

• 研究论文 •

聚乙烯醇与溶菌酶的相互作用及其对溶菌酶构象的影响

王改珍^b 贺进田^{*,a} 闫慧源^a 周志涛^a
周香莲^a 侯笑娜^a 崔 艳^b

(^a 河北师范大学生命科学院 石家庄 050016)

(^b 河北科技大学环境科学与工程学院 石家庄 050018)

摘要 在生理条件下, 使用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示扫描量热分析和傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)研究了溶菌酶与聚乙烯醇(PVA)的相互作用. 结果表明 PVA 与溶菌酶结合形成复合物, 在它们的相互作用过程中, 溶菌酶酪氨酸的发射荧光部分被猝灭, 但是, 相互作用并没有改变酪氨酸的微环境; 差示扫描量热分析结果表明, 溶菌酶与 PVA 之间的相互作用没有破坏溶菌酶的高级结构; 进一步使用红外光谱法结合可增强分辨率的傅里叶去卷积技术和高斯曲线拟合技术共同用于对溶菌酶与 PVA 复合物冻干粉中溶菌酶酰胺 I 带的定量分析, 发现冻干粉溶菌酶分子中与分子间相互作用相关的 β -折叠组分含量减少了, 但是, 用于衡量冻干状态蛋白质结构完整性的 α -螺旋组分含量没有降低. 活性分析结果进一步确认, PVA 与溶菌酶的相互作用没有破坏溶菌酶的三级结构.

关键词 聚乙烯醇; 溶菌酶; 傅里叶变换红外光谱; 凝胶过滤; 荧光光谱

Interaction between PVA and Lysozyme and Its Influence on the Conformation of Lysozyme

WANG, Gai-Zhen^b HE, Jin-Tian^{*,a} YAN, Hui-Yuan^a ZHOU, Zhi-Tao^a
ZHOU, Xiang-Lian^a HOU, Xiao-Na^a CUI, Yan^b

(^a College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

(^b College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract Gel filtration chromatography, fluorescence spectrophotometry, differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectrophotometry (FT-IR) were used to investigate the interaction between polyvinyl alcohol (PVA) and lysozyme under physiological conditions. The results showed that lysozyme formed complex with PVA. During lysozyme interaction with PVA, emission fluorescence derived from tryptophan of lysozyme was partially quenched upon binding to PVA. However, microenvironment of tryptophan was not changed during the binding process. The results of DSC showed that the interaction of PVA with lysozyme did not destroy advanced structures of lysozyme. Fourier transform infrared spectrometry was combined with resolution enhancement technique Fourier deconvolution and Gaussian curve-fitting procedures to quantitate the spectral information from the amide I bands of lysozyme within the freeze-dried mixture of PVA and lysozyme. The results showed that the interaction of PVA with lysozyme affected only the β -sheet content rather than α -helix, which was usually used as an indicator of the protein structural integrity in lyophilized state. Analysis of activity of the lysozyme showed that interaction of PVA with the lysozyme did not destroy the tertiary structure of the lysozyme.

Keywords polyvinyl alcohol; lysozyme; Fourier transform infrared spectrometry; gel chromatography;

* E-mail: he_jintian@sina.com; Tel.: 0311-85895276.

Received September 26, 2007; revised November 19, 2007; accepted January 7, 2008.

河北师范大学博士基金(No. L2005B23)资助项目.

fluorescence spectrometry

聚乙烯醇(PVA)是一种用途相当广泛的水溶性高分子聚合物, 已经被广泛用于纺织、食品、建筑等领域. 并且由于 PVA 毒性很低、无刺激性、安全性好, 已经被日本和美国批准用于医药和食品工业^[1]. 最近的研究发现, PVA 作为添加剂可以防止蛋白质在水/二氯甲烷界面的变性^[2]. 作者和合作者在研制葡激酶突变体 K35R 的聚乳酸羟基乙酸缓释微球过程中, 发现 PVA 可以有效保护蛋白质在微球研制过程中的稳定性^[3~5]. 由此推断 PVA 可能与蛋白质之间存在相互作用, 这种相互作用可能保护了蛋白质的结构稳定性, 使 PVA 可能成为新型的蛋白质稳定剂. 但是, 查阅相关文献资料, 发现 PVA 与蛋白质的相互作用研究甚少. 因此, 我们选择溶菌酶作为模型蛋白, 使用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示扫描量热分析和傅里叶变换红外光谱法研究了溶菌酶与 PVA 的相互作用, 发现 PVA 与溶菌酶形成了复合物, 它们的相互作用并没有明显改变蛋白质的高级结构, 使溶菌酶的结构具有了更强的稳定性.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

荧光光谱仪(F-2500 荧光分光光度计)是日本 Hitachi 公司产品; Perkin Elmer DSC-2c 型示差扫描量热仪是美国珀金埃尔默公司产品; Thermo Nicolet Avatar 360 傅立叶红外光谱仪为美国热电尼高力(Thermo Nicolet)产品; HD-1 核酸蛋白检测仪是上海沪西分析仪器厂有限公司产品; 微量移液器是 Eppendorf 产品.

卵清蛋白的溶菌酶是 AMRESCO 产品; 聚乙烯醇(PVA, 87%~89%, 分子量 31000~70000), 为 Aldrich 产品; 溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 购自中国科学院微生物研究所; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-150 是 Pharmacia 产品; 实验中所有用水均为 MiLLiQ 系统制备的超纯水.

1.2 凝胶色谱层析

Sephadex G-150 凝胶层析柱(1.5 cm×60 cm)用于检测溶菌酶与 PVA 的相互作用, 凝胶柱上样前用 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.4)平衡过夜, 控制流速在 20 cm/h. 将 2 mL 浓度为 5 mg/mL 溶菌酶样品和相同摩尔浓度的 PVA 样品混合, 静置 15 min 后上样, 用核酸蛋白分析仪检测样品峰. 为检测溶菌酶的纯度和保留时间, 溶菌酶单独柱层析进行对照.

1.3 荧光光谱测定

用 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.4)配制溶菌酶和

PVA 溶液, 用 F-2500 荧光光谱仪分别检测样品的激发荧光光谱和发射荧光光谱. PVA 无激发荧光光谱和发射荧光光谱, 溶菌酶在 280 nm 处有一个强吸收光谱峰, 设定 280 nm 为激发光, 溶菌酶在 340 nm 有一个强发射荧光光谱峰. 检测溶菌酶与 PVA 的相互作用过程中 340 nm 处发射荧光强度随时间的变化.

1.4 差示扫描量热分析

将物质的量比为 1:1 的 PVA 与溶菌酶混合溶液冷冻干燥制备成固体样品. PVA 与溶菌酶的混合冻干粉、溶菌酶和 PVA 样品的热性质由美国产 Perkin Elmer DSC-2c 型示差扫描量热仪测定, 将研磨的样品充分搅拌均匀, 精确称量样品(3~6 mg), 用药匙将样品均匀地平铺于专用铝皿的底部, 加盖密封. 在纯氮的环境下, 样品进行相转变动态分析, 从 25~250 °C 以 10 °C/min 的升温速率升温, 采集样品在加热过程中热量的变化.

1.5 溶菌酶的活性测定

用 50 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液将底物微球菌充分研磨配制浓度为 0.4 mg/mL 的悬浮液, 取 200 μL 上述底物悬浮液于比色杯中, 加入 50 μL 样品, 迅速搅匀以启动反应, 然后置于酶标仪中, 每隔 15 s 记录其在 450 nm 处的吸光度.

1.6 傅里叶变换红外光谱及数据处理

2 mg 样品与 200 mg KBr 混合均匀, 压片. 红外光谱在 Nicolet Avatar 360 型傅里叶变换红外光谱仪上测定, 采用 CaF₂ 窗片, 扫描次数: 120 次, 分辨率: 2 cm⁻¹. 对光谱进行水汽和二氧化碳校正, 扫描范围 600~4000 cm⁻¹. 从 PVA、溶菌酶混合冻干粉的红外光谱中扣除 PVA 吸收是用 Ominic 2.1 程序完成的. 扣除的标准是在 1800~2200 cm⁻¹ 范围内红外光谱为一条直线^[4].

利用软件 Ominic 6.0a 得到二级导数谱和去卷积谱, 去卷积参数控制半峰宽(FWHM)为 27, 增强因子(Enhancement factor)为 2.4, 得到的去卷积谱, 进行 11 点平滑. 在二级导数谱指导下, 利用 Microsoft Origin 数学软件对酰胺 I 带去卷积谱图进行高斯曲线拟合.

2 结果与讨论

2.1 凝胶层析法分析溶菌酶和 PVA 的相互作用

在凝胶层析色谱图上, 溶菌酶呈现单一、对称的吸收峰(图 1A). 而将 PVA 与溶菌酶的混合溶液上同样的凝胶柱之后, 凝胶过滤色谱发生了明显变化, 在比溶菌酶保留时间短的位置出现了一个不对称的色谱峰. 在此

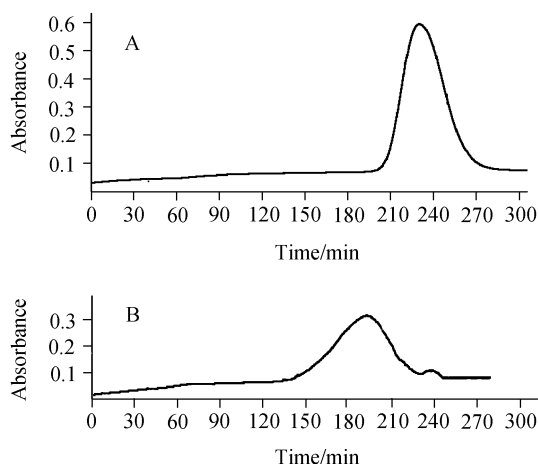


图1 溶菌酶(A)和溶菌酶、PVA 混合物(B)的 Sephadex G-150 色谱层析谱图

Figure 1 Elution profiles of lysozyme (A) and the mixture of lysozyme and PVA (B) from Sephadex G-150

峰之后出现一个很小的色谱峰,其保留时间与溶菌酶相似(图 1B).

PVA 分子在 280 nm 不发生紫外吸收,实验过程中所检测得到的吸收峰为溶菌酶所产生的吸收.由近似等摩尔浓度的 PVA 与溶菌酶的混合溶液产生二个色谱峰的结果可以推测,溶菌酶与 PVA 发生了相互作用. PVA 分子量(31000~70000)远大于溶菌酶(15000),它们所形成复合物的分子量也远大于溶菌酶,因而, Sephadex G-150 凝胶层析柱可以有效地将复合物与溶菌酶分离.此外, PVA 分子量不均一,复合物分子量同样不均一,在色谱图上呈现的色谱峰不对称.对复合物和溶菌酶的色谱峰积分计算峰面积,可估算出 96.6%的溶菌酶处于与 PVA 的复合状态.

2.2 时间对 PVA 与溶菌酶之间相互作用的影响

溶菌酶的紫外光谱吸收峰在 280 nm,用波长 280 nm 激发光进行激发,溶菌酶的发射荧光谱峰在 340 nm,这些谱峰主要来自于溶菌酶中的酪氨酸^[6].使用 340 nm 的发射荧光强度检测溶菌酶与 PVA 的相互作用过程,发现其发射荧光强度逐渐下降,大约至 4 min 后趋于平缓,略有波动(图 2).溶菌酶的发射荧光强度降低,说明 PVA 与溶菌酶的酪氨酸发生了相互作用,导致了荧光猝灭现象.进一步检测不同浓度的溶菌酶和 PVA 相互作用对溶菌酶荧光发射波长的影响,发现荧光发射波长并未发生明显改变.说明在相互作用过程中并未导致酪氨酸的微环境发生明显变化.

2.3 差示扫描量热分析

在热流-温度曲线上, PVA 与溶菌酶的吸热峰为单峰,分别在 190.82 和 201.45 °C(图 3A 和 3B). PVA、溶菌酶混合物冻干粉的吸热峰与溶菌酶的吸热峰在同一

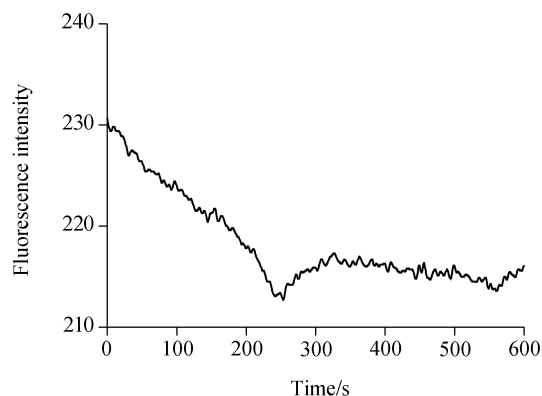


图2 PVA 与溶菌酶相互作用过程中发射荧光强度随时间的变化

Figure 2 The change of emission fluorescence intensity with time during interaction of PVA with lysozyme

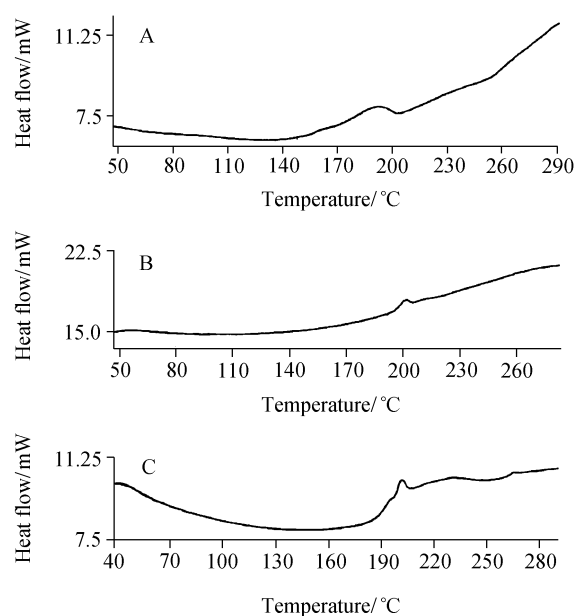


图3 PVA (A)、溶菌酶(B)和 PVA、溶菌酶混合冻干粉(C)的差示扫描量热分析谱图

Figure 3 DSC thermograms of PVA (A), lysozyme (B) and the freeze-dried mixture of PVA and lysozyme (C)

位置,在 201.43 °C, PVA 的吸热峰消失,在 196.81 °C 出现了一个肩峰(图 3C).溶菌酶在 200 °C 左右出现的吸热峰反映了其变性熔解的温度,蛋白质的高级结构在此温度时遭到破坏^[7].溶菌酶与混合物冻干粉的变性温度相同,提示溶菌酶与 PVA 之间的相互作用并没有明显改变溶菌酶的高级结构.差示扫描量热分析的 DSC 数据提示,溶菌酶的结晶融熔热为 7.50 J/g,而溶菌酶混合物冻干粉的结晶融熔热为 18.87 J/g.混合物冻干粉的结晶热比溶菌酶明显升高,提示溶菌酶与 PVA 之间发生了相互作用,产生了新的作用力.推测正是 PVA 与溶菌酶之间的这种作用力使得溶菌酶可以抵抗在超声条

件下的变性,使溶菌酶在有机溶剂表面超声时活性不但没有下降,反而有少量的升高^[2].

2.4 PVA 与溶菌酶之间相互作用对溶菌酶二级结构的影响

PVA 在酰胺 I 带($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)范围内没有强红外吸收,但是, PVA 在 1738 cm^{-1} 有强吸收峰(图 4), 它的峰尾会影响对酰胺 I 带的定量分析. 因此,测定混合冻干粉中溶菌酶的红外光谱时,应该扣除 PVA 的影响. 溶菌酶和扣除 PVA 吸收后的溶菌酶、PVA 混合冻干粉的 FT-IR 谱图分别见图 5B 和 5A.

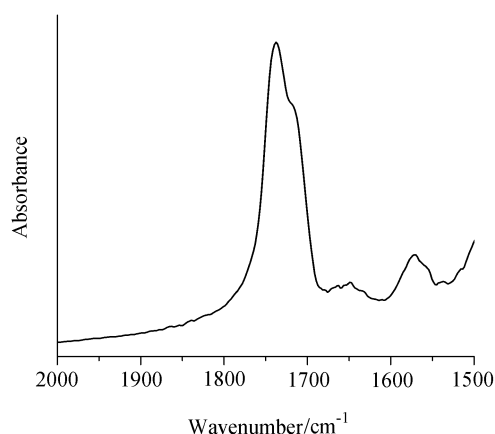


图 4 PVA 在 $1500\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的 FT-IR 谱图

Figure 4 FT-IR spectra of PVA in the $1500\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ region

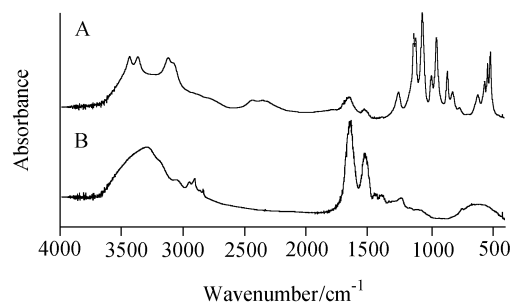


图 5 扣除 PVA 吸收后的溶菌酶、PVA 混合冻干粉(A)和单独溶菌酶(B)的 FT-IR 谱图

Figure 5 FT-IR spectra of the freeze-dried mixture of PVA and lysozyme after PVA absorbance was subtracted (A) and lysozyme (B)

溶菌酶和扣除 PVA 吸收后的溶菌酶的酰胺 I 带去卷积谱的高斯曲线拟合结果见图 6A、图 6B 和表 1. 参考溶菌酶 FT-IR 文献结果^[8~10], 对所得谱带进行了归属, 结果见表 1. 1617 cm^{-1} 是氨基酸侧链振动吸收峰, 1631.9 cm^{-1} 是 β -折叠吸收峰, 1661.6 cm^{-1} 是 α -螺旋的吸收峰, 1675.2 和 1690.3 cm^{-1} 主要是转角(turn)的吸收, 可能也有少量的 β -折叠的贡献.

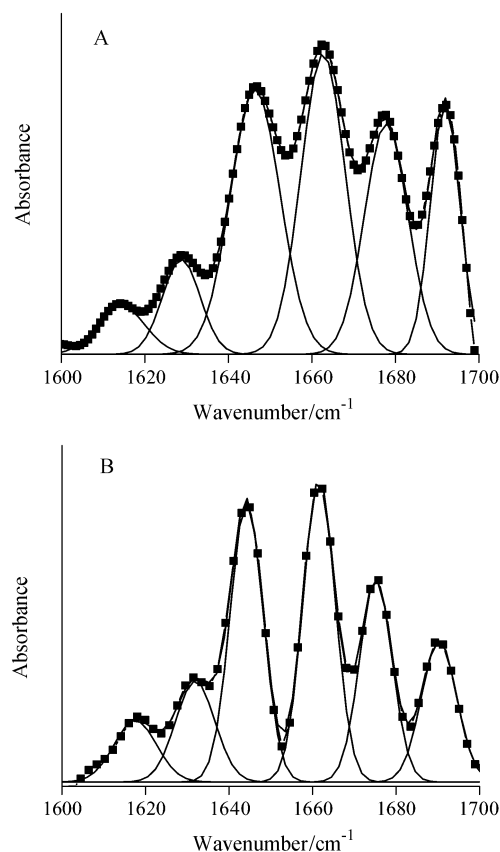


图 6 溶菌酶(A)和溶菌酶、PVA 混合物中溶菌酶(B)的酰胺 I 带去卷积谱及其高斯曲线拟合

Figure 6 Deconvoluted amide I band and Gaussian curve-fitting of lysozyme (A) and lysozyme within the freeze-dried mixture of PVA and lysozyme (B)

1631.9 cm^{-1} 是典型的分子间相互作用形成 β -折叠的吸收峰^[2], 在 PVA 与溶菌酶发生作用后, 这个峰高明显降低, 由此推测 PVA 与溶菌酶的相互作用减少了冻干粉中溶菌酶分子间的相互作用, 而这种分子间相互作用有时候会导致蛋白质的变性失活; 1644.2 cm^{-1} 是无规则卷曲的吸收, PVA 与溶菌酶的相互作用没有导致无规则卷曲组分的增加(表 1); 1661.6 cm^{-1} 是 α -螺旋的吸收峰, PVA 与溶菌酶的相互作用没有导致螺旋成分的下降(表 1); 在蛋白质冷冻干燥过程中, 大量的溶剂水会被蒸发, 蛋白质分子之间的相互作用会导致 β -折叠组分的改变, 因而, β -折叠组分不能用于衡量冻干粉中蛋白质的结构组分; 而 α -螺旋一般不会受到分子间作用的影响, 因而, 一般使用 α -螺旋结构衡量蛋白质的稳定性^[7,11,12]. 由此可以推测 PVA 与溶菌酶的相互作用减少了冻干品中溶菌酶分子间的相互作用, 没有破坏溶菌酶的高级结构.

将溶菌酶与 PVA 混合溶液的冻干样品溶解后, 溶液澄清, 没有发现不溶物; 测定溶液中溶菌酶的活性, 结果发现溶菌酶的活性保留了 98.5%, 进一步确认了 PVA 与溶菌酶的相互作用没有破坏溶菌酶的高级结构.

表 1 溶菌酶红外吸收谱带的位置和归属
Table 1 Infrared band position and band assignments of lysozyme

Sample	Band position/cm ⁻¹	Band area/%	Assignment
Lyophilized power	1617.6	—	Side-chain vibrations
	1631.9	11.47	β -Sheet
	1644.2	26.7	Unordered
	1661.6	28.2	α -Helix
	1675.2	19.1	β -Turn
	1690.3	14.5	β -Turn
Lyophilized mixture of PVA and lysozyme	1614.3	—	Side-chain vibrations
	1628.7	7.6	β -Sheet
	1646.4	27.8	Unordered
	1662.7	28.0	α -Helix
	1677.8	21.1	β -Turn
	1691.9	15.5	β -Turn

3 结论

PVA 作为添加剂可以有效保护蛋白质的稳定性,可能成为新型的蛋白质稳定剂. 本文以溶菌酶作为模型蛋白,使用分子筛色谱和荧光光谱法研究了溶菌酶与聚乙烯醇(PVA)的相互作用,发现 PVA 与溶菌酶结合形成 1:1 复合物;溶菌酶与 PVA 作用过程中,溶菌酶的酪氨酸发射荧光强度随时间降低,表明 PVA 与溶菌酶中的酪氨酸发生了相互作用导致了荧光淬灭;用差示扫描量热分析研究 PVA、溶菌酶和它们复合物冻干粉的热性能,发现溶菌酶与混合物冻干粉的变性温度相同,提示溶菌酶与 PVA 之间的相互作用并没有明显改变溶菌酶的高级结构. 并且混合物冻干粉的结晶热比溶菌酶明显升高,提示溶菌酶与 PVA 之间发生了相互作用,产生了新的作用力,这种作用力增加了溶菌酶的结构稳定性. 进一步使用傅里叶变换红外光谱法(FT-IR)结合可增强分辨率的傅里叶去卷积技术与高斯曲线拟合技术共同用于对复合物中溶菌酶酰胺 I 带的定量分析, PVA 与溶菌酶的相互作用减少了冻干粉溶菌酶分子中与分子间相互作用相关的 β -折叠组分含量,但是,没有降低可以衡量冻干粉蛋白质结构完整性的 α -螺旋组分含量. 溶菌酶的活性分析结果进一步确认, PVA 与溶菌酶的相互作用没有破坏溶菌酶的高级结构.

References

- 1 Chen, Q. H.; Qu, W. *Chin. Pharm. J.* **2000**, 35, 147 (in

Chinese).

(陈庆华, 瞿文, 中国药学杂志, **2000**, 35, 147.)

- 2 van de Weert, M.; Hoechstetter, J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A. *J. Control. Release* **2000**, 68, 351.
- 3 He, J. T.; Su, H. B.; Li, G. P.; Tao, X. M.; Mo, W.; Song, H.-Y. *Int. J. Pharm.* **2006**, 309(1~2), 101.
- 4 He, J. T.; Wang, G. Z.; Song, H. Y. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2006**, 26, 1209 (in Chinese).
(贺进田, 王改珍, 宋后燕, 光谱学与光谱分析, **2006**, 26, 1209.)
- 5 He, J. T.; Wang, G. Z.; Feng, M. Y.; Song, H. Y. *Chin. Pharm. J.* **2007**, 42, 593 (in Chinese).
(贺进田, 王改珍, 冯美彦, 宋后燕, 中国药学杂志, **2007**, 42, 593.)
- 6 Zhang, Y. P.; Wei, Y. J.; Li, N.; Qin, S. J. *Chin. J. Anal. Chem.* **2004**, 32, 779 (in Chinese).
(张玉平, 魏永巨, 李娜, 秦身钧, 分析化学, **2004**, 32, 779.)
- 7 Elkordy, A. A.; Forbes, R. T.; Barry, B. W. *Int. J. Pharm.* **2002**, 247, 79.
- 8 Fu, K.; Griebenow, K.; Hsieh, L.; Alexander, M. K.; Robert, L. *J. Control. Release* **1999**, 58, 357.
- 9 Liu, H. Z.; Yang, W. J.; Chen, J. Y. *Biochem. Eng. J.* **1998**, 2, 187.
- 10 Brandes, N.; Welzel, P. B.; Werner, C.; Kroh, L. W. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 299, 56.
- 11 Yang, T. H.; Dong, A.; Meyer, J.; Johnson, O. L.; Cleland, J. L.; Carpenter, J. F. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 161.
- 12 Carrasquillo, K. G.; Costantino, H. R.; Cordero, R. A.; Hsu, C. C.; Griebenow, K. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 166.

(A0709264 SUN, H. P.; DONG, H. Z.)