

丝胶蛋白质与铜(Ⅱ)的配位反应*

刘冠峰 陈文兴 傅雅琴

沈之荃

(浙江工程学院材料与纺织学院 杭州 310033)

(浙江大学高分子科学与工程系 杭州 310027)

摘 要 本文运用 pH 滴定、光谱法、电子自旋波谱、X 射线衍射研究丝胶蛋白质与铜(Ⅱ)的配位反应及其络合物的高次结构。当溶液的 pH>9.1 时,丝胶蛋白质与 Cu(Ⅱ)生成了稳定的络合物,此络合物具有拉伸八面体 $\text{Cu}(\text{N})_4(\text{OH}^-)_2$ 型配位结构,高次结构为无规卷曲非晶结构。

关键词 丝胶, Cu(Ⅱ)-蛋白质络合物, 配位结构, 高次结构

金属离子能和蛋白质分子中的羰基和亚胺基,以及侧基的羟基、胺基、巯基、羧基、咪唑基等供电子基团配位从而稳定或改变蛋白质的高次结构,使有关基团有一定的取向和环境,形成具有特定生物功能的配合物——金属蛋白和金属酶,它们在一系列生命过程,如氮的固定、光合作用、氧的输送及贮存、能量转换及许多酶催化反应中起着重要的作用。因此这一领域的研究颇为活跃^[1]。占蚕丝蛋白质总量约 25% 的丝胶蛋白质,在蚕丝加工过程中被全部废弃,这不仅浪费了宝贵的天然蛋白质资源,而且污染了环境。如何开发利用丝胶这一问题近来已引起人们的关注并有若干研究报道,如丝胶蛋白质的抗氧化活性^[2],丝胶蛋白质与氢氧化铜制成农作物杀菌剂^[3],而这些工作都与丝胶蛋白质和金属离子的络合物有关。本文作为蚕丝蛋白质金属络合物基础研究的一环,将探讨丝胶与 Cu(Ⅱ)在水溶液中的配位反应及其对蛋白质高次结构的影响。

1 实验部分

1.1 丝胶溶液提取

选取白净春茧茧层,在索氏脂肪萃取器中用乙醚萃取 48h,得脱脂茧层。脱脂茧层用蒸馏水煮沸 1h,滤去不溶物得丝胶溶液。用溶液干燥称重法求得丝胶重量浓度,根据丝胶氨基酸组成比例^[4],求得丝胶氨基酸平均残基分子量为 98,并将丝胶重量浓度换算成摩尔浓度。

1.2 丝胶与 Cu(Ⅱ)的配位反应

Cu(Ⅱ)-丝胶体系的调制:在 21 只样品试管中,各注入丝胶溶液 10mL, 0.02mol/L CuCl_2 溶

液 1mL、2.5mol/L KCl 溶液 1mL、0.05mol/L KOH 溶液 0~4mL(间隔 0.2mL),加蒸馏水至溶液的总体积为 25mL,各样品试管密闭后室温放置 24h,使配位反应达到平衡。丝胶对照体系的调制:另在 21 只样品试管中,除了不加 CuCl_2 外,其余组成和条件与 Cu(Ⅱ)-丝胶体系完全相同。

1.3 Cu(Ⅱ)-丝胶络合物粉末制备

将 pH=10.5 的 Cu(Ⅱ)-丝胶络合溶液放入半透膜袋,在常温下用相同 pH 值的氨水透析 1 天,然后送风吹干制成粉末。

1.4 测定

各溶液的可见吸收光谱用岛津 UV-240 型紫外分光光度计测定。Cu(Ⅱ)-丝胶络合溶液的电子自旋波谱(ESR)用日本 JES-FE1XG 型电子自旋共振仪在低温 -100℃ 测定,扫场范围 0.22~0.42T。丝胶粉末的 X 射线衍射强度曲线用日本理学 D/MAX-III B 型 X 射线多晶衍射仪测定,测定条件为 Ni 过滤的 Cu-K α 射线, $\lambda = 0.154\text{nm}$,管电流 25mA,管电压 40kV。

2 结果与讨论

图 1 是丝胶对照体系(a)和 Cu(Ⅱ)-丝胶体系(b)的 pH 滴定曲线,曲线(b)始终比(a)pH 值低,说明丝胶与 Cu(Ⅱ)的配位反应消耗了 OH^- 。若按每个 Cu(Ⅱ)离子消耗的 OH^- 计算,并相对于 pH 作图,结果如图 2 所示。从图 2 可知,当 pH>9.1 时每个 Cu(Ⅱ)离子约消耗 4 个 OH^- 。

不同 pH 值的 Cu(Ⅱ)-丝胶络合溶液的可见吸收光谱如图 3 所示。低 pH 时络合溶液呈淡绿色,放置容易出现凝胶或沉淀,因此可见光谱吸光

* 1999-11-25 收稿,2000-02-22 修稿;浙江省自然科学基金人才奖金资助项目(基金号 RC00047)

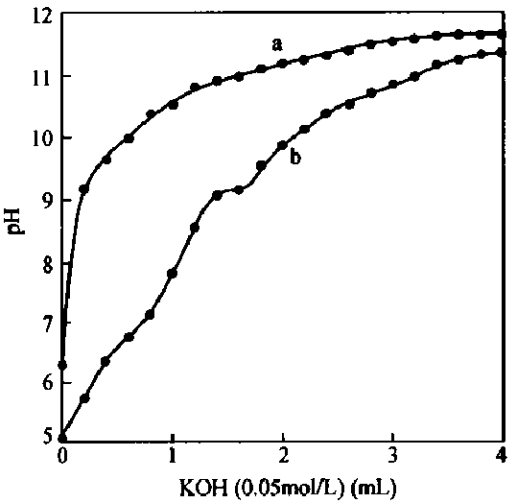


Fig. 1 pH Titrations of the silk sericin(a) and the Cu (Ⅱ)-silk sericin (b) systems at room temperature and $\mu = 0.1$ (KCl), $[Cu(Ⅱ)]_T/[Sericin\ residue]_T = 0.0812$, $[Sericin\ residue]_T = 9.856\text{ mmol/L}$

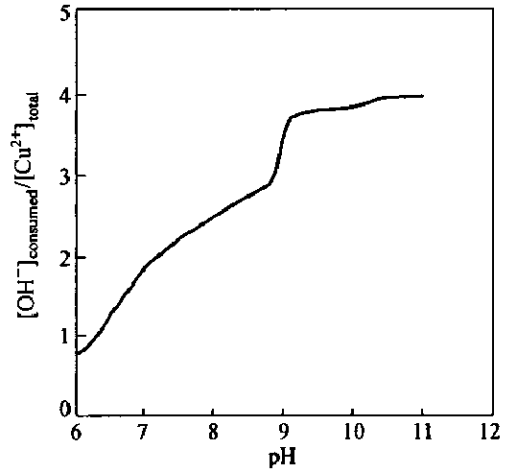


Fig. 2 Relationship between pH and consumed OH^- for the Cu (Ⅱ)-silk sericin systems at room temperature. and $\mu = 0.1$ (KCl), $[Cu(Ⅱ)]_T/[Sericin\ residue]_T = 0.0812$, $[Sericin\ residue]_T = 9.856\text{ mmol/L}$

度很大;随着 pH 值的增大吸收峰逐渐蓝移,溶液颜色向蓝紫色变化并逐渐加深;约当 $pH > 9.1$ 时,可见区吸收峰位于 540nm 左右,此 pH 值以上,吸收峰位置和吸光度基本不再随 pH 值的增大继续变化,这表明溶液此时形成了稳定的络合物.540nm 处的吸收峰归属为 $Cu(N)_4$ 结构的 $d-d$ 电子跃迁峰^[5]

$pH > 9.1$ 的 $Cu(Ⅱ)$ -丝胶络合溶液各样品的 ESR 波谱基本相同,如图 4 所示.图中显示 $Cu(Ⅱ)$ 的未成对电子以 $d_{x^2-y^2}$ 轨道为基态^[6],求得

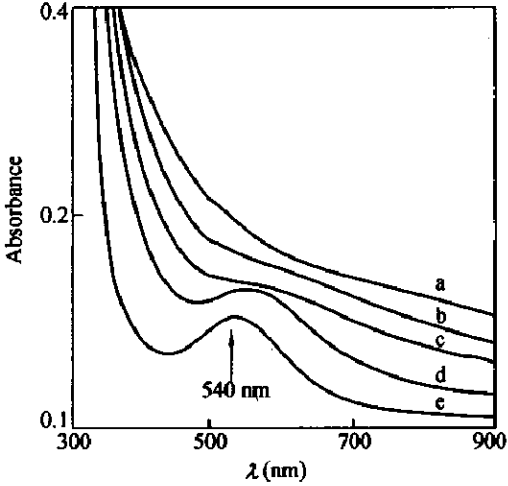


Fig. 3 Optical spectra of the Cu (Ⅱ)-silk sericin systems at room temperature and $\mu = 0.1$ (KCl), $[Cu(Ⅱ)]_T/[Sericin\ residue]_T = 0.0692$, $[Sericin\ residue]_T = 11.568\text{ mmol/L}$, 1.0 cm cell
pH:4.78 (a); 7.14(b); 7.50(c); 8.77 (d); 11.36(e)

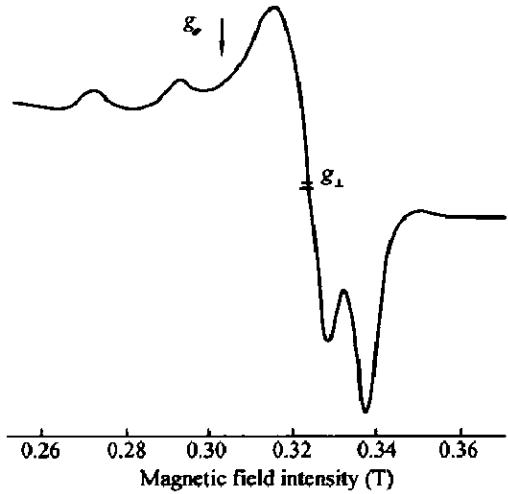


Fig. 4 ESR spectrum of the Cu (Ⅱ)-silk sericin complex solution at $pH = 10.58$ and $-100℃$

ESR 参量为: $g_{||} = 2.198$, $g_{\perp} = 2.056$, $A_{||} = 0.0206\text{ cm}^{-1}$, $\alpha^2 = 0.83$. 其中 $g_{||}$ 表示 g 张量在对称轴方向的主值, $g_{\perp}$ 表示 g 张量垂直于对称轴方向的主值, $A_{||}$ 表示超精细耦合张量 A 在对称轴方向的主值, α^2 表示 $Cu(Ⅱ)$ 的未成对电子在 d 轨道上的电子云密度,它根据公式 $\alpha^2 = (A_{||}/P) + (g_{||} - g_e) + 3/7(g_{\perp} - g_e) + 0.04$ 计算(g_e 表示自由电子 g 因子, $g_e = 2.0023$; P 为铜自由离子在基态的 $3d$ 电子和核之间的偶极-偶极相互作用能, $P = 0.036\text{ cm}^{-1}$)^[7]. ESR 参量反映了晶体场分裂与未偶电子非定域化等信息,它们与配位

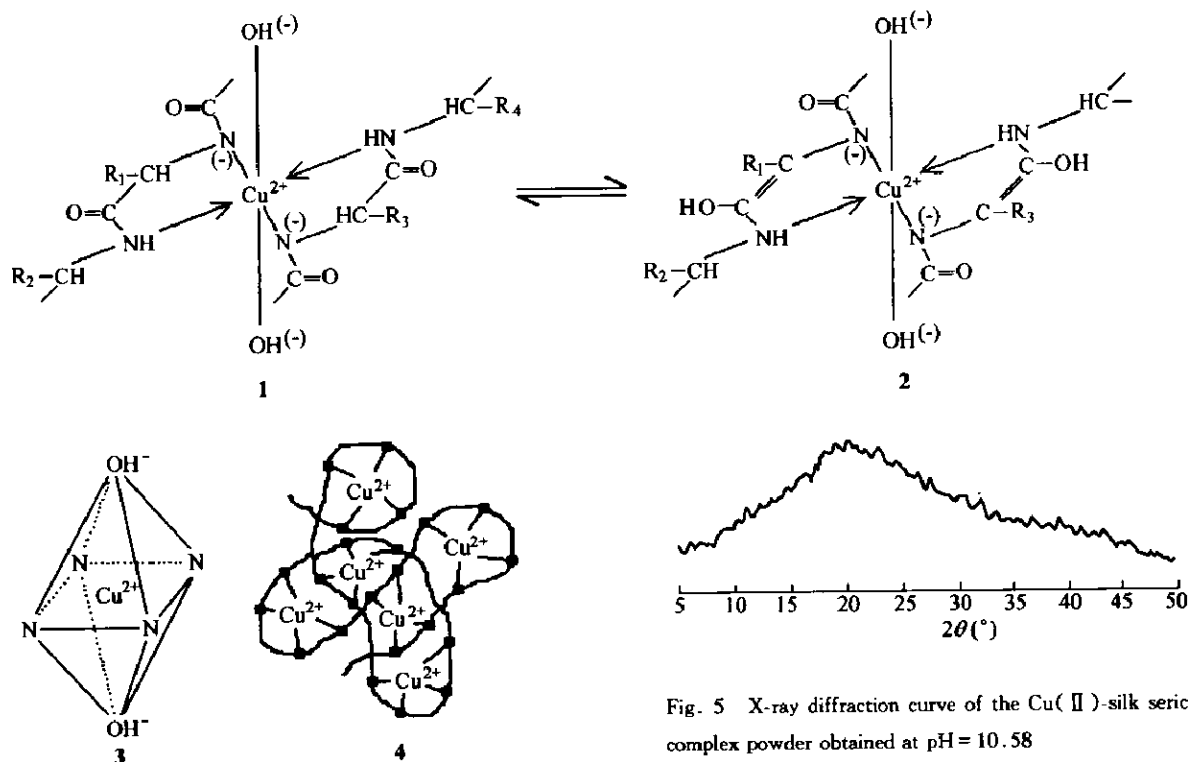


Fig. 5 X-ray diffraction curve of the Cu(II)-silk sericin complex powder obtained at pH=10.58

原子密切相关. 对众多已知结构络合物的数据归纳表明^[8]: 以氮为配位原子时 $g_{//} < 2.30$, $A_{//} > 0.016 \text{ cm}^{-1}$; 以氧为配位原子时 $g_{//} > 2.30$, $A_{//} < 0.018 \text{ cm}^{-1}$; 以硫为配位原子时得到异常小的 $A_{//}$ 值. Cu(II)-丝胶络合物的 $g_{//} = 2.198$, $A_{//} = 0.0206 \text{ cm}^{-1}$, 因此推断 Cu(II) 与 N 形成了配位, 与可见光谱的结果一致. α^2 反映配位键的性质: $\alpha^2 = 1$ 为 100% 离子键, 未成对电子全部定域在 Cu(II) 的 d 轨道上; $\alpha^2 = 0.5$ 为 100% 共价键, 未成对电子被 Cu(II) 和配体共享. Cu(II)-丝胶络合物的 $\alpha^2 = 0.83$, 说明该络合物的配位键具有一定的共价性.

根据上述实验结果, 可以认为当溶液的 pH 值约大于 9.1 时, Cu(II) 与丝胶形成了稳定的络

合物, 它们是丝胶肽链酰胺基的 N 螯合 Cu(II) 形成稳定的五圆环, 由于每个 Cu(II) 离子约消耗 4 个 OH^- , 提出如下 1 和 2 两种可能的结构式:

1 中含有羰基; 2 是 1 的烯醇式, 由于 $\text{Cu}-\text{NH}-\text{C}=\text{C}$ 形成共轭体系有利于络合物稳定, 所以 2 式也可能存在. Cu(II) 的 3d 电子为 9, 易产生 Jahn-Teller 变形使体系能量降低^[6], 所以 1 和 2 中 $\text{Cu}(\text{N})_4(\text{OH}^-)_2$ 的空间结构为拉伸八面体, 如 3.

Cu(II)-丝胶络合物粉末的 X 射线衍射曲线如图 5 所示, 显示为完全非晶结构, 而丝胶溶液送风吹干制得的丝胶粉末具有一定的 β 折叠结构和结晶度^[9], 说明丝胶大分子由于 Cu(II) 的架桥, 改变了其高次结构. Cu(II)-丝胶络合物的高次结构用式 4 示意.

REFERENCES

- 1 Ciardelli F, Tsuchida E, Wohrle D. *Macromolecule-Metal Complexes*. Berlin: Springer, 1996. 1~9
- 2 Kato N, Shoji A, Yamada H. *Bio Industry*, 1998, 15(4): 15~21
- 3 Duan Yafeng(段亚峰), Yang Xiaoyu(杨晓瑜). *Silk Monthly(丝绸)*, 2000, (1): 16~17
- 4 Kirimura J. *Bull Seric Expt Station Jpn*, 1962, 17: 447~522
- 5 Hojo N, Fukatsu F, Hayakawa T, Kondo Y. *J Jpn Chem Soc*, 1986, 108: 3358~3362
- 6 Chen Deyu(陈德余). *Chemistry(化学通报)*, 1992, (7): 20~25
- 7 Kivelson D, Neiman R. *J Chem Phys*, 1961, 35: 149~155
- 8 Lin Qingsong(林青松). *Chinese Journal of Magnetic Resonance(波谱学杂志)*, 1989, 6: 201~208
- 9 Chen Wenxing(陈文兴), Koyama T, Hanabusa K, Shirai H. *Kobunshi Ronbunshu*, 1994, 51(3): 167~171

COORDINATION REACTION OF SILK SERICIN PROTEIN WITH COPPER(Ⅱ)

LIU Guanfeng, CHEN Wenxing, FU Yaqin

(College of Materials & Textiles, Zhejiang Institute of Science & Technology, Hangzhou 310033)

SHEN Zhiquan

(Department of Polymer Science & Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract In order to develop and apply the silk sericin protein in functional polymeric materials, the coordination reaction of sericin with copper(Ⅱ) ion in aqueous solution is studied by measurements of pH titration and optical spectra, and the coordination structure of the formed complex at high pH as well as its higher order structure are investigated by electron spin resonance(ESR) spectra and X-ray diffraction. When the pH value is over 9.1 or so, each Cu^{2+} consumes about four OH^- ions, and the optical absorption band lies at 540nm, which indicate that the type of Cu^{2+} -protein biuret complex is formed. And the ESR spectrum shows that the unpaired electron of copper(Ⅱ) in the complex localizes in the ground state of $d_{x^2-y^2}$ orbit. So it is put forward such coordination structure as $\text{Cu}(\text{N})_4(\text{OH}^-)_2$, whose special structure is of stretchy octahedron. The X-ray diffraction pattern shows that the copper(Ⅱ)-silk sericin complex has an amorphous structure of random coil.

Key words Silk sericin, Copper(Ⅱ)-protein complex, Coordination structure, Higher order structure