

不同 pH 值的酸处理溶菌酶溶液的拉曼光谱分析

衡航,柯惟中,籍康

(南京师范大学分析测试中心,江苏省光电技术重点实验室,江苏 南京 210097)

[摘要] 分析了 pH 5.0 到 pH 1.0 的溶菌酶溶液的激光拉曼谱,酰胺 I 振动谱带分别出现在 1 660、1 656、1 657、1 660 和 1 655 cm^{-1} ,酰胺 III 振动谱带分别出现在 1 255、1 257、1 263、1 261、1 260 cm^{-1} 和 1 301、1 302、1 302、1 302、1 301 cm^{-1} ,并计算了它们相对强度的变化.由此定性可知,该蛋白质分子的肽链主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成.在酸化的过程中,溶菌酶的构象基本一直保持稳定,但当 pH < 2.0 时,该溶菌酶开始变性.在 pH = 5.0 时酪氨酸为“暴露式”,当 pH = 4.0 - 2.0 时为“埋藏式”,而到了 pH = 1.0 时酪氨酸的双峰已基本消失了.色氨酸的 1 361 cm^{-1} 的强度随酸性的增强而减弱,由“埋藏式”逐渐转化为“暴露式”.硫-硫桥键的振动谱带按 pH 5.0 到 pH 1.0 的顺序分别在 508、508、507、507 和 509 cm^{-1} ,且强度基本不变,表明在酸环境中,硫-硫键部位的几何构型都是扭曲-扭曲-扭曲, pH 值的改变对几何构型无影响.

[关键词] 溶菌酶,激光拉曼光谱,分子构象

[中图分类号] O657.37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0048-04

The Raman Spectral Analysis of Lysozyme Solution Treated with Acid at Various pH

Heng Hang, Ke Weizhong, Ji Kang

(Analysis and Test Center, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Lab on Opto-Electronic Technology, Nanjing 210097, China)

Abstract: The character of Raman spectra of lysozyme solution treated with various pH (from pH 5.0 to pH 1.0) have been analyzed. From pH 5.0 to pH 1.0, the amide I bands appear at 1 660, 1 656, 1 657, 1 660 and 1 655 cm^{-1} , the amide III bands appear at 1 255, 1 257, 1 263, 1 261 and 1 260 cm^{-1} , and 1 301, 1 302, 1 302, 1 302 and 1 301 cm^{-1} , respectively, and their relative intensities are concluded. Thus all the characteristic Raman bands of the protein proved that their structure consist of the α -helix and random coil. In the procedure of acidity, the conformation of lysozyme would keep stable, but at pH < 2.0, the lysozyme begin to denature. At pH 5.0, the tyrosine residue are “exposed”, at pH 4.0 - pH 2.0, the tyrosine residue are “buried”, at pH 1.0, the Raman bands of the tyrosine residue almost have vanished. The intensity of the 1 361 cm^{-1} , peak in tryptophan decreases with increase in acidity and slowly change from “buried” to “exposed”. The Raman bands of the disulfide bridge C-C-S-S-C-C appear at 508, 508, 507, 507 and 509 cm^{-1} , and their intensities almost do not change. As can they indicated, in the environment of acid, the conformation of the disulfide bridge S-S always are gauche-gauche-gauche.

Key words: lysozyme, laser Raman spectra, molecular conformation

0 引言

蛋白质受外界因素如 pH 值、温度、紫外辐射等影响而发生构象变化,即分子内部原有的高度规则性的空间排列和折迭方式发生变化,致使原物理、化学、生物性质部分或全部丧失,这种作用称为变性.随着细

收稿日期: 2005-09-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(399770117).

作者简介: 衡航,1980—,硕士研究生,主要从事拉曼光谱的学习与研究. E-mail: henghang71@sohu.com

通讯联系人: 柯惟中,1947—,教授,主要从事拉曼光谱的教学与研究. E-mail: kewe@jlonline.com

胞研究工作的深入,需要我们在分子水平下,了解不同酸度的酸处理蛋白质分子到底产生怎么样的影响. 目前,在生物大分子的构象研究中,特别是溶液中生物大分子空间结构与功能相互关系的动态研究中,激光拉曼光谱已成为很有前景的新技术. 从蛋白质的拉曼光谱可以同时得到很多可贵信息,不但能够得到有关它的芳香族组成氨基酸的信息,还能进一步得到二级结构的信息. 溶菌酶是一种胺糖酶,具有抗菌素的特性,它由 129 个氨基酸组成,分子量是 14 400,含 4 个二硫键. 曾有文献^[1]报道过溶菌酶水溶液的激光拉曼谱,在分子水平上定性地证明了蛋白质分子的肽链结构组成,侧链环境和构型,但它只是在近似天然状态低浓度溶液中进行研究;也有文献^[2]报道过用拉曼光谱测试 pH 诱导牛血清白蛋白芳香氨基酸残基微环境的变化,但该文在酸性环境中仅取 pH 2.3 和 pH 5.1 二个点作研究,没有详细地研究蛋白质构象随酸度的增加而发生的一系列变化. 迄今为止,未曾有文献系统报道过,对溶菌酶在系列 pH 值的酸处理后的拉曼光谱研究.

本文研究了溶菌酶溶液在 pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0、pH 2.0、pH 1.0 逐个 pH 值点的拉曼谱图. 通过我们的实验,发现了溶菌酶溶液在酸环境中,其结构较为稳定,酸度的增加对主链构象影响不大. 直至 pH = 1.0 时,溶菌酶溶液才开始变性. 在 pH = 5.0 时酪氨酸为“暴露式”,当 pH = 4.0–2.0 时为“埋藏式”,而到了 pH = 1.0 时酪氨酸的双峰已基本消失了. 色氨酸残基的吡咯环处于“埋藏式”并逐渐变为“暴露式”. C-C-S-S-C-C 链段的几何构型在酸性条件下都是扭曲-扭曲-扭曲,表明酸处理对它的几何构型影响不大.

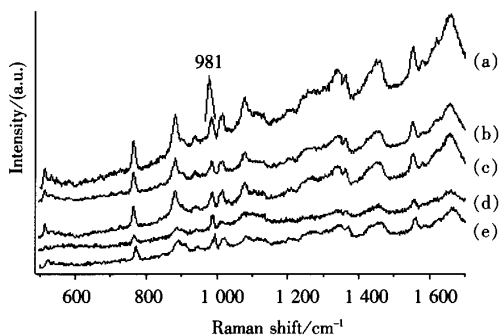
1 材料与方法

溶菌酶为美国 Sigma 公司的晶体粉末,将其称取 5 份各为 75 mg. 同样称取 5 份各为 32 mg Na_2SO_4 粉末,用 pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0、pH 2.0、pH 1.0 的磷缓冲液分别将其溶解,配置成 0.045 mol/L 的溶液,再分别用针管抽取 190 μL 的 pH 5.0–pH 1.0 的 Na_2SO_4 酸溶液,用其将 5 份溶菌酶溶解,这样便制得 5 份 5% 溶菌酶酸溶液样品,其 pH 值分别为 5.0、4.0、3.0、2.0、1.0,放置在 4℃ 冰箱中,经 24 h 充分水合,分别取出测其拉曼谱图,以硫酸根 SO_4^{2-} 的 981 cm^{-1} 为内标,以此作为各拉曼峰强度变化的依据. 在实验前预先测试了 5 份磷缓冲溶液的拉曼谱图,均未见明显拉曼峰.

样品的拉曼测试均在室温(22℃)下进行. 实验在法国 Jobin Yvon 公司 LABRAM HR800 型激光共聚焦微拉曼谱仪上完成. CCD 进行光电转换. 光谱物理公司的 163 型氩离子激光器作光源,激发激光波长 514.5 nm,出射功率 10 mW,狭缝宽 200 μm . 每个样品都重复扫描 3 次以上,各样品的拉曼谱图都由计算机作信号累加平均并绘图输出,峰值误差小于 $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$.

2 结果与讨论

室温下测试的 pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0、pH 2.0、pH 1.0 的 5% 溶菌酶酸溶液拉曼谱见图 1 所示,有关的拉曼特征频率和指认列于表 1^[1]. 谱线中 981 cm^{-1} 作为内标,各谱中以它的强度作为 1,在此基础上计算了不同 pH 值的溶菌酶溶液中各个基团的谱线强度的变化率. 由于拉曼谱线的强度与散射中心的数目成正比,谱线强度的变化即意味着散射中心(包括基团和化学键)数目的变化. 强度变小说明相应谱线所属的基团或化学键受到损伤. 如果谱线位移,则可能是相应的基团或化学键受到处理而发生变化的缘故^[3].



(a) pH 5.0; (b) pH 4.0; (c) pH 3.0; (d) pH 2.0; (e) pH 1.0

图 1 经 pH 5.0–pH 1.0 酸处理后的溶菌酶拉曼谱图

表 1 经过 24 h 酸处理后的拉曼光谱及特征频率归属

Raman shift/(cm ⁻¹)						Tentative assignments
In aqueous solution	pH					
	5. 0	4. 0	3. 0	2. 0	1. 0	
505	508	508	507	507	509	γ(s - s)
758	760	759	760	761	761	Trp
837	830	831	834	835		Tyr
854	853	853	848	850		Tyr
876	878	877	877	881	881	γ(C - C)
897	896	900	899	894	893	γ(C - C)
931	936	935	934	937	933	γ(C - C)
1006	1012	1011	1011	1009	1010	phe
1056	1056					γ(C - N)
1074	1078	1079	1078	1077	1081	γ(C - N)
1105	1103	1102	1104	1105	1103	γ(C - N)
1193	1197	1198	1197	1197	1196	Tyr + phe
1207	1211	1210	1205	1208		Tyr + phe
1253	1255	1257	1263	1261	1260	Amide III
1302	1301	1302	1302	1302	1301	Amide III
1340	1337	1338	1334	1335	1334	Trp
1361	1361	1361	1361	1363	1361	Trp
1449	1453	1451	1453	1454	1453	γCH ₂ , γCH ₃
1550	1553	1552	1552	1554	1553	Trp
1657	1660	1656	1657	1660	1655	Amide I

2.1 对主链构象的影响

蛋白质主链的构象主要由酰胺 I 和酰胺 III 的拉曼特征峰确定,按照 Tu 对蛋白质拉曼光谱的指认^[4],酰胺 I 拉曼特征峰位置为:α-螺旋结构:1 645-1 658 cm⁻¹;β-折迭结构:1 665-1 680 cm⁻¹;β-回折结构:1 680-1 690 cm⁻¹;无规则卷曲结构:1 660-1 665 cm⁻¹. 酰胺 III 拉曼特征峰位置为:α-螺旋:1 260-1 310 cm⁻¹;β-折迭:1 230-1 245 cm⁻¹;β-回折:1 250-1 330 cm⁻¹;规则卷曲:1 240-1 260 cm⁻¹. 在 pH 5.0 到 pH 1.0 的溶菌酶溶液中,酰胺 I 谱带分别出现在 1 660、1 656、1 657、1 660 和 1 655 cm⁻¹,对应的强度为 5.351、10.878、10.389、11.565、18.037. 由此表明,在 pH 5.0 到 pH 1.0 的溶菌酶溶液中含有 α-螺旋和无规则卷曲结构,而且是以 α-螺旋结构为主,而峰强随着酸度增加未有明显变化. 酰胺 III 是蛋白质主链结构中对结构变化最敏感的谱带,因此有必要研究该谱带变化^[5]. 在 pH 5.0 到 pH 1.0 的溶菌酶溶液中,酰胺 III 谱带分别出现在 1 255、1 257、1 263、1 261 和 1 260 cm⁻¹,对应的强度为 0.652、0.871、1.804、1.408、1.187. 这是 α-螺旋 β-回折和无规则卷曲重复的区域,又由于从上面的酰胺 I 谱带已确认无 β-回折结构,由此可推得溶液仍是 α-螺旋和无规则卷曲结构,且峰强也是随酸度增加而增加,可见肽链仍保持高度规则的紧密排列和折迭卷曲. 从 pH 2.0 到 pH 1.0 的下降,说明溶菌酶稳定性下降,构象开始变化. 此外,酰胺 III 还在各 pH 值对应点出现 1 301、1 302、1 302、1 302 和 1 301 cm⁻¹等谱峰,这些可归结为 α-螺旋和 β-回折结构的区域范围,同理推得,此时溶液中主要含有 α-螺旋结构. 从 pH 5.0 到 pH 2.0,峰的强度分别为 0.161、0.141、0.102、0.092、0.026,说明溶菌酶溶液中 α-螺旋结构一直保持了一个相对稳定略有减少的值,到了 pH 1.0 时才有较大幅度下降. 说明此时溶液里有大量净正电荷,使溶菌酶的等电点随之下移,使部分氢键断裂,部分多肽键高度伸展,产生了变性. 综合以上分析可知,在 pH 5.0 到 pH 2.0 溶菌酶溶液中其构象为 α-螺旋和无规则卷曲结构,酸性的增强对它影响不大,直到 pH 1.0 时才发生变性. 也正如文献[2]所说,溶菌酶对酸碱不敏感,在多肽链中,部分 α-螺旋结构很不容易被破坏,尤其是在酸性环境中十分稳定,直到 pH 2.0 左右的环境中,溶菌酶仍然保持了大量的 α-螺旋结构.

2.2 对侧链环境的影响

蛋白质的某些残基的侧链拉曼光谱对环境变化敏感^[1]. 由酪氨酸的环呼吸振动和环平面外弯曲振动的倍频之间的费米共振引起的 830 和 850 cm⁻¹左右的特征峰随侧链微环境而变,当强度比 $I_{850}/I_{830} \geq 1$ 时,该酪氨酸是“暴露的”;强度比 $I_{850}/I_{830} < 1$ 时,该酪氨酸就是“埋藏的”. 在 pH 5.0 到 pH 2.0 的溶菌酶溶液中,其峰位分别出现在 830、831、834、835 cm⁻¹和 853、853、848、850 cm⁻¹,可得 $I_{853}/I_{830} = 1.040$, $I_{853}/I_{831} =$

0.816, $I_{848}/I_{834} = 0.690$, $I_{850}/I_{835} = 0.241$,而在 $\text{pH} = 1.0$ 时酪氨酸的双峰已基本消失了,由此可知,溶菌酶溶液在 $\text{pH} = 5.0$ 时酪氨酸为“暴露式”,当 $\text{pH} = 4.0 - 2.0$ 时为“埋藏式”,到 $\text{pH} = 1.0$ 时酪氨酸的双峰已被破坏。在色氨酸残基的一系列谱带中, 1361 cm^{-1} 谱带的存在表明色氨酸残基的吡咯环处于“埋藏式”。在 $\text{pH} 5.0$ 到 $\text{pH} 1.0$ 的溶菌酶溶液中, 1361 cm^{-1} 峰的峰强分别为 0.619、0.600、0.509、0.472、0.398,它的峰形由尖锐强峰变为不明显的肩峰,峰强随着酸度的增加而减少。由此可见在溶菌酶逐渐酸化的溶液中,色氨酸吡咯环已由处于“埋藏式”,逐步变为“暴露式”。

2.3 对侧链构象的影响

在拉曼光谱的 $500 - 550\text{ cm}^{-1}$ 范围内出现强的 S-S 伸缩振动谱带,它的位置变化对于 C-C-S-S-C-C 键的几何构型极为敏感,二硫键的对称伸缩振动频率与二硫链 C-C-S-S-C-C 中碳原子的构象有关,当这些碳原子的构象是扭曲-扭曲-扭曲(g-g-g)时, S-S 伸缩振动谱带出现在 510 cm^{-1} 附近,构象为扭曲-扭曲-反式(g-g-t)时,出现在 525 cm^{-1} 附近,构象为反式-扭曲-反式(t-g-t)时,出现在 540 cm^{-1} [1]。在 $\text{pH} 5.0$ 到 $\text{pH} 1.0$ 的溶菌酶溶液中, S-S 键伸缩振动谱峰分别出现在 508、508、507、507 和 509 cm^{-1} ,且它们的相对强度基本上一直保持不变,表明在酸性环境中 C-C-S-S-C-C 链段的几何构型都一直为扭曲-扭曲-扭曲,也说明 S-S 键在不同 pH 值酸处理溶菌酶的过程中其构型一直保持稳定。

3 结论

蛋白质为由氨基酸连接成链的肽键组成,在肽链的不同部分之间,存在着静电的相互作用(相互吸引或者是相互排斥)。静电吸引有助于维持蛋白质的构象。静电排斥可以使蛋白质的稳定性下降,导致构象松散或变化[6]。在 pH 值大大低于等电点时,产生较多的净的正电荷;在 pH 值大大高于等电点时,产生较多的净的负电荷。由于同性电荷的相斥及盐键的断裂,使蛋白质构象起了变化。从拉曼光谱结果来看,在从 $\text{pH} 5.0$ 到 $\text{pH} 1.0$ 的溶菌酶溶液中,其结构为 α -螺旋和无规则卷曲,在酸性环境中比较稳定,且随着酸度增加,对主链构象影响不大。但酪氨酸残基在酸性环境中逐步产生变化,到 $\text{pH} 1.0$ 时被破坏。在溶菌酶逐渐酸化的过程中,色氨酸吡咯环已由处于“埋藏式”,逐步变为“暴露式”。到 $\text{pH} 1.0$ 时,溶菌酶开始变性。在 $\text{pH} 5.0$ 到 $\text{pH} 1.0$ 的酸性环境中, C-C-S-S-C-C 链段的几何构型始终以扭曲-扭曲-扭曲的形式存在。

[参考文献]

- [1] 柯惟中,余多慰. 溶菌酶水溶液的激光拉曼谱[J]. 南京师大学报:自然科学版, 1993, 16(4): 48-51.
- [2] 魏晓芳,丁西明,刘会洲. pH 诱导牛血清白蛋白芳香氨基酸残基微环境变化的光谱分析[J]. 光谱学和光谱分析, 2000, 20(4): 556-559.
- [3] 柯惟中,余多慰,陈婉蓉,等. 热处理和紫外辐射 DNA 影响的拉曼光谱研究[J]. 光学学报, 1997, 17(12): 1681-1686.
- [4] Tu A T. Advances in Spectroscopy[M]//Clark R J H, Hester R E. Spectroscopy of Biological Systems. New York: John Wiley & Sons Chichester, 1986: 65-116.
- [5] Carey P R. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies[M]. New York: Academic Press, 1982: 71-96.
- [6] 陶慰孙,李惟,姜涌明,等. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987: 242-243.

[责任编辑:丁蓉]