

蛋白质及核酸的激发态与能量转移译文集



科学出版社

蛋白质及核酸的激发态 与能量转移译文集

程极济 译

科学出版社

1981

内 容 简 介

蛋白质及核酸的激发态与能量转移,不仅是量子生物化学中的一个理论问题,而且,逐渐成为研究生物大分子的结构、功能及其相互关系的重要实验方法。本译文集汇集了10篇文章,介绍了这方面的基础工作和有关的理论探讨。

本书可供从事生物化学、生物物理学的科技人员及有关院校的师生参考。

蛋白质及核酸的激发态 与能量转移译文集

程 极 济 译

责任编辑 马素卿

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1981年8月第一版 开本:787×1092 1/32

1981年8月第一次印刷 印张:10

印数:0001—3,100 字数:229,000

统一书号:13031·1614

本社书号:2214·13—10

定 价: 1.55 元

译 者 的 话

蛋白质及核酸的激发态与能量转移是量子生物化学中的一个研究领域,它不仅是一个理论问题,而且愈来愈成为研究生物大分子结构、功能及其相互关系的重要实验方法。它的研究历史虽已有五十年,但还是在最近十五年里进展较大,特别是核酸激发态的研究因为起步很晚,大量的工作开展才不过十年。我国目前正在开展这方面的研究工作,但缺乏资料。为此,汇集翻译了有关文章,编辑成册,以介绍这方面的基础工作及有关的理论探讨,为有关的科技人员及大专院校师生提供参考资料。

译文集中文章选自各书,篇幅长短不一,各有侧重。前三篇系介绍蛋白质的激发态与能量转移,第四至第六篇是核酸的激发态与能量转移,第七、第八两篇是有关蛋白质与核酸相互关系方面的内容,最后两篇系对蛋白质能量转移工作的评论及看法。为保持原文的完整性都是全文予以译出,故书中难免有局部的重复之处。

随着实验方法与仪器的发展,蛋白质及核酸的激发态与能量转移研究工作,从七十年代开始,已经逐步向快速和动态方面发展,因限于篇幅与时间,本书基本没有包括这方面的文章。另外,书中选用了个别发表时间较早一点的文章,因其至今仍有参考价值。

限于译者水平,难免有错误不妥之处,请读者批评指正。

译 者

1979年1月

目 录

芳香氨基酸的发光	1
一、引言.....	1
二、芳香氨基酸的激发.....	2
三、环境对芳香氨基酸荧光的影响.....	6
四、芳香氨基酸的荧光量子产额与寿命.....	12
五、芳香氨基酸衍生物的荧光.....	17
六、激发态的无辐射去活化作用.....	20
七、芳香氨基酸的磷光.....	24
八、发光的偏振.....	29
九、寡肽中的能量转移.....	33
十、芳香氨基酸的热发光.....	36
蛋白质及有关分子的低温发光研究	43
一、引言.....	43
二、理论.....	44
三、实验.....	46
四、氨基酸和肽的发光.....	54
五、蛋白质发光.....	62
六、结论.....	72
蛋白质与多肽中电子激发能的长距离非辐射转移	77
一、引言.....	77
二、理论基础.....	79
三、关于蛋白质与多肽中的能量转移.....	83
四、小肽与多肽的能量转移.....	86

五、仅含氨基酸发色团的蛋白质中的能量转移·····	92
六、蛋白质-染料共轭物的能量转移·····	96
七、含有辅基的蛋白质中的能量转移·····	103
核酸的激发态 ·····	116
一、引言·····	116
二、分子的电子激发态摘要·····	118
三、核苷酸的激发态·····	128
四、作为探针的核苷酸的发光: 转移 RNA 中的 Y 碱基·····	148
五、发色团的相互作用·····	157
六、激发的多核苷酸·····	173
七、光产物的激发态前体物·····	195
DNA 与 DNA 碱基在 300 K 下的荧光 ·····	214
一、引言·····	214
二、实验结果·····	215
三、结束语·····	231
多核苷酸与核酸组成的聚集物的激发态与能量转移的比 较 ·····	234
一、引言·····	234
二、单体的激发态·····	235
三、核苷酸冰冻水溶液中聚集态的形成·····	236
四、在聚集物中胞嘧啶及其阳离子与胞嘧啶多核苷酸 之间的相互作用·····	238
五、多聚腺嘌呤核苷与腺嘌呤核苷聚集物中的相互 作用与能量转移·····	240
六、核酸组成间的能量转移·····	250
七、结论·····	253
酪氨酸与核酸碱基间的相互作用与能量转移 ·····	258

芳香氨基酸的发光

I. Weinryb R. F. Steiner

一、引 言

天然蛋白质的荧光与磷光是来自芳香氨基酸的芳香环的发光。这种大分子的发光可以看成是相应的内在的发光。它代表氨基酸发色团的总贡献,但由于掺合到多肽中会受到扰动,并且还受到蛋白质的二级和三级结构的影响。因此要解释蛋白质的荧光与磷光,必须首先了解色氨酸、酪氨酸与苯丙氨酸的发光特性。

系统地研究芳香氨基酸的荧光特性还不到十年。最早的研究是测定激发和发光的最大值,这是与荧光分析的发展联系的^[1-4]。Shore 与 Pardee^[5] 及以后的 Teale 与 Weber^[6] 早期测定了荧光量子产额。对于芳香氨基酸低温磷光的极大兴趣是由于 Debye 与 Edwards^[7] 对这些芳香氨基酸和蛋白质磷光的相互关系的研究而开始的,其后 Steele 与 Szent-Györgyi^[8] 又对生物分子的三重态的发光可能性问题进行了实验和讨论。

本文主要是讨论色氨酸、酪氨酸与苯丙氨酸及其衍生物发光的有用数据,以及对这些数据提供的关于激发态特性与弛豫机制进行讨论。吲哚、酚与苯的发光特性在适当的地方也要涉及。

二、芳香氨基酸的激发

(一) 近紫外线辐射的激发: 紫外线吸收光谱

发光常用所研究的化合物的吸收光谱的长波长的最大峰值进行辐射,这样可得到较高的灵敏度、较强的选择性与最小的光分解。为了要选择适合的激发波长,首先就要了解溶液中的化合物的吸收光谱。色氨酸、酪氨酸与苯丙氨酸的最长波长的电子跃迁是在近紫外区。所以这里要描述一下这些化合物大于 200 nm 波长的光谱的主要特性。读者如需要进一步了解芳香氨基酸的紫外吸收光谱的详细资料可参考所列文献[9—18]。

1. 苯和苯丙氨酸

液体溶液中的苯在大于 200 nm 波长的光谱中,在 250 nm 处有一弱吸收带,克分子消光系数 ϵ 等于 200, 在 205 nm 附近有一强吸收带,消光系数 ϵ 等于 7,400^[19,20]。甚至在水溶液中光谱的振动细微结构也很显著。这些电子跃迁的结果使得吸收强度很低,这是由于禁戒特性以及苯分子高度对称的关系;只有具有较低对称的振动相互作用以及高能量电子态才能使其完全发光^[21-23]。在 340 nm 波长附近苯有一些非常微弱的跃迁,它的吸收强度仅有 255 nm 处的 10^{-5} 。这种跃迁是直接的单线态—三重态激发过程。

苯丙氨酸的光谱与苯的平行(图 1)。258 nm 处的吸收最大值已稍微移向长波,但强度($\epsilon \cong 9600$)稍有增加,这是因为环的取代作用稍微降低了一些分子的对称性的结果。pH 的变动使苯丙氨酸光谱发生较小的变化,这是由于氨基和羧基离解扰动了环的吸收^[12]。

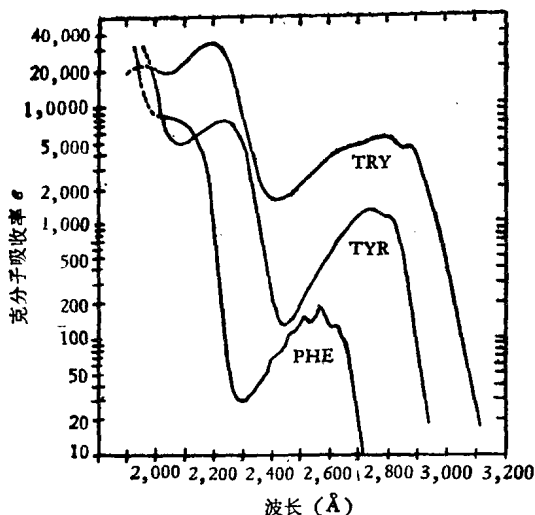


图1 色氨酸、酪氨酸与苯丙氨酸在 pH6 时的紫外吸收光谱。(Wetlaufer^[11])

2. 酚与酪氨酸

苯被一个羟基取代可显著地改变它的吸收光谱。吸收最大值移向 210 nm 与 270 nm, 后者的跃迁强度增加了 7 倍。形成阴离子可导致光谱进一步的红移和加强, 峰值出现在 235 nm ($\epsilon = 9,400$) 与 287 nm ($\epsilon = 2,600$)^[20]。此效应(1)是由于对羟基取代物的影响, 降低了环的对称性(因而增加了跃迁的许可性)的结果, 这种影响可通过环上电荷分布的诱导形变产生, 正如可通过环取代物电荷的直接相互作用产生一样; (2)是由于在阴离子情况下, 附加结构的共振稳定性的结果^[27,28]。

酪氨酸的光谱与酚的相似(图1)。在 pH 6 时, 电子跃迁是在 275 nm ($\epsilon = 1,400$) 与 222 nm ($\epsilon = 9,000$)。当酚侧链

离解时, 峰值移到 240 nm 与 293 nm, 相应的消光系数分别增加到 11,000 与 2,300^[12]。

3. 吡啶与色氨酸

吡啶与色氨酸与上述两个例子相似也具有相似的光谱。吡啶在许多溶剂中主要峰值是在 225 nm, ($\epsilon = 2,500$) 以及 270 nm 附近($\epsilon = 6,000$)^[29, 30]。所有溶剂在长波长吸收带上有明显的振动结构, 至于分解的程度和确切的亚峰位置, 则随溶剂而定。吡啶在非极性溶剂环己烷中, 次高峰是在 280 nm 与 288 nm 附近^[29]。

色氨酸在水中的原始吸收带的细微结构有一些模糊不清了。光谱的最大值(图 1)是在 220 nm ($\epsilon = 3,600$) 与 280 nm ($\epsilon = 5,500$)^[11, 12] 波长处。此外, 次高峰是在 288 nm, 一个肩峰是在 265 nm ($\epsilon = 4,500$)^[11, 12]。也报道过有一弱的长波吸收带是靠近 300 nm ($\epsilon = 700$), 它在水溶液中就成为一个肩峰^[11]。

Weber^[28] 用荧光偏振研究的结果指出, 在 260—310 nm 范围内至少有两个独立的电子跃迁分别与吡啶和色氨酸的光谱相对应。最近用自洽场方法对色氨酸进行了量子力学的计算预测了这个区域中的两个跃迁^[31]。吡啶发色团的类苯特性及吸收光谱以及振动细微结构都指出这两个跃迁至少有一个是 $\pi\pi^*$ 型, 与前述的苯丙氨酸与酪氨酸的长波吸收带相似^[11, 28]。

4. 肽键

不规则的卷曲形式^[32]的肽和蛋白质中的肽键吸收峰值是在 190 nm。研究芳香氨基酸与肽衍生物常用的激发波长(250—290 nm) 可以消除这个波长的影响。Setlow 与 Guild^[33] 指出肽键的尾部吸收一直延续到 270—280 nm, 尽管波长大于

250 nm 时吸收已非常微弱 ($\epsilon \cong 5$)。正因为大于 250 nm 的波长吸收很弱,所以肽键本身的发光往往可忽略不计。但是,即使肽键在此波长区域吸收很弱,但在光化学上却很有兴趣,因为 McLaren^[34] 观察过,1 个爱因斯坦的 253.7 nm 的光量子具有 112 千卡的能量,在适宜情况下这已超过它能断裂肽键所需的克分子能量的两倍,因此在相当长的长波激发下,仍旧存在肽键光分解的可能性。

(二) 高能辐射的激发

芳香氨基酸不论在溶液还是在粉末状态下,都曾用真空紫外、快中子及 X 射线激发研究过它的发光。当激发的辐射能量增加,就会有较高的激发单线态布居 (Populate) 到较高程度。光化学过程可导致基因的形成以及更可能的是使吸收分子产生不可逆的变化。这些反应都与直接的荧光发射过程竞争。

这些研究的主要结论概括如下:

(1) 一般说来,高能辐射比起近紫外线波长 (250—280 nm)^[35,36] 的激发引起发光的效果较差。特别是芳香氨基酸在稀水溶液中用软 X 射线 (7eV) 激发所得的荧光量子产额比紫外线激发要小得多 (0.4—0.02%)。

(2) X 射线对氨基酸粉末照射引起的荧光发光光谱与由紫外线引起的相似^[38]。

(3) 增加激发辐射的能量,色氨酸粉末的磷光/荧光比显著增加^[36]。这是反映了较高激发单线态与三重态的较高振动耦合,有利于系间交换的进行。低温下 (<140K) 的色氨酸溶液中观察到的磷光增强^[37], 其中一个重要因素就是离子与电子的重结合。

(4) X 射线引起的粉末荧光的热猝灭不如紫外线引起的

溶液荧光^[39]猝灭显著。

三、环境对芳香氨基酸荧光的影响

(一) 温度

芳香氨基酸的量子产额随温度而变化是决定于不同的非辐射过程的活化能,这些过程使激发态去活化,所以与直接的荧光发射竞争。由于这些过程具有有限的活化能,所以随温度增加其重要性也就增加了,通常增加温度,量子产额就下降。

任何荧光物质的量子产额可以用下式表示:

$$Q = \frac{K_f}{K_f + \sum_i K_i} \quad (1)$$

式中 K_f 是荧光发射的速率常数, K_i 是各种竞争的非辐射过程的速率常数。方程式(1)可以重写成:

$$Q^{-1} - 1 = K_f^{-1} \sum_i K_i \quad (2)$$

根据机率概念,若 K_f 与温度无关,则与温度有关的 Q 可表述为:

$$Q^{-1} - 1 = K_f^{-1} K_0 + K_f^{-1} \sum_i f_i \exp - \frac{E_i}{RT} \quad (3)$$

此处 K_0 表示与温度无关的去活化过程速率常数的总和,它包括通过系间交换到三重态的过程。方程式(3)求和则相应依赖于温度过程的贡献; f_i 与 E_i 分别表示第 i 个过程的频率因素与活化能。

假若仅仅只有一个依赖于温度的去活化过程存在,则

$$Q^{-1} - 1 = K_f^{-1} K_0 + K_f^{-1} f \exp - \frac{E}{RT} \quad (4)$$

方程式(4)微分后得到:

$$\frac{dQ^{-1}}{d(1/T)} = - \frac{fE}{K_f R} \exp - \frac{E}{RT} \quad (5)$$

与

$$\ln \left[- \frac{dQ^{-1}}{d(1/T)} \right] = \ln \frac{fE}{K_f R} + \frac{E}{RT}$$

此时,以 $\ln [- dQ^{-1}/d(1/T)]$ 对 $1/T$ 作图可产生具有斜率 $-E/R$ 的直线。但是对此方程式的图解微分需要准确性相当高的数据才能进行成功地分析。实践上,研究的温度范围若是 $Q < 0.1$, 则方程式(4)中的 $K_0 K_f^{-1}$ 比起 $Q^{-1} - 1$ 就很小,因而可忽略不计,这时 $Q^{-1} - 1$ 对 $1/T$ 作图也可得到斜率为 $-E/R$ 的直线。

方程(3)到(5)是描述依赖于温度的量子产额。Galley 与 Edelman^[40,41] 发现水溶液中的色氨酸与酪氨酸的荧光量子产额是随温度增加而降低。色氨酸的荧光似乎比酪氨酸对于温度更敏感。含有色氨酸与酪氨酸的小肽也有此特点。对于承担色氨酸与酪氨酸荧光的热猝灭的非辐射去活化过程的本性,将在第六节中讨论。

(二) 物理状态

液体溶液中的芳香氨基酸的物理状态只要将温度降到液态氮或更低时就可以改变,对于任何溶剂如 50% 乙二醇-水,此时都形成坚固的玻璃态。除降低温度本身可增强荧光以外,至少还有两个因素可使荧光发射增强。第一,由于在坚固玻璃态中与溶剂分子相互作用而产生的猝灭大大降低;第二,任何依赖于溶质分子的转动和振动自由度的内转换机制都被截住, Bishai 等^[42]发现,在 77K 玻璃态(0.5% 葡萄糖)下酪氨酸、苯丙氨酸与色氨酸的总发光(荧光加磷光)都接近于 1。此

外,色氨酸荧光的最大波长与室温下的数值相比蓝移了 25nm 或更多。酪氨酸与苯丙氨酸波长移动得较小。

也观测过其他固体状态的荧光发射。Nag-chaudhuri 与 Augenstein^[43] 在液态氮温度下的研究揭露了氨基酸粉末的最大荧光波长比坚固的水或有机溶剂的玻璃态有些“红移”。苯丙氨酸粉末在 300 K 时的荧光量子产额比水溶液^[44]中的数值增加了十倍多(参考 Augenstein^[36] 等人工作)。许多作者认为量子产额增加是由于减少了碰撞的自猝灭,降低了与溶剂分子相互作用而引起的猝灭,以及限制了系间交换过程等原因产生,所有这些过程都是由于晶体的结构引起的。

Konev^[45] 等研究色氨酸在固体聚乙烯醇(PVA)中的荧光发现,色氨酸在 PVA 板中的荧光寿命比水溶液中要长 50%。Kuntz^[46] 报道在 PVA 薄膜中的色氨酸荧光量子产额比水中要大一倍,而最大发光波长蓝移了 15 nm。

(三) 溶剂

一般来说,一个分子的荧光发射光谱比吸收光谱对于溶剂性质更敏感。原因是由于吸收与发光过程之间的差别。吸收是从平衡的基态到弗兰克-康登 (Franck-Condon) 激发态的一种跃迁,激发态由于与溶剂相互作用而处于非平衡态,而发射是从平衡的激发态到非平衡的基态的跃迁,因此这两个过程不是完全互补的。在吸收发射前的平衡过程中,溶剂的再取向有很重要的影响。

溶剂可按下列一种或两种方式影响一个分子的荧光:
(i) 通过与溶剂的极性或介电常数有关的非特异性相互作用;
(ii) 通过特异的溶质与溶剂相互作用形成化学计量学的络合物。第一种相互作用是当溶剂围绕激发的溶质分子重新排列成新的平衡取向时消耗了能量,这种相互作用的本质是偶极-

偶极相互作用, 主要决定于溶剂与激发溶质分子的极性。Lippert^[47] 证明, 只要机制 (i) 是主要的, 溶质的激发态偶极矩从原则上讲, 可以从基态的极性以及一系列不同极性的溶剂引起的荧光发射的波长移动来测定。激发的芳香分子往往比其基态分子极性更高, 这是为何溶剂对发光比对吸收有更大影响的又一原因。

溶剂对吡啶与色氨酸衍生物的荧光特性的影响受到很大注意。表 1 总结了不同极性的溶剂对吡啶与 N-乙酰色氨酸甲基酯的最大荧光强度波长的影响; 数据是取自 Van Dunren^[29], Cowgill^[48], 与 Walker^[49] 等人的工作。结论是很明显的, 随着溶剂极性的增加, 发光光谱波长明显地移向红光, 而溶剂对吡啶吸收光谱的影响就很小^[29]。这些化合物的量子产额在极性溶剂中则降低^[48]。

若吡啶与 N-乙酰色氨酸甲基酯在激发时进行 $\pi\pi^*$ 跃迁并增加偶极矩时, 在极性溶剂中荧光发光谱就会移向长波长^[47]。

表 1 溶剂对吡啶与乙酰色氨酸甲基酯荧光最大值的影响

溶 剂	介电常数	荧光发光最大值 (nm)	
		吡 啶	乙酰色氨酸甲基酯
戊 烷	1.8	296	
环 己 烷	2.0	297	
己 烷	1.9	300	310
二乙基乙醚	4.3	303	
苯	2.2	305	
丁基乙醚		310	330
二氧乙 酮	2.2	310, 315	330
正 丁 醇	17.1	326, 330	340
甲 醇	32.6	328, 330	340
正 丙 醇	20.1	330	340
乙 醇	24.3	330	
水	28.5	350	350

吡啶与色氨酸在激发态时的偶极矩计算值分别为 5.6 与 8.5D^[50]。根据 Mataga 等人^[51]的计算,吡啶激发时增加了 5D。Yeagers^[31] 计算色氨酸基态(π 电子)的偶极矩是 2.3D。Van Dunren^[52] 指出离子的内消旋结构(这是增加偶极矩的一个因素)对吡啶激发态也有类似的重要贡献。

但是激发的吡啶与溶剂的偶极-偶极相互作用并不能解释所有的观察结果。低浓度的极性溶剂对环己烷中的吡啶荧光有很显著的和不对称(歧化)的作用。Van Dunren^[29] 看到把 10% 乙醇加到环己烷中的吡啶可使荧光光谱红移 18 nm。溶剂的整体介电常数几乎没有变化,所以很难用与溶剂的偶极-偶极相互作用来解释此现象。

Walker^[49,53] 等使吡啶溶于几种极性和非极性溶剂的混合物中也得到类似的结果。所以他提出,是激发的吡啶分子与极性溶剂形成了特异性的和化学计量学的络合物亦即“激发络合物”(Exciplex)(机制 ii 的一个例子)。此模型可以成功地应用于观察戊烷中的吡啶在有低级醇如甲醇与丁醇存在时的荧光。在此体系中形成了吡啶-醇(1:2)络合物^[49](Longworth 报道过可形成 1:1 吡啶-异丙醇激发络合物)。

但是也有另外一种解释,吡啶被极性溶剂选择性溶剂化后可使局部介电常数大于整体数值,这样偶极-偶极相互作用就可来说明歧化作用的重要性。从荧光光谱的分布可以区分出这两种不同机制。“激发络合物”模型可预示在极性溶剂的浓度范围内有等发光波长,而另一模型则预示荧光光谱的逐渐移动。Walker 等人^[49]对于戊烷-醇混合溶剂中的吡啶的等值分析证实了激发络合物的模型(但是 Eisinger 与 Navon^[50]应用这种分析没有得到色氨酸与乙二醇-水溶剂的激发络合物)。

Bobrovich 等^[54]测定极性和非极性溶剂中的吸收和荧光

偏振光谱发现, 发光在极性溶剂中是发生于第二激发单线态 (1L_a), 而在非极性溶剂中则既来自于第一单线激发态 (1L_b) 也来自于第二单线激发态 (L_a 与 L_b 是 Weber^[28] 用来讨论色氨酸的近紫外跃迁的)。但是 Walker 等^[35] 指出苏联研究者所用的石蜡非极性溶剂的结果, 可能由于溶剂中的极性杂质存在而复杂化了。他们^[35] 认为在极性溶剂中形成激发络合物时两个态的能量反转了, 所以在非极性溶剂中的发光是来自于 1L_b 态, 而在极性溶剂中发光是来自于 1L_a 态。

然而 Kurtin 与 Song^[56] 用荧光偏振光谱研究吡啶与一些吡啶羧酸得出结论, 不论是在极性(甘油-甲醇)还是在非极性(二乙基醚-异丙醇)溶剂中, 发光都是来自于 1L_a 与 1L_b 两个态, 只有吡啶乙酸是例外。并且在极性溶剂中 1L_a 的贡献占主要。一些其他作者也得出相似的结论^[51, 57, 58], 所以这问题目前还没有解决。

芳香化合物溶液中有溶解氧时可以使荧光猝灭, 因而常成为荧光研究的实际问题。吡啶的猝灭并不太重, 约是 5—10^[29]% 数量级。Bridges 与 Williams^[59] 研究了一系列的吡啶衍生物(包括色氨酸在内), 揭露了在溶液去氧时只有吡啶与 5-羟基吡啶荧光加强。X 射线激发的色氨酸(与酪氨酸)可为氧和 NO 猝灭^[66, 51]。这两种气体都是顺磁性的(即具有三重态基态), 所以在激发态中可加强系间交换。

Feitelson^[62] 发现与 X 射线引起的酪氨酸荧光的结果相反, 溶解氧对紫外光激发的一些酪氨酸与苯丙氨酸的荧光并没有影响, 也研究了一些加入其他溶质的作用。

氧对荧光的猝灭是一个动力学过程, 它决定于溶解的氧分子扩散到激发的发色团的能力以及在激发态寿命期间内相互作用的能力^[63]。一般随激发态寿命的降低猝灭效率也减少了, 而激发分子的寿命小于 5ns (包括芳香氨基酸) 猝灭就很