

稀土荧光探针在生物大分子研究中的应用

杨斌盛 杨 频

(山西大学分子科学研究所,太原)

提 要

钙(II)、镁(II)离子是生物体内最重要的闭壳层无机阳离子。引入具有适当光性质的、与钙(II)等离子成键性质相近的铽(III)或镱(III),利用荧光光谱技术,是研究一些与钙(II)有关的生物大分子在水溶液中构象的一条有效途径。本文综述了稀土荧光探针技术的研究进展。

一、引 言

自荧光光谱发展起来后,被广泛地应用于研究生物分子结构。若生物分子自身是发荧光的,可使用内源荧光性质得到一些结构信息,但有时仅使用内源荧光是不够的,需要引入一荧光分子或离子,即通过外源荧光性质的研究获得更多的结构信息。若引入的荧光分子为有机分子,则该分子叫做有机荧光探针[如1-苯胺基-8-磺酸盐(ANS)等],关于有机荧光探针的设计、使用已取得很大的进展^[1]。然而,到目前为止在生物大分子结构(酶活性部位、金属结合蛋白的结合部位等)研究中使用金属离子荧光的甚少,其原因是在生物大分子保持其结构和功能中所包含的必需或重要的已知金属离子中,没有一个能具有荧光[如必需元素钙(II)、镁(II)、锌(II)等]。在许多情况下,当金属离子与生物大分子结合且靠近其荧光发色团时,金属离子都是起了一个对生物分子自身荧光的淬灭作用,几乎所有的过渡金属离子以及它们的络合物都是这样。稀土离子铽(III)和镱(III)恰完全不同,这两种离子在水溶液中都是发荧光的,与一些络合剂及生物大分子结合后仍保留它们的荧光。这是稀土离子铽(III)、镱(III)用作荧光探针的原因之一。

二、铽(III)和镱(III)的一些物理化学性质

铽(III)和镱(III)是在4f轨道填充有不同数目电子的稀土离子,它们的电子组态分别为 $4f^8$ 和 $4f^{14}$,表1给出了两种稀土离子氯化物的一些能级和相应的多重度^[2]。由表中数据可以看出,对于铽(III)的水溶液,当激发波长选择在 $\bar{\nu}$ 大于 20400cm^{-1} 时,所有的发射基本上都

表1 铽(III)和镱(III)的一些能级和相应的多重度

铽(III) ($4f^8$)		镱(III) ($4f^{14}$)	
谱 项	能级 (cm^{-1})	谱 项	能级 (cm^{-1})
$^3\text{D}_4$	20453.9	$^1\text{D}_0$	17267.35
$^3\text{F}_0$	5700.93	$^3\text{F}_6$	4978
$^3\text{F}_1$	5471.90	$^3\text{F}_5$	3909.0
$^3\text{F}_2$	5024.24	$^3\text{F}_4$	2877.2
$^3\text{F}_3$	4348.27	$^3\text{F}_3$	1882.0
$^3\text{F}_4$	3355.63	$^3\text{F}_2$	1044.8
$^3\text{F}_5$	2103.79	$^3\text{F}_1$	380.16
$^3\text{F}_6$	85	$^3\text{F}_0$	0

是由 $^3\text{D}_4$ 发出的,在高灵敏度的仪器上所有的 $^3\text{D}_4 \rightarrow ^3\text{F}_J$ ($J = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$) 跃迁都能被观察到,一般仪器可观察到 $^3\text{D}_4 \rightarrow ^3\text{F}_6, ^3\text{F}_5, ^3\text{F}_4, ^3\text{F}_3$ 四个跃迁峰,其中出现在545nm附近的 $^3\text{D}_4 \rightarrow ^3\text{F}_5$ 跃迁强度最大。有时铽(III)与

生物大分子的结合,由于配位场所引起的 ${}^3D_4 \rightarrow {}^7F_1$ 跃迁几率的变化会改变 ${}^3D_4 \rightarrow {}^7F_1$ 的跃迁强度和谱带结构,其中 ${}^3D_4 \rightarrow {}^7F_6$ 和 7F_4 的跃迁对配位环境最为敏感。对于铈(III)的水溶液,当激发波长选择在 λ 大于 17300 cm^{-1} 时,所有的发射基本上都是由非简并的 3D_0 发出的,其中最强的发射是 ${}^3D_0 \rightarrow {}^7F_1$ 和 7F_2 ,这两个跃迁峰的相对强度对配位环境是极为敏感的,这主要反映了 ${}^3D_0 \rightarrow {}^7F_2$ 跃迁(电偶极跃迁)的超灵敏性,即使在低对称体系中, ${}^3D_0 \rightarrow {}^7F_1$ 跃迁(磁偶极跃迁)仍保留它的磁偶极性,跃迁几率受配体的影响几乎为零。

在整个镧系系列中,稀土离子的配位化学性质虽然呈现出一些变化,但是这一变化与过渡系列的变化相比较是相当小的^[2]。由于4f电子处于原子结构的内层,受到外层电子的屏蔽,4f轨道几乎不参与或较少参与化学键的形成,络合物的键型主要是离子型的,稀土离子与配位原子是以静电引力相结合。由于稀土离子有较大的体积,从配位体的空间要求来看,络合物将会有高的配位数,在成键方向上选择性也较差,所以络合物中配体的几何排布将主要取决于空间要求。从金属离子的酸碱性分类出发,稀土离子属于硬酸类,它们与属于硬碱的配位原子如氧、氮有较强的结合能力,而与属于软碱的配位原子如硫、磷等的结合能力较弱。

在生物体内最为重要的金属离子钙(II)、镁(II)等,由于它们具有闭壳层的电子结构,没有适当的光、磁性质,使得对它们的研究受到了一定的限制。然而,它们的一些物理化学性质与具有开壳层4f电子结构的稀土离子是极为相近的,如同属于硬酸类、离子半径相近、与配体作用时均以静电作用为主、成键方向选择性较差等,这就使得人们可使用稀土离子替换钙(II)离子等,通过监测稀土探针离子的光谱变化得到与钙(II)等离子有关的生物大分子结构信息。这是铽(III)、铈(III)使用为荧光探针的原因之一。目前,使用稀土荧光探针进行的研究主要有:①在不均匀体系中结构类型分布的研究;②在特定物理化学条件下具体平衡

结构的研究;③一些小分子及金属离子与生物大分子结合的研究等。

三、利用稀土荧光探针研究活性部位微环境

作为一个好的稀土荧光探针应满足:①探针离子对原有金属的同型置换,这种置换不会导致生物分子结构发生大的变化,置换后能保留或部分保留原有生物功能;②能够发生无辐射能量转移,即能量给予体在没有能量接受体存在时是发荧光的,能量给予体的荧光光谱必须与能量接受体的吸收光谱有重叠,能量给予体-接受体间的距离处在一定的范围之内。在满足这些条件的基础上可进行:

1. 在不均匀体系中结构类型分布的研究

铽(III)与生物大分子(蛋白质、核酸)结合后,一般可以由Förster型偶极-偶极无辐射能量转移导致铽(III)荧光的敏化(如图1所示)。Brittain等^[3]将36种与钙(II)有关的蛋白质中的钙(II)用铽(III)替换后测定其荧光光谱,其中有32种蛋白质使铽(III)的 ${}^3D_4 \rightarrow {}^7F_J$ ($J = 6, 5, 4, 3$)荧光敏化,而只有4种蛋白质(β -淀粉酶、卵黄高磷蛋白、凝血酶、 α -酪蛋白)对铽(III)荧光没有加强效应。按照Förster型偶极-偶极无辐射能量转移机理,结合在不同蛋白质上的铽(III)、结合在同

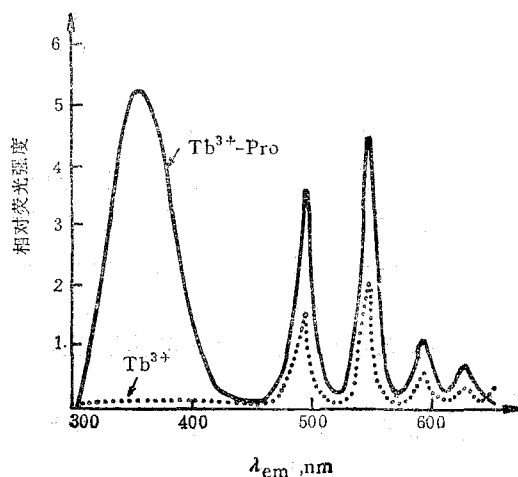


图1 铽(III)荧光敏化示意图

一蛋白质上不同结合部位的铽(III)将会导致不同程度的铽(III)荧光敏化。正是这一特点使得我们可利用稀土荧光探针研究生物大分子金属离子结合部位的结构类型。若通过稀土探针溶液滴定金属结合蛋白(或酶原)给出如图2所示的荧光滴定曲线,图2a为色氨酸或酪氨酸残基敏化的铽(III) $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ 跃迁(545nm附近)随着生物大分子结合铽(III)的变化而作图所给出的三种可能荧光滴定曲线;图2b为结合在生物大分子上的铕(III)的 $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$ 跃迁(579 nm附近)随着铕(III)与生物大分子浓度比的变化作图所给出的三种可能滴定曲

线。由图中滴定曲线的形状就可判断生物大分子的金属离子结合部位数、结合部位是否等同、强弱结合部位与芳香族氨基酸残基的相对远近等。例如 Horrock 等^[4,5]用铕(III)、铽(III)为探针,研究了钙调蛋白(Calmodulin)、小白蛋白的钙(II)结合部位。类似的工作有, α -淀粉酶、小牛 S-100 蛋白、胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶钙(II)结合类型的研究^[3,6]。Canada^[7]使用铽(III)为荧光探针研究了与钙(II)有关的顺铂与 GH 3/B6 垂体肿瘤细胞的结合。关于这方面的研究工作是离子探针技术应用最广泛的一个方面,尤其是使用铽(III)为探针时在商品

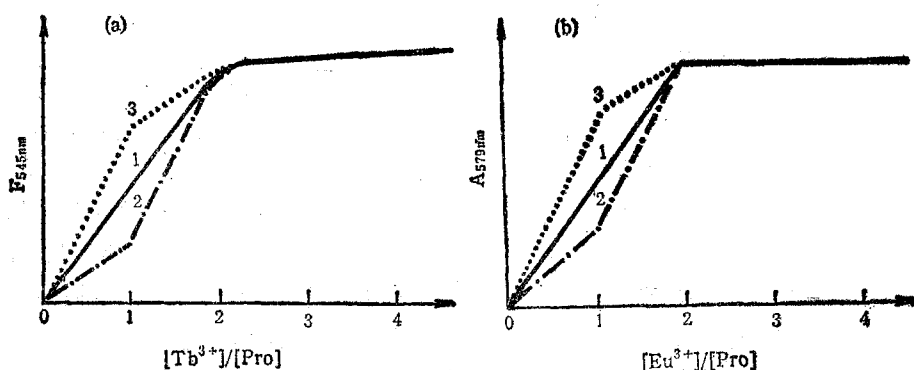


图2 荧光探针滴定生物大分子的滴定曲线

(a) 铽(III) $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ 荧光强度随着加入铽(III)的三种可能变化;
(b) 铕(III) $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$ 激发峰强随着加入铕(III)的三种可能变化

化的荧光光谱仪上即可进行测定。

根据配位场理论,当金属离子配位环境的对称性及性质发生变化时,金属离子的一些谱项发生分裂,测定圆偏振荧光可确定生物大分子中金属离子结合部位的不对称性^[8]。对于直接配位在已结合于生物大分子上的铽(III)或铕(III)中的水分子数的确定,可通过激光诱导的荧光寿命测定来进行^[9]。有时荧光敏化随pH值(若pH值变化不引起大的生物分子构象变化)的变化能给出金属离子配位基团的信息。

2. 在特定物理化学条件下具体平衡结构的研究

这方面的工作主要是关于蛋白质荧光发色团和探针离子[铽(III)或铕(III)]之间距离的测定。根据 Förster 型偶极-偶极无辐射能

量转移机理^[1],能量给予体和能量接受体间的距离 r 与能量转移效率为 50% 所对应的临界能量转移距离 R_0 、能量转移效率 E 间有如下关系:

$$r = R_0 \cdot (E^{-1} - 1)^{1/6} \quad (1)$$

其中

$$R_0^6 = 8.78 \times 10^{-25} K^2 \phi n^{-4} J (\text{cm})^6 \quad (2)$$

K^2 为取向因子,实验中难以测定, Eisinger^[10]估计 K^2 的数值在 1/3—3/4 之间的机率为 60%,一般都以 K^2 的平均值 2/3 进行计算,这是由于 K^2 的数值反映在 R_0 上有六次方根的关系,因此 K^2 的取值不同不致产生大的误差; ϕ 为没有能量接受体时能量给予体的量子产率; n 为介质的折射指数; J 为光谱重迭积分,且有:

$$J = \int F(\nu) \varepsilon(\nu) \nu^{-4} d\nu / \int F(\nu) d\nu \quad (3)$$

$F(\nu)$ 为能量给予体的荧光强度, $\varepsilon(\nu)$ 为能量接受体的摩尔消光系数, 单位是 $(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, r 是波数, 单位是 cm^{-1} 。

由临界能量转移距离 R_0 和实验测得的能量转移效率 E , 可利用 (1) 式确定能量给予体和接受体间的真实距离 r 。如小白蛋白^[12]、嗜热菌蛋白酶^[13]中色氨酸残基与键合铽 (III) 间距离的测定, 嗜热菌蛋白酶中两类钙 (II) 结合部位所结合的铽 (III)、钴 (II) 间距离的测定^[12], 钙调蛋白中两类钙 (II) 结合部位所结合的铈 (III)、铈 (III) 间距离的测定^[4]。使用稀土荧光探针技术所测得水溶液中生物大分子能量给予体-接受体间距离一般都能与 X-射线衍射结果相吻合。

四、金属离子与生物大分子结合的研究

稀土荧光探针还可测定金属离子与不含金属离子的蛋白质分子(或酶中非活性部位等)的结合, 在这类应用中通常可根据 Scatchard 作图方法得到生物大分子的金属离子结合位置数和结合常数。根据离子间的竞争, 还可测定其它非荧光离子与生物大分子的结合性质。如使用铈 (III) 为探针, 向已知的生物大分子-铈 (III) 水溶液中逐渐加入其它稀土离子, 监测生物大分子-铈 (III) 络合物中铈的 ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ 激发峰变化, 该峰强度的减小正比于络合物中被其它离子所置换出的铈 (III), 据此可测定生物大分子与其它离子的相对结合常数。从化学平衡过程来看, 若生物大分子具有一个或一个以上等同的、相互独立的稀土离子结合部位时, 由此得到的结合常数是可靠的, Epstein 等^[13]关于猪胰蛋白酶的研究就是一个好的例证。若生物大分子具有两个或两个以上不等价的稀土离子结合部位时, 由此只能得到一个近似的估计结果。如 Breen 等^[14]进行的各种稀土离子在小白蛋白中钙结合部位的结合以及关于钙调蛋白的类似研究^[4]。由所给出的稀土离子在钙调蛋白钙(II)结合部位结合的相对结合常数可

看出, 所有稀土离子中铈 (III) 的结合最为牢固, 这与铈 (III) 的离子半径最接近钙 (II) 的离子半径的事实是相吻合的。

除此以外, 使用铽 (III) 络合物还可研究一些小分子与生物大分子的结合。如 H^+ -ATPase 活性部位的研究^[15], 博莱霉素 A_2 与 DNA 作用机理的研究^[16]。

五、生物大分子构象的研究

常用于研究生物大分子构象的紫外差分光谱法可获得生物大分子中有关芳香族氨基酸残基微环境变化的信息^[17], 与之类似, 荧光光谱法研究生物大分子水溶液中的构象, 一条途径是测定生物大分子自身荧光基团的荧光^[18]; 另一条途径是测定引入生物大分子特定部位的有机荧光探针的荧光^[19]。稀土荧光探针的使用将为生物大分子构象的研究开辟一条新的途径。

在水溶液中自由铽 (III) [或铈 (III)] 的 ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_1$ (${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$) 电子跃迁是一宇称禁阻的 $4f-4f$ 跃迁, 其振子强度很小, 因此对应的荧光强度很弱, 但是, 若在生物大分子结合部位的邻近有芳香族氨基酸残基存在时, 铽 (III) [或铈 (III)] 的荧光比自由离子时显著增强(荧光敏化), 生物大分子键合铽 (III) 荧光敏化的大小与单位时间内从能量给予体到受体的一个能量量子的转移机率有关。由 Förster 理论^[2]知, 能量转移机率不仅与能量给予体的量子产率、光谱重迭积分成正比, 而且与取向因子成正比, 与能量给予体-接受体间距离的六次方成反比, 因此铽 (III) [或铈 (III)] 荧光敏化的测定可给出与生物大分子构象有关的信息。若底物与生物大分子结合只改变生物大分子的构象, 并不影响铽 (III) [或铈 (III)] 在生物大分子中的结合部位, 则可通过对比生物大分子与底物结合前后能量给予体-接受体间距离来观察构象变化, 如对比人血清白蛋白结合苯甲二氮草前后 214 位色氨酸残基与键合铽 (III) 间的距离。

铽 (III) [或铈 (III)] 荧光寿命的测定也能给出一些生物大分子构象、构象动力学信息。

高温(室温)时,在铽(III)[或铕(III)]离子激发态寿命期间,生物大分子经过了许多构象亚态变化,尽管该离子所处的环境是不均匀的,但由于晶体场的时间有效平均,所测出的铽(III)[或铕(III)]荧光寿命只有一个值。在低温(如液氮温度)时,由于生物大分子已被冻结,结合在不同构象生物大分子上的铽(III)[或铕(III)]处于不同的晶体场,这时构象弛豫时间大于铽(III)[或铕(III)]的荧光寿命,所测出的铽(III)[或铕(III)]荧光发射寿命与生物大分子的构象分布一样呈几率分布。Austin等^[20]使用铽(III)为探针研究了钙调蛋白的构象动力学。

六、结 束 语

稀土荧光探针技术是研究溶液中生物大分子的一种强有力的手段,尤其是作为钙(II)等离子的替换物可获得许多有关生物大分子中钙(II)结合部位的信息。Eisinger^[1]曾经在能量转移已成为科学的五十周年就预言,这一技术“可能会重新引起人们对能量转移的应用发生兴趣。假若能证明这种方法确实是有用的话,那么能量转移将会提供一种实验技术,补偿X-射线只能对晶体研究之不足,从而扩大到可对溶液中生物大分子进行研究”。由近年来的研

究结果可看出,对一些距离的测定结果与X-射线衍射结果相吻合。

参 考 文 献

- [1] 程极济:《蛋白质及核酸的激发态与能量转移译文集》,第一版,科学出版社,北京,1981,79—103页。
- [2] 张若桦:《稀土元素化学》,第一版,天津科学技术出版社,天津,1987,45—52页;191—201页。
- [3] Brittain, H. G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 8255.
- [4] Mulqueen, P. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 6639.
- [5] Horrocks, W. D. Jr. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2856.
- [6] De Jersey, J. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, 1980, 205, 536.
- [7] Cannada, R. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 887, 29.
- [8] Gafni, A. et al.: *Biochemistry*, 1974, 13, 800.
- [9] Horrock, W. D. Jr. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 334.
- [10] Dale, R. E. et al.: *Biophys. J.*, 1979, 26, 161.
- [11] Horrock, W. D. Jr. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 100, 111.
- [12] Horrock, W. D. Jr. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 4764.
- [13] Epstein, M. et al.: *Biochemistry*, 1974, 13, 1777.
- [14] Breen, P. T. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 4991.
- [15] Ronjat, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(7), 3146.
- [16] Wensel, T. G. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 3060.
- [17] Mani, R. S. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 244, 559.
- [18] O'Neil, J. D. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 243, 611.
- [19] Chiba, K. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26, 711.
- [20] Austin, R. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1541.

[本文于1988年3月29日收到]

(上接第353页)

- [8] Ferguson, B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3652.
- [9] Schmitz, M. et al.: *Virology*, 1986, 148, 23.
- [10] Wang, T. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 2597.
- [11] Hunter, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 4843.
- [12] Wang, T. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 8505.
- [13] Dennis, F. M. et al.: *FEBS Letters*, 1985, 190, 11.
- [14] Young, J. C. et al.: *J. Virol.*, 1984, 52, 913.
- [15] Ghosh, D. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1654.
- [16] Kamps, M. P. et al.: *Nature*, 1984, 310, 589.
- [17] Braun, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 2504.

- [18] Tetsu, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 5592.
- [19] Habib, M. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 2804.
- [20] 陈燕:《生物化学与生物物理进展》,1987,(5),17.
- [21] Dionisio, M. Z. et al.: *Nature*, 1986, 319, 743.
- [22] Ranachandran, J. et al.: *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1987, 8(1), 28.
- [23] Kasuga, M. et al.: *Jikkoku. Igaku*, 1986, 4(9), 785.
- [24] Sngimoto, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2117.

[本文于1988年4月1日收到]