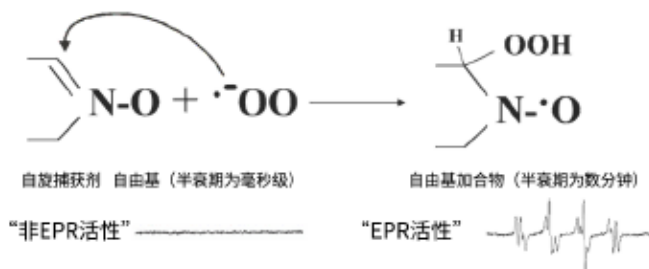


借助硝酮类自旋捕获剂 DMPO 和 BMPO，进行超氧自由基的 EPR 检测

一般而言，化学、生物和医学领域中用于检测和表征自由基的最直接方法是 EPR 波谱。但是，由于自由基的高反应活性和短半衰期，许多自由基（如超氧自由基、羟基自由基、烷基自由基等）几乎不可能在室温下的溶液中利用 EPR 直接检测。自旋捕获是 20 世纪 60 年代末发展起来的一项技术，是用硝酮或亚硝基类化合物与目标自由基反应，以形成稳定的、可鉴别的自由基，再用 EPR 波谱进行检测。自旋捕获技术涉及到将高反应活性的自由基加成到抗磁性“自旋捕获剂”的双键之上，以形成一种更加稳定的、能用 EPR 进行检测的自由基（即“自由基加合物”）：



最常用的自旋捕获剂是 5,5 - 二甲基 - 1 - 吡咯啉 - N - 氧化物 (DMPO)，它在 Medline 数据库中的被引次数已达 1,000

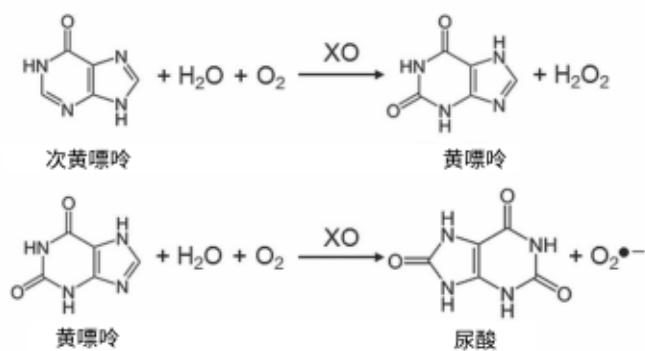
次以上。DMPO 相比其他硝酮类自旋捕获剂具有明显的优势，氧化还原活性很低。DMPO 与 O-、C-、N-、S- 中心自由基反应，形成 EPR 谱图易于辨识的自由基加合物。这使得研究人员能够鉴定在特定反应中形成的自由基的类型。其他自旋捕获剂（如 α -苯基-N-叔丁基硝酮 (PBN)）的情形则有所不同：无论捕获了什么类型的自由基，所形成的自由基加合物的 EPR 谱图几乎完全相同。DMPO 自由基加合物的鉴定，可通过查阅在线检索出的相关科学文献来实现。

BMPO (5-叔丁氧羰基-5-甲基-1-吡咯啉-N-氧化物) 是 DMPO 的类似物，由威斯康星医学院开发，旨在突破 DMPO 遇到的一些限制。它最适于在体内或体外特异性捕获短寿命的超氧自由基、羟基自由基和硫自由基。和 DMPO 一样，BMPO 也与自由基反应，形成 EPR 谱图易于辨识的自由基加合物。但 BMPO 相比 DMPO 有显著的改进，它能与超氧自由基反应形成更加稳定的自由基加合物 (DMPO/ \bullet OOH $t_{1/2} = 45$ 秒; BMPO/ \bullet OOH $t_{1/2} = 23$ 分钟)。基于 BMPO 的加合物其 EPR 谱图也具有更高的信噪比，使其适合作为细胞悬浮液中的自由基检测的捕获剂。此外，BMPO 是以高度纯化的晶体形式出售，可以长时间储存。

通过 DMPO 和 BMPO 进行氧中心自由基的自旋捕获 (利用 Xenon 软件包进行分析)

超氧自由基

因为与体内的许多反应有关，氧中心自由基尤其引人关注。通过 DMPO 和 BMPO 进行超氧自由基 ($O_2^{\bullet-}$) 的 EPR 自旋捕获，是一种广泛用于研究生物系统中的 $O_2^{\bullet-}$ 产生的方法。酶 / 底物系统黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶是产生超氧自由基的常用方法之一，也是比较来自其他化学或生物反应体系的超氧自由基通量的一项标准。黄嘌呤氧化酶会将次黄嘌呤氧化成尿酸 (图式 1)；来自该氧化反应的电子传递至氧分子，同时生成 H_2O_2 和 $O_2^{\bullet-}$ ：



图式 1

遗憾的是，DMPO/ \bullet OOH 的 EPR 测定也存在种种问题，诸如：过渡金属的干扰，DMPO/ \bullet OOH 的寿命短， $O_2^{\bullet-}$ 会与 DMPO/ \bullet OOH 和 DMPO/ \bullet OH 反应，以及 DMPO/ \bullet OOH 有可能自发转化形成 DMPO/ \bullet OH。下面的实验用于验证超氧自由基和羟基自由基与 DMPO 或 BMPO 之间的自由基加合物的形成。

实验步骤

1. 制备 100 mM 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)，含 25 μ M 的二乙撑三胺五乙酸 (DTPA) (Sigma) 作为过渡金属螯合剂。
2. 用 100 mM 的磷酸盐缓冲液配制 1 mM 的次黄嘌呤 (Sigma) 溶液 (pH 7.4)。
3. 用 100 mM 的磷酸盐缓冲液配制浓度为 1 单位 / 毫升的黄嘌呤氧化酶 (Sigma) 溶液。
4. 配制浓度为 1 M 的 DMPO (Dojindo) 溶液。若是 BMPO (Dojindo)，则将 10 mg BMPO 溶解到 200 μ L 磷酸盐缓冲液中，最终浓度应为 250 mM。
5. 制备总体积为 200 μ L 的反应混合液。向 Eppendorf 离心管中加入 70 μ L 缓冲液。然后加入 20 μ L 1 M 的 DMPO 溶液

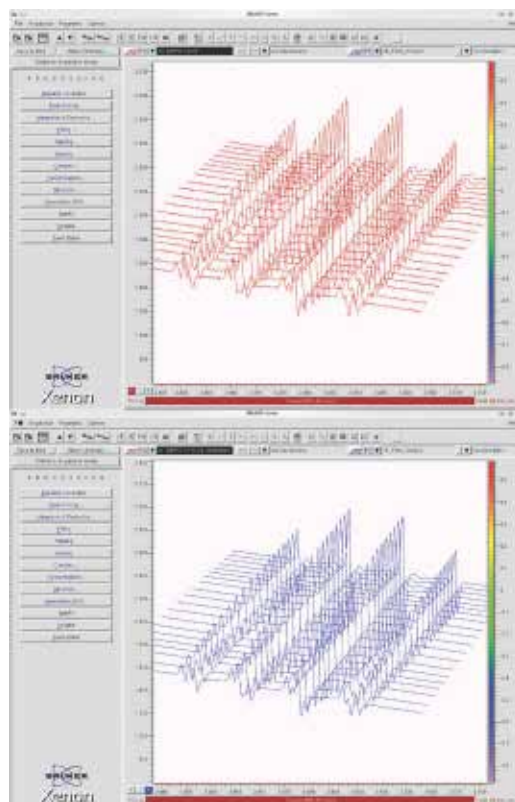
(或 20 μ L 250 mM 的 BMPO 溶液)，以及 100 μ L 备好的 1 mM 的次黄嘌呤溶液。最后加入 10 μ L 黄嘌呤氧化酶溶液引发反应，振荡离心管，然后将溶液转移至扁平池中。将扁平池插入谐振腔，调谐波谱仪，继而采集谱图。反应液组成成分的最终浓度为：100 mM DMPO (或 25 mM BMPO)、0.5 mM 次黄嘌呤和 0.05 单位 / mL 黄嘌呤氧化酶。

6. 务必开展排除了一种或多种试剂的对照试验。对照试验能揭示是否存在顺磁杂质，并证明必须具备所有成分才能产生 EPR 信号。

自旋捕获延时实验

利用 DMPO 或 BMPO 作为自旋捕获剂，在布鲁克 EMXmicro 6/1 EPR 系统上进行自旋捕获实验。通过在布鲁克的 Xenon 软件中设置的二维实验 (场扫描 vs. 时间)，监测自由基加合物的形成和它们随时间的演化 (图 1)。采集完实验数据后，利用 Xenon 的 SpinFit 模块模拟每张包含多种物质的信号的谱图，以鉴别出自由基加合物 (图 2)。

图 1 和图 2



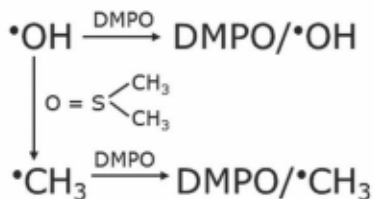
通过二维场扫描 vs. 时间实验设置，获得的两组 DMPO 自由基加合物在特定时间点的实验数据 (红色) 和 SpinFit 模拟谱图 (蓝色)。

模拟参数可以键入，也可从 Xenon 软件中包含的数据库导入。一个拟合结果给出每种加合物的积分强度。然后，通过 Xenon 的 SpinCount 模块，利用该值计算每种自由基加合物的实际摩尔浓度（图 3）。



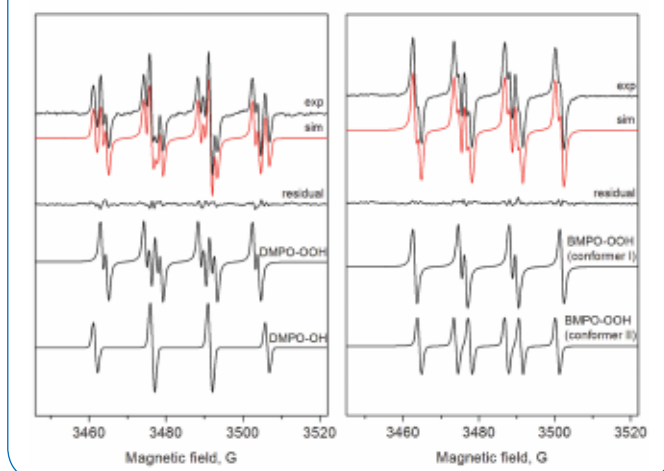
图 3 通过从 Xenon 的自由基加合物数据库导入或手动输入的方式，在 SpinFit 对话框中定义 DMPO 自由基加合物。SpinCount 模块会给出实验进行过程中拟合物种对应的面积的报告。

若是 DMPO，则通过黄嘌呤氧化酶系统形成两种自旋加合物 (DMPO/•OOH 和 DMPO/•OH) (图 4)。若是 BMPO，则形成 BMPO/•OOH 的两种立体异构体，而不产生 BMPO/•OH (图 5)。利用 SpinFit 可以得到二维实验中采集的每个数据切片的模拟谱图 (图 4 和图 5)。对于二维实验中的每个时间点，可以看到自旋捕获的 EPR 实验谱图、复合模拟谱图、每种自由基加合物的模拟谱图，以及残差数据。拟合得到的两种 DMPO 加合物的超精细参数 (图 4) 分别如下所示：DMPO/•OOH 加合物： $a_N = 14.2 \text{ G}$ ， $a_H^\beta = 11.4 \text{ G}$ ，以及 $a_H^{\gamma1} = 1.2 \text{ G}$ ；DMPO/•OH 加合物： $a_N = a_H^\beta = 14.9 \text{ G}$ 。两种 BMPO/•OOH 加合物的拟合参数分别如下所示：构象异构体 I： $a_N = 13.4 \text{ G}$ ， $a_H^\beta = 12.1 \text{ G}$ ；构象异构体 II： $a_N = 13.4 \text{ G}$ ， $a_H^\beta = 9.4 \text{ G}$ (图 5)。SpinCount 模块利用二维自旋拟合谱图的积分强度，计算 DMPO 和 BMPO 自由基加合物的浓度 (图 6 和图 7)。



图式 2

图 4 和图 5

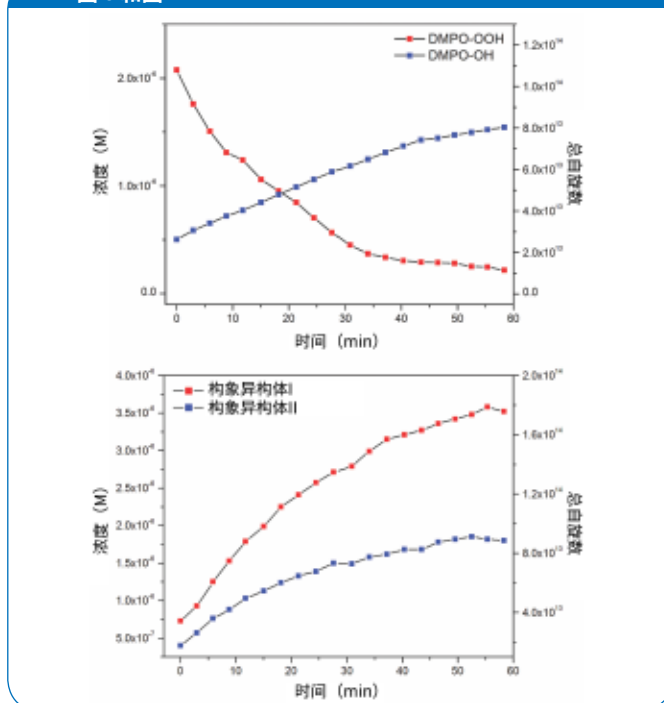


在二维场扫描 vs. 时间实验中，获得的两组物种在特定时间的谱图的拟合结果。除了所用的自旋捕获剂，两幅图中的其他条件都完全相同。

实验示例：通过黄嘌呤 / 黄嘌呤氧化酶验证超氧自由基和羟基自由基的产生

为了明确地证实自旋捕获实验中游离羟基自由基的存在，通常需要利用羟基自由基清除剂进行基于动力学的竞争实验。例如，在这种竞争试验中可以使用二甲亚砷、乙醇和甲酸盐。

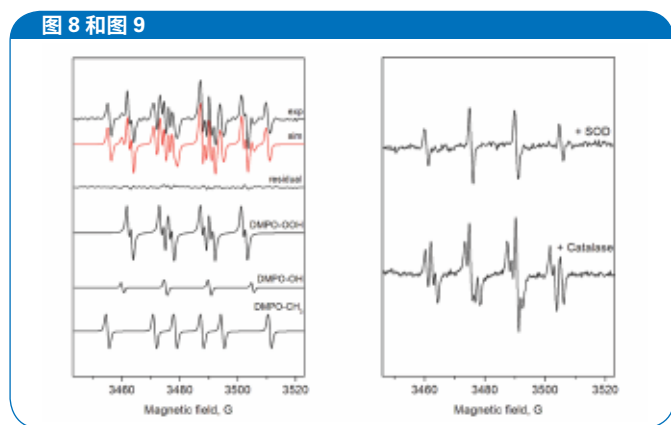
图 6 和图 7



将 SpinFit 的结果输入 SpinCount 中后，即可获得浓度随实验时间的变化

这些试剂与羟基自由基反应，会形成之后能被 DMPO 捕获的碳-中心自由基（反应体系 2）。下面的实验用于研究黄嘌呤氧化酶系统中的羟基自由基来源。除了反应是在 10% 的 DMSO（即，在添加其他试剂之前，先取 20 μ L DMSO 加入反应混合液中）中进行之外，完全遵照前文所述的实验步骤 1-6 开展实验。所得的谱图（图 8）显示出可忽略不计的少许 DMPO/ \bullet OH 信号，而主要的谱图成分则显示为 DMPO/ \bullet CH₃ 自由基加合物的特征（ $a_N = 16.4$ G, $a_H^\beta = 23.3$ G）。SpinFit 模拟验证了这一点。该结果表明，在无 DMSO 存在的情况下观察到的 DMPO/ \bullet OH 信号，大多源自于 \bullet OH 自由基自身被捕获，而非 DMPO/ \bullet OOH 的自发转化。

在反应开始前加入超氧自由基清除酶：超氧化物歧化酶（SOD）（图 9），用以验证 \bullet OH 自由基大多源自于自身被捕获。如果我们所检测到的 DMPO/ \bullet OH 实际上源自于 DMPO/ \bullet OOH 的转化，则 DMPO/ \bullet OH 的谱图预计将完全消失。图 9 中上面的谱图是在加入黄嘌呤氧化酶后立即采集的。和预期一样，SOD 完全清除了超氧自由基。但 DMPO/ \bullet OH 的谱图仍然存在。这证明 \bullet OH 自由基的产生不是由超氧自由基介导的，而是 H₂O₂ 在黄嘌呤氧化酶作用下发生的进一步还原反应所致。通过加入过氧化氢酶（图 9 中下面的谱图）也验证了这一点，该图显示，DMPO/ \bullet OOH 和 DMPO/ \bullet OH 的 EPR 强度相比图 4 中上面的谱图都降低了。



加有 10% 的 DMSO 时，黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统中形成的 DMPO 自由基加合物。

加有 1000 单位/mL 的 SOD（上面的谱图）和 1000 单位/mL 的过氧化氢酶（下面的谱图）时，黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统中形成的 DMPO 自由基加合物。

结论

借助 DMPO 和 BMPO 进行的 EPR 自旋捕获实验，可以有效用于在酶催化反应中产生的超氧自由基的机理研究和动力学分析。恰当控制的自旋捕获实验证明，自由基加合物的形成是由于在所研究的反应体系中产生了自由基。DMPO 和 BMPO 的超氧自由基加合物的 EPR 谱图很容易鉴定和区分。这两种自旋捕获剂还都具备细胞穿透能力，因此都适用于检测组织和细胞中的细胞外和细胞内超氧自由基。借助布鲁克的模拟模块 SpinFit（包含在 Xenon 软件套件中），很容易精准地确定自旋加合物的氮原子和 β -H 原子的超精细耦合常数。DMPO 的主要缺点是：与超氧自由基之间的反应速度缓慢，自由基加合物不稳定（ $t_{1/2} = 45$ 秒），以及容易自发衰变成 DMPO-羟基加合物。相较之下，BMPO 的超氧自由基自旋加合物具有长得多的半衰期（ $t_{1/2} = 23$ 分钟），且不会衰变成羟基加合物。此外，BMPO 可通过结晶实现高度纯化，处理方便，长时间贮存也无需担心发生分解。

参考文献

1. Eaton G.R., Eaton S.S., Barr D.P., Weber R.T. (2010) "Quantitative EPR" Springer-Verlag/Wien.
2. Eaton S.S., Eaton G.R., Berliner L.J. (2005) "Biomedical EPR", vol. 23, pp. 80-82.
3. Zhao H, Joseph J, Zhang H, Karoui H, Kalyanaraman B. (2001) "Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathyl radicals", Free Radic. Biol. Med., vol. 31, pp. 599-606.
4. Rangelova K. and Mason R.P. (2011) "The fidelity of spin trapping with DMPO in biological systems", Magn. Reson. Chem., vol. 49, pp.152-8.
5. Buettner G.R. (1993) "The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO (5,5-Dimethylpyrroline-N-oxide): more about iron", Free Rad. Res. Comms., vol. 19, pp. S79-S87.



布鲁克磁共振微信公众号

● 布鲁克（北京）科技有限公司

网址: www.bruker.com
E-mail: sales.bbco.cn@bruker.com
布鲁克应用技术咨询:
400-898-5858
布鲁克售后技术支持:
400-898-1088

布鲁克（北京）科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号
中关村东升科技园B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路
2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路
618号南丰汇6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886