磷脂酰胆碱与牛血清白蛋白相互作用的 FT-IR 研究*

王 凡

杨展澜

张 莉

翁诗甫

吴瑾光

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 利用傅立叶变换红外 (FT-IR) 和拉曼 (FT-Raman) 光谱研究了高浓度磷脂酰胆碱 (PC) 与牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用, 及 Eu^{3+} 对该作用的影响. FT-IR 结果显示, PC/BSA 混合体系中二者的相互作用主要发生在 PC 头部极性基团, 且这一作用随 BSA 含量的增加而增强, 作用后蛋白质二级结构中 α 螺旋的比例有所增加. FT-Raman 光谱说明 PC 与 BSA 的相互作用影响磷脂 CH 链的排列有序程度. PC/BSA/ Eu^{3+} 体系的红外光谱显示, Eu^{3+} 与 PC 的磷氧键发生了强相互作用, 并使蛋白 α 螺旋的比例进一步增加.

关键词: FT-IR, FT-Raman, 磷脂酰胆碱(PC), 牛血清白蛋白(BSA)

中图分类号: O641.3

磷脂酰胆碱(PC)是生物膜结构的主要成分, 它在承担不同生理功能及其自身输运代谢的过程中伴随着与多种蛋白质的相互作用^[1]. 血清类白蛋白是包括 PC 在内的多种物质的输运载体^[2], 对 PC 和血清类蛋白相互作用位点的研究有助于阐明这一过程. 在我国, 由于含稀土微肥和饲料的广泛应用, 稀土元素通过食物链进入生物体内从而对生理过程产生影响. 20 世纪 90 年代以来, 磷脂和蛋白相互作用以及金属离子对该体系影响的研究逐渐成为生物、化学、医学领域的研究热点^[3-8], 这一研究涉及到多种生物、化学和物理方法, 但该体系特有的复杂性给每一种方法都带来了一定的局限. X 射线衍射^[9-10] 在研究物质结构方面具有权威性和准确性, 但受到磷脂与蛋白质相互作用单晶制备难度的限制. NMR^[11] 方法在研究这一体系时, 由于体系的分子量过大而给谱峰的指认带来了困难. 荧光光谱和紫外光谱^[12-13] 只对某些发色基团及其周围环境敏感, 也存在着应用的局限.

FT-IR 作为重要的结构测试手段, 对研究磷脂与蛋白质相互作用体系以及金属离子对这一体系的影响具有一定优势. 该方法对样品要求相对宽松, 且能够得到多种结构基团的信息, 如: 蛋白质的二级结构^[14-16], 磷脂 CH 链、磷脂极性头部基团^[17-18] 等; 并能用于阐明金属离子和蛋白质的相互作用^[19].

用红外方法研究磷脂与蛋白质体系相互作用的文献报道主要集中于采用 Brewster 角显微镜和红外反射吸收光谱法 (IRRAS), 对空气/水界面磷脂单层膜与蛋白的相互作用进行研究^[20-22]. 考虑到在生物体中磷脂与蛋白发生相互作用时多为浓度较高的双层脂膜状态, 我们利用 FT-IR 和 FT-Raman 光谱, 采用研磨法对水相高浓度 PC 与 BSA 的相互作用及 Eu^{3+} 对该作用的影响进行了研究.

1 实验

1.1 试剂和仪器

Nicolet Magna-750 II 傅立叶变换红外光谱仪, Nicolet 950 傅立叶变换拉曼光谱仪, 谱图处理软件 OMNIC 5.0.

磷脂酰胆碱 (美国 Sigma 公司, 纯度 > 60%), 粉末状牛血清白蛋白 (华美生物公司), EuCl_3 用 Eu_2O_3 (99.99%) 自制, 实验中使用的所有溶剂均为二次去离子水.

1.2 样品制备

PC/BSA 红外样品制备: 称取 50 mg PC, 分别加入不同量的 BSA 粉末, 形成质量比 $m(\text{PC}): m(\text{BSA})$ 分别为 5:1、5:2、1:1、1:1.5、1:2 和 1:2.5 的混合物, 放入玛瑙研钵, 加入 400 μL 二次去离子水, 研磨 10 min. 将得到的粘稠状物质均匀平铺在

图 1 FT-IR 光谱酰胺 I 带的曲线拟合结果

Fig. 1 The curve-fitting results of amide I of BSA

(a) BSA; (b) $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 1 : 1$

BaF₂晶片上, 室温下晾干. 纯 PC 和 BSA 用上述同样方法处理后制样.

Eu³⁺/PC/BSA 红外样品制备: 称取 50 mg PC 和 50 mg BSA 放入玛瑙研钵, 滴加不同体积的 EuCl₃ (1 mol·L⁻¹) 溶液, 使 PC 和 Eu³⁺ 的摩尔比 $n(\text{PC}) : n(\text{Eu}^{3+})$ 分别为 5:1、3:1、2:1、1:1、0.75:1、1:1、1:1.2、1:1.5、1:1.75、1:2、1:3 和 1:5, 补加二次去离子水至总体积为 400 μL, 研磨 10 min. 得到的粘稠状物质均匀平铺在 BaF₂ 晶片上, 室温下晾干.

PC/BSA 拉曼样品制备: 称取 50 mg PC 和 50 mg BSA 共同放入玛瑙研钵, 加入 400 μL 二次去离子水, 研磨 10 min, 将得到粘稠状物质放入直径 2 mm 的拉曼管至 2/3 高度. 纯 PC 和 BSA 用上述同样方法处理后制样.

1.3 谱图采集和处理

红外光谱采集: 室温下收集谱图, 扫描范围 4000 ~ 800 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹, 扫描次数 32 次.

拉曼光谱采集: 室温下采集谱图, 扫描范围 3700 ~ 400 cm⁻¹, 分辨率 16 cm⁻¹, 扫描次数 2000 次.

差谱及谱图处理由 OMNIC 5.0 软件获得. 酰胺 I 带的曲线拟合经过二阶导和去卷积处理, 由 Peaksolve 软件得到^[14].

2 结果和讨论

2.1 不同比例 PC 和 BSA 相互作用的 FT-IR 结果

图 1a 是纯 BSA 的曲线拟合结果, 按照文献中的指认^[14, 23], 通过峰面积计算出纯 BSA 中 α 螺旋结构的含量是 44.2%, 与文献报导的数据相符^[24-25]. 图 1b 是 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 1 : 1$ 时 PC/BSA 混合体系中 BSA 酰胺 I 带的拟合结果, 和纯 BSA 谱图比较有了很大变化, 同时 α 螺旋结构的含量也发生了变化. 不同比例 PC/BSA 混合体系的 α 螺旋结构的含量列于表 1. 从表 1 可以看出: (1) BSA 在 PC 的作用下, α 螺旋结构的含量均有所上升, 上升趋势不是随着 PC 相对含量的增加而线性变化, 说明 PC 的加入对 BSA 二级结构产生了影响, 然而随着 PC 含量不同它们之间相互作用的形式可能有所不同; (2) 当 PC 相对含量 ($m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$) 是 1:2.5、1:2 和 1:1.5 时, α 螺旋结构的含量保持在 65% 附近, 说明在这个比例下 PC 对 BSA 二级结构的影响达到一定的平衡; (3) 继续增加 PC 的含量, 上述相对平衡状态被打破. 在 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 1 : 1$ 时, α 螺旋结构的含量降低到 52.4%; $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 5 : 2$ 时, α 螺旋结构的含量增加到 70.4%; 而 PC 相对含量增加到 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 5 : 1$ 时, BSA 中 α 螺旋结构的含量又降低到 53.9% 的水平. BSA 中 α 螺旋结构的含量随着 PC 相对含量的增加而上下波动, 可能是 PC/BSA 混合体系中 PC-BSA 和 PC-PC 两种相互作用之间的竞争所导致.

在磷氧、碳氧、磷氧碳等基团伸缩振动区 (1300 ~ 1000 cm⁻¹), PC 的磷氧键反对称伸缩振动和 BSA 酰

表 1 不同体系酰胺 I 带的曲线拟合结果

Table 1 Curve-fitting results of amide I band of BSA in different systems

System	BSA	$m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$						$m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) / n(\text{PC}) : n(\text{Eu}^{3+})$
		5:1	5:2	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:1/1:1
α -helix (%)	44.2	53.9	70.4	52.4	65.4	67.2	65.3	63.4

$m : m$: mass ratio; $n : n$: molar ratio

图2 PC/BSA 混合体系中 P-O 反对称伸缩振动吸收峰的位移变化

Fig. 2 The change of band positions near 1239 cm^{-1} in different mass ratios of BSA in PC/BSA mixture system

胺 III 带分别在 1239 和 1242 cm^{-1} 有特征吸收. 在混合体系谱图中 1239 ~ 1244 cm^{-1} 附近出现了一个吸收峰, 其峰位变化随 BSA 含量的不同而改变 (如图 2 所示). 当 $m(\text{BSA}) : m(\text{PC}) < 0.4$, 该谱带和 PC 谱图相比没有发生位移. 当 $m(\text{BSA}) : m(\text{PC})$ 在 0.4 ~ 2.5 范围内, 峰位随 BSA 含量的增加向高频移动, 在 $m(\text{BSA}) : m(\text{PC}) = 2.5$ 时位移至 1244 cm^{-1} , 比纯 BSA 酰胺 III 带高 2 cm^{-1} . 由于蛋白酰胺 III 带的变化随其二级结构而改变^[26], 而这一体系中 BSA 二级结构的变化在 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$ 为 1 : 1.5 时已经趋于相对平衡状态 (表 1), 不易发生峰位移动, 因此我们认为当 BSA 含量增加到一定量时与 PC 的极性头基发生了相互作用.

图 3 中, 曲线 a 和 e 分别是纯 PC 和 BSA 在 1400 ~ 1000 cm^{-1} 范围内的红外吸收, 曲线 b、c、d 分别是 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$ 为 5 : 2、1 : 1 和 2 : 3 的混合体系谱图与纯 BSA 和 PC 谱图的差谱, 其对应的未

经差减的谱图 (图 3B、C 和 D) 用虚线列出加以对比. 在差谱中可以看到: (1) 在 1298 cm^{-1} 混合体系均出现了新吸收谱带, 对此谱带的具体指认还不明确, 但是可以作为 PC 和 BSA 发生相互作用的一个佐证; (2) 表征磷氧、磷氧碳、碳氧基团对称伸缩振动的谱带 (1089 cm^{-1}) 在蛋白含量较少时位移 6 cm^{-1} (见图 3b), 蛋白含量增加到 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$ 为 1 : 1 和 2 : 3 时位移 13 cm^{-1} (图 3c 和 d). 这一变化说明混合体系中 BSA 与 PC 的极性头基发生了相互作用, 且随蛋白含量的增加而增强.

2.2 FT-Raman 光谱

从 FT-Raman 谱图 (图 4) 中可以看出: 在 CH 伸缩振动区域 (3000 ~ 2800 cm^{-1}), 纯 PC 出现双重吸收 (2910 和 2876 cm^{-1}); BSA 出现一个单峰 (2946 cm^{-1}); 而 PC/BSA 混合体系的 FT-Raman 谱图发生了很大变化, 与纯 PC 相比向高频位移了 10 cm^{-1} , 与纯 BSA 相比向低频位移了 26 cm^{-1} . 由此推测混合体系中 PC 和 BSA 的相互作用可能降低了磷脂碳氢链排列的有序程度^[27].

2.3 Eu^{3+} /PC/BSA 混合体系的 FT-IR 研究

在 $m(\text{PC}) : m(\text{BSA})$ 为 1 : 1 的混合体系中加入 Eu^{3+} , FT-IR 谱图在 1300 ~ 1000 cm^{-1} 区域内发生了显著变化. 随着 Eu^{3+} 含量增加, 磷氧键反对称伸缩振动吸收峰的峰位向低频移动 (图 5), 当 Eu^{3+} 与 PC 的摩尔比为 2 : 1 时吸收峰位从 1241 cm^{-1} 移动到了 1208 cm^{-1} . 与未加入 Eu^{3+} 时相比移动了 33 cm^{-1} , 而继续增加 Eu^{3+} 的含量该峰不再进一步位移. 并且, 酰胺 I 带的曲线拟合结果 (表 1) 显示, 与同样比例的 PC/BSA 混合体系相比蛋白 α 螺旋的含量进一步增加. 上述结果表明: (1) Eu^{3+} 与磷氧键发生了强相互作用; (2) 该作用在 Eu^{3+} 和 PC 的摩尔

图3 PC/BSA 混合体系 FT-IR 谱图的减法光谱(b,c,d)和纯 PC(a)、BSA(e)以及 PC/BSA 混合体系谱图(B,C,D)的比较

Fig. 3 The subtraction results of PC/BSA systems(b, c, d) and the FT-IR spectra of pure PC(a), BSA(e), the original PC/BSA systems(B, C, D),

(a)PC; (b, B) $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 5 : 2$; (c, C) $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 1 : 1$; (d, D) $m(\text{PC}) : m(\text{BSA}) = 2 : 3$; (e)BSA

图4 BSA、PC 和 $m(\text{PC}):m(\text{BSA})=1:1$ 混合体系的 FT-Raman 光谱

Fig. 4 FT-Raman spectra of PC, BSA and the mixture of PC and BSA

图5 PC/BSA/ Eu^{3+} 混合体系中磷氧反对称伸缩振动吸收峰的位移变化

Fig. 5 The change of band positions near 1239 cm^{-1} in different proportions of Eu^{3+} in the PC/BSA/ Eu^{3+} mixture system

比为 2:1 时达到饱和; (3) Eu^{3+} 加入使 BSA 的二级结构发生进一步的改变, 有利于形成 α 螺旋结构。

3 结论

PC/BSA 体系 FT-IR 谱图中 P-O 吸收峰的峰位移动和酰胺 I 带及 FT-Raman 光谱 C-H 伸缩振动谱带的变化揭示了 BSA 和 PC 的相互作用主要发生在 PC 的磷酸头部极性基团; 其作用结果使 BSA 中 α 螺旋的含量增加, 改变了 PC 碳氢链的有序程度。当 PC/BSA 体系中加入 Eu^{3+} 离子以后, Eu^{3+} 和磷酸头部基团发生了强的相互作用, 使 BSA 中 α 螺旋的含量进一步增加。

References

- Raphael, R. M.; Waugh, R. E. *Biophysical Journal*, **1996**, **71**(3): 1374
- Ahmad, N.; Qasim, M. A. *European Journal of Biochemistry*, **1995**, **227**(1-2): 563
- Sasaki, D. Y. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **2003**, **39**(2): 145
- Williamson, I. M.; Alvis, S. J.; East, J. M.; Lee, A. G. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2003**, **60**(8): 1581
- Tauc, P.; Mateo, C. R.; Brochon, J. C. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **2002**, **1595**(1-2): 103
- Dumas, F.; Lebrun, M. C.; Tocanne, J. F. *FEBS Letters*, **1999**, **458**(3): 271
- Misharin, A. Y. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **1998**, **24**(8): 563
- Kinnunen, P. K. J. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1996**, **81**(2): 151
- Yoder, M. D.; Thomas, L. M.; Tremblay, J. M.; Oliver, R. L. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, **276**(12): 9246
- Oliver, R. L.; Tremblay, J. M.; Helmkamp, G. M.; Yarbrough, L. R. *Acta Crystallographica, Section D-Biological Crystallography*, **1999**, **55**: 522 Part 2
- Saito, H.; Yamamoto, K.; Tuzi, S.; Yamaguchi, S. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **2003**, **1616**(2): 127
- Le, X. J.; Zhang S. R.; Zhang S. G. *Chem. J. Chinese Universities*, **1999**, **20**(1): 127 [李晓晶, 张善荣, 张树功. 高等学校化学学报 (*Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*), **1999**, **20**(1): 127]
- Zhao, C. G.; Liu, L. Y.; Qiu, A. D. *Chem. J. Chinese Universities*, **1997**, **18**(5): 744 [赵陈光, 刘兰英, 邱爱东. 高等学校化学学报 (*Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*), **1997**, **18**(5): 744]
- Susi, H.; Byler, D. M. *Methods Enzymol*, **1986**, **130**: 290
- Song, Y. Y.; Xu, Y. Z.; Weng, S. F.; Wu, J. G. *Biospectroscopy*, **1999**, **5**(6): 371
- Liu, F.; Lewis, R.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N. *Biochemistry*, **2002**, **41**(29): 9197
- Prenner, E. J.; Lewis, R.; Kondejewski, L. H.; McElhaney, R. N. *Biophysical Journal*, **1999**, **76**(1): A66 Part 2
- Lewis, R.; McElhaney, R. N. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1998**, **96**(1-2): 9
- Li, X. F.; Xu, Y. Z.; Wu, J. G.; Xu, G. X. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **1996**, **16**(2): 24 [李晓峰, 徐怡庄, 吴瑾光, 徐光宪. 光谱学与光谱分析 (*Guangpuxue yu Guangpu Fenxi*), **1996**, **16**(2): 24]
- Berdycheva, O.; Desbat, B.; Vaultier, M.; Saint-Pierre-Chazalet, M. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2003**, **125**(1): 1

- 21 Bi, X. H. ; Flach, C. R. ; Perez-Gil, J. ; Plasencia, I. ; Andreu, D. ; Oliveira, E. ; Mendelsohn, R. *Biochemistry*, **2002**, **41** (26): 8385
- 22 Ronzon, F. ; Desbat, B. ; Roux, B. *BBA-Biomembranes*, **2002**, **1560**(1-2): 1
- 23 Krimm, S. ; Bandekar, J. *Adv. Prot. Chem.*, **1986**, **38**: 181
- 24 Peters, T. *Adv. Protein Chem.*, **1985**, **37**: 161
- 25 Peng, Z. G. ; Hidajat, K. ; Uddin, M. S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2004**, **33**: 15
- 26 Shuowei, C. ; Bal, R. S. *Biophysical Chemistry*, **1999**, **80**: 7
- 27 Wong, P. P. T. ; Murphy, W. F. ; Mantsch H. H. *J. Chem. Phys.*, **1982**, **76**(11): 5230

FT-IR Study of the Interaction between Phosphatidylcholine and Bovine Serum Albumin *

Wang Fan Yang Zhan-Lan Zhang Li Weng Shi-Fu Wu Jin-Guang
(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The interactions between phosphatidylcholine (PC) and bovine serum albumin (BSA) were studied by FT-IR and FT-Raman spectroscopies, then the influence of lanthanide ion Eu^{3+} on the PC/BSA mixture system was discussed. In the region of $900 \sim 1300 \text{ cm}^{-1}$, FT-IR spectra showed that the bands of $\text{P}=\text{O}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ and $\text{C}-\text{O}$ of the PC/BSA mixture were shifted compared with the corresponding bands of pure PC and BSA, and the more content of BSA (relative to the content of PC) the greater shift was observed. The curve-fitting result of amide I band indicated that an increase of α -helix fragments in the PC/BSA mixture. FT-Raman spectra showed that the CH stretching bands in the PC/BSA mixture were varied, which indicated a disturbance of PC's long chains in the mixture system. After Eu ion was added into the PC/BSA system, the $\text{P}=\text{O}$ stretching vibration bands in FT-IR spectra shifted from 1241 to 1208 cm^{-1} . This helped us to conclude that the Eu ions bind to the $\text{P}=\text{O}$ group in the PC/BSA mixture.

Keywords: FT-IR, FT-Raman, Phosphatidylcholine, BSA