

碱性氨基酸辐射保护机理的 电子自旋共振研究

李学鹏 林念芸 屠铁城 谢继东

(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 本文研究了组氨酸和精氨酸对胸腺嘧啶的辐射保护机理。用 ESR 方法和分子轨道计算确证其辐射保护是由于电子清除和从胸腺嘧啶阴离子向碱性氨基酸的转移。碱性氨基酸的亲电子性能随质子化程度而异,在 pH=7 的条件下,组氨酸对胸腺嘧啶的辐射保护机理可能是电子转移与氢原子转移的协同过程。

关键词 碱性氨基酸; 电荷转移保护; 氢原子转移; 电子自旋共振; 胸腺嘧啶; 组氨酸; 精氨酸。

前 言

前文^[1]曾报道用 ESR 研究两种亲电子氨基酸—半胱氨酸、胱氨酸对 DNA 的重要组份胸腺嘧啶、脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)的辐射保护机理。从程序升温法所得结果详细地讨论了半胱氨酸对 dTMP 的修复过程,同时还用几种方法协同研究了这两种亲电子氨基酸对胸腺嘧啶在 77 K 的保护机理,发现并证实了电子转移机理。

众所周知,在染色质中 DNA 是与组蛋白缠绕在一起并与之形成离子键以保持自身的稳定。而组蛋白属于碱性蛋白富含碱性氨基酸,因此,探讨这些氨基酸组份对 DNA 碱基的辐射保护效应有助于阐明组蛋白对 DNA 可能的辐射保护机理。

实 验 部 份

1. 试剂

胸腺嘧啶,组氨酸,精氨酸均为生化试剂。

2. 样品的制备与辐照

将胸腺嘧啶与氨基酸按不同克分子比称量后溶于三重蒸馏水中,然后将上述水溶液的 pH 分别调至 5; 6; 7, 并进行冷冻干燥。将冷冻干燥后的样品置入内径约 3mm 的 GG-17 玻璃管中用超纯氮除氧封管。样品在钴源上 77 K 避光条件下进行辐照至 7 Mrad。

3. ESR 波谱的测定

所有被辐照的样品都用 Varian E-112 ESR

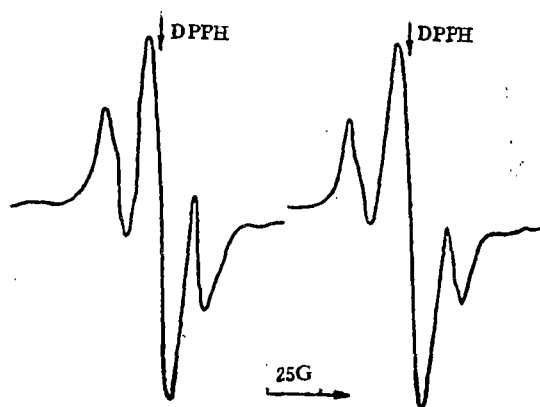


图 1 组氨酸(pH 5,6)77 K 辐照,
77 K 测定的 ESR 波谱
(左) pH 5 (右) pH 6

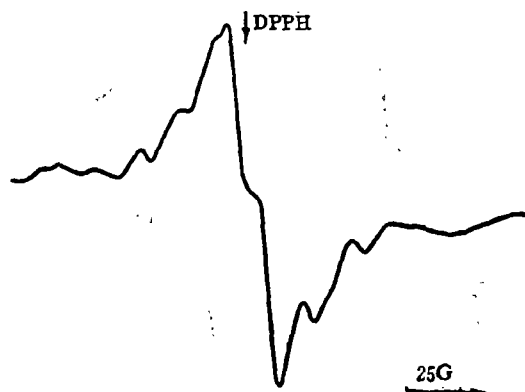


图 2 胸腺嘧啶 77 K 辐照的 ESR 波谱



图 3 组氨酸(pH 5)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱



图 4 组氨酸(pH 6)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

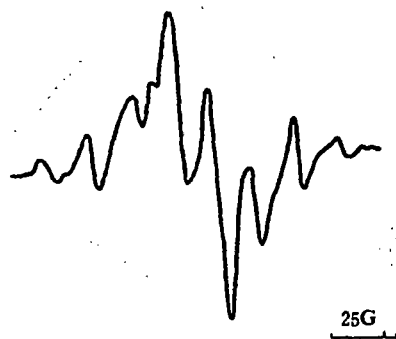


图 5 胸腺嘧啶 77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

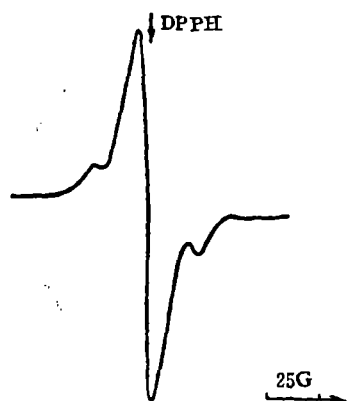


图 6 组氨酸(pH 7)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱

波谱仪 X 波段进行测定, 所用微波功率一般为 1 mw。用 E-500-2 精密的 NMR Gauss 计跟踪测定磁场。用 E231/232 双样品腔和 DPPH 标准样品协同标定 g 值, 在 77K 辐照的样品直至在该温度进行 ESR 测定, 始终保持在液氮内。然后在室温退火后测定。

结果和讨论

1. 胸腺嘧啶-组氨酸二元体系

图 1 展示了组氨酸(pH 5;6) 77K 辐照, 测定的 ESR 波谱。其波谱特征与 Westhof^[2]Box^[3]低温辐照测定的组氨酸单晶的还原自由基产物十分相似。Westhof^[2]曾用部分氧化的方法确证了上述自由基产物和半胱氨酸^[1]相似, 也是由 C-H β 质子和 O⁻(H⁺) 活动质子的超精细谱组成的并且显示出氨基酸阴离子自由基

的共同特征 $\left(\text{R}-\text{CH}-\dot{\text{C}} \begin{matrix} \text{O}^-(\text{H}^+) \\ \text{O}^- \end{matrix} \right)$, 与胸腺嘧啶 77 K 的 ESR 波谱截然不同(图 2)。



上述微酸性条件下 77 K 辐照产生的自由基升至室温退火后转化为脱氢自由基与咪唑环加氢自由基波谱的重叠, 对于 pH 5 条件下主要显示加氢自由基的特征(图 3), 均与胸腺嘧啶 5 位

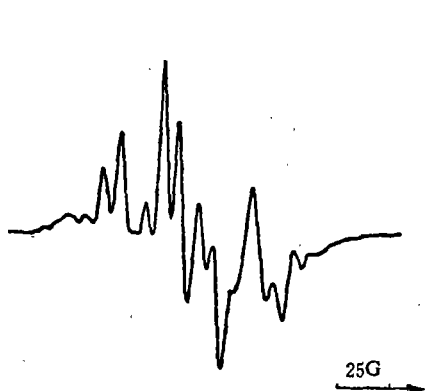


图 7 组氨酸(pH 7)77 K 辐照, 升至室温退火后 ESR 波谱

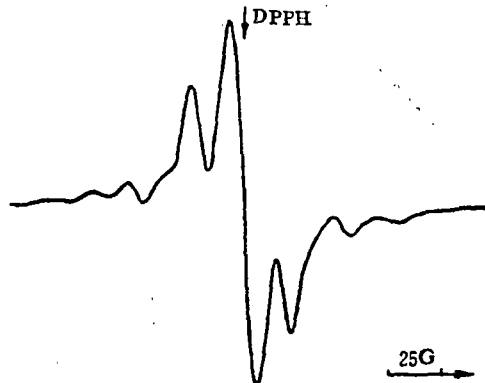


图 8 胸腺嘧啶-组氨酸 (pH 5, 4:1)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱

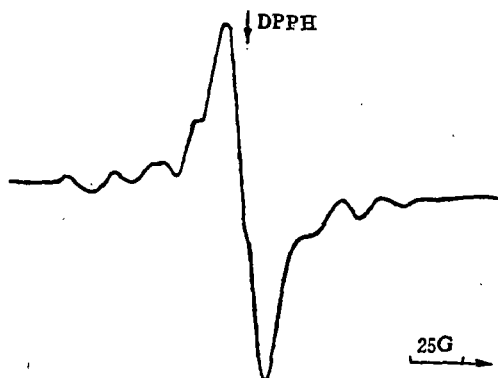


图 9 胸腺嘧啶-组氨酸 (pH 7, 4:1)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱

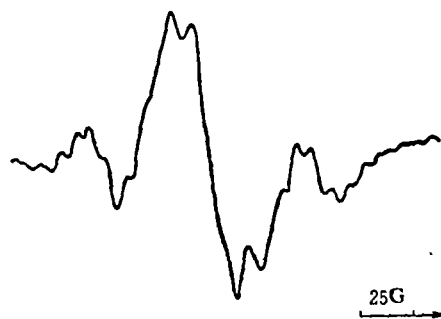


图 10 胸腺嘧啶-组氨酸 (pH 5, 4:1)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

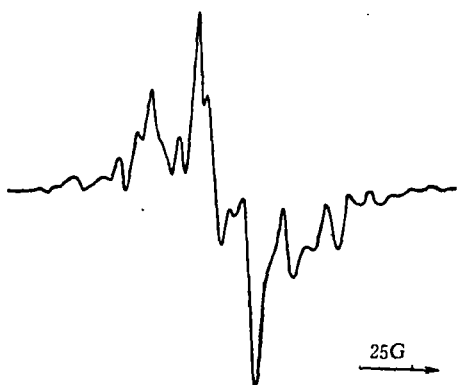
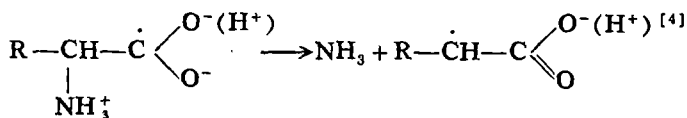


图 11 胸腺嘧啶-组氨酸 (pH 7, 4:1)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

自由基的八重峰截然不同(图 5)。图 6 所示 pH 7 条件下 77K 辐照, 测定的 ESR 波谱虽然也显示氨基酸阴离子的特征, 但不如微酸性条件下那么显著, 正如 Westhof^[2]所确证的上述阴离子自由基升至室温退火后转化为脱氨基自由基。

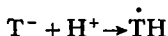


至于胸腺嘧啶-组氨酸二元体系, 研究了 pH 5; 6; 7 时在 77 K 辐照后的 ESR 波谱, 实验结果表明对于微酸性条件下 (pH 5; 6) 胸腺嘧啶-组氨酸二元体系的三种克分子比(1:1, 2:1, 4:1)都显示组氨酸本身的 ESR 谱。图 8 展示了 pH 为 5、克分子比为 4:1, 77 K 辐照后二元体系的 ESR 波谱。但当二元体系的 pH 为 7 时(4:1)77 K 辐照后的 ESR 波谱却明显显示胸腺嘧啶自由基的痕迹(图 9)。

如图 10, 11 所示, 上述 77K 的二元体系在室温退火后其 ESR 波谱不论 pH 值如何, 都显示室温下氨基酸本身的 ESR 波谱特征。

由于嘧啶碱基是 DNA 中亲电子性能较强的组份, 在电离辐射作用下能俘获次级电子而成为

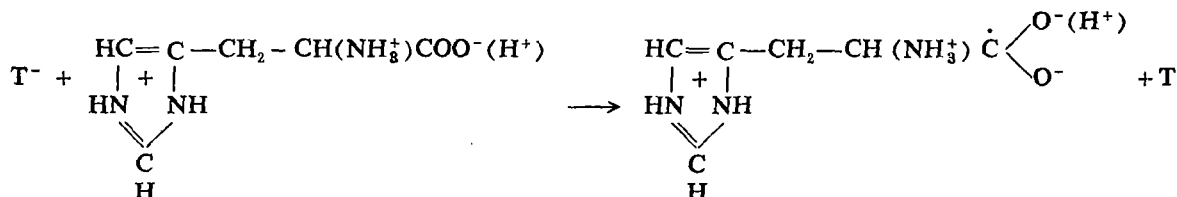
阴离子自由基^[5-6], 胸腺嘧啶阴离子自由基经历质子化反应便会生成 5 位自由基而导致 DNA 的变性^[7]。



当胸腺嘧啶与亲电子的保护剂共存时, 次级电子便可能被保护剂俘获或者先被胸腺嘧啶俘获, 然后经由电子转移最终仍被保护剂所俘获。

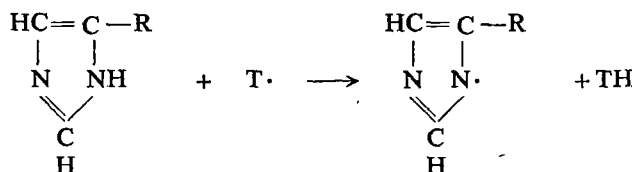
前文^[1]报道的半胱氨、胱氨酸便是一种含硫氨基酸亲电子保护剂, 碱性氨基酸的组氨酸是另一种亲电子氨基酸。它的亲电子性能随质子化程度而变异。pH 6 时有 50% 以上质子化, pH 7 时质子化的氨基酸不到 10%, 质子化的氨基酸其最低空轨道能量为 -3.61eV , 而胸腺嘧啶则为 2.60eV 。但当组氨酸失去质子转为中性后, 其最低空轨道能量便升至 3.02eV 。

对于质子化的组氨酸与胸腺嘧啶阴离子之间的电子转移如下式:



如前所述, 由于 pH 7 条件下组氨酸只有少量 ($<10\%$) 处于质子化状态, 二元体系更多的显示胸腺嘧啶自由基的痕迹。但当升至室温退火后即使胸腺嘧啶与组氨酸的克分子比为 4:1 的情况下也基本显示组氨酸自由基的特征。辐射保护的机理可能是除了少量质子化组氨酸通过电子转移对胸腺嘧啶进行保护外, 还应当考虑到氢原子转移机理。参照前文^[8]关于 AET 保护胸腺嘧啶的氢原子转移机理, 设想咪唑环上的 $\text{N}-\text{H}$ 基团可能是修复靶分子的活动氢的一个来源,

即:



2. 胸腺嘧啶-精氨酸二元体系

图 12 展示了 pH 5, 6, 77 K 辐照后精氨酸的 ESR 波谱, 它的基本特征与组氨酸, 半胱氨酸阴

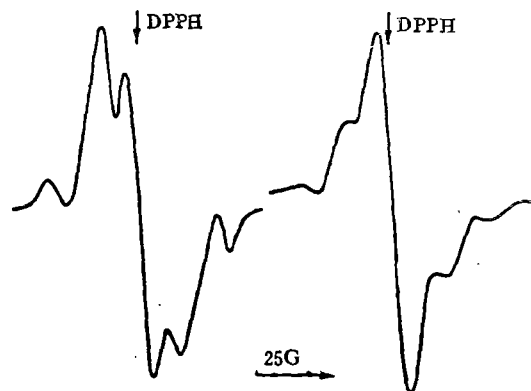


图 12 精氨酸(pH 5,6)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱
(左) pH5 (右) pH6

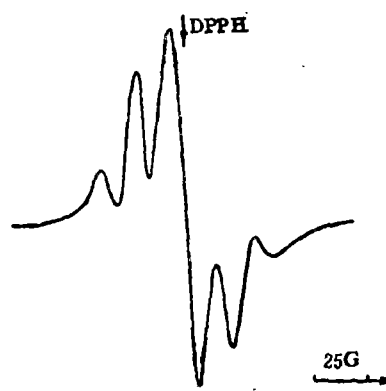


图 13 精氨酸(pH 7)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱

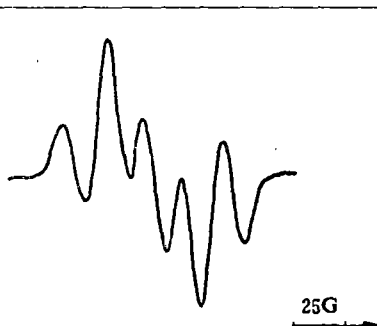


图 14 精氨酸(pH 5)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

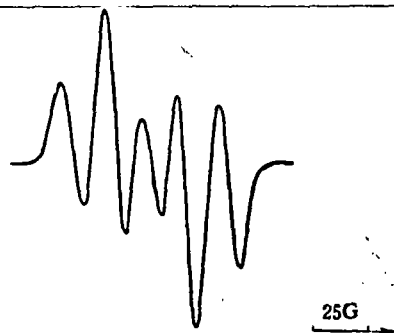


图 15 精氨酸(pH 7)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

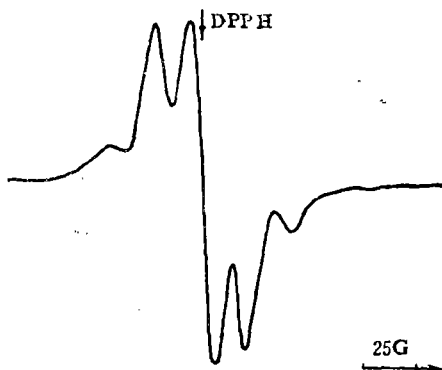


图 16 胸腺嘧啶-精氨酸(pH 5, 1:1)77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱

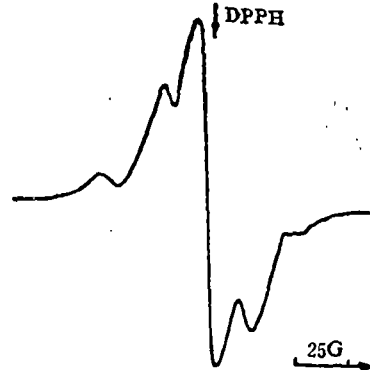


图 17 胸腺嘧啶-精氨酸 77 K (pH 7, 1:1) 77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 波谱



图 18 胸腺嘧啶-精氨酸(pH 5, 1:1)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

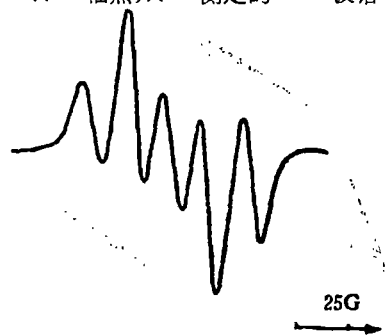


图 19 胸腺嘧啶-精氨酸(pH 7, 1:1)77 K 辐照, 升至室温退火后的 ESR 波谱

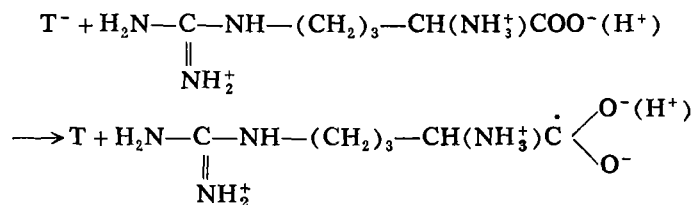
离子自由基的 ESR 波谱颇为相似, 也显示出由 C—H β 质子和 O $^-$ (H $^+$) 活动质子的超精细谱。而 pH 7, 77 K 的 ESR 波谱特征与微酸性条件下类同(图 13)。

如图 14、15 所示, 上述反映阴离子自由基的波谱在室温退火后也转化为脱氢或加氢自由基的波谱。

至于克分子比 1:1 的胸腺嘧啶-精氨酸二元体系, 微酸性 (pH 5; 6) 条件下的二元体系 77 K 的 ESR 波谱仅显示精氨酸本身的 ESR 特征, 当 pH 为 7 时 77 K 辐照, 测定的二元体系的 ESR 波谱也显示阴离子自由基的特征, 图 16, 图 17 分别展示了 pH 5; 7 条件下上述二元体系的 ESR 波谱。

前述 77 K 不同 pH 条件下的 ESR 波谱在室温退火后都仅仅显示室温下精氨酸本身的 ESR 波谱特征而不见胸腺嘧啶 5 位自由基的痕迹(图 18, 19)

精氨酸是组蛋白中含量较多的一种碱性氨基酸,和组氨酸相似,带正电的精氨酸其最低空轨道能量为 -1.97 eV ,而不带正电的精氨酸其最低空轨道能量为 0.96 eV 。于是质子化的精氨酸与胸腺嘧啶负离子之间的电荷转移机理如下:



本工作在前文^[1]的基础上探讨了两种碱性氨基酸对胸腺嘧啶的辐射保护电荷转移机理,根据77 K 二元体系 ESR 波谱特征和77 K ESR 波谱向室温的转化,协同分子轨道计算所得碱性氨基酸最低空轨道能量,确证它们对胸腺嘧啶的辐照保护也是基于电子从胸腺嘧啶阴离子向碱性氨基酸的转移。其电荷转移过程的特点与半胱氨酸对胸腺嘧啶的保护机理同属一类^[1]。在 pH 7 的条件下,组氨酸对胸腺嘧啶的保护机理可能是电荷转移与氢原子转移的协同过程,而活动氢的一个可能的来源是咪唑环上的(>N-H)基团。

参 考 文 献

- [1] Li Xuepeng, Tu Tiecheng and Lin Nianyun, *Radiat. Phys. Chem.*, 17, 273 (1981).
 [2] E. Westhof, W. Flossmann, H. D. Ludemann and A. Müller, *J. Chem. Phys.*, 61, 3376 (1974).
 E. Westhof, W. Flossmann and A. Müller, *Mol. Phys.*, 28, 151 (1974).
 [3] F. Q. Ngo, E. E. Budzinski and H. C. Box, *J. Chem. Phys.*, 60, 3373 (1974).
 [4] H. C. Box, *Radiation Effects; ESR and ENDOR Analysis*, P. 151, Academic Press, New York, 1977.
 [5] Liu Renzhong and Lin Nianyun, *Radiat. Phys. Chem.*, 17, 293 (1981).
 刘仁忠, 林念芸, 倪民华, 辐射研究与辐射工艺学报 2, 1, (1984)
 [6] J. Hüttermann, J. N. Herak and E. Westhof, in J. Hüttermann et al ed., "Effects of Ionizing Radiation on DNA" P. 48, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York, 1978.
 [7] Lin Nianyun, Liu Renzhong, Li Xuepeng, Zhang Jiashan and Tu Tiecheng, *Radiat. Phys. Chem.*, 16, 445 (1980).
 [8] 王高栋, 翁晨亮, 沈光华, 林念芸, 核科学与工程, 2, 62 (1982)。 (1983年4月5日收到)

ESR STUDIES OF RADIATION PROTECTION MECHANISMS BY BASIC AMINO ACIDS

Li Xuepeng Lin Nianyun Tu Tiecheng Xie Jidong

(Institute of Nuclear Research, Academie Sinica)

ABSTRACT In this paper the mechanisms of radiation protection exerted by histidine and arginine on thymine were studied. By means of ESR and molecular orbital calculations the radiation protection mechanism via electron transfer from thymine anion to the basic amino acids has been confirmed. The electrophilic property of the amino acids varies with their degree of protonation. Under PH7 condition, the mechanism of radiation protection by histidine on thymine may be a coordinated process of electron and hydrogen transfer.

KEY WORDS Basic amino acid; Charge transfer protection; Hydrogen transfer; ESR; Thymine; Histidine; Arginine.