

惠晓梅, 郭栋生, 袁小英. 2010. 四种金属离子对 CHBr₃ 和小牛胸腺 DNA 间结合作用影响[J]. 环境科学学报, 30(4): 820-824

Hui X M, Guo D S Yuan X Y. 2010. The effect of Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ and Mg²⁺ on the interactions between bromoform and calf thymus DNA[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(4): 820-824

四种金属离子对 CHBr₃ 和小牛胸腺 DNA 间结合作用的影响

惠晓梅¹, 郭栋生^{1,*}, 袁小英²

1 山西大学环境与资源学院, 太原 030006

2 山西大学化学与化工学院, 太原 030006

收稿日期: 2009-08-07 修回日期: 2009-11-13 录用日期: 2009-12-31

摘要: 采用紫外光谱和荧光光谱法研究了 CHBr₃ 与离体小牛胸腺 DNA (cDNA) 间的相互作用, 以及 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Mg²⁺ 4 种金属离子单独或共存时对 CHBr₃ 与 cDNA 结合的影响。结果表明: 4 种金属离子与 CHBr₃、cDNA 均能发生基态络合反应, 络合物的生成导致体系的紫外吸收峰强度和形状改变, 使 cDNA-溴化乙锭体系的荧光发生了不同程度的猝灭; 向 CHBr₃-cDNA-溴化乙锭体系中分别或同时加入 4 种金属离子后, Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺ 可减弱两者之间的结合, 减弱顺序为 Cu²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺, Mg²⁺ 可加强两者之间的结合, 4 种金属离子同时加入后出现不同于 4 种金属离子单独加入时的中间类型。据此推断, CHBr₃ 可能主要是通过嵌插作用与 cDNA 碱基结合, 金属离子对 CHBr₃ 与 cDNA 结合的影响主要取决于金属离子与 DNA 的碱基和磷酸基团间结合的相对亲疏比。

关键词: 金属离子; 三溴甲烷; 小牛胸腺 DNA; 紫外光谱; 荧光光谱

文章编号: 0253-2468(2010)04-820-05 中图分类号: X131 文献标识码: A

The effect of Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ and Mg²⁺ on the interactions between bromoform and calf thymus DNA

HUI Xiaomei¹, GUO Dongsheng^{1,*}, YUAN Xiaoying²

1 College of Resources and Environment Shanxi University, Taiyuan 030006

2 College of Chemistry and Chemical Engineering Shanxi University, Taiyuan 030006

Received 7 August 2009; received in revised form 13 November 2009; accepted 31 December 2009

Abstract Using the technique of ultraviolet absorption spectrometry and fluorescence spectrometry, this study examined the interactions between bromoform (CHBr₃) and calf thymus DNA (cDNA) with or without Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ and Mg²⁺ individually or concurrently. The results show complex ground-state reactions among the metal ions, CHBr₃ and cDNA, as evidenced by the variations in the peak of UV absorption intensity and shape in the cDNA-ethidium bromide system. The interactions cause fluorescence quenching to various extents. The presence of Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ (ranked by decreasing strength) weakened the binding between CHBr₃ and cDNA, while Mg²⁺ enhanced such binding. In addition, the simultaneous presence of the four metal ions resulted in intermediate impact varying from the effect of the individual metal ions. The results suggest that CHBr₃ is likely to intercalate into cDNA and such interactions mainly depend on the relative binding affinity of a metal ion to the bases and to the phosphate groups in DNA.

Keywords metal ions; bromoform; calf thymus DNA; ultraviolet spectrum; fluorescence spectrum

1 引言 (Introduction)

饮用水中残留的三溴甲烷 (CHBr₃) 是在氯化消毒过程中产生的挥发性副产物, 已被 Ames 试验证实为移码型直接致突变物, 且致突变活性较大 (唐

明德, 2000)。一般认为, 离体条件下如果化学物质能够与 DNA 相互作用, 那么这些化学物质在活体条件下可能也会与 DNA 相互作用 (齐树民, 1985)。小分子物质与 DNA 的非共价键力作用包括静电结合、沟渠结合和嵌插作用 3 种方式 (陈勇等, 1994), 但

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (No. 20031016)

Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 20031016)

作者简介: 惠晓梅 (1983-), 女, E-mail: huixm@sxu.edu.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: dongsguo@sxu.edu.cn

Biography: HUI Xiaomei (1983-), female, E-mail: huixm@sxu.edu.cn; * Corresponding author, E-mail: dongsguo@sxu.edu.cn

有关 CHB₃与 DNA 结合方式以及金属离子 (Me) 对它们两者结合影响规律的研究尚未见报道. 因此, 研究环境污染小分子物质 CHB₃与 DNA 间的结合方式, 以及当金属离子、CHB₃共存于饮用水中时金属离子对 CHB₃与 DNA 相互作用的影响规律具有一定的价值.

基于此, 本文通过选取在饮用水中普遍存在且与 DNA 有不同结合方式和强度的 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Mg²⁺ 4种金属离子, 研究它们单独和共存条件下对 CHB₃与 cDNA 之间结合的影响. 以为饮用水消毒副产物在金属元素共存条件下的毒性机理研究, 以及不同性质金属离子的影响规律探讨提供参考.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 仪器与主要试剂

仪器: 日本岛津 UV-265 型紫外分光光度仪, RF-540 型荧光分光光度仪.

试剂: Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.0); 0.1 mol·L⁻¹ 的氯化铜、氯化钴、氯化镉、氯化镁储备液; 溴化乙锭 (EB): 用 0.02 mol·L⁻¹ NaCl 溶液配制成 1.27 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的储备液, 避光保存; 三溴甲烷 (CHB₃, M = 252.73, ρ = 2.889 g·cm⁻³) 水饱和溶液; 小牛胸腺 DNA (cDNA, sigma UV 谱 A₂₈₀/A₂₆₀ 为 1.80~1.90): 取适量 cDNA 直接溶于 0.2 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液中, 由 260nm 处的紫外吸光度 ε(P) = 6600 L·mol⁻¹·cm⁻¹ 计算 cDNA 浓度, 于冰箱中 0~4℃ 保存 (Pyle *et al.*, 1989; Guo *et al.*, 2007). 实验中所用水均为二次蒸馏水, 所用试剂均不低于分析纯.

2.2 方法

在 15 支 5mL 比色管中分别加入 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液、cDNA 溶液, 滴加 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Mg²⁺ 离子溶液和 CHB₃ 水饱和溶液, 定容, 混合后形成 Cu²⁺-cDNA、Co²⁺-cDNA、Cd²⁺-cDNA、Mg²⁺-cDNA、CHB₃-cDNA、CHB₃-cDNA-Me、CHB₃-cDNA-4Me 和相应的试剂空白体系. 在室温环境, 扫描 220~320nm 范围内相应体系的紫外光谱, 测定并记录 260nm 处的最大吸光值; 以 EB 为荧光探针, 在激发波长 480nm, 发射波长 590nm, 狭缝宽度均为 10nm 的条件下, 扫描 500~700nm 范围内相应体系的荧光光谱, 测定并记录 590nm 处相应体

系的荧光强度. 在滴定过程中, 各种溶液均以 μL 为单位滴加.

3 结果 (Results)

3.1 cDNA 与 Me、CHB₃ 的二元结合

当外来物质同 DNA 体系发生结合反应时, 其体系的吸收光谱将产生增色或减色效应, 出现等吸收点及谱移等光谱现象 (徐宏娟等, 2003). 图 1 是 4 种金属离子和 CHB₃ 溶液加入 cDNA 体系中紫外光谱的变化情况, 其中, C_{cDNA} = 1.18 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹, C_{Mg²⁺} = 3.33 × 10⁻³ mol·L⁻¹, C_{Co²⁺} = 3.33 × 10⁻³ mol·L⁻¹, C_{Cu²⁺} = 3.33 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹, C_{Co²⁺} = 3.33 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹, C_{CHB₃} 分别为 0 和 15.83 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹. 从图 1a 可以看出, Cu²⁺、Co²⁺ 和 Cd²⁺ 使 cDNA 在 260nm 处最大吸收峰出现不同程度的红移; Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 使其产生不同程度的减色效应, Mg²⁺ 和 Co²⁺ 离子的加入使其产生不同程度的增色效应. CHB₃ 的加入使 cDNA 的吸收光谱产生了明显的减色效应, 同时, 260nm 处的最大吸收波长发生明显的红移 (图 1b). 金属离子和 CHB₃ 的溶液加入使 cDNA 体系的紫外吸收峰均发生不同程度的变化, 并使最大吸收波长出现位移, 这表明金属离子、CHB₃ 均能与 cDNA 发生基态络合反应, 络合物的生成导致体系的吸收峰强度和形状改变.

吸光度减小、吸收带红移及等吸收点的形成是小分子与 DNA 发生嵌插作用的标志 (Long *et al.*, 1990; 朱莉等, 2008). Cu²⁺、Co²⁺ 和 Cd²⁺ 溶液加入使 cDNA 在 260nm 处的吸收峰发生红移, CHB₃ 溶液加入使 cDNA 吸光度减小、吸收带红移, 说明 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺ 和 CHB₃ 与 cDNA 碱基对之间的距离较近, 即它们可能嵌插到 cDNA 双螺旋结构的碱基对中.

研究表明, EB 本身仅有很弱的荧光, 但能平行地嵌入双螺旋 DNA 的碱基对, 与 DNA 分子发生嵌插作用, 使自身荧光强度显著增强, 因而常作为研究小分子与 DNA 作用模式的荧光探针 (徐春等, 2000; 马立波等, 2003). 向 EB 溶液中分别加入 4 种金属离子、CHB₃ 溶液时, 体系的荧光光谱几乎没有发生变化, 这表明在实验条件下 EB 与金属离子和 CHB₃ 并不发生结合反应.

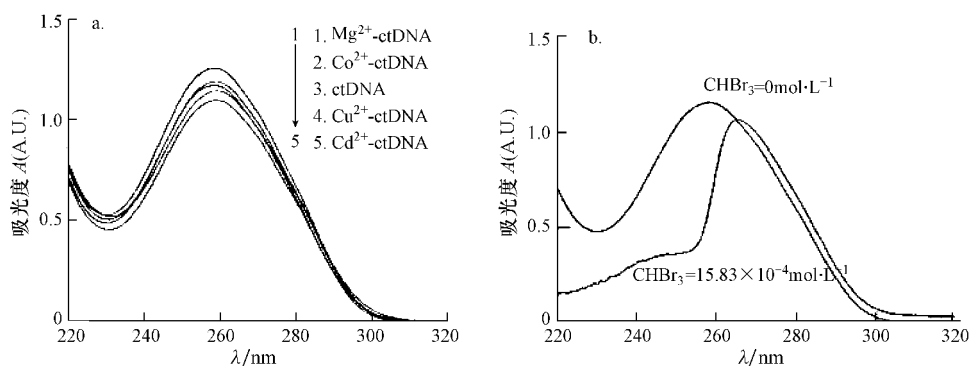


图 1 cDNA / Me体系 (a)和 cDNA / CHBr₃体系 (b)的紫外吸收图谱

Fig. 1 Ultraviolet spectra for ctDNA / Me systems (a) and ctDNA / CHBr₃ systems (b)

图 2 为 4 种金属离子和 CHBr₃ 溶液分别滴定 ctDNA (EB) 溶液的荧光光谱, 其中, $C_{\text{ctDNA}} = 8.67 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{EB}} = 4.23 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Mg}^{2+}} = 1.67 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cd}^{2+}} = 1.67 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cu}^{2+}} = 1.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Co}^{2+}} = 1.67 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{CHBr_3} (1~5) 分别为 0.396×10^{-4} 、 7.91×10^{-4} 、 11.87×10^{-4} 、 $15.83 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 由图 2a 可知, 金属离子在一定浓度下均能不同程度地猝灭 ctDNA (EB) 荧光, 猝灭程度为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. 研究表明, Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 与 ctDNA 的结合

主要是与其碱基结合, 而 Mg^{2+} 主要是与磷酸基团结合 (Wang *et al.*, 2005). 因此, 推测猝灭程度可能和金属离子与 DNA 碱基结合能力的强弱有关; 用 CHBr₃ 溶液滴定 ctDNA (EB) 溶液的荧光光谱 (图 2b) 表明, 随着体系内 CHBr₃ 浓度在一定范围内的增加, ctDNA (EB) 体系的荧光强度逐渐猝灭, 且在 560 nm 处形成等发射点. 这表明 CHBr₃ 可能通过竞争方式干扰了 EB 与 ctDNA 的结合, CHBr₃ 与 ctDNA 之间发生嵌插作用.

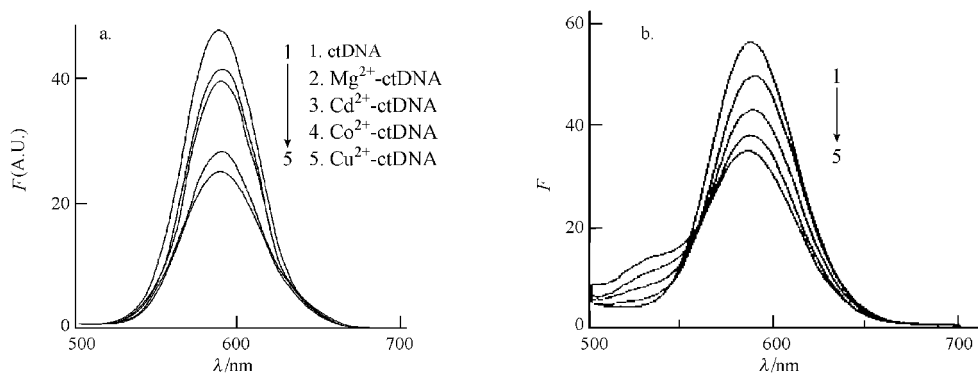


图 2 cDNA (EB) / Me体系 (a)和 cDNA (EB) / CHBr₃体系 (b)的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra for ctDNA (EB) / Me systems (a) and ctDNA (EB) / CHBr₃ systems (b)

利用荧光猝灭的测定结果, 由公式 $\lg [(F_0 - F) / F] = \lg K + n \lg C$ (Xie *et al.*, 2006) 可以计算 Me / CHBr₃ 与 ctDNA 的结合常数. 其中, F_0 为 ctDNA (EB) 的荧光强度, F 为 Me / CHBr₃ 存在下的 ctDNA (EB) 荧光强度, K 为 Me / CHBr₃ 与 ctDNA 的结合常数, n 为 Me / CHBr₃ 与 ctDNA 的结合位点数, C 为 Me / CHBr₃ 的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 具体结果见表 1.

表 1 Me / CHBr₃ 与 ctDNA (EB) 间的结合常数

Table 1 Binding constants for ctDNA (EB) / Me / CHBr₃ systems

化学物质	数据 数 / 个	R^2	n	$K /$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Cu^{2+} -ctDNA	10	0.9933	1	11221
Co^{2+} -ctDNA	10	0.9972	1	4618
Cd^{2+} -ctDNA	10	0.9888	1	402
Mg^{2+} -ctDNA	10	0.9951	1	387
CHBr ₃ -ctDNA	10	0.9933	1	2010

3.2 4种金属离子单独或共存对 CHB₁₃与 ctDNA 结合的影响

用金属离子溶液分别或同时滴定 CHB₁₃-ctDNA 二元体系,体系的紫外吸收光谱均发生了不同程度的改变,说明 CHB₁₃、ctDNA 和金属离子之间形成了较为稳定的络合物。同时,CHB₁₃-ctDNA (EB)体系的荧光强度发生改变。采用公式 $\lg [(F_0 - F) / F] = \lg K + n \lg C$ 计算得出单独或共同存在的条件下 CHB₁₃与 ctDNA 的结合常数,结果见图 3 混合体系中, $C_{\text{ctDNA}} = 8.67 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{EB}} = 4.23 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Mg}^{2+}} = C \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cd}^{2+}} = C \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Co}^{2+}} = C \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{Cu}^{2+}} = C \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从图 3 中可以看出,当单独加入金属离子时,随着体系内金属离子浓度在一定范围内的增加,CHB₁₃与 ctDNA 的结合常数有着不同的变化趋势,Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺使 CHB₁₃与 ctDNA 结合常数降低,降低强度为 Cu²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺, Mg²⁺增大 CHB₁₃与 ctDNA 之间的结合常数,当 4 种金属离子同时加入后出现了不同于 4 种金属离子单独作用的中间类型。

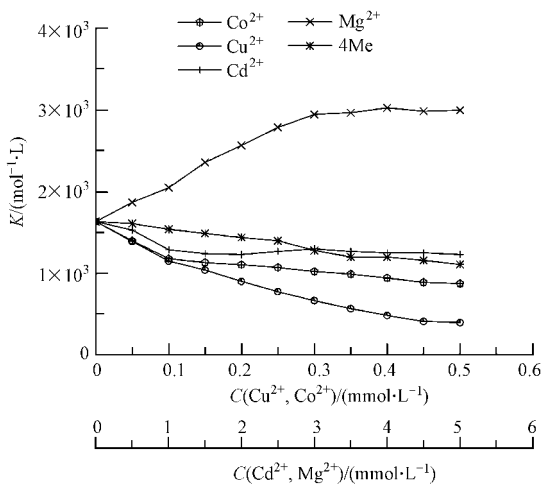


图 3 CHB₁₃-ctDNA (EB) / Me / 4Me 体系的结合常数

Fig. 3 The binding constants for CHB₁₃-ctDNA (EB) / Me / 4Me systems

上述结果表明,Me与 ctDNA 的碱基和磷酸基团间结合的相对亲合力 (Guo *et al.*, 2007; Eichhorn *et al.*, 1968)可能对于 CHB₁₃与 ctDNA 结合有一定的影响,主要依据是:①Me-ctDNA (EB)体系中,结合常数 $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-ctDNA}} (11221) > K_{\text{Co}^{2+}\text{-ctDNA}} (4618) > K_{\text{Cd}^{2+}\text{-ctDNA}} (402) > K_{\text{Mg}^{2+}\text{-ctDNA}} (387)$,在 CHB₁₃-ctDNA (EB)-Me体系中,随着 Me浓度在一定范围内的增

加,结合常数的变化趋势为 CHB₁₃-ctDNA (EB)-Cu²⁺、CHB₁₃-ctDNA (EB)-Co²⁺、CHB₁₃-ctDNA (EB)-Cd²⁺体系降低,CHB₁₃-ctDNA (EB)-Mg²⁺升高,可以推测 Me与 ctDNA 碱基和磷酸基团间结合的相对亲合力对 CHB₁₃与 ctDNA 结合常数变化有直接关系;②大多数金属离子和 DNA 结合位置主要为 G-C 碱基对 (Guo *et al.*, 2007),而 CHB₁₃与 ctDNA 的作用也主要是通过碱基结合的。本实验中 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺与 ctDNA 的结合主要是与其碱基结合,而 Mg²⁺主要是与磷酸基团结合。Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺的加入使 CHB₁₃-ctDNA 的结合变弱,说明它们与 ctDNA 间的结合可能与 CHB₁₃与 ctDNA 间的结合有相同的结合位点,可能会与 CHB₁₃通过竞争作用与 ctDNA 碱基结合,从而使 CHB₁₃与 ctDNA 的结合变弱;而 Mg²⁺主要是与 ctDNA 的磷酸基团结合,它的加入有利于 ctDNA 的双螺旋打开,从而促进 CHB₁₃与 ctDNA 的结合。

4 结论 (Conclusions)

研究结果表明,CHB₁₃与 ctDNA 可能是通过嵌插方式相互作用的,金属离子能影响 CHB₁₃与 ctDNA 结合,其影响的程度主要取决于金属离子与 DNA 碱基和磷酸基团间结合的相对亲合力。如果金属离子在一定浓度时,金属离子主要与 DNA 的碱基结合,则可通过竞争作用降低 CHB₁₃与 ctDNA 之间的结合常数,如 Cu²⁺、Co²⁺、Cd²⁺等。而如果金属离子在一定浓度时,金属离子主要与 DNA 的磷酸基团结合,则可能增加它们之间的结合常数,如 Mg²⁺会提高 CHB₁₃与 ctDNA 之间的结合常数。

责任作者简介:郭栋生 (1954—),男,教授,主要从事环境化学方面的研究。E-mail: dongshu@sxu.edu.cn

参考文献 (References):

- 陈勇,李元宗,常文保,等. 1994 核酸分子嵌入剂 [J]. 分析科学学报, 10(1): 67-74
- Chen Y, Li Y Z, Chang W B *et al.* 1994 Intercalators of nucleic acids [J]. Journal of Analytical Science, 10(1): 67-74 (in Chinese)
- Eichhorn C L, Shin Y A. 1968. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds XII The relative effect of various metal ions on DNA helicity [J]. J Am Chem Soc 90: 7323-7328
- Guo D S, Yuan X Y, Wu J B. 2007. Influence of Cr(II), Cr(VI) on the interaction between sparfloxacin and calf thymus [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 101(6): 644-648

- Long E C, Barton J K. 1990 On demonstration DNA intercalation [J]. *Accounts Chem Res*, 23: 273
- 马立波, 石昕, 牛淑妍, 等. 2003. 溴化乙锭与 DNA 相互作用的电化学及紫外-可见光谱研究 [J]. *青岛科技大学学报*, 24 (5): 400
- Ma L B, Shi X, Niu S Y, *et al.* 2003 Electrochemical and UV-Vis Spectrometry studies on the interaction between ethidium bromide and DNA [J]. *Journal of Qingdao University of Science and Technology*, 24(5): 400 (in Chinese)
- Pyke A M, Rehm J P, Meshoyrer C V, *et al.* 1989. Mixed ligand complexes of ruthenium: factors governing binding to DNA [J]. *J Am Chem Soc*, 111: 3051
- 齐树民. 1985 药理学进展 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 319
- Qi S M. 1985. Progress of Pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House. 319 (in Chinese)
- 唐明德. 2000. 饮水氯化消毒副产物与肿瘤 [J]. *癌变·畸变·突变*, 12 (3): 185—190
- Tang M D. 2000. Disinfection by products in chlorinated drinking water and cancer [J]. *Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis*, 12 (3): 185—190 (in Chinese)
- Wang X Y. 2005 Progress of research on the interactions between DNA and metal ions [J]. *Journal of Analytical Science*, 21 (5): 557—562
- Xie M X, Long M, Liu Y, *et al.* 2006. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1760(8): 1184—1191
- 徐春, 何品刚. 2000 溴化乙锭标记 DNA 电化学探针的研究 [J]. *高等学校化学学报*, 21 (8): 1187—1190
- Xu C, He P G. 2000 Studies on the preparation and characterization of ethidium bromide labeled DNA probe [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 21(8): 1187—1190 (in Chinese)
- 徐宏娟, 于俊生, 王树玲, 等. 2003 Ru(III)、Rh(III)、Pd(II) 离子与 ctDNA 的相互作用 [J]. *无机化学学报*, 19 (4): 355—360
- Xu H J, Yu J S, Wang S L, *et al.* 2003 Studies on interactions of Ru(III), Rh(III), Pd(II) with ctDNA [J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 19(4): 355—360 (in Chinese)
- 朱莉, 彭斌, 凌友, 等. 2008 配合物 $[\text{Co}_2(\text{EGTB})\text{Cl}_2] \cdot (\text{BF}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与 DNA 相互作用的研究 [J]. *化学学报*, 66 (24): 2705—2711
- Zhu L, Peng B, Ling Y, *et al.* 2008 Interaction of complex $[\text{Co}_2(\text{EGTB})\text{Cl}_2] \cdot (\text{BF}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ with DNA [J]. *Acta Chimica Sinica*, 66(24): 2705—2711 (in Chinese)