

甲基- β -D-半乳糖与 HBP 相互结合的 质子 NMR 研究

——二价钙离子的作用

王 金 凤

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

摘 要

本文通过质子 NMR 谱研究 Ca^{2+} 对 HBP 上完整的唾液酸残基与甲基- β -D-半乳糖之间相互作用的影响。测量了不同的 Ca^{2+} 浓度时, HBP 和半乳糖混合溶液的质子 NMR 谱。由实验结果分析表明, Ca^{2+} 参与了 HBP 上完整的唾液酸残基和半乳糖的相互结合, 使半乳糖分子较稳定地处于结合态。用掺有 EDTA 样品的质子 NMR 谱证实了这一结论。

肝浆细胞膜与去唾液酸血清糖蛋白 (desialylated serum glycoprotein) 的相互结合, 是该糖蛋白被输入细胞内进行分解代谢的先导, Ashwell 等人已对这一问题作了深入的研究^[1,2]。他们发现, 肝浆细胞膜与去唾液酸糖蛋白结合的必要条件是: 同时存在 Ca^{2+} 和肝浆细胞膜结合位——HBP 的完整唾液酸残基^[3]。对 ^{125}I 标记的研究指出, 去唾液酸糖蛋白的摄入机制是特异的, 即要求血清糖蛋白末端唾液酸残基预先被切除, 而暴露出糖键倒数第二位的完整半乳糖残基^[4]。

本文主要是运用质子核磁共振波谱分析由兔子肝分离提纯的 HBP 和甲基- β -D-半乳糖相互作用中 Ca^{2+} 的影响。

一、材料与方 法

1. HBP 的分离 运用亲和柱吸附作用由兔子肝分离提纯 HBP^[1]。在 4°C 下将兔子肝破碎, 先后用缓冲液 ($\text{pH} \sim 6.0$) 和去离子水在匀浆器中进行匀浆, 每次匀浆后取匀浆液的离心沉淀物。在最后一次用去离子水匀浆后, 将去离子水匀浆液的离心沉淀物溶解在 Triton (X-100) 缓冲液中, $\text{pH} \sim 7.8$, 并在 4°C 下保温若干小时。然后, 再取离心后的上清液, 将亲和凝胶放入此上清液中, 并加入一定量的 CaCl_2 , 再将此悬浮液 ($\text{pH} \sim 7.8$) 置于 4°C 中保温。在保温时, HBP 逐渐被结合到亲和凝胶上。过滤保温后的悬浮液, 将所得到的凝胶装入柱中, 在 4°C 下, 可用不含 Ca^{2+} 的缓冲液 ($\text{pH} \sim 6.0-6.4$) 从此亲和柱上洗脱 HBP。将提取的

本文 1984 年 4 月 4 日收到, 1985 年 2 月 25 日收到修改稿。

本文缩写: NMR 为核磁共振; HBP 为肝结合蛋白 (hepatic binding protein)。

HBP 放入 0.2 M NaCl 溶液中透析三天,再经冷冻干燥后,置于零度以下保存备用。

用溴化氰活化方法将人体血清类粘蛋白 (humanorosomuroid) 以共价键方式连接到琼脂糖 4B 凝胶上,再用唾液酸苷酶除出蛋白质的唾液酸末端,由此得到亲和凝胶。

琼脂糖 4B 凝胶,人体血清类粘蛋白以及唾液酸苷酶是 SIGMA 公司产品。甲基- β -D-半乳糖系 CALBIOCHEM-BEHRING 公司产品。试剂未经进一步提纯而直接使用。

2. NMR 样品的准备 将提取的 HBP 溶解在含有 0.5 M NaCl 的 D_2O 中,然后加入甲基- β -D-半乳糖以及 $CaCl_2$,溶液的 pH 值被校正到 ~ 7.8 (pD ~ 7.4)。在 Ca^{2+} 滴定实验中,使用了 3 mg/ml HBP,甲基- β -D-半乳糖浓度为 1.66 mM,而 Ca^{2+} 浓度从零增加到 0.066 mM。

从上述每一种混合溶液中各取出 0.5 ml,分别移入不同的 5 mm 直径标准 NMR 样品管内,并将这些样品管置于 4°C 下保存,以备 NMR 实验之用。

3. 质子 NMR 测量 在室温下,由 Bruker WM 500 核磁共振谱仪记录质子 NMR 谱,质子共振频率为 500.13 MHz,得到了不同 Ca^{2+} 浓度时半乳糖质子信号的线宽。由半乳糖各质子峰所包含的面积以及 HBP 上唾液酸质子峰所包含的面积,计算出半乳糖质子峰面积与唾液酸质子峰面积之比,由此得到在 Ca^{2+} 滴定实验中半乳糖各质子峰的相对面积变化。

二、实验结果

图 1 表示 500 MHz HBP 质子 NMR 谱。图中化学位移为 2.1 ppm 的峰来自 HBP 的唾液酸残基质子。因为在溶液中加入唾液酸苷酶后,唾液酸残基逐渐从 HBP 上被切除而呈游离小分子状态。从图 1 上部小图可见,HBP 质子 NMR 谱中位于 2.1 ppm 的峰发生变化,在 2.0 ppm, 1.8 ppm 和 2.2 ppm 附近出现质子峰,它们分别相应于唾液酸质子 NMR 谱中的 N-乙酰基质子峰、 H_{3a} 和 H_{3c} 四重峰^[5]。在 1 ppm 附近,以及 3.8 ppm 附近的信号均是来自从亲和柱上洗脱 HBP 过程中残留的 Triton(X-100)质子的贡献。由图 2 可以看到,这些信

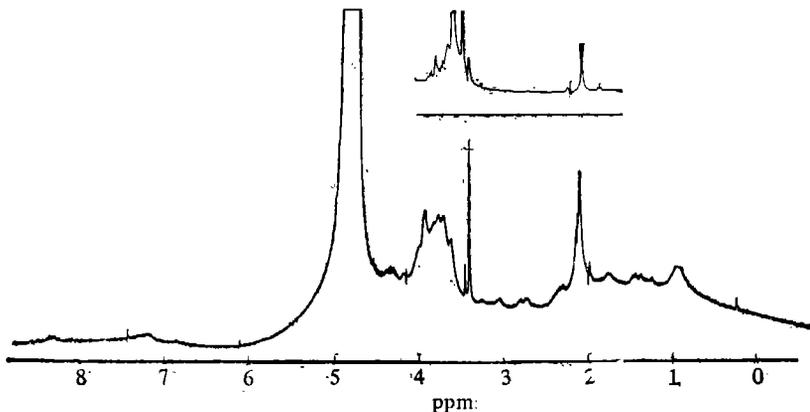


图 1 溶解在 D_2O 中的 HBP 质子 NMR 谱

(图中每一格为 1 ppm. 波谱参数:累加 1200 次,采样时间 1.6 s, 16k 内存 Fourier 变换,窗函数等于零。在 4.78 ppm 附近的强峰为样品中的 H $_2$ O 水峰。上部小图为溶液中加入唾液酸苷酶后,HBP 质子 NMR 谱的变化)

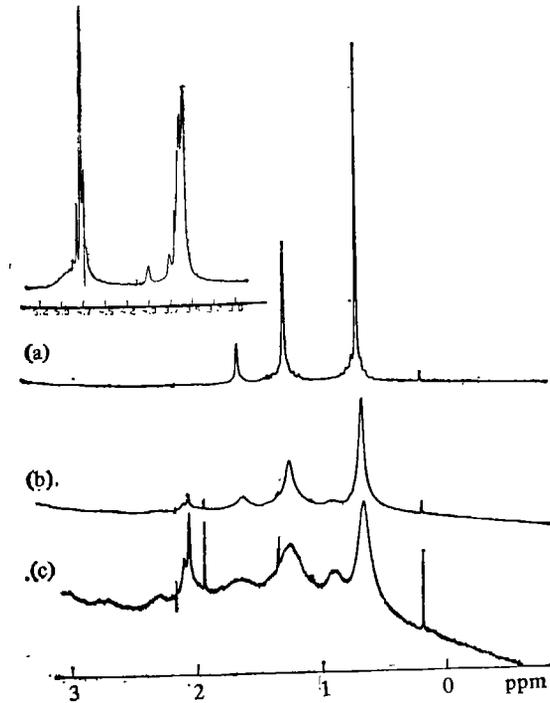


图2 HBP 和 Triton (X-100) 混合溶液在 0—3ppm 波谱范围内的质子 NMR 谱 ((a) 0.5% Triton 的 D₂O 溶液; (b) 0.4% Triton 和 3 mg/ml HBP; (c) 0.2% Triton 和 3 mg/ml HBP. 图中左上方小图为 3.8 ppm 附近的纯 Triton 质子谱 (4.7 ppm 附近为 HDO 水峰))

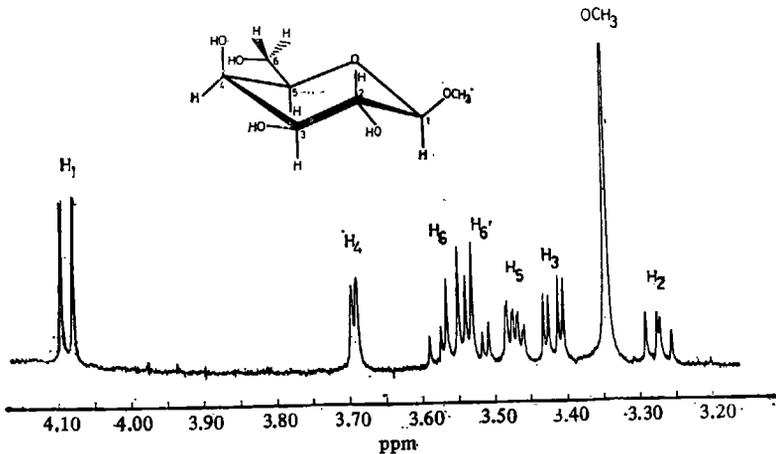


图3 溶于 D₂O 的甲基-β-D-半乳糖质子 NMR 谱 (每一格代表 0.05ppm. 波谱参数如下: 累加 128 次, 采样时间为 2.7 s, 32 k 内存 Fourier 变换, 窗函数为零. 图中上部小图为甲基-β-D-半乳糖分子结构式)

号出现的位置与 Triton 的 500 MHz 质子 NMR 谱峰位置相同,同时,在 HBP 和 Triton 混合溶液中 Triton 含量逐渐降低时可以观察到与图 1 类似的谱线形状. 在 3.4 ppm 附近的尖峰是样品中小分子掺杂的结果, HBP 样品经再次透析后可除去此峰. 与所有蛋白大分子相

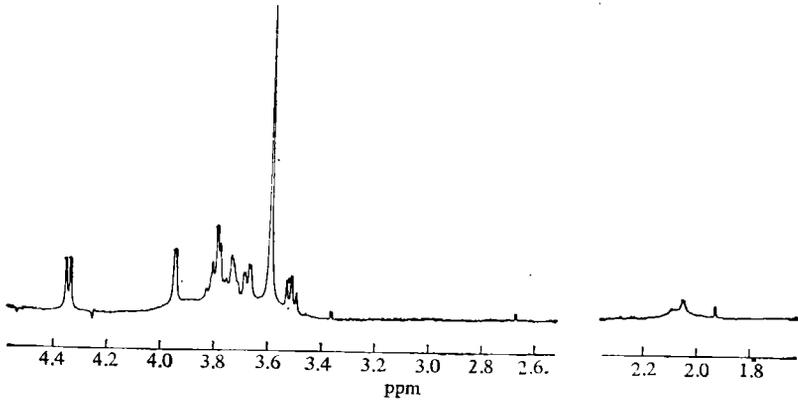


图 4 HBP (1.5 mg/ml) 和甲基-β-D-半乳糖 (3.29mM) 混合溶液的质子 NMR 谱
(每一格为 0.2 ppm. 波谱参数: 16k 内存采集数据, 2048 次累加, 用 1Hz 致宽窗
函数在 32 k 内存中进行零填充 Fourier 变换)

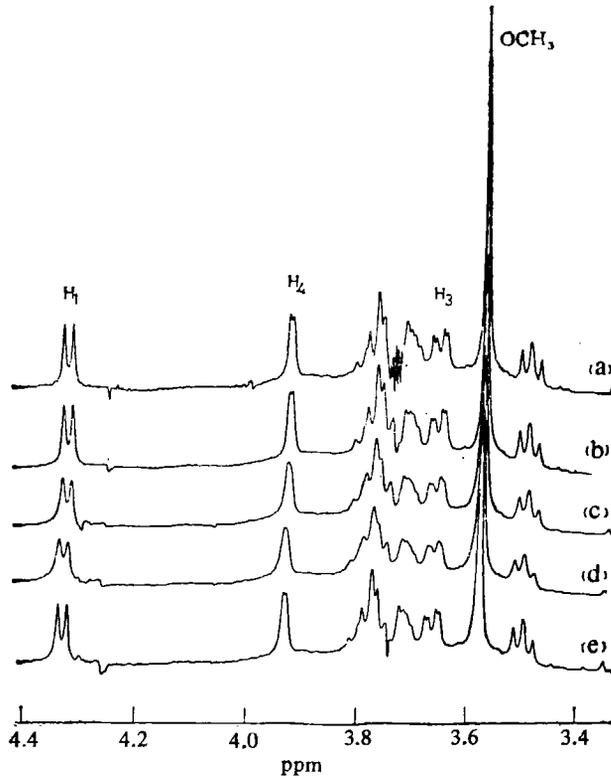


图 5 3 mg/ml HBP, 1.66 mM 甲基-β-D-半乳糖和不同浓度 Ca^{2+} 的混合溶液中半乳糖质子的 NMR 谱

((a) 没有 Ca^{2+} 存在; (b) 0.007 mM Ca^{2+} ; (c) 0.039 mM Ca^{2+} ; (d) 0.066 mM Ca^{2+} ; (e) 0.066 mM Ca^{2+} + 0.07 mM EDTA. 所有波谱是在同样的波谱参数和实验条件下记录的)

似,在 HBP 质子 NMR 谱的谱宽范围内呈现出背底隆起,这是来自 HBP 中质子峰相互叠加的结果。

图 3 为甲基-β-D-半乳糖在 D₂O 溶液中的质子 NMR 谱。由同核去耦脉冲技术完成识

谱。由于 H₁ 和 H₂ 质子之间的自旋-自旋耦合, H₁ 质子信号分裂为双重峰。H₃ 和 H₂ 以及 H₄ 之间同时存在自旋-自旋耦合,结果 H₃ 质子信号分裂成四重峰。H₄ 除与 H₃ 之间存在自旋-自旋耦合以外,与 H₅ 之间仅有弱的耦合,所以 H₄ 基本表现为双重峰。H₅ 质子信号以及两个立体异构质子 H₆、H_{6'} 的信号则都表现为多重峰,这同样是由于它们之间的自旋-自旋耦合的结果。

在半乳糖和 HBP 混合溶液的质子 NMR 谱中(图 4),相对于 HDO 水峰信号,半乳糖分子的质子信号出

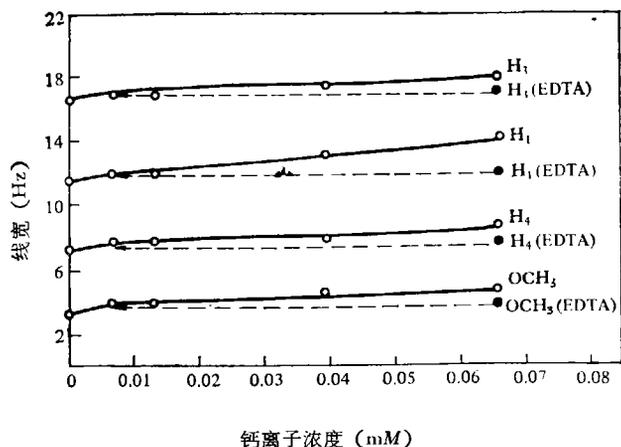


图 6 半乳糖分子的质子峰线宽随 Ca²⁺ 浓度增加的变化曲线(虚线箭头表明,加入 EDTA 后半乳糖各质子峰线宽的减小值及其所对应的 Ca²⁺ 浓度)

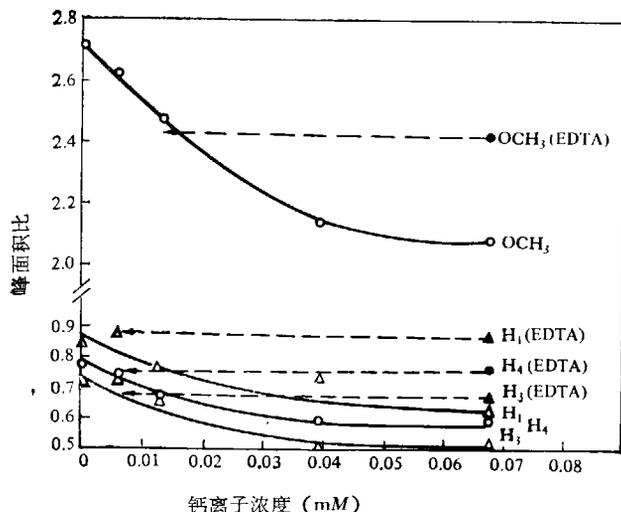


图 7 半乳糖分子的质子峰面积与唾液酸质子峰面积之比随 Ca²⁺ 浓度增加的变化曲线(虚线箭头表明,在样品中加入 EDTA 后,面积比的增大值及其所对应的 Ca²⁺ 浓度)

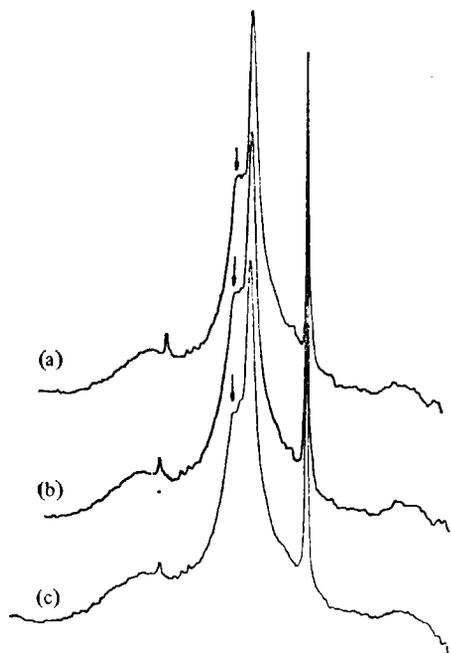


图 8 HBP 的唾液酸残基质子 NMR 信号(相应于图 4 中位于 2.05 ppm 附近的唾液酸质子信号)(样品含有 1.5 mg/ml HBP, 3.29 mM 半乳糖以及不同 Ca²⁺ 浓度。(a) 不存在 Ca²⁺, (b) 0.029 mM Ca²⁺, (c) 0.12 mM Ca²⁺)

现在 3.4—4.4 ppm 波谱范围内,而 HBP 的唾液酸残基质子信号位于 2.05 ppm 附近(图 4 中右图)。

在 Ca^{2+} 滴定实验中, HBP 和半乳糖的浓度保持不变。图 5 给出在不同的 Ca^{2+} 浓度时,半乳糖质子信号变化情况。以 H_1 质子峰的分裂情况为例,可以看到,随着样品中 Ca^{2+} 浓度的增加, H_1 双重峰的裂距不变,但峰分裂的深度减小,说明 H_1 峰的线宽增宽。半乳糖 H_1 , H_2 , H_4 和 OCH_3 等质子峰的线宽与 Ca^{2+} 浓度的关系曲线表示于图 6。图 7 表明,半乳糖质子峰面积与唾液酸质子峰面积的比值随 Ca^{2+} 浓度的增加而减小。当 Ca^{2+} 浓度增加至 0.066 mM 左右,半乳糖质子 NMR 谱线线宽显著增宽,峰面积也相应地显著减小(图 5 中(d))。在这样的混合溶液中(3 mg/ml HBP, 1.66 mM 半乳糖和 0.066 mM Ca^{2+}) 加入 0.07 mM EDTA 以后,所测得的半乳糖质子 NMR 谱表明, H_1 、 H_2 、 H_4 和 OCH_3 等峰的线宽变窄,面积增大(图 5 中(e))。图 6 和图 7 明确指出,加 EDTA 以后,质子峰线宽变窄且数值上接近于 Ca^{2+} 浓度为 0.007 mM 时的线宽,峰相对面积也增大至 Ca^{2+} 浓度为 0.007—0.01 mM 时的情况。比较图 5 中(e)和图 5 所示其它各图,可以清楚地看到,加入 EDTA 后半乳糖的质子 NMR 谱与 0.007 mM Ca^{2+} 浓度时所测得的谱(图 5 中(b))相似。

图 8 给出, Ca^{2+} 浓度由零增加到 0.12 mM 时,在半乳糖和 HBP 混合溶液的质子 NMR 谱(图 4)中,位于 2.05 ppm 附近的, HBP 上唾液酸残基质子峰左侧肩峰逐渐降低,唾液酸质子谱线的线型变化也愈益明显。

三、讨 论

在研究 Ca^{2+} 对 HBP 和甲基- β -D-半乳糖相互作用的影响时,主要观察半乳糖分子的质子谱线的变化。在 HBP、半乳糖和 Ca^{2+} 混合溶液中存在游离的半乳糖分子,同时也存在与 HBP 相互结合的半乳糖分子。由图 4 可知,处于游离态的半乳糖分子和处于结合态的半乳糖分子之间存在着快速的化学交换^[6]。在这一条件下所观察到的半乳糖质子峰线宽将由式(1)描述^[7]。

$$\Delta H_0 = \frac{[G]_B}{[G]_T} \Delta H_B + \frac{[G]_F}{[G]_T} \Delta H_F \quad (1)$$

式中 ΔH_0 是测得的表观质子峰线宽; ΔH_B 是处于结合态的半乳糖质子峰线宽; ΔH_F 是处于游离态的半乳糖质子峰线宽; $[G]_B$ 表示处于结合态的半乳糖浓度; $[G]_F$ 表示处于游离态的半乳糖浓度; $[G]_T$ 表示溶液中半乳糖分子的总浓度,即 $[G]_T = [G]_B + [G]_F$ 。如图 3 所示,游离态的半乳糖质子 NMR 谱线是一组尖锐的峰组成。但是,在半乳糖分子与 HBP 相互结合时(即半乳糖分子处于结合态),它们之间的偶极相互作用使半乳糖质子峰线宽加宽,结果 $\Delta H_B \gg \Delta H_F$ 。根据(1)式,在混合溶液中所测得的表观半乳糖质子峰线宽 ΔH_0 是 ΔH_B 和 ΔH_F 的权重平均。由于溶液中 HBP 和半乳糖的浓度保持不变,因此,如果处于结合态的半乳糖分子比例增大,处于游离态的半乳糖质子的贡献就相对减小, ΔH_0 表现为增大。相反,当处于结合态的半乳糖分子比例减小,处于游离态的半乳糖质子贡献增大, ΔH_0 将减小。根据上述论据,图 6 所表示的当样品中 Ca^{2+} 浓度由零增加至 0.066 mM 时,半乳糖分子的质子峰线宽逐渐增宽表明:由于 Ca^{2+} 的增加,处于结合态的半乳糖分子比例也增加,即 Ca^{2+} 有助于半乳糖分子和 HBP 的相互结合。由于 NMR 谱峰所包含的面积与参加共振的原子核的数目成

正比。所以,当样品中 HBP 和半乳糖浓度保持一定时,所有的半乳糖质子峰面积和 HBP 上唾液酸残基的质子峰面积应保持不变,因而,它们的比值应保持不变。然而,在 HBP, 半乳糖和 Ca^{2+} 混合溶液中我们观察到的是,处于游离态的半乳糖分子与处于结合态的半乳糖分子之间存在快速化学交换条件下的表观半乳糖质子峰。如果样品中有部分半乳糖分子比较稳定地处于结合态(即与 HBP 的解离速率非常低),则这部分半乳糖对表观半乳糖质子峰就无贡献^[6],这就表现为表观出半乳糖质子峰面积减小。图 7 所指出现象正是说明了,随着样品中 Ca^{2+} 浓度的增加,使部分半乳糖分子可以较稳定地处于与 HBP 相互结合的状态,因而,半乳糖质子峰面积与唾液酸质子峰面积的比值降低。

为了证实 Ca^{2+} 所起的这一作用,在 HBP, Ca^{2+} 和半乳糖混合溶液中加入 EDTA, EDTA 的浓度近似等于 Ca^{2+} 的总浓度。由于 EDTA 与 Ca^{2+} 以 1:1 相互螯合,混合溶液中绝大部分 Ca^{2+} 与 EDTA 形成金属螯合物。因此,样品中原来由于 Ca^{2+} 的存在而处于稳定结合态的那部分半乳糖分子被解离,同时,半乳糖分子在结合态与游离态上的比例也改变。又因为样品中半乳糖浓度不变,所以,混合溶液中 $[G]_B$ 和 $[G]_F$ 的比例应该回到 Ca^{2+} 浓度接近于零时的状态。图 5 中 (e) 和图 5 中 (b) 的相似性以及图 6 和图 7 中所示加 EDTA 后的实验数据说明,样品中位于不同态的半乳糖比例回到 Ca^{2+} 浓度为 0.007—0.01 mM 时的情况。因此,EDTA 的实验结果证明, Ca^{2+} 参与了甲基- β -D-半乳糖与 HBP 的结合,使半乳糖分子较稳定地处于结合态。

在半乳糖与 HBP 的相互结合中, Ca^{2+} 的作用不仅仅表现为图 4 中 3.4—4.4 ppm 范围内半乳糖质子 NMR 谱线的变化,而且也反映在位于 2.05 ppm 附近(图 4) HBP 上完整的唾液酸残基质子 NMR 谱中。图 8 给出的唾液酸残基质子 NMR 谱表明,正如 Ashwell 等人^[6]指出的,在 HBP 与半乳糖的相互结合中,HBP 上的唾液酸残基为半乳糖的使用部位。因而,半乳糖质子与唾液酸质子之间的偶极相互作用导致唾液酸质子 NMR 谱线线形发生变化。

由上述分析可以得出结论: Ca^{2+} 参与了半乳糖和 HBP 上完整的唾液酸残基的相互结合,使半乳糖分子较稳定地处于结合态。

本工作是在 Sunney I. Chan 教授指导下,在美国加州理工学院 Noyes 实验室完成。F. Tsu 博士参加了部分工作。中国科学院生物物理研究所杨福愉教授审阅了全文。谨此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Gilbert Ashwell, M. D., and Clifford J Steer, M. D., *JAMA*, **246**(1981), 2438.
- [2] Gilbert Ashwell and Joe Harford, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**(1982), 531—554.
- [3] Roger L. Hudgin, William E. Pricer, Jr. and Gilbert Ashwell, *Journal of Biological Chemistry*, **249**(1974), 17: 5536.
- [4] Jon H. Labadie, Kristi Peterson Chapman and Nathan N. Aronson, Jr., *Biochem. J.*, **152**(1975), 271—279.
- [5] 王金凤, 钙离子与唾液酸相互作用的核磁共振研究, 中国科学 B 辑, 待发表.
- [6] Carrinton, A., and McLachlan, A. D., *Introduction to Magnetic Resonance with application to chemistry and chemical physics*, London, Chapman and Hall, 1979.
- [7] Dwek, Haymond A., *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry application to enzyme systems*, Oxford Clarendon, 1973.
- [8] Manju Sarkar, Jerry Liao, Elvin A. Kabat, Tadaski Tanabe, Gilbert Ashwell, *Journal of Biological Chemistry*, **254**(1979), 9: 3170.