

将会更迅速地发展。

参 考 文 献

- [1] Орлова, Т. Г., в ДР., 1980, *Вопр. Вирусол.* 5: 594—596.
- [2] Merigan, M. C., 1982, 干扰素研究的进展。新医学, 9: 451—453.
- [3] Epstein, L. B., 1981, *Interferon 1981*, V. 3, ed. Gresser, I., p. 13, Acad. Press.
- [4] J. L. M., 1979, *Science*, 204: 1184—1185.
- [5] DeClercq, E., et al., 1972, *Infect. Immun.*, 8: 309.
- [6] Field, A. K., et al., 1972, *Medicine*, 51: 169.
- [7] 胡其光, 1982, 天津聚肌胞的实验研究和临床应用。三届全国干扰素学术会议资料。
- [8] Levy, H. B., et al., 1975, *J. Infect. Dis.*, 132: 434—439.
- [9] Storch, E., et al., 1982, *Eur. J. Immunol.*, 9: 793—794.
- [10] Catalona, W. J., et al., 1981, *Nature*, 291 (5810): 77.
- [11] Saksela, E., 1981, *Interferon 1981*, V. 3, ed. I. Gresser, p. 45, Acad. Press.
- [12] Sehgal, P. B., et al., 1980, *Nature*, 288: 95.
- [13] Houston, W. E., et al., 1976, *Infect. Immun.*, 14: 318—319.
- [14] Stebbing, N., et al., 1980, *Infect. Immun.* 29: 960—965.
- [15] Moreno, J. A., et al., 1979, *J. Gen. Virol.*, 42: 219—222.
- [16] Baer, G. M., et al., 1979, *Bull. W. H. O.*, 57: 807—813.
- [17] Harmon, M. W., et al., 1975, *J. Infect. Dis.*, 132: 241—249.
- [18] Marcucci, F., et al., 1982, *Eur. J. Immunol.*, 9: 787—788.
- [19] 常春燕等, 1982. 医学研究通讯, 10: 5.
- [20] 金建平, 1982. 医学研究通讯, 10: 5—6.
- [21] Stringfellow, D. A., 1975, *Infect. Immun.*, 11: 294—302.
- [22] Vilcek, J., et al., 1976, *J. Infect. Dis.*, 133: A22—A29.
- [23] Diandani, F., et al., 1980, *Nature*, 283: 400—402.
- [24] Dziarski, R., et al., 1979, *Infect. Immun.*, 23: 706—710.
- [25] Dziarski, R., et al., 1979, *Ibid.*, 26: 508—514.

核磁共振(NMR)技术在生物膜中的应用

ERIC OLDFIELD

前 言

近四、五年来, 我们研究完整膜结构的能力大大地加强了, 其主要原因是在膜的研究领域中引入了固相核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)的技术(Davis等, 1976; Haberkorn等, 1978)。现在已经可以利用样品快速旋转技术(rapid sample rotation techniques)获得非声处理的类脂膜的高分辨的波谱(Haberkorn等, 1978)或借助于同位素标记和四极-回波脉冲技术(quadrupole-echo pulse technique)详细地研究类脂分子中几乎所有原子的运动速率及运动类型(Davis等, 1976; Huang等, 1980)。此外, 现在已经研究了磷脂中所有其他稳定的核(^{14}N , ^{17}O , ^{31}P)(Sim-

inovitch等, 1980; Rajan等, 1981, 及文中所列的文献; Tsai等, 未发表的资料), 这就使研究者可以把精力集中于他们所希望研究的类脂双层膜系统中的任何部分。以下主要介绍某些有代表性的研究。至于研究中所用的仪器设备及一些技术性的问题, 有兴趣的读者可参考其它有关的文献。

除了类脂双层动力学和固醇、多肽及蛋白质对动力学影响的相当详细的研究工作外, 最近又有许多报道表明, 有可能在完整的生物膜中获得蛋白质本身的固态波谱(Kinsey等, 1981a; Kinsey等, 1981b; Rice等, 1981a)。从 *Halobacterium halobium* (一种极其嗜盐性的细菌), *Escherichia coli*, 和 *Thermus thermophilus* (一种专性喜温种类)的研究结果, 可以预料, 在

不久的将来, NMR 方法学可能被用于确定那些最令人感兴趣的膜中酶的动态和静态的结构(Jost 等, 1973; Warren 等, 1974; Stoekenius 等, 1979)。

膜中蛋白质的 NMR

尽管在生物膜中的蛋白质的 NMR 是一项在实验技术上急待解决的任务, 这是由于个别种类的氨基酸的浓度极低的缘故(单个氨基酸共振更是如此), 但是人们对在完整的细胞膜中获得蛋白质的 NMR 波谱仍然很感兴趣。因为蛋白质是一种活性催化剂, 作为酶它参与膜所进行的一切重要的反应, 如呼吸、光合作用、视觉、神经脉冲传导及细胞与细胞的识别作用。

在完整的细胞膜中的蛋白质的 NMR 的研究最近已经有所报道(Oldfield 等, 1981 a, b; Kinsey 等, 1981 a, b; Schramm 等, 1981; Rice 等, 1981a)。尽管有不同的看法, 我们已经证明, 在完整的生物膜中, 获得个别类型氨基酸残基分辨率好的高信噪比的波谱是比较容易的。首先, 我们以及其他作者研究了 *Halobacterium halobium* R₁ 的紫膜。这种膜具有特殊的可兴奋性, 它只有一种蛋白质, 细菌视紫红质(bacteriorhodopsin), 这种蛋白质的排列顺序已经清楚(Gerber 等, 1979; Ovchinnikov 等, 1979; Walker 等, 1979), 其分子量相对较低, 大约为 27,000, 而且对其二维结构也有所了解(Henderson 和 Unwin, 1975; Engelman 和 Zaccari, 1980), 故它适合于供 NMR 波谱的研究。

图 1 表示在 *H. halobium* 的紫膜中一个典型的缬氨酸甲基的 ²H-NMR 波谱。在这种情况下, 样品量大约是 0.8 cm³, 相当于干重~50 mg, 其中 80% 为紫膜蛋白, 细菌视紫红质。必须注意, 图 1 所示的波谱是在比较短的时间周期 260 毫秒中获得的, 最近我们使用更为先进的仪器, 用 1 毫秒也获得了类似的结果。遗憾的是, 波谱所表示的是在紫膜中 26 个缬氨酸所有共振叠加的结果! 不过, 紫膜可借助于电场方法(Keszthelyi, 1980)和磁场方法(Neugebauer 等, 1977; Rice 等, 1981 a)或借机械样品调整的方法(Henderson 和 Unwin, 1975)来确定方位。因此有充分理由相信, 在将来随着在膜蛋白中各个位点的伴随物的分辨, 有可能获得这种定向排列的“单一”结晶的波谱。

我们研究组已经用 *H. halobium* 紫膜得到各种经过重氢处理的氨基酸的 ²H-NMR 的结果, 包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和甲硫氨酸(Kinsey 等, 1981 a, b; Schramm 等, 1981; Oldfield 等, 1981 a, b)。从在这种膜蛋白中所得到的氨基酸动力学的综合图象看来, 蛋白质具

有相对较强的刚性的结构。在室温时, 在所有的情况中的甲基都迅速地旋转(10¹⁰—10¹¹ 秒⁻¹)。在所有的例子中(除了丙氨酸外)沿 C^α-C^β 轴的旋转运动按 NMR 实验的时间级来看是较慢的, 即 $\geq 10^4$ 秒⁻¹。在小侧链苏氨酸和缬氨酸的情况中由于甲基的旋转, 沿 C^β-C^γ 轴运动又快起来。但是, 对于具庞大残基的苯丙氨酸和酪氨酸, 沿 C^β-C^γ 轴的运动是慢得多, 在生长温度 37°C 时为 $\approx 10^6$ —10⁸ 秒⁻¹。另外, 也象离散过程一样, 显然发生了这么一种运动, 在这种运动中苯环在一个平面结构和另一个平面结构之间不停翻转(Schramm 等, 1981; Kinsey 等, 1981b; Oldfield 等, 1981 a, b; Rice 等, 1981 a), 即象一个硬币在“正面”和“反面”两个构型之间翻转一样。这种迅速翻转的过程以前在溶液中蛋白质的 NMR 波谱由 Willians 及其合作者, Wuthrich 及其合作者提出过, 而其他学者则做过牛蛋白质的胰腺蛋白的酶抑制剂(Wagner 等, 1976), 细胞色素 C 和溶菌酶(Willians, 1978)的研究, 他们也提过这种现象。在固态中, ²H-NMR 波谱(图 2)的分析表明, 重新取向的过程无疑是一个双位点(two-site)之间的翻转过程, 用来完成翻转过程的时间是比实际逗留在指定的结构状态的时间少得多。Karplus 及其同事已经研究过这种“不频繁”(“infrequent”)运动的理论, 而对其结果也有所评论(McCammon 和 Karplus, 1980)。

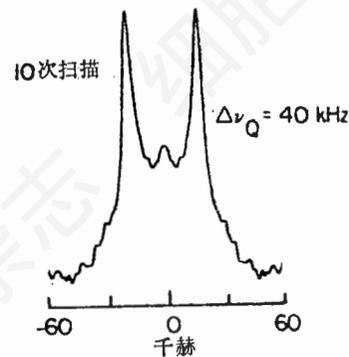


图 1 在 *Halobacterium halobium* R₁ 的紫膜中 [²-²H₆]缬氨酸重氢标记的细菌视紫红质在 260 毫秒所记录的 55.3 MHz 重氢傅里叶变换 NMR 波谱

从苯丙氨酸到色氨酸, 增长了羟侧链, 所增加的体积妨碍了任何快速的大振幅的侧链运动。其结果, 在色氨酸侧链沿 C^β-C^γ 轴的运动可以忽略不计, 在紫膜蛋白质中色氨酸的 C^α-C^β 和 C^β-C^γ 键可以被看作具有“刚性”。

当我们研究天然的, 指定的膜蛋白时, 有能力在

合理的时间周期内(通常大约为10分钟)获得各个种类氨基酸残基的高质量波谱,这就意味着我们能够很详细地研究膜中所含的酶的静态和动态的结构。

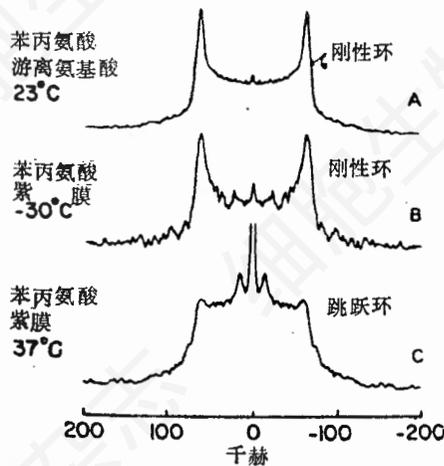


图2 $[\delta_1, \delta_2, \epsilon_1, \epsilon_2, \zeta\text{-}^2\text{H}_5]$ 苯丙氨酸的55.3 MHz重氢傅里叶变换NMR波谱

(A)在23°C游离的氨基酸;(B)在-30°C标记的紫膜;(C)在37°C(生长温度)标记的紫膜。(C)中的反对称参数是 ~ 0.66 ,表明苯丙氨酸环正在进行快速2-折的“翻转”运动(2-fold “flipping” motions)

在将来的研究工作中,一个特别令人瞩目的领域是涉及剖析类脂对脂蛋白的动态结构的影响的实质,例如测定类脂不饱和度、极性端基的结构和胆固醇的存在对不同的氨基酸侧链运动的速率和运动类型的影响。这种资料也有助于解释在晶态的蛋白质中氨基酸侧链的动力学性质。

蛋白质对膜结构的影响

有关生物膜中和在重建的类脂-蛋白质体系中蛋白质-类脂相互作用的本质,在过去的十年中有很大的争论。蛋白质-类脂在生物膜中的相互作用的基本构想是由Jost等(1973)提出的。这些作者利用电子自旋共振(ESR)自旋标记技术证明,至少在蛋白质/类脂比率高的情况下,类脂自旋标记物被固定在不同的膜蛋白的表面上不动。在这种情况下被固定不动的意思就是说,在 $\sim 10^{-9}$ 秒的时间级上不发生快速的大振幅的运动。对ESR结果的解释是认为类脂分子滞附在蛋白质的表面。类脂滴定法和综合的强度实验指出,只有接近蛋白质的第一层类脂以这种方式完全固定不动。许多理论家根据蛋白质对类脂双层的界面脂的“指令”(“ordering”)或“定向”(“orienting”)效应来解释这

些实验。理论学家把蛋白质看作是一种插入类脂双层的刚性棒(a rigid rod)或六角形柱体(hexagonal cylinder),因此阻碍了液晶相磷脂所特有的类脂烃链的正常折曲。也就是说,蛋白质被认为能象胆固醇那样对类脂双层结构有“凝集效应(condensing effect)”。但是,最近对这些体系所做的 $^2\text{H-NMR}$ 波谱学研究(Oldfield等, 1981 b; Seelig和Seelig, 1978)表明,没有证据认为以下任何一种蛋白质如髓磷脂的含蛋白脂质的脱辅基蛋白(myeline proteolipid apoprotein),细胞色素氧化酶,细胞色素 b_5 ,噬菌体外衣蛋白或肌浆网ATP酶能对磷脂烃链起到上述指令的作用。在几乎所有的例子中所观察到的蛋白质-类脂重组的波谱实际上是与纯类脂双层的波谱一样的,而类脂-胆固醇体系中类脂烃链接受的指令是它在纯类脂双层的两倍,或是一种蛋白质/类脂(2:1 W/W)的复合体。这自然导致提出一个认为类脂-蛋白质之间基本上没有强烈的相互作用的模型。应特别强调蛋白质表面没有对类脂烃链发出强的指令。当然,如果没有实例说明膜蛋白是类似于一种六角棒,这倒似乎是一个合理的解释。

在许多体系中,在游离的双层类脂和与蛋白质表面结合的一类脂之间可能存在着快速的交换(Seelig和Seelig, 1978; Kang等, 1979 a, b; Bloom, 1980),与蛋白质表面邻接的类脂烃链的结构与在纯类脂双层的类脂烃链的结构之间可能只有微小的差别。如果有不同的话,那是与蛋白质表面相结合的一类脂在某种程度上受到蛋白质表面粗糙和不规则的性质扰乱所产生的结果,而蛋白质表面的粗糙和不规则是由在膜双层内部所发现的类型繁多的不同的氨基酸所造成的。不过,应该指出,至今对类脂-蛋白质体系的研究相对来说还是很少的。毫无疑问,进一步的研究将表明蛋白质对特殊种类的类脂有明显的选择性。另外也将证明,强烈的相互作用(特别是包括在类脂端基和蛋白质表面的带电的基团之间的库伦(Coulombic)作用力)在某些膜蛋白的作用机制上具有重大的意义。尽管Oldfield等(未发表的资料)在细胞色素C氧化酶存在的条件下曾经获得非常宽的心脂(Cardiolipid)的波谱,并指出在这种特殊的体系中有强烈的相互作用,但是迄今为止这种相互作用的证据还是很少的。有趣的是,这种强烈的相互作用在磷脂酸/细胞色素C氧化酶体系中并没有发现。

由 $^2\text{H-NMR}$ 波谱技术所获得的最新资料表明,在大多数研究工作中,在膜蛋白和膜脂之间并没有强烈的相互作用。的确,从物理学的观点看,很难知道这

样的相互作用到底是什么力。似乎还没有令人信服的证据使人相信,在一个类脂和另一个类脂之间或一个类脂和一个蛋白质表面之间的范德华作用力会有明显的差异。因此在类脂-蛋白质之间的强烈相互作用中起决定性作用的力可能性最大的是库伦力,或是以上所讨论的心脂/细胞色素C氧化酶体系中极性端基-蛋白质之间的作用力。

某些作者认为,在高浓度蛋白质中类脂的陷阱作用(trapping of lipids)对类脂链的动力学有巨大的影响(Chapman等,1979)。但是在大多数生物膜系统中,得到的蛋白质/类脂比率大约是1:1,从1:1蛋白质/类脂比率的 ^2H -NMR波谱看,平均起来,蛋白质对类脂链组成的影响相对来说是较小的。总之,根据用NMR波谱技术研究有关蛋白质类脂相互作用的结果,目前认为蛋白质对类脂链或极性端基结构的影响是很小的。所看到的主要影响是表现在 ^2H 和 ^{31}P 波谱中有轻微的峰形加宽及在 ^{31}P 和 ^2H -NMR谱中自旋-晶格弛豫时间有所减少。这两种过程可以解释为个别基团的运动速率低,但运动振幅基本上没有任何的变化。

总结和展望

在这篇短文中,我们试图指出,在研究模式的和生物膜系统中的类脂和蛋白质的静态和动态结构方面应用NMR波谱学技术所获得的最令人兴奋和最新的进展。大部分的进展是由于NMR波谱设备的改进而取得的。随着新的超高场的超导磁体的设计和建造,这个领域将来的发展是极有前途的。对于质子来说,超导磁体最终将达到800—1000 MHz。尽管这种非常高的频率可能给质子NMR波谱学家提出许多问题,但是在膜的NMR领域中留下的问题却并不多(如果有的话)。最近经常选择的核是 ^2H 和 ^{13}C ,它们在 $\sim 23\text{T}$ 时的共振频率将大约是150 MHz和250 MHz,从射频设备的观点来看,所涉及的频率是比较简单的频率。

近二、三年来,令人感兴趣的生物化学的主要进展有以下几个方面。在蛋白质-类脂相互作用的领域

中,已经提出蛋白质对类脂结构的影响的新模型。在NMR领域工作的大多数学者现在同意:与小的固醇类胆固醇不同,类脂分子并没有接受蛋白质大量的指令。随着发生在双位点的偏-反异构化过程基本被证实,目前对凝胶态的磷脂及糖脂的运动也有更深入的认识。在膜蛋白本身(和在其他凝聚相的蛋白质)的NMR领域中,近一、二年来有几个小组研究得相当活跃。对于许多天然存在的于膜蛋白中发现的氨基酸的动力学问题,我们已有一个初步的认识。这些结果正在进行分析并与在结晶态的蛋白质(Schramm等,1981及未发表的资料)及在溶液中的蛋白质所获得的结果进行比较。这样,将来就可以在溶液中的,膜中的及在结晶的固态中的蛋白质动力学之间进行详细的比较。

由于在单个蛋白质晶体的动力学过程的研究工作中引入了X射线结晶学方法的新成就(Frauenfelder等,1974; Artymiuk等,1979)很可能在今后五年内将能得到有关在各种各样环境中,包括生物膜中蛋白质静态和动态结构的最详细的知识。

最后,我希望再次强调,只有引入(并提供资金)新的高场的超导磁体才有这些令人兴奋的新进展。以下的事实可以充分证明这一点:在1971年我们得到第一个类脂的 ^2H -NMR波谱(Oldfield,1971),这些波谱是在8 MHz获得的,所以需要大量的完全重氢化的磷脂($\sim 100\text{mg}$),我们只能得到中等水平的信噪比和波谱分辨率。相比之下,十年之后我们在1981年只用1毫秒就得到特殊标记的膜蛋白波谱,而这只有在高得多的操作场强下才能做到,在这种情况下是8.5T(360 MHz的 ^1H 共振频率)。很明显,若能得到甚至更高场的仪器设备就能得到时间分辨波谱数据。这样就能进行诸如阐明光合作用膜结构变化的研究以及可能对某些体系中膜所存在的酶的各个氨基酸基团在催化过程中运动的实际速率和运动类型进行研究。

(厦门大学生物系 洪水根

胡友川译 汪德耀校)

(上接第129页)

tissue culture and tumor culture and tumor line by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519.

[7] Erskine, A. G. and Socha, W. W.: 1978. The principles and practice of blood grouping. The C. V. Mosby company.

本实验得到刘尔翔副教授、吴安然副教授的支持,我师谢少文教授的指导。林加友大夫帮助鉴定单克隆抗体类型。浙医大张继秀、史始君和顾文祥老师协助检测染色体,陈中凡大夫帮助血清学检测,在此一并致谢。