

## 蒽与 DNA 碱基胸腺嘧啶相互作用的分析\*

何盈盈<sup>1, 2\*\*</sup> 赵波<sup>2</sup> 王晓昌<sup>2</sup> 金鹏康<sup>2</sup>

(1 西安建筑科技大学理学院; 2 西安建筑科技大学环境与市政工程学院,  
西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安, 710055)

**摘 要** 利用紫外、红外和荧光光谱法研究 DNA 碱基胸腺嘧啶与蒽的相互作用以及由此引起的胸腺嘧啶结构变化。荧光猝灭实验测得二者的结合常数为  $9.6 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; 紫外差谱结果显示, 蒽与胸腺嘧啶的作用对共轭系统的  $\pi-\pi^*$  跃迁产生了影响; 蒽与胸腺嘧啶混合物的红外光谱显示胸腺嘧啶的 N-H 和 C=O 振动峰以及环的面外变形振动峰均发生位移, 表明二者之间可能以面对面相平行的方式发生了  $\pi-\pi$  电子给体受体作用, 作用结果导致胸腺嘧啶环上电子云密度增大。

**关键词** 蒽, 胸腺嘧啶。

多环芳烃经代谢后的亲电性产物与 DNA 碱基之间由于共价作用产生的加合物是引起 DNA 损伤的主要原因<sup>[1, 2]</sup>。但多环芳烃本身也与 DNA 碱基之间存在着相互作用并形成复合物<sup>[3]</sup>。Lianos 等<sup>[4]</sup>以芘为例, 发现芘可和核苷酸钠盐的碱基形成化学计量关系为 1:1 的复合物。Hossein 等<sup>[5]</sup>研究了蒽衍生物与 DNA 碱基之间的作用, 结果显示在 PAHs 与碱基之间生成了相当强的复合物。对多环芳烃与 DNA 碱基之间相互作用引起的碱基结构或电荷分布变化的研究, 为其致癌机理提供了参考。

本文选择蒽作为多环芳烃的模型物质, 以仅存在于 DNA 中的碱基胸腺嘧啶为研究对象, 用紫外、红外和荧光光谱法研究蒽与胸腺嘧啶的相互作用, 以及由此引起的胸腺嘧啶结构变化。

### 1 实验方法

称取 0.01g 蒽 (99%, Alfa Aesar 美国) 溶于 100mL 甲醇中, 取上清液, 得到蒽甲醇饱和溶液; 称取 0.0637g 胸腺嘧啶 (生物纯, 上海国药集团) 两份, 分别用 1:1 甲醇-水和纯水溶解, 定容于 250mL 容量瓶中, 配制成  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胸腺嘧啶储备液, 作为荧光和紫外实验的储备液。

**荧光猝灭实验** 用移液管分别量取  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胸腺嘧啶水溶液 0.4、0.8、1.6、2.4 和 3.2mL 置于 50mL 容量瓶中, 加入 1mL 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 用水稀释, 并用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值为 7.0 定容。分别用微量注射器向上述溶液中加入 20 $\mu\text{L}$  蒽甲醇储备液, 放入恒温水浴振荡器中振荡 30min, 用  $1 \times 1 \times 4 \text{ cm}$  石英比色皿在荧光光谱仪 (FP-650Q Jasco 日本) 测定荧光强度。激发和发射狭缝宽度为 10 nm, 固定激发波长 280 nm, 扫描范围 350—500 nm。测定时实验室温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

**紫外差光谱测量** 用移液管分别量取 0.8、2.4、4.0、5.6、7.2 和 8.8mL 的  $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胸腺嘧啶储备液, 置于 50mL 容量瓶中, 加入 1mL 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 用 1:1 甲醇-水稀释, 并用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值为 7.0 定容, 作为 A 组溶液。分别取上述 6 份溶液各 25mL 用微量注射器加入 10 $\mu\text{L}$  蒽甲醇储备液, 作为 B 组溶液。另外取 10 $\mu\text{L}$  蒽甲醇饱和溶液, 置于 25mL 1:1 甲醇-水中作为 B 组溶液的参比。将配好的溶液置于恒温水浴振荡器中振荡 30min 后, 分别以溶剂空白 (A 组溶液) 和蒽空白 (B 组溶液) 进行紫外光谱 (UV-1650PC, Shimadzu 日本) 扫描。将 B 组溶液的吸收光谱减去相应的 A 组溶液的吸收光谱, 得到不同浓度胸腺嘧啶与蒽作用的紫外差光谱。

**红外光谱测定** 取适量胸腺嘧啶和蒽固体分别用溴化钾压片法直接进行红外 (R Prestige-21, Shimadzu 日本) 测定, 另外, 将适量胸腺嘧啶和蒽混合研磨, 用溴化钾压片法进行红外测定, 从混合物的红外光谱中减去蒽的红外光谱, 得到胸腺嘧啶在与蒽作用后的红外光谱。以  $884.4 \text{ cm}^{-1}$  处峰的吸光度为参照计算浓度因子 (只有蒽在  $884.4 \text{ cm}^{-1}$  处有强吸收)。

2008 年 6 月 10 日收稿。

\* 陕西省教育厅专项基金 (06.K266) 资助。 \*\* 通讯联系人, Tel: 029-82207861, E-mail: heyinying@hotmail.com

## 2 荧光猝灭效应

荧光实验结果如图 1 所示, 胸腺嘧啶对蒽的荧光存在明显的猝灭效应, 说明二者之间存在相互作用. 380nm 处的荧光强度与胸腺嘧啶浓度之间满足 Stern-Volmer 方程:  $F_0/F = 9577 [Q] + 1.0$ , 其中,  $F_0$  为蒽的初始荧光强度,  $F$  为胸腺嘧啶存在时蒽的荧光强度,  $[Q]$  为胸腺嘧啶的浓度, 线性相关系数  $R = 0.996$ , 由斜率可得胸腺嘧啶与蒽的结合常数  $k = 9.6 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 高于相同方法测得的胸腺嘧啶与芘之间的结合常数<sup>[6]</sup>, 说明蒽与胸腺嘧啶之间的作用较强.

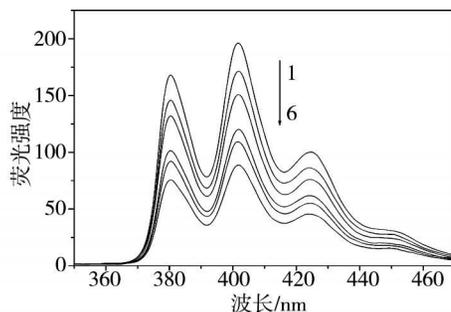


图 1 不同浓度胸腺嘧啶对蒽的荧光猝灭效应

胸腺嘧啶浓度 (1→6):  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $96 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $128 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 1 Fluorescence quenching spectra of anthracene

## 3 紫外光谱

胸腺嘧啶的紫外光谱如图 2 所示. 由图 2 可见, 胸腺嘧啶在 265nm 处出现强且宽的吸收峰, 对应于嘧啶环共轭体系的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁及  $n \rightarrow \pi^*$  跃迁. 图 2(a) 中虚线为蒽的紫外吸收光谱, 吸收峰位于 252nm 处, 对应于蒽的稠环共轭体系  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁. 当胸腺嘧啶和蒽同时存在时, 以相应浓度的蒽溶液为参比, 并在混合物光谱中减去相应的胸腺嘧啶光谱, 得到的差谱如图 2(b) 所示. 差谱中在 252nm 处出现一个负的峰, 随着嘧啶浓度从  $3.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $3.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 其强度随胸腺嘧啶浓度增大而增大, 表明蒽与胸腺嘧啶作用后引起了明显的减色效应. 减色效应被发现普遍存在于外来物质与核酸 DNA 的作用中, 通常被认为是外来物质进入 DNA 内部使得物质的疏水性增强引起的. 但在本文的实验条件下, 这种解释显然是不适用的. 嘧啶环中含两个氮原子, 属缺电子的杂芳环, 而蒽作为稠合芳环, 其电子云密度较大, 二者都是平面状分子, 分子间很可能发生  $\pi$ - $\pi$  电子给体受体作用. 差谱出现在 252nm, 应该是由  $\pi$ - $\pi$  电子给体受体作用干扰了  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁产生的, 是二者之间发生  $\pi$ - $\pi$  电子给体受体作用的佐证. 张新宇<sup>[6]</sup>等发现在芘与嘧啶碱基之间也存在这种作用.

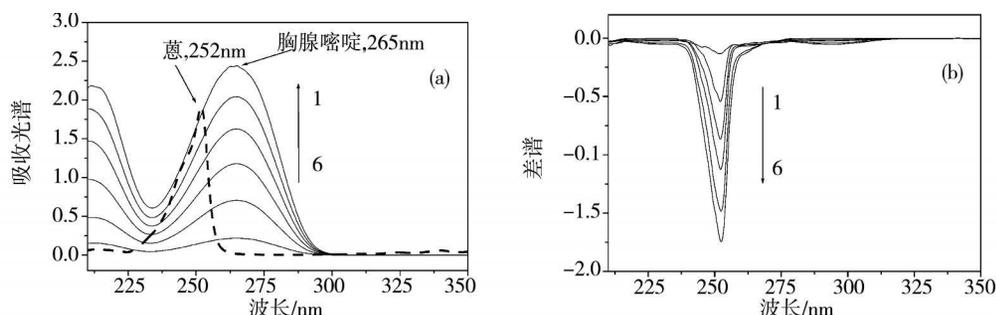


图 2 不同浓度胸腺嘧啶与蒽的紫外光谱图 (a) 和紫外差谱图 (b)

胸腺嘧啶浓度 (1→6):  $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $96 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $224 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $288 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $352 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig 2 UV absorption spectra of thymine and anthracene respectively (a) and UV difference spectra of the mixture (b)

## 4 红外光谱实验

尚志国等<sup>[7]</sup>曾对胸腺嘧啶的红外光谱进行了理论计算和实验验证, 得出了胸腺嘧啶的主要红外吸

收峰及其归宿. 图 3 的结果表明,  $3447\text{ cm}^{-1}$ ,  $3209\text{ cm}^{-1}$ 和  $3063\text{ cm}^{-1}$ 分别对应于胸腺嘧啶的  $\text{N}_1\text{-H}$ ,  $\text{N}_3\text{-H}$ 和  $\text{C}_6\text{-H}$  伸缩振动,  $1744\text{ cm}^{-1}$ 和  $1679\text{ cm}^{-1}$ 分别由  $\text{C}_2=\text{O}$ 和  $\text{C}_4=\text{O}$ 的伸缩振动引起,  $1449\text{ cm}^{-1}$ 为  $\text{N}_1\text{-H}$ 的弯曲振动峰,  $1246\text{ cm}^{-1}$ ,  $1215\text{ cm}^{-1}$ ,  $815\text{ cm}^{-1}$ 和  $560\text{ cm}^{-1}$ 为环的面内变形振动吸收,  $1030\text{ cm}^{-1}$ ,  $984\text{ cm}^{-1}$ ,  $839\text{ cm}^{-1}$ 和  $759\text{ cm}^{-1}$ 为环的面外变形振动吸收. 当蒽存在时, 胸腺嘧啶红外光谱中的部分吸收峰发生变化.  $\text{N}_1\text{-H}$ 和  $\text{N}_3\text{-H}$ 的  $3447\text{ cm}^{-1}$ ,  $3209\text{ cm}^{-1}$ ,  $1449\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰以及  $\text{C}_2=\text{O}$ 和  $\text{C}_4=\text{O}$ 的  $1744\text{ cm}^{-1}$ ,  $1679\text{ cm}^{-1}$ 伸缩振动峰均明显向低波数移动, 环的面外变形振动吸收  $1030\text{ cm}^{-1}$ ,  $984\text{ cm}^{-1}$ ,  $839\text{ cm}^{-1}$ 和  $759\text{ cm}^{-1}$ 也有明显位移. 实验说明, 蒽与胸腺嘧啶的作用引起了胸腺嘧啶共轭大  $\pi$  系统振动峰的变化, 尤其是使环的面外变形振动以及电子云密度相对集中的氮原子和氧原子的运动受到干扰, 而环的面内变形几乎不受影响, 这应该是两个环平面以面对面平行的方式发生  $\pi\text{-}\pi$  电子给体受体作用的结果. 这种  $\pi\text{-}\pi$  电子给体受体作用使得胸腺嘧啶的电子云密度增加, 其中使得氮原子和氧原子的负电荷更为集中, 双键性降低, 吸收波数减小. 已有研究表明, DNA 加合物多数发生在外来亲电性物质与嘌呤或嘧啶碱基的氧、氮原子上<sup>[8-9]</sup>, 因此, 胸腺嘧啶氮原子和氧原子电荷分布的变化有可能对胸腺嘧啶与外来亲电性物质之间的共价作用产生影响. 从这个角度而言, 蒽虽然被认为是不具有致癌性的多环芳烃, 但它与胸腺嘧啶之间的非共价作用却可能影响其它亲电性致癌物质 DNA 加合物的生成.

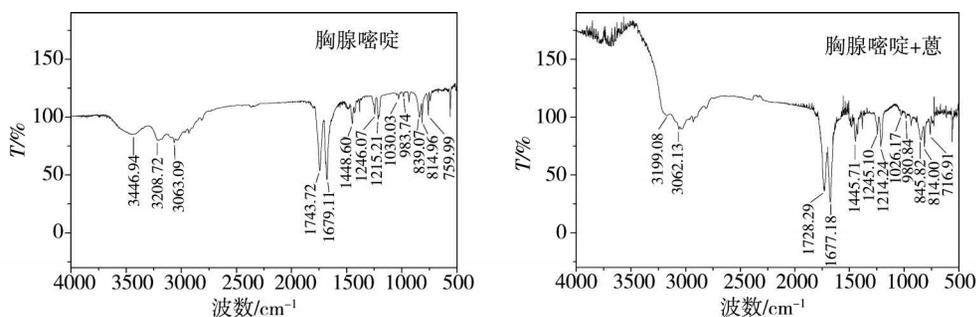


图 3 胸腺嘧啶与蒽作用前后的红外光谱

Fig 3 R spectra of thymine before and after interaction with anthracene

综上所述, 蒽与胸腺嘧啶之间存在较强的相互作用, 作用本质为蒽平面与胸腺嘧啶平面以面对面平行的方式产生的  $\pi\text{-}\pi$  电子给体受体作用, 作用结果导致胸腺嘧啶环上电子云密度增大, 尤其是使得胸腺嘧啶环上氮原子和氧原子的负电荷更为集中. 胸腺嘧啶电荷分布的变化有可能影响胸腺嘧啶与外来亲电性物质之间发生共价作用, 有可能为研究多环芳烃的致癌机理以及多环芳烃的协同致癌作用提供参考.

### 参 考 文 献

- [1] Dipple A, DNA Adducts of Chemical Carcinogens. *Carcinogenesis*, 1995, **16**: 437-441
- [2] 张立金, 闵顺耕, 赵慈等, 光谱法研究甲萘威与 DNA 的相互作用. *环境化学*, 2004, **23** (5): 520-524
- [3] Geacintov N E, Prusk T, Khosrofiar JM, Properties of Benzo[a]pyrene-DNA Complexes Investigated by Fluorescence and Triplet Flash Photolysis Techniques. *Journal of American Chemical Society*, 1976, **98** (21): 6444-6452
- [4] Lianos P, Georghiou S, Complex Formation between Pyrene and the Nucleotides GM P, CMP, TMP and AMP. *Photochemistry and Photobiology*, 1979, **29** (1): 13-21
- [5] Sharifian H A, Pyun C H, Jiang F B et al., Interactions of Several Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with DNA Base Molecules Studied by Absorption Spectroscopy and Fluorescence Quenching. *Journal of photochemistry*, 1985, **30**: 229-244
- [6] 张新宇, 金声, 明阳福等, 水溶液中芘的荧光被核酸碱基猝灭的研究. *感光科学与光化学*, 1994, **12** (4): 353-357
- [7] 尚治国, 白莹, 张燕珂, 胸腺嘧啶振动光谱的 DFT 理论研究及与实验结果的比较. *光谱学与光谱分析*, 2005, **25** (12): 2005-2008
- [8] 裘著蕃, 戴树桂, 张林等, 应用紫外及荧光光谱法研究三种醛类污染物对牛磺 DNA 的损伤作用. *环境化学*, 1999, **18** (5): 453-457
- [9] Farmer P B, Carcinogen Adducts Use in Diagnosis and Risk Assessment. *Clinical Chemistry*, 1994, **40** (7): 1438-1443

## STUDY ON THE BINDING MODE OF THYMINE WITH ANTHRACENE

HE Ying-ying<sup>1, 2</sup> ZHAO Bo<sup>2</sup> WANG Xiao-chang<sup>2</sup> JIN Peng-kang<sup>2</sup>

(1 School of Science Faculty of Chemistry, 2 School of Environmental and Municipal Engineering  
Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

### ABSTRACT

The interaction of anthracene with thymine, a base only existing in DNA, was studied by using the methods of fluorescence quenching, UV absorption spectra and IR spectra. As a result, a linear Stern-Volmer plot was obtained from fluorescence quenching and the binding constant was calculated as  $9.6 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ . From the UV difference spectra, it was understood that the  $\pi-\pi^*$  transition was disturbed by the interaction between anthracene and thymine in the conjugated system, and from the IR spectra of the mixture, it was noticed that the peak position with respect to pure thymine shifted at the absorption bands of N—H, C=O and the out-of-plane deformation bands of the ring. It could thus be concluded from these results that charge transfer interaction of face-to-face geometry occurred between the two  $\pi$  systems, and this eventually brought about an increase of the electron cloud density of thymine.

**Keywords** anthracene, thymine