

金属钴树状高分子与 DNA 相互作用的光谱法研究

李金焕, 艾仕云*, 时伟杰, 殷焕顺, 杜红霞

山东农业大学化学与材料科学学院, 山东 泰安 271018

摘要 通过氯化钴、乙二醛和第五代树状高分子反应合成了金属钴树状高分子配合物。并以亚甲基蓝为荧光探针, 通过紫外-可见光谱、荧光光谱和同步荧光方法研究了金属钴树状高分子配合物与鲱鱼精 DNA (hsDNA) 的相互作用。结果显示, 此配合物与 hsDNA 作用时, 其紫外吸收产生明显增色效应, 荧光强度增强。NaCl 不同程度抑制金属钴树状高分子与 hsDNA 的结合。配合物也以竞争方式抑制亚甲基蓝与 hsDNA 作用, 而亚甲基蓝可以插入金属钴树状高分子配合物的内部。这些结果证明, 配合物主要通过与 hsDNA 链上带负电荷的磷酸基静电相吸形式结合而堆积在双螺旋 hsDNA 分子表面, 减弱了结合位点附近亚甲基蓝分子与 hsDNA 的静电作用, 而钠离子中和了 hsDNA 上磷酸基团上的负电荷, 削弱了该配合物与 hsDNA 的静电结合。

关键词 金属钴树状高分子; DNA; 相互作用; 光谱法

中图分类号: O641.4, O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)03-0726-04

引言

近年来, 基因治疗是公认的高效、经济的疾病治疗途径。DNA 和金属配合物及药物分子的相互作用研究^[1], 不仅能探索开发新的核酸探针, 而且有利于从分子水平上了解药物的作用机制, 为设计临床上更为有效的药物提供理论指导。席夫碱及其金属配合物由于与 DNA 的作用而具有良好的抗肿瘤、抗病毒活性, 是一类较好的抗癌药物, 同时, 席夫碱的配合物在生理和药理上也具有特殊的活性^[2,3], 对其与 DNA 作用的研究也正日益受到人们的重视^[4-7]。另外, 在研究配合物与 DNA 的相互作用时, 一般多采用溴化乙啶 (EB) 作荧光探针的荧光法。此法虽然较为灵敏, 但荧光探针 EB 具有强致癌性并且具有一定的局限性^[8,9], 而亚甲基蓝是一类光敏性药物分子, 能与 DNA 以嵌插和静电方式结合, 常作为生物染料和光谱探针^[10]。树状高分子具有精确纳米构造, 表面高官能团密度, 分子大小、形状可控的三维结构, 良好的单分散性, 高对称性和生物相容性等特性使其在医学和生物学领域得到广阔的发展^[11,12]。本文合成了一种既具有树状高分子特性又具有席夫碱配合物性质的金属钴树状高分子 (记为 PAMAM-Co), 并选用亚甲基蓝 (MB) 为荧光探针研究了 PAMAM-Co 与 DNA 的相互作用, 为探索新的基因

治疗药物的研究提供了依据。

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

鲱鱼精 DNA (生化试剂, 美国 Sigma 公司, 于 4℃ 保存备用); 亚甲基蓝 (生物染料剂, 天津市天新精细化工开发中心); 5.0 G PAMAM 按照文献^[13,14]合成, 实验用水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。PHS-3CT 型精密 pH 计 (上海大中分析仪器厂); Vario EL 型元素分析仪 (德国 Elementar); UV-2450 紫外分光光度计 (日本岛津); RF-5301PC 荧光分光光度计 (日本岛津)。

1.2 金属钴树状高分子的合成与表征

15 mL 氯化钴溶液 ($3.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加入 7 mL 乙二醛水溶液 (14%), 60℃ 氮气保护下搅拌反应 2 h。然后在 1 h 内滴加 5 mL 20% 的 PAMAM 甲醇溶液, 控制温度 60℃ 搅拌反应 74 h, 溶液慢慢由亮紫色变成黑红色。将所得溶液采用 8000-14400 透析袋依次用 6 × 500 mL 的去离子水、4 × 500 mL 的 0.1 mol · L⁻¹ NaCl、6 × 500 mL 的去离子水透析。透析液用硝酸银检验至无氯离子存在。冷冻、干燥得到棕色絮状目标产物, 其结构式见图 1。

由 FTIR 数据看出, 3 432 和 3 429 cm⁻¹ 处为伯胺和仲胺

收稿日期: 2007-11-12, 修订日期: 2008-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20775044) 和山东省自然科学基金项目 (Y2006B20) 资助

作者简介: 李金焕, 女, 1982 年生, 山东农业大学化学与材料科学学院硕士研究生 e-mail: lijih@163.com

*通讯联系人 e-mail: ashy@sdau.edu.cn

NH 伸缩振动峰, $1\ 654\ \text{cm}^{-1}$ 为 —C=N— 振动峰, $1\ 560\ \text{cm}^{-1}$ 为 —CONH— 中的 NH 伸缩振动峰, $563\ \text{cm}^{-1}$ 为 Co—N 的振动峰。元素分析结果(%, 计算值)为 C: 47.20(46.30), N: 16.27(16.61), H: 7.27(7.38)。

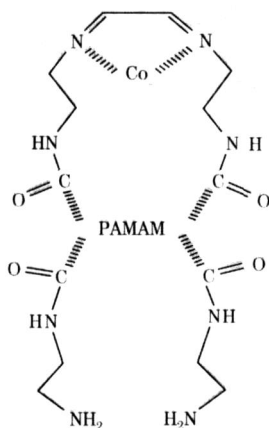


Fig 1 Structure of $\text{Co}(\text{II})[\text{PAMAM-gly}]$

1.3 紫外-可见吸收光谱分析

向含有 $3.04 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hsDNA 的 Tris-HCl 缓冲溶液及含有 $4.08 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MB 和 $2.78 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hsDNA 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 分别加入不同浓度的 PAMAM-Co 溶液, 分别于 $200 \sim 400\ \text{nm}$, $500 \sim 800\ \text{nm}$ 波长范围内室温下测定各自的吸光度。

1.4 荧光光谱与同步荧光分析

向含有 $4.08 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MB 和 $2.78 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hsDNA 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 加入不同浓度的金属钴树状高分子 PAMAM-Co 溶液, 用激发波长为 $630\ \text{nm}$, 室温下测定各自的荧光光谱和同步荧光光谱 ($\lambda = 15\ \text{nm}$)。

2 结果与讨论

2.1 PAMAM-Co 配合物对 DNA 紫外吸收光谱的影响

图 2 为 PAMAM-Co 配合物对 DNA 紫外吸收光谱的影响。由图可知, 随着配合物的不断加入, 其 $260\ \text{nm}$ 紫外吸收增大, 峰位置不变, 增色效应表明配合物和 DNA 有很强作用。

2.2 PAMAM-Co 配合物对 DNA-MB 的紫外-可见光谱影响

由图 3 可以看出, 亚甲基蓝水溶液在 $600 \sim 700\ \text{nm}$ 范围分别存在其二聚体 $618\ \text{nm}$ 的吸收和单体的 $664\ \text{nm}$ 吸收宽峰, 当向 MB 溶液中逐渐加入 DNA 时, MB 的吸收光谱呈明显减色效应。减色现象表明嵌入生色团电子态与 DNA 发生了强的相互作用^[15, 16], 由于电子间作用的强度随着生色团与 DNA 碱基间的空间距离增大而减弱, 明显的减色现象表明 MB 位于 DNA 碱基附近^[15]。

MB 与 DNA 发生嵌插作用。与热变性 ssDNA 相比较, dsDNA 对 MB 的减色效应较大。随着配合物的不断加入, MB-DNA 体系的吸收强度逐渐增大。在 pH 7.3 的环境中, 配合物会由于末端呈正电荷, 与 DNA 上的磷酸基团发生静电作用, 使得部分结合的 MB 游离出来。当配合物的浓度在

$0 \sim 9\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 体系的吸光度随着配合物浓度的增大而增大, 说明形成的 DNA 与 PAMAM-Co 复合物对体系有增色效应。但继续增大配合物浓度, 体系吸光度有所减小, 这可能是游离的 MB 进入配合物的空腔, 体系吸光度减小。

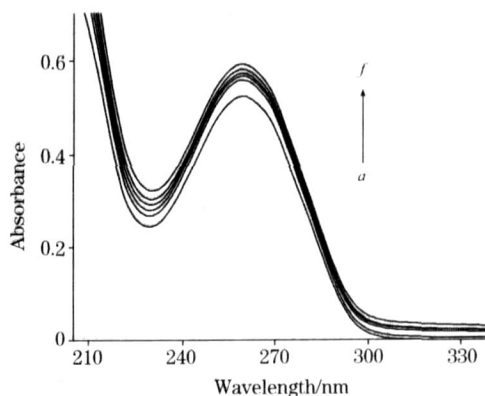


Fig 2 Absorption spectra of hsDNA in the presence of the increasing amounts of PAMAM-Co concentrations in Tris-HCl buffer solution

Line *a-f* represent PAMAM-Co concentrations of 0, 1.5, 4.5, 7.5, 10.5, 13.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; hsDNA: $3.04 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.3

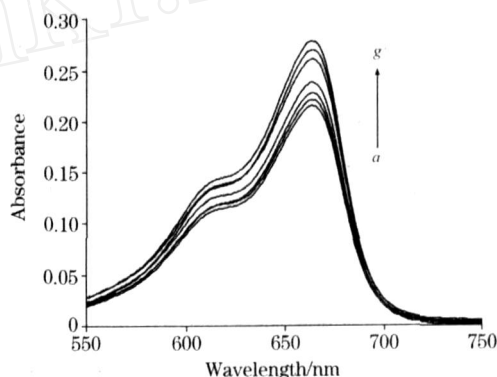


Fig 3 Absorption spectra of the MB-hsDNA complexes in the presence of the increasing amounts of Cobalt(II) polyamidomine dendrimer concentrations in aqueous solution

Lines *a, g* represent Cobalt(II) polyamidomine dendrimer concentrations of 0, 0.6, 1.5, 3, 6, 9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; Line *f* is the absorption spectrum of pure MB in aqueous solution. $c(\text{MB})$: $4.08 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (hsDNA): $2.78 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.3

2.3 PAMAM-Co 配合物对 DNA-MB 的荧光光谱影响

选择以 $\lambda_{\text{ex}} = 664\ \text{nm}$ 为激发波长时, MB 和 MB-DNA 的荧光光谱峰在 $680\ \text{nm}$, 两者距离太近, 选 $\lambda_{\text{ex}} = 630\ \text{nm}$ 为激发波长以便于观察。在水溶液中配合物的荧光很微弱, 对 MB 的荧光光谱无影响。但随着配合物的加入 MB-DNA 体系的荧光增强, 如图 4 中曲线 a 所示。荧光增强的原因是溶液中游离的 MB 量增加, 进一步表明 PAMAM-Co 与 DNA 作用可使结合到 DNA 上的少量 MB 游离出来, 导致体系荧光增强。当 PAMAM-Co 的浓度达 $10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的荧光

强度最大。再继续增大配合物浓度,少量游离的 MB 进入配合物的空腔中,导致体系的荧光有所降低。与吸收光谱的分析结果一致。

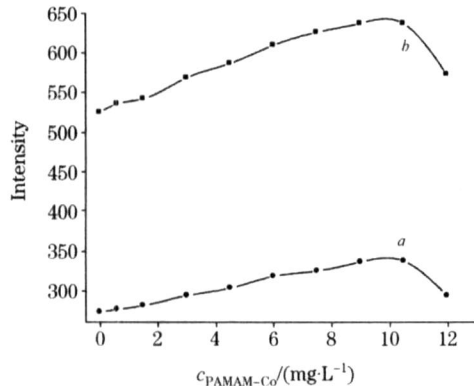


Fig 4 Effect of PAMAM-Co on the fluorescence spectra intensity of MB-DNA

a: Effect of fluorescence spectroscopy;

b: Effect of synchronous fluorescence spectroscopy

基于散射光的干扰,实验研究了 MB-DNA 体系和配合物存在下 MB-DNA 体系的同步荧光光谱。波长差 $\lambda = 15$ nm, MB, MB-DNA 和配合物存在下的 MB-DNA 体系的同步荧光光谱谱峰都在波长 679 nm 处,且峰最窄。随着加入不同浓度配合物的 MB-DNA 体系荧光变化规律,如图 4 中曲线 b 所示。配合物浓度低时,配合物的加入使得 MB-DNA 体系的同步荧光强度增大。与荧光光谱的分析结果一致。

2.4 配合物对 MB 与 DNA 结合的影响

图 5 为不同浓度的金属钴树状高分子 PAMAM-Co 对 DNA 上结合 MB 的分子数 (r) 的影响。 r 为 DNA 上平均每个核苷酸结合 MB 的分子数 $r = \frac{c_b}{[DNA]}$, c_b 表示结合的 MB 浓度。分别以不同的 z ($z = [DNA]/[MB]$) 作为研究对象,考察了配合物对 DNA 上结合 MB 的分子数 (r) 的影响。由图 5 可知,配合物的存在不同程度地影响了 MB 与 DNA 的结合。研究表明, z 较低时,MB 与 DNA 之间以静电结合为主,而当 z 较高时,MB 倾向于与 DNA 碱基发生嵌插结合^[10]。当 $z = 2.5$ 时, r 随着配合物浓度的增加而明显减小,而 $z = 14.6$ 时,随着配合物的浓度增加 r 减小缓慢。结果表明 z 较低时 PAMAM-Co 通过静电作用与 DNA 骨架上带负电荷的磷酸根结合,减弱了 MB 与 DNA 之间的静电作用使部分结合的 MB 游离出来;而当 z 较高时,配合物不是以单纯的静电或嵌插作用的方式,而是以一种较复杂的混合作用与 DNA 分子结合,对嵌入到 DNA 双螺旋结构中的 MB 影响较小。

2.5 离子强度对金属钴树状高分子与 hsDNA 作用的影响

在含 NaCl 的 DNA-MB 体系中逐渐加入 PAMAM-Co 溶液时,体系相对荧光强度 F/F_0 (F_0 为未加入配合物的 DNA-MB 体系荧光值, F 为加入配合物的 DNA-MB 体系的荧光值)对配合物浓度 c (PAMAM-Co) 作图均应得到一条直线,如图 6 所示。NaCl 的存在不同程度地抑制了金属钴树状高

分子对 DNA-MB 体系的荧光增强。当 $c(\text{NaCl}) > 0.004 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DNA-MB 体系的荧光强度随配合物 PAMAM-Co 浓度的增加基本不变,高浓度 Na^+ 中和了部分 DNA 表面的磷氧负离子导致 DNA 分子收缩^[17],从而减少了 DNA 与 MB 的作用位点,MB 主要以游离态存在。因此,即使加入较大量配合物对 MB 荧光强度的影响也不明显,说明 DNA 与配合物之间以静电作用为主。

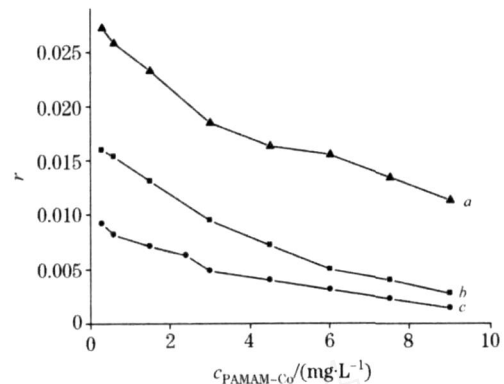


Fig 5 Number of MB bounding to DNA as a function of PAMAM-Co concentrations in Tris-HCl buffer solution

a: $z = 2.5$; b: $z = 6.8$; c: $z = 14.6$; $z = [DNA]/[MB]$

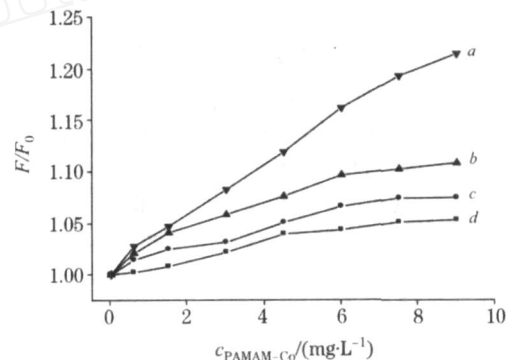


Fig 6 Effect of NaCl on the intensity of MB-DNA with increasing concentration of PAMAM-Co in Tris-HCl buffer solution

Lines a-d represent the sodium chloride concentration of 0, 0.001, 0.002, 0.004 mol \cdot L⁻¹, respectively; MB: $4.02 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; hsDNA: $2.73 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.3

3 结论

用光谱法研究了金属钴树状高分子配合物与 hsDNA 的作用。结果表明, PAMAM-Co 配合物主要通过与其与 hsDNA 链上带负电荷的磷酸基静电相吸形式结合而堆积在双螺旋 hsDNA 分子表面,减弱了结合位点附近亚甲基蓝分子与 hsDNA 的静电作用。NaCl 对配合物与 hsDNA 之间的结合具有显著的抑制作用。本文的探究为从分子水平上探讨配合物与 DNA 作用机制提供了有价值的信息。

参 考 文 献

- [1] Kemr C V, Emma H A. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115: 8547.
- [2] Adsule S Barve V, Chen Dahmed F, Dou Q P Padhye S, et al. J. Med. Chem., 2006, 49(24): 7242.
- [3] Zhong X, Yi J, Sun J, et al. Eur. J. Med. Chem., 2006, 41(9): 1090.
- [4] SHEN Jing-shan, SUN Dan-dan, FU Lian-chun, et al (沈景山, 孙丹丹, 付连春, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 232.
- [5] Wang B D, Yang Z Y, Wang Q, et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2006, 14: 1880.
- [6] YANG Hao(杨 浩). Chemical Research in Chinese Universities(高等学校化学学报), 2007, 28(5): 872.
- [7] Monica R P, Tania G, Encarnacion L, et al. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(11): 2675.
- [8] WANG Yan-ming, SONG Yu, KONG De-ling, et al(王燕铭, 宋 瑜, 孔德领, 等). Chinese Science Bulletin(科学通报), 2005, 50(13): 1323.
- [9] WANG Ping-hong, ZHANG Qi, WANG Liu-fang, et al(王平红, 张 岐, 王流芳, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 941.
- [10] Hu Z, Tong C L. Analytica Chimica Acta, 2007, 587: 187.
- [11] Luo D, Haverstick K, Belcheva N, et al. Macromolecules, 2002, 35(9): 3456.
- [12] Su C J, Liu Y C, Chen H L, et al. Langmuir, 2007, 23(3): 975.
- [13] Tomalia D A, Dewald J R. US Patent, 4568737, 1986.
- [14] WANG Jun, YANG Jin-zong, CHEN Hong-xia, et al(王 俊, 杨锦宗, 陈红侠, 等). Chinese Journal of Synthetic Chemistry(合成化学), 2001, 9(1): 62.
- [15] Long E C, Barton J K. Acc. Chem. Res., 1990, 23(9): 271.
- [16] Cantor C, Schimmel P R. Biophysical Chemistry, 1980, 2: 398.
- [17] GUO Mao-lin, YANG Pin, YANG Bin-sheng, et al(郭茂林, 杨 频, 杨斌盛, 等). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1995, 40(13): 1187.

Study on the Interaction of Cobalt() Polyamidomine Dendrimer with DNA by Spectrometry Techniques

LI Jin-huan, AI Shi-yun*, SHI Wei-jie, YIN Huan-shun, DU Hong-xia

College of Chemistry and Materials Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract Cobalt() polyamidomine dendrimer was prepared by the reaction of cobalt chloride, glyoxal and polyamidomine dendrimer of 5.0 generation. The interaction of cobalt() polyamidomine dendrimer complex with herring sperm (hsDNA) was carried out using methylene blue (MB) as the probe molecule by absorption and fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. The results showed that the intensity of absorption peaks and fluorescence peaks increased when the complex interacted with hsDNA. The effect of sodium chloride showed that sodium ion can significantly constrain the interaction of cobalt() polyamidomine dendrimer with hsDNA. The curves indicated the competitive inhibition of MB binding to hsDNA in the presence of cobalt() polyamidomine dendrimer complexes, also MB could insert into interior of cobalt() polyamidomine dendrimer complexes. The results suggested that the complex mainly interacted with negatively charged phosphate moieties on hsDNA through electrostatic attraction and stacked on the surface of double stranded hsDNA, which may reduce the binding affinity of MB to hsDNA in the surrounding site. It was indicated that sodium ion might neutralize the negatively charged phosphate backbone of hsDNA, and then weaken the electrostatic attraction between complexes and hsDNA.

Keywords Cobalt() polyamidomine dendrimer; DNA; Interaction; Spectrometry

*Corresponding author

(Received Nov. 12, 2007; accepted Feb. 16, 2008)