羊毛角蛋白浓度对其双硫键重建的影响

杨 潇 林章碧 崔树勋*

(高分子材料工程国家重点实验室, 四川大学高分子研究所, 成都 610065. * 联系人, E-mail: cuisx@scu.edu.cn)

摘要 发现了从羊毛提取的角蛋白的浓度对其在透析过程中双硫键重建的影响, 即在较高浓度时角蛋白聚集体中形成交联网状结构, 而在较低浓度时优先形成分子内双硫键. 这项初步研究展示了在不加入其他化学试剂的条件下通过简单的方法调控角蛋白链间交联的可能性, 有助于构筑生物大分子的自组装体.

关键词 角蛋白 双硫键 重建

羊毛纤维由角蛋白分子通过多级组装形成, 是生物大分子自组装的范例 [1~3]. 对羊毛角蛋白的研究将深化对生物大分子自组装的认识. 羊毛纤维的结构由几种相互作用所稳定, 包括双硫键、氢键、盐键和范德华力. 像其他交联材料一样, 经双硫键交联的羊毛纤维不溶于普通溶剂 [4,5]. 从羊毛纤维中提取角蛋白的方法已有较多报道, 然而只有利用还原剂切断双硫键的方法才能完整地保留角蛋白的一级结构 [6]. 该还原法基于巯基-双硫键的交换反应 [7,8], 其他方法往往会使蛋白严重降解而只能得到无规的短肽.

通常采用还原法从羊毛纤维提取角蛋白时, 高浓度变性剂(如尿素和胍盐)是必需的 [6]. 在蒸馏水中透析除掉角蛋白溶液中的还原剂和变性剂会导致角蛋白形成白色聚集体 [4].

为了提高角蛋白溶液在没有还原剂和变性剂存在时的稳定性, 人们采用了许多方法来避免形成双硫键交联结构, 其中多数方法要对角蛋白链上的半胱氨酸残基进行化学修饰 [9~11]. 但是对角蛋白的化学修饰会使其失去作为自组装结构基元的能力. 为了保持这种能力, 不宜采用化学修饰的方法. 对角蛋白链间交联的控制被认为是理解角蛋白怎样自组装成羊毛纤维的重要一步. 本文报道在较低浓度下, 被还原的角蛋白链不易形成链间交联的网状结构, 其双硫键倾向于在链内形成.

用 0.2 mol/L的巯基乙醇, 6 mol/L盐酸胍, 在氮气的保护下采用还原法于50℃提取干净的白色羊毛 15 h. 因为尿素可发生水解产生氨, 使pH上升, 从而导致角蛋白降解, 所以本文使用胍盐作为变性剂 [12]. 滤掉不溶物, 即得透明稳定的角蛋白溶液. 因为角蛋白家族是由许多结构相近的蛋白组成, 所以被提取的角蛋白分子量分布较宽. 凝胶电泳的结果表明, 所提取的角蛋白中大部分的分子量在 6 万左右.

20 mL 的角蛋白溶液(浓度为 3.5 mg/mL)在 500 mL 的去离子水中进行透析以除去还原剂和变性剂. 保留液在 1 h 内从透明溶液变成乳状悬浊液. 如果延长透析时间, 由于透析过程中悬浊颗粒的尺寸明显增大, 悬浊液中最终会产生白色沉淀. 悬浊液的透过率(T%, 722E 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器公司)在 300~800 nm 范围内只是呈单调的递增趋势而没有明显的峰值. 为了分析双硫键的状态, 在 600 nm 处用透过率来监测悬浊液的浑浊程度随透析时间的变化, 如图 1 所示. 在 1 h 内快速的聚集使透过率从约 100%降低到约 15%.

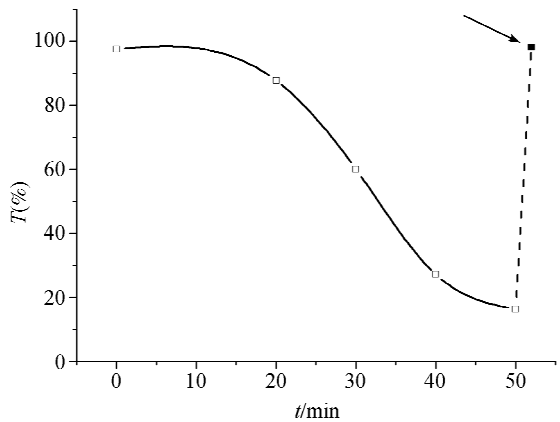

图 1 角蛋白溶液/悬浊液在 600 nm 的透过率随透析时间延长的变化情况(□)

当加入胍盐使其浓度达 6 mol/L 时, 在 2 min 内悬浊液重新变成透明溶液(■). 角蛋白浓度 3.5 mg/mL

2007-06-01 收稿, 2007-08-15 接受

国家自然科学基金(批准号: 20544003)和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

因为角蛋白主要由疏水性的氨基酸组成，其水溶性依赖于高浓度的变性剂 [5]. 为了研究变性剂对角蛋白悬浊液的影响，在悬浊液中加入胍盐使其浓度达到 6 mol/L. 结果悬浊液在 2 min内重新变得清澈透明，如图 1 的箭头所示. 这一快速重新溶解的过程说明在透析 1 h后聚集的角蛋白链间并没有明显的交联结构形成. 在没有变性剂存在的条件下，短时间透析造成的蛋白快速聚集沉淀是由角蛋白分子本身的疏水性引起的.

当透析时间延长后，我们发现了不同的结果. 在加入变性剂后，角蛋白悬浊液透过率起初增长很快，随后变得缓慢并最终达到平衡值. 达到平衡值的时间可超过 10 h. 我们发现如果透析时间延长到 6 h以上，即使在加入胍盐达到平衡后，角蛋白悬浊液也不能恢复到其初始透明的状态，并且透析的时间越长，恢复的程度越差，如图 2 所示. 和先前短时间透析的结果相比较，长时间透析后的透过率只能部分恢复. 我们推测是由于溶解氧对角蛋白链缓慢的氧化形成了链间交联结构 [5,13]. 为了证实角蛋白交联结构的形成，巯基乙醇(0.2 mol/L)和盐酸胍(6 mol/L)同时加入到经48 h透析的样品中，结果角蛋白悬浊液在短时间内变得完全透明. 这一结果证实了长时间透析后角蛋白链间双硫键的形成. 为了研究长时间透析后的疏水作用对角蛋白聚集的影响，我们在透析了24 h的样品中加入了盐酸胍和一种常见的表面活性剂，十二烷基磺酸钠(SDS，11.5 mg/mL，5 倍于其临界胶束浓度). 平衡后悬浊液的浑浊程度接近于只加入胍盐的样品. 这一结果表明长时间透析产生聚集体的主要结合力不是疏水作用，而是通过双硫键形成了交联结构.

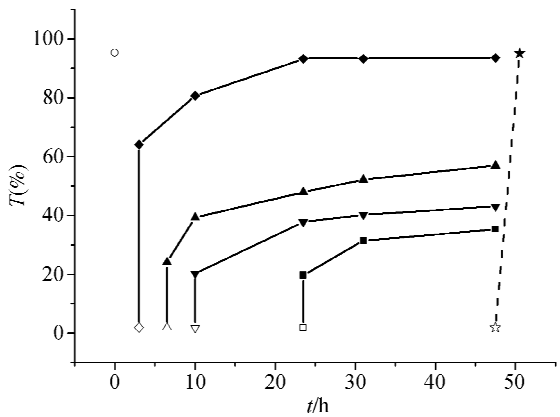

图 2　角蛋白溶液/悬浊液在 600 nm 的透过率随时间的变化情况(空心标记)

当加入胍盐使其浓度达到 6 mol/L 时，悬浊液的透过率(实心标记)逐渐增加至平衡值，其值低于透析前的透过率(○). 当还原剂和胍盐加入到经 48 h 透析的悬浊液中时，在 3 h 内聚集体完全被溶解(★). 角蛋白浓度 3.5 mg/mL

在以上的讨论中，我们认为角蛋白被溶解氧所氧化. 如果事实如此，那么透析环境的条件应该对结果有所影响. 我们于真空条件下进行长时间透析(透析液事先已用氮气除氧)，以尽量减少溶解氧的影响. 我们发现在悬浊液中加入胍盐后，在 2 h 内其透过率能恢复到约 90%，如图 3 所示. 这个结果清楚地表明，如果没有足够的氧，交联结构将很难形成. 当同时加入胍盐和还原剂后，透过率能恢复到 99%. 这两个实验结果的差别暗示了在所用的真空体系下仍然有微量的氧存在，从而导致一小部分巯基被氧化成链间双硫键. 这一发现还提供了一种通过调节透析环境的氧气分压来控制交联程度(即巯基和双硫键的比率)的方法.

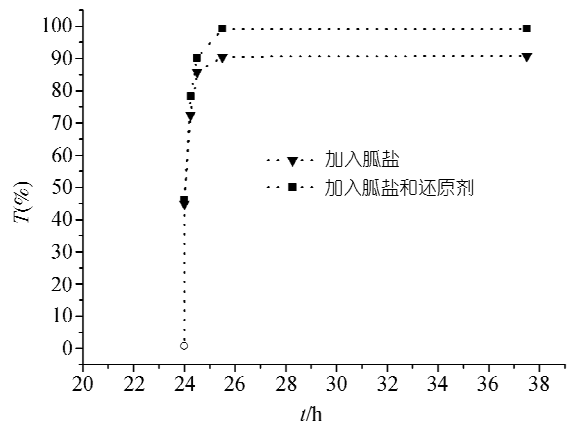

图 3　角蛋白溶液/悬浊液在 600 nm 的透过率随时间的变化情况

胍盐或者胍盐和还原剂一起分别加入到经 24 h 透析后的角蛋白样品中. 角蛋白浓度 3.5 mg/mL

为了研究角蛋白浓度对双硫键重建的影响，我们进行了相似的角蛋白提取实验，使角蛋白浓度较低(0.66 mg/mL). 透析后，溶液变成浑浊状态. 当加入胍盐到 6 mol/L 后，角蛋白悬浊液逐渐恢复成透明溶液. 在达到平衡后，较低浓度角蛋白的结果明显不同于较高浓度的情况，如图 4 所示. 我们发现在平衡值时，较低浓度的角蛋白溶液的透过率能恢复到很接近初始提取角蛋白溶液的水平. 延长透析时间达 48 h也能观察到相似的结果. 完全恢复的透过率表明

在角蛋白链间几乎没有交联. 应该注意到在角蛋白溶液中仍然存在溶解氧, 只要透析时间足够长, 它会将半胱氨酸氧化成双硫键. 因为在角蛋白链间几乎没有发生交联, 我们认为双硫键的重建应该发生在角蛋白链内, 所以在变性剂存在下氧化产物仍有较好的溶解性.

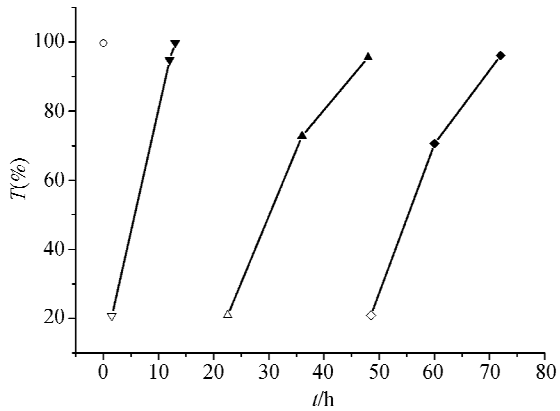

图 4 角蛋白溶液/悬浊液在 600 nm 的透过率随时间的变化情况(空心标记)

当加入胍盐使其浓度达到 6 mol/L 时, 悬浊液的透过率(实心标记)逐渐增加至平衡值, 并与透析前的透过率(○)相当接近. 角蛋白浓度 0.66 mg/mL

综上所述, 我们发现了角蛋白的浓度对其透析时双硫键重建的影响, 即在较高浓度时, 聚集体中易形成交联网状结构; 而在较低浓度时, 优先形成链内双硫键. 这项初步研究展示了在不加入其他化学试剂的条件下调控角蛋白链间交联结构的可能性. 本文的制备过程较为简单, 得到的角蛋白聚集体是无定形的. 然而我们相信这个领域更多的相关研究将指导有序结构的自组装, 从而揭示羊毛等天然纤维的组装秘密.

参 考 文 献

1 Plowman J E. Proteomic database of wool components. J Chromatogr B, 2003, 787(1): 63—76[DOI]

2 Strelkov S V, Herrmann H, Aebi U. Molecular architecture of intermediate filaments. BioEssays, 2003, 25(3): 243—251[DOI]

3 Feughelman M. Natural protein fibers. J Appl Polym Sci, 2002, 83(3): 489—507[DOI]

4 Schrooyen P M M, Dijkstra P J, Oberthuer R C, et al. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. J Agric Food Chem, 2000, 48(9): 4326—4334[DOI]

5 Schrooyen P M M, Dijkstra P J, Oberthuer R C, et al. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. J Colloid Interf Sci, 2001, 240(1): 30—39[DOI]

6 Yamauchi K, Yamauchi A, Kusunoki T, et al. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. J Biomed Mater Res Part A, 1996, 31(4): 439—444[DOI]

7 Fava A, Iliceto A, Camera E. Kinetics of the thiol-disulfide exchange. J Am Chem Soc, 1957, 79(4): 833—838

8 Fava A, Reichenbach G, Peron U. Kinetics of the thiol-disulfide exchange. Ⅱ. Oxygen-promoted free-radical exchange between aromatic thiols and disulfides. J Am Chem Soc, 1967, 89(25): 6696—6700

9 Woodin A M. Structure and composition of soluble feather keratin. Biochem J, 1956, 63: 576—581

10 Harrap B S, Woods E F. Soluble derivatives of feather keratin. 1. Isolation, fractionation and amino acid composition. Biochem J, 1964, 92: 8—18

11 Schrooyen P M M, Dijkstra P J, Oberthuer R C, et al. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. J Agric Food Chem, 2001, 49(1): 221—230[DOI]

12 Rajagopal S, Rajagopalan S, Iyer C S P. Thermal studies on ammonium uranates. J Therm Anal Calorim, 2000, 61(1): 99—105[DOI]

13 Liff M I, Zimmerman M N. NMR Study of crosslinking by oxidation of four-cysteine polypeptide models of the elastic network phase of wool fibre. Polym Int, 1998, 47(3): 375—385[DOI]