

2007-11-28

Electrochemical Oxidization of Herring Sperm DNA and its Interaction with Histone

Juan XU

Gui-ping HUANG

Hong LI

Wei ZHU

Recommended Citation

Juan XU, Gui-ping HUANG, Hong LI, Wei ZHU. Electrochemical Oxidization of Herring Sperm DNA and its Interaction with Histone[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2007 , 13(4): 372-376.

DOI: 10.61558/2993-074X.1836

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol13/iss4/3>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

鲑鱼精 DNA 的电化学氧化及与组蛋白的相互作用

许娟¹, 黄桂萍¹, 李红^{1*}, 朱伟²

(1 华南师范大学化学与环境学院, 广东 广州 510006;

2 广州市疾病预防控制中心毒理科, 广东 广州 510080)

摘要: 应用循环伏安法、微分脉冲伏安法和荧光光谱法研究了鲑鱼精 DNA 的电化学氧化及其与组蛋白的相互作用. 结果发现, 在 0.20~1.25 V 电位区间内, DNA 在酸性溶液中呈现一个明显的不可逆氧化峰, 在中性及碱性溶液中呈现两个不可逆氧化峰. 氧化峰电位随溶液 pH 值增大而负移, 变化幅度为 $-57 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$. 氧化峰电流与 DNA 浓度 ($0.45 \sim 8.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 成线性关系. DNA 能与组蛋白结合, 导致氧化电位正移, 氧化电流减小, 并减弱钌配合物指示剂和 DNA 相互作用的荧光强度以及减少 DNA 的氧化损伤.

关键词: 鲑鱼精 DNA; 电化学氧化; 组蛋白; 相互作用

中图分类号: O 646

文献标识码: A

DNA 和蛋白质是生命体的主要生物大分子, 各具特殊的结构和功能. 组蛋白是真核生物核染色体的结构蛋白, 其与 DNA 组成的核小体是染色体的基本结构单元. 组蛋白在 DNA 复制、转录、损伤修复以及细胞衰老、细胞凋亡中发挥着重要作用^[1]. 目前应用于 DNA 和蛋白质相互作用研究的方法主要包括荧光光谱^[2-3]、共振光散射^[4]、表面等离子共振^[5-6]、扫描探针显微镜^[7-8]、物质谱^[9]、压电石英晶振技术^[10]、PCR 放大检测^[11]、示差扫描量热技术^[12]、X 光散射^[13]、差示 FT-IR^[14]、分子计算与模拟^[15]及电化学方法^[16-17]等. 电化学方法较多用于探讨物质的电子转移过程. 目前已证实带负电的 DNA 链可以通过静电作用影响肌红蛋白、血红蛋白、细胞色素 c、细胞色素 P450 及辣根过氧化酶的电子转移^[16-20]. 组蛋白属非氧化还原蛋白, 在电极上不容易发生氧化或还原. DNA 则可以在一定条件下于铂^[21]、金^[18]、玻碳^[22]、石墨^[23]等电极上发生直接的氧化反应. DNA 氧化通常认为是鸟嘌呤和腺嘌呤的氧化^[22], 也有较多电化学工作者从事 DNA 碱基的电化学反应机理研究. 但关于 DNA 与组蛋白作用的电化学研究至今尚未见诸文献报道. 本文研究了鲑鱼精

DNA 在玻碳电极上的电化学氧化行为, 并进一步探讨了其与组蛋白的作用.

1 实验部分

主要仪器: PGSTAT-30 电化学综合测试仪 (荷兰 Autolab)、F-2500 荧光光谱仪 (日本) 和 PHS-3C pH 计 (上海雷磁).

电化学实验: 常规三室电解池. 工作电极为玻碳盘 ($\phi = 4 \text{ mm}$), 对电极为铂片, 参比电极为饱和甘汞电极 (SCE). 文内所给电位均相对于 SCE. 每次测试前, 工作电极先在麂皮抛光垫上依次用 3 nm、0.5 nm 和 0.1 nm 氧化铝抛光粉抛光至镜面, 再用二次重蒸水和超声波清洗干净. 荧光光谱测定使用 $1 \times 1 \text{ cm}$ 四通石英比色皿.

鲑鱼精 DNA、组蛋白和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自 Sigma 公司, 其他试剂为分析纯, 使用前均未做进一步处理. 缓冲溶液为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 二次重蒸水配制. DNA 溶液浓度以核苷酸计量, 由紫外可见光谱测其 260 nm 波长的吸光度确定. 配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2 \text{tatp}] (\text{ClO}_4)_2$ (bpy = 2, 2' 联吡啶, tatp = 1, 4, 8, 9 四氮三联苯) 按文献 [24] 方法合成, 以它作为荧光光谱

测定指示剂, 选用 450 nm 波长激发.

室温 ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) 下实验.

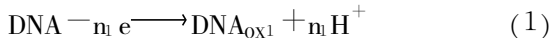
2 结果与讨论

2.1 DNA 的氧化行为

图 1a 给出 DNA 在 $\text{pH} = 5.1$ 缓冲溶液中于玻碳电极上的循环伏安曲线. 图中, 0.97 V 附近出现一个氧化峰 ($0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$), 但还原峰不明显. 以氧化峰电流 (I_{pa}) 对扫描速率的平方根 ($v^{1/2}$) 作图, 可得一良好直线 (见图 1a 插图), 说明在玻碳电极上 DNA 的氧化乃受反应粒子的扩散影响.

DNA 的氧化通常是其碱基的氧化, 因而它的氧化历程大多与溶液的 pH 值有关. 图 1b 给出, 当溶液 pH 值为 7.2 时, DNA 循环伏安曲线显示出双氧化峰. 在 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ 扫速下, I, II 氧化峰电位分别为 0.78 V 和 1.08 V . 据文献 [22], 氧化峰 I 可能为鸟嘌呤碱基的氧化, 而氧化峰 II 则可能是腺嘌呤的氧化. 如以两峰的峰电流各对扫速的平方根作图, 也可以获得良好的线性关系 (见图 1b 插图), 表明这两个氧化反应均受扩散过程的影响.

图 2 示出 DNA 在不同 pH 值的缓冲液中的微分脉冲伏安曲线. 由图可见, 其氧化峰电位 (E_p) 随溶液 pH 值增大而逐渐负移. 而在中性或碱性溶液中, 微分脉冲曲线呈现两个氧化峰. 其中, 第 1 氧化峰电位 E_p 与溶液 pH 值呈很好的线性关系 (见图 2 插图), 斜率 $-57 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$, 甚接近可逆质子转移反应的理论值 ($-59 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$), 表明该氧化过程中有质子 H^+ 的直接参与. 在溶液 pH 值较低时, DNA 的微分脉冲曲线只呈现单个氧化峰, 这可能是因为第 2 个氧化峰电位较正, 处在扫描电位区间之外的缘故. 反应过程可表示如下:



反应式 (1) 可能对应于鸟嘌呤碱基的氧化, 而反应式 (2) 则表示腺嘌呤的氧化. 假设反应电子数 $n_1 = n_2$, 那么依据图 1 中峰 II 峰电流大于峰 I 电流, 推测鲑鱼精 DNA 分子中腺嘌呤的含量比鸟嘌呤的大.

2.2 DNA 浓度的伏安测定

图 3 给出了在 $\text{pH} = 5.1$ 溶液中 DNA 于玻碳电极上的循环伏安曲线随其浓度的变化. 对照图 1, 图中显示的氧化峰电位随 DNA 浓度的增大而正移, 而且氧化峰电流 (I_{pa}) 与 DNA 浓度 (C_{DNA})

呈现很好的线性关系 ($0.45 \sim 8.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 相关系数为 0.996 (见图 3 插图), 说明该电极过程主要受 DNA 在溶液中扩散控制.

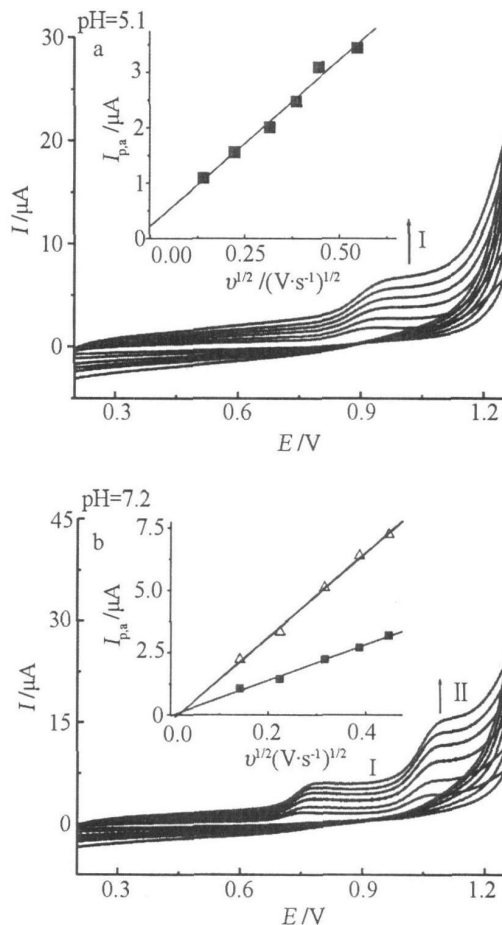


图 1 $0.62 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA 在 $\text{pH} = 5.1$ (a) 和 $\text{pH} = 7.2$ (b) 缓冲溶液中于玻碳电极上的循环伏安图. 插图为氧化峰 (I 或 II) 电流 (I_{pa}) 随扫速平方根 ($v^{1/2}$) 变化关系.

Fig. 1 Cyclic voltammograms of $0.62 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA in buffer solutions with $\text{pH} = 5.1$ (a) and $\text{pH} = 7.2$ (b) at the GC electrode. inset is plots of the oxidative peaks (I or II) current (I_{pa}) vs square root of scan rate ($v^{1/2}$).

2.3 DNA 与组蛋白的作用

组蛋白属非氧化还原蛋白, 不容易发生电化学氧化或还原. 而且实验表明, 组蛋白基本不影响玻碳电极的活性. 通常认为, 核心组蛋白对 DNA 损伤能起保护作用 [1]. 图 4 和图 5 分别给出在含有组蛋白的缓冲溶液中 DNA 的微分脉冲曲线. 由

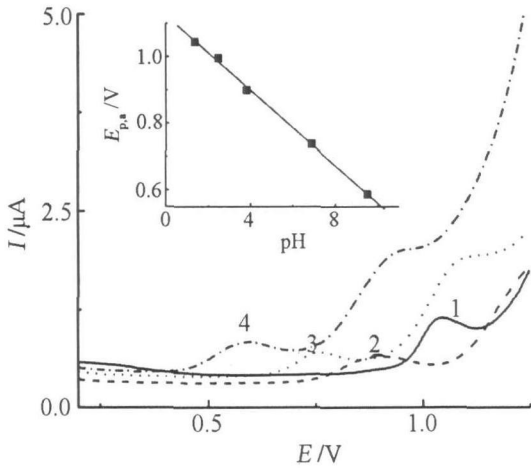


图 2 0.62 mmol · L⁻¹ DNA 在不同 pH 值缓冲剂中于玻碳电极上的微分脉冲伏安曲线
pH 值: 1) 1.4, 2) 5.8, 3) 6.9, 4) 9.5. 插图为氧化峰电位(E_p)随溶液 pH 值关系

Fig. 2 Differential pulse voltammograms of 0.62 mmol · L⁻¹ DNA in buffer solution with different pH at the GC electrode
pH: 1) 1.4, 2) 5.8, 3) 6.9, 4) 9.5, inset is plots of oxidative peak potential (E_p) vs. pH

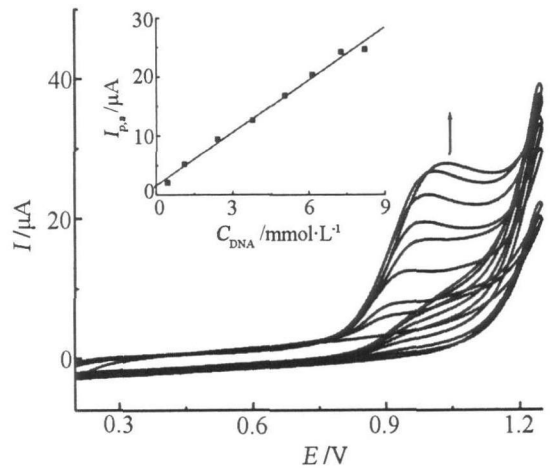


图 3 不同 DNA 的浓度在 pH = 5.1 缓冲溶液中于玻碳电极上的循环伏安曲线 插图为氧化峰电流($I_{p,a}$)对 DNA 浓度(C_{DNA})的关系图

Fig. 3 Cyclic voltammograms of DNA in buffer solution (pH = 5.1) with different DNA concentration at GC electrode
the inset is plot of oxidative peak current ($I_{p,a}$) as a function of DNA concentration (C_{DNA})

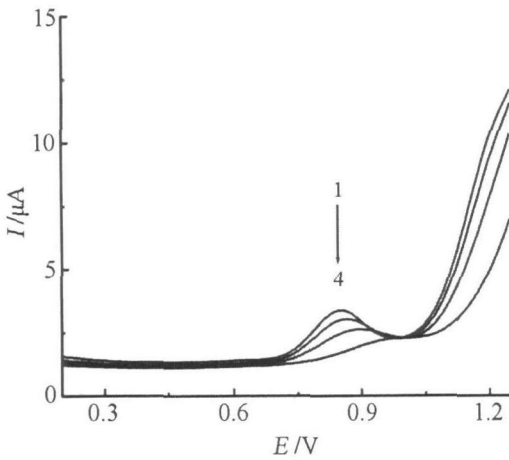


图 4 不同组蛋白浓度的含有 0.62 mmol · L⁻¹ DNA 在 pH = 5.1 缓冲溶液中微分脉冲伏安曲线 组蛋白浓度/mg · L⁻¹: 1) 0, 2) 2.0, 3) 12.8, 4) 25.5

Fig. 4 Differential pulse voltammograms of 0.62 mmol · L⁻¹ DNA in buffer solution of (pH = 5.1) containing different concentrations of histone/mg · L⁻¹: 1) 0, 2) 2.0, 3) 12.8, 4) 25.5

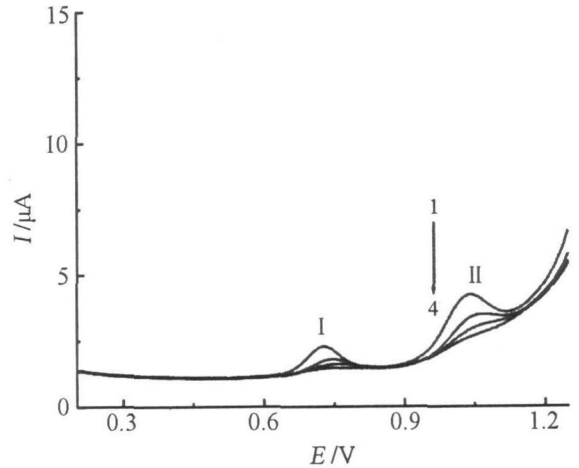


图 5 不同组蛋白浓度的含有 0.62 mmol · L⁻¹ DNA 在 pH = 7.2 缓冲溶液中微分脉冲伏安曲线 组蛋白浓度/mg · L⁻¹: 1) 0, 2) 4.0, 3) 10.7, 4) 26.7

Fig. 5 Differential pulse voltammograms of 0.62 mmol · L⁻¹ DNA in buffer solution of (pH = 7.2) containing different concentrations of histone/mg · L⁻¹: 1) 0, 2) 4.0, 3) 10.7, 4) 26.7

图可见, 不管溶液 pH 值是 5.1 还是 7.2 DNA 的氧化峰电流均随着组蛋白浓度的增大而减小, 并且氧化峰电位逐渐正移. 表明组蛋白在一定的浓

度范围内 (0~22.5 mg · L⁻¹) 与 DNA 存在着明显的相互作用. DNA 通常显负电性, 组蛋白显正电性, 两者可以通过静电作用和分子间的作用力形

成结合体. 两者结合时, 组蛋白可以外包 DNA, 使其反应的电活性点减少, 氧化难度增大. DNA 与组蛋白之间的结合可以根据以下的荧光测定得到进一步佐证: 借助具有强光致发光性能的多吡啶钌配合物 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2 \text{tatp}]^{2+}$ ($\text{bpy} = 2, 2$ 联吡啶, $\text{tatp} = 1, 4, 8, 9$ 四氮三联苯) 作指示剂, 测定组蛋白对 DNA 荧光强度的影响, 即如图 6 所示. 由于配合物中的 tatp 配体具有较大的共轭平面, 能插入 DNA 碱基对之间^[24], 因此 DNA 能减弱钌配合物指示剂的激发态与水分子间的作用, 导致钌配合物的荧光强度增强 (比较曲线 1 与 2). 然而, 这种增强作用随着组蛋白浓度的增大而被减弱 (见曲线 2 至 5), 表明 DNA 与组蛋白存在明显结合作用.

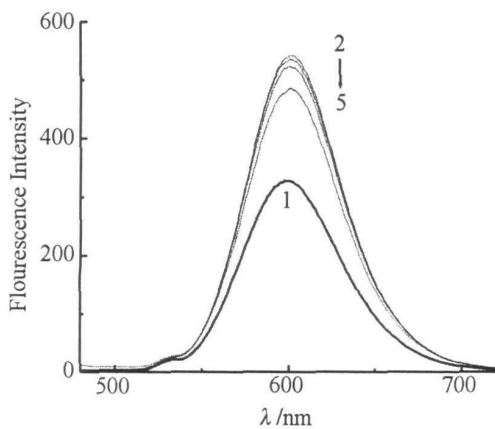


图 6 组蛋白对 DNA 增强 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2 \text{tatp}]^{2+}$ ($8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 荧光强度的影响
曲线 2 至 5 的 C_{DNA} 为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 组蛋白浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$: 1) 0, 2) 0, 3) 1.0, 4) 3.0, 5) 10.0

Fig 6 Effects of histone on the fluorescence spectra of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2 \text{tatp}]^{2+}$ ($8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) enhanced by DNA
DNA concentration: $200 \mu\text{mol}$ histone concentrations/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$: 1) 0, 2) 0, 3) 1.0, 4) 3.0, 5) 10.0

3 结 论

组蛋白在 DNA 损伤和修复中扮演着重要的角色. 本文结合荧光光谱法应用电化学技术研究发现, 鲑鱼精 DNA 能与组蛋白结合, 导致氧化电位正移, 氧化电流减小, 减弱 DNA 对钌配合物荧光强度的增强作用以及减少 DNA 氧化损伤.

参考文献 (References):

[1] Qin S, Parthun M R. Histone H³ and the histone

acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair [J]. *Mol Cell Biol* 2002, 22 (23): 8353-8365.

[2] Daniel D C, Thompson M, Woodbury N W. Fluorescence intensity fluctuations of individual labeled DNA fragments and a DNA binding protein in solution at the single molecule level: A comparison of photobleaching diffusion and binding dynamics [J]. *J Phys Chem B* 2000, 104 (6): 1382-1390.

[3] Tachiiri Y, Ishikawa M, Hirano K. Investigation of the hydrolysis of single DNA molecules using fluorescence video microscopy [J]. *Anal Chem* 2000, 72 (7): 1649-1656.

[4] Guo Z X, Li L, Shen H X, et al. Bromopyrrole red enhanced resonance light scattering spectroscopic determination of DNA with 5, 10, 15, 20-tetrakis[4-(trimethylammonium) phenyl]porphine [J]. *Anal Chim Acta* 1999, 379 (1~2): 45-51.

[5] Yobum J C, Deb S, Manfield I W, et al. A biaryl peptide crosslink in a MetJ peptide model confers cooperative nonspecific binding to DNA that ablates both repressor binding and in vitro transcription [J]. *Bioorg Med Chem* 2003, 11 (6): 811-816.

[6] Hao D Y, Ohme-Takagi M, Yamasaki K. A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins [J]. *FEBS Lett* 2003, 536 (1~3): 151-156.

[7] O'Brien J C, Stickney J T, Porter M D. Self-assembled double-stranded DNA (dsDNA) microarrays for protein dsDNA screening using atomic force microscopy [J]. *J Am Chem Soc* 2000, 122 (20): 5004-5005.

[8] Seong G H, Niimi T, Yanagida Y, et al. Single molecular AFM probing of specific DNA sequencing using RecA promoted homologous pairing and strand exchange [J]. *Anal Chem* 2000, 72 (6): 1288-1293.

[9] Lu M M, Zhang J G. Mass spectrometry and its application in life sciences [J]. *Biotech Inform* 2001, (4): 38-41.

[10] Zhou A H, Xie Q J, Li P, et al. Piezoelectric crystal impedance analysis for investigating the modification processes of protein cross-linker and DNA on gold surface [J]. *Appl Surf Sci* 2000, 158 (1~2): 141-146.

[11] Takeuchi A, Sode K. A Salmonella detection system using an engineered DNA binding protein that specifically captured a DNA sequence [J]. *Anal Chem* 2000, 72 (13): 2809-2813.

[12] Makhatadze G I, Loladze V V, Gribenko A V, et al. Mechanism of the mostabilization in a designed cold

- shock protein with optimized surface electrostatic interactions[J]. *J Mol Biol* 2004, 336 (4): 929-942.
- [13] Kato R, Kataoka M, Kan ikubo H, et al Direct observation of three conformations of MuS protein regulated by adenine nucleotides[J]. *J Mol Biol* 2001, 309 (1): 227-238.
- [14] Brewer S H, Cresawn S G, Nguyen D T, et al Difference FT-IR studies of nucleotide binding to the recombination protein RecA[J]. *J Phys Chem B* 2000, 104 (29): 6950-6954.
- [15] Elstner M, Frauenheim T, Suhai S An approximate DFT method for QM/MM simulations of biological structures and processes[J]. *J Mol Struct (Theorchem)*, 2003, 632 (1~3): 29-41.
- [16] Nassar A E F, Rusling J F, Nakashima N. Electron transfer between electrodes and heme proteins in protein-DNA films[J]. *J Am Chem Soc* 1996, 118 (12): 3043-3044.
- [17] Lvov Y M, Lu Z Q, Schenkman J B, et al Direct electrochemistry of myoglobin and cytochrome P450cam in alternate layer-by-layer films with DNA and other polyions[J]. *J Am Chem Soc* 1998, 120 (17): 4073-4080.
- [18] Lu T, Qu X, Dong X, et al The direct electrochemistry of cytochrome c at the nanometer-sized rare earth element oxide particle modified gold electrodes[J]. *J Mol Catal A; Chemical* 1996, 106 (1~2): 1-5.
- [19] Valetti F, Sadeghi S J, Meharena Y T, et al Engineering multi-domain redox proteins containing flavodoxin as bio-transformer: preparatory studies by rational design[J]. *Biosens Bioelectron* 1998, 13 (6): 675-685.
- [20] Chen X H, Ruan C M, Kong J L, et al Characterization of the direct electron transfer and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase in DNA film at pyrolytic graphite electrode[J]. *Anal Chim Acta* 2000, 412 (1~2): 89-98.
- [21] Lin L, Li J R, Jiang L. Fixation of single-stranded DNA nucleotide by self assembly[J]. *Colloids Surf; Physicochem Eng Aspects* 2000, 175 (1~2): 11-15.
- [22] Wang Z X, Liu D J, Dong S J. In situ infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode[J]. *Bioelectrochem Bioenergy* 2001, 53 (2): 175-181.
- [23] Rusling J F. Sensors for toxicity of chemicals and oxidative stress based on electrochemical catalytic DNA oxidation[J]. *Biosens Bioelectron* 2004, 20 (5): 1022-1028.
- [24] Zhen Q X(甄启雄), Ye B H(叶保辉), Liu J G(刘劲刚), et al Synthesis of ruthenium polypyridyl complexes and the steric influence of the intercalated ligand on DNA-binding[J]. *Chem J Chinese Univer* 1999, 20 (11): 1661-1666.

Electrochemical Oxidation of Herring Spem DNA and its Interaction with Histone

XU Juan¹, HUANG Gui-ping¹, LI Hong^{1*}, ZHU Wei²

(1. School of Chemistry and Environment South China Normal University, Guangzhou 510006, China

2Unit of Molecular Toxicology, Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The voltammetric behavior of herring sperm DNA at glassy carbon electrode and its interaction with histone have been investigated by using cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and fluorescence measurement. In the potential range of 0.20 V to 1.25 V, it is found that an irreversible oxidative peak is exhibited in acid solution, but in the neutral or alkaline solution two oxidative peaks are observed. Oxidative peak potential values show a negative shift with increasing pH via a slope of $-57 \text{ mV} \cdot \text{pH}^{-1}$ and a linear relation with DNA concentration in the range of 0.45 to 8.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In the presence of histone, the oxidative peak current of DNA and the fluorescence intensity of interactive product between a ruthenium complex and DNA are found to have an obvious decrease and the oxidative potentials show a positive shift. Moreover, the experimental results suggest that the DNA damage is weakened based on its binding interaction with histone.

Key words: herring sperm DNA; electrochemical oxidation; histone; interaction