

电喷雾质谱法研究 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 DNA 的相互作用*

管小虹¹, 邓慧敏¹, 林中祥²

(1. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275;
2. 南京林业大学化学工程学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 采用电喷雾质谱(ESI-MS)法研究了 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 4 种 DNA—dC₆, dT₆, dA₆, d(AT)₃ 的相互作用, 考察了 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 DNA 形成复合物的电喷雾质谱行为及 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮-DNA 复合物 -4 价离子的二级质谱(MS/MS)行为。结果表明, *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 4 种 DNA 均可形成非共价复合物, 且复合物离子主要以 -4 价形式存在; *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 4 种不同的 DNA 形成的 -4 价复合物离子均在碰撞能(CE)约 20% 时发生裂解, 并且具有大致相同的裂解方式。

关键词: 电喷雾电离质谱; *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮; DNA; 相互作用; MS/MS

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)06-0074-04

Study on the Interaction Between *N*-benzoyl-Dehydroabitylamine-7-one and DNA by ESI/MS Analysis

GUAN Xiaohong¹, DENG Huimin¹, LIN Zhongxiang²

(1. Instrumental Analysis Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The interactions between *N*-benzoyl-dehydroabitylamine-7-one (NBDO) and dC₆, dT₆, dA₆ and d(AT)₃ were studied by ESI-MS analysis. The [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ complexes ions were investigated by MS/MS method. The results showed that the NBDO could formed non-covalent complexes with dC₆, dT₆, dA₆, d(AT)₃, and the complexes ions were mainly charged -4. The [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ ions fragmented at approximately 20% collision energy and all [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ ions had similar fragmentation mode.

Key words: ESI-MS; *N*-benzoyl-dehydroabitylamine-7-one; DNA; interaction; MS/MS

电喷雾电离(ESI)技术,在分析生物大分子(蛋白质,核酸)与药物小分子的相互作用方面具有独特优势:能够直接反映液相中分子间的非共价键相互作用,并具有快速、灵敏、可直接观测到复合物化学结合计量比等特点^[1]。近年来,DNA作为药物筛选的靶模型已经受到越来越多的关注,研究DNA与药物的相互作用对药物作用机理阐释及体外筛选有重要意义^[1-4]。脱氢枞胺是重要的松香改性产品、属于三环菲结构的光学活性碱。脱氢枞

胺及其衍生物已被广泛应用于医药、杀菌、染料、表面活性等领域^[5]。对于脱氢枞胺类衍生物,已有的文献大多是探讨它们的合成方法及应用,关于脱氢枞胺类化合物与DNA相互作用的研究少有报道。本文采用电喷雾质谱法研究了有望开发成新型药物的 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮(NBDO)^[6]与4种DNA—dC₆, dT₆, dA₆及d(AT)₃的相互作用,讨论了NBDO-DNA复合物的存在形式以及NBDO与DNA的结合方式。本文的工作对于进一

* 收稿日期: 2010-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771688, 30871989)

作者简介: 管小虹(1983年生),女,硕士研究生;通讯作者: 邓慧敏; E-mail: denghm@mail.sysu.edu.cn

步深入探讨 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 DNA 的相互作用机制和研发 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮类药物具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LCQ^DECA^{XP}电喷雾质谱仪(美国 Thermo-Finnigan 公司), Xcalibur 1.3 数据处理软件。甲醇(色谱纯)购自美国 Merck 公司,超纯水(自制)。dC₆(相对分子质量为 1 674.2), dT₆(相对分子质量为 1 764.2), dA₆(相对分子质量为 1 818.2), d(AT)₃(相对分子质量为 1 791.2)购自上海英骏(invitrogen)生物技术有限公司。*N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮(NBDO, 相对分子质量为 403, 结构见图 1)由南京林业大学林中祥教授实验室合成。

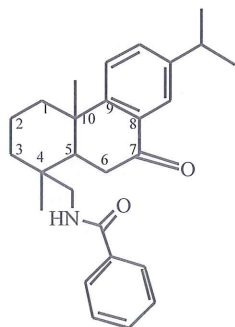


图 1 *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮的结构

Fig. 1 Structure of *N*-benzoyl-dehydroabietylamine-7-one

1.2 实验方法

喷雾电压 3 kV, 毛细管温度 250 °C, 鞘气流速 15 arb, 毛细管电压 18 V, MS/MS 碰撞气为氦气, 相对碰撞能 15%~20%, 负离子方式扫描。

dC₆, dT₆, dA₆, d(AT)₃ 分别用超纯水溶解, NBDO 用甲醇溶解, 以上各样品均配成 1.0×10^{-4} mol/L 溶液。将 NBDO 与 DNA 溶液按体积比 1:1 混合后, 用注射泵直接导入 ESI-MS 离子源, 流速为 2 μ L/min。

2 结果与讨论

图 2 为 NBDO 与 DNA 混合液电喷雾质谱图。由图 2 可知, NBDO 与 dC₆, dT₆, dA₆, d(AT)₃ 均可发生相互作用形成非共价复合物, 且复合物离

子主要以 -4 价形式存在。图 2 A-D 中的 m/z 518.1 (100%)、 m/z 540.5 (90%)、 m/z 554.0 (50%)、 m/z 547.3 (50%) 分别为 [NBDO + dC₆ - 4H]⁴⁻、[NBDO + dT₆ - 4H]⁴⁻、[NBDO + dA₆ - 4H]⁴⁻、[NBDO + d(AT)₃ - 4H]⁴⁻ 离子峰, 这 4 种复合物离子的相对丰度及图 2 给出的其他质谱数据表明, 以化学计量比 1:1 形成的 -4 价复合物离子 [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 比所有其他形式的复合物离子都更加稳定。此外, NBDO 与 dT₆ 还可形成更高价态(-5 价)的复合物离子 [NBDO + dT₆ - 5H]⁵⁻ (m/z 432.5) 和 [(NBDO)₂ + dT₆ - 5H]⁵⁻ (m/z 512.8) (见图 2B); DNA 分子中含有较多磷酸基团, 在 ESI-MS 负电离模式下, 容易失去多个质子形成多电荷负离子; 相比之下, NBDO 则较难负电离且只产生单电荷负离子, 因此, NBDO-DNA 复合物多电荷离子的形成主要取决于 DNA 分子的性质, 复合物所带的多个电荷主要分布在 DNA 分子端。NBDO 与 dC₆, dT₆, dA₆ 还可以形成化学计量比为 2:1 的复合物 [(NBDO)₂ + dC₆ - 4H]⁴⁻ (m/z 618.8)、[(NBDO)₂ + dT₆ - 4H]⁴⁻ (m/z 641.2) 和 [(NBDO)₂ + dA₆ - 4H]⁴⁻ (m/z 654.8)。NBDO 与 4 种 DNA 形成的复合物在离子价态及化学结合计量比方面存在的差异, 与 4 种 DNA 的分子组成及结构差异有关。NBDO 与 DNA 分子中, 分别具有酰胺基、羰基、氨基、磷酸基等极性官能团, 因此容易通过分子间氢键作用形成非共价复合物^[7-9]。

表 1 列出了对以 [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 为母离子进行碰撞诱导解离 (CID) 分析得到的二级质谱结果。表 1 数据显示, [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 发生裂解所需的碰撞能不超过 20%, 且 4 种不同 [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 复合物离子具有相同的裂解方式。根据 4 种 [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 离子的二级质谱都产生 -3 和 -4 价的 DNA 分子离子以及 -1 价的 NBDO 分子离子, 且 NBDO 分子负电离程度不高的结果推测, [NBDO + DNA - 4H]⁴⁻ 复合物离子的形成可能有两种方式: ①由中性 NBDO 分子与 -4 价 DNA 分子离子通过非共价键作用形成; ②由 -1 价 NBDO 分子离子与 -3 价 DNA 分子离子通过非共价键作用形成。

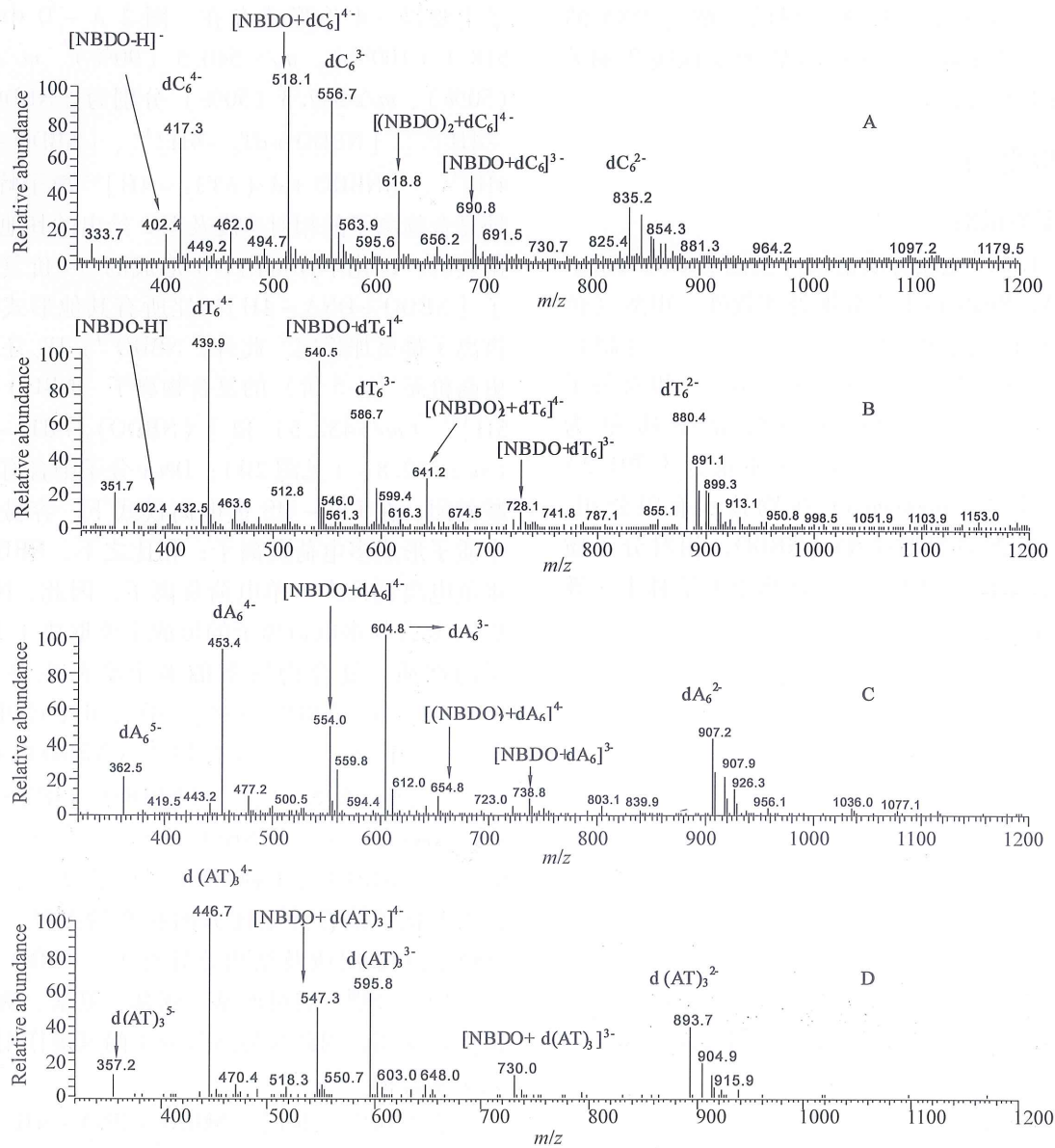


图 2 NBDO 与 dC_6 (A), dT_6 (B), dA_6 (C), $d(AT)_3$ (D) 摩尔比为 1:1 混合液的电喷雾负离子质谱图

Fig. 2 ESI (-) MS spectra of mixture of NBDO and dC_6 (A), dT_6 (B), dA_6 (C), $d(AT)_3$ (D) at molar ratio 1:1

表 1 $[NBDO + DNA - 4H]^{4-}$ 的 MS/MS 谱图数据

Table 1 ESI-MS/MS analyses of $[NBDO + DNA - 4H]^{4-}$

母离子/ (m/z)	子离子/(m/z)/ (相对丰度%)	碰撞能 量/%
$[NBDO + dC_6]^{4-}/(518.1)$	$dC_6^{3-}/(556.7)/(15)$ $dC_6^{4-}/(417.3)/(100)$	18
$[NBDO + dT_6]^{4-}/(540.5)$	$[NBDO - H]^{-}/(402.2)/(5)$ $dT_6^{3-}/(586.7)/(70)$ $dT_6^{4-}/(439.8)/(100)$	15
$[NBDO + dA_6]^{4-}/(554.0)$	$[NBDO - H]^{-}/(402.2)/(10)$ $dA_6^{3-}/(604.7)/(90)$ $dA_6^{4-}/(453.3)/(100)$	20
$[NBDO + d(AT)_3]^{4-}/(547.3)$	$[NBDO - H]^{-}/(402.2)/(10)$ $d(AT)_3^{3-}/(595.6)/(100)$ $d(AT)_3^{4-}/(446.5)/(80)$	18
	$[NBDO - H]^{-}/(402.3)/(12)$	

3 结 论

N-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮与 dC_6 , dT_6 , dA_6 , $d(AT)_3$ 可通过非共价键作用形成化学结合计量比 1:1 和 2:1 的复合物, 这些复合物在电喷雾方式下电离可产生 $[NBDO + DNA - 3H]^{3-}$, $[NBDO + DNA - 4H]^{4-}$, $[NBDO + DNA - 5H]^{5-}$, $[(NBDO)_2 + DNA - 4H]^{4-}$, $[(NBDO)_2 + DNA - 5H]^{5-}$ 等多种不同形式的离子, 其中 $[NBDO + DNA - 4H]^{4-}$ 为丰度最强和最稳定的复合物离子。 $[NBDO + DNA - 4H]^{4-}$ 离子可能由 $[NBDO - H]^{-}$ 与 $[DNA - 3H]^{3-}$ 和 NBDO 与 $[DNA - 4H]^{4-}$ 两两之间发生分子间相互作用而形成。

参考文献:

- [1] ROSU F, PAUW E D, GABELICA V. Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions [J]. *Biochimie*, 2008, 90(7): 1074 - 1087.
- [2] TERRIER P, TORTAJADA J, BUCHMANN W. A study of noncovalent complexes involving single-stranded DNA and polybasic compounds using nanospray mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18(2): 346 - 358.
- [3] ZHOU X M, SHEN Z, LI D Z, et al. Study of interactions between actinomycin D and oligonucleotides by microchip electrophoresis and ESI-MS [J]. *Talanta*, 2007, 72(2): 561 - 567.
- [4] 林秀丽, 陆玮洁, 主沉浮. 电喷雾质谱在药物和 DNA 相互作用研究中的应用 [J]. *中国生化杂志*, 2007, 28(2): 124 - 126.
- [5] 饶小平, 宋湛谦, 高宏. 脱氢枞胺及其衍生物的研究与应用进展 [J]. *化学通报*, 2006, 60(3): 168 - 172.
- [6] 陈泳, 林中祥. *N*-苯甲酰基-脱氢枞胺-7-酮的合成及其对雄激素受体活性的研究. [J]. *林产化学与工业*, 2009, 10(增刊): 121 - 124.
- [7] WAN C H, CUI M, SONG F R, et al. A study of the non-covalent interaction between flavonoids and DNA triplexes by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2009, 283(1/2/3): 48 - 55.
- [8] POCSFALVI G, LANDA G D, FERRANTI P, et al. Observation of non-covalent interactions between beauvericin and oligonucleotides using electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11(3): 265 - 272.
- [9] JANSSEN P A, DONGEN J J, MEIJER E W, et al. Electrospray-ionization mass spectrometry for screening the specificity and stability of single-stranded - DNA templated self-assemblies [J]. *Chemistry European*, 2009, 15(2): 352 - 360.
- [2] SUSHMA K, MANESH K. Optimization of bit plane combination for efficient digital image after marking [J]. *International Journal of Computer Science and Information Security*, 2009, 4(2): 19 - 20.
- [3] ZHANG L. Combined the information hiding technology with JPEG2000 [D]. University of TianJin, 2003: 95 - 98.
- [4] ZHAO H M. Fingerprint system and DSP fast processing technology [J]. *Research & Progress of Solid State Electronics*, 2004, 24(3): 337 - 342.
- [5] TAUBMAN D S, MARCELLIN M W, et al. Image compression foundation, standard and practice of the JPEG2000 [M]. Electronics Industrial Publisher, 2004: 415 - 417.
- [6] LI K, ZHANG X P. An image watermarking method integrating with JPEG-2000 still image compression standard [C] // *Electrical and Computer Engineering IEEE CCECE Canadian Conference on*, 2003: 2053 - 2054.
- [7] TRAPPE W, WU M, WANG Z J. Anti-collusion fingerprinting for multimedia [J]. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 2008, 53(4): 1069 - 1087.
- [8] WANG Z J, WU M, TRAPPE W. Group-oriented fingerprinting for multimedia forensics [J]. *EURASIP Journal on Applied Signal Processing*, 2004, 14(8): 2142 - 2162.
- [9] WANG Y, LIANG F, XIAO M M. Color image watermarking adaptively in DC coefficients [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2010, 49(4): 43 - 48.
- [10] SWANSON M D, KOHAYASHI M, TEWFIK A. Multimedia data embedding and watermarking technologies [J]. *Proc of the IEEE*, 1998, 86(6): 1064 - 1087.
- [11] REN J, NADOOSHAN T. A cryptographic watermark embedding technique [C] // *IEEE Asilomar Conf on Signals, Systems and Computers*, 2004: 382 - 386.
- [12] MAEDER A J, PLANITZ B M. Medical image watermarking for multiple modalities [C] // *34th IEEE Proc on Applied Imagery and Pattern Recognition Workshop*, 2005: 158 - 165.
- [13] FEI C, KUNDER D, KWONG R H. Analysis and design of secure watermark-based authentication systems [J]. *IEEE Trans On Information Forensics and Security*, 2006, 1(1): 43 - 55.
- [14] PRAYOTH K, KITTI A, ARTHIT S. A new approach for optimization in image watermarking by using genetic algorithms [J]. *IEEE Trans on Signal Processing*, 2005, 53(12): 4707 - 4719.
- [15] COX J, KILIAN J, THOMSON F, et al. Secure spread spectrum watermarking for multimedia [J]. *IEEE Trans on Image Processing*, 1997, 6(12): 1673 - 1686.

(上接第 67 页)