

[研究快报]

瓜环 [2]准轮烷分子晶体结构及切割 DNA 研究

霍方俊, 阴彩霞, 杨 频

(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, 太原 030006)

关键词 瓜环; 准轮烷; 晶体结构; DNA切割

中图分类号 O629.7

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)05-0894-03

核酸 DNA 和 RNA 的定位断裂是分子生物学和基因技术的核心技术, 是生物化学研究的前沿领域. 开发这一技术的必备前提和关键是对人工核酸切割试剂的研究. 有关核酸切割试剂切割机理的研究不但对理解核酸酶的作用机理极为有用, 而且在疾病的基因治疗中也具有十分重要的作用^[1]. 另外, 核酸切割试剂也可以作为分子生物学的重要工具用来研究核酸高级结构^[2]. 但已报道的核酸切割试剂绝大部分是金属或者金属配合物, 不含金属离子的 DNA 切割试剂极少. 因此, 研究不含金属离子的核酸切割试剂具有理论意义和应用潜力^[3].

瓜环 (Cucurbit[*n*]uril, $n=4\sim 12$; 简记为 CB[*n*])^[4,5]是超分子化学中继环糊精 (Cyclodextrin)、冠醚 (Crown ether) 及杯芳烃 (Calixarene) 之后发展起来的一类新型高度对称的桶状大环分子. 在超分子组装、分子识别、离子通道、超分子生物学、纳米科学、超分子药理学等领域中展现出广泛的应用前景^[6,7]. 有关基于瓜环的核酸切割的研究报道^[8]极少. 文献 [9] 通过瓜环 CB[6] 和 1,6-二咪唑基己烷二溴酸盐反应, 合成了新的准轮烷分子, 并报道了其晶体结构及超分子组装. 进一步的研究发现, 该种类型的准轮烷在生理条件下能够对 DNA 实施有效切割, 切割机理可能是一个客体分子与主体瓜环协同作用的结果.

本文报道了瓜环 [2]准轮烷分子晶体结构及 DNA 的切割.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 瓜环 CB[6] 按文献 [4,5] 方法合成; 1,6-二咪唑基己烷二盐酸盐为本实验室自制; [2]准轮烷分子自制; 质粒 DNA (pBR 322DNA) 购自华美公司. 与 DNA 作用时, 样品均溶解在 10 mmol/L Tris·HCl 和 6.2 mmol/L NaCl 的二次蒸馏水缓冲液 (pH = 7.18) 中. 其它试剂均为市售分析纯或生化试剂.

Bruker 300 核磁共振仪 (D₂O 为溶剂, TMS 为内标); Perkin-Elmer 240C 元素分析仪; Beckman 50 精密 pH 酸度计; DYY 32 型电泳槽和 DYY 型电泳仪.

1.2 [2]准轮烷分子合成 将 100 mg (0.1 mmol) 瓜环 CB[6] 和 29.2 mg (0.1 mmol) 客体分子 BMH-Cl 溶于 20 mL 蒸馏水中, 用 80 °C 油浴保温, 搅拌 24 h. 减压浓缩至约 5 mL, 加入 30 mL 四氢呋喃, 析出白色固体. 抽滤, 用少量丙酮淋洗, 真空干燥 24 h, 得 121 mg [2]准轮烷分子 CB[6]/BMH, 产率 86%. ¹H NMR (300 MHz, 25 °C, D₂O, TMS), δ: 9.16 (s, 2H), 7.92 (s, 2H), 7.37 (s, 2H), 5.78 (d, 12H), 5.58 (s, 12H), 4.32 (d, 12H), 3.99 (t, 4H), 1.18 (m, 4H), 0.57 (m, 4H); ¹³C NMR (300 MHz, D₂O), δ: 155.8, 135.2, 123.3, 116.8, 71.1, 51.2, 48.6, 28.6, 27.3; ESI-MS: 608.7 (双电荷阳离子), 1215.4 (单电荷阳离子). 元素分析 (%), C₃₆H₃₆N₂₄O₁₂·C₁₂H₂₀N₄·2Cl·8H₂O 计算值): C 39.99 (40.22); H 4.97 (5.03); N 27.12 (27.37).

1.3 晶体结构测定 选取 0.5 mm × 0.4 mm × 0.3 mm 的无色单晶, 在带有石墨单色器的 SMART5.0

收稿日期: 2006-11-10

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30470408) 资助.

联系人简介: 杨 频 (1933 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物无机及超分子化学研究. E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

CCD Area Detector X射线衍射仪上进行衍射测量 (203 K). 用 Mo K 射线 ($\lambda = 0.071073$ nm) 和 扫描方式, 在 $2.2^\circ \sim 25^\circ$ 范围内收集 13534 个衍射点, 其中 4968 个 $I > 2\sigma(I)$ 衍射数据用于结构分析 ($R_{\text{int}} = 0.0223$). 晶体结构由 SHELXL97 软件解析. 晶体为单斜晶系, $P2_1/c$ 空间群, $a = 1.2369(4)$ nm, $b = 2.0115(6)$ nm, $c = 1.2578(4)$ nm, $\beta = 113.664^\circ$, $V = 2.8663(15)$ nm³, $Z = 2$, $D_c = 1.659$ g/cm³, $F(000) = 1500$, 偏差因子为 $R_1 = 0.0664$, $wR_2 = 0.1900$.

1.4 电泳实验 在 0.5 mL 安道夫管中加入一定浓度 (0 ~ 150 $\mu\text{mol/L}$) 的 [2] 准轮烷分子 CB[6]/BMH-Cl, 0.5 μL pBR322 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 和 10 mmol/L Tris-HCl/NaCl (6.2 mmol) 的反应缓冲溶液 (pH = 7.18), 使总体积保持 10 μL , 混合后, 在 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中避光恒温 4 h, 通过加入 EDTA 和溴酚蓝终止反应, 然后进行琼脂糖凝胶电泳分析. 琼脂糖凝胶中含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭, 电泳缓冲液为 50 \times TAE (TAE: 2 mol/L Tris-HAc, 50 mmol/L EDTA).

2 结果与讨论

2.1 CB[6]/BMH-Cl 准轮烷分子的晶体结构及 DNA 切割 晶体结构如图 1(A) 所示. 客体分子从主体分子空腔的中部穿过, 形成了稳定的 [2] 准轮烷超分子实体. 从晶体结构看, [2] 准轮烷分子主要由 10 个 C—H...O 氢键得以稳定存在. ¹H NMR, ¹³C NMR, ESI-MS 谱表明, 该超分子实体在溶液和气相中都能稳定存在. 从切割的琼脂糖凝胶电泳结果 [图 1(B)] 可以看出, 在生理条件下, CB[6]/BMH-Cl 准轮烷分子能够有效地切割 DNA. 当质粒 pBR 322DNA 与准轮烷分子 CB[6]/BMH-Cl 反应后, 超螺旋 *S* 被降解至缺刻开环型 *C*, 进而出现线型 *L*. 随着准轮烷分子浓度的增大, 质粒 pBR 322DNA 超螺旋构型 *S* 逐渐减少, 而缺刻开环型 *C* 和线型 *L* 不断增多. 当准轮烷分子浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 超螺旋 DNA 被降解为含有 7% 的超螺旋、69% 的缺刻及 24% 的线型的混合物. 在对比实验条件下, 单独的客体分子不能对 DNA 实施切割 (Lane 6).

Fig 1 Crystal structure of [2] pseudorotaxane (CB[6]/BMH) (hydrogen atoms involving hydrogen bonds were shown) (A) and cleavage of pBR322 plasmid DNA induced by CB[6]/BMH with the varying concentrations (B)

Conditions: 10 mmol/L Tris-HCl buffer, 6.2 mmol/L NaCl, pH = 7.18, at 37 $^\circ\text{C}$ for 4 h; lane 1—5: $c[\text{CB}[6]/\text{BMH}]/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 10, 25, 50, 150. *S* is supercoiled DNA (CCC form), *C* is nicked circular form DNA (OC form), *L* is linear DNA. Lane 1: 64% *S* + 36% *C*; lane 5: 7% *S* + 69% *C* + 24% *L*; lane 6: only BMH-Cl (150 μmol).

2.2 切割机理探讨 当有准轮烷分子参与时, DAN 的模型化合物 BDNPP 的水解在切割条件下被加速了大约 40 倍, 这一水解速率的增加从侧面论证了切割属于水解机理. 随着准轮烷分子浓度的增加, DNA-EB 体系荧光光谱的荧光强度增加, 说明准轮烷分子与 DNA 之间存在典型的静电干扰.

从已报道的有机分子切割 DNA 机理^[3,10]及其晶体结构, 给出一个假定的水解机理 (见图 2): 准轮烷分子质子化的咪唑通过氢键静电作用于 DNA 分子的磷酸酯键的阴离子, 瓜环充当路易斯碱的角

Fig 2 Proposed DNA-cleavage mechanism for CB[6]/BMH [2] pseudorotaxane

色, 通过氢键活化水分子, 活化后的水分子进攻磷原子, 使得 DNA 得以切割.

参 考 文 献

- [1] WAN Rong(万荣), ZHAO Gang(赵刚), CHEN Jing(陈晶), *et al.* Chinese Science Bulletin(科学通报) [J], 2000, **45**(8): 785—798
- [2] WAN Rong(万荣), WANG Ning(王宁), ZHAO Yu-Fen(赵玉芬). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2001, **22**(4): 598—600
- [3] ZHONG Ru-Gang(钟儒刚), ZHAO Li-Jiao(赵丽娇), ZHAO Yu-Fen(赵玉芬). Acta Chimica Sinica(化学学报) [J], 2004, **62**(24): 2444—2446
- [4] Kim J., Jung I S., Kim S Y., *et al.* J. Am. Chem. Soc [J], 2000, **122**(3): 540—541
- [5] Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., *et al.* Angew Chem. Int Ed [J], 2005, **44**(31): 4844—4870
- [6] MOU Lan(牟兰), XUE Sai-Feng(薛赛凤), ZHU Qian-Jiang(祝黔江), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(10): 1835—1839
- [7] Isobe H., Sato S., Lee J. W., *et al.* Chem. Commun [J], 2005, (12): 1549—1551
- [8] LU Si-Min(刘思敏), WU Cheng-Tai(吴成泰). Progress in Chemistry(化学进展) [J], 2005, **17**(1): 143—150
- [9] Huo F. J., Yin C. X., Yang P. J. Incl. Phenom. Macro. [J], 2006, **56**: 193—196
- [10] Yang Q., Xu J. Q., Sun Y. S., *et al.* Biorg Med Chem. Lett [J], 2006, **16**: 803—806

Crystal Structure and DNA Cleavage of [2] Pseudorotaxane Composed of Cucurbit[6] uril

HUO Fang-Jun, YN Cai-Xia, YANG Pin*

(*Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*)

Abstract The [2] pseudorotaxane of cucurbit[6] uril (CB [6]) with guest molecule 1, 6-bis(imidazol-1-yl) hexane dihydrochloride (B MH-Cl) made pBR322 DNA hydrolyzed efficiently in physiological environment. The cleavage mechanism was proposed that was a cooperation process of the CB [6] molecule and the guest B MH molecule. In this mechanism, the protonated imidazole might bind DNA *via* the electrostatic interactions and the CB [6] glycoluril carbonyl oxygen atoms activated a water molecule to attack the phosphorus atom.

Keywords Cucurbituril; Pseudorotaxane; Crystal structure; DNA Cleavage

(Ed : H, J, Z)