

人卵泡促性腺激素释放肽 (hF-GRP) 的 STM 研究*

吴宏伟 林克椿

(北京医科大学 生物物理系 北京 100083)

摘 要

人卵泡促性腺激素释放肽 (hF-GRP) 为一只含 14 个氨基酸的多肽类激素, 我们已经用 2D-NMR 技术测定了它的溶液构象, 本文又用 STM 技术观察了 hF-GRP 单层铺展时的分子图象, 测得其分子大小约为 2.4nm, 并用 2D-NMR 结果较好地解释了所得的图象。

关键词: STM hF-GRP 2D-NMR 单层铺展

人卵泡促性腺激素释放肽 (human Follicular Gonadotropin Releasing Peptide, hF-GRP, H-Thr-Asp-Thr-Ser-His-His-Asp-Gln-Asp-His-Pro-Thr-Phe-Asn-OH) 是 1987 年由 C. H. Li 等人首先分离提纯的, 分子量约为 1625 Da, 它与功能相似的促性腺激素释放激素 (LHRH) 在一级序列上完全不同, 并且具有长时程作用特点^[1]。我们已经用二维核磁共振技术测定了 hF-GRP 的溶液构象^[2], 本文的工作是尝试用 STM (Scanning Tunneling Microscope) 观察 hF-GRP 的分子图象。虽然 STM 还不具有人们开始所期望的能给出象 X-射线晶体衍射或 2D-NMR 技术那样确凿无疑的高分辨分子图象, 但这一技术相对而言操作简便, 并能给出极高分辨率的直观图象, 这里我们首次得到了 hF-GRP 单层铺展时的分子图象, 测得其分子大小约为 2.4nm, 并利用 2D-NMR 结果较好地解释了所得的结果。

1 材料和方法

hF-GRP 由中国医学科学院药物研究所合成, 经 HPLC 纯化。

将真空干燥后的 hF-GRP 溶于双蒸水中, 配成浓度分别为 10mg/ml、5mg/ml 和 1mg/ml 的三种纯水溶液。取 3 μ l 样品溶液滴于新撕的高定向裂解石墨 (HOPG) 上, 置于放硅胶的干燥器中 25 min, 以接近无水分为宜, 然后进行观察。

用本实验室 SSX-1 型 STM 在空气环境下操作, 针尖用直径 0.25mm 的钨丝剪制而成, 先扫石墨表面, 能得到碳原子晶格排列图象后再扫样品图象。仪器参数选择为: $I_t=0.7nA$, $V_{bias}=80mV$, $Z_{gain}=4.0$, 所得图象扫描范围放大倍数分别是 $4\times 10\times 2$ 和 $5\times 10\times 2$, 扫描方式选择 Z 方向慢扫方式, 扫描延迟 delay 为 10。图象处理在 AST386/25 计算机上进行, 利用中国科学院化学研究所研制的 CSTM 9000 图象处理系统进行平滑和插值处理。

2 结果和讨论

hF-GRP 为 14 个氨基酸组成的小肽, 虽然还没人测过它的真实长度, 但从氨基酸个数推断估计只有几个纳米。

*国家自然科学基金重点项目资助。

为了寻找最适合做STM观察的样品浓度,我们分别配制了10mg/ml, 5mg/ml和1mg/ml的hF-GRP纯水溶液。观察发现,10mg/ml偏浓,且因此常常容易撞针而无法扫描,1mg/ml又偏稀,几乎找不到样品痕迹,5mg/ml这个浓度比较适合,得到的图象都比较清楚,分别见图1a, 2a。图1b, 2b是经平滑和插值处理后的图像。

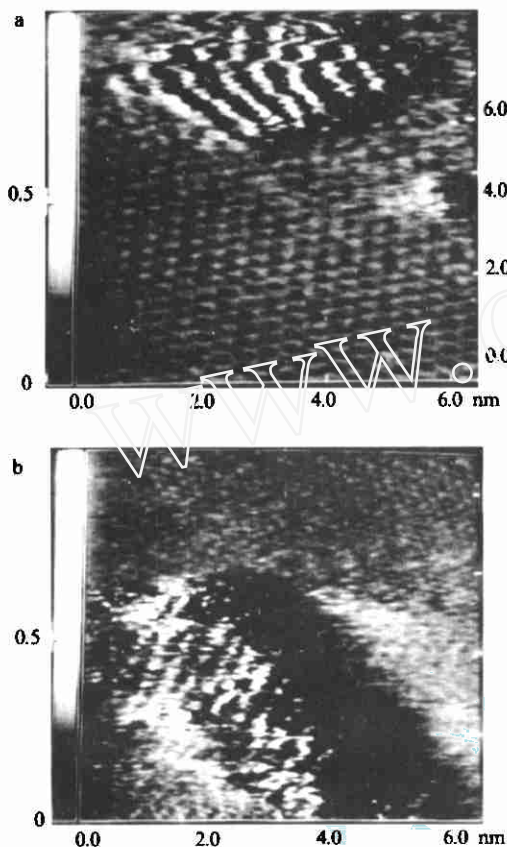


Fig.1 STM image of hF-GRP molecules deposited on HOPG, a, the original (up); b, after processing of smooth and interpolation. Scan area 6.4×7.2 nm.

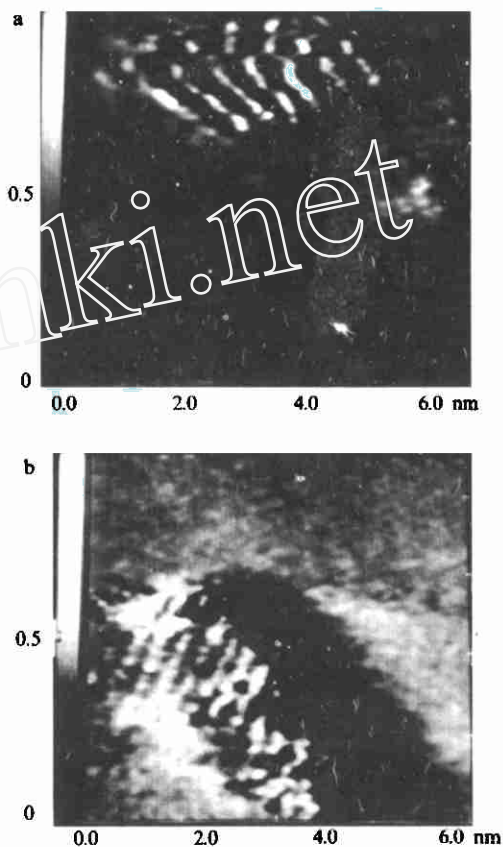


Fig.2 Another STM image of hF-GRP molecules deposited on HOPG, a, the original (up); b, after processing of smooth and interpolation. Scan area 8×9 nm.

从图1b中可以看到,在石墨原子晶格排列的表面上有七股彼此非常相似的短链比较整齐和均匀地铺展着,测量它们的长度约为2.4nm,此幅图像的扫描范围是 $4 \times (1.6 \times 1.8)$ nm。

图2b所示的另一次实验得到的图像,其扫描范围是 $5 \times (1.6 \times 1.8)$ nm,从图中可以看到石墨原子表面上(从图像的右上部可见石墨碳原子的晶格排列),铺展有10股以上的短链,测量它们的长度约为2.5nm。

根据以上结果,即(1)测得的这些短链的长度,(2)在同一幅图象中重复出现相似的个体,(3)改变扫描范围的放大倍数后图象中短链的长度比例也随之相应改变,(4)重复实验,都得到非常相似的结果。我们认为,我们得到的就是hF-GRP分子的图象。

用STM观察氨基酸和小肽,想要得到单个分子的图象是很困难的,因为这些较小的分子很难固定在石墨上而不被针尖扫掉。当这些小分子能形成多聚体,能均匀地单层铺展或最好能形成二维结晶时,则得到STM图象的可能性就大大增加,因为这样一来样品分子容易固定,图象识别也较容易和可信。从已发表的文献来看,得到的小分子图像大都是上面提到的三种聚集形式。如L. Feng等观察到氨基酸二聚体的图像^[2],J. K. H. Horber等观察到Gramicidin A单展铺展的图象^[3]以及N. M. Brown等观察到Gramicidin S二维结晶的图象等^[4]。多肽的聚集主要靠一些弱相互作用,如范德华力、氢键、静电、疏水等作用。从我们得到的图象来看,在5mg/ml的浓度下,hF-GRP在小范围能形成单层铺展,因而整体上增加了对石墨表面的吸附作用,这是我们能够得到其图像的重要保证(从图2来看,该肽稍有堆积的倾向)。

仔细观察二幅图象中的每一个肽链,会发现它们几乎都有一个共同的特征,即一端比较伸展,另一端则存在明显地不规则弯曲,如果对照前面的2D-NMR的结果,即hF-GRP羧基端三个残基为无规卷曲,同时考虑到肽在HOPG上干燥过程中失去大量的水分,以及由于彼此聚集的弱相互作用,自然会使肽链的运动性大大降低,则羧基端的无规卷曲趋于固定,形成不规则的弯曲走向。2D-NMR结果显示氨基端尽管Ser4-His5-His6为一部分类似 β -转角II的弯曲,但由于干燥和聚集,这一段仍会更加刚性和伸展。这样我们还可以推断该肽链的拐点最有可能是11位的Pro,那么,又会发现Pro11-Thr12-Phe13-Asn14这四个残基占总共14个残基的约1/3,从图象上看,弯曲部分的长度占肽链总长度的比例大约也是1/3。因此,我们用STM得到的hF-GRP的分子图象,如用2D-NMR得到的结果来解释,则非常吻合。显然,用STM得到的图像越清晰,则从中获取的有关结构的信息也越丰富。这一技术相对而言操作简便和能给出较高分辨率的直观图像,在目前,至少做为一种对其它技术印证和补充的手段是具有重要价值的。

参考文献

- 1 Li, C. H., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, 84: 959-962.
- 2 Feng, L. et al.: *Journal of Microscopy*, 1988, 152 Pt. (3): 811-816.
- 3 Horber, J. K. H. et al.: *J. Vac. Sci. Technol.*, 1991, B 9(2): 1214-1218.
- 4 Brown, N. M. D. and You, H. X.: *J. Struct. Biol.*, 1991, 107: 250-258.
- 5 吴宏伟等: *生物物理学报*, 1995, 11(3): 299-304.

CONFORMATIONAL STUDY OF HUMAN FOLLICULAR
GONADOTROPIN-RELEASING PEPTIDE (hF-GRP) BY STM

Wu Hongwei Lin Kechun

(Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing, 100083)

ABSTRACT

hF-GRP deposited on a highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) substrate, has been observed by STM under ambient conditions.

A single layer packed structure of hF-GRP molecules was imaged for the first time. About 2.4nm in length was found in the STM image of hF-GRP molecule. The conformational properties of hF-GRP molecules on the STM image agree well with the results of 2D-NMR experiment.

Key Words: STM hF-GRP 2D-NMR