

蛛丝蛋白 PySp 用于静电纺纤维膜的研究

沈庆春, 米俊鹏, 田露阳, 莫秀梅, 孟清
(东华大学生物科学与技术研究所, 上海 201620)

摘要 蛛丝纤维具有强度高、柔韧性及生物相容性好等材料学特性,因而蛛丝蛋白在人造血管、神经导管及药物载体等方面有潜在的巨大价值。将本课题组前期得到的大腹圆蛛梨状腺丝的一个重复区(Rp)进行原核表达,得到蛛丝蛋白作为实验材料。通过探究静电纺丝条件,将该蛋白纺成纳米纤维膜。SEM 观察显示该膜形成的纤维均匀一致;ATR-FTIR 测试表明,经过 75% 乙醇交联的静电纺纳米纤维的二级结构主要为 β 折叠;接触角证明,纳米纤维膜是亲水的。为蛛丝蛋白应用于组织工程提供了一种良好的纤维材料,对蛛丝蛋白的进一步应用奠定了基础。

关键词 蛛丝蛋白;静电纺丝;纤维膜;性能表征
中图分类号 Q51 **文献标识码** A

Study on spidroin PySp using electrospinning as fiber membrane

SHEN Qing-chun, MI Jun-peng, TIAN Lu-yang, MO Xiu-mei, MENG Qing
(Institute of Biological Science and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract Recombinant spider silk as a kind of biological material with good performance, owns a great biocompatibility, meanwhile, there is great potential application value in the field of biomedical. Spider silk has potential application value in blood vessels, nerve conduit and drug carriers, but still lacks research in the tissue engineering. In this study, spidroin PySp was expressed in *E. coli* as the material. By investigating the electrospinning conditions, fiber membrane was obtained at a suitable spinning voltage and other conditions. SEM displays that fiber membrane is uniform. The ATR-FTIR graph shows that the secondary structure of the electrospun fibers cross-linked by 75% ethanol is mainly β -folded. The contact angle reveals that the fiber membranes are hydrophilic. This study has provided a type of good fiber material for the application of spider silk protein in tissue engineering and laid a foundation for the further application of spider silk.

Keywords spidroin; electrospinning; fiber membrane; performance characterization

蜘蛛丝有着强度高、柔韧性好、质地轻、可降解、高温耐受性及生物相容性好等特性,综合性能远超蚕丝,KEVLAR 及目前最好的纤维制品,在材料、军工、纺织和建筑等领域有着巨大的潜在应用价值和商业价值^[1-4]。至今国内外尚未有一家科研单位可以仿生接近天然蛛丝性能的人造蛛丝纤维,严重阻碍了这种新型优良材料的产业化应用。

大腹圆蛛是我国的主要蜘蛛品种,拥有 7 种丝腺,相应的能产生 7 种不同特性的纤维及蛛丝相关蛋白,

各具有不同的生物学和材料学功能^[2]。在大腹圆蛛的 7 种丝腺中,梨状腺体产生梨状腺丝蛋白(PySp),是一种强力胶,用于固定蛛丝,确保蛛丝与靶子稳定连接,在蜘蛛获取猎物时也至关重要^[5]。

在组织工程领域,静电纺纳米纤维能够模拟细胞外基质(ECM),为细胞生长提供所需要的外部环境^[6];在生物医学工程领域,力学性能优异,生物相容性好的静电纺材料在组织再生与修复领域中具有很高的应用价值。基于静电纺的各种优势,静电纺在组织

收稿日期:2017-09-18;修回日期:2017-10-09

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 31570721);上海市科委攻关项目(No. 14521100700);上海市科委国际合作项目(No. 14520720200)

作者简介:沈庆春,硕士研究生,主要从事人造蛛丝的应用研究,E-mail: qingchunshen@foxmail.com

通信作者:孟清,博士生导师,研究方向为编码蜘蛛丝蛋白质基因的克隆、表达、结构与功能、成丝机理及仿生研究,E-mail: mengqing@dhu.edu.cn

支架或伤口敷料^[7-8]、小口径人造血管^[9]等方面有着广泛的研究。但迄今为止,国内外很少有研究机构使用蜘蛛丝进行相关材料学研究。

不同的蛛丝蛋白具有不同的重复结构域,不同的蛛丝的性能与品质基本由重复结构域 Rep 所决定^[10-12]。所以,为了更好地研究蜘蛛梨状腺丝蛋白的应用价值,我们以表达本实验室前期获得的大腹圆蛛 PySp 完整重复区(Rep)基因为蛋白材料,利用静电纺丝探究合适的纺丝条件,得到合适的纳米纤维膜,利用 SEM 观察纳米纤维膜表面结构、内部丝直径和表面性状;利用红外光谱研究纤维膜二级结构;接触角测试研究纤维膜亲水性;热重分析研究蛋白纤维膜热力学性质,为进一步获得具有优异力学性能的人工蛛丝蛋白纳米纤维材料提供研究方向和可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

重组梨状腺丝蛋白;六氟异丙醇(HFIP)(上海达瑞精细化学品有限公司);静电纺丝装置(自制);高压静电发生器(上海仰光电子科技有限公司);扫描电子显微镜 Phenom XL(美国飞纳);NEXUS-670 型傅里叶变换红外-拉曼光谱仪(美国 Nicolet 公司);接触角分析仪 DSA30(德国 Kruss 公司);热重分析仪 TG209F1(德国 NETZSCH 公司)

1.2 静电纺丝与纳米纤维膜特性测定

1.2.1 纺丝液的配制

将一定质量的蛛丝蛋白溶于六氟异丙醇(HFIP)中,过夜搅拌至透明,得到不同质量体积比的纺丝溶液。

1.2.2 静电纺纳米纤维的制备

将纺丝液注入 2.5 mL 的注射器中,注射器的金属针头内径为 0.65 mm,静电高压发生器和针头通过电线和一个铁夹连接起来,将包有铝箔的方形板作为接收器接收静电纺纤维,并通过地线接地。通过实验摸索,静电纺工艺参数为电压:10~14 KV;接收距离:10~15 cm;给液速率:0.6~1.0 mL/h。

1.2.3 纳米纤维膜交联

将得到的均匀的纳米纤维膜放入 75% 乙醇蒸气中过夜交联,然后将交联后纤维膜放入真空干燥箱中干燥。

1.2.4 纳米纤维形貌表征

将静电纺纤维试样喷金 60 s,然后在 10 KV 加速电压下,用 Phenom XL 型扫描电子显微镜(SEM)观察纤维的形态。根据所得的 SEM 图像,对蛛丝蛋白纤维膜表面微观结构进行定性分析。

1.2.5 红外光谱测试

将交联并干燥和未经交联的蛋白纳米纤维膜,利用 NEXUS-670 型衰减全反射-傅里叶变换红外光谱法 ATR-FTIR 进行二级结构测定,并对比两者的差别,波长范围为 600~4000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.2.6 热重分析(Thermogravimetric analysis, TGA)

将待测样品剪碎,称重,装入坩埚中压紧,用 TG209F1 型热重分析仪对其进行热重分析。 N_2 为氛围,升温速率为 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,温度范围为 10 $^{\circ}\text{C}$ ~600 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.7 亲疏水测试

将 0.03 mL 去离子水滴在静电纺纳米纤维膜上,观察液滴在纳米纤维膜上的状态,并实时录像,对接触后 2、4、6 s 后的状态进行记录,得出其亲疏水性质。

2 结果

2.1 静电纺蛛丝蛋白 PySp 纳米纤维膜 SEM 结果分析对比

在静电纺的过程中,我们发现在 12 KV 的电压下,当蛛丝蛋白 PySp 浓度为 2.5 W/V % 时(图 1-A),视野中仅出现少量带有液珠的纤维;当浓度增加到 5% 时(图 1-B),情况相对 2.5 W/V % 时变化不大,纤维依旧附着有液珠。可以推测,在 12 KV 的情况下,浓度太小,基本无法形成纤维。当浓度为 12 W/V % 时(图 1-C),视野中只有不多的纤维,且短细,有大量液珠在丝纤维上;当浓度为 15 W/V % 时(图 1-D),有光滑的丝纤维形成,但是数量不多;当浓度为 18 W/V % 时(图 1-E),有相对大量的丝纤维形成,丝纤维上有明显的结点;当浓度为 20 W/V % 时(图 1-F),视野中有大量且密集的丝纤维形成。在相对低电压下(12 KV),随着浓度的增加,蛛丝纯蛋白的成丝质量在变好,同时,证明了纯蛛丝蛋白的可纺性。之后,增大电压,在 14 KV 的电压,8% 的浓度下,静电纺得到光滑致密,分布均匀的静电纺蛛丝纤维膜(图 1-G),以及经 75% 乙醇蒸气交联的纤维膜(图 1-H)。图中可以看出,经过交联的纤维膜变得更加致密了。

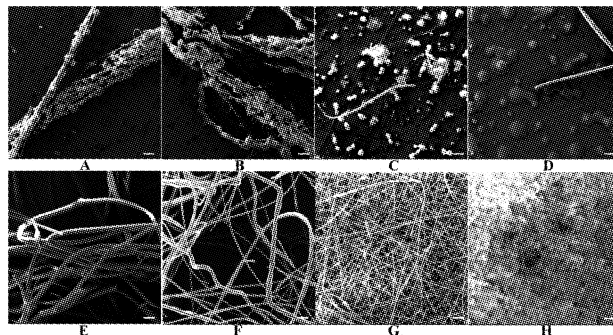


图 1 静电纺蛛丝蛋白纤维

Fig 1 Spidroin silk fiber by electrospinning

A:12 KV 电压,2.5% 浓度;B:12 KV 电压,5% 浓度;C:12 KV 电压,12% 浓度;D:12 KV 电压,15% 浓度;E:12 KV 电压,18% 浓度;F:12 KV 电压,20% 浓度;G:14 KV 电压,8% 浓度;H:14 KV 电压,8% 浓度。交联后 比例尺 A - F 为 20 μm ,G 和 H 为 5 μm

2.2 静电纺蛛丝蛋白 PySp 纳米纤维膜红外光谱测定

红外光谱 (ATR-FTIR) 是测量分子间相互作用的有效工具,其酰胺峰的位置和强度能反映出蛋白质的构象。蛋白纤维膜主要观察红外光谱的酰胺 I 带^[13]。如图 2 - A, a 为交联前红外光谱图,酰胺 I 带在 1652 cm^{-1} 有强吸收峰,说明未经 75% 乙醇蒸气交联的纤维膜蛋白构象主要是 α 螺旋;而如图 2 - A, b 为交联后红外光谱图,在 1625 cm^{-1} 处有强吸收峰,说明经过 75% 乙醇蒸气交联的蛋白纤维膜为 β 折叠。说明 75% 乙醇蒸气交联改变了蛋白纤维膜的构象。

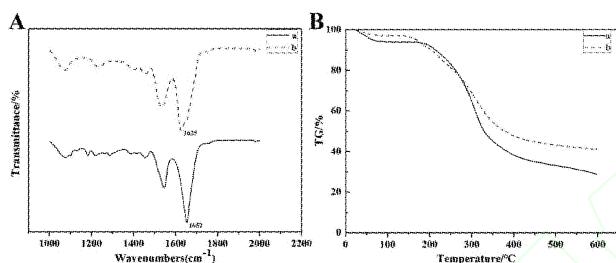


图 2 红外谱图与热重分析图

Fig 2 ATR-FTIR spectra and TG analysis

A:静电纺蛛丝纳米纤维红外谱图,其中 a 为交联前红外谱图,b 为交联后红外谱图;B:蛋白纳米纤维热失重曲线,其中 a 为交联后曲线,b 为交联前曲线

2.3 热重 (TGA) 结果分析

热失重是测量物质热稳定性较为常用的方法。通过热失重曲线可知材料随温度升高时的分解温度、分解速度及分解的程序。从图 2 - B 中可以看出,交联前图 2 - B, a 纳米纤维在温度升高的初期,在很短的温度范围中失重较快,之后失重较慢,中期失重较快,后期又趋于平稳。交联后图 2 - B, b 趋势与交联前相似,失重速度更快,最终总的失重为 71.1%,较交联前的 59%,失重更多^[14]。这表明,交联后的蛋白纳米纤维热稳定性比交联前的相对低。

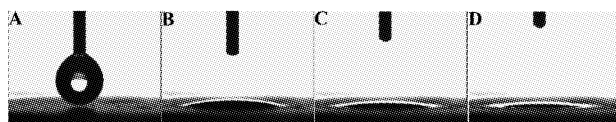


图 3 接触角分析图

Fig 3 Water contact angles of spidroin fiber membrane

A:液滴刚接触纤维膜;B:2 s 时的状态;C:4 s 时的状态;D:6 s 时的状态

2.4 亲疏水测试

生物材料的亲疏水性是材料的一项重要性能指标,直接影响着材料的吸附、表面细胞的黏附、增殖和

迁移^[15],其通常利用接触角测试来确定。我们利用交联后的纤维膜作为亲疏水测试材料。如图 3 为液滴从接触纤维膜到 6 s 后的状态。可以看到当液滴接触到纤维膜上时,6 s 内,便完全没入纤维膜中。说明纳米纤维膜有良好的亲水性^[16]。

3 讨论

静电纺对于聚合物分子量大小有一定的要求,故我们首先以一定的电压 (12 KV) 测试 PySp 蛋白的可纺性。从扫描电镜图中我们可以发现,从 2.5 W/V % 开始,发现成丝量较少,且液珠过多,故增加蛋白含量,至 20 W/V %,发现成丝量满足要求但因为浓度过大,导致纤维直径过大,部分达到 1000 nm 甚至 1500 nm 以上,且丝纤维直径长度分布不均,对后续实验会有影响。之后尝试增加电压,为 14 KV,在 8% W/V 浓度下得到较为合适的蛋白丝纤维。在交联前后,丝纤维直径有明显增大,这应该是因为蛋白构象发生变化导致的。在红外光谱图中,显示蛋白纤维膜的二级结构。通过交联前后红外光谱的对比,验证了扫描电镜中的观察结果,在红外光谱的酰胺 I 带中,可以发现交联前在 1652 cm^{-1} ,交联后在 1625 cm^{-1} ,有强吸收峰,表明蛋白构象因为 75% 乙醇蒸气发生了相对完全的改变,整体从 α 螺旋转变为 β 折叠。构象的改变使得蛋白纤维膜不溶于水,强度增强,且不易氧化分解^[13],对于后续的实验以及同类的研究有比较大的意义。在热失重分析试验中,从 10 $^{\circ}\text{C}$ 到 600 $^{\circ}\text{C}$ 的升温范围中,可以看出,交联后的纤维膜的热稳定性不及交联前,这可能是因为构象的改变所导致的。热失重的结果表明,纤维材料的工作温度需要在失重较大的温度以下,也为之后的实验提供借鉴,可以尝试运用其他物理化学或生物化学的方法提升纤维膜的热稳定性。综合以上测试,交联后纤维膜具有更好的综合性能。亲水性实验中,我们可以发现,蛋白纤维膜的亲水性是相当优秀的,完全是一种亲水材料,这对于应用于组织工程是有较大的用处的。这将提升细胞、组织的黏附性质。

本次研究首次实现大腹圆蛛梨状腺丝 PySp 蛋白的组织工程应用。采用静电纺丝方法实现纤维膜的制备,并对纤维膜的各项性质进行了测试,确定了交联后的纳米纤维膜具有更好的综合性能,对静电纺蛛丝蛋白纤维膜有了更加深入的认识,将给之后蛛丝蛋白领域的进一步应用带来启示。同时,因为蛛丝蛋白优良的生物相容性并具有一定的力学性能,可将蛛丝蛋白与其他合成材料通过一定的方式混合,得到各方面更为优秀的合成材料,为人工蛛丝蛋白在生物材料应用上提供了新的可能。

参考文献

- [1] HINMAN M B, JONES J A, LEWIS R V. Synthetic spider silk: a modular fiber [J]. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(9): 374 – 379.
- [2] LEWIS R V. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials [J]. *Chem Rev*, 2006, 106(9): 3762 – 3774.
- [3] LINKE W A. Biomaterials: spider strength and stretchability [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(10): 702 – 703.
- [4] WIDHE M, JOHANSSON J, HEDHAMMAR M, et al. Invited review current progress and limitations of spider silk for biomedical applications [J]. *Biopolymers*, 2012, 97(6): 468 – 478.
- [5] GEURTS P, ZHAO L, HSIA Y, et al. Synthetic spider silk fibers spun from Pyriform Spidroin 2, a glue silk protein discovered in orb-weaving spider attachment discs [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(12): 3495 – 3503.
- [6] BOATENG J S, MATTHEWS K H, STEVENS H N, et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(8): 2892 – 2923.
- [7] KHIL M S, CHA D I, KIM H Y, et al. Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2003, 67(2): 675 – 679.
- [8] WANG X, CHENG F, GAO J, et al. Antibacterial wound dressing from chitosan/polyethylene oxide nanofibers mats embedded with silver nanoparticles [J]. *J Biomater Appl*, 2014, 29(8): 1086 – 1095.
- [9] MARELLI B, ALESSANDRINO A, FARÈ S, et al. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(10): 4019 – 4026.
- [10] ADRIANOS S L, TEULÉ F, HINMAN M B, et al. Nephila clavipes Flagelliform silk – like GCX motifs contribute to extensibility and spacer motifs contribute to strength in synthetic spider silk fibers [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(6): 1751 – 1760.
- [11] LIN Z, DENG Q, LIU X Y, et al. Engineered large spider eggcase silk protein for strong artificial fibers [J]. *Adv Mater*, 2013, 25(8): 1216 – 1220.
- [12] WANG S, HUANG W, YANG D. NMR structure note: repetitive domain of aciniform spidroin 1 from Nephila antipodiana [J]. *J Biomol NMR*, 2012, 54(4): 415 – 420.
- [13] ZHOU P, LI G, SHAO Z, et al. Structure of Bombyx mori Silk Fibroin Based on the DFT Chemical Shift Calculation [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001, 105(50): 12469 – 12476.
- [14] DU C H, ZHU B K, CHEN J Y, et al. Metal ion permeation properties of silk fibroin/chitosan blend membranes [J]. *Polymer International*, 2006, 55(4): 377 – 382.
- [15] SRIDHAR R, LAKSHMINARAYANAN R, MADHAIYAN K, et al. Electrospayed nanoparticles and electrospun nanofibers based on natural materials: applications in tissue regeneration, drug delivery and pharmaceuticals [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(3): 790 – 814.
- [16] LAMPIN M, WAROCQUIER – CLÉROUT, LEGRIS C, et al. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, 36(1): 99 – 108.