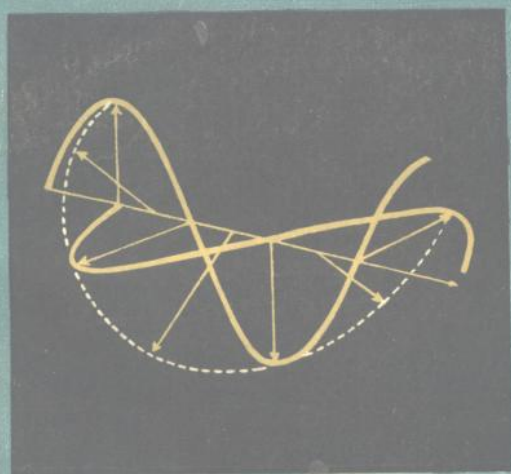


圆二色性和旋光色散在 分子生物学中的应用

鲁子贤 崔 涛 施庆洛 编著



科学出版社

58-17
777

圆二色性和旋光色散 在分子生物学中的应用

鲁子贤 崔 涛 施庆洛 编著

21548 / 11



内 容 简 介

圆二色性(CD)和旋光色散(ORD)是两种研究生物大分子不对称的立体结构的非常有用的技术,它们的原理紧密相关。本书介绍了这两种技术的基本原理。在此基础上,着重介绍了如何利用这两种技术去研究蛋白质、多肽、核酸和寡核苷酸等的立体结构的方法。在详细讨论了研究这些分子的立体结构的方法外,还列举了各种典型的和非典型的图谱,以便读者易于了解和掌握这些技术,开展结构和结构变化的研究。本书还简单介绍了有关的仪器情况。可供分子生物学和生物化学工作者参考,也可供高等学校有关专业的师生和研究生阅读。

圆二色性和旋光色散 在分子生物学中的应用

鲁子贤 崔 涛 施庆洛 编著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年10月第一版 开本: 850×1168 1/32

1987年10月第一次印刷 印张: 6

印数: 0001—1,850 字数: 155,000

统一书号: 13031·3918

本社书号: 4601·13-10

定价: 1.75元

序 言

各类生物大分子最重要特征之一是具有特定的构象。如多肽和蛋白质的 α 螺旋、 β 折叠；多聚核苷酸及核酸的单股、双股、三股螺旋；以及一些糖的螺旋结构。这些特定的构象是它们表达生物功能的结构基础。测定生物大分子的这种结构并联系功能研究它们的变化，对了解这些分子如何表现功能有重要作用，是近年来分子生物学领域中吸引人们注意的问题。

在研究生物大分子的构象方法中，X 射线衍射法虽然对蛋白质的构象能提供最详细的资料，但仅能在晶体状态下了解分子结构，有它的局限性，因此需要有研究溶液构象的方法配合。圆二色性 (circular dichroism, 简称 CD) 和旋光色散 (optical rotatory dispersion, 简称 ORD) 是研究分子结构不对称性的方法，可用来检测生物大分子样品在溶液状态下的构象，是一种比较成熟的测定溶液中生物高分子构象的方法。

早在十七世纪 Huggens 就发现了偏振光，直到十九世纪才被用来研究分子的旋光现象。Biot 于 1881 年发现石英能使偏振光的偏振面旋转，在松节油等液体和某种气体中也有这种效应。Biot 在发现旋光现象的同时，在电气石中也观察到圆二色性。后来将旋光色散和圆二色性这两种现象的相互关系称为科顿效应。十九世纪中期许多旋光性的定律已经公式化了，这些定律对于十九世纪末有机立体化学和有机结构理论的发展都起了直接的推动作用。又过了将近一个世纪，1934 年 Lowry 发表了第一本完整的有关旋光色散的书，《Optical Rotatory Power》。直到 1953 年在 Djerassi 实验室里建立了第一台普通的偏振光检测仪后，旋光色散方法才广泛地用来研究有机分子和生物大分子。六十年代，圆二色性开始发展，当仪器的改进能测出远紫外区的信号时，圆

二色性就逐步取代了旋光色散方法，成为研究生物大分子溶液构象的有力工具。

本书将介绍圆二色性与旋光色散的基本原理、仪器以及在生物高分子研究中的应用情况。

目 录

序言	iii
第一章 光的偏振	1
§ 1-1 光波、谐振动及其合成	1
§ 1-2 偏振光、椭圆偏振及圆偏振	4
§ 1-3 旋光	9
§ 1-4 圆双折射	11
第二章 光的吸收	14
§ 2-1 Lambert-Beer 定律	14
§ 2-2 吸收光谱的结构基础	14
第三章 圆二色性及其与旋光色散的关系	19
§ 3-1 圆二色性	19
§ 3-2 圆二色性与旋光色散的单位	21
§ 3-3 光学活性和旋转强度	23
§ 3-4 Kronig-Kramer 转换式	28
第四章 用旋光色散研究蛋白质的构象	33
§ 4-1 蛋白质的立体结构的不对称性	33
§ 4-2 利用 Drude 公式测定蛋白质的螺旋度	35
§ 4-3 利用 Moffitt 公式测定蛋白质的螺旋度	41
§ 4-4 肽键的科顿效应	45
第五章 氨基酸和肽的圆二色性	50
§ 5-1 氨基酸的圆二色谱	50
§ 5-2 肽的圆二色谱	57
第六章 用圆二色谱研究蛋白质	74
§ 6-1 多聚氨基酸的远紫外圆二色谱	75
§ 6-2 蛋白质远紫外圆二色谱	

——单值计算 α 螺旋含量	79
§ 6-3 用远紫外圆二色谱计算蛋白质的构象含量	82
第七章 各种蛋白质的圆二色性	92
§ 7-1 高 α 螺旋度的蛋白质的圆二色谱	92
§ 7-2 高 β 折叠的蛋白质的圆二色谱	104
§ 7-3 α 螺旋和 β 折叠都较多的蛋白质	111
§ 7-4 全无规卷曲的蛋白质的圆二色谱	113
§ 7-5 远紫外圆二色谱异常的蛋白质	115
§ 7-6 膜蛋白和病毒的远紫外圆二色谱	122
第八章 核酸的圆二色性	134
§ 8-1 核酸光学活性的基础	134
§ 8-2 圆二色谱和核酸的结构	143
§ 8-3 核酸圆二色谱的一般实验考虑	156
第九章 旋光仪和圆二色仪	161
§ 9-1 光源、起偏器及单色器	161
§ 9-2 调制器	164
§ 9-3 商品仪器	166
附录一 书中主要符号的定义	168
附录二 旋光色散与圆二色性部分参数表	172
附录三 蛋白质中各构象元及生色团的圆二色性特征	185

第一章 光的偏振

§ 1-1 光波、谐振动及其合成

光具有波、粒二重性，光波是电磁波的一种特殊形式。它们在真空中的传播速度为 3×10^{10} 厘米/秒。电磁波包含电场矢量 E 和磁场矢量 H 这两个振动。这两个矢量以相同的位相在两个相互垂直的平面内振动。而传播速度 V 的方向又与 E 和 H 垂直。就 E 或 H 来看，光是一种横波，如图 1-1。电磁波的波长范围是极宽的，通常根据不同的波长范围的电磁波显示不同的现象，有不同的应用，大致如图 1-2 所示。

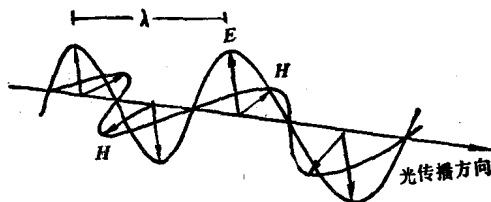


图 1-1 光波
 E ，电矢量； H ，磁矢量； λ ，波长。

可以将光的运动看成是光量子的简谐运动。如有两个简谐振动，它们的频率相同，但振动方向互相垂直。它们的前进方向都是 Z 轴，而各自的振动面都分别与 X - Y 或 Y - Z 平面叠合。这两个谐振动可以用下列两式表示：

$$X = A_x \cos(\omega t + \psi_1) \quad (1.1)$$

$$Y = A_y \cos(\omega t + \psi_2) \quad (1.2)$$

式中 ω 是角频率， t 是时间， A_x ， A_y 分别是两个谐振最大振幅的绝对值。 X 和 Y 分别是 t 时刻谐振在相应轴上的振幅，是矢量。

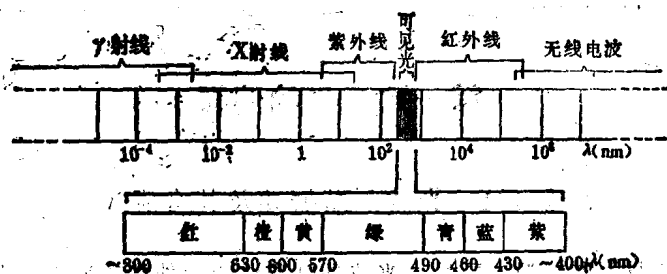


图 1-2 各波段的波长范围

ψ_1 与 ψ_2 是初位相。

两个简谐运动可以合成为一个同频率、同位相的谐振动。综合的谐振的振幅如投影到 X—Y 平面上，振幅端点的运动轨迹方程可以将式 (1.1) 与 (1.2) 合并消去 t 而得到

$$\frac{x^2}{A_x^2} + \frac{y^2}{A_y^2} - 2 \frac{x}{A_x} \cdot \frac{y}{A_y} \cos(\psi_2 - \psi_1) = \sin^2(\psi_2 - \psi_1) \quad (1.3)$$

一般地说，式(1.3) 是一个椭圆方程。因此上述简谐运动合成的结果成为一个椭圆运动。椭圆的形状由相差 $(\psi_2 - \psi_1)$ 决定。当 $\psi_2 - \psi_1 = \pm 2n\pi$, $n=0, 1, 2, \dots$ 时，式 (1.3) 变成一直线方程，

合成的谐振是直线的谐振。当相差 $\psi_2 - \psi_1 = \pm \frac{(2n+1)}{2} \pi$, $n=0,$

1, 2, $\dots$ ，并 $|A_x| = |A_y|$ 时，合成的谐振动是一圆运动。一个质点绕一直线作圆周运动前进时，其旋转方向有左手旋转和右手旋转两种，如图 1-3。

上述合成的圆谐振中 $\psi_2 - \psi_1 = + \frac{(2n+1)}{2} \pi$ 和 $\psi_2 - \psi_1$

$= - \frac{(2n+1)}{2} \pi$ 正好是旋转方向相反的两种圆谐振。

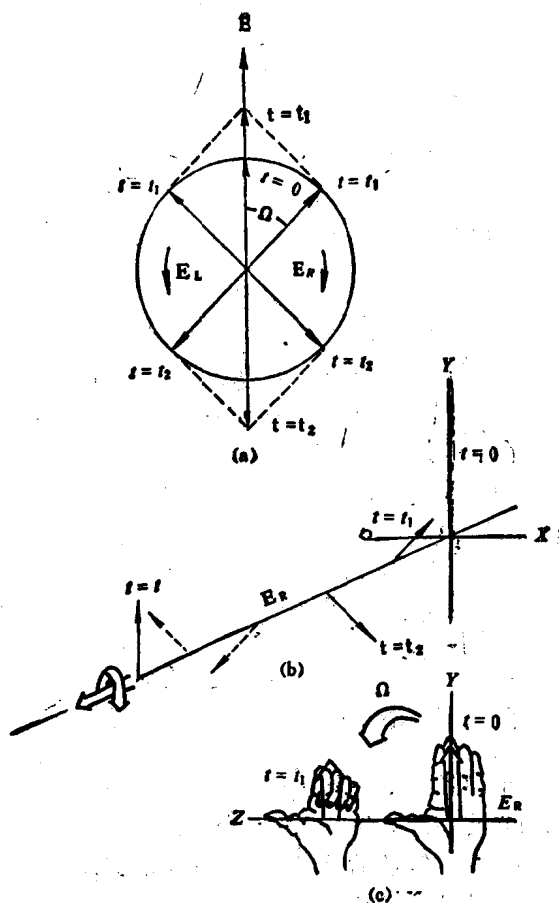


图 1-3 (a) 平面偏振光振动矢量 E 在不同时刻 (t) 时的平面图。 E 运动垂直于纸平面并朝向读者。 E 可被认为是两个电矢量相干叠加的结果。一个 E_L 为左圆偏振光，另一个 E_R 为右圆偏振光。

(b) E_R 在不同时刻的示意图。在 $t=0$ 和 $t=T$ 之间， E_R 向 Z 轴下面运动。 T 是周期，相当于 $1/\gamma$ ， γ 是光频率。矢量箭头虚线表示在 YZ 平面后面。

(c) 用左和右来描述圆偏振光是不准确的，因为 E_L 表征了一个右手螺旋，它向 Z 轴下面运动。而 E_R 是一左手螺旋。(c) 图中用左手来表示 E_R 。首先，四指伸向 E_R 的方向 (这时 $t=0$)，拇指伸向 Z 轴。达到第二个矢量 (此时 $t=t_1$) 时，四指弯曲通过两个矢量之间的夹角 Ω 。如果这个角是两个矢量所能夹的角中最小的，即表现为一个左手螺旋。在这时， Ω 与 $2\pi - \Omega$ 正好相反。

§ 1-2 偏振光、椭圆偏振及圆偏振

先看一束光通过电气石晶体的现象。从电气石晶体切出一个晶片，晶片的面平行于晶体内主晶轴方向。使一束自然光沿垂直晶片平面的方向通过晶片。同时，让晶体绕入射光方向旋转，可看到透射光的强度不变。如在光线路径上再放上第二个同样的晶片，它的晶面与第一个晶片的晶面平行（如图1-4），并使两个晶片之一绕光线方向旋转，可观察到透射光强度随着旋转而有变化。当两个晶片的晶轴相互平行时，透射光的强度最大；而两个晶片的晶轴相互垂直时，透射光的强度为零；当两个晶片的晶轴的夹角为 α 时，透射光的强度与 $\cos^2\alpha$ 成正比。

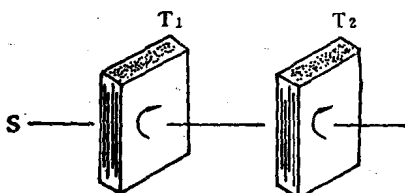


图 1-4 光通过电气石晶片的偏振

发光体辐射的光波是这个物体中大量分子和原子辐射出来的电磁波的混和光波。由于分子或原子辐射过程的间歇性，每一瞬时光波上在某一点的矢量 E 和 H 仍相互保持垂直，并垂直于光的传播方向，但是 E （和 H ）的振动方向都经常迅速而极不规则地改变。在任何时刻， E （和 H ）在垂直于波前进方向的平面 P 上，如图1-5，可以取所有可能的方向，而且没有一个方向较其它方向占优势。这种光称为自然光，光波中产生的感光作用主要是由电场 E 引起的，因此一般就把电场矢量 E 作为光波的振动矢量。振动矢量与光波传播方向所决定的平面叫做振动面，自然光的振动面是迅速地、极不规则而随机地变化着的。

当自然光入射到电气石晶片时，晶片强烈地吸收振动面与晶

轴垂直的光波，而只允许振动面平行于晶轴的光波通过。因此通过晶片的光就变为具有一定振动面（与晶轴平行）的光，叫做平面偏振光或线偏振光。自然光经过某种晶体后振动面成为特定的，这种现象称为光的偏振。

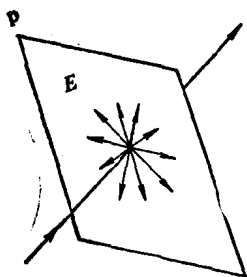


图 1-5 自然光中电场矢量的方向
 E 是光的电场矢量， P 是与光传播方向垂直的平面。

在图 1-4 中， T_1 将自然光变为偏振光，叫做起偏器，透射的偏振面与 T_1 的晶轴平行。当偏振光射至 T_2 时，通过 T_2 的光的强度与这两个晶片的晶轴夹角 α 有关。故 T_2 起检查偏振光的作用，叫做检偏器。

菲涅耳公式及布儒斯特角

当一束光射到两种介质的界面上时，会引起反射和折射，如图 1-6。反射光和折射光的偏振情况与入射光是不同的。如入射光、反射光和折射光的电矢量振幅分别是 E_0 、 E_1 及 E_2 ，它们与三束光所成的平面（入射面）垂直的分量各是 $E_{0,\perp}$ 、 $E_{1,\perp}$ 及 $E_{2,\perp}$ ，与入射面平行的分量各是 $E_{0,\parallel}$ 、 $E_{1,\parallel}$ 及 $E_{2,\parallel}$ 。如入射角、反射角及折射角各是 i_0 、 i_1 及 i_2 ，入射光和反射光所经的介质的折射率是 n_1 ，折射光所经的介质的折射率是 n_2 ，菲耳涅于1823年证明，这些参数间有下列关系：

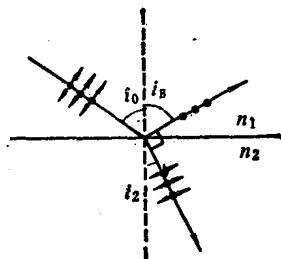


图 1-6 布儒斯特角示意图
 i_0 是入射角， i_B 是布儒斯特角（ $=i_0$ ）
 i_2 是折射角， $i_B + i_2 = \pi/2$ 。图中入射角是自然光，有各种偏振方向。折射光是部分偏振光。反射光是全平面偏振光，其偏振面与纸面垂直。

$$E_{1, \parallel} = \frac{n_2 \cos i_0 - n_1 \cos i_2}{n_2 \cos i_0 + n_1 \cos i_2} \cdot E_{0, \parallel} = \frac{\operatorname{tg}(i_0 - i_2)}{\operatorname{tg}(i_0 + i_2)} E_{0, \parallel} \quad (1.4a)$$

$$E_{1, \perp} = \frac{n_1 \cos i_0 - n_2 \cos i_2}{n_1 \cos i_0 + n_2 \cos i_2} \cdot E_{0, \perp} = - \frac{\sin(i_0 - i_2)}{\sin(i_0 + i_2)} \cdot E_{0, \perp} \quad (1.4b)$$

$$E_{2, \parallel} = \frac{2n_1 \cos i_0}{n_2 \cos i_0 + n_1 \cos i_2} \cdot E_{0, \parallel} = \frac{2 \sin i_2 \cdot \cos i_0}{\sin(i_0 + i_2) \cdot \cos(i_0 - i_2)} \cdot E_{0, \parallel} \quad (1.4c)$$

$$E_{2, \perp} = \frac{2n_1 \cos i_0}{n_1 \cos i_0 + n_2 \cos i_2} \cdot E_{0, \perp} = \frac{2 \sin i_2 \cdot \cos i_0}{\sin(i_0 + i_2)} \cdot E_{0, \perp} \quad (1.4d)$$

因此将此四个公式称为菲涅耳公式。从中可以看出, $E_{1, \parallel}/E_{1, \perp}$ 及 $E_{2, \parallel}/E_{2, \perp}$ 二者与 $E_{0, \parallel}/E_{0, \perp}$ 的比值都不同, 即与入射光的偏振性质比, 其余二者都是不一样的。

从式 (1-4a) 看, 当 $i_0 + i_2 = \pi/2$, $\operatorname{tg}(i_0 + i_2) = \infty$, 此时 $E_{1, \parallel} = 0$ 。即反射光中, 平行于入射面的电矢量等于零。因此反射光是电矢量与入射面垂直的平面偏振光。如此时的入射角 $i_0 = i_B$, 则

$$\begin{aligned} \sin i_2 &= \sin\left(\frac{\pi}{2} - i_B\right) = \cos i_B, \text{ 于是根据折射定律, 可以有} \\ n_1 \sin i_B &= n_2 \cos i_B \\ \therefore \frac{n_2}{n_1} &= \frac{\sin i_B}{\cos i_B} = \operatorname{tg} i_B \end{aligned} \quad (1.5)$$

i_B 这一特殊的角度称布儒斯特角。实验证明, 入射光以布儒斯特角射到两相界面上时, 反射光是平面偏振光。因此可以利用物质的这一特性来制造起偏器。

双折射现象

由一束光经各向同性介质 (如玻璃) 所产生的折射光只有一束; 而对于光学性质随方向而异, 即各向异性的一些晶体 (或其它状态的介质), 一束入射光常分解为两束折射光, 这种现象称

为双折射。

双折射效应产生的两束光性质不同，其中之一在晶体内的传播方向遵守折射定律，这个光称为寻常光，简写作 o 光；另一条光线在晶体内的进行方向与折射定律不符，这种光称为非寻常光，简写作 e 光。研究 o 光和 e 光的结果发现，这两种光都是线偏振光，不过它们的电矢量的振动方向不同。o 光是一个电矢量的振动方向垂直于自己的主截面（即包含晶体光轴和光前进方向所夹成的平面）的平面偏振光；e 光则为电矢量的方向在自己的主截面内的平面偏振光。

在某些晶体内，o 光和 e 光被晶体吸收的程度有很大的不同。电气石是一种晶体，它对 o 光有强烈的吸收作用，而对 e 光则吸收得很少。于是当自然光射在电气石晶片上时，在晶体内所产生的 o 光和 e 光受到不同的吸收，在很短的路程上 o 光会全部被吸收。因而透射的光是与晶体内 e 光相应的线偏振光。电气石对 o 光和 e 光的不同吸收现象称为晶体的二色性（dichroism）。除电气石外，已知还有一些有机化合物晶体，如碘化硫酸奎定亦有二色性。

双折射产生的 o 光和 e 光是两束频率相同而振动方向相互垂直的平面偏振光。如有一各向异性的晶体，它的表面与该晶体的光轴平行。有一束平面偏振光以与晶体表面垂直的方向射入晶体，其偏振面与晶体的光轴夹 θ 角，如图 1-7。当入射光的振幅是 E ，寻常光和非常光的振幅 E_o 和 E_e 将是

$$E_o = E \sin \theta$$

$$E_e = E \cos \theta.$$

由于两束光在介质内的传播速度不同，因此在晶体内两列光波的振动将是

$$E_o = E_o \cos \left[2\pi \left(\frac{t}{T} - \frac{r}{\lambda_o} \right) \right]$$

$$E_e = E_e \cos \left[2\pi \left(\frac{t}{T} - \frac{r}{\lambda_e} \right) \right]$$

这里, λ_e 和 λ_o 是非寻常光和寻常光在晶体中的波长, r 表示光在晶体中所经的光程, E_o 和 E_e 是在 t 时的振幅。从式 (1.3) 可知, 两束光的位相差是

$$\begin{aligned}\Delta\varphi &= \varphi_e - \varphi_o = 2\pi \left(\frac{t}{T} - \frac{r}{\lambda_e} \right) - 2\pi \left(\frac{t}{T} - \frac{r}{\lambda_o} \right) \\ &= 2\pi r \left(\frac{1}{\lambda_o} - \frac{1}{\lambda_e} \right)\end{aligned}$$

但有下列关系:

$$n_e = \frac{c}{v_e} = \frac{\lambda}{\lambda_e}$$

$$n_o = \frac{c}{v_o} = \frac{\lambda}{\lambda_o}$$

此中 v_o 和 v_e 是相应光在晶体中的速度, λ 是光在真空中的波长, n_e 和 n_o 是相对于两束光的折射率。于是有

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi r}{\lambda} (n_o - n_e)$$

如晶体厚度是 l , 则两束光离开晶体后, 维持一恒定的相差是

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi l}{\lambda} (n_o - n_e) \quad (1.6)$$

由此可见, 两束光在离开晶体时合成的椭圆偏振光的长短轴取向和形状取决于两种折射率的差、晶体的厚度及入射光的波长。这些关系可以用图形表示如图 1-8。

四分之一波片

能使寻常光和非寻常光的光程相差 $\lambda/4$ 的晶片称为四分之一波片。从式 (1.6) 可知其厚度应是

$$l = \lambda/4(n_o - n_e) \quad (1.7)$$

此时 $\Delta\varphi = \pi/2$ ，所以透射的合成光是长轴与光轴重叠的正椭圆偏振光。

假如射入四分之一波片的平面偏振光的偏振面与光轴夹成 45° 角，则 $E_o = E_e$ 。因此透射的合成光就是圆偏振光。四分之一波片是产生圆偏振光的重要器件。

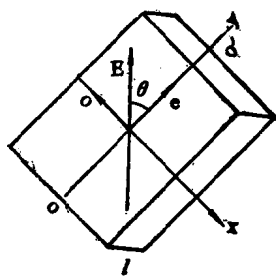


图 1-7 平面偏振光射入各向异性晶体中 E 是入射的平面偏振光的电矢量，它与晶轴 OO' 夹 θ 角。 e 与 o 是 E 分解的非寻常光与寻常光。

但一般只能制成 $(2k+1) \cdot \frac{\lambda}{4}$ 的晶片，其中 k 是任意正整数。

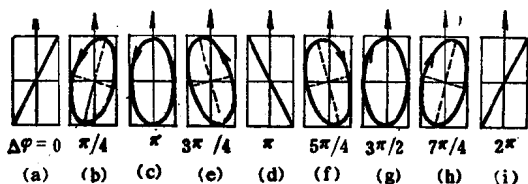


图 1-8 非常光和寻常光的相差和合成椭圆偏振光的关系
 $\Delta\varphi$ 为非常光和寻常光的相差

§ 1-3 旋 光

光在晶体内沿其光轴方向的传播应该象在各向同性的均匀介质中传播一样，不产生双折射。但对某些晶体如石英或某些物质的溶液，当平面偏振光沿其光轴方向传播时，出射光虽然仍为平面偏振光，但其振动面相对于原入射光的振动面旋转了一个角度，如图 1-9，这种现象称为偏振光振动面的旋转或旋光。能使偏振面旋转的物质称为旋光性物质或光学活性物质。

设 α 为有旋光性质的介质对于某一单色的平面偏振光所产生的振动面的旋转角度，由实验得知，它正比于光在该介质中所走

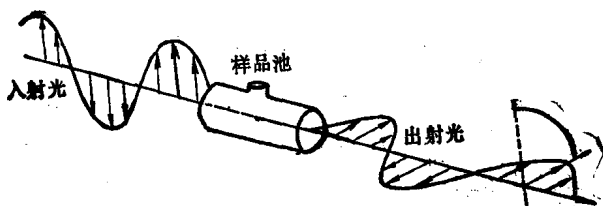


图 1-9 旋光现象

入射光是平面偏振光，由于样品溶液是右旋的，使出射光虽仍为平面偏振光，但振动平面偏转了一个角度 α 。

的路程。对于有旋光性物质的溶液，旋转角度 α 除与路程长度有关外，还正比于溶液中旋光性物质的浓度 C ，因此有：

$$\alpha = [\alpha] l C \quad (1.8)$$

$$\text{即} \quad [\alpha] = \frac{\alpha}{l C} \quad (1.9)$$

式中 $[\alpha]$ 为比例常数，称为介质的旋光率，单位是度·厘米²·10克⁻¹。对于同一介质， $[\alpha]$ 值与偏振光的波长有关，也就是说，对于给定光的路径长度的旋光介质，不同波长的偏振光的旋转角度不同。旋光率与波长的这种关系称为旋光色散。固体介质的旋光率 $[\alpha]$ 在数值上等于单位光径长度的旋光介质所引起的偏振光振动面的旋转角度；溶液的旋光率在数值上等于单位光程长度（一般采用1分米为长度单位）单位浓度所引起的偏振面旋转的角度。

此外偏振光偏振面的旋转具有方向性。如面对光的入射，有些光学活性物质使迎射来的光线偏振面沿顺时针方向旋转，称为右旋；而另一些光学活性介质，使迎射来的光线的偏振面沿逆时针的方向旋转，称为左旋，见图1-10。通常右旋用正号表示，左旋用负号表示。

* $[\alpha]$ 常被定义为 $[\alpha] = \frac{100\alpha}{l C}$ ，浓度 C 取单位克/100毫升，此时 $[\alpha]$ 的量纲是度·厘米²·克⁻¹。各家选用的旋光单位及符号不一致，请注意。