

解释算法之间有一进化的链条。从进化观点看,这是“运动图形的中心化”。

参 考 文 献

- [1] Heim, R. et al.: *Theoretical Approaches to Complex System, Proceedings Tuebingen 1977 (Lecture Notes in Biomathematics)*, Ed by S. Levin, Springer-Verlag, 1978.
- [2] Sueddeutsche Zeitung: *Forschung in Deutschland am Beispiel Von Max-planck-Instituten*, 1975—1976.
- [3] Reichardt, M. et al.: *Theoretical Approaches in Neurobiology*, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 1, 1979.
- [4] Reichardt, W. et al.: *Quarterly Reviews of*

Biophysics, 9, 311, 1978.

- [5] Wehrhahn, C.: *Biol. Cybernetics*, 32, 239, 1979.
- [6] Reichardt, W.: *Theoretical Approaches to Complex Systems* (Ed. by Heim, R. et al.) 117, 1978.
- [7] Poggio, T. et al.: *Kybernetik*, 12, 185, 1973.
- [8] Heide, G.: *Biol. Cybernetics* 20, 99, 1975.
- [9] Reichardt, W. et al.: *Biol. Cybernetics*, 18, 69, 1975.
- [10] Virsik, R. et al.: *Biol. Cybernetics*, 23, 83, 1976.
- [11] Reichardt, W.: *Naturwissenschaften*, 60, 122, 1973.
- [12] Poggio, T. et al.: *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, 40, 635, 1976.
- [13] Geiger, G. et al.: *Science*, N. Y., 190, 479, 1975b.

[本文于1981年1月28日收到]

自旋标记 ESR 波谱技术在生物学中的应用

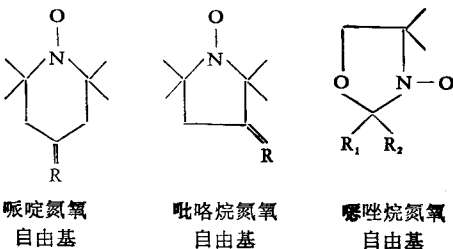
张 建 中 赵 保 路

(中国科学技术大学研究生院)

电子自旋共振 (ESR) 波谱技术虽已深入到生物科学中的许多领域,但由于其研究对象只限于顺磁性物质,因而极大地限制了 ESR 技术的应用。McConnell 等人 1965 年引入了自旋标记方法,为 ESR 波谱的应用开辟了一个新的天地。

所谓自旋标记*方法,就是将一顺磁性报告基团加到生物体系,借助于报告基团的 ESR 波谱特征来反映周围环境的物理、化学性质。这个顺磁性报告基团应具备如下条件:首先必须是足够稳定的,第二,能够结合到被研究物质的某个位置上,第三,ESR 波谱参数的变化对环境的物理、化学性质极为敏感,同时标记化合物本身对体系的扰动甚微。实验证明,氮氧自由基是一类理想的标记化合物。

常用的氮氧自由基有下列几种



结构式中的 R 是根据不同需要所选择的烷基、芳基或其它有机基团。标记物可以同生物大分子共价结合,也可插入生物体系,可以是特异性的,也可非特异性的,根据所研究的对象和目的合理地选择标记化合物。

自旋标记技术对生物体系的研究具有非常重要的意义,它不仅有助于探明生物大分子的结构和功能,而且能对各种生物体系的内部环境,空间构象和运动状态提供极有价值的信息。

本文仅就自旋标记方法在生物学中应用的几个主要方面,膜、蛋白、酶、核酸,加以简单介绍。

一、基 本 原 理

1. 自旋 s 为 $\frac{1}{2}$ 的未偶电子,在磁场 H 中可分裂成对应于磁量子数 $M_s = \pm \frac{1}{2}$ 的两个塞曼能级,如在垂直于 H 的方向加一频率为 ν 的电磁波,且满足于条件

* 自旋标记 (Spin Label) 通常是指与样品共价结合的氮氧自由基分子,对于与样品以其它方式结合的情况,则称为自旋探针 (Spin Probe)。本文则一律称为自旋标记。

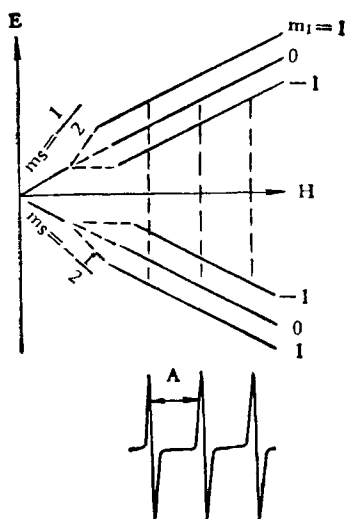


图1 氮氧自由基的 ESR 波谱
下部的谱线为吸收曲线的一次微分

$$h\nu = g\beta H \quad (1)$$

则产生能量吸收,检出 ESR 信号。式中 h 是普朗克常数, g 为光谱分裂因子。对自由电子 $g = 2.0023$, 氮氧自由基的 g 因子与自由电子的 g 因子十分接近。 β 为玻尔磁子。

氮氧自由基的未偶电子主要定域在氮原子的 $2p\pi$ 轨道。 ^{14}N 的核自旋 $I = 1$, 沿外磁场 H 的分量 $M_I = 0, \pm 1$ 。由于未偶电子和核磁矩的相互作用使 ESR 谱发生超精细分裂,得到等强度,等距离的三线谱^[1](图1)。三重线的间隔 A 称为超精细分裂常数,单位为高斯。一般来说, g 和 A 都是各向异性的,也就是说, g 和 A 的数值和自由基相对于磁场 H 的方位有关。实际上可将它们分解成各向同性的和各向异性的两部分。在低粘度介质中,由于分子的快速运动,各向异性的部分平均为零,只表现出各向同性的 g -值和超精细分裂 A_0 。对于存在各向异性的情形, g 和 A 的分量用 g_{xx}, g_{yy}, g_{zz} 和 A_{xx}, A_{yy}, A_{zz} 分别表示氮氧基的三个坐标轴与磁场 H 平行时的数值。氮氧基的 N—O 键选为 x 轴, N 的 $2p_x$ 轨道的指向选为 z 轴。由于氮氧基大致具有轴对称性, $g_{xx} \approx g_{yy} = g_{\perp}$, $A_{xx} \approx A_{yy} = A_{\perp}$, $g_{zz} = g_{\parallel}$, $A_{zz} = A_{\parallel}$ 。

氮氧自由基 ESR 波谱的 g -值,分裂常数

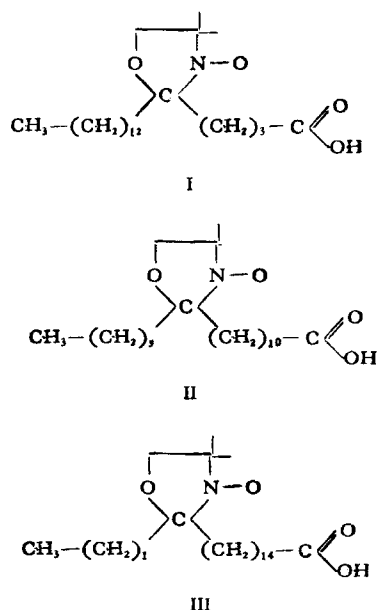
A 、线宽以及三条谱线的相对强度在不同的情况下是不同的,因而它带给我们各种宝贵的信息。

二、应 用

1. 用于生物膜的研究

生物膜有相当复杂的内部结构和重要的生物功能,用自旋标记方法研究膜的结构,探讨膜类脂双层的流动性和在各种情况下的横向扩散以及膜蛋白的存在状态都具有独特的优越性。

(1) 膜的极性轮廓 构成膜的一类脂链亲水端处于膜的表面,疏水端伸向双层内部,显然愈接近表面极性愈大。利用氮氧自由基各向同性的超精细分裂常数 A_0 。随介质极性的增大而增加的性质,把氮氧自由基连结到脂肪链的不同位置,测量其 ESR 波谱的溶剂效应,将 A_0 的变化对自由基横过膜的距离作图,即可得到膜的清晰的极性图象。作为一个例子,用三种脂肪酸自旋标记化合物



对类脂双层进行标记测量。I—III 的形状都同双层中的类脂链十分相似,可以作为类脂链的一部分插入双层,羧基端处于膜的表面,甲基端伸向膜的内部。这三个标记物唯一的差别就是氮氧自由基的位置不同。插入后,从 I 到 III 的

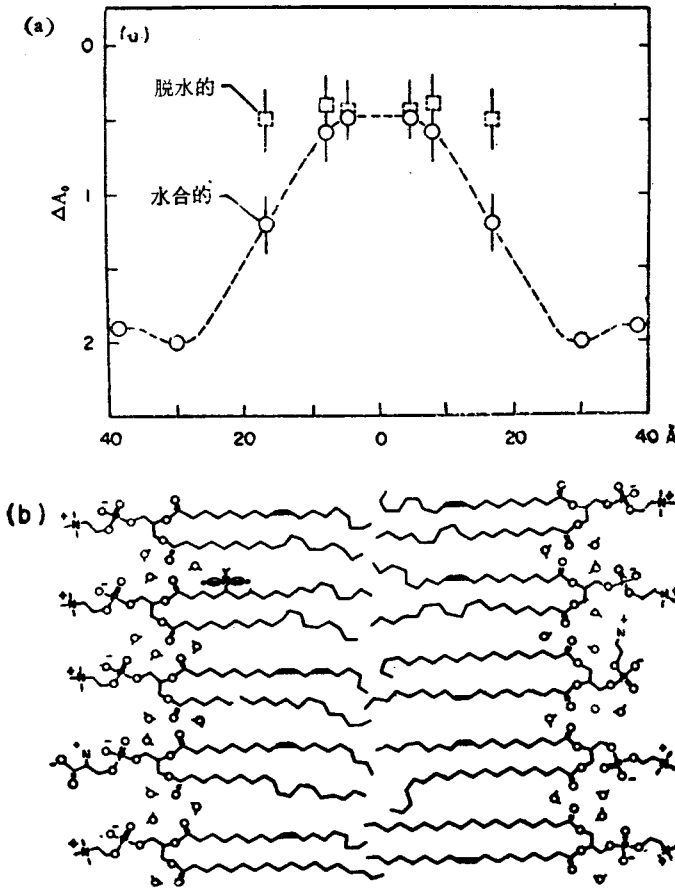


图 2(a) 由自旋标记 I, II, III 的 ESR 波谱数据画出的微粒体膜类脂双层的极性轮廓
(b) 类脂双层的横截面 “α”表示水分子

ESR 波谱分别反映了膜双层表面, 类脂链中间和双层中央的信息。通常选定一理想的非极性介质, 以实际样品的 A_0 与理想非极性介质中所测得的 A_0 之差 ΔA_0 作为极性指标。图 2(a) 示出了微粒体膜的极性轮廓, 图中 40 Å 处的 ΔA_0 是标记物水溶液的数据, 在 30 Å 处的 ΔA_0 是用在浓缩的 LiCl_3 溶液中的自旋标记物间接测得的, 这是为了近似地模拟荷电双层的环境。“○”和“□”分别为水合膜和脱水膜的数据。图 2(b) 是根据综合测量的结果画出的类脂双层的横截面^[2]。

(2) 类脂双层的液晶性质和流动性 借助于不同类型的脂肪酸自旋标记物 (例如上述的 I, II 和 III) 研究膜的结构和运动性质是普遍采用的方法^[3,4]。膜的流动性主要表现在类脂链

的空间摆动和旋转, 这种特性通常用序参数 s 表征。 $s = 1$, 相当于完全有序状态, $s = 0$, 对应于完全混乱状态。通常 $0 < s < 1$ 。 s 同 ESR 波谱参数的关系一般由下式给出^[13]

$$s = \frac{A'_{\parallel} - A'_{\perp}}{A_{xx} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \cdot \frac{a}{a'} \quad (2)$$

$A'_{\parallel}$ 和 $A'_{\perp}$ 是自旋标记的实际样品的超精细分裂, A_{xx} , A_{yy} 和 A_{zz} 为同种标记物的单晶数据, $a = \frac{1}{3} \times (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$, $a' = \frac{1}{3} (A'_{\parallel} + 2A'_{\perp})$ 。图 3 是脂肪酸自旋标记用于生物膜或模式膜最常见的 ESR 谱*。显然对不同的体系, 即使对同一体系的不同部位, 例如膜的表面和内部测得的序参数是不同的。序参数 s 可以直接地当地反映双层膜的流动性和柔曲性以及 Trans-Gauche 构象的异构化^[5,6]。R. D. Sauerheber (1980) 等许多人在研究内部和外界条件对序参数的影响, 以此来探索

膜的许多重要的生物功能, 力图阐明生理, 病理和药理作用等研究领域的一些重要课题。

例如, 一些人研究了胆固醇对流动双层的影响, 已观察到胆固醇在双层中的凝聚效应。将胆固醇加到水合卵磷脂多层中, 当胆固醇的浓

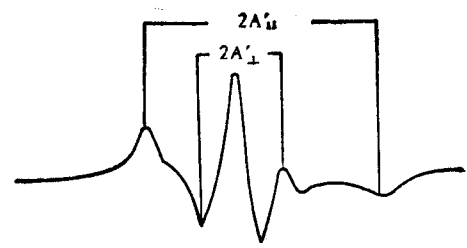


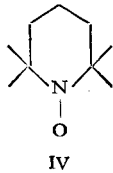
图 3 脂肪酸自旋标记在双层膜中的 ESR 波谱

* 本文所涉及的仅限于 X 波段 ESR 谱。

度由零增加到 55%， A'_1 由 9.4 高斯降低到 6.7 高斯， A'_H 由 17 高斯增加到 18.9 高斯^[7,8]。但对不同的类脂膜和不同的胆固醇，所得的结果大不相同。一般说，胆固醇有调节膜的流动性的作用。

还有人用自旋标记技术观察了各种致癌物对膜的作用。例如借助胆甾烷类自旋标记物探测一系列的芳烃致癌物的活性，发现有较小或没有致癌活性的芳烃基本上不改变磷脂分子的有序程度，而强致癌芳烃则能促使类脂双层由凝胶相向液晶相转化^[9]。

(3) 类脂链的相转变 基于各向同性的 g -值和超精细分裂 A_0 同介质的极性有关，可以用 TEMPO (2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氮氧基)



测量类脂链的相转变温度。图 4 为 TEMPO(IV) 在磷脂，二反油酸磷脂胆碱水溶液的 ESR 谱。高场线清楚地由两个成分 H 和 P 组成，信号 P 来自亲水区的 TEMPO， H 来自疏水区的 TEMPO，

令 H 和 P 分别表示两种信号的峰高，并定义 $f = \frac{H}{H + P}$ 为 TEMPO 参数，它近似等于 TEMPO 溶于疏水区的份数。以 f 对温度 T 作图(图 5)， f 值迅速增加时的温度，即为碳氢链的“溶点”。图 5 给出了几种体系的相转变曲线^[10,11]。

(4) 研究膜的横向扩散 用自旋标记方法研究磷脂双层的横向扩散是根据氮氧自由基的 ESR 谱的线形随浓度的变化。将一很浓的自旋标记“斑点”(直径约 0.2 毫米)插入双层膜体系，在不同的时间记录波谱，由线宽的变化计算横向扩散速度。有人用这种方法测得的一种磷脂在室温下的扩散系数 $D = 2 \times 10^{-8}$ 厘米² · 秒⁻¹，扩散步频为 10^7 秒⁻¹^[12]。

2. 在蛋白质和酶方面的应用

(1) 强固定化和弱固定化波谱和旋转相关时间 通常这类自旋标记的 ESR 谱有一个共同的特点，就是出现强固定化和弱固定化波谱。我们知道，氮氧基所特有的三线谱在不同的情况下是不同的。在低粘度介质中，得到间隔约 15 高斯的等强度的三条尖峰，随着介质粘度的增加，三峰间的裂距和线宽逐渐增加，最后出现固体粉末的波谱^[13]。这样我们就可以通过 ESR

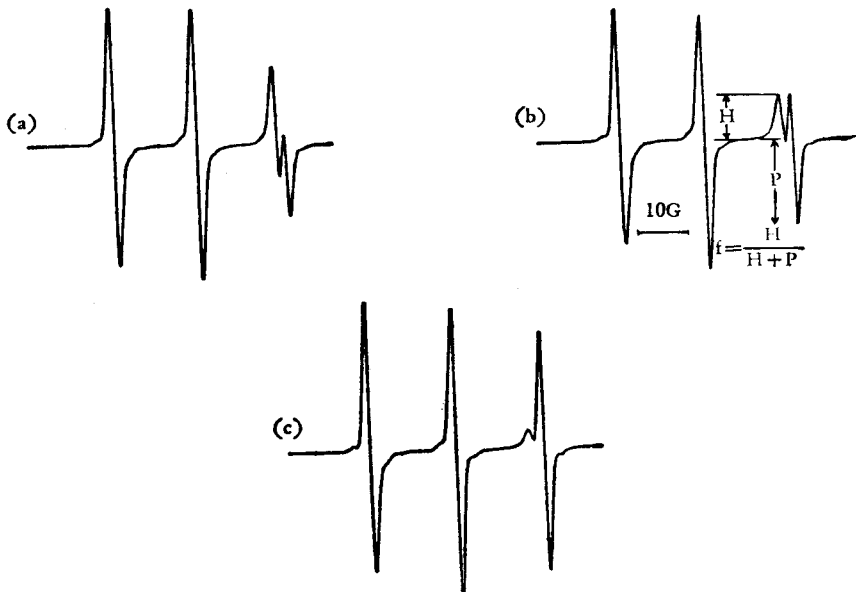


图 4 自旋标记 IV 在磷脂，二反油酸磷脂胆碱水溶液中的 ESR 谱

(a) 25.2℃，高于碳氢链的相转变温度； (b) 12.6℃，几乎等于相转变温度； (c) 9.8℃ 低于相转变温度

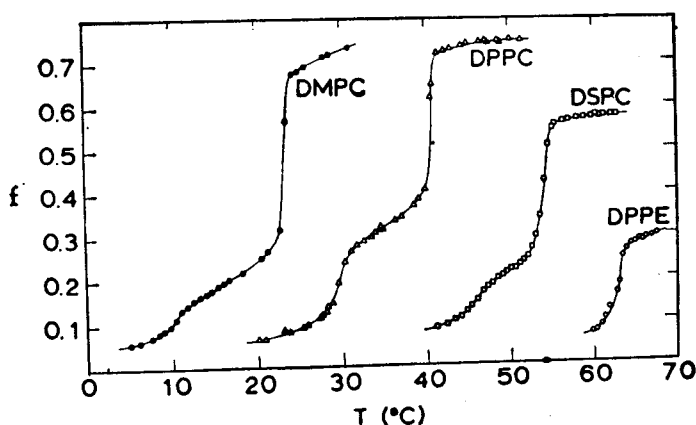


图5 TEMPO 参数 f 对温度 $T(^{\circ}\text{C})$ 作图

(●): 二肉豆蔻酰磷脂胆碱, (Δ): 二棕榈酰磷脂胆碱, ($\square$): 二硬脂酰磷脂胆碱, ($\circ$): 二棕榈酰磷脂乙醇胺。

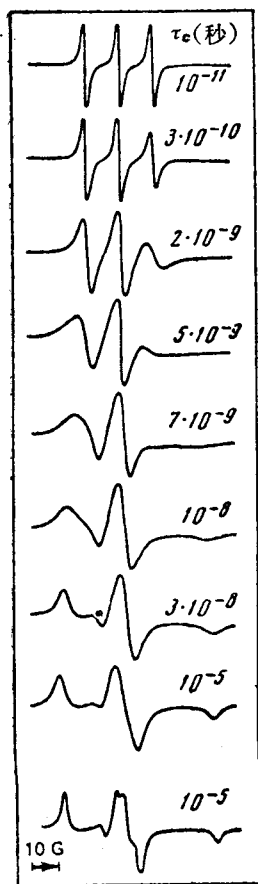


图6 氮氧自由基不同相关时间 τ_c (秒) 的 ESR 波谱

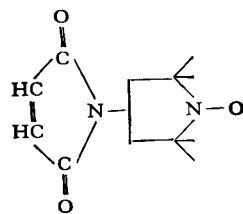
一个分子两次取向中间停顿的时间,单位为秒。图6表示不同相关时间 τ_c 所对应的 ESR 谱^[14]。习惯上, $\tau_c > 10^{-8}$ 秒的波谱称强固定化波谱,它的极限为固体粉末谱, $\tau_c < 10^{-9}$ 秒的波谱称为弱固定化波谱,其极限为低粘度稀溶液的波谱。

对于 10^{-10} 秒 $< \tau_c < 10^{-9}$ 秒的情况(大多数皆属这种情况),人们总结出用波谱参数计算 τ_c 的简便的关系式^[15,16]:

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \Delta H_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{\frac{1}{2}} - 1 \right] \text{ 秒} \quad (3)$$

式中 h_0 、 h_{-1} 分别为中央峰和高场峰的高度, ΔH_0 为中央峰的峰-峰宽度,单位为高斯。

(2) 蛋白质的结构 用得最多的是以各种特异性的自旋标记物探测蛋白质某些特殊部位的情况。例如 O. H. Griffith 和 H. M. McConnell (1966) 很早就用马来酰亚胺氮氧自由基



v

研究牛血清蛋白的结构,得到图7所示的 ESR

波谱参数的改变,观察生物体系的微观粘度和分子运动。为此定义一个重要参数,旋转相关时间(亦称相关时间) τ_c ,它可以形象地理解为

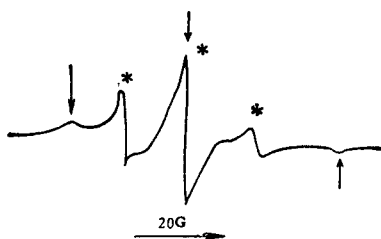
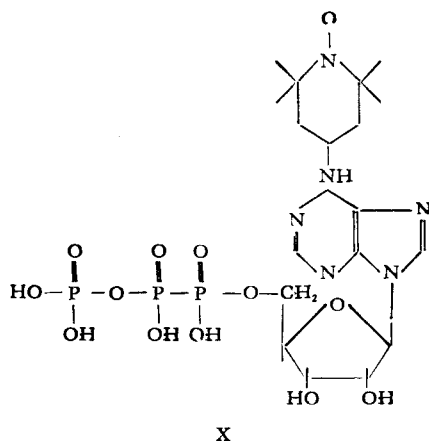
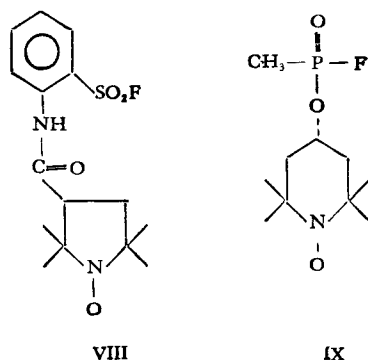
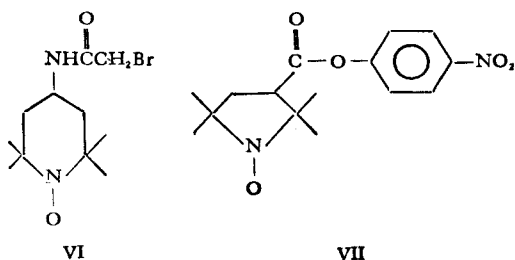


图7 自旋标记化合物V标记的牛血清蛋白的ESR谱
箭头表示强固定化波谱，星号表示弱固定化波谱。

谱。显然，图7是强、弱固定化两种波谱的叠加。标记V能与蛋白中硫氢基和氨基进行特异性结合。一部分标记在表面，其运动比较自由，产生弱固定化波谱，另一部分进入结构内部，其运动受到限制，产生强固定化波谱。实验结果表明，蛋白的结构必须是足够开放的，这样标记物才能同活性基团反应，另一方面又必须是足够关闭的，以使标记物分子固定化。

E. Sandberg (1969)及 H. Schneider (1970)等人用类似的方法分别研究了各种血清蛋白，血红蛋白以及红细胞膜蛋白的组成和结构，并探讨了在不同条件下，例如添加某种试剂或药物，蛋白质构象的改变。我国科学工作者用类似V的标记物研究了正常和癌变细胞强、弱固定化波谱的对比，发现自旋标记的癌变细胞ESR波谱弱固定化对强固定化谱峰高度的比值，与正常细胞相比明显地下降，而且只有癌变细胞对抗肿瘤药物长春新碱有特别的敏感性^[17]。

(3) 酶 要完全确定一种酶的微观结构，需要利用多种方法和技术，自旋标记方法就是其中之一。目前已合成了近百种关于酶的标记化合物。共价结合的，包括烷基化(VI)、酰基化(VII)、磺酰基化(VIII)和磷酰基化(IX)标

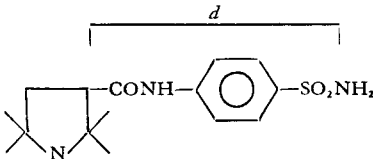
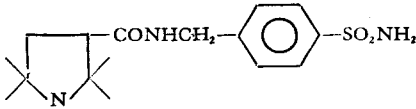
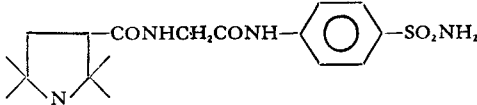
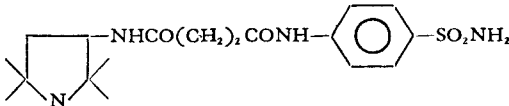
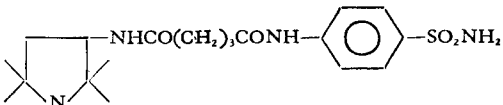


记物以及非共价结合的标记物(X)，每一种都有各自的特异性和适应性^[1]。

下面用一系列的磺胺抑止剂自旋标记(表1)研究人和哺乳动物红细胞碳酸酐酶的活性位置来说明自旋标记技术如何应用于酶的研究^[18]。

这些结合到人的碳酸酐酶 II(C) 上的自旋标记物 XI—XV 的 ESR 谱见图 8。标记物的侧链长度 d 是已知的，由波谱参数可以算出相关时间 τ_c ，图 9 画出了同人和其它哺乳动物的碳酸酐酶结合的标记物 XI—XV 的 τ_c - d 关系图。若氮氧自由基接近芳环，ESR 谱就变得高度固定化，随着距离 d 的增加，氮氧自由基的运动性亦随之增加，即 τ_c 减小。已经知道，标记物的磺胺基同活性位置锌原子配价结合，测得的这一位置深度的上限约 14 Å，这同 X-衍射测得的结果相符合。由图 9 还可看出，人的碳酸酐酶 II(C) 的活性位置是漏斗形的，这是因为运动性是随着 d 的改变慢慢变化的。有趣的是，对于

表 1 磺胺自旋标记化合物的结构

自旋标记物	结 构	$d(\text{\AA})$
XI		8.16
XII		8.88
XIII		11.28
XIV		12.72
XV		14.72

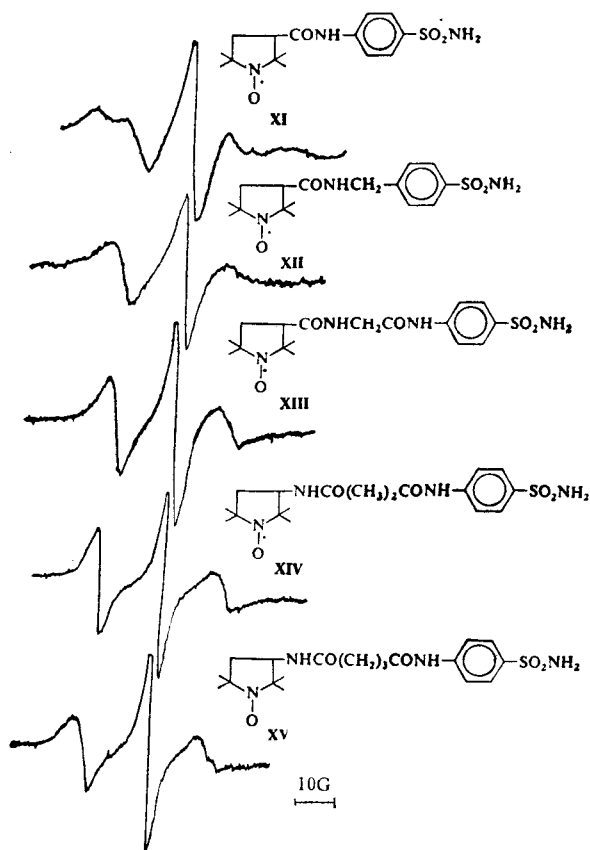


图 8 结合到人的碳酸酐酶 II(C) 上的自旋标记化合物 XI—XV 的 ESR 谱

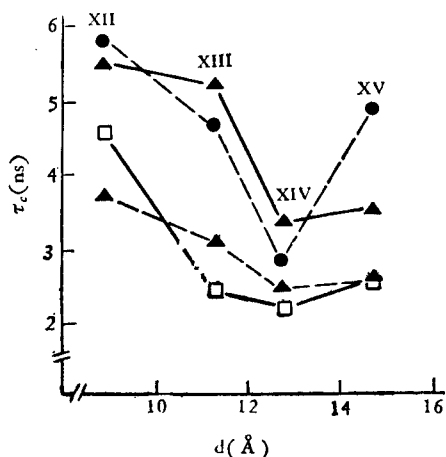
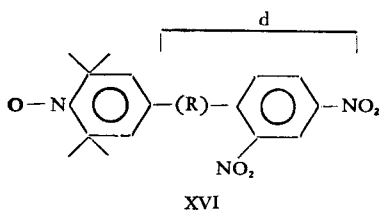


图 9 结合到人和各种哺乳动物的碳酸酐酶上的自旋标记化合物 XII—XV 的 τ_c - d 关系图

($\triangle$ — $\triangle$): 人的碳酸酐酶 I(B); ($\triangle$ ···· $\triangle$): 人的碳酸酐酶 II(C); ($\bullet$ ···· $\bullet$): 牛的碳酸酐酶 II(B); ($\square$ — $\square$): 碳酸酐酶 I, 距离 d 由表 1 确定。

牛的碳酸酐酶 II(B), 从标记物 XIV 到 XV (图 9) 的运动性有一个明显的减少, 这可能是由于酶的表面有一个附加的结合位置, 也可能是因为芳环和吡咯环之间的分子链有足够的柔性和性, 以致允许吡咯再进入活性位置。

然而, 用一系列的二硝基苯自旋标记物测

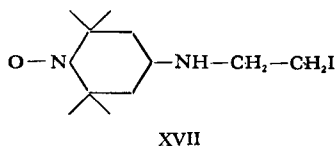


量指向 2,4-二硝基半抗原的免疫球蛋白的结合位置则是另一种样子。只有当 d 增加到 $10 \text{ \AA}$ 时, 氮氧基的运动才明显增加, 因抗体只能识别 XVI 的二硝基部分。结果表明, 结合位置深度的上限是 $10 \text{ \AA}$, 而且结合位置的形状是细长形的^[18]。

3. 核酸研究中的自旋标记方法

核酸的组成及其 1、2、3、4 级结构是比较清楚的, 但对于在复杂环境中核酸形成的各种生物聚合物, 则了解得较少。原因是由于它们的化学组成以及分子间的相互作用太复杂, 借助于其它分析手段往往难于得到满意的结果。自旋标记技术为研究复杂体系中的核酸的行为和性质提供了一个有效的方法。

自旋标记应用于核酸的关键在于合成各种特异性和非特异性的标记化合物。目前已制成了几十种适用于各种要求的自旋标记物, 并测定了它们在不同条件下(pH 值, 离子强度, 温度等)同核酸分子中的多种碱基的反应程度, 进而确定 ESR 波谱参数, 以资探测有关核酸大分子的信息。例如, Pan 等人^[19]用



考察了各种聚核苷酸的构象与温度的关系。表 2 列出了在 $0.04 \text{ M Na}^+ - 0.01 \text{ M}$ 磷酸缓冲液中自旋标记的聚 rA, 聚 rA · 聚 ru 和聚 ru, 聚 ru · 聚 rA 在 26°C 和 66°C 时的相关时间 τ_c 。 τ_c 值是由 ESR 波谱参数测得的 [式(3)]。图 10 为聚 rA 和聚 rA · 聚 ru 的阿伦尼乌斯图。可以看到, 对于单股的聚 rA 在整个温度范围内为一直线, 而对标记的双股螺旋聚 rA · 聚 ru 则表现为一折线。当温度逐渐升高, 标记物的转动

表 2 在 $0.04 \text{ M Na}^+ - 0.01 \text{ M}$ 磷酸缓冲液中, 自旋熔融的结果 pH 7.0

	$\tau_c \times 10^{10}$ 秒		E 千卡/ 克分子	T_m° $^\circ\text{C}$
	26°C	66°C		
标记的聚 rA	10.4 ± 0.4	1.5 ± 0.2	8.3 ± 0.5	47.5
标记的聚 rA · 聚 ru	14.6 ± 0.4	2.2 ± 0.2	$6.3^a \pm 0.5$	
标记的聚 ru	5.4 ± 0.4	1.8 ± 0.2	$8.3^b \pm 0.5$	47.5
标记的聚 ru · 聚 rA	17.5 ± 0.4	1.6 ± 0.2	$6.5^a \pm 0.5$	
			$6.5^b \pm 0.5$	

a: T_m° 以前, b: T_m° 以后。

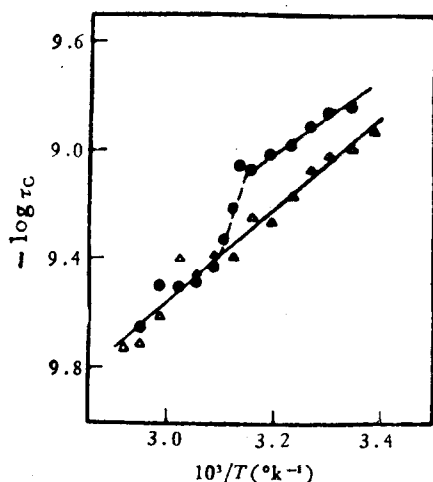


图 10 $-\log \tau_c$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图

(●—●): 自旋标记的聚 rA、聚 ru;
(△—△): 自旋标记的聚 rA

速度增加, 在 45°C 左右有一个明显的跳跃, 接着又呈一直线, 且与聚 rA 的重合。两线段不连续的中点所对应的温度称为自旋变性温度 T_m° (表 2), 利用关系

$$\tau_c = \tau_0 e^{\frac{E}{RT}} \quad (4)$$

容易算出相应的活化能 E 。式中 R 为气体常数, T 为绝对温度, τ_0 为外推至无限稀释时的 τ_c 值。在到达 T_m° 以前, 活化能 E 为 6.3 千卡/克分子, T_m° 以后为 8.3 千卡/克分子 (表 2)。而对于聚 ru 和聚 ru · 聚 rA 的阿伦尼乌斯图与图 10 有某些明显的不同, 借此可以比较这几种聚核苷的不同特征。例如碱基的堆集情况, 双股

螺旋的运动状态等。这个方法称为自旋熔融法。显然此法的最大特点就是能给出一个由双股向单股转化的清晰图象。用自旋熔融法测得的 T_m^p 和在相同的条件下用吸收曲线测得的变性温度 T_m^{op} 相符合。其后, W. J. Caspary (1976) 等除研究了聚核苷的变性温度以外, 还考察了核酸结构的各向异性和温度以及自旋标记运动性和介质粘度的关系。

另外, 不少作者还成功地利用自旋标记技术研究了 DNA 的结构, 核酸同多肽和蛋白质的相互作用等^[18]。

参 考 文 献

- [1] Berliner, L. J. et al.: *Spin Labeling*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1976.
- [2] Griffith, O. H. et al.: *J. Membrane Biol.*, **15**, 159, 1974.
- [3] Jost, P.: *J. Mol. Biol.*, **59**, 77, 1971.
- [4] Muccillo, S. S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 297, 1973.
- [5] Hubbell, W. L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**,

314, 1971.

- [6] McFarland, B. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1274, 1971.
- [7] Lapper, R. D. et al.: *Can. J. Biochem.*, **50**, 969, 1972.
- [8] Schreier-Muccillo, S. et al.: *Chem. Phys. Lipids*, **10**, 11, 1973.
- [9] Sanioto, D. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 530, 1975.
- [10] Wu, S. H. W. et al.: *Biochem.* **14**, 874, 1974.
- [11] Shimshick, E. J. et al.: *Biochem.* **12**, 2531, 1973.
- [12] Devaux, P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4475, 1972.
- [13] 裘祖文, «电子自旋共振波谱», 科学出版社, 1980年。
- [14] Likhtenshtein, G. I.: *Spin Labeling Methods in Molecular Biology* (From Russian), John Wiley, New York, 1976.
- [15] Knowles, P. F. et al.: *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley, London, 1976.
- [16] Bartosz, G. et al.: *Blut* **41**, 131, 1980.
- [17] 析文娟等, «科学通报», 1981年, 第23期。
- [18] Berliner, L. J. ed.; *Spin Labeling II*, Academic Press, New York 1979.
- [19] Pan, Y. C. E. et al.: *Biopolymers*, **12**, 367, 1973.

[本文于1980年12月2日收到]

选择性自由基及其在酶失活机制研究中的应用

聂 玉 生

(中国科学院生物物理研究所)

六十年代初, E. J. Hart 等独立利用脉冲辐射离解技术 (Pulse Radiolysis) 直接观测到水化电子 e_{aq}^- 吸收光谱之后, 这一领域立即受到极大重视, 大量文章报道在极性和非极性溶液方面的基础研究。利用水溶液辐射原初过程中产生的选择性自由基 (Selected free radical) 鉴别氨基酸残基在酶活性中的作用就是其中之一。G. E. Adams, R. B. Cundall, J. L. Redpath, R. L. Willson 和 R. H. Bisby 等人在这方面做了许多工作。

水化电子 e_{aq}^- 、羟自由基 $OH^\cdot$ 和氢原子 $H^\cdot$ 是水辐射过程中产生的三种主要自由基。但它们与氨基酸的反应缺乏专一性, 能与酶结构中

的大多数氨基酸反应^[1,2,3], 不宜于进行酶失活机制的研究。后来, Adams 等人发现, 有一类阴离子自由基, 它们只与几种氨基酸反应, 且反应速率随 pH 不同而改变。我们称这类自由基为选择性自由基。在探讨酶的失活机制, 鉴别与酶的活性有密切关系的氨基酸残基的研究中, 它们所起的作用犹如一个“探针”, 所以人们又把这类自由基称作“阴离子探针”。

一、选择性自由基的产生

在早期溶菌酶的辐射研究中, Adams 等人发现, 溶菌酶主要受到 $OH^\cdot$ 自由基的攻击而失活^[4]。但后来 Adams 又发现, 在有足够的 $OH^\cdot$