

برهم کنش DNA با رنگ زرد دایرکت ۴۲ توسط روش‌های طیف‌سنجی

مهین گلوی ثانی

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

موسی بهلولی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

منصور غفاری مقدم

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

خاطره خرسندی

گروه پژوهشی فتودینامیک، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

سمیه شهرکی

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

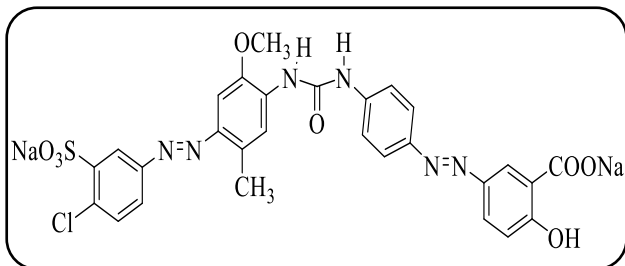
چکیده: برخی ترکیب‌های شیمیایی مانند رنگ‌های مصنوعی مورد استفاده در صنایع گوناگون می‌توانند اثر بدی بر سلامتی بدن داشته باشند. مهم‌ترین مولکول زیستی در بدن موجودهای زنده، DNA می‌باشد که هرگونه تغییر در ساختار آن می‌تواند کل سامانه موجود زنده را تحت تأثیر قرار دهد. در این پژوهش برای اولین بار برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲، که به‌طور عمده در صنعت نساجی استفاده می‌شود، با DNA به کمک روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس، UV-Vis و FT-IR در بافر فیزیولوژیکی (pH ~ 7.4) و در سه دمای ۲۹۸ تا ۳۰۸ و ۳۱۸ کلوین مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های به‌دست آمده از طیف‌سنجی جذبی نشان داد که رنگ زرد دایرکت ۴۲ می‌تواند در غلظت‌های پایین به DNA متصل شود. پارامترهای ترمودینامیکی به‌دست آمده از آزمایش‌های فلورسانس در دماهای گوناگون، پیوند هیدروژن و نیروی واندروالسی در روند اتصال این رنگ، با DNA را نشان داد. ثابت پیوندی (K_b) و تعداد سایت اتصال محاسبه شد. نتیجه‌ها نشان داد که مکانیسم خاموش‌سازی (DNA + اتیدیوم برمید) با رنگ‌ساز از نوع استاتیک می‌باشد. سرانجام تغییرهای ساختار DNA دو رشته‌ای، ناشی از رنگ زرد دایرکت ۴۲ توسط نتیجه‌های FT-IR تأیید شد. نتیجه‌های این مطالعه می‌تواند نگاه نوینی به کاربرد رنگ‌ها در صنعت و خطرهای ناشی از استفاده از آن‌ها را ارائه دهد.

کلمات کلیدی: برهم‌کنش DNA، رنگ زرد دایرکت ۴۲، پارامترهای ترمودینامیکی، روش‌های اسپکتروسکوپی.

KEYWORDS: Interaction of DNA; Direct Yellow 42 dye; Thermodynamic parameters; Spectroscopic methods.

مقدمه

به طور کلی رنگ‌ها به دو دسته مصنوعی و طبیعی تقسیم می‌شوند: رنگ‌های طبیعی مانند رنگ‌های خوراکی و رنگ‌های مصنوعی مانند رنگ‌های نساجی که در تولید چرم، ابریشم و غیره به کار می‌روند [۱]. برخی از این ترکیب‌ها به ویژه رنگ‌های مصنوعی می‌توانند توسط سلول‌های مخاطی بدن جذب و یا حتی باعث مسمومیت‌های ناشناخته شوند [۲]. نتیجه‌ها نشان داده است که برخی رنگ‌ها که در صنعت نساجی به کار می‌روند، می‌توانند توسط سلول‌های مخاطی بدن جذب شده (به دلیل ارتباط مستقیم لباس با بدن انسان) و بر بخش‌های گوناگون سلول مانند سیتوپلاسم، میتوکندری، DNA و غیره تأثیر گذارند [۳] و منجر به بروز اختلال‌های و نیز مسمومیت‌های ناشناخته شوند. بنابراین بررسی چنین ترکیب‌های شیمیایی بر سلول‌های بدن امری ضروری به نظر می‌رسد. با وجود این که در سامانه‌های فیزیولوژیک، DNA بسیار محافظت شده و دور از دسترس می‌باشد، ولی اثر این رنگ‌ها باعث تغییرهای ساختاری در DNA می‌شوند. سلول‌های سالم در بدن قادر به ترمیم صد درصد DNA تغییر یافته هستند، زیرا در غیر این صورت عارضه‌های جانبی بروز خواهد کرد [۴]. بسیاری از رنگ‌های مورد استفاده در صنعت نساجی دارای گروه عاملی $-N=N-$ می‌باشند. ترکیب‌ها دارای این گروه عاملی به ترکیب‌های آزونیک مشهور هستند. این گونه رنگ‌ها با توجه به حلالیت بالا در آب می‌توانند با سادگی بیش‌تری نسبت به سایر رنگ‌ها با اندام‌های زیستی برهمکنش داشته باشند. *آناستازیا و همکاران* در سال ۲۰۱۰ میلادی به بررسی ویژگی‌های سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک برخی از این رنگ‌ها مانند اریتروزین و تترازین پرداختند و سمی بودن این رنگ‌ها را در شرایط *In vitro* بر روی لنفوسیت‌های انسانی اثبات کردند. پژوهش آن‌ها نشان داد که این دو رنگ می‌توانند به طور مستقیم به DNA انسانی متصل شوند [۵]. رنگ زرد متیل می‌تواند به گوانین موجود در رشته DNA پیوند کووالان داده و منجر به ایجاد جهش در این مولکول زیستی شود [۶]. با وجود خاصیت جهش‌زایی و سمی بودن در این ترکیب‌ها، برخی از رنگ‌های آزو دارای ویژگی‌های دارویی نیز هستند، مانند برخی از مشتق‌های آزو ۵-سالیسیلیک اسید که به پلی‌اتیلن گلیکول متصل شده باشند. این ترکیب‌های پلیمری در تحویل دارو به اندام هدف در درمان سرطان روده بزرگ کارایی دارند [۷، ۸]. نمونه‌ای دیگر از این ترکیب‌ها رنگ زرد دایرکت ۴۲ (شکل ۱) است که با فرمول مولکولی $C_{28}H_{21}ClN_6Na_2O_8S$ و جرم مولکولی $683/01 \text{ g/mol}$ دارای کاربرد گسترده در رنگ‌رزی می‌باشد. رنگ زرد دایرکت ۴۲ می‌تواند کمپلکس‌های فلزی پایدار



شکل ۱- ساختار مولکولی رنگ زرد دایرکت ۴۲

با فلزها ایجاد کند که منجر به پایداری و نیز حلالیت مناسب آن در محیط آبی می‌شود. براساس بررسی‌های صورت گرفته تاکنون، پژوهشی در مورد تعامل و برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با هیچ یک از اندام‌های زیستی گزارش نشده است.

DNA، بزرگ‌ترین مولکول زیستی در بدن می‌باشد، از آنجایی که ترمیم سلول‌های آسیب دیده، رونویسی و جهش سلول‌ها را بر عهده دارد بسیار دارای اهمیت است. برهم‌کنش DNA با ترکیب‌های گوناگون مانند داروها، ترکیب‌های شیمیایی و یا سایر ترکیب‌های زیستی موضوع پژوهش‌های بسیار زیادی از پژوهشگران می‌باشد. با توجه به مطالب ارائه شده در بالا در این پژوهش اثر رنگ زرد دایرکت ۴۲ بر ساختار DNA با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی (فلورسانس، UV-Vis و FT-IR) در بافر فیزیولوژیکی (pH ~ 7/4) و در سه دمای ۲۹۸، ۳۰۸ و ۳۱۸ کلوین مورد بررسی قرار گرفت. به کمک این روش‌ها می‌توان تغییرهای کنفورماسیونی DNA، نوع برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA، مکانیسم خاموش‌سازی سامانه DNA - اتیدیوم بر مایید توسط رنگ و پارامترهای ترمودینامیکی پیوند ایجاد شده را بررسی نمود. در واقع هدف این مطالعه ارائه مکانیزم روشن از پیوند یک رنگ شیمیایی با DNA می‌باشد، زیرا نوع پیوند ترکیبات شیمیایی با این مولکول زیستی نقشی تعیین‌کننده در میزان سمی بودن آن‌ها بازی می‌کند. پیوندهای کووالان که قوی‌تر از سایر پیوندهای شیمیایی هستند، برگشت‌پذیر نبوده و اگر ترکیبی چنین پیوندی با DNA برقرار نماید، پیش‌بینی می‌شود که عوارض کاربرد آن می‌تواند خطرناک باشد و باید در مصرف آن در صنعت (نساجی) تجدید نظر نمود.

بخش تجربی

مواد

در این پژوهش رنگ زرد دایرکت ۴۲، DNA غده تیموس گوساله (CT-DNA)، تریس هیدروکسی متیل آمینومتان، (Tris-buffer) $[(OHCH_2)_3CNH_2]$ با جرم مولکولی $127/1 \text{ g/mol}$

ساخت شرکت Bruker کشور آلمان در ناحیه $1400-1600 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شدند. برای بررسی طیف FT-IR، طیف جذبی مربوط به DNA تنها ثبت و برای حذف پیک مربوط به آب، طیف مربوط به بافر تنها نیز ثبت و طیف DNA از طیف بافر کم (تفریق) شد. سپس محلولی به نسبت ۵ به ۱ و ۱۵ به ۱ از رنگ زرد دایرکت ۴۲ نسبت به DNA تهیه و جذب آن گرفته شد. برای مشخص کردن تغییرهای ساختاری DNA، طیف DNA تنها از طیف کمپکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA کم شد.

طیف‌سنجی فلورسانس

طیف‌های خاموش‌سازی توسط دستگاه فلورسانس برای محلول‌هایی با غلظت ثابت DNA (۳ میکرومولار) به همراه اتیدیوم برمید با افزودن غلظت‌های (۰/۳۶-۰/۰۶ میکرومولار) از رنگ زرد دایرکت ۴۲ در $\lambda_{\text{ex}} = 471 \text{ nm}$ توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر فلورسانس، مدل RF-5301 از شرکت Shimadzu کشور ژاپن ثبت شد. برای تعیین پارامترهای ترمودینامیکی پیوند میان رنگ زرد دایرکت و DNA (تغییرهای آنتالپی (ΔH))، تغییرهای آنتروپی (ΔS) و تغییرهای انرژی آزاد گیبس (ΔG)) این آزمایش‌ها در سه دمای گوناگون ۲۹۸، ۳۰۸ و ۳۱۸ کلین انجام گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

بررسی طیف UV-Vis

شکل ۲، طیف‌های UV-Vis، مربوط به DNA، رنگ زرد دایرکت ۴۲ و کمپلکس (DNA-رنگ زرد دایرکت ۴۲) را نشان می‌دهد. تغییر شکل طیف مربوط به کمپلکس (DNA-رنگ زرد دایرکت ۴۲) نسبت به طیف DNA تنها نشان دهنده برهم‌کنش میان DNA با این رنگ است. بنابراین در مرحله بعد، تیتراسیون DNA در حضور غلظت‌های گوناگون رنگ زرد دایرکت ۴۲ انجام گرفت که در شکل ۳ دیده می‌شود. همان‌گونه که دیده می‌شود با افزایش غلظت رنگ زرد دایرکت ۴۲ میزان جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر افزایش می‌یابد. این مشاهده نشان می‌دهد که رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA برهم‌کنش داشته و این برهم‌کنش به گونه‌ای است که باعث افزایش برخورد نور UV-Vis به بازهای پورین و پیریمیدین شده است [۹]. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که در این برهم‌کنش ساختار DNA دو رشته‌ای از حالت طبیعی خارج و کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA تشکیل شده است [۱۰].

DNA از نوع Highly Polymerized Calf Thymus و اتیدیوم برمید ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) با وزن مولکولی $394/3 \text{ g/mol}$ ، از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند.

محلول استوک DNA، به‌وسیله حل کردن $4/2$ میلی‌گرم از DNA در هر میلی‌لیتر از بافر تریس هیدروکلرید با شرایط فیزیولوژیکی (غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و pH معادل ۷/۴) تهیه شد. برای اطمینان از یکنواختی محلول DNA پایانی، محلول موجود در 4°C درون یخچال به مدت ۲۴ ساعت به‌طور مکرر و به آرامی هم زده شد. برای تهیه محلول مادر رنگ زرد دایرکت ۴۲، یک میلی‌گرم از رنگ زرد دایرکت ۴۲ با حل کردن در یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و رقیق کردن محلول به دست آمده با توجه به غلظت‌های مورد نیاز تهیه شد.

طیف‌سنجی UV-Vis

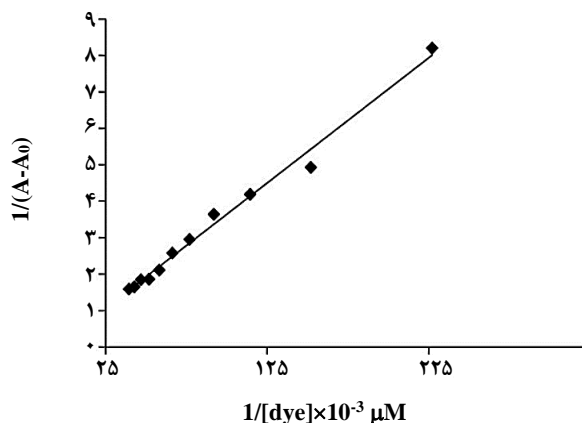
پیش از آغاز آزمایش‌های برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA، زمان مورد نیاز برای اتمام برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA و همچنین غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Vis مدل UV-2100 از شرکت Rayleigh کشور چین، در بازه‌ی ۱۹۰-۳۰۰ نانومتر بهینه شد. به این منظور رنگ زرد دایرکت ۴۲ در بازه‌ی غلظتی $0/001-0/45$ میکرومولار با غلظت ثابت DNA (۳ میکرومولار) تیتراژ شدند.

طی این روند دیده شد که DNA حتی در غلظت‌های خیلی پایین از رنگ انتخابی برهم‌کنش داشت. ولی این برهم‌کنش بسیار محدود است و نمی‌توان با درصد خطای پایین آن‌را گزارش کرد. در غلظت‌های بالاتر از $0/35$ میکرومولار از رنگ انتخابی، DNA دچار تغییرهای ناگهانی در شدت طیف جذبی شد که بیانگر از دنا توره شدن این ماکرومولکول زیستی بود. به همین دلیل بازه‌ی غلظتی $0/006-0/36$ میکرومولار از رنگ زرد دایرکت ۴۲ به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

برای به‌دست آوردن زمان بهینه برهم‌کنش میان رنگ زرد دایرکت ۴۲ و DNA، غلظت مشخصی از DNA با رنگ زرد دایرکت ۴۲ در مدت زمان‌های گوناگون تیتراژ شد و بهترین زمان برهم‌کنش انتخاب شد.

طیف‌سنجی FT-IR

طیف‌های FT-IR مربوط به برهم‌کنش DNA با رنگ زرد دایرکت ۴۲ توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر FT-IR مدل Tensor 27



شکل ۴ - نمودار $1/(A - A_0)$ بر حسب $1/[dye]$ برای تیتراسیون غلظت ثابتی از DNA (۳ میکرومولار) با غلظت‌های متفاوت (۰/۳۶-۰/۰۶ میکرو مولار) از رنگ زرد دایرکت ۴۲ در دمای ۲۹۸ کلوین.

جدول ۱- مقدارهای ثابت پیوندی محاسبه شده برای کمپلکس DNA-رنگ زرد دایرکت ۴۲.

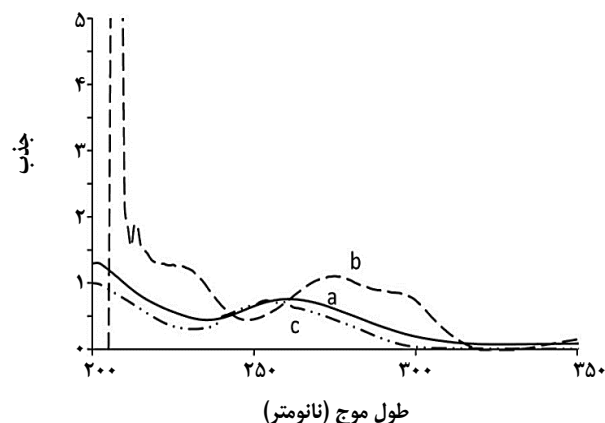
ترکیب	$k_{bin} (1 \cdot M^{-1})$	R^2
رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA	۴/۲۵	۰/۹۸۹۳

برای بررسی قدرت پیوند بین DNA و رنگ، ثابت پیوند (K) را می‌توان با استفاده از داده‌های به دست آمده از طیف الکترونی DNA و معادله (۱) به دست آورد.

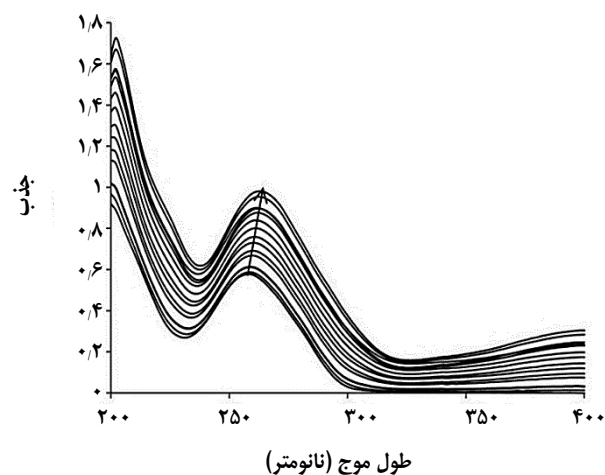
$$\frac{b}{A-A_0} = \frac{1}{P_t K_b \Delta \epsilon_{BL} [L]} + \frac{1}{P_t \Delta \epsilon_{BL}} \quad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله فوق A_0 بیشینه جذب DNA در غیاب رنگ و A بیشینه جذب DNA در حضور غلظت‌های گوناگون رنگ، b طول مسیر نور (۱ سانتی‌متر)، P_t غلظت کل DNA، $[L]$ غلظت رنگ، K_b ثابت پیوندی است و $\Delta \epsilon_{BL}$ ضریب جذب مولی کمپلکس رنگ-DNA است. با رسم منحنی $1/(A-A_0)$ بر حسب $1/[dye]$ یک خط راست به دست می‌آید. (شکل ۴). در این برهم کنش مقدار K با محاسبه نسبت عرض از مبدا به شیب منحنی به دست آمده از نمودار به دست آمده است [۱۱].

جدول ۱ مقدارهای محاسبه شده K_{bin} برای رنگ زرد دایرکت ۴۲ را نشان می‌دهد. مطالعه‌ها نشان داده است که اگر ثابت پیوندی لیگاند با DNA در گستره $10^6 - 10^9 M^{-1}$ باشد [۱۱]، احتمال پیوند کووالانسی کاهش یافته و برهم کنش لیگاند و DNA از نوع غیر کووالانسی می‌باشد.



شکل ۲- طیف UV-Vis مربوط به DNA (a)، رنگ زرد دایرکت ۴۲ (b) و کمپلکس DNA-رنگ زرد دایرکت ۴۲ (c).

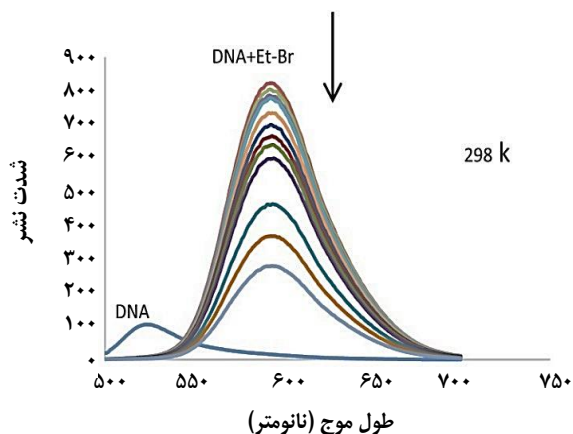


شکل ۳: طیف الکترونی UV-Vis مربوط به DNA (۳ میکرومولار) با افزودن غلظت‌های متفاوت (۰/۳۶-۰/۰۶ میکرو مولار) از رنگ زرد دایرکت ۴۲ در دما ۲۹۸ کلوین

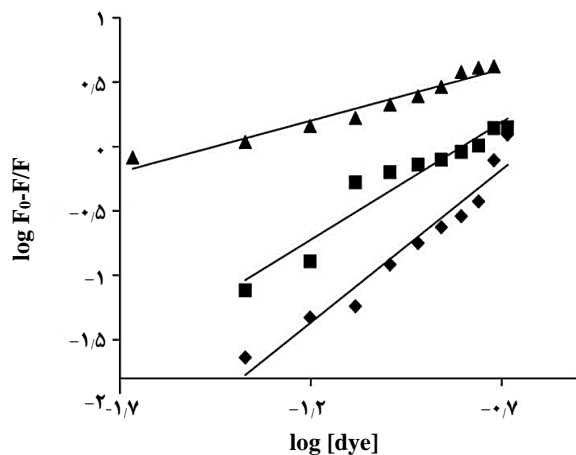
جابه‌جایی شیمیایی قرمز (جابه‌جایی شیمیایی به سمت طول موج‌های بلندتر) هم در برهم کنش‌هایی از نوع اینترکیلشن (حدود ۲۰-۱۵ نانومتر) و هم در اتصال شیاری (کمتر از ۱۰ نانومتر) دیده می‌شود [۱۱]. اما چون تغییرهای ساختاری ایجاد شده از اتصال شیاری در DNA بسیار محدودتر از اینترکیلشن است، این جابه‌جایی شیمیایی نیز محدودتر می‌باشد. همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، این جابه‌جایی شیمیایی حدود ۶ نانومتر است که می‌تواند نشان‌دهنده تغییرهای ساختاری DNA در اثر رویارویی با رنگ زرد دایرکت ۴۲ باشد. البته این جابه‌جایی به‌طور کامل این نوع پیوند را به اثبات نمی‌رساند و باید سایر داده‌ها از جمله داده‌های ترمودینامیکی به دست آمده از برهم کنش DNA با رنگ زرد دایرکت ۴۲ نیز مورد بررسی قرار گیرد.

جدول ۲- مقادارهای K_{sv} و K_q محاسبه شده در دماهای گوناگون برای برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA.

ترکیب	T (K)	$K_{sv} (10^6 M^{-1})$	$K_q (10^{14} M^{-1} s^{-1})$	R^2
کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA	۲۹۸	۲۱/۵۶	۲۱/۵۶	۰/۹۷۸۲
	۳۰۸	۱۵/۰۳	۱۵/۰۳	۰/۹۵۵۳
	۳۱۸	۳/۱۵	۳/۱۵	۰/۹۱۳۶



شکل ۵: طیف خاموش‌سازی فلورسانس DNA (۳ میکرومولار) + اتیدیوم برمید (Et-Br)، با اضافه کردن غلظت‌های متفاوت (۰/۳۶-۰/۰۶ میکرومولار) از رنگ زرد دایرکت ۴۲ در $\lambda_{ex} = 471 \text{ nm}$ و دمای ۲۹۸ کلوین



شکل ۶: منحنی‌های استرن-والمر برای برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA در دماهای ۲۹۸ (■)، ۳۰۸ (◆) و ۳۱۸ (▲) کلوین

DNA اتیدیوم برمید کاهش یافته است. بنابراین افزایش دما نیز می‌تواند در ناپایدار کردن مؤثر باشد و شاید تشکیل پیوند رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA یک واکنش گرمازاست. افزون بر این متوسط مقدار n برای برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA حدود ۱ به‌دست آمد که نشان می‌دهد، تنها یک جایگاه پیوندی برای رنگ زرد دایرکت ۴۲ بر روی DNA وجود دارد.

بررسی طیف فلورسانس

تعیین مکانیسم خاموشی DNA توسط رنگ زرد دایرکت ۴۲

شکل ۵، طیف فلورسانس DNA با افزودن غلظت‌های گوناگون از رنگ زرد دایرکت ۴۲ در دمای ۲۹۸ کلوین را نشان می‌دهد. با افزایش اتیدیوم برمید به DNA افزایش چشمگیری در شدت نشر DNA ایجاد می‌شود. در شکل ۵ علامت پیکان، جهت تغییر شدت نشر DNA + اتیدیوم برمید را با روند افزایش غلظت‌های گوناگون رنگ زرد دایرکت ۴۲ نشان می‌دهد. با توجه به این شکل، با افزایش غلظت رنگ زرد دایرکت ۴۲، شدت نشر طیف مربوط به DNA + اتیدیوم برمید کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با سیستم DNA + اتیدیوم برمید است. با توجه به این که پیوند اتیدیوم برمید و DNA از نوع اینترکیلیشن می‌باشد، احتمال نوعی رقابت میان رنگ زرد دایرکت ۴۲ و اتیدیوم برمید برای تشکیل پیوند اینترکیلیشن وجود دارد. برای بررسی بیشتر و تعیین دقیق نوع پیوند رنگ به DNA باید پارامترهای ترمودینامیکی برهم‌کنش DNA و رنگ زرد دایرکت ۴۲ را محاسبه نمود که در بخش بعد به آن پرداخته می‌شود.

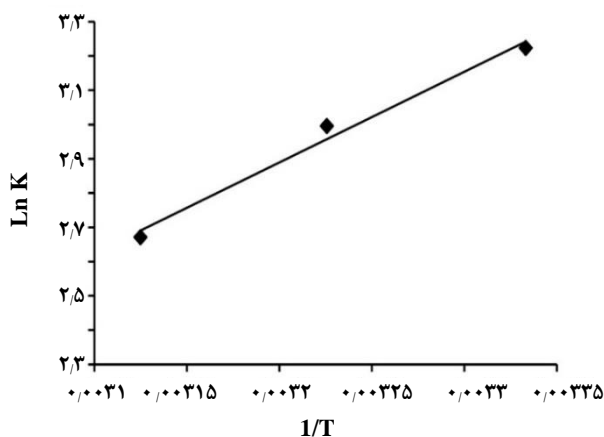
برای تعیین نوع خاموش‌سازی فلورسانس کمپلکس DNA - رنگ زرد دایرکت ۴۲ مقادارهای K_{sv} (ثابت خاموش‌سازی استرن-ولمر) و k_q (ثابت سرعت خاموش‌سازی) در دماهای گوناگون محاسبه شد (شکل ۶ و جدول ۲). با توجه به مقادیر K_{sv} به‌دست آمده مکانیسم خاموش‌سازی سامانه DNA + اتیدیوم برمید، توسط رنگ زرد دایرکت ۴۲ از نوع استاتیک است زیرا مقادارهای K_{sv} با افزایش دما کاهش می‌یابند [۱۲، ۱۳].

تعیین ثابت پیوندی و تعداد سایت‌های پیوندی برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA

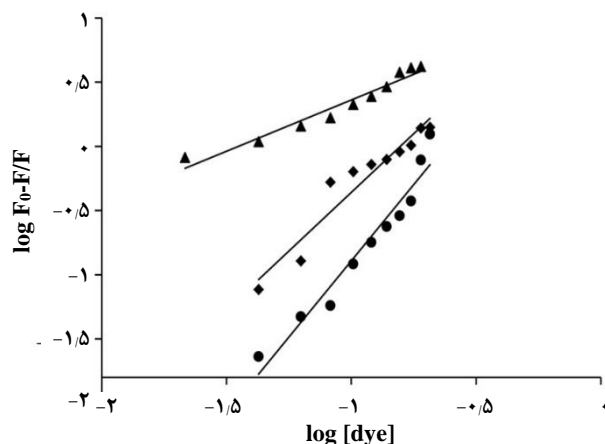
شکل ۷، منحنی‌های $\log F_0-F/F$ بر حسب $\log[\text{dye}]$ را برای سامانه رنگ زرد دایرکت ۴۲ - DNA در دماهای گوناگون نشان می‌دهد. در (جدول ۳) مقادارهای محاسبه برای k_{bin} و n برای برهم‌کنش DNA + اتیدیوم برمید و رنگ زرد دایرکت ۴۲ ($\lambda_{ex} = 471 \text{ nm}$) نشان داده شده است. با افزایش دما، مقادارهای K_{bin} کاهش می‌یابد به این معنی که با افزایش دما، پایداری سامانه DNA +

جدول ۳- ثابت‌های پیوندی رنگ زرد دایرکت ۴۲ و DNA در دماهای گوناگون.

ترکیب	T(K)	$K_b(10^7 M^{-1})$	n	R^2
رنگ زرد دایرکت ۴۲	۲۹۸	۲۵/۱۱	۱/۳۷	۰/۹۹۳۵
	۳۰۸	۲۱/۸۴	۱/۱۲	۰/۹۹۶۸
	۳۱۸	۱۴/۲۵	۰/۷۹	۰/۹۹۵۴



شکل ۸ - منحنی وانت هوف در دماهای گوناگون برای سامانه رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA.

شکل ۷- منحنی‌های $\log(F_0-F/F)$ را بر حسب $\log[\text{dye}]$ برای سامانه رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA در دماهای ۲۹۸ (▲)، ۳۰۸ (◆) و ۳۱۸ (●) کلوین

نیز کوچک‌تر از صفر به‌دست آمد که می‌تواند وجود پیوندهای هیدروژنی را میان رنگ زرد دایرکت ۴۲ و DNA به اثبات برساند. این دو پیوند در ترکیباتی دیده می‌شود که دارای اتصال شیاری به DNA هستند. البته این نوع اتصال با توجه به ساختار به‌تقریب طولی مولکول رنگ زرد دایرکت ۴۲ قابل پیش‌بینی بود. بنابراین احتمال برهم‌کنش DNA با رنگ زرد دایرکت ۴۲ به‌صورت اینترکلیشن منفی بوده و نوع برهم‌کنش آن با DNA، از نوع شیاری می‌باشد [۱۶]. افزون بر این، مقدارهاب منفی انرژی آزاد گیبس به دست آمده از برهم‌کنش رنگ با DNA نشان دهنده این است که تشکیل پیوند میان رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA فرآیندی خودبه‌خودی است.

بررسی طیف FT-IR

برای درک بیشتر تغییرهای ساختاری DNA ناشی از اتصال رنگ زرد دایرکت ۴۲، بررسی طیف‌سنجی FT-IR مربوط به DNA و کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA (شکل ۹) انجام شد. طیف a در شکل ۹ مربوط به جذب محلول DNA و طیف‌های b و c مربوط به جذب غلظت‌های گوناگون محلول کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA است. باند موجود در 1560 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی تیمین، باند 1542 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی آدنین

با توجه به حضور گروه‌های N-H، کربوکسیل و هیدروکسیل در ساختار رنگ زرد دایرکت ۴۲ احتمال پیوندهای واندروالسی و هیدروژنی بین DNA و رنگ زرد دایرکت ۴۲ دور از ذهن نیست. اما حضور حلقه‌های آروماتیک و سیستم π غیر مستقر نیز می‌تواند با اینترکلیشن با DNA ایجاد برهم‌کنش نماید [۱۴]. برای اثبات نوع این برهم‌کنش باید از مقادیر به‌دست آمده از پارامترهای ترمودینامیکی یاری گرفت.

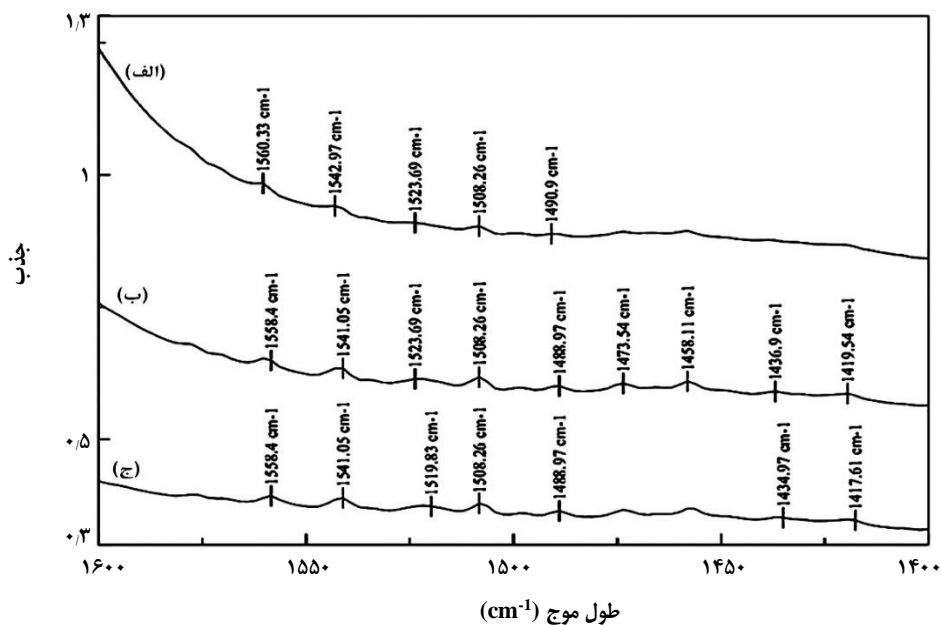
تعیین پارامترهای ترمودینامیکی

با محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی به‌دست آمده از برهم‌کنش رنگ با DNA می‌توان نوع پیوند، در این برهم‌کنش را پیش‌بینی نمود. محاسبه پارامترهای ΔH ، ΔS و ΔG با کمک معادله وانت‌هوف و رسم منحنی $\ln K$ نسبت به $1/T$ امکان‌پذیر است. شکل ۸، منحنی‌های وانت‌هوف کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA و جدول ۴ مقدارهای ΔH ، ΔS و ΔG محاسبه شده [۱۵]، برای برهم‌کنش بالا را نشان می‌دهند.

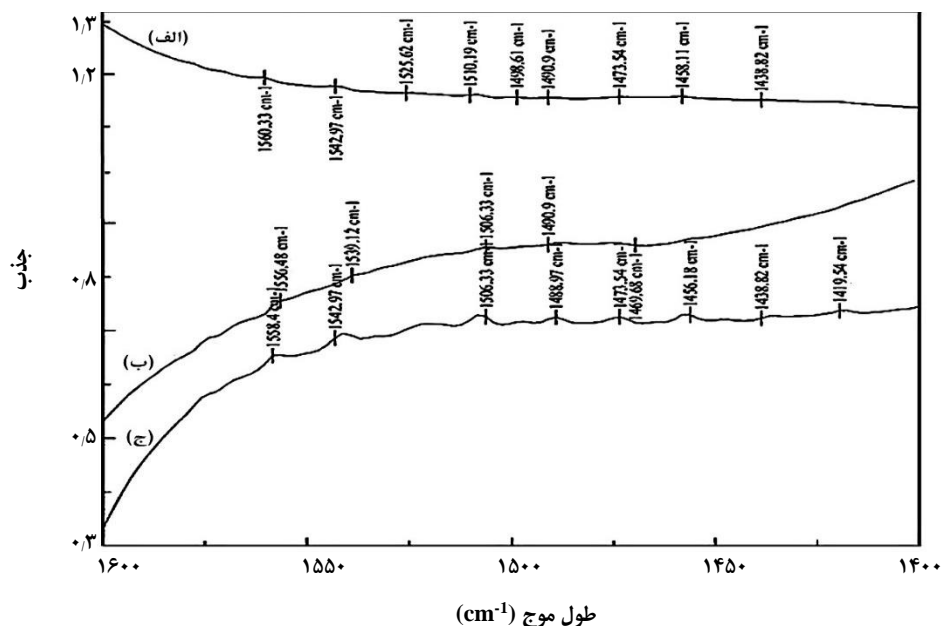
همان‌گونه که دیده می‌شود مقدارهای ΔS برای برهم‌کنش رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA کوچک‌تر از صفر است و این یک شاخص مهم برای برهم‌کنش‌های واندروالسی میان مولکول رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA می‌باشد. مقدارهای ΔH برای رنگ زرد دایرکت ۴۲

جدول ۴- پارامترهای ترمودینامیکی رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA.

ترکیب	T (K)	ΔG (kJ. mol ⁻¹)	ΔH (kJ. mol ⁻¹)	ΔS (kJ. mol ⁻¹ .K ⁻¹)	R ²
رنگ زرد دایرکت ۴۲	۲۹۸	-۷۴/۸۲			۰/۹۸۶
	۳۰۸	-۶۲/۵	-۴۴۴/۵۲	-۱/۲۳۳	۰/۹۴۹
	۳۱۸	-۵۰/۱۸			۰/۹۷۳



شکل ۹: طیف FT-IR در ناحیه ۱۶۰۰-۱۴۰۰ cm⁻¹ برای DNA خالص (a) و رنگ زرد دایرکت ۴۲ با نسبت‌های غلظتی متفاوت: نسبت ۱:۱۵ (b)، نسبت ۱:۵ (c)



شکل ۱۰: طیف FT-IR در ناحیه ۱۶۰۰-۱۴۰۰ cm⁻¹ برای DNA خالص (a) و طیف مربوط به تفاوت طیف جذبی DNA خالص از طیف کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA با نسبت ۱:۱۵ (b) و نسبت ۱:۵ (c)

نتیجه گیری

در این پژوهش، برهم کنش میان رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA به کمک روش‌های طیف‌سنجی FT-IR، UV-Vis و فلورسانس بررسی شد. نتیجه‌ها نشان می‌دهند که ترکیب بالا قدرت پیوندی بالایی با DNA دارد. با توجه به نتیجه‌های FT-IR دیده شد که علت تغییر باندها و شدت ارتعاش‌ها به واکنش مستقیم رنگ زرد دایرکت ۴۲ با DNA مربوط می‌باشد. با توجه به نتیجه‌های فلورسانس مشخص شد که نوع برهم‌کنش از نوع اتصال شیاری است و رنگ زرد دایرکت ۴۲ با پیوندهای واندروالسی و هیدروژنی به DNA متصل می‌شود. مطالعه‌های فلورسانس نشان داد که با افزایش K_{bin} و نیز K_{sv} کاهش پیدا می‌کند و این امر نوع خاموش‌سازی از نوع استاتیک را در سامانه اتیدیوم‌برمید + DNA به اثبات رساند. همچنین این بررسی نشان داد که تنها یک جایگاه پیوندی برای اتصال رنگ به DNA وجود دارد.

و باند موجود در 1508 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی سیتوزین می‌باشد (باند مربوط به ارتعاش‌های کششی گوانین در ناحیه بالاتر از 1700 cm^{-1} قرار می‌گیرد اما به دلیل حضور باند پهن در این ناحیه که مربوط به آب می‌باشد، این باند قابل دیدن نبود). با افزایش رنگ به محلول DNA، مقداری جابه‌جایی شیمیایی در باند مربوط به تیمین و آدنین دیده می‌شود که این جابه‌جایی در باند مربوط به سیتوزین قابل دیدن نیست. در شکل ۱۰، طیف جذبی DNA خالص و طیف مربوط به تفاوت طیف جذبی DNA خالص از طیف کمپلکس رنگ زرد دایرکت ۴۲-DNA، با نسبت ۱ به ۵ و ۱ به ۱۵ دیده می‌شود. در این دو غلظت متفاوت تغییر چشمگیری در باند سیتوزین دیده نشد. ولی باندهای مربوط به آدنین و تیمین، جابه‌جایی شیمیایی نشان دادند. با این نتیجه‌ها می‌توان پیش بینی نمود که رنگ زرد دایرکت ۴۲ با آدنین و تیمین بیش از سیتوزین برهم‌کنش دارد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۷

مراجع

- [1] Ohme R., Preuschhof H., Heyne H., Azoethane. *Org. Syn. Coll*, **6**: 68-78 (1988).
- [2] Pourahmad J., "General Toxicology Persian". 1st ed. Tehran: Samat, 178-840 (2006).
- [3] Cohen S.N., "DNA Cloning: Historical Perspectives. Biogenetics of Neurohormonal Peptides", Academic Press. 3- 14 (1995).
- [4] Ashraf J.M., Arif B., Dixit K., Moinuddin., Alam, K., Physicochemical Analysis of Structural Changes in DNA Modified with Glucose, *Int. J. Biol. Macromolec.*, **51** (4): 604-11 (2012).
- [5] Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T., Cytogenetic Evaluation and DNA Interaction Studies of the Food Colorants Amaranth, Erythrosine and Tartrazine, *Food Chem. Toxicol.*, **48**(10): 2934-44 (2010).
- [6] Levine W. G., Metabolism of Azo Dyes: Implications for Detoxification and Activation, *Drug Metab. Rev*, **23**(3-4): 253-309 (1991).
- [7] Van den Mooter G., Maris B., Samyn C., Augustijns P., Kinget R., Use of Azo Polymers for Colon-Specific Drug Delivery, *J. Pharm. Sci*, **86**(12):1321-7 (1997).
- [8] Weglarz-Tomczak, E., Gorecki L., Azo Dyes–Biological Activity and Synthetic Strategy. *Chemik*, **66**(12): 1298-1307 (2012).
- [9] Pray L., Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick, *Nat. Educ*, **1**(1):100 (2008).
- [10] Van Vranken D., Weiss G., "Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology ", Garland Science (2012).

- [11] Nafisi S., Sadeghi G.B., PanahYab A., Interaction of Aspirin and Vitamin C with Bovine Serum Albumin, *J. Photochem. Photobiol*, **105**(3): 198-202 (2011).
- [12] Albani J.R., "Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy", *Blackwell Science. A Blackwell Publishing Company*, **35**: 108-110 (2007).
- [13] Albani J.R., " Principles and Applications of fluorescence Spectroscopy", *John Wiley & Sons. Inc.* (2008).
- [14] Shweta A., Deepak K.J., Ranjana M., Spectroscopic Studies of the Effects of Anticancer Drug Mitoxantrone Interaction with Calf-Thymus DNA, *J. Photochem. Photobiol*, **120**: 177-182. (2013).
- [15] Pace C.N., The Stability of Globular Proteins, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1-43 (1975).
- [16] Shahabadi N., Mohammadi S., Alizadeh R., DNA Interaction Studies of a New Platinum (II) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands, *Bioinorg. Chem. Appl*, **2011**: ID 429241 (2011).