

傅里叶变换红外光谱法研究 PLGA 微球中 葡激酶突变体(K35R)的二级结构

贺进田^{1,2}, 王改珍³, 宋后燕²

1. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016
2. 复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032
3. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北 石家庄 050018

摘要 用复乳溶剂挥发法制备了葡激酶突变体(K35R, DGR)的 PLGA 微球, 并用傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 定量研究了 PLGA 微球内 DGR 的二级结构。将可增强分辨率的傅里叶去卷积技术与高斯曲线拟合技术共同用于对微球内 DGR 酰胺 I 带的定量分析, 发现 DGR 酰胺 I 带共包含 9 个红外吸收峰, 并对各组分进行了归属。此外, 还对微球内 DGR 结构稳定性相关的 1 623 和 1 650 cm^{-1} 吸收峰进行了讨论。

主题词 葡激酶; 微球; 傅里叶变换红外光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)07-1209-04

引言

红外光谱是最早用于研究蛋白质二级结构的手段之一, 酰胺 I 带和酰胺 II 带包含多种二级结构信息。Byler 和 Susi 等人将傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 和计算机辅助程序相结合, 得到了蛋白质二级结构的定量信息^[1-3]。最近几年, 有人成功地将 FTIR 用于研究微球内蛋白的二级结构, 这种方法可以使得在不破坏微球结构的情况下, 了解微球内蛋白的结构状态, 正在得到日益广泛的关注^[4-6]。但是, 现在用 FTIR 研究的包封蛋白非常有限, 只有牛血清白蛋白、生长因子和溶菌酶等几种蛋白得到了系统研究。

葡激酶突变体 DGR 是本实验室在基因工程葡激酶研究的基础上, 构建的具有低免疫原性、兼具溶栓和抗血小板聚集的新型突变体, 是很有前景的预防和治疗血栓性疾病的药物^[7]。在此基础上, 我们使用生物可降解的聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 为封装材料, 制备了 DGR 的缓释微球, 希望为临床提供更为方便的给药方式。本文用 FTIR 定量研究了 PLGA 微球内 DGR 的二级结构信息, 并对包封后 DGR 的二级结构的变化进行了分析。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

DGR 由本实验室制备^[7], 75 : 25 PLGA 相对分子量为 ~13 000, 购自成都航利精细化学品有限公司, 聚乙烯醇 (PVA) 为 Aldrich 产品, 分子量为 30 000~70 000。其余的化学试剂都是分析纯。

JY92-II 型超声波细胞粉碎机为宁波新芝生物科技股份有限公司生产; Thermo Nicolet Avatar 360 傅里叶红外光谱仪为美国热电尼高力 (Thermo Nicolet) 产品。

1.2 微球的制备

将 0.25 mL 浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DGR 溶液 (含 2% PVA 的 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 乳化于 2.5 mL PLGA 的二氯甲烷溶液中, 超声功率为 80 W, 超声时间为 30 s, 得到 W/O 乳液。将该乳状液用微量取样器注入到 75 mL 含 2% PVA 和 2.5% 氯化钠的 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 以 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 1 min 制得 W/O/W 乳液, 将此乳液倾入 225 mL 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中, 室温下 300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 6 h, 挥发有机溶剂, 离心收集微球, 双蒸水洗涤三次, 冷冻干燥, 低温保藏。当内水相中不含 DGR 时, 所制备的微球为空微球。

1.3 变性 DGR 样品制备

将 0.25 mL 浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DGR 溶液 (0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 乳化于 2.5 mL 二氯甲烷中, 超声功率为 80 W, 超声时间为 30 s, 得到 DGR 沉淀。用 0.02 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液洗涤二次, 冷冻干燥, 低温保藏。

收稿日期: 2005-05-23, 修订日期: 2005-08-24

基金项目: 国家“863”生物高技术研究发展计划项目 (863-2001AA215291) 资助

作者简介: 贺进田, 1968 年生, 河北师范大学生命科学学院教员, 博士

1.4 PLGA 微球内 DGR 的状态研究

一定量的干燥微球溶于二氯甲烷中,离心除去溶于 PLGA 的有机相。将沉淀溶解在 0.02 mL pH7.4 的磷酸缓冲液中,离心分离出上清和沉淀,沉淀用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素溶解。用 Bradford 试剂盒测定沉淀和上清中的 DGR 的含量,同时,用酪蛋白凝胶板溶圈法测定上清中 DGR 的纤溶活性。上清和沉淀的 DGR 总量用于计算包封率,即实际包封的蛋白总量与蛋白给与量比率。

1.5 傅里叶变换红外光谱及数据处理

2 mg 样品与 200 mg KBr 混合均匀,压片。红外光谱是在 Nicolet Avatar 360 型傅里叶变换红外光谱仪上测定的,采用 CaF_2 窗片,扫描次数:120 次,分辨率: 2 cm^{-1} 。对光谱进行水汽和二氧化碳校正,扫描范围 $600 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。从包封 DGR 的微球中扣除空 PLGA 微球的吸收是用 Ominic 2.1 程序完成的。扣除的标准是在 $1800 \sim 2500 \text{ cm}^{-1}$ 范围内红外光谱为一条直线。

利用仪器自备软件 Ominic 2.1 得到二级导数谱和去卷积谱,去卷积参数控制半峰宽(FWHM)为 27,增强因子(Enhancement factor)为 2.4,得到的去卷积谱,进行 11 点平滑。在二级导数谱指导下,利用 Microsoft Origin 数学软件对酰胺 I 带去卷积谱图进行高斯曲线拟合,拟合过程中进行了基线校正。

1.6 DGR 的纤溶活性测定

DGR 的纤溶活性采用酪蛋白凝胶板溶圈法测定^[7],凝胶含 3% 脱脂奶粉,1% 琼脂粉,0.02% NaN_3 和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 纤溶酶原。凝胶经打孔后,在各孔加标准系列或样品, 37°C 湿盒保湿过夜,所形成的溶圈直径用于计算纤溶活性。

2 结果与讨论

2.1 冻干葡激酶的 FTIR 分析

冻干的 DGR FTIR 谱图及其酰胺 I 带去卷积谱的高斯曲线拟合分别见图 1 和图 2。参考葡激酶和链激酶 FTIR 文献结果,我们对所得谱带进行了归属(见表 1)。Dornberger 等研究了葡激酶和几个葡激酶突变体水溶液的红外光谱^[8],谱峰位置与我们所得谱峰位置大致相同。 1614 cm^{-1} 是氨基酸侧链振动吸收峰, 1624 和 1634 cm^{-1} 是 β -折叠吸收峰, 1662 , 1670 和 1682 cm^{-1} 组分主要是转角(Turn)的吸收,可能也有少量的 β -折叠的贡献。 1650 cm^{-1} 组分一般将其归于 α -螺旋,但是,我们在变性 DGR FTIR 谱图上观察到这个峰所占的比例明显增加(见图 3 和表 1),因而,将其归属为 α -螺旋和无规卷曲的组合峰。 1642 cm^{-1} 是难以归属的一个峰, Fabian 等在研究链激酶时,将 1640 cm^{-1} 吸收峰归属为 3_{10} -螺旋、转角和开环结构(Open loop)^[9], Dornberger 等对葡激酶中的这个峰也未能给出明确的归属^[8],因而我们将其归为“未知”。

与 Dornberger 等报道的溶液中葡激酶及其突变体谱图相比,固态 DGR 谱图明显在 1624 , 1662 和 1694 cm^{-1} 多出三个峰, 1624 , 1694 cm^{-1} 组分是 β -折叠的吸收峰, 1662 cm^{-1} 组分是转角(Turn)的吸收。在脱水状态下,蛋白的 β -折

叠成分增加是常见的现象。Andreeva 等观察到 I 型氯霉素乙酰转移酶处于冻干状态的蛋白的 IR 谱图与溶液谱图相差很大,尤其在 $1640 \sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ β -折叠吸收范围内谱图差别

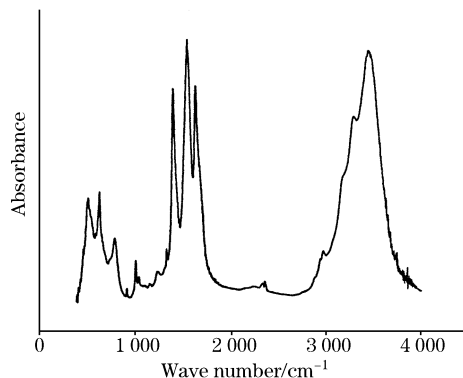


Fig. 1 FTIR spectrum of lyophilized DGR

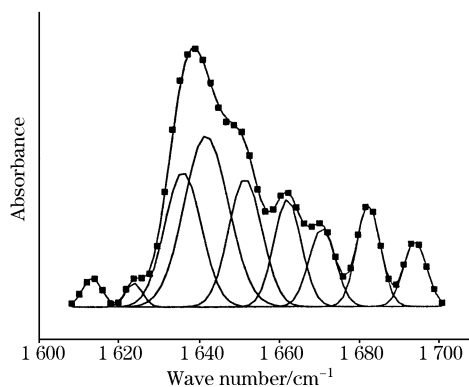


Fig. 2 Deconvoluted amide I band and Gaussian curve-fitting (the individual Gaussian bands are shown as symmetrical peaks underneath the IR spectra) of lyophilized DGR. Note that spectra are shown on a relative scale and not an absolute scale.

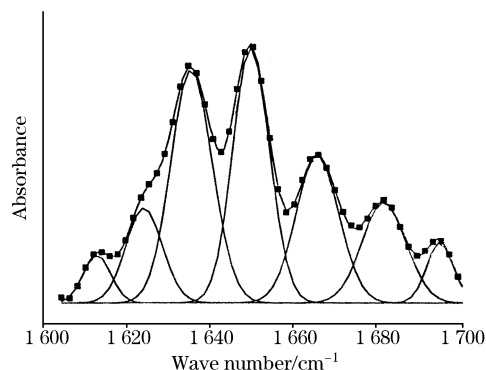


Fig. 3 Deconvoluted amide I band and Gaussian curve-fitting (the individual Gaussian bands are shown as symmetrical peaks underneath the IR spectra) of DGR precipitates at the water/methylene chloride interface. Note that spectra are shown on a relative scale and not an absolute scale.

非常大^[10]。他们认为这可能是由于在冻干蛋白中,氨基酸残基被迫相互作用,而这种相互作用在溶液中是熵禁止的。当脱水的蛋白重新进入溶液后,这种构象变化又得到了恢复,也就是说这种变化是可逆的。因而,我们认为 1 624, 1 694 cm^{-1} 组分是固态 DGR 分子间相互作用导致 β 折叠结构增加的结果,它们的产生并不表示蛋白的不可逆失活。

Table 1 Infrared band position of DGR and band assignments

Sample	Band position / cm^{-1}	Band area/%	Assignment
Lyophilized powder	1 614		Side-chain vibrations
	1 624	1.5	β -sheet
	1 634	18.8	β -sheet
	1 642	27.1	Unknown
	1 650	18.4	α -helix, irregular
	1 662	11.3	Turn
	1 670	7.8	Turn
	1 682	8.7	Turn
	1 694	4.7	β -sheet
	In PLGA microspheres	1 614	
1 623		6.8	β -sheet
1 633		18.0	β -sheet
1 643		14.2	Unknown
1 651		19.5	α -helix, irregular
1 662		15.5	Turn
1 671		7.8	Turn
1 682		9.4	Turn
1 694		5.8	β -sheet
Denatured powder		1 613	
	1 626	14.0	β -sheet
	1 636	22.9	—
	1 650	28.0	—
	1 666	17.8	—
	1 682	12.6	—
	1 695	4.6	—

2.2 微球内 DGR 的 FTIR 分析

所制备的包含 DGR 的 PLGA 微球平均粒径为 86.1 μm , 包封率为 85.5% \pm 3.4%, 包封率比较高, 适于进行 FTIR 分析。PVA 是制备 DGR 微球的蛋白稳定剂, 它的加入可以提高包封过程中 DGR 的稳定性。PVA 与包封蛋白的基质材料 PLGA 在酰胺 I 带(1 600~1 700 cm^{-1})范围内没有强红外吸收, 但是, PVA 在 1 738 cm^{-1} 和 PLGA 在 1 759 cm^{-1} 有强吸

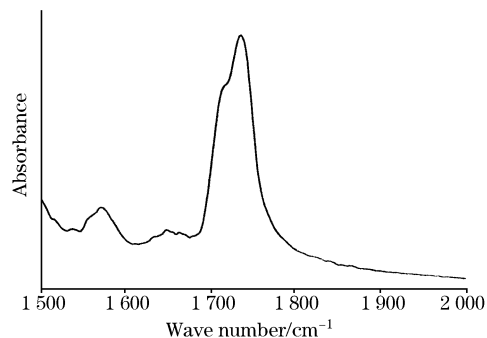


Fig. 4 FTIR spectrum of PVA in the 1 500-2 000 cm^{-1} region

收峰(见图 4 和图 5), 它们的峰会影响到酰胺 I 带的定量分析。因此, 测定 PLGA 微球内 DGR 红外光谱时, 应该扣除 PVA 和 PLGA 的影响。扣除 PVA 和 PLGA 吸收后的 DGR 的 FTIR 谱图及其酰胺 I 带去卷积谱的高斯曲线拟合分别见图 6 和图 7。

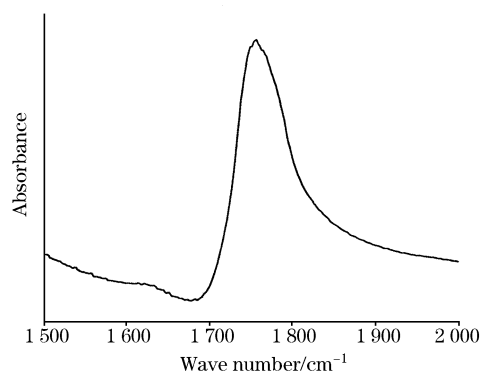


Fig. 5 FTIR spectrum of PLGA in the 1 500-2 000 cm^{-1} region

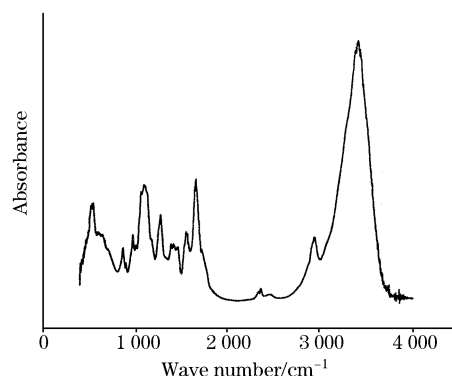


Fig. 6 FTIR spectrum of encapsulated DGR within microspheres

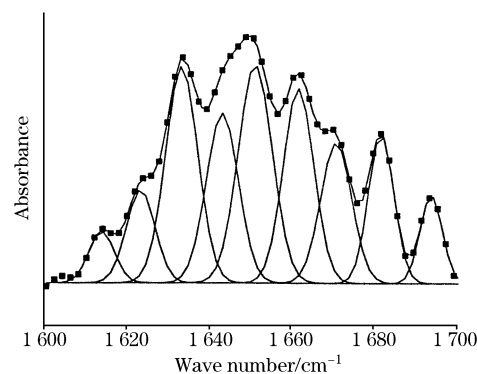


Fig. 7 Deconvoluted amide I band and their Gaussian curve-fitting (the individual Gaussian bands are shown as symmetrical pesks underneath the IR spectra) of DGR within PLGA microspheres. Note that spectra are shown on a relative scale and not an absolute scale.

比较冻干 DGR 和微球内的 DGR 的酰胺 I 带可以发现, DGR 经过包封以后, 条带的位置基本相同, 但强度发生了变化。我们发现微球内的 DGR 在 $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收强度明显增加, 而变性蛋白分子间以 β -折叠非共价键相互作用, 会在 $1\ 626\ \text{cm}^{-1}$ 附近产生特征吸收峰^[11]。那么, 微球内的 DGR 在 $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收强度增加是否由 DGR 变性引起的呢? 分析微球中 DGR 状态表明, 有 96% 的 DGR 是可溶的, 其活性与未包封的 DGR 相同, 说明有 96% 的 DGR 构象处于天然状态, 只有 4% 的 DGR 是不可溶的。而包封的 DGR 产生的这个峰相对强度较高, 占总面积的 6.8%, 完全变性的 DGR 仅占总面积的 14% (见表 1)。所以, 不可能将 $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ 峰的吸收强度增加完全归属于 4% 变性 DGR; 我们推测吸收导致增加的原因主要是受到微扰的蛋白正常二级结构成分。Perez 等研究 PLGA 微球中的溶菌酶结构时, 发现包封时变性的溶菌酶在 $1\ 627\ \text{cm}^{-1}$ 产生了一个很强的吸收峰, 这个峰太强不能将其完全归属为分子间相互作用的 β -折叠结构, 且这个峰类似于规则的反平行 β -折叠结构^[12]。Perez 等推测 $1\ 627\ \text{cm}^{-1}$ 组分可能来源于结构受到微扰的溶菌酶的 β 结构。因此, 我们认为受到微扰的蛋白正常二级结构才是 $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ 组分增加的主要来源。包封 DGR 的 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 成

分比未包封时也稍有增加, 说明包封后有部分蛋白发生了去折叠。一般将 α -螺旋结构含量用于衡量微球内蛋白结构的完整性^[4-6], 但是我们在 DGR 中无规卷曲结构与 α -螺旋结构发生了红外吸收重叠, 且在变性 DGR 中 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰变得很强, 是否还能用这个组分定量微球内 DGR 结构的完整性还须进一步探讨。

3 结 论

傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 可以成功用于 PLGA 微球内 DGR 的二级结构研究。使用可增强分辨率的傅里叶去卷积技术及高斯曲线拟合技术得到了微球内 DGR 酰胺 I 带中包含的二级结构定量信息, 在酰胺 I 带中共发现了 9 个红外吸收峰, 并将各组分进行了归属。微球内 DGR 在 $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰可能部分来源于变性 DGR, 而大部分是来源于 DGR 中受到微扰的二级结构。在 DGR 中 α -螺旋和无规卷曲的吸收峰均在 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$, 是否还能用这个组分定量微球内 DGR 结构的完整性还须进一步探讨。

致谢: 感谢珀金埃尔默仪器(上海)有限公司高级技术专员孙明先生在数据处理上所给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Susi H, Byler D M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 115(1): 391.
- [2] Byler D M, Susi H. *Biopolymers*, 1986, 25(3): 469.
- [3] Susi H, Byler D M. *Methods Enzymol.*, 1986, 130: 290.
- [4] Yang T H, Dong A, Meyer J, et al. *J. Pharm. Sci.*, 1999, 88(2): 161.
- [5] Carrasquillo K G, Costantino H R, Cordero R A, et al. *J. Pharm. Sci.*, 1999, 88(2): 166.
- [6] Fu K, Griebenow K, Hsieh L, et al. *J. Control Release*, 1999, 58(3): 357.
- [7] Su H B, Zhang Y G, He J T, et al. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2004, 36: 336.
- [8] Dornberger U, Fandrei D, Backmann J, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1294(2): 168.
- [9] Fabian H, Naumann D, Misselwitz R, et al. *Biochemistry*, 1992, 31(28): 6532.
- [10] Andreeva A E, Karamancheva I R, *J. Mol. Struct.*, 2001, 565-566: 177.
- [11] Dong A, Prestrelski S J, Allison S D, et al. *J. Pharm. Sci.*, 1995, 84: 415.
- [12] Perez C, De Jesus P, Griebenow K. *Int. J. Pharm.*, 2002, 248(1-2): 193.

FTIR Characterization of the Secondary Structure of a Staphylokinase Variant (K35R) Encapsulated within PLGA Microspheres

HE Jin-tian^{1,2}, WANG Gai-zhen³, SONG Hou-yan^{1,2}

1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2. Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China

3. College Laboratory Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology Shijiazhuang 050018, China

Abstract The secondary structure of a staphylokinase variant (K35R, DGR) encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres was quantitatively examined by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Resolution enhancement technique and Fourier deconvolution were combined with band with curve-fitting procedures to quantitate the spectral information from the amide I bands. Nine component bands were found under the broad, nearly featureless amide I bands and assigned to α -helix, β -sheet, turn and irregular(random) structures. The changes of bands at $1\ 651$ and $1\ 623\ \text{cm}^{-1}$ after encapsulation were discussed.

Keywords Staphylokinase; Microsphere; FTIR

(Received May 23, 2005; accepted Aug. 24, 2005)