

水溶性金属席夫碱与 DNA 相互作用的荧光光谱

廖见培, 刘国东, 黄杉生

(湖南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410082)

摘要: 研究了几种水溶性的金属席夫碱与 DNA 相互作用的光谱性质。在所研究的金属中 Mn 的络合物与 DNA 的相互作用最强, 荧光强度改变最大且其激发和发射峰均有微小紫移。其紫外可见光谱亦有明显的减色效应和微紫移。KI 猝灭和 Mn 席夫碱与溴化 3, 8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶的竞争实验证实了 Mn 席夫碱与 DNA 之间的作用方式是嵌入方式。同时也考察了 pH 值、温度对 Mn 席夫碱及 Mn 席夫碱-DNA 体系荧光强度影响。Mn 席夫碱仅与 DNA 的一部分键位发生作用, Mn 席夫碱相对荧光强度与加入的小牛胸腺 DNA 的浓度, 在 $3 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内呈线性关系。水溶性 Mn 席夫碱可以作为一种新型荧光探针用于微量 DNA 的检测。

关键词: 水溶性; 金属席夫碱; DNA; 嵌入作用; 荧光光谱

中图分类号: Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2001)03-0005-04

近年来, 一些小分子与 DNA 的相互作用及有机金属络合物与 DNA 键合或者断裂 DNA 分子, 引起了众多研究者的注意^[1]。一些金属络合物如: Cu-phenanthroline、Fe-EDTA、Mn-porphrin、Ru-polypyridyl 及金属席夫碱, 在氧化剂存在的条件下, 能够断裂或者键合 DNA^[2]。席夫碱及金属席夫碱化合物是一类抗癌药物, 但其与 DNA 的相互作用机理较少报道^[3]。研究抗癌药物与 DNA 的相互作用机理, 对选择核酸酶及抗癌药物的合成具有重要意义。本文报道了几种水溶性的金属席夫碱与小牛胸腺(CT) DNA 的相互作用。在生理条件下, 用荧光光谱研究了它们与 CTDNA 作用的强弱。紫外可见光谱, KI 猝灭效应, 金属席夫碱、溴化 3, 8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶 (EB) 与 DNA 的竞争键合都证实了金属席夫碱与 DNA 的相互作用方式为嵌入作用方式。Mn 合 4-三乙胺甲基水杨醛亚胺作为一种新型荧光探针, 可用于 DNA 的分析测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Hitachi850 荧光分光光度计 (日本), pHs-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂), WFZ-34A 紫外可见分光光度计 (天津仪器厂)。

CTDNA, 华美生物工程公司产品, UV 测定 A_{260}/A_{280} 大于 1.8, 配制成 2 g/L CTDNA 的 NaCl 水溶液保存于 4 °C 冰箱中。水溶性金属席夫碱按文献[4, 5]合成, 结构见图 1。产物的熔点及元素分析结果均与文献报道值相符。

实验用水为一次蒸馏水, 其余所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 吸收光谱 10 mL 比色管中加入 100 μ L 1.0×10^{-3} mol/L 的金属席夫碱溶液, 用 pH=7 的 Britton-Robison (BR) 缓冲液稀释至刻度, 取 3 mL 于比色皿中, 加入不同量的 CTDNA, 以相应空白作溶液参比, 在紫外可见分光光度计上扫描其吸收光谱。

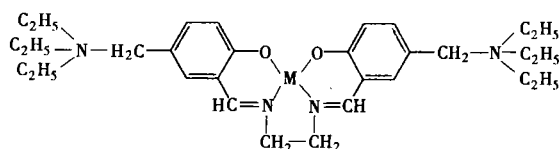


图 1 金属席夫碱的结构图

Fig. 1 Structure of metal Schiff base compound

Compound 1. M= Mn; Compound 2. M= Ni; Compound 3. M= Cu

收稿日期: 2000-07-26; 修回日期: 2001-04-09

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (12200000)

作者简介: 廖见培 (1974-), 女, 湖南湘阴人, 硕士研究生; 黄杉生, 联系人。

1.2.2 荧光光谱 取一定量的金属席夫碱溶液用 pH= 7 的 BR 缓冲液(除特别指出外) 稀释, 在发射波长 λ_{em} = 410 nm、激发波长 λ_{ex} = 303 nm 处记录其荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

分别取相同浓度的金属席夫碱溶液测定它们的荧光强度, 当发射波长为 410 nm 时, 在 236 nm 和 303 nm 左右出现 2 个激发峰, 不同金属化合物在 410 nm 左右荧光峰的强度不同, 其中 Ni 化合物的荧光强度最强, Mn 次之, Cu 最弱。 在它们的溶液中加入相同量的 DNA 溶液, 观察到 3 种物质(金属席夫碱浓度为 1.0×10^{-5} mol/L) 的荧光强度均降低, 而 Mn 的荧光强度降得最显著(见表 1), 这表明 Mn 席夫碱与 DNA 的相互作用最强, 这可能是由于 Mn 原子 d 轨道中具有较多的未配对电子, 因而本文以 Mn 化合物(化合物 1) 为研究对象来讨论水溶性的金属席夫碱与 DNA 的相互作用。 化合物 1 的荧光强度随着 DNA 的加入, 逐渐降低, 其猝灭常量 (K_{sv}) 可用 Stern- Volmer 方程来描述:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot c_{DNA}$$
 (1)

式中 F_0 和 F 是 DNA 不存在和有 DNA 存在时的荧光强度, K_{sv} 是 Stern- Volmer 猝灭常量, 用来衡量 DNA 猝灭速率, c 为 DNA 的浓度。 由 CTDNA 浓度与化合物 1 的荧光强度关系曲线(图 2) 可知, Stern- Volmer 猝灭常量为 $1.4 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 很明显在很高浓度下的 DNA 其猝灭作用仍没有达到饱和, 这显示仅有一部分键位对荧光有猝灭作用^[1], 同时它的相对荧光强度与 DNA 的浓度在 $3 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 之间呈线性关系。

表 1 金属席夫碱的荧光光谱性质
Table 1 Fluorescence spectrum properties of metal Schiff_base

Compound	Fluorescence Intensity						$(F_0 - F) / F_0$			
	λ_{ex} / nm	F_0	F	λ / nm	F_0	F	λ / nm	F_0	F	%
Mn- Schiff_base	237	67.13	49.54	303	105.0	101.2	415	105.0	102.3	26.2
Ni- Schiff_base	235	95.69	82.19	302	138.4	134.3	412	139.2	136.3	14.1
Cu- Schiff_base	236	45.64	38.40	302	65.84	63.8	411	66.0	64.5	15.9

* F_0 : fluorescence of metal Schiff_base in the absence of DNA at λ_{ex1} ; F : fluorescence of metal Schiff_base in the presence of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ DNA at λ_{ex1}

2.2 UV 吸收光谱

化合物 1 的紫外- 可见光谱如图 3 所示, 由图 3 可见对于化合物 1, 随着 DNA 的加入, 其吸收光谱发生明显的减色效应, 同时其 234 nm 处的吸收峰有 2 nm 的微小紫移。 可能是因为化合物 1 的 $\pi - \pi^*$ 键与 DNA 的静电基团发生重叠, 使 UV 吸收光谱发生改变, 表明化合物 1 可能已嵌入 DNA 的碱基对中。

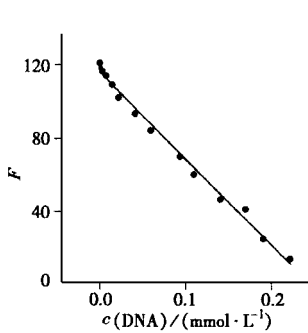


图 2 CTDNA 浓度对化合物 1 的荧光强度的影响
Fig. 2 Effect of concentration of CTDNA on fluorescence intensity

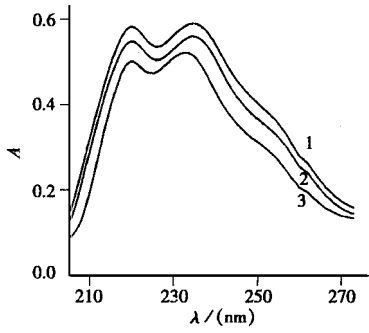


图 3 化合物 1 的紫外吸收光谱图
Fig. 3 UV absorption spectra of compound 1
concentration of DNA: 1. 0 mol/L; 2. 30 $\mu\text{mol/L}$;
3. 100 $\mu\text{mol/L}$; $c(\text{comp}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

2.3 变性 DNA 的影响

将天然的 DNA(dsDNA) 在 100 °C 的水浴中加热 15 min, 然后放入冰浴中迅速冷却, 再回复至室温, 即可得到变性 DNA(ssDNA)。天然 DNA 变性后, 其紧密堆积的两条链松散开来, 成为两条单链。在同浓度的化合物 1 溶液中分别加入不同量的 ssDNA 和 dsDNA, 记录它们各自的荧光值(见图 4)。由图 4 可知变性 DNA 和天然 DNA 都对化合物 1 的荧光有猝灭作用, 只是强度不同, 变性的 DNA 对化合物 1 的荧光猝灭作用减弱了。

2.4 pH 值的影响

以不同 pH 值的 BR 缓冲液配制相同浓度的化合物 1 溶液, 分别记录它们在有 DNA 和没有 DNA 存在的荧光强度。实验表明在 pH= 4~ 8 的范围内, 溶液 pH 值的改变对化合物 1 的荧光强度的影响较小, 而当 pH< 4 或 pH> 8 时, pH 值的影响较大, 但 pH 值的变化在整个 pH 范围内对化合物 1-DNA 体系的影响都较小。可能因为在低 pH 值的酸性条件下化合物 1 质子化, 而在高 pH 值的碱性条件下, 化合物 1 的 Mn^{2+} 与 OH^- 配位, 破坏了化合物 1 的结构, 从而使其荧光强度发生较大的变化。但在有 DNA 存在时, 由于化合物 1 嵌入 DNA 双链中受到磷酸骨架的保护, 受外界离子的影响变小, 所以 pH 值的改变对它影响较小。

2.5 KI 的猝灭实验

一些物质(如卤素离子、硝基化合物、重金属离子等等)可以使荧光猝灭。KI 是常用的荧光猝灭剂, 荧光猝灭实验可用 Stern-Volmer 方程来描述, 猝灭常数 K_s 用来衡量 KI 的猝灭速率。本实验通过在有 CTDNA 存在和无 CTDNA 存在的情况下, KI 对化合物 1 的荧光猝灭程度不同, 进一步论证化合物 1 与 DNA 的嵌入作用。图 5 是 KI 的猝灭实验曲线, 由图 5 可知化合物 1 的荧光强度随 KI 的增加而快速降低, 没有 DNA 存在时比有 DNA 存在时降得快, 它们的猝灭常数(K_s) 分别为 $94 L \cdot mol^{-1}$ 和 $61 L \cdot mol^{-1}$ 。这表明化合物 1 嵌入 DNA 双链中, 因受到磷酸基团的保护从而使荧光猝灭变慢。

2.6 EB 和化合物的竞争实验

EB 是一种具有平面结构、能与 DNA 双链发生嵌入作用的荧光染料, 它能插入到 DNA 双链的碱基对之间导致其荧光强度大大增强, 如果化合物与 DNA 发生类似的作用, 就会竞争其结合位点, 减弱 EB-DNA 体系的荧光, 通常以 $c(comp1)/c(DNA) < 100$ 为限, 荧光值减弱 50% 作为化合物是否与 DNA 作用的判据^[6]。由图 6 可知随化合物 1 浓度的增加 EB-DNA 荧光强度减弱, 当化合物 1 的浓度增至 $c(comp1)/c(DNA) = 31.84$ 时, 体系的荧光强度已降至 48.5%, 这表明化合物 1 嵌入到了 DNA 双链之间。

2.7 温度的影响

温度对物质的荧光强度有一定影响, 一般来说温度越高, 荧光强度越低。对化合物 1 而言随温度的升高

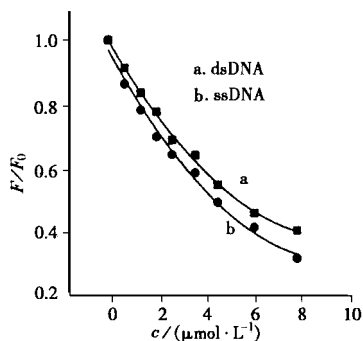


图 4 天然 DNA 和变性 DNA 对荧光光谱的影响
Fig. 4 Effect of dsDNA and ssDNA on the fluorescence intensity
 $c(comp1) = 10 \mu mol/L$

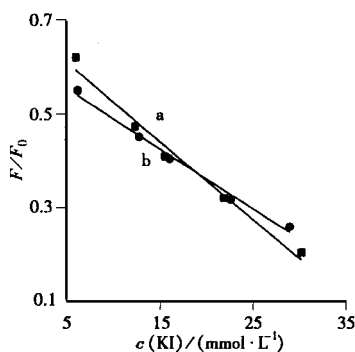


图 5 KI 对荧光强度的猝灭
Fig. 5 Effect of KI on fluorescence intensity
a. in the absence of DNA; b. in the presence of 30 mmol/L DNA; $c(comp1) = 10 \mu mol/L$

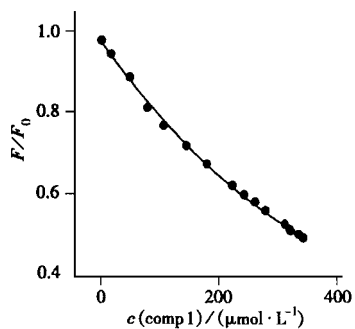


图 6 化合物 1 浓度对荧光强度的影响
Fig. 6 Effect of concentration of compound 1 on the fluorescence intensity for EB-DNA

荧光强度降低,但在化合物 1-DNA 体系中,随温度上升,体系荧光强度先升后降(图 7)。在较低温度下, DNA 双链堆积较为紧密,化合物 1 嵌入碱基对中,因而荧光强度较弱,随着温度升高, DNA 双链的堆积程度减弱,荧光强度增强。但当温度升至近 60 °C 时, DNA 双链几乎完全松散,变性 DNA 对化合物 1 的荧光猝灭保护作用减弱,因而该体系的荧光强度又降低。

3 结 论

金属离子对金属席夫碱荧光光谱的影响较小, Mn 席夫碱以嵌入作用模式与 CTDNA 有较强的作用,且与 DNA 浓度在 $3 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L 之间呈线性关系。Mn 席夫碱有可能成为一种新型荧光探针用于 DNA 的分析测定。

参考文献:

- [1] KUMAR C V, EMMA H A. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthry probe[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115(19): 8547- 8553.
- [2] YOUNGQUIST R S, DERVAN P B. Sequence-specific recognition of B DNA by bis(EDTA- distamycin) fumaramide[J]. J Am Chem Soc, 1985, 107(19): 5528- 5530.
- [3] MORROW J R, KOLOSA K. Cleavage of DNA by nickel complexes[J]. Inorg Chim Acta, 1992, (195): 245- 248.
- [4] SATO K, CHIKIRA M, FUJII Y, *et al.* Stereospecific binding of chemically modified salen type Schiff base complexes of copper (II) with DNA [salen= bis(salicylidene) ethylenediamine][J]. J Chem Soc Chem Commun, 1994, 198(5): 625- 626.
- [5] ANGYAL S J, MORRIS P J, TETAZ J R, *et al.* The sommelet reaction par III: The choice of solvent and the effect of substituents [J]. J Chem Soc, 1950, (3): 2141- 2145.
- [6] 叶 勇, 胡继明, 曾云鹏. 2-氯代苯甲醛丙氨酸席夫碱类抗癌药物对 DNA 作用的谱学研究[J]. 无机化学学报, 1998, 14(1): 84- 90.

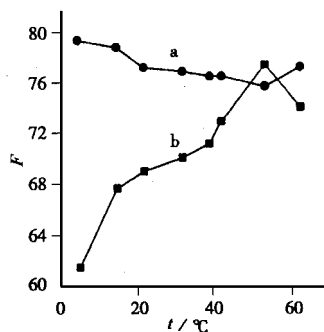


图 7 温度对荧光强度的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the fluorescence intensity
a. in the absence of DNA; b. in the presence of 30 μ mol/L DNA; c(comp1)= 10 μ mol/L

Fluorescence Analysis of Water_soluble Metal Complexes of Schiff_base with DNA

LIAO Jian_pei, LIU Guo_dong, HUANG Shan_sheng*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: The fluorescence spectral characteristics and interaction of Mn-, Ni-, Cu- metal complexes of *N, N'*-di-(5-triethyl aminomethyl-salicylidene)-ethylenediamine with DNA are described. Among the complexes tested, Mn- Schiff_base bound to DNA shows the most decrease fluorescence intensity with a little blue shift of excitation and emission peaks. KI quenching and competitive binding between Mn- Schiff_base and ethidium bromide for DNA were studied. The results showed that the interactive model Mn- Schiff_base and DNA was an intercalative one. The effect of pH and temperature on fluorescence were also investigated. A linear relationship between F/F_0 and concentration of calf thymus DNA covers a range of $3 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-4}$ mol/L. Mn- Schiff_base can be used for determining trace of calf thymus DNA as a new fluorescence probe.

Key words: Water_solubility; Metal Schiff_base; DNA; Intercalative interaction; Fluorescence spectrum

* Corresponding author