

微波作用下“氨基酸-磷酸盐”的成肽反应

——生命起源的最可能途径的探索

胡蓉 田金平 尹应武*

① 西南民族大学环境与保护工程学院, 成都 610041; ② 清华紫光英力化工技术有限责任公司, 北京 100085;
③ 清华大学化学系 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要 研究了氨基酸与磷酸二氢钠在微波作用下的成肽反应, 结果显示在较短时间里可获得二肽到八肽以及环肽. 同时伴有磷酸氢盐分子间缩合形成多聚磷酸盐的反应. 在微波作用下, 温度 200 °C 反应 2 h 后磷酸盐的聚合度可达到 99% (其中焦磷酸盐 64%, 三偏磷酸盐 35%). 在反应产物的 ESI-MS 中还检测到了磷酸盐与甘氨酸分子间脱水生成的混酐中间体. 三偏磷酸盐与氨基酸在水体系中也成肽反应, 在室温下缬氨酸成肽的转化率达到 46%. 发现并证实了在微波作用下“氨基酸-磷酸盐”的体系中可以实现氨基酸生成肽及磷酸盐聚合、再生、利用的循环过程, 在这个过程中只需要输入能量就可以源源不断的生成肽, 这也许是生命起源以前的化学进化中氨基酸成肽的最可能途径.

关键词 微波 磷酸盐 氨基酸 肽 生命起源

从氨基酸等非生物小分子形成肽及其以后的蛋白质是生命形成的重要阶段^[1]. 越来越多的实验事实证明磷在生命化学中起着重要的作用. 有机磷化物 (如 ATP) 是生命化学中能量储备的主要形式, 磷酸盐在现代生命中的奇特作用暗示了它在生命起源以前的能量转化和生命起源以前的合成与降解中的重要作用^[2,3]. 近年来, 聚合磷酸盐作为一种可能的生命化学进化过程中的缩合剂引起了广泛的兴趣. 但聚磷酸盐在活化氨基酸成肽的同时, 必然伴随着聚合磷酸盐自身水解成低聚合态的磷酸盐和正磷酸盐,

随着聚磷酸盐的聚合度降低, 其活化能力迅速下降. 这就意味着在催化成肽的同时产生了大量的低活性的磷酸盐和正磷酸盐, 这个过程是很不经济的^[4]. 提高聚合磷酸盐的利用率有两种途径, 一是尽可能地避免水解的发生提高聚磷酸盐的利用率; 另一种途径是将聚合磷酸盐水解产生的聚合度低的低活性磷酸盐再次变成聚合度高的高活性聚合磷酸盐, 将聚合磷酸盐反复利用. 我们认为第二种途径更符合化学进化的原始过程, 因此研究聚磷酸盐在活化氨基酸后的复原具有重要的意义.

收稿日期: 2005-05-25; 接受日期: 2005-06-09

* 联系人, E-mail: cd_rong@yahoo.com.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^{31}\text{P-NMR}$ 谱图的测定均在 Bruker-300 DPX 型核磁共振仪上测定, $^1\text{H-NMR}$ 以 D_2O 为内标, $^{31}\text{P-NMR}$ 以 $85\%\text{H}_3\text{PO}_4$ 为外标.

电喷雾电离质谱图(ESI-MS)是在 Bruker ES-QUIRE-LC 质谱仪上测量.

微波由祥鹤科技公司提供的微波催化反应仪产生.

所用氨基酸和磷酸二氢钠均来自北京化学试剂公司. 三偏磷酸钠($\text{P}_{3\text{m}}$)按照文献[5]制备, 经 $^{31}\text{P-NMR}$ 检验合格并确定含量^[6].

1.2 氨基酸与磷酸二氢钠的微波反应

实验装置是由耐热玻璃反应器和穿过微波炉的顶部的回流冷凝器组成. 将微波反应仪上的溶剂蒸汽出口接到反应瓶上保证水汽的蒸发, 反应物的温度是由一个微波透明的直接插入溶液中的温度探针测定. 将 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mmol 与甘氨酸 10 mmol 混合于 100 mL 的三颈瓶中, 加入 10 mL 水并使反应物完全溶解. 将微波的功率调到 600 W, 100°C , 加热时间周期为每次 5 min, 开启微波开关, 进行微波照射. 当反应体系中的水蒸发刚好完成时开始计时. 按实验预订的时间取样 TLC 检测反应结果, 展开剂为正丁醇:乙酸:水=5:2:3, 用 5% 茚三酮-乙醇溶液显色, $^1\text{H-NMR}$ 跟踪反应进程. 反应过程中反应物的表面需喷洒少量的水, 以增加体系的热导效率和帮助控制反应体系的温度. 反应完成后将固体溶解于水, 用阳离子交换树脂层析^[4]除去其中的磷酸盐后直接 ESI-MS 分析.

其他温度的微波实验方法与之相同.

1.3 三偏磷酸盐与氨基酸的实验

将 10 mmol 氨基酸和 10 mmol 三偏磷酸盐溶于装有 100 mL 水的烧杯中, 加入 NaOH 调节 $\text{pH}=10$, 将烧杯置于室温下. 按实验预订的时间取样做 TLC 分析, 并用 $^1\text{H-NMR}$ 进行反应过程跟踪. 在反应中给反应体系中补加水, 避免水蒸发干. 反应完成后除盐处理方式与微波反应相同, 并进行 ESI-MS 分析.

2 结果与讨论

微波实验中将考察在 NaH_2PO_4 催化下氨基酸形成最简单的肽的反应. 甘氨酸与磷酸二氢钠互溶之后, 用微波加热, 在反应体系中保持一定的水蒸气环境, 逐渐使水蒸发直至干, 反复循环这个过程氨基酸就能转化为肽. 这样的操作构成了一个“干-湿”循环过程, 在一定程度上恒定和维持反应体系的温度. 实验结果发现, 在微波作用下反应可以在较短时间里得到二肽和其他较长的肽以及环肽, 并且收率可观. 在实验中还研究了在微波辐射下不同反应时间、反应温度下磷酸二氢钠-甘氨酸体系成肽反应的变化趋势(图 1). 从图 1 中可见, 反应中随着微波照射时间的加长和辐射温度的升高, 甘氨酸转化率迅速上升.

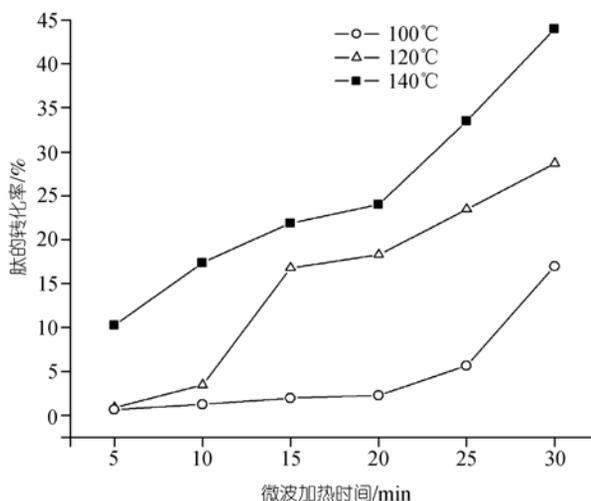
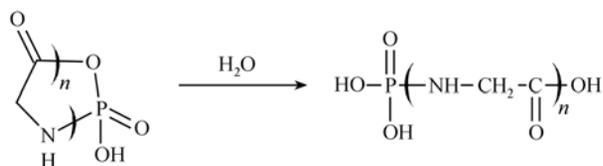


图 1 不同的反应时间和温度下甘氨酸体系成肽反应的收率变化

$^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 原位跟踪结果显示甘氨酸与磷酸二氢钠在微波的照射后的产物中得到了线性肽和环肽, 经电喷雾质谱确认. 使用 $^1\text{H-NMR}$ 积分定量的方法^[7,8], 确定线性肽和环肽的含量. 微波照射初期即低温段主要生成线性肽, ESI-MS 检测到二肽、三肽直到八肽(式 1). 温度升高后线性肽的含量相对降低, 环肽的转化率增加, 环肽主要为环四肽和环六肽(表 1). 本实验适合的酸度条件是 $\text{pH} \leq 7$, 在相同条件下, 当 $\text{pH} > 8$ 时反应时间超过 2 倍也未见产物生成. 这里要说明的是表 1 中 ESI-MS 所显示的肽数据是表中所

同条件下进行反应, 其结果是在此条件下都不能使氨基酸形成肽。



式 2 混酐的生成

表 2 混酐的 ESI-MS 数据

ESI-MS: $n = 1$ H^+ 137.9	ESI-MS: $n = 1$ H^+ 155.9
$n = 2$ H^+ 194.7, Na^+ 217.1	
$n = 3$ H^+ 252.0, Na^+ 274.2	$n = 3$ H^+ 270.0
$n = 4$ H^+ 309.0, Na^+ 331.1	$n = 4$ H^+ 327.1, Na^+ 349.0
$n = 5$ H^+ 365.9, Na^+ 388.2	

很明显, 磷酸二氢钠吸收微波的能量催化氨基酸成肽而自身聚合成高聚合态的磷酸盐。原始汤 (primitive soup)^[2]模拟实验是在水中加入氨基酸和三偏磷酸盐(P_{3m}), 研究在常温($25^\circ C$)条件聚合磷酸盐催化氨基酸的缩合成肽反应。实验结果(表 3)显示, 在适当的 pH 值的条件下, 三偏磷酸盐放出能量使氨基酸生成肽, 自身水解成磷酸盐。三偏磷酸盐在水体系中对氨基酸成肽的催化缩合作用非常强, 即使在室温下也能使缬氨酸的肽转化率达到 46.5%。在水体系中聚磷酸盐确能够由促进氨基酸缩合成肽更进一步肯定了其在生命起源的过程中的催化作用^[9]。在反应

表 3 氨基酸在水中成肽的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据

氨基酸+ $P_{3m}/mmol$	pH	反应时间 /h	二肽 转化率 /%	三、四肽 转化率 /%	1H -NMR			^{13}C -NMR δ (归属)	
					δ (峰形)	积分面积	归属)		
Gly (10+10)	7.5	20	0	0	3.72614 (s 2.817	二肽	$-CH_2-$	176.844($-COOH$)	
		8	0	0	3.70712 (s 1.452	三和四肽	$-CH_2-$	173.590($-CO-NH-$)	
	10	2	7.4	0	3.42513 (s 1.845	三和四肽	$-CH_2-$	173.240($-CO-NH-$)	
		24	31.2	9.6	3.39339 (s 1.276	三和四肽	$-CH_2-$	169.196($-CONH$)	
		48	18.5	4.1	3.30511 (s 1.241	三和四肽	$-CH_2-$	43.967 ($-CH_2-$)	
		52	14.5	2.7	3.28534 (s 2.486	二肽	$-CH_2-$	43.477 ($-CH_2-$)	
		72	21.6	8.4	3.15775 (s 20.000	NH_2-CH_2COOH)		41.788 ($-CH_2-$)	
		103	11.7	4.5				40.804 ($-CH_2-$)	
		144	15.9	3.2					
		168	22.5	0.9					
240	11.9	0							
L-Ala(10+10)	7	20	0	0	1.21146, 1.18821 (d $J = 6.97$	2.3048	$-CH-CH_3$)	185.121 ($-COOH$)	
		8	0	0	1.21942, 1.24028 (d $J = 7.03$	3.1182	$-CH-CH_3$)	182.031 ($-CO-$)	
	9.5	17	6.6	0	1.14113, 1.11722 (d $J = 7.17$	20.000	Ala $-CH-CH_3$)	168.798 ($-CO-NH-$)	
		48	7.2	0	3.57957	(q $J = 7.17$	7.5623	Ala $-CH-CH_3$)	147.875 ($-C=N-$)
		72	1.5	0	4.02322	(多重峰	2.0877	肽 $-CH-CH_3$)	52.085 ($-CH-N-$)
L-Val(10+10)	9	24	22.2	0	0.70570, 0.68292 (d $J = 6.843$	1.4593	$(CH_3)_2CH-$	182.166 ($-COOH$)	
		48	11.9	0	0.76710, 0.74482 (d $J = 6.681$	4.0126	$(CH_3)_2CH-$	180.757 ($-COOH$)	
	144	31.9	0	0	0.82965, 0.80651 (d $J = 6.942$	2.5239	$(CH_3)_2CH-$	178.269 ($-CONH-$)	
		168	46.5	0	0.91440, 0.89041 (d $J = 7.194$	0.6425	$(CH_3)_2CH-$	163.530 ($-CONH-$)	
					0.95204, 0.97611 (d $J = 7.203$	0.5089	$(CH_3)_2CH-$	163.191 ($-CONH-$)	
					1.94331, 1.92450 (多重峰,	1.4175	$(CH_3)_2CH-$	61.943 ($-CH-N-$)	
					3.65871, 3.64346 (d $J = 4.575$	0.3902	$-CH-CO-$	60.735 ($-CH-N-$)	
								30.567 (CH_3-C-)	
							29.956 (CH_3-C-)		
							18.430 (CH_3-C-)		
						17.974 (CH_3-C-)			
						16.565 (CH_3-C-)			
						16.114 (CH_3-C-)			

进行的过程中伴有肽的水解, 导致体系中肽的浓度下降. 表中的数据进一步证明生成的肽如果不及地从反应体系中脱离或得到保护就可能被分解. 这也意味着在表 3 中给出的肽的数量实际上是反应与水解之间的综合结果. 这种合成的(合成代谢的)和水解的(分解代谢的)的反操作也使所有现存新陈代谢产物保持了一种稳定的浓度^[10]. 表中还显示了在水体系中肽的生成强烈地依赖于反应在介质的 pH 值, 反应结果显示 pH<8 时, 体系中没有肽的生成. 例如, 甘氨酸在 pH=8 时, 28 h 后仍观察不到新的物质生成, 而当 pH=10 时, 反应体系中 2 h 后就能观察到新物质的生成. 反应体系在 pH=9~10 是三偏磷酸盐催化氨基酸成肽的最佳酸碱度.

3 结论

磷酸盐在促进氨基酸成肽的同时自身也经历了不同形态变化的过程, 多聚磷酸盐对成肽反应起着明显催化的作用^[11], 水解生成的低聚磷酸盐又可以在微波和热的作用下聚合成高聚磷酸盐, 循环发挥作用. 整个循环过程除需要能量的补充外, 不需外加催化剂(图 3), 这似乎更符合原始状态的地球环境情况.

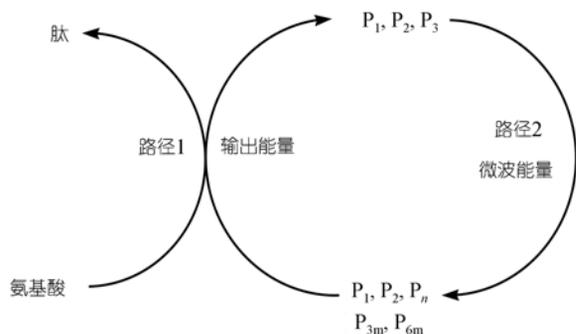


图 3. 微波作用下“氨基酸-磷酸盐”的体系实现了氨基酸成肽及磷酸盐聚合再生的循环过程

P_1 , 正磷酸盐; P_2 , 焦磷酸盐; P_3 , 三磷酸盐; P_n , 多聚磷酸盐; P_{3m} , 三聚偏磷酸盐; P_{6m} , 六聚磷酸盐

这两个过程的耦合既实现了氨基酸的成肽过程又实现了磷酸盐在自然界的再生循环. 原始状态的地球存在大量紫外线和强烈的太阳辐射^[12]、微波辐射、地热温泉、火山频繁活动, 这一切都为氨基酸生成肽和磷酸盐聚合成成为多聚磷酸盐提供了能量. 此

外, 太古时代的地球可能没有稳定的水体^[2], 为氨基酸形成的肽得以保存下来和磷化合物不同形式的变化提供了地质上的依据. 综上所述, 我们发现在微波作用下“氨基酸-磷酸盐”的体系中可以实现氨基酸生成肽及磷酸盐聚合再生的循环过程, 只需要输入微波就可能源源不断地生成肽, 我们推断这也许是化学进化过程中氨基酸成肽的最可能途径, 同时也揭示了电磁波在前生物合成及生命起源过程中可能“悄悄地”起着作用.

致谢 感谢清华大学化学系生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室陈益博士在 ESI-MS 分析方面的帮助, 以及北京清华紫光英力化工技术有限公司经费上的支持.

参 考 文 献

- McClendon J H. The Origin of Life. *Earth-Science Reviews*, 1999, 47: 71~93^[DOI]
- Wang K J, Chai Z F, Pan X M. Enhanced photolysis of nucleic acid monomers by pyrophosphate in the simulated primitive soup. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1999, 29: 261~272^[DOI]
- Alan W S. Prebiotic phosphorus chemistry reconsidered. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1997, 27: 505~512^[DOI]
- 田金平. 生命起源中的氨基酸成肽新途径探索与碳谱定量规律研究. 清华大学博士学位论文, 2003
- Tshako M. The reaction of cyclo-triphosphate with L-Valine. *Bull Chem Soc Jpn*, 1980, 53: 1968~1972
- Yin Y W. N-phosphoryl amino acids and peptides. Part v: *o*-alkyl substitution effects on the ³¹P NMR spectra of phosphoramidates. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 1991, 61: 31~39
- Zhang Y H, Mao X. Nitrogen-14 nuclear magnetic resonance as a method of quantitative nitrogen analysis and its application to determination of nitrate in several hnmic acid. *Journal of Magnetic Resonance*, 2000, 17 (6): 449~454
- 易大年, 徐光漪. 核磁共振波谱在药物分析中的应用. 上海: 科学技术出版社, 1985. 46~48
- Miller S L, Schopf F W, Lazcano A. Oparin's origin of life: sixty years later. *J Mol Evol*, 1997, 44: 351~353^[DOI]
- Claudia H, Günter W. Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni, Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science*, 1998, 281: 670~672^[DOI]
- Glindemann D, Degraaf R M, Alan W S. Chemical reduction of phosphate on the primitive earth. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1999, 29: 555~561^[DOI]
- Ryan R J, Beauchamp J L. Abiotic synthesis of ATP from AMP in the gas phase: implications for the origin of biologically important molecules from small molecular clusters. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 227: 147~159^[DOI]