

110keV 铁离子束辐照 L(+)-半胱氨酸的 分子改性研究*

袁世斌¹ 卫增泉¹ 李文建¹ 高清祥²

1 (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2 (兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 用 110keV Fe 离子注入 L(+)-半胱氨酸薄膜样品,然后通过傅里叶变换红外光谱、紫外-可见光谱和核磁共振氢谱分析表明,L(+)-半胱氨酸在接受 Fe 离子束辐照后受到了严重损伤,在样品中产生了新的分子基团. ESR 波谱分析表明在辐照产物中存在一种长寿命自由基. ESI 质谱分析进一步支持了低能离子束辐照所致生物分子改性的发生.

关键词 低能离子注入 L(+)-半胱氨酸 辐照效应 分子改性 质量沉积

1 引言

20 世纪 90 年代以来,我国对注入离子在辐照材料中的质量沉积进行的研究,特别是对生物和药物分子的改性,已取得一些很有意义的成果^[1-3]. 国外科学工作者也已开始关注低能离子束对氨基酸^[4]和 DNA^[5]等生物分子的辐照效应,但低能离子辐照分子改性和质量沉积的研究仍是初步的^[6,7].

以往的辐射生物学对氨基酸溶液的辐射分解研究较多,主要采用 ESR 和脉冲辐解技术分析自由基产物,并描述辐解过程. 在水溶液中,简单 α -氨基酸如甘氨酸和丙氨酸等与水的主要辐解产物 OH^\cdot 和 e_{aq}^- 反应,主要产物为氨、酮酸和脂肪酸等. 固态下氨基酸的辐解产物与溶液中极为相似. 低能离子注入丙氨酸、甘氨酸和酪氨酸的剂量-效应和低能离子注入酪氨酸的电荷交换效应已有报道,但较少涉及氨基酸在低能离子束辐照下物质结构的变化特点,而这是了解氨基酸乃至蛋白质的低能离子辐照效应的重要组成部分. L(+)-半胱氨酸的晶体和分子结构已经用 X 射线单晶衍射法进行了测定^[8],并已对其进行过大量的谱学分析. 本文采用 L(+)-半胱氨酸

薄膜样品,注入 110keV Fe 离子,试图通过仪器分析研究 110keV Fe 离子辐照引起的氨基酸分子化学改性,以进一步推动重离子束生物学的发展.

2 实验

2.1 L(+)-半胱氨酸薄膜样品制备

参照文献[9]的方法,用电子天平准确称取 L(+)-半胱氨酸(上海生物化学试剂公司, BR, 白色晶粉, 分子量为 121.16, 分子式为 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{SH}$) 36.0 mg 溶于 6.0 mL $6.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液,在超净工作台上用 $100\mu\text{L}$ 微量移液器将溶液 $100\mu\text{L}$ 逐滴滴加并铺展在 $2.4\text{cm}\times 2.4\text{cm}$ 的盖玻片上,无菌风吹干或 40°C 烘干后,制成 L(+)-半胱氨酸薄膜样品,仔细挑选在整张盖玻片上均匀铺展的薄膜样品,膜厚约 $1.0\mu\text{m}$.

2.2 低能铁离子注入

在盖玻片背面中央贴上一小块双面胶,将另一面粘在圆铜片上,注入 200kV 离子注入机提供

2002-05-29 收稿

* 中国科学院九五重点项目基金(KJ952-S1-424),中国科学院知识创新基金(CX010007)资助

的能量为 110keV 的 Fe 离子,流强约为 $2.0\mu\text{A}$. 束流扫描截面为 $\phi 35\text{mm}$,均匀度好于 95%,采用束流积分仪监测离子剂量. 取精心挑选的若干张 L(+)-半胱氨酸薄膜样品注入 Fe^+ 2.88×10^{15} — 115.2×10^{15} 个(离子辐照剂量范围为 5.0×10^{14} — 2.0×10^{16} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$),注入过程中采用流动自来水冷却靶托,避免样品受辐照后局部升温过高(样品温度在注入过程中均低于 50°C).

2.3 样品处理及分析

1) 傅里叶变换红外光谱分析:用解剖刀片将注入铁离子的 L(+)-半胱氨酸(灰黑色)薄膜刮下,在固态下充分混和并适当研磨同一辐照剂量的样品,制作 KBr 压片,采用美国 Nicolet 公司的 AVATAR360 型 FTIR 红外光谱仪测试样品的红外光谱. 仪器分辨率 4cm^{-1} ,扫描次数 140 次 $\cdot\text{s}^{-1}$,扫描范围 400 — 4000cm^{-1} 波数,室温 20°C ;并进行对照样品的红外光谱分析^[7,10,11].

2) 紫外-可见光谱分析:用电子天平分别称量不同离子辐照剂量的样品,溶于蒸馏水中,经定量滤纸过滤,并用蒸馏水冲洗转入容量瓶定容,使样品浓度均为 $0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 离子辐照前后的同浓度样品均采用紫外-可见分光光度计(756 CRT 型,上海精密科学仪器有限公司)全谱扫描,扫描速度为中速,狭缝宽度为 2nm ,石英池厚度为 1cm .

3) 电子自旋共振(ESR)波谱分析:分别取经和未经离子注入的 L(+)-半胱氨酸,离子辐照剂量分别为 5.0×10^{14} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ (注入后 24—36h)和 5.0×10^{15} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ (注入后 36—96h)的薄膜样品,装入石英玻璃 NMR 样品管并使样品所装高度基本相同,在室温下置于 Bruker 公司 200D SRC 型 ESR 波谱仪的共振腔中,对样品进行长寿命自由基测定. 以 DPPH(二苯基苦基肼基,日本东京化学工业株式会社出品,光谱纯)作为工作标样. 操作于 X 波段(约 9.50GHz)和 100kHz 场调制,微波频率为 9.64GHz ,微波功率为 5dB ,中心磁场强度为 0.34564T ,场扫描范围为 0.02T ,调制宽度为 $1.0 \times 10^{-4}\text{T}$,响应时间为 0.2s ,扫描时间为 200s ,放大倍数为 6.3×10^4 ^[12].

4) 核磁共振波谱分析:用电子天平分别称量不同辐照剂量的样品,溶于 D_2O 中,使其浓度基本一致,经定量滤纸过滤,转入核磁共振专用石英玻璃管中,在室温下置于 JEOL JNM-PMX 60 SI 型 NMR 波谱仪的共振腔中,对样品进行核磁共振氢谱测定. 以 TMS(四甲基硅烷,光谱纯)作为工作标样. 滤波为

20Hz ,扫描宽度为 480 — 600Hz ,扫描时间为 250s ,积分时间为 100s .

5) 电喷雾电离-傅里叶变换质谱分析:用兰州大学应用有机化学国家重点实验室装备有外部电喷雾电离(ESI)源的质谱仪(Bruker 公司 APEX II 型)记录铁离子注入前后 L(+)-半胱氨酸样品的正离子电喷雾质谱. 气体温度为 150°C ,分辨率(fwhm)为 2×10^4 — 1×10^4 ,测试范围为 100 — 2000amu .

3 实验结果和讨论

1) 傅里叶变换红外光谱:低能铁离子辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的红外光谱分别表明辐照前后样品的红外光谱发生了明显的峰位移动和峰面积改变,并且呈现明显的剂量效应. 在样品辐照后于 1860cm^{-1} 波数处的吸收峰全都消失,在 2500 — 2700cm^{-1} 波数范围内的吸收峰面积逐渐减小. 图 1(b)中于 1515 , 1105 和 983cm^{-1} 等波数处,图 1(c)中于 2503 , 1519 和 1103cm^{-1} 等波数处,图 1(d)中于 2511 , 1615 , 1523 , 1490 和 1098cm^{-1} 等波数处均出现了新的吸收峰,表明原分子中的基团逐渐受到能量沉积所致的辐射损伤,产生了新的分子基团和产物.

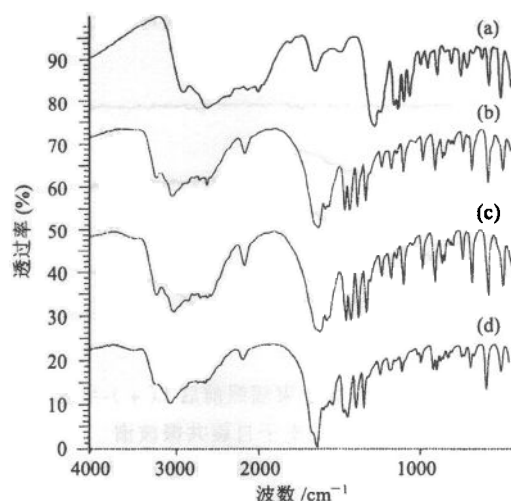


图1 L(+)-半胱氨酸低能铁离子束辐照样品的红外光谱
(a):对照;(b),(c)和(d)的辐照剂量分别为 5.0×10^{14} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$,
 5.0×10^{15} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$ 和 2.0×10^{16} $\text{ions}\cdot\text{cm}^{-2}$.

2) 紫外-可见光谱:离子辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的紫外-可见光谱分别示于图 2. 由比较可见,样品经过离子辐照生成了在波长 250nm 左右具有紫外吸收的新物质,且随着辐照剂量的加大该波长附近的吸收峰面积逐渐增大,即生成该基团的产额随着剂量的增加而增加;另一方面也反映了原

样品分子受低能离子束辐照后发生了明显的化学改性。

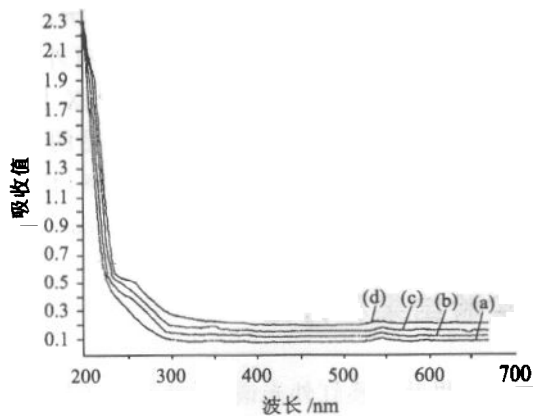


图 2 低能铁离子束辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的紫外-可见光谱

(a): 对照; (b), (c) 和 (d) 的辐照剂量分别为 $5.0 \times 10^{14} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$, $5.0 \times 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $2.0 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

3) ESR 波谱: 注入铁离子前后 L(+)-半胱氨酸样品的电子自旋共振波谱(见图 3)为一典型的单峰自由基信号。表明辐照样品中产生了一种长寿命自由基, 其产额随辐照剂量而增加。样品中很可能也产生了一些其他的短寿命自由基, 但鉴于实验条件难于测知。自由基的生成必将导致原分子的化学改性^[10]。

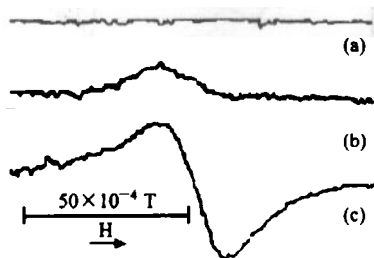


图 3 低能铁离子束辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的电子自旋共振波谱

(a): 对照; (b) 和 (c): 辐照剂量分别为 $5.0 \times 10^{14} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $5.0 \times 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

4) 核磁共振氢谱: 注入铁离子前后 L(+)-半胱氨酸样品的核磁共振氢谱见图 4。低能铁离子束辐照样品的氢峰峰宽和峰强度均随剂量的增加而减小, 表明原样品分子中的氨基、羧基或巯基等含氢基团所受到的辐射损伤随辐照剂量而逐渐增大。

5) 电喷雾电离-傅里叶变换质谱: 低能铁离子注入前后 L(+)-半胱氨酸样品的电喷雾电离-傅里叶变换质谱见图 5。显然, 在低能铁离子束辐照样中, 出现了质荷比为 163.04, 181.05, 402.02,

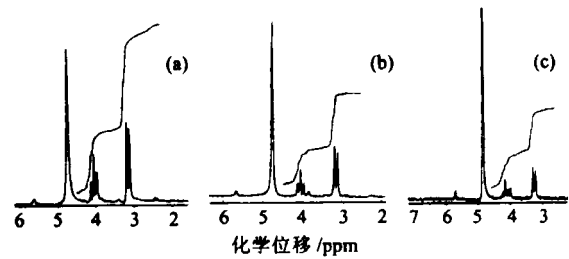


图 4 低能铁离子束辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的核磁共振氢谱

(a): 对照; (b) 和 (c): 辐照剂量分别为 $5.0 \times 10^{15} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $2.0 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

415.21 和 537.23 等的新质谱峰, 而原来质荷比为 279.16, 296.97, 298.97 和 347.12 的质谱峰消失, 直接反映了原分子的化学改性和不同分子量新物质的生成。

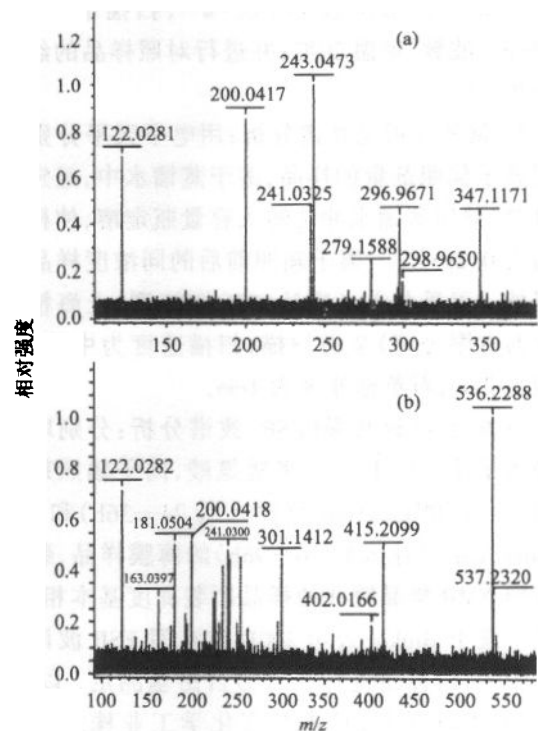


图 5 低能铁离子束辐照前后 L(+)-半胱氨酸样品的电喷雾电离质谱

(a): 对照; (b): 辐照剂量为 $2.0 \times 10^{16} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

4 总结

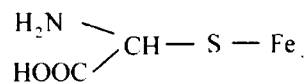
通过将 L(+)-半胱氨酸分子中所没有的铁元素的低能重离子注入薄膜样品后的一系列现代仪器分析, 充分揭示了低能离子束对生物分子所引起的化学改性。

由于注入离子有一定的射程分布(采用传统的荷能离子理论射程计算程序 TRIM^[13] 计算,文中低能 Fe 离子在薄膜样品中的注入深度仅为样品厚度的 5%—10%,考虑到所谓晶体“沟道效应”,某些离子的实际射程可能要大一些),在样品的局部将发生较大的能量转移并沉积较多的离子,使部分样品分子改性^[7]。

低能铁离子束辐照样品的红外光谱和紫外-可见光谱中均出现了新的吸收峰,反映了原分子逐渐受到低能离子束的辐射分解,并组合成为新的分子基团和产物,特别是在图 2 中不同辐照剂量下于 1519cm⁻¹ 波数附近稳定出现的新峰很可能系新形成的—NO₂ 基团的特征吸收峰。特别注意到,通过对比离子注入前后样品的 ESI 质谱,发现新形成的几个质荷比不同的质谱峰,其中质荷比为 181.05 的峰已经通过 X 射线单晶衍射分析证明系新形成的一种含有沉积铁离子的有机化合物的质谱峰,其化学式为 [CH₂CH(NH₂)NO₂]₂ClFe^[7]。

由于 110keV 铁离子束的 LET 较高,根据以往的辐射化学知识,在产物中将出现较多的交联分子或缩合寡肽分子,质荷比为 415.21 的分子有可能为四肽分子的末端羧基失去羟基成为醛基的产物:

Cys—Cys—Cys—Cys(—C=O),
质荷比为 537.23 的化合物可能即为缩合五肽。质荷比为 163.04 的产物推测可能结构是^[14]:



低能离子束辐照引起靶分子的解体会产生各种离子或自由基碎片(有些自由基本身也是离子型的),ESR 波谱分析揭示出随着剂量的增大,所生成的单峰长寿命自由基的信号强度逐渐增加,即产额逐渐增加,必将造成原分子(未经离子辐照的样品没有观测到自由基信号)所受损伤的增大。可见在固体样品中,除直接作用外,与液态样品一样,间接作用也是存在的。虽然没有测定该自由基的 *g* 值,但根据文献[15],该自由基信号很可能系由自由电子所引起,即半胱氨酸的巯基(—SH)脱氢形成的谱形宽大的 R—S[•]。从交联产物的生成看,辐射反应类型及方式与溶液态样品也很类似。从核磁共振氢谱结果也可看出,离子辐照样品的峰宽和峰强度均随能量沉积的增加而减小,表明原分子中的含氢基团逐渐受到辐射分解。

参考文献 (References)

- HUANG Wei-Dong et al. *Chemical Physics*, 1998, **237**:223—231
- CAI Xi-Chen, WEI Zeng-Quan, LI Wen-Jian et al. *Chin. J. Anal. Chem.*, 1999, **27**(8):869(in Chinese)
(蔡喜臣, 卞增泉, 李文建等. *分析化学*, 1999, **27**(8):869)
- LIANG Jian-Ping, WEI Zeng-Quan, ZHANG Li et al. *J. Radiat. Res. Radiat. Proces.*, 1999, **17**(1):24 (in Chinese)
(梁剑平, 卞增泉, 张力等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1999, **17**(1):24)
- Foti A M, Milano F, Torrisi L. *Nucl. Instru. Meth.*, 1990, **B46**:361
- Rydberg B. *Int. Radiat. Biol.*, 1985, **47**(1):57
- SHAO Chun-Lin, BI Qiang, YU Zeng-Liang. *Nucl. Tech.*, 1994, **17**(1):25(in Chinese)
(邵春林, 毕强, 余增亮. *核技术*, 1994, **17**(1):25)
- YUAN Shi-Bin, WEI Zeng-Quan, GAO Qing-Xiang. *Chin. Sci. Bull.*, 2002, **47**(8):672
- Harding M M, Long H A. *Acta Cryst.*, 1968, **B24**:1096
- YU Zeng-Liang, SHAO Chun-Lin. *Radiat. Phys. Chem.*, 1994, **43**(4):349
- ZHANG Dong-Mei, SUN Su-Qin, MA Zhi-Long et al. *Nucl. Tech.*, 2000, **23**(4):213(in Chinese)
(张冬梅, 孙素琴, 马志龙等. *核技术*, 2000, **23**(4):213)
- YUE Song. *Chem. Res. Appl.*, 2000, **12**(4):387(in Chinese)
(岳松. *化学研究与应用*, 2000, **12**(4):387)
- ZHENG Rong-Liang. *Radical Biology*. Beijing: Higher Edu. Press, 1992, 9(in Chinese)
(郑荣梁. *自由基生物学*. 北京:高等教育出版社, 1992, 9)
- Ziegler J F, Biersack J P, Littmark U. *The Stopping and Range of Ions in Solids*. Pergamon: New York, 1985
- ZHANG Gui-Zhu, WANG Yue-Mei, ZHAO Peng et al. *Rare Metals*, 1998, **22**(1):55(in Chinese)
(张贵珠, 王月梅, 赵鹏等. *稀有金属*, 1998, **22**(1):55)
- HAN Jian-Wei, YU Zeng-Liang. *Nucl. Tech.*, 1999, **22**(4):200(in Chinese)
(韩建伟, 余增亮. *核技术*, 1999, **22**(4):200)

Research on Molecular Modification of L(+)-Cysteine Induced by 110 keV Fe⁺ Ion Beam Irradiation*

YUAN Shi-Bin¹ WEI Zeng-Quan¹ LI Wen-Jian¹ GAO Qing-Xiang²

¹ (Institute of Modern Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

² (School of Bio-Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Fe⁺ ions with the energy of 110 keV were implanted into films of L(+)-cysteine. FTIR, UV-VIS spectrometry and ¹H-NMR analysis of the irradiated samples prove that some of the original bio-molecules were seriously damaged and significant modifications were induced. ESR analysis shows that a kind of long-life radical was formed in the irradiated samples. The results of ESI-FTMS analysis further supports the molecular modification induced by low-energy ion beam irradiation. The radiation effects are closely connected with the energy deposition in solid L(+)-cysteine samples.

Key words low-energy ion implantation, L(+)-cysteine, radiation effect, molecular modification

Received 27 May 2002

* Supported by Major Subject of The Chinese Academy of Sciences (KJ952-S1-424), Innovation Foundation of The Chinese Academy of Sciences (CX010007)