

The Effect of Selenite on the Crystallin Genes Transcription of Rat Lens Epithelial Cells.

WANG Bo, HE Haiying, JIA Weihong, ZHANG Jiaping, LIANG Kang, ZHANG Changying (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The transcriptional changes of α A-crystallin and β 23-crystallin genes in response to various concentrations of selenite were studied in RLE cells *in vitro*. The results showed that along with the increasing of selenite concentra-

tion, α A-crystallin transcription decreased, then went up sharply at 5×10^{-5} mol/L Na_2SeO_3 . The results suggested that α A-crystallin might at least respond to high concentration of selenite and express as a stress protein. But β 23-crystallin gene transcription showed increasing followed by decreasing with the increase of selenite concentration. It indicated that selenium might play a critical role in lens epithelial cell differentiation.

Key words selenite, lens epithelium, crystallin gene transcription, differentiation, stress

五个氨基酸磷光性质的研究

黄如衡

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 研究了5个氨基酸的磷光特性、光谱、寿命和最小检测量。以色氨酸 (Trp) 的磷光最强, 在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 290/438$ nm, 最小检测量为 1 ng, 酪氨酸 (Tyr) 其次 (284/390 nm) 为 Trp 的 1/10, 苯丙氨酸 (Phe) 在 276/386 nm, 脯氨酸 (Pro) 在 308/454 nm, 组氨酸 (His) 在 320/466 nm, 其磷光只有 Trp 的 1%。Phe 与 Trp 磷光寿命最长, 在 7 s 左右; His 最短, 只有 0.49 s; Tyr 2.8 s, Pro 1.34 s。另外研究氨基酸在甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇中及 pH 对氨基酸磷光性质的影响。还计算了 Stokes 位移能量及激化态 pK_a^* 值。

关键词 磷光, 氨基酸磷光性质, 激化态 pK_a^*

低温磷光 (low temperature phosphorescence, LTP) 灵敏度高, 信息量大, 是分析化学的重要工具之一。但由于磷光读数波动大, 国外至今不能用作常规分析工具, 对化合物的磷光特点研究的也不多^[1,2], 只有少数报道关于色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 的磷光光谱, 对脯氨酸 (Pro)、组氨酸 (His) 的磷光性质未见报道。本文研究比较这5个氨基酸的磷光性质及 Trp、Tyr 和 Phe 激化态 pK_a^* 值的测量。

1 材料与方法

1.1 试剂

DL-Trp、DL-Tyr、Phe、His 和 Pro 均进口分装, 均用 0.05 mol/L HCl 液配成 1 g/L, 于冰箱 4 ± 2 °C 保存, 用前适当稀释。甲醇、无水乙醇、正丙醇和正丁醇均为北京试剂厂 AR 级。25% 乙醇, 由无水乙醇加重蒸水配制。0.1 mol/L 磷酸氢二钠与磷酸二氢钾均用

分析试剂配制. 由上两液按不同比例混合成不同 pH 缓冲液. 0.1 mol/L HCl 与 NaOH, 分别由 HCl 与 NaOH (AR 级) 配制并经标化.

1.2 仪器

磷光分光光度计, 由日立 MPF-2A 荧光分光光度计加装磷光镜^[3]组成.

1.3 方法

磷光光谱, 相对磷光强度与寿命按文献 [3, 4] 测定.

2 结 果

2.1 磷光性质

在一组试管中, 各加 0.1 ml pH 6.8 磷酸缓冲液, 0.1 ml 25% 乙醇, 再分别加 0.1 μg Trp, 1 μg Tyr, 10 μg Phe, His 和 Pro 后测磷光光谱, 磷光寿命及 Stokes 位移能量 (ΔE) 见表 1.

表 1 5 个氨基酸的磷光性质

氨基酸	$m/\mu\text{g}$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta E/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})^1)$	寿命/s
酪氨酸	1.0	284	390	116.93	2.84
色氨酸	0.1	290	438	140.07	7.02
苯丙氨酸	10	276	386	127.68	7.43
组氨酸	10	320	466	117.73	0.49
脯氨酸	10	308	454	125.66	1.31

¹⁾ Stokes 位移能量公式: $\Delta E = hc6.02 \times 10^{23}/4.18 \times 1000[1/\lambda_{\text{ex}} - 1/\lambda_{\text{em}}]$. h: 普朗克常数, c: 光速.

5 个氨基酸以 Trp 磷光最强, Tyr 其次, 为 Trp 的 1/10, Phe、His 和 Pro 磷光均弱, 仅为 Tyr 的 1/10 左右. 激发波长以 Phe 最短 (276 nm), His 最长为 320 nm; 发射波峰以 Phe、Tyr 最短 (386~390 nm), His 最长为 466 nm. 磷光寿命以 His 最短, 仅 0.49 s, Phe 与 Trp 最长, 为 7~7.4 s. 计算 Stokes 位移能量, 以 Trp 最高, Tyr 最低. 各氨基酸之间, 位移能量相差较小, 约 21 kJ/mol.

2.2 线性关系

在上述光谱, 取不同量氨基酸, 测磷光强度. 氨基酸量与磷光强度回归成线性相关 (表 2). 证明为磷光波峰.

2.3 不同醇中磷光性质

在 0.2 ml 甲醇、乙醇、正丙醇和正丁醇中分别加入 5 种氨基酸后测磷光光谱、磷光寿命, 并计算 Stokes 位移能量 ΔE (表 3). 在不同醇中各氨基酸的激发波峰变化不大, Tyr、Trp 与 Phe 的发射波峰也接近, His 和 Pro 变化较多. 磷光寿命则随溶剂极性下降而下降, 只有 His 变化最小.

2.4 pH 对 Trp、Tyr 和 Phe 磷光的影响

以 0.1 μg Trp, 5 μg Tyr, 10 μg Phe 分别加入 0.1 mol/L 不同 pH 的磷酸缓冲液中, 再加等体积 25% 乙醇后测磷光光谱与磷光寿命 (表 4).

表 2 氨基酸量与磷光强度关系

氨基酸	线性量程/μg	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	直线回归 ($Y = a + bX$) ¹⁾		
				a	b	r
酪氨酸	0.02~0.2	284	390	6.7	2.65	0.997
色氨酸	0.0025~0.2	290	438	3.4	2.57	0.991
苯丙氨酸	0.5~2.5	286	386	1.8	1.0	0.997
组氨酸	5~25	320	466	1	3.64	0.994
脯氨酸	5~25	308	454	1.4	1.14	0.997

¹⁾ r: 相关系数; n = 3.

表 3 不同醇中氨基酸的磷光性质

氨基酸	<i>m</i> / μg	溶剂 ¹⁾	λ_{ex} / nm	λ_{em} / nm	ΔE / kJ·mol ⁻¹	寿命 / s
酪氨酸	0.5	M	286	390	111.59	2.93
		E	286	392	113.15	2.82
		P	288	390	108.86	1.82
		B	286	590	113.53	1.84
色氨酸	0.1	M	285	436	144.48	7.10
		E	288	436	141.49	6.50
		P	290	440	141.20	6.33
		B	294	436	132.97	4.70
苯丙氨酸	10	M	262	384	145.82	5.87
		E	268	380	132.01	5.61
		P	270	384	131.42	3.76
		B	278	392	125.75	5.44
组氨酸	10	M	318	450	110.63	0.68
		E	320	472	120.96	0.66
		P	320	462	131.71	0.66
		B	306	452	126.84	0.68
脯氨酸	10	M	320	430	96.10	2.38
		E	292	432	133.35	1.41
		P	310	440	114.49	1.18
		B	294	450	141.62	0.80

¹⁾ 溶剂: M= 甲醇, E= 乙醇, P= 正丙醇, B= 正丁醇.

表 4 pH 对氨基酸磷光性质的影响

氨基酸	pH	λ_{ex} / nm	λ_{em} / nm	相对磷光强度	寿命 / s	ΔE / kJ·mol ⁻¹	
酪氨酸	1	284	390	46	1.76	114.66	
	5.9	286	388	42	1.62	110.46	
	6.47	285	390	45	1.83	113.57	
	6.8	286	390	50	1.93	112.10	
	7.17	286	387	42	1.76	120.58	
	7.73	286	388	41	1.23	110.50	
	9	286	390	43	1.70	112.10	
	9.18	288	388	44	1.78	107.60	
	14	285	388	46	1.87	112.01	
	色氨酸	1	290	444	65	8.14	144.31
		4.5	290	434	30	8.1	138.26
		5.9	286	436	31	6.83	145.49
		6.4	290	434	30	7.51	138.26
		6.8	292	438	30	7.02	137.09
7.17		288	438	29	7.03	143.09	
8.04		290	440	30	6.79	141.96	
9.18		298	440	30	7.07	131.04	
14		290	436	36	6.66	139.48	
苯丙氨酸		1	266	384	80	6.58	139.48
		4.5	270	378	70	6.75	126.25
		5.7	266	381	70	7.11	137.09
		6.4	280	382	70	6.80	114.24
		6.81	286	386	68	6.70	109.41
	7.1	282	382	68	6.71	111.85	
	9.18	282	382	70	6.92	111.85	
	14	275	382	75	6.75	122.64	

3个氨基酸受pH影响较小,在酸中,Trp与Phe的相对磷光较强,而对磷光寿命,则Trp在酸中寿命长,在碱中寿命短;Tyr和Phe磷光寿命受pH影响甚小。

2.5 pK_a^* 的计算

激化态 pK_a^* (pK_a^*) 用下列公式计算^[7]:

$$pK_a - pK_a^* = hc/KT(\nu - \nu')$$

式中 h 为普朗克常数 ($6.6 \times 10^{-34} \text{Js}^{-1}$), c 为光速 ($3 \times 10^{10} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$), K 为玻耳兹曼常数 ($1.38 \times 10^{-23} \text{J} \cdot \text{K}^{-1}$), T 为绝对温度, ν 为自 pH 4.5~10 的激发与发射频率 ($1/\lambda$) 之平均值, ν' 为 pH 14 时激发与发射频率之平均值。3个氨基酸的激化态 pK_a^* 值计算见表 5。

表 5 3个氨基酸的激化态 pK_a^* 值

氨基酸	pK_a	λ/nm	λ'/nm	pK_a^*
色氨酸	9.39	363.86	363	9.91
酪氨酸	9.11	337.3	336.5	9.68
苯丙氨酸	9.13	329.75	328.5	10.06

3 讨 论

在测量生物样品中氨基酸含量时,由于氨基酸磷光波峰很接近相互干扰,一般必须分离后再测定。在定性分析时可利用磷光寿命不同来区分,如Tyr与Trp寿命差别较大,可用磷光寿命来区分。最近作者^[5,6]设计在生物样品中加入不同量Trp后测磷光寿命来计算原始Trp含量的方法,可作常规分析用。

蛋白磷光主要是Trp产生,其他氨基酸磷光弱,但数量大,故影响蛋白磷光的波峰、波形、强度及磷光寿命等特性。每种蛋白含的磷光体-氨基酸量不同,使不同蛋白的磷光性质各异,因此比较不同蛋白的磷光特点,有助于了解蛋白的性质。

参 考 文 献

1 Ward J L, Walden G L, Winefordner J D. A review of recent uses of phosphorimetry for organic analysis. *Talanta*,

1981, **28** (4): 201~ 266

- Guilbault G G. *Practical fluorescence*, 2nd. New York: Marcel Dekker Inc., 1990: 367~ 497
- 黄如衡, 徐旭. 磷光技术的改进. *军事医学科学院院刊*, 1986, **10** (2): 129~ 132
- 黄如衡. 简易磷光寿命测定方法. *军事医学科学院院刊*, 1983, **7** (3): 359~ 362
- 黄如衡. 用磷光寿命变化计算组织中游离色氨酸. *皖南医学院学报*, 1994, **13** (增刊): 44~ 46
- 黄如衡, 纪庆娥. 用磷光寿命变化分析血中游离色氨酸. *分析化学*, 1995, **23** (3): 245~ 249
- Wilson D L, Wirz D R, Schenk G H. Fluorescence and phosphorescence of antihistamines having the 2-aminopyridine chromophore. Effect of pH on fluorescence. *Anal Chem*, 1973, **45** (8): 1447~ 1455

Phosphorescence of Five Amino Acids.

HUANG Ruheng (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The phosphorescence properties of tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), proline (Pro), and histidine (His) were investigated. The phosphorescence of Trp is the strongest (high quantum yield). Tyr is the next (about 1/10 of Trp) and Phe, Pro, His are weak (about 1/100 of Trp). The spectra of Tyr and Phe are short (λ_{ex} 284 and 276, λ_{em} 390 and 386 nm respectively), but Trp, Pro, His are long (λ_{ex} 290, 308 and 320 nm, respectively). The phosphorescence lifetime of Phe, Trp, are the longest (about 7 s), Tyr, Pro and His are short (2.84, 1.31 and 0.49 s respectively). The phosphorescence spectra of amino acids in different alcohol (methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol) are changed little, but the lifetime becomes shorter as the polarity of alcohol decreasing. The effect of pH on the spectra of amino acids were studied. The Stokes energy loss and the excited pK_a^* were also measured.

Key words phosphorescence, phosphorescence lifetime of amino acids, excited pK_a^*