

$\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA 和 鱼精 DNA 作用的研究^{*}

王 雷 杨 光 吴建中 计亮年 许 琳

(中山大学化学系 生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 用吸收光谱、荧光光谱和 CD 光谱等方法研究了配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA 的作用. 结果表明, 配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA 作用为插入作用方式, 而与鱼精 DNA 的作用却是面式结合方式. 该配合物与这两种 DNA 的作用具有不同的立体选择性.

关键词 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$, DNA, 插入, 面式结合

分类号 O 614. 821

自 Barton 报道钌的多吡啶配合物可以作为 DNA 二级结构的探针以来^[1], 这一发现引起了人们普遍的重视, 并且得到了深入的研究. $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与 DNA 和多核苷的作用是研究最早、报道最多的^[2]. 本文研究了 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA) 和鱼精 DNA (herring sperm DNA) 作用时发现, $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与鱼精 DNA 的作用, 并不是通常所报道的插入作用方式, 而是比较罕见的面式结合作用方式 (surface-bound mode).

1 实验部分

1.1 实验仪器

Shimadzu MPS-2000 紫外可见分光光度计, Hitachi 850 荧光分光光度计. JASCO 公司的 Model J-20C 旋光光谱仪, 配有 DP-501N 数字处理器.

1.2 试 剂

$[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 按文献 [3] 制备. 小牛胸腺 DNA (上海市牛奶公司综合厂, $A_{260}/A_{280} = 1.92$), 鱼精 DNA (Sigma 公司, $A_{260}/A_{280} = 1.81$), DNA 直接使用, 未进一步的提纯. $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 按文献 [4] 制备. $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (广州化学试剂厂, AR 级). Tris (广州化学试剂批发部分装). 用双蒸水配制 5 mmol/L Tris 和 50 mmol/L NaCl 的缓冲溶液, DNA 的浓度用 P 含量来表示, DNA 中 P 的测量按文献 [5] 进行.

1.3 配合物与 DNA 作用的光谱测定

配制 $[\text{Ru}] = 10 \mu\text{mol/L}$, $[\text{DNA}] / [\text{Ru}] = 40$ 的溶液, 避光, 静置过夜后, 用 UV

^{*} 国家自然科学基金 (29570033) 和广东省博士后基金资助项目

收稿日期: 1996-10-04 王雷, 男, 28 岁, 博士后

及荧光光谱进行测定. 所有的测定过程均在室温下进行.

1. 4 配合物与 DNA作用的荧光猝灭实验

[Ru] = 2 μmol/L, [DNA] / [Ru] = 40, [Fe (CN)₆]⁴⁻ 的浓度在 0~ 0. 1 mmol/L之间变化; Co (phen)₃³⁺ 的浓度在 0~ 25 μmol/L之间变化.

1. 5 透析袋的预处理

透析袋在使用前, 用 3% 的 NaHCO₃ 溶液煮沸 10 min, 再用双蒸水洗净.

1. 6 配合物对 DNA的透析实验^[6]

取 5 mL × 10⁻³ mol/L浓度的 DNA于透析袋中, 取 10 mL 5 × 10⁻⁴ mol/L左右的浓度的配合物在室温下进行透析, 透析 48 h后, 透析液用旋光光谱仪进行 CD光谱的测定.

2 结果与讨论

2. 1 吸收光谱和荧光光谱

Ru (phen)₃²⁺ 与小牛胸腺 DNA和鱼精 DNA的作用的光谱数据表 1所示.

表 1 Ru (phen)₃²⁺ 与小牛胸腺 DNA和鱼精 DNA作用的光谱性质变化

Tab. 1 Spectroscopic properties in binding Ru (phen)₃²⁺ to calf thymus DNA and herring sperm DNA

DNA	吸收光谱 ¹⁾ λ _{max} /nm			减色效应 %	荧光光谱 λ _{max} /nm			I/I ₀
	未结合	结合 ²⁾	峰移动		未结合	结合	峰移动	
小牛胸腺 DNA	445	447	2	12	599	602	3	1. 92
鱼精 DNA	445	447	2	0	599	601	2	0. 99

1) [Ru] = × 10⁻⁵ mol/L, 所有溶液在 5 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl; 2) [P]/[Ru] = 40

文献^[5]报道了小牛胸腺 DNA和鱼精 DNA中各自的碱基含量, 各种碱基在这两种DNA中的含量基本接近. 所以, 配合物与这两种DNA作用时所表现出来的差异性, 并不是由碱基的不同所造成的.

Ru (phen)₃²⁺ 与小牛胸腺 DNA的结合方式主要是插入作用为主^[7], 当这种作用发生时, 配合物的光谱性质会有部分的变化, 如荧光增加, 以及吸收光谱中的 MLCT吸收峰的减色效应等等. 当 Ru(phen)₃²⁺ 与鱼精 DNA发生作用时, 即没有看到 MLCT的减色效应, 也没有看到配合物与DNA作用时, 荧光强度的变化. 从这些数据可以看出, Ru (phen)₃²⁺ 与鱼精DNA的作用, 并不是与插入作用为主.

2. 2 荧光猝灭

根据文献 [2, 8], 本研究还通过配合物的荧光猝灭研究了配合物与DNA作用. 对于研究配合物与DNA作用, 荧光猝灭也是非常有效的方法之一. 所用的猝灭剂为 K₄ [Fe (CN)₆] 和 Co (phen)₃³⁺.

Ru (phen)₃²⁺ 是带正电荷的, 在溶液中, 如果DNA不存在时, 这些配合物的荧光很容易被带负电荷的 K₄ [Fe (CN)₆]所猝灭, 但加入DNA之后, 因配合物部分插入到DNA中, 受到了DNA的保护, DNA是带负电荷的, 在溶液中, 带负电荷的DNA与带负电荷的猝灭剂, 是同种电荷相排斥, 所以, K₄ [Fe (CN)₆]不能猝灭插入到DNA中的配合物.

Co (phen)₃³⁺ 对钌多吡啶类配合物的荧光猝灭作用与 K₄ [Fe (CN)₆]对配合物的荧光猝灭作用刚好相反. Co (phen)₃³⁺ 带正电荷, 在溶液中与钌的配合物带同种的电荷, 因同种电荷互相排斥, 在DNA不存在时, Co (phen)₃³⁺无法猝灭 Ru (II) 配合物的荧光.

DNA 存在下, DNA 作为电子受体和电子给体之间电子转移的介质, $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 对配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的荧光具有猝灭作用, 并且, 随着 DNA 含量的增加, 该猝灭反应速度加大^[8]. 从猝灭剂分别为 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (图 1a) 和 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ (图 1b), 配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图可以看出, 从猝灭曲线的斜率可以比较配合物与这 2 种 DNA 作用的程度.

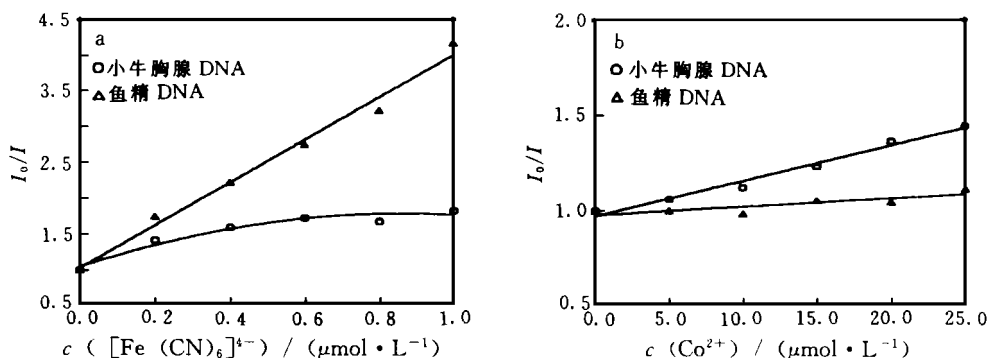


图 1 DNA 存在下, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (a) 和 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (b) 对 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的荧光猝灭

Fig. 1 Quenching of $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ by $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (a) and $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (b) in the presence of DNA

从猝灭曲线上看, 猝灭剂为 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 时, 在鱼精 DNA 存在下, $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的荧光很容易被猝灭, 即 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 受到 DNA 的保护程度小, 反映出配合物与鱼精 DNA 作用的强度较弱. 而以此相对比的小牛胸腺 DNA, 在 DNA 存在下, 配合物的荧光强度随这猝灭剂浓度的增加减弱缓慢, 表明 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与小牛胸腺 DNA 有较好的结合能力.

猝灭剂为 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 时, DNA 作为电子转移的介质, 只有 DNA 存在下, 才可以观察到 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 对配合物的荧光猝灭作用. 当鱼精 DNA 存在时, 未观察到 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 对 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的猝灭作用, 这样从另一方面证实了 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 未插入到鱼精 DNA 中, 没有发生插入作用的模式.

2.3 CD 光谱

通过配合物对双螺旋 DNA 透析后, 对透析液的 CD 光谱的测定可以判断配合物是否与 DNA 之间存在立体选择性的作用. 所有配合物对小牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA 透析后, 透析液的 CD 光谱如图 2 所示. 从 CD 光谱看出, 配合物与 DNA 的作用具有立体选择性, 用外消旋的配合物对 DNA 透析时, Δ 和 Λ 光学异构体对 DNA 的结合能力是不同的. 经过长时间配合物对 DNA 透析后, 与 DNA 结合能力强的对映体在透析袋内与 DNA 立体选择性结合, 使得在透析液中, 表现出与 DNA 结合能力弱的对映体含量增加, 这样透析液具有 CD 光学活性.

当用外消旋的 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 分别对小牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA 透析 48 h 后, 对透析液测 CD 光谱 (图 2). 平衡透析是用来检测配合物与 DNA 立体选择作用的一个有利的手段. 透析液中的配合物原来是外消旋的, 在对 DNA 的透析过程中, 2 种对映体对 DNA 的结合的能力不同的, 经过长时间的透析后, 使得与 DNA 结合能力弱的对映体在透析液中富集, 表现出 CD 光学活性. 外消旋的 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 对这两种 DNA 透析后, 透析液的 CD 光谱表明, 所得的透析液刚好为一对光学对映体.

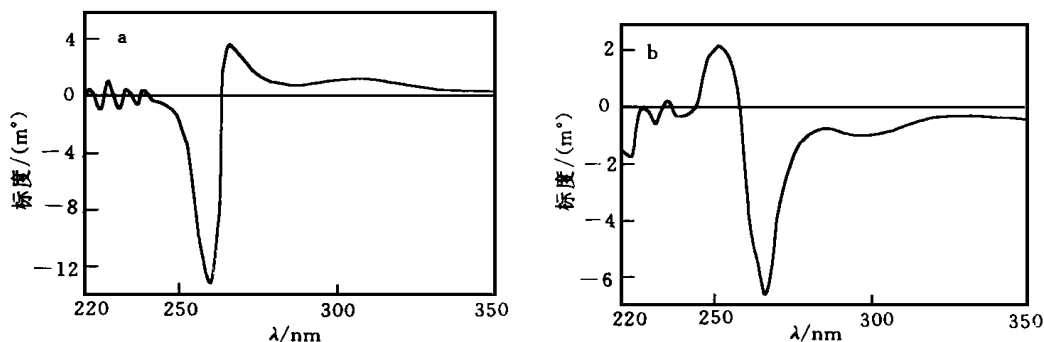


图 2 配合物对小牛胸腺 DNA (a) 和鱼精 DNA (b) 透析 48 h 后, 透析液的 CD 光谱

Fig. 2 CD spectra of 48 h dialyzates versus calf thymus DNA (a) and herring sperm DNA (b)

小牛胸腺 DNA 为典型的 B-DNA, 配合物与小牛胸腺 DNA 的作用是以发生在大沟处插入作用为主, 这种作用方式以 Δ -对映体的结合有利, 使得溶液中的 Δ -对映体富集, CD 光谱同样证明了这种结果。

配合物对鱼精 DNA 透析后的透析液的 CD 光谱, 透析液中的 Δ -对映体含量增多, 从而表明, 该配合物与鱼精 DNA 作用时, Δ -对映体优先与 DNA 结合。

根据配合物与 DNA 作用的实验结果, 结合 Barton 所提出的配合物与 DNA 作用的两种构型^[12], 认为 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与鱼精 DNA 的作用, 是表面吸附作用, 即“面式结合作用”。这种结合模型是在 DNA 的“小沟”处, 配合物靠配体与 DNA 的疏水性稳定下来。 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 配合物与 DNA 发生面式作用时, 2 个 phen 配体靠近 DNA 双螺旋的小沟。对于 Δ -对映体, 配体的位置刚好与双螺旋的小沟的构型相匹配; 而对于 Λ -对映体, 当配合物靠近 DNA 的小沟时, 配体的位置正对着 DNA 双螺旋的两条磷酸链, 配体与磷酸的空间作用, 阻碍了配合物向 DNA 靠近。所以, 从 CD 光谱的结果分析: 配合物对鱼精 DNA 的作用, 透析液产生负康顿效应, 与配合物对小牛胸腺 DNA 透析后, 透析液所产生的正康顿效应相反。证明鱼精 DNA 立体选择性地与 Δ - $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 结合, 这种结合符合面式作用的特征。

由于“面式结合作用”是配合物只在 DNA 表面处的结合, 未插入到 DNA 的碱基对之间, 所以, 对于整个配合物而言, 金属中心的微观环境没有改变, 配合物的吸收光谱不会出现变化。同样的原因, 在发生面式作用时, 配合物的荧光强度也不会增大。荧光强度的增加是插入作用的重要特征。原因主要是配合物插入到 DNA 中后, 激发态的振动方式受到限制, 同时, 配合物插入后, 与水分子的碰撞几率以及能量的散失等方面减少所致。“面式结合方式”只是配合物在 DNA 表面结合, DNA 分子不能阻碍水分子以及猝灭试剂对配合物的进攻, 因此, 配合物与 DNA 发生的若是面式结合作用, 就不会有荧光强度增加等现象。

$\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与鱼精 DNA 作用时, 吸收光谱和荧光光谱都没有发生变化, 同时, Δ -对映体配合物表现出优先结合的趋势, 这些实验结果与“面式结合作用”的特点十分吻合。在这里, CD 光谱的结果是十分重要的。如果, 配合物仅仅与 DNA 发生的是静电吸附作用甚至并未发生作用, 尽管在这种情况下, 也不会有吸收光谱和荧光光谱的变化, 但这种情况下, 配合物对 DNA 透析后, 不可能有透析液的 CD 光谱活性。

由于配合物与 DNA 的插入作用发生在 DNA 的“大沟”处, 而面式作用发生在 DNA 的

“小沟”处.通过配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与这两种 DNA 作用的方式,可以定性地比较这两种 DNA 的沟的大小.配合物 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 能插入到小牛胸腺 DNA 的大沟处,与小牛胸腺 DNA 的作用为插入作用为主,说明小牛胸腺 DNA 的大沟比较宽而浅,小牛胸腺 DNA 的小沟处,不易与配合物发生面式结合作用,即小牛胸腺 DNA 的小沟显得窄而深,这些特点符合 B-DNA 的特征.而对于鱼精 DNA 与 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 的作用,却以发生在小沟处的面式结合作用为主,相反却不易在 DNA 的大沟处发生插入作用.从这个配合物与 DNA 的作用,可以预测,鱼精 DNA 的大沟比较狭,而且很深,配合物不易插入.相反,鱼精 DNA 的小沟比较浅而且宽,适合发生面式结合作用.文献报道了用配合物三(3,4,7,8-四甲基-邻菲-啉)铈的配合物来探测 A 型 DNA^[9],实验的现象与我们用 $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 与鱼精 DNA 作用的结果相类似. A-DNA 有非常深而且狭的大沟,却有很宽而且浅的小沟. A-DNA 十分有利于发生“面式结合作用”.根据实验结果,我们推测,鱼精 DNA 可能有 A-DNA 的一些特点.

参 考 文 献

- 1 Barton J K, Panishefsky A, Goldberg J M. Tris(phenanthroline) ruthenium(II): Stereo-selectivity in binding to DNA. J Am Chem Soc, 1984, 106 2172
- 2 Barton J K, Goldberg J M, Kumar C V, et al. Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline) ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. J Am Chem Soc, 1986, 108 2081
- 3 Liu C F, Liu N, Bailar J C. The stereochemistry of complex inorganic compounds X X VII. Inorg Chem, 1964, 3(8): 1085
- 4 Strazza G, Sinibold M. Preparation and characterization of cobalt(III) bipyridine and phenanthroline complexes. Inorg Chim Acta, 1980, 44 295
- 5 Jones A S, Ross G W, Takemura S, et al. The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids part VI. J Chem Soc, 1964 373
- 6 Zhao G, Tang W X, Dai A B. $\text{Cr}(\text{phen})_3^3$ 与 DNA 的立体选择性作用. Chem J Chinese Univ, 1990, 1(12): 1327
- 7 Pyle A M, Rehmann J P, Barton J K, et al. Mixed-ligand complexes of ruthenium II. J Am Chem Soc, 1989, 111 3051
- 8 Barton J K, Kumar C V, Turro N J. DNA-Mediated photoelectron transfer reactions. J Am Chem Soc, 1986, 108 6391
- 9 Mei H Y, Barton J K. Chiral probe for A-form helices of DNA and RNA: Tris(4-trimethylphenanthroline)ruthenium (II). J Am Chem Soc, 1986, 108 7414

Studies on Interaction of Tris(Phenanthroline) Ruthenium with Calf Thymus DNA and Herring Sperm DNA

Wang Lei Yang Guang Wu Jianzhong Ji Liangnian* Xu Lin

Abstract The binding of coordination compound $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ to calf thymus DNA and herring sperm DNA has been investigated by absorption, emission and circular dichroism spectroscopy. Measurement of enantioselectivity combined with photophysical experiment shows the binding of $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ with calf thymus DNA is intercalatively bound mode, but the binding of $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ with herring sperm DNA is surface-bound mode.

Keywords $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$, DNA, intercalation, surface-bound

* Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou. 510275