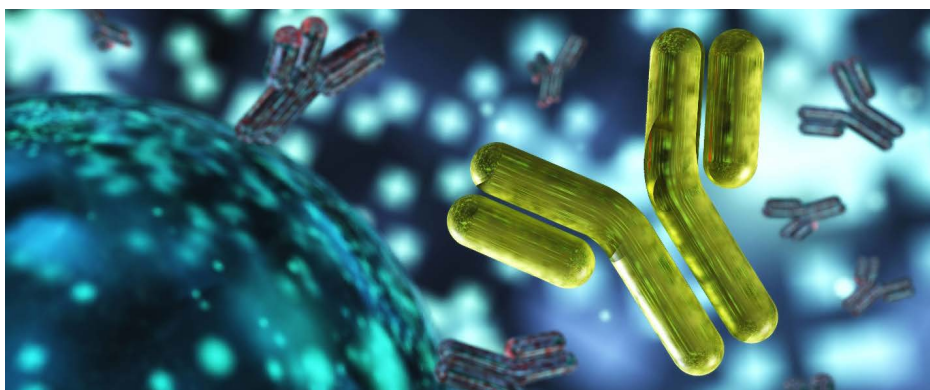


使用 Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪 进行蛋白质二级结构评估

一种采用 FTIR 评估蛋白质二级结构的快速灵活的方法



作者

Ravindra Gudihal 和
Wesam Alwan
安捷伦科技有限公司

摘要

蛋白质具有各种分子功能，部分原因在于它们能够折叠成各种构象。因此，评估 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规则卷曲等蛋白质二级结构的程度对于了解蛋白质功能至关重要。本应用简报采用傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱法，通过配备**衰减全反射 (ATR)**的 **Agilent Cary 630 FTIR** 光谱仪和 **Agilent MicroLab Expert** 软件，快速评估溶液中蛋白质的二级结构。将 FTIR 结果与文献中通过 X 射线晶体分析得到的结果进行比较，证明了此方法可以快速、灵活地评估溶液中的蛋白质二级结构。

前言

最早针对大型多肽和蛋白质二级结构的研究是采用红外光谱进行的^[1]。圆二色性 (CD) 和 X 射线晶体分析也是评估蛋白质结构的重要方法^[2,3]，但这两种技术都有相应的缺点，限制了它们的使用。X 射线分析要求蛋白质呈晶体形式，因此需要复杂且通常耗时的样品前处理流程，而 CD 只能在有限的光密度范围内应用，这将样品浓度限制在了约 0.1–1 mg/mL 的范围内。

FTIR 技术对样品的限制较少，并且 FTIR 光谱显示的吸收带可提供有关蛋白质骨架酰胺基团振动模式的宝贵信息，从而可揭示关于蛋白质二级结构的信息^[1]。酰胺 I 谱带频率是确定二级结构的关键参数。研究结果已经证明，酰胺 I 谱带是一种灵敏且常用的蛋白质二级结构评估参数。红外光谱的这一区域通常位于 $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ，主要受 C=O 和 C-N 基团伸缩振动的影响，而这两个基团可以指示蛋白质的二级结构。在这一谱带内， α -螺旋和 β -折叠的特征频率范围可用于确定这些结构。虽然 FTIR 缺乏 X 射线晶体和核磁共振 (NMR) 波谱的高分辨率，但它的响应速度更快，操作简便，且在二级结构评估方面应用更广泛。

实验部分

仪器

本研究采用配备 ZnSe 光学元件的 Cary 630 FTIR 光谱仪和单反射钻石晶体 ATR 附件，该附件光程较短，可以分析浓度相对较高的蛋白质样品，包括粘稠样品 (图 1)。使用 MicroLab Expert 软件，通过表 1 所示的参数进行数据采集。



图 1. Agilent Cary 630 FTIR 搭配单反射钻石晶体 ATR 附件一起使用

表 1. Agilent Cary 630 FTIR 的实验参数

参数	设定值
光谱范围	$4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$
样品/背景扫描次数	140
分辨率	4 cm^{-1}
补零因子	无
切趾函数	三角
相位校正	Mertz
采样技术	ATR

样品：牛血清白蛋白 (05470)、溶菌酶 (鸡蛋清, L-6876)、木瓜蛋白酶 (P4762)、 β -酪蛋白 (C6905) 和肌红蛋白 (M1882) 均购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。单克隆抗体 (mAb) 购自新加坡当地药店。使用 Vivaspin 500 超滤浓缩离心管离心柱 (10 kDa MWCO; Sartorius) 浓缩 mAb 样品。

样品前处理：使用的牛血清白蛋白 (BSA)、mAb 和木瓜蛋白酶的浓度为 10 mg/mL。使用的溶菌酶、 β -酪蛋白和肌红蛋白的浓度为 25 mg/mL。每个蛋白质样品取 10 μL 进行检测。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Merck Millipore) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。从蛋白质溶液的 FTIR 光谱中扣除纯水的 FTIR 光谱，然后分析得到的光谱。

数据分析

使用 MicroLab Expert 软件（版本 1.1.0.1）进行数据分析：

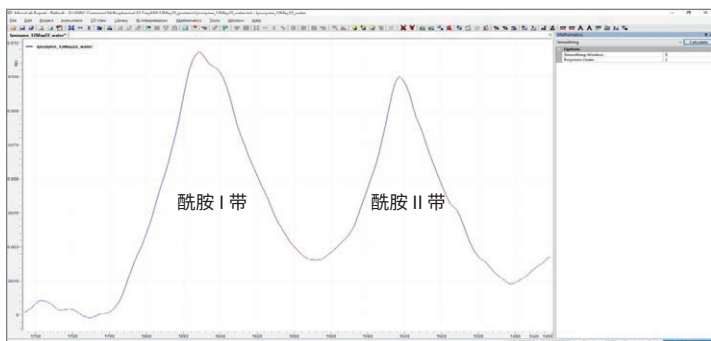
- 使用三次测量的平均光谱进行数据处理
- 使用 Mathematics（运算）选项卡下 Spectrum Arithmetic（光谱运算）的 Subtract Spectra（扣除光谱）函数，从平均光谱中扣除空白光谱（如水或制剂缓冲液）
- 使用 2D View（2D 视图）选项卡的 Merge View（合并视图）合并扣除空白后的光谱
- 在 Mathematics（运算）选项卡上使用平滑窗口 9 和 3 阶多项式进行进一步平滑
- 对于二阶导数光谱，应用了 Mathematics（运算）选项卡下具有平滑窗口 9 的 Savitzky Golay 二阶导数

使用 MicroLab Expert 软件的曲线拟合程序进行二级结构评估

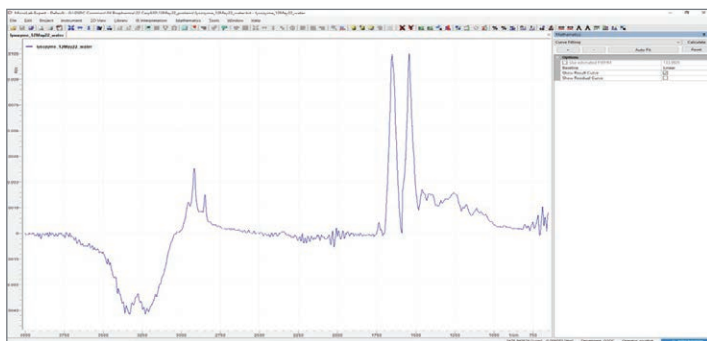
通过 MicroLab Expert 软件的 Curve Fit（曲线拟合）菜单命令，执行以下操作：

1. 对酰胺 I 谱带 ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) 进行基线校正，然后进行曲线拟合
2. 激活要拟合的二维数据对象
3. 从 Mathematics（运算）菜单中，选择 **Curve Fit**（曲线拟合）命令
4. 单击 **Plus**（添加）按钮，将新的峰添加到用于评估的峰列表中
5. 在 Mathematics（运算）选项卡中调整所有必要的参数（FWHM、最大 X 和 Y 位置）
6. 从步骤 3 开始重复，直到确定最佳峰数量
7. 单击 **Auto Fit**（自动拟合）按钮
8. 单击 **Calculate**（计算）按钮创建一个新表，其中包含所评估峰的详细信息

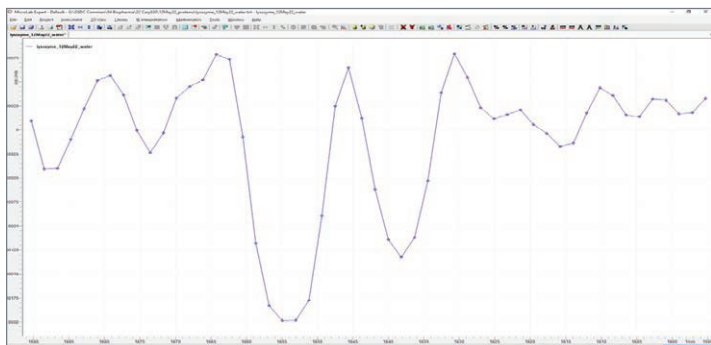
图 2 为使用溶菌酶进行曲线拟合的示例。



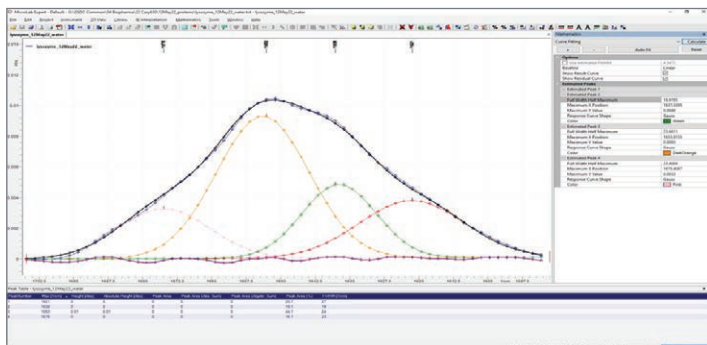
1 从溶菌酶平均光谱中扣除水的光谱获得的结果



2 对酰胺 I 带 ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) 进行基线校正



3 使用 Savitzky-Golay 滤波器（平滑窗口为 9）计算二阶导数，以识别被掩盖的峰



4 对步骤 2 中获得的光谱进行曲线拟合，重点关注 $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围

图 2. 使用 Agilent MicroLab Expert 软件中的曲线拟合程序估计蛋白质二级结构。通过计算每个成分峰的谱带面积来估算各成分对二级结构的贡献

使用每个成分峰的谱带面积来计算各成分对蛋白质二级结构的贡献。根据表 2 分配二级结构归属。由于蛋白质之间的氢键相互作用不同以及它们所处的环境不同，所有的归属结果都显示为一个范围。请记住“半峰宽”，以便将来使用相同样品时作为参考。

表 2. 二级结构与酰胺 I 谱带频率的相关性^[4]

结构	酰胺 I 频率 (cm ⁻¹)
α-螺旋	1648-1660
无规则	1640-1648
β-折叠	1625-1640
交联 β 结构	1610-1628
转角	1660-1699

以 1648 和 1660 cm⁻¹ 为中心的成分归属于 α-螺旋二级结构。1625-1640 cm⁻¹ 范围内的谱带通常归属于 β-折叠结构 (表 2)。无规则卷曲构象会在 1643 和 1649 cm⁻¹ 附近表现出红外谱带。

结果与讨论

本文研究了六种已知具有不同二级结构的天然蛋白质的红外光谱：肌红蛋白（螺旋型）、免疫球蛋白 G（折叠型）、溶菌酶（螺旋型）、牛血清白蛋白（主要为螺旋型）、木瓜蛋白酶（混合型）和 β-酪蛋白（无规则型）。按照数据分析部分所述的程序对扣除水光谱的谱图进行了峰拟合（图 2）。酰胺 I 谱带几乎不能提供关于基本二级结构组成的信息，因为不同二级结构的谱带宽度大于各自峰之间的间隔。为了识别隐藏的峰，使用光谱的二阶导数作为缩小谱带/优化峰形的方法。图 3 为所研究的六种蛋白质的整体曲线拟合。光谱的酰胺 I 谱带区域有几个离散峰。

将红外光谱中拟合曲线下的面积（对应于酰胺 I 谱带）用于分配特定的二级结构归属，例如 α-螺旋和 β-折叠。这一归属分配基于特征频率范围，参考表 2。通过分析酰胺 I 谱带拟合曲线下的面积，可以估算出蛋白质中各二级结构的相对含量。

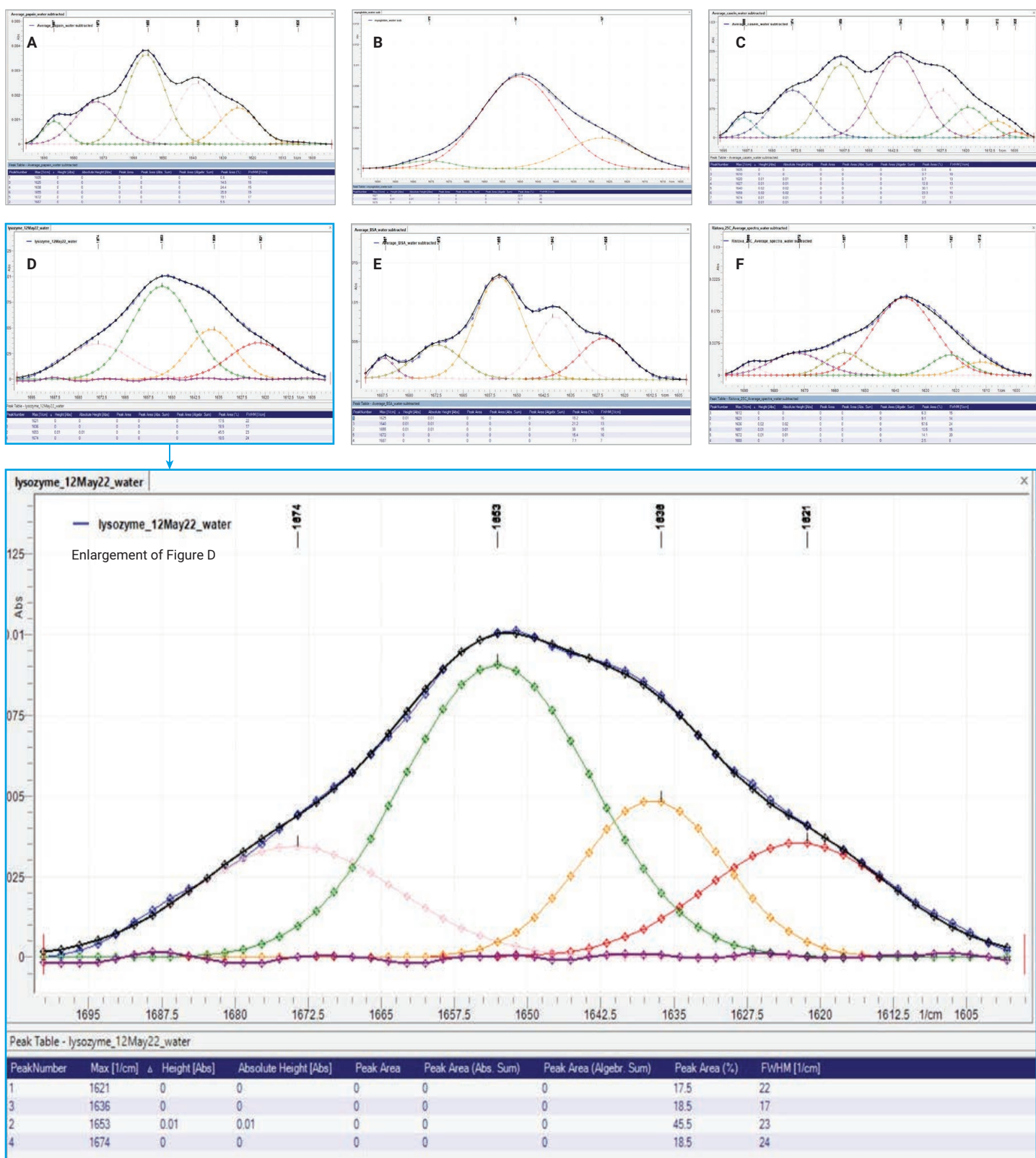


图 3. 所研究的六种蛋白质的曲线拟合: (A) 木瓜蛋白酶 (混合型); (B) 肌红蛋白 (螺旋型); (C) β -酪蛋白 (无规则型); (D) 溶菌酶 (混合型); (E) 牛血清白蛋白 (主要为螺旋型); (F) 免疫球蛋白 G (折叠型)。蓝色框中为放大的溶菌酶拟合曲线

表 3 汇总了 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规则卷曲二级结构的定量结果。

表 3. 通过 FTIR 曲线拟合估计的蛋白质二级结构相对含量，并与 X 射线研究进行比较^[5-7]

蛋白质	结构 (%)							
	α -螺旋		β -折叠		β -转角		无规则卷曲	
	X 射线	FTIR	X 射线	FTIR	X 射线	FTIR	X 射线	FTIR
BSA	74 ⁽⁷⁾	38	3.1	18	1.4	23	20.6	21
木瓜蛋白酶	25 ⁽⁶⁾	36	21	39	4	6	50	19
β -酪蛋白	n.d.	23	n.d.	22	n.d.	21	n.d.	34
溶菌酶	45 ⁽⁵⁾	44	19	19	23	16	13	21*
IGG (利妥昔单抗)	3 ⁽⁵⁾	10	67	67	18	14	12	9
肌红蛋白	85 ⁽⁵⁾	72	n.d.	23	8	5	7	n.d.

* 归属为交联 β 结构

n.d.= 不确定

免疫球蛋白 G 扣除水后的谱图 (图 1B) 在 1636 cm^{-1} 附近有一个非常强的酰胺 I 谱带峰值，这反映了经 X 射线研究证实的较高的 β -折叠含量^[5]。在免疫球蛋白 G 的光谱中，约 1636 cm^{-1} 处的峰占总酰胺 I 谱带面积的 67%。溶菌酶扣除水后的红外光谱表现出相对较窄的酰胺 I 谱带，最大值接近 1654 cm^{-1} ，这是具有大量 α -螺旋二级结构的蛋白质的特征^[5]。根据曲线拟合估计，溶菌酶存在明显的 α -螺旋成分 (1654 cm^{-1} 谱带处)，占 44%，并具有 19% 的 β -折叠。肌红蛋白主要为

α -螺旋二级结构，但也存在 β -折叠。BSA、木瓜蛋白酶和酪蛋白等蛋白质也获得了不同的蛋白质二级结构组成。BSA 的二级结构对各种实验条件都很敏感，这会导致其结构分布发生变化。温度、pH 值和表面活性剂等因素会显著影响蛋白质的二级结构，包括螺旋含量。与水分子的相互作用和对氢键的竞争会破坏螺旋结构的稳定性，这凸显了维持蛋白质稳定性的相互作用达到微妙平衡的重要性。结晶过程可以去除溶剂，有助于保留蛋白质的天然构象，这就解释了 BSA 螺旋程度最高的结构为何通常在结晶状态下出现^[7-9]。

表 3 汇总了 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规则二级结构的百分比定量结果。

结论

本应用简报展示了使用 FTIR 分析溶液中蛋白质二级结构的方法。配备单反射钻石晶体 ATR 的 Cary 630 FTIR 光程短、样品限制少，因此使用其进行分析。FTIR 分析需要将酰胺 I 谱带分解为各个组成成分，我们使用 MicroLab Expert 软件完成了这一工作。采用谱带曲线拟合方法来估算关键二级结构特征的相对含量，通过 FTIR 得出的结果与文献报道大致一致。

Cary 630 FTIR 能够以非破坏性的方式研究蛋白质结构，而且易于使用，样品前处理非常简单，表明该技术可用于快速评估总体二级结构特征，并可作为实验引起结构变化的直接筛选工具。

参考文献

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.

更多信息

- Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪
- Agilent MicroLab FTIR 软件
- Agilent MicroLab Expert
- FTIR 分析与应用指南
- FTIR 光谱基本原理 — 常见问题解答

www.agilent.com/chem/cary630

DE-001141

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024
2024 年 10 月 1 日，中国出版
5994-7808ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

