

2,6-二[(2'-甲酚基-2"-羟乙基)氨基甲基]-对-甲酚合四锌(II) 促进 DNA 水解的研究

陈战芬^{*,1,3} 王晓勇² 郭子建³

(¹ 湖北师范学院化学与环境工程学院, 黄石 435002)

(² 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

(³ 南京大学配位化学国家重点实验室, 配位化学研究所, 南京 210093)

摘要: 本文利用圆二色、荧光光谱和琼脂糖凝胶电泳等方法考察了一个四核锌荧光配合物 $[\text{Zn}^{\text{II}}_4(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**I**, L=2,6-二[(2'-甲酚基-2"-羟乙基)氨基甲基]-对-甲酚)与 DNA 的结合性质及其 DNA 水解酶活性。结果表明,配合物 **I** 能与 DNA 磷酸骨架的共价结合诱导其构象变化,而本身的荧光被淬灭。该四核锌配合物能在生理条件和不加任何辅助剂情况下水解切割 pBR322 质粒 DNA,且在 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表现出最大的切割效果,使 DNA 的水解速率提高了 6~7 个数量级。

关键词: 四核锌荧光配合物; DNA; 水解切割

中国分类号: O614.24*1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)10-1945-07

DNA Hydrolysis Mediated by a Tetranuclear Zinc(II) Complex with 2, 6-Bis {[(2-hydroxybenzyl)(2-hydroxyethyl)amino]methyl}-4-methylphenol

CHEN Zhan-Fen^{*,1,3} WANG Xiao-Yong² GUO Zi-Jian³

(¹ College of Chemistry and Environmental Engineering, Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435002, China)

(² State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

(³ State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Institute of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: DNA binding properties and hydrolase activity of a fluorescent tetranuclear Zinc(II) complex $[\text{Zn}^{\text{II}}_4(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**I**, L=2, 6-bis {[(2-hydroxybenzyl)(2-hydroxyethyl)amino]methyl}-4-methylphenol), were monitored by circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy and agarose gel electrophoresis. The results indicate that **I** binds to phosphate backbones of DNA covalently. The interaction induces the conformational variation of DNA double helix and the fluorescence quenching of **I**. The complex can mediate rapid hydrolytic cleavage of pBR322 plasmid DNA under physiological conditions (pH=7.4) and in the absence of any external agents. And **I** exhibits its optimal DNA hydrolytic activity at the concentration of $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the rate of DNA hydrolysis was a 6~7-fold acceleration.

Key words: fluorescent tetranuclear Zinc(II) complex; DNA; hydrolytic cleavage

核酸中的磷酸二酯键具有很高的稳定性,所以能在生理条件下催化切割 DNA 的试剂在生物工程和基因治疗药物等方面具有广阔的应用前景^[1-2]。金属配合物特有的电子和结构性质使其对 DNA 具有

天然的亲和力,从而有可能成为有效的核酸酶。关于金属配合物催化 DNA 降解的研究大都集中在氧化切割或 DNA 模型化合物的水解上,对 DNA 本身水解的报道却为数较少。然而在生物体内天然核酸酶

收稿日期:2011-05-05。收修改稿日期:2011-06-08。

国家自然科学基金重点(No.20631020);江苏省自然科学基金重点(No.BK2005209);湖北师范学院人才引进项目(2007F11)资助项目。

*通讯联系人。E-mail:chenzf1979@sohu.com

降解 DNA 所采用的模式是水解断裂,水解断裂相对于氧化断裂有诸多优点,因此有关金属配合物的水解型 DNA 切割试剂的设计与合成倍受关注。本文首先用圆二色和荧光光谱研究了一个具有荧光活性的四核锌配合物 $[\text{Zn}_4^{\text{II}}(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}(\text{I})$,该配合物的化学结构如图 1^[3];其中 L=2,6-二[(2'-甲酰基-2''-羟乙基)氨基]-对-甲酚与 DNA 的结合性质,其次用琼脂糖凝胶电泳研究了该配合物对质粒 DNA 的切割活性及反应动力学。

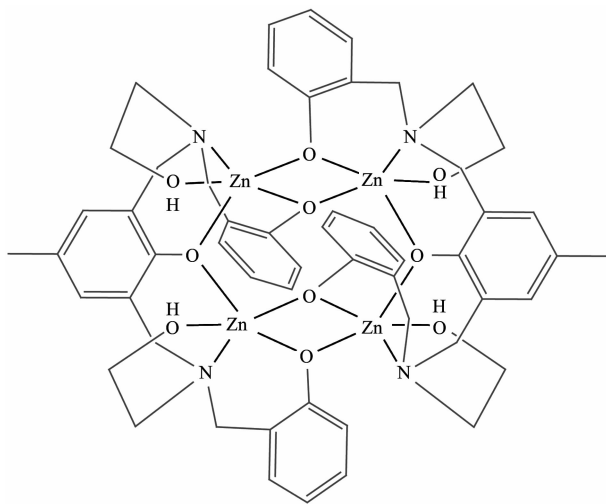


图 1 $[\text{Zn}_4^{\text{II}}(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}(\text{I})$ 阳离子的化学结构

Fig.1 Chemical structure of the cationic core of complex $[\text{Zn}_4^{\text{II}}(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}(\text{I})$

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

小牛胸腺 DNA(CT-DNA),溴化乙锭(EB)和三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自 Sigma 公司。pBR322 质粒 DNA 购自 MBI Fermentas 公司。琼脂糖胶购自 Biowest 公司。T4 DNA 连接酶 (350 U/ μL),10×T4 DNA 连接酶缓冲液和核酸琼脂糖回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。四核锌配合物 I 按文献^[3]提供的方法合成。圆二色(CD)光谱在 Jasco-810 自动光谱仪上测定;荧光光谱在 AMINCO Bowman series 2 发光光谱仪上测定。

1.2 光谱法研究配合物 I 与 CT-DNA 的结合能力

配合物 I 与 DNA 间的相互作用用圆二色(CD)和荧光光谱进行研究。CT-DNA 的储存液在 50 mmol·L⁻¹ NaCl/5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 的缓冲溶液(pH 7.4) 中配制得到。DNA 的浓度通过测定其在 260 nm 处的吸光度来确定 (DNA 在 260 nm 处的摩

尔消光系数为 6 600 L·mol⁻¹·cm⁻¹ [4]),且在 260 和 280 nm 处的吸收强度之比(A_{260}/A_{280})为 1.8~1.9,表明该 DNA 样品不含蛋白质^[5]。该储备液在 4 °C 保存且使用不超过 4 d。四核锌配合物的初溶液在 50% 甲醇和 50% 的缓冲溶液(5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl,pH 7.4)中配制,初浓度为 13.5 mmol·L⁻¹。

在室温下,固定 CT-DNA 的浓度在 1.31 mmol·L⁻¹,将配合物 I 溶液分别按 $r(c_1/c_{\text{DNA}})=1:80;1:40;1:20;1:16;1:10;1:8$ 和 1:4 的比例加入到 DNA 的溶液中,记录每次的 CD 光谱。扫描波长范围为 220~320 nm,扫速 10 nm·min⁻¹,数据记录间隔 0.1 nm,每次扫描背景均被自动扣除。

固定四核配合物 I 的浓度为 45 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,将 CT-DNA 溶液分别按 $r(c_{\text{DNA}}/c_1)=0;0.1;0.2;0.3;0.4;0.5;0.6;0.7;0.8$ 和 0.9 的比例加入到配合物的溶液中,记录每个比例下的荧光光谱 (激发波长为 298 nm,发射波长为 330 nm)。

1.3 配合物 I 对质粒 DNA 的切割实验

利用琼脂糖凝胶电泳的方法研究配合物 I 对 DNA 的切割作用。将超螺旋 pBR322 质粒 DNA (200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,1 μL) 与一定量的配合物 I 混合,用 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl/50 mmol·L⁻¹ NaCl (pH=7.4)缓冲液定容到 10 μL 。混匀后,反应液在 37 °C 下温育 12 h,然后加入 1.5 μL 终止缓冲剂(含溴酚蓝、甘油、EDTA 和二甲苯腈蓝)终止反应,用 EB 染色的 1.0% 凝胶电泳分析切割结果。电泳测定在 TAE(40 mmol·L⁻¹ Tris-醋酸/1 mmol·L⁻¹ EDTA)缓冲液,60 V 电压下进行 1.5 h,用 UVP 凝胶成像系统对电泳图进行拍照。每一条泳带的切割程度是通过 EB 染色的凝胶(EB,0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行光密度分析。由于 EB 与超螺旋 DNA 的嵌入作用低于开环(Form I)及线性 DNA (Form II),故定量 DNA 时应在得到的超螺旋 DNA 含量上乘以一个校正因子 1.47^[6]。制备所用溶液样品均用二次去离子水,每个实验都平行地进行 3 次。

在机理研究中,0.1 mol·L⁻¹ 的 DMSO,10 mmol·L⁻¹ 的叔丁醇(羟基自由基捕捉剂)或 10 mmol·L⁻¹ 的 NaN₃(单线态氧捕捉剂),或 10 mmol·L⁻¹ 的 KI(过氧化氢捕捉剂) 加入到 pBR322 质粒 DNA 和配合物 I 的混合溶液中,在 37 °C 温育 12 h 后停止反应,随后的处理和分析参照上述方法进行。另外为进一步进行机理研究,T4 连接酶实验按下操作进行。按照核酸琼脂糖回收试剂盒的使用说明,将配合物 I 切割 pBR322 质粒 DNA 所得的开环和线性 DNA 回收,

回收的产物中加入 1 μL 的 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲溶液和 0.6 μL 的 T4 连接酶(350 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),在 23 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min 后终止反应,然后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。平行对照实验是在等同条件下未用 T4 连接酶处理的样品。

配合物 **I** 对超螺旋 pBR322 质粒 DNA 的切割随着反应时间的变化实验在 12 h 内完成,相应的处理和分析同上。

2 结果与讨论

2.1 光谱法研究配合物 **I** 与 DNA 间的相互作用

由于配合物 **I** 能跟 H_2PO_4^- 共价作用^[3],DNA 是由脱氧核糖和磷酸根组成的分子骨架,那么配合物 **I** 也有可能通过类似的结合模式与 DNA 发生相互作用。由于该配合物的紫外最大吸收波长与小牛胸腺 DNA(CT-DNA)的最大吸收波长 260 nm 相近,所以配合物 **I** 与 DNA 的相互作用在这里主要利用圆二色(CD)和荧光光谱进行研究。

图 2 表示 CT-DNA 本身和配合物 **I** 存在下的 CD 光谱。在图中 245 nm 的负峰和 275 nm 的正峰是标准 B-DNA 的特征峰^[7]。随着配合物 **I** 浓度的增加,CD 光谱中正峰和负峰的强度均降低,这表明配合物 **I** 与 DNA 之间发生了相互作用,并诱导 DNA 构象发生一定程度的改变。在图 3 中,配合物 **I** 的荧光强度随着 CT-DNA 浓度的增加而逐渐减小,也说

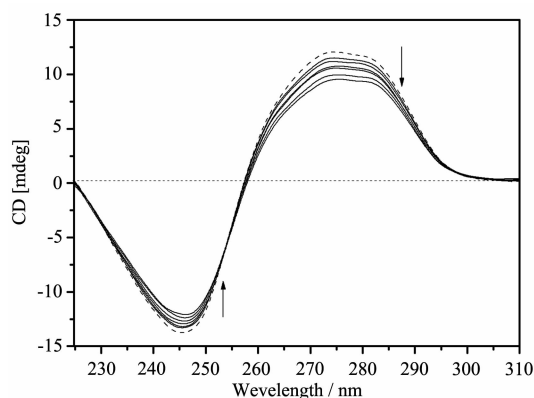


图 2 CT-DNA(0.131 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)(虚线)及 $r(c_I/c_{\text{DNA}})=0.0125; 0.025; 0.05; 0.0625; 0.1; 0.125$ 和 0.25 时 DNA 的 CD 光谱图

Fig.2 CD spectra of CT-DNA in the absence (dashed line) and presence (solid line) of complex **I**. The concentration of CT-DNA was 0.131 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. $r(c_I/c_{\text{DNA}})=0.0125; 0.025; 0.05; 0.0625; 0.1; 0.125; 0.25$

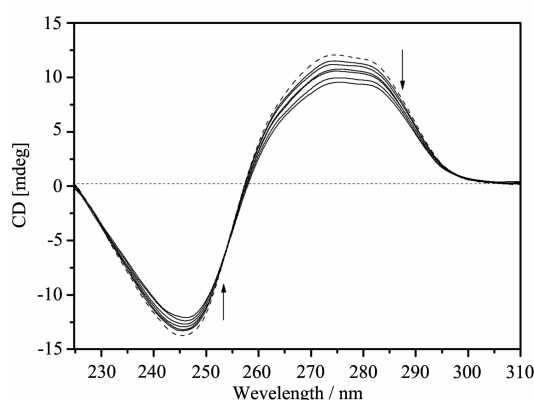


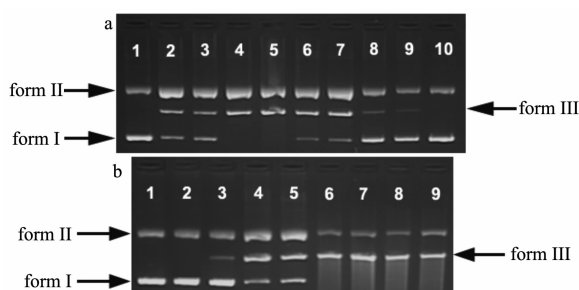
图 3 配合物 **I**(固定浓度为 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在室温下在存在 CT-DNA 的情况下的荧光发射谱(激发波长为 298 nm)

Fig.3 Fluorescence emission spectra (excited at 298 nm) of complex **I** with increasing concentration of CT-DNA. The concentration of the complex is 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $r(c_{\text{CT-DNA}}/c_I)=0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9$

明 **I** 与 CT-DNA 发生了作用,而且这种荧光淬灭的效果与文献报道的磷酸根淬灭作用相似^[3]。所以,配合物 **I** 可能是通过同样的结合模式与 DNA 上的磷酸根发生了螯合作用。

2.2 配合物 **I** 的切割活性

利用琼脂糖凝胶电泳的方法研究了配合物 **I** 在生理条件下切割 pBR322 质粒 DNA 的活性。图 4 所示的是不同浓度的配合物 **I** 与 pBR322 质粒 DNA 在 pH 7.4、37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 12 h 后的切割电泳图。切割产物的平均定量结果列于表 1。由图可以看出,当配合物 **I** 的浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时(图 4b 中 lane 3),**I** 就可将超螺旋 DNA(Form **I**)降解为开环(Form **II**)和线性 DNA (Form **III**)。随着配合物 **I** 浓度的增加,Form **I** 型 DNA 逐渐的减少,Form **II** 和 Form **III** DNA 逐渐增加。当配合物的浓度大约为 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 (b 中 lane 6),Form **I** DNA 完全转变为 Form **II** 和 Form **III**。继续增加配合物 **I** 的浓度,Form **II** DNA 的部分转化为 Form **III**。继续提高配合物 **I** 的浓度到 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,配合物 **I** 诱导 DNA 断裂产生 60.1%的 Form **II** 和 39.9%的 Form **III** DNA 产物(a 中 lane 5)。但是再继续提高配合物 **I** 的浓度 (大于 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),切割效果降低(如图 4a 中 lane 6~9)。实验结果表明 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的配合物 **I** 对 DNA 产生最大的切割效果。相比之下,600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Zn (ClO_4)₂·6H₂O(a 中 lane 10)和 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配体本身



The incubation time is 12 h. a: lane 1, DNA control; lane 2, DNA+I (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 3, DNA+I (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 4, DNA+I (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 5, DNA+I (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 6, DNA+I (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 7, DNA+I (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 8, DNA+I (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 9, DNA+I (150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 10, DNA+Zn (ClO_4) $\cdot$ 6H $_2$ O (600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). b: lane 1, DNA control; lane 2, DNA+I (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 3, DNA+I (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 4, DNA+I (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 5, DNA+I (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 6, DNA+I (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 7, DNA+I (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 8, DNA+I (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); lane 9, DNA+I (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图 4 配合物 I 在 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L⁻¹, pH 7.4), 37 °C, 避光条件下切割 pBR322 质粒 DNA(0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的凝胶电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis patterns for the cleavage of pBR322 plasmid DNA (0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) by complex I in Tris-HCl buffer (50 mmol·L⁻¹, pH 7.4) at 37 °C in the dark

表 1 不同浓度的配合物 I 与 pBR322 质粒 DNA 孵化 12 h 后切割产物的定量分析结果

Table 1 Quantified data for different forms of DNA produced by complex I at different concentrations

Complex	Concentration / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Supercoiled / %	Nicked / %	Linear / %
none	0	64.47	35.53	0
	5	59.66	30.63	9.71
	10	20.52	62.70	16.78
	20	15.02	66.76	18.22
	30	0	71.85	28.15
	40	0	68.83	31.16
	50	0	64.33	35.67
	60	0	60.10	39.90
	80	8.78	61.43	29.79
	100	12.07	59.66	28.27
I	120	46.13	44.99	8.88
	150	58.03	41.97	0

(b 中 lane 2)并没有诱导 DNA 的断裂。

2.3 配合物 I 的 DNA 切割机理的探讨

一般来说,超螺旋 DNA(Form I)的一条链上有一个缺口时,会使超螺旋结构变得松弛,得到缺刻环状(或称开环)DNA。如果在互补链上,距离第一个缺口大约 12 个碱基以内的长度再有一个缺口时,会得到线性 DNA^[8-9]。因此,配合物 I 定在 DNA 上切割了 2 次,将 DNA 从 Form I 转变为 Form III 型。如图 4 所示的线性 DNA 的形成可以由超螺旋 DNA 经两种反应途径获得。第 1 种是单链切割机理,超螺旋 DNA 首先被随机地转变为开环形式,再被切割试剂

在 DNA 的另处再切一刀使其转变成线性 DNA。典型的例子如 DNA 的印迹试剂 FeMPE^[10]和人脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)^[11]。第 2 种是双链切割机理,这种情况下线性 DNA 是由超螺旋 DNA 通过双链切割直接转变而成。典型的例子如铁-博来霉素。电泳图中 3 种不同形式的 DNA 条带同时共存这一现象可为此过程的发生提供有力证据^[12-14]。上面浓度梯度实验中所观察到的凝胶电泳图(图 4)中的 3 种 DNA 条带共存,说明了配合物 I 诱导形成线性 DNA 主要是通过双链断裂来完成的。基于 Poisson 分布和 Freifelder-Trumbo 关系式的标准统计分析办法^[6,15],

在我们的实验中, n_1/n_2 (其中 n_1 和 n_2 分别表示每一 DNA 分子产生单链断裂和双链断裂的数目)的值为 3.8 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6.7 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 7.2 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。这些值都远小于 100, 说明配合物 I 诱导线性 DNA 形成主要是通过非任意的切割方式来进行的。

DNA 断裂的途径有 2 种:活性氧物种导致的氧化断裂和亲核试剂(水或羟基离子)引发的水解断裂。在这里为了确定配合物 I 促使 DNA 的断裂是水解断裂, 我们首先在体系中加入各种不同的活性氧物种捕捉试剂进行平行实验(见图 5)。研究表明体系中加入 DMSO、 NaN_3 、KI 和叔丁醇几乎对 DNA 的切割不产生影响, 说明了扩散性的羟自由基、单线态氧和过氧化氢等都不包含在切割过程中。结合我们研究报道 I 跟磷酸根作用结果^[3], 我们初步断定配合物 I 断裂 DNA 不是通过氧化途径, 而是通过水解 DNA 的磷酸二酯键完成的。为了进一步证实这个结论, 我们还利用 T4 连接酶对配合物 I 在最佳反应条件下导致的切割产物进行了连接实验。其琼脂糖电泳图见图 6 所示。用 T4 连接酶处理过的样品与相应的未处理过的样品相对照, 从电泳条带位移发现 T4 连接酶能一定程度的将开环和线性化的质粒 DNA 转化为闭合环状或连环状的形式。经 T4 连接酶连接后在电泳条带上超螺旋 DNA 处似乎出现两条条带, 这也许是由于两个方面的原因造成的, 一方面, 连接酶与 DNA 非共价结合导致连接起来的连环体超螺旋态有些致后; 另一方面, 连接后的超螺旋不再是原来那种紧密堆积的形式, 也就是其密度减少, 导致条带有些致后。定量分析说明连接的效率大约为 40~60%。显然, 这种 DNA 片断的有效连接结果证明了

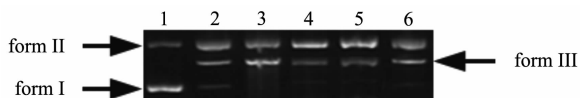


图 5 配合物 I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在存在不同标准自由基捕捉剂时切割 pBR322 质粒 DNA ($0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis patterns for the pBR322 plasmid DNA ($0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) by complex I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of standard radical scavengers. Lane 1, DNA control; lane 2, DNA+I; lane 3, DNA+I+DMSO ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 4, DNA+I+ NaN_3 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 5, DNA+I+KI ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 6, DNA+I+tert-butyl alcohol ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

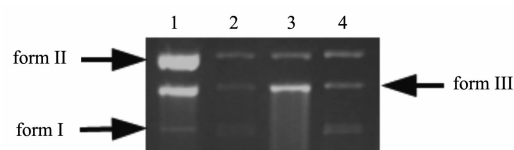


图 6 在 Tris-HCl 缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) 中 37°C 下配合物 I 促使 pBR322 质粒 DNA 断裂产物的连接实验(用 T4 连接酶)

Fig.6 Ligation experiments of DNA cleavage products induced by complex I in Tris-HCl buffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) at 37°C . Lane 1, DNA+I ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 2, DNA+I ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)+T4 ligase; lane 3, DNA+I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); lane 4, DNA+I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)+T4 ligase

配合物 I 诱导 DNA 断裂反应是通过水解途径进行的。

2.4 配合物 I 水解 DNA 的动力学

另外我们选取了配合物 I 的浓度为 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 研究配合物诱导 DNA 断裂随反应时间的变化规律。其琼脂糖凝胶电泳图显示在图 7。当体系温育 1 h 后, 就有线性 DNA 出现。随着反应时间的延长, 超螺旋(Form I 型)DNA 继续减少, 开环(Form II 型)DNA 和线性(Form III 型)DNA 的量继续增加。当体系温育 4 h, Form I 型 DNA 完全消失, 全部转化为 Form II 型和 Form III 型 DNA。继续延长反应时间, Form II 型 DNA 开始部分地转化为 Form III 型。在测试的反应时间内, 线性 DNA 达到 55.39% 的最大量时, 开环 DNA 达到 44.61%。通过对琼脂糖凝胶上的 3 种 DNA 形态含量分布的定量分析, 我们可以估计每一条泳道中 DNA 磷酸二酯键水解的程度。对这些数据进行简单的动力学分析, 结果显示在图 8。动力学曲线显示, 随时间增加, Form III DNA 的形成和

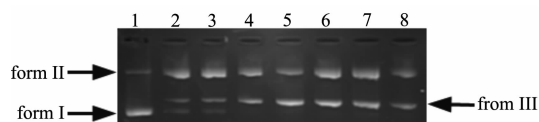


图 7 配合物 I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 Tris-HCl 缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4), 37°C , 避光条件下在递增的反应时间下切割 pBR322 质粒 DNA ($0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的凝胶电泳图

Fig.7 Agarose gel electrophoresis patterns for the cleavage of pBR322 ($0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) plasmid DNA by complex I ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in Tris-HCl buffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4) at 37°C in the dark for different incubations times. Lane 1, DNA control; lane 2~8, DNA+I, after 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h, respectively.

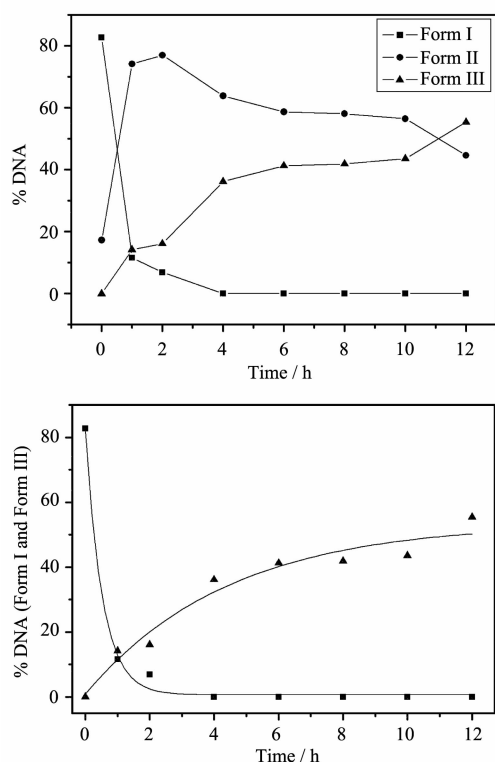


图 8 配合物 **I** ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 pBR322 质粒 DNA 的反应后 DNA 各物种的百分比分布随反应时间的变化图 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 37°C)

Fig.8 (a) A plot of the time course of mass fractions of DNA species during the cleavage reaction of pBR322 DNA ($0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) by $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ complex **I** in $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.4 at 37°C . (b) Kinetics plot for the decrease of form I DNA and the increase of form III DNA under the above conditions

Form I DNA 的减少遵从准一级动力学, 曲线的变化符合单指数式衰减规律, 从曲线拟合可以求出 37°C 下, 当配合物 **I** 浓度为 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 水解的速率常数为 1.89 h^{-1} (Form I 的减少; $R^2=0.995$) 和 0.23 h^{-1} (Form III 的增加; $R^2=0.945$)。而在无催化剂的生理条件下, 双链 DNA 磷酸二酯键的一级水解速率常数为 $3.6\times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$ ^[16], 相比之下配合物 **I** 使 DNA 的水解速度提高了 6~7 个数量级。这种 DNA 水解速率的加速作用是 Lewis 酸活化作用 (磷酸根的氧配位到金属离子上) 和分子内醇氧或者桥式酚氧的亲核活化二者共同作用的结果^[17]。在配合物 **I** 中 4 个 Zn(II) 通过桥连酚氧原子形成 2 个双金属中心, 通过配合物 **I** 选择性识别磷酸根的分析^[3], 我们推测这 2 个双重 Lewis 协同结合磷酸基 (如图 9 所示), 导致了与

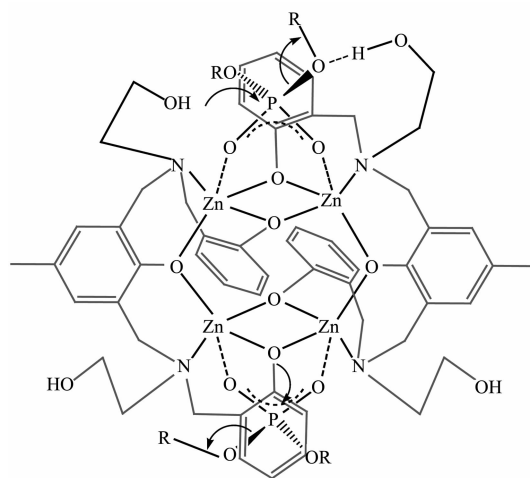


图 9 四核配合物 **I** 促进 DNA 水解断裂的可能机理

Fig.9 Proposed mechanism for the hydrolysis of DNA by the tetranuclear Zn(II) complex

Zn(II) 配位的醇羟基从 Zn(II) 中心上解离下来^[18]。脱离下来的醇羟基可一方面作为一般碱或亲核试剂进攻磷酸酯中心磷原子, 另一方面通过氢键与 DNA 上磷酸酯结合, 有利于离去基团的离去。同时桥式酚氧也可能发挥其亲核活化作用^[19]。共同的作用效果促进水解断裂反应的发生。

3 结 论

四核锌荧光配合物 $[\text{Zn}_4(\text{L}-3\text{H})_2](\text{ClO}_4)_2\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**I**) 与 DNA 的结合引起 DNA 构象一定程度的改变和配合物荧光强度的淬灭。这种效果可能是由配合物与 DNA 磷酸根的配位结合产生的。琼脂糖凝胶电泳实验表明, 配合物 **I** 可以在生理条件下水解切割 pBR322 质粒 DNA, 且在 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表现出最强的切割效果, 使 DNA 的水解速率提高了 6~7 个数量级。这种切割效果可能来源于 2 个双 Lewis 酸活化和分子亲核试剂活化 2 个过程的协同作用。

参考文献:

- [1] Komiyama M, Sumaoka J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, *2*: 751-757
- [2] Cowan J A. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *5*: 634-642
- [3] Chen Z F, Wang X Y, Chen J W, et al. *New J. Chem.*, **2007**, *31*: 357-362
- [4] Reichmann M E, Rice S A, Thomas C A, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*: 3047-3053
- [5] Marmur J. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*: 208-214
- [6] Jin Y, Cowan J A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*: 8408-8415

- [7] Johnson W C. In: Nakanishi K, Berova N, Woody R W(Eds), *Circular Dichroism: Principles and Applications*. New York: VCH, **1994**:523-540
- [8] Grover N, Gupta N, Singh P, et al. *Inorg. Chem.*, **1992**,**31**: 2014-2020
- [9] Basile L A, Barton J K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**,**109**:7548-7550
- [10] Herzberg R P, Dervan P B. *Biochemistry*, **1984**,**23**:3934-3945
- [11] Pan C Q, Lazarus R A. *Biochemistry*, **1997**,**36**:6624-6632
- [12] Povirk L F, Wübker W, Khnlein W, et al. *Nucleic Acids Res.*, **1977**,**4**:3573-3580
- [13] Drak J, Iwasawa N, Danishefsky S, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1991**,**88**:7464-7468
- [14] Branum M E, Que Jr. L. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**,**4**:593-600
- [15] Branum M E, Tipton A K, Zhu S R, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**:1898-1904
- [16] Westheimer F H. *Science*, **1987**,**235**:1173-1178
- [17] Williams N H, Takasaki B, Wall M, et al. *Acc. Chem. Res.*, **1999**,**32**:485-493
- [18] Kimura E, Aoki S, Koike T, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **119**:3068-3076
- [19] Kimura E. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**,**4**:207-213