

牛血清白蛋白膜水合的红外光谱研究

章正廉 李士江

(中国科学院生物物理研究所)

有关生命体系中水的状态及构成生命的重要物质蛋白、核酸、类脂与水的相互作用,已成为重要的研究课题^[1,2]。蛋白质的水合系指蛋白质分子的荷电基团,极性基团以离子键、氢键等弱键形式与水分子之间相互作用,引起水分子状态及蛋白质分子构象的改变。对于蛋白质分子水合位点存在不同的观点。Pauling, L. J. (1945) 根据吸附等温线的实验结果认为各侧链基团为主要水合位点。而 McLaren, A. D. (1951), Mellon, E. F. (1948) 等则认为除侧链基团外主肽链也有水合效应。Susi, H. (1971) 和 Malcolm, B. R. (1970) 的红外实验结果证明蛋白质分子的水合主要发生在主肽链上。目前对此尚未取得一致的结论。

红外光谱是研究分子特征基团的有力工具,但是由于水分子的强红外吸收,掩盖了研究对象的重要信息,这使红外光谱应用在生物研究中受到限制。随着差光谱技术的发展,以及计算机对光谱数据处理的应用,红外光谱技术在蛋白质水合的研究中,有可能取得比以前较重要的进展。

本文报道我们用红外差光谱技术研究牛血清白蛋白的水合作用。

实验方法

将牛血清白蛋白(本所生化厂电泳纯)溶于重蒸水中,制成浓度为9%的溶液,滴于CaF₂窗片上,缓慢蒸发,以获得均匀的蛋白质薄膜。样品厚度控制在3300 cm⁻¹处透过率为30%。

将两个两端为CaF₂窗片密封池分别置于样品及参比光路中。参比端密封池窗片上无蛋

白样品,它是为抵偿样品池水蒸汽而设置的。将干燥氮气通过具有LiCl, MgCl₂饱和盐溶液密封容器及不同浓度的甘油溶液以获得不同相对湿度的氮气,再将此不同湿度的氮气通入样品、参比两端密封池,以3400 cm⁻¹透过率动力学曲线监测吸附的平衡过程。湿度达到平衡即进行测量。分别选用11%、33%、40%、50%、60%、70%、80%、90%等九种相对湿度,在同一蛋白膜上按相对湿度自小而大依次记录红外谱图。

红外分光光度计为Perkih-Elmer 580 B型,用Interdata 8116计算机进行差谱及数据处理。

结 果

分别在九种相对湿度下,在4000 cm⁻¹—1000 cm⁻¹波段测得牛血清白蛋白的红外透过谱。为使图谱清晰,图1仅为无水蛋白及在50%、90%相对湿度下所得结果。

4000 cm⁻¹—3700 cm⁻¹及2700 cm⁻¹—1800 cm⁻¹之间的背景透过率随相对湿度的增高而

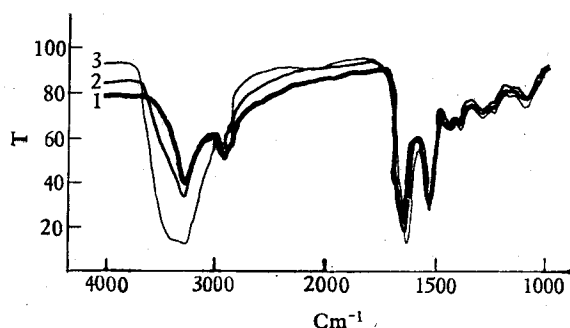


图1 不同相对湿度下牛血清白蛋白的红外光谱图

1——干蛋白; 2——相对湿度50%;
3——相对湿度90%

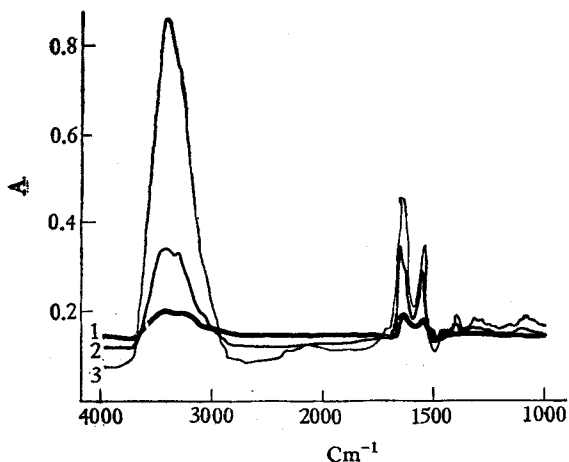


图2 不同相对湿度下牛血清白蛋白的差光谱
1——相对湿度 11% 2——相对湿度 50%
3——相对湿度 90%

增大。可能是因为折射系数的改变,或是样品的不均匀造成的^[2]。高波数的改变较低波数显著,可能是由于水合作用引起蛋白质分子的比体积的减小,使光散射及由此引起的光损失减弱,从而提高背景透过率。

本实验使用同一蛋白质膜依次在不同相对湿度下测量,因而消除了由于蛋白质含量不同及制膜技术可能造成的实验误差。将不同相对湿度下所得蛋白膜的图谱,与无水蛋白膜的图谱差减所得差谱,即反映不同水合程度所引起的变化。以 2997 cm^{-1} 的吸收峰高计算出差减因子,用 Spect 580 B 应用程序即可得到一系列差谱图。见图 2。

反映蛋白质红外光谱特征的主要是酰胺 A. B. I—VII 带。本实验着重研究酰胺 A. B. I. II 四个带在水合中的变化。

牛血清白蛋白的酰胺 A 及酰胺 B 分别为 3300 cm^{-1} 及 3067 cm^{-1} 。有关水合对这两个带的影响文献报道是不一致的^[4,5]。我们的实验在 90% 的相对湿度下得到 4 cm^{-1} 的位移。酰胺 B 带向低波数位移 5 cm^{-1} 。此两带的吸收强度亦随水合而增大(图 1)。

牛血清白蛋白的酰胺 I 带为 1665 cm^{-1} , 其主要贡献来源于 $\gamma_{\text{C=O}}(\text{s})$ 羰基团, 此外尚有 $\nu_{\text{CN}}(\text{s})$ 及 δ_{NH} 的影响。随水合程度增大未见

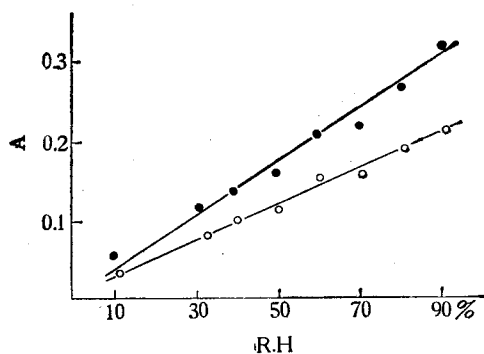


图3 牛血清白蛋白差光谱特征峰强度与相对湿度的关系
●——酰胺 I 带 ○——酰胺 II 带

此带峰位有显著位移,却得到向低波数方向加宽的结果,在相对湿度为 90% 时其半宽增加 12 cm^{-1} 。且在 1635 cm^{-1} 出现一肩峰(图 2)。酰胺 I 带的强度随水合作用呈显著线性增大(图 3)。

酰胺 II 带的吸收强度亦随水合线性增大(图 3),且峰值波数向高频端位移,由无水蛋白质的 1539 cm^{-1} 变成 90% 相对湿度下的 1548 cm^{-1} , 位移 9 cm^{-1} 。

1500 cm^{-1} 带随吸附水增多出现负峰。如果用曲线表示负峰的强度与相对湿度的关系,则发现此曲线与酰胺 II 带频率位移的曲线一致。频率位移愈大,负峰强度愈高。根据上述 1500 cm^{-1} 负峰的出现,可归因于酰胺 II 带向高波数位移造成的“微分效应”。为确认这一结论,我

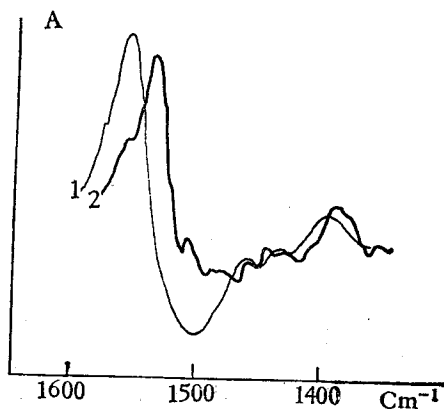


图4 不同相对湿度下牛血清白蛋白酰胺 II 带的频率位移

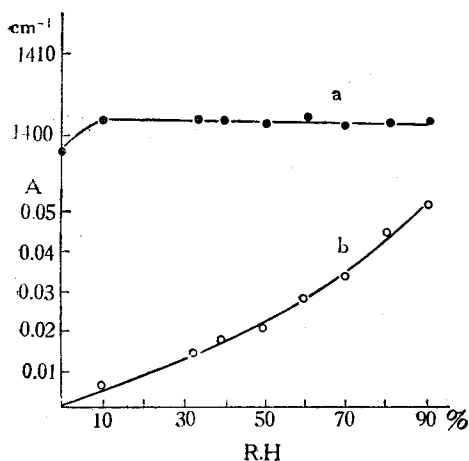


图 5 牛血清白蛋白膜 1398 cm^{-1} 带频率 (a) 强度 (b) 随水合的变化

们应用分区指令,将每个相对湿度下蛋白质谱,按照酰胺 II 带其位移数向低频方向移动相应的波数,再做其与无水蛋白质的差谱,这样处理后,1500 cm^{-1} 处负峰消失(图 4)。

1398 cm^{-1} 为 COO^- 的特征谱带,它随水合向高频位移,其强度亦随之增大(图 5)。

蛋白质水合对水的红外谱也产生影响。低水合时,OH 带的红移达 20 cm^{-1} (图 6)。

不同相对湿度下,差光谱的 3700 cm^{-1} —3000 cm^{-1} 波段的吸收主要是吸附水的贡献。用求积指令对此波段积分,并以此积分值与无水蛋白的积分值之比为纵坐标,相对湿度为横坐标作图,则得一与吸附等温线极为相似的 S 形曲线(图 7)。它可能为蛋白质中微量水的定量提供一个简便、快速的方法。

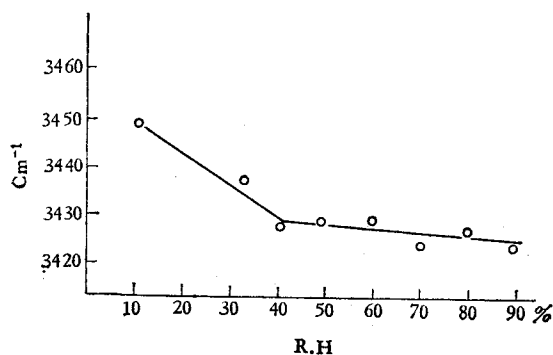


图 6 不同相对湿度下牛血清白蛋白吸附水的 OH 伸展推动频率位移

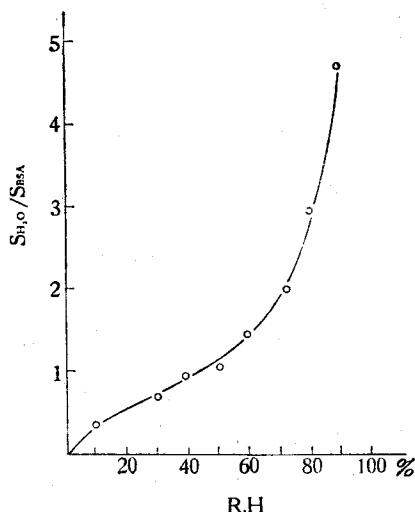


图 7 3700 cm^{-1} —3000 cm^{-1} 波段牛血清白蛋白差光谱与干蛋白光谱积分面积比与相对湿度的关系

讨 论

我们观察到牛血清白蛋白的酰胺基团的红外光谱随水合有明显变化。

吸附水的 OH 基团弯曲振动频率为 1645 cm^{-1} , 它叠加在以 1650 cm^{-1} 为中心的酰胺 I 带上, 这给结果的分析带来困难。谱带向低频方向加宽(半宽增大 12 cm^{-1}) 可以认为是 C=O 基团氢键键合及 OH 变形振动叠加的结果。至于酰胺 I 带强度增大的原因, 除要考虑 OH 吸收带的贡献外, 也不可忽略 C=O 伸展振动因水合而发生的改变。Broderson 在重水水合的实验中排除了吸附水吸收带在此波段的叠加, 却仍然观察到酰胺 I 带强度的增大^[6]。我们知道, 红外谱带的强度主要取决于化学键电荷分布的变化及瞬间偶极矩的大小。水合过程中 C=O 的氢键键合可能导致瞬间偶极矩的增大。Ventcka 等证明酰胺及苯胺中由于正反式结构的费米共振可导致 C=O 振动带强度的增大^[7]。蛋白质分子的水合首先是带电基团的水合, 它可能引起蛋白质分子的中介作用 (mesomerism), 形成下列两种结构之间的平衡:



此两种形式的共振即可能使酰胺 I 带的强度增大。与此同时还应该注意在 1650 cm^{-1} 附近有 NH_3^+ 的吸收带 (1650 cm^{-1} — 1600 cm^{-1})，水合可能使蛋白质分子展开，形成更多的 NH_3^+ 基团。上述多种原因可能促使酰胺 I 带强度增大，对此需做深入研究。

酰胺 II 带的蓝移似乎为蛋白质水合的普遍规律^[4,5,6]。Miyazawa, J. (1958) 提出酰胺 II 带中 40% 来源于 C—N 的伸展振动，60% 来源于 N—H 的弯曲振动。酰胺 II 带蓝移是 NH 与水分子形成的氢键导致 NH 弯曲振动的改变。而此带强度增大的原因可能与酰胺 I 带相似。

至于酰胺 A 带，目前看法不一致。Bendit 认为水合会引起其频率红移，强度增大^[8]。Buontempo 等则认为酰胺 A 带在水合中没有变化，把 3296 cm^{-1} 的出现归因于一种特殊状态的水——无定形冰的出现^[9]。我们认为后一种观点难以信服。按照每克蛋白质可以结合 0.3 g 左右非冻结水的概念，如果这些无定形冰就是非冰结水，则在相对湿度 85% 以下的水合蛋白中仅应该有 3296 cm^{-1} 的吸收带，而不应该出现 3400 cm^{-1} 带，因为在相对湿度 85% 以下每克蛋白的吸附水，不会超过 0.3 克，而我们的实验，在低相对湿度下却同时有 3400 cm^{-1} 与 3296 cm^{-1} 带的存在，这显然与无定形冰的结论是相矛盾的。

大部分红外光谱测试结果，倾向于肽链是主要水合位点。象牛血清白蛋白这样易溶于水，具有大量侧链极性基团的蛋白质在吸附水时，其侧链基团不发生或很少发生水合是难以理解的。Oakes 在核磁共振的工作中就测得各侧链基团的水合值^[10]。只是由于在红外光谱中 NH_3^+

COO^- , COOH , OH , $\text{C}=\text{O}$ 等极性基团的特征谱带被酰胺带及吸附水的 OH 带所掩盖，故难以得到侧链极性基团水合的信息。但我们可以从 1398 cm^{-1} 的蓝移及强度的改变中得出 COO^- 基团参与水合的结论，而且这种水合主要发生在低湿度下，这与 Colin 等应用吸附等温线法证明牛血清白蛋白的离子基团水合的结果是吻合的^[11]。可以预期，对于酰胺 I、II 带强度增加原因的深入分析将对离子基团及侧链基团的水合提供更多的证据。

至于蛋白质对水的影响在相对湿度低于 40% 的低水合阶段，OH 伸展振动的红移比较显著。低水合时荷电离子基团及强极性基团的水合占优势，它们对水分子的作用较强，因而对水分子的 OH 伸展振动频率向低波数位移的影响也比较强烈。

本工作过程中得到张极震、陈润生等同志的帮助，特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Cooke, R. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 95, 1974.
- [2] Hopfinger, A. J.: *Intermolecular interaction and biological Organization*, 113, 1977.
- [3] Careri, G. et al., *Biopolymers*, 18, 1187, 1979.
- [4] Riiegg, M.: *BBA*, 400, 17, 1975.
- [5] Susi, H.: *Biopolymers*, 10, 1597, 1971.
- [6] Brodersen, R. et al.: *Acta Chem. Scand.*, 27, 573, 1973.
- [7] Ventaka, V. C. et al.: *J. of mol. Spectrosc.*, 26, 444, 1968.
- [8] Bendit, E. G.: *Biopolymers*, 4, 539, 1966.
- [9] Buontempo, U. G.: *Biopolymers*, 11, 59, 1972.
- [10] Oakes, J.: *J. of Chem. Soc. Faraday trans.*, 1 (72) 217, 1976.
- [11] Colin, H.: *ibid.*, 2753, 1976.

[本文于 1981 年 6 月 16 日收到]

学术动态

瑞典 Pharmacia 公司在京举办聚焦层析讲座

1981 年 10 月中旬，瑞典 Pharmacia 公司生物物理所举办了为期两天的技术讲座和演示实验。Liz Hill 博士就新近发展的层析聚焦以及亲和层析作了讲解，并配合进行了演示实验。Thomas 先生就琼脂平板等电聚焦和以 Picol 作为一种新型密度梯度离心介质作

了讲解和演示。聚焦层析的原理较新，在京区尚属首次介绍，同时这种小型技术交流配合以演示实验对提高目前国内生化技术水平是有促进作用的。

(雷克健)