

蚕丝和蜘蛛丝纤维多级结构对力学性能的影响

张鸿昊^{1, 2, 3}, 林乃波^{1, 2, 3*}, 刘向阳^{1, 2, 3*}

(厦门大学 1.材料学院生物材料系; 2.生物仿生及软物质研究院; 3.福建省柔性功能材料重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘 要: 家蚕丝和蜘蛛丝纤维具有力学性能优异、生物可相容和生物可降解等诸多优点。本文阐述了蚕丝和蜘蛛丝的一级结构、二级结构、 β -折叠晶体网络(纳米纤维)结构和形成过程, 综述了丝蛋白亲疏水域, 分子量和晶体网络结构对力学性能的影响。其中, 晶体网络结构的强度是影响力学性能的关键, 由拓扑结构、相关长度、取向度和连接或者相互作用的强度这四个因素决定, 这四个因素的总结为力学性能的控制及提高提供了指导。

关键词: 蚕丝; 蜘蛛丝; 多级结构; 力学性能

中图分类号: TS 149

文献标志码: A

Effects of Multi-Level Structure of Silk and Spider Silk Fiber on Mechanical Properties

ZHANG Hong-hao^{1, 2, 3}, LIN Nai-bo^{1, 2, 3*}, LIU Xiang-yang^{1, 2, 3*}

(1. College of Materials, Department of Biomaterials; 2. Research Institution for Biomimetics and Soft Matter; 3. Fujian Key Provincial Laboratory for Soft Functional Materials Research, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Bombyx mori silk and spider dragline silk fibers have many advantages such as excellent mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. Compared with Bombyx mori silk fiber, spider dragline silk fiber has more excellent comprehensive mechanical properties, however, spiders cannot be raised and spider silks cannot mass produced. The mechanical difference between two kinds of fibers could be caused by the multi-level structure. This article describes the primary structure, secondary structure, β -crystal network (nanofibril) structure and the formation process of multi-level structure of the Bombyx mori silk and spider dragline silk fibers. The effects of the hydrophobic and hydrophilic domain, molecular weight and crystal network structure on the mechanical properties of silk protein fibers are reviewed. Among them, the strength of the crystal network is the key to the mechanical properties, which is determined by the four factors of topological structure, correlation length, degree of orientation, and strength of the connection or interaction. The summary of these four factors provides guidance for the control and improvement of the mechanical properties. Super strong silk fibers can be obtained by controlling the crystal

network using regenerated silk fibroin protein or specific recombinant spider silk protein with genetic engineering technique as raw materials. Based on the concept of multi-level structure of *Bombyx mori* silk and spider dragline silk fibers, the crystal networks in particular, the new understanding acquired will transfer the research and engineering of protein fiber to a new phase.

Key words: *Bombyx mori* silk fiber; spider dragline silk fiber; multi-level structures; mechanical properties

蚕丝纤维作为一种天然纤维在中国为人类服务已经超过了 4000 年的时间, 蚕丝穿着时具有柔软和凉爽的舒适感, 一直作为奢侈的衣服织品原材料, 是古代中国与其他国家地区贸易的重要商品。在西汉时期开辟出了一条闻名世界的“丝绸之路”, 成为了中国古代外交和社会繁荣的象征。蜘蛛丝纤维相比于丝素蛋白纤维而言拥有更加优秀的力学性能, 即便与力学性能最优异的人造纤维相比也毫不逊色^[1], 但是由于蜘蛛同类相食的特性无法大规模饲养, 所以蜘蛛丝的商业化一直没法实现。由于蚕丝和蜘蛛丝优异的力学性能、生物相容性和可降解等优点, 从上世纪开始, 生物、化学和材料等领域的科学家就开始投入大量的精力对其进行研究。

蚕属于节肢动物门昆虫纲鳞翅目, 有桑(家)蚕、柞蚕、蓖麻蚕、木薯蚕、柳蚕和天蚕等品种, 其中对桑(家)蚕的产量最大, 对其研究最为广泛, 本文中除非特殊说明, 所称蚕丝一般代指桑(家)蚕丝。蜘蛛属节肢动物门蛛形纲蜘蛛目, 非昆虫, 截至 2010 年底, 全球已知蜘蛛 100 科 5420 属 4205005 种, 中国大陆有 67 科约 3800000 种, 大多数的蜘蛛至少含有六种丝腺, 如大壶状腺, 小壶状腺, 鞭状腺和聚状腺等, 蜘蛛丝蛋白经由各自的通道, 最终由丝疣之处拉出, 不同丝腺分泌出的蜘蛛丝也具有不同的物理性质, 以达成不同的功能或建构复杂的蜘蛛网。大壶状腺丝主要功能为蜘蛛随时都会牵引著的曳丝、蜘蛛圆网上的辐射状丝及骨架丝, 必须能够承受较大的张力且不容易断裂, 所以大壶状腺丝的物理性质也偏向强且硬。

丝素蛋白丝和蜘蛛大壶状腺丝均是具有多级结构的天然材料(如图 1 所示), 两者优秀的综合力学性能与它们的多级结构有着密不可分的关系^[2-4]。丝素蛋白纤维和蜘蛛大壶状腺丝纤维看似光滑的表面, 其实是由许许多多取向的纳米纤维束组成的, 纳米纤维则是由 β -折叠晶体和无定型态的蛋白质相互连接构成的渔网状结构所组成^[5, 6], β -折叠晶体在渔网状结构中作为承载应力的节点, 而无定型结构则像绳子一般将一个个节点(β -折叠晶体)连接起来, 形成了一种既柔韧、强度又高的结构^[7]。研究蚕丝和蜘蛛大壶状腺丝纤维多级结构以及结构对力学性能影响一直是该领域的热点, 有诸多争议和不清楚的地方。

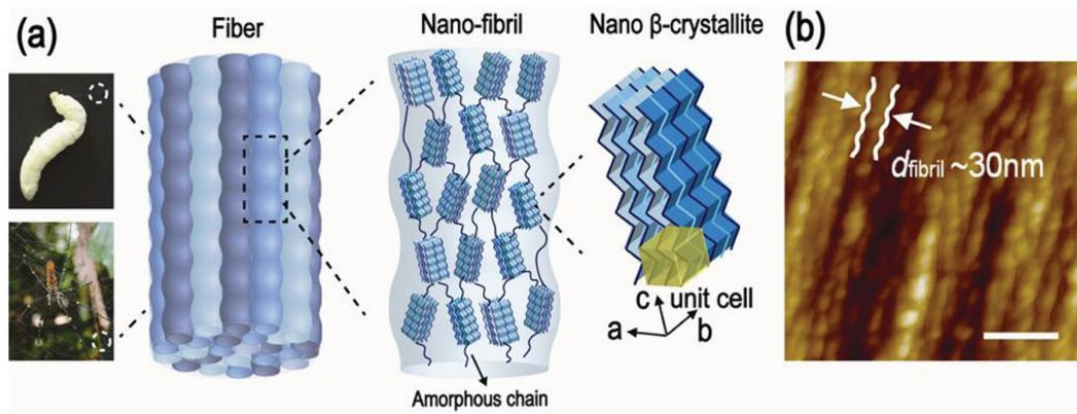


图 1 桑蚕丝素蛋白和蜘蛛大壶状腺丝纤维的多级结构, 两者都是由直径为数十个纳米的纳米纤维组成, 纳米纤维则是由 β -折叠晶体通过无定型的二级结构连接形成的网络^[2]

Fig. 1 The multi-level structures of *Bombyx mori* silk and spider dragline silk fibers. Both are composed of nanofibrils with a diameter of several tens of nanometers, and the nanofibrils are crystal networks formed by β -sheet crystals connected with each other through amorphous secondary structures^[2]

1 天然蚕丝和蜘蛛大壶状腺丝的结构及形成过程

1.1 天然蚕丝纤维和蜘蛛大壶状腺丝纤维的形成过程

蚕的丝腺结构如图 2 所示, 丝素蛋白和丝胶蛋白都在丝腺当中合成, 而丝腺又分为三个部分: 细小而弯曲的后部 (posterior), 较宽的中部 (middle) 和前部 (anterior)。只有丝腺的后部合成重链和轻链蛋白以及一种辅助蛋白, P25。丝素蛋白随后从内腔被运输到丝腺的中部, 此时丝素蛋白以一种不稳定的凝胶态存在直到这些丝素蛋白被用于纺丝, 而在丝腺的中部开始分泌出少量丝胶蛋白并逐渐在丝腺的前部达到分泌量的最大值, 最终与丝素蛋白凝胶一起通过口器挤出形成纤维, 丝胶蛋白把丝素蛋白纤维包裹在其中^[8]。丝素蛋白纤维直径在 10 到 18 μm 之间, 是一种具有多级结构的天然纤维^[3]。

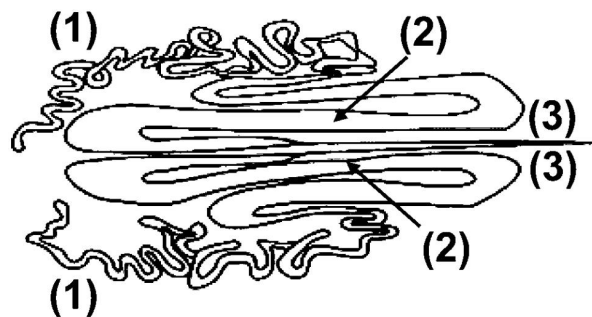


图 2 蚕的丝腺结构。(1) 是细小而弯曲后部, (2) 是 S 型的中部, (3) 是狭小的导管^[9]

Fig. 2 The silk gland structure of silkworms. (1) is a small, curved posterior secretory part, (2) is the S-shape middle secretory part, and (3) is a narrow duct^[9]

蜘蛛大壶状腺喷丝头如图 3 所示，蜘蛛大壶状腺由很长的尾部和很宽的液囊构成，尾部是分泌纺丝原液的主要部位，而液囊则是储藏纺丝原液的部位。大壶状腺蛋白在 A 区和 B 区合成，其中 A 区的蛋白质构成纤维的核心部分，B 区合成的蛋白质薄薄地一层包覆在纤维表面，随后通过漏斗状结构进入导管部分形成纤维，纤维经过瓣膜以后进入狭窄的管状区域快速吸水，最后通过喷丝口牵引而出。

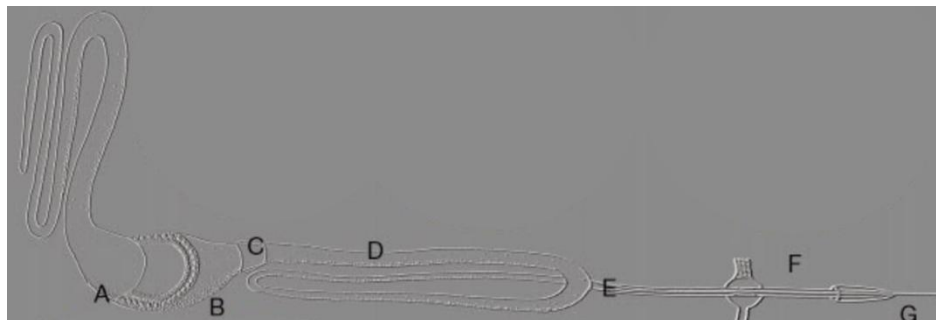


图 3 蜘蛛大壶状腺喷丝头。(A) A 区，(B) B 区，(C) 漏斗状结构，(D) 导管，(E) 瓣膜，(F) 管状区域，(G) 喷丝口^[10]

Fig. 3 Spider dragline spinneret. (A) A-zone, (B) B-zone, (C) funnel structure, (D) duct, (E) valve, (F) tubular area, (G) spigot^[10]

1.2 天然蚕丝纤维和蜘蛛大壶状腺丝纤维的结构

如图 4 所示，桑蚕吐出的蚕丝纤维是由两根丝素蛋白纤维外面包裹一层丝胶蛋白粘结在一起，丝素蛋白纤维具有很优异的力学性能而丝胶蛋白只是作为一种粘结物质存在^[11]。

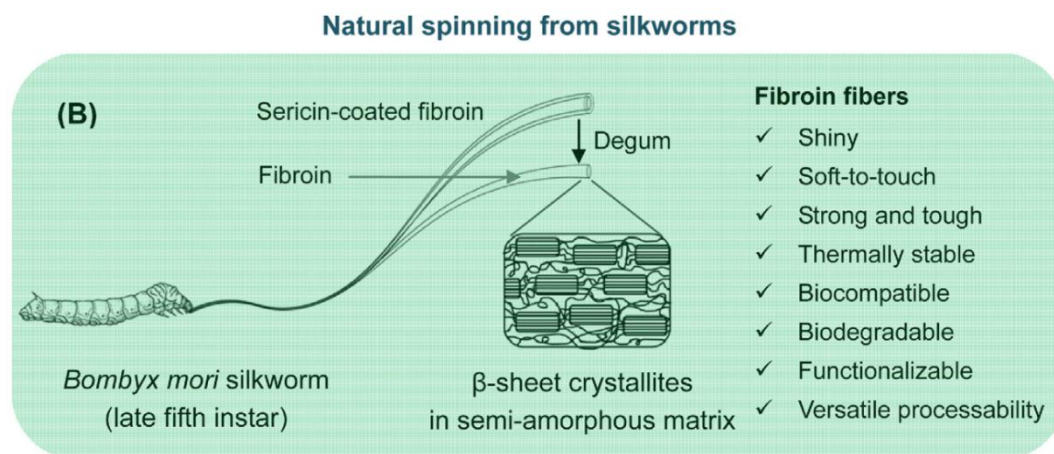


图 4 蚕丝纤维由丝素蛋白和丝胶蛋白构成，丝胶蛋白内部包裹的丝素蛋白纤维，具有诸多优异的性能^[11]

Fig. 4 *Bombyx mori* silk fiber is composed of silk fibroin and sericin, and silk fibroin encapsulated in sericin has many excellent properties^[11]

图 5 所示是两种丝蛋白的一级结构，由于蛋白质分子中氢键作用不同造成不同的构象，形成了无规卷曲、 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠等二级结构^[7]。丝素蛋白纤维由重链（分子量约 391 kDa）和轻链（分子量约

26 kDa) 两种丝素蛋白以 1:1 的比例通过二硫键连接形成, 重链带有 85 个残余的 C 端 (C-terminal) 序列, 而轻链则在丝素蛋白纤维中扮演着一个不重要的角色。根据基因序列的推算, 重链带有 5263 个氨基酸残基, 其中甘氨酸 (glycine, Gly, G) 占有氨基酸成分的 45.9%, 丙氨酸 (alanine, Ala, A) 占 30.3%, 丝氨酸 (serine, Ser, S) 12%, 酪氨酸 (tyrosine, Try) 占 5.3%, 缬氨酸 (valine, Val) 占 1.8%, 剩余其他 15 种氨基酸只占 4.7%。大部分氨基酸序列比较简单, 形成了 2377 个重复的 Gly-X (GX) 二肽序列, 而 GX 的重复序列是 β -折叠和纤维整体的基本构建单元。由于氨基酸序列中包含大量的 GX 重复序列, 所以一定会构成能够引起 X 射线衍射的结构—— β -折叠晶体。重复序列 GX 中, X 为 Ala 占 64%, Ser 占 22%, Tyr 占 10%, Val 占 3%, Thr 占 1%, 而其他 14 中氨基酸则不存在这种重复序列当中。上述的二肽中有百分之二的起始氨基酸是丙氨酸 (Ala) 而不是甘氨酸 (Gly), 这种情况只发生在 GAAS 这种重复了 41 次的四肽当中。六肽 GAGAGS 重复了 433 次, GAGAGY 重复了 120 次, Y 指代 Tyr 等其他氨基酸, 这两种六肽占有 GX 重复序列的 70%。相比于 GX 重复序列的部分, 连接两个重复域 (domain) 之间的氨基酸残基是非重复的, 或者称作“无定型 (amorphous)”, 这一概念是相对于“结晶 (crystalline)”域而言^[12]。

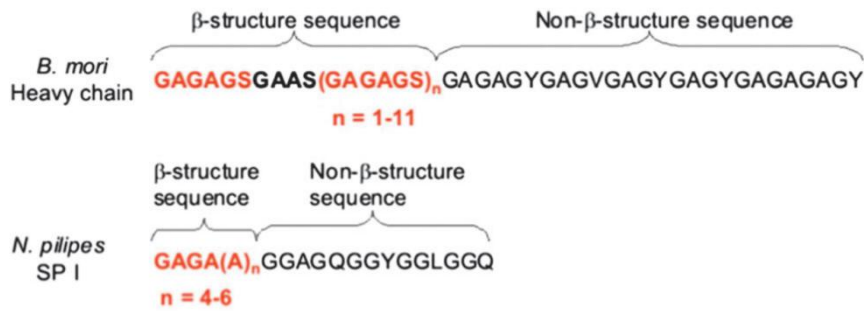
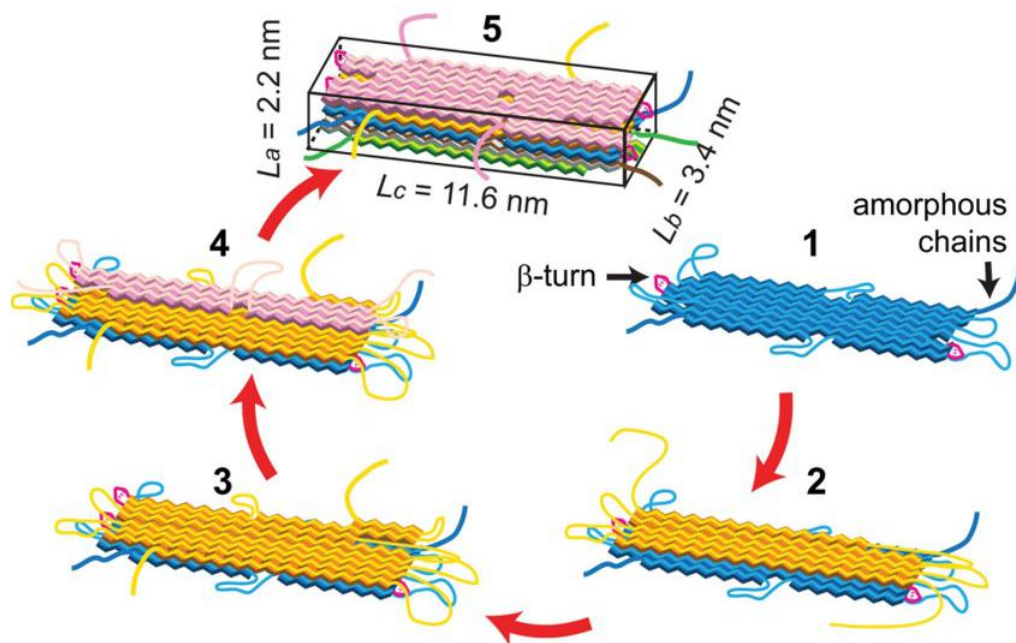


图 5 丝素蛋白重链和蛛丝蛋白 MaSp1 的一级结构^[3]

Fig. 5 Primary structure of silk fibroin heavy chain and spider silk protein MaSp1^[3]

β -折叠晶体的生长过程如图 6 所示, β -折叠晶体则是以 β -折叠为模板, 其他丝素蛋白分子在这个模板上形成新的一层 β -折叠, 然后如此往复、一层层堆叠最终形成了 β -折叠晶体, 该过程就是成核生长的过程^[7]。 β -折叠晶体正交晶胞的晶格常数为 $a = 0.938 \text{ nm}$, $b = 0.949 \text{ nm}$, $c = 0.698 \text{ nm}$ 。丝素蛋白中的 β 结构可以用 $\text{GAGAGSGAAS(GAGAGS)}_n$, $n=1-11$ 的重复氨基酸序列来表示^[2, 9, 12, 13]。蛋白质可以分为无规卷曲 (random coil), α -螺旋 (α -helix), β -转角 (β -turn) 和 β -折叠 (β -sheet), 其中 β -折叠又可以分为平行 β -折叠和反平行 β -折叠, 各种二级构象在一定条件下可以发生相互转变^[14]。丝素蛋白作为一种半晶质材料, 其综合力学性能是由结晶区和非晶区共同决定的, 一般认为丝素蛋白优异的力学强度是由高度有序的 β -折叠以及由 β -折叠构成的结晶区所赋予的, 而非晶区, 包括无规卷曲, α -螺旋和 β -转角则提供了丝素蛋白纤维弹性^[11, 15]。

图 6 β -折叠晶体的生长过程^[7]Fig. 6 β -sheet crystal growth process^[7]

蜘蛛大壶状腺丝纤维主要由两种大壶状腺蛛丝蛋白 MaSp1 和 MaSp2 构成, 其中 MaSp2 蛋白的脯氨酸含量明显高于 MaSp1^[16]。大壶状腺蛛丝蛋白的分子量在 200-350 kDa 之间, 由 40-200 种氨基酸重复 100 次左右构成了主体部分, 由聚丙氨酸链段和富集甘氨酸/脯氨酸的模块 (GPGXX, X 主要是酪氨酸、亮氨酸和谷氨酰胺) 构成, 其中聚丙氨酸链段折叠成的 β -折叠可以形成 β 晶体, 为蜘蛛大壶状腺丝纤维提供了强度, 而富集甘氨酸/脯氨酸的模块则提供弹性和柔性^[16]。

2 丝蛋白结构对力学性能的影响

力学性能是丝蛋白材料功能的基础, 只有优异的力学性能才能保证材料在使用过程中正常发挥其功能性和持久性^[17, 18]。本部分将从丝蛋白结构的角度总结其对力学性能的影响。

2.1 丝蛋白亲疏水域

Shangchao Lin 等利用耗散粒子动力学模拟的方法研究了分子内亲疏水域比例对形成丝素蛋白纤维的影响^[19]。蛋白分子形成纤维的过程中需要经历剪切流变的过程, 如图 7 所示, 只有 H (AB)₂ 中形成了脆弱的晶体网络, 并在剪切流变后受到很大程度的破坏, 而其他两种多肽序列无论剪切流变前后都没有形成晶体网络, 证明只有适中的亲疏水域比例才能形成连接的晶体网络从而进一步形成丝素蛋白纤维。

Randolph V. Lewis 通过蜘蛛腺体中 MaSp1 氨基酸序列的测试发现, MaSp1 中亲疏水域比例十分接近 1:1, 而蜘蛛大壶状腺丝的强度又证明了这一亲疏水域的比例确实最有利于动物蛋白纤维的力学性能^[20]。

即使同为蜘蛛大壶状腺丝, 但是品种不同的蜘蛛吐出的蜘蛛大壶状腺丝在氨基酸亲疏水域的比例上却

有着略微的不同，而这种略微的区别对于蜘蛛大壶状腺丝的综合力学性能却有着巨大的影响。Todd A. Blackledge 等通过研究表明，络新妇蛛大壶状腺丝中丙氨酸的比例为 21.1%~27.5%，而十字园蛛大壶状腺丝中丙氨酸的比例则为 17.6%，意味着前者的蛛丝蛋白中拥有更多的疏水域，最终导致的结果就是前者的杨氏模量为 8~14 GPa，而后者的杨氏模量仅为 4 GPa，由此也可以看出丝蛋白中亲疏水域比例对最终丝蛋白纤维的力学性能有着巨大的影响^[21]。

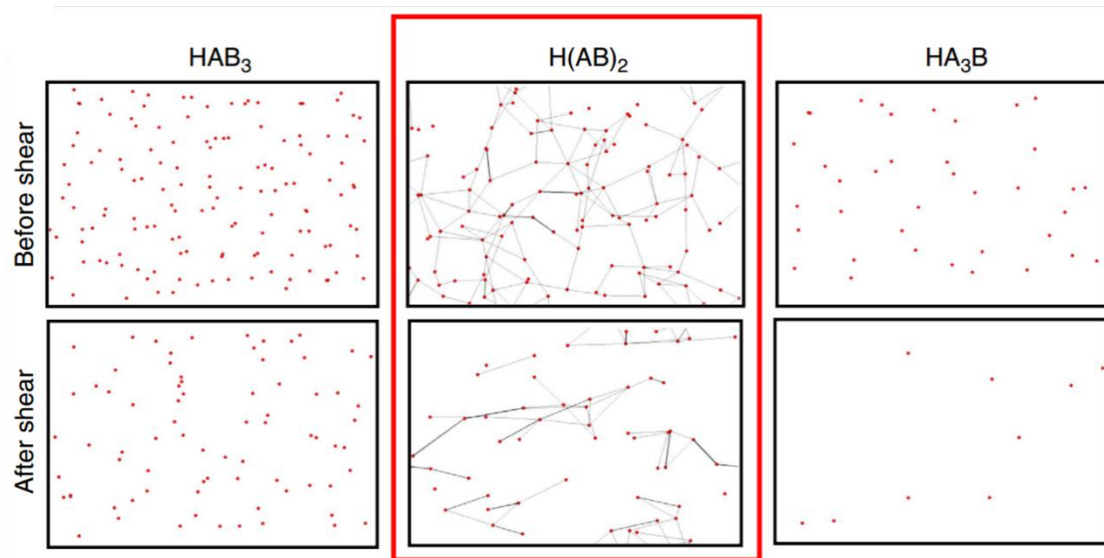


图 7 三种多肽序列的“节点-桥”模型表示剪切流变前后晶体网络结构的变化。“A”为疏水域，“B”为亲水域，“H”为亲水的终端域，红色点代表晶体，黑色线代表晶体间的相互作用力^[19]

Fig. 7 The "node-bridge" model of the three polypeptide sequences represents the changes in the crystal network structure before and after shear rheology. "A" is a hydrophobic domain, "B" is a hydrophilic domain, "H" is a hydrophilic terminal domain, red dots represent crystals, and black lines represent interaction between crystals^[19]

2.2 丝蛋白分子的分子量

2.2.1 丝蛋白分子量对力学性能影响 丝素蛋白重链分子量约 391 kDa^[12], 大壶状腺蛛丝蛋白分子量约为 350 kDa^[16], 都是典型的生物大分子, 因此用于形成纤维的丝蛋白分子量对最终形成的蛋白纤维的力学性质也有十分重要的影响。Shangchao Lin 等还研究了分子链长度对形成丝素蛋白纤维的影响^[19]。如图 8 (a) 和 (b) 所示, H(AB)₄ 和 H(AB)₁₂ 对应的分子量分别为 12 kDa 和 44 kDa。从图 (c) 和 (d) 可以看出长链蛋白分子形成的晶体网络更加致密, 内部有更稳定的结构。从图 (e) 和 (f) 可以看出长链蛋白分子受到剪切力作用后晶体间的相互作用力更强了, 并且还保持着均匀连续的网络结构, 而短链蛋白分子受到剪切力以后虽然部分晶体间的相互作用力变强了, 但剪切力也破坏了部分相互作用力, 使得晶体网络变得不连续。因此可以得出结论, 长链丝蛋白更有利于形成力学性能优异的丝蛋白纤维。

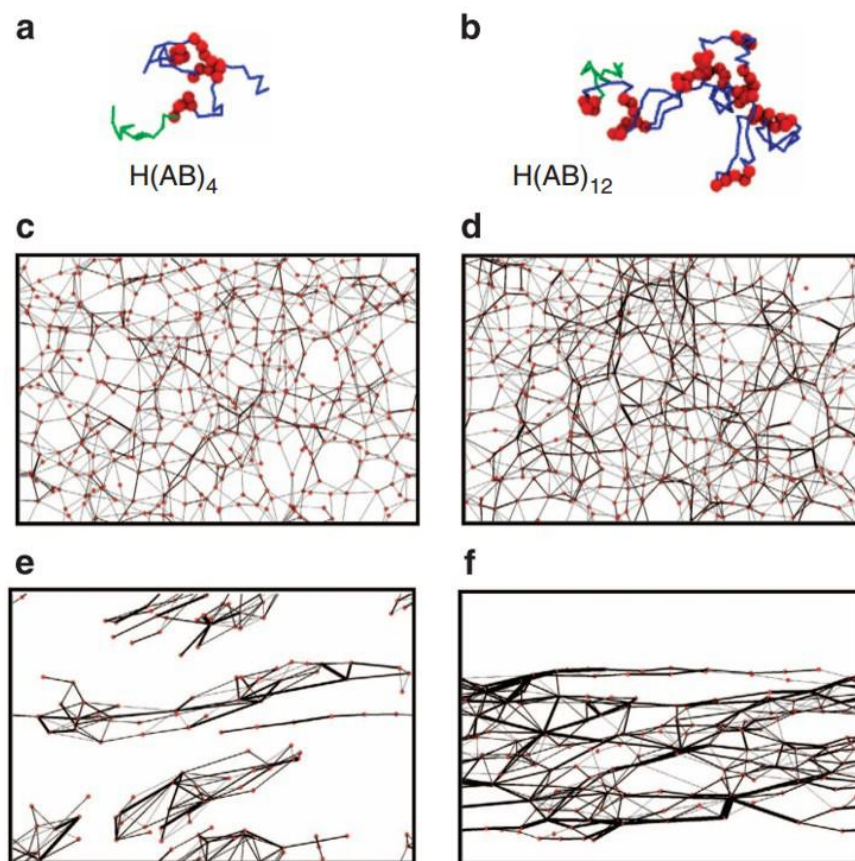


图 8 短链多肽序列 H(AB)₄ (左列) 和长链多肽序列 H(AB)₁₂ (右列)。(a)、(b) 单个蛋白的示意图, (c)、(d) 蛋白溶液剪切流变前和 (e)、(f) 蛋白溶液剪切流变后的“节点-桥”模型。黑色实线的粗细程度代表“桥”重叠的程度, 即晶体之间相互作用力的大小^[19]

Fig. 8 Short-chain polypeptide H(AB)₄ (left column) and long-chain polypeptide H(AB)₁₂ (right column). (a), (b) Schematic of individual proteins. “Node-bridge” models of protein solution (c), (d) before shear rheology and (e), (f) after shear rheology. The degree of the black solid line thickness represents the degree of overlap of the “bridge”, that is, the magnitude of the interaction between the crystal^[19]

Guanqiang Zhou 等研究表明对丝素蛋白分子施加剪切力可以提高丝素蛋白纤维内部分子的取向度, 最终导致丝素蛋白纤维的力学性能提高^[22]。Ning Du 等同样观察到使用拉伸剪切应力提高蜘蛛吐丝的速度可以提高蜘蛛大壶状腺丝纤维内部晶体的取向, 最终也使得蜘蛛大壶状腺丝纤维的力学性能明显提高^[23]。无论是丝素蛋白纤维还是蜘蛛大壶状腺丝纤维在纤维轴向上有着优异的拉伸断裂强度, 而施加非拉伸应力的时候二者却是十分柔软的材料, 剪切力和拉伸力对丝蛋白的分子链和分子链聚集态结构均有使之取向排列的作用, 因此, 对形成力学性能优异的丝蛋白纤维都有至关重要的贡献。

Xiao-Xia Xia 等利用基因工程合成了不同分子量的重组蜘蛛丝蛋白, 通过实验证明了分子量对再生蜘蛛丝蛋白纤维的结构和力学性能的影响^[24]。由图 9 可以看出由重组蛛丝蛋白分子量最小的 16 mer 得到的再生蛛丝蛋白纤维截面有许多不规则的孔洞, 孔洞的大小随着分子量增加到 32 mer 和 64 mer 时逐渐减小, 当分子量达到与天然蛛丝蛋白分子量 250–320 kDa 相当的 96 mer (分子量 284.9 kDa) 时孔洞几乎消失, 可能的原因是分子量越大, 裸露的分子链末端就越少, 在纤维成型时造成的缺陷就越少。纤维截面孔洞的存在必然会降低纤维的力学性能, 因此重组蛛丝蛋白分子量增加可以提高再生蛛丝蛋白纤维的力学性能^[24]。

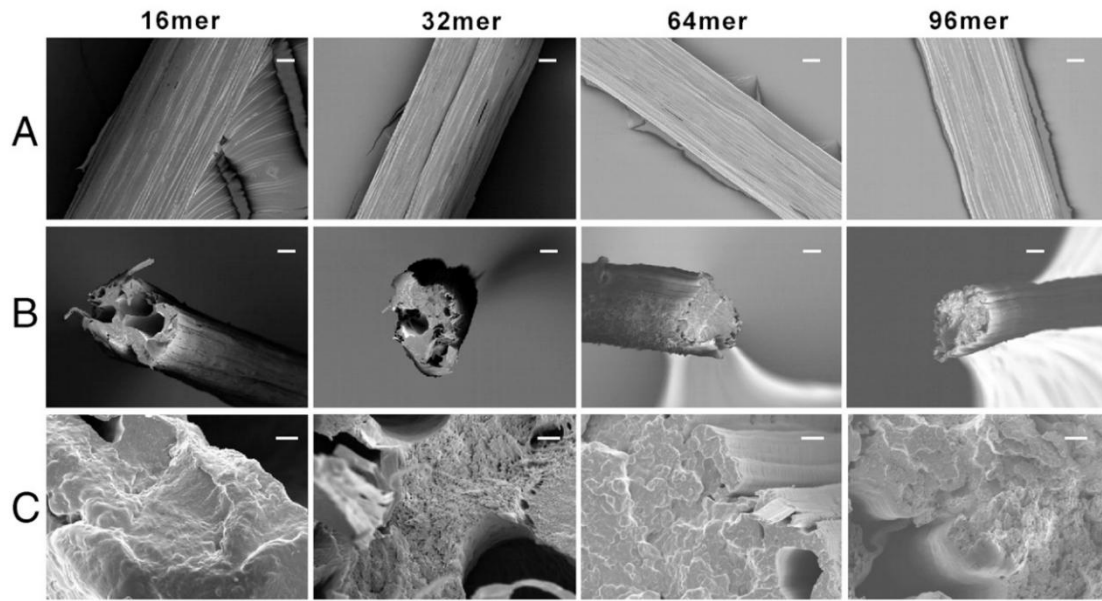


图 9 不同分子链长度的重组蛛丝蛋白制备得到的再生蛛丝蛋白纤维场发射扫描电子显微镜形貌图。(A) 表面形貌, (B) 和 (C) 断裂点处的形貌。比例尺: (A) 和 (B) 是 10 μm , (C) 是 1 μm 。16-96 mer 代表氨基酸序列重复 16-96 次, 对应分子量为 54.6-284.9 kDa^[24]

Fig. 9 Field emission scanning electron microscope images of the regenerated spider silk protein fibers spun from recombinant spider silk solution with different molecular weight. (A) Topography, (B) and (C) morphology at break. Scale bars: (A) and (B) are 10 μm , (C) is 1 μm . The 16-96 mer represents 16-96 amino acid sequence repeats and corresponds to a molecular weight of 54.6-284.9 kDa^[24]

2.2.2 丝纤维的处理对分子量的影响 由于蚕丝纤维中只有丝素蛋白纤维具有优异的力学性能和生物相容性,而包裹在丝素蛋白纤维外层的丝胶蛋白不提供任何力学性能,甚至会引起生物炎症的现象,所以蚕丝纤维在使用之前都需要进行脱胶除去丝胶蛋白^[25],而蚕丝的脱胶方式有许多,不同的脱胶方式都会对丝素蛋白的分子量造成一定的降解。同样,脱胶后得到的丝素蛋白纤维溶解方法也有很多,不同的溶解方法也会对丝素蛋白的分子量造成一定的降解。由之前的讨论可知分子量越低越不利于丝素蛋白纤维的成型,最终得到的丝素蛋白纤维力学性能就越差,所以得到对丝素蛋白纤维降解效果最弱的洗丝方式和溶解方法是制备力学性能优秀的再生丝素蛋白纤维的必备条件。

Hiromi Yamada 等利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对不同洗丝方式对丝素蛋白分子量降解的效果进行了分析^[26]。结果发现使用煮沸的 Na_2CO_3 溶液会对丝素蛋白纤维造成强烈的降解效果,使用 Ajisawa 试剂(CaCl_2 :乙醇:水=1:2:8,摩尔比)溶解后的丝素蛋白分子也发生了明显的降解,但是使用 LiSCN 溶液溶解后的丝素蛋白分子降解程度很小。Qin Wang 等证明和 LiSCN 溶液同为锂盐溶液的 LiBr 溶液也可以最大程度上保持丝素蛋白分子不降解,而且脱胶时采用 NaHCO_3 溶液而不采用 Na_2CO_3 也可以尽量保持丝素蛋白分子不降解^[27]。而 David L Kaplan 领导的实验室采用 NaHCO_3 溶液脱胶和 LiBr 溶液溶解的方式,并且得到了数量众多的实验成果^[25]。

目前许多实验室也意识到了分子量对纤维宏观性能的影响,希望通过使用交联剂的方法对最终纤维的性能进行改性^[28, 29]。

2.3 丝蛋白的晶体网络

天然丝素蛋白纤维和蜘蛛大壶状腺丝纤维拥有出色的机械性能与丝素蛋白纤维的一级结构、二级结构、 β -折叠晶体网络(纳米纤维)以及纳米纤维之间的相互作用力等多级结构有关。丝素蛋白纤维内由蛋白质/多肽的 β -折叠堆砌而成的纳米结构(例如纳米纤维)拥有显著的机械稳定性^[30, 31],主要是由于 β -折叠自身具有优异的力学稳定性^[22],以及构成晶体网络的独特拓扑结构进一步提高了结构的稳定性。在丝素蛋白纤维中纳米结构单元彼此是如何连接的,而各种结构单元的含量是多少,这些都决定了丝素蛋白纤维最终独特的宏观性能,目前已经发展出许多对丝素蛋白材料晶体网络表征的方法,例如 X 射线衍射(XRD)^[32, 33],电子显微镜^[34, 35],核磁共振^[36, 37],傅里叶红外光谱^[13, 14],拉曼光谱^[22],原子力显微镜(AFM)^[7]等,人们借助上述表征方法对丝素蛋白纤维的内部结构也有了很广泛的研究。

研究表明丝素蛋白纤维并不是由单独的一个晶体网络构成,而是由一系列独立的晶体网络(纳米纤维)扭结在一起形成的^[7],相邻纳米纤维之间主要是依靠物理接触或者弱的相互作用构成的整体^[3]。因此丝素蛋白纤维的宏观性能既决定于低维度的晶体网络内部结构,也决定于高维度的晶体网络-晶体网络之间的相互作用。如图 10A 所示在丝素蛋白纤维中,因为纳米纤维在成型过程中受到拉伸取向的作用所以使纳米纤维

朝着纤维方向高度取向, 纳米纤维和纳米纤维之间紧凑排列, 可以形成很强的相互作用力, 最终使丝素蛋白纤维拥有优异的力学性能^[23, 38]。而如图 10B 所示的丝素蛋白凝胶中, 由于纳米纤维生长的过程当中没有外部作用力诱导纤维的生长方向, 所以纳米纤维会朝着各个方向自由生长形成多个各向同性的纳米簇, 纳米纤维簇之间由于空间上分布不致密而且中间充斥着水分子, 所以纳米纤维簇之间的相互作用力相对于丝素蛋白纤维而言十分的弱, 导致丝素蛋白的水凝胶力学性能远不如丝素蛋白纤维^[38]。因此, 对纳米纤维进行取向致密排列是得到力学性能优异的再生丝素蛋白纤维的又一关键。

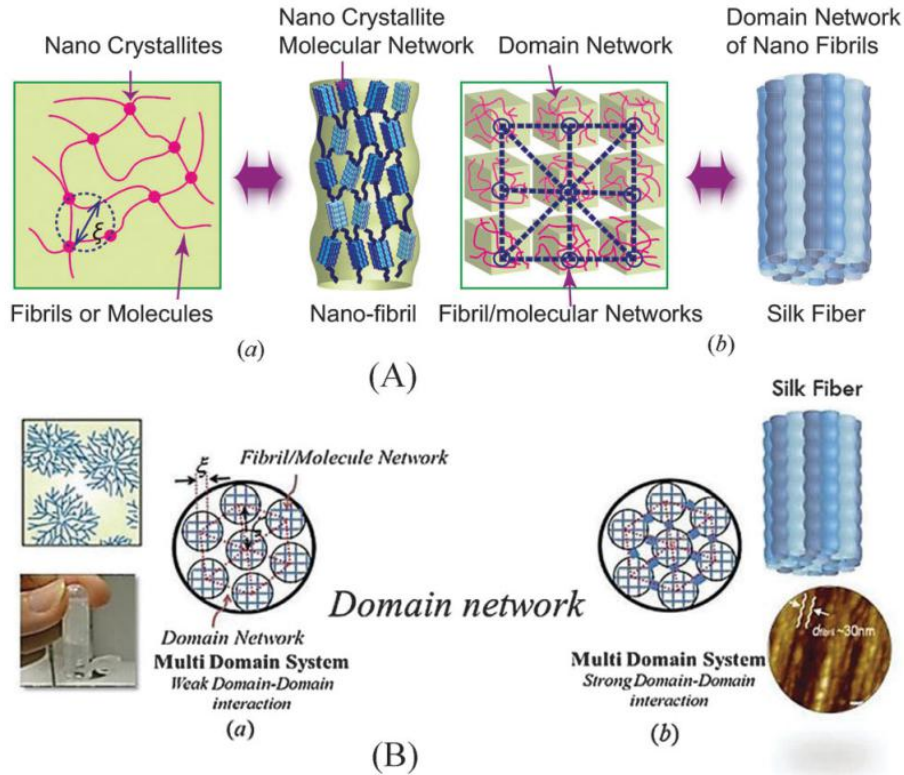


图 10 (A) 为丝素蛋白纤维的多级结构示意图, 图 A (a) 所示以 β -折叠晶体为节点、以无定型二级结构为纽带而形成的纳米晶体网络就是纳米纤维的主体, 由于丝素蛋白纤维的形成过程中受到剪切力取向的作用, 所以纳米晶体网络 (纳米纤维) 就会沿着纤维方向择优取向^[23, 39], 如图 A (b) 各个独立的晶体网络 (纳米纤维) 受到取向力以后就会如麻绳一般扭结在一起形成了纳米纤维束, 从而赋予了纳米纤维之间很强的相互作用力, 这种结构也给丝素蛋白纤维带来了优异的强度与韧性。但是在凝胶, 支架和薄膜等无取向或者弱取向的再生丝素蛋白材料中, 各个独立的晶体网络 (纳米纤维) 朝着各个方向自由生长 (如图 B(a)), 无法形成致密的纳米纤维网络, 所以纳米纤维之间的相互作用力很弱, 导致再生丝素蛋白材料的宏观力学性能也不尽如人意, 图 B (b) 的原子力显微镜 (AFM) 图则展示了丝素蛋白纤维中纳米纤维沿着纤维轴向有序排列形成致密的网络结构, 这种网络结构内部则有着很强的相互作用力^[3]

Fig. 10 A is a schematic of the multi-level structure of the silk fibroin fibers. The nanocrystal network shown in A(a) with the β -sheet crystal as the node and the amorphous secondary structure as the link is the main body of the nanofibrils. Due to the effect of the shear force during fiber formation, nanocrystal networks (nanofibrils) are

preferentially oriented along the fiber direction^[23, 39]. As A(b) shows, individual crystal networks (nanofibril) are subjected to the orientation force will then be twisted together as a twine to form a nanofibril bundle, giving the nanofibrils a strong interaction. This structure also gives silk fibroin fibers an excellent strength and toughness. However, in non-orientated or weakly oriented regenerated silk fibroin materials such as gels, scaffolds and films, the individual crystal networks (nanofibrils) grow freely in all directions (see B(a)) and cannot form dense nanofibril network, so the interaction between nanofibrils is very weak, resulting in the mechanical properties of these regenerated silk fibroin material are not satisfactory. The AFM pattern in Figure B(b) shows the nanofibrils in silk fibroin fibers. A dense network structure is formed in an orderly manner along the axial direction of the fiber, and there is a strong interaction inside the network structure^[3]

晶体网络结构可以说是与材料宏观性能最密不可分的控制因素之一，晶体结构中拓扑结构、相关长度、取向度和连接或者相互作用的强度这四个因素又决定了晶体结构的强度。许多研究发现 β -折叠晶体是丝素蛋白纤维的纳米结构单元， β -折叠晶体是通过无定型的丝素蛋白分子相互连接而成，最终形成了一种“渔网状”的结构（如图 11 所示）^[3, 7]，正是这种独特的结构赋予了丝素蛋白纤维优异的力学性能。如何提高并控制再生丝素蛋白纤维的结晶度和网络密度是提高再生丝素蛋白纤维力学性能的一个重要关键。

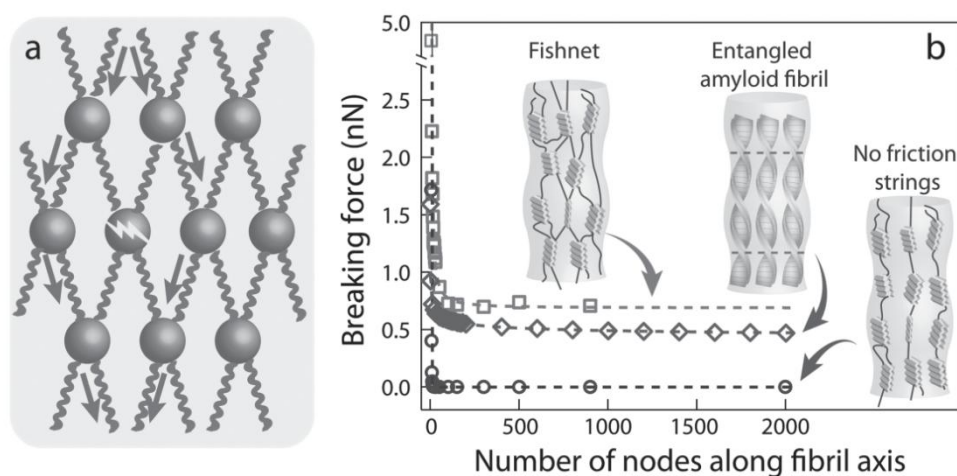


图 11 (a) 渔网状结构模型，断裂晶体附近的晶体可以有效的分担应力不至于使纤维整体断裂。(b) 相比于扭转的淀粉原纤和串状原纤，渔网状结构赋予材料的宏观力学强度最优异^[7]

Fig. 11 (a) Fishnet-like structures model shows crystals near the fractured crystal can effectively share stress without breaking the fiber as a whole. (b) The fishnet-like structure gives materials the best strength compared to entangled amyloid fibrils and no friction strings^[7]

Sung-Won Ha 等使用甲醇和水的混合液作为凝固浴制备再生丝素蛋白纤维^[40]，Enrico Marsano 等使用乙醇作为凝固浴制备再生丝素蛋白纤维^[41]，但最终制备的再生丝素蛋白纤维断裂伸长仅仅只有 2% 不到，远低于天然丝素蛋白纤维的 15%。目前已有许多文献证明使用醇类作为凝固浴制备再生丝素蛋白纤维得到的纤维断裂伸长都十分的低，主要是因为醇类会诱导丝素蛋白迅速结晶，使得内部丝素蛋白分子结构以杂乱无

序的状态稳定下来, 毫无取向可言, 十分不利于再生丝素蛋白纤维的力学性能, 因此以醇类作为凝固浴并不是一种很好的选择。

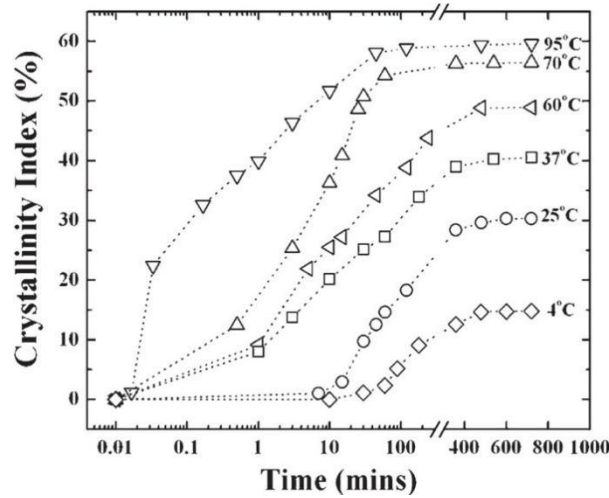


图 11 再生丝素蛋白材料受到不同温度的蒸汽处理后结晶度随时间的变化, 图片来自^[42]。

Fig. 11 The change in regenerated silk fibroin materials crystallinity over time treated with steam annealing at different temperatures^[42].

Xiao Hu 等研究表明可以通过对再生丝素蛋白材料施加水蒸气退火的方式提高材料的结晶度^[42], 并且该方法促使丝素蛋白结晶是一个缓慢连续的过程, 有利于再生丝素蛋白纤维内部晶体的取向, 最终提高纤维的力学性能^[22]。通过抽真空的方式可以控制不同的蒸汽温度, 从图 11 可以看出, 再生丝素蛋白材料受到的蒸汽温度越高结晶度上升的越快, 最终得到的结晶度也越高。如果结晶度不够高再生丝素蛋白材料甚至很容易溶于水, 也有实验证明了通过蒸汽提高结晶度可以明显提高再生丝素蛋白纤维的断裂强度^[22]。

Masuhiko Tsukada 等使用甲醇对再生柞蚕丝素蛋白薄膜进行处理, 结果表明丝素蛋白的二级构象也会发生从 α -螺旋到 β -折叠的转变, 并提高了薄膜的结晶度^[43]。Haeyong Kweon 等则对再生柞蚕丝素蛋白薄膜进行热处理, 同样观察到了丝素蛋白的二级构象会从 α -螺旋转变为 β -折叠, 并提高薄膜的结晶度^[44]。而 J. D. van Beek 等对蓖麻蚕的研究表明, 蓖麻蚕丝纤维中丝素蛋白分子主要是反平行的 β -折叠构象, 力学性能和家蚕丝纤维相近, 而直接从丝腺中得到的溶液成膜以后则主要是 α -螺旋构象^[45]。由此可以看出, 虽然蚕的种类不同使得丝蛋白的一级结构有所不同, 但是二级结构乃至晶体结构的变化规律以及变化对材料宏观性质的影响却有着诸多相似之处。

3 超强丝纤维

再生丝素蛋白纤维是再生丝素蛋白材料的一种重要研究对象, 各国科学家都希望通过将天然丝素蛋白纤维溶解后重新固化成型, 得到力学性能比天然丝素蛋白纤维更加优异的再生丝素蛋白纤维, 详见表 1。

表 1 再生丝素蛋白纤维的力学性能比较

Table 1 Comparison of mechanical properties of regenerated silk fibroin fibers

Sample	Fracture stress/MPa	Elongation at break/%	Reference
1	360±10	7±1	[46]
2	450±20	27.7±4.2	[22]
3	280±16	12.7±1	[47]
4	410±20	56±3	[48]
5	450±30	27.3±4.6	[49]
6	435±75	21±9	[50]
7	470±54	38.6±6.3	[51]
8	120	35	[41]
9	127±8	12±2	[52]
10	390±50	32.1±5.8	[53]
11	314±19	37±4	[54]

上述对于再生丝素蛋白纤维的研究主要都集中在断裂强度和断裂能的提高上面，采用的方法多为提高再生丝素蛋白的结晶度和内部分子的取向度。

由于蜘蛛丝原料的匮乏，目前还无法开展大规模的再生蜘蛛丝材料生产。研究材料的来源主要来自基因工程和蜘蛛丝腺。Aniela Heidebrecht 等利用基因工程合成了重组蛛丝蛋白并将其用于溶液纺丝，他们研究发现重组蛛丝蛋白的链末端紧连着氨基或者羧基的氨基酸结构虽然很短但对最终得到的再生蛛丝纤维的力学性能有着巨大的影响，除此之外重组蛛丝蛋白的分子量也对最终力学性能有着很大的影响^[16]。实验结果显示虽然力学性能最好的再生蛛丝纤维强度只能达到 370-380 MPa 远低于天然蛛丝的 1.2 GPa，但由于其断裂伸长能超过 100%远大于天然蛛丝不足 30%的断裂伸长，使得再生蛛丝纤维的断裂能可以到达 170-190 MJ/m³，甚至高于天然蛛丝的 160 MJ/m³，主要是由于富含脯氨酸的 MaSp2 蛋白类似物导致的。相比于天然蛛丝，再生蛛丝力学性能差异如此巨大的主要原因是天然蛛丝纺丝过程至少有 2 种大壶状腺丝蛋白参与而该实验是单一的蛋白纺丝体系，以及天然纺丝过程比人工纺丝过程复杂的多，人工能够引入更多的纺丝蛋白并优化仿生的纺丝有希望获得力学强度超过天然蛛丝纤维的再生蛛丝纤维。Xiao-Xia Xia 等利用基因工程合成了不同分子量的重组蛛丝蛋白，然后将各分子量的蛛丝蛋白进行溶液纺丝，最后发现蛛丝蛋白分子量越大得到的重组蜘蛛丝纤维力学性能越优异^[24]。

4 结论与展望

丝素蛋白纤维和蜘蛛大壶状腺丝纤维拥有出色的机械性能与一级结构、二级结构、 β -折叠晶体网络（纳米纤维）以及纳米纤维之间的相互作用力等多级结构有关。晶体网络结构是与材料宏观性能最密不可分的

控制因素之一, 晶体网络结构中拓扑结构、相关长度、取向度和连接或者相互作用的强度这四个因素又决定了晶体结构的强度, 这为再生丝素蛋白纤维和再生蜘蛛丝纤维的力学性能的控制及提高提供了指导。

参考文献:

- [1] PORTER D, GUAN J, VOLLRATH F. Spider silk: super material or thin fibre? [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(9): 1275-1279.
- [2] ANH TUAN N, HUANG Q L, YANG Z, et al. Crystal Networks in Silk Fibrous Materials: From Hierarchical Structure to Ultra Performance [J]. *Small*, 2015, 11(9-10): 1039-1054.
- [3] LIN N B, LIU X Y. Correlation between hierarchical structure of crystal networks and macroscopic performance of mesoscopic soft materials and engineering principles [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(21): 7881-7915.
- [4] XU G, GONG L, YANG Z, et al. What makes spider silk fibers so strong? From molecular-crystallite network to hierarchical network structures [J]. *Soft Matter*, 2014, 10(13): 2116-2123.
- [5] DU N, YANG Z, LIU X Y, et al. Structural origin of the strain-hardening of spider silk [J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(4): 772-778.
- [6] ASAKURA T, SUZUKI Y, NAKAZAWA Y, et al. Elucidating silk structure using solid-state NMR [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(48): 11440-11450.
- [7] LIU R, DENG Q, YANG Z, et al. "Nano-Fishnet" Structure Making Silk Fibers Tougher [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(30): 5534-5541.
- [8] OCHI A, HOSSAIN K S, MAGOSHI J, et al. Rheology and dynamic light scattering of silk fibroin solution extracted from the middle division of *Bombyx mori* silkworm [J]. *Biomacromolecules*, 2002, 3(6): 1187-1196.
- [9] ASAKURA T, UMEMURA K, NAKAZAWA Y, et al. Some observations on the structure and function of the spinning apparatus in the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(1): 175-181.
- [10] VOLLRATH F and KNIGHT D P. Liquid crystalline spinning of spider silk [J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 541-548.
- [11] KOH L D, CHENG Y, TENG C P, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials [J]. *Progress in Polymer Science*, 2015, 46: 86-110.
- [12] ZHOU C Z, CONFALONIERI F, JACQUET M, et al. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence [J]. *Proteins-Structure Function And Genetics*, 2001, 44(2): 119-122.
- [13] TU H, YU R, LIN Z F, et al. Programing Performance of Wool Keratin and Silk Fibroin Composite Materials by Mesoscopic Molecular Network Reconstruction [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(48): 9032-9043.
- [14] SONG Y, LIN Z F, KONG L Q, et al. Meso-Functionalization of Silk Fibroin by Upconversion Fluorescence and Near Infrared In Vivo Biosensing [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(26): 1700628.1700628.
- [15] HAYASHI C Y, SHIPLEY N H and LEWIS R V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 24(2-3): 271-275.
- [16] HEIDEBRECHT A, EISOLDT L, DIEHL J, et al. Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk [J]. *Advanced Materterials*, 2015, 27(13): 2189-2194.
- [17] VOLLRATH F, PORTER D. Silks as ancient models for modern polymers [J]. *Polymer*, 2009, 50(24): 5623-5632.
- [18] FOO C W P, BINI E, HENSMAN J, et al. Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders [J]. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 2006, 82(2): 223-233.
- [19] LIN S, RYU S, TOKAREVA O, et al. Predictive modelling-based design and experiments for synthesis and spinning of bioinspired silk fibres [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6892.
- [20] LEWIS R V. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials [J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(9): 3762-3774.

- [21] BLACKLEDGE T A, KUNTNER M, MARHABAIE M, et al. Biomaterial evolution parallels behavioral innovation in the origin of orb-like spider webs [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 833.
- [22] ZHOU G, SHAO Z, KNIGHT D P, et al. Silk Fibers Extruded Artificially from Aqueous Solutions of Regenerated Bombyx mori Silk Fibroin are Tougher than their Natural Counterparts [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(3): 366-370.
- [23] DU N, LIU X Y, NARAYANAN J, et al. Design of superior spider silk: from nanostructure to mechanical properties [J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(12): 4528-4535.
- [24] XIA X X, QIAN Z G, KI C S, et al. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered escherichia coli results in a strong fiber [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States Of America*, 2010, 107(32): 14059-14063.
- [25] ROCKWOOD D N, PREDA R C, YUCEL T, et al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin [J]. *Nature Protocols*, 2011, 6(10): 1612-1631.
- [26] YAMADA H, NAKAO H, TAKASU Y, et al. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons [J]. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2001, 14(1-2): 41-46.
- [27] WANG Q, CHEN Q, YANG Y H, et al. Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(1): 285-289.
- [28] 张芳芳, 扈艳红, 杜磊, 等. 含噁嗪环硅烷偶联剂对石英纤维/含硅芳炔复合材料性能的影响 [J]. *功能高分子学报*, 2017, 30(3): 347-353.
- [29] 张雪, 刘媛, 杨斌, 等. 碳纤维表面改性对复合材料性能的影响 [J]. *功能高分子学报*, 2017, 30(4): 444-449.
- [30] VOLPATTI L R, KNOWLES T P J. Polymer physics inspired approaches for the study of the mechanical properties of amyloid fibrils [J]. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2014, 52(4): 281-292.
- [31] XIAO S, XIAO S, GRAETER F. Dissecting the structural determinants for the difference in mechanical stability of silk and amyloid beta-sheet stacks [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, 15(22): 8765-8771.
- [32] ZHAO L N, LU L, CHEW L Y, et al. Alzheimer's disease-a panorama glimpse [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(7): 12631-12650.
- [33] MEERSMAN F, CABRERA R Q, MCMILLAN P F, et al. Compressibility of insulin amyloid fibrils determined by X-ray diffraction in a diamond anvil cell [J]. *High Pressure Research*, 2009, 29(4): 665-670. Pii 917825715.
- [34] ABELEIN A, ABRAHAMS J P, DANIELSSON J, et al. The hairpin conformation of the amyloid beta peptide is an important structural motif along the aggregation pathway [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014, 19(4-5): 623-634.
- [35] TYCKO R, WICKNER R B. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46(7): 1487-1496.
- [36] BUCHETE N V. Unlocking the atomic-level details of amyloid fibril growth through advanced biomolecular simulations [J]. *Biophysical Journal*, 2012, 103(7): 1411-1413.
- [37] WEINGARTH M, BALDUS M. Solid-state NMR-based approaches for supramolecular structure elucidation [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46(9): 2037-2046.
- [38] CHEN Z, ZHANG H, LIN Z, et al. Programing performance of silk fibroin materials by controlled nucleation [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(48): 8978-8990.
- [39] TSIORIS K, RAJA W K, PRITCHARD E M, et al. Fabrication of silk microneedles for controlled-release drug delivery [J]. *Advanced Functional Materials*, 2012, 22(2): 330-335.
- [40] HA S W, TONELLI A E, HUDSON S M. Structural studies of Bombyx mori silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(3): 1722-1731.
- [41] MARSANO E, CORSINI P, AROSIO C, et al. Wet spinning of Bombyx mori silk fibroin dissolved in

- N-methyl morpholine N-oxide and properties of regenerated fibres [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 37(4): 179-188.
- [42] HU X, SHMELEV K, SUN L, et al. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1686-1696.
- [43] TSUKADA M, FREDDI G, MONTI P, et al. Structure and molecular conformation of tussah silk fibroin films: effect of methanol [J]. *Journal Of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 1995, 33(14): 1995-2001.
- [44] KWEON H, WOO S O, PARK Y H. Effect of heat treatment on the structural and conformational changes of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin films [J]. *Journal Of Applied Polymer Science*, 2001, 81(9): 2271-2276.
- [45] VAN BEEK J D, BEAULIEU L, SCHAFER H, et al. Solid-state NMR determination of the secondary structure of *Samia cynthia ricini* silk [J]. *Nature*, 2000, 405(6790): 1077-1079.
- [46] PLAZA G R, CORSINI P, MARSANO E, et al. Correlation between processing conditions, microstructure and mechanical behavior in regenerated silkworm silk fibers [J]. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2012, 50(7): 455-465.
- [47] CHO H J, YOO Y J, KIM J W, et al. Effect of molecular weight and storage time on the wet- and electro-spinning of regenerated silk fibroin [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97(6): 1060-1066.
- [48] FANG G Q, ZHENG Z K, YAO J R, et al. Tough protein-carbon nanotube hybrid fibers comparable to natural spider silks [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(19): 3940-3947.
- [49] FANG G, HUANG Y, TANG Y, et al. Insights into silk formation process: correlation of mechanical properties and structural evolution during artificial spinning of silk fibers [J]. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(11): 1992-2000.
- [50] ZHANG C, ZHANG Y P, SHAO H L, et al. Hybrid silk fibers' dry-spun from regenerated silk fibroin/graphene oxide aqueous solutions [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(5): 3349-3358.
- [51] ZHANG F, LU Q, YUE X X, et al. Regeneration of High-Quality Silk Fibroin Fiber by Wet Spinning from CaCl₂-Formic Acid Solvent [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 12: 139-145.
- [52] PLAZA G R, CORSINI P, PEREZ-RIGUEIRO J, et al. Effect of water on *Bombyx mori* regenerated silk fibers and its application in modifying their mechanical properties [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2008, 109(3): 1793-1801.
- [53] YAN J P, ZHOU G Q, KNIGHT D P, et al. Wet-spinning of regenerated silk fiber from aqueous silk fibroin solution: discussion of spinning parameters [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1): 1-5.
- [54] ZHOU H, SHAO Z Z, CHEN X. Wet-spinning of regenerated silk fiber from aqueous silk fibroin solutions: influence of calcium ion addition in spinning dope on the performance of regenerated silk fiber [J]. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2014, 32(1): 29-34.



林乃波, 厦门大学材料学院副教授。基于对蚕丝多级结构与性能之间关系的理解, 将具有光学性能的材料复合到蚕丝蛋白材料中, 通过调节添加物与材料之间的相互作用, 赋予了蚕丝材料的特殊的光学性能, 并将其应用在生物医学领域。以第一作者或通讯联系人发表在 *Chem. Soc. Rev*, *Adv. Funct. Mater.*, *Small*, *Polym. Chem.* 和 *J. Mater. Chem. B* 等。已撰写两本专著章节, 分别由世界知名出版公司 WILEY-VCH 和 Woodhead Publishing 出版。主持承担了福建省自然科学基金杰出青年项目, 国家自然科学基金项目面上项目和青年基金项目等。



刘向阳，中组部“千人计划”专家，教育部长江学者讲座教授，厦门大学物理与科学技术学院副院长、厦门大学生物仿生及软物质研究院院长。在生物物理、仿生材料、纳米科技、晶体生长、表面以及胶体科学等方面有超过 25 年在学术界及工业界工作经验。由于在晶体生长，生物物理及软功能材料方面杰出成就，多次应邀去世界各地做学术报告，并在不同国际性学会任职。以第一作者及通讯作者在 *Nature*, *J. Am. Chem. Soc.*, *Phys. Rev. Lett.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *Adv. Mat.*, *J. Biological Chem.* 等发表近 200 篇论文。由 Springer, Wiley-VCH 特邀编著 4 部专著。