

# 丝胶蛋白分子结构及其制取条件\*\*

张瑶琴, 陈忠敏, 张艳冬, 陈鹏

## Structure and extraction conditions of sericin protein

Zhang Yao-qin, Chen Zhong-min, Zhang Yan-dong, Chen Peng

College of Chemical and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China

Zhang Yao-qin★, Studying for master's degree, College of Chemical and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China

Correspondence to: Chen Zhong-min, Professor, Doctor, College of Chemical and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China  
chenzhongmin@cqu.edu.cn

Supported by: a grant by Chongqing Municipal Education Department, No. KJ090624\*

Received: 2010-08-17  
Accepted: 2010-11-07

重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆市400050

张瑶琴★, 女, 1986年生, 湖北省仙桃市人, 汉族, 重庆理工大学药学与生物工程学院在读硕士, 主要从事生物材料研究。

通讯作者: 陈忠敏, 教授, 博士, 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆市400050  
chenzhongmin@cqu.edu.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2011)03-00468-05

收稿日期: 2010-08-17  
修回日期: 2010-11-07  
(20100817007/GW\*Y)

### Abstract

**BACKGROUND:** Sericin has been widely used as a biomaterial. The properties and function of sericin may be changed with different extraction methods and conditions, thus affecting the biological properties.

**OBJECTIVE:** To observe the changes of sericin molecular conformation using different materials and under different preparation conditions.

**METHODS:** Sericin protein was extracted under the same extraction conditions from cocoon shell (Jk1, Jk2, Jk3) and cocoon outer floss (Jy4), respectively. Sericin protein peptide from cocoon shell (Jkmj5) was prepared by neutral proteinase. It was characterized by the molecular weight determination, infrared spectroscopy, amino acid composition and content measurement, solubility test, respectively

**RESULTS AND CONCLUSION:** When sericin extracted from cocoon shell and cocoon outer floss, there were significant differences in molecular weight determination, amino acid composition and content measurement. The molecular weight determination of Jk1, Jk2, Jk3 was about 66 200-130 000, respectively, while that of the Jy4 was about 43 000-130 000. The aspartic acid, serine, threonine and glycine contents decreased, while glutamic acid and lysine increased significantly in sericin extracted from cocoon outer floss compared with that extracted from cocoon shell. By the infrared spectroscopy, Jk1, Jk2, Jk3, Jy4 were mostly  $\alpha$ -helix structure type, and the random coil structure increased in Jy4. The dissolving property of Jy4 was almost twice that of Jk1, Jk2, Jk3. Jkmj5 was the structure of corners and random coil mainly. The sericin protein extracted on the same extraction materials and conditions has similar composition and stable properties.

Zhang YQ, Chen ZM, Zhang YD, Chen P. Structure and extraction conditions of sericin protein. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):468-472. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 丝胶作为生物材料被广泛应用,但在各种不同提取方法和条件下,其性状会发生变化,有可能会影响其生物学性能。  
**目的:** 观察不同原料和制备条件下丝胶分子构象的变化。

**方法:** 采用同等提取条件从蚕茧壳、茧衣中提取丝胶蛋白质(Jk1, Jk2, Jk3及Jy4),同时采用中性蛋白酶酶解制备了小分子丝胶蛋白肽(Jkmj5),并进行红外光谱、氨基酸组成与含量检测、水溶性测试。

**结果与结论:** 提取丝胶原料分别为茧壳和茧衣时,其丝胶的相对分子质量分布范围、氨基酸组成及含量均有差异。从茧壳中提取出的丝胶Jk1, Jk2, Jk3相对分子质量主要分布在66 200~130 000之间,而茧衣中提取出的丝胶Jy4相对分子质量主要分布在43 000~130 000范围内;茧衣丝胶粉与茧壳丝胶粉相比其氨基酸中的天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸的含量有所降低,谷氨酸、赖氨酸大幅增加。红外光谱图显示茧衣丝胶比茧壳丝胶更多的以“无规”卷曲结构为主,茧衣丝胶的溶解率几乎为茧壳丝胶溶解率的2倍,小分子蛋白肽Jkmj5为转角结构和“无规”卷曲结构。结果表明,在同等原料和条件下提取的丝胶结构组成、性能基本一致。

**关键词:** 丝胶蛋白; 提取条件; 红外光谱; 氨基酸含量; 分子构象

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.03.022

张瑶琴, 陈忠敏, 张艳冬, 陈鹏. 丝胶蛋白分子结构及其制取条件[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3):468-472. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

蚕丝蛋白是人类利用很早的天然蛋白质之一,组成成分为丝胶(质量分数占20%~30%)和丝素(质量分数占70%~80%),其作为性能优良的纤维材料而一直被应用在纺织业。近年来,有较多学者进行了蚕丝蛋白应用于生物医用材料的研究,开发蚕丝蛋白的新功能。但研究主要是集中于丝素,因为丝素是纤维状蛋白质,结构较为简单,就一级结构而论,经常出现一些序列相同或相似的重复肽段,二级结构

也几乎是单一的,很少有转角、环状和“无规”卷曲结构,开发和利用都比较容易达成。而丝胶是球状蛋白质,结构极为复杂。

球状蛋白质带有极性残基的氨基酸含量高,形成三级结构时,一些相对规则的 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠分布到了球状蛋白质内部并压积得很紧,致使蛋白质成为致密结构,而那些连接的 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠的规整性相对差一些的二级结构,转角和环状以及特定的“无规”卷曲,更多地分布在外周。同时,球状蛋白质的立体结构在X射线衍射分析的时候,发现在空间上肽链还可以被分为几个相对独立的部分,即结构域。结构域

间可由一段一定长度的肽段连接, 存在一定空间的缝隙, 使结构域间能做相对运动。相当多的结构域部位还具有局部而不完全的功能, 多结构域蛋白质活性是不同域结构的活性总和, 结构域的相互作用会导致整个蛋白质分子的变构效应, 若结构域发生变化将导致整个蛋白质性能或多或少的改变<sup>[1]</sup>。这样的结构使球状蛋白质具有独特的生物活性。丝胶即具有如此复杂的结构, 表面氨基酸残基和环境的易变性, 也使其在被开发的过程中出现阻碍, 制约其被开发为生物材料。

从丝胶蛋白的组成结构来看, 作为一种优质的球状蛋白质资源, 其降解特性、凝胶-溶胶转化特性优于丝素蛋白, 可用作特定范围的生物材料, 优势明显。但丝胶绝大部分是在煮茧、缂丝以及缂丝副产品加工、绢纺制棉、丝绸精炼等工序中随着生产废水被排放的, 其资源流失率在25%以上, 为直接影响桑蚕丝绸产业生产成本的重要因素之一。含有大量丝胶蛋白质资源的废水流入河道还会造成严重的富氧化水质污染。将丝胶开发利用于生物材料领域, 意义重大。

部分文献综述了丝胶作为生物材料应用的可行性及广泛性<sup>[2-3]</sup>。现今将丝胶用做生物材料的研究很多, 但由于丝胶的性能环境可变性, 在各种不同的丝胶提取方法和条件下, 其性状就有所不同的, 按照结构决定性能一说, 其性状发生改变, 可能会影响其生物学性能。本文即对提取丝胶的不同原料、制取条件与内部结构变化间的关系进行探索, 用相对固定的提取条件从茧壳和茧衣中提取丝胶, 同时酶解制备小分子丝胶蛋白肽, 观察分析不同原料和制备条件对其分子构象变化的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 蚕丝胶蛋白的分子构象变化。

**时间及地点:** 于2010-03/07在重庆理工大学药学与生物工程学院生物材料实验室完成。

**材料:** 茧壳、茧衣由重庆纤维检验所提供, 为下、次茧混合蚕茧。Tris碱、SDS、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、三羟甲基甘氨酸、考马斯亮蓝R-250、溴酚蓝均为Sigma公司分装,  $\beta$ -巯基乙醇、甲醇、乙醇、冰乙酸、戊二醛、甘氨酸、甘油、盐酸、氨水等均为市售分析纯, 未作处理直接使用。中性蛋白酶购自南宁庞博生物工程有限公司。

**实验方法:**

**丝胶的提取:** 用蒸馏水将茧壳或茧衣清洗晾干, 按浴比为1:30用600 mL乙醚浸泡48 h(24 h时中途更换乙醚1次)除蜡质物, 洗净、摊晾干燥; 将干燥茧壳和茧衣用无水乙醇在室温下浸泡24 h除去部分有机物和杂质, 蒸馏水洗净后室温下摊晾干燥备用。

按照质量比为1:40的比例, 分别将茧壳和茧衣放

入蒸馏水中煮沸脱胶, 取小样用苦味酸胭脂红检测至茧丝变黄, 即丝胶脱净。将所得丝胶溶液两等分, 其中一份经浓缩、摊晾干燥后即为丝胶蛋白粉末试样, 另一份以溶液状备用。

**丝胶蛋白质的酶解:** 将经上述方法从茧壳中提取的丝胶溶液进行酶解。按照文献[4]的方法, 采用中性蛋白酶进行酶解。具体操作步骤: 按照丝胶蛋白:酶质量比为10:1的比例加入蛋白酶, 调节pH值和温度到中性蛋白酶最大活性条件, 搅拌水解2 h后, 在-40 °C冻库中让酶失活停止反应。用全玻璃微孔滤膜过滤器(GN-CA滤膜、孔径0.45  $\mu\text{m}$ )过滤, 滤液用旋转蒸发器在50 °C下浓缩、摊晾干燥后即得到酶解后的丝胶蛋白肽粉末。

中性蛋白酶酶解实验温度及pH值条件:  $t=50\sim 55$  °C,  $\text{pH}=6.0\sim 7.0$ 。

**溶解性的测定**<sup>[5]</sup>: 称取1 g丝胶粉, 将其配成质量百分比为10%的悬浮液, 于25 °C中振荡保温1 h后, 再在4 000 r/min转速下离心40 min, 然后将上清液置于培养皿中烘干, 称取溶出蛋白的质量, 按照以下公式算出其溶解率。

$$\text{溶解率}(\%) = \frac{\text{溶出蛋白的质量}}{\text{样品蛋白质量}} \times 100\%$$

**仪器表征:** 茧壳和茧衣中提取的蛋白质分子量测定是采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法观察<sup>[6-7]</sup>, 分离胶的浓度为12%; 茧壳中提取的丝胶经酶解得到的丝胶蛋白肽相对分子质量采用Tricine-SDS-PAGE法观察, 其分离胶的浓度为16.5%。根据标准蛋白质相对分子质量的迁移状态, 得到蛋白质相对分子质量分布情况。

氨基酸组成分析测定在全自动氨基酸分析仪(日立L-8800型)上进行。称取一定量的丝胶粉末在6 mol/L盐酸中于(110 $\pm$ 1) °C水解22 h, 将丝胶水解液去除盐酸, 吸取一定量体积的水解液来进行测定。每个样品分析周期为53 min, 分析时分离柱柱温70 °C, 柱压10.386 MPa, 洗脱液流速0.4 mL/min.; 反应柱柱温135 °C, 柱压0.882 MPa, 茚三酮及茚三酮缓冲液流速0.35 mL/min。

丝胶样本的红外吸收光谱是在傅里叶变换红外光谱仪(PerkinElmer BX型)上进行, 采用KBr压片制样测定。

**主要观察指标:** 丝胶蛋白质红外光谱分析、氨基酸组成与含量检测、水溶性测试。

## 2 结果

**2.1 丝胶的提取** 为了解明在相同提取或制备条件下从茧壳中提取的丝胶的结构与性质变化, 进行了乙醚浸泡除蜡、无水乙醇除杂、水煮提胶的相同提取条

件下的3次试验, 见表1中Jk1, Jk2和Jk3, 其收率分别达到16.8%, 18.0%和17.3%。众多研究文献已表明了茧壳中丝胶和丝素的含量为20%~30%, 本实验采用了下脚茧, 在洗涤、除杂等过程中有丝胶损失, 导致其收率较低。采用相同方法从茧衣中提取丝胶, 表1中Jy4, 其收率达到40%以上, 这是因为茧衣的主要组成成分即为丝胶, 但在提取中损失也较大。通过SDS-PAGE凝胶电泳, 得到Jk1, Jk2和Jk3三个样本的相对分子质量均分布在66 200~130 000之间。而茧衣中提取出的丝胶相对分子质量在43 000~130 000范围。

表1 提取丝胶样本  
Table 1 Sericin samples

Sample	Materials	Weight (g)	Recovery (%)
Jk1	Cocoon shell	20	16.8
Jk2	Cocoon shell	20	18.0
Jk3	Cocoon shell	20	17.3
Jy4	Cocoon outer floss	20	44.5

采用Jk1, 用中性蛋白酶对其进行了酶解实验得到样本Jkmj5的收率为15.7%(相对于最初茧壳质量)。采用Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳测得其相对分子质量在3000以下。

2.2 氨基酸组成分析 丝胶蛋白肽的氨基酸组成成分、比例见表2。

表2 丝胶蛋白肽氨基酸组成分析  
Table 2 Amino acid composition analysis of sericin protein peptide (%)

Amino acid	Jk1	Jk2	Jk3	Jy4	Jkmj5
Aspartic acid	14.944	14.845	14.688	13.018	14.532
Threonine	6.742	6.576	6.448	5.474	6.188
Serine	28.501	28.170	28.585	24.928	22.989
Glutamic acid	2.115	2.215	2.305	6.952	5.382
Glycine	8.218	8.104	7.964	6.643	8.037
Alanine	3.128	3.043	2.94	3.157	2.896
Cysteine	0.711	0.607	0.716	0.962	0.758
Valine	2.571	2.518	2.446	2.005	2.438
Methionine	0.316	0.294	0.303	0.297	0.361
Isoleucine	0.748	0.726	0.759	1.108	0.700
Leucine	1.225	1.219	1.215	1.895	1.153
Tyrosine	4.692	4.497	4.417	4.065	4.639
Phenylalanine	0.929	0.876	0.92	1.127	0.914
Lysine	2.715	2.691	2.69	3.538	2.629
Histidine	1.976	1.830	1.976	2.405	1.882
Arginine	4.161	4.069	3.906	4.167	3.713
Proline	0.391	0.383	0.401	0.679	0.474
Total	84.082	82.665	82.679	81.864	79.684

Jk1、Jk2、Jk3是从同一批次茧壳中采用相同条件提取的丝胶样本, 其氨基酸组成及比例基本一致, 按照蛋白质组成及比例与其构象的相关性, 说明在同样的提取环境下制得的丝胶蛋白可基本一致。见表2所示, 其含量较高的氨基酸为丝氨酸、天冬氨酸、甘氨酸和苏氨酸, 含有极性侧链的丝氨酸、天冬氨酸和苏氨酸三者的

含量几乎占了丝胶蛋白质中氨基酸含量的一半。

表2所示Jy4为从茧衣中提取制备的丝胶蛋白的氨基酸组成和比例, 其天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸的含量相比茧壳丝胶又有少量降低, 但是拥有带电残基的谷氨酸、赖氨酸则有大幅提高, 其二级结构中的转角结构和“无规”卷曲将增加。这是因为茧衣为蚕初期吐出的丝状物, 其基本上是中部丝腺满溢溢出物, 未太经历牵引挤压, 二级结构松散无规则, 刚性极差。Jkmj5是用中性蛋白酶酶解制备的小分子量的丝胶蛋白肽的氨基酸组成比例, 除丝氨酸比例减小、谷氨酸含量增大以外, 其余比例与大分子量茧壳的组成比例相近, 也呈现为β转角类的部分规则二级结构。

2.3 溶解特性分析 从不同原料中提取出来的丝胶以及大、小分子量的丝胶蛋白粉的溶解度有很大差异, Jk1, Jk2, Jk3, Jy4, Jkmj5溶解率分别为21.7%, 20.8%, 21.3%, 40.1%, 93.8%。在相同提取条件下制备的Jk1、Jk2、Jk3样本在水中的溶解率是基本一致的。而从茧衣中提取出的丝胶Jy4的溶解率是茧壳中提取出的丝胶的近2倍; 酶解后得到的低分子蛋白肽Jkmj5的溶解率是原来丝胶的4倍多。

2.4 红外光谱分析 见图1~3。

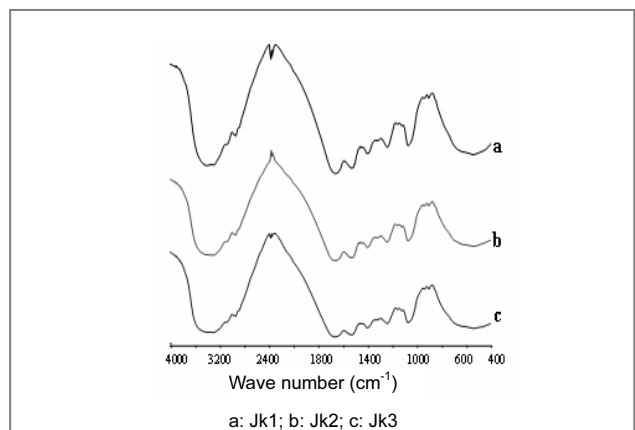


Figure 1 Infrared spectroscopy of Jk1, Jk2, Jk3 on the same extraction methods and conditions  
图1 提取制备方法、条件相同情况下从茧壳中提取丝胶蛋白粉的红外光谱图

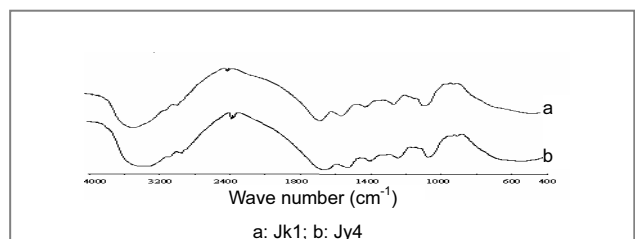


Figure 2 Infrared spectroscopy of Jk1 and Jy4  
图2 从茧壳、茧衣中提取丝胶的红外光谱图

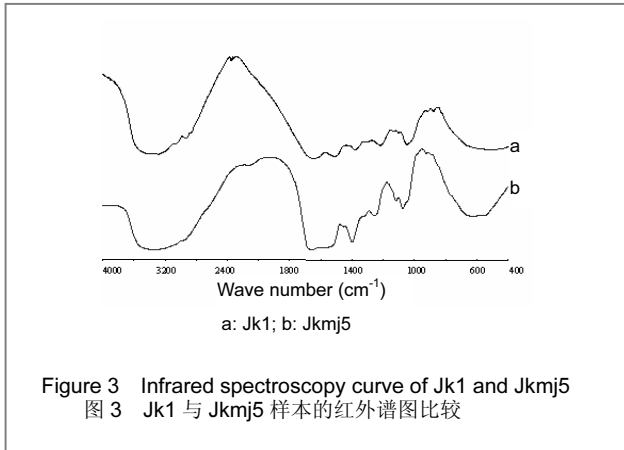


图1中丝胶蛋白酰胺 I 特征谱带的波数为 $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 II 为 $1\ 527\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 III 为 $1\ 238\ \text{cm}^{-1}$ , a, b, c3 条曲线的特征吸收峰完全相同。图2中茧衣丝胶蛋白Jy4的酰胺 I 特征谱带的波数为 $1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 II 为 $1\ 536\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 III 为 $1\ 238\ \text{cm}^{-1}$ , 酰胺 I、酰胺 III 的特征谱带的波数和茧壳丝胶蛋白Jk1很接近, 但酰胺 II 特征谱带上, Jy4为 $1\ 536\ \text{cm}^{-1}$ , 而Jk1为 $1\ 527\ \text{cm}^{-1}$ , 即酰胺 II 特征谱向高波数方向移动。

由图3可以看出, 将Jk1样本采用中性蛋白酶酶解后得到的低分子蛋白肽Jkmj5样本, 其酰胺 I 和酰胺 II 的特征吸收峰分别由Jk1的 $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$ 与 $1\ 527\ \text{cm}^{-1}$ 向高波数方向移动到了酰胺 I  $1\ 666\ \text{cm}^{-1}$ 和酰胺 II  $1\ 536\ \text{cm}^{-1}$ 处, 而酰胺 I 在 $1\ 666\ \text{cm}^{-1}$ 说明蛋白质呈转角结构, 酰胺 II 在 $1\ 536\ \text{cm}^{-1}$ , 其分子构象多以无规卷曲结构为主。

### 3 讨论

家蚕茧丝胶存在于茧丝条的表面, 随着一粒蚕茧由外到内从茧衣到茧层、蛹衣, 其在茧衣丝条中含量最高, 茧层丝条含量较低, 而蛹衣中基本不含丝胶。从蚕吐丝结茧状况来看, 熟蚕最初吐出的均为从其中部丝腺分泌的丝胶和少量后部丝腺分泌的丝素, 其生理学意义为构建结茧场所。然后才有后部丝腺分泌的丝素推进至中部丝腺, 被中部丝腺分泌的丝胶包裹, 吐丝形成茧层, 生理学意义为保护化蛹和蛹体抵御自然恶劣环境。由于其生理意义的不同, 茧衣和茧层丝胶的蛋白质分子构象有可能有所不同, 故对从茧衣和茧层中得到的丝胶进行了构象比较。制备提取方法采用了最常用提取法, 即乙醚浸泡除蜡、无水乙醇除杂、水煮提胶法。为了研究在相同提取条件下丝胶构象的变化情况, 对茧壳进行了同环境的3次再现性试验, 对得到的丝胶性状进行了氨基酸组成、溶解性、红外光谱分析。并对其在被酶解成为小分子时的构象变化进行研究以解明其变化, 因为小分子蛋白质是更为优秀的生物材料<sup>[8]</sup>。

首先进行了氨基酸组成分析。在采用常用的乙醚浸

泡除蜡、无水乙醇除杂、水煮提胶方法提取得到的丝胶蛋白质Jk1、Jk2、Jk3的氨基酸分析结果中, 其蛋白质肽段中带极性侧链经常出现在 $\beta$ 转角的丝氨酸、天冬氨酸占氨基酸含量的40%以上, 另外还有占氨基酸总量8%的影响规则二级结构形成的甘氨酸, 这些氨基酸致使丝胶蛋白质呈现为 $\beta$ 转角类的部分规则二级结构, 其特点在于具有规则二级结构的刚性和肽段中各残基间更大自由度的柔性<sup>[1]</sup>。 $\beta$ 转角中含有的大量极性残基使得大多数 $\beta$ 转角存在于分子表面, 使得 $\beta$ 转角附近具有比整个分子更大的亲水性, 作为一种球状蛋白质, 这些亲水性残基的肽段位于其表面, 疏水性残基由于折叠被裹于球体内部, 是丝胶蛋白质行使功能所必需。由于其亲水性基团易于与其它物质结合, 对于其作为药用生物材料应用时有利。

部分文献资料曾提示丝胶的甘氨酸含量为15%左右、丝氨酸约有35%、苏氨酸9%、甲硫氨酸0.05%<sup>[9]</sup>, 而本文再生丝胶蛋白Jk1、Jk2、Jk3样本的氨基酸分析结果显示其分别为8%、28%、6%和0.3%, 即带极性侧链的丝氨酸、苏氨酸含量有所降低, 影响规则二级结构形成的甘氨酸降低, 而形成二硫键的甲硫氨酸含量增加, 从某种程度上将增大该丝胶蛋白质的规则性分子构象。这可以归结为是采用了下、次茧的缘故。下、次茧在使用时经过了反复的洗涤和有机溶剂、无机盐的深度处理, 表层带极性侧链的易溶性氨基酸部分被溶解除去, 导致了含量百分比发生了变化, 从而使其分子构象变化。与文献[9]的比较结果, 说明在采用下、次茧提取丝胶时, 和上茧提取的丝胶相比, 由于处理手段的不同而致其氨基酸组成有所不同, 则其在作为生物材料使用时, 下次茧和上茧丝胶的混用将出现性状性能不易控制的问题。用中性蛋白酶酶解制备的小分子量的丝胶蛋白肽Jkmj5的氨基酸组成比例, 与大分子量Jk1的组成比例相近, 仅丝氨酸比例略减小、谷氨酸含量增大, 也呈现为 $\beta$ 转角类的部分规则二级结构、“无规”卷曲略有增加。但从茧衣中提取制备的Jy4的氨基酸组成和比例中, 天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸含量相比茧壳丝胶有降低, 拥有带电残基的谷氨酸、赖氨酸比例大幅提高, 表明其二级结构中的转角结构和“无规”卷曲增加。

蛋白质水溶性是与其氨基酸组成, 分子结构与构象, 变性程度等相关的。同批次茧壳原料在同等制备条件下制取的丝胶蛋白溶解率一致, 说明同样的制备条件, 能得到氨基酸组成, 分子结构与构象, 变性程度大致相仿的蛋白质材料。而从茧衣中提取出的丝胶Jy4的溶解率是Jk1、Jk2、Jk3的近2倍, 这与其二级结构中的转角结构和“无规”卷曲增加结果一致。而低分子蛋白肽Jkmj5的溶解率是原来丝胶Jk1的4倍多, 这并不是构象变化导致, 而是其分子量降低的结果。

比较同样茧壳原料在同等制备条件下制取的丝胶蛋白的红外光谱谱图, 其谱图的一致性, 可以推测在同等

条件下能得到分子构象相同的丝胶蛋白质, 根据结构与性能的关系, 在作为生物材料使用时, 同批次条件下制取的丝胶蛋白原料, 在某种意义上可以推测其生物学性能一致。从茧壳中提取的丝胶蛋白质, 其酰胺 I 为  $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$ , 被指认为标准 $\alpha$ -螺旋, 谱图中没有发现  $1\ 666\ \text{cm}^{-1}$  以上的转角吸收峰和  $1\ 642\ \text{cm}^{-1}$  以下的 $\beta$ -折叠和侧链伸展结构, 由于蛋白质分子结构中的无序结构构象对应的酰胺 I 在  $1\ 651\ \text{cm}^{-1}$ , 该子峰的固有宽度大于仪器分辨率, 所以在图1所示谱图显示出该丝胶蛋白质可能具有无序结构构象。谢瑞娟等<sup>[10]</sup>在采用石油醚处理茧壳, 再用水煮提取丝胶的工艺后得到的红外谱图吸收峰, 与本实验得到的数据不同。其研究中采用了乙醚、乙醇处理后再用水煮提取的工艺, 和本实验方法不一致, 从另一个角度也说明了不同原料、不同提取制备工艺下得到的丝胶蛋白构象有一定差异。

茧衣丝胶蛋白红外光谱谱图中观察到了酰胺 I、酰胺 III 峰值未变而酰胺 II 特征谱向高波数方向的移动。这个现象说明了茧衣丝胶与茧壳丝胶相比, 其分子构象更多的以“无规”卷曲结构为主。

从茧壳酶解为小分子丝胶蛋白的红外光谱谱图来看, 茧壳丝胶在经过中性蛋白酶水解后, 其分子构象发生了 $\alpha$ 螺旋向转角结构、无规卷曲结构的转换。这个结论对其可作为溶解性凝胶组织工程材料应用打下了理论基础。

**结论:** ①研究采用了相对固定的提取方法和条件从茧壳提取丝胶, 其相对分子质量、氨基酸组成及含量、蛋白质分子构象基本一致, 溶解性能相似。②提取丝胶原料分别为茧壳和茧衣时, 其丝胶的相对分子质量分布范围、氨基酸组成及含量均有差异。从茧壳中提取出的丝胶相对分子质量主要分布在  $66\ 200\sim 130\ 000$  之间, 而茧衣中提取出的丝胶相对分子质量主要分布在  $43\ 000\sim 130\ 000$  范围内; 茧衣丝胶粉与茧壳丝胶粉相比其氨基酸中的天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸的含量有所降低, 谷氨酸、赖氨酸大幅增加。红外光谱图显示茧衣丝胶比茧壳丝胶更多的以“无规”卷曲结构为主, 茧衣丝胶的溶解率几乎为茧壳丝胶溶解率的2倍。③采用中性蛋白酶酶解茧壳丝胶得到的小分子蛋白肽的氨基酸组成比例, 与大分子量 Jk1 的组成比例相近, 仅丝氨酸比例略减

小、谷氨酸含量增大, 按照其红外光谱数据, 小分子蛋白肽为转角结构和“无规”卷曲结构。

#### 4 参考文献

- [1] Yan LF, Sun ZR. Beijing: Qinghua Daxue Chubanshe. 2000: 76-79, 32-42.  
阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京: 清华大学出版社, 2000: 76-79, 32-42.
- [2] Chen H, Zhu LJ, Min SJ, et al. Gongneng Gaofenzi Xuebao. 2001; 14(3): 344-348.  
陈华, 朱良均, 闵思佳, 等. 蚕丝丝胶蛋白的结构、性能及利用[J]. 功能高分子学报, 2001, 14(3): 344-348.
- [3] Zhang YQ. Fangzhi Xuebao. 2003; 24(3): 98-100.  
张雨青. 丝胶蛋白的药理及其在医用材料上的应用[J]. 纺织学报, 2003, 24(3): 98-100.
- [4] Chen ZM, Hao XF, Wu DY, et al. Fangzhi Xuebao. 2008; 29(7): 17-20.  
陈忠敏, 郝雪菲, 吴大洋, 等. 再生蚕丝素蛋白纳米颗粒的制备及抗菌性[J]. 纺织学报, 2008, 29(7): 17-20.
- [5] 小松計一. セリシンの溶解性ならびに構造特性に関する研究[J]. 蚕絲試験場報告, 1975, 26(3): 135-256.
- [6] Wang FR. Beijing: Zhongguo Qinggongye Chubanshe. 2005: 140-148.  
王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 140-148.
- [7] Zhang LX, hang Z DF, Li LY. Beijing: Gaodeng Jiaoyu Chubanshe. 1997: 45-47.  
张龙翔, 张诞芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 45-47.
- [8] Wu QM, Qiao QZ, Zhao WL, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008; 12(35): 6927-6930.  
武清敏, 乔钦增, 赵卫林, 等. 药物洗脱支架和内皮细胞种植支架的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(35): 6927-6930.
- [9] 北條舒正. 統 絹糸の構造[M]. 1980: 382-393, 379-416.
- [10] Xie RJ, Li MZ, Lu SZ, et al. Sizhou. 2005: 50(1): 22-24.  
谢瑞娟, 李明忠, 卢神州, 等. 丝胶及其溶解性能探讨[J]. 丝绸, 2005, 50(1): 22-24.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 重庆市教委科技项目 (KJ090624)。

**作者贡献:** 第二作者进行实验设计, 实验实施为第一、四作者, 实验评估为第一、二作者, 资料收集为第三作者, 第一作者成文, 第二作者审核, 第二作者对文章负责。

**致谢:** 感谢重庆纤维检验所提供的原材料及熊佳庆为实验提供方便。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 以“丝胶, sericin”为关键词检索 CNKI 和 Science Direct 数据库 2001/2010 文章。实验观察不同原料和制备条件下丝胶分子的构象变化, 结果显示, 随着制备环境的变化, 丝胶的基础形状、分子构象易发生规律性变化, 作为生物材料这些变化将会导致其性能的变化, 并将影响其应用。