

文章编号: 0253-9950(2001)04-0198-05

低能离子注入法在水溶液中合成 胞苷酸和脱氧胞苷酸

石怀彬, 邵春林, 王相勤, 余增亮

(中国科学院 等离子体物理研究所 离子束生物工程中心, 安徽 合肥 230031)

摘要: 利用 N_2 常压弧光放电产生低能 N^+ , 在放电间隙电场加速后进入水溶液并诱发其中的化学反应, 克服了离子注入装置要求真空注入室的缺点, 使研究低能离子与水溶液或含水生物样品间的相互作用成为可能。利用低能离子与水溶液的作用模拟原始地球条件研究核苷酸的前生物合成, 以低能 N^+ 注入含 *D*-2-脱氧核糖、*D*-核糖、磷酸二氢铵的胞嘧啶水溶液, 用高效液相色谱、核磁共振对反应产物进行分析, 证明有 5-核苷酸生成, 并给出了不同反应时间内 5-核苷酸的产额。

关键词: 低能离子; 胞苷酸; 前生物合成; 高效液相色谱 (HPLC); 核磁共振

中图分类号: O644.22 **文献标识码:** A

生命起源作为当代自然科学的三大难题之一, 多年来吸引了无数的科学家。1871 年达尔文首次提出生命起源与化学进化的设想, 认为地球上生命的起源经历了由原子、简单分子、复杂分子直至产生生命的历程。为验证此设想, 人们以不同的化学反应模拟原始地球条件, 试图合成生命的基础分子。该过程又称生命小分子的前生物合成 (Prebiotic synthesis)。1953 年, 美国芝加哥大学的米勒 (S. L. Miller)^[1] 首次在实验室模拟原始地球条件下合成了氨基酸, 这标志着生命起源的研究进入了一个新阶段。由于核酸是生物体内重要的遗传物质, 在遗传信息的储存及生物体的遗传变异等方面均有重要作用。因此, 原始地球条件下核苷酸的化学合成对生命起源与进化尤为重要, 以往的研究结果表明核苷及核苷酸的前生物合成十分困难, 至今仍是前生物合成中的主要问题^[2~4]。生命为何从大量复杂的混合物中选择了核糖、DNA 碱基及磷, 在原始地球条件下如何产生核苷酸继而形成长链的有功能的 DNA, 这些问题一直困扰着人们。1986 年, YU ZL^[5,6] 等首次将低能重离子注入 (Low energy heavy ion implantation) 技术应用于生命科学, 但由于受离子注入装置等客观条件的限制, 一直未能开展低能离子与溶液体系相互作用的研究。为此, 本文利用一种可使低能离子与溶液体系相互作用的装置^[7],

收稿日期: 2001-05-28; 修订日期: 2001-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29772033)

作者简介: 石怀彬 (1971 -), 男, 安徽固镇县人, 博士, 有机化学专业

对低能离子诱发核苷酸的前生物合成作初步研究。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂 胞嘧啶,5-磷酸胞苷(5-CMP),5-磷酸脱氧胞苷(5-dCMP),D-核糖及D-2-脱氧核糖均为AMRESCO公司产品,优级纯;磷酸二氢铵,上海试剂二厂,分析纯。

1.1.2 仪器 600型高效液相色谱仪,美国WATER公司产品;DMX500NMR核磁共振谱仪,BRUKER公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 反应液配制 称取0.077 0 g胞嘧啶(0.69 mmol),0.104 0 g D-核糖(0.69 mmol),0.077 0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.69 mmol),依次溶于10 mL重蒸水中。另配一份反应液,其组成为0.077 0 g胞嘧啶(0.69 mmol),0.093 0 g D-2-脱氧核糖(0.69 mmol),0.077 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.69 mmol)溶于10 mL重蒸水中。分别配制一定浓度的5-磷酸胞苷(5-CMP)和5-磷酸脱氧胞苷(5-dCMP)水溶液作标样,用于HPLC分析。

1.2.2 低能离子诱发反应 实验装置见文献[7]。向反应液中通入高纯氮(>99.99%)5~10 min,接通电源,调节输入电压为2 kV,此时电流应为1.5~2 mA,以冷凝水保持反应温度为20~25℃,反应过程中连续通入 N_2 并不断搅拌,定时取出少量试样。

1.2.3 高效液相色谱分析 试样用高效液相色谱仪分析。选用C-18柱,流动相为30%甲醇水溶液,流速为1.0 mL/min,柱温30℃,紫外检测波长270 nm。

1.2.4 $^1\text{H-NMR}$ 分析 以 D_2O 为溶剂,在DMX500NMR核磁共振谱仪上分别测量5-CMP,5-dCMP标样及目标产物的 $^1\text{H-NMR}$ 谱。

2 结果和讨论

2.1 高效液相色谱分析

试样的高效液相色谱分析结果示于图1,2。由图1可见,保留时间 $t = 3.2$ min的峰(图1(a))是原料胞嘧啶, N^+ 处理10 h后出现两组新峰(图1(b))。一组 t 值在1~2 min,可能是胞嘧啶的分解产物或其碎片与核糖和磷重新化合的产物;另一新峰在 $t = 2.45$ min处,该峰与5-CMP标样峰(图1(c))的保留时间十分接近,可能为5-CMP。图2中的情况与图1相似。 $t = 3.25$ min的峰(图2(a))是原料胞嘧啶, N^+ 处理10 h后出现 $t = 2.5$ min新峰(图2(b)),该峰保留时间与5-dCMP(图2(c))基本相同,有可能就是5-dCMP。核糖及脱氧核糖5-位的空间位阻较小,因而实验中的主要产物为5-核苷酸,反应中可能有少量2-或3-核苷酸生成,但量很少,其流出峰可能被包埋在其它峰中或淹没在基线噪音中而无法辨认。

2.2 $^1\text{H-NMR}$ 分析

为了确定产物的结构,将图1中2.45 min及图2中2.5 min流出物进行分离,提纯后的分离物进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析,结果示于图3,4。图中右边分别为5-CMP,5-dCMP的结构式,各峰对应的氢及其积分面积(氢原子数)已在图中标明。通过对两图的分析及与标样谱图的比较,可以看出,文中产物就是5-CMP及5-dCMP^[8]。

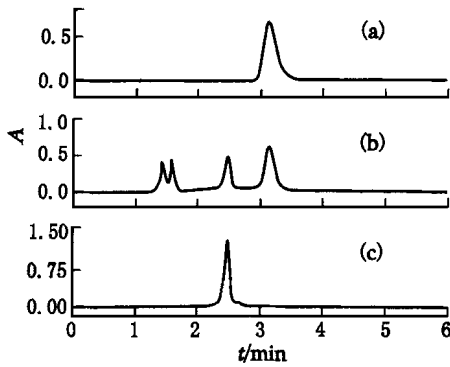


图 1 N^+ 处理胞苷酸
组分水溶液 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of CMP components
solution implanted by N^+

(a) —— 未经处理的水溶液 (solution without
implantation), (b) —— 经 N^+ 处理 10 h 的水
溶液 (solution implanted by N^+ for 10 h),
(c) —— 5-CMP

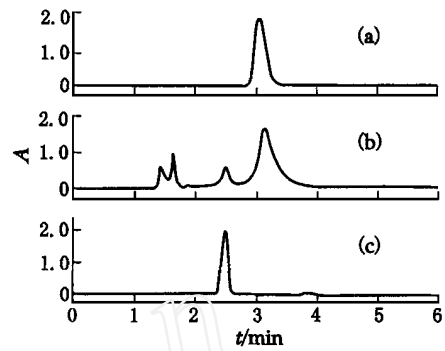


图 2 N^+ 处理脱氧
胞苷酸组分水溶液 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of dCMP
components solution implanted by N^+

(a) —— 未经处理的水溶液 (solution without
implantation), (b) —— 经 N^+ 处理 10 h 的水
溶液 (solution implanted by N^+ for 10 h),
(c) —— 5-dCMP

实验中测得适当浓度 5-CMP 和 5-dCMP 标样的吸光度值, 利用朗伯-比耳定律计算出不同反应阶段中 5-CMP 和 5-dCMP 的产量, 从而计算出相应的产额。反应中的 5-CMP 和 5-dCMP 产额示于图 5。由图 5 可以看出, 5-CMP 和 5-dCMP 的产额随反应时间的延长而逐渐增加, 10 h 后产额都达 4% 左右。由于胞嘧啶室温下在水中的溶解度很小, 可以想象, 上述

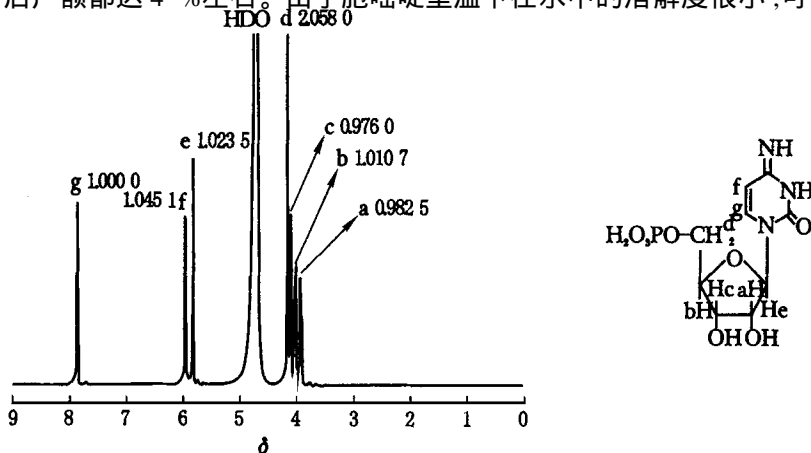


图 3 胞苷酸组分水溶液经 N^+ 处理 10 h 后
分离物的 1H -NMR 谱图及 5-CMP 结构式

Fig. 3 1H -NMR spectra of the compound detached from CMP components
solution implanted by N^+ for 10 h and structural formula of 5-CMP

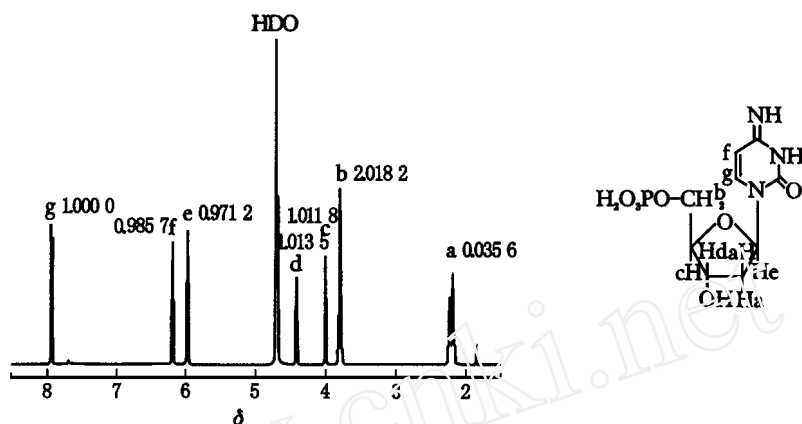


图 4 脱氧胞苷酸组分水溶液经 N^+ 处理 10 h 后分离物的 1H -NMR 谱图及 5-dCMP 结构式

Fig. 4 1H -NMR spectra of the compound detached from dCMP components solution implanted by N^+ for 10 h and structural formula of 5-dCMP

水溶液中的反应主要是低能离子与溶液体系的相互作用,在这样的稀溶液中反应 10 h 有 4 % 的产额,这对于生命起源之初原始海洋中核苷酸的形成与积累具有重要意义。

3 结 论

原始地球上核苷酸的产生是生命起源于进化中的重要一步,核苷酸的前生物合成也是生物小分子前生物合成中最为困难的一步^[9]。以往的研究表明,除非使用多聚磷酸盐或脱水缩合剂及高岭土等作为催化剂,否则在简单条件下很难产生核苷酸^[10]。而在本实验中模拟原始地球条件下低能离子与水溶液的作用,在无任何催化剂的条件下证明有核苷酸生成。这说明,本实验与米勒的放电实验有本质区别。在米勒实验中水

是以蒸汽的形式参与反应,在本实验中,则是通过放电产生低能离子,注入水溶液中诱发其中的反应。现代科学认为,生命诞生于海洋,水的存在对生命的起源与进化是十分必要的。原始大气中低能离子诱发水溶液中的化学反应是普遍存在的,这对生命的起源与进化可能产生过重要的影响。

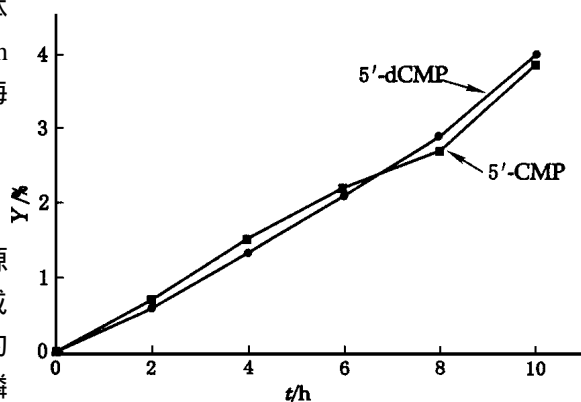


图 5 5-CMP 与 5-dCMP 的产额-时间曲线

Fig. 5 Effect of time on the Yields of 5-CMP and 5-dCMP

参考文献:

- [1] MILLER S L. A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions [J]. *Science*, 1953, 117:528 ~ 529.
- [2] FERRIS J P, HAGAN W J. HCN and Chemical Evolution: The Production of Cyano Compounds in Prebiotic Synthesis [J]. *Tetrahedron*, 1984, 40:1 093 ~ 1 120.
- [3] PONNAMPERAMA C. Chemical Evolution and the Origin of Life[J]. *Nature*, 1964, 201:337 ~ 340.
- [4] ORO J. Synthesis of Organic Compounds by High Energy Electrons [J]. *Nature*, 1963, 197:971 ~ 974.
- [5] YU Z L, Wu Y J, Deng J G,. Mutation Breeding by Ion Implantation [J]. *Nucl Instr Meth Phys Res*, 1991, B59/ 60:705 ~ 708.
- [6] YU Z L. Ion Beam Application in Genetic Modification [J]. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 2000, 28(1):128 ~ 132.
- [7] 石怀彬,邵春林,王相勤,等.低能离子与脱氧腺苷酸组分水溶液作用合成脱氧腺苷酸[J].核化学与放射化学,2001,23(3):141 ~ 144.
- [8] 阎长泰.有机分析基础[M].北京:高等教育出版社,1991,121 ~ 1 152.
- [9] 米勒 SL,奥吉尔 LE.地球上生命的起源[M].彭弈欣译.北京:科学出版社,1981,107 ~ 144.
- [10] MILLER S L. Production of Some Organic Compounds Under Primitive Earth Conditions[J]. *J Am Chem Soc*, 1955, 77:2 351 ~ 2 361.

SYNTHESIS OF 5 -CMP AND 5 -dCMP IN AQUEOUS SOLUTION INDUCED BY LOW ENERGY IONS IMPLANTATION

SHI Huai-Bin, SHAO Chun-Lin, WANG Xiang-Qin, YU Zeng-Liang

(Centre of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei, 230031, China)

Abstract :Low energy N^+ ions produced by N_2 are accelerated and then introduced into aqueous solution to induce chemical reactions. This process avoids the need of a vacuum chamber and makes it possible to investigate the actions of low energy ions in aqueous solution. In order to explore prebiotic synthesis of nucleotide via reaction between low energy ions and aqueous solution under the primitive earth conditions, low energy N^+ is implanted into aqueous solution containing cytosine, *D*-ribose, *D*-2-deoxyribose and $NH_4H_2PO_4$. It is confirmed that 5 -CMP and 5 -dCMP are produced by HPLC and 1H -NMR analyses. The relation between yields of 5 -CMP and 5 -dCMP and irradiation time has been obtained.

Key words : low energy ions; CMP; prebiotic synthesis; HPLC; 1H -NMR