

- [8] Schlant, R. C. & Hurst, J. W. (ed): *Advances in Electrocardiography*, V. 2, Grune & Stratton Inc., N. Y., 1976.
- [9] Williams, Jos, L.: *Computers Biomed. Res.*, **13**, 120, 1980.

- [10] Nygard, M. E. & Hulting, J.: *ibid.*, **12**, 181, 1979.
- [11] Meijler, F. L., et al.: *Brit. Heart J.*, **44**, 1980, 1.
- [12] Caceres, C. A.: *Eur. J. Cardiol.*, **8**, 145, 1978.

[本文于1982年1月18日收到]

牛血清白蛋白溶液热变性过程中的构象变化

杨景文 叶国辉 钮择玲 章正康

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白质变性是指在外界环境各种物理、化学因素影响下,其天然状态的二级,三级等高级空间结构的改变,进而引起天然蛋白质物化性质及生物活性的变化。尽管科学家们对这一问题进行了长期的探索,由于变性过程的复杂性以及各种测量手段提供数据的差异,至今对它的认识还远未完成,因此,它仍然是人们感兴趣的研究课题。

血清白蛋白是高等动物体内起重要作用、结构复杂的蛋白质,对其变性问题,已用各种手段进行了大量的研究^[1,2],对其变性机制也有多种模型。本文试图用红外光谱法对牛血清白蛋白溶液在不同 pH 影响下热变性过程中蛋白质构象变化做进一步观察。

蛋白质在 $1600-1700\text{cm}^{-1}$ 有一强的吸收带,叫酰胺 I 带,它是由肽键伸缩振动而产生。这个带对于氢键及构象变化特别灵敏,它可提供蛋白质二级结构的信息。由于溶剂水分子在 1650cm^{-1} 处有吸收峰,为排除它对酰胺 I 带的干扰,我们采用重水 (D_2O) 作溶剂对酰胺 I 带的位移进行了定量研究。

实验方法

配制 2% (W/V) 的牛血清白蛋白的重水溶液。用自制的 DCl , NaOD 的重水溶液调制一系列不同 pH 的蛋白溶液^[3], 在 pH2—11 范围内选用 24 个不同的 pH 值。

牛血清白蛋白为本所生化厂生产,电泳纯。

重水为北京化工厂生产,分析纯。

溶液 pH 测定采用国产 25 型酸度计,由于市售的 pH 计的玻璃电极和甘汞电极测量端体积较大,难以做微量样品测量,我们用自制小型玻璃电极代替,可以测量 0.5ml 的重水溶液。

本文中数据均以 pH 表示。所测得 pH 值均按下列关系式校正为 pD 值^[4]。

$$\text{pD} = \text{pH} + 0.40。$$

制得的样品溶液置于自动温度控制器变温池中进行测量。为提高其精度,将温度控制器的输出端连结一国产 DS-18 型数字电压表和 DS-18M₁ 放大单元,用标准温度计校正到最小标度为 0.1°C 。

液体池窗片为 CaF_2 。池厚 35μ 。

对于不同 pH 的蛋白质溶液,在不同温度时,用 580B 型红外分光光度计 (Perkin-Elmer 公司) 进行光谱测量,再用 Interdata 8/16 型计算机进行数据处理。

结 果

在一定的 pH 范围内,随着温度逐渐上升,达到某一温度时,牛血清白蛋白溶液红外谱的酰胺 I 带会出现低频肩峰 1617cm^{-1} , 此峰标志蛋白质 β -折叠结构形成(图 1、2)。

实验结果表明,开始出现 1617cm^{-1} 肩峰的温度与溶液的 pH 值有密切关系。在 pH3.3—9.5 范围以外无此现象,如图 2 所示。在等电点 pH4 附近 1617cm^{-1} 峰出现的温度为最小值。随

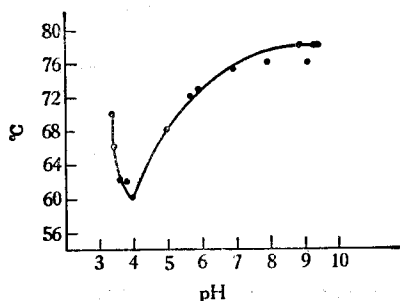


图1 牛血清白蛋白重水溶液在 1617cm^{-1} 处开始出现 β -峰时的 T -pH 关系图

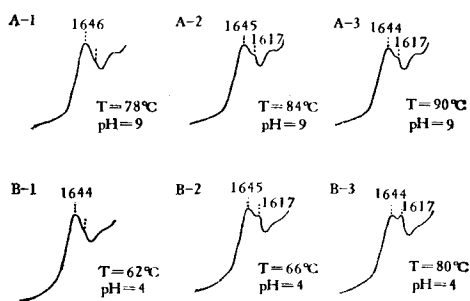


图2 不同 pH 的牛血清白蛋白重水溶液温度变化时的红外谱图

着溶液 pH 值减小和增大,此温度均上升。pH4 时, 1617cm^{-1} 带出现的温度为 60°C , 而 pH3.4 时,此带出现的温度为 70°C , pH9 时直到 78°C 才出现此吸收峰。

以 1617cm^{-1} 及 1650cm^{-1} 两波数吸收之比: $R = E_{1617}/E_{1650}$ 表示牛血清白蛋白的 α 螺旋向 β 折叠的结构转变。以 80°C 时, R 与 pH 关系作图得图 3 所示曲线。 R 值显然低于等电点时, 在 pH3.3—4 之间,随 pH 增大, R 值迅

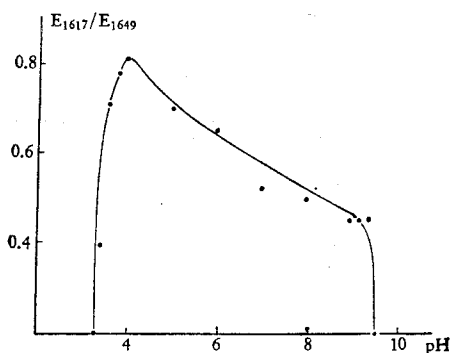


图3 牛血清白蛋白重水溶液在 80°C 时 E_{1617}/E_{1649} 与 pH 关系图

速增大;在等电点附近达最大值,之后随 pH 增大而减小,在碱性条件下, R 值较小。

若以 R 对温度作图则可以明显看出在不同 pH 条件下,随着温度的升高, α 结构向 β 结构转变的动力学不尽相同,图 4 为在 pH4 及 pH8 时, R 值随温度增大的变化规律。

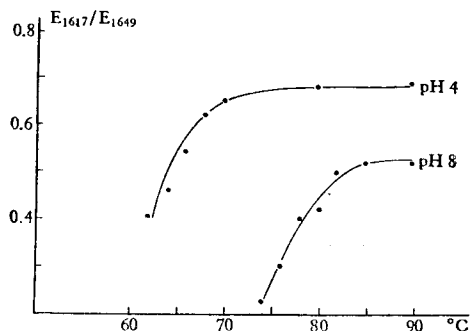


图4 牛血清白蛋白重水溶液的不同 pH 的 E_{1617}/E_{1649} 与温度的关系图

我们还观察到牛血清白蛋白重水溶液,在 1650cm^{-1} 的峰位随着温度变化发生红移,且红移的大小与溶液的 pH 值有关。在 pH3.3—9.5 范围内, 1650cm^{-1} 峰位随着温度上升逐渐向低波数位移(图 5),位移数达 8cm^{-1} 。当溶液的 pH 超出 3.3—9.5 范围以外,随温度上升,未见峰位的频率位移。

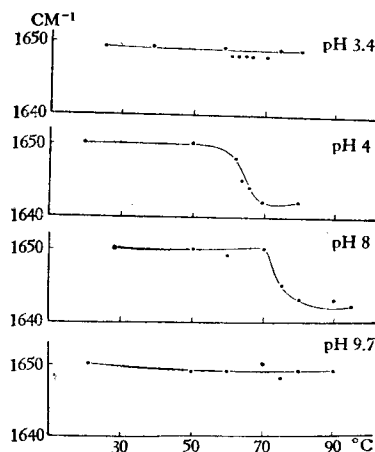


图5 牛血清白蛋白重水溶液在不同 pH 下, α -峰位与温度关系图

讨 论

我们的实验证实了在不同 pH 条件下代表

β -结构的 1617cm^{-1} 吸收带出现时的温度不同, 等电点附近温度最低, 最易形成聚集体。在等电点两端随着 pH 偏离等电点的程度 $\alpha(1650\text{cm}^{-1}) \rightarrow \beta(1617\text{cm}^{-1})$ 的相变温度升高。我们知道牛血清白蛋白在不同的 pH 下具有不完全相同的结构, 对此 Foster 等进行了大量系统的研究。他们发现在 pH4 左右发生 $N \rightarrow F$ 转变, 即由天然状态向快速电泳迁移相转变, 后者具有一种扩展结构, 当 pH 为 3 时, 蛋白质分子发生显著膨胀, 酪氨酸及疏水基团同时暴露于溶液中。另一方面, 在碱性条件下在 pH7—9 之间发生天然结构向 B 结构的转变 ($N \rightarrow B$), 此时, 巯基活性性增大, 失去部分 α 螺旋; 在大于 pH9.5 时则发生 B 结构向 A 结构的转变, 称之为中性转变, 此时发生双硫键不可逆的重组^[5]。我们实验中, 在 $\text{pH} < 3.3$, $\text{pH} > 9.5$ 的情况下, 未检测到 B 结构的出现。有可能在此条件下, 蛋白质处于显著改变的结构状态, 使其不可能发生在较为缓和的 pH 条件下所发生的那种 α 螺旋向 β 折叠的转变。溶液在 pH3.3 时, 蛋白质处于 F 结构, 而随着温度上升 F 结构不再向 β 结构转化, 而是向着随机结构转化。溶液在 $\text{pH} > 9.5$ 时, N 结构转变成另一种异构体 A 结构, 它比天然状态易于降解; 温度再高时, 就不再出现 β 结构, 而可能向 σ 结构转化。

从图 5 中我们看到在 pH4 及 pH8 的条件下, 1650cm^{-1} 吸收带随着温度上升向低波数移

动。我们知道蛋白质分子的溶剂化过程会引起酰胺 I 带波数的红移。这在牛血清白蛋白水合现象的红外光谱研究中已得到证实。本实验结果表明在蛋白质分子的 α 结构向 β 结构转化时, 中间经过伸展过程, 这时, 蛋白质分子内氢键和双硫键的状态改变^[6,7]。分子结构由致密转向疏松。本来不可进入的溶剂分子开始进入蛋白质分子内, 与肽链上的 $\text{C}=\text{O}$ 形成氢键; 随着温度上升, 蛋白质分子逐步伸展, 进入的水分子增多, 与 $\text{C}=\text{O}$ 形成的氢键增多, 故使 $\text{C}=\text{O}$ 伸展振动频率发生红移。当这种溶剂化现象达到一定程度后, 才出现凝聚过程, 从而导致 β 结构的形成。

沈莉莉同志提供测试 pH 的自制微形玻璃电极, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Oakes, J.: *J. Chem. Soc. Far. Trans.*, I, V. 72, Part 1, 228, 1978.
- [2] Lin, V. J. C., et al.: *Biopolymers*, 15, 203, 1976.
- [3] Klotz, I. M. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 2721, 1965.
- [4] Glasoe, P. K. et al.: *J. Phys. Chem.*, 64, 188, 1960.
- [5] Jr. T. P.: *Albumin, Structure, Biosynthesis*, 12, 1978.
- [6] Febs.: *Federation of European Biochemical Societies 11th meeting Copenhagen V. 50*, Colloquium B9, 1977.
- [7] Rosenoer, V. M. et al.: *Albumin Structure, Function And Uses*, 1977.

[本文于1981年11月11日收到]

新 书 介 绍

Practical Methods in Molecular Biology 由 R. F. Schleif 和 P. C. Wensink 合著, 1981 年由 Springer-Verlag 公司初次正式出版。此书以 R. F. Schleif 为美国勃朗第斯大学 (Brandeis University) 生物化学系编写的实验室方法一书为基础, 经修订和扩充撰写而成。全书共七章, 除第七章为一般实验室常用辅助技术外, 第一、二章分别介绍以大肠杆菌和入噬菌体为主要实验材料进行生理、生化、诱变、转导等实验的基本操作方法, 第三章介绍大肠杆菌的几种常用酶的分析方法, 和使用大肠杆菌偶联的转录与转译体系的实验方法, 第四章为研究蛋白质的常规实验方法, 第五章介绍核酸研究中对 DNA 分离、提纯、分子大小分级、限制性内

《分子生物学实用方法》简介

切酶切点图谱制定, 及核苷的层析与凝胶电泳分离等方法, 第六章介绍重组 DNA 和分子克隆技术常用的基本实验方法, 包括用分子杂交法筛选含特定基因片段克隆株的技术, 以及用麦胚或家兔网质红细胞制备的无细胞蛋白质合成体系进行真核 mRNA 离体转译实验等适用于研究真核基因活动的一系列技术。

书中涉及的技术适用范围比较广泛, 介绍的方法比较成熟和实用, 文字简明, 操作步骤介绍清楚, 便于初学者阅读, 对从事生命科学的有关领域科研工作的实验室工作人员, 和以遗传工程为主要手段生产药物的技术人员也有一定的参考价值。

[情]