

## 低能离子与腺苷酸组分水溶液作用合成腺苷酸\*

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, 合肥 230031)

**摘要** 利用自行设计的实验装置将低能离子引入水溶液以诱发水溶液中的化学反应, 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-核糖、磷酸二氢铵的腺嘌呤过饱和溶液, 用高效液相色谱、核磁共振等方法对反应产物进行分析, 证明有 5'-腺苷酸生成. 给出了产物的产额时间曲线, 并对反应机理作了初步探讨.

**关键词:** 低能离子, 腺苷酸, 前生物合成, 高效液相色谱(HPLC)

核糖核酸(RNA)是生物体内重要的信息分子, 在遗传信息的传递及蛋白质的生物合成方面均有重要作用. 80年代 Gilbert 等提出生命进化之初是“RNA世界”以来<sup>[1]</sup>, 越来越多的证据表明原始RNA既能象DNA一样具有编辑功能<sup>[2,3]</sup>, 又能象蛋白质一样能够催化化学反应<sup>[4]</sup>, RNA在生命起源中的作用因而备受关注. 但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RNA, 这个问题一直困扰着人们<sup>[5,6]</sup>. Yu Zengliang<sup>[7]</sup>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. 考虑到低能离子在地球形成之初大量存在, 它们在生命的起源与进化中可能发挥过重要的作用, 本文设计了一种可使低能离子与溶液体系相互作用的装置, 以低能  $N^+$  注入腺苷酸组分的水溶液模拟原始地球条件. 与该领域内以往的研究方法相比, 本方法简便易行, 为生命起源的研究提供了一种新的尝试.

## 1 实验装置与方法

### 1.1 实验装置

为了模拟研究低能离子与水溶液的相互作用, 设计了图1所示实验装置. 在图1中, B为针状不锈钢阳极, C为银丝, R为限流电阻, 阻值450 k $\Omega$ .

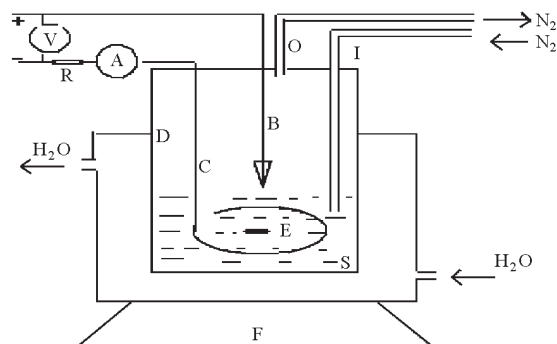


图1 低能离子与水溶液的相互作用模拟装置图

Fig. 1 Apparatus for reaction in aqueous solution induced by low energy  $N^+$  ions

B: anode, C: cathode, D: glass container, E: magnet, F: stirrer, I: gas inlet, O: gas outlet, R: resistor, S: solution sample, A: ammeter, V: voltmeter

当阴阳极之间的电位差达到一定值后, 其间的气体将电离产生等离子体, 其中的阳离子在阳极与水面的鞘层中得到加速后进入水溶液, 诱发水溶液中的化学反应<sup>[8]</sup>.

### 1.2 实验方法

腺嘌呤, D-核糖, 5'-腺苷酸(AMP), 腺苷(AR)为AMRESCO公司产品, 优级纯; 磷酸二氢铵为上海试剂二厂产品, 分析纯.

依次称取腺嘌呤 0.0360 g(0.27 mmol), D-核糖 0.0400 g(0.27 mmol),  $NH_4H_2PO_4$  0.0300 g(0.27

mmol), 溶于含 20 mL 双蒸水的玻璃器皿中, 充分振荡配成腺嘌呤的过饱和溶液. 向溶液中通入高纯氮 (>99.99%) 5-10 min, 以驱除空气. 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°C, 反应过程中连续通入 N<sub>2</sub> 并不断搅拌, 定时取出少量试样. 试样用美国 WATERS 公司 600 型高效液相色谱仪分析, 选用 C-18 柱, 流动相 A 为 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸钾水溶液, 用磷酸将其 pH 值调至 6.5, 流动相 B 为甲醇. 采用梯度分离, 0~15 min 梯度, 0~25% 甲醇, 流速 1.2 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30°C, 紫外检测波长 270 nm. 将目标产物从反应液中分离出来然后在 DMX500NMR 核磁共振谱仪上测其 <sup>1</sup>H-NMR 谱.

## 2 结果与讨论

试样高效液相色谱分析结果如图 2 所示.

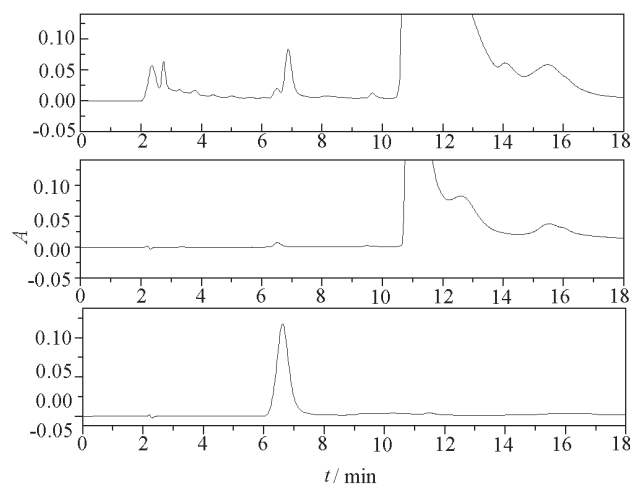


图 2 样品的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of the production of 5'-AMP

downwards each graph represents sample, CK, 5'-AMP CK

在图 2 中, 通过试样与对照样谱图对比可以看出, 反应 10 h 后试样中出现两组新峰, 一组保留时间 (RT 值) 在 2-4 min, 可能是腺嘌呤的分解产物或其碎片与核糖和磷重新化合的结果; 另一组是 RT = 6.8 min 处的一个单峰, 通过加入 5'-AMP 标样可以判定它极有可能就是 5'-AMP. 在试样及对照样 (CK) 中均有另一吸收峰, 即图中 RT = 6.5 min 的小峰, 可能是原料腺嘌呤中的杂质峰. 实验中由于使用了腺嘌呤的过饱和溶液, 所以它的吸收峰

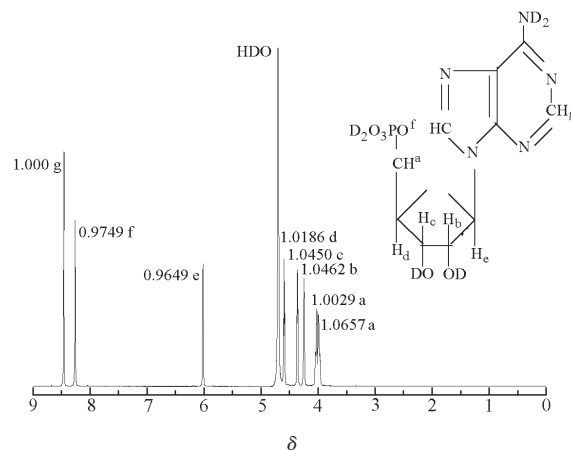


图 3 N<sup>+</sup>处理 10 h 后样品分离物 <sup>1</sup>H-NMR 谱图

Fig. 3 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the content detached from N<sup>+</sup> implanted solution (D<sub>2</sub>O as solvent)

(RT = 11.3 min) 在反应前后并无太大变化. 实验中还测定了同等条件下 AR 标样的 HPLC 谱图 (文中略), 通过保留时间的比较得知样品经低能 N<sup>+</sup> 注入后无 AR 产生. 为进一步确定图 2 中 6.8 min 峰的归属, 我们将该峰的流出物收集, 干燥后的样品做 <sup>1</sup>H-NMR 谱分析, 结果如图 3 所示. 谱图中各峰的归属已于图中标明. 虽然 SADTLER 图库中无 5'-AMP 的标准谱图, 但从图 3 可以看出, 分离物的谱图与 5'-AMP 的结构是相符的<sup>[9]</sup>, 图中各峰的积分面积之比也与 5'-AMP 分子中氢原子数目的比例相一致. 由此可以确定图 2 中 6.8 min 峰就是 5'-AMP.

实验中测得一定浓度 5'-AMP 标样的吸光度

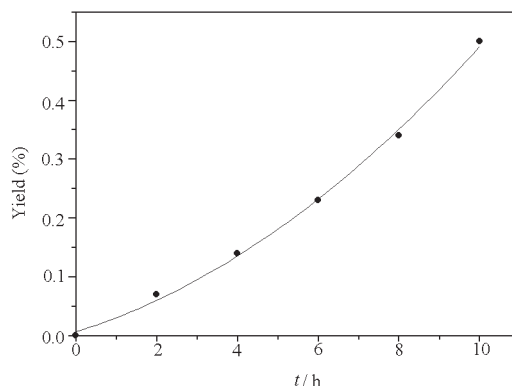
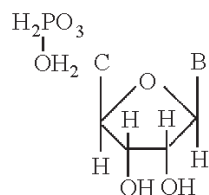
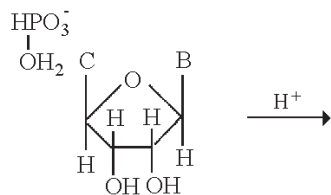
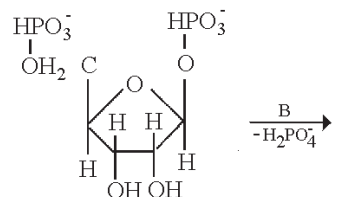
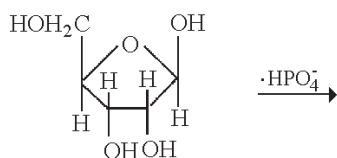
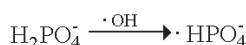
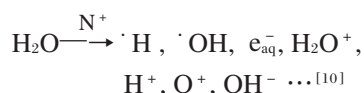


图 4 5'-AMP 的产率与反应时间的关系

Fig. 4 The relation between yield of 5'-AMP and irradiation time

值, 利用朗伯 - 比尔定律即可算出不同反应阶段中 5'-AMP 的产量, 从而计算出相应的产率. 反应中 5'-AMP 的产率如图 4 所示. 由图 4 可以看出, 5'-AMP 的产率随反应时间的延长而逐渐上升, 10 h 后产率达 0.5% 左右. 由于腺嘌呤室温下在水中的溶解度很小, 上述水溶液中的反应绝大多数应该是溶剂水分子之间的反应. 在这样的稀溶液中反应 10 h 有 0.5% 的产率, 我们认为这一点对于生命起源之初原始海洋中核苷酸的形成与积累是有重要意义的.

低能离子诱发水溶液中化学反应无疑是复杂的, 对于实验中核苷酸产生的机理我们提出以下猜测 (B 为腺嘌呤):



事实上, 实验中的反应产物是比较复杂的, 除 5'-AMP 外, 溶液中的含磷自由基可能与碱基或糖类发生去氢反应, 产物在 270 nm 处亦有吸收, 只是由于产额较小或液相保留时间与碱基相近而被碱基峰包埋, 因而在图 2 中看不到其峰.

原始地球上核苷酸的产生是生命起源的重要一步, 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种<sup>[11]</sup>. Lohrmann<sup>[12]</sup>和 Katcher<sup>[13]</sup>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, 通常在简单条件下很难产生核苷酸, 而文中的实验可以模拟原始海洋上的闪电, 在无任何催化剂的条件下证明有核苷酸生成. 我们认为生命之初的气候条件是十分恶劣的, 由于太阳风、闪电、地球内部核辐射等活动频繁, 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.

## References

- Gilbert W. *Nature*, **1986**, **319**: 618
- Gibbons A. *Science*, **1992**, **257**: 30
- Dorit R L, Schoenbach L, Gilbert W. *Science*, **1990**, **250**: 1377
- Waldrop M M. *Science*, **1992**, **256**: 1396
- Ferris J P, Hill Jr A R. *Nature*, **1996**, **381**: 59
- Ertem G, Ferris J P. *Nature*, **1996**, **379**: 238
- Yu ZL, Wu YJ, Deng JG. *Nucl. Instr. and Meth.*, **1991**, **B 59** / **60**: 705
- Jian YF. Handbook of Static Electricity, Trans. Group of Handbook of Static Electricity. Beijing: Science Press, 1981, 98 [静电手册, 静电手册翻译组译, 北京: 科学出版社, 1981, 98]
- Hong SH. Application of Spectroscopy in Organic Chemistry. Beijing: Science Press, 1980, 126 [洪山海. 光谱解析法在有机化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1980, 126]
- Xia SX. Molecular Radiation Biology. Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1992, 36 [夏寿萱. 分子放射生物学. 北京: 原子能出版社, 1992, 36]
- Miller S L, Orgel L E. The Origin of Life on the Earth, Trans. Peng YX. Beijing: Science Press, 1981, 275 [地球上生命的起源, 彭奔欣译, 北京: 科学出版社, 1981, 275]
- Lohrmann R, Orgel L E. *Science*, **1968**, **161**: 64
- Kutcher G J, Green A E S. *Radiation Research*, **1976**, **67**: 408

## Synthesis of Adenosine-5'-monophosphate from Its Constitutes by Implanting Low Energy $N^+$ into Aqueous Solution

Shi Huai-Bin      Shao Chun-Lin      Wang Xiang-Qin      Yu Zeng-Liang

(Center of Ion Beam Bio-engineering, Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

**Abstracts** Low energy ion implantation has been widely used for mutation breeding, DNA delivery and microbe improvement *et al.* since 1980's, but for a long time such kind of implantation was performed only to dry samples because it needed a vacuum chamber, for this reason, a new apparatus (see Fig. 1) was designed in this paper to induce chemical reactions by introducing low energy ions into aqueous solution. In order to explore the origin of life induced by low energy ions and prebiotic synthesis of nucleotide *via* reaction between low energy ions and aqueous solution under primitive earth conditions, low energy  $N^+$  was implanted into aqueous solution containing adenine, D-ribose, and  $NH_4H_2PO_4$ . HPLC analysis showed that a new substance was synthesized which was eluted as 5'-AMP (to see Fig. 2), then it was separated from the sample and analyzed by  $^1H$ -NMR spectrum. It was confirmed that 5'-AMP was formed in the experiment by  $^1H$ -NMR spectrum (see Fig. 3). The relation between yield of 5'-AMP and irradiated time was obtained (see Fig. 4). Mechanism of the production of 5'-AMP was also discussed. The result is interesting for the formation and accumulation of nucleotide in the primitive oceans on the early earth.

**Keywords:** Low energy ions, Adenosine-5'-monophosphate, Prebiotic synthesis, HPLC