

使用圆二色性光谱和红外光谱研究冬小麦麸皮抗冻蛋白的二级结构

张超^{1,2}, 张晖^{2*}, 赵晓燕¹, 马越¹, 姚惠源²

1. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

2. 江南大学食品科学与工程国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要 使用圆二色性光谱和红外光谱技术对冬小麦麸皮抗冻蛋白的二级结构进行了研究。由于冬小麦麸皮抗冻蛋白在酰胺带和带位置中, 各个特征峰相互叠加, 因此采用 Gausse 峰型对圆头峰进行拟合、解析, 判断其 α -helix, β -sheet, β -turn 和 Random coil 的相对含量; 同时对圆二色性光谱获得的结构信息, 采用按照 Chen-Yang 原理和最小二乘法编写的程序计算了冬小麦麸皮抗冻蛋白的二级结构。最后, 讨论了两种检测方法结果差异的原因, 为冬小麦麸皮抗冻蛋白抗冻机理的研究奠定基础。

关键词 冬小麦麸皮抗冻蛋白; 二级结构; 傅里叶变换; 红外光谱; 圆二色性光谱; 酰胺带和带

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)07-1764-04

引言

抗冻蛋白是一种具有降低体系冰点、抑制体系发生重结晶作用的蛋白质, 其独特的特性是与其结构密不可分的^[1]。在前文的研究中, 本课题组从冬小麦中筛选获得抗冻蛋白 TaAFP^[2], 但是对其结构和抗冻机理还知之甚少。为了进一步研究 TaAFP 的抗冻机理, 本文对 TaAFP 的二级结构进行了研究, 通过对 TaAFP 二级结构的解析, 可以为从理论上解释 TaAFP 与冰晶结合的方式与结合位点奠定基础, 有效地揭示 TaAFP 的抗冻机理。

光谱技术是研究生物蛋白质构象与功能关系的一种有效途径, 其中圆二色光谱(CD)可以灵敏地反映出蛋白质构象的变化, 已被广泛应用于蛋白质的构象研究中^[3,4]。傅里叶变换红外光谱(FTIR)属于振动光谱, 主要研究分子间能级的跃迁, 是依据被检测样品中某一化学成分在近红外光谱区的吸收特性不同而进行定量检测的一种无损、非破坏的绿色分析方法^[5,6]。通过测定样品酰胺带和带构象中 α -helix, β -sheet, β -turn 和 Random coil 的相对含量, 最终获得样品的二级结构信息^[5,7-9]。本文结合使用 CD 和 FTIR 光谱的两种测定方法, 最终确定了 TaAFP 的二级结构信息。

1 材料与方法

1.1 TaAFP 的分离纯化

TaAFP 按照本课题组已报道的方法进行纯化^[2]。

1.2 圆二色光谱检测

将样品溶解于 ddH₂O, 蛋白浓度达到 0.1 mg · mL⁻¹, 测定远紫外区(190 ~ 250 nm) CD 谱。采用光径 0.1 cm, 分辨率为 0.2 nm, 谱带宽度为 1.0 nm, 灵敏度为 20 mdeg, 响应时间为 0.25 s, 扫描速度为 100 nm · min⁻¹, 环境温度 25 °C, 重复扫描 8 次, 累加得到 CD 谱图。

图谱经过仪器本底消除和溶液空白差减, 然后用根据 Chen-Yang 原理^[6]和最小二乘法编写^[10]的程序计算 α -helix, β -sheet, β -turn 和 Random coil 的百分比含量。

1.3 FTIR 光谱检测

将冻干样品置于干燥器内用 P₂O₅ 充分干燥, 称取样品 1 mg, 与 100 mg 溴化钾研磨混匀压片测定 FTIR。在数据采集期间, 为了减少水蒸汽 IR 吸收的干扰, 持续用干燥的 N₂ 淋洗测量室。在与样品测定完全相同的条件下在室温敞开状态收集空气背景。测定在波数范围为 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 的吸收光谱, 分辨率 4 cm⁻¹, 波数精度 0.01 cm⁻¹, 扫描次数 32 次, 环境温度 25 °C。

谱图处理利用 Systat 的 Peakfit Version 4.11 软件差减背景谱图, 差减后的谱图在谱带范围内(酰胺带 1 600 ~

收稿日期: 2008-06-16, 修订日期: 2008-09-18

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2001BA501A03)资助

作者简介: 张超, 1978 年生, 北京市农林科学院蔬菜研究中心助理研究员 e-mail: zhangchao@nercv.org

*通讯联系人 e-mail: hui1003@hotmail.com

1 700 cm^{-1} ; 酰胺带 (1 220 ~ 1 330 cm^{-1}) 进行两点基线校正, 进行 9 点 Savitsky-Golay 函数平滑^[11], 做二阶导数谱并同时采用 Gauss 峰形进行拟合, 估算出子峰的个数和位置^[12], 手动调整各子峰的峰高和半峰宽, 多次拟合使残差最小 ($r^2 \geq 0.999$), 重叠在一起的不同谱带可完全分辨, 确定各子峰与各个二级结构的对应关系后, 根据其积分面积计算各种二级结构的相对百分含量。

2 结果与讨论

2.1 TaAFP 使用 CD 光谱检测结果

TaAFP 的 CD 光谱[图 1(a)] 在 193 nm 处有正吸收峰; 在 215 nm 附近有 β -sheet 的特征负吸收峰; 不存在 α -helix 所特有的 209 和 222 nm 的双负槽峰。因而推测, TaAFP 只含少量或不含 α -helix, 具有部分 β -sheet 结构。

采用 Jasco J-715 圆二色谱仪计算机程序 (主要根据 Chen-Yang 原理^[6] 和最小二乘法^[10] 原理), 计算 TaAFP 中各种二级结构的百分含量[图 1(b)]。结果显示 TaAFP 的 α -helix, β -sheet, β -turn 和 Random coil 的含量分别为 11.7%, 52.6%, 0.7% 和 35.0%。

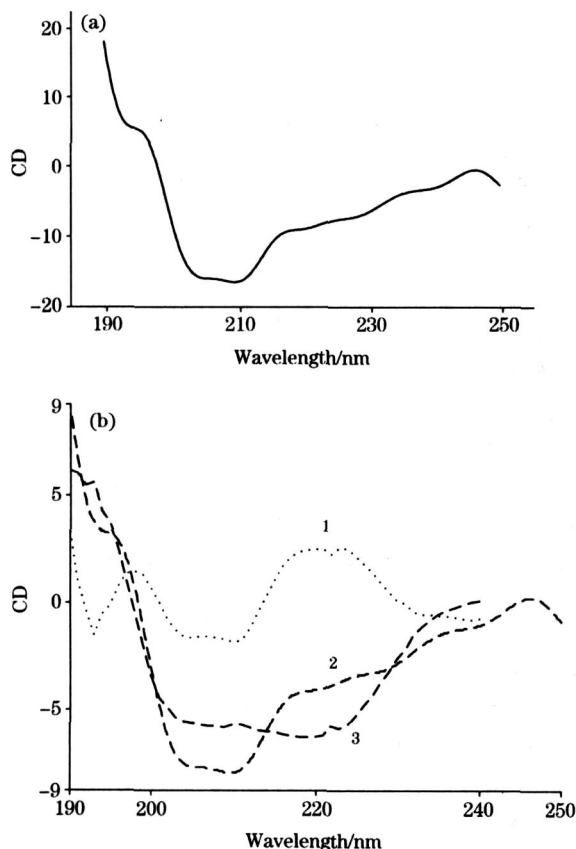


Fig 1 Circular dichroism spectra and the experimental analysis of TaAFP

(a): Circular dichroism spectra of TaAFP;

(b): Secondary structure of the experimental analysis of TaAFP

1: Residue; 2: Observe; 3: Calculate

2.2 TaAFP 使用 FTIR 光谱检测结果

使用 FTIR 对 TaAFP 的二级结构进行研究, 主要对影响其二级结构的酰胺带, 带和带构象进行讨论(图 2)。根据相关文献报道显示图 2 中, 1 659 cm^{-1} 的吸收峰主要归属于酰胺带的吸收, 1 547 cm^{-1} 的吸收峰归属于酰胺带的吸收, 1 299 cm^{-1} 的吸收峰归属于酰胺带的吸收^[14, 15], 1 395 cm^{-1} 的吸收峰主要归属于酰胺带的吸收, 鉴于 TaAFP 酰胺带的峰特征不明显。因此, 主要对 TaAFP 酰胺带和酰胺带进行解析, 并综合酰胺带和酰胺获得的构象信息, 最终获得 TaAFP 的二级结构。

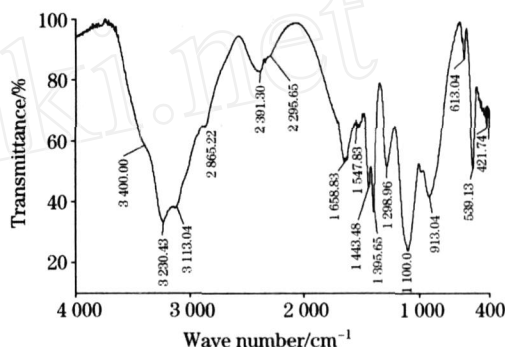


Fig 2 FTIR spectra of TaAFP

在酰胺带 (1 600 ~ 1 700 cm^{-1}) 和酰胺带 (1 220 ~ 1 330 cm^{-1}) 的图谱中, α -helix, β -sheet, β -turn 和 Random coil 的吸收峰彼此严重重叠, 因此形成圆头峰。为了使各个峰分开, 利用傅里叶红外光谱退卷积技术, 同时考虑各吸收峰相对吸光度差别的校正问题, 将漫反射粉末直接红外光谱技术所得结果进行解卷积后, 分别在酰胺带和酰胺带范围内获得 9 个吸收峰(图 3), 然后对各个吸收峰进行指认, 确定了各个吸收峰的位置和峰面积, 并使拟合图谱与原图谱残差 $r^2 \geq 0.999$ 。

具体来说, 酰胺谱带 (1 600 ~ 1 700 cm^{-1}) 的振动频率取决于 C=O 和 N-H 之间的氢键性质, 即特征振动频率, 反映了多肽或蛋白质的特定二级结构信息^[15]。根据报道在酰胺带中, 1 612, 1 621, 1 631 和 1 641 cm^{-1} 为 β -sheet 的特征吸收峰, 1 650 和 1 659 cm^{-1} 为 α -helix 的特征吸收峰, 1 659 和 1 668 cm^{-1} 为 Random coil 的特征吸收峰, 1 678 和 1 688 cm^{-1} 为 β -turn 的特征吸收峰[图 3(a)]^[5, 6]。综合 CD 光谱的分析结果, TaAFP 中 α -helix 的含量较小, 而 1 659 cm^{-1} 处于 α -helix 和 Random coil 的交界位置, 因此将 1 659 cm^{-1} 峰归属于 Random coil 比较合理(表 1)。通过对酰胺带峰形拟合, 最终获得在 TaAFP 中, α -helix β -sheet β -turn Random coil = 15.87 36.00 17.31 30.82。对图 3(a) 拟合谱各峰进行了二级结构指认, 结果见表 1。

按照类似的方法, 酰胺带中 1 238, 1 250, 1 262 和 1 274 cm^{-1} 为 β -sheet 的特征吸收峰, 1 274 和 1 287 cm^{-1} 为 β -turn 的特征吸收峰, 1 299 和 1 311 cm^{-1} 为 α -helix 的特征吸收峰, 1 311, 1 323 和 1 336 cm^{-1} 为 Random coil 的特征吸收峰[图 3(b)]。综合酰胺带的分析结果, TaAFP 中 α -helix 的含量较小, 而 1 311 cm^{-1} 处于 α -helix 和 Random coil 的

交界位置, 所以将 $1\,311\text{ cm}^{-1}$ 峰归属于 Random coil 比较合理。而 $1\,274\text{ cm}^{-1}$ 处于 β -sheet 和 β -turn 的交界位置, 若归于 β -sheet, 则可以于酰胺带的结果相互吻合, 因此, 将 $1\,274$

cm^{-1} 子峰归于 β -sheet (表 1)。通过对酰胺带峰形的拟合, 最终可以获得在 TaAFP 中 α -helix β -sheet β -turn Random coil = 15. 03 36. 92 17. 75 30. 30。

Table 1 Secondary structural compositions of TaAFP determined by FTIR spectra

Amide &	Composition of the secondary structure			
	α -helix	β -sheet	β -turn	Random coil
Peak/ cm^{-1}	1 650 (15. 87)	1 612 (2. 33) , 1 621 (5. 89) , 1 631 (13. 18) , 1 641 (14. 61)	1 678 (10. 84) , 1 688 (6. 47)	1 659 (16. 67) , 1 668 (14. 14)
Content/ %	15. 87	36. 00	17. 31	30. 82
Peak/ cm^{-1}	1 299 (15. 03)	1 238 (4. 98) , 1 250 (7. 90) , 1 262 (9. 74) , 1 274 (14. 29)	1 287 (17. 75)	1 311 (17. 88) , 1 323 (9. 16) , 1 336 (3. 26)
Content/ %	15. 03	36. 92	17. 75	30. 30

The number out of the bracket is the wavelength of the peak (cm^{-1}) and the number in the bracket is the content of the corresponding peak in the line of peak

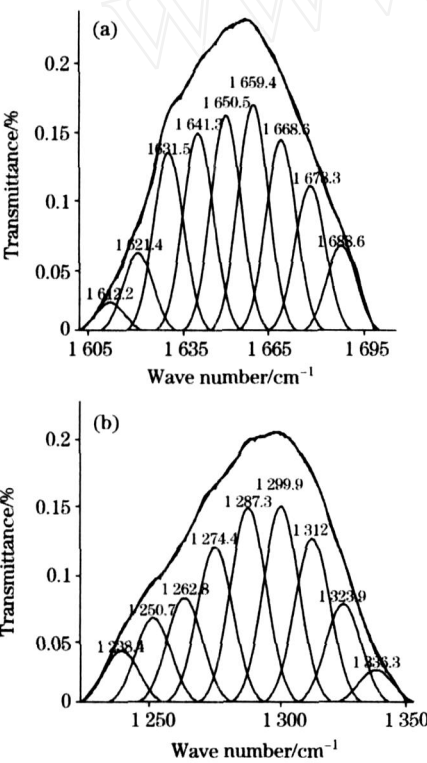


Fig 3 FTIR curve fitting of TaAFP in the amide and region

(a) : Fitting curve of TaAFP amide by Gauss peak;
(b) : Fitting curve of TaAFP amide by Gauss peak

综合分析 FTIR 图谱中酰胺带和酰胺带的结果, TaAFP 的二级结构组成: α -helix 为 15. 05 % ~ 15. 87 %, β -sheet 为 36. 00 % ~ 36. 92 %, β -turn 为 17. 31 % ~ 17. 75 %, Random coil 为 30. 31 % ~ 30. 82 %。

2. 3 FTIR 光谱与 CD 光谱检测结果差异的原因

FTIR 光谱和 CD 光谱测定结果有差别的原因很多, 比如测定温度、测定环境、数据处理方法、样品状态和测定方法等^[16-18]。在本研究中, 测定温度和测定环境的影响可以排除。在 FTIR 光谱数据处理方法方面, 我们曾经尝试使用更多或更少的 Gauss 峰对红外图谱进行拟合, 但是结果显示最优拟合的残差 (R^2) 依然不能达到 0. 98 (数据未显示), 不符合一般数据拟合的要求。所以, 我们选择了 9 个 Gauss 峰对其进行拟合, 应该是最佳的数据处理方法。在 CD 光谱处理中, 使用了最通用按照 Chen Yang 原理^[6]和最小二乘法编写^[11]的程序进行计算, 也应该是非常合理的。因此, 数据处理方法应该也不是造成实验结果差异的主要原因。

综合上述讨论, 测定结果有差异的原因可能在于两种测定方法测定对象的状态不同。CD 光谱研究对象为浓度非常低的 TaAFP 溶液; 而 FTIR 的研究对象为 TaAFP 的固体粉末。TaAFP 在稀溶液的状态下分子结构充分舒展, 同时由于其具有将强的亲水性^[2], 因此, TaAFP 还可能与水发生氢键作用, 对其天然的二级结构可能会产生轻微影响, 类似的结论杨海灵^[16]等也曾经报道过。而一般认为蛋白质固体的有序程度要比在溶液中的有序程度高一些^[19]。因此, FTIR 和 CD 光谱的测定结果有微小差别是合理的。

参 考 文 献

[1] Kristiansen E, Zachariassen K E. Cryobiology, 2005, 51: 262.
[2] Zhang C, Zhang H, Wang L, et al. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007, 55: 7654.
[3] WANG Ao-jin, HU Kun-sheng, SUN Yong-tai (王敖金, 胡坤生, 孙永泰). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 1994, 14(3): 41.
[4] HONG Fa-shui (洪法水). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 583.
[5] XIE Meng-xia, LIU Jun (谢孟峡, 刘俊). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2003, 24: 226.

- [6] Byler D M, Brouillette J N, Susi H. Spectroscopy, 1986, 1: 29.
- [7] XIAO He-lan, SUN Su-qin, ZHOU Qun, et al (肖和兰, 孙素琴, 周 群, 等). Chinese Journal of Atomic and Molecular Physics(原子与分子物理学报), 2003, 20: 211.
- [8] WU Jin-guang (吴瑾光). Application and Technology of Modern FTIR(近代傅里叶变换红外光谱技术及应用). Beijing: Scientific and Technical Documents Publishing House(北京: 科学技术文献出版社), 1994. 23.
- [9] Carter D C, Ho J X. Adv. Protein Chemistry, 1994, 45: 153.
- [10] Watanabe R, Masui R, Mikawa T, et al. J. Biochem. (Tokyo), 1994, 116: 969.
- [11] LIU Yuan, XIE Meng-xia, KANG Juan(刘 媛, 谢孟峡, 康 娟). Acta Chim. Sinica(化学学报), 2003, 61: 1305.
- [12] Surewicz W K, Mantsch H H. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 952: 115.
- [13] Mallapragada S K, Peppas N A. Journal of Applied Polymer Science Part B-Polymer Physics, 1996, 34: 1339.
- [14] Somania P R, Marimuthua R, Viswanatha A K, et al. Polymer Degradation and Stability, 2003, 79: 77.
- [15] YAN Long-fei, SUN Zhi-rong(阎隆飞, 孙之荣). Structure of Protein(蛋白质分子结构). Beijing: Tsinghua University Press(北京: 清华大学出版社), 1999. 120.
- [16] YANG Hai-ling, GAO Bo, ZENG Qing-yin, et al(杨海灵, 高 波, 曾庆银, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2003, 24: 1472.
- [17] LU Yan, ZHANG Wei-wei, WANG Gong-ke(卢 雁, 张玮玮, 王公轲). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2008, 28(1): 88.
- [18] HE Jin-tian, WANG Gai-zhen, SONG Hou-yan(贺进田, 王改珍, 宋后燕). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1209.
- [19] Jagdeesh B. Biochim. Biophys. Acta, 1992, 1120: 123.

The Secondary Structure of Winter-Wheat Bran Antifreeze Protein Determined by FTIR and CD Spectrum

ZHANG Chao^{1,2}, ZHANG Hui^{2*}, ZHAO Xiao-yan¹, MA Yue¹, YAO Hui-yuan²

1. National Vegetable Engineering Research Center, Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China
2. Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract The secondary structure of winter wheat bran antifreeze protein was analyzed by FTIR and CD spectra. The characteristic peaks of the secondary structure of the winter wheat bran antifreeze protein were overlapped from the FTIR analysis. The overlapped peaks of amide and of the winter wheat bran antifreeze protein were fitted by the Gauss peak to show the characteristic peaks of the α -helix, β -sheet, β -turn and random coil. The CD spectrum was evaluated by the Chen-Yang principle and analyzed by the least squares method. Furthermore, the difference between the two analyses was discussed. The final results showed that the α -helix, β -sheet, β -turn and random coil of the winter wheat bran antifreeze protein was 15.05%~15.87%, 36.00%~36.92%, 17.31%~17.75%, and 30.30%~30.82%, respectively. The result would be helpful to the study of the antifreeze mechanism of the winter wheat bran antifreeze protein.

Keywords Winter-wheat-bran antifreeze protein; Secondary structure; Fourier transform infrared spectrum; Circular dichroism spectrum; Amide and

(Received Jun. 16, 2008; accepted Sep. 18, 2008)

* Corresponding author