

文章编号:1001-9014(2004)03-0213-04

用二维相关红外光谱研究蛋白质分子的热动力学过程

袁波, 赵海鹰, 黄梅珍, 窦晓鸣

(上海交通大学物理系分子与光子学实验室, 上海 200240)

摘要:利用傅立叶变化红外(FT-IR)二维样本和波数相关光谱研究了水溶液中牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)的热动力学过程. 二维样本相关分析的结果给出了牛血清白蛋白随温度变化的趋势, 表明牛血清白蛋白剧烈的结构变化开始于66℃; 而二维波数相关分析提供了在升温过程中牛血清白蛋白结构上变化和结构变化次序的细节. 研究显示了二维相关光谱在蛋白质热变性分析中的重大作用.

关键词:FT-IR; 热动力学; 二维相关分析; 牛血清白蛋白

中图分类号:0657.7 **文献标识码:**A

STUDIES ON THERMAL DYNAMICS OF PROTEIN BY TWO-DIMENSIONAL CORRELATION INFRARED SPECTROSCOPY

YUAN Bo, ZHAO Hai-Ying, HUANG Mei-Zhen, DOU Xiao-Ming

(Molecular and Photonics Lab, Physical Department, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Sample-sample (s-s) and wavenumber-wavenumber (w-w) two-dimensional (2D) correlation analysis of Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra were employed to investigate the thermal dynamics of bovine serum albumin (BSA) in the aqueous solution. S-s 2D correlation spectra show the temperature profile of BSA, which indicates that the drastic variations in BSA structure starts at 66 °C. However, w-w 2D correlation spectra reveal the variations in the structure of BSA and their orders of variation in the process of temperature elevation. The study demonstrates the key roles of 2D correlation spectra in the analysis of thermal dynamics of protein.

Key words: FT-IR; thermal dynamics; two-dimensional correlation analysis; Bovine serum albumin

引言

广义二维相关光谱(Generalized two-dimensional correlation spectroscopy)具有高分辨率、能够研究分子间和分子内相互作用以及分析谱带强度变化次序等优点^[1], 它已被广泛地应用, 特别在对复杂分子(如: 聚合物、蛋白质等)的研究中发挥着巨大的作用^[2,3].

二维样本相关光谱(Sample-sample 2D correlation spectroscopy)是Šašić提出的一种新的二维相关光谱形式^[4], 它是通常意义上的二维相关光谱的补充. 与通常的二维相关光谱相比较, 它研究的不是谱带之间的相关性, 而是不同光谱(样本)之间的相关性, 所以也称通常的二维相关光谱为二维波数(或波长)相关光谱. 二维样本相关光谱能够提供光谱

变化随外部扰动变化趋势的信息, 所以对于解析动力学过程很有帮助^[4].

蛋白质分子是非常重要的生物分子, 对于其热动力学特性的研究, 通常采用热分析方法, 比如: DSC和DTA^[5,6]. 振动光谱对于蛋白质的结构和动力学研究也是非常有效的, 尤其将二维相关分析应用到其光谱分析当中, 能够从酰胺谱带中分辨不同的二级结构、分析二级结构之间变化的相关性和判别结构变化次序^[3,7,8]. 在此, 我们同时使用二维波数(或波长)和样本相关光谱对牛血清白蛋白(Bovine serum albumin)的热变性过程的进行了详细研究.

1 实验部分

1.1 样品配置和测量

收稿日期: 2002-12-26, 修回日期: 2003-09-11

Received date: 2002-12-16, revised date: 2003-09-11

作者简介: 袁波, 男, (1978-), 江西萍乡人, 博士研究生, 研究方向为光谱分析和光谱仪器.

具有 99% 纯度的牛血清白蛋白为 Sigma Chemical Co. (USA) 的产品, 纯净水由 Ultrapure Water System Model CPW-101 (Advantec, Japan) 净化而得. 牛血清白蛋白溶解到纯净水中, 配成浓度为 5wt% 的溶液 ($pH=6.8$). 进行光谱测量时, 溶液被放入一特定容器中 (Model HC-32 Heated-Cooled Cell, Thermal Nicolet Co.), 该容器能够通过循环水控制待测对象的温度, 精确度可达 ± 0.2 °C. 在 26 °C ~ 90 °C 的温度范围内, 每隔 2 °C, 每一个温度下用 Nicolet Magna 760 傅立叶红外光谱仪 (MCT 探测器) 测量液体的红外光谱, 分辨率为 2cm^{-1} .

1.2 数据处理

软件 Grams (Thermo Galactic Co.) 被用于光谱数据预处理和将光谱数据转化为文本格式. 二维相关光谱的计算是在软件 Matlab 5.3 (MathWorks, Inc.) 下展开的, 相关程序是由其中一个作者 (袁波) 编写, 其具体算法可参照参考文献 [1] 和 [4].

2 结果与讨论

2.1 一维红外光谱分析

图 1 给出了 26 °C、42 °C、74 °C 和 90 °C 时的 BSA 水溶液的红外差减光谱. 我们将仅研究酰胺 I 区, 这也是以往的研究中大家经常采用的研究区域. 从图中可以观测到, 吸收峰 1652cm^{-1} 的强度随着温度的升高而下降; 达到某一温度后, 1682 和 1616cm^{-1} 处的吸收强度急剧增加; 此外, 随着温度的升高, 1645cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰. 各吸收峰的指

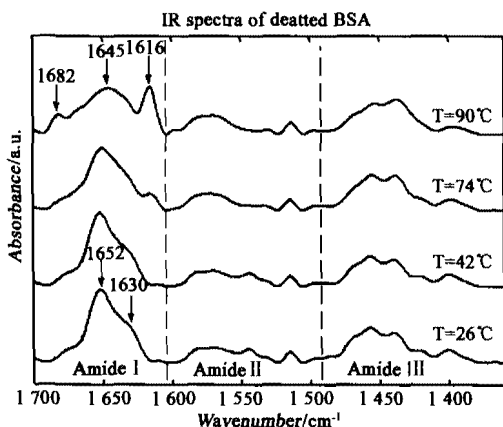


图 1 在温度为 26, 42, 74 和 90 °C 时, 水溶液中 BSA 在 $1700-1350\text{cm}^{-1}$ 的红外差减光谱 (将 BSA 水溶液的红外光谱减去相同温度下水的贡献)

Fig. 1 Representative difference IR spectra of BSA in aqueous solution (5.0wt%) at the temperature of 26, 42, 74 and 90 °C, by subtracting the contribution of water at the same temperature in the $1700-1350\text{cm}^{-1}$ region

认情况见表 1. 由此可见, 随着温度的升高, α -螺旋结构减少, 而 β -转角和侧链结构增加, 1645cm^{-1} 处吸收峰的出现说明无规卷曲结构的形成.

表 1 一维和二维相关光谱上牛血清蛋白的红外吸收峰在 $1700-1600\text{cm}^{-1}$ 的指认情况

Table 1 The assignments of IR bands of the BSA in aqueous solution from the one-dimensional spectra and two-dimensional correlation spectra in the $1700-1600\text{cm}^{-1}$ region

一维光谱	峰的位置 (波数 cm^{-1})		指认
	二维波数相关光谱 (26 ~ 66 °C)	二维波数相关光谱 (68 ~ 90 °C)	
1682	1683, 1676, 1667	1684, 1669, 1661	β -转角
1652	1655	1653, 1658	β -转角或 β -股
1645	1645	1650	α -螺旋
1630	1633		无规卷曲
1616	1616	1616, 1612, 1618	伸展链
			侧链

2.2 一维红外光谱分析

为了解析水溶液中 BSA 热动力学过程, 我们首先对其光谱进行二维样本相关性分析. 光谱依照温度从低到高的次序按列排列成矩阵形式, 在计算相关光谱前, 依次对光谱矩阵按样本方向进行了平均标准化和中心化 [4].

图 2a 为同步二维红外样本相关光谱的三维表示图. 它非常清楚的显示样本随温度的变化经历了两个阶段: 在区域 (26 ~ 66 °C, 26 ~ 66 °C), 同步光谱呈现为一个平面, 这说明从 26 °C 开始加热到 66 °C 水溶液中的蛋白质几乎不变化; 在区域 (66 ~ 90 °C, 66 ~ 90 °C), 同步光谱近似为一陡峭的斜面, 并且在 (90 °C, 90 °C) 达到最大值, 这些表明在 66 °C 左右, 样本开始发生变化, 并且越来越剧烈, 这种剧烈变化在大约 80 °C 后变得缓和; 同步光谱的最小值在交叉区域 (26 ~ 66 °C, 66 ~ 90 °C), 同步光谱在这一区域近似为一下降的斜面, 这说明随着温度的升高, 样本之间的差别越来越大. 图 2b 是图 2a 的剖面光谱, 从中可以更加清楚地观察到蛋白质结构的剧烈变化发生在温度 66 ~ 80 °C 之间.

异步二维红外样本相关光谱显现出比较大的噪声, 很难直观地从中获取有用的信息, 所以在此我们没有给出其结果.

2.3 二维红外波数相关光谱分析

根据同步二维样本相关光谱探测到的水溶液中 BSA 的变性点, 我们分别在 26 ~ 66 °C 和 68 ~ 90 °C 两个温度区间展开二维波数相关分析. 为了便于解

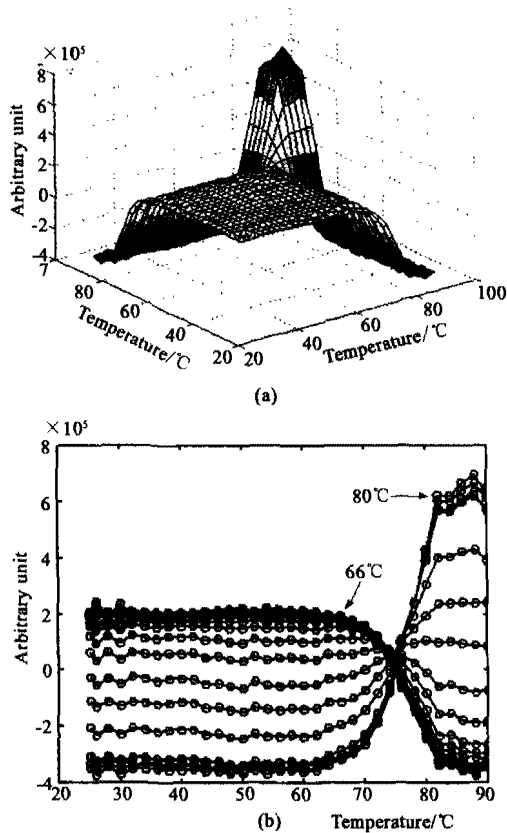


图2 (a) 在 $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ 区间, 从水溶液中 BSA 在 $26\text{--}90^\circ\text{C}$ 的红外光谱获得的同步二维样本相关光谱的三维表示图 (b) 图 2(a) 的剖面光谱

Fig. 2 (a) Three-dimension (3D) presentation of synchronous sample-sample 2D correlation spectra generated from temperature-dependent ($26\text{--}90^\circ\text{C}$) difference IR spectra of BSA in aqueous solution in the spectral region of $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$. (b) slice spectra of the 3D presentation shown in Fig. 2(a)

析, 二维波数相关光谱用等高线图表示, 其中 a 为同步相关光谱, b 为异步相关光谱. 在谱图中, 虚线 (---) 表示负峰, 实线 (—) 表示正峰, 点划线 (-.-) 为对角线. 谱图中各峰的指认情况如表 1 所示.

图 3a 是 $26\text{--}66^\circ\text{C}$ 温度区间的同步波数相关光谱, 它在对角线上 1633 、 1655 和 1683 cm^{-1} 处有 3 个自相关峰, 说明它们的吸收强度随温度变化比较显著, 这 3 个吸收峰相互间的正交叉峰表明它们的强度随温度的升高而同向变化. 光谱中的负交叉峰表明, 随着温度升高, 1616 和 1667 cm^{-1} 的强度变化方向与 1633 、 1655 和 1683 cm^{-1} 的强度变化方向相反.

图 3b 是同温度区间的异步波数相关光谱. 根据 Noda 阐述的二维相关光谱谱带变化次序的判定规则^[1], 我们获得在 $26\text{--}66^\circ\text{C}$ 温度区间随着温度的升高各谱带吸收峰强度 (或者蛋白结构) 变化的先后

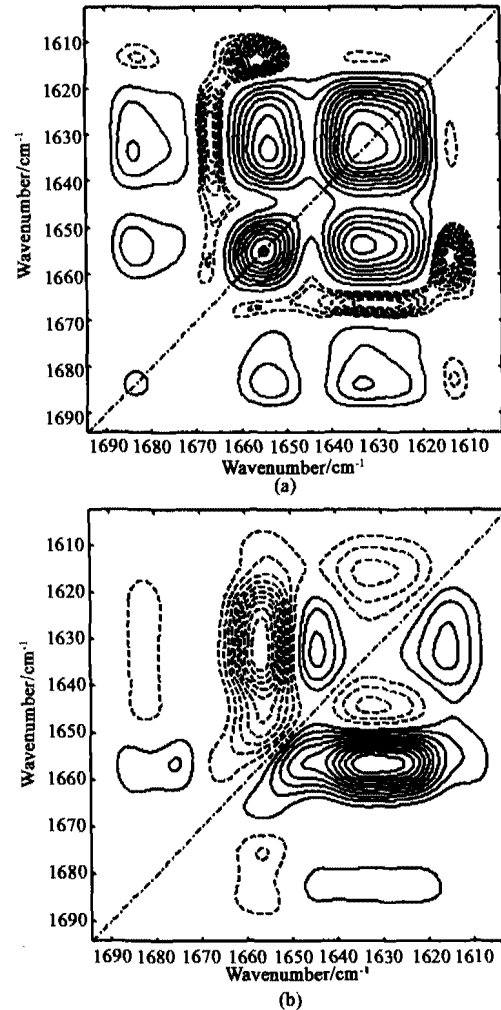


图3 在 $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ 区间, 由 $26\text{--}66^\circ\text{C}$ 的血清白蛋白溶液红外差减光谱计算而来的同步 (a) 和异步 (b) 二维波数相关光谱

Fig. 3 Synchronous (a) and asynchronous (b) wavenumber-wavenumber 2D correlation spectra constructed from temperature-dependent ($26\text{--}66^\circ\text{C}$) difference IR spectra of BSA in aqueous solution in the spectral region of $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$

顺序为:

伸展链 (1633 cm^{-1}) > 侧链 (1616 cm^{-1})、 α -螺旋 (1655 cm^{-1})、 β -转角 (1683 cm^{-1})

图 4a 是 $68\text{--}90^\circ\text{C}$ 温度区间的同步波数相关光谱. 它在对角线上有 3 个吸收峰 1616 、 1653 和 1684 cm^{-1} , 与图 3a 相比较, 1633 cm^{-1} 的强度随温度的变化变得非常微小, 而 1616 cm^{-1} 的强度随温度的变化变得显著, 这说明在高温时侧链结构随温度的变化比较剧烈. 1616 cm^{-1} 与 1669 和 1684 cm^{-1} 间的正交叉峰表明在升温过程中, 它们之间强度变化方向是相同的; 而 1653 cm^{-1} 与 1616 、 1669 和 1684 cm^{-1} 之间的负交叉峰表明其变化方向是相反的.

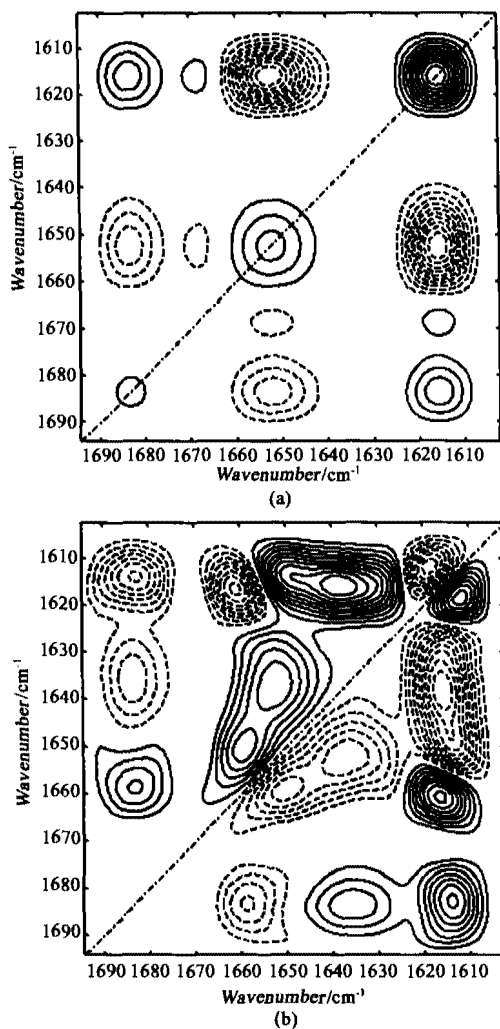


图4 在 $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$ 区间,由 $68\sim 90^\circ\text{C}$ 的血清白蛋白溶液红外差减光谱计算而来的同步(a)和异步(b)二维波数相关光谱

Fig.4 Synchronous (a) and asynchronous (b) wavenumber-wavenumber 2D correlation spectra constructed from temperature-dependent($68\sim 90^\circ\text{C}$) difference IR spectra of BSA in aqueous solution in the spectral region of $1700\text{--}1600\text{cm}^{-1}$

图4b是同温度区间的异步波数相关光谱.与图3b相似,我们获得在 $68\sim 90^\circ\text{C}$ 之间随着温度升高各吸收峰变化次序为:

β -转角 或 β -股(1661 cm^{-1}) > α -螺旋(1658 cm^{-1})、侧链(1616 cm^{-1}) > β -转角(1684 cm^{-1})、无规卷曲(1650 cm^{-1})

它与 $26\sim 66^\circ\text{C}$ 区间各结构的变化次序完全不同,主要反映在 α -螺旋和侧链结构变化发生在 β -转角(1684 cm^{-1})结构变化之前.

3 结论

二维样本相关光谱和二维波数(或波长)相关光谱是互补的两种二维相关光谱:前者通过分析样本之间的相关性,解析出样本随外部扰动的变化趋势;而后者通过分析波数(或波长)之间的相关性,显示光谱变化特征,提供谱带强度随外部扰动变化和变化次序的信息.

借助二维样本和波数相关光谱,对热变过程中BSA水溶液的红外光谱进行了研究.二维样本相关分析表明,在升温过程中,BSA重大结构变化开始于 66°C ;而在 $26\sim 66^\circ\text{C}$ 和 $68\sim 90^\circ\text{C}$ 之间的二维波数相关分析显示了BSA结构和不同结构变化次序在转折点前、后的差别.这些结果显示了二维样本和波数(波长)相关光谱在蛋白质研究中的巨大潜力.

REFERENCES

- [1] Noda I. Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman and other types of spectroscopy [J]. *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47** (9): 1329—1336.
- [2] REN Y, Murakami T, Nishioka T, et al. Two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy studies of compatible polymer blends; composition-dependent spectral variations of blends of atactic polystyrene and poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene ether) [J]. *J. Phys. Chem.*, 2000, **104** (4): 679—690.
- [3] WU Y Q, Yukihiro O. Two-dimensional infrared correlation spectroscopy studies of proteins in aqueous solutions [J]. *J. Infrared. Millim. Waves*, 2003, **22** (3): 161—168.
- [4] Šašić S, Muszynski A, Ozaki Y. A new possibility of the generalized two-dimensional correlation spectroscopy. 1. sample-sample correlation spectroscopy [J]. *J. Phys. Chem.*, 2000, **A104** (27): 6380—6387.
- [5] Ruegg M, Moor U, Blanc B. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate [J]. *J. Dairy Res.*, 1977, **44**: 509—520.
- [6] Itoh T, Wada Y, Nakanishi T. Differential thermal analysis of milk proteins [J]. *Agr. Biol. Chem.*, 1976, **40**: 1083—1086.
- [7] Hu X, Rodgers K R, Mukerji I, et al. New light on allostery: dynamic resonance Raman spectroscopy of hemoglobin kempsey [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**: 3462—3467.
- [8] Panick G, Winter R. Press-induced unfolding/refolding of Ribonuclease A: static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study [J]. *Biochemistry*, 2000, **39**: 1862—1869.