

镍(II)多吡啶配合物的合成及其插入配体的形状对键合DNA的影响^{*}

张黔玲¹, 刘剑洪¹, 徐宏², 任祥忠¹, 刘建忠³, 计亮年²

(1. 深圳大学师范学院化生系, 广东 深圳 518060;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

3. 中山大学生命科学学院//教育部基因工程重点实验室, 广东 广州 501275)

摘要: 合成了2个多吡啶过渡金属镍(II)配合物 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{IP}]^{2+}$ 和 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{2+}$, 利用质谱和元素分析对配合物进行了表征。利用电子吸收光谱、荧光光谱以及黏度测定研究了配合物与小牛胸腺DNA的作用机制。结果表明, 配合物与DNA能够以插入模式作用, 并且由于配合物中的插入配体IP和PIP的形状不同, 从而使配合物与DNA的键合强弱不同。

关键词: 多吡啶镍(II)配合物; 小牛胸腺DNA; 插入作用

中图分类号: O614.821 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2003)03-0021-04

过渡金属多吡啶配合物与DNA的相互作用的研究一直是生物无机化学领域十分活跃的研究课题^[1]。近年来, 它们已经广泛地被研究用于DNA结构探针、DNA分子光开关、DNA足迹试剂、以及DNA断裂试剂等领域^[2,3]。这些八面体过渡金属多吡啶配合物与DNA以非共价结合作用, 主要有以下3种作用方式: ①静电作用; ②沟面结合和③插入结合。其中以插入结合模式最引人注意, 因为现在已经发现某些抗癌药的抗癌作用与插入结合有关。这种插入结合要求配合物的插入配体具有较好的平面性和适中的平面面积。为了研究配体的形状对配合物与DNA的作用的影响, 本文合成了具有不同插入配体的配合物 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{IP}]^{2+}$ 和 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{2+}$ (图1), 并且利用光谱学方法和流体力学方法研究了配合物与DNA的作用。

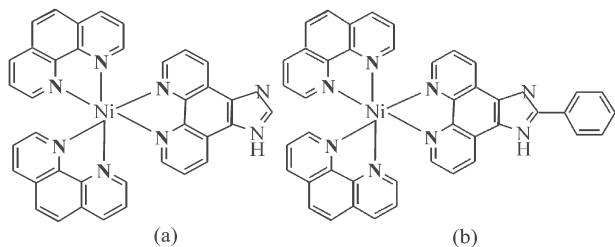


图1 配合物 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ (a) 和 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ (b) 的结构

Fig. 1 Structures of $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ (a) and $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ (b)

1 实验部分

1.1 实验仪器和试剂

Perkin Elmer 240 型元素分析仪; 岛津 MPS-2000 型紫外-可见分光光度计; VG ZAB-MS 质谱仪; Hitachi RF-4500 荧光光谱仪。

小牛胸腺DNA (BR, 华美生物工程公司), Tris (AR, 广州化学试剂批发部分装), 高氯酸钠 (分析纯, 上海恒信化学试剂有限公司)。配合物及小牛胸腺DNA均用 5 mmol/L Tris HCl, 50 mmol/L NaCl (pH=7.2) 的缓冲溶液配制。

1.2 合成

插入配体IP和PIP参照文献[4]的方法合成, $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ 参照文献[5]方法合成。

$[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{IP}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 的合成: 称取 0.49 g $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ (1.0 mmol) 和 0.33 g IP (1.5 mmol), 溶于绝对无水甲醇溶液中, 回流 3 h, 过滤。滤液中加入过量的高氯酸钠水溶液, 有粉色沉淀生成, 抽滤, 用冰水、甲醇反复洗涤, 真空中干燥。元素分析 ($\text{C}_{37}\text{N}_8\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{O}_{11}\text{Ni}$, w/%, 括号内的数值为理论值): C 49.86 (50.00); H 3.72 (3.38); N 12.72 (12.61)。质谱分析 m/z : 735 $[\text{M}-\text{ClO}_4^{2-}-1]$, 635 $[\text{M}-2\text{ClO}_4^{2-}-1]$ 。

$[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{PIP}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 的合成: 用PIP代替IP, 和上述同样的方法制备, 产品为淡黄色。

* 收稿日期: 2002-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29801005)

作者简介: 张黔玲 (1972年生), 女, 博士; E-mail: qzlh98@yahoo.com.cn

元素分析 ($\text{C}_{48}\text{N}_8\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{O}_{10.5}\text{Ni}$, w/%; 括号内的数值为理论值): C 53.88 (53.86); H 3.69 (3.45); N 12.04 (11.69). 质谱分析 m/z : 813 $[\text{M}-\text{ClO}_4^{2-}]$, 713 $[\text{M}-2\text{ClO}_4^-]$.

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 和配合物浓度的确定 称取适量的小牛胸腺 DNA 溶于 Tris 缓冲溶液中, 抽滤, 将所得到的滤液按需要稀释至一定浓度。测量 DNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值, 如果 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 1.9$, 说明基本上不含蛋白质, 不需要再进一步处理。小牛胸腺 DNA 的浓度以 DNA 在 260 nm 处的 $\epsilon = 6\,600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 来确定。

1.3.2 吸收光谱滴定 在紫外可见光谱仪中, 向参比池中加入 2.5 mL Tris 缓冲液, 在样品池中加入同样体积的 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的配合物溶液。每次往参比池和样品池中加入相同体积的小牛胸腺 DNA 溶液, 使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加, 直至饱和, 配合物的吸收峰不再减色。

1.3.3 稳态发光光谱滴定 在样品池中加入 2.5 mL $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的配合物溶液, 每次往样品池中加入一定体积的小牛胸腺 DNA 溶液, 使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加, 用适当的波长激发, 记录发射峰的波长及强度。

1.3.4 DNA 溶液黏度的测定 DNA 的黏度用乌氏黏度计测定。测量时, 温度恒定在 $(30 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。测试液按固定 DNA 的浓度为 0.5 mmol/L , 逐渐增加镍 (II) 配合物浓度的方法配制。测试液的相对黏度按下列公式计算:

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0}$$

其中, t_0 为缓冲液流经毛细管所需的时间, t 为 DNA 溶液 (含浓度不等的镍配合物) 流经毛细管所需的时间, η_0 为未加配合物时 DNA 溶液的相对黏度。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对结合比率 r ($r = [\text{Ni}]/[\text{DNA}]$) 作图, 可以看到镍配合物对 DNA 黏度的影响。

2 结果与讨论

2.1 配合物与 DNA 作用的紫外吸收光谱

吸收光谱是研究配合物与 DNA 作用的最常用的方法之一。通常, 镍 (II) 配合物在紫外区有一定的电子吸收。当配合物与 DNA 结合后, 其电子结构会受到 DNA 的扰动, 导致其配体所处环境发生改变, 配合物与 DNA 的结合强弱可通过光谱变化的幅度反映出来。一般来讲, 当小分子配合物以插入模式与 DNA 作用时, 其吸收光谱会出现一定

的减色效应和峰位红移现象。这是因为插入配体与 DNA 的碱基对发生 π 电子堆积后, 使其 π^* 空轨道与碱基的 π 电子轨道发生偶合, 能级下降, 从而导致 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能减小, 产生红移现象。同时, 偶合后的 π 轨道因部分填充电子, 使跃迁几率减小, 产生减色效应。减色效应与配合物的插入程度有关, 减色效应越明显, 吸收峰红移越大, 表明插入程度越强。配合物与 DNA 作用的吸收光谱如图 2 所示。从图中可见, 配合物在 Tris 缓冲液中的吸收光谱在 280 nm 和 220 nm 左右出现了 2 个较强的吸收峰, 归属于配体间 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所产生的 $\pi\pi^*$ 峰。与 DNA 作用后, 配合物的吸收光谱都出现了减色效应, 并伴有轻微的红移现象。这些光谱变化特征表明配合物与 DNA 是以插入模式作用的。同时, 还可以看出, 对于含不同插入配体 IP 和 PIP 的配合物, 其光谱扰动幅度明显不一样, $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ 与 DNA 作用后的减色效应程度要比 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ 大。这是由于配合物与 DNA 插入作用时插入程度不同引起的, PIP 比 IP 拥有更大的平面面积和扩展的 π 体系, 从而使 PIP 能够更有效地插入到 DNA 的碱基对并与之更强地结合。

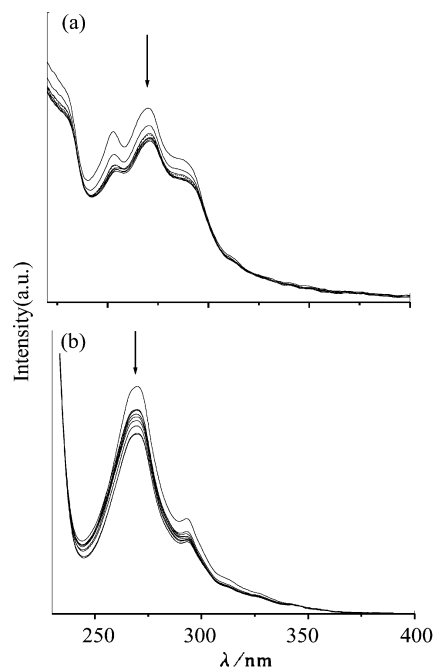


图 2 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ (a) 和 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ (b) 与 DNA 作用的吸收光谱

Fig 2 Absorption spectra of $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ (a) and $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ (b) in the presence of increasing amounts of CT DNA

2.2 配合物与 DNA 作用的荧光光谱

荧光光谱也可以用来研究配合物与 DNA 的作

用机制。若配合物与 DNA 结合后，荧光光谱发生变化，说明配合物与 DNA 之间发生了某种方式的结合。荧光光谱变化幅度的大小也能反映配合物与 DNA 作用的强弱。在 260 nm 波长的光激发下，配合物在 360 nm 左右出现较强的荧光发射峰。加入 DNA 后，配合物的发射峰会发生一定的位移，同时，荧光强度出现不同程度的增强。荧光强度的增强原因是由于配合物与 DNA 插入结合后，DNA 起到保护作用，使配合物不受水分子的进攻。其中，配合物 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{2+}$ 的荧光增强幅度要比 $[\text{Ni}(\text{phen})_2\text{IP}]^{2+}$ 的大。这表明含 IP 配体的配合物受 DNA 保护的程 度比含 PIP 的配合物小。这是由于含 PIP 的配合物能够更有效地插入到 DNA 的碱基对中，从而使其受 DNA 保护程度增大。这些结果与上面的吸收光谱滴定结果相一致。

表 1 镍(II)配合物与 CT DNA 作用的发射光谱数据¹⁾

Tab 1 Emission data of nickel(II) complexes in the absence and presence of DNA

配合物	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{max}0}/\text{nm}$	I/I_0
$[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$	353	342	1.10
$[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$	355	336	1.47

1) $[\text{Ni}] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $[\text{DNA}] / [\text{Ni}] = 20$; λ_{max} 为加入 DNA 后的荧光波长, $\lambda_{\text{max}0}$ 为未加入 DNA 后的荧光波长; I 为加入 DNA 后的荧光强度, I_0 为未加 DNA 时的荧光强度

2.3 配合物与 DNA 作用的黏度法研究

光谱学方法对于确定配合物与 DNA 的作用模式只能提供必要的证据。在缺少高精度晶体结构数据和核磁数据的情况下，黏度这种对 DNA 长度变化比较敏感的流体力学方法是检测溶液状态下配合物与 DNA 作用模式的最有效的重要手段。一般来讲，当小分子配合物以插入模式与 DNA 作用时，DNA 的相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体，因而导致 DNA 双螺旋伸长，DNA 溶液的黏度增加；当配合物以静电或沟面结合等非插入模式与 DNA 作用时，DNA 溶液的黏度无明显变化；以部分插入方式与 DNA 作用时，则可能使 DNA 的双螺旋扭结，使其黏度减小。配合物与 DNA 作用后对 DNA 溶液黏度的影响如图 3 所示。从图 3 中可以看出，随着配合物浓度的增加，DNA 溶液的黏度也随之增大。这些配合物对 DNA 溶液黏度的影响效果与已知的 DNA 经典插入试剂 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 相似。因此配合物与 DNA 是以经典的插入模式作用的。

同时，从图中还可看出， $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ 使 DNA 溶液黏度增加幅度要比 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ 大，进一步说明 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ 与 DNA 的作用比 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ 强。这些结果与前面的吸收光谱和荧光光谱的结果是一致的。

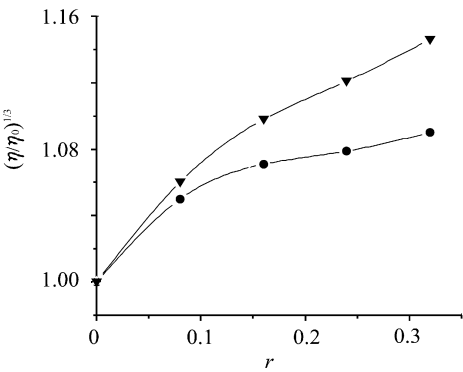


图 3 镍（II）配合物的浓度对小牛胸腺 DNA 的黏度的影响

Fig 3 Effect of increasing amounts of Ni（II） complexes on the relative viscosities of CT DNA

从实验结果可以看出， $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ 和 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{IP})]^{2+}$ 均能以插入模式与 DNA 作用，同时由于 PIP 比 IP 拥有更大的平面面积和扩展的 π 体系，因而 $[\text{Ni}(\text{phen})_2(\text{PIP})]^{2+}$ 与 DNA 的作用相对较强。

参考文献:

[1] XIONG Y, JI L N Synthesis, DNA-binding and DNA-mediated luminescence quenching of Ru(II) polypyridine complexes[J]. Coord Chem Rev, 1999, 185—186: 711—733.

[2] 计亮年, 张黔玲, 巢辉. 多吡啶配合物在大分子 DNA 中的功能及其应用前景[J]. 科学通报, 2001, 46: 451—460.

[3] 王雷, 杨光, 吴建忠, 等. Ru(phen)₃²⁺ 与小牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA 作用的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(5): 50—54.

[4] WU J Z, YE B H, JI L N, et al Bis(2,2'-bipyridine) ruthenium(II) complexes with imidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline or 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]-phenanthroline[J]. J Chem Soc Dalton Trans 1997, (8): 1395—1401.

[5] AROUNAGUIRI A, MAIYA B G. Dipyrrophenazine complexes of cobalt(III) and nickel(II): DNA-binding and photocleavage studies[J]. Inorg Chem, 1996, 35: 4267—4270.

Synthesis of Nickel (II) Polypyridyl Complexes and
the Effect of Planarity of Intercalative Ligand on DNA Binding

ZHANG Qian ling¹, LIU Jian hong¹, XU Hong², REN Xiang zhong¹, LIU Jian zhong³, JI Liang nian²

(1. Department of Chemistry and Biology, Normal College, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
3. School of Life Sceinses, Sun Yat sen University //
The Key Laboratory of Gene Engineering of Minstry of Education, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Two polypyridyl nickel (II) complexes [Ni (phen)₂IP]²⁺ and [Ni (phen)₂PIP]²⁺ were synthesized and characterized by EA and MS FAB. The DNA binding of both complexes have been investigated by electronic absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and viscosity measurements. The results indicate that both complexes bind to DNA by intercalation, and the complexes exhibit different DNA binding affinity due to the different planarity of IP and PIP.

Key words: polypyridyl nickel (II) complex; calf thymus DNA; intercalation

(上接第 20 页)

Non Debye Dielectric Spectroscopy of Lead Tungstate Crystals

WANG Wei lin¹, CHEN Min², SHEN Han²

(1. Department of Physics, Yichun College, Yichun 336000, China;
2. Department of Physics, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Frequency domain dielectric spectra of pure and La doped PWO₄ crystals have been measured from room temperature to 150 °C. Both dielectric relaxations of the two samples are non Debye. Two and three order structures related to defects and impurities make dielectric spectroscopy change along with the thermal dynamical history of the given sample.

Key words: PWO₄ crystal; dielectric spectroscopy; Debye relaxation