

pH值和金属离子对尖吻蝮蛇抗凝血因子Ⅱ二级结构的影响

陈结霞 徐小龙* 刘祥虎 刘清亮*

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要: 圆二色谱(CD谱)测量表明, 尖吻蝮蛇抗凝血因子Ⅱ(ACFⅡ)与抗凝血因子Ⅰ(ACFⅠ)的二级结构十分相似, 它们的主要骨架构象都为反平行 β -折叠和 α -螺旋结构。pH值对天然ACFⅡ的构象有一定的影响, pH值从3到10增大时, α -螺旋含量逐渐减少, 反平行 β -折叠含量逐渐增大。钙和其他二价金属离子对ACFⅡ的骨架结构没有明显影响。三价稀土离子使ACFⅡ的 α -螺旋含量升高, 同时降低其 β -转角和 β -折叠的含量。

关键词: 抗凝血因子Ⅱ; 酸度(pH); 二级结构; 圆二色谱

中图分类号: O614.2; O614.33; Q518.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)01-0069-04

The Effects of pH and Metal Ions on the Secondary Structure of Anticoagulation Factor Ⅱ Studied by CD Spectroscopy

CHEN Jie-Xia XU Xiao-Long* LIU Xiang-Hu LIU Qing-Liang*

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract: Anticoagulation factors holo-ACFⅡ and holo-ACFⅠ have similar secondary structures and their main backbone conformations are anti-parallel β -sheet and α -helix determined by CD spectra. The contents of anti-parallel β -sheet and α -helix are 26.2%, 13.7% for holo-ACFⅡ, respectively. When pH value increases, the content of α -helix of ACFⅡ decreases, while the contents of anti-parallel β -sheet increases. No apparent effects of Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} and transition metal ions (Zn^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+}) on conformations of the backbone of ACFⅡ are observed. The substitution of lanthanide ions for Ca^{2+} in ACFⅡ increases the content of α -helix, but decreases the content of β -sheet.

Key words: anticoagulation factor Ⅱ; pH; secondary structure; CD spectra

尖吻蝮蛇又称五步蛇和祁蛇, 其毒液中含有丰富的生物活性蛋白, 其中有一类蛋白质影响凝血系统, 起着促凝或抗凝作用^[1]。深入研究这类蛋白质对进一步认识凝血机理和开发蛇毒抗栓药物具有重要意义。我们从该蛇毒中分离纯化出一个新的抗凝血因子ACFⅡ。ACFⅡ具有显著的抗凝血活性, 没有出血活性和毒性, 是一种潜在的高效蛇毒抗栓药物。ACFⅡ具有独特的抗凝机理, 它是通过与活化凝血因子X(FXa)在钙离子作用下形成1:1的复合物来延

长凝血时间^[2]。钙离子在结合反应中起着重要的促进作用。 Sr^{2+} 也可以取代 Ca^{2+} 在使ACFⅡ与FXa结合成复合物反应中的作用。荧光光谱的结果表明钙离子对ACFⅡ的局部构象产生一定的影响。钙离子是否对它的二级结构产生影响? 其他金属离子对ACFⅡ又有什么影响? 我们从离子的半径、电荷、软硬度三个方面选择不同金属离子, 用圆二色谱方法研究了它们对ACFⅡ二级结构的影响。 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 与 Ca^{2+} 同属第二主族却有不同半径, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 与

收稿日期: 2005-06-27。收修改稿日期: 2005-09-08。

国家自然科学基金资助项目(No.20571069, 20171041)。

*通讯联系人。E-mail: qliu@ustc.edu.cn; xuxl@ustc.edu.cn

第一作者: 陈结霞, 女, 24岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

Ca^{2+} 具有不同的软硬度, Eu^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Tb^{3+} 与 Ca^{2+} 具有相似的半径,却有不同电荷。本文还用此种方法研究了 pH 值对其二级结构的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

尖吻蝮蛇毒冻干粉购于安徽屯溪蛇伤研究所, Tb_4O_7 、 Eu_2O_3 和 Nd_2O_3 (上海跃龙化工厂)的纯度均为 99.9%;其他试剂均为国产分析纯试剂;所有试剂用 Milli-Q 超纯水配制;JASCO J-720 分光偏振仪为日本分光公司产。

1.2 样品的制备

ACF II 的提纯和制备详见文献^[3],其浓度用 280 nm 紫外吸收方法测定: $A_{280}^{1\%}(\text{ACF II})=30$, $M_r(\text{ACF II})=29\,468$ 。将纯化的 ACF II 溶液对 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH=7.6,内含 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA)溶液透析 24 h 后,再对 Milli-Q 超纯水透析 48 h,以制备脱钙 ACF II(apo-ACF II)。

用少量的浓盐酸和双氧水在加热的条件下溶解 Tb_4O_7 ,加热至干,用 Milli-Q 超纯水溶解。用少量的浓盐酸溶解 Tb_4O_7 、 Eu_2O_3 和 Nd_2O_3 ,加热至干,用 Milli-Q 超纯水溶解。用 HCl 和 NaOH 溶液调节以上溶液的 pH 值,使其均为 6,稀土离子溶液浓度用标准 EDTA 溶液标定,指示剂为二甲酚橙。

所用缓冲溶液为 Gly-HCl (pH:2.0~3.5),NaAc-HAc(pH:4.0~6.0),Tris-HCl(pH:7.0~9.0)和 Gly-NaOH (pH:10.0~11.0)。实验中所用的缓冲溶液均用 Chelex-100 (30 cm × 2.6 cm)柱脱去二价和多价金属离子。

1.3 方法

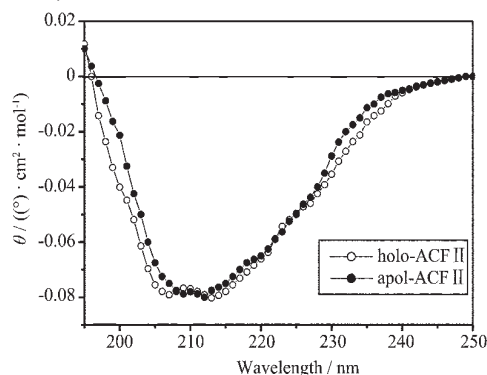
远紫外 CD 谱的测定在 JASCO J-720 分光偏振仪上进行,蛋白质浓度均为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,石英样品池的光径为 0.1 cm,灵敏度为 $0.002^\circ\cdot\text{cm}^{-1}$,测定波长范围为 195~250 nm。分别将不同 pH 值的缓冲液和不同金属离子($1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 ACF II 在室温下作用 30 min 后测 CD 谱,以不含蛋白质的溶液作为各自的空白。缓冲液浓度均为 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CD 谱数据为 3 次扫描平均值。

采用 LINCMB 程序处理 CD 谱数据,以计算二级结构含量。该程序按照 Per 等人^[4]的方法,并进行了改进,可计算出 α -螺旋、反平行- β 折叠、 β -转角/平行- β 折叠、芳香残基和二硫键、无规规则转曲/ γ -转角 5 种组分的百分含量。

2 结果与讨论

2.1 ACF II 的二级结构

CD 谱是研究蛋白质液体构象的有效方法。图 1 是天然 ACF II 和脱钙 ACF II 在 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc-HAc, pH=6.0 条件下的 CD 谱。天然的 ACF II 的 CD 谱与 ACF I 的 CD 谱相似^[5],都表现出 208~215 nm 处的负峰。这种谱峰比较复杂,并非典型的 α -螺旋、 β -折叠和无规则转曲图谱,说明它们的主链骨架结构含有多种构象。脱钙 ACF II 的 CD 谱与天然状态下的 CD 谱相似。由 LINCOMB 计算的结果列于表 1 中。由表 1 中可见,天然 ACF II 的主要骨架结构为反平行 β -折叠结构和 α -螺旋结构。反平行 β -折叠结构含量较多为 26.2%; α -螺旋含量为 13.7%; β -转角/平行 β -折叠含量较少;无规转曲/ γ -转角含量也较多。与一般蛋白质不同的是,天然 ACF II 含有特别多的芳香残基和二硫键结构,达到了 17%左右。这与氨基酸组分分析结果相一致,ACF II 含有 23 个 Phe、14 个 Tyr 和 14 个 Trp 残基^[6]。它含有 14 个 Cys 残基,因此它们分子中可形成 7 对二硫键。这些芳香残基和二硫键的贡献使其 CD 谱呈复杂的谱形。ACF I 的二级结构含量分别为, α -螺旋 15.5%,反平行 β -折叠 26.5%, β -转角/平行 β -折叠 9.7%,芳香残基和二硫键 17.4%,无规转曲/ γ -转角 31.0%^[5]。由此可见,ACF II 和 ACF I 的二级结构非常相似。



$c_{\text{holo-ACF II}}=0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $c_{\text{apo-ACF II}}=0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

图 1 holo-ACF II 和 apo-ACF II 的 CD 谱

Fig.1 CD spectra of holo-ACF II and apo-ACF II

ACF II 和黄绿烙铁头(*Trimeresurus flavoviridis*, habu snake)蛇毒中抗凝蛋白 habu IX/X 都是凝血因子 IX/凝血因子 X 结合蛋白。Habu-IX/X 的晶体结构显示^[7],它含有 19.0%的 α -螺旋和 24.6%反平行- β 折叠,不含平行- β 折叠结构。其中,反平行 β -折叠含量与天然 ACF II 十分接近,它们之间的 α -螺旋含量

表 1 金属离子对 ACF II 二级结构的影响

Table 1 Effects of metal ions on secondary structure of ACF II

pH=6.0	α -Helix / %	Anti-parallel β -sheet / %	β -Turn/ parallel- β sheet / %	Aromatic group and isulfide bond / %	Random coil / %
holo-ACF II	13.70	26.20	14.30	16.40	29.30
apo-ACF II	13.60	25.50	13.90	18.20	28.90
Ca ²⁺ -ACF II	14.10	25.00	15.20	17.20	28.50
Sr ²⁺ -ACF II	12.80	27.30	14.60	17.90	27.30
Mg ²⁺ -ACF II	15.20	23.00	14.70	17.30	29.80
Zn ²⁺ -ACF II	14.50	24.20	14.00	16.50	30.70
Mn ²⁺ -ACF II	13.90	26.50	12.00	17.50	30.10
Co ²⁺ -ACF II	14.70	24.00	12.90	17.70	30.70
Eu ³⁺ -ACF II	16.40	22.70	11.50	18.00	31.40
Nd ³⁺ -ACF II	16.10	23.20	9.80	16.80	34.10
Tb ³⁺ -ACF II	16.80	24.00	9.20	16.30	33.80

$c_{\text{apo-ACF II}}=0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $c_{\text{M}^{2+}}=1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{HAC-NaAC}}=0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=6.0.

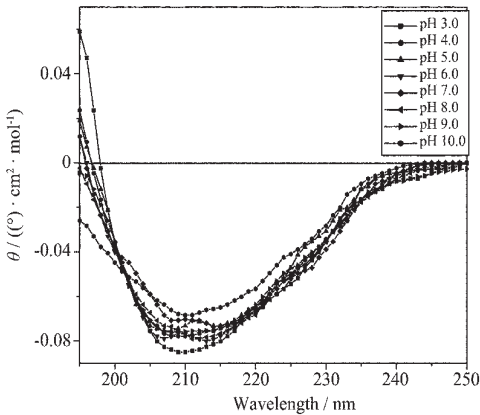
差别也不大。天然 ACF II 的 β -转角和平行 β -折叠含量总共才 14.3%,这也和 habu-IX/X 的情况相似。因此推测,ACF I、ACF II 与 habu-IX/X 的二级结构相似,这 3 种凝血因子 IX/X 结合蛋白可能有相似的骨架结构。

从表 1 中还可以看出,脱钙的 ACF II 的二级结构与它们在天然状态的二级结构基本一样,表明钙离子对 ACF II 的骨架结构影响不大。

2.2 酸度对 ACF II 二级结构的影响

蛋白质分子中 α -螺旋和 β -折叠的稳定性主要取决于分子内部的氢键,静电作用和范德华引力对它有一定的影响。蛋白质分子中的氢键是一个氨基酸残基上的氢原子与另一个氨基酸残基上的氧原子由于静电引力而形成,很显然,pH 值改变将对它产生影响。另外,在蛋白质多肽链的不同部位,存在着酸性氨基酸残基(如 Asp 和 Glu)和碱性氨基酸残基(如 His,Lys 和 Arg),因而在多肽链不同部位的侧链基团之间存在静电相互作用。如果是异性电荷相吸,则有利于维持这种构象的稳定。pH 值变化将影响这些残基的静电状态,因而影响静电作用。

天然 ACF II 在不同 pH 值时的 CD 谱及二级结构变化见图 2、图 3。如图 3 所示,随着 pH 值从 3 到 10 的增大, α -螺旋含量逐渐减少,反平行 β -折叠含量逐渐增大,说明酸性有利于 α -螺旋结构,碱性有利于反平行 β -折叠结构。这与 ACF I 的情况不一样,两者的性质存在一定的差异。这可能与它们的酸碱氨基酸含量差异有关,ACF I 含有 34 个 Glu 残



$c_{\text{holo-ACF II}}=0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Gly-HCl (pH: 2.0~3.5), NaAC-HAC(pH: 4.0~6.0), Tris-HCl (pH: 7.0~9.0) and Gly-NaoH (pH: 10.0~11.0)

图 2 pH 值对 holo-ACF II CD 谱的影响

Fig.2 Effects of pH value on CD spectra of holo-ACF II

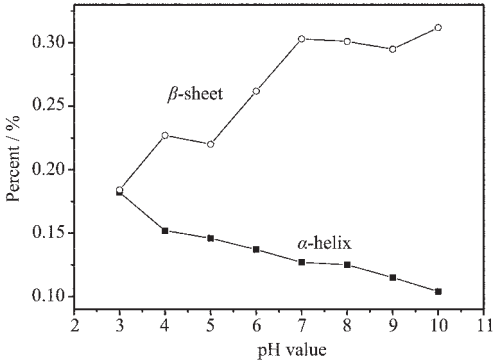


图 3 pH 对 holo-ACF II 二级结构的影响

Fig.3 Main backbone conformations of ACF II at different pH values

基^[5d],比 ACF II 多 4 个;而 ACF II 含有 7 个碱性 Arg 残基,比 ACF I 多 3 个。pH 值变化对 ACF II 分子中其他二级结构影响不大。

2.3 金属离子对 ACF II 二级结构的影响

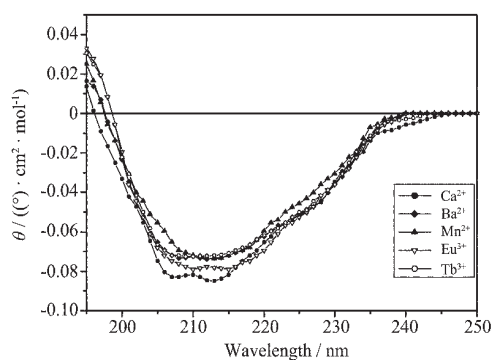
我们曾分析金属离子对 ACF I 二级结构的影响^[5],发现二价金属离子对 ACF I 的水溶液中构象影响不大。脱钙 ACF II (apo-ACF II)在 pH=6.0 条件下与不同的金属离子重组后,其 CD 谱没有明显变化,如图 4 所示。由表 1 可见,钙及其他二价金属离子对 ACF II 的骨架结构也没有明显影响,但三价稀土离子对二级结构有一定影响。Apo-ACF II 重组三价金属离子(Eu^{3+} 、 Nd^{3+} 和 Tb^{3+})后,主要骨架构象发生了一些变化, α -螺旋含量由 13.7%增大至 16%以上,分别增大了 19.9%、17.6%、22.6%;反平行 β -折叠由 26.2%减少至 24%以下,分别降低了 13.3%、11.5%、8.4%;同时 β -转角/平行 β -折叠含量由 14.3%减少至 11.5%以下,分别降低了 19.6%、31.5%、35.7%。这是因为 Sr^{2+} 和 Mg^{2+} 与钙离子性质相似,都是第二主族元素,它们取代钙离子后,对 ACF II 的骨架结构影响不大。二价过渡金属离子具有较多的 d 电子,为软酸或交界酸,与硬碱的配位基团之间不易形成稳定的配位键。二价过渡金属离子不大可能取代 ACF II 中的钙离子,因而对 ACF II 的二级结构影响也不大。而三价的稀土离子是硬酸,具有与钙相似的离子

半径,但却有更高的正电荷,与 ACF II 分子内硬碱配位基团更易结合。所以三价的金属离子能完全取代钙离子,由于稀土离子具有较大的离子势和较强的诱导力,使 ACF II 构象产生较大的变化。这可能是三价金属离子使 ACF II 失活的主要原因。

综上所述,天然的 ACF II 与 ACF I 二级结构十分相似,主要骨架构象都为反平行 β -折叠和 α -螺旋结构。ACF II 中反平行 β -折叠结构较多,达到 26.2%; α -螺旋的含量为 13.7%; β -转角/平行 β -折叠含量较少;无规转曲/ γ -转角含量也较多。ACF I、ACF II 和 Habu IX/X 可能有相似的骨架结构。pH 值对天然 ACF II 的构象有一定的影响,pH 值从 3 到 10 增大时, α -螺旋含量逐渐减少,反平行 β -折叠含量逐渐增大。钙和其他二价金属离子对 ACF II 的骨架结构没有明显影响,但三价稀土离子对其二级结构有一定影响。

参考文献:

- [1] Lu Y, Huang W Z, Wang C, et al. *Hemostasis and Animal Venoms*. Pirkle H, Markland F S Jr, eds., New York: Marcel Dekker Inc, 1987.349
- [2] XU Xiao-Long(徐小龙), LIU Qing-Liang(刘清亮), WU Suang-Ding(吴双顶). *Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Wuli Jinzhan(Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2000,27(5):516~520
- [3] XU Xiao-Long(徐小龙), LIU Qing-Liang(刘清亮). *Shengwu Huaxue Yu Fenzi shengwu Wuli Jinzhan(Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 2000,32(1):84~86
- [4] Perczel A, Park K, Fasman G D. *Anal. Biochem.*, 1992,203: 83~93
- [5] YU Hua-Ming(余华明), XU Xiao-Long(徐晓龙), WANG Chun(王 淳), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, 1995,11(1):78~81
- [6] XU Xiao-Long(徐小龙), LIU Qing-Liang(刘清亮), WU Suang-Ding(吴双顶). *Kexue Tongbao(Chinese Science Bulletin)*, 2000,45(7):710~714
- [7] Mizuno H, Fujimoto Z, et al. *Nature Strutural Biology*, 1997, 4(6):438~441



$c_{\text{holo-ACF II}}=0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $c_{\text{M}^{n+}}=1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

$c_{\text{HAC-NaAc}}=0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=6.0

图 4 金属离子对 ACF II 的 CD 谱的影响

Fig.4 Effects of metal ions on CD spectra of holo-ACF II