

核酸酶催化磷酸二酯键水解断裂作用的配位化学模拟

高飞 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. * 联系人, E-mail: yangpin@sxu.edu.cn)

摘要 在生物体内发生着核酸的合成与降解, 涉及核酸上磷酸二酯键的生成与断裂. 磷酸二酯键的断裂模式有氧化性断裂和水解性断裂, 水解性断裂的产物有可能用连接酶再连接. 近年来, 磷酸二酯键水解断裂的配位化学模拟取得了很大进展. 在所发现的具有水解断裂核酸能力的金属配合物中, 有单核金属配合物, 也有双核金属配合物, 涉及的金属离子有过渡金属离子, 也有镧系金属离子, 但反应速率同天然酶相比仍差几个数量级. 用多核金属配合物来模拟核酸酶对磷酸二酯键的水解断裂应当是一个有前途的研究方向.

关键词 磷酸二酯键的断裂 DNA 的水解作用 DNA 断裂试剂 金属配合物

1 磷酸二酯键的稳定性及其断裂方式

核酸是长链形的多聚核苷酸, 分脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两大类, 其中DNA是生物遗传信息的载体, RNA是蛋白质合成过程中必不可少的物质. 在生物活体内, 根据生理活动的需求, 有时需要发生核酸的合成, 有时又需要发生降解, 这就涉及到核酸上磷酸二酯键的生成和断裂; 这些合成和降解均由相关的酶催化, 并受到严格调节. DNA中的磷酸二酯键极其稳定. 在25℃, pH 7.0的中性水溶液条件下, 其半衰期长达千亿年^[1], 比地球自身的年龄还要大. 欲使DNA中的磷酸二酯键在数分钟之内发生水解, 要求催化剂能够提供高达 10^{17} 数量级的速率增强因子^[2]. 磷酸二酯键的高度稳定性被认为是核酸作为遗传物质的重要原因之一^[3]. 天然核酸酶能加速磷酸二酯键水解速率 $10^{12} \sim 10^{17}$ 倍, 除了包含在DNA修复中的核酸酶, 这些核酸酶的催化性能均靠直接的亲核取代反应及转换构象来实现^[4]. 这一普遍原则对于核酸酶, 包括限制性内切酶和非特异性的核酸酶都成立.

除了生物体内固有的严格受控的磷酸二酯键的生成与断裂外, 某些天然存在的或人工合成的抗癌药物, 其作用过程中也涉及到DNA的断裂. DNA的主要断裂方式可分为氧化性断裂^[5-13]和水解性断裂^[14-50], 水解性断裂是生物体内降解核酸所采取的模式.

氧化性断裂常需要在体系中加入辅助试剂(如 H_2O_2 等)或用一定频率的光照射, 生成原子态氧或氢氧自由基等活性物种, 以氧化还原反应机理断裂核

酸. 烯二炔(Enediyne)类抗菌素以及它们的类似物, 如铁-博雷霉素和其他的金属配合物如 $Fe(II)$ -EDTA, 已被用来产生DNA的氧化性断裂. 一般来说, 这些体系通过产生自由基, 对核酸中戊糖环及其磷酸骨架进行脱氢氧化, 进一步引起磷酸二酯键断裂和碱基脱落. 它们的共同特点或代价之一是要破坏核酸链上的某些戊糖环乃至核苷酸, 结果使原有的信息部分丢失; 而且氧化性切割产生的片段通常不是黏性的. 换句话说, 这样的片段难以进行后续的连接操作. 另外, 氧化性断裂过程中首先需要生成活性氧物种(reactive oxygen species, ROS), 这些物种才是真正的反应启动者, 然而ROS具有明显的细胞毒性.

水解性断裂只将核酸链上某些磷酸二酯键发生水解性切割, 产生的断裂片段通常是黏性的. 然而, 磷酸二酯键固有的稳定性使之除了在核酸酶作用下才能发生有效断裂外, 要发生非酶催化的水解性断裂存在着极大的困难.

DNA水解断裂的结果大多是生成带有5'-磷酸基和3'-羟基的片段. 这是一个亲核取代过程, 涉及三种基团: (1) 活化亲核水分子的广义碱; (2) 稳定五价过渡态磷原子上负电荷的Lewis酸(通常为二价金属离子); (3) 促进3'-羟基离去的广义酸. DNA的水解断裂过程可简化为两步机理^[15,16](图1):

首先, 亲核物种氢氧根离子(由金属离子活化后的水分子离解产生)进攻磷原子, 形成一个五配位中间物, 这一步是可逆性的; 第二步, P—O键发生断裂(非酶催化水解中也要发生此键的断裂), 带有3'-OH的2'-脱氧核苷酸离去, 形成产物. 因此, 要使整个反应加快, 催化剂必须能够促进其中的速率限制步骤,

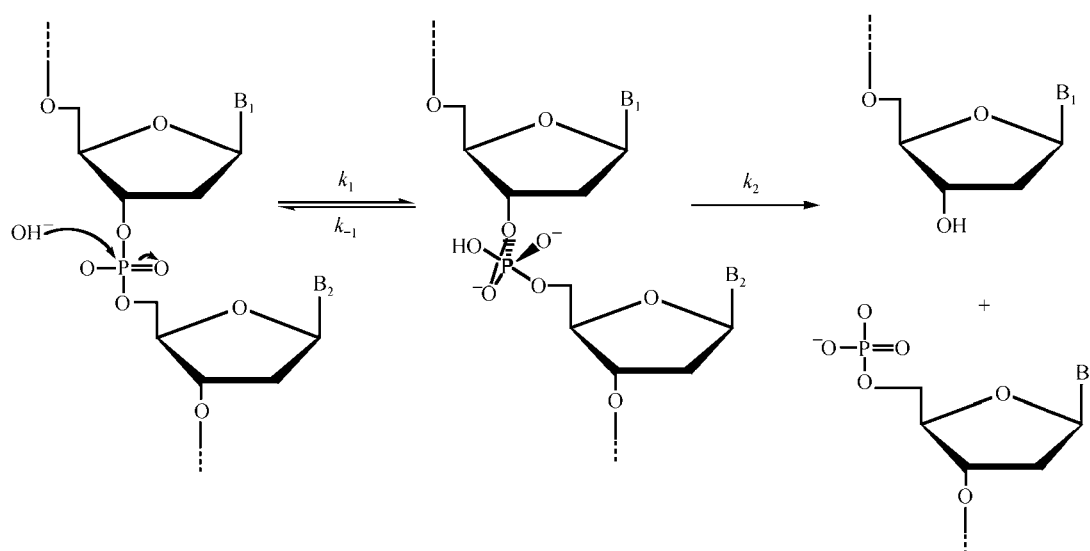


图1 简化的 DNA 水解断裂两步机理

即最慢的那一步. 研究发现^[15], 第二步反应, 即P—O键的断裂是速率限制步骤. 故可得整个反应的速率常数 k_{obs} 如下:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1}{k_{-1}} k_2. \quad (1)$$

由此可知, DNA 水解的加速可通过两个途径实现: (1) 增大 k_2 , 即加速第二步 P—O 键的断裂; (2) 增大 k_1/k_{-1} , 即加大五配位中间物的形成常数或稳定性(同初始状态相比较). 整个反应的活化能 $\Delta E^\ddagger$ 是五配位中间物与反应物初始状态的能量差 $\Delta E_1^\ddagger$ 和中间物再翻越第二个能垒到产物形成与五配位中间物本身的差 $\Delta E_2^\ddagger$ 两者的总和.

磷原子形成五配位中间物的观点已经获得了实验证实. 最近, Allen等人制备并测定了 β -葡糖磷酸变位酶(β -phosphoglucomutase, β -PGM)结合天然底物后的晶体结构(分辨率 1.2 Å), “看”到了该酶转换底物的过程^[17]. Allen等获得了关键性中间物. 晶体结构分析表明, 中间体上的磷原子采取五配位三角双锥几何构型(图2). 这是P原子在参与磷酸二酯键断裂与形成过程中须经过五配位中间体的确切证据. 在这个有Mg()参与、发生磷酸基转移反应的酶活性中心上, 磷原子采取三角双锥形的配位结构, 赤道面上的3个P—O键较短(均为 1.7 Å), 说明结合作用较强, 被假设为 sp^2 杂化, 其中有一个氧原子与Mg()离子直接配位; 轴向的2个P—O键较长(分别为 2.1 和 2.0 Å), 说明结合较弱, 被假设为直线形的 p_2d_{2^2} 杂化. RNA的

水解断裂机理有别于DNA的情况, 即RNA戊糖环上的2'-OH可以参与形成P原子结构的五配位中间物.

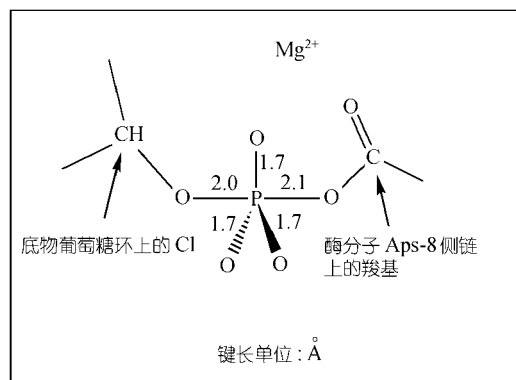


图2 磷酸二酯键断裂与形成过程中P原子要经过一个三角双锥构型的五配位中间体

研究发现, 移去金属酶中的金属离子会导致酶失活, 用其他金属离子取代酶中原有的金属离子也会引起酶的活性下降或失活. 这说明特定的金属离子对于金属酶正常发挥活性至关重要. 因此不难理解, 用金属配位化合物来尝试模拟磷酸酯酶的活性就成为生物无机化学重要的研究内容之一.

2 核酸水解性断裂的配位化学模拟

人工合成具有水解断裂DNA性质的配位化合物的最早报道见诸于1987年^[34]. Barton等合成了一个大环多臂式Ru()配合物($\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{Macro}^{n+}$)(DIP = di-

phenyl-1,10-phenanthroline, Macro = 4,7-[(NH₂CH₂CH₂)₂NCH₂CH₂NHSO₂C₆H₄]-1,10-phenanthroline), 配位中心的结构与 Co(DIP)₃() 的类似, 并包含两个多胺臂. 在金属离子 Cu()、Co()、Zn()、Cd()、Pb() 等存在下, 配合物可以断裂质粒 DNA pBR322, 作用方式与酶切反应类似. 所涉金属离子的切割有效性顺序为: Cu() > Co() > Zn() ≈ Cd() ≈ Pb(). 对照试验表明, Ru(DIP)₂Macroⁿ⁺ 能够将高浓度的金属离子带到 DNA 双螺旋周围, 以便亲核进攻 DNA 的磷酸二酯键. Barton 等人的体系效率不高, 断裂产物可被连接的约 40%, 但却是用金属配合物模拟核酸酶使磷酸二酯键发生水解断裂的先驱工作.

1994 年, Que 等人^[36]用 Fe₂(HPTB) (OH)(NO₃)₄ (HPTB = N,N,N',N'-tetrakis (2-benzimidazoly(methyl)-2-hydroxy-1,3-diaminopropane), 在 H₂O₂ 或 O₂ 加还原剂二硫苏糖醇(DTT)或抗坏血酸存在下, 实现了对质粒 DNA pBR322 的“水解性”断裂. 反应条件虽然与典型含铁配合物氧化降解 DNA 的条件类似, 但发现切割产物符合水解性断裂, 因为断裂产物经 T4 DNA 连接酶连接后, 与由内切酶切割后再经 T4 DNA 连接酶连接所得结果完全相同. 并且, 连接后的两种 pBR322 转化到大肠杆菌 JM109 菌株进行表达的结果也相同. 这说明, 利用人工合成试剂模拟核酸酶对 DNA 进行水解切割是完全可能的. Que 等人的工作是化学核酸酶成功所在的一个突出例子.

20 世纪 90 年代, 人们发现镧系离子及其配合物具有催化核酸水解的作用^[20,37,38,40-52], 研究体系包括核苷酸二聚体、寡聚核苷酸及超螺旋质粒 DNA 等.

1994 年, Chin 等^[41]发现 Ce() 能使脱氧核苷酸二聚体 dApdA 发生断裂. 引人注目的是, 在通常采用 Ce() 的反应中, 需要 O₂ 才能使核苷酸二聚体断裂; 而 Ce() 却不需 O₂, 并且得到的产物属于水解产物而非氧化产物, 说明 Ce() 可作为活性物种, 催化核酸磷酸二酯键发生水解. Schneider 等人^[49]发现 Eu() 盐也能有效地切割双链质粒 DNA 及核苷酸二聚体, 在 [Eu()] = 5 mmol/L 条件下, 二聚体水解速率促进因子高达 10⁷.

镧系离子催化核酸水解的作用也受到我国化学家的关注. 倪嘉缙等^[50,51]用 ¹H NMR, ³¹P NMR, HPLC 等方法研究了镧系离子对多种单核苷酸(3'-AMP, 3'-GMP, 5'-AMP, 5'-GMP, 3'5'-cAMP 以及 3'5'-dcAMP) 的水解断裂作用, 发现镧系元素对 3'-核苷酸的断裂作用远大于 5'-核苷酸. 沈鹤柏等利用电泳及 Raman 光谱研究了 Ce() 离子水解断裂含 26 个碱基的单链寡聚脱氧核苷酸(Oligers DNA) 的行为^[52], 发现对 Ce() 离子在酸性、碱性条件下均可切断 Oligers DNA, 在近中性时切断能力最强; 而 Ce() 离子则需要有氧气存在, 生成 Ce() 离子才能产生切割作用.

最近, Komiyama 研究组对 Ce() 作用机理进行了研究, 得出双金属-氢氧配离子物种 [Ce()₂ (OH)₄]⁴⁺ 是水解切割 DNA 的活性物种, 并提出如下机理^[16] (图 3).

两个 Ce() 与磷酸基配位, 使 P 原子的电正性增大, 并且 Ce() 的 4f 轨道与磷酸基的有关轨道形成新的杂化轨道, 使 P 更易接受与 Ce() 配位的 OH⁻ 的亲核进攻而形成五配位中间体. 与 Ce() 配位的

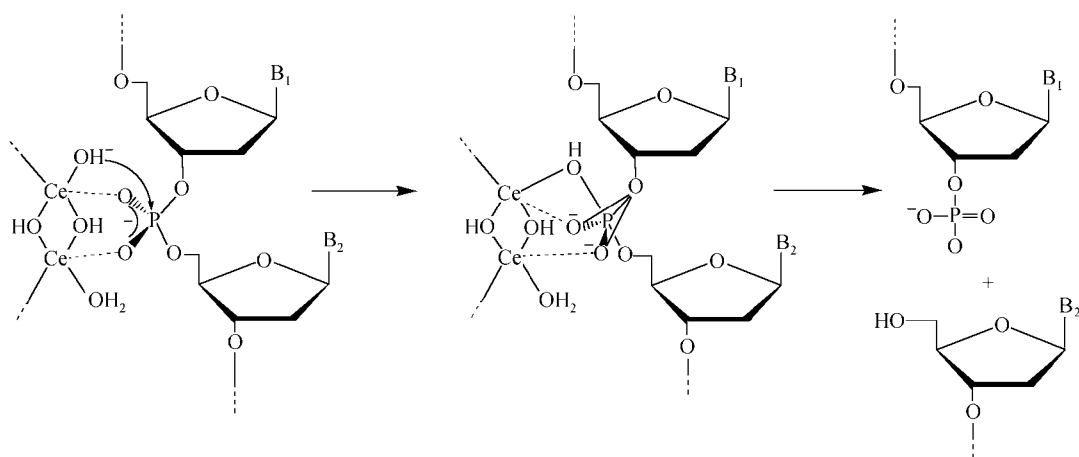


图 3 Komiyama 等人提出的 Ce() 水解断裂 DNA 的机理

水发生解离并起催化作用, 进一步促使 P-O(5')键或 P'-O(3')键发生断裂。

RNA 的断裂机理有别于 DNA 的情况. RNA 的戊糖环 2'-OH 参与形成 P 原子组构的五配位中间物(图 4). 在镧系离子中, Tm(), Yb(), Lu()对 RNA 水解的效果最佳, 但活性中间物却类似, 即 $[\text{Ln}(\text{OH})_4]^{4+}$ 是水解切割 RNA 的活性物种。

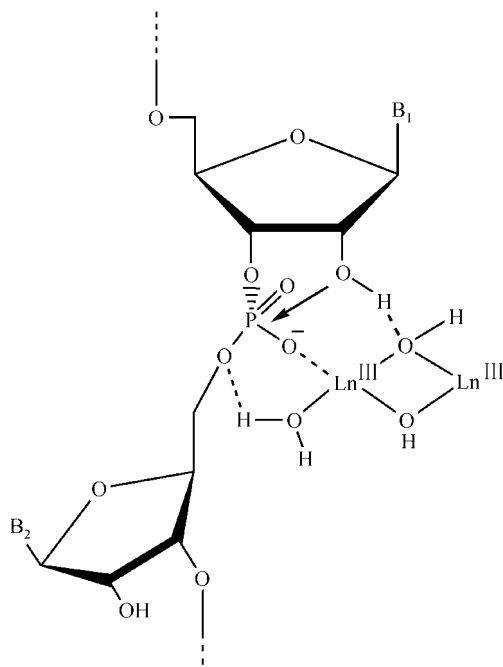


图4 重镧系离子 Tm(), Yb(), Lu()水解断裂 RNA 的机理

Komiyama 等强调, 在镧系催化过程中, 无论是 DNA 还是 RNA 水解都包含着酸催化(由金属离子和/或结合金属的水)和碱催化(金属结合羟基)的协同作用。

另有报道表明, 铜系元素 Th()的大环配合物^[53]以及铀酰离子 UO_2^{2+} ^[54]也具有催化断裂磷酸二酯键的作用。

镧系金属离子配合物作为核酸断裂剂的缺点在于这些金属本身不是生命元素, 这样的体系应该具有相当大的细胞毒性, 难于用于体内。但这类体系往往活性很大, 用于活体外是可行的。

许多过渡金属离子配合物能使磷酸二酯键发生水解断裂^[18-20,44,55-76], 所涉及的金属离子包括: Cu()^[23-33,55-57], Zn()^[18,19,58,59,76], Fe()-Fe()^[36,60], Co()^[61,62,74,75], Ni()^[63,64], Zn()-Fe()^[65,66], Zr()^[67,68], V()^[69]等。Burstyn 研究室^[55,56]的结果表

明, Cu()的胺类配合物能够水解切割单、双链 DNA、RNA 以及含有磷酸二酯键的模型化合物(最常用的模型化合物有: 双-(对硝基苯基)磷酸盐 BNPP 和双-(2,4-二硝基苯基)磷酸盐 BDNPP), 但速率低于镧系配合物。Fujii 等人^[57]报道的研究体系速率令人瞩目, 他们选用铜的顺-1,3,5-环己三氨配合物对噬菌体 DNA 进行了有效的切割, 在 pH 8.1, 35 °C 下, 速率常数高达 $4.35 \pm 0.77 \text{ h}^{-1}$, 速率增长因子达 10^8 。近来有人等报道 Zr()盐 (ZrCl_4)^[65,66]和 Zr()的配合物^[67,68]能够水解断裂磷酸二酯键。在 pH 7.0, 37 °C 下水解脱氧核糖核苷酸二聚体 dTpdT 的反应速率可与 Ce()相比, 为 $(1.32 \pm 0.2) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ^[67,68]。

近年来, 杨频课题组致力于磷酸二酯键水解断裂的配位化学模拟, 陆续发现一些具有水解 DNA 或磷酸二酯键模型化合物的体系^[23-30]。我们发现, Cu()-L-组氨酸配合物能够有效地水解 DNA^[23], 合成的 Cu()-L-His 配合物在生理 pH 及 37 °C 条件下, 可以有效切割双链质粒 DNA 和单链核苷酸二聚体 dApdA。通过采用在体系中加入自由基捕捉剂、无氧充氮实验及酶连接等手段, 发现切割反应符合水解途径, 水解切割的准一级动力学反应速率常数在 37 °C 下为 0.76 h^{-1} (对超螺旋构型而言), 反应速率加速了 10^8 倍。用放射性 ^{32}P 同位素标记, 核酸测序中启动子延伸方法对 Cu()-L-His 切割 DNA 的位置确定表明, Cu()-L-His 配合物对 DNA 切割具有一定的序列选择性(优先选择 5'-GT-3')^[23]。值得注意的是, 组氨酸与金属离子 (Cu(), Ni(), Zn()) 等的反应已经被用于蛋白质的纯化、连接, 标记蛋白到类脂双层等生化反应。

国内外许多研究组试图寻找能水解切割 DNA 的小分子, 而已发现的这些试剂的大部分中, 要么几乎无效, 要么是靠含有毒性元素来帮助活化水分子来推动水解反应。因而发展可以水解切割 DNA 的镁配合物在这个领域是一项有意义的工作。我们还首先发现, 二乙基三胺-镁()配合物 (Mg-dien) 具有很好的引发双链 DNA 的水解断裂的活性^[39]。这一体系不仅可以在准生理条件下水解切割双链 DNA, 也可以切割二核苷酸 dApdA, 甚至可以有效地水解切割单核苷酸 5'-dAMP 和 3'-dAMP。将二核苷酸 dApdA 的水解切割产物用 HPLC 系统进行检测, 发现产物是 dA 和 5'-dAMP, 而无其他副产物。用电喷雾离子质谱法 (ESI-MS) 得出反应的活性物种为 $[\text{Mg}(\text{dien})(\text{OH})]^+$ 。镁

是最重要的生命金属之一。虽然镁出现于诸多核酸酶的活性中心,但用镁的简单配位化合物模拟核酸酶水解断裂DNA的迄今尚无报道。我们的工作对于寻找用s-区生命金属为基础的人工核酸酶做出了有益的探索。

鉴于天然核酸酶分子的活性中心多为双核金属或三核金属(通常是Mg(), Ca()及一些过渡金属离子)的配位结构,人们对双核金属配合物模拟酶水解切割核酸格外关注。Sissi等^[58]合成了侧链上含有三氮杂环的七肽-双锌金属配合物,作为人工核酸酶试剂并考察了其生物学活性。将质粒DNA pBR322(按碱基对计算浓度为 12 $\mu\text{mol/L}$)在 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 的 20 $\mu\text{mol/L}$ HEPES缓冲溶液中同合成的锌双核配合物一起温育 24 h, 质粒DNA pBR322 由超螺旋的型转变为缺刻状的(nicked)型和线状的型。发现活性与双核配合物的浓度有关,但在金属配合物的浓度降至 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时仍具活性。在 12 $\mu\text{mol/L}$ (bp) pBR322, 3.6 $\mu\text{mol/L}$ 双锌金属配合物条件下,测得速率常数为 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。同DNA的非酶催化水解反应相比,反应速率增大了一千万倍。这说明,利用天然核酸酶中最常见的锌离子和多肽来形成配合物是提高人工核酸酶活性的有效手段。Zn²⁺是一个软硬度适中的Lewis酸,而多肽可以较好地模拟蛋白质分子在调整构象时发挥刚柔相济、动静结合的特点,从而可获得较大的生物学活性。

Yamaguchi等人^[63]以N,N,N',N'-tetrakis(6-methyl-2-pyridyl)methyl-1,3-diaminopropane-2-ol为配体,制备了具有OH桥和COO桥结构的双核镍配合物[Ni₂(Me₄-tpdp)(MeCO₂)(H₂O)](ClO₄)₂,作为镍取代的磷酸二酯酶模型化合物,发现比相应的Cu₂(), Zn₂()配合物(浓度为 2.0 mmol/L)具有更大的促使磷酸二酯键(用模型化合物 BNPP)发生水解的催化活性。

Schneider等^[77]发现,Pr(), Eu()等与含氮大环配体的双核配合物可使pBR322质粒DNA发生单股水解断裂的速度增快 10⁷倍。Komiyama等人^[46]研究了Ce()和La()对质粒DNA的水解作用,发现对二核苷酸,Ce(IV)的水解能力远大于La();而对质粒DNA的水解,Ce()又不及La()有效。Que等人^[22]合成了一种双铈化合物Ce₂(HXTA)(HXTA = 5-methyl-2-hydroxy-1,3-xylene- α,α -diamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid),能在 pH 8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水解DNA,并具有一定的DNA片段区域选择性。

Chin等合成了一些羟基和磷酸二酯或磷酸单酯桥连的双核Co()配合物,来模拟某些磷酸酶的“双金属钻石核”活性部位,使磷酸二酯键水解断裂的速度比非配位的磷酸二酯大约快 10¹¹倍^[74,75]。磷酸单酯类似物的¹⁸O标记和pH-速率曲线表明,桥连羟基对磷的分子内亲核进攻引起酯键的断裂。Komiyama等用一个双核Zn()配合物DNA寡聚体相连对RNA进行了定位切割^[76]。

利用三核金属甚至四核金属配合物模拟核酸酶的功能也有报道^[32,72,73]。

自然界中存在的某些抗肿瘤物质如博雷霉素分子中含有糖单位,有的则含有氨基酸残基。Myers等人^[78]的研究表明,新制癌菌素(neocarzinostatin)中的糖残基有助于DNA的有效断裂和增加速率,可能与糖残基协助识别核酸有关。这启发Cowan等人^[31]设计了铜-氨基糖作为DNA切割试剂,发现这类化学核酸酶无需其他试剂的协助就能够有效地对质粒DNA进行水解性断裂,生成的产物带有 5'-磷酸基和 3'-羟基。图5是Cowan等人设计并合成的新霉素(neamine)和卡那霉素A(kanamycin A)作为配体的Cu()配合物的结构,分子中带有邻位-羟基氨基的糖残基。

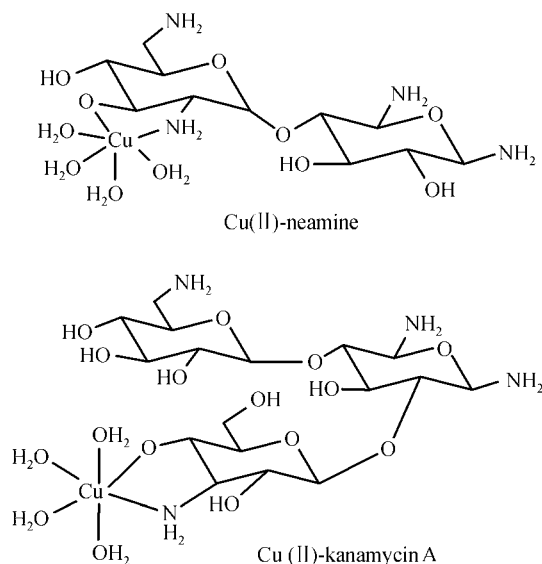


图5 Cowan等人^[31]合成的新霉素(neamine)和卡那霉素A(kanamycin A)

Franklin等人考虑到,DNA结合蛋白中与DNA产生结合作用的部分往往是含有螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)基序的一个超二级结构,钙结合蛋白中的EF手与Ca()离子形成配位结构,而铜

系离子具有断裂核酸的活性并且与钙离子的化学性质十分相似。若将三者有效组合,则可望制备出具有序列识别能力的DNA断裂体系 $\text{Ln}(\text{---})\text{-HTH/EF}$ 。按此思路,他们制备了含有HTH/EF超二级结构的两个多肽P3和P3W^[79],在37℃, pH 6.9, pH 8.0, 50 mmol/L Tris-硼酸缓冲溶液中,将 $\text{Eu}(\text{---})$ 或 $\text{Ce}(\text{---})$ 离子与P3, P3W按1:1混合,对质粒DNA pUC19 试样温育24 h后,使质粒DNA发生了序列选择性水解切割断裂。这样的化学核酸酶体系无论从组成结构上,还是从作用模式上都和天然核酸酶十分类似,惟活性方面尚显逊色。

近年来迅速发展的组合化学方法使短时间内同时合成大量相关化合物并测试它们是否具有水解磷酸二酯键活性成为可能。Janda等人^[80]用组合化学方法合成并考察了携有不同取代基的含氮冠醚与各种镧系离子生成的配合物(图6)对模型化合物双-(对-硝基苯基)磷酸酯(BNPP)、对-硝基苯基-2-羟基丙基磷酸酯及双链DNA的水解活性,发现 β -萘取代含氮冠醚的 $\text{Gd}(\text{---})$ 配合物水解双链DNA的活性最大。采用组合化学中的固相混合裂分合成法(split-mix synthesis), Berkessel和Herault^[81]制备了含625种十一肽的配体库,并筛选出在 $\text{Zr}(\text{---})$ 存在下能够水解磷酸酯的多肽配体,活性多肽的N-端均为丝氨酸,与10-组氨酸一起参与同金属离子的配位。

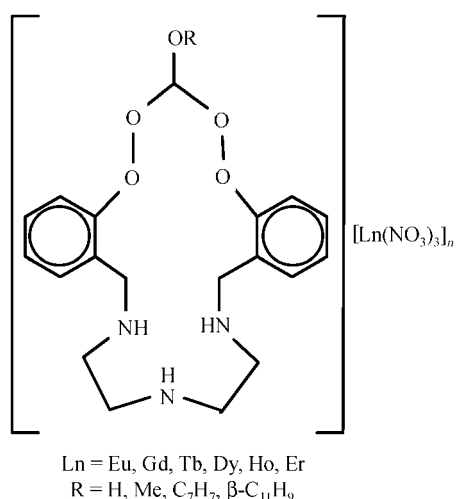


图6 Janda等人合成的含氮冠醚-镧系离子配合物^[80]

组合化学技术使化学家的合成制备能力空前提高,同时也带来了如何对这些化合物进行高效筛选的挑战。但可以肯定,组合化学技术在人们发展水解

性断裂核酸试剂这一领域中将获得很大应用与发展。

3 双核金属配合物的核酸酶活性^[2]

天然核酸酶分子中常含有桥联的双金属或三金属配位结构充当活性中心,并为酶发挥活性所必需。例如,催化磷酸单酯水解作用的紫酸性磷酸酯酶(PAP,在pH 4.9~6.0时活性最大)分子中含 $\text{Fe}(\text{---})$, $\text{Fe}(\text{---})$ 或 $\text{Fe}(\text{---})$, $\text{Zn}(\text{---})$ 活性位点^[82],碱性磷酸酯酶(AKP, pH~8时活性最大)分子中含有2个 $\text{Zn}(\text{---})$ 及1个 $\text{Mg}(\text{---})$ ^[82],而催化双链DNA磷酸二酯骨架发生选择性水解断裂的DNA内切酶EcoR及EcoRV需要有2个 $\text{Mg}(\text{---})$ (或 $\text{Mn}(\text{---})$)离子并与酶形成配位结构,作为活性位点^[82,83]。又如,催化环核苷酸发生水解断裂的磷酸二酯酶(PDE4B2B)的X射线衍射晶体结构表明^[84],其活性中心含有双桥联的双金属核Me1, Me2,其中Me1是 $\text{Zn}(\text{---})$,而Me2可以是 $\text{Mg}(\text{---})$, $\text{Mn}(\text{---})$ 或 $\text{Zn}(\text{---})$ 。Me1是五配位的,参加配位的原子有来自蛋白质上Asp-392(2.2 Å)的羧基O_δ, His-238(2.0 Å)及His-274(2.1 Å)的咪唑N_ε,另外Asp-275的羧基通过两个氧原子分别与Me1和Me2配位,充当桥联配体;另一个桥联配体则由H₂O或OH⁻充当,Zhan等人的理论计算表明后一种情况更为合理^[85]。Me2为六配位,除了两个桥联配体,其余4个均为水分子。Me1和Me2相距3.9 Å。

双金属中心可以发挥协调相关的生理化学性质,特别是当两个金属离子通过桥联配体(如氢氧基或水分子)进行配位时更为有效。假如不是桥联,或通过一个较大的多原子桥联基团(如羧基或咪唑基桥联)进行桥联,或者是两个金属原子相距很大时,它们之间协调相关性便受到限制,这时两个金属离子在酶中分别发挥不同的功能,或者在酶催化过程的不同步骤中起作用。双核金属中心具有如下优点^[86]:(1)有利于电荷的离域化;(2)由于电荷离域化而使反应的活化能变小;(3)有利于结合较大的底物分子;(4)有利于底物分子的静电活化或水分子的电离;(5)减小反应过渡态的能量。据估计,双核静电效应可使水分子质子解离作用的pK_a值至少下降3~4单位。这些特征使双核金属酶适合于促进某些特殊反应的进行。双金属中心协作功能促进以下过程:(1)底物的活化,(2)水分子的电离,(3)过渡态的稳定化,(4)底物的识别与选择。

金属酶及其模型化合物研究中最主要的问题是阐明酶的催化机理,认识金属离子在其中所起的作

用.金属离子在促进磷酸酯发生水解过程中所起的作用可归结为直接活化作用和间接活化作用,前者占主导地位^[87].直接活化作用发生于金属离子的内配位球或称第一配位球;包括:(1) Lewis酸活化作用(图 7 中的 1, 涉及磷酸基上的氧向金属配位);(2) 亲核体活化作用(2, 涉及亲核体如氢氧根向金属配位);(3) 离去基团活化作用(3, 涉及离去基团上的氧原子向金属配位).

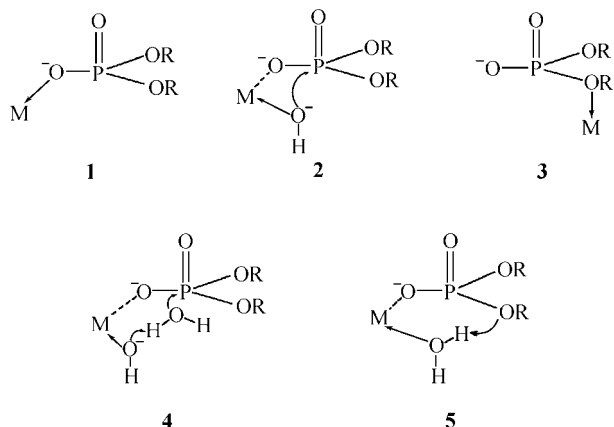


图 7 磷酸酯发生水解过程中的直接活化作用(1, 2, 3)和间接活化作用(4, 5)

同时,金属离子还可以影响发生于外配位球的间接活化作用,包括:(1) 配位于金属离子的氢氧根同金属一起充当分子内广义碱催化剂(4);(2) 配位于金属离子的水分子充当分子内广义酸催化剂(5);另外,未参与配位的磷酸酯部分和金属离子之间的静电相互作用也会在某种程度上促进水解反应.以下重点讨论直接活化作用.

(1) Lewis酸活化作用. 研究表明^[82],酶催化磷酸酯发生水解时,磷酸基首先以桥联方式同磷酸酯酶(如EcoR 核酸内切酶,哺乳动物蛋白质磷酸酶,果糖-1,6-二磷酸酯酶)中的双金属活性中心发生结合.原则上,双核金属配合物可以通过其上的两个金属中心与磷酸基上的氧原子桥连(图 8, 6),从而为水解磷酸酯提供双重Lewis酸活化作用.然而要对双重Lewis酸活化作用进行定量描述相当困难,因为水解反应可以按不同的机理进行,如单Lewis活化/金属氢氧化物活化(7)或单Lewis活化/离去基团活化(8).但由于这三种取代活性的金属配合物在发生水解作用之前即处于快速平衡之中,结果使得机理 6, 7, 8 在动力学上不可区分.

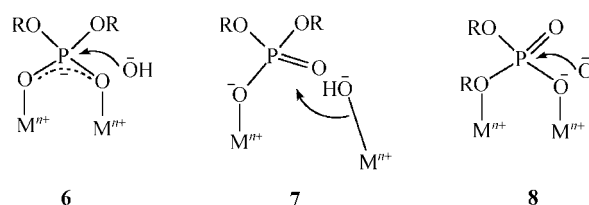


图 8 Lewis 酸活化作用

Chin等人对模型化合物中出现的磷酸二酯键断裂过程中双重Lewis酸活化作用作了定量分析.他们取含有两个取代惰性的Co()中心的磷酸二酯模型物 9a(图 9)所经历的反应为研究对象^[2],测得在 25 下 9a的氢氧根催化酯基转移反应的二级速率常数为 $430 \pm 20 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$;而相比之下,溶液中游离二酯由氢氧根催化的酯基转移反应二级速率常数为 $9.8 \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[87].由此可知,模型化合物中的双重Lewis酸活化作用使磷酸二酯的断裂加速了 4×10^5 倍,而且与离去基团的碱度无关.

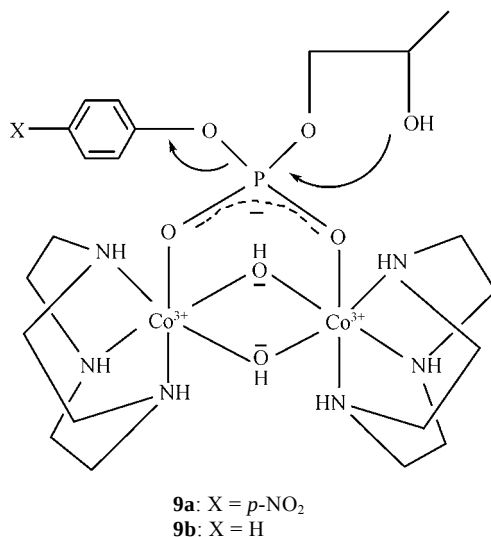


图 9 Co()中心取代惰性的磷酸二酯模型物^[87]

Sargeson研究组对Co()中心单Lewis酸活化作用促进磷酸三酯水解断裂研究结果表明,速率常数增大约 400 倍^[88],还得出Co()中心的单Lewis酸活化作用对配位状态下的磷酸二酯的水解反应加速 50 倍^[89].对照可知,促进体系 9 发生水解的双重Lewis酸活化作用的速率增大是促进磷酸三酯水解反应的单Lewis酸活化作用速率增大倍数的平方(400^2)倍数,而与单Lewis酸活化作用引起磷酸二酯的水解加速相比,速率增大因子比平方倍数(50^2)还要大.由此可见,

双金属中心在发挥双重Lewis酸活化作用,引起磷酸二酯发生酯交换过程中具有相当大的协作性.这种增速作用的产生在一定程度上起因于O—P—O键角中存在的张力,因为晶体结构数据表明,该键角(117.4°)比正四面体结构中的角度(109.5°)明显地大,更接近于过渡状态所要求的三角双锥构型的角度.双核Co(Ⅲ)配合物 **9** 中不仅产生了明显的速率加强,而且两个金属离子在向磷酸基的配位过程中也表现出很大的协作性.

Co(Ⅲ)配合物对于不同类型的活化作用进行定量化处理很有用,因为它们是取代惰性的,但通常难于获得转换数(turnover number).

双重 Lewis 酸活化作用对于断裂 RNA 和 DNA 所能提供的速率增强在数量级上大致相同.但不应忘记,断裂 DNA 所需要的速率增强幅度比断裂 RNA 要高 9 个数量级.

(2) 亲核活化作用. 金属羟化物及金属醇盐或酚盐可以在断裂磷酸酯和胺类化合物中充当亲核试剂,如在氨肽酶和磷酸酯酶中,羟基向两个金属离子的配位就起这种亲核体作用. Co(Ⅲ)配合物特有的慢速配体交换性质,使之不仅可用于定量处理Lewis酸活化作用,而且在研究反应机理细节时也成为理想的体系. Chin等人^[75]利用 ¹⁸O同位素标记方法证明:在如下一类化合物 **10**(图 10)中,桥式羟基在水解桥联配位的磷酸二酯中可作为非常有效的亲核催化剂^[76]. 羟基同一个金属离子配位可望比同两个金属离子配位更具亲核性,但在另一方面,第二个金属离

子的配位可降低桥式羟基的pK_a值,使其上的质子解离而产生额外的亲核作用. 综合而言,双重Lewis酸活化作用,再加上产生桥式氧带来的活化作用,总共可以使模型物 **10b**中磷酸二酯键的水解作用增速约 11 个数量级^[2,75]. 然而更详细的机理研究表明,要使上述活化作用引起磷酸二酯键水解速率的明显增强,要求底物含有好的离去基团. 倘若离去基团很差,速率增强幅度仍然很小.

对三类亲核体,即金属桥联氧化物、金属羟化物和金属醇(酚)盐进行研究后发现,对于携有差的离去基团的底物,要求含有可脱去质子的亲核体(如金属羟化物,而不是金属醇(酚)盐或金属桥联氧化物). 对于差的离去基团从底物上的解离(这正是 DNA 水解作用遇到的情况,其中无离去基团的活化作用)要求伴随着金属羟化物发生脱质子作用,这种作用可能与离去基团氧的质子化作用相偶联.

亲核活化作用对 DNA 的水解很重要,但对 RNA 水解则不甚重要,因为 RNA 上特有的 2'-OH 能为促进离去基团被取代提供大约 9 个数量级的速率增强作用. 因此不难得出,对于 DNA 情况,要想设计一个携带有极其高效亲核体的催化剂,使其作用能够与 RNA 上 2'-OH 所能提供的速率增强作用相匹敌是十分困难的.

(3) 离去基团的活化. 磷酸酯上离去基团的氧直接与金属离子发生配位相当困难,但还是可以对磷酸酯的水解发挥增速作用. 磷酸二酯水解速率对离去基团上醇的pK_a值颇为敏感. 当水或醇与金属离子发生配位时,pK_a值最多可能下降 10 个单位^[2],如在Co(Ⅲ), Cu(Ⅱ), Ln(Ⅲ)情况下,离去基团活化作用对速率增加幅度可望达 6 个数量级,这还是未考虑空间效应和静电效应时的贡献^[2]. 在碱性磷酸酯酶(AKP)催化的磷酸单酯水解中,离去基团上的氧原子与活性中心上的Mg(Ⅱ)离子发生配位.

(4) 不同类型活化作用的累积性. 假设上述几种活化作用具有累积性,就可以对它们促进磷酸酯键水解作用所贡献的速率常数的对数值,即引起速率常数增大的数量级做出估计:其中Lewis酸活化作用(1)约贡献 10²,亲核活化作用(2)10⁸,离去基团活化作用(3)10⁶,三者共计 16 个数量级^[2]. 这样一来,就有可能使 25 °C、中性水溶液条件下DNA中磷酸二酯水解反应的半衰期缩短到几十分钟. 但上述几种活化作用的加和性在有些情况下成立,而在另一些情

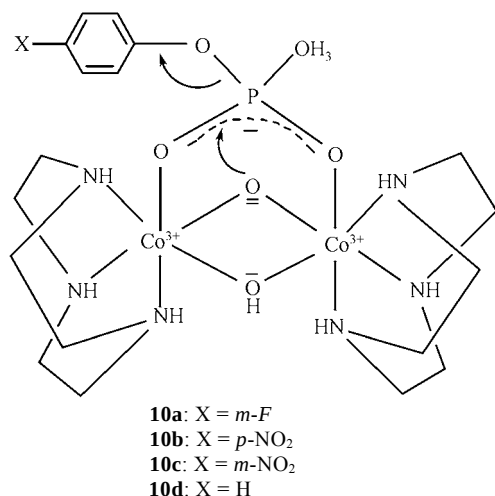


图 10 在亲核活化作用中,桥式羟基在水解桥联配位的磷酸二酯中作为有效的亲核催化剂

况下又不成立。前面提到,金属酚(醇)盐及金属桥联氧(化物)可以对携有好的离去基团的磷酸酯水解发挥很大的速率增强,而对于携有差离去基团的磷酸酯则否。金属对差离去基团上氧原子的配位作用会使离去基团的碱性降低,使亲核体的反应活性提高。

上述研究是对金属离子在较简单的模型化合物水解过程中所发挥的作用进行剖析的,有助于人们对金属离子在磷酸二酯酶中所起的作用做出分析,并对它们在速率加强中的贡献做出估计。

关于金属促进的RNA或RNA模型物的水解机理,包括用取代惰性的双核 $\text{Co}(\text{II})$,取代活性的双核 $\text{Cu}(\text{II})$ 及 $\text{Ln}(\text{III})$ 配合物,似乎都具有相关的统一机理。对于RNA,仅双重Lewis酸活化作用就足以使之快速水解;对于DNA,除双重Lewis酸活化外,还需要亲核体活化和离去基团活化,才能使其有效水解。

综上所述,要使DNA在十几分钟内发生水解,需要大幅度($\sim 10^{17}$)的速率增强。对于水解磷酸二酯,金属离子能够提供三种活化作用,即Lewis酸活化作用,分子内亲核活化作用和离去基团活化作用,累计三者可望使水解速率常数增大16个量级。

4 水解性断裂模式的确定

一种核酸断裂试剂是以水解断裂模式起作用,还是以氧化断裂模式起作用,需要得到实验上的证实。通常可按两类方法进行确定:一类是分析反应产物,另一类是加入自由基消除剂。假如反应按水解模式进行,则由于核酸链上仅发生了磷酸二酯键的切断,组成原来核酸的诸核苷酸未遭到破坏,水解断裂部位生成相应的3'-OH和5'-OPO₃末端,并分属于两个片断,通常还是黏性的,有可能用核酸连接酶进行连接;在实践中,常采用T4 DNA连接酶进行操作,将已被断裂的DNA片段用DNA连接酶连接,然后将连接产物分离进行电泳分析;或者更进一步,将连接了的DNA用电穿孔(electroporation,利用强电流将外源DNA引入细胞的基因转移技术)方法重新植入细菌体内并进行表达。假如原来的断裂不是水解性的,那么连接就不能成功,更谈不上进行正确的表达。因此,切割产物能够被连接酶重新连接是标志水解性切割最强有力的证据。另一方面,假如断裂是按氧化还原机理发生的,则在严格消除氧化还原活性物种的条件下,反应应该受到阻碍而不能进行,或者说不再具有切割作用。例如,Que等人在验证 $\text{Fe}_2(\text{HPTB})\cdot(\text{OH})(\text{NO}_3)_4$ 对质粒DNA pBR322的断裂产物是否符

合水解模式时^[36],将断裂产物用T4 DNA连接酶连接,发现与经内切酶切割后再用T4 DNA连接酶连接所得结果相同。杨频等在确认合成的铜(II)-L-组氨酸DNA断裂体系中,也进行了基因工程中的连接实验^[23]。鉴于限制性内切酶断裂的多具有3'-OH和5'-OPO₃末端,利用T4噬菌体DNA连接酶能够使断裂产物重新连接形成磷酸二酯键,将 $\text{Cu}(\text{II})$ -L-His断裂切割的线形DNA纯化,再用T4DNA连接酶连接。

Komiyama等^[46]利用高压液相色谱分析反应产物来确认水解切割方式。他们在研究连接有15-mer DNA的 $\text{Lu}(\text{III})$ 亚胺二乙酸配合物(15-mer DNA-IDA)切割RNA过程中,用反相高压液相分离手段发现,在1:1的 LuCl_3 和浓度为10 mmol/dm⁻³的亚胺二乙酸的混合物中培育腺(嘌呤核)苷酰(基)(3'-5')(嘌呤核)苷时,仅有腺苷和它的2'-和3'-磷酸酯形成。产物中既没有腺嘌呤,也没有其他的氧化性切割模式中应当释放的副产品,从而证实发生了RNA的水解型切割。实验还发现,可充当金属中介反应的助催化剂二硫苏糖醇对水解39-mer RNA几乎不发生影响。更进一步,采用冷冻-抽空-融化循环法(Freeze-pump-thaw cycle)彻底去除分子氧,水解作用非但没有阻断,反而更加有效。

Fujii等人^[57]利用无氧充氮实验来表征水解性断裂反应。在进行 $\text{cis-cis-1,3,5-triaminocyclohexane-Cu}(\text{II})$ 配合物对DNA的切割(pH 8.1, $t = 35^\circ\text{C}$)实验中,为了验证配合物对噬菌体DNA断裂的水解机理,在充氮手套箱中进行了严格的无氧反应,发现在有氧和无氧条件下,在琼脂糖凝胶电泳误差范围内,切割效率几乎不变。换句话说,切割过程不依赖于O₂的存在,即不按照氧化还原机理进行。

核磁共振方法也能用于表征磷酸二酯键的水解断裂反应。在探讨Mg-dien体系水解切割双链DNA活性时,我们用¹H, ³¹P{¹H} NMR手段分析5'-dAMP的切割产物。随着时间的推移,底物的信号逐渐减小,最后消失;而产物的信号则从无到有并逐渐增大,从而得知水解断裂的确发生^[39]。

我们还建议了可能的反应机理。在Mg-dien配合物断裂二核苷酸dApdA反应中,金属镁同时起Lewis酸活化作用和促进产物离去作用。与金属Mg(II)离子发生配位结合的水分子的pK_a值下降并发生解离,生成的氢氧根或高度极化趋于解离的H₂O分子进攻P原子并形成了五配位过渡态中间体(图11),

此中间体结构由受生成的氢键所稳定, 碱基起定位作用. 分子力学模拟给出了磷原子五配位中间体的能量变化情况(图 12), 对于底物 5'-dAMP 来说, 中间体中有 4 个氢键生成, 而如果 3'-dAMP 为底物则仅有 2 个氢键生成. 在整个水解反应过程中, Mg^{2+} 离子起 Lewis 酸活化作用, 组构形成并稳定过渡态中间体, 促进水解产物 3'-氧片断的离去. 类似的机理可能也适用于催化 DNA 发生水解性断裂过程, 其中活性物种 Mg -dien 配合物一定是参与了与 DNA 一起形成具有较大反应活性的构象.

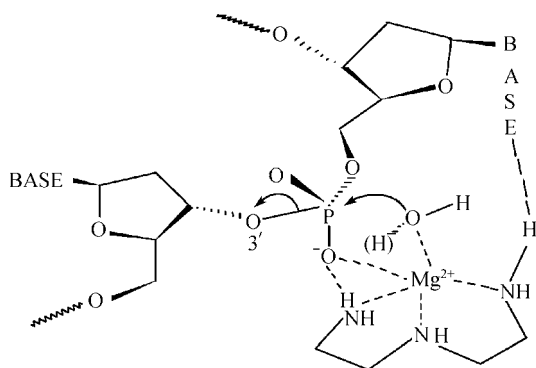


图 11 活性物种 $[Mg(dien)(OH)]^+$ 促进底物二核苷酸 dApdA 及 DNA 水解断裂的可能机理

向反应体系中加入自由基清除剂也是排除氧化性切割模式的一种方法. Que 等人^[36]在研究 $Fe_2(HPTB)(OH)(NO_3)_4/H_2O_2$ 对 pBR322 的切割反应时, 在向反应体系中加入断裂助剂 H_2O_2 之前先加入反应活性物种羟基自由基的清除剂如二甲基亚砷、甲酸,

硫脲或甘油, 发现切割作用在实验误差范围之内几乎不受影响, 说明反应中没有羟基自由基的产生. 他们还利用产物分析法印证推断机理^[36]. 在质粒 DNA pBR322 的切割实验中, 为了确认有无碱基脱落, 将 0.1 M 的哌啶加入到切割体系中, 接着在 65 °C 下加热混合物 5 min 后进行电泳实验, 然后再在混合物反应液中加入 0.6% 的 2-巯代巴比妥酸, 加热煮沸 20 min, 观察反应前后 532 nm 处的吸光度值的变化. 假如反应过程中有碱基脱落, 则会生成哌啶置换相应碱基并与核糖结合的产物, 这些产物可用分光光度法测定^[90].

5 总结

迄今, 人类已发现不少核酸断裂试剂, 但是水解性断裂试剂相对来说较少, 效率也较差. 随着基因工程的飞速发展, 有关人工核酸酶, 特别是能够有效水解断裂 DNA 体系的研究引起人们的极大关注. 在所发现的具有水解断裂核酸能力的金属配合物中, 有单核金属配合物, 也有双核金属配合物, 涉及的金属离子有过渡金属离子, 也有镧系金属离子, 但反应速率同天然酶相比仍差几个数量级. 这说明磷酸二酯键水解断裂的化学模拟任重而道远, 是对化学家的极大挑战. 同时也应当看到, 在人类孜孜不倦的努力探索下, 这一领域不断有所进展. 利用双核、多核金属配合物来模拟核酸酶对磷酸二酯键的水解断裂应当是一个有前途的方向, 因为天然核酸酶分子中就含有双金属乃至三金属活性中心. 和单金属中心相

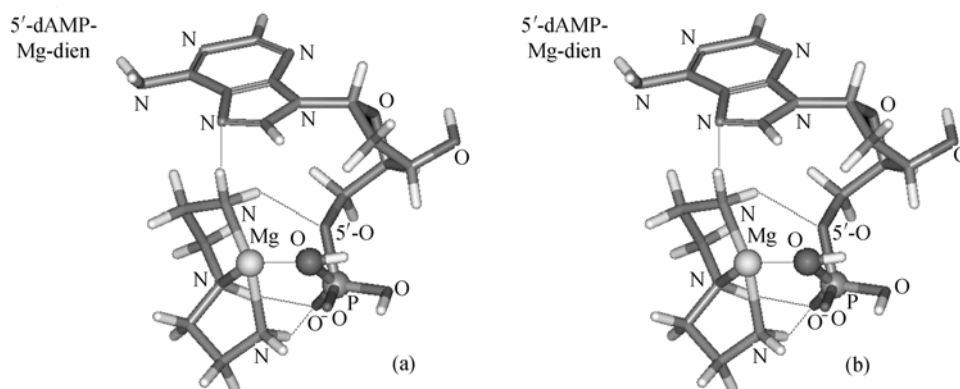


图 12 分子模拟说明, 在过渡态中间体中活性物种 $[Mg(dien)(OH)]^+$ 同底物 5'-dAMP (a) 的作用大于同底物 3'-dAMP (b) 的作用

比,双核金属中心可以更好地协调活性中心的结构,使之有利于结合底物分子并进一步活化它;其中的一个金属离子(较强的 Lewis 酸)使结合在其上的水分子在生理 pH 条件下活化,解离一个质子产生 OH⁻离子,后者是对 P 原子发动亲核进攻的活性物种;而另一个金属离子则发挥结合底物,促进产物离去的作用。另外,双金属中心有利于其上电荷的离域化,降低反应活化能,并且有利于过渡态的稳定化作用,为产物的离去创造有利条件。更进一步,鉴于天然酶活性中心上双金属离子的配位环境并非等同,发展具有不对称配位环境的异核金属配合物可能有较大的突破,应当引起我们的重视。另一方面,稀土离子的引入对于提高磷酸二酯键的水解速率效果明显,也应当进一步予以深入探索。同国外相比,我国开展磷酸二酯键水解断裂化学模拟的研究在强度、广度、深度诸方面尚感不足,应当迎头赶上。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号:20171031)及山西省留学回国人员科研资金资助项目。

参 考 文 献

- 1 Wolfenden R, Ridgway C, Yong Gregory. Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 833 ~ 834[DOI]
- 2 Williams N H, Takasaki B, Chin Jik. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Acc Chem Res*, 1999, 32: 485 ~ 493[DOI]
- 3 Westheimer F H. Why nature chose phosphates. *Science*, 1987, 235: 1173 ~ 1178
- 4 Sigman D S, Mazumder A, Perrin D M. Chemical nucleases. *Chem Rev*, 1993, 93: 2295 ~ 2316
- 5 Chen C B, Sigman D S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper: sequence-specific targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 7147 ~ 7151
- 6 Mejia-Radillo Y, Yatsmisky A K. Complex formation and kinetics of phosphodiester cleavage in the hydrogen peroxide-lanthanide() system. *Inorg Chim Acta*, 2003, 351: 97 ~ 106[DOI]
- 7 Dhar S, Chakravarty A R. Efficient visible light induced nuclease activity of a ternary mono-1,10-phenanthroline Copper() complex containing 2-(methylthio) ethylsalicylaldimine. *Inorg Chem*, 2003, 42(8): 2483 ~ 2485[DOI]
- 8 Moser H E, Dervan P B. Sequence-specific cleavage of double-helical DNA by triple helix formation. *Science*, 1987, 238: 645 ~ 650
- 9 Gonzalez-Alvarez M, Alzuet G, Castineiras A. Oxidative cleavage of DNA by a new ferromagnetic linear trinuclear Copper() complex in the presence of H₂O₂/sodium ascorbate. *Inorg Chem*, 2003, 42(9): 2992 ~ 2998[DOI]
- 10 Sigman D S, Chen C B, Gorin M B. Sequence-specific scission of DNA by RNAs linked to a chemical nuclease. *Nature*, 1993, 363: 474 ~ 475[DOI]
- 11 Pendergrast P S, Ebright Y W, Ebright R H. High-specificity DNA cleavage agent: Design and application to kilobase and megabase DNA substrates. *Science*, 1994, 265: 959 ~ 962
- 12 Sitlani A, Barton J K. Sequence-specific recognition of DNA by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): importance of steric and Van der Waals interaction. *Bochemistry*, 1994, 33: 12100 ~ 12108
- 13 Mack D P, Dervan P B. Nickel-mediated sequence-specific oxidative cleavage of DNA by a designed metalloprotein. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 4604 ~ 4606
- 14 Roelfes G, Banum M E, Que L Jr. Efficient DNA cleavage with an iron complex without added reductant. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 11517 ~ 11518[DOI]
- 15 Komiyama M, Takeda N, Shigekawa H. Hydrolysis of DNA and RNA by lanthanide ions: mechanism studies leading to new applications. *Chem Commu*, 1999, 1443 ~ 1451
- 16 Takeda N, Shibata M, Tajima N, et al. Kinetic and theoretical studies on the mechanism of alkaline hydrolysis of DNA. *J Org Chem*, 2000, 65: 4391 ~ 4396[DOI]
- 17 Lahiri S D, Zhang F F, Dunaway-Mariano D, et al., The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science*, 2003, 299: 2067 ~ 2071[DOI]
- 18 Iranzo O, Kovalecsky A Y, Morow J R, et al. Physical and kinetic analysis of the cooperative role of metal ions in catalysis of phosphodiester cleavage by a dinuclear Zn(II) complex. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 1988 ~ 1993[DOI]
- 19 Chapman W H Jr, Breslow R. Selective hydrolysis of phosphate esters, nitrophenyl phosphates and UpU by dimeric zinc complexes depends on the spacer length. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 5462 ~ 5469
- 20 Tsubouchi A, Bruice C. Phosphonate ester hydrolysis catalyzed by two lanthanum ions. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 7399 ~ 7411
- 21 Jurek P E, Martell A E. Dinuclear lanthanide complex catalyzes the hydrolysis of a phosphate diester with unprecedented speed. *Chem Commun*, 1999, 1609 ~ 1610
- 22 Branum M E, Tipton A K, Que L Jr. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37 . *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 1898 ~ 1904[DOI]
- 23 Ren Rui, Yang Pin, Zheng W, et al. A simple copper()-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. *Inorg Chem*, 2000, 39: 5454 ~ 5463[DOI]
- 24 周春琼, 高飞, 李树娥, 等. Eu()与 HbbimpB 的配合物的合成、表征及活化磷酸二酯键模型化合物 BDNPP 的水解动力学研究. *中国稀土学报*, 2003, 21: 499 ~ 503
- 25 杨频, 周春琼, 李树娥. Ni()与 Hbbimp 配合物的合成、表征及晶体结构. *无机化学学报*, 2003, 19(4): 415 ~ 418
- 26 杨频, 周春琼. 两种新稀土双核配合物的合成、表征及其对磷酸二酯键模型物(BDNPP)和 DNA 的作用研究. *化学学报*, 2003, 361(9): 1455 ~ 1460
- 27 Lu L P, Zhu M L, Yang P. Crystal structure and nuclease activity

- of mono(1, 10-phenanthroline) copper complex. *J Inorg Biochem*, 2003, 95(1): 31 ~ 36[DOI]
- 28 Yang P, Guo M L. DNA interact with metal ions and their complexes. *J Inorg Biochem*, 2001, 86(1): 115
- 29 Song Y F, Yang P. Synthesis, DNA scission chemistry, and an investigation of the reactive oxygen species of two 2,6-dimethoxyhydroquinone-3-mercaptopropionic acid-peptide conjugates. *Austr J Chem*, 2001, 54(4): 253 ~ 259[DOI]
- 30 Pin Yang, Song A X, Fan X Y. Mechanism of cleaving DNA through hydrolysis of a novel complex of Mg containing dien ligand. *Chinese Chemical Letters*, 2000, 11(1): 35 ~ 36
- 31 Screedhara A, Freed J D, Cowan J A. Efficient inorganic deoxyribonucleases. greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 8814 ~ 8824[DOI]
- 32 Bencini A, Berni E, Bianchi A, et al. Proton and Cu() binding to tren-based tris-macrocycles. Affinity towards nucleic acids and nuclease activity. *Dalton Trans*, 2003, 793 ~ 800
- 33 Abe K, Matsufuji K, Ohba M, et al. Site specificity of metal ions in heterodinuclear complexes derived from an "end-off" compartmental ligand. *Inorg Chem*, 2002, 41(17): 4461 ~ 4467[DOI]
- 34 Basile L A, Barton J K. Design of a double-stranded DNA cleavage agent with two polyamine metal-binding arms: Ru(DIP)₂ macrocyclic. *J Am Chem Soc*, 1987, 109: 7548 ~ 7550
- 35 Basile L A, Raphael A L, Barton J K. Metal-activated hydrolytic cleavage of DNA. *J Am Chem Soc*, 1987, 109: 7550 ~ 7551
- 36 Schnaith L M T, Hanson R S, Jr Que L. Double-stranded cleavage of pBR322 by a diiron complex via a "hydrolytic" mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 569 ~ 573
- 37 Schneider H J, Rammo J, Hettich R. Catalysis of hydrolysis of phosphoric acid diesters by lanthanide ions and influence of ligands. *Angew Chem Int Ed*, 1993, 32: 1716 ~ 1719[DOI]
- 38 Breslow R, Zhang B. Cleavage of phosphate esters by a cyclodextrin dimer catalyst that binds the substrates together with La³⁺ and hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 7893 ~ 7894
- 39 Yang P, Ren R, Guo M, et al. Double-strand hydrolysis of DNA by a magnesium() complex with diethylenetriamine. *J Biol Inorg Chem*, 2004, 9: 495 ~ 506[DOI]
- 40 Takeda N, Irisawa M, Komiyama M. Cooperation of lanthanide ion and non-lanthanide ions for the hydrolysis of bis(4-nitrophenyl)phosphate. *J Chem Soc Chem Commun*, 1994, 2773 ~ 2774
- 41 Takasaki B K, Chin J. La()-hydrogen-peroxide cooperativity in phosphate diester cleavage: a mechanistic study. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 8582 ~ 8585
- 42 Oh S J, Song K H, Park J W. Catalytic hydrolysis of phosphate monoesters by Lanthanide() cryptate(2.2.1) complexes. *J Chem Soc Chem Commun*, 1995, 575 ~ 576
- 43 Welch J T, Sirish M, Lindstorm K M, et al. De novo nucleases based on HTH and EF-Hand chimeras. *Inorg Chem*, 2001, 40: 1982 ~ 1984[DOI]
- 44 Tagle P G, Yatsmirsky A K. Phosphodiester hydrolysis by lanthanide complexes of bis-tris propane. *Inorg Chem*, 2001, 40: 3786 ~ 3796[DOI]
- 45 Magda D, Miller R A, Sessler J L, et al. Site-specific hydrolysis of RNA by Europium() texaphyrin conjugated to a synthetic oligodeoxyribonucleotide. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 7439 ~ 7440
- 46 Matsumura K, Endo M, Komiyama M. Lanthanide complex-oligo-DNA hybrid for sequence-selective hydrolysis of RNA. *J Chem Soc Chem Commun*, 1994, 2019 ~ 2020
- 47 Rammo J, Hettich R, Roigk A, et al. Catalysis of DNA cleavage by Lanthanide complexes with nucleophilic or intercalating ligands and their kinetic characterization. *Chem Commun*, 1996, 105 ~ 107
- 48 Sumaoka J, Igawa T, et al. Homogeneous Ce() complexes for efficient hydrolysis of plasmid DNA. *Chem Lett*, 2000, 56 ~ 57
- 49 Hettich R, Schneider H-J. Evidence for hydrolytic DNA cleavage by lanthanide() and cobalt() derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1997, 2069 ~ 2072
- 50 朱兵, 李新民, 吴亦洁, 等. 稀土元素对 3'-腺嘌呤及 3'-鸟嘌呤核苷酸的水解断裂作用. *化学学报*, 1998, 56: 47 ~ 51
- 51 朱兵, 李新民, 吴亦洁, 等. 稀土元素对腺嘌呤及鸟嘌呤单核苷酸的水解断裂作用. *化学学报*, 1996, 54: 1089 ~ 1092
- 52 沈鹤柏, 夏静芬, 杨海峰, 等. Ce()离子水解断裂 Oligomers DNA 中磷酸二酯键. *中国科学, B 辑*, 2001, 31: 178 ~ 184
- 53 Wang C, Choudhary S, Vink C B, et al. Harnessing Thorium(IV) as a catalyst: RNA and phosphate diester cleavage by a Thorium() macrocyclic complex. *Chem Commun*, 2000, 2509 ~ 2510
- 54 Moss R A, Bracken K, Zhang J. Actinide (uranyl) hydrolysis of phosphodiester. *Chem Commun*, 1997, 563 ~ 564
- 55 Hegg E L, Deal K A, Kiessling L L, et al. Hydrolysis of double-stranded and single-stranded RNA in hairpin structure by one copper() macrocycle Cu([9]ane N₃)Cl₂. *Inorg Chem*, 1997, 36: 1715 ~ 1718[DOI]
- 56 Hegg E L, Burstyn J N. Copper() macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under aerobic and anaerobic conditions. *Inorg Chem*, 1996, 35: 7474 ~ 7481[DOI]
- 57 Itoh T, Hisada H, Sumiya T, et al. Hydrolytic cleavage of DNA by a novel copper() complex with *cis-cis*-1,3,5-triaminocyclohexane. *Chem Commun*, 1997, 677 ~ 678
- 58 Sissi C, Rossi P, Felluga F, et al. Dinuclear Zn²⁺ complexes of synthetic heptapeptides as artificial nucleases. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 3169 ~ 3170[DOI]
- 59 Worm K, Chu F, Matsumoto K, et al. Preorganized bis-zinc phosphodiester cleavage catalysts possessing natural ligands: a lesson pertinent to bimetallic artificial enzymes. *Chem Eur J*, 2003, 9: 741 ~ 747[DOI]
- 60 Bernard E, Moneta W, Laugier J, et al. A mixed-valent, unsymmetrical Fe^{II}Fe^{III} complex with a terminal phenolate ligand as a model for the active site of purple acid phosphatases. *Angew Chem Int Ed*, 1994, 33: 887 ~ 889[DOI]
- 61 Seo J S, Hynes R C, Chin J. Structure and reactivity of dinuclear Cobalt() complexes with peroxide and phosphate diester analogues bridging the metal ions. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 9943 ~ 9944[DOI]

- 62 Dixon N E, Geue R J, Lambert J N, et al. DNA hydrolysis by stable metal complexes. *Chem Commun.* 1996, 1287 ~ 1288
- 63 Yamaguchi K, Akagi F, Fujinami S, et al. Hydrolysis of phosphodiester with hydroxo-or carboxylate-bridged dinuclear Ni() and Cu() complexes. *Chem Commun.* 2001, 375 ~ 376
- 64 Kong Deyuan, Reibenspies J, Mao J-G, et al. Novel 30-membered octaazamacrocyclic ligand: synthesis, characterization, thermodynamics stabilities and DNA cleavage activity of homodinuclear Copper and Nickel complexes. *Inorg Chim Acta*, 2003, 342:158 ~ 170[DOI]
- 65 Belle C, Gautier-Luneau I, Karmazin L, et al. Regio-directed synthesis of a Zn Fe complex from unsymmetrical ligand and its relevance to purple acid phosphatases. *Eur J Inorg Chem*, 2002, 3087 ~ 3090
- 66 Lanznaster M, Neves A, Bortoluzzi A J, et al. New Fe Zn complex containing a single terminal Fe-O phenolate bond as a structure and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. *Inorg Chem*, 2002, 41:5641 ~ 5643[DOI]
- 67 Ott R, Kramer R. Rapid phosphodiester hydrolysis by Zirconium(). *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37: 1957 ~ 1960[DOI]
- 68 Stulz E, Leumann C. X-ray structure and solvolytic activity towards phosphate diesters of a Zirconium() complex. *Chem Commun*, 1999, 239 ~ 240
- 69 Otieno T, Bond M R, Mokry L M, et al. Plasmid DNA cleavage by oxo-bridged Vanadium() dimer without added co-oxidants or reductants. *Chem Commun*, 1996, 37 ~ 38
- 70 Young M J, Chin J. Dinuclear Copper() complex that hydrolyzes RNA. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 10577 ~ 10584
- 71 Yashiro M, Ishikubo K, Komiyama M. Efficient and unique cooperation of three Zinc() ions in the hydrolysis of diribonucleotides by a trinuclear Zinc() complex. *Chem Commun*, 1997, 83 ~ 84
- 72 Fritsky I O, Ott R, Kramer R. Allosteric regulation of artificial phosphoesterase activity by metal ions. *Angew Chem Int Ed*, 2000, 18: 3255 ~ 3258[DOI]
- 73 Korupolu S R, Mangayakarasi N, Zaxharias P S, et al. Synthesis, structure and DNA cleavage activity of new trinuclear Zn₃ and Zn₂Cu complexes of a chiral macrocycle: structure correlation with the active center of P1 nuclease. *Inorg Chem*, 2002, 41: 4099 ~ 4101[DOI]
- 74 Wahnou D, Lebus A M, Chin J. Hydrolysis of a phosphate diester doubly coordinated to a dinuclear Cobalt() complex: a novel mechanism. *Angew Chem Int Ed*, 1995, 34: 2412 ~ 2414[DOI]
- 75 Williams N H, William C, Chin J. Reactivity of phosphate diester doubly coordinated to a dinuclear Cobalt() complex: dependence of the reactivity on the basicity of the leaving group. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 8079 ~ 8087[DOI]
- 76 Matsuda S, Ishikubo A, Komiyama M. Conjugates of a dinuclear Zinc() complex and DNA oligomers as novel sequence-selective artificial ribonucleases. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37: 3284-3286[DOI]
- 77 Ragunathan K G, Schneider H J. Binuclear lanthanide complexes as catalyst for the hydrolysis of bis-(p-nitrophenyl)- phosphate and double-stranded DNA. *Angew Chem Int Ed*, 1996, 35: 1219 ~ 1221[DOI]
- 78 Myers A G, Kort M E, Hammond M. A comparison of DNA cleavage by neocarzinostatin chromophore and its aglycon: evaluating the role of the carbohydrate residue. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 2965 ~ 2972[DOI]
- 79 Kovacic R T, Welch J T, Franklin S J. Sequence-selective DNA cleavage by a chimeric metalloprotein. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6656 ~ 6662[DOI]
- 80 Berg T, Simeonov A, Janda K D. A combined parallel synthesis and screening of macrocyclic lanthanide complexes for the cleavage of phospho di- and tri-esters and double-stranded DNA. *J Combinat Chem*, 1999, 1: 96 ~ 100[DOI]
- 81 Berkessel A, Herauld D A. Discovery of peptide-zirconium complexes that mediate phosphate hydrolysis by batch screening of a combinatorial undecapeptide library. *Angew Chem Int Ed*, 1999, 38(1/2): 102 ~ 105[DOI]
- 82 Wilcox D E. Binuclear metallohydrolases. *Chem Rev*, 1996, 96: 2435 ~ 2458[DOI]
- 83 Sam M D, Perona J J. Catalytic role of divalent metal ions in phosphoryl transfer by rcoRV. *Biochemistry*, 1999, 38: 6576 ~ 6586[DOI]
- 84 Xu R X, Hassel A M, Vanderwall D, et al. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science*, 2000, 288: 1822 ~ 1825[DOI]
- 85 Zhan C-G, Fang Z. First computational evidence for a catalytic bridging hydroxide ion in a phosphodiesterase active site. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 2835 ~ 2838[DOI]
- 86 Jedrzejewski M J, Setlow P. Comparison of the binuclear metalloenzymes. *Chem Rev*, 2001, 101: 607 ~ 618[DOI]
- 87 William N H, Chin J. Metal-ion catalyzed phosphate diester transesterification: quantifying double lewis-acid activation. *J Chem Soc Chem Commun*, 1996, 131 ~ 136
- 88 Hendry P, Sargeson A M. Base hydrolysis of the penta-ammine (trimethyl phosphate) iridium ion. *J Chem Soc Chem Commun*, 1984, 164 ~ 167
- 89 Hendry P, Sargeson A M. Reactivity of coordinated phosphate esters. *Inorg Chem*, 1990, 29, 92 ~ 98
- 90 F. 奥斯特伯等著. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999. 185 ~ 191

(2003-12-05 收稿, 2004-03-15 收修改稿)