

生物物理讲座

第六讲 生物大分子中的相互作用

汪 和 睦

(南开大学物理系)

核酸、蛋白质等生物大分子是构成生命的主要物质基础。研究它们的结构与功能是现阶段认识生命现象的中心环节。生物大分子的一个重要特点,就是其三维结构对其功能有极大的影响。所谓三维结构,是指分子在三度空间中的立体结构,亦即组成分子的所有原子的特征空间排布。三维结构也常称为空间结构。现在,越来越多的研究结果使人们认识到,没有特征的三维结构就没有复杂的核酸和蛋白质的功能。蛋白质是生命现象的功能分子。为了适应各种各样的生物功能,不同的蛋白质需要有不同的立体结构。在一定意义上,可以说是一个蛋白质分子对应一种立体结构。核酸是信息分子,其主要功能是贮存遗传信息,通过复制而传代,并能适应调节和控制机能的需要。因此,核酸的立体结构与蛋白质的立体结构迥异。

最近十年来,我们对蛋白质分子的本质特征有了新的更加深入的认识,可以说又进入了一个新阶段。它的主要标志有以下两个方面:(1)由于晶体学修正技术和一系列波谱方法[如核磁共振(NMR)、电子自旋共振(ESR)、Mössbauer谱、荧光光谱等]以及能量极小化和分子动力学计算的综合应用,揭示出蛋白质分子并非刚体而具有构象运动性(mobility)或构象灵活性(flexibility),这一重要特征对其功能的发挥具有重要意义。(2)蛋白质结构的大量测定结果表明,蛋白质分子的运动特征、功能表现和结构域(domain)具有基本的重要性。现在已经可以在结构域水平对复杂而多样的蛋白质分子进行较好的分类,并开始了了解结构域

的遗传基础。

有关蛋白质分子三维结构是如何决定和如何形成的问题,是目前一个十分活跃的领域。现在已经知道,在细胞中,蛋白质分子的合成是在核糖体上进行的,它是从N端开始逐个加到序列上去的氨基酸,合成一线性的多肽链。它如何折叠成蛋白质分子的独特高级结构? Anfinsen选择了核糖核酸酶来研究变性后分子中四对二硫键天然配对方式的重新形成。这一著名的实验证实了蛋白质分子折叠的自发性,即蛋白质分子的一级结构(氨基酸序列)决定其高级结构。以此为基础,一个新的研究领域已生长出来,这就是从氨基酸顺序来预测蛋白质的三维结构。近年来的注意力集中在折叠机理方面,其中为多数人接受的是随机成核理论。人们还对折叠过程提出了成核-扩展模型(Anfinsen)、扩散-碰撞动力学模型(Karplus and Weaver)和分步结构化模型(Richardson)等假说。

我们知道,生物大分子是高聚合的多原子系统,例如,蛋白质分子是由二十种氨基酸聚合而成的,而核酸是由四或五种核苷酸聚合成的。生物大分子采取特定结构的物理基础是:非键原子(未成共价键的原子)间可以形成次级键(氢键、极化力和库仑力等)。单独或少数次级键产生的力是弱相互作用力;由众多的次级键协同作用而产生的力却是较强的。因此,主要由次级键决定的空间结构既有较大的稳定性(在条件一定的情况下),又有较大的灵活易变性(在条件改变的情况下)。这些众多的次级键相互作用为决定生物大分子的结构及其构象的运

动性提供了依据,从而保证了生物大分子执行不断变化的功能。为了对决定生物大分子结构的相互作用有一基本的了解,下面分三个方面进行介绍。

一、决定蛋白质结构的非键相互作用和构象分析

研究蛋白质分子采取特定结构的物理基础,也就是研究一级结构如何决定其高级结构,这是当代生物学中最迷人而又富有挑战性的问题。

我们知道蛋白质长链是由二十种不同的氨基酸残基通过酰胺键(肽键)结合而成的。图1表示全反形式的 α -L多肽键,其残基以1至*n*的顺序来标明。肽链从氨基端开始,以羧基端结尾。对同一残基中两个碳原子分别记为 C^α (α 碳原子)和 C' (羧基碳原子)。每个氨基酸残基在主链中有三个键,其中肽键具有部分双键性质,不能自由旋转。氨基氮原子N和 C' 与 C^α 原子之间为二个单键,可以自由旋转,分别用内旋转角 ϕ 和 ψ 来描述。从理论上讲,链状大分子可以有无限多种主链构象,每一种构象对应一组不同的主链旋转角 (ϕ_i, ψ_i) 。六十年代,Ramachandran研究了肽链的几何结构,认为只要一对非键合原子间的距离小于两原子半径之和,那么原子间强烈的排斥作用就会使这一构象成为立体化学所不允许,即这种构象不能在天然蛋白质中存在。

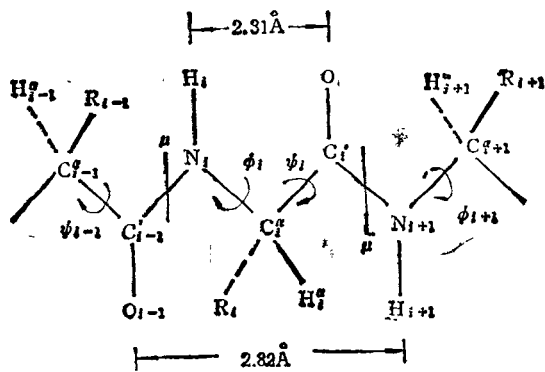


图1 全反形式的 α -L多肽链旋转角及酰胺偶极矩 μ 物理

后来为了使计算进一步精确化,人们计算了 ϕ_i, ψ_i 改变时所有各对非键合原子间相互作用的总势能。非键合原子k和l之间距离 r_{kl} 是 ϕ_i, ψ_i 的函数,其相互作用功 $E_{kl}(\phi_i, \psi_i)$ 为

$$E_{kl}(\phi_i, \psi_i) = \frac{a_{kl}}{r_{kl}^m} - \frac{C_{kl}}{r_{kl}^6}$$

式中六次方的吸引相互作用能是诱导偶极子之间产生相互作用。参数 C_{kl} 可由原子k和l的极化率和有效价电子数来确定。式中排斥相互作用能尚无严格的理论证明, m 值由分子束实验来确定,其范围为9—12, a_{kl} 由原子半径之和确定。

势能的第二项贡献是酰胺基团偶极子(见图1)之间相互作用能

$$E_d = \sum_{i,k} \frac{q_i q_k}{\epsilon r_{ik}}$$

根据实验测得的酰胺偶极矩 μ 的数值和X射线确定的H, N, O, C' 四个原子的相对位置,可以选定各原子所带的部分电荷为 $\delta_N^+ = 0.39, \delta_O^- = -0.39, \delta_{C'}^+ = 0.28, \delta_H^- = -0.28$ 。选定适当的介电系数很不容易,可以认为相邻酰胺键的各原子作用力线通过主链,而不经过程积水,因此可选用固态酰胺聚合物的介电系数,取 ϵ 为2—5。

势能的第三项贡献来源于成键电子云形状的改变。在旋转 360° 中,共出现三个极小值: $60^\circ, 180^\circ, 300^\circ$,而势垒高度 E_ϕ^0 和 E_ψ^0 约为1kcal/mol。故扭转势能为

$$E_{\text{tor}}(\phi_i, \psi_i) = -\frac{E_\phi^0}{2} (1 + \cos 3\phi) + \frac{E_\psi^0}{2} (1 + \cos 3\psi)$$

这样,总的旋转势能可由下式给出:

$$E(\phi_i, \psi_i) = \sum_{kl} E_{kl}(\phi_i, \psi_i) + E_d(\phi_i, \psi_i) + E_{\text{tor}}(\phi_i, \psi_i)$$

处于肽链中的二十种氨基酸残基,根据总势能的情况可以分为五类:甘氨酸残基、似L-丙氨酸残基、 β 碳原子有分支的残基、孤立脯氨酸残基和处于L-脯氨酸前的残基。根据上式

已经计算出的作为 ϕ_i, ψ_i 函数的各类残基的总势能,以 ϕ 为横坐标, ψ 为纵坐标, 分别作出相应的势能等高图。这些势能图已对各种氨基酸残基在多肽链中优先采取的构象, 提供了丰富的知识。例如甘氨酸残基具有对称的势能图, 且低能区更接近能图的中心 ($\phi = 0, \psi = 0$), 这使得甘氨酸链具有较大的柔顺性, 并采取较紧密的结构。由似 L-丙氨酸能图中能量最低的 I 区可以看出, 它们优先采取右手 α -螺旋构象。由脯氨酸残基能图可知, 它既可取较紧密的形式, 也可取较伸展的形式, 使它可以处于 β -折叠和右手 α -螺旋构象之中, 它还是造成多肽链转角结构的合适候选者。由处于 L-脯氨酸前的残基能图可知, 它不出现低能 I 区, 说明这时残基不再可能采取右手螺旋构象, 也表明脯氨酸残基只出现在螺旋的开始处。

需要比较实测的氨基酸残基的构象和计算的能图是否相符。根据晶体结构数据, 多种蛋白质中各残基的 ϕ, ψ 值, 绝大多数都落在低能区, 但也有少数落在两低能区间鞍部, 这是由于能图考虑的相互作用还不够完全, 有待势能计算的进一步精确化。

二、决定蛋白质结构的特异相互作用

势能图虽然大大地减小了各种残基可能采取的空间构象, 但还远远不能使蛋白质构象特定化, 即使假设三个低能区各仅表示一种构象, 这样每个残基仍可采取三个构象。由 100 个氨基酸残基组成的蛋白质链状分子, 仍然共存在着 $3^{100} \approx 10^{48}$ 种不同的构象, 从能量上看, 这些构象都是可能存在的, 但这是一个不可处理的大数字。很显然, 只有进一步考虑了氢键、疏水作用、离子相互作用等非共价相互作用和肽链间二硫键等特异相互作用后, 才能使蛋白质链基本上倾向于一种特定的结构。

1. 氢键在确定蛋白质构象中的作用

氢键存在于供体 X-H 和受体 Y 之间, 其中 X, Y 为电负性原子, 它们通过供体的氢原子 H 而结合起来。可用一简明的静电模型来说明氢

键的物理基础: 由于 X, Y 为电负性原子, 使共价键 $X^{\delta-}-H^{\delta+}$ 和 $Y^{\delta-}-R^{\delta+}$ 产生了部分电荷的分离, 形成了两个小偶极子, 当它们排列成首尾相接的一直线时, 具有最低相互作用能。氢键的强度在 2—10 kcal/mole 范围内, 是一种较弱的相互作用。单个氢键容易为热扰动所断裂, 但在生物大分子中, 它们的数目很大, 故能使结构具有很大的稳定性。

对蛋白质结构来说, 最重要的氢键是主链中酰胺氮和羰基氧之间的氢键。蛋白质分子中的主要二级结构是 α -螺旋和 β -片层。 α -螺旋是由链内第 $i + 4$ 个残基的 N-H 中氢和第 i 个残基的 C=O 中氧形成氢键, 每个氢键跨越三个残基, 各残基的侧链一般地在空间向外扩展。 α -螺旋是一种出现氢键数目最多的结构, 从而确保它是一种最稳定的构象, 要破裂 α -螺旋至少要连续断开 4 个氢键。 β -片层是另一种可使氢键数目达到最大的结构, 这里的氢键不是在肽链的内部, 而存在于肽链之间。两平行肽链处于扩展的构象, 不同链中 N-H 和 C=O 基大致垂直于主链, 相互形成垂直于主链的氢键。

2. 疏水相互作用和水结构对蛋白质结构的影响

为了说明蛋白质结构响应溶剂组成的灵敏程度, 可看下面的例子: 当在水中加入小浓度的脲 (相当于 7 个水分子中只有一个脲分子) 后, 蛋白质的天然结构立刻瓦解为无规线团。而在糖核酸酶溶液中加入 2-氯乙醇后, 就使酶采取比在水中具有更高的螺旋构象。溶剂与蛋白质的相互作用主要表现为三种效应: 一是水分子与蛋白质分子竞争氢键结合位点。根据 H_2O 分子的 sp^3 杂化轨道的电子云分布, 每个水分子能形成四个氢键。二是水使氨基酸极性基团溶剂化, 使极性基团优先处于水环境中, 从而使其具有较低的自由能。以上两种水与蛋白质的相互作用仍不能构成主要的影响, 因为脲也能形成氢键, 并与极性基团相互作用, 起着瓦解蛋白质的结构的作用。

水环境的第三种效应是其与非极性基团的相互作用。已经观察到非极性分子在水中被十二个水分子形成的五角十二面体空腔所包围。

热力学研究证明：氨基酸非极性侧链将优先处于非水的环境中，即非极性侧链倾向于聚集在一起，构成蛋白质分子的油性内部环境，这就是疏水作用或称疏水键。热力学研究表明，疏水作用的驱动力是熵，而焓变则会出现相反的趋势。关于脲对蛋白质结构的作用机制，长期以来一直存在着争论。原来认为脲与蛋白质形成氢键的能力比水强，从而破坏了蛋白质分子内的氢键。近来倾向于认为脲改变了疏水作用，从而改变了非极性侧链在内部油相和溶剂相的分配。

3. 蛋白质分子中离子相互作用

蛋白质分子中存在大量离子化的侧链，能明显地形成“盐桥”，这是另一种稳定蛋白质结构的非共价相互作用。在中性 pH 范围内，羧基是负电荷源，它们存在于天门冬氨酸和谷氨酸的侧基中以及 C-末端；而正电荷来自赖氨酸、精氨酸和组氨酸的侧基及 N-末端。盐桥对蛋白质生物功能的重要性的一个例子是血红蛋白，当血红蛋白和氧结合以后，盐桥就断了。为了比较疏水作用和离子相互作用，我们可以加入乙醇等非极性溶剂，这时蛋白质性质就会发生变化。加入非极性溶剂，可以使离子作用增强，从而降低疏水作用。这一结果表明，在天然蛋白质结构中，疏水作用超过了静电作用。

4. 二硫键对稳定蛋白质结构的重要性

对蛋白质构象稳定性起作用的一种共价键，是肽链内相隔较远的半胱氨酸残基之间形成的二硫键。二硫键的形成大大地限制了蛋白质分子可能采取的三维构型的数目。没有二硫键的限制，变性态将具有多得多的构型自由度。假如一个蛋白质分子共有 N 个半胱氨酸残基，则其随机配对的方式数 W 为

$$W = (N - 1)(N - 3)(N - 5) \dots$$

为什么天然蛋白质结构仅能形成一种特殊的配对方式呢？在七十年代，Anfinsen 等用核糖核酸酶进行了著名的实验研究。这种蛋白酶共有 4 对二硫键 ($N = 8$)，按上式共存在 105 种配对方式。实验表明，在 8M 脲中重新氧化，105

种可能的配对方式都以相同的几率出现，有活性的酶（即具有天然结构的酶）只有 1% (1/105)。在除去脲的条件下重新氧化，则全部酶都具有独特的天然结构。实验还表明，在水环境中，由于各种相互作用，使蛋白质向着最稳定的状态折叠起来，而这一状态又因二硫键的形成而得到进一步的稳定，最终使蛋白质采取天然结构。这一过程已在体外得到有力的证实。

以上我们介绍了较接近实际的势函数精确化的分析，并介绍了各种重要的特异相互作用。假如对以上提到的各种相互作用都有足够的了解，而且有了有效的数学工具，那么我们将有可能从蛋白质的氨基酸顺序，来预测其三维结构，到那时才能真正地对蛋白质进行工程设计。目前对于蛋白质结构的预测存在的主要问题是：(1)多重极小的问题，以及难于求得的总体极小问题；(2)相互作用的数量太大；(3)疏水相互作用了解得还不够，溶剂效应还难于考虑。虽然预测蛋白质结构的这一目标目前还达不到，但这并不是不可能实现的。

为了预测蛋白质结构以及其他一些目的，Lovinthal 等发展了一种很有吸引力的方法，他们应用计算机来建立分子模型。计算机根据主链的旋转角迅速地构成模型，并将结果显示在荧光屏上。由于屏幕只给出二维投影，当将此结构绕一轴旋转起来，以致结构的不同部分对观察者来说，变得直观了，这样就得到三维观察的效果。由于这种结构图直观透明，给人印象深刻。同时由于计算机能迅速地显示出结构图，故能直观地研究结构的多变性，从中选择一种优先的结构。

三、决定核酸结构的相互作用和构象分析

核酸的物理和化学性质与蛋白质有显著的不同。蛋白质主链为电中性，连接着二十种不同的侧链；而核酸主链为高度地带电的聚合电解质，大多数核酸中仅带有四种不同的侧链，而且核酸侧链呈特异的互补关系(碱基配对)。这

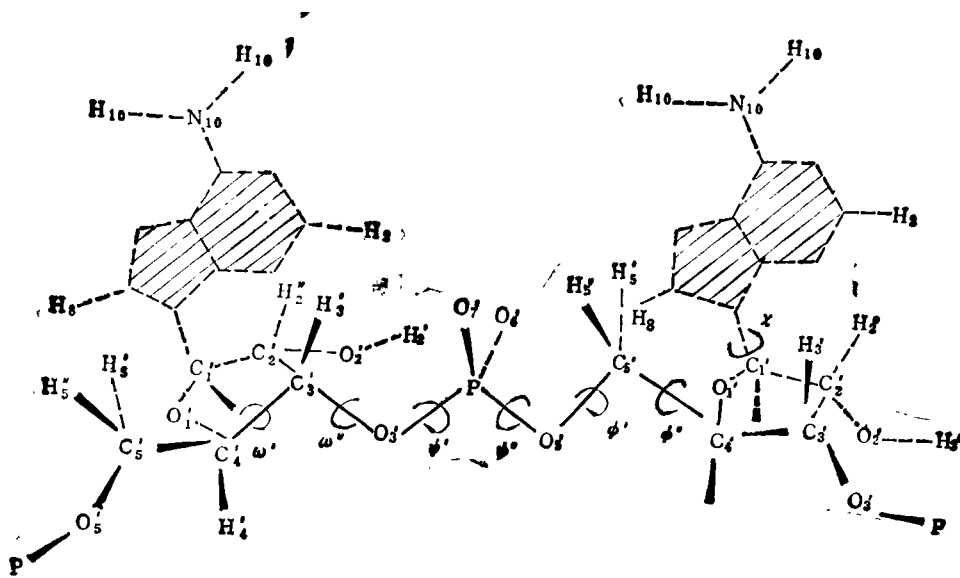


图2 聚脱氧核糖腺苷酸链及其旋转角

种互补性部分地造成了单股和双股链中螺旋杆状结构。同时带电主链使核酸难于采取致密的球状结构，而在蛋白质中常常优先采取球状结构。决定核酸结构的相互作用的分析方法与研究蛋白质所采用的分析方法相同。其分析项目一般地有几何空间约束、精确化势能计算、氢键、疏水相互作用和静电作用等。

1. 核酸主链的空间相互作用

图2表示了一聚脱氧核糖腺苷酸链的片段情况。在每个重复单位中存在着六个骨架键。由于在每个单位内有六个可变的旋转角，故必须研究大批的空间相互作用。此外，还须研究相邻单位之间相互作用的可能性。这样，很显然会使分析核酸构象要比分析蛋白质构象更为复杂。七十年代 W. K. Olson 和 P. J. Flory 提出的分析程序，证明作大量的简化是可能的。戊糖环周期出现是一个重要的特征。它有效地确保了绕环后五个主链键的旋转角与环前五个键的旋转角相互独立。这样仅须考虑一个单位内六个旋转角改变时产生的构象。这六个角就是图2中的 ω' , ω'' , ϕ' , ϕ'' , ϕ' 和 ϕ'' 。为了简化对空间相互作用的处理，可首先研究单一旋转角对原子间距离的作用，并把这种作用称为一级相互作用。因为任一对原子距离为空间位阻所不允许，则可把这一旋转角的区域排除在可

能的构象之外。类似地同时考虑两个旋转角所不允许的区域，则为二级相互作用。它可在一级相互作用排除的区域的基础上考虑。通过上述分析后，可以看到主链构象空间的很大一部分可以根据 ϕ' 和 ϕ'' , ϕ' 和 ϕ'' 及 ω' 和 ω'' 的一级和二级相互作用，而加以排除。此外，还应考虑别的旋转角对(如 ϕ' 和 ω'' , ϕ' 和 ϕ'' , ω' 和 ϕ'') 以及原子间距离同时依赖于三个以上旋转角时的相互作用，碱基与碱基、碱基与主链之间的空间相互作用。

空间相互作用的计算可以采取蛋白质链中计算势函数的方法，这样可使计算结果进一步精确化。对核酸来说，特别重要的是分析各极性基团之间的静电相互作用，为此必须把部分电荷分配给磷酸基、碱基和核糖中的适当原子。势能计算结果表明，主链优先采取静电作用能最小的空间构象，这时核酸链将具有较展开的构象。

2. 碱基配对的氢键相互作用

虽然势能计算使我们能够估计构型空间的区域，但是象蛋白质一样，不能计算出在生理条件下核酸所采取的独特结构。因为空间相互作用和简单的静电相互作用对允许的自由度即使给出相对的限制，但仍足以出现多种多样的有序结构，不能解释通常出现的双股螺旋等特

定的有序结构。因此必须考虑对稳定规则的核酸结构有着头等重要性的那些相互作用。这就是特异的碱基配对相互作用和惊人的碱基平行堆集相互作用。这两种相互作用在脱氧核糖核酸双股螺旋和转移 RNA 单股链中都是很突出的,因此研究这两种重要的相互作用的分子基础是很有趣的。

1953年,青年生物学家 Watson 和物理学家 Crick 提出了B-型 DNA 双股螺旋模型,即两股聚核苷酸按右手螺旋相互缠绕,碱基处于双股螺旋的内侧,而磷酸二脂主链处于外侧,碱基平面垂直于螺旋轴而互相平行地堆集,相邻碱基平面之间距离为 3.4nm。相对两股碱基间有精确的几何定位。碱基配对氢键有高度的特异性:腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)(或尿嘧啶 U)由两个氢键结合成对;而鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)由三个氢键结合成对。

显然,我们希望知道是什么相互作用造成这种碱基间专一性的配对方式和特殊的氢键排列方式。为此人们研究了核苷酸单体 A, T 和 U 的晶体衍射,发现存在着多种多样的缔合成氢键的方式。而在双核苷酸的晶体研究中,聚合物优先采取 Watson-Crick 氢键配对方式,而这种效应在单体中不出现。进一步在溶液中用红外光谱和核磁共振谱来研究特异的碱基配对,结果表明, Watson-Crick 碱基配对方式的 A-U 缔合常数 K 要比 A-A 和 U-U 的缔合常数大 15--20 倍。 Watson-Crick 碱基对 G-C 的缔合常数要比 C-C 和 G-G 大 10—100 倍。为了进一步研究是哪些因素确定了碱基间缔合的强度和专一性,采用了一系列碱基衍生物。实验表明,虽然许多碱基有几何互补性,但仍不足以形成强缔合的复合物。因此,必须认为特异的 A-U 和 G-C 配对除了有利的空间相互作用(几何互补性)外,还应具有“电子的互补性”。这无疑需要用量子力学来进行解释,但是由于目前的量子力学的近似处理方法还不够精细,不能区分“特异”配对和“非特异”配对之间的较小的能量差别。

3. 碱基平行堆集相互作用

物理

螺旋核酸的晶体结构的研究表明,相邻碱基部分的嘌呤环和嘧啶环平面实际上是互相平行的,且有明显的重叠。通过对溶液中腺苷酸单体 AMP 和聚腺苷酸的吸收光谱研究,发现含有等量核苷酸残基的聚 A 的积分吸收作用显著地小于它的组成单位单体 AMP 的积分吸收作用,这就是有着广泛应用的减色效应。在多核苷酸链中,碱基堆集的倾向不限于最邻近的碱基。在水溶液中,单核苷酸也有堆集的倾向。红外光谱和 NMR 谱都表明,这种缔合不是氢键的作用。在这种复合物中,氢的共振峰全部移向高场,这正是环流效应对这些共振峰的影响的预期结果。热力学研究表明,嘌呤堆集要优先于嘧啶的堆集。提供碱基堆集的驱动力是什么呢?显然,一种可能是堆集的碱基之间 π 电子云的诱导偶极子相互作用;另一种可能是溶剂化作用。各种溶剂中 DNA 的减色变化的研究结果表明,在水溶液中,水对堆集的构象最有利。水对稳定碱基堆集的作用机理目前有两种:一种认为是疏水相互作用;另一种则认为这是由于水有较大的表面张力。

总之,我们可以看到,上述进展是鼓舞人心的。但应当说,涉及的大多数问题需要进一步深入研究,这无疑需要生物、化学、物理、数学等多学科的合作。

- [1] C. B. Cantor and P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Copyright W. H. Freeman and Company, (1980), 253—341.
- [2] W. Hoppe et al., *Biophysics*, Springer-Verlag Press, New York, (1983), 205—264.
- [3] P. Y. Chou and G. D. Fasman, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**(1978), 251.
- [4] G. Schultz and R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, New York, Springer-Verlag, (1979).
- [5] C. B. Anfinsen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47** (1961), 1309.
- [6] A. T. Hagler and B. Honig, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**(1978), 554.
- [7] L. R. Pratt and D. Chandler, *J. Chem. Phys.*, **67** (1977), 3683.
- [8] W. K. Olson and P. J. Flory, *Biopolymers*, **11** (1972), 1.
- [9] 陈德高, *物理*, **8**(1979), 103.