

羧甲基壳聚糖-Cr(III)配合物与鲱鱼精 DNA 的作用

冯小强^{1*}, 李小芳¹, 杨 声²¹天水师范学院 生命科学与化学学院, 天水 741001; ²定西师范高等专科学校, 定西 743000

摘要: 采用循环伏安法和紫外光谱法研究了羧甲基壳聚糖-Cr(III)配合物与鲱鱼精 DNA 之间的作用方式。结果发现: (1) 羧甲基壳聚糖-Cr(III) 的存在导致 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 探针分子氧化还原峰电流下降, 式量电位正移, 显示羧甲基壳聚糖-Cr(III) 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 与 DNA 之间存在竞争性作用, 说明羧甲基壳聚糖-Cr(III) 通过插入方式与 DNA 相互作用的; (2) 中性红的加入导致羧甲基壳聚糖-Cr(III)/DNA 体系的特征吸收峰发生增色效应、峰位红移并伴有等吸收点出现, 这进一步表明羧甲基壳聚糖-Cr(III) 是以插入方式与鲱鱼精 DNA 发生了相互作用, 导致 DNA 分子的构象变化, 并且 CMC-Cr 与 DNA 的结合比 $n(\text{CMC-Cr}) : n(\text{DNA})$ 为 3:1。

关键词: 羧甲基壳聚糖-Cr(III); 鲱鱼精 DNA; 循环伏安法; 紫外光谱; 相互作用

中图分类号: X703.1

文献标识码: A

Interaction of Carboxymethylchitosan-Cr(III) Complex with Herring Sperm DNA

FENG Xiao-qiang^{1*}, LI Xiao-fang¹, YANG Sheng²¹College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;²Dingxi Teachers' College, Dingxi 743000, China

Abstract: The interaction between carboxymethylchitosan-Cr(III) Complex (CMC-Cr) and herring sperm DNA were investigated by cyclic voltammetry and UV-Vis spectra. The results indicated: Firstly, the peak current of probe molecule $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ at Au/DNA electrodes obviously decreased and the peak potential shifted positively because of the existences of CMC-Cr, which showed that there was a competitive effect between CMC-Cr and $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ with herring sperm DNA, and revealed that a binding mode intercalation was interacted between CMC-Cr and herring sperm DNA. Secondly, the absorption intensity of CMC-Cr/DNA system increased with the adding of neutral red (NR), the maximum absorption peak had a red shifted and appeared equal absorption point, which further illustrated that a binding mode intercalation was interacted between CMC-Cr and herring sperm DNA, thus led to the change of DNA conformation. The combining ratio of $n(\text{CMC-Cr})$ and $n(\text{DNA})$ was 3:1.

Key words: CMC-Cr; herring sperm DNA; cyclic voltammetry; UV-Vis spectrum; interaction

DNA 是生命的基本遗传物质, 是抗癌药物进入体内作用的主要标靶。近年来, 由于过渡金属配合物在 DNA 探针、DNA 分子开关以及新型抗癌药物设计等方面都具有潜在的价值, 所以过渡金属配合物与 DNA 相互作用的研究一直是生物无机化学领域的热门课题。壳聚糖是由多个 *N*-乙酰氨基葡萄糖通过 β -(1 \rightarrow 4) 糖苷键连接起来的高聚物, 它无毒无害, 具有多种独特的生物活性如可活化淋巴细胞、增强机体免疫力、抗菌抑菌、抗肿瘤等, 但由于水溶性差的缺点而限制了壳聚糖的应用范围。羧甲基壳

聚糖(CMC)是壳聚糖重要衍生物之一, 它既保留了壳聚糖的优点, 又极大地改善了水溶性。另外, 由于羧基的引入使其结合金属离子的种类增加, 络合能力与壳聚糖相比大大提高, 因而在众多壳聚糖衍生物中倍受关注。有关羧甲基壳聚糖与金属离子 Fe^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Ag^+ 、 Cu^{2+} 的配合物结构及性能的研究有所报道。但就羧甲基壳聚糖金属配合物与 DNA 相互作用的研究国内外鲜见报道。本课题组前期工作中, 制备并表征了羧甲基壳聚糖-Cr(III) 配合物, 发现其抗氧化活性较羧甲基壳聚糖和壳聚糖本身增强, 相关研究结果在另文报道。在前期工作的基础上, 本实验采用循环伏安法和光谱法进一步研究了羧甲基壳聚糖-Cr(III) 配合物与鲱鱼精 DNA 的相互作用, 该研究为其在药物的开发和分子生物学中的

收稿日期: 2014-2-21 接受日期: 2014-07-03

基金项目: 天水师范学院“青蓝”人才工程和中青年科研项目 (TSA1305, TSA1307)

* 通讯作者 E-mail: fengxiaoliang1979@163.com

应用提供有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

CMC-Cr(III)实验室自制, Cr^{3+} 含量为 0.37%; 鲱鱼精 DNA 为 Sigma 公司产品。实验用水为二次蒸馏水。CHI660B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司), 电化学测试前所有溶液均用氮气除去游离氧。DNA 在金电极表面的自组装参看文献^[1]。获得实验所需的 DNA 修饰金电极记为 Au/DNA 电极; UV-2450 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 CMC-Cr 配合物与鲱鱼精 DNA 的作用

电化学实验: 实验前预先在电化学池加入 1.0 mL 的包含 5 mmol/L 电活性指示剂 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 支持电解质的 pH 6.8 Tris-HCl 缓冲溶液。以 Au/DNA 为工作电极, 甘汞电极为参比电极, 铂电极为辅助电极, 运用循环伏安法测定 Au/DNA 修饰电极在不同 CMC-Cr 浓度和不同扫描速率条件下的循环伏安曲线。

紫外吸收光谱: 于样品池和参比池中分别加入 0.1 mg/mL 的 DNA 3.5 mL, 于样品池中滴加 75 μL 浓度为 0.5 mg/mL 的 CMC-Cr, 尔后依次用浓度为 2×10^{-4} mol/L 的中性红(NR)溶液进行滴定, 摇匀, 放置 5 min, 扫描吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 循环伏安法研究 CMC-Cr 与 DNA 的相互作用

DNA 与金属配合物的作用主要有三种: 嵌插作用、沟槽结合作用和静电结合作用。Bard 等研究发现当 DNA 与金属配合物作用时, 若式量电位 $E_{1/2}$ 负移, 则金属配合物与 DNA 发生了静电作用; 如果式量电位 $E_{1/2}$ 正移, 则存在嵌插作用^[2]。图 1 是 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 在含有不同浓度的 CMC-Cr 中, 扫描速率为 0.1 V/s 时在 Au/DNA 电极上的循环伏安曲线。图 1 中第 1、2 条曲线分别为含 KCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液中的 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 在裸金电极和 Au/DNA 修饰电极的循环伏安曲线, 可见当裸金电极表面修饰 DNA 后, 电活性指示剂 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 的氧化峰和还原峰电流分别从 -1.392×10^{-4} A 和 1.702×10^{-4} A 下降到 -1.389×10^{-4} A 和 1.649×10^{-4} A, 且氧化峰和还原峰电位分别从 0.483 V 和 0.339 V 正移到 0.493 V 和 0.354 V, 可见式量电位 $E_{1/2}$ 向正方向移动, 这说

明组装在金电极表面的 DNA 作为电子和物质传递的阻碍层降低了铁氰化物向电极表面的扩散, 同时电位正移也说明 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 通过嵌插模式与 DNA 发生作用^[3]。

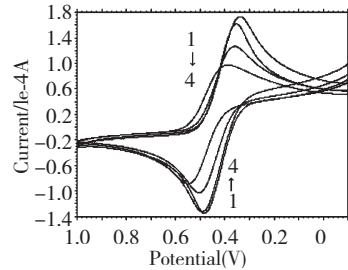


图 1 含不同浓度 CMC-Cr 的 Tris-HCl 缓冲溶液中的 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 在 Au/DNA 电极上循环伏安图

Fig. 1 CV curves of $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in Tris-HCl buffer solution containing different concentrations of CMC-Cr
 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液在裸金电极(1)、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液在 Au/DNA 电极(2)的循环伏安图; 3, 4, CMC-Cr 的浓度为: 0.2、0.4 mg/mL

随着 CMC-Cr 溶液的加入, 体系的氧化还原峰电流下降, 但图中没有新的氧化还原峰出现, 式量电位 $E_{1/2}$ 正移。当 CMC-Cr 溶液的浓度增加到 0.4 mg/mL 时, 氧化峰和还原峰电流分别下降到 -1.077×10^{-4} A 和 9.380×10^{-5} A, 氧化峰和还原峰电位分别正移到 0.547 V 和 0.387 V。表明 DNA 与 CMC-Cr 配合物之间发生了作用, 未与 DNA 作用的留在溶液中的自由配合物的浓度就相应降低, 由于在单位时间内溶液中迁移到电极表面的配合物分子数量下降了, 使得测得的峰电流减小, 同时也说明 DNA 与 CMC-Cr 配合物生成的复合物无电活性^[4]。根据 DNA 与靶向分子相互作用的三种模式, 可以初步推测 CMC-Cr 分子通过插入方式与 DNA 作用。

进一步研究了不同扫描速率下, 在含 CMC-Cr 溶液(浓度为 0.2 mg/mL)的 Tris-HCl 缓冲溶液中 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 在 Au/DNA 修饰电极的氧化还原峰电流的影响(图 2a)。从图 2b 可知, 反应体系中 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 在 Au/DNA 修饰电极上的氧化峰电流 i_{pa} 和还原峰电流 i_{pc} 与扫描速度平方根 $v^{1/2}$ 均呈现良好的线性关系, i_{pa} 与扫描速度平方根 $v^{1/2}$ 满足线性方程 $i_{pa} = -0.579 - 2.434v^{1/2}$ ($r = -0.9937$), i_{pc} 与扫描速度平方根 $v^{1/2}$ 满足线性方程 $i_{pc} = 0.689 + 1.944v^{1/2}$ ($r = 0.9903$)。这说明在一定的扫描速率区间内(0.1 ~ 0.6 V/s), 在 CMC-Cr 参与条件下, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 在 Au/DNA 电极上的反应受吸附控制^[5]。

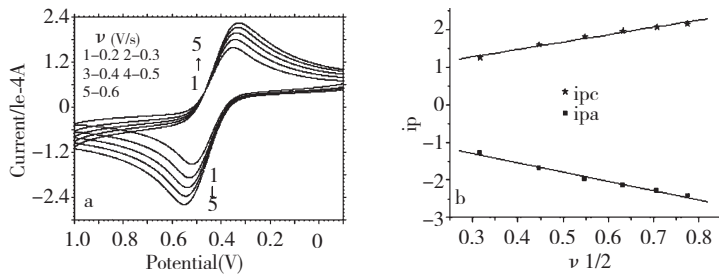
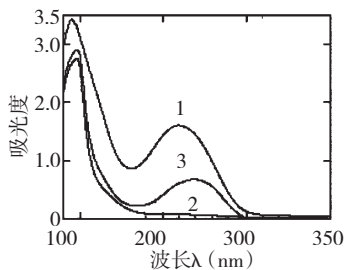


图2 扫速对 CMC-Cr 在 Tris-HCl 缓冲溶液中的 $K_4Fe(CN)_6$ 在 Au/DNA 电极上 CV 曲线影响

Fig. 2 Effect of scan rate on CV curves of $K_4Fe(CN)_6$ in Tris-HCl buffer solution containing CMC-Cr

2.2 光谱法研究 CMC-Cr 与鲑鱼精 DNA 的作用

当配合物与 DNA 作用时会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扰动的变化反映出来。对 DNA 的吸收光谱来说,如果导致分子的轴向变化即其构象变化,则产生减色效应及红移现象,且作用越强减色效应越明显;如果导致 DNA 双螺旋结构的破坏,则产生增色效应^[6]。CMC-Cr 对 DNA 紫外光谱的影响如图 3 所示,CMC-Cr 和 DNA 分别在 202 nm、258 nm 附近有紫外吸收,而当往 DNA 中滴加 CMC-Cr 后(CMC-Cr 最终浓度为 0.011 mg/mL),发现 DNA 的特征吸收峰红移至 270 nm 附近,并且吸光度急剧减小,即 CMC-Cr 对 DNA 的吸收峰位发生红移和明显的减色效应,表明 CMC-Cr 导致了 DNA 分子构象的变化。



1:DNA;2:CMC-Cr;3:CMC-Cr/DNA

图3 CMC-Cr 对 DNA 紫外光谱的影响

Fig. 3 Effect of CMC-Cr on the absorption spectra of DNA

固定 CMC-Cr 浓度,改变 DNA 浓度,测定在 202 nm 处的吸光度,吸光度对 DNA 浓度作图,结果如图 4 所示。实验测得 CMC-Cr 与 DNA 的结合比 n (CMC-Cr): n (DNA) = 3:1。根据 Beer 定律,配合物-DNA 溶液中的吸光度可表达为 $A = \epsilon bc$ 。式中 ϵ 代表配合物-DNA 的摩尔吸光度, c 代表配合物-DNA 的浓度,即结合形成此复合物的 DNA 的浓度, b 代表比色皿的厚度。计算求得 CMC-Cr 的表观摩尔吸光系数 $\epsilon = 1.08 \times 10^6 L / (mol \cdot cm)$ 。

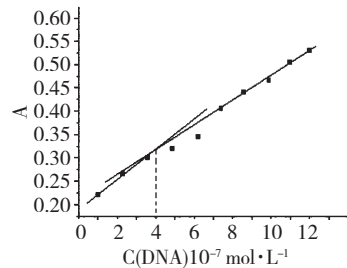


图4 CMC-Cr -DNA 系统的摩尔比图

Fig. 4 Molar ratio plots of CMC-Cr -DNA system

NR 能以嵌插方式与 DNA 结合,因此常以 NR 作为光谱探针来研究小分子与 DNA 的作用方式。NR 对 CMC-Cr-DNA 体系紫外光谱的影响如图 5 所示,当 CMC-Cr-DNA 体系在 202 nm 和 265 nm 处存在特征吸收峰。当加入 NR 后溶液的吸收光谱发生了较大的变化,CMC-Cr-DNA 体系特征吸收峰强度随着 NR 体积的增加而增强,在 265 nm 处的峰位也发生了红移,在 235、310 nm 处是减色效应,而在 202、265 nm 是增色效应,同时在 205、250 nm 和 290 nm 附近出现三个等吸收点。紫外光谱图的变化表明 CMC-Cr、DNA 与 NR 三者存在新的共平衡体系,由于 NR 与 DNA 发生嵌插作用,NR 对 CMC-Cr 与

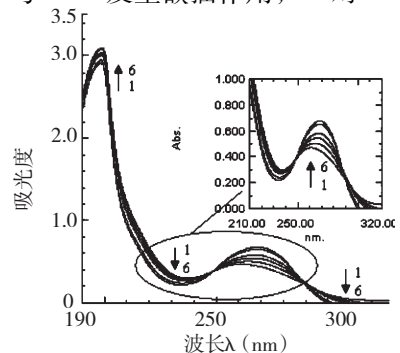


图5 NR 对 CMC-Cr-DNA 体系紫外光谱的影响

Fig. 5 Effect of NR on the UV-Vis spectra of CMC-Cr-DNA
1-6:NR 最终浓度为 0、1、2、4、8、16 mM

DNA 的作用有竞争抑制作用,进一步证实 CMC-Cr 能够以嵌插方式与 DNA 作用。

3 结论

以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 为探针分子,采用循环伏安法研究了 CMC-Cr 与鲑鱼精 DNA 的相互作用。实验结果表明:CMC-Cr 的存在导致 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 探针分子峰电流的下降,且式量电位 $E_{1/2}$ 正移,显示 CMC-Cr 与 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 探针分子间存在与 DNA 的竞争性作用。

NR 的加入使得 CMC-Cr/DNA 体系的特征吸收峰发生增色效应、峰位红移并伴有等吸收点出现,表明 CMC-Cr、DNA 与中性红三者存在新的共平衡体系,这进一步表明 CMC-Cr 以嵌插方式与鲑鱼精 DNA 发生相互作用,导致 DNA 分子的构象变化,并且 CMC-Cr 与 DNA 的结合比 $n(\text{CMC-Cr}):n(\text{DNA})=3:1$ 。

参考文献

1 Hu Q (胡全), Zhang KJ (张克军), Jin HL (金辉乐), *et al.* Electrochemical investigation on the interaction of ben-

zene sulfonyl 5-fluorouracil derivatives with double-stranded DNA and G-quadruplex DNA. *Sci Sin, Chim* (中国科学:化学), 2012, 42: 792-798.

2 Rodriguez M, Bard AJ. Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. Voltammetric and eletrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2-bipyridine) osmium(II) with DNA. *Anal Chem*, 1990, 62: 2658-2662.

3 Patiente N, Sierra S, Airaksinen A. Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*, 2005, 107: 183-193.

4 Carter MT, Rodriguez M, Bard AJ. Voltammetric studies of interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated Cr complexes of Crbalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2-bipyridine. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 8901-8911.

5 Erkkila KE, Odom DT, Barton JK. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chem Rev*, 1999, 99: 2777-2796.

6 Du JY (杜江燕), Huang XH (黄晓华), Xu F (徐飞), *et al.* Spectral study on the interaction mechanism between thionine and calf thymus DNA. *Spectrosc Spectral Anal* (光谱学与光谱分析), 2005, 25: 1435-1439.

(上接第 1802 页)

9 Bai HJ (白红进), Wang HB (王河滨), Luo F (罗锋). Study on extracting and scavenging activity against DPPH free radical of pigment from *Lycium ruthenicum* Murr. *Acta Agr Boreali-Occid Sin* (西北农业学报), 2007, 16: 190-192.

10 Yu D (于东), Chen GX (陈桂星), Fang ZX (方忠祥), *et al.* Advances on extraction, isolation, purification and identification of anthocyanins. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2009, 35: 127-132.

11 Ma ZC (马自超), Pang SZ (庞世珍). Natural Food Coloring Chemicals and Production Technology (天然食用色素化学及生产工艺学). Beijing: China Forestry Press, 1994. 39-92.

12 Hendry GAF, Houghtor JD. Natural Food Colorants. London: Springer, 1992. 227.

13 Jiang NS (江南生), Yan RR (严日仁), Tang BL (唐本琏). Identification of red pigment of roselle. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 1990, 3: 18-23.

14 Hong V, Wrolstad RE. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 1990, 36: 708-715.

15 Tang CH (唐传核). Bioactive Components from Plants (植物生物活性物质). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 218-248.

16 Yuan S (袁帅), Yao SJ (姚胜军), Geng Y (耿昱), *et al.* Identification of anthocyanins and flavonols in extract of blueberry by using HPLC-ESI-MS/MS. *Acta Chim Sin* (化学学报), 2009, 67: 318-322.

17 Haibo W, Edward JR, Anil J, *et al.* Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 1839-1844.

18 Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem*, 1958, 70: 22-29.

19 Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J C. Anthocyanins in cereals. *J Chromatogr A*, 2004, 1054: 129-141.

20 Ji M (季梅), Li Q (李强), Lou HX (娄红祥). HPLC-DAD-MS-MS determination of anthocyanins in red grape skin. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, 31: 2240-2243.

21 Liang ZC, Wua BH, Fan PG, *et al.* Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chem*, 2008, 111: 837-844.