

2008-02-28

Study on the Binding mode of $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ with DNA by the Methods of Electrochemistry

Jun-wei WANG

Jian-guo REN

Bao-juan ZHOU

Xiao-ling GAO

Yan-ni TIAN

Recommended Citation

Jun-wei WANG, Jian-guo REN, Bao-juan ZHOU, Xiao-ling GAO, Yan-ni TIAN. Study on the Binding mode of $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ with DNA by the Methods of Electrochemistry[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2008 , 14(1): 71-75.

DOI: 10.61558/2993-074X.1866

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol14/iss1/15>

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.

文章编号: 1006-3471(2008)01-0071-05

2,2 联吡啶 In(III) 配合物与 DNA 作用的 电化学研究

王俊伟, 任建国, 周保娟, 高筱玲, 田燕妮*

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要: 应用循环伏安法、微分脉冲伏安法和交流阻抗法研究了配合物 $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 与 DNA 在 Tris-HCl 缓冲溶液 ($\text{pH}=7.2$) 中的相互作用. 结果表明: 配合物中心 $\text{In}(\text{III})$ 离子的循环伏安曲线上呈现一对准可逆的氧化还原波, DNA 与配合物作用后, 配位中心离子的氧化还原峰电流明显降低, 扩散系数减小, 电化学反应阻抗增大, 式量电位负移, 表明该配合物与 DNA 的作用方式为静电结合.

关键词: $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; DNA; 静电作用

中图分类号: O 646

文献标识码: A

DNA 与小分子的键合以及识别分子的特性是生命科学中重要的研究课题, 对高效低毒的新药设计, 新药筛选以及化疗药物的改型换代都具有十分重要的意义^[1]. 金属吡啶配合物与 DNA 相互作用的研究一直是生物无机化学领域十分活跃的研究课题^[2]. 近年来, 它们已经广泛地被用于 DNA 结构探针, DNA 分子光开关, DNA 足迹试剂, 以及 DNA 断裂试剂等领域^[3-4]. 并且此类配合物的热力学性质稳定, 光化学和光物理信息丰富, 能够以插入、静电和沟面结合 3 种方式与 DNA 作用^[5]. 其中配体的形状、平面性、平面大小和取代基团等对配合物与 DNA 的作用模式有着重要的影响^[5]. 电学研究可以得到 DNA 与识别分子相互作用的信息和作用机理, 是近代生物电化学研究中的前沿领域之一. 许多药物的设计都是以 DNA 为作用靶, 文献报道^[6], 铈的配合物与 DNA 作用有抗癌活性, 因此本文应用电化学方法研究了吡啶 $\text{In}(\text{III})$ 配合物与 DNA 的作用机制, 对深入了解这类配合物与 DNA 的作用机制和键合能力, 设计寻找新型的核酸结构探针及抗肿瘤药物等具有十分重要的意义^[7-10].

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 DNA (华美生物工程公司), Tris (Sigma 公司), 其他实验试剂均分析纯. 缓冲溶液由 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 配制, 经盐酸调至 $\text{pH}=7.2$ 后定容至 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 实验用水均为二次蒸馏水.

CHI660B 电化学工作站, BECKMAN $\Phi 50$ pH 计.

1.2 配合物 $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的合成^[11]

1) $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的制备: 取一定量的高纯铈粒与浓度为 6 mol/L 的盐酸反应, 微热溶解后, 蒸发浓缩到糊状, 冷却结晶抽滤, 用乙醚洗涤再次抽滤, 真空干燥制得 $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. 2) 搅拌下, 将 1 mL 0.1 mol 的 $\text{InCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液缓慢滴加到含 0.1 mmol 联吡啶 (bpy) 的 20 mL 无水乙醇溶液中, 加热, 升温至 75°C , 回流 3 h 过滤, 收集清液于烧杯中, 数天后有浅黄色晶体 $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 析出, 经元素分析, 其组成与文献^[11]一致.

1.3 实验方法

三电极体系, 以热解石墨电极作工作电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝为辅助电极. 支持电解质溶液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液, 缓冲为 pH

=7.2的 Tris-HCl溶液. 室温下实验, 测定之前系统均通入高纯氮气除氧, 测定时液面保持氮气氛. 循环伏安测试, 扫描电位区间 $-0.5 \sim -0.9$ V, 扫描速率 $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. 微分脉冲伏安测试扫描电位区间 $-0.7 \sim -1.0$ V, 平衡时间 10 s 脉冲高度 50 mV , 脉冲宽度 0.05 s 阶跃电位 4 mV . 交流阻抗实验^[12-13]: 恒定电压 -0.8 V ($\text{In}(\text{bpy})^{3+}$ 的还原峰电位), 交流电频率 $0.01 \text{ Hz} \sim 100 \text{ kHz}$ 振幅 5 mV . 等效电路由 Evolve Circuit软件模拟.

2 结果与讨论

2.1 循环伏安特性

一般而言, 当小分子与 DNA 分子发生插入作用时, 其矢量电位正移; 但如它与 DNA 分子骨架上带负电荷的磷酸基发生静电作用时, 则其矢量电位负移. 据此, 可根据循环伏安曲线的矢量电位移动来判断小分子与 DNA 作用的模式^[14].

图 1 示出, $\text{In}(\text{bpy})^{3+}$ 在含有 DNA 的 Tris-HCl 缓冲溶液 ($\text{pH} = 7.2$) 中于热解石墨电极上的循环伏安曲线. 如图可见, 当溶液不含 DNA 时, InL 有一对可逆的氧化还原峰 (曲线 1), 峰电位分别为 $E_{\text{pa}} = -0.632 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.759 \text{ V}$. 式量电位 $E^0 = -0.696 \text{ V}$, 氧化/还原峰电位差 $\Delta E = 127 \text{ mV}$. 加入 $100 \mu\text{L}$ DNA (即 $[\text{DNA}] / [\text{InL}]$ 浓度比 $R = 0.25$) 后 (曲线 2), 峰电流随之减小, 氧化还原峰电位略有负移: $E_{\text{pa}} = -0.649 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.764 \text{ V}$, ΔE 减小至 115 mV , 式量电位 $E^0 = -0.707 \text{ V}$. 加入 $200 \mu\text{L}$ DNA ($R = 0.50$) 后 (曲线 3), 峰电流继续减小, 氧化还原峰电位分别为 $E_{\text{pa}} = -0.664 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.769 \text{ V}$, ΔE 减小至 105 mV , 式量电位为 $E^0 = -0.717 \text{ V}$. 如上, 从曲线 1 至 3 矢量电位负移了 21 mV , 说明此时的 InL 当与 DNA 骨架上带负电的磷酸基发生静电作用. 图 2 表明, InL -DNA 体系的还原峰电流与其扫描速率的平方根 ($v^{1/2}$) 成正比关系^[15], 可知整个反应历程受反应物扩散控制^[16], 基本符合准可逆氧化还原过程的特征. 参照以下公式^[17]

$$i_{\text{pc}} = 2.69 \times 10^5 \text{ A n}^{3/2} \text{ D}^{1/2} \text{ C}_0 v^{1/2} \quad (1)$$

即可根据图 2 中 i_{pc} 随 v 的变化求得上述体系在不同 $[\text{DNA}] / [\text{InL}]$ 浓度比 (R) 下 InL -DNA 的扩散系数 D , 分别为 $D_1 (R=0) = 2.47 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $D_2 (R=0.25) = 1.32 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $D_3 (R=0.50) = 7.95 \times 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

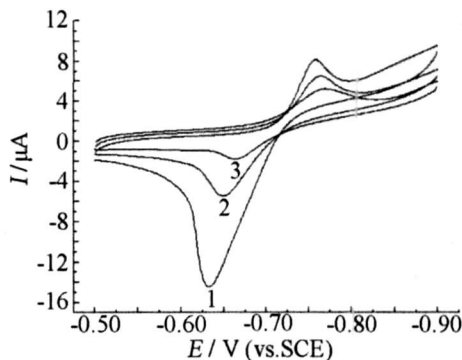


图 1 InL 在不同 $[\text{DNA}] / [\text{InL}]$ 浓度比 (R) 的 Tris-HCl 缓冲溶液中热解石墨电极上的循环伏安图

Fig 1 Cyclic voltammograms of the $\text{In}(\text{bpy})\text{Cl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in Tris-HCl buffer solution with different $[\text{DNA}] / [\text{InL}]$ ratio (R) at PG electrode curve 1~3: $R=0, 0.25, 0.50$

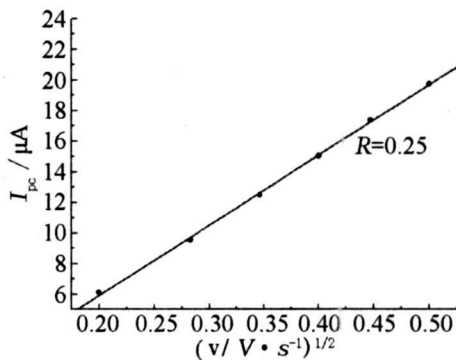


图 2 InL -DNA 伏安扫描还原峰电流随其扫描平方根的变化关系

Fig 2 Variation of the I_{pc} of InL -DNA with $v^{1/2}$, experimental conditions as Fig 1

又据文献 [18]

$$i_{\text{pc}} = 0.227 \text{ nFAC}_0 k_s \times \exp [(-\alpha \text{ nF} / \text{RT}) (E_{\text{p}} - E^0)] \quad (2)$$

$$E_{\text{p}} = E^0 + \text{RT} / (\alpha \text{ nF}) [0.780 + \ln(\text{Db})^{1/2} - \ln k_s], \quad b = \alpha \text{ nF} v / \text{RT} \quad (3)$$

便可分别求出与上述扩散系数相对应该电极反应的速率常数 k_s , 依次为, $k_{s1(R=0)} = 1.93 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{s2(R=0.25)} = 1.64 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{s3(R=0.50)} = 1.34 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. 显然随着溶液中 DNA 含量 (R 值) 的增加, InL -DNA 的扩散系数和反应速率常数都依次减小, 这是由于 DNA 与配合物发生了明显的相互作用, 从而阻碍了配合物中心离子在氧化还原反应过程中的电子传递.

另据文献 [19-20], $\Delta E^{0'} = \Delta E_b^{0'} - \Delta E_f^{0'} =$

59.15 lg(K_R / K_0). 此处 $\Delta E_f^{0'}$ 和 $\Delta E_b^{0'}$ 分别表示加入 DNA 前后配合物发生氧化还原反应的条件电位, K_R 和 K_0 分别为配合物发生还原反应前后与 DNA 的结合常数, 实验表明, 当 DNA 的加入量为 $R=0.25$ 时, $\Delta E_f^{0'}$ 较未加入 DNA 前负移了 11 mV. 据此按上式计算可得 $K_R / K_0 = 1.53$, 说明配合物还原产物与 DNA 的结合稳定.

2.2 微脉冲伏安特性

图 4 是在含有不同 DNA 加入量的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH=7.2) 中, InL 于热解石墨电极上的微分脉冲伏安曲线, 与上述循环伏安测试结果一致.

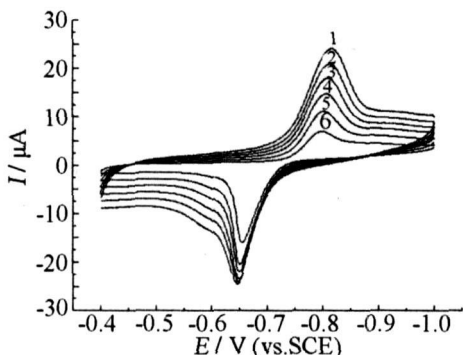


图 3 InL-DNA 在 Tris-HCl 缓冲溶液中于热解石墨电极不同扫描速率下的循环伏安图

Fig 3 Cyclic voltammograms of the InL-DNA in Tris-HCl buffer solution at PG electrode with different scan rate
 $R=0.25$, curve 1~6; $v/mV \cdot s^{-1} = 40, 80, 120, 160, 200, 240$

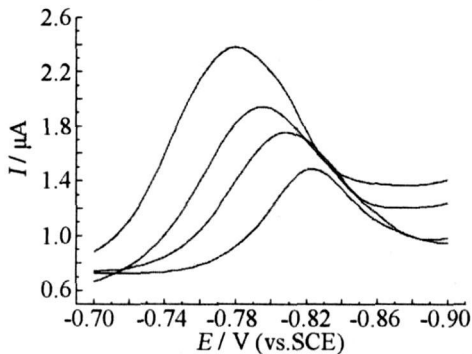


图 4 InL 在不同 R ([DNA]/[InL]) 溶液中热解石墨电极上的微分脉冲伏安曲线

Fig 4 Differential pulse voltammograms of the InL in Tris-HCl buffer solution with different [DNA]/[InL] ratio (R) at PG electrode
 modulation amplitude 50mV, step potential 5mV

如图可见, 随着溶液中 R 值的增大, 还原峰电流不断降低, 峰电位依次负移, 进一步表明该配合物与带负电的 DNA 确实发生了明显的相互作用.

2.3 交流阻抗

图 5 为 InL 在含有不同 [DNA]/[InL] 浓度比的缓冲溶液中于 -0.8V 电位下的阻抗复数平面图. 图中高频区出现一个压扁的半圆, 并随 [DNA]/[InL] 浓度比 (R) 的增加而增大, 图 6 是应用 Evolve Circuit 软件依据体系阻抗谱 (图 5) 拟合的等效电路, 其中各元件拟合值如表 1 所示. 从表 1 结果可见, 随着溶液中 [DNA]/[InL] 浓度比的增加, R_{ct} 和 C_{dl} 均明显增大, 原因是 InL 与带负电的 DNA 发生了显著的相互作用, 由于吸附导致电极表面负电荷增加, 正电荷减少, 从而使 InL-DNA 在阴极上发生还原的能垒增大^[1]. 同样, 正电荷的减少也会造成反应活性物质在电极上的吸附量减小, 扰动电极表面的双电层, C_{dl} 也因此而增大.

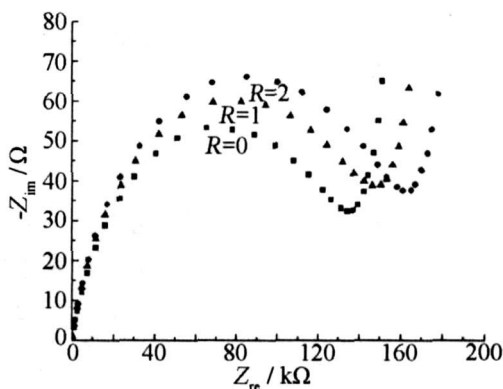


图 5 InL 在含有不同 [DNA]/[InL] 浓度比的缓冲溶液中的阻抗复平面图 ($10^5 \sim 10^{-2}$ Hz)

Fig 5 Complex impedance plots of the InL in Tris-HCl buffer solution with different [DNA]/[InL] ratio (R) at PG electrode ($10^5 \sim 10^{-2}$ Hz)

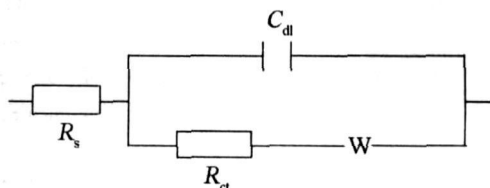


图 6 根据图 5 阻抗谱拟合的 InL 在 Tris-HCl 缓冲溶液中热解石墨电极上反应的等效电路

The equivalent circuit for the reaction of InL in Tris-HCl buffer solution at a PG electrode

表 1 InL在含有不同 [DNA] / [InL] 浓度比的 Tris-HCl 缓冲溶液中于热解石墨电极上反应的等效电路元件值 (R_e表示电化学反应电阻, C_{dl}为双电层电容)

Tab 1 Values of each element in the equivalent circuit for InL as a function of DNA concentration

R ([DNA] / [InL])	R _s / Ω · cm ²	R _{ct} / Ω · cm ²	C _{dl} / μF · cm ²
0	6.45	143	4.86
0.25	7.32	157	7.55
0.50	8.21	169	9.31

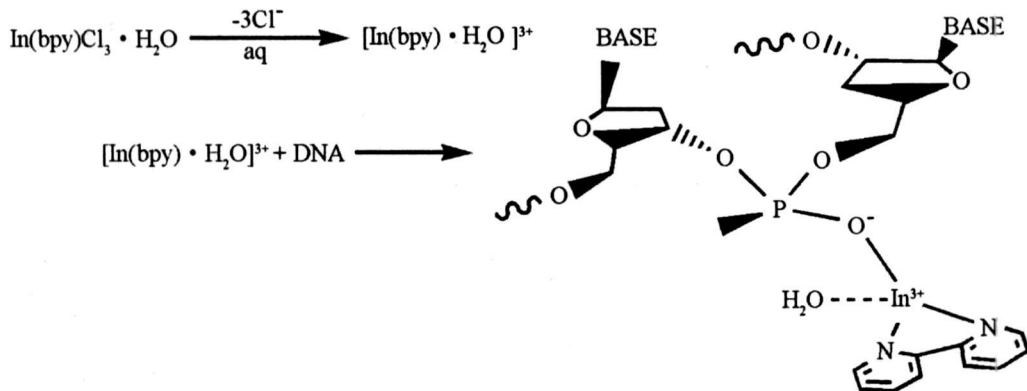


图 7 In(bpy)Cl₃ · H₂O 与 DNA 作用的可能模式

Fig 7 Imaginable binding mode of the In(bpy)Cl₃ · H₂O with DNA

3 机理探讨

以上实验表明,配合物 InL 与 DNA 之间发生的不是插入作用,而是外部结合,此二者作用过程很可能是:三氯一水联吡啶合铟(III)在缓冲溶液中电离,生成的 InL³⁺ 离子,与 DNA 带负电的磷酸基团发生静电吸引,其作用模式设想如图 7 所示.

4 小结

合成的三氯一水 2,2'-联吡啶合铟(III)配合物,其 InL 与 DNA 的作用模式是以静电结合为主,表现为中等程度的外部键合.

参考文献 (References):

[1] Li Hong (李红), Ji Liang-nian (计亮年), Wu Jian Zhong (吴建中), et al Studies on the interaction between copper(II) complex with phenanthroline and L-methionine ligands and DNA [J]. Acta Chimica Sinica 2003, 61(2): 245-250.

[2] Xiong Y, Ji L N. Synthesis DNA binding and DNA mediated luminescence quenching of Ru(II) polypyridine complexes [J]. Coord Chem Rev 1999, (185~186): 711-733.

[3] Ji Liang-nian (计亮年), Zhang Qian-ling (张黔玲), Chao Hui (巢辉). Functions and applications of poly-

pyridyl complexes in DNA [J]. Chinese Science Bulletin (in Chinese), 2001, 46(6): 451-460.

[4] Wang Lei (王雷), Yang Guang (杨光), Wu Jian-zhong (吴建忠), et al Studies on interaction of tris(phenanthroline) ruthenium with calf thymus DNA and herring sperm DNA [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (in Chinese). 1997, 36(5): 50-54.

[5] Ji Liang-nian (计亮年), Zhang Qian-ling (张黔玲). Functions and applications of polypyridyl complexes in DNA [J]. Science in China (series B), 2001, 31(3): 193-204.

[6] Al-Ejeh Fares Darby Jocelyn M, Pensa Katherine et al In vivo targeting of dead tumor cells in a murine tumor model using a monoclonal antibody specific for the la autoantigen [J]. Clinical Cancer Research 2007, 13 (18): 5519-5527.

[7] Huang Cheng-zhi (黄承志), Li Yuan-fang (李原芳), Huang Xin-hua (黄新华). Spectra of the supramolecular interaction of Neutral Red with double-stranded DNA in a neutral medium [J]. Acta Phys Chim Sin 2001, 17(3): 222-228.

[8] Yang Zhou-sheng (杨周生), Yu Jun-sheng (于俊生), Chen Hong-yuan (陈洪渊). Studies on interaction of tetracycline A1(III) complex with DNA [J]. Chemical

- Research In Chinese Universities (in Chinese). 2002, 23(8): 1457-1461.
- [9] Joseph W, Mehmet O, Xiaohua C et al. Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface [J]. *Bioelectrochem Bioenerg* 1998, 45 (1): 33-40.
- [10] Du Jiang-yan (杜江燕), Huang Xiao-hua (黄晓华), Xu Fei (徐飞). Effect of pH on the interaction mode between TH and CT-DNA [J]. *Acta Phys-Chim Sinica* 2003, 19(11): 1064-1068.
- [11] Malyarik M A, Petrosyants S P, Llyuhin A B. Structures of indium trichloride complexes with 2,2'-bipyridyl stereochemical features of pseudo-octahedral indium(III) complex halides [J]. *Polyhedron* 1992, 11 (9): 1067-1073.
- [12] He Yan-bin, Luo Hong-qun, Li Nian-bing. Electrochemical behavior of epinephrine at two-component self-assembled monolayer of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and penicillamine on gold electrode [J]. *Instrumentation Science and Technology* 2007, 35: 1-13.
- [13] Cao Chu-nan (曹楚南), Zhang Jian-qing (张鉴清). An introduction to electrochemical impedance spectroscopy [M]. Beijing Chinese Science Press 2002. 86-92.
- [14] Pang D W, Abnuna H D. Micro method for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules [J]. *Anal Chem* 1998, 70 (15): 3162-3169.
- [15] Satyanaryans S, Dabonwiak J C, Chaires J B. Tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomer interactions with DNA: Mode and specificity of binding [J]. *Biochemistry* 1993, 32 (10): 2573-2584.
- [16] Han G Y, Yang P. Synthesis and characterization water-insoluble and water-soluble dibutyltin(IV) porphyrinate based on tris(pyridinyl) porphyrin moiety and their activity of anti-tumor in vitro and interaction with DNA [J]. *J Inorg Biochem* 2002, 91(1): 230-236.
- [17] Dong Shao-jun (董绍俊), Che Guang-li (车广礼), Xie Yuan-wu (谢远武). Chemically modified electrodes [M]. Beijing Chinese Science Press 1995. 54.
- [18] Richard S Nicholson W, Irving S. Theory of stationary electrode polarography [J]. *Anal Chem* 1964, 36(4): 706-723.
- [19] Cater M T, Rodrigues M, Bard A J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA 2. tris-chelated complexes of cobalt(III) and Iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine [J]. *Am Chem Soc* 1989, 111(24): 8901-8911.
- [20] Dong Sao-jun (董绍俊), Zhang Dong-bo (张东波). Study of the inclusion complexes of cyclodextrin by cyclic voltammetry [J]. *Acta Chim Sin* 1988, 46(4): 335-339.

Study on the Binding mode of In(bpy)Cl₃·H₂O with DNA by the Methods of Electrochemistry

WANG Jun-wei REN Jian-guo ZHOU Bao-juan GAO Xiao-ling TIAN Yan-ni*
(Institute of Molecular Science Key Laboratory of Chemical Biology and
Molecular Engineering of Ministry of Education Shanxi University Taiyuan 030006, China)

Abstract: The complex In(bpy)Cl₃·H₂O was synthesized. The binding mode of the complex with DNA was studied by the methods of cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry and ac impedance in the buffer Tris-HCl (pH=7.2). A quasi-reversible redox wave for the central Indium ion from the cyclic voltammograms was shown at a PG electrode. It has been found that after the complex acted with DNA, The complex's formal potential negatively shifted from -0.696 V to -0.717 V, the values of the reduction peak current and apparent diffusion coefficient decreased significantly. The results of differential pulse voltammetry were the same as cyclic voltammetry and the electrochemical reaction resistance values increased from 143 Ω·cm² to 169 Ω·cm². The result indicated that the complex In(bpy)Cl₃·H₂O acted with DNA apparently. The binding mode of the complex with DNA was stable electricity binding also medium degree exterior bonding mode was manifested.

Key words: In(bpy)Cl₃·H₂O; calf thymus DNA; stable electricity binding