

稀有三环核苷衍生物的光谱学研究

赵红卫 窦大营 苗金玲 姚思德

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室 上海 201800)

江致勤 赵春雷

(同济大学化学系 上海 200092)

摘要 利用时间分辨激光光解技术对稀有三环核苷的前体化合物 N - 4 - desmethylwyosine (dYt) 研究发现,该化合物能被 248nm 激光单光子电离,但未观察到明显的激发三线态。用氧化性自由基 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 引发其阳离子自由基,揭示了其光电离机理。以 KI 溶液为参照,测得该化合物中性条件下的光电离量子产额(ϕ)为 0.04。

关键词 稀有三环核苷衍生物,单光子电离,自由基,激光光解,瞬态吸收光谱

中图分类号 O644.18

修饰的碱基(modified bases)由于在核酸中含量很低,因此也常称作稀有碱基(rare bases),它们所构成的核苷称为修饰的核苷或稀有核苷。稀有核苷在各种核酸中的分布不均一。现已发现近 100 种修饰核苷^[1],以 tRNA 中所含最多。yW 核苷是其中一类不寻常的高度修饰的天然稀有核苷,它是鸟嘌呤的衍生物,具有独特的三环结构如 Wyosine 见图 1 所示。面包、啤酒、酵母及一些哺乳动物的肝等的苯丙氨酸特异性转运核糖核酸 tRNA^{Phe} 中可分离到该种类似结构的稀有核苷化合物,它们被称为 Y - nucleosides 系列^[2]。该类稀有核苷位于 tRNA^{Phe} 反密码区的 3' - 端,参与苯丙氨酸密码子的识别。它们一般具有很强的荧光,可被用来检验反密码子沟可能的构象变化并可能成为一种研究 DNA 序列的有效荧光探针^[3]。这些特点引起了人们对其化学性质及生物学意义的关注^[4]。由于这类核苷具有独特的三环结构,能够保持一定的刚性平面,预计比鸟嘌呤对紫外光的影响更敏感。本工作首次用纳秒级激光光解技术对稀有核苷 Wyosine 的前体化合物即未甲基化的 N - 4 - desmethylwyosine (dYt) 进行光激发,通过其光谱学分析研究,来了解该类化合物的光物理光化学性质。

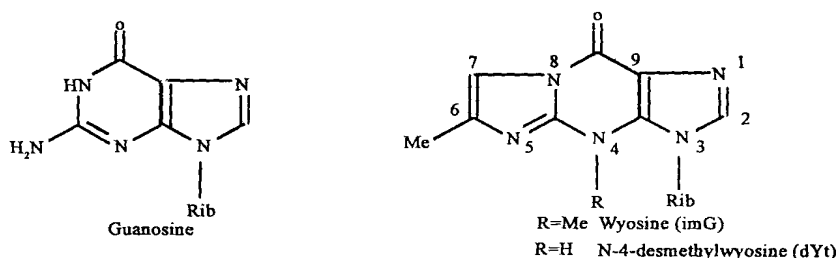


Fig. 1 The structures of Guanosine, Wyosine and N - 4 - desmethylwyosine (dYt)

1 实验材料和方法

1.1 试剂及化合物

N - 4 - desmethylwyosine (dYt) 根据文献[5]方法合成,产物经紫外、质谱及核磁鉴定。

国家自然科学基金(20072025)及中国科学院前沿领域项目资助

第一作者:赵红卫,女,1966年12月出生,1998年毕业于同济大学化学系,有机化学专业,现为中国科学院上海原子核研究所,博士

通讯联系人:姚思德

收稿日期:初稿 2002 - 03 - 29, 修回 2002 - 05 - 30

$K_2S_2O_8$ 为 Sigma 分析纯试剂。NaOH、 $HClO_4$ 及 KI 为上海试剂厂分析纯试剂,其中 KI 经重结晶后使用。混合磷酸盐 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 为上海雷磁厂标准样品,叔丁醇(t-BuOH) 为上海试剂厂分析纯试剂,经重蒸后使用。实验所用氮气及氧化亚氮纯度均为 99.99%。

1.2 仪器和方法

实验是在中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室进行。激光光解装置采用 KrF 准分子激光器做激励光源,激光波长为 248nm,脉宽 20ns,单脉冲能量为 50mJ。检测方法和数据处理详见文献[6]。稳态紫外光谱吸收在 TU-1800PC 型分光光度计上测定,光谱带宽 2nm,采样间隔 0.5 nm。

本实验所用溶液均用 3 次蒸馏水配制,样品光照前,分别用高纯 N_2 或 N_2O 气体去除氧气或清除水合电子,鼓泡时间不少于 20min。实验中用稀 $HClO_4$ 、NaOH 及混合磷酸盐缓冲溶液调节溶液的 pH。实验在室温下进行。化合物光电离水合电子的量子产额的测定,以一定浓度的 KI 水溶液为参比($\phi_e^- = 0.23$)^[7],通过改变激光强度测定 650nm 处水合电子的瞬态吸收值,并作图计算求得。

2 结果和讨论

2.1 dYt 紫外光谱的稳态分析

由于该类核苷在结构上比鸟嘌呤具有更高的电子离域程度,因此紫外吸收较嘌呤有所红移,主要的吸收带在 280—300nm 左右。图 2A 为 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dYt 的水溶液在 pH2, pH6.8 及 pH8 时的紫外吸收曲线。在 pH6.8 时有两个最大吸收峰,分别为 $\lambda_{\text{max}} = 230$, $\lambda_{230\text{nm}} = 34900$; $\lambda_{\text{max}} = 284\text{nm}$, $\lambda_{284\text{nm}} = 11900$,其中 284nm 处的吸收为 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁,230nm 处为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。从图 2 中可以看出该溶液在碱性情况下,会发生较大程度的红移。其原因主要是在酸性条件下,羰基上的氧原子和环上氮原子的未成键 p 电子容易与质子结合而发生离子化,形成有效的正电荷,增强了对共轭 π 电子的吸引力;而碱性条件下,氮原子上出现的是有效的负电荷,使电子更容易跃迁,因而吸收发生红移。配制一系列不同 pH 值的 dYt 水溶液,分别在 $\lambda_{\text{max}} = 284\text{nm}$ 及 $\lambda_{\text{max}} = 305\text{nm}$ 处测得溶液吸光度,并以 pH 值为横坐标作图,两处所求得溶液 pK 值一致,为 $pK_{a1} = 2.5$, $pK_{a2} = 7.2$ 图 2B 为 $\lambda_{284\text{nm}}$ 处测得的吸收值随 pH 变化曲线。

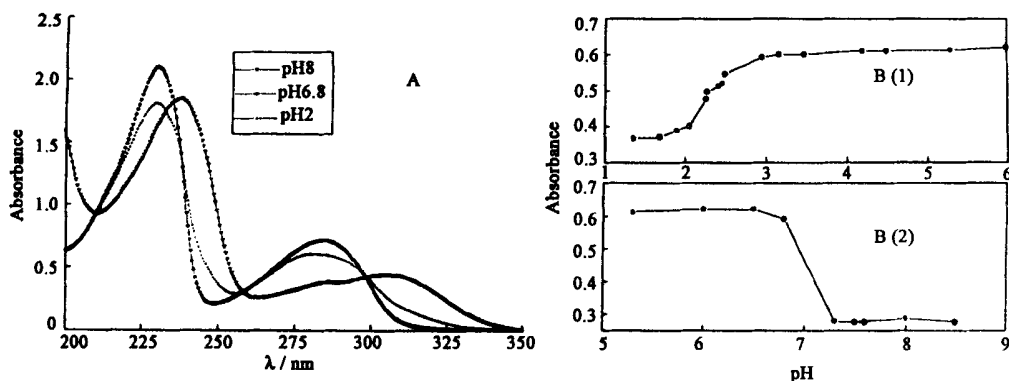


Fig. 2 A. UV spectra of $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ N-4-desmethylwytosine in aqueous solution at different pH, B. Absorbance at 284nm as a function of pH dependence

2.2 单光子电离及水合电子量子产额(e^-)的测定

图 3 为 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 dYt 水溶液通过 N_2 20min 后激光光解所得的瞬态吸收光谱。在激光脉冲 $1\mu\text{s}$ 后,在 350nm 处有一吸收峰,同时观察到一个波段很宽的强吸收在 500—700nm, $\lambda_{\text{max}} = 700\text{nm}$ 。10 μs 后 700nm 左右的瞬态产物的迅速衰减,320nm 处的吸收有所增加。当体系中加入 t-BuOH 并通 N_2O 或 O_2 饱和后,未观察到以上 500—700nm 处的宽带吸收,因此可将该段吸收归结为水合电子 e_{aq}^- 的贡献,见图 4 所示。 e_{aq}^- 的产生是 dYt 光电离的直接证据。在 N_2 饱和的水溶液中, e_{aq}^- 以一级动力学规律衰减,且与底物的浓度有关,其反应速率常数为 $3.6 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,这跟 e_{aq}^- 与底物分子生成阴离子自由基有关。当体系中加入三线态淬灭剂 Mn^{2+} 后,未观察到明显的三线态。这可能是由于三线态的量子产额低,在该区域的摩尔吸光系数又较小的原因。

为了判断 dYt 光电离是单光子还是双光子过程,将光电离产生的 e_{aq}^- 在 650nm 处的吸收值对激光强度作图,所得吸收值与激光强度呈线性关系,由此说明 dYt 的光电离是单光子过程。以一定浓度 KI 溶液的激光光解作参比,测得 dYt 光电离生成的水合电子产额(e^-)为 0.04。

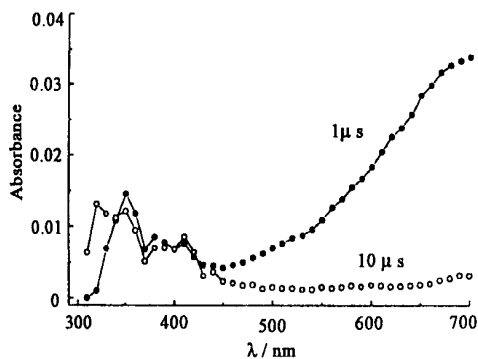


Fig. 3 Absorbance spectra observed after 248nm laser irradiation of $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dYt aqueous solution saturated with N_2
○, 1 μs , ○, 10 μs

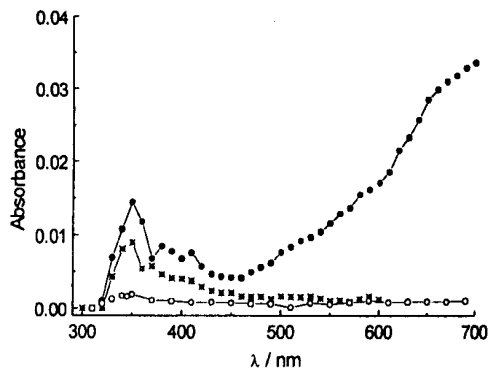


Fig. 4 Absorbance spectra observed after 248nm laser irradiation of $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dYt aqueous solution at 1 μs , ○, N_2 saturated, ○, O_2 saturated, *, N_2O saturated

我们知道在正常的几种核苷中,鸟嘌呤是最容易被氧化受损伤的,然而用 250nm 单光子的能量并不足以使之发生光电离^[8]。Kasama^[9]曾用 248nm KrF 激光引发鸟嘌呤,并未观察到相应的瞬态吸收。宋钦华等^[10]在碱性情况下,才观察到鸟嘌呤被 248nm 激光单光子电离的产物。这意味着三环结构的鸟嘌呤衍生物对紫外光的影响更敏感,更容易受到光损伤。

2.3 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 自由基氧化 dYt

由于 dYt 在 248nm 激光下发生了光电离,为确认电离产生的阳离子自由基,本文采用 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 来氧化 dYt。用 248nm 激光激发 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液很容易产生单一的 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 自由基。 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 是氧化性很强单电子氧化剂,它一般可以从底物分子上夺取一个电子,同时伴随明显的特征吸收及寿命衰减。实验中 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 与目标化合物的浓度应保持一定的配比,一般是将两者在 248nm 处的吸光度之比保持在 100 以上,以保证激光能量基本被 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 所吸收。图 5 为 N_2 饱和的 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 dYt 含 $5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 水溶液体系的激光光解瞬态吸收谱。当激光脉冲 $1\mu\text{s}$ 后在 460nm 处出现一很强的吸收峰,它随时间延长逐渐衰减,为 $\text{SO}_4^{\cdot -}$ 的特征吸收。随着 460nm 的衰减,在 320—350nm 和 640nm 处出现新的峰并且生成

与衰减呈同步进行,(见图 5 的插图)。新生成的峰应归结为 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 氧化 dYt 的反应产物,即 $\text{dYt}^{\cdot+}$ 阳离子自由基,但由于 dYt 在稳态时的 pK_a 为 2.5,故在本实验 $\text{pH}6.8$ 情况下, $\text{dYt}^{\cdot+}$ 阳离子自由基很可能会脱一质子呈中性自由基状态即 $\text{dYt}(-\text{H})^{\cdot}$ 。

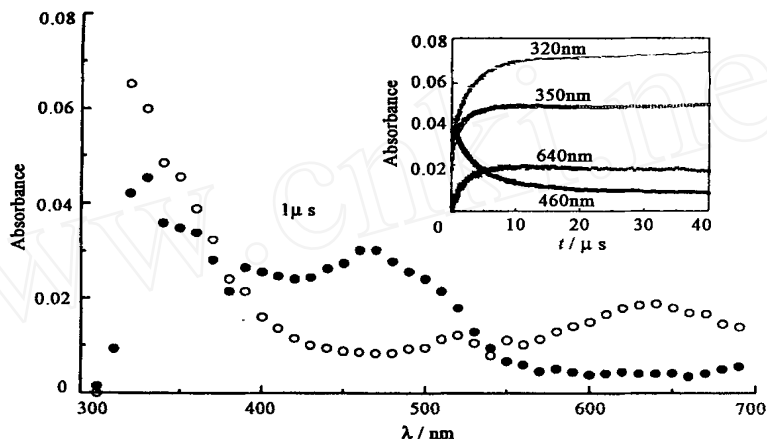
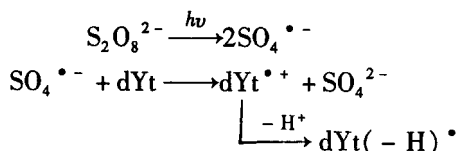
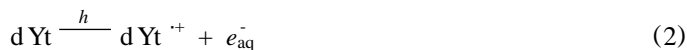


Fig. 5 Transient absorbance spectra from laser irradiation of $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dYt and $2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ aqueous solution deoxygenated with N_2 at $\text{pH}6.8$, \cdot $1\mu\text{s}$, \circ $10\mu\text{s}$
Inset: The transient absorbance curves with the decay of $\text{SO}_4^{\cdot-}$ observed at 460nm and the growth traces of products at 320nm, 350nm and 640nm

在 $\text{pH}6.8$ 条件下,以 640nm 处测得生成的表观速率常数 k_{obs} 对 dYt 的浓度作图,可以求出 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 氧化 dYt 的速率常数为 $1.9 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。反应过程可表示如下



通过以上实验及分析可见,用 248nm 激光直接激发脱氧的 dYt 水溶液,能使之发生光电离,在所产生的瞬态吸收光谱中,500—700nm 处的宽带吸收为光电离产生的水合电子,而在 320—350nm 观察到的吸收除了 $\text{dYt}^{\cdot+}$ 阳离子或进一步脱质子的 $\text{dYt}(-\text{H})^{\cdot}$ 外,还应该考虑到有 dYt 阴离子自由基的贡献,即在这一波长范围的吸收是几种瞬态产物的叠加。其反应机理可归纳如下



3 结论

在 248nm 激光下,dYt 能被单光子电离。以 KI 水溶液为参比,测得室温下其光电离的量子产额为 0.04。电离首先产生了 $\text{dYt}^{\cdot+}$ 阳离子自由基和水合电子,由于 dYt 在稳态的 pK_{a1} 为 2.5 及 pK_{a2} 7.2,因此,在本实验 $\text{pH}6.8$ 条件下, $\text{dYt}^{\cdot+}$ 阳离子会进一步脱质子成 $\text{dYt}(-\text{H})^{\cdot}$ 自由基,同时基态的底物分子会与水合电子作用生成 $\text{dYt}^{\cdot-}$ 阴离子自由基。在本实验中未观察

到明显的三线态。由于三环稀有核苷衍生物在结构上比鸟嘌呤多一个环,电子离域程度高,因此对紫外光的影响比鸟嘌呤更敏感,也更容易受到光的损伤,这为进一步了解该类稀有核苷化合物的光物理及光化学性质提供了一定的帮助。

致谢 本工作得到中国科学院上海原子核研究所辐射化学实验室韩镇辉和钱素平同志,以及该所纳米医药室的李晴暖博士的支持和帮助,在此致谢。

参 考 文 献

- 1 Karl M K, Richard G, Elzbieta S *et al.* *Biochemistry*, 1999, **38**(27):8647 - 8656
- 2 Kasai H, Goto M, Takemura S *et al.* *Tetrahedron Lett*, 1971, **29**(29):2725 - 2728
- 3 (a) Okabe N, Cramer F. *J Biochem*, 1981, **89**(5):1439 - 1443
(b) Nordlund T M, Rigler R, Glemarec C *et al.* *Nucleosides and Nucleotides 1988*, **7**(5,6): 805 - 811
- 4 (a) Itaya T, Morisue M, Shimomichi M *et al.* *J Chem Soc Perkin Trans*, 1994, (19):2759 - 2765
(b) Werneck A S, Neto M de O, Maia E R. *J Mol Struct (Theochem)*, 1998, **427**(issue:1):15 - 23
(c) Rosemeyer H, Toth G, Golankiewicz B *et al.* *J Org Chem*, 1990, **55**(22):5784 - 5790
- 5 Golankiewicz B, Folkman W. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**(15):5243 - 5255
- 6 YAO S D, SHEN S D, CAIJ H *et al.* *Radiat Phys Chem*, 1995, **46**(1):105 - 109
- 7 Wala M E, Bothe H G, Schulte - Frohlinde D. *J Photochem Photobiol A:Chem*, 1990, **53**(1):87 - 108
- 8 (a) Cadet J and Vigny P in Morrison H (ed.). *Bioorganic Photochemistry, Photochemistry and the Nucleic Acids*, Vol. 1, Wiley, New York, 1990, 1 - 272
(b) Görner H. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1994, **26**(2):117 - 139
(c) Steenken S. *Chem Rev*, 1989, **89**(3):503 - 520
(d) Candeias L P and Steenken S. *J Am Chem Soc*, 1992, **114**(2):699 - 704
- 9 Kasama K, Takematsu A, Arai S. *J Phys Chem*, 1982, **86**(3):2420 - 2427
- 10 SONG Q H, YAO S D, WANG W F *et al.* *J Photochem Photobiol A*: 1997, **102**(issue:2 - 3):197 - 201

SPECTRAL STUDIES OF DERIVATIVE OF TRICYCLIC MODIFIED NUCLEOSIDE IN AQUEOUS SOLUTIONS

ZHAO Hongwei DOU Daying MIAO Jinling YAO Side

(*Laboratory of Racitacion Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*)

JIANG Zhiqin ZHAO Chunlei

(*Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092*)

ABSTRACT The absorption spectra of N - 4 - desmethylwyosine (dYt), a derivative of the tricyclic modified nucleoside wyosine, in aqueous solutions were studied by time - resolved laser photolysis. The oxidizing radical $\text{SO}_4^{\cdot -}$ was used to produce dYt radical cation. The mechanism of dYt monophotonic ionization was suggested. Distinct triplet was not observed in this work. The quantum yield of formation of hydrated electrons (e^-) was determined to be 0.04 at room temperature in neutral aqueous solution by using KI solution as a reference.

KEYWORDS Derivative of tricyclic modified nucleoside, Monophotonic ionization, Radical, Laser photolysis, Transient absorption spectrum

CLC O644.18