

紫外圆二色光谱预测蛋白质结构的研究方法

黄汉昌 姜招峰* 朱宏吉[#]

(北京联合大学应用文理学院 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室 北京 100083;

[#]天津大学化工学院 天津 300072)

摘要 介绍了蛋白质紫外圆二色性 (CD) 产生的原理及其与蛋白质结构的关系。评述了远紫外蛋白质 CD 预测蛋白质二级结构的研究方法原理、参考蛋白、拟合算法及拟合程序, 远紫外 CD 预测蛋白质二级结构存在的问题; 近紫外 CD 与蛋白质的三级结构密切相关, 近紫外蛋白质 CD 反映芳香氨基酸残基、二硫键等微环境的变化, 表征着丰富的蛋白质三级结构的信息。

关键词 圆二色 蛋白质结构 紫外光谱

The Methods of Protein Conformation Predicted by UV-Circular Dichroism

Huang Hanchang, Jiang Zhaofeng*, Zhu Hongji[#]

(Beijing Union University Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, Beijing 100083;

[#]School of chemical engineering and technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract The principle of protein circular dichroism (CD) and the relationship between protein structures and its CD are introduced in this article. The methods, including principle, reference proteins, fitting algorithm and its program, of protein secondary structures predicted by far ultraviolet (UV) CD are reviewed. The proteins near UV CD spectra contain the information of the aromatic amino acids and disulfide group which are hypersensitive to environmental changes, and they imply the protein tertiary structures information.

Key words Circular dichroism, Protein secondary structure, Ultraviolet spectra

自上世纪 80 年代以来, 结构生物化学得以迅速的发展, 生物大分子结构的测定逐渐成为生命科学领域研究的热门课题。人类基因组测序完成后, 蛋白质组学的相关研究成为生物学中的重要课题。蛋白质是生物活性大分子物质, 蛋白质的结构对生物活性有着重要的影响, 其结构的变化将会导致其它性能的变化。目前, 确定蛋白质结构最准确的方法是 X 射线晶体衍射, 要求蛋白质是晶体存在状态, 这对结构复杂、柔性的生物大分子蛋白质来说, 要得到所需的晶体结构较为困难。二维、多维核磁共振技术能测出溶液状态下较小蛋白质的结构, 可是对分子量较大的蛋白质的数据计算处理非常复杂, 相比之下, 圆二色是研究稀溶液中蛋白质结构的一种快速、简单、较准确的方法。自 1969 年 Greenfield 用圆二色 (Circular Dichroism, 简称 CD) 光谱数据估计了蛋白质二级结构后^[1], 相关的 CD 光谱研究蛋白质结构的方法报道增多^[2-10]。圆二色现象是由光学活性物质对左右圆偏振光的吸光率之差引起的, 按照圆二色产生的机理, 圆二色有几种类型: 由电子跃迁引起的一般称之为圆二色 (CD), 又称为 ECD; 由分子振动引起的圆二色成为 VCD (Vibrational Circular Dichroism), 另外还有荧光 CD, 拉曼旋光等。本文只对由电子跃迁引起的圆二色现象, 就紫外 CD 光谱技术分析蛋白质二级和三级结构的基本原理及其研究方法进展作一评述。

1. 蛋白质的圆二色性原理

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率也不同, 因此叠加产生的平面偏振光的偏振方向将会改变, 产生旋光性; 同时, 由于手性介质对左右旋圆偏振光的摩尔吸光率 ($\epsilon_l(\lambda)$, $\epsilon_d(\lambda)$) 不同, 产生一个差值 $\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_l(\lambda) - \epsilon_d(\lambda)$, 使得左右

旋圆偏振光通过介质后振幅也将不同,这样两者叠加而形成椭圆偏振光。圆二色也常用摩尔椭圆率 $[\theta(\lambda)]$ 来表示,单位为 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$, 摩尔椭圆率 $[\theta(\lambda)]$ 与摩尔吸光率差值 $\Delta\varepsilon(\lambda)$ 存在以下换算关系^[11],

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi} \cdot \log_e^{10} \Delta\varepsilon \quad (1)$$

一般手性物质的圆二色性与波长有关,如果对手性物质按照一定的波长扫描,便得到其 CD 光谱图,从图谱上可以了解其分子及结构上的手性特性。

蛋白质或多肽是由氨基酸通过肽键连接而成的具有特定结构的生物大分子,主要的光学活性生色基团是肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基及二硫桥键,另外,有的蛋白质辅基对蛋白质的圆二色性有影响。蛋白质一般有一级结构、二级结构、超二级结构、结构域、三级结构和四级结构几个结构层次,相同的氨基酸序列,因蛋白质的折叠结构不同,影响了其光学活性生色基团的光学活性,其圆二色性也有较大的差异。蛋白质的圆二色性主要由活性生色基团及折叠结构两方面圆二色性的总和。根据电子跃迁能级能量的大小,蛋白质的CD光谱分为三个波长范围^[12]: (1) 250nm以下的远紫外光谱区,圆二色性主要由肽键的 $n\rightarrow\pi^*$ 电子跃迁引起^[13]; (2) 250~300nm的近紫外光谱区,主要由侧链芳香基团的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 电子跃迁引起; (3) 300~700nm的紫外-可见光光谱区,主要由蛋白质辅基等外在生色基团引起。蛋白质的CD光谱已经应用于预测蛋白质的折叠结构等。相应于蛋白质CD产生的机理,远紫外CD主要应用于蛋白质二级结构的解析,近紫外CD主要揭示蛋白质的三级结构信息,紫外-可见光CD主要用于辅基的偶合分析。

2 远紫外 CD 预测蛋白质二级结构方法

利用圆二色光谱仪获得蛋白质 CD 主要的工作包括:溶剂体系的选择,蛋白质溶液样品的制备^[14],圆二色光谱仪实验参数的选择与调整等。正确的蛋白质 CD 图谱是预测蛋白质结构的基础与关键,Kelly等^[15]从溶剂的选择、蛋白样品的准备到仪器的标定、实验参数的选择与调整对蛋白质 CD 测量实验作了较为全面的综述。在正确获得蛋白质 CD 后,主要的工作是如何从 CD 图谱解析蛋白质的结构信息。远紫外 CD 预测蛋白质的二级结构的方法,主要运用计算采用一定的拟合算法,对 CD 数据进行加工处理,进而解析蛋白质二级结构。

2.1 预测方法的基本原理

远紫外区CD光谱主要反映肽键的圆二色性。在蛋白质或多肽的规则二级结构中,肽键是高度有规律排列的,其排列的方向性决定了肽键能级跃迁的分裂情况。具有不同二级结构的蛋白质或多肽所产生CD谱带的位置、吸收的强弱都不相同。因此,根据所测得蛋白质或多肽的远紫外CD谱,能反映出蛋白质或多肽链二级结构的信息,从而揭示蛋白质或多肽的二级结构。如图1所示^[16]: α -螺旋结构在靠近192nm有一正的谱带,在222和208nm处表现出两个负的特征肩峰谱带; β -折叠的CD光谱在216nm有一负谱带,在185~200nm有一正谱带; β -转角在206nm附近有一正CD谱带,而左手螺旋P2结构在相应的位置有负的CD谱带。

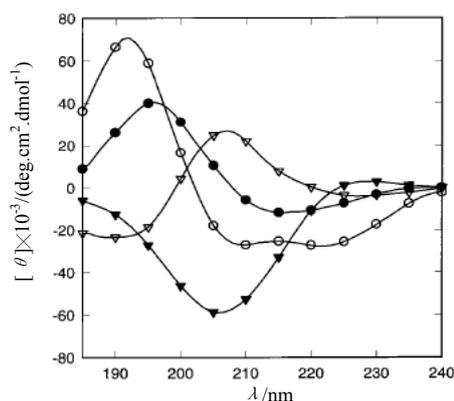


图1 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及 P2 结构多肽的 CD 谱^[16]

Fig. 1 Circular dichroism (CD) spectra of polypeptides in the α -helical, β -sheet, β -turn and P2 conformation^[16]

(○) α -螺旋; (●) β 2 折叠; (△) β -转角; (▼) P2 (0.1mol/L 醋酸溶液中的聚-L-脯氨酸)

单一波长常用于测定蛋白质或多肽由动力学或热力学引起的二级结构的变化。 α -螺旋结构在208及222nm有特征吸收峰,可以利用这两处的摩尔椭圆度 $[\theta]_{208}$ 或 $[\theta]_{222}$ 来简单估计 α -螺旋的含量^[17]。这种方法的优点是能够快速地获取这两点的实验数据,反映瞬时的动力学和热力学信息,可作为光谱探针对 α -螺旋的变化作简单的推算;但缺点是忽略了蛋白质中其它二级结构及芳香基团对 $[\theta]$ 的贡献,分析结果具有误差性。对于非 α -螺旋结构含量的估算,由于 α -螺旋的CD值对其它螺旋结构的干扰很大,难于得到理想的估算值。

利用一定波长范围的蛋白质远紫外CD光谱来表征蛋白质的二级结构的方法,能够得到更加完全及可靠的二级结构信息。CD数据拟合计算蛋白质的二级结构的方法基本原理是^[7, 18]:假设蛋白质在波长 λ 处的CD信号 $\theta(\lambda)$ 是蛋白质中或多肽各种二级结构组分及由芳香基团引起的噪音的线性加, $\theta(\lambda) = \sum f_i \theta(\lambda)_i + \text{noise}$ 。 $\theta(\lambda)_i$ 是第*i*个二级结构成分的CD信号值, f_i 为第*i*个二级结构成分的含量分数, $\sum f_i$ 规定值为1;通过已知蛋白(或称参考蛋白)二级结构的圆二色数据库,曲线拟合未知蛋白或多肽的圆二色数据,估算未知蛋白或多肽的二级结构。

2.2 蛋白质二级结构拟合算法

早期的蛋白质或多肽的二级结构拟合计算方法中,主要采用多聚氨基酸为参考多肽。Greenfield等采用多聚 L-lys 作参考多肽,建立 α -螺旋、 β -折叠及无规卷曲等二级结构参考 CD 光谱曲线,采用单一波长法(208nm)计算出 α -螺旋含量后,然后假设不同的 β -折叠含量(X^β)值,并假设 CD 值是 α -螺旋含量(X^H)、 β -折叠含量(X^β)无规卷曲(X^R)三者贡献值的加和,即:

$$X^H + X^\beta + X^R = 1 \quad (2)$$

通过计算计算出不同波长的 $\theta(\lambda)$, 得出计算曲线。假设一些不同的 X^β 值, 分别求出它们相应的计算曲线, 找出与实验曲线最接近的曲线, 相应于该最接近曲线的 X^β 及 X^R 即认为是该蛋白质的相应结构含量。这种方法简单便捷, 仍然应用于粗略比较蛋白质或多肽的二级结构变化比较中。但是, 由于参考蛋白体系过于简单, 难免丢失其它二级结构的信息, 不能较全面地反映二级结构信息。Chen 等^[19, 20]在这基础上增加了参考蛋白, 并假设各个波长的 $[\theta]$ 值是由三种构象 $[\theta]$ 值的代数和, 即

$$[\theta]_{\lambda,i} = X^H [\theta]_{H,\lambda,i} + X^\beta [\theta]_{\beta,\lambda,i} + X^R [\theta]_{R,\lambda,i} \quad (3)$$

利用已知参考蛋白(肌红蛋白、溶菌酶、乳酸脱氢酶、木瓜酶及核糖核酸酶)的二级结构(已知 X^H 、 X^B 及 X^R)，最小二乘法曲线计算拟合待测蛋白质的二级结构。Chen 等的方法对 α -螺旋的数值比较可靠，而 β -折叠的结果不准确。随着圆二色技术的发展，更多的蛋白质或多肽作为测定未知蛋白质或多肽的参考蛋白，并且在计算算法上有进一步的改进。现代的蛋白质 CD 拟合二级结构的算法主要采用最小二乘法、单值分解及神经网络方法等算法，以待测蛋白质代替参考蛋白体系中结构相似的某一蛋白质，反复计算取代后的收敛性，计算拟合未知待测蛋白质二级结构组成。

2.3 参考蛋白及应用程序

参考蛋白是拟合未知蛋白质远紫外 CD 二级结构的参考标准，参考蛋白的选取将影响 CD 拟合结果。文献报道用于拟合的参考蛋白质共有 48 种^[4,8,20-22]，圆二色的波长均在远紫外区，其精确结构主要是通过 X-射线晶体衍射或核磁共振技术测定，包括 Hennessey 等报道的 29 种(178~260nm)，Pancoska 等报道的 5 种(185~240nm)，Yang 等报道的 6 种(190~240nm)，及 Sreerama 等报道的 3 种球蛋白(185~240nm)和 5 种失活蛋白质(185~240nm)。运用这些参考蛋白组合，文献已报道多种蛋白质远紫外 CD 数据拟合蛋白质二级结构的计算方法，拟合计算 α -螺旋、平行 β -折叠、反平行 β -折叠、 β -转角、P2 结构及无规卷曲等二级结构。尽管有人对以上的蛋白质 CD 拟合其二级结构的方法提出了诸多批评^[23]，认为丰富的蛋白质二级结构被局限与几种类型，同时有限的参考蛋白也难于充分反映蛋白的多样性，但是 CD 拟合蛋白二级结构的方法还是得到了不少的进展。按发表时间先后分别有：多级线性回归(multilinear regression)，拟合程序为 G&F, L INCOMB, MLR[2]；峰回归(ridge regression)，拟合程序为 CONTIN^[24,25]；单值分解(singular value decomposition)，拟合程序为 SVD^[20]；变量选择(variable selection method)拟合程序为 VARSLC^[26]；凸面限制(convex constraint analysis)，拟合程序为 CCA^[27]；神经网络(neural nets)，拟合程序为 K2D^[28]；自洽方法(self-consistent methods)，拟合程序为 SELCON^[29]；以及综合运用以上拟合算法联用的 CDSSTR 方法^[8,30]。CDPRO 专业软件包包含了 CONTIN、SELCON 和 CDSSTR 三种拟合运算程序。以上程序的拟合计算过程在相关文献中有比较详细的综述^[7,8,31,32]。

随着光学技术发展及同步加速器辐射圆二色(SRCD)光谱技术的发展，远紫外测量光谱可以达到 190nm 以下的真空远紫外区^[33]，并且这一 CD 光谱区域内，包含着更为丰富的蛋白质二级结构信息，这一光谱区域的参考蛋白质的圆二色光谱及拟合运算方法也成为研究热点。在环境温度 4°C 下，Lees 等^[34]建立了 170 及 175nm 远紫外光谱下限的 SP170 和 SP175 两套参考蛋白质圆二色光谱体系，其中 SP175 体系(图 2)，含有 72 个不同 CATH 数据库分类号的参考蛋白质。SP175 体系的蛋白质数据库将在 DICHROWEB 中心发表 (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>)，并将备份于蛋白质圆二色数据库(PCDDB)中 (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk>)。SP175 参考体系主要由球蛋白组成，对纤维蛋白及多肽的二级结构预测效果较差。随着圆二色光谱 SP170 及 SP175 参考蛋白质体系的建立，要求有新的拟合程序与之相适用。Jonathan 等改编了 SELCON3 程序，产生新的版本，取名为 SELMAT3，它克服了 SELCON3 程序最大参考蛋白质数不超过 60 的缺点，并且采用 MATLAB 数学软件来实现运算过程。SELMAT3 对 SP175 参考体系对富含 α -螺旋结构的蛋白结构拟合效果较好。他们采用同步局部最小二乘法(SIMPLS)及神经网络等算法，利用主成分分析方法(PCA)优化神经网络的输入层与训练模式，利用 MATLAB 数学软件实现运算过程，产生了 SIMPLS-NN 程序，对富含 β -折叠结构蛋白的拟合效果较好^[35]。对 SP170 参考体系的拟合计算效果较差，有待进一步发展适合 SP170 参考体系的拟合算法。

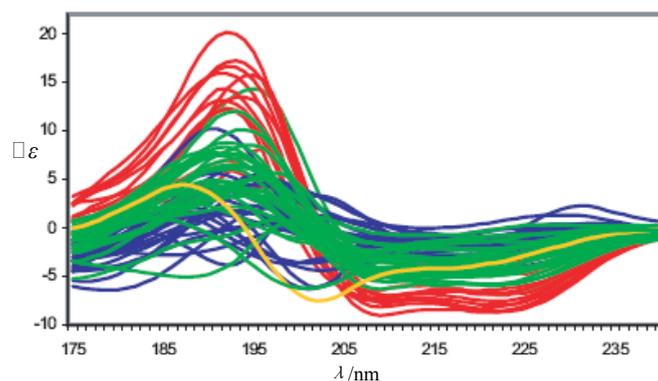


图2 SP175参考蛋白库CD光谱^[34]

Fig. 2 CD Spectra of all component proteins in the SP175 database^[34]

2.4 远紫外 CD 预测二级结构存在的问题

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。CD 已经成为研究溶液中蛋白质二级结构的强有力工具，越来越广泛地应用于蛋白质二级结构的预测，然而远紫外 CD 光谱预测蛋白质二级结构仍然存在一些不足之处。

膜蛋白是近年来分子生物学的研究热点，膜蛋白是一类具有晶体类似结构的镶嵌于细胞膜上的蛋白，到目前为止，仅有为数不多的膜蛋白结构得到确认。研究表明，膜蛋白紫外电子光谱跃迁受到周围环境介电常数的影响，其原因可能是由于溶剂影响了电子由基态跃迁到激发态 ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$) 的跃迁能量。不同于溶液环境中的蛋白质，膜蛋白镶嵌于疏水的脂质环境之中，因此，膜蛋白紫外 CD 光谱可能跟溶液状态下的 CD 信号有所区别。Wallace 等研究表明^[36]，以现有的未包括膜蛋白的参考蛋白体系，采用 SELCON3、CONTIN 及 CDSSTR 等拟合运算程序预测具有富含 α -螺旋及 β -折叠的膜蛋白，其结果与溶液状态的蛋白 CD 光谱有差别，特别在 190nm 后尤为明显；并且溶液状态的 CD 光谱拟合蛋白结构结果与由 DSSP 方法计算的膜蛋白晶体二级结构有差别。所以他们认为，现有的溶液参考蛋白体系不适合于 CD 拟合预测膜蛋白二级结构，提倡建立新的含有膜蛋白的参考蛋白体系。

在结构多变性方面，蛋白质结构丰富多样，CD 光谱方法将蛋白质结构分为 4~5 个二级结构元件貌似有点粗糙；螺旋的长度对 $[\theta]$ 值有一定的影响，这给不同螺旋长度的蛋白质数据拟合结果带来较大的误差， β -折叠的 $[\theta]$ 值与其链长及链的数目有关，并受环境影响比较大，在 CD 光谱预测蛋白质二级结构的方法中可能会带来比较大的误差。另外，在侧链基团 CD 吸收影响方面，由于二硫键及芳香氨基酸在远紫外 CD 光谱区也有不同强度的 CD 峰，蛋白质的远紫外 CD 光谱是包括肽键、芳香氨基酸及二硫键在内的 $[\theta]$ 值贡献的加和，这对以肽键电子跃迁产生 CD 光谱为主要依据的远紫外 CD 光谱拟合预测蛋白质二级结构的方法产生干扰，有时甚至产生错误的结果。因此，在采用参考蛋白拟合预测未知蛋白时，应该先尽可能的收集未知蛋白包括其它谱学在内的相关信息，谨慎地采用相似结构的参考蛋白拟合预测其二级结构。

3 蛋白质近紫外 CD 表征三级结构信息

蛋白质中芳香氨基酸残基，如色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)及二硫键处于不对称微环境时，在近紫外区 250~320nm，表现出 CD 信号^[37]。研究表明：色氨酸在 290 及 305nm 处有精细的特征 CD 峰；酪氨酸在 275nm 及 282nm 有 CD 峰；苯丙氨酸在 255、260 及 270 nm 有弱的但比较尖锐的峰带；

另外芳香氨基酸残基的在远紫外光谱区也有 CD 信号；二硫键的变化信息反映在整个近紫外 CD 谱上。实际的近紫外 CD 光谱形状与大小受蛋白质中芳香氨基酸的种类、所处环境（包括氢键、极性基团及极化率等）及空间位置结构（空间位置小于 1nm 的基团形成偶极子，虽然这对 CD 光谱的贡献不是很明显）的影响。近紫外 CD 光谱可作为一种灵敏的光谱探针，反映 Trp、Tyr 和 Phe 及二硫键所处微环境的扰动，能应用于研究蛋白质三级结构的精细变化。冯永君等^[38]为了弄清火菇素蛋白的结构与功能的关系并揭示抗癌机理，研究了火菇素的远紫外圆二色光谱，测定了其在 245~320nm 的近紫外 CD 光谱，发现二硫键和芳香氨基酸对 CD 光谱有较大的贡献，在 268nm 处的 CD 峰是苯丙氨酸的贡献，酪氨酸的峰值在 275nm 左右，因火菇素不含色氨酸故在 290~310 没有峰值。总的来说，在 250~280nm 之间，由于芳香氨基酸残基的侧链的谱峰常因微区特征的不同而改变，不同谱峰之间可能产生重叠。

目前为止，还没有系统的理论揭示蛋白质近紫外 CD 光谱与其三级结构之间的关系，但是，研究者在这方面作了不少尝试。Freskgard 等^[39]通过直接位点移除的办法，考察了芳基侧链对人碳酸酐酶蛋白质近紫外 CD 光谱的影响，Woody 等^[40]用同样的方法，考察了芳基侧链对牛核糖核酸酶的 CD 光谱的影响。近紫外 CD 光谱可以作为反映蛋白质三级结构变化的很有价值的指纹图谱，Krell 等^[41]研究了来自 *Streptomyces coelicolor* 的野生型与突变型 dehydroquinase 的远紫外与近紫外 CD 光谱，结果表明，野生型与突变型 dehydroquinase 的远紫外 CD 光谱几乎没有发生变化，也即二级结构没有发生明显变化，而其近紫外 CD 光谱却发生较为明显的变化，也即较之二级结构，突变型 dehydroquinase 的三级结构可能发生了较为明显变化（图3）。

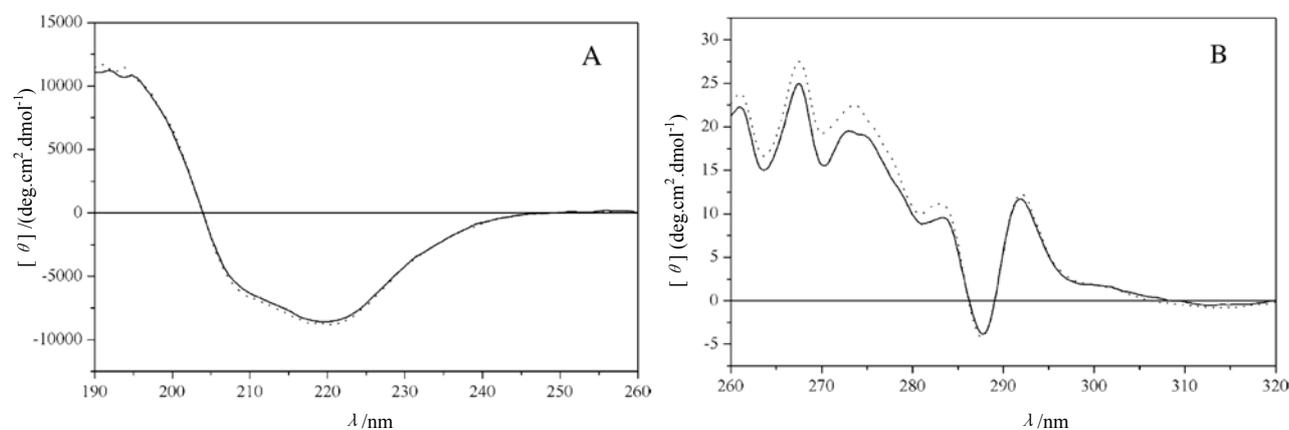


图3 链霉菌 *S.coelicolor* 野生型和突变型(R23Q)Dehydroquinase II CD 光谱

Fig.3 CD spectra of wild type and mutant (R23Q) type II dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor*

A-远紫外 CD, B-近紫外 CD, 实线表示野生型, 点线表示突变型

4 展望

综上所述，圆二色是研究溶液中蛋白质构象的一种快速、简单、较准确的方法，远紫外 CD 数据能快速地计算出溶液中蛋白质的二级结构；近紫外 CD 光谱可灵敏地反映出芳香氨基酸残基、二硫键的微环境变化，蕴含着丰富的蛋白质三级结构信息。随着现代分析仪器的飞速发展，高压液相色谱、停流技术、电化学及荧光等附加装置与 CD 光谱仪器联用技术的应用，CD 已经广泛地用于了解蛋白质—配体的相互作用，监测蛋白质分子在外界条件诱导下发生的结构变化，探索蛋白质折叠、失活过程中的热力学与动力学等多方面的信息。虽然紫外圆二色光谱预测蛋白质结构还存在着参考蛋白体系及计算算法有

待进一步完善之处，但随着人们对蛋白质 CD 理解的深入及 CD 光谱技术的进一步发展，其必将在蛋白质研究领域发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] R Mestel. *Sci.*, 1996, 273: 184~189.
- [2] N J Greenfield, G D Fasman. *Biochem.*, 1969, 8: 4108~4116.
- [3] Y H Chen, J T Yang. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 1971, 44(6): 1285~1291.
- [4] C T Chang, Wu CS, Yang JT. *Anal. Biochem.*, 1978, 91(1): 13~31.
- [5] S Brahm, J Brahm. *J Mol Biol.*, 1980, 138(2): 149~178.
- [6] W C Jr Johnson. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1988, 17: 145~166.
- [7] N J Greenfield. *Anal. Biochem.*, 1996, 235: 1~10.
- [8] N Sreerama, R W Woody. *Anal. Biochem.*, 2000, 287: 252~260.
- [9] P McPhie. *Anal. Biochem.*, 2001, 293: 109~119.
- [10] J M Andrew, W Frank. *Spectroscopy*, 2005, 19: 43~51.
- [11] M Legrand, M J Rougier 著; 陈荣峰等译, 旋光谱和圆二色光谱, 开封: 河南大学出版社, 1990: 10~30.
- [12] Sreerama N, Woody RW. *Methods Enzymol.*, 2004, 383: 318~351.
- [13] DAVID MR, JONATHAN DH. *Chirality*, 2004, 16: 234~243.
- [14] 沈琼, 黄滨, 邵嘉亮. *中山大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(4): 62~64.
- [15] S M Kelly, T J Jess, N C Price. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2005, 1751 (2): 119~139.
- [16] J D Morrisett, J S David, H J Pownall. *Biochem.*, 1973, 12: 1290~1299.
- [17] A J Adler, N J Greenfield, G D Fasman. *Methods Enzymol.*, 1973, 27: 675~735.
- [18] B Dalmas, W H Bannister. *Anal. Biochem.*, 1995, 225: 39~48.
- [19] N Sreerama, S Y Venyaminov, R W Woody. *Anal. Biochem.*, 2000, 287: 243~251.
- [20] J P Jr Hennessey, W C Jr Johnson. *Biochem.*, 1981, 20: 1085~1094.
- [21] P Pancoska, E Bitto, V Janota, et al. *Protein Sci.*, 1995, 4: 1384~1401.
- [22] N Sreerama, S Y Venyaminov, Woody RW. *Protein Sci.*, 1999, 8: 370~380.
- [23] W J Robert. *Bioinformatics*, 2005, 21: 4230~4238.
- [24] S W Provencher, J E Glockner. *Biochemistry*. 1981, 20: 33~37.
- [25] I H M Van Stokkum, H J W Spoelder, M Bloemendal, et al. *Anal. Biochem.*, 1990, 191: 110~118.
- [28] P Manavalan, W C Jr Johnson. *Anal. Biochem.*, 1987, 167: 76~85.
- [29] A.Perczel, Park K, G D Fasman. *Anal. Biochem.*, 1992, 203: 83~93.
- [30] M A. Andrade, P Chacón, J J Merelo, et al. *Protein Eng.*, 1993, 6: 383~390.
- [29] N Sreerama, R W Woody. *Anal. Biochem.*, 1993, 209: 32~ 44.
- [30] W C Johnson. *Proteins: Str. Func. Genet.*, 1999, 35: 307~312.
- [31] 沈星灿, 梁宏, 何锡文. *分析化学*, 2004, 32: 388~394.
- [32] N Sreerama, R W Woody. *Methods Enzymol.*, 2004, 383: 318~351.

- [33] K Matsuo, T Fukuyama. *J. Electron Spectros Relat Phenom.*, 2005, 1023~1025.
- [34] J G Lees, A J Miles, F Wien, et al. *Bioinformatics*, 2006, 22: 1955~1962.
- [35] G L Jonathan, J M Andrew, W J Robert. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 507~517.
- [36] B A Wallace, J G Lees, A J W Orry. *Protein Sci.*, 2003, 12: 875~884.
- [37] S M Kelly, N C Price. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1338:161~185.
- [38] 冯永君, 张长铠, 陈雅丽. *化学学报*, 2000, 58: 816~820.
- [39] P O Freskgard, L G Martensson, P Jonasson. *Biochemistry*, 1994, 33: 14281~14288.
- [40] A Y Woody, R W Woody. *Biopolymers*, 2003, 72: 500~513.
- [41] T Krell, M J Horsburgh, A J Cooper. *Biol. Chem.*, 1996, 271: 24492~24497.

第一作者:



黄汉昌

1975年4月生于广东省紫金县

2006年获得天津大学生物化工硕士学位

现系北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室助理研究员

从事蛋白质结构化学与功能, 生物活性物质分离工程研究。

E-mail: hanchang@ygi.edu.cn

通讯联系人



姜招峰

1995年获白求恩医科大学医学博士学位

现系北京联合大学教授, 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室主任。

从事神经生物化学及相关生物活性物质研究

E-mail: zhaofeng@buu.com.cn