

稀土离子对 DNA 作用的循环伏安法和光谱法研究

沈鹤柏* 康玉专 杨海峰 郁林 章宗穰

(上海师范大学化学系 上海 200234)

摘要 运用循环伏安法,紫外光谱和拉曼光谱等方法研究了 Eu^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 等稀土金属离子与 DNA(小牛胸腺)的相互作用。 Ce^{3+} 与 DNA 作用后, Ce^{3+} 的 CV 曲线的峰电流密度明显降低,且氧化峰降低的程度大于还原峰; Ce^{3+} 的差示 UV 曲线呈减色效应,且在 272 nm 处出现新峰;DNA 的差示 UV 曲线呈增色效应;DNA 的拉曼谱线中 814 cm^{-1} 处的峰消失,表明铈离子对 DNA 的磷酸二酯键具有切断作用。 Eu^{3+} 和 DNA 作用后, Eu^{3+} 的 CV 曲线的峰电流密度仅略有减少,氧化峰和还原峰电流密度降低程度相近,且 DNA 的差示 UV 曲线呈减色效应。可能是 Eu^{3+} 和 DNA 磷酸基之间的静电作用使碱基面进一步堆积所致。 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 也都能与 DNA 发生作用,但是,与 DNA 作用的能力不同。其中 Ce^{3+} 离子对 DNA 作用最强,且对 DNA 主链磷酸二酯键具有切断功能, Ce^{3+} 离子有可能成为催化水解切断 DNA 的“分子剪刀”。

关键词 DNA,稀土金属离子,循环伏安法,光谱法

DNA 中磷酸二酯键非常稳定,在 pH 7.25 时,如无天然酶参与下,水解断裂 DNA 中磷酸二酯键的速度非常缓慢,但天然限制性内切酶识别序列短,专一性强,不能满足分子生物学和生物工程的需要。因此,应用化学物质水解断裂核苷酸间磷酸酯键是一项有意义的工作^[1]。近 10 年来,天然限制性内切酶模型化合物的开发研究及与此相关的金属离子、金属配合物及药物分子与 DNA 相互作用的研究是活跃的前沿研究领域之一^[2]。上述体系中研究较多的有铜配合物、铁配合物、镍配合物等。这些金属配合物对 DNA 的作用大多通过游离基破坏脱氧核糖环,从而导致 DNA 磷酸二酯键断裂,这种断裂 DNA 的方法,严重破坏了 DNA 链上的碱基和脱氧核糖环,使其应用受到极大限制。有关稀土金属离子及配合物与 DNA 作用的报导尚不多见^[3~5]。本文用循环伏安法(CV)和光谱法研究了铈离子和铈离子等七种稀土金属离子对 DNA 的作用,发现不同稀土金属离子与 DNA 作用不同,铈离子和 DNA 作用后,使 DNA 的构型发生变化,并具有切断 DNA 的作用。这一结果可为探索新的 DNA 水解切断体系及了解稀土元素进入人体后的作用机制提供有价值的依据。

本文 1998-01-20 收到,1998-04-21 收到修改稿; 上海市教委重点科研项目基金资助

* 通讯联系人

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

DNA(小牛胸腺),中国科学院上海生物研究所东风生化技术公司提供,其余试剂均为市售分析纯。ZF-3型恒电位仪,ZF-4型信号发生器(上海防腐专业公司);LM15型函数记录仪(上海大华仪表厂);HP8451A紫外分光光度计(美国HP公司);超级小型共焦拉曼光谱仪(法国Dilor公司)。

1.2 溶液配制和测量

将氯化铈、硝酸铈等稀土金属氯化物或硝酸盐和DNA配制在HAc-NaAc缓冲溶液中(pH 6),测定稀土离子及DNA的差示UV曲线和 Ce^{3+} 、 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 分别与DNA作用产物的拉曼光谱,测定上述体系的CV曲线。工作电极为金丝电极($\varnothing=1\text{ mm}$),对电极为螺旋状铂丝电极,参比电极为Ag/AgCl电极。

2 结果与讨论

2.1 DNA对 Eu^{3+} 、 Ce^{3+} 的CV曲线的影响

天然DNA分子,其碱基的电还原活性位点深藏于双螺旋中,一般不能参与电极过程。而变性后的单链DNA分子的碱基,虽然能发生化学还原和氧化,但还原电位较负($< -1.2\text{ V}$ (vs. SCE))^[6]。缓冲溶液中天然DNA在 $-0.1\sim 1.6\text{ v}$ (vs. Ag/AgCl)范围内,也不发生电化学响应。作者根据DNA的加入对 Eu^{3+} 和 Ce^{3+} 的CV曲线的影响,研究了DNA和 Eu^{3+} 和 Ce^{3+} 的相互作用。图1示出 Eu^{3+} 与DNA相互作用的CV曲线。图1中,曲线a)($\text{EuCl}_3\ 1.6\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$)的氧化峰和还原峰的峰电位差约为70 mV。 i_p^a 和 i_p^c 之比接近1,为准可逆电子迁移过程。而曲线b)(保持pH值不变,溶液组成为: $1.6\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}\text{ Eu}^{3+}$ 加 $1\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ DNA混合)的峰电位则几乎不变,峰电流稍有减小,氧化峰和还原峰的减小程度相近。这可能是由于 Eu^{3+} 带正电荷,DNA分子中的磷酸基带负电荷,发生了某种程度的静电作用,导致自由状态 Eu^{3+} 的浓度降低,从而使峰电流降低。

图2是DNA和 Ce^{3+} 相互作用的CV曲线。曲线a)(扫描速度 $20\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3\ 1.6\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$)在 1.40 V (vs. Ag/AgCl)处有一氧化峰, 0.52 V (vs. Ag/AgCl)处有一还原峰,峰电位差远大于59 mV, i_p^a 和 i_p^c 之比为1.7,是不可逆过程。曲线b)(保持扫描速度和pH值不变),溶液组成: $1.6\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}\text{ Ce}^{3+}$ 和 $1\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ DNA混合的氧化峰位置稍有负移,还原峰位置几乎不变,氧化峰和还原峰电流明显减小。并且,氧化峰电流比还原峰电流降低得更多。表明 Ce^{3+} 比 Eu^{3+} 对DNA有较强的作用,且其作用机理也应有所不同。为此,采用光谱方法对 Ce^{3+} 、 Eu^{3+} 和DNA的作用作了进一步研究。

2.2 稀土金属离子与DNA作用的紫外光谱

测定 Eu^{3+} 的UV曲线, Eu^{3+} 在紫外区无吸收。将 $2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}\text{ Eu}^{3+}$ 与 $2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ DNA作用后,测定其UV曲线,并与未加 Eu^{3+} 的DNA($2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$)的UV曲线相比较。发现加入 Eu^{3+} 后,UV曲线形状几乎不变,仅略有减色效应(图略),这可能是由于 Eu^{3+} 带正电荷,而DNA的磷酸基带负电荷,两者发生静电作用,使碱基进一步堆积所致^[7,8]。

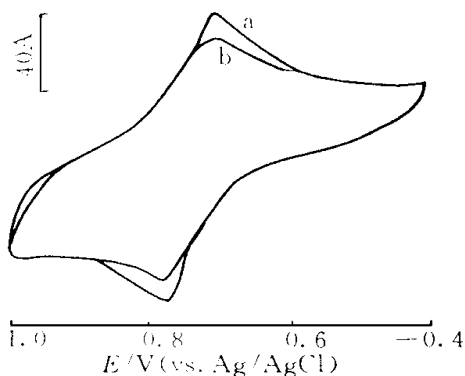


图 1 铕离子与 DNA 作用的 CV 曲线

Fig. 1 Effect of DNA on the CV curve of Eu^{3+} ion

- a) Solution of $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Eu}^{3+}$
 - b) Solution of $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Eu}^{3+}$ and $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{DNA}$
- Scan rate: $20 \text{ mV} \cdot \text{S}^{-1}$

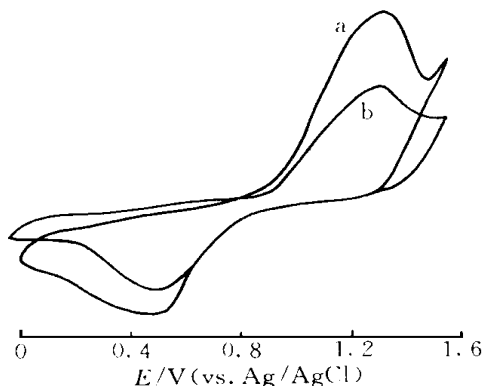


图 2 铈离子与 DNA 作用的 CV 曲线

Fig. 2 Effect of DNA on the CV curve of Ce^{3+} ion

- a) Solution of $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{3+}$
 - b) Solution of $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{3+}$ and $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{DNA}$
- Scan rate: $20 \text{ mV} \cdot \text{S}^{-1}$

图 3 是 Ce^{3+} 与 DNA 作用的 Ce^{3+} 的差示 UV 曲线, 曲线 a ($\text{Ce}^{3+} 2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) 在 228 nm 处有一最大吸收峰. 曲线 b ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{3+}$ 和 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{DNA}$ 作用后, 以 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{DNA}$ 为参比) 示出 Ce^{3+} 最大吸收峰呈减色效应, 且稍有红移, 而在 272 nm 处出现新峰. 1 h 后再次测定同一溶液时发现 228 nm 和 272 nm 处的吸光度都有所增加, 如 c) 所示. 图 4a) 是 DNA 的 UV 曲线, 在 260 nm 处有一特征吸收峰. 而 b) ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{3+}$ 和 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{DNA}$ 作用后, 以 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{3+}$ 为参比) 呈增色效应. 如果 Ce^{3+} 与 DNA 没有作用, 则图 3 中的 a), b), c) 三条曲线及图 4 中的 a), b) 两条曲线应重合. 实验结果表明 Ce^{3+} 和 DNA 发生较强的作用. 反映在 DNA 的差示 UV 曲线呈增色效应及 272 nm 处出现新峰. Komiyama 和朱兵等^[3,4]曾报导铈离子具有催化水解生物体内磷酸二酯键化合物的功能. 笔者推测上述实验现象可能是由于铈离子切断 DNA 的磷酸二酯键所致. 所以, Ce^{3+} 比 Eu^{3+} 对 DNA 有较强作用, 且作用机理不同.

按上述相同方法还分别测定了 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 等与 DNA 作用后 DNA 的差示 UV 曲线. 实验结果表明, 上述稀土金属离子与 DNA 作用后, DNA 的差示 UV 曲线呈不同程度的增色效应. 若以 DNA 的吸光度为 1, 稀土金属离子与 DNA 作用后吸光度增值即如表 1 所列.

表 1 稀土金属离子与 DNA 作用后 DNA 吸光度的变化

Tab. 1 The change of DNA adsorbance after adding rare earth ions into DNA solution

与 DNA 作用的金属离子	Ce^{3+}	Er^{3+}	Sm^{3+}	Tb^{3+}	La^{3+}	Nd^{3+}	Eu^{3+}
吸光度增加值 (%)	8.2	6.0	4.5	3.5	1.6	0.5	- 7.4

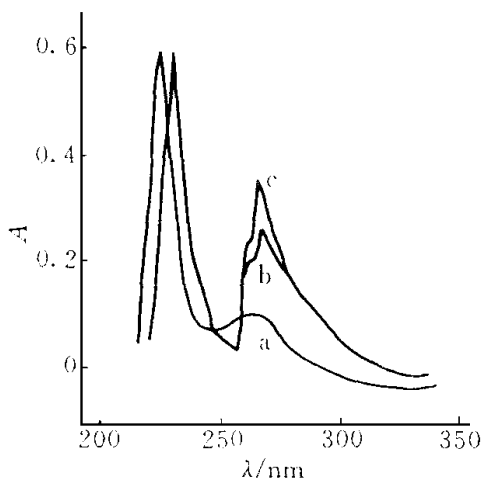


图 3 铈离子与 DNA 作用后的 Ce^{3+} 的差示 UV 曲线

Fig. 3 Differential UV spectra of Ce^{3+} ion after adding Ce^{3+} ion into DNA solution

- a) Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Ce^{3+}$, HAC-NaAc buffer (pH = 6) as the reference
- b) Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Ce^{3+}$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$, Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$ as the reference
- c) 1 hour after mixing

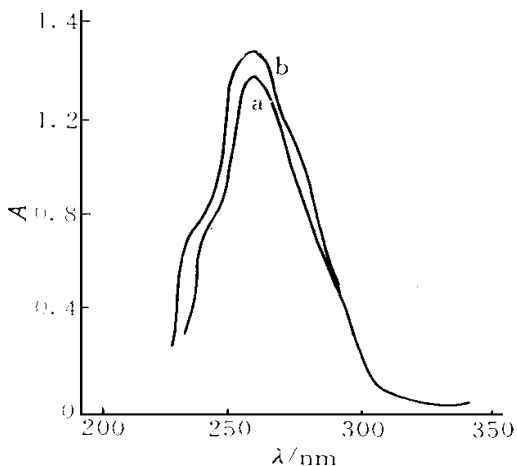


图 4 铈离子与 DNA 作用后的 DNA 的差示 UV 曲线

Fig. 4 Differential UV spectra of DNA after adding Ce^{3+} ion into DNA solution

- a) Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$, HAC-NaAc buffer (pH = 6) as the reference
- b) Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Ce^{3+}$ and $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$, Solution of $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Ce^{3+}$ as the reference

2.3 稀土金属离子和 DNA 作用后产物的拉曼光谱

为进一步研究稀土金属离子与 DNA 的作用机理,分别测定了 Ce^{3+} 、 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 与 DNA 作用产物的拉曼光谱.当浓度为 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ce^{3+} 、 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 分别和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$ 等体积混合时,生成大量絮状沉淀.但以 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Eu^{3+}$ 和 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$ 等体积混合时,则不生成沉淀.用拉曼光谱对 Ce^{3+} 等稀土金属离子和 DNA 作用后的絮状沉淀进行了分析.

图 5 曲线 a) 是固态 DNA 的拉曼光谱谱线.其中大部分峰属碱基部分的振动.除碱基峰

外, 1100 cm^{-1} 的峰属 $[P(=O)(OH)_2]^-$ 的对称伸缩振动. 814 cm^{-1} 的峰属 $P(=O)(OH)_2$ 的对称伸缩振动,这

是多核苷酸的主链所特有的.主链断裂或构型发生变化时,此峰的强度变弱乃至消失^[9]. b) 是 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Ce^{3+}$ 与 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} DNA$ 作用后生成絮状沉淀吸干水后测得谱线.由图 5 可见, 814 cm^{-1} 峰的消失,各碱基的拉曼峰发生了不同程度的位移.表明 Ce^{3+} 离子具有切断 DNA 主链的磷酸二酯键的功能,使 814 cm^{-1} 的峰消失.同时也能使 DNA 构型发生

变化,导致各碱基峰产生位移. DNA 构型的变化引起溶解度的变化而产生絮状沉淀. 我们测定了 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 拉曼谱线,在 1000 cm^{-1} 有一强的拉曼峰,图 5b) 中 1000 cm^{-1} 处出现的新峰明显与絮状物中所含 Ce^{3+} 的振动拉曼峰有关. 分别测定 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 与 DNA 作用后生成絮状沉淀物的拉曼光谱, 814 cm^{-1} 处峰强度有不同程度变弱. 推测这些稀土金属离子也可能有切断 DNA 主链磷酸二酯键的功能,但比 Ce^{3+} 要弱.

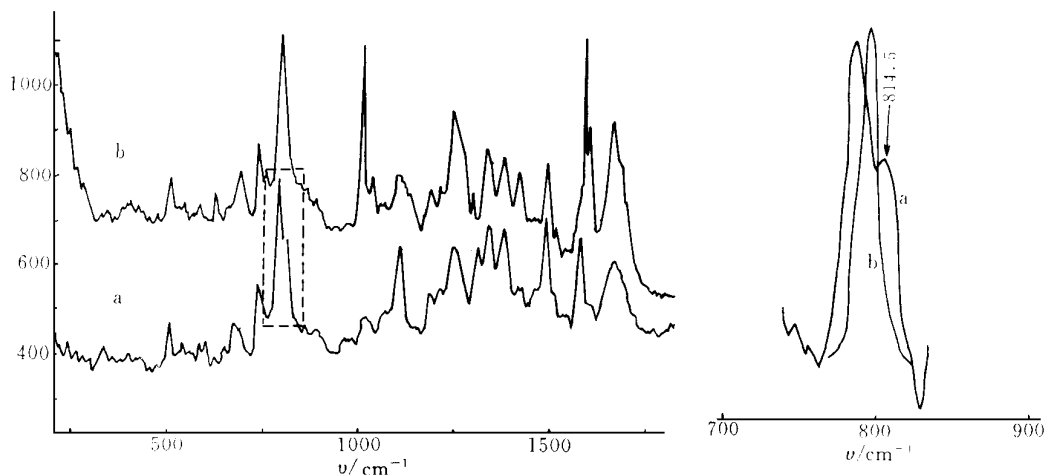


图 5 DNA 的拉曼光谱 a) DNA(小牛胸腺)固体 b) Ce^{3+} 离子与 DNA 作用后的絮状物

Fig. 5 Raman spectra of DNA a) DNA (calf thymus) solid b) Floccus from DNA solution adding Ce^{3+} ion

3 结 论

1) Ce^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Er^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 La^{3+} 、 Nd^{3+} 都能与 DNA 发生作用,但 Ce^{3+} 对 DNA 的作用更强,不同稀土金属离子与 DNA 作用机理可能不同.

2) Ce^{3+} 离子对 DNA 主链的磷酸二酯键具有切断功能, Ce^{3+} 离子有可能成为催化水解切断 DNA 的分子剪刀.

Study of the Effect of Rare Earth Ions on DNA Using Cyclic Voltammetry and Spectroscopy

Shen Heibai* Kang Yuzhuan Yang Haifeng Yu Lin Zhang Zongrang

(Dept. of Chem., Shanghai Teachers' Univ., Shanghai 200234)

Abstract The interaction between rare earth ions (e. g. Eu^{3+} , Ce^{3+} , Er^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , La^{3+} and Nd^{3+}) and DNA had been investigated by using Cyclic Voltammetry, Ultraviolet and Raman Spectroscopy. After the adding of Ce^{3+} ion to DNA solution, the cathodic peak cur-

rent of Ce^{3+} ion reduction was found to decrease obviously, and the anodic peak current to decrease even more significantly. Differential UV spectra of Ce^{3+} ion depicted hyperchromic effect after the reaction of these two species and a new peak of 272 nm was found. Differential UV spectra of DNA also showed the hyperchromic effect. The peak of 814 cm^{-1} disappeared in the Raman spectra of DNA. All of above results may be interpreted as the cleavage effect of cerium ion on DNA. Similar effect were observed between Eu^{3+} ion and DNA, but less significant than those observed in Ce^{3+} - DNA system. Probably due to the electrostatic interaction between Eu^{3+} and DNA and the stack effect of the base in DNA. Peak current decreasing and hyperchromic effect were also observed in cases of reaction of DNA with Er^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , La^{3+} and Nd^{3+} , but all weaker than in Ce^{3+} - DNA system. The cleavage effect of Ce^{3+} on the phosphodiester linkage in DNA may be useful in employing the Ce^{3+} ion as the "Molecular scission" for catalytically hydrolytic cleavage of DNA.

Key words DNA, Rare earth ions, Cyclic voltammetry, UV and Raman spectroscopy

References

- 1 Westheimer F. Why nature chose phosphates. *Science*, 1987, 235:1173
- 2 刘长林,徐辉碧,周井炎. 特异识别和切割DNA的过渡金属配合物. *化学通报*, 1995, 8:26
- 3 Komiyama M. et al. Catalytically active species for $CeCl_3$ -induced DNA hydrolysis. *J. Biochem.*, 1994, 115:809
- 4 朱兵,李新民,赵大庆等. 稀土元素对腺嘌呤及鸟嘌呤单核苷酸的水解断裂作用. *化学学报*, 1996, 54:1089
- 5 Takasaki B. K., Chin J. Cleavage of the phosphate diester backbone of DNA with Cerium() and molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116:1121
- 6 G. Milazzo, Martin Blank 著. 生物电化学—生物氧化还原反应. 肖科等译. 天津:天津科学技术出版社, 1990, 4:224
- 7 李安之,丁玫,于海鹰等. 不同价态金属离子对DNA构象的影响. *物理化学学报*, 1992, 8:207
- 8 Shen Hebai, Kuai Liheng, Ni Lihua et al. Study on the interaction between Eurphenylalanine and DNA by using cyclic voltammetry and UV spectroscopy. *J. of the Chinese Rare Earth Society*, 1997, 15(4):300
- 9 日本生化学会编. 生化学实验讲座(2). 东京:东京化学同人, 1977. 145