

伴刀豆球蛋白 A 中铽 (III) 和钴 (II) 之间的能量转移

一种新的金属离子之间距离的探针

马贵斌 杨 频

(山西大学化学系分子科学研究所, 太原 030006)

关键词 伴刀豆球蛋白 A, 铽离子, 钴离子, 离子探针

基于 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理, 估测溶液状态下能量给予体和接受体之间的距离已广泛应用于生物大分子的构象分析中^[1,2], 但仍局限于有机物基团之间的距离测定。Horrocks^[3] 等人用铽和钴离子作为探针测定了嗜热菌蛋白酶分子内一个钙离子与锌离子之间的距离, 测定结果与 X-光衍射结果相吻合。铽是钙的有效荧光探针^[3,4], 钴能占据 Con-A 中锰离子的位置^[5,6]。本文利用铽和钴为探针, 估测了 Con-A 中两金属离子结合位置之间的距离。

一、理论基础

按照 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理^[1-3], 能量给体与受体间转移效率 E 与真实距离 r 和临界距离 R_0 有下列关系:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (1)$$

$$R_0^6 = 8.78 \times 10^{-17} K^2 \phi_D n^{-4} J \quad (2)$$

式中 K^2 为取向因子, ϕ_D 为无受体时给体的量子产率, n 为介质的折射指数, J 为光谱重迭积分, 由(3)式计算:

$$J = \frac{\int F(\bar{\nu})\epsilon(\bar{\nu})\bar{\nu}^4 d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu})d(\bar{\nu})} \quad (3)$$

式中 $F(\bar{\nu})$ 是给体的荧光强度, $\epsilon(\bar{\nu})$ 是受体的摩尔

SOD 催化茴香胺氧化作用提供了关于这类酶的一种染色方法, 简单易行, 灵敏度高, 便宜, 且谱带长期稳定, 不易模糊, 保存方便, 利于线性扫描定量, 值得推广。

参 考 文 献

- 1 Privalle C T, Fridovich I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 2723
- 2 Loven O P et al. *Int J Cancer*, 1984; 33: 783
- 3 Giannopolitis C N, Ries S K. *Plant Physiol*, 1977; 59: 309

消光系数, 单位是 $(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\bar{\nu}$ 是波数, 单位是 cm^{-1} 。

能量转移效率 E 由下式测定:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (4)$$

F 和 F_0 分别为给体在存在和不存在受体时的荧光强度。

使用方程(1)可由 R_0 和 E 计算出 r 。

二、材料与方法

1. 仪器和试剂

日本 Hitachi Model-850 荧光光谱仪, 日本岛津 UV-365 型紫外-可见-近红外分光光度仪, 伴刀豆球蛋白 A: 生化试剂, 中国科学院上海药物研究所制品。其它试剂均为分析纯。

2. 试剂的处理

试剂的处理及探针溶液的制备同文献[10]。

三、结果与讨论

1. 铽 (III) 与 Con-A 配合比的确定

向脱离离子的 Con-A 溶液中逐渐加入氯化铽(III)的溶液, 在荧光仪上观测 545 nm 处铽 (III) 的敏化特征荧光强度。铽的 F 与 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{Con-A}]$ 的变化关系如图 1。由图 1 可见 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{Con-A}]$ 达到 1:1

- 4 莽克强等, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 北京: 科学出版社, 1975; 32-33
- 5 Misra H P, Fridovich I. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183: 511
- 6 Beauchamp C O, Fridovich I. *Anal Biochem*, 1971; 44: 276
- 7 Giannopolitis C N, Ries S K. *Plant Physiol*, 1977; 59: 315
- 8 Misra H P, Fridovich I. *Arch Biochem Biophys*, 1969; 18: 830

[本文于1990年7月18日收到, 9月28日修回]

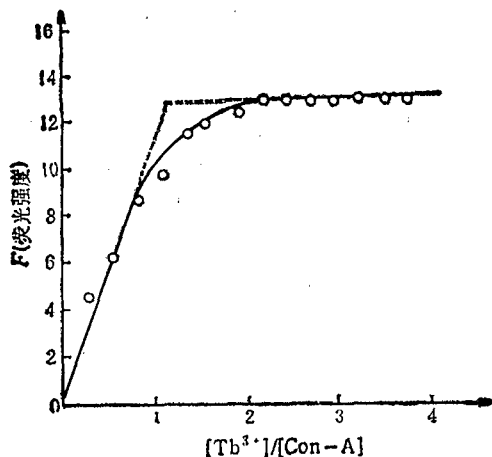


图1 铽(III)的545nm敏化荧光强度与 $[Tb^{3+}]/[Con-A]$ 的变化关系

时,铽的敏化荧光强度不变。结果表明每个 Con-A 单体中仅结合 1 个铽(III)离子。

脱离子 Con-A 浓度为 0.037mmol/L , 0.1mol/L 的六次甲基四胺-盐酸缓冲溶液, $\text{pH} = 6.7$, 0.1mol/L 的氯化钠,加入铽的最终浓度为 0.138mmol/L 。激发波长 $\text{Ex} = 296.0\text{nm}$ 。

2. 钴对 Con-A 结合铽(III)的荧光淬灭

向 Con-A 铽(III)配合物的溶液中滴加氯化钴溶液,铽的荧光强度逐渐降低,如图2。在伴刀豆球蛋白A中钴(II)进入锰(II)的结合位置,则钴对铽的荧光淬灭是能量转移淬灭。

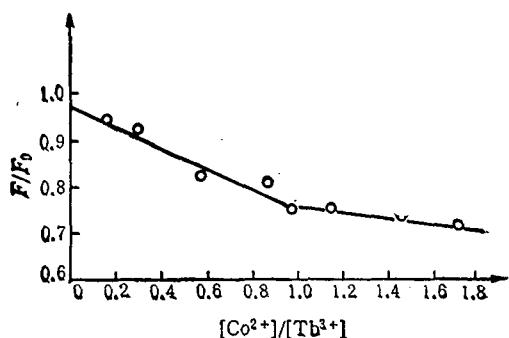


图2 钴(II)对 Con-A 与铽(III)配合物中铽(III)的荧光淬灭

Con-A 浓度 0.04mmol/L , 铽(III)浓度 0.356mmol/L , 0.1mol/L 的六次甲基四胺-盐酸缓冲溶液, $\text{pH} = 6.4$, 激发波长 $\text{Ex} = 296.0\text{nm}$

3. Con-A 中钙(II)与锰(II)之间距离的确定

由锰(II)在 Con-A 中的配位环境^[11],选择了3:1的乙酰丙酮和钴(II)配合物为模型化合物。光谱的重迭见图3,由图3应用方程(3)计算重迭积分为 $2.16 \times 10^{-18}\text{cm}^6(\text{mol/L})^{-1}$ 。折射指数取水的折射指数 $n =$

1.33, K^1 取向同性因子 $2/3$ 。给予体铽(III)的量子产率的测定比较复杂,环境对此影响比较大,实验测定的铽(III)的量子产率为 $\phi_D = 0.25$ 。将上述数值代入方程(2)可得转移效率为50%时的临界距离 $R_0 = 6.82\text{\AA}$,由方程(4)测定 $E = 0.67$,由方程(1)可得 $r = 6.0\text{\AA}$ 。

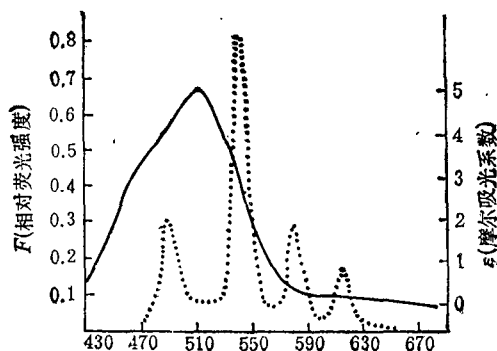


图3 Con-A · Tb(III) 配合物的铽(III)的荧光光谱与3:1的乙酰丙酮钴(II)配合物的吸收光谱的光谱重迭

——吸收光谱, -----荧光光谱

4. 讨论

估测的 Con-A 中两离子结合位置间的距离与 X-光晶体衍射的结果 $r = 4.6\text{\AA}$ 有些差别。这一结果有两方面的因素,其一可能是晶体状态与溶液状态分子的空间构象不完全相同;其二可能是测量过程中有误差。虽然结果有些差别,但作为近似距离的估算也是有意义的。总之,这一技术研究溶液状态下生物大分子的微区结构,方法简便,药品用量少,可以补偿 X-衍射方法的不足之处。

参考文献

- 1 Stryer L, Haugland R P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967; 58: 719
- 2 Beardsley K, Cantor C R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970; 65: 39
- 3 William D H Jr, Barton H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72(12): 4764
- 4 Harry G B, Frederick S R, Martin R B. *J Amer Chem Sci*, 1976; 98(25): 8255
- 5 Kalb J, Levitzki A. *Biochem J*, 1968; 109: 669
- 6 Rodney D B III, Seymour H K, Brewer C F. *Biochemistry*, 1982; 21: 465
- 7 Förster T. *Ann Phys* 1948; 2: 55
- 8 Förster T. *Z Naturforsch. Teil A4*, 1949. 321
- 9 Förster T. *Discuss Faraday Soc*, 1959; 27: 7
- 10 Yang Pin, Ma Guibin, Yang Binsheng. *Acta Chim Sin Eng Ed*, 1989, 5: 443
- 11 Becker J W, George N R Jr et al. *J Biol Chem*, 1975; 250(4): 1513

[本文于1990年7月3日收到,9月25日修回]