

天花粉蛋白的化学

VI. 用激光拉曼光谱研究天花粉蛋白的二级结构

方一行* 朱自莹 何大钧 田庚元

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海)

由天花粉蛋白的水和重水溶液的激光拉曼光谱, 测得酰胺 III 谱带 1240 cm^{-1} 和酰胺 I 谱带 $1632, 1660\text{ cm}^{-1}$ 对 CH_2 弯曲模式 1448 cm^{-1} 的强度比值. 按 Lippert 等建立的方程组作定量计算, 求得天花粉蛋白的二级结构含量为 α -螺旋 43.5%, β -折叠 31.3% 和无序 25.2%, 它们与 4 \AA 分辨率天花粉蛋白单晶 X 射线衍射法的结果相一致. 同时, 研究了上述溶液的冻干粉状固体的二级结构, 经过冻干, 使其中约 10% 的 β -折叠转变成无序构象, 而 α -螺旋含量无明显变化. 在水溶液中, 由测得的 I_{850}/I_{830} 比值计算, 天花粉蛋白中的酪氨酸残基约有 80% 呈“暴露式”.

激光拉曼光谱应用于蛋白质结构研究, 近十余年中已取得了明显成效, 它能提供许多结构信息^[1,2], 特别是酰胺 I 和 III 谱带对蛋白质的二级结构构象极为敏感, 并已研究成多种定量测试方法^[3~7]; 它适用于多种状态的样品测试, 是其他方法不能解决的. 天花粉蛋白是我国发现的一种具有终止妊娠作用的植物性球蛋白^[8,9], 我们已测得它的粉末固体的激光拉曼光谱, 对有关结构和组成氨基酸的信息谱带作了初步讨论^[10]. 为了深入研究它的二级结构和不同状态时的构象变化, 再次用激光拉曼光谱对它作进一步的研究, 求得的二级结构含量与 4 \AA 分辨率 X 射线衍射法^[11] 的结果相一致. 经过冻干后的天花粉蛋白显示出约有 10% β -折叠转变成无序构象的变性现象, 而 α -螺旋无明显变化.

实 验

试样制备 取 150 mg 结晶天花粉蛋白^[12] 置于 5 mL 离心管中, 加入 2.5 mL 重蒸水 (或重水), 小心搅拌, 使结晶充分分散于溶剂中, 放入冰箱过夜. 次日离心 (4000 转/min) 25 min, 除去不溶物, 得无色透明溶液, 含量约 3%, pH 6.8.

将上述水和重水溶液分别放置于小试管中, 经真空冷冻干燥, 得天花粉蛋白冻干粉状固体.

光谱记录 使用 Ar^+ 激光光源, 激发波长采用 5145 \AA 或 4880 \AA , 测定溶液样品时所用功率为 180 mW; 测定固体样品时所用功率为 80 mW. 毛细管装样, 90°C 照射. 用 T-800 型激光拉曼光谱仪记录谱图, 光子计数, 时间常数 10 s, 扫描速度 $20\text{ cm}^{-1}/\text{min}$, 采集 $550\sim 1800\text{ cm}^{-1}$, 每谱重复记录五次, 每次测得的有关二级结构谱带的强度与五次平均值的差在 ± 0.05 以内.

结果与讨论

表 1 为天花粉蛋白水和重水溶液及它们的冻干粉的主要拉曼光谱数据。在水溶液的谱中, 它的酰胺 I 受到 H_2O 散射强谱带干扰, 但可观察到酰胺 III 宽谱带, 其中有表征 α -螺旋的 $1275, 1255\text{ cm}^{-1}$ 谱带和表征 β -折叠的 1240 cm^{-1} 肩峰。由重水溶液谱, 在酰胺 I 宽谱带中出现表征 β -折叠和无序的 $1670, 1660\text{ cm}^{-1}$ 谱峰和 α -螺旋的 1655 cm^{-1} 谱峰, 而原酰胺 III 区域由 D_2O 强散射干扰, 氘代的酰胺 III 位移至 $930\sim 960\text{ cm}^{-1}$ 范围, 呈强的宽谱带, 其中 930 cm^{-1} 表征 α -螺旋构型, 960 cm^{-1} 谱带归属为无序的 $C-C_\alpha-N$ 骨架振动。

表 1 天花粉蛋白水和重水溶液及冻干(水)和(重水)粉的主要拉曼谱带*

$\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$				指 定
水	重水	冻干(水)	冻干(重水)	
	1660(7.96)	1667	1660(8.15)	酰胺 I (β 和无序结构)
	1650	1655	1655	酰胺 I (α -螺旋结构)
	1632(6.64)	1632	1632(6.09)	
	1615	1610	1608	酪氨酸残基
1448(10.00)	1448(10.00)	1448(10.00)	1448(10.00)	CH_2 弯曲振动
1332	1335	1335	1335	CH_2 弯曲振动
1275		1263		酰胺 III (α -螺旋结构)
1255		1250	1254	酰胺 III (β 和无序结构)
1240(5.90)		1240(5.54)		
		1205	1203	
1127	1127	1165	1124	C—N 振动
		1148		
		1095		
1028	1028	1027	1029	
1000	1002	998	1000	苯丙氨酸残基
955	960	956	952	C—C $_{\alpha}$ —CN 骨架振动
	924	921	924	
850	850	846	844	酪氨酸残基
826	826	822	822	
642	640	627		酪氨酸残基
622	618	618		苯丙氨酸残基

* 表中括号内的数字为谱带强度, 用作二级结构的计算。

用拉曼光谱定量测定蛋白质的二级结构, 自1976年以来已创立了多种计算方法^[3~7], 其中 Lippert 等人^[4]建立的方法是用聚-L-赖氨酸的三种构象为模型, 将 1240 cm^{-1} 和 1660 cm^{-1} 表征 β -折叠和无序构象, 1632 cm^{-1} 为 α -螺旋构象, 列出如下的四阶联立方程组:

$$C_{\text{蛋白质}}^{I_{1240}} I_{1240}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1240}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1240}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1240}^{\text{R}} \quad (1)$$

$$C_{\text{蛋白质}}^{I_{1632}} I_{1632}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1632}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1632}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1632}^{\text{R}} \quad (2)$$

$$C_{\text{蛋白质}}^{I_{1660}} I_{1660}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1660}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1660}^{\beta} + f_{\text{R}} I_{1660}^{\text{R}} \quad (3)$$

$$f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{\text{R}} = 1 \quad (4)$$

其中, $I_{1240}^{\text{蛋白质}}$ ($I_{1632}^{\text{蛋白质}}$, $I_{1660}^{\text{蛋白质}}$) 为被测蛋白质水(重水)溶液拉曼光谱中 1240 cm^{-1} ($1632, 1660$) 谱带的强度与 CH_2 弯曲模式 1448 cm^{-1} 强度的比值; I_{1240}^{α} (I_{1632}^{β} , I_{1660}^{R}) 为聚-L-赖氨酸的三种构象与 CH_2 模式 1448 cm^{-1} 的强度比值; f_{α} , f_{β} , f_{R} 分别代表被测蛋白质的 α -螺旋, β -折叠和无序的百分比组成; $C_{\text{蛋白质}}$ 是被测蛋白质 CH_2 模式比例常数. 该计算方程组建立后, 已对十余种天然蛋白质进行了二级结构定量计算, 取得了与 X 射线衍射法相一致的结果^[4, 13, 14] 我们认为该方法虽不如 Williams 等人^[6] 的方法可以定量地鉴别有序、无序螺旋、平行和反平行折叠、反转等多种构型, 但它是比较简便和基本有效的. 表 2 列出聚-L-赖氨酸三种构象的酰胺谱带 ($1240, 1632, 1660\text{ cm}^{-1}$) 对 CH_2 1448 cm^{-1} 模式的相对强度数据, 它是 Lippert 等的修正值^[4], 它切合用于天花粉蛋白, 因天花粉蛋白酰胺 I 中最高峰值低于模型聚-L-赖氨酸约 5 cm^{-1} . 用表 1 数据按 Lippert 等的方程组作定量计算, 求得天花粉蛋白的二级结构含 α -螺旋 43.5%, β -折叠 31.3%, 无序 25.2%. 表 3 列出本工作和 X 射线衍射法^[11], 圆二色性 (CD) 法^[15] 对天花粉蛋白二级结构测定的结果, 它表明拉曼光谱法与 4 \AA 分辨率的 X 射线衍射法更为一致. 按同理, 我们计算了由天花粉蛋白水和重水溶液经真空冻干的固体粉末的二级结构, 它们是 α -螺旋 42.3%, β -折叠 22.2%, 无序 35.5%. 这是因为, 当天花粉蛋白质溶液经过冻干这个过程显示出它的二级结构发生了部分变化, 其中有 10% β -折叠转变成无序构象, 而 α -螺旋无明显变化.

在多肽和蛋白质的拉曼光谱中, 谱带 850 cm^{-1} 和 830 cm^{-1} 是酪氨酸残基的对位取代苯的

表 2 聚-L-赖氨酸和天花粉蛋白三种构型的拉曼强度对 1448 cm^{-1} 谱带强度的比值

	水 溶 液	重 水 溶 液	
	1240 cm^{-1}	1632 cm^{-1}	1660 cm^{-1}
聚-L-赖氨酸, α -螺旋*	0.00	0.80	0.55
聚-L-赖氨酸, β -折叠*	1.20	0.72	0.88
聚-L-赖氨酸, 无序*	0.60	0.08	0.78
天花粉蛋白	0.59	0.644	0.796
天花粉蛋白冻干粉	0.554	0.609	0.815

* 数据取自文献[4]中的表 II.

表 3 拉曼光谱、X 射线衍射、圆二色性法测定天花粉蛋白二级结构的比较

		全 残 基 百 分 率			比 例 常 数	备 注
		α -螺旋	β -折叠	无 序		
拉 曼	溶 液	43.5	31.3	25.2	0.89	本文
	冻 干 粉	42.3	22.2	35.5	0.86	本文
X 射线衍射 (4 \AA)		39	32	29		文献[11]
圆二色性 (CD)		24	30	46		文献[16]

有关振动。由于环的呼吸振动和面外弯曲振动倍频之间的费米共振，它们总是成对地出现，而且这两谱带的强度比，表征着酪氨酸残基所处环境，并定量地表示它呈“暴露式”或“埋入式”^[16]。我们测得天花粉蛋白水溶液的 I_{850}/I_{830} 比值为 1.10，天花粉蛋白中含有 13 个酪氨酸^[17,18]，由公式 $0.5N_{(\text{埋入})} + 1.25N_{(\text{暴露})} = I_{850}/I_{830}$ 计算^[15]，约有 10 个 (~80%) 呈“暴露式”状态。

参 考 文 献

- [1] Tu, A. T., "Raman Spectroscopy in Biology", John Wiley & Sons, New York, 1982, p. 56.
- [2] Corey, P. R., "Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopy", Academic, New York, 1982, p. 71.
- [3] Pézolet, M.; Pigeon-Gosselin, M.; Coulombe, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *453*, 502.
- [4] Lippert, J. L.; Tyminski, D.; Desneules, P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 7075.
- [5] Williams, R. W.; Cutrera, T.; Dunker, A. K.; Peticolas, W. L., *FEBS. Lett.*, **1980**, *115*, 306.
- [6] Williams, R. W.; Dunker, A. K.; Peticolas, W. L., *Biophys. J.*, **1980**, *32*, 232.
- [7] Peticolas, W. L.; Cutrera, T.; Rodgers, G. R., *Biomol. Struct. Conform. Funct. Evol. Int. Symp.*, **1981**, *2*, 45.
- [8] 金善炜, 孙孝先, 汪绍福, 田庚元, 顾梓伟, 钱薇薇, 刘寅曾, 余维扬, 钱瑞卿, 汪猷, 化学学报, **1981**, *39*, 917.
- [9] 潘克桢, 张永茂, 林玉娟, 郑安, 陈元柱, 董贻诚, 陈世芝, 吴仲, 马星奇, 王耀萍, 伍伯牧, 龚士琦, 夏宗芾, 田庚元, 范肇昌, 倪朝周, 马益权, 孙孝先, 中国科学(B 辑), **1982**, 521.
- [10] 朱自莹, 方一行, 何大钧, 有机化学, **1984**, 373.
- [11] 潘克桢, 董贻诚, 夏宗芾, 中国科学(B 辑)待发表.
- [12] 天花粉蛋白研究协作组, 科学通报, **1978**, *23*, 176.
- [13] Craig, W. S.; Gaber, B. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 4130.
- [14] Bailey, G. S.; Loe, J.; Tu, A. T., *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 8922.
- [15] Siamwiza, M. N.; Lord, R. C.; Chen, M. C.; Takamatsu, T.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T., *Biochemistry*, **1975**, *14*, 4870.
- [16] 庄培其, 高宪成, 张永茂, 结构化学, **1983**, *2*, 47.
- [17] 钱瑞卿, 顾梓伟, 张秀兰, 朱仕钦, 张文勤, 傅瑶红, 翁秋璇, 吴元伟, 刘永福, 徐珊珍, 金善炜, 田庚元, 汪猷, 化学学报, **1981**, *39*, 927.
- [18] 汪猷, 待发表.

CHEMISTRY OF TRICHOSANTHIN

VI. DETERMINATION OF THE SECONDARY STRUCTURE OF TRICHOSANTHIN BY LASER RAMAN SPECTROSCOPY

FANG YI-XING* ZHU ZI-YING HE DA-JUN TIAN GENG-YUAN

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

ABSTRACT

The Raman spectral intensities of trichosanthin at the conformation sensitive frequency 1240 cm^{-1} in H_2O (amide III) and 1632 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} in D_2O (amide I) relative to the intensity of 1448 cm^{-1} methylene band was measured. The secondary structural content of trichosanthin was calculated according to the method developed by Lippert et al: 43.5% for α -helix, 31.3% for β -sheet and 25.2% for disordered. Those values are in agreement with the results of X-ray crystal analysis of 4 \AA resolution. Lyophilized powder of the above trichosanthin solution are measured by the same method. It indicates that about 10% β -sheet was changed to the disordered conformation and α -helix content remains unchanged.

In aqueous solution, quantitative treatment of Raman data proved that about 80% tyrosine residues are "exposed".