

同步辐射核共振振动能谱学(下):应用篇

王宏欣^{1,2,†} 周朝晖³ 徐伟⁴

(1 劳伦兹·伯克利国家实验室 美国加州伯克利 94720)

(2 加州大学戴维斯分校化学系 美国加州戴维斯 95616)

(3 厦门大学化学化工学院 厦门 361005)

(4 中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

2014-03-05收到

† email: hxwang2@lbl.gov

DOI: 10.7693/wl20141001

Synchrotron radiation based nuclear resonant vibrational spectroscopy: Applications

WANG Hong-Xin^{1,2,†} ZHOU Zhao-Hui³ XU Wei⁴

(1 Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley CA 94720, USA)

(2 Department of Chemistry, University of California, Davis CA 95616, USA)

(3 College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(4 Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

摘要 文章上篇介绍了核共振振动能谱学的基础理论和实验方法。本篇将着重介绍其在铁基化学和铁基生物化学研究中的应用实例: 首先讨论单铁玉红氧还蛋白溶液样品和晶体样品的核振能谱以及它们的对比情况; 然后由简入繁, 系统地叙述核振能谱学方法在铁硫蛋白、氢化酶、固氮酶等一系列重要的以铁硫为基础的多铁蛋白研究中的应用和相关的研究成果; 作为非铁硫类蛋白的代表, 作者也简述了一氧化碳肌红蛋白的核振能谱。以上述实例为基础, 本篇最后综述了该能谱方法在理论上和实验上突出的优越性和它在国内外的发 展前景。

关键词 核共振振动能谱学, 振动态密度函数, 铁硫蛋白, 固氮酶, 氢化酶, 肌红蛋白

Abstract In the article in the last issue (Part 1), we discussed the theoretical concept and experimental aspects of nuclear resonant vibrational spectroscopy (NRVS). In this issue, we will focus on its practical applications in iron-specific chemistry and biochemistry. As an introduction, the NRVS techniques for solution and crystal samples of single iron rubredoxin are first described and compared. Then the recent research results of multi-iron iron-sulfur proteins such as ferredoxins, hydrogenases and nitrogenases are discussed in detail. As an example of non-iron-sulfur proteins, carbon monoxide bound myoglobin is also presented. Based on the above examples, the theoretical and experimental advantages and potential of NRVS are reviewed, and its future prospects at home and abroad are discussed.

Keywords nuclear resonant vibrational spectroscopy (NRVS), partial vibrational density of states (PVDOS), iron sulfur proteins, nitrogenase, hydrogenase, myoglobin

6 核共振振动能谱学的应用实例

在本文上篇简述了核共振振动能谱学的基本原理、实验要求和能谱分析过程之后,本篇将着重讲述这一能谱方法的应用实例。我们将从相对简单的单铁玉红氧还蛋白开始,一一介绍核共振能谱学在研究各种含单铁和多铁的生物分子中的具体应用。

生物分子是自然存在于生物体中的分子的总称。它们的主体由氢、碳、氧、氮、磷、硫六种元素组成。但含量极少的金属元素(如铁)往往位于生物分子催化或电子转移的关键位置,并具有十分重要的生物和化学功能,是生物化学研究的重点之一。我们之所以选择生物分子作为核共振能谱学应用的主要方向进行介绍,首先是因为该能谱学方法对 ^{57}Fe 具有甄别性,特别适用于对生物大分子中微量铁元素的定点测量;二是因为生物化学是当今最重要的应用科学之一,具有先进性;三是它同其他微量元素、微弱信号的能谱测

量(如对非 ^{57}Fe 铁标定的陨石样品的测量)有类似之处,面临共同的挑战;此外,生物大分子样品的提纯、化学状态的调控和微弱信号的探测之间的有机结合,可以充分体现同步辐射在交叉学科研究中的关键角色。

除非特别注明,本篇中提到的核共振能谱均指振动态密度函数(PVDOS),而不是原始能谱。因此,能谱图纵轴均为能态密度,单位为横轴能量单位(波数, cm^{-1})的倒数,即波数 $^{-1}$ 或 cm 。

6.1 玉红氧还蛋白的能谱分析

玉红氧还蛋白(Rubredoxin)是最简单的铁硫蛋白之一^[5]。它的活性中心有一个铁离子和4个配位的半胱氨酸(一种氨基酸)中的硫原子,结构呈大致的四面体结构(见图7(a)),类似于上篇中的四氯化铁离子($[\text{FeCl}_4]^-$),但其中两个铁硫键明显较长,而另外两个铁硫键较短。

处于氧化态下的样品的核共振能谱(见图7(b))^[5]的非对称伸缩谱线位于 ~ 360 波数,非对称弯曲谱线位于 ~ 150 波数,与 $[\text{FeCl}_4]^-$ 离子的核共振能谱

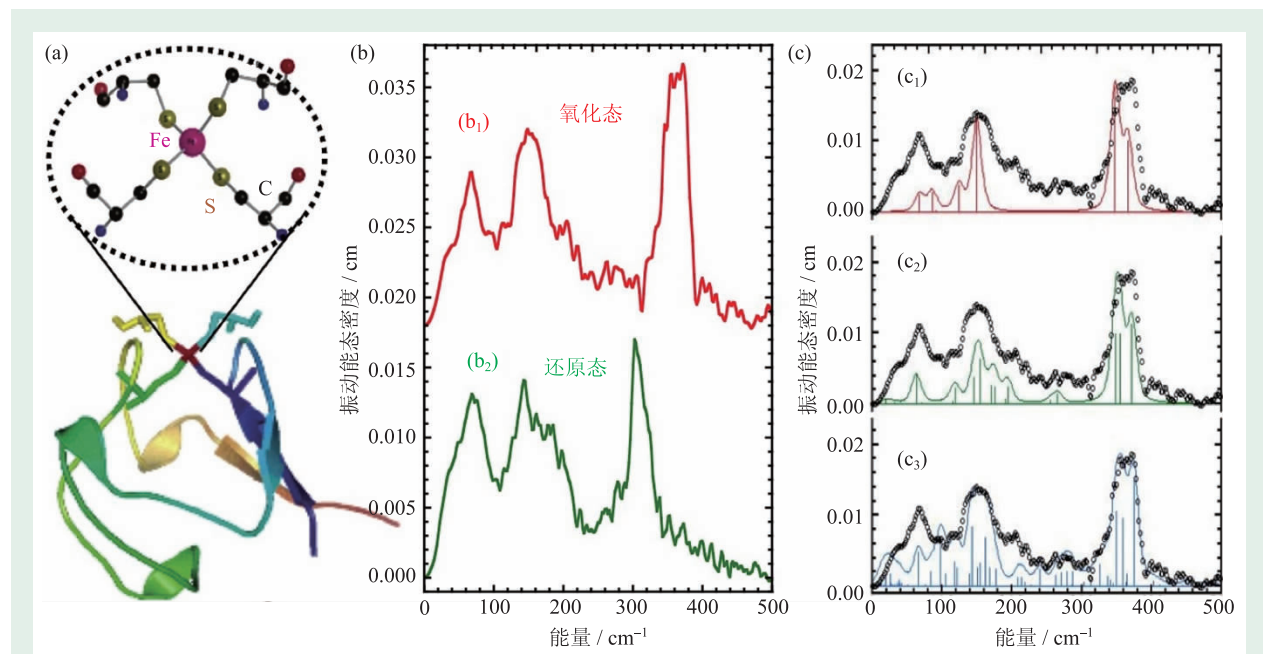


图7 (a)玉红氧还蛋白和单铁活性中心的结构示意图;(b₁)和(b₂)分别为处于氧化态和还原态的玉红氧还蛋白的核共振能谱;(c₁), (c₂), (c₃)为氧化态玉红氧还蛋白的核共振能谱的简正振动分析拟合图,其中(c₁)为假设具有 D_{2d} 对称性的Fe—S—C的双层配位原子拟合,(c₂)为引用真实晶体学结构数据的Fe—S—C—C三层配位原子拟合,(c₃)为引用真实结构数据,并对Fe—S和外面5层原子(Fe—S—X5,共6层)进行拟合。图中空心圆圈代表测量能谱

大体上类似。对称伸缩和对称弯曲模态因为没有铁位移,因此没有核振散射强度。当然,玉红氧还蛋白与 $[\text{FeCl}_4]^-$ 在细节处有着明显不同。首先,玉红氧还蛋白谱线比 $[\text{FeCl}_4]^-$ 的谱线要宽得多,这是由于玉红氧还蛋白的结构比 $[\text{FeCl}_4]^-$ 要复杂得多,因而要牵涉到更多的振动模态的组合(数目 $=3N-6$, N 为一个分子内的原子数);其次,基于分子与分子间的低能区的振动也几乎达到与弯曲模态相同的振动强度,明显要比 $[\text{FeCl}_4]^-$ 强得多;最后,位于220波数左右、明显不为零的“背景强度”实际上也是由许许多多低强度谱线所组成的,尽管在每一个这样的振动模态中,铁的位移量很小。这再次说明玉红氧还蛋白分子相较模型分子,含有更多、更复杂的振动模态。

当样品转变为还原态时(见图7(b₂)),非对称伸缩振动谱线的能量位置下降到 ~ 309 波数;而非对称弯曲谱线的能量位置也下降到 ~ 140 波数,但没有伸缩振动的变化那么明显。低能区的谱峰变化则微乎其微。这是因为,氧化态的变化主要涉及到中心原子(^{57}Fe),其变化对伸缩振动的力常数影响较大,而弯曲振动一般与几个原子同时有关,因而其中一个原子氧化态的变化,对其

力常数影响相对较小。同时,弯曲振动的能量位置较低,其绝对位移量自然也要小些。分子与分子间的振动与更多个原子有关,一个原子氧化态的变化对其整体振动影响几乎可以忽略不计。这些规律与其他传统光谱结果相似,但核振能谱定点测量与铁位移有关的振动模态,可以一目了然。而且,核振能谱谱峰的位置和强度均可进行理论拟合,从而大大增强了拟合力常数的可靠性。

图7(c₁)—(c₃)是运用简正模态分析对氧化态玉红氧还蛋白的核振能谱进行拟合的计算图谱(实线)与测量能谱(空心圆圈)的对比^[5]。首先,如果假设铁原子处于一个标准正四面体 T_d 的对称中心,进行Fe—S的单层拟合,其结果只有两个独立的谱峰,无论如何也无法拟合其实验测量能谱,这说明玉红氧还蛋白的活性中心与标准四面体结构相距很远;其次,我们假设铁原子处于更接近于实际晶体结构的 D_{2d} 对称中心,进行Fe—S—C的双层配位拟合,其计算结果与实验的测量结果开始接近,但细节处还有明显的差别(见图7(c₁)),特别是在220波数处的过渡区的强度没有得到拟合;接下来,我们不做对称假设和处理,直接引用分子的晶体结构数据,进行Fe—S—C—C的三层拟合,结果得到进一步改进(见图7(c₂));最后,我们还是直接引用分子的结构数据,并且计算到除了半胱氨酸硫原子之外的第五层(共六层)配位原子,即Fe—S—X₅。这时,拟合结果变得十分接近测量结果,在伸缩能区、弯曲能区和 ~ 220 波数的过渡区都十分吻合(见图7(c₃))。这说明,如果只包括与铁有明显关系的振动模态,而完全忽略那些好像与铁并不直接有关的模态,其拟合效果就不会太好。

6.2 晶体与溶液的能谱分析

由于核振散射强度正比于沿着X射线入射方向的 ^{57}Fe 位移量的平方,核振能谱可以测量出晶体样品中的各向异性。图8展示了入射X射线沿着玉红氧还蛋白晶体晶向 a 和沿着晶向 c 的核振能谱的对比(见图8(a)),以及沿晶向 a, b, c 的平

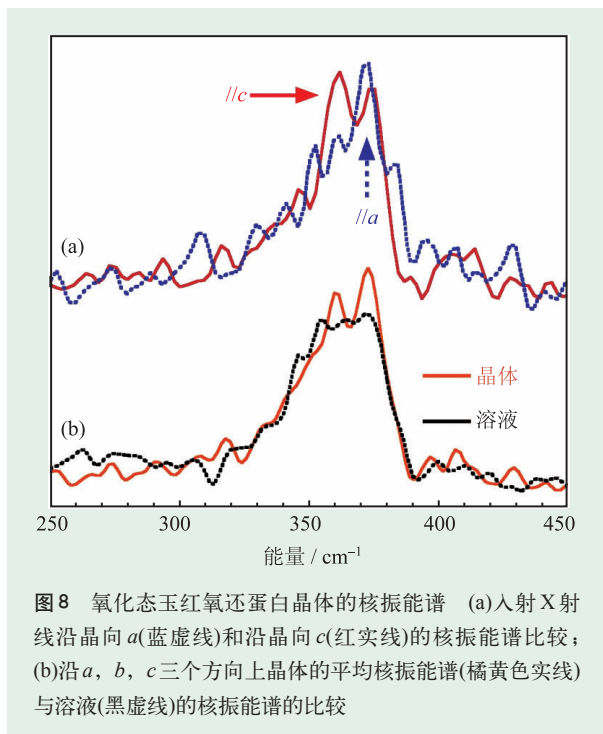


图8 氧化态玉红氧还蛋白晶体的核振能谱 (a)入射X射线沿晶向 a (蓝虚线)和沿晶向 c (红实线)的核振能谱比较;(b)沿 a, b, c 三个方向上晶体的平均核振能谱(橘黄色实线)与溶液(黑虚线)的核振能谱的比较

均晶体能谱与溶液能谱的对比(见图8(b))^[22]。

与溶液能谱大体上类似, 玉红氧还蛋白晶体能谱^[22]同样具有大约在360, 150和70波数的3个谱峰区。但是溶液能谱的360波数谱峰, 在晶体能谱中分立为三个亚峰, 即位于375, 358和350波数谱线。当入射X射线平行于晶向 c 时, 358波数谱峰强度最强, 375波数谱峰次之, 350波数谱峰基本没有强度; 当入射光束平行于晶向 a 时, 375波数谱峰变为最强, 358波数谱峰次之, 350波数谱峰再次之(但仍有强度)。我们还注意到, 沿两个晶向的核振能谱主要在伸缩振动区有明显差别(图8(a)), 两谱在弯曲振动区和低能振动区则相似(见文献[22])。晶向 a 大体上沿着两个较短的铁硫键, 晶向 c 大体上沿着两个较长的铁硫键, 但两个方向上的结构差别并不十分突出, 因此沿晶向 a 和沿晶向 c 的两幅核振能谱图的差别也不十分突出。塞奇(Sage)教授在文献[23]中报道了四苯基卟啉咪唑亚硝基铁络合物[Fe(TPP)(Im)(NO)]的晶体核振能谱, 其各向异性特征则十分突出。

除了各向异性之外, 从图8(b)的对比中可以看出, 即便是晶体三晶向的平均能谱, 其谱峰还是比溶液能谱的谱峰具有更高的精细度。

6.3 其他铁硫蛋白的能谱分析

铁硫蛋白(Iron-sulfur protein)是生物化学研究中最常见、最重要的蛋白质之一。其特征是其中存在着铁硫簇。铁硫簇含有与硫连接着的一、二、三、四、六和八铁中心, 并可处于各种变化的氧化还原态。铁硫簇存在于多种金属蛋白之中, 例如上面讲到的玉红氧还蛋白, 还有二铁、三铁或四铁的铁氧化还原蛋白(Ferredoxin, 也称铁氧还蛋白)等。此外, 固氮酶和氢化酶中也含有多种形式的铁硫蛋白。铁硫蛋白通常是电子传递途径中的重要成员, 其参与或涉及的生物化学过程包括呼吸作用、光合作用、羟化作用、吸氢、放氢、氢分子重组以及生物固氮等反应过程。

二铁、三铁、四铁簇的铁氧还蛋白较单铁的玉红氧还蛋白具有更丰富的核振跃迁。二铁的铁

氧还蛋白的弯曲谱峰和分子与分子间振动谱峰已连成一片, 基本上无法区分(见图9(b)中的蓝线)^[4]。但四铁的铁氧化还原蛋白(例如处于氧化态下的D14C变体火球菌中的铁氧还蛋白, 简称D14C, 见图9(b)中的红线), 其核振能谱结构又出现较高的离散性, 并形成典型的四谱峰结构^[24], 这是由于四铁四硫的立方烷结构具有较高的刚性所致。这时, 除了极低能区外, 其余部分可以归纳为能量在120—180波数(本文称为A区), 260—290波数(B区)和340—400波数(C区)的3个能谱区间。能量最高的C区还有可能会分裂为两个谱峰, 例如, 四铁铁氧化还原蛋白的C区可大致分为~355波数和390波数的两个亚峰(图9(b)中红线)。通常, C区的低能峰(355波数)与终端Fe—S的伸缩有关, C区的高能峰(390波数)和B区谱峰则与Fe—S桥的伸缩有关, A区则与弯曲振动有关^[24, 25]。经过简正模态分析, 同样可以得出各化学键上的振动力常数, 从而获得相关的结构和化学信息。

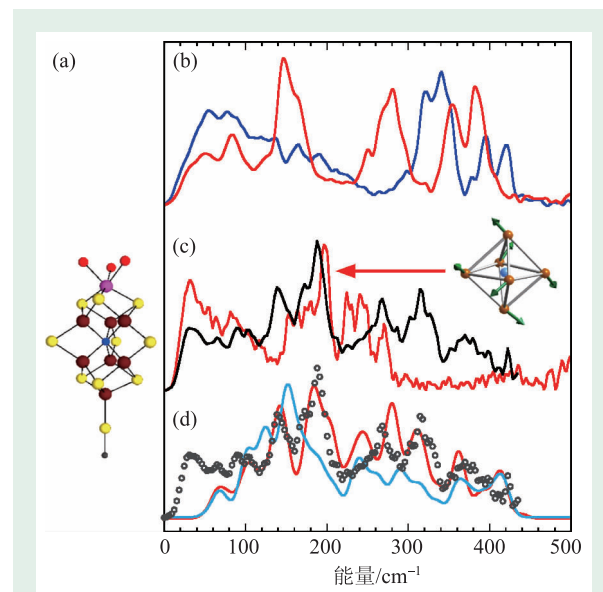


图9 (a)固氮酶中的铁钼辅因子结构示意图; (b)二铁(蓝线)和四铁(红线)铁氧化还原蛋白的核振能谱图; (c)棕色固氮酶(Av1)与其NiFe基因编码蛋白的核振能谱差值图(简称为M簇核振能谱, 黑线)对比作为模型结构的笼型氮代十五羰基合铁阴离子 $[\text{Fe}_5\text{N}(\text{CO})_{15}]^-$ 的核振能谱图(红线)。右侧的插图为后者的中心结构之呼吸振动模态的示意图; (d) M簇核振能谱(黑色空心圆圈)和密度泛函理论的计算结果(红线代表假设中心元素为C; 蓝线代表假设中心元素为O)

C区两个谱峰的相对强度还与诸如Fe—S—C—C二面角是接近90°还是接近0°(或180°)的几何结构相关。有关各种铁硫簇蛋白的核振能谱的详情情况请参阅文献[4, 25—27]。

6.4 固氮酶的能谱分析

固氮酶(Nitrogenase)可以催化无法被植物利用的气体氮分子,使其产生可以被利用的氨分子的化学反应,因而是自然界中最重要的金属蛋白酶之一。在结构上,固氮酶(如棕色固氮菌Av1中的固氮酶)由铁蛋白和钼铁蛋白两部分组成。铁蛋白含有铁硫簇,钼铁蛋白含有M簇和P簇两个中心,其中M簇被认为是结合并催化氮分子的活性中心。如果是棕色固氮菌的 $\Delta nifE$ 突变种,则其中只有P簇,没有M簇。2002年的X射线晶体结构研究结果指出,固氮酶中M簇的结构是一个 $MoFe_7S_9X$ 的笼形结构,外接一个高柠檬酸(见图9(a))。研究还发现笼中心存在电子云密度,但其中心元素(X)是N、C或O则无法被当时的X射线晶体学所确定^[28]。在随后的2006年,核振能谱得出 $X=C$ 或N,排除 $X=O$ 的可能性^[29]。2011年,这个中心元素^[30, 31]最终被确定为 C^{4+} 。

在核振能谱研究中^[29],人们首先分别记录含P簇和M簇的Av1和只含P簇的 $\Delta nifE$ 突变种分子的核振能谱,然后求取两者的差值,即代表M簇部分的核振能谱(图9(c)中的黑线和图9(d)中的黑色空心圆圈)。由于M簇的 $MoFe_7S_9C$ 结构也含有Fe—S键,因此它的部分谱峰与二铁和四铁铁硫簇的核振能谱相重合。但~190波数左右的M谱峰与任何铁硫能谱都不重合(对比图9(b), (c), (d))。对比在图9(c)中M簇(黑线)和氮代十五羰基合铁阴离子($[Fe_6N(CO)_{15}]^{3-}$, 红线)的核振能谱,以及两者的结构图(图9(a)与图9(c)插图),人们可以看到,固氮酶M簇的~190波数谱峰应该就是其M簇笼形结构的呼吸振动模态(breathing mode)^[29]。

在图9(d)中,红线代表假设中心元素为C的密度泛函理论的计算能谱。与实验测得的M簇能谱(黑色空心圆圈)相比,可以看出,两者之间有

较好的对应关系。由于密度泛函理论是从头开始的量子计算,其理论能谱与测量能谱不会正好吻合。如果假设中心元素为O,其理论拟合(见图9(d)中的蓝线)与测量能谱(黑色空心圆圈)相差较远。这是第一个关于固氮酶M簇振动的振动谱。虽然核振能谱信号较弱,但人们依然可以测得高质量的差值能谱,并得出较为细致的推论,说明核振能谱在生物化学研究中大有作为。

6.5 氢化酶的能谱分析

氢化酶(Hydrogenase)催化质子还原放出氢气的反应以及它的逆反应(即将氢气氧化为质子的过程),多存在于厌氧微生物体内。氢化酶大致分为含有镍铁活性中心和若干铁硫蛋白的镍铁氢化酶,含有双铁活性中心和若干铁硫蛋白的唯铁氢化酶,以及不含铁硫蛋白的单铁氢化酶。自从由微生物体内成功地提取到唯铁氢化酶以及镍铁氢化酶的晶体结构被解出之后,合成化学家们一直希望通过研究和模拟氢化酶的结构来人工实现氢化酶的功能^[32, 33],从而找到一种清洁、高效、无污染的可再生新能源。

镍铁氢化酶和唯铁氢化酶通常含有多个铁硫蛋白和一个催化活性中心。例如,宫崎脱硫小球藻F(DvMF)中的镍铁氢化酶含有两个 Fe_4S_4 簇,一个 Fe_3S_4 簇(两者共含11个铁原子)和一个镍铁中心(含一个铁原子)。由于这样的原因,氢化酶的核振能谱(图10(a)中的红线)总体上与铁硫蛋白的核振能谱相近,有时甚至基本一致。然而,与图9(b)中的氧化态的D14C相比,镍铁氢化酶的铁硫振动能谱在其细节处还是有差别,原因在于两者在几何结构的细节上(如:在Fe—S—C—C二面角上)有着明显差别。如果是与图10(a)中的四铁高能铁硫蛋白(HiPiP, 黑线)对比,由于两者结构基本一致,能谱也基本一致。这些微小的差别使得人们可以利用核振能谱推测样品中铁硫簇结构在诸如Fe—S—C—C二面角这样的细节上的差别^[13]。图10(b)则展示了处于不同氧化还原态下的镍铁氢化酶的能谱,其主要区别也是在铁硫能谱区(因为这

一氢化酶有 11 个铁在铁硫簇上), 特别是在终端 Fe—S 的伸缩振动谱区。

另一方面, 虽然镍铁中心的铁仅为全部铁含量的 1/12, 能位较高的 Fe—CO 和 Fe—CN 的核振散射信号也相对较弱, 但它们对活性中心几何结构的表征和化学机理的研究都十分重要^[13], 类似于红外光谱中的 CO 谱线^[34]。由于 Fe—CO 和 Fe—CN 的核振能谱谱线位于铁硫蛋白的能谱谱线范围之外, 测量 Fe—CO 和 Fe—CN 核振能谱在理论上是可行的。但由大量的铁硫蛋白组分带来强大的尾部背景信号, 使得 Fe—CO 和 Fe—CN 这些本来就微弱的有用信号难以显现。

在大量研究了各种铁硫蛋白^[4, 24]和几种含一氧化碳和一氧化氮的模型分子之后^[11, 35], 著名同步辐射能谱学专家斯蒂夫·克莱默(S. P. Cramer)教授领导的研究团队率先发表了他们对 DvMF 镍铁氢化酶中 Fe—CO 和 Fe—CN 核振能谱的测量结果^[13], 如图 10(b)所示。在 Fe—CO 能区, 还原态样品(图 10(b)中的蓝线)比氧化态样品(图 10(b)中的红线)有着更高的 Fe—CO 频率, 这是一氧化碳(CO)电子的负反馈效应。由于太靠近铁硫谱线, Fe—CN 的谱线强度更显微弱, 目前还是难以确切辨认。若想得到更好的核振能谱, 需要对光束线强度、探测器的噪音水平和样品有选择的标记等方面的工作做进一步地改进, 这方面的工作还在进行之中。

除了这里的 Fe—CO 和 Fe—CN 谱峰以外, 核振能谱还可以用于测量其他分子的 Fe—CO, Fe—NO 甚至 Fe—H/D 等振动模态^[11, 35]。

6.6 血红素的能谱分析

血红素(Heme)是一种铁卟啉化合物, 它是血红蛋白、肌红蛋白等重要蛋白的组成单元, 也是动物性食品中铁元素的储存单元。含血红素的蛋白是铁硫类金属蛋白之外的另外一大类非常重要的金属蛋白, 是具有储存氧和运输氧功能的氧载体。而相对比较简单的肌红蛋白(Myoglobin, Mb)和一氧化碳肌红蛋白(MbCO, 图 11(a)代表了这一类重要金属蛋白分子的典型。众多的光谱学

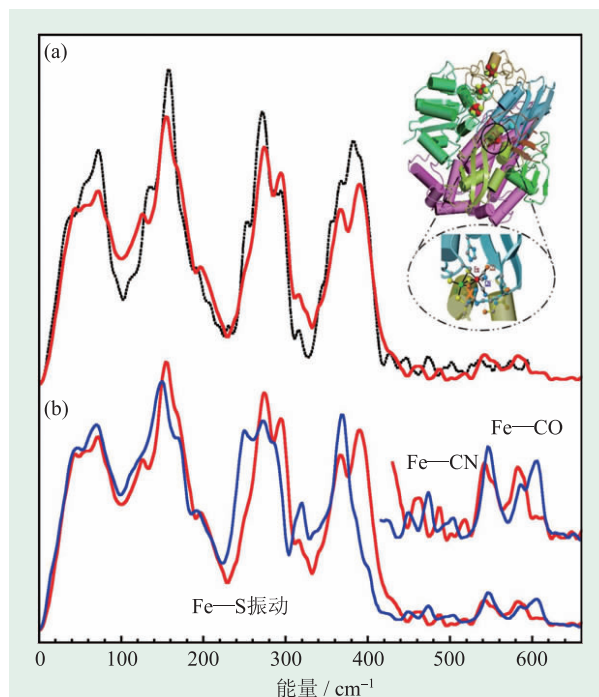


图 10 (a)还原态高能铁硫蛋白(HiPiP, 黑线)和氧化态 DvMF 镍铁氢化酶(红线)的核振能谱, 两者在铁硫振动谱区(100—420 cm^{-1})上的结构非常接近; (b)氧化态(红线)和还原态(蓝线)的 DvMF 镍铁氢化酶的核振能谱对比

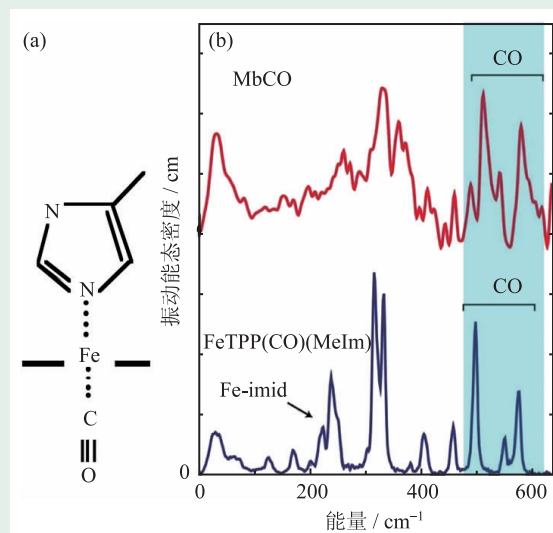


图 11 (a)一氧化碳肌红蛋白分子的结构示意图; (b)一氧化碳肌红蛋白(MbCO)(红线)与甲基咪唑四苯基卟啉亚硝基铁络合物[Fe(TPP)(MeIm)(CO)](蓝线)的核振能谱对比。图中 Fe-imid 为铁与咪唑环的键合(此图经美国《无机生物化学》期刊出版社同意转载)^[17]

或能谱学研究都是首先从肌红蛋白入手^[36, 37], 然后再拓展到其他更复杂的分子上的, 核振能谱的研究也不例外^[17, 38]。

图 11(b)引自文献[17]。对比甲基咪唑四苯基卟啉亚硝基铁络合物($[\text{Fe}(\text{TPP})(\text{MeIm})(\text{CO})]$)的核振能谱(图 11(b)中的蓝线),可以看出,一氧化碳碳肌红蛋白(图 11(b)中的红线)在 200—400 波数的谱峰对应于与铁卟啉有关的振动,506 波数的谱峰对应于 Fe—CO 的伸缩振动,而 561 和 587 的两个谱峰则与 Fe—C—O 弯曲振动有关。与镍铁氢化酶^[13]的核振能谱分区类似,Fe—CO 的伸缩和弯曲振动谱峰的能量位置也明显高于其他谱峰。由于一氧化碳碳肌红蛋白分子是每一个铁原子对应于一个 Fe—CO 键,而 DvMF 镍铁氢化酶分子是每 12 个铁原子中只用一个铁原子有 Fe—CO 键,因此,图 11(b)中的 Fe—CO 信号比图 10(b)中镍铁氢化酶之 Fe—CO 信号要突出得多。

7 核共振振动能谱学的优越性

在分子振动的测量中,红外光谱具有直接测量、灵敏度高、重复性好等特点,而拉曼光谱也有若干突出的优点。从选择定则上看,对于具有几何对称性的分子,采用红外光谱可测量非对称的振动模式,而采用拉曼光谱可测量对称的振动

模式,两者互为补充,共同形成一种比较全面的振动测量方法。既然如此,我们为什么还要颇费周折地选用核振能谱这一相对复杂并且需要同步辐射作为光源的现代能谱技术呢?这是因为核振能谱具有如下几个几乎无法替代的优点^[4, 39]。

第一,从理论上讲,虽然是测量振动,但由于核振能谱具备 X 射线能谱对元素甄别性,因而特别适合于测量复杂分子中的微量金属中心(如本文中谈到的铁元素)。

第二,它还具有同位素甄别性,如针对⁵⁷铁。在某些情况下,人们可以选择仅仅标记和测量有兴趣的铁原子,而不是标记全部铁原子,从而进一步增强信号的选择性。比如,我们可以将氢化酶活性中心的铁元素标记为⁵⁷铁,而蛋白中的其他铁硫簇不标记。这样,对应的核振能谱将会有更明显的 Fe—CO 和 Fe—CN 谱峰结构(与一氧化碳碳肌红蛋白分子的情形类似),而不是将这些微弱的谱峰埋在含许多个铁的铁硫蛋白之背景信号中。尽管人们还未能在镍铁氢化酶上实现这样的标记,但在(含双铁活性中心的)巴氏梭菌(CpI)唯铁氢化酶方面已经有了一些进展,实现可以仅仅标记有 H 簇的 6 个铁原子,而不是全部 19 个铁原子^[40]。

第三,与红外光谱和拉曼光谱的选择定则相比,其中⁵⁷铁有位移的振动模式全部具有核振信号。比如, $[\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4]^{2-}$ 离子^[18]一共有 18 个振动模式,其中 16 个振动模式有核振散射(见图 12 的右下插图),而该离子的红外光谱和拉曼光谱各仅有少数几个振动模式。而且,红外光谱峰(测量非对称振动)和拉曼光谱峰(测量对称振动)出现的位置往往是交替的,不重合,但它们多数都有核振散射信号,如图 12(主图)所示。对比上篇中的 $[\text{FeCl}_4]^-$ 离子,由于 $[\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4]^{2-}$ 离子中的铁不在对称中心,这里的核振能谱与红外能谱并不一致。它既有非对称的核振谱峰,也有对称的核振谱峰。

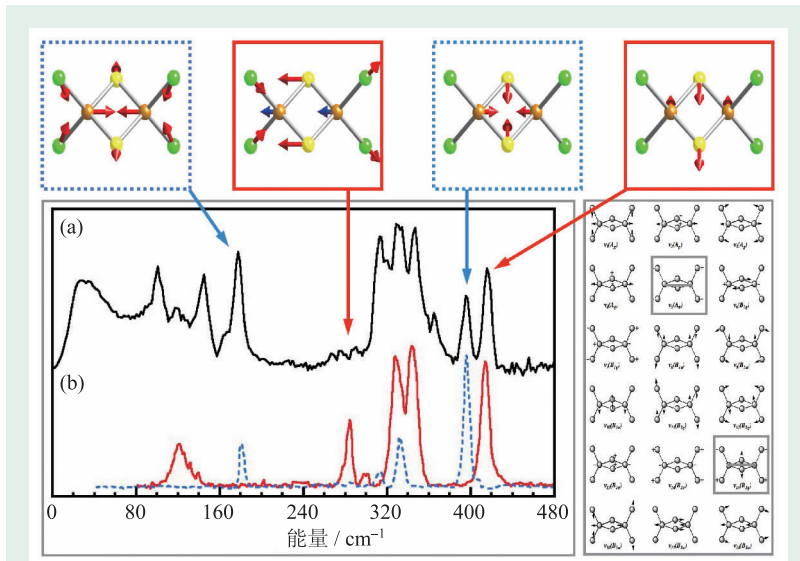


图 12 $[\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4]^{2-}$ 离子^[18]的核振能谱图((a)中的黑实线)与红外光谱图((b)中的红实线)、拉曼光谱图((b)中的浅蓝色虚线)的对比(右侧插图为 $[\text{Fe}_2\text{S}_2\text{Cl}_4]^{2-}$ 离子的 18 个振动模式,其中 16 个模式具有核振散射强度;上方插图显示与箭头所指之能谱峰对应的振动模式(其中蓝虚线框内为拉曼振动模式,红实线框内为红外振动模式))

第四, 与红外光谱和拉曼光谱的拟合分析相比, 核振能谱除了可以拟合能谱的跃迁位置之外, 还可以精确地拟合能谱强度, 从而大大提高了经拟合得到的力常数的可信度。

第五, 由于可以在时间上有效地分离电子散射信号和核散射信号(参见《上篇》), 而核共振与非共振散射强度之比高达几个数量级, 配位原子也不可能在相同能量区间出现核散射, 核振能谱的理论背景噪音几乎为零。

第六, 由于同样的原因, 核振能谱的测量起点真正为零波数, 因而可以测量许多诸如分子与分子之间(或分子团与分子团之间)的整体振动等弱相互作用。例如, 本文中引用的全部核振能谱都是从零波数开始的。然而因为种种限制, 拉曼和远红外光谱的实际测量起点通常在 ~ 100 波数左右。

此外, 在实验方面, 由于 14.4 keV 的X射线在水中的穿透厚度达 10 mm , 核振能谱对水溶剂完全透明, 特别适合于研究水基生物分子样品。而到目前为止, 还未见过有关运用 600 波数以下的远红外光谱对生物样品或其他水基样品进行测量的报道。拉曼光谱虽然广泛用于测量生物分子, 但某些样品会受到光学或X射线荧光的困扰。相比之下, 核振能谱不受荧光的干扰。最后, 与扩展X射线吸收精细结构能谱相比, 核振能谱测得的 $\text{Fe}-X$ 可以明确分辨出配位原子 X 的类型, 如 O , N 或 C , 而扩展X射线吸收精细结构能谱可以更好地推出配位原子的数目和它们与铁之间的键长, 两者互为补充。

8 未来的展望和国内发展建议

8.1 未来的展望

由于以上这些突出的优越性, 核振能谱或将成为研究与铁有关的生物化学问题的一种极具吸引力的新型能谱学手段。随着同步辐射环、波荡器、光束线、探测器等设施 and 元件性能的不提高, 核振散射信号水平在可预见的将来可能有 $1-2$ 个数量级的提高, 使得在目前条件下对氢化

酶、固氮酶等复杂大分子的某些细节的研究, 或对极低浓度的活性生物分子, 特别是对分子中间态的测量变为可能。另一方面, 具有更高(如 $0.1-0.2\text{ meV}$)能量分辨能力的核振散射光束线也正在研究和规划之中。最后, 具有 $\sim 1\text{ meV}$ 和适用于其他核振散射同位素研究的光束线也将逐步出现, 使得核振散射的研究不止局限于 ^{57}Fe , 例如对 ^{119}Sn 和 ^{151}Eu 的研究工作已经开展^[41, 42]。因此, 核振散射谱学方面的研究工作可以说才刚刚起步, 今后的发展潜力很大。

生物分子的能谱测量和研究是一个系统工程, 光源、样品和探测器缺一不可。具有超级低噪音水准的探测器将在一定程度上弥补光源强度的不足。反之, 如果在光源强度提高的同时带来探测器噪音水准的升高, 则其意义将大打折扣。随着光源强度的不断提高, 探测器的饱和问题也将成为焦点之一。为了避免饱和, 采用单元面积较小的多单元探测器取代单个大面积的探测器是今后测量核振散射(或其他核散射)的重要选择之一。目前, 多数核振散射光束线上已经采用了多单元探测器。

在给定光源和探测器水平的条件下, 样品离探测器的距离越近, 探测立体角越大, 核振能谱的信号水平也就越高。然而, 样品离冷阱窗口太近会导致样品温度急剧上升^[12], 因而能谱信号水平和样品温度之间也需要进行平衡考虑。

样品的浓度和纯度当然也是核心问题之一。目前, 国际上常见的几条专用核振散射光束线的光通量大约为 $1-2 \times 10^9$ 光子/秒, 测量铁硫振动的最低可测量浓度大约为 2 mmol 浓度的 ^{57}Fe 含量^[39]。如果要测量氢化酶中的 $\text{Fe}-\text{CO}$ 等微弱振动信号, 其浓度需要大约为此水准的 10 倍以上, 也就是大约为 20 mmol 浓度的 ^{57}Fe 含量^[39]。但从蛋白分子的生物活性和反应功能上讲, 往往要求样品的浓度越低越好, 与能谱学的要求恰恰相反。过度浓缩和纯化常常会导致样品的意外氧化还原、分解或其他副反应产生, 对于过渡态的样品更是如此。这样, 样品应该在生物活性、样品稳定性和高浓度、高纯度之间取得合理的平衡。

对某些铁原子进行有选择的同位素标记,也是增强信噪比的有效途径之一。比如在CpI唯铁氢化酶中,一共有19个铁原子。但由于实现了仅仅对H簇的6个铁原子进行 ^{57}Fe 标记,使得含Fe—CO信号的 ^{57}Fe 原子占全部 ^{57}Fe 原子的比例由2/19提高到2/6^[40]。

8.2 国内发展建议

国内同步辐射的研究工作开展较晚,但进展很快。具有高标准的第三代光源——上海同步辐射光源(SSRF)已于2009年9月向用户开放,截止到2012年底已经有267家单位在上海光源开展了同步辐射实验,实验人数达13252人次,并取得了一大批重要的成果^[43-45],它是我国迄今为止最大的大科学装置和大科学平台。每天能容纳数百名来自全国或全世界各领域的科学家和工程师在此进行研究和开发工作。包括16条各式光束线的二期工程已在筹备之中,许多应用项目也将迅速展开。但由于受到电子储存环周长和能量的限制,在目前条件下直接开展与核散射有关的实验还不可能。国家正在规划建设周长在1 km以上的高能同步辐射装置,解决这方面的问题。相关的先期探索项目已列为国家“十二五”期间重点项目之一。

目前,国际上若干高能同步辐射光源,如APS, ESRF, SPring-8都在未来的升级计划中将降低发射度作为发展目标。将来中国的高能同步辐射光源,也同样瞄准极低发射度这一科学前沿。在提高光源亮度的同时,它使得光束具有更高的准直度,能够提高高分辨设备所接受光的强度,从而提高核散射束线的整体性能,帮助生物化学工作者研究接近真实的低浓度样品。在大力推进谱学实验的同时,未来新光源可能为穆斯堡尔谱微区扫描成像领域带来全新的突破^[46]。因此,新的装置将达到或超过国际上现有高能同步辐射装置的综合性能,可为核共振振动散射和其他核散射实验等提供重要的实验手段。

与此同时,诸如样品组织、理论计算和关键配套元器件的开发等工作可以先期展开。可以首

先通过国际合作,到国外已有的核散射光束线上直接参与核振能谱的实验工作,以培养人员和积累经验。

同其他同步辐射科学一样,应用于生物分子研究的核振能谱学涉及多个学科和多项技术领域。例如,用实验物理学方法决定光束线、探测器和能谱方法的选择;用生物学方法研究生物蛋白的培养和纯化;用化学方法研究实验样品的制备和萃取;用核电子学方法指导X射线信号的探测和控制等等。另外,还有超高真空、深冷温度等一系列配套的工程和技术问题。这些问题可以通过以同步辐射为中心的多学科、多单位、多层次和经常性的横向合作来实现,无须大而全。但一个研究团队中至少应有一名能够全面了解总体技术路线图的科研人员,成为在新形势下这一多学科联合工作可以顺利进行的关键之一。希望本文能为提倡、推动这方面的联合研究尽一点微薄

9 结束语

核共振振动能谱学是一种以同步辐射为实验基础的新型的振动能谱学方法。对比红外、拉曼等传统振动能谱学方法,它在理论上和实验上有着一系列突出的优越性,其中包括对元素和同位素甄别性,可定量拟合的振动能态密度函数,零背景和从零波数开始的能谱图等等,从而使之成为在复杂分子中研究铁振动和铁化学的重要研究手段之一。

本文上篇简述了核振能谱的基本理论、实验方法和数据分析方法。本篇着重介绍了该能谱方法在铁基化学和铁基生物化学中的应用,先后阐述了含单铁的玉红氧还蛋白、一氧化碳肌红蛋白以及含多铁簇的铁硫蛋白、固氮酶和氢化酶等重要和具有代表性的金属蛋白分子的核振能谱(严格上称振动态密度函数),并给出了相应的参考文献。

随着第三代高能同步辐射环的建设和更新换代,插入件、光束线、高分辨单色器、探测器的不断更新,以及样品在浓度、稳定性、化学状态

控制技术等方面的不断改进,核振能谱正在成为研究生物化学问题的一种极为有效和极具吸引力的现代能谱学手段。本文也为将来在国内建设高能同步辐射光源和具有高能分辨能力的核振散射光束线提供借鉴;提出了核振散射试验对高分辨单色器、APD探测器等关键设备,以及特殊冷阱等试验站配套设施的要求;并建议在国内条件尚未满足之前,可以通过国际合作,先期到国外直接参与核振散射方面的科学研究。

参考文献

- [22] Guo Y, Brecht E, Aznavour K *et al.* *Hyperfine Inter.*, 2013, 222: 77
- [23] Lehnert N, Sage J T, Silvernail N *et al.* *Inorg. Chem.*, 2010, 49: 7197
- [24] Mitra D, Pelmenschikov V, Guo Y *et al.* *Biochemistry*, 2011, 50: 5220
- [25] Xiao Y M, Koutmos M, Case D A *et al.* *Dalton Trans.*, 2006, (18): 2192
- [26] Xiao Y, Tan M L, Ichiye T *et al.* *Biochemistry*, 2008, 47: 6612
- [27] Tinberg C E, Tonzetich Z J, Wang H *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 18168
- [28] Einsle O, Tezcan F A, Andrade S L A *et al.* *Science*, 2002, 297: 1696
- [29] Xiao Y, Fisher K, Smith M C *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 7608
- [30] Spatzal T, Aksoyoglu M, Zhang L *et al.* *Science*, 2011, 334: 940
- [31] Lancaster K M, Roemelt M, Ethenhuber P *et al.* *Science*, 2011, 334: 974
- [32] Tard C, Pickett C. *Chem. Rev.*, 2009, 109: 2245
- [33] Cook T, Dogutan D, Reece S *et al.* *Chem. Rev.*, 2010, 110: 6474
- [34] Ogata H, Lubitz W, Higuchi Y. *Dalton Trans.*, 2009, (37): 7577
- [35] Pelmenschikov V, Guo Y, Wang H *et al.* *Faraday Discussions*, 2011, 148: 409
- [36] Wang H X, Peng G, Miller L M *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 4921
- [37] Durst D, Miller L M, Chance M R. *Biophysical J.*, 1994, 66: A269
- [38] Leu B M, Ching T H, Zhao J *et al.* *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113: 2193
- [39] Wang H X, Alp E, Yoda Y *et al.* *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1122: 125
- [40] Kuchenreuther J M, Guo Y, Wang H *et al.* *Biochemistry*, 2013, 52: 818
- [41] Nowik I, Felner I, Ren Z *et al.* *New J. Phys.*, 2011, 13: 023033
- [42] Kobayashi H, Yoda Y, Shirakawa M *et al.* *J. Phys. Soc. Japan*, 2006, 75: 034602
- [43] 王璐, 张元庆, 赵云等. *核技术*, 2013, 36: 030101
- [44] 张博, 郎春燕, 马玲玲等. *分析化学*, 2013, 41: 580
- [45] 上海光源装置年报, 2012
- [46] Yan L, Zhao J, Toellner T S *et al.* *J. Synchrotron Rad.*, 2012, 19: 814

致谢 本文多数能谱数据引自著名生物能谱学专家、加州大学戴维斯分校教授斯蒂夫·克莱默先生领导的研究工作。我们在此向克莱默教授,同时向肖煜明、郭以嵩博士等全部原始工作的共同参加者和合作者,以及资助这些工作的美国国家卫生研究院基金会、美国科学基金会和美国能源部科学基金会表示衷心感谢。此外,作者衷心感谢中国科学院高能物理研究所胡天斗教授对本文的推荐和宝贵的修改意见。

高悬大镜 则照四邻



本期刊登了戴念祖先生《物理与诗歌同行》一文,记述了古代中国诗词如何精彩地描述物理现象。文中引了梁元帝萧绎,诗人词客庾信、韦应物、寇准、沈约、徐陵、岑参等的作品,还配了历代名画,我一面欣赏诗词和画,一面感慨戴先生深厚的文学历史功底。其中淮南王刘安的“高悬大镜,坐见四邻”应当是描写反射镜原理,因找不到合适的画,戴先生提议由我作画,并附了示意图。我画“仿丰(子恺)画”已经多年,只仿不创。戴先生和编辑部的盛情难却,想了好几天才命笔,把外公丰子恺的两幅画《梁上燕、轻罗扇》和《无条件劳动》各取一部分“拼接”起来,又添了挂在树上的镜子和外景,似乎院墙里的女子通过镜子观看院外孩子们嬉戏,也大致符合反射镜的原理,两个场景尚属接榫,供大家赏析。

(大恒新纪元科技股份有限公司 宋菲君 供稿)