

## 吡咯-多胺钴配合物的合成及与 DNA 的作用研究

周春琼\* 邹敏 游文玮 唐中坤 郭瑞芬

(南方医科大学药学院, 广州 510515)

**摘要:** 合成了一种新的钴配合物 $[\text{CoL}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})\text{Cl}]\text{Cl}$ , L 为  $N^1, N^8$ -二(1-甲基-4-硝基吡咯-2-酰基)三乙基四胺, 并用质谱、核磁、红外、摩尔电导、元素分析等多种手段分析了配体和配合物的结构; 紫外、荧光和粘度等方法分析了钴配合物与小牛胸腺 DNA 的作用, 发现配合物与 DNA 的作用方式可能为部分插入和静电混合作用模式; 电泳法研究了配合物与超螺旋 pBR322 DNA 的作用, 发现反应温度为 50 °C 时, 配合物能将超螺旋 DNA 完全切割为缺刻产物。

**关键词:** 吡咯; 多胺; 钴配合物; DNA

中图分类号: O614.81·2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2010)02-0257-06

## Synthesis, DNA-Binding and Cleavage Studies by Cobalt Complex of Pyrrole-Multiamine

ZHOU Chun-Qiong\* ZOU Min YOU Wen-Wei TANG Zhong-Kun GUO Rui-Fen

(School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

**Abstract:** A new cobalt complex $[\text{CoL}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})\text{Cl}]\text{Cl}$  (L= $N^1, N^8$ -bis(1-methyl-4-nitropyrrole-2-carbonyl) triethylenetetramine) was synthesized. Its structure was characterized by MS,  $^1\text{H}$  NMR, IR, molar conductance and elementary analysis. CT DNA-binding of cobalt complex was investigated using UV spectra, fluorescent spectra and viscosity. The results indicate that the cobalt complex may interact with CT DNA by partial intercalation and electrostatic binding. The cleavage reaction on plasmid DNA was monitored by agarose gel electrophoresis. The cobalt complex can absolutely translate pBR322 DNA into the nicked DNA when the reaction temperature is 50 °C.

**Key words:** pyrrole; multiamine; cobalt complex; DNA

## 0 引言

天然多胺在细胞的生长和死亡中起着很关键的作用, 多胺类化合物能与多种分子配位, 不仅能在体外与 DNA 特异性结合, 而且还能穿透细胞膜、穿过核膜, 进入细胞核内抑制基因表达, 因此多胺化学核酸酶对新型肿瘤、抗艾滋病化学药物的定向设计及其基因治疗等方面均有重要意义和应用前景。当前合成多胺化学核酸酶的研究报道很多, 如环状多胺 DMC 在低浓度下能水解双链和超螺旋 DNA<sup>[1]</sup>; 计亮年等发现的带胍/胺基侧链的双吡啶铜配合物能水

解超螺旋 DNA, 同时能得到线性产物<sup>[2]</sup>; 环状多胺锌配合物在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下可水解断裂 DNA<sup>[3]</sup>; 杜俊等发现的单取代大环多胺铜-铂异核配合物具有较好的 DNA 切割活性<sup>[4]</sup>; 二水杨醛三乙基四胺镁配合物可将超螺旋 DNA 水解为线性产物<sup>[5]</sup>。为提高多胺化合物对 DNA 的特异选择性, 将 DNA 识别体系吡咯-咪唑等聚酰胺化合物与多胺类化合物结合, 合成特异性识别 DNA 能力更高的人工核酸切割试剂的研究正得到重视, 国内多个课题组从事环多胺与吡咯(咪唑)聚酰胺化合物的研究<sup>[6-8]</sup>, 还有一些课题组从事直链多胺与吡咯(咪唑)聚酰胺化合物的研究<sup>[9-10]</sup>。据

收稿日期: 2009-08-25。收修改稿日期: 2009-12-02。

广东省自然科学基金(No.7300452)资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: huagongzhoucq@163.com; Tel: 020-61648549

第一作者: 周春琼, 女, 32 岁, 讲师; 研究方向: 生物无机化学和药物合成。

此本文合成了一种新的直链多胺-吡咯钴配合物,并研究了配合物与 DNA 的作用,该研究将为合成具 DNA 定点识别和定位切割的化学核酸酶提供了有效的途径。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA(CT DNA)购自华美生物工程公司,溴化乙锭(EB)购自舒伯韦公司,其它试剂均为国产分析纯试剂。PE-240C 元素分析仪;ZQ4000 液相

色谱-质谱联用仪;Shimadzu FTIR-8300 红外光谱仪,KBr 压片;Bruker Am-300 MHz 核磁共振仪;显微熔点测定仪;DDS-11A 电导率仪;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计;RF-5301PC 荧光光谱仪;乌氏粘度计(毛细管内径 0.5~0.6 mm);BECKMAN  $\Phi$ 34 pH 计;Tanon EPS300 电泳仪;Tanon HE-90 电泳槽;Alpha Hp 3400 荧光/可见数字图像分析仪。

### 1.2 配体和钴配合物的合成及表征

通过元素分析、质谱、核磁、红外、熔点测定、摩尔电导等多种手段表征,配体和配合物结构式<sup>[10]</sup>见图 1。

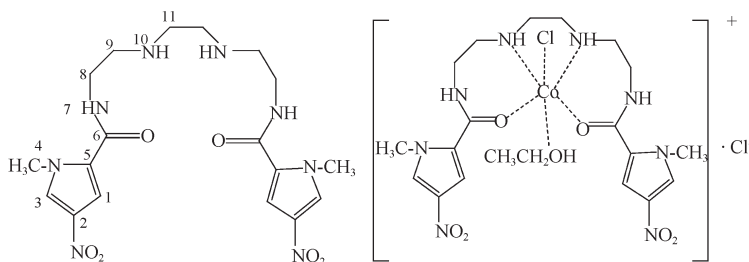


图 1 配体及钴配合物的结构示意图

Fig.1 Structure of ligand and cobalt complex

#### 1.2.1 配体的合成和表征

参考文献<sup>[10-13]</sup>方法合成了配体  $N^1, N^8$ -二(1-甲基-4-硝基吡咯-2-酰基)三乙基四胺。该配体  $C_{18}H_{26}N_8O_6$  的元素分析结果如下(% , 计算值):C 47.96(48.00), N 28.92(24.88), H 5.82(5.78)。FAB-MS: 473.0(M+Na)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(DMSO),  $\delta$ /ppm: 8.42(t, 2H, H7), 8.20(d, 2H, H3), 7.40 (d, 2H, H1), 3.85(s, 6H, H4), 3.28(t, 4H, H8), 2.65(t, 4H, H9), 2.58(s, 4H, H11), 2.01(m, 2H, H10), m.p. 174~176 °C, 与文献<sup>[10]</sup>基本吻合。IR(KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu$ (N-H) 3276.46,  $\nu$ (N-H) 3137.79,  $\nu$ (C-H) 2931.3,  $\nu$ (C-H) 2839.40,  $\nu$ (C=O) 1655.48,  $\nu$ (N-H) 1558.00,  $\nu$ (C=C) 1532.03,  $\nu$ (C=C) 1500.64,  $\nu$ (N-CH<sub>3</sub>, C-N) 1422.45,  $\nu$ (C-NO<sub>2</sub>, C-N) 1310.92,  $\nu$ (CO-NH, C-N) 1211.63,  $\nu$ (CH<sub>2</sub>-NH, C-N) 1144.35,  $\nu$ (CH<sub>2</sub>-NH, C-N) 1107.02,  $\nu$ (C-NO<sub>2</sub>, C-N) 852.22,  $\nu$ (N-H) 813.63,  $\nu$ (N-H) 751.12,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>) 707.20,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>) 597.54。

#### 1.2.2 钴配合物的合成和表征

将上述配体(0.200 6 g, 0.446 mmol)溶于 10 mL DMF 溶液中,将  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.106 g, 0.446 mmol)溶于 5 mL 乙醇溶液中,再将其在搅拌下加入配体溶液中,室温搅拌 20 h,减压蒸馏除去溶剂,将残渣用甲醇溶出,滤液置于冰箱中冷却得到红褐色固体,过滤,水洗,干燥,得到产品钴配合物  $CoL$ 。其( $C_{20}H_{30}N_8O_7Cl_2Co$ )

元素分析结果如下(% , 计算值):C 38.22(38.47), N 17.78(17.95), H 4.92(4.84)。FAB-MS: 625.3(M+H)<sup>+</sup>。IR (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\nu$ (O-H)3331.62,  $\nu$ (N-H)3128.87,  $\nu$ (C-H) 2933.66,  $\nu$ (C=O)1646.68,  $\nu$ (N-H) 1552.75,  $\nu$ (C=C) 1528.25,  $\nu$ (C=C) 1499.69,  $\nu$ (N-CH<sub>3</sub>, C-N)1420.28,  $\nu$ (C-NO<sub>2</sub>, C-N) 1311.28,  $\nu$ (CO-NH, C-N)1211.92,  $\nu$ (CH<sub>2</sub>-NH, C-N)1139.51,  $\nu$ (CH<sub>2</sub>-NH, C-N)1109.71,  $\nu$ (C-NO<sub>2</sub>, C-N)845.43,  $\nu$ (N-H)809.5,  $\nu$ (N-H)749.10,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>)708.30,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>)591.49。配体与配合物的红外光谱图有明显的不同: 配体中位于 3 276.46 和 3 137.79  $cm^{-1}$  处有 2 个不同位点的氨基的伸缩振动峰, 当形成配合物之后, 位于 3 276.4 6  $cm^{-1}$  处的氨基峰消失, 在 3 331.62  $cm^{-1}$  处出现了一个羟基峰, 同时另一个氨基峰朝低频迁移至 3 128.87  $cm^{-1}$ , 这表明金属离子与氨基上的氮原子和乙醇中的羟基氧发生了配位; 配体中位于 1 655.48  $cm^{-1}$  处的 C=O 的伸缩振动峰在配合物中向低频迁移至 1 646.68  $cm^{-1}$  处, 说明金属离子与 C=O 上的氧原子配位形成 Co-O 键。配制 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的钴配合物的水溶液, 其摩尔电导率为 118 S·cm<sup>2</sup>·mol<sup>-1</sup>; 相同浓度的  $CoCl_2$  水溶液的摩尔电导率为 241 S·cm<sup>2</sup>·mol<sup>-1</sup>。比较钴配合物与钴盐的摩尔电导率值可以判断出钴配合物内外阴阳离子个数比为 1:1。

### 1.3 钴配合物与 CT DNA 作用的实验方法

#### 1.3.1 吸收光谱

在参比池和样品池中分别加入 3 mL 缓冲溶液和配合物溶液,在 200~400 nm 范围内测定配合物的吸收光谱;然后依次向参比池和样品池中滴加相同体积(数  $\mu\text{L}$ )的 CT DNA 溶液,同上方法测定吸收光谱。

#### 1.3.2 CoL 对 DNA-EB 荧光光谱的影响

固定 CT DNA 浓度为  $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,加入一定体积的 EB,使 DNA 与 EB 的物质的量比为 1:1,然后进行 CoL 或  $\text{Co}^{2+}$  对 EB-DNA 复合物的荧光强度的影响实验。仪器条件为:狭缝宽度: $d_{\text{ex}}=d_{\text{em}}=5 \text{ nm}$ ;扫描速度: $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ;激发波长: $520 \text{ nm}$ ;发射谱范围: $540 \sim 700 \text{ nm}$ <sup>[14]</sup>。

#### 1.3.3 荧光 Scatchard 图

CT DNA 的浓度固定不变,以不同物质的量浓度比  $C_{\text{CoL}}/C_{\text{CT DNA}}$  加入配合物,室温反应 1 h,分别用  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 EB 溶液进行滴定,测量溶液的荧光强度。仪器条件为:激发波长: $520 \text{ nm}$ ;狭缝宽度: $d_{\text{ex}}=d_{\text{em}}=10 \text{ nm}$ ;发射谱范围: $540 \sim 700 \text{ nm}$ 。由荧光数据算出  $r$  和  $r/c_f$  ( $r$  为键合 EB 与总的核酸浓度的比值, $c_f$  为游离的 EB 浓度),根据 Scatchard 方程: $r/c_f = k(n-r)$ ,以  $r/c_f$  对  $r$  作图,所得直线的斜率  $k$  即为 EB 与 DNA 的表观结合常数,由斜率和截距算出  $n$  即为每个核苷酸键合 EB 的位点数。

#### 1.3.4 CT DNA 溶液黏度测定

CT DNA 浓度固定为  $1.4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,CoL 或  $\text{Co}^{2+}$  浓度依次增大,温度恒定在  $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,反应 0.5 h 后,进行测量,以  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  对  $C_{\text{Co}}/C_{\text{DNA}}$  (CoL 或  $\text{Co}^{2+}$  与 CT DNA 浓度的比值)作图,其中  $\eta$  代表出现 CoL 或  $\text{Co}^{2+}$  时的黏度, $\eta_0$  代表 CT DNA 单独存在时的黏度,测试液的相对黏度计算公式  $\eta=(t-t_0)/t_0$ ,其中  $t_0$  为缓冲液流经毛细管所需的时间, $t$  为 DNA 溶液(或含浓度不等的 CoL-DNA 或  $\text{Co}^{2+}$ -DNA 溶液)流经毛细管所需的时间。

### 1.4 配合物与 pBR322 DNA 的电泳实验方法

按顺序加入  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH = 7.50,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl) 缓冲溶液和一定体积的钴配合物(溶于缓冲溶液),最后加入  $0.5 \mu\text{L}$  的 pBR322 DNA ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),总体积为  $20 \mu\text{L}$ ,混匀后,在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水中反应 5 h,通过加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应,然后琼脂糖凝胶电泳分析配合物切割 DNA 的结果。当需要向上述体系中加入羟基自由基捕捉剂如 DMSO,甘油,甲醇等时,应在配合物之前加入。

## 2 结果与讨论

### 2.1 钴配合物与 CT DNA 的作用

#### 2.1.1 吸收光谱

加入 CT DNA 前后钴配合物的吸收光谱变化情况见图 2,从图中可以看出,当体系中加入少量的 CT DNA 后,随着 DNA 浓度的增大,配合物的吸收峰伴随有明显的减色和红移效应,其最大吸收峰减色率可达到 10% 左右。配合物吸收峰的减色效应是其与 DNA 以插入作用相结合的重要特征之一<sup>[15]</sup>,根据配合物的结构分析,这种现象可能是由于配合物中的吡咯环平面插入到 DNA 的碱基对中,与其发生吡咯环堆积作用引起的。然而随着 DNA 浓度的进一步增大,配合物的吸收光谱从减色效应变为增色效应,分析原因可能为钴配合物本身带有一定的正电荷,与带负电荷的 DNA 发生静电相互作用,致使配合物的吸收光谱发生增色效应。由此分析钴配合物可能是以部分插入同时伴随有静电方式与 DNA 相互作用。

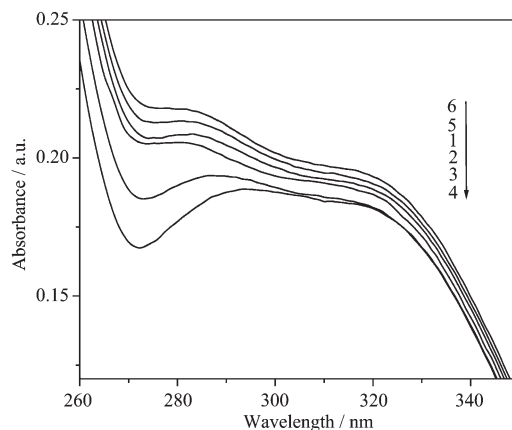


图2 钴配合物与 CT DNA 作用的吸收光谱

Fig.2 Absorption spectra of cobalt complex (CoL,  $4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in solution in the absence (1) and presence (2~6) of CT DNA  $C_{\text{DNA}}/C_{\text{CoL}}=0, 0.44, 0.88, 2.67, 4.44, 6.67$

#### 2.1.2 CoL 对 EB-DNA 荧光光谱的影响

EB 能专一性地插入 DNA 双螺旋或二螺旋内部的碱基对之间,使荧光显著增强,当 EB 从碱基对中被挤出来或双螺旋减少时,荧光发生淬灭,因而可用作结构探针。图 3 为配合物与 EB-DNA 体系作用的荧光光谱图,从图中可以看出:随着配合物浓度的不断增加,EB-DNA 复合物的荧光明显发生淬灭,具体分析原因,可能是金属配合物中的吡咯环平面插入

到 DNA 双链之间,导致挤出部分“插入”状态的 EB,使 EB 与 DNA 的结合减少,从而导致荧光淬灭,由此说明配合物可能以插入方式与 CT DNA 结合。同时为了进一步分析钴配合物中的钴离子或者单独的钴离子对 EB-DNA 体系的荧光强度的影响程度,对钴配合物和钴离子与 EB-DNA 体系的荧光强度的影响做了对比实验如图 4。由图可见  $\text{Co}^{2+}$  加入 EB-DNA 复合物体系中也会导致荧光强度降低,其原因可能为钴离子与水形成的水合物插入或部分插入到 DNA 双链之间,导致挤出部分“插入”状态的 EB,致使荧光淬灭;而且由图 4 也可以观察到在相同浓度

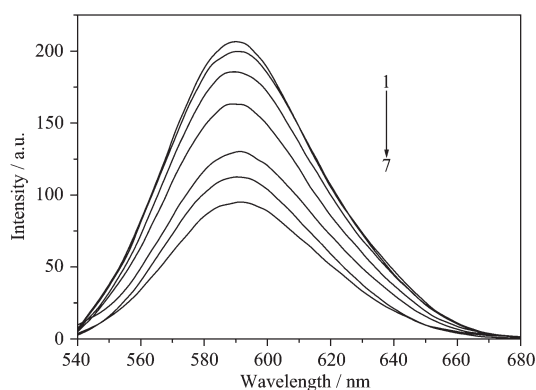


图 3 钴配合物与 EB-DNA 复合物体系荧光强度的影响

Fig.3 Fluorescence emission spectra of EB-DNA complex ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in the absence (1) and presence of increasing concentrations of  $\text{CoL}$  (2~7, 1, 2, 4, 9, 13, 18  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively)

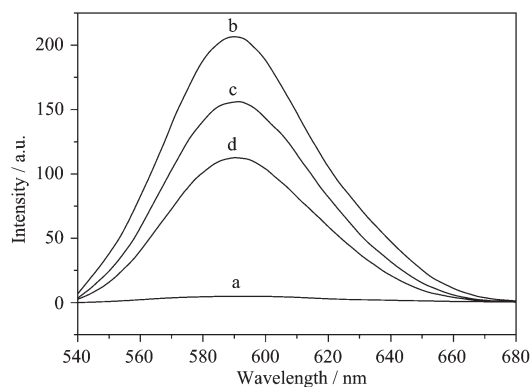


图 4  $\text{Co}^{2+}$ 和配合物与 EB-DNA 复合物体系荧光强度影响的对比图

Fig.4 Emission spectra of ethidium ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in the absence (a) and in the presence of (b) DNA ( $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); (c) DNA+ $\text{Co}^{2+}$  ( $13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); (d) DNA +  $\text{CoL}$  ( $13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

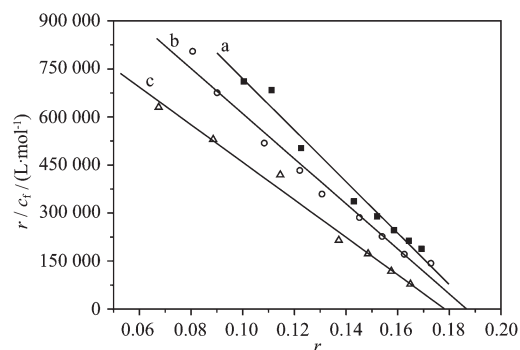
下钴离子使 EB-DNA 复合物体系荧光强度减弱的程度明显要弱于钴配合物,由此说明钴配合物使 EB-DNA 复合体系发生荧光淬灭起主导作用是钴配合物,受钴离子影响较小。

### 2.1.3 荧光 Scatchard 图

荧光 Scatchard 图是研究配合物与 DNA 作用方式的一种非常重要的实验方法,参考文献<sup>[16-19]</sup>绘制出荧光 Scatchard 图,EB 对 DNA 的表观结合常数  $k$  和结合位点数  $n$  数据列于表 1。通常当药物以插入方式与 DNA 键合时,药物与 EB 对 DNA 上同一位点的结合是竞争性的,则  $k$  值变化, $n$  值不变;当药物以静电方式与 DNA 结合时,药物与 EB 对 DNA 上不同位点的结合是非竞争性的,则  $n$  值变化, $k$  值不变;当药物与 DNA 的结合存在插入和非插入两种方式时, $k$  和  $n$  都变化<sup>[20]</sup>。从图 5 和表 1 中的数据可以看出,随着配合物浓度的变化, $k$  值减小, $n$  值也减小,这说明配合物既不是典型地竞争性抑制 EB 与 DNA 的结合,也不是典型地非竞争性抑制 EB 与 DNA 的结合。由此分析配合物与 DNA 的作用方式可能为部分插入方式,同时钴配合物阳离子有可能与 DNA 骨架中带负电荷的磷酸基团作用,而使配合物与 DNA 的结合中伴随有微弱的静电结合方式。

### 2.1.3 黏度实验

黏度法是检测溶液状态下配合物与 DNA 作用方式最有效的重要手段之一。一般来讲,当小分子配合物以插入方式与 DNA 作用时,DNA 的相邻碱基对的距离会变大以容纳插入型配体,因而导致 DNA



$C_{\text{CoL}}/C_{\text{CT DNA}}$  increases in the order of 0.000, 0.025 and 0.125 for lines a~c, respectively

图 5 加入配合物前后 EB 与 DNA 作用的荧光 scatchard 图

Fig.5 Fluorescence Scatchard plots for binding of EB to CT DNA ( $7.657 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in the absence (a) and the presence (b and c) of increasing concentration of  $\text{CoL}$

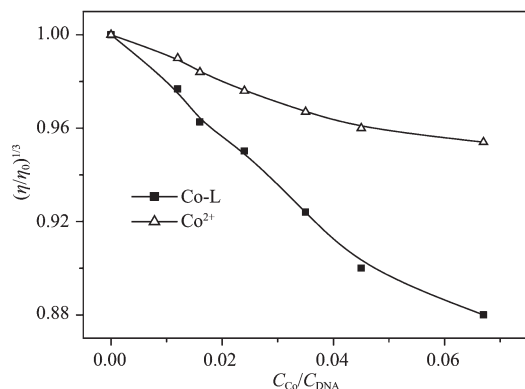
表 1 CoL 对 EB-DNA 体系 Scatchard 方程的影响

Table 1 Influence of CoL on the EB-DNA system

| $C_{CoL}/C_{DNA}$ | Scatchard equation                                | Correlation coefficient | $k / (L \cdot mol^{-1})$ | $n$   |
|-------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| 0.000             | $r/c_f = 1.524 \times 10^6 - 8.044 \times 10^6 r$ | 0.989                   | $8.044 \times 10^6$      | 0.190 |
| 0.025             | $r/c_f = 1.315 \times 10^6 - 7.044 \times 10^6 r$ | 0.990                   | $7.044 \times 10^6$      | 0.186 |
| 0.125             | $r/c_f = 1.045 \times 10^6 - 5.86 \times 10^6 r$  | 0.994                   | $5.86 \times 10^6$       | 0.178 |

双螺旋伸长,溶液的黏度增加;部分插入的配合物可能导致 DNA 双螺旋扭结,使得 DNA 的双螺旋长度减小,进而导致 DNA 溶液黏度的减小;DNA 本身是一多聚阴离子,在溶液中由于负电荷之间的相互静电排斥,使 DNA 大分子较为伸展,若配合物阳离子与带负电荷的磷酸氧基团以静电作用结合时,使得的负电荷被部分中和,导致螺旋收缩,分子长度变小,相应黏度值也会降低<sup>[15,21]</sup>。

图 6 显示了钴配合物及钴离子对 CT DNA 溶液黏度的影响,从图可以看出钴配合物与 DNA 发生相互作用后,随着配合物浓度的增大,DNA 黏度值逐渐减小,结合吸收光谱、荧光光谱实验更进一步地说明了配合物与 DNA 的结合方式为部分插入同时可能伴随有静电作用。分析原因可能为配合物中的吡咯环平面像一个“楔子”插入到 DNA 的碱基对中,它从一侧分开了碱基对,而并没有完全的插入到碱基对中,这种作用的结果导致 DNA 双螺旋扭结,使得 DNA 的双螺旋长度减小,导致 DNA 溶液黏度减小,也有可能是因为配合物阳离子与带负电荷 DNA 的磷酸氧基团以静电作用结合时,使得 DNA 的负电荷被部分中和,导致螺旋收缩,分子长度变小,相应黏度降低。当钴离子加入 CT DNA 溶液中后,随着离子浓度的增大,DNA 黏度值也逐渐减小,其原因可能

图 6 钴配合物或  $Co^{2+}$  对 DNA 黏度的影响Fig.6 Effect of increasing concentration of cobalt complex or  $Co^{2+}$  on the relative viscosity of DNA ( $0.14 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ )

是水合钴离子部分插入同时伴有静电结合方式与 DNA 作用的结果。比较钴配合物和钴离子对 DNA 溶液黏度的影响情况,虽然两者均可以使 DNA 黏度减小,但在相同浓度条件下,钴配合物使 DNA 的黏度值降低得更多,由此说明在钴配合物与 DNA 的相互作用中,钴配合物起主导作用。

## 2.2 钴配合物与 pBR322 DNA 的作用

配合物在  $37^\circ C$  时切割 DNA 效果不佳,提高反应温度至  $50^\circ C$ ,其电泳图如图 7,随着配合物浓度的不断增大,超螺旋 DNA 被切割成缺刻产物,当配合物浓度达到  $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时可以将超螺旋 DNA 完全切割为缺刻产物,当配合物的浓度高于  $0.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  时,钴配合物阳离子与 DNA 中带负电荷的磷酸基团结合,从而使 DNA 沉淀在胶孔中。为了进一步确定是否是钴配合物的加入导致了 DNA 的切割,图 8 中的孔道 7 和 8 显示了配体和钴离子的

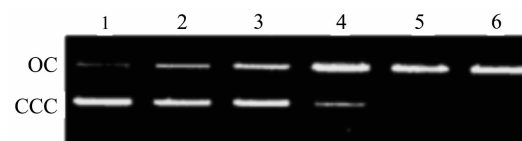
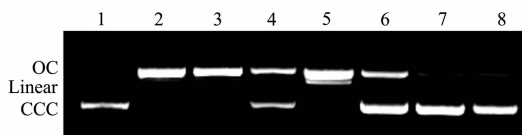
图 7  $50^\circ C$  时钴配合物与 pBR322 DNA 作用的电泳图Fig.7 Results of electrophoresis of pBR322 DNA in the presences of varying concentration of cobalt complex 1~6:  $0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 0.60 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  at  $50^\circ C$ . CCC: supercoiled; OC: nicked.Cleavage conditions:  $0.50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  CoL,  $50^\circ C$ . Lane 1: DNA control. Lane 2: CoL. Lane 3: CoL+ $0.4 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  MeOH. Lane 4: CoL+ $0.4 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  DMSO. Lane 5: CoL+ $H_2O_2$ . Lane 6: CoL+glycerol. Lane 7:  $0.50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  ligand. Lane 8:  $0.50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$   $Co^{2+}$ 

图 8 钴配合物与 pBR322 DNA 作用的机理实验电泳图

Fig.8 Cleavage of pBR322 DNA by cobalt complex in the absence or presence of radical scavengers and in the presence  $1 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$   $H_2O_2$

与 DNA 的作用情况,由图显示配体和钴离子在相同实验条件下对 DNA 基本上无切割能力。

同时图 8 对钴配合物切割 DNA 的作用机理进行了研究,孔道 5 显示当体系中加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  后,配合物的切割效果略有提高,有少量的线性产物出现;孔道 4 和 6 显示当加入羟基自由基清除剂 DMSO 和甘油后,钴配合物对 DNA 的切割受到明显的抑制作用,在相同条件下不能将超螺旋 DNA 完全切割为缺刻 DNA,说明配合物在作用过程中可能产生了活性氧物种,由此说明钴配合物切割 DNA 的机理可能为氧化机理<sup>[22]</sup>。

### 3 结 论

合成了一种新的三乙基四胺-吡咯钴金属配合物,通过多种手段对其结构进行了表征。紫外、荧光、粘度等方法对其与 CT DNA 的作用方式进行了研究,发现 CT DNA 的加入使配合物吸收光谱先发生减色效应后发生增色效应;配合物的加入导致 EB-DNA 发生荧光淬灭;随着配合物浓度的增大,EB 与 DNA 的表观结合常数  $k$  和结合位点数  $n$  均不断减小;随着配合物浓度的增大,DNA 溶液的黏度值不断减小,这些结果均说明配合物与 DNA 的作用方式可能为部分插入和静电混合作用模式。凝胶电泳分析结果表明钴配合物在 50 °C 时,可以将超螺旋 pBR322 DNA 完全切割为缺刻产物,说明该配合物是一种比较有效切割 DNA 的多胺类化学核酸酶。

#### 参考文献:

- [1] Wan S H, Liang F, Xiong X Q, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**,**16**:2804-2806
- [2] He J, Hu P, Ji L N, et al. *Dalton Trans.*, **2008**:3207-3214
- [3] Qian J, Gu W, Yan S P, et al. *Dalton Trans.*, **2007**:1060-1066
- [4] DU Jun(杜俊), WU Zi-Yi(吴子怡), GUO Zi-Jian(郭子建). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2008**,**24**(10):1669-1674
- [5] XI Xiao-Li(席小莉), YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频). *Chinese Sci. Bull. (Kexue Tongbao)*, **2006**,**51**(19):2322-2326
- [6] ZHAO Yu-Feng(赵玉芬), QIAO Ren-Zhong(乔仁忠), ZHANG Zhen(张祯). *CN Patent*, 1560112, 2005-01-05.
- [7] ZHAO Yu-Feng(赵玉芬), QIAO Ren-Zhong(乔仁忠), YU Xiao-Qi(余孝其), et al. *CN Patent*, 1560053, 2005-01-05.
- [8] TIAN Ying-Liang(田英良), SUN Si-Bing(孙诗兵), ZHANG Ji-Guang(张继光). *CN Patent*, 101353345, 2009-01-28.
- [9] ZHOU Cheng-Yong(周成勇), ZHU Miao-Li(朱苗力), YANG Pin(杨频). *Chinese J. Org. Chem. (Youji Huaxue)*, **2006**,**6**:831-834
- [10] Zhou C Y, Zhao J, Yang P, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**,**101**:10-18
- [11] Baird E E, Dervan P B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**,**118**:6141-6146
- [12] HUANG Wei-Qiang(黄伟强), YUAN Gu(袁谷), XIAO Jun-Hua(肖军华). *Chemistry (Huaxue Tongbao)*, **2001**,**7**:425-427
- [13] XIAO Jun-Hua(肖军华), HUANG Wei-Qiang(黄伟强), YUAN Gu(袁谷), et al. *Chemistry (Huaxue Tongbao)*, **2000**,**6**:35-37
- [14] ZHOU Chun-Qiong(周春琼), YANG Pin(杨频), DENG Xian-He(邓先和), et al. *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, **2004**,**25**(9):1608-1612
- [15] WU Hong-Xing(吴红星), LI Feng-Hua(李风华), LIN Hai(林海), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2005**,**21**(1):117-122
- [16] Hove-Grant M, Wu K C, Brauer W R, et al. *Biochem.*, **1976**,**15**:4339-4345
- [17] Yang P, Guo M L. *Metal Based Drugs*, **1998**,**5**:41-48
- [18] HU Min(胡敏), ZHANG Zhen-Xi(张镇西), SHEN Guo-Li(沈国励), et al. *Chinese J. Anal. Chem. (Fenxi Huaxue)*, **2007**,**35**(6):890-892
- [19] LI Xi(李曦), ZHANG Zhi-Jun(张志军), WANG Cheng-Gang(王成刚), et al. *J. Wuhan Univ. (Wuhan Daxue Xuebao)*, **2008**,**54**(6):650-654
- [20] LI Lai-Sheng(李来生), WANG Li-Ping(王丽萍), HUANG Wei-Dong(黄伟东), et al. *Chinese J. Anal. Chem. (Fenxi Huaxue)*, **2002**,**30**(6):675-679
- [21] Ghosh S, Barve A C, Kumbhar A S, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**,**100**:331-343
- [22] Ren R, Yang P, Zheng W J, et al. *Inorg. Chem.*, **2000**,**39**:5454-5463