

胸腺嘧啶二聚体的辐射解聚机理

张文龙 张加山 秦国良

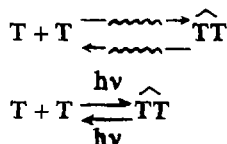
(中国科学院上海原子核研究所)

摘要 本文研究了水溶液中胸腺嘧啶二聚体在 γ 射线辐照下解聚成胸腺嘧啶的机理。研究表明,胸腺嘧啶二聚体的解聚是由于 OH 自由基及水合电子与二聚体作用所致,一个 OH 自由基产生0.5个胸腺嘧啶分子,一个水合电子产生1.5个胸腺嘧啶分子,其反应速率常数分别为 $2.3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

关键词 胸腺嘧啶二聚体; 辐射解聚; 反应动力学。

前言

冰冻的胸腺嘧啶水溶液,无论在电离辐照下,还是在一定波长的紫外光辐照下均形成以环丁烷型连接的二聚体,该过程与其逆过程是一个动态平衡的过程。



紫外辐照下,二聚体解聚方面的文献报导较多。当波长低于 $2600(10^{-10} \text{ m})$ 时,二聚体直接吸收光子发生解聚,但波长大于 $3000(10^{-10} \text{ m})$ 时,便不会引起二聚体解聚^[1]。Angelo A Lamola^[2]报道了当存在敏化剂时,经 $3130(10^{-10} \text{ m})$ 紫外光辐照后,敏化剂的激发三重态能量能转移给DNA中的嘧啶碱基二聚体,使其解聚。Tagger^[3]报道了DNA中的胸腺嘧啶二聚体在酶存在下,通过能量转移而解聚。

关于电离辐照下胸腺嘧啶二聚体的解聚机理所见报道不多。Lachmance^[4]和Grossweiner等^[5]曾报道水辐解产生的自由基能使胸腺嘧啶二聚体解聚为单体。

本文研究了胸腺嘧啶二聚体在 ^{60}Co γ 射线作用下解聚为胸腺嘧啶单体的反应机理及其动力学。通过测定在不同的气氛及加入不同浓度的自由基清除剂体系中胸腺嘧啶形成的G值(G_T),证实了胸腺嘧啶二聚体解聚为单体是由 OH 自由基及水合电子引起的。经动力学处理,给出了这两种活性粒子与二聚体作用的反应速率常数。从实验值与计算值的一致性,证明了我们所提出的反应机理是合理的。

实验

胸腺嘧啶二聚体是用 254 nm 的紫外光在干冰温度下辐照胸腺嘧啶的冰冻水溶液,用Zerolit FF离子交换树脂进行分离、纯化而制得^[6]。纯度为99%(约合1%胸腺嘧啶)。这种方法所制得的二聚体为以环丁烷型连接的顺-顺式的A型异构体^[7]。全部溶液用三次重蒸水配制。二聚体浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} \sim 6.7$ 。

取一定体积的二聚体溶液,视需要加入或不加入自由基清除剂,分别用高纯氮(99.99%)、

高纯氧、氧化亚氮(98%)通气鼓泡 20 min, 或高真空脱气三次(真空度约 $133.332 \times 1 \times 10^{-6} \text{Pa}$), 经封口后, 用 ^{60}Co 辐照至剂量 72.9 Gy, 然后在波长 265 nm 处测定样品经辐照后光吸收的增加, 计算出胸腺嘧啶的生成 G 值。

结 果 和 讨 论

1. 胸腺嘧啶二聚体的解聚作用

在不同体系中测得的 G_T 值列于表 1 中。

表 1 胸腺嘧啶二聚体经 ^{60}Co 辐照形成胸腺嘧啶的 G 值(二聚体浓度, $1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 剂量, 72.9 Gy)

Table 1 G values for forming thymine by ^{60}Co - γ irradiation of the thymine dimer ($1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, does, 72.9 Gy)

体 系 System	G_T	
	实 验 值 Experimental value	计 算 值 Calculated value
脱 气 Deaerated	6.0 ± 0.4	6.04
氮气饱和 N_2 -Sat	6.1 ± 0.3	6.04
含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCOO}^-$, 氮气饱和 Contained $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCOO}^-$, N_2 -Sat	4.8 ± 0.1	4.70
含 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 特丁醇, 氮气饱和 Contained $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ t-butanol, N_2 -Sat.	5.0 ± 0.1	4.70
空气饱和 Air-Sat.	4.5 ± 0.2	4.43
含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCOO}^-$, 空气饱和 Contained $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCOO}^-$, Air-Sat.	3.4 ± 0.1	3.12
氧气饱和 O_2 -Sat	2.6 ± 0.1	2.59
氧化亚氮饱和 N_2O -Sat	3.0 ± 0.4	3.03
含 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 特丁醇, 氧化亚 氮饱和 Contained $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ t-butanol, N_2O -Sat	0.23 ± 0.1	0.26

这些实验结果表明, 水辐解产生的活性粒子能引起胸腺嘧啶二聚体解聚为胸腺嘧啶单体。从表中可看出, 在含有 OH 自由基清除剂甲酸钠及特丁醇体系中, 无论有氧与否, 胸腺嘧啶的形成产额 G_T 值均明显地低于不含这两种清除剂的相应体系。这表明, OH 自由基是引起二聚体解聚为单体的活性粒子之一, 可以进一步看出, 在氧化亚氮饱和体系中, 二聚体解聚为单体的产额 $G_T = 3.0$, 相当于体系中水合电子和 OH 自由基产额之和的一半, 说明一个 OH 自由基与胸腺嘧啶二聚体反应后可形成 0.5 个胸腺嘧啶。

同样从表可看出, 在脱气除氧和通氮除氧两个体系中, 形成胸腺嘧啶的产额平均为 $G_T = 6.05$ 。当体系中有氧存在时, G_T 值随氧浓度的增加而下降。这表明, 二聚体的解聚与水合电子有关。在含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 甲酸钠通氮除氧体系中, G_T 为 4.8。此时可以认为体系中的 OH 自由基和氢原子均已被甲酸根除掉。因此, 该值可以认为是水合电子的贡献。在除氧体系中考虑到 OH 自由基的作用, 将胸腺嘧啶的形成产额扣除体系中 OH 自由基的贡献, 则水合电子对 G_T 的贡献为 4.70, 这跟含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 甲酸钠的通氮体系中的 $G_T = 4.8$ 相当一致。在中性水溶液中, 水辐解产生的水合电子

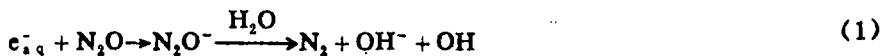
和 H 原子的产额之和为 3.67, 而氢原子的产额为 $0.55^{[8]}$, 则水合电子的产额可取为 3.12。从实验结果可以看出, 在 $1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 胸腺嘧啶二聚体的除氧中性水溶液中, 胸腺嘧啶的形成产额与水合电子的产额之比为 1.5:1, 这表明, 一个水合电子与二聚体反应可形成 1.5 个胸腺嘧啶。

应该指出, 在含 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 特丁醇的氧化亚氮饱和体系中, 测出胸腺嘧啶的形成产额为 0.23。这似乎是 H 原子的贡献, 但从下面关于二聚体反应动力学的研究中, 可以证明实际情况并非如此, 恰恰相反, H 原子不会引起二聚体的解聚。例如从下面的二聚体解聚的反应动力学研究

结果中,我们测出 OH 自由基与二聚体反应的速率常数为 $(2.3 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 并估算出水合电子与二聚体反应的速率常数为 $\approx 1 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。据此可以估算出在含 0.25 mol dm^{-3} 的氧化亚氮饱和体系中,水合电子和 OH 自由基并未完全被清除,而对二聚体解聚还是一定有贡献。其中水合电子的贡献为 0.206,而 OH 自由基的贡献约为 0.05,计为 0.26。该值在实验误差范围内与实验值 0.23 相一致。

2. 胸腺嘧啶二聚体解聚反应动力学

(1) OH 自由基与二聚体的反应 在上述的讨论中已经知道,一个 OH 自由基可以形成 0.5 个胸腺嘧啶分子,且胸腺嘧啶的产额因 OH 自由基清除剂的存在而下降。现用竞争反应动力学方法来研究 OH 自由基与二聚体反应形成胸腺嘧啶的反应历程,在 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 胸腺嘧啶二聚体氧化亚氮饱和和中性溶液中,经辐照后可存在如下反应:



由此可看出一个 OH 自由基可产生 0.5 个胸腺嘧啶。当体系中存在甲酸钠时,便有反应:



此时体系中形成胸腺嘧啶的产额 G_T 服从方程 (I) 或 (II):

$$G_T = \frac{1}{2} G_{\text{OH}} \frac{k_2 [\hat{\text{T}}\text{T}]}{k_2 [\hat{\text{T}}\text{T}] + k_5 [\text{HCOO}^-]} \quad (\text{I})$$

$$1/G_T = 2/G_{\text{OH}} \left(1 + \frac{k_5 [\text{HCOO}^-]}{k_2 [\hat{\text{T}}\text{T}]} \right) \quad (\text{II})$$

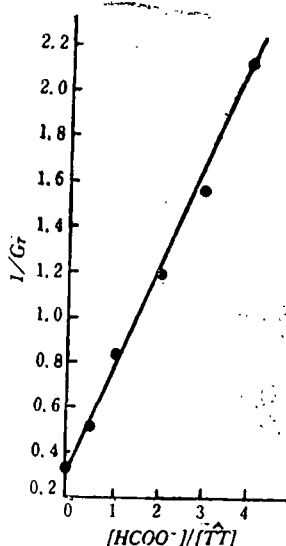


图 1 氧化亚氮饱和的胸腺嘧啶水溶液中,自由基清除剂(HCOO^-)的浓度对胸腺嘧啶生成 G 值的影响

Fig. 1 Variation of thymine G values with the concentrations of radical scavenger (HCOO^-) in aqueous dimer solution saturated by nitrous oxide.

现在固定体系中二聚体的浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,改变甲酸钠的浓度,在吸收剂量 72.9 Gy 时,分别测出相应胸腺嘧啶的产额,把测出的产额按方程 (II) 与对应的甲酸钠的浓度作图,得一直线(见图 1)。从该直线的截距 (0.35 ± 0.01) 得 $G_T = 2.89$,与实验值 3.0 相一致。斜率为 0.43 ± 0.01 。取 k_5 值为 $2.8 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [10] 则可求得 $k_2 = (2.3 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

(2) 水合电子与二聚体的反应动力学探索 从除氧体系和含甲酸钠的除氧体系的实验结果已表明,一个水合电子与二聚体反应能形成 1.5 个胸腺嘧啶分子,且 G_T 随氧含量变化而变化。当氧不存在时,体系中除反应 (2)~(4) 外,还

应有如下反应:



因此, 体系中形成胸腺嘧啶的产额 $G_T = \frac{1}{2}G_{OH} + 1.5G_{e_{aq}^-}$ 。当氧存在时, 氧便与二聚体竞争水合电子:



此时形成胸腺嘧啶的产额为:

$$G_T = \frac{1}{2}G_{OH} + 1.5G_{e_{aq}^-} \frac{k_8[\widehat{TT}]}{k_8[\widehat{TT}] + k_9[O_2]} \quad (III)$$

由不同的氧浓度所测出的 G_T 值, 根据方程(III)可估算出 k_9 值。在氧浓度分别为 2.5×10^{-4} 和 $1.3 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 并取 k_8 值为 $1.9 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [11], 则 k_9 值约为 $9.3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。如果从含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 甲酸钠的通氮除氧体系和含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 甲酸钠的空气饱和体系中形成胸腺嘧啶的产额之差 ΔG_T 值来估计水合电子与二聚体的反应速率常数, 亦得 k_8 为 $1.1 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

根据这些反应动力学的研究结果, 我们计算出不同体系中二聚体解聚为胸腺嘧啶的产额 G_T 。从实验值和理论计算值相符(见表1), 可以认为本文所提出的胸腺嘧啶二聚体解聚为胸腺嘧啶的反应机理是合理的, 所得到的反应速率常数是可靠的。

结 论

胸腺嘧啶水溶液在常温下经电离辐照解聚为胸腺嘧啶是由于水的辐解产物 OH 自由基和水合电子与二聚体的反应所引起的, 一个 OH 自由基产生 0.5 个胸腺嘧啶分子; 一个水合电子产生 1.5 个胸腺嘧啶分子, 其反应速率常数分别为 $(2.3 \pm 0.1) \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $\approx 1 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

参 考 文 献

- [1] R. B. Setlow, Biochim. Biophys. Acta, 49, 237 (1961).
- [2] A. Angelo, Lamola, J. Amer. Chem. Soc. 88, 813 (1966).
- [3] Jagger, Photochem. Photobiol., 3, 451 (1964).
- [4] E. R. Lachmann, Naturwissenschaften, 50, 474 (1963).
- [5] L. I. Grossweiner, A. G. Kepka, R. Santus, and J. A. Vigil, Inter. J. Radiat. Biol. 25, 521 (1974).
- [6] Zhang Jiasan, Qien Guo liang and Zhang Wenlong, Radiat. Phys. Chem. 17, 207 (1981).
- [7] G. M. Blackburn, R. J. H. Davies, J. Chem. Soc. (C), 2239 (1966).
- [8] J. W. T. Spinks, R. J. Woods, An Introduction to Radiation Chemistry, P 258 John Wiley sons, New York, Second Edition, 1976.
- [9] J. W. T. Spinks, R. J. Woods, An Introduction to Radiation Chemistry, p. 288, John Wiley sons, New York, Second Edition 1976.
- [10] J. W. T. Spinks, R. J. Woods, An. Introduction to Radiation Chemistry p. 172, John Wiley Sons, New York, Seceond Edition 1976.
- [11] J. W. T. Spinks, R. J. Woods, An Introduction to Radiation Chemistry, p 276, John Wiley Sons, New York, Seceond Edition 1976.

(1986年10月26日收到)

(下转封三)

THE MECHANISM FOR AQUEOUS SOLUTION OF THYMIN DIMER SPLITTING BY RADIATION

Zhang Wenlong Zhang Jiashan Qin Guoliang

(*Institute of Nuclear Research Academia Sinica Shanghai China*)

ABSTRACT In this paper the mechanism for radiation cleavage of thymine dimer in aqueous solution at room temperature has been studied. The results indicate that thymine dimer splitting by radiation is due to the reactions of hydroxyl radicals and hydrated electrons with the dimer and 0.5 thymine molecule is given for each hydroxyl radical and 1.5 thymine molecules for each reacted hydrated electron their rate constants are $2.3 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $\simeq 1.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively.

KEY WORDS Thymine dimer; Splitting by radiation; Kinetics of reaction.