

闪光光解方法对蛋白质原初光化学反应的研究

庞素珍 沈 恂

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

一、前 言

蛋白质受紫外线照射后, 除形成光解产物外, 其溶解度、粘度、对热变性的敏感性以及荧光等物理化学和光学性质均有显著的改变。这些变化主要是由氨基酸残基的改变引起的。因此, 研究氨基酸的光化学是了解紫外辐射对蛋白质或酶的效应的基础。

用闪光光解方法研究氨基酸和蛋白质光化学反应, 能够直接观察瞬态产物, 并测定它们的衰变动力学过程, 因而特别受到人们的重视。

该法由 Porter 和 Norrish^[1] 首先创立。基本原理是: 用一个很强的闪光使研究系统在极短的时间内(几微秒、几毫微秒)完成原初光物理和光化学过程, 通过快速探测和记录系统观察这些瞬态产物的光吸收随时间和波长的变化, 从而确定产物的物理化学特性。这种研究可以在室温下进行, 样品不需低温处理。如配

合 ESR 技术, 将了解自由基反应提供较为全面的知识。

过去的十多年间, 人们用闪光光解方法对蛋白质的主要发色团残基的原初光化学反应做了相当多的工作, 这为研究酶的光化学机制奠定了良好的基础。某些工作还探讨了残基破坏与蛋白质空间构象的关系。本文将对此作一扼要的介绍。

二、发色团氨基酸的光解原初过程

蛋白质中主要发色团氨基酸是芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)、半胱氨酸、胱氨酸及组氨酸。闪光光解研究证明, 光电离和光分解是光化学反应的主要原初过程。

1. 色氨酸 其光化学分解在蛋白质的光化学和光生物学过程中起着重要的作用。色氨酸的主要光解产物为色胺、狗尿氨酸、吲哚-3-醋酸、氨、脂肪族氨基酸和过氧化氢。其原初光解过程表示如下:

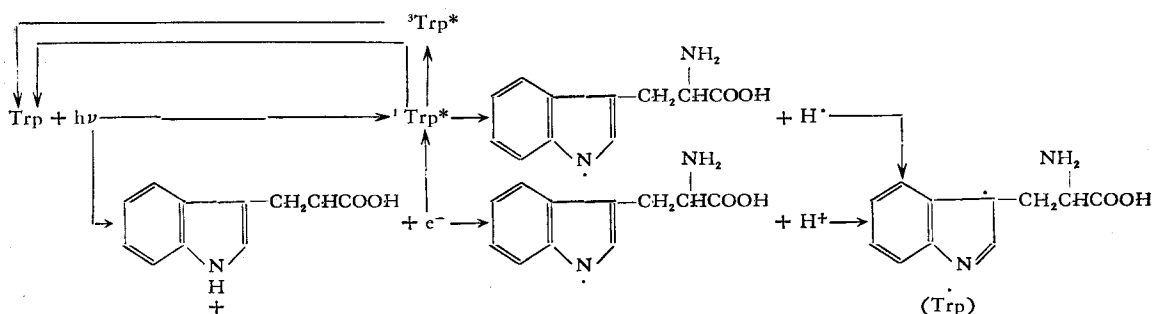
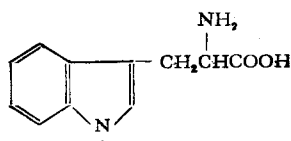


图 1 色氨酸光解的原初过程

色氨酸吸收一个能量足够的光子后, 或者跃迁为激发单线态 $^1\text{Trp}^*$ 或者打出一个光电子变成阳离子 $\text{Trp}^{+\bullet}$ 。 $\text{Trp}^{+\bullet}$ 的寿命很短, 约 1×10^{-6} 秒, 它可能由于再与电子结合而跃迁到 $^1\text{Trp}^*$

或者失去质子而成为色氨酸中性自由基 $\text{Trp}^\bullet$, $^1\text{Trp}^*$ 或者通过系统间跃迁生成 $^3\text{Trp}^*$, 或者激发能用于使吲哚环上的 N-H 键断裂, 形成一个极不稳定的自由基



这自由基再经电子重排，在 3 位碳上产生不配对电子，从而形成中性自由基 Trp

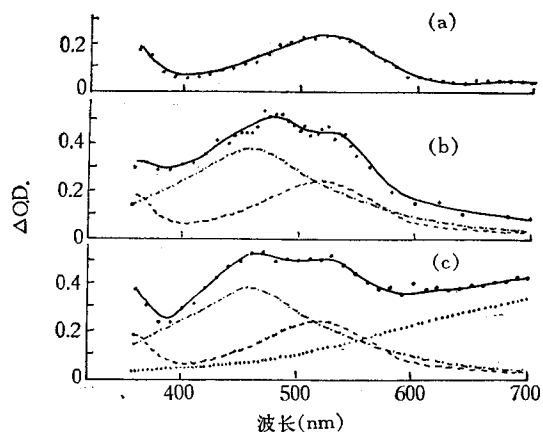
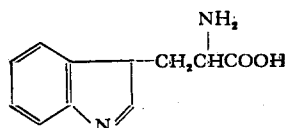


图 2 $1.58 \times 10^{-4} M$ 色氨酸水溶液 (pH5.0) 光解瞬态产物的吸收光谱^[2]

(a) 空气饱和, 由于三线态 ^3Trp 和 e_{aq}^- 均被氧猝灭, 只看到 Trp ($\lambda_{\max} = 510\text{nm}$) (b) N_2O 饱和, e_{aq}^- 被清除, 可观察到 Trp 和 ^3Trp ($\lambda_{\max} = 460\text{nm}$); (c) N_2 气饱和, 三种瞬态产物均可观察到。在(b)和(c)中, 实线是实际观察到的光谱, 它们分解为下列组份: ----Trp, - - - - ^3Trp 和 e_{aq}^-



用闪光光解方法在中性或碱性溶液中可以检测出三种瞬态产物, 即 Trp、 ^3Trp 和 e_{aq}^- (见图 2)。

量子产额是光化学反应的重要参数, 它既反映了特定波长的光引起某种反应的效率, 也反映了不同物质发生某种光反应的能力。光解原初产物的量子产额取决于激发光的波长和溶液的 pH 值, 由于测量技术上的误差, 不同作者测量结果不完全一致 (见表 1)。

表 1 色氨酸原初光解产物的量子产额

原初光产物	测量条件	量子产额 ϕ	文 献
水合电子 e_{aq}^- 或 Trp^+	265nm 光, pH6.4	0.11	[6]
	265nm 光, pH6.0	0.080	[3]
Trp	Xe 闪光灯, pH6.42	0.050	Paithorpe, et al. (1973)

2. 酪氨酸 是唯一具有可解离发色团 (酚环) 的芳香族氨基酸。它的光解稳定产物主要有: 天冬氨酸、天冬酰胺、双酪氨酸、氨和多巴。在空气中, 多巴氧化成黑素。

光解原初过程如下:

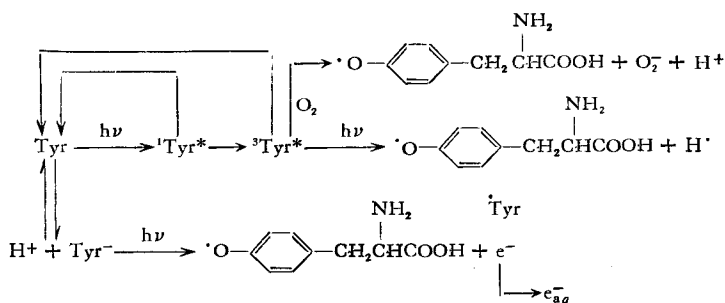
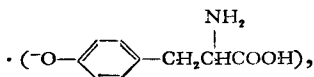


图 3 酪氨酸光解的原初过程

由于酪氨酸酚环上的羟基在水中可以解离 ($\text{pK} \approx 11$) 形成阴离子 Tyr^-



酪氨酸与其阴离子的光解过程不同, 多数作者认为前者是双光子过程, 而后者是单光子过程。

中性酪氨酸分子吸收一个光子后, 首先跃迁至激发单线态 $^1\text{Tyr}^*$ (很可能是 S_2 态), $^1\text{Tyr}^*$ 大部分通过内转换和荧光发射返回基态, 少部分变成第一激发三线态 $^3\text{Tyr}^*$, $^3\text{Tyr}^*$ 再吸收第二个光子使分子有足够的激发能而致酚环上羟基的 $\text{H}-\text{O}$ 键断裂, 形成 $\dot{\text{Tyr}}$ 自由基。对于 Tyr^- , 由

于电离电位降低,吸收一个光子即可从解离的酚环上击出一个电子而形成 $\dot{\text{Tyr}}$ 。有氧存在时, $^3\text{Tyr}^*$ 可与 O_2 反应形成 $\dot{\text{Tyr}}$ 、 O_2^- 和 H^+ ,从而增加了 $\dot{\text{Tyr}}$ 的产额。

酪氨酸闪光光解产物的瞬态吸收光谱和量

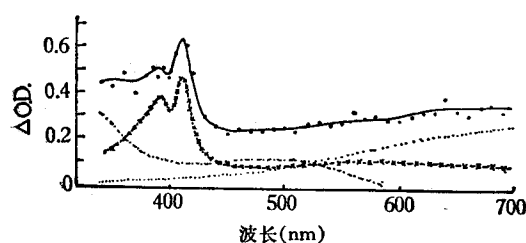


图 4 $5.8 \times 10^{-4} \text{M}$ 酪氨酸水溶液 (pH5.0, N_2 饱和) 闪光光解瞬态产物的吸收光谱^[2](实线)
 $\dot{\text{Tyr}}$ (—×—×—); $^3\text{Tyr}^*$ (·····) 和 e_{aq}^- (-----)

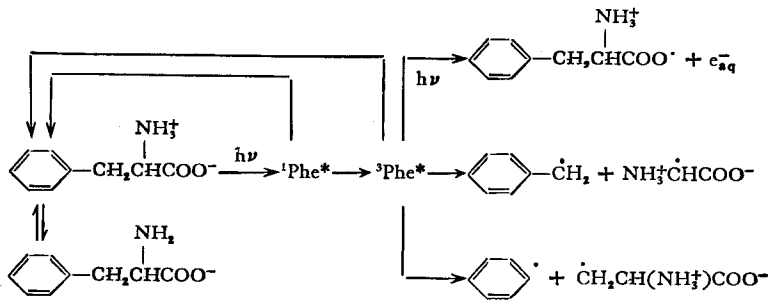


图 5 苯丙氨酸的光解原初过程

在近中性溶液中苯丙氨酸以

$$\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$$

的形式存在,而在碱性溶液中则为

$$\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$$

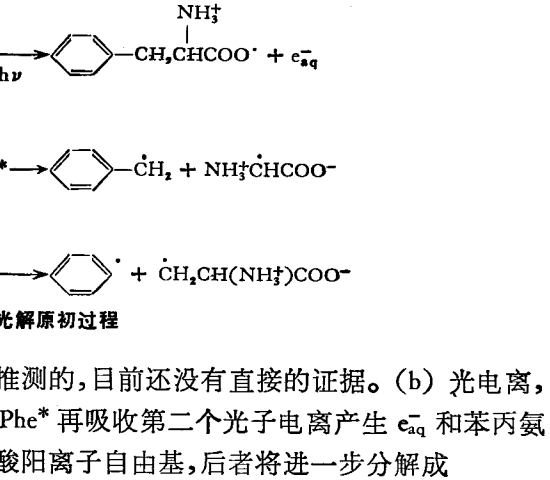
吸收一个光子后跃迁至激发单线态 $^1\text{phe}^*$,通过发荧光和内转换返回基态,或者变成三线态 $^3\text{Phe}^*$, $^3\text{Phe}^*$ 可以进一步发生两种过程:(a)光分解,当氨基以 NH_3^+ 存在时,由于 $^3\text{Phe}^*$ 的激发能与C-C键的键能大致相同,因此几乎不需要活化能就可以分解。当氨基以 $-\text{NH}_2$ 存在时,必须再吸收一个光子 $^3\text{Phe}^*$ 才能分解产生 $\text{PhCH}_2\cdot$ 和甘氨酸自由基或 $\text{Ph}\cdot$ 和丙氨酸自由基。闪光光解实验中观察到主要是前一种分解,后一种分解是根据芳香羧酸闪光光解实验

子产额,见图4、表2。

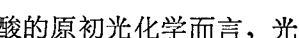
表 2 酪氨酸光解原初产物的量子产额

原初光产物	光解条件	量子产额 ϕ	文献
水合电子 e_{aq}^-	265nm	0.151	[4]
	265nm pH7.5	0.095	[5]
	pH11.5	0.151	[5]
	265nm pH4—8	0.088	[6]
	265nm pH9—12	0.112	[6]
对位 α -氨基丙酸-苯氧自由基 $\dot{\text{Tyr}}$	265nm pH4—8	0.14	[6]
	265nm pH9—12	0.112	

3. 苯丙氨酸 苯丙氨酸的稳定光解产物是氨、多巴、酪氨酸和一些脂肪族氨基酸。它的光解原初过程与游离末端的氨基和羧基的解离状态有关,可用下图表示。



推测的,目前还没有直接的证据。(b) 光电离, $^3\text{Phe}^*$ 再吸收第二个光子电离产生 e_{aq}^- 和苯丙氨酸阳离子自由基,后者将进一步分解成



对苯丙氨酸的原初光化学而言,光分解可以是一个单光子过程,也可以是一个双光子过程,它取决于氨基的解离状态;而光电离总是双光子过程。苯丙氨酸光解原初产物的瞬态吸收光谱和量子产额见图6和表3。

表 3 苯丙氨酸光解原初产物的量子产额 (水溶液 25℃)^[7]

原初光产物	条 件	量子产额 ϕ
水合电子 e_{aq}^-	265nm 激发光 pH7.5	0.034
	265nm 激发光 pH11.1	0.028
苯甲基自由基 $\text{PhCH}_2\cdot$	265nm 激发光 pH7.5	0.034
	265nm 激发光 pH11.1	0.058

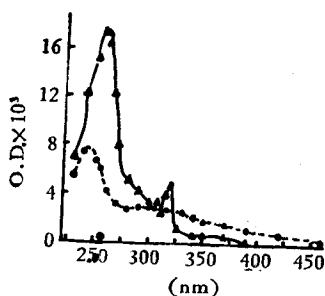


图 6 $4 \times 10^{-3} M$ 苯丙氨酸水溶液 (pH11.6) 瞬态吸收光谱^[7]

用 265 nm 激光光解后分别在 20ns 和 10μs 时观察 (e_{aq}^- 已被 N_2O 清除)。

$^3Phe^*$ (·) 和 $Ph\dot{C}H_2$ (▲)

芳香氨基酸的原初光解过程直接影响着蛋白质的最终光化学变化(如酶的钝化,蛋白质与核酸的交联),用快速吸收光谱学方法定量研究原初光产物的继发过程,必须知道原初产物的摩尔消光系数,为此把它们汇集在表 4 中。

表 4 芳香族氨基酸光解原初自由基的吸收峰值和摩尔消光系数

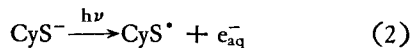
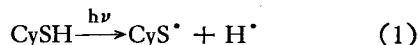
氨基酸	主要自由基	观察条件	$\lambda_{max}(nm)$ $\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	文献
色氨酸	色氨酸中性自由基 Tip	pH7—12	510 1800 ± 200	[4]
			330 3100 ± 300	
		pH7	510 $1750(\pm 20\%)$	[8]
			320 $2800(\pm 20\%)$	
酪氨酸	对位 α -氨基丙酸苯氧自由基 $\dot{T}yr$	pH7	520 1840	[9]
			320 2860	
			410 2600 ± 500	[10]
			390	
			410 2750 ± 200	
苯丙氨酸	苯甲基自由基 $Ph\dot{C}H_2$	pH11.6	405	[11]
			390 $3150 \pm (10\%)$	
			410 $3400(\pm 10\%)$	
			390	
苯丙氨酸	苯甲基自由基 $Ph\dot{C}H_2$	pH11.6	318 9.0×10^3	[9]
			307 4.7×10^3	
			258 2.5×10^4	

4. 胱氨酸和半胱氨酸 有机二硫键在生物分子的结构和功能中起着重要的作用。胱氨酸光解量子产额很高,是影响蛋白质功能最敏感的靶部位。

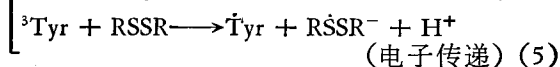
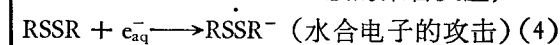
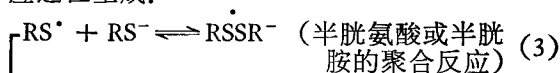
在 254nm 光照下,胱氨酸($CySSCy$)光解产物包括半胱氨酸($CySH$)、 NH_3 、 H_2S 、 $CySO_3H$ 等。光解瞬态产物有 $CySSCy^-$ 、 $CyS^{\cdot}$ 、 $CySS$ 。用 ESR 方法研究表明:辐照含硫氨基酸时,在

硫原子上产生不配对电子,并形成相应的自由基。 $RSSR^-$ (R 代表烷基)在 420nm 附近有强的特征吸收; $RS^{\cdot}$ 在波长 300 与 400 之间只有弱的吸收。1981 年 Morine 报道二硫化物水溶液闪光光解时,观察到由 C-S 键断裂产生的过硫自由基(RSS),它的吸收最大值在 380nm(胱氨酸和胱胺也产生这种自由基)^[12],由于产生 RSS 的反应可能是不可逆的,因此,蛋白质的永久性光损伤可能与该自由基有关。

半胱氨酸光解原初反应如下式:



二硫阴离子自由基 $RSSR^-$ 可以通过几种反应途径生成:



三、蛋白质的闪光光解研究

大部分工作是研究酶的光钝化问题。即研究酶的初始光化学产物及其与酶的永久性化学损伤和生物活力变化的关系。

1. 蛋白质光解的瞬态产物 蛋白质光解产生瞬态产物的类型取决于组成它的氨基酸残基的光解性质。一些蛋白质闪光光解产生的主要瞬态产物列于表 5^[13]。

表 5 蛋白质光解的瞬态产物

蛋 白 质	自 由 基			
	Tip	-s·s-	$\dot{T}yr$	e_{aq}^-
溶菌酶 pH7	×	×		×
胰蛋白酶 pH7	×	×		×
木瓜蛋白酶 pH7	×	×		×
人血清白蛋白 pH3	×	×	×	
碳酸酐酶 pH3	×	×		
枯草杆菌蛋白酶 pH7	×		×	
核糖核酸酶 A pH11.5			×	×
胰岛素 pH11.5			×	×
组蛋白 pH3			×	

根据不同气体饱和时某些自由基可以被猝灭,而另一些自由基保持不变的性质,发展了自由基光谱研究技术。

图 7 给出的是以色氨酸为主要发色团的木瓜蛋白酶,在不同气体饱和条件下,分辨出的几种瞬态产物: Trp 、 ^3Trp 、 $-\text{SS}^-$ 、 e_{aq}^- 在 N_2O 气饱和条件下清除了 e_{aq}^- 而不猝灭 $-\text{SS}^-$;若充以空气,则 e_{aq}^- 和 ^3Trp 都被猝灭,但 Trp 不改变。

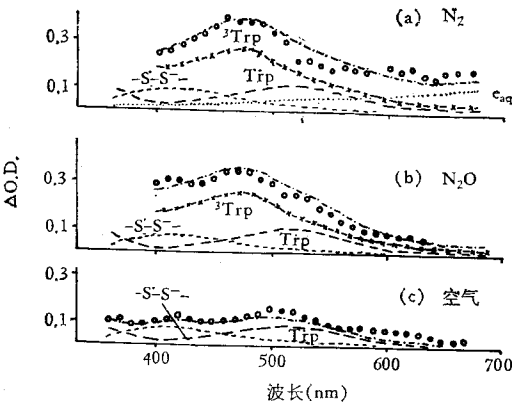


图 7 $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ 木瓜蛋白酶闪光光解瞬态光谱
5 微秒延迟, pH7

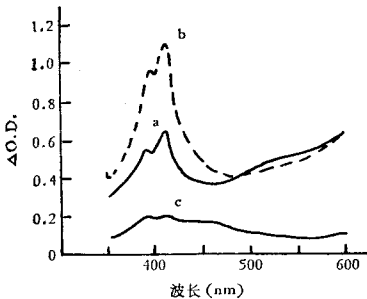


图 8 RNA 酶 A 闪光光解瞬态光谱
(a) $42 \mu\text{M}$ RNA 酶, pH11.5; (b) 在 pH11.5 时, 相当于 $42 \mu\text{M}$ 核糖核酸酶的氨基酸混合物; (c) $42 \mu\text{M}$ RNA 酶, pH7.0^[14]

图 8 是核糖核酸酶与等浓度氨基酸混合物光解产生的 $\dot{\text{Tyr}}$ 产额的比较。在 pH7 时, RNA 酶中酪氨酸残基的光解受到抑制, 在碱性条件下, 它们被光电离形成 $\dot{\text{Tyr}}$, 但是量子产额低于游离状态的酪氨酸。

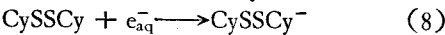
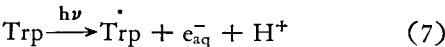
2. 芳香族氨基酸残基对胱氨酸残基的敏化作用

通过闪光光解方法了解到, 蛋白质中胱

氨酸残基的光解可以被芳香族氨基酸残基敏化。同时含胱氨酸和酪氨酸残基的蛋白质中, 胱氨酸残基光解的量子产额比相应浓度的胱氨酸大 1.5—2 倍, 而在同时含色氨酸残基的蛋白质中, 胱氨酸残基的光解产额更高。蛋白质中胱氨酸残基光解的量子产额可用下式表示:

$$\Phi = f_c \Phi_c + f_{\text{trp}} \Phi_{\text{trp}} + f_{\text{tyr}} \Phi_{\text{tyr}} + f_{\text{phe}} \Phi_{\text{phe}} \quad (6)$$

式中 f_c 、 f_{trp} 和 f_{tyr} 分别代表 CyS 、 Trp 和 Tyr 残基吸收光能的相对比例, 而 Φ_c 是胱氨酸残基本身直接吸收光能引起的光解量子产额, Φ_{trp} 、 Φ_{tyr} 和 Φ_{phe} 是由于光能被色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸吸收而引起胱氨酸分解的量子产额。这种反应的机制是芳香氨基酸光电离产生的电子沿着蛋白质分子传递给胱氨酸残基, 从而使二硫键还原。例如, 色氨酸残基对胱氨酸残基的敏化是通过如下的反应:



酪氨酸光解也产生类似的结果。

3. 氨基酸残基损伤与酶的光化学钝化的关系

多年来对于酶的紫外光钝化机制的研究发展了两种不同的理论。McLaren 等认为蛋白质中任何氨基酸残基的损伤都能引起酶钝化, 而不考虑各种残基的相对重要性和它们之间的能量传递。于是, 酶钝化的量子产额 Φ_e 可以表示为

$$\Phi_e = \frac{\sum_i \Phi_i \epsilon_i n_i}{\epsilon_e}$$

式中 Φ_i 、 ϵ_i 和 n_i 分别为酶中第 i 种氨基酸残基的光解量子产额、摩尔消光系数和该种残基的数目, ϵ_e 是酶的摩尔消光系数。

Augenstein 等则认为酶的紫外钝化是由于特异的胱氨酸残基的破坏。该理论强调能量传递的重要性。也有的作者认为这两种理论都正确, 只是由于酶的结构特点不同, 光钝化机制不同而已。现在已把闪光光解工作与酶的结构及永久性损伤的研究联系起来, 以探讨各种酶的钝化机制。就目前资料可以看出, 鸡溶菌酶和木瓜蛋白酶紫外照射时主要由于色氨酸残基光解

而钝化(前者是 Trp108, 后者是 Trp177); 牛胰蛋白酶有 2—3 个色氨酸残基是光易变的, 邻近 Ser198 的 Trp199 是紫外钝化的靶部位, 由酪氨酸和胱氨酸残基吸收光形成的自由基对酶的钝化也有贡献; RNA 酶的光钝化与靠近 Tyr 25 的胱氨酸二硫键的光解有关, 酪氨酸光电离则不十分重要。

从闪光光解瞬态光谱能够得到衡量光解效率的两个参数: 相对光解效率 (即酶成份中某种氨基酸光解的量子产额与该种氨基酸在游离状态下光解量子产额之比。以色氨酸为例, 假定某些色氨酸不光解, 而其余的以与游离的色氨酸水溶液相同的效率光解, 就得到表 6 中的 n_{ox} 值)。第二个参数是光电离量子效率 (根据光强度测量和自由基消光系数得到的)。

表 6 中的 n_{ox} 值可以和用普通方法测量的芳香族残基在结构中处于埋藏和暴露的状态相比较。 n_{ox} 值近似等于在平均钝化剂量下永久损伤的残基数。 Volkert 等用闪光光解方法测量

表 6 酶中色氨酸残基的光解量子产额、曝露数以及与酶钝化量子产额 ϕ_e 的比值

酶	n_{ox}^a	$\Phi(\text{Trp})^b$	$\Phi^*(\text{Trp})^c$	$\Phi'_{\text{trp}}/\Phi_e^d$	曝露残基数
溶菌酶	2.5	0.05	0.13	1.7, 2.5	~2
胰蛋白酶	2.4	0.04	0.07	1.8, 1.0	2—3
木瓜蛋白酶	3.0	0.04	0.07	3.3	2
核糖核酸酶 A	2.4	—	—	1.3	2~3

a. 酶中色氨酸残基中能够光电离的数目
b. 酶分子中色氨酸残基的光解量子产额
c. $\Phi^*(\text{Trp}) = \Phi(\text{Trp}) \times (Z_{\text{trp}}^0/n_{ox})$, 若酶分子中所有色氨酸残基都能光电离所应得到的色氨酸中性自由基的量子产额。 Z_{trp}^0 是酶含有的色氨酸残基数。
d. 钝化一个酶分子要破坏的色氨酸残基数。

核糖核酸酶光解产生 Tyr 的量子产额, 并与游离酪氨酸的产额进行比较, 证明在 pH10 条件下, RNA 酶 6 个酪氨酸残基中有 3 个是暴露的。

在蛋白质光化学研究中, 除强调局部的改变, 即敏感的氨基酸残基的光解外, 还必须考虑蛋白质的构象、聚集状态以及微环境等因素。

综上所述, 闪光光解有可能作为研究蛋白质结构与功能的一种手段。

参 考 文 献

[1] Norrish, R. G. W. et al.: *Nature*, **164**, 658, 1949.
[2] Grossweiner, L. I. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **29**, 1, 1976.
[3] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2612, 1975.
[4] Bryant, F. D. et al.: *J. Phys. Chem.*, **79**, 2711, 1975.
[5] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2599, 1975.
[6] Baugher, J. F. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **22**, 163, 1975.
[7] Bent, D. V. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2606, 1975.
[8] Redpath, J. L. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **28**, 243, 1975.
[9] Fietelson, J. et al.: *J. Phys. Chem.*, **77**, 10, 1073.
[10] Baugher, J. F. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **28**, 175, 1978.
[11] 沈恂等:《生物化学与生物物理学报》, 1982年 14 卷, 437页。
[12] Morine, G. H. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **33**, 1, 1981.
[13] Grossweiner, L. I.: *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, **11**, 141, 1976.
[14] Volkert, W. A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **17**, 81, 1973.

[本文于 1982 年 7 月 26 日收到]

活性氧在放射生物学中的作用

郑 荣 梁

(兰州大学生物物理教研组, 兰州)

人们早已知道电离辐射作用于水分子产生的自由基能引起一系列放射生物学间接效应。

但是近十多年来才认识到水的射解产物——活性氧类的重要作用。活性氧类不仅引起一系列