

两种新稀土双核配合物的合成、表征及其 对磷酸二酯键模型物(BDNPP)和 DNA 的作用研究

杨 频^{*} 周春琼

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

(南京大学配位化学国家重点实验室 南京 210093)

摘要 合成和表征了两种新的双核配合物 $[\text{Eu}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (**A**) 和 $[\text{Nd}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (**B**)。用紫外光谱法分别研究了磷酸二酯键模型物双-(2,4-二硝基苯基)磷酸盐(BDNPP)与配合物(**A**, **B**)的水解动力学反应。当 BDNPP 与 **A**, **B** 的浓度均为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,反应为二级反应;在 25 $^\circ\text{C}$, pH 7.26 时,二级水解速率常数分别为 $2479 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $1678 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 半衰期分别为 16.1 min 和 23.8 min,比单独的 Eu^{3+} , Nd^{3+} 水解 BDNPP 的速率均快得多,37 $^\circ\text{C}$ 时反应更快;在 25 $^\circ\text{C}$, pH 6.50 ~ 8.50 时,两个反应的水解速率常数的 $\lg K$ 与 pH 值均呈正的线性关系。两种配合物与小牛胸腺(CT)DNA 作用,使 CT DNA 最大吸收峰发生减色和红移,使溴化乙锭(EB)-DNA 复合物体系荧光强度减弱。两种配合物对超螺旋质粒 pBR322 DNA 的断裂在 50 $^\circ\text{C}$, pH 8.0 时,效果最好。

关键词 双核稀土配合物,磷酸酯水解,动力学,DNA

Synthesis and Characterization of Two New Rare-earth Complexes and Their Research for Cleaving an Activated Phosphate Diester BDNPP and DNA

YANG, Pin^{*} ZHOU, Chun-Qiong

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract $[\text{Eu}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (**A**) and $[\text{Nd}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (**B**) were synthesized and characterized. The kinetic studies on the hydrolysis of BDNPP by complexes were carried out by UV-vis methods. The two reactions obey the second-order when the complexes ($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) cleaved BDNPP ($2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$). The rate constants and the half-time at 25 $^\circ\text{C}$ and pH 7.26 for the hydrolysis of BDNPP are $2479 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 16.1 min in **A**, and $1678 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 23.8 min in **B**. They are more reactive than that Eu^{3+} and Nd^{3+} for cleaving BDNPP. Furthermore, **A** or **B** is more reactive at 37 $^\circ\text{C}$ than at 25 $^\circ\text{C}$ for cleaving BDNPP. The pH $\lg K$ for the two hydrolytic reactions were approximated with a linear equation at 25 $^\circ\text{C}$ in the pH 6.50 ~ 8.50. The investigation on the interaction of both complexes and CT DNA indicates that the absorbance value and the wavelength number at the maximum peak of CT DNA are reduced and red-shifted while the intensity of fluorescence spectra of EB-DNA is gradually weakened. The two complexes are capable of promoting cleavage of pBR322 DNA at 50 $^\circ\text{C}$ and pH 8.0.

Keywords binuclear rare-earth complexes, hydrolysis of phosphate diester, kinetics, DNA

近年来,多核金属配合物用作核酸切割剂的研究取得了引人注目的进展,其中重要的原因是人们从结构上逐步认识

到与核酸有关的多种天然酶的活性部位含有两个或三个协同作用的金属离子,如 $\text{Zn}(\quad)$, $\text{Mg}(\quad)$, $\text{Ni}(\quad)$, $\text{Fe}(\quad)$

* E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

Received December 24, 2002; revised April 1, 2003; accepted May 9, 2003.

国家自然科学基金(No. 20171031)以及山西省自然科学基金资助项目.

等^[1,2]. 同时相关的稀土双核配合物作为人工核酸酶的研究正受到越来越多的重视,因为它们作为核酸断裂试剂克服了过渡金属及其配合物作为人工核酸酶的一些缺点,能以水解方式断裂核酸中的磷酸二酯键,并且断裂效率很高^[3]. Schneider 等^[4]发现 Pr^{3+} , Eu^{3+} 等一些大环配体组成的双核配合物可使 pBR322 质粒 DNA 发生单股水解断裂的速度有大幅度的提高,使其半衰期从 2000 年缩短到只需 50 min,快了 2.1×10^7 倍. 朱兵等^[3]研究了另一种含氮大环配体的双核稀土配合物对 pCAT 及 pUC19 质粒的断裂作用,发现断裂 pCAT 质粒的半衰期仅为 25 min,可能是目前断裂质粒 DNA 的最快催化体系. Lawrence^[5]合成的 $\text{Ce}_2(\text{HPTA})$ 和 $\text{La}_2(\text{HPTA})$ 在 55 °C 时能有效切割超螺旋质粒 DNA,但 37 °C 水解效果不明显; $\text{Ce}_2(\text{HXTA})$ 在 37 °C 时就能有效切割超螺旋质粒 DNA. 本文合成了模拟铜蓝蛋白活性部位的配体 Hbbimp,为两个金属离子提供相同的配位环境,虽然它的过渡金属配合物的结构和性质研究得很多^[6-9],但双核稀土配合物的合成及性质却很少见报道. 本文合成和表征了双核 $[\text{Eu}_2(\text{bbimp})-(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (A) 和 $[\text{Nd}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (B) 配合物,并用 UV-vis 法从浓度、温度、pH 值及与单独的 Eu^{3+} , Nd^{3+} 水解性能的比较上,研究了配合物 A, B 分别与活化磷酸二酯键模型物 BDNPP 的水解动力学反应,同时用紫外和荧光光谱法研究了配合物与 CT DNA 的作用,并用凝胶电泳研究了它们与 pBR322 DNA 的作用情况.

1 实验

1.1 试剂与仪器

Hbbimp, BDNPP 按文献[8,10]方法合成,高氯酸铈、高氯酸钕由纯度 99.9% 的 Eu_2O_3 , Nd_2O_3 按常规方法合成,其它试剂均为分析纯.

^1H NMR 谱用 Bruker 300 核磁共振仪测定(DMSO 为溶剂);C, H, N 分析用 Perkin-Elmer 240C 元素分析仪; Eu^{3+} , Nd^{3+} 含量以 EDTA 配位滴定;摩尔电导用 DDS-12A 型数字电导率仪于 25 °C 测定(1 mmol L^{-1} , CH_3OH 为溶剂);红外光谱用 Shimadzu FTIR-8300 红外光谱仪测定(KBr 压片);紫外光谱用 Hewlett Packard HP-8453 紫外光谱仪测定;pH 值用 Beckman 450 精密 pH 酸度计测定;荧光光谱用 Perkin-Elmer LS-50B 型荧光分光光度计测定;电泳用 DYY-32 型电泳槽和 DYY 型电泳仪进行操作.

1.2 配合物的合成

取 0.2 mmol Hbbimp,溶于 15 mL 乙醇,滴加溶于 5 mL 乙醇的 0.4 mmol $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ [或 $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$],搅拌 10 min,加入 5 mL 溶于乙醇的 0.2 mmol 乙酸钠溶液,再搅拌 2 h,静置一夜,得粗产品,过滤,洗涤,干燥,分别得到黄色固体配合物 A 和浅紫色固体配合物 B.

1.3 配合物与 BDNPP 的水解作用

反应中用紫外光谱仪跟踪 BDNPP 水解产物 2,4-二硝基

苯酚在其特征吸收波长 400 nm 处的吸收峰,400 nm 处的峰从无到有,由弱到强,2,4-二硝基苯酚的生成即说明该反应机理为水解机理^[11]. 实验中用 10 mmol/L Tris-HCl/NaCl 为反应缓冲液,选取 $[\text{BDNPP}] = [\text{配合物}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 由于配合物在水中的溶解性不太好,加少量二甲基亚砜溶解,后加反应缓冲液. 光谱滴定中用 1 cm 吸收池,选取温度为 25 °C, 37 °C, pH 6.50 ~ 8.50.

1.4 配合物与 CT DNA 的光谱作用研究

所用溶液均用 5 mmol/L Tris-HCl/NaCl , pH 7.23 的缓冲溶液配制.

(1) 配合物与 CT DNA 相互作用的紫外可见光谱测定. 固定 CT DNA 的浓度,在配合物 A 中, $[\text{CT DNA}] = 1.31 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,在配合物 B 中, $[\text{CT DNA}] = 1.41 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. 溶液中,配合物的浓度分别为 0, 1.0×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , $4.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. 用相同浓度的 Tris-HCl/NaCl 溶液作参比,测定 CT DNA 和配合物/CT DNA 复合物的吸收曲线.

(2) 配合物对 EB-DNA 荧光强度影响测定. 在 $C_{\text{DNA}} = 8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 溶液中加入一定体积的 1 mg/mL 的 EB,使 $[\text{DNA}]/[\text{EB}] = 1:1$,然后做配合物(A, B)和两种稀土离子(Eu^{3+} , Nd^{3+})对 EB-DNA 荧光强度影响实验. 仪器条件为:狭缝宽度 $E_x = E_m = 5 \text{ nm}$,扫描速度 1500 nm/min,激发波长 520 nm.

1.5 配合物与 pBR322 DNA 的电泳实验

0.5 mL 安道夫管中加入一定浓度(0 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$)的配合物(加少量二甲基亚砜溶解),0.3 μL 的 pBR322 DNA (0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 mmol/L Tris-HCl/NaCl , pH 8.0 的缓冲溶液,使总体积保持 10 μL ,混合,然后在 50 °C 恒温水浴中恒温 6 h,通过加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应,然后琼脂糖凝胶电泳分析结果.

2 结果与讨论

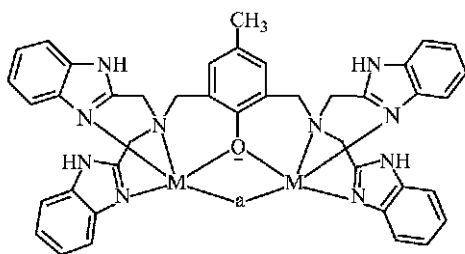
2.1 配合物表征

Hbbimp 的 ^1H NMR 谱: 7.4 ~ 7.1 (m, 18H, phenyl); 5.9 (s, 1H, OH-phenyl); 4.3 (s, 8H, CH_2 -benzimidazole); 3.9 (s, 4H, CH_2 -phenyl); 3.3 (s, 4H, NH-benzimidazole); 2.0 (s, 3H, CH_3), m.p. 178 °C,与文献[8]相符.

配合物 A, B 微溶于水,易溶于甲醇、乙醇、二甲基亚砜,25 °C 1 mmol/L 配合物甲醇溶液的摩尔电导值分别为 $167.6 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ 和 $190.3 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$,说明合成的配合物均为 2:1 电价型配合物^[12]. IR (KBr): Hbbimp 位于 $3100 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 处由酚羟基和氨基的伸缩振动形成的一系列宽峰, 1346.2 cm^{-1} 处的 OH 在形成配合物后均消失,而配合物 A, B 分别在 3392.6 cm^{-1} , 3382.9 cm^{-1} 处出现了一个较强的氨基峰, 673.1 cm^{-1} 和 669.3 cm^{-1} 处出现了典型的金属-酚氧伸缩振动峰. 表明酚羟基脱质子,酚氧与金属离子成键. 配合物 A, B 分别在位于 1522.6 cm^{-1} , 1541.0 cm^{-1} 附近出现了羧基反对称伸缩振动峰 $[\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)]$,在 1433.4 cm^{-1} , 1436.9 cm^{-1} 附近出现了羧基的对称伸缩振动峰

[$s(\text{COO}^-)$], 两个峰的差值 $< 200 \text{ cm}^{-1}$, 说明乙酸根上的氧与金属离子以桥联形式配位结合^[9,13]. 比较配合物与配体的红外光谱发现, 配体在 1481.2 cm^{-1} 处的咪唑环振动峰, 在配合物 A, B 中分别移到 1456.2 cm^{-1} , 1454.2 cm^{-1} , 吸收峰向低频移动, 这表明咪唑环 C=N 上的 N 原子直接参与配位. 配体中位于 1120.6 cm^{-1} 处的叔氮的 C—N, 在配合物 A, B 中迁移到 1113.0 cm^{-1} , 1109.0 cm^{-1} 处, 表明叔氮氮原子与金属离子成键. 由于金属—氮键的形成, 降低了咪唑环 C=N 和叔氮中 C—N 的键力常数, 致使 C=N, C—N 向低频移动. 在配合物 A, B 中位于 3203.5 cm^{-1} , 3122.5 cm^{-1} 处出现了醇羟基的伸缩振动峰, 1336.6 , 1328.9 cm^{-1} 和 1039.6 , 1037.6 cm^{-1} 处出现了 OH 和 C—O 伸缩振动峰, 说明配合物中存在乙醇分子. 由于镧系离子与氧的配位能力很强, 乙醇上的氧原子很有可能与 Eu(), Nd() 成键, 由于 M—O 键的形成, 致使醇羟基伸缩振动吸收峰移向低频. ClO_4^- 在 1089.7 cm^{-1} 附近有较强的伸缩振动吸收峰, 为典型的未参与配位吸收峰, 且在 624.9 cm^{-1} 附近产生了面外弯曲振动峰^[14]. UV-vis(CH_3OH): 配合物 A, B 在 305 , 310 nm 处的峰为咪唑氮-M 的电荷迁移, 485 nm 处的峰为酚氧-M 的电荷迁移, 656 nm 处为 f-f 跃迁^[8]. Anal. calcd for A $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}_2\text{Eu}_2$: C 42.52, H 4.05, N 10.12, Eu 21.98; found C 42.79, H 4.25, N 10.01, Eu 21.83. Anal. calcd for B: $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}_2\text{Nd}_2$: C 43.00, H 4.10, N 10.24, Nd 21.09; found C 42.71, H 4.03, N 10.07, Nd 21.25.

综上分析, 配合物化学式为: $[\text{Eu}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (A) 和 $[\text{Nd}_2(\text{bbimp})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (B), 其主体结构示意图如图式 1.



图式 1 配合物的主体结构

Scheme 1 Structure of the complexes

M = Eu^{3+} , Nd^{3+} ; a = CH_3COO^-

2.2 配合物与 BDNPP 作用的研究

2.2.1 水解动力学参数测定

选取 $[\text{配合物}] = [\text{BDNPP}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 用 UV-vis 法研究了本文合成的配合物与 BDNPP 的水解反应, 该反应可用下式表示:



根据 $r = dx/dt = k(a-x)(a-x)$, 得到 $1/(a-x) = kt + B$, 以 $1/(a-x)$ 对 t 作图, 若为一直线, 则该反应为二级反应, 直线斜率 k 为 BDNPP 的水解速率常数, 其半衰期可按公式 $t_{1/2} = 1/ka$ 求算. 其中 a 为配合物、BDNPP 的起始浓度, $(a-x)$ 为 t 时刻配合物、BDNPP 的浓度, x 为 t 时刻生成的 2,4-二硝基苯酚的浓度. x 可由公式 $A = bc$, 用 400 nm 时的吸光度值和摩尔消光系数求算. 2,4-二硝基苯酚在 25°C , 400 nm 处的摩尔消光系数为 $8048 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. 将 $1/(a-x)$ 对 t 作图 (如图 1) 得到两条直线, 则 25°C 时配合物 A 与 BDNPP 的水解速率常数 $k = 2479 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 半衰期 $t_{1/2} = 16.1 \text{ min}$, 线性相关因子 $R = 0.998$; 配合物 B 与 BDNPP 的水解速率常数 $k = 1678 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $t_{1/2} = 23.8 \text{ min}$, 线性相关因子 $R = 0.996$. 同时, 我们计算了 BDNPP 分解一半时, 其水解产物 2,4-二硝基苯酚在常温下 400 nm 处的吸光度值, 通过实验数据观察吸光度值所对应的时间, 得到两种配合物水解 BDNPP 的半衰期大致为 16 和 24 min.

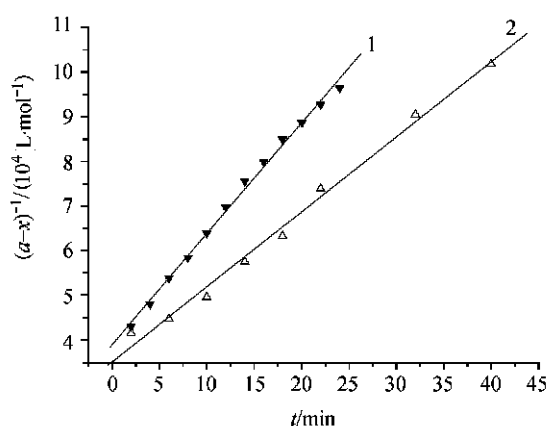


图 1 A, B 与 BDNPP 反应的动力学关系图

Figure 1 Kinetic plots of the reaction of A and BDNPP at 25°C , pH 7.26

2.2.2 pH 值对水解反应的影响

pH 值的大小对天然酶的酶活力至关重要, 从这一角度出发, 我们研究了 25°C 时, 不同 pH 值对水解反应速率常数的影响, 同时考虑到配合物及磷酸二酯键可稳定存在的 pH 值范围, 选取 pH 值为 $6.50 \sim 8.50$, $[\text{配合物}] = [\text{BDNPP}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 配合物 A 与 BDNPP 反应的水解动力学常数的 $\lg K$ 与 pH 值的关系图, 如图 2. 观察图 2, 配合物 A, B 分别与 BDNPP 反应的 $\lg K$ 与 pH 值均成正的线性关系, 线性相关因子分别为 0.990 , 0.984 . Komiyama 等^[15]在研究镧系离子与 DNA, RNA 的水解作用时指出: $[\text{Nd}_2(\text{OH})_2]^{4+}$ 水解 RNA 时, 其 $\lg(K_{\text{obs}}/\text{min}^{-1})$ 与 pH 值, 在 pH 为 $6.5 \sim 8.0$ 范围内成正的线性关系; 同时 $[\text{Ce}_2(\text{OH})_4]^{4+}$ 水解 DNA 时情况相类似. Chin 等^[16]在研究 $[(1,4,7\text{-triazacyclononane})_2\text{Co}_2(\text{OH})_2](\text{NO}_3)_3$ (25 mmol/L) 水解 25 mmol/L 的双(2,4-二甲基)磷酸盐时, 25°C , pH $7.0 \sim 8.0$, $\lg K$ 与 pH 值成正的线性关系. 我

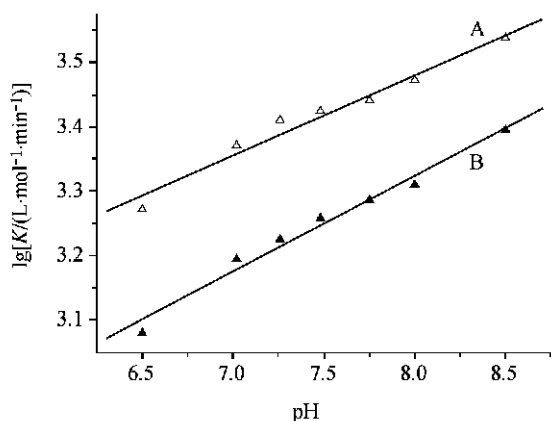


图2 配合物 A, B 与 BDNPP 反应的水解动力学常数的 $\lg K$ 与 pH 值变化

Figure 2 Plots of the logarithm of the observed rate constants vs. pH for hydrolyzing BDNPP unit in A or B at 25

们的实验也验证了这一结果,由此可见:在 pH 为 6.50~8.50 范围内,酸性条件下反应速率较慢,随着碱性逐渐增强,水解反应速率逐渐增大,并且其 $\lg K$ 值随 pH 呈线性增长。

2.2.3 温度对水解反应的影响

天然酶与磷酸二酯键的反应一般都受温度的影响,且最佳反应温度绝大多数都在生理温度下,因此我们研究了 25 和 37 °C 下, [配合物] = [BDNPP] = 2.5×10^{-5} mol/L, pH 为 7.26 时,两种配合物 A, B 与 BDNPP 的水解作用,将 $1/(a-x)$ 对 t 作图,如图 3。

由图可看出 37 °C 时,配合物 A, B 与 BDNPP 的水解反应速率明显比 25 °C 时快,说明 37 °C 更适合水解反应的进行。经过计算,配合物 A 与 BDNPP 在 37 °C 时的水解速率常数为 $6060 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,半衰期为 6.6 min,比 25 °C 下其水解速率常数大了 2.44 倍;配合物 B 与 BDNPP 在 37 °C 时的水解速率常数为 $3922.2 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,半衰期为 10.2 min,比 25 °C 时的水解速率常数大了 2.33 倍。

2.2.4 单独离子与 BDNPP 作用的比较

稀土离子也可通过与水现场形成双核配合物而有效地切割磷酸二酯键,因此作为对比研究,在相同条件下测定了 5×10^{-5} mol/L 的 $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ 和 $\text{Nd}(\text{ClO}_4)_3$ 分别与 2.5×10^{-5} mol/L 的 BDNPP 的水解动力学常数,其值各为 $25.48 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $23.10 \text{ (mol/L)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,半衰期分别为 1570 min 和 1731 min。配合物与 BDNPP 的水解速率常数和单独离子与 BDNPP 作用相比较,配合物 A 与 BDNPP 的水解速率常数大了 97 倍,配合物 B 与 BDNPP 的水解速率常数大了约 73 倍。由此水解快慢关系为: $\text{A} > \text{B} > \text{Eu}^{3+} > \text{Nd}^{3+}$ 。25 °C,中性溶液中,BDNPP 的准一级水解速率常数为 $1.8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$,半衰期为 1.5 个月^[17],由此可见,配合物 A, B 的加入使 BDNPP 的催化水解活性大大提高。研究发现^[18],在催化磷酸酯水解时,碱性磷酸酯(AP)的 102 位丝氨酸羟基受周围基团的活化而形成的烷氧负离子 ^-OR 在催化底物水解时有重要作用;Kimura 等^[19,20]发现, $\text{Zn}(\text{---})\text{OR}$ 是很好的亲核试

剂;链型氮氧杂配体 $\text{Cu}(\text{---})$ 和 $\text{Zn}(\text{---})$ 配合物催化 NA 酯水解时^[21], $\text{Cu}(\text{---})\text{OR}$ 和 $\text{Zn}(\text{---})\text{OR}$ 也是很好的亲核试剂。由此我们推断 A 和 B 两种配合物水解 BDNPP 时,稀土离子作为 Lewis 酸活化底物, $\text{Eu}(\text{---})\text{OR}(\text{---OAr})$ 和 $\text{Nd}(\text{---})\text{OR}(\text{---OAr})$ 则可作为亲核试剂进攻底物磷酸二酯键上的磷原子,从而发挥双重催化作用,使水解速度大大提高。

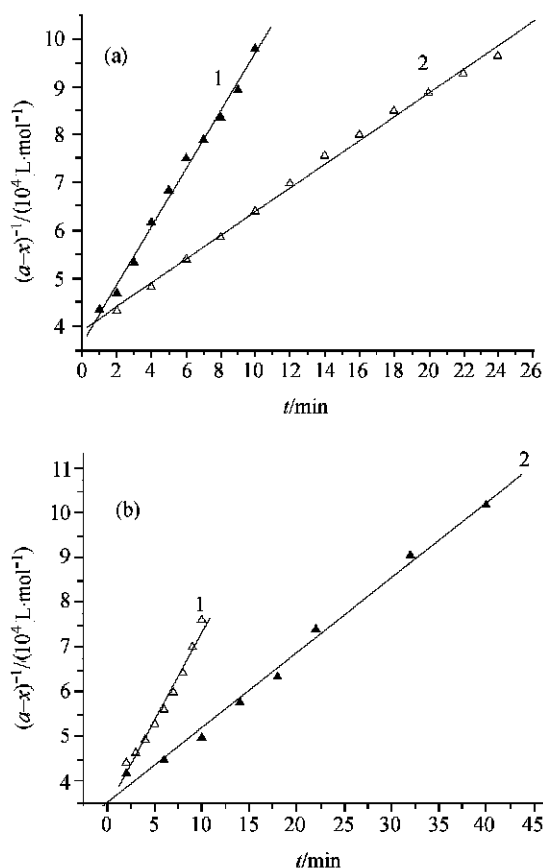


图3 配合物 A(a), B(b) 与 BDNPP 反应的动力学关系图

Figure 3 Kinetic linear plots of the reaction of A, B and BDNPP
(a) 1—37 °C, 2—25 °C; (b) 1—37 °C, 2—25 °C

2.3 CT DNA 的光谱作用研究

2.3.1 紫外可见光谱研究

配合物与 DNA 作用的紫外可见光谱见图 4。配合物的加入使 DNA 吸收光谱发生了一定的变化,随着配合物浓度的增加,使 DNA 产生了明显的减色效应,且最大吸收由 258 nm 红移至 260 nm 处;且在 273, 280 nm 处出现了两个峰,为配合物自身的吸收峰。增色和减色效应是 DNA 特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质。盐类阳离子可与 DNA 骨架磷酸基团结合使 DNA 收缩而产生减色效应,酸碱可与 DNA 碱基作用破坏 DNA 的双螺旋结构而产生减色效应。当配合物加入 DNA 中,配合物可能替代了 DNA 周围的内层和弥散外层阳离子,与 DNA 的磷酸基团作用而稳定了 DNA 的双螺旋结构,致使 DNA 双螺旋结构中堆积的碱基之间的电子相互作用增强,而降低了嘌呤碱及嘧啶碱对紫外光的吸收。

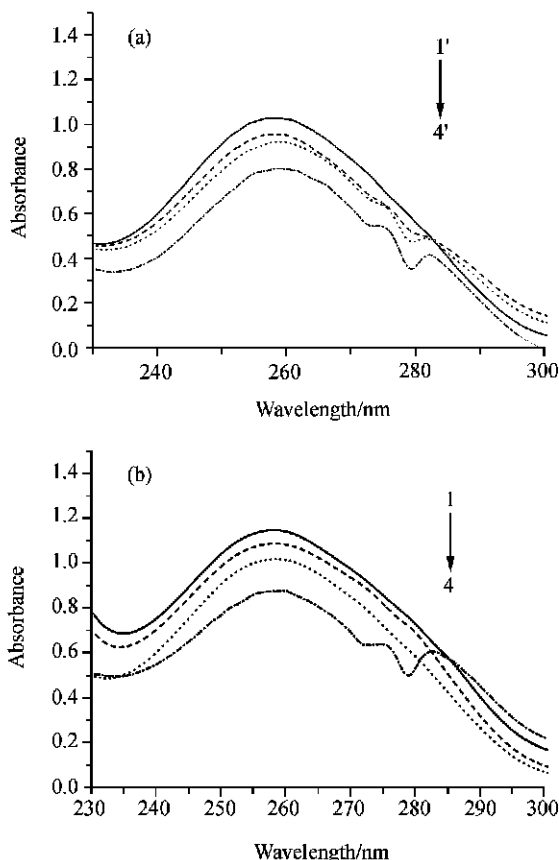


图4 配合物 A(a), B(b) 浓度对 DNA 吸收光谱的影响

Figure 4 Effect of the complexes A and B concentration on UV spectra of DNA

(a) 1 — $C_{DNA} = 1.31 \times 10^{-4}$ mol/L, 2 — $C_A = 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L, 3 — $C_A = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L, 4 — $C_A = 4.5 \times 10^{-5}$ mol/L; (b) 1 — $C_{DNA} = 1.41 \times 10^{-4}$ mol/L, 2 — $C_B = 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L, 3 — $C_B = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L, 4 — $C_B = 4.5 \times 10^{-5}$ mol/L

2.3.2 荧光探针示踪配合物与 DNA 作用的光谱强度变化

在图 5 中, F_0 , F 分别是溴化乙锭(EB)-DNA 体系缺少和存在配合物或金属离子的荧光强度, C_M/C_{DNA} 为反应体系中金属离子与 DNA 的浓度比值. 当配合物 A, B 以及金属离子 Eu^{3+} , Nd^{3+} 分别加入 EB-DNA 体系时, F 随着各自浓度的增加, EB-DNA 体系荧光被猝灭的程度为 $B > A > Nd^{3+} > Eu^{3+}$, 结果的不同与不同体系中所带的电荷、配位的立体构型都密切相关. 稀土离子加入 EB-DNA 体系, 可能是由于水合稀土双核离子引起 DNA 双螺旋结构的变化从而挤出一部分 EB 或是由于稀土离子直接与插入 DNA 的 EB 作用而引起荧光强度的减弱^[22]. 对于配合物而言, 其结构为三角架结构而非平面结构, 不可能将整个分子插入 DNA 双链间, 仅能将苯并咪唑基团插入 DNA 双链间, 或者有可能与 DNA 的磷酸基团发生静电相互作用, 而引起 DNA 双螺旋结构构象的变化, 导致挤出部分插入状态的 EB, 从而导致荧光的猝灭. 配合物 A 和 B 对 EB-DNA 体系荧光猝灭的程度的不同, 可能与

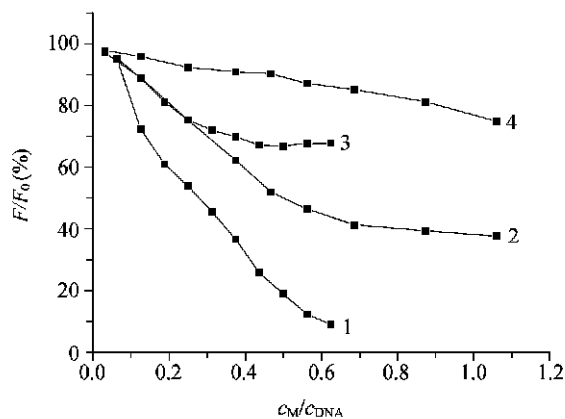


图5 配合物浓度对 EB-DNA 体系荧光强度的影响

Figure 5 Effect of the complex concentration on the emission of EB-DNA

1 — B; 2 — A; 3 — Nd^{3+} ; 4 — Eu^{3+}

两种稀土离子自身的结构有关.

2.4 配合物与 pBR322 DNA 的电泳实验

在配合物能够快速水解活化模型物 BDNPP 的磷酸二酯键的基础上, 我们进一步作了配合物与 pBR322 DNA 的电泳实验, 以期证实两种配合物是否也是比较好的断裂核酸的试

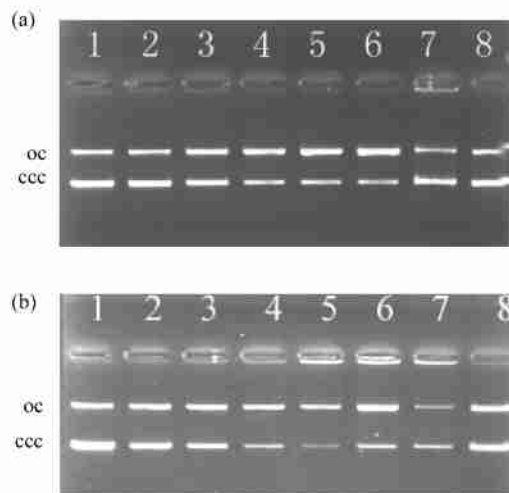


图6 配合物 A(a), B(b) 切割 pBR322 DNA 电泳图 (pH 8.0, 50 °C)

Figure 6 Cleavage of pBR322 DNA in the presence of the complex A or B after 6 h

Cleavage conditions: 32.7 μ mol/L base pairs; 5 mmol/L NaCl in 5 mmol/L Tris-HCl buffer; pH 8.0. (a) Concentration of A were 0, 50, 100, 150, 180, 200 μ mol/L at 50 °C (lane 1 ~ 6) and 200 μ mol/L at 37 °C (lane 7); concentration of Eu^{3+} was 400 μ mol/L at 50 °C (lane 8); (b) concentration of B were 0, 50, 100, 120, 150, 180 μ mol/L at 50 °C (lane 1 ~ 6) and 180 μ mol/L at 37 °C (lane 7); concentration of Nd^{3+} was 360 μ mol/L at 50 °C (lane 8)

剂. 由电泳实验, 两种配合物在 37 °C 时, 切割 pBR322 DNA 效果不太明显, 因此我们研究了两种配合物在 50 °C 时, 切割 pBR322 DNA 的情况, 图 6 即为两种配合物切割 pBR322 DNA 的浓度梯度图. 随着配合物浓度的逐渐增大, DNA 超螺旋 CCC 带逐渐减少, 缺刻 OC 带逐渐增多, 然而并无线性出现, 同时两种配合物的浓度均不能超过 200 $\mu\text{mol/L}$, 否则配合物所带的正电荷与 DNA 所带的负电荷阴阳离子正负结合, 导致 DNA 沉淀, 这可能也是配合物不能很好地切割 DNA 的一个原因; 反过来, 也说明了两种配合物在较低的浓度下即可以将大部分 CCC 带切割为 OC 带. 另一方面, 虽然配合物不能很好地切割 DNA, 但是其切割 DNA 的能力却明显强于单独的稀土离子. 溶液的配制过程中, 加入了少量二甲基亚砜以使配合物完全溶解, 同时二甲基亚砜也是羟基自由基抑制剂, 所以反应过程中不可能产生羟基自由基, 至于是氧化还是水解机理有待进一步研究.

3 结论

本文合成和表征了两种新的稀土双核配合物 $[\text{Eu}_2(\text{bbinip})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (A) 和 $[\text{Nd}_2(\text{bbinip})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})](\text{ClO}_4)_2$ (B). 用 UV-vis 法研究了恰当浓度, 不同 pH, 不同温度下, 配合物与 BDNPP 的水解动力学反应, 实验结果表明: 两种配合物是断裂 BDNPP 中 P—O 键的很好的试剂. 配合物与 CT DNA 作用的光谱研究结果为: 配合物使 DNA 最大吸收峰发生减色和红移, 使 EB-DNA 体系的荧光强度减弱, 说明配合物与 CT DNA 之间以静电方式或部分插入方式结合. 两种配合物切割 pBR322 DNA, 在 37 °C 时作用效果不明显, 在 50 °C, pH 8.0 时, 切割效果比较好.

References

- 1 Strater, N.; Lipsomb, W. N.; Klablunder, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 35, 2024.
 - 2 Wilcox, D. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2435.
 - 3 Zhu, B.; Zhao, D.-Q.; Ni, J.-Z. *Prog. Chem.* **1998**, 10, 395 (in Chinese).
 - 4 Ragunathan, K. G.; Schneider, H. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1219.
 - 5 Mark, E. B.; Adrianne, K. T.; Lawrence, Q. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1898.
 - 6 Wall, M.; Rosemary, C. H.; Chin, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32(11), 1633.
 - 7 Hilde, P. B.; Douglasw, S. *Inorg. Chim. Acta* **1985**, 99, L53.
 - 8 Hilde, P. B.; Douglasw, S. *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 749.
 - 9 Suzuki, M.; Kanatomi, H.; Murase, L. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 57, 36.
 - 10 Bunton, C. A.; Farber, S. *Org. Chem.* **1969**, 34, 768.
 - 11 Young, M. J.; Wahnnon, D.; Chin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9441.
 - 12 Geary, W. J. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, 7, 81.
 - 13 Deacon, G. B.; Phillips, R. J. *Coord. Chem. Rev.* **1980**, 33, 227.
 - 14 Rapt, M.; Kamaras, P.; Brewer, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12865.
 - 15 Koniyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H. *Chem. Commun.* **1999**, 1443.
 - 16 Wahnnon, D.; Lebuis, A. M.; Chin, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 14, 2412.
 - 17 Browne, K. A.; Bruce, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4951.
 - 18 Gettins, P.; Coleman, J. E. *Biol. Chem.* **1996**, 35(32), 2415.
 - 19 Kimura, E.; Kodama, Y.; Koike, T.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8304.
 - 20 Koike, T.; Kajitani, S.; Kimura, E.; Nakamura, I.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1210.
 - 21 Xie, Y.-S.; Yu, J.; Lin, R.-S.; Liu, Q.-L. *Chem. J. Chin. Univ.* **2000**, 21, 1441 (in Chinese).
 - 22 Mahadevan, S.; Palaniadavar, M. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 254, 291.
- (朱兵, 赵大庆, 倪嘉缙, 化学进展, **1998**, 10, 395.)
- (解永树, 郁隽, 林瑞森, 刘清亮, 高等学校化学学报, **2000**, 21, 1441.)
- (A0212244 SHEN, H.)