

DOI: 10.13376/j.cblls/2021058

文章编号: 1004-0374(2021)05-0557-08

主要壶腹腺丝蛋白分子结构与机械性能之间的关系

秦瑞奇, 袁文肃*

(天津大学生命科学学院, 天津 300072)

摘要: 蜘蛛丝是性能优异的天然丝类材料, 其中主要壶腹腺丝蛋白产生的牵引丝具有极高的力学性能、良好的生物相容性和生物可降解性, 广泛应用于纺织、生物医学和环境工程等领域。深入研究蜘蛛丝蛋白分子结构与机械性能, 有助于理解蜘蛛丝蛋白的成丝机制, 为制备具有良好机械性能的人造蜘蛛丝纤维提供理论依据。该文围绕不同物种主要壶腹腺丝蛋白的分子组成、成丝机理和分子结构与机械性能之间的关系进行了阐述。

关键词: 主要壶腹腺丝蛋白; 牵引丝; 分子结构; 机械性能; 蜘蛛丝

中图分类号: Q812; TS102.3 **文献标志码:** A

The relationship between molecular structure and mechanical properties of the major ampullate spider protein

QIN Rui-Qi, YUAN Wen-Su*

(School of Life Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Spider silk is a natural silk material with excellent performance. The dragline silk produced by major ampullate spider protein has extremely high mechanical properties, biocompatibility and biodegradability, and widely used in textile, biomedicine, environmental engineering and other fields. To further study the molecular structure and mechanical properties of spider protein will help understand the mechanism of the silk fiber forming and provide a theoretical basis for the production of artificial spider silk fibers with better mechanical properties. This review introduces the molecular composition, mechanism of silk fiber forming as well as relationship between molecular structure and mechanical properties of different species.

Key words: major ampullate spider protein; dragline silk; molecular structure; mechanical properties; spider silk

蜘蛛可以分泌多种具有优异机械性能的蛛丝, 具有较好的工业前景, 广泛应用于生物医学和纺织等领域, 但天然蛛丝获取成本高昂, 限制了其在工业中推广应用。因此, 研究人员希望能够生产大量人造合成蛛丝蛋白纤维应用于科研或工业^[1]。由于蛛丝蛋白的种类和序列存在单一性, 导致目前对蛛丝蛋白形成丝纤维的作用机制没有较为清晰的认识。因此, 人造蛛丝纤维的机械性能与天然蛛丝相比具有一定的差异。目前合成生物学技术的发展为重组丝蛋白的设计和合成提供了一定的技术支持, 同时也为人造蛛丝纤维的机械性能调控提供了新的方法和思路, 通过合成生物学方法构建重组丝蛋白, 可进一步提高蛛丝纤维的机械性能^[2]。2020年,

Gonska等^[3]构建了一种既具有高度可溶性又能自组装的重组蛛丝蛋白, 采用新型的纺丝方法进行人工纺丝, 获得的人造蛛丝纤维的结构与天然丝纤维的结构特性类似。蛛丝通常由不同基因家族编码的蛛丝蛋白构成, 不同腺体中的丝蛋白基因序列相同或不同^[4-6]。圆网蜘蛛主要壶腹腺中产生的牵引丝作为蜘蛛的生命线, 由于其较高的强度而被广泛研究^[7-9]。牵引丝包含两种脯氨酸含量不同的蛛丝蛋白,

收稿日期: 2020-11-27; 修回日期: 2021-01-17

基金项目: 天津市自然科学基金项目(17JCYBJC-24200)

*通信作者: E-mail: yuanwensu@tju.edu.cn; Tel: 022-27403906

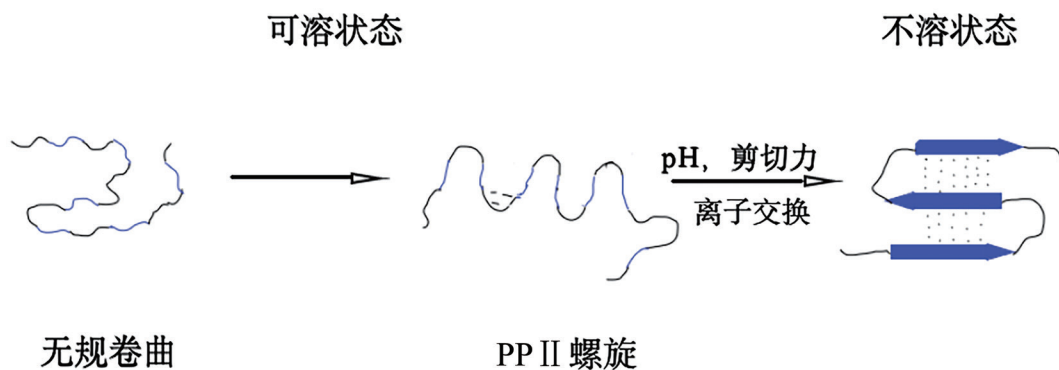
分别是主要腹壶腺丝蛋白 1 和 2 (MaSp1 和 MaSp2), 近年来新被发现的 MaSp3 丝蛋白也属于主要腹壶腺丝蛋白家族^[10-11]。主要壶腹腺中存在的非主要壶腹腺丝蛋白也参与了牵引丝纤维的组装^[12]。大多数蛛丝蛋白具有相同的结构特征, 即由重复核心区域和高度保守的非重复末端结构域组成, 重复核心区域包含一些高度重复的 GGX、GPGXX、(A)_n 和 (GA)_n 的短氨基酸基序 (其中 G = 甘氨酸, P = 脯氨酸, A = 丙氨酸, X = 酪氨酸)^[13]。2019 年, Knon 等^[14] 在研究 *Araneus ventricosus* MaSp3 的全长序列时发现, MaSp3 中除了存在 (A)_n 和 GPGXX 基序, 其重复结构域中还存在之前从未报道过的具有 Arg 的 GGR 基序。高浓度蛛丝蛋白以液态储存在腺体中, 在通过纺丝管的成丝过程中, 随着 pH 值降低 (7.2 到 5.7)、离子类型、离子浓度以及剪切力的改变, 可转变为固态的不溶性丝纤维^[15]。通过拉曼共聚焦光谱研究牵引丝的天然构象, 发现丝蛋白在形成丝纤维之前存在多种二级结构。2007 年, Thierry 等^[16] 在研究重复结构域时发现, 重复结构域中主要的二级结构是无规卷曲和原纤维中的多聚脯氨酸 II 型螺旋 (polyproline II, PP II 螺旋), 其中甘氨酸中存在的 PPII 螺旋被认为是牵引丝原纤维中重要的二级结构, 可溶的原纤维通过 PP II 螺旋相互作用形成 β -折叠结构, 在剪切力和生化环境改变时进一步形成丝纤维 (图 1)。

目前有两种理论对蛛丝纤维的形成进行了解释。第一种称为胶束理论, 该理论认为蛛丝蛋白以胶束形式储存在蜘蛛腹部, 蛛丝蛋白的亲水结构域构成胶束的边缘, 促使蛛丝蛋白可溶, 疏水结构域

则构成胶束的中心, 其中胶束大小取决于链的折叠程度和疏水相互作用。在形成丝纤维的过程中, 剪切力诱导了 β -折叠结构的形成, 同时纺丝管中 pH 降低促使蛛丝蛋白末端结构中的氨基酸发生质子化, 使得末端结构域从单体形式转变为二聚体形式, 这一转变防止了丝纤维的早熟^[17-18]。第二种称为液晶理论, 该理论认为蛛丝蛋白呈向列型液晶态, 以高浓度形式储存, 受到剪切力时蛛丝蛋白在纺丝管中发生自组装, 并形成与丝腺和纺丝管长轴平行的双层结构, 在这期间无规卷曲和 PP II 螺旋转变为 β -折叠结构^[19-21]。

1 蛛丝蛋白重复结构域

大部分丝蛋白的相对分子质量在 250~400 kDa 范围内。无规卷曲和 PP II 螺旋是丝蛋白重复结构域的主要成分, 重复结构域中大量 PP II 螺旋通过分子间相互作用促使丝蛋白形成稳定构象。丝蛋白具有的这种多重重复结构域的特性可能是导致丝纤维具有较强机械性能的重要原因。序列分析表明, 每个丝蛋白中的氨基酸序列可以被看作是一系列的重复基序, 通过比较不同类型丝蛋白发现 (A)_n、(GA)_n、GGX 和 GPGGX 四种氨基酸基序是共有的。天然丝中存在结晶区域和非晶区域, 结晶区域分散在非晶区域中。目前针对重复结构域研究最多的是多聚丙氨酸 (poly-Ala) 基序, 在天然丝有序的结晶区域中, 相邻的连续丙氨酸位于主链的侧面上, 可以通过疏水作用相互形成紧密结合的反平行 β -折叠。无定形的非晶区域主要是由多聚甘氨酸丙氨酸 (poly-Gly-Ala) 形成的 3_1 -螺旋和 β -转角构成, 但由于甘



丝蛋白中存在两种主要的二级结构, 分别是无规卷曲和 PP II 螺旋。物理条件的改变使得原纤维通过 β -折叠相互作用形成不溶性丝纤维。剪切力和生化环境的变化使末端结构域发生单体和二聚体之间的转变, 并参与可溶性蛛丝蛋白到不溶性丝纤维的转变过程。富含甘氨酸的区域显示为黑色, 聚丙氨酸区域显示为蓝色。

图1 可溶性丝蛋白到不溶性丝纤维的转变过程

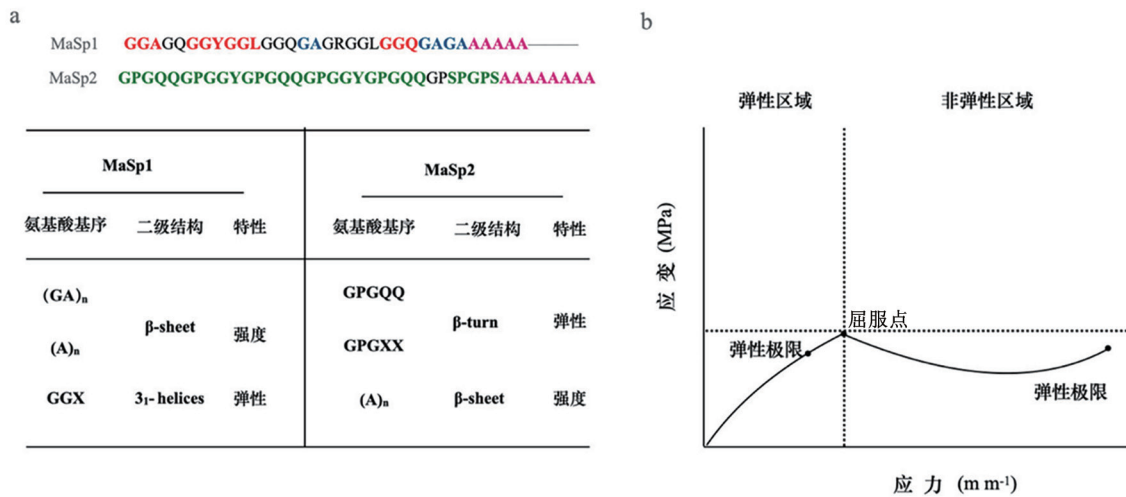
氨酸侧链之间无法形成疏水相互作用, 结合力比聚丙氨酸低, 所以含有 poly-Gly-Ala 的丝纤维与含有 poly-Ala 的丝纤维相比, 其拉伸性能较低^[22]。在剪切力的作用下, 主要壶腹腺丝蛋白中无定形区域的 β -转角转变为 β -折叠结构, 提高了丝纤维的机械性能。通过核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 和分子动力学 (molecular dynamics, MD) 分析 MaSp 中氨基酸基序的二级结构, 发现 GGX 基序 (X 代表任意氨基酸) 在非晶区域中形成 3_1 -螺旋结构, 在维持丝纤维强度方面发挥作用; GPGGX 基序中脯氨酸失去了形成氢键的酰胺质子, 在 MaSp2 中主要以 β -转角构象存在, 这一构象导致丝蛋白多肽链的移动, 在维持丝纤维的韧性方面发挥作用 (图 2a)^[22-24]。在描述丝纤维的机械性能时采用典型的应力应变曲线图: 在屈服点之前, 丝纤维具有弹性行为, 在失去应力的作用后恢复到原来的大小和形状; 屈服点之后, 在较大力作用下, 丝纤维则永久变形在一个特定区域内且横截面积变小, 表现为曲线的倾斜; 之后, 曲线上移表明丝纤维的应变硬化, 最终丝纤维断裂 (图 2b)。

基因表达模块分析不同氨基酸组成与机械性能之间的关系, 揭示了脯氨酸含量与丝纤维的力学性能之间存在正相关, 脯氨酸含量较高的丝纤维具有更高的拉伸性和超收缩性, 造成这种现象的原因主要是水影响甘氨酸富含基序的运动^[25-26]。离子环境

也会影响丝蛋白重复结构域的构象和动力学。纺丝管道中 Na^+ 和 Cl^- 浓度降低, SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 等的亲水离子增加, 主要壶腹腺纺丝原液中的高浓度 Na^+ 和 Cl^- 阻止了重复结构分子内和分子外相互作用并促进丝蛋白可溶, SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 等的浓度增加则促进了甘氨酸富含区域氢键的形成, 氢键的存在则有利于丝纤维中 β -sheet 结构的形成^[27]。当加入 PO_4^{3-} 后, 蛛丝蛋白自组装形成纳米丝纤维, 动力分析揭示了丝蛋白含有较多重复结构会缩短蛛丝蛋白自组装形成纳米丝纤维的时间^[28]。

2 蛛丝蛋白非重复N末端

蛛丝蛋白 N 末端结构域 (N-terminal domain, NTD) 是一个高度保守的五螺旋束, 长度通常为 120~140 个氨基酸, 表面存在大量的带电残基, 每个 NTD 亚基含有 4 个碱性氨基酸残基 (Lys53、His61、Arg62 和 Arg64)、6 个酸性氨基酸残基 (Asp35、Asp38、Asp39、Glu76、Asp126 和 Glu130)^[29]。pH 降低引起的酸性氨基酸质子化可诱导 NTD 发生单体和二聚体之间的转换, 在 pH 6.3 时, 往往会形成长度约为 700 nm 的复合物。由于离子组成和强度发生变化, 两个 NTD 单体 N 末端的正极和负极之间可以依靠静电相互作用形成反平行二聚体。NTD 二聚体的形成是由偶极-偶极相互作用导致的, 这对于丝纤维的形成至关重要。NTD 二聚体界面高度保守且疏水中心是一对螺旋 3 (helix3, H3), 一段保守序列使

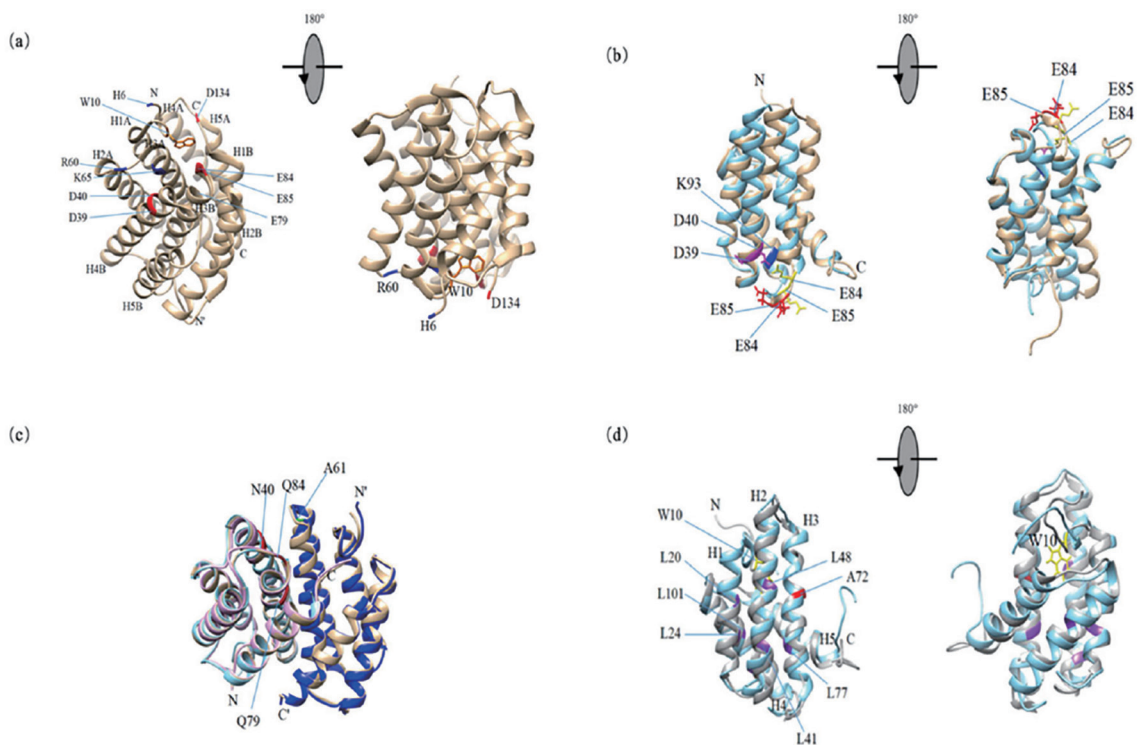


(a) MaSp1 和 MaSp2 重复结构域的氨基酸基序、二级结构以及在丝纤维机械性能方面的作用; (b) 典型的丝纤维应力应变曲线示意图。红色代表 MaSp1 的 GGX 基序; 粉色代表 (A)_n; 蓝色代表 (GA)_n; 绿色代表 MaSp2 中的 GPGGX 和 GPGQQ 氨基酸基序。应力代表丝纤维的强度, 应变代表丝纤维的延展性, 杨氏模量即斜率则代表丝纤维的硬度。

图2 MaSp重复结构域的部分氨基酸序列以及应力应变曲线示意图

H3 紧密地结合 NTD 亚基, NTD 二聚体对维持丝蛋白的稳定性具有一定的作用(图 3a)^[30]。*Nephila clavipes* 和 *Euprosthenoops australis* 的蛛丝蛋白 NTD 结构相似, 但 Asp40、Lys65 和 Glu84 之间的相互作用有一定的不同。为了观察 NTD 的理化性质, 在不同的 pH 条件下, 对野生型和突变型 (*E. australis*) NTD 进行滴定实验, 通过计算野生型和突变型 NTD 的静电荷含量得到滴定曲线, 发现酸性氨基酸单突变滴定曲线相比野生型滴定曲线出现上移, 但碱性氨基酸单突变滴定曲线相比野生型滴定曲线向下移动, 其中突变对于碱性氨基酸 R60、K65 和 K93 没有影响, 这些氨基酸仍保持完全质子化并使丝蛋白 NTD 二聚体不稳定, 突变对残基 H6、D40、E79、E84 的影响则较大^[31]。在中性条件下, E84 和 E85 在 NTD 单体和二聚体中所处的位置不同, 在 NTD 单体结构中处于无规卷曲的环境, 在 NTD 二

聚体结构中处于螺旋的环境; D39 和 D40 在 NTD 单体和二聚体的位置没有发生改变; 由于 Lys 的侧链位于内部, K93 突变对 NTD 二聚体的稳定性影响较小(图 3b)。滴定的保守氨基酸残基 Glu79、Glu84 和 Glu119 可增加 pKa 值, 并参与形成 pH 依赖的二聚体。2012 年, Wallace 和 Shen^[32] 提出 E79 和 E119 的质子化对 NTD 二聚体的形成至关重要。E79QE-119Q 双突变中加入 Glu84, NTD 趋向于形成二聚体, Glu84 与第三个高度保守的氨基酸残基 Asp40 之间具有紧密的相互作用, E84Q 和 T61A 突变的 NTD 结构与野生型 NTD 结构相比没有差异, 突变对野生型 NTD 二聚体影响较小(图 3c)^[33-34]。酸性氨基酸残基 D39、E76 和 E81 相继质子化形成紧密构象, 被认为是 NTD 单体转变为二聚体的关键。E81 或 E114 的突变会影响芳香族氨基酸 Trp9(W9) 侧链所处的环境, NTD 构象发生变化时, W9 会存在于更



(a) NTD二聚体的结构。酸性氨基酸残基(红色)位于 NTD 二聚体的一极, 碱性氨基酸残基(蓝色)位于NTD二聚体的另一极, 图中标注的氨基酸均参与了丝纤维的形成过程。(b) 在 pH 7.0时, NTD单体结构(PDB ID: 2LPJ浅蓝色)与NTD二聚体结构(PDB ID: 3LR2金色)存在差异, E84和E85在NTD单体和二聚体中所处的位置发生了变化。(c) D40N、E79Q、E84Q和T61A突变型的 NTD 结构分别与野生型NTD二聚体的两个亚基构象相比没有差异。(野生型NTD二聚体PDB ID: 3LR2金色; 突变型NTD二聚体结构PDB ID: 3LR8、3LRD和 6R9D, 分别是粉色、天蓝色和深蓝色)。(d) 在 *E. australis* 中, Met突变为Leu的突变型NTD结构(PDB ID: 6QJY天蓝色)与野生型NTD的结构(PDB ID: 2LPJ深灰色)相比存在差异, 其中紫色部分分别是L20、L24、L41、L48、L77、L101, 黄色代表Trp10(W10)。结构中重点标注的氨基酸为: 组氨酸(His, H)、色氨酸(Trp, W)、精氨酸(Arg, R)、赖氨酸(Lys, K)、天冬氨酸(Asp, D)、谷氨酸(Glu, E)、谷氨酰胺(Gln, Q)、半胱氨酸(Cys, C)、丙氨酸(Ala, A)、亮氨酸(Leu, L)。

图3 主要壶腹腺丝蛋白NTD结构

亲水的环境中。MaSp1 的 NTD 中酸性氨基酸突变后的 NMR 结构 (PDB 2N3E) 和晶体结构与 *E. australis* 野生型 MaSp1 (PDB 2LPJ) NTD 略有不同。K65 和 R60 的带电侧链可通过亚基间的盐桥稳定 NTD 二聚体构象^[35-36]。进一步分析 NTD 序列发现, 在牵引丝蛋白的 NTD 疏水核心中大量存在的 Met 稳定了丝蛋白构象, Met 侧链为丝蛋白二级和三级结构提供动力。六个 Met 突变为侧链能形成更多范德华相互作用的 Leu 后, 突变型 NTD 构象与野生型 NTD 构象相比存在差异 (图 3d)。分子动力学 (MD) 可以通过计算的方法提供氨基酸突变后的 NTD 构象。除了氨基酸突变引起的结构变化以外, pH 和盐也可使 *L. hesperus* 中 MaSp1 的 NTD 构象发生变化^[37]。2020 年, Chakraborty 等^[38] 研究葡萄状腺丝蛋白 (aciniform silk protein, AcSp) N 端的 MaSp 末端结构域序列发现, 当蛛丝腺体中的 pH 从中性变为酸性或者是从高盐变为低盐时, AcSp 的 NTD 组装形成大的聚体而不是形成二聚体。NMR 与同源建模研究表明, AcSp 和 MaSp 的 NTD 单体结构相似, 但却有着不同的电荷分布, 对 AcSp NTD 结构的研究有利于进一步了解 AcSp 丝纤维形成的机制。

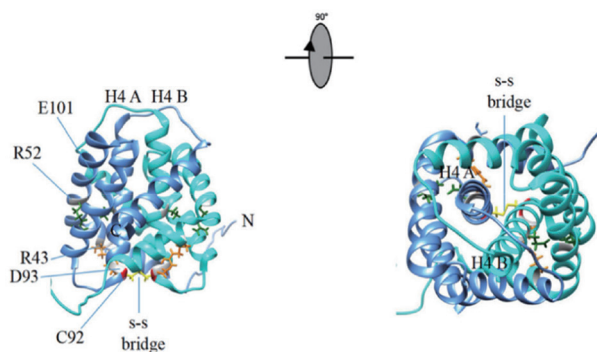
关键氨基酸残基 E79、E119、E84、D39、E76、E81 相继质子化促使 NTD 单体转变为二聚体, K65 和 R60 通过形成盐桥进一步稳定 NTD 二聚体, 而 Met 突变为 Leu 则进一步稳定 NTD 单体。总的来说, 这些氨基酸均参与了 NTD 二聚化的过程, 其优点是防止丝蛋白在腺体中过早聚集和促使二聚体快速形成, 进而保持二聚体在纺丝管中的稳定性。外部环境的 pH 和离子间的静电相互作用同样影响了 NTD 二聚体的形成。NTD 二聚体的锁定对于丝纤维的形成至关重要。

3 蛛丝蛋白非重复 C 末端

丝蛋白在腺体中的储存、组装以及重复结构域的重排是由非重复末端控制的。丝蛋白的 C 末端结构域 (C-terminal domain, CTD) 通常由 80~110 个氨基酸组成, 在不同物种中高度保守^[39-40]。CTD 二聚体有较强的疏水性, 且含有易于发生疏水性 β 聚集的序列 VLIQALLEVVSALIQIL, 类似于淀粉样蛋白^[41]。CTD 的天然结构隐藏了核心的疏水残基, 使表面的亲水残基暴露在外, 从而确保了丝蛋白的可溶性。ADF-3 (*Araneus diadematus* fibrion 3) 的 CTD 是一个平行取向的二聚体五螺旋束, 最长的螺旋 4 (H4) 位于二聚体的中心。每个 CTD 单体在 H4 的

N 末端都有一个半胱氨酸残基形成分子间二硫键 (图 4), 两个盐桥存在于两个单体最保守的位置, 从而将 H1 和 H2 固定在 H4 的侧面^[42]。带电残基的突变对保持非重复结构域的完整性至关重要, 盐桥的缺失会导致整个结构域的热稳定性降低。

中性条件下的天然重组 MaSp1 的 CTD, 其 CD 光谱呈现典型的 α -螺旋结构。当 pH 降至 5.0 时, CTD 仍能保持 α -螺旋结构; 当 pH 进一步降至 4.0 和 3.0 时, 可以观察到 CTD 的吸收峰从 208 nm 到 206 nm 的轻微移动, 显示出 CTD 的结构发生微小变化, 出现了一些 β -转角或无序结构^[43]。CTD 结构的不稳定性与 pH 3.0 和 4.0 下熔融小球的存在 (缺乏三级结构, 但保持二级结构) 有关, 在自然状态下, 熔融小球的疏水残基掩埋在核心结构域中, 一旦出现特定条件, 蛋白质将失去三级结构并暴露疏水性基团, 利用 8-苯胺基萘-1-磺酸 (ANS) 荧光检测 CTD 暴露的疏水基团发现, ANS 显示出与疏水基团较强的亲和力, 疏水残基的最大吸收峰从 510 nm 变为 490 nm。熔球状态促进 CTD 的有序聚集和晶体的形成, 使两个带电残基天冬氨酸 (Asp63) 和谷氨酸 (Glu71) 与碱性氨基酸 (Arg13 和 Arg22) 相互作用形成盐桥^[44]。化学变性剂和氯化钠滴定 ¹⁵N 标记的丝蛋白 CTD 后, 异核单量子相关 (heteronuclear single quantum coherence, HSQC) 图谱反映了 CTD 中氨基酸的化学位移变化, 化学位移变化主要发生在盐桥附近。在化学变性剂的存在下, 盐桥附近最先发生解折叠, 氯化钠由于阻止了分子内和分子外的相互作用而稳定了 CTD 的构象。在特定条件下, 只有具有非重复结构域的丝蛋白才能发生聚集并形成



CTD 二聚体由两个亚基组成, 分别是亚基 A (蓝色) 和亚基 B (青色), CTD 二聚体的两个亚基中均存在 Arg 与 Glu 和 Asp 之间形成的盐桥, 两个亚基通过二硫键 (黄色) 相互连接。 (PDB ID: 2KHM)

图4 ADF-3 CTD二聚体结构

成有序的 β - 折叠结构, 其功能是可以使丝蛋白稳定储存并促使丝纤维形成。

保守的 NTD 和 CTD 对维持丝蛋白在主要壶腹腺体中的稳定性具有一定的作用。离子环境的改变导致 NTD 形成反平行二聚体, 通过影响重复结构的有序排列进而控制丝蛋白的组装; 同样地, CTD 二聚体也通过调控重复结构使其形成 β - 折叠结构进而影响丝蛋白的组装。末端非重复结构域在防止主要壶腹腺体中丝蛋白的聚集和调控丝纤维的组装中发挥着重要且独立的作用。末端非重复结构域之间不存在相互作用, 这有利于一步步控制丝蛋白形成丝纤维。

4 丝纤维机械性能

天然蛛丝的综合力学性能优于绝大多数人工合成纤维, 这是由于天然蛛丝纤维中丝蛋白结构较好造成的。丝纤维的主要结构是由结晶和非晶区域嵌合形成的微米尺度的原纤维, 其中结晶区域是由氢键以及 poly-Ala 和 poly-Gly-Ala 侧链相互作用形成的, 无序肽链束则组装成无定形基质, 丝纤维的强度和韧性主要受几何空间、无定形基质和长度的限制。晶体亚单位是天然丝纤维的主要成分, 运用有限元 (finite element, FE) 分析了不同晶体大小对丝纤维弹性和韧性的影响, 发现增加晶体的 β - 折叠结构会增加丝纤维的弹性模量、韧性和断裂力, 增加 β - 折叠股会降低这些丝纤维机械特征。蛛形纲动物会利用丝蛋白基因的多样性形成不同类型的丝蛋白以应对复杂的环境。一些含有多外显子结构的丝蛋白通过选择性剪接的方式增加转录多样性, 这种方式形成的丝蛋白剪接体进一步提高了丝纤维的机械性能^[45]。人工合成纤维的机械性能与丝蛋白的相对分子质量有关。2020年, Wen 等^[46]研究 *Araneus ventricosus* 葡萄状丝蛋白 2 (aciniform silk protein2, AcSp2) 的一级结构发现, AcSp2 的一级结构与 AcSp1 的一级结构类似, 均含有保守的末端结构域和独特的重复结构域, 其中 AcSp2 在溶液中的二级结构主要是 α - 螺旋, 由 AcSp2 蛋白制备的人工合成纤维, 其机械性能与丝蛋白的相对分子质量之间存在一定的正相关。因此, 深刻了解丝蛋白分子结构和机械性能之间的关系对于生产更高质量的丝纤维至关重要。

外部环境也会影响牵引丝的机械性能。Porter 等^[47]认为丝纤维的直径大小会对丝纤维的韧性造成一定的影响, 牵引丝纤维较小的直径和高密度的氢键是其具有较好机械性能的重要影响因素。在合

成纤维中, 丝纤维的力学性能与纺丝速度有关, 过高的卷绕速度会导致断裂应变的降低^[48]。丝纤维的机械性能与纺丝条件存在一定的关系, 不同的后处理方式会对丝纤维的机械性能产生一定的影响^[49-50]。当纤维处于水中时, 其直径增加, 长度减小, 这种现象被称为超收缩。Shao 等^[51]用拉曼光谱研究了当丝纤维处于水或者甲醇中时的收缩现象, 发现这一现象伴随着丝纤维中的二级结构从高度有序的 β - 折叠转变为无序的螺旋和无规卷曲, 丝纤维中 β - 折叠含量的降低导致丝纤维的硬度降低。然而, 分子结构相较于环境对丝蛋白的影响更大, 分子内部结构的改变可以提高丝纤维的机械性能, 而外部环境同样是通过影响丝蛋白中的二级结构影响丝纤维的机械性能。

丝纤维机械性能的研究可以用典型的应力 - 应变曲线来描述, 曲线可以清晰地显示自然纤维和人造纤维的机械性能。逐渐发展的计算方法在深入了解丝纤维的机械性能方面具有重要的作用, 分子动力学 (SMD) 方法揭示了应力 - 应变曲线中的 4 个状态, 早期关于丝纤维机械性能的研究建立了弹性网络模型。该模型比较了单纤维和成纤维束在不同湿度下处理前和处理后的杨氏模量 (GPa)、强度 (GPa) 和延展性 (%); 另一种方法是在分子水平上通过控制丝纤维能量的存储和释放来揭示其机械性能^[47,52]。这些计算方法证实了结晶区域和非晶区域在提高丝纤维机械性能中的作用。

5 总结

不同类型的蛛丝蛋白大多含有相似的结构, 丝蛋白结构决定了丝纤维的力学性能。保守氨基酸基序 GGX 倾向于形成螺旋结构, GGX 基序是丝蛋白晶体中 β - 折叠结构和无序结构之间转变的桥梁, 相邻的 GGX 螺旋相互作用维持丝纤维中蛋白质分子的排列; GPGXX 氨基酸基序形成类似于 β - 转角的结构, GPGXX 基序的重复数量与丝纤维的延展性之间存在正相关, 其中脯氨酸的含量与丝纤维的延展性之间有着较大的关系。在生理条件下, 天然折叠的末端结构域作为单独的分子开关将可溶性丝蛋白组装成高度有序的结构, 随着纺丝管中 pH 逐渐降低, 氨基酸残基之间利用静电相互作用保持 NTD 单体和二聚体结构的稳定; 特定的物理化学条件使 CTD 发生一定的结构转变, 并参与丝纤维形成; 较长的重复结构域会提高丝纤维的强度和硬度。丝蛋白分子结构的研究与丝纤维机械性能计算方法的

结合, 详细描述了有序基序对蜘蛛牵引丝的形成以及机械性能的影响。因此, 深刻了解丝蛋白分子结构和机械性能之间的关系有利于人造纤维的合成。

6 讨论

为了解决蜘蛛较难捕捉和具有较强攻击性等难题, 工业上利用重组技术和人工纺丝方法制备了人造丝纤维。利用原核、真核或者是动物宿主表达系统得到的重组蛛丝蛋白的可溶性仍较差且得率较低; 另外, 人工纺丝需要高浓度的蛛丝蛋白, 而蛛丝蛋白在高表达过程中会发生聚集, 但在蜘蛛腺体中却能以 30%~50% (W/V) 的高浓度可溶形式储存。天然丝纤维具有复杂的二级、三级和四级结构, 人工纺丝得到的丝纤维与天然丝纤维相比有一定的偏差, 且对外部环境的湿度敏感。目前通过人工纺丝方法制备的人造丝纤维还达不到天然丝纤维的机械性能。随着人工纺丝技术的不断发展, 人造成丝纤维的机械性能将会逐渐提高。

[参 考 文 献]

- [1] Gosline JM, Demont ME, Denny MW. The structure and properties of spider silk. *Endeavour*, 1986, 10: 37-43
- [2] Liu K, Li JJ, Ma J, et al. Biological synthesis of structural proteins and applications. *Acta Polym Sin*, 2020, 51: 698-709
- [3] Gonska N, Lopez PA, Lozano-Picazo P, et al. Structure-function relationship of artificial spider silk fibers produced by straining flow spinning. *Biomacromolecules*, 2020, 21: 2116-24
- [4] Wen R, Wang K, Liu X, et al. Molecular cloning and analysis of the full-length aciniform spidroin gene from *Araneus ventricosus*. *Int J Biol Macromol*, 2017, 117: 1352-60
- [5] Wen R, Liu X, Meng Q. Characterization of full-length tubuliform spidroin gene from *Araneus ventricosus*. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105: 702-10
- [6] Chaw RC, Saski CA, Hayashi CY. Complete gene sequence of spider attachment silk protein (PySp1) reveals novel linker regions and extreme repeat homogenization. *Insect Biochem Mol Biol*, 2017, 81: 80-90
- [7] Gosline JM, Guerette PA, Orllepp CS, et al. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol*, 1999, 202: 3295-303
- [8] Vollrath F. Strength and structure of spiders' silks. *Mol Biol*, 2000, 74: 67-83
- [9] Blackledge TA, Hayashi CY. Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *J Exp Biol*, 2006, 209: 2452-61
- [10] Malay AD, Kazuharu A, Keiji N, et al. Analysis of repetitive amino acid motifs reveals the essential features of spider dragline silk proteins. *PLoS One*, 2017, 12: e0183397
- [11] Collin MA, Clarke TH, Ayoub NA, et al. Genomic perspectives of spider silk genes through target capture sequencing: conservation of stabilization mechanisms and homology-based structural models of spidroin terminal regions. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 829-40
- [12] Shanafelt M, Rabara T, Macart D, et al. Structural characterization of black widow spider dragline silk proteins CRP1 and CRP4. *Molecules*, 2020, 25: 3212
- [13] Lewis RV. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chem Rev*, 2006, 106: 3762-74
- [14] Knon N, Nakamura H, Ohtoshi R, et al. Orb-weaving spider *Araneus ventricosus* genome elucidates the spidroin gene catalogue. *Sci Rep*, 2019, 9: 8380
- [15] Römer L, Scheibel T. The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*, 2008, 2: 154-61
- [16] Thierry L, Jérémie L, Franois J, et al. Conformation of spider silk proteins *in situ* in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 2342-4
- [17] Jin HJ, Kaplan DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 2003, 424: 1057-61
- [18] Yamada H, Nakao H, Takasu Y, et al. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Mat Sci Eng C Mater*, 2001, 14: 41-6
- [19] Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001, 410: 541-8
- [20] Bunning JD, Lydon JE. The cellular optical texture of the lyotropic nematic phase of the caesium pentadecafluorooctanoate (CsPFO)/water system in cylindrical tubes. *Liq Cryst*, 1996, 20: 381-5
- [21] Giesa T, Perry CC, Buehler MJ. Secondary structure transition and critical stress for a model of spider silk assembly. *Biomacromolecules*, 2016, 17: 427-36
- [22] Asakura T. Structure and dynamics of spider silk studied with solid-state nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulation. *Molecules*, 2020, 25: 2634
- [23] Hayashi CY, Shipley NH, Lewis RV. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *Int J Biol Macromol*, 1999, 24: 271-5
- [24] Malay AD, Kazuharu A, Keiji N, et al. Analysis of repetitive amino acid motifs reveals the essential features of spider dragline silk proteins. *PLoS One*, 2017, 12: e0183397
- [25] Marhabaie M, Leeper TC, Blackledge TA. Protein composition correlates with the mechanical properties of spider (*Argiope trifasciata*) dragline silk. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 20-9
- [26] Agnarsson I, Boutry C, Wong SC, et al. Supercontraction forces in spider dragline silk depend on hydration rate. *Zoology*, 2009, 112: 325-31
- [27] Nur AO, Akimasa M, Fumiaki H, et al. Ion effects on the conformation and dynamics of repetitive domains of a spider silk protein: implications for solubility and β -sheet formation. *Chem Commun*, 2019, 55: 9761-4
- [28] Humenik M, Magdeburg M, Scheibel T. Influence of

- repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins. *J Struct Biol*, 2014, 186: 431-7
- [29] Askarieh G, Hedhammar M, Nordling K, et al. Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature*, 2010, 465: 236-8
- [30] Landreh M, Askarieh G, Nordling K, et al. A pH-dependent dimer lock in spider silk protein. *J Mol Biol*, 2010, 404: 328-36
- [31] Barroso DS, Fernando L, Pasquali S, et al. Electrostatics analysis of the mutational and pH effects of the N-terminal domain self-association of the major ampullate spidroin. *Soft Matter*, 2016, 12: 5600-12
- [32] Wallace JA, Shen JK. Unraveling a trap-and-trigger mechanism in the pH-sensitive self-assembly of spider silk proteins. *J Phys Chem Lett*, 2012, 3: 658-62
- [33] Schwarze S, Zwettler FU, Johnson CM, et al. The N-terminal domains of spider silk proteins assemble ultrafast and protected from charge screening. *Nat Commun*, 2013, 4: 2815
- [34] Jiang W, Askarieh G, Shkumatov A, et al. Structure of the N-terminal domain of *Euprosthenois australis* dragline silk suggests that conversion of spidroin dope to spider silk involves a conserved asymmetric dimer intermediate. *Acta Crystallogr D*, 2019, 75: 618-27
- [35] Kronqvist N, Otikovs M, Chmyrov V, et al. Sequential pH-driven dimerization and stabilization of the N-terminal domain enables rapid spider silk formation. *Nat Commun*, 2014, 5: 3254
- [36] Guerette PA, Ginzinger DG, Weber BHF, et al. Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science*, 1996, 272: 112-5
- [37] Bauer J, Schaal D, Eisoldt L, et al. Acidic residues control the dimerization of the N-terminal domain of black widow spiders' major ampullate spidroin 1. *Sci Rep*, 2016, 6: 34442
- [38] Chakraborty R, Fan JS, Lai CC, et al. Structural basis of oligomerization of N-terminal domain of spider aciniform silk protein. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4466
- [39] Bini E, Knight DP, Kaplan DL. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *J Mol Biol*, 2004, 335: 27-40
- [40] Hagn F, Eisoldt L, Hardy J G, et al. A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*, 2010, 465: 239-42
- [41] Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, et al. A comparative study of the relationship between protein structure and β -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol*, 2004, 342: 345-53
- [42] Ittah S, Michaeli A, Goldblum A, et al. A model for the structure of the C-terminal domain of dragline spider silk and the role of its conserved cysteine. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 2768-73
- [43] Perczel A, Hollosi M, Sandor P, et al. The evaluation of type I and type II β -turn mixtures. *Int J Pept Prot Res*, 1993, 41: 223-36
- [44] Gauthier M, Leclerc, Jérémie, et al. Effect of pH on the structure of the recombinant C-Terminal domain of nephila clavipes dragline silk protein. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 4447-54
- [45] Wang K, Wen R, Meng Q. Properties of two spliceoforms of major ampullate spidroin 1 reveal unique functions of N-linker region. *Int J Biol Macromol*, 2020, 157: 67-74
- [46] Wen R, Wang K, Meng Q. Characterization of the second type of aciniform spidroin (AcSp2) provides new insight into design for spidroin-based biomaterials. *Acta Biomater*, 2020, 115: 210-9
- [47] Porter D, Cuan J, Vollrath F. Spider silk: super material or thin fibre? *Adv Mater*, 2013, 25: 1275-9
- [48] Vollrath F, Porter D. Spider silk as a model biomaterial. *Appl Phys A*, 2006, 82: 205-12
- [49] Koeppel A, Holland C. Progress and trends in artificial silk spinning: a systematic review. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 226-37
- [50] Pérez-Rigueiro J, Madurga R, Gañán-Calvo AM, et al. Straining flow spinning of artificial silk fibers: a review. *Biomimetics*, 2018, 3: 29
- [51] Shao ZZ, Vollrath F, Sirichaisit J, et al. Analysis of spider silk in native and supercontracted states using Raman spectroscopy. *Polymer*, 1999, 40: 2493-500
- [52] Lang G, Neugirg BR, Kluge D, et al. Mechanical testing of engineered spider silk filaments provides insights into molecular features on a mesoscale. *ACS Appl Mater Inter*, 2017, 9: 892-90