

## 丝蛋白纤维机理的模型

### ——应力作用下丝蛋白构象的转变\*

于同隐 李光宪

(复旦大学材料科学系,上海,邮政编码: 200433)

#### 摘 要

本文用喇曼(Raman)光谱和 X-射线衍射等手段研究了桑蚕吐丝过程中丝腺体不同部位的丝蛋白的构象变化.发现随应力增加,从前部丝腺开始,丝蛋白产生了 $\beta$ -折叠构象.通过将丝蛋白直接在拉力机上拉伸,用 Raman 光谱等手段检测,详细研究了在不同拉伸条件下丝蛋白构象的变化,在微观层次上揭示了丝蛋白在应力作用下变性的全过程,并提出了相应的转变模型.

**关键词** 丝蛋白、丝腺体,应力作用、构象转变、喇曼光谱

桑蚕的吐丝纤维化过程与合成纤维纺丝过程有类似之处.后部丝腺分泌出丝蛋白液体,在中部和前部丝腺体内丝蛋白受到剪切应力和拉伸应力作用,经吐丝口吐出成为固体丝.丝蛋白分子量虽高达约30万,但蚕的吐丝速度和压力却很低<sup>[1]</sup>.目前对这一过程仍缺乏认识. Iizuka<sup>[2]</sup>曾系统地研究了再生丝水溶液的流变行为,发现在高速剪切速率下,溶液粘度骤增,体系中出现三维结构. Yamura<sup>[3]</sup>进一步研究了不同搅拌速率下再生丝水溶液中生成的结晶纤维的结构和产率,发现搅拌后的丝蛋白构象由无规线团转变为 $\beta$ -折叠构象.但迄今为止,有关蚕丝和丝蛋白纤维化机理的研究工作多以生丝和丝蛋白水溶液作为研究对象,故无法了解在蚕吐丝过程中丝蛋白在丝腺体内的结构及其变化情况,对在应力作用下丝蛋白的构象变化是如何发生和进行的,受到哪些因素的影响,仍不清楚.

在前文[4]中,我们研究了中部丝腺体中丝蛋白的结构和形态.在本文中,我们将研究和讨论在蚕吐丝过程中丝腺体内丝蛋白的构象变化,在此基础上采用模拟蚕吐丝的方法,将丝腺体内丝蛋白取出后直接在拉力机上以不同的条件拉伸,并用喇曼(Raman)光谱和广角 X-衍射(LAXS)等方法检测其构象相应的变化,以便深入了解和研究丝蛋白在应力作用下构象变化的详细情况及影响因素,作为丝蛋白纤维化的过程是蛋白质应力变性过程在微观结构水平上的证明.

## 实 验 部 分

### 1. 试样制备

桑蚕品种为浙12×苏1,浙江农业大学提供.将开始吐丝的熟蚕解剖,取出丝腺体.丝

\* 1991年6月18日收到,国家自然科学基金资助项目

腺体内丝蛋白样品的制备同文献[4]. 试样呈粘稠胶状态, 丝蛋白浓度约25—28%. 脱胶生丝的制备见文献[3]. 在进行模拟蚕吐丝过程研究时, 将用上述方法得到的中部丝腺中新鲜试样(直径约2—2.5mm, 长20—30mm)在 Instron 拉力机上以不同拉伸速率拉伸至所需倍数, 温度25℃. 拉伸后的试样立即固定在事先准备好的玻璃样品框架上, 随即用 Raman 光谱和 LAXS 进行观察记录, 并进行比较.

## 2. 测试

(1) Raman 光谱 Spex 1403 激光 Raman 仪, 氩离子激光器 (Spectra Physics, Model Sp-164), 记录范围  $800—1800\text{cm}^{-1}$ , 分辨率  $5\text{cm}^{-1}$ .

(2) LAXS Rigaku D-Max/Rb 型 X-射线衍射仪,  $\text{CuK}\alpha$  靶, 电压40kV, 电流100mA. 纤维样品架, 记录范围  $5—40^\circ$ .

(3) 双折射测定用 Leitz 公司 Orthoplan-pol 偏光显微镜, Tilting Compensator B 测定.

## 结 果 与 讨 论

Tab. 1 The birefringence of silk fibroin in different part of silk gland

sample	middle gland		anterior gland	silk fiber
	middle region	anterior region		
Birefringence $\times 10^3$	1.4	1.9	2.5	6.3

### 1. 吐丝过程中丝腺体不同部位的丝蛋白构象及变化

丝蛋白在中部丝腺和前部丝腺体内受到的剪切速率相差几个数量级(中部丝腺体内  $3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ , 前部丝腺内  $4 \times 10^2—2 \times 10^3\text{s}^{-1}$ [5]), 在这样的条件下, 丝蛋白构象会发生何种

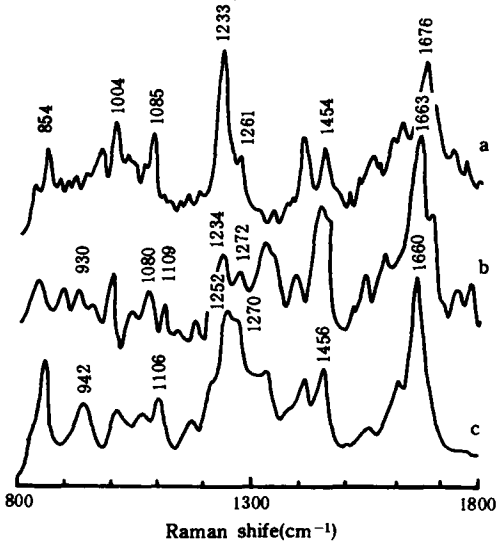


Fig. 1 Raman spectra of a) degummed silk fiber, b) silk fibroin in anterior silk gland and c) silk fibroin in middle silk gland

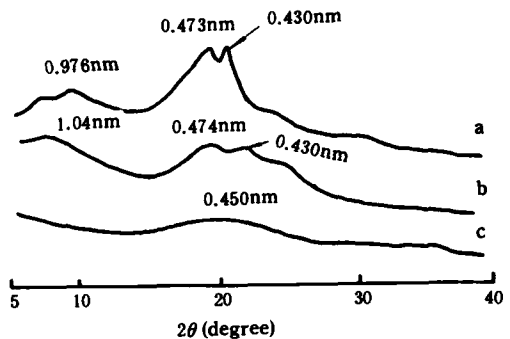


Fig. 2 LAXS patterns of a) degummed silk fiber, b) silk fibroin in anterior silk gland and c) silk fibroin in middle silk gland

变化?图1是中部丝腺,前部丝腺和生丝的 Raman 谱. 从中可看到中部丝腺中丝蛋白主要为无规线团(1252、1660 $\text{cm}^{-1}$ [4,6])和  $\alpha$ -螺旋构象(942、1106和1270 $\text{cm}^{-1}$ [4,6,7]). 而前部丝腺丝蛋白在 Amide III 区域出现了1234 $\text{cm}^{-1}$ 新谱带,另一新谱带1080 $\text{cm}^{-1}$ 出现在又一构象敏感区域900—1100 $\text{cm}^{-1}$ 内,这些均为  $\beta$ -折叠构象特征谱带[4,6,7];其在 Amide III 区域中的无规线团谱带强度减弱,难以分辨,表明在较高的应力作用下丝蛋白构象发生了由无规线团向  $\beta$ -折叠构象的转变. 经蚕吐丝口吐出的丝受到的剪切和拉伸应力作用更大,因此生丝(图1a)的  $\beta$ -折叠构象谱带强度显著增加(1085、1233、1676 $\text{cm}^{-1}$ [6,7]),而相应的无规线团和  $\alpha$ -螺旋谱带强度明显下降或消失. 这些结果表明,沿蚕吐丝方向,丝蛋白在挤出进程中受到的应力作用,使其构象发生了转变,由无规线团,  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠构象转化,转变的程度随所受应力的增加而提高. 图2是 LAXS 结果,可以看到前部丝腺试样和生丝都存在  $\beta$ -折叠的结晶衍射峰(0.430nm和0.473nm)[8,9],与 Raman 光谱的结果一致. 表1是丝腺体不同部位丝蛋白双折射值,沿吐丝方向,丝蛋白双折射值逐步增加,说明

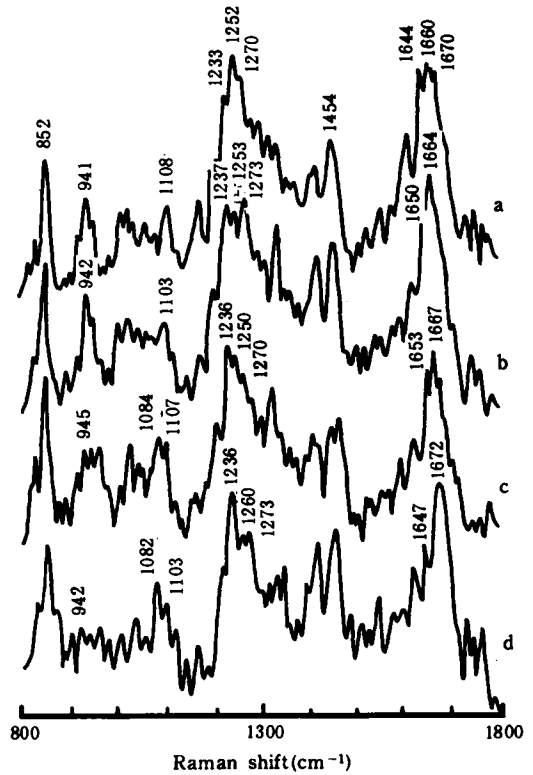


Fig. 3 Raman spectra of drawn silk fibroin Drawing ratio: a)R=4, b)R=7, c)R=10, d)R=15 Drawing rate: 500mm/min

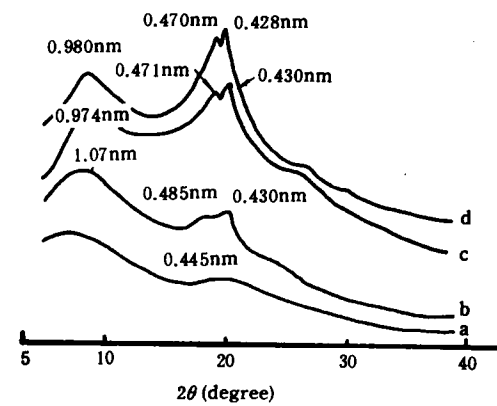


Fig. 4 LAXS patterns of drawn silk fibroin Drawing ratio: a)R=0, b)R=10, c)R=15, d)silk fiber

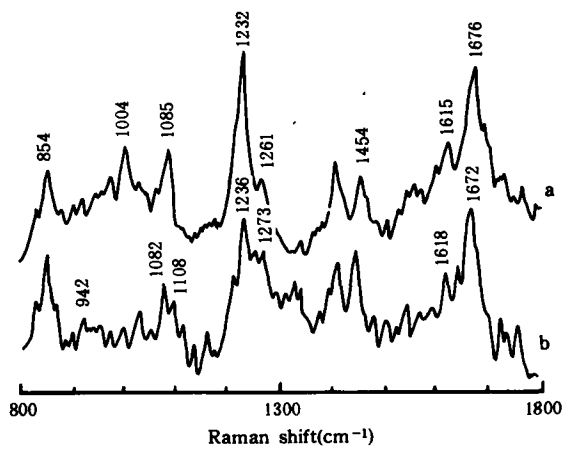


Fig. 5 Raman spectra of a)degummed silk fiber, b)drawn silk fibroin Drawing ratio: R=15, Drawing rate: 500mm/min

在应力作用下,丝蛋白不仅构象发生变化,其取向程度也逐步提高.

### 2. 桑蚕吐丝过程的模拟研究

由于试样制备的困难和实验条件的局限,用上述方法难以深入、全面地了解应力作用下丝蛋白构象变化的全过程及其影响因素.为此,我们采用了直接在拉力机上拉伸丝蛋白,用 Raman 光谱等检测手段,较为全面地研究了丝蛋白在不同拉伸条件下的构象变化.

(1)拉伸比的影响 首先测定了在500mm/min(与蚕实际吐丝速率约600mm/min 接近)拉伸速率下,试样被拉伸不同倍数后丝蛋白构象的变化(图3). 随拉伸倍数增加,在 Amide III 区域,1233—1236 $\text{cm}^{-1}$ 谱带强度逐渐增加,而1252及1270 $\text{cm}^{-1}$ 附近谱带强度逐渐减弱.表明丝蛋白构象从无规线团、 $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠构象转变<sup>[6]</sup>. 在另一个对构象变化敏感区域900—1100 $\text{cm}^{-1}$ 也可以发现同样规律: $\alpha$ -螺旋特征谱带强度下降,而  $\beta$ -折叠特征谱带强度随拉伸比增加而上升.这些结果与前面讨论的丝蛋白在丝腺体内的构象变化情

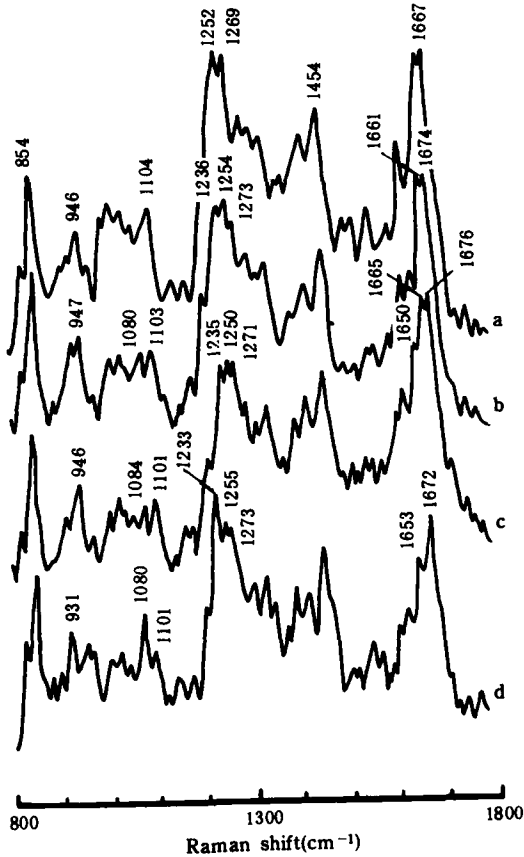


Fig. 6 Raman spectra of drawn silk fibroin  
Drawing ratio: a)  $R=4$ , b)  $R=7$ ,  
c)  $R=12$ , d)  $R=16$   
Drawing rate: 300mm/min

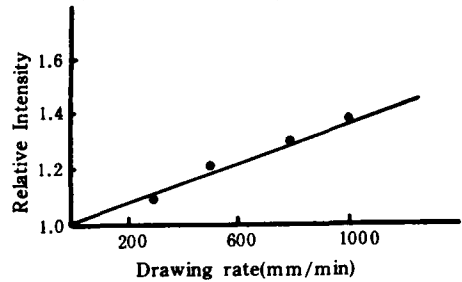


Fig. 7 Effect of drawing rate on the intensity of  $\beta$ -sheet band 1233—1236 $\text{cm}^{-1}$

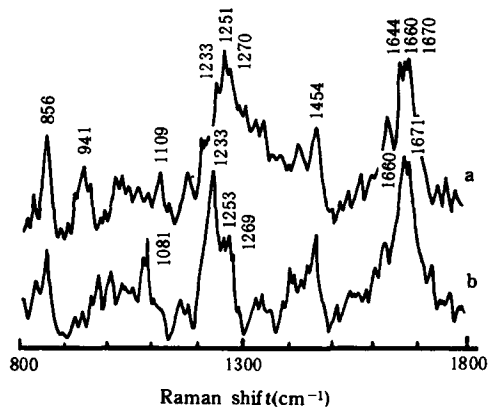


Fig. 8 Effect of water on conformation transition  
a) normal sample (containing about 25% silk fibroin),  
b) "dry" sample (containing about 38% silk fibroin)  
Drawn to  $R=4$  at a 500 mm/min rate

况十分类似,说明桑蚕吐丝纤维化的实质是应力导致的构象变化. 构象由无规线团,  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠转化. 若以  $1454\text{cm}^{-1}$  谱带为内标, 用 Pezolet 方法<sup>[10]</sup>可以估算出拉伸倍数为15时,  $\beta$ -折叠的含量约为37%. 上述构象转变过程同样反映在 LAXS 结果中(图4). 随拉伸比增加, 试样中出现了  $\beta$ -折叠特征峰  $0.430\text{nm}$ , 且强度也有所增加. 与此同时, 拉伸试样的双折射值由未拉伸时的  $1.4 \times 10^{-3}$  上升至  $4.4 \times 10^{-3}$  (拉伸15倍), 表观取向度 ( $\pi = \frac{180^\circ - H}{180^\circ} \times 100\%$ ,  $H$  为半峰宽, 由试样 X-衍射峰强度分布曲线测得, 图略) 也从未拉伸试样的约40%增加至90%,

表明试样分子链的有序程度也随拉伸比增加而提高. 拉伸样品与实际蚕吐出的丝的一个主要差别是前者仍保留有强度较弱的  $\alpha$ -螺旋谱带(图5). 这是由于受拉伸条件限制, 达不到蚕实际吐丝时所能达到的拉伸比所致. 实验中还发现, 拉伸速率为  $500\text{mm}/\text{min}$  时, 临界拉伸比为4, 低于此值则观察不到  $\beta$ -折叠构象的产生.

(2) 拉伸速率的影响 当拉伸速率改为  $300\text{mm}/\text{min}$  时, 丝蛋白的 Raman 谱有类似规律(图6): 随拉伸倍数增加, 无规线团和  $\alpha$ -螺旋的特征谱带强度下降,  $\beta$ -折叠谱带强度上升, 但是临界拉伸比数值增大至7. 若拉伸倍数不变, 则 Amide III 区域中的  $1233-1236\text{cm}^{-1}$   $\beta$ -折叠谱带强度随拉伸速率增加而提高(图7), 反映了拉伸速率对构象转变, 生成  $\beta$ -折叠构象的影响: 拉伸速率越高, 构象转变程度越大,  $\beta$ -折叠含量越多.

(3) 试样中水份对构象转变的影响 试样中存在的水份对构象转变的影响较大(图8). 在同样拉伸倍数下, 丝蛋白浓度为38%(将25%丝蛋白浓度的试样放置一段时间, 使其水份挥发至所需浓度)的试样拉伸后,  $\beta$ -折叠谱带( $1086, 1233\text{cm}^{-1}$ )强度比一般试样(丝蛋白含量约25%)的上述谱带高许多. 这可能是由于水在丝蛋白构象转变中起了类似于高聚物加工中增塑剂的那种作用. 水分子的存在削弱了大分子间的相互作用, 使分子链易于活动. 水份少的试样由于缺少这种“增塑”作用, 拉伸至同样倍数时分子链受到的应力作用较大(图9), 从而导致更多的  $\beta$ -折叠构象的形成.

### 3. 应力条件下丝蛋白构象转变模型

仔细分析拉伸试样在 Amide III 区域中谱带的变化, 可以对丝蛋白在应力作用下的构象转变过程获得更深入的认识(图10). 图中尽管试样的拉伸速率不同, 但 Amide III 区域中谱带的强度变化呈现共同的规律: 随拉伸倍数增加, 总是无规线团谱带( $1250-1260\text{cm}^{-1}$ )强度首先减弱,  $\beta$ -折叠谱带( $1233-1236\text{cm}^{-1}$ )强度相应增加, 然后随拉伸比进一步提高,  $\alpha$ -螺旋谱带( $1270-1273\text{cm}^{-1}$ )强度才随之减弱. 这表明最初的  $\beta$ -折叠构象主要是试样中原有的无规线团那部分的贡献.  $\alpha$ -螺旋由于较强的分子内氢键作用, 只有在受到较大应力下才被破坏, 向  $\beta$ -折叠转化. 在更高的应力条件下(经吐丝口吐出的丝蛋白, 图10中的生丝),  $\alpha$ -螺旋构象全被破坏, 只有  $\beta$ -折叠和无规线团存在构象, 可以认为其中的

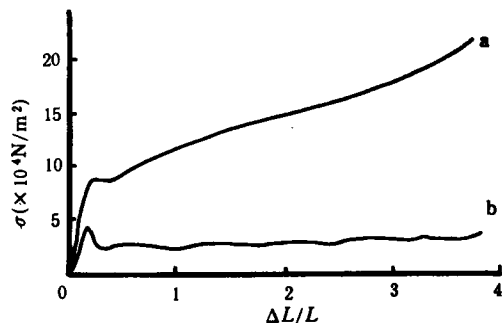


Fig. 9 Stress-strain curve of silk fibroin

a) "dry" sample (containing about 38% silk fibroin)  
b) normal sample (containing about 25% silk fibroin)

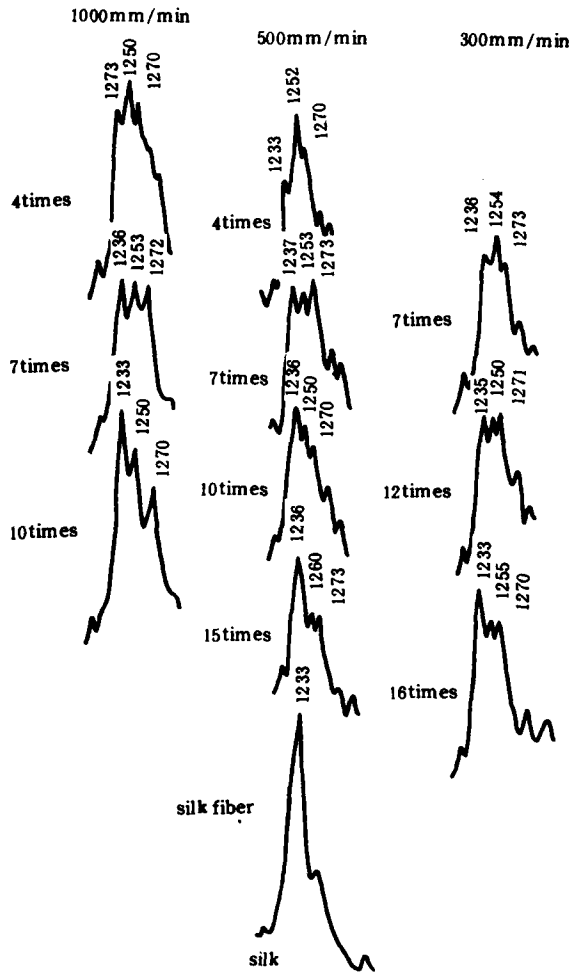


Fig. 10 Raman spectra, effect of drawing ratio and rate on the relative intensity of Amide I band of silk fibroin

无规线团主要是被破坏了的 $\alpha$ -螺旋部分。

根据在前文[4]中提出的分子模型和上述讨论,丝蛋白在应力作用下发生构象转变的历程可描述如下(图11,以拉伸速率500mm/min试样为例):

未拉伸时,试样(图11a)中丝蛋白分子链呈折叠状,折叠部分为无规线团, $\alpha$ -螺旋包含在伸直部分中.在应力作用下,分子链折叠部分被拉开,无规线团发生有序排列,转为 $\beta$ -折叠(图11b),此时由于拉伸比不大, $\alpha$ -螺旋部分由于分子内氢键作用而基本保持不被破坏.随拉伸比进一步增加(图11c), $\alpha$ -螺旋的分子内氢键被破坏,一部分转为无规线团,一部分进一步形成 $\beta$ -折叠构象.经蚕吐丝口吐出的丝由于受到很高切变应力作用,拉伸了很大倍数,故 $\alpha$ -螺旋全被破坏,分子链中只存在 $\beta$ -折叠和无规线团两部分(图11d).

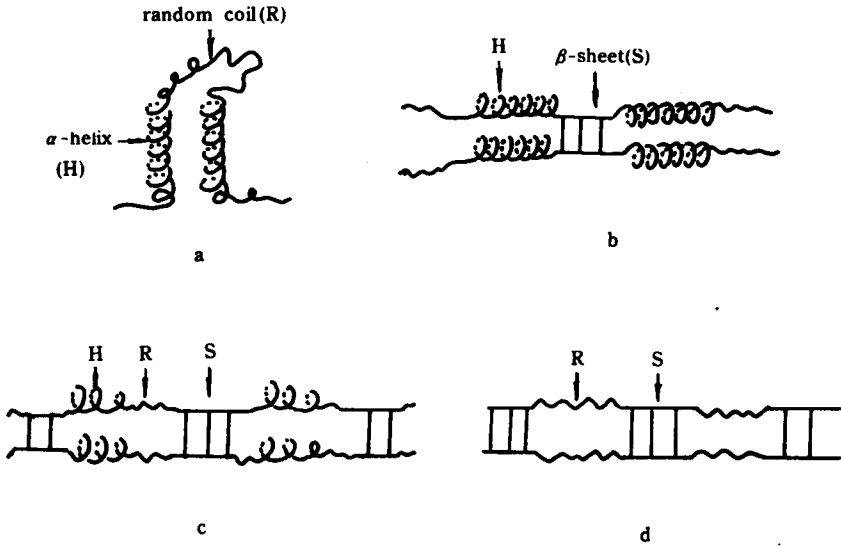


Fig. 11 Model of conformation transition of silk fibroin under stress  
 Drawing ratio: a)  $R=0$ , b)  $R=4$ , c)  $R=4-15$ , d) degummed silk  
 Drawing rate: 500 mm/min

### 参 考 文 献

- [1] Iizuka, E., *Proc. 7th Int. Wool Textile Research Conference*, 1985, 1, 319
- [2] Iizuka, E., *Biorheology*, 1966, 3, 141
- [3] Yamaura, K., *J. Macromol. Sci-Phys.*, 1982, B21(1), 46
- [4] 李光宪、于同隐, *科学通报*, 1989, 21, 1656
- [5] Iizuka, E., *Experientia*, 1983, 39, 449
- [6] Zheng, S., LI, G., Yu, T., *Applied Spectroscopy*, 1989, 43(7), 1269
- [7] Tu, A. T., *Raman Spectroscopy in Biology, Principles and Applications*, John & Wiley, New York, 1982, 66
- [8] Bhat, N. V., Ahirrao, M., *J. Polym. Sci., Chem. Ed.*, 1983, 21, 1273
- [9] Magoshi, J., Magoshi, Y., Nakamura, S., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 1981, 19, 185
- [10] Pezolet, M., Pigeon-Gosselin, M., Coulombe, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 453, 502

## A MODEL OF THE FIBRILLIZATION MECHANISM OF SILK FIBROIN THE CONFORMATIONAL TRANSITION OF FIBROIN BY STRETCHING

YU Tongyin, LI Guangxian

*(Department of Material Science, Fudan University, Shanghai, Post code: 200433)*

### ABSTRACT

In this paper, the conformational transition of silk fibroin in different parts of silkgland was determined by Raman spectroscopy and LAXS. It was discovered that the  $\beta$ -sheet conformation of fibroin came into being gradually when the stress was increased. By stretching the fresh fibroin directly with Instron, their conformational transitions were studied by Raman spectroscopy. The denaturing process of silk fibroin under stress was revealed on microscopic levels, and a relevant model was made.

**Key words** Fibroin, Silkgland, Stress, Conformational transition, Raman spectroscopy