

# 氚水对 $\lambda$ -dsDNA 结构影响的 拉曼光谱分析和 DFT 模拟

邓 冰, 董 亮, 全 旂, 王和义

中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621999

**摘要:** 用拉曼光谱法和密度泛函理论(DFT)研究了氚水与  $\lambda$  双链脱氧核糖核酸( $\lambda$ -dsDNA)之间的相互作用。拉曼光谱法用于分析不同剂量(50 mGy~8 Gy)HTO(活度浓度  $1 \times 10^9$  Bq/L 和  $1 \times 10^{11}$  Bq/L)和  $\gamma$  射线辐照后  $\lambda$ -dsDNA 的结构变化。在低剂量(100~500 mGy)的  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用下, HTO 主要是通过电离辐射过程中的间接作用, 破坏碱基之间的氢键, 从而导致碱基的错配和碱基结构的修饰, 引起碱基对不配对。而低剂量(50~100 mGy)的  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 对  $\lambda$ -dsDNA 具有类似于  $\gamma$  射线的短期影响, 主要是通过射线的直接电离或质子化引起  $\lambda$ -dsDNA 基本结构的破坏。此外, 高辐射剂量(2~8 Gy)的 HTO 可能导致呋喃糖环的构象转移或通过氚-氢(T-H)交换反应裂解共价键。通过拉曼光谱标记观察到, HTO 的三种作用方式可能最终导致  $\lambda$ -dsDNA 骨架构象和  $\lambda$ -dsDNA 变性的改变。

**关键词:** HTO;  $\lambda$ -dsDNA; 拉曼光谱; DFT

**中图分类号:** R818.74; Q271 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2021)03-0291-10

**doi:** 10.7538/hhx.2021.43.03.0291

## Raman Spectroscopic and DFT Computational Study of Interaction Between Tritiated Water and $\lambda$ -dsDNA

DENG Bing, DONG Liang, QUAN Yi, WANG He-yi

Institute of Nuclear Physics and Chemistry, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621999, China

**Abstract:** The interaction between tritiated water and  $\lambda$  double-stranded deoxyribonucleic acid( $\lambda$ -dsDNA) was investigated using Raman spectroscopy and density functional theory (DFT). Raman spectroscopy was applied to analyse structural changes in  $\lambda$ -dsDNA after HTO of different radioactivity( $1 \times 10^9$  Bq/L and  $1 \times 10^{11}$  Bq/L) and  $\gamma$ -irradiation(50 mGy to 8 Gy). At a low dose(100-500 mGy) of  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO is mainly indirect effect of ionizing radiation during irradiation, destroying hydrogen bonds between bases caused base mismatches and modification in base structure, resulting in better unpairing of base pairs. However,  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO on  $\lambda$ -dsDNA in low dose(50-100 mGy) for a short period of time is similar to  $\gamma$ -ray, mainly caused by direct ionization or protonation of the ray, which leads to the destruction of the base structure. In addition, high radiation dose(2-8 Gy) of HTO can cause the conformational transfer of the furanose ring or the cleavage of the covalent bond through tritium-hydrogen(T-H) exchange reaction. It is observed by spectral markers that

the three modes of action of HTO may eventually lead to changes in  $\lambda$ -dsDNA backbone conformation and  $\lambda$ -dsDNA denaturation.

**Key words:** HTO;  $\lambda$  double-stranded DNA; Raman spectroscopy; DFT

随着核技术的迅速发展以及核能的广泛应用,特别是以国际热核聚变实验反应堆(ITER)为代表的国内外可控热核聚变研究的大力发展,大量的氚将释放进入环境空间并且以 HTO 的形式进入生态循环<sup>[1]</sup>。此外,福岛核事故所产生的氚废水量逐渐增加<sup>[2]</sup>,日本政府宣布将于 2022 年夏天开始,分批将百万吨含氚废水直接排入大海,这导致氚可能引起的生物效应成为公众最关心的问题<sup>[3-6]</sup>。虽然受氚污染的水排放到环境中引起的生物效应可能相当小,但是由于天然水占生物物质的 70%~90%,水分子是组成所有生物大分子整体的一部分也是细胞结构的组成部分,因此 HTO 一旦进入体内就会自由和迅速地整个生物体中扩散,宏观层面上氚在全身的水池中保持平衡;更重要的是氚可以进入细胞内被结合到有机分子中,氚  $\beta$  射线的短距离低能作用导致  $^3\text{H}$  能量的吸收会即刻发生在  $^3\text{H}$  核的附近,从而导致局部能量沉积,因此,微观层面上氚在体内各种有机化合物中的分布和作用不均匀<sup>[7-8]</sup>,氚原子的微小位置很可能是决定其生化后果的关键所在。而对于大多数细胞效应的敏感靶点是细胞 DNA,已有研究充分证明了 DNA 损伤会导致细胞死亡、突变甚至癌症的发生<sup>[9-11]</sup>。

由于  $^3\text{H}$  的  $\beta$  发射的平均能量和最大能量分别为 5.69 keV 和 18.6 keV,在水(或软组织)中的平均范围约为 0.5  $\mu\text{m}$ (500 nm),远远小于细胞的典型直径(10~30  $\mu\text{m}$ ),甚至小于细胞核的直径(5~10  $\mu\text{m}$ )。因此,评估氚在亚细胞水平造成的损伤是研究氚内照射效应的一个主要问题。由于氚发射的  $\beta$  粒子具有极低能量的电子但其线性能量转移(LET)值高于由高能光子(例如外部  $\gamma$  射线)相互作用产生的电子(约 400 个离子对/ $\mu\text{m}$ ),这一较高的 LET 可能会导致更大的致癌效果<sup>[12]</sup>。因此,氚  $\beta$  辐射与 DNA 的相互作用是目前关于氚内照射生物效应的研究重点,已有的研究主要集中在 DNA 碱基损伤、碱基丢失、双螺旋断裂和双链断裂<sup>[13]</sup>等方面。拉曼光谱为研究核酸的结构表征提供了一定的优势。天然 DNA 在拉曼光谱中的带归属在文献<sup>[14-16]</sup>中得到了很

好的描述。在最近的应用中已经发现,特定拉曼标记带的变化能够提供有关 DNA 结构变化的详细信息<sup>[17-18]</sup>。该方法已经用于区分二价阳离子与 DNA 的特异性和非特异性结合<sup>[19]</sup>,监测 DNA 和 DNA/金属-离子配合物的热变性<sup>[20]</sup>,以及测量基因组 DNA 在缩合态和非凝聚态中质子/氘交换的动力学研究<sup>[21-24]</sup>。

本工作利用拉曼光谱和密度泛函理论(DFT)模拟研究不同活度浓度  $1\times 10^{11}$  Bq/L 和  $1\times 10^9$  Bq/L HTO 作用下,不同剂量(50 mGy~8.0 Gy)作用后,天然  $\lambda$  双链脱氧核糖核酸( $\lambda$ -dsDNA)结构细节的变化。试图阐释 HTO- $\lambda$ -dsDNA 相互作用的分子机制。比较不同剂量率的 HTO 引起的  $\lambda$ -dsDNA 损伤的差异,以助了解 HTO 生物效应的机制,为低剂量或低剂量率的 HTO 辐射后的随机性效应评估提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

$\lambda$ -dsDNA,美国 Sigma-Aldrich。在 0.2 mol/L NaCl 中制备  $\lambda$ -dsDNA 水溶液(约 20 g/L)用于 HTO 和  $\gamma$  射线辐照实验。将含有 4 mg  $\lambda$ -dsDNA 的 0.2 mL 等体积试样与 HTO(中国工程物理研究院核物理与化学研究所,放射化学纯度 98%)混合。辐照后,将溶液在液氮中振荡冷冻,然后在保温瓶中运输。通过将样品冻干,来解决拉曼光谱测量中小体积和浓缩的  $\lambda$ -dsDNA 溶液成分复杂性的问题。未经 HTO 或  $\gamma$  射线照射的标准样品经过上述相同处理程序制备。

### 1.2 辐照程序

**1.2.1 HTO 辐照** 通过不同活度浓度( $1\times 10^9$  Bq/L 和  $1\times 10^{11}$  Bq/L)HTO 分别照射  $\lambda$ -dsDNA 溶液不同剂量(50 mGy~8 Gy),持续时间为 18.24 min~2 432 h。辐照后的样品首先在 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存 24 h,在冻干前保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下。

**1.2.2  $\gamma$  射线辐照**  $\lambda$ -dsDNA 溶液用中国工程物理研究院核物理与化学研究所的  $^{60}\text{Co}$  源辐照。 $^{60}\text{Co}$  源(最大活度 3.7 TBq)发出的光子能量为 1.25 MeV。 $\gamma$  射线的传送剂量由校准的监视器控制,其辐照剂量为 50 mGy、100 mGy 和 500 mGy,

持续时间为 1~10 min。

### 1.3 拉曼光谱

使用配备了 20 倍物镜的 Leica Research 显微镜的拉曼光谱系统(Renishaw 公司)进行拉曼光谱测量。一个 He/Ne 激光系统,其激发线为 532 nm,在样品空间处的激发能量约为 25 mW。每个样品在室温(21~23 °C)下测量 6 个光谱累积然后取平均值。为了避免测量期间波数标度所有可能的漂移,在样品光谱的累积测量后 1 s 收集校准光谱。拉曼数据的分析使用 Origin 8.0 软件(美国 Microcal Origin),从不同剂量下测得的光谱减去冻干的非辐照  $\lambda$ -dsDNA 光谱,获得拉曼差异光谱。在减去之前,将所有光谱按比例缩放以在  $\lambda$ -dsDNA 主干  $\text{PO}_2$  对称拉伸振动的  $1\,095\text{ cm}^{-1}$  波段具有相等的强度。当谱带差异反映出其父代谱带强度变化至少 5% 时,被认为是有效的。

### 1.4 模拟计算

所有计算均使用高斯 09 程序<sup>[24]</sup>在 DFT 级别上进行。先前的研究表明,混合元交换关联 M06-2X 功能<sup>[25-27]</sup>在相互作用较弱的系统中表现良好。因此,使用 M06-2X 方法和 6-311++G(d,p) 基组<sup>[28-31]</sup>进行了几何优化,用以定位静止点和过渡状态(TS)。零点振动能量(ZPVE)校正也应用气相中的相对能量。计算表明,B3LYP 方法可以提供高度精确的能量,并且 M06-2X/6-311++G(d,p) 水平将适合于研究系统。所有优化结构的振动频率均在同一水平上获得,并且该种类的振动频率表征为最小值(无虚数频率)或过渡态(唯一虚数频率)。

## 2 结果与讨论

图 1 显示了  $\lambda$ -dsDNA 在不同活度 HTO 作用前后的拉曼光谱图,拉曼波段的归属概述列于表 1。

由于碱基和磷酸盐基团上的电子比位于其他  $\lambda$ -dsDNA 基团(脱氧核糖,主链)中的电子具有更高的极化率<sup>[32]</sup>,因此大部分  $\lambda$ -dsDNA 拉曼带均代表碱基和磷酸盐振动。文中所提到的  $\lambda$ -dsDNA 谱带的归属来源于不同作者的报道<sup>[15-17,33-38]</sup>,光谱带覆盖范围  $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 。出现的拉曼标记与磷酸二酯键、脱氧核糖基和核碱基有关,其中嘌呤(dA,dG)和嘧啶(dC,dT)的碱基拉曼谱线在  $\lambda$ -dsDNA 光谱中占主导地位,以下几个光谱区域代表核碱基的不同振动模式:C=O 拉伸振动( $1\,600\sim 1\,750\text{ cm}^{-1}$ )、环平面振动( $1\,000\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$ )和环呼吸振动( $600\sim 800\text{ cm}^{-1}$ ); $800\sim 1\,200\text{ cm}^{-1}$  区域含有较强的磷酸盐振动带,主要为磷酸二酯键、 $\text{PO}_2^-$  和磷酸、O-P-O 的对称拉伸模式;出现在  $800\sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$  之间的一些弱拉曼带也可以部分归属于脱氧核糖振动。

如图 1 所示,相较于  $1\times 10^{11}\text{ Bq/L}$  HTO 辐射作用,核碱基的特征拉曼条带在  $1\times 10^9\text{ Bq/L}$  HTO 作用 100~500 mGy 后发生更明显的变化。在  $1\times 10^9\text{ Bq/L}$  HTO 辐照 100 mGy 后可以看到,一些碱基和脱氧核糖的特征峰强度增加: $1\,463\text{ cm}^{-1}$ (脱氧核糖)、 $1\,303\text{ cm}^{-1}$ (dC,dA)、 $1\,185\text{ cm}^{-1}$ (dG,dA,dC)、 $1\,047\text{ cm}^{-1}$ (脱氧核糖)、 $914\text{ cm}^{-1}$ (脱氧核糖)和  $756\text{ cm}^{-1}$ (dT,C2'-endo/anti)<sup>[39-41]</sup>,这些标记带的强度增加可归因于  $\lambda$ -dsDNA

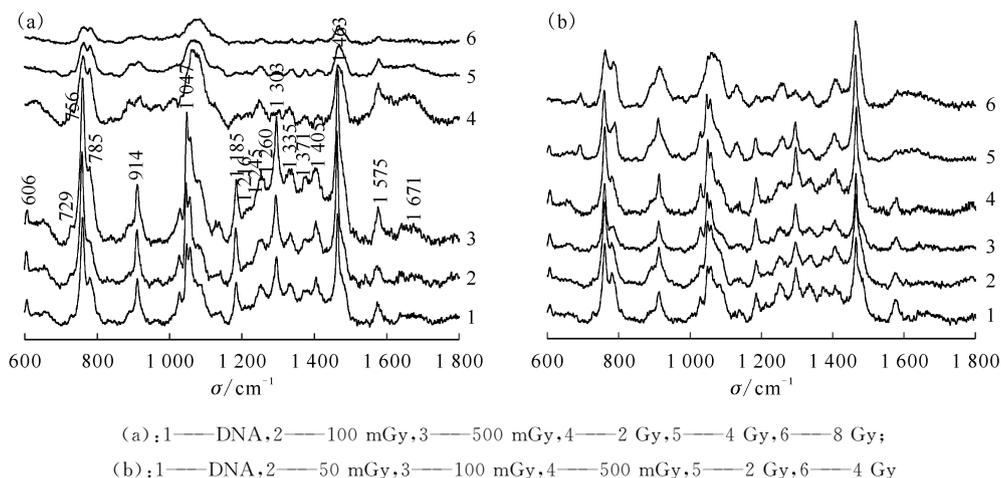


图 1  $1\times 10^9\text{ Bq/L}$ (a)和  $1\times 10^{11}\text{ Bq/L}$ (b) HTO 作用不同剂量下  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图

Fig. 1 Raman spectra of  $\lambda$ -dsDNA after  $1\times 10^9\text{ Bq/L}$ (a) and  $1\times 10^{11}\text{ Bq/L}$ (b) HTO irradiated at different doses

表1  $\lambda$ -dsDNA 在 HTO 和  $\gamma$  射线作用后相关波段的归属Table 1 Wavenumber and assignments of relevant Raman bands of  $\lambda$ -dsDNA after HTO and  $\gamma$ -rays irradiation  $\text{cm}^{-1}$ 

$\lambda$ -dsDNA	HTO		$\gamma$ 射线	拉曼波段归属
	$1 \times 10^9$ Bq/L	$1 \times 10^{11}$ Bq/L		
681	681	689		鸟嘌呤-环呼吸振动
724	729		729	腺嘌呤-环呼吸振动
751	756	759	759	胸腺嘧啶-环呼吸振动
781	785	789	785	磷酸二酯键,胞嘧啶
913	914	913	914	脱氧核糖-(CCO) 振动
1 026	1 029	1 029	1 030	鸟嘌呤, 胞嘧啶, 胸腺嘧啶-脱氧核糖
1 042	1 047	1 048	1 047	脱氧核糖
1 056	1 056	1 056	1 056	脱氧核糖-(CO)振动
1 070~1 090	1 070~1 090	1 070~1 090	1 070~90	DNA 中 $\text{PO}_2$ 对称拉伸振动
1 100	1 100	1 100	1 100	氧化磷酸根( $\text{PO}_2^-$ )基团
1 185	1 185	1 185	1 185	鸟嘌呤, 胞嘧啶, 腺嘌呤
1 259	1 260	1 258	1 258	鸟嘌呤, 胞嘧啶- $\text{NH}_2$
1 303	1 303	1 298	1 296	胞嘧啶, 腺嘌呤-环振动
1 336	1 335	1 333	1 333	鸟嘌呤, 腺嘌呤
1 371	1 371	1 373	1 374	胞嘧啶, 腺嘌呤, 胸腺嘧啶- $\text{CH}_3$
1 463	1 463	1 465	1 465	2'- $\text{CH}_2$ 和 5'- $\text{CH}_2$ 的费米作用
1 485	1 485	1 487	1 485	鸟嘌呤, 腺嘌呤-环呼吸振动
1 575	1 575	1 575	1 575	鸟嘌呤, 腺嘌呤-环呼吸振动
1 651	1 651	1 651	1 651	胸腺嘧啶-( $\text{C}2=\text{O}$ )
1 670	1 671	1 672	1 672	胸腺嘧啶-( $\text{C}4=\text{O}$ )
1 684	1 684			胞嘧啶-( $\text{C}2=\text{O}$ )
1 712	1 712			鸟嘌呤-( $\text{C}6=\text{O}$ )

通过特殊碱基对非堆积和相应核苷中脱氧核糖构象的转变而部分变性<sup>[39,42]</sup>。特征峰  $1\ 056\ \text{cm}^{-1}$  表示两个主要的核酸含量比例的变化,其强度的增加也证明  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用 100 mGy 会导致碱基对非堆积作用。此外,  $1\ 150 \sim 1\ 720\ \text{cm}^{-1}$  波段的拉曼峰归属于碱基的电子结构和碱基配对,其中  $1\ 200 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  波段区域被划分为嘌呤和嘧啶的环振动,是环电子结构的敏感指标<sup>[43-48]</sup>。相较于  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 辐照 100 mGy,辐照 500 mGy 后还会引起碱基归属峰  $1\ 575\ \text{cm}^{-1}$  (dA, dG)、 $1\ 371\ \text{cm}^{-1}$  (dT, dA, dC)、 $1\ 335\ \text{cm}^{-1}$  (dA, dG)、 $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$  (dG, dC( $\text{NH}_2$ ))强度的显著增加,提示碱基对非堆积作用进一步加强。除此之外,  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 辐照 500 mGy 后引起

$750 \sim 800\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 050 \sim 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$  区域的拉曼标记带强度的增加,两个标记带与  $\text{C}5'-\text{O}5'-\text{P}(\text{O}2-)-\text{O}3'-\text{C}3'$  链中的磷酸酯转角有关,强度的增加可能是  $\lambda$ -dsDNA 螺旋构象的部分改变引起的<sup>[44-49]</sup>。提示,随着  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 作用剂量的增加,碱基对非堆积作用增强并引起  $\lambda$ -dsDNA 构象的变化。

通过  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 长时间作用导致碱基对的非堆积作用以及  $\lambda$ -dsDNA 构象的改变,推测低剂量 HTO 主要破坏的是碱基间的氢键。图 2 为除本底(0 Gy)后  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 和  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 作用不同剂量后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图。从图 2 可以看到  $1\ 600 \sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$  区域谱图的变化特征,该区域谱图具

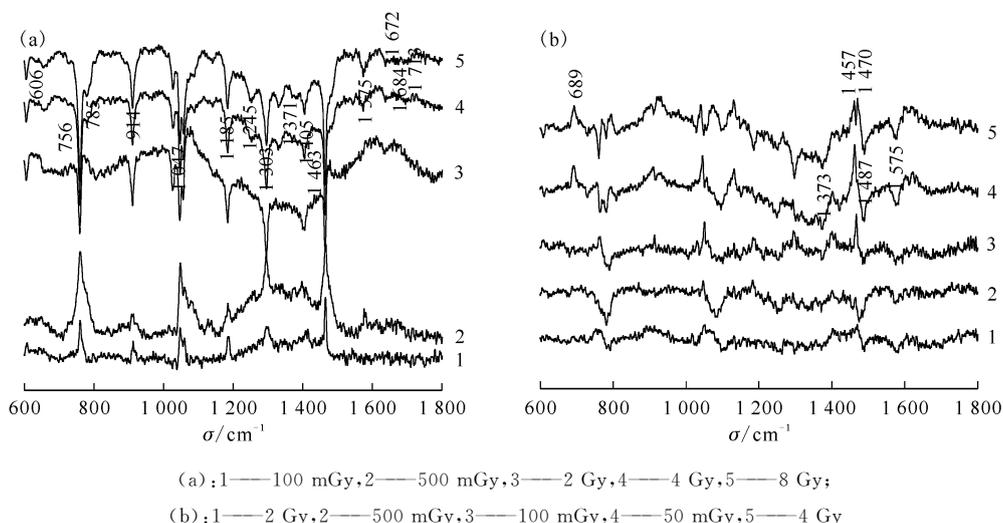


图2 除本底(0 Gy)后的  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO(a)和  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO(b)作用不同剂量后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图  
 Fig. 2 Raman difference spectra obtained by subtraction of the 0 Gy  $\lambda$ -dsDNA spectrum from the spectra measured after  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO(a) and  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO(b) at different doses

有高度重叠的宽拉曼特征峰;根据模型化合物的测量,这些峰均有直接的归属,它们归属于dT(C2=O和C4=O)、dC(C2=O)和dG(C6=O)的羰基伸缩振动与相应的N-H形变模式耦合;除dT(C2=O)原子外<sup>[17-18]</sup>,所有这些均参与Watson-Crick配对的氢键网络,这些谱带对AT、GC对碱基和氢键的改变非常敏感<sup>[50-51]</sup>。从图2可知,  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 500 mGy的辐照作用下,  $\lambda$ -dsDNA中重叠峰的强度增高,经2 Gy的辐照后  $\lambda$ -dsDNA的重叠带的强度显著上升,这些变化可能反映了碱基不配对以及碱基结构的变化,碱基对较好的解叠导致  $\lambda$ -dsDNA<sup>[21]</sup>的部分变性。此外,相比于  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO,  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO在高剂量(2~8 Gy)的辐照作用使核碱基的拉曼特征峰发生了更显著的变化。结构敏感的dG( $681 \text{ cm}^{-1}$ 和  $1\ 185 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[40-42]</sup>、dA( $729$ 、 $1\ 303 \text{ cm}^{-1}$ 和  $1\ 335 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[40,52]</sup>、dC( $785 \text{ cm}^{-1}$ 和  $1\ 260 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[40-42]</sup>和dT( $756$ 、 $1\ 216 \text{ cm}^{-1}$ 和  $1\ 671 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[40-52]</sup>的特征峰显著减弱,它们是作为核苷酸C2'-endo/anti构象的标记物<sup>[40,42,53]</sup>,表明核苷酸的几何形状发生了变化。最高辐射剂量(8 Gy)导致核碱基的拉曼特征峰在整个光谱中显著减少和扩大,表明嘌呤和嘧啶部分降解,提示高剂量辐射作用对这些碱基结构的损坏或改变最终导致  $\lambda$ -dsDNA的断裂。

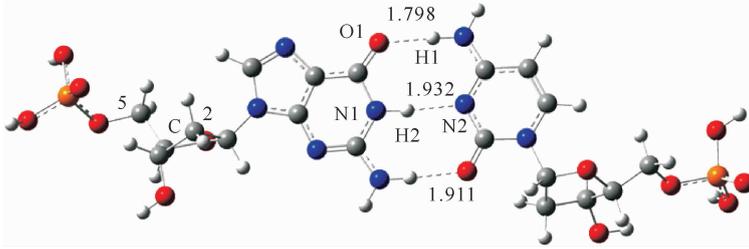
为了进一步研究高剂量HTO和低剂量HTO对碱基结构的破坏作用,从理论上开展了HTO对碱基作用方式的研究。优化的配合物几

何结构(图3)显示鸟嘌呤核苷和胞嘧啶核苷之间有很强的氢相互作用,相应的O...H和N...H的距离在  $2 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$ )之内,这表明该碱基对通过强氢键是稳定的。当HTO作用于碱基对时,可能会对复杂结构造成两种不同的反应:一个是鸟嘌呤核苷和胞嘧啶核苷之间的氢键裂解,另一个是H-T同位素交换,其发生在五元环的C2位或CH<sub>2</sub>的C5位。通过DFT方法详细研究了两种不同类型的反应。计算表明,有两个反应路径可导致氢键的断裂。在C=O不饱和键上添加HTO以及从鸟嘌呤核苷部分的N1-H2中除去H均可能破坏氢键,计算所获得的过渡状态(TS)示于图4。如图4(a)所示,将HTO的T原子加到C=O的O1原子上,并将OH加到C原子上,也就是将HTO加到C=O键上导致醇分子的形成,将引起鸟嘌呤核苷和胞嘧啶核苷之间的O1...H1氢键断裂。还考虑了另一种HTO分子以这种方式加成形成六元环TS的可能性,但计算未能找到相应的结构。另一方面,为了除去N1-H2键的H原子,质子转移过程是借助于一个HTO分子通过形成六元环TS而完成的,从而使N2...H2和O1...H1键的氢键断裂。根据计算,加成形成TS<sub>C=O</sub>的相对能量的计算值为  $-9.67 \text{ kJ/mol}$ ,质子传递形成TS的计算值为  $-145.55 \text{ kJ/mol}$ 。结果表明,氢键的断裂容易发生,并且HTO分子通过将H原子加到C=O的O原子上从而促进六元环氢迁移TS的形成所需要的相对能量更低。这些结果与拉曼实验结果一

致,在拉曼实验结果中,低剂量 HTO 对  $\lambda$ -dsDNA 的作用是通过破坏氢键相互作用。

$1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 作用后拉曼特征峰的变化与  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 辐照后的拉曼特征峰有明显的区别。图 5 为不同剂量  $^{60}\text{Co}$

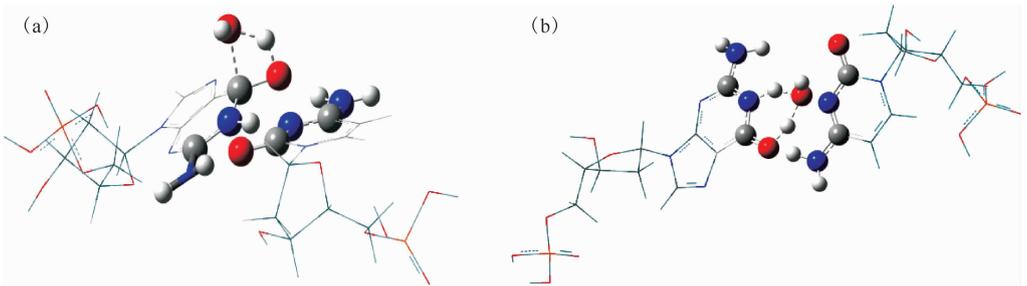
$\gamma$  射线作用后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图及除本底后不同剂量  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线作用后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图。从图 2 和图 5 可以看到,  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 和  $\gamma$  射线低剂量(50~100 mGy)辐照后碱基的特征峰没有发生明显的改变,只是在  $1575\text{ cm}^{-1}$  和



键长单位为  $\text{\AA}$

图 3 核苷复合物的优化结构

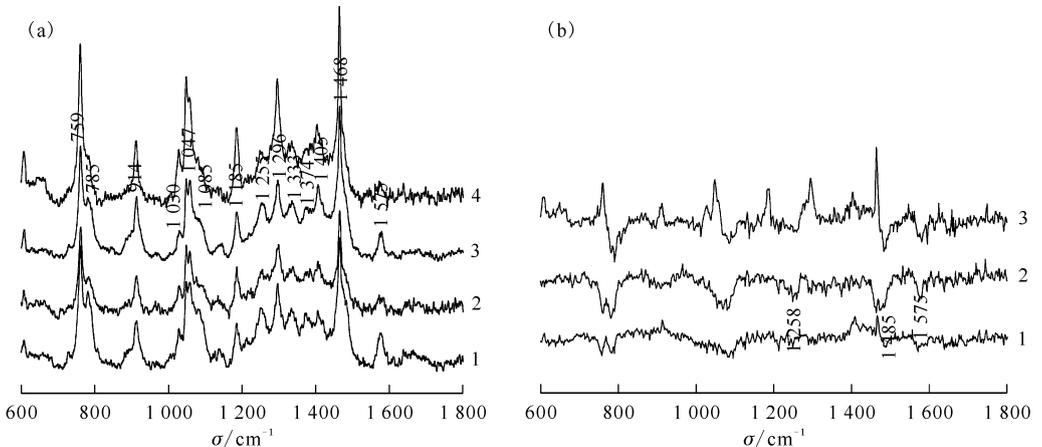
Fig. 3 Optimized structure of nucleoside complex



(a)  $\Delta E = -9.67$  kJ/mol, (b)  $\Delta E = -145.55$  kJ/mol

图 4 计算得到氢键断裂的过渡状态

Fig. 4 Obtained TSs of cleavage of hydrogen bonding



(a): 1—DNA, 2—100 mGy, 3—500 mGy, 4—50 mGy; (b): 1—50 mGy, 2—100 mGy, 3—500 mGy

图 5 不同剂量  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线作用后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图(a)及除本底后不同剂量  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线作用后  $\lambda$ -dsDNA 的拉曼谱图(b)

Fig. 5 Raman spectra of  $\lambda$ -dsDNA after  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays irradiated at different doses(a), and Raman spectra obtained by subtraction of 0 Gy  $\lambda$ -dsDNA spectrum from spectra measured after  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays irradiation at different doses(b)

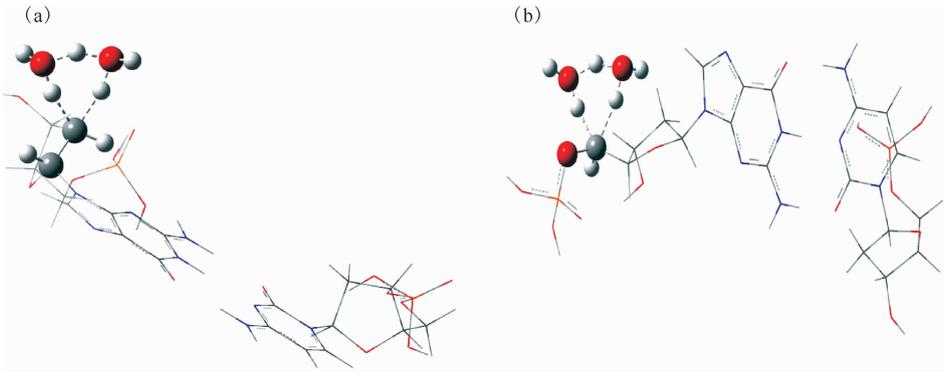
1 485  $\text{cm}^{-1}$  条带处峰强度减弱。1 575  $\text{cm}^{-1}$  主要归属于嘌呤的 C4 = C5 和 C4 = N3<sup>[54]</sup> 的联合拉伸振动, 这个条带的减少可能是由 dA 和 dG 的环改变所致; 在 1 485  $\text{cm}^{-1}$  处峰强度降低可归因于 dA 和 dG 的环修饰, 但主要归因于鸟嘌呤的振动; 相同条件下, 在表征  $\lambda$ -dsDNA 主链状态的拉曼标记区域 750~800  $\text{cm}^{-1}$  和 1 050~1 100  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[16-17, 33-40]</sup> 的特征峰出现强度减弱。提示了高剂量率 HTO 与  $\gamma$  射线作用类似, 在低剂量时主要通过  $\beta$  射线能量沉积等电离作用或质子化作用导致碱基、特别是嘌呤环结构的破坏而引起  $\lambda$ -dsDNA 骨架的断裂。由图 2(b) 和图 5(b) 可知, 随着  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 和  $\gamma$  射线作用剂量的增加, 在 500 mGy 时碱基和脱氧核糖的特征峰强度增加, 出现了  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 作用后相同的谱图特征峰变化, 提示随着 HTO 辐照作用时间增加,  $\beta$  射线辐照产生的次级自由基分子 ( $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{H}$ 、 $e_{\text{aq}}^-$ ) 与  $\lambda$ -dsDNA、特别是碱基对的氢键开始产生过氧反应, 导致碱基对非堆积作用而引起  $\lambda$ -dsDNA 构象的变化。

同样, 从图 2 还可以看到,  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 作用 500 mGy 后 1 371  $\text{cm}^{-1}$  归属于 dT 内环振动的峰强度降低, 而在  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用后一直没有出现此类现象。同样  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 作用于  $\lambda$ -dsDNA 后 1 575  $\text{cm}^{-1}$  处波段强度持续减弱, 而在  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 辐照后, 该条带强度持续增加, 在 4 Gy 辐照后峰强才出现明显减弱; 提示  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 和  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 与  $\lambda$ -dsDNA 作用的区别在于,  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 主要通过  $\beta$  射线的直接电离作用或质子化作用导致碱基结构的破坏而引起  $\lambda$ -dsDNA 主链的断裂, 而  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 主要通过自由基分子的间接作用导致碱基结构、碱基对氢键损伤, 从而出现碱基对非堆积效应引起  $\lambda$ -dsDNA 构象的变化。然而, 在更高剂量 (4 Gy) 的 HTO 作用下, 碱基和  $\lambda$ -dsDNA 主链的特征峰强度随  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用剂量的增加出现更明显的减弱和展宽, 拉曼谱线的减少和展宽表明  $\lambda$ -dsDNA 结构组分的降解和有序构象的丢失。因此, 结果提示低剂量 HTO 的长期作用可通过自由基分子对  $\lambda$ -dsDNA 产生更显著的破坏作用。

此外, 呋喃糖在  $\lambda$ -dsDNA 螺旋链的构成中起着重要的作用, 尽管脱氧核糖在  $\lambda$ -dsDNA 中给出

较弱的拉曼谱线, 这些谱线的特征不像核酸碱基的特征那么明显。但还是可以利用脱氧核糖的振动模式来识别辐射引起的呋喃糖和  $\lambda$ -dsDNA 主链的变化<sup>[34-39, 53-54]</sup>。 $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用 2 Gy 后, 被指定为脱氧核糖振动的 914  $\text{cm}^{-1}$  的条带处分裂成若干弱条带, 在 910~970  $\text{cm}^{-1}$  区域出现了一些新的特征峰, 表明了呋喃糖环结构的变化, 而这一现象可能是 T-H 的同位素交换引起的。同样的现象可以在  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 作用 2 Gy 后看见, 归属于 dG 环形呼吸振动的峰的波数从 681  $\text{cm}^{-1}$  移动到 694  $\text{cm}^{-1}$ , 新波段的出现表示 dG 带发生扰动, 提示 dG 中糖皱褶发生了变化<sup>[34]</sup>, 特征归属 dG 呋喃环平面弯曲的新峰出现, 提示可能是 H-T 的同位素作用的影响。此外, 1 463  $\text{cm}^{-1}$  是脱氧核糖的两个  $\text{CH}_2$  费米相互作用的拉曼标记, 具有辐射敏感性。 $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 作用 2~8 Gy 后, 其强度随辐射剂量增加呈现依赖性消失, 这可能是 C-O 或 C-C 键断裂导致脱氧核糖结构破坏的结果, 该损伤能引起  $\lambda$ -dsDNA 骨架单链断裂<sup>[36]</sup>; 该特征峰在  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 作用后峰强度随剂量增加在 4 Gy 时分裂为新的特征峰 1 457  $\text{cm}^{-1}$  和 1 470  $\text{cm}^{-1}$ , 显示高剂量率的 HTO 辐射可能引起构象转移或共价键的断裂, 从而导致脱氧核糖的干扰。因此, 除了 HTO  $\beta$  射线的直接作用和自由基的间接作用, 高剂量 HTO 还可以通过 T-H 的同位素交换作用导致脱氧核糖结构的变化和  $\lambda$ -dsDNA 骨架的断裂。

对于 T-H 同位素交换反应, 计算表明 HTO 对  $\lambda$ -dsDNA 结构的作用主要发生在五元环的 C2 位置或  $\text{CH}_2$  的 C5 位置, 计算所获得的 T-H 交换 TS 示于图 6。如图 6 所示, 通过包括两个 HTO 分子的六元环氢迁移 TS 可以容易地进行 T-H 交换。先前关于 HTO 对受氘污染的泵油中 T-H 同位素交换过程的影响研究<sup>[55]</sup> 提出, TS 相对能量的显著降低可归因于从 4 变为 6 时成环状 TS 环应力的降低。经计算, T-H 交换过渡态的相对能量在 C2 位为 -28.35 kJ/mol, 在 C5 位为 -20.01 kJ/mol。该结果表明, 当一定剂量的 HTO 作用于  $\lambda$ -dsDNA 结构时, 会发生 T-H 交换, 从而破坏了  $\lambda$ -dsDNA 结构。但是, 获得的该能量远高于如上所述的  $\text{N2} \cdots \text{H2}$  氢键裂解的能量, 这与相对较高剂量的 HTO 会破坏  $\lambda$ -dsDNA 结构的实验观察结果一致。



(a)——C2位,  $\Delta E = -28.35$  kJ/mol; (b)——C5位,  $\Delta E = -20.01$  kJ/mol

图6 C2位和C5位 T-H 交换的过渡态

Fig. 6 Obtained T-H exchange TSs of C2 position and C5 position

### 3 结论

研究 HTO 的内照射辐射生物效应,就必须清楚地理解 HTO 在亚细胞结构中对生物大分子的损伤,以及这个损伤在生物空间、时间上的分布。细胞内 HTO 辐射能量的吸收和传递、分子的激发和电离、自由基的产生和化学键的断裂所涉及的生物物理和生物化学过程中的多种中间阶段均会产生  $\lambda$ -dsDNA 的损伤。在此背景下,比较不同剂量率 HTO 引起的  $\lambda$ -dsDNA 损伤可能有助于理解 HTO 的内照射辐射损伤的机制。

(1)  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 在辐照时主要是电离辐射的间接作用为主,即由溶剂分子介导的电离辐射对溶解的  $\lambda$ -dsDNA 起主要破坏作用。从实验结果可以看到,在  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 的低剂量(100~500 mGy)作用下出现的碱基和脱氧核糖的特征峰强度增加,可归因于水辐解的各种初级产物和次级产物导致的碱基对非堆积作用,并且它们对  $\lambda$ -dsDNA 分子结构具有一定的选择性,主要破坏碱基间的氢键造成碱基不配对以及碱基结构的变化,从而造成碱基对较好的解叠加,最终导致  $\lambda$ -dsDNA 的部分变性。而  $1 \times 10^9$  Bq/L HTO 的高辐射剂量(4~8 Gy)作用导致拉曼特征峰强度降低更明显,整个光谱的拉曼标记带分裂和展宽,表明通过自由基分子的长期作用更容易导致糖-磷酸主链或核碱基的局部变化。

(2)  $1 \times 10^{11}$  Bq/L HTO 在低剂量短时间作用于  $\lambda$ -dsDNA 产生的生物效应类似于  $\gamma$  射线,主要通过射线直接的电离作用或质子化作用导致碱基、特别是嘌呤环结构的破坏而引起  $\lambda$ -dsDNA 骨架的断裂。随着 HTO 辐照剂量的增加,辐照

作用时间增长,同样出现了碱基对非堆积效应。

(3) 脱氧核糖的特征拉曼峰在 2~8 Gy HTO 辐照后呈现拉曼标记带的分裂、新拉曼峰的出现以及特征谱线的剂量依赖性消失,说明高剂量 HTO 的长期作用可产生 H-T 的同位素交换作用,能造成呋喃糖环构象转移或共价键的断裂,可引起  $\lambda$ -dsDNA 骨架单链的断裂。

### 参考文献:

- [1] Feinendegen L E, Cronkite E P, Bond V P. Radiation problems in fusion energy production[J]. *Radiat Environ Biophys*, 1980, 18: 157-183.
- [2] Tauchi H, Toyoshima-Sasatani M, Nagashima H, et al. Tritium biology in Japan: a search for a new approach[J]. *Fusion Eng Des*, 2018, 128: 28-32.
- [3] Hofer K G, Hughes W L. Radiotoxicity of intranuclear tritium, 125iodine and 131iodine[J]. *Radiat Res*, 1971, 47: 94-109.
- [4] Pomerantseva M D, Balonov M I, Ramaia L K, et al. Mutagenic action of tritium on the germ cells of male mice II: the genetic damages in stem spermatogonia induced by tritium oxide and gamma radiation[J]. *Genetika*, 1984, 20: 782-787.
- [5] Balonov M I, Muksinova K N, Mushkacheva G S. Tritium radiobiological effects in mammals: review of experiments of the last decade in Russia[J]. *Health Phys*, 1993, 65: 713-726.
- [6] Johnson H A, Moghissi A A. Quality factor for tritium radiation[J]. Las Vegas NV: Messenger Graphics, 1973: 231-239.
- [7] Diabate S, Strack S. Organically bound tritium[J]. *Health Phys*, 1993, 65(6): 698-712.
- [8] ICRP. Recommendations of the international com-

- mission on radiological protection[C]. Oxford: Pergamon Press, 1991.
- [9] Zhou B B, Elledge S J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective[J]. *Nature*, 2000, 408: 433-439.
- [10] Lord C J, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy[J]. *Nature*, 2012, 481: 287-294.
- [11] Hall E J, Giaccia A J. Radiobiology for the radiologist[M]. 7th ed. Lippincott; Williams & Wilkins, 2012.
- [12] Nikjoo H, Goodhead D T. Track structure analysis illustrating the prominent role of low energy electrons in radiobiological effects of low-LET radiations[J]. *Phys Med Biol*, 1991, 36(2): 229-238.
- [13] Health Protection Agency. Review of risks from tritium report of the independent advisory group on ionising radiation(RCE-4)[M]. London: Health Protection Agency, 2007.
- [14] Xue J M, Du G H, Wang Y G. Proton irradiation on bovine serum- albumin molecule, nuclear instruments & methods in physics research section B-beam interactions with materials and atoms[J]. *Effect Mev*, 2006, 245(1): 318-321.
- [15] Guan Y, Thomas G J. Vibrational analysis of nucleic acids V: force field and conformation-dependent modes of the phosphodiester backbone modeled by diethyl phosphate[J]. *Biopolys J*, 1996, 71(5): 2802-2814.
- [16] Guan Y, Thomas G J. Vibrational analysis of nucleic-acids 3: conformation-dependent Raman markers of the phosphodiester backbone modeled by dimethyl-phosphate[J]. *J Mol Struct*, 1996, 379(6): 31-41.
- [17] Deng H, Bloomfield V A, Benevides J M, et al. Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence[J]. *Biopolymers*, 1999, 50: 656-666.
- [18] Belli M, Lanzini F, Sapora O, et al. Adv DNA double strand break production and rejoining in V79 cells irradiated with light ions[J]. *Advances in Space Research*, 1996, 18: 73-77.
- [19] Duguid J, Bloomfield V A, Benevides J M, et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes II: the thermal denaturation of DNA in the presence of  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  [J]. *Biophys J*, 1995, 69: 2623-2641.
- [20] Duguid J, Bloomfield V A, Benevides J M, et al. DNA melting investigated by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy[J]. *Biophys J*, 1996, 71: 3350-3360.
- [21] Lee C, Park K H, Cho M H. Vibrational dynamics of DNA I: vibrational basis modes and couplings[J]. *J Chem Phys*, 2006, 125(11): 114508.
- [22] Lee C, Park K H, Cho M H. Vibrational dynamics of DNA II: deuterium exchange effects and simulated IR absorption spectra[J]. *J Chem Phys*, 2006, 125(11): 114509.
- [23] Reilly K E, Thomas G J Jr. Hydrogen exchange dynamics of the P22 virion determined by time-resolved Raman spectroscopy: effects of chromosome packaging on the kinetics of nucleotide exchanges[J]. *J Mol Biol*, 1994, 241: 68-82.
- [24] Tuma R, Bamford J K H, Bamford D H, et al. Structure, interactions and dynamics of PRD1 virus II: organization of the viral membrane and DNA[J]. *J Mol Biol*, 1996, 257: 102-115.
- [25] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. PSI4: an open-source ab initio electronic structure program: Gaussian 09, Revision C.01[M]. Gaussian; Inc Wallingford CT, 2010.
- [26] Hogan S W L, van Mourik T. Competition between hydrogen and halogen bonding in halogenated 1-methyluracil: water systems[J]. *J Comput Chem*, 2016, 37: 763-770.
- [27] Giroday T, M-Campillo M M, M-Diez N. Thermodynamic stability of PFOS: M06-2X and B3LYP comparison[J]. *Comput Theor Chem*, 2014, 1046: 81-92.
- [28] Zhao Y, Truhlar D. A density functional that accounts for medium-range correlation energies in organic chemistry[J]. *Org Lett*, 2006, 8: 5753-5755.
- [29] Hehre W J, Pople J A. Self-consistent molecular orbital methods III: an extended Gaussian-type basis for boron[J]. *J Chem Phys*, 1972, 56: 4223.
- [30] Hariharan P C, Pople J A. Accuracy of AH n equilibrium geometries by single determinant molecular orbital theory[J]. *Mol Phys*, 1974, 27: 209-214.
- [31] Gordon M S. The isomers of silacyclopropane[J]. *Chem Phys Lett*, 1980, 76: 163-168.
- [32] Hariharan P C, Pople J A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies[J]. *Theor Chim Acta*, 1973, 28: 213-222.
- [33] Thomas G J, Wang A H, Eckstein F, et al. Nucleic acids and molecular biology[M]. Berlin: Spring-

- er-Verlag, 1988.
- [34] Sailer K, Viaggi S, Nusse M. Kinetics of radiation-induced and cytochrome-C-induced modifications in liposomes analyzed by FT-Raman spectroscopy[J]. *Biochem Biophys Acta-Biomembr*, 1997, 1329(2): 259-268.
- [35] Tang Y L, Guo Z Y. Raman spectroscopic analysis of the effect of ultraviolet irradiation on calf thymus DNA[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(1): 39-46.
- [36] Mathlouthi M, Seuvre A M, Koenig J L. FT-IR and laser-Raman spectra of constituents of nucleic acids; Part I: FT-IR and laser-Raman spectra of D-ribose and 2-deoxy-D-erythro-pentose ("2-deoxy-D-ribose")[J]. *Carbohydr Res*, 1983, 122(1): 31-47.
- [37] Sailer K, Viaggi S, Nusse M. Radiation-induced structural modifications in dsDNA analyzed by FT-Raman spectroscopy[J]. *Int J Radiat Biol*, 1996, 69(5): 601-613.
- [38] Benevides J M, Overman S A, Thomas G J. Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman-spectroscopy of nucleic-acids and their complexes[J]. *J Raman Spectrosc*, 2005, 36(4): 279-299.
- [39] Taillandeier E, Liquier J, Ghomi M. Conformational transitions of nucleic acids studied by IR and Raman spectroscopies[J]. *J Mol Struct*, 1989, 241: 185-211.
- [40] Puppels G J, Otto C, Greve J, et al. Raman microspectroscopic study of low-pH-induced changes in DNA structure of polytene chromosomes[J]. *Biochem*, 1994, 33(11): 3386-3395.
- [41] Segers-Nolten G M J, Sijtsema N M, Otto C. Evidence for Hoogsteen GC base pairs in the proton-induced transition from right-handed to left-handed poly(dG-dC) · poly(dG-dC)[J]. *Biochem*, 1997, 36: 13241-13247.
- [42] Thomas G J Jr, Benevides J M, Duguid J, et al. Fifth international conference on the spectroscopy of biological molecules[C]. Theophanides T, Anastasopoulou J, Fotopoulos N, eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993.
- [43] O'Connor T, Scovell W M. pH-dependent Raman spectra and thermal melting profiles for polycytidylic acid[J]. *Biopolymers*, 1981, 20: 2351-2367.
- [44] Hanvey J C, Klysik J, Wells R D. Influence of DNA sequence on the formation of non-B right-handed helices in oligopurine: oligopyrimidine inserts in plasmids[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 7386-7396.
- [45] Duguid J, Bloomfield V A, Benevides J, et al. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes I: interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd[J]. *Biophys J*, 1993, 65: 1916-1928.
- [46] Thomas G J Jr, Tsuboi M. Adv Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes[J]. *Adv Biophys Chem*, 1993, 3: 1-70.
- [47] Thomas G J Jr, Wang A H J. Nucleic acids and molecular biology[M]. Eckstein F, Lilley D M J, ed. Berlin: Springer-Verlag, 1988, 2: 1-30.
- [48] Peticolas W L, Kubasek W L, Thomas G A, et al. Biological applications of Raman spectroscopy[M] // Raman spectra and the conformations of biological macromolecules. Spiro TG, ed. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- [49] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues[J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2007, 42: 493-541.
- [50] Feurestein B G, Williams L D, Basu H S, et al. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions[J]. *J Cell Biochem*, 1991, 46: 37-47.
- [51] Ruiz-Chica A J, Medina M A, Sánchez-Jiménez F, et al. Raman study of the interaction between polyamines and a GC oligonucleotide[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285: 437-446.
- [52] Muntean C M, Segers-Nolten G M J. Raman microspectroscopic study of effects of Na(I) and Mg(II) ions on low pH induced DNA structural changes[J]. *Biopolymers*, 2003, 72(4): 225-229.
- [53] Dostal L, Misselwitz R, Welfle H. ARC repressor-operator DNA interactions and contribution of PHE10 to binding-specificity[J]. *Biochem*, 2005, 44(23): 8387-8396.
- [54] Chan J W, Taylor D S, Zwerdling T, et al. Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic-cells[J]. *Biophys J*, 2006, 90(2): 648-656.
- [55] Dong L, Yang N, Yang Y, et al. Isotope exchange reaction in tritium-contaminated vacuum pump oil: mechanism and HTO effect[J]. *RSC Advances*, 2017, 7: 890.