

辐射引发肌球蛋白与咖啡酸之间 电子转移的ESR波谱研究

林维真 屠铁城 董继荣

(中科院辐射化学开放研究实验室, 上海原子核研究所, 上海 201800)

摘要 采用计算机计算模拟 ESR 波谱法, 研究 77 K 下辐射引发电子沿肌球蛋白肽链长程转移, 并最终定域于咖啡酸的机制。对 77 K 测定的一系列不同摩尔比肌球蛋白-咖啡酸二元体系 ESR 波谱进行解析, 求得各二元体系中由于电子自肌球蛋白向咖啡酸转移产生的咖啡酸自旋数与辐照直接产生的咖啡酸自旋数之比值 R_{ST} 。结果显示, R_{ST} 值随体系内肌球蛋白的氨基酸残基数与咖啡酸摩尔数之比的递增呈线性递升。参照肌球蛋白肽链酰胺基、亲电子氨基酸与咖啡酸最低空轨道能量的理论值, 并比较它们与水合电子反应的速率常数, 阐述了辐射引发的次级电子在固态二元体系内被肌球蛋白的亲电子组分俘获, 转移及最终定域于咖啡酸的机制。

关键词 电子转移, 肌球蛋白, 咖啡酸, ESR 波谱解析

咖啡酸是亲电子性能较强的羟基肉桂酸衍生物, ESR 研究表明它对 DNA 及其组分具有明显的电荷转移保护效应, 并已用来研究辐射引发电子沿 DNA 双链长程转移的机制^[1]。为了研究辐射引发电子沿蛋白质肽链转移的机制, 本文以咖啡酸为电子受体, 研究低温下辐射引发肌球蛋白-咖啡酸二元体系内由两种途径产生的咖啡酸自旋浓度之比值 R_{ST} 与咖啡酸相对含量变化的关系, 比较脉冲辐解测定的亲电子氨基酸^[2]和咖啡酸分别与水合电子 e_{aq}^- 反应的速率常数, 及各亲电子组分的最低空轨道能量, 结合室温退火后二元体系 ESR 波谱的变化, 阐明辐射引发电子在肌球蛋白-咖啡酸二元体系内转移与定域的机制。

1 实 验 部 分

1.1 样品制备及辐照

1.1.1 肌球蛋白 本开放实验室提取^[3], 为含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl 的肌球蛋白水溶液, pH 为 6.5。聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳检定其纯度, 根据紫外分光光度吸收值计算溶液中肌球蛋白浓度约为 8 mg/ml , 平均分子量为 46×10^4 。

1.1.2 咖啡酸 上海试剂一厂产品, 用三次重蒸水重结晶, 熔点 224°C 。

1.1.3 制样 配浓度为 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 咖啡酸水溶液, 将肌球蛋白溶液与不同量的咖啡酸溶液充分混匀, pH 6.6—6.8, 在液氮中冻结, 真空抽干至恒重, 制成以肌球蛋白氨基酸残基数与咖啡酸摩尔数之比从 1:1 到 100:1 的一组二元分子混合物。分别将分子混合物、冻干的纯肌球蛋白

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1993-12-04, 修改稿 1994-03-16

白和纯咖啡酸装入各自的辐照管, 通干燥纯氮气后封管。在液氮中进行 ^{60}Co γ 辐照, 总吸收剂量达 100 kGy, 所有样品均在液氮温度下测定 ESR 波谱。

1.2 ESR 波谱测定及数据处理

使用 Varian E-112 电子自旋共振波谱仪 X 波段, 在 77 K 下测定所有样品的 ESR 波谱。微波功率 1 mW, 用 E-500 NMR 进行磁场跟踪测量, E-231/232 双样品腔和 DPPH 协同标定所测样品的 g 因子, 以联用的 HP-9835 B 微机记录样品的 ESR 信号。以强 Pitch 作标, 二次积分后计算纯肌球蛋白和纯咖啡酸的自旋数 S_m 、 S_c 。根据低温下复合 ESR 谱可用其组分的单谱信号线性叠加拟合的原理进行模拟, 即二元体系的总自旋数 $S_r = W_{mr}S_m + W_{cr}S_c$, 这里 W_{mr} 、 W_{cr} 分别是纯肌球蛋白(M)和纯咖啡酸(C)的自旋信号在摩尔比为 γ 的二元体系 ESR 谱中所占权重, 由计算机模拟解析而得。然后, 将所有样品由 77 K 升至室温下退火后, 在室温下测定其 ESR 波谱。

1.3 咖啡酸与水合电子(e_{aq}^-)反应速率常数

用本实验室纳秒级脉冲辐解动态吸收光谱装置测定。设备及实验方法详见文献[4]。

2 结果及讨论

2.1 肌球蛋白-咖啡酸二元体系在 77 K 下辐照, 在 77 K 下测定的 ESR 波谱

77 K 下测定的 ESR 波谱见图 1。由图显示二元体系 ESR 波谱均类似于纯咖啡酸 ESR 波

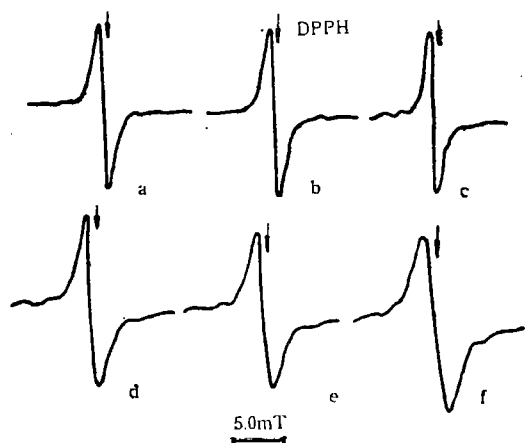
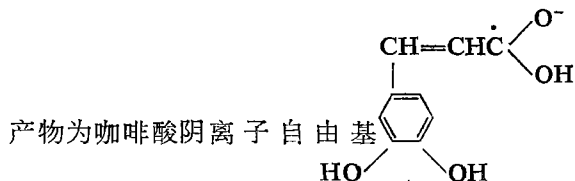


Fig 1. ESR spectra from binary molecular aggregates composed myosin and caffeic acid with varies molar ratios(r) irradiated and recorded at 77 K

- (a) caffeic acid, $g = 2.0044$, $\Delta H_{pp} = 1.10$ mT
- (b) myosin-caffeic acid with molar ratio (r)1:1 $g = 2.0046$, $\Delta H_{pp} = 1.05$ mT
- (c) myosin-caffeic acid with molar ratio (r)20:1 $g = 2.0045$, $\Delta H_{pp} = 1.42$ mT
- (d) myosin-caffeic acid with molar ratio (r)60:1 $g = 2.0045$, $\Delta H_{pp} = 1.60$ mT
- (e) myosin-caffeic acid with molar ratio (r)100:1 $g = 2.0045$, $\Delta H_{pp} = 1.81$ mT
- (f) myosin, $g = 2.0038$, $\Delta H_{pp} = 2.64$ mT

谱特征: $g = 2.0044$, $\Delta H_{pp} = 1.1$ mT, 与纯肌球蛋白 ESR 波谱特征差异显著: $g = 2.0038$, $\Delta H_{pp} = 2.64$ mT。这表明体系中主要的自由基



而且随着体系内肌球蛋白相对量逐渐增加, 其 ESR 谱逐渐显示出肌球蛋白阴离子自由基的痕迹, 且逐渐增强。

2.2 ESR 波谱解析

对于 77 K 下辐照及测定的二元体系的 ESR 波谱, 按照单谱线性叠加原理进行模拟重组, 由相应的模拟谱可求得在体系摩尔比为 γ 时, 两单组分的 ESR 谱在复合谱中的比例系数 W_{cr} 和 W_{mr} 。辐照后, 如果体系内发生了自旋转移, 其受体咖啡酸的自旋数 S_{or} 来源于两方面: 由辐照直接产生的自旋数 S_{or}° 和由于发生了转移而产生的自旋数 S_{or}^T , 即 $S_{or} = S_{or}^{\circ} + S_{or}^T$ 。令 $R_{ST} = \frac{S_{or}^T}{S_{or}^{\circ}}$, 其含意为体

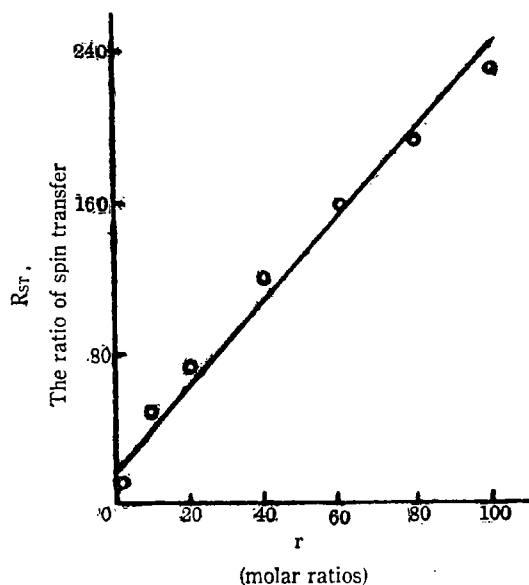


Fig 2. The relationship between R_{ST} and molar ratio (r) of amino acid residues in myosin to caffeic acid within aggregates irradiated and observed at 77 K

系内咖啡酸的自旋转移比; 又令 $P_{ST} = 1 - \frac{1}{R_{ST}}$, 这代表体系内发生转移的咖啡酸自旋百分率。分别以 R_{ST} 对 γ 和 P_{ST} 对 γ 作图(图 2, 3), 结果显示 R_{ST} 与 γ 之间呈现良好的线性关系, R_{ST} 值随体系摩尔比的增加, 即咖啡酸相对含量的递减而递升; 而 P_{ST} - γ 图又显示从 γ 为 10:1 起, 体系中咖啡酸的自旋主要由自旋转移而产生。这些都表明本体系发生了高效率的自旋转移, 咖啡酸是优异的自旋受体, 这与以前发表的结果相吻合^[9]。

2.3 肌球蛋白-咖啡酸二元体系在 77 K 下辐照, 室温下退火后测定的 ESR 波谱

由图 4 可见, 室温下所有二元体系 ESR 波谱均显示咖啡酸室温下自由基信号的特征, 只有摩尔比 γ 大于 60:1 的二元体系 ESR 波谱边缘显示出肌球蛋白自由基信号的痕迹。由此可见, 退火过程中, 二元体系内肌球蛋白与咖啡酸之间进一步产生继发的自旋转移过程。

2.4 电子在肌球蛋白-咖啡酸二元体系内进行长程转移的机制

根据蛋白质脉冲辐解研究结果显示^[6], 在中性水溶液中的蛋白质主要亲电子组分按亲电子性

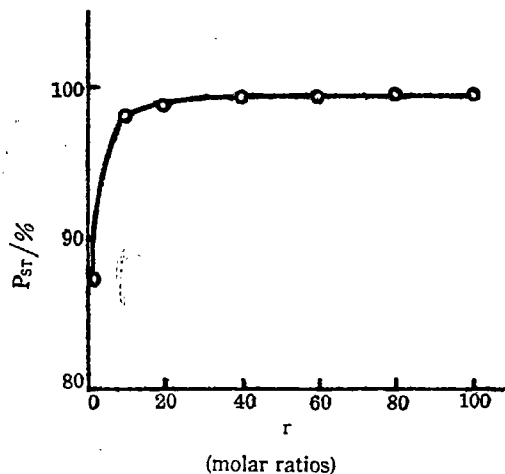


Fig 3. The relationship between P_{ST} and molar ratio (r) of aggregates at 77 K

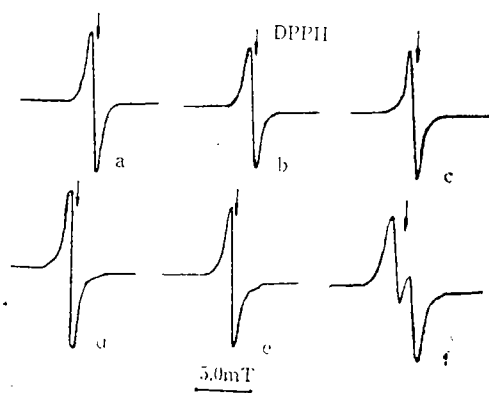


Fig 4. ESR spectra from binary molecular aggregates composed myosin and caffeic acid with varied molar ratios (r) irradiated at 77 K, and recorded after annealing at room temperature

- (a) caffeic acid, $g = 2.0042$, $\Delta H_{pp} = 0.90$ mT
- (b) myosin-caffeic acid with molar ratio (r) 1:1 $g = 2.0044$, $\Delta H_{pp} = 0.87$ mT
- (c) myosin-caffeic acid with molar ratio (r) 20:1 $g = 2.0048$, $\Delta H_{pp} = 0.88$ mT
- (d) myosin-caffeic acid with molar ratio (r) 60:1 $g = 2.0048$, $\Delta H_{pp} = 0.88$ mT
- (e) myosin-caffeic acid with molar ratio (r) 100:1 $g = 2.0047$, $\Delta H_{pp} = 0.89$ mT
- (f) myosin, $\Delta H_{pp} = 2.78$ mT

强弱依次为二硫键 S—S、酰胺键—CONH—、芳香侧链和杂环侧链的氨基酸残基, 根据它们与水合电子 e_{aq}^- 反应的速率常数, 及其在肌球蛋白中的相对含量, 可估算出肌球蛋白内这些亲电子组分分别与 e_{aq}^- 反应的几率, 见表 1。

Tab 1. Reaction probabilities of electrophilic constituents in myosin with e_{aq}^-

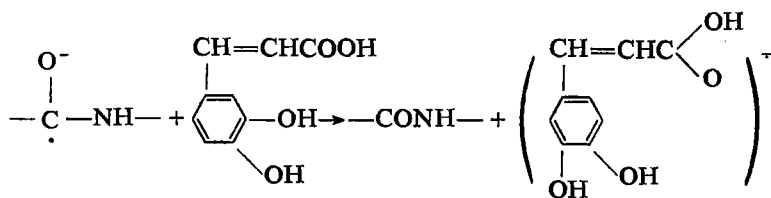
Constituents	Contents in myosin	Reaction rate with $e_{aq}^-/\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Reaction probabilities with $e_{aq}^-/k_1c_1. [\sum_i K_i C_i]^{-1}/\%$
S—S	20	$\sim 10^{10}$	8.8
—CONH—	4000	5×10^8	88
Aromatic amino acid	230	3×10^8	3

由表 1 可见, 肌球蛋白中的酰胺键俘获了大约 88% 的 e_{aq}^- , 与以前对肌球蛋白 γ 辐解研究结果相吻合^[6], 即在 77 K 下辐照、测定的肌球蛋白 ESR 谱中, 主要显示了 $g = 2.0037$ 的酰胺羰基阴离子自由基的对称吸收峰($-\dot{\text{C}}-\text{NH}-$), 还可能有痕量的 $g = 2.015(\text{S}-\text{S})^\cdot$ 特征吸收。

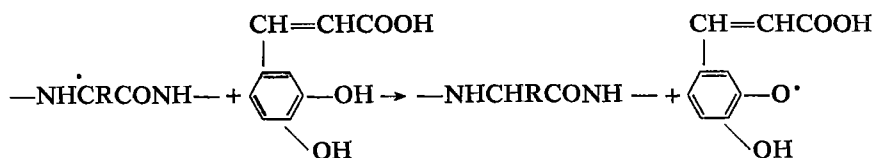


肌球蛋白-咖啡酸二元体系受 γ 辐照后, 其中的咖啡酸必然与上述亲电组分竞争次级电子。以脉冲辐解动态吸收光谱法测定咖啡酸在中性水溶液中与 e_{aq}^- 反应速率常数为 $\sim 10^{10} \text{mol/L}\cdot\text{s}^{-1}$, 其单电子还原电位(E^1)为 -341mV ^[7], 另外按半经验分子轨道理论计算法(CNDO/2)求得咖啡酸和若干亲电子氨基酸最低空轨道能量 $E_{\text{LUMO}}(\text{eV})$ 值为 Caf. 1.79, His 3.02, Phe 2.43, Tyr 2.55, Trp 2.36, Cys 2.02。由此可见, 咖啡酸的 E_{LUMO} 低于几种主要亲电子氨基酸的 E_{LUMO} 。因此, 咖啡酸的 E_{LUMO} 值及 e_{aq}^- 反应速率常数均显示其亲电子性强于肌球蛋白中的亲电子组分, 77 K 下辐照的二元体系随着摩尔比 γ 增加, 体系内氨基酸残基和酰胺键相对含量增加, 它们应首先俘获大部分次级电子, 产生各自的电子加合物即阴离子自由基。但实验结果显示, 即使二元体系内咖啡酸相对量很低, 体系 ESR 谱仍主要显示咖啡酸阴离子自由基特征吸收。显而易见, 其中发生了电子转移。对此不能完全用它们的亲电子性强弱来解释。而根据咖啡酸和肌球蛋白的结构可推论咖啡酸的芳环极易与肌球蛋白中的酰胺键形成共面接触, 使咖啡酸的酚羟基与酰胺羰基产生了便于电子转移的通道, 即氢键 $\cdot\text{HOOCCH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \cdots \text{O}=\text{C}-\text{NH}-$, 有利于肌球蛋白酰

胺羰基阴离子自由基的电子通过多肽链和氢键传递^[8]并定域于咖啡酸。



室温退火后, 二元体系的 ESR 波谱均主要显示咖啡酸自由基特征吸收, 这是由于温度上升增加了电子转移的速率, 还由于咖啡酸的酚羟基具有较强的还原性, 退火后通过氢转移还原了室温时的肌球蛋白肽链抽氢自由基。



致谢: 感谢刘仁忠副研究员提供以分子轨道理论 (CNDO/2) 计算的多种亲电子氨基酸和咖啡酸最低空轨道能量 E_{LUMO} 值

参 考 文 献

- 1 a) 林念芸等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1983, 1(1):1
b) Lin Nian-yun. Radiat. Phys. Chem., 1986, 28:211
- 2 Simic M G et al. Natl. Stand. Ref. Dats Ser., Natl. Bur. Stand., 1973: (43)
- 3 Perry S V. in Colowick S P and Kaplan N D ed. Methods in Enzymology, 1955, v1. II:582
- 4 骆坚等. 科学通报, 1993, 38(8):715
- 5 a) Faraggi M et al. Radiat. Res., 1977, 71(2):311
b) Faraggi M et al. Radiat. Res., 1977, 72(1):81
c) Faraggi M et al. J. Phys. Chem., 1978, 82(5):508
d) Simic M G. J. Agric. Food Chem., 1978, 26(1):6
- 6 林维真等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1988, 6(4):42
- 7 李虎成, 硕士学位论文, 1993年6月
- 8 Farragi M et al. Radiat. Res., 1975, 62(2):347
- 9 Lin W Z et al. Radiation Research (Edited by J. D Chapman, W. C. Dewey and G. F Whitmore) Academic Press, Inc. San Diego, 1991, 1:298

ESR STUDIES OF RADIATION INDUCED ELECTRON TRANSFER BETWEEN MYOSIN AND CAFFEIC ACID

Lin Weizhen Tu Tiecheng Dong Jirong

*Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research,
Academia Sinica, Shanghai 201800)*

ABSTRACT The mechanism of radiation induced electron transfer within a series of binary molecular aggregates, which were composed of myosin and caffeic acid with varied molar ratios (r) of amino acid residues in myosin to caffeic acid, has been studied by resolution of composite ESR spectra recorded at 77 K. A series of spin transfer ratios (R_{ST}) defined as the spin concentration ratios of caffeic acid anion radical arising from transfer of captured electron by peptide chain of myosin to that from directly trapping of secondary electrons by caffeic acid were obtained. A series of R_{ST} were plotted against r varied from 1:1 to 100:1. A linear relationship between R_{ST} and r demonstrates that R_{ST} increase linearly with decrease of caffeic acid content. The capture of radiation induced secondary electrons depend on the electron affinities of components including electron affinitive amino acid residues and peptide carbonyl of myosin and caffeic acid. The process of electron transfer along peptide chain and trapping on caffeic acid finally has been elucidated based on the comparison of the energies of lowest empty molecular orbital (E_{LUMO}) of the electron affinitive components and reaction rate constants of e_{aq}^- with these components respectively using pulse radiolysis techniques.

KEYWORDS Electron transfer, Myosiu, Caffeic acid, Resolution composite ESR spectra