

不同相对湿度下的原胶原蛋白的红外光谱

钮择玲 叶国辉

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

作为重要的纤维状蛋白之一的胶原蛋白, 在动物体内有支持、连接和保护等多种功能, 这些功能均与胶原蛋白分子及超分子结构有关。业已证明, 胶原蛋白是由三股单螺旋肽链沿着单向排列或卷曲形成超螺旋的平行束构成, 这种结构的形成除决定于其氨基酸的组成外, 还与分布于螺旋内及螺旋间水分子的多少有关。用多种方法研究胶原蛋白与水相互作用的结果已有报道^[1-4], 但用红外光谱法研究胶原蛋白的结构单元——原胶原蛋白的工作目前尚未见到报道。胶原蛋白与原胶原蛋白在水中的溶解度是不同的, 因此探索它们与水分子之间相互作用的关系, 是个十分有趣的问题。本文研究了不同含水量的原胶原蛋白的红外光谱及其某些基团振动带的变化, 目的是探讨原胶原蛋白水合过程中的规律。

方 法

将酸溶性原胶原蛋白 (Sigma, No. C-3511, Lot. 43F-8035) 溶于 pH 4.3 的柠檬酸缓冲液中, 配制成浓度为 0.33% (w/v) 的溶液, 然后在冰箱中搅拌, 直至全部溶解。再将溶解了的样品液放入透析袋中, 在 5℃ 用重蒸水透析三天, 透析好的原胶原蛋白溶液滴到 CaF_2 红外窗片上, 每片 250 μl , 涂成约 $\phi 16\text{mm}$ 的均匀薄膜, 放入盛有 P_2O_5 的干燥器中, 备用。

干燥后的样品, 在室温条件下 (20℃ 左右) 放入饱和盐溶液气氛中, 相对湿度 (R.H.) 分别为 11%, 23%, 33%, 43%, 57%, 67%, 75%, 79%, 86% 和 92% 等。每种湿度平衡时间为 4 天, 然后移入测量池, 平衡 12 小时, 再进行测定。

用 PLE580B 型红外分光光度计进行红外吸收光谱测量, 测量池为封闭的盛有饱和盐溶液的不锈钢容器 (图 1)。

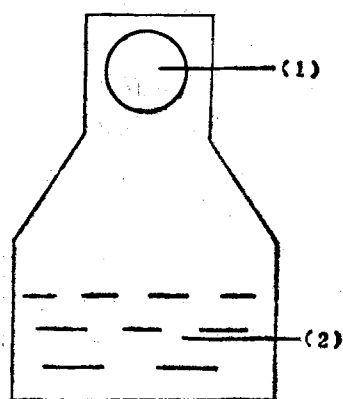


图 1 测量池

- (1) 装有可拆卸的红外窗片, 其中一片涂有样品膜, 另一片为空白, 密封用。
(2) 饱和盐溶液

参比池内为相应饱和盐溶液, 二片窗片均无样品, 只作为气氛补偿。

结果与讨论

分别在 11%, 23%, 33%, 43%, 57%, 67%, 75%, 79%, 86% 和 92% 等相对湿度下, 测量了吸附水的原胶原蛋白膜的红外吸收光谱, 并分别将其与干膜的红外光谱进行差减, 得到各自的差谱图。图 2 (a, b) 为 23% 相对湿度, 测量范围分别为 4000 cm^{-1} — 2500 cm^{-1} 和 1800 cm^{-1} — 1100 cm^{-1} 的测定结果。原胶原蛋白干膜的酰胺 A 带峰频为 3320 cm^{-1} , 与 Susi^[1] 报道的胶原蛋白的结果无差别。但其频率高于球蛋白及多肽的酰胺 A 带 20 cm^{-1} , 这可

的耦合,使频率红移。由于水合,酰胺 II 带的改变表现在频率位移(约 20 cm^{-1}),峰变窄(半宽由 65 cm^{-1} 变为 55 cm^{-1})。类似的频率蓝移及半宽变窄的现象在 CH 弯曲振动带(约在 1450 cm^{-1})也有表现,这符合 H 键能使基团的弯曲变形振动频率蓝移及峰变窄的一般规律。图 3(a, b) 是在 86% 相对湿度下测得的结果(测量范

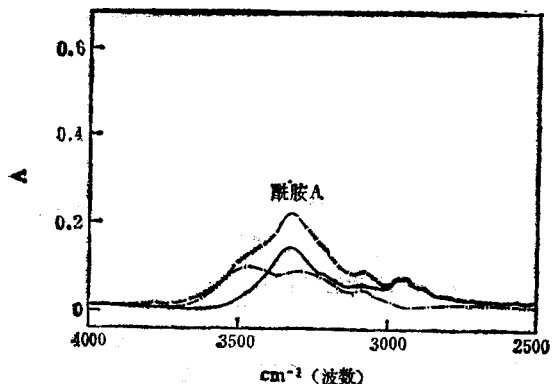


图 2(a) R. H. 为 23% 的原胶原蛋白膜的红外光谱(---)及与干膜(——)的差谱(-·-)

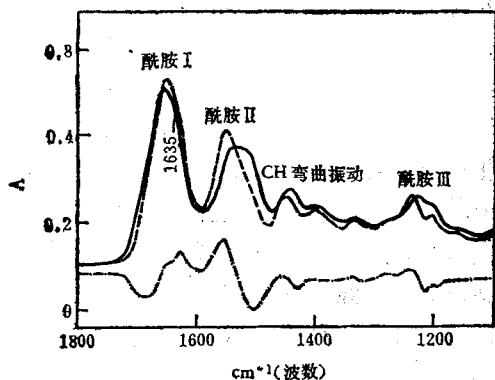


图 2(b) R. H. 为 23% 的原胶原蛋白膜的红外光谱(---)及与干膜(——)的差谱(-·-)

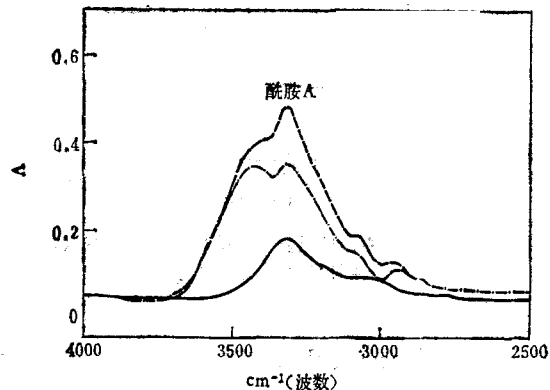


图 3(a) R. H. 为 86% 的原胶原蛋白膜的红外光谱(---)及与干膜(——)的差谱(-·-)

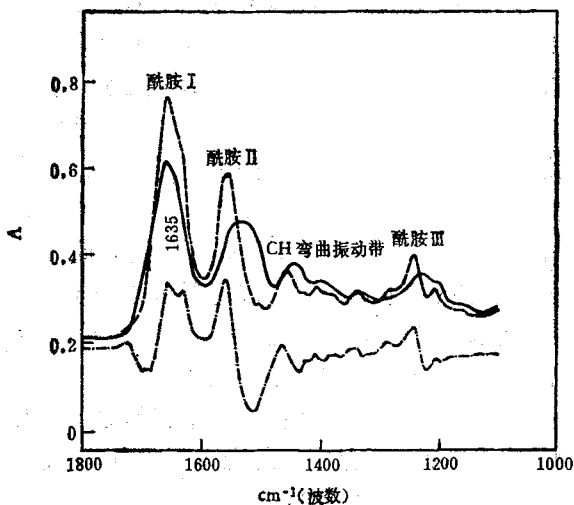


图 3(b) R. H. 为 86% 的原胶原蛋白膜的红外光谱(---)及与干膜(——)的差谱(-·-)

能是因为原胶原蛋白及胶原蛋白的 H 键强度均较弱所致,图 2(a) 中水合膜 A 带未因水合而发生频率的显著位移,然而其差谱却显示出 3460 cm^{-1} 及 3300 cm^{-1} 两个峰。 3460 cm^{-1} 显然是吸附水的 OH 伸展振动带,它比纯水中所测的峰频 3400 cm^{-1} 蓝移了 60 cm^{-1} ,至于 3300 cm^{-1} 带,可以有两种解释,或是由于水分子的 H 键键合导致酰胺 A 带的红移,或是反映了 H 键键合的 OH 振动带,我们倾向于后者。酰胺 I 带水合后波数红移 5 cm^{-1} ,且从图 2(b) 和图 3(b) 中可以看到酰胺 I 带的 1635 cm^{-1} 肩峰水合后增强,这一特点在差谱图中更为清楚。 1635 cm^{-1} 的肩峰在胶原蛋白中也有表现,究其原因不外乎 C=O 之间的耦合,或 C=O 周围环境的不同。水分子与 C=O 基团 H 键键合会影响 C=O 伸展振动频率,或影响 C=O 与 C=O 之间

围同图 2),与图 2 所观察到的各部位的变化相似,只是变化更为显著,特别引起注意的是各个带强度均增大,其原因一方面是因为水的 OH 带的叠加(3400 cm^{-1} 的 OH 伸展振动及 1650 cm^{-1} 处 OH 变形振动),另一方面也与各酰胺带受 H 键影响有关。

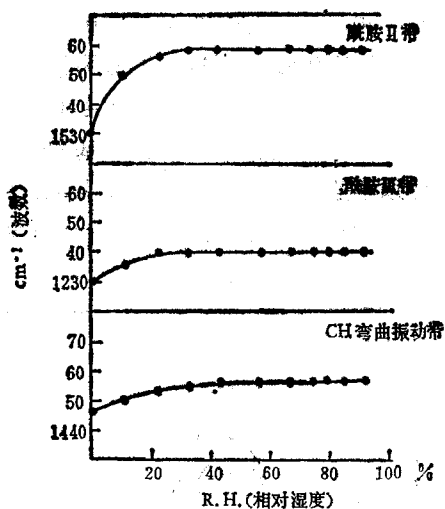


图4 原胶原蛋白膜的酰胺 II 带, III 带, CH 弯曲振动带随相对湿度的改变

图4所示酰胺 II 带, III 带及 CH 弯曲振动带的频率随不同水合程度的变化。酰胺 II 带在高于 23% 相对湿度时随水合增大变化渐缓,直至 33% 达到恒值。酰胺 II 带是由 CN 伸展振动与 NH 弯曲振动组成,低湿度范围内的频率急剧蓝移说明在水合初期阶段 NH 迅速与水分子结合,到 33% 即趋于饱和。酰胺 III 带亦有类似表现,这是因为它也是由同样的二种振动组成,只是各自的贡献不同而已。对于 CH 弯曲振动带在 R. H. 44% 后趋于恒值。此带随水合蓝移的现象, Susi 在胶原蛋白的水合实验中曾报道过^[4],然而这种看法并非无懈可击,首先,一般认为疏水基团不易水合,即使形成疏水键能否引起疏水基团振动频率有如此大的改变,值得怀疑。况且在红外光谱研究中,一般认为水合不影响 CH_2 , CH_3 的伸展振动带,所以常以它们为基准进行标准化处理后差减。这样就得出一个假设,即水合 H 键不会引起 CH 基团的伸展振动改变,而仅引起 CH 弯曲振动的改变,这种现象,需要进一步证明。其次为什么这种改变只发生在胶原蛋白及原胶原蛋白中,而在球蛋白中却没有观察到,它是否反映了纤维蛋白与球蛋白中 CH 的环境差异,这还是值得深入研究的问题。

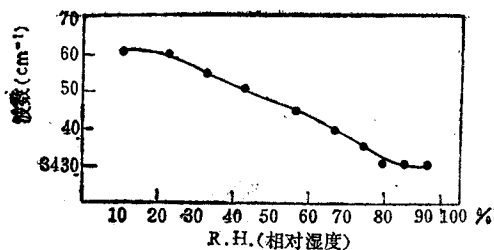


图5 不同相对湿度下原胶原蛋白膜吸附水的 OH 带的频率位移

图5说明差谱中 OH 带频率位移与 R. H. 的关系十分密切,类似的现象在本实验室的 BSA 及溶菌酶的水合研究中也曾看到^[5,6]。在 23% 的低相对湿度下 OH 的峰值减小不显著,但随水含量的继续增大而 OH 的峰值下降显著,当 R. H. 为 86% 以上时其趋于恒值,为 3430 cm^{-1} ,明显高于纯水的 OH 带,显然这一变化反映水合过程中水状态的改变。Ramachandran^[7] 等曾提出在胶原蛋白中单股螺旋之间形成水桥,相当于每三个残基有两个水分子,它们是形成三股螺旋结构不可分割的一部分,近似于 R. H. 为 25% 的吸附水量,本实验观察到 OH 位移的拐点,酰胺 II 带, III 带的频率蓝移的恒值点均在 23% 左右,这表明此时链间水合完成,即逐渐完成三股螺旋的结构。

总之,我们观察到原胶原蛋白的红外光谱酰胺 A 带, I 带, II 带, III 带及 CH 弯曲带随吸附水含量的改变与胶原蛋白的变化有相似的规律,证明其水合性质并不因分子的大小而有显著改变, R. H. 为 23% 时出现的各吸收带转折标志着单分子链间水合的完成。

参 考 文 献

- [1] Susi, H. et al.: *Biopolymers*, 10, 1597, 1971.
- [2] Bradbury, E. M.: *Discuss. Faraday Soc.*, 25, 173, 1958.
- [3] Zhang, J. Z. et al.: *Second International Conference on Water and Ions in Biological Systems*, 310, 1982.
- [4] Privalov, P. L.: *Biopolymers*, 9, 127, 1970.
- [5] Zhang Z. L. et al.: *Acta Biophysica Sinica*, 1, 286, 1985.
- [6] 章正廉等:《生物化学与生物物理进展》, 2, 33, 1982.
- [7] Ramachandran, G. N.: *Biopolymers*, 6, 1649, 1968.

[本文于 1986 年 4 月 24 日收到]