

# 界面蛋白质分子结构与动力学的和频振动光谱研究

魏 锋<sup>2</sup>, 谈军军<sup>1</sup>, 张佳慧<sup>1</sup>, 李传召<sup>1</sup>, 汪文婷<sup>1</sup>, 罗 毅<sup>1</sup>, 叶树集<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家研究中心, 合肥, 安徽, 230026

<sup>2</sup> 江汉大学交叉学科研究院, 光电化学材料与器件教育部重点实验室, 武汉, 湖北, 430056

**摘要:** 蛋白质与界面相互作用是自然界中一种非常普遍但又十分复杂的现象, 其在物理、生物技术、化学工程、药物、环境科学等诸多领域中发挥着极其重要的作用。生物膜界面蛋白质的错误折叠引起的功能障碍与许多疾病的发生和发展直接相关。原位、实时、精确地表征界面蛋白质分子构象变化与动力学行为是揭示界面蛋白质功能的核心, 对阐明与蛋白质聚集相关的神经退行性疾病的发生和发展机理非常重要。但目前对其结构与动力学的了解相当匮乏, 蛋白质折叠仍是分子生物学中心法则中至今尚未解决的一个重大生物学问题。这主要是因为其表征技术不仅要求具有足够高的结构分辨率和时间分辨率, 还需满足时间、空间、活体、非介入性等要求, 但同时满足这些要求的技术甚少。而和频振动光谱是一种可以在分子层次上探测界面蛋白质分子结构与动力学的表征方法。本文详细介绍了和频振动光谱技术在界面蛋白质结构与动力学表征方面的应用。通过原位实时探测不同蛋白质骨架振动的酰胺 I, 酰胺 III 与酰胺 A 谱带, 可以实现界面蛋白质分子结构、构象变化与动力学特征的精确测量, 进而揭示蛋白质-细胞膜相互作用、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质聚集的分子机理。本综述将为人们研究复杂界面体系物理与化学问题提供新的思路。

**关键词:** 界面蛋白质; 和频振动光谱; 酰胺谱带; 构象; 结构与动力学

中图分类号: O412 文献标识码: A

DOI: 10.13725/j.cnki.pip.2018.03.002

## 目 录

I. 引言	132
A. 界面蛋白质分子的重要性	132
B. 界面蛋白质分子结构与动力学研究难点及常规技术	133
II. 界面蛋白质结构与动力学表征有效技术: 和频振动光谱	134
A. 和频振动光谱简介	134
B. 和频振动光谱研究界面蛋白质二级结构的分析方法	135
III. 和频振动光谱在研究界面蛋白质稳态结构中的应用	136
A. $\alpha$ -螺旋结构	136
B. $3_{10}$ 螺旋结构	137
C. $\beta$ -折叠结构	138
D. 无规则卷曲结构	138
IV. 和频振动光谱在研究界面蛋白质动力学中的应用	139
A. 无规则卷曲 $\Rightarrow$ $\alpha$ -螺旋转变	139
B. 无规则卷曲 $\Rightarrow$ $\alpha$ -螺旋 $\Rightarrow$ $\beta$ -折叠转变	140
C. 离子通道动力学过程	141
D. 界面蛋白质酰胺键振动能量转移	142
V. 结论与展望	143

## 致 谢

143

## 参考文献

143

## I. 引言

### A. 界面蛋白质分子的重要性

蛋白质是自然界以及生命体内广泛存在的组分。蛋白质与界面的相互作用是自然界中一种非常普遍但又十分复杂的现象, 其在物理、生物技术、化学工程、药物、环境科学等诸多领域中发挥着极其重要的作用。特别是, 蛋白质是维系细胞结构完整性不可或缺的成分, 是生命体执行细胞膜上选择性物质传递和信号传导等特定生理功能的分子机器。而生理功能的实现主要依赖于细胞膜上内源性蛋白质分子结构与构象的变化, 例如, 离子通道蛋白质通过改变  $\alpha$ -螺旋片段与  $3_{10}$  螺旋片段的倾斜角与夹角来实现通道的打开与关闭<sup>[1]</sup>; 细胞膜上 GPRB 蛋白通过改变细胞膜内 G 蛋白亚基构象和释放信号分子来实现自身的激活<sup>[2-3]</sup>。

Received date: 2018-02-07  
\*E-mail: shujiye@ustc.edu.cn

简称列表

核磁共振	nuclear magnetic resonance: NMR
X 射线衍射	X-ray diffraction: XRD
X 射线光电子能谱	X-ray photo-electron spectroscopy: XPS
二级离子质谱	secondary ion massspectrometry: SIMS
扫描电子显微镜	scanning electron microscopy: SEM
扫描隧道显微镜	scanning tunneling microscopy: STM
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)
DMEPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphospho- choline (chloride salt)
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

另一方面, 生物膜界面蛋白质保持正常的结构与功能是维持生命过程的基础。它的错误折叠引起的功能障碍与老年性痴呆症、帕金森、糖尿病、疯牛病等许多疾病的发生和发展直接相关<sup>[4-6]</sup>。同时, 外源性蛋白质入侵细胞膜, 可以破坏细胞膜对外界环境的隔离, 导致细胞的病变, 比如蜂毒素的入侵可诱导细胞膜破裂, 离子外流, 细胞凋亡等一系列反应<sup>[7-8]</sup>。此外, 现代医学中, 很多用于免疫测试和可控药物运输的医疗器械与生物传感器也离不开界面蛋白质的参与和调控<sup>[9-13]</sup>。原位实时精确地表征界面蛋白质分子构象变化及其动力学行为是揭示界面蛋白质功能的核心, 在阐明神经退化型疾病的病理机制、调控细胞功能、开发新型生物相容性功能器件以及筛选药物分子中发挥非常重要的作用。

## B. 界面蛋白质分子结构与动力学研究难点及常规技术

蛋白质分子是一个非常复杂的体系。蛋白质是以氨基酸为基本单元构成的生物高分子, 氨基酸的排列顺序及由此而形成的立体构象造就了蛋白质结构的复杂性(图 1), 进而造就了其功能的多样性。此外, 细胞膜是一个具有一定流动性的复杂体系, 其主要组成部分为厚度仅有几个纳米的磷脂双分子层。细胞膜上的界面蛋白质体系尤为复杂<sup>[14]</sup>。研究这一复杂体系不仅要求表征技术具有足够高的结构分辨率和时间分辨率, 还需同时满足时间、空间、活体、非介入性等要求。

近年来, 核磁共振 (Nuclear magnetic resonance: NMR)<sup>[15]</sup>、X-射线晶体衍射<sup>[16]</sup>、X-光电子能谱 (X-ray photo-electron spectroscopy: XPS)<sup>[17]</sup>、二级离子质谱 (Secondary ion mass spectrometry: SIMS)<sup>[18]</sup>、扫描电子显微镜 (Scanning electron microscopy: SEM)<sup>[19,20]</sup>、表面等离子体共振 (Surface plasmon resonance: SPR)<sup>[21]</sup>、原子力显微镜 (Atomic force microscopy: AFM)<sup>[22]</sup>、荧光探测、衰减全反射傅利叶红外光谱、圆二色谱、电子自旋共振、中子散射、椭圆光度法等许多技术手段已经应用于蛋白质结构的研究<sup>[23-27]</sup>。利用这些技术, 可以从分子水平上测出蛋白质与界面相互作用的信息, 例如, 表面等离子体共振仪可有效测出界面上蛋白质或多肽的覆盖率<sup>[28-30]</sup>。但是这些技术存在以下局限性: 需要在真空环境下操作、灵敏度不够高、无法获得界面环境中的蛋白质(多肽)分子的结构和动力学。此外, 这些技术存在着诸多的限制与不足, 难以捕获真实的信息。比如, X-射线晶体衍射只适用于处于结晶状态的蛋白质(多肽), 而结晶过程很可能导致蛋白质(多肽)的变性。核磁共振虽然广泛用于研究界面蛋白质(多肽), 但是它的灵敏度很低, 实验中样品用量很大, 难以获得蛋白质(多肽)分子的绝对取向角度。此外, 微胞尺寸对液体核磁共振结果有较大影响, 固体核磁共振也常常受到样品的限制: 样品中可能含有多层磷脂双层膜, 然而生物体系中的细胞膜主要由一层磷脂双层膜组成; 另外固体核磁共振实验中很难制备出内层和外层组成不同的磷脂双层膜样品<sup>[31]</sup>。特别是, 这些生物学常规技术很难同时满足高结构分辨率和高时间分辨率, 以及时间、空间、活体、非介入性等要求。因此, 如何在超快时间尺度上研究界面蛋白质分子结构与动力学依然是现代生物科学中的一个挑战, 同时也是生物、物理与化学交叉学科中非常重要的前沿科学问题。

最近发展的具有界面选择性的和频振动光谱 (sum frequency generation vibrational spectroscopy: SFG-VS) 技术则是可以同时满足这些要求的为数不多的技术之一<sup>[32-41]</sup>。由于它独特的表、界面选择性和单分子层灵敏度, 和频振动光谱目前已经广泛应用于各种界面环境下的蛋白质分子结构与动力学表征<sup>[42-58]</sup>。例如, 实时原位表征界面上 IAPP、Prion 等淀粉状蛋白质的结构, 解释其结构转变的具体过程与形成聚集体的机理<sup>[59-61]</sup>; 探测抗菌肽分子入侵细胞膜过程, 从分子水平上揭示其与细胞膜相互作用的机理<sup>[62-65]</sup>; 监控生物膜上离子通道蛋白质模型丙甲甘肽在 pH 驱动下的通道开关过程, 阐明通道开关机

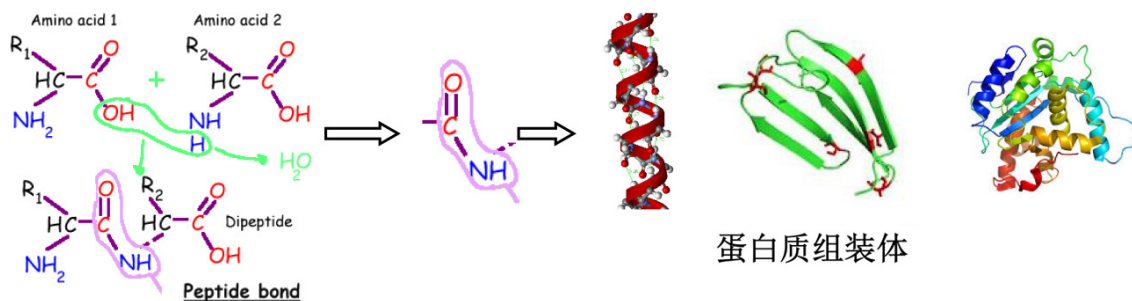


图 1. 蛋白质组装体示意图

理<sup>[1]</sup>。表 I 列出了一些利用和频振动光谱技术来研究界面蛋白质分子与界面多肽分子的综述。本综述将主要介绍和频振动光谱研究界面蛋白质分子结构与动力学的方法、发展历史、及其应用。

## II. 界面蛋白质结构与动力学表征有效技术: 和频振动光谱

### A. 和频振动光谱简介

和频振动光谱是三十年前发展起来的一种二阶非线性光学技术<sup>[66]</sup>。其基本原理是两束光，一束红外光，一束可见光或紫外光，在时间和空间上同时作用于表面或者界面上，然后产生第三束光，叫和频光，如图 2 所示。它通过红外光对分子振动能级的激发与可见光对电子能级的激发产生一个三光子相干跃迁过程。该过程实质上可看作是一个红外振动激发和一个反斯托克斯拉曼散射的组合过程，因此该技术要求被测分子同时具有红外活性和拉曼活性。理论上，和频光谱的强度与界面分子二阶极化率 ( $\chi_{\text{eff}}^{(2)}$ ) 的平方、两束入射光的强度  $I_1(\omega_{\text{vis}})$ 、 $I_2(\omega_{\text{IR}})$  成正比<sup>[32-41]</sup>:

$$I(\omega_{\text{SFG}}) = \frac{8\pi^3 \omega_{\text{SFG}}^2 \sec^2 \beta}{c^3 n_1(\omega_{\text{SFG}}) n_1(\omega_{\text{vis}}) n_1(\omega_{\text{IR}})} |\chi_{\text{eff}}^{(2)}|^2 I_1(\omega_{\text{vis}}) I_2(\omega_{\text{IR}}) \quad (1)$$

其中  $\omega_{\text{SFG}}$ ,  $\omega_{\text{IR}}$  与  $\omega_{\text{vis}}$  分别是和频光频率, 红外光频率与可见光频率, 并满足  $\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{IR}} + \omega_{\text{vis}}$ ,  $c$  是光速;  $n_i(\omega_j)$  是频率为  $\omega_j$  的光在介质  $i$  内传播的折射率;  $\beta$  是 SFG 的出射角;  $\chi_{\text{eff}}^{(2)}$  是含菲涅尔系数的有效非线性极化率。当红外光频率范围内有对应的分子振动能级时, 和频光谱信号得到增强。 $\chi_{\text{eff}}^{(2)}$  随红外光频率的变化可以表示为:

$$\chi_{\text{eff}}^{(2)}(\omega_{\text{SFG}}) = \chi_{\text{NR}}^{(2)} + \sum_{\nu} \frac{A_{\nu} \cdot e^{i\varphi_{\nu}}}{\omega_{\text{IR}} - \omega_{\nu} + i\Gamma_{\nu}} \quad (2)$$

其中  $A_{\nu}$ ,  $\omega_{\nu}$ , 和  $\Gamma_{\nu}$  分别对应每一个振动模式 ( $\nu$ ) 的振动峰强度, 振动峰频率与振动峰峰宽,  $e^{i\varphi_{\nu}}$  为振动模式的相位因子, 并将不同振动模式对和频光谱信号的贡献进行加和。

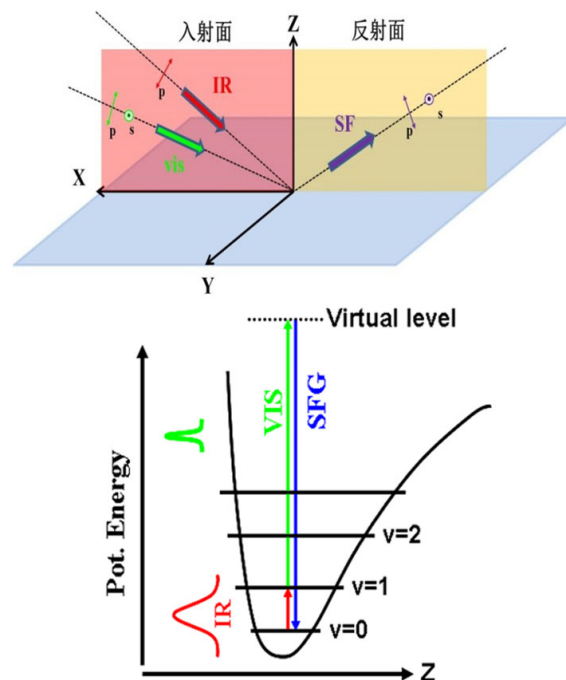


图 2. 和频光谱原理和光路示意图

根据二阶非线性光学过程的对称性选择定则, 在电偶极近似下, 具有中心对称性的分子或介质中的二阶极化率始终为零, 不能产生和频信号。因而, 和频光谱具有非常高的表界面选择性和灵敏性。利用和频光谱技术, 我们不仅可以表面或界面的分子振动光谱信号和体相信号区分开, 还可以测出表面或界面上的分子与功能团的取向<sup>[32-41]</sup>。总的来说, 和频振动光谱可以提供以下几方面的信息: 1) 界面上存在的分子基团; 2) 界面分子排列的有序程度; 3) 界面分子的结构变化; 4) 界面官能团取向; 5) 分子手性结构; 6) 界面分子吸附动力学; 7) 界面氢键网络强

表 I. 一些界面蛋白质的和频振动光谱研究综述<sup>[43]</sup>

年份	标题	界面	信号	文献
2016	Engineering and characterization of peptides and proteins at surfaces and interfaces: a case study in surface-sensitive vibrational spectroscopy	Solid/liquid, Air/liquid	酰胺 I, C=O	[42]
2014	Advanced experimental methods toward understanding biophysicochemical interactions of interfacial biomolecules by using sum frequency generation vibrational spectroscopy	Solid/liquid, Air/liquid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I, N-H	[43]
2014	Biological macromolecules at interfaces probed by chiral sum frequency generation spectroscopy	Air/liquid, Solid/liquid	酰胺 I, 酰胺 II, 酰胺 III, N-H	[44]
2014	Biomolecular structure at solid-liquid interfaces as revealed by nonlinear optical spectroscopy	Solid/liquid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I, N-H	[45]
2014	Sum frequency generation vibrational spectroscopy: a sensitive technique for the study of biological molecules at interfaces	Solid/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I, N-H	[46]
2013	Elucidation of molecular structures at buried polymer interfaces and biological interfaces using sum frequency generation vibrational spectroscopy	Air/liquid, air/solid, solid/liquid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , OCH <sub>3</sub> , 酰胺 I	[47]
2013	Structure and orientation of interfacial proteins determined by sum frequency generation vibrational spectroscopy: method and application	Solid/liquid, air/liquid	酰胺 I	[48]
2013	Characterization of crystalline cellulose in biomass: basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG	Air/solid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , OD, 酰胺 I	[49]
2013	Nano-bio interfaces probed by advanced optical spectroscopy: from model system studies to optical biosensors	Solid/liquid, Air/solid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I	[50]
2012	Molecular interactions of proteins and peptides at interfaces studied by sum frequency generation vibrational spectroscopy	Solid/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , CD <sub>2</sub> , CD <sub>3</sub> , 酰胺 I	[51]
2012	Molecular structures of buried polymer interfaces and biological interfaces detected by sum frequency generation vibrational spectroscopy.	Solid/liquid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , SiCH <sub>3</sub> , 酰胺 I	[52]
2011	Chiral vibrational structures of proteins at interfaces probed by sum frequency generation spectroscopy	Air/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I, N-H	[53]
2011	Nonlinear spectroscopy of bio-interface	Air/solid, metal surface	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , OSO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , 指纹区	[54]
2009	<i>In situ</i> molecular level studies on membrane related peptides and proteins in real time using sum frequency generation vibrational spectroscopy	Solid/liquid, air/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , CD <sub>2</sub> , CD <sub>3</sub> , 酰胺 I	[55]
2009	Sum frequency generation studies on bioadhesion: elucidating the molecular structure of proteins at interfaces	Solid/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I	[56]
2006	SFG studies on interactions between antimicrobial peptides and supported lipid bilayers	Solid/liquid	OH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , CD <sub>2</sub> , CD <sub>3</sub> , 酰胺 I	[57]
2005	Sum frequency generation vibrational spectroscopy studies on molecular conformation and orientation of biological molecules at interfaces	Solid/liquid, air/liquid	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , 酰胺 I, 酰胺 A	[58]

弱与重构; 8) 界面超快能量转移过程。目前, 该技术在界面分子结构与动力学的研究中发挥了极其重要作用。研究的界面包括固/固, 固/液, 固/气, 液/液等体系; 研究对象十分广泛, 从水分子, 聚合物, 蛋白质, 甚至到 DNA 都有涉及。

## B. 和频振动光谱研究界面蛋白质二级结构的分析方法

自从 1987 年被发展以来, 和频振动光谱已经广泛应用于各种界面环境下的蛋白质分子结构与动力学表征 (综述文献见表 I)。通过测量蛋白质分子上的不

同基团与不同二级结构的谱学特征, 和频光谱可以提供用于阐明界面蛋白质分子的作用机理和病变机制等科学问题的有力证据。早期的研究主要集中在 CH 伸缩振动波段 (2800-3200 cm<sup>-1</sup>)。例如 Cremer 等人利用 gramicidin A 分子吸附于 *d*-DMPC 单层膜上后产生的 CH 伸缩振动光谱, 来表征 gramicidin A 分子的侧链结构<sup>[67]</sup>。但是从 CH 伸缩振动光谱内获取蛋白质侧链结构的同时, 也会受到生物膜中的碳链结构和界面吸附的其他碳基分子基团的干扰, 因此该方法较难用于定量分析。另一方面, 蛋白质是由一个一个氨基酸通过脱水缩合反应形成酰胺键, 通过酰胺键把各个氨基酸连接成蛋白质的一级结构, 酰胺键之间再通过形



成不同的氢键结构进而产生蛋白质的二级、三级和更高级的结构(图1)。一般而言,不同蛋白质二级结构具有不同的对称性和不同的氢键结构,从而产生具有不同频率的酰胺键骨架振动,如表II所示。表II列出了不同蛋白质二级结构的对称性、振动模式、已报道的和频光谱振动峰位置以及手性结构等信息。表II显示所有酰胺谱带都是结构敏感的,而且酰胺谱带受蛋白质的二级结构的影响较大而受侧链结构的影响较小。因而,如果我们要表征界面蛋白质的结构,需重点观察蛋白质酰胺键的振动。事实上,基于蛋白质酰胺键骨架振动的酰胺特征谱带与二级结构的关联性已经得到大量红外光谱和拉曼光谱数据的支持[68-69]。酰胺键骨架振动主要存在于三个能量区域:处于功能团振动区域( $\geq 1600\text{ cm}^{-1}$ )的酰胺I谱带,处于指纹区( $< 1600\text{ cm}^{-1}$ )的酰胺II和酰胺III谱带[70](图3)。酰胺I谱带主要来自于C=O伸缩振动和少量的C-N面外伸缩振动;酰胺II谱带主要来自于C-N伸缩振动和N-H面外弯曲振动;酰胺III谱带则主要来自于C-N伸缩振动和N-H面内弯曲振动[68-70]。酰胺II和酰胺III信号本身就很弱,到了界面则变得更加微弱,常规方法很难测出来。目前国内外学者主要是通过测量酰胺I信号来表征界面蛋白质结构。

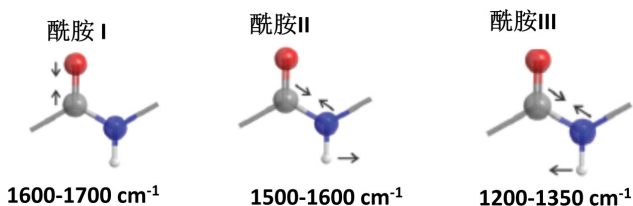


图3. 蛋白质酰胺键振动模式示意图

Chen 等人在 2005 年首次测出界面蛋白质/多肽分子的酰胺 I 谱带和频光谱信号。利用近全反射的实验构型,他们获得很强的界面蛋白质的酰胺 I 信号[71,72]。从那以后,很多小组开始运用和频振动光谱来表征界面蛋白质的排列和取向结构。但是酰胺 I 信号存在两个弱点:一是振动峰位置与水分子弯曲振动位置重叠;二是各个二级结构所对应的酰胺 I 谱带集中在  $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ , 因此具有不同分子结构的振动峰有可能重叠在一起,例如, $\alpha$ -螺旋与无规卷曲结构的振动峰均位于  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ 。要把这样复杂的结构区分开来,需要发展新的研究理念和方法。最近本小组成功解决了测量酰胺 II 和酰胺 III 弱信号这一技术难关。通过酰胺 I 和酰胺 III 信号的同时观测,成功解决了区分界面蛋白质  $\alpha$ -螺旋与无规卷曲结构这一界面表征难题[73]。

### III. 和频振动光谱在研究界面蛋白质稳态结构中的应用

根据酰胺键骨架的氢键结构不同,蛋白质二级结构可分为无规卷曲、 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转折结构等。目前和频振动光谱已经成功地应用于这些结构的测量和动态监控。

#### A. $\alpha$ -螺旋结构

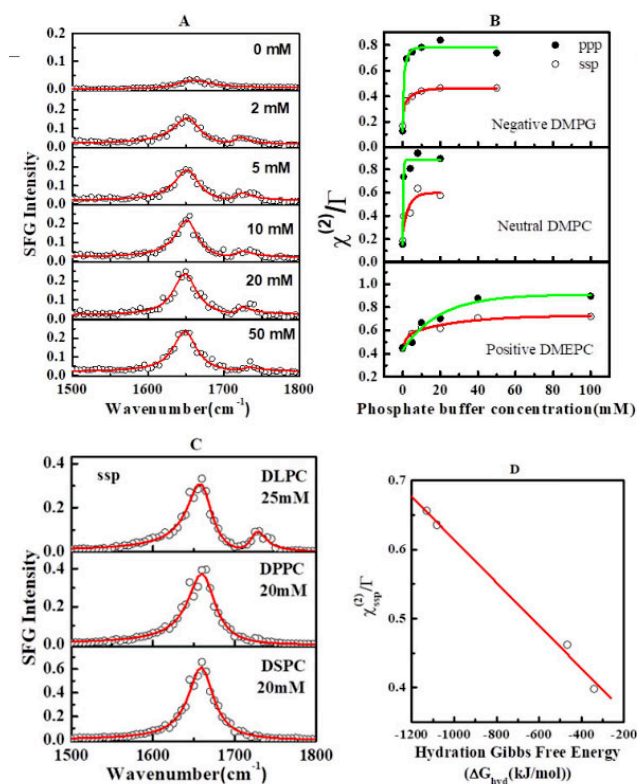


图4. A)DMPG 双层膜中 MP 分子的 ssp 偏振酰胺 I 光谱随磷酸盐缓冲溶液浓度的变化。B)负电荷 DMPG、中性 DMPC 与正电荷 DMEPC 双层膜中 MP 分子的和频光谱 ppp 和 ssp 偏振拟合强度随磷酸盐缓冲溶液浓度的变化。C) 磷酸盐缓冲溶液存在时 MP 分子与 DLPC, DPPC 和 DSPC 双层膜作用的 ssp 和频光谱图。D) 不同离子种类下和频光谱拟合强度与离子水合化吉布斯自由能的关联。图片摘自文献 80 和 81, 版权所有 American Chemical Society。

$\alpha$ -螺旋结构是蛋白质/多肽分子中最常见的二级结构。很多通道蛋白通过多个  $\alpha$ -螺旋来构建离子通道。大部分的抗菌肽在细胞膜上也是通过形成  $\alpha$ -螺旋结构来完成插入并破坏细胞膜的操作[58]。过去研究表明,和频振动光谱是一种能够在分子水平上进行生物膜上蛋白质与多肽结构及其动力学研究的有效手段。目前,已经被和频振动光谱研究过的具有  $\alpha$ -螺旋结构的物质包括:  $\text{LK}\alpha_{14}$ [75-78]、ovispirin-

表 II. 蛋白质不同二级结构的特征信息 [44, 45, 48, 74]

二级结构	重复序列	对称性	振动模式	峰位 ( $\text{cm}^{-1}$ )				手性
				酰胺 A	酰胺 I	酰胺 II	酰胺 III	
无规则卷曲			A	NS	$\sim 1655$	NR	1220~1250	No
$\alpha$ -螺旋	3.6	$C_{18/5}$	A, $E_1$	$\sim 3300$	$\sim 1655$	NR	$\sim 1300$	No
$3_{10}$ 螺旋	3	$C_{3v}$	A, $E_1$	$\sim 3350$	$\sim 1635$	NR	NR	No
反平行 $\beta$ 折叠	4	$D_2$	$B_1$	$\sim 3270$	$\sim 1685$	$\sim 1560$	NR	Yes
			$B_2$	$\sim 2410(\text{In})$	$\sim 1630$	$\sim 1470(\text{In})$		Yes
			$B_3$	$\text{D}_2\text{O})$	$\sim 1720$	$\text{D}_2\text{O})$		Yes
平行 $\beta$ 折叠	2	$C_2$	A B	NR	$\sim 1620$	NR	NR	Yes
					$\sim 1670$			Yes

NS: 无信号; NR: 未有报道。

1 [79]、mastoparan (MP) [80,81]、cecropin P1 (CP-1) [10,82–85]、pardaxin [73,86]、melittin [62,87] 等。这些物质的研究已被部分总结在最近发表的综述上 [42,51]。这里我们以蜂毒素 MP 分子为例, 通过对多肽分子  $\alpha$ -螺旋结构的取向分析, 介绍如何利用和频振动光谱研究不同离子浓度和 pH 值下蜂毒素在生物膜上的分子结构响应, 进而获得 MP 分子与不同细胞膜的作用机理。

盐离子的独特效应无处不在。地球上海水含量占全球总水量的 95% 以上, 海水中含有 3.5% 左右的无机盐。此外, 人体内水含量超过了体重的三分之二, 且体液中包含着大量无机盐离子, 浓度约为 0.15M。这些无机盐离子的存在会对蛋白质与界面相互作用产生显著影响, 直接关系到蛋白质在界面的吸附、稳定、折叠与凝聚途径。从分子水平上理解离子调控蛋白质与界面之间相互作用的机理是物理、化学与生物交叉学科中一个非常重要的前沿科学问题。针对这个问题, 我们利用和频振动光谱系统研究了盐离子如何影响蛋白质在不同电荷和不同亲疏水性质的固体支撑界面上的结构和动力学行为。我们在研究疏水长度为 2.1 nm 的 MP 与疏水长度为 2.3 nm 的带不同种电荷的磷脂分子双层膜的相互作用时发现, 磷酸盐离子不仅能加速 MP 插入到带负电荷的 DMPG 和中性 DMPC 磷脂双层膜的进程, 竟也能助其插入到带正电荷的 DMEPC 磷脂膜中 [81], 见图 4B。图 4A 中, MP 分子与纯水环境下 ( $C=0$  mM) 的 DMPG 双层膜作用时, 只观测到一个位于  $1665\text{ cm}^{-1}$  左右的较弱的宽峰, 说明 MP 在纯水环境的生物膜下只能形成无规则卷曲结构。随着磷酸盐缓冲溶液浓度的上升, MP 分子的光谱峰位移至  $1655\text{ cm}^{-1}$  左右, 且光谱强度随离子强度的增加而增大, 说明磷酸盐缓冲溶液的加入促进了 MP 分子  $\alpha$ -螺旋结构的形成, 并有效促进  $\alpha$ -螺旋结构多肽分子与细胞膜的相互作用。通常而言, MP 带正电荷, 带正电的 MP 与带正电

荷的 DMEPC 作用在能量上是不利的。为了理解该现象, 我们还研究了其他带正电荷的多肽分子 (MP-X, melittin 和  $\text{LK}\alpha_{14}$ ) 与正电荷 DMEPC 生物膜的相互作用。结果表明, 在磷酸盐离子溶液中, MP-X, melittin 和  $\text{LK}\alpha_{14}$  也能插入到带正电荷的 DMEPC 生物膜中 [81]。在此基础上, 我们还进一步研究了不同生物膜疏水长度, 盐离子种类以及无磷酸根基团的脂质分子膜对 MP 与生物膜相互作用的影响。结果表明, 在磷酸盐离子中, MP 不仅能插入到疏水长度较短的 DLPC (1.95 nm) 和 DMPC (2.3 nm) 双层膜中, 同时也能插入到疏水长度是 MP 两倍的 DPPC (3.6 nm) 和 DSPC (4.05 nm) 双层膜中 (图 4C) [80]。通过改变溶液的离子种类, 我们发现离子的水合化 Gibbs 自由能与插入到 DMPC 双层膜的 MP 分子数量成线性关系 (图 4D), 说明离子改变了体系的水合作用, 从而驱动 MP 插入到生物膜中。同时研究表明, MP 与生物膜上带正电荷的胆碱基团作用是 MP 插入到生物膜过程中重要的一步 [80]。

## B. $3_{10}$ 螺旋结构

$3_{10}$  螺旋虽然在自然界蛋白质中占比例较少, 在已知的蛋白质晶体结构中仅占有 10% 左右, 但其也是一种重要的蛋白质二级结构。 $3_{10}$  螺旋主要存在于临近  $\alpha$ -螺旋结构的位置。包含  $\alpha$ -氨基异丁酸的多肽片段较易形成  $3_{10}$  螺旋, 例如丙甲甘肽 (Alamethicin) [11]。丙甲甘肽是一个含有 20 个氨基酸的多肽分子, 晶体数据显示, 它可以同时形成  $3_{10}$  螺旋和  $\alpha$ -螺旋结构 [11]。丙甲甘肽由于其特殊结构被广泛用作电压门控离子通道的模型蛋白分子。本小组利用和频光谱研究了没有外加电场情况下丙甲甘肽分子在不同磷脂膜上的结构。如图 5 所示, 当丙甲甘肽分子与流动相细胞膜 (d-DMPC/DMPC 双层膜) 作用时, 光谱中有两个明显的特征峰, 峰的中心分别在  $1635\text{ cm}^{-1}$  和  $1670\text{ cm}^{-1}$ ,

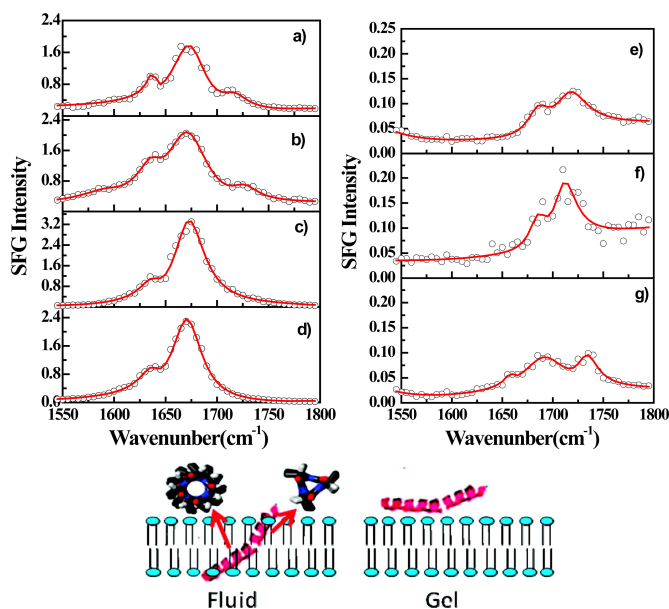


图 5. pH = 6.7 时丙甲甘肽分子在不同细胞膜 (a) POPC/POPC; (b) POPC/POPG; (c) *d*-DMPC/DMPC; (d) *d*-DMPC/*d*-DMPC; (e) *d*-DPPC/DPPC; (f) *d*-DPPG/DPPG; (g) *d*-DSPC/DSPC 上的 ppp 光谱以及丙甲甘肽在不同膜上的结构示意图。图片摘自文献 11, 版权所有 American Chemical Society。

这两个峰分别是  $3_{10}$  螺旋和  $\alpha$ -螺旋结构的特征峰。由于  $3_{10}$  螺旋的影响, 丙甲甘肽  $\alpha$ -螺旋的特征峰位置相比其他多肽  $\alpha$ -螺旋特征峰位置 ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ) 出现了蓝移。通过对  $3_{10}$  螺旋和  $\alpha$ -螺旋结构进行取向分析, 可以知道两种二级结构的取向角分别为  $43^\circ$  和  $63^\circ$ 。当丙甲甘肽分子与凝聚相细胞膜 (*d*-DPPC/DPPC 双层膜) 作用时, 只能躺在凝胶相磷脂双层膜表面并形成聚集态, 结果酰胺 I 振动峰位移到了  $1685\text{ cm}^{-1}$  (其中位于  $1720\text{ cm}^{-1}$  的振动峰来自磷脂分子的 C=O 基团) [11]。此外, 密歇根大学陈战教授小组还研究了盐溶液浓度与磷脂双层膜相转变过程对丙甲甘肽分子结构与构象的影响 [88,89]。

### C. $\beta$ -折叠结构

$\beta$ -折叠结构存在于蚕丝蛋白、蜘蛛网以及蛋白纤维中。和频振动光谱研究过的  $\beta$ -折叠物质包括 Prion [61]、LK $_{7\beta}$  [74,90]、IAPP [56,60,91–93], 详细的总结见最近的综述《Chemical Reviews》[44]。这里以朊蛋白 (Prion) 为例进行介绍。朊蛋白是海绵状脑病 (疯牛病) 的关键蛋白分子。前人的研究表明朊蛋白从  $\alpha$ -螺旋结构转变成  $\beta$ -折叠结构的二级结构转变, 是朊蛋白在神经细胞中发生聚集, 导致神经元坏死的主要原因。但是, 朊蛋白引起神经细胞死亡的机制还不清楚, 特

表 III. 不同浓度的 PrP 所对应的  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠结构在膜中的相对分子数目比例 [61]

二级结构	PrP118-135 浓度 (mg/mL)				
	0.01	0.02	0.03	0.05	0.10
$\alpha$ -螺旋 (%)	90.7	92.9	90.6	67.8	56.1
$\beta$ -折叠 (%)	9.3	7.1	9.4	32.2	43.9

别是低浓度下朊蛋白发生的构象变化与聚集机制需要进一步研究。我们用朊蛋白的片段 PrP118-135 作为模型分子 [61], 利用和频光谱原位实时研究了 PrP118-135 与负电荷磷脂 POPG 双层膜的相互作用。如图 6 所示, 随着 PrP118-135 分子浓度的逐渐上升, ssp 光谱和 ppp 光谱中  $1655\text{ cm}^{-1}$  处  $\alpha$ -螺旋结构的特征峰强度并没有单调上升, 而 psp 光谱中  $1620\text{ cm}^{-1}$  处  $\beta$ -折叠结构的特征峰强度却逐渐上升。通过分析不同多肽浓度下的酰胺 I 谱带信号, 可以获得 PrP118-135 的结构转变过程和取向信息。我们发现在多肽浓度较低时, 90%以上的 PrP118-135 在 POPG 双层膜中采取  $\alpha$ -螺旋结构而 10%以下的分子是  $\beta$ -折叠结构。随着多肽浓度的增大,  $\beta$ -折叠结构所占的比例逐渐增大。在多肽浓度为  $0.10\text{ mg/mL}$  时,  $\beta$ -折叠结构的分子比例达到 44% (见表 III)。这表明 PrP 分子在低浓度 ( $< 0.10\text{ mg/mL}$ ) 下, 就可以形成致病的  $\beta$ -折叠结构。这些  $\beta$ -折叠结构的朊蛋白有可能成为低聚物的核心, 从而引发神经细胞的病变。该研究从分子水平上揭示了 PrP118-135 在细胞膜中的早期构象变化, 对于理解朊蛋白引发疾病及疾病初期的发展过程非常重要。

### D. 无规则卷曲结构

无规则卷曲结构是蛋白质实现其功能的重要部分。但是在酰胺 I 谱带中, 无规则卷曲的特征峰与  $\alpha$ -螺旋的特征峰几乎是重合的, 很难将这两种结构区分开, 这无疑给蛋白质结构的精确表征带来了很大困难。当把和频光谱的检测范围扩展到  $1150\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  区间时, 我们发现, 通过蛋白质结构的酰胺 III 波段可以准确分辨出无规则结构与  $\alpha$ -螺旋结构, 它们的振动峰分别位于  $1260\text{ cm}^{-1}$  以下和  $1260\text{ cm}^{-1}$  以上 [73]。从表 IV 中可以看出, MP-X、CP-1、Pardaxin 和 Melittin 四种多肽分别具有不同比例 of 无规则卷曲结构。但仅从这四种多肽的酰胺 I 谱带 ssp 光谱中并不能看出很大的差别 (如图 7B 所示), 而从这四种多肽酰胺 III 谱带的 ssp 光谱却可以看出明显的差别 (图 7C)。此外, 当无规则结构比例不同时, 无规则卷曲结构特征峰的峰强与峰位置也发生了改变。同时两种结构所对应的酰胺 III 谱带特征峰面积比与蛋白质中的无规卷



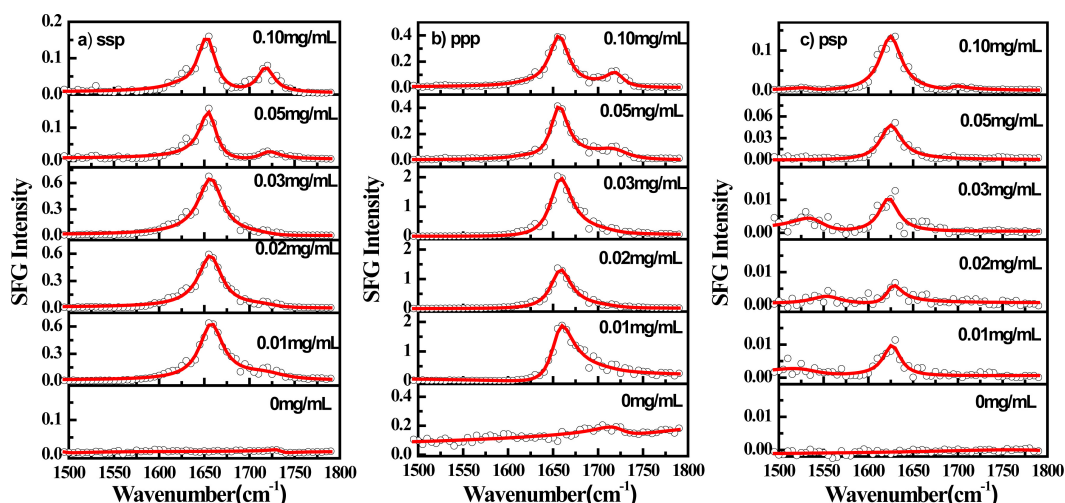


图 6. 不同浓度的 PrP118-135 分子在 POPG/POPG 双层膜中的酰胺 I 谱段和频光谱。(a) ssp 光谱; (b) ppp 光谱; (c) psp 光谱。红色的实线为拟合曲线。图片摘自文献 61, 版权所有 American Chemical Society。

表 IV.  $\alpha$ -螺旋比例与酰胺 III 谱带谱图拟合参数 [73]

多肽种类	$\alpha$ -螺旋比例 (NMR/CD)	酰胺 III 特征峰位置	
		Peak1 ( $\text{cm}^{-1}$ )	Peak2 ( $\text{cm}^{-1}$ )
MP-X	86%	1255	1296
Cecropin P1	68%–88%	1237	1297
Pardaxin	~63.6%	1228	1277
Melittin	~54%	1227	1283

曲结构含量存在一定的线性关系。这些结果表明, 将酰胺 I 波段和酰胺 III 波段的和频振动光谱信息进行结合, 可以非常有效地分辨出无规则卷曲与  $\alpha$ -螺旋这两种二级结构, 可用于这两种二级结构相对含量的估计。

#### IV. 和频振动光谱在研究界面蛋白质动力学中的应用

和频振动光谱不仅可用于测量界面蛋白质的稳态结构, 还可以用于监控蛋白质的动态转变、界面折叠过程和界面蛋白质能量转移等动态过程。

##### A. 无规则卷曲 $\Rightarrow$ $\alpha$ -螺旋转变

从无规卷曲到  $\alpha$ -螺旋结构的转变是膜蛋白折叠的第一步。之前因为缺乏有效区分这两种结构的界面技术, 实验上很难研究界面蛋白质的折叠过程, 因而对该过程在哪里发生、什么时候发生、怎样发生了解甚少。无规卷曲结构如何成核, 如何转变成  $\alpha$ -螺旋结构仍然是未解难题。通过研究生物膜电荷对多肽分

子 pardaxin 在生物膜上的折叠过程的影响, 我们证实酰胺 III 信号可以用作膜蛋白折叠过程的分子探针。

我们首先研究 pardaxin 分子在 *d*-DMPC 双层膜上的作用过程 [86]。从图 8A 中 pardaxin 分子酰胺 III 波段 ssp 光谱随时间的变化可以看到, 在  $1240 \text{ cm}^{-1}$  (peak1) 与  $1290 \text{ cm}^{-1}$  (peak2) 处出现两个特征峰, 说明 pardaxin 分子包含了两种不同的二级结构: 无规则卷曲结构与  $\alpha$ -螺旋结构。从图 8B 中随时间变化的峰强和峰强比例变化趋势可以看出, 虽然 pardaxin 分子在 *d*-DMPC 双层膜上的吸附量随时间逐渐上升, 但是 pardaxin 分子两种结构之间的比例并没有发生非常大的改变。这表明在我们观测的时间范围内, 主要发生的是 pardaxin 分子在 *d*-DMPC 双层膜上的吸附/插入过程, 而并没有发生明显的结构转变。

随后, 我们原位实时地检测 pardaxin 分子在 *d*-DMPC 双层膜上的作用过程。图 9A 显示 ssp 光谱在作用初期出现了  $1230 \text{ cm}^{-1}$  (peak1) 与  $1280 \text{ cm}^{-1}$  (peak2) 两个特征峰。随时间的推移, 无规则卷曲结构所对应的特征峰强逐渐减弱。两个峰的位置也逐渐迁移至  $1240 \text{ cm}^{-1}$  (peak1) 与  $1290 \text{ cm}^{-1}$  (peak2)。从图 9C 中两个峰的峰强比例变化趋势可以看出, pardaxin 分子的无规则卷曲结构的比例随时间的延长而逐渐下降。这说明在实验观测的时间范围内, 吸附在 *d*-DMPC 双层膜上的 pardaxin 分子发生了一定的结构转变, 其中无规则卷曲结构比例逐渐减少,  $\alpha$ -螺旋结构比例逐渐增加。这些结果表明, 细胞膜上的负电荷可以促进 pardaxin 分子在细胞膜中的插入、组装和  $\alpha$ -螺旋结构的形成。这些认识有助于我们深层次理解界面蛋白质的折叠与组装机理。在此基础

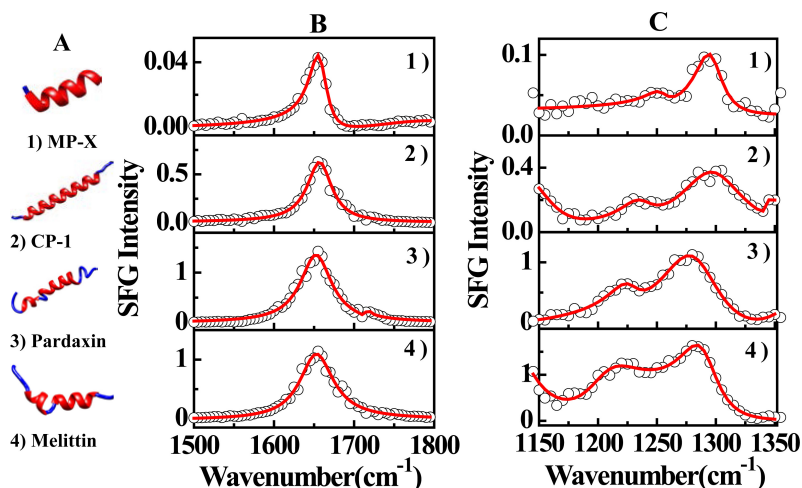


图 7. 1) MP-X、2) CP-1、3) Pardaxin 和 4) Melittin 在磷脂双层膜上的酰胺 I 和酰胺 III 谱带 ssp 谱图, (A) 根据 NMR 的结果给出的以上四种多肽的二级结构图: 粗线代表  $\alpha$ -螺旋结构、细线代表无规则卷曲结构, (B) 酰胺 I 谱带, (C) 酰胺 III 谱带。图片摘自文献 73, 版权所有 American Chemical Society。

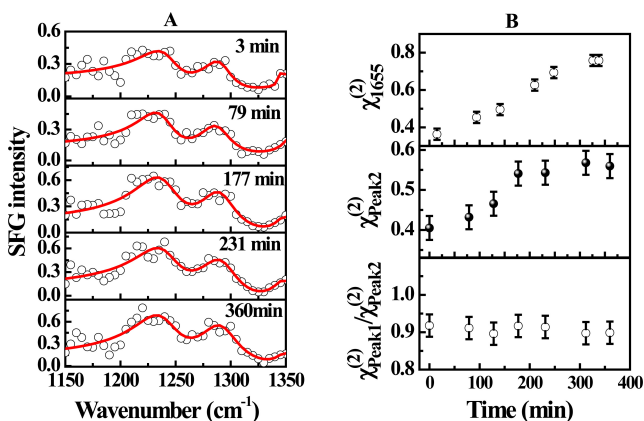


图 8. *d*-DMPC 磷脂双层膜中 pardaxin 分子的 A) 酰胺 III 波段的 ssp 光谱, B)  $1655\text{ cm}^{-1}$  处谱峰强度,  $1290\text{ cm}^{-1}$  处谱峰强度, 以及谱峰强度比  $r = \chi_{\text{peak1}}^{(2)}/\chi_{\text{peak2}}^{(2)}$  随时间的变化。图片摘自文献 86, 版权所有 American Chemical Society。

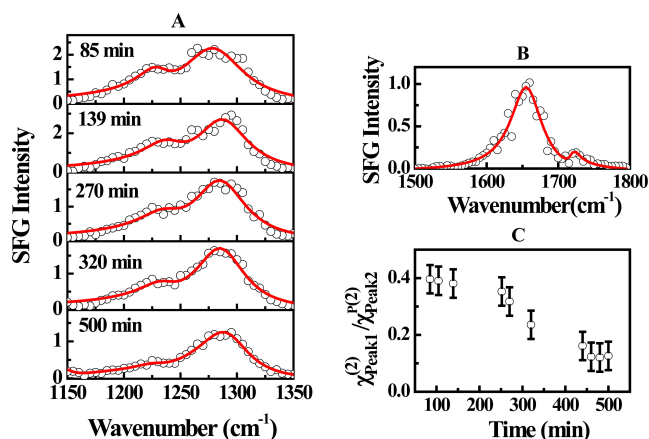


图 9. *d*-DMPG 磷脂双层膜中 pardaxin 分子的 A) 酰胺 III 波段 ssp 光谱随时间的变化, B) 酰胺 I 波段 ssp 光谱, C) 谱峰强度比  $r = \chi_{\text{peak1}}^{(2)}/\chi_{\text{peak2}}^{(2)}$  随时间的变化。图片摘自文献 86, 版权所有 American Chemical Society。

上, 我们还探索出了生物膜上 pH 诱导的酸感应蛋白质折叠的可逆性规律<sup>[94]</sup>。

## B. 无规则卷曲 $\Rightarrow$ $\alpha$ -螺旋 $\Rightarrow$ $\beta$ -折叠转变

蛋白质错误折叠会导致 II 型糖尿病等神经退行性疾病的产生。错误折叠涉及  $\beta$ -折叠的生成及其纤维化过程。Elsa Yan 等人通过探测手性与非手性和频光谱对 hIAPP 在 DPPG 单层膜上的结构与结构变化动力学进行了研究<sup>[44,59,91]</sup>。hIAPP 是一种 II 型糖尿病相关蛋白质, 它的错误折叠以及纤维化是造成胰岛  $\beta$ -细胞凋亡的主要原因。如图 10 所示, 经过了 10 个小时的作用后, hIAPP 分子酰胺 I 的 ssp 光谱中的振动峰

产生了明显的蓝移, 而酰胺 I 的 psp 光谱在  $1620\text{ cm}^{-1}$  处出现了明显的振动峰。 $1620\text{ cm}^{-1}$  处振动峰的出现表明 hIAPP 分子形成了平行  $\beta$ -折叠结构。图 10B 展示的是 hIAPP 分子和频光谱随时间的变化过程。从酰胺 I 的 ssp 光谱中可以看到, hIAPP 分子的特征峰位置从  $1655\text{ cm}^{-1}$  逐渐蓝移至  $1660\text{ cm}^{-1}$ 。酰胺 I 的 psp 光谱中  $1620\text{ cm}^{-1}$  处振动峰在 200 分钟之后才开始出现并逐渐增强; 酰胺 A 的 psp 光谱中  $3285\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰强度在 200 分钟之后才开始出现并逐渐上升, 在 3 小时后到达最高点, 随后又逐渐降低, 最终在 10 小时后完全消失。由于酰胺 A 波段中  $3285\text{ cm}^{-1}$  处振动峰是来自于  $\alpha$ -螺旋结构, 所以, 以上结果表明在与 DPPG 单层膜相互作用时, hIAPP 首先从无规则卷

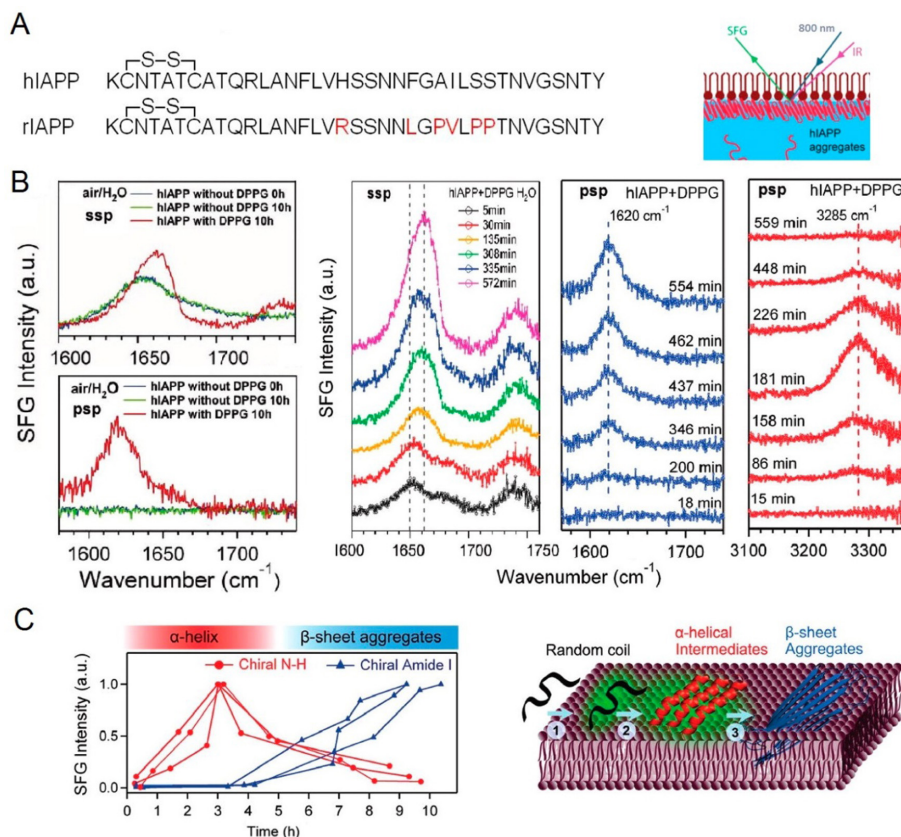


图 10. 利用和频振动光谱酰胺 I 谱带和酰胺 A 谱带监控界面蛋白质 hIAPP 的结构演变过程。(A) hIAPP 分子序列与实验示意图。(B) DPPG 单层膜上 hIAPP 分子稳态 ssp 光谱(非手性)与 psp 光谱(手性), 以及酰胺 I 波段 ssp 光谱、酰胺 A 波段 psp 光谱随作用时间的变化。(C) 谱峰强度随作用时间的变化以及 hIAPP 在膜表面上结构演变示意图。图片摘自文献 59, 版权所有 American Chemical Society。

曲结构转变为  $\alpha$ -螺旋结构, 然后又从  $\alpha$ -螺旋结构转变为平行  $\beta$ -折叠结构(详见图 10C)。这些结果有助于我们理解 II 型糖尿病的发病机制和细胞膜上淀粉状多肽聚集的形成机理。这些实验也展示了和频振动光谱的手性光谱可作为一种非常有效的动力学表征方法以应用于界面生物大分子结构与构象变化的原位实时检测。

### C. 离子通道动力学过程

和频振动光谱除了可以用来研究界面蛋白质的结构转变, 还可以用来揭示离子通道开放和关闭这样的复杂过程。虽然 Peter Agre 和 Roderick MacKinnon 因发现离子通道蛋白质于 2003 年获得诺贝尔化学奖 [95–97], 但是目前人们对通道在开放与关闭过程中各个电压传感多肽的运动情况仍不明朗。理论上存在三种有争议的模式, 分别为: 螺旋螺杆模型, 转运模型, 以及桨模型 [95–97]。针对这一现状, 我们探索了利用和频振动光谱来研究这种复杂模型过程的可能性, 以大型离子通道模型丙甲甘肽作为研究对象, 研究其在细胞膜上的结构变化动力学 [1]。前人研究表明, 通过加入磷酸盐, 磷脂分子头部的磷酸根基团能与多肽上的精氨酸基团形成强氢键相互作用, 形成盐桥结构, 进而改变膜电位, 由此激活离子通道。从图 11 中不同 pH 值下丙甲甘肽分子酰胺 I 波段的 ppp 光谱与 ssp 光谱对比可以看出, pH 的上升不仅引起了酰胺 I 波段光谱强度的明显增大, ssp 光谱与 ppp 光谱

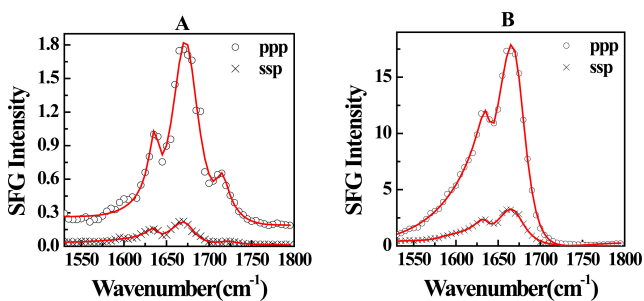


图 11. (A) pH = 6.7 与 (B) pH = 11.9 时 POPC/POPC 双层膜中丙甲甘肽分子酰胺 I 波段的 ppp 光谱与 ssp 光谱。图片摘自文献 1, 版权所有 American Chemical Society。



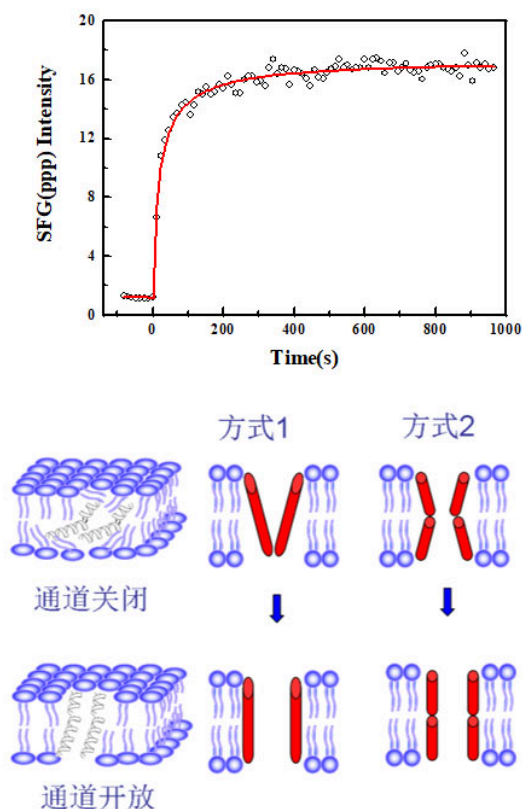


图 12. pH 值改变 (由 6.7 变成 11.9) 后 POPC/POPC 双层膜中丙甲甘肽分子  $1665\text{ cm}^{-1}$  位置的 ppp 偏振和频信号与不同片段取向角度发生的变化。图片摘自文献 1, 版权所有 American Chemical Society。

强度之间比例也发生了明显的变化。如图 12 所示, 随着  $\text{K}_3\text{PO}_4$  的加入 (pH 值从 6.7 变成 11.9), 丙甲甘肽分子  $1665\text{ cm}^{-1}$  处的和频光谱信号发生了快速的变化, 于 400 秒后达到平衡。同时取向分析结果显示, 丙甲甘肽分子在受到 pH 值变化的外界刺激之后,  $3_{10}$  螺旋和  $\alpha$ -螺旋结构的取向角度分别由  $72^\circ$  和  $50^\circ$  变成了  $56.5^\circ$  和  $45^\circ$ 。这些结果表明离子通道蛋白在受到外界刺激时, 通过两种分子构象的同时变化 (取向角减小和片段之间的角度差减少) 来实现通道的开放<sup>[1]</sup>。

#### D. 界面蛋白质酰胺键振动能量转移

蛋白质分子能量转移对生化反应及生理功能的正常运作至关重要, 许多重要的生理和细胞过程都依赖于蛋白质的超快能量转移过程, 例如, 构象变化传输和变构通讯与沿蛋白质骨架上的能量传输直接相关。快速且有效的能量转移是蛋白质维持在很窄温度范围内正常工作的重要保证。因而, 理解生物膜界面蛋白质的能量转移过程是揭示膜蛋白质工作机制的关键。

但是, 迄今为止, 人们对蛋白质 (特别是界面蛋白质) 能量转移的了解十分有限。这主要是因为能量传递过程往往牵涉皮秒或更短时间尺度内的激发态动力学, 而目前在理论和实验上对激发态动力学, 尤其是界面激发态动力学的精确描述还缺乏行之有效的方法和数据积累。最近我们独立搭建了振动态选择激发-和频光谱探测的飞秒时间分辨测量系统。该系统技术指标达到当前国际最先进水平: 时间分辨率  $100\text{ fs}$ , 光谱分辨率  $\leq 5\text{ cm}^{-1}$ , 能实现目前文献报道中最快的和频光谱采谱速度 (采集一张光谱最快只需 18 毫秒)<sup>[98]</sup>。该系统的发展为深入研究界面超快构象变化和界面能量转移等动力学行为提供了新的思路。利用具有特定能量的飞秒红外脉冲选择激发生物膜上蛋白质的 N-H 基团, 然后用飞秒和频光谱监控 N-H 基团的瞬态变化, 本小组首次成功测出水环境下生物膜上蛋白质 N-H 的振动能量弛豫速率 (图 13)<sup>[99]</sup>。如图 13 所示, WALP23 分子的 ssp 光谱在  $t = -2.0\text{ ps}$  时只有  $3314\text{ cm}^{-1}$  处一个振动基态的特征峰。由于  $t = 0\text{ ps}$  时泵浦光的激发导致一部分基态分子被激发到激发态, 使得基态的分子布居数减小, 基态峰的强度比没有激发时要小。与此同时,  $3177\text{ cm}^{-1}$  处也出现了一个源于振动激发态的新的特征峰。随着弛豫时间的增加, 振动激发态的能级布居数逐渐减少, 激发态振动峰逐渐降低, 同时基态振动峰也逐渐回归到原来的强度。通过四能级模型的拟合与计算, 获得 WALP23 分子 N-H 伸缩振动的弛豫时间常数为  $1.70 \pm 0.05\text{ ps}$ 。这个弛豫时间常数略低于非氢键作用环境下 AcAla(H)OMe 分子的弛豫时间常数 ( $4\text{ ps}$ ), 略高于二氯甲烷溶液中 N-甲基乙酰胺分子的弛豫时间常数 ( $1\text{ ps}$ )。而  $\beta$ -折叠结构样品中的弛豫时间则为  $0.9\text{ ps}$ 。

在此基础上, 通过激发 N-H 基团, 探测酰胺 I 谱带的瞬态变化, 我们发现 N-H 到 C=O 的振动能量传递存在两种途径: 一种是直接的 NH-CO 耦合作用 ( $\sigma_{\text{NH-CO}}$ ); 另一种是 N-H 先弛豫到某中间态 (记为 X 态), 然后 X 态与 C=O 发生耦合作用 ( $\sigma_{\text{X-CO}}$ ) (图 14C)。系统研究表明 N-H...O=C 的氢键强弱决定 N-H 与 C=O 间两种耦合途径 ( $\sigma_{\text{X-CO}}/\sigma_{\text{NH-CO}}$ ) 的比例: 氢键越强,  $\sigma_{\text{X-CO}}$  耦合的比例越高。这一发现成功揭示了氢键作用影响膜蛋白能量传递途径和速率的规律, 同时也表明具有强氢键相互作用的蛋白质分子中的振动模式存在明显的能量耦合, 因此目前理论计算中使用的非耦合近似处理似乎是不够准确的。以上实验结果将有助于我们理解蛋白质分子在变构通讯过程中真实的动力学特征与反应

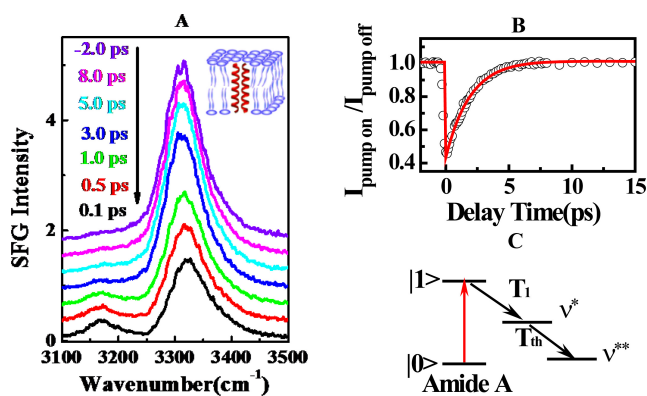


图 13. *d*-DPPG 双层膜/ $D_2O$  界面上 WALP23 分子酰胺 A 谱带的能量弛豫过程 (泵浦光频率:  $3300\text{ cm}^{-1}$ )。 (A) WALP23 分子酰胺 A 光谱随泵浦弛豫时间的变化; (B) WALP23 分子的 N-H 伸缩振动谱峰相对强度随泵浦弛豫时间的变化; (C) 弛豫能级示意图。图片摘自文献 99, 版权所有 John Wiley & Sons, Inc.。

机理。

## V. 结论与展望

本文中我们系统介绍了二阶非线性和频振动光谱在界面蛋白质分子结构与动力学方面的研究进展。和频振动光谱可以作为表征界面蛋白质分子结构、动力学与超快能量转移的强有力技术。通过探测酰胺 I 波段, 酰胺 III 波段与酰胺 A 波段的谱学特征, 我们可以精确测定界面蛋白质分子的结构与取向。通过原位实时定点地监控和频振动光谱的依时变化, 我们可以挖掘出界面上蛋白质分子的构象和二级结构的演变机制。这些分子层次上的信息, 将有助于我们全面理解界面蛋白质的结构与动力学特征, 阐明界面蛋白质在跨膜、折叠、分子识别、变构通讯等过程, 揭示各种与蛋白质关联的神经退化型疾病机制, 进而为发展新药物提供理论指导。和频振动光谱技术近年来在我国发展迅速, 并将在界面复杂体系的物理与化学问题的相关研究中发挥出越来越重要的作用。

## 致 谢

感谢国家自然科学基金 (21473177, 21633007, 21790350), 国家重点研发计划 (2017YFA0303500, 2018YFA0208700), 中央高校基本科研业务费专项资金 (WK2340000064), 中国科学院 (2016HSC-IU003), 安徽量子信息技术先导项目 (AHY090000)。

## 参考文献

- [1] Ye S J, Li H C, Wei F, *et al.* *J Am Chem Soc*, 2012, **134**: 6237-6243
- [2] Wang H Y, Tao J, Shumay E, *et al.* *Eur J Cell Biol*, 2006, **85**: 643-650
- [3] Chen X, Boughton A P, Tesmer J J G, *et al.* *J Am Chem Soc*, 2007, **129**: 12658-12659
- [4] Outeiro T F. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**: 581-582
- [5] Bates G P. *Science*, 2006, **311**: 1385-1386
- [6] Dobson C M. *Nature*, 2003, **426**: 884-890
- [7] Dos Santos Cabrera M P, Arcisio-Miranda M, Gorjao R, *et al.* *Biochemistry*, 2012, **51**: 4898-4908
- [8] Tang J, Signarvic R S, DeGrado W F, *et al.* *Biochemistry*, 2007, **46**: 13856-13863
- [9] Hlady V, Buijs J. *Curr Opin Biotech*, 1996, **7**: 72-77
- [10] Ye S J, Nguyen K T, Boughton A P, *et al.* *Langmuir*, 2009, **26**: 6471-6477
- [11] Ye S J, Nguyen K T, Chen Z. *J Phys Chem B*, 2010, **114**: 3334-3340
- [12] Zhu H, Snyder M. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, **7**: 55-63
- [13] Castellana E T, Cremer P S. *Surf Sci Rep*, 2006, **61**: 429-444
- [14] Battle A R, Ridone P, Bavi N, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1848**: 1744-1756
- [15] Judge P J, Watts A. *Curr Opin Biotech*, 2011, **15**: 690-695
- [16] Fenwick R B, van den Bedem H, Fraser J S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**: E445-E454
- [17] Coen M C, Lehmann R, Gröning P, *et al.* *J Colloid Interface Sci*, 2001, **233**: 180-189
- [18] Boxer S G, Kraft M L, Weber P K. *Annu Rev Biophys*, 2009, **38**: 53-74
- [19] Li H, Xu B, Wang D, *et al.* *J Biotechnol*, 2015, **203**: 97-103
- [20] Zhang W, Qing W, Ren Z, *et al.* *Bioresour Technol*, 2014, **172**: 16-21
- [21] Yano Y F. *J Phys.: Condens Matter*, 2012, **24**: 503101
- [22] Fotiadis D. *Curr Opin Biotech*, 2012, **23**: 510-515
- [23] Van den Berg B, Clemons W M, Collinson I, *et al.* *Nature*, 2004, **427**: 36-44
- [24] Vogeley L, Sineshchikov O A, Trivedi V D, *et al.* *Science*, 2004, **306**: 1390-1393
- [25] Faller M, Niederweis M, Schulz G E. *Science*, 2004, **303**: 1189-1192
- [26] Ashcroft F M. *Nature*, 2006, **440**: 440-447
- [27] Khakh B S, North R A. *Nature*, 2006, **442**: 527-532
- [28] Besenicar M, Macek P, Lakey J H, *et al.* *Chem Phys Lipids*, 2006, **141**: 169-178
- [29] Devanathan S, Salamon Z, Lindblom G, *et al.* *FEBS J*, 2006, **273**: 1389-1402
- [30] Salamon Z, Macleod H A, Tollin G. *Biochim Biophys. Acta*, 1997, **1331**: 131-152
- [31] Seddon J M, Cevc G. *Lipid Polymorphism: Structure and Stability of Lyotropic Mesophases of Phospholipids*, Marcel Dekker, Inc: New York, 1993
- [32] Shen Y R. *The Principles of Nonlinear Optics*, John Wiley & Sons: New York, 1984
- [33] Zhuang X, Miranda P B, Kim D, *et al.* *Phys Rev B*, 1999, **59**: 12632-12640
- [34] Wei X, Hong S C, Zhuang X W, Goto T and Shen Y R, *Phys Rev E*, 2000, **62**: 5160-5172

- [35] Belkin M A, Shen Y R. *Int Rev Phys Chem*, 2005, **24**: 257-299
- [36] Geiger F M. *Annu Rev Phys Chem*, 2009, **60**: 61-83
- [37] Rivera C A, Fourkas J T. *Int Rev Phys Chem*, 2011, **30**: 409-443
- [38] Shen Y R. *Annu Rev Phys Chem*, 2013, **64**: 129-150
- [39] Wang H F, Velarde L, Gan W, *et al. Annu Rev Phys Chem*, 2015, **66**: 189-216
- [40] Moad A J, Simpson G J. *J Phys Chem B*, 2004, **108**: 3548-3562
- [41] Wang H F, Gan W, Lu R, *et al. Int Rev Phys Chem*, 2005, **24**: 191-256
- [42] Ding B, Jasensky J, Li Y X, *et al. Acc Chem Res*, 2016, **49**: 1149-1157
- [43] Ye S J, Luo Y. *Sci China Chem*, 2014, **57**: 1646-1661
- [44] Yan E C Y, Fu L, Wang Z, *et al. Chem Rev*, 2014, **114**: 8471-8498
- [45] Roy S, Covert P A, FitzGerald W R, *et al. Chem Rev*, 2014, **114**: 8388-8415
- [46] Boughton A P, Chen Z. *Surface Analysis and Techniques in Biology*, Berlin: Spriger Verlag, 2014
- [47] Zhang C, Myers J N, Chen Z. *Soft Matter*, 2013, **9**: 4738-4761
- [48] Ye S J, Wei F, Li H C, *et al. Adv Protein Chem Struct Bio*, 2013, **93**: 213-255
- [49] Kim S H, Lee C M, Kalle K. *Korean J Chem Eng*, 2013, **30**: 2127-2141
- [50] Zhang X X, Han X F, Wu F G, *et al. Chin Sci Bull*, 2013, **58**: 2537-2556
- [51] Liu Y, Jasensky J, Chen Z. *Langmuir*, 2011, **28**: 2113-2121
- [52] Chen Z. *Acta Phys Chim Sin*, 2012, **28**: 504-521
- [53] Fu L, Wang Z G, Yan E C Y. *Int J Mol Sci*, 2011, **12**: 9404-9425
- [54] Roke S. *Int J Mat Res*, 2011, **102**: 906-912
- [55] Ye S J, Nguyen K T, Le Clair S V, *et al. J Struct Biol*, 2009, **168**: 61-77
- [56] Le Clair S V, Nguyen K, Chen Z. *J Adhesion*, 2009, **85**: 484-511
- [57] Chen X Y, Chen Z. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1758**: 1257-1273
- [58] Chen X Y, Clarke M L, Wang J, *et al. Int J Mod Phys B*, 2005, **19**: 691-713
- [59] Fu L, Liu J, Yan E C Y. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**: 8094-8097
- [60] Engel M F M, vandenAkker C C, Schleegeer M, *et al. J Am Chem Soc*, 2012, **134**: 14781-14788
- [61] Li H C, Ye S J, Wei F, *et al. Langmuir*, 2012, **28**: 16979-16988
- [62] Chen X, Wang J, Boughton A P, *et al. J Am Chem Soc*, 2007, **129**: 1420-1427
- [63] Wang J, Lee S H, Chen Z. *J Phys Chem B*, 2008, **112**: 2281-2290
- [64] Nguyen K T, Le Clair S V, Ye S J, *et al. J Phys Chem B*, 2009, **113**: 12169-12180
- [65] Lee S, Wang J, Krimm S, *et al. J Phys Chem A*, 2006, **110**: 7035-7044
- [66] Guyot-Sionnest P, Hunt J H, Shen Y R. *Phys Rev Lett*, 1987, **59**: 1597-1600
- [67] Kim G, Gurau M C, Lim S M, *et al. J Phys Chem B*, 2003, **107**: 1403-1409
- [68] Tamm L K, Tatulian S A. *Q Rev Biophys*, 1997, **30**: 365-429
- [69] Barth A, Zscherp C. *Q Rev Biophys*, 2002, **35**: 369-430
- [70] Oladepo S A, Xiong K, Hong Z M, *et al. Chem Rev*, 2012, **112**: 2604-2628
- [71] Wang J, Chen X, Clarke M L, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**: 4978-4983
- [72] Chen X, Wang J, Sniadecki J J, *et al. Langmuir*, 2005, **21**: 2662-2664
- [73] Ye S J, Li H C, Yang W L, *et al. J Am Chem Soc*, 2014, **136**: 1206-1209
- [74] Fu L, Xiao D Q, Wang Z, *et al. J Am Chem Soc*, 2013, **135**: 3592-3598
- [75] Weidner T, Breen N F, Drobny G P, *et al. J Phys Chem B*, 2009, **113**: 15423-15426
- [76] Phillips D C, York R L, Mermut O, *et al. J Phys Chem C*, 2007, **111**: 255-261
- [77] Weidner T, Apte J S, Gamble L J, *et al. Langmuir*, 2009, **26**: 3433-3440
- [78] York R L, Mermut O, Phillips D C, *et al. J Phys Chem C*, 2007, **111**: 8866-8871
- [79] Ding B, Laaser J E, Liu Y, *et al. J Phys Chem B*, 2013, **117**: 14625-14634
- [80] Wei F, Li H C, Ye S J. *J Phys Chem C*, 2013, **117**: 26190-26196
- [81] Wei F, Ye S J, Li H C, *et al. J Phys Chem C*, 2013, **117**: 11095-11103
- [82] Han X, Liu Y, Wu F G, *et al. J Phys Chem B*, 2014, **118**: 2904-2912
- [83] Wang Z, Han X, He N, *et al. J Phys Chem B*, 2014, **118**: 5670-5680
- [84] Han X, Uzarski J R, Mello C M, *et al. Langmuir*, 2013, **29**: 11705-11712
- [85] Han X, Soblosky L, Slutsky M, *et al. Langmuir*, 2011, **27**: 7042-7051
- [86] Huang J H, Tian K Z, Ye S J, *et al. J Phys Chem C*, 2016, **120**: 15322-15328
- [87] Chen X, Wang J, Kristalyn C B, *et al. Biophys J*, 2007, **93**: 866-875
- [88] Yang P, Wu F G, Chen Z. *J Phys Chem C*, 2013, **117**: 3358-3365
- [89] Yang P, Wu F G, Chen Z. *J Phys Chem C*, 2013, **117**: 17039-17049
- [90] Wang Z, Fu L, Yan E C Y. *Langmuir*, 2013, **29**: 4077-4083
- [91] Fu L, Wang Z, Psciuk T B, *et al. J Phys Chem Lett*, 2015, **6**: 1310-1315
- [92] Xiao D Q, Fu L, Liu J, *et al. J Mol Biol*, 2012, **421**: 537-547
- [93] Fu L, Ma G, Yan E C Y. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**: 5405-5412
- [94] Hu X, Tan J J, Ye S J. *J Phys Chem C*, 2017, **121**: 15181-15187
- [95] King L S, Agre P. *Annual Rev Physiol*, 1996, **58**: 619-648
- [96] Borgnia M, Nielsen S, Engel A, *et al. Annual Rev Biochem*, 1999, **68**: 425-458
- [97] Long S B, Tao X, Campbell E B, *et al. Nature*, 2007, **450**: 376-382
- [98] Tan J J, Luo Y, Ye S J. *Chin J Chem Phys*, 2017, **30**: 671-677
- [99] Tan J J, Zhang B, Luo Y and Ye S J, *Angew Chem Int Edit*, 2017, **129**: 13157-13161.

## Molecular Structure and Dynamics of Interfacial Protein Molecules Investigated by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy

Wei Feng <sup>[2]</sup>, Tan Jun-Jun <sup>[1]</sup>, Zhang Jia-Hui <sup>[1]</sup>, Li Chuan-Zhao <sup>[1]</sup>, Wang Wen-Ting <sup>[1]</sup>, Luo Yi <sup>[1]</sup>, Ye Shu-Ji <sup>[1]</sup>

<sup>1</sup>Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale,  
University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China

<sup>2</sup>Institution for Interdisciplinary Research, & Key Laboratory of Optoelectronic Chemical Materials  
and Devices of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430056, China

The interaction of proteins and the interface is a universal but complex phenomenon in nature, which plays an extremely important role in many fields such as physics, biotechnology, chemical engineering, medicine, and environmental science. For example, the structural mutation and dysfunction caused by the misfolding of proteins at the biointerface are directly related to the occurrence and development of various diseases. Precise characterization of the conformations and dynamics of interfacial proteins *in situ* and in real-time is the core of revealing the function of interfacial proteins, which is of great importance to elucidate the mechanism of neurodegenerative diseases associated with protein aggregation. Nevertheless, there is still a lack of knowledge about their structure and dynamics at this moment. Protein folding is also an unresolved problem in molecule biology central rules. It is mainly because its characterization technology has to require enough structural and temporal resolution as well as requests for *in situ*, in real-time, in vivo, and non-invasive measurement, yet few methods can meet all the requirements. Sum frequency generation vibrational spectroscopy (SFG-VS) is a powerful technique that can probe the structure and dynamics of interfacial protein molecules at the molecular level. In this review, the application of SFG-VS in the structure and dynamic characterization of interfacial proteins were introduced in details. By probing different protein backbone vibrational bands of amide I, amide III and amide A *in situ* and in real-time, the precise measurements of the structure, conformation transition and dynamic features of interfacial protein molecules can be achieved, which can further reveal the molecular mechanisms of protein-membrane interaction, protein-protein interaction and protein aggregation. This review will provide a new train of thought for people to study the physical and chemical problems of complex interface systems.

**Key words:** Interfacial proteins; Sum frequency generation vibrational spectroscopy; Amide bands; Conformations; Structure and dynamics