

电子核双共振 (ENDOR) 在生物学中的应用

赵保路 张建功

(中国科学技术大学研究生院)

电子自旋共振 (ESR) 研究在磁场作用下电子自旋能级之间的跃迁。核磁共振 (NMR) 研究在磁场作用下核自旋能级之间的跃迁。ESR 有很高的灵敏度 (10^{-13} 克分子), 但分辨率不太高, 特别是对具有大量超精细结构的样品。NMR 的分辨率较好, 但灵敏度不高。ENDOR 是在核磁跃迁情况下观察电子自旋共振信号的变化, 它具有 ESR 的灵敏度和 NMR 的分辨率, 可以得到用 ESR 和 NMR 得不到的信息, 而且能够使复杂的 ESR 波谱大为简化, 求出精确的超精细耦合常数。因此 ENDOR 引起了人们的普遍重视。它已愈来愈多地应用到物理、化学、生物等各个学科领域。特别是近十几年来, 由于理论和实验技术的改进, ENDOR 的生物学应用有了明显的增加, 每年都有不少的文献报道。本文仅就 ENDOR 的基本原理作一概述, 并通过几个实例说明在生物研究中如何分析 ENDOR 波谱所得到的信息。

一、基本原理

在 ESR 中, 样品受一直流磁场 H_0 的作用, 使电子自旋能级分裂, 然后在垂直于 H_0 的方向上加一微波磁场, 使处于低能级上的电子跃迁到高能级, 即观察到 ESR 信号。对于 ENDOR, 在垂直 H_0 的方向加上两个辐射电磁场, 一是微波场 H_1 , 用以激发电子自旋跃迁, H_1 足够强, 使 ESR 跃迁出现部分饱和现象; 另一个是射频辐射场 H_2 , 用以激发核自旋跃迁, 使处于饱和状态的电子自旋能级的粒子数发生反转, 这时观察到 ESR 信号的增大, 即所谓电子核双共振 (ENDOR) 信号。

对只有一个未偶电子和一个 $I = \frac{1}{2}$ 的核

的体系。自旋哈密顿为^[1]

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H} + g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} \quad (1)$$

其中 β 和 β_N 分别为玻尔磁子和核磁子, H 为外加静磁场, $\mathbf{g}$ 和 $\mathbf{A}$ 分别为 g 张量和超精细耦合张量, $\mathbf{S}$ 和 $\mathbf{I}$ 分别是电子自旋和核自旋。对于各向同性的样品, 采用一级近似, 其能量本征值为

$$E = \nu_e M_S - \nu_N M_N + a M_S M_I \quad (2)$$

式中 $\nu_e = g\beta H/h$, $\nu_N = g_N \beta_N H/h$, $a = A/h$, 其中 h 为普朗克常数。

四个能级是

$$E_1 = -\frac{1}{2}(\nu_e + \nu_N) - \frac{1}{4}a$$

$$E_2 = -\frac{1}{2}(\nu_e - \nu_N) + \frac{1}{4}a$$

$$E_3 = \frac{1}{2}(\nu_e - \nu_N) + \frac{1}{4}a$$

$$E_4 = \frac{1}{2}(\nu_e + \nu_N) - \frac{1}{4}a$$

如图 1 所示。各能级的相对集居数亦示于图 1。

样品在固定磁场 H 中, 以强微波磁场使 1—3 能级之间产生 ESR 饱和跃迁, 此时 ESR 信号很小, 然后用一宽频带和大功率的射频扫描, 当扫过两个特定的频率 ν_1 和 ν_2 时, ESR 信号增强, 得到 ENDOR 波谱, 其中

$$\nu_1 = E_4 - E_3 = \nu_N - \frac{a}{2},$$

$$\nu_2 = E_2 - E_1 = \nu_N + \frac{a}{2}$$

在包括一组等价质子的自由基体系中, 情况就是如此, 其 ENDOR 频率为

$$\nu^H = \nu_H \pm a/2 \quad (3)$$

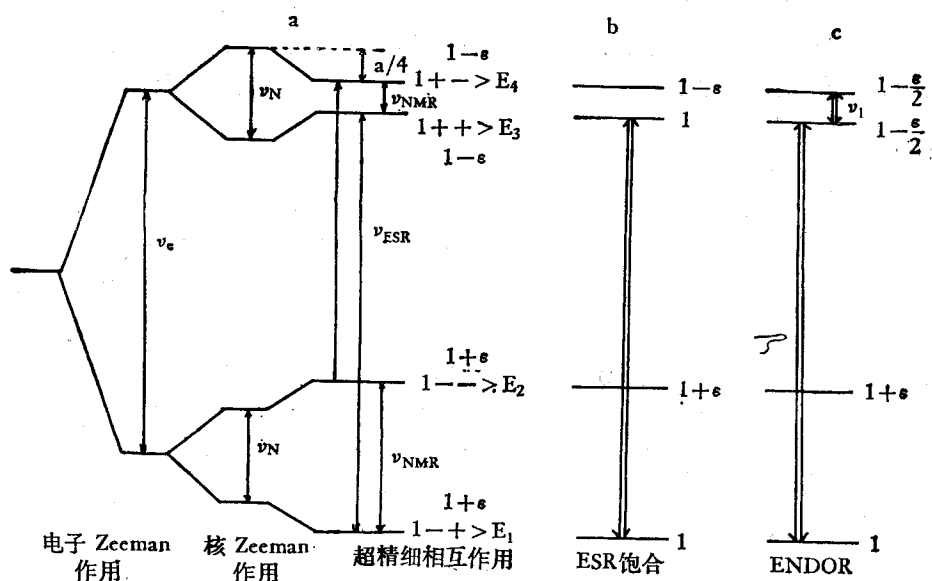


图 1 $S = \frac{1}{2}, I = \frac{1}{2}$ 自旋体系能级图

(a) 热平衡时各种相互作用的贡献和集居数分布; (b) ESR 饱和跃迁时的状态相对集居数;
 (c) ENDOR 跃迁时电子相对集居数。 $e = \nu_e/2kT$, k 为玻尔兹曼常数, T 为绝对温度。

因此 ENDOR 信号是以自由质子的拉摩频率 ν_H (在 3200 高斯磁场时为 13.62 兆赫) 为中心, 对含有一组等同的 ^{14}N 核的样品, $I = 1$, ENDOR 频率为

$$\nu^N = a^N/2 \pm P^N \pm \nu_N \quad (6)$$

其 ENDOR 谱表现为四条峰, 中心在 $a^N/2$, 峰之间的分裂与 ^{14}N 的拉摩频率 ($\nu_N = 0.984$ 兆赫, 磁场 3200 高斯) 和核四极矩耦合常数 P^N 有关。

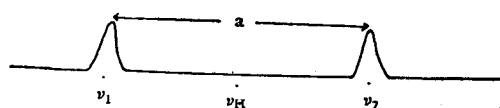


图 2 一组磁等同质子的 ENDOR 谱示意图

成对称分布的一对峰, 峰之间的分裂为 a , 即超精细耦合常数。

对 $I > \frac{1}{2}$ 的体系需要考虑核四极矩耦合的相互作用, 在通常的 ESR 波谱中, 核四极矩耦合常数是得不到的, 但用 ENDOR 就可定出核四极矩耦合常数, 这时其一级近似哈密顿为^[1]

$$\mathcal{H} = g\beta H_z S_z - g_N \beta_N H_z I_z + a S_z I_z + P \left[I_z^2 - \frac{1}{3} I(I+1) \right] \quad (4)$$

式中 P 是核四极矩耦合常数。能量本征值为

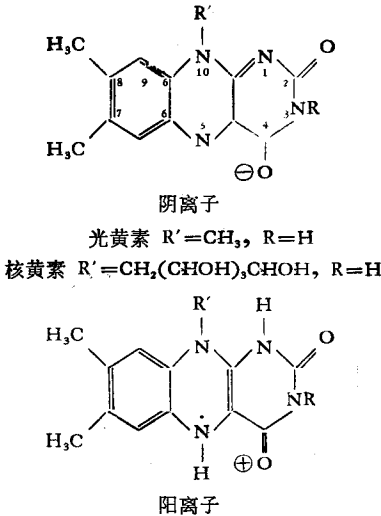
$$E = \nu_e M_S - \nu_N M_I + a M_S M_I + P \left[M_I^2 - \frac{1}{3} I(I+1) \right] \quad (5)$$

二、应 用

ENDOR 技术较多地应用于生物体系开始于七十年代后期, 起初主要是研究一些辐照的氨基酸、嘌呤和嘧啶单晶所产生的自由基^[2]。虽然单晶样品可以得到关于自由基的最完全的信息, 但在很多情况下我们得不到生物样品的单晶, 因而在一定程度上限制了 ENDOR 在生物体系中的应用。可庆幸的是, 后来发展起来了一种高能 ENDOR, 它可以研究无规取向的样品, 从而很多生物样品可借助于 ENDOR 方法进行卓有成效的工作。下面概括介绍 ENDOR 技术在生物体系中这方面的几种主要应用。

1. 黄素蛋白 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 脱氢酶是一个分子量为 104,000 的

蛋白酶，每个脱氢酶分子包含两个黄素单核苷(FMF)。用 ENDOR 研究的黄素分子和形成的有关阴离子和阳离子自由基为



自由基阴离子是把一个电子加到中性黄素上形成的，自由基阳离子是把 H_2^+ 加到中性黄素上形成的，因此都是还原形式。锌或钙在 N₁ 和 C₄ 的氧之间形成的自由基螯合物与黄素阴离子自由基有大致同样的自旋密度分布。在二甲基甲酰胺中的光黄素锌螯合物自由基在 113°K 时的 ENDOR 谱示于图 3。在 19—20MHz 之间突出的 ENDOR 线是由旋转甲基所贡献。这可通过用 CD_3 或 Cl 取代黄素不同位置的甲基所得的 ENDOR 与图 3 进行比较来证实。C₈ 上的甲基对应 19MHz 处的较强的 ENDOR

18.7MHz 的弱信号属于 C-6H。总起来看，黄素阳离子自由基很容易用 C-8 甲基上的 19MHz 的强的 ENDOR 线来标示。

将这个模型体系的 ENDOR 与冻结在溶液中的光致 NADPH 脱氢酶的 ENDOR 谱进行比较就可以得出在黄素蛋白中自由基的位置处在黄素单核苷部分的结论。也可以肯定 19MHz 突出部分的 ENDOR 信号确实属于 C-8 位置的甲基。在冻结溶液谱中的 17.5MHz 处出现的弱峰在图 3 并没有发现。通过与核黄素阴离子的比较，发现这些弱线是属于黄素单核苷 N-10 位上的甲基质子，为了确证 19MHz 处突出的 ENDOR 线是属于 C-8 位的甲基质子，将黄素单核苷从 NADPH 脱氢酶分离出来，再氘代 C-8 位的甲基，然后重组入黄素蛋白，在得到的 ENDOR 谱中，19MHz 处的峰大大下降了，这就充分地证明了 19MHz 处的峰是 C-8 位甲基质子所贡献。

晶格质子信号可用于了解水分子（或晶格分子）对自由基位置的接近程度。当 NADPH 脱氢酶在 D_2O 中光致还原时，晶格质子的 ENDOR 谱线降低 40%，由此可以断言，溶剂水分子是可以接近这个黄素蛋白自由基位置的，但不象自由黄素阴离子自由基那样接近，因为晶格的 ENDOR 在 D_2O 中几乎全部消失。

2. 变位肌红蛋白 对于变位肌红蛋白体系，可以分辨出 ^{14}N 的 ENDOR 线，并且能够精确测量 ^{14}N 的超精细耦合张量和核四极矩张量。肌红蛋白为一重要的血红蛋白，其顺磁中心是 Fe^{+3} ， Fe^{+3} 和四个平面吡咯环的氮相结合，与它作用的第五个氮是定域在络合物分子平面下方组氨酸残基上，第六个配位基是水分子。它的 ESR 谱是轴对称的， $g_{\parallel} = g_{xx} = 2$ ， $g_{\perp} = 6$ 。虽然变位肌红蛋白中的 Fe^{+3} 是高自旋态，但基态可以作为有效自旋 $S = \frac{1}{2}$ 来处理。

设磁场的位置在 $g = 2$ 处，这样就可以选择那些垂直血红素平面而平行磁场的那些分子。在此情况下所得的 ENDOR 波谱示于图 4。

每组等价氮应给出四条 ENDOR 谱线，分

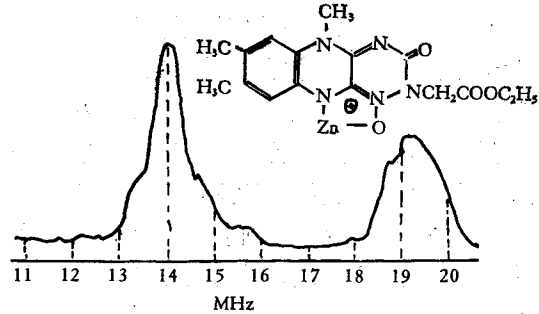


图 3 在二甲基甲酰胺中的光黄素锌螯合物自由基在 113°K 的 ENDOR 谱
(自由质子频率为 14MHz^[31])

信号，而 N-10 上的甲基则与 18MHz 处弱的 ENDOR 信号相对应。根据自旋密度的计算，

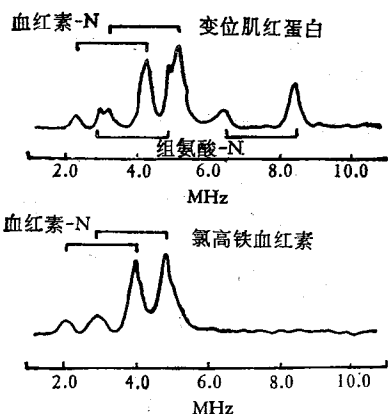


图4 变位肌红蛋白和氯高铁血红素低频部分的 ENDOR 谱

变位肌红蛋白在 6mM 甘油-水 (1:1) 和磷酸缓冲液中, pH=6。氯高铁血红素在二甲基甲酰胺-甲醇 (1:1) 中。2.1°K $H_0 = 3.2\text{G}^{[5]}$

为两对, 每对谱线之间的分裂值为自由氮核的拉摩频率的 2 倍, 中心在 $1/2$ 超精细分裂常数 $\pm$ 核四极矩偶合常数处。在血红素平面中的四个氮原子是等价的, 而与配位基组氨酸中的氮原子是不等价的, 因此可以观察到 8 条 ENDOR 线, 实验结果正是如此。通过和氯高铁血红素的双共振波谱作比较可以确定低频部分的 ENDOR 线来源于血红素中的氮。因为氯高铁血红素不再包含组氨酸的氮原子。

通过对图 4 双共振波谱的分析得到血红素氮的 $A_{zz} = 7.60 \pm 0.62\text{MHz}$, $P_{zz} = 0.44 \pm 0.01\text{MHz}$ 。组氨酸氮的 $A_{zz} = 11.46 \pm 0.03\text{MHz}$, $P_{zz} = 1.75 \pm 0.02\text{MHz}$ 。如果要得到 ENDOR 的垂直分量, 就需要在对应 $g = 6$ 的磁场测量 ENDOR 谱。另外, 在接近自由质子频率的位置观察到了质子的双共振谱线, 相应的偶合常数分别为 0.80MHz 和 1.30MHz。

3. 细胞色素 c 过氧化酶 细胞色素 c 过氧化酶在生物氧化和电子传递过程中起着重要作用, 它可以催化底物氧化。很多人用不同的方法对氧化机理及形成的自由基进行了研究。用的较多的是 ESR 和 ENDOR 技术。图 5 示出了细胞色素 c 过氧化酶的过氧化氢化合物的电子核双共振波谱。a、b 为标准的 9.6GHz, c、d 为高频 11.66GHz。波谱的范围到 34MHz, 在

其它频率没有观察到信号。图 5 的 ENDOR a 和 b 基本上是以自由质子的拉摩频率 $\nu_H = 13.4\text{MHz}$ 成对称分布, 这表明信号主要来自质子共

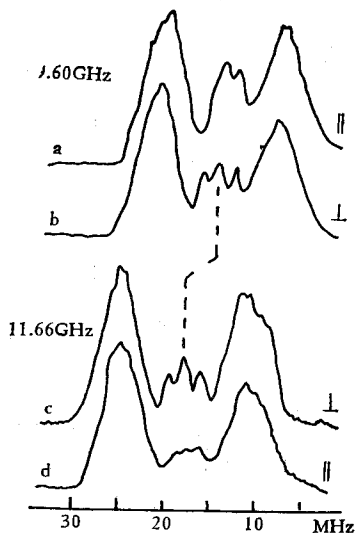


图5 细胞色素 c 过氧化酶的过氧化氢化合物的 ENDOR 谱

2°K a, b 在 9.6GHz; c, d 在 11.66GHz
虚线表示 ν_H 随微波频率的偏移^[6]

振。但在 $\nu \leq 7\text{MHz}$ 的低频中是否有 ^{14}N 的 ENDOR 存在, 尚不能确定。再做 11.66GHz 的 ENDOR 如 c、d, 结果双共振谱向高频移动, 中心移到 $\nu_H = 17.5\text{MHz}$, 这就可以肯定 ENDOR 谱线是由质子产生而不是来自 ^{14}N 。因为由公式(3)和(6)知, 一组磁等性质子的 ENDOR 谱的中心位于自由质子的拉摩频率 ν_H , 而 ν_H 正比于微波频率, 因此质子的 ENDOR 谱随微波频率而改变; 与此相反, 一组磁等性的 ^{14}N 的 ENDOR 谱的中心则位于 $a^N/2$, 它与微波频率无关。这是鉴别质子和 ^{14}N ENDOR 线的一个有效的方法。由图 5 可以看出, 有两组不同质子的 ENDOR, 外边的一组强线的偶合常数为 $10\text{MHz} \lesssim a \lesssim 22\text{MHz}$, 里边一组弱线的偶合常数为 $a \lesssim 4\text{MHz}$ 。为了更好地分辨中间的弱信号, 提高增益, 并缩小扫描频率, 得到的 ENDOR 谱可以分辨出不少于 5 对质子的共振峰。比较 a、b 两种取向的 ENDOR 谱, 可以看出, 这些质子的超精细偶合常数有一定的各向异性, 但并不很大。说明这些偶合来自 β 质子, 因为 α

质子偶合常数的各向异性很强。从这些图谱测量计算的偶合常数列于表 1。

表 1 细胞色素 c 过氧化酶过氧化氢化合物的偶合常数^[6]

	$A_{\parallel}$ (MHz)	$A_{\perp}$ (MHz)
强偶合质子	21.6 ± 0.5	21.4 ± 0.5
	18.9	18.1
	16.0	17.1
	13.4	13.9
	11.4	12.0
弱偶合质子	3.54 ± 0.05	4.68 ± 0.05
	2.95	3.01
	1.76	1.83
	0.96	0.95
	0.47	0.44

4. 细菌叶绿素 (Bchl) 叶绿素中含有镁,四个吡咯环的 4 个氮与 Mg^{++} 形成配键,在光合成中的作用是从叶绿素传递电子产生叶绿素阳离子。ENDOR 技术将叶绿素阳离子作为二聚体阳离子研究^[7],从红极杆菌分离出来的细菌叶绿素溶在 12% 甲醇的二氯甲烷中用碘氧化成阳离子的 ENDOR 谱表示于图 6a。13.7 MHz 突出的 ENDOR 线是自由质子信号。16.1 MHz 和 18.3MHz 的谱线是属于旋转甲基,这已被氙代实验所证实。在完整细胞中用少量 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化产物的 ENDOR 谱示于图 6。由此图可以看出,晶格质子的 ENDOR 大大减弱,说明未成对电子附近质子很少,活性位置是一个非常疏水的环境。用氙代实验表明在 16 MHz 处的突出信号相当图 6a 中 18.3MHz 的信号。另一个旋转甲基的信号出现在 14.7MHz。在 17—19MHz 出现的信号对应于细菌叶绿素中 β 和 δ 甲基质子。比较图 6a 和图 6b,会发现一个有趣的结果,对同样的甲基在体内细菌叶绿素阳离子中的偶合常数比在体外的小。事实上两个偶合常数几乎相差一倍,这表明体内体系的阳离子是二聚体,其自旋密度分布在两个单分子上,因此在一个给定的甲基质子位置其自旋密度只有一半。

5. 铜蛋白—星形花青 包含铜的蛋白在呼吸和代谢过程中起着重要作用。铜蛋白中的铜有两个类型。类型 1 在 600nm 有一个强吸

收,呈现蓝色。类型 2 无色。铜蛋的 ESR 谱是轴对称的。类型 1 的铜有一个 $A_{\parallel} = 150MHz$ 的窄的超精细分裂;类型 2 的铜,其 $A_{\parallel} = 600 MHz$ 。星形花青是含有类型 1 铜的一种铜蓝蛋

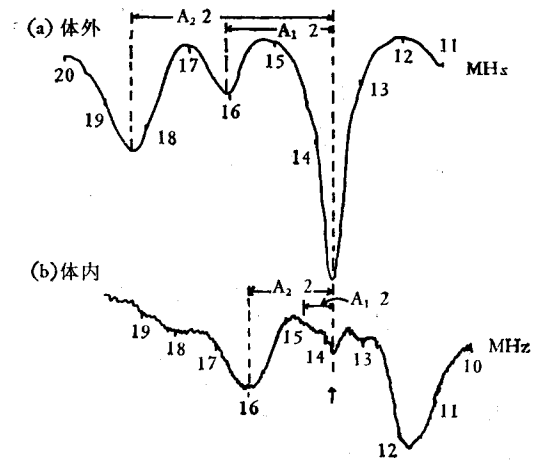


图 6 在体外和体内氧化的细菌叶绿素质子在 103°K 的 ENDOR 谱

(a) 体外,在 $CH_2Cl_2-CH_3OH$ (88:12)中, Bchl 被 I_2 氧化成 $Bchl^+$; (b)体内,在色素细胞中 Bchl 被少量的 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化^[7]

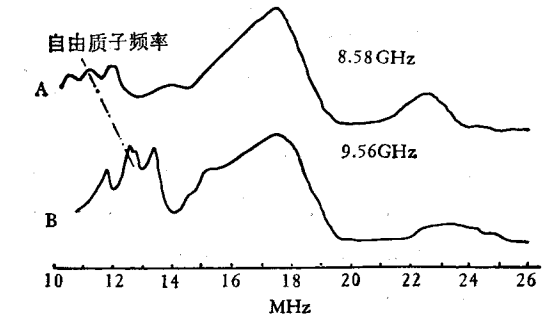


图 7 水中 1.5mM 星形花青在 15—20°K 的 ENDOR 谱

磁场在 g_{zz} 的位置^[8]

白,分子量大约为 20,000,是从日本的一种漆树上得到的。它的 ESR 谱表现出明显的各向异性。ENDOR 谱表明铜至少与一个氮相结合。图 7 是在 ESR 谱的低场端观察的星形花青的 ENDOR。改变微波频率时发现在 18MHz 之 ENDOR 线没有变化,说明它是属于氮原子的偶合,而随微波频率改变的谱线则是属于弱质子的偶合。在 18MHz 附近的宽线是由一组等价氮原子的四条超精细谱线和核四极矩偶合

造成的。这四条线分成两对，每对的分裂为自由氮核频率的两倍，中心在 $a/2 \pm P$ ，在 3200G 时，自由氮核频率的两倍为 2MHz，所以四条线没有分开。但从谱上可以确定 $A_{\perp}/2$ 为 18MHz，因此得 $A_{\perp} = 36\text{MHz}$ 。22—24MHz 的峰也与微波频率无关，因而是属于氮的偶合，它是相应于平行取向的偶合，故得 $A_{\parallel} = 48\text{MHz}$ 。这与模型铜的复合物的研究结果是一致的^[1]。接近自由质子的 ENDOR 线不受 D_2O 代替 H_2O 的影响，这说明铜离子位置对于水是不可接近的，深深埋在蛋白结构之中。

参 考 文 献

[1] 裘祖文,《电子自旋共振波谱》,(1980)科学出版社。

- [2] Box, H. C. *Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis* Academic Press, 1977.
- [3] Eriksson, L. E. G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **192**, 211, 1969.
- [4] Eriksson, L. E. G. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **17**, 539, 1970.
- [5] Scholes, C. P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 448, 1972.
- [6] Hoffman, B. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 6556, 1981.
- [7] Norris, J. R. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 1680, 1973.
- [8] Rist, G. H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 79, 1970
- [9] Rist, G. H. et al.: *J. Chem. Phys.*, **52**, 4033, 1970.

[本文于1982年5月11日收到]

可兴奋细胞的网格结构及其在兴奋过程中的作用*

罗 林 儿 顾 大 明

(北京大学生物物理教研室)

一般认为微管在诸如细胞运动、有丝分裂、细胞运输以及通过组成细胞骨骼维持细胞的形状方面都起着很大的作用。而神经组织含有大量的微管蛋白和微管，因此国际上很多人对可兴奋细胞的网格结构及其在兴奋过程中的作用普遍地发生兴趣。1981年8月31日—9月3日在美国海洋生物学实验所召开的“关于可兴奋细胞的结构和功能”的国际会议上，对这一问题作了广泛的探讨，本文试图对有关材料作一简单介绍。

一、神经胞质的网格结构

自1978年以来，美国神经生理学家 Alan J. Hodge 对神经细胞的网格结构作了大量的观察，并已证明在软体动物乌贼 (squid) 和海蛞蝓 (sea slug) 甲壳类动物龙虾 (lobster) 两栖类蟾蜍和哺乳类大鼠的神经轴突中，神经细丝和神经微管通过周期性分布的横桥相互连在一

起，组成了一种界限分明的三维栅格结构，这就是所谓的神经胞质网格 ('lattice')。这里用的术语是 '网格' ('lattice')，而不是使用网络 network 这个词。这就表明它含有周期性序列，类似于结晶学上的含义。而网络一般是指不含重复序列的联系结构。这就道出了网格的重复序列的性质。更应注意的是，神经细胞内的横桥也和具有各种膜结构的轴浆纤维状成分相连接，例如轴膜、内质网、囊泡和线粒体。

这种精细的横桥，直径为 $2-5\mu\text{m}$ ，长度不一。有人称之为微小索，也有人称之为细胞的骨骼成分。显然从它的结构特点可以设想，它是积极的而不是消极的连结成分，在轴突结构的发生和维持中起着重要作用。同样可以设想，神经胞质的网格是支承能量偶联的高分子有序排列的结构，这些高分子对轴浆里的囊泡和

* 本文资料皆由美国休斯顿 Baylor 医学院张才教授提供。