

• 研究论文 •

光谱法研究 pH 值对再生桑蚕丝素蛋白在水溶液中结构的影响

杨宇红 邵正中* 陈新

(教育部聚合物分子工程重点实验室 复旦大学高分子科学系 上海 200433)

摘要 通过一系列光谱实验手段研究了再生桑蚕(*Bombyx mori*)丝素蛋白在水溶液中的构象转变情况。由于丝素蛋白含有较多带电荷的氨基酸残基, 因此环境 pH 值对丝素蛋白的结构有着一定的影响: 酸性越强, 丝素蛋白越容易发生从无规线团到 β -折叠结构转变; 相对而言, 碱性条件则更有利于丝素蛋白以无规线团结构稳定存在。特别是当 pH 在 4 附近时, 丝素蛋白的无规结构最易发生改变; 而 pH 为 6 左右时, 丝素蛋白的结构则较为稳定。这种变化趋势与沿着成熟蚕腺体中丝素蛋白所处的环境及其状态相当吻合, 由此表明 pH 值的调节是蚕在生物体中控制其丝素蛋白状态的一个相当重要的手段。这一结果对人工纺制动物丝条件的调控有着极其重要的现实意义。同时我们还发现, 在相当宽的 pH 范围内, 丝素蛋白的二级结构存在着中间体形态, 表明丝素蛋白的变性过程不符合简单的二态机制。

关键词 丝素蛋白; 构象转变; 圆二色谱; 荧光光谱

Influence of pH Value on the Structure of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibroin in Aqueous Solution by Optical Spectroscopy

YANG, Yu-Hong SHAO, Zheng-Zhong* CHEN, Xin

(Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Ministry of Education and Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract A wonderful process of soluble silk fibroin transiting to solid silk catches great attentions for decades. In this paper, fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopy were used to monitor the conformational transition of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin (RSF) in aqueous solutions under different pH values. It is shown that the secondary structure of RSF is very sensitive to pH value of solution. During acid driving conformational transition process, the silk protein aggregated near the isoelectric point of RSF ($pI=4.22$), whereas its conformation is relatively stable as pH value is around 6. These changes are in accordance with the states and environments of fibroin along the silkworm silk gland, showing the essential way for silkworm controlling the state of fibroin by pH. On the other hand, the existence of intermediate during pH induced unfolding process implied that the conformational transition of RSF does not fit the simple two-state mechanism.

Keywords silk protein; conformation transition; circular dichroism; fluorescence spectrum

包括蜘蛛丝和蚕丝在内的天然丝, 由于具有优异的综合力学性能以及其由溶胶态的丝素蛋白转变为固态丝的奇妙过程, 激起了人们极大的兴趣^[1~3]。在熟蚕的腺体中, 水溶性的溶胶状丝素蛋白呈现出无序结构。然

而, 一旦经历了动物纺器的纺制, 这类浓稠的丝素蛋白剧变成“半结晶”的水不溶性丝纤维。其中, 约占总量 55% 的规整 β -折叠结构分散在无定型基体中, 整个分子链沿着纤维的长轴方向排列^[4]。这种规整微区分散于连

* E-mail: zzshao@fudan.edu.cn; Fax: 021-65640293.

Received November 24, 2005; revised February 16, 2006; accepted April 28, 2006.

国家自然科学基金(Nos. 20434010, 50373006)和国家杰出青年基金(No. 20525414)资助项目。

续的非规整区域并且两者均高度地取向是丝纤维具有出色力学性能的主要原因, 因此, 许多研究都集中于丝形成时丝素蛋白结构变化的机制上. Iizuka 和 Yamaura 等^[5-7]的研究发现, 在蚕吐丝的过程中, 剪切力对丝素蛋白的构象转变起着至关重要的作用. 我们则提出了丝素蛋白构象转变过程中的成核依赖聚集机制^[8]. 另外, 我们还发现离子也对丝素蛋白的构象转变起着促进作用, 而且在此过程中可能有多个中间态的存在^[9-11]. 但是, 迄今对丝素蛋白在稀溶液中其二级结构转变过程的直接研究尚未见报道.

从氨基酸序列来看, 丝素蛋白的疏水侧链和亲水侧链是均匀地相间分布^[12]. 94%的氨基酸一级序列由高度重复的(Gly-X)组成^[13], 而且溶液中仅具有无规线团和少量 β -折叠构象. 相对简单的结构使丝素蛋白被认为是研究蛋白质结构的最佳模型之一^[14].

研究蛋白质结构变化的方法有多种. 其中, 荧光光谱法被广泛地用于从原子水平上解释蛋白质的结构^[15]. 在蛋白质分子中, 能发射荧光的氨基酸残基只有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)以及苯丙氨酸(Phe), 其荧光谱对环境极为敏感, 成为研究蛋白质的结构、折叠动力学以及蛋白质分子间的相互作用的一种理想选择. 在这三种氨基酸中, Trp 的荧光强度最大, 而 Phe 的荧光强度则很低. 在同时含有 Trp 和 Tyr 的蛋白质中, 由于其分子发生了从 Tyr 残基到 Trp 残基的能量转移, 从而导致 Tyr 残基的荧光猝灭和 Trp 残基的荧光增加, 因而 Trp 最常被用作内源探针来研究蛋白质的结构^[16]. 对于丝素蛋白来说, 其 5263 个氨基酸中共含有 11 个 Trp, 277 个 Tyr 和 29 个 Phe, 分别占全部氨基酸的 0.2%, 5.3%和 0.6%^[12]. 最近的研究发现, 在丝素蛋白分子中, Tyr 位于 β -折叠的转折处^[17], 因此 Tyr 有可能成为丝素蛋白结构由无规线团向 β -折叠转变的关键, 从而也使荧光光谱法在丝素蛋白结构的研究中成为其它手段无法取代的重要方法.

本文中, 我们主要通过丝素蛋白中的 Trp 和 Tyr 作为内源探针, 结合荧光光谱和圆二色谱, 探索溶液 pH 对丝素蛋白结构的影响, 并对其构象转变及结构稳定性进行考察. 结果发现酸度对丝素蛋白的结构有着重要的影响, 印证了对 pH 值的调节是蚕在腺体中控制其丝素蛋白状态的一个极为重要的手段. 另外, 我们还发现在稀水溶液中丝素蛋白的构象转变并非通过简单的二态机制, 而是有一个稳定的中间态存在于上述过程中.

1 实验部分

1.1 丝素蛋白样品的制备

桑蚕生丝的脱胶和溶解以及丝素蛋白水溶液的制

备见文献^[18], 透析袋的截留分子量为 12000~14000 Da. 通过称重法得到丝素蛋白溶液的浓度, 并将溶液置于冰箱中储存(4 °C下可保存 3 d). 其它浓度的溶液由这一溶液稀释得到. 透析好的样品要避免强烈搅拌和震荡, 以防引起丝素蛋白构象的变化.

1.2 样品表征

1.2.1 圆二色谱(Circular dichroism, CD)的测定

丝素蛋白的圆二色谱测试在 Jasco Spectropolarimeter-715 (Japan)上完成. 对于远紫外圆二色谱, 使用光径为 1.0 mm 的石英样品池, 扫描范围为 190~250 nm, 蛋白质浓度为 1.0×10^{-4} g/mL; 近紫外圆二色谱则使用光径为 10 mm 的石英样品池, 扫描范围为 250~350 nm, 蛋白质浓度为 1.0×10^{-3} g/mL. 测量参数: 带宽 1.0 nm, 扫描速率 100 nm/min, 响应时间 0.5 s, 分辨率 0.2 nm, 扫描次数 6 次. 测量时对光源系统通氮气以除去空气和水汽. 除非特殊说明, 所有样品的测试均在室温下完成. 空白样品在同样实验条件下完成, 其影响在最终结果中均被扣除. 测试前, 丝素蛋白样品需在室温下培养 2 h. 椭圆度单位为 $\text{mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, 由公式(1)得出^[19]:

$$[\theta] = 78\theta_{\text{exp}}/10cl \quad (1)$$

式中, 78 是桑蚕丝素蛋白的平均残基分子量, θ_{exp} 是实验测得的椭圆度, c 是丝素蛋白的浓度, l 为光径(单位为 cm).

1.2.2 静态荧光光谱测量

静态荧光光谱试验在 Cary Eclipse 荧光光谱仪 (Varian)上完成. 采用光径为 1.0 cm 石英样品池. 对于 Tyr 为内源探针的实验, 样品浓度为 2.0×10^{-4} g/mL, 而 Trp 为内源探针时, 样品浓度为 2.5×10^{-3} g/mL.

对于 Tyr, 激发波长为 274 nm, 发射谱的扫描范围为 290~400 nm; 而对于 Trp, 激发波长为 295 nm, 扫描范围为 300~450 nm. 激发和发射单色器的带宽均为 5 nm. 样品测试前在室温下培养 1 h. 空白样品在相同条件下测量, 最终的实验结果均扣除空白的影响.

1.2.3 pH 对丝素蛋白构象稳定性的影响

通过监测不同缓冲溶液中 CD 谱和静态荧光光谱的变化, 我们分别考察了丝素蛋白在不同 pH(2~12)条件下的构象转变过程. 为了消除离子的影响, 我们选用了磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾以及 Mes-Tris ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}-\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)三种不同的缓冲体系, 分别用磷酸、氢氧化钠、氢氧化钾以及 Mes 和 Tris 调节酸度. pH 值的测定在 pHS-2ST 型数显酸度计(上海天达仪器有限公司)上采用 E-201 型复合电极完成. 在制备缓冲溶液时, pH 值的最大误差范围为 ± 0.02 . 缓冲溶液

的浓度均为 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 所有样品的制备和测量均在室温下进行.

2 结果与讨论

2.1 丝素蛋白在酸性条件下的构象转变

CD 谱可以有效地探测蛋白质中主链二级结构的含量和变化(远紫外区, $190\sim 250 \text{ nm}$), 也可以提供一些三级结构, 包括芳香性残基侧链环境及二硫键的信息(近紫外区, $250\sim 330 \text{ nm}$)等^[20~22].

图 1 是不同 pH 值的丝素蛋白溶液在室温下放置 72 h 后的远紫外 CD 谱图. 从图中可以看出, 随着 pH 值的增加, 197 nm 处的负科顿效应(代表无规线团构象的相对含量^[23])逐渐减弱, 在 pH 值为 4~5 时出现极小值, 表明在此酸性环境下丝素蛋白的无规线团结构很不稳定, 容易转变成 β -折叠结构而沉淀下来. 但是当溶液 pH 值为 6 时, 科顿效应突然增强, 意味着丝素蛋白中无规线团结构含量较多. 当 pH 值达到 7 时, 科顿效应几乎消失, 说明此时溶液中基本上没有无序结构的丝素蛋白存在. 由此表明, 丝素蛋白在 pH 值为 4~5 的酸性环境以及 pH 值为 7 的中性环境中无法以无规线团结构在水溶液中稳定存在. 而 pH 值为 2 和 6 时, 丝素蛋白的远紫外 CD 谱在 197 nm 处均显示出较强的负科顿效应, 我们认为 pH 为 6 的环境有利于丝素蛋白以无规线团结构在水溶液中稳定存在. 但是在 pH 为 2 的强酸性环境中, 丝素蛋白的分子链可能已经被破坏, 此时的科顿效应似与丝素蛋白二级结构的稳定性无关, 因此, 在以后的讨论中, pH 为 2 的环境将不再被列入.

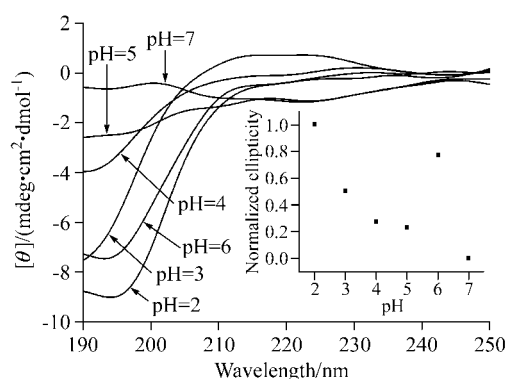


图 1 丝素蛋白在不同 pH 值(7~2)缓冲溶液中放置 72 h 后的远紫外圆二色光谱

插图是 197 nm 处归一化的椭圆度对 pH 值作图

Figure 1 Far-UV CD spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (7~2), after incubated for 72 h

The inserted illustration shows the normalized ellipticity as a function of pH value at 197 nm

一般而言, 人们能够通过近紫外($250\sim 330 \text{ nm}$) CD

谱研究球蛋白的三级结构变化对其氨基酸中芳香侧链的影响来了解蛋白质的结构^[24]. 它不仅能够灵敏地反映蛋白质构象的细微变化, 而且也能被用于测量蛋白质中芳香残基在环境中的不对称性, 因此, 近紫外 CD 谱对蛋白质结构而言, 是一个非常有用的“指纹区”. 近紫外 CD 谱中 275 和 282 nm 处很强的科顿效应主要是源于 Tyr 残基的振动变化, 而 255 和 270 nm 处弱的科顿效应是由 Phe 侧链引起的, 282 和 288 nm 则是 Trp 的贡献^[23]. 因为这三种氨基酸的 1L_b 跃迁能够扩展并达到 300 nm , 固定的 Tyr 残基一般对芳香基团 CD 谱的低能量部分有贡献, 同时还具有确定的振动结构^[25]. 图 2 是丝素蛋白在酸致构象变化过程中其近紫外 CD 谱的变化情况. 从图中可以看出, 随着 pH 值增加, 样品在 278 nm 处的负科顿效应逐渐增强, 当 pH 值为 4~5 时达到极值, 表明在此条件下, Tyr 残基出现较强的圆二色行为, 即说明其构象活动能力很低, 可能位于蛋白质内较疏水的环境中; 而当 pH 为 6 时, Tyr 在 278 nm 处的负科顿效应最弱, 表现出较低的圆二色行为, 说明 Tyr 构象活动的能力很高, 意味着其对溶剂的暴露程度较高. 同时我们还发现随着溶液酸性的增强, Tyr 峰逐渐向短波方向移动, 显示出酸性的增加, 将使 Tyr 残基逐渐移到蛋白质中相对疏水的位置^[23]. 结合远、近 CD 谱的观测结果, 我们认为当环境 pH 值为 6 时, 丝素蛋白将以松散的无规线团结构在水溶液中稳定存在, Tyr 残基位于蛋白质的表面; 而当处于 pH 值为 4 附近的环境中时, 丝素蛋白的二级结构极不稳定, 容易发生从无规线团到 β -折叠的构象转变, 在这个转变过程中, 原本位于蛋白质表面的 Tyr 残基逐渐转移到蛋白质的疏水内部.

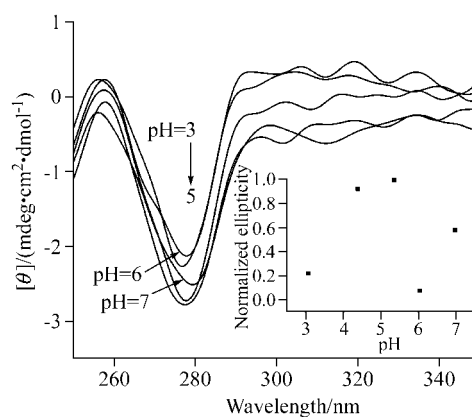


图 2 丝素蛋白在不同 pH 值(3~7)的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液的近紫外圆二色光谱

插图是 278 nm 处归一化的椭圆度对 pH 值作图

Figure 2 Near-UV CD spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (3~7), using $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ as buffer

The inserted illustration shows the normalized ellipticity as a function of pH value at 278 nm

由于在通常情况下,乙醇能够使水溶液中的丝素蛋白迅速从无规线团转变成 β -折叠构象,为了排除时间因素对丝素蛋白结构稳定性的影响,我们通过加入乙醇来促进其构象转变,实验结果如图3所示.从图中可以看出,pH值为3~4时丝素蛋白在217 nm处有较强的负科顿效应,但随着pH的增加逐渐减弱,到pH为6时几乎观察不到.然而,当pH继续增至7时,丝素蛋白在217 nm处的科顿效应再次出现.表明随着酸性的减弱,溶液中丝素蛋白的 β -折叠结构的含量逐渐减少,当pH达到6时,丝素蛋白在溶液中的 β -折叠结构的含量最低.由于整个实验过程中并未观察到沉淀的生成,表明丝素蛋白可能是以某种介于无规线团和 β -折叠之间的结构存在.由此,我们认为,在pH为3~4的酸性环境以及中性环境(pH为7)中,丝素蛋白的无规线团结构极不稳定,容易发生变化;而当溶液环境的pH为6时,丝素蛋白的构象转变程度最低,表明这种酸度有利于丝素蛋白以松散的无规线团结构稳定存在.许多研究表明离子对丝素蛋白的结构稳定性影响很大,特别是钾离子、钙离子以及铜离子^[10,26,27].虽然钠离子对丝素蛋白构象的影响相对较小^[9],但为了排除离子影响的可能性,我们还选用对丝素蛋白结构影响较大的钾离子(磷酸二氢钾-磷酸氢二钾)和不含离子的有机(Mes-Tris)缓冲体系进行研究,仍用乙醇促使丝素蛋白的构象转变.实验得到的结果(图略)基本上与磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲体系一致,说明前述的实验现象确由不同pH值引起,而与离子种类的影响无关.而且在三种缓冲体系中,我们均发现了在pH为5以及中性的环境中存在着丝素蛋白二级结构的中间体.

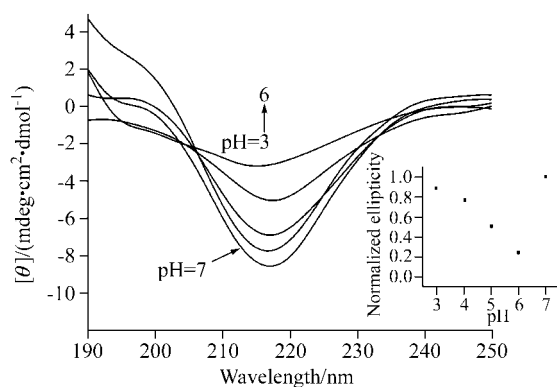


图3 丝素蛋白在不同pH值(3~7)的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液中的远紫外圆二色光谱,使用60%(V/V)的乙醇为变性剂
插图是217 nm处归一化的椭圆度对pH值作图

Figure 3 Far-UV CD spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (3~7), using NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 as buffer and 60% (V/V) ethanol as denaturant

The inserted illustration shows the normalized ellipticity as a function of pH value at 217 nm

为了研究丝素蛋白的构象转变以及其中Tyr残基和Trp残基在不同构象中微观环境的变化,我们在不同条件下进行了荧光光谱测试.为了选择性地研究丝素蛋白中Trp残基,我们选用295 nm的激发波长以避免Tyr残基的干扰,在此波长下,Tyr的吸收基本上为零^[28].

酸致构象转变过程中丝素蛋白二级结构变化的荧光光谱结果列于图4.从图4A的Tyr荧光发射光谱中可以看出,在pH值为4和7的环境中,Tyr的荧光强度最低,说明在这两种环境中,Tyr残基位于蛋白质中较为疏水的位置.而当溶液的pH为6时,Tyr具有较高的荧光强度,意味着在这种环境中Tyr残基位于蛋白质的表面而暴露于溶剂之中.同样,荧光光谱实验中也发现丝素蛋白二级结构在酸致构象转变过程形成了中间体形态,此时溶液的pH值约为3~4以及6.从图4B的Trp荧光发射光谱中可以发现,在pH值为3的酸性环境中,Trp具有很高的荧光强度,说明此时Trp残基位于蛋白

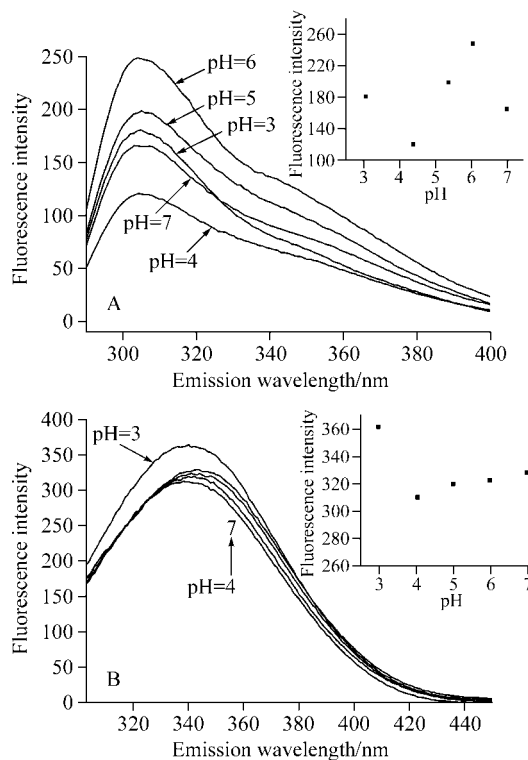


图4 丝素蛋白在不同pH值(3~7)的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液中的荧光发射光谱,使用60%(V/V)的乙醇为变性剂
(A)激发波长为274 nm;(B)激发波长为295 nm.插图分别是(A)304 nm处和(B)354 nm处的荧光强度对pH值作图

Figure 4 Fluorescence emission spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (3~7), using NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 as buffer and 60% (V/V) ethanol as denaturant

(A) excited at 274 nm; (B) excited at 295 nm. The inserted illustrations show the fluorescence intensity as a function of pH value at 304 nm in (A) and 354 nm in (B)

质的表面;但在 pH 4~7 的范围内,随着 pH 的减小, Trp 的荧光强度逐渐减弱,至 pH 为 4 时, Trp 的最大发射峰蓝移了约 5 nm,表明在此环境下, Trp 残基位于蛋白质中较为疏水区域. 这些实验结果与圆二色谱的观察相当吻合.

2.2 丝素蛋白在碱性条件下的构象转变

类似的实验也被用于研究丝素蛋白的碱致构象转变过程. 图 5 是丝素蛋白溶液(室温下放置 72 h 后)在相应 pH 值下的远紫外 CD 谱图. 可以看出,随着 pH 值的增加, 197 nm 处的负科顿效应迅速增强,到 pH 为 9 后基本保持不变,表明丝素蛋白溶液中无规线团结构的含量随溶液碱性的增强而提高. 这表明相对于碱性环境,在中性环境中丝素蛋白难以以无规线团的形式在水溶液中稳定存在.

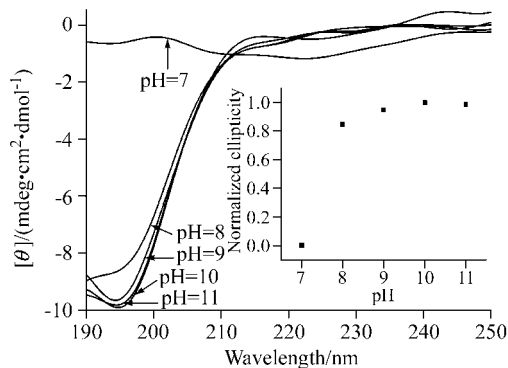


图 5 丝素蛋白在不同 pH 值(7~12)缓冲溶液中放置 72 h 后的远紫外圆二色谱

插图是 197 nm 处归一化的椭圆度对 pH 值作图

Figure 5 Far-UV CD spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (7~12), after incubated for 72 h

The inserted illustration shows the normalized ellipticity as a function of pH value at 197 nm

图 6 是丝素蛋白溶液在碱性条件下其近紫外 CD 谱的变化情况. 从图中可以看出,在溶液 pH 为 7~9 的范围内, 278 nm 处的负科顿效应没有大的不同,表明在这些环境中, Tyr 残基因蛋白质结构变化而暴露于溶剂中的程度基本相似,但 pH 为 7 时的科顿效应仍略强于其它情况;当环境碱性很强时,即 pH 为 11 和 12 时, 278 nm 处的负科顿效应基本上消失,这可能是由 Tyr 残基的负离子化造成的,而与蛋白质的结构变化无关^[29].

同样,我们也使用了另两种不同的缓冲体系即磷酸二氢钾-磷酸氢二钾和 Mes-Tris 来排除由于离子的种类可能造成的影响(图略). 60% (V/V)的乙醇作为变性剂以促进蛋白质的构象转变. 研究发现在偏中性环境(pH 为 7~8)中,丝素蛋白结构最不稳定,而高 pH 值环境能够使丝素蛋白的无规线团结构在溶液中稳定地存在. 在

pH 为 10 的较强碱性环境中同样发现了丝素蛋白二级结构中间体状态的形成.

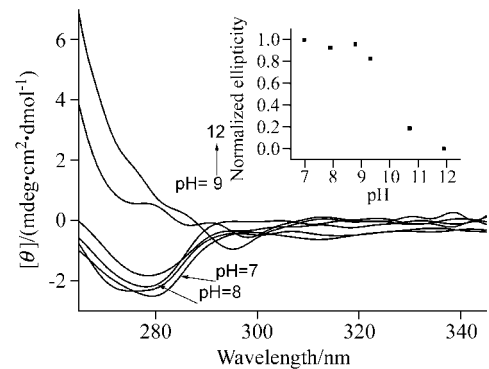


图 6 丝素蛋白在不同 pH 值(7~12)的 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 缓冲溶液的近紫外圆二色谱

插图是 278 nm 处归一化的椭圆度对 pH 值作图

Figure 6 Near-UV CD spectra of regenerated silk fibroin under different pH values (7~12), using NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ as buffer

The inserted illustration shows the normalized ellipticity as a function of pH value at 278 nm

图 7 是碱致构象转变过程中丝素蛋白二级结构变化的荧光光谱结果. 从图 7A 的 Tyr 荧光发射光谱中可以看出,随着溶液碱性的增强, Tyr 的荧光强度逐渐降低,而且在 pH 值为 8 和 11 的溶液中有丝素蛋白二级结构的中间体形成. 图 7B 是 Trp 的荧光发射光谱. 实验结果与 Tyr 为荧光探针得到的结果非常吻合. 然而, pH 值为 7 时, Trp 具有相对较低的荧光强度,而且其最大发射峰蓝移了 6~7 nm,说明与碱性溶液相比,中性环境的溶液中 Trp 残基位于蛋白质中较为疏水的位置.

2.3 不同 pH 值下丝素蛋白的二级结构及其变化

我们的研究表明,虽然在不同缓冲体系中, pH 值对丝素蛋白构象影响的程度略有不同,但总体而言,酸性条件(特别是当 pH 值在 4 左右时)不利于丝素蛋白以无规线团的结构形式存在,容易使其发生向 β -折叠的构象转变. 而当 pH 值约为 6 时,丝素蛋白结构处于相对稳定的状态,这与 Magoshi 等^[30]对 *Bombyx mori* 幼蚕腺体的不同部位中丝素蛋白的结构和它们所处环境的 pH 值关系研究相当吻合. Magoshi 发现,在腺体中部,丝素蛋白主要以水溶性的无规线团结构存在,其 pH 值在 6 附近,而在接近吐丝口的腺体前部,丝素蛋白则以 β -折叠结构存在,而此处的 pH 值约为 4.8. 我们的实验结果证实了 pH 值是蚕在腺体中控制其丝素蛋白状态的一个极为重要的手段;另一方面,丝素蛋白在碱性环境中能够以无规线团的形式稳定地存在,碱性越大,丝素蛋白越稳定,说明丝素蛋白分子侧基团若以负离子形式存在,将有利于其维持松散的无序结构.

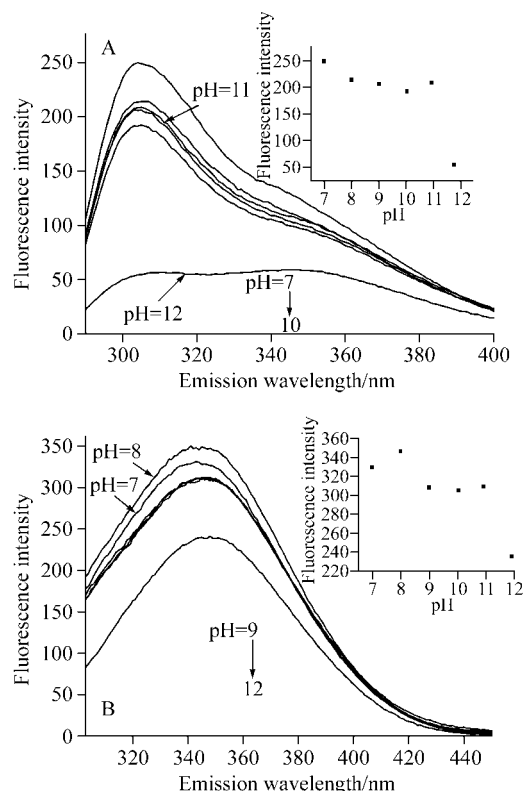


图7 丝素蛋白在不同 pH 值(7~12)的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液中的荧光发射光谱, 使用 60% (V/V) 的乙醇为变性剂 (A) 激发波长为 274 nm; (B) 激发波长为 295 nm. 插图分别是 (A) 304 nm 处和 (B) 354 nm 处的荧光强度对 pH 值作图

Figure 7 Fluorescence emission spectra of regenerated silk fibroin under different pH (7~12), using $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ as buffer and 60% (V/V) ethanol as denaturant

(A) excited at 274 nm; (B) excited at 295 nm. The inserted illustrations show the fluorescence intensity as a function of pH value at 304 nm in (A) and 354 nm in (B)

考虑到实验的误差, 我们推测这些现象主要与丝素蛋白的等电点以及丝素蛋白分子的质子化有关. 根据 GCG 等电点程序对丝素蛋白的氨基酸组成中带电的氨基酸(14 个 Arg, 12 个 Lys, 5 个 His, 30 个 Glu, 25 个 Asp, 277 个 Tyr 和 5 个 Cys)的计算, 其等电点为约 4.22^[31]. 在等电点附近, 维系丝素蛋白无规线团结构的一个重要作用力——同种电荷之间的排斥力变小乃至不复存在, 丝素蛋白变得不甚稳定, 容易发生向热力学上能量更低、结构更稳定的 β -折叠结构的转变.

在水溶液中, 相对于水与蛋白质分子亲水部分形成的氢键而言, 蛋白质分子链间氢键的影响微乎其微, 对大分子结构的稳定性几乎没有贡献, 除非在蛋白质的某些区域由于碳氢类残基浓度极高造成非常低的介电常数^[32]. 因此在对蛋白质结构稳定性的贡献上, 蛋白质与水之间的氢键起着压倒性的作用. 当 pH 值开始下降时, 由于丝素蛋白分子链的逐渐质子化, 蛋白质的表面亲水基团尽可能多地与周围水分子形成氢键, 而疏水基团则

包埋在蛋白质内部, 形成松散无序的结构, 而且结合水也能够与蛋白质外形成氢键网络以确保蛋白质结构的稳定^[33]. 另外, 分子链段之间同种电荷的相互排斥作用, 以及蛋白质内部的疏水相互作用均使丝素蛋白能够稳定地以松散的无规线团结构形式存在于水溶液中.

当 pH 值达到 7 时, 丝素蛋白分子链去质子化, 分子链之间以及分子链与水分子之间氢键的相互作用被削弱, 导致蛋白质的结构被破坏. 随着溶液碱性的增强, 丝素蛋白分子链所带的负电荷越来越多, 同种电荷之间的排斥力越来越强, 蛋白质的无规线团结构也随之稳定下来. 在强碱环境 (pH > 11) 中, 荧光发射强度的下降在蛋白质研究中是常见的^[29], 一般认为与蛋白质结构的变化无关, 而主要与 pK 值在 10 附近的氨基酸残基的离子化有关. Tyr 的 pK 为 9.11, 当 pH > 11 时, 由于 Tyr 残基的离子化, 其自身的荧光强度消失. 同时, 阴离子状态的 Tyr 残基还会通过 Fröster 过程有效地猝灭 Trp 残基的荧光^[34], 因此在荧光光谱实验中, 我们观察到强碱环境中丝素蛋白 Tyr 和 Trp 残基极低的荧光发射强度. 但是, 根据丝素蛋白的远紫外圆二色谱的结果, 当 pH > 11 时, 丝素蛋白主要以无规线团结构存在, 证实丝素蛋白在碱性环境中确实拥有很高的二级结构稳定性.

我们还发现, Tyr 和 Trp 残基在 pH 诱导的丝素蛋白二级结构变化中的行为与有机溶剂如乙醇等引起的有所不同. 有机溶剂的存在, 将导致丝素蛋白周围环境的极性逐渐降低, 使原本在无规线团结构中处于中等暴露程度的 Tyr 残基(具有中等疏水性)随着结构的调整逐渐移到丝素蛋白表面, 完全暴露于溶剂之中^[18]. 而在 pH 引起的蛋白质的构象转变中, 由于 pH 值的不同, 丝素蛋白环境中的电荷情况发生改变, 但溶剂极性没有变化. 因此随着蛋白质二级结构的变化, Tyr 残基移动到蛋白质中相对疏水的内部. 由此表明, 丝素蛋白的酸碱变性机制与其化学变性机制完全不同: 有机溶剂诱导的丝素蛋白的构象转变是通过有机溶剂的烷烃链与蛋白质分子的疏水侧链发生疏水相互作用, 导致原本维系蛋白质结构稳定的结合水有序结构被破坏, 从而引发整个蛋白质的构象转变; 而 pH 值诱导的丝素蛋白结构变化则主要是由于溶液酸性条件变化引起蛋白质分子的质子化和去质子化, 导致氢键形成情况的变化以及蛋白质分子链上电荷分布的变化, 从而最终改变蛋白质结构的稳定性.

无论是酸性环境 (pH 3~4) 还是碱性 (pH 10~11) 环境中, 我们都发现了在丝素蛋白构象转变的过程中有构象的中间形态存在. 提示丝素蛋白在酸、碱变性过程中其构象转变并不是一个简单的二态机制.

3 结论

由于丝素蛋白含有较多带电荷的氨基酸, 因此, 在水溶液中, 环境的酸碱度对丝素蛋白的结构有着较大的影响: 丝素蛋白容易在酸性条件下发生从无规线团到 β -折叠结构转变; 相对而言, 碱性条件则更有利于丝素蛋白以无规线团的结构稳定存在. 当pH在4附近时, 丝素蛋白的无规结构最易发生改变; pH为6左右时, 丝素蛋白的无规线团结构最稳定. 这种现象与成熟蚕体的腺体中丝素蛋白所处的环境及其状态相当吻合, 对人工纺丝条件的调节和控制也有着重要的启示.

References

- Aboubacar, M.; Matallah, H.; Tamaddon-Jahromi, H. R.; Webster, M. F. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **2002**, *104*, 125.
- Hinman, M. B.; Jones, J. A.; Lewis, R. V. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 374.
- Gosline, J. M.; DeMont, M. E.; Denny, M. W. *Endeavour* **1986**, *10*, 31.
- Termonia, Y. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7378.
- Iizuka, E. *Appl. Polym. Symp.* **1985**, 131.
- Yamaura, K.; Okumura, Y.; Matsuzawa, S. *J. Macromol. Sci. Phys.* **1982**, *B21*, 49.
- Yamaura, K.; Okumura, Y.; Ozaki, A.; Matsuzawa, S. *Appl. Polym. Symp.* **1985**, 205.
- Li, G. Y.; Zhou, P.; Shao, Z. Z.; Xie, X.; Chen, X.; Wang, H. H.; Chunyu, L. J.; Yu, T. Y. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6600.
- Chen, X.; Shao, Z. Z.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 2203 (in Chinese). (陈新, 邵正中, Knight D. P., Vollrath F., 化学学报, **2002**, *60*, 2203.)
- Chen, X.; Zhou, L.; Shao, Z. Z.; Zhou, P.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 625 (in Chinese). (陈新, 周丽, 邵正中, 周平, 化学学报, **2003**, *61*, 625.)
- Zhou, L.; Terry, A. E.; Huang, Y. F.; Shao, Z. Z.; Chen, X. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 1379 (in Chinese). (周丽, Terry A. E., 黄郁芳, 邵正中, 陈新, 化学学报, **2005**, *63*, 1379.)
- Expert Protein Analysis System, P05790; P07856.
- Zhou, C. Z.; Confalonieri, F.; Jacquet, M.; Perasso, R.; Li, Z. G.; Janin, J. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *44*, 119.
- Yamada, K.; Tsuboi, Y.; Itaya, A. *Thin Solid Films* **2003**, *440*, 208.
- Ladokhin, A. S.; Meyers, R. A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2000**, p. 5762.
- Tao, W. S.; Li, W.; Jiang, Y. M. *The Molecular Basis of Protein*, 2nd ed., Higher Education Press, Beijing, **1995**, p. 258 (in Chinese). (陶慰孙, 李惟, 姜涌明, 蛋白质分子基础, 第2版, 高等教育出版社, 北京, **1995**, p. 258.)
- Asakura, T.; Sugino, R.; Yao, J. M.; Takashima, H.; Kishore, R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4415.
- Yang, Y. H.; Shao, Z. Z.; Chen, X.; Zhou, P. *Biomacromolecules* **2003**, *5*, 773.
- Canetti, M.; Seves, A.; Secundo, F.; Vecchio, G. *Biopolymers* **1989**, *28*, 1613.
- Iizuka, E.; Yang, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1966**, *55*, 1175.
- Stevens, L.; Townend, R.; Timasheff, S. N.; Fasman, G. D.; Potter, J. *Biochemistry* **1968**, *7*, 3717.
- Schellman, J. A. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 323.
- Lu, Z. X.; Cui, T.; Shi, Q. L. *Applications of Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion in Molecular Biology*, Science Press, Beijing, **1987**, p. 74 (in Chinese). (鲁子贤, 崔涛, 施庆洛, 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用, 科学出版社, 北京, **1987**, p. 74.)
- Woody, R. W. *Methods Enzymol.* **1995**, 34.
- Cocchetti, P.; Monzani, E.; Alberghina, L.; Casella, L.; Martegani, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1383*, 292.
- Chen, X.; Knight, D. P.; Shao, Z. Z.; Vollrath, F. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14944.
- Zhou, L.; Chen, X.; Shao, Z. Z.; Zhou, P.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 337.
- Creighton, T. E.; Schmid, F. S. *Protein Structure: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, **1997**, Chapter 11, p. 261.
- Steiner, R. F.; Edelhoch, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *66*, 341.
- Magoshi, J. *Polymeric Materials Encyclopedia*, CRC Press, Florida, **1996**, p. 667.
- Zhou, C. Z.; Confalonieri, F.; Medina, N.; Zivanovic, Y.; Esnault, C.; Yang, T.; Jacquet, M.; Janin, J.; Duguet, M.; Perasso, R.; Li, Z. G. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2413.
- Klotz, I. M.; Franzen, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3461.
- Lakshmikanth, G. S.; Krishnamoorthy, G. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1100.
- Ozog, A.; Bechet, J. J. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 501.