

金属离子 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对抗蚜威与 DNA 结合作用的影响

胡兴¹, 张国文^{1,*}, 付鹏¹, 占春瑞²

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.江西出入境检验检疫局, 江西 南昌 330002)

摘要: 在人体生理酸度(pH7.4)下, 运用紫外、荧光光谱法和 DNA 熔点实验研究抗蚜威与小牛胸腺 DNA 的作用方式以及 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 分别对两者结合的影响。溴化乙锭(EB)竞争实验和 DNA 熔点测定结果表明, 抗蚜威主要是通过嵌插方式与 DNA 碱基发生作用。3 种金属离子均能与抗蚜威络合, 络合物的生成使体系的紫外吸收峰强度和形状发生改变, 并能不同程度地猝灭 DNA-EB 复合物的荧光; Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 的存在使 DNA-抗蚜威复合物的结合常数呈现先减弱后增强的趋势, 而 Mg^{2+} 的参与能增强两者之间的结合。由此推断出, 金属离子对抗蚜威与 DNA 结合的影响主要取决于金属离子与 DNA 的碱基和磷酸基团间结合的相对亲和比。

关键词: 金属离子; 抗蚜威; 小牛胸腺 DNA; 荧光光谱; 嵌插作用

Effects of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} on the Interaction of Pirimicarb with Calf Thymus DNA

HU Xing¹, ZHANG Guo-wen^{1,*}, FU Peng¹, ZHAN Chun-rui²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanchang 330002, China)

Abstract: The interaction between pirimicarb and calf thymus DNA was studied by UV absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and melting point measurement in the respective presence of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} in physiological buffer (pH 7.4). From the results of ethidium bromide (EB) competition and DNA melting point measurement, pirimicarb reacted with DNA basic groups mainly through intercalative binding. All the three metal ions were found to be able to complex with pirimicarb, and the generation of complexes made a difference to the ultraviolet absorption peak intensity and shape of the reaction systems and quenched the fluorescence intensity of the EB/DNA complex to different extents. In the respective presence of Cu^{2+} and Ca^{2+} , the binding constant of the DNA/pirimicarb complex initially decreased, followed by increase, and the involvement of Mg^{2+} could enhance the binding between DNA and pirimicarb. It can be concluded that the binding between DNA and pirimicarb mainly depends on the relative affinity ratio between metal ions and DNA basic groups or phosphate groups.

Key words: metal ions; pirimicarb; calf thymus DNA; fluorescence spectrum; intercalative binding

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)19-0146-04

DNA 是生命遗传信息的主要载体, 也是化学物质作用于生物体的一个重要靶标^[1-2]。化学物质与 DNA 之间的非共价键结合方式主要有静电结合、沟槽结合和嵌插结合^[3]。已有文献报道金属离子能够参与药物分子与 DNA 的结合过程^[4]。 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 是细胞内主要的二价金属离子(Me^{2+}), 在细胞体内充当各种重要角色, 许多重要的遗传过程需要金属离子的协助才能发挥正常功能^[5-7]。

抗蚜威(pirimicarb)是目前农业生产中广泛使用的一种氨基甲酸酯类农药, 美国环境保护署(EPA)2008 年发布的致癌可能性的农药名录, 抗蚜威被列为可能对人类具有致癌性农药^[8]。DNA 是许多农药在体内的主要靶分子, 某些农药分子通过与正常细胞 DNA 发生加合作用破坏其结构, 进而影响基因调控与表达的功能。目前, 农药抗蚜威与 DNA 作用方式及金属离子对抗蚜威与

收稿日期: 2010-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060210); 江西省科技支撑计划项目(2009BNA09000);

国家质检总局科技项目(2009IK141); 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-MB-200807)

作者简介: 胡兴(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: hx0726@126.com

* 通信作者: 张国文(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与食品安全。E-mail: gwzhang@ncu.edu.cn

DNA 结合的影响尚未见报道。本实验采用紫外、荧光光谱法和熔点实验,研究抗蚜威与 DNA 的结合作用以及 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对其结合作用影响,期望为进一步研究抗蚜威的毒性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

抗蚜威标准品(用 95% 的乙醇配制,得溶液浓度为 $8.39 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,使用时根据所需进行稀释);小牛胸腺 DNA(以下简称 DNA,用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液溶解,浓度利用 $\epsilon_{260}=6600 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 来确定,溶液于 4℃ 的冰箱中储备)由北京华美生物工程有限公司提供;溴化乙锭(EB)配制成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的水溶液,使用时根据所需进行稀释;1.0 mol/L 的 NaCl 溶液;0.05 mol/L 的 Tris-HCl (pH7.4)缓冲溶液;其他试剂均为分析纯;实验用水均为二次蒸馏水。

F-4500 型荧光光度计 日本日立公司;UV-2450 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司;PHS-3C 型酸度计 上海雷磁仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 紫外光谱测定

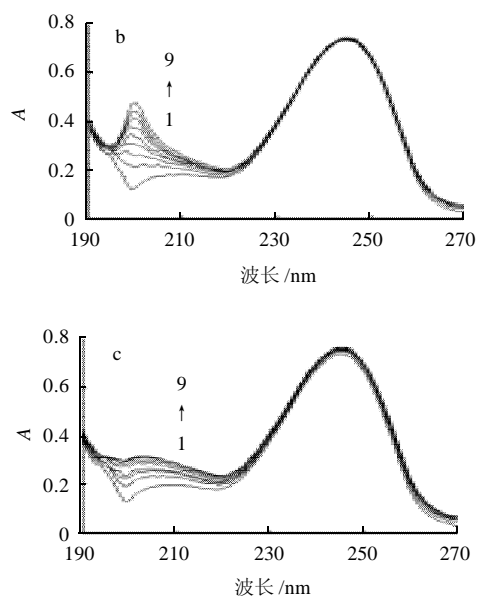
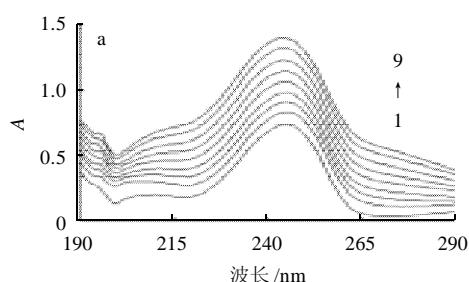
在 10 mL 的比色管中,加入 4.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液后再加入 30 μL $8.39 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的抗蚜威,定容至 10 mL 混匀。移取此溶液各 3 mL 于比色皿中,测量其紫外光谱后再逐次分别加入 8 μL 0.1 mol/L Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 溶液,测定紫外光谱,并扣除背景空白吸光度。

1.2.2 荧光光谱测定

在 10 mL 的比色管中,加入 4.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液及 20 μL $8.39 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的抗蚜威后,再分别加入一系列浓度的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 溶液,定容至 10 mL 混匀。准确移取此溶液各 3 mL 于荧光池中,测量其荧光强度后,分别用等量 DNA (16 μL /次,溶液中 DNA 的最终浓度为 $1.02 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) 进行荧光滴定,测定其荧光强度。上述测定激发和发射狭缝均为 5 nm。

2 结果与分析

2.1 抗蚜威与金属离子的相互作用

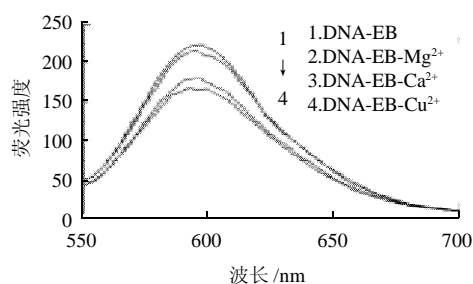


$c(\text{pirimicarb})=2.52 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; 曲线 1 → 9: $c(\text{Cu}^{2+})$ 、 $c(\text{Ca}^{2+})$ 、 $c(\text{Mg}^{2+})$ 的浓度分别为 0、 0.27×10^{-3} 、 0.53×10^{-3} 、 0.80×10^{-3} 、 1.06×10^{-3} 、 1.33×10^{-3} 、 1.60×10^{-3} 、 1.87×10^{-3} 、 $2.14 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

图 1 Cu^{2+} (a)、 Ca^{2+} (b)和 Mg^{2+} (c)存在下抗蚜威的紫外吸收光谱
Fig.1 UV absorption spectra of pirimicarb in the respective presence of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} and absence of metal ions

图 1 是 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 分别加入到抗蚜威中的紫外光谱(扣除了背景空白)。 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的加入均使抗蚜威体系产生不同程度的增色效应,且 Cu^{2+} 的增色最大,表明 3 种金属离子均与抗蚜威发生了络合^[9]。

2.2 金属离子、抗蚜威竞争置换 EB 与 DNA 结合实验



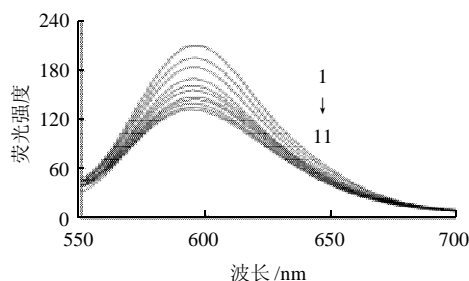
$c(\text{DNA})=5.7 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c(\text{EB})=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$;
 $c(\text{Cu}^{2+})=c(\text{Ca}^{2+})=c(\text{Mg}^{2+})=2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

图 2 3 种金属离子对 DNA-EB 复合物的荧光影响

Fig.2 Fluorescence spectra of the EB/DNA complex in the respective presence of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} and absence of metal ion

EB 是一种典型的嵌入式荧光探针,它本身的荧光强度很弱,但当其生色团平行地嵌入双螺旋 DNA 的碱基对中可使荧光显著增强^[10]。向 EB 溶液中分别加入 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、抗蚜威溶液时,体系的荧光光谱几乎没有发生变化,表明在实验条件下 EB 与金属离子和抗蚜威并不发生结合反应。而分别用 3 种金属离子滴

定 DNA-EB 混合溶液, 3 种离子均能对 DNA-EB 体系的荧光产生一定程度的猝灭(图 2), 猝灭程度为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。文献[11]报道 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 可以与 DNA 的磷酸基团和碱基对结合, 且结合能力 $\text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$, 而 Mg^{2+} 与 DNA 碱基的亲和力很小, 主要是与 DNA 的磷酸基团结合。由本实验结果推测, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 可能与 EB 竞争 DNA 的结合位点, 而导致 DNA-EB 体系的荧光猝灭, 荧光猝灭程度可能和金属离子与 DNA 碱基结合能力的强弱有关。用抗蚜威代替金属离子滴定 DNA-EB 混合溶液, 图 3 表明, 随着体系内抗蚜威浓度在一定范围内的增加, DNA-EB 体系的荧光强度逐渐猝灭, 说明抗蚜威与 EB 竞争结合 DNA 的同一位点, 而置换出 DNA-EB 复合物中的 EB, 从而使体系的荧光强度降低, 表明抗蚜威与 DNA 之间发生了嵌插作用。



$c(\text{DNA})=5.7 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; $c(\text{EB})=3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$; 曲线 1 → 11: $c(\text{pirimicarb})/(10^{-5} \text{ mol/L})$: 0、0.22、0.44、0.66、0.88、1.10、1.32、1.54、1.76、1.98、2.20。

图 3 抗蚜威对 DNA-EB 复合物的荧光影响

Fig.3 Fluorescence spectra of the EB/DNA complex in the presence of different concentrations of pirimicarb

2.3 熔点实验

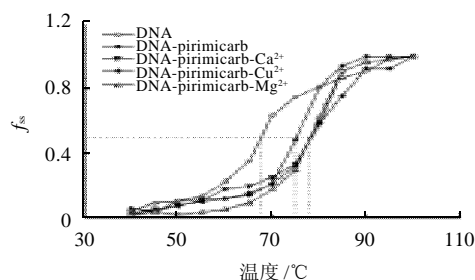


图 4 金属离子对 DNA- 抗蚜威熔点的影响

Fig.4 Effects of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} on the melting point of the EB/DNA complex

通常把 DNA 的双螺旋结构失去一半时的温度称为该 DNA 的溶解温度或熔点(T_m)。小分子与 DNA 的相互作用对 T_m 有影响, 嵌插结合使得 DNA 双螺旋结构更加稳定, T_m 会增加 $5 \sim 8^\circ\text{C}$, 而沟槽结合或静电结合对 T_m 影响不明显[12]。在 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的人体生理离子

浓度下[13], 分别测定 DNA、DNA- 抗蚜威体系在不同温度下的吸光度。在 $40 \sim 100^\circ\text{C}$ 温度范围内, 作 $f_{ss} = (A - A_0)/(A_T - A_0)$ 对温度 T 的热变性曲线(图 4, A_0 和 A_T 分别为 40°C 和 100°C 时体系的吸光度, A 为温度变化对应的吸光度), 求得 DNA 的 T_m 为 67.2°C , DNA- 抗蚜威体系的 T_m 为 75°C , 升高了 7.8°C , 进一步说明抗蚜威与 DNA 以嵌插方式结合, 抗蚜威嵌入到 DNA 碱基对之间, 使得 DNA 双螺旋结构更加稳定。 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 分别存在下, DNA- 抗蚜威体系的 T_m 为 78°C 左右, T_m 增加值小于 5°C , 表明 3 种离子的参与均未影响抗蚜威与 DNA 的结合方式。

2.4 金属离子对 DNA- 抗蚜威体系结合常数的影响

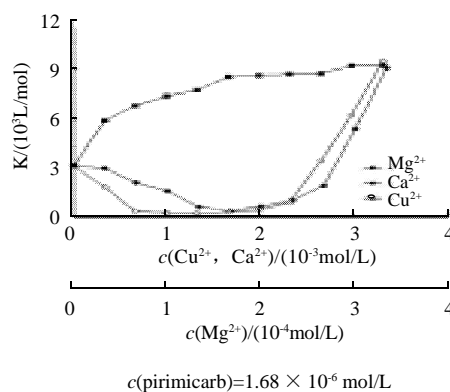


图 5 不同金属离子浓度对抗蚜威-DNA 体系结合常数的影响

Fig.5 Effect of Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} at different concentrations on the binding constant of the pirimicarb/DNA complex

在不同浓度 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 存在下, 分别用 DNA 滴定抗蚜威, 体系的荧光光谱均发生了不同程度猝灭。采集荧光猝灭数据, 由方程 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q]$ [14], 求得不同浓度的金属离子存在下抗蚜威与 DNA 之间的结合常数, 如图 5 所示。Hackl 等[11]研究结果证明: Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 与 DNA 的磷酸基团和碱基都可以结合, 且与碱基的结合能力更强。结合本实验 2.2 节和图 5 结果, 可以得出当 $\text{Cu}^{2+} (< 2.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L})$ 和 $\text{Ca}^{2+} (< 2.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L})$ 处于低浓度时, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 主要与 DNA 的碱基结合, 它们与抗蚜威发生了竞争作用, 从而减小了 DNA- 抗蚜威体系的结合常数。而当 $\text{Cu}^{2+} (> 2.6 \times 10^{-3} \text{ mol/L})$ 和 $\text{Ca}^{2+} (> 2.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L})$ 处于高浓度时, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 先与抗蚜威络合, 再通过离子桥作用于 DNA 的磷酸基团结合, 形成 DNA- 抗蚜威- Cu^{2+} 或 DNA- 抗蚜威- Ca^{2+} 复合物使结合常数明显增大; 而 Mg^{2+} 与 DNA 碱基的亲和力很小, 主要是与 DNA 的磷酸基团结合, 当 Mg^{2+} 在其与核苷酸作用的时候, 嘌呤的 N7 位会取代其中一个水配体, 其余水配体能与磷酸上的氧以及嘌呤 C6 位上的 O 形成氢键[15], Mg^{2+} 的参与有利于 DNA 的双螺旋打开,

从而促进抗蚜威与 DNA 的结合, 表现为增大了抗蚜威与 DNA 的结合常数^[16]。

3 结 论

紫外光谱表明, Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 都能与抗蚜威络合, EB 竞争实验和 DNA 熔点实验表明, 抗蚜威与 DNA 以嵌插方式结合。金属离子对 DNA- 抗蚜威结合的影响程度主要取决于金属离子与 DNA 碱基和磷酸基团间结合的相对亲疏比。当 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 在低浓度时, 其主要与 DNA 的碱基结合, 此时 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 通过竞争抗蚜威与 DNA 的结合位点而导致 DNA- 抗蚜威之间的结合常数降低, 在高浓度时通过 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 离子桥作用增大了 DNA- 抗蚜威之间结合常数, 而 Mg^{2+} 主要与 DNA 的磷酸基团结合, Mg^{2+} 浓度的增加能增加抗蚜威与 DNA 之间的结合常数。

参考文献:

- [1] 于婷婷, 何平, 梁艳, 等. 有机药物分子与 DNA 相互作用的研究进展[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(7): 937-944.
- [2] 汪佳蓉, 张国文, 杨佳, 等. 倍硫磷与 DNA 相互作用的光谱法研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 78-81.
- [3] 孙伟, 李清军, 焦奎, 等. 有机小分子与 DNA 的相互作用及其在 DNA 分析中的应用[J]. 化学试剂, 2005, 27(3): 149-152.
- [4] YUAN Xiaoying, GUO Dongsheng, ZHANG Ming. The influence of $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Mg}(\text{II})$ on the binding of adriamycin with DNA and the study on their interaction mechanism[J]. Spectrochim Acta A, 2006, 63(2): 444-448.
- [5] AHMAD I, MARIA V L, OLIVEIRA M, et al. Modulatory role of copper on β -naphtho avone-induced DNA damage in European eel (*Anguilla anguilla* L.)[J]. Ecotox Environ Safe, 2008, 71(3): 806-812.
- [6] GERMAN-FATTAL M, LECERF F, SABBAGH F, et al. Neuroprotective gene prole in the brain of magnesium-decient mice[J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(4): 264-272.
- [7] ANASTASSOPOULOU J, THEOPHANIDES T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis irradiation and free radicals[J]. Crit Rev Oncol Hemat, 2002, 42(1): 79-91.
- [8] 王以燕, 许建宁, 胡洁. 美国 EPA 对农药致癌可能性的评估[J]. 农药, 2009, 48(6): 462-466.
- [9] SHAIKH S M T, SEETHARAMAPPA J, ASHOKA S, et al. A study of the interaction between bromopyrogallol red and bovine serum albumin by spectroscopic methods[J]. Dyes and Pigments, 2007, 73(2): 211-216.
- [10] 江崇球, 贺吉香, 王金山. EB 荧光探针法研究多黏菌素 B 与 DNA 的作用方式[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(1): 103-106.
- [11] HACKLE V, KORNILOVA S V, BLAGOI Y P. DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solutions[J]. Int J Biol Macromol, 2005, 35(4): 175-191.
- [12] KUMAR C V, TURNER R S, ASUNCION E H. Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix: the salt effect[J]. J Photoch Photobiol A, 1993, 74: 231-238.
- [13] 秦俊法, 李增禧, 楼蔓藤. 人体头发和血液微量元素正常参考值确定原则及方法[J]. 广东微量元素科学, 2005, 12(10): 2-11.
- [14] DING Fei, HUANG Jinli, LIN Juan, et al. A study of the binding of C.I. Mordant Red 3 with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy[J]. Dyes and Pigments, 2009, 82(1): 65-70.
- [15] 王新莹, 纪鸣, 李志果, 等. 金属离子与 DNA 相互作用的研究进展[J]. 分析科学学报, 2005, 21(5): 557-562.
- [16] 惠晓梅, 郭栋生, 袁小英. 四种金属离子对 CHBr_3 和小牛胸腺 DNA 间结合作用的影响[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4): 820-824.

《山东食品发酵》征稿启事

《山东食品发酵》杂志, 季刊, 创刊于 1971 年, 至今已发行总第 157 期, 发行范围遍及全国 30 多个省(直辖市、市), 在全国食品发酵行业中有着广泛的影响。

本刊着重报道、刊登国内外食品发酵行业内的科研成就、学术论文、发明专利、专题综述及行业快讯等。注重行业内的新技术、新产品、新工艺的介绍与宣传。另外将增加企业发展成功之路, 明星企业家, 新产品推介, 行业管理交流等宣传、介绍性综合栏目, 以更好地促进企业之间的交流与合作, 推动行业发展。

本刊采用图文混排, 版式灵活多样, 投稿方式信函、电子邮件都可, 欢迎广大企业、个人踊跃投稿, 稿酬从优。

欢迎广大读者与本编辑部联系征订、互换业务。

联系与投稿方式:

邮编: 250013 地址: 山东省济南市解放路 41 号

单位: 《山东食品发酵》杂志编辑部

E-mail: sdsfj@126.com

电话: (0531)88933188 联系人: 李亮 张新明