

运用圆二色谱研究酶与化合物相互作用的机理^{*}

沈 琼¹, 黄 滨¹, 邵嘉亮¹, 彭 权¹, 马 林¹, 古练权^{1,2}

(1 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

2 中山大学药学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 介绍远紫外圆二色谱数据计算蛋白质二级结构的原理、方法、实验技术。应用圆二色谱原理、方法、实验技术研究 α -葡萄糖苷酶与化合物的相互作用, 初步提出酶被化合物抑制的机理。

关键词: 圆二色; 蛋白质二级结构; 酶; 抑制剂; 机理

中图分类号: O 621.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 04-0062-03

随着人们对生命科学的日益关注, 蛋白质的相关研究成为生物分析中的重要课题。自 K endrew 采用 X 射线技术, 首次揭示肌红蛋白质的折叠结构以来, 蛋白质的研究从氨基酸残基序列的测定, 深入到空间结构—构象的确定。近年来, 人们发现疯牛病, 克—雅氏病和震颤病等神经退行性疾病是由 Prion 病蛋白质所致, 而构象变化在 Prion 病蛋白的致病因素中起着至关重要的作用^[1-2], 这使人们进一步认识到蛋白质的构象对其生理功能的巨大意义。要深入理解蛋白质的生物活性, 就必须了解它的构象及其相关变化。圆二色 (circular dichroism, 简称 CD) 光谱是研究稀溶液中蛋白质构象的一种快速、简单、较准确的方法。1969 年, Greenfield 最早用 CD 光谱数据估计了蛋白质的构象^[3], 此后相关的研究方法陆续有报道^[4-12]。

特别是近十几年来, 用远紫外圆二色 (Far UVCD) 数据分析蛋白质二级结构, 不但在计算方法和拟合程序上有了极大的发展, 而且随着 X 射线晶体衍射与核磁共振技术的提高, 越来越多的蛋白质的精确构象得到测定, 为 CD 数据的拟合提供了更精确的数据库。CD 光谱技术作为研究溶液状态下蛋白质或多肽构象的一种重要手段, 已受到研究者的广泛关注。

1 蛋白质的圆二色性及其测量

1.1 蛋白质的圆二色性

在蛋白质或多肽中, 主要的光活性基团是肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基及二硫桥键。当平面圆偏振光通过这些光活性的生色基团时, 光活性

中心对平面圆偏振光中的左、右圆偏振光的吸收不相同, 产生的吸收差值, 由于这种吸收差的存在, 造成了偏振光矢量的振幅差, 圆偏振光变成了椭圆偏振光, 这就是蛋白质的圆二色性。

蛋白质的 CD 光谱一般分为两个波长范围, 即 178 ~ 250 nm 为远紫外区 CD 光谱, 250 ~ 320 nm 为近紫外区 CD 光谱。远紫外区 CD 光谱反映肽键的圆二色性。在蛋白质或多肽的规则二级结构中, 肽键是高度有规律排列的, 排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况。因此, 具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生 CD 谱带的位置、吸收的强弱都不相同。 α -螺旋结构在靠近 192 nm 有一正的 β 谱带, 在 222 和 208 nm 处表现出两个负的特征肩峰谱带; β 折叠的 CD 谱在 216 nm 有一负谱带, 在 185 ~ 200 nm 有一正谱带; β 转角在 206 nm 附近有一正 CD 谱带, 而左手螺旋 P2 结构在相应的位置有负的 CD 谱带。

1.2 CD 测量的样品准备及测试条件选择

由于 CD 是一种定量的、灵敏的光谱技术。所以, 样品的准备及测量条件的选择对分析计算蛋白质构象的准确性至关重要, 尤其是一些蛋白质的构象信息出现在低 195 nm 的真空紫外区, 对试剂和缓冲体系的要求更高。测试用的蛋白质样品中应避免含有光吸收的杂质, 缓冲剂和溶剂在配制溶液前最好做单独的检查, 透明性极好的磷酸盐可用作缓冲体系。

蛋白质最佳浓度的选择和测定, 决定 CD 数据计算二级结构的准确性。CD 光谱的测量一般在蛋白质含量相对低 (0.01 ~ 0.20 g/L) 的稀溶液中进

* 收稿日期: 2005-12-29

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (20032021)

作者简介: 沈琼 (1976 年生), 女, 讲师, 通讯联系人: 马林; E-mail: ceanl@mail.sysu.edu.cn

行, 溶液最大的吸收不超过 2。稀溶液可减少蛋白质分子间的聚集。但如果太稀, 则导致蛋白质过多地吸附在容器壁上, 影响实验的准确性。确定蛋白质的精确浓度是计算样品的二级结构的关键。一般蛋白质在 280 nm 附近的消光系数可用来计算浓度, 但此处吸收信号与蛋白质的构象有关, 该方法的误差一般可达到 5%。采用慢的扫描速度和较长的响应时间可以提高 CD 的信噪比。必要时, 用数据平滑算法和傅里叶变换对谱图进行平滑处理, 可得到较高质量的光谱图。

2 CD 光谱应用于酶抑制剂的研究

为了进一步熟悉 CD 光谱应用的条件, 同时为了从分子水平研究化合物与酶 (一种蛋白质) 作用后酶 (蛋白质) 的活性抑制机理, 进行了酶与化合物 (化合物即酶抑制剂为本实验组合成, 结构式如图 1 其中, 化合物 1、2 为非竞争的酶抑制剂, 3 为竞争的酶抑制剂) 作用后的酶的溶液构象的 CD 光谱实验, 寻找化合物对酶活力影响之原因。

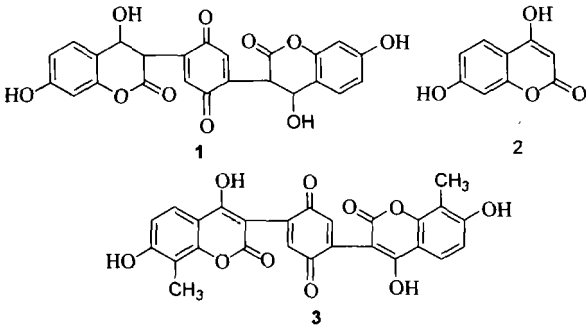


图 1 3 种酶抑制剂和结构式
Fig. 1 Structure of compounds 1, 2, 3

2.1 CD 测定

图二色谱在 Jasco810 型 CD 光谱仪上进行测定, 被测样品浓度为 0.3 ~ 0.5 mg/L, 采用 1 mm 液池, 在 180 ~ 260 nm 范围内扫描, 累加 10 次, 按照 chedi 的计算方法求各二级结构的比例。

2.2 结果与讨论

从表 1 看出, 当化合物都是 α -葡萄糖苷酶的非竞争型抑制剂时, 随着化合物量的增加, 酶的二级结构中 α 螺旋的含量显著降低, β 折叠的含量的变化没有一定的趋势, 但是 $(\alpha + \beta)$ 的总的含量呈下降的趋势, Loop (β -turn 和 random) 的总的含量是上升的趋势。

从表 1 还可以看出, 当化合物是竞争型抑制剂时, 随着化合物量的增加, α 螺旋含量是呈增加趋

势, 而 β 折叠出现下降趋势, 但总的 $\alpha + \beta$ 的含量是呈下降趋势, Loop 的含量是呈上升趋势。

表 1 α -葡萄糖苷酶二级结构的影响

Tab. 1 The influence of compounds on the secondary structure of α -glucosidase

化合物	<i>c</i> ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	质量百分含量 %			
		α -HELIX	β -SHEET	β -TURN	$\alpha + \beta$
1	0	39.3	15.8	18.7	26.1
1	10.0	36.0	14.6	18.9	30.6
1	20.0	22.0	18.3	28.5	31.2
1	30.0	17.5	34.2	22.6	25.7
2	200	36.2	0.0	25.6	38.2
3	0	31.0	30.3	12.3	26.5
3	20.0	40.4	16.9	9.50	33.2
3	40.0	46.3	4.7	11.1	37.9

α -葡萄糖苷酶是 α/β 结构模体的酶, 因此合适的 α 螺旋的含量, 一定 α/β 的比率, 以及 Loop 的含量与酶的特定的功能域的形成以及酶的构象的变化是相关的, 而酶的天然构象以及酶的特定的功能域对酶保持其活性是十分重要的^[9-10]。酶失去活性有以下几个原因: 第一, 由于 α 螺旋结构紧密的特殊性, 过大 α 螺旋度的构象, 由于结构紧密使其不利于酶形成活性中心, 从而使底物不能与之结合, 使酶假象失去活性; 过小的 α 螺旋度的构象, 就会彻底破坏酶蛋白质的氢键结构或其他结构而产生酶结构不可逆破坏。第二, 由于 Loop 是一个柔性极强的构象。Loop 越多, 它就有越多的机会运动到活性中心或是键合位点的上面, 从而覆盖这些有可能与底物结合的位点, 导致底物或是抑制剂与酶结合的失败, 从而使酶失去活性。第三, 由于 α -葡萄糖苷酶是 α/β 结构模体, 所以其天然构象与 α/β 的比率有关, 特定的 α/β 比率决定天然构象。 α/β 的比率改变越大, 导致分子的折叠 (fold) 或去折叠 (unfold) 改变愈大, 总体上就呈现的是愈多的错误的折叠 (misfold), 最终导致酶天然构象不能形成, 从而使酶失去活性。这说明酶的天然构象改变越多, 活性中心或是键合位点就减少, 酶的活性越差。

从表 1 可以明显的看出, 随着非竞争型抑制剂化合物浓度增加, 峰变大且蓝移; 同时, 根据表 1 可以推测出, 酶分子构象发生变化, 结构趋于松散, 天然构象改变, 从表 1 可以看出, 竞争型抑制剂与酶作用后随着化合物浓度增加, 峰变小且红移, 酶的构象改变。上述结果表明, 酶的活性密切依赖于酶的构象, 特别是活性部位点构象, 邹承鲁提出, 酶的活性部位是处于局部的, 与整个酶分子

比较, 它是对变性剂更为敏感的部位, 且酶分子活性部位的相对柔性或运动性可能为酶的催化活力所必需, 对于酶活性部位的功能基因间的正确空间几何关系的任何变化都将破坏酶的活力。这是由于构象变化, 特别是活性部位构象变化的结果。

活性部位变得太大, 肽链发生较大程度的松散, 酶分子便不能有效结合底物, 基因之间不能正确定位, 导致活力下降或完全失活, 因此, 酶活性部位的适度柔性才是表现酶的最高活力所必需的。

研究结果显示, α -葡萄糖苷酶的活性与其天然构象有着重要的关系, 天然构型的改变预示着酶活性改变, 化合物通过与酶分子的相互作用而改变酶分子构象, 从而使酶降低活性甚至失活。

参考文献:

- [1] MESTEL R. Putting prions to the test[J]. Science 1996 273(5272): 184 – 189.
- [2] PETCHAN KOW C, SABORIO G P, ANDERES L et al. Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism[J]. FEBS Letters 2001 509(3): 451 – 456.
- [3] GREENFIELD N, FASMAN G D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation[J]. Biochemistry 1969 8(10): 4108 – 4116.
- [4] SAXENA V B, WETLAUFER D B. A new basis for interpreting the circular dichroic spectra of proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1971 68(5): 969 – 972.
- [5] CHEN Y H, YANG J T. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by

optical rotatory dispersion and circular dichroism[J]. Biochem Biophys Res Commun 1971 44(6): 1285 – 1291.

- [6] BRAHMS S, BRAHM J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism[J]. J Mol Biol 1980 138(2): 149 – 178.
- [7] CHANG C T, WU C S G, YANG J T. Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta turns[J]. Anal Biochem 1978 91(1): 13 – 31.
- [8] BOLOTINA IA, CHEKHOV V O, LUGAUSKAS V Y et al. Determination of the secondary structure of proteins from their circular dichroism spectra. I. Protein reference spectra for alpha, beta and irregular structures[J]. Mol Biol Mosk 1980 14(4): 891 – 902 (Russian).
- [9] CHEN Y H, YANG J T, MARTNEZ H M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion[J]. Biochemistry 1972 11(22): 4120 – 4131.
- [10] ADLER A J, GREENFIELD N, FASMAN G D. Complexes of deoxyribonucleic acid with lysine rich (fl) histone phosphorylated at two separate sites: circular dichroism studies[J]. Arch Biochem Biophys 1972 153(2): 769 – 777.
- [11] PROVENCHER S W, GLOCKNER J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism[J]. Biochemistry 1981 20(1): 33 – 37.
- [12] HENNESSEY J B, JOHNSON W C Jr. Information content in the circular dichroism of proteins[J]. Biochemistry 1981 20(5): 1085 – 1094.

Mechanism Discussion of Interaction Between Enzyme and Several Compounds with Circular Dichroism Method

SHEN Qiong¹, HUANG Bin¹, SHAO Jir-liang¹, PENG Quan¹, MA Lin¹, GU Lian-quan^{1,2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering Sun Yat sen University, Guangzhou 510275 China)

2. School of Pharmaceutical Sciences Sun Yat sen University, Guangzhou 510275 China)

Abstract The principles, methods and experimental techniques for the determination of the protein secondary structure with Far-ultraviolet (UV) circular dichroism data are introduced. The interaction between enzyme (α -glucosidase) and several compounds were investigated. The inhibitory mechanism of enzyme on α -glucosidase was discussed.

Key words circular dichroism; protein secondary structure; enzyme; inhibitor; mechanism