

# 喇曼光谱法对血纤维蛋白溶酶原激活剂 e-TPA 的二级结构的测定

许以明 吴 骋 樊 蓉

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

研究 e-TPA 的结构与功能的关系, 阐明其空间结构是一个重要的方面. 本工作用激光喇曼光谱研究了它的水和重水溶液并据此计算了该激活剂分子的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规卷曲构象的残基百分率.

## 一、材料和方法

**1. 光谱测量方法** 在配备了美国 NIC-1180 计算机和光谱物理公司 164 型氦离子激光光源的法国 JY-T800 喇曼光谱仪上获得了全部的喇曼光谱图. 三单色器的 4 个狭缝宽度 600, 700, 700, 600  $\mu\text{m}$ . 扫描速度  $1.2\text{cm}^{-1}/\text{s}$ . 时间常数  $1\text{s}(3\text{K} \times 1.3)$ . 信号平均扫描 4 次. 室温  $20-22^\circ\text{C}$ .

**2. 材料** 对活性较高的 e-TPA 7<sup>[1]</sup>(收集样品的管号)进行冰冻干燥. 将样品溶解在  $\text{H}_2\text{O}$  或  $^2\text{H}_2\text{O}$ <sup>[2,3]</sup> 中制备 250mg/ml (pH7) 高浓度的溶液. 该溶液封装在  $\phi 1\text{ mm}$  内径的毛细管中, 在冰箱中保存约 24h (约  $4^\circ\text{C}$ ). 测试前离心 10min (3000r/min).

## 二、结果和讨论

e-TPA 7 溶液 ( $\text{H}_2\text{O}$  和  $^2\text{H}_2\text{O}$ ) 的喇曼光谱的部分数据列于表 1. 由于 e-TPA 7 分子是由蛋白质和辅基聚鸟苷酸和聚胞苷酸组成, 为了清晰和简便本文省略了部分数据和聚鸟苷酸、聚胞苷酸的初步指定.

对于水溶液的喇曼光谱分别指定在 1659, 1672, 1641 $\text{cm}^{-1}$  的谱线为  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -回折(酰胺 I)<sup>[2,4,5]</sup> 以及指定在 1276, 1232, 1302 $\text{cm}^{-1}$  的谱线为  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -回折(酰胺 III)<sup>[2,4,5]</sup>. 而对于重水溶液的喇曼光谱分别指定在 1653, 1671, 1645 $\text{cm}^{-1}$  的谱线为  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -回折<sup>[2,3]</sup>(酰胺 I') 氘化的酰胺 III' 位移到 958 $\text{cm}^{-1}$ . 虽然蛋白质与聚鸟苷酸和聚胞苷酸的谱线互相部分地重叠, 但聚鸟苷酸和聚胞苷酸在 1240(水), 1632, 1660 $\text{cm}^{-1}$ (重水)处没有贡献<sup>[6]</sup>, 因此并不影响计算结果.

值得注意的是氘化的色氨酸有一处频率与 lord 等人发表的不同<sup>[2]</sup>. 本图谱中指定为 N-DTrp 的谱线的特征频率在 743 $\text{cm}^{-1}$ \*, 而 Lord 等人发表的则在 760 $\text{cm}^{-1}$ .

本工作用 Lippert 等人建立的方法对 e-TPA 的二级结构进行测定. 该方法建立后对九种天然蛋白进行了计算并取得了与用 X-射线衍射、圆二色性法获得的较一致的结果<sup>[3,7,8]</sup>. Lippert 等人建立的方法是用聚-L-赖氨酸的三种构象为模型, 根据它们在 1240 $\text{cm}^{-1}$  (在水中)

本文 1986 年 4 月 10 日收到.

和在 1632, 1660 $\text{cm}^{-1}$  (在重水中)和被测蛋白质在同样的频率(条件相同)的喇曼光谱强度,列出如下四个联立方程式<sup>[3]</sup>:

$$C^{\text{蛋白质}} I_{1240}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1240}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1240}^{\beta} + f_R I_{1240}^R \quad (1)$$

$$C^{\text{蛋白质}} I_{1632}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1632}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1632}^{\beta} + f_R I_{1632}^R \quad (2)$$

$$C^{\text{蛋白质}} I_{1660}^{\text{蛋白质}} = f_{\alpha} I_{1660}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1660}^{\beta} + f_R I_{1660}^R \quad (3)$$

$$f_{\alpha} + f_{\beta} + f_R = 1. \quad (4)$$

以上各式中  $I_{1240}^{\text{蛋白质}}$ 、 $I_{1632}^{\text{蛋白质}}$ 、 $I_{1660}^{\text{蛋白质}}$  分别是被测蛋白质(在水或重水中)在 1240, 1632, 1660  $\text{cm}^{-1}$  的谱高与  $\text{CH}_2$  弯曲模式在 1448 $\text{cm}^{-1}$  的谱高之比;  $I_{1240}^{\alpha}$  对于“纯” $\alpha$ -螺旋的蛋白质是“标准”值;  $f_{\alpha}$ ,  $f_{\beta}$ ,  $f_R$  分别为被测蛋白质的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、无规卷曲的残基百分数;  $C^{\text{蛋白质}}$  是比例常数(被测定), 相对于模型化合物聚-L-赖氨酸的  $\text{CH}_2$  弯曲谱带强度<sup>[3]</sup>. 聚-L-赖氨酸三种构象和 e-TPA7 的喇曼光谱强度与 1448 $\text{cm}^{-1}$  谱线的光谱强度之比的数据列于表 2. 据此计算 e-TPA7 的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规卷曲构象的残基百分率. 所得结果如下:  $\alpha$ -螺旋 61%、 $\beta$ -折叠 29%、无规卷曲 10%, 比例常数 0.61. 误差范围与测量喇曼谱线强度的不定性相对应, 不

表 1 e-TPA7 在重水和水中的喇曼光谱  
(450—1750 $\text{cm}^{-1}$ )

| 频率 $\text{cm}^{-1}$ |                  | 初步指定                                             | 频率 $\text{cm}^{-1}$ |                  | 初步指定           |
|---------------------|------------------|--------------------------------------------------|---------------------|------------------|----------------|
| H <sub>2</sub> O    | D <sub>2</sub> O |                                                  | H <sub>2</sub> O    | D <sub>2</sub> O |                |
| 1672                | 1671             | } 酰胺 I 和 I'                                      | 1115                | 1116             | } V(C—N)       |
| 1669                | 1653             |                                                  | 1087                | 1083             |                |
| 1641                | 1645             |                                                  | 1072                | 1071             |                |
| 1626                | 1622             | Trp; Tyr                                         |                     | 958              | 酰胺 III'        |
| 1577                | 1580             | Trp; N-DTrp                                      | 937                 | 932              | } V(C—C)       |
| 1550                | 1556             | Trp; N-DTrp                                      | 922                 | 903              |                |
| 1471                | 1480             |                                                  | 893                 |                  |                |
| 1447                | 1450             | r(C—H)                                           | 854                 | 856              | } Tyr; O—D Tyr |
| 1424                | 1423             | } V <sub>s</sub> (CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) | 835                 | 831              |                |
| 1413                | 1410             |                                                  | 763                 | 743              |                |
| 1363                | 1360             | Trp                                              | 718                 | 732              | } V(C—S)       |
| 1334                | 1336             | Trp; N-DTrp                                      | 703                 | 704              |                |
| 1302                | 1306             |                                                  | 668                 | 673              |                |
| 1276                |                  | } 酰胺 III                                         | 645                 | 646              | Trp; O-DTyr    |
| 1245                |                  |                                                  | 530                 | 522              | } V(S—S)       |
| 1232                |                  |                                                  | 511                 | 515              |                |

Trp: 色氨酸; Tyr: 酪氨酸; D: 氘化;  $\beta$ t:  $\beta$ -回折; V: 伸张振动; Vs: 对称伸张; r: 变形.

表 2 聚-L-赖氨酸的三种构象和 e-TPA7 的喇曼光谱强度对 1448 $\text{cm}^{-1}$  谱线强度的比值

| 名 称                   | 水溶液<br>1240 $\text{cm}^{-1}$ | 重 水 溶 液               |                       |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                       |                              | 1632 $\text{cm}^{-1}$ | 1660 $\text{cm}^{-1}$ |
| 聚-L-赖氨酸, $\alpha$ -螺旋 | 0.00                         | 0.80                  | 0.55                  |
| 聚-L-赖氨酸, $\beta$ -折叠  | 1.20                         | 0.72                  | 0.88                  |
| 聚-L-赖氨酸, 无规卷曲         | 0.60                         | 0.08                  | 0.78                  |
| e-TPA 7               | 0.665 $\pm$ 0.035            | 1.15 $\pm$ 0.05       | 1.09 $\pm$ 0.03       |

包括 Lippert 等人的方法中固有的不定性。

### 三、结 论

活性较高的  $\epsilon$ -TPA 7 的水和重水溶液的激光喇曼光谱表明它的二级结构包括 61% 的  $\alpha$ -螺旋 29% 的  $\beta$ -折叠和 10% 的无规卷曲,比例常数 0.61。这个结果为探讨它有效地治疗血管栓塞症的机理积累了必要的数据。

致谢:感谢本所王大成、王今著先生和中国科学院物理研究所贾惟义、高小平先生所给予的帮助。

### 参 考 文 献

- [1] 吴聘等,生物物理学报, 1(1986), 86.
- [2] Lord, R. C. et al., *J. Mol. Biol.*, 50(1970), 500—514.
- [3] Lippert, J. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 98(1976), 7075.
- [4] Cary, P. R., *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, New York, 1982, 77.
- [5] Gerald, Ehrenstein et al., *Methods of Experimental Physics*, 20(1982), 147.
- [6] Erfurth, S. C. et al., *Biopolymer*, 14(1975), 247—264.
- [7] Graig, W. S., Gaber, B. P., *J. Amer. Chem. Soc.*, 99(1977), 4130.
- [8] Bailey, G. S., Loe, J., Tu, A. T., *J. Biol. Chem.*, 254(1979), 8922.