

# Dithiothreitol Inhibits the Amyloid Fibril Formation of $\beta$ -Lactoglobulin

Baoliang Ma, Liangshu Wei, Liping Lu, Fang Wu

Department of Physics, Science of College, Nanjing Agricultural University, Nanjing

Email: [mabaoliang@njau.edu.cn](mailto:mabaoliang@njau.edu.cn)

Received: Sep. 9<sup>th</sup>, 2014; revised: Oct. 4<sup>th</sup>, 2014; accepted: Oct. 10<sup>th</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

Amyloid fibrils are associated with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and non-neuropathic systemic amyloidosis. The effect of DTT on the amyloid formation of  $\beta$ -lactoglobulin has been examined by thioflavin T binding, Congo red binding and transmission electron microscopy. The results showed that the formation of the amyloid fibril took place when  $\beta$ -lactoglobulin was incubated in the presence of 5M urea and at neural pH. However, the formation of amyloid fibrils was inhibited when DTT was added into the solutions and the inhibitory effect is dependent on the concentrations of DTT. These results demonstrate that the disulfide bonds play important roles in the formation of amyloid fibrils.

## Keywords

$\beta$ -Lactoglobulin, Disulfide Bonds, Amyloid Fibrils, Transmission Electron Microscopy, Dithiothreitol (DTT)

---

# 二硫苏糖醇抑制乳球蛋白淀粉样纤维的形成

马保亮, 魏良淑, 卢礼萍, 吴芳

南京农业大学理学院物理系, 南京

Email: [mabaoliang@njau.edu.cn](mailto:mabaoliang@njau.edu.cn)

收稿日期: 2014年9月9日; 修回日期: 2014年10月4日; 录用日期: 2014年10月10日

## 摘要

淀粉样纤维与老年痴呆症、帕金森病和非神经性组织淀粉样变性病等人类疾病相关。运用ThT荧光、刚果红结合和透射电镜的方法研究了还原剂二硫苏糖醇对乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响。实验结果表明：当乳球蛋白在中性条件和5M尿素中培养时，乳球蛋白会形成淀粉样纤维。然而当在溶液中加入二硫苏糖醇时，其淀粉样纤维的形成会受到抑制，并且这种抑制能力依赖于二硫苏糖醇的浓度。这些结果表明，二硫键在乳球蛋白淀粉样纤维形成过程中起着非常关键的作用。

## 关键词

$\beta$ -乳球蛋白，二硫键，淀粉样纤维，透射电子显微镜，二硫苏糖醇

## 1. 引言

越来越多的研究显示，蛋白质淀粉样纤维化是很多人类疾病的重要特征，例如，阿尔茨海默疾病、海绵性脑病和帕金森等均与相关的蛋白质和多肽的纤维化沉积有关[1] [2]。目前已经发现 30 多种蛋白质与这些疾病相关，这些蛋白质并没有序列同源性，且表现出天然结构的多样性，但是形成的淀粉样纤维具有共同的  $\beta$ -折叠片结构[3]。进一步的研究发现，一些与疾病不相关的蛋白质也可以形成淀粉样纤维，如乳球蛋白、溶菌酶等。目前的研究认为：淀粉样纤维化是所有蛋白质的共性，而与其特定的序列和结构无关[4] [5]。

$\beta$ -乳球蛋白是牛乳乳清蛋白中的主要成分，它是由乳腺上皮细胞合成的乳特有蛋白，是反动物和猪等乳中的主要乳清蛋白成分。 $\beta$ -乳球蛋白在牛乳中主要以二聚体形式存在，每个单体含有两个二硫键 Cys66-Cys160 和 Cys106-Cys199 还有一个 Cys121 自由巯基。 $\beta$ -乳球蛋白在中性 pH 时是由 8 条反平行链组成的桶状结构，桶外存在着一个具有 3 个转角的  $\alpha$  螺旋和 9 条  $\beta$  链[6] [7]。许多研究已经表明， $\beta$ -乳球蛋白在酸性条件下加热或者在中性条件下加入变性剂时很容易形成淀粉样纤维[8]-[10]。

二硫苏糖醇(Dithiothreitol, 简称为 DTT)是一种小分子有机还原剂，DTT 可以作为巯基化 DNA 的还原剂和去保护剂。巯基化 DNA 末端硫原子在溶液中趋向于形成二聚体，特别是在存在氧气的情况下。这种二聚化大大降低了一些偶联反应实验(如 DNA 在生物感应器中的固定)的效率；而在 DNA 溶液中加入 DTT，反应一段时间后除去，就可以降低 DNA 的二聚化。DTT 也常常被用于蛋白质中二硫键的还原，可用于阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成的蛋白质分子内或分子间二硫键。但 DTT 往往无法还原包埋于蛋白质结构内部(溶剂不可及)的二硫键，这类二硫键的还原常常需要先将蛋白质变性(高温加热或加入变性剂，如 6M 盐酸胍、8M 尿素或 1% SDS)。反之，根据 DTT 存在情况下，二硫键还原速度的不同，可以判断其包埋程度的深浅。

本文研究了二硫苏糖醇对乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响。实验结果表明，二硫苏糖醇能够抑制乳球蛋白淀粉样纤维的形成，且这种抑制效应依赖于二硫苏糖醇的浓度，当二硫糖醇浓度达到 10 mM 时，乳球蛋白淀粉样纤维的形成能够完全被抑制。

## 2. 实验方法和步骤

### 2.1. 试剂与仪器

1) 试剂： $\beta$ -乳球蛋白、硫黄素-T(Thioflavin)、刚果红、二硫苏糖醇均为 Sigma 公司产品，其它试剂

均为国产分析纯试剂。实验过程中所用水均为 MilliQ 去离子水，所有缓冲溶液均用去离子水配制。

2) 仪器: F-4600 荧光光谱(日本 Hitachi 公司), Shamizu UV-1800 型紫外可见分光光度计, H-7650 型透射电子显微镜。

## 2.2. 淀粉样纤维样品的制备

配制浓度为 10 mM 的磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 称取  $\beta$ -乳球蛋白配制蛋白质母液, 后用 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌注射过滤器过滤以除去颗粒状物质。再称取尿素配制 10M 的变性剂母液。把  $\beta$ -乳球蛋白和尿素溶液进行混合得到 5M 的蛋白和变性剂混合溶液, 然后再称取一定量的二硫苏糖醇配制溶液, 将该二硫苏糖醇母液加入到蛋白和变性剂的混合溶液, 最终得到含有不同浓度二硫苏糖醇的混合溶液, 用膜封好管口, 置于 37°C 的水浴中进行培养, 在不同的时间点取出一定量的  $\beta$ -乳球蛋白样品进行检测, 剩下样品溶液封口后继续恒温培养。

## 2.3. ThT 荧光检测

使用 10 mM, pH 值 7.0 磷酸钠缓冲液配制 1 mM ThT 的储液。取不同时间的  $\beta$ -乳球蛋白样品 10  $\mu\text{L}$ , 加入 ThT 储液使其最终的浓度为 20  $\mu\text{M}$ , 与 10 mM, pH 值为 7.0 磷酸钠缓冲液混合使其体积为 3 mL, 置于水浴中 37°C 保温。用 F-4600 型荧光光谱仪检测 482 nm 的荧光强度值, 选择荧光激发波长为 450 nm, 激发光栅长度为 5 nm, 发射光栅长度也为 5 nm。连续检测 60 s 荧光强度取平均值来增加检测的信噪比, 同时扣除空白对照的平均值。

## 2.4. 刚果红结合

用 10 mM, pH 值为 7.0 磷酸钠缓冲液配制浓度为 200  $\mu\text{M}$  的刚果红储液, 加入 10%(v/v)的无水乙醇作为助溶剂。后用 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌注射过滤器过滤以除去颗粒状物质。储液 4°C 避光保存。取在不同二硫苏糖醇浓度条件下培养的  $\beta$ -乳球蛋白样品, 加入刚果红储液, 然后用 Shamizu UV-1800 型紫外可见分光光度计扫描 400 nm~700 nm, 对照组为只含有刚果红和只含有  $\beta$ -乳球蛋白的磷酸钠缓冲液。

## 2.5. 透射电子显微镜

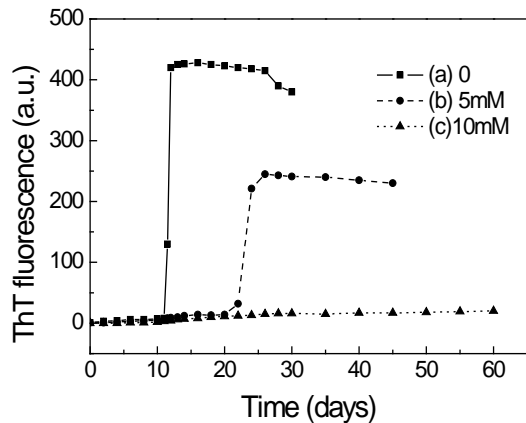
在不同的时间将待测的  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的样品轻微振荡均匀, 取样品 5  $\mu\text{L}$  加到聚醋酸甲基乙酯膜覆盖的铜网(200 孔)上, 用 2%的磷钨酸负染 40 s, 多余染液和样品用滤纸吸干。在 H-7456 型透射电子显微镜下观察, 加速电压为 80 V。

# 3. 结果

## 3.1. 二硫苏糖醇对 $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响

### 3.1.1. 动力学影响的研究

由于 ThT 是一种能与淀粉样纤维结合从而导致其荧光强度升高的荧光染料, 因而 ThT 已经被广泛地用于淀粉样纤维形成动力学的研究[11]-[13]。二硫苏糖醇对  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响如图 1 所示。由图 1 可见, 在蛋白溶液中不存在二硫苏糖醇的情况下,  $\beta$ -乳球蛋白在 5M 的尿素溶液中(37°C)培养到 12 天左右时, 当加入 ThT 时, 其荧光强度可是明显的增强, 这表明  $\beta$ -乳球蛋白在部分解折叠的情况下能够形成淀粉样纤维。同时我们也可以观察到荧光增加的曲线是 S 型的, 这说明其淀粉样纤维化是一个成核-聚合的动力学过程。然而, 在蛋白溶液中存在 5M 的二硫苏糖醇时, 虽然 ThT 荧光强度仍然能够上升, 但淀粉样纤维形成的滞后时间增加, 荧光上升的强度明显的减小, 这表明二硫苏糖醇能够抑制  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成。特别当二硫苏糖醇的浓度增加到 10 mM 时, 即使把蛋白溶液培养到 60 天



**Figure 1.** Effect of DTT on amyloid fibril formation of  $\beta$ -lactoglobulin monitored by ThT fluorescence. (a) 0 (b) 5 mM (c) 10 mM DTT

**图 1.** ThT 荧光检测二硫苏糖醇对  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响 (a) 0 (b) 5 mM (c) 10 mM DTT

时, ThT 荧光的强度也不会增强, 这表明 10 mM 的二硫苏糖醇能够完全抑制  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成。

### 3.1.2. 刚果红结合实验

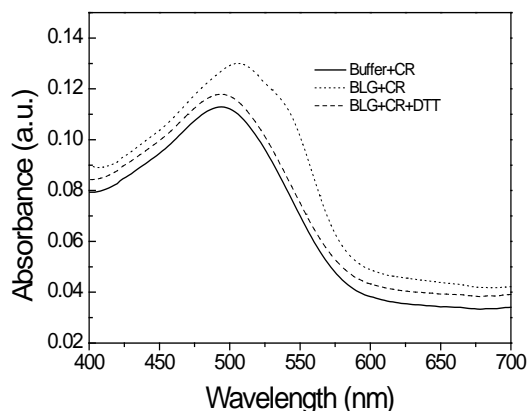
由于刚果红可以和淀粉样纤维发生相互作用, 导致刚果红吸收光谱的红移, 因此常被用来检测淀粉样纤维的存在[14]。为了探索二硫苏糖醇是否能对  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成产生抑制效应, 我们又使用刚果红结合实验分析了当加入二硫苏糖醇时  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成情况。图 2 展示出刚果红吸收谱的变化。当溶液中不存在纤维时, 刚果红在 490 nm 处有一个吸收峰, 而当刚果红在与 5M 尿素中培养 12 天的  $\beta$ -乳球蛋白溶液培养时, 其吸收峰红移到了 504 nm 处, 并且在 540 nm 处出现了一个肩峰, 这种吸收谱的变化表明在这种条件下  $\beta$ -乳球蛋白形成了淀粉样纤维。然而, 当  $\beta$ -乳球蛋白在 10 mM 的二硫苏糖醇中培养时, 刚果红的吸收峰没有出现明显的红移, 与 ThT 荧光的结果一样, 这个结果进一步支持了我们得出的结论: 10 mM 的二硫苏糖醇能够完全抑制  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成。

### 3.1.3. 透射电子电镜

为了表明二硫苏糖醇对  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维组装的抑制效应, 我们使用透射电镜直接观察了  $\beta$ -乳球蛋白当溶液中存在不同浓度的二硫苏糖醇时淀粉样纤维的形成情况。图 3 展示出当不存在二硫苏糖醇时,  $\beta$ -乳球蛋白所形成淀粉样纤维的形貌, 成熟的  $\beta$ -乳球蛋白的淀粉样纤维展示出典型的淀粉样纤维形貌, 其特征是又长又直的密集直径为 8~30 nm 的纤维。当存在 5 mM 二硫苏糖醇时,  $\beta$ -乳球蛋白展示出与控制样品相同的形貌, 但与控制样品比较起来, 其纤维的数量明显的减少了, 这表明二硫苏糖醇能够抑制  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成, 特别是当二硫苏糖醇的浓度达到 10 mM 时, 在电镜下没有观察到淀粉样纤维, 这表明, 10 mM 的二硫苏糖醇完全抑制了  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的形成。

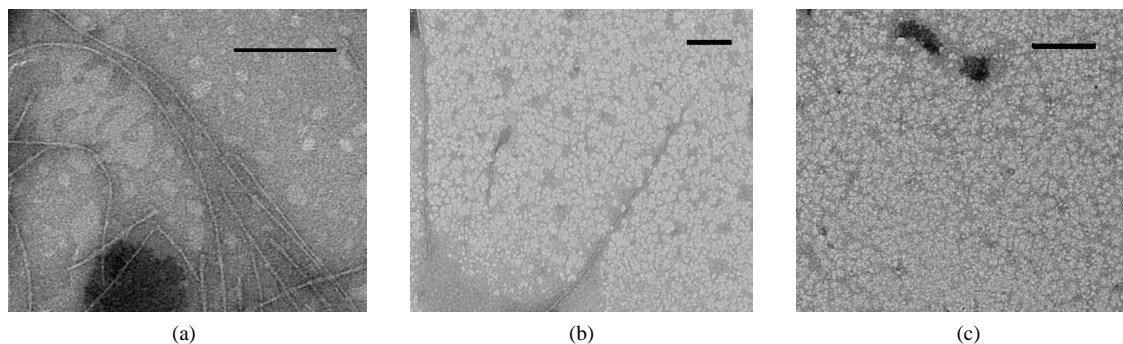
## 4. 讨论

$\beta$ -乳球蛋白是具有淀粉样纤维化倾向的蛋白之一, 酸化、升高温度和加入变性剂等因素都能够导致  $\beta$ -乳球蛋白形成淀粉样纤维, 形成的纤维形貌依条件不同而具有多样化特征。在本实验中,  $\beta$ -乳球蛋白在低和高浓度的尿素中均不能够形成淀粉样纤维, 而在中等浓度的尿素中形成了淀粉样纤维, 这个结果表明: 部分解折叠态的  $\beta$ -乳球蛋白是淀粉样纤维的前体。



**Figure 2.** Congo Red binding assays to characterize the effect of DTT on amyloid fibril formation of  $\beta$ -lactoglobulin

**图 2.** 刚果红连接确定二硫苏糖醇对  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维形成的影响



**Figure 3.** Transmission electron microscopy of amyloid fibrils of  $\beta$ -lactoglobulin. (a) 0 (b) 5 mM (c) 10 mM (Scale bars represent 200 nm)

**图 3.** 不同 DTT 浓度下  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维的透射电镜形态图 (a) 0 (b) 5 mM (c) 10 mM (标尺代表 200 nm)

二硫键在蛋白质折叠和稳定性方面扮演了非常重要的作用。但二硫键在蛋白质淀粉样纤维形成过程中的作用却是有争议的[15] [16]。Yamamoto [17]等人已经展示出还原剂，例如二硫苏糖醇和半胱氨酸，能够抑制微球蛋白淀粉样纤维的形成，这表明二硫键在微球蛋白淀粉样纤维形成过程中起着至关重要的作用，然而来鲁华[18]等人的研究展示出，溶菌酶在被完全还原时也能够形成淀粉样纤维。这表明二硫键在溶菌酶淀粉样纤维形成过程中没有作用。然而在我们的实验中，当在部分解折叠态的  $\beta$ -乳球蛋白溶液中加入二硫苏糖醇时，其淀粉样纤维的形成受到了抑制，并且这种抑制效应是与二硫苏糖醇的浓度相关的。当其浓度达到 10 mM 时，淀粉样纤维的形成被完全抑制。以前的研究表明，二硫苏糖醇能够还原部分解折叠  $\beta$ -乳球蛋白中二硫键。因此，我们的结果就证明了：当  $\beta$ -乳球蛋白中的二硫键被破坏时，其淀粉样纤维的形成就会受到抑制，这表明，二硫键在  $\beta$ -乳球蛋白中淀粉样纤维的形成过程中扮演了关键的作用。

综上所述， $\beta$ -乳球蛋白在中等浓度的尿素溶液中时能够形成淀粉样纤维。二硫苏糖醇对该过程有明显的抑制作用。本研究的结果对于了解  $\beta$ -乳球蛋白淀粉样纤维形成的机制，以及寻找抑制蛋白淀粉样纤维形成的小分子化合物提供了实验依据。

## 致 谢

感谢中央高校基本科研业务费(KYZ201321)的支持。

## 参考文献 (References)

- [1] Stefani, M. and Dobson, C.M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*, **81**, 678-689.
- [2] Selkoe, D. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature*, **426**, 900-904.
- [3] Hamada, D. and Dobson, C.M. (2002) A kinetic study of  $\beta$ -lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Science*, **11**, 2417-2426.
- [4] Walsh, D., Lomakin, A., Benedek, G., Condron, M. and Teplow, D. (1997) Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 22364-22372.
- [5] Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 329-332.
- [6] Kuwata, K., Hoshino, M., Forage, V., Era, S., Batt, C.A. and Goto, Y. (1999) Solution structure and dynamics of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Protein Science*, **8**, 2541-2545.
- [7] Sakurai, K. and Goto, Y. (2002) Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine  $\beta$ -lactoglobulin by amino acid substitution. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 25735-25740.
- [8] Giurleo, J.T., He, X.L. and Talaga, D.L. (2008)  $\beta$ -lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, **381**, 1332-1348.
- [9] Hamada, D. and Dobson, C.M. (2002) A kinetic study of  $\beta$ -lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Science*, **11**, 2411-2426.
- [10] Ma, B.L., Xie, J.B., Wei, L.S. and Li, W. (2013) Macromolecular crowding modulates the kinetics and morphology of amyloid self-assembly by  $\beta$ -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, **53**, 82-87.
- [11] Xue, W.F., Homans, S.W. and Radford, S.E. (2008) Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8926-8931.
- [12] Platt, G.W., Routledge, K.E., Homans, S.W. and Radford, S.E. (2008) Fibril growth kinetics reveal a region of  $\beta_2$ -microglobulin important for nucleation and elongation of aggregation. *Journal of Molecular Biology*, **378**, 251-263.
- [13] Ikeda, K., Okada, T., Sawada, S., Akiyoshi, K. and Matsuzaki, K. (2006) Inhibition of the formation amyloid  $\beta$ -protein fibrils using biocompatible nanogels as artificial chaperones. *FEBS Letters*, **580**, 6587-6595.
- [14] Krebs, M.R.H., Morozova-Roche, L.A., Daniel, K., Robinson, C.V. and Dobson, C.M. (2004) Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils. *Protein Science*, **13**, 1933-1938.
- [15] Li, Y., Gong, H., Sun, Y., Yan, J., Cheng, B., Huang, K., et al. (2012) Dissecting the role of disulfide bonds on the amyloid formation of insulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **423**, 373-378.
- [16] Sarkar, N., Kumar, M. and Dubey, V.K. (2011) Effect of sodium tetrathionate on amyloid fibril: Insight into the role of disulfide bond in amyloid progression. *Biochimie*, **93**, 962-968.
- [17] Yamamoto, K., Yagi, H., Ozawa, D., Sasahara, K., Naiki, H. and Goto, Y. (2008) Thiol compounds inhibit the formation of amyloid fibrils by  $\beta_2$ -microglobulin at neutral pH. *Journal of Molecular Biology*, **376**, 258-268.
- [18] Cao, A.N., Hu, D.Y. and Lai, L.H. (2004) Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme. *Protein Science*, **13**, 319-324.