

39-42

9

用 ESR 研究水合作用对 RNase A 分子
动力学性质的影响

Q 55

Q 51

傅亚珍* 杨景文

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 通过 RNase A 的水合等温线, 确定 RNase A 吸附水时所处的相对湿度及其水合值的关系; 将标记上自旋探针(马来酰亚胺氮氧自由基)的 RNase A 溶液经透析后冷冻干燥并装入样品管后, 在不同相对湿度下与水相互作用, 待吸附平衡后将样品管密封测其 ESR 波谱, 找出谱图上的 A_{max} 与 RNase A 水合值的关系; 从而建立了含微量水的 RNase A 分子运动与其水含量关系的检测方法, 得到导致 RNase A 分子开始运动的最低水含量阈值约为每克干酶含水 0.20 g, 即当 1 个 RNase A 分子周围有约 152 个水分子时 RNase A 分子开始运动。

关键词 水合作用; RNase A; 电子自旋共振

动力学性质

水不仅影响蛋白质分子的结构^[1]、稳定性^[2]、伸展与折叠^[3]及生物功能^[4], 而且影响着它的动力学性质^[5]。蛋白质分子的物理化学性质的变化一般都伴随着分子运动性的变化, 因此研究水对蛋白质分子运动性的影响有利于人们更好地了解蛋白质的结构与功能。自旋标记物的电子自旋共振(ESR)波谱对自旋探针的旋转运动的速度和性质非常敏感, 因此, 通过自旋标记物的 ESR 波谱参数的改变, 可以研究自旋标记物与生物大分子的结合位点因环境因素的变化而导致的运动性的变化。80 年代美国的 Rupley 实验室^[6]用 ESR 技术开始研究水含量对溶菌酶分子运动性的影响。他们研究的结果表明, 溶菌酶分子开始运动时的最低水含量阈值约为每克干酶含水 0.20 g, 此时结合在溶菌酶分子上的 ESR 探针开始发生旋转运动, 且随着水含量的再增加, 探针的旋转弛豫速率也随之增加。对其他的蛋白质而言, 导致其分子运动的最低水含量阈值是多少? 这些水含量的阈值与蛋白质的结构和种类有什么关系? 对这些问题的回答将有利于更好地认识水与蛋白质的相互作用。为此我们建立了检测含微量水的核糖核酸酶 A 分子运动的自旋标记 ESR 波谱方法, 并测出导致 RNase A 分子表面活性位点开始运动

的最低水含量阈值约为每克干酶含水 0.20 g, 即当 1 个 RNase A 分子周围有约 152 个水分子时该酶分子开始运动。

1 材料和方法(Materials and Methods)

1.1 材料

牛胰核糖核酸酶 A(RNase A)购自 Sigma(X11-A 型, 批号 73H7012); 4-马来酰亚胺氮氧自由基(4-maleimide-TEMPO)购自 Sigma(批号 78F3712); 溶剂水为无离子重蒸水, pH 6.8。

1.2 水合等温线及吸附等温线的测定

将 2.5~4.0 mg 的 RNase A 分别放入预先称好重量的由美国 PE 公司提供的用于差示扫描量热仪的挥发型铝样品盘内, 再分别将盘置于盛有 P_2O_5 、LiCl、 $MgCl_2$ 、 K_2CO_3 、NaBr、 $CuCl_2$ 、NaCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $CdCl_2$ 、 K_2CrO_3 、 KNO_3 、 K_2SO_4 过饱和盐溶液的密封干燥器中(造成不同相对湿度的环境), 在 25 °C 的恒温箱内放置 5 d 后, 立即用密封压盖装置将预先称好重量的铝盖把铝样品盘密封好, 称其总重量(由此可知样品盘内含水酶的总重量)。在封好的盖子上扎几个小孔后, 将样品盘置于 105 °C 的干燥箱内烘烤 24 h, 然后迅速称重, 计算出样品中水的含量及酶的干重。用 RNase A 吸附水时的相对湿度(R. H.)及相应的 RNase A 的水合值 h (水/干酶), 即每克干酶所含水的克数, 可得出 RNase A 吸附水时所处的相对湿度及其水合值

收稿日期: 1999-06-07 接受日期: 1999-08-20

国家自然科学基金资助项目, No. 39470153

* 联系人: Tel. 010-64888584; Fax. 010-64871293; e-mail, fuyz@sun5.ibp.ac.cn

的关系图即水合等温线。将水合等温线图的横坐标上移至 R.H. 为零时的水合值的高度, 该图即成为吸附等温线图(图 1)。

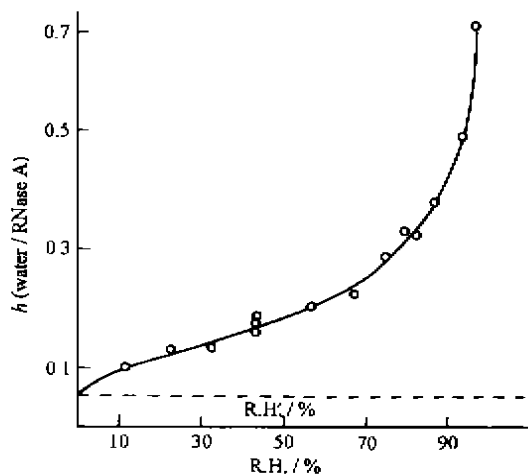


Fig 1 Hydration isotherm and water adsorption isotherm for RNase A at 25 °C

1.3 带有自旋标记的 RNase A 固体粉末的制备

将 15 mg RNase A 溶于 1.5 ml pH 6.8 的无离子重蒸水中。为了除去 RNase A 溶液中的 RNase A 二聚体^[7], 将该溶液在 63 °C 下加热 1 h, 然后缓慢冷却到室温。将冷却后的 RNase A 溶液与用 10 μ l 无水乙醇溶解的 2 mg 4-马来酰亚胺-2,2,6,6,-四甲基哌啶-N-氧基自由基(4-maleimide-TEMPO)混匀, 在 25 °C 黑暗处用磁力搅拌器搅拌约 5 d。为了除去未标记上的多余的自旋标记物, 在 4 °C 冰箱中避光连续透析上述标记 RNase A 溶液约 8 d。经 ESR 测量表明, 此时标记的 RNase A 溶液中已没有游离的自旋标记物。然后将其冷冻干燥, 得到带有自旋标记的 RNase A 粉末样品。

1.4 具有不同水含量的标记 RNase A 测试样品的制备

将标记的 RNase A 粉末样品分别装入长约 5 cm、直径约 1 mm 的毛细石英玻璃管中, 再将这些毛细管分别放进盛有不同饱和盐溶液的密封干燥器中吸附水。6 d 后将样品管一端用橡皮泥密封, 再继续水合 5 d 后, 密封另一端, 又用液体石蜡将样品管两端沾一下以达到更好的密封效果。水合 11 d 后得到具有不同水合值的标记 RNase A 的测试样品。

1.5 ESR 实验测试条件

在 Varian-E109 型 ESR 波谱仪上进行测量。中心磁场 3240G, 扫场宽度 200G, 调制幅度 1G, 时间常数为 0.128 s, 微波功率为 20 mW, 扫描时间

4 min, 室温下测定。

2 结果和讨论(Results and Discussion)

2.1 RNase A 在 25 °C 时的水合等温线及吸附等温线

图 1 为实验测定的 RNase A 在 25 °C 时的水合等温线(在 R.H. 对 h 的坐标系中)及吸附等温线(在 R.H., 对 h 的坐标系中)。

为了提高操作的准确性及节省样品和时间, 直接测得水合等温线。因为 R.H. = 0 时, RNase A 的吸附水量为零, 但 RNase A 的含水量(水合值)大于零。因此将水合等温线的横坐标上移至 R.H. = 0 时的水合值处, 在新的坐标系中, 水合等温线就是吸附等温线了。从该水合等温线上, 可以很方便地查找到在某一 R.H. 下的 RNase A 的水合值。

本实验得出的 RNase A 的吸附等温线为典型的 S-II 型, 符合一般蛋白质吸附水的规律^[8]。表明 RNase A 分子表面对水的吸附不是均一的, 而是多位点、多层次的吸附。

2.2 具有不同水含量的标记 RNase A 的 ESR 波谱图

图 2 为典型的具有不同水含量的标记 RNase A 的 ESR 波谱图。

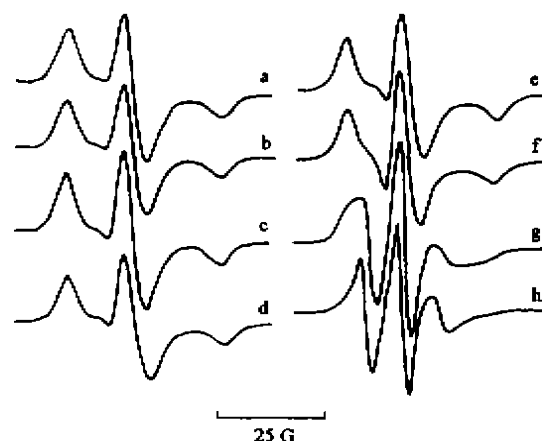


Fig. 2 ESR spectra of 4-maleimide-TEMPO bound to 41-Lys of RNase A at hydration levels of 0.09 - 0.68 g of water per gram of RNase A. Ratio of H₂O/RNase A(g/g) as follow: a, 0.093; b, 0.143; c, 0.170; d, 0.201; e, 0.233; f, 0.285; g, 0.494; h, 0.678.

其中 a 为典型的固体粉末 ESR 波谱, 第一个极大峰为强固定化波谱峰, 不存在弱固定化波谱峰, 说明当 RNase A 中的水含量很低时, RNase A 呈固体性质。h 为典型的液体 ESR 波谱, 第一个极大峰

为弱固定化波谱峰而无强固定化波谱峰,表明当 RNase A 的水含量大于每克干酶含水 0.68 g 时, RNase A 呈液体性质。c~g 为固-液体共存 ESR 波谱,它是强固定化波谱峰和弱固定化波谱峰叠加的结果。说明当 RNase A 的水含量为每克干酶含水 0.170 ~ 0.494 g 时, RNase A 呈固-液共存状态。

波谱图上第一个极大峰值和最后一个极小峰值之间的宽度为最大超精细分裂(A_{max}),从图 2 明显看出,随着水含量的增加, A_{max} 逐渐减小。

马来酰亚胺自旋标记的氮氧自由基上有一个未成对电子,因此它可以产生具有 3 条超精细分裂线的 ESR 波谱。在本实验中,自旋标记的马来酰亚胺部分可以特异地结合到 RNase A 活性位点的第 41 位赖氨酸上^[7]。ESR 波谱对自旋探针的旋转运动的速度和性质非常敏感,因此,如果第 41 位赖氨酸残基运动的话,就会直接影响自旋探针的运动,从而在 ESR 波谱上得到明显的指认。如果自旋探针越被束缚,则 ESR 谱线就越不对称、越宽、 A_{max} 越大^[7,9]。由图 2 可以看出,随着 RNase A 中水含量的增加, A_{max} 随之逐渐减小,说明自旋探针的束缚性越来越小, RNase A 表面上的第 41 位赖氨酸残基的运动性越来越大,即分子活性位点的柔性随水含量的增加而增加。

2.3 诱发 RNase A 分子开始运动的最低水含量阈值

图 3 为 RNase A 的水合值与相应的其 ESR 波谱上的 A_{max} 值之间的关系图。

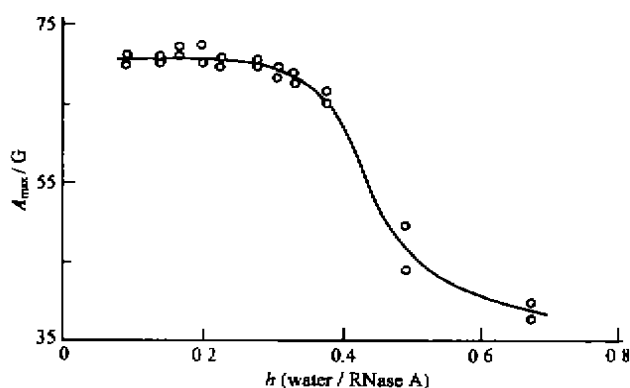


Fig. 3 A_{max} in ESR spectra at various degrees of hydration of RNase A

如上面所述, ESR 波谱图上的 A_{max} 可以表征 RNase A 被标记处的运动状态,即 A_{max} 值越小,标记处的运动性越大。由图 3 可以看到当 RNase A 的水合值在每克干酶含水 0.09 ~ 0.68 g 范围内变动时,其相应的 A_{max} 值的变化规律为 S 型曲线,曲线

初始部分的切线与 S 型曲线相交之切点约为每克干酶含水 0.20 g。即当水合值小于每克干酶含水 0.20 g 时, A_{max} 保持一定的最大值, RNase A 为固体状态;当水合值大于每克干酶含水 0.20 g 时,其 A_{max} 开始缓慢减小,说明分子开始运动且随水含量的增加,酶分子的运动性增加;当水合值在每克干酶含水 0.40 g 左右时,随水含量的增加, A_{max} 显著减小即酶分子运动性显著增加;当水合值大于每克干酶含水 0.60 g 时,随水含量的增加, A_{max} 又缓慢减小即分子运动性缓慢增加。以上结果表明:(1) 水含量对酶分子运动的影响不是呈直线性的,当酶处于固体或液体时,水含量的增加对酶分子运动性的增加不显著,而当酶处于固-液共存状态时,水含量的增加会显著地增加酶分子的运动性。(2) 诱发 RNase A 分子活性位点开始运动的最低水含量阈值约为每克干酶含水 0.20 g。

我们所测的 RNase A 分子运动和水合值的关系与 Rupley 等人所测的溶菌酶的分子运动与水合关系的规律相似, Rupley 测得 1 个溶菌酶分子周围有约 159 个水分子时,溶菌酶分子开始运动。我们测得 1 个核糖核酸酶分子周围有约 152 个水分子时,核糖核酸酶分子开始运动。可能与这两种蛋白酶的结构相似有关。RNase A 与溶菌酶都是亲水的由单肽链构成的小球蛋白,前者由 124 个氨基酸组成^[10],后者由 129 个氨基酸组成,它们的活性位点均在球形分子的裂缝周围。我们认为它们的分子结构的相似性可能是它们分子运动性相似的基础,若回答前言中提出的问题,目前还为时过早,有待大量的实验研究结果。

李美芬高级工程师为本实验进行 ESR 测定,赵保路和侯君武先生提供自旋探针,在此一并向他们表示衷心的感谢。

References

- Gregory R B, Gangoda M, Gilpin R K, Su W. The influence of hydration on the conformation of BSA studied by solid-state C_{13} NMR. *Biopolymers*, 1993, 33(12): 1871—1876
- Fu Y Z. Effect of hydration on the thermal stability of lysozyme. *Chinese Science Bulletin*, 1985, 30(6): 456—459 (引自:科学通报)
- Privolov P L, Makhataдзе G I. Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein unfolding. *J Mol Biol*, 1992, 224(3): 715—723
- Gregory R B. Protein hydration and glass transition behavior. In:

- Gregory R B ed *Protein-solvent Interactions*. New York: Dekker, 1995, 191—264
- 5 Frauenfelder H, Gratton E. Protein dynamics and hydration. *Methods Enzymol.*, 1986, 127: 207—216
- 6 Rupley J A, Yang P H, Tollin G. In: Rowland S P ed. *Water in Polymers*, ACS Symposium Series, Washington D C: ACS Press, 1980, 127: 111—132
- 7 Smith Ian C P. A study of the conformational properties of bovine pancreatic ribonuclease A by electron paramagnetic resonance. *Biochemistry*, 1968, 7(2): 745—757
- 8 Kuntz I D, Kauzmann W. Hydration of proteins and polypeptides. *Adv Protein Chem.*, 1974, 28: 239—345
- 9 Zhang J Z, Zhao B L, Zhang Q G ed. *Basic Theory and Application of Electron Spin Resonance*, Beijing: Science Press, 1987, 51—57
- 10 Kartha G, Bello J, Harker D. Tertiary structure of ribonuclease *Nature*, 1967, 213(5079): 862—865

An ESR Study on the Effect of Hydration on the Dynamic Property of RNase A

FU Ya-Zhen*, YANG Jing-Wen

(*Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract A method is described for the measurement of dynamic property of RNase A by ESR under xeric conditions. The relationship between relative humidity and hydration degree of RNase A was determined by hydration isotherm. A solution of RNase A was allowed to react with a solution containing maleimide nitroxide label at 25 °C, then was dialysed and lyophilized. The stable powder of RNase A - maleimide nitroxide label compound was put into the tubules, then was hydrated under different relative humidity for 11 days. After hydration, the tubules were closed and measured by ESR. The relationship between hydration value and A_{max} was detected. The results showed that the lowest water content that could induce motion of RNase A by water is about 0.20 g of water per g of RNase A. That means the motion of RNase A molecule becomes detectable when there are 152 water molecules around one RNase A molecule.

Key words hydration; RNase A; ESR

Received: June 7, 1999 Accepted: August 20, 1999

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China, No. 39470153

* Corresponding author: Tel. 86-10-64888584; Fax. 86-10-64871293; e-mail. fuyz@sun5.ibp.ac.cn

大连国际会议通知(第一轮)

兹定于2000年6月26~29日在大连召开“大连国际糖复合物、脂类、信息转导讨论会”(Dalian International Symposium on Glycoconjugates, Lipids and Signal Transduction)。会议由大连医科大学主办,大连理工大学和辽宁师范大学协办,国家自然科学基金委资助。欢迎国内外同行参加。会议官方语言为英语。会议组织委员会有崔肇森(大连医大),朱正美(大连医大),安利佳(理工大学),李庆伟(辽师大)及国外的几位华人学者组成。特邀演讲者中有加拿大ALBERTA大学的VANCE教授。

征文内容包括会题有关方面的化学或生物学作用,每篇论文摘要限1页,请勿用图表。欢迎综述自己研究。请用A4纸激光打印,1或2份。上下顺序为:题目(用4号字),作者姓名(报告人下画线)、单位、地址及邮编、联系电话*、传真*、E-mail地址*(“请用下脚注)及摘要正文(都为5号字)。版面上下留空3cm,左右空2.5cm。请自行校对(文责自负,包括英文文字加工)。录用后脱印印刷。摘要寄:大连(116027)大连医大学生物化学及分子生物学教研室邵伟老师收。同时汇寄审稿与汇编印刷费50元。摘要征集截止日期为2000年4月15日(注意为收文日期)。参加会议意向请尽早告知。

国内与会者会议注册费为800元人民币(包括会务费、资料费、伙食及宴会)。住宿自负,标准自定。如有询问事宜,请与邵伟老师联系。

电话:0411-4720051, E-mail: cnz60528@pub.dl.lnpta.net.cn 第二轮将根据第一轮通知的反馈寄发书面通知。