

聚肽分子链构象转变研究*

林嘉平 周达飞

(华东理工大学高分子材料系 上海 200237)

摘 要 聚肽分子链在一定的条件下可发生右旋分子链构象与左旋分子链构象间的构象转变. 文中提出了一个有关这一现象的统计理论解释, 理论包含了两个重要的参数 γ 、 ρ . γ 与右旋和左旋分子链构象间能量差别有关; ρ 与在左旋分子链段中起始一个右旋构象的结构单元所需能量有关. 进一步考虑了体系中酸分子存在对构象转变的影响, 以解释新近发现的聚肽左、右旋多重分子链构象转变现象. 此外, 运用核磁共振(NMR)手段还对这一现象做了进一步的研究. 通过与实验结果和文献中报告的数据比较, 证明这一理论可以很好地解释聚肽分子链中发生的左、右旋分子链构象转变.

关键词 左右旋分子链构象转变, 分子链构象统计理论, 生物聚肽

用人工方法可以合成聚肽. 通过研究它们的性能可模拟蛋白质结构与性能之间的关系, 从而进一步了解生命现象. 研究发现聚肽的分子链会按螺旋状卷曲, 每圈含有 3.6 个氨基酸, 在圈与圈之间以氢键固定^[1]. 分子链螺旋状卷曲, 可以是左旋也可以是右旋. 它们之间会发生转变, 这种转变取决于聚肽的分子结构、环境条件, 如: 温度、酸度等. 图 1 所示为聚肽发生分子链构象左旋、右旋间转变的示意图. 研究这种分子链的不同螺旋方式以及它们之间的互相转变, 对了解各种蛋白质的生理作用, 无疑将提供十分有用的信息.

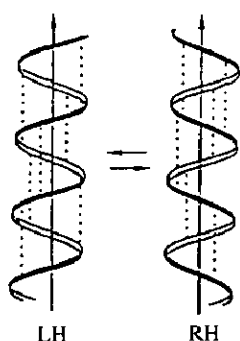


Fig. 1 Schematic representation of the screw-sense inversion phenomenon observed for polypeptide
LH: left-handed, RH: right-handed

聚肽的分子结构特别是侧链结构对分子链采取何种螺旋卷曲方式影响很大. 根据侧链的不同, 聚肽可以采取左旋或右旋的分子链构象. Bradbury 等的研究结果表明^[2], 在稀溶液中聚

(β -苯甲基-L-天门冬氨酸酯)(Poly(β -benzyl-L-aspartate))和聚(β -甲基-L-天门冬氨酸酯)(Poly(β -methyl-L-aspartate))采取左旋的分子链构象, 而聚(β -乙基-L-天门冬氨酸酯)(Poly(β -ethyl-L-aspartate))和聚(β -丙基-L-天门冬氨酸酯)(Poly(β -propyl-L-aspartate))则采取右旋的分子链构象. 上述两类物质只是侧链结构存在差别. 聚肽的分子链构象还会随温度发生变化. Watanabe 等^[3,4]报道在四氯乙烷(TCE)中聚(β -苯乙基-L-天门冬氨酸酯)(Poly(β -phenethyl-L-aspartate)、PPLA)会随温度的升高发生由右旋向左旋的构象转变, 转变温度在 80~100℃. 这种转变除了可以在稀溶液中进行外, 还可以在液晶态中进行.

最近, Abe 等的研究发现 PPLA 在 CHCl_3 /三氟乙酸的混合溶剂中, 存在一个所谓的多重左旋 $\rightleftharpoons$ 右旋分子链构象转变^[5], 即在低温下 PPLA 采取左旋的分子链构象, 随着温度上升至常温范围, 左旋构象会向右旋构象转变, 温度进一步升高, 右旋构象又会转变成左旋构象. 也就是对于 PPLA 聚肽分子链, 在常温下它采取右旋模式. 温度升高由于热运动, 发生右旋向左旋的转变; 温度下降, 体系中的酸分子会同聚肽的侧链发生作用, 增大侧链柔性, 从而诱发右旋向左旋的转变. 上述分子链构象转变被称为多重左旋 $\rightleftharpoons$ 右旋分子链构象转变.

有关左旋、右旋转变的机理, Abe 在总结了以往实验结果后, 认为整个过程是一个链式过

程^[5].在转变点上至少要有三个聚肽结构单元上的氢键同时打开和重新组合,这是因为在聚肽分子链上第 i 个结构单元要同第 $i+4$ 个结构单元形成氢键.这种链式过程机理与聚肽分子链螺旋分子链构象同无规线团分子链构象间的转变机理相似^[6-11].

在这篇论文中,作者首次提出了一个关于聚肽左旋、右旋构象转变的理论.这个理论包含两个重要的参数,一个是 γ ,它与右旋与左旋间的能量差有关,另一个是 ρ ,它表示在左旋聚肽分子链上起始一个右旋态肽链单元的难度,或者说是一个表征起始点与左旋构象间能量差的参数.此外,作者还在理论中进一步考虑了有机酸存在对构象变化的贡献.用核磁共振方法研究 PPLA 在 CHCl_3/TFA 稀溶液中的多重分子链构象转变.将理论与实验结果及文献中所报道的数据进行比较,发现理论可以令人满意地解释在聚肽中发生的左、右旋分子链构象的转变.

1 实验部分

PPLA 可根据文献所报所道的方法合成^[12].首先,将左旋-天门冬氨酸(*L*-Aspartate acid)与苯乙醇在硫酸存在的条件下反应,反应温度为 70°C 并不断搅拌.反应生成的 β -苯乙基-*L*-天门冬氨酸酯(β -Phenethyl-*L*-aspartate)再同三光气反应生成 *N*-羧基- β -苯乙基-*L*-天门冬氨酸酯(*N*-Carboxy- β -phenethyl-*L*-aspartate).将此产物提纯并充分干燥,在四氢呋喃/正己烷混合溶剂中以三乙胺为引发剂聚合生成 PPLA.将 PPLA 溶于二氯乙酸/ CHCl_3 (2.98, V/V)中,测得特性粘数,然后根据 Teramoto 等人所提出的关系式^[13],得到 PPLA 的分子量为 104320,实验所需的 PPLA 溶液是将 PPLA 溶解于 TFA/CHCl_3 混合溶剂中制得, $^1\text{H-NMR}$ 使用的仪器为 Bruker AMX-400 WB 在 400.13MHz 条件下进行操作.

2 理论与计算结果

2.1 温度升高引起的右旋向左旋分子链构象转变

对于左右旋构象可变的聚肽高分子链,根据[14]、[15]等文献论述,按 Boltzmann 定律,右旋的肽链重复单元的统计权重定义为:

$$\gamma = \exp[-G_R - (G_L)/RT] = \exp[-\Delta G/RT] \quad (1)$$

式中 G_R 与 G_L 分别为右旋态与左旋态所对应的能量, ΔG 为两种状态间的能量差.在实用上,一般指定某一种状态的统计权重为 1,其它态可按此标准计算出相对权重,在本研究工作的理论处理中,假设左旋的肽链单元的统计权重为 1,即左旋态为基准态.根据吴大诚在文献[14]中所论述的原理,式(1)中的 ΔG 可近似地用自由能差来代替,于是式(1)可进一步写成:

$$\gamma = \exp[-\Delta G/RT] = \exp[-\Delta H/RT + \Delta S/R] \quad (2)$$

式中 ΔH 与 ΔS 分别为右旋与左旋状态之间的焓差和熵差.聚肽链的左右旋构象转变是一个链式过程^[5],例如:左旋肽链向右旋肽链转变时,首先在肽链中一个肽链单元发生左旋向右旋的转变,然后引发其他单元由左旋向右旋转变,在左旋肽链中起始一个右旋单元需要三个肽链单元协同动作,对于这种起始点,发生转变所要克服的能量相对要大^[5],它相对左旋构象的统计权重相应要下降.设其为 $\rho\gamma$, ρ 应该小于 1, ρ 值的大小表示在左旋的聚肽链段上起始一个右旋结构的难易程度, ρ 值越小难度越大,分子链构象转变的协同性越大^[11].

对于右旋与左旋状态之间的焓差(ΔH)和熵差(ΔS),由于右旋构象较左旋构象稳定^[16,17],所以 ΔH 应为负值.此外,根据核磁共振测试以及 Rotational Isomeric State(RIS)的计算结果^[5,18],右旋结构较左旋结构而言,其侧链的运动受到了比较大的限制,也就是其熵值较小,而侧链熵值的差别在左右旋分子链构象熵差别中,起了决定性的作用^[5],因此, ΔS 也应为负值.

可用于推导聚肽分子链的配分函数的方法有多种,作者选用了行列式法,这种方法比较适应于高分子分子链.它曾被应用于著名的 Zimm-Bragg 理论中^[6],用来推导聚肽分子链中螺旋构象与无规线团构象间的构象转变.参照 Zimm-Bragg 理论,对于左、右旋构象可变聚肽分子链,若分子链包含 N 个结构单元,且仅考虑相邻结构单元间的作用,则其分子链的配分函数可为:

$$Z_N = [1 \ 1]M^{N-1}[0 \ 1]^T \quad (3)$$

式中 T 代表矢量矩阵转置,行列式 M 表示为:

$$M = \begin{vmatrix} \gamma & \rho\gamma \\ 1 & 1 \end{vmatrix} \quad (4)$$

计算 Z_N 首先要将 M 通过行列式 B 对角线化成行列式 Λ :

$$A = B^{-1}MB \quad (5)$$

这样式(3)可写成:

$$Z_N = [1 \ 1]B\Lambda^{N-1}B^{-1}[0 \ 1]^T \quad (6)$$

$$Z_N = [1 \ 1]B \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{bmatrix}^{N-1} B^{-1}[0 \ 1]^T \quad (7)$$

式中 $\lambda_1 > \lambda_2$, 且为与 M 有关的特征方程的两个根, 即:

$$(\lambda - \gamma)(\lambda - 1) = \rho\gamma \quad (8)$$

$$\lambda_{1,2} = (1/2)\{1 + \gamma \pm [(1 - \gamma)^2 + 4\rho\gamma]^{1/2}\} \quad (9)$$

于是 Z_N 可进一步化简成:

$$Z_N = \left(\frac{\lambda_1 - \gamma}{\lambda_1 - \lambda_2}\right)\lambda_1^N + \left(\frac{\gamma - \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2}\right)\lambda_2^N \quad (10)$$

聚肽分子链的许多重要物理参数都可以通过 Z_N 求得^[11], 如: 分子链中采取右旋构象结构单元所占的分数 F_R 可表示为:

$$F_R = \frac{1}{(N-1)} \cdot \frac{\partial \ln Z_N}{\partial \ln \gamma} \quad (11)$$

如果 N 值很大, 则:

$$F_R = \frac{\partial \ln \lambda_1}{\partial \ln \gamma} \quad (12)$$

$$F_R = \frac{\gamma}{\{(\gamma + 1) + [(\gamma - 1)^2 + 4\rho\gamma]^{1/2}\} \cdot \left\{1 + \frac{(\gamma - 1) + 2\rho}{(\gamma - 1)^2 + 4\rho\gamma} \right\}} \quad (13)$$

图2所示为根据方程(13)计算所得的 F_R 与温度之间的关系, 计算中使用的热力学参数在图标中列出. 从图中计算结果可以看到随温度的升高, 理论预测了一个聚肽由右旋至左旋的分子链

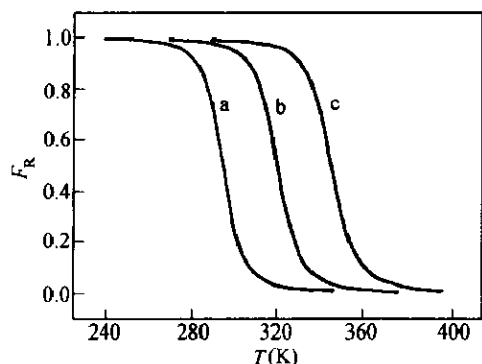


Fig. 2 Variation of the right-handed helix fraction with temperature calculated from equation (13) with (a) $\Delta H = -502 \text{ J/mol}$; (b) $\Delta H = -544 \text{ J/mol}$; (c) $\Delta H = -586 \text{ J/mol}$

Invariant parameters are: $\Delta S = -1.7 \text{ J/molK}$ and $\rho = 1.0 \times 10^{-5}$

构象转变. 图中还显示了 ΔH 值对构象转变的影响, ΔH 取值为 -502 J/mol (a)、 -544 J/mol (b)、 -586 J/mol (c). ΔH 值与右旋同左旋构象之间的能量差别有关. 如果我们假定 $F_R = 0.5$ 时的温度为构象转变温度 T_u , 计算结果显示 ΔH 的绝对值越大, 即能量差越大, 右旋向左旋的转变温度越高.

2.2 多重左旋 $\rightleftharpoons$ 右旋分子链构象转变

研究结果表明^[17], 在聚肽/中性溶剂/有机酸所组成的溶液中, 有机酸会与聚肽侧链上的羧基通过氢键发生作用, 改变侧链的构象. 当这种作用达到一定强度时, 就会引起聚肽分子链的构象发生右旋向左旋的转变. 于是在有机酸存在条件下, 聚肽的左、右旋分子链构象转变过程中, 还应存在一个酸分子与聚肽分子作用的化学平衡, 这个平衡的平衡常数可写成:

$$K_C = \exp\left[-\frac{\Delta H_C}{RT} + \frac{\Delta S_C}{R}\right] \quad (14)$$

式中 ΔS_C 应为负值, 因为在左旋态时, 由于同聚肽发生作用, 酸分子的运动受到限制; ΔH_C 也应为负值, 且其值在形成氢键的热焓范围中.

由于处在左旋状态, 酸分子会与聚肽发生作用, 于是左旋态聚肽结构单元的统计权重 1 必须作修正. 根据文献[11], 聚肽的肽链单元如同酸发生作用, 其值应升高. 因为每一个结构单元有一个羧基可与酸作用, 所以行列式 M 中的 1 应被 δ 取代:

$$\delta = 1 + \alpha K_C \quad (15)$$

式中 α 为酸的活度, 假定它等于体系中酸的摩尔分数. 由于左旋构象的统计权重发生了变化, 于是 M 应改写成:

$$M = \begin{vmatrix} \gamma & \rho\gamma \\ \delta & \delta \end{vmatrix} \quad (16)$$

用 δ 代替 1 之后, 必须改变 M 的本征值. $\lambda_{1,2}$ 应为:

$$\lambda_{1,2} = (1/2)\{(\delta + \gamma) \pm [(\gamma - \delta)^2 + 4\rho\delta\gamma]^{1/2}\} \quad (17)$$

F_R 也相应改变成:

$$F_R = \frac{\gamma}{\{(\gamma + \delta) + [(\gamma - \delta)^2 + 4\rho\delta\gamma]^{1/2}\} \cdot \left\{1 + \frac{(\gamma - \delta) + 2\rho\delta}{[(\gamma - \delta)^2 + 4\rho\delta\gamma]^{1/2}} \right\}} \quad (18)$$

图3所示为公式(18)的计算结果, 计算中所使用的热力学参数在图标中列出. ΔH_C 、 ΔS_C 的取

值在氢键的范围内.从图中的计算结果可以看到,在适中的温度下,聚肽采取了右旋的分子链构象.温度升高,右旋的分子链构象会转变成左旋,这种转变是由热运动造成的;当温度下降时,同样也会发生右旋向左旋的转变,而它是因为体系中酸分子与聚肽侧链作用引起的.图中还显示了不同酸度 α 对构象转变的影响.随着酸度的升高,右旋分子链构象的稳定性会逐渐下降,以至于达不到100%的右旋分子链构象.上述计算结果表明,理论成功的预测了聚肽在含有有机酸体系中的多重分子链构象转变.

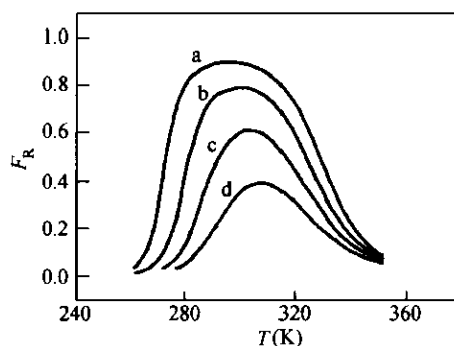


Fig. 3 Variation of the right-handed helix fraction with temperature according to equation (18) at four acid compositions: (a) 0.15mol%; (b) 0.17mol%; (c) 0.19mol%; (d) 0.21mol%

Invariant parameters used in the calculation are: $\Delta H = -586\text{J/mol}$, $\Delta S = -1.7\text{J/molK}$, $\Delta H_C = -2093\text{J/mol}$, $\Delta S_C = -46\text{J/molK}$ and $\rho = 1.0 \times 10^{-5}$

3 理论与实验结果的比较

3.1 温度升高引起的分子链构象由右旋向左旋的转变

Watanabe 等^[3,4]报道了有关 PPLA 在四氯乙烷(TCE)中右旋、左旋构象转变的研究结果.他们用 Optical Rotatory Dispersion (ORD) 测量了 PPLA 稀溶液随温度升高 Moffit-Yang 参数 b_0 的变化情况,发现 PPLA 由右旋向左旋的构象转变温度在 80℃ 到 100℃ 之间.在此实验结果基础上,假设对于完整的右旋分子链构象,其 Moffit-Yang 参数 b_0 为 -598,而完整的左旋分子链构象,其 b_0 为 +402,并且参数 b_0 与 F_R 成线性关系,于是就可以得到 F_R 与温度之间的关系.结果如图 4 所示,图中□即代表实验所得结果.

利用 Least-Squares 方法^[19],将方程(13)对实

验结果进行拟合.拟合结果如图中实线所示.可以看到理论可以很好地模拟实验结果.通过拟合实验数据所得到的参数理论计算值为: $\Delta H = -654.0\text{J/mol}$, $\Delta S = -1.84\text{J/molK}$ 和 $\rho = 1.2 \times 10^{-5}$.关于这些参数还可以通过其它方法得到^[5,18].例如 Abe 等利用 $^1\text{H-NMR}$ 测定了液晶态 PPLA 侧链,在右旋和左旋时的不同取向,然后用 Rotational Isomeric State(RIS)方法计算出同右旋和左旋相应的构象分数,从而估算出 $\Delta H = \Delta ST_{tr} = -1101\text{J/mol}$.计算所得的 ρ 值很小,这说明产生一个构象转变起始点所要克服的能量较大,或者说左、右旋分子链构象转变的协同性很强.

3.2 多重左旋 $\rightleftharpoons$ 右旋分子链构象转变

聚肽的多重分子链构象转变可以用偏光显微镜在液晶态下观察到^[5].这种转变同样也会在稀溶液中发生,并可以用 $^1\text{H-NMR}$ 进行跟踪.左右旋不同的分子链构象可以从肽链—NH 基团上 ^1H 的不同化学位移表现出来^[20,21].当聚肽采取右旋分子链构象时, $\delta_{\text{NH}} = 8.2$;而采取左旋构象时, $\delta_{\text{NH}} = 8.8$.图 5 所示为在 PPLA/ CHCl_3 /三氟乙酸体系中, PPLA 的—NH 基团 $^1\text{H-NMR}$ 核磁共振谱与温度之间的关系,体系中酸的摩尔分数为 0.209%.可以看出,随着温度的上升或下降,聚肽会发生右旋向左旋的构象转变.

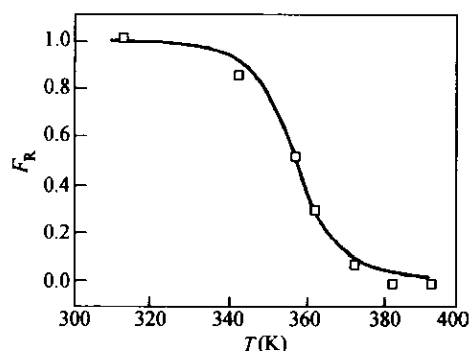


Fig. 4 Variation of the right-handed helix fraction of PPLA in TCE with temperature according to Ref. [3]

The solid line is the best fit of equation (13) with $\Delta H = -654.0\text{J/mol}$, $\Delta S = -1.84\text{J/molK}$ and $\rho = 1.2 \times 10^{-5}$

假定聚肽中左、右旋构象所占分数与其相应的核磁共振谱峰面积成正比,于是通过分峰程序^[19],可得到右旋分子链构象的比率分数 F_R .图 6 所示为三种不同含酸量的 PPLA 稀溶液 F_R 与温度的关系.其中酸的摩尔分数分别为 0.146% (a)、0.209% (b)、0.333% (c),图中□代表实验所

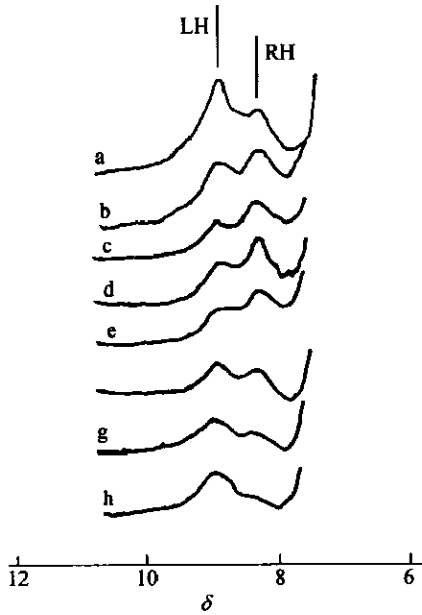


Fig. 5 Example of ^1H -NMR spectra of the amide NH resonance of PLLA observed at (a) 60°C; (b) 50°C; (c) 40°C; (d) 30°C; (e) 20°C; (f) 10°C; (g) 0°C; (h) -10°C
LH:left-handed, RH:right-handed

得结果.用 Least-Squares 法^[19]将公式(18)对实验结果拟合.图中的实线为理论计算结果.可以看出理论可以很好的描述实验现象.拟合实验数据所得的 ΔH 、 ΔS 、 ΔH_c 、 ΔS_c 和 ρ 的理论计算值在表 1 中列出.

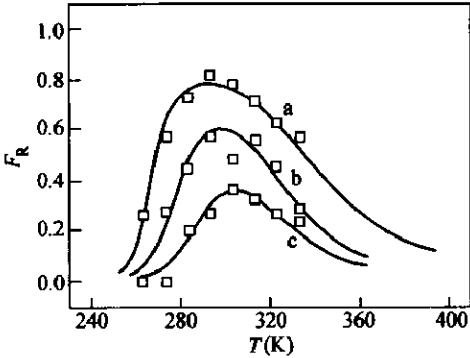


Fig. 6 Variation of the right-handed helix fraction of PLLA in CHCl_3/TFA mixtures with temperature at three acid compositions: (a) 0.146mol%; (b) 0.209mol%; (c) 0.333mol%
The solid lines are the best fits of equation (18). The thermodynamic parameters obtained in the calculations are listed in Table 1

Table 1 Thermodynamic parameters for helix-helix transitions of PLLA obtained from fits of theory

TFA mole fraction(%)	PLLA conc. (wt%)	ΔH (J/mol)	ΔS (J/molK)	ΔH_c (J/mol)	ΔS_c (J/molK)	ρ
0.0	1.0	-654.0	-1.84			1.2×10^{-5}
0.146	1.0	-515.4	-1.51	-32027.0	-89.6	1.1×10^{-4}
0.209	1.0	-529.6	-1.55	-22896.0	-56.5	3.8×10^{-5}
0.333	1.0	-538.4	-1.55	-20168.2	-48.6	2.4×10^{-5}

分析发现, ΔH_c 、 ΔS_c 与形成氢键的焓与熵在同一数量级范围^[10]. 这些结果进一步证明有关聚肽分子链构象统计理论的正确性,它能够有效的描述聚肽的各种左、右旋分子链构象转变.

REFERENCES

1 Teramoto A, Fujita H. Adv Polym Sci, 1975, 18: 65~149
2 Bradbury E M, Carpenter B G, Goldman H. Biopolymers, 1968, 6: 837~850
3 Abe A, Okamoto S, Kimura N, Tamura K, Onigawara H, Watanabe J. Acta Polymer, 1993, 44: 54~56
4 Watanabe J, Okamoto S, Abe A. Liq Cryst, 1993, 15: 259~263
5 Abe A, Furuya H, Okamoto S. Biopolymers, 1997, 43: 405~412
6 Zimm B H, Bragg J K. J Chem Phys, 1959, 31: 526~535
7 Lin Jiaping, Abe A, Furuya H, Okamoto S. Macromolecules, 1996, 29: 2584~2589
8 Lin Jiaping. Polymer, 1997, 38: 4837~4841
9 Lin Jiaping. Polymer, 1998, 39: 5495~5500
10 Dupre D B. Biopolymers, 1990, 30: 1051~1060

- 11 Teramoto A, Fujita H. J Macromol Sci Rev Macromol Chem, 1976, C15: 165 ~ 278
- 12 Daly W H, Poche D. Tetrahedron Lett, 1988, 29: 5859 ~ 5862
- 13 Hayashi Y, Teramoto A, Kawahara K, Fujita H. Biopolymers, 1969, 8: 403 ~ 420
- 14 Wu Dacheng(吴大诚). Introduction to Statistical Mechanics of Polymer Conformation(高分子构象统计理论导引). Chengdu(成都): Sichuan Education Press(四川教育出版社), 1985. 43 ~ 161
- 15 Flory P J. Statistical Mechanics of Chain Molecules(链状分子的统计力学), Wu Dacheng, Gao Yushu, Xu Yuanze, Zhao Delu translate(吴大诚, 高玉书, 许元泽, 赵得禄译). Chengdu(成都): Sichuan Science and Technology Press(四川科学技术出版社), 1990. 53 ~ 87
- 16 Ooi T, Scott R A, Vanderkooi G, Scheraga H A. J Chem Phys, 1967, 46: 4410 ~ 4426
- 17 Tonumi H, Saso N, Yasumoto Y, Sasaki S, Uemaesu I. Polymer J, 1979, 11: 977 ~ 981
- 18 Okamoto S, Furuya H, Abe A. Polymer J, 1995, 27: 746 ~ 756
- 19 Zhong Suisheng(钟穗生), Liu Xuguang(刘旭光). Computer Processing of Experimental Data(实验数据的计算机处理). Beijing(北京): Ocean Press(海洋出版社), 1994. 150 ~ 170
- 20 Bradbury E M, Carpenter B G, Robinson C C, Goldman H. Macromolecules, 1971, 4: 557 ~ 564
- 21 Watanabe J, Okamoto S, Satoh K, Sakajiri K, Furuya H, Abe A. Macromolecules, 1996, 29: 7084 ~ 7088

HELIX-HELIX TRANSITIONS IN POLYPEPTIDES

LIN Jiaping, ZHOU Dafei

(Department of Polymer Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract A statistical mechanical treatment concerning the helix-helix transition of polypeptide chains was attempted based on a model which specifies the state of each peptide residue by either right-handed screw sense or left-handed screw sense. Two principal parameters were introduced. γ is the statistical weight of a right-handed helical residue that follows one or more other right-handed helical residues ρ represents the difficulty for the initiation of a right-handed sequence after a run of left-handed segments. To account for the newly discovered multiple helix-helix transitions, the acid effect was further incorporated into the theory. The proposed theory was compared with experimental results and some published data, and the agreement is encouraging.

Key words Helix-helix translation, Statistical theory of polymer chain, Poly(β -phenethyl-L-aspartate)