

利用红外光谱和窗口因子分析研究加热导致的牛血清白蛋白的二级结构变化

袁波, 严惠民

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 国家光学仪器工程技术研究中心, 杭州 310027)

摘要 用红外光谱和窗口因子分析(WFA)对加热导致的D₂O中牛血清白蛋白(BSA)的二级结构变化进行了研究. 常规光谱分析和WFA的结果表明, BSA的结构变化开始于56℃, 而二级结构的剧烈变化发生在68~82℃, 与 α -螺旋片断相连的短链变化发生的温度比其它二级结构变化的发生温度低10℃左右. 研究表明, WFA在解析溶液里蛋白质的温度相关红外光谱中起重大作用.

关键词 红外光谱; 窗口因子分析; 加热; 牛血清白蛋白; 二级结构

中图分类号 O657.7 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)12-2255-04

血清白蛋白是血液中一种非常重要的蛋白质, 人们已对其在各种环境下(如pH值、压力及活性剂等)的结构变化进行了深入研究^[1]. 在温度导致的溶液中牛血清白蛋白(BSA)的结构变化方面, 目前获得的结论是: 结构变化发生的温度范围与溶液的pH值相关^[2]; 结构和水合作用的剧烈变化仅发生在狭窄的温度区间^[3,4]; BSA的结构变化并不是简单的两相转化过程^[5,6]. 红外光谱是研究蛋白质二级结构和结构变化的有效工具. 为了从光谱中提取信息, 人们除了采用导数、去卷积及曲线拟合等常规分析法外^[2,6], 还采用回归分析及因子分析等化学计量学方法^[7]. 其中, 由Malinowski^[8,9]提出的窗口因子分析(WFA)可有效地研究渐进过程, 该法自提出后已在化学反应监测及色谱解析等方面得到了广泛应用^[10~14], 并针对其对噪声敏感的缺点已进行了不断地改进^[13,14]. 本文采用红外光谱和窗口因子分析研究了D₂O中BSA的热动力学过程, 获得了对加热导致的蛋白质二级结构变化的新信息, 结果显示, 窗口因子分析在解析溶液中蛋白质结构变化过程中存在巨大潜力.

1 实验部分

1.1 样品及配制

结晶BSA购自美国Reheis Chemical公司, 其它试剂购自美国Sigma公司, 纯净水通过Ultrapure Water System Model CPW-101(Advantec公司, 日本)净化得到. 利用Sogami等^[15]提出的方法对BSA进行脱脂纯化, 并用TOYOPEARL HW-55F(Tosoh公司, 日本)滤除BSA二聚体和多聚体. 将纯化的BSA在室温下溶于D₂O中, 配成质量分数为2.0%的溶液(用于光谱检测), 经测定其pD值为5.4.

1.2 光谱采集

将BSA溶液置于Model HC-32 Heated-Cooled Cell(Thermal Nicolet公司, 美国)中, 该容器通过循环水控制温度, 精度可达到 ± 0.2 ℃. 在26~90℃的温度范围内, 每隔2℃为一测定单元, 每个温度下用Nicolet Magna 760傅里叶变换红外光谱仪测量溶液的红外光谱, 光谱分辨率为2 cm⁻¹.

1.3 数据分析与处理

将软件OMNIC(Nicolet Co.)和Grams(Galactic Co.)分别用于红外光谱数据的获取和预处理. 首先, 在相同的温度下, 将溶液的红外光谱减去D₂O的红外光谱, 并扣除水蒸气对光谱的影响. 然后利用傅里叶自去卷积(Fourier self-deconvolution, FSD)增强BSA的红外谱带(半峰宽为19.8 cm⁻¹, 谱带

窄化因子为 1.8), 得到的光谱用于进一步分析. 利用 Matlab 7.0 (Mathworks, Inc.) 做进一步的光谱分析. 采用 Savitzky-Golay 法对光谱进行平滑和求导; 利用多个高斯峰对光谱进行曲线拟合, 其中峰数和峰位由对应的二阶导数光谱决定, 迭代结束时相关系数大于 0.999; 根据 Malinowski^[8,9] 提出的自动 WFA 算法编写了 Matlab 程序, 用于窗口因子分析.

窗口因子分析的基本原理参见文献[8], 窗口因子分析的具体步骤如下:

(1) 光谱数据用矩阵 $D_{m \times n}$ 表示 (m 代表波长或波数, n 代表样品), 并假设它包含了 p 个组分:

$$D = \sum_{i=1}^p D_i = \sum_{i=1}^p s_i c_i^T = SC^T \quad (1)$$

(2) 沿样品方向指定一个区域(该组分浓度完全位于该区域)为第 q 个组分的窗口, 将该区域的光谱从矩阵 D 中删除得子矩阵 D^0 , 对 D^0 实施奇异值分解 (Singular Value Decomposition):

$$D^0 = \sum_{i=1}^{p-1} s_i^0 c_i^{0T} = S^0 C^{0T} \quad (2)$$

(3) 可根据下面的窗口因子分析表达式求得第 q 个组分的光谱矩阵 X_q :

$$X_q = (I - S^0 C^{0T}) \cdot D \quad (3)$$

(4) 对光谱矩阵 X_q 实施奇异值分解, 第 1 个因子的分解结果即分别为第 q 个组分的光谱特征和浓度变化特征.

2 结果与讨论

2.1 D_2O 中 BSA 的 Amide I 谱带

Amide I 区对蛋白质的结构变化非常敏感, 图 1(A) 和 (B) 分别为 D_2O 中的 BSA 在 1690 ~ 1605 cm^{-1} 范围内的温度相关红外光谱和二阶导数光谱. 从图 1 中可以看出, 在加热到 70 $^{\circ}C$ 之前, Amide I 区主要被 1654 cm^{-1} 的强吸收峰占据, 该峰来源于 α -螺旋, 说明此时 BSA 的二级结构以 α -螺旋为主; 同时在 1629 cm^{-1} 处伴随出现一个肩峰, 以往的研究中通常将它指认为 β -片层, 但由于天然状态的 BSA 并不存在 β -片层, 因此, 将其指认为与 α -螺旋片段相连的短链^[6]. 此外, 在 1679 和 1610 cm^{-1} 处还存在两个弱吸收峰, 它们分别来源于 β -转角和侧链. 当加热到 70 $^{\circ}C$ 之后, 1654 cm^{-1} 的强度显著减弱, 并且分别在 1683 和 1615 cm^{-1} 处出现两个新的吸收峰, 它们均来源于 β -片层, 其中前者为反向平行 β -片层, 后者为分子间的 β -片层, 这说明加热导致了 BSA 中 α -螺旋的减少和 β -片层的增加的协同变化; 1645 cm^{-1} 处也出现了一个新吸收峰, 表明在高温下形成了无规卷曲.

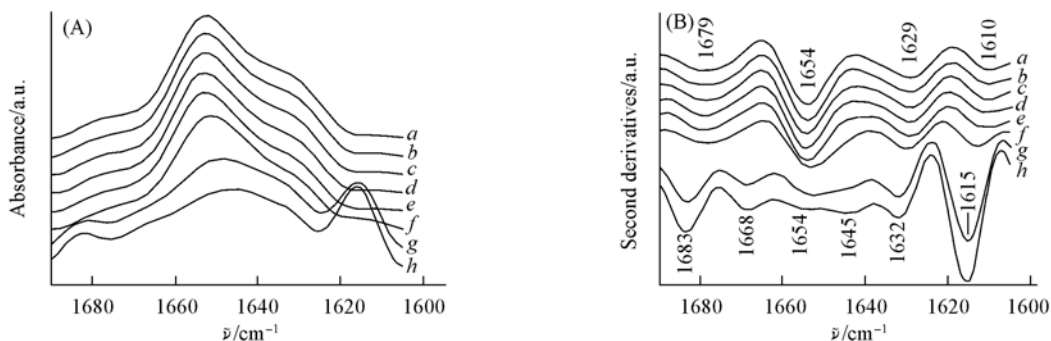


Fig. 1 Temperature-dependent infrared spectra of BSA in D_2O in the spectral region of 1690—1605 cm^{-1} in the temperature range of 26—90 $^{\circ}C$ (A) and the corresponding second derivatives (B)

$t/^{\circ}C$: a. 26; b. 30; c. 40; d. 50; e. 60; f. 70; g. 80; h. 90.

2.2 BSA 二级结构变化的热动力学特性

从 D_2O 中 BSA 的温度相关光谱和二阶导数光谱中不容易看出其结构变化的动力学特性, 为此给出了特定波数处的吸收强度随温度的变化曲线(图 2). 1654 cm^{-1} 处吸收强度的显著下降和 1615 cm^{-1} 处吸收强度的显著增加均发生在约 68 ~ 82 $^{\circ}C$ 温度范围内, 这进一步证实了在加热过程中 α -螺旋和 β -片层是协同变化的, 但应该注意到 1654 cm^{-1} 处的吸收强度的下降是从约 56 $^{\circ}C$ 时开始的; 1670 cm^{-1}

处的吸收强度变化相对较小,但也可看出在约 70 °C 时强度明显增加;此外,1630 cm^{-1} 处的强度变化无明显特征,这是因为它在原始光谱中为肩峰,因此其强度并不能直接反映对应的二级结构的浓度.

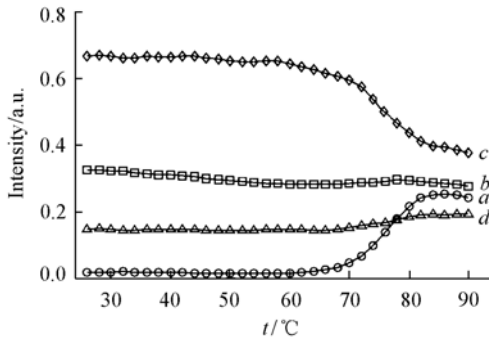


Fig. 2 Plots of the absorbance of the spectra in Fig. 1 (A) as the function of temperature at 1615 cm^{-1} (a), 1630 cm^{-1} (b), 1654 cm^{-1} (c) and 1670 cm^{-1} (d), respectively

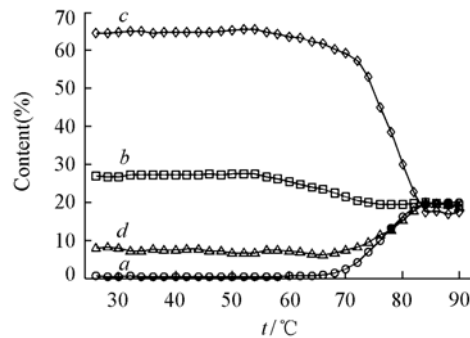


Fig. 3 Temperature-dependent variations of the contents of β -sheet (a), short-segment chains connecting α -helical segment (b), α -helix (c) and β -turn (d) in BSA

以往的研究结果证明,由高斯线型曲线拟合获得的高斯峰的面积能够用于估计对应的蛋白质二级结构的含量^[6].图3为二级结构含量随温度的变化曲线.可以看出, α -螺旋的显著减少和 β 结构(β -片层和 β -转角)的显著增加均发生在68~82 °C,而与 α -螺旋片断相连短链的显著减少则发生在约56~72 °C,说明在加热过程中这些短链很容易受到蛋白质表面溶剂的影响.

2.3 窗口因子分析

由主成分分析得到的前3个因子对光谱的贡献度分别为96.72%,3.23%和0.03%,可见前3个因子已经能够解释整个数据样本的变化,但第3个因子的贡献相对过小,它有可能只是来源于噪声.为了判断第3个因子是否来自噪声,对 D_2O 中BSA的温度相关光谱进行了奇异值分解,得到前10个因子的奇异值见图4,可以看出,因子3实际上已经脱离了噪声水平,说明该因子也包含了BSA结构随温度变化的信息.此外,以往的研究^[5,6]已证实加热导致的水或者 D_2O 中BSA的结构变化并不是简单的两相转化过程,这也表明加热过程中 D_2O 中BSA的存在状态可能不止两个.因此,选择3个因子进行窗口因子分析可更全面地研究 D_2O 中BSA的动力学过程,而此后的窗口因子分析结果也进一步证实选择3个因子是完全合理和正确的.

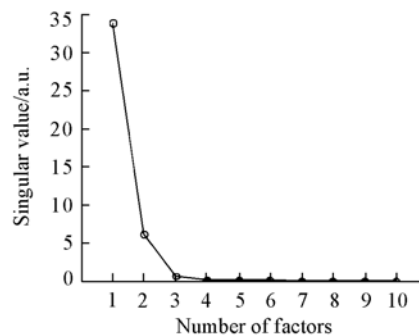


Fig. 4 Plots of singular values

由窗口因子分析得到的光谱特征见图5(A).因子1在1654 cm^{-1} 处出现一个强吸收峰,并在1629 cm^{-1} 处伴随有一肩峰,此外在1679和1610 cm^{-1} 处分别存在一弱吸收峰,可见因子1以 α -螺旋为主并含有少量 β -转角和链状结构,因此将因子1定义为天然蛋白质.因子3相对于因子1,分别在1683,1645和1615 cm^{-1} 处出现一个新吸收峰,且1654 cm^{-1} 处的吸收强度显著下降,说明因子3中 α -螺旋大大减少并形成了 β -片层和无规卷曲,因此将因子3定义为变性蛋白质.因子2的光谱特征介于因子1和因子3之间,相对于因子1,1654 cm^{-1} 附近的强度稍有下降并在1615 cm^{-1} 处出现一个新吸收峰,说明因子2中 α -螺旋稍有减少并开始形成了分子间 β -片层,因此将因子2定义为中间蛋白质.

由窗口因子分析得到的温度变化特征如图5(B)所示.天然蛋白质一开始就存在于溶液中,加热至56 °C开始显著减少,至82 °C时溶液中基本上不含天然蛋白质;中间蛋白质在加热至56 °C开始出现于溶液中,加热至72 °C时其含量达到极大,然后开始减少,加热至82 °C时溶液中也基本不含中间蛋白质;变性蛋白质在加热至68 °C时才出现于溶液中,并开始急剧增加,加热至82 °C时溶液中绝大部分为变性蛋白质.因此,加热导致的 D_2O 中BSA的结构经历了由天然蛋白质 \rightarrow 中间蛋白质 \rightarrow 变性蛋白质的转变,而不是直接从天然蛋白质转变为变性蛋白质.

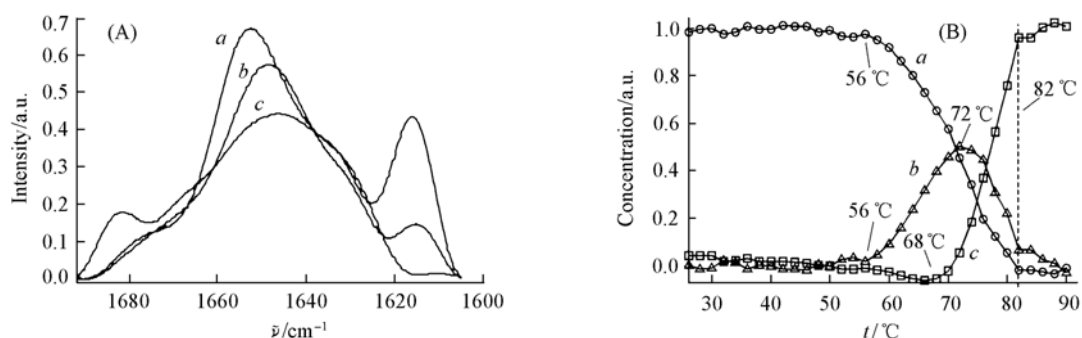


Fig. 5 Spectral profiles(A) and temperature profiles(B) obtained from WFA by selecting three factors
a. Factor 1; *b.* factor 2; *c.* factor 3.

参 考 文 献

- [1] Peters T. . All about Albumin[M], New York: Academic Press, 1994: 1—40
- [2] Militello V. , Casarino C. , Emanuele A. , *et al.* . Biophys. Chem. [J], 2004, **107**: 175—187
- [3] Yuan B. , Murayama K. , Wu Y. Q. , *et al.* . Appl. Spectrosc. [J], 2003, **57**(10): 1223—1229
- [4] YUAN Bo(袁波), ZHAO Hai-Ying(赵海鹰), HUANG Mei-Zhen(黄梅珍), *et al.* . J. Infrared Milim. Waves(红外与毫米波学报) [J], 2004, **23**(3): 213—216
- [5] Michnik A. . J. Therm. Anal. Calorim. [J], 2003, **71**: 509—519
- [6] Murayama K. , Tomida M. . Biochemistry[J], 2004, **43**: 11526—11532
- [7] Navea S. , Tauler R. , Goormaghtigh E. , *et al.* . Proteins[J], 2006, **63**(3): 527—541
- [8] Malinowski E. R. . J. Chemometr. [J], 1992, **6**: 29—40
- [9] Malinowski E. R. . J. Chemometr. [J], 1996, **10**: 273—279
- [10] Jiang J. H. , Šašić S. , Yu R. Q. , *et al.* . J. Chemometr. [J], 2003, **17**: 186—197
- [11] Zhao Z. M. , Malinowski E. R. . J. Chemometr. [J], 1999, **13**: 83—94
- [12] Shao X. G. , Cai W. S. . J. Chemometr. [J], 1998, **12**: 85—93
- [13] DONG Lin(董林), XU Lu(许禄). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(6): 1039—1042
- [14] SHAO Xue-Guang(邵学广), SHAO Li-Min(邵利民), LI Mei-Qing(李梅青), *et al.* . Sci. China. Ser. B(中国科学, B辑)[J], 2002, **32**(2): 97—104
- [15] Sogami M. , Foster J. F. . Biochemistry[J], 1968, **7**: 2172—2182

Heat-Induced Changes of Secondary Structures of BSA in D₂O Studied by Infrared Spectroscopy and Window Factor Analysis

YUAN Bo* , YAN Hui-Min

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, CNERC for Optical Instrument,
 Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract Heat-induced changes of secondary structures of bovine serum albumin(BSA) in D₂O was studied by using infrared spectroscopy and window factor analysis(WFA). The results obtained from the conventional spectral analysis methods and WFA indicate that conformational changes of BSA began at 56 °C, while the drastic variations of secondary structures occurred in the temperature range of 68—82 °C. Additionally, the temperature at which the variation of short-segment chains connecting α -helical segment took place is lower by round 10 °C than that of the other secondary structures. The present study reveals that WFA plays a key role in the analysis the temperature-dependent infrared spectra of protein in solution.

Keywords Infrared spectroscopy; Window factor analysis(WFA); Heating; Bovine serum albumin(BSA); Secondary structure
 (Ed. : A, G)