

丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中构象变化的光谱学研究

马 林, 何维仁, 黄爱民, 李立硕, 童张法, 韦俏娜, 黄子伦

广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004

摘 要 应用圆二色谱、内源荧光和外源荧光探针研究了丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中的构象变化及机理。结果显示, 在浓度低于 30%(V/V)的甲醇-水混合溶剂中, 处于无规卷曲状态的丝素蛋白可以通过疏水相互作用形成小的疏水区域, 随着甲醇浓度的增加, 丝素蛋白发生由无规卷曲向 β -折叠的构象转变, 削弱了疏水侧链的相互作用。分析表明, 丝素蛋白的构象变化与溶剂体系的微观结构密切相关, 其稳定性主要由肽键单元与混合溶剂中的分子簇之间的相互作用决定。低浓度的甲醇-水混合溶剂保持水固有的氢键结构, 对丝素蛋白肽键单元的溶剂化和丝素蛋白构象的影响较小, 而随着甲醇浓度的增加, 溶剂结构出现由四面体结构的水分子簇向链状结构的甲醇分子簇的转变, 丝素蛋白通过形成分子内氢键减少肽键单元与溶剂分子的接触, 从而引发丝素蛋白的构象转变。

关键词 丝素蛋白; 甲醇; 构象变化; 荧光光谱; 圆二色谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)11-3047-05

引 言

蚕丝是最早被利用的天然蛋白质之一, 由于其组成、结构和成纤机理赋予它天生的各种优良的纤维秉性而享有“纤维皇后”的美誉。丝素蛋白(SF, silk fibroin)是蚕丝最主要的组成部分, 随着对其独特氨基酸成分、结晶结构和理化性能研究的深入^[1-3], 尤其是近年来蚕丝多用途开发向高新技术的渗透, 国内外对丝素蛋白的应用正从传统的纺织领域积极向生物医药、化妆品、食品等领域拓展, 丝素蛋白由于其优异的力学性能、生物相容性和可生物降解性而在组织工程^[4]和药物缓释材料^[5]等领域展现出巨大的应用前景。

丝素蛋白在稀溶液中主要以无规线团形式存在, 但是对于丝素蛋白而言, 无规卷曲并不是热力学上稳定的结构, 在一定的外界条件下(如温度、浓度、溶剂、离子作用及应力等)会发生由无规卷曲向 β -折叠的构象变化, 并伴随着丝素蛋白由水溶性的无规线团向不溶于水的半结晶结构的转变^[1-3]; 另一方面, 在某些盐和酸的作用下, 丝素蛋白的构象也可以发生由 β -折叠向无规卷曲的转变。丝素蛋白这种在可控条件下可以实现水溶性与非水溶性的双向转化的特点, 使其可以非常方便地制成纤维、粉末、薄膜、凝胶、多孔支架等多种形式, 为其在生物医药领域的应用提供良好的基础^[4, 5]。

近年来, 国内外对丝素蛋白生物材料的制备和应用得到了很大发展, 制备结构和性能可调控的丝素蛋白材料以适应实际应用的需要已经逐步成为科研工作者的工作重点。利用甲醇诱导丝素蛋白产生由无规卷曲向 β -折叠的转变是丝素蛋白材料制备中最普遍的方法^[4, 5], 但是, 甲醇-水混合溶剂中丝素蛋白构象变化的机理尚有待进一步研究。

本文分析了丝素蛋白在系列浓度的甲醇-水混合溶剂中的圆二色谱(CD)和发射荧光光谱。圆二色谱是研究溶液中生物大分子构象的重要手段, 可以有效探测蛋白质二级结构的变化。蛋白质内源性荧光的重要特征之一是对环境的变化很敏感, 蛋白质的构象转变、变性、结构域的缔结、与底物结合, 都会引起内源性荧光生色基团局部环境的改变, 因此可以了解蛋白质的构象变化提供大量有用信息。结合外源荧光探针 8-苯胺基萘-1-磺酸镁(ANS)的光谱分析, 我们根据溶剂微观结构的变化探讨了丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中构象转变的机理, 为丝素蛋白材料的结构性能调控提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂

无水碳酸钠(分析纯, 汕头市西陇化工有限公司)、甲醇(光谱纯, 美国 Sigma 公司)、溴化锂(化学纯, 国药集团化学

收稿日期: 2009-12-16, 修订日期: 2010-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20766001)资助

作者简介: 马 林, 1974 年生, 广西大学化学化工学院副教授

e-mail: malinzju@gxu.edu.cn

试剂有限公司)、ANS(美国 Sigma 公司)未经进一步纯化直接使用,实验用水为二次蒸馏水,所用蚕丝由南宁市质量技术监督局友情提供。

1.2 仪器和实验方法

1.2.1 再生丝素蛋白和 ANS 储液的制备

再生丝素蛋白按常规方法制备^[4, 5]。蚕丝在 100 °C 的 NaCO_3 (0.5%) 水溶液中脱胶 2 次,每次 30 min, 50 °C 干燥后溶解于 $9.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LiBr 溶液,所得的丝素蛋白盐溶液利用截留分子量为 12 000~14 000 的透析袋(美国 Sigma 公司)在二次水中透析 3 d,期间每天更换溶剂 3 次。透析后的丝素蛋白溶液经 0.22 μm 微膜过滤器过滤后 0~5 °C 保存,丝素蛋白含量应用称重法测定。

ANS 用二次水配制成储液 0~5 °C 保存,使用时稀释至 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ANS 储液浓度利用 UV-2501PC 分光光度计(日本岛津 Shimadzu)在 350 nm 测定,摩尔吸光系数取 $6300 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[6]。

1.2.2 样品配制

在 25 mL 的容量瓶中准确加入所需的甲醇和大部分的二次水,混合均匀后加入所需的再生丝素蛋白和 ANS 储备液,利用二次水定容、混合均匀后备用。圆二色谱和荧光光谱测定所用样品中丝素蛋白浓度分别为 0.1 和 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 圆二色谱

使用光径为 1.0 mm 的石英样品池在 Jasco Spectropolarimeter-715(日本 Jasco)室温下测定丝素蛋白在 190~260 nm 的圆二色谱,测量时带宽为 1.0 nm,扫描速率 $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,响应时间 4 s,分辨率 0.2 nm,每个样品重复扫描 5 次。同样实验条件下测定相同浓度的甲醇-水混合溶剂的圆二色谱,其影响在最终结果中扣除。

1.2.4 荧光光谱

利用 $1 \times 1 \text{ cm}$ 石英比色皿在 RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津 Shimadzu)室温下记录丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中 280~450 nm 的发射荧光光谱($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$),测定 ANS 在 ANS-甲醇-水三元溶液和 ANS-丝素蛋白-甲醇-水四元溶液中 400~600 nm 的发射荧光光谱($\lambda_{\text{ex}} = 388 \text{ nm}$),测量时激发和发射带宽为 3 nm,分辨率为 1 nm。

实验过程中所用溶液的配制使用 Mettler AB104-N 型电子分析天平,称量误差 $\pm 0.1 \text{ mg}$ 。

2 结果与讨论

2.1 圆二色谱

丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中的圆二色谱测定结果汇总于图 1。在纯水中,丝素蛋白在 195 nm 附近出现负的圆二色谱带,这是无规线团的特征谱带^[7]。随着甲醇的加入,丝素蛋白的无规线团特征谱带逐渐减弱,在 $c_{\text{MeOH}} \geq 30\%$ 的甲醇-水混合溶剂中 195 nm 附近的负圆二色谱带消失,同时在 198 和 217 nm 附近分别出现正的和负的圆二色谱带,说明丝素蛋白发生了由无规线团到 β -折叠的构象变化^[7, 8]。

从氨基酸的疏水特征来看,丝素蛋白重链中疏水侧链和亲水侧链沿着氨基酸序列相间分布,这种氨基酸序列的肽链

易于形成一种亲水侧链和疏水侧链各自位于一侧的 β -折叠结构,并可能包含了相当数量的 β -转角^[8]。 β -转角的圆二色谱特征与 β -折叠相似,分别于 206 和 227 nm 附近出现正的和负的圆二色谱带^[7, 8]。Brahms^[7]对多种蛋白质模型分子的研究显示,与 β -折叠相比较, β -转角的正圆二色谱带的强度增强,而负圆二色谱带的强度减弱。分析丝素蛋白 198 与 217 nm 的光谱强度比 $\text{abs}(\theta_{198}/\theta_{217})$ 发现,在 $c_{\text{MeOH}} > 60\%$ 的混合溶剂中丝素蛋白的 $\text{abs}(\theta_{198}/\theta_{217})$ 随着甲醇浓度的增加而上升,与低浓度混合溶剂中的变化规律相反(图 1),同时,圆二色谱带出现红移,这一现象可能就是由于丝素蛋白出现部分的 β -转角造成的。

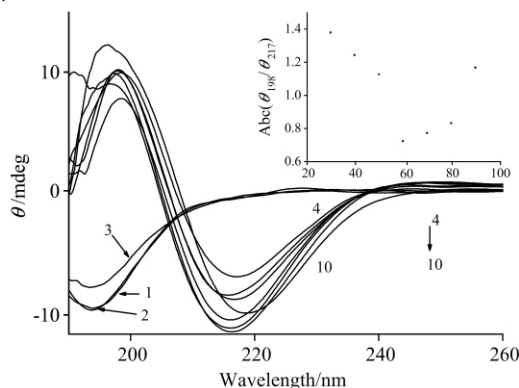


Fig 1 CD spectra of silk fibroin in methanol-water mixtures

$c_{\text{SF}}: 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}; c_{\text{MeOH}}/\%(\text{V/V}): 1: 0; 2: 10; 3: 20; 4: 30; 5: 40; 6: 50; 7: 60; 8: 70; 9: 80; 10: 90$

2.2 荧光光谱

圆二色谱主要反映了蛋白质分子二级结构的变化,结合荧光光谱,可以更多地了解蛋白质构象变化的细节。蛋白质的内源性荧光主要来自色氨酸残基和酪氨酸残基,其发射荧光光谱相互叠加,给蛋白质荧光光谱的分析带来一定的困难。由于酪氨酸对 295 nm 以上波长的光的吸收很弱, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 的发射荧光光谱主要体现了蛋白质分子中色氨酸残基所处环境的变化^[9],本文测定了丝素蛋白在激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 的发射荧光光谱,结果汇总于图 2。

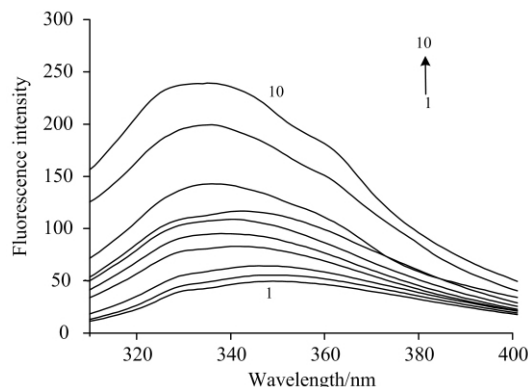


Fig 2 Fluorescence emission spectra of silk fibroin in methanol-water mixtures

$\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}; c_{\text{SF}}: 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}; c_{\text{MeOH}}/\%(\text{V/V}): 1: 0; 2: 10; 3: 20; 4: 30; 5: 40; 6: 50; 7: 60; 8: 70; 9: 80; 10: 90$

色氨酸残基的荧光对环境的变化非常敏感,常常作为蛋白质构象变化的指针。尽管色氨酸周围电场和偶极距的变化也会引起荧光光谱的移动,但是色氨酸荧光光谱的红移通常被认为是微区环境极性增加的结果^[10]。Burstein^[11]认为,色氨酸处于疏水环境时最大发射波长 $\lambda_{\max}=331\text{ nm}$,部分暴露于水中时 $\lambda_{\max}=341\text{ nm}$,完全暴露于水中时 $\lambda_{\max}=351\text{ nm}$ 。由图 2 可见,纯水中丝素蛋白色氨酸残基发射荧光在 350 nm 附近出现最大荧光强度,荧光强度较弱,表明色氨酸残基主要暴露于溶剂中,与水分子的碰撞对其荧光产生较强的猝灭作用。我们注意到,丝素蛋白色氨酸的荧光峰峰宽达 80~100 nm,说明色氨酸残基处于不同的微观环境中。图 2 显示,可能由于甲醇的加入使得混合溶剂的极性减小,色氨酸残基的最大荧光发射波长总体上随着甲醇浓度的增加逐步蓝移。丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中的荧光特征与在乙醇-水混合溶剂中相似,结合丙烯酰胺和碘离子对色氨酸荧光的猝灭性质, Yang 等^[12]认为无规卷曲状态的丝素蛋白在溶液中存在一定的疏水区域,乙醇的加入破坏了丝素蛋白疏水侧链之间的疏水相互作用,从而引发丝素蛋白由无规卷曲向 β -折叠的转变。然而,一般认为,疏水相互作用是稳定蛋白质三级结构的主要作用,而氢键结合则是维持蛋白质二级结构的关键因素。由于丝素蛋白中不存在特定的三级结构,因此我们认为,在醇水溶剂中丝素蛋白的疏水区域的破坏并非丝素蛋白构象转变的主要原因。

为了进一步探讨丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中构象转变的机理,我们以 ANS 为探针,测定了 ANS 在 ANS-丝素蛋白-甲醇-水四元体系中的荧光光谱($\lambda_{\text{ex}}=388\text{ nm}$),为方便比较,实验同时测定 ANS 在 ANS-甲醇-水三元体系中的荧光光谱,结果汇总于图 3 和图 4, ANS 在 2 种体系中的最大荧光发射波长汇总于图 5。

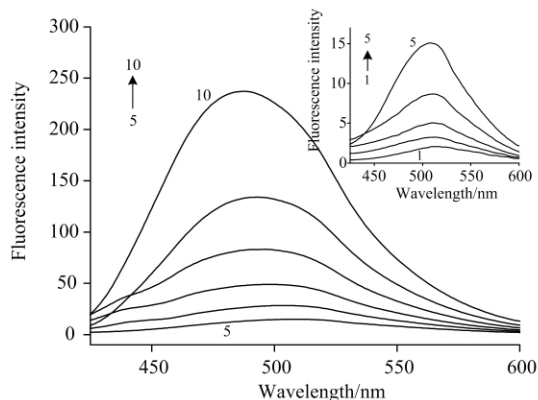


Fig 3 Fluorescence emission spectra of ANS in ternary mixtures of ANS-methanol-water

$\lambda_{\text{ex}}=388\text{ nm}$; $c_{\text{ANS}}: 5 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{MeOH}}/\%(V/V)$: 1: 0; 2: 10; 3: 20; 4: 30; 5: 40; 6: 50; 7: 60; 8: 70; 9: 80; 10: 90

ANS 是研究疏水相互作用的一种极好的荧光探针,其荧光量子产率和最大发射波长与溶剂的性质有关^[13]。一般情况下,共轭芳族化合物激发时发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁,其荧光光谱受溶剂极性影响较大。这些分子受激发时,其电子激发态比基态具有更大的极性,溶剂极性的增大对激发态比对基态

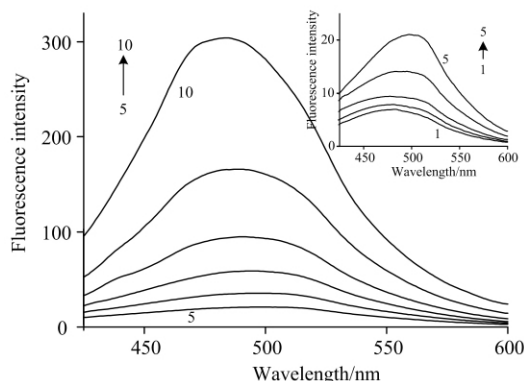


Fig 4 Fluorescence emission spectra of ANS in quaternary mixtures of ANS-silk fibroin-methanol-water

$\lambda_{\text{ex}}=388\text{ nm}$; $c_{\text{SF}}: 0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{ANS}}: 5 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{MeOH}}/\%(V/V)$: 1: 0; 2: 10; 3: 20; 4: 30; 5: 40; 6: 50; 7: 60; 8: 70; 9: 80; 10: 90

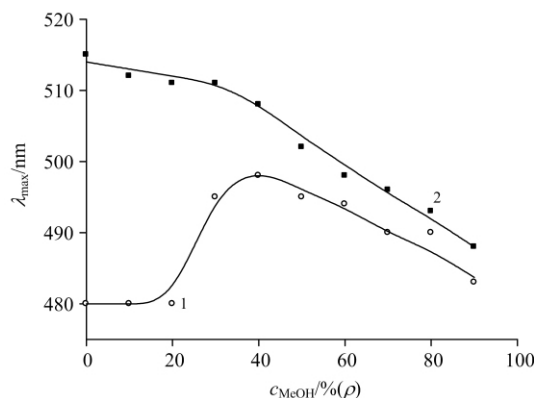


Fig 5 Peak position of fluorescence emission of ANS in methanol-water mixtures in the presence and absence of silk fibroin

1: In the presence of silk fibroin; 2: In the absence of silk fibroin;

$c_{\text{SF}}: 0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{ANS}}: 5 \times 10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

产生更大的稳定作用,结果,荧光光谱随溶剂极性的增大而向长波方向移动^[9]。在水溶液中,激发态的 ANS 通过与水分子间的电子转移过程产生非辐射能量转移,造成其荧光量子产率很低^[14],但是,在非极性溶剂(如甲醇,乙醇)中分子间电子转移过程所必需的溶剂分子重排由于溶剂分子较大的体积而难以快速完成,ANS 的荧光量子产率将显著增加^[15]。由图 3 可以看到,实验结果与上述 ANS 的荧光光谱特征相吻合。比较图 3 与图 4 可以看到,丝素蛋白的加入使得 ANS 的荧光光谱产生明显的变化,在 $c_{\text{MeOH}} < 30\%$ 的混合溶剂中,与丝素蛋白的相互作用使得 ANS 的荧光光谱急剧蓝移,表明 ANS 所处环境的极性下降,与丝素蛋白产生疏水相互作用,说明处于无规卷曲构象的丝素蛋白分子中色氨酸残基等基团确实通过疏水相互作用发生聚集。但是,可能由于丝素蛋白肽链中疏水/亲水规则相间的氨基酸残基排列方式以及含量高达 90%的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸等小分子氨基酸残基的存在,丝素蛋白不易形成较大的疏水区域以容

纳 ANS 分子,使其避免与水分子碰撞产生的动态猝灭,丝素蛋白的加入并没有导致 ANS 的荧光强度出现明显增强。随着甲醇浓度的进一步增加,丝素蛋白形成规整的 β -折叠构象,妨碍了肽链的缠绕和氨基酸疏水侧链之间的聚集,从而释放出其中的 ANS,使得 ANS 荧光光谱发生显著红移。然而,如前文所述, β -折叠结构中亲水侧链和疏水侧链各自位于折叠的一侧^[8],尽管这种结构不利于丝素蛋白疏水残基形成较大的疏水区域,但是并不妨碍与 ANS 产生疏水相互作用。由图 5 可以看到,与在 ANS-甲醇-水三元体系中相比,即使是在甲醇浓度为 90% 的 ANS-丝素蛋白-甲醇-水四元体系中,ANS 与丝素蛋白相互作用造成的荧光光谱蓝移并未消失,可能就是由于上述原因造成的。

2.3 甲醇-水混合溶剂结构与丝素蛋白的构象变化

在上述光谱试验中,我们注意到,三元体系中 ANS 的荧光光谱总体上随着甲醇浓度的增大而向短波长方向移动,但是在 $c_{\text{MeOH}} \geq 30\%$ 的混合溶剂中 ANS 最大荧光发射波长的变化速率明显增加(图 5),由圆二色谱可知,在此浓度下丝素蛋白发生由无规卷曲到 β -折叠的构象转变,这一结果似乎表明甲醇-水混合溶剂的微观结构在该浓度附近发生明显变化,影响了丝素蛋白氨基酸残基之间的相互作用,并导致丝素蛋白的构象转变。

蛋白质在溶液中的构象稳定性取决于氨基酸残基之间及其与溶剂分子的相互作用,人们常常根据氨基酸、肽在混合溶剂中热力学性质的变化解释蛋白质的折叠和去折叠过程。Nozaki^[16]测定了各种氨基酸从水到醇-水混合溶剂的迁移自由能,结果显示疏水侧链的迁移自由能为负值,而骨架肽键单元的迁移自由能为正值,表明醇有助于疏水侧链的溶解而不利于肽键单元的溶解,尽管肽键单元可以与醇分子的羟基形成氢键,但是其倾向处于一个纯水的环境中。这一理论常被用于解释一元醇在破坏蛋白质的天然结构的同时,能增强去折叠状态的蛋白质的 α -螺旋结构的现象^[17]。由此也可以看到,蛋白质在醇水体系中发生变性时,疏水侧链的溶解(即三级结构的破坏)和肽键单元间形成氢键(二级结构的增加)是两个独立的热力学过程,前者并不是后者的原因,由此推测,丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中形成 α -折叠取决于

肽键单元与溶剂的相互作用的改变。

Wakisaka^[18]等根据溶剂分子簇的结构特征分析了醇-水混合溶剂中多种荧光物质的光谱特征和叔丁基氯的水解速率常数的变化规律,他们认为溶质的溶剂化是由溶剂的分子簇结构控制的。综合以上分析,我们认为,丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中的构象转变是由于溶剂的分子簇结构变化引起的。由于低浓度的甲醇-水混合溶剂保持水固有的氢键结构,甲醇对丝素蛋白肽键单元的溶剂化作用和丝素蛋白构象的影响较小,而随着甲醇浓度的增加,溶剂出现由四面体结构的水分子簇向链状结构的甲醇分子簇的转变^[19],不利于肽键单元的溶剂化作用,丝素蛋白通过形成分子内氢键减少肽键单元与溶剂分子的接触,从而引发由无规卷曲向 β -折叠的构象转变。我们注意到,与 Wakisaka^[18]的研究结果相比较,本文中 ANS 最大荧光发射波长在 $c_{\text{MeOH}} = 30\%$ ($\chi_{\text{MeOH}} \approx 0.15$) 附近出现转折(图 5),略低于甲醇-水二元体系的结构转变浓度,这可能是丝素蛋白和 ANS 的水化作用与甲醇分子形成竞争造成的。这一现象与我们在以前的工作中观察到的牛血清白蛋白引起水溶液中叔丁醇在更低浓度下发生聚集相似^[20]。

3 结 论

丝素蛋白的圆二色谱、内源荧光和外源荧光光谱反映了丝素蛋白在甲醇-水混合溶剂中的构象变化,并在一定程度上揭示了丝素蛋白构象转变的机理。丝素蛋白在浓度高于 30% (V/V) 的甲醇-水混合溶剂中发生由无规卷曲向 β -折叠的构象转变,削弱了丝素蛋白疏水侧链之间的相互作用。在甲醇-水混合溶剂中,丝素蛋白的构象稳定性由肽键单元与溶剂的分子簇之间的相互作用决定,低浓度的甲醇-水混合溶剂保持水固有的氢键结构,甲醇对丝素蛋白肽键单元的溶剂化作用和丝素蛋白构象的影响较小,而随着甲醇浓度的增加,溶剂出现由四面体结构的水分子簇向链状结构的甲醇分子簇的转变,丝素蛋白通过形成分子内氢键减少肽键单元与溶剂分子的接触,从而引发由无规卷曲向 β -折叠的构象转变。

参 考 文 献

- [1] Zhou P, Xie X, Knight D P, et al. *Biochemistry*, 2004, 43: 11302.
- [2] Nakazawa Y, Asakura T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 7230.
- [3] Tanaka C, Takahashi R, Asano A, et al. *Macromolecules*, 2008, 9: 796.
- [4] Kino R, Ikoma T, Yunoki S, et al. *J. Biosci. Bioeng.*, 2007, 103: 514.
- [5] Wenk E, Wandrey A J, Merkle H P, et al. *J. Control. Release*, 2008, 132: 26.
- [6] Haouz A, Mohsni S E, Zentz C, et al. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 264: 250.
- [7] Brahms S, Brahms J, Spach G, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 3208.
- [8] Johnson W C. *Annual Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1988, 17: 145.
- [9] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1999. 185.
- [10] Schay G, Smeller L, Tsuneshige A, et al. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281: 25972.
- [11] Burstein E A, Vedenkina N S, Ivkova M N. *Photochem. Photobiol.*, 1973, 18: 263.
- [12] Yang Y H, Shao Z Z, Chen X, et al. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 773.
- [13] Gasymov O K, Glasgow B J. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1774: 403.

- [14] Kosower E M. Annu. Rev. Phys. Chem. , 1986, 37: 127.
- [15] Lee J, Robinson G W. J. Am. Chem. Soc. , 1985, 107: 6153.
- [16] Nozaki Y, Tanford C. J. Biol. Chem. , 1971, 246: 2211.
- [17] Parodi R M, Bianchi E, Ciferri A. J. Biol. Chem. , 1973, 248: 4047.
- [18] Wakisaka A, Komatsu S, Usui Y. J. Mol. Liq. , 2001, 90: 175.
- [19] Yoshida K, Kitajo A, Yamaguchi T. J. Mol. Liq. , 2006, 125: 158.
- [20] Ma L, Wang X, Xu L, et al. Chin. J. Chem. , 2008, 10: 1793.

Spectroscopic Study on the Conformational Change of Silk Fibroin in Methanol-Water Mixtures

MA Lin, HE Wei-ren, HUANG Ai-min, LI Li-shuo, TONG Zhang-fa, WEI Qiao-na, HUANG Zi-lun
College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract A combinational study of circular dichroism, intrinsic fluorescence of protein and exogenous fluorescence probe of ANS was made to investigate the conformational change of silk fibroin in methanol-water mixtures as well as the mechanism. The spectral results showed that small hydrophobic regions were formed in silk fibroin in methanol-water mixtures at the concentration lower than 30% (V/V) via hydrophobic interaction, which was decreased at higher methanol content due to a structural transition of silk fibroin from random coil to β -sheet. The conformational change of silk fibroin was found to be of a close relationship with the microstructure of the solvent and to be determined by the interaction between the peptide unit of silk fibroin and the cluster of the mixed solvent. Methanol-water mixture at low concentration had little effect on the solvation of the peptide unit and the conformation of silk fibroin, as a consequence of the fact that the inherent water structure was conserved. The transition from the tetrahedral-like water structure to the chain-like methanol structure, due to the increasing concentration of methanol, induced the conformational change of silk fibroin to eliminate the contact of peptide unit with the solvent molecular.

Keywords Silk fibroin; Methanol; Conformational change; Fluorescence; Circular dichroism

(Received Dec. 16, 2009; accepted Mar. 22, 2010)