

马槟榔甜味蛋白的圆二色谱 和激光拉曼光谱

丁 鸣* 马忠新[†] 胡 忠

(中国科学院昆明植物研究所)

摘 要

测定了自马槟榔 (*Capparis masaiikai* Levl.) 种子分离的二种甜味蛋白 Ma I 和 Ma II 的远紫外区域圆二色谱, 并按 Yang 和 Chen 的方法用最小二乘法计算了它们的构象单元含量, 结果表明 α 螺旋含量最多: 对 Ma I $f_H = 0.43$ 、 $f_\beta = 0.24$ 、 $f_R = 0.33$; 对 Ma II, $f_H = 0.37$ 、 $f_\beta = 0.33$ 、 $f_R = 0.30$; 其相关系数均为 0.9876; 计算所得理论曲线与实验曲线其本吻合。二种甜蛋白的激光拉曼光谱测定结果也表明其主要构象单元为 α 螺旋, 此外, 均无 SH 谱带; Ma I 的 Tyr 残基暴露于分子表面; 与 Ma II 相比, Ma I 有明显的 545cm^{-1} 和 1101cm^{-1} 谱带, 这可能从构象上说明 Ma I 与 Ma II 对热和变性剂处理表现不同的原因。

关键词: 圆二色谱; 激光拉曼光谱; 甜味蛋白

前 言

1972年, Morris 和 Cagan^[10], Van der wel 等^[12] 分别报告了从西非产的二种植物 *Dioscoreophyllum cumminssi* 和 *Thaumatococcus daniellii* 的浆果中分离到二种甜味很强的蛋白, 名称为 Monellin 和 Thaumatin。此后, 许多人对这二种甜蛋白的结构和甜味活性的关系进行了大量的研究。Iyengar 等^[7]; Jirgensons^[8] 及 korver 等^[9] 用 Chou 和 Fasman 的构象预测法及圆二色谱(CD) 的测定和计算得出这二种甜蛋白的主链构象主要是 β 折迭, α 螺旋含量较少的结论)1983年本实验室报告了从我国中药材马槟榔 (*Capparis masaiikai* Levl.) 种子中分离到称为 Mabinlin 的甜蛋白^[2] 有二个组分, 分别称为 Ma I 和 Ma II。其分子量各为 11600 和 10400; 等电点 11.8 和 11.3^[3]。Ma I 和 Ma II 甜味相同, 但对热和变性剂处理的稳定性显著不同^[1]。Ma II 经受 80°C 48 小时处理不改变甜味, 而 Ma I 经 80°C 30 分钟处理即丧失甜味。为了了解这二种甜蛋白主链构象的特点及其与甜味活性稳定性的关系, 我们对它们的远紫外区域圆二色谱和激光拉曼光谱进行了测定和分析。

* 1985 届硕士研究生, 现地址: 复旦大学生物工程系 [†] 云南大学化学系
本工作承中国科学院生物物理所六室协助。本文于 1985 年 12 月 25 日收到

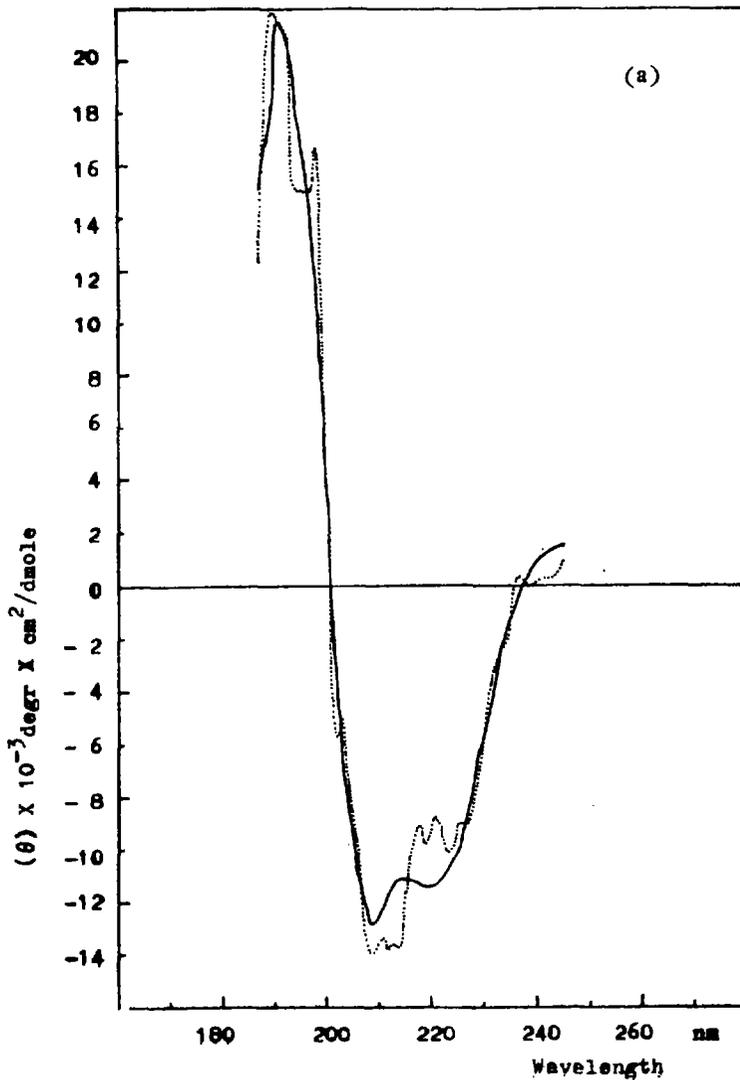
材 料 和 方 法

一、材料

马槟榔种子自成熟的果实中剥出并干燥后于8℃储存备用。将种子去壳,种仁粉碎后用石油醚脱脂。脱脂干粉用50%丙酮水溶液提取蛋白,通过CM-纤维素柱层析分离纯化后制得MaI和MaII冰冻干粉。经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,达到了电泳纯^[3]。

二、方法:

CD谱的制作在法国J.Y. Dichrographe III型光谱仪上进行。样品溶于重蒸馏水中,浓度4mg/ml,光程0.01mm,扫描速度60nm/min,灵敏度 5×10^{-6} ,所有图谱均经机附计算机



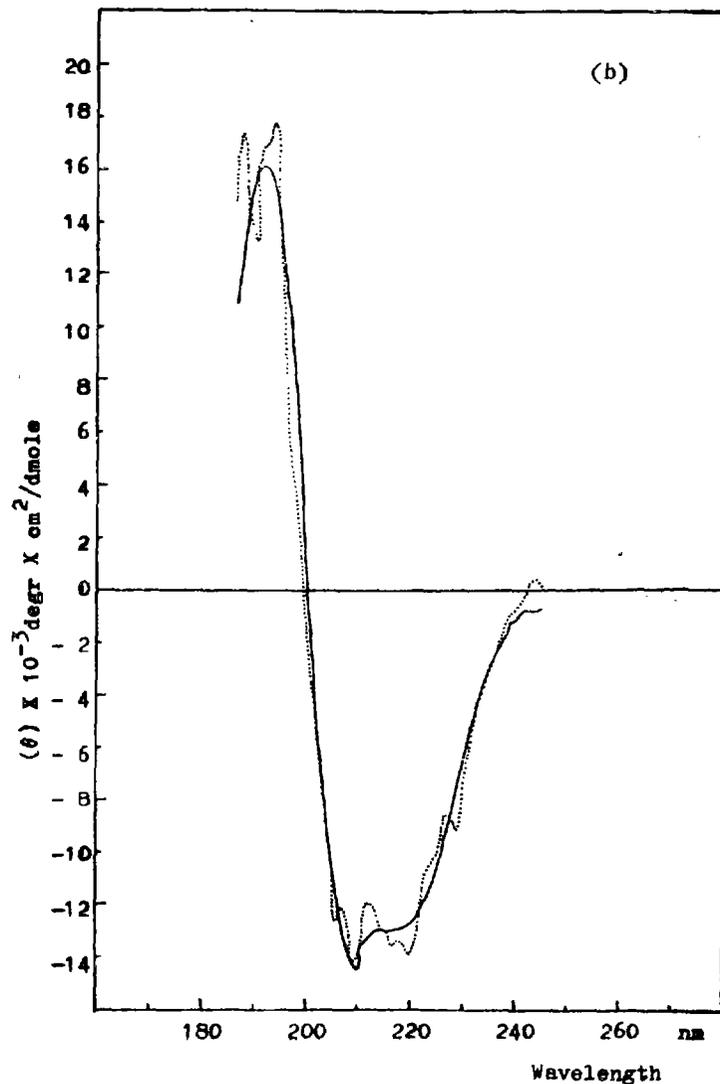


Fig. 1 Comparison of the experimental CD Spectrum curves (.....) with computed curves (—) of the sweet protein MaI (a) and MaII (b) .

累加 4 次并进行平滑化处理。

得到 CD 谱后根据 Chen 和 Yang 的方法，以 5 个球蛋白的圆二色数据为基础，用最小乘法在 Dual 计算机上计算出二种甜蛋白主链构象单元含量，并用计算得到的回归系数代回原式求得理论曲线，再与测量曲线进行比较^{[4] [6]}。

激光拉曼光谱由 J.Y.T-800 三单色器光谱仪记录，氩离子激光器为光源，功率 400mW，激光波长 5145Å，灵敏度 $1.3 \times 3K$ 光子/分，扫描速度 1.5 波数/分，用 0.3ml 液体池。样品溶于重蒸水中，浓度 50mg/ml。使用前仪器用四氯化碳校正频率在 $\pm 2cm^{-1}$ 之内。谱仪配备 Nicolet 1180 计算机作信号平均累加，Ma I 和 Ma II 各累加 6 次和 5 次。测定在室温下进行。

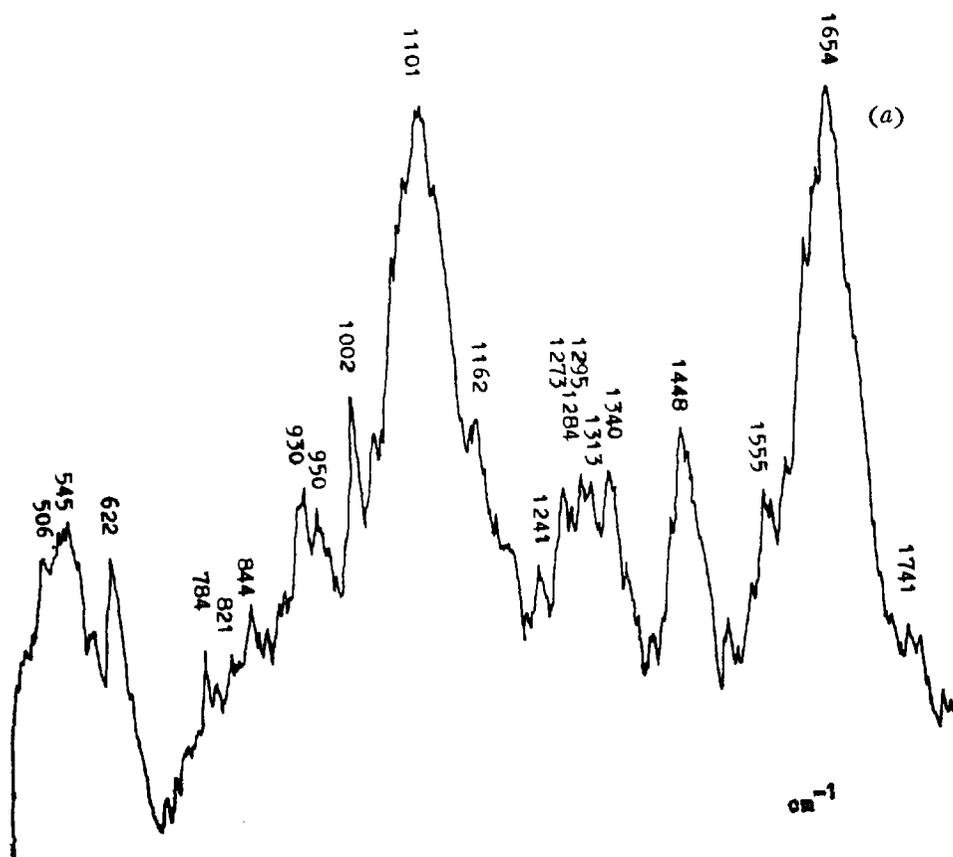
结 果 和 讨 论

Ma I 和 Ma II 远紫外区域圆二色谱实验曲线见 Fig 1。图中纵标用以 $\text{degr}\cdot\text{cm}^2\text{dmole}^{-1}$ 为单位的平均残基椭圆度值来表示。根据氨基酸分析结果取氨基酸残基平均分子量 M_0 , Ma I 为 135.3, Ma II 为 119.8。利用最小二乘法计算得到的构象单元含量结果为: Ma I 为 $f_H=0.43$, $f_\beta=0.24$, $f_R=0.33$, 总相关系数为 0.9876; Ma II 为 $f_H=0.37$, $f_\beta=0.33$, $f_R=0.30$, 总相关系数为 0.9876。将得到的回归系数代回原式, 用得到的理论 θ 值绘出计算的圆二色理论曲线, 与实验曲线相比较可见其吻合程度较好 (见 Fig 1)。

Ma I 和 Ma II 的激光拉曼谱见 Fig 2。其扫描范围均为 450cm^{-1} — 1800cm^{-1} 。另外, 为了验证是否有 SH 基, 也曾对 Ma I 和 Ma II 进行了 2500cm^{-1} — 2600cm^{-1} 范围内扫描, 结果未有明显峰出现, 这与这两种蛋白质用化学方法测定无自由 SH 基的结果是一致的^[3]。

从 Fig.1 CD 谱可看出, Ma I 和 Ma II 在 209nm、223nm 和 210nm、220nm 处均各有二个负峰, 这表明二者均有较多的 α 螺旋。与已报道的 Monellin 和 Thaumatin 相比明显不同, 后二者在 215nm 处有明显的负峰。

Ma I CD 谱中 189nm 处有一显著正峰, 而 Ma II 在 188nm 和 194nm 处有二个明显的正



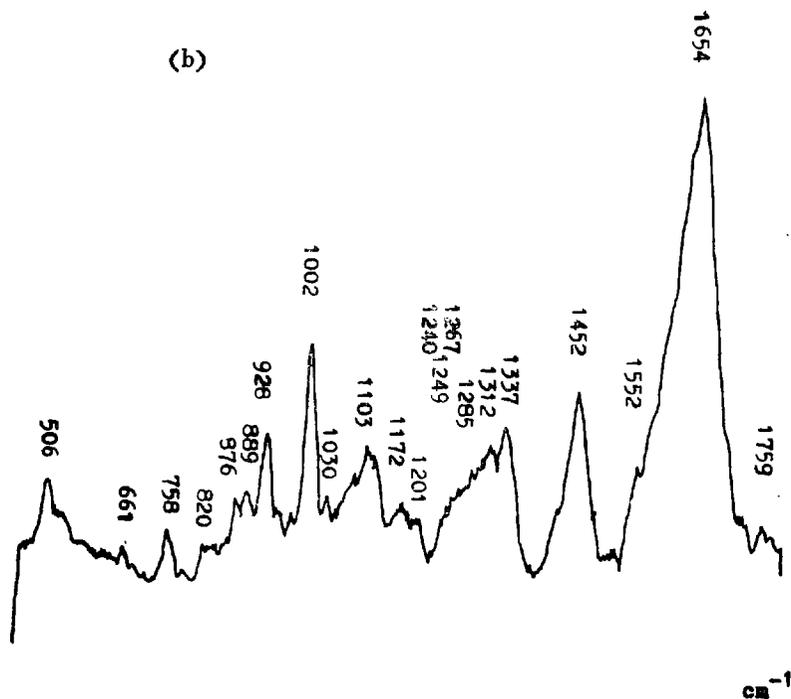


Fig. 2 Raman spectra of the sweet protein MaI(a) and MaII(b).

峰, 这种区别尚难解释。正峰在热变性时消失而变为负值^[1]。此外, 将 215nm 处 θ 值进行比较, Ma II 为 -12998 , Ma I 为 -12276 , 因此 Ma II 比 Ma I 可能含有更多的 β 折迭成份^{[4] [14]}。

计算结果表明 α 螺旋含量较高, 与图谱分析的结果相关性很好; 而且将得到的各个相关系数代回原式, 求得的理论计算图谱与实际的测量曲线也比较吻合。计算结果中仅 α 螺旋的含量较可靠, 其它的由于多种因素的影响仅能做为参考^{[4] [5]}。

激光拉曼光谱图的解释见 Table 1。从表征主链构象的酰胺带来看, 二者均含有较多的 α 螺旋。Ma I 和 Ma II 表征 α 螺旋的酰胺 I 带 1654cm^{-1} 很明显, 但该带受 H_2O 的干扰。较弱的酰胺 III 带中, 以 1285cm^{-1} 为中心的 $\pm 15\text{cm}^{-1}$ 的一些小峰表明 α 螺旋的存在。此外 933 和 928cm^{-1} 强谱带也表明 α 螺旋结构。酰胺 III 带中也表明有 β 反平行折迭 (1241cm^{-1}) 和无规卷曲 (1249cm^{-1})。上述结果与圆二色谱结果基本一致。

拉曼光谱中 Ma I 和 Ma II 的 S—S 键的振动频率各为 506 和 507cm^{-1} , 表明二硫键的几何构象为扭曲-扭曲-扭曲式。但 Ma I 有较强的 545cm^{-1} 峰, 按 Sugeta 理论^[11], 其中一部分二硫键处于 trans-扭曲-trans 构型, 这种构象常常发生在热变性后的蛋白中, 因此很可能这些二硫键处于肽链的松散部分。在 Ma I 和 Ma II 的拉曼光谱比较中, 还可看到 Ma I 的 1103cm^{-1} 峰比 Ma II 要强得多, 由于认为这条谱带对构象的变化比较敏感, 为构象标志带^[11], 因此也为 Ma I 较 Ma II 不稳定的事实提供构象上的解释。

Ma I 拉曼光谱有明显的 821cm^{-1} 和 844cm^{-1} 双峰, 强度比为 $1:0.8$, 表明分子中有 Tyr 残基且暴露于分子表面^[11, 13]。Ma II 无 Tyr 残基。

Table 1 Explanations of Raman Spectra of Ma I and Ma II

Frequency (cm ⁻¹)		Tentative	Structural
Ma I	Ma II	assignment	information
507	506	S(s-s)	gauche-gauche-gauche
545	—	S(s-s)	trans-gauche-trans
622	—	Phe	
—	661	S(c-s)	
784	758	Try	
821	820		
844	—	Tyr	Exposed Tyr
—	876,889	Try	
933	928	S(c ^α -c)	α-Helix
1001	1002	Phe	
1101	1103	S(c ^α -N)	
1241	1240	Amide III	Antiparallel β-pleated sheet or/and random coil
—	1249		
1273	1267		
1284	1285	Amide III	α-Helix
1295	—		
1313	1312	T(CH ₂)(?)	
1340	1337	Trp, C-H band and symmetric S(COO ⁻)	
1448	1452	D(CH ₂)	
1555	1552	Try	
1654	1654	Amide I and H ₂ O	α-Helix
1741	1759	S(COOH, C=O)(?)	

S—means stretching, T—twisting, D—deformation

从氨基酸分析数据可知^[3], Ma I比Ma II多含有6个Pro。根据Chou和Fasman对各种氨基酸在各个构象单元中分布作统计处理得到的构象参数来看^[6], Pro易破坏α螺旋和β折迭,但和Gly、Asn及Asp一样,易形成β转角,若β转角和β折迭相连,则β转角往往得到稳定。在含有较多α螺旋的Ma I中,这些插入的β转角势必破坏部分螺旋的稳定性,造成一些松散的螺旋,这部分结构极易在变性条件下被破坏;而Ma II含有较多的β折迭,与β转角一起构成稳定的构象结合体而不被破坏。以上观点均为Ma I较Ma II不稳定的事实提供部分解释。

参 考 文 献

- [1] 丁鸣、胡忠 (1986),《云南植物研究》,8(2), 131。
- [2] 胡忠、何敏 (1983),《云南植物研究》,5(2), 207。
- [3] 胡忠等 (1985),《云南植物研究》,7(1), 1。
- [4] 鲁子贤 (1982),《蛋白质化学》,87—113页, 科学出版社。
- [5] Chen, Y. H. et al. (1972), *Biochemistry*, 11, 4120。
- [6] Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974), *Biochemistry*, 13, 222。
- [7] Iyengar, R. B. et al. (1979), *Eur. J. Biochem.*, 96, 193。
- [8] Jirgensons, B. (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, 493, 178。

- [9] Korver, O. et al. (1973), *Eur. J Biochem.*, 35, 554.
- [10] Morris, J. A., and Cagan, R.-H. (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, 261, 114.
- [11] Parker, F.S. (1983), *Application of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*, p 83—143, Plenum Press, N. Y. and London.
- [12] Van der wel, H. et al. (1972), *FEBS Letter*, 21, 88.
- [13] Van Wart, H. E. et al. (1978), *Raman and Resonance Raman Spectroscopy*, in: *Method in Enzymology*, Vol. XLIX, p67—127, Academic Press.
- [14] Yang, G., Chen, G.C., and Jirgenson, B. (1980), in: *CRC handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd ed. Protein, Vol. III, p3—13.

CIRCULAR DICHROISM SPECTRA AND LASER RAMAN SPECTRA OF THE SWEET PROTEIN MABINLINS

FROM *Capparis masaiikai* Levl

Din, Ming Ma, Zhong-xin Hu, Zhong

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

ABSTRACT

CD spectra in far ultraviolet region of two sweet proteins (Mabinlin) MaI and MaII from the seeds of *Capparis masaiikai* Levl were recorded and according to Yang and Chen's method, the content of different conformational units were estimated by least square method using Dual computer system. From the CD spectra of MaI and MaII, an obviously positive peak at about 190nm and two negative peaks near 210 and 220nm were easily found. These illustrated that the α -helices were the major conformational units of both proteins; the regression coefficients of calculation were $f_H=0.43$, $f_\beta=0.24$, $f_R=0.33$ for MaI, and $f_H=0.37$, $f_\beta=0.33$, $f_R=0.30$ for MaII, the correlation values were both 0.9876. The theoretical curves obtained using these coefficients were well in accordance with the experimental data.

From Raman spectra of MaI and MaII, the positions of Amide I and III bands also indicated that the main conformational units were α -helices. There was no SH peak; the Tyr residues of MaI were shown to be on the surface of the protein molecule. The stronger intensity of peaks at 545 cm^{-1} and 1101 cm^{-1} of MaI may be the signs of differences between MaI and MaII in sweetness stability to heat and denaturants treatments.

Key words: Circular dichroism spectrum, Raman spectrum, Sweet protein