd^{2+} 浓度的增大而变化
Fig. 1 Fluorescence spectra of phenanthroline in the absence (---) and presence of Cd^{2+} (—)
(a) 0; (b) 1.0×10^{-5} ; (c) 2.0×10^{-5} ;
(d) 3.0×10^{-5} ; (e) 4.0×10^{-5} ; (f) 5.0×10^{-5} ;
(g) 6.0×10^{-5} (Cd^{2+} , $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

为 1.4×10^4 , Cd^{2+} 离子与邻二氮菲的键合比为 1:2。

用吸收光谱进一步考察了邻二氮菲与 Cd^{2+} 的相互作用。图 2 是记录的 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲在不存在和存在不同浓度 Cd^{2+} 离子时的吸收光谱。从图 2 中可以看到, 邻二氮菲在 262nm 有最大吸收峰, 在 290nm 处有肩峰。当加入 Cd^{2+} 离子时, 在 262nm 处的吸收带红移, 吸光度降低, 并在 278nm 和 290nm 处有两个等吸收点。吸收带的红移, 等吸收点的出现表明, Cd^{2+} 离子与邻二氮菲形成了配合物。这与荧光光谱所得到的结果相一致。

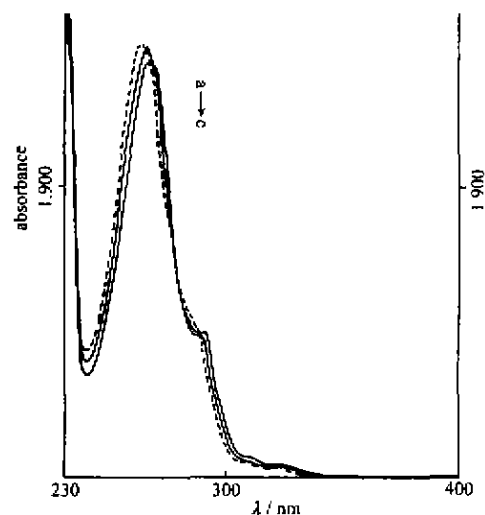


图 2 邻二氮菲的吸收光谱随 Cd^{2+} 的浓度变化
Fig. 2 Absorption spectra of phenanthroline on the concentration of Cd^{2+}
(a) 0; (b) 2.0×10^{-5} ; (c) 5.0×10^{-5}
(Cd^{2+} , $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 邻二氮菲- Cd^{2+} 与 DNA 的键合作用

在含有 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻二氮菲和 $5.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 离子的体系中, 逐渐增加体系中 DNA 的浓度, 记录的荧光光谱如图 3 所示。随着 DNA 浓度的增加, 邻二氮菲- Cd^{2+} 体系的荧光强度逐渐减弱, 并且发射峰的位置稍有蓝移。这表明 DNA 的加入引起了邻二氮菲- Cd^{2+} 体系的荧光猝灭, 由 Stern-Volmer 方程, 得到猝灭常数 $K_A = 6.2 \times 10^4 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (见图 4)。在不含 Cd^{2+} 离子的情况下, 在同样的实验条件下, 考察了 DNA 对邻二氮菲的荧光猝灭作用, 结果发现, DNA 同样也能引起邻二氮菲本身的荧光猝灭, 但是荧光猝灭的程度比 Cd^{2+} 离子存在下要小得多, 其猝灭常数 $K_B = 4.5 \times 10^3 \text{L} \cdot$

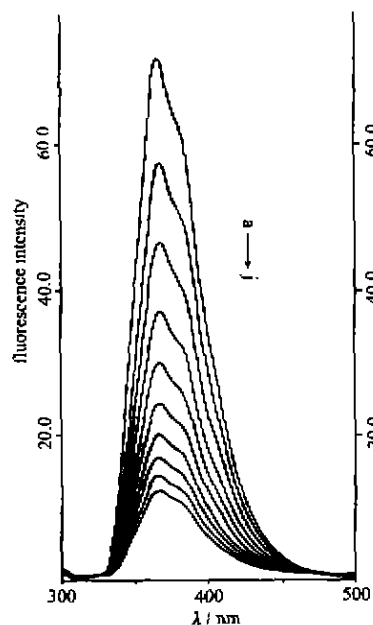


图 3 邻二氮菲 - Cd^{2+} 配合物的荧光光谱随 DNA 浓度的变化

Fig. 3 Dependence of fluorescence spectra of phen - Cd^{2+} complex on the concentration of DNA

(a) 0; (b) 1.0×10^{-5} ; (c) 2.0×10^{-5} ;
(d) 3.0×10^{-5} ; (e) 4.0×10^{-5} ; (f) 5.0×10^{-5} ;
(g) 6.0×10^{-5} ; (h) 7.0×10^{-5} ; (i) 8.0×10^{-5} ;
(j) 9.0×10^{-5} (DNA, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

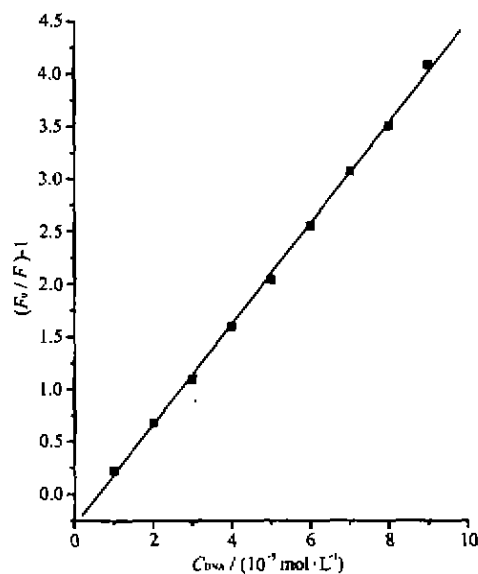


图 4 DNA 对邻二氮菲 - Cd^{2+} 配合物的荧光强度的影响

Fig. 4 Influence of DNA on the fluorescence intensity of phen - Cd^{2+} complex

mol^{-1} 。并且 DNA 对邻二氮菲的荧光猝灭作用没有使其发射峰的位置改变 ($\lambda_{\text{em}} = 363\text{nm}$)。这种现象表

明, 在邻二氮菲 - Cd^{2+} -DNA 体系中, 中心离子 Cd^{2+} 与 DNA 发生了键合作用。

图 5 是在与图 3 其它实验相同的条件下, 存在和不存在 DNA 时, 邻二氮菲 - Cd^{2+} 体系的吸收光谱。从图 5 可以看到, 随 DNA 浓度的增加, 邻二氮菲 - Cd^{2+} 体系在 266nm 处的吸光度减小, 290nm 处肩峰的吸光度也随 DNA 浓度的增加而降低, 等吸收点出现在 295nm 处。

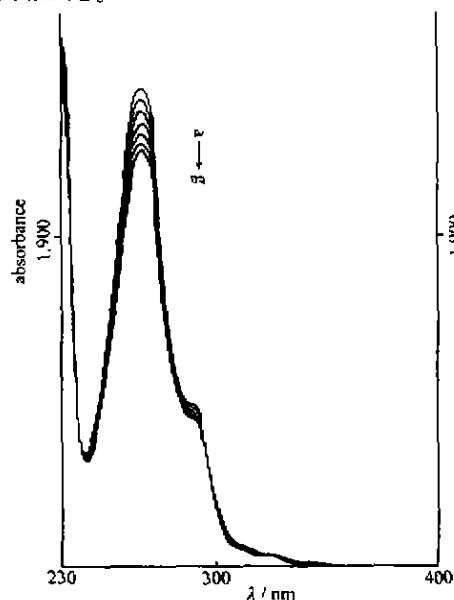


图 5 邻二氮菲 - Cd^{2+} 配合物的吸收光谱随 DNA 浓度的变化

Fig. 5 Dependence of absorption spectra of phen - Cd^{2+} complex on the concentration of DNA

(a) 0; (b) 1.0×10^{-5} ; (c) 2.0×10^{-5} ;
(d) 3.0×10^{-5} ; (e) 4.0×10^{-5} ; (f) 5.0×10^{-5} ;
(g) 6.0×10^{-5} ; (DNA, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

由于 DNA 的加入, 邻二氮菲 - Cd^{2+} 体系的吸收光谱的减色作用及等吸收点的出现表明, 邻二氮菲 - Cd^{2+} 与 DNA 发生了较强的作用。

2.3 EDTA、柠檬酸对邻二氮菲 - Cd^{2+} -DNA 相互作用的影响

在 $1.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻二氮菲、 $5.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 和 $5.0 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 体系中, 逐渐加入 EDTA, 测量其荧光光谱。结果发现, EDTA 的加入引起邻二氮菲 - Cd^{2+} -DNA 体系的荧光强度减弱, 其猝灭常数 $K_0 = 4.6 \times 10^4 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, (见图 6A)。在相同的实验条件下, EDTA 对邻二氮菲 - Cd^{2+} 体系也有荧光猝灭作用, 其猝灭常数 $K_0 = 5.2 \times 10^3 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (见图 6B)。这表明 EDTA 对邻二氮菲

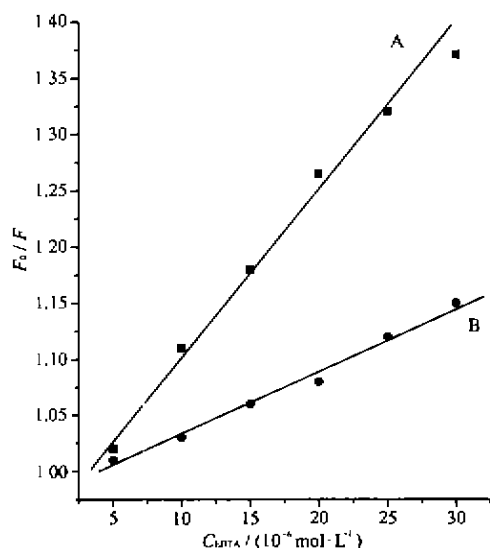


图 6 EDTA 对体系荧光强度的影响

Fig. 6 Influence of EDTA on the fluorescence intensity of system, A: system of Phen- Cd^{2+} -DNA, B: system of phen- Cd^{2+}

- Cd^{2+} -DNA 体系的荧光猝灭更强。然而在邻二氮菲-DNA 体系中加入 EDTA, 发现 EDTA 对该体系几乎无荧光猝灭作用。

上述实验结果表明: EDTA 能与 Cd^{2+} 离子发生配位作用。由于 EDTA 对 Cd^{2+} 离子的配位作用, 减弱了 Cd^{2+} 与 DNA 之间的相互作用, 使 DNA 释放出来。被释放的 DNA 进一步与邻二氮菲作用, 从而引起体系的荧光猝灭。因此, EDTA 对邻二氮菲- Cd^{2+} -DNA 体系的荧光猝灭程度要大于它对邻二氮菲- Cd^{2+} 体系的荧光猝灭。类似地, 也研究了柠檬酸对邻二氮菲- Cd^{2+} -DNA 体系的荧光猝灭作用。得到的结果与 EDTA 的影响变化趋势一致, 但是柠檬酸对减弱邻二氮菲- Cd^{2+} -DNA 体系的相互作用程度要比 EDTA 的影响要小一些。

根据上述实验结果, 我们认为 Cd^{2+} 离子与 DNA 可以通过静电作用相结合。即 Cd^{2+} 离子带有正电

荷, 它能与 DNA 骨架上的磷酸基发生作用。在 Cd^{2+} 离子与邻二氮菲形成配合物后, 该配合物也能与双螺旋 DNA 结合。当带有负电荷的螯合剂如 EDTA 或柠檬酸等存在时, 这些螯合剂能与 Cd^{2+} 离子发生螯合作用而生成带负电性的配合物。这些配合物既与 DNA 分子中的带负电性的磷酸基部分相排斥, 也不易接近 DNA 碱基部分, 因而阻止了 Cd^{2+} 与 DNA 的结合作用。因此, 象 EDTA, 柠檬酸类物质能有效地起到缓解 Cd^{2+} 的毒性作用。

致谢: 萧蓉同学参加了部分实验工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Singhal R. N., Jain M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1997**, *58*, 456.
- [2] James R., Sampath K. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1999**, *62*, 222.
- [3] Arif I. A. *Al-Azhar J. Microbiol.*, **1998**, *39*, 1.
- [4] Litchfield T. M., Ishikawa Y., Wu L. N. Y., Wuthier R. E., Sauer G. R. *Calcif. Tissue Int.*, **1998**, *62*, 341.
- [5] Helleday T., Nilsson R., Jenssen D. *Environ. Mol. Mutagen.*, **2000**, *35*, 114.
- [6] Garguit J. J., Watson A. L., Summers A. O. *J. Bacteriol.*, **1999**, *181*, 3462.
- [7] Razmiafshari M., Zawia N. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**, *166*, 1.
- [8] CHEN Xia(陈霞), YANG Wen-Sheng(杨文胜), JIN Jian(靳健), XU Li(徐力), YANG Bai-Quan(杨百全), JIANG Lin(江林), LI Tie-Jin(李铁津), CHEN Xi(陈曦) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J. Chinese Universities)*, **2001**, *22*, 1228.
- [9] にしかわ やすはる, ひらきけいそう *Fluorescence Spectrophotometry (荧光しうん光分析法)*, Kyoritsu Publishing Co.: Tokyo, **1984**, p94.

Studies on the Interaction of 1, 10- Phenanthroline - Cd^{2+} with DNA

YANG Zhou-Sheng YU Jun-Sheng* CHEN Hong-Yuan

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

The interaction of 1, 10-Phenanthroline(Phen) - Cd^{2+} with calf thymus DNA has been examined through utilizing fluorescence and absorption spectroscopy method in Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 - NaCl ($\text{pH} = 7.2$) system. The metal Cd^{2+} ion can interact with Phen to form a complex with the ratio of 1:2. The complex is shown to interact strongly with double helix DNA with $K = 6.2 \times 10^4 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$. Results imply that metal Cd^{2+} ion in the center of complex binds to DNA helix. The experimental results revealed that the binding affinity of metal Cd^{2+} with DNA is decreased in the presence of EDTA or citric acid, which indicates that EDTA or citrate acid can lessen toxic effect of Cadmium binding to DNA at certain extent.

Keywords: 1, 10-phenanthroline Cd^{2+} DNA fluorescence quenching