

参 考 文 献

1 Downs M E, Kobayashi S, Karube I. New DNA technology and the DNA biosensor. *Anal Lett.* 1987, **20** (12): 1897~1927

2 Millan K M, Mikkelsen S R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Anal Chem.* 1993, **65** (17): 2317~2323

3 Tsuruta H, Matsui S, Hatanaka T *et al.* Detection of the products of polymerase chain reaction by an ELISA system based on an ion sensitive field effect transistor. *J Immunol Methods.* 1994, **176** (1): 45~52

4 Fawcett N C, Evans J A, Chien L Y *et al.* Nucleic acid hybridization detected by piezoelectric resonance. *Anal Lett.* 1988, **21** (7): 1099~1114

5 Paul A E P, Ulrich J K, Robert H E H *et al.* Fiber-optic DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination. *Anal Chem.* 1995, **67** (15): 2635~2643

6 Pollard K D, Hawkins E, Yeung D *et al.* Immunoassays and nucleic acid detection with a biosensor based on surface plasmon resonance. *Ann Biol Clin Paris.* 1990, **48** (9): 642~646

7 Downs M E, Warner P J, Turner A P *et al.* Optical and electrochemical detection of DNA. *Biomaterials.* 1988, **9** (1): 66~70

8 Graham C R, Leslie D, Squirrel D J. Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor. *Biosens Bioelectron.* 1992, **7** (7): 487~493

9 Hashimoto K, Miwa K, Goto M *et al.* DNA sensor: a novel electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem.* 1993, **2**: 265~270

10 Hashimoto K, Ito K, Ishimoyi Y. Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Anal Chim Acta.* 1994, **286**: 219~224

11 王申五主编. 基因诊断技术——非放射性操作手册. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1993: 19~20

12 Strachan N J, Gray D I. A rapid general method for the identification of PCR products using a fiber-optic biosensor and its application to the detection of *Listeria*. *Lett Appl Microbiol.* 1995, **21** (1): 5~9

13 朱 滨, 王国荃. 基因诊断技术进展. *中华医学检验杂志*, 1996, **19** (5): 298~300

14 Wood S J. DNA-DNA hybridization in real time using BIA-core. *Microchem J.* 1993, **47**: 330~333

15 Nilsson P, Persson B, Uhlen M *et al.* Real time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal Biochem.* 1995, **224** (1): 400~408

16 Kruchinin A A, Vlasov Yu G. Surface plasmon resonance monitoring by means of polarization state measurement in reflected light as the basis of a DNA-probe biosensor. *Sensors and Actuators B.* 1996, **30** (1): 77~80

17 Syvanen A C, Tchen P, Ranki M *et al.* Time resolved fluorometry: a sensitive method to quantify DNA-hybrids. *Nuc Acids Res.* 1986, **14** (2): 1017~1028

18 Okano K, Kambara H. DNA probe assay based on exonuclease III digestion of probes hybridized on target DNA. *Anal Biochem.* 1995, **228** (1): 101~108

19 Karymov M A, Kruchinin A A, Tarantov Yu A *et al.* Fixation of DNA directly on optical waveguide surface for molecular probe biosensor development. *Sensors and Actuators B.* 1995, **29** (1, 2, 3): 324~327

20 Millan K M, Saraullo A, Mikkelsen S R. Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Anal Chem.* 1994, **66** (18): 2943~2948

Current Status and Prospects for the Nucleic Acid Biosensors. ZHU Bin, WANG Guoquan (*Department of Public Health, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China*).

Abstract Study of the nucleic acid biosensors have important significance in the fields related to molecular biology. In order to meet the needs for practice, the study of the nucleic acid biosensors was stressed in the sensor field recently. The principles, classification, current status and prospects of the nucleic acid biosensors were described.

Key words nucleic acid, sensor, biosensor

Fenton 反应及其可能的活性产物*

王玉秋 何锡文

(南开大学化学系, 天津 300071)

摘要 活性氧对许多生物分子, 如脂质、蛋白质和DNA等均可引起损伤, 它与许多疾病过程相联系。

* 国家自然科学基金资助课题 (29575200). 收稿日期: 1996-10-22, 修回日期: 1997-05-07

由超氧阴离子自由基和过氧化氢所引起的许多损伤被认为与它们转变为反应活性更强的组分有关, 这些组分包括羟自由基及可能的高价铁组分. 实验材料及理论结果表明, 当铁盐与过氧化氢混合时, 除羟自由基产生以外, 高价铁组分也被认为同时产生. Fenton 试剂的活性中间体是一亲核加合物, 其反应活性及其产物不同于游离态羟自由基的反应活性及产物. Fenton 试剂的产物分布依赖于不同的过渡金属离子、不同的配位体、不同的反应底物以及不同的溶剂基体效应.

关键词 羟自由基, Fenton 试剂, 高价铁组分, 机理

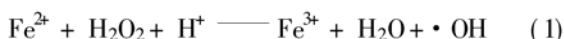
人体在正常及病理过程中均有自由基参与反应, 自由基参与的各种发病机理研究受到越来越广泛的重视^[1-3], 它们不仅可以通过与核酸、蛋白质及多不饱和脂质反应造成细胞永久性损伤, 甚至可以导致细胞的死亡, 其病原学意义得到普遍地承认^[4,5]. 另外, 如 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ 及 HOCl 等非自由基层组分也在体内参与了各种自由基过程, 因此被统称为活性氧. 机体内含有可灭活某些活性氧的酶以及各种水溶性、脂溶性抗氧化剂等组成的防御系统, 使氧化性损伤趋势与抗氧化防御系统在正常生理情况下处于动态平衡状态^[6]. 一般认为, 由于 $\cdot\text{OH}$ 与任何生物分子都以近乎扩散控制的反应速率反应, 而 H_2O_2 及 O_2^- 等的反应活性与 $\cdot\text{OH}$ 相比不是很高, 很可能 O_2^- 和 H_2O_2 等对生物体的损害是通过金属离子如铁、铜转变为 $\cdot\text{OH}$ 而起作用, 因此 $\cdot\text{OH}$ 可能是对生物体危害最大的氧自由基^[7].

由于大多数生物有机分子都是以单线态形式存在, 而氧分子以三线态形式存在, 它们之间的反应一般是不可能发生的, 这一点成为生物体在自然界中得以动力学稳定存在的重要原因^[8]. 金属离子能够克服自旋能垒, 为氧化反应的发生提供低能量路径, 成为氧分子与生物有机分子之间反应的桥梁, 由于铁在大多数生物体中的含量比其他微量元素的总和还多, 所以被认为是生物体中非正常性氧自由基产生的主要参与者^[9].

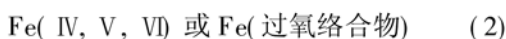
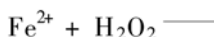
1 回顾历史

在铁参与催化的活性氧产生反应中, 有两种主要机理被提出, 由于其重要的理论及生物学意义, 对历史的简单回顾是必要的.

1894 年 Fenton 发表了一篇文章, 报道说在 H_2O_2 对酒石酸的氧化过程中, 二价铁对此反应起极大的促进作用, 1934 年, Harber 和 Weiss 提出, 在此体系中 $\cdot\text{OH}$ 是实际上的氧化剂反应中间体:



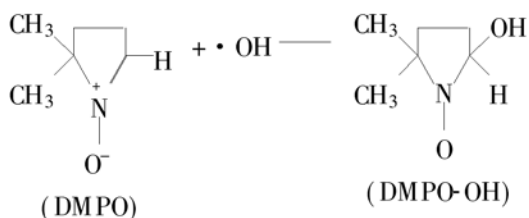
由于 Fenton 试剂在许多体系中确有羟基化作用, 所以 Harber-Weiss 机理得到了普遍承认, 有时人们把反应 (1) 称为 Fenton 反应. 但是, 上述机理被提出的同时, 其他非 $\cdot\text{OH}$ 作为中间体的反应机理也被提出, 该机理认为, 反应中间体不是 $\cdot\text{OH}$, 而是以高价铁形式存在的复合物, 即:



从此, 两种机理相伴相生, 直到现在^[10].

2 实验材料分析

电子自旋捕集技术在活性氧自由基理论研究和实验测定中占有重要位置, 目前最常使用的 $\cdot\text{OH}$ 捕集剂为 5, 5-二甲基吡咯啉-1-氮氧化物 (DMPO)^[11]:

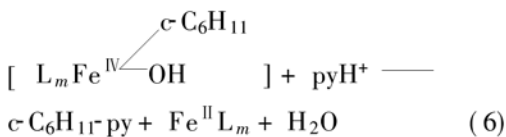
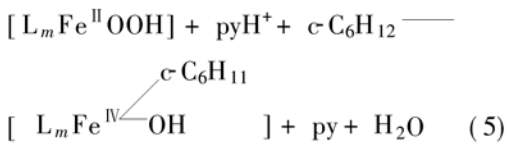
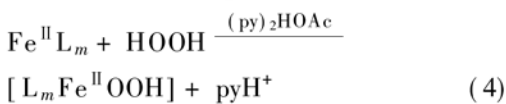


(3)

该技术是目前公认的、精确的、直接用于 $\cdot\text{OH}$ 及其他生物医学相关自由基研究的主要方法^[12], 其理论探索也在不断地进行^[13]. 大量的实验证实, 在 $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ 组成的反应体系中, $\cdot\text{OH}$ 是存在的, 并被 DMPO 捕集

到. Yamazaki 等^[14]利用 ESR 方法详尽地研究了人体生理条件 pH 值下, 各种螯合态的 Fe (II) 与 H₂O₂ 组成的 •OH 发生体系中, •OH 的产生浓度、形态及其他氧化剂如高价铁氧化物的行为变化规律, 指出在此类体系中, 各种可能生成物的浓度、状态 (如游离态 •OH, 键合态 •OH) 受铁螯合物种类、Fe (II) 及 H₂O₂ 浓度影响很大. Scholes 研究小组^[15]更为精细地研究了 Yamazaki 的实验, 证明此类反应体系中确有 •OH 产生, 但是其产生反应只是全部反应中的一个.

过渡金属离子与 H₂O₂ 组成的特异性氧化体系, 从一开始就受到生物有机化学家们的重视, Sawyer 等^[16, 17]对大量的过渡金属配位体及溶剂基体效应等进行了详细研究, 得出 Fenton 反应不可能以反应式 (1) 进行, 即不可能有游离的 •OH 产生的结论, 认为更一般的机理可能是, 首先 H₂O₂ 对 Fe (II) L_m (L: 配位体, m: 配位数) 亲核加成以形成原始的反应中间体 [L_mFe^{II}OOH], 它在各种具体条件下, 与各种底物、溶剂及氧分子等相互作用生成不同产物. 例如以 (py)₂HOAc (py: 吡啶; HOAc: 乙酸) 为溶剂, 当底物 (以 *c*-C₆H₁₂ 为例) 十分过量时, 生成一种溶剂参与的化合物 *c*-C₆H₁₁-py, 发生如下反应:



若此反应在水溶液中进行, 则生成 *c*-C₆H₁₁OH, 即与游离态 •OH 和底物作用所生成的反应产物相同, 在等比的 H₂O₂/HCl 条件下, 将产生另一种高价铁氧化物中间体 [L_mFe^{IV}(OH)Cl], 其反应活性比 HOCl 高, 此种类型的反应被

Sawyer 称为氯化 Fenton 化学. 如果上述有机反应条件下所得的实验结果可以推广到生物体内, 它的生物学意义是重大的. 因为在许多免疫细胞中提供防御功能的有效物质就包括具有反应活性的铁、H₂O₂ 及 Cl⁻, 以上研究结果表明, 起决定作用的不是游离态的 •OH, 而是具有更强定位损伤作用的键合态的 •OH, 具有位置特异性的 •OH 一旦在体内形成, 其损伤将不易被体内已有的酶及非酶抗氧化剂所消除.

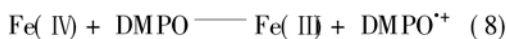
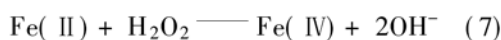
目前大多认为, 在 pH 2 左右的酸性条件下, Fenton 反应将以反应式 (1) 进行. 但是 Wink 等^[18]对此结论提出了异议, 他们的实验结果表明, 在此经典的 Fenton 反应中, 至少可以产生两种反应性质不同的中间体. 中间体 1 被认为是 H₂O₂ 与 Fe (II) 直接结合的铁螯合体 [Fe^{II}(OOH)], 中间体 2 是铁的高价氧化物如 [Fe^{IV}-O²⁺], 这两种反应中间体与各种生物分子如碱基、糖类、核苷酸及氨基酸的反应性质不同于 •OH 与上述生物分子的反应性质. 动力学同位素效应研究表明, 在反应中间体与某些底物的反应中, 其反应速控步包括 C—H 键的直接活化, 即反应可能是通过氢原子的获取而实现的, 如果两种反应中间体均可通过获取氢原子而发生单电子氧化还原反应的话, 那么很容易把 Fenton 反应中间体所进行的反应与 •OH 所发生的反应相混淆. 如果 Fenton 反应不是与 •OH 产生反应等同的话, Wink 等认为, 基于此反应所建立的病原学及病理学基础将受到严肃地挑战.

3 高价铁化合物的实验考察

Bielski 小组^[19]的研究工作为最后在生物学领域中彻底揭示 Fenton 反应的意义及作用带来了曙光, 他们的研究表明, 高价铁组分在与氨基酸的反应中优先与 α 位的碳或 α 位的氮反应, 而 •OH 是无选择性地与底物分子的所有可能反应位发生反应, 在 •OH 与含有芳香环的氨基酸反应中, 与芳香环发生的反应是主要反应路径, 而高价铁化合物则主要进攻

此类氨基酸的侧链, 产生 α -酮衍生物, Bielski 认为, 由于这两类产物极不相同, 故可以用它们作底物来测定 Fenton 反应中 $\cdot\text{OH}$ 和高价铁化合物的产生比.

无论是自旋捕集 ESR 方法, 还是以最后产物分析为基础的其他分析方法, 在本质上是相同的, 只是用于鉴别的手段不同. ESR 分析方法既可以发生反应 (3), 同时也可能伴随以下反应发生:

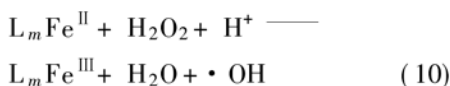


从而使顺磁信号归属受到怀疑, Makino 等^[20]的工作证明了这种可能. 同样, 最后产物分析方法是分析底物与 $\cdot\text{OH}$ 形成的最后产物为鉴别依据, 也面临与 ESR 技术相同的问题, 即不同的底物分子与各种不同的中间体反应, 产生相同的最终产物, 导致鉴别工作失败.

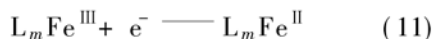
4 理论研究结果

电子转移过程大致上遵循两种机理: 内壳机理和外壳机理. 外壳机理假设在电子转移反应中没有键的形成和断裂, 即反应物之间不共享公共原子或基团, 在此假设基础上, 反应速率常数的理论计算将变得更加简单. Marcus 理论是建立在外壳机理假设下应用相当广泛的描述电子转移的理论之一, 在 Fenton 反应的机理研究中得到了广泛的应用.

假设一般的 Fenton 反应如下进行:



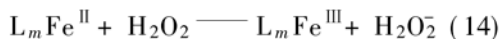
则可分解为以下两个半反应:



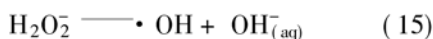
反应式 (10) 的标准电位差为:

$$\Delta E_{10}^0 = E_{12}^0 - E_{11}^0 \quad (13)$$

假设上述反应 (10) 的初始反应服从外壳电子转移反应机理, 即:



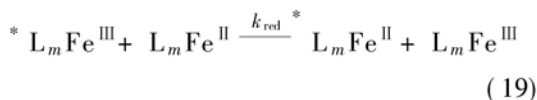
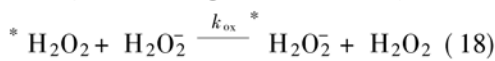
并伴随以下反应:



利用 Marcus 理论, 由反应式 (14) 可得出如下关系式:

$$k_{14} = (k_{\text{ox}} k_{\text{red}} K_{14} f_{14})^{1/2} \quad (17)$$

其中 k_{14} 代表反应式 (14) 的动力学速率常数, k_{ox} 、 k_{red} 分别代表如下两个反应的自交换速率常数 (self-exchange rate constants)



K_{14} 代表反应式 (14) 的热力学平衡常数, f_{14} 是 k_{ox} 、 k_{red} 及 K_{14} 的函数, 且

$$\ln f_{14} = (1/4) (\ln K_{14})^2 / \ln(k_{\text{ox}} k_{\text{red}} / z^2) \quad (20)$$

z 代表不带电荷反应物间的碰撞频率

另外可得

$$E_{(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2^-)}^0 = E_{12}^0 - \Delta E_{15}^0 - \Delta E_{16}^0 \quad (21)$$

如果 H_2O_2^- 形成的话, 将是很不稳定的, 因此, $\Delta E_{15}^0 > 0$, 从而

$$E_{(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2^-)}^0 < (E_{12}^0 - \Delta E_{16}^0) \quad (22)$$

由于 $\Delta G_{14}^0 = -RT \ln K_{14} = -F \Delta E_{14}^0$ 将 (22) 式代入并整理可得:

$$K_{14} < \exp(- (F/RT) (\Delta E_{16}^0 - E_{12}^0 + E_{11}^0)) \quad (23)$$

这样, 由于 $k_{\text{ox}} \propto k_{\text{red}}$ 从文献中可以得到, K_{14} 的上限值可从方程式 (23) 求出, 从而由方程式 (17) 即可求出反应式 (14) 的理论计算反应速率常数 k_{14}^{calc} , 将此理论计算反应速率常数 k_{14}^{calc} 与实验测得的实际反应速率常数 k_{14}^{exp} 进行比较, $k_{14}^{\text{calc}} \ll k_{14}^{\text{exp}[21]}$, 说明在实际 Fenton 反应中, 以外壳机理按反应式 (14) 进行的 Fenton 反应不可能发生, 即 $\text{L}_m\text{Fe}^{\text{II}}$ 与 H_2O_2 首先要发生亲核加成反应, 生成共同的反应中间体 $[\text{L}_m\text{Fe}^{\text{II}}-\text{H}_2\text{O}_2]$. Goldstein 等^[21] 认为, 此中间体在不同的底物

类型、浓度及 pH 条件下最终产物是不同的。产生 $\cdot\text{OH}$ 以及高价铁中间体的反应只是各种可能反应中的一种反应类型。由此可知, 理论计算与实验结果有相似之处, 反映出 Marcus 理论有一定的合理性。

对 Fenton 反应机理的研究具有重要的理论价值及生物医学意义, 随着实验分析手段的不断发展, 以及理论研究的逐步深入, 其真正机理将会被最终阐明。

参 考 文 献

- 1 Knight J A. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci*, 1995, **25** (2): 111~ 121
- 2 Ames B N, Gold L S, Willett W C. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 5258~ 5265
- 3 Halliwell B. Mechanisms involved in the generations of free radicals. *Pathol Biol*, 1996, **44** (1): 6~ 13
- 4 Knight J A. The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci*, 1995, **25**: 1~ 12
- 5 Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 7915~ 7922
- 6 Gutteridge J M C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995, **41** (12): 1819~ 1826
- 7 Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 1994, **52** (8): 253~ 265
- 8 Feig A L, Lippard S J. Reactions of non-heme iron (II) centers with dioxygen in biology and chemistry. *Chem Rev*, 1994, **94**: 759~ 805
- 9 Hardy J A, Aust A. Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem Rev*, 1995, **95**: 97~ 118
- 10 Koppenol W H. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biol Med*, 1993, **15**: 645~ 651
- 11 Knecht K T, Mason R P. *In vivo* spin trapping of xenobiotic free radical metabolites. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **303** (2): 185~ 194
- 12 Halliwell B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 1995, **49** (10): 1341~ 1348
- 13 Bentley J, Madden K P. Theoretical investigation of spin trapping reactions. *J Am Chem Soc*, 1994, **116**: 11397~ 11406
- 14 Yamazaki I, Piette L. EPR spin trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**: 7588~ 7593
- 15 Jiang J, Bank J F, Scholes C P. Subsecond time resolved spin trapping followed by stopped-flow EPR of Fenton reaction products. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 4742~ 4746
- 16 Sawyer D T, Sobkowiak A, Matsushita T. Metal [MLx; M = Fe, Cu, Co, Mn] /hydroperoxide induced activation of dioxygen for the oxygenation of hydrocarbons: oxygenated fenton chemistry. *Acc Chem Res*, 1996, **29**: 409~ 416
- 17 Sawyer D T, Kang C, Llobet A *et al.* Fenton reagents (1: 1 $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Lx}/\text{HOOH}$) react *via* [$\text{LxFe}^{\text{II}}\text{OOH}(\text{BH}^+)$] (1) as hydroxylases ($\text{RH}\rightarrow\text{ROH}$), not as generators of free hydroxyl radicals ($\text{HO}\cdot$). *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 5817~ 5818
- 18 Wink D A, Nims R W, Seavedra J E *et al.* The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6604~ 6608
- 19 Bielski B H J. Reactivity of hypervalent iron with biological compounds. *Ann Neurol*, 1992, **32**: S28~ S32
- 20 Makino K, Hagi A, Ide H *et al.* Mechanistic studies on the formation of aminoxyl radicals from 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide in Fenton systems. Characterization of key precursors giving rise to background ESR signals. *Can J Chem*, 1992, **70**: 2818~ 2827
- 21 Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radical Biol Med*, 1993, **15**: 435~ 445

Fenton Reaction and Its Probable Active Products. WANG Yuqiu, HE Xiwen (*Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China*).

Abstract Reactive oxygen species (ROS) cause various types of damage to many biomolecules, including lipids, proteins, DNA and so on. ROS may contribute to various diseases. Much of the damage caused by superoxide anion radical and hydrogen peroxide *in vivo* is thought to be due to their conversion into more reactive species, including hydroxyl radical, and probable ferryl iron species. The experimental material and theoretic result have shown that in addition to generation of hydroxyl radical, the ferryl iron species have been proposed to be involved when iron salts are mixed with hydrogen peroxide. The reactive intermediate of Fenton reagents is a nucleophilic adduct. The products profiles and reactivity for Fenton reagents are different from those for free hydroxyl radical and depend upon the transition metal, the ligand, the solvent matrix and substrate.

Key words hydroxyl radical, Fenton reagent, ferryl iron species, mechanism