

研究简报

不同配体对钌多吡啶配合物与 DNA 的作用和荧光性质的影响

张黔玲^{*1} 刘剑洪¹ 任祥忠¹ 魏波¹ 徐宏¹ 张培新¹ 刘建忠² 计亮年^{*2}⁽¹⁾ 深圳大学师范学院化学与生物学系, 深圳 518060)⁽²⁾ 中山大学化学与化工学院, 广州 510275)关键词: 多吡啶钌配合物 DNA 作用机制 荧光
分类号: O614.92

近年来, 八面体多吡啶钌(II)配合物与 DNA 的作用引起了人们极大的兴趣^[1,2]。与其它金属配合物相比, 这类配合物易于构造一个既为刚性又带手性的八面体构型, 并且配合物的热力学稳定性好, 光化学和光物理信息丰富, 既可以作为 DNA 结构探针^[3], 又可以作为 DNA 分子光开关^[4]。这些配合物能够以插入、静电和沟面结合三种方式与 DNA 作用, 其中, 插入模式最为重要, 因为配合物的很多性质都与插入结合有关。在插入模式中, 配合物以其三个配体中的一个(称插入配体)嵌入到 DNA 的碱基对之间, 其余两个配体(称辅助配体)留在碱基对外面。这种模式通常要求配合物的插入配体具有较好的平面性, 如果插入配体是带有取代基团的非完全平面配体, 则可能导致配合物与 DNA 的结合能力的下降, 同时对配合物的荧光性质等也会产生一定的影响。为了探讨这个问题, 我们设计合成了带有不同取代基团的非完全平面配体及其钌配合物, 并利用光谱

学和流体力学方法研究了配合物与 DNA 的作用。配体和配合物的结构如图 1 所示。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

所用试剂均为分析纯, 使用前未作进一步处理。小牛胸腺 DNA 购自华美生物工程公司; Tris(三羟甲基氨基甲烷) 广州化学试剂批发部进口分装。配体 MDHIP、DCHIP 及其钌配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ 的合成参照文献^[5]的方法合成, 通过元素分析、¹H NMR 及质谱等方法进行表征和确定。配合物及小牛胸腺 DNA 均用 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl ($\text{pH} = 7.2$) 缓冲液配制。小牛胸腺 DNA 的浓度以 $\varepsilon_{260} = 6600\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 来确定。

电子吸收光谱用 Shimadzu MPS-2000 紫外可见光谱仪记录。荧光光谱用 Hitachi RF-4500 荧光光谱

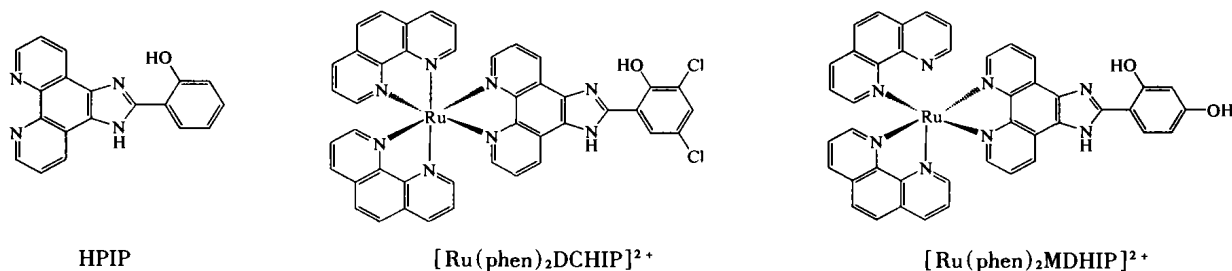


图 1 配体及配合物的结构图

Fig. 1 Structures of ligand and complexes

收稿日期: 2002-12-05。收修改稿日期: 2003-04-07。

国家自然科学基金资助项目(No. 29801005)。

* 通讯联系人。E-mail: qlzh98@yahoo.com.cn

第一作者: 张黔玲, 女, 30 岁, 博士, 讲师; 研究方向: 生物无机化学。

仪测定。粘度用 Ubbelodhe 粘度计测定。

1.2 实验方法

1.2.1 吸收光谱滴定

在紫外可见光谱测试中, 向参比池和样品池中加入同样体积的缓冲液和配合物溶液, 配合物的浓度固定为 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每次往参比池和样品池中滴加相同体积的小牛胸腺 DNA 溶液, 使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加, 直至饱和, 配合物的吸收峰不再减色。

1.2.2 荧光光谱滴定

在样品池中加入一定体积的配合物溶液, 配合物的浓度固定为 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每次往样品池中滴加一定体积的小牛胸腺 DNA 溶液, 使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加, 用 450nm 波长的光进行激发, 测定配合物的发射光谱。

1.2.3 DNA 溶液粘度的测定

测量粘度时, 将温度恒定在 $(30 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。测试液相对粘度按下列公式计算^[6]:

$$\eta = (t - t_0) / t_0$$

其中 t_0 为缓冲液流经毛细管所需的时间, t 为 DNA 溶液 (含浓度不等的配合物) 流经毛细管所需的时间, η_0 为未加配合物时 DNA 溶液的相对粘度。以 $(\eta / \eta_0)^{1/3}$ 对结合比率 r ($r = [\text{Ru}] / [\text{DNA}]$) 作图, 可以看到钌配合物对 DNA 粘度的影响。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

多吡啶钌配合物具有丰富的与金属 - 配体荷移跃迁 (MLCT) 有关的电子吸收性质, 并且对外界环境非常敏感。当配合物与 DNA 作用时会导致其配体所处环境发生改变, 配合物与 DNA 的结合强弱可通过光谱变化反映出来, 如图 2 所示。配合物与 DNA 作用的吸收光谱数据如表 1 所示。从表中可以看到加入 DNA 后, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ 在 461 nm 处的最大吸收峰减色率为 17.8%。相同条件下,

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 在 448nm 处的最大吸收峰的减色率相应小些, 为 11.7%。为了定量地比较这些钌配合物与 DNA 的结合强弱, 我们计算了配合物与 DNA 的结合常数^[7]。同时为了比较, 也测定了 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+}$ 与 DNA 的结合常数^[8]。从表中可以看出, 配合物与 DNA 结合强弱顺序为

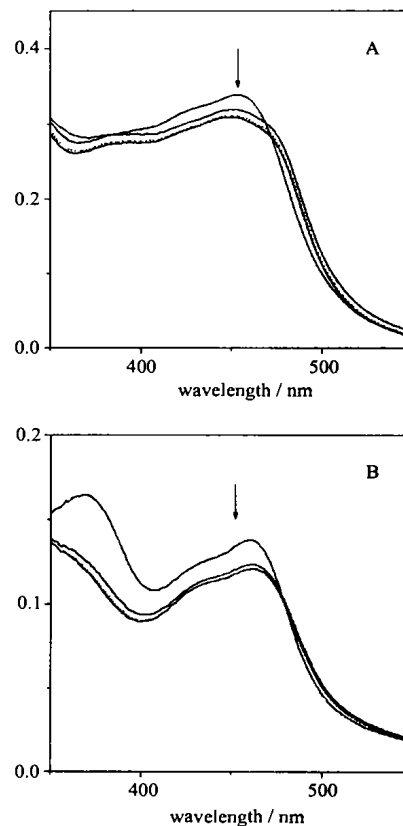


图 2 配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ (A) 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ (B) 与 DNA 作用的荧光光谱图

Fig. 2 Absorption spectra of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ (A) and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ (B)
Arrow shows the intensity changes upon increasing DNA concentration, $[\text{Ru}] = 20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{DNA}] / [\text{Ru}] = 0, 8, 12$.

表 1 钌(II)配合物与 DNA 作用的吸收光谱数据

Table 1 Absorption Data of Ruthenium (II) Complexes with DNA

complex	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$		bathochromism $\Delta\lambda / \text{nm}$	hypochromism / %	$K_b / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
	free	bound			
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$	448	451	3	11.7	6.9×10^4
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$	461	465	4	17.8	2.7×10^5
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+}$	456	462	6	31.3	9.1×10^5

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+} > [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 。在影响配合物与 DNA 结合强弱的因素中, 配体的平面性及其位阻是非常重要的因素。我们曾证明 HPIP 苯环 2- 位置上的 OH 取代基可以与相邻咪唑环上的 N 原子形成分子内氢键, 增大配体平面面积, 从而使 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+}$ 与 DNA 的作用增强^[8]。而在配体 MDHIP 和 DCHIP 中, 尽管 2- 位置上的 OH 取代基可以与相邻咪唑环上的 N 原子形成分子内氢键, 增大配体的平面面积, 但另一方面, 苯环上其余位置的不同取代基团又会产生一定的位阻效应, 降低配体的平面性, 使配体不能完全插入到 DNA 的碱基对中, 从而使配合物与 DNA 的作用减弱。此外, 配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ 与 DNA 的作用比 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 强, 可能是由于 DCHIP 上的两个 Cl 取代基分别位于苯环的 3- 和 5- 位置上, 配体的平面性要比 MDHIP 相对高些, 另一方面, 配体上的 OH 和 Cl 形成氢键的能力可能也会对配合物与 DNA 的作用产生一定的影响, 这方面的研究将进一步通过量化计算来证实。

2.2 粘度

通常在缺少高精度晶体结构数据和核磁数据的情况下, 粘度这种对 DNA 长度变化比较敏感的流体力学方法是检测溶液状态下配合物与 DNA 作用模式的最有效的重要手段^[9, 10]。一般来讲, 当小分子配合物以插入模式与 DNA 作用时, DNA 的相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体, 因而导致 DNA 双螺旋伸长, DNA 溶液的粘度增加; 当配合物以静电或沟面结合等非插入模式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度无明显变化; 而以部分插入方式与 DNA 作用时, 则可能使 DNA 的双螺旋扭结, 使其粘度减小。配合物对 DNA 溶液粘度的影响如图 3 所示。从图中可以看出, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ 的加入会使 DNA 溶液的粘度发生一定程度的变化。DNA 溶液的粘度先增大, 然后又逐渐减小, 表明配合物是以部分插入模式与 DNA 作用, 导致 DNA 双螺旋发生扭结, 这与上面的吸收光谱结果也是一致的。

2.3 荧光光谱

配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ 的荧光光谱如图 4 所示。从图中可见, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ 在 593nm 处发出较强的荧光,

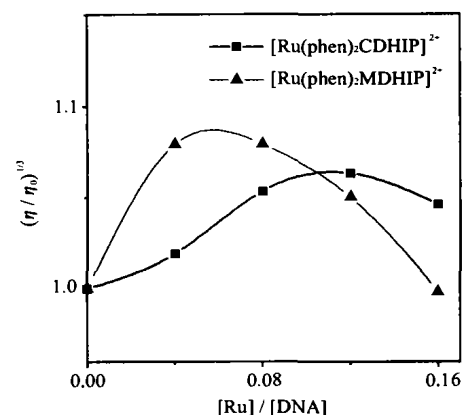


图3 配合物对小牛胸腺 DNA 粘度的影响

Fig. 3 Effect of increasing amounts of complexes on the relative viscosities of CT DNA, $[\text{DNA}] = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

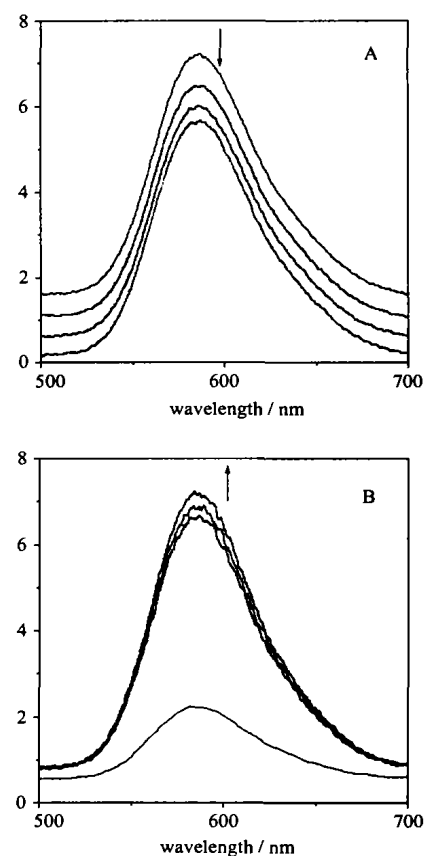


图4 配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ (A) 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ (B) 与 DNA 作用的荧光光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ (A) and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ (B) through the action with DNA

Arrow shows the intensity changes upon increasing DNA concentration, $[\text{Ru}] = 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $[\text{DNA}]/[\text{Ru}] = 0, 4, 8, 12$

与 DNA 作用后荧光减弱, 当 $[DNA]/[Ru] = 20$ 时, 配合物的荧光强度只有初始时的 62%, 说明 DNA 对配合物的荧光起着猝灭的作用。DNA 对 $[Ru(phen)_2MDHIP]^{2+}$ 的荧光猝灭过程可由 Volmer-Stern 方程描述:

$$I_0/I = 1 + K_D[Q]$$

其中 I_0 和 I 分别为不存在和存在猝灭剂时的荧光强度, K_D 是 Volmer-Stern 猝灭常数。在 DNA 低浓度范围内我们以 $[Ru(phen)_2MDHIP]^{2+}$ 的荧光强度变化 I_0/I 对 $[DNA]$ 作图, 其 Volmer-Stern 猝灭曲线为一直线, 但在 DNA 高浓度区其荧光猝灭曲线偏离 Volmer-Stern 直线。结合 $[Ru(phen)_2MDHIP]^{2+}$ 的激发态的氧化还原电位 ($E^{*2+/+} = 1.40V$) 比 DNA 中易被氧化的碱基鸟嘌呤的氧化还原电位^[11, 12] ($E^{*G/G^+} \approx 1.0V$) 要高, 因此我们判断 DNA 对 $[Ru(phen)_2MDHIP]^{2+}$ 的荧光猝灭可能是配合物的激发态通过电子转移对 DNA 中的鸟嘌呤碱基进行氧化的结果, 这与文献所报道的 DNA 对 $[Cr(phen)_3]^{2+}$ 以及 $[Ru(tap)_2hat]^{2+}$ 等的荧光猝灭机制是一致的^[11, 13]。而配合物 $[Ru(phen)_2DCHIP]^{2+}$ 在 Tris 溶液中的荧光较弱, 但加入 DNA 后配合物的荧光显著增强, 这是由于配合物中的配体 DCHIP 插入到 DNA 的碱基对中, 受到 DNA 保护使其免受水分子的猝灭, 从而使配合物荧光增强。

3 结 论

在影响配合物与 DNA 插入结合强弱的因素中, 配体的形状是非常重要的因素。对含不同配体的配合物来讲, 配体的平面性越好, 平面面积越大, 同时配体的立体位阻越小, 则配合物与 DNA 的作用相对

较强。此外, 配体上的不同取代基团对配合物的荧光性质也具有一定的影响, 并且含不同配体的配合物与 DNA 作用时, 荧光产生的变化也不相同。

参 考 文 献

- [1] Hall D. B., Holmlin R. E., Barton J. K. *Nature*, **1996**, **382**, 731.
- [2] Dandliker P. J., Holmlin R. E., Barton J. K. *Science*, **1997**, **275**, 1464.
- [3] Holmlin R. E., Stemp E. D., Barton J. K. *Inorg. Chem.*, **1998**, **37**, 29.
- [4] Freidman A. E., Chambron J. C., Sauvage J. P., Turro N. J., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**, 4960.
- [5] Ji Liang-Nian(计亮年), Zhang Qian-Ling(张黔玲), CHAO Hui(巢 辉) *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, **2001**, **46**(16), 1332.
- [6] Satyanarayana S., Dabrowiak J. C., Chaires J. B. *Biochemistry*, **1992**, **31**, 9319.
- [7] Wolfe A., Shimer G. H., Meehan T. *Biochemistry*, **1987**, **26**, 6392.
- [8] Liu J. G., Ye B. H., Li H., Zhen Q. X., Ji L. N., Fu Y. H. *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, **76**(3~4), 265.
- [9] Satyanarayana S., Daborusak J. C., Chaires J. B. *Biochemistry*, **1993**, **32**, 2573.
- [10] Satyanarayana S., Dabroniak J. C., Chaires J. B. *Biochemistry*, **1992**, **31**, 9319.
- [11] Watson R. T., Desai N., Wildsmith J., Wheeler J. F., Kane-Maguire N. A. *Inorg. Chem.*, **1999**, **38**, 2683.
- [12] Dandliker P. J., Nunez M. E., Barton J. K. *Biochemistry*, **1998**, **37**, 6491.
- [13] Lecomte J. P., Kirsch-De Mesmaeker A. *Inorg. Chem.*, **1995**, **34**, 6481.

Effects of Different Ligands on the DNA-Binding and Fluorescence Properties of Complexes

ZHANG Qian-Ling^{*·1} LIU Jian-Hong¹ REN Xiang-Zhong¹ WEI Bo¹

XU Hong¹ ZHANG Pei-Xin¹ LIU Jian-Zhong² JI Liang-Nian^{*·2}

(¹ Department of Chemistry and Biology, Normal College, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

(² School of Chemistry and Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Two polypyridyl ligands DCHIP (2-hydro-3, 5-dichlorophenyl-imidazo[4, 5-f][1, 10] phenanthroline), MDHIP (2, 4-dihydrophenyl-imidazo[4, 5-f][1, 10]phenanthroline) and their ruthenium (II) complexes $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ were prepared. Their DNA-binding properties were studied by spectroscopic methods and viscosity measurements. The results indicated that the complexes both bound to DNA by partial intercalation mode, but $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ exhibited stronger binding affinity for DNA than $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ due to the different planarities and steric effects of ligands. On the other hand, after binding to DNA, the fluorescence intensity of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{MDHIP}]^{2+}$ decreased, while the fluorescence intensity of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DCHIP}]^{2+}$ increased.

Keywords: polypyridyl ruthenium complex DNA binding mechanism fluorescence