

牛血清白蛋白水溶液的激光喇曼谱*

柯惟中 余多慰** 陈婉蓉

(南京师范大学理化实验中心, 南京 210024)

提 要

本文报道了用硝基苯萃取法获得的牛血清白蛋白水溶液的喇曼光谱. 定性地证明了该蛋白质多肽链可能由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 酪氨酸残基在肽链中呈全“暴露”式, 硫-硫键部位的几何构型为反式-扭式-扭式.

关键词 喇曼光谱, 牛血清白蛋白, 硝基苯.

1 引 言

用激光喇曼光谱研究蛋白质分子在水溶液中的构象变化是近年来发展的一门新技术. 它可以确定蛋白质二级结构(α -螺旋、 β -折迭、无规则卷曲等)的重要特征参数. 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, 简称BSA)是一种常见的蛋白质大分子, 分子量67000, 通过18个二硫桥键将其肽链结合成一定的空间状态. 大部分蛋白质分子都有较高的荧光产率, BSA受激光激发时会产生很强的荧光, 使喇曼信号淹没于荧光之中, 因而用常规的喇曼技术很难得到稳定的BSA水溶液的喇曼图谱, 本文在BSA水溶液里加入少量硝基苯溶液再进行萃取. 使之与BSA分子发生共振能量转移过程, 淬灭蛋白质中某些氨基酸的荧光⁽¹⁾, 获得了用其他技术难以得到的稳定而清晰的喇曼谱图.

2 实验装置及过程

实验所用BSA结晶粉末样品为美国Sigma公司出品. 用二次重蒸水溶解, 配制成5%的BSA水溶液, PH值为7. 加入2%的硝基苯溶液, 再经高速离心机离心15分钟, 取出其上面的澄清液测定激光喇曼散射谱.

实验仪器为美国Coherent公司的氩离子激光器, 激发波长514.5 nm, 出射功率为200 mW. 由法国JOBIN YVON公司的HRD-2型双光栅单色仪分光, 采用RCA 31034光电倍增管和1109/1121A型光子计数器进行光电转换和信号接受. 实验为90°方向散射几何装置, 并用自制的激光喇曼数据采集装置记录光散射数据⁽²⁾. 狭缝宽为400 μm , 光栅扫描起始点(即500 cm^{-1} 处)的光子计数为 2.5×10^3 photon/sec 每次测试扫描8次, 重复两次, 由计算机对信号作累加平均, 峰值误差不超过 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$.

另在同样条件下测试了纯硝基苯的激光喇曼谱(图1)和2%硝基苯水溶液的激光喇曼谱

收稿日期: 1992年1月10日; 收到修改稿日期: 1992年4月27日

* 江苏省自然科学基金资助课题.

** 南京师范大学生物系.

(图 2). 以谱带 1350 cm^{-1} 为基准峰, 用计算机进行光谱峰值和基线校正, 再进行本底扣除并绘图. 所得的两张差分光谱图(图 3: BSA 水溶液减纯硝基苯本底谱; 图 4: BSA 水溶液谱减 2% 硝基苯水溶液本底谱)上各喇曼峰的位置完全一致. 整个实验过程在室温 13 C 进行.

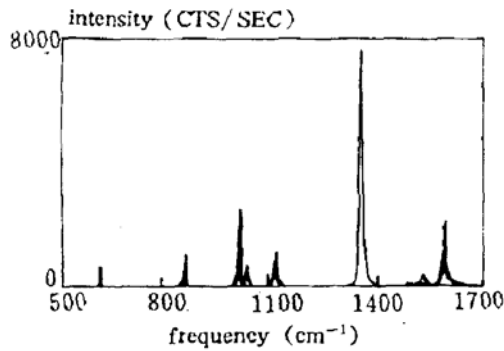


Fig. 1 Raman spectrum of nitrobenzene

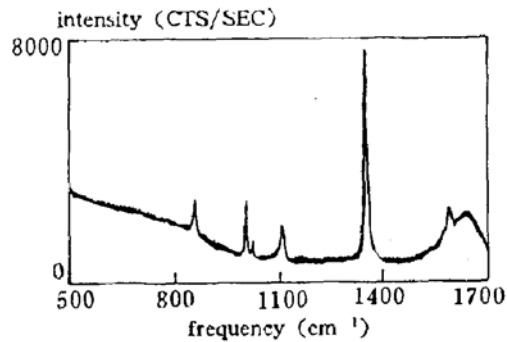


Fig. 2 Raman spectrum of 2% nitrobenzene

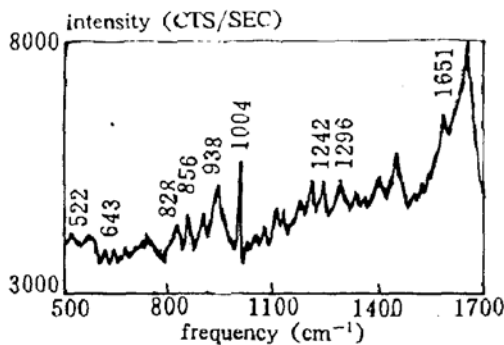


Fig. 3 Raman spectrum of 5% BSA : Subtracts the background occurring in nitrobenzene

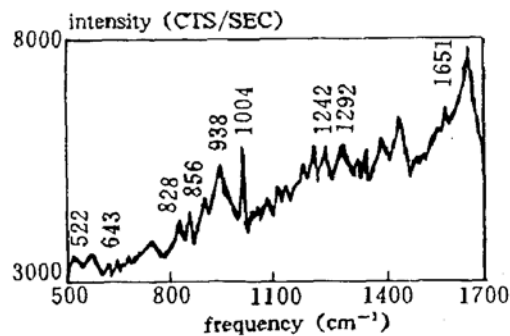


Fig. 4 Raman spectrum of 5% BSA : Subtracts the background occurring in 2% nitrobenzene

3 结果与讨论

图 3、图 4 为 5% BSA 水溶液在 $500\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ 范围内的激光喇曼谱. 这与已发表文献^[3~6]的结果是基本一致的. 其各喇曼峰的相对强度和频率位置如表 1 所列.

蛋白质是由氨基酸通过肽链连接起来的生物大分子. 能够提供其蛋白质结构信息的喇曼光谱带主要有肽链的酰胺 I、酰胺 II 谱带, 组成肽链的氨基酸残基(侧链)的谱带以及硫-硫桥键的谱带等^[7].

3.1 主链构象

蛋白质主链构象在喇曼光谱中主要反映在酰胺基团的振动频率上, 即酰胺 I 和酰胺 II. 对于蛋白质的多肽链, α -螺旋和无规则卷曲的酰胺 I 谱带频率位于 $1645\sim 1680\text{ cm}^{-1}$; β -折迭、 β -回转的酰胺 I 谱带位于 $1665\sim 1680\text{ cm}^{-1}$; 而 α -螺旋和 β -回转的酰胺 II 特征谱带出现在 $1260\sim 1295\text{ cm}^{-1}$, β -折迭和无规则卷曲的酰胺 II 特征谱带出现在 $1230\sim 1250\text{ cm}^{-1}$. 由该牛血清白蛋白样品酰胺 I 谱带出现在 1651 cm^{-1} , 可推出样品中基本没有 β -折迭和 β -回转的存

在, 再进一步推出 1242 cm^{-1} 的酰胺 III 谱带归属于无规则卷曲, 1292 cm^{-1} 的酰胺 III 谱带归属于 α -螺旋. 由此推得牛血清白蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲两种结构组成. 这结果和文献 [3~5] 是一致的.

3.2 侧链环境

蛋白质的某些残基的侧链谱带对环境变化敏感. 酪氨酸残基在 856 cm^{-1} 和 828 cm^{-1} 处出现两个特征谱带. 这两个谱带的强度可以表征酪氨酸残基在蛋白质中的微环境的变化. 由公式

$$N_{buried} + N_{exposed} = 1,$$

$$0.5N_{buried} + 1.25N_{exposed} = I_{856}/I_{828},$$

可以计算出酪氨酸残基是“埋藏”式的还是“暴露”式的⁽⁸⁾. 由图中测得 $I_{856}/I_{828} \approx 1.25$, 代入公式则计算出酪氨酸残基在该牛血清白蛋白中是全“暴露”式的.

Table 1 Raman Spectrum of BSA in Aqueous Solution

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Tentative assignment	Frequency (cm^{-1})	Intensity	Tentative assignment
522	W	$\gamma(\text{s-s})$	1050	W	(c-N)
564	W		1075	W	(c-N)
643	W	Tyr + $\gamma(\text{c-s})$	1112	m	(c-N)
662	W	$\gamma(\text{c-s})$	1128	W	(c-N)
744	W		1182	W	Tyr
828	m	Tyr	1208	ms	Tyr + phe
856	ms	Tyr	1242	m	Amide III
902	m		1292	m	Amide III
938	s	$\gamma(\text{c-c-N})\text{sym}$, Skeletal (α -helical)	1320	W	$\delta(\text{cH})$
			1396	m	$\gamma(\text{coo-})\text{Sym}$
1004	s	phe + Trps	1450	s	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$
1031	W	phe	1593	m	phe + Tyr
			1651	Vs	Amide I

W-weak, S-strong, m-medium, V-very, γ -Stretching Vibration, δ -deformation Vibration

3.3 侧链构型

由 Sugeta 理论⁽⁷⁾, 蛋白质中肽链硫-硫桥键出现的谱带并不依赖于 C-S-S-C 二面立体角, 而依赖于 C-C-S-S-C-C 的扭转角度. 激光喇曼光谱能区分三种硫-硫键段的几何构型, 即扭式-扭式-扭式, 反式-扭式-扭式和反式-扭式-反式三种, 它们的硫-硫键振动谱带分别出现在 510 cm^{-1} 、 525 cm^{-1} 和 540 cm^{-1} 附近. 图中显示出牛血清白蛋白的硫-硫键振动谱带位于 522 cm^{-1} , 即表明 C-C-S-S-C-C 链段的几何构型为反式-扭式-扭式. Chen 等人的结果中⁽⁵⁾, 牛血清白蛋白水溶液中蛋白质的二硫键几何构型为扭式-扭式-扭式. 本结果与之不同, 其原因可能在于样品的来源不同, 或是硝基苯作用.

参 考 文 献

- [1] 陈国珍, 黄贤智等, 荧光分析法. 第二版, 北京: 科学出版社, 1990: 112~132
- [2] 柯惟中, 陈家胜, 联接双单色仪和光子计数系统的喇曼光谱数据记录装置. 光散射学报, 1991年, 3(1-2): 70~75
- [3] A. M. Bellocq, R. C. Lord, R. Mendelsohn, Laser-Excited Raman Spectroscopy of Biomolecules, III. Native Bovine Serum Albumin and β -Lactoglobulin. *Biochim. & Biophys. Acta*, 1972, 257: 280~287
- [4] S. K. Freeman, *Applications of Laser Raman Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 1974: 278~281
- [5] M. C. Chen, R. C. Lord, Laser-Excited Raman Spectroscopy of Biomolecules, VIII. Conformational Study of Bovine Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98(4): 990~992
- [6] V. J. C. Lin, J. L. Koenig, Raman Studies of Bovine Serum Albumin. *Biopolymers*, 1976, 15: 203~218
- [7] A. T. Tu, *Raman Spectroscopy in Biology, Principles and Applications*. New York: John Wiley & Sons, 1982: 66~108
- [8] M. N. Siamwiza, R. C. Lord, M. C. Shen *et al.*, Interpretation of the Doublet at 850 and 830 cm^{-1} in the Raman Spectra of Tyrosyl Residues in Proteins and Certain Model Compounds. *Biochemistry*, 1975, 14: 4870~4873

The Raman Spectra of Bovine Serum Albumin in Aqueous Solution

KE Weizhong YU Duowei* CHEN Wanrong

(Physics and Chemistry Centrolab, Nanjing Normal University Nanjing 210024)

(Received 10 January 1992; revised 27 February 1992)

Abstract

The Raman spectra of BSA in 5% aqueous solution extracted by nitrobenzene have been studied. The amide I band appears at 1651 cm^{-1} , amide III band appears at 1292 and 1242 cm^{-1} . The characteristic Raman bands of the tyrosine residue are at 856, 828 and 643 cm^{-1} . The band of the s-s bond is at 522 cm^{-1} . All the characteristic Raman bands of unis protein peptide prove that its structure consists of α -helical and random-coil. The tyrosine residue is "exposed" and the conformation of the carbon atoms in the disulfide bridge C-C-S-S-C-C is trans-gauche-gauche.

Key Words Raman spectra, bovine serum albumin (BSA), nitrobenzene.

* *Biology Department, Nanjing Normal University, Nanjing 210024*