

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。

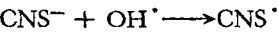
水化电子 e_{aq}^- 、羟自由基 $OH^\cdot$ 和氢原子 H 是水辐射过程中产生的三种主要自由基。但它们与氨基酸的反应缺乏专一性, 能与酶结构中

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”。

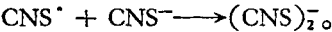
一、选择性自由基的产生

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 $OH^\cdot$

净化剂硫氰酸离子 CNS^- 存在的情况下, 溶菌酶仍然失活。通过脉冲辐射离解的研究证明溶菌酶的失活是辐射过程中产生的阴离子自由基 $(\text{CNS})_2^-$ 引起的^[5]。 $(\text{CNS})_2^-$ 产生过程是: 水溶液受照射时产生的 $\text{OH}^\cdot$ 迅速使硫氰酸离子 CNS^- 氧化成硫氰酸自由基 $\text{CNS}^\cdot$:

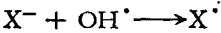


产生的 $\text{CNS}^\cdot$ 马上与另一个 CNS^- 复合, 生成硫氰酸阴离子自由基 $(\text{CNS})_2^-$:

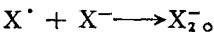


更广泛的研究发现, 在脉冲辐射离解实验中, 照射卤化物水溶液, 也发生类似过程^[5]:

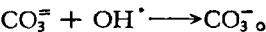
照射时产生的 $\text{OH}^\cdot$ 立即使卤素离子 X^- 氧化成卤素原子自由基:



卤原子自由基 $\text{X}^\cdot$ 又迅速与相应的卤离子 X^- 复合, 形成相应的卤素阴离子自由基:



此外, 碳酸离子 CO_3^{2-} 被 $\text{OH}^\cdot$ 氧化直接变成碳酸离子自由基^[5]



二、选择性自由基的特性

1. 选择性自由基 X_2^- 、 $(\text{CNS})_2^-$ 和 $\text{CO}_3^{\cdot-}$ 等在紫外或可见光部分有明显的光吸收。 Cl_2^- ^[6]、 Br_2^- ^[7]、 I_2^- ^[8]、 $(\text{CNS})_2^-$ ^[9] 和 $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ^[10] 的最大吸收峰分别为 350、360、385、480 和 600 毫微米。

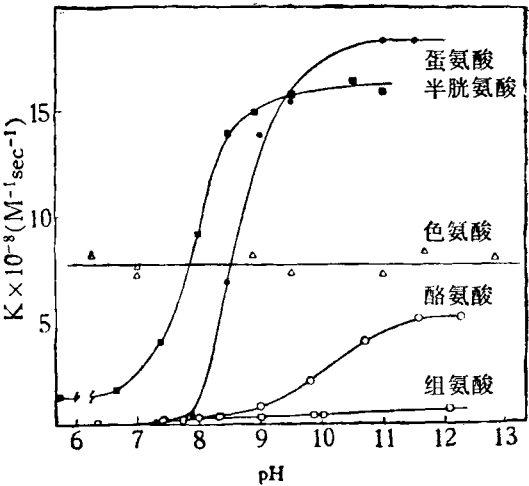


图 1 pH 对 Br_2^- 与氨基酸双分子反应速率常数的影响。 KBr , 0.1M ^[5]

利用选择性自由基的这光谱特性可以测定它们的动力学过程。

2. 在选择性自由基与各种氨基酸的反应中, 只有色氨酸、酪氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸等六种氨基酸的反应能力较强, 其余十几种氨基酸的反应速率常数均低于可准确测量的下限 ($10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)。从表 1 列出的各选择性自由基与六种氨基酸反应速率常数^[5]中可以看出选择性自由基的反应性与它们的氧化能力是一致的, 它们与色氨酸或酪氨酸的反应性为 $\text{Cl}_2^- > \text{Br}_2^- > \text{I}_2^-$ 。

3. 选择性自由基与氨基酸的反应性与溶液的 pH 值有密切关系。从图 1 可以看出, 除色

表 1 选择性自由基与氨基酸的反应速率常数

阴离子自由基	色氨酸	酪氨酸	组氨酸	苯丙氨酸	半胱氨酸	蛋氨酸
Br_2^-	77	2.0 pH7.5	1.5 pH7.6	<0.1	18 pH6.6	1.1 pH7.3
$(\text{CNS})_2^-$	27	0.5	<0.1	<0.1	5 pH6.6	0.2
I_2^-	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	11 pH6.8	<0.1
$\text{CO}_3^{\cdot-}$ pH = 11.2 ± 0.3	44	29	0.7	<0.1	27	12
Cl_2^- pH = 1.8 ± 0.2	260	27	1.4	0.6	85	0.7

温度 22°C ; 表中未标明的 pH 均为 7.0 ± 0.2 , 除 I^- ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) 外, 其余无机盐浓度均为 10^{-4}M 。速率常数单位 $1.0 \pm 0.1 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 。

氨酸外,所有选择性自由基与氨基酸的反应性均随 pH 升高而增强。这是因为 pH 升高时氨基酸的去质子化程度加强,从而更容易被选择性自由基氧化。

利用这种 pH 效应,我们可以把溶液调到适当的 pH 值,使自由基专一攻击某种氨基酸。这是研究酶失活机理的一种常用的方法。

4. 选择性自由基和氨基酸的反应性与氨基酸本身的酸碱特性有关。从表 1 看出,不同氨基酸与选择性自由基的反应性是不同的,对同一种自由基来说,氨基酸与它们的反应能力为色氨酸>酪氨酸>组氨酸>苯丙氨酸。这与这些氨基酸的 pK 值由高到低的顺序大致相符。

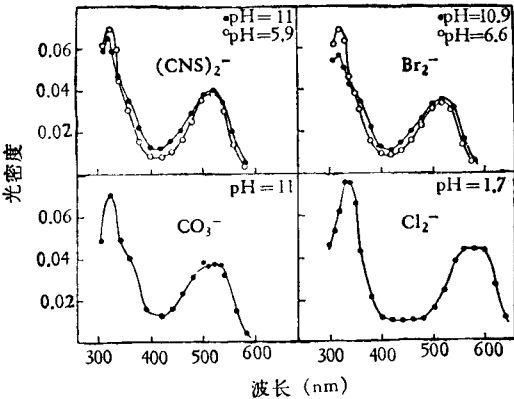


图 2 N_2O 饱和的含有不同阴离子 ($10^{-1}M$) 的色氨酸溶液 ($10^{-1}M$) 的脉冲辐射分解瞬态谱
脉冲后 50 微秒测量剂量 2400 拉德

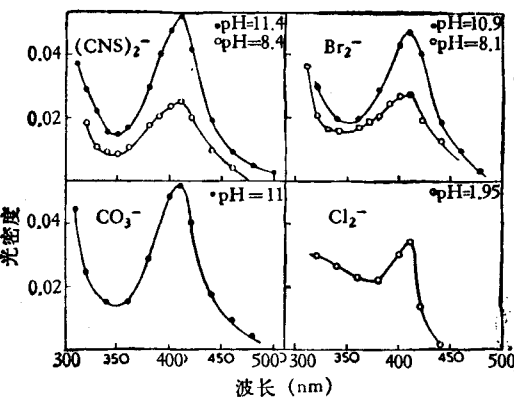


图 3 含有不同阴离子 ($10^{-1}M$) 的酪氨酸 ($10^{-1}M$) 溶液的脉冲辐射分解的瞬态谱
 N_2O 饱和,脉冲后 50 微秒测量,剂量 2400 拉德

5. 一般说,选择性自由基与氨基酸反应的瞬态产物的吸收光谱仅仅反映了氨基酸的特性,而与选择性自由基无关。图 2 图 3 是 CNS^- 、 Br^- 、 CO_3^- 和 Cl^- 的色氨酸和酪氨酸溶液的脉冲辐射分解瞬态谱^[5]。可以看出,用不同选择性自由基得到的瞬态谱大致相同 (Cl_2^- 的谱有些红移,可能是该实验所需的低 pH 所致)。但色氨酸与 I_2^- 的瞬态谱例外,由于 I_2^- 的亲电子性较弱,这可能是加合到色氨酸的吲哚环上^[11]。用组氨酸得到的谱尽管较弱,但也表现出这种相似性^[5]。

这里叙述的是游离氨基酸的情形。当酶结构中的氨基酸基团与选择性自由基反应时,所得到的瞬态谱也与该氨基酸自由状态时得到的瞬态谱相似^[12]。以核糖核酸酶为例,在适当 pH 下,选择性自由基与该酶中的酪氨酸残基的反应占优势,所以核糖核酸酶与选择性自由基反应的瞬态谱 (图 4)^[12] 主要是由酪氨酸残基决定。与自由酪氨酸与选择性自由基反应的瞬态谱 (图 3) 相比较,就可以看出这二个谱是十分相似的。这一特性在判断酶中的哪个氨基酸残基被选择性自由基所攻击是很有价值的。

选择性自由基与氨基酸反应的产物的瞬态谱为什么与自由基无关而只与氨基酸有关呢? Adams 作了如下推断: 这一反应可能是个简单的电子从氨基酸(用 AH 表示)转移给选择性自由基,随后发生质子脱离而形成氨基酸自由

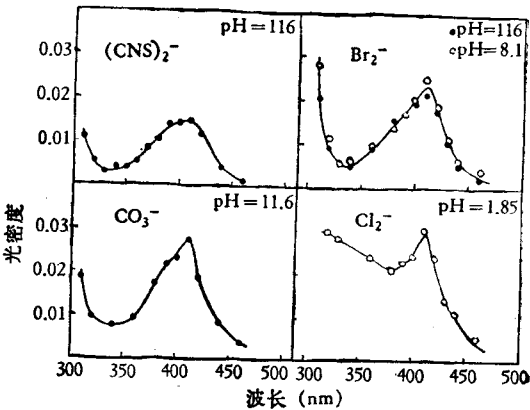
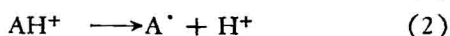
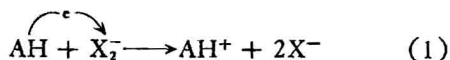


图 4 含有不同阴离子 ($10^{-2}M$) 的核糖核酸酶溶液 (0.5 毫克/毫升) 的脉冲辐射分解的瞬态谱
 N_2O 饱和,脉冲后 280 微秒,剂量 2300 拉德

基的过程:



或是选择性自由基与氨基酸的直接加合:



在某些情况下可能二套反应同时发生, 或者反应(3)的产物仅是电子转移过程的中间产物。

如果(1)、(2)是反应的唯一过程, 那末, 对于给定的氨基酸, 瞬态产物的吸收光谱显然与自由基无关而只与氨基酸有关; 如果(3)是主要反应, 那末瞬态产物的吸收光谱也可能主要与氨基酸有关而不一定与无机自由基的性质密切相关。

三、实验技术

用选择性自由基研究酶失活机制的实验技术, Keene^[13]、Dorfman^[14] 等人已较详细讨论, 本文简单介绍如下:

在脉冲辐射离解技术中, 产生的自由基的寿命很短, 一般是毫秒级或毫秒级以下。所以, 为了观测自由基的动力学过程, 辐射剂量必须足够大, 并在大大短于自由基寿命的时间内给出, 以产生足以观测到的自由基浓度。最合适的辐射源是微波直线加速器和脉冲式 Van de Graaff (发生器)。被研究的物质置于石英样品池中。样品在高能电子束(一般 2—15 MeV)^[15] 照射下形成自由基时, 分子的电子分布状态受到扰动, 于是使自由基中的电子激发所需的能量往往比使原来分子中的电子激发所需的能量低, 因此, 自由基的光吸收波长红移, 瞬态产物的消光系数也比原来稳定分子的消光系数大。这就是为什么自由基往往在光谱的紫外及可见部分有较强光吸收的原因。正因如此, 我们一般都采用光谱分析的方法作为波长和时间的函数, 对自由基的产生、衰变动力学过程进行观测^[16]。所用的观测系统必须有足够高的分辨率和足够快的响应速度。常用

的观测方法有动力学光谱法和闪光摄谱法二种。

动力学光谱法 实验装置示意图 5^[13]。

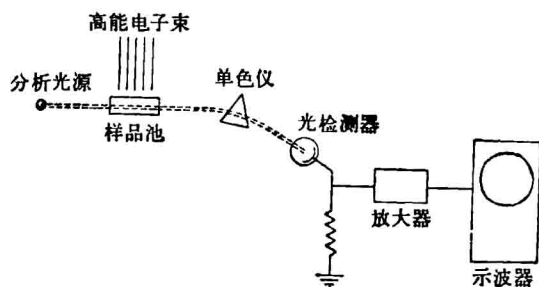


图 5 采用动力学光谱法的脉冲辐射离解实验装置示意图

动力学光谱法采用多色连续光作为分析光。分析光通过样品池后被光学系统聚焦在单色仪入射狭缝上, 经单色仪分光后由光检测器(一般为光电倍增管)接收选定波长的单色光, 转换成电压讯号经过放大在示波器上显示出来。这个电压讯号正比于样品池透射光的强度 I , 这样, 脉冲辐射后因产生的自由基对光的吸收而引起透射光强度随时间的变化 $I(t)$ 就完全由示波器荧光屏上显示的垂直幅度的变化 $V(t)$ 所代表。把光迹拍摄下来, 即可得到瞬态产物的光密度随时间变化的函数^[17]:

$$O \cdot D(t) = \log \frac{I_0}{I(t)} = \log \frac{V_0}{V(t)}$$

式中 I_0 、 V_0 分别是脉冲辐射前(瞬态产物未产生时)透射光强度及示波器上与其对应的光迹的垂直幅度。图 6^[9] 是从荧光屏上拍摄的

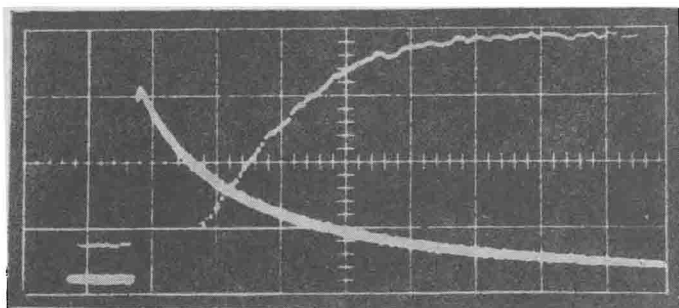


图 6 $(\text{CNS})_2^-$ 的产生和衰变曲线

$80 \times 10^{-6} M \text{ CNS}^-$, 中性, 氧饱和, 500 毫微米。

a. 纵座标 1.49%/厘米, 横座标 1 微秒/厘米。

b. 纵座标 1.40%/厘米, 横座标 50 微秒/厘米。

(CNS) $_2^-$ 自由基的动力学曲线。

动力学光谱法不仅能测量选定波长上瞬态产物吸收光密度随时间的变化,而且(如果拍摄不同波长上示波器扫描光迹的照片),还可得到脉冲辐射后任何时刻瞬态产物的吸收光谱(如图2、3、4等)。

闪光摄谱法 实验装置示意如图7^[14]。

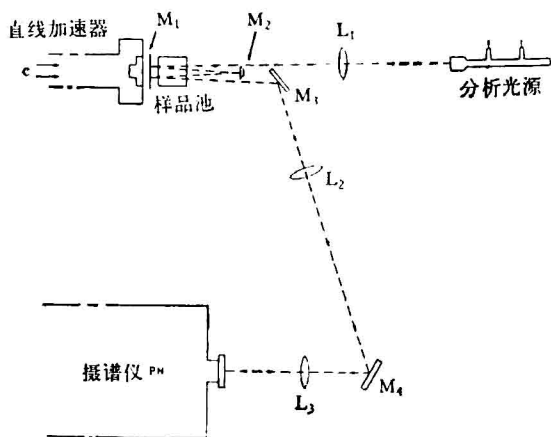


图7 采用闪光摄谱法的脉冲辐射离解实验装置示意图

L₁—L₃ 是透镜, M₁—M₄ 是反射镜

闪光摄谱法中的分析光源通常是多色闪光。在电子脉冲照射样品的同时或延迟短暂的选定时间触发闪光光源,闪光经光学系统通过样品池并聚焦在摄谱仪入射狭缝上,摄谱^[16]。用光密度计等测定谱板上各波长处的密度,就可得到脉冲辐射后选定时刻的瞬态产物的吸收光谱,测定脉冲辐射后不同时刻某一选定波长上的谱板密度就可得到瞬态产物在该波长下光密度随时间变化的曲线。图8是一组脉冲辐射后不同时刻拍摄的三亚苯的单线态—单线态和三线态—三线态的吸收谱^[18]。

动力学光谱法和闪光摄谱法各有优缺点,但动力学光谱法更为灵敏,所以被广泛采用。

水化电子 e_{aq}^- 是受照射水溶液中产生的重要瞬态产物,它在可见光部分有很强的光吸收(吸收峰在700毫微米左右)^[19],它具有-2.9伏的氧化还原电势,是个强还原剂^[15],能广泛地攻击氨基酸及蛋白质分子上的基团。这样,它的存在将严重影响对选择性自由基与氨基酸和蛋

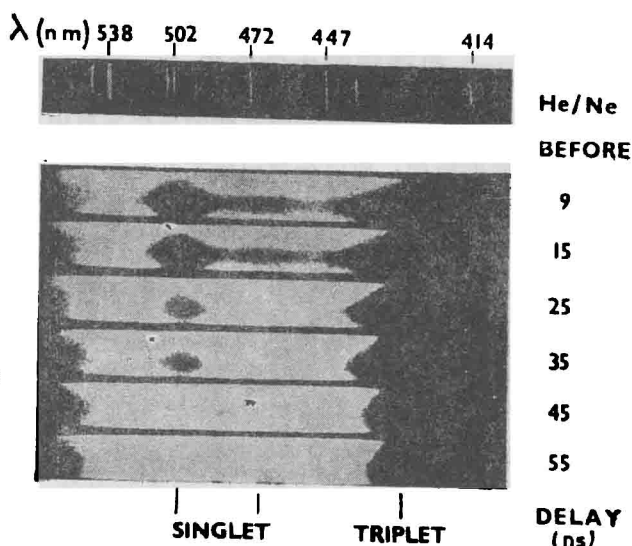
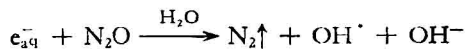


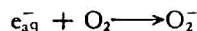
图8 脉冲辐射后不同时刻的三亚苯的单线态—单线态,三线态—三线态的吸收光谱

白质反应动力学过程的观测,必须设法消除。一个广泛采用的有效方法是将样品溶液用N₂O气饱和。当溶液受电离辐射时,产生的 e_{aq}^- 立即与N₂O反应,生成OH $^{\cdot}$ 自由基^[20]。



这样,不但清除了 e_{aq}^- ,而且使OH $^{\cdot}$ 的产额增加一倍左右(纯净水受电离辐射时 e_{aq}^- 的产额G2.8,与OH $^{\cdot}$ 的产额G2.9相近)^[15],从而使选择性自由基的产额增加了约一倍,提高了观测灵敏度。

在某些脉冲辐射离解实验中,也有人用氧O₂饱和水溶液^[9], e_{aq}^- 通过与O₂的加合而被清除,产生不活泼的O₂ $^{2-}$ ^[21]:



H原子也是受照水溶液中产生的瞬态产物,但它的产额G(H) $\simeq$ 0.1[G(e_{aq}^- + OH $^{\cdot}$)],对选择性自由基与酶的反应影响不大,一般不予考虑^[22]。

由于微量杂质就能对自由基产额产生极大影响,所以实验用的水,试剂及容器须十分纯净。试剂须分析纯;溶液须用三蒸水(后二蒸用石英蒸馏器)或更纯净的水配制。在我们的实验中采用了五级蒸馏装置^[17]。溶液要用石英器皿或Pyrex玻璃器皿盛装。

四、选择性自由基在酶失活机理研究中的应用

由于选择性自由基与氨基酸的反应表现出一些特有的性质,所以在蛋白质尤其是酶失活机理的研究中它发挥了很大作用。一个较早的实验是对溶菌酶活性基团的判定。

在脉冲辐射离解实验中,用高能电子照射 N_2O 气饱和的含有 KCNS 的溶菌酶溶液,则溶菌酶受产生的 $(CNS)_2^-$ 攻击而失活。Adams 等人测定了 $(CNS)_2^-$ 与自由氨基酸的反应性,发现在中性 pH 下, $(CNS)_2^-$ 与色氨酸的反应速率比其它氨基酸至少大 50 倍^[4],又发现 $(CNS)_2^-$ 与溶菌酶反应产生的瞬态吸收光谱和 $(CNS)_2^-$ 与色氨酸反应产生的瞬态光谱一致,于是推断,溶菌酶的失活是色氨酸残基受 $(CNS)_2^-$ 攻击所致。Adams 又用选择性氧化方法证明,溶菌酶的色氨酸 108 是使它失活的关键靶子^[4]。

Adams 等人也用选择性自由基对核糖核酸酶的活性基团进行了鉴别^[12],发现在 pH7—11 范围, $(CNS)_2^-$ 与蛋氨酸和酪氨酸的反应速率高。但并未使酶明显失活,说明这二个基团与核糖核酸酶的活性关系不大。在同样 pH 范围内, Br_2^- 除了与蛋氨酸和酪氨酸反应外,还与组氨酸反应,同时随着 pH 的增加,前二者的反应速率增加较组氨酸快,但在 pH8—10 范围,酶失活的相对效率却下降,再次证实了酪氨酸,蛋氨酸基团与核糖核酸酶活性关系不大的观点。在 pH8—11 内, Br_2^- 与组氨酸反应后,使核糖核酸酶失活,说明组氨酸基团与该酶的活性是密切相关的。碳酸盐实验的结果支持这种观点: CO_3^- 与组氨酸的反应性小于 Br_2^- 、大于 $(CNS)_2^-$,而 CO_3^- 使核糖核酸酶的失活效率恰居二者之间。

Adams 等人也对胰蛋白酶,木瓜蛋白酶等进行了研究。在胰蛋白酶的研究中^[11],结合旋光色散,证明色氨酸、酪氨酸及组氨酸基团都与酶活性有密切关系。对木瓜蛋白酶的研究^[20]证明半胱氨酸,色氨酸及组氨酸基团与它的活性密切相关,而酪氨酸基团与酶活性关系不大。

参 考 文 献

- [1] Scholes, G. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 151, 1965.
- [2] Davies, J. V. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 165, 1965.
- [3] Braams, R.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.), 171, 1965.
- [4] Adams, G. E. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 16, 333, 1969.
- [5] Adams, G. E. et al.: *Radiat. Res.*, 49, 278, 1972.
- [6] Anbar, M. et al.: *J. Phys. Chem.*, 68, 3829, 1964.
- [7] Cercek, B. et al.: *Science*, 145, 919, 1964.
- [8] Thomas, J. K. et al.: *Trans. Faraday Sec.*, 61, 702, 1965.
- [9] Adams, G. E. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 117, 1965.
- [10] Keene, J. P. et al.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 99, 1965.
- [11] Adams, G. E. et al.: *J. Chem. Sec. Faraday Trans.*, 1, 69, 1608, 1973.
- [12] Adams, G. E. et al.: *Radiat. Res.*, 49, 290, 1972.
- [13] Keene, J. P.: in *Pulse Radiolysis* (Ebert, M. et al. eds.) 1, 1965.
- [14] Dorfman, L. M.: in *Techniques of Chemistry* (Hammes, G. G. ed.) Vol. 6, pt. 2, 463, 1974.
- [15] Klapper, M. H. et al.: *Quarterly Reviews of Biophysics*, 12, 465, 1979.
- [16] 刘蓉:《生物科学参考资料》,1977年,第8集第103页。
- [17] 沈恂等:《生物化学与生物物理学报》, 13, 165, 1981.
- [18] Porter, G. et al.: in *Techniques of Chemistry* (Hammes, G. G. ed.) Vol. 6, pt. 2, 367, 1974.
- [19] Gressweiner, L. I. et al.: *Science*, 141, 805, 1963.
- [20] Adams, G. E. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 25, 129, 1974.
- [21] Adams, G. E.: in *Current Topics in Radiat. Res.* (Ebert, M. et al. eds.) 3, 35, 1967.
- [22] Wardman, P.: *Rep. Prog. Phys.*, Vol. 41, No. 2, 1978.

[本文于1981年4月20日收到]

(上接第69页)

谱有二个峰(322毫微米和472毫微米),当与DNA络合后,峰值向长波位移到332毫微米和526毫微米(图3)。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物物理所一室二组:《生物化学与生物物理进展》1975年第1期28页。
- [2] Gaugain B., et al.: *Biochemistry*, 17, 5071, 1978.
- [3] Markovits J., et al.: *Analytical Biochemistry*, 94, 259, 1979.