

博莱霉素与 DNA 在镍离子注入修饰电极上的相互作用及其应用

胡劲波^a 黄清泉^b 李启隆^{a*}

(^a 北京师范大学化学系 北京 100875)

(^b 中国药品生物制品检定所 北京 100050)

摘要 博莱霉素(BLM)在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 缓冲溶液(pH 4.62)中,在 Ni/GCE 离子注入修饰电极上有一灵敏的还原峰,峰电位为 -1.16 V(vs. SCE),峰电流与 BLM 浓度有关.用线性扫描和循环伏安法研究体系的行为表明,体系为具有加速作用的不可逆过程.是注入的 Ni 加速 BLM 的还原.引入 DNA 后,BLM 的峰电位为 -1.15 V(vs. SCE),与未加入 DNA 前几乎完全一致;只使峰电流降低,形成一种非电活性的结合物.求得该结合物的结合比为 BLM:DNA = 3:1,结合常数为 $\beta = 3.16 \times 10^{16}$.用线性扫描和循环伏安法,并辅以紫外可见光谱法等手段研究表明,电极过程仍为不可逆过程,与未加入 DNA 时一样.加入 DNA 后,BLM 的峰电流降低,据此,可用于 DNA 的测定,回收率在 96.8 ~ 103.9% 之间.

关键词 博莱霉素, DNA, 离子注入, 伏安行为, 表面分析

Study on the Interaction between Bleomycin and DNA at Ni/GCE Ion Implantation Modified Electrode and Its Application

HU Jing - Bo^a HUANG Qin - Quan^b LI Qi - Long^{a*}

(^a Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing, 100875)

(^b National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing, 100050)

Abstract With a Ni / GCE ion implantation modified electrode in 0.1 mol / L HOAc - NaOAc solution (pH 4.62), a sensitive reduction peak of bleomycin (BLM) was obtained by linear - sweep voltammetry. The peak potential is -1.16 V (vs. SCE). The peak current is proportional to the concentration of BLM. The electrochemical behavior of the system was also studied by cyclic voltammetry. The experimental results depict that the electrode process at Ni / GCE is irreversible and the reduction of BLM is accelerated obviously. Measurements of AES show that Ni is surely implanted into the surface of GCE. After adding DNA to the solution containing BLM, the peak potential is almost no change, but the peak current of BLM is decreased. The interaction between BLM and DNA at a Ni / GCE modified electrode was studied by linear sweep and cyclic voltammetry. An inactive complex of BLM with DNA was formed and resulted in a decrease of BLM concentration as well as the reduction current. The composition of the complex is estimated as BLM : DNA = 3 : 1 and the combination constant is calculated as 3.16×10^{16} . Its electrochemical behavior is the same as that in the absence of DNA. The decrease in the peak current is proportional to DNA concentration and can be used to the determination of the concentration of DNA.

* E - mail: LiQilong@BNU.Edu.cn

收稿日期: 2000 - 09 - 07, 修回日期: 2000 - 12 - 04, 定稿日期: 2001 - 02 - 24, 国家自然科学基金 (29875003) 和教育部博士学科点基金 (98002709) 资助项目

(Received September 7, 2000. Revised December 4, 2000. Accepted February 24, 2001)

Keywords bleomycin, DNA, ion implantation, voltammetric behavior, surface analysis

离子注入是一种新的材料表面改性技术,是材料科学中颇有生命力的研究领域.我们研究小组首次将这种技术引入分析化学,并制成具有特殊功能的修饰电极,用于研究药物的电化学反应及测定,取得了可喜的成绩^[1].这类电极具有以下特点:(1)可按人们的意愿和需要,将不同的离子注入到不同的基体电极表面,而且离子注入不受相律和化学平衡的限制,注入的浓度和深度又可精确控制,可制成多种多样的具有不同功能的修饰电极.(2)用特殊的离子注入机将金属离子注入到基体表面的内部,其深度一般为 100~1000 nm,所得的表层牢固均匀,耐磨耐蚀,因而这类电极比一般的化学修饰电极具有较高的稳定性和重现性.其使用寿命可达数月,甚至数年.(3)被注入的表面造成缺陷、偏析和位错等微观结构的变化,形成众多的活性中心,因而它的催化活性不仅比未注入的基体电极高,也比纯的被注金属电极高.(4)选择性较好,测定试样往往不必事先分离,经稀释后,可直接进行测定.(5)操作简单,保存方便.每次做完实验后,只要用清水冲洗,用滤纸轻轻拭干,就能反复多次使用.用了一段时间后,可将电极放在乙醇中浸泡 5~10 min,就可除去吸附物,保持电极的活性.电极用后保存于常温的容器中,不必置于冰箱或特殊设备里.博莱霉素(BLM)属多肽类抗癌药物,主要抑制胸腺嘧啶脱氧核苷掺入 DNA,与 DNA 结合,使之破坏,也能使 DNA 单链断裂,放出部分游离核碱,破坏 DNA 模板,阻止 DNA 复制^[2].BLM 在汞电极上的伏安行为和电极反应机理^[3,4]及其测定^[5],已有报道.但 BLM 在离子注入修饰电极上的电化学反应及其与 DNA 相互作用尚未见报道.本文的创新性在于用离子注入技术研制一种新的修饰电极,并用于研究 BLM 与 DNA 相互作用的电化学反应及其应用.这种电极稳定性和重现性比一般的化学修饰电极优越得多;而灵敏度也比较高. BLM 在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 溶液 (pH 4.62) 中,在 Ni/GCE 离子注入修饰电极上的还原,属具有加速作用的不可逆过程,是注入的 Ni 加速 BLM 的还原.引入 DNA 后,BLM 的峰电位几乎不变化,只使峰电流降低,形成一种非电活性的结合物.求得该结合物的结合比和结合常数.电极过程仍为不可逆过程,与未加入 DNA 时一样.加入 DNA 后,BLM 的峰电流降低,据此,可用于 DNA 的测定,得到满意的

结果.

1 实验部分

1.1 主要试剂与仪器

1.0×10^{-4} mol/L BLM 溶液:准确称取 7.2 mg BLM(中国医学科学院药物研究所)用三次水溶解后转入 50 mL 容量瓶中定容,摇匀,用黑纸包好置于冰箱保存.使用时再用蒸馏水稀释至所需浓度.1.0 mol/L HOAc - NaOAc 溶液 (pH 4.62). 本实验所用试剂均为分析纯.水为二次去离子水再经蒸馏的纯水.高纯氮除氧.

CHI660 电化学工作站 (CH Instruments U. S. A.), 通过 586 IBM 兼容微机应用 CHI 电化学软件进行各种电化学测量.三电极体系,参比电极为饱和甘汞电极 (SCE),辅助电极为铂电极,工作电极为离子注入修饰电极 Ni/GCE 和玻碳电极 GCE. 800 型离心机 (上海手术器械厂). UV - 250 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司). PHI610 型扫描俄歇微探针能谱仪 (AES) (美国 Perkin - Elmer 公司). 807 型数字 pH/离子计 (广州登峰分析仪器厂).

1.2 离子注入修饰电极 Ni/GCE (5×10^{17} 离子/ cm^2) 制备

选择面积为 1.0 cm^2 玻碳为基体材料,因为它具有低渗透性、氧化时高稳定性和强抗腐蚀性等良好的性能.将其依次用丙酮,1 mol/L NaOH, HNO₃ 和蒸馏水清洗 3~5 min. 晾干后用金属蒸气弧 (MEVVA) 源离子注入机进行离子注入,能量为 40 keV,注入 Ni 离子纯度高于 99.9%,注入剂量为 5×10^{17} 离子/ cm^2 ,注入束流量为 1 mA/ cm^2 . 用一般方法引出导线制成电极.

2 结果与讨论

2.1 博莱霉素在镍离子注入修饰电极上的电化学反应

2.1.1 Ni/GCE 与 GCE 性能的比较 如图 1 所示,在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 缓冲溶液 (pH 4.62) 中,记录 Ni/GCE 离子注入修饰电极的伏安曲线,得一灵敏的 BLM 还原峰 (曲线 c). 峰电位为 -1.16 V (vs.

SCE). BLM 在玻碳电极上不发生可察觉的电极过程(曲线 b). 表明注 Ni 的玻碳电极对 BLM 的电还原有加速作用.

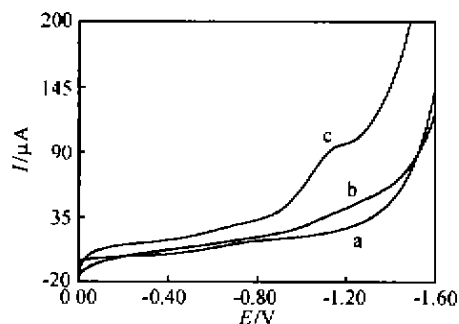


图 1 线性扫描伏安曲线

Fig. 1 Linear sweep voltammograms

a—0.1 mol/L HOAc-NaOAc at the Ni/GCE;

b—0.1 mol/L HOAc-NaOAc + 5.0×10^{-6} mol/L BLM at GCE;

c—a + 5.0×10^{-6} mol/L BLM; $v = 100$ mV/s

2.1.2 循环伏安法 如图 2 所示, 在 0 V ~ -1.4 V 内扫描, 正扫, 有一阴极峰; 反扫, 没有峰. 所以可以认为, BLM 在镍离子注入修饰电极上还原过程为不可逆过程.

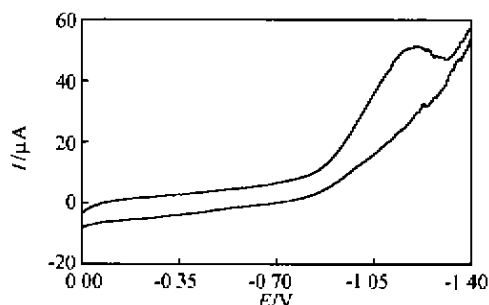


图 2 循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammogram

0.1 mol/L HOAc-NaOAc; 5.0×10^{-6} mol/L BLM; $v = 100$ mV/s

2.1.3 扫速的影响 峰电流与扫速平方根成正比, 而与扫速一次方的关系是一条向下弯曲的曲线. 表明该体系的峰电流主要受扩散控制.

2.1.4 静止时间的影响 当静止时间在 2 ~ 120 s 之间变化时, 峰电流基本不变, 表明峰电流主要受扩散速率控制.

2.2 表面分析

图 3 是 Ni/GCE 修饰电极表面元素深度分布图. 如图所示, 镍元素的深度分布出现一个峰, 成高斯分布. 最高原子百分含量为 45%. 可以认为, 由于 Ni 离子的注入, 改变了玻碳基体的性质, 加速了

BLM 在 Ni/GCE 修饰电极表面的还原.

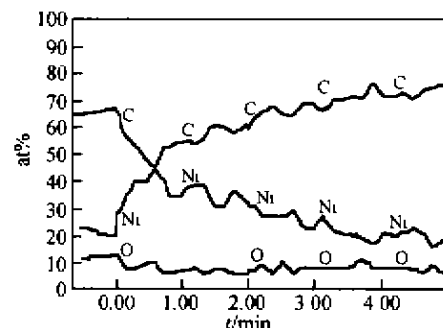


图 3 Ni/GCE 修饰电极表面元素深度分布图

Fig. 3 The depth distribution of elements in Ni/GCE

图 4 和图 5 是玻碳电极和镍离子注入修饰电极的 AES 图. 对比这两张图, 表明, 玻碳电极表面仅含有 C, O 两种元素, 而镍离子注入表面除了 C, O 之外, 还有 Ni 元素, 且镍元素的含量小于碳元素, 与理论判断一致. 表明镍确实被注入到玻碳电极表面上.

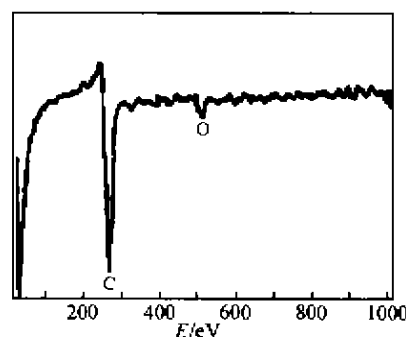


图 4 玻碳电极的 AES 图

Fig. 4 AES of GCE

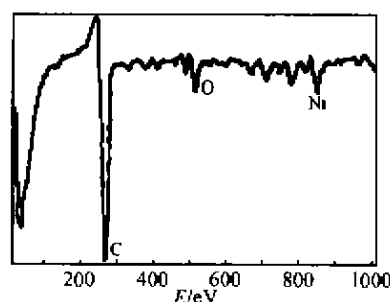


图 5 Ni/GCE 的 AES 图

Fig. 5 AES of Ni/GCE

综上所述, BLM 在 0.1 mol/L HOAc-NaOAc 溶液 (pH 4.62) 中, 在 Ni/GCE 上有一还原峰, 是 BLM 分子中嘧啶环得 2 个电子的还原^[3]. 表面分析证实, Ni 的确被注入到玻碳电极的表面, 加速了 BLM 的还原. 电极过程为不可逆过程.

2.3 BLM 与 DNA 相互作用的研究

在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 溶液 (pH 4.62) 中, 在 Ni/GCE 上, BLM 有电活性, 而 DNA 为非电活性. 实验表明, 在 BLM 溶液中引入 DNA, 在 37℃ 恒温 2 h 后, BLM 与 DNA 发生相互作用, 使得 BLM 的峰电流下降 (见图 6).

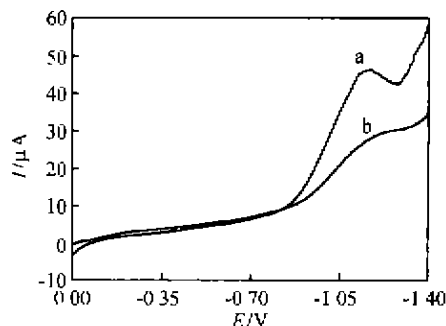


图 6 线性扫描伏安图

Fig.6 Linear sweep voltammograms

a—0.1 mol/L HOAc - NaOAc, 1.2×10^{-5} mol/L BLM;
b—a + 5.3×10^{-5} mol/L DNA

2.3.1 BLM 与 DNA 作用的光谱证据 如图 7 所示, 在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 溶液 (pH 4.62) 条件下, BLM 在 287 nm 处有一最大吸收峰; DNA 的最大吸收峰位于 257 nm. BLM 中引入 DNA 后, 在 250 nm 处出现一新的吸收峰, 表明 BLM 与 DNA 发生结合作用.

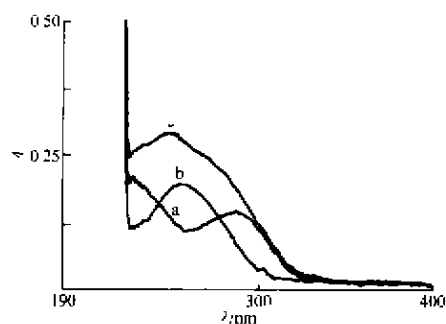


图 7 吸收光谱图

Fig.7 Absorption spectra

a— 5.0×10^{-6} mol/L BLM; b— 2.65×10^{-5} mol/L DNA;
c—a + b; 0.1 mol/L HAc - NaAc

2.3.2 BLM 与 DNA 的相互作用条件的选择 加热时间的影响: 在固定 37℃ 水温中, 作加热时间的影响实验, 结果如图 8 所示. 由图可见, 随着时间的增加, BLM 的峰电流降低, 而趋于一稳定值. 表明 BLM 与 DNA 的作用, 随着时间的增加而加强, BLM 的游离态不断的减少, 因而峰电流不断降低, 而 2 h 后达

到作用完全.

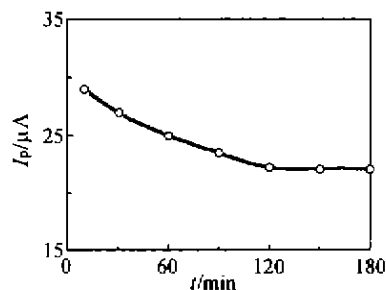


图 8 时间的影响

Fig.8 Effect of time

0.1 mol/L HOAc - NaOAc; 5.0×10^{-6} mol/L BLM;
 5.3×10^{-6} mol/L DNA

温度的影响: 恒温时间为 2 h, 作加热温度的影响实验, 结果如图 9 所示. 由图可见, 随着加热温度的升高, BLM 的峰电流降低, 而趋于一稳定值. 表明 BLM 与 DNA 的作用, 随着温度的升高而增加, 因而使峰电流不断降低, 33℃ 后达到作用完全.

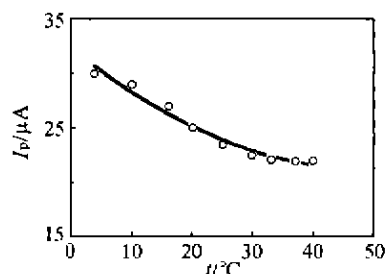


图 9 温度的影响

(条件同图 8)

Fig.9 Effect of temperature

(Conditions as in Fig. 8)

2.3.3 BLM 与 DNA 结合数及结合常数的测定 对于 BLM 与 DNA 形成的结合物, 可以求出 BLM 与 DNA 结合数及结合常数^[7]. DNA 浓度在 5.3×10^{-5} mol/L 时, 改变 BLM 浓度所得的还原峰电流的变化, 如图 10 所示. 直线 a 为未加入 DNA 前, 峰电流 I_p 与 BLM 浓度 c_{BLM} 的关系图; 曲线 b 为加入 DNA 后, I_p 与 c_{BLM} 的关系曲线; 曲线 c 则为曲线 a 和 b 的峰电流差值 ΔI_p 与 c_{BLM} 的关系曲线. 由图中曲线 c 可见, 当 BLM 的浓度高于 5.25×10^{-6} mol/L 时, 曲线 c 趋于稳定值, 表明溶液中几乎无游离的 DNA.

假定 BLM 与 DNA 只形成一种简单的化合物 $\text{DNA} - m\text{BLM}$, 即



结合常数可表示为

$$\beta = \frac{[\text{DNA} - m\text{BLM}]}{[\text{BLM}]^m [\text{DNA}]}$$

经推导,可得 $\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I} = \log \beta + m \log [\text{BLM}]$

和 $\frac{1}{\Delta I} = \frac{1}{\Delta I_{\max}} + \frac{1}{\beta \Delta I_{\max} [\text{BLM}]^m}$, 式中 ΔI_{\max} 表示引入 DNA 前后 BLM 峰电流的差值。

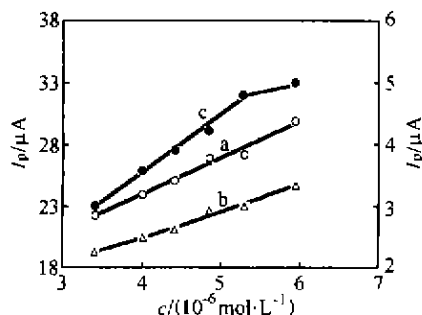


图 10 I_p 和 c_{BLM} , ΔI_p 和 c_{BLM} 的关系图

Fig. 10 The relationship between I_p and c_{BLM} , ΔI_p and c_{BLM}

a— $c_{\text{DNA}} = 0$; b— $c_{\text{DNA}} = 5.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$;

c— $I_{pa} - I_{pb}$

若 BLM 与 DNA 只形成一种简单的化合物,则作 $\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I} \sim \log [\text{BLM}]$ 图应是一条直线,可以根据该直线的斜率和截距分别求得结合数 m 和结合常数 β 。

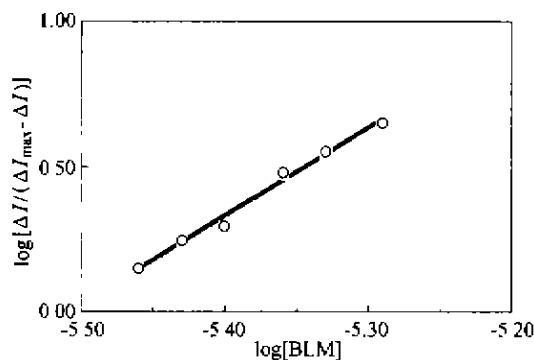


图 11 $\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I}$ and $\log [\text{BLM}]$ 的关系图

Fig. 11 The relationship between

$\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I}$ and $\log [\text{BLM}]$

在曲线 c 上读取多点 ΔI , 再从曲线 b, a 上找出各个点相应的 BLM 的平衡浓度 $[\text{BLM}]$, 计算 $\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I}$ 和 $\log [\text{BLM}]$, 并作 $\log \frac{\Delta I}{\Delta I_{\max} - \Delta I} \sim \log [\text{BLM}]$ 的关系图(图 11)。

图 11 为一直线, 由斜率求得结合数 $m = 3$, 由截

距求得结合常数 $\beta = 3.16 \times 10^{16}$. 初步表明 BLM: DNA 形成 3:1 型化合物。

假定 $m = 1, 2, 3$, 分别作曲线 $\frac{1}{\Delta I} \sim \frac{1}{[\text{BLM}]^m}$, 如果计算出的 ΔI_{\max} 接近实验值 $5.2 \mu\text{A}$, 则有理由认为假定的 m 值是正确的。表 1 列出了计算结果。

表 1 结合常数的测定

Table 1 Determination of combination constants

m	$\Delta I_{\max}/\mu\text{A}$	β	R
1	10.0	1.62×10^6	0.9901
2	7.4	1.50×10^{12}	0.9959
3	5.4	5.23×10^{16}	0.9810

显然 $\Delta I_{\max} = 5.4 \mu\text{A}$ 最接近实验值, 因此 m 确定为 3, 结合常数 $\beta = 5.23 \times 10^{16}$ 也接近于实验值 3.16×10^{16} , 所以 BLM 与 DNA 形成一种 DNA-3BLM 的结合物, 也就是说平均每摩尔 DNA 碱基对结合了 3 摩尔 BLM 分子。

2.3.4 电化学行为的研究 连续循环伏安图: 如图 12 所示, 引入 DNA 后, 仅出现一阴极峰, $E_{p,c} = -1.15 \text{ V}$. 与未加入 DNA 时完全一致, 仍为不可逆过程。

扫速的影响: 在 $0.1 \text{ mol/L HOAc} - \text{NaOAc}$ 的缓冲溶液中, 加入 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L BLM}$ 和 $2.65 \times 10^{-5} \text{ mol/L DNA}$, 在 37°C 恒温 2 h 后, 作扫速对峰电流的影响试验, 当扫速在 $5 \sim 150 \text{ mV/s}$ 时, 峰电流与扫速平方根成正比; 峰电流与扫速一次方的关系是一条向下弯曲的曲线, 表明峰电流主要受扩散控制。

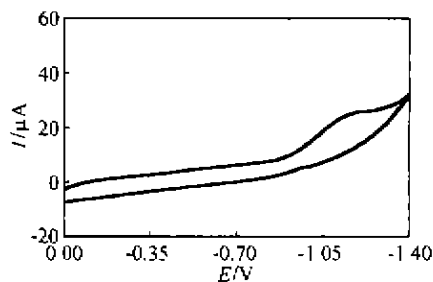


图 12 循环伏安图

Fig. 12 Cyclic voltammogram

$0.1 \text{ mol/L HOAc} - \text{NaOAc}$; $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L BLM}$;

$2.65 \times 10^{-5} \text{ mol/L DNA}$;

$v = 100 \text{ mV/s}$; $t_{\max} = 5 \text{ s}$

静止时间的影响: 在 $0.1 \text{ mol/L HOAc} - \text{NaOAc}$ 的缓冲溶液中, 加入 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L BLM}$ 和 $2.65 \times 10^{-5} \text{ mol/L DNA}$, 在 37°C 恒温 2 h 后, 作静止时间对峰电流的影响试验, 当静止时间在 $2 \sim 120 \text{ s}$ 之间

变化时,峰电流基本不变,表明峰电流主要受扩散速率控制。

综上所述,在含有 BLM 的体系中,引入 DNA 并在 37℃ 恒温 2 h 后,峰电位几乎没有变化,只是峰电流降低。UV 光谱、线性扫描和循环伏安法等实验表明, DNA 与 BLM 发生了反应,形成了一种非电活性的结合物。加入 DNA 后,体系的性质没有改变,电极过程仍是不可逆过程。

2.3.5 分析应用 在 0.1 mol/L HOAc - NaOAc 缓冲溶液 (pH 4.26) 中,加入 DNA 后使 BLM 的峰电流降低,可用于检测 DNA 的浓度。当 BLM 的浓度为 5.1×10^{-6} mol/L 时,还原峰电流的降低值 ΔI_p 与 DNA 的浓度在 $1.06 \times 10^{-6} \sim 2.21 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内成线性关系,线性方程为 $\Delta I_p = 130.3 \times 10^6 c - 43.13$ ($\Delta I_p, \mu A; c, \text{mol/L}$),线性相关系数为 $R = 0.9913$ 。测定结果和回收率试验示于表 2,3 和 4。由表可见,相对标准偏差为 0.52% ~ 1.03%,测得结果与分光光度法一致,回收率在 96.8% ~ 103.9% 之间,表明该法用于 DNA 的测定是可行的。

表 2 样品的测定结果

Table 2 Results of sample determinations

Sample (No.)	Found (10^{-6} mol/L)	Average (10^{-6} mol/L)	RSD (%)
1	3.05	3.07	0.52
	3.08		
	3.07		
2	3.11	3.07	1.03
	3.09		
	3.07		
3	3.02	3.05	1.01
	3.04		
	3.08		

表 3 回收率的试验

Table 3 Results of recovery experiments

Sample	Added (10^6 mol/L)	Found (10^6 mol/L)	Recovery (%)
CTDNA	1.54	1.50	97.4
	1.54	1.60	103.9
	3.09	3.15	101.9
	3.09	2.99	96.8
	6.18	6.00	97.1
	6.18	5.98	96.8
FSDNA	2.25	2.60	102.0
	5.15	5.05	98.1

表 4 UV-S 和本法测定结果的比较

Table 4 Comparison of results by UV-S and this method

Sample	UV-S (10^{-6} mol/L)	本法 (10^{-6} mol/L)
1	3.09	3.07
2	3.02	3.07
3	3.10	3.05

References

- 1 Li, Q. - L.; Hu, J. - B. *Chem. Bull.*, 2000, 3, 32 (in Chinese).
- 2 Tang, G. *Contemporary Pharmacology*, Medical Science and Technology Press, 1998, p. 757 (in Chinese).
- 3 Li, Q. - L.; Tan X. - C.; Hu J. - B. *Chem. J. Chin. Univ.*, 1997, 1, 37 (in Chinese).
- 4 Tan, X. - C.; Hu J. - B.; Li Q. - L. *Analyst*, 1997, 122(9), 991.
- 5 Tan, X. - C.; Li Q. - L. *J. Anal. Chem.*, 1997, 25(7), 789 (in Chinese).
- 6 Andrieux, C. P.; Blocman, C.; Dumasbouchat, J. M.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 3431.
- 7 Qu, F.; Li, N. - Q.; Jiang, Y. - Y. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 344, 97.

(Ed. XIE Hui - Qin)

(ZHENG Guo - Cheng)