

饱和转移电子顺磁共振实验方法的研究

卢景雾 王金凤 张斌贤

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

生物大分子慢运动的旋转相关时间 τ_c 长达 10^{-7} — 10^{-3} 秒。在这个运动范畴, 常规的自旋标记电子顺磁共振 (SL-EPR) 方法检测的灵敏度是极低的。1972 年 Hyde 及其同事提出饱和转移电子顺磁共振技术 (ST-EPR)。1976 年 Thomas 等又成功地应用于生物大分子和超分子混合物动力学过程的研究, 获得很慢运动的信息。

我们以马来酰亚胺自旋标记的人血红蛋白样品为材料, 研究了 ST-EPR 的实验方法。其中包括样品的制备, 标记技术, 波谱测量要点和波谱参数的计算方法。讨论了三组波谱参数 L''/L , C'/C 和 H''/H 与实验条件的关系。并应用 ST-EPR 方法研究 H^+ -ATP 酶在脂酶体中的慢运动。

与常规 EPR 实验不同, ST-EPR 记录的是二次谐波异相吸收信号。这种检测方式对很慢运动速率的变化是灵敏的。但它检测的灵敏度毕竟比常规 EPR 低得多, 除了要求提高样品的标记浓度外, 还要求仪器有更高的稳定性。仪器参数的选择和正确的操作更重要; 特别要注意参考相位的调整。研究表明自零法 (self-null) 可以较准确地调整仪器在异相检测状态。以避免记录异相和同相的混合信号, 因为后者对慢运动是不灵敏的。

实验条件如微波功率, 温度和粘度等明显地影响 ST-EPR 波谱。实验证实对上述样品使用的微波功率在 40—60mW 时, 给出灵敏的

ST-EPR 波谱。在 MSL-Hb 体系渗入甘油, 当甘油含量从 0% 增加至 90%, 对应的 τ_c 从 10^{-7} 秒减慢到 10^{-3} 秒。对甘油含量为 90% 的 MSL-Hb 样品, 调节温度从 16°C 至 -15°C , 对应的 τ_c 从 8×10^{-6} 秒慢至 3×10^{-4} 秒。实验显示了 ST-EPR 技术对于 $10^{-7} < \tau_c < 10^{-3}$ 秒的很慢运动有很好的检测能力。同时样品尺寸和样品在腔中的位置影响 ST-EPR 波谱的形态, 从而影响 τ_c 值。因为微波场和调制场沿腔中心轴线上的分布是不均匀的。实验要求用尽量小的“点”样品, 在灵敏度达不到的情况下, 在比对性的实验中要求各样品的尺寸和放置位置严格一致。

生物膜中, 膜蛋白在膜脂中的旋转相关时间约为 10^{-5} — 10^{-6} 秒, 非常适合用 ST-EPR 技术研究它的慢运动。本文用 ST-EPR 方法研究了猪心线粒体 H^+ -ATP 酶嵌入脂质体重组体系中, Mg^{2+} 对酶蛋白运动的影响。并按 Horvath 等人提出的修正了的 L''/L , C'/C 和 H''/H 对 τ_c 的关系曲线, 计算 τ_c 值。结果表明: Mg^{2+} 浓度 0—20mM/L 时, 随 Mg^{2+} 浓度增加导致 H^+ -ATP 酶运动变慢。1mM/L Mg^{2+} 浓度约可使 τ_c 增加 10 μ s。在温度实验和脂序参数随 Mg^{2+} 浓度变化的实验中, 看到类似的结果。从而说明 Mg^{2+} 的作用在于改变膜脂的物理特性, 进而减慢 H^+ -ATP 酶在脂酶体中的慢运动。

[本文于 1986 年 12 月 30 日收到]