

蛋白质和肽的溶液构象研究

施庆洛 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所)

这是作者在 1981 年 5 月上海举行的中美蛋白质学术讨论会上的报告, 现经重新整理, 并作了补充。本文侧重介绍了圆二色性(CD)方面的工作, 它反映了我国目前以 CD 研究蛋白质和肽构象的进展情况。

——编者

研究蛋白质的构象一般从两个方面进行, 一是研究晶体的立体结构, 一是研究溶液中的构象。二者各有优缺点。现将我所近年来蛋白质和肽的溶液构象研究工作综述如下:

一、简单的历史回顾

1953—1954 年间, Kauzman 及 Yang 与 Doty 等先后发表了蛋白质手征性的论文。与此同时, 谭佩幸等^[1]报道, 原肌球蛋白从卷曲变到松散时, 它的旋光负值增加。这是国内有关溶液构象的创始作, 也是国际上最早研究蛋白质手征性的论文之一。1962 年张友尚等^[2]用旋光色散 (ORD) 研究原肌球蛋白的溶液构象, 推算天然原肌球蛋白的螺旋度约为 80%, 聚合前后其螺旋度无变化。最近用 CD 研究的结果支持上述结论。1963—1964 年间, 鲁子贤^[3]、李其梁等^[4]先后测定了胰岛素 B 链和 A 链的 ORD 谱和紫外差光谱。当时结果显示 B 链含有少量 α -螺旋, 而 A 链则以无规卷曲存在。1965 年钱元任等^[5]用德鲁多单项式的 λ_c 来计算烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白质在不同状态时的螺旋度。发现在 67% 氯乙醇中, 此蛋白质亚基主链构象以 α -螺旋为主, 含量达 75%。变性蛋白质能恢复到天然状态, 恢复后的蛋白质螺旋度降低至 24%, 与天然状态相同。

在上述的研究中, 他们都已经注意到 $[\alpha]_D$

与 λ_c 或 $[\alpha]_D$ 与 b_0 的变化不平行的情况, 系 ORD 方法本身的局限性引起。从六十年代开始, 人们注意到光学活性的另一种性质——圆二色性 (CD), 它在解释蛋白质构象上有独特的优点。近十多年来, 人们已放弃 ORD 而只用 CD 来研究蛋白质的构象。随着多种技术如各种荧光方法及核磁共振等的发展, 人们倾向于综合多种方法来探测蛋白质构象。我们近年来即以 CD 谱为主, 结合其他方法研究了一些蛋白质和肽的构象。

二、胰岛素结构与功能关系

胰岛素的远紫外 CD 谱已被多家实验室测量。其远紫外 CD 谱显示 207nm 和 222nm 的双负峰。用部分酶解法得到了三个胰岛素类似物: B 链 C 端去五肽胰岛素 (DPI), B 链 C 端去 7 肽胰岛素 (DHPI), B 链 C 端去八肽胰岛素 (DOI)。其水溶液的远紫外 CD 谱彼此相似, 而和胰岛素不同(图 1)。乙醇和 SDS 对此三个类似物 CD 谱的影响极为相似, 也都与胰岛素不同^[6]。

对 DPI 的紫外差光谱的测定结果表明^[7], 它的三个苯酚基团全部暴露在分子表面。这可能反映 DPI 的主链构象与胰岛素稍有不同。但也可能是由于 DPI 不能缔合成二体的结果。

对三个胰岛素类似物的内源荧光测定结果

表明,它们的构象相似^[8]。

DPI 的活力接近于胰岛素; DHPI, DOI 没有活力。DPI 的结合能力与胰岛素相同, 其余类似物的结合能力依分子逐步变小而降低。DOI 还表现出少量结合能力。根据 CD、荧光谱等, 可判断胰岛素类似物主链构象彼此相似。曾经提出, 胰岛素二体内单体间的疏水面是胰岛素分子与受体结合的结合部位。因此根据上述结果可以设想, 在三个类似物中还保留着形成结合部位的疏水表面的大部分构象。既如此, 则胰岛素 B 链 C 端失去两个苯丙氨酸残基后活力的丧失不是由于主链构象改变引起的。从而说明 B₂₄, B₂₅ 本身在胰岛素的受体结合部位中起重要作用。

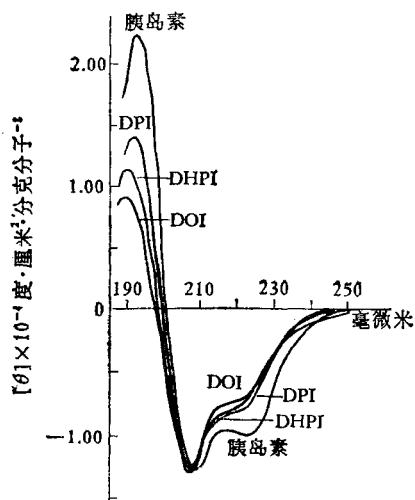


图 1 胰岛素及其类似物在水溶液中的 CD 谱

三、蛋白质的非典型远紫外 CD 谱

一般球状蛋白质的远紫外 CD 谱反映它的主链构象。Fasman, Wetlaufer 及 Yang 等人相继建立了用远紫外 CD 谱计算蛋白质主链构象元含量的方法。这些方法的基点是, α -螺旋提供双负峰的谱线, 峰顶在 208nm 及 222nm 附近; β -折迭提供 215nm 左右的单负峰; 无规卷曲则在 195nm 附近提供单负峰。一般球蛋白的 CD 谱为上述三种构象元的参考图谱的线性加和。我们已测出, 原肌球蛋白和副肌球蛋白的远紫外 CD 谱呈 α -螺旋谱^[9,10], 兔小肠蔗糖酶异麦

芽糖酶复合体显示 β -折迭的 CD 谱^[11]。

但是有不少蛋白质的 CD 谱很难用上述构象元的图谱来解释。在近几年的工作中鲁子贤等着重注意到了这些谱线。

1. 胰岛素与工字肽^[6] 胰岛素用胰凝乳蛋白酶限制性水解, 可得到 A₁—A₁₄、B₁—B₁₆ 两个片段用二硫键连接起来的肽, 简称为工字肽。在水溶液中, 工字肽的远紫外 CD 谱显示 203nm 的负的极顶, 202nm 以下大体上是负的平顶。在盐酸胍溶液中, $[\theta]_{222}$ 与水溶液中的相近。加入 SDS 使 $[\theta]_{222}$ 负值增加, 203nm 负峰转移到 206nm。这些结果都说明工字肽无有序结构。但工字肽远紫外 CD 谱和自由卷曲的多聚赖氨酸相比, 差别很大。一些研究结果都指出二硫键在 200nm 周围显示负峰。工字肽分子内二个二硫键互相套在一起, 因此有些特别。推想工字肽的 CD 谱可能有相当部分系二硫键贡献。

与典型的 α -螺旋谱线比较, 胰岛素 CD 谱有些异常, 即 $[\theta]_{207}$ 与 $[\theta]_{222}$ 的比值偏大。考虑到工字肽在 203nm 有负峰, 再注意到它包含了胰岛素分子三分之二的二硫键, 及 60% 的残基, 也许引起胰岛素 CD 谱异常的因子包含在工字肽部分之中。用胰岛素 CD 谱减去工字肽 CD 谱得到的差 CD 谱与一般球状蛋白质的相似。用 Chen 和 Yang^[12] 的方法对此差 CD 谱计算所得出的构象单元含量与胰岛素晶体结构的结果相近。这说明胰岛素的 CD 谱异常可能与二硫键的特定构象有关。

2. 半夏蛋白^[13] 远紫外 CD 谱显示 226nm 的单一负峰(图 2)。近紫外 CD 谱显示 295nm 和 286nm 的两正峰和 248nm 的负峰。295nm 与 286nm 间, 为一信噪比较低的宽阔的正峰。这些峰值的大小都随着溶液中盐酸胍浓度的增加而减小。 $[\theta]$ 变化的转折点发生在 2.75M 胍中。根据其 CD 行为考虑, 半夏蛋白在 6M 胍中的变性过程是可逆的。复性蛋白质能重新卷曲成天然构象。

226nm 的单一负峰不易解释。半夏蛋白是一凝集素, 刀豆球蛋白和某些凝集素显示和半

夏蛋白相近的远紫外 CD 谱。

3. 肌球蛋白轻链^[10] 已分别从猪心肌和文昌鱼骨骼肌中分离得到。它们的远紫外 CD 谱形都为双负峰,但峰的位置和 α -螺旋不同。从猪心肌中得到的此蛋白质所显示的两负峰的比值也和 α -螺旋相差甚远。上述远紫外 CD 谱的异常可能牵涉到侧链贡献。

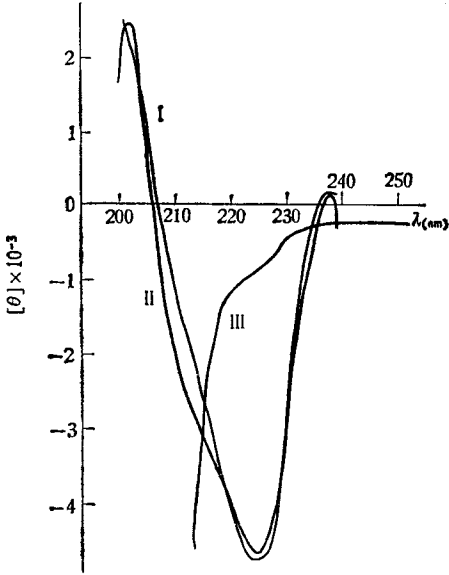


图2 半夏蛋白的远紫外 CD 谱

I. 天然半夏蛋白; II. 复性后半夏蛋白;
III. 变性半夏蛋白

4. 绿豆胰蛋白酶抑制剂^[14] 其紫外 CD 谱与一般球状蛋白质不同,属典型的 Bowman-Birk 抑制剂的图形,具有 231 nm 正峰,245 nm 肩,275 nm 负峰及 202 nm 大负峰。溴化氰处理后,抑制剂 Arg 活力区破坏,231 nm 峰消失,202 nm 峰变小。Yoshida 等报道赤豆胰蛋白酶抑制剂 CD 谱中也有 232 nm 的正峰,建议它是由邻近硫-硫键的特殊的主链构象所提供。一些含二硫键较多的蛋白质都有 202—206 nm 的大负峰。溴化氰处理后,绿豆胰蛋白酶抑制剂中肽键已被切断,但硫-硫键未断,并保留 202 nm 峰;推想 202 nm 峰反映硫-硫键特定构象。

四、肽的 CD 谱

研究肽的构象对蛋白质的结构研究以及阐明一些活性肽结构及功能关系都有重要意义。

国内外已有许多人注意肽的构象。近年来,我们主要测定了一些五肽和四肽的 CD 谱。

亮氨酸⁵-脑啡肽^[15]为五肽,含有一个酪氨酸和一个苯丙氨酸残基。在 pH 5.8 的水溶液中,其近紫外 CD 谱在 275, 268, 262 和 255 nm 四处显示四个正峰。在水溶液或 90% 乙醇或 90% 三氟乙醇中,此肽的远紫外 CD 谱都显示一个 220—223 nm 的宽正峰。此种 CD 谱表示有序结构还是无规卷曲,尚难定论。

Asn-Ala-Gly-Ala (NAGA) 与其二个类似物^[16], Asn-D-Ala-Gly-Ala-NH₂ (NDAGA) 和 Asn-Ala-Gly-Ala-Asn (NAGAN), 都具有镇痛作用。在酸性水溶液中 (pH 1.3), NAGAN 的 CD 谱显示 232.5 nm 负峰, 215 nm 正峰 (图3) 和 Woody 所作的 IV 型 β -转角的理论曲线相近。在 pH 5.8 的 90% 乙醇或 90% 三氟乙醇中, NAGAN 的远紫外 CD 谱显示 218 nm 的单一负峰,和典型 β -折迭图谱相符。由于 5 个氨基酸残基可能不足以形成分子内 β -折迭,所以在此种条件下,此肽可能以一种类似 β -折迭的构象存在: Asn-1 侧链羧基与 Asn-5 侧链 NH₂, Ala-2 肽键羧基与 Asn-5 肽键 NH₂, 都通过氢键连接。也就是说,此五肽分子中 Ala-Gly-Ala-Asn 4 个残基形成 β -转角。NAGA 的远紫外 CD 谱显示 215 nm 的单一正峰,和亮氨酸⁵-脑啡肽的接近,目前尚难解释。NDAGA 的远

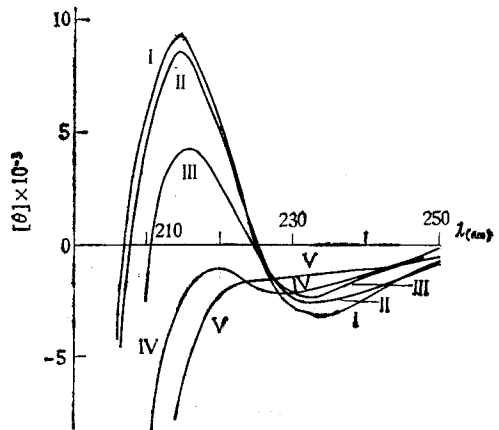


图3 NAGAN 的 CD 谱

水溶液, 25°C。曲线 I—V 分别表示 pH 1.3, 2.2, 2.7, 3.7 和 4.5。

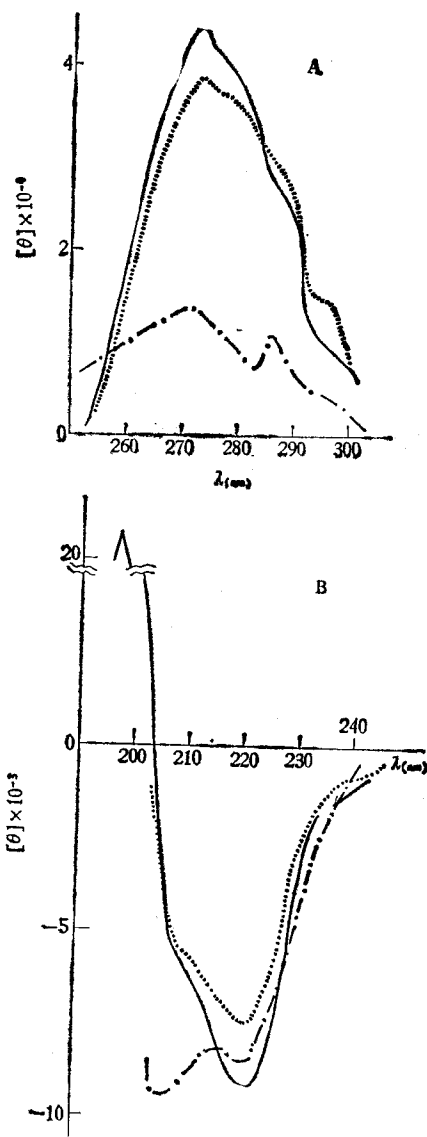


图4 CCGCV 生理盐水溶液的 CD 谱, 25°C

- (A) 近紫外 CD 谱。pH5—10.8, —; pH2.5,; pH12.6, ———。
- (B) 远紫外 CD 谱。pH5—10.8, —; pH2.2,; pH11.1, ———。

紫外 CD 谱则为 210—250nm 间的正的平顶, 210nm 以下负 $[\theta]$ 值增加, 表示此肽的溶液构象为无规卷曲。实验结果显示, 三个肽虽都有镇痛作用, 但它们的构象并不相同。

对六个人工合成的胰岛素原 C 肽肽段衍生物的 CD 谱的测定^[17]显示, BPOC-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-OH (GPGAG) 的 CD 行为与其他肽

显著不同。其 CD 谱显示 221nm 较弱负峰和 199nm 的较强正峰, 正, 负峰值的比例约为 -12。此种谱形与 I 型 β -转角或 II 型 β -转角的理论或实验曲线相近。根据 Chou 和 Fasman^[18] 的构象预测法, 发现此肽的 β -转角出现机率远大于其他 5 个肽段衍生物。此种构象可能与在人工合成胰岛素原 C 肽过程中所发现的此肽的异常化学行为有关。

五、中国大白菜灰心病毒的 CD 谱研究^[19,20]

到目前为止, 有关整体病毒的 CD 研究报道甚少。生化所病毒组从大白菜中提取到一种纯病毒制剂, 属 TMV 株系。在 pH5—10.8 的生理盐水中, 此病毒 (CCGCV) 的近紫外 CD 谱显示 273nm 正峰, 273—300nm 间的 3 个肩; 远紫外 CD 谱显示 221nm 负峰, 208—207nm 肩, 197nm 正峰 (图 4)。溶液中盐浓度的变化对此病毒的 CD 谱影响很小。

对此病毒的游离蛋白质 (CCGCV-P) 和游离核酸 (CCGCV-RNA) 组份的 CD 谱测定说明, 在远紫外区核酸组份对病毒 CD 谱的贡献可忽略不计。病毒的远紫外 CD 谱即代表病毒内蛋白质的 CD 谱。

从病毒的近紫外 CD 谱中减去 CCGCV-P 的 CD 谱, 所得差 CD 谱与 CCGCV-RNA 的比较, 差异很大。这种差异不能仅用构象上的差别来解释。也许病毒内核酸和蛋白质间的相互作用是这种差异的主要原因。

在 pH3.1—4.8 的生理盐水中, 用 234nm 或 221nm 紫外光照射此病毒稀溶液能使它的 CD 值发生大幅度变化。类似的现象也在 TMV 株系的其他病毒 (TMV-普通株, 蕃茄条纹病毒) 上观察到。CCGCV 的两个游离组份在相同条件下却无此现象。

受紫外光照后, CCGCV 的 CD 谱形很不寻常, 在 230—231nm 和 205nm 附近, 呈现二个强正峰。两强正峰的大小, 随光照时间的长短而改变。上述 CD 谱形与芳香族氨基酸以及

含有芳香族残基的一些寡肽的 CD 谱相似。每个 CCGCV 蛋白质亚基上含有 2 个色氨酸, 7 个酪氨酸, 5 个苯丙氨酸残基。这些残基是否和光照诱发的结构变化有关, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 谭佩幸、曹天钦:《生理学报》, 1954 年, 19 期 223 页。
[2] 张友尚、曹天钦:《生物化学与生物物理学报》, 1962 年, 2 期, 120 页。
[3] 鲁子贤:《生物化学与生物物理学报》, 1963 年, 3 期, 154 页。
[4] 李其梁、鲁子贤:《生物化学与生物物理学报》, 1964 年, 4 期, 488 页。
[5] Chien Yüan-jen et al.: *Scientia Sinica*, **14**, 998, 1965.
[6] 鲁子贤:《中国科学》, 1981 年, 9 期, 145 页。
[7] 中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组:《中国科学》, 1976 年, 4 期, 429 页。
[8] 王淳等:《胰岛素类似物的内源荧光光谱》(待发表)。
[9]—[10] 邹永水等:《第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》, 3 页, 南宁, 1981 年 11 月。
[11] 施庆洛等:《兔小肠蔗糖酶-异麦芽糖酶复合体的圆二色性》(待发表)。
[12] Chen, Y. H. et al.: *Biochem.*, **13**, 3350, 1974.
[13] 徐琴钰、鲁子贤:《生物化学与生物物理学报》, 1981 年, 13 卷, 379 页。
[14] 罗珊珊、鲁子贤:《用圆二色性探测绿豆胰蛋白酶抑制剂的构象》(待发表)。
[15] 施涛涛、鲁子贤:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 12 卷, 400 页。
[16] 鲁子贤、施涛涛:《Asn-Ala-Gly-Ala 与 Asn-Ala-Gly-Ala-Asn 在溶液中的构象——远紫外圆二色性》(待发表)。
[17] 施庆洛等:《胰岛素原 C 肽中合成肽段的溶液构象》(待发表)。
[18] Chou, P. Y. et al.: *J. Mol. Biol.*, **115**, 135, 1977.
[19] 施庆洛等:《大白菜病毒的圆二色性》(待发表)。
[20] 鲁子贤等:《紫外照射诱发的大白菜病毒圆二色性变化》(待发表)。

[本文于 1982 年 2 月 25 日收到]

环糊精的模拟酶作用

文 重 周 晴 中

(北京大学化学系)

环糊精 (cyclodextrin) 早在 1891 年就已发现。但长期以来, 由于化学反应被认为只是发生于分子间的碰撞, 所以具有包接复合作用的环糊精并没有引起人们的重视。

随着酶化学研究的不断深入, 人们认识到, 酶的高效快速催化作用, 在于酶分子在催化反应进行时, 首先能够通过疏水力相互作用, 使反应底物向酶分子定向靠近, 并将底物或底物的一部分立体特异地包接(复合)在酶分子具有疏水微环境的活性中心处。然后, 酶分子活性中心处的活性基团再向底物进攻, 形成反应中间体, 最后生成反应的最终产物。近些年来, 对环糊精性质的研究表明, 它正是一种能包接复合许多种有机和无机分子的简单的大分子化合物。利用其对其他分子的包接(复合)作用来影响和催化一些反应的进行, 也就是说环糊精可作为酶的模型, 正引起人们越来越大的兴趣, 有

关环糊精的化学也有了很大的进展^[1]。

一、环糊精的结构及性质

环糊精是由 6 个或更多的葡萄糖分子形成的环状低聚糖的总称。以 n 表示葡萄糖分子数, $n = 6$ 为 α -环糊精; $n = 7$ 为 β -环糊精; $n = 8$ 为 γ -环糊精。

环糊精分子的形状如轮胎, 它是由几个 $D(+)$ 吡喃型葡萄糖残基, 通过 α -(1,4) 连接而形成的。每个葡萄糖残基均处于无扭变变形的椅式构象, 如图 1 所示。各葡萄糖残基的 C-2 和 C-3 原子上的二级羟基均位于环糊精圆环分子的一端, 而 C-6 上的一级羟基则位于另一端。一级羟基可以自由旋转, 甚至可以部分地将空穴的一端堵塞, 而二级羟基则有相当的刚性, 不能旋转。环糊精分子内部为一个稍呈“V”字形的空穴, 具有二级羟基的一端的直径比具