

液态簧振动力学谱在蛋白质水凝胶脱水变性过程的应用研究*

周恒为¹⁾²⁾ 刘君²⁾ 雷婷²⁾ 黄以能^{1)2)†}

1) (南京大学物理学院, 国家固体微结构重点实验室, 南京 210093)

2) (伊犁师范学院物理科学与技术学院, 新疆凝聚态相变与微结构实验室, 伊宁 835000)

(2012年10月23日收到; 2012年11月28日收到修改稿)

本文用液态簧振动力学谱 (RMS-L) 方法, 对典型蛋白质水凝胶鸡蛋清的脱水变性过程进行了测量, 结果表明, 随水含量的减少, 鸡蛋清至少存在 4 个力学谱的显著变化过程. 基于此结果并结合力学谱的理论分析, 作者推测, 随水含量的减少, 鸡蛋清可能依次存在下述 4 个状态: 1) 类体水 (bulk-like water) 的蛋白质水凝胶态; 2) 键合水 (bonding water) 的蛋白质水凝胶态; 3) 键合水和键合蛋白质 (bonding protein) 的混合态; 4) 键合蛋白质态. 而蛋白质的空间构型 (spatial configuration) 转变即变性, 主要发生在拥有键合水的蛋白质通过失水向键合蛋白质转变的混合态. 这表明 RMS-L 对鸡蛋清脱水变性过程的检测是有效的, 所得结果对蛋白质变性机理、以及蛋白质水凝胶态的深入研究也应具有参考价值.

关键词: 力学谱, 蛋白质水凝胶, 蛋白质变性

PACS: 62.40.+i, 82.70.Gg, 87.15.kr, 87.14.E-

DOI: 10.7498/aps.62.076203

1 引言

在物理和化学因素作用下, 蛋白质分子特定的空间构象被破坏, 进而导致蛋白质理化性质的改变和生物活性的丧失, 称为蛋白质的变性^[1-25]. 蛋白质变性后, 不仅失去了生理活性, 同时也失去了原来的可溶性. 这可用于许多方面, 如利用变性因素, 作用于病原微生物蛋白, 使其变性失活来消毒及灭菌; 利用各种蛋白质对变性剂的敏感程度不同, 使结合蛋白质变性沉淀, 达到提纯生物制品等. 因此, 蛋白质变性研究不仅是生物物理与生物化学的基本问题之一, 同时也具有现实的应用价值^[1-18].

蛋白质变性研究方法是多种多样的, 如核磁共振^[19]、差热分析^[20]、红外光谱^[21,22]、荧光光谱^[23]、电泳^[24]、色谱^[25]技术等. 但不同方法各有优缺点, 所以探索检测蛋白质变性的新手段

无疑是有益的, 因为它必然从新视角给出相应的新信息. 本文中, 作者尝试了用液态簧振动力学谱^[26-32] (reed-vibration mechanical spectroscopy for liquids, RMS-L), 对典型蛋白质水凝胶鸡蛋清的脱水变性过程进行了测量与分析, 目的是探索该方法在相关领域应用的可行性. 另外, 随水含量的变化, 蛋白质水凝胶存在几个状态仍有争议^[1,18]. 本文对该问题也进行了探讨.

2 实验

本文选用的鸡蛋清样品是按照如下方法获得的. 打开鸡蛋壳后, 将未混合的蛋清和蛋黄至于玻璃盘中, 蛋清中浓度较稀的部分会自然流向边缘处, 然后在靠近蛋黄的蛋清中取出一部分. 该部分蛋清较稠, 蛋白质含量较高, 是良好、无色透明的天然蛋白质水凝胶.

* 新疆维吾尔自治区科技援疆 (批准号: 201091112)、国家重点基础研究发展计划 (973 项目) (批准号: 2012CB821500) 和新疆自然科学基金 (批准号: 2009211B16, 2010211B16) 资助的课题.

† 通讯作者. E-mail:

RMS-L 的示意图如图 1 所示, 其测量原理为 [26-32]: 1) 首先测量簧片 (衬底) 的共振频率 (f_r) 和内耗 (Q_r^{-1}) 随温度 (T) 和时间 (t) 的变化; 2) 然后测量液态样品和衬底组成复合体系的共振频率 (f_c) 和内耗 (Q_c^{-1}) 随 T 和 t 的变化; 3) 再利用测得的 f_r , Q_r^{-1} , f_c , Q_c^{-1} 数据, 并依据 RMS-L 的测量理论 [26-32], 计算出待测样品的复杨氏模量随 T 或 t 的变化. 实验结果表明, 只要所选择的衬底与液态样品能够浸润结合, 实验的可重复性就非常

好.

共振频率和内耗的测量仪器为南京大学自主知识产权的 PJ-II 型簧振动力学谱仪. 本文所用衬底材料为 SiO_2 玻璃, 其尺寸为: $l_r \times w \times h_r = 40 \text{ mm} \times 4 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$, 基频共振频率 $f_r \approx 1520 \text{ Hz}$, 加上待测样品的频率变化约为 60 Hz , 由此可以估算出样品质量约为 30 mg .

实验测量条件为室温 (约 290 K)、1 个大气压、相对湿度约 45% .

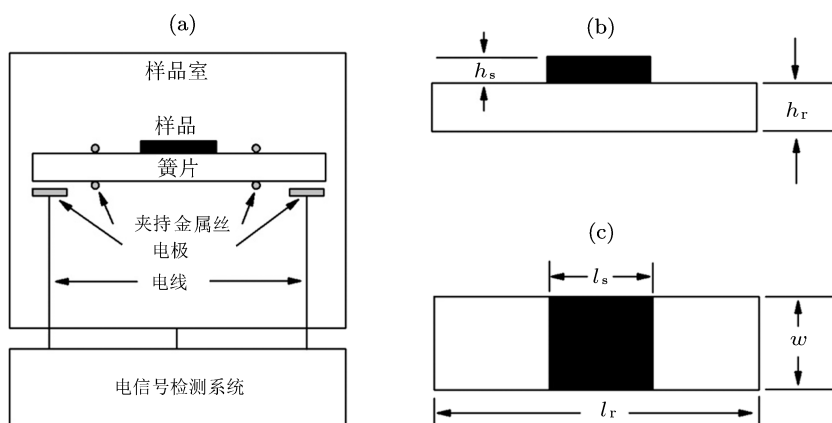


图 1 (a) 为 RMS-L 示意图; (b) 和 (c) 分别为衬底和样品的侧视和俯视图 (其中 w 为簧片 (衬底) 宽度, l_r , l_s 分别为衬底和样品长度, h_r , h_s 分别为衬底和样品的厚度)

3 结果与讨论

图 2 所示的是鸡蛋清/ SiO_2 玻璃衬底复合系统的 f_c (图 2(a)) 和 Q_c^{-1} (图 2(b)) 随 t 变化的测量结果. 由于 SiO_2 衬底的 f_r 和 Q_r^{-1} 几乎不随 t 变化, 所以图 2 中 f_c 和 Q_c^{-1} 随 t 的变化只能来自鸡蛋清. 另外, df_c/dt 更能反映 f_c 随 t 变化的细节, 所以图 2(c) 中还给出了 df_c/dt 随 t 变化的结果. 需要说明的是, 图中 t_s ($= 17 \text{ min}$) 由 df_c/dt 斜率变化确定, t_c ($= 215 \text{ min}$) 由 Q_c^{-1} 的最小值确定, t_f ($= 307 \text{ min}$) 由 df_c/dt 和 Q_c^{-1} 的斜率变化确定.

图 2 的结果表明, 鸡蛋清脱水变性的力学谱主要有如下 4 个变化过程:

- 1) 0 至 t_s 的 I 过程, f_c 随 t 而快速上升, 但是 df_c/dt 和 Q_c^{-1} 都快速下降;
- 2) t_s 至 t_c 的 II 过程, f_c 随 t 继续上升, 但 df_c/dt 和 Q_c^{-1} 下降变缓;
- 3) t_c 至 t_f 的 III 过程, f_c 和 Q_c^{-1} 随 t 上升, 而 df_c/dt 缓慢减小;
- 4) t_f 以后的 IV 过程, f_c 和 Q_c^{-1} 随 t 极为缓慢地增加, 而 df_c/dt 则极为缓慢的减小.

可以想象, 直接观测也表明, t_f 以后鸡蛋清的脱水变性基本完成. 因此, 上述结果表明, 鸡蛋清的脱水变性过程至少包括 3 个过程, 即: 0 至 t_s 的 I 过程; t_s 至 t_c 的 II 过程; t_c 至 t_f 的 III 过程. 换句话说, 鸡蛋清随水含量的变化, 至少可能存在如图 2(c) 所示的 I, II, III, IV 等 4 个状态. 下面对上述过程或状态进行深入分析.

按照 RMS-L 的测量理论 [26-32], 当样品长度 l_s 、厚度 h_s 分别比簧片长度 l_r 、厚度 h_r 小得多时, 即 $l_s/l_r \ll 1$ 和 $h_s/h_r \ll 1$ 时, 可以得到

$$f_c = f_r \left[1 - \frac{m_s}{2m_r} \left(1 - \frac{3\rho_r Y_s}{\rho_s Y_r} \right) \right], \quad (1)$$

$$Q_c^{-1} = Q_r^{-1} + \frac{3\rho_r Y_s m_s}{\rho_s Y_r m_r} (Q_s^{-1} - Q_r^{-1}), \quad (2)$$

其中 m_r , ρ_r , Y_r 和 m_s , ρ_s , Y_s 分别簧片和样品的质量、密度和杨氏模量, Q_s^{-1} 为样品的内耗.

由于刚获得的鸡蛋清中水含量 $\sim 80\%$, 所以可以想象有 $Y_s \ll Y_r$, 并依据方程 (1) 可得 $f_c \approx f_r \left(1 - \frac{m_s}{2m_r} \right)$. 由该方程可得, I 过程中 f_c 随 t 的快速上升、以及 df_c/dt 和 Q_c^{-1} (方程 (2)) 的快速

下降,主要是由于鸡蛋清的质量减少,即其中水的快速挥发导致的.又因为与 II, III, IV 状态相比, I 状态的 Q_c^{-1} 最大.因此,按照内耗产生的一般理论^[33-37],说明 I 状态中水分子的随机运动最强,与大体积水 (bulk water) 中分子行为最为类似^[18].因此, I 状态主要为类体水 (bulk-like water) 的蛋白质水凝胶态.

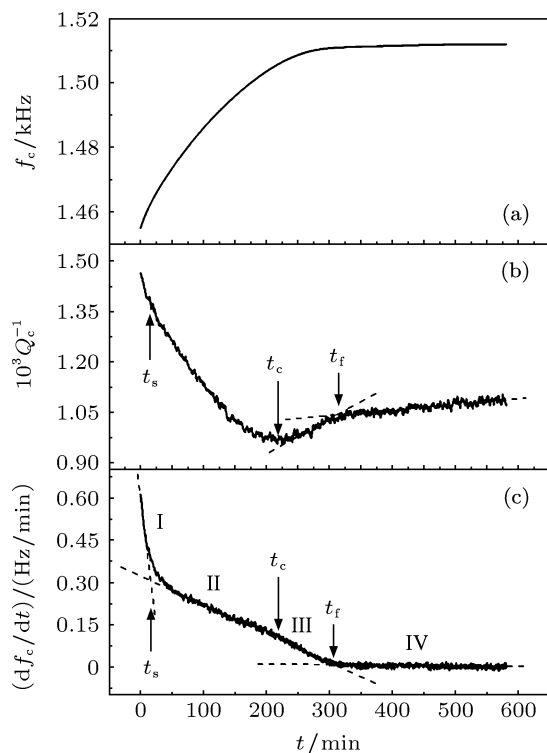


图2 鸡蛋清/SiO₂ 复合系统的共振频率 f_c (a), 内耗 Q_c^{-1} (b), df_c/dt (c) 随时间 t 的变化结果

与 I 状态相比, II 状态的 Q_c^{-1} 逐步变小,最后到达 t_c 时最小.该结果表明 II 状态中分子的随机运动逐步受到抑制,而且在 t_c 分子的随机运动在所有状态中最弱^[33-37].换句话说, II 状态中分子之间的关联逐步增强,并在 t_c 发展到最强^[33-37].可以想象,随着水含量的减少, II 状态中与蛋白质形成氢键的水分子比例逐渐增大、甚至在 t_c 可能几乎全部

成键,即类体水的比例逐步减小、以致可能完全消失^[18].同时,体系中成键分子比例的增加,必然导致 Y_s 的快速增加,也必然导致 df_c/dt 的斜率快速变小(方程(1)).因此, II 状态主要为键合水 (bond water) 的蛋白质水凝胶态.

对 t_c 至 t_f 的 III 状态,其 f_c 和 Q_c^{-1} 随 t 而增加,表明随着其中键合水的挥发,失去键合水分子的蛋白质分子中的氢键基团,既可以与分子内部、也可以与相邻蛋白质分子的氢键基团,通过氢键连接形成键合蛋白质 (bonding protein),即形成化学交联结构而导致相应蛋白质分子变性,当然材料的 Y_s 即 f_c 必然增加(方程(1)).同时,也有部分蛋白质分子的氢键基团,由于附近已经没有可以形成氢键的基团,而处于相对自由的状态.该部分基团的数目随水含量的减少而增加,而它们的随机运动必然导致 Q_c^{-1} 随 t 而增加^[33-37],直到水分子几乎挥发完毕后基本不再改变.因此, III 状态主要是键合水和键合蛋白质的混合态.

可以想象, t_f 以后主要为键合蛋白质态,蛋白质分子之间的三维化学交联结构已经形成,鸡蛋清脱水变性基本完成.此时 f_c 和 Q_c^{-1} 随 t 的微小变化是材料中极少量水的挥发和结构微调引起的.

上述分析表明,在鸡蛋清脱水变性过程中,蛋白质的构型转变即变性,主要发生在拥有键合水的蛋白质,通过失水向键合蛋白质转变的混合态.

总之,本文的 RMS-L 测量与分析表明,随水含量的减少,鸡蛋清可能依次存在下述 4 个状态: 1) 类体水的蛋白质水凝胶态; 2) 键合水的蛋白质水凝胶态; 3) 键合水和键合蛋白质的混合态; 4) 键合蛋白质态.而蛋白质的空间构型 (spatial configuration) 转变即变性,主要发生在拥有键合水的蛋白质通过失水向键合蛋白质转变的混合态.这表明 RMS-L 对鸡蛋清脱水变性过程的检测是有效的,所得结果对蛋白质水凝胶态、蛋白质变性机理的进一步研究,也应具有参考价值.

- [1] Li L X, Chi Y J, Yu B 2008 *Food Science* **29** 46 (in Chinese) [李俐鑫, 迟玉杰, 于滨 2008 食品科学 **29** 46]
 [2] Xu G H 2010 *Bulletin of Biology* **45** 23 (in Chinese) [徐国恒 2010 生物学通报 **45** 23]
 [3] Chen L J, Cao X J 2006 *China Biotechnology* **27** 75 (in Chinese) [陈霖杰, 曹学君 2006 中国生物工程杂志 **27** 75]
 [4] Huang H 2002 *Food and Machinery* **88** 6 (in Chinese) [黄海 2002 食

品与机械 **88** 6]

- [5] Lin A H, Sun X M, Li B H 2002 *Journal of South-Central University for Nationalities (Nat. Sci. Edition)* **21** 21 (in Chinese) [林爱华, 孙小梅, 李步海 2002 中南民族大学学报 (自然科学版) **21** 21]
 [6] Sa C E F, Luo L F 2002 *Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition)* **31** 2630 (in Chinese) [萨楚尔夫, 罗辽复 2003 内蒙古师范大学学报 (自然科学 (汉文) 版) **31** 2630]

- [7] Lu Y, Li X R 2005 *Progress in Chemistry* **17** 905 (in Chinese) [卢雁, 李向荣 2005 化学进展 **17** 905]
- [8] Liu L, Yang C, Guo Q X 2000 *Chinese Science Bulletin* **45** 918 (in Chinese) [刘磊, 杨超, 郭庆祥 2000 科学通报 **45** 918]
- [9] Liu Z J, Hua Z Z 2000 *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics* **21** 263 (in Chinese) [刘占杰, 华泽钊 2000 中国生化药物杂志 **21** 263]
- [10] He Y, Yao K, Jia T Y, He Q 2007 *Amino Acids & Biotic Resources* **29** 36 (in Chinese) [何芸, 姚开, 贾冬英, 何强 2007 氨基酸和生物资源 **29** 36]
- [11] Guo Y Y, Kong B H 2011 *Food Science* **32** 335 (in Chinese) [郭园园, 孔保华 2011 食品科学 **32** 335]
- [12] Pan J F, Shen H X, Song Y L, You J, Luo Y K 2009 *Meat Research* **124** 9 (in Chinese) [潘锦锋, 沈慧星, 宋永令, 尤娟, 罗永康 2009 肉类研究 **124** 9]
- [13] Tao Z W, Zheng D, Di M L, Shan X J 2010 *Drug Evaluation Research* **33** 148 (in Chinese) [陶遵威, 郑夺, 邸明磊, 单晓菊 2010 药物评价研究 **33** 148]
- [14] Zhang Y L, Xia W S 2007 *Chinese Agricultural Science Bulletin* **23** 116 (in Chinese) [章银良, 夏文水 2007 中国农学通报 **23** 116]
- [15] Guan Z Q, Jiang X Q, Li M, Zhang Z H, Hong B Z 2005 *Journal of Fisheries of China* **29** 837 (in Chinese) [关志强, 蒋小强, 李敏, 章超桦, 洪鹏志 2005 水产学报 **29** 837]
- [16] Ma H J, Wang X, Zhou G H, Xu X L 2004 *Science and Technology of Food Industry* **25** 63 (in Chinese) [马汉军, 王霞, 周光宏, 徐幸莲 2004 食品工业科技 **25** 63]
- [17] Chen H B, Chen T W, Chen S J, Peng B, Wang M Y 2009 *Chinese Agricultural Science Bulletin* **25** 447 (in Chinese) [陈慧斌, 陈团伟, 陈绍军, 彭彪, 王梅英 2009 中国农学通报 **25** 447]
- [18] Sun D P, Yang J Z 2010 *The bacterial cellulose functionality materials and their industrial applications* (Beijing: Science Press) p35–43 (in Chinese) [孙东平, 杨加志 2010 细菌纤维素功能材料及其工业应用 (北京: 科学出版社) 第 35–43 页]
- [19] Yang H H, Li P J, Kong B H, Liu Q, Li J 2012 *Science and Technology of Food Industry* **33** 400 (in Chinese) [杨赫鸿, 李沛军, 孔保华, 刘菁, 李菁 2012 食品工业科技 **33** 400]
- [20] Yi W, Hu Y Q 2004 *Chin. Pharm J.* **39** 401 (in Chinese) [易薇, 胡一桥 2004 中国药学杂志 **39** 401]
- [21] Lu Y, Zhang W W, Wang G K 2008 *Spectroscopy and Spectral Analysis* **28** 88 (in Chinese) [卢雁, 张玮玮, 王公轲 2008 光谱学与光谱分析 **28** 88]
- [22] Guo X N, Yao H W 2011 *Spectroscopy and Spectral Analysis* **31** 1611 (in China) [郭晓娜, 姚惠源 2011 光谱学与光谱分析 **31** 1611]
- [23] del Pino M M S, Fersht A R 1997 *Biochemistry* **36** 5560
- [24] Fang S Q, Lu M, Chen K W, Xu H Y, Geng J P, Wang H L, Liu G R, Liang C Z 2006 *Modern Food Science and Technology* **22** 219 (in Chinese) [方绍庆, 卢闽, 陈克卫, 许红岩, 耿金培, 王洪来, 刘桂荣, 梁成珠 2006 现代食品科技 **22** 219]
- [25] Chen G L, Li R, Li H R 1997 *Chemical Journal of Chinese Universities* **18** 701 (in Chinese) [陈国亮, 李蓉, 李华儒 1997 高等学校化学学报 **18** 701]
- [26] Ying X N, Yuan Y H, Zhang L, Huang Y N, Wang Y N, Wang X L, Zhou D S, Xue G 2006 *Rev. Sci. Instrum.* **77** 053902
- [27] Wu W H, Zhang J L, Zhou H W, Guo X Z, Huang Y N 2008 *Appl. Phys. Lett.* **92** 011918
- [28] Zhang J L, Zhang L L, Wu W H, Zhou H W, Guo X Z, Huang Y N 2008 *Appl. Phys. Lett.* **92** 131906
- [29] Huang Y N, Zhang J L, Ying X N 2006 *Prog. Phys.* **26** 359 (in Chinese) [黄以能, 张晋鲁, 应学农 2006 物理学进展 **26** 359]
- [30] Zhou H W, Zhang J L, Huang Y N, Ying X N, Zhang L, Wu W H, Shen Y F 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 6547 (in Chinese) [周恒为, 张晋鲁, 黄以能, 应学农, 张亮, 吴文惠, 沈异凡 2007 物理学报 **56** 6547]
- [31] Guo X Z, Zhou H W, Zhang J L, Wu W H, Zhang J L, Huang Y N 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 417 (in Chinese) [郭秀珍, 周恒为, 张丽丽, 吴文惠, 张晋鲁, 黄以能 2010 物理学报 **59** 417]
- [32] Zhou H W, Wang L N, Guo X Z, Wu N N, Zhang L, Zhang J L, Huang Y N 2010 *Acta Phys. Sin.* **59** 2120 (in Chinese) [周恒为, 王丽娜, 郭秀珍, 吴娜娜, 张丽, 张晋鲁, 黄以能 2010 物理学报 **59** 2120]
- [33] Nowick A S, Berry B S 1972 *Anelastic Relaxation in Crystalline Solid* (New York: Academic) p115–129
- [34] Huang Y N, Wang Y N 1992 *Phys. Rev. B* **46** 3290
- [35] Huang Y N, Wang Y N, Zhao Z X 1994 *Phys. Rev. B* **49** 1320
- [36] Huang Y N, Li X, Ding Y 1997 *Phys. Rev. B* **55** 16159
- [37] Huang Y N, Wang C J, Riande E 2001 *J. Chem. Phys.* **22** 144502

Application of reed-vibration mechanical spectroscopy of liquids for studying dehydration denaturation of protein hydrogel*

Zhou Heng-Wei¹⁾²⁾ Liu Jun²⁾ Lei Ting²⁾ Huang Yi-Neng^{1)2)†}

1) (*National Laboratory of Solid State Microstructures, School of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China*)

2) (*Xinjiang Laboratory of Phase Transition and Microstructure in Condensed Matters, College of Physical Science and Technology, Yili Normal University, Yining 835000, China*)

(Received 23 October 2012; revised manuscript received 28 November 2012)

Abstract

Protein denaturation is not only one of the basic problems in biophysics and biochemistry, but also a practical one in applications. It is undoubtedly useful to explore new methods for detecting protein denaturation because they will surely provide some new information from new angles of view. For the first time, so far as we know we apply the reed-vibration mechanical spectroscopy for liquids (RMS-L) to measure the dehydration and denaturation process of egg white, one of typical protein hydrogels, in this work. The results show that there exist at least 4 remarkable processes of mechanical spectra with the reduction of water content. Based on the experiments and the analyses according to the relevant mechanical spectrum theories, the authors inferred that, with the water content reduction egg white may undergo the following 4 states successively: 1) bulk-like water protein hydrogel state; 2) bond water protein hydrogel state; 3) bond water and bonding protein mixed state; 4) bonding protein state. And the spatial configuration change of protein, namely degeneration, happens mainly in the mixed state in which the protein with bond water transforms to binding protein by losing the water. This means that the detection of dehydration and denaturation of egg white by RMS-L is effective, and we think the conclusions would also be reference materials for the deep studies of protein denaturation mechanisms and protein hydrogel states.

Keywords: mechanical spectrum, protein hydrogel, protein denaturation

PACS: 62.40.+i, 82.70.Gg, 87.15.kr, 87.14.E–

DOI: 10.7498/aps.62.076203

* Project supported by the Ke-Ji-Zhi-Jiang Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (Grant No. 201091112), the National Basic Research Program of China (973 Program), (Grant No. 2012CB821500), and the Natural Science Foundations of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (Grant Nos. 2009211B16, 2010211B16).

† Corresponding author. E-mail: