

二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配合物水解切割 DNA

周庆华 杨 频*

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要: 本文合成并表征了二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配合物。我们利用凝胶电泳实验研究, 发现该配合物在近生理条件下, 能有效地切割双链 pBR322 DNA。通过采用在反应体系中加入自由基清除剂, 无氧操作实验, 脱水丙二醛产物分析, 以及 T4DNA 连接酶连接实验等方法, 确认该切割反应是通过水解途径进行的。进一步地, 我们对切割反应进行了较详细的动力学研究, 求出其催化速率常数 K_{cat} 为 $0.72 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ ($\text{pH}=8, 37^\circ\text{C}$)。

关键词: 锰(II)配合物; DNA; 水解断裂; 动力学

中图分类号: O614.7+11; Q523; O643.12

文献标识码: A

文献编号: 1001-4861(2005)07-0960-05

Hydrolytic Cleavage of DNA by a Mn(II) Complex with Bis(2-benzimidazolylmethyl)amine

ZHOU Qing-Hua YANG Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: MnL (here, $\text{L}=\text{bis}(2\text{-benzimidazolylmethyl})\text{amine}$) was synthesized and characterized. The Mn(II) complex acts as an artificial nuclease by effectively promoting the hydrolysis of plasmid DNA at physiological pH and temperature. The studies on mechanism of DNA cleavage by added radical scavengers, rigorously anaerobic experiments, analysis for malondialdehyde-like products, and the religation assays show that DNA cleavage mediated by MnL occurs *via* a hydrolytic path. Values for apparent rate constants for the decrease of supercoiled DNA (form I) and the increase of linearized DNA (form III) were obtained under different complex concentrations at physiological pH and temperature. The catalytic rate constant (K_{cat}) was obtained on the transformation of the Michaelis-Menten equation from a best-fit line of the apparent rate constant *versus* complex concentration. The estimation of K_{cat} for the decrease of form I shows a rate enhancement factor of 10^8 .

Key words: Mn(II) complex; DNA; hydrolytic cleavage; kinetics

人工核酸酶的研究一直是活跃的研究领域。由于 DNA 对水解的高度稳定性^[1] (在 $\text{pH}=7$ 和 25°C 的条件下, DNA 磷酸二酯键的半衰期被估计为 2 亿年), 同时, 由于 DNA 中核糖环易于氧化, 因此, 有许多化合物通过氧化机制对 DNA 进行切割, 如 $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ 、 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ 。由于这些氧化切割试剂要求外加试剂 (如光、 H_2O_2 等) 启动切割, 并且这些过程

往往产生自由基^[2], 产物缺少 3'-或 5'-磷酸末端^[3], 不能用连接酶再连接起来以进一步的表达, 因此它们在分子生物学的应用上存在很大的局限性。而水解切割试剂则没有这些缺点, 在药物的设计及分子生物学的应用中具有广泛的应用前景。因此, 发展水解切割核酸试剂正愈来愈引起人们的关注^[4-10]。

本文合成了二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配

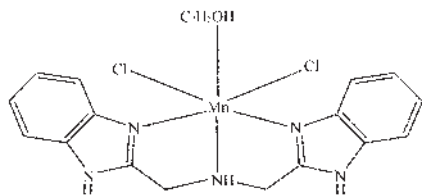
收稿日期: 2004-11-08。收修改稿日期: 2005-01-15。

国家自然科学基金(No.20171031)和山西省青年自然科学基金(No.20011007)资助。

*通讯联系人。E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

第一作者: 周庆华, 男, 28 岁, 博士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

合物,发现该化合物对 DNA 有很好的切割活性,初步确定其切割机理为水解切割,并用动力学详细地表征了其切割活性。



图式 1 配合物的结构

Scheme 1 Structure of MnL

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

T4DNA 连接酶、*Hind* III 酶购于宝生物工程(大连)有限公司,胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司,小牛胸腺 DNA、pBR322 购于北京华美公司,其余试剂均为市售的分析或生物试剂。Perkin-Elmer 2400 型元素分析仪,Shimadzu-FTIR-8300 红外光谱仪(KBr 压片),Bruker DRX-300MHz 核磁共振仪,UVPGDS 8000 凝胶成像分析系统。

1.2 配合物的合成与表征

按文献^[12]合成配体 L[二(2-苯并咪唑亚甲基)胺],得一白色粉末。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 7.49(m, 4H), 7.12(m, 4H), 4.00(s, 4H); IR(KBr) ν (cm⁻¹): 1 623, 1 445, 1 330, 1 272; Anal. Calcd. for C₁₆H₁₅N₅·H₂O: C 65.08, H 5.76, N 23.73; found C 65.18, H 5.44, N 23.58。

配合物的合成。将 0.01 mol MnCl₂·4H₂O 溶于 25 mL 乙醇中,搅拌下,加入 0.01 mol 配体 L 的乙醇溶液。室温下,继续搅拌 4 h,静置,过滤,真空干燥,得到粉色固体粉末。IR(KBr) ν (cm⁻¹): 1 624, 1 470, 1 453, 1 322, 1 278; Anal. Calcd. for MnL·Cl₂·3/2C₂H₅OH: C 48.31, H 5.08, N 14.83; found C 48.19, H 5.01, N 15.02。

1.3 切割实验

1.3.1 DNA 切割反应

在 20 μ L, 5 mmol·L⁻¹ Tris·HCl(pH=8.0, 5 mmol·L⁻¹ NaCl)缓冲溶液中,加入一定体积配合物溶液,最后加入 DNA,混匀,然后在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中恒温,反应一定时间后,加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应,然后用琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.3.2 无氧反应

整个切割反应在氮气手套箱中进行,所用试剂

预先通氮气处理,之后经过 3 次反复抽真空,充氮气以保证充分除氧。

1.3.3 脱水丙二醛产物分析

配合物与 CT DNA 在 37 $^{\circ}$ C 反应 20 h,然后加入 0.6% 2-硫代巴比妥酸于反应溶液中,加热煮沸 20 min,观察反应前后 532 nm 处吸光度值的变化。

1.3.4 连接反应

从琼脂糖凝胶中,切取线型的 pBR322 带,用胶回收试剂盒对其纯化,再向其中加入 2 μ L 10 $\times$ 连接缓冲溶液,1 μ L 的 T4DNA 连接酶,混匀,在 16 $^{\circ}$ C 下,反应 14~16 h,用 1%的琼脂糖凝胶检验反应产物。

1.3.5 产物分析和定量

DNA 被切割的程度通过溴化乙锭(EB)染色的琼脂糖凝胶进行分析,用 UVP GDS 8000 凝胶成像分析系统进行,分析软件为 Gelworks 1D 版本 3.00。由于 EB 插入超螺旋型 DNA 的能力减弱,在计算其含量时乘以校准系数 1.42^[11]。

2 结果与讨论

2.1 配合物对双链 DNA 切割及其机理的研究

我们用琼脂糖凝胶电泳实验研究了配合物对双链 pBR322 DNA 切割作用。如图 1,在没有外加共反应物的条件下,二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配合物能够在近生理条件下(pH=8, 37 $^{\circ}$ C)有效地切割 DNA,使超螺旋型 DNA(form I)降解至缺刻开环型(form II),进而产生线型(form III)。超螺旋型 DNA 的

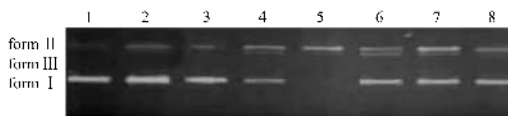


图 1 配合物切割 DNA 电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of pBR322 DNA cleavage

Reaction conditions: 5 mmol·L⁻¹ Tris·HCl (pH=8.0, 5 mmol·L⁻¹ NaCl) buffer, 37 $^{\circ}$ C for 2 h.

Lane 1: control;

Lane 2: 0.25 mmol·L⁻¹ Mn²⁺;

Lane 3: 0.25 mmol·L⁻¹ L;

Lane 4: 0.25 mmol·L⁻¹ MnL;

Lane 5: 1 mmol·L⁻¹ [Fe(EDTA)]⁻ + 9 mmol·L⁻¹ H₂O₂;

Lane 6: 0.25 mmol·L⁻¹ MnL + 0.4 mol·L⁻¹ DMSO;

Lane 7: 0.25 mmol·L⁻¹ MnL + 0.4 mol·L⁻¹ glycerol;

Lane 8: 1 mmol·L⁻¹ [Fe(EDTA)]⁻ + 9 mmol·L⁻¹ H₂O₂ + 0.4 mol·L⁻¹ glycerol.

一条链上出现一个缺刻时,超螺旋结构被松开,形成环型结构,在原始切割位置大约 12 个碱基对附近^[13]的互补链上,进行第二次切割,才能产生线型 DNA。这说明该配合物对 DNA 的切割具有一定的特异性。但在相同的实验条件下,单独的 Mn^{2+} 和配体不能产生明显切割作用。由此可见,在该实验条件下,对 DNA 进行切割的活性物种主要是锰(II)配合物。

2.2 配合物对双链 DNA 切割机理的研究

为排除 $\text{HO}\cdot$ 切割机理,我们向反应体系中加入 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO 或 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油,如图 1, DNA 的切割几乎没受影响,而 $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ 与 H_2O_2 体系已被证明是通过 $\text{HO}\cdot$ 对 DNA 进行切割^[14],当加入 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油时,切割反应能有效地被阻止。这说明 DNA 的切割并非通过羟基自由基途径。为排除分子氧在切割 DNA 中的作用,我们在氮气手套箱中进行了严格的无氧反应。结果发现,配合物在无氧条件下,仍能有效地切割 DNA,切割效率仅有 5% 的差别,其量值在琼脂糖凝胶电泳误差范围之内。说明 DNA 的切割并不依赖于 O_2 。同时,我们将 0.6% 2-巯代巴比妥酸加入到配合物与 CT DNA 在 37°C 反应 20 h 后的溶液中,没有检测到类似于脱水丙二醛的产物,说明 DNA 的戊糖环没有被破坏。

为进一步确定切割机理,我们进行了基因工程中的连接实验。T4DNA 噬菌体连接酶能够催化 DNA 5'- OPO_3 末端和 3'-OH 之间形成磷酸二酯键。

如图 2,配合物切割产生的线型 DNA 经纯化,与 T4DNA 连接酶作用,有部分的 DNA 被连接成带切口的环状 DNA,在相同条件下,用 T4DNA 连接酶处理 *Hind* III 酶的产物,得到的主要也是带切口的环状 DNA,同时,有部分的 pBR322 多倍体及超螺

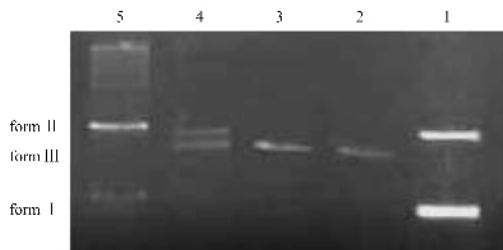


图 2 线型 DNA 连接电泳图

Fig.2 Ligation of linearized pBR322 DNA

Lane 1: supercoiled (lower) and nicked (upper) pBR322 DNA; Lane 2 and 4: comparison of MnL linearized DNA without and with T4DNA ligase treatments, respectively; Lane 3 and 5: comparison of *Hind* III linearized DNA without and with T4DNA ligase treatments, respectively.

旋型 DNA。实验结果表明,锰的配合物与 *Hind* III 酶一样,在断裂质粒 DNA 时,主要是水解其中的磷酸二酯键,产生 5'- OPO_3 和 3'-OH 末端产物。应该指出的是,如果水解和氧化还原切割 DNA 发生在反应的同一循环中,连接物种就不能被检测到^[15]。以上的各种实验结果均表明,该锰的配合物切割 DNA 主要是通过水解途径。

2.3 配合物对双链 DNA 切割的动力学研究

为了进一步表征配合物切割 DNA 的活性,我们对其进行了动力学研究。Dabrowiak^[16]等根据核酸酶切割 DNA 的详细机理,提出了酶切割 DNA 的动力学方程。为进一步简化,假定在切割 DNA 时,按下式进行:



则,我们可以得到下面 3 个公式:

$$\text{form I} : A_1(t) = A_1(0)e^{-k_1 t}$$

$$\text{form II} : A_2(t) = A_1(0) \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + A_2(0)e^{-k_2 t}$$

$$\text{form III} : A_3(t) = A_1(0) \left(1 - \frac{k_2}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} + \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2 t} \right) + A_2(0)(1 - e^{-k_2 t}) + A_3(0)$$

其中, $A_i(t)$ 表示在时间 t 时,第 i 物种的浓度; $A_i(0)$ 表示各物种的初始浓度; k_1 、 k_2 表示表观速率常数。

我们系统研究了不同浓度配合物对质粒 pBR322 DNA 切割的时间梯度行为,然后利用凝胶成像分析系统对实验结果中观察到的三种构型的 DNA 进行定量分析,使我们能够计算 DNA 被水解切割的程度,利用这些数据进行动力学分析。如图 3,为 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnL 对 pBR322 切割的时间梯度电泳图。

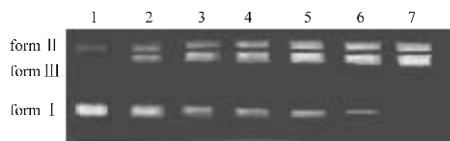


图 3 配合物切割 DNA ($1.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的时间梯度电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis patterns for time course of DNA ($1.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) cleavage by Mn(II) complex ($0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Lane 1: DNA control; Lane 2~7: reaction after 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h.

由图 3 可见,随着反应时间的延长,超螺旋型 DNA (form I) 逐渐减少,而缺刻型 (form II) 和线型

(form III)在逐渐增多。我们利用凝胶成像分析系统对实验结果进行定量分析,使我们能够计算 pBR322 被水解切割的程度。图 4 为 $0.25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnL 在不同时间下对 pBR322($1.44\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)切割的各物种的分布图。用上面三式进行拟合可得到 k_1 为 $0.60\pm 0.12\text{ h}^{-1}$, k_2 为 $0.52\pm 0.09\text{ h}^{-1}$ 。

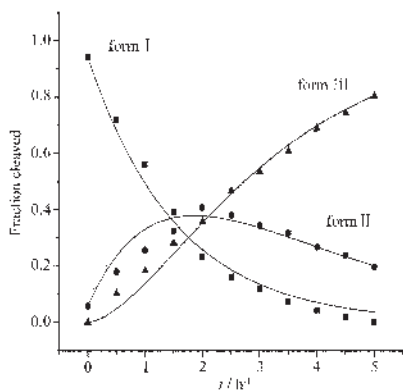


图 4 各物种随时间变化图

Fig.4 Mass fractions of DNA species during cleavage reaction of pBR322 DNA with MnL
Supercoiled DNA (form I); nicked DNA (form II); linear DNA (form III). Smooth curves are the best fit to the experimental data.

为求出催化速率常数,我们做了不同浓度配合物切割 DNA 的时间梯度,并求出了各自的表观速率常数,利用 Michaelis-Menten 方程的变形式^[17]对表观速率常数 k_1 进行了拟合,如图 5,得到催化速率常数 K_{cat} 为 $0.72\pm 0.02\text{ h}^{-1}$ 。美国的 Burstyn 等^[18]用铜的大环三胺配合物在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,水解切割 pBR322 DNA 的速率常数为 $0.04\sim 0.09\text{ h}^{-1}$ 。在配合物浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下, $[(\text{en})_2\text{Co}(\text{OH})(\text{OH})_2]^{2+}$ 的准一级速率常数为 0.0036 h^{-1} , $[(\text{cyclen})\text{Co}(\text{OH})(\text{OH})_2]^{2+}$ 的为 0.0136 h^{-1} , $[(\text{tamen})\text{Co}(\text{OH})(\text{OH})_2]^{2+}$ 的为 0.18 h^{-1} ^[19]。镉(II)离子水解切割 DNA, 在 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 准一级速率常数为 0.25 h^{-1} ^[20]。在浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 对 DNA 超螺旋型的减少, $\text{Co}(\text{III})$ 多聚胺配合物的速率常数为 0.82 h^{-1} ^[21], 而 $\text{Cu}(\text{II})$ -L-His 体系的为 0.76 h^{-1} ^[11]。目前报道最快的水解切割体系为 $\text{Cu}(\text{II})$ -1,3,5-环己烯氨^[22], $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$ ^[23]在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 速率常数为 4.3 h^{-1} 。而我们合成的锰(II)配合物在近生理条件下, 水解速率常数为 0.72 h^{-1} (对 DNA 超螺旋型的减少)。因此, 二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配合物对水解切割 DNA 具有比较高的催化能力。DNA 中磷酸二酯键的准一级水

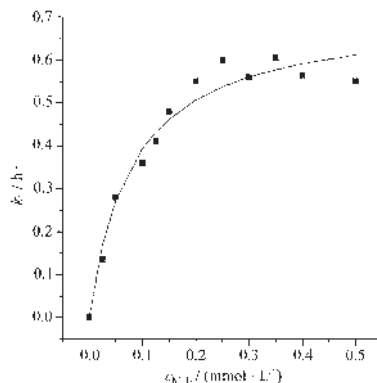


图 5 配合物不同浓度切割 DNA 动力学

Fig.5 Catalytic activity of MnL that cleaves DNA
Data were fit to a curve based on the Michaelis-Menten equation.

解速率常数为 $2\times 10^{-10}\text{ h}^{-1}$ ($24\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.4)^[24]具有很强的抗水解能力。与之相比,我们合成的锰配合物对 DNA 水解速率增长因子为 10^8 ($37\text{ }^\circ\text{C}$ 与 $24\text{ }^\circ\text{C}$ 的温度校正因子为 10)^[21]。虽然这些金属配合物能够极大地提高 DNA 水解速率,但与天然 DNA 水解酶相比仍然相差几个数量级(天然 DNA 水解酶的速率常数为 40 到 $1.4\times 10^4\text{ h}^{-1}$ ^[25]),而且这些金属配合物的浓度往往远远大于 DNA 的浓度,在这一点上,也远不及天然 DNA 水解酶。

3 结 论

综上所述,在没有外加试剂的情况下,二(2-苯并咪唑亚甲基)胺合锰(II)配合物是一种有效的 DNA 水解切割试剂。在近生理条件下,该配合物能将 DNA 水解速率提高约 10^8 倍。

参考文献:

- [1] Chin J, Banaszczyk V, Jubian V. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**:186~190
- [2] Dervan P B. *Science*, **1986**, **232**:464~471
- [3] Giese B, Beyrich-Graf X, Burger J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, **32**:1742~1743
- [4] Scarpellini M, Neves A, Horner R, et al. *Inorg. Chem.*, **2003**, **42**(25):8353~8365
- [5] Kovacic R T, Welch J T, Franklin S J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, **125**(22):6656~6662
- [6] Zelder F H, Mokhir A A, Kramer R. *Inorg. Chem.*, **2003**, **42**(26):8618~8620
- [7] Cheng C C, Huang Y C, Liu M C. *J. Inorg. Biochem.*, **2003**,

- 96**(1):115~115
- [8] Kitamura Y, Sumaoka J, Komiyama M. *Tetrahedron*, **2003**,**59**(52):10403~10408
- [9] Yang P, Ren R, Guo M L, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**,**9**(4):495~506
- [10] Liu C L, Wang M, Zhang T L, et al. *Coordination Chemistry Reviews*, **2004**,**248**:147~168
- [11] Ren R, Yang P, Zheng W J, et al. *Inorg. Chem.*, **2000**,**39**(24):5454~5463
- [12] Berends H P, Stephan D W. *Inorganica Chimica Acta*, **1984**,**93**:173~178
- [13] Grover N, Gupta N, Singh P, et al. *Inorg. Chem.*, **1992**,**31**:2014~2020
- [14] Schnaith L M T, Hanson R S, Que Jr L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**,**91**:569~573
- [15] Basile L A, Raphael A L, Barton J K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**,**109**:7548~7550
- [16] Googisman J, Kirk C, Dabrowiak J C. *Biophysical Chemistry*, **1997**,**69**:249~268
- [17] Ordoukhanian E, Joyce G F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**,**124**:12499~12506
- [18] Hegg E L, Burstyn J N. *Inorg. Chem.*, **1996**,**35**:7474~7481
- [19] Dixon N E, Geue R J, Lambert J N, et al. *Chem. Commun.*, **1996**,**11**:1287~1288
- [20] Rammo J, Hettich R., Roigk A., et al. *Chem. Commun.*, **1996**,**1**:105~107
- [21] Hettich R, Schneider H J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**,**119**:5638~5647
- [22] Itoh T, Hisada H, Sumiya T, et al. *Chem. Commun.*, **1997**,**7**:677~678
- [23] Liu C L, Yu S W, Li D F, et al. *Inorg. Chem.*, **2002**,**41**:913~922
- [24] Serpersu E H, Shortle D, Mildvan A S. *Biochemistry*, **1987**,**26**:1289 ~1300
- [25] Wright D J, Jack W E, Modrich P. *J. Biol. Chem.*, **1999**,**274**:31896~31902