

辐射引发肌球蛋白自由基的 ESR 研究*

林维真 屠铁城 董继荣

(中国科学院上海原子核研究所, 上海)

摘要 本文用电子自旋共振波谱法, 对经过低温 γ 辐照的肌球蛋白产生的自由基及其在程序升温中发生的反应进行了研究。由 77 K 辐照并测定的 ESR 谱表明, 低温下肌球蛋白产生的主要初级不稳定产物为羰基阴离子自由基 ($g = 2.0037$)。经过程序升温并达到 223 K 时, 所测得的 ESR 谱又显示了次级不稳定产物: 肽链 α 碳抽氢自由基的波谱特征。随着测定温度继续上升, 该自由基很快的衰减。

关键词 肌球蛋白; 羰基阴离子自由基; α 碳抽氢自由基。

前 言

1955 年 Cordy 等人第一次用 ESR 波谱测定了被 X 线照射过的蛋白质所产物的自由基^[1]。随着检测技术的进步, 低温 ESR 方法为研究蛋白质辐解不稳定产物的反应机制和性质提供了有意义的信息。Taub 总结了他们对辐照导致的肌球蛋白化学反应的 ESR 研究后指出^[2], 当干燥的肌球蛋白在 233 K 辐照并测定时, 得到的主要辐解产物是肽链 α 碳抽氢自由基, 该自由基的 ESR 信号强度只随温度的升高而减弱, 在 273 K 时其 $t_{1/2} = 8h$ 。同时, Taub 对该自由基产生的机制作推论。在此基础上, 我们应用电子自旋共振波谱仪检定了猪肌球蛋白经 77 K γ 辐照后产生的初级不稳定产物, 并用程序升温法跟踪检测该产物随着温度升高而发生变化。

实 验 部 分

1. 抽提肌球蛋白

将定量的新鲜猪里脊部位瘦肉, 绞碎后按 Perry 法抽提^[3], 得到肌球蛋白粗提取物的 KCl 溶液, 分离掉其中的肌动蛋白和其他杂蛋白质后, 将提取物溶于 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 KCl 溶液中, 可短期保存在低温冰箱内以备用。同时, 对该提取物做聚丙烯酰胺-SDS 的凝胶电泳^[4], 鉴定它的纯度。

2. 制备样品并辐照

取上述肌球蛋白的 KCl 溶液, 倒入冷冻干燥装置内, 低温下抽干。将肌球蛋白冻干物制成圆柱状, 放入 $\phi = 3 \text{ mm}$ 的 GG-17 玻管内, 通入 99% 的纯氮 5 min 后封管。将该样品管浸入液氮内, 放入 $4.44 \times 10^{16} \text{ Bq}$ 的 Co^{60} 源辐照室, 辐照至总吸收剂量达 100 kGy 为止。

3. 测定样品的 ESR 波谱

用 Varria-E112 电子自旋共振波谱仪的 X 波段, 测定受照样品在所研究温度下的 ESR 波谱, 微波功率为 1mW, 由 E-500-2 NMR Gauss 计进行磁场跟踪测定, 同时使用 E-231/232 样品双腔和 DPPH 标准样品, 标定被测样品的 g 因子。当进行程序升温测定时, 改用 E-257/WL-257 程序升温装置。

* 本文系国家自然科学基金资助项目。

结果与讨论

1. 77 K 辐照并测定的肌球蛋白谱

77 K 辐照并测定的肌球蛋白的 ESR 谱图(见图 1), 显示出一个较对称的单峰, $g = 2.0037$, 线宽为 26.5 G, 在单峰两侧还略带一组重叠峰的痕迹, 总线宽为 130 G。

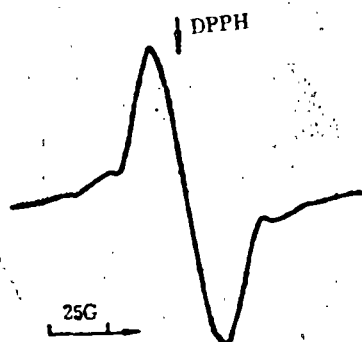


图 1 肌球蛋白 77 K 辐照, 77 K 测定的 ESR 谱

Fig. 1 The ESR spectrum from myosin irradiated and recorded at 77 K.

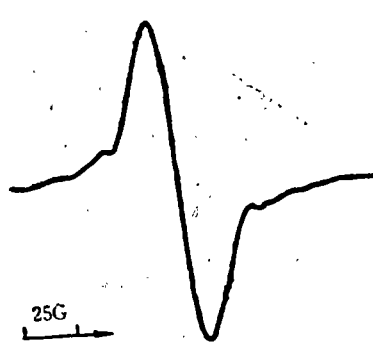


图 2-a

图 2 肌球蛋白 77 K 辐照, 程序升温测定的 ESR 谱

a. 113 K 测定的 ESR 谱, b. 153 K 测定的 ESR 谱

Fig. 2 The ESR spectra from myosin irradiated at 77 K

a. recorded at 113 K.

b. recorded at 153 K

图 2-b

根据 1970 年 Box 对甘氨酸单晶在 4.2 K 下的辐解研究指出^[5], 甘氨酸单晶的初级辐解还原产物为羧基阴离子自由基($\text{NH}_3-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}-\text{OH}$), 其各向异性 g 因子分别为 2.0026, 2.0041,



2.0048。继而他又在 X 线照射的 ^{13}C 标记的乙酰甘氨酸的 ENDOR 研究中^[6], 证明了在 4.2 K 时它的初级还原产物($-\overset{13}{\text{C}}-\dot{\text{C}}-$)的 g 因子非常接近 2.0036, 接着, 他将辐照后的化甘氨酸酰胺甘氨酸的



盐酸单晶辐照后作了 ENDOR 研究^[7], 进一步指出它的辐解还原产物分别是酰胺键羰基电子加合自由基($-\overset{\cdot}{\text{C}}-$)和羧基电子加合自由基($-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{OD}$)。而 Simic 对多肽水溶液的辐解效应进行研究



后^[8], 认为随着肽键($-\text{C}-\text{N}-$)数目的增加, 酰胺键上羰基亲电子能也相应增强, 该基团的



电子加合产物: 羧基阴离子自由基($-\text{NH}-\text{CHR}-\dot{\text{C}}-$)就成为蛋白质初级辐解还原产物中的主



要成分。本实验在 77 K 得到的肌球蛋白 ESR 谱图中 $g = 2.0037$ 的单峰, 即反映了该自由基在此温度下的 ESR 波谱特征。另外, 肌球蛋白所含有的芳香氨基酸残基和二硫键部分, 其亲电子性能均很强, 辐照后它们与酰胺键竞争电子, 生成各自的电子加合自由基, 在 ESR 谱图中表现为位于单峰两侧的重叠峰信号。

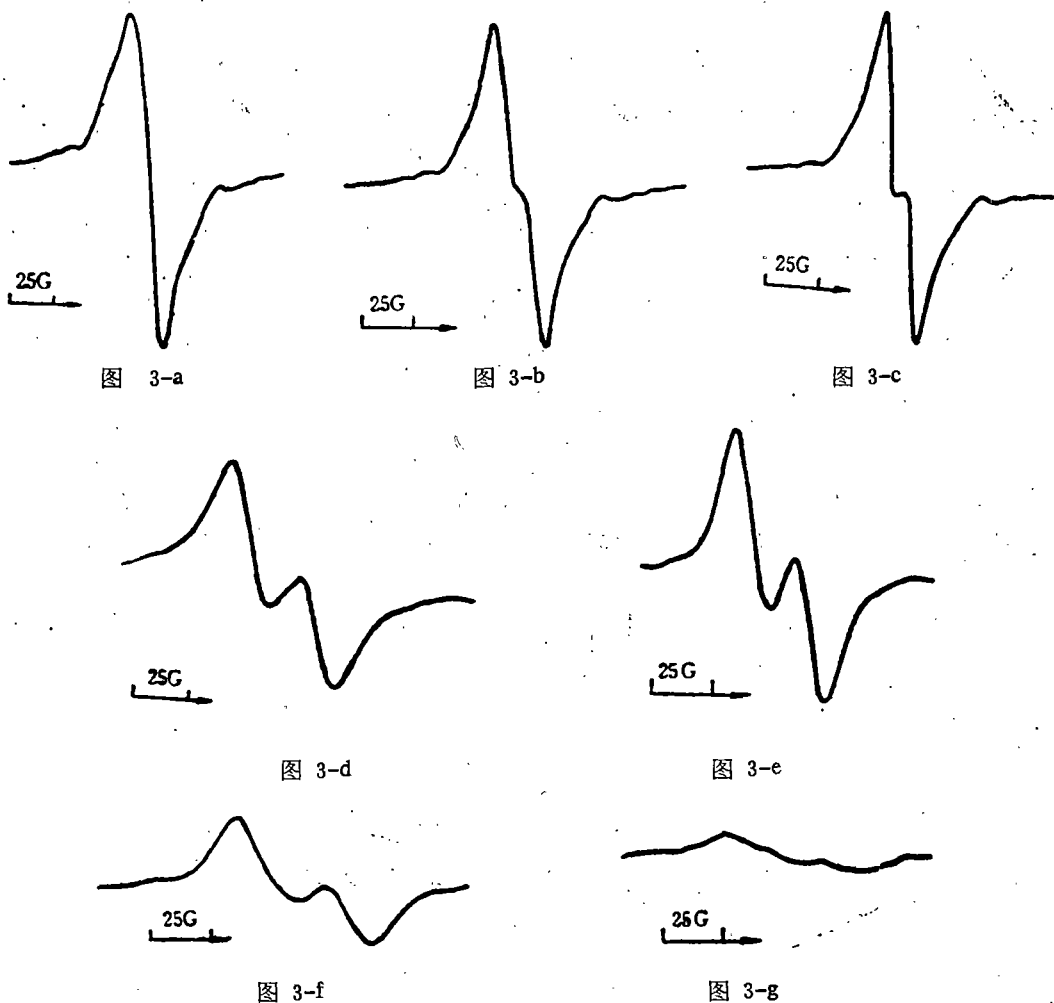


图 3 肌球蛋白 77 K 辐照, 程序升温测定的 ESR 谱

- a. 193 K 测定的 ESR 谱; b. 213 K 测定的 ESR 谱
c. 223 K 测定的 ESR 谱; d. 253 K 测定的 ESR 谱
e. 273 K 测定的 ESR 谱; f. 293 K 测定的 ESR 谱; g. 313 K 测定的 ESR 谱。

Fig. 3 The ESR spectra from myosin irradiated at 77 K

- a. recorded at 193 K. b. recorded at 213 K; c. recorded at 223 K;
d. recorded at 253 K; e. recorded at 273 K; f. recorded at 293 K;
g. recorded at 313 K.

2. 程序升温过程中肌球蛋白 ESR 谱的变化

从 77 K 至 173 K 程序升温过程中测定的 ESR 谱(见图 2 a, b), 谱形均无变化, 显示了羰基阴离子自由基的特征谱形, 但是其 ESR 信号强度略有衰减。

从 173 K 开始, 随着温度程序性升高, 肌球蛋白的 ESR 谱形出现了变化(见图 3 a, b)。当温度达到 223 K 时, 其 ESR 谱图中央出现了一个 $\Delta H_{pp} = 28$ G 的二重峰(见图 3 c), 由 Taub 结论可知此二重峰为肽链上 α 碳抽氢自由基的特征峰($-\text{CR}-\text{CO}-\text{NH}-$)。接着继续阶段性升温至 313 K, 其 ESR 谱的二重峰信号迅速衰减(见图 3 d, e, f, g)。

根据 Sevilla 对几种二肽的碱性玻璃态在 77 K 经过 UV 辐照后所作的 ESR 研究^[9], 得出 77 K 生成的二肽羰基阴离子自由基, 在升温后通过分子内电子转移, 导致二肽脱氨反应, 在 180 K 时

生成了碳中心的自由基($\text{CHR}-\text{CO}-\text{NH}$), 该自由基又与二肽发生抽氢反应, 在 190 K 时生成 α 碳抽氢自由基($-\text{NH}-\text{CR}-\text{CO}$), 继续升温, 使该自由基发生重合反应而消失。本实验升温过程中测得的肌球蛋白 ESR 谱图的变化表明了蛋白质辐解反应也遵循类似的途径, 但是在 223 K 时才显示出肌球蛋白 α 碳抽氢自由基的 ESR 信号。这可能是由于蛋白质的羰基阴离子自由基还存在着通过蛋白质分子间氢键而进行的电子转移过程, 引起蛋白质肽链脱氨、脱酰胺等反应, 导致肽链断裂, 生成多种小分子多肽自由基, 这些自由基同时存在着与蛋白质 α 位碳的抽氢反应, 以及自由基间的重合反应, 这样就滞后了 α 碳抽氢自由基的出现。

结 论

由本工作的结果可见, 在 77 K 经 γ 辐照后, 肌球蛋白生成的主要电子加合产物是羰基阴离子自由基, 它从 173 K 时起, 通过电子转移引起一系列反应, 最后导致在 223 K 生成更稳定的 α 碳抽氢自由基, 该自由基随着检测温度的升高会迅速衰减。

在本实验进行过程中, 得到了上海生化所鲁子贤研究员和其他同志对肌球蛋白抽提工作所给予的热情指导, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] W. Cordy; W. B. Ard and H. Shields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 985(1955).
- [2] I. A. Taub; M. G. Simic; F. F. Robins; J. E. Walker and E. Wierbicki *Ed. Tech.* 184(1979).
- [3] S. V. Perry. in S. P. Colowick and N. D. Kaplan ed; "Methods in Enzymology" VI. II. 582 (1955).
- [4] K. Weber and M. Osborn. *J. Biol. Chem.* 244. 4406(1969).
- [5] H. C. Box. "Radiation Effects, ESR and ENDOR Analysis" 145. Academic Press, New York, 1977.
- [6] H. C. Box; E. E. Budzinski and K. T. Lilgo. *J. Chem. Phys.* 57. 4295(1972)
- [7] H. C. Box and J. Y. Lee. *J. Chem. Phys.* 61. 428(1974).
- [8] M. G. Simic. *J. Agric. Food Chem.* 26. 6(1978).
- [9] M. D. Sevilla. *J. Phys. Chem.* 74. 18(1970).

(稿件收到日期: 1987 年 10 月 21 日)

ESR STUDIES OF RADIATION INDUCED RADICAL PRODUCTS FROM MYOSIN

Lin Weizheng Tu Tiecheng Dong Jirong

(Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, Shanghai, China)

ABSTRACT Radiation induced primary radicals from dried pork myosin irradiated at 77 K, and the subsequent radicals appeared in the course of variable temperature elevation from 77 K to 313 K have been studied by ESR. The ESR spectrum shows that the primary carbonyl anion radical in the peptide chain ($g=2.0037$) is the predominant transient product from the myosin irradiated at 77 K and somewhat higher temperature than 77 K. Then at 223 K, the secondary transient species, α -carbon radical on the peptide backbone which was characterized by the ESR spectrum of the myosin just appeared via the variable elevation of temperature. Finally, this kind of radical decayed rapidly with elevating from 223 K to 313 K variably.

KEY WORDS Myosin; Carbonyl Anion Radical; α -carbon Radical,