

蜘蛛丝的分子结构与力学性能研究^{*}

黄智华 李敏^{**}

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要 蜘蛛丝尤其是蜘蛛大囊状腺产生的拖丝,具有独特的机械性能,是自然界颇具应用潜力的生物材料。现代分子生物学技术使蜘蛛丝蛋白基因得以克隆,通过高分子物理化学手段方法的利用,有利于揭示蜘蛛丝蛋白质序列、分子结构、以及分子结构和力学性能之间的关系。对不同类型蜘蛛丝蛋白的深入研究,将为基因工程方法人工合成并改造蜘蛛丝成为可能。

关键词 蜘蛛丝 力学性能 人工合成蛛丝

结网蜘蛛有7种不同的腺体,每种腺体能产生独特功能特性的蜘蛛丝,其中拖丝的性能可与最好的现代技术合成纤维相媲美,是外科手术缝合线、降落伞、防弹衣及组织工程所需的临时搭架的理想材料,受到各国研究者的广泛关注。近20年来,对蜘蛛丝的研究主要集中于大囊状腺产生的拖丝和鞭毛状腺产生的鞭毛丝。科学家对蜘蛛丝的化学组成、分子结构、聚集态结构和蛛丝蛋白基因均作了大量研究,以期根据蜘蛛丝聚合物的结构信息通过基因工程的方法人工合成蜘蛛丝,商业化生产蛛丝蛋白^[1,2]。从目前的研究看,对蜘蛛丝的氨基酸组成和基本力学性能已有了较系统的研究,但它的特殊力学性能的形成机理和丝纤维的微细结构以及微细结构和力学性能间的关系尚未被完全揭示。揭开蜘蛛丝结构和性能的关系对于生物纺丝技术的发展和新型生物材料的开发有着重要的作用^[3]。本文就不同蜘蛛丝的力学性能特征、分子结构及两者之间的关系作一综述。

1 蜘蛛丝的力学特征

1.1 蜘蛛丝的应力-应变性质

丝纤维的力学性能可以用应力-应变曲线来表征。应力-应变曲线反映了丝纤维在轴线上的变形,是最重要的力学特征^[4]。力学特性实验表明,

十字圆蛛(*Araneus diadematus*)拖丝的起始硬度低于Kevlar、碳纤维、高弹性钢等工程材料,但其硬度比其它的聚合生物材料都高。在强度方面,拖丝略低于Kevlar、碳纤维、高弹性钢,但明显高于其他生物材料。从弹性来讲,十字圆蛛拖丝伸长率为0.27,而一般工程材料的伸长率则在0.01~0.03之间,高伸长率使之具有比工程材料更好的韧性,其断裂能(韧度)为 160MJm^{-3} ,是工程材料的3~10倍。因此,拖丝被认为是目前已知的具有高硬度、高强度、高韧度的生物材料之一^[4]。鞭毛丝具有与拖丝不同的特性,其起始硬度为0.003GPa,比拖丝低3个数量级,与交联度低的合成橡胶的硬度相近。鞭毛丝是一种高弹性的类橡胶材料,伸长率为2.7,强度(0.5GPa)约为其他天然或合成橡胶的10倍,高弹性、高强度使鞭毛丝具有和拖丝相近的韧度^[3]。根据聚合物材料应力-应变曲线分类的原理,拖丝是一种硬而强的材料,而鞭毛丝则是一种软而韧的材料^[5]。

1.2 蜘蛛丝的粘弹性与蜘蛛捕捉昆虫

当昆虫撞击蜘蛛网时,会在丝拉索上形成直角的冲击负荷,由于拖丝和鞭毛丝均具有高韧度,两者的平衡阻滞(hysteresis)约为65%,即昆虫飞行时所具有的动能约有65%被吸收转化成热量,因而不致于使昆虫通过反弹作用被弹出蜘蛛网^[6]。由于蜘蛛丝具有高韧性、高水平的内部分子摩擦和高平衡阻滞等特点,被认为是一种粘弹性的生物材料,其力学特性具有应变率依赖性。拖丝的硬度、强度、伸长率、韧度在应变率 $0.005\text{S}^{-1} \sim 0.024\text{S}^{-1}$

收稿日期:2003-01-29

^{*}福建省自然科学基金重大科技项目资助(2001F006)

^{**}通讯作者,电子信箱:mli@fjnu.edu.cn

的范围内不断提高,提高应变率可以提高拖丝的性能,在最高应变率 0.024s^{-1} 时,使之断裂需要 $11\text{s}^{[7]}$ 。这种类似的情形也发生在蜘蛛捕捉昆虫或掉落的过程中,拖丝承受力的时间极短,因而具有更高的应变率。Gosline 等设计了一种冲力装置,以大约 1ms^{-1} 的速度下降的物体对拖丝的纤维轴线施加负荷,其断裂的时间约为 0.02s ,应变率为 30s^{-1} ,初步的结果表明,拖丝具有高应变率依赖性,应变率提高时,起始硬度和强度急剧上升,强度与 Kevlar 相当,韧度最高达 $1000\text{MJm}^{-3[3]}$ 。

1.3 蜘蛛丝的超浓缩特性

拖丝对水敏感,当浸入水中时会收缩为原来的 $40\% \sim 50\%$,力学特性也发生显著变化,起始硬度下降 3 个数量级,在性状上变成与类橡胶材料一致。鞭毛丝在水中也会发生收缩,但水对其力学特性的影响不是非常显著,蜘蛛丝的这种收缩现象被称为超浓缩^[8]。当空气中的湿度高于 90% 时,蜘蛛丝的超收缩现象也会发生。蜘蛛丝发生超浓缩时,随着水含量的提高,其平衡阻滞下降,应变率依赖性曲线也发生变化^[6]。

2 蜘蛛丝的分子结构

2.1 蜘蛛丝蛋白序列

蜘蛛丝的主要成分是蛋白质,其基本组成单元为氨基酸。不同种类蜘蛛丝的氨基酸组成有很大

差异。Xu 等分析了由棒络新妇蛛 (*Nephila clavipe*) 拖丝蛋白部分 cDNA (Spidroin-1) 编码的氨基酸序列 Nc-MA-1,拖丝蛋白肽链中具有明显的重复序列,一个完整的重复单元由 34 个氨基酸残基组成,可分为 3 个保守区,发现编码氨基酸的密码子第 3 位碱基上 C 和 G 出现的频率较低^[9]。Hinman 等获得了棒络新妇蛛拖丝蛋白基因 spidroin-2,该基因编码的氨基酸序列 Nc-MA-2 也有 3 个保守区,但可变区与 spidroin-1 略有不同^[10]。王迎等对大腹圆蛛拖丝蛋白序列的测定分析表明,大腹圆蛛 (*Araneus ventricosus*) 与棒络新妇蛛拖丝蛋白序列有一个完全相同的肽段 GYGPG,其余所测片段则存在差异^[11]。Hayashi 等获得了棒络新妇蛛鞭毛丝蛋白的序列结构信息,这种蜘蛛丝蛋白几乎完全由富甘氨酸的序列构成,五肽 GPGGX 重复 $40 \sim 65$ 次,之后是另一种重复单元 GGX,重复 $6 \sim 12$ 次,十字圆蛛与棒络新妇蛛产生的鞭毛丝蛋白序列结构可能不同^[12]。图 1 列出了 4 种蜘蛛丝蛋白重复序列^[9,10,12~14]。

2.2 蜘蛛丝的分子构象

Guerette 等^[13] 分析了十字圆蛛的蜘蛛丝蛋白序列,至少 3 种腺体(大囊状腺、小囊状腺、管状腺)产生的丝是一种微结晶区嵌入无定形区的结构。对棒络新妇蛛拖丝的纤维结构的研究是最为深入的,结晶区富含丙氨酸,分子的构象为 β -折叠链,分子间呈反向平行排列,相互间以氢键结合,形成折曲

Major ampullate gland (MA) fibroins
Nc-MA-1: AGAAAAAAGGAGQGGYGLGSQGAGRGGLGGQG
Nc-MA-2: SAAAAAAAAGPGYGPGQQPGGYGPGQQPGGYGPGQQPGSPGP
Ad-MA-1: ASAAAAAAGGYGPGSGQGPQQPGGQGPYGP
Ad-MA-2: ASAAAAAASGPGYGPGSQGPSGPGGYGPGGPG
Minor ampullate gland (MI) fibroins
Nc-MI-1: AGAGAGAAAGAGAGGYGGQGGYGAGAGAGAAAAAGAGAGGYGRG
Nc-MI-2: AVAGSGSAAGAGARAGSGGYGGQGGYGAGAGAGAAAGAGAGSAGGYGRG
Ad-MI-1: GAGSGAGAGAAAAAGAGGYGQGY
Cylindrical gland (CY) fibroin
Ad-CY-1: AAAAAAAGGQGGQGGYGLGSQGGAGQGGYGAAGLGGQGG
Flagelliform gland (FL) fibroin
Nc-FL-1: (GPGG X) $N \approx 50$ - (GG X) $N \approx 9$ - (Spacer, 28 residues long)

图 1 不同蜘蛛丝蛋白的重复序列

Nc:棒络新妇蛛; Ad:十字圆蛛; G:glycine; A:alanine; S:serine; P:proline; Q:glutamine;
Y:tyrosine; L:leucine; V:valine; R:arginine; X:alanine,serine, valine, tyrosine

的栅片,结晶区中一部分为完全结晶结构,另一部分为准晶态结构。完全结晶区分子链构成 β -折叠栅片,沿纤维轴线方向高度取向。准晶态区域 β -折叠分子链并未连接成栅片,且取向度较低,起到连接完全结晶区和无定形区的作用。无定形区富含甘氨酸,分子链为 β -转角结构^[13,15]。由于蜘蛛丝中大侧基氨基酸多,其结晶度低于蚕丝,约为蚕丝的55%~60%。不同的蜘蛛丝具不同含量的结晶区和无定形区,十字圆蛛大囊状腺的两种丝蛋白(Ad-MA-1与Ad-MA-2)与棒络新妇蛛的大囊状腺的丝蛋白(Nc-MA-1与Nc-MA-2)具有相似的组成,从蛋白质序列来看,其 β -折叠结晶区约占重复序列的25%,无定形区为16~20个氨基酸,十字圆蛛小囊状腺丝蛋白(Ad-MF1)结晶区含量为68%,无定形区含量为32%^[14]。Hayashi等报道的鞭毛丝蛋白序列几乎完全由富甘氨酸的序列构成,而没有类似小囊状腺、大囊状腺、管状腺丝蛋白的结晶形成区^[12]。

蜘蛛丝分子结构的研究最初采用X-射线结晶学的方法,NMR技术的发展大大促进了蜘蛛丝分子构象的研究。X-射线衍射实验表明,棒络新妇蛛拖丝聚丙氨酸组成的 β -折叠结晶区的三维大小为2nm×5nm×7nm,结晶区含量为10%~15%^[16]。Thiel等基于拖丝的电子衍射和X-射线衍射模型提出了一种假说,认为当拖丝被拉伸时,富甘氨酸区易形成大量的 β -折叠结晶结构,但这种结晶结构不如聚丙氨酸结晶有序。这种推断的前提是富甘氨酸区必须不含脯氨酸,因此,这种假说只适用于拖丝蛋白中的一种(Nc-MA-1),因为其他3种拖丝蛋白(Nc-MA-2、Ad-MA-1、Ad-MA-2)的重复序列中均含有15%~17%的脯氨酸^[3,17]。Simmons等用NMR的方法对其结晶区进行研究,结果表明,只有40%的丙氨酸残基存在于定向的 β -折叠结晶区中,余下的60%则存在于轻度定向和非聚合的 β -折叠中^[18]。也有实验报道运用二维NMR技术发现富甘氨酸区含有有序的微结构的证据,推断了最符合实验数据的 3_1 -螺旋结构,并推测在拖丝中 3_1 -螺旋聚合结构增强了高度定向的网状结构^[19]。近来van Beek等应用新发展的固态NMR技术,对*Eri-silkworm*、*Samia cynthia ricini*的丝主链上转角进行测定,发现尽管天然丝纤维最可能的结构是反向平行的 β -折叠,但从丝腺中抽提的液体则主要是 β -螺旋

结构^[20]。

3 蜘蛛丝的分子结构与力学性能间的关系

蜘蛛不同的腺体所产生的丝蛋白因具有不同比例的能形成结晶区和无定形区的成分,使不同的蜘蛛丝形成结晶的能力不同,具有不同的力学特性^[3]。十字圆蛛和络新妇蛛的小囊状腺丝蛋白的结晶区含量比拖丝蛋白高,因此,小囊状腺蜘蛛丝更具双折射特性,在水中不会超浓缩^[14]。

十字圆蛛拖丝结晶区被无定形区分开并占一定体积,是其具有高强度、高韧度、高粘弹性的基础。无定形区结构分子链能形成伸展的聚合玻璃态,这是拖丝具有高弹性、高平衡阻滞能力的原因,而富甘氨酸区含有大量的极性氨基酸是其具有超浓缩能力的原因^[3]。Yang等使用固态 ^{13}C -NMR技术研究蜘蛛丝遇水超浓缩时的分子构象,发现当蜘蛛丝接触水时,蛋白质主链上的Glu、Tyr、Ser、Leu使振幅定向频率极大地增强,但只有一部分Leu受水的影响,认为高度保守的YGGLGS(N)QGACR序列在蜘蛛丝超浓缩过程中起着重要的作用^[21]。蜘蛛丝的大分子链之间以氢键结合维持构象,当将其置于水中后,水分子首先进入无定形区域,切断无定形区呈 β -转角构象分子链间的氢键结合,从而使分子链逐渐转化为无规卷曲的结构。然后,随浸润时间的增加,水分子逐渐向结晶区渗透,切断结晶区分子间的氢键和二硫键结合,分子间的作用力下降,分子链可以自由运动,向无规卷曲的空间构象转化。分子构象及结构的这些变化,导致丝线长度的缩短。同时,蜘蛛丝内部由数十根微细纤维构成的多孔结构层,使水分子较之一般的纤维更易渗透到蜘蛛丝纤维的内部,因而蜘蛛丝表现出一般纤维所没有的超收缩性能^[22]。

十字圆蛛拖丝与棒络新妇蛛拖丝的富甘氨酸区域脯氨酸总含量分别为16%和3%,两者的富甘氨酸区形成有序的结构能力不同,表现出不同的力学特性。棒络新妇蛛拖丝具有高起始硬度($E_{\text{ini}} = 22\text{GPa}$),相对较低的伸长率($\epsilon_{\text{max}} = 0.12$),相同强度下棒络新妇蛛拖丝的韧度是十字圆蛛拖丝的一半,科研人员还报道了应变率 3000S^{-1} 时弹道学实验中拖丝的硬度和伸长率数值,发现棒络新妇蛛拖丝的硬度应变率依赖性很小,伸长率略微下降,这些特征与其更具结晶化的网状结构一致^[3]。

4 蜘蛛丝研究与应用展望

蜘蛛丝具有与其他纤维材料无法比拟的性能特性,尤其是作为生物材料的应用,具有十分诱人的前景,一些大学和公司的实验室从高分子物理化学、材料科学、分子生物学等角度,对蜘蛛丝进行了详细的研究。蜘蛛丝蛋白基因及表达的研究近几年取得了一定的成果,一般是利用已经清楚的主要重复氨基酸序列信息,人工合成其类似物的 DNA 片段(仿蜘蛛拖丝蛋白基因),在原核系统、酵母、植物系统及哺乳动物中表达蜘蛛丝蛋白。但重组产物与天然纤维在分子构型上只有一定程度的相似性,表达的丝蛋白一般还不具有分子取向,还不能够模拟蜘蛛丝的纤维化过程,将人工丝蛋白制成具有天然丝纤维特性的人工丝还处在摸索阶段,人工抽丝存在相当的困难^[2]。关于蜘蛛丝为何具有高强度高弹性、高韧度、超浓缩能力的特性,尚待进一步研究^[3]。应用现代生物技术和高分子物理化学手段对蜘蛛丝的本质进行研究,具有重要的理论和实际意义。作者认为应进行以下几个方面的研究:

- (1) 加强对蜘蛛丝基础科学的研究:弄清蜘蛛丝蛋白的基因、调控机理,以及蜘蛛丝蛋白的组成,及其具有各种性能的分子机理。
- (2) 进行蜘蛛丝的人工合成与改造的研究:蜘蛛丝的生物降解性适用于手术缝合线、组织工程的搭架等生物材料的开发,高韧度适用于防弹衣的开发,因此,人类可以通过合成手段,设计、表达以及人工纺丝,通过对特性的检验,人工合成出以蜘蛛丝为基础具有不同用途的最佳材料。
- (3) 合成蜘蛛丝蛋白表达系统的选择:寻找多种高效表达人工丝蛋白的宿主系统,现在科学家们已经在寻找新的途径,开始尝试在昆虫(如蚕)、植物系统以及哺乳动物细胞中表达。
- (4) 合成蛛丝蛋白下游工程的研究:加强由丝蛋白到具有天然丝纤维特性的工艺研究。

参考文献

- [1] Weissbart K. Silk biotechnology. Reviews in Molecular Biotechnology, 2000, 74: 65 ~ 66
- [2] Wong B, Foo C, Kaplan D L. Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(8): 1131 ~ 1143
- [3] Gosline J M, Guerette P A, Oplepp C S, et al. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. Journal of Experimental Biology, 1999, 202 (23): 3295

~ 3303

- [4] Strichaisit J, Young R J, Vollrath F. Molecular deformation in spider dragline silk subjected to stress. Polymer, 2000, 41: 1223 ~ 1227
- [5] 徐恒钧. 材料科学基础. 北京工业大学出版社, 2001. 377
- [6] Denny M. The physical properties of spider's silk and their role in the design of orb-web. J Exp Biol, 1976, 65: 483 ~ 506
- [7] Denny M, Cunliff P M. Mechanical and thermal properties of dragline silk from *Nephila clavipes*. Polymers Adv Technol, 1976, 5: 401 ~ 410
- [8] Gosline J M, Nichols C, Guerette P, et al. The macromolecular design of spider silks. In Biomimetics: Design and Processing of Materials (ed. M. Sarikaya and I. Aksay). Woodbury, New York: American Institute of Physics, 237 ~ 262
- [9] Xu M, Lewis R V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87: 7100 ~ 7124
- [10] Hinman M B, Lewis R V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. J Biol Chem, 1992, 267: 19320 ~ 19324
- [11] 王迎, 谢锦云, 梁宋平. 大腹圆蛛拖丝蛋白一级结构初步研究. 生物化学与生物物理学报, 1997, 29(5): 469 ~ 474
- [12] Hayashi C Y, Lewis R V. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. J Mol Biol, 1998, 275: 773 ~ 784
- [13] Guerette P, Ginzinger D, Weber B, et al. The spider silk fibroin gene family: gland specific expression controls silk properties. Science, 1996, 272: 112 ~ 115
- [14] Colgin M A, Lewis R V. Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like 'spacer regions'. Protein Sci, 1998, 7: 667 ~ 672
- [15] Erik J S, Wu Huaichuan, Neville R. The role of alanine sequences in forming beta-sheets of dragline spider silk. Journal of the American Chemical Society, 1997, 119(11): 5053 ~ 5054
- [16] Yang Z, Grubb D T, Jelinsky L W. Small angle X-ray scattering of spider dragline silk. Macromolecules, 1997, 30: 8254 ~ 8261
- [17] Thiel B L, Guess K B, Viney C. Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider MA silk. Biopolymers, 1996, 41: 703 ~ 719
- [18] Simmons A H, Michal C A, Jelinski L W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. Science, 1996, 271: 84 ~ 87
- [19] Kummerlin J, van Beek J, Vollrath F, et al. Local structure in spider dragline silk investigated by 2-dimensional spin-diffusion NMR. Macromolecules, 1996, 29: 2920 ~ 2928
- [20] van Beek J D, Beaulieu L. Solid-state NMR determination of the secondary structure of *Samia cynthia ricini* silk. Nature, 2000, 405(6790): 1077 ~ 1079
- [21] Yang Z, Liivak O, Seidel A, et al. Super contraction and backbone dynamics in spider silk: C-13 and H-2 NMR studies. Journals of the American Chemical Society, 2000, 122: 9019 ~ 9025
- [22] 潘志娟, 盛家镛, 陈宇岳. 大腹圆蛛牵引丝的结构与性能分析. 中国纺织大学学报, 2000, 26(5): 82 ~ 84

The Molecular Structure and Mechanical Properties of Spider Silks

Huang Zhihua Li Min

(Bioengineering College ,Fujian Normal University Fuzhou 350007)

Abstract Spiders produce a variety of high-performance structural fibres including the major ampullate dragline silk with more remarkable mechanical properties than the best synthetic fibres produced by modern technology. The cloning of genes for silk fibroins and the utility of modern macromolecular physi-chemical technology lead to an increase in the understanding which is related to fibroin sequence ,microstructure ,the mechanical properties and structure-property. The research of different kinds of silk fibroins provides opportunity in the synthesis of genetically engineered silk fibres with even higher performance.

Key words Spider silk Fibroin sequence Mechanical properties

(上接第 75 页)

Advance of Alkaline and Thermophilic Xylanase

Xie Fuhong Li Wenpeng Zhang Keqin

(Key Laboratory of Industrial Microbiology ,Fermentation Technology of Yunnan ,Yunnan University Kunming 650091)

Abstract Xylanases are important enzyme and have various applications in industry. Their application in pulp and paper industry is especially attractive since they can reduce some environmental pollutants. Those with higher thermostability and optimal activity at alkaline pH are of particular importance to the paper and pulp industry due to the demands of conditions under which the enzymatic reactions are carried out. There are two ways to obtain such enzymes , the first is to screen high-productivity microorganism from extreme environment ,the other is make use of site-directed mutagenesis as well as other high technology to alter wild enzyme more desirable. The advance of xylanase on the two aspects were reviewed.

Key words Xylanase Pulp and paper indutry Site-directed mutagenesis Protein engineering Error-prone PCR