

Application News

No. A585

光吸收分析

使用 FTIR 进行蛋白质分析

— 用分峰法对牛血清白蛋白进行二级结构分析 —

蛋白质是肽键的 C=O 基和 N-H 基在聚肽链内或者链间进行氢键结合，形成 α -螺旋、 β -片层、 β -转角、无规卷曲等称为二级结构的局部立体结构。与二级结构相关的红外吸收在多个吸收重叠的状态下，在 1650 cm^{-1} 附近作为一个宽谱峰出现。该谱峰被称为“酰胺 I 带”，是源于肽键 C=O 基的伸缩振动，通过解析酰胺 I 带，可以获得关于蛋白质二级结构的信息。

在通过重叠的吸收带求得各吸收带谱峰信息的方法中，有一种方法是曲线拟合（分峰）。分峰是为了尽可能减小用洛伦兹曲线、高斯曲线等的近似曲线表示各吸收带波形的计算光谱与实测光谱间差异，而对各吸收带的近似曲线和谱峰信息（位置、强度、半高宽）进行优化的方法¹⁾。

在这里我们为您介绍使用分峰进行牛血清白蛋白二级结构解析的分析案例。

S. Iwasaki, R. Fuji

■ 试样的制备

准备市售的牛血清白蛋白，用水 (H_2O) 稀释成 2 mM。酰胺 I 带与 H_2O 的吸收重叠，所以很多情况下也会使用氘 (D_2O)，但在 D_2O 与 H_2O 中，蛋白质形态和氢键存在差异，因此，使用 H_2O 更接近自然的状态²⁾。

■ 牛血清白蛋白的测定

通过在如图 1 所示的 ATR 测定装置 MicromATR™，使用九次反射的 ATR 进行测定。使用 ATR 法时，只需将试样紧贴晶体即可获得光谱，因此，与透射法相比，测定后更容易清洗。另外，在使用九次反射 ATR 时，相较于常用的单次反射，灵敏度更高。九次反射 ATR 的使用仅限于液体，在样品量非常少、30 μl 以下时也可以分析。测定条件如表 1 所示。零填充设置为 4 倍，进行光谱测定。其目的是着眼于酰胺 I 较窄的波数范围，增加傅立叶变换的计算点，获得平滑的光谱。牛血清白蛋白光谱图、 H_2O 红外光谱图、用牛血清白蛋白的红外光谱减去 H_2O 的红外光谱图得到的差谱（将纵轴强度放大显示）如图 2 所示。因为酰胺 I 的谱峰与水蒸气的谱峰重叠，为了去除酰胺 I 谱峰内的 H_2O ，使用差谱法，为确保 1900~1700 cm^{-1} 之间的平坦度（图 2 蓝色箭头），使用干燥空气对光学系统进行了吹扫。



图 1 MicromATR 测定装置

表 1 测定条件

装置	: IRTracer-100、MicromATR (九次反射 ATR)
分辨率	: 4 cm^{-1}
扫描次数	: 100
切趾函数	: Sqr-Triangle
零填充	: 4 倍
检测器	: DLATGS

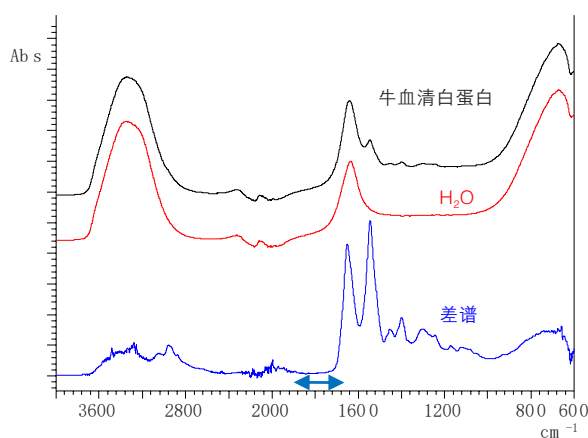


图 2 牛血清白蛋白和 H_2O 的红外光谱、差谱

■ 二次微分光谱

在进行分峰时，需要提前设置吸收带的峰形、指定峰的个数以及每个峰的位置等的初始值，但在指定峰的个数时，应参考二次微分光谱。在这里，在图3所示二次微分光谱的范围内读取负谱峰的波数，指定峰个数。

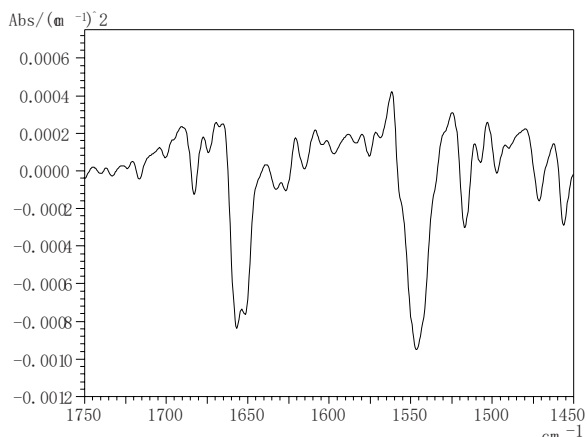


图3 牛血清白蛋白的二次微分光谱

■ 波形分离

依据二次微分光谱的信息，在通过图2求得的差谱的1760~1480 cm⁻¹范围内进行了分峰处理。

分峰的条件如表2所示。分峰前的红外光谱、通过分峰而求得各谱峰、其合成光谱如图4所示。如果分峰精度良好，所测定光谱和分峰的合成光谱就会一致。

表2 分峰条件

峰值曲线的种类	: 洛伦兹函数
基线	: Offset 1Pt
范围	: 1760~1480 cm ⁻¹
最大误差	: 0.01 %

■ 蛋白质的二级结构分析

对构成酰胺 I 带的 1700~1600 cm⁻¹ 附近的波形进行峰值检测，求得谱峰波数和校正面积。其结果如表3所示。参考文献²⁾，对各峰进行二级结构分配，求得二级结构的比例。通过上述操作，求得 α-螺旋、β-片层、β-转角、无规卷曲的比例分别为 23.31%、37.14%、27.56% 和 12.00%。

表3 分峰峰值分析

峰值波数	二级结构	校正面积	面积比
1685.78	β-转角	0.221	2.50 %
1679.52	β-转角	0.335	3.80 %
1673.25	β-转角	0.48	5.44 %
1667.47	β-转角	0.617	6.99 %
1662.17	β-转角	0.779	8.83 %
1656.87	α-螺旋	0.988	11.19 %
1652.05	α-螺旋	1.069	12.11 %
1646.75	无规卷曲	1.059	12.00 %
1640.96	β-片层	1.078	12.21 %
1634.70	β-片层	1.108	12.55 %
1626.99	β-片层	1.092	12.37 %

■ 总结

对牛血清白蛋白进行分析，通过酰胺 I 带的进行分峰，可以解析水溶液中蛋白质的二级结构。通过采用 FTIR，可以用少量试样轻松完成解析。

参考文献:

- 1) 田隅三生编著《红外分光测定法 基础与最新方法》株式会社 S·T·JAPAN
- 2) Jilie KONG, Shaoning YU. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochim Biophys Sin 2007, 39(8): 549-559

IRTracer 是岛津制作所株式会社的商标。

MicromATR 是 CziTek, LLC. 的商标。

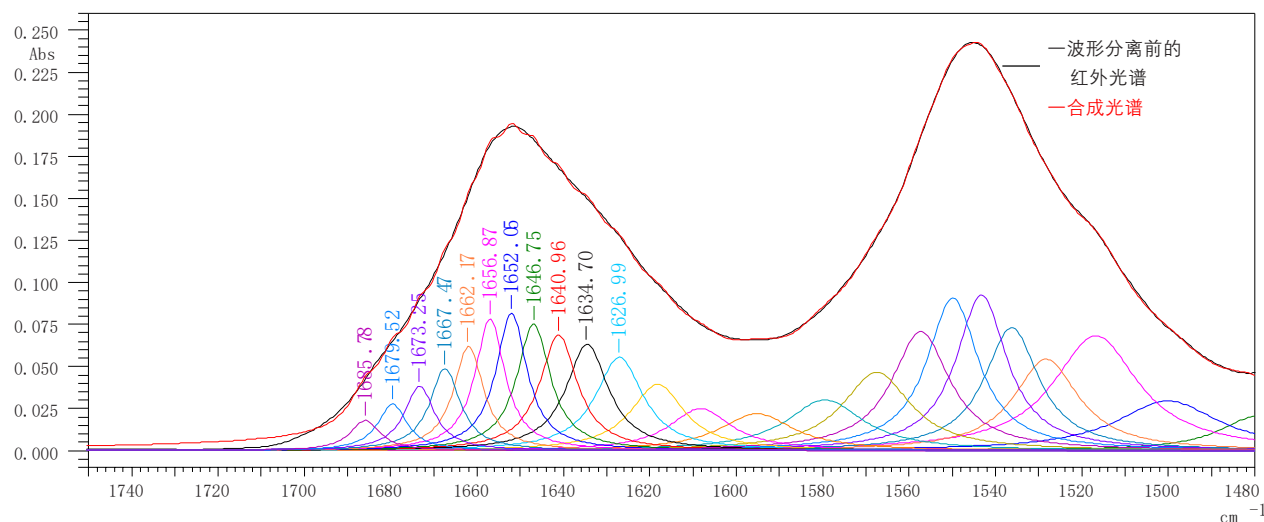


图4 通过波形分离求得各峰值和合成光谱



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2018年11月