

中国生物物理学会

第五届全国生物物理学学术会议

论文摘要汇编



浙江 杭州
一九八六年十月

一、第三届全国会员代表大会
与第五届全国生物物理学术会议日程

8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	2:00	3:00	4:00	5:00	5:30	7:00	
日 期	上 午					下 午					晚
10月20日 星期一	报 到					报 到					第二届理事 会全体会议
10月21日 星期二		开 幕 式	综 述 报 告			分 组 交 流		综 述 报 告			
10月22日 星期三	分 组 交 流					墙 报 展 讲		综 述 报 告			
10月23日 星期四	分 组 交 流					选 举 理事 会 (投票)	墙 报 展 讲			第三届理事 会全体会议	
10月24日 星期五	分 组 交 流					闭 幕 式					
10月25日 星期六	机 动					机 动					

二 全国自由基生物学与自由基医学

学 术 讨 论 会 日 程

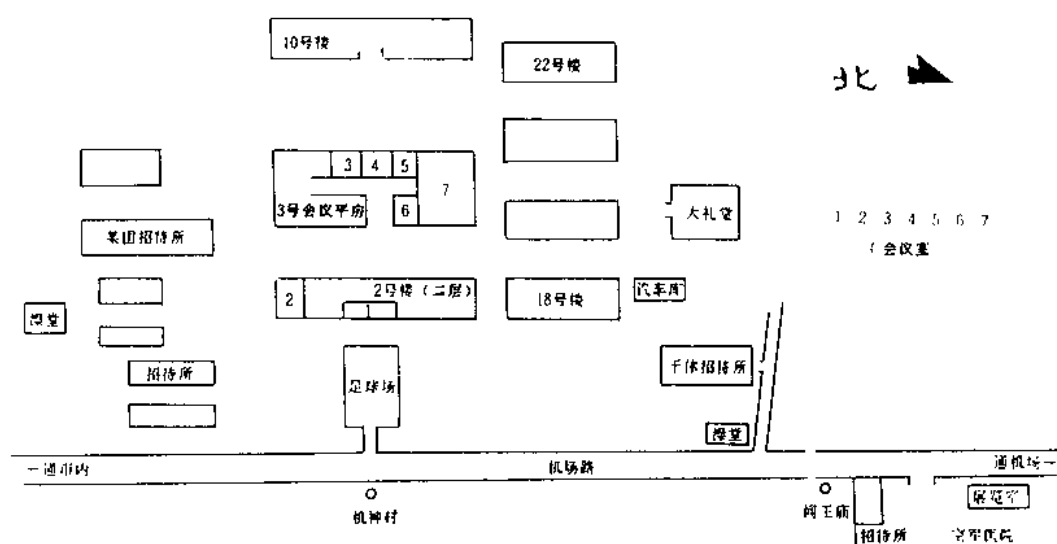
8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	2:00	3:00	4:00	5:00	5:30	7:00
日 期	上 午				下 午				晚	
10月27日 星期一	报 到				报 到				予 备 会	
10月28日 星期二	开幕式	大 会 报 告			分 组 交 流					
10月29日 星期三	大 会 报 告				分 组 交 流		自由发 言闭幕			
10月30日 星期四	机 动				机 动					

三、第二次全国生物电磁学学术讨论会日程

	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	2:00	3:00	4:00	5:00	7:00	
日 期	上 午					下 午					晚
10月27日 星期一	报 到					报 到					予 备 会
10月28日 星期二	开 幕	大 会 报 告				大 会 报 告					
10月29日 星期三	分 组 交 流					分 组 交 流				闭 幕	
10月30日 星期四	机 动					机 动					

四、生物物理学科普工作讨论会将在同一会址召开。

五、生物物理学教材讨论会十月二十六、二十七在同一会址召开。



会场示意图

因时间有限,本论文集的编辑、印刷均较仓促,论文集内出现的错误还望读者提出批评、建议,以利今後。

中国生物物理学会
办公室
一九八六年十月

目 录

A. 01-050 分子生物物理	(1)
B. 01-084 膜与细胞生物物理	(25)
C. 01-031 理论生物物理	(66)
D. 01-041 感官、神经、肌肉生物物理	(81)
E. 01-081 生物信息论与生物控制论 生物数学.....	(101)
F. 01-038 光生物学	(140)
G. 01-027 环境生物物理与辐射生物物理	(159)
H. 01-054 生物流变学与生物力学	(173)
I. 01-067 生物物理仪器与实验技术	(198)
J. 01-073	(232)
K. 01-097	(267)
L. 01-03	(315)

D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 的X射线衍射研究

林敬烟 李 军 高义贵
宋时英 梁树坚 邹承鲁
中国科学院 生物物理所

D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(简称GAPDH)是糖酵解代谢途径中一个关键酶,它与辅酶NAD⁺的结合,表现典型的变构效应。用X射线衍射方法阐明此酶催化与变构调节机制的结构基础是很有意义的。一直受到重视。廿年来,国外先后有许多实验室开展了不同种属GAPDH酶的晶体学研究。其中以嗜热脂肪芽孢杆菌和北美*Homarus Americanus*龙虾两种酶的研究比较深入。现在酶分子的总的肽链折叠模式,四个亚基的空间排列和催化及辅酶结合部位的某些结构特点已被人们所了解。变构调节的结构基础也已得到一些揭露。虽然如此,目前还有许多重要问题有待于深入研究。例如四个亚基的排列是具有严格的222对称性,还是只存在“二体的二体”的对称性关系?辅酶结合前后酶结构是否有较大的变化?是否都像嗜热脂肪芽孢杆菌酶那样两个结构域发生相对运动?当辅酶分子依次与四个亚基结合时,酶结构发生什么样的变化?这种变化又与协同作用有什么联系等等。这些问题还不甚清楚或各家结论不一致。

已经证明,在NAD⁺存在下,活性中心羧甲基化的GAPDH酶,经紫外光照射会生成一种新的荧光衍生物;反应是一种“半位”反应,与催化与变构机制密切相关。我们正在系统的进行光照酶以及全酶和羧甲基酶的结构分析,同时还开展缺NAD⁺的L₂的结构比较研究,期望对此酶催化与变构机制的结构基础作更多的了解。

我们以中国南海*P. Versicolor*龙虾酶为原料,生长出了适合X射线衍射用的上述各种酶的晶体。进行了空间群与晶胞参数的测定,收集了其中四种晶体的SA分辨率衍射数据,用分子置换技术完成了低分辨率的结构测定,获得了一些有意义的结构信息。

X射线衍射实验指出,全酶、羧甲基酶和光照酶晶体以及相应的缺NAD⁺酶即APO-酶、APO-羧甲基酶和APO-光照酶晶体均属同一晶型,而且晶胞参数很接近,最大差别不超过0.5Å,但可观察到明显的衍射强度的差异,这提示着活性部位的修饰、荧光衍生物生成反应以及辅酶的结合虽导致某种结构变化,但这种变化可能主要集中在远离分子表面的NAD⁺结合部位;辅酶NAD⁺的结合不大可能出现像嗜热脂肪芽孢杆菌酶那样幅度较大的涉及两个结构域相对运动的结构变化。

在我们的C2晶型中,酶分子坐落在晶体学二重轴上。根据已经建立的结构模型,红与黄亚基,兰与绿亚基结构上应当分别是等价的。我们曾对红黄与兰绿两对亚基之间结构是否等同作了初步探索。(1)在hol特微图上观察到假对称性联系的某些反射的强度不是严格相等的。定量的计算证实了这一点;假对称反射的偏离因子R_{pseudosym}为对称性反射的偏离因子R_{sym}的两倍。(2)自身旋转函数的计算表明,旋转函数峰值只有原点峰的五分之二。(3)在全酶与光照酶的电子密度图上,可以看到红黄亚基的NAD⁺与Cys-149的Sδ基之间有明显的密度相连,而兰绿亚基对应部位的密度较弱。上述几点暗示红黄与兰绿两对亚基的结构很可能不是完全等同的。

更高分辨率的精细结构分析正在进行中。

肽链 Asn-Ala-Gly-Ala-Asn 溶液构象的二维核磁共振波谱研究

许凯平 施庆浩 施维清 詹子刚
中国科学院大学生物系
中国科学院上海生物化学所

核磁共振波谱和计算机模拟结合,测定分子量为二万以下的蛋白质在溶液中的三维空间结构,这是继X-射线衍射法之后测定蛋白质空间结构的又一重要方法。该法弥补了X-射线晶体衍射限于晶体状态的缺陷,可以测定蛋白质和天然溶液构象。

从国内这方面的工作刚刚起步,本文报导的是我们的一项尝试性工作。小鼠NAGAN是大脑中分离出来的具有镇痛作用的四肽NAGAN的类似物,它由A1合成,也有镇痛作用。詹子刚等人曾用远紫外CD谱研究其溶液构象。

实验在Bruker AM 400MHz谱仪上进行,我们测定了NAGAN的二重质子相关谱(COSY),核欧沃兹斯效应谱(ROESY),接力相关转移谱(RELAY),J谱,并进行了变温实验。样品浓度为15mM,溶剂为80%的DMSO和20%的重水,PH 5.8。聚CD谱研究,在一定条件下,NAGAN可能有确定的构象。

通过COSY谱,J谱,RELAY谱及与四肽NAGAN应谱的比较,对NAGAN的全部谱线包括二个Asn残基侧链的酰胺质子全部进行了识别,并得到了一些重要的偶合常数。

根据NOESY谱中的交叉峰,以及由偶合常数根据Karplus-Bystrov关系式推出的二面角的信息,可以确定NAGAN中残基A-G-A之间形成第I类β-转角,N端和C端(-NH...COO-)之间存在氢键。在上述模型的基础上我们用计算机模拟出了结构模型,并用能量优化法进行了结构修正,得到了NAGAN在溶液中的三维结构,及一些侧链基团运动快慢的信息。

样品由上海生化所施维清同志提供,在此表示感谢。
本实验工作在上海生化所开放实验室Bruker AM400 MHz谱仪上进行。

天花粉酶蛋白酶抑制剂 对核糖核酸酶抑制作用的研究

熊德编 韩世海 戚正武 R. Bolonese R. Kaptein
中国科学院大学生物系
中国科学院上海生物所
荷兰格罗宁根大学物理化学实验室

迄今为止我们对蛋白质三维空间结构的信息主要来自X-射线晶体衍射,但是并非所有样品都易结晶且晶体状态也不是生理状态。二维核磁共振和计算机分子动力学模拟是国际上70年代末80年代初发展起来的新技术,二者结合有可能不依赖晶体衍射独立测定蛋白质在溶液中的结构。

天花粉酶蛋白酶抑制剂是由41个残基组成的小蛋白,一级结构序列清楚,有4对分子内二硫键。本工作以其为对象试图将2D NMR和MD相结合得到该蛋白在溶液中的空间结构。本文仅作为第一阶段工作结果即通过一系列二维核磁共振谱实验对被谱进行顺序识别,为进一步开展空间结构研究打下基础。

样品按戚正武方法从瓜亚根中用热变性,分子筛柱层析,亲和层析,离子交换柱层析法提纯。

2D NMR实验用8mM蛋白溶液,分别以D₂O和H₂O为溶剂,PH为4.25,在Bruker HX300和Bruker WM500谱仪上进行,数据用2D NMR数据处理软件在VAX 11/750上进行。

为了识别谱峰,所进行的二维核磁共振谱实验包括:同核 Hartmann-Hahn谱,核欧沃兹斯效应谱(ROESY),二重质子相关谱(COSY),三重质子相关谱(COSY),接力相关转移谱(RELAY),及双量子谱的COSY谱(DQP-COSY)。

谱峰识别分残基类型识别和顺序特异性识别两步进行。前者主要根据不同氨基酸的自旋系统进行识别,后者主要根据NOESY谱和COSY谱(或类似的谱)中交叉峰的H₂O系和J耦合关系达到氨基酸序列中特定氨基酸残基的识别。为进一步证实芳香环共振峰还作了光诱导质子化转移实验(Photo-CIDNP)。

通过上述实验对大部分共振峰进行了识别,并得到有关三维空间结构的部分信息。

陆青 邱树业

(南京大学)

张继斌 朱思明

(南京医学院)

光声光谱学是近年来迅速发展起来的一门研究物质吸收光谱的新技术。它既与光谱技术相类似,又具有传统光谱技术无可比拟的独特优点。表现为检测的物质可不拘性状也无须处理,适用范围广泛。为了将这门新技术应用于医学领域,我们进行了人体血液的光声光谱实验研究。

光声光谱学的理论基础是光声效应。光声效应是物质吸收光能而产生声波的过程。血液光声光谱的基本原理是:当一束调制光照射在密闭于光声池内的血液样品上,样品分子吸收入射光后被激发至高能态,通过非辐射途径,激发态分子吸收的光能转变为热能,引起样品表面气体层如同活塞一样周期性地伸缩,产生压力波,即光声信号。改变入射光波长,得到不同波长下样品的光声信号,即光声光谱。

实验中采用南京大学声学研究所研制成功的 PQS-1 型光声光谱仪系统。该系统的特点是采用分立式的单光路结构,利用微型计算机进行光声信号的归一化处理。在结构上该系统由三个部分组成:(1)辐射源,包括斩光器;(2)光声池,包括微音器;(3)信号检测和数据处理及记录系统。

血液的光声光谱实验结果表明:(1)在波长为 350 nm 到 800 nm 的光谱范围内,正常人体血液全血的光声光谱中存在三个吸收峰,称为 γ 峰, θ 峰和 α 峰,它们的波长分别约为 410 nm, 540 nm 和 575 nm,

吸收峰的强度比 β/α 比值约为 1, γ/β 比值约为 2。全血的光声光谱主要反映红细胞内血红蛋白的光吸收特性,其特征取决于血红蛋白中血红素的分子结构。(2)血红蛋白的光声光谱随其浓度改变而变化,表现在 γ/β 比值随着浓度降低而单调增大。贫血和白血病血液的血红蛋白浓度低于正常值,实验结果是它们光声光谱中 γ/β 比值明显大于正常人血液的相应比值。(3)某些化学物质如尿素, NaOH 和 HCl , 对血红蛋白中血红素结构的影响,能使其光声光谱发生变化;而血红蛋白中珠蛋白的组成不同,并不影响血红蛋白的光声光谱,如正常成人和胎儿血红蛋白的光声光谱并没有明显的差异。

光声光谱学在血液学上的应用可以概括为两个方面:(1)从全血的光声光谱中可以直接诊断血红蛋白浓度低于正常值的某些血液病,如贫血和白血病。(2)从全血的光声光谱中可以直接诊断血红素结构异常的血红蛋白病。光声光谱学的特点是方法简便,检测迅速,因此将这门新技术应用于医学临床诊断方面具有重要的意义。

袁传恩

(中国科学院遗传研究所)

杜泽福 冯锐

(军事医学科学院)

核酶结构与功能的研究,对分子遗传学、遗传工程课题的进一步探讨具有重要意义。超导核磁共振技术是一种能直接观察酶类生物大分子天然结构的有效工具。尤其能较直观地观察到溶液环境下酶类多肽链上各基团键排布情况,比较各种酶类溶液构型构象的异同及其与底物相互作用方式,追踪观察酶作用的动力学过程。

本文进一步报导了核酶类及其与底物相互作用的 400 兆超导核磁共振谱学研究新结果。

本研究采用了与分子遗传学、遗传工程实验密切有关的核酶类样品牛胰核糖核酸酶 A、牛胰脱氧核糖核酸酶 I 等工具酶。与其相互作用的底物是核糖苷酸和小牛胸腺 DNA 等核酸生物分子。

上述核酶类生物分子和核酸底物分子首先分别在室温下置入 5 mm 核磁共振样品管内,加入浓度为 99.8% 的中性 D_2O , 使其充分溶解。

采用日本 JEOL-400 兆超导核磁共振仪, 50°C D_2O $\text{H}-360$ 兆超导核磁共振仪记录高分辨谱。

在 400 兆超导核磁共振谱仪测出的牛胰核糖核酸酶 A 的高分辨率谱上,呈现出我们前所未见的能反映此酶精细结构的质子峰。此酶不链上谱系质子峰排布及其化学位移值分析如下: I. 位于 $0.22-1.04$ ppm 的甲基谱峰区,主要是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸和丙氨酸等的 $-\text{CH}_3$ 质子贡献而成; II. 位于 $1.04-3.52$ ppm 的次甲基谱峰区,系由缬氨酸、精氨酸、谷氨酸、脯氨酸、丝氨酸和甘氨酸等不同侧链位置上的 $-\text{CH}$ 质子贡献而成。III. 聚峰 HOD 峰上侧的 $3.52-4.40$ ppm 谱峰区是由核糖基的 $-\text{OH}$ 质子的贡献而共两组。IV. 聚峰区显示了此酶的活性部位是位于 $6.20-9.20$ ppm 的低场区。此芳族谱峰区主要是由缬氨酸、色氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸等芳环上的质子贡献而成。当此酶与底物核糖分子相互作用后,主要是此芳族区质子峰发生变化,并观察到相互作用的动力学过程。

在我们实验条件下,中性 D_2O 内牛胰脱氧核糖核酸酶 I 的超导核磁共振谱上,它的高场侧脂肪族谱峰区的谱峰特征之一,是位于 0.73 ppm 处的由亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸等 CH_3 质子贡献而成的甲基峰强度最为高大。它的低场侧芳族谱峰区芳族氨基酸质子主峰出现在 7.06 ppm 处。比上述牛胰核糖核酸酶 A 的芳族质子主峰的化学位移值 6.72 ppm 要大。

我们分析研究还表明,上述的两种核酶的商场区脂肪族氨基酸质子峰强度各异,主要归因于这两种核酶的侧链上其相对应的脂肪族氨基酸含量不同。

当牛胰脱氧核糖核酸酶 I 与小牛胸腺 DNA 相互作用时,经过 10 分钟后,此酶的低场区芳族氨基酸质子主峰的强度明显变弱,而其高场区脂肪族氨基酸质子峰变化不显。加热 100°C 后此酶除高场区甲基峰尚可见外,其余谱峰皆消失得以辨认。

研究表明,超导核磁共振技术能直接提供酶反应过程的结构变化信息。

*本研究是中国科学院科学基金资助的课题。

核糖核酸及其核苷酸的 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P
高分辨核磁共振研究
袁传熙 曹伟强
(中国科学院遗传研究所)
黄培林
(中国科学院武汉物理研究所)

核糖核酸(RNA)在生物遗传信息传递和蛋白质合成中起重要作用。应用高分辨核磁共振技术研究它在溶液中的结构与功能。可获得一些其它方法不易得到的结构信息。

本文报导了核糖核酸及其核苷酸的 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P 高分辨核磁共振的新结果。

所用实验材料是酵母RNA、酵母tRNA、tRNA^{pho}、其核苷酸和核苷样品主要是5'-UTP、5'-GTP、5'-ATP、IDP、CDP、ADP、5'-UMP、5'-CMP、5'-UMP、5'-AMP和尿嘧啶核、胞嘧啶核等。

上述样品分别溶解在纯度为99.8%中性D₂O或重蒸水内。应用中国科学院武汉物理研究所研制的ZWH-360超导核磁谱仪和美国LX-400超导核磁谱仪、法国RMN-250超导核磁谱仪记录高分辨 ^1H 谱、应用脉冲傅里叶变换核磁共振仪记录高分辨 ^{13}C 谱和 ^{31}P 谱。

在我们的实验条件下,上述三种酵母RNA蕴藏有遗传信息的高分辨率谱峰主要分布在谱图的低场区。低场I区的谱峰位于5.40—6.40 PPM处,主要是胞嘧啶和尿嘧啶碱基上的H-5、H-1质子贡献而成。II区位于6.80—8.80 PPM处,其谱峰主要是由鸟嘌呤的H-8、腺嘌呤的H-2、H-8以及胞嘧啶的H-6和尿嘧啶的H-6等质子贡献而成。经分析发现,酵母RNA II区的质子主峰呈现在7.62 PPM处而酵母tRNA^{pho}的质子主峰则分别位于7.64 PPM和7.56 PPM处。而且这两种酵母RNA各碱基质子峰的可分辨率也较高。

IDP的I、H-5、H-1质子峰出现在5.14 PPM处, I、H-8、H-2质子峰出现在8.00和8.36 PPM处,而CDP的C、H-5、H-1质子峰出现在5.70—5.80 PPM处, C、H-8质子峰出现在7.82 PPM附近。尿嘧啶核和胞嘧啶核的H-6质子峰分别出现在7.54 PPM和7.62 PPM处。

5'-GMP和5'-UMP等四种核苷酸的 ^{13}C 谱中,其谱峰特征是具有遗传信息意义的碱基上的碳原子信号出现在低场区;它们的C-6、C-2、C-4、C-8和C-5等化学位移依次由高到底,其中以碱基上的C-5信号强度较大;而核糖上的 ^{13}C 信号峰出现在高场区,它的4、2、3、5和1等信号的化学位移也是依次由高到底,其中以核糖的3信号强度最大。

酵母tRNA的高分辨率 ^{31}P 信号出现在1.20 PPM附近,其谱峰的半高宽度约40 Hz,并可见到裂分的双重峰形。

在5'-UTP、5'-GTP、5'-ATP等的 ^{31}P 谱中,观察到由低场到高场依次可见 γ -P、 α -P和 β -P三组P信号;其中以 γ -P的信号强度弱, α -P的信号最强,而 β -P的信号居中。而在5'-ADP的 ^{31}P 谱中只观察到低场的 γ -P信号和较高场的 α -P信号。

文中讨论了多种核酸及其核苷酸的 ^{13}C 、 ^{31}P 等多核磁共振谱特征的某些共同性和异性问题。还阐述了多核磁共振技术研究核酸类生物大分子结构与功能的优越性。

1) 本研究是中国科学院科学基金资助的课题。

脱氧核糖核酸及其与组蛋白的相互作用 高分辨 ^1H 、 ^{13}C

^{31}P 核磁共振研究

刘传熙 吴军

(中国科学院遗传研究所)

肖圣前 张炎民

(中国科学院武汉物理研究所)

本文报导了脱氧核糖核酸及其与组蛋白相互作用的高分辨 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{31}P 核磁共振研究新结果。

DNA是小牛胸腺和鱼精子提取制备,本研究所用的组蛋白F_{2a1}和F_{2a2}是按改良的H、W、JOHNS方法从小牛胸腺中提取制备。上述生物样品分别置入标准的核磁共振样品管内,室温下滴入纯度为99.8%中性D₂O,使其充分溶解。

应用中国科学院武汉物理研究所研制的ZWH-360超导核磁谱仪和英国Varian LX-400超导核磁谱仪、法国RMN-250超导核磁谱仪记录高分辨 ^1H 谱,而用脉冲傅里叶变换核磁共振仪记录高分辨 ^{13}C 谱和 ^{31}P 谱。

本研究表明,中性D₂O内脱氧核糖核酸的超导核磁高分辨 ^1H 谱可分辨出五个主要场区;位于1.24—1.28 PPM处最显著的谱峰是胞嘧啶核糖的甲基质子贡献而成;位于1.98—2.98 PPM处的谱峰是脱氧核糖的H-2'的质子贡献而成;在3.60—4.30 PPM处出现的谱峰是脱氧核糖的H-4'、5'的质子峰;脱氧核糖的H-3'质子峰出现在5.24

—5.74 PPM处;胞嘧啶核糖的H-5、H-1质子峰出现在5.72—6.42 PPM场区;更低场的7.24—8.58 PPM处谱峰是由腺嘌呤核糖的H-2、8,鸟嘌呤核糖的H-8,胞嘧啶核糖的H-6和等质子共同贡献而成。

值得指出的是,室温下中性D₂O内的脱氧核糖核酸小牛胸腺DNA无论用360兆赫超导核磁谱仪或400兆赫超导核磁谱仪皆未谱出良好的高分辨 ^1H 谱图。加热至95℃左右,小牛胸腺DNA和鱼精子DNA皆可呈现出上述五个主要质子谱峰区。令小牛胸腺DNA降解,其400兆赫超导核磁谱图谱图中,前述的五个场区有三处质子峰区曾出现进一步裂分。主要裂分在T-C₂H₂出现三重峰;低场的碱基质子谱峰区7.20—8.60 PPM处共显示出18个可分辨的峰;位于5.72—6.42 PPM处的C₂H-5、H-1谱峰区也显示出15个可分辨的峰;但高场区脱氧核糖的H-2'质子峰宽化不显。DNA的 ^{31}P 谱峰出现在1.20 PPM附近,其特征是它的半高宽度可达50 Hz左右。

中性D₂O内脱氧DNA的高分辨率核磁共振 ^{13}C 谱图可分辨出四个主要场区。位于1.20 PPM处的是T-Me碳原子信号,脱氧核糖的C-2、C-5'、C-3'、C-4'和C-1'等碳原子峰出现在35.0—85.0 PPM场区;碱基C-5、T-5、G-5和A-8等的碳原子峰出现在110—118 PPM处, G、C、T、A四碱基的第8、6、4、2位置上的 ^{13}C 信号则出现在140—180 PPM场区。

在室温下使小牛胸腺DNA与小牛胸腺组蛋白F_{2a1}等量相互作用,组蛋白F_{2a1}肽链上的富含精氨酸等碱性氨基酸侧链的质子峰强度变得大为削弱,而位于0.73 PPM处的VAL、LEU、ILE-C₂质子峰强度变化不显。启示组蛋白F_{2a1}肽链的碱性氨基酸侧链结合到DNA上,而非碱性氨基酸侧链是组蛋白——组蛋白相互作用的主要部位。

DNA与组蛋白F_{2a2}相互作用, F_{2a2}的富含精氨酸等碱性氨基酸侧链的质子峰宽化,强度面积极好变得削弱。这启示了如同F_{2a1}一样,组蛋白F_{2a2}的碱性氨基酸侧链不包含在自身相互作用中,而是结合到DNA上。

(DAFPA)
脱氧核糖无啉酸的自旋标记研究

刘本仙 盛沛振 王华荣

(中国科学院上海生物化学研究所)

自旋标记法已日益深入地应用于检测核结构变化和构象变化。但关于核酸的化学修饰产物的自旋标记研究至今未见文献报道。由于 EPR 和 DAFPA 在结构方面与 DNA 密切相关, 对这两种物质进行自旋标记研究, 具有重要意义。本文报道对小牛胸腺 DNA 制备的 DAFPA 进行自旋标记和对所得产物 (简称 SL-DAFPA) 进行 ESR 检测的结果, 并与本课题组前此关于小牛胸腺 DNA 的自旋标记研究结果进行了比较和讨论。

我们采用 Türler & Chargaff (1969) 的降解法并作了改进。所得 DAFPA 经分析, 其碱基 A/G 比率基本不变, 而啉酸完全除尽。用 2, 2', 6'-四甲基-4-(2-乙氧基乙氧基) 三苯胺代氮基啉酸-1-基基的乙醇溶液与 DAFPA 的溶液在 57°C 反应 2.4 小时。按反应液中标记物与嘌呤碱基的不同克分子比率 (I_0/Pu) (分别为 0.5, 1, 2, 3, 4) 制得的产物, 其 ESR 波谱均呈弱固定型, 且各自的五种波谱参数 (^{15}N 峰相对高度, 中央峰的线宽 ΔH_0 , 超精细分裂常数 A_N , g 值和旋转相关时间 τ) 彼此极为接近。但除 g 值外, 这些参数与在标记物本身之例有很明显区别, 说明我们对 DAFPA 的自旋标记是成功的。谱线随 I_0/Pu 的增大而增强, 当后者达到了 3 时则趋于原值。SL-DAFPA 在 100°C 的 0.9N KOH 中处理 1 小时, 可大大解除标记物的固定化程度, 据此测定了 SL-DAFPA 中的标记物结合量如下: 对 1000 个嘌呤碱基的最大结合量约为 184 个分子。就等量的嘌呤碱基而言, 标记物对 DAFPA 的结合程度比

DNA 大 29-51 倍。

SL-DAFPA 的微波饱和功率为 8mW, 而标记物本身为 4mW, 这说明标记物与 DAFPA 结合后, 电子机制加强, 导致饱和功率提高。此外, SL-DAFPA 的降解产物的微波饱和特性与标记物本身非常接近, 亦足以证明 SL-DAFPA 的降解大致是完全的。

对在反应液中不同 I_0/Pu 比率制得的三种 SL-DAFPA 样品通过变温所得 Arrhenius 图均为直线, 并显示出转折点, 其斜率范围为 -1.0004 ~ -0.9563。按 Arrhenius 公式 $\ln \tau = E_a/RT$ 算出标记物的旋转活化能 E_a 为 4.38 ~ 4.57 Kcal/mol。比从标记物本身所得直线给出的旋转活化能 1.06 Kcal/mol 高得多。同时倘若升温至 50°C 左右 SL-DAFPA 的 ESR 波谱中逐渐出现与双链中自旋交换相互作用相似的特征, 这说明结合在 SL-DAFPA 中相邻两个嘌呤碱基上的标记物相互作用随升温而越来越加强。

在 DAFPA 中由于啉酸不存在, 碱基之间配对已不再可能, DNA 的双螺旋已崩解, 因此它与 DNA 在结构上从两方面在 ESR 特性上的差别是非常显著的。由于标记物不再受到双螺旋结构的约束, 以及嘌呤碱基完全暴露于分子表面, 与标记物接触的几率大为增加, 可解释 SL-DAFPA 给出弱固定化的 ESR 波谱, 其中标记物结合量比在 SL-DNA 中高得多。又因 SL-DAFPA 中标记物大多结合在其分子表面, 电子效率低, 所以微波饱和功率比 SL-DNA 低。又因其不具有高级结构, 所以不显示结构敏感温度。变温测定所得 Arrhenius 图仅为直线。由此可见, 用自旋标记法观察到的上述多方面的差异对于增进有关 DNA 及其衍生物的结构和构象变化的了解, 当具有实际意义。

用自旋捕捉法对没食子酸丙酯在水溶液
中抗 DNA 辐射损伤作用的研究*

刘本仙 沈志民 盛沛振

(中国科学院上海生物化学研究所)

本课题组于一九八二年用 ESR 方法已证明, 在固态的分子混合物中没食子酸丙酯 (PG) 对 DNA 显示强有力的抗辐射损伤的保护作用, 并判定这是由于氢转移机制。但至今, 尚未有人报道在接近生理条件下 (室温, 溶液状态) 用 ESR 方法检测 PG 是否具有抗 DNA 辐射损伤的作用。本工作利用自旋捕捉法的特点, 对此进行探索并获得了令人满意的初步结果。

我们用亚硝基特丁烷 (tBN) 作自旋捕捉剂, 所有样品水溶液 (所含 tBN 浓度均相等) 不除氧, 用 ^{60}Co 的 γ 射线在室温下进行辐照。辐照后进行 ESR 检测, 结果如下:

(一) tBN 的水溶液

ESR 波谱由两组谱线叠加而成, 两组强度比为 8.3:1, 第一组为 3X1 条谱线, $a_N = 17.16$ G, 来自二特丁基氮氧化物 (DTBN), 即 t-BuN(O)-t-Bu。用石油醚抽去第一组谱线后所得的第二组为 3X3 条谱线, $a_N = 16.53$ G, $a_{PH} = 10.76$ G (2H), 它来自 t-BuN(O)CH₂C(CH₃)₂H=O。

(二) 含小牛胸腺 DNA 与 tBN 的水溶液

ESR 波谱由两组谱线叠加而成。第一组为 DTBN 的三峰, 可用石油醚抽去。第二组为 DNA 给出的宽谱线, 主要有两个组分, 尖峰的 g 值各为 2.0226 及 2.0077, 两者在基线以上的高度之比为 0.344:1。

●中国科学院科学基金资助的课题

(三) 含 PG 与 tBN 的水溶液

对含不同浓度的 PG 的五种溶液所得 ESR 波谱, 谱线及波谱总强度基本不随 PG 含量而变。波谱由两组谱线叠加而成。第一组为 DTBN 的三峰, 第二组为 3X2 条谱线, $a_N = 16.28$ G, $a_{PH} = 1.66$ G, 来自 (HO)₃C₆H₂COOCH₂CH₂CH₃ (I) 或 (HO)₃C₆H₂COOCH₂CH₂CH₃ (II) 二种自由基之一。

(四) 含 DNA, PG 与 tBN 的五种水溶液 [DNA 浓度全同]

(二), PG 五种浓度全同 (三)]

波谱由三组谱线叠加而成。即由上述溶液 (三) 中的两组谱线及 DNA 显示的宽谱线构成。随 PG 的含量增大, 可看出: (1) 与自由基 (I) 对应的谱线强度基本不变; (2) DNA 的宽谱线显著减弱; (3) 与溶液 (三) 相比, DTBN 三峰显著增强。

(五) 在上述体系中加入一定量的没食子酸 (GA) 或碱性没食子酸 (PGA) 代替 PG 所得结果。

在含 DNA, GA 或 PGA 与 tBN 的溶液中, DNA 的宽谱线比无 GA 或 PGA 分别减弱至 16.6% 和 8.6%, 而 DTBN 三峰比无 DNA 存在时, 分别增强 18.6 和 22.1 倍。

(六) 结论

PG, GA 与 PGA 均有减弱 DNA 辐射损伤的作用, 这是由于发源于这三种物质的三个不同的氢转移机制。推测 DNA 辐射引起的自旋自由由 DNA 转移至 PG, 再由 PG 氧化 tBN 使 DTBN 产量增加。

张清州 刘芳 蔡同茂

(中国科学院生物物理研究所 北京)

我们曾用ESR技术研究了伴刀豆球蛋白A(简称ConA)对小鼠腹水肝癌细胞膜蛋白、脂质和界面脂构型的影响。发现ConA与受体交链以后,可以迅速诱导小鼠腹水肝癌细胞膜蛋白质构象发生重排,使膜脂流动性下降,膜蛋白相邻类脂发生固定化作用等一系列构型改变,对小鼠腹水肝癌细胞膜在接受和传递ConA信号时所发生的物理过程具有一定的意义。至于ConA在交链过程中的构象变化及其与受体之间的动态关系尚不清楚。本文则首次使用我们合成的ConA氮氧自由基,动态的研究了ConA与小鼠腹水肝癌细胞膜受体在凝集作用过程中的信息变化及其相互关系。结果如下:

(1) ConA氮氧自由基的ESR波谱: ConA是由含有237个氨基酸的亚基组成的四聚体。并疏基硫基可同含有N-末端氨基的氨基酸共价连接,使得ConA氮氧自由基,其ESR波谱为强、弱固定化组分重叠的五重谱线。若将ConA氮氧自由基加至小鼠腹水肝癌中20分钟,其ESR波谱最大分裂 $2T_{11}$ 加宽,弱固定化组分减少,强固定化组分加强,这是由于ConA与膜受体交链以后ConA分子运动受到较多的限制,分子彼此靠近,产生偶极加宽。

(2) ConA氮氧自由基与受体凝集作用过程中的构象变化: 自ConA加至细胞中2分钟开始连续记录ESR波谱,发现 W/g 比值随反应时间延长很快下降,10分钟以后便接近最低点。ConA氮氧自由基,强固定化组分的变化,可能与ConA分子在交链时其肽链分子运动向内卷曲有关系。而ConA诱导受体蛋白构象发生改变则不同,其 W/g 比值是随凝集作用时间延长而上升。但它们的动态变化

时间却是同步的。

(3) ConA氮氧自由基与其受体交链以后,旋转相关时间 τ_c 迅速增加,15分钟后便趋平缓。反映了ConA分子与受体交链以后,分子旋转运动变慢了。

(4) 微管对ConA受体的影响: 用秋水仙碱破坏微管蛋白的结构对小鼠腹水肝癌细胞膜蛋白的构象在短期内有一定的作用。经秋水仙碱处理20分钟以后的细胞,再加入ConA氮氧自由基,所获ESR波谱与对照组近似。

(5) 微丝对ConA受体的影响: 用细胞松弛素B($5\mu g/ml$)处理小鼠腹水肝癌细胞20分钟,再加入ConA观察与受体凝集作用。结果表明其ESR波谱介于ConA氮氧自由基与未凝细胞松弛素B处理组的ESR谱之间。表明微丝对ConA受体构象有一定影响。

赵南明 郭宝辉

(清华大学生物科学与技术系)

黄有文 王荣新

(中国人民解放军303医院)

张秀芳 高乃飞

(清华大学物理系)

穆斯堡尔效应(简称ME)可在整体红细胞下对胞内的含铁物质进行研究,同时得出不同含铁物质的ME参数及各组分的含铁份额。

地中海贫血(简称地贫)是一群遗传性血红蛋白病。可造成 α (或 β)链合成的不平衡状态,而过量的 α (或 β)链易变性沉淀在红细胞内,损伤红细胞膜,导致严重的溶血性贫血。该病在我国南部也较常见。但人们至今对包涵体的形成、结构及其对红细胞膜的损伤机制仍不清楚。本文结合临床分析,着重分析其血红蛋白的结构变化,为探讨地贫的分子病理和溶血性贫血的机理提供一些有用的信息。

地贫病人血液取自南宁地区,并进行了血液学常规检查、Hb电泳。测量是在一台AMB-50型等加速穆斯堡尔谱仪上完成(50K)。在M-150型计算机上完成对实验谱的最小二乘法拟合,得到各组分的谱参数。

我们已作测量的样品有:二例正常人,四例重 β 地贫,一例Hb Barts胎儿水肿症,三例HbH病,一例 α 地贫2。实验结果如下:
(1) 正常人血红蛋白:所得的谱图有二条峰。一套(α)峰)相当于氧合血红蛋白($OxyHb$),另一套(β)峰)相当于脱氧血红蛋白($DeoxyHb$),它们的参数与以前的报道类似。

(2) 重 β 型地贫病人血红蛋白:三例未切脾病人的Hb含量在3克至7克间,肝脾肿大,贫血很严重。与正常人的谱图相比较,均多出现了一个明显的(C)峰,含铁份额在10%—20%,其大小与病情严重程度有一定联系。

一例切脾病人的谱图与上述的类似,但含铁份额高达46%。病人切脾后Hb从5克上升到8克,这说明(C)组分在红细胞通过脾脏时,对膜有较大损伤作用。四例样品的(C)组分参数与高自旋三价铁物质类似。它是否是铁卟啉物质以及它与 α 链的关系仍有待研究。

(3) Hb Barts胎儿水肿症血红蛋白:该病比较少见,它完全不能合成 α 链,导致胎儿死亡。我们首次报道的ME研究证实Hb Barts(r_4)是不稳定血红蛋白,变性产物可能是高(或亚)铁血色原。结果还表明氧合型(r_4)四聚体中铁的状态与HbA中的大致相同,这说明Hb Barts所具有的很高的氧亲和力与铁的电子状态和配基分子环境无直接联系。

(4) HbH病血红蛋白:三例病人的Hb含量在7克至9克间, HbH约占20%至30%。与正常人的谱图相比较,均多出现一套峰,但参数有差别。一种(α)峰)相当于双价亚铁血色原成份,另一种(β)峰)与高自旋三价铁物质(不同于 β 地贫的参数)类似。因为HbH在氧化变性过程中可具有不同的步骤和中间产物,所以我们认为(β)组分可能是(α)组分的进一步氧化变性的产物。我们的结果同时指出以前关于HbH的ME研究结果可能是不全面的。

(5) α 地贫2:该类型患者通常没有贫血症状由谱图得出的结果与临床分析一致。

大肠杆菌的两种结合蛋白的结晶和晶体学研究*

卢光莹[†] Florante A. Quiocho

位于大肠杆菌等革兰氏阴性细菌外周胞质中的各种结合蛋白与这些细菌摄取营养物质时的趋化性运动和运输有关。它们一般有三个功能位置。一是与某种营养物质如氨基酸、糖、无机盐离子等相结合。二是与膜上的运输成分相互作用以及三是与横跨于膜的对趋化性运动有关的蛋白质相互作用。只有测定它们的三维结构才能弄清其作用机理。

一、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白的结晶和晶体学研究：

我们纯化了大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(由360个氨基酸残基组成,分子量约为40,500道尔顿)并用接入晶种法得到了大单晶。晶体学研究表明其晶胞参数为: $a=105.87\text{\AA}$, $b=68.57\text{\AA}$, $c=57.77\text{\AA}$ 以及 $\beta=112.4^\circ$ 。用浸泡法试验和筛选了重原子试剂,分别含有Ag, Au, Cd, Ir, Hg, Os, Pb, Pt, Re, S, Tl, U以及W等18种重原子,共22种试剂,41种条件,最后得到了三种可用的重原子衍生物:Mercury Sodium(一种有机汞化合物)、 $Pb(NO_3)_2$ 以及 K_2PtO_4 。用差值帕特逊函数法及交叉帕特逊函数法确定了各重原子的位置并进行了修正。然后用多对同晶置换法计算了相角,并计算出 $4-8.5\text{\AA}$ 分辨率电子密度图。从图中可清楚地看到分子的边界以及一些 α 螺旋区。尚不能追踪出肽键的走向。

二、大肠杆菌一变种(对糖趋化性运动缺陷但能正常运输)的D-半乳糖结合蛋白的结晶和低分辨率结构分析。

野生型大肠杆菌具有对D-半乳糖的趋化性运动和运输作用,而它的—变种(K12-ΔW551)为对D-半乳糖趋化性运动缺陷但能正常运输。二者均由300个氨基酸残基组成,分子量均为82,100道尔顿,二者的氨基酸序列差别仅有两处:野生型的156为Lys,157为Glu,而变种的156为Glu,157为Ala。

我们纯化了这一变种的D-半乳糖结合蛋白,并用接入晶种法获得了大单晶。晶体学研究表明其晶胞参数为: $a=65.95\text{\AA}$, $b=37.04\text{\AA}$, $c=61.84\text{\AA}$ 以及 $\beta=107.6^\circ$ 。由于变种D-半乳糖结合蛋白的晶体与野生型D-半乳糖结合蛋白的晶体是同晶型的,而后者的晶体结构分析已达高分辨率,因此我们直接用野生型蛋白的相角计算了变种蛋白质的 $8.0\text{\AA}$ 电子密度图,并以 $|F_{\text{变种}}|-|F_{\text{野生型}}|$ 作系数,以野生型相角计算了差值电子密度图。结果表明,变种与野生型的D-半乳糖结合蛋白的三维结构基本相同。因此看来变种蛋白质中氨基酸取代所引起的构象变化必定是高度局部性的。这种变化很可能影响了该蛋白与横跨于膜的、启动趋化性运动的蛋白质相互作用的位置。

*此工作是在美国Rice大学生物化学系Florante A. Quiocho教授的实验室内完成的。

†北京大学生物系

8Å分辨率绿豆胰蛋白酶抑制剂Lys活力碎片—牛胰蛋白酶(MBILF-BTRY)复合物分子模型及初步修正

唐有祺 曹杰 陈忠国 李根培 卢光莹 卫新成

(北京大学物理化学研究所 生物系)

曹天钦 林允大 张荣光 宣建成 戚正武
(上海生物化学研究所)

绿豆胰蛋白酶抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂中结构最复杂的Bowman-Birk型抑制剂。这一类型抑制剂的立体结构以前尚未见报导。MBILFBTRY复合物(分子量为27,500道尔顿)晶体的晶胞参数为: $a=62.09\text{\AA}$, $b=63.54\text{\AA}$, $c=89.70\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。空间群为 $P2_12_12_1$ 。我们收集了8Å分辨率的数据,并以蛋白质数据库中所得到的牛胰蛋白酶原子的座标为模型,以4Å分辨率数据,用快速旋转函数法和平移函数法得到模型分子和晶胞中的BTRY分子的相对取向关系,并将BTRY模型分子根据修正后的旋转和平移参数正确放置于MBILF-BTRY复合物晶体的晶胞之中,算得可靠性因子 $R=0.390$ 。对BTRY分子进行四轮REFE能量限制修正,将R因子降至0.353。根据此时BTRY分子在MBILF-BTRY复合物晶胞中的座标,以S1=权重方法计算了模型结构因子的相角,并以此套相角数据与 $|F_o|-|F_c|$ 及 $|F_o|-|F_c|$ 为系数计算得到了8Å分辨率的电子密度图及差值电子密度图。图中可清楚地看到MBILF分子线度约为 $15\times 15\times 25\text{\AA}$,位于BTRY结合部位附近。参考差值电子密度图,得到了MBILF的多肽链走向,无 α 螺旋

组分。 β 折迭也很少,由四个二硫桥交联形成的三个畸变的环形区连在一起形成以Lys 20为头部的前小后大的形状。Lys 20的侧链伸入到BTRY分子的专一性口袋之中而起到抑制作用。

将根据电子密度图解释所得到的MBILF分子中的25个氨基酸座标投入到复合物分子中后,对整个MBILF-BTRY的复合物分子进行五轮REFE修正,将R因子降至0.346。此时差值电子密度图较平坦,没有较高的残留电子密度峰。MBILF-BTRY复合物的进一步修正工作正在进行之中。

正交晶系天花粉蛋白低分辨率晶体结构测定

马星奇 王雄辉 王翠桃

(中国科学院生物物理所)

天花粉蛋白是从葫芦科植物栝楼根中分离得到的既能终止妊娠又能对滋养层细胞疾病(宫外孕、葡萄胎和绒毛膜上皮癌)具有优良临床疗效的有效成份。它是由234个氨基酸残基组成的不含二硫键单链碱性蛋白,氨基酸序列结构已获测定。序列结构比较研究表明它与蓖麻蛋白的毒性亚基可能是同源的。不同pH条件下白蛋白毒素的构象变化使其能穿出溶解体膜到达细胞发挥活性,所以比较研究不同pH条件下的天花粉蛋白结构具有生物学意义,在碱性溶液生长的单斜晶系晶体结构测定已经获得。

正交晶系的天花粉蛋白单晶是在酸性条件下高离子强度获得的, $S. G. P2_12_12_1$, 晶胞参数 $a=38.23 \text{ \AA}$, $b=76.18 \text{ \AA}$, $c=79.12 \text{ \AA}$; 实验测得晶体密度 1.245 克/厘米^3 ; $M=26000$; 估算溶剂分子约占晶胞体积的44.5%, 每个不对称单位有一个蛋白分子; 用浸泡法得到 K_2PtCl_6 和 K_2HgI_4 二个重原子衍生物, 用通常方法收集和处理数据, 对母体及铂汞等效点数据因子分别为——0.043, 0.066 及 0.029。

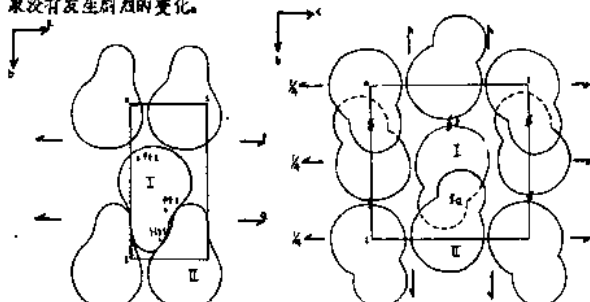
二个衍生物的重原子位置分别通过帕特逊图分析确定的, 所有哈克峰和非哈克峰都得到满意的。二个衍生物重原子坐标间的相关原点及绝对构型是用交叉差值法里来确定的。

以 r_{HLE} 为重原子结构振幅的观照值对重原子参数进行修正, 结果如下:

衍生物	坐标	分数坐标	占有率	温度因子	比例因子	偏离因子
K_2PtCl_6	Pt1	0.4411, 0.6700, 0.0543	0.3822	10.91	0.5747	0.463
	Pt2	0.0756, 0.3238, 0.1512	0.2118	34.14		
K_2HgI_4	Hg1	0.1972, 0.0770, 0.0679	1.2772	213.86	1.3022	0.406
	Hg2	0.5332, 0.7429, 0.5295	0.6894	58.86		

用联合概率法求得最佳相角 φ_p , 品质因子 0.7750 用 $m|F_p| \exp(i\varphi_p)$ 得到 5 埃电子密度图。沿 C 轴方向密度分布明显, 二个明显的稠密区大都在 $z=1/4$ 和 $z=3/4$ 处隔开, 沿 b 轴方向是一个高密度区, 与 a 轴平行方向的 2a 轴分为二类: 一类称为 P, 它穿过密度较弱的区域(分子间边界); 另一类为 Q, 以它相关连的分子间由于接触较紧密, 边界不易划分, 使整个密度好象串在 Q 轴上的一串粘在一起的珠子。

二种晶系都获得了汞和铂的衍生物, 利用不同晶系内对应的重原子位置(一对铂及一个汞), 用三个重原子最佳迭合求得均方偏差是 $1.3 \text{ \AA}$ 从同轴轴我们利用已知 C 2 晶体结构中的分子边界来正确划分 $P2_12_12_1$ 晶体内汞铂结构的部分边界, 因上不易分开的沿 Q 轴重叠的区域正是蛋白质分子的小结构域, 初步结果表明, 酸性条件下, 天花粉蛋白分子构象没有发生剧烈的变化。

天花粉蛋白分子在 $P2_12_12_1$ 晶胞中不同方向排列的投影图

天然兔肌肌凝蛋白的小角X线散射研究

王曼霖

(中国科学院生物物理所)

肌凝蛋白(Greenstein, Kinsess, EC. 2. 7. 3. 2)存在于所有脊椎动物的肌肉、心脏和脑组织中, 是一种参与细胞能量代谢的重要酶。了解溶液中酶的四级结构及其变化, 对酶的活性研究具有重要意义。小角散射技术是分析溶液态生物大分子的四级结构的重要手段。由于肌凝蛋白在细胞能量代谢中有重要作用。人们对它作了详细的研究, 但是有关溶液中它的四级结构的分析还作的很少。本文对兔肌肌凝蛋白的大小及形状作了分析, 并提出了可能的中空筒球模型。

肌凝蛋白的分子量约为 82600, 由两个分子量为 41300 的相同亚基构成。二个亚基形成二个平行的“雪茄”其轴比估计是 4:1。

实验所用的兔肌肌凝蛋白是由兔胫前肌中提取出的。小角散射实验用的肌凝蛋白的缓冲液为 0.1 M 甘氨酸——盐酸的溶液 (PH 9.0), 内含 1 M EDTA 和 0.1 M DTT。测量了五种不同浓度的溶液, 即 3.10, 4.5, 8.2, 33.11, 22.88, 11.37 毫克/毫升。

由 Guinier 方法得到兔肌肌凝蛋白的回转半径为 $30.3 \text{ \AA}$ 。采用一个中空筒球模型, 它的三个轴半径 a, b, c 的尺寸为

$30.00 \text{ \AA} \times 17.47 \text{ \AA} \times 5.94 \text{ \AA}$, 其中有一个三轴半径相对于 a, b, c 之比为 $0.767 \times 0.359 \times 0.426$ 的椭球孔。由这一模型算出的理论散射曲线与实验散射曲线符合得比较好, 而且该模型的最大尺寸 $11.2 \text{ \AA}$ 与用距离分布函数 $P(r)$ 求得的分子最大尺寸值 $9.1.2 \text{ \AA}$ 比较接近。在大角区域二条曲线有偏离, 原因还有待分析。

所用样品是在供立向、周海步同志帮助下制备的, 特此感谢。

本工作是作者在日本京都大学化学研究所大井克夫教授指导实验室与持弓敏子博士合作进行的。

1.9 埃分辨率 (D-Ala)⁸⁰ 猪胰岛素晶体结构的研究*

牛立文 戴金壁** 梁栋材**

(中国科学技术大学, 合肥)

为了从空间结构角度探讨胰岛素分子B链N端的生物学作用, 本文对(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素晶体结构进行了深入研究, 用微量过饱和静置法在柠檬酸盐体系中培养了优质的可供X射线晶体结构分析用的(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素单晶。晶体空间群为R3, 晶胞参数为 $a_0 = 82.5 \text{ \AA}$, $c_0 = 34.2 \text{ \AA}$, 不对称单位中含两个分子。在PW1100四圆衍射仪上收集了1.9 Å分辨率三个独立区的衍射强度数据。数据经LP因子和辐射衰减因子校正但未进行吸收校正。应用差值 Fourier 技术以1.2 Å分辨率的三方=猪胰岛素晶体结构模型为起点, 建立了(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素晶体结构试用模型。应用立体化学约束最小二乘法并辅以差值 Fourier 图的人工分析对试用模型进行了调整和精化, 最终偏差因子 $R = 0.211$, 键长与约束值的均方偏差为0.057 Å。

(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素晶体结构模型与电子密度的吻合情况良好。修饰的B₀(D-Ala)残基在独立区两个分子中的表现十分清晰, 能够准确地确定其位置。在1.9 Å分辨率的水平上, 部分电子密度已开始按单个原子分裂。相对于三方=猪胰岛素, (D-Ala)⁸⁰猪胰岛素分子在晶胞中的堆积方式以及整体构象均未发生明显的变化, 但分子B链N端, C端以及分子表面部分残基侧链的构象发生了较为明显的改变。B₀(D-Ala)残基恰好占据了原来三方=猪胰岛素B1(Phe)残基附近的空位, 周围各个残

基的构象基本上保持了原来三方=猪胰岛素晶体中的构象状态。B₀(D-Ala)残基的引入降低了分子B链N端构象的运动性, 使分子的堆积更加紧密。(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素分子B链N端的晶体学微环境与在2.0 Å分辨率水平上所揭示的(Tyr)⁸¹猪胰岛素有很大的差异。本文还对(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素分子和三方=猪胰岛素分子的构象运动性进行了比较, 同时也比较了独立区两个(D-Ala)⁸⁰猪胰岛素分子的差异, 并对胰岛素分子结构与功能的关系进行了简单地讨论。

*本文是作者牛立文在中国科学院生物物理所作的研究生论文。作者感谢王大成同志以及生物物理所七室胰岛素组全体同志对本工作的帮助。

**通讯地址: 北京中国科学院生物物理所。

DNA液晶膜的有序结构与压电性研究*

张淑萍 黄嘉华

(复旦大学)

晶体因机械作用(压缩或拉伸)而荷电的现象称为压电效应。压电性材料可制成各种换能器和传感器。在生物体系中, 一些实验研究表明, 生物组织和生物聚合物也具有这种功能, 如人体、动物皮肤、昆虫表皮等皆具有压电、热电传感层。这种功能源于组织表皮层的极性结构, 单轴取向的光学活性生物聚合物——多糖、聚核苷酸、多肽等显示的压电性, 往往与结晶度和分子的取向度有关。

DNA是一种极性很强的分子, 在稀溶液时分子无规取向, 随着浓度的增大, 分子间电的相互作用力增强, 达一定浓度时分子取向有序, 形成一种各向异性很强的液体——液晶。液晶态DNA形成的膜, 分子呈有序排列, 具有晶体结构的某些物理特性。本文通过测试, 观测到这种膜的有序结构与压电性, 及其间的关系, 简述如下。

一、本文用偏光显微镜, 小角激光光散射法观测液晶膜的有序结构。由于DNA的螺旋结构, 有类似刚性棒的特征, 在稀溶液状态时, 分子无规取向为各向同性液体, 正交偏振光下视场黑暗, 随着浓度的增大, 在一定浓度时聚集成棒状分子群光学性质为各向异性, DNA液晶膜在正交偏振光下显示了这种性质。小角激光光散射图呈十字形, 这表示DNA液晶膜中, 螺旋链聚集成棒状微区, 微区中棒状分子链的最大极化方向倾斜于棒的长轴。

二、压电特性的测试: 将铜片电极用导电胶粘附于样品膜上, 用一圆棒与样品膜电极接触, 圆棒的另一端与扬声器连接, 用超音频信号发生器驱动。在DNA膜上施加一矩形压力脉冲, 压电信号经放大后, 输入X-Y函数记录。DNA膜对机械压力脉冲产生电压响应, 压缩时产生正的信号, 拉伸时为负的信号。

*中国科学院科学基金资助课题

信号, DNA显示的这种压电性是与分子的有序度和极性有关。

压电效应是介电体在机械力作用下发生形变, 正负电荷中心相对位移产生的极化电荷现象。DNA是一种极性很强的分子, 具有大的偶极矩, 在外加应力下极化改变, 是由于应力诱导第一磷酸主链中偶极子的取向, 以及与主链相连接的碱基中偶极子的取向所致, 对光学活性生体多肽、蛋白等, FUKADA认为压电性是由于与不对称性碳原子相连接的CONH偶极子的内旋转所引起。DNA在机械力作用下荷电的机理, 可以认为与其相似。

SDS对叶绿素蛋白二级结构的影响

韦江 曲长芝 赵南明

(清华大学生物科学与技术系)

阎隆飞

(北京农业大学)

光合作用是在叶绿体膜上的光系统Ⅰ及光系统Ⅱ上进行的,而光系统Ⅰ、Ⅱ则主要是由叶绿素蛋白组成的。因此,深入研究叶绿素蛋白的结构与功能,对了解光合作用机制有很重要的意义。

我们将菠菜类囊体膜用SDS增溶后,经温和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离得到SDS结合叶绿素蛋白,而后去除叶绿素蛋白中的SDS,对去除SDS前后叶绿素蛋白的CD谱进行了比较。发现其CP1a的CD谱峰形和峰位基本无变化,其二级结构成分变化也很小。而叶绿素蛋白LHCP3的CD谱峰位虽无变化,但其峰形有一定变化。208nm处负峰明显减小,而二级结构成分由 α :21%, β :25%, R :54%,变为 α :17%, β :32%, R :51%。这说明SDS对不同叶绿素蛋白的影响并不一致。

增加与叶绿素蛋白结合SDS的量,同样也表明,不同叶绿素蛋白与SDS的作用差别很大。随着SDS量的增加,叶绿素蛋白CP1a的圆二色谱变化很大,207nm和218nm处的负峰全部消失,负峰位置变为230nm处。而在213nm处出现一很大正峰。经计算表明,随SDS量的增加,CP1a二级结构成分由 α :16%, β :34%, R :50%,先变为 α :37%, β :0%, R :63%,几乎全部有序结构均为 α 螺旋结构状态,随着SDS的继续增加,二级结构成分变为 α :3%, β :62%, R :35%,以 β 折叠为主的结构状态。这表明SDS对CP1a二级结构

的影响,可能牵涉到蛋白内部静电力,疏水力等的变化,导致氢键的重新组合,从而发生 α 螺旋结构向 β 折叠结构的转变。

同样,SDS的加入,也使叶绿素蛋白CPa的二级结构发生很大变化。随着SDS量的增加,CPa的圆二色谱中,201nm及216nm处的负峰完全消失,225nm处出现一负峰,同时在208nm处出现一正峰,其变化与CP1a的变化有相近之处。计算表明,随着SDS的增加,CPa的二级结构成分从 α :16%, β :34%, R :50%变为 α :53%, β :0%, R :47%的以 α 螺旋为主的结构状态,但并不发生 α 螺旋向 β 折叠结构的转变,这说明CPa的内部氢键变化与CP1a有很大差别。

而捕光叶绿素蛋白LHCP3在SDS作用下,圆二色谱变化与CP1a、CPa变化有很大差别,其207nm负峰基本消失,217nm处负峰移至222nm处,但无正峰出现。计算表明,LHCP3的二级结构成分仅由 α :17%, β :32%, R :51%变为 α :28%, β :15%, R :57%的结构状态,并不出现 α 或 β 结构明显占优势的状态。

这说明SDS对不同蛋白的二级结构的影响不甚相同。SDS的增加,一般将首先导致蛋白的 α 螺旋成分增加, β 折叠成分减少,但对某些蛋白而言,这种变化会导致 β 折叠结构的全部消失。而对另一些蛋白而言,经过这种状态将发生 α 螺旋结构向 β 折叠结构的转变,这可能反映了蛋白内部结构的差异。同时,与其功能也可能有某种联系。

Mg²⁺及冷冻—解冻对叶绿素蛋白二级结构的影响

韦江 曲长芝 赵南明

(清华大学生物科学与技术系)

阎隆飞

(北京农业大学)

Mg²⁺在光合作用中起着非常重要的作用。它不仅对光系统Ⅰ及光系统Ⅱ之间受激能量流动有调节作用,而且也影响着叶绿素蛋白的聚合和解聚。最近发现,Mg²⁺的加入导致叶绿素蛋白77°K荧光光谱发生改变,F730/F685随Mg²⁺的增加而减少。同时也发现用冷冻—解冻过程处理叶绿素蛋白可得与加入Mg²⁺几乎相同的结果,但其作用机制和相互联系尚待研究。

我们将菠菜类囊体膜用SDS增溶后,经温和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、去除SDS,得到叶绿素蛋白,对Mg²⁺对叶绿素蛋白二级结构的影响进行了研究。

研究表明,随着Mg²⁺的增加,叶绿素蛋白CP1a的二级结构成分从 α :18%, β :36%, R :46%,变为 α :28%, β :12%, R :60%的结构,说明Mg²⁺对叶绿素蛋白的二级结构有一定影响。

同样,Mg²⁺对叶绿素蛋白CPa的CD谱影响较大,205nm处负峰完全消失,变为210nm处的正峰,同时负峰出现在228nm处。计算表明,CPa的二级结构成分由 α :19%, β :32%, R :49%变为 α :0%, β :73%, R :27%的以 β 折叠为主的结构状态。这表明Mg²⁺的加入导致了其结构的根本性变化。

而Mg²⁺对叶绿素蛋白LHCP3的CD谱影响与CP1a、CPa又不相同。

随着Mg²⁺的加入,216nm的负峰移至225nm,而205nm处的负峰逐渐消失。计算表明,其二级结构成分由 α :16%, β :32%, R :52%变为 α :48%, β :0%, R :52%的以 α 螺旋为主的结构状态。但并不发生 α 螺旋向 β 折叠的结构转变。

在此基础上,我们考察了冷冻—解冻处理,对叶绿素蛋白二级结构的影响。

结果表明,冷冻—解冻处理使叶绿素蛋白CP1a的CD谱发生很大改变。计算表明,CP1a的二级结构成分从 α :18%, β :36%, R :46%,首先变为 α :58%, β :0%, R :42%,以 α 螺旋为主的状态,然后再变为 α :0%, β :72%, R :28%,以 β 折叠为主的结构状态。这说明冷冻—解冻处理导致叶绿素蛋白内部氢键的巨大变化,从而发生 α 螺旋向 β 折叠结构的转变。

而冷冻—解冻处理使叶绿素蛋白CPa、LHCP3的CD谱变化并不大。计算表明,CPa的二级结构成分由 α :19%, β :32%, R :49%变为 α :25%, β :23%, R :52%,而LHCP3的二级结构成分由 α :16%, β :32%, R :52%变为 α :24%, β :17%, R :59%的结构状态。但CPa、LHCP3的结构变化与CP1a的变化有很大差别,这可能体现了其内部结构差异。

我们认为,Mg²⁺及冷冻—解冻过程对叶绿素蛋白二级结构的影响,可能是由于叶绿素蛋白中的部分叶绿素形成脱镁叶绿素的原因。由于Mg²⁺及冷冻—解冻处理的影响引起叶绿素蛋白内部静电力的改变,从而使得其内部氢键发生变化,最终导致结构的改变。当Mg²⁺及冷冻—解冻处理超过一定程度后,蛋白内的脱镁叶绿素遭到破坏,从而导致蛋白结构的巨大变化。

水合牛胰核糖核酸酶A的量热研究

张玉拉 张叔家

(中国科学院生物物理研究所)

水对蛋白质的结构、活性和功能起着决定性作用,因此对水同蛋白质的相互作用和蛋白质内水的状态的研究一直引起人们极大的兴趣。本文用DSC法对含水量 R 为 $0.05-3.15$ 克(水)/克(蛋白)的牛胰RNase A在 $220-450$ K范围内的热行为作了全面的研究,结果表明了水同蛋白质相互作用的复杂性。

当 $R \geq 0.30$ 克/克时,在 $225-275$ K范围观察到水的熔融峰,其峰形同 R 及低温恒温时间 t_h 密切相关。在 0.94 克/克以上,积分熔融热 Q_{tr} 同 R 呈线性关系: $Q_{tr} = 75.19R - 32.11$ (1)。在 $0.49-0.94$ 克/克范围, $Q_{tr} = 53.18R - 23.98$ (2)。在 $R \leq 0.49$ 克/克时,指数回归给出 $Q_{tr} = 2.20 \times 10^{-3} \exp(17.11R)$ (3)。

在冻结/熔融过程中表现出冻结明显滞后。冻结是个很慢的过程, Q_f 密切依赖于 t_h 。 Q_f 对 t_h 的这种依赖性表明,方程(1)-(3)中各项参数均随 t_h 等实验条件而变,不冻水量 R_{nf} 亦随之而变,从而进一步证实了我们以前提出的在低温下水合蛋白质是个亚稳体系, R_{nf} 是个受动力学制约的不确定量。在此次会议上我们关于DNA的报告中对冻结的动力学特性作了进一步定量的描述。

在 $280-450$ K范围内观察到三个热诱导转变的吸热峰,其出现的规律同水合度密切相关。当 $R < 0.40$ 克/克时,在 $315-345$ K和 $400-450$ K左右,观察到两个小吸热峰,(峰I和峰II)。1974年Tanizawai首先报导了峰I并对其机制作了探讨。峰II通常被视为热变性峰,其转变热 Q_{tr} 和温度 T_{tr} 及半宽 $\Delta T_{1/2}$ 示于图1。图1表明三个参数与 R 密切相关。当 $R \geq 1.0 \pm 0.1$ 克/克时, $T_{tr} = 335.5$ K, $Q_{tr} = 7.38$ 卡/克,与溶液内的值相接近。 $R \geq 1.90$ 克/克时, $\Delta T_{1/2} = 7.34$ K。实验表明,水合蛋白质热诱导转变行为相当复杂。上述数据同以Vant Hoff方程计算值相差较大,表明水合蛋白质分子间的相互作用对热诱导转变的

影响不能忽视。 Q_{tr} 是分子内外一系列氢键断裂及再形成的宏观综合结果。图1表明,在不同 R 下,蛋白质热转变的始终态不同。然而,我们对此尚无了解。对随 R 降低, T_{tr} 和 $\Delta T_{1/2}$ 急剧上升和 Q_{tr} 趋于零的趋向等很难用现有的有关蛋白质结构和热变性的知识予以阐明。然而可以断定,水合蛋白质热诱导转变同其在溶液内的变性的微观过程不尽相同。

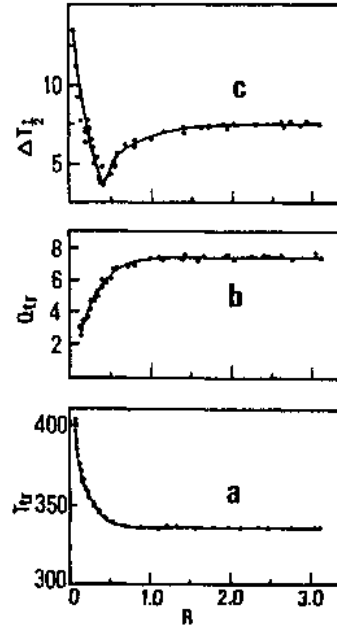


Fig. 1. The Temperature, T_{tr} , Heat, Q_{tr} , and Half Width, $\Delta T_{1/2}$, of the Thermotransitional Peak II vs. Degree of Hydration, R .

聚L-赖氨酸的构象与水合

章正康 邹泽玲 杨景文 叶国瑞

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白质分子的构象除决定于氨基酸序列,还与其介质的溶剂类型、 $NaCl$ 位、离子种类及离子强度等多种因素有关。作为普遍存在于生命体系中的水显然是十分重要的,结合水的存在决定蛋白质分子活性及其构象的研究业已取得一定进展。但由于蛋白质结构的复杂性及实验技术上的困难,对于水分子的定位与蛋白质分子构象的关系,了解的尚很不完全。聚赖氨酸具有蛋白质肽链的结构特点,又是同一氨基酸残基的重复,此简单模型化合物的构象改变与水分子存在关系的研究有助于深入探讨水在决定蛋白质分子构象中的作用。

P/E 580 B型红外分光光度计测得不同含水量的聚赖氨酸(PLL, 10Br)、脱氧聚赖氨酸(PLL)膜及在不同PD下的液体样品的红外吸收光谱。用改装的P/E TGS-2型天平进行不同相对湿度下平衡的膜样品的水含量的测定以确定水合值 h (克 H_2O /克多肽)或 h (克分子 H_2O /残基)。

不同相对湿度平衡的多肽膜的红外吸收光谱的OH带, CH₂带及酰胺A带, B带及I, II, III带均随含水量而改变。拥有二级结构重要信息的酰胺I带的波数变化如表1所示。

表1.

LL-II. (%)	0	11	23	33	42-66	75-92
I带波数 (cm ⁻¹)	1665	1655	1655	1633	1625	
				1669	1669	1650

显然,在LL-II. 33%及75%时发生两个构象转变。这些观察的第一个构象转变是随机卷曲到 β 折叠的转变,而第二个构象转变则为 β 折叠向 α 螺旋的转变,即在每个残基1个水分子到4个水分子之间为 β 结构,水分子数超过4个水分子为 α 螺旋,小于一个水分子为随机卷曲结构。脱水合过程观察到第二个过程的逆转变,第一个过程不可逆。在膜样品中亦观察到类似现象,只是发生转变的 h 值较低。

为了研究溶液构象与干膜构象的关系,将不同PD的PLL-10Br水溶液与其相应干膜的构象进行比较。表2为各PD值溶液及干膜的酰胺I带的波数。

表2.

PD值	6.0	7.1	8.0	8.6	9.4	10.4	11.4	12.4
溶液 (cm ⁻¹)	1650	1650	1648	1645	1645	1645	1614	1614
							1640	1685
								1685
干膜 (cm ⁻¹)	1655	1655	1655	1625	1625	1625	1625	1625
				1630	1695	1695	1695	1695

从表中可以看出随PD的改变,多肽具有不同的构象,当PD > 11后,出现 β 结构。干膜中的构象与溶液中不尽相同。当PD > 8.0或PD > 11干膜保持溶液中原构象,当 $8.0 > PD > 11$ 干膜后,发生向 β 折叠的构象转变。实验中还观察到随PD的提高,水合还增大诱导的第二个由 β 结构向 α 螺旋转变需要更长的时间,尽管由于 Na^+ 离子的介入其吸附水盐更大。

本文就侧链静电基团的水合及离子间斥力对构象转变中的作用进行了讨论。

水合聚乙烯与水合蛋白质 热力学性质的比较研究

赵泽玲 李正康 张玉柱

(中国科学院生物物理所)

本实验室曾对蛋白质—水体系的热力学性质进行了一系列的研究。结果证明：蛋白质变性温度随含水量增大而下降，变性焓也随之增大。并达到一恒值；在一定含水范围内出现变性前峰；蛋白质中不同状态水的冻结焓不同；水的冻结过程随低温保存时间发生动态变化。显然，蛋白质与水分子之间存在极为复杂的相互作用。非生命高分子体系如何？聚乙烯(P.E.O.)具有极为特殊的水溶性，从寡聚体到分子达数百万的高聚合度的多聚体均可以任何比例与水互溶，这一特殊性质使它成为一个合适的模型化合物。它的研究可能启发人们更深入认识复杂生命体系中生物高分子与水的相互作用。

将不同聚乙烯(P.E.O.)—水体系用P/E DSC—2型差示扫描量热计测热焓谱图。仪器灵敏度达 1.25 mcal/sec 。以Tektronix 31计算机进行峰温及峰面积的数据处理。

P.E.O.与蛋白质的吸热等温线明显不同。在相对温度(R.H.)小于82%范围内，随R.H.的增大，吸热水的峰长较小，R.H.仅达到0.08，而肽类蛋白此时已达0.25左右。当R.H. > 82%后，P.E.O.的吸热峰急剧增长。当R.H. 92%时，R.H.超过0.85，此时肽类蛋白质的吸热峰略高于0.3，P.E.O.与天然肽类蛋白质的吸热峰机制有明显差异。

根据低温下P.E.O.—水体系的热焓谱图与样品含水量R.H.的关系图。可以划分出冻结焓值分别为78.8, 70.5, 64.2 cal/g三种不同状态的水。其对应含水量分别为R=1.26及0.82 (或h=3及2)。R=

0.16 (或h=0.86)为非冻结水量。蛋白质也有类似的Q—R曲线，亦可划分为几种具有不同冻结焓值的水，只是边界R值不同。应当指出，这种划分带有相当的人为性。实际上这是一条连续分布的曲线。P.E.O.中的非冻结水量低于蛋白质中。有趣的是，在一定含水量的P.E.O.体系中，同样看到随着在低温下(223°K)保持时间的延长，冻结峰的面积增大，这就使得此体系与蛋白质一样，非冻结水量的测量带有相当的不确定性，与测量条件、体系状态等多种因素有关。

当R在0到1.1之间变动，P.E.O.—水体系的热焓谱图有一高温吸热峰，其峰形、峰温及峰值随R值而改变。当R值达到0.3时，除高温峰外，在270°K—290°K之间出现一小峰，随含水量进一步增大，高温峰开始裂分为2或3个峰，而近室温峰的峰面积继续增大，当R≈0.82时，高温峰全部消失。近室温峰最大，再进一步增大含水量，此峰向低温移动，峰值逐渐减小，直到R=1.1时消失。在溶菌酶及LKA的实验中也观察到高温峰随含水量改变而发生复杂变化。然而重要的区别在于P.E.O.中，第二次扫描仍然有高温峰的出现，只是峰温降低，且多个峰变为单峰。X光衍射实验已证明，结晶状态下，P.E.O.键含有七个结构单元，每个纤维周围有四个螺旋轴。这种结构在不同含水量下显然会发生改变。升温也会导致结构的变化，然而其可逆性表现与蛋白质的不同，说明在蛋白质中高温峰主要反映了高级结构的不可逆改变，而P.E.O.中主要是结晶区的溶融过程。它的晶区分布、高级结构在不同含水量下也不同。

碘离子淬灭ACF的荧光

陈阳, 张旭, 李婉娟, 王涛, 李子贤

(中国科技大学)

一 荧光的碰撞淬灭, 可用Stern-Volmer方程描述 $F_0/F = 1 + K[Q]$ (1), F_0, F 分别是未加入和加入淬灭剂的荧光强度; K 为碰撞淬灭常数; $[Q]$ 是淬灭剂浓度。

经过变换, (1)式可表示为: $F_0/F = 1/f_a + 1/f_a K [Q]$ (2) f_a 为荧光团在溶剂中的暴露系数, $\Delta F = F_0 - F$ 。一般地, 经过变换的Stern-Volmer方程可如下表示: $\Delta F/F_0 = \frac{f_i K_i [Q]}{1 + K_i [Q]}$ (3) N 是大分子中荧光团的种类数; i 是第 i 类荧光团; f_i 是第 i 类荧光团在某一波长处对总荧光强度的贡献系数和碰撞淬灭常数。

二 ACF是从蛇毒(Agkistrodon acutus)蛇毒中分离到的蛋白质——抗凝血因子(Anticoagulation Factor)。ACF是一个由二硫键连接的双链蛋白质, 分子量23,400; PI 4.7。光谱法分析, 其每分子中含有8个Trp。

三 在 PH 为3.6, 4.7, 7.1, 8.2各相应的 $[NaCl]$ 为0.00, 0.25, 0.50, 0.75M的各种情况下, 用含有 $10^{-4} M Na_2S_2O_3$ 的 KI 溶液淬灭ACF的Trp的荧光, 得到以下结果:

1. $[I^-]$ 在0.0—0.2M范围内, 淬灭条件及结果见表-1。用(1)式处理实验数据, 随 $[I^-]$ 增大, 游离Trp为一直线, 而ACF曲线呈向下弯曲形状, 表明在 I^- 可接触到的表面, ACF的Trp具有不同的微环境。

用(2)式处理, 得到 $(f_a)_{eff}$, $(K)_{eff}$ 如表-1。
2. $[I^-]$ 在0.0—1.0M范围内, $PH=4.5$, 淬灭实验数据用非线性最小二乘法, 按(3)式处理, 表明 I^- 可接触到的Trp分为

三类, 分别为Trp-S1, Trp-S2, Trp-S3。

3 综合上述结果, 得到如下结论: $PH=4.5$ 时, ACF的8个Trp分为4类, Trp-S1, 完全暴露的Trp; Trp-S2, 部分暴露的Trp; Trp-S3, 处在蛋白质表面裂隙中, 与溶剂有限接触的Trp; Trp-B, 埋藏在蛋白质核心的Trp。

4 含有多个Trp的蛋白质淬灭数据见表-2。
含有多个Trp的蛋白质, 淬灭情况复杂, f_a, K 的确定需要较大量的计算, ACF的淬灭数据测定正在进行。

TABLE 1 The Quenching of the Tryptophyl Fluorescence of ACF by Iodide Ion

Conditions	Temp. (°C-2.0)	$(f_a)_{eff}$	$(K)_{eff}$
pH 4.5	30	0.714	3.69
pH 3.6	30	0.465	6.52
pH 7.1	30	0.488	6.56
pH 8.2	30	0.855	7.05
$[I^-]$: 0.25M	30	0.810	0.54
$[I^-]$: 0.50M	30	0.312	12.8
$[I^-]$: 0.75M	30	0.325	18

$\lambda_{max} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$
($f_a)_{eff}$, effective fractional radiation absorbance
($K)_{eff}$, effective quenching constant

TABLE 2 The Quenching Data of Some Protein Containing Multi-Trp

Protein	Num. of Trp	$(f_a)_{eff}$ (%)	f_a (%)
ACF	8	71.4	
Pepsin	6	85	
Lysozyme	6	66	
Hexokinase	4		41, 25
Isoenzyme S	4		22, 3

叶绿素 (ChL) 的发光偏振研究

陈连春 唐树廷 徐叔容

(中国科学院长春物理研究所)

本工作在12 K测量了ChL粉末和溶液的偏振发光, 讨论了偏振度和发光峰位与有关数据同ChL结构和聚集特性的关系。

实验数据是在T-800型激光拉曼光谱仪上测得的。绝对测量系统的光谱响应进行了校正。在12 K, 用氦离子激光器4880 Å激发, ChL粉末发光有750 nm, 727 nm, 672 nm, 658.5 nm, 588 nm和498.4 nm等子峰, ChL已烷溶液发光有690 nm和764 nm二子峰。在527 nm左右有一宽带。在室温, 用氮分子泵浦可调谐染料激光器4300 Å激发, ChL粉末有峰位在580 nm一宽带。ChL已烷溶液有663 nm, 720 nm和764 nm三个子峰。这些发光数据难于建立起发光与ChL分子结构和构型的关系。因为每个峰, 尤其是宽带, 是由若干个高斯线型发光峰叠合而成。因此我们进一步研究了12 K ChL的线偏振发光。将发光方向垂直于接收方向, 激发光电矢量垂直于激发和接收方向组成的平面。用 $P_{\parallel}$ 和 $P_{\perp}$ 表示平行和垂直于激发光电矢量方向的二线偏振发光。偏振度 $P = (P_{\parallel} - P_{\perp}) / (P_{\parallel} + P_{\perp})$ 。我们用不同波长的偏振度做图, 得到明显的偏振度峰。把发光谱和偏振度曲线做在同一图上, 看到发光光谱子峰与偏振度峰相对应, 有的发光子峰强度很低, 但其偏振度并不低。这说明偏振发光研究方法是研究聚集态结构的灵敏的方法。ChL发光偏振度主要峰值列于后表。

ChL粉末是小的晶粒, 有较整齐的排列。在溶液中, ChL是溶质中的杂质, 是无规随机排列。有序排列的一种发光中心每个

个发射光谱峰的偏振度应该是相同的, 同种发光中心之间和异种

ChL _a	峰值 (10^3 cm^{-1})	13.125	14.0	14.375	14.635	15.00	15.625	16.00
粉末	偏振度	-0.05	-0.01	-0.05	0.05	-0.2	0.06	-0.025
ChL _a	峰值 (10^3 cm^{-1})	12.0	12.9	13.5	14.3	15.0	16.75	
溶液	偏振度	0.2	0.03	0.48	0.38	0.75		

发光中心之间的相互作用, 以及发光中心同介质之间的相互作用, 会改变偏振度不同振动模式的电子跃迁发射的偏振度也是有差异的。发光中心方位, 激发光电矢量方向, 发光中心的转动, 光散射以及能量传递等均影响发光偏振度。因此偏振度包含发生中心种类, 排列, 相互作用, 能量传递和激发态性质等有用信息。从上表看到, ChL_a溶液的偏振度峰比ChL_a粉末的偏振度峰少, 而且有两段偏振度平坦的波段。这表明ChL_a溶液有较少的发光中心种类, 而且ChL_a溶液发光偏振度普遍大于ChL_a粉末发光偏振度。这说明在溶液中ChL_a之间以及它们同介质之间的相互作用小于ChL_a粉末中ChL_a之间的相互作用。ChL_a粉末的偏振度峰, 有的是负值, 这表明ChL_a吸收态电偶极矩方向和发射态电偶极矩方向处于不同的方位。ChL_a粉在15000 cm^{-1} ChL_a溶液在14800 cm^{-1} 都是强峰, 同过去的工作比较可知二者是ChL_a单体的发射峰。在粉末中ChL_a之间有较强烈的相互作用。峰位红移2000 cm^{-1} 。在ChL_a溶液中, 在13500~14500 cm^{-1} 的偏振度接近0.5。按简谐振子模型计算可知, 它属于一种随机分布的电偶极矩发射。综上所述, 发光偏振研究是研究大分子结构和能态的有效方法。发光偏振度包含的更多信息尚待研究。

单链核酸的一种灵敏的荧光探针

——Tb与核酸复合物荧光特性的研究

戚建生 程极济

(复旦大学生物物理教研室)

应用三价铈元素阳离子作为蛋白质、核酸的荧光探针, 研究它们的结构和功能日益引起人们的兴趣。特别是由于Tb与核酸及其组分结合后, 可以作为紫外线激发核酸的能量受体, 在可见光部分有很强的荧光。本文报导Tb与核酸及其组分复合物的一些荧光特性。

一、Tb—核酸复合物的荧光光谱与激发光谱: TbCl₃在水溶液中荧光很弱, 当其与大分子物质结合后就有很强的荧光。用Tb³⁺以及Tb³⁺分别与GMP、GTP与RNA结合后, 测到的荧光峰有三个, 以546 nm峰值最大。用游离的Tb³⁺以及Tb³⁺与GTP、RNA与变性的DNA结合后, 除游离Tb³⁺的激发光谱很弱外, 后三者的激发光谱都在260 nm处有一峰值。进一步证明用 10^{-4} M GMP与Tb结合, 激发光谱只有260 nm一个峰。凡是光密度大于0.6的, 以及未经内滤光校正的激发光谱只有260 nm的峰。

二、应用Tb³⁺研究核酸及其各组分的荧光特性: 下面的工作应用的激发波长是260 nm, 荧光检测的波长是546 nm。Tb³⁺与碱基结合不发光。Tb³⁺与核苷酸结合都有荧光, 并以含鸟嘌呤的核苷酸荧光最强。在核苷酸中又是GTP>GMP。Tb与天然的及变性的RNA结合都有很强的荧光。而与天然的DNA结合只有很弱的荧光, 但与变性的DNA结合荧光就大大增强。说明Tb³⁺是标记在单链核酸, 并说明Tb³⁺与核苷酸的作用主要是作用在磷酸根上。

从荧光滴定曲线可以看出, 变性DNA在0.2~1.0 μg之间就可看到Tb—DNA荧光随DNA浓度增加一直增强。酵母RNA的滴定曲线在1~1.6 μg浓度范围内, Tb的荧光与浓度也是线性关系, 所以本文提出此法可作为测量RNA含量及变性DNA含量的较灵敏的方法。

三、Tb与核酸结合的位点: Tb与GMP及RNA结合, 在PH5~7之间随PH增大荧光增强。GMP在PH6.5左右, RNA在PH5.5~7.5范围为最大。二者在酸性下荧光都很弱。这是由于鸟嘌呤环上N-7已质子化, 使Tb—GMP荧光猝灭的结果。说明这也是Tb结合的位点。此外, 用5 μM Ca²⁺可使Tb—DNA荧光抑制50%, 其它二价阳离子要达到此效果, 需要大3~4个数量级的浓度。说明Tb³⁺与Cu²⁺与核酸有相同的结合位点。因为Cu²⁺可与DNA上的磷酸部位及碱基上的电子供体部位结合, 所以也说明Tb³⁺除与磷酸根结合外, 还可与鸟嘌呤上的电子供体部位结合。

四、Tb³⁺对DNA双链的去稳定性作用: DNA在有Tb³⁺存在时, T_m要小于无Tb³⁺时的T_m, 这是由于Tb³⁺可增加DNA的单链含量, 使DNA去稳定。用CD谱测量也发现Tb³⁺可降低DNA螺旋度使其(θ)下降。

钙调蛋白 (CAM) 是广泛分布于真核细胞中的多功能钙结合蛋白, 调节胞内许多与 Ca^{2+} 有关的生理功能, 引起人们广泛的研究兴趣。

我们曾报导从植物粉防己根中提取的粉防己碱, 作用的靶点是钙调蛋白 (CAM), 该药物在临床上已被用于治疗心绞痛, 高血压, 抗肿瘤等。为研究药物的结构与拮抗 CAM 活性的相关性, 我们对药物结构进行一系列改造, 发现它的一种衍生物, 0-4-乙氧基丁基小 胺 (EBB), 拮抗 CAM 活化的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的 IC_{50} 值为 $0.35 \mu M$ (拮抗活性是母药的 100 倍), 是一个新的强 CAM 拮抗剂。

EBB 与 CAM 相互作用的荧光光谱研究表明 EBB 与 CAM 有很高的亲和性, 其 K_d 值约 $5 \mu M$, 每个分子 CAM 有二个依赖 Ca^{2+} 的 EBB 结合位点, 该位点不同于常用的 CAM 拮抗剂三氟拉唑与 CAM 结合的位点。

材料与方法 (略)

结果与讨论

1. EBB 与 CAM 的结合引起蛋白构象的变化

丹磺酰荧光团标记的钙调蛋白 (D-CAM) 是研究配体与 CAM 相互作用的一个方便的工具。在无 Ca^{2+} 存在下, D-CAM 的发射光谱峰值在 $512 nm$, 荧光量子产率也很低。相反, 在 Ca^{2+} 存在下, D-CAM 的发射光谱蓝移, 峰值从 $512 nm$ 蓝移至 $495 nm$, 荧光强度增加约 1.6 倍, 用 EBB 滴定 Ca^{2+} -CAM 溶液时, 发射光谱峰值继续蓝移 (峰值 $484 nm$), 荧光强度进一步增加。相反在不存在 Ca^{2+} 的条件下, EBB 滴定 D-CAM 时, 荧光峰值蓝移及荧光强度变化的程度都远远小于 Ca^{2+} 存在下的情况。

上述荧光谱的变化反映 EBB 与 Ca^{2+} -CAM 复合物直接的结合引起 CAM 肽链构象的变化, 导致丹磺酰荧光团微环境的变化。而在无 Ca^{2+} 时, CAM 表面的疏水位点也能非专一性地吸附 EBB。

2. EBB 与 CAM 亲和常数的测定

EBB 滴定 Ca^{2+} -CAM 复合物, 引起荧光强度的增加, 可用于测定表现解离常数 (K_d') (产生半最大荧光增加的配体浓度)。EBB 分别滴定 $100, 75, 50, 25 \mu M$ D-CAM, 将 K_d' 对 [D-CAM] 浓度作图, 外推到 [CAM]=0 时的解离常数反映真实解离常数 K_d , 用该法测定 EBB 与 CAM 的解离常数在 $5 \mu M$ 左右, 接近于一个最强的 CAM 拮抗剂—calmidazolium 与 CAM 的解离常数。

3. EBB 与 CAM 结合位点的研究

在存在与缺少 Ca^{2+} 情况下, 定量测定 EBB 于 D-CAM 中, 检测荧光强度的变化, 由于滴定使用 D-CAM 浓度 ($1 \mu M$) 远高于解离常数 ($\sim 5 \mu M$) 可以认为滴定加入的 EBB 完全被结合在蛋白上。在 Ca^{2+} 存在下, 滴定曲线由两段具有不同斜率的直线组成, 折点出现在 $2 \mu M$ EBB 处 ($2 EBB/CAM$)。大于 $2 \mu M$ EBB 时, 滴定曲线的斜率几乎相当于存在 EGTA 时的滴定曲线。这结果表示在存在 Ca^{2+} 时 CAM 有二个专一性结合 EBB 的位点, 而不存在 Ca^{2+} 时 EBB 与 CAM 也有非专一性的相互作用。

为比较 EBB 与三氟拉唑 (一种常用的 CAM 拮抗剂) 与 CAM 结合的位点, 我们利用一种疏水探针 NPN, 它结合在 Ca^{2+} -CAM 复合物中, 荧光强度增加 8 倍以上, 峰值从 $435 nm$ 可蓝移至 $415 nm$, TFP 抑制荧光的增强与峰值的蓝移, 表明 TFP 可能竞争结合在 NPN 结合位点上, 相反 EBB 都进一步增加 NPN 的荧光及发射光谱的蓝移 ($408 nm$), 反映 EBB 与 CAM 的结合通过构象效应增加蛋白对 NPN 的亲和性, 也暗示它与 TFP 在 CAM 上有不同的结合位点。

天花粉蛋白紫外光谱的研究

陈世芝 冯章 董北

(中国科学院生物物理所七室)

郑惠群

(中国科学院生物物理所二室)

天花粉蛋白是由葫芦科植物栝楼根中提取的一种碱性蛋白质, 由 384 个氨基酸残基组成, 分子量 55600。它对终止妊娠和治疗某些妇科疾病有很好的疗效。

为了揭示天花粉蛋白在溶液中的结构和性质, 我们开展了天花粉蛋白紫外光谱的研究。

一、溶剂微扰差光谱的研究: 在 $210-5-8-6$ 的范围内用了几种分子大小不同的微扰剂。

结果表明: 在各种条件下, 所有的 13 个 Tyr 残基中约 40% 是“暴露”的, 其余是“内埋”的。详见表 1。

	pH 7.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 7.0	pH 8.6
D_{280}	51.5%	47.6%	47.6%	47.6%	45.5%
D_{280}/D_{260}	42.4%	45.5%	45.5%	41.4%	42.1%
Z_{max}	40.2%	36.0%	44.0%	50.6%	47.6%
PD_{max}		38.2%	36.0%	41.7%	
PD_{max}/D_{280}		46.4%	44.6%	43.6%	

表 1

二、酪氨酸光谱测定: 在波长 $282 nm$ 完成了四个温度 $20^\circ C$, $24^\circ C$, $34^\circ C$, $38^\circ C$ 的光谱测定。在 $20^\circ C$, $24^\circ C$ 天然天花粉蛋白滴定曲线呈两步阶梯状; 第一步发生在 $pH 9-pH 11.5$, 它是可逆的, 不依赖于时间; 第二步发生在 $pH 11.5$ 以上, 是不可逆的, 并随时间而变化。如图 1 所示。第一步相当于 4—5 个 Tyr 残基被滴定。其余 7—8 个残基都在第二步被滴定。而 $34^\circ C$ 和 $38^\circ C$ 的滴定曲线还存在第三步, 如图 2 所示, 它相当于 2—3 个 Tyr 残基被滴定。

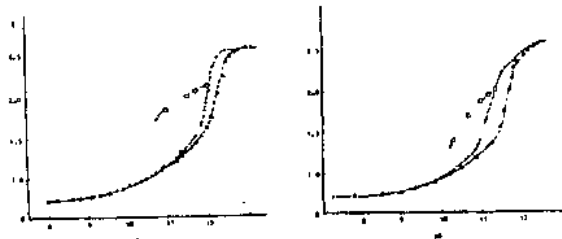


图 1

图 2

由此揭示出天花粉蛋白分子可能存在一个较稳定的“核心”。从天花粉蛋白分子三维结构可见。它的 α 螺旋集中在分子中部, β 折叠层分布在它的周围, 对照三维结构, 可以设想一个天花粉蛋白分子中 13 个 Tyr 残基是这样被滴定: 在曲线第 I 步, 位于分子表面的约 4—5 个 Tyr 残基被滴定; 继续提高 pH, β 片层 A (β_1, β_2 组成) 和 β 片层 B ($\beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7, \beta_8$ 组成) 向外展开, 使那些位于 α 螺旋和 β 折叠之间的约 5—6 个 Tyr 残基可以被滴定, 它相当于滴定曲线第 II 步。最后, 在更高 pH, 由几段 α 螺旋构成的分子“核心”可能被破坏, 位于其间的 2—3 个 Tyr 残基得以暴露, 从而形成了滴定曲线的第 III 步。

还计算了四个温度第 I 步滴定反应的 pK' , 列于表 2。

最后, 对 Tyr 残基的环境和稳定的“核心”以及体系分子稳定的各因素进行了分析和讨论。

pK'	K_d'	$20^\circ C$	$24.5^\circ C$	$33.8^\circ C$	$38^\circ C$
1		10.70	10.75	10.40	10.22
2		10.94	10.77	10.35	10.25
3		10.52	10.76	10.38	10.24

表 2