α 螺旋构象对模型寡肽与聚合物相互作用的影响

李纪红[①②]　党琴琴[①]　孙宏伟[①]　查瑞涛[③]　袁 直[①*]

(① 南开大学化学学院, 天津 300071; ② 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; ③ 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457. * 联系人, E-mali: zhiy@nankai.edu.cn)

摘要　通过核磁技术中的化学位移微扰法和分子模拟技术, 在分子水平上揭示了二甲基胺修饰聚丙烯酰胺吸附剂(DMAPAM)对八肽 VVRGCTWW(V8)和四肽 CTWW(C4)吸附能力差异的原因. 结果表明, 除了非键的相互作用影响吸附剂对多肽的吸附能力外, 寡肽的构象是造成对多肽吸附能力差异的重要因素. V8 的α螺旋结构使得 V8 与吸附剂间可以形成多种弱相互作用力协同作用的模式, 从而显著提高吸附剂对其的吸附能力. 该结果对了解生物材料与多肽间的作用机理具有重要意义.

关键词　寡肽　构象　聚合物　作用机制

近年来, 随着合成高分子在生物材料领域应用的日趋广泛, 多肽与高分子聚合物的相互作用机理成为人们关注的热点. 研究主要涉及多肽尤其是寡肽与聚合物作用时, 多肽的一级序列对相互作用的影响 [1~4]. 尽管有文献报道, 多肽与某些合成高分子发生相互作用后, 构象会改变而形成有序的二级结构 [5,6], 但未见关于多肽二级结构对其与聚合物相互作用影响的研究报道. 本文在研究吸附剂对寡肽吸附时发现, 寡肽的二级结构对其与聚合物的相互作用具有非常重要的影响.

V8 是一种从尿毒症患者血液中分离出的中分子多肽, 其一级序列为VVRGCTWW[7]. 为清除该物质, 我们通过Mannichi 反应, 合成了一种改性的二甲基胺修饰聚丙烯酰胺吸附剂(DMAPAM)[8]. 前期研究表明, DMAPAM与V8 的主要作用位点位于C端的Trp. 为了考察多肽二级结构对吸附剂吸附能力的影响, 人工合成了寡肽C4, 其一级序列为CTWW. C4 中含有DMAPAM与V8 的作用位点Trp, 且Trp的位置及主要相邻氨基酸残基在两条肽中完全一样, 由此可以排除邻位效应的影响; 此外, 两条肽中所含疏水和亲水氨基酸的比例相同, 肽的亲疏水性质不会受到明显影响.

为了考察 DMAPAM 对两个寡肽的吸附情况, 进行了静态吸附实验. 取 3 mL 预先配制好的多肽水溶液, 注入 10 mL 比色管中, 加入 0.2 g 充分溶胀后的吸附剂 DMAPAM, 加塞密封后置于摇床中匀速摇动, 37℃下进行吸附. 每隔 10 min 定时取样, 通过吸光度的变化计算吸附剂对多肽的吸附量, 直至吸附达到动态平衡. 结果如表 1 所示, 尽管两条肽的结构相似, 但是吸附剂 DMAPAM 对 C4 的吸附能力极低, 在 pH 值为 5.4 时, 吸附量甚至为 0.

表 1　吸附剂 DMAPAM 对多肽的吸附结果

多肽	吸附量/mg·g^{-1}(湿球)		
	pH=4	pH=5.4	pH=9
V8	0.318	0.541	0.598
C4	0.024	−0	0.045

核磁技术中的化学位移微扰法是测定分子间相互作用位点的有力手段, 但是该方法仅适用于液相体系. 因此, 我们合成了水溶性线型的 DMAPAM, 采集了 C4 与 DMAPAM 作用前后的同核化学位移全相关谱(TOCSY), 如图 1 所示.

C4 是含 4 个氨基酸残基的寡肽, 链段具有非常好的柔顺性, C4 中任一个氨基酸残基都有可能与聚合物发生相互作用. 图 1 结果显示, 除了碳端的 Trp 残基中αN 上的质子向高场移动了−0.02, 其他氨基酸残基的化学位移都没有受到聚合物的影响. 这表明 DMAPAM 与 C4 的相互作用位点也在碳端 Trp.

吸附结果显示, 体系 pH 值对 DMAPAM 吸附 V8 具有显著影响, 由此看来对多肽吸附能力的差异有可能是电荷性质的差异造成的. 利用ζ 电势滴定法, 测定了 DMAPAM 在不同 pH 下的带电情况, 结果如图 2 所示. 由滴定曲线得到 DMAPAM 的等电点是 8.33. 同时, 利用 DNAMAN 软件计算了 V8 和 C4 的等电点, 分别为 8.66 和 5.22.

2007-09-06 收稿, 2007-11-08 接受

国家自然科学基金重点项目(批准号: 20634030)及面上项目(批准号: 50573034)资助

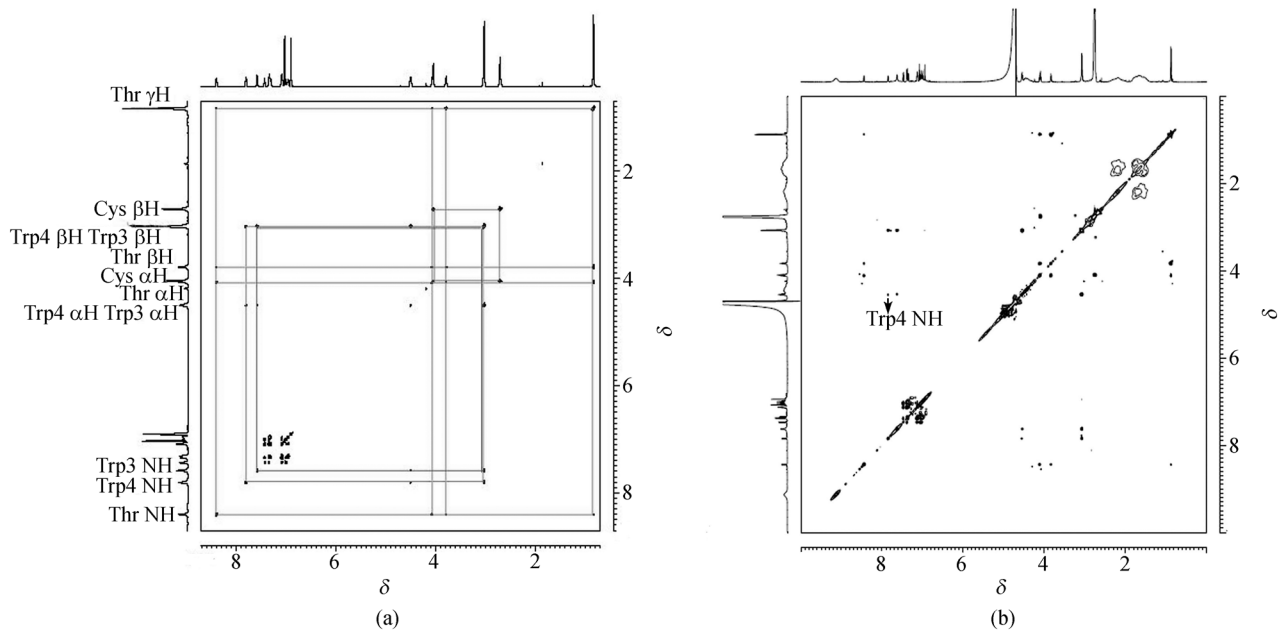

图 1 C4 与聚合物 DMAPAM 相互作用的 TOCSY 谱图

(a) C4(0.5 mL 10 mmol/L 含 10%D_2O 水溶液)的 TOCSY 谱及谱图归属; (b) C4 与 DMAPAM 等物质量的混合样品(0.5 mL 10 mmol/L 含 10%D_2O 水溶液)的 TOCSY 谱

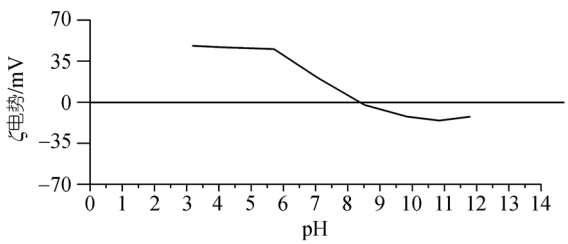

图 2 聚合物 DMAPAM 的ζ电势-pH 滴定曲线

由等电点的测定结果可知, 当溶液的pH为 5.4 时DMAPAM带正电, 而V8 此时带正电, C4 应该带负电. 根据“同性相斥, 异性相吸”的原理, DMAPAM对C4吸附能力应强于V8, 但吸附试验结果正好与之相悖. 这一结果表明, DMAPAM与V8 相互作用的主要驱动力不只是静电力. Tribet等人 [9]曾经报道由于疏水作用的驱动, 疏水改性的聚阴离子可以与带负电的牛血清蛋白BSA形成复合物. 由此我们认为, 在DMAPAM与V8 间还存在静电作用之外的弱相互作用力, 从而弥补静电斥力的影响.

在前期的研究中, 核磁及园二色分析结果均证明寡肽V8 具有α螺旋结构[7]. 为了考察多肽二级构象对吸附能力的影响, 我们分别用Sybyl6.91 建立了α螺旋的V8, 无规的V8 和无规C4 的分子模型, 用Autodock3.0 软件对吸附剂模型和多肽模型进行了分子对接 [10,11]. 对接构象最低能量结果见表 2. 显然, 无规构象的C4 和V8 与DMAPAM的结合能明显低于α 螺旋构象的V8. 对接的最低能量构象模型直观地给出了造成这一结果的原因(图3). 图3(a)显示具有α螺旋的V8 不仅与DMAPAM对接的位点与核磁结果完全吻合, 而且由于V8 的α 螺旋结构, C端两个Trp残基可以形成一个疏水的钳式结构, 有利于DMAPAM的配体插入, 形成疏水、氢键和静电的多重协同作用. 相对而言, 不具有α 螺旋的寡肽则没有这样的钳式结构(图 3(b)和(c)). 虽然四肽与DMAPAM间能形成氢键作用, 但是暴露在水体系中, 氢键会被大大削弱, 因此不存在弱相互作用的加合效果, 所以作用力明显减弱.

表 2 分子对接最低能量构象的结合能

	α 螺旋构象 V8	无规构象 V8	无规构象 C4
结合能/kJ·mol^{-1}	–37.97	–28.73	–27.05

核磁实验中给出在 DMAPAM 与 C4 间可能存在静电引力, 但静态吸附实验中 DMAPAM 对 C4 几乎没有吸附的实验结果, 可能是由于 DMAPAM 和 C4 之间只存在单点的静电相互作用, 吸附速率和解吸速率基本相等, 并且是一个快速过程, 所以表观上没有明显的吸附.

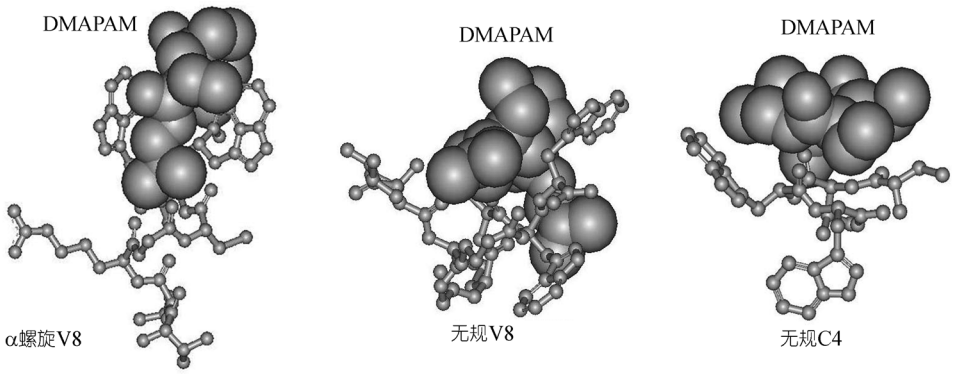

图 3　不同构象多肽与 DMAPAM 分子对接最低能量构象模型

综上所述，由于V8的 α 螺旋结构存在一个疏水的钳式区域，能够形成多种弱相互作用的协同效应，这是造成 DMAPAM 对 V8 和 C4 吸附能力差别的关键因素. 这一结论揭示了寡肽的二级结构在多肽与聚合物的相互作用中的重要作用，对了解生物材料与多肽间的作用机理具有重要意义.

参　考　文　献

1 Jódar-Reyes A B, Ortega-Vinuesa J L, Martín-Rodríguez A. Adsorption of different amphiphilic molecules onto polystyrene latices. J Colloid Interface Sci, 2005, 282(2): 439—447[DOI]

2 Cárdenas M, Schillén K, Pebalk D, et al. Interaction between DNA and charged colloids could be hydrophobically driven. Biomacromolecules, 2005, 6: 832—837[DOI]

3 Huang H M , Chen W Y, Ruaan R C. Microcalorimetric studies of the mechanism of interaction between designed peptides and hydrophobic adsorbents. J Colloid Interface Sci, 2003, 263(1): 23—28[DOI]

4 Renner C, Piehler J, Schrader T. Arginine- and lysine-specific polymers for protein recognition and immobilization. J Am Chem Soc, 2006, 128(2): 620—628[DOI]

5 Verma A, Nakade H, Simard J M, et al. Recognition and stabilization of peptide α-helices using templatable nanoparticle receptors. J Am Chem Soc, 2004, 126(35): 10806—10807[DOI]

6 Tashiro S, Tominaga M, Yamaguchi Y, et al. Peptide recognition: Encapsulation and a-helical folding of a nine-residue peptide within a hydrophobic dimeric capsule of a bowl-shaped host. Chem Eur J, 2006, 12(12): 3211—3217[DOI]

7 李国华，李纪红，杨眉，等. 尿毒症毒素多肽二级结构的测定与预测. 高等学校化学学报, 2005, 26(10): 1855—1857

8 Li G H, Li J H, Wang W, et al. Adsorption mechanism at the molecular level between polymers and uremic octapeptide by the 2D 1H NMR technique. Biomacromolecules, 2006, 7: 1811—1818[DOI]

9 Tribet C, Porcar I, Bonnefont P A, et al. Association between hydrophobically modified polyanions and negatively charged bovine serum albumin. J Phys Chem B, 1998, 102(7): 1327—1333[DOI]

10 Wang B L, Wang J G, Ma Y, et al. Molecular docking and 3D-QSAR research of amidines of KARI inhibitor. Acta Chimica Sinica, 2006, 64(13): 1373—1378

11 胡建平，常珊，陈慰祖，等. HIV-1 整合酶与抑制剂 LCA 的结合模式及抗药性研究. 中国科学 B 辑: 化学, 2007 , 37(3): 279—287