

硫酸铈对 5-腺嘌呤及 5-鸟嘌呤 核苷酸的水解断裂的催化作用

朱 兵* 李新民 吴亦洁 赵大庆 倪嘉缙

(中国科学院长春应用化学研究所希土化学与物理开放实验室, 长春 130022)

本文用核磁共振(NMR)波谱和化学定磷法研究了 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 对 5-腺嘌呤核苷酸(5-AMP)及 5-鸟嘌呤核苷酸(5-GMP)的水解断裂作用。结果表明: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 在 37 °C, 酸性条件下使 5-AMP 断裂为腺嘌呤核苷(A)及无机磷, 使 5-GMP 断裂为鸟嘌呤核苷(G)及无机磷, SO_4^{2-} 浓度及酸强度对 5-AMP 及 5-GMP 的水解断裂程度有很大影响, 并对其水解断裂机制进行了研究。

关键词: 硫酸铈 5-腺嘌呤及 5-鸟嘌呤核苷酸 水解断裂作用

核酸是重要的生命基础物质, 选择性的对核酸中特定排列的核苷酸进行切断是当前基因工程的关键技术之一。过去许多工作集中在小分子 DNA 断裂试剂方面, 它们一般是在 H_2O_2 、 O_2 或还原剂存在下发生氧化还原反应, 产生活性自由基对核酸中戊糖环及其磷酸骨架进行脱氢氧化, 使磷酸二酯键断裂^[1,2], 但这种断裂产物不能用连接酶再连接^[3], 而且容易损伤分子识别部位^[2], 带来许多不便, 而水解断裂则克服了这些缺点。近年来, 希土对核酸的断裂越来越倍受人们的重视, 希土元素对核酸的水解断裂具有优异的选择性和高效性^[4-6]。过去的报道均是在碱性介质中进行反应, 此时希土形成氢氧化物沉淀而成非均相体系, 影响了它们在水溶性介质中的应用, 因此, 寻求可溶性的希土水解核酸体系, 防止形成氢氧化物沉淀, 并且又保持良好的水解活性就显得非常重要。本文用核磁共振(NMR)和化学法研究了硫酸铈在酸性条件下对 5-腺嘌呤核苷酸(5-AMP)及 5-鸟嘌呤核苷酸(5-GMP)的水解断裂作用, 并研究了其水解机理, 指出硫酸铈使 5-GMP 水解为鸟苷(G)和无机磷, 使 5-AMP 水解为腺苷(A)和无机磷, 其断裂机制是水解断裂, 这对于研究希土与核酸的作用, 寻找新的核酸均相水解体系都具有非常重要的意义。

实 验 方 法

5-腺嘌呤核苷酸、5-鸟嘌呤核苷酸为美国 Sigma 公司产品; D_2O (99.8%) 为北京化工厂产品; 硫酸铈由 CeO_2 (99.999%) 用浓硫酸溶解, 除去过量酸; 硝酸铈铵参照文献制得, 二者的浓度由硫酸亚铁铵标定。

* 收稿日期: 1995-04-24。

国家攀登计划“希土科学基础研究”和中国科学院基础局资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者: 朱 兵, 男, 27 岁, 博士生。

核磁共振实验在 Varian Unity 400 型核磁共振仪上进行, 温度 37 °C。化学定磷法参照 [7] 进行, 水解反应均在 37 °C 下进行。

结 果 与 讨 论

一. 硫酸铈对 5'-AMP 及 5'-GMP 的水解断裂作用

为了考察硫酸铈断裂单核苷酸的产物, 我们分别用 ^1H NMR 和 ^{31}P NMR 研究了这种断裂作用。图 1 为硫酸铈(酸度: H_2SO_4 1 mol/L) 对 5'-GMP 作用的 ^1H NMR 谱, 通过监测 5'-GMP 中戊糖环上 $\text{C}_1\text{-H}$ 的化学位移来研究其水解反应过程。5'-GMP 中 $\text{C}_1\text{-H}$ 的化学位移为 6.054 ppm 和 6.043 ppm, 加入硫酸铈后, 由于酸度增大, 使谱线均向高场位移^[8]。5.755 ppm 及 5.763 ppm 为原 5'-GMP 中 $\text{C}_1\text{-H}$ 的峰, 在 5.645 ppm 和 5.652 ppm 处出现新峰, 此峰为

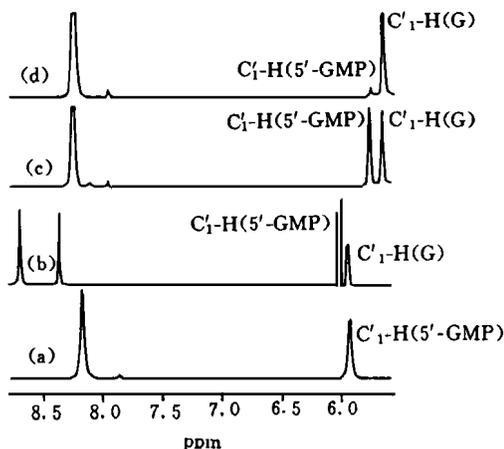


图 1 硫酸铈(酸度: H_2SO_4 1 mol · dm⁻³) 在 D₂O 中水解断裂 5'-GMP 的 ^1H NMR 谱(400 MHz), 37 °C

Fig 1 ^1H NMR (400 MHz) spectrum of hydrolyzing 5'-GMP by $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (acidity: H_2SO_4 1 mol · dm⁻³) at 37 °C in D₂O

$[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]_0 = 241 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$[5\text{-GMP}]_0 = 18 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

(a) pure sample of 5'-GMP

(b) mix guanosine (G) in to solution of 5'-GMP

(c) incubate solution of 5'-GMP 4h by addition of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (acidity: H_2SO_4 1 mol · dm⁻³) at 37 °C

(d) incubate 16h at 37 °C

[]₀ - initial concentration

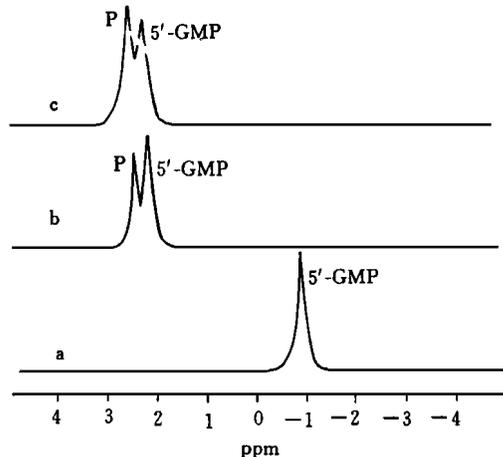


图 2 硫酸铈(酸度: H_2SO_4 1 mol · dm⁻³) 水解断裂 5'-GMP 的 ^{31}P NMR 谱(161.903 MHz), 37 °C

Fig 2 ^{31}P NMR (161.903 MHz) spectrum of hydrolyzing 5'-GMP by $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (acidity: H_2SO_4 1 mol · dm⁻³) at 37 °C

$[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]_0 = 241 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$[5\text{-GMP}]_0 = 18 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

(a) pure sample of 5'-GMP in solution of H_2SO_4 (1 mol · dm⁻³)

(b) incubate solution of 5'-GMP 16h by addition of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ at 37 °C

(c) incubate solution of 5'-GMP 30h by addition of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ at 37 °C

[]₀ - initial concentration

鸟嘌呤核苷(G)中 $\text{C}_1\text{-H}$ 的峰, 随着反应时间的增长, 该峰强度逐渐增强, 表明硫酸铈使 5'-

GM P 中的 P- O 键断裂而生成鸟嘌呤核苷(G), 并无因断裂戊糖环及脱去鸟嘌呤后的产物出现^[3,4], 并且鸟嘌呤核苷(G) 的浓度随反应时间的增长而增强。硫酸铈对 5-AM P 的水解断裂也观察到了类似的结果。图 2 为硫酸铈与 5-GM P 作用的³¹P 谱, - 0.867 ppm 为 5-GM P 中磷酸基团的峰(1 mol/L H₂SO₄ 中), 在 5-GM P 中加入硫酸铈后(酸度: H₂SO₄ 1 mol/L), 使谱线均向低场移动, 2.168 ppm 为原 5-GM P 中磷酸基团的峰, 在 2.451 ppm 处出现新峰, 该峰为 5-GM P 水解断裂后产生无机磷的峰, 随着反应时间的增长, 该峰强度逐渐增强, 说明产生的无机磷的浓度随反应时间的增长而逐渐增大。同样对 5-AM P 也观察到了类似的结果。综上所述, 硫酸铈使 5-GM P 水解断裂为鸟嘌呤核苷(G) 及无机磷, 使 5-AM P 水解断裂为腺嘌呤核苷(A) 及无机磷, 其断裂机制为水解断裂。

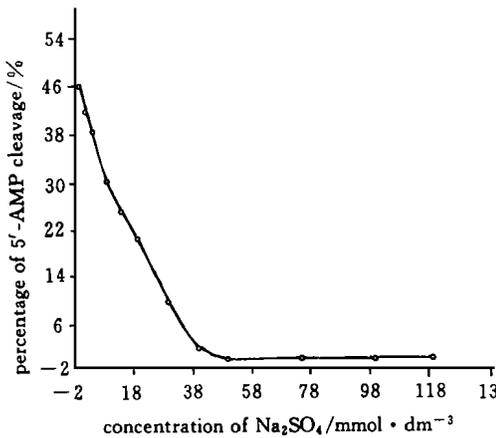


图 3 硫酸钠对硫酸铈水解断裂 5-AM P 的影响

Fig. 3 Influence of Na₂SO₄ on cleaving 5-AM P

by

Ce(SO₄)₂

[Ce(SO₄)₂]₀ = 9.7 mmol · dm⁻³

[5-AM P]₀ = 0.2 mmol · dm⁻³

acidity: H₂SO₄ 0.04293 mol · dm⁻³,

37 °C, 10 h

[]₀ - initial concentration

二. 影响 5-AM P 及 5-GM P 水解断裂的因素

硫酸铈中 Ce(IV) 能与 SO₄²⁻ 生成稳定的配离子 Ce(SO₄)_n⁴⁻²ⁿ, 其配位稳定常数为: β₁ = 10^{3.54}, β₂ = 10^{5.84}, β₃ = 10^{7.14}, 从而可以计算出硫酸铈中不同酸度及硫酸根浓度时的自由 Ce(IV) 离子浓度。为此, 我们研究了硫酸铈中 SO₄²⁻ 浓度的大小对 5-AM P 水解断裂的影响, 图 3 为向硫酸铈溶液中加入不同浓度的 Na₂SO₄ 后对 5-AM P 水解断裂程度的影响, 从图中可以看出, 随着外加 Na₂SO₄ 浓度的增大, 5-AM P 的水解断裂程度逐渐减小, 直至不能使 5-AM P 水解, 这说明由于硫酸铈中 SO₄²⁻ 浓度的增大, 导致硫酸铈配位平衡体系中游离 Ce(IV) 水合离子浓度降低, 而生成了更多稳定的 Ce(IV) 的配离子, 而这些稳定配离子不是使 5-AM P 水解断裂的活性组分, 使 5-AM P 水解断裂的活性组分应为游离的 Ce(IV) 离子。

为了进一步验证上述结论,我们研究了硫酸铈在 HCl, HClO₄ 及 H₂SO₄ 不同酸性介质中对 5'-AMP 水解断裂程度的影响。图 4 为硫酸铈随 HCl, HClO₄ 及 H₂SO₄ 浓度的增大对 5'-AMP 水解断裂的影响。由图 4 可以看出,随着 H₂SO₄ 浓度的增大,5'-AMP 的水解程度逐渐减少,而随着 HCl 及 HClO₄ 浓度的增大,5'-AMP 的水解程度逐渐增大。H₂SO₄ 浓度的增大,必然导致体系中 SO₄²⁻ 浓度的增大,由于 SO₄²⁻ 阴离子的明显配位作用,形成了 Ce(SO₄)_n⁴⁻²ⁿ 配离子降低了 Ce(IV) 离子的浓度,从而减少了水解 5'-AMP 的活性组分,使 5'-AMP 的水解程度降低。而在高氯酸和低 Cl⁻ 溶液中,阴离子的配位作用可以忽略,Ce(IV) 的水解和聚合按下式进行^[9]:



随着 HCl 和 HClO₄ 浓度的增大,Ce(IV) 离子浓度增大,从而导致 5'-AMP 水解程度的增大。

因此,我们认为硫酸铈水解断裂 5'-GMP 和 5'-AMP 的机理是 Ce(IV) 通过其高的正电

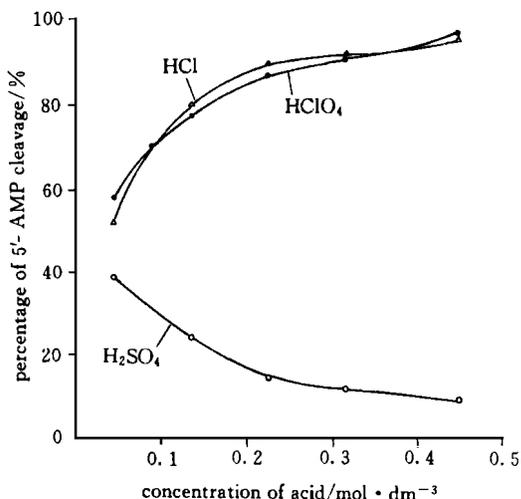


图 4 不同酸的浓度对硫酸铈水解断裂 5'-AMP 的影响

Fig. 4 Influence of concentrations of different acid on cleaving 5'-AMP by Ce(SO₄)₂
 [Ce(SO₄)₂]₀ = 9.7 mmol · dm⁻³
 [5'-AMP]₀ = 0.2 mmol · dm⁻³
 acidity: H₂SO₄ 0.04293 mol · dm⁻³,
 37 °C, 10 h
 []₀ - initial concentration

表 1 硝酸铈铵和硫酸铈对 5'-AMP 的水解断裂作用

Table 1 Hydrolytic Cleavage Action of 5'-AMP by Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ and Ce(SO₄)₂
 [Ce(NH₄)₂(NO₃)₆]₀ = [Ce(SO₄)₂]₀ = 9.6 mmol · dm⁻³, [5'-AMP]₀ = 0.2 mmol · dm⁻³,
 []₀ - initial concentration

| reaction time (h) | percentage of 5'-AMP cleavage (%) | |
|-------------------|---|-----------------------------------|
| | Ce(NH ₄) ₂ (NO ₃) ₆ | Ce(SO ₄) ₂ |
| 0.5 | 6.7 | 0 |
| 1 | 26.7 | 0 |
| 2 | 44.8 | 0 |
| 4 | 55.2 | 0 |
| 7 | 84.8 | 2.4 |
| 9 | 88.5 | 4.8 |
| 10 | 95.7 | 13.3 |

Data are the average of three experiment results

荷来中和 5'-GMP 和 5'-AMP 中 PO₂⁻ 中氧的负电荷,与带负电荷的两个氧结合后,削弱了 P - O 键,从而使之断裂。

图 5 为不同硫酸铈浓度对 5-AMP 和 5-GMP 水解断裂的影响, 由图 5 可以看出: 随着硫酸铈浓度的增大, 反应体系中 Ce(IV) 水合离子的浓度也增大, 也就是说水解 5-AMP 和 5-GMP 的活性组分浓度增大, 因而对 5-AMP 和 5-GMP 的水解程度也随之增强。

同时考虑到 NO₃⁻ 与 Ce(IV) 离子的配位稳定常数 ($\beta_1 = 10^{0.78}$ 及 $\beta_2 = 10^{1.2}$), 要小于 SO₄²⁻ 与 Ce(IV) 离子的稳定常数 ($\beta_1 = 10^{3.54}$, $\beta_2 = 10^{5.84}$ 及 $\beta_3 = 10^{7.14}$)^[10], 溶液中游离 Ce(IV) 离子的浓度要大于硫酸铈中 Ce(IV) 离子的浓度。因此, 我们研究了硝酸铈铵和硫酸铈在相同浓度及酸度下对 5-AMP 水解断裂的差异如表 1 所示。从表中可以看出: 硝酸铈铵对 5-AMP 的水解断裂作用远远大于硫酸铈对 5-AMP 的水解断裂作用, 这进一步证实了我们的上述结论。

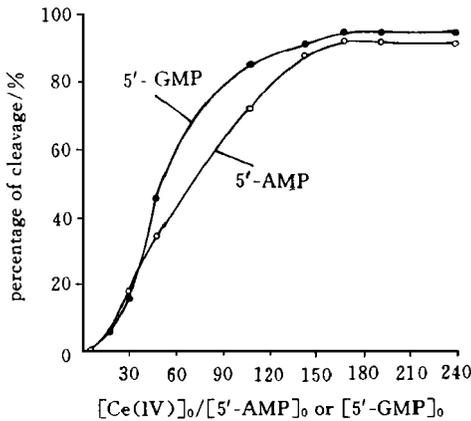


图 5 硫酸铈浓度对 5-AMP 和 5-GMP 的水解断裂程度的影响

Fig 5 Influence of concentration of Ce(SO₄)₂ on cleaving 5-AMP and 5-GMP
 $[5-AMP]_0 = [5-GMP]_0 = 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 37 °C, 10 h, $[]_0$ - initial concentration

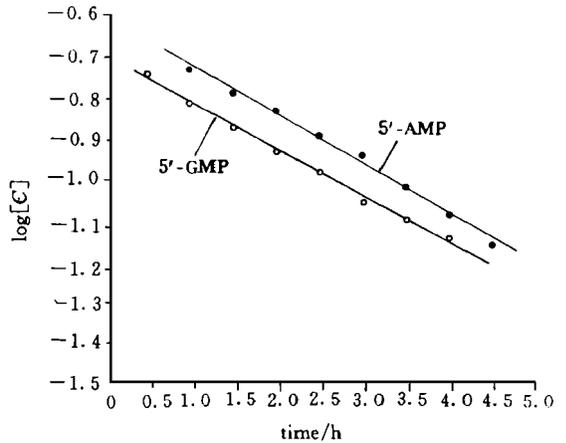


图 6 硫酸铈水解断裂 5-AMP 和 5-GMP 的 log C - T 图

Fig 6 log C - T plot showing the hydrolytic cleavage of 5-AMP and 5-GMP by Ce(SO₄)₂
 $[5-AMP]_0 = [5-GMP]_0 = 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$,
 $[Ce(SO_4)_2]_0 = 38.6 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 37 °C,
 acidity: H₂SO₄ 0.1547 mol · dm⁻³,
 $[]_0$ - initial concentration, C- $[5-AMP]_t$ or $[5-GMP]_t$

图 6 为在硫酸铈催化下 5-AMP 及 5-GMP 的水解断裂随时间变化图, 从图中可以看出以 log C-T 作图得一条直线, 这说明硫酸铈对 5-AMP 和 5-GMP 的水解反应符合假一级反应动力学特征, 由直线的斜率得出相应的表观速度常数 k_{obs} (h⁻¹) 分别为 0.285 (h⁻¹) 和 0.270 (h⁻¹), 但随着反应时间的增长, 硫酸铈水解 5-AMP 和 5-GMP 的反应速度逐渐减慢, 这可能是因为随着反应时间的增长, 水解产生的无机磷含量也增多, 与体系中 Ce(IV) 水合离子产生沉淀后, 减少了 Ce(IV) 离子的浓度, 减少了水解活性组分的含量, 从而使反应速度减慢。

参 考 文 献

- [1] Strobel, S. A., Dervan, P. B., *Science*, **249**, 73(1990).
- [2] Morrow, R. J., Buttrey, A. L., Shelton, M. V. et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1903(1992).
- [3] Pratiel, G., Durarte, V., Bernadou, J. et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7939(1993).
- [4] Matsumoto, R., Komiyama, M., *Chem. Express*, **7**, 785(1992).
- [5] Hayashi, N., Takeda, N., Shiiba, T. et al, *Inorg. Chem.*, **32**, 5899(1993).
- [6] Sumaoka, J., Yashiro, M., Komiyama, M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1707(1992).
- [7] 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 高等教育出版社, 北京, (1984).
- [8] Schweizer, M. P., Broom, A. D., Hollis, D. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1042(1968).
- [9] 黄春辉等. 稀土元素, 科学出版社, 北京, (1992).
- [10] 中山大学金属系编, 稀土物理化学常数, 冶金工业出版社, 北京, (1978).

**CATALYSIS OF HYDROLYTIC CLEAVAGE OF
ADENOSINE-5-MONOPHOSPHATE AND
GUANOSINE-5-MONOPHOSPHATE BY CERIC SULFATE**

Zhu Bing Li Xinmin Wu Yijie Zhao Daqing Ni Jiazuan

*(Laboratory of Rare Earth Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Science, Changchun 130022)*

In this paper, the hydrolysis of adenosine-5-monophosphate (5'-AMP) and guanosine-5-monophosphate (5'-GMP) by $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ was investigated by NMR and the method of measuring the liberated inorganic phosphate. The results showed that 5'-AMP was converted to adenosine (A) and phosphate and 5'-GMP was converted to guanosine (G) and phosphate by $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ at 37 °C under acidic conditions. The concentration of SO_4^{2-} and acid strength greatly influenced the degree of hydrolysis of 5'-AMP and 5'-GMP. The mechanism of hydrolytic cleavage was discussed in detail.

Keywords: ceric sulfate adenosine-5-monophosphate guanosine-5-monophosphate
hydrolytic cleavage