

讲 座

美国加州理工学院化学物理和生物物理教授陈长谦 (Sunney I. Chan) 来华讲学时, 在中国科学院生物物理研究所系统地讲授了核磁共振 (NMR) 与电子自旋共振 (ESR) 的基本原理及其在生物膜研究中的应用, 并介绍了他们实验室近期的部分研究成果。现以他的讲授内容为基础, 并参考有关文献, 经过删节与补充, 整理出三个专题, 在本刊连载, 供参考。这些专题是: (一) NMR 用于膜的研究的原理与实验基础; (二) NMR 在膜研究中的应用; (三) ESR 的基本原理及其在膜研究中的应用。因报告整理成文后未经报告人审阅, 如有不妥之处, 概由整理者负责。

NMR 用于膜的研究的原理与实验基础(上)

一、导 言

生物膜是一个主要由脂质和蛋白质组成的复杂的分子体系。其部分有序的结构、分子有限的各向异性运动以及分子间的相互作用, 与膜上生命活动的三种表现——物质运输、信息传递和能量转换——有着密切的关系。对它们的研究有助于深入了解膜的功能。各种光谱和波谱手段的综合应用已使这一研究从分子水平深入到原子水平, 从静态结构发展到动态过程。其中 NMR 由于某些突出的特点而愈益受到重视。

(1) NMR 可对含水样品进行非破坏性测量, 不似 X-射线衍射需在晶态下进行, 亦不象 ESR 那样可能因标记而引进干扰, 从而使观测能在接近生理条件下实现, (2) 一切生物膜都含有 ^1H , ^{13}C 和 ^{31}P 等元素, 因而均可用 NMR 来研究, (3) 为其它手段所不及的是, 它可以从单个原子或基团水平上提供膜上分子的动态结构和运动的信息。

NMR 和 ESR 都对分子的运动灵敏, 差别在于 ESR 能测量发生在 10^{-7} 秒内的运动, 而 NMR 原则上可反映从 10^{-12} 秒到几秒区间的运动, 对慢运动尤其灵敏^[1]。这种慢运动很重要, 因为它所涉及的多分子的协同作用和集体运动, 可能与膜上的多种协同效应有关。

以人工膜作为生物膜的理想模型, 用 NMR 加以研究, 提供了许多膜结构和流动性的信息。例如磷脂分子脂肪酸长链由于重取向并不总是平行于膜表面法线方向, 其平均取向与膜法线有大约 30° 的夹角^[2], 磷脂双分子层的流动性从表面向深部增加, 疏水端最高^[3], 胆固醇使双层膜曲率变小, 流动性降低^[4]。与其它手段相配合, ESR 证明了细胞色素氧化酶上不存在

蓝铜^[5]。关于蛋白质与脂的相互作用, NMR 亦得到一些不同于 ESR 的结果: 蛋白质的存在对脂的流动性影响不大, 在 10^{-7} 秒时间内, 靠近和远离蛋白质的脂区的流动性并无明显差别^[6,7]。

本文将介绍 NMR 何以能够及如何用来研究膜的问题, 并通过几个应用的代表性例子来说明 NMR 与其它手段相配合用于膜的研究是大有潜力的。

二、NMR 用于膜的研究的原理和实验基础

膜上 ^1H , ^{13}C 和 ^{31}P 等元素的核具有非零的自旋, 当与外磁场和射频电磁场相互作用且满足共振条件时, 将吸收射频场能量而发生自旋能级间的跃迁。这就是核磁共振。

核自旋系统还可能存在其它的相互作用, 如磁屏蔽, 磁偶极矩相互作用和电四极矩相互作用。其结果将影响共振吸收过程而产生化学位移, 谱线分裂等特征现象。这些相互作用的涨落变化则导致自旋系统的弛豫使之恢复平衡。

膜上分子的有限运动一方面决定着膜的部分有序结构和流动性, 另一方面又影响和调节上述三种相互作用, 从而影响了化学位移的各向异性, 谱线分裂大小以及弛豫过程的时间常数 T_1 , T_2 。于是通过这些可以测量的 NMR 参数便可获得有关膜的动态结构、分子运动以及相互作用的信息。

A 序参数 (Order parameter)

a. 膜上分子的有限运动 生物膜 (及人工膜) 处于一种类似液晶的流动状态, 与脂质分子的有限的各向异性的运动密切相关, 有限性指的是脂分子在空间各方向上出现的几率不同, 例如其烃链的取向与膜法

线相平行的几率就远大于与之相垂直的几率。各向异性则表示分子转动时在各个方向上速率不等。当然有限运动通常也总是各向异性的。分子的这种有限运动使膜处于一种部分有序的流动状态。一方面脂质分子不断运动,以某种速率改变着它的空间位置和取向,另一方面,从一段时间的平均效果看,分子的取向又围绕某一平均方向限制在一定范围内变化(例如 50—60 度)^[3]。

在 NMR 中如何定量描述有限运动的这两个方向?分子运动的快慢反映了分子的 mobility,这可由测量弛豫时间来获得。运动在空间方向上的有限范围则反映了分子的 flexibility,它可通过序参数来度量。它们分别从脂质分子运动状态随时间的变化以及随空间方向的变化两个方面反映了膜的流动性,彼此并无直接关系^[1,4]。

NMR 可以测量的膜脂分子的运动分为快运动和慢运动两类。前者为分子内部的运动,主要指键的运动,其中 trans-gauche 异构化幅度大、频率低,易于探测,而键的振动和摆动则因高频低幅而难以测量。后者包括:(1)分子的运动,如围绕膜表面法线方向的旋转扩散,沿水平方向的侧向扩散,沿法线方向的上、下跳动及二单层间的分子交换;(2)分子的集体运动,指一个个微区中分子的集体运动。以上两种慢运动使分子长链产生一种围绕平衡位置的重取向(reorientation),其相关时间约为 10^{-7} 秒^[3],故不能为 ESR (观察时间小于 10^{-8} 秒)所探测。因此 ESR 测量的序参数只反映了第一类快运动,这可能是用 ESR 及 NMR 测量同一人工膜的序参数而得到不同结果的原因之一^[3,4]。

b. 序参数

1) 序参数的含义 在 NMR 中序参数是一个可以测量,用以描述分子的取向分布,因而是膜脂分子运动有限性的度量。在 NMR 的测量时间内,运动相对于膜法线具有轴对称性。序参数的基本形式为:

$$S_{\beta\beta} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\beta - 1 \rangle. \quad (1)$$

其中 β 是 r 与膜法线 n 的夹角(图 1)。

r 为 $\begin{cases} \text{二核间矢量} & \text{对偶极相互作用} \\ \text{C-D 键} & \text{对电四极矩相互作用} \\ \text{分子主轴} & \text{对磁屏蔽} \end{cases}$

$\langle \rangle$ 表示对测量时间内 β 的变化范围求平均。

由图 1 可以看到:④序参数不包含运动的时间信息,即不能反映运动的快慢,而只提供测量时间内分子空间取向的平均分布信息。运动有限性越小,取向分布范围越大,序参数就越小。

对于液体 $S_{\beta\beta} = 0$

对于晶体 $S_{\beta\beta} = 1$

对于液晶(如膜) $0 < S_{\beta\beta} < 1$

② 序参数只是对于膜的液晶相才是有意义的;实

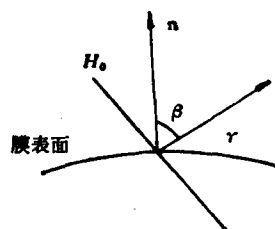


图 1

验中接近相变温度时膜就处于凝胶相 (gel phase), 分子运动大大受限制,运动不再满足轴对称条件, NMR 谱上峰的分裂越来越大而信号越来越小,序参数实际上难以测出。

③ 脂分子长链上任一原子部位原则上都可以求得序参数,因而能比较膜的不同深度上运动的有限性、分子的 flexibility,在原子水平上得到了解膜脂分子空间取向的有序性能。

2) 序参数的实验测量 序参数可以通过 NMR 谱测量。这是因为分子的有限运动对磁屏蔽、偶极矩相互作用或电四极矩相互作用的调节而影响了谱形的不对称程度或谱线的分裂程度。对不同的测量方法,某一种相互作用可能是主要的,例如测膜上的 ^1H NMR 谱时,质子间磁偶极矩相互作用占优势,当用氘取代质子测 ^1H NMR 谱时,氘核的电四极矩相互作用为主。这两种情况下都会发生谱线的分裂,分裂的大小正比于序参数。特别是后者,谱线分裂容易测量,是实验测定序参数最常用的方法。 ^{31}P NMR 谱有显著的化学位移各向异性,亦可以测量,但因磁屏蔽本身非轴对称,需两个序参数才能描述,故从化学位移各向异性很难直接得到序参数。

用 ^1H NMR 测序参数步骤如下:

① 选择氘化 将脂肪酸欲测部位的 ^1H 换为 ^2H ,再合成为磷脂,然后作成人工膜。

② 测 ^2H NMR 谱 只有氘化部位的 ^2H 产生共振跃迁,且因氘核的电四极矩相互作用而出现两个共振频率,故谱线分裂为二,其间距为:

$$\Delta\nu = \frac{3}{4} \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right) S_{\text{CD}} (3 \cos^2\theta' - 1) \quad (2)$$

其中 $\left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)$ 是电四极矩耦合常数,可由其它方法得到,

例如对于链烷属烃等于 170KHz ^[4], θ' 是膜法线与外磁场的夹角,若膜定向排列,则 θ' 可知,谱线如图 2 中 a 所示,若膜随机排列, $(3 \cos^2\theta' - 1)$ 因子消失,谱线变为峰,如图 2 中 b,虚线表示没有电四极矩相互作用时的谱线位置。

③ 计算序参数 从谱上测出 $\Delta\nu$, 根据公式(2)即可得到序参数 S_{CD} ,它代表氘化部位 C—D 键的序参数,描述整个次甲基 CH_2 的序特征尚需要其它的序参

数,如 S_{H-H} 等。通常即以 $S_{mol} = -2S_{CD}$ 来表示磷脂分子在氘核所在部位的有序性^[7]。

3) 分子运动有限性的定量分析 实验测得序参数后,再根据磷脂分子的运动模型,假设 C—D 键的空间取向分布函数来计算序参数,再与测量的序参数比较,从而检验或修正分布函数,给出运动有限性的定量描述。

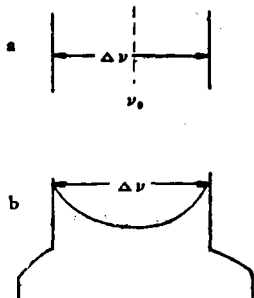


图2 1H NMR 谱

曾提出两种运动模型。一是 Seelig 等人的模型,只考虑了磷脂分子链的 *trans-gauche* 异构化对序参数的贡献。二是陈长谦等人的模型,还同时考虑了链的重取向运动,对序参数作出更详细、更满意的解释。

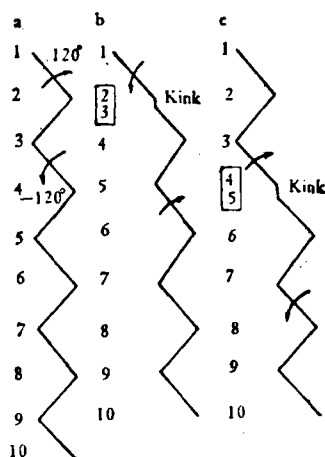


图3 Kink 的扩散^[3]

trans-gauche 异构化是由于 C—C 键旋转而形成的链的 *trans* (反式)和 *gauche* (扭曲)两种构象之间的转换。处于全反构象的链如图 3a 所示。由于一个 C—C 键旋转 120° ,其后的链将扭曲而形成一个 *gauche* 构象。单一的 *gauche* 构象不稳定,隔一个 C—C 键再反向旋转 120° 形成另一 *gauche*。这种 g^-g^+ 的构象叫“Kink” (扭结),异构化的结果是 Kink 沿着长链的移动(图 3b,c),其速度较快,返回原处的时间 $\tau_{11} \approx 10^{-9} - 2 \times 10^{-10}$ 秒^[3],这一运动相对长链对称,使 r 角改变。

链的重取向是单个分子运动和分子集体运动的结果,使链相对于膜法线的取向变化,即 α 角改变。这一运动较慢,相关时间为 10^{-7} 秒左右。

由于两种运动时间范围差别很大,序参数可以分解为独立的两部分:

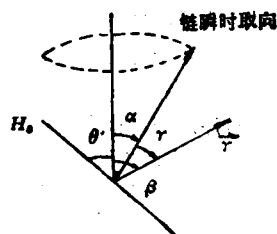


图4

$$S_{\beta\beta} = \left[\frac{1}{2} (3\cos^2\alpha - 1) \right] \cdot \left[\frac{1}{2} (3\cos^2\gamma - 1) \right] = S_\alpha \cdot S_\gamma \quad (3)$$

S_α 和 S_γ 分别相应于链的重取向和异构化。

于是 S_α, S_γ 可从理论上分别计算

$$S_\alpha = \frac{\int \frac{1}{2} g(\alpha) (3\cos^2\alpha - 1) \sin\alpha d\alpha}{\int g(\alpha) \sin\alpha d\alpha} \quad (4)$$

$$S_\gamma = \frac{\int \frac{1}{2} g(\gamma) (3\cos^2\gamma - 1) \sin\gamma d\gamma}{\int g(\gamma) \sin\gamma d\gamma} \quad (5)$$

其中 $g(\alpha)$ 是键相对膜法线的分布函数, $g(\gamma)$ 是 C—D 键(对 1H NMR 则是 H—H)相对键链的取向分布函数。

假设 $g(\alpha)$ 为矩形函数或高斯函数 ($K e^{-\frac{(\alpha/\alpha_0)^2}{2}}$), $g(\gamma_i) = P(\gamma_i)\delta(\gamma - \gamma_i)P_i^+ + P_i^- + P_i = 1$, 代入(4)、(5)可以计算出 S_α 和 S_γ 。这里, P_i 是 C—C 键处于扭曲构象的概率, P_i^+ 表示 C—C 键处于全反式构象的概率。

陈长谦教授从实验上测得 $S_{\beta\beta}(C-D)$ 和 $S_{\beta\beta}(H-H)$, 再基于 S_α 对 C—D 及 H—H 相同而 S_γ 对二者不同:

$$S_\gamma = -\frac{3}{8} P_i - \frac{1}{8} \quad \text{对 H-H}$$

$$S_\gamma = -\frac{1}{2} P_i \quad \text{对 C-D}$$

从而将测量的 $S_{\beta\beta}(C-D)$ 分解为 S_α 和 S_γ , 与理论计算值进行比较,最后得到下列参数:

$$50^\circ \leq \Delta\alpha \leq 60^\circ$$

$$27^\circ \leq \alpha_0 \leq 34^\circ$$

这表明,磷脂分子长链由于有限运动,其空间取向在 $50-60$ 度范围内变化,而平均取向并不平行于膜的法线,与之成大约 30 度的夹角。这种定量描述提供了一幅膜上脂分子排布及可能的变化范围的生动图象。

(待续)

参 考 文 献

- [1] Chan, S. I. (陈长谦): Lecture on "NMR and ESR" in Institute of Biophysics, Academia Sinica, 1981.
- [2] Chan, S. I. et al.: *Membrane Spectroscopy*, 1981.
- [3] Bocian, D. F. et al.: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 29, 307, 35, 1978.
- [4] Seelig, J. et al.: *Q. Rev. Biophys.*, 13, 19—61,

1980.

- [5] Seelig, J.: *Biochemistry*, 13, 4839, 1974.
- [6] Jacobs, R. E.: *Progress in NMR Spectroscopy*, 1980.
- [7] Seelig, J.: *Birchem. Biophys. Res. Com.*, 57, 406, 1974.
- [8] Burnett, L. J. et al.: *J. Chem. Phys.*, 55, 3829—31, 1971.

[何润根整理]

会议简讯

第一次全国分子免疫学研究进展学术讨论会

中国生物化学会于1983年10月5日至8日在江苏省南京市召开第一次分子免疫学研究进展学术讨论会,会议由中国医学科学院基础医学研究所王世中教授和南京医学院生化教研组徐愤副教授共同筹办召集的。到会者共70余人,其中约有一半刚从国外归来。生化学会名誉理事,南京大学教授、生化界老前辈郑集先生出席了会议。

会议共收到论文53篇,内容包括免疫球蛋白、补体系统、免疫细胞活化机制、淋巴因子、胸腺素、免疫核糖核酸、免疫受体、免疫不育、免疫网络学说等重要基础问题,此外在单克隆抗体方面的论文报告中还提到我国已制备出各种单克隆抗体24种。会议简略回顾了我国免疫化学和分子免疫学的发展概况,特别提到

刘思职教授早期对免疫学所作的贡献。

会上由六位专家分别作了题为《抗原抗体作用机制》《淋巴细胞活化》《免疫网络与分子免疫学》《补体在生物膜上的集合关系》《白细胞间介素-2的分子生物学》《蛋白质分子的进化》研究进展综述报告,深受大家的欢迎。

会议向中国生化学会提出几点建议:(1)成立分子免疫学研究委员会或联络组,(2)成立分子免疫学名词命名委员会。(3)组织鉴定国内建立的单克隆细胞株,投入生产。

北京友谊医院、北京市临床医学研究所生化研究室

袁振铎

分子生物学的今天和明天

1983年9月19—21日在美国纽约召开了一次会议,讨论了三十年来的DNA研究进展,内容包括以下几个方面:(1)DNA基因与复制。三十年前DNA的螺旋结构还不完全肯定,今天则左螺旋与右螺旋的DNA结构全清楚了。(2)基因表达。基因的结构与表

达的关系,以及基因在进化过程中的作用正在阐明。(3)发育生物学。分化问题是一块未开发的处女地。如果免疫球蛋白基因重排及基因功能的序列可以作为一般的模型。(4)生物医学。基因拼接方法对重要医学问题的解决投射出曙光。(5)对未来的展望。遗传工程肯定将在医学领域中得到应用。在会议闭幕式上提出了三个报告:神经肽,基因转移,昆虫的分节。

[*Nature*, 305(5930), XIII, 1983. 敏摘]