

圆二色技术及应用

张志英 盛毅 徐少毅

近几十年以来,生物大分子结构的测定逐渐成为生命科学领域的热门课题.许多生物大分子,如蛋白质、核酸、多糖等都是手性分子,所谓手性(Chirality)就是具有不能重叠的三维镜像对应异构体.一般说来,凡具有手性的分子就具有旋光活性.旋光活性很早就为人们所认识并广泛应用于研究分子的非对称性结构.1896年科顿效应(Cotton Effect)的发现为旋光色散(Optical Rotatory Dispersion)和圆二色(Circular Dichroism)的出现奠定了理论基础.这些灵敏方法的出现,使得人们有可能从这些实验技术中得到一些新的结构信息,为更深入的研究立体化学和电子结构提供了条件.在本世纪六、七十年代,旋光色散和圆二色技术一度成为研究分子结构的主要手段.由于圆二色谱具有包含信息量大,不易受背景干扰及结果更直接等优点,它已逐渐取代了旋光色散,成为测定生物大分子结构,特别是测定蛋白质二级结

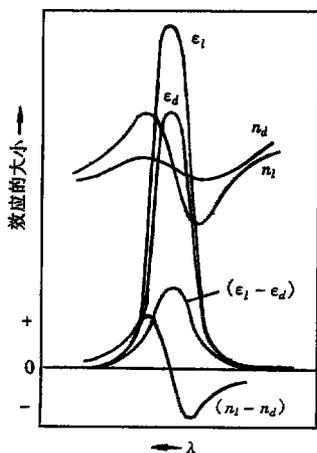


图1 理想科顿效应曲线(ϵ_l, ϵ_d 分别为左右圆偏振光的摩尔吸收系数)

构的有力手段.

1. 什么是圆二色性

我们知道,光有五种可能的偏振状态:自然光、部分偏振光、平面偏振光(线偏振光)、圆偏振光和椭圆偏振光.其中,自然光不显示出偏振现象,但可以看成两个振幅相同,振动相互垂直的非相干平面偏振光的叠加.一束平面偏振光又可以分解为两个振幅和速度相同,而螺旋前进方向相反的圆偏振光的叠加,分别为右旋圆偏振光(dextrorotary,用符号*d*表示)和左旋圆偏振光(levorotary,用符号*l*表示).

当一束平面偏振光通过具有手性的介质时,由于该介质对左、右旋圆偏振光的折射率不同,使得它们通过介质的速度也不同,因此叠加产生的平面偏振光的振动方向将会改变,偏振光的振动平面将发生偏转,称为旋光性;同时,对于同一种分子,其手性不同的两种构型对左、右旋圆偏振光的吸收 ϵ_l 与 ϵ_d 是不同的,这二者的差值就定义为圆二色性,即

$$\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_d.$$

圆二色性使得左右旋圆偏振光通过介质后振幅也将不同,这样二者的叠加将不再是线偏振光,而形成椭圆偏振光(如图2).因此,圆二色性也常用椭圆度 θ 来表示;对于通过浓度为*c*的溶液的平面偏振光,其椭圆度可近似表示为

$$\theta(\lambda) = 0.5761c(\epsilon_l - \epsilon_d)$$

圆二色性与波长有关,如果按波长扫描就得到了圆二色谱.测定生物大分子的圆二色谱就可以了解其分子手性的特征,从而进一步研

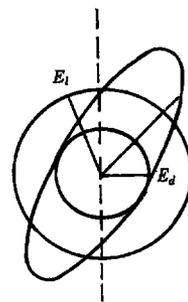


图2 椭圆偏振光的产生

究分子的结构及其物理、化学、生物的特性。

2. 圆二色谱所包含的信息

圆二色谱是一种吸收谱,但它又与一般的吸收谱不同。一般的吸收谱用吸光率 A 来表示所检测的电子跃迁,并遵循比尔定律: $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc$, 其中 ε 与波长有关,为摩尔吸光系数, l 与 c 分别为光程和溶液浓度。圆二色谱测量的是两种圆偏振光吸收的差值,由于 ε_l 可能比 ε_d 大,也可能比 ε_d 小,因此与一般的吸收谱相比,在同样的谱区内,将出现或正或负的几个峰值,这样就觉察出在吸收谱中被掩盖的信息,比一般的吸收谱包含的信息量更大。

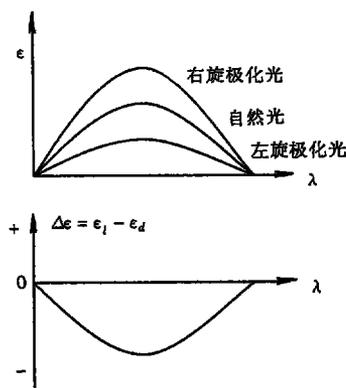


图3 物质对自然光,左、右极化光吸收的比较及圆二色的定义

3. 由圆二色谱推测蛋白质的二级结构

近几十年来,随着基因工程与蛋白质工程的发展,人们迫切需要了解蛋白质的结构。目前为止,蛋白质的一级结构已有相应的氨基酸顺序分析仪可用,二级结构可以通过 X-Ray 衍射或核磁共振 (NMR) 技术来研究,但二者都存在很大局限: X-Ray 衍射所用样品必须为蛋白质晶体, NMR 技术要求所测蛋白质的分子量在 15000 以下。圆二色技术则不同:它不仅测定大分子量蛋白质的结构,并且完全可以研究自然状态蛋白质的结构。

目前,由圆二色谱推测蛋白质二级结构的方法有很多,比如 SVD(SINGULAR VALUE

DECOMPOSITION, CONVEX CONSTRAINT ANALYSIS, VARIABLE SELECTION METHOD 等,其中 SVD 应用较为广泛,其基本方法是:做出 N 个已知二级结构的蛋白质的圆二色谱(这 N 个蛋白质叫做参考蛋白质),选取光谱上一段有代表性的区域进行离散化(比如每 1nm 取一次值)形成一个列向量,则 N 个参考蛋白质可以写出 N 个列向量,这 N 个列向量就构成了 $\bar{M} \times \bar{N}$ 的矩阵(设为 R)。对于每个参考蛋白质而言都包含五种二级结构—— H, A, P, T, O , 与组成 \bar{R} 矩阵的方法相似,可以形成 $5 \times N$ 的矩阵(设为 \bar{F})。设 $\bar{F} = \bar{X}\bar{R}$, 其中 \bar{X} 是连接 \bar{F} 与 \bar{R} 的系数矩阵,我们的工作就是解出系数矩阵 \bar{X} 。根据 SVD 的原理 $\bar{R} = \bar{U}\bar{S}\bar{V}^T$, 其中 $\bar{U}_{M \times N}$ 是正交阵,其基向量是 $\bar{R}\bar{R}^T$ 的特征向量; \bar{V} 是正交方阵,与 $\bar{R}^T\bar{R}$ 有相同的特征向量; \bar{S} 是对角阵,其主对角线上的元素非零,是 $\bar{R}\bar{R}^T$ 和 $\bar{R}^T\bar{R}$ 公共特征值的正平方根,则 $\bar{X} = \bar{F}\bar{V}\bar{S}^{-1}\bar{U}^T$ 。解出矩阵 \bar{X} , 当已知圆二色值时,就可以求出所对应的蛋白质的二级结构了。

4. 圆二色技术展望

圆二色技术已广泛应用于生物大分子结构的研究,但是,由于常规圆二色仪所检测的光谱范围一直在 200nm 以上,丢失了 200nm 以下的重要信息,因此从圆二色谱上一般得不到精确结果。近十几年以来,随着同步辐射光的出现,圆二色谱区的扩展已经成为现实。现在,利用同步辐射光作为光源,可以把圆二色谱区扩展到 110nm—130nm,真正实现了真空紫外圆二色。此外,磁圆二色与振动圆二色的发展可以用来探测普通光谱学无法分辨的分子的多重跃迁,及某些分子激发态的角动量,为圆二色技术的应用开辟了更为广阔的前景。现在,在英、美等一些发达国家的国家实验室都建有专门的圆二色生物光谱实验站,我国的圆二色生物光谱实验站也正在建设中。相信在不久的将来,圆二色技术一定会以其更为完善的功能和更为精确的结果成为生命科学工作者的得力工具。