

水溶性阳离子卟啉与 ctDNA 的相互作用及其聚集行为研究

马洪敏, 陈欣, 孙舒婷, 张丽娜, 吴丹, 朱沛华, 李燕, 杜斌*, 魏琴

济南大学化学化工学院, 山东 济南 250022

摘要 水溶性阳离子卟啉作为多功能 DNA 结合试剂在光动力学疗法、抗病毒药物等方面得到了越来越多的应用, 因此研究阳离子卟啉与 DNA 的相互作用引起人们极大的兴趣。文章采用吸收光谱、荧光光谱和共振光散射技术研究了 *meso*-四(4-三甲胺基苯基)卟啉(TMAP)和 5-苯基-10, 15, 20-三(N-甲基-4-吡啶基)卟啉(TriMPyP)两种水溶性阳离子卟啉在水溶液中的聚集状态及与小牛胸腺 DNA(ctDNA)的相互作用。在 $R > 1$ 时($R = c_{\text{TMAP}}/c_{\text{DNA}}$), TMAP 在 DNA 分子表面发生聚集, 吸收光谱有明显的减色效应, 卟啉的荧光被猝灭。在 $R < 1$ 时, TMAP 与 DNA 以外部结合方式结合, 荧光得到增强, 共振光信号减弱。DNA 的加入, 使 TriMPyP 的聚集程度进一步增加。考察了离子强度对卟啉与 DNA 相互作用的影响, 离子强度增大, 卟啉的荧光得到增强, 卟啉与 DNA 的结合方式发生改变。

关键词 阳离子卟啉; ctDNA; 相互作用; 聚集

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0423-05

引言

水溶性阳离子卟啉不但可以作为核酸、蛋白质的结构和动力学探针^[1], 而且在光动力学疗法^[2]、病毒抑制^[3]、人工核酸酶^[4]等方面都有潜在的应用, 因此水溶性阳离子卟啉及其金属配合物与 DNA 的相互作用是多年来人们感兴趣的问题。一般认为阳离子卟啉与 DNA 主要有三种结合方式: 插入到碱基对之间、沟槽结合和外部自堆积结合^[5]。卟啉的结构、DNA 碱基组成以及卟啉与 DNA 的相对浓度决定了两者之间的结合方式, 同时其稳定性受静电作用、范德华力、疏水作用以及空间张力等因素的影响。卟啉自身的聚集状态也将影响其与 DNA 的相互作用。阳离子卟啉中研究最多的是 *meso*-四(N-甲基-4-吡啶基)卟啉(TMPyP)及其衍生物^[6, 7]。*meso*-四(4-三甲胺基苯基)卟啉(TMAP)与 DNA 的相互作用近年来也有报道^[8, 9], 但研究结果并不一致, 并且对具体的结合方式等仍不能确定。近来已发现三价阳离子卟啉 5-苯基-10, 15, 20-三(N-甲基-4-吡啶基)卟啉(TriMPyP)对白色念珠菌等有很好的光灭活作用^[10], 但关于其与 DNA 相互作用的报道较少^[11]。本文采用吸收光谱法、荧光光谱法和共振光散射法研究了 TMAP 和 TriMPyP 两种阳离子卟啉(结构如图 1 所示)与小牛胸腺 DNA(ctDNA)的相互作用, 重点考察

卟啉聚集行为的变化。同时本文用光谱软件将吸收光谱进行解析, 定量分析了不同 DNA 浓度下卟啉结合方式的分布情况。

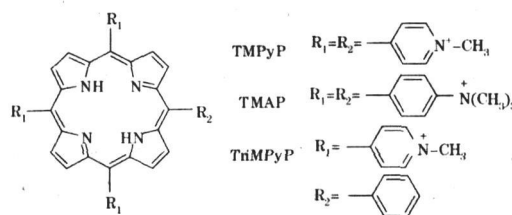


Fig 1 Structures and abbreviations of cationic porphyrins

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Lambda 35 紫外-可见分光光度计(美国 Perkin Elmer); LS 55 荧光光度计(美国 Perkin Elmer); PHS 3C 型精密 pH 计(上海雷磁)。

ctDNA(Sigma)用二次水配制成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 于 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 保存, 其浓度由 $\epsilon_{260} = 1.31 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算得到。TMAP 和 TriMPyP 按文献方法合成, 溶于二次水配成溶液, 其浓度分别由 $\epsilon_{413} = 4.16 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[12] 和 $\epsilon_{20} = 1.58 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[10] 计算得到。用混合磷酸

收稿日期: 2007-10-16, 修订日期: 2008-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577016)和山东省自然科学基金项目(Y2006B36, Y2008B44)资助

作者简介: 马洪敏, 1982 年生, 济南大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: mahongmin2002@126.com

* 通讯联系人 e-mail: sdjndb@263.net

盐缓冲溶液控制溶液的酸度, pH 为 6~8。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

吸收光谱的测量采用 1 cm 石英比色皿, 扫描范围为 350~700 nm, 狭缝 2.0 nm。荧光光谱测量采用 R928 红敏光电倍增管 (Hamamatsu), 扫描范围为 600~750 nm, 扫描速度为 $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。共振光散射在荧光光度计上以 $\Delta\lambda=0$ 同步扫描模式进行。吸收光谱使用 PeakFit 软件 (V4.12, Searsolve) 自动拟合功能进行解析。

2 结果与讨论

2.1 卟啉在溶液中的聚集状态

由于卟啉具有大的共轭体系, 在水溶液中可以通过范德华力形成分子聚集。对于水溶性卟啉, 阴离子卟啉如 TSP₄ 等在中性水溶液中以二聚体形式存在, 并已被很多光谱法所证明, 但关于阳离子卟啉在水溶液中的聚集状态却有很大争议。研究最多的 TMPyP 曾被报道在水溶液中以二聚体形式存在^[13], 二聚体模型提出后, 人们对 π - π 堆积作用能否克服正电荷在卟吩环上离域产生的静电斥力表示怀疑, 后来研究表明电荷离域阻碍了卟啉二聚体的形成, TMPyP 在水溶液中以单体形式存在^[14]。TMAP 在水溶液中一般也认为以单体形式存在^[13], 尽管正电荷不能在大环上离域, 但外围基团体积较大, 空间阻碍较大, 限制了聚集体的形成。由吸收光谱 (图略) 可以看出, TMAP 最大吸收峰位于 413 nm, 呈现出与有机溶剂中单体相似的光谱特征, 同时也没观察到强的共振光散射信号。与 TMAP 相比, TriMPyP 的吸收光谱强度较弱, 最大吸收峰位于 420 nm, 峰型变宽, 在 445 nm 处有肩峰出现, 说明部分 TriMPyP 在水溶液中以聚集形式存在, 同时强的共振光散射信号说明有高级聚集体的存在。这可能是由于分子结构的不对称性, 在静电斥力的作用下分子发生扭曲所致^[15], 与最小能量立体构型优化结果一致 (Chem3D, Mopac)。

2.2 卟啉与 DNA 的相互作用

不同 DNA 浓度下 TMAP 和 TriMPyP 吸收光谱如图 2 所示。随着 DNA 的加入, TMAP 吸收光谱发生明显的减色效应, 并略有红移, 当 DNA 的加入量为 $2.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 即 $R \approx 1$ 时 ($R = c_{\text{TMAP}}/c_{\text{DNA}}$), 最大吸收峰位于 416 nm, 红移约 3 nm, 减色达 36%, 同时 Q 带也有明显红移。吸收光谱的扰动说明 TMAP 与 DNA 发生了结合作用, 但在这个过程中没有出现文献提到的等吸收点^[8], 说明两者之间不是简单的结合, 强的减色效应表明卟啉的 π 电子体系受到了微扰。当 DNA 浓度为 $4.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 开始出现新的吸收峰, 最大吸收峰位于 420 nm, 红移约 7 nm。随 DNA 浓度的进一步增加 (R 减小), 吸光度开始增加, 同时伴有轻微的蓝移, 当 DNA 浓度为 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R \approx 0.04$) 时, 吸收峰强度基本保持不变。与 TMAP 相似, 加入 DNA 后, TriMPyP 的吸收光谱发生减色现象, 峰位红移, 同时 Q 带也发生红移, 当 DNA 的浓度为 $3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($R \approx 1$) 时, 减色达 15%。随 DNA 浓度的增加, 吸光度略有增加, 峰位进一步红移。与

TMAP 不同的是, TriMPyP 的吸收光谱没有明显的增色现象, 但红移程度大, 同时峰型变宽。插入图为不同 DNA 浓度下 TriMPyP 的吸收光谱 Soret 带解析结果相对浓度的变化情况。

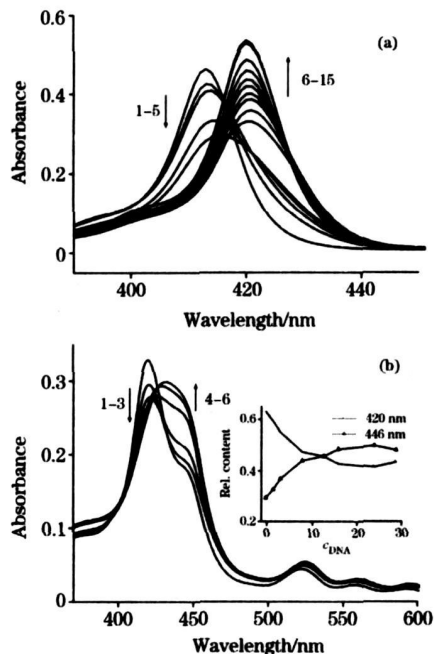


Fig 2 Absorption spectra of porphyrin solutions with different DNA concentrations

(a): $c_{\text{TMAP}} = 2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of DNA from 1 to 15: 0, 0.8, 1.2, 1.6, 2.1, 4.3, 8.6, 10.8, 13.0, 17.2, 21.5, 25.8, 43.0, 53.8 and $64.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (b): $c_{\text{TriMPyP}} = 3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of DNA from 1 to 6: 0, 1.6, 3.2, 8.0, 12.8 and $28.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Insert is the decomposition results of absorption spectra; pH 6.8

图 3 为 TMAP 和 TriMPyP 与 DNA 相互作用的荧光光谱图。TMAP 的最大发射峰位于 641 nm, 加入 DNA 后荧光强度开始下降, 峰位逐渐红移, 同时 $Q(0,0)$ 和 $Q(0,1)$ 两个发射带变得模糊, 当 DNA 的浓度为 $2.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $Q(0,1)$ 带发生明显红移。与文献 [8] 不同的是, 当进一步增加 DNA 的浓度时, 荧光开始增强, 同时最大发射峰位略有蓝移, $Q(0,0)$ 和 $Q(0,1)$ 两个发射带能很好的分开。当 DNA 的浓度为 $65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧光强度基本保持不变, 最大发射峰位于 644 nm, 但仍小于未加入 DNA 时的荧光强度。在较低 DNA 浓度下, TriMPyP 的荧光强度被猝灭, 增大 DNA 的浓度, 荧光略有增强, 但峰位变化变得没有规律。与 TMAP 不同的是, 在较高 DNA 浓度下, TriMPyP 的荧光强度大于原来的未加入 DNA 时的荧光强度, 两个荧光发射带进一步模糊 (图略)。

共振光散射是检测卟啉分子高级聚集体的有效手段, 由于生色基团间强的电子耦合, 在吸收波长处共振光散射信号得到大大加强。TMAP 共振光最大散射峰位于 445 nm, 在最大吸收峰附近散射信号最低 (如图 4 所示), 这是由于卟啉分子在最大吸收处摩尔吸光系数大, 但分子散射小的缘故。在

DNA 浓度下, TMAP 的散射信号得到加强, 当 DNA 的浓度为 $2.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 共振光强度开始下降, 但总体上 TMAP 的散射强度变化不大。TriMPyP 由于在溶液中部分以聚集体形式存在, 自身的共振光散射强度较大, 加入 DNA 后没有明显的变化。

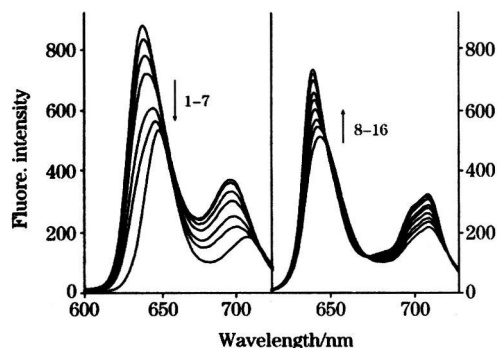


Fig. 3 Fluorescence spectra of porphyrins with different DNA concentrations

$c_{\text{TMAP}} = 2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of DNA from 1 to 16: 0, 0.8, 1.2, 1.6, 2.1, 4.3, 8.6, 10.8, 13.0, 17.2, 21.5, 25.8, 43.0, 53.8, 64.5 and $86.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 6.8

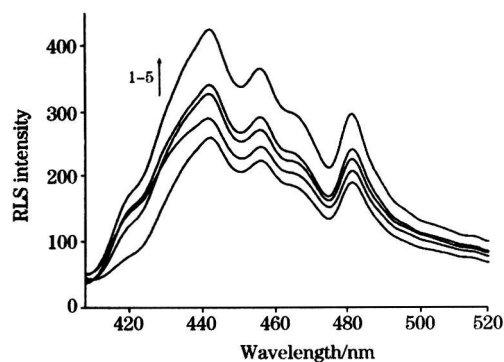


Fig. 4 RLS spectra of TMAP with different DNA concentrations

$c_{\text{TMAP}} = 2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of DNA 1 to 5: 0, 0.4, 0.8, 1.2 and $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 6.8

2.3 离子强度的影响

实验考察了离子强度对卟啉与 DNA 相互作用的影响。对于 TMAP 考察了两种 DNA 浓度下离子强度的影响, 在 DNA 浓度为 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 情况下, 吸光度随离子强度增大逐渐增加, 峰位没有明显变化。图 5(a) 为 DNA 浓度为 $24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不同 NaCl 浓度下 TMAP 的吸收光谱, 加入 NaCl 后, 吸光度开始降低, 吸收峰位略有蓝移, 随着离子强度的进一步增大, 吸光度开始增加, 同时峰位进一步蓝移, 当 NaCl 浓度达到 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 吸收光谱变化不大。图 5(b) 为不同 NaCl 浓度下 TriMPyP 的吸收光谱, 当 NaCl 浓度小于 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着离子强度增大, 峰位不变, 吸光度逐渐降低。当 NaCl 浓度大于 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随离子强度的增大吸光度增加, 吸收峰位从 441 nm 蓝移至 420 nm , Q

带没有明显的变化。插入图为不同离子强度下吸收光谱 Soret 带解析结果相对浓度的变化情况。实验还考察了离子强度对卟啉荧光光谱的影响, 对于 TMAP 和 TriMPyP, 增大离子强度, 荧光都得到增强, 发射峰位有不同程度的蓝移。通过实验可以看出, 离子强度对卟啉与 DNA 相互作用影响很大, 在中性条件下, 阳离子卟啉所带正电荷与 DNA 磷酸根所带负电荷之间的静电引力是两者结合的主要作用力。

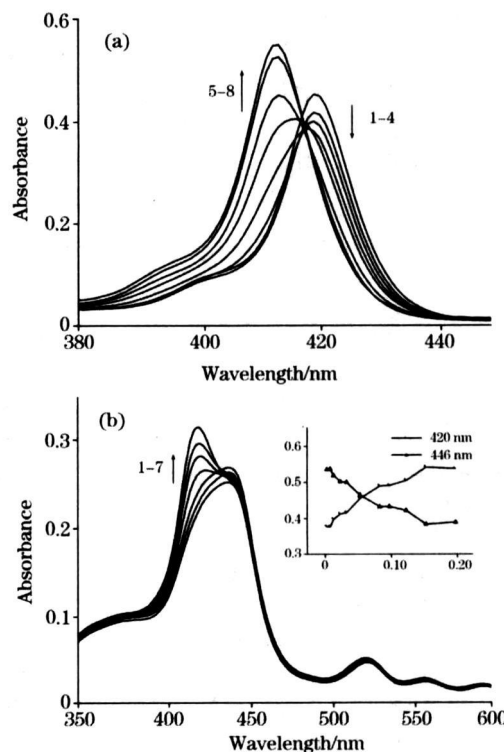


Fig 5 Absorption spectra of porphyrin solutions under different ionic strength

(a): $c_{\text{TMAP}} = 2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{DNA}} = 24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of NaCl: 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4 and $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
(b): $c_{\text{TriMPyP}} = 3.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; concentrations of NaCl: 0, 1.6, 3.2, 8.0, 12.8, 16.0 and $28.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Insert is the decomposition results of absorption spectra; pH 6.8

2.4 相互作用机理

由以上讨论可知, 具有不同结构, 带不同电荷的两种阳离子卟啉在中性条件下与 DNA 有明显的相互作用。DNA 的加入对卟啉的吸收光谱有较大影响, 存在明显的减色和增色现象, 峰位也有明显的移动, 但从吸收峰减色和移动程度来看^[6], 两种卟啉都没有明显的插入作用。对 TMAP 来讲, 在 $R > 1$ 的情况下, DNA 浓度较低, 卟啉分子在 DNA 表面发生聚集作用, 吸收光谱有明显的减色效应, 峰位有较大红移, 卟啉的荧光被猝灭, 但从共振光增强的程度看, TMAP 分子之间耦合程度小, 分子聚集程度较小。当 $R < 1$ 时, DNA 浓度较高, 卟啉结合位点增加, TMAP 分子逐渐以外围结合方式与 DNA 结合, 吸收光谱有明显的增色效应, 卟啉荧光得到增强, 两个发射带分辨率提高, 共振光信号减

弱。随 DNA 浓度的增加, 吸收峰位和荧光发射峰位有较小的蓝移, 可能是随结合位点数目的增加, 结合部位发生了变化, 部分 TMAP 分子插入到沟槽中与 DNA 结合, 疏水环境改变所致。在较高 DNA 浓度下 TMAP 的荧光强度仍小于未加 DNA 时的荧光强度, 可能是因为卟啉与鸟嘌呤间发生了电子转移^[19]。离子强度增大, 电荷屏蔽作用使卟啉与 DNA 间的静电作用力减弱, 使部分 TMAP 分子从 DNA 结合位点脱落, 同时降低了卟啉分子间的静电斥力, 在 DNA 表面发生聚集。继续增大离子强度, 使卟啉分子几乎全部从 DNA 上脱落, 在溶液以单体分子形式存在。对于 TriMPyP, 在溶液自身以单体和聚集体两种形式存在, DNA 的加入, 使卟啉分子聚集程度增加, 吸收光谱发生减色效应。但 TriMPyP 分子扭曲使空间位阻增大, 阻碍了其 with DNA 的进一步结合。荧光增强可能是因为 DNA 的加入, 使溶液的粘度增大, 单

体分子的荧光猝灭程度减小所致。同样, 离子强度的增大, 使卟啉分子的聚集体形式减少, 单体分子数目增多, 这可以从吸收光谱解析结果不同存在形式的相对浓度变化得出。

3 结 论

卟啉的结构、卟啉与 DNA 的相对浓度决定了两者之间的结合方式。在较低 DNA 浓度下, TMAP 在 DNA 分子表面发生聚集, 随 DNA 浓度的增加, TMAP 与 DNA 以外部结合方式结合。由于 TriMPyP 分子的不对称性, 空间位阻使其不能与 DNA 有效地进行插入或外部结合, DNA 的加入, 使 TriMPyP 聚集程度增加。离子强度对卟啉与 DNA 的相互作用影响很大, 离子强度的增大, 减弱了分子间的静电引力, 使卟啉与 DNA 的结合方式发生了改变。

参 考 文 献

- [1] Sehlstedt U, Kim S K, Carter P, et al. *Biochemistry*, 1994, 33(2): 417.
- [2] Granville D J, McManus B M, Hunt D W. *Histol. Histopathol.*, 2001, 16(1): 309.
- [3] HOU Anxin, LIU Yi, HUANG Weiguang, et al(侯安新, 刘义, 黄伟国, 等). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2003, 61(9): 1382.
- [4] Onuki J, Ribas A V, Medeiros M H, et al. *Photochem. Photobiol.*, 1996, 63(3): 272.
- [5] LI Jianqing, HOU Xiaoli, WEI Yuxia, et al(李建晴, 侯晓丽, 魏玉霞, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2007, 27(3): 530.
- [6] Ohyama T, Mita H, Yamamoto Y. *Biophys. Chem.*, 2005, 113(1): 53.
- [7] Jin B, Sub Shin J, Hwan Bae C, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1760(7): 993.
- [8] Ghaderi M, Bathaie S Z, Saboury A A, et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2007, 41(2): 173.
- [9] Bordbar A K, Keshavarz M, Zare K, et al. *Phys. Chem. Liq.*, 2006, 44(4): 457.
- [10] Lambrechts S A G, Aalders M C G, Van Marle J. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49(5): 2026.
- [11] Munson B R, Fiel R J. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20(6): 1315.
- [12] Krishnamurthy M. *Indian J. Chem., Sect B*, 1977, 15(10): 964.
- [13] Kano K, Takei M, Hashimoto S. *J. Phys. Chem.*, 1990, 94(5): 2181.
- [14] Kano K, Minamizono H, Kitae T, et al. *Phys. Chem. A*, 1997, 101(34): 6118.
- [15] Kessel D, Luguia R, Vicente M G H. *Photochem. Photobiol.*, 2003, 78(5): 431.
- [16] McMillin D R, Shelton A H, Bejune S A, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 2005, 249(13-14): 1451.

Study on the Aggregation Behavior of Cationic Porphyrins and Their Interaction with ctDNA

MA Hongmin, CHEN Xin, SUN Shuting, ZHANG Lina, WU Dan, ZHU Peihua, LI Yan, DU Bin*, WEI Qin
School of Chemistry & Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022, China

Abstract Interest in the interaction between cationic porphyrins, particularly derivatives of meso-tetra(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin(TMPyP), and DNA abounds because they are versatile DNA-binding agents that could find application in photodynamic therapy, cancer detection, artificial nucleases, virus inhibition and so on. The interaction of two water-soluble cationic porphyrins, meso-tetrakis(4-N,N,N-trimethylanilinium)porphyrin (TMAP) and 5-phenyl-10,15,20-tris[4-(N-methyl)pyridinium]porphyrin (TriMPyP), with calf thymus DNA (ctDNA) was studied by UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and resonance light scattering technique. TriMPyP forms aggregate in water due to the molecular asymmetry while TMAP exists as monomers. At lower concentrations of ctDNA ($R > 1$, $R = c_{\text{TMAP}}/c_{\text{DNA}}$ base pair), the interaction of TMAP with DNA leads to significant hypochromicity and bathochromic shift of absorption spectra. And the fluorescence of TMAP was quenched while it showed enhanced resonance light scattering signals. But the extent of enhancement of resonance light scattering

signals is very small, so the aggregate of TMAP is not very high. These observations indicate the self stacking of TMAP along the DNA surface. At higher concentrations of ctDNA ($R < 1$), TMAP association with DNA is via outside binding which is accompanied with hyperchromic effect and fluorescence enhancement while the resonance light scattering signals is reduced. DNA addition decreases the fluorescence intensity of TriMPPyP and it shifts the peak to the higher wavelengths (red shift). The interaction with DNA promotes the aggregation of TriMPPyP and no simple outside binding is observed even at higher concentrations of ctDNA. The steric effect of molecular distortion constrains the intercalation or further binding to DNA. The effect of ionic strength on the interaction was investigated at two DNA concentrations, 1.2 and 24.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, for TMAP. The Interactions of both porphyrins with DNA show high sensitivity to ionic strength. By addition of NaCl, electrostatic attraction is decreased, resulting in the change of binding mode.

Keywords Cationic porphyrin; ctDNA; Interaction; Aggregate

(Received Oct. 16, 2007; accepted Jan. 20, 2008)

* Corresponding author

学术活动简讯

February 2009

1-4 Advanced Solid State Photonics 2009 OSA Optics & Photonics Congress (ASSP),

Grand Hyatt Denver, Denver, CO;

Contact: Optical Society of America, 2010 Massachusetts Ave., NW, Washington, DC 20036-1023; Tel. (202) 416-1907, or (800) 723-4632, Fax: (202) 416-6140;

E mail: custserv@osa.org

Web site: <http://www.osa.org/assp>

2-7 Young Optical Scientists Conference (YOSC),

Moscow, Russia;

Contact: Vahan Senekerimyan,

E mail: vahan@caltech.edu

Web site: <http://www.yosconf.org/>

15-20 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry,

Graz, Austria;

Contact: Ms. Astrid Tuidar, Conference Secretary, Karl-Franzens University Graz,

Institute of Chemistry/ Analytical Chemistry, Universitätsplatz 1, A-8010 Graz,

Austria; Tel. 43 316 380 5300, Fax: 43 316 380 9845;

E mail: astrid.tuidar@uni-graz.at

Web site: <http://www.winterplasmagraz.at/>

20-22 National 2DCOS Symposium 2009,

Rincón, Puerto Rico;

Contact: Dr. Belinda Pastrana, Department of Chemistry, University of Puerto Rico, P.O. Box 9019, Mayaguez, PR 00681-9019; Tel. (787) 265-6520, Fax: (787) 265-3849;

E mail: 2DCOS@uprm.edu

Web site: <http://www.2dcos.uprm.edu/>