

疏水表面上吸附态溶菌酶的 DSC 和 FTIR 研究

雷祖猛¹, 耿信鹏^{1*}, 戴丽¹, 耿信笃²

1. 西安工程大学环境与化学工程学院, 陕西 西安 710048

2. 西北大学现代分离科学研究所, 陕西 西安 710069

摘要 联合差示扫描量热 (DSC) 和傅里叶变换红外吸收光谱 (FTIR) 分别研究了鸡蛋白溶菌酶 (Lyz) 在适度疏水吸附剂 (PEG-600) 表面上吸附和折叠时, 不同盐 (硫酸铵) 浓度、表面覆盖度和变性剂 (盐酸胍) 浓度对无水环境的吸附态天然和变性溶菌酶构象变化及热稳定性的影响。研究发现: 随着硫酸铵浓度和溶菌酶表面覆盖度的增加, 吸附态天然和变性溶菌酶的吸热峰温度都逐渐降低, 同时在较高温度下的微扰也增多。吸附发生后, α 螺旋结构减少, β 折叠和 β 转角结构增多。在 FTIR 图谱中, 吸附态变性溶菌酶在 $1400\sim 1425\text{ cm}^{-1}$ 处的 C—C 拉伸振动峰和 $1650\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ 处的酰胺 I 带特征峰都能明显观测到。但是, 与之相比, 相同条件下吸附态天然溶菌酶在 $1650\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ 处特征峰却几乎看不到。吸附态天然溶菌酶发生了结构丢失, 表现得更加不稳定。

关键词 吸附态溶菌酶; 表面覆盖度; 盐浓度; 构象变化; DSC (差示扫描量热)

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)09-2058-04

引言

蛋白在固体表面上的热稳定性研究一直受到人们的关注, 研究手段也是多种多样, 包括红外 (FTIR)^[1], H/D 交换和质谱联用 (HDX-MS)^[2] 以及差示扫描量热 (DSC)^[3,4] 等。通过蛋白去折叠的 DSC 热谱图可以获得蛋白热稳定性的有效信息, 如变性转变温度、变性焓和转变峰的宽窄。其中转变温度直接反映蛋白的热稳定性^[1]。目前蛋白热变性的 DSC 研究多集中在溶液中水合状态的蛋白, 分析蛋白热变性前新峰的峰温和焓变值与蛋白种类、水合值的关系^[5], 而对在疏水表面吸附态无水环境下蛋白的热变性的 DSC 研究却少有报道。无水环境下的 DSC 研究能彻底避开讨论吸附态蛋白分子同水分子之间的相互作用, 从而使人们对吸附态蛋白热性质变化的分析变得更有效。

本文是在吸附实验的基础上, 利用 Sapphire DSC 差示扫描量热仪, 对 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吸附在 PEG-600 上的天然及变性溶菌酶进行热扫描, 讨论升温过程中不同盐浓度、表面覆盖度对吸附态溶菌酶热稳定性的影响, 并与相同条件下吸附态溶菌酶的红外图谱结果相比较, 进一步探讨其构象变化规律。

1 实验部分

1.1 实验仪器及试剂

Sapphire DSC 差示扫描量热仪 (美国 Perkin Elmer 公司); FTIR 5700 型红外光谱分析仪 (美国 Nicolet 公司)。

鸡蛋白溶菌酶 (Lysozyme (EC 3.2.1.17), Lyz, 美国 Sigma 公司), 疏水吸附剂 PEG-600 (经聚乙二醇端基表面改性, 颗粒粒径为 $5.0\text{ }\mu\text{m}$, 孔径 30 nm , 西北大学现代分离科学研究所)。

1.2 溶菌酶的吸附

天然吸附态溶菌酶: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时溶菌酶溶液 ($x\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Lyz, $y\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($w\geq 99.0\%$, 天津石英钟厂霸州市化工分厂), $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ ($w\geq 99.5\%$, 天津石英钟厂霸州市化工分厂, $\text{pH } 7.0$) 与疏水填料 PEG-600 混合振荡 4 h 后离心分离所得, 其中, $x = 0.4, 0.7, 1.0$; $y = 0.0, 0.3, 0.9, 1.5, 1.8, 2.1$ 。

变性吸附态溶菌酶: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时经 $1.8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{GuHCl}$ ($w\geq 99.0\%$, 国药集团化学试剂有限公司) 变性 24 h 的溶菌酶溶液 ($x\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Lyz, $y\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH } 7.0$) 与疏水填料 PEG-600 混合振荡 4 h 后离心分离所得, 其中, $x = 0.4, 0.7, 1.0$; $y = 0.0, 0.3, 0.9$,

收稿日期: 2007-06-02, 修订日期: 2007-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20673080) 资助

作者简介: 雷祖猛, 1983 年生, 西安工程大学硕士研究生 * 通讯联系人 e-mail: xinpenggang@163.com

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5, 1.8, 2.1, 2.4。以上天然及变性溶菌酶的吸附参见文献[6]。

1.3 DSC 测定

将吸附态溶菌酶在室温下于干燥器中充分干燥至恒重,称取一定质量的 PEG-600 填料测试样(小于 5 mg)置于 Sapphire DSC 测试铝池中,以相同型号的空池子作为参比,设定程序在 25~120 ℃ 的温度范围内以 1.0 ℃·min⁻¹ 速率进行热扫描, N₂ 氛围保护。本文所给的热量谱图均按每一个测试样质量规整化为 5 mg 后的量热测试结果。由于在对未吸附实验的 PEG-600 热扫描时,没有明显的吸热或放热峰,因此吸附实验后对 PEG-600 热扫描出现的峰都认为是与吸附态溶菌酶有关的峰。

1.4 FTIR 测定

干燥测试样 PEG-600 填料的处理方法与 1.3 节中 DSC 测定中相同。处理好的测试样在美国 Nicolet 公司 5700 型红外光谱分析仪中设定范围 2 000~600 cm⁻¹ 扫描。并同未吸附的蛋白及 PEG-600 填料在以上范围内扫描结果进行比较。分析天然及变性溶菌酶在发生吸附后特征峰的变化情况。

2 结果及讨论

2.1 表面覆盖度的影响

图 1 为具有不同表面覆盖度的吸附态溶菌酶(25 ℃ 经 1.8 mol·L⁻¹ GuHCl 变性后的溶菌酶,自 2.1 mol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.0 的溶液中吸附到 PEG-600 疏水表面)的 DSC 图谱。

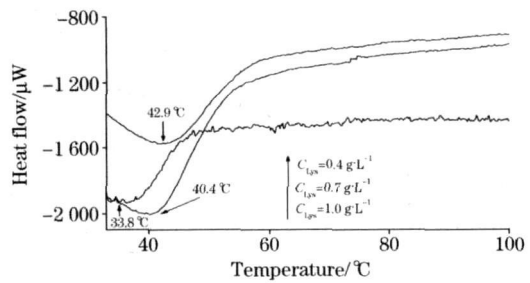


Fig 1 DSC profiles of sample adsorbed by PEG 600 from solutions (2.1 mol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.0 at 25 ℃) with different concentrations of Lyz denatured by 1.8 mol·L⁻¹ GuHCl

图 1 中,当硫酸铵浓度恒定为 2.1 mol·L⁻¹ 时,随着吸附态变性溶菌酶表面覆盖度增加(蛋白初始浓度由 0.4 g·L⁻¹ 增加到 0.7 和 1.0 g·L⁻¹),吸热峰温度逐渐降低(相应地由 42.9 ℃ 降到 40.4 和 33.8 ℃),同时在较高覆盖度下的微扰(DSC 曲线发生微小上下波动却没有明显转变峰^[7])也增多,这在文献[8]也有相关报道。

图 2 和表 1 分别表示溶菌酶和 PEG-600 吸附前和溶菌酶在 PEG-600 表面上被吸附后的 FTIR 图谱。

从图 2 中可以明显看出, 1 083 cm⁻¹ 处为 PEG-600 的特征吸收峰, 1 533 和 1 650 cm⁻¹ 处为蛋白的特征吸收峰。表 1

中,当硫酸铵浓度恒定为 2.1 mol·L⁻¹ 时,随着吸附态变性溶菌酶表面覆盖度增加(蛋白初始浓度由 0.4 g·L⁻¹ 增加到 1.0 g·L⁻¹),酰胺 I 带吸收峰 1 650~1 670 cm⁻¹ 和 C—C 拉伸振动峰 1 400~1 425 cm⁻¹ 都向高频率移动。其中 1 657 cm⁻¹ 处为 α 螺旋结构^[9],而对于特征峰(1 667±2) cm⁻¹ 处的解释不大统一,常见的有 β 转角结构^[1, 10]、β 折叠结构^[11] 或无序结构^[12] 三种说法。溶菌酶在吸附后,其吸收峰发生移动,这与变性溶菌酶在适度疏水表面上发生了部分再折叠有关,而且酰胺 I 带吸收峰是由多种二级结构共同叠加而成的,随着蛋白表面覆盖度的增加,紧密的 α 螺旋结构减少,而松散的 β 折叠和 β 转角结构增多^[1],使得转变温度降低,处在疏水吸附剂 PEG-600 表面的吸附态蛋白分子更容易形成分子间的 β 片层结构^[11, 13]。也再次证明了高表面覆盖度蛋白保留更多二级结构这一说法,同图 1 中 DSC 曲线上观测到的信息相吻合。

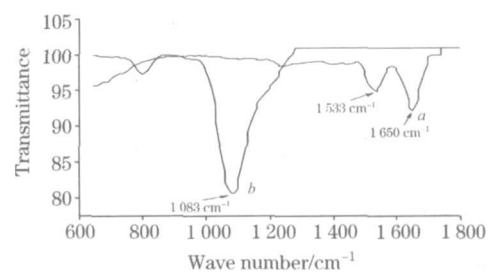


Fig 2 FTIR spectra of Lyz and PEG 600
a: Pure protein; b: PEG-600

Table 1 FTIR spectra of adsorbed Lyz denatured by 1.8 mol·L⁻¹ GuHCl with different concentrations

Lyz concentration (g·L ⁻¹)	Amide I band frequency/cm ⁻¹		C—C stretching frequency/cm ⁻¹	
	Denatured	Native	Denatured	Native
0.4	1 657.3	—	1 413.6	1 413.6
1.0	1 668.7	—	1 417.4	1 431.2

注:表中“—”表示此状态下没能观测到明显的峰

2.2 盐浓度的影响

25 ℃,不同盐浓度条件下,经 1.8 mol·L⁻¹ 盐酸胍变性的 1.0 g·L⁻¹ 溶菌酶在 PEG-600 表面吸附态的 DSC 图谱如图 3 所示。可以看出,当蛋白浓度恒定为 1.0 g·L⁻¹ 时,在高盐(从 1.5 mol·L⁻¹ 逐渐变化到 1.8, 2.1, 2.4 mol·L⁻¹)

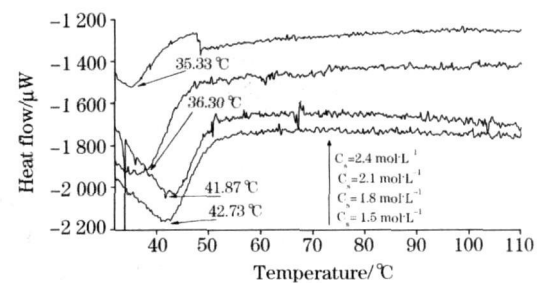


Fig 3 DSC profiles of Lyz adsorbed from 1.0 g·L⁻¹ Lyz solutions denatured by 1.8 mol·L⁻¹ GuHCl with different (NH₄)₂SO₄ concentrations

条件下,随着硫酸铵浓度的增加,吸热峰对应的温度和峰的强度都是逐渐降低的。吸附态溶菌酶在较高温度下开始出现微扰结构时的温度变化也同样符合这个规律。这与文献[14]报道的高离子强度时,疏水相互作用增强,蛋白聚集趋势较低,此时热稳定性也较低的观点是一致的。

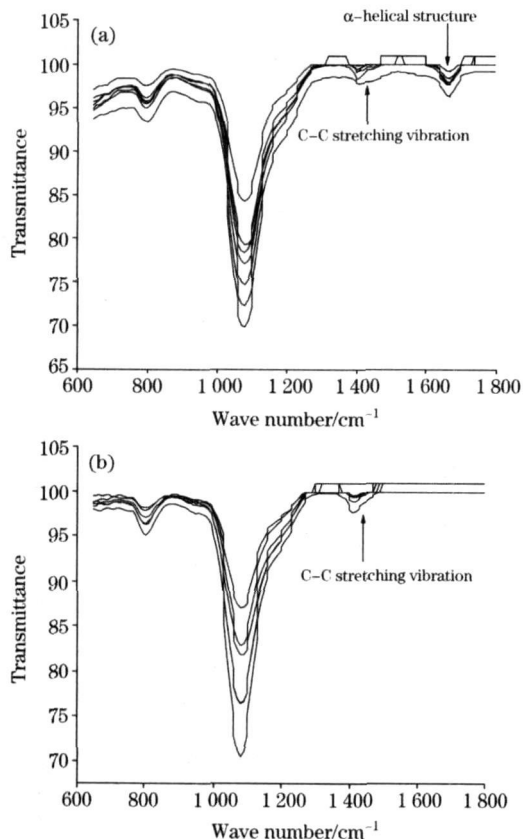


Fig 4 FTIR spectra of adsorbed Lyz denatured by $1.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GuHCl (a) and native Lyz (b) adsorbed from $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyz solutions with varying $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations, respectively

图4为蛋白浓度恒定为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,硫酸铵浓度分别为 $0.0, 0.3, 0.9, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的FTIR图谱。图4(a)中所有吸附态溶菌酶酰胺I带的特征峰都向高频率移动,如表2所示,从吸附前的 1650 cm^{-1} 到吸附后的 $1665 \sim 1669 \text{ cm}^{-1}$ 。这是形成分子间 β 片层结构^[11]的明显特点。因为在高离子强度条件下,变性溶菌酶和疏水吸附剂PEG 600表面的疏水相互作用增加,使吸附态溶菌酶的侧向相互作用(或分子间的氢键作用)加强,趋向于形成分子间 β 片层结构。对于相同吸附体系的量热研究^[6]表明,随盐浓度增大,蛋白疏水肽链与适度疏水表面间的疏水相互作用增强;在高盐条件下,疏水相互作用和有序分子构象作用引起的焓驱动促使部分变性的蛋白在PEG-600表面上的吸附及折叠。吸附态溶菌酶在较高盐浓度条件下稳定性降低也是可能的。由于二级结构几乎存在于所有盐浓度条件下,可以推测,可能是由于二级结构多肽链的折叠而引起的三级结构改变最终影响了吸附态溶菌酶的稳定性^[1, 11]。

Table 2 FTIR spectra of adsorbed Lyz denatured by $1.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GuHCl and native Lyz adsorbed from $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyz solutions with varying $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations, respectively

Lyz concentration /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Amide I band frequency/ cm^{-1}		C—C stretching frequency/ cm^{-1}	
	Denatured	Native	Denatured	Native
0.0	1 668.7	—	—	—
0.3	1 664.9	—	1 409.7	1 417.4
0.9	1 668.7	—	1 402.1	1 425.0
1.5	1 664.9	—	1 405.9	1 421.2
1.8	1 664.9	—	1 402.1	1 421.2
2.1	1 668.7	—	1 417.4	1 421.2
2.4	1 664.9	—	1 402.1	—

2.3 变性程度的影响

25°C ,天然和经 $1.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍变性的溶菌酶自溶液($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyz, $2.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0)吸附到PEG 600表面的吸附态试样的DSC图谱如图5所示。可以看出,当硫酸铵浓度为 $2.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,蛋白初始浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyz时,吸附态天然溶菌酶的转变温度低于变性溶菌酶(图中变性态的转变温度为 35.1°C ,而天然态转变温度更低些)。说明吸附态的天然溶菌酶与相同条件下的变性态相比,更加不稳定。这与红外光谱中吸附态天然溶菌酶 $1650 \sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ 处特征峰几乎观测不到图4(b)和表2是一致的,也与由热力学函数分量分析天然溶菌酶在疏水表面上吸附时的次级过程相对较弱所得到的结果^[15]相吻合。

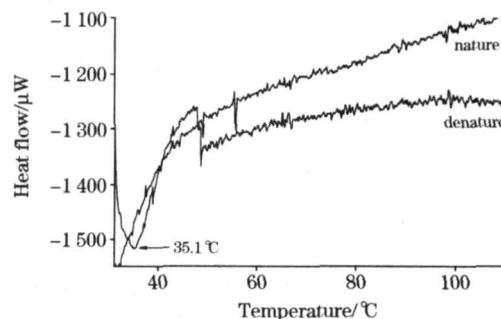


Fig 5 DSC profiles of adsorbed Lyz denatured by $1.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GuHCl and native Lyz adsorbed from $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lyz, $2.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solutions, respectively

从图4和表2中均可看出,吸附态变性溶菌酶FTIR图谱中 $1400 \sim 1425 \text{ cm}^{-1}$ 处C—C拉伸振动峰和 $1650 \sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ 处酰胺I带特征峰都能明显观测到,但是,与之相比,相同条件下吸附态天然溶菌酶 $1650 \sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ 处特征峰却几乎看不到。这是因为,当变性溶菌酶吸附到疏水吸附剂PEG 600表面时,表面上有更多暴露的疏水残基来结合配体,二级结构在复性后形成并在朝向外部的变性条件下保留,因此,酰胺I带可以被检测到。对于吸附态天然溶菌酶,酰胺I带的特征峰的消失可以解释为是吸附行为诱导了其构象变化,导致其发生结构丢失^[1, 15],变得更加不稳定。

3 结 论

随着硫酸铵浓度和溶菌酶表面覆盖度的增加,吸附态天然和变性溶菌酶的吸热峰温度都逐渐降低,同时在较高温度下的微扰也增多。吸附发生后, α 螺旋结构减少, β 折叠和 β

转角结构增多。表明吸附态溶菌酶的热稳定性降低。吸附态天然或变性溶菌酶在较高盐浓度和表面覆盖度时,都可能发生三级结构改变。天然和变性溶菌酶在 PEG 600 表面的吸附倾向是不同的,同变性溶菌酶在适度疏水表面折叠而复性相比较,吸附导致了在 PEG 600 表面天然溶菌酶结构的丢失,吸附态天然溶菌酶变得更加不稳定。

参 考 文 献

- [1] Natascha B, Petra B W, et al. Journal of Colloid Inter. Sci., 2006, 299: 56.
- [2] Helén L, Sven O, Jos B. Journal of Colloid Inter. Sci., 2004, 276: 261.
- [3] Haynes C A, Sliwinsky E, Norde W. Journal of Colloid Inter. Sci., 1994, 164: 394.
- [4] Haynes C A, Norde W. Journal of Colloid Inter. Sci., 1995, 169: 313.
- [5] FU Ya zhen(傅亚珍). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(15): 1420.
- [6] Geng X P, Wu Y N, Song J R, et al. J. of Thermal Analysis and Calorimetry, 2006, 85(3): 593.
- [7] Peng Z G, Hidajat K, Uddin M S. Colloids Surf. B, 2004, 35: 169.
- [8] Samir U S, Steven M C, Todd M P. Journal of Chromatography A, 1999, 849: 149.
- [9] DENG Hua, SONG Zhan jun, WANG De wen, et al(邓桦, 宋占军, 王德文, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1437.
- [10] HE W Y, LI Y, TANG J H, et al. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 39(45): 165.
- [11] WANG Bin, WANG Jing, YU Jiang, et al(王斌, 王靖, 余江, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 1999, 19(4): 535.
- [12] Fu K, Griebenow K, Hsieh L, et al. Journal of Controlled Release, 1999, 58: 357.
- [13] Yang L, She L, Zhou J G, et al. Inorganic Chemistry Communications, 2006, 9: 164.
- [14] HUANG Youru, HUA Yrfei, WANG Xiaohong(黄友如, 华欲飞, 王晓虹). Journal of Cereals & Oils(粮食与油脂), 2003, (8): 15.
- [15] Geng X P, Zheng M R, Wang B H, et al. J. of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008, 93(2): 503.

DSC and FTIR Study of Adsorbed Lysozyme on Hydrophobic Surface

LEI Zhi meng¹, GENG Xir peng^{1*}, DAI Li¹, GENG Xir du²

1. College of Environment & Chemical Engineering, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China

2. Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract During a process of hen egg white lysozyme adsorption and folding on a moderately hydrophobic surface (PEG 600), the effects of salt ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) concentrations, surface coverage and denaturant (guanidine hydrochloride, GuHCl) concentrations on thermal stability and the changes in the molecular conformation of adsorbed native and denatured lysozyme without aqueous solution were studied with a combination of differential scanning calorimetry (DSC) with FTIR spectroscopy. The results showed that temperature due to endothermic peaks was reduced and the disturbance increased at higher temperature with the increase in salt concentration and surface coverage of adsorbed protein. β Sheet and β Turn structure increased while α Helix structure decreased after the adsorption. The peaks corresponding to both C—C stretching frequency in $1400\text{--}1425\text{ cm}^{-1}$ and amide I band frequency in $1650\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ of adsorbed denatured lysozyme can be detected in FTIR spectra while that due to amide I band frequency of adsorbed native lysozyme almost can't be observed. Adsorption resulted in structural loss of adsorbed native lysozyme, whose performance was less stable.

Keywords Adsorbed lysozyme; Surface coverage; Salt concentration; Conformational change; DSC (Differential scanning calorimetry)

* Corresponding author

(Received Jun. 2, 2007; accepted Aug. 28, 2007)