

# 冰态水溶液中 $\gamma$ 射线引发胸腺嘧啶二聚作用机理研究 I. 影响胸腺嘧啶二聚作用的因素

秦国良 张文龙 张加山

(中国科学院上海原子核研究所)

**摘要** 本文研究了自由基清除剂和正负离子清除剂对冰态水溶液中 $\gamma$ 射线引发胸腺嘧啶二聚作用的影响,证明水辐解产生的OH自由基的间接作用不是形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的原因,正负离子重合也不是形成这种二聚体的途径,而从激发能转移过程的研究中,给出了由胸腺嘧啶激发态的途径形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的证据。同时发现,在268K时,亦形成胸腺嘧啶二聚体的A型异构体。

**关键词** 清除剂;胸腺嘧啶二聚作用;冰态水溶液;激发能转移。

## 引 言

我们曾用纸层析紫外逆向、质谱、红外和核磁共振等技术以及与标准样品对照的方法,清楚地判明了在冰态水溶液中 $\gamma$ 射线引发胸腺嘧啶形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的A型异构体<sup>[1]</sup>。为了研究这种二聚体的形成机理,我们研究了若干因素对二聚体形成的影响。

在电离辐射引发胸腺嘧啶核苷和核苷酸的二聚作用的研究中,人们曾提出过由正负离子重合的机理形成二聚体的假设<sup>[2~3]</sup>。Infante等人<sup>[4]</sup>在评述嘧啶碱基的辐射化学时,曾给出了由水辐解产生的OH自由基的间接作用途径形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的反应图式。我们在详细地考察了这些可能性后,认为前一种机理不是形成以环丁烷型连接的二聚体的途径,而后一途径不能形成这种构型的二聚体。通过酪氨酸、色氨酸和丙酮等对二聚体产额影响的研究,证明这种二聚体是由胸腺嘧啶激发态的途径形成的。本文详细地报道这些研究结果。

## 实 验

我们发现,经重结晶纯化和未经纯化的胸腺嘧啶,其结果相同,所以大部分实验中所用的胸腺嘧啶为未经进一步纯化的市售生化试剂,其它均为AR级试剂。全部溶液都用三次重蒸馏水配制。

在一定体积的胸腺嘧啶水溶液中加入一定量的<sup>14</sup>C标记的胸腺嘧啶,经真空脱气三次(真空度为 $2 \times 10^{-5}$  mmHg左右)或经用纯度为99.99%的氮气鼓泡20 min后封管,用液空快速冰冻后置于干冰中用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线辐照至吸收剂量为 $5 \times 10^7$  rad。室温辐照时,剂量为 $1 \times 10^8$  rad。辐照后的样品

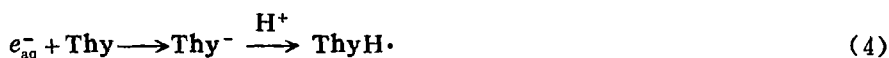
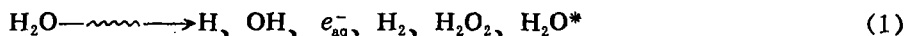
经自然融化后,取适量作纸色层分离。把经紫外逆向定位的二聚体斑点剪下,在 NE-8312 型液体闪烁谱仪上测放射性,从其与适量料液的总放射性之比而计算出所形成的二聚体的辐射产额  $G_d$  (分子/100 eV)。详细实验方法如前文所述<sup>[1]</sup>。

为了研究添加剂对二聚体  $G_d$  值的影响,在  $2 \times 10^{-2} M$  的胸腺嘧啶水溶液中,加入各种添加剂,然后进行辐照及  $G_d$  值测定。

## 结 果 与 讨 论

### 1. 关于由 OH 自由基的间接作用形成二聚体的可能性

从辐射化学的观点,在稀水溶液中,电离辐射对溶质分子的作用主要是通过水辐解所产生的活性产物的间接作用引起的。在胸腺嘧啶水溶液体系中,应有如下一些辐射化学反应:



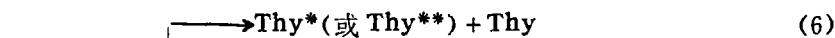
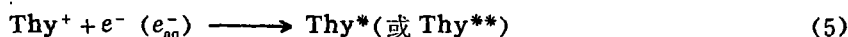
这些自由基产物的存在,人们已用 ESR 和脉冲辐解技术作过广泛的研究而证实。它们必然会引起胸腺嘧啶的损伤,产生各种各样的胸腺嘧啶的辐射降解产物,这已为许多研究者的工作所证明<sup>[4-6]</sup>。问题是,这些胸腺嘧啶的自由基产物会不会形成以环丁烷型连接的二聚体呢?

如果二聚体的生成是由水辐解的活性产物的间接作用引起的,则在一定范围内改变胸腺嘧啶的浓度,二聚体的  $G_d$  值应基本上保持不变。我们在实验中发现结果与此相反,即二聚体的  $G_d$  值随胸腺嘧啶浓度变化而变化,且这种变化在胸腺嘧啶的不同浓度范围内遵循不同的规律<sup>[7]</sup>。

如果情况像 Infante 等<sup>[4]</sup>所设想的那样,胸腺嘧啶的 OH 加合物自由基  $ThyOH \cdot$  可以形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体,则加入 OH 自由基的清除剂时,二聚体的  $G_d$  值应该下降,或者在体系中增加 OH 自由基的产额时,二聚体的  $G_d$  值应该增加。为此,我们把特丁醇加到  $2 \times 10^{-2} M$  的胸腺嘧啶水溶液中以清除 OH 自由基,在特丁醇浓度为 0.2 和 0.4 M 时,发现二聚体的  $G_d$  值并不下降。Cadet<sup>[8]</sup> 从  $N_2O$  饱和的  $2 \times 10^{-2} M$  胸腺嘧啶冰冻水溶液中测出二聚体的  $G_d$  值为  $6.8 \times 10^{-3}$  分子/100 eV,这基本上等于我们的含氮体系中的产额 ( $7.0 \times 10^{-3}$  分子/100 eV)。在  $N_2O$  饱和的体系中,  $N_2O$  把水合电子转化为 OH 自由基,体系中的 OH 自由基的产额增加了,但二聚体的  $G_d$  值并没有增加。因此,我们的结果和 Cadet<sup>[8]</sup> 的结果都表明以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体不是经由胸腺嘧啶的 OH 加合物自由基的途径形成的。

### 2. 关于正负离子重合的机理

根据双光过程生成胸腺嘧啶阳离子和阴离子的理论<sup>[9]</sup>, Gregoli 等<sup>[2]</sup>提出,在胸腺嘧啶核苷酸的冰冻水溶液中,  $\gamma$  射线引发生成胸腺嘧啶核苷酸的正、负离子,由其重合作用而形成二聚体。Sharpaty 等<sup>[3]</sup>在研究冰态水溶液中由电离辐射引发胸腺嘧啶核苷酸的二聚作用时,也倾向于由正负离子重合形成二聚体的观点。对此,我们可假设在体系中发生如下反应:



显然在反应(5)和(6)中,无论发生哪一个反应,不是形成激发态就是生成超激发态,由这些过程

形成二聚体, 本质上是经由激发态的途径, 其形成二聚体的反应历程应服从激发态的反应图式。如果是经由反应(7)直接形成二聚体, 它便不会遵循激发态的反应图式。但是无论由反应(5)到反应(7)的哪一个过程形成二聚体, 则可以预期加入电子清除剂或阳离子清除剂都会降低它们的反应机率, 引起二聚体  $G_d$  值的下降。表 1 列出了我们的一些实验结果, 其中第 I 组为电子清除剂, 第 II、III 组为阳离子转移体。

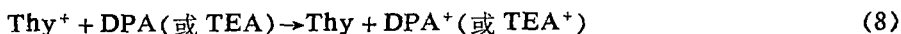
表 1 清除剂对胸腺嘧啶二聚体形成产额的影响(干冰温度辐照, 胸腺嘧啶浓度为  $2 \times 10^{-2} M$ , 剂量为  $5 \times 10^7 rad$ )

组号	清除剂	$G_d (\times 10^{-3} \text{ 分子}/100 \text{ eV})$
I	—	7.1
	30% 丙酮 (v/v)	8.2
	$N_2O$ 饱和 <sup>[8]</sup>	6.8
	$3.4 \times 10^{-3} M$ 半胱氨酸	6.4
	对甲苯磺酸盐	
II	$5 \times 10^{-4} M DPA$	7.1
	$5 \times 10^{-4} M TEA$	7.2
	$5 \times 10^{-3} M DPA$	6.7
	$5 \times 10^{-3} M TEA$	6.8
III	$4 \times 10^{-4} M$ 吡啶	7.2
	$4 \times 10^{-3} M$ 吡啶	6.5

首先, 在 30% (体积比) 的丙酮体系中, 约有 98% 以上的水合电子被清除。同时, 这样高浓度的丙酮亦可清除体系中的“干”电子。在氧化亚氮饱和的体系中, 电子为  $N_2O$  所清除。从表 1 可以看出, 在这两种情况下, 二聚体的  $G_d$  值并没有下降。在半胱氨酸对甲苯磺酸盐的体系中,  $G_d$  值略有下降。这可能是由于半胱氨酸能够竞争嘧啶的三重态<sup>[10]</sup>, 起猝灭剂作用而降低  $G_d$  值<sup>[11]</sup>, 也可能像在第 II 组和第 III 组实验那样, 由于添加剂浓度较高而增加了胸腺嘧啶的分散性所引起的。

第二, Kira 等<sup>[12]</sup> 研究了脉冲辐照 S-BuCl 在 77 K 玻璃态中正电荷由胺类的清除过程指出, 正电荷转移给胺类的速率随胺类电离电位的下降而增加, 认为该过程可以看作是电子从胺的长距离的转移过程。胸腺嘧啶的电离电位为  $9.43 \sim 8.25 \text{ eV}$ <sup>[13]</sup>, 二丙胺(DPA)和三乙胺(TEA)的电离电位分别为  $7.73$  和  $7.50 \text{ eV}$ <sup>[12]</sup>。因此在胸腺嘧啶阳离子和二丙胺与三乙胺之间

能够发生有效的电荷转移过程。



但如表 1 所表明的那样, 加入阳离子转移体 DPA 或 TEA 后并不影响二聚体的  $G_d$  值。

第三, 在含吡啶的体系中, 吡啶的电离电位比胸腺嘧啶高 ( $9.8 \text{ eV}$ <sup>[14]</sup>), 它应该发生与第 II 组的阳离子转移体相反的电荷转移过程, 从而增加胸腺嘧啶阳离子的产额。



从表 1 第 III 组的实验结果表明, 当体系中存在吡啶时, 二聚体的  $G_d$  值并没有增加。

表 2 在不同气氛中二聚体的  $G_d$  值

体系	$G_d (\times 10^{-3} \text{ 分子}/100 \text{ eV})$
脱气	9.3 (= 0.79 + 8.4)
$N_2$ 饱和	7.1 (= 0.79 + 6.2)
$N_2O$ 饱和 <sup>[8]</sup>	6.8 (= 0.79 + 6.2)
空气饱和	6.6 (= 0.38 + 6.2)

基于上述结果, 我们认为正负离子重合不是形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的途径。

### 3. 关于激发能的转移

表 2 列出了在不同气氛中  $2 \times 10^{-2} M$  胸腺嘧啶冰态水溶液在干冰温度时由  $\gamma$  射线辐照至剂量为  $5 \times 10^7 rad$  后所测出的胸腺嘧啶二聚体的  $G_d$  值。从该表可以看出, 在含空气体系中二

聚体的  $G_d$  值比在脱气、氮饱和以及  $N_2O$  饱和的体系中的  $G_d$  值低。

从二聚作用动力学的研究<sup>[7]</sup>可以看出,这些产额的每一项都有两部分组成,其中之一是由胸腺嘧啶的激发三重态形成的,这一部分数值在脱气、氮饱和、 $N_2O$  饱和的体系中是相同的,均为  $(0.79 \pm 0.07) \times 10^{-3}$ ,而在空气饱和的体系中该值较上述三个体系中的低。这是因为胸腺嘧啶的三重态被氧猝灭所引起的,我们估计在该体系中被氧猝灭的胸腺嘧啶激发三重态的辐射产额为  $8.2 \times 10^{-4}$  分子/100 eV。上述结果是由激发三重态机理形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的证据。

在嘧啶碱的光引发二聚作用的研究中,许多研究者指出,丙酮的三重激发态的能量比嘧啶高,能把其激发能转移给嘧啶而增加嘧啶二聚体的  $G_d$  值<sup>[15-17]</sup>。如前所述,我们在研究用丙酮清除水合电子的实验中也发现有类似的过程。因而我们进一步研究了酪氨酸和色氨酸对胸腺嘧啶二聚作用的影响。人们曾指出,稀水溶液的快速冰冻引起溶质分子聚集态的形成,而把两种不同溶质的水溶液快速冰冻,由于溶质分子的堆积排列引起混合聚集态的形成<sup>[18-20]</sup>,而利于激发能的转移。Montenay-Garester<sup>[21]</sup>提供了在 77 K 时激发单重态和三重态的能量有效地从酪氨酸向核酸碱基转移的证据。表 3 列出了丙酮<sup>[17]</sup>、酪氨酸、色氨酸和胸腺嘧啶核苷酸<sup>[22]</sup>的激发态的能量。由此可以预期,当体系中存在酪氨酸时,胸腺嘧啶二聚体的  $G_d$  值将会增加。表 4 列出了我们的一

表 3 某些有关化合物的激发态能量

化合物	单重激发态能量 ( $cm^{-1}$ )	三重激发态能量 ( $cm^{-1}$ )
TMP	34100	26300
Tyr	37000	29600
Trp	34400	25000
丙酮		28200

表 4 几种激发能转移体对胸腺嘧啶二聚体  $G_d$  值的影响(中性 pH, 干冰温度辐照, 剂量为  $5 \times 10^7 rad$ )

体系	$G_d (\times 10^{-3} \text{分子}/100eV)$
$2 \times 10^{-2} MThy$	7.1
30%丙酮、70% $2 \times 10^{-2} MThy$	8.2
$1 \times 10^{-3} MTyr, 2 \times 10^{-2} MThy$	10.91*
$5 \times 10^{-3} MTrp, 2 \times 10^{-2} MThy$	5.0

\* 辐照  $4 \times 10^7 rad$  时  $G_d$  值为 12.45。

些实验结果。从中可以看出,在含丙酮和酪氨酸体系中,二聚体的  $G_d$  值要比不含这些化合物时的  $G_d$  值要高。这是由激发态途径形成二聚体的又一有力证据。虽然表 3 指出色氨酸能把其单重激发态的能量转移给胸腺嘧啶,但胸腺嘧啶三重激发态的能量却能转移给色氨酸,并且如 Settow<sup>[23]</sup>所发现的那样,在冰态水溶液中,色氨酸能使使环丁烷型胸腺嘧啶二聚体光解聚的敏化剂作用。Helene<sup>[22]</sup>把这种现象归之于电子自色氨酸的单重激发态转移给邻近的基态二聚体。我们的实验证实了色氨酸可以敏化这种解聚效应。这再次证明了以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体是由激发态的途径形成的。我们在另一篇论文<sup>[7]</sup>中详细地报道了关于激发态途径形成胸腺嘧啶二聚体的反应动力学历程。

#### 4. 关于温度效应

我们研究了辐照温度对胸腺嘧啶二聚作用的影响,发现在 268K 时,无论在空气饱和还是在脱气体系中,均能形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体 A 型异构体。在此温度辐照的  $2 \times 10^{-2} M$  胸腺嘧啶的脱气冰态水溶液中,在剂量为  $5 \times 10^7 rad$  时,测得的二聚体的  $G_d$  值要比在干冰温度辐照时的  $G_d$  值为高。前者为  $10.6 \times 10^{-3}$  分子/100 eV,后者为  $9.28 \times 10^{-3}$  分子/100 eV。这跟 Fisher 和 Johns<sup>[24]</sup>在研究胸腺嘧啶的光引发二聚作用时所发现的 A 型二聚体的  $\phi_{isc} \cdot f_d$  随温度的增

加而增加的情况相一致。

和 Infante 等<sup>[26]</sup>的结果相反,我们反复研究了空气饱和的  $2 \times 10^{-2} M$  胸腺嘧啶水溶液在室温时由  $\gamma$  射线引发胸腺嘧啶的二聚作用,即使把大量辐照样品浓缩、分离后也未曾发现形成以环丁烷型连接的二聚体。我们并不排除形成以单键连接的二聚体的可能性,如同在腺嘧啶的情况那样<sup>[20]</sup>。在脱气的体系中于室温辐照时,我们分离出一种产物。它在  $1300 \text{cm}^{-1}$  处有一特征红外吸收峰。同时它经紫外辐照后可形成紫外吸收斑点。这种产物的辐射产额极低,无法准确测出。

## 结 论

本文研究了若干因素对冰态水溶液经  $\gamma$  射线引发而形成的以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体  $G_d$  值的影响,获得了如下一些结论:

(1) 以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的形成不是由水辐解所产生的自由基,特别是 OH 自由基的间接作用途径所引起的。

(2) 胸腺嘧啶的正负离子自由基的重合也不是形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的原因。

(3) 以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体是经由胸腺嘧啶激发态的途径形成的。

(4) 酪氨酸可把其激发能转移给胸腺嘧啶,从而增加胸腺嘧啶二聚体的  $G_d$  值。

(5) 在 268 K 时亦形成以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的 A 型异构体,其  $G_d$  值要比在 195 K 时为高。当室温辐照时,在空气饱和的体系中没有发现形成这种构型的二聚体,而在脱气的体系中,虽分离出了一种产物,它为紫外光所逆向,且在红外谱图中于  $1300 \text{cm}^{-1}$  处有特征吸收峰,但其产额太低,难以准确测定其辐射产额及进行结构鉴定。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang Jiashan, Qin Guoliang and Zhang Wenlong, *Radiat. Phys. Chem.*, 17, 207 (1981).
- [2] S. Gregoli, M. Oast and A. Bertinchamps, *Radiat. Res.*, 65, 202 (1976).
- [3] V. Sharpatyi, J. Cadet and R. Teoule, *Int. J. Radiat. Biol.*, 33, 419 (1978).
- [4] G. A. Infante, E. J. Fendler and J. H. Fendler, *Radiat. Res. Rev.*, 4, 301 (1973).
- [5] R. Teoule and J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.*, 27, 211 (1975).
- [6] C. Scholes, in S. Y. Wang ed., "photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids." Vol I, PP. 521-577, Academic Press. 1976.
- [7] 张加山, 秦国良, 张文龙, 辐射研究与辐射工艺学报, 1 (1), 35 (1983).
- [8] J. Cadet, *Tetrahedron Letter.*, 47, 4275 (1976).
- [9] M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem.*, 75, 626 (1971).
- [10] T. Jellinck and R. B. Johns, *Photochem. Photobiol.*, 11, 349 (1970).
- [11] H. E. Johns, G. J. Fisher, and D. W. Whillans, in G. E. Adams, E. M. Fielden and B. D. Michael ed., "Fast Processes in Radiation Chemistry and Biology", PP. 215~234, The Int. Institute of Physics and John Wiley and Sons, 1975.
- [12] A. Kira, Y. Nasaka and M. Imamura, *J. Phys. Chem.*, 84, 1882 (1980).
- [13] J. S. Kwiatkowski and Pullman, in A. R. Katritzky and A. J. Boulton ed., "Advances in Heterocyclic Chemistry", Vol. 18, PP. 228, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.
- [14] F. H. Field and J. L. Franklin, "Electron Impact Phenomena", P. 113, Academic Press, New York, 1957.
- [15] B. H. Jeimings, S. C. Pastra and J. L. Wellington, *Photochem. Photobiol.*, 11, 215 (1970).
- [16] C. L. Greenstock and H. E. Johns, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 30, 21 (1968).
- [17] R. F. Borkman and D. R. Kearns, *J. Chem. Phys.*, 44, 954 (1966).

- [18] P. O. P. Tso, in G. D. Frasnman and S. N. Timasheff ed, "The Biological Macromolecules," P. 49, Dekken, New York, 1970.
- [19] T. N. Solie and J. A. Schallman, *J. Mol. Biol.*, **33**, 61 (1968).
- [20] T. Montenary-Garester, M. Charlier and C. Helene, in S. Y. Wang ed, "Photochemistry and Photo-biology of Nucleic Acids", PP. 382~418 Academic Press, 1976.
- [21] T. Montenary-Garester, in J. B. Birks ed., "Excited State of Biological Molecules". PP. 207~216, Johns Wiley and sons, 1976.
- [22] C. Helene, in J. B. Birks, ed "Excited State of Biological Molecules," PP. 151~168, Johns Wiley and Sons, 1976.
- [23] R. B. Settow, *Photochem. Photobiol.*, **7**, 643 (1968).
- [24] G. J. Fisher and H. E. Johns *Photochem Photobiol.*, **11**, 429 (1970).
- [25] G. A. Infante, P. Jirathana, J. H. Fendler and E. E. J. Fendler, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1.*, **69**, 1586 (1973).
- [26] P. C. Shragge, A. J. Varghese, J. W. Hunt and C. L. Grenstock, *Radiat Res.*, **60**, 250 (1974).

(1983年3月8日收到)

## THE STUDY OF MECHANISM FOR DIMERIZATION OF THYMINE IN FROZEN AQUEOUS SOLUTIONS INDUCED BY $\gamma$ -RAYS I. FACTORS AFFECTING THE DIMERIZATION OF THYMINE

Qin Guoliang    Zhang Wenlong    Zhang Jiashan

(Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, P. O. Box, 8204, Shanghai, China.)

**ABSTRACT** In this paper, we have investigated the effect of the radical and cation-anion scavengers on the dimerization of thymine in frozen aqueous solution induced by  $\gamma$ -rays. It was proved that the indirect effect of OH radical produced by water radiolysis is not the cause of forming the thymine dimer linked by the cyclobutane ring. The cation-anion recombination is not the way of forming the dimer too. From the research of excitation transfer we have obtained the evidence that thymine dimer linked by the cyclobutane ring is caused by the excited state of thymine. At the same time, we have found that the thymine dimer A can also be formed at 268 K.

**KEY WORDS** Scavenger; Dimerization of thymine; Frozen aqueous solution; Excitation transfer.