

# 用傅立叶变换红外光谱研究有机溶剂 对脂肪酶构象的影响

杨 红\*      高修功\*\*      曹淑桂\*      章克昌\*\*

(\* 吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春, 130023)

(\*\* 无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

**摘要** 利用衰减全反射(Attenuated Total Reflection, ATR)傅立叶变换红外光谱研究了脂肪酶在不同非水有机溶剂中的构象变化。结果表明, 各种溶剂均能使酶的二级结构发生一定程度的变化, 极性愈强效果愈明显。这种构象变化是动态过程, 且具有一定的可逆性。另外, 两亲分子也能导致酶构象的改变。

**关键词** 傅立叶变换红外光谱; 衰减全反射; 脂肪酶; 构象; 有机溶剂

**中图分类号** Q71

## 0 前 言

酶的功能和特性与其结构密切相关。研究非水介质中酶的结构, 不仅可以弄清有机溶剂对酶结构和功能的影响, 而且可以通过与水相酶结构的比较, 认识水在维持蛋白质空间构象中的重要作用<sup>[1]</sup>。然而, 由于蛋白质在无水溶剂中呈不溶状态, 因而大多数研究均采用水和溶剂的混合介质, 在无水溶剂中的红外光谱研究甚少<sup>[2]</sup>。衰减全反射红外光谱无需蛋白质呈溶解状态, 因而使非水介质中酶结构的研究成为可能<sup>[3]</sup>。在本文中, 我们将脂肪酶从水溶液沉积到 ATR 晶体片表面, 然后置于不同种类的有机溶剂中, 获得酶与各种溶剂作用不同时间的红外光谱, 并与水溶液中的光谱相比较, 得出有机溶剂导致脂肪酶二级结构变化的某些规律性认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** 脂肪酶 CSL(*Candida* sp. lipase), 粗酶由中国科学院微生物研究所提供, 纯化后平板梯度凝胶电泳检测呈单一带<sup>[4]</sup>; 两亲分子 A(结构见图1), 由东北师范大学化学系提供; 其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 主要仪器** 傅立叶变换红外光谱仪, Bruker(德国) IFS-66V 真空型。采用硅碳棒光

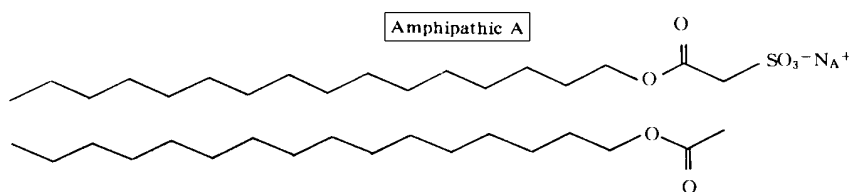


图1 两亲分子 A 结构示意图

源, KBr 分束器, 液氮制冷 MCT 检测器。仪器扫描次数 200, 分辨率  $4\text{cm}^{-1}$ , 扫描范围  $1590 \sim 1800\text{cm}^{-1}$ 。配用 PE 公司的 ATR 装置, ATR 片为单晶硅,  $30^\circ$  入射角。

## 1.2 方法

**1.2.1 傅立叶变换红外光谱测定** 将  $4\text{mg}$  CSL 溶于  $0.3\text{ml}$  磷酸盐缓冲液 ( $0.01\text{mol/L}$  pH 7.5) 中, 均匀铺展于 ATR 片表面, 置于  $4^\circ$  干燥器中干燥, 酶以均匀薄层吸附于 ATR 片上, 测定其红外光谱(水溶液中)。然后将此 ATR 片置于不同种类的有机溶剂中, 一定时间后取出置于干燥器中除去溶剂, 再测定其红外光谱(有机溶剂中)。

**1.2.2 红外光谱数据处理** 利用红外光谱傅立叶退卷积技术, 对所得光谱进行退卷积后, 得到酰胺 I 键振动区 ( $1500 \sim 1800\text{cm}^{-1}$ ) 范围内的几个振动峰, 各峰峰位与对应的蛋白质二级结构之间的关系为<sup>[3, 5, 6]</sup>:

- 1)  $1626 \pm 1\text{cm}^{-1}$ : 异常  $\beta$  折叠(disordered  $\beta$ -sheet);
- 2)  $1636 \pm 1\text{cm}^{-1}$ : 正常  $\beta$  折叠(native  $\beta$ -sheet) 组分一;
- 3)  $1651 \pm 2\text{cm}^{-1}$ :  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ -helix);
- 4)  $1672 \pm 2\text{cm}^{-1}$ : 正常  $\beta$  折叠(native  $\beta$ -sheet) 组分二;
- 5)  $1710 \sim 1720\text{cm}^{-1}$ : 无规卷曲(和  $\beta$  转角)。

根据上述关系, 在  $1590 \sim 1800\text{cm}^{-1}$  范围内选用 5 条 Gauss 曲线, 利用统计学的曲线拟合公式, 对各种情况下获得的红外光谱进行拟合。每条曲线固定中心峰位(峰位由退卷积结果确定), 自动调整曲线的半峰宽和峰高(黑点表示实验原始点, 实线为拟合后的曲线, 虚线为 Gauss 曲线)以达到与原始曲线拟合的目的, 由曲线峰面积计算出各构象组分的百分含量。

## 2 结果与讨论

作者曾利用圆二色光谱(CD)对含大量水的有机溶剂中 CSL 的二级结构作过研究, 结果表明其  $\alpha$ -螺旋含量明显增加<sup>[7]</sup>。那么在无(微)水有机溶剂中蛋白质的二级结构会发生怎样的变化呢? 两种情况下的结构变化有无内在的联系? 为了解决这一问题, 实验中利用衰减全反射(ATR)技术对各种条件下 CSL 的红外光谱作了研究, 结果示于图 2 至图 7 中。利用傅立叶退卷积技术处理谱图, 得到各种条件下 CSL 分子内各基本构象单元的百分含量(将正常  $\beta$ -折叠结构的两种组分合并处理), 结果见表 1。

图 2 为 CSL 从缓冲液中干燥后的红外光谱, 该酶天然构象中各种二级结构单元的大致含量为: 异常  $\beta$ -折叠,  $14.6\%$ ;  $\alpha$ -螺旋,  $16.2\%$ ; 正常  $\beta$ -折叠,  $49.3\%$ ; 无规卷曲(和  $\beta$  转角),  $19.9\%$ 。异常  $\beta$ -折叠(disordered or distorted  $\beta$ -sheet)的吸收峰位于  $1626 \pm 1\text{cm}^{-1}$  附近(图 2 ~ 7), 它是一种在不同分子之间或同一分子内部的不同肽链之间所形成的  $\beta$ -折叠结构, 与正

常的  $\beta$  折叠(native  $\beta$ -sheet) 相比, 其结构比较松散, 规律性较低<sup>[3, 6]</sup>。

表1 根据 FT-IR 计算出的 CSL 在不同介质中的二级结构单元百分含量

| 作用介质与时间                  | 含 量 (%)                         |                 |               |                               |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|-------------------------------|
|                          | D $\beta$ -sheet <sup>(1)</sup> | $\alpha$ -helix | $\beta$ -turn | $\beta$ -sheet <sup>(2)</sup> |
| ① 缓冲液                    | 14.6                            | 16.2            | 19.9          | 49.3                          |
| ② 二氧六环中10min             | 10.6                            | 18.4            | 8.5           | 62.6                          |
| ③ 二氧六环中4h                | 8.4                             | 43.1            | 13.0          | 35.6                          |
| ④ 二氧六环中4h 后<br>重新暴露于缓冲液中 | 22.0                            | 16.7            | 9.6           | 51.6                          |
| ⑤ 环己烷中4h                 | 10.6                            | 15.8            | 14.5          | 59.1                          |
| ⑥ 含两亲分子 A 的<br>环己烷中4h    | 3.1                             | 27.9            | 17.9          | 51.1                          |

注: (1) 异常  $\beta$ -折叠; (2) 组分一与组分二之和。

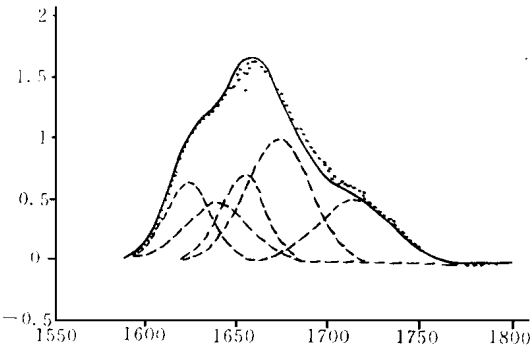


图2 CSL 暴露于缓冲液时的红外光谱

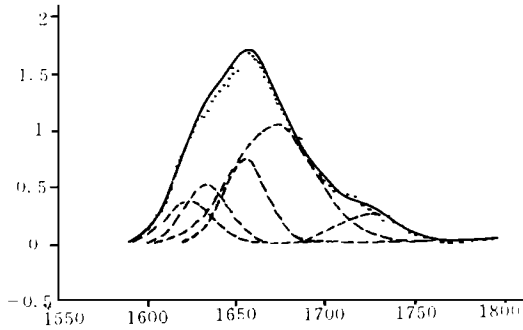


图3 CSL 与二氧六环作用10min 后的红外光谱

时使少量的异常  $\beta$ -折叠和部分无规卷曲转变为正常  $\beta$ -折叠, 随着作用时间的增加, 新产生的正常  $\beta$ -折叠及一部分原来存在的正常  $\beta$ -折叠又转变为  $\alpha$ -螺旋, 即二氧六环最终诱导产生了新的  $\alpha$ -螺旋。

图5为 CSL 与二氧六环作用4h 后, 又重新暴露于磷酸盐缓冲液中( 10min ) 的红外光谱。可以看出尽管暴露的时间较短, 酶的  $\alpha$ -螺旋与正常  $\beta$ -折叠的含量已基本恢复到了在缓冲液中的水平, 但无规卷曲及异常  $\beta$ -折叠的含量却未恢复, 有可能两者之间发生了某些转化。上

图3为 CSL 与二氧六环作用10min 后的红外光谱。可以看出在二氧六环的作用下, 酶的二级结构中有少量异常  $\beta$ -折叠和部分无规卷曲转变为正常  $\beta$ -折叠, 使正常  $\beta$ -折叠的含量增加了13.3%, 而  $\alpha$ -螺旋的含量则无明显变化。

图4为 CSL 与二氧六环作用4h 后的红外光谱, 与图3的结果不同, 此时酶的  $\alpha$ -螺旋含量发生了变化, 较缓冲液中提高了26.9%, 而正常  $\beta$ -折叠的含量却减少了13.7%。

由图3及图4可以推测: 二氧六环在开始

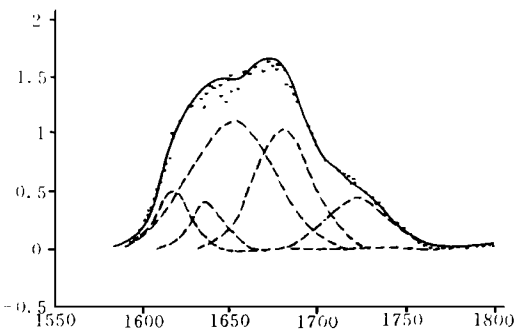


图4 CSL 与二氧六环作用4h 后的红外光谱

述现象说明, 二氧六环诱导酶分子构象发生变化的过程具有部分可逆性。

图6为 CSL 与环己烷作用4h 后的红外光谱, 其  $\alpha$ -螺旋含量基本未发生变化, 其它各种构象单元变化亦不明显, 推测环己烷只是使少量异常  $\beta$  折叠和无规卷曲转变为正常  $\beta$  折叠, 但没再继续诱导  $\alpha$ -螺旋的产生。

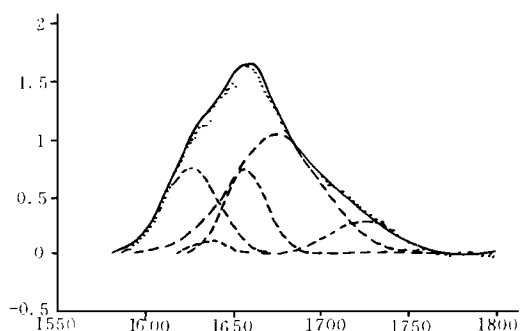


图5 CSL 与二氧六环作用4h 后又重新暴露于缓冲液中的红外光谱

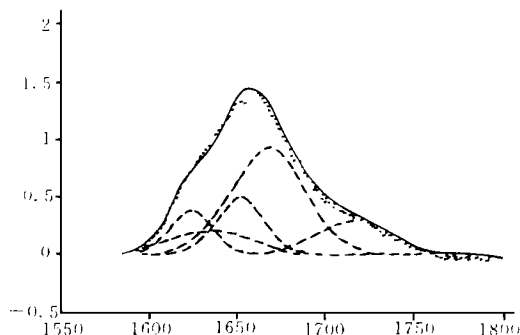


图6 CSL 与环己烷作用4h 后的红外光谱

图7为 CSL 与含1.0mg/ml 两亲分子 A 的环己烷溶液作用4h 后的红外光谱。其中异常  $\beta$  折叠含量降低11.5%,  $\alpha$ -螺旋含量增加11.7%, 而另外两种构象单元无明显变化。上述变化应该是两亲分子 A 与环己烷共同作用的结果, 前已述及环己烷能将少量异常  $\beta$  折叠和无规卷曲转变为正常  $\beta$  折叠, 因而可以推测两亲分子 A 的作用可能是使新产生的(或原有的)正常  $\beta$  折叠又继续转变为  $\alpha$ -螺旋, 即两亲分子 A 可能也会诱导  $\alpha$ -螺旋的产生。总的结果是正常  $\beta$  折叠基本无变化, 而  $\alpha$ -螺旋含量增加。

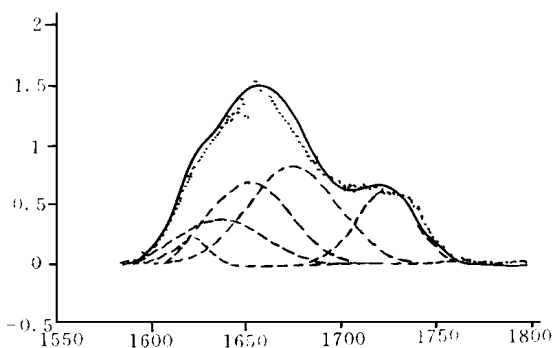


图7 CSL 与含两亲分子 A 的环己烷溶液作用4h 后的红外光谱

### 3 结 论

综合上述结果可以得出如下结论: 1) 二氧六环和环己烷均能使 CSL 的二级结构发生不同程度的变化。2) 二级结构变化的程度与有机溶剂的种类有关, 极性较强的有机溶剂更容易导致酶的构象发生变化。环己烷仅使少量的异常  $\beta$  折叠和部分无规卷曲转变为正常  $\beta$  折叠, 不能继续诱导  $\alpha$ -螺旋的产生。而二氧六环不仅能使少量的异常  $\beta$  折叠和部分无规卷曲转变为正常  $\beta$  折叠, 还能继续诱导  $\alpha$ -螺旋的产生。这可能是因为极性较强的溶剂较易溶于水, 因而能越过酶分子周围的“必需水”层而与酶分子直接发生作用; 而对于极性较弱的溶剂, 实现这一过程的阻力较大。3) 有机溶剂诱导酶分子构象发生变化是一动态过程, 与作用时间密切相关。4) 有机溶剂导致酶分子发生的构象变化具有一定的可逆性。5) 两亲分子也能使酶分子构象发生变化。

刘红兵等在研究有机溶剂对缙圣碱性磷酸酯酶分子构象的影响时, 也发现二氧六环对

该酶的  $\alpha$ -螺旋的含量有明显影响<sup>[8]</sup>。而 Ryu 和 Dordick 在利用 CD 谱研究有机溶剂对辣根过氧化物酶构象的影响时发现, 该酶的二级结构基本不受有机溶剂的影响<sup>[9]</sup>。可见有机溶剂对不同种类的酶之结构影响有很大差异。另外, 有机溶剂及两亲分子 A 导致 CSL 二级结构所发生的变化, 可能正是 CSL 在有机溶剂及两亲分子 A 存在时所表现出的许多新的催化性质(包括催化活性和选择性)<sup>[7]</sup> 的内在结构原因。

#### 致 谢

本研究工作是在吉林大学酶工程国家重点实验室完成的。实验中得到吉林大学分子结构与分子光谱开放实验室赵冰博士的指导和大力协助, 谨此致谢。

#### 参 考 文 献

- 1 Singer S J. In: Advances in Protein Chemistry. Anfinsen C B, et al. ed, New York: Academic Press, 1962
- 2 Purcell J M, Susi H. J. Biochem. Biophys. Methods 1984, 9: 523
- 3 Wasacz F M, Olinger J M, Jakobsen R J. Biochemistry 1987, 26: 1464
- 4 杨 红. [博士学位论文]. 长春: 白求恩医科大学, 1995
- 5 Susi H, Byler D M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983, 115: 391
- 6 Carey P R. In: Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies, New York: Academic Press, 1982
- 7 高修功. [博士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学生物工程学院, 1995
- 8 刘红兵, 颜思旭, 程玉华. 生物化学杂志, 1993, 9: 500
- 9 Ryu K, Dordick J S. Biochemistry, 1992, 31: 2588

## Conformational Studies of Lipase in Nonaqueous Solvents by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Yang Hong\* Gao Xiugong\*\* Cao Shugui\* Zhang Kechang\*\*

(\* National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun, 130023)

(\*\* School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

**Abstract** An infrared/attenuated total reflection (ATR) technique has been utilized to study the conformational changes of lipase induced by nonaqueous solvents, without the need of dissolving the protein in the nonaqueous solvent. Dioxane and cyclohexane both induced changes in the secondary structure of the lipase. However, the effect of dioxane was more sound because of its higher hydrophilicity. The conformational change of the enzyme induced by organic solvents was a dynamic process and was reversible to some extent. In addition, it was found that an amphipathic compound could also induce an increasement in the  $\alpha$ -helix content of the enzyme.

**Key-words** fourier transform infrared; attenuated total reflection; lipase; structure; organic solvent

(责任编辑: 秦和平)