

研究简报 ·

色氨酸及其肽对 *cis-syn* 型 1,3-二甲基胸腺嘧啶二聚体的光敏化裂解作用

晏利琴^a 宋钦华^{*, a} 黑晓明^a 郭庆祥^a 俞书勤^{b*}

(^a 中国科学技术大学化学系 合肥 230026)

(^b 中国科学技术大学化学物理系 合肥 230026)

摘要 通过荧光猝灭实验和测定二聚体裂解程度的辐照实验,研究色氨酸(Tip)及其二肽色氨酸苯丙氨酸(Tip-Phe)对 *cis-syn* 型 1,3-二甲基胸腺嘧啶二聚体(DMTD)的光敏化裂解作用.结果表明,色氨酸及其二肽在较强光(> 290 nm)辐照下,主要通过双光子电离生成的水合电子(e_{aq}^-)导致二聚体裂解,其次,通过激发单重态与二聚体间的电子转移导致二聚体裂解.另外一导致二聚体裂解的可能途径:色氨酸残基激发三重态与二聚体间的电子转移光敏化二聚体裂解.

关键词 色氨酸,环丁烷型胸腺嘧啶二聚体,光敏化,DNA 光复活

Photosensitized Splitting of *Cis-syn* 1,3-Dimethylthymine Dimer by Tryptophan and Its Peptides

YAN, Li-Qin^a SONG, Qin-Hua^{*, a} HEI, Xiao-Ming^a GUO, Qing-Xiang^a YU, Shu-Qin^b

(^a Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

(^b Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Photosensitized splitting of *cis-syn* 1,3-dimethylthymine dimer by tryptophan and its peptides (Tip-Phe) was studied based on the fluorescence quenching experiments and irradiation experiments determining the splitting percentage of the dimer. It was revealed that 1,3-dimethylthymine dimer was mainly splitted by e_{aq}^- resulted from two-photon ionization of Tip and its peptides under irradiation with light (> 290 nm). Moreover, the excited singlet state of Tip and its peptides can transfer an electron to the dimer and make it splitted. In addition, the excited triplet state of Tip can also transfer an electron to the dimer and make it splitted.

Keywords tryptophan, cyclobutane dimethylthymine dimer, photosensitization, DNA photoreactivation

DNA 是紫外线作用于生物体的主要靶分子. DNA 吸收 260 ~ 320 nm 的紫外光的能量会定域在 DNA 链上能量较低的胸腺嘧啶碱基(T)上,诱发其与 DNA 双螺旋同一链上另外的碱基(T 或 C)发生[2 + 2]环加成反应生成环丁烷型嘧啶二聚体(Phy-Phy) (图 1),主要是 *cis-syn* 型和极少量的 *trans-syn* 型. Phy-Phy 的生成阻碍了 DNA 的复制与转录,造成细胞死亡,并可引起变异,是导致人类皮肤癌的主要原因.在近紫外-可见光下,生物体可通过光复活打开环丁烷环,修复嘧啶碱基,恢复 DNA 的双螺旋结构.在正常情况下, DNA 的

这种损伤与修复处于平衡.但是由于人们对消耗臭氧层化学品的大量使用,释放到大气中的这些物质还将在今后 10 ~ 20 年使臭氧层进一步变薄,使辐射到地面的 UV 线增强,对生物圈的损害加剧.因此,近年来, DNA 的修复尤其是 DNA 光复活作用的研究引起了人们的极大关注^[1,2].

在 DNA 光复活作用中,光复活酶(又称为 DNA 光解酶)可特异性地识别受损 DNA,并在嘧啶二聚体处与之结合,在近 UV-vis 光作用下, DNA 光解酶中天线辅酶吸收光子并将能量传递给催化辅酶($FADH_2$, 活性形式为 $FADH^+$),被激

* E-mail: qhsong@ustc.edu.cn

Received December 10, 2002; revised March 12, 2003; accepted May 2, 2003.

国家自然科学基金(Nos. 30000036, 20273066)、高等学校博士学科点专项科研基金资助项目.

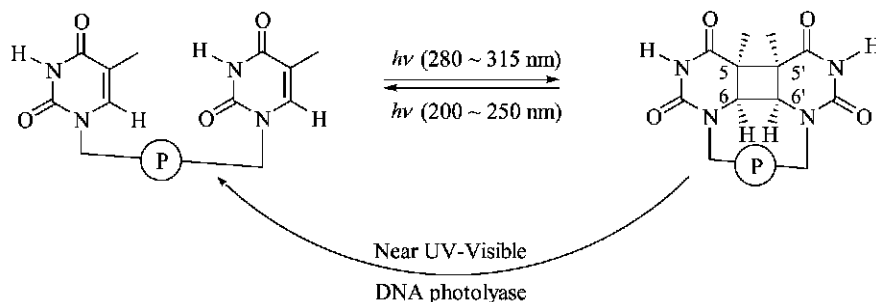


图1 DNA中嘧啶二聚体的形成及其逆反应:光解酶利用近UV-vis进行光复活作用

Figure 1 Formation of thymine dimer of DNA and reversed reaction: photoreactivation catalyzed by photolyase using UV-vis light

发的 FADH^- 转移一个电子给二聚体,得到电子的二聚体快速裂解并返还电子,最后,光解酶从修复的DNA上解离下来^[3]. 进一步研究发现,DNA光复活作用中除 FADH^- 与受损DNA间的电子转移外,还存在二类电子转移^[4]:一是在可见光下,酶蛋白向半醌态的催化辅酶(FADH^-)转移一个电子使其活性恢复(具有催化活性的辅酶是一种全还原型黄素阴离子 FADH^- ,极易被氧化为无活性的 FADH^\cdot);二是在近紫外光下,酶蛋白可直接、高效率($\epsilon = 0.56^{[5]}$)修复嘧啶二聚体. 这两类电子转移过程都涉及酶蛋白中的色氨酸残基,这种蛋白质中的电子转移在酶促反应中扮演重要角色^[6],人们对此抱有极大的研究兴趣. 酶蛋白对半醌态辅酶活性的恢复被称为光活化作用,它所引起蛋白质内的电子转移已被直接观察到^[7,8]. 然而,酶蛋白对二聚体的直接修复作用还缺乏认识,人们研究过吲哚衍生物以及含色氨酸的三肽(Lys-Tip-Lys)对嘧啶二聚体的光敏化裂解,提出了单重态电子转移的敏化机理^[9],但未涉及其他含色氨酸的肽. 本工作通过研究色氨酸及其二肽 Tip-Phe 对 *cis-syn* 型1,3-二甲基胸腺嘧啶二聚体的光敏化裂解,认识DNA光解酶中酶蛋白对二聚体的裂解途径.

1 实验部分

DL-色氨酸(Tip)和色氨酸苄丙氨酸(Tip-Phe)为Sigma公司产品,未经进一步纯化直接使用. 胸腺嘧啶为上海试剂二厂产品,硫酸二甲酯为化学纯,上海化学试剂公司产品. 丙酮、硫酸二甲酯经一次重蒸后使用.

1,3-二甲基胸腺嘧啶(DMT)的合成:低温下,将硫酸二甲酯滴加到胸腺嘧啶的碱性水溶液中,然后加热至沸,用氯仿萃取,蒸去氯仿,在乙醇中重结晶纯化.

*cis-syn*型二甲基胸腺嘧啶二聚体(DMTD)的合成^[10]:将DMT的丙酮溶液置于Pyrex反应池中, N_2 鼓泡下用300 W高压汞灯辐照至DMT完全反应(约21 h). 蒸去溶剂,以乙酸乙酯-石油醚(6:1, V/V)为抽提液经硅胶色谱柱分离,得到四种结构的DMTD(图2): *cis-syn*, *cis-anti*, *trans-syn*, *trans-anti*-DMTD. 甲基化的尿嘧啶二聚体和甲基化的胸腺嘧啶二聚体因在多种溶剂中具有良好的溶解性,通常把它们作为研究模型,而不直接用未甲基化的嘧啶二聚体.

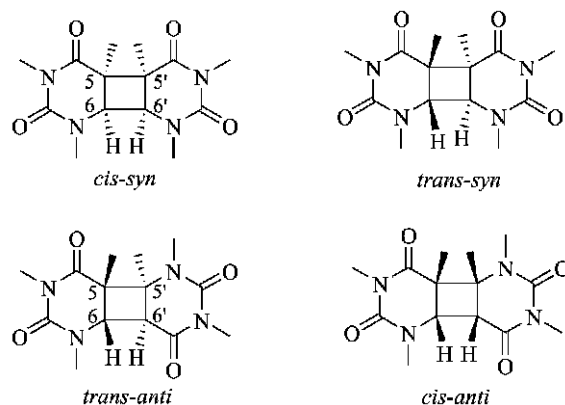


图2 4种1,3-二甲基胸腺嘧啶二聚体异构体的结构

Figure 2 Structures of the isomeric 1,3-dimethylthymine dimers

荧光猝灭实验和辐照实验在室温下进行,水溶液配制均用三重蒸馏水,并加入pH为7.0的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液,在实验前根据实验目的用高纯氮(99.99%)、高纯氧(99.99%)和氧化亚氮(99.99%)鼓泡15 min. 荧光猝灭实验在RF-5301PC荧光分光光度计上进行,UV吸收光谱及吸光度测定在TU-1901双光束紫外可见分光光度计上进行.

DMTD裂解生成DMT,共轭体系恢复,其吸收光谱在275 nm有一吸收峰(图3). 可以根据体系在275 nm处的吸光度

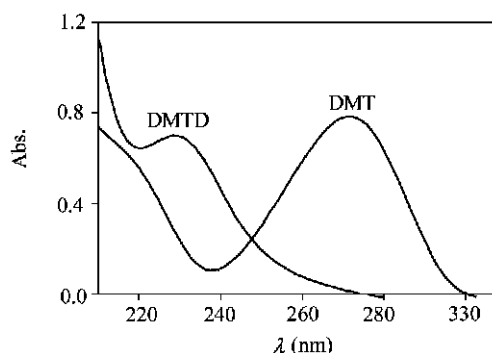


图3 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 二甲基胸腺嘧啶(DMT)和二甲基胸腺嘧啶二聚体(DMTD)的紫外吸收光谱

Figure 3 UV absorption spectra of $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dimethylthymine (DMT) and dimethylthymine dimer (DMTD) in water

变化计算二聚体的裂解程度. DMT 在 275 nm 处的消光系数 $= 7600 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 而 DMID 在此处的 $= 10 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. 若 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID 完全裂解将生成 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMT, 由此引起的 275 nm 处吸光度的变化为 $A_{275} = 7600 \times 0.2 \times 10^{-3} \times 1 - 10 \times 0.1 \times 10^{-3} \times 1 = 1.519$, 据此可计算出辐照实验中二聚体的裂解程度.

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭实验

DMID 在 290 nm 以上已无吸收, 我们以 290 nm 光为激发光, 分别研究不同浓度的 DMID 对 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Ttp 和 Ttp-Phe 的荧光猝灭作用, 作 Stern-Volmer 图 (图 4), 从拟合的直线斜率得到 k_{sv} , 列于表 1. DMID 对 Ttp 及其肽的荧光猝灭顺序为 Ttp > Ttp-Phe. 另外, 实验发现氧对其荧光猝灭作用很小, O_2 饱和体系的荧光强度仅比 N_2 饱和的降低 1%, 而空气饱和与 N_2 饱和体系的荧光谱观察不到差别. 由文献值^[11]也可预测 O_2 对 Ttp 荧光猝灭情况: 在水溶液中, O_2 对 Ttp 的猝灭速率常数 $k_q = 5.9 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$; Ttp 的荧光寿命 $\tau_s = 2.5 \text{ ns}$; 在 25 °C 的水中, O_2 饱和时其浓度为 $1.27 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 、空气饱和时 O_2 的浓度为 $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

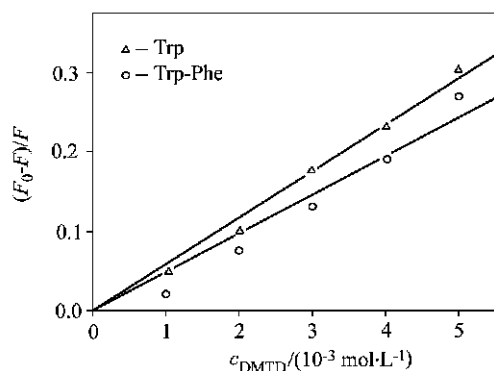


图 4 不同浓度的 DMID ($0 \sim 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) 对 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Ttp 和 Ttp-Phe 水溶液 (pH 7.0) 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Figure 4 Stern-Volmer analysis of $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Ttp and Ttp-Phe in water (pH 7.0) quenching by concentrated ($0 \sim 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) DMID

表 1 Ttp 和 Ttp-Phe 的氧化电位及被 DMID 荧光猝灭常数

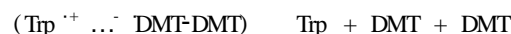
Table 1 Oxidation potentials and rate constants of Ttp and Ttp-Phe quenching by DMID

化合物	$k_{sv}/$ (mol L^{-1}) ⁻¹	E_{ox}^a/V (vs. SCE)	$G_S^b/$ (kJ mol^{-1})	$G_T^b/$ (kJ mol^{-1})
Ttp	58	0.78	-111	-10
Ttp-Phe	48	0.82	-107	-6.6

^a From ref. [16]. ^b Calculated according to excited singlet and triplet energy of Ttp and Ttp-Phe, respectively.

由荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程, O_2 饱和时, $(F_0 - F)/F = k_{q, O_2}[\text{O}_2] = 0.019$; 空气饱和时, $(F_0 - F)/F = 0.004$, 这个结果与实验结果一致.

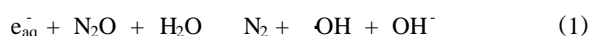
由 UV 吸收光谱可知, DMID 激发单重态能级 (约 436 kJ mol^{-1}) 比 Ttp 的 (399 kJ mol^{-1}) 高, DMID 不可能通过能量转移途径猝灭 Ttp 及其肽的荧光. 因此, 二者是通过电子转移途径导致荧光猝灭, 同时引起 DMID 的裂解^[9].



2.2 辐照实验

将分别含有 5×10^{-4} Ttp 或 Ttp-Phe 的 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID 溶液 (pH 7.0) 样品置于 Pyrex ($> 290 \text{ nm}$) 反应管中, 同一样品分别用三种气氛: N_2 , N_2O 和空气鼓泡饱和, 然后, 用 300 W 高压汞灯进行辐照, 每隔一定时间取出测定 275 nm 处的吸光度 (A_{275}).

不同气氛对光化反应会造成不同的影响. N_2 是一种惰性气氛, 通常不会与光化反应中活性中间体反应; N_2O 是 e_{aq}^- 的高效清除剂 (N_2O 饱和水溶液浓度为 $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, 与 e_{aq}^- 的反应速率 $k = 9.1 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [12]), 将 e_{aq}^- 转化为 $\cdot\text{OH}$. 在 N_2O 饱和的体系中, 另加入 $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ 的叔丁醇 (*t*-BuOH), 以清除氧化性很强的 $\cdot\text{OH}$; 空气饱和的水溶液中含 $2.7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (本段所引数据温度均为 25 °C) O_2 , O_2 是激发态尤其是激发三重态的高效猝灭剂, 并由此生成活泼的单重态氧, 另外, O_2 与水合电子 (e_{aq}^-) 有很高的反应速率 ($k = 1.9 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [12]).



在波长大于 290 nm 的光辐照下, 色氨酸及二肽没有明显的光化学事件发生. 实验表明, N_2 饱和的 Ttp 水溶液 (pH 7.0) 在 Pyrex 反应管中辐照 2 h, 其 UV 光谱没有发生变化, 而 Ttp-Phe 仅有很小的变化.

图 5 是 Ttp + DMID 溶液体系三种气氛下的二聚体裂解程度随时间的变化. 图中反映出, N_2 饱和体系的二聚体裂解效率最高, N_2O 饱和体系裂解程度介于 N_2 饱和体系和空气饱和体系之间. 这一结果与 Ttp-Phe + DMID 体系 (图 6) 完全一致. 从 N_2 和 N_2O 二种气氛下体系中二聚体的裂解百分率差别, 可以推测 e_{aq}^- 参与了二聚体的裂解:



式中 $\text{DMT-DMT}^{\cdot-}$ 表示 DMID $^{\cdot-}$ 发生 C(5) — C(5') 断裂后, 以 C(6) — C(6') 连接的 DMT 与 $\text{DMT}^{\cdot-}$. e_{aq}^- 与二聚体反应导致

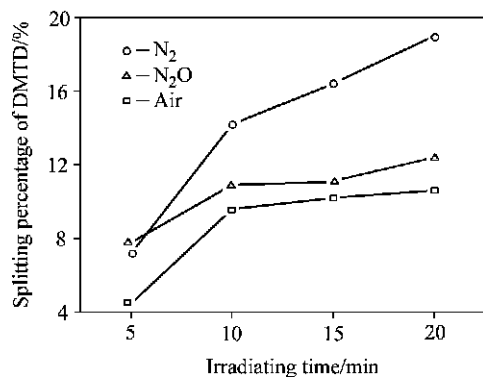


图5 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID 在 $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Tip 存在下的水溶液 (pH 7.0) 中裂解百分数随辐照时间的变化图

Figure 5 Change of splitting percentage of $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID in water (pH 7.0) in the presence of $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Tip with irradiating time

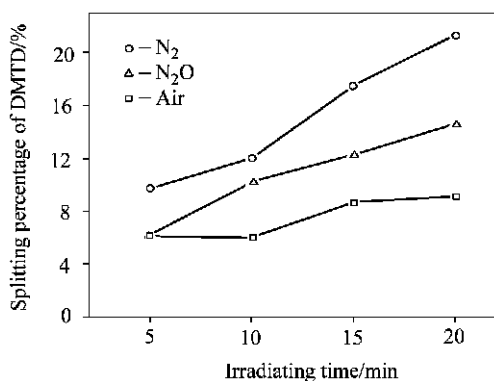
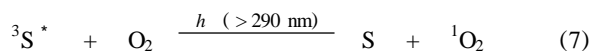
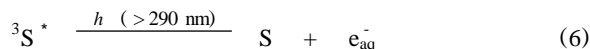
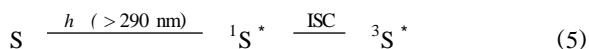


图6 $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID 在 $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Tip-Phe 存在下的水溶液 (pH 7.0) 中裂解百分数随辐照时间的变化图

Figure 6 Change of splitting percentage of $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DMID in water (pH 7.0) in the presence of $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Tip-Phe with irradiating time

二聚体裂解是非常快的过程,速率常数为扩散控制(约 $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[13].

因为波长大于 290 nm 的一个光子能量 (4.3 eV) 不足以使 Tip ($E_{\text{ion}} = 4.5 \text{ eV}$ ^[14]) 及其肽光电离(即单光子电离),那么,只可能通过双光子电离.由 Tip 的荧光寿命(2.5 ns)看,通过单重激发态途径的双光子电离可能性不大.并且,从空气饱和体系的结果分析,如果是单重态途径的双光子电离,荧光猝灭结果表明 O_2 对 $^1\text{Tip}^*$ 猝灭作用很小,而光电离生成的 e_{aq}^- 将与 DMID, O_2 竞争反应,结果必然要比 N_2O 气氛的裂解程度高出较多,但实验结果相反.因此, e_{aq}^- 应是三重态的二步双光子电离产生的.在 $^3\text{Tip}^*$ 生成之后, O_2 可有效地将其猝灭.空气饱和体系的二聚体裂解途径只剩下 Tip 及其肽(用 S 表示)单重态敏化裂解途径了.



N_2O 饱和体系裂解程度介于 N_2 饱和、空气饱和体系之间,说明有 Tip 的三重态参与了反应.

在较低强度的汞灯辐照下进行同样实验发现,三种气氛体系二聚体裂解情况非常接近,也证实了光电离是通过双光子途径进行的,即低光强下,双光子过程不易发生.此时对 DMUD 起裂解作用的仅有 Tip, Tip-Phe 的激发单重态,而三种气氛中仅空气中所含 O_2 对激发单重态有很小的影响.

根据 Rehm-Weller 方程可计算 Tip 和 Tip-Phe 的激发单重态、三重态与 DMID 间电子转移的自由能变化 (G_{S} , G_{T}). DMID 的还原电位 (E_{red}) 为 -2.2 V (vs. SCE)^[15], Tip 激发单重态、三重态的最低能量^[9] 分别为 399, 298 kJ mol^{-1} ,代入(8)式,计算结果列于表 1.

$$G = 96.5 (E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) - E_{0,0} \quad (8)$$

结果表明,Tip 和 Tip-Phe 激发单重态 ($^1\text{Tip}^*$) 和激发三重态 ($^3\text{Tip}^*$) 均可与 DMID 自发地发生电子转移反应.由此可以推测,在 Tip 和 Tip-Phe 的光敏化裂解体系中,可能存在 $^3\text{Tip}^*$ 与 DMID 间的电子转移反应,进而敏化裂解 DMID.因此,在 N_2O 饱和体系,其裂解百分率介于 N_2 饱和、空气饱和(空气饱和体系 O_2 可猝灭 $^3\text{Tip}^*$) 之间.

由于还原电位的不同,Tip 和 Tip-Phe 对另一嘧啶二聚体模型化合物 1,3-二甲基尿嘧啶二聚体 (DMUD),其还原电位 (E_{red}) 为 -2.3 V (vs. SCE) 的敏化裂解就没有三重态裂解这种途径了.此时 N_2 饱和体系裂解程度比在 N_2O 饱和和空气饱和体系高出许多,而 N_2O 饱和和空气饱和体系裂解程度相近.

3 结论

从上述结果与讨论中,可以归纳出色氨酸及其肽对 *cis-syn* 型 1,3-二甲基胸腺嘧啶二聚体光敏化裂解途径(图 7):

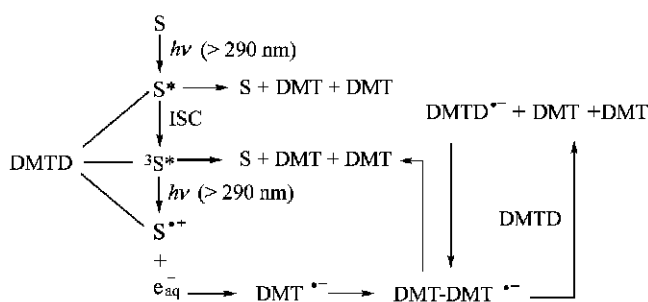


图7 Tip 和 Tip-Phe 光敏裂解 DMID 的反应途径

Figure 7 Reaction pathway of photosensitized splitting of DMID by Tip and Tip-Phe

在较强光辐射下,(1) 主要是通过 T₁p 及其残基的三重态途径的二步双光子电离产生水合电子导致 DMUD 裂解。(2) 其次,激发单重态与 DMUD 进行电子转移的敏化裂解。在低光强辐照下,仅为这一途径。(3) 还可能通过色氨酸激发三重态与 DMUD 间的电子转移进行敏化裂解。色氨酸残基激发三重态敏化二聚体裂解这一可能途径为首次提出。

DNA 光解酶的酶蛋白中,对于二聚体结合点处的 T₁p 残基(T₁p-277)^[4],由于电子授/受体十分接近,因此,在 UV 光作用下,色氨酸残基激发单重态将是二聚体裂解的主要途径。DNA 光复活作用是嘧啶二聚体损伤的一种修复形式,广泛存在于生物界。人类是另一种形式的修复作用,通过切除修复酶将二聚体切除来修复受损 DNA,不需要光的作用。内切核酸酶 V 就是一种 DNA 的切除修复酶,它与二聚体结合点的氨基酸序列为 T₁p-Tyr-Lys-Tyr-Tyr^[17],其中含有 T₁p-Tyr 肽段。可以推测,内切核酸酶 V 在 UV 光下,将具有对含有二聚体的 DNA 进行光修复的功能。

References

- 1 Thoma, F. *EMBO J.* **1999**, 18, 6585.
- 2 Sancar, G. B. *Mutat. Res.* **2000**, 451, 25.
- 3 Sancar, A. *Biochemistry* **1994**, 33, 2.
- 4 Park, H.-W.; Kim, S.-T.; Sancar, A.; Deisenhofer, J. *Science* **1995**, 268, 1866.
- 5 Kim, S.-T.; Li, Y. F.; Sancar, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 900.
- 6 Stubbe, J.; van der Donk, W. A. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 705.
- 7 Aubert, C.; Mathis, P.; Eker, A. P. M.; Brettel, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 5423.
- 8 Aubert, C.; Vos, M. H.; Mathis, P.; Eker, A. P. M.; Brettel, K. *Nature* **2000**, 405, 586.
- 9 Rustandi, R. R.; Fisher, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2537.
- 10 Kloepper, R.; Morrison, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 225.
- 11 Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, **1993**.
- 12 Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, 17, 513.
- 13 Pezeshk, A.; Podmore, I. D.; Heelis, P. F.; Symons, M. C. R. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19714.
- 14 Amouyl, E.; Bernas, A.; Grand, D. *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 1071.
- 15 Scannell, M. S.; Prakash, G.; Falvey, D. E. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 4332.
- 16 Sheng, Z. Y.; Song, Q. H.; Gao, F.; Zhou, X. G.; Li, J.; Dai, J. H.; Sun, H. H.; Li, Q. X.; Wa, S. Q.; Ma, X. X. *Res. Chem. Intermed.* **2000**, 26, 715.
- 17 Valerie, K.; Henderson, E. E.; deRiel, J. K. *Nucleic. Acids Res.* **1984**, 12, 8085.

(A0212106 LI, L. T.)