

酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用机理

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 γ 引发酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用反应机理,并发现,胸腺嘧啶二聚体的产额 G_d (分子/100 eV)随酪氨酸浓度而变。揭示在胸腺嘧啶浓度较高时,酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用,并不是经由酪氨酸三重激发态的能量向胸腺嘧啶转移的途径,而是经由酪氨酸单重激发态的能量向胸腺嘧啶聚集态转移的机理。同时研究了这种敏化作用的反应动力学历程。

关键词 酪氨酸敏化作用; 聚集态; 单重激发态; 三重激发态; 能量转移。

引言

在研究冰态水溶液中 γ 引发胸腺嘧啶二聚作用机理时发现,添加酪氨酸能增加二聚体的产额^[1]。关于敏化嘧啶碱二聚作用机理不但在辐射化学范围内未见报道,就是在光引发嘧啶二聚作用的研究中,报道也不多。而这种敏化嘧啶二聚作用机理无论在理论上还是在实际应用中,特别在辐射灭菌方面,都有重要意义。为此本文研究了酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用的反应机理。结果发现,在酪氨酸存在时,并不增加由胸腺嘧啶三重激发态机理形成二聚体的产额 ^3G_d ,而是增加了由胸腺嘧啶激发聚集态机理形成的二聚体的产额 ^1G_d 。这表明,在胸腺嘧啶和酪氨酸形成混合堆积聚集态的冰态水溶液中,酪氨酸单重激发态的能量能有效地转移给胸腺嘧啶聚集态。经动力学处理证明,所提出的机理是合理的。现将结果综述如下。

实验

胸腺嘧啶和酪氨酸均为生化试剂(上海试剂二厂,中国科学院生物化学研究所生产),未经进一步纯化。溶液全部用三次重蒸水配制。胸腺嘧啶浓度为 $2.2 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2} M$ 。酪氨酸浓度为 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-4} M$ 。取一定体积的含有或不含有酪氨酸的胸腺嘧啶水溶液,加入 ^{14}C 标记的胸腺嘧啶,置于干冰中,用 $^{60}Co\gamma$ 射线辐照至吸收剂量为 $4 \times 10^7 \text{ rad}$ 。辐照后的样品经自然融化后,取一定体积作纸层析,经紫外逆向定位后,用本所产YS-80型液体闪烁谱仪测放射线,计算出二聚体的产额。详细实验方法参见文献[1]和[2]。

结果

Montenarz-Garestier^[3]指出,酪氨酸单重激发态和三重激发态的能量均能有效地转移给核酸碱基。我们在研究胸腺嘧啶二聚作用机理时,首先证明这种转移的结果能够增加以环丁烷型连接的二聚体的产额^[1]。但是这种转移是经由单重激发态机理还是经由三重激发态机理?二聚体增加

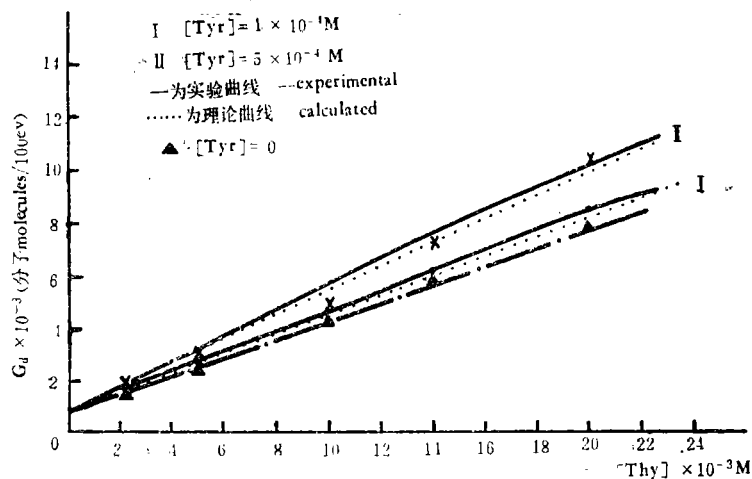


图 1 二聚体产额 G_d 与胸腺嘧啶和酪氨酸浓度的关系
Fig. 1 The plot of yields G_d of dimer vs. the concentrations of thymine in different tyrosine

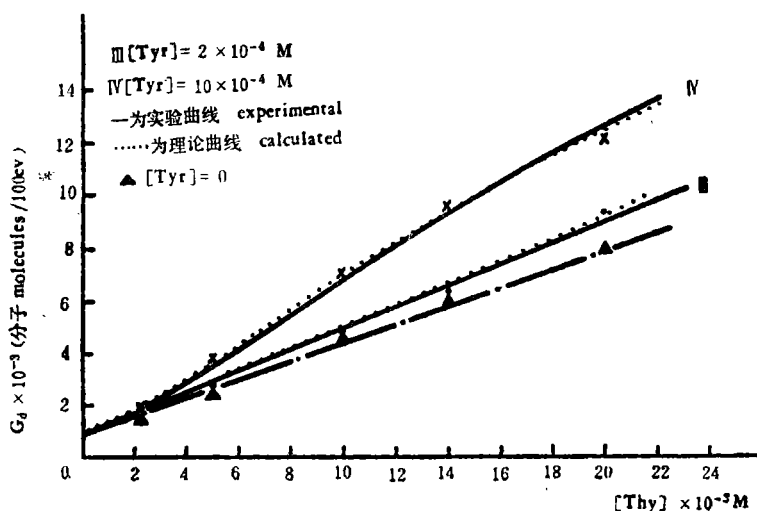
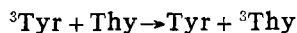


图 2 二聚体产额 G_d 与胸腺嘧啶和酪氨酸浓度的关系
Fig. 2 The plot of yields G_d of dimer vs. the concentrations of thymine in different tyrosine

在光引发嘧啶碱的二聚作用研究中,许多研究者指出,激发态的能量比嘧啶碱高的物质,可将其激发能转移给嘧啶碱。它们通过三重激发态的能量转移而增加嘧啶碱二聚体的产额^[6-7]。但这多数是在嘧啶碱浓度较低的情况,且也只是一些实验结果的定性解释,往往有其局限性,有时不能深入问题的本质。

在酪氨酸存在时,如果以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体产额的增加是由于酪氨酸单重激发态经过交叉转换为酪氨酸三重激发态,而后将其能量转移给胸腺嘧啶:



则经由胸腺嘧啶三重激发态机理形成二聚体的产额 ${}^3G_d$ 值应增加,即在酪氨酸存在时,反映在方

的产额和酪氨酸浓度之间又有什么关系?这是本文所要解决的问题。在上述的实验条件下,我们得到了图(1)和图(2)的实验结果。从图(1)和图(2)可以看出,二聚体的产额不但随胸腺嘧啶的浓度而变化。而且随酪氨酸的浓度而变化。

讨 论

1. 关于三重激发态的能量转移

早些时候,Fisher 和 Johns^[4]提出了紫外光引发胸腺嘧啶二聚作用的反应图式。我们将其应用于研究辐射引发二聚作用,并引进了二聚体的解聚分数 f_s ,提出了能够满意地解释 γ 引发胸腺嘧啶二聚作用的反应历程,给出了在胸腺嘧啶浓度较高时,二聚体形成的动力学关系式^[5]:

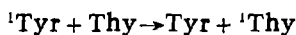
$$G_d = (1 - f_s)({}^3G_d + 2K^A G[\text{Thy}]) \quad (I)$$

式中 ${}^3G_d$ 为由胸腺嘧啶三重激发态形成二聚体的产额, k 为胸腺嘧啶聚集态与胸腺嘧啶间的平衡常数($\text{Thy} + \text{Thy} \xrightleftharpoons{K} \text{ThyThy}$), ${}^A G$ 为形成二聚体的聚集态的激发态的产额。

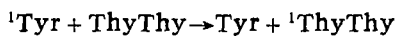
程(I)中的 $(1-f_s)^3G_d$ 值应大于不存在酪氨酸时的相应值。但事实并非如此。在酪氨酸浓度为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} M$ 范围内, 剂量为 $4 \times 10^7 \text{ rad}$ 时, G_d 值外推到胸腺嘧啶浓度趋于无限小时而得到的 $(1-f_s)^3G_d$ 值都等于不含酪氨酸体系中的值, 均为 $(9.0 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ 分子/100 eV。这表明在我们所研究的体系中, 酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用并不是经由酪氨酸三重激发态的能量向胸腺嘧啶转移的途径。

2. 酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用机理

Montenary-Garestier^[3] 和我们的研究^[1] 都表明酪氨酸的激发能可有效地转移给胸腺嘧啶。且本工作发现, 二聚体的产额随酪氨酸浓度的增加而增加。这只有两种可能的途径: 第一、酪氨酸单重激发态能量转移给胸腺嘧啶, 形成胸腺嘧啶单重激发态, 而后经过交叉转换成三重激发态, 再形成二聚体。



如是, 则必然增加 ^3G_d 值, 这与实验结果不符。因此可排除这种可能性。第二、酪氨酸单重激发态能量转移给胸腺嘧啶聚集态, 而后形成二聚体。



如这样, 则由胸腺嘧啶激发聚集态形成二聚体的产额 ^3G_d 值应增加。结果证明属于这种情况。曾有报道: 把含有两种不同溶质的水溶快速冰冻, 由于溶质分子的堆积排列引起混合聚集态的形成而利于激发能的转移^[8-9]。在我们的体系中, 由于胸腺嘧啶和酪氨酸分子结构的特性, 它们在快速冰冻过程中容易形成这种堆积聚集态或堆积络合物。因此, 当酪氨酸受到射线激发后, 便能有效地把其能量转移给混合堆积聚集态中的胸腺嘧啶聚集态, 从而增加二聚体的产额。

3. 关于敏化作用反应动力学历程的假设

根据我们所提出的胸腺嘧啶二聚作用反应动力学历程^[5]并考虑到激发能转移, 我们建议在冰态水溶液中酪氨酸敏化 γ 引发胸腺嘧啶二聚作用反应图式如图(3)所示。根据这一图式, 在体系中应有如下反应。

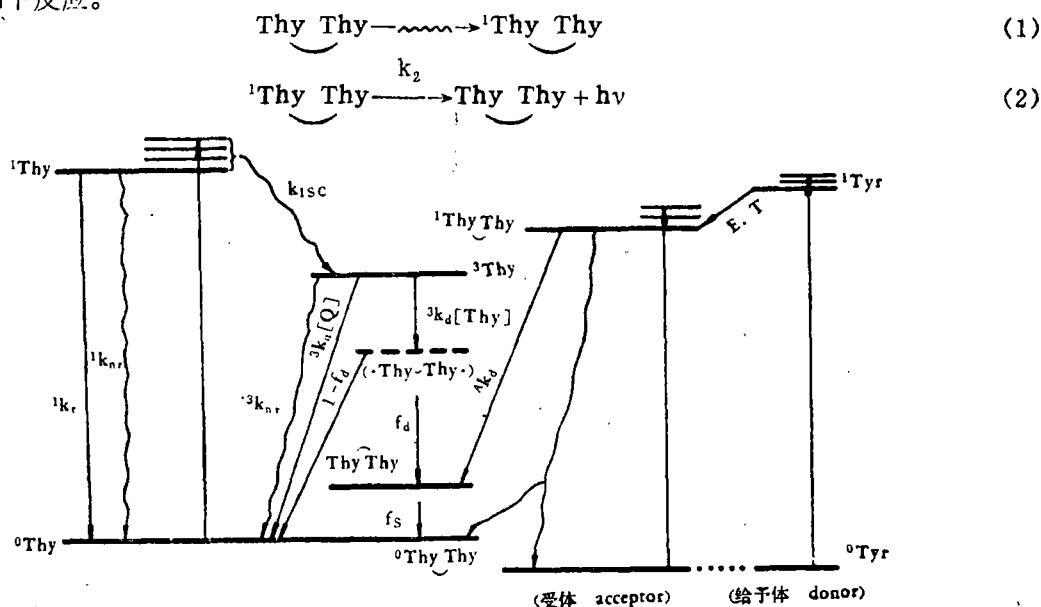
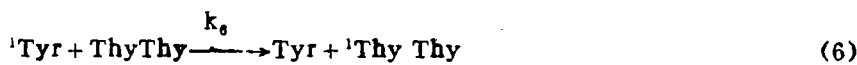


图 3 胸腺嘧啶二聚作用和能量转移反应图式
Fig. 3 The scheme of energy transfer from tyrosine to thymine



在酪氨酸存在时, 方程(I)中的 $^AG = ^AG_0 + ^AG_1$ 。其中 $^AG_0$ 和 $^AG_1$ 分别为酪氨酸不存在时形成二聚体的胸腺嘧啶聚集态的产额和由酪氨酸的激发能转移给胸腺嘧啶聚集态而能形成二聚体的胸腺嘧啶激发聚集态的产额。因为在体系中, 胸腺嘧啶聚集态的浓度为 $[\text{ThyThy}] = K[\text{Thy}]^2$, 所以 $^AG_0$ 和 $^AG_1$ 分别为:

$$^AG_0 = G_1 n_{\text{Thy}} \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (\text{II})$$

$$^AG_1 = K ^AG_0 \frac{G_2}{G_1} \frac{n_{\text{Tyr}}}{n_{\text{Thy}}} \frac{[\text{Thy}]^2}{K[\text{Thy}]^2 + \frac{k_5 + k_7}{k_6}} \quad (\text{III})$$

式中 G_1 和 G_2 分别为胸腺嘧啶和酪氨酸组分吸收能量后所产生的胸腺嘧啶激发聚集态和酪氨酸激发单重态的产额。 n_{Thy} 和 n_{Tyr} 分别为体系中胸腺嘧啶和酪氨酸所吸收能量的分数。它们跟体系中分子的原子序数 Z 与分子量 A 的比率 $(Z/A)_M$ 以及胸腺嘧啶和酪氨酸在体系中所占的重量分数有关。因为 $(Z/A)_{\text{Thy}}$ 和 $(Z/A)_{\text{Tyr}}$ 极其接近, $n_{\text{Tyr}}/n_{\text{Thy}}$ 趋近于它们在体系中的浓度比。方程(III)可变为(IV):

$$^AG_1 = K ^AG_0 \frac{G_2}{G_1} \frac{[\text{Thy}]}{K[\text{Thy}]^2 + \frac{k_5 + k_7}{k_6}} [\text{Tyr}] \quad (\text{IV})$$

根据上述分析, 当酪氨酸存在时, 二聚体的产额 G_d 为:

$$G_d = (1 - f_s) \left\{ ^3G_d + 2K ^AG_0 \left(1 + K \frac{G_2}{G_1} \times \frac{[\text{Thy}]}{K[\text{Thy}]^2 + \frac{k_5 + k_7}{k_6}} [\text{Tyr}] \right) [\text{Thy}] \right\} \quad (\text{V})$$

4. 关于敏化作用反应动力学的验证

首先讨论胸腺嘧啶聚集态的平衡常数 K 。 K 值一般可用渗透法测得。然而, 由于胸腺嘧啶的溶解度太小, 而难以测得。但可与胸腺嘧啶核苷酸的 K 值相比拟。 T'SO 等^[9-10] 测出胸腺嘧啶核苷酸的 K 值在 0.9 ~ 1.2 之间。 Fisher 和 Johns ^[11] 在处理光引发胸腺嘧啶二聚作用时取 $K = 1$ 。考虑到在我们体系中是胸腺嘧啶浓度较高的冰

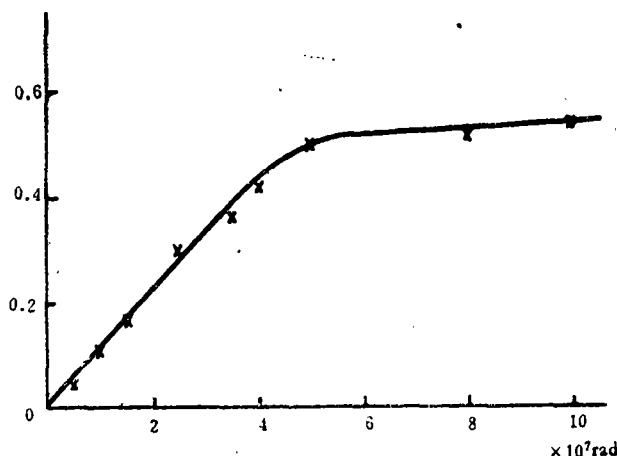


图 4 胸腺嘧啶二聚过程中的解聚分数 f_s 和吸收剂量的关系

Fig. 4 The splitting f_s of thymine dimer as function of absorbing dose

态水溶液, 则在不含添加剂时, 取 K 为 1.2 是合理的。从实验求得的 $K^A G_0$ 值, 可得到 $^A G_0$ 值为 0.35 分子/100 eV。根据在五种不同的添加剂存在时, 我们所测得的各自的二聚体产额, 可得到在这些体系中的 $K^A G_0$ 值, 从而获得了添加剂浓度在 $1 \times 10^{-3} M$ 以下时 K 为 0.89, 在 $5 \times 10^{-3} M$ 时, K 为 0.84。

其次讨论二聚体的解聚分数 f_s 。在冰态水溶液体系中, 我们发现, 当辐照至一定剂量后二聚体的形成和解聚处于动态平衡。而在此之前, f_s 随剂量和增加而增加。图 4 给出了胸腺嘧啶二聚过程中二聚体的解聚分数 f_s 和剂量的关系。从中可得在剂量为 4×10^7 rad 时, f_s 为 0.43。因此, 根据二聚体的最大产额^[5], 在该剂量时, $(1 - f_s)^3 G_d$ 应等于 9×10^{-4} 分子/100 eV。这与实验结果一相致, 说明在胸腺嘧啶浓度较高的冰态水溶液中, 酪氨酸敏化二聚体形成的途径不是经由三重激发态能量转移的机理。

在酪氨酸浓度固定为 $1 \times 10^{-4} M$ 时, 把上述的 K 、 $^A G_0$ 和 f_s 值以及实验测得的在不同浓度的胸腺嘧啶体系中二聚体的产额代入方程(V); 求得 $G_2/G_1 = 19$, $(k_5 + k_7)/k_6 = 1.6 \times 10^{-1} (M)$ 。预期改变酪氨酸的浓度时, 所得到的 G_d 值与胸腺嘧啶浓度的关系应服从方程(V)。图(1)和图(2)中的虚线是根据上述参数按方程(V)算得的理论曲线。实线是实验曲线。从图中可看出两者相当吻合, 说明本文所提出的反应机理是合理的。

结 论

根据上述关于在冰态水溶液中酪氨酸敏化 γ 引发胸腺嘧啶二聚作用机理的研究, 可得到如下结论:

(1). 在冰态水溶液中, 由于胸腺嘧啶和酪氨酸形成混合堆积聚集态, 而使酪氨酸激发态的能量能有效的转移给胸腺嘧啶, 从而增加了以环丁烷型连接的胸腺嘧啶二聚体的产额。

(2). 在胸腺嘧啶浓度较高时, 酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用, 不是经由三重激发态能量转移, 也不是经由酪氨酸单重激发态能量转移给胸腺嘧啶后而形成胸腺嘧啶三重激发态的机理, 而是经由酪氨酸单重激发态的能量转移给胸腺嘧啶聚集态的机理。

(3). 胸腺嘧啶二聚体的产额随酪氨酸浓度的增加而增加。根据酪氨酸敏化胸腺嘧啶二聚作用反应动力学研究, 得出了二聚体的产额和酪氨酸及胸腺嘧啶浓度之间服从如下关系式。

$$G_d = (1 - f_s) \left\{ {}^3 G_d + 2 K^A G_0 \left(1 + K \frac{G_2}{G_1} \frac{[Thy]}{K[Thy]^2 + \frac{k_5 + k_7}{k_6} [Tyr]} \right) [Thy] \right\}$$

本所刘关福同志协助作了大量的液体闪烁测量, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 秦国良, 张文龙, 张加山, 辐射研究与辐射工艺学报, 2 (2), 6 (1984).
- [2] Zhang Jiashan, Qin Guoliang, Zhang Wenlong, *Radia. Phys. Chem.*, 17, 207 (1981).
- [3] T. Montenary-Garestier, in J. B. Birks ed., "Excited Stated of Biological Molecules", pp. 207-216, John Wiley Sons, 1976.
- [4] G. J. Fisher and H. E. Johns, *Photochem. Photobiol.*, 11 429 (1970).
- [5] 张加山, 秦国良, 张文龙, 辐射研究与辐射工艺学报, 1 (1), 35 (1983).
- [6] R. F. Bockman and D. R. Kearns, *J. Chem. Phys.*, 44 945 (1966).
- [7] C. Hélène, in A. Castellani and I. E. Quercia eds., *Synchrotron Radiation Applied to Biophysical and*

- Biochemical Research. p. 219 plenum Press, New York and London, (1978).
- [8] T. Montenary-Garst er, M. Charlier and Helene, in S. Y. Wang ed. "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids". pp. 382~418, Academic Press, New York, 1976.
- [9] T. N. Solie and J. A. Schallman, *J. Mol. Biol.*, 33, 61 (1968).
- [10] POP TSO, I. Melvin and Olson, *J. Am Chem. Soc.*, 85, 1289 (1963).
- [11] G. J. Fisher, and H. E. Johns, in S. Y. Wang, ed, "Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids." Vol I, pp. 226~259, Academic Press, New Yorks, 1976.

(1984 年 4 月 12 日收到)

THE SENSITIZATION MECHANISM OF DIMERIZATION OF THYMINE BY TYROSINE

Qin Guoliang Zhang Wenlong Zhang Jiashan

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

ABSTRACT The mechanism of tyrosine sensitizing the dimerization of thymine has been studied in this paper.

Deoxidized aqueous solutions of thymine ($2.2 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2} \text{M}$) containing tyrosine ($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$) were irradiated at dry ice temperature using Co-60 γ -rays at 4×10^7 rads of absorbed dose, then a series of yields G_d of the dimer were determined. In the range of studied tyrosine concentrations, it was found that the values G_d varied with the concentrations of thymine and tyrosine and the values $(1 - f_s)^2 G_d$ all equal that obtained from the solution absents tyrosine, however, the values $(1 - f_s) 2K_A G$ vary with the concentrations of thymine and tyrosine. Therefore it is evident that the mechanism of tyrosine sensitizing the dimerization of thymine is based on the energy transfer from excited state of tyrosine to aggregating state of thymine. The reaction dynamic process has been presented and the relationship between the dimer yield and the concentrations of thymine and tyrosine has been given as follows.

$$G_d = (1 - f_s) \left\{ {}^2G_d + 2K_A G_0 \left(1 + K \frac{G_2}{G_1} \frac{[\text{Thy}]}{K[\text{Thy}]^2 + \frac{k_5 + k_7}{k_6}} [\text{Tyr}] \right) [\text{Thy}] \right\}$$

The values of G_2/G_1 and $(k_5 + k_7)/k_6$ have been given in this paper. The following conclusions can be drawn out:

1. owing to thymine with tyrosine being formed into mixed stacked aggregating state in frozen aqueous solution, the excited state energy of tyrosine can effectively transfer to aggregating state of thymine, then the yield of the dimer is increased.

2. In the case of higher concentrations of thymine the sensitization of tyrosine to dimerization behaves via the mechanism of energy of excited single state of tyrosine transferring to aggregating state of thymine rather than the mechanism of the excited triplet state.

3. The increasing yield of the dimer varies with the concentrations of thymine and tyrosine.

KEY WORDS Sensitization of tyrosine; Aggregated state; Single excited state; Triplet excited state; Energy transfer.