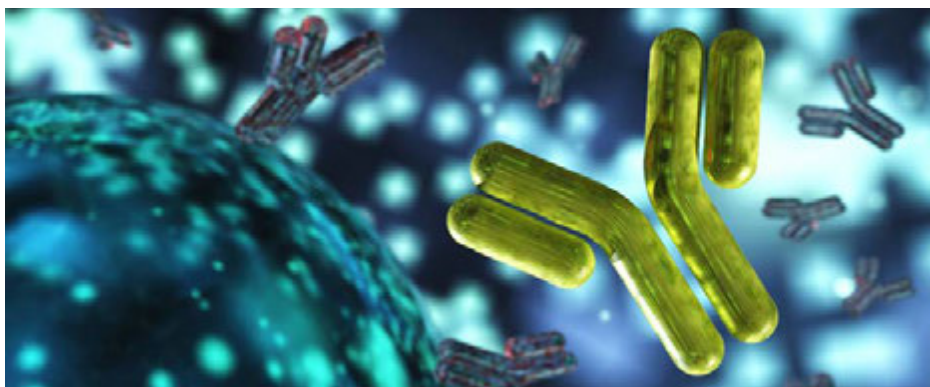


Estimación de la estructura secundaria de las proteínas con el espectrómetro FTIR Agilent Cary 630

Un método rápido y flexible para evaluar la estructura secundaria de las proteínas mediante espectroscopia FTIR



Autores

Ravindra Gudihal y
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones moleculares, lo que se debe en parte a su capacidad de plegarse y adoptar un número casi ilimitado de conformaciones. Por este motivo, la evaluación del alcance de las distintas estructuras secundarias de las proteínas (hélice alfa, hoja beta, giro beta y ovillo aleatorio) resulta esencial para comprender las funciones de las proteínas. En esta nota de aplicación, se empleó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR); en concreto, se usaron el espectrómetro **FTIR Agilent Cary 630** con un módulo de **reflectancia total atenuada (ATR)** y el **software Agilent MicroLab Expert** para realizar una estimación rápida de la estructura secundaria de proteínas en solución. La comparación de los resultados obtenidos por espectroscopia FTIR con los valores bibliográficos correspondientes a la cristalografía por rayos X demuestra la utilidad de este planteamiento como método rápido y flexible para estimar la estructura secundaria de proteínas en solución.

Introducción

Algunos de los primeros estudios de la estructura secundaria de proteínas y péptidos de alto peso molecular se llevaron a cabo por espectroscopia infrarroja¹. La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) y la cristalografía por rayos X también han resultado esenciales para evaluar la estructura de las proteínas^{2,3}; no obstante, ambas técnicas presentan inconvenientes que limitan su uso. El análisis por rayos X exige que la proteína esté en una forma cristalina, lo que conlleva una preparación de muestras compleja y, a menudo, laboriosa; por su parte, la espectroscopia de CD únicamente se puede utilizar en un intervalo estrecho de densidad óptica, lo que hace que la concentración de las muestras esté limitada a un intervalo aproximado de 0,1 a 1 mg/ml.

Las técnicas de espectroscopia FTIR conllevan menos restricciones relativas a la muestra; asimismo, los espectros FTIR muestran bandas de absorción que aportan información valiosa acerca de los modos de vibración disponibles para los grupos amida de la cadena principal de las proteínas; es decir, acerca de la estructura secundaria existente¹. La frecuencia de la banda amida I es un parámetro crucial para determinar las estructuras secundarias. La banda amida I ofrece una sensibilidad adecuada y se ha convertido en un recurso habitual para estimar la estructura secundaria de las proteínas. Esta región del espectro infrarrojo, ubicada habitualmente entre 1.600 y 1.700 cm^{-1} , se rige principalmente por las vibraciones de estiramiento de los grupos C=O y C-N, que actúan como indicadores de la estructura secundaria de las proteínas. Los intervalos característicos de frecuencia de las hélices alfa y las hojas beta de esta banda posibilitan la determinación de estas estructuras. A pesar de que la espectroscopia FTIR no ofrece la alta resolución de la cristalografía por rayos X y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN), resulta sencilla de usar y proporciona una respuesta más rápida y un grado de aplicación más amplio para la estimación de la estructura secundaria.

Experimento

Instrumentos

En este estudio, se usó un espectrómetro FTIR Cary 630 con óptica de ZnSe en combinación con un módulo de ATR de diamante de reflexión única, que tiene una longitud de paso corta y permite el análisis de muestras de proteínas con concentraciones relativamente altas, incluidas muestras viscosas (Figura 1). La adquisición de datos se llevó a cabo mediante el software MicroLab Expert con los parámetros que se recogen en la Tabla 1.



Figura 1. El espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 se equipó con el módulo de ATR de diamante de reflexión única.

Tabla 1. Parámetros experimentales del sistema FTIR Agilent Cary 630.

Parámetro	Valor
Intervalo espectral	De 4.000 a 650 cm^{-1}
Barridos de la muestra/del fondo	140
Resolución	4 cm^{-1}
Factor de llenado cero	Ninguno
Apodización	Triangular
Corrección de fase	Mertz
Tecnología de muestreo	ATR

Muestras: Se adquirieron albúmina de suero bovino (05470), lisozima (clara de huevo de gallina, L-6876), papaína (P4762), β -caseína (C6905) y mioglobina (M1882) a Sigma Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). Asimismo, se adquirió un anticuerpo monoclonal (AcM) a un distribuidor farmacéutico local de Singapur. La muestra de anticuerpo monoclonal se concentró mediante columnas centrífugas concentradoras Vivaspín 500 (10 kDa de MWCO; Sartorius).

Preparación de muestras: Se usaron albúmina de suero bovino (BSA), anticuerpo monoclonal y papaína con una concentración de 10 mg/ml. Además, se usaron lisozima, β -caseína y mioglobina con una concentración de 25 mg/ml. La medición se realizó usando 10 μl de cada muestra de proteína. Se obtuvo agua ultrapura nueva a partir de un sistema integrado MilliQ equipado con un cartucho de membrana de 0,22 μm en el punto de consumo (Merck Millipore). El espectro FTIR del agua pura se sustrajo del espectro FTIR de las soluciones de proteína; a continuación, se analizó el espectro resultante.

Análisis de datos

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el software MicroLab Expert (versión 1.1.0.1):

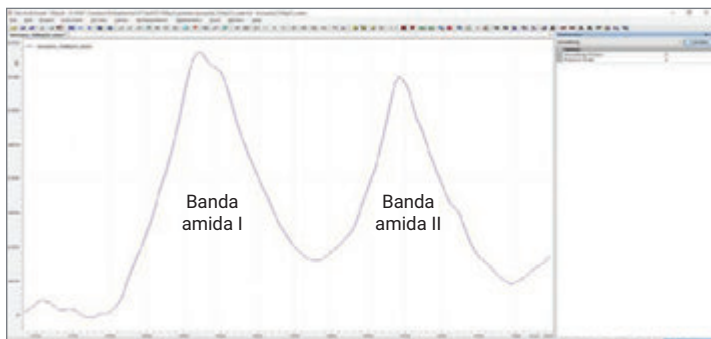
- Se utilizaron los espectros promedio obtenidos a partir de tres mediciones para llevar a cabo el procesamiento de los datos.
- Se sustrajo un espectro en blanco (por ejemplo, del agua o el tampón de formulación) del espectro promedio mediante la función Subtract Spectra (Sustraer espectro) de la sección Spectrum Arithmetic (Aritmética de espectros) que se encuentra en la pestaña Mathematics (Cálculos matemáticos).
- Tras la sustracción del blanco, los espectros se combinaron mediante la función Merge View (Combinar vista) de la pestaña 2D View (Vista en 2D).
- Se llevó a cabo un suavizado adicional usando la ventana 9 de suavizado y el orden polinómico 3 de la pestaña Mathematics (Cálculos matemáticos).
- En el caso de los espectros derivados de segundo orden, se aplicó una derivada de segundo orden de Savitzky-Golay con la ventana 9 de suavizado de la pestaña Mathematics (Cálculos matemáticos).

Estimación de la estructura secundaria mediante un procedimiento de ajuste de la curva con el software MicroLab Expert

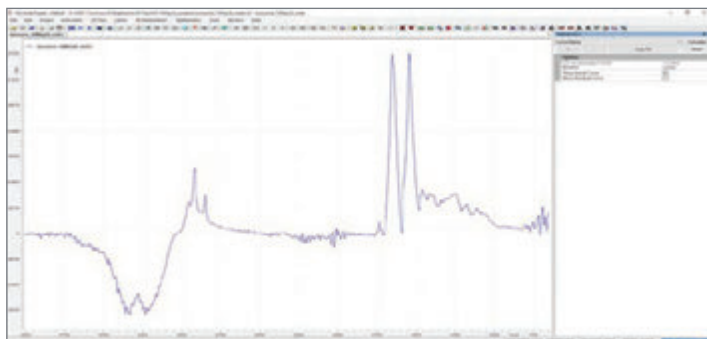
Se llevaron a cabo las siguientes acciones usando el comando Curve Fit (Ajuste de la curva) del menú del software MicroLab Expert:

1. Se realizó una corrección de la línea de base para la banda amida I (1.600-1.700 cm^{-1}) antes de aplicar el ajuste de la curva.
2. Se activó el objeto de datos 2D deseado para el ajuste.
3. En el menú Mathematics (Cálculos matemáticos), se seleccionó la opción **Curve Fit** (Ajuste de la curva).
4. Se hizo clic en el botón **Plus** (Más) para añadir un nuevo pico a la lista de picos estimados.
5. Se ajustaron todos los parámetros necesarios en la pestaña Mathematics (Cálculos matemáticos): Full Width Half Maximum (Anchura total a la mitad del valor máximo del pico), Maximum X Position (Posición máxima en X) y Maximum Y Value (Valor máximo en Y).
6. Se repitió el proceso desde el paso 3 hasta que se definió el número óptimo de picos.
7. Se hizo clic en el botón **Auto Fit** (Ajuste automático).
8. Se hizo clic en el botón **Calculate** (Calcular) para crear una nueva tabla con información detallada de los picos estimados.

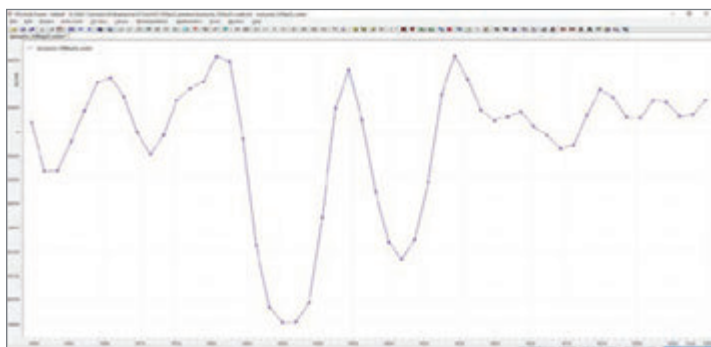
En la Figura 2 se muestra un ejemplo de ajuste de una curva para la lisozima.



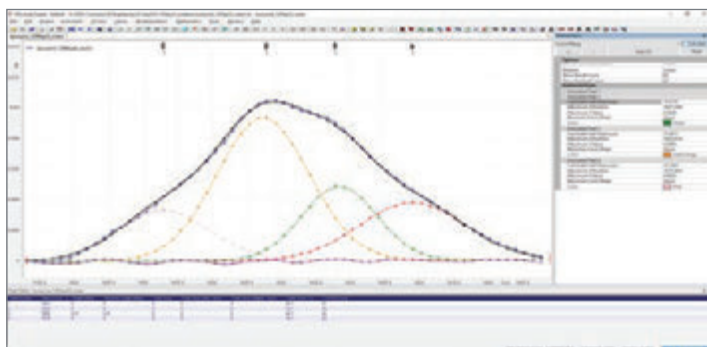
1 Resultado tras sustraer el espectro del agua del espectro promedio de la lisozima.



2 Corrección de la línea de base de la banda amida I (de 1.600 a 1.700 cm^{-1}).



3 Uso de un filtro de Savitzky-Golay con una ventana 9 de suavizado para aplicar una derivada de segundo orden e identificar picos ocultos.



4 Ajuste de la curva a partir del espectro obtenido en el paso 2, centrado en el intervalo espectral de 1.600 a 1.700 cm^{-1} .

Figura 2. Estimación de la estructura secundaria de las proteínas mediante el procedimiento de ajuste de la curva en el software Agilent MicroLab Expert. Las contribuciones de los distintos componentes a la estructura secundaria se estimaron a partir del cálculo del área de la banda asociada al pico de cada componente.

Las contribuciones de los distintos componentes a la estructura secundaria de cada proteína se calcularon a partir del área de la banda del pico de cada componente. La asignación de las estructuras secundarias se realizó según se indica en la Tabla 2. Debido a las diferencias en las interacciones de enlace de hidrógeno entre las proteínas y los distintos entornos en los que están presentes, todos los valores asignados se expresaron como intervalos. Debe tenerse en cuenta la anchura total a la mitad del valor máximo del pico para usarla como referencia para futuras muestras.

Tabla 2. Correlación de la estructura secundaria con la frecuencia de la banda amida I⁴.

Estructura	Frecuencia de la banda amida I (cm ⁻¹)
Hélice alfa	1.648-1.660
Ovillo aleatorio	1.640-1.648
Hoja beta	1.625-1.640
Estructura beta cruzada	1.610-1.628
Giro beta	1.660-1.699

Se asignó un componente centrado entre 1.648 y 1.660 cm⁻¹ a la estructura secundaria de hélice alfa. Las bandas en la región de 1.625 a 1.640 cm⁻¹ se suelen asignar a la estructura de hoja beta (Tabla 2). La conformación de ovillo aleatorio presenta bandas IR aproximadamente entre 1.643 y 1.649 cm⁻¹.

Resultados y comentarios

Se investigaron los espectros infrarrojos de seis proteínas nativas que se caracterizan por diferentes estructuras secundarias conocidas: mioglobina (helicoidal), inmunoglobulina G (laminar), lisozima (helicoidal), albúmina de suero bovino (mayoritariamente helicoidal), papaína (mixta) y β-caseína (aleatoria). El ajuste de los picos se efectuó partiendo de los espectros obtenidos tras la sustracción del agua conforme al procedimiento descrito en la sección “Análisis de datos” (Figura 2). Una banda amida I proporciona escasa información sobre los componentes subyacentes de la estructura secundaria, ya que las anchuras de las bandas de los diferentes componentes son mayores que las separaciones entre sus picos. Para identificar los picos ocultos, se usó la segunda derivada del espectro como método de estrechamiento/afinamiento de los picos. En la Figura 3 se muestra el ajuste general de las curvas correspondientes a las seis proteínas estudiadas. Existen varios picos discretos en la región amida I del espectro.

Se utilizó el área bajo la curva de un espectro infrarrojo, correspondiente a la banda amida I, para asignar estructuras secundarias específicas, como hélices alfa y hojas beta. La asignación se basó en los intervalos característicos de frecuencia que figuran en la Tabla 2. La proporción relativa de cada estructura secundaria presente en la proteína en cuestión se estimó mediante el análisis del área bajo la curva de ajuste asociada a la banda amida I.

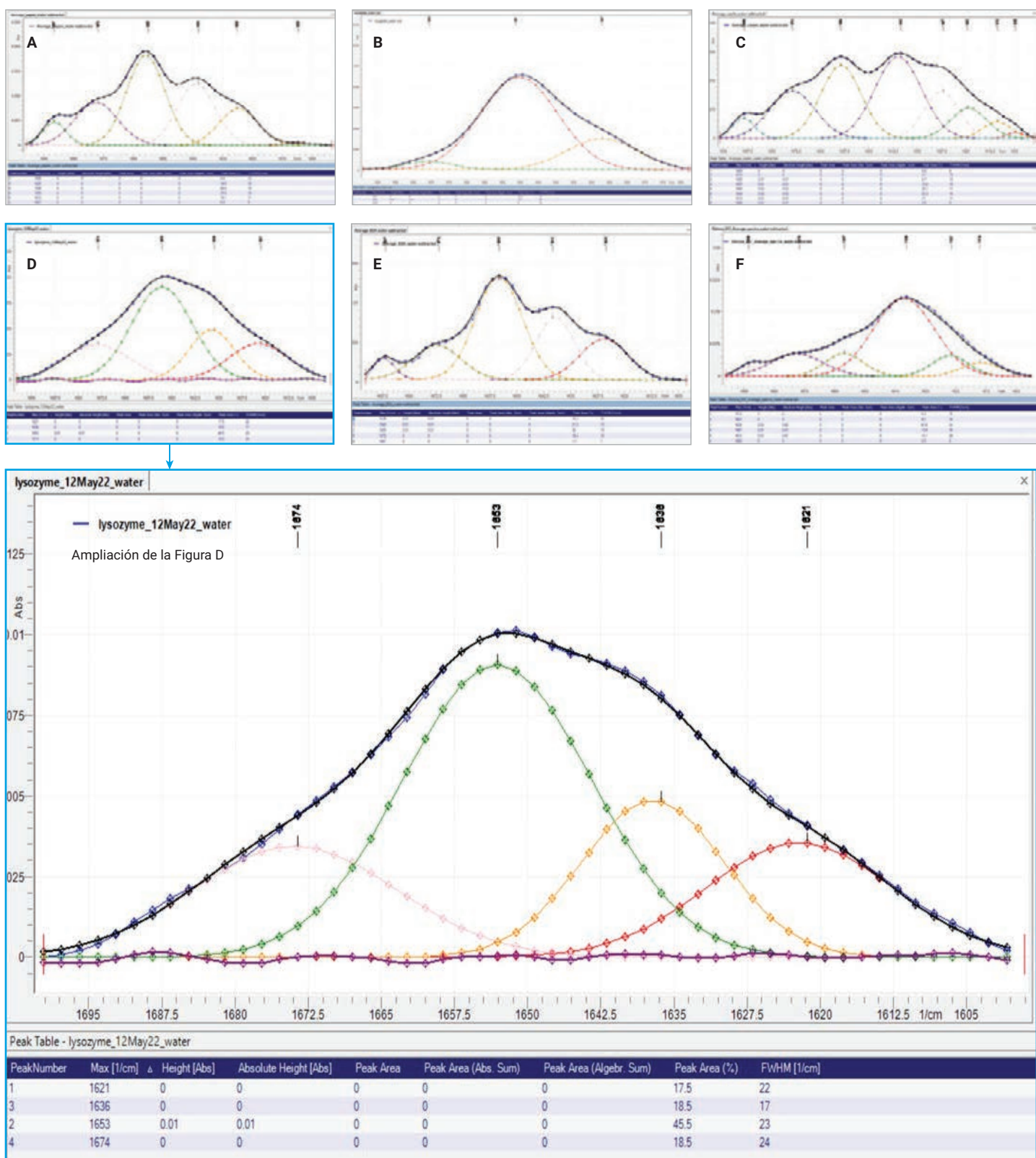


Figura 3. Ajuste de las curvas de las seis proteínas estudiadas: (A) papaína (mixta); (B) mioglobina (helicoidal); (C) β -caseína (desordenada); (D) lisozima (mixta); (E) albúmina de suero bovino (mayoritariamente helicoidal); (F) inmunoglobulina G (laminar). En el cuadro azul aparece ampliada la curva de ajuste de la lisozima.

En la Tabla 3 se resumen los resultados de cuantificación para las distintas estructuras secundarias: hélice alfa, hoja beta, giro beta y ovillo aleatorio.

Tabla 3. Proporción relativa de estructuras secundarias de las proteínas, estimada mediante el ajuste de la curva del espectro FTIR, y comparación con los resultados de los estudios por rayos X⁵⁻⁷.

Proteínas	% de la estructura							
	Hélice alfa		Hoja beta		Giro beta		Ovillo aleatorio	
	Rayos X	FTIR	Rayos X	FTIR	Rayos X	FTIR	Rayos X	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3,1	18	1,4	23	20,6	21
Papaína	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
β-Caseína	ND	23	ND	22	ND	21	ND	34
Lisozima	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IGG (rituximab)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
Mioglobina	85 ⁽⁵⁾	72	ND	23	8	5	7	ND

* Asignado a la estructura beta cruzada.

ND = No definido.

El espectro de la inmunoglobulina G tras la sustracción del agua (Figura 1B) presentó un máximo muy marcado para la banda amida I alrededor de 1.636 cm^{-1} , lo que refleja su elevado contenido de hojas beta, que se confirmó mediante estudios por rayos X⁵. El pico situado a aproximadamente 1.636 cm^{-1} en el espectro de la inmunoglobulina G equivalió al 67 % del área total de la banda amida I. El espectro infrarrojo de la lisozima tras la sustracción del agua mostró una banda amida I relativamente estrecha con un máximo cerca de los 1.654 cm^{-1} , lo que es característico de las proteínas con un elevado contenido de hélices alfa en la estructura secundaria⁵. Conforme a la estimación realizada a partir del ajuste de la curva, la lisozima tiene un componente específico de hélices alfa del 44 % en la posición de la banda a 1.654 cm^{-1} , mientras que el componente de hojas beta es del 19 %. La mioglobina mostró una estructura secundaria en la que predominan las hélices alfa, aunque también está presente el componente de hojas beta. En las proteínas como la BSA, la papaína y la caseína también se observan estructuras secundarias con diferentes componentes. La estructura secundaria de la BSA es sensible a diversas

condiciones experimentales, lo que puede producir variaciones en su distribución estructural. Existen factores, como la temperatura, el pH y la presencia de tensioactivos, que pueden influir sensiblemente en la estructura secundaria de esta proteína, incluida la proporción de hélices. La interacción con las moléculas de agua y la competencia por los enlaces de hidrógeno pueden desestabilizar la estructura helicoidal, lo que pone de manifiesto el delicado equilibrio de las interacciones que mantienen la estabilidad de esta proteína. La cristalización puede contribuir a preservar la conformación nativa de la proteína gracias a la eliminación del solvente, lo que explica por qué la forma más helicoidal de la BSA se suele observar en su estado cristalino⁷⁻⁹.

En la Tabla 3 se resumen los resultados de cuantificación, expresados como porcentajes, de las distintas estructuras secundarias: hélice alfa, hoja beta, giro beta y ovillo aleatorio.

Conclusiones

La presente nota de aplicación sirve como demostración de un método para el análisis de la estructura secundaria de proteínas en solución mediante espectroscopia FTIR. Se utilizó el espectrómetro FTIR Cary 630 con un módulo de ATR de diamante de reflexión única debido a su longitud de paso corta y a que apenas conlleva requisitos asociados a las muestras. El análisis por espectroscopia FTIR exigió resolver la banda amida I en sus componentes constituyentes, lo que se consiguió gracias al software MicroLab Expert. Se aplicó un método de ajuste de la curva de la banda para estimar la proporción relativa de los principales componentes de la estructura secundaria; asimismo, se observó que, en general, los resultados obtenidos por espectroscopia FTIR coincidieron con los datos disponibles en las referencias bibliográficas.

La capacidad del espectrómetro FTIR Cary 630 para estudiar la estructura de las proteínas de forma no destructiva, combinada con su facilidad de uso y unos requisitos mínimos de preparación de muestras, indica que esta técnica puede utilizarse para la evaluación rápida de las características generales de la estructura secundaria y como herramienta para simplificar el cribado de los cambios estructurales inducidos de forma experimental.

Referencias

1. Barth, A. Infrared Spectroscopy of Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics* **2007**, 1767(9), 1073-1101.
2. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (6), 2876-2890. doi: 10.1038/nprot.2006.202. PMID: 17406547; PMCID: PMC2728378.
3. Shi, Y. A Glimpse of Structural Biology Through X-Ray Crystallography. *Cell* **2014**, 159 (5), 995-1014.
4. Jackson, M.; Mantsch, H. H. The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30, 95-120.
5. Levitt, M.; Greer, J. Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 181-239.
6. Kamphuis, I. G.; Kalk, K. H.; Swarte, M. B. A.; Drenth, J. Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1984**, 179, 233-256.
7. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, 52, 174-182.
8. Barreto, M. S. C.; Elzinga, E. J.; Alleoni, L. R. F. The Molecular Insights into Protein Adsorption on Hematite Surface Disclosed by In-Situ ATR-FTIR/2D-COS study. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 13441.
9. Abrosimova, K. V.; Shulenina, O. V.; Paston, S. V. FTIR Study of Secondary Structure of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series* **2016**, 769.

Más información

- [Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer](#)
- [Agilent MicroLab FTIR Software](#)
- [Agilent MicroLab Expert](#)
- [FTIR Analysis & Applications Guide](#)
- [FTIR Spectroscopy Basics – FAQs](#)

www.agilent.com/chem/cary630

DE-001141

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Impreso en EE. UU., 1 de octubre de 2024
5994-7808ES