

# AP 与鲱鱼精子 DNA 相互作用的研究



叶林安\*, 金余娣

宁波海洋中心自然资源部, 浙江宁波 315175

**摘要:** 脱氧核糖核酸 (DNA) 是重要的生命物质之一, 是生物体遗传信息的载体, 在医药研究中, 靶向分子与 DNA 相互的机理研究, 对于阐述一些抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物的作用具有重要意义, 可以进一步指导人工核酸的合成、DNA 高级结构以及新型药物的设计合成。本文采用紫外光谱 (UV) 和荧光光谱 (FS) 方法研究了小分子药物 (AP) 与鲱鱼精子 DNA 的作用机制, 确定了药物与 DNA 在单链与双链下的相互作用方式, 经实验研究表明: AP 与 DNA 的结合常数约为  $105 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ , 小分子药物与 DNA 可能以沟槽式相结合。通过对 AP 该小分子药物与 DNA 的相互作用方式进行研究, 也从分子水平对与 DNA 的相互作用方式及其潜在致 DNA 损伤和遗传的机制进行了探究提供了新思路。

**关键词:** 紫外光谱; 荧光光谱; 小分子药物; 鲱鱼精子 DNA; 作用方式

**DOI:** [10.57237/j.life.2023.03.003](https://doi.org/10.57237/j.life.2023.03.003)

## Research on the Interaction between AP and Herring Sperm DNA

Linan Ye\*, Yudi Jing

Ningbo Oceanographic Center, Ministry of Natural Resources, Ningbo 315175, China

**Abstract:** Deoxyribonucleic acid (DNA) is one of the important living substances and a carrier of genetic information in organisms. In medical research, the study of the mechanism of the interaction between targeted molecules and DNA is of great significance for elucidating the effects of some anti-tumor, antiviral drugs, and carcinogens. It can further guide the synthesis of artificial nucleic acids, advanced DNA structures, and the design and synthesis of new drugs. UV and fluorescence spectroscopic methods to study the mechanism of action of the small molecule drugs with herring sperm DNA. Determine the interaction of drugs and DNA single-stranded and double-stranded way. The interaction between AP and DNA may be realized via groove combined. The thermodynamic formulation constant ( $K$ ) was ca.  $105 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ . By studying the interaction between AP, a small molecule drug, and DNA, a new approach has been provided to explore the potential mechanisms of DNA damage and inheritance at the molecular level.

**Keywords:** UV; FS; AP; Herring Sperm DNA; Interaction Mode

基金项目: 自然资源部东海局青年科技基金项目 (202209).

\*通信作者: 叶林安, [Yelinan2018@163.com](mailto:Yelinan2018@163.com)

收稿日期: 2023-07-09; 接受日期: 2023-08-31; 在线出版日期: 2023-09-08

<http://www.lifescitech.org>

## 1 引言

脱氧核糖核酸(DNA)是一类很重要的生命物质,是生物体遗传信息的载体,自从 1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 的双螺旋结构模型,有关生物基本遗传物质 DNA 的研究也就成为分子生物学、生物化学及医药学的一个重要课题[1]。

一些药物分子与 DNA 的相互作用,会影响到 DNA 的生理和物理化学性质,改变 DNA 的转录和复制。在医药研究中, DNA 与靶向分子相互作用的研究不仅可以阐述一些抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物的作用机理,而且对进一步指导人工核酸的合成、DNA 高级结构以及新型药物的设计合成的研究都具有重要意义[2]。药物分子与 DNA 的相互作用主要有以下 3 种模式[3, 4]: (1) 通过转录因子和聚合酶控制药物与蛋白质的相互作用,从而和 DNA 发生相互作用[3]。(2) 通过 RNA 与 DNA 双链的作用形成核酸三螺旋结构或 RNA 杂交(特殊位点的键合)与 DNA 单链的键合形成 RNA—DNA 杂交体影响转录酶的活性[3]。(3) 芳香族配合物分子与 DNA 的双链结合,这种结合有 3 个方面:一是与带负电荷的核酸的磷酸骨架通过静电作用结合,这种结合是非特异性的。二是平面芳香环体系嵌入核酸碱基对之间。主要是芳香稠环的平面有机分子以嵌入模式与 DNA 作用,例如一些抗癌的抗生素药物(道诺霉素,阿霉素,棘霉素,博来霉素等)。三是沟槽键合。药物与 DNA 双链的两种(大、小)沟槽键合[3]。与沟槽紧密接触的小沟槽键合,常伴有氢键结合和与磷酸骨架静电结合,例如光神霉素、纺锤霉素等;与大沟槽键合可以引起与 DNA 的氢键结合并形成 DNA 三链结构,如诺福克等[2]。

药物与核酸作用时,可以同时存在一种或几种基本作用方式。一部分芳香族分子(比如一些有电化学活性的抗癌药物)嵌入到 DNA 双链的碱基对之间,除了主要通过堆积作用与 DNA 键合外,分子周边的基团与碱基对边缘或磷酸骨架表面的大或小沟槽,或 DNA 双链的表面还可以有其他作用力存在(比如氢键或静电吸引)。通过比较可以发现,沟槽键合分子与 DNA 作用明显大于嵌入剂与 DNA 的作用引[3]。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

鲱鱼精子 DNA(A.R.)为 Sigma 公司产品;紫外-可

见分光光度计;F-4500 荧光分光光度计;DELTA 320 pH 计;Sigma D-37520 高速离心机。

亚甲基蓝(MB, A.R.)和三羟甲基氨基甲烷(Tris, A.R.)为国药集团化学试剂有限公司产品;鲱鱼精子 DNA(B.R.)为上海伯奥生物科技有限公司产品,其纯度通过比较 260 和 280nm 处的吸光度来确定( $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 1.9/1$ ),用所需 pH 条件下缓冲溶液配制,浓度通过测定 260nm 处的吸光度计算而得( $\epsilon = 6600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),其储备液置于 4℃ 保存。水为去离子水。

小分子药物( $C_{20}H_{16}N_4O_2$ , Mol. Wt: 344.37, 以下简称 AP, 分子结构见图 1)是一种具有平面芳香环体系和电化学活性的抗癌药物。本实验选择 pH=7.00 近生理条件下的 Tris-HCl 缓冲溶液为研究介质,运用光谱等技术研究小分子药物与鲱鱼精子 DNA 的相互作用,对作用机理进行了初步分析。

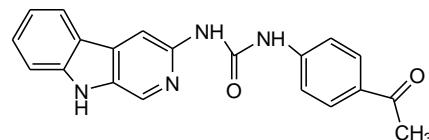


图 1 小分子药物(AP)的分子结构

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 AP 与 DNA 相互作用的电子吸收光谱测定

分别加入一定量的 AP, DNA, DNA-AP 混合溶液,三种溶液均分别用 pH=7.00 的 Tris( $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )-HCl 缓冲溶液配制,以 Tris-HCl 缓冲溶液定容,摇匀,放置 20 min,以试剂空白为参比,扫描电子吸收光谱。

在 1cm 比色皿中,加入 3.00 mL 相关溶液,通过滴定法扫描电子吸收光谱或测定吸光度。每次滴加 20  $\mu\text{L}$ ,至 400  $\mu\text{L}$ ,可忽略体积效应(下同)分别在 200~500 nm 范围内进行扫描。

将 DNA 溶液放入沸水中加热 1 h 后迅速放入冰水中骤冷,按上述步骤重复此实验。

### 2.2.2 AP 与 DNA 相互作用的荧光光谱测定

在 1cm 比色皿中,加入 3.00 mL DNA 溶液,用 AP 溶液以未加药物 AP 的 DNA 为参比,依次加入 20  $\mu\text{L}$  AP 测定荧光强度,至 400  $\mu\text{L}$ ,激发和发射狭缝均 5nm;固定激发波长 700 nm,扫描发射波长范围为 200~900 nm 体系的荧光光谱;或固定发射波长 700 nm,扫描激

发波长范围为 200~900 nm 体系的荧光光谱[5]。将 DNA 溶液放入沸水中加热 1 h 后迅速放入冰水中骤冷，按上述步骤重复此实验。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 电子吸收光谱法

##### 3.1.1 光谱分析

紫外—可见吸收光谱是由分子中电子的能级跃迁产生的。双链 DNA 分子含有芳香性碱基和磷酸根，在 260 nm 处有一很强的吸收峰。小分子与 DNA 作用后会或发生红移、蓝移，或在 260 nm 处的吸收峰增加或

减少，根据峰位及强度的变化可推测小分子与 DNA 的相互作用。

测定了 pH=7.00 的 Tris(0.05 mol·L<sup>-1</sup>)-HCl 缓冲溶液中加入 AP 前后 DNA 的电子光谱，见图 2~图 5。AP 溶液滴加到 DNA 溶液中后，观察到 DNA 在 260 nm 附近处的特征吸收峰位置出现小的红移（约 2 nm）和减色效应（吸光度 A 减小约 0.18, 30%），且 DNA-AP 体系的吸光度小于同浓度 DNA 与 AP 吸光度的理论值加和，说明测得的 AP-DNA 吸收曲线并非为 AP 和 DNA 紫外-可见光谱的简单加和，而是二者之间发生了一定的相互作用。但由于红移（约 2 nm）较小，虽然减色效应约达 30%，尚不足以说明 AP 与 DNA 的相互作用方式为经典的嵌插作用。

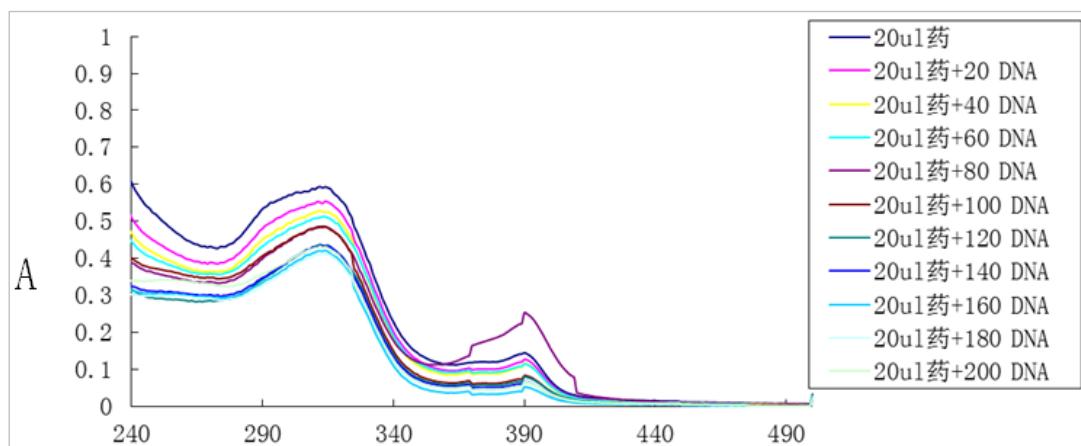


图 2 AP 与双链鲱鱼精 DNA 相互作用的吸收光谱

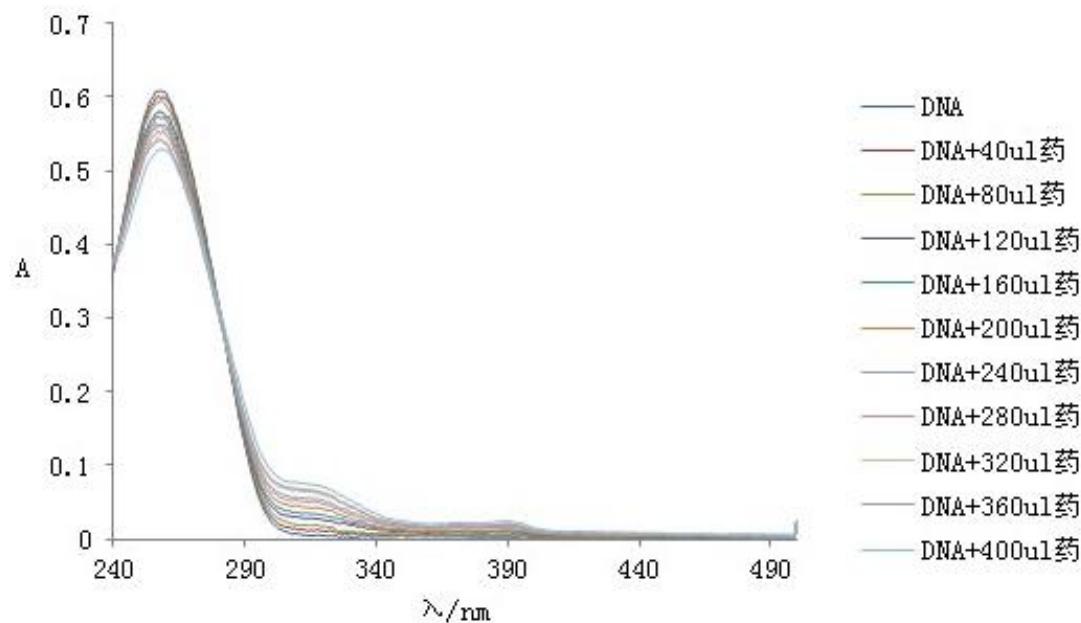


图 3 双链鲱鱼精 DNA 与 AP 相互作用的吸收光谱

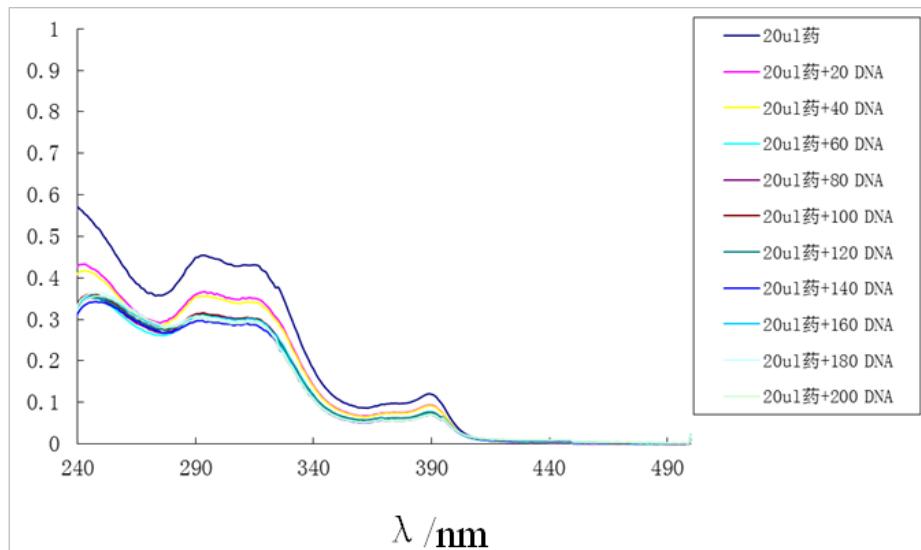


图 4 AP 与单链鲱鱼精 DNA 相互作用的吸收光谱

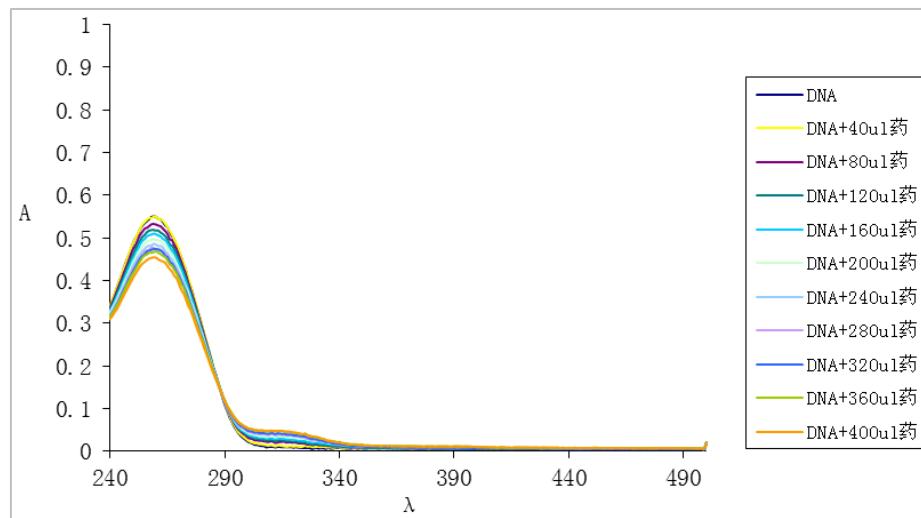


图 5 单链鲱鱼精 DNA 与 AP 相互作用的吸收光谱

AP 与双螺旋 DNA 结合方式主要有静电相互作用、嵌插作用和沟槽式结合 3 种模式[6]。如果小分子与 DNA 通过嵌插作用结合，则当 DNA 变性后，双螺旋被破坏，这种作用应该减弱或消失，本文将鲱鱼精 DNA 溶液在沸水中加热 1 h，并在冰水中快速冷却，使 DNA 双螺旋解开制得变性 DNA，将此变性 DNA 与 AP 作用，发现变性 DNA 和未变性 DNA 对 MM 作用时引起 DNA 在 260 nm 附近处的特征吸收峰位置出现红移(约 2 nm)和减色效应(吸光度 A 减小约 0.18, 30%)能力几乎一致，说明 AP 与 DNA 相互作用的模式不是嵌插作用。同时还在 330 nm 附近处出现了一处等吸收点，等吸收点的出现，表明溶液中有平衡存在，说明药物可能通过氢键与 DNA 沟槽结合方式作用。

### 3.1.2 AP 与 DNA 作用的结合常数

在常温下，固定 DNA 浓度，改变 AP 浓度，在 260 nm 处测定吸光度。根据双倒数公式[1]:

$$1/(A_0 - A) = 1/A_0 + 1/[K \times A_0 \times c(AP)] \quad (1)$$

式中  $A_0$  和  $A$  分别为加入 AP 前后体系的吸光度， $K$  为结合常数。以  $1/(A_0 - A)$  对  $1/c(AP)$  作图，如图 6~图 9 所示，计算得到结合常数在  $K = 3.8 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  附近，比以经典的嵌插作用与 DNA 结合的溴化乙啶、道诺霉素低 1~2 个数量级[6-7]，可以说明 AP 与 DNA 的作用方式并非为经典的嵌插作用[8-9]。

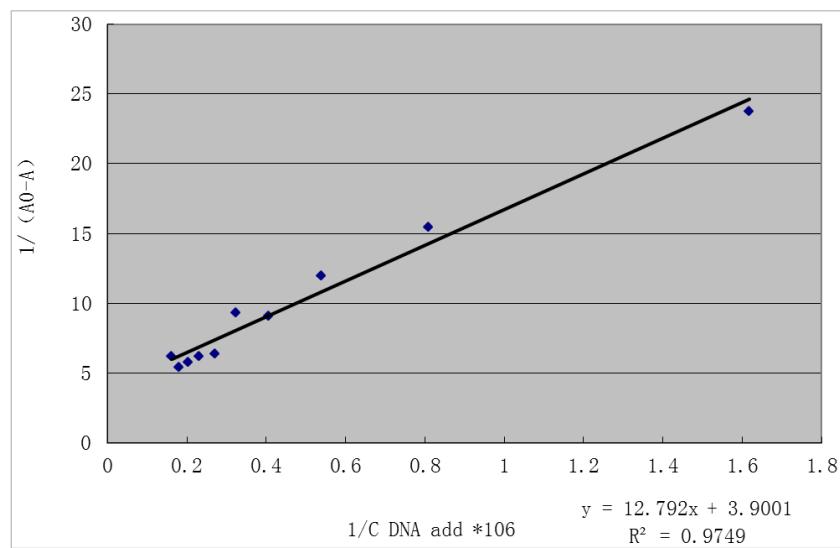


图 6 AP 与双链鲱鱼精 DNA 相互作用的吸收光谱

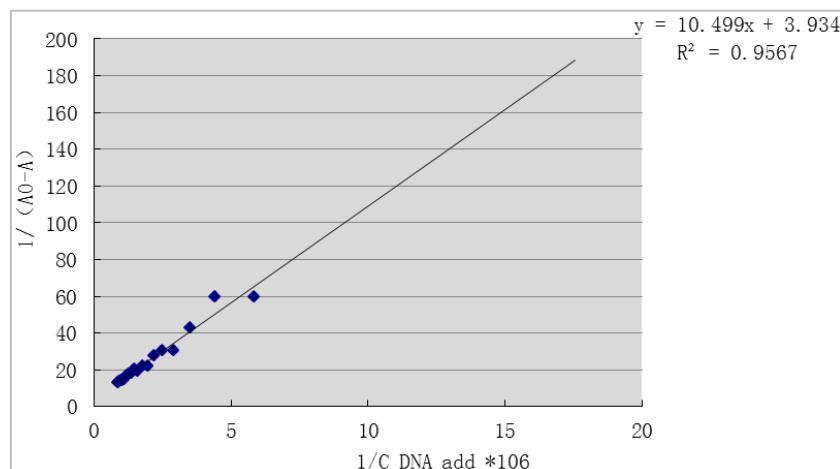


图 7 双链鲱鱼精 DNA 与 AP 相互作用的吸收光谱

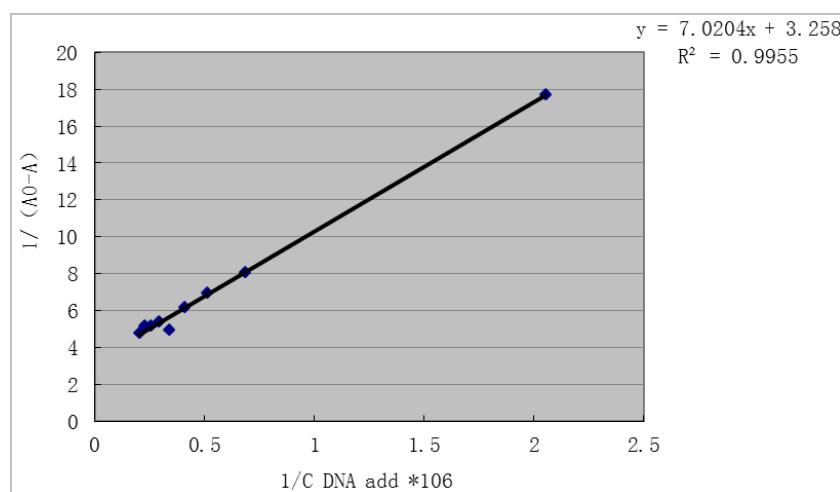


图 8 AP 与单链鲱鱼精 DNA 相互作用的吸收光谱

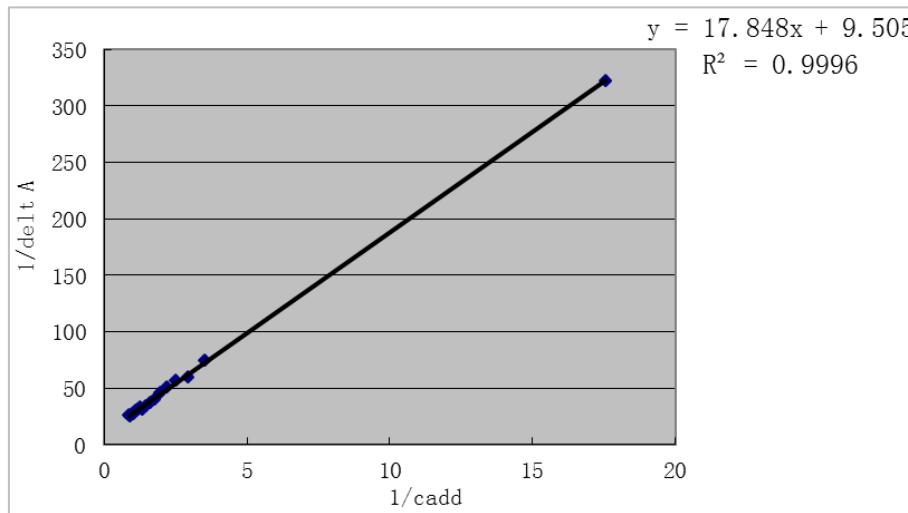


图 9 单链鲱鱼精 DNA 与 AP 相互作用的吸收光谱

### 3.2 荧光光度法

荧光光谱法是研究小分子与 DNA 相互作用的主要手段[10-12]。为了校验电子光谱法测得的准确性, 特对 DNA 与小分子药物 AP 作用进行荧光测定。固定 DNA 的浓度加入药物 AP, 扫描体系的荧光光谱。结果如图 10 和图 11 所示, 可见随着药物加入到 DNA 体系后, 体系的荧光强度随着药物 AP 浓度的增大而增强[13, 14]。

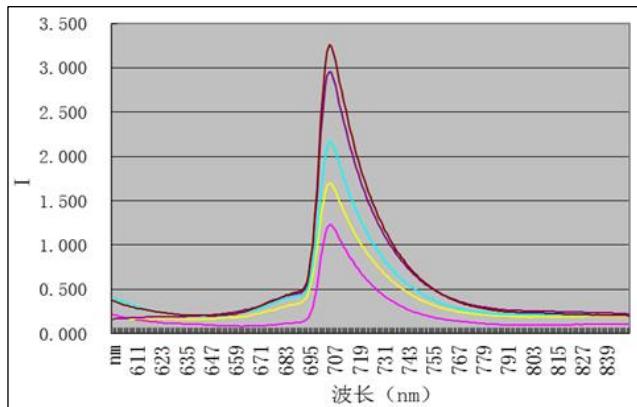


图 10 单链鲱鱼精 DNA 与药物相互作用的荧光光谱

药物 AP 与 DNA 结合常数可以采用修正后的 Benesi-Hildebrand 方程[1]:

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{KLQ[MB-DNA]_0[M]_0} + \frac{1}{(LQ[MB-DNA]_0)} \quad (2)$$

根据实验结果, 以  $1/(F - F_0)$  对  $1/[AP]_0$  作图 (如图 12 和图 13 所示), 得到 AP-DNA 体系的形成常数为: 双链  $1.5 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$ ; 单链  $2.03 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$ , 与电子光

谱法得到的形成常数为  $2.72 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$  接近。可见单、双链 DNA 与药物 AP 的结合常数也非常接近。可以认为单、双链与 AP 的作用机理相同[15-16]。因此, AP 与 DNA 可能以沟槽方式相结合。与电子光谱法得到的 DNA 与 AP 作用方式结论一致。

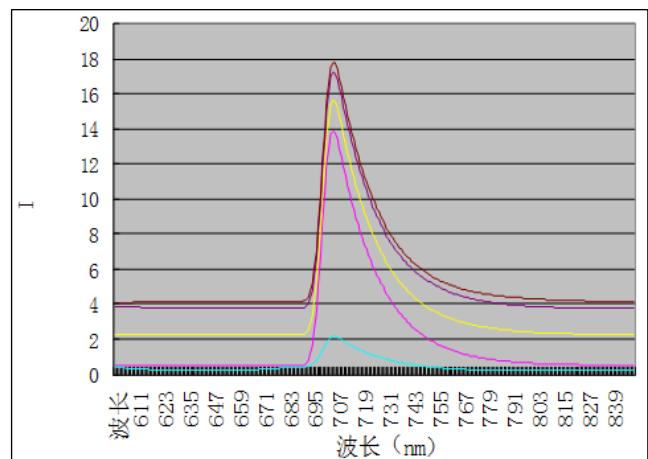


图 11 双链鲱鱼精 DNA 与药物相互作用的荧光光谱

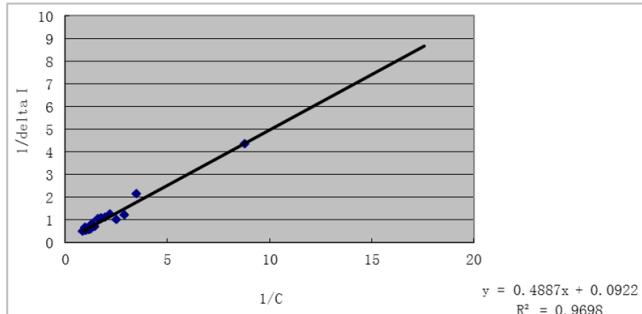


图 12 单链鲱鱼精 DNA 与药物相互作用的荧光光谱

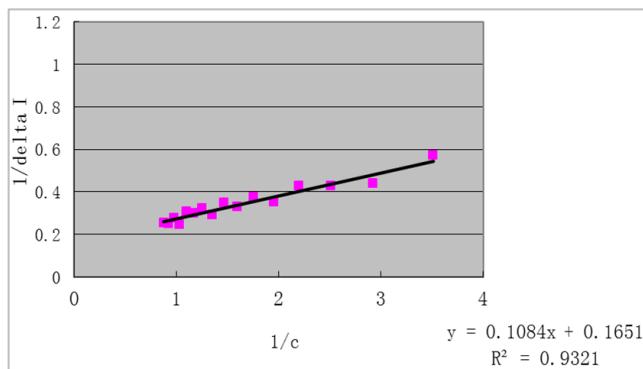


图 13 双链鲱鱼精 DNA 与药物相互作用的荧光光谱

## 4 结论

本文采用电子吸收光谱法和荧光光谱法研究了 AP 与 DNA 的相互作用, 获得了 AP 与 DNA 相互作用的数据和信息。研究结果表明 AP 与 DNA 可能以沟槽方式相结合, 结合常数 K 约为  $105 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}$ 。本文的研究对于进一步了解和认识该药物对 DNA 的损害及其相互作用机制和为全面评价该药物的安全性能提供科学依据有积极意义。

## 参考文献

- [1] Shen, Haoyu, Zhu, Fan Shi, Wei Chen, Zhen Pan, Qingqing. Acta Chim. Sinica 2010, 68, 1719-1725.
- [2] Gao, E.-J.; Cheng, M.-S.; Wang, K.-H.; Sun, Y.-G. Acta Chim. Sinica 2006, 64, 2169.
- [3] Zhao, L.; Wu, B.-Y.; Gao, L.-H.; Wang, K.-Z. Acta Chim. Sinica 2006, 64, 1402.
- [4] Yan, J.-H.; Zhang, C.-P.; Yang, P. Acta Chim. Sinica 2006, 64, 652.
- [5] Zheng, X.-L.; Sui, B.-Z.; Li, Y.-H.; Yang, Q.; Sun, F.-Z. J. Microbiol. 2000, 20, 57.
- [6] Gao, E.-J.; Zhao, S.-M.; Liu, Q.-T.; Xu, R. Acta Chim. Sinica 2004, 62, 593.
- [7] Li, H.-B.; Wang, X.-M.; Liu, H.-P.; Hu, Y.-M.; Yang, D.-M.; Shi, R.-M.; Dong, F.-Q. Chinese J. Inorg. Chem. 2006, 22, 1695.
- [8] Hen, G.-Z.; Huang, X.-Z.; Zheng, Z.-Z.; Xu, J.-G.; Wang, Z.-B. Fluorescence Analytical Method, Science Press, Beijing, 1990, p. 263.
- [9] 林铌, 张佳宁, 刘丽等. 基于 QSAR 模型、紫外光谱法和分子对接技术研究杂质 5-羟甲基糠醛及其二聚体和代谢产物与 DNA 的相互作用 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (07): 1221-1228.
- [10] 郭辉, 汪涛, 苏文卿等. 烷氧基三联吡啶钌配合物的合成、结构及其与 DNA 相互作用[J]. 无机化学学报, 2022, 38 (10): 2019-2027.
- [11] 吕嘉楠, 李军生, 黄国霞等. 与鲱鱼精子 DNA 相互作用及其影响因素的光谱学分析 [J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42 (01): 210-214.
- [12] 杨莉宁, 刘春叶. N,N'-二甲基-5-硝基-2,2'-联咪唑锌 (II) 配合物的合成, 表征及与 DNA 相互作用 [J]. 化学工程师, 2021, 35 (08): 6-9+21.
- [13] 刘璐, 陈笑艳. 国产小分子化学创新药临床药物相互作用研究现状 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26 (08): 863-875.
- [14] 王君, 王琦, 陈丹丹等. DNA 与小分子化合物相互作用的研究进展与展望 [J]. 辽宁大学学报 (自然科学版), 2013, 40 (04): 289-300+284.
- [15] 李悦. 药物小分子与生物大分子相互作用的研究进展 [J]. 天津职业院校联合学报, 2013, 15 (10): 110-115.
- [16] 孟彦波, 张立峰, 蒋晔. 药物小分子与 DNA 相互作用分析方法概述 [J]. 中国药师, 2010, 13 (04): 572-575.