

几种蛋白质的真空紫外 CD 谱研究

盛毅 李晓薇 李冬梅

(中国农业大学信息学院 北京 100094)

陶冶

(中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

摘要 介绍了北京同步辐射装置(RSRF)3B1B VUV 实验站在 VUVCD 谱测量方面的新进展,并对其中几种蛋白质 VUVCD 谱的测量结果进行了分析.

关键词 同步辐射 VUVCD 谱 蛋白质 CD 谱 蛋白质二级结构

1 引言

1965 年, Holzwarth 和 Doty 第一次把圆二色性应用于蛋白质结构的分析中^[1]. 当时, 由于实验水平和技术的限制还只能得到 α 螺旋的信息. 直到 20 世纪 70 年代, 才在圆二色谱中找到了关于 β 转角的信息. 后来, 随着技术的进一步发展, 能够测量到的圆二色谱的谱区越来越靠近真空紫外, 从圆二色谱中获得的结构信息也就越来越多. 迄今为止, 圆二色谱仪可达到的最短波长为 140nm, 有报道的可以获得误差范围内数据的最短波长为 168nm. 在圆二色谱仪取得长足进步的同时, 对蛋白质圆二色谱解析的方法也取得了很大进步^[2-4]. 实验的几种蛋白质的 CD 谱是在中国科学院高能物理研究所的同步辐射装置 3B1B VUV 实验站的真空紫外圆二色谱仪上测得的, 它与商业用的圆二色谱仪相比有以下优点: 一是同步辐射光在真空紫外波段的高强度极大地改善了信噪比; 二是波长从普通仪器的 190nm 延伸到 160nm, 而这一波段包含丰富的蛋白质结构信息; 三是所用样品量很少, 为 μ l 量级, 这点在结构基因组学的研究中尤显重要.

2 实验

2.1 实验材料

2.1.1 蛋白质缓冲液的制备

取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶液 29.05ml, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 22.5ml 混合, 得 PH 值为 6.79. 取该混合液 12.5ml 并定容至 250ml, 得该混合液的浓度为 0.01M, PH 值为 6.52.

2.1.2 蛋白质样品

肌球蛋白(Myoglobin)、核糖核酸酶 A(Ribonuclease)、木瓜蛋白酶(Papain)、溶菌酶(Lysozyme)和血红蛋白。

2.1.3 实验仪器

(1) 样品池: 样品池为石英镀膜的两个玻璃片, 光程为 0.01mm。

(2) 圆二色谱仪: 中国科学院高能物理研究所的同步辐射装置 3B1B VUV 实验站的真空紫外圆二色谱仪。

2.2 测量方法

2.2.1 仪器校正

圆二色谱仪使用(+)-10-樟脑磺酸((+)-10-Camphorsulfonic acid-CSA)进行校正。仪器校正应符合以下标准:

(+)-10-樟脑磺酸的浓度为 1mg/ml; 样品池光程为 1mm; (+)-10-樟脑磺酸在 295nm 的吸光度为 $\Delta\varepsilon = 2.36$ (或 $\Delta A = 0.51 \times 10^{-3}$, $\theta = 16.8\text{mdeg}$); (+)-10-樟脑磺酸在 192.5nm 的吸光度为 $\Delta\varepsilon = -4.90$ (或 $\Delta A = 1.06 \times 10^{-3}$, $\theta = 35\text{mdeg}$); 测量温度: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; 时间常数: 10s; 扫描速率: 2nm/min; 光谱仪狭缝: 1.6nm。

2.2.2 处理方法

称取肌球蛋白 0.0069g 溶于缓冲液中并定容至 1ml。取 0.25 μl 滴入样品池中央并迅速将两玻片对紧并用金属夹固定以待测量; 称取核糖核酸酶 A 0.0011g, 木瓜蛋白酶 0.0018g, 溶菌酶 0.0012g 及血红蛋白 0.0009g 按与肌球蛋白同样的处理方法进行处理。

2.2.3 波长范围

用(+)-10-樟脑磺酸在 160nm—330nm 对仪器进行校正, 对样品的测量范围为 160nm—260nm。

3 测量结果

在北京同步辐射装置(RSRF)3B1B VUV 实验站, 用其真空紫外圆二色仪测量 5 种蛋白质的 CD 谱如图 1 所示。

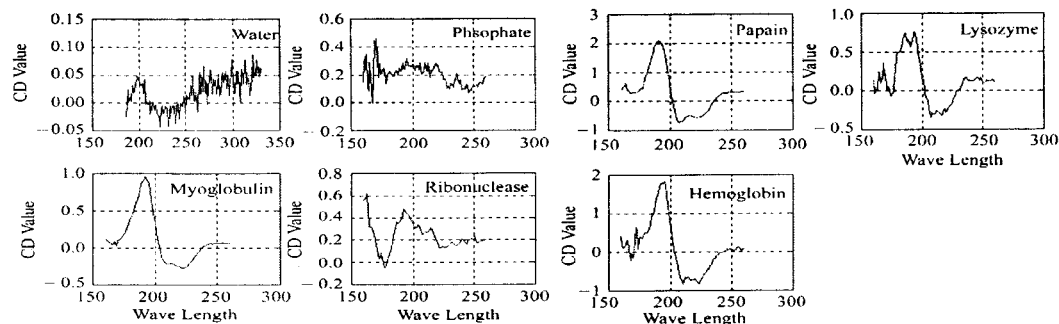


图 1 水、磷酸缓冲液、肌球蛋白、核糖核酸酶 A、木瓜蛋白酶、溶菌酶和血红蛋白的圆二色谱

用径向基神经网络算法(采用了由美国 Oregon 大学 W.Curtis Johnson 教授提供的 26 种标准蛋白数据, 其中 20 个建模, 6 个做预测检验.)预测了实验所测的 5 种蛋白质二级结构的结果并与其 X 射线衍射结果进行了比较, 如表 1 所示.

表 1 径向基网络方法预测实验所测蛋白质的二级结构(波长在 178nm—260nm 之间)

	H	G	E	T	P	O
肌球蛋白						
X 射线衍射						
径向基网络	0.488	0.037	0.153	0.092	0.045	0.186
核糖核酸酶 A						
X 射线衍射	0.171	0.049	0.191	0.110	0.081	0.398
径向基网络	0.150	0.056	0.205	0.120	0.084	0.385
木瓜蛋白酶						
X 射线衍射	0.239	0.050	0.152	0.109	0.081	0.370
径向基网络	0.239	0.057	0.161	0.096	0.050	0.293
溶菌酶						
X 射线衍射	0.305	0.117	0.039	0.195	0.023	0.320
径向基网络	0.343	0.074	0.036	0.115	0.033	0.399
血红蛋白						
X 射线衍射	0.681	0.082	0.000	0.100	0.004	0.133
径向基网络	0.584	0.057	0.053	0.087	0.014	0.205
<i>R</i>	0.982	0.892	0.965	0.516	0.880	0.782
σ	0.057	0.025	0.024	0.039	0.020	0.074

H: α 螺旋(alpha-Helix); G: 3/10 螺旋(3/10-Helix); E: 扩展的 β 折叠片(Extended-beta-strand);
 T: β 转角(beta-Turns); P: 聚脯氨酸-类似 3/1-螺旋(Polyproline-like 3/1-helix); O: 其它结构(Others);
 R: 相关系数(Correlative Coefficient); σ : 标准差(Standard Difference).

从上表可以看出径向基网络方法对实验所测蛋白质的预测结果良好, 其中 α 螺旋和扩展的 β 折叠的预测相关性都比较高(相关系数都在 0.95 以上), 其它几种结构则相对较低一些, 这可能是由于测量误差引起的. 实验所测 5 种蛋白质的波段为 160nm—260nm, 但由于用于建立模型的 CD 谱范围是从 178nm—260nm, 因而只截取了实验所测该波段 5 个蛋白质的 $\Delta\epsilon$ 值, 这样便失去了 160nm—177nm 波段的信息, 而这一波段则包含丰富的蛋白质结构信息. 因而如果有足够多的延伸至 160nm 的可靠的蛋白质的圆二色谱来构成参考矩阵谱, 圆二色谱的解析一定会迈上一个新的台阶.

参考文献(References)

- 1 John T. Pelton, Larry R. Mclean. *Analytical Biochemistry*, 1996, **235**: 1—10
- 2 Bridget Dalmas, William H Bannister. *Analytical Biochemistry*, 1995, **225**:39—48
- 3 Norma J Greenfield. *Analytical Biochemistry*, 1996, **235**:1—10
- 4 Elizabeth Zubritsky. CD Begins to Bloom. *Analytical Chemistry News & Features*, August i. 1999, 545A

Study on Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism Spectra of Several Proteins

SHENG Yi LI Xiao-Wei LI Dong-Mei

(College of Information, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

TAO Ye

(Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Beijing Synchrotron Radiation Setting (BSRF)3B1B Vacuum Ultraviolet Experimental Station and new development on Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism spectroscopy (VUVCD) are introduced. At the same time, results on VUVCD spectra of several proteins are analyzed.

Key words synchrotron radiation, VUVCD spectra, circular dichroism of proteins, secondary-structure of proteins