

# DNA 碱基激光光解的新颖瞬态产物\*

王文锋 骆 坚 左志华 姚思德 郑智德 张加山 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所, 辐射化学开放研究实验室, 上海 201800)

## 摘 要

本文报道了利用纳秒级激光光解瞬态吸收光谱技术研究 DNA 碱基光解和光敏作用的结果: 发现了胸腺嘧啶的一个新激发三重态和胸腺嘧啶羟基加合物自由基的生成; 首次观察到胞嘧啶及其衍生物胞嘧啶核苷、脱氧胞嘧啶核苷酸的激发三重态光吸收谱; 确证了鸟嘌呤核苷的激发三重态, 其  $pK_a$  值为 8.7; 并研究了上述瞬态产物的动态演变过程, 总结了其反应机理.

**关键词** 碱基、激发三重态、能量转移、受激络合物、激光光解

DNA 在光生物效应中起着至关重要的作用, 因而 DNA 碱基的光化学行为便成为光生物化学领域中最活跃的课题. 碱基的光化学和光敏作用<sup>[1]</sup> 研究已有大量的报道. Salet<sup>[2]</sup> 在 70 年代就已利用激光光解研究嘧啶碱基的激发三重态, Arce<sup>[3]</sup> 等在 80 年代对嘌呤碱基激发三重态进行了较详细的研究. Kasama<sup>[4]</sup> 等利用丙酮作为敏化剂, 研究丙酮激发三重态与吡咯、嘌呤等的能量转移、抽氢以及加成反应. 这些结果推进了 DNA 碱基光化学的研究, 为光生物学研究提供了丰富的信息, 尤其是 DNA 碱基光解瞬态产物的种类、结构及其反应性等. 但是在室温水溶液中, 由于碱基激发态的量子产额小, 摩尔消光系数低等原因, 对其研究还很不充分, 而且以往的一些实验是在疏质子溶剂(如乙腈)中进行的<sup>[2]</sup>, 这对于了解生理条件下 DNA 的光化学行为有较大的距离. 本文利用纳秒级激光光解动态吸收光谱装置, 研究了胸腺嘧啶(Thy)、胞嘧啶(Cyt)、胞嘧啶核苷(Cyd)、脱氧胞嘧啶核苷酸(dCMP)、鸟嘌呤核苷(Gua)等水溶液体系的激光光解和光敏作用, 获得有关瞬态产物及其反应机理方面的一些新信息.

## 一、材料与方 法

Thy 为生化试剂, 经两次重结晶; Gua, dCMP 为 Sigma 公司产品, Cyt 为东京化成公司产品, Cyd 为 Fluka 公司产品, 它们未经进一步纯化直接使用, 氯化锰、二苯甲酮(Benzo)(均为分析纯)经一次重结晶, 丙酮(Ace)(分析纯)经重蒸馏后使用, 溶液的 pH 值由 NaOH 或 HCl 调节, 所有溶液的配制及纯化均采用 3 次或 5 次重蒸馏水. 样品在实验前使用 99.99% 的氮气、氧化亚氮或氧气鼓泡 20min.

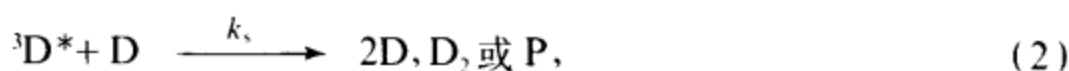
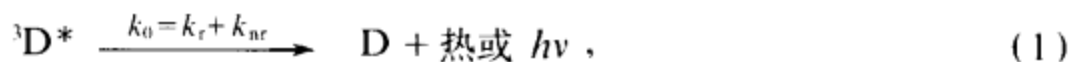
1991-12-09 收稿

\*国家自然科学基金资助项目

实验方法及仪器主要参数前文已叙<sup>[5]</sup>,部分实验数据采用 100MHz 瞬态记录仪(中国科学院上海原子核研究所研制)转化成数字信号后送计算机记录,并采用自行编制的软件对数据进行处理.

## 二、结果与讨论

碱基(D)受光辐照使吸收光子跃迁到激发单重态,其中有部分经体系交叉转换产生激发三重态.碱基也可经激发能转移过程产生三重态.激发三重态可经辐射跃迁( $k_r$ )和非辐射跃迁( $k_{nr}$ )而去活化,其反应速率常数  $k_0 = k_r + k_{nr}$ ,它还可与其基态分子或猝灭剂(Q)反应而去活化,对于嘧啶碱基常常还会通过受激准分子而生成二聚体.



三重态衰变过程服从准一级反应动力学规律,表观衰变速率常数为:

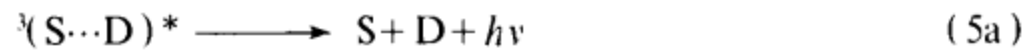
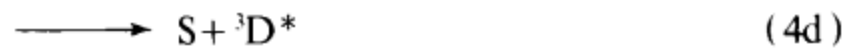
$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_s[\text{D}] + k_q[\text{Q}]. \quad (1)$$

当体系中存在光敏剂(S)如丙酮、二苯甲酮等时,尤其是光敏剂的浓度比较大的情况下,便会发生一系列的能量转移和包括电子转移在内的光化学反应.这些反应可以通过三重态-三重态能量转移或者通过受激络合物的途径发生.三重态-三重态之间的能量转移效率是随给体的磷光光谱与受体的吸收光谱重叠的增大而增高,以及其它多种因素有关;受激络合物的瞬态吸收光谱特征表现为受体阴离子自由基( $\text{A}^-$ )与给体阳离子自由基( $\text{D}^+$ )瞬态吸收谱的特征<sup>[6]</sup>.

表 1 某些物质的激发三重态能量

名称	Ace	Benzo	Thy	Cyt	Cyd	dCMP	Gua	Ade
三重态能量 $\Delta E_1$ (kJ/mol)	337 <sup>[4]</sup>	286 <sup>[4]</sup>	294 <sup>[7]</sup>	291 <sup>[8]</sup>	280 <sup>[9]</sup>	334 <sup>[10]</sup>	314 <sup>[11]</sup>	311 <sup>[4]</sup>

发生有效的三重态能量转移反应,要求敏化剂的最低激发三重态能量大于受体的激发三重态能量.从表 1 可以看出丙酮激发三重态的能量比 DNA 中四种碱基的激发三重态能量都大,因此丙酮和碱基之间有可能发生有效的三重态能量转移过程.表 1 表明二苯甲酮激发三重态和碱基之间不可能发生有效的三重态能量转移过程.但我们的研究发现,在二苯甲酮和 Thy 体系中,二苯甲酮激发三重态的寿命明显缩短,而在二苯甲酮和 Gua 以及丙酮与 Gua 体系中均检测到鸟苷脱氢自由基的瞬态吸收峰,这表明二苯甲酮、丙酮激发三重态和 DNA 的碱基之间发生了某种反应.根据实验结果和反应自由能的变化(表 2),得出这种反应可能经由受激络合物的途径进行的.因此,当存在光敏剂时,DNA 碱基的光敏作用,用下述反应机理能得到合理的解释,即当光敏剂吸收光子产生激发态后,便与 DNA 碱基形成受激络合物<sup>[12]</sup>,随后发生一系列的反应:



当光敏剂的激发三重态能量和碱基的激发三重态能量差超过 12kJ/mol 时,则可能发生三重态-三重态能量转移反应:



### 1. DNA 碱基的激发三重态

(1) 胸腺嘧啶 图 1 可看出氮气饱和下的 Thy 水溶液受激光束照射后的光吸收谱中出现两个瞬态吸收峰,  $\lambda_{330}$  nm 处的吸收峰衰变符合一级反应规律, 当 Thy 的浓度为  $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$  时, 其半衰期  $\tau_{1/2} = 2.2 \mu\text{s}$ , 这与 Salet<sup>[2]</sup> 用 265 nm 激光照射 Thy 溶液所观察到的相一致, 并已被认为是 Thy 激发三重态的特征吸收, 氧对其猝灭反应速率常数  $k_q^{300} = 2.9 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$ . 峰值在 300 nm 处的瞬态吸收峰未见报道, 它的衰变也服从一级反应规律, 在胸腺嘧啶浓度为  $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$  时, 半衰期  $\tau_{1/2} = 0.43 \mu\text{s}$ . 在体系不存在猝灭剂(Q)时, 改变 Thy 浓度, 测得一系列表观衰变速率常数  $K_{\text{obs}}^{300}$  值. 按(1)式以  $k_{\text{obs}}^{300}$  对 [Thy] 作图为一一直线, 从而得到峰值在 300 nm 处的瞬态产物衰变速率常数  $k_0^{300} = 3.4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , 以及与基态分子反应的速率常数  $k_s^{300} = 4.2 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$ . 改变溶液中氧的浓度, 可得它被氧猝灭的反应速率常数  $k_q^{300} = 3.1 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$ . 基于峰值在  $\lambda_{330}$  nm 和  $\lambda_{300}$  nm 的两个瞬态产

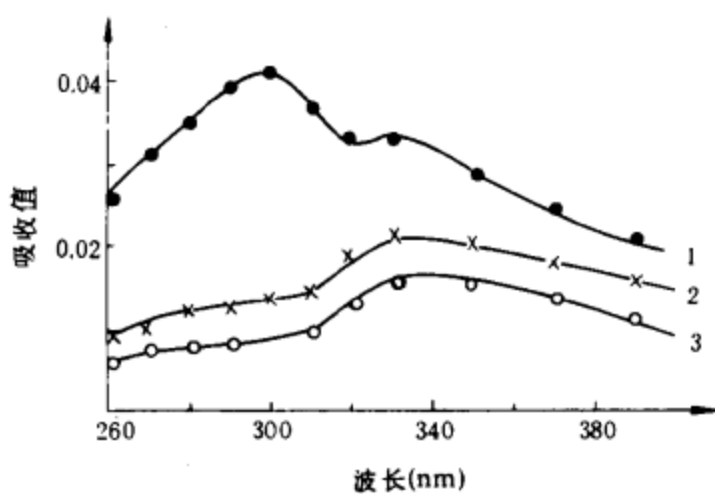


图 1  $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$  的 Thy 水溶液在  $\text{N}_2$  饱和下的激光光解瞬态吸收光谱

1—40 ns, 2—0.4  $\mu\text{s}$ , 3—1  $\mu\text{s}$

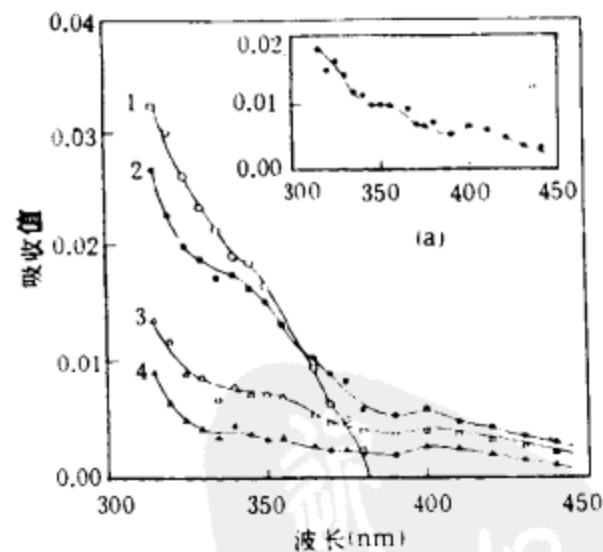


图 2 丙酮( $0.13 \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$ )与 Cyt( $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$ )中性水溶液体系在  $\text{N}_2$  饱和下的激光光解瞬态吸收光谱  
1—0  $\mu\text{s}$ , 2—1  $\mu\text{s}$ , 3—5  $\mu\text{s}$ , 4—10  $\mu\text{s}$ ; (a) 为在激光照射后 1  $\mu\text{s}$  时 Cyt 激发三重态的吸收光谱

物服从同样的反应动力学规律, 同样能被氧猝灭, 同时如下文所指出的那样, 均能被  $N_2O$  所猝灭并形成胸腺嘧啶羟基加合物自由基, 因此在  $\lambda_{300}$  nm 处的瞬态吸收可归之为 Thy 不同能态的激发三重态的特征吸收.

**(2) 胞嘧啶、胞嘧啶核苷和脱氧胞嘧啶核苷酸** 在丙酮水溶液体系的激光光解研究中<sup>[11]</sup>, 在 300—380 nm 范围内观测到一瞬态产物, 其衰变符合一级反应规律, 并能被  $O_2$  及  $Mn^{2+}$  所猝灭, 可以推断它就是丙酮激发三重态的吸收谱, 当丙酮浓度为  $0.13 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时, 其半衰期  $\tau_{1/2} = 1.23 \mu\text{s}$ .

在 Cyt 与丙酮水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱(图 2)中, 可以看到  $0 \mu\text{s}$  时即为丙酮激发三重态的吸收, 随着丙酮三重态的衰变在 380—450 nm 波长范围内出现新的吸收, 同时 380 nm 以前的衰变也比单独丙酮体系的慢, 通过动力学分析证明, 该体系存在着除丙酮三重态外的新瞬态产物, 其吸收波长在 310—450 nm 范围内, 图 2(a) 为新瞬态产物的吸收谱, 它的衰变服从一级反应规律,  $Mn^{2+}$  可使该瞬态产物的寿命明显缩短. 当 Cyt 的浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时, 半衰期  $\tau_{1/2} = 5.0 \mu\text{s}$ .

在 Cyt 与丙酮水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱图(图 3)中, 与 Cyt 体系一样也可观察到除丙酮三重态外的新瞬态吸收, 图 3 中的插图为新瞬态产物的吸收谱. 它的衰变也服从一级反应规律, 当 Cyt 的浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时, 其半衰期  $\tau_{1/2} = 5.6 \mu\text{s}$ .

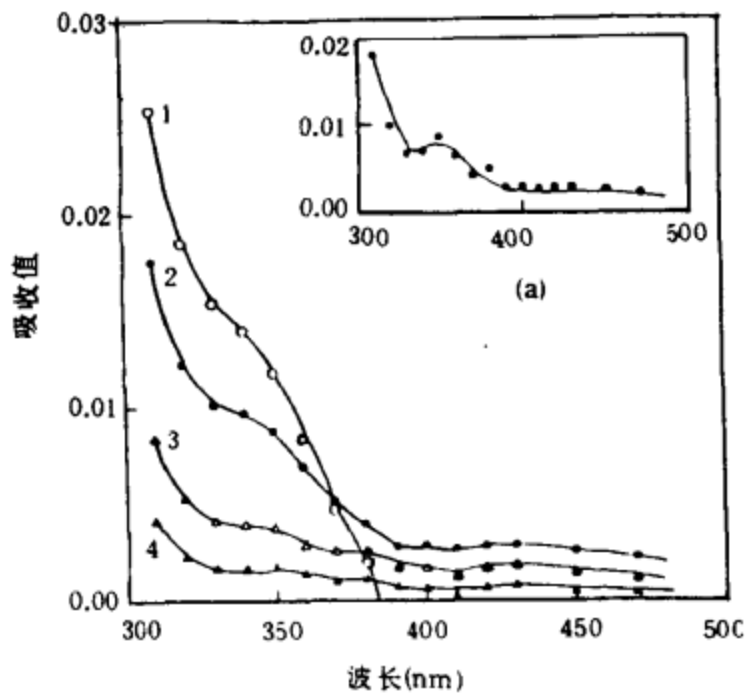


图 3 丙酮( $0.13 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )与 Cyt( $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) 中性水溶液体系在  $N_2$  饱和下的激光光解瞬态吸收光谱 1— $0 \mu\text{s}$ , 2— $1 \mu\text{s}$ , 3— $5 \mu\text{s}$ , 4— $10 \mu\text{s}$ ; (a) 为在激光照射后  $1 \mu\text{s}$  时 Cyt 激发三重态的吸收光谱

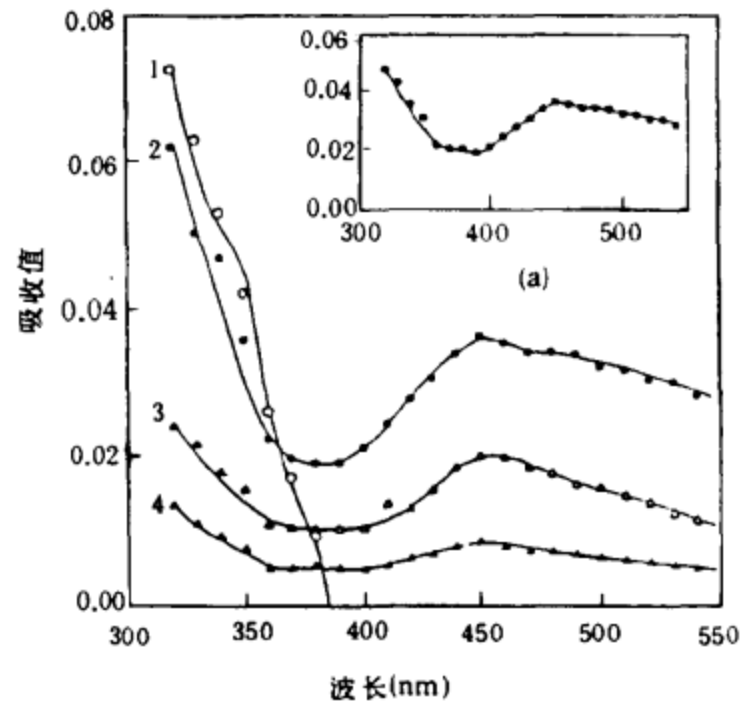


图 4 丙酮( $0.13 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )与 dCMP( $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) 中性水溶液体系在  $N_2$  饱和下的激光光解瞬态吸收光谱 1— $0 \mu\text{s}$ , 2— $1 \mu\text{s}$ , 3— $5 \mu\text{s}$ , 4— $10 \mu\text{s}$ ; (a) 为在激光照射后  $1 \mu\text{s}$  时 dCMP 激发三重态的吸收光谱

在丙酮与 dCMP 水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱(图 4)中, 可观察到在  $\lambda_{\text{max}}$  为 450 nm 处有一个新的瞬态吸收, 其衰变同样服从一级反应规律, 图 4(a) 为新瞬态产物的吸收谱. 当 dCMP 的浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时, 半衰期  $\tau_{1/2} = 5.3 \mu\text{s}$ .

用丙酮敏化胞嘧啶及其衍生物的光解过程, 在它们的瞬态吸收光谱中均发现在单纯胞嘧啶及其衍生物水溶液体系中难以观察到, 而在单纯丙酮水溶液体系中又不存在的瞬态吸收峰.

表2 碱基与丙酮、二苯甲酮三重态发生电子转移反应的自由能变化

碱 基	$E_{ox}(SCE)$	$\Delta G(kJ/mol)$	
		与丙酮反应	与二苯甲酮反应
胸腺嘧啶	1.75 <sup>[13]</sup>	54.2	60.4
胸腺嘧啶核苷	1.63 <sup>[13]</sup>	42.6	48.8
胞 嘧 啶	1.60 <sup>a)</sup>	39.8	45.9
1-甲基胞嘧啶	1.39 <sup>a)</sup>	19.5	25.6
鸟 嘌呤	0.81 <sup>[14]</sup>	-36.5	-30.3
鸟嘌呤核苷	0.80 <sup>[14]</sup>	-37.4	-31.3
腺 嘌呤	1.04 <sup>[14]</sup>	-14.3	-8.1
腺嘌呤核苷	1.12 <sup>[14]</sup>	-6.6	-0.4

a) 根据经验公式  $E_{ox}=0.89IP-6.34(SCE)^{[15]}$  计算, 其中 IP 为电离电位

它们的衰变均服从一级反应规律, 均能被  $Mn^{2+}$  离子所猝灭, 因此, 可将这些瞬态吸收归之为胞嘧啶及其衍生物的激发三重态吸收. 改变胞嘧啶及其衍生物的浓度, 通过(1)式可求得三重态衰变速率常数( $k_0$ ), 与基态分子的反应速率常数( $k_s$ ). 体系中加入不同浓度的  $Mn^{2+}$ , 可测得  $Mn^{2+}$  对激发三重态的猝灭反应速率常数  $k_q$ . 分析丙酮三重态与不同浓度胞嘧啶及其衍生物反应的衰变速率常数, 可以求出丙酮三重态的激发能向胞嘧啶及其衍生物转移的反应速率常数( $k_{tr}$ ), 数据见表3. 从表1可看出丙酮激发三重态能量大于 Cyt, Cyt, 能量转移可以通过三重态-三重态能量转移的途径(反应6), 也可能是经由受激络合物内的能量转移过程即反应(4d), (5d)的途径而发生<sup>[12]</sup>. 至于 dCMP, 其激发三重态能量与丙酮激发三重态能量非常接近(表1), 因而发生三重态-三重态能量转移反应是次要的, 它们之间的反应可能是通过反应(4d), (5d)而发生.

(3) 鸟嘌呤核苷 图5为丙酮与 Gua 中性水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱. 从中可以看出在波长为 350—450nm 范围内出现一个新的吸收带. 它在激光照射后  $2\mu s$  时达到最大值,  $25\mu s$  时已基本消失. Kasama 等人也观察到同样的吸收峰<sup>[4]</sup>, 但没有作进一步分析.

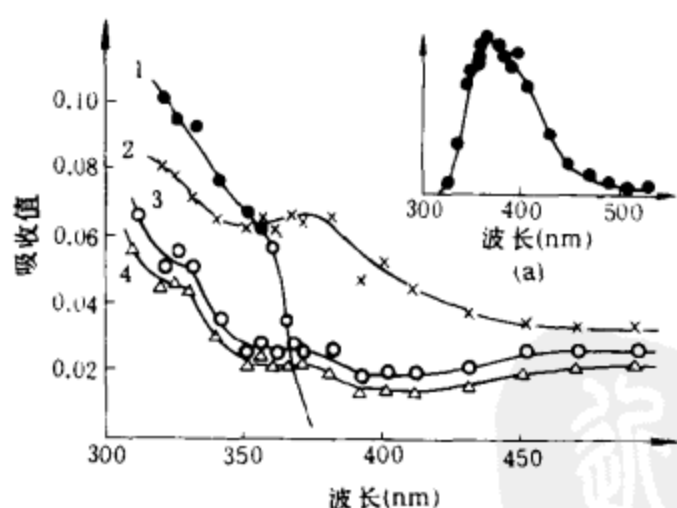


图5 丙酮( $0.13\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )与Gua( $1\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )中性水溶液体系在 $N_2$ 饱和下的激光光解瞬态吸收光谱  
1—— $0\mu s$ , 2—— $2\mu s$ , 3—— $25\mu s$ , 4—— $35\mu s$

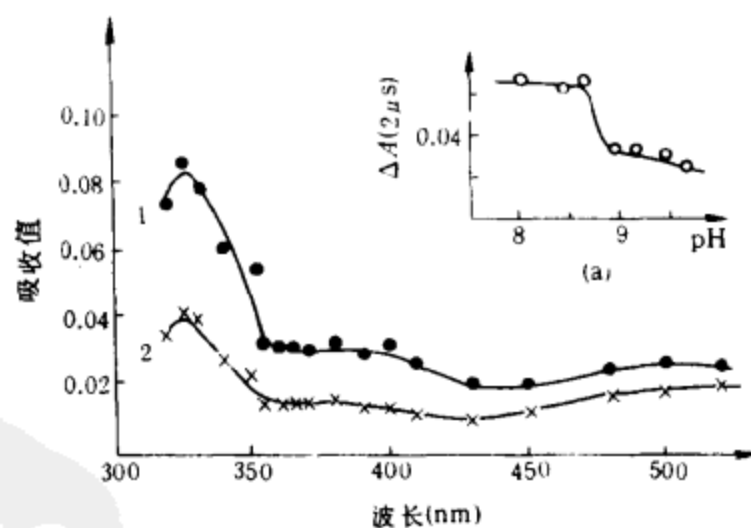


图6 丙酮( $0.13\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )与Gua( $1\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )水溶液体系在pH9.4时 $N_2$ 饱和下的激光光解瞬态吸收光谱  
1—— $2\mu s$ , 2—— $25\mu s$ ; (a)为不同pH值时 ${}^1\text{Gua}^*$ 在380nm处的吸收值( $2\mu s$ )

为了判明这一新吸收带的归属,对其进行了动力学分析,它的衰变服从一级反应规律. 当 Gua 浓度为  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$  时, 其表观衰变速率常数  $k_{\text{obs}} = 9.4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ , 半衰期  $\tau_{1/2} = 7.4 \mu\text{s}$ . 用  $\text{Mn}^{2+}$  作为猝灭剂, 观察到新产物的寿命明显缩短, 改变  $\text{Mn}^{2+}$  的浓度, 得到  $\text{Mn}^{2+}$  对这一产物的猝灭速率常数  $k_q = 1.9 \times 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$ , 这与 Equinones 等测得的  $\text{Mn}^{2+}$  对嘌呤三重态的猝灭反应速率  $2.0 \times 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$  一致. 可以认为吸收带在 350—450 nm 范围内的瞬态产物是 Gua 的激发三重态 ( $^3\text{Gua}^*$ ), 它可能是通过反应 (4d), (5d) 或 (6) 的途径生成. 丙酮对其能量转移反应速率常数  $k_{\text{et}} = 2.0 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ s}^{-1}$ . 图 5(a) 为经解析后而得到的 Gua 激发三重态的吸收谱.

图 6 为丙酮与 Gua 水溶液体系在  $\text{pH} = 9.4$  时的光解谱图. 图中可看出  $^3\text{Gua}^*$  的吸收已消失. 通过 pH 值滴定 (图 6(a)), 得到  $^3\text{Gua}^*$  的  $\text{p}K_a = 8.7$ , 而基态 Gua 的  $\text{p}K_a = 9.2$ , 这是由于处于激发态时能量较高, 使分子中的活泼氢更容易离子化. Parkanyi 等人认为鸟嘌呤的离子化是发生在 N-9 的位置上<sup>[16]</sup>, 而本实验中的 Gua N-9 上的氢已被戊糖取代, 却具有相同的性质. 结合以前的研究结果<sup>[13]</sup>, 可以认为 Gua 中氧原子对 N-1 位的 p 电子云有强的吸引作用, 导致 N-1 位上的氢更易离子化, 而不是 Parkanyi 等认为的在 N-9 上离子化.

## 2. 碱基自由基

(1) 胸腺嘧啶羟基加合物自由基 在  $\text{N}_2\text{O}$  饱和的 Thy 水溶液体系激光光解瞬态吸收光谱 (图 7) 中, 可观察到 Thy 激发三重态的吸收峰消失了, 而在 370 nm 处出现一个宽的吸收带, 它服从二级反应规律. 它与脉冲辐解实验所得到的胸腺嘧啶羟基加合物自由基 ( $\text{TOH}\cdot$ ) 的特征吸收相一致. 当体系中加入  $\text{SCN}^-$  离子时, 该吸收强度明显下降, 同时在 480 nm 处出现  $(\text{SCN})_2^-$  离子的特征吸收. 这表明体系中确实生成了  $\text{OH}\cdot$  自由基. 其机理可能是按反应 (4c), (5c) 形成  $\text{Thy}^+$  和  $\text{N}_2\text{O}^-$ , 然后经由如下过程形成胸腺嘧啶羟基加合物自由基.

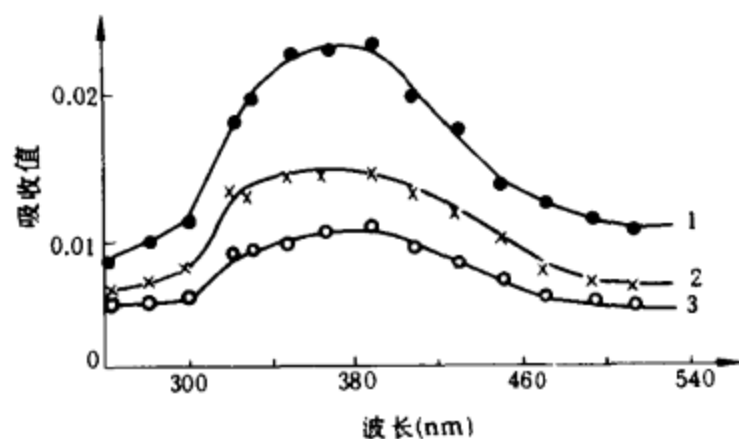
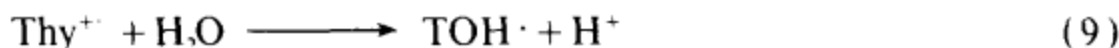
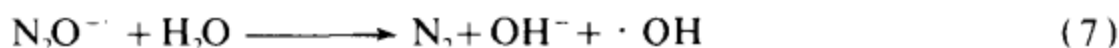


图 7  $\text{N}_2\text{O}$  饱和下的 Thy ( $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{ dm}^{-3}$ ) 中性水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱  
1—0  $\mu\text{s}$ , 2—1  $\mu\text{s}$ , 3—2  $\mu\text{s}$



(2) 丙酮、二苯甲酮激发三重态与碱基的反应 丙酮激发三重态除了可与碱基发生三重态-三重态能量转移反应外, 它和二苯甲酮激发三重态还可以与碱基发生其它的反应. 从图 5 中可以看出除了在波长 350—450 nm 范围内出现的属于鸟苷激发三重态的吸收带外, 其瞬态吸收光谱图中在  $\lambda_{320} \text{ nm}$  左右出现一个平台, 其特征吸收伸展至整个观察波长范围, 寿命很长, 性质与 O'Niell 等人<sup>[11,17]</sup> 用  $\text{SO}_4^-$  或  $\text{Br}_2^-$  与 Gua 反应生成的鸟苷脱氢自由基 ( $\text{G}(-\text{H})\cdot$ ) 相一致. 它可能是通过受激络合物内的电子转移过程而生成  $\text{S}^-$  和  $\text{D}^+$ , 即反应 (4c), (5c), 而后发生反应:





生成碱基脱氢自由基<sup>[18]</sup>. 为了进一步判明丙酮、二苯甲酮激发三重态分别与 DNA 碱基发生电子转移反应的可能性, 按 Rehm-Weller 方程 (II)<sup>[18]</sup> 计算了自由能变化  $\Delta G$  (表 2).

$$\Delta G = 96.48(E_{ox} - E_{red}) - \Delta E_T \quad (II)$$

其中  $\Delta E_T$  为激发三重态能量,  $E_{ox}$  为被氧化碱基的半波电位,  $E_{red}$  为被还原酮类的半波电位. 对丙酮  $E_{red} = -2.305V(SCE)$ , 二苯甲酮  $E_{red} = -1.84V(SCE)$ <sup>[4]</sup>.

表 3 胞嘧啶及其衍生物激发三重态反应动力学参数

碱 基	$k_0$ (s <sup>-1</sup> )	$k_1$	$k_q(Mn^{2+})$	$k_{tt}$
Cyt	$5.5 \times 10^4$	$4.2 \times 10^8$	$8.0 \times 10^7$	$3.8 \times 10^9$
Cyd	$7.6 \times 10^4$	$2.4 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^9$
dCMP	$9.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$5.1 \times 10^9$

由表 2 可知其自由能变化为正值, 丙酮、二苯甲酮激发三重态不可能有效地通过受激络合物的途径从嘧啶碱基上夺取电子; 与嘧啶碱基相反, 上述光敏剂都能从嘌呤碱基上夺取电子, 随后从失去电子的嘌呤碱基上获得质子而形成加氢自由基, 嘌呤碱基则形成脱氢自由基  $G(-H)\cdot$ . 在二苯甲酮和 Gua 体系的光解实验中, 更加清楚地表明这种反应的可能性. 图 8 (a) 指出在二苯甲酮和 Gua 体系中, 波长 330 nm 处有一新的尖峰出现, 在 5  $\mu s$  时达到最大, 同时在 480—570 nm 范围内出现双峰结构, 其寿命明显长于二苯甲酮三重态, 根据 Charlier 等人<sup>[19]</sup>的工作, 可认为这是二苯甲酮抽氢自由基的吸收峰, 它是通过受激络合物内部的电子转移过程而生成的.

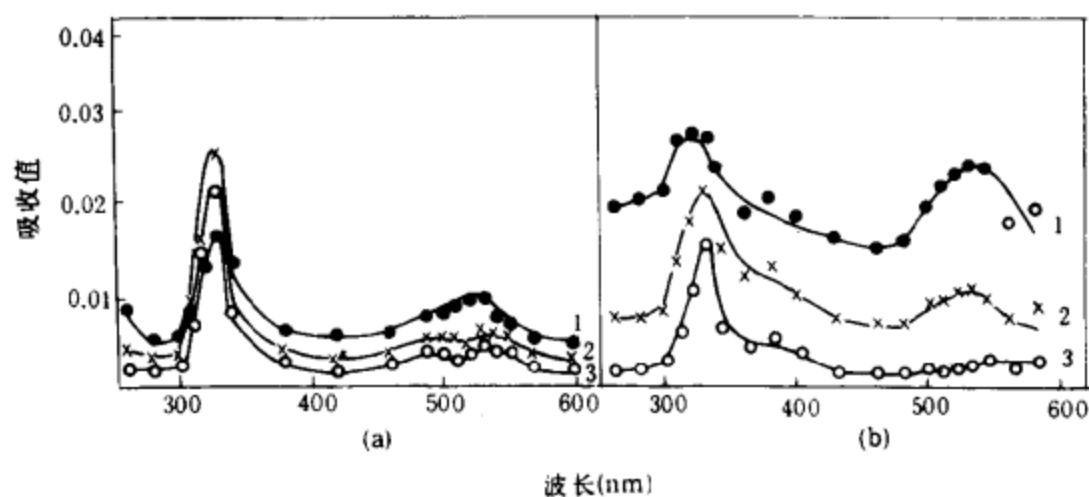


图 8 二苯甲酮( $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )与碱基中性水溶液体系在  $N_2$  饱和下的激光光解瞬态吸收光谱

(a) Gua ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), 1—0  $\mu s$ , 2—5  $\mu s$ , 3—15  $\mu s$ ;

(b) Thy ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), 1—0  $\mu s$ , 2—1  $\mu s$ , 3—8  $\mu s$

图 8(b) 为二苯甲酮和 Thy 水溶液体系的激光光解瞬态吸收光谱, 它与单独二苯甲酮体系的光解谱图基本一致, 主要是二苯甲酮激发三重态的吸收峰(峰值在 330 和 520 nm<sup>[19]</sup>), 只是其三重态的寿命明显缩短, 而二苯甲酮三重态能量低于 Thy(表 1), 这种变化不能用激发能转移来解释, 比较合理的解释是通过反应 (5a), (5b) 使二苯甲酮激发三重态去活化.

总之,丙酮激发三重态与 DNA 碱基之间三重态-三重态能量转移的动力学研究是对我们前已提出的辐射保护与敏化三转移机理<sup>[20]</sup>之一-激发能转移机理的新证实;而丙酮、二苯甲酮与碱基通过受激络合物的电子转移反应生成碱基抽氢自由基则是三转移机理之一-电荷转移机理的新发展.

### 三、结 论

综上所述,在研究 DNA 碱基水溶液体系的激光光解中得到了如下主要结论:

1. 在 Thy 体系中,于 300nm 处发现一个 Thy 新的激发三重态,当浓度为  $4 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时其半衰期为  $0.43 \mu\text{s}$ . 在  $\text{N}_2\text{O}$  体系中观察到  $\text{TOH}\cdot$ , 认为它是通过激发络合物内电子转移过程而形成的.

2. 在丙酮与 Cyt 及其衍生物 Cyt, dCMP 体系中,首次观察到它们的激发三重态吸收谱,当浓度为  $2 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时,胞嘧啶、胞嘧啶核苷、脱氧胞嘧啶核苷酸等激发三重态半衰期分别为  $5.0 \mu\text{s}$ ,  $5.6 \mu\text{s}$ ,  $5.3 \mu\text{s}$ .

3. 在丙酮与 Gua 体系中,于 380nm 处观察到鸟嘌呤核苷激发三重态,当浓度为  $1 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时半衰期为  $7.4 \mu\text{s}$ , 其  $pK_a$  值为 8.7.

4. 对丙酮、二苯甲酮激发三重态与 DNA 碱基的反应研究表明:丙酮激发三重态可与碱基进行有效的能量转移反应,而二苯甲酮不能;丙酮与二苯甲酮激发三重态可与嘌呤碱基通过受激络合物内的电子转移过程而发生抽氢反应,与嘧啶碱基则不能.

### 参 考 文 献

- [1] Steeken, S., *Chem. Rev.*, **89**(1989), 503.
- [2] Salet, C. & Bensasson, R., *Photochem. photobiol.*, **22**(1975), 231.
- [3] Equinones, E. & Arce, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**(1989), 8218.
- [4] Kasama, K. et al., *J. Phys. Chem.*, **86**(1982), 2420.
- [5] Wang, W. F. et al., *Chin. Sci. Bull.*, **37**(1992), 294.
- [6] Matage, N. et al., in *Molecular Association* (Ed. Foster, R.), Vol. 2, Academic Press, London, 1975, 31.
- [7] Montenay-Garestier, T. et al., in *Photochemistry and photobiology of Nuclear Acids* (Ed. Wang Shiyi), Academic Press, New York, 1976, 392.
- [8] Wierzchowski, K. L. et al., *Acta. Biolchem. Pol.*, **8**(1961), 219.
- [9] Zotikov, A. A., Polyakov, Y. S., *Biofizika*, **20**(1975), 557.
- [10] Lamola et al., *J. Chem. Phys.*, **47**(1967), 2210.
- [11] Luo, J., Wang, W. F. et al., *Res. Chem. Intermed.*, **15**(1991), 293.
- [12] Kavarnos, G. J. & Turro, N. J., *Chem. Rev.*, **86**(1986), 401.
- [13] Paul, O. P. TS'O, in *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry* (Ed. Paul, O. P. TS'O), Vol. 1, Academic Press, New York & London, 1974, 454.
- [14] Varadi, M. et al., *J. Chromatr.*, **90**(1974), 259.
- [15] Miller, L. L. et al., *J. Org. Chem.*, **37**(1972), 916.
- [16] Parkaryi, C. et al., *J. Chim. Phys.*, **81**(1984), 21.
- [17] O'Neill, P. & Davies, S. E., *Int. J. Radiat. Biol.*, **52**(1987), 577.
- [18] Kemp, T. J. & Parker, A. W., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **II**, 1987, 397.
- [19] Charlier, M. & Helene, C., *Photochem. Photobiol.*, **15**(1972), 71.
- [20] Lin N. Y., *Radiat. Phys. Chem.*, **28**(1986), 211.



# 水稻种子贮存蛋白 Prolamin 4a 基因的组织特异性表达调控\*

周先锦 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室,北京 100081)

## 摘 要

本文分离了水稻中花8号种子贮存蛋白 Prolamin 基因的5'端调控区域,对其DNA的全序列结构作了分析,表现启动子DNA的典型序列结构. 构建了GUS融合基因,利用农杆菌LBA4404双元载体系统转化烟草,分子杂交获得转基因烟草植株,在转基因烟草开花20天时,对烟草种子作GUS基因表达的组织化学分析. 实验结果表明Prolamin基因的启动子在种子的胚乳中激活下游GUS基因的表达,这是水稻Prolamin基因5'端调控序列功能的首次报道.

**关键词** 水稻中花8号、Prolamin基因、启动子DNA、组织发育特异性表达、转基因烟草

水稻种子贮存蛋白的分子生物学的研究是基因工程改良品质的基础,因此具备潜在的重要应用意义,同时作为种子贮存蛋白在种子发育的特定时期与特定组织表达累积,这为高等植物基因组织发育特异性表达的研究提供了一个很好的模式系统.

水稻种子胚乳中主要的贮存蛋白为Glutelin与Prolamin两类,其中Glutelin占种子蛋白的80%左右,Prolamin占10%左右. 相对其他禾谷类基因来说,对水稻种子贮存蛋白的基因研究还相当少. 水稻Glutelin是由一个相对较小的基因家族编码的,由三个亚基因族 $Gt_1$ 、 $Gt_2$ 、 $Gt_3$ 组成. 每一个亚基因族中有5—8个基因拷贝. 而水稻的Prolamin是由一个非常复杂的基因族组成,单倍体基因组中有80—100拷贝. 分子克隆发现2.5kb的EcoRI片段串联重复,每个片段包含一个Prolamin基因<sup>[1]</sup>. 迄今尚未见到对Prolamin基因的功能启动子的研究报告.

在本文的研究中,分离了水稻种子贮存蛋白Prolamin基因5'端调控区域,对其DNA的全序列结构作了分析,构建了融合基因并在转基因烟草中验证了其组织发育特异性表达的功能.

1991-07-12 收稿,1991-11-25 收修改稿

\* 国际洛克菲勒基金资助项目

