

·快报·

# 黄素类光核酸酶对 DNA 定位损伤的直接检测

陆长元 韩镇辉 姚思德 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所 辐射化学开放实验室, 上海 201800)

**关键词** DNA, 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 激光光解, 鸟嘌呤阳离子自由基, 定位损伤  
**中图分类号** O64

近来研究人工合成能使 DNA 定位损伤的光核酸酶成为光医学、光化学和光生物学领域的研究热点<sup>[1]</sup>。然而,目前光核酸酶对癌细胞 DNA 的作用机制尚不完全了解。尽管已公认 DNA 碱基阳离子自由基(或氧化性自由基)是核酸光敏氧化反应的最初、最重要的瞬态产物,然而至今未能直接观察到光氧化产生的碱基阳离子自由基的瞬态吸收光谱。这一问题已成为国际同行关注的难题。因为它是激光束进入细胞时激发生物大分子动态过程的关键,是阐明电荷转移光氧化治疗畸变基因、调控基因表达机制的原初证据。现有的研究主要集中在稳态分析上<sup>[1,2]</sup>,尽管也有少数关于瞬态方面的文献报道,但主要以光敏化剂自身的性质研究为主<sup>[1,3]</sup>。在最近的实验中我们发现,光核酸酶经光激发产生的敏化剂活性粒子无论是激发态还是氧化性自由基主要与研究的 DNA 发生反应,而与识别系统中的寡聚核苷酸不起作用。即连接在光敏化剂上的寡聚核苷酸主要起定位作用。从而将本实验室及其它国际同类实验室单凭光敏化剂与 DNA 及其组分的敏化作用来推导光核酸酶的作用机理推进了一步。

核黄素又称维生素 B<sub>2</sub>,是一种非常重要的内源性生物光敏化剂。据报道它是在 UVA 与可见光波段导致 DNA 损伤的主要敏化剂之一<sup>[2]</sup>。通过荧光显微镜方法,我们首次发现核黄素主要分布在细胞内部,因而其光敏化的靶位置主要在细胞核的内部。我们近来的研究表明,在敏化过程中核黄素的激发三重态和氧化性自由基可能都是反应的活性中间体,它们首先与 DNA 碱基之间发生电荷转移,生成碱基阳离子自由基<sup>[3,4]</sup>。由于双链 DNA 碱基的堆积效应,使碱基阳离子自由基将空穴转移至氧化电位最低的同型鸟嘌呤序列,并最终导致 DNA 链中 G-G 的 5'-G 上发生选择性损伤<sup>[2,5]</sup>。这个结论主要依据于终产物分析,并未能以动态的方法直接观察到。黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)是由核黄素和 AMP 组成,因而可以作为光核酸酶的模型化合物来研究与 DNA 的相互作用。为排除激发态的干扰以及提高氧化性自由基的量子产额,我们选用强氧化剂 SO<sub>4</sub><sup>·-</sup>自由基(氧化电位为 2.5-3.1 V/NHE)氧化的方法来产生光敏活性粒子-氧化性自由基。

从 FAD 氧化性自由基氧化 dGMP、dAMP 与 ssDNA 后得到的结果可以看出:ssDNA 氧化性自由基吸收谱具有 dGMP 氧化性自由基的特征,而与 dAMP 的截然不同。DNA 鸟嘌呤端基阳离子自由基的直接检测,为黄素类化合物定位损伤 DNA 的鸟嘌呤组分提供了瞬态证据。

国家自然科学基金(39830090)资助

第一作者:陆长元,男,1973 年 9 月出生,2000 年 7 月中国科学院上海原子核研究所无机化学专业博士毕业,现为德国波鸿大学博士后

收稿日期:初稿 2000-09-01, 修回 2000-09-29

分子轨道理论计算与激光光解实验一致指明 DNA 的同型鸟嘌呤是空穴(阳离子自由基)长程转移的特定定域序列<sup>[1,5]</sup>。DNA 阳离子自由基是电荷转移光氧化 DNA 的主要原初瞬态产物,也是电离辐射、真空紫外对细胞 DNA 直接作用的共同原初瞬态产物。所以,直接检测 DNA 阳离子自由基是充分阐明这些原初过程的关键。放射生物学家、光生物学家均认为真空紫外(通常用 193 nm)单光子电离最能模拟电离辐射对细胞 DNA 的直接作用机制,力图直接观察 DNA 阳离子自由基的特征瞬态吸收光谱,但迄今所获 DNA 阳离子自由基的瞬态吸收均不能充分显示鸟嘌呤端基阳离子特征。我们实验室在系统研究丙酮三重态选择性氧化 DNA 的基础上<sup>[6]</sup>,又得出内源性黄素类光核酸酶电荷转移氧化核酸碱基生成其阳离子自由基的机理,进而获取了 DNA 阳离子空穴迁聚于鸟嘌呤序列的原初过程。这是电离辐射、强紫外光电离及光敏化剂氧化损伤核酸的一项突破。

### 参 考 文 献

- 1 Armitage B. *Chem Rev*, 1998, **98**:1171—1200
- 2 Ito K, Inoue S, Yamamoto K *et al.* *J Biol Chem*, 1993, **268**: 13221—13227
- 3 Lu C Y, Wang W F, Lin W Z *et al.* *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1999, **52**: 111—116
- 4 Lu C Y, Lin W Z, Wang W F *et al.* *Phys Chem Chem Phys*, 2000, **2**:329—335
- 5 Sugiyama H, Saito I. *J Am Chem Soc*, 1996, **118**:7063—7068
- 6 Song Q H, Lin N Y, Yao S D. *Prog Natural Sci*, 2000, **10**:81—90

## DIRECT OBSERVATION OF SITE-SELECTIVE DAMAGE OF DNA BY FLAVIN PHOTONUCLEASE

LU Changyuan HAN Zhenhui YAO Side LIN Nianyuan

(*Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*)

**ABSTRACT** The interaction of oxidized FAD radical with dGMP, dAMP and single-stranded DNA (ssDNA) was investigated in neutral aqueous solution using time-resolved 248 nm laser flash photolysis aimed at elucidation of the initial photosensitization mechanism. The characterized absorption spectra of transient species were observed. Moreover, direct observation of stabilized DNA guanyl radical has provided transient evidence for site-selective photosensitized damage of DNA at guanine moiety, which has simulated the major initial species produced by the direct effect of ionizing radiation or UV light on DNA.

**KEYWORDS** DNA, Flavin adenine dinucleotide (FAD), Laser flash photolysis, Guanyl radical, Site-selective damage

CLC O64