

皖南尖吻蝮蛇蛇毒内抗凝血因子(ACF)的二级结构 和金属离子对其影响的 CD 谱研究

余华明* 徐晓龙 王淳[△] 鲁非[‡]
张祖德 刘清亮

(中国科技大学应用化学系、生物系[△]、结构成分开放实验室[‡], 合肥 230026)

利用 CD 谱对皖南尖吻蝮蛇蛇毒内抗凝血因子(ACF)的二级结构,即 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲进行了测定,利用 Chen and Yang 的方法计算出了它们在 ACF 分子内的百分比。溶液的 pH 值对 ACF 的二级结构影响不大,但当 pH 位于 5 和 6 时,二级结构稍稍出现了异常。这可能是由于氢离子电离引起的电荷变化带来的效应。ACF 的脱钙破坏了分子内的配位结构,而使 α -螺旋的百分比大大降低。尽管三价镧系离子能取代 ACF 中的钙离子,但是没有给 ACF 的二级结构带来较大的影响。

关键词: 蛇毒 抗凝血因子(ACF) 二级结构 CD 谱

利用葡聚糖凝胶色谱和二乙胺乙基葡聚糖离子交换层析的方法,从皖南尖吻蝮蛇蛇毒内分离出了抗凝血因子(ACF)。它的抗凝血功能是通过干扰凝血酶源与它的激活因子之间的相互作用去影响凝血酶的生存活力^[1]。我们从前面的工作^[2]中得知,ACF 分子中有两个可结合钙离子的位点,但本身只含有一个钙离子,位于具有较高亲和性的结合位点上,而具有较低亲和性的钙离子结合位点是空着的。若 ACF 所处溶液中还含有钙离子,低亲和位点也可以结合钙离子,但这种结合不牢固,随着溶液中钙离子的增加和减少而处于一种动态的结合与解离的平衡之中。这也许就是过去人们一直未能准确测定 ACF 中钙离子含量的一个主要原因。我们用 Tb^{3+} 取代 ACF 中的钙离子进行荧光光谱分析,表明钙离子结合位点的周围环境与色氨酸残基相近,所以能量可以通过 Tb^{3+} 离子传递给周围的色氨酸残基,使其敏化而发荧光^[3]。本工作重点研究了金属离子对 ACF 分子二级结构的影响。我们通过圆二色谱和 Chen and Yang 计算方法^[4]得到了 ACF 分子中 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲的百分比,即它的二级结构;研究了 pH 对二级结构的影响;钙离子的结合与解离对它的影响;以及三价镧系离子和二价过渡金属离子的加入对它的影响。

实 验 部 分

一、ACF 的分离与纯化

ACF 的分离按文献[5]的方法进行。为了进一步提高纯度,我们将得到的 ACF 组份再经

本文于1994年4月14日收到。

国家自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

DEAE-Scphadex A-50 (2.8 × 35cm)离子交换梯度淋洗,这时的 ACF 可达到使用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法所达的纯度。

二、ACF 溶液的配制及 CD 谱的测定

用 0.02mol/l Tris-HCl 缓冲溶液配制浓度为 0.10mg/ml 的 ACF 溶液,调 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。利用 Jasco-J 500C 圆二色谱仪测 CD 谱。扫描区域为远紫外 200-250nm,灵敏度为 1 毫度/cm,温度为 25℃,以对应 pH 值的 0.02mol/l Tris-HCl 缓冲溶液作为空白样品。

用 0.02mol/l Tris-HCl 缓冲溶液配制浓度为 0.10mg/ml 的 ACF 溶液,调 pH 为 6.0。再分别加入 Tb^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子,配制成 ACF 的金属离子溶液,金属离子浓度均为 0.50mmol/l。将溶液于 5℃ 下放置两天,以便使 ACF 中的钙离子与溶液中的金属离子充分交换。以 pH=6.0 的含 0.50mmol/l 相应金属离子的 0.02mol/l Tris-HCl 缓冲液作为空白样品,然后进行 CD 谱测定,其他测试条件同上。

在 ACF 溶液(0.02mol/l Tris-HCl, pH=7.0)中加入一定量的 EDTA 溶液(pH=7.0),使混合后溶液中 ACF 浓度为 0.1mg/ml, EDTA 为 20mmol/l。在 5℃ 下放置两天,再用 0.02mol/l Tris-HCl(pH=7.0)透析两天,将此溶液分为两份,其中一份直接用于 CD 谱测定,另一份在 5.0mmol/l Ca^{2+} 溶液(含 0.02mol/l Tris-HCl, pH=7.0)中透析两天,再进行 CD 谱测定。分别以 0.02mol/l Tris-HCl(pH=7.0, 含等当量的 EDTA)和 5mmol/l Ca^{2+} 溶液(含 0.02mol/l Tris-HCl, pH=7.0)作为 CD 谱测定的空白样品,样品的其他测试条件同上。

结果与讨论

一、ACF 的二级结构和 pH 对它的影响

ACF 的二级结构是圆二色谱(CD 谱)中不同波长下的平均氨基酸残基克分子椭圆值,可以根据 Chen and Yang 的方法求知。图 1 是不同 pH 条件下 ACF 的 CD 谱,纵坐标为 $[\theta]$ 值,横坐标为远紫外的波长 λ , 曲线是两次扫描的算术平均值。所有谱图都是扣除了空白溶液的差谱。我们根据 Chen and Yang 的方法计算出了波长为 209nm 时不同 pH 下 ACF 的 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲的百分比(见表 1)。从图 1 和表 1 的结果可以看出,随着 pH 从 4.0 变到 9.0 时,ACF 中 α -螺旋和无规则卷曲的百分比分别上升了近 2 个百分点和 4 个百分点,而 β -折叠则下降了近 6 个百分点,但总的说来 pH 的变化对 ACF 二级结构影响不大。不过仔细观察可以发现,在 pH 为 5 和 6 时,这些百分比的变化趋势稍稍出现了异常。这可能因为多数氨基酸的 pI 值($pK_a + pK_w - pK_b$)位于 5 到 6^[6], ACF 中氨基酸残基的氢离子解离引起的电荷变化对其二级结构的影响所致,也可能是由实验误差所致,确切原因有待进一步研究。

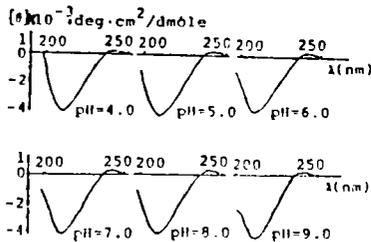


图 1 不同 pH 条件下 ACF 的 CD 谱比较
(于 0.02mol/l Tris-HCl 缓冲溶液中)

Fig. 1 Contrast of the CD spectra of ACF in different pH
(in 0.02mol/l Tris-HCl buffer)

表 1 ACF 在不同 pH 条件下分子构象百分含量比较

Table 1 Contrast of the Components Percentages of ACF in Different pH

pH	A(%)	B(%)	C(%)
4.0	6.47	56.36	37.18
5.0	7.54	52.79	39.67
6.0	6.65	53.56	39.79
7.0	6.98	54.70	38.33
8.0	7.10	53.52	39.39
9.0	8.14	50.66	41.20

A = α -helix; B = β -sheet; C = random coil

二、ACF 脱钙与复钙后的二级结构

在 20mmol/l EDTA 长时间的透析作用下, 由于 EDTA 的配位作用而使 ACF 脱钙。这时得到的 CD 谱如图 2, a 所示。将脱钙后的 ACF 置于 5mmol/l Ca^{2+} 的溶液中进行透析平衡, 使其复钙。得到的 CD 谱见图 2, b。从这两张 CD 谱中可以明显看出, 脱钙对 ACF 的二级结构能产生很大的影响。利用 Chen and Yang 的方法计算出来的数据列入表 2 ($\lambda = 209nm$)。表 2 的结果清楚地表明脱钙使 ACF 的 α -螺旋大大地降低了, 而 β -折叠和无规则卷曲的比均明显上升, 复钙后 ACF 的二级结构几乎又回到原来的水平。这说明钙离子在维持 ACF 的结构方面确实起着重要的作用。生物分子中的螺旋结构主要依赖于分子内形成的氢键, 但带正电荷的金属离子与氨基酸残基上带负电荷的功能团之间所形成的具有一定空间结构的配位键也是形成或稳定螺旋结构的原因之一。在铁(III)与模拟正铁色素的结合中也有类似的情况^[7]。

表 2 脱钙和复钙对 ACF 构象中各成份百分含量的影响

Table 2 Effects of Decalcification and Calcification on the Components Percentages of ACF

	α -helix (%)	β -sheet (%)	random coil (%)
ACF (pH = 7.0)	6.98	54.70	38.33
ACF decalcification	2.55	57.80	39.64
ACF calcification	6.52	55.34	38.14

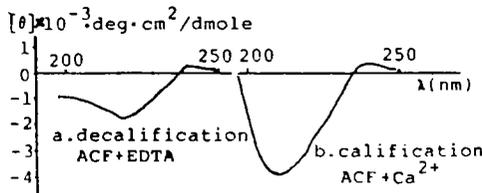


图 2 ACF 脱钙和复钙后的 CD 谱

[于 0.02mol/l Tris-HCl (pH = 7.0)缓冲溶液中]

Fig. 2 CD spectra of ACF after decalcification and calcification

[in 0.02mol/l Tris-HCl buffer (pH = 7.0)]

三、金属离子对 ACF 二级结构的影响

在 ACF 溶液中加入三价镧系离子 Tb^{3+} 、 Nd^{3+} 和 Eu^{3+} , 以及二价过渡金属离子 Mn^{2+} 、

Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} ,经放置达平衡后测其 CD 谱,并用 Chen and Yang 方法计算 ACF 分子内 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲的百分比($\lambda = 209\text{nm}$,见表 3)。表中的结果显示金属离子对 ACF 在水溶液中的结构影响不大。这是因为钙离子为硬酸,能与 ACF 分子内硬碱一类的配位基团形成较稳定的配位键。而二价过渡金属离子具有较多的 d 电子,为软酸或交界酸,与硬碱类的配位基团不易形成稳定的配位键。这样,二价过渡金属离子不大可能取代 ACF 中的钙离子,因而二价过渡金属离子的加入对 ACF 二级结构的影响不大就很容易理解了^[3]。文献[3]的实验表明,镧系离子 Tb^{3+} 能够全部取代 ACF 中的钙离子,这是因为 Tb^{3+} 也是硬酸,具有与钙离子相近的离子半径和比钙离子更高的正电荷,与 ACF 分子内配位基团有更高的亲合力。 Tb^{3+} 取代钙离子后仍保留了原来的空间结构,也不可能破坏分子内原来的氢键,这可能就是镧系离子也没有对 ACF 二级结构产生较大影响的原因。

表 3 加入金属离子后 ACF 构象中各成份百分含量的变化

Table 3 Variety of Components Percentages in ACF after Adding Metal Ions

name	ACF	ACF	ACF	ACF	ACF	ACF	ACF	ACF	ACF
		+Nd ³⁺	+Eu ³⁺	+Tb ³⁺	+Cu ²⁺	+Co ²⁺	+Zn ²⁺	+Cd ²⁺	+Mn ²⁺
α -helix	6.65	5.94	7.46	6.81	6.00	6.24	6.54	6.86	6.51
β -sheet	53.56	56.43	52.11	55.51	57.61	52.48	55.09	54.10	55.72
random coil	39.79	37.63	40.43	37.69	36.39	41.27	38.36	39.04	37.77

参 考 文 献

- [1] 陈远聪、李文杰主编,蛇毒的生化、毒理和应用,北京,科学出版社,(1983).
- [2] 刘清亮等,无机化学学报,9,71(1993).
- [3] 刘清亮等,中国稀土学报,10,106(1992).
- [4] 鲁子贤、崔涛、施庆洛编著,圆二色谱和旋光色散在分子生物学中的应用,北京,科学出版社,(1987).
- [5] Lu Yang et al, Animal Venoms and Hemostasis, Pirkle, D.(ed.), (1987).
- [6] C.P.C Handbook of Chemistry and Physics, 63cd, Robert C. Weast(ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, (1982).
- [7] 鲁非等,波谱学杂志,9,157(1992).

**CD SPECTROSCOPY STUDIES OF SECONDARY
STRUCTURE OF ANTICOAGULATION FACTOR IN THE
VENOM OF AGKISTRODON ACUTUS AND THE EFFECT OF
METAL IONS ON THE STRUCTURE**

Yu Huaming Xu Xiaolong Wang Chun[△] Lu Fei[#] Zhang Zude Liu Qingliang
(*Department of Applied Chemistry, Department of Biology[△],
Center of Structure and Element Analysis[#] in USTC, Hefei, 230026*)

The secondary structure of Anticoagulation Factor (ACF) in the venom of agkistrodon acutus, i. e. α -helix, β -sheet and random coil, have been studied by CD spectroscopy, and their percentages have been also obtained from the calculation based on Chen and Yang Equation. The effect of pH on the secondary structure of ACF is small, while a bit abnormal changes on pH = 5 and 6, observed in H₂O percentages, is possibly caused by the changes of electric charges during the ionization of protons on the amino acid residues. The decalcification of ACF results in a great decrease for the α -helix, due to the destruction of coordination between Ca²⁺ and the ligand groups in ACF molecule. The lanthanide ions, for example, Tb³⁺, Nd³⁺ and Eu³⁺, do not effect the secondary structure of ACF, even they can substitute for Ca²⁺ ion in ACF.

Keywords: snake venom anticoagulation factor(ACF) secondary structure
CD spectroscopy