

④ 209-212

第22卷 第4期
1999年4月核 技 术
NUCLEAR TECHNIQUESVol. 22, No.4
April, 1999

离子注入胞嘧啶核苷酸的释磷动力学研究*

邵春林 王招勤^v 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

Q 523.02
Q 691

摘要 离子注入下胞嘧啶(CMP)核苷酸释放无机磷具有快反应和慢反应两种方式,研究了温度对慢反应过程的影响,发现辐射诱发的不稳定磷酸酯释磷反应的特殊模式:在353K以下和368K条件下分别遵循一级反应和二级反应方式,给出了反应的动力学方程和速率常数。

关键词 离子注入, ~~释磷~~, 释磷反应, 动力学

胞嘧啶核苷酸 DNA

作为DNA的基本组成单位,核苷酸在电离辐射研究中受到广泛的重视^[1-3]。除释放碱基外,核苷酸的一个重要辐解反应是释放无机磷。对固态样品,释磷反应有两种方式:一是辐射能量直接作用于靶分子,使其磷酸键断裂而释放无机磷;一是辐射能量引起核苷酸分子其它部位的损伤,产生不稳定磷酸酯,再进一步释放无机磷^[4]。其中部分受损分子,如C4'自由基分子溶于水后可很快水解释放无机磷^[5,6],与直接作用一起统称为释磷的快反应。另有一些不稳定磷酸酯的脱磷反应则较慢,但热处理可加速其进程,故将此反应过程称为释磷的慢反应。一般地,368K热处理1—2h将使无机磷的释放量达到最大。文献[7]认为,核苷酸脱磷反应遵循一级反应模式,本文研究发现, N⁺注入后胞嘧啶(CMP)核苷酸在不同温度热处理下的释磷反应分别符合一级反应和二级反应,并给出了其规律。

1 材料与方方法

1.1 材料

胞嘧啶核苷酸钠盐(5'-CMP · Na₂)为上海生物化学研究所的层析纯产品,其 OD₂₈₀/OD₂₆₀ = 0.986,其它试剂均为分析纯。

1.2 辐照源

离子注入所用的N⁺由中国科学院等离子体物理研究所离子束育种装置产生。离子能量选为20keV,束流为20mA,采用脉冲式辐照,脉冲时间为10s,脉冲间隔为20s,离子注量为 $3 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 。靶室真空度高于0.133Pa,样品架采用水循环冷却。

1.3 方法

取24.5mg 5'-CMP · Na₂于载玻片上制成薄膜。干燥后以N⁺束辐照。辐照前后的样品分别溶于一定体积蒸馏水中,并分成若干组,分别在333K, 343K和353K水浴中处理不同时间后,以未辐照样品为空白对照,根据磷钼酸法以7530-G型紫外-可见光分光扫描仪在660nm处测无机磷的量。

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1997-08-12, 修回日期:1998-10-14

2 结果与分析

2.1 一级反应

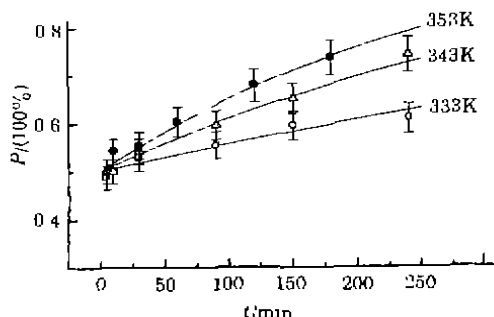


图1 受离子注入的CMP核苷酸样品经不同温度热处理后的释磷量与热处理时间的关系

实线为方程(2)的拟合曲线

Fig.1 Time responses of the relative yield of inorganic phosphate released from the ion-implanted CMP nucleotide samples treated at different temperatures

Solid lines are theoretical curves fitted with Eq.(2)

根据一级反应动力学原理可推导出受离子注入的样品经热处理后所释无机磷之相对含量的动力学方程

$$P = 1 - (1 - P_0) \exp(-k_1 t) \quad (2)$$

式中, $P_0 = X_0/C$, 为离子注入下CMP核苷酸释磷快反应所产生的无机磷量 X_0 占受离子束辐照样品在热处理下所能释放无机磷量 C 的百分比; t 为热处理时间。

根据(2)式对实验结果进行拟合的结果如图1中实线所示。通过拟合可得: P_0 值为 0.5 ± 0.01 , 上述三种温度下一级反应的 k_1 值如表1所示。

表1 M—Pi在不同温度 T 时释磷反应的一级反应常数 k_1

Table 1 The rate constants of the first order phosphate release reaction of M—Pi

	T/K		
	333	343	353
k_1/s^{-1}	$(1.99 \pm 0.15) \times 10^{-5}$	$(4.12 \pm 0.22) \times 10^{-6}$	$(5.97 \pm 0.36) \times 10^{-6}$

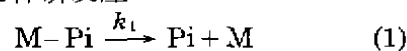
2.2 二级反应

进一步升高热处理温度, 将离子注入后样品以368K处理, 发现无机磷的 P 值具有如图2所示的时间响应关系。如以一级反应方程(2)式对其进行拟合, 并设 $P_0 = 0.5$, 可得图中虚线所示的拟合结果, 拟合参数 k_1 为 $(5.72 \pm 0.31) \times 10^{-4} s^{-1}$; 显然, 该拟合结果不是很好, 意味着此时的释磷反应遵循其它反应模式。以 $1/(1-P)$ 对 t 作图可得一直线, 说明368K热处理下的释磷反应遵循二级反应模式。

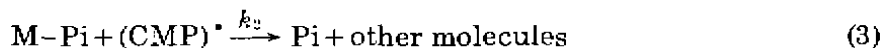
过去的研究指出, 辐射产生的核苷酸自由基分子(CMP) \cdot 能够从邻近的磷酸酯分子中抽氢产生C4'自由基^[8], 从而引起其无机磷的释放。设此反应式为

离子注入下CMP核苷酸分子释放无机磷不仅有快反应过程, 还具有慢反应方式。结果表明368K热处理2h可使其无机磷释放量达到最大值。以该最大值为对照, 可得333K、343K和353K热处理后无机磷相对释放量 P 值的时间响应关系(如图1)。由 $\ln(1-P)$ 对时间 t 作图为一一直线可知, 此种情况下的释磷反应为一级反应。

设5'-CMP核苷酸在离子注入下产生的不稳定性磷酸酯(记为M—Pi)在热作用下具有如下的释磷反应



式中, k_1 为一级反应速率常数。



式中, k_2 为二级反应速率常数。若M-Pi, (CMP)*的起始浓度分别为a, b, 则在t时刻所产生的无机磷量X满足下列关系

$$\ln[(a-X)/(b-X)] = (a-b)k_2t - \ln(a/b) \quad (4)$$

考虑离子束辐照CMP释磷快反应产生的无机磷量为 X_0 及 $a = C - X_0$, 并设 $b = P_1C$, 代入(4)式得368K热处理下样品中P的动力学方程

$$P = \frac{P_0 + P_1(1 - P_0) - P_1 \exp[-Ck_2(1 - P_0 - P_1)t]}{1 - P_0 - P_1 \exp[-Ck_2(1 - P_0 - P_1)t]} \quad (5)$$

式中, $C = 2.28 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 为实验测得368K热处理2h后所释无机磷的量。

以(5)式对图2中实验数据进行拟合, 可得较好的拟合结果(即图2中的实线)。拟合参数为: $P_0 = 0.503 \pm 0.025$, $P_1 = 0.469 \pm 0.058$, $k_2 = (3.6 \pm 0.9) \times 10^2 \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 。此处所得 P_0 与一级反应时的 P_0 一致, 说明了假设的可行性。

2.3 Arrhenius图

Arrhenius给出了反应常数 k_1 与热处理温度T的经验公式

$$\ln k_1 = -E_a/RT + \ln a \quad (6)$$

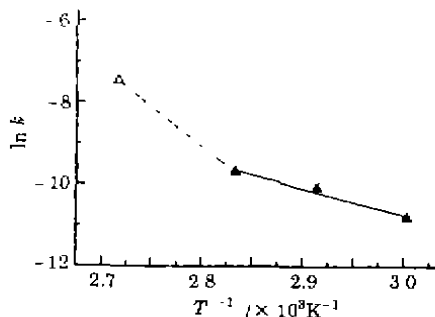


图3 释磷反应常数的Arrhenius图
Fig.3 The Arrhenius plot of the relation between reaction rate constant k_1 and heat-treatment temperature

以(5)式对图2中实验数据进行拟合, 可得较好的拟合结果(即图2中的实线)。拟合参数为: $P_0 = 0.503 \pm 0.025$, $P_1 = 0.469 \pm 0.058$, $k_2 = (3.6 \pm 0.9) \times 10^2 \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 。此处所得 P_0 与一级反应时的 P_0 一致, 说明了假设的可行性。

3 讨论

离子注入下CMP核苷酸既可快速释放无机磷, 又可产生不稳定磷酸酯, 它在热作用下进一步释放无机磷, 且在不同温度下分别遵循一级反应和二级反应模式。无论是一级反应还是二级反应, P_0 均为 0.50 ± 0.01 , 意味着20keV、 $3 \times 10^{16} \text{cm}^{-2} \text{N}^+$ 注入下, CMP核苷酸快

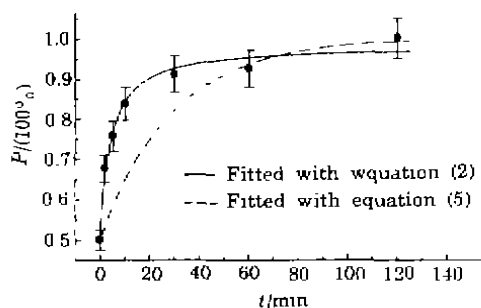


图2 离子注入后CMP在368K热处理下的释磷量与热处理时间的关系

Fig.2 Time response of the relative yield of inorganic phosphate released from the implanted CMP sample treated at 368K

式中, E_a 为表观反应活化能, R 为常数, a 为前指因子。据此, $\ln k_1$ 对 T 作图应为直线。实验结果如图3所示, 其中368K处理时的 k 值取假设为一级反应时的 k_1 值。由图3可见, 在333—353K之间, k_1 与 T 能很好地符合Arrhenius方程, 并且由此区间直线的斜率和截距计算得(1)式所示脱磷反应的一级反应活化能 $E_a = 53.7 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $a = 5.54 \times 10^3 \text{s}^{-1}$ 。另一方面, 当热处理温度大于353K后, 图3中曲线发生明显转折, 说明此时脱磷反应转向另外的反应模式, 且该反应在高温如368K时占绝对优势。而一级反应则在低温如333K时占优势, 这与368K时脱磷反应呈二级反应模式的假设相一致。

速释磷反应所产生的无机磷只占总无机磷的50%，辐射后的间接释磷在辐射损伤中占有相当的比例。

另外，离子注入CMP核苷酸产生的不稳定磷酸酯在368K热处理下的释磷反应除二级反应外，还可能包括一级反应方式，只是由于此时反应条件满足了二级反应要求，使之处于绝对优势地位，一级反应的几率非常小。事实上，若将(2)式中的 P_0 以(5)式中的 P 代替，对368K时的实验结果进行拟合，所得一级反应常数 k 非常小，几乎为零。

参 考 文 献

- 1 Raleigh J A, Greenstack C L, Whitehouse R, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1973, 24(6):595-603
- 2 SHAO Chunlin, YU Zengliang. *Radiat Phys Chem*, 1994, 44(6):651-654
- 3 SHAO Chunlin, YU Zenghang. *Radiat Phys Chem*, 1997, 50(6):561-565
- 4 Ward J F, Kuo I. *Int J Radiat Biol*, 1973, 23(6):545-557
- 5 Boon P J, Cullis P M, Symons M C R, *et al.* *J Chem Soc Perkin Trans II*, 1984, 1393-1399
- 6 朱幼南, 翁晨亮, 张如山. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1986, 4(1):42-47
- 7 George D D J, O'Neill P. *Int J Radiat Biol*, 1991, 59(5):1127-1145
- 8 Deeble D J, Schulz D, Von Sonntag C. *Int J Radiat Biol*, 1986, 49(6):915-926

Kinetics of phosphate release in ion implanted CMP nucleotide

SHAO Chunlin WANG Xiangqin YU Zengliang

(*Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031*)

Abstract

The inorganic phosphate release in CMP nucleotide implanted by N^+ ions includes fast reaction and slow one, and the latter is influenced by heat-treatment. With heat-treatments of lower than 353 K and of 368K, it was found that the kinetic process of phosphate release followed the first and second order reaction mode respectively. Moreover, the kinetic equations and the rate constants were deduced.

Keywords Ion implantation, CMP, Phosphate release, Kinetics