

紫 外 差 光 谱 技 术

郭 尧 君

(中国科学院生物物理研究所)

差光谱是研究生物大分子溶液构象的重要手段之一。X光衍射固然是大分子结构分析的最有力的工具。它几乎可以得到大分子结构的全部信息,但需要合格的晶体,且分析周期长,工作量大,并且不易说明大分子在生理状态下结构与功能的关系。所以在大分子的结构与功能的工作显得日益重要的时候,溶液构象的各种测定手段也就越来越为人们所感兴趣了。目前大分子溶液构象的测定方法大致有小角散射(X射线或中子),核磁共振和顺磁共振,激光-拉曼光谱和红外光谱,紫外-可见差光谱,荧光,磷光,旋光色散和圆二色等等。这些手段各有用处,如紫外-可见差光谱可以研究生色团的环境;圆二色和激光-拉曼光谱可以测定大分子的二级结构;荧光可以探测大分子的疏水区,氨基状态,二硫键……等。如果将各种手段得到的信息综合起来,就可以比较全面地得到大分子在溶液中执行功能状态时的构象情况了。就这些手段所需要的设备条件来说,以紫外-可见差光谱较易满足,同时它又是各种光谱的差光谱技术的基础,掌握了它,无疑对于进一步掌握荧光、圆二色、激光-拉曼等的差光谱技术会有很大的帮助。

蛋白质的光吸收是由于芳香族氨基酸侧链——主要是色氨酸、酪氨酸,其次是苯丙氨酸、组氨酸的生色团吸收光的结果。因此通过这些氨基酸的环境变化来推断蛋白分子的构象主要是在紫外区域,而可见区域的研究则限于反映蛋白-蛋白,酶-辅酶,酶-底物(例如转移金属离子)的相互作用等,在可见区有时还需引入生色团才能进行。

当生色团经受一定的环境变化时,它的吸

收光谱就会产生一个小的变化。这时光谱沿着波长刻度位移一个量 $\Delta\lambda$,且高度和谱带宽度也有变化。生色团经受的这种变化,称之为微扰作用,变化后和变化前的光谱差称差光谱。

蛋白质中通常见到的生色团的微扰差光谱如图1所示。它们类似吸收光谱的一级微分。

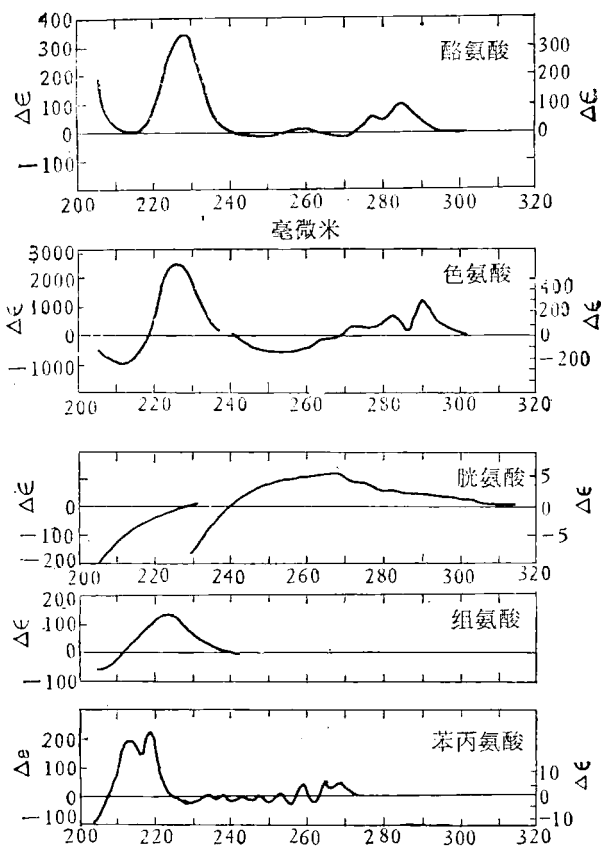


图1 用20%(v/v)乙二醇微扰产生的几种氨基酸的差光谱

Herskovits 曾对每个生色团的特征进行了讨论。差光谱的最大值大致上是在吸收光谱的最陡波长处。根据产生差光谱的作用因素的不同,目

前常见的有溶剂微扰差光谱, pH 差光谱, 温度微扰差光谱以及浓度差光谱。

溶剂微扰差光谱

这个技术是通过测量改变溶剂组成(加入微扰剂)所引起的光谱变化来计算暴露于溶剂的蛋白质生色团的份数(fraction)这些微扰剂的加入常常降低溶剂的极性, 使生色团的基态和激发态之间的能级差变小, 从而使蛋白质芳香氨基酸的最大吸收峰红移(重水相反)。常用微扰剂的分子大小及作用距离见表 1。

表 1 常用微扰剂的分子尺寸及作用距离

微 扰 剂	平均直径(埃)	作用距离
重水	2.2	长
二甲亚砜	4.0	短
乙二醇	4.3	长
甘油	5.2	长
赤藓醇(丁四醇)	5.8	—
阿糖醇	6.4	—
葡萄糖	7.2	—
甘露糖醇	7.4	—
聚乙二醇	9.2	短
蔗糖	9.4	长

为了准确测定, 微扰剂的加入必须不改变欲测大分子的构象。如果微扰作用的大小和微扰剂浓度之间成直线关系, 通常可以认为没有构象变化发生。但是辅助性的测量, 如圆二色性、旋光色散、沉降系数、比粘度等的测定则可作为更可靠的证明。虽然某微扰剂在特定 pH 或离子强度时可能对某种蛋白的构象没有影响, 但在个别条件下(如极端 pH)则仍然可能改变其天然构象, 因此必须谨慎。

用溶剂微扰方法测得蛋白质生色团的暴露程度与微扰剂的性质和生色团的状态有关。因为直径较小或作用距离较大的微扰剂分子有较多的机会接近不规则表面的生色团, 甚至“钻”到蛋白质的“裂缝”中。因此为了观察部分暴露的生色团或在“裂缝”中的生色团, 必须要仔细地设计实验。

为了推算蛋白质中一些氨基酸残基的暴露份数, 需要选择相应的、残基暴露份数为 100 %

的样品作为参考。一般用以下两种方法来得到: (1) 用相应于蛋白质氨基酸组成的模型化合物, 例如 N-乙酰-L-酪氨酸(或色氨酸, 苯丙氨酸)乙酯来代替。(2) 展开蛋白链本身, 并且必须使氨基酸残基充分暴露, 自由地与溶剂接触。考虑到空间位阻情况的相似性以及多肽链本身及邻近侧链基团对生色团的影响, 第二种方法是可取的。此外, 由于蛋白质的来源及制备方法的不同, 氨基酸的组成可能有改变, 所以采用第一个方法时, 精确地计算氨基酸的含量有时也是个问题。但是由于充分变性的蛋白质在水溶液中是难溶的, 因此测量需要在 8M 尿素中进行。可是尿素对生色团的差光谱参数又有影响, 所以必须用相应的模型化合物分别在水中和 8M 尿素中测定其差光谱常数, 以得到校正系数 F, 用以校正 8M 尿素中变性蛋白所得到的数据。校正系数通常在 0.8—1.2 之间, 随微扰剂和氨基酸残基的生色团而异。

$$R_p = \frac{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{蛋白(在水中)}}}{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{展开蛋白(在 8M 尿素中)}}} \times F$$
$$F = \frac{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{模型化合物(在 8M 尿素中)}}}{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{模型化合物(在水中)}}$$

这里 R_p 是校正后的氨基酸残基的暴露份数。 $\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}}$ 是差光谱常数即差克分子吸收系数和克分子吸收系数之比。 $\lambda_{\max}$ 为差光谱峰值(用于 $\Delta\epsilon$) 和蛋白质或模型化合物的吸收光谱的峰值(用于 ϵ)。

对残基暴露部分的一种近似的估计 (R_M) 也可以用下面的公式来测定:

$$R_M = \frac{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{蛋白}}}{(\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/\epsilon_{\lambda_{\max}})_{\text{模型化合物}}}$$

如果一个蛋白质既有酪氨酸, 又有色氨酸, 它们的暴露份数可以用两个联立方程式来解出。

$$\begin{aligned} \Delta\epsilon_{256-288\text{毫微米}}(\text{蛋白}) &= a \times \Delta\epsilon_{256-288\text{毫微米}}(\text{酪氨酸}) \\ &+ b \times \Delta\epsilon_{286-288\text{毫微米}}(\text{色氨酸}) \\ \Delta\epsilon_{292-294\text{毫微米}}(\text{蛋白}) &= a \times \Delta\epsilon_{292-294\text{毫微米}}(\text{酪氨酸}) \end{aligned}$$

$$+b \times \Delta\epsilon_{292-294\text{毫微米(色氨酸)}}$$

这里 a 和 b 分别表示酪氨酸和色氨酸的暴露份数。 $\Delta\epsilon$ 指的是蛋白、酪氨酸或色氨酸的实验测定的差克分子吸收系数。脚注表示波长。286—288 毫微米为酪氨酸的差吸收峰位, 292—294 毫微米为色氨酸的差吸收峰位。

溶剂微扰的实验技术已由 Herskovits 详细地介绍过, 采用的双池结构见图 2。先在 1 和 3 中加微扰剂(浓度通常为 20%), 在 2 和 4 中加蛋白。调整基线后, 将样品光路中的 3 和 4 洗净, 干燥。然后, 在 3 中放入溶剂, 4 中灌注与 1、2 池中浓度相同的蛋白加微扰剂, 扫描差光谱。因为差光谱常常是直接光谱的百分之几, 因此必须严格容量操作。一种样品常用同一根移液管配置。蛋白和微扰剂可事先配置母液。样品制备后及时测谱, 免得放置后出现混浊。在使用尿素溶液时, 由于太粘, 容量操作可在 35℃ 左右进行。

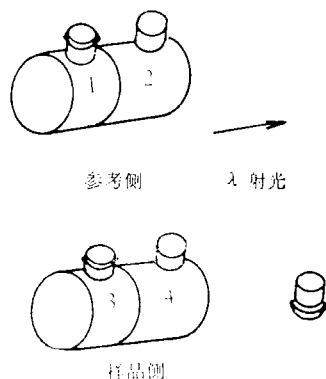


图 2 溶剂微扰差光谱采用的串联双池

pH 差光谱及滴定

引起溶剂微扰差光谱的原因可归结于比较单一的现象, 如蛋白质中芳香族侧链的暴露情况。但酸或碱引起的差光谱(250—300 毫微米)却归结于几个相关的物理现象: (1) 在生色团附近正电荷和负电荷分配的变化。(2) 酪氨酸残基的侧链氢键的破坏或组成。(3) 生色团环境的极性变化。(4) 在强碱性 pH 时, 酪氨酸残基的解离。由于引起 pH 差光谱的原因复杂, 为了合理的解释结果, 常需配有多种手段的测量。

如粘度, 超离心分析和其它几种差光谱等。

在高 pH 范围, 富有酪氨酸的蛋白其光谱的主要变化是由于酪氨酸的解离。此时, 可以看到吸收明显增加, 且峰位从 275 毫微米红移到 293 毫微米。蛋白质中酪氨酸的解离用差光谱方法研究是最方便的。酪氨酸的解离 pK 约为 9.7。蛋白质中也有一些酪氨酸常常在高的 pK 值解离, 这种异常高的 pK 值实际上是由于残基被掩蔽或被埋藏, 或可能是由于有氢键结合到蛋白质的别的侧链上。

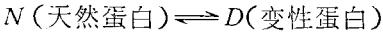
pH 差光谱及 pH 滴定的实验方法比较简单。可以用一套 pH 不同的缓冲液, 但其它条件都相同的样品溶液。以某一特定 pH 溶液作参考, 调整基线后, 样品光路中的吸收池洗净, 干燥。灌注不同 pH 的蛋白溶液, 扫描差光谱。也可以配置某一特定 pH 溶液作参考, 调整基线后, 在样品池中滴加极微量的浓酸或浓碱, 混匀, 边用插入池内的微电极监控 pH, 边扫描差光谱。pH 滴定常用后一种方法。

温度微扰差光谱

由温度引起的光谱变化已用于蛋白质和核酸的热变性动力学研究。吸收变化是由于温度引起生色团环境的改变产生的。当样品和参考溶液之间温度的不同没有导致样品产生分子构象变化, 而又产生了吸收变化的时候, 实际上类似于溶剂微扰。不同的是溶剂仅微扰某些表面生色团(在表面的、能接触溶剂的那些生色团), 而温度的变化是使所有的生色团被微扰。但对蛋白质内部生色团的微扰作用是比较小的。因为温度微扰涉及表面所有的生色团, 因此将这个技术进一步发展作为蛋白质表面状况的探针, 在一定程度上胜过溶剂微扰技术。

用差光谱方法研究蛋白质的热变性, 同用尿素和酸变性的情况一样, 在温度升高到一定程度时, 蛋白质的二级和三级结构的破坏总是伴随着光谱的改变。如果用辅助的方法(圆二色, 旋光色散, 比粘度, 沉降常数等)证明它确是单一变性过程的时候, 温度微扰就是获得这个过程的热力学参数的最合适的方法。

如果我们假定这个变性过程是一个可逆的
单级反应。则从这个过程的平衡常数 K ，就能
测定各种变性的热力学参数。



$$K = (\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_N)/(\Delta\epsilon_D - \Delta\epsilon)$$

这里 $\Delta\epsilon_N$ 和 $\Delta\epsilon_D$ 分别指的是蛋白质在天然和
变性状态时的差克分子吸收系数。 $\Delta\epsilon$ 是蛋白质
在转变范围的差克分子吸收系数。求得 K 后，就
可以得到标准自由能 ΔF° ，焓 ΔH° 和熵 ΔS°
了。

在溶菌酶热变性的研究中，可以在 293 毫
微米观察到差吸收 ΔA 随温度的变化。在转变
温度范围中， ΔA 的急速增加是蛋白质构象变
化的结果。这是由于在天然蛋白质中的一部分
或整个埋藏生色团环境的变化，例如使它们变
成暴露于溶剂之中。如果 ΔA 变化速率小，说
明在蛋白质中没有或只有很少的构象变化产
生。

温度微扰实验技术比较简单。配置两份完
全相同的样品，分别放在具有恒温装置的参考
和样品光路中。在参考溶液所用的温度下平衡
基线后，参考溶液继续保持恒温，样品溶液则通
过水浴逐步改变温度，并同时扫描差光谱。为
了准确监控被测溶液的温度，温度计最好通过
池盖插入池中。样品温度的改变可能影响分光
光度计的波长准确性，为了得到高精度的结果，
在样品室壁上必须装有恒温隔板。

浓度差光谱

浓度差光谱是用于测定浓度对蛋白质生色
团环境的影响而引起的构象变化。在蛋白质本
身的浓度是唯一可变参数的条件下，蛋白质的
缔合和解离就可以通过这个手段反映出来。虽
然蛋白质分子的构象变化经常表现为二级和三
级结构的变化，但在一些条件下，也常有四级结
构的变化。如由于亚基的聚合，生色团可以埋
藏在新形成的结构中，或由于解离，使先前埋藏
的生色团变成暴露等等。胰岛素的浓度差光谱
反映了单体到二体的缔合变化，但对进一步高
聚化(如六聚体)没有明显反映。由 $\Delta\epsilon$ 对浓度

的一组曲线可以计算单体 $\rightleftharpoons$ 二体的平衡常
数。如果进一步研究温度对缔合的影响，那就
可以测定各种热力学参数，如缔合焓、自由能
等。

浓度差光谱是将等量的吸收物质分别放在
参考和样品光路中，使得参考溶液的光程等于
样品溶液的光程和它们的浓度比的乘积。如
图 3。

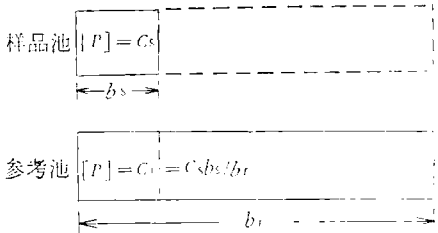


图 3 浓度差光谱用的吸收池
[P]表示蛋白浓度，其它同文中所述

$$c_s b_s = c_r b_r \quad (1)$$

这里 c 为蛋白浓度， b 为吸收池光程长度， s 和
 r 分别代表样品和参考。最后使这四个因数仅
仅由于蛋白浓度不同致使生色团环境变化而引
起差光谱。

$$\Delta A_\lambda = A_{s_\lambda} - A_{r_\lambda} \quad (2)$$

$$\Delta \epsilon_\lambda = \epsilon_{s_\lambda} - \epsilon_{r_\lambda} \quad (3)$$

这里 A 是吸收， ϵ 是克分子吸收系数， ΔA 是差
吸收， $\Delta\epsilon$ 是差克分子吸收系数。 s 和 r 分别代
表样品和参考。

$$\Delta A_\lambda = \epsilon_{s_\lambda} c_s b_s - \epsilon_{r_\lambda} c_r b_r \quad (4)$$

根据公式(1),(3),(4)

$$\Delta \epsilon_\lambda = \frac{\Delta A_\lambda}{c_s b_s} \quad (5)$$

这就是浓度差光谱的基本公式。

测定浓度差光谱的方法可参看图 3。虚线
先不管，较短的池用作样品池，较长的池用作
参考池。后者池中的样品浓度根据如下公式计
算：

$$c_r = c_s b_s / b_r$$

灌注蛋白质样品前，先在两个池中装溶剂，
并平衡基线。池洗净干燥后，再装蛋白质溶液，
扫描浓度差光谱。最好使用一对串联双池，此
时，在样品池的虚线部分始终是装溶剂。

对仪器和样品的要求

因为差光谱的差吸收 ΔA 仅仅是直接吸收光谱吸收 A 的百分之几, 所以进行差光谱扫描最好使用具有量程扩展 ($0-0.1 A$ 或 $0-0.2 A$) 的双光束紫外分光光度计。在使用前必须对仪器进行波长校正和量程校正。由于测定差光谱用的样品吸收较高, 所以最好使用具有低杂散光的双单色器的分光光度计。同时, 近代的分光光度计使用微型计算机自动调整基线, 不但大大简化操作, 提高速度, 并且保证了高吸收样品的基线平直性, 这对差光谱测定是非常宝贵的。此外, 在做温度微扰时, 希望参考池和样品池能分别恒温、并有探头能随时监控溶液温度。在做 pH 差光谱时, 希望有微电极随时监控 pH。在做溶剂微扰和浓度差光谱时, 希望有串联双池, 且后者需具备不同光径的串联双池。

由于差光谱的 ΔA 小, 放大器的漂移、光电倍增管的噪音和迟滞现象常常可以引起较大的误差。为了精确测定, 必须足够的预热仪器。此时可以通过记录空气-空气基线来判断, 直到记录谱恒定为止。在差光谱扫描中应使用快响应、高灵敏度和慢的扫描速度, 以保证所有的差峰都能得到显示。

为了保持参考光路有恒定的光电流输出, 自动记录的双光束分光光度计通常有两种设计形式。一是在波长扫描过程中自动改变光电倍增管的供电电压, 但狭缝宽度保持恒定 (如果色散元件是光栅的话, 谱带宽度基本上也是相等的)。二是光电倍增管的供电电压恒定, 但狭缝宽度随波长自动改变。前一种形式对于差光谱测量比较合适, 但在选择狭缝宽度时, 既要考虑光的单色性, 又要考虑单色光的能量输出。这可以由大到小不断地改变狭缝宽度, 反复扫描差光谱来选择, 直到找出能得到光谱精细结构的最小狭缝宽度。

紫外差光谱的长波侧至少必须从 350 毫微米扫描。如果溶液混浊或在 350 毫微米以上存在具有吸收的蛋白凝胶物, 则需从更长的波长扫描。记录一个完整光谱有以下好处: (1) 样

品混浊有时不易用眼睛辨认, 但如从 400 毫微米到 310 毫微米样品吸收均匀地增加, 就说明样品有混浊。因为在这个波长范围中, 蛋白质本身应该是没有吸收的 (色氨酸的吡咯环长波侧从 310 毫微米才开始有吸收)。如果用离心、过滤、改变 pH 等办法都不能避免混浊的话, 可以采用 S. J. Leach 的方法校正散射对光谱的影响, 即用 $\log \Delta A$ 对 $\log \lambda$ 作图。(2) 重复扫描光谱, 通过各波段范围的光谱变化可观察样品是否发生沉淀或化学反应。(3) 当分光光度测定是用直接测量或差吸收测量完成时, 可以从光谱是否通过等吸收点来检查实验的可靠性。(4) 通过完整差光谱可以检查所有生色团的微扰作用, 从而帮助结果的解释。例如酪氨酸和苯丙氨酸生色团的微扰作用同时发生时, 那么更多的可能象是发生了构象变化 (比起酚基团的氢键变化来说)。(5) 在溶液制备中的任何误差可以通过差光谱的大小、形状和偏离情况表现出来。如图 4 中 (1) 为酪氨酸的正常差光谱, 主峰 (286—288 毫微米) 大于次峰 (278—280 毫微米)。除吸收峰外, 谱基本落在基线上。图 4* 中 (2) 表示样品有散射, 虽然主峰仍大于次峰, 但在 340 毫微米就有背景吸收, 且越往短波, 背景吸收越大, 使整个差光谱稍往上抬。图 5 表示

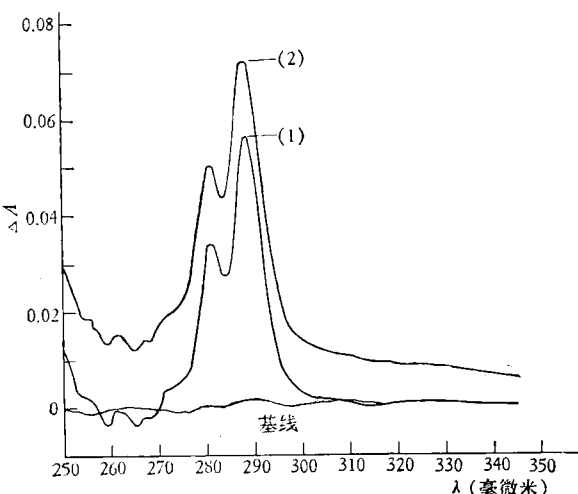


图 4 散射对差光谱的影响
(1) 正常谱; (2) 样品有散射

* 图 4—6 的实验承雷克健、王志珍同志一起完成, 特此感谢。

配置样品时有误差,样品溶液浓度略大于参考溶液浓度时(约为1%,根据样品不同等还有差别),主峰与次峰高度相似,但当这种浓度误差增大时,次峰反较主峰大,且在短波时谱抬高甚剧,谱形畸变。图6正好是另一种情况,即配样时样品浓度小于参考浓度,此时主峰不正常的大于次峰,次峰低下,短波显示负值。且误差越大,次峰越低下,短波负值越大,谱形畸变。

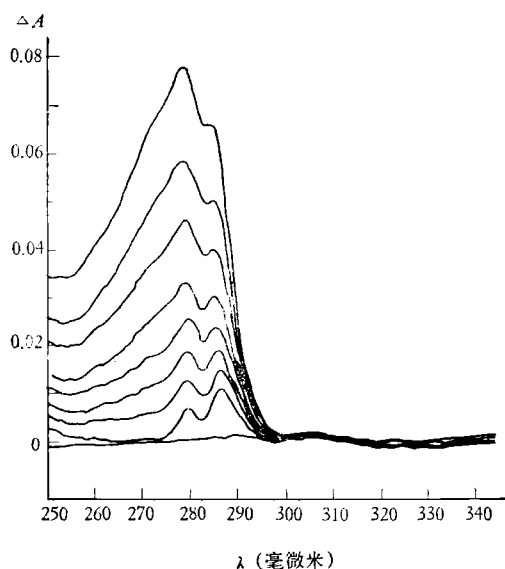


图5 参考和样品的溶液浓度误差对 pH 差光谱的影响
(自下至上样品溶液浓度渐大于参考溶液浓度)

吸收池的光径准确度与清洁程度对差光谱测定也是非常重要的。常规光径的商品吸收池光径误差为 ± 0.01 毫米。用于差光谱测量的吸收池最好事先进行匹配选择,方法是在池中装入高吸收的样品,测试后,选用相同或相近的。如采用 Swaney 的交错技术,则对池的匹配要求可以降低。清洗池一定要及时,许多市售的烷基磺化型的清洗剂具有类似蛋白质的吸收光谱,所以最好用非离子洗涤剂。冲洗干净后,要用蒸馏水洗过,凉干备用。

(学术动态)

美国冷泉港实验室召开病毒致癌等专题讨论会

1979年5月和8月,美国冷泉港实验室分别召开了病毒致癌和细菌噬菌体专题讨论会。在病毒致癌专题讨论会上讨论了:1. DNA 肿瘤病毒的转化基因;2. DNA 肿瘤病毒:早期 RNAs 及早期蛋白质;3. T-抗原;4. 还原病毒的基因组与蛋白;5. 在转化细胞中 DNA 病毒转化基因及其排列;6. 原病毒及其表达;7. DNA 肿瘤病毒的转化遗传学;8. 转化

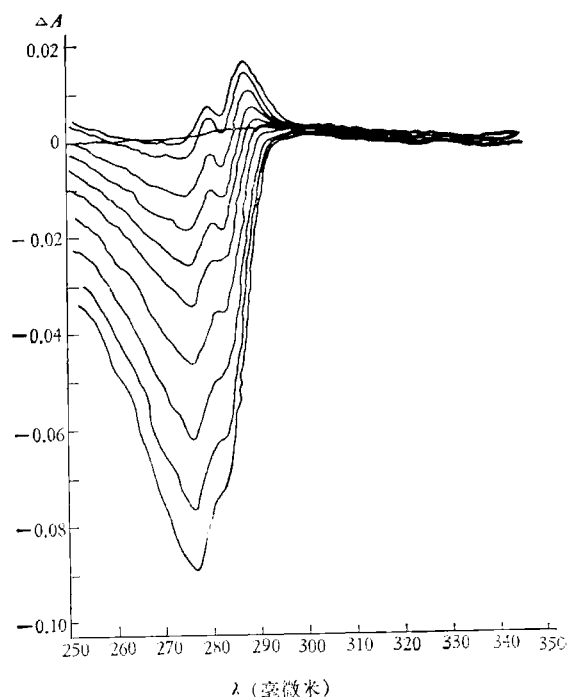


图6 参考和样品的溶液浓度误差对 pH 差光谱的影响
(自上至下参考溶液浓度渐大于样品溶液浓度)

参考文献

- [1] Herskovits, T. T.: *Methods in Enzymology*, vol.11, p. 748, 1967. (ed. Hirs, C. H. W.)
- [2] Donovan, J. W.: *ibid.*, vol. 27, p. 497, 1973. (ed. Hirs, C. H. W.)
- [3] Leach, S. J. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 4791, 1960.
- [4] Herskovits, T. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2481, 1962.
- [5] Fisher, H. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 217, 1965.
- [6] Bello, J.: *Biochemistry*, **8**, 4543, 1969.
- [7] Bello, J.: *ibid.*, **9**, 3562, 1970.
- [8] Bello, J. et al.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, **10**, 226, 1977.
- [9] Swaney, J. B.: *Anal. Biochem.*, **43**, 388, 1971.

[本文于1979年3月14日收到]

表现型与分化;9. 腺病毒的转化基因及其表达;10. 转化细胞;11. 胸腺白血病病毒。细菌噬菌体专题讨论会涉及的问题有:1. DNA 复制;2. 噬菌体 Mu; 3. Mu 的复制与转位; 4. 整合重组;5. λ 的促进子与操纵子;6. λ 基因表达的调节;7. T 噬菌体的染色体结构与功能等。

(生物物理研究所情报室)