

文章编号:1001-9014(2007)04-0265-04

利用红外光谱和渐进因子分析研究牛血清白蛋白的热动力学过程

袁波, 严惠民

(浙江大学 现代光学仪器重点实验室国家光学仪器工程技术研究中心, 浙江 杭州 310027)

摘要:利用红外光谱和渐进因子分析(Evolving factor analysis, EFA)对水溶液中牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的热动力学过程进行了研究. 三因子 EFA 的结果表明加热导致了牛血清白蛋白的结构变化经历了轻微变化和剧烈变化两个阶段, 它们分别发生在温度区间 56~76°C 和 68~82°C. 研究显示了渐进因子分析在解析水溶液中蛋白质温度相关红外光谱中的重大作用.

关键词:红外光谱; 渐进因子分析; 热动力学; 牛血清白蛋白

中图分类号:0657.7 **文献标识码:**A

THERMAL DYNAMICS OF BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) STUDIED WITH INFRARED SPECTROSCOPY AND EVOLVING FACTOR ANALYSIS

YUAN Bo, YAN Hui-Min

(State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, CNERC for Optical Instrument, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Thermal dynamics of bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution was studied by using infrared spectroscopy and evolving factor analysis (EFA). The results from three-factor EFA indicate that heat-induced structural change of BSA undergoes two stages; slight variation and drastic variation, which occur in the temperature range of 56~76°C and 68~82°C, respectively. The study demonstrates the key roles of EFA in the analysis of the temperature-dependent infrared spectra of protein in aqueous solution.

Key words: infrared spectroscopy; evolving factor analysis; thermal dynamics; bovine serum albumin

引言

红外光谱法是研究蛋白质二级结构和动力学特性的有效工具^[1]. 但是, 在同一个动力学过程中, 不同二级结构的变化并不一致, 采用通常的吸收度分析方法不能有效地解析其动力学过程, 因此需要采用更好的光谱分析方法^[2-4].

而渐进因子分析就是一种能很好地分析随时间渐进的系统的方法. 它由 Maeder 提出^[5], 已经成功地被应用于解决一些化学问题^[6,7], 而近来在对红外光谱的解析中也获得了很好地应用^[8]. 但是, 渐进因子分析很少被应用到蛋白质动力学过程的研究中^[10], 用以解析蛋白质的变性特性.

本文中, 利用红外光谱和渐进因子分析对水溶液中牛血清白蛋白的热变性过程进行了研究, 获得了对不同状态下牛血清白蛋白的二级结构和蛋白质热变性特性的新认识.

1 实验部分

1.1 样品配置与测量

99%纯度的牛血清白蛋白获取自 Sigma Chemical Co. (USA), 纯净水由 Ultrapure Water System Model CPW-101 (Advantec, Japan) 净化得到. 牛血清白蛋白溶解到纯净水中, 配成 5 wt% 的溶液 (pH = 6.8). 光谱测量时, 溶液置于 Model HC-32 Heated-Cooled Cell (Thermal Nicolet Co.), 该容器能通过循

收稿日期: 2006-10-13, 修回日期: 2006-12-26

Received date: 2006-10-13, revised date: 2006-12-26

作者简介: 袁波 (1978-), 男, 江西萍乡人, 博士后, 研究方向为光谱分析和光学仪器.

环水控制温度,精度可达到 $\pm 0.2^\circ\text{C}$.在 $26^\circ\text{C} \sim 90^\circ\text{C}$ 的温度范围内,每隔 2°C ,每个温度下用 Nicolet Magna 760 傅里叶变换红外光谱仪测量溶液的红外光谱,光谱分辨率为 2cm^{-1} .

1.2 数据处理

从红外光谱仪上获取的光谱数据利用软件 Grams (Thermo Calatic Co.) 转化为文本格式. 光谱的预处理和渐进因子分析利用软件 Matlab 7.0 (MathWorks, Inc.) 展开.

2 理论部分

2.1 渐进因子分析的算法

假设实验所获取的光谱数据矩阵为 $D_{m \times n}$,其中下标代表矩阵维数为 $m \times n$ (下同), m 为波数, n 为样本数. 光谱按照一定的时间顺序排列,通过因子分解可将矩阵 D 用公式(1)表示

$$D_{m \times n} = S_{m \times p} \times C_{n \times p}^T, \quad (1)$$

式中, p 为因子数, S 和 C 分别代表因子的光谱特征和浓度特征. S 和 C 矩阵通过迭代求得:首先选择初始的 C 矩阵,将其代入公式(1)中求 S 矩阵,并对 S 矩阵进行一定的条件约束(比如:非负、单峰等);然后再将求得的 S 矩阵代入公式(1)中求 C 矩阵,同样对 C 矩阵进行一定的条件约束;如此循环迭代,直到收敛为止.在本文中,对 S 矩阵和 C 矩阵均采用了非负的约束条件.

渐进因子分析初始 C 矩阵是由正向本征值和反向本征值决定的.正向本征值通过对由矩阵 D 的第1列到第 i 列($i=1,2,\dots,n$)组成的新矩阵(从1列开始,每次增加1列,直到整个矩阵)展开主成分分析得到,而反向本征值通过对由矩阵 D 的第 i 列($i=n,n-1,\dots,1$)到第 n 列组成的新矩阵(从1列开始,每次增加1列,直到整个矩阵)展开主成分分析得到.将因子 $j(j=1,2,\dots,p)$ 的正向本征值与因子 $p-j+1$ 的相应正向本征值比较,取较小的值组成矩阵 C 的第 j 列,由此获得初始的 C 矩阵.

3 结果与讨论

3.1 温度相关红外光谱分析

图1(a)和图1(b)分别给出了BSA水溶液在酰胺I区域的温度相关红外差减光谱和相应的二阶导数光谱.从图中可以看出: 1652cm^{-1} 处的吸收峰强度随温度的升高而下降; 1682 和 1616cm^{-1} 处的吸收峰随温度的升高而升高;当升高到一定温度时,在 1645cm^{-1} 处出现一个新的吸收峰,这一点可以从相应

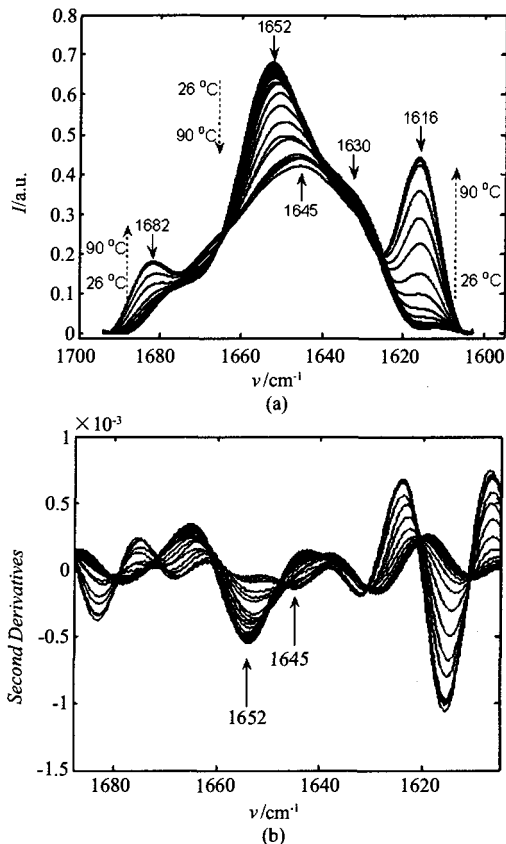


图1 温度从 26°C 升高至 90°C 的过程中,水溶液中BSA在 $1695 \sim 1605\text{cm}^{-1}$ 的红外差减光谱(将BSA水溶液的红外光谱减去同温度下水的贡献)(a)和相应的二阶导数光谱(b)
Fig.1 Difference IR spectra (a) of BSA in aqueous solution (5.0 wt%) in the temperature elevation from 26°C to 90°C , by subtracting the contribution of water at the same temperature in the $1695 \sim 1605\text{cm}^{-1}$ region, and the corresponding second derivatives (b)

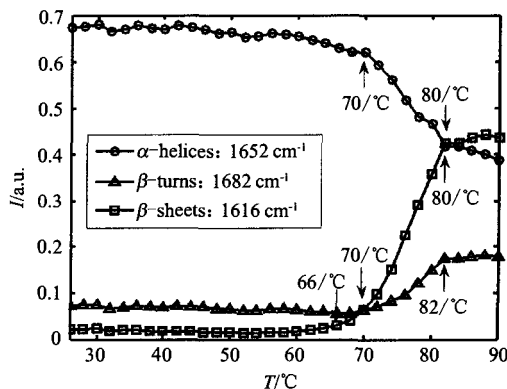


图2 1682 、 1652 和 1616cm^{-1} 处的吸收强度随温度的变化
Fig.2 Plots of absorbance at 1682 、 1652 和 1616cm^{-1} as a function of temperature

的二阶导数光谱更清楚地观察到.各吸收峰的具体指认情况如表1所列.因此,温度相关红外光谱表明:牛血清白蛋白在升温的过程中, α -螺旋结构减

表 1 牛血清白蛋白溶液在酰胺 I 区域的红外吸收峰的指认情况

Table 1 The assignments of IR bands of BSA solution in amide I region

峰的位置 (波数 cm^{-1})	1682, 1679, 1677, 1669	1652, 1650	1645	1632, 1630, 1629	1616, 1614
指认	β -转角	α -螺旋	无规卷曲	β -链	β -片层

少, β -转角和 β -片层结构增加, 并逐渐形成无规卷曲结构。

3.2 利用吸光度分析热动力学过程

为了研究蛋白质结构变化的热动力学特性, 根据图 1(a) 的温度相关光谱绘制了某一波数处光谱吸收强度随温度变化的曲线, 如图 2 所示。图 2 给出了 1682、1652 和 1616 cm^{-1} 处的吸收强度随温度的变化, 它们分别代表 β -转角、 α -螺旋和 β -片层。可以看出, 这些蛋白质二级结构的剧烈变化均发生在一个相对较窄的温度范围内, 大致为 70 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$, 而不同的二级结构稍有差别; 另外, 在发生剧烈变化之前, 二级结构已经开始轻微变化了。

3.3 渐进因子分析

在进行渐进因子分析之前, 必须先确定所采用的因子数。通过对图 1(a) 中的光谱展开主成分分析, 可以得到前 3 个因子的贡献分别为: 96.72%、3.23% 和 0.03%, 它们的贡献度之和达到了 99.98%, 因此前 3 个因子已经足够解释整个数据样本。进一步计算前 3 个因子的正向和反向奇异值 (奇异值为本征值的平方根), 其结果如图 3 所示。可以看出, 前 2 个因子的奇异值变化明显脱离了噪声水平, 而因子 3 是否属于噪声很难判断, 所以接下

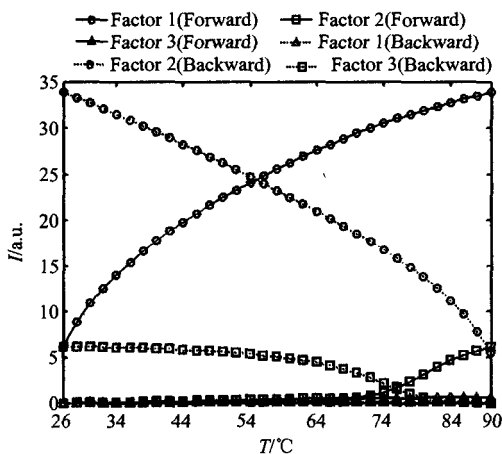


图 3 对图 1(a) 中的光谱进行计算获得的前 3 个因子的正向和反向奇异值

Fig. 3 Forward and backward singular value plots of the first three factors calculated from the spectra in Fig. 1 (a)

来将分别采用 2 个因子和 3 个因子展开渐进因子分析。

对图 1(a) 中的光谱进行 2 因子 EFA 分析, 得到 2 个因子的光谱特征和温度变化特征分别如图 4 (a) 和 (b) 所示。因子 1 在 1652 cm^{-1} 处出现一个很强的吸收峰, 它被指认为 α -螺旋; 在 1679 和 1629 cm^{-1} 处各出现一个肩峰, 它们分别被指认为 β -转角和 β -链。可以看出因子 1 的二级结构主要以 α -螺旋为主, 它接近 26 $^{\circ}\text{C}$ 时牛血清白蛋白的光谱特征, 所以将因子 1 定义为天然状态下的蛋白质。因子 2 与因子 1 相比较, 在 1645 和 1616 cm^{-1} 处出现了新的吸收峰, 它们分别被指认为无规卷曲和 β -片层; 1679 cm^{-1} 附近的吸收峰分裂为 1682 和 1669 两个吸收峰, 它们均被指认为 β -转角, 说明因子 2 中出现了新的 β -转角结构; 1652 cm^{-1} 处吸收峰强度显著降低, 说明因子 2 中的 α -螺旋结构大大减少。因子 2 的光谱特征接近 90 $^{\circ}\text{C}$ 时牛血清白蛋白的光谱特征, 所以将因子 2 定义为变性状态下的蛋白质。

从因子 1 和因子 2 的温度变化特征可以看出,

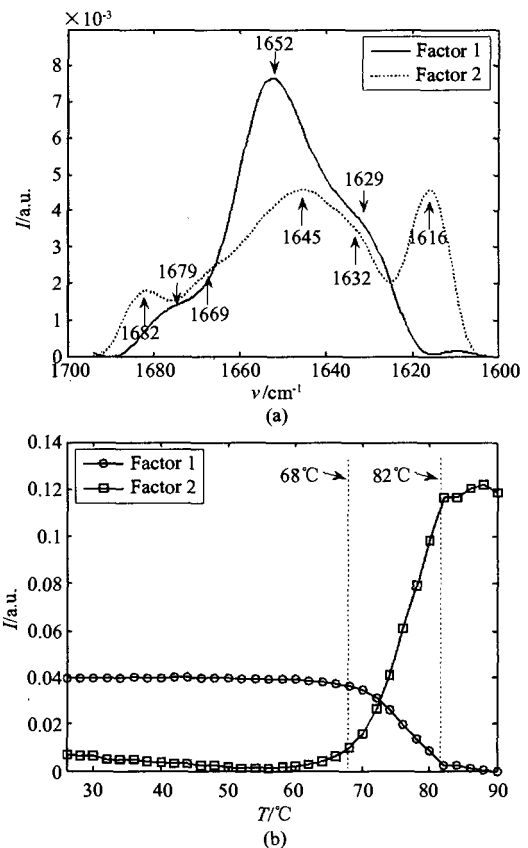


图 4 利用 2 因子 EFA 获得的光谱特征 (a) 和温度变化特征 (b)

Fig. 4 Spectroscopic profiles (a) and temperature profiles (b) obtained from two-factor EFA

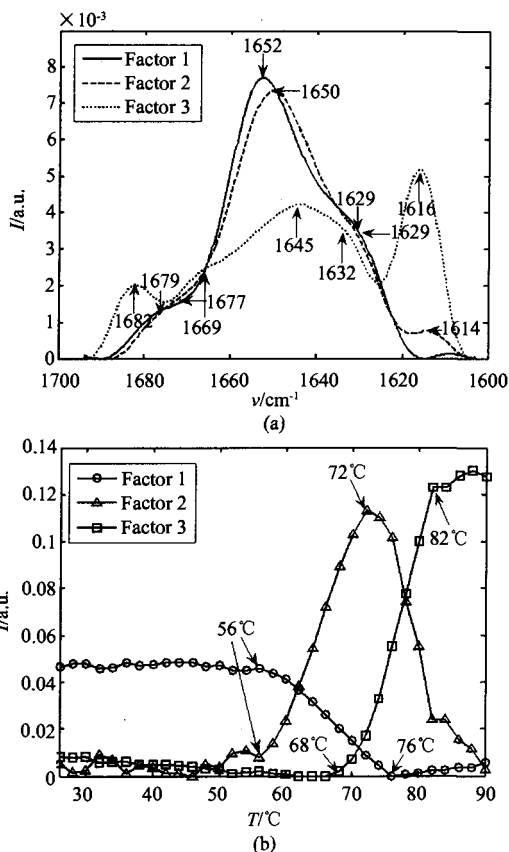


图5 利用3因子EFA获得的光谱特征(a)和温度变化特征(b)

Fig. 5 Spectroscopic profiles (a) and temperature profiles (b) obtained from three-factor EFA

当温度升高至68℃时,因子1开始减少,因子2开始增加,直至82℃时,因子1和因子2的变化开始趋于平缓.因此,2因子EFA的结果表明:蛋白质的加热过程是蛋白质从天然状态转化为变性状态的过程,这一转化大致发生在温度区间68~82℃.

对图1(a)中的光谱展开3因子EFA分析,得到3个因子的光谱特征和温度变化特征分别如图5(a)和图5(b)所示.从光谱特征中可以看出,因子1和因子3分别与前面两因子EFA中的因子1和因子2相同.而因子2与因子1相比较,在1614 cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰,说明因子2中已出现 β -片层;1652 cm^{-1} 附近的吸收峰强度有所下降并朝低波数方向移动,说明因子2中的 α -螺旋已有所减少.在此,将因子2定义为中间状态的蛋白质.

从3个因子的温度变化特征中可以看出,因子1的减少主要发生在温度区间56~76℃,因子3的增加主要发生在温度区间68~82℃,而因子2从56℃开始增加至72℃开始减少.这表明:当加热到56℃时,蛋白质已经开始由天然状态转化为中间状

态;当继续加热至68℃时,蛋白质才开始由中间状态转化为变性状态.因此,在加热过程中,蛋白质并不是直接从天然状态转化为变性状态,而是经历了一个中间状态,即蛋白质的结构变化经历了两个阶段.

由此可见,3因子EFA的结果不仅反映了加热过程中蛋白质结构的剧烈变化阶段,而且也反映了蛋白质结构的轻微变化阶段,它能够更完整地描述加热过程中蛋白质的结构变化过程.

4 结语

本文利用红外光谱和渐进因子分析对水溶液中牛血清白蛋白的热变性过程进行了研究.与以往的研究认为加热导致蛋白质结构从天然状态变化到变性状态不同,3因子EFA的结果表明,加热导致水溶液中牛血清白蛋白的二级结构经历了轻微变化和剧烈变化2个阶段,分别发生在温度区间56~76℃和68~82℃.同时,研究结果也说明渐进因子分析在解析水溶液中蛋白质热动力学过程中的巨大潜力.

REFERENCES

- [1] Mantsch H H, Chapman D. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1996, 1: 1—17, 239—254.
- [2] Ozaki Y, Murayama K, Wu Y, et al. Two-dimensional infrared correlation spectroscopy studies on secondary structures and hydrogen bondings of side chains of proteins [J]. *Spectroscopy*, 2003, 17: 79—100.
- [3] Borges A, Tauler R, Juan A D. Application of multivariate curve resolution to the temperature-induced unfolding of α -chymotrypsin [J]. *Analytica Chimica ACTA*, 2005, 544: 159—166.
- [4] YUAN Bo, ZHAO Hai-Ying, HUANG Mei-Zhen, et al. Studies on thermal dynamics of protein by two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. *J. Infrared Millim. Waves* (袁波,赵海鹰,黄梅珍,等.用二维相关红外光谱研究蛋白质分子的热动力学过程.红外与毫米波学报), 2004, 23(3): 213—216.
- [5] Maeder M. Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks [J]. *Analytical Chemistry*, 1987, 59: 527—530.
- [6] Nicholson M A, Aust J F, Booksh K S, et al. Kinetic and spectroscopic profiles of three pyridine complexes at a silver electrode using surface-enhanced Raman scattering and evolving factor analysis [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2000, 24: 157—163.
- [7] Juan A D, Tauler R. Chemometrics applied to unravel multicomponent process and mixtures revisiting latest trends in multivariate resolution [J]. *Analytica Chimica ACTA*, 2003, 500: 195—210.
- [8] Navea S, Juan A D, Tauler R. Modeling temperature-dependent protein structural transitions by combined near-IR and mid-IR spectroscopies and multivariate curve resolution [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75: 5592—5601.