

自旋标记 ESR波谱的 基本理论和应用

张建中 赵保路 编著
张清刚
忻文娟 审校

科学出版社

自旋标记 ESR 波谱的 基本理论和应用

赵保路
张建中 张清刚 编著

忻文娟 审校

科学出版社

1987

内 容 简 介

本书系统地阐述了自旋标记 ESR 波谱方法的基本理论及其在生物和化学领域中的应用。内容包括:概括介绍电子自旋共振波谱的基本原理,详细分析各种情况下的氮氧自由基的 ESR 波谱;讨论顺磁共振波谱仪器的基本结构和自旋标记方法的实验技术;介绍自旋标记化合物本身的合成方法和化学性质;根据大量的有关文献和作者的研究成果分别介绍自旋标记方法在生物膜、酶和蛋白质、核酸、生物医学、药理学,以及在合成聚合物方面的应用;最后简要介绍自旋捕集技术。

本书可供生物物理学、分子生物学、生物化学、医学和高分子化学等专业的科技工作者及有关大专院校师生参考。

自旋标记 ESR 波谱的 基本理论和应用

张建中 赵保路 张清刚 编著

忻文娟 审校

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

*

1987 年 2 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/32

1987 年 2 月第一次印刷 印张: 17 7/8

印数: 0001—1,550 字数: 404,000

统一书号: 13031·3436

本社书号: 4635·13—10

定价: 4.15 元

序 言

我们小组于 1978 年开始将自旋标记 ESR 波谱方法用于生物体系的研究,近几年来,做了一些工作。由于自旋标记方法具有许多优越性,逐渐引起国内有关科学工作者的重视,要求了解和利用这一方法的研究单位和个人日益增多。为适应我国科学技术的发展和有关研究工作的需要,我们编写了《自旋标记 ESR 波谱的基本理论和应用》一书。此书取材来源主要是: 1) L. J. Berliner 所编的两本“Spin Labeling, Theory and Applications”; 2) 约 500 篇国内外有关文献; 3) 我们自己的研究成果。

全书共十二章,主要由张建中、赵保路编写,张清刚编写了第五章。内容以应用为主,尽量绕过复杂的 ESR 波谱分析和弛豫理论,着重于文字叙述,力图避开繁琐的公式推导,以适合于生物学工作者阅读。力求做到概念清楚,叙述准确,但由于我们的水平有限,错误和不当之处在所难免,希望读者批评指正。

本书完稿后,徐广智教授和柴璋副教授审阅了全稿,赵瑶兴副教授审阅了第十一章,并提出宝贵的意见。在编写过程中,曾得到中国科学院图书馆和研究生院图书馆的支持和帮助,在此一并致谢。

忻文娟

一九八五年十二月 北京

目 录

序言

第一章 绪论.....	1
参考文献.....	5
第二章 ESR 波谱的基本原理	6
§ 2-1 电子自旋共振 (ESR) 现象	6
1. 顺磁性物质.....	6
2. 磁共振现象.....	7
3. g 因子	14
§ 2-2 ESR 波谱的超精细结构.....	16
1. ESR 波谱的超精细分裂.....	16
2. 超精细结构的来源.....	19
§ 2-3 弛豫和线宽	23
1. ESR 谱线增宽的两个来源.....	23
2. 自旋-晶格弛豫	25
§ 2-4 多晶 ESR 波谱.....	28
参考文献.....	32
第三章 氮氧自由基的 ESR 波谱.....	34
§ 3-1 氮氧自由基的 ESR 波谱.....	35
1. 溶液中的 ESR 波谱	35
2. 各向异性的 ESR 波谱.....	36
§ 3-2 各向同性运动的 ESR 波谱.....	40

1. 各向同性的运动相关时间	40
2. 快运动范围的 ESR 波谱	44
3. 慢运动范围的 ESR 波谱	51
§ 3-3 在液晶结构中的各向异性运动	58
1. 自旋标记和液晶	58
2. 自旋标记在液晶中的各向异性运动	61
3. 共振谱线的位置	61
4. 序参数	64
5. ESR 谱线的位置和标记物分子的几何形状	66
§ 3-4 自旋标记的生物膜脂类双层的 ESR 波谱 分析	75
1. 各向异性的运动模型	75
2. 绕一个分子轴的快速旋转	78
3. 振动模型	83
4. 长分子轴的摆动	85
5. 序参数的进一步讨论	90
6. 序参数的测量和计算	94
§ 3-5 ESR 波谱的极性相关性	99
1. ^{14}N 超精细耦合常数的溶剂效应	99
2. 两种波谱成分的合成	103
参考文献	105

第四章 电子自旋共振波谱仪及实验方法

§ 4-1 顺磁共振波谱仪的基本结构	109
1. 有关的微波部件	110
2. 波谱仪的工作原理	117
§ 4-2 实验条件的选择和有关技术	121
1. 样品和样品管	121
2. 放大倍数、调制幅度和微波功率	123
3. 扫描时间和滤波时间常数	127

4.样品的去气和自由基的浓度	128
5.波谱的积分和波谱滴定	130
6.仪器的变温装置	133
§ 4-3 波谱参数的测量方法	135
1.各向同性的 g 因子和超精细偶合常数的测量	135
2.单晶样品的 g 张量和 A 张量的测量方法	138
参考文献	140

第五章 自旋标记化合物的化学..... 141

§ 5-1 引言	141
§ 5-2 稳定氮氧自由基的结构及其化学性质	142
1.氮氧自由基的稳定性	142
2.自旋标记化合物的基本结构及其特点	144
3.氮氧自由基的化学	146
4.氮氧自旋标记物的鉴定及其波谱	154
§ 5-3 自旋标记化合物的合成	156
1.母体化合物的合成	156
2.嘧啶烷和吡咯烷衍生物的合成	157
3.自旋标记蛋白质的修饰剂	161
4.脂类自旋标记化合物的合成	166
5.核苷酸自旋标记物的合成	171
6.糖类的自旋标记	174
7.药物及其它生物分子的自旋标记	176
8.双氮氧基自旋标记物	178
§ 5-4 合成氮氧自旋标记化合物的新方法	180
1.嘧啶烷氮氧自旋标记物	180
2.Proxyl 氮氧自旋标记物	181
3. Azethoxyl (2,5-二烷基-2,5-二甲基-吡咯氮氧自由基)	183
4.衍生咪唑烷氮氧自旋标记物	186

5. 衍生咪唑啉氮氧自由基	187
6. 衍生四氢嘧啶氮氧自由基	189
7. 吡(氮杂)啉族氮氧自由基	190
§ 5-5 氮氧基的分子结构	191
1. 氮氧基单晶的 X 射线分析	191
2. 量子化学法	193
参考文献	195

第六章 自旋标记的膜

§ 6-1 膜脂的分子运动	199
1. 脂类链的柔曲性	204
2. 膜脂分子的侧向扩散	209
3. 膜脂的翻转运动 (Flip-Flop)	212
4. 膜的融合	214
§ 6-2 流动脂类分数的测定	216
1. 波谱滴定法	217
2. Tempo 方法	218
§ 6-3 膜脂的相分析	221
1. 一元体系	221
2. 二元体系 侧向相分离	222
§ 6-4 膜中的类固醇	225
§ 6-5 膜中的脂类-蛋白相互作用	234
1. 外周膜蛋白	235
2. 整体膜蛋白	236
3. 人工膜中的蛋白	245
§ 6-6 极性分布	248
§ 6-7 pH 值和盐效应	252
§ 6-8 膜的通透性	253
§ 6-9 麻醉剂的作用	256

参考文献.....	257
-----------	-----

第七章 自旋标记的酶和蛋白质..... 262

§ 7-1 引言	262
----------------	-----

§ 7-2 研究酶所用的自旋标记	263
------------------------	-----

1. 共价结合的自旋标记	263
--------------------	-----

2. 非共价结合的自旋标记	273
---------------------	-----

§ 7-3 自旋标记酶的实验技术	276
------------------------	-----

1. 自旋标记酶	276
----------------	-----

2. 自旋标记酶的性质	279
-------------------	-----

3. 样品的测量	280
----------------	-----

§ 7-4 从自旋标记的酶和蛋白质所得到的信息 ...	280
-----------------------------	-----

1. 催化速率	281
---------------	-----

2. 变性机理	284
---------------	-----

3. 不同基团之间的距离	285
--------------------	-----

4. 蛋白质的对称性	291
------------------	-----

5. 活性部位的几何形状	293
--------------------	-----

6. 由配位结合或蛋白质水解引起的活性部位构象的改变	297
-------------------------------------	-----

7. 酶的旋转相关时间	299
-------------------	-----

§ 7-5 自旋标记酶举例	299
---------------------	-----

1. 溶菌酶	300
--------------	-----

2. 核糖核酸酶	301
----------------	-----

3. DNA 聚合酶	303
------------------	-----

4. 柠檬酸合成酶	303
-----------------	-----

5. 磷酸果糖激酶	303
-----------------	-----

6. 肌酸激酶	305
---------------	-----

7. 乙醇脱氢酶	305
----------------	-----

8. D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GPDH)	307
-------------------------------	-----

9. 胰凝乳蛋白酶	308
-----------------	-----

10. 胰蛋白酶	309
11. 枯草杆菌蛋白酶	311
12. 凝血酶	311
13. 弹性蛋白酶	311
14. 葡萄球菌蛋白酶	312
15. 胆碱酯酶	312
16. 腺苷三磷酸酶 (ATP 酶).....	313
17. 亮氨酸氨肽酶	313
18. 天冬氨酸转氨甲酰酶	313
19. 碳酸酐酶	314
20. 天冬氨酸转氨酶	314
21. 木瓜蛋白酶	315
参考文献.....	317

第八章 自旋标记的核酸..... 323

§ 8-1 引言	323
§ 8-2 核酸的自旋标记和自旋探针	324
1. 通过化学修饰的自旋标记	324
2. 自旋标记核酸的酶合成	334
3. 核酸的自旋探针	335
§ 8-3 含有自旋标记或自旋探针的核酸的 ESR 波 谱.....	339
1. 测量	339
2. 标记核酸的氮氧基波谱的理论分析	341
3. 氮氧基-Mn(II) 离子相互作用波谱的分析	344
§ 8-4 用 ESR 监测核酸构象的变化.....	344
1. RNA 体系	345
2. DNA 体系	352
§ 8-5 用自旋标记核酸研究分子的缔合	355
1. 同小分子的相互作用	355

2.同多肽和蛋白质的相互作用	356
3.同单层哺乳动物细胞的相互作用	361
4.检测在 RNA 中的 (A) _n 的生物方法	363
§ 8-6 结论	365
参考文献.....	366
第九章 自旋标记方法与生物医学	369
§ 9-1 自旋测定法	369
§ 9-2 自旋免疫测定法 (SIA).....	376
§ 9-3 自旋膜免疫测定法 (SMIA).....	380
§ 9-4 抗氮氧基自旋标记抗体的研究	386
§ 9-5 用自旋标记方法研究致癌作用机理	390
1.致癌物与细胞膜的相互作用	390
2.致癌物与核酸的相互作用	393
§ 9-6 用自旋标记方法研究癌细胞膜脂的流动性... 403	
§ 9-7 研究癌细胞膜蛋白某些活性部位的性质 ... 407	
§ 9-8 在体内的电子自旋共振	411
参考文献.....	413
第十章 自旋标记方法与药理学研究	416
§ 10-1 药物的吸收、分布和排泄	416
1.自旋免疫测定法	416
2.结合到血浆蛋白质上的药物	417
3.药物的分布	418
§ 10-2 药物新陈代谢	422
§ 10-3 药物的药理学效应	425
1.受体的媒介效应	425
2.不通过受体为媒介的效应	436
§ 10-4 抗癌药物对细胞膜的影响	438

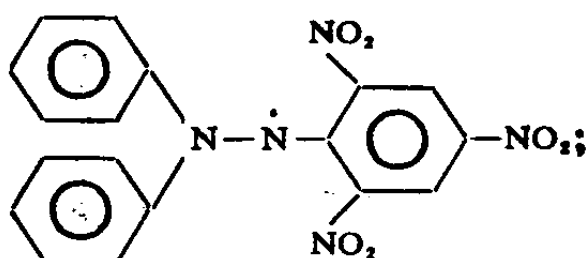
• 18 •

1. 抗癌药物对细胞膜流动性的影响	438
2. 药物对细胞膜通透性的影响	441
参考文献	446
第十一章 自旋标记的合成聚合物	449
§ 11-1 样品的制备	449
1. 自旋标记的聚合物	449
2. 向聚合物中掺入自旋探针	462
§ 11-2 聚合物的分子运动	463
1. 不同运动范围的 ESR 波谱	465
2. 聚合物的分子运动	472
§ 11-3 其它方面的应用	480
1. 研究聚合物的结构	480
2. 研究增塑作用	483
3. 用于网状结构聚合物的研究	483
参考文献	484
第十二章 自旋捕集技术及其应用	488
§ 12-1 一般原理和方法	488
§ 12-2 紫外光解酰胺-过氧化氢产生的自由基 ...	491
1. 乙酰胺	493
2. 甲酰胺	497
3. 琥珀酰胺	498
§ 12-3 在水溶液中氨基酸和羟基自由基的反应 ...	501
1. 甘氨酸	501
2. 丙氨酸	506
3. 缬氨酸	506
4. 亮氨酸	507
5. 异亮氨酸	507
6. 丝氨酸	509

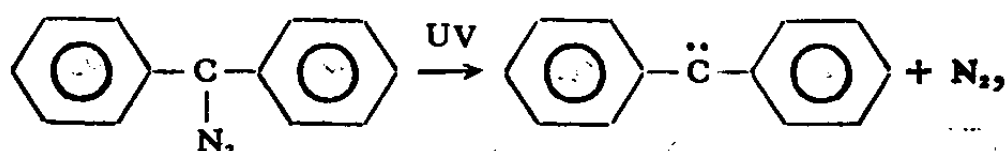
7. 苏氨酸	511
8. 天冬氨酸和天冬酰胺	511
9. 谷氨酸和谷氨酰胺	512
10. 赖氨酸	513
11. 精氨酸	513
12. 蛋氨酸	515
13. 组氨酸	517
14. 苯丙氨酸	520
15. 酪氨酸	520
16. 脯氨酸和羟脯氨酸	521
§ 12-4 γ 射线辐照核酸及其成分水溶液的自由基	522
1. 尿嘧啶	522
2. 尿苷	526
3. 胸腺嘧啶	526
4. 胸苷和 5'-胸苷单磷酸	529
5. 胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶	534
6. 2'-脱氧胞苷和胞苷单磷酸	534
7. 嘌呤和嘌呤衍生物	536
8. 5'-聚胞苷酸、5'-聚尿苷酸和 DNA	536
§ 12-5 研究致癌机理	536
1. 自由基致癌作用的研究	536
2. 脂的过氧化	539
§ 12-6 二肽多晶自由基	541
参考文献	546
附录	547
一、基本常数	547
二、几种氮氧自由基的波谱参数	548
三、某些商品自旋标记化合物英文名称	550

第一章 绪 论

电子自旋共振 (ESR) 波谱, 亦称电子顺磁共振 (EPR) 波谱, 其研究对象是具有未成对电子的顺磁性物质。包括: 1) 自由基, 即分子中含有未成对电子的化合物, 如甲基 $\text{CH}_3\cdot$ 、二苯基苦基肼基 (DPPH)



2) 过渡金属离子和稀土离子, 它们大多具有未被充满的 3d, 4d, 5d, 或 4f 电子壳层, 有一个或多于一个未成对电子, 例如 Mn^{2+} 、 Mo^{5+} 、 Ce^{3+} 等; 3) 有机三重态分子, 这类化合物在分子轨道中有两个相距很近的未成对电子, 例如二苯基偶氮甲烷, 经紫外光照射即产生一个基态三重态分子



碳上两个电子的自旋彼此平行; 4) 固体中某些局部的晶格缺陷, 如 F 心, V 心等; (5) 其它某些顺磁性气体, 如 O_2 , NO 等^[1,2]。

ESR 波谱方法已广泛地应用于物理、化学、生物、医学、地质等各个学科领域。这是因为这一新的技术具有独特的优越性。ESR 波谱技术是观察自由基等顺磁物质的一种最直接、最灵敏的方法, 例如在有利的条件下, 它能检测出 10^{-14}mol 的样品。其次, ESR 波谱方法一般不需对样品进行复杂的处

理，直接拿来检测而不破坏样品，这就为生物或化学体系中存在的低浓度自由基和微量的过渡金属离子的测量提供了可能。对诸如高分子聚合、酶反应、衰老、致癌、辐射损伤、光合作用等化学反应或生命过程中产生的自由基中间体，以及所涉及的微量元素的组成和价态的变化，ESR 方法都可以提供重要的信息^[3]。

当然，ESR 和其它任何一种方法一样，亦有其不足之处。首先，ESR 方法有很大的局限性，因为多数物质都不是顺磁性的。ESR 的灵敏度固然很高，但总有一定的限度，许多生命和化学过程所产生的自由基，各种组织中存在的顺磁离子的浓度往往太低，以致最灵敏的 ESR 仪器也无能为力。另外，ESR 波谱所涉及的理论和技术比较复杂，波谱解析比较困难，这是它不能象其它分析仪器那样被普遍采用的原因之一。

1965 年，McConnell 及其同事引入了自旋标记方法^[4,5]，为 ESR 波谱的应用开辟了一个新的天地。

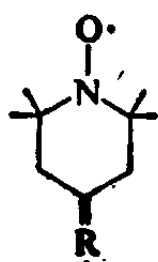
所谓自旋标记方法，就是将一顺磁性的报告基团加到被研究的体系，借助于报告基团的 ESR 波谱特征来反映该报告基团周围环境的物理、化学性质。这个顺磁性报告基团应具备如下条件：首先必须是足够稳定的；第二，能够以某种方式结合或嵌入到被研究物质的某个位置上；第三，其 ESR 波谱的变化对环境的物理、化学性质极为敏感，而报告基团本身对体系的扰动却甚微。符合上述条件的顺磁性报告基团称之为自旋标记 (spin label) 或自旋探针 (spin probe)。通常称与被研究物质共价结合者为自旋标记，与样品以其它方式结合者(例如嵌入)为自旋探针。除非特别指明，本书一律称为自旋标记。

最理想的标记化合物是氮氧自由基。除氮氧自由基外，

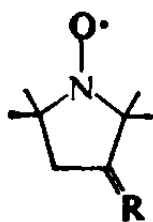
也可用 Mn^{2+} 或其它过渡金属离子以及其它有机自由基。例如第一个自旋标记化合物就是氯丙嗪 (chlorpromazine) 的正离子自由基^[4]。似乎现在一提及自旋标记就被理解为氮氧自由基, 本书所涉及的也只是氮氧自由基。

氮氧自由基自旋标记所以被广泛采用是因为: 第一, 它比较稳定, 便于合成, 并可根据需要与多种类型的母体分子结合, 以适用于各种不同的生物和化学体系。例如, 能与蛋白质中的巯基作特异性共价结合的马来酰亚胺类自旋标记, 可嵌入各种生物膜脂类体系中的脂肪酸类自旋标记, 等等; 第二, 其 ESR 波谱具有很高的灵敏度, 只需很低的浓度, 例如 $10^{-6}mol/l$, 即可得到很强的信号。这就避免了外加的标记物分子对被研究体系的显著干扰; 第三, 所产生的 ESR 波谱可以反映被研究物质的多种信息, 而且一般便于分析。氮氧自由基周围环境的极性、粘度、空间障碍、流动性、大分子的组成、构象和排列的有序性等一系列的性质, 均可由 ESR 波谱得到程度不同的反映。

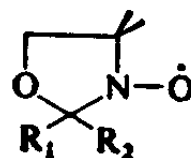
常用的氮氧自由基主要有以下几种形式



哌啶氮氧自由基



吡咯烷氮氧自由基



噁唑烷氮氧自由基

结构式中的 R 是根据不同的需要所选择的烷基、芳基或其它有机基团。标记化合物可以同生物大分子或高分子聚合物共价结合, 也可插入或以其它方式进入样品, 可以是特异性的, 亦可是非特异性的。研究工作者就是要根据所研究的对象和目的来合理地选择标记化合物。

本书以主要的篇幅阐述自旋标记方法的生物学应用，因为这一新的技术对生物体系的研究具有非常重要的意义，它不仅有助于探明生物聚合物的结构和功能，而且能对各种生物系统的内部环境、空间构象和运动状态提供有价值的信息^[5-9]。

本书在第二章讲述 ESR 波谱的基本原理。第三章是在前章的基础上讨论氮氧自由基 ESR 波谱的主要特征，它是贯串全书的理论基础。由于 ESR 波谱牵涉到较复杂的数理知识，本书照顾到一般生物学工作者的数理基础，行文力图做到深入浅出，尽量避免繁琐的数学语言，而着重于文字叙述和图示。

作为自旋标记技术的主要设备，顺磁共振波谱仪，本书照例作专章介绍。因为这也是有关科学工作者所必须具备的基本知识。此章还包括主要的操作步骤和测量方法，这往往被一般作者所忽视，但它确实是实验工作者首先必须了解的问题，而且常常是一项研究工作成败的关键。

第五章是自旋标记化学，讲述自旋标记化合物本身的性质和化学合成的方法。以后诸章讨论自旋标记方法在生物膜、蛋白、核酸等各种生物体系中的具体应用，包括在生物医学和药理学中的应用^[9,12]。

鉴于自旋标记技术亦广泛应用于高分子化学领域，而在国内这方面的工作目前尚未开展，为向国内化学工作者推荐这一新的方法，本书第十一章对自旋标记方法如何用于合成高聚物的研究亦作了简要介绍^[10,11]。

另外，自旋捕集 (spin trapping) 技术作为扩大 ESR 波谱应用的另一分支亦逐渐得到广泛采用。“自旋捕集”是研究不稳定短寿命自由基的行之有效的办法。这一技术所涉及的基本原理和实验方法与自旋标记有很多相似之处，因而亦列