

某些环肽及其相应线型肽在不同溶剂 中构象的 CD 谱研究*

蒋云 苗振伟 徐筱杰 唐有祺

(北京大学物理化学研究所, 北京 100871)

关键词: 圆二色谱, 环肽, 线型肽, 构象

环肽在自然界广泛存在且普遍具有生物活性^[1,2], 由于其主链呈环状结构, 具有一定的构象约束作用, 其构象相应于线型肽来说有一定的稳定性. 这个特点使环肽具有许多重要的性质, 如具有一定程度的抗酶解能力, 与受体结合的选择性^[3,4], 以及跨膜输送离子的能力^[5,6]. 了解环肽与线型肽的构象之间的关系对于生物活性肽及肽类药物的合理设计将有重要意义. 在这里, 我们设计并合成了三个环肽及其相应线型肽, 用圆二色谱研究它们在极性不同的三种溶剂中的构象. 这三个环肽是:

CP10E: cyclo[Glu(OBzl)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gly]₂

CP10K: cyclo[Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂

CP12K: cyclo[Phe-Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂

相应的线型肽是:

LP10E: Boc-[Glu(OBzl)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gly]₂-OPac

LP10K: Boc-[Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂-OMe

LP12K: Ac-[Phe-Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂-OMe

(Boc= 叔丁氧羰基; Bzl= 苄基; Z= 苄氧羰基; Ac= 乙酰基; Pac= 苯甲酰甲基, 所有氨基酸均为 L-型)

三种溶剂是: 乙腈、氯仿、三氟乙醇.

1 实验部分

1.1 样品

所有肽都采用经典的溶液法合成^[7](合成工作将另文发表), 环肽均用硅胶 H 柱 (2.5×60cm) 纯化, 洗脱剂: 氯仿 / 甲醇 = 90/10, 检测波长为 254 nm, 质谱结果如下:

	CP10E	LP10K	LP12K	CP10E	CP10K	CP12K
M ⁺	1534	1602	1838	1298	1470	1764

1995-01-26 收到初稿, 1995-06-30 收到修改稿. 联系人: 苗振伟. * 攀登计划“生命中重要化学问题”资助项目

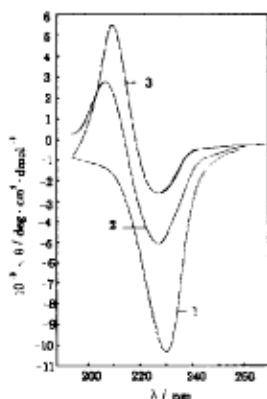


图 1 LP10E 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.1 The CD spectra of LP10E
in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

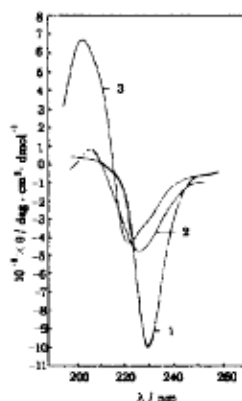


图 2 LP10K 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.2 The CD spectra of LP10K
in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

1.2 CD 谱研究

仪器：磁圆二色仪 J-500C 型

实验条件：温度：25 °C，液池厚度，1mm，扫描范围：180-280nm，样品浓度均为 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对于线型肽，灵敏度为 $5 \times 10^{-3} (^\circ) \cdot \text{cm}^{-1}$ ，时间常数是 2 s，走纸速度是 $10 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ；对于环肽，灵敏度为 $2 \times 10^{-3} (^\circ) \cdot \text{cm}^{-1}$ ，时间常数是 5 s，走纸速度是 $5 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。所有 CD 吸收谱均扣除空白溶剂的吸收。

2 结果与讨论

多肽和蛋白质的肽链骨架的酰胺键存在着 $n-\pi^*$ 和 $\pi-\pi^*$ 能量跃迁，当肽链骨架折叠成相同的二级、三级结构时，这些跃迁就有固定的能量，体现在 CD 谱上就是在某一特定波长处有特征吸收峰。一般而言， α -螺旋在 193 nm 处有最大正吸收，在 207 nm 和 222 nm 处有双负吸收。 β -折叠在 215 nm 处有最大负吸收^[10]，I 型 β -turn 结构在约 208 nm 处有较大负吸收或在 201 nm 和 221 nm 附近有双负吸收，II 型 β -turn 结构在 202-203 nm 处有正极大吸收，在 228-230 nm 处有负极大吸收。 γ -turn 结构在约 230 nm 处有负极大吸收^[8]。利用这些特征吸收，人们可以定性或定量地判断多肽和蛋白质的二级结构或它们所采用的主要构象。

2.1 线型肽在不同溶剂中的构象

三个线型肽的 CD 谱如图 1- 图 3，其特征吸收波长见表 1。

表 1 线型肽在不同溶剂中的吸收峰的波长 (nm)

Table 1 The wavelength of the absorb peaks of linear peptides in different solvents (nm)

	chloroform		acetonitrile		2,2,2-trifluoroethanol	
	[+]max	[-]max	[+]max	[-]max	[+]max	[-]max
LP20E		228	210	228	209	228
LP10K		229	207	226	203	203
LP12K		228	206	227	205	226

从表 1 可以看出, 这三个线型肽在乙腈和三氟乙醇中主要以 II 型 β -turn 结构存在, 而在非极性溶剂氯仿中则主要采取 γ -turn 的构象. 由于三氟乙醇极性较大, 使肽链骨架的 $n-\pi^*$ 跃迁能量降低, 导致最大吸收移至波长较长处.

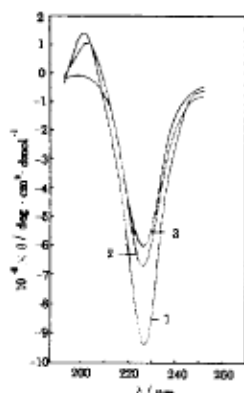


图 3 LP12K 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.3 The CD spectra of LP12K in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

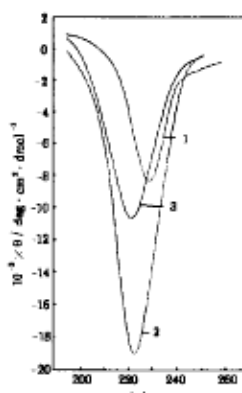


图 4 CP10E 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.3 The CD spectra of CP10E in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

通常情况下, 短的线型肽在溶液中没有稳定的构象, 当含某些特殊氨基酸如 *N*- 甲基氨基酸、 α - 甲基氨基酸和 α, β 不饱和氨基酸, 由于它们的构象约束作用, 则易于形成二级结构. 在 LP10E、LP10K 和 LP12K 中, 脯氨酸相当于 *N*- 烷基化氨基酸, 它的吡咯环使得 $N-C_{\alpha}$ 二面角被限制在 60° 左右, 肽链自由扭转的程度主要取决于 $C_{\alpha}-C_1$ 键上的二面角 φ . 在所研究的三个线型肽中, 与 Pro 相连的是侧链最小的氨基酸 - 甘氨酸, 这样的结构利于形成稳定的二级结构. 据此推测, 这三个肽能形成一定的稳定二级结构, 它们的 CD 谱显示出较明显的转折结构, 证实了我们的推测.

2.2. 环肽在不同溶剂中的构象

三个环肽的 CD 谱如图 1- 图 6 所示, 其特征吸收波长见表 2.

表 2 环肽在不同溶剂中的吸收峰的波长

Table 2 The wavelength of the absorb peaks of cyclic peptides in different solvents (nm)

	chloroform		acetonitrile		2,2,2-trifluoroethanol	
	[+]max	[-]max	[+]max	[-]max	[+]max	[-]max
CP20E		229		222		223
CP10E		231		209		220
CP12K		232	201	222	201	226

从表 2 可以看出, 这三种环肽在非极性溶剂氯仿中主要以 γ -turn 的形式存在. 在极性溶剂乙腈和三氟乙醇中, 除 CP10K 在乙腈中主要以 I 型 β -turn^[8] 的构象存在外, 其余都不能用一种单一形式的转折结构来描述. 根据它们在 220 nm 处有较大的负吸收, 可以判断可能是几种转折结构共存或者是某种转折与 β - 折叠共存. 根据 CP12K 的 2D-NMR 研究结果^[9], 表明它存

在有两个 γ -turn, 两个 β -turn, 没有 β - 折叠结构. 因此推测这三个环肽在乙腈和三氟乙醇中存在两种或两种以上的转折结构, 在 220 nm 处的负吸收是几种转折迭加的结果 [8].

2.3 线型肽与环肽在不同溶剂中的构象比较

在非极性溶剂氯仿中, 线型肽和环肽都主要以 γ -turn 的构象存在, 主要原因是在非极性溶剂中, 肽分子内的作用力较肽与溶剂分子之间的作用力强得多, 环化前后主要靠肽分子自身的作用力来维持构象. 因此, 线型肽和环肽的构象无较大差别. 而在极性溶剂中, 如乙腈、三氟乙醇和二甲亚砜等, 肽分子和溶剂分子之间的作用力较强, 对线型肽的构象有很大影响, 肽环化后主要仍由肽分子内的作用力如氢键等决定其构象, 溶剂的作用则通过改变分子内氢键的位置体现出来 [8], 所以在极性溶剂中肽环化前后构象有较大变化.

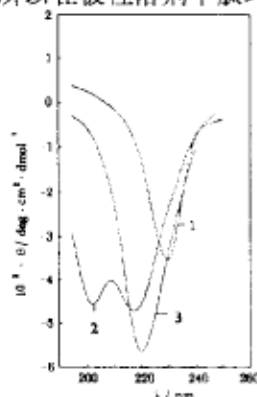


图 5 CP10K 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.5 The CD spectra of CP10K
in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

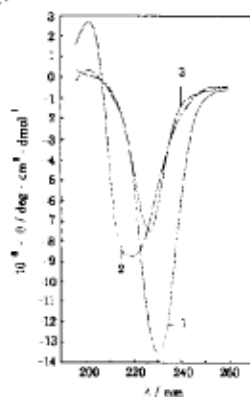


图 6 CP12K 在不同溶剂中的 CD 谱
Fig.6 The CD spectra of CP12K
in different solvents

- 1) chloroform
- 2) acetonitrile
- 3) 2,2,2-trifluoroethanol

根据我们的研究结果可以得出如下结论: (1) 在具有构象限制作用的氨基酸如脯氨酸存在时, 短肽在溶液中也能够形成明显的二级结构; (2) 溶剂的极性不同对肽在溶液中的构象有较大影响, 其中对线性肽的影响大于对环肽的影响; (3) 环化后由于主链骨架的构象约束作用, 使得它们在不同的溶剂中形成的二级结构与线型肽有所不同, 从而为设计具有不同的受体选择性的活性肽提供了依据.

参 考 文 献

- 1 Carter D C, More R E, Mynderso J S, et al. *J. Org. Chem.*, **1984**, **49**:236
- 2 Ireland C, Scheuer P J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, **102**:5688
- 3 Shemyakin M M, Ovchinnikov Y A, Evstraton A V, Ivanon V T, et al. *Nature*, **1967**, **213**:412
- 4 Dimio J, Nguyent M D, Lemieux C, Schiller P W. *J. Med. Chem.*, **1982**, **25**:1432
- 5 Freden H. *Biochimie*, **1989**, **71**:71
- 6 Ghadiri M R, Graja J R, Buehler L K. *Nature*, **1994**, **369**:26
- 7 黄惟德, 陈常庆. 多肽合成. 北京: 科学技术出版社, 1985, 102
- 8 Rose G D, Gierasch L M, Smith J A. *Advances in Protein Chemistry*, **1985**, **37**:1
- 9 米鲁华, 马立斌, 苗振伟, 徐俊杰, 唐有祺. *化学学报*, **1994**, **52**:1028
- 10 Woody R W, *The Peptides*, Vol. 7, Academic Press, Inc., 1985, 15

Study on the Conformation of Three Cyclic Peptides and Their Correspondent Linear Peptides with CD Spectroscopy

Jiang Yun Miao Zhenwei Xu Xiaojie Tang Youqi

(Institute of Physical Chemistry, Peking University, Beijing 100871)

Abstract We used CD spectroscopy to study the conformations of three cyclic peptides (CP10E: cyclo[Glu(OBzl)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gly]₂, CP10K: cyclo[Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂, CP12K: cyclo[Phe-Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂ and their correspondent linear peptides (LP10E: Boc-[Glu(OBzl)-Pro-Gly-Glu(OBzl)-Gly]₂-OPac, LP10K: Boc-[Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Pro]₂-OMe, LP12K: Bao-[-Lys(Z)-Pro-Gly-Lys(Z)-Gly]₂-OMe) in three solvents of different polarity (chloroform, acetonitrile, 2,2,2-trifluoroethanol), and it was found that all of linear and cyclic peptides exist as γ -turn conformation in chloroform, however, in TFE & CH₃CN solutions, the three linear peptides are in β II-turn conformations. CP10E is β I-turn conformation, CP10K & CP12K exist in more than one types of turn conformations. On the basis of our experiments, it was concluded: 1) In the presence of conformational constrained amino acids short linear peptides form obvious secondary structure; 2) The solvent polarity has influence on the peptide conformation and this influence on linear peptides is greater than that on cyclic peptides; 3) The backbone of cyclic peptide has constraint effect on its conformation and makes the secondary structure of cyclic peptide different from that of its relative linear peptide. This information might give some clues in the design of bioactive peptides with different receptor selectivity.

Keywords: Circular dichroism spectroscopy, Cyclic peptide, Linear peptide, Conformation