

水杨酸与 DNA 相互作用的电化学研究

郑新宇^a, 黄建松^a, 郑舒燕^b, 苏妍^b, 林瑞余^{a*}

(福建农林大学 a.生命科学学院; b.植物保护学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 采用紫外光谱法和电化学法研究了水杨酸(SA)与鲱鱼精 DNA 的相互作用。紫外吸收光谱法结果表明, SA 与 DNA 的相互作用为嵌插方式。在 pH 5.8 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中对 SA 进行循环伏安扫描, SA 在玻碳电极上于 1.070 V(Ag/AgCl 参比电极)有 1 个阳极氧化峰, 随着 DNA 的加入, 氧化峰电流降低, 峰电位正移, 进一步表明 SA 嵌插到 DNA 分子的双螺旋结构中, 二者相互作用生成了一种非电活性的超分子复合物。通过电化学方法可计算出 SA 与 DNA 复合物的结合比为 3 : 1, 结合常数 β 为 2.53×10^{12} 。

关 键 词: 水杨酸; DNA; 电化学; 紫外光谱

中图分类号: O657.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)02-0225-04

Electrochemical characteristics of the interaction between salicylic acid and DNA

ZHENG Xin-yu^a, HUANG Jian-song^a, ZHENG Shu-yan^b, SU Yan^b, LIN Rui-yu^{a*}

(a. School of Life Sciences; b. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University; Fuzhou 350002, China)

Abstract: The interaction between salicylic acid(SA)and DNA was investigated by electrochemistry and ultraviolet spectroscopy. The ultraviolet spectroscopy results showed that SA and DNA interacted in an intercalative way. Then SA was further studied by cyclic voltammetry in $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ buffer solution, pH5.8. SA had a DPV oxidation peak at the potential of 1.070 V(vs. Ag/AgCl)on the glassy carbon electrode. The presence of DNA led to the decrease in the oxidation peak current of SA and the positive shift in the potential. The results indicated that SA was intercalated into the helix structure of DNA and forms an electrochemically inactive supermolecular complex DNA:mSA. Electrochemical method showed a binding ratio of 3 : 1 between SA and DNA in the complex, and the binding constant was $=2.53 \times 10^{12}$.

Key words: salicylic acid; DNA; electrochemical; ultraviolet spectroscopy

药物小分子与 DNA 作用后会引引起 DNA 分子结构与功能发生不同程度的变化^[1-4]。研究药物小分子与 DNA 的相互作用及其机理, 有助于提高对药物与 DNA 相互作用方式及药物代谢动力学的认识, 实现对疾病的有效治疗。

Carter 等^[5]最先将电化学方法应用于电活性分子与 DNA 分子相互作用的研究, 后续的研究有不少文献报道^[6-8]。笔者采用电化学方法研究了水杨

酸(SA)与鲱鱼精 DNA 的相互作用, 测定了这种作用的表现结合常数及结合位点数, 分析了结合反应机理, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

水杨酸对照品购自中国生物药品检验所, 鲱鱼精 DNA 对照品购自美国 Sigma 公司。支持电解

收稿日期: 2011-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070403)

作者简介: 郑新宇(1977—), 男, 福建仙游人, 博士, 讲师, 主要从事化学生物学研究, 0621zhengxinyu@163.com; *通信作者, lrylin2004@163.com

质为 pH5.8 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液。

主要仪器有 CHI660D 电化学工作站(三电极体系: CHI-104 玻碳电极为工作电极(表观面积为 $1.256 \times 10^{-5} \text{ m}^2$), Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极) 紫外可见分光光度计(varian Cary 50, 美国)。

1.2 方 法

1.2.1 测定 SA 与 DNA 反应体系的紫外吸收光谱

于 5 mL 容量瓶中加入 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的水杨酸标准溶液 0.5 mL 和质量浓度为 500 mg/L 的 DNA 标准溶液 0.5 mL, 用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液稀释至刻度后, 转入紫外可见分光光度计测定 SA 与 DNA 反应体系的紫外吸收光谱。同时测定 SA 的紫外吸收光谱。

1.2.2 测定 SA 与 DNA 反应体系的电化学性质

玻碳工作电极在测定前用 Al_2O_3 (0.3 μm) 悬浊液在抛光绒布上抛光至镜面, 用双蒸水冲洗干净, 用滤纸吸去水分后置于待测溶液中进行电化学测量。所有测试均在 25 $^\circ\text{C}$ 下进行。在电位 0.4 ~ 1.6 V 用循环伏安法扫描, 测定过程在 N_2 气保护下进行。

用 B-R、 $\text{CH}_3\text{COOH--CH}_3\text{COONa}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 等 3 种缓冲溶液, 选择合适的缓冲介质。
②固定 SA 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 和 DNA 质量浓度为 50 mg/L, 在 pH 5.8~8.0, 考察酸度对 SA 与 DNA 相互作用的影响。
③在合适的酸度下, 测定反应时间(5、10、15、20、25、30 min)、扫描速率(10、20、50、100、200、300、400、500、600、700 mV/s) 对 SA 与 DNA 反应体系的影响。

2 结果与讨论

2.1 SA 与 DNA 反应体系的紫外吸收光谱

图 1 中, 曲线 a 为 SA 的紫外吸收光谱, 曲线 b 为 SA 中加入 DNA 后的紫外吸收光谱。当 SA 标准溶液中加入 DNA 后, SA 最大吸收峰强度减小。根据文献^[9-10]报道, 当小分子以嵌入方式结合于 DNA 双螺旋碱基对之间时, 其吸收光谱表现出减色效应; 因此, 推测此时 SA 与 DNA 之间的相互作用

应以嵌入方式为主。

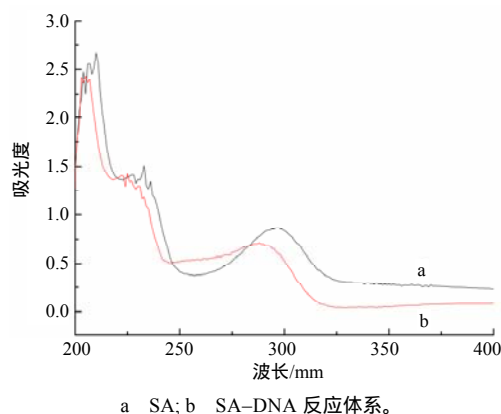
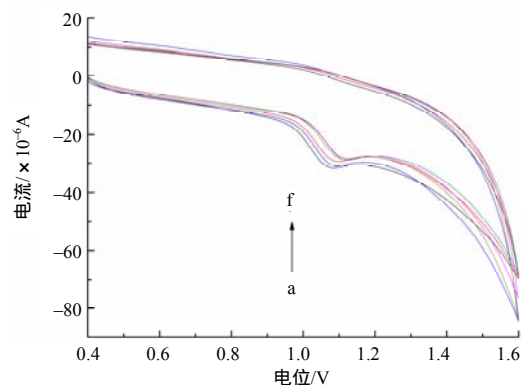


图 1 水杨酸及 SA-DNA 反应体系的紫外吸收光谱
Fig.1 Absorption spectra of SA and the SA-DNA complex

2.2 SA 与 ds DNA 反应体系的伏安特性

在 pH5.8 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中, SA 在 1.070 V 有 1 个阳极氧化峰(图 2), 随着 DNA 的加入, SA 的峰电位从 1.070 V 正移至 1.109 V, 峰电流随着 DNA 质量浓度的增加而下降; 当 DNA 质量浓度达到 50 mg/L 时, 峰电流和峰电位基本不变, 且没有新峰出现, 表明 SA 与 DNA 相互作用时形成了非电活性的复合物, 不能在电极上氧化, 非电活性结合物的形成使溶液中游离的 SA 浓度降低, 导致氧化峰电流的减小。



a~f SA 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, DNA 质量浓度分别为 0、10、30、50、70、90 mg/L。

图 2 SA 与 DNA 反应体系的伏安特性

Fig.2 The cyclic voltammetric characteristics of reaction system between SA and DNA

SA 与 DNA 相互作用后, 峰电位发生正移, 说明二者发生了嵌插作用^[11]。由于 SA 空间位阻小, 推测它可能嵌插到 DNA 分子的双螺旋结构中, 与 DNA 的碱基发生相互作用, 形成 DNA-SA 的复合

物。这与紫外光谱测定的结果一致。

2.3 试验条件对 SA 与 DNA 反应体系的影响

2.3.1 缓冲溶液

SA 在 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液中循环伏安图峰形最好,并且加入 DNA 后,峰电流下降最多;因此,选择 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液作为 SA 与 DNA 反应体系的缓冲溶液。

2.3.2 酸度

加入 DNA 后,SA 氧化峰下降值 I_p 随着酸度的增加而减小。当 pH 5.8 时 ΔI_p 最大。因此选取 pH 5.8 作为研究 SA 与 DNA 作用体系的最佳酸度。

2.3.3 反应时间

随着 SA 与 DNA 反应时间的延长,峰电流有一定的增加。当反应体系作用 20 min 后,峰电流基本稳定,说明二者结合较完全。选择 SA 与 DNA 相互作用的反应时间为 20 min。

2.3.4 扫描速率

SA 与 DNA 相互作用 20 min 后,当扫描速率在 100~300 mV/s 变化时,峰电位随扫描速率的增加而增加,且峰电位 E_p 与扫描速率的 $\ln v$ 之间存在着良好的线性关系, $E_p = 1.054 + 0.0118 \ln v$, $R^2 = 0.9973$ 。

峰电流随扫描速率的增加而增加,且与扫描速率呈线性关系, $I_p = 3.8407 + 0.022 \ln v$, $R^2 = 0.9986$ 。说明此条件下电极反应过程主要受吸附控制^[9]。

2.4 SA 与 DNA 相互作用机理

固定 SA 浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, DNA 质量浓度为 50 mg/L,考察 DNA 存在条件下,SA 在玻碳电极上的电极反应机理。

2.4.1 参与电极反应的电子数

根据文献[12],对于不可逆电极反应,测得峰电位与扫描速率有如下关系式:

$$E_p = 1.054 + 0.0118 \ln v, R^2 = 0.9973.$$

得到 $\frac{RT}{2(1-\alpha)nF} = 0.0115$,由此求出 $(1-\alpha)n$ 的值为

1.09。

式中: α 为转移系数; F 为法拉第常数; n 为电子转移数。

根据不可逆吸附体系峰电流 I_p 与吸附电量 Q 关系式^[13],在扫描速率 0.1 V/s, SA $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 测得其峰电流 I_p 为 9.141 μA , Q 为 4.379 μC 。

计算可得: $n = 1.8 \approx 2$,即在电极反应中有 2 个电子参与反应。由于 $(1-\alpha)n = 1.09$,则 $\alpha = 0.45$ 。

2.4.2 参与电极反应的质子数

测定 SA 在 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中 pH 对峰电位的影响。结果表明,在 pH 5.8~8.0 时,pH 增大,峰电位负移,表明有质子参与电极反应^[14]。SA 的峰电位 E_p 与 pH 值呈良好的线性关系, $E_p = 1.425 - 0.059 \cdot \text{pH}$ 。

由 Nernst 方程式得 E_p 与 pH 值关系式:

$$E_p = K - \frac{0.059m}{\alpha n} \cdot \text{pH}.$$

式中 $\alpha = 0.45$, $n = 2$,所以 $m = 0.9 \approx 1$,即参与反应的质子数为 1。

罗红梅等^[15]研究 SA 在玻碳电极上的电极反应是属于失 1 个质子和 2 个电子的不可逆的氧化反应,结合本研究结果,说明体系无论有无 DNA 存在,对 SA 在电极上的电子转移数 n 及电极反应的质子数 m 均无影响,进一步说明 SA 与 DNA 作用时形成了一种非电活性的超分子化合物,从而使溶液中游离的 SA 浓度降低,最终导致氧化峰电流减少。

2.5 SA 与 DNA 结合常数和结合数

根据文献[16],可以测定 SA-DNA 复合物的结合比和结合常数。图 3 中曲线 a 为未加入 DNA 前 SA 的氧化峰电流 I_p 与 C_{SA} 变化的关系曲线;曲线 b 为加入 DNA 后 I_p 与 C_{SA} 变化的关系曲线;曲线 c 为曲线 a 和 b 的峰电流差值 I_p 与 C_{SA} 变化的关系

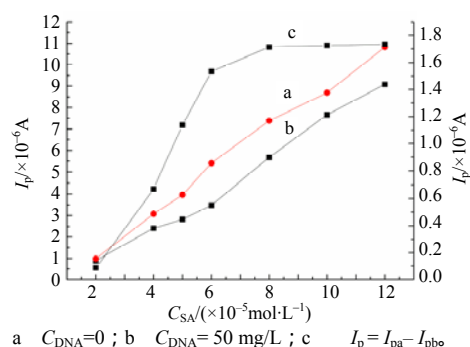


图 3 SA 浓度与峰电流的关系

Fig.3 The relationship between the concentration and the peak current of SA

曲线。由曲线 c 可见,当 SA 的浓度大于 $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时,曲线 c 趋于稳定值,表明溶液中几乎没有游离的 DNA。

假定 SA 与 DNA 仅生成单一的复合物 DNA-SA,结合反应中 SA 与 DNA 之间的结合数 m 以及平衡常数 β ,可通过下式计算:

$$\frac{1}{\Delta I_p} = \frac{1}{\Delta I_{p\max}} + \frac{1}{\beta \Delta I_{p\max} \times C_{SA}^m}$$

式中: $\Delta I_{p\max}$ 表示引入 DNA 前后 SA 峰电流的最大差值。

在 pH 5.8 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中,固定 DNA 质量浓度为 50 mg/L,SA 浓度发生变化, $\frac{1}{\Delta I_p}$ 与 C_{SA}^m 呈线性关系(结合比 $m=1, 2, 3, \dots$),由直线斜率和截距即可算出结合常数 β ,结果如图 4 所示。

当 $m=3$ 时,回归方程为 $\frac{1}{\Delta I_p} = 0.2276 + 90.089 \times \frac{1}{C_{SA}^3}$,相关系数 $R^2=0.9989$,由截距求得结合常数 $\beta=2.53 \times 10^{12}$ 。表明 SA 与 DNA 是以 3:1 形式结合形成 SA-DNA 型超分子复合物。

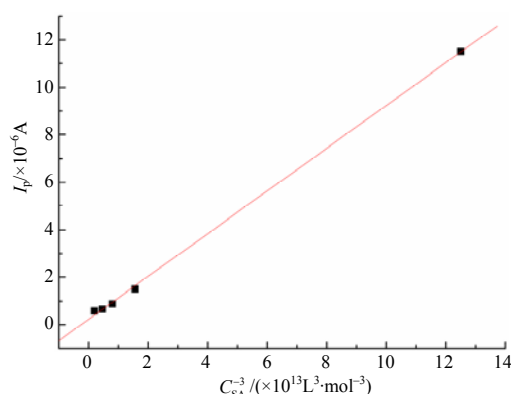


图 4 $\frac{1}{\Delta I_p}$ 与 $\frac{1}{C_{SA}^m}$ 的关系

Fig.4 Plot of $\frac{1}{\Delta I_p}$ versus $\frac{1}{C_{SA}^m}$

参考文献:

- [1] 时巧翠,王素芬,朱斌,等.环丙沙星与DNA相互作用的电化学研究[J].浙江大学学报,2007,34(3):330-334.
- [2] 尚永辉,李华,孙家娟.线性扫描伏安法研究美托拉踪与DNA的相互作用[J].分析测试学报,2009,28(11):1340-1343.

- [3] 李美仙,李南强.Fe(II)-EDTA剪切DNA在悬汞电极上的电化学行为研究[J].高等学校化学学报,2001,22(7):1230-1232.
- [4] 王宏飞,杨频,李青山.阿霉素-铁(III)配合物的电化学特征及其与DNA结合作用研究[J].高等学校化学学报,1997,18(5):671-675.
- [5] Carter M T, Rodriguez M, Bard A J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2: Trischelated complexes of cobalt (III) and iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine [J]. American Chemical Society, 1989, 111(24): 8901-8911.
- [6] Hossein Banitaba M, Hosseiny Davarani S S, Mehdinia A. Study of interactions between DNA and aflatoxin B1 using electrochemical and fluorescence methods[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 411(2): 218-222.
- [7] Wang L, Xiong H Y, Zhang X H, et al. Electrochemical behaviors of nicotine and its interaction with DNA [J]. Electrochemistry Communications, 2009, 11(11): 2129-2132.
- [8] Zhou C L, Dong Y M, Li Z Y, et al. Electrochemistry of magnolol and interaction with DNA[J]. Electroanalytical Chemistry, 2010(2): 115-119.
- [9] Long E C, Barton J K. On demonstrating DNA intercalation[J]. Accounts of Chemical Research, 1990, 23(9): 271-273.
- [10] 杨培慧,郑志雯,周志军,等.青蒿素在银电极和玻碳电极上的伏安法测定[J].药学分析杂志,2004,24(5):512-515.
- [11] Widom J, Baldwin R L. Cation-induced toroidal condensation of DNA: Studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$ [J]. Molecular Biology, 1980, 144(4): 431-434.
- [12] Bard A J, Faulkner L R. Electrochemical Methods Fundamentals and Applications[M]. New York: John Wiley & Sons, 1980: 236.
- [13] 王辰,付艳丽,王振,等.环境激素双酚A与蛋白质相互作用的电化学研究[J].云南民族大学学报,2011,20(2):92-98.
- [14] 李启隆.电分析化学[M].北京:北京师范大学出版社,1995:240.
- [15] 罗红梅,廖钊,谭宝玉,等.水杨酸在多壁碳纳米管修饰电极上的电化学行为及其测定[J].分析科学学报,2009,25(6):665-668.
- [16] 漆红兰,陈沛,张成孝.氧氟沙星的测定及其与DNA相互作用的研究[J].药物分析杂志,2007,27(1):96-99.

责任编辑:罗慧敏