

综述



生物高分子在溶液中的空间结构与功能关系的研究概况

——讨论会纪要*

一、研究溶液中空间结构的意义

蛋白质在一定的条件下处理时,共价键不变而失去它的生物活力,这种过程叫做变性。1931年吴宪指出蛋白质的变性就是它的主链从卷曲变到伸展,这说明蛋白质的空间结构与功能之间有重要关系。1951年 Pauling 提出了蛋白质肽链 α 螺旋结构的理论,在这种基础上逐步开展了蛋白质在溶液中的空间结构即构象的研究。1953年, Watson 与 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)碱基互补的双螺旋结构,说明另一种重要的生物高分子——核酸与蛋白质一样,其活力与构象有紧密的联系,在此基础上又开展了核酸的构象研究。

生物高分子的构象就是主链的盘曲方式和侧链基团间的空间关系,二者是同一事物的两个方面。由于主链的盘曲,使从一级结构看相距甚远的两个侧链可以紧靠在一起,形成了侧链的相互联系。蛋白质主链的构象主要有三种—— α 螺旋、 β 折叠与无简单几何规则的卷曲;而侧链基团的相互配置,形成了具有各种特性的分子微区,如疏水区、盐键等等。

回顾蛋白质研究的历史,可以说,四十年代进行的是分子大小、形状和电荷等分子“宏观”性质的研究。到五十年代提出了蛋白质分子构象与功能关系的问题,并开展了构象测定技术的研究,兴旺了一时,可是没有取得什么重要成果。但对蛋白质一级结构的测定和X光衍射分析有了突破,这是重要的转折点。六十年代是研究一级结构与功能关系获得丰硕成果的年代,也是晶体结构研究成果不断出现的年代。

到七十年代开始,一级结构测定与晶体结构分析趋于成熟,已经进入动态地研究空间结构与功能关系的时候了。当前,对蛋白质的研究已必须包括从一级到四级结构的全部内容。对于核酸结构功能的研究与蛋白质有类似的发展过程,只是在时间上稍晚一个阶段。目前关于遗传密码与蛋白质生物合成的研究,特别是在噬菌体体系内,已使两类生物高分子的研究汇合在一起,互相补充,相得益彰。

用X光衍射法研究晶体生物高分子,可以得到很丰富的结构信息。但是生物高分子发挥生物功能大都是在溶液或界面上,而且都是动态的变化,这些动态的过程又常常是几个生物高分子在相互作用。X光衍射法只能研究晶态下的生物高分子,而晶态不是一个活动的状态,因此X光衍射法只能描绘过程的初态和终态,而不能描绘动态,至于描绘几个生物高分子间的相互关系,就更感到困难。因此测定生物高分子的构象、追踪构象变化与功能关系的动态研究又被人们所重视。近一、二年来这方面的工作报导的数量增长很快,看来七十年代将是生物高分子结构功能关系研究工作中最活跃的领域之一。

二、溶液构象的研究取决于测定技术的发展

研究溶液中生物高分子的构象与功能关系的首要问题是改进测定构象的技术。经过将近

* 出席人:江寿平,周国城,施建平,徐京华,钱元任,郭志炯,许根俊,曹天钦,鲁子贤。

执笔人:鲁子贤,曹天钦。

二十年的研究,已经有一些测定溶液中构象的技术,但是要清楚地说明构象与功能关系,这些技术还感到不足。因此在当前,溶液构象测定技术本身的研究还占很重要的地位。

在五十年代,旋光色散、氢同位素交换与紫外差吸收等方法是盛行一时的,这些方法经过一些改进,成了实验室的常规技术。近十多年内又增添了荧光光谱、激光雷曼光谱、磁共振等一系列的技术,这些技术在探索溶液中构象变化及其与功能关系的研究中,已初步显示了巨大的潜力。现将这些技术简介如下:

旋光色散与圆二色性

根据 α 螺旋结构的理论研究蛋白质的光学活性,发现它与蛋白质的构象有紧密的联系。自1965年以后,远紫外 Cotton 效应的研究得到了很大进步,仪器性能也进一步提高,旋光色散技术就成了测定蛋白质和核酸构象的常规技术。但在蛋白质分子中残基有旋光,因此用来计算螺旋结构的程度有一些困难。1965年前后研究了另一种表示光学活性的方法——圆二色性与生物高分子构象的关系,发现它在紫外区比旋光能更直接地反映螺旋与 β 结构的含量,因此已与旋光色散并用,甚至逐步地取代了后者的地位。

氢同位素交换

Linderstrom-Lang 于1953年设计的氢同位素交换技术经历了较大的改进,在测定方法上用红外或氘交换取代了早期的密度梯度法。由于形成 α 螺旋、 β 折叠或处于疏水区都引起氢交换速度的降低,因此解释起来有一定困难,但作为一种构象变化的指标,仍然在被人使用。

紫外差吸收

紫外差吸收法是研究紫外生色基团(色氨酸与酪氨酸侧链)所处分子微区特性的技术,它在使用了微扰剂后能测出生色基团所处孔穴状微区的深度,用它测定变化过程动力学比较方便,有个别报导用这一技术研究苯丙氨酸侧链

获得成功。

荧光方法

五十年代初,Weber 利用荧光结合剂与蛋白质共价结合后,测定它的迴转弛豫时间,从而判定蛋白质分子的体积和不对称性,这时候荧光法不能提供分子构象的知识。随着荧光测定技术的发展,出现了几种方法。一是利用荧光探测剂测定分子微区的特性。有一些化合物如萘、吲哚、吡啶等的衍生物从水中转移到极性很低的溶剂中时,荧光强度(即量子转化率)大增而荧光光谱的最高峰移向短波(蓝向移动)。有许多蛋白质与这些探测剂有结合作用。结合后荧光特征的变化与探测剂从水转移到低极性溶剂者相当,因此蛋白质与探测剂的结合区是一疏水微区。就是说,探测剂测出了某些蛋白质中存在疏水微区。在这类工作中最有意思的是一些酶的带荧光竞争性抑制剂及底物用做探测剂的例子,这类探测剂说明许多酶如碳酸酐酶、血清胆碱磷酸酯酶等的活性中心具有疏水微区的特征。

利用荧光的第二种方法是测定蛋白质自身荧光与构象的关系。蛋白质所含残基中色氨酸与酪氨酸的侧链能激发荧光,这种荧光的特征与所处分子微区的性质有关,因此可研究上述两种侧链的微观环境。但因色氨酸、酪氨酸并存时,酪氨酸的荧光大多被熄灭,因此多数是用来研究色氨酸环境。用蛋白质自身荧光为指标,测定核酸酶变性后重新构成天然构象的动力学,说明这一过程有两步:第一步形成卷曲螺旋的内核,速度快;第二步再形成全部构象,过程较慢。

蛋白质分子上接上两种荧光生色基团,一个基团激发,将能量传递到第二个基团,第二个基团受激后发射荧光。利用这种原理可以测定两个基团在分子中的距离。在早期荧光寿命的测定比较困难,近年来已有商品仪器可探索荧光寿命与分子构象的联系。还值得注意的是生物高分子磷光的测定也已经开始。总之,荧光方法灵活性高,因此近年来有关报导数量很多。

激光雷曼光谱

激光雷曼光谱是近年来发展很快的一种测定技术。经典雷曼光谱曾应用于研究生物高分子,但因入射光强度不够,谱线太弱,无法开展工作。激光有许多优点,如高度的单色性、相干性、高的强度、窄的光束等,因此于六十年代中期,将气体激光作为光源引入雷曼光谱研究中,对蛋白质进行测定,在近红外得到了四十几个分辨很好的峰。经过几年的研究,约 1/4 的峰初步得到解释。如以氙离子激光(514.5nm)为光源,测定胰岛素的雷曼光谱,其中 1662, 1680 cm^{-1} 两个峰是酰胺 I, 分别各反映了分子中 α 螺旋与无简单几何规则卷曲的两种结构;而 1239、1270、1288 cm^{-1} 三个峰属于酰胺 III, 分别为无简单几何规则卷曲、 β 折叠和 α 螺旋的反映。已经开始研究雷曼光谱谱线的偏振性质,发现对于激发光谱有些峰是退偏振的,有些峰是“反偏振”的。进一步的解释尚待更多的工作。激光雷曼光谱谱线多,有一些蛋白质残基给出几条谱线,因此有可能提供较多的构象信息,是值得特别重视的、很有发展前途的一种技术。

激光雷曼光谱的测定在技术上还有一些困难,如散射辐射背景和生物高分子的荧光等干扰的消除还要努力。此外如能采用波长更短的(如紫外)激光做光源,可能将雷曼光谱移到可见区,这样,设备将进一步简化。

核磁共振

磁共振的研究最近一二十年来发展较快,是有机化学领域中测定分子结构的有力工具之一,它包括顺磁共振与核磁共振两类。前者研究电子的磁性质,主要用于研究顺磁物质和自由基,研究生物高分子有局限性。后者在生物高分子中应用较多。其基本原理主要是根据自旋磁矩不等于零的原子核,在恒定磁场中产生能级分裂,因而吸收一定波长的电磁辐射而发生量子跃迁,即共振。共振时外加恒定磁场 H 与电磁波辐射频率 ν 间有如下关系:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} H,$$

γ 是迴磁系数,由原子核的固有参量决定。在分子中原子核并不孤立,其周围的原子核和电子对它也产生一外加磁场,因此产生了共振谱线的变化。反之,测定、分析这种谱线的变化,就能推断分子的精细结构。利用核磁共振谱研究有机化合物是相当成功的,但对于生物高分子,由于结构复杂和分子内的偶极作用、自旋-自旋耦合等等效应,使谱线重叠,若仪器不能产生足够高的磁场,把谱线中诸特征峰拉得足够开的话,则难于说明问题。1964 年后,使用超导磁铁先后制出了磁场高达五万多高斯、工作频率 220 兆赫和磁场七万多高斯、工作频率 300 兆赫的波谱仪。目前水平还在继续提高。在这类仪器上,生物高分子的谱线已能很好地分辨,因此工作开展很快,报导很多,主要涉及蛋白质和核酸的构象变化,酶反应过程中活性中心和底物之间的作用过程等。

生物高分子磁矩不等于零的原子核不多,因此对生物高分子的研究主要限于氢原子核。为了进一步研究,设计了一系列的核磁共振探测剂。其中多数都是含 ^{19}F 的化合物。与此相似,有一些工作者设计了带自由基的顺磁共振探测剂,部分克服了顺磁共振仪在生物高分子构象研究上的局限,取得了一些结果。

上面就一些发展比较快的测定生物高分子构象的技术作了简介。现在正在寻找新的方法,如 X 光散射、磁圆二色性等,获得了很有希望的结果;至于介电常数、声速、体积、差热分析、电子能谱学等等,也发现它们与构象之间都有一定的联系,但发展希望是否很大,还需要进一步的研究,才能判断。

上述这些测定溶液中构象的技术,就单独一个技术讲大都只能提供构象的某一个侧面,但几个技术的综合运用,可以得到较为全面的知识。因此当前最理想的是综合运用多种测定构象的方法,观察生物高分子在溶液中的变化,将它们与生物功能紧密地联系起来。在综合运用各种溶液构象测定技术时,能参考 X 光

衍射晶体分析的结果, 将是比较有利于开展工作的, 因为 X 光衍射晶体分析法能提供晶态生物高分子的构象信息最多。同时相当多的比较研究说明, 蛋白质的构象在溶液中与晶态大体相似而又有细结构上的变化, 有时这种细结构的变化在功能上有其重要性。所以, 如能综合多种技术进行研究, 在攻克空间结构与功能关系上就较易于取得成就。

三、溶液构象与功能关系的研究已有很多成果

将构象变化与功能联系起来的研究工作已取得成效。现在从大量的报导中举出数例, 说明现阶段的成就和发展的前景。

酶

对于酶结构与功能的研究, 在溶液构象方面比较集中于下列各种过程中构象的变化: 变性过程, 变构现象, 化学改性和探测标记与微区变化, 底物、抑制剂与酶结合, 金属离子、配体 (Ligand) 与酶结合, 酶原激活, 催化活性中心的微区和种属差异等等。

酶的变构现象是近年来研究酶的空间结构与功能关系的一个重要领域, 但在溶液状态直接测出酶的变构现象者尚不多。最近利用荧光探测剂测出了酶的局部构象变化, 直接证明了变构现象。酶的活性中心是起催化作用的核心部分, 因此许多工作集中研究了酶分子中这一微区的构象。如用荧光探测剂说明, 溶菌酶的活性中心有一些疏水微区存在。经溶菌酶的自身荧光测定说明, 处于活性中心的 62 位色氨酸比较地暴露在水溶剂中, 而溶菌酶与三聚 (N-乙酰-D-葡萄糖胺) 结合时, 62 与 108 位色氨酸的环境变得更加疏水。核磁共振的方法说明, 以竞争性抑制剂与溶菌酶结合时, 52 位门冬氨酸和 35 位谷氨酸与单糖结合中心接近, 抑制剂分子的羟基方向合适时与活性中心的侧链形成氢键, 所成氢键又影响乙酰基的质子和 108 位色氨酸的位置变化。此外, 用核磁共振还对溶菌酶可逆热变性的机制进行了一些研究。这些工

作充分利用了各种氨基酸的各部位质子谱线的知识。溶菌酶中六个色氨酸的吡啶基的 NH 质子共振谱线是热变性的很好标志。根据这些谱线的位移和强度的变化, 推出了热变性时 $\Delta H = 73.5$ 千卡/克分子, $\Delta S = 215$ 卡/度/克分子。溶菌酶的研究结果说明其溶液构象与晶态高度相似。

激素

蛋白质激素的分子量一般比较低, 对这类蛋白质的构象有许多研究报导。对增殖血糖素 (29 肽) 和促肾上腺皮质激素 (39 肽) 的研究说明, 这些多肽有特定的空间结构。研究激素的一级结构改变与功能的关系的工作比较多。近来有些报导将一级结构改变后引起的活力变化与构象变化联系起来, 这对理解激素蛋白质的结构与功能关系是有益的。对于蛋白质激素的研究以胰岛素为最系统, 包括拆合、局部酶解、改变侧链, 类似物合成和胰岛素原-胰岛素转变等过程的构象变化等。如圆二色性测定说明, 胰岛素具有约 30% 的螺旋, 并有 β 折叠结构存在。将胰岛素 B 链 C 端八肽去除后 β 折叠不再存在, 但螺旋不变。激光雷曼光谱说明胰岛素主链中存在 α 螺旋、 β 折叠与无规则卷曲。荧光探测法说明, 胰岛素分子中有疏水区存在。电子能谱学说明胰岛素的三对硫-硫键中有一对与其它二对能量不同, 等等。近年来发现激素通过其专一受体而发挥其调节功能。因此研究激素与受体这两类蛋白质的一级结构与空间结构, 抓住两者结构间的相互关系, 有可能从分子基础上了解激素的调节控制机制。

含血红素蛋白质

对含血红素蛋白质如血红蛋白、肌红蛋白和细胞色素等的研究, 取得了重要的进展。血红蛋白中血红素的微观环境及其与氧结合时蛋白质亚基的协同效应与变构效应, 用顺磁共振、Mössbauer 光谱等技术进行了一些研究, 这对于晶体衍射的结果有所补益。但是更有潜力的方法是高鉴别率的核磁共振。在血红素顺磁场

中,质子(H,也有人注意观察 ^{13}C ,亦可代入探测基团后追踪 ^{19}F)的核磁共振受到微扰所给予的谱线位移到正常抗磁蛋白质谱线区外。这些谱线对微环境的改变(如种属差异、分子病、氧合邻链等)异常敏感。对于谱线所反映的本质,目前还处于开始辨认阶段,仅能辨识属于邻近血红素的甲基、组氨酸等约十几个基团。但通过比较不同配合状态的亚基和各种杂交血红蛋白,已取得一些有意义的结果。例如人血红蛋白的 α 链与 β 链在结合氧时是不相当的。血红蛋白结合配体的亲和力只取决于亚基构象,即氧合态或失氧态,而与其它血红素的配合状态无关。血红素与氧结合时,蛋白质构象改变。亚基可以区分为两种,即氧合态与失氧态,两态之间互相转换,此种四级结构的改变是血红蛋白与氧结合时协同效应的分子基础;血红素与血红素之间并无直接的相互作用,这些都支持了 Monod 等人变构效应的模型。对于紧邻血红素的个别基团的位移变化,小至 $0.1\text{ \AA}$ 都能灵敏示出,而这是X光衍射分析所不易测出者。可以推测,在人血红蛋白F和马血红蛋白中,丝氨酸70与吡咯环IV的甲基接触。核磁共振还显示,在 α 和 β 链聚合形成血红蛋白的四聚体(特别是在失氧状态)时,肽链构象有细微改变。

核酸

核酸的高级结构是分子生物学中一个重要的课题,也是当前国际上研究得很多的领域。碱基互补双螺旋结构和其它高级结构对了解遗传信息的传递有着根本的意义。近年来使用温度跳跃的快速反应,磁共振及红外光谱等技术,利用一些合成的模型(多核苷酸),通过透析平衡方法,研究了碱基互补的生物化学基础。使用小角度X光散射,荧光光谱(利用一些稀有碱基的荧光特性)、圆二色性、旋光色散等技术,利用模型的寡核苷酸与转移核糖核酸(t-RNA)结合等方法,验证了t-RNA的三叶草型结构。最近t-RNA晶体X光衍射的分析已达 $3\text{ \AA}$ 水平,这对于三叶草型结构在空间进一步的折叠将有所阐明,同时对于核酸溶液构象的测定也将有

所促进。脱氧核糖核酸的结构复杂,在细胞活动中又不断产生分枝,因此很难如一般的生物高分子那样,用具有固定构象的概念来看待它的分子。人工合成的模型多聚脱氧核糖核酸,使有可能进行一些物理化学性质研究。近年来值得注意的一个动向是研究核酸与蛋白质的相互作用,即利用蛋白质溶液构象的知识,通过蛋白质和核酸结合的状态来研究核酸的构象。这样做可以充分运用蛋白质研究中的一些技术,如免疫学的方法和酶化学的方法来探讨核酸的构象。这种研究不但对DNA,而且对RNA的高级结构研究也有很大益处,同时也与功能密切结合。很多工作者认为这是一种“识辨”问题,即核酸与核酸,核酸与蛋白质的相互辨认问题。除了上述实验途径外,近年来也开始有一些运用量子力学、统计热力学及非平衡态统计物理学等方法研究核酸溶液构象的理论工作。

生物膜

对生物膜内的分子也开展了构象的研究。用旋光色散与圆二色性研究说明膜蛋白有相当量的 α 螺旋而无 β 结构;红外光谱说明,膜蛋白的酰胺I在 1650cm^{-1} 而非 1630cm^{-1} ,也说明 α 螺旋的存在。荧光偏振说明,视色素在膜内有很大的活动度,而顺磁标记探测剂研究也说明膜中有中等粘度的液体状态的区域存在。这些结果对了解膜的结构有很大的帮助。

四、几点看法

回顾生物高分子溶液构象研究的发展历史,可以看出:在这项研究中引入物理学或化学的新成就是很重要的,常常因此开辟新的园地,产生新的进展。X光衍射法进入蛋白质与核酸研究领域的结果,比较系统地弄清了蛋白质与核酸构象的一系列基本参数与概念。核磁共振的研究对生物高分子的立体结构提供了大量的信息,特别是超导磁铁的使用使核磁共振仪对生物高分子研究的有效性大大提高。雷曼光谱本是一个老的技术,它在生物高分子研究中使用比较困难,但是自从激光技术引入到雷

曼光谱后,面貌完全改观,给出了许多清晰的谱线,提供了反映构象信息的一系列可能性,因此高分子构象研究与其它学科间有紧密的依赖关系。还须指出,这种关系并非单方面的。物理学和化学的技术与观念引起了生物学的重大变化,同样,生物高分子研究的进展,也对在物理学和化学的技术和观念产生了重大的影响。

回顾生物高分子溶液构象研究的历史,还可以看到:研究技术有一个从无到有,由简入繁,然后,又在新的水平上再由繁入简的发展过程。四十年代在研究生物高分子过程中逐步发展起来的超离心、扩散、界面电泳等复杂的技术,今日虽仍在使用,但测定生物高分子纯度、分子量和亚基组成等工作,在经历不断的技术革命和技术革新之后,在一般常规性工作中,已为聚丙烯酰胺凝胶电泳等简单技术所代替。另一方面,测定溶液构象的一些新技术,无论在仪器的设计或数据的处理与解释方面,都还处于由简入繁的阶段,对仪器设备有很高的要求,而所得的信息还相对有限。总之,这是一个活跃的发展中的领域,在这里可以发挥人们的创造性,如果投入艰巨的劳动,将会取得较好的成果。

此外,还应注意:目前测定溶液构象的技术和理论,包括一些数学推导,关于肽链构象还只能初步描述那些有特定的简单几何规则的结构,如 α 螺旋或 β 折叠等,不能处理那些特定的但无简单几何规则的空间排列形式。而后一种

形式在大多数球状蛋白质中占很大的比例;而螺旋构象,除血红蛋白和肌红蛋白等少数球状蛋白质外,都是纤维状蛋白的主要结构方式。还值得指出, α 螺旋与 β 折叠在维持特定的空间构象方面起重要的作用。但近来有一些工作者发现,在肽链转弯的地方有所谓U形转折(或称发夹结构)的结构。在此结构中的残基间有特定的键角的关系。它所占残基的量在十个左右的蛋白质中统计,与 α 螺旋相似。胰岛素处于U形转折结构中的残基与功能之间的紧密关系也有了初步的研究。许多晶体结构的研究结果说明,直接与蛋白质生物活力有密切关系的部位大都在有特定的但无简单几何规则的部分。而对这些,溶液结构测定上尚有困难。同样,对于蛋白质的侧链,测定溶液构象的一些技术和理论,还多利用一些有物理或化学特征的侧链如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等等,而对没有这些特征又与活性中心有关的基团的空间关系与变化,则尚不能或不易测知。当然在这方面现有某些技术如核磁共振等还有潜力可挖,但是要变成一个得心应手的工具,还有一段崎岖的路程。

总之,生物高分子在溶液中的空间结构与功能关系这一领域到七十年代又在新的基础上得到人们的重视,现在这方面的研究报导越来越多。可以预期通过这方面的研究,与一级结构和功能的研究相结合,人们在认识生命的本质这个基本课题上,必将做出重要的贡献。