

生命科学研究中的稀土发光

——稀土荧光探针及荧光标记在生物大分子研究中的应用

李文连

(中国科学院长春物理研究所, 长春 130021)

本文介绍了稀土发光在生命科学研究中的作用,从稀土发光基本知识入手,着重描述了稀土离子发光与生物大分子研究的关系,稀土离子作为荧光探针及荧光标记在生物大分子结构探测与分析方面的应用概况。

在您观看彩色电视时,也许您不一定知道电视荧光屏发出的鲜艳的红色光是哪种材料的贡献,这种红色光就来自稀土铕离子(Eu^{3+}),可见稀土发光已进入我们的家庭。那么,稀土发光是怎样步入生命科学领域的呢?首先看一下生命现象与哪些物质有关。构成生命体的主要单元是蛋白质、核酸和糖等生物大分子。它们与繁殖、遗传及神经兴奋等生命现象有着密切关系,而且这些生命现象无不依赖于生物大分子的结构和功能。而稀土荧光探针及荧光标记恰恰是用来研究生物大分子的结构及其与功能的关系,用来分析生物大分子含量等,这些都与生命现象有着密切的关系。可见,稀土发光在生命科学中有着重要的作用。

过去,在研究生物大分子结构、功能过程中,有时也利用生物大分子发射团发光即内源荧光,以获得一些有意义的信息(如酶活性部位、金属结合蛋白的结合部位等),但这远远不能满足这方面研究工作的需要。于是,就引入了发荧光的离子以获得更丰富的结构信息,其中最理想的就是稀土离子。

一、稀土离子在溶液介质中的发光

稀土离子发光是稀土元素的重要特征之一。这是由它们的4f电子组态决定的^[1]。 Eu^{3+} 离子及 Tb^{3+} 离子的电子组态分别为 $4f^6$ 及 $4f^8$,

由于4f层电子被5d6s6p电子所屏蔽,所以4f层电子跃迁受它们所处的配位场影响很小,即4f电子跃迁产生的辐射跃迁谱线位置基本不受它们所处的配位场及其化学环境影响。图1示出了 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 离子的电子能级。这些不连续的电 子能级是按照量子力学理论计算的。这两个离子的基态及激发态电子能级都用 7F_J 及 5D_J 表示,但下角标“J”的顺序, Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 离子恰好相反。

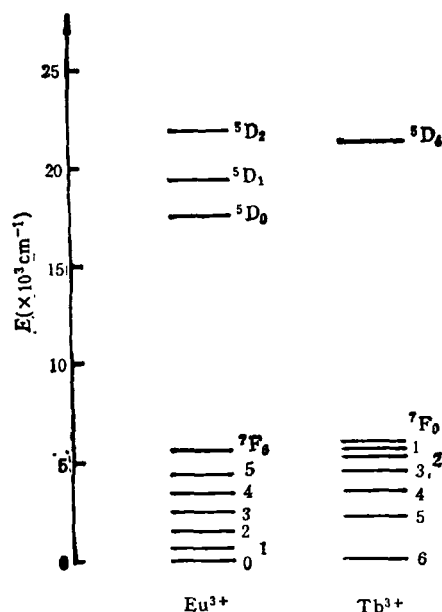


图1 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 离子的电子能级

表1 溶液介质中 Eu^{3+} , Tb^{3+} 配合物的发射、激发光谱特征

激发模式	主要光谱特征	
	Tb^{3+} 配合物	Eu^{3+} 配合物
直接激发: 在体系中不存在适宜的能量给体时,对稀土离子用近紫外、可见光进行直接激发	(1) 它的激发和发射光谱与 $\text{Tb}^{3+}(\text{H}_2\text{O})$ 离子的光谱基本类似 (2) 激发光谱很类似于 $\text{Tb}^{3+}(\text{H}_2\text{O})$ 的吸收光谱	(1) ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^7\text{D}_{0,1,2,3}$ 可见区吸收的激发光谱类似于 $\text{Eu}^{3+}(\text{H}_2\text{O})$ 离子的光谱,在可见区的激发光谱与吸收光谱类似 (2) 近紫外的激发光谱可以、也不可以类似于近紫外的吸收光谱,这取决于 Eu^{3+} 的 CT 态位置
间接激发: 配体吸收激发的能量,然后传给稀土离子	(1) 除了 Tb^{3+} 的 ${}^3\text{D}_0$ 位于 $20000 \sim 21000 \text{ cm}^{-1}$ 吸收带外,它还有适宜的受体吸收能级,位于 $26000 \sim 42000 \text{ cm}^{-1}$,到 Tb^{3+} 的任何能级的能量传递都将敏化 Tb^{3+} 发射 (2) Tb^{3+} 的 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 发射易被紫外一蓝光的生物大分子配体敏化,导致 Tb^{3+} 发射强度提高	(1) Eu^{3+} 在近紫外区及可见区 ($\bar{\nu} > 17300 \text{ cm}^{-1}$),具有合适的能量受体能级以敏化 ${}^3\text{D}_{0,1,2,3}$ 的发射,使 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 发射增强,当这种能量传递到 Eu^{3+} 的 CT 态时,就不会敏化 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 的发射 (2) 当 CT 态主要为受体能级时,它的激发光谱与吸收光谱彼此不相似

稀土离子作为荧光探针对生物大分子结构和功能的研究都是在水溶液中进行的,它在介质中与生物大分子生成稀土生物大分子配合物.在配合物中, Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 离子发射光谱分别对应于 ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 及 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$, 而 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 及 ${}^3\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$; 又分别是这两个离子的主发射跃迁,并且对生物大分子配体微环境很敏感.

生物大分子大多具有手性中心(chiral center).当 Tb^{3+} 离子处于手性中心生物大分子中时,它的 ${}^3\text{D}_j \rightarrow {}^7\text{F}_j$ 跃迁就表现出圆偏振特性,这种现象称为发射光学活性(CPL)或圆偏振光特性.这种特性在研究生物大分子结构过程中也常常被利用.

利用稀土-生物大分子配合物的发光性能研究生物大分子的结构时,实验工作是在水介质中进行,因为这更接近实际生命体的生理条件.为此,这里简要介绍一下 Eu^{3+} 及 Tb^{3+} 离子在水溶液中的发射、激发光谱学特征^[2].表1汇集了有关的数据.表1中提到的直接激发是激发光能被中心离子直接吸收的过程;而间接激发是激发能被配位体吸收,再通过能量传递过程把激发能传给中心的稀土离子.表1中还提到 Eu^{3+} 的电荷转移(CT)态,这种能量状态实际上是一种瞬间的中间态即过渡态.对于 Eu^{3+} 离子,CT 态吸收的能量主要以损失热能的形式回到基态. CT 态在生物大分子结构研究中起着不可忽视的作用.

二、稀土离子作为研究生物大分子结构的荧光探针

稀土离子独特的光谱学特征,使得它们在生命科学研究中起着重要作用.特别是一些金属,如 Ca^{2+} , Mg^{2+} 等的结合蛋白,这些金属没有可进行探测的信号而给这些蛋白质的研究带来很大困难.而稀土离子由于具有与 Ca^{2+} , Mg^{2+} 等离子相似的配位化学特性,因而可以对其进行同构取代,从而使 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的位置有了可以探测的光谱信号.通过研究这些信号随其周围微环境的变化,可以了解 Ca^{2+} , Mg^{2+} 离子周围的一些情况.人们为什么对 Ca^{2+} , Mg^{2+} 金属离子如此感兴趣呢?那是因为在生命活动中(如 Ca^{2+} 与刺激-分泌耦合有关,还可加速血液凝固,调节平衡等)起重要作用.这里需要指出的是,稀土离子取代 Ca^{2+} , Mg^{2+} 等金属离子后,不应改变原来的生物活性及构象,否则探测的信号就无法说明原来金属离子周围的微环境.稀土离子对 Ca^{2+} , Mg^{2+} 等金属离子能够同构取代的理由^[3]是:稀土离子与 Ca^{2+} 离子有相近的半径(约为 1.1 \AA),二者都是“硬”阳离子,与生物大分子中的氧产生静电性离子键; Eu^{3+} , Tb^{3+} 的配位数(8~9)与 Ca^{2+} (9)相同.

1. 对生物大分子(蛋白质)中金属离子结合部位数的研究

生物大分子的一个重要化合物是钙调蛋白 (CaM)。用稀土荧光探针研究 CaM 的 Ca^{2+} 结合部位的内容很多,这是因为许多蛋白都依赖于 Ca^{2+} ,并能与 CaM 进行可逆结合。研究结果表明, CaM 的高亲和位点在 N 结构域, Tb^{3+} 在 CaM 上有不同的结合顺序。用高分辨率 ($< 0.1 \text{ \AA}$) 的激光对结合在蛋白质上的 Eu^{3+} 激发,当监控 Eu^{3+} 的 ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ 发射时,可获得 ${}^5\text{D}_0 \leftarrow {}^7\text{F}_0(0-0)$ 跃迁的不同激发带。由于每个带反应了一个微环境,由此可以判别金属离子结合部位数。例如,对牛乳白蛋白 (BLA) 中金属结合部位的研究表明,有两个不同位置^[3]。

2. 用 Eu^{3+} 离子研究生物大分子配体形式电荷

因为 Eu^{3+} 的 ${}^5\text{D}_0 \leftarrow {}^7\text{F}_0$ 跃迁的能量随电子间相互排斥参数而变化,所以直接与铕离子结合的配体形式的电荷总数 q 与 $0-0$ 跃迁能量 $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$ 有如下关系:

$$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 17.273 + 2.299 - 0.76q^2(T = 296\text{K}). \quad (1)$$

通过 (1) 式可以给出在给定生化环境下的 ${}^5\text{D}_0 \leftarrow {}^7\text{F}_0$ 跃迁的对应关系。

3. 对生物大分子中金属离子位置对称性的研究

每个金属离子位置的局部对称性可通过群论原理对 Eu^{3+} 的 ${}^5\text{D}_J \rightarrow {}^7\text{F}_J$ 跃迁进行分析来确定,特别是生物大分子中的反演中心,极易用这种方法辨认。

4. 对金属离子结合水分子数目的探测研究

因为稀土离子与键合 H_2O 分子的 OH 的振动耦合将对稀土离子的无辐射去激活提供很好的通路,而在重水 (D_2O) 中,这种去激活作用变得无效。这样,就可以通过比较在 D_2O 和 H_2O 存在下的 Eu^{3+} 的 ${}^5\text{D}_0$ 激发态寿命 τ , 来确定与 Eu^{3+} 结合的水分子数目 n , 计算公式为

$$n = 1.05[1/\tau(\text{H}_2\text{O}) - 1/\tau(\text{D}_2\text{O})]. \quad (2)$$

5. 对蛋白质中金属离子间距离的研究

如果蛋白质中两个位置被匹配合适的不同金属离子(其中受体可以不是稀土)所占据,那么根据 Förster 型偶极-偶极无辐射能量传递理论^[49]可以推出,其能量传递效率 η 与受体存在

或不存在的荧光寿命 τ 或 τ_0 有关,给体-受体间距离 r 可按下式计算

$$\eta = \tau/\tau_0 = 1/(1 + r^6/R_0^6) \quad \text{或} \\ r = R_0 \cdot (\eta^{-1} - 1)^{1/6}, \quad (3)$$

上式中 R_0 为能量传递效率达 50% 时临界传递距离。Wang^[6] 用这种方法研究了哺乳动物的 CaM 中 Ca^{2+} 结合部位(见图 2),发现对于稀土离子, CaM 中部位 I, II 有高亲和性, III, IV 有低亲和位, I-II 间距为 11.8 \AA , III-IV 间距为 $9.6 \pm 0.6 \text{ \AA}$ 。

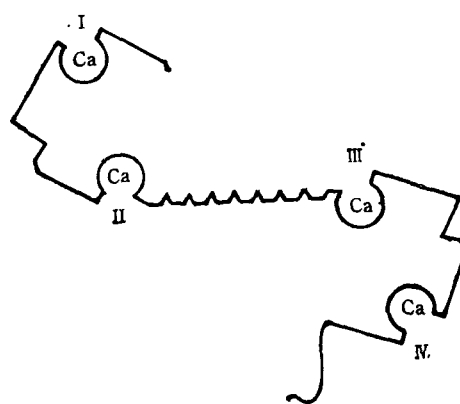


图 2 钙调蛋白 (CaM) 四个金属离子的位置模型

当 Tb^{3+} 离子作为能量传递的给体时,其受体可以是其他稀土离子,如 Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Er^{3+} 及 Tm^{3+} 等,也可以是不发光的过渡金属离子。利用能量传递理论计算金属离子间距,是通过监控 Tb^{3+} 的荧光寿命随受体浓度的变化来进行的。

6. 对生物大分子发色团与结合金属间的距离的研究

许多生物大分子,如蛋白质等在紫外光激发下有发光现象。这是因为,其中含有称之为发色团的发光基团,如核酸碱,蛋白质的某些氨基酸残基——色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸。它们在 $280-500 \text{ nm}$ ($35,700-20,000 \text{ cm}^{-1}$) 范围有发射,而 Eu^{3+} , Tb^{3+} 在此区亦有多重态吸收,这就满足了从发色团到稀土 Eu^{3+} , Tb^{3+} 离子的能量传递条件,从而敏化稀土离子,使其发光增强。如 Brittain 等人^[7]将 36 种与 Ca^{2+} 有关的蛋白中的 Ca^{2+} 用 Tb^{3+} 离子取代后,有

32种蛋白质敏化了 Tb^{3+} 的发光。同样,可用(3)式计算从氨基酸残基到金属离子之间的距离^[8]。

7. 用 CPL 光谱研究生物大分子弱配位基特性

前述的稀土荧光探针主要是利用稀土离子与生物大分子配位基团——羧基氧的配位特性。生物大分子在水溶液介质中,还有一些与稀土离子配位能力较弱的配位基团,如羰基、氨基、酰氨基及羟基等。它们在生物大分子的结构、功能研究中也起着相当大的作用^[9]。尽管这些基团与稀土离子结合似乎不起主要作用,但由于它们在稀土-生物大分子配合物水溶液中占据内配位圈,可以“锚状物”的形式与稀土结合。CPL 光谱恰恰是研究这类结合的有力工具,因为它把立体化学结构的灵敏度与自然光学活性的特异性结合在一起。例如,用 CPL 光谱和 Tb^{3+} 的发光可以灵敏地监控在溶液状态下的 Tb^{3+} 拉沙里菌素 (lasalocid) 配合物的形成过程及结构。

8. 对生物大分子构象的研究

所谓生物大分子构象是指生物大分子的立体结构。在前面介绍的关于生物大分子发色团到金属离子之间距离的研究中,利用了 Förster 理论。从这种发色团到稀土离子的能量传递几率不仅与能量给体的量子效率、光谱叠加的积分成正比,还与取向因子、给体-受体间距离的六次方成正比,这就给出了与生物大分子的构象相关的信息。

生物大分子结合 $Tb^{3+}(Eu^{3+})$ 离子之后,室温下生物大分子的许多瞬间亚稳态构象变化都发生在这些稀土离子激发态过程中,因此对 $Tb^{3+}(Eu^{3+})$ 离子的荧光寿命测量,也可以给出某些与生物大分子构象及构象动力学相关的信息。

三、稀土离子作为生物大分子的分析探针

1. 时间分辨免疫荧光分析

这种方法实际上是把稀土离子(如 Eu^{3+} 离

子)作为蛋白质(抗体)的荧光标记,从而对抗体或抗原进行超微量分析。它是继酶免疫分析之后,在发光免疫分析基础上由 Soini 等人^[10,11]创造和发展起来的非放射性免疫超微量分析技术。这种方法的原理如图 3 所示。由图 3 可以看出,先用一种双功能螯合剂(如异硫氰酸-苯基-二乙胺四乙酸)把 Eu^{3+} 离子与蛋白质(抗体)连接上,这种双功能螯合剂象人的两只手,一只手抓住蛋白质,另一只手又牢牢地抓住 Eu^{3+} 离子,此时以定量条件连在蛋白质上的 Eu^{3+} 离子并不发光。当把其释放到增效液中时,在紫外光(340 nm)下激发,才有很强的发光(红色,615 nm)。通过把未知体系的 Eu^{3+} 的发光强度与浓度的关系曲线和标准的 Eu^{3+} 发光强度与浓度的关系曲线对比,就可确定待测的抗体的量。增效液是由对 Eu^{3+} 发光提供能量的 β -二酮配体, β NTA (β -萘酰基三氟乙酰丙酮)和 TOPO (三正辛基氧化磷)及防止 Eu^{3+} 发射在水溶液中损失能量的表面活性剂(如 Triton X-100)构成。值得指出的是,荧光标记利用的是稀土有机配合物发光,而在本文第二部分介绍的荧光探针主要利用的是稀土-生物大分子配合物发光。在检测时采用荧光分辨技术的目的在于排除增效液中生物、有机分子的快速(纳秒量级)荧光干扰,准确地对长寿命(毫秒量级)的 Eu^{3+} 发光进行分析。

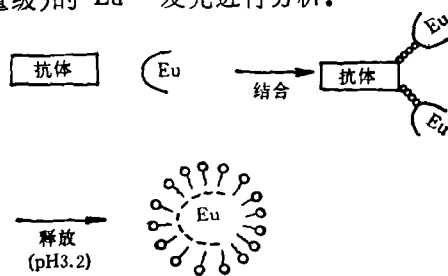


图 3 用稀土离子作为蛋白质荧光标记的荧光免疫分析原理

这种研究方法已在生物学、微生物学、免疫学、药理学、基础医学以及临床医学等领域中得到广泛应用。

2. 在医学和药物分析方面的应用

稀土发光学在医学及药物学研究中也起着

(下转第66页)