

甘缬二肽-铜(II)-多吡啶配合物合成、表征及与 DNA 的作用

丁 杨¹ 任祥祥¹ 庄楚雄² 乐学义^{*1}

(¹ 华南农业大学理学院应用化学系, 广州 510642)

(² 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要: 本文合成了 3 个新的三元铜(II)配合物: $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{Phen})] \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**1**)、 $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{TATP})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) 和 $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{DPPZ})] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**3**) [Gly-L-Val=甘缬二肽, Phen=1,10-邻菲咯啉, TATP=1,4,8,9-四氮三联苯, DPPZ=二吡啶并[3,2-a;2,3-c]吩嗪]。通过元素分析、红外光谱、紫外-可见光谱以及摩尔电导率测定对这些配合物进行了表征。采用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定和琼脂凝胶电泳方法研究了这些配合物与 DNA 之间的相互作用。结果表明, 这些配合物对 DNA 有较强的键合作用, 作用模式为插入作用; 配合物在还原剂维生素 C 存在下对 pBR322 DNA 具有显著的断裂作用。配合物对 DNA 键合及断裂作用大小为配合物 **3**>**2**>**1**。

关键词: 三元肽铜(II)配合物; 多吡啶配体; 甘缬二肽; 核酸酶; DNA

中图分类号: O614.121 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2009)04-0656-07

Synthesis, Characterization of Ternary Gly-L-Val-Copper(II)-Polypyridyl Complexes and Their Interaction with DNA

DING Yang¹ REN Xiang-Xiang¹ ZHUANG Chu-Xiong² LE Xue-Yi^{*1}

(¹Department of Applied Chemistry, College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(²College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Three new ternary copper(II) complexes: $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{Phen})] \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**1**), $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{TATP})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**), and $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{DPPZ})] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**3**) (phen=1,10-phenanthroline, tatp=1,4,8,9-tetranitrogen, dppz=dipyrido [3,2-a; 2,3-c]phenazine, Gly-L-Val=Gly-L-Valine), were synthesized characterized by elemental analysis, molar conductivity, IR and UV-Vis spectrosopes. In addition, the interaction of the complexes with DNA has been investigated by electronic absorption spectroscopy, ethidium bromide(EB) fluorescence spectroscopy, viscosity and gel electrophoresis measurements. The results indicated that the complexes could bind to DNA by intercalative mode, and cleave pBR322 DNA in the presence of vitamin C as a reducing reagent with the order of the binding ability and cleavage activity of the complexes to DNA: complex **3**>**2**>**1**.

Key words: ternary peptide copper(II) complex; polypyridyl ligand; Gly-L-Valine; nuclease; DNA

核酸是生物体内重要组成物质,与生物的生长、发育与繁殖等正常生命活动以及癌变、突变等异常生命活动有关。研究发现,多吡啶金属配合物对核酸具有识别键合作用,可作为核酸结构探针、核酸足迹试剂、核酸分子定点切割试剂及抗病毒和抗肿瘤药

物等。因此,进行多吡啶金属配合物与 DNA 相互作用及其应用研究有重要的意义^[1-5]。在所研究的多吡啶金属配合物中,铜是一类重要的生命元素,与生命过程中酶的催化、物质的储存和运送及金属离子的转运过程有关,并且由于铜离子的氧化还原作用使

收稿日期:2008-11-18。收修改稿日期:2009-01-14。

广东省自然科学基金资助项目(No.04105986)。

*通讯联系人。E-mail:lexyfu@163.com; Tel: 020-85287010

第一作者:丁 杨,男,24 岁,硕士研究生;研究方向:应用生物无机化学。

得 Cu(II)配合物具有潜在的核酸酶活性,因此多吡啶铜配合物与 DNA 的相互作用尤为引人注目^[6-9]。更为重要的是,近年来研究发现,当在多吡啶铜配合物分子中插入生物配体(如 *L*-氨基酸、小肽等)时,能有助于提高这类配合物对核酸作用的选择性和酶活性,因此,生物配体-铜(II)-多吡啶型配合物与 DNA 的作用成为热门研究课题^[10-15]。然而,目前研究较多的是 *L*-氨基酸-铜(II)-多吡啶配合物,而对其它生物配体如二肽-铜(II)-多吡啶配合物的研究较少^[15]。因此,为了进一步深入这方面的研究,本文设计、合成和表征了 3 个新的甘缬二肽-铜(II)-多吡啶配合物: [Cu(Gly-*L*-Val)(Phen)]·3.5H₂O(**1**)、[Cu(Gly-*L*-Val)(TATP)]·2H₂O(**2**)、[Cu(Gly-*L*-Val)(DPPZ)]·1.5H₂O(**3**) (Gly-*L*-Val = 甘缬二肽, Phen = 1,10-邻菲咯啉, TATP = 1,4,8,9-四氮三联苯, DPPZ = 二吡啶并[3,2-*a*;2,3-*c'*]吩嗪)。采用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定和琼脂凝胶电泳方法研究了这些配合物对 DNA 的键合及切割作用,探索了其作用机理。研究结果对设计、合成新型人工核酸酶及药物等有重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

参照文献方法制备 TATP^[16]和 DPPZ^[17],甘氨酸-*L*-缬氨酸二肽参照文献^[18]方法制备。维生素 C(Vit

C)、琼脂糖凝胶、溴酚蓝、三羟甲基氨基甲烷、小牛胸腺 DNA(CT-DNA)、pBR322 DNA、甘氨酸及 *L*-缬氨酸均为生化试剂,其他为分析纯试剂。Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液[10 mmol·L⁻¹ 的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)+50 mmol·L⁻¹ 的 NaCl,pH=7.2],TBE 电泳液(4.5×10⁻² mol·L⁻¹ Tris+4.5×10⁻² mol·L⁻¹ H₃BO₃+10⁻³ mol·L⁻¹ EDTA,pH=8.3),CT-DNA 浓度的确定见文献^[19]。整个实验过程均使用二次蒸馏水。

Elementar240C 型元素分析仪,ACATAR 360 FTIR 型红外分光光度计(KBr 压片),DDS-12 型电导率仪,UV-Vis 4000 型紫外/可见分光光度计,F-4500 型荧光光谱仪;乌式粘度计;凝胶电泳池;BIO-RAD 凝胶成像系统。

1.2 配合物的合成

3 种配合物的制备方法相同。将 0.6 mmol Gly-*L*-Val 溶于 5 mL 蒸馏水,搅拌下加入 5 mL 0.1 mol·L⁻¹ CuCl₂ 溶液,再加入 2 滴 4 mol·L⁻¹ NaOH 水溶液得 pH=4.8 的溶液 A。将 0.5 mmol 多吡啶配体溶解于热的 25 mL 乙醇中得溶液 B。混合 A、B 溶液,用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调节溶液 pH=6.5。在氮气保护下回流 1 h,室温搅拌 8 h,过滤,滤液室温下静置数周后析出蓝色针状晶体。晶体用 95%乙醇洗涤,经空气干燥后于干燥器中保存。配合物元素分析结果列于表 1。

表 1 配合物元素分析结果

Table 1 Results of elemental analysis of the complexes

Complex	Found (calcd.)		
	C / %	H / %	N / %
C ₁₉ H ₂₇ O _{6.5} N ₄ Cu(1)	47.73(47.60)	5.66(5.68)	11.67(11.70)
C ₂₁ H ₂₄ O ₅ N ₄ Cu(2)	52.87(52.95)	5.03(5.08)	11.84 (11.77)
C ₂₅ H ₂₅ O _{4.5} N ₆ Cu(3)	54.91(55.04)	4.57(4.62)	15.37(15.42)

1.3 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

在测定配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱时,室温下往空白池和样品池中分别加入 3 mL Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液和 0.05 mmol·L⁻¹ 配合物溶液,在 200~400 nm 波长范围内扫描。然后,依次往空白池和样品池中加入等体积的 CT-DNA 溶液,使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加,在同样波长范围内扫描。

1.4 配合物与 DNA 作用的荧光光谱

以 525 nm 为激发波长,扫描速度为 10 nm·s⁻¹,扫描间隔为 0.2 nm,记录系列配合物/CT-DNA/溴化乙锭 (EB)体系在 550~650 nm 波长范围的荧光强度变化。系列试样中 EB 和 CT-DNA 的浓度分别恒定为

4.8 μmol·L⁻¹ 和 5.5 μmol·L⁻¹,而配合物浓度依次增加。

1.5 DNA 粘度测定实验

在进行 DNA 粘度测定实验时,恒定溶液温度为 29(±0.1) °C,CT-DNA 浓度固定为 0.2 mmol·L⁻¹,依次增大配合物浓度。DNA 比粘度按公式 $\eta=(t-t_0)/t_0$ 计算(其中 t 为含不同浓度配合物的 DNA 溶液流经毛细管所需的时间,而 t_0 为缓冲溶液流经毛细管所需时间)。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $c_{\text{complex}}/c_{\text{DNA}}$ (η_0 为未加配合物时 DNA 溶液的比粘度)作图。

1.6 琼脂糖凝胶电泳

在进行琼脂糖凝胶电泳实验时,将 300 ng pBR322 DNA 与不同浓度的配合物(或多吡啶配体),

以及 50 倍于配合物(或多吡啶配体)浓度的还原剂 Vit C 混合并用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液定容至 20 μL 。待反应 5 min 后,用 0.8% 琼脂糖凝胶在 TBE 电泳液中电泳(150 V)30~40 min。Gold View(4~5 μL) 作为凝胶着色剂,溴酚蓝作为电泳过程指示剂,在 BIO-RAD 紫外检测仪下观察电泳结果并进行拍照。在进行作用机理探讨实验中,将 4 μL DMSO 或 NaN_3 与 150 ng pBR322 DNA 混合反应 15 min 后再加入配合物溶液及 Vit C,反应 5 min 后进行电泳。配合物将 pBR322 DNA 从 I 型断裂成 II 型的转化率通过 Quantity One 软件(Version 4.4.0, Build 036) 进行定量估算。

2 结果与讨论

2.1 配合物的组成与结构

2.1.1 配合物的摩尔电导率

室温下,测得配合物 **1**、**2** 和 **3** 在乙醇溶液中的摩尔电导率分别为 3.1、3.5 和 7.1 $\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$,由此

推测配合物均为非电解质^[20]。

2.1.2 配合物的红外光谱

室温下,测得配合物在 200~4 000 cm^{-1} 范围内的 IR 谱(KBr 压片)如表 2 所示。

配合物 3 420 cm^{-1} 附近强的吸收峰归属于结晶 H_2O 的 $\nu_{\text{O-H}}$; 2 913~3 264 cm^{-1} 范围内 2 个强吸收带归属于 $-\text{NH}_2$ 的 2 个不对称分裂吸收峰 $\nu_{\text{N-H}}$, 表明 $-\text{NH}_2$ 参与了配位; 1 700~1 750 cm^{-1} 范围内没有任何吸收带,且二肽中 $-\text{COO}^-$ 的对称和非对称伸缩振动吸收带进一步发生了分裂(1 382~1 634 cm^{-1}), $\Delta\nu(\nu_{\text{COO}}^{\text{s}} - \nu_{\text{COO}}^{\text{as}}) > 200 \text{ cm}^{-1}$, 表明 $-\text{COO}^-$ 为单齿配体基团^[20]。另外,配合物在 1 570 cm^{-1} 附近吸收峰归属于配体 Phen、TATP 和 DPPZ 芳环上的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动,表明 Phen、TATP 和 DPPZ 参与了配位。

2.1.3 配合物的电子吸收光谱

室温下测定了配合物甲醇溶液的电子吸收光谱。结果列于表 3。

表 2 配合物的主要红外光谱数据(cm^{-1})
Table 2 Selected IR data(ν/cm^{-1}) of the complexes

Compound	$\nu_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{N-H}_2}^{\text{as}}$	$\nu_{\text{N-H}_2}^{\text{s}}$	$\nu_{\text{-COO}^-}^{\text{as}}$	$\nu_{\text{-COO}^-}^{\text{s}}$	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C=N}}$
Complex 1	3 426	3 264	2 926	1 605	1 389	745	1 567
Complex 2	3 434	3 231	2 925	1 634	1 384	731	1 567
Complex 3	3 420	3 257	2 913	1 631	1 382	765	1 573
Gly- <i>L</i> -valine	3 426	3 179	—	1 614	1 412	—	—
Phen	3 397	—	—	—	—	739	1 588
TATP	3 435	—	—	—	—	740	1 581
DPPZ	3 423	—	—	—	—	740	1 577

表 3 配合物在甲醇溶液中紫外-可见光谱数据
Table 3 UV-Vis data of the complexes in methanol solution

Complex	$\pi \rightarrow \pi^*$			$d \rightarrow d$
	$\lambda / \text{nm} \ (\varepsilon / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}))$			
1	205(46 312)	225(39 038)	272(38 512)	610(58.9)
2	207(20 825)	257(27 850)	336(2 925)	617(92.3)
3	275(22 260)	356(4 035)	374(4 035)	610(79.0)

配合物在紫外区均有 3 个较强的吸收峰,归属于多吡啶配体的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。与自由多吡啶配体相比,最大吸收峰的位置未发生明显变化,但强度有所减弱,这归因于多吡啶芳环上的氮原子配位后引起芳环上电子云密度的降低。另外,测定配合物在可见区 610~620 nm 范围内均出现了一个弱而宽的吸收峰,归属于中心 Cu(II) 离子的 $d \rightarrow d$ 跃迁。

对上述配合物元素分析、摩尔电导率、红外光谱及紫外可见光谱测定结果进行综合分析,并参照相关配合物的研究结果^[15],推测配合物可能的分子式为: $[\text{Cu}(\text{Gly-}L\text{-Val})(\text{Phen})]\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**1**)、 $[\text{Cu}(\text{Gly-}L\text{-Val})(\text{TATP})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) 和 $[\text{Cu}(\text{Gly-}L\text{-Val})(\text{DPPZ})]\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**3**)。分子中每个中心铜(II)离子与多吡啶配体的 2 个 N 原子、二肽分子中的 2 个 N 原子以及 1 个羧基 O 原

子配位而产生一变形的四方锥结构:

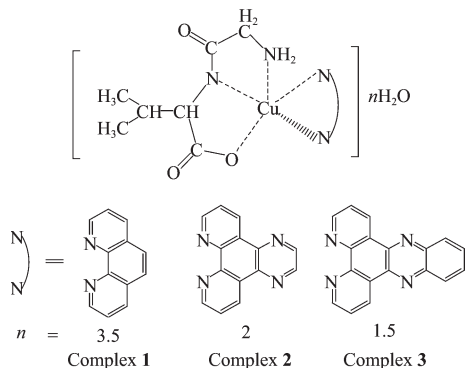
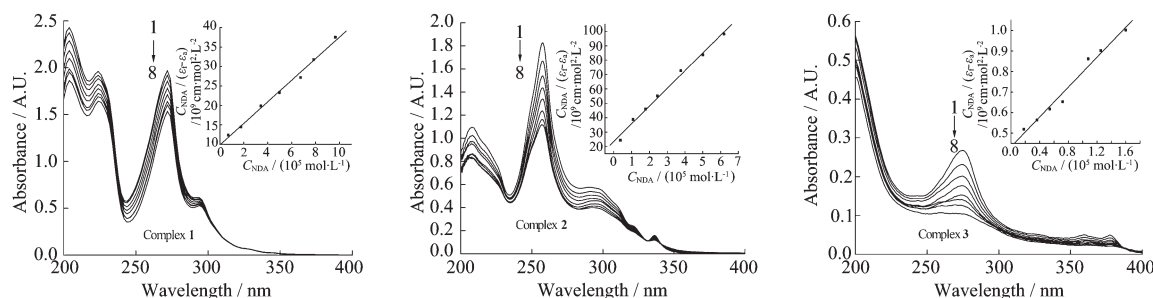


图1 配合物的分子结构

Fig.1 Molecular structures of the complexes



Arrows show the absorbance changing upon the increase in DNA concentration; plots of $C_{DNA}/(\epsilon_t - \epsilon_a)$ vs C_{DNA} for the titration of the complexes with DNA; $C_{complex 1}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 4×10^{-5} , $C_{DNA}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: (1) 0, (2) 7.24×10^{-6} , (3) 1.77×10^{-5} , (4) 3.44×10^{-5} , (5) 5×10^{-5} , (6) 6.75×10^{-5} , (7) 7.88×10^{-5} , (8) 9.67×10^{-5} ; $C_{complex 2}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 4×10^{-5} , $C_{DNA}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: (1) 0, (2) 3.64×10^{-6} , (3) 1.08×10^{-5} , (4) 1.77×10^{-5} , (5) 2.45×10^{-5} , (6) 3.76×10^{-5} , (7) 5×10^{-5} , (8) 6.18×10^{-4} ; $C_{complex 3}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1×10^{-5} , $C_{DNA}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: (1) 0, (2) 1.83×10^{-6} , (3) 3.64×10^{-6} , (4) 5.45×10^{-6} , (5) 7.24×10^{-6} , (6) 1.08×10^{-5} , (7) 1.25×10^{-5} , (8) 1.6×10^{-5}

图2 配合物在不同 DNA 浓度下的电子吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of the complexes upon addition of DNA

通过 DNA 对配合物的电子吸收光谱滴定实验,能够根据以下方程式求得配合物与 DNA 的结合常数^[22]:

$$C_{DNA}/(\epsilon_a - \epsilon_t) = C_{DNA}/(\epsilon_b - \epsilon_t) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_t)$$

其中, C_{DNA} 表示 DNA 的浓度, ϵ_a 、 ϵ_t 和 ϵ_b 分别表示 $A_{obs}/C_{complex}$ 、自由配合物的摩尔吸光系数和完全结合后的配合物的摩尔吸光系数 (选取配合物最大吸收波长处的吸光值), 以 $C_{DNA}/(\epsilon_t - \epsilon_a)$ 对 C_{DNA} 作图, 斜率与截距的比值即为配合物与 DNA 的结合常数 K_b 。配合物 1, 2, 3 的 K_b 值分别为: 2.82×10^3 , 5.20×10^3 , $8.44 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 其相对大小与配合物分子中多吡啶配体芳环大小一致。另外, 这些配合物对 DNA 的结合能力明显弱于经典插入剂 EB (EB-DNA = $1.4 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ in $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl/40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl buffer, pH=7.9)^[23], 属于中等程度的 DNA 插入剂。

2.2 配合物对 DNA 的键合作用

2.2.1 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

配合物与 DNA 相互作用的电子吸收光谱滴定曲线如图 2 所示。

结果表明, 随着 DNA 浓度增加, 配合物在 200~400 nm 波长范围内吸收都发生了一定程度的减色效应, 这可能主要归因于配体插入到 DNA 碱基之间, 从而使配体的 π^* 空轨道与碱基的 π 轨道发生偶合, 偶合后的 π^* 轨道因部分填充电子, 使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁几率减小, 产生减色效应。因而可初步推测配合物主要以插入模式与 DNA 作用。

2.2.2 配合物与 DNA 作用的溴化乙锭(EB)荧光分析

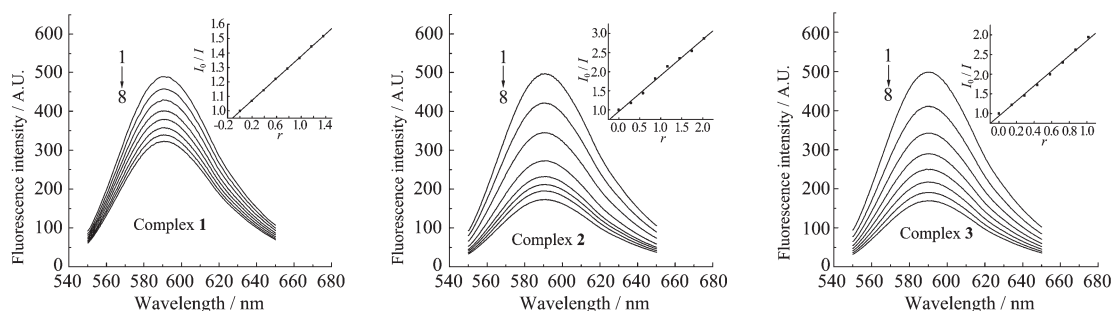
测得配合物与 DNA 作用的溴化乙锭(EB)荧光光谱如图 3 所示。

从图中可以看出, 随着 EB-DNA 体系中配合物浓度增加, 体系的荧光强度有明显的淬灭, 这归因于配合物分子将 EB 从 EB-DNA 复合物中挤出, 表明配合物与 DNA 之间有明显的插入作用。

通过配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的滴定实验, 可以应用经典 Stern-Volmer 方程求得配合物取代 EB 与 DNA 作用的淬灭常数 K_{sq} ^[24]:

$$I_0/I = 1 + K_{sq}r$$

其中, I 和 I_0 分别表示滴加和未滴加配合物时 EB-DNA 体系的荧光强度, r 表示配合物与 DNA 的浓度比。以 I_0/I 对 r 作图获得一条直线 (图 3 中插图), 直线的斜率即 K_{sq} 值。由此获得配合物 1, 2, 3 的 K_{sq} 值分别为 0.38、0.94 和 1.92, 与 DNA 作用大



Arrows show the absorbance changing upon the increase in complex concentration; plots of I_0/I vs r for the titration of DNA with the complexes; $[C_{\text{complex}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})]$: (1) 0, (2) 1.02, (3) 1.98, (4) 2.86, (5) 3.68, (6) 4.45, (7) 5.16, (8) 5.84; $C_{\text{complex } 2}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: (1) 0, (2) 1.53, (3) 2.96, (4) 4.28, (5) 5.51, (6) 6.67, (7) 7.74, (8) 8.75; $C_{\text{complex } 3}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: (1) 0, (2) 0.77, (3) 1.48, (4) 2.14, (5) 2.76, (6) 3.33, (7) 3.87, (8) 4.38]

图 3 配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响

Fig.3 Effects of the complexes on the fluorescence spectra of EB-DNA system

小次序为:配合物 **3>2>1**,即配合物 **3** 对 DNA 具有较强的插入作用,而配合物 **1、2** 只具有中等强度的插入作用^[25],其相对大小与上述电子吸收光谱测定结果一致。

2.2.3 配合物与 DNA 作用的粘度测定

粘度法被认为是在缺乏晶体结构数据的情况下确定配合物与 DNA 键合模式最有力的证据之一^[26]。DNA 粘度对其链长度变化非常敏感。当配合物以静电、沟面结合等非插入方式与 DNA 作用时,DNA 溶液的粘度无明显变化;以部分插入方式与 DNA 作用时,则可能使 DNA 碱基对的相对位置发生变化,导致双螺旋发生扭结,使 DNA 溶液粘度减小。通过经典插入方式与 DNA 作用时,DNA 相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体,导致 DNA 双螺旋伸长,DNA 溶液的粘度增加。DNA 相对比粘度随配合物加入量的变化如图 4 所示。

随配合物加入量的增加,DNA 溶液的相对比粘度增大,由此推测配合物以插入方式与 DNA 作用。与经典的插入剂 EB 比较,配合物对 DNA 的插入作用均明显低于 EB,且据 DNA 溶液相对比粘度的变化幅度推得配合物与 DNA 插入作用的强弱为:配合物 **3>2>1**,与上述电子吸收光谱和荧光光谱分析的结论一致。

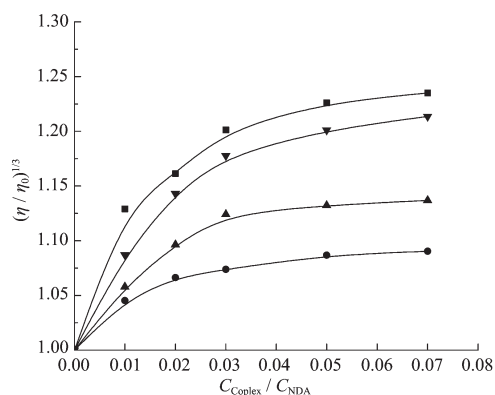


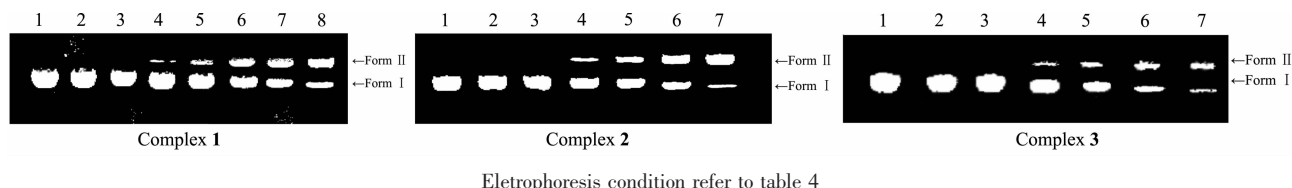
图 4 DNA 相对粘度随配合物加入量的变化

Fig.4 Effects of increasing amounts of the complexes on the relative specific viscosity of DNA

2.3 配合物对 DNA 的切割作用

完整的 pBR322 DNA 通常呈超螺旋型(I 型),当其中一条链上出现一个切口(即单链断裂)时就变为切口环型(II 型),而当两条链在同一位置都发生断裂时就变为线型(III 型)。这 3 种构型的 pBR322 DNA 在电泳过程中具有不同的迁移速率,通常 I 型速率最快,III 型次之,II 型最慢。

在 pH=8.3 下,不同作用体系反应 5 min 时的琼脂糖凝胶电泳如图 5 所示。带 2、3 与带 1 相比没有明显变化,表明分别在 Vit C 和配合物存在下对



Electrophoresis condition refer to table 4

图 5 配合物浓度对 pBR322 DNA 切割活性的影响

Fig.5 Agarose gel electrophoresis for the cleavage of pBR322 plasmid DNA by the complexes at different concentrations in the presence of vitamin C

pBR322 DNA 不具有切割作用。然而,在 Vit C 存在下,配合物对 pBR322 DNA 具有切割作用,且随着配合物浓度增大, I 型 DNA 的含量逐渐减少, II 型

DNA 的含量逐渐增加。另外,能够应用 Quantity One-4.4.0 软件对 DNA I 型和 II 型进行定量估算^[27],结果如表 4 所示。

表 4 配合物将 pBR322 DNA 从 I 型断裂成 II 型的百分率

Table 4 Comparison of the DNA cleavage efficiency of the complexes in the presence of vitamin C

Complexes			Form / %	
			I	II
Complex 1	Lane 1	DNA control(0.30 μg)	96	4
	Lane 2	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	95	5
	Lane 3	DNA(0.30 μg)+complex 1(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	97	3
	Lane 4	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 1(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	87	13
	Lane 5	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 1(3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	77	23
	Lane 6	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 1(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	61	39
	Lane 7	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.35 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 1(7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	52	48
	Lane 8	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 1(9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	34	66
Complex 2	Lane 1	DNA control(0.30 μg)	97	3
	Lane 2	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	97	3
	Lane 3	DNA(0.30 μg)+complex 2(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	96	4
	Lane 4	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	81	19
	Lane 5	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	67	33
	Lane 6	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	48	52
	Lane 7	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.35 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	14	86
Complex 3	Lane 1	DNA control(0.30 μg)	98	2
	Lane 2	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	98	2
	Lane 3	DNA(0.300 μg)+complex 2(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	96	4
	Lane 4	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 3(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	81	19
	Lane 5	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 3(2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	68	32
	Lane 6	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	26	74
	Lane 7	DNA(0.30 μg)+Vit C(0.20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+complex 2(4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	11	90

^a The serial number is the same as the lane number shown in Fig.5.

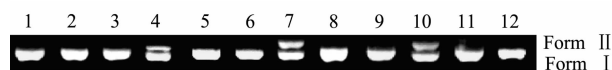
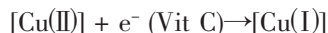
表 4 中数据表明,对应相同的浓度下,切割 DNA 的活性为:配合物 3>2>1,其相对大小与配合物对 DNA 插入作用大小一致,表明配合物对 DNA 的切割作用与其插入作用有关。

为了进一步探求配合物切割 pBR322 DNA 的作用机理,我们在上述实验条件下加入自由基清除剂 DMSO 或 NaN_3 。凝胶电泳结果如图 6 所示。

结果表明,在 Vit C 存在下,DMSO 和 NaN_3 均能有效地抑制配合物对 pBR322 DNA 的氧化切割作用,表明配合物是通过羟基自由基(hydroxyl radical)对 DNA 进行切割的,与多吡啶-铜(II)^[28]及 L-氨基酸-铜(II)-多吡啶型配合物类似^[13]。由此推测配合物对 DNA 切割的作用机理如下:

首先,配合物($[\text{Cu(II)}]$ 表示)被还原剂 Vit C 还原

成 $[\text{Cu(I)}]$,并与 DNA 形成复合物 $[\text{Cu(I)}]\text{-DNA}$:



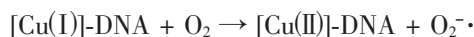
($C_{\text{DNA}}=300 \text{ ng}$, $C_{\text{complex}}=4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_{\text{ascorbic acid}}:C_{\text{complex}}=50:1$, $c_{\text{DMSO}}=4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{NaN}_3}=4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Lane 1: DNA, (2):DNA+ DMSO, (3): DNA+ NaN_3 , (4): DNA+complex 1+Vit C, (5): DNA+complex 1+Vit C+DMSO, (6): DNA+complex 1+Vit C+ NaN_3 , (7): DNA+complex 2+Vit C, (8): DNA+complex 2+Vit C+DMSO, (9): DNA+complex 2+Vit C+ NaN_3 , (10): DNA+complex 3+Vit C, (11): DNA+complex 3+Vit C+DMSO, (12): DNA+complex 3+Vit C+ NaN_3)

图 6 加入抑制剂 DMSO 或 NaN_3 后配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

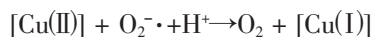
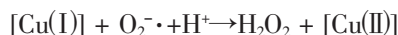
Fig.6 Cleavage of pBR322 DNA in the presence of the complexes and/or inhibitor DMSO/ NaN_3



$[\text{Cu(I)}]\text{-DNA}$ 中 Cu(I) 离子能激活空气中 O_2 产生超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ [29]:



而配合物具有超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 能快速催化 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应 [30]:



产生的 H_2O_2 能被还原剂 ($[\text{Cu(I)}]\text{-DNA}$ 中 Cu(I) 或 $\text{O}_2^{\cdot-}$) 还原产生羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ [31,32], 该活性氧进攻并最终切割 DNA 双螺旋结构。

3 结 论

本文合成并表征了 3 个新的 Gly-L-Val-铜(II)-多吡啶配合物: $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{Phen})] \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**1**)、 $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{TATP})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**2**)、 $[\text{Cu}(\text{Gly-L-Val})(\text{DPPZ})] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (**3**), 这些配合物分子均具有变形四方锥配位结构。另外, 应用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定和琼脂糖凝胶电泳方法研究了这些配合物与 DNA 之间的相互作用。结果表明, 配合物以插入模式对 DNA 作用, 在还原剂维生素 C 存在的条件下配合物可通过自由基作用机理对 pBR322 DNA 进行氧化断裂。配合物对 DNA 键合和切割作用大小为配合物 **3** > **2** > **1**, 即随着多吡啶配体芳环的增大而增加。

参考文献:

- [1] Copeland K D, Fitzsimons M P, Houser R P, et al. *Biochemistry*, **2002**, **41**(1):343~356
- [2] Erkkila K E, Odom D T, Barton J K. *Chem. Rev.*, **1999**, **99**(9):2777~2796
- [3] Karidi K, Reedijk J, Hadjiladis N, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, **101**(7):1483~1491
- [4] Biver T, Secco F, Venturini M. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, **252**(10):1163~1177
- [5] Gao F, Chao H, Zhou F, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, **102**(5):1050~1059
- [6] Maity B, Roy M, Chakravarty A R. *J. Organomet. Chem.*, **2008**, **693**(8):1395~1399
- [7] Ruíz P, Ortiz R, Perelló G, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, **101**(5):831~840
- [8] Kumar R S, Sasikala K, Arunachalam S. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, **102**(2):234~241
- [9] Jiang Q, Xiao N, Shi P F, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, **251**(2):1951~1972
- [10] Chikira M, Tomizawa Y, Fukita D, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, **89**(1):163~173
- [11] Zhang S C, Zhu Y G, Tu Ca, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(10): 2099~2106
- [12] Patra A K, Nethaji M, Chakravarty A R. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, **101**(2):233~244
- [13] Le X Y, Gu Q, Song Z J, et al. *J. Coord. Chem.*, **2007**, **60**(13):1359~1371
- [14] Rao R, Patra A K, Chetana P R. *Polyhedron*, **2008**, **27**(5): 1343~1352
- [15] Garcia-Raso A, Fiol J J, Adrover B, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, **95**(1):77~86
- [16] Zwellig L A, Michaels S, Schwartz H, et al. *Cancer Res.*, **1981**, **41**(2):640~647
- [17] Dicken J E, Summers L A. *Aust. J. Chem.*, **1970**, **23**(5): 1023~1027
- [18] YANG Xiao-Qiang(杨小强), ZHANG Gao-Yong(张高勇), YUAN Ming-Long(袁明龙). *Amino Acids & Biotic Resources (Anjisuan & Shengwu Ziyuan)*, **2004**, **26**(3):49~51
- [19] Cater M T, Rodriguez M, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(24):8901~8911
- [20] Geary W J. *Coord. Chem. Rev.*, **1971**, **7**(1):81~119
- [21] Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds* (4th edition), New York: John Wiley and Sons Inc., **1986**. 257
- [22] Wolfe A, Shimer G H, Meehan T. *Biochemistry*, **1987**, **26**(20): 6392~6396
- [23] Lepecq J B, Paoletti C. *J. Mol. Biol.*, **1967**, **27**(1):87~106
- [24] Lakowicz J R, Weber G. *Biochemistry*, **1973**, **12**(21):4161~4170
- [25] Baguley B C, LeBret M. *Biochemistry*, **1984**, **23**(5):937~943
- [26] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992**, **31**(39):9319~9324
- [27] BIO-RAD. *Quantity One, Version 4.4.0*, Build 036, BIO-RAD, Inc. US, **2004**.
- [28] Santra B K, Reddy P A N, Neelakanta G, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, **89**(2):191~196
- [29] Thederahn T B, Kuwabara M D, Larsen T A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(13):4941~4946
- [30] DING Yang(丁 杨). *Thesis for the Master of South China Agricultural University* (华南农业大学硕士论文). **2008**.
- [31] Goynes T E, Sigman D S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, **109**(9): 2846~2848
- [32] Pope L M, Reoch K A, Graham D R, et al. *J. Biol. Chem.*, **1982**, **257**(20):12121~12128