

H⁺对溶菌酶热变性过程的促进机制

李梦娜

(中国科学技术大学化学物理系, 安徽合肥 230026)

摘要: 利用自发拉曼光谱方法研究了 H⁺ 在溶菌酶热变性过程中对其起始变性温度的影响, 分析了 H⁺ 在溶菌酶变性过程中与其分子上氨基酸残基相互作用的动力学过程. 在变性过程中同步记录并分析了所有的拉曼谱带. 研究表明, H⁺ 加速了溶菌酶的热变性过程, 在此过程中, H⁺ 削弱了溶菌酶分子残基间形成的氢键, 该氢键是维持蛋白质稳定三级结构的次级键的组成部分之一. 此外, 在此过程中, 溶菌酶更靠近分子内部的氨基酸残基的起始变性温度表现出低于外层氨基酸残基的变化. 这直接揭示了溶菌酶热变性过程在 H⁺ 的作用下遵从由内到外的变性机制. 本研究不仅揭示了 H⁺ 在溶菌酶热变性过程中的促进机制, 还说明了同步拉曼分析是研究离子对促进蛋白质变性机理的有力方法.

关键词: 拉曼光谱; 溶菌酶; 动力学机制; 蛋白质变性

中图分类号: O641 **文献标识码:** A doi: 10.3969/j.issn.0253-2778.2020.05.011

引用格式: 李梦娜. H⁺对溶菌酶热变性过程的促进机制[J]. 中国科学技术大学学报, 2020, 50(5): 637-644.

LI Mengna. The Kinetic Mechanism of H⁺ in lysozyme with increasing temperature[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2020, 50(5): 637-644.

The kinetic mechanism of H⁺ in lysozyme with increasing temperature

LI Mengna

(Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: In this study, Raman spectroscopy was employed to study the kinetic mechanism of lysozyme denaturation at high temperatures induced by H⁺. All of the Raman bands were synchronously recorded and analyzed during the denaturation process. It was found that the denaturation process of lysozyme was accelerated in the presence of H⁺. It was demonstrated that H⁺ reduced the influence of hydrogen bond that is one of the secondary bonds to maintain the tertiary structure of lysozyme. Moreover, it was found that the side groups remote to the lysozyme molecular surface changed before those on the surface during the denaturation. It directly reveals the inside-out mechanism caused by H⁺ in lysozyme denaturation with increasing temperature. This study not only prove that lysozyme denaturation was accelerated in the presence of H⁺, but also illustrate this synchronous Raman analysis as a powerful method to study the denaturation mechanisms of other proteins caused by a variety of ions.

Key words: Raman spectroscopy; lysozyme; kinetic mechanism; protein denaturation

0 引言

蛋白质的物理和化学性质与其特殊的分子结构密切相关,因此,蛋白质的错误折叠和聚集会直接导致其变性和纤维化等现象,诱发众多人类疾病.大量的研究表明:老年痴呆症、帕金森症和Ⅱ型糖尿病等都源于蛋白质错误折叠和聚集形成的不溶性 β 淀粉样原纤维^[1-2].因此,蛋白质变性相关的研究一直以来都是生物物理和生物化学研究的热点.

蛋白质的特异性空间结构主要由二硫键的交联以及次级键共同作用实现^[3].在不同的溶液 pH 值、离子强度和共溶剂的影响下,这些分子间作用力能够促进蛋白质的展开,增强疏水相互作用,减少离子键的数量,削弱氢键作用,破坏二硫键等^[4-6].其中,pH 对蛋白质变性的影响主要通过静电作用和氢键作用体现,例如,水环境中 pH 对丝素蛋白的二级和三级结构有较大影响,在酸性条件下(pH = 4~5.2),丝素蛋白链内的氢键被破坏,蛋白质结构从无序卷曲状转变为舒展状态,并且在伸展过程中形成链间氢键,最终形成不溶性的纤维状蛋白^[7].

鸡蛋清溶菌酶作为一种较简单的蛋白质分子,常常被用作模型蛋白研究相关的变性过程.1963年,Canfield^[8]测定了鸡蛋清溶菌酶分子的化学成分和相应的氨基酸序列,证实其分子量为 14307.之后的研究进一步确认了鸡蛋清溶菌酶分子是由 129 个氨基酸组成的多肽链,其中主要是 4 个二硫键交联半胱氨酸残基 64-80、76-94、6-127 和 30-115 构成的 α -helix 构象^[9-10].作为水溶性球蛋白,鸡蛋清溶菌酶分子不具有纤维状蛋白质一样的重复序列,在水溶液中主要靠疏水相互作用和氢键保持结构的稳定性,并且它是一种少数可以在酸性环境中保持高度稳定性的酶分子,仅在 pH < 2 时才会发生明显的变性.前人的研究表明:溶菌酶分子保持稳定结构的最适合 pH 值范围为 5~6,在该范围内其变性温度最高,不易发生变性^[11].

以往,人们已经采用多种实验技术手段开展了溶菌酶分子在各种诱导作用(加热、酸性、金属离子等)下变性过程的研究,如核磁共振、圆二色光谱、傅里叶变换红外光谱、差热扫描法等,获得了许多重要的微观结构和动力学信息^[11-14].最近,本实验室通过检测各特征结构(如 α -helix 和 β -sheet 等)的拉曼光谱指针变化,确认了溶菌酶分子在热变性和化学变性过程中的多步动力学变化机制^[12].在此基础

上,本实验室完整地获得了溶菌酶分子在酸性热孵育条件下变性直至生成淀粉样纤维的动力学过程,提出了四阶段分步变性模型^[15],以及澄清了金属铝离子对溶菌酶分子变性的独特作用^[16].尽管酸性条件是已知的重要蛋白质变性诱导因素,能够有效加快蛋白质变性速率,但是对不同的蛋白质结构来说,其作用方式必然有所不同.以溶菌酶分子为例,Venkataramani 等^[11]在酸性条件下的傅里叶变换红外光谱中,发现其二级结构的特征谱带——Amide I 谱带存在明显的位移和强度变化.其中,对应反平行 β -sheet 结构的 1613cm^{-1} 谱峰逐渐蓝移至 1617cm^{-1} ,且强度显著增加; α -helix 对应的 1654cm^{-1} 谱峰强度则相应减弱;此外,随着 pH 值的不同,其变性温度亦有所改变. Lewis 等^[17]通过差热扫描和拉曼光谱等实验手段也研究了溶菌酶分子二级结构 α -helix、 β -sheet、 β -turn 和无序卷曲结构等对 pH 值变化的响应,他们证实在酸性条件下,随着 pH 值的降低, α -helix 向 β -sheet 结构转变的变性温度也逐渐降低.然而,上述研究均忽略了三级结构对 pH 的响应,这显然不足以完整反映酸性条件中溶菌酶的多步变性机制.

为了澄清 pH 对溶菌酶分子变性温度的影响,本文采用自发拉曼光谱方法实时记录了其在热酸变性过程中,不同二级和三级结构对应的特征拉曼谱带的动态变化.考虑到溶菌酶分子的酸稳定性,本文仅考察了 pH = 2、3、4 条件下的热变性过程.通过对比不同 pH 条件下的变化趋势,讨论了 pH 值对溶菌酶二级和三级结构变性温度的影响,从而在微观尺度上描绘了氢键作用在溶菌酶变性过程中的动力学机制.

1 实验方法和材料制备

鸡蛋清溶菌酶(活性:22800U/mg)购买自圣工生物工程(上海)股份有限公司,使用时未进行进一步的提纯.实验过程中,溶菌酶在水溶液中的初始质量浓度均为 10%.溶剂采用盐酸水溶液,由 99.9% 的浓盐酸稀释得到不同 pH 值,最终的溶液 pH 值由 pH 计测定.

实验中,溶菌酶盐酸溶液被分别装入若干长方体石英比色皿中(1 mm × 1 mm × 3 mm),置于冰箱保存.热孵育变性在恒温加热槽(THD-2006;宁波)中进行,从 25℃ 到 85℃,间隔取 5℃ 或 2℃,每改变一次温度后,重新取样并置于预设温度的加热槽中

恒温 30min 后立刻进行拉曼光谱测量, 如此取样过程可以避免将样品池直接放入恒温槽连续升温测量带来的叠加效应。

自发拉曼光谱系统与之前的实验研究系统相同^[12, 15-16, 18-23], 这里仅做简单地描述. 本实验采用了自主搭建的背向散射拉曼光谱检测系统, 激发光源为 4 W 功率的准连续激光器 (532 nm, Verdi V5; Coherent). 输出的线偏振 532 nm 激光经透镜聚焦在样品池上, 散射光由收集透镜和偏振系统选择汇聚, 其中, 仅选择与入射光偏振方向平行的散射光, 即本实验中所采集的偏振拉曼光谱为平行光谱. 线偏的拉曼散射光经三重单色仪 (TriplePro; Acton Research) 分光后, 由液氮冷却的 CCD 相机 (Spec10; 100B; Princeton Instruments) 记录. 实验利用汞灯的标准谱线校准了散射光的波长, 所得拉曼光谱的光谱分辨率为 1~2 cm⁻¹. 单一温度下的光谱采集时间约为 40~50 min, 且每个温度下光谱采集所用时间相同。

实验中, 我们主要采用了溶菌酶分子二级结构和三级结构对应特征拉曼光谱谱带的拉曼频移和半高全宽 (full-width half-maximal, FWHM) 作为光谱指针, 其谱带的中心拉曼位移和半高全宽由高斯函数拟合得到. 峰参数与温度的关系可由前人研究文献中得到^[24-27], 符合 sigmoid 曲线. 在本实验中, 我们只需对 sigmoid 曲线的上升沿做拟合, 因此可以由如下函数(1)进行拟合:

$$S = S_0 + A \cdot \exp[(T - T_0)/\Delta T] \quad (1)$$

式中, S 和 S_0 是光谱指针在不同 pH 时待测温度 T 和中性 25°C 条件时的峰参数 (拉曼频移或 FWHM); T_0 为未加热时的初始温度; A 为由 pH 引入的、对由温度影响峰参数改变的调制, 当 $T = T_0$ 时, $S = S_0 + A$ 是单纯由 pH 的改变导致的峰参数的改变; $1/\Delta T$ 是速率常数, 表征指针增长的速度. 考虑到本实验主要关注各指针在不同 pH 作用下出现明显变化的先后顺序, 为此, 本文近似以曲线斜率具有明显变化时的温度作为该曲线条件下的起始变性温度点。

2 结果与讨论

2.1 溶菌酶分子的自发拉曼光谱

图 1 为实验记录的 25°C 下, 700~1750 cm⁻¹ 范围内溶菌酶分子盐酸溶液 (pH=2) 的自发拉曼光谱. 显然, 其中包括了大量的官能团振动峰, 参考以

往的光谱标识结果^[28-37], 我们主要选取了若干常用的拉曼光谱指针, 用以分别表征溶菌酶分子骨架振动 (与二级结构密切相关, 以红色标注) 和侧链基团振动 (与蛋白质三级相关, 以蓝色标注). 不仅如此, 这些指针在图 1 中也相对独立, 受附近的振动峰影响较少, 能够较为准确地描述溶菌酶分子在不同温度和不同 pH 条件下的分子结构变化趋势, 从而反映出溶菌酶分子的变性程度。

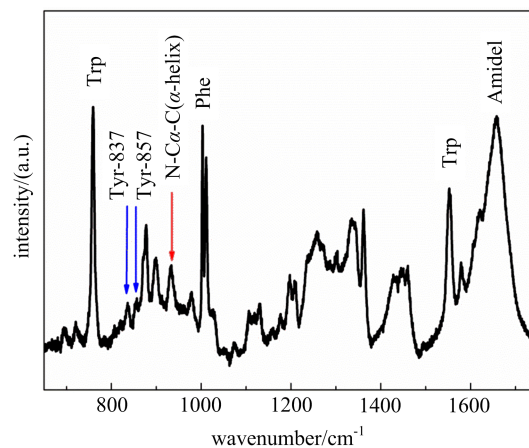


图 1 25°C 时, 溶菌酶盐酸溶液的自发拉曼光谱
Fig. 1 Raman spectra of lysozyme in HCl at 25°C

表 1 列出了以上光谱指针的具体振动模式描述. 其中, 935cm⁻¹ 的振动带由蛋白质分子中处于 α 螺旋结构的 N-C α -C 基团伸缩振动引起, 其拉曼位移和强度与 N-C α -C 基团的构象和布居密切相关^[28, 30-31, 35, 37]. 位于 1640~1685 cm⁻¹ 区域的宽带为酰胺 I (Amide I) 谱带, 中心位移在 1658 cm⁻¹ 附近, 主要振动模式对应羰基 C=O 和 C-N 键的耦合伸缩振动以及少量 N-H 面内弯曲振动^[29, 35]. 以往的大量拉曼光谱研究^[30, 35] 已经得到共识: 不同蛋白质二级结构中 Amide I 谱带的中心位置略有差异, α -helix 主要位于 1640~1654 cm⁻¹, 高度有序的 β -sheet 则处于 1665~1680 cm⁻¹, 而包括 β -turns 和疏松的 β -strands 等无序结构 (random coil) 则处于两者之间 (1654~1665 cm⁻¹). 这样, 随着蛋白质二级结构由 α -helix 向 β -sheet 的转变, 该谱带的中心拉曼位移必然发生一定程度的蓝移. 由于以上两个拉曼谱带均是由肽链骨架结构的振动形成的, 因此, 常常作为蛋白质二级结构的敏感光谱指针, 用以反映蛋白质变性过程中的二级结构变化。

表 1 溶菌酶分子各特征拉曼振动指针的标识和相应的振动模式描述

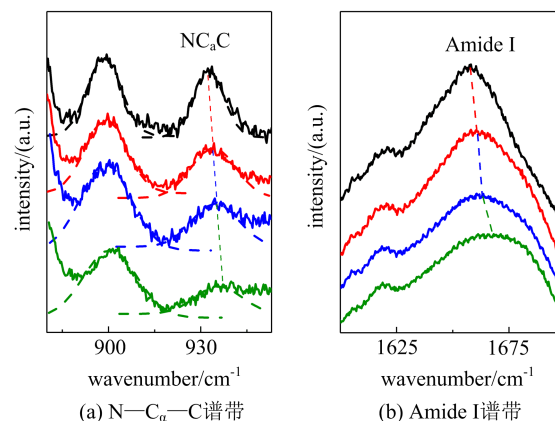
Tab. 1 Parameters and the assignments of Raman bands of lysozyme

Groups	Frequency / (cm ⁻¹)	Assignment	Parameters
skeletons			
N—C _α —C	935	stretching of N—C _α —C segment in α-helix ^[30,35,37]	Peak position
Amide	1658	Amide I mode as the coupling mode of the C=O and C—N stretching vibration and a small amount of N—H in-plane bending vibration ^[29,35]	Peak position
Side groups			
Trp	759	coupled vibrations of in-phase breathings of benzene and pyrrole ^[28,36]	FWHM
Trp	1554	stretching of C ₂ =C ₃ segment in benzene ^[30,33]	Peak position
Tyr	837/857	doublet of Fermi resonance between the ring breathing mode and overtone of out-of-plane ring deformation ^[30,34]	Peak position
Phe	1005	ring breathing of benzene in Phe amino residue ^[35,37]	FWHM

蛋白质的三级结构在其变性过程中同样会发生显著的改变,而这些三级结构主要是由肽链在二级结构的基础上进一步盘绕、折叠形成的.三级结构的维持主要依靠氨基酸侧链之间的氢键、疏水相互作用、范德华力和静电作用,因此,它们的振动频率显然对氨基酸周围环境极其敏感.在拉曼光谱中,带芳香基侧链基团的氨基酸常常具有较为突出的光谱贡献,如图 1 所示.这里,我们主要选取了色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)作为代表,用以研究溶菌酶蛋白在变性过程中的三级结构变化.位于 759 cm⁻¹ 处拉曼谱带对应 Trp 中苯环和吡咯环的同相呼吸振动^[28,36],而其苯环的 C₂=C₃ 伸缩振动则位于 1554 cm⁻¹ 处^[30,33]. Tyr 中芳香环呼吸和平面外环振荡变形之间的费米共振导致出现位于 837 cm⁻¹ 和 857 cm⁻¹ 处的双峰结构^[30,34]. Phe 的苯环呼吸则位于 1005 cm⁻¹ 附近^[35,37].

图 2 显示了溶菌酶蛋白质在不同 pH 作用下孵育 30 min 后二级结构变化导致拉曼光谱指针谱带变化的细节图.显然,随着温度从 25℃ 逐步增加至 84℃, N—C_α—C 和 Amide I 谱带均表现出明显的蓝移,并且不同 pH 条件下蓝移程度不同. 935 cm⁻¹ 附近的 N—C_α—C 伸缩振动模的中性频率位移由 pH 为 4 时的 1 cm⁻¹ 增大至 2 cm⁻¹ (pH = 3) 和 3 cm⁻¹ (pH = 2). 类似的, Amide I 带的谱峰也发生了蓝移,分别从 1658 cm⁻¹ 变化至 1667 cm⁻¹ (pH=2)、1663 cm⁻¹ (pH=3) 和 1664 cm⁻¹ (pH=4). 这些谱峰位移表明溶菌酶蛋白质的二级结构由 α-helix 向无序结构和 β-sheet 结构转变,这与以往利用量热法和拉曼光谱手段对热酸诱导蛋白质变性

过程中二级结构构象变化的研究结论完全一致^[38-39],并且与 Venkataramani 等^[11]利用红外光谱对蛋白质热酸变性的研究结论相符,均表明随着 pH 的降低,蛋白质的二级结构变性程度加深并呈现出对 pH 响应的非线性变化趋势.



不同颜色表示不同孵育条件,黑色为 25℃、pH=2.0;红色为 85℃、pH=4.0;蓝色为 85℃、pH=3.0;绿色为 85℃、pH=2.0

图 2 溶菌酶蛋白二级结构的光谱指针在热酸性条件下孵育变性的拉曼光谱图

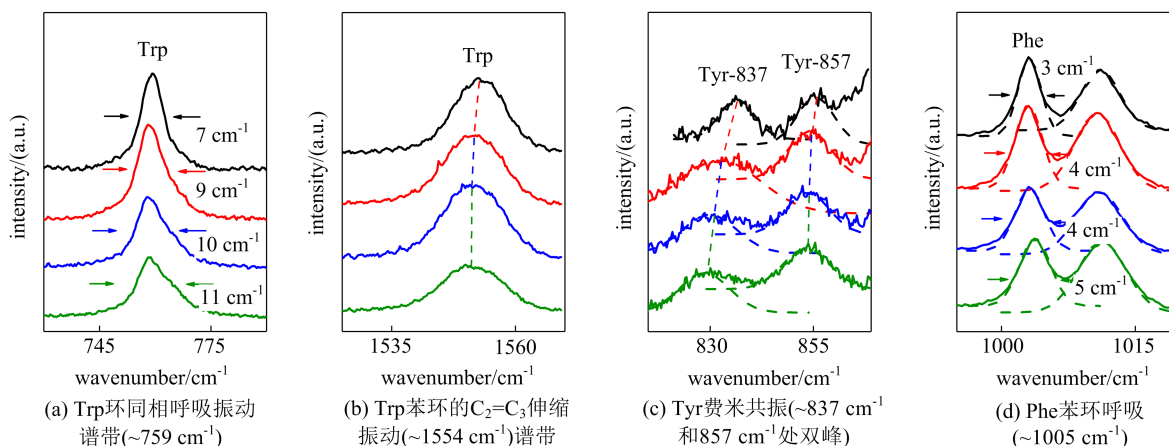
Fig. 2 The Raman spectra of denaturation of lysozyme secondary structure under the condition of high temperature and acid

对 Trp、Tyr 和 Phe 为代表的三级结构光谱指针而言,类似的变化也可以清楚地被观测到(图 3).当溶液 pH 为 4.0 时,随着热孵育的温度增加,759 cm⁻¹ 处 Trp 谱峰的 FWHM 由 7 cm⁻¹ (25℃) 逐渐加宽至 9 cm⁻¹ (85℃),而当 pH 降低至 2.0 时,这个增宽更为明显,其 FWHM 增长至 11 cm⁻¹ (85℃). 这种加宽反映了溶菌酶蛋白在变性过程中侧链 Trp

残基的构象更为复杂无序,即随着水解的发生,蛋白三级结构逐渐松散,Trp 基团的侧链对应 C₂=C₃-C_β-C_α 二面角增大^[40-41].此外,随着 pH 值的降低,更宽的 Trp 基团 FWHM 意味着其水解的程度进一步增大. Trp 基团的另一振动谱峰(位于 1553 cm⁻¹ 处)也表现出类似的动力学行为,其中心位置发生了红移.在 pH 为 4 的条件下,由 1553 cm⁻¹ (25°C)微弱红移至 1552 cm⁻¹ (85°C),而当 pH 降至 2 时,红移进一步加强至 1551 cm⁻¹ (85°C).

对 Tyr 残基而言,图 3(c)中清楚地显示出溶菌酶蛋白水解展开时,Tyr 在 837 cm⁻¹ 和 857 cm⁻¹ 处的费米共振双峰发生了红移.在 pH 为 4 时,两峰分别从 836 cm⁻¹ 和 855 cm⁻¹ 红移至 832 cm⁻¹ 和

854 cm⁻¹,在 pH 为 3 时,则分别红移至 830 cm⁻¹ 和 854 cm⁻¹,当 pH 进一步降为 2 时,则红移至 829 cm⁻¹ 和 853 cm⁻¹.考虑到 Tyr 残基和水分子间的作用力越强,红移越明显^[34,42],因此,实验观察到的 Tyr 基团的谱峰红移与溶菌酶蛋白的水解密切相关,随着三级结构的破坏,越来越多的 Tyr 残基暴露在水环境中,相互作用加强.图 3(d)显示了残基指针 Phe 的 FWHM 的变化,从图中可以看出,在溶液初始 pH 值由 4 降低至 2 的过程中,其 FWHM 由 3 cm⁻¹ 分别增长至 4 cm⁻¹、4 cm⁻¹ 和 5 cm⁻¹.这些溶菌酶分子的侧链基团的变化表征了溶菌酶在变性过程中的三级结构的变化,并且表明了 pH 值越低,其变性程度越高.



不同颜色表示不同孵育条件,黑色为 25°C、pH = 2.0;红色为 85°C、pH=4;蓝色为 85°C、pH=3;绿色为 85°C、pH=2

图 3 溶菌酶蛋白三级结构的光谱指针在热酸性条件下孵育变性的拉曼光谱图

Fig. 3 The Raman spectra of denaturation of lysozyme tertiary structure under the condition of high temperature and acid

2.2 溶菌酶变性温度随溶剂 pH 的变化

图 4 是各溶菌酶分子氨基酸残基随温度以及 pH 值变化的曲线图,在较低温度下,各残基几乎不随温度的变化而发生改变,且各指针随 pH 减小其拉曼频移或 FWHM 变化不大.此外可以看到随 pH 值的降低,溶菌酶的起始变性温度降低,与前人研究溶菌酶热稳定性对 pH 响应的结论相符合^[11],这主要是由于溶液中 H⁺ 浓度增大后,侧链基团间形成的氢键被削弱.

图 4 显示了溶菌酶二级结构指针 N-C_α-C 和 Amide I 谱带在不同 pH 值溶剂中孵育时由温度变化导致的谱带位置的改变,显然溶菌酶在 pH 值为 2 时的二级结构变化早于 pH 值为 3 和 4 的盐酸溶液,分别为 60°C、75°C、75°C (N-C_α-C), 60°C、

67.5°C、67.5°C (Amide I). 可以看到在本实验的结果中,溶菌酶蛋白二级结构在 pH 为 3 和 4 的溶液中显露出几乎同步的变性过程,但是在 pH 值为 2 的溶液中,无论是 N-C_α-C 谱带还是 Amide I 谱带,都显示出了明显快于在高 pH 值溶液中的变性速率.这表明溶菌酶二级结构的变性速率随着 pH 值的降低呈现出非线性增长.

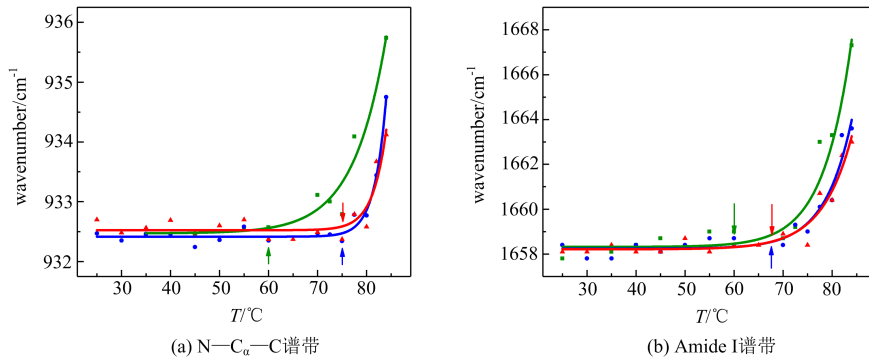
显然,溶菌酶蛋白三级结构指针的变性程度同样显示出随 pH 值变化的非线性增加.图 5(a)为位于 759cm⁻¹ 附近的 Trp 环同相呼吸振动谱带的 FWHM 随 pH 值以及温度的变化趋势图,可以看到在不同 pH 值溶液中,其起始变性温度不同,分别为 47.5°C、62.5°C 和 62.5°C,对应于 pH=2、3 和 4.图 5(b)中另一位于 1554 cm⁻¹ 附近的 Trp 苯环上

C₂=C₃ 伸缩振动谱带拉曼频移显示出与其一致的变化. 图 5(c)和图 5(d)分别对应于由费米共振导致的位于 837 cm⁻¹ 和 857 cm⁻¹ 附近的 Tyr 拉曼双峰位置,随着溶液 pH 值的降低,其起始变性温度显示出递减趋势,分别为 70°C (pH=4)、65°C (pH=3)和 55°C (pH=2). 图 5(e)为位于 1005 cm⁻¹ 附近的 Phe 苯环呼吸振动谱带 FWHM 随 pH 和温度的变化曲线图,其在 pH=3 和 4 的溶液中显示出几乎重合的变性过程,当 pH 值减小至 2 时,其变性起始温度骤减至 55°C. 表 2 列出了各残基发生变性时的起始温度.

表 2 各溶菌酶分子中氨基酸残基在各 pH 条件下的起始变性温度

Tab. 2 The initial denaturation temperature of raman bands of lysozyme under different pH

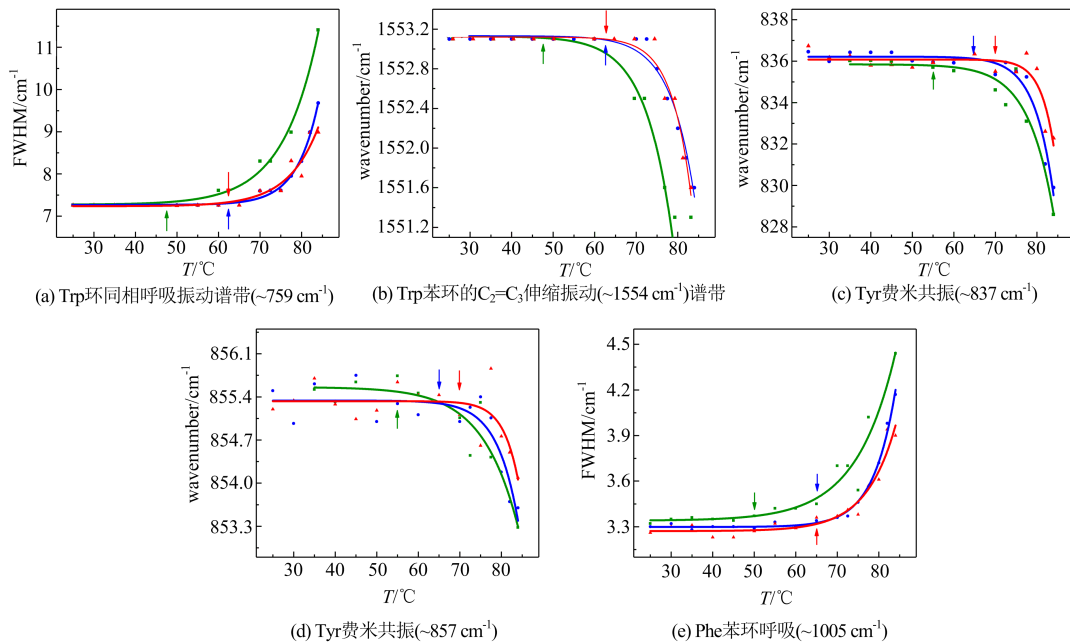
pH	2	3	4
N—C _α —C(α-helix)	60°C	75°C	75°C
Amide I	60°C	67.5°C	67.5°C
Trp-FWHM	47.5°C	62.5°C	62.5°C
Trp-1553	47.5°C	62.5°C	62.5°C
Tyr-837	55°C	65°C	70°C
Tyr-857	55°C	65°C	70°C
Phe-FWHM	55°C	65°C	65°C



不同颜色表示不同孵育条件,红色为 pH=4,蓝色为 pH=3,绿色为 pH=2

图 4 85°C 孵育条件下溶菌酶蛋白二级结构的光谱指针随盐酸溶液 pH 值变化的函数(1)模型图

Fig. 4 The model graphs of denaturation of lysozyme secondary structure in the hydrochloric acid with different pH values at 85°C



不同颜色表示不同孵育条件,红色为 pH=4,蓝色为 pH=3,绿色为 pH=2

图 5 85°C 孵育条件下溶菌酶蛋白三级结构的光谱指针随盐酸溶液 pH 值变化的函数(1)模型图

Fig. 5 The model graphs of denaturation of lysozyme tertiary structure in the hydrochloric acid with different pH values at 85°C

3 结论

从实验数据中可以看出,随着 pH 值的降低,各氨基酸残基侧链基团都表现出了起始变性温度降低的特性,说明溶液中 H⁺ 的加入使得溶菌酶分子变性进程加快,原因是 H⁺ 的加入使得溶菌酶分子各残基间形成的分子内氢键作用减弱。可以注意到,在溶菌酶分子变性过程中,Trp 侧链基团的开始变性温度较另两个残基 Tyr 和 Phe 低,究其原因,是 Trp 侧链基团中存在吡咯环(图 6),容易与溶菌酶分子中其他残基形成分子内氢键,而 Tyr 与 Phe 为非极性氨基酸残基,并不易与其他残基形成氢键。

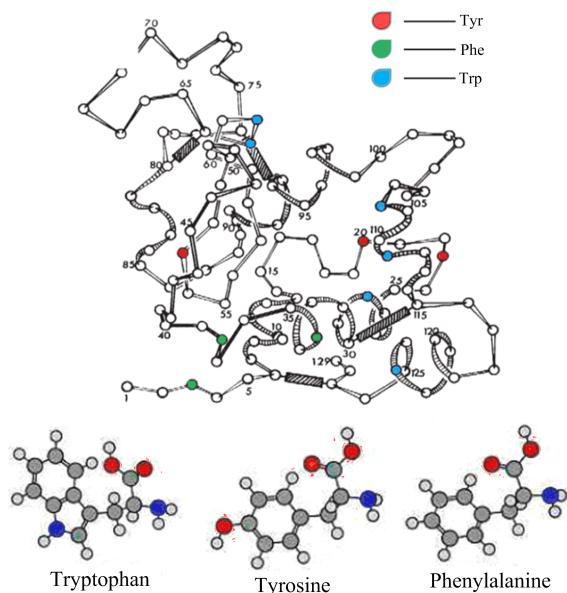


图 6 酪氨酸 Tyr(红色)、苯丙氨酸 Phe(绿色)、色氨酸 Trp(蓝色)在溶菌酶分子中的位置和其原子平面结构图

Fig. 6 The position of Tyr (red), Phe (green), Trp (blue) in lysozyme and the model of their atomic structure

当 H⁺ 靠近溶菌酶分子上的极性氨基酸时,削弱了其形成的分子内氢键作用,当达到一定温度时,这些极性氨基酸率先发生变性,随后使得其他氨基酸残基周围微环境发生改变,导致连锁反应,使蛋白质进一步发生变性。有趣的是,可以形成分子内氢键的极性氨基酸大部分都处于靠近溶菌酶分子内部的位置,随着这些极性氨基酸基团周围环境先行改变,外围三级结构的溶液环境也随之发生改变,因此溶菌酶在热酸条件下的变性遵从由内而外的机制。该实验不仅揭示了 H⁺ 在溶菌酶分子变性进程中的作用,还证明了对所有拉曼谱带数据的同步分析是研

究离子对蛋白质变性机理的有力方法。

参考文献(References)

- [1] DOBSON C M. Protein folding and misfolding [J]. Nature, 2003, 426(6968): 884-890.
- [2] NEUDECKER P, ROBUSTELLI P, CAVALLI A, et al. Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation[J]. Science, 2012, 336(6079): 362-366.
- [3] CAMPBELL L, RAIKOS V, EUSTON S R. Modification of functional properties of egg-white proteins [J]. Nahrung, 2003, 47(6): 369-376.
- [4] HANDA A, TAKAHASHI K, KURODA N, et al. Heat-induced egg white gels as affected by pH[J]. Journal of Food Science, 1998, 63(3): 403-407.
- [5] MINE Y, NOUTOMI T, HAGA N. Thermally induced changes in egg-white proteins[J]. J Agr Food Chem, 1990, 38(12): 2122-2125.
- [6] DU H B, LIU Z Z, JENNINGS R, et al. The effects of salt ions on the dynamics and thermodynamics of lysozyme unfolding[J]. Sep Sci Technol, 2017, 52(2): 320-331.
- [7] 谢桐,周平,邓风,等. pH 值对丝素蛋白构象转变的影响[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(5): 961-965.
- [8] CANFIELD R E. Amino acid sequence of egg white lysozyme[J]. J Biol Chem, 1963, 238(8): 2698-2708.
- [9] VANEY M C, MAIGNAN S, RIES-KAUTT M, et al. High-resolution structure (1.33 Å) of a HEW lysozyme tetragonal crystal grown in the APCR apparatus. Data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from SpaceHab-01 mission [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1996, 52: 505-517.
- [10] WANG S S, CHAO H S, LIU H L, et al. Stability of hen egg white lysozyme during denaturation is enhanced by pretreatment with supercritical carbon dioxide[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(4): 355-359.
- [11] VENKATARAMANI S, TRUNTZER J, COLEMAN D R. Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier transform infrared study[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2013, 5(2): 148-153.
- [12] XING L, LIN K, ZHOU X G, et al. Multistate mechanism of lysozyme denaturation through synchronous analysis of Raman spectra[J]. J Phys Chem B, 2016, 120(41): 10660-10667.
- [13] BARRECA D, LAGANA G, MAGAZU S, et al. FTIR, ESI-MS, VT-NMR and SANS study of trehalose thermal stabilization of lysozyme[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 63 (225-32).
- [14] HIRAI M, ARAI S, IWASE H. Complementary analysis of thermal transition multiplicity of hen egg-white lysozyme at low pH using X-ray scattering and scanning calorimetry[J]. J Phys Chem B, 1999, 103(3): 549-556.

- [15] XING L, FAN W, CHEN N, et al. Amyloid formation kinetics of hen egg white lysozyme under heat and acidic conditions revealed by Raman spectroscopy[J]. *J Raman Spectrosc*, 2019,50(5): 629-640. .
- [16] XING L, CHEN N, FAN W, et al. Double-edged effects of aluminium ions on amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019,132: 929-938.
- [17] LEWIS E N, QI W, KIDDER L H, et al. Combined dynamic light scattering and Raman spectroscopy approach for characterizing the aggregation of therapeutic proteins [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 20888-20905.
- [18] CHEN L, ZHU W D, LIN K, et al. Identification of alcohol conformers by Raman spectra in the C-H stretching region[J]. *J Phys Chem A*, 2015, 119(13): 3209-3217.
- [19] LIN K, HU N Y, ZHOU X G, et al. Reorientation dynamics in liquid alcohols from Raman spectroscopy[J]. *J Raman Spectrosc*, 2012, 43(1): 82-88.
- [20] LIN K, ZHOU X G, LIU S L, et al. Identification of free OH and its implication on structural changes of liquid water[J]. *Chinese J Chem Phys*, 2013, 26(2): 121-126.
- [21] LIN K, ZHOU X G, LUO Y, et al. The microscopic structure of liquid methanol from Raman spectroscopy[J]. *J Phys Chem B*, 2010, 114(10): 3567-3573.
- [22] TANG C Q, LIN K, ZHOU X G, et al. In situ detection of amide a bands of proteins in water by Raman spectrum [J]. *Chinese J Chem Phys*, 2016, 29(1): 129-134.
- [23] WANG C C, LIN K, HU N Y, et al. Ion pairs in aqueous magnesium nitrate solution by excess Raman spectroscopy [J]. *Acta Phys-Chim Sin*, 2012, 28(8): 1823-1829.
- [24] ELWELL M L, SCHELLMAN J A. Stability of phage-T4 lysozymes. 1. Native properties and thermal-stability of wild-type and 2 mutant lysozymes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 494(2): 367-383.
- [25] HEDOUX A, IONOV R, WILLART J F, et al. Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: A Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation[J]. *J Chem Phys*, 2006, 124 (1):1604.
- [26] THOMSON J A, SHIRLEY B A, GRIMSLEY G R, et al. Conformational stability and mechanism of folding of ribonuclease-T1 [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264 (20): 11614-11620.
- [27] VANSTOKKUM I H M, SCHERER T, BROUWER A M, et al. Conformational dynamics of flexibly and semirigidly bridged electron donor-acceptor systems as revealed by spectrotemporal parameterization of fluorescence [J]. *J Phys Chem-U*, 1994, 98 (3): 852-866.
- [28] CHEN M C, LORD R C, MENDELSON R. Laser-excited Raman-spectroscopy of biomolecules. 5. Conformational-changes associated with chemical denaturation of lysozyme[J]. *J Am Chem Soc*, 1974, 96 (10): 3038-3042.
- [29] ELLIS D I, COWCHER D P, ASHTON L, et al. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool[J]. *Analyst*, 2013, 138 (14): 3871-3884.
- [30] KOCHERBITOV V, LATYNIS J, MISIUNAS A, et al. Hydration of lysozyme studied by Raman spectroscopy[J]. *J Phys Chem B*, 2013, 117(17): 4981-4992.
- [31] LORD R C, YU N T. Laser-Excited Raman spectroscopy of biomolecules. 2. Native ribonuclease and alpha-chymotrypsin[J]. *J Mol Biol*, 1970, 51(2):203-213.
- [32] LORD R C, YU N T. Laser-Excited Raman spectroscopy of biomolecules. 1. Native lysozyme and its constituent amino acids[J]. *J Mol Biol*, 1970, 50(2):509-524.
- [33] RYGULA A, MAJZNER K, MARZEC K M, et al. Raman spectroscopy of proteins: a review[J]. *J Raman Spectrosc*, 2013, 44(8): 1061-1076.
- [34] SIAMWIZA M N, LORD R C, CHEN M C, et al. Interpretation of doublet at 850 and 830 cm^{-1} in Raman-spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds [J]. *Biochemistry-U*, 1975, 14 (22): 4870-4876.
- [35] SPIRO T G, GABER B P. Laser Raman-scattering as a probe of protein-structure[J]. *Annu Rev Biochem*, 1977, 46(1):553-572.
- [36] SWEENEY J A, ASHER S A. Tryptophan UV resonance Raman excitation profiles [J]. *J Phys Chem*, 1990, 94 (12): 4784-4791.
- [37] WEN Z Q. Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(11): 2861-2878.
- [38] SEO J A, HEDOUX A, GUINET Y, et al. Thermal denaturation of beta-lactoglobulin and stabilization mechanism by trehalose analyzed from Raman spectroscopy investigations[J]. *J Phys Chem B*, 2010, 114 (19): 6675-6684.
- [39] TORREGGIANI A, DI FOGGIA M, MANCO I, et al. Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: A calorimetric and Raman study[J]. *J Mol Struct*, 2008, 891(1-3): 115-122.
- [40] TAKEUCHI H. Raman structural markers of tryptophan and histidine side chains in proteins [J]. *Biopolymers*, 2003, 72(5): 305-317.
- [41] TAKEUCHI H. UV Raman markers for structural analysis of aromatic side chains in proteins[J]. *Anal Sci*, 2011, 27(11): 1077-1086.
- [42] CHEN M C, LORD R C, MENDELSON R. Laser-excited Raman-spectroscopy of biomolecules. 4. Thermal denaturation of aqueous lysozyme [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 328(2): 252-260.