

# 多功能生物材料蛛丝蛋白的一级结构特征和生物合成进展

林宝杨<sup>1</sup>, 熊永吉<sup>1</sup>, 陈惠宇<sup>2</sup>, 韦晟楠<sup>2</sup>, 任芃芃<sup>2</sup>, 成骋<sup>2\*</sup>, 何冰芳<sup>2\*</sup>

1 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211800

2 南京工业大学药学院, 江苏 南京 211800

林宝杨, 熊永吉, 陈惠宇, 韦晟楠, 任芃芃, 成骋, 何冰芳. 多功能生物材料蛛丝蛋白的一级结构特征和生物合成进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 687-704.

LIN Baoyang, XIONG Yongji, CHEN Huiyu, WEI Shengnan, REN Pengpeng, CHENG Cheng, HE Bingfang. Primary structure characterization and biosynthesis of spider silk proteins for multifunctional biomaterials[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 687-704.

**摘 要:** 蜘蛛丝是已知复合性能最强的天然纤维, 兼具极高的抗拉伸强度与韧性, 有着“生物钢”之美誉, 且具有优良的生物相容性和形状记忆性能, 在生物医药、组织工程等多个领域有着巨大的应用潜力。蜘蛛丝由一类富有结构多样性的高分子蛛丝蛋白所组成, 天然蛛丝蛋白基因 GC 含量高、重复核心区氨基酸序列高度重复、特定氨基酸含量高以及分子量大等特点给其异源表达带来了较大的困难。本文重点阐述了蛛丝蛋白重复单元中重复核心区特征基序与其结构、纺丝性能和异源表达之间的相关性。对重组蛛丝蛋白的序列进行优化设计, 结合异源表达策略, 极大地促进了多功能蛛丝蛋白生物合成的发展。本综述可为重组蛛丝蛋白的理性设计与高效合成提供思路。  
**关键词:** 重组蛛丝蛋白; 序列设计; 表达策略; 结构特征; 分类

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905200); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20220335); 江苏省先进生物制造协同创新中心项目(XTC2206)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905200), the Natural Science Foundation Youth Project of Jiangsu Province (BK20220335), and the Jiangsu Synergetic Innovation Center for Advanced Bio-manufacture (XTC2206).

\*Corresponding authors. E-mail: CHENG Cheng, cheng2@njtech.edu.cn; HE Bingfang, bingfanghe@njtech.edu.cn

Received: 2023-06-17; Accepted: 2023-10-16

# Primary structure characterization and biosynthesis of spider silk proteins for multifunctional biomaterials

LIN Baoyang<sup>1</sup>, XIONG Yongji<sup>1</sup>, CHEN Huiyu<sup>2</sup>, WEI Shengnan<sup>2</sup>, REN Pengpeng<sup>2</sup>,  
CHENG Cheng<sup>2\*</sup>, HE Bingfang<sup>2\*</sup>

1 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, Jiangsu, China

2 School of Pharmaceutical Science, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, Jiangsu, China

**Abstract:** Spider silk is a natural fiber known as “biosteel” with the strongest composite performance, such as high tensile strength and toughness. It is also equipped with excellent biocompatibility and shape memory ability, thus shows great potential in many fields such as biomedicine and tissue engineering. Spider silk is composed of macromolecular spidroin with rich structural diversity. The characteristics of the primary structure of natural spidroin, such as the high repeatability of amino acids in the core repetitive region, the high content of specific amino acids, the large molecular weight, and the high GC content of the spidroin gene, have brought great difficulties in heterologous expression. This review discusses focuses on the relationship between the featured motifs of the microcrystalline region in the repetitive unit of spidroin and its structure, as well as the spinning performance and the heterologous expression. The optimization design for the sequence of spidroin combined with heterologous expression strategy has greatly promoted the development of the biosynthesis of spider silk proteins. This review may facilitate the rational design and efficient synthesis of recombinant spidroin.

**Keywords:** recombinant spider silk protein; sequence design; expression strategy; structural characteristics; classification

蜘蛛丝是一类高分子蛋白纤维, 其优越的机械性能和生物相容性, 显示了巨大而广阔的应用前景。目前多种蛛丝蛋白的基因编码被阐明, 重组蛛丝蛋白的序列设计<sup>[1]</sup>、表达策略<sup>[2]</sup>, 及其材料蛋白的应用开发<sup>[3-4]</sup>均受到研究人员的广泛关注; 在医疗应用领域, 利用蛛丝蛋白制作心血管疾病治疗用纳米纤维支架已取得了令人瞩目的进展, 将重组蛛丝蛋白和聚乳酸己内酯共混, 静电纺丝后作为纳米纤维支架, 相较于传统的纳米纤维支架具有更高的拉伸强度和延伸率<sup>[5]</sup>; 以及利用重组蛛丝蛋白制成的水凝胶所具有的自我修复能力、细胞亲和力以及非凡的抑菌性能, 用于生物医用材料开发<sup>[6-7]</sup>; 或

是利用蛛丝蛋白的生物相容性和生物降解性<sup>[8]</sup>, 作为靶向药物递送和控制药物释放的载体, 均具有较好的应用前景<sup>[9-10]</sup>。在军工、环境等领域, 通过将蜘蛛丝缠绕在锥形单模光纤上并将链霉亲和素-生物素与蜘蛛丝结合来进行磁场感应<sup>[11]</sup>。同时, 在我国的芯片制造领域, 利用重组蛛丝蛋白制备了具有高机械强度的光刻胶, 突破了传统材料的限制, 实现了超高精度( $\leq 100$  nm) 3-D 电子束光刻技术(3-D electron beam lithography), 推动我国芯片制造技术向前迈进一大步<sup>[12]</sup>。本文旨在对蛛丝蛋白的特征基序与其结构、自组装及纺丝性能、高效异源表达等方面的相关性进行系统阐述, 为重组蛛丝

蛋白特征序列的设计优化、重组蛛丝蛋白的高效合成提供参考。

## 1 蛛丝蛋白结构特征与分类

蛛丝蛋白是一类富有结构和功能多样性且极具自组装能力的天然高分子蛋白质。目前研究较为深入的蛛丝蛋白主要源于棒络新妇蜘蛛(*Nephila clavipes*), 该属蜘蛛的 7 个产丝腺体可分别生产 7 种不同性能的蛛丝, 包括主壶腹腺丝、次壶腹腺丝、鞭毛状腺丝、胶状腺丝、葡萄状腺丝、管状腺丝和聚合状腺丝(图 1)<sup>[13]</sup>。每种腺丝均由独特的蛛丝蛋白组成<sup>[1]</sup>, 本文对这 7 种蛛丝蛋白进行了总结概括(表 1)。通常蛛丝蛋白由 3 个部分组成, 包括较为保守的 N 末端(N terminal, NT)非重复区、C 末端(C terminal, CT)非重复区以及具有高度特异性的重复核心区。近期有研究发现, N/CT 与蛛丝蛋白的自组装相关, 并对纺丝过程中构象的转变起着主导作用<sup>[26-27]</sup>。而重复核心区主要与蛛丝蛋白的纺丝性能直接相关, 不同类型的腺丝之间的重复

核心区显示出很大的差异性, 导致纺丝性能差异显著<sup>[28]</sup>。

主壶腹腺丝(major ampullate spider silk)是蜘蛛的牵引丝, 在蛛网上以辐射状展开(图 1), 用于承受蛛网本身的张力和猎物冲击力, 具有动物纤维中最高的抗拉伸强度, 是研究者主要关注的一类腺丝。主壶腹腺丝主要由主壶腹腺丝蛋白(major ampullate spidroin, MaSp)组成, MaSp 中富含丙氨酸和甘氨酸, 含量可达约 50%, 主要来源于 MaSp 重复核心区中的 2 种特征基序, 即寡聚丙氨酸(A)<sub>n</sub> (n=4-12)基序以及富含甘氨酸的 GGX/GPGXX/GPGPX (X=Y、L 或 Q)基序<sup>[29]</sup>。寡聚丙氨酸基序在腺丝中主要形成反平行  $\beta$ -折叠, 是腺丝  $\beta$ -折叠微晶结构域的分子基础, 也是蛛丝蛋白纤维具有高抗拉伸强度的关键因素<sup>[30]</sup>, 因此该结构对应的区域称为微晶区。而富含甘氨酸的特征基序主要形成  $\beta$ -转角、 $\beta$ -螺旋、 $3_{10}$  螺旋或无规则卷曲, 与主壶腹腺丝的弹性、韧性及高延展性的形成相关, 该结构区域称为柔性区; MaSp 的重复单元由微晶

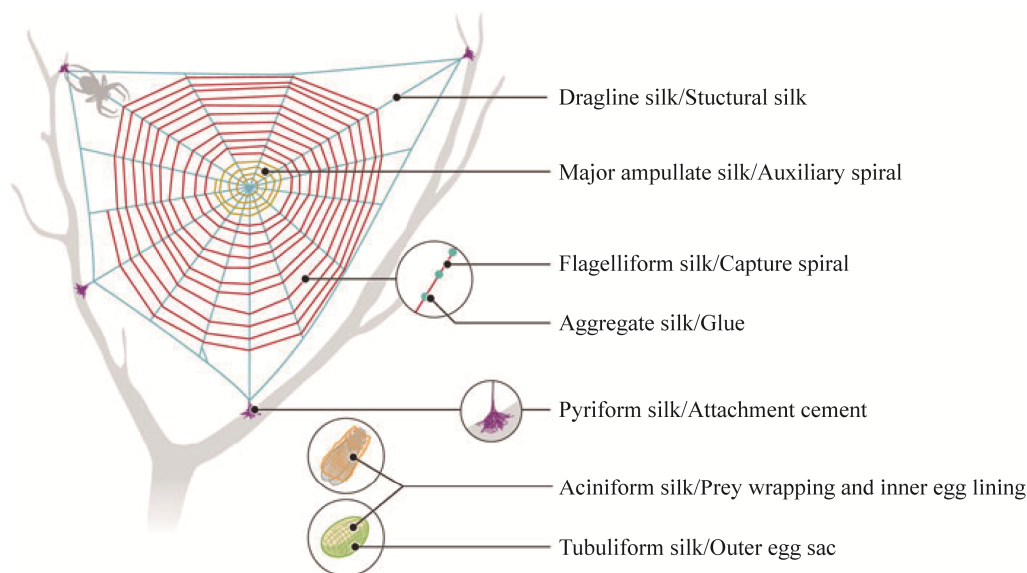


图 1 七种类型蜘蛛丝的示意图及其在蜘蛛网中的作用<sup>[13]</sup>

Figure 1 Schematic diagrams of the seven types of spider silk and their roles in spider webs<sup>[13]</sup>.

表 1 不同种类重组蛛丝蛋白的异源表达

Table 1 Heterologous expression of different species of recombinant spider silk proteins

| Protein types | Species   | Host                                    | Molecular weight (kDa) | Yield (mg/L) | Expression strategy  | References |
|---------------|---|---|------------------------|--------------|--|------------|
| MiSp          | <i>Araneus ventricosus</i>                          | <i>Pichia pastoris</i> (GS115)          | 26.6                   | 25.3         | Novel expression host ( <i>P. pastoris</i> strain GS115)   | [14]       |
| MaSp1         | <i>Nephila clavipes</i>                             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (GM103) | 94                     | 450          | <i>S. cerevisiae</i> (GM103), low temperature induced expression   | [15]       |
| MaSp1         | <i>Nephila clavipes</i>                             | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 100.7–284.9            | 500–2 700    | Metabolic engineering modification (co-expression of key enzymes encoding tRNAgly synthesis)   | [16]       |
| MaSp1         | <i>Nephila clavipes</i>                             | <i>E. coli</i> ((NEB10β))               | 282–556                | 1 240–2 000  | Gene optimization, transcriptional-translational regulation optimization, fusion expression (fusion tag+breakage of intrinsic peptide) | [17]       |
| MaSp1         | <i>Euprostheneops australis</i>                     | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 33                     | 14 500       | Chimeric arachnidins (NT-MaSp1-CT) (NT from MaSp1, CT from MiSp), soluble expression, high density fermentation                        | [18]       |
| MaSp2         | <i>Trichonephila clavipes</i>                       | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 201                    | 3 600        | Metabolic engineering modification (co-expression of key enzymes encoding tRNAgly synthesis); high density fermentation                | [19]       |
| MaSp1         | <i>Euprostheneops australis</i>                     | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 41.8                   | 30           | Chimeric arachnidins (NT-MaSp1-CT), fusion tag   | [20]       |
| MaSp1s        | <i>Cyrtophora moluccensis/Latro dectus hesperus</i> | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 42.7                   | 300–400      | Chimeric arachnidins NT-MaSp1s-CT (N/CT from MaSp1)  | [21]       |
| AcSp1         | <i>Araneus ventricosus</i>                          | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 84.7–103.1             | 35–60        | Chimeric arachnidins (NT-AcSp1-CT) (NT from MaSp1, CT from MiSp)   | [22]       |
| PySp1         | <i>Araneus ventricosus</i>                          | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 20.8–92.4              | –            | Chimeric arachnidins (NT-PySp-CT) (N/CT from MiSp)   | [23]       |
| TuSp1         | <i>Araneus ventricosus</i>                          | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 45                     | 70           | Optimization of transcription-translation regulation   | [24]       |
| Flag/MaSp1    | <i>Araneus ventricosus</i>                          | <i>E. coli</i> BL21(DE3)                | 28.7                   | 173          | Chimeric arachnidins (NT(MaSp1)+Flag+CT(MaSp1))  | [25]       |

–: Yield is not mentioned in the references.

区和柔性区共同组成, 由于其数量通常多达数百个, 因此 MaSp 的分子量一般高达 200–350 kDa<sup>[31]</sup>。

不同蜘蛛来源的 MaSp 呈现出特征基序的多样性, 例如, 来源于 *N. clavipes* 蜘蛛的主壶

腹腺丝中主要为 MaSp1, 其重复核心区的重复单元由典型的聚丙氨酸(A)<sub>n</sub> (n=4–12)基序以及几个 GGX (X=Y、L 或 Q)基序组成, GGX 基序在腺丝中主要以 3<sub>10</sub>螺旋的形式存在, 有利于腺

丝高延展性的形成<sup>[32]</sup>。而来源于金丝网蛛(*Trichonephila clavipes*)的主壶腹腺丝,其中的MaSp2在重复核心区含有一种独特的GPGXX(X=Y、L或Q)基序,脯氨酸的存在促进了 $\beta$ -转角<sup>[33]</sup>的形成,这与该腺丝的高度弹性相关<sup>[33]</sup>。黑寡妇蜘蛛(*Latrodectus hesperus*)的主壶腹腺丝中含有一种独特的蛋白MaSp3<sup>[34]</sup>,MaSp3重复核心区中典型的寡聚丙氨酸(A)<sub>n</sub>和甘氨酸基序含量较少,但极性氨基酸的比例(约35%)是MaSp1(约16.5%)的两倍,其中丝氨酸(10%)和苏氨酸(6%)的差异较为显著<sup>[35]</sup>,而极性氨基酸侧链的氢键相互作用被认为与腺丝的高韧性相关<sup>[24]</sup>。达尔文树皮蜘蛛(*Caerostris darwini*)的主壶腹腺丝具备极高的韧性(350 MJ/m<sup>3</sup>)和抗拉伸强度(1.6 GPa),其含有的主壶腹腺丝蛋白MaSp4具备全新序列特征,微晶区以VSVVS(TA)VS基序为主,不存在聚丙氨酸(A)<sub>n</sub>基序,由于序列中特定氨基酸含量较低,被认为是一种易于异源表达的蛋白<sup>[36]</sup>。此外,摩鹿加云斑蛛(*Cyrtophora moluccensis*)的主壶腹腺丝由一种低分子量蛋白组成,故被称为MaSp1s(MaSp1 short),MaSp1s重复核心区中仅含191个氨基酸,且缺乏通常的重复特征和典型的特征基序,有较短的寡聚丙氨酸(A)<sub>n</sub>(n=3-4)基序和少量GGX短肽基序,但是富含带电氨基酸残基(占10%以上),如天冬氨酸、精氨酸、谷氨酸以及组氨酸等,MaSp1s形成的蛋白纤维显示了优良的抗拉伸强度等机械性能<sup>[37]</sup>,MaSp1s的发现大大颠覆了人们对于主壶腹腺丝蛋白特征序列及大分子结构-功能的认知。

次壶腹腺丝(major ampullate spidroin, MaSp)呈圆圈状附着于主壶腹腺丝(图1),主要用于包裹猎物并稳定蛛网,它由次壶腹腺丝蛋白(major ampullate spidroin, MaSp)组成,具有良好的力学强度和延展性。MiSp重复核心区中主要为寡

聚丙氨酸基序,典型特征是该基序两侧常被(GA)<sub>n</sub>基序包围<sup>[38]</sup>。大腹圆蛛(*Araneus ventricosus*)蜘蛛的MiSp重复核心区的特征基序除了寡聚丙氨酸(A)<sub>n</sub>外,还包含GX(X=A、Q、I、V、E、S和D),GGX(X=A、S、V、E、Y)和GGGX(X=Y、A)等基序<sup>[28]</sup>。在二级结构上,MiSp较易形成 $\beta$ -折叠和<sub>310</sub>螺旋结构,与主壶腹腺丝相比,次壶腹腺丝在拉伸时易产生不可逆变形,所以抗拉伸强度与杨氏模量略低,特点是延展性较高<sup>[39]</sup>。

鞭毛状腺丝(flagelliform spider silk)处于蛛网的正中,主要用作蛛网上横丝的轴心丝(图1),能够防止猎物挣脱蛛网,拥有很好的弹性与延展性,能够拉伸至其自身长度的2倍<sup>[40]</sup>,主要由鞭毛状腺丝蛋白(flagelliform spidroin, Flag)组成;*N. clavipes*蜘蛛的Flag重复核心区中不含有典型的寡聚丙氨酸基序,其主要特征基序为GPGXX(X=A、S、V、Y)、GGX(X=A、S、V、Y、T)基序以及多个带电荷亲水性氨基酸的高度保守间隔区,形成的蛋白二级结构主要为无规则卷曲,这可能与鞭毛状腺丝的延展性与超收缩性相关<sup>[33]</sup>。

胶性腺丝(pyiform spider silk)是具有黏性的蛋白纤维,被认为是蜘蛛网中不同腺丝间的连接材料,由胶性腺丝蛋白(pyiform spidroin, PySp)组成;银蜘蛛(*Argiope argentata*)的PySp重复核心区中主要含有短肽PXPXP基序,该基序中富含酸碱性和极性氨基酸,如谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和谷氨酰胺,谷氨酰胺的存在被证明有利于PySp自组装形成胶性腺丝<sup>[41]</sup>;PySp二级结构中富含 $\alpha$ -螺旋(>50%),这与该腺丝的黏性密切相关<sup>[42]</sup>。

葡萄状腺丝(aciniform spider silk)主要用于蜘蛛猎物的包裹,是蛛丝当中韧性最强的腺丝,在外力的作用下不容易发生形变,主要由葡萄状腺丝蛋白(aciniform spidroin, AcSp)组成,

AcSp 与其他蛛丝蛋白的同源性较低, 缺乏重复核心区中常见的富含甘氨酸的 GGX/GPGXX/GPGPX (X=Y、L 或 Q) 特征基序<sup>[43]</sup>; *A. ventricosus* 的 AcSp, 其重复核心区的特征基序为寡聚丙氨酸 A<sub>2</sub>、寡聚丝氨酸 S<sub>2-5</sub> 以及高比例的甘氨酸 (14.5%) 和丝氨酸 (18.0%), 结构中无规卷曲的含量较低, 主要以  $\beta$ -折叠为主<sup>[44]</sup>, 可能与葡萄状腺丝出色的韧性密切相关<sup>[45]</sup>。

管状腺丝也称包卵丝 (tubuliform spider silk), 主要功能是制作卵囊、保护蛛卵, 在所有蛛丝中硬度最高, 由包卵丝蛋白 (tubuliform spidroin, TuSp) 组成, 重复核心区含 (A)<sub>n</sub>、(T)<sub>n</sub>、(S)<sub>n</sub>、SQ 和 GX (X 代表 N、F、T、L、I 等氨基酸) 等特征基序, 其中富含的谷氨酰胺和丝氨酸残基散布于寡聚丙氨酸 (A)<sub>n</sub> 基序附近, 促进  $\beta$ -折叠结构的形成。如悦目金蛛 (*Argiope amoena*) TuSp 的部分重复基序为 AAA-SQAASS, 相较于主壶腹丝蛋白中寡聚丙氨酸基序所形成的  $\beta$ -折叠的层间距更大, 因此 TuSp 所形成的  $\beta$ -折叠二级结构易发生变形扭曲, 导致抗拉伸强度较低<sup>[46]</sup>。此外, TuSp 重复核心区中富含极性氨基酸, 使得 TuSp 整体结构中离子含量上升, 这可能是管状腺丝耐受外界湿度变化并且具备较强耐腐蚀性的原因之一<sup>[47]</sup>。

聚合状腺丝 (aggregate spider silk) 由聚合状腺黏液 (aggregate spider glue, ASG) 组成, 鞭毛状腺丝将捕获猎物的力量传递给轴向纤维, 而 ASG 的黏性能够阻碍猎物从网中逃脱。来源于 *N. clavipes* 蜘蛛的聚合状腺黏液主要由蛛丝蛋白 ASG1 和 ASG2 组成。ASG1 的重复核心区中富含谷氨酸、苏氨酸和脯氨酸。而 ASG2 的重复核心区中富含丝氨酸、甘氨酸和缬氨酸。较多的极性氨基酸组成能够促进蛋白分子内的相互作用, 从而形成稳定的  $\beta$ -折叠结构, 这可能与 ASG1 和 ASG2 形成的二级结构中  $\alpha$ -螺旋含

量极低有关<sup>[48]</sup>。

## 2 重组蛛丝蛋白在不同宿主中的表达

由于蜘蛛是肉食性节肢动物, 无法像家蚕一样大规模饲养, 因此异源表达成为大量获取蛛丝的唯一途径。研究者在剖析蛛丝蛋白的序列基序及结构特征的基础上, 从表达宿主的选择与改造、蛛丝蛋白基序的设计到各种表达策略等方面开展了全方位的探索性研究, 以下按照宿主分类对蛛丝蛋白生物合成相关进展进行阐述。

### 2.1 蛛丝蛋白在家蚕细胞中的表达

由于家蚕体内的表达环境与蜘蛛较为接近, 可直接将重组蛛丝蛋白混杂在蚕丝中进行表达, 因此家蚕是目前蛛丝蛋白异源表达研究较多的宿主之一。Nakagaki 等<sup>[49]</sup>利用新开发的家蚕重组杆状病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 在家蚕幼虫中表达鞭毛状蛋白, 将重组杆状病毒 (rBacmid/BmNPV/Flag) 皮下注射入幼虫体内。与对照组相比, Bac-to-Bac/BmNPV 杆状病毒表达系统可有效地在家蚕体内表达目的基因, 与传统的同源重组方法相比, 重组杆状病毒的产生仅需 7–10 d。Lewis 等<sup>[50]</sup>报道了在家蚕幼虫体内表达重组蛛丝蛋白, 每个幼虫体内蛛丝蛋白产量为 6 mg, 研究者认为较低产量与所表达重组蛛丝蛋白较低的溶解度有关。Xu 等<sup>[51]</sup>利用转录激活因子样效应核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 策略, 将蚕丝蛋白重链基因替换为 MaSp1 基因 (1.6 kb), 转化后的蚕茧壳中含有高达 35.2% 的 MaSp1 蛋白。Lewis 团队<sup>[52]</sup>相继报道了利用 CRISPR/Cas9 定点启动策略成功地将蜘蛛丝蛋白 MaSp 和 MiSp 基因整合到家蚕丝素基因组重链或轻链

(FibH 或 FiBL)的内含子中,这种策略获得了含有近 20%蛛丝蛋白的混合蚕丝,该混合蛛蚕丝的纤维强度接近于天然蛛丝(1.2 GPa)的抗张强度;经过 25 代的连续追踪,遗传基本稳定,解决了一直以来外源基因在家蚕宿主中遗传不稳定的问题。然而混合丝中蛛丝蛋白与蚕丝蛋白浑然一体,无法分离获取真正意义上的蛛丝蛋白,从而制约了一些特殊材料的开发与应用。

## 2.2 蛛丝蛋白在植物细胞中的表达

由于整合在植物染色体中的蛛丝蛋白基因不易丢失,研究人员对植物宿主也进行了探究。Hauptmann 小组<sup>[53-54]</sup>在不同植物中进行蛛丝蛋白的表达,如在马铃薯种子中实现了 Flag (分子量 460 kDa)蛛丝蛋白的表达,产量约为 190 mg/kg;在烟草叶片中表达了 Flag (分子量 250 kDa)蛛丝蛋白,产量约为 36 mg/kg。虽然植物宿主为表达大分子量蛛丝蛋白提供了有效工具,但其产量较低并且重组蛋白难分离,用于生产大量的蛛丝蛋白尚难实现<sup>[55]</sup>。

## 2.3 蛛丝蛋白在哺乳动物细胞中的表达

哺乳动物细胞具有表达大片段基因的潜力,并且能够直接分泌表达蛋白,理论上可作为蛛丝蛋白的高效表达宿主。Xu 等<sup>[56]</sup>在转基因小鼠中克隆了 6 倍体的来自 *N. clavipes* 蜘蛛的 *MaSp1* 与 *MaSp2* 基因,最终通过小鼠的乳腺表达出 40 kDa、11.7 mg/L 的重组蛛丝蛋白,然而,由于在转基因过程中“位置效应”的影响,即目的基因插入小鼠基因组中的不同位置从而产生的不同的蛋白,获得的重组蛛丝蛋白分子量大小不均一。Lewis 等<sup>[57]</sup>在转基因山羊中克隆了 *N. clavipes* 蜘蛛的 *MaSp1* 与 *MaSp2* 基因,并在山羊奶中提取出分子量为 65 kDa 的重组蛛丝蛋白,经过纺丝后拉伸处理使得纺丝性能获得了一定的提升,抗拉伸强度达到 200 MPa,但相较于主壶腹腺丝(1.5 GPa)仍然较低。

## 2.4 蛛丝蛋白在微生物细胞中的表达

### 2.4.1 酵母

酵母是一种真核表达宿主,相比于原核细菌,可表达分子量更大的异源蛋白,不易发生翻译过早终止的情况。杨子江等<sup>[14]</sup>成功构建了酵母表达株 GS115,实现了在酵母中对 *A. ventricosus* 蜘蛛的 MiSp 部分重复序列的表达,优化后产量达到 3.5–7.0 mg/L。Sidoruk 等<sup>[15]</sup>报道了利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)获得了重组蛛丝蛋白(94 kDa),通过发酵条件的优化,产量达到 450 mg/L。虽然现阶段酵母宿主表达的产量较高,但由于利用酵母进行转化时存在基因重组现象,最终导致产生丝蛋白的分子量不一致,难以形成稳定均一的蛛丝蛋白<sup>[58]</sup>。

### 2.4.2 沙门氏菌

Widmaier 等<sup>[59]</sup>利用鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)的 III 型分泌系统(T3SS)来控制其表达分泌蛋白,实现了来自 *A. ventricosus* 蜘蛛的 3 种不同类型的主壶腹腺丝蛋白 ADF-1、ADF-2 以及 ADF-3 的分泌表达,简化了纯化步骤,最终获得分子量为 25–56 kDa 的蛛丝蛋白,产量为 14 mg/L。由于沙门氏菌产量过低,难以满足工业化生产的需求,因此该平台有待进一步开发完善。

### 2.4.3 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)遗传背景清晰、操作简单,具有较短的生产周期和较低的生产成本,因而广泛用于蛛丝蛋白表达系统的研究<sup>[2]</sup>。早在 1996 年, Lewis 等<sup>[60]</sup>就使用大肠杆菌作为底盘细胞表达出重组蛛丝蛋白,他们选用来自天然蛛丝蛋白 *MaSp2* 的重复序列的关键蛋白序列进行异源表达,获得了不同分子量(31–112 kDa)的重复序列蛋白,蛛丝蛋白表达量在 2–10 mg/L。2010 年, Xia 等<sup>[16]</sup>首次实现了在大肠杆菌中高分子量重组蛛丝蛋白 *MaSp1*

(284.9 kDa)的表达,并通过高密度发酵将产量提升至 2.7 g/L。2018 年,Zhang 等<sup>[17]</sup>利用分子连接策略在大肠杆菌中获得了 192 倍体嵌合体 MaSp1 (550 kDa)蛛丝蛋白(迄今为止分子量最大的人工合成重组蛛丝蛋白)。2021 年,Rising 等<sup>[18]</sup>通过高密度发酵在大肠杆菌中获得了高达 14.5 g/L 的重组嵌合蛛丝蛋白,是目前报道的最高水平。因此,大肠杆菌作为现阶段具有较大潜力的重组蛛丝蛋白异源表达平台,有希望实现蛛丝蛋白的工业化生产。以下针对一系列重组蛛丝蛋白在大肠杆菌中的异源表达策略进行了总结(表 1)。

### 3 蛛丝蛋白在大肠杆菌中的表达策略

#### 3.1 提升蛛丝蛋白基因稳定性

在提升大片段高 GC 含量蛛丝蛋白基因的转录稳定方面,Fahnestock 等<sup>[61]</sup>设计了一系列重组蛛丝蛋白,通过密码子优化,降低稀有密码子的使用量,可以有效缓解重组蛛丝蛋白的截短表达问题,以获得全长蛋白;实现了重组蛛丝蛋白 8 倍体(65 kDa)和 16 倍体(163 kDa)的 *DP-1B* (MaSp1)和 *DP-2A* (MaSp2)在大肠杆菌中的表达,产量分别为 300 mg/L 和 133 mg/L。Chilkoti 等<sup>[62]</sup>报道了一种密码子扰乱算法,该算法利用相同氨基酸密码子的冗余性,实现了通过 PCR 合成基于高度重复蛋白的同义基因序列,并证明该方法适用于在大肠杆菌中的重组表达高度重复序列,如重组蛛丝蛋白 ADF-1 序列,多聚丙氨酸[AAAQAAQAQAAAEAAQAAQAQ]<sub>6</sub>序列以及具有高  $\beta$ -sheet 形成倾向的[AGAGAGPEG]<sub>10</sub>序列等高度重复蛋白均能够在大肠杆菌中获得较好的表达。

由于蛛丝蛋白基因的高度重复性,其质粒

DNA 的复制、转录和翻译给细胞造成极高的代谢压力,从而导致质粒易丢失,这被认为是造成表达量下降的重要原因。Bhattacharyya 等<sup>[2]</sup>发现在高密度培养条件下,抗生素的选择压力对于维持蛛丝蛋白基因稳定性具有重要作用,实验结果表明,通过在诱导菌体表达蛋白时保持高浓度的抗生素,将重组蛛丝蛋白质粒维持在较高的水平,最终使重组蛛丝蛋白的产量得到显著提高。Xia 团队<sup>[19]</sup>报道了一种低温诱导大肠杆菌高效表达蛛丝蛋白的方法,该研究表明低温诱导能够降低细胞代谢,降低蛋白合成速度并促进有效折叠,同时显著改善重组细菌细胞中的质粒维持水平。最终通过 16 °C 的低温诱导大大提高了 MaSp2 的可溶性表达,通过高密度发酵培养获得了产量为 3.6 g/L 的大分子量的 MaSp2 (201.6 kDa)。

#### 3.2 提升蛛丝蛋白溶解性

天然蛛丝蛋白由于  $\beta$ -折叠含量较高,通常在微生物中以不溶性包涵体沉淀表达,后续纺丝过程需要将包涵体用酸性有机试剂预处理为纺丝原液。虽然重组蛛丝蛋白能够溶解于六氟异丙醇、异丙醇、甲酸等有机溶剂,但是溶解度仍远低于蛛丝蛋白在天然纺丝原液中的溶解度(30%–50%,质量体积分数),并且有机溶剂可能使其在生物医学领域的开发具有一定的危险性。Kaplan 等<sup>[63-64]</sup>通过在寡聚丙氨酸序列两侧任意位置添加蛋氨酸残基充当氧化还原的“触发器”,控制蛛丝蛋白的溶解度。甲硫氨酸在氧化状态时,侧链形成较大且亲水的亚砷形式,破坏  $\beta$ -折叠的形成使溶解度上升;而在还原状态下,甲硫氨酸侧链的影响减小, $\beta$ -折叠结构得以恢复。最终获得了溶解度极高的 8 倍体 MaSp1 (在 Tris-HCl 溶液中的溶解性 40%–50%,质量体积分数)。



由于谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 已发现的 *sec* 和 *tat* 途径能够有效地将异源蛋白进行分泌表达, 同时很少将内源蛋白质分泌到细胞外培养基中, 因此有利于简化纯化过程并获得高纯度的高溶解性蛛丝蛋白。Xia 团队<sup>[65]</sup>通过对谷氨酸棒杆菌中 *sec* 途径依赖型信号肽进行筛选, 获得了能够使重组蛛丝蛋白高效分泌的信号肽, 并在此基础上对谷氨酸棒杆菌的细胞壁合成与基因重组酶相关基因进行了改造, 进一步提高了细胞的易透过性和外源基因的遗传稳定性。最终利用高密度发酵获得了产量为 2.2 g/L、蛋白分子量为 43.36 kDa 的 MaSp1 重组蛛丝蛋白。该蛋白在 pH 为 4.0 的水溶液中能够制备 66% 的高浓度溶液, 具有较强的溶解性, 并且纺丝成纤维的韧性可达 70 MJ/m<sup>3</sup>。

Heidebrecht 等<sup>[66]</sup>通过设计嵌合体蛛丝蛋白, 实现了重组蛛丝蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达, 以 *Araneus diadematus* 来源的 ADF-3 与 ADF-4 序列为基础, 构建了嵌合体蛛丝蛋白 (48–134 kDa), 得益于 ADF-3 序列的高度亲水性, 高分子量嵌合蛛丝蛋白在盐溶液 (300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl) 中的可溶性 (15%–20%, 质量体积分数) 显著提升。Andersson 等<sup>[67]</sup>将蛛丝蛋白的 2 个重复单元 (来源 *Euprosthenois australis* 的 MaSp1) 嵌入具有 pH 响应性的 NT (来源 *E. australis* 的 MaSp1) 以及具有高度可溶性的 CT 中 (来源 *A. ventricosus* 的 MiSp), 构建出一种低分子量嵌合体蛛丝蛋白 (33 kDa)。该嵌合体蛛丝蛋白在大肠杆菌中获得了较高的表达量 (100 mg/L), 并且具有高度溶解性 (在 Tris-HCl 溶液中的溶解性 > 50%, 质量体积分数), 能够在水溶液中维持长达数月的可溶状态 (可浓缩至 500 mg/mL)。此外, 该蛋白还能够在水溶液中而非有机溶剂中进行人工拉丝, 获得了高力学性能的重组蜘蛛丝, 后续通过高密度发酵<sup>[18]</sup>

进一步将该低分子量嵌合体蛛丝蛋白的产量提升至 14.5 g/L 的水平。

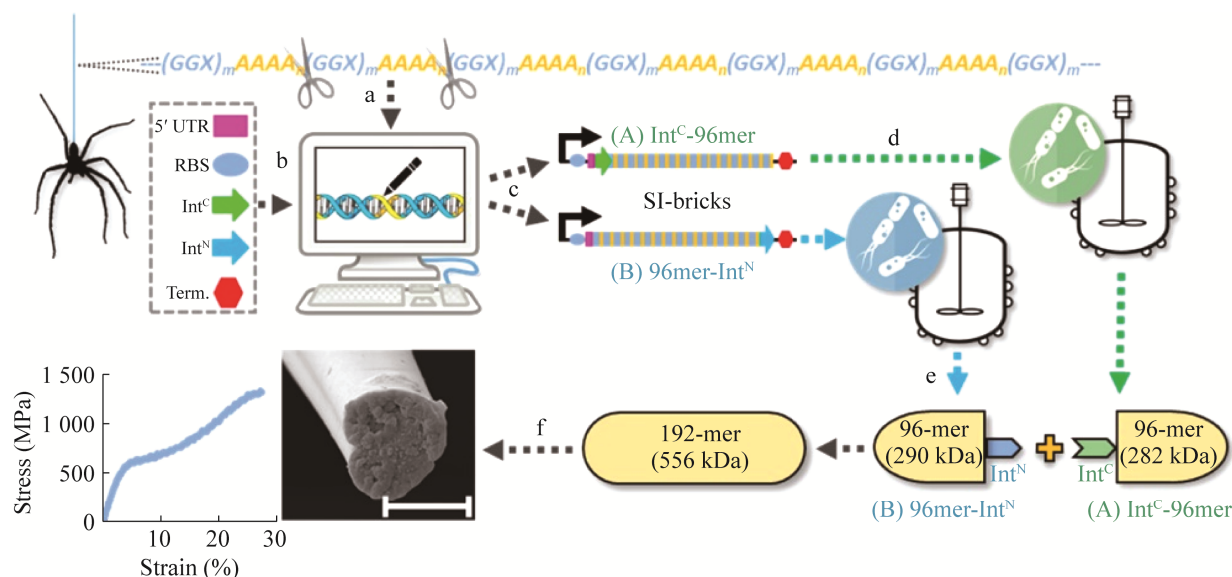
### 3.3 代谢工程改造与融合表达

早期的研究表明在利用大肠杆菌表达高甘氨酸含量的重组蛛丝蛋白时, 由于 tRNA 的不足导致翻译过早地结束, 往往只能获得对应蛛丝蛋白的截短体, 且产量在 100 mg/mL 以下<sup>[64]</sup>, 完整蛛丝蛋白的异源表达以及产量受到限制。Xia 等<sup>[16]</sup>通过代谢工程改造上调了大肠杆菌细胞中甘氨酸-tRNA 的含量, 显著提高了翻译效率, 实现了 96 倍体 *N. clavipes* 蜘蛛来源的 MaSp1 (284.9 kDa) 在大肠杆菌中的高效表达, 高密度发酵后蛋白表达量达到 2.7 g/L, 纺丝后的蛋白纤维具有与天然蛛丝相当的力学性能。Cao 等<sup>[68]</sup>通过同样的方法获得了高分子量蛛丝蛋白 MaSp2 (110 kDa)。

上调甘氨酸-tRNA 的代谢工程改造已被广泛用于高分子量蛛丝蛋白的高效表达, Zhang 等<sup>[17]</sup>在此基础上, 分别在两批次的 96 倍体蛛丝蛋白的 N 端和 C 端融合表达内含肽 (split inteins) (构建方式如图 2 所示), 最终获得了 192 倍体嵌合体 MaSp1 (550 kDa) 蛛丝蛋白。内含肽是一段自加工结构域, 当融合到单独表达的蛋白中时, 能够催化自发剪接反应, 通过肽键将其融合蛋白共价连接, 并在连接位点仅留下少量残基 (≤ 6 个)。实验结果表明, 上调氨酰-tRNA 后 192 倍体 MaSp1 表达量达到约 2.0 g/L。该研究结合代谢工程与融合表达内含肽的策略, 设计出具有聚合功能的重组蛛丝蛋白, 该策略有望应用于其他高分子量蛋白的高效表达中。

## 4 重组蛛丝蛋白序列设计

尽管重组蛛丝蛋白的异源表达甚至高密度发酵等问题得到了一定的解决, 但是目前重组蛛丝依然难以复刻天然蛛丝的力学性能, 并且



**图 2 192 倍体嵌合体 MaSp1 重组蛛丝蛋白构建示意图<sup>[17]</sup>** a: *N. clavipes* 拖丝蛋白 MaSp1 的高重复核心(如图所示为简化一致的肽序列)被还原为单个重复单元(1-mer)。请注意,“-mer”通常指小分子或单个氨基酸,这里的缩写是指构成较大蜘蛛蛋白重复单元的 35 个氨基酸肽。b: 将 1-mer DNA 序列与 5' UTR、RBS、分裂内链(SI)和终止序列在计算机上组合,然后对其进行计算优化,用于微生物生产。c: 优化的 DNA 序列在称为 SI-Bricks 的标准化 DNA 部分组装系统的框架内组装,以产生互补的 Int<sup>C</sup> 或 int<sup>N</sup> 融合的 96-mer 结构。d: 构建质粒转入大肠杆菌进行生物生产。e: 将细胞培养物混合并裂解,以启动 si 介导的 96 聚合物蜘蛛蛋白共价连接,产生 192 聚合物,556 kDa 的产物。f: 将连接后的产物提纯并纺成纤维进行力学测试。比例尺表示 5  $\mu$ m

Figure 2 Schematic diagram showing the construction of the 192-fold chimeric MaSp1 recombinant arachnid protein<sup>[17]</sup>. a: The highly repetitive core of natural *N. clavipes* dragline silk protein MaSp1 (shown as a simplified consensus peptide sequence) was reduced to a single repeat unit (1-mer). Note, while “-mer” often refers to a small molecule or individual amino acid, the abbreviation here refers to the 35 amino acid peptide that constitutes the repeating unit of the larger spidroin. b: The 1-mer DNA sequence was combined *in silico* with 5' UTR, RBS, split intein (SI), and terminator sequences, which were then computationally optimized for microbial production. c: The optimized DNA sequences were assembled within the framework of a standardized DNA part assembly system termed SI-Bricks to yield complementary Int<sup>C</sup>- or Int<sup>N</sup>-fused 96-mer constructs. d: Constructs were transformed to metabolically engineered *E. coli* for bioproduction. e: Cell cultures were mixed and lysed to initiate SI-mediated covalent ligation of 96-mer spidroins to yield a 192-mer, 556 kDa product. f: The ligated product was purified and spun into fibers for mechanical testing. Scale bar indicates 5  $\mu$ m.

大分子量蛛丝蛋白的高效表达也有很大的局限性,这进一步推动了对蛛丝蛋白的序列、结构与纺丝性能之间的关系的研究。

结构蛋白分子是创建多尺度组装的蛋白生物材料的基本模块。通过蛋白质工程和基因编

辑工具对蛋白分子进行理性设计和优化,从而易于异源表达并且提升蛋白材料的功能,已经成为高性能蛋白材料合成发展的新趋势。多尺度计算模拟为重组蛛丝蛋白设计提供了新思路和新工具,随着蛋白质结构的认知、计算模拟

和设计改造技术的快速发展,结合计算机模拟实验使得蛋白质功能材料的精准设计成为可能。在本课题组前期工作中,通过不同蜘蛛物种来源的结构蛋白模块重组,获得了具有高力学性能的重组蛛丝蛋白,并将其应用于糖尿病伤口的智能管理<sup>[69]</sup>。本团队结合重组蛛丝蛋白和聚氨酯(polyurethane, PU)复合材料微观结构的优点,开发了具有高力学性能、高集成度的智能伤口敷料,并在糖尿病小鼠模型的伤口恢复中取得了较好的效果<sup>[70]</sup>。该工作突破了传统蛛丝蛋白范畴,有望用于新一代仿生人造蛛丝材料的设计和应用于生物医学领域。

#### 4.1 聚丙氨酸基序形成的 $\beta$ -折叠对纺丝性能的影响

随着对蛛丝蛋白特征基序和结构的深入研究,发现多数天然蛛丝的微晶区是蛛丝纤维抗拉伸强度的关键,微晶区中寡聚丙氨酸所形成的反平行  $\beta$ -折叠是由蛛丝蛋白重复核心区的寡聚丙氨酸相互作用所致;有研究<sup>[71-72]</sup>利用副本交换分子动力学模拟(replica exchange molecular dynamics, REMD)对蛛丝蛋白的二级结构进行计算分析。将蛛丝蛋白的重复核心区域划分成不同片段,以预测与天然蛛丝蛋白结构相关的最稳定的结构状态。REMD 模拟了 *N. clavipes* 蜘蛛的主壶腹腺丝蛋白 MaSp1 构象的转变,通过创建和分析测试蛛丝蛋白数据集合来选取数据特征,集合包含了多种聚丙氨酸长度的来源于 *N. clavipes* 蜘蛛的 MaSp1 序列,包括野生型。通过 K 均值聚类方法获取每种情况下可能性最大的天然结构,再通过用显性溶剂平衡优化二级结构,通过对二级结构和二面角的分析,确定聚丙氨酸长度对  $\beta$ -折叠纳米晶体形成的影响。结果表明,在蛛丝蛋白自组装的过程中,形成的  $\beta$ -折叠纳米晶体的长度取决于聚丙氨酸区域的长度,而非侧链方向的宽度<sup>[73]</sup>。

Keten 等<sup>[74]</sup>利用全原子动力学模拟(all-atom molecular dynamics, AAMD)辅助分析蛛丝中反平行  $\beta$ -折叠纳米晶体的机械性能,以及溶剂分子如何影响  $\beta$ -纳米晶体间的氢键<sup>[72]</sup>。通过沿 y 轴复制  $\beta$  链,建立了不同尺寸  $\beta$ -纳米晶体的原子结构,使用拉伸动力学模拟对它们的弯曲刚度和破坏行为进行了模拟,发现尺寸为 3–4 nm 的  $\beta$ -纳米晶体最有效地利用了氢键,并通过分子粘滑变形帮助蜘蛛丝获得了更高的刚度、强度和韧性。

Graham 等<sup>[73]</sup>利用分子动力学模拟进一步准确地预测出形成  $\beta$ -折叠晶体所需的临界聚丙氨酸长度为 4 个聚丙氨酸,而要形成坚固的  $\beta$ -折叠晶体则至少需要 6 个丙氨酸,该发现已被 Kaplan<sup>[75]</sup>的实验验证。同时,在天然蛛丝蛋白中,一种低重复度聚丙氨酸序列也被发现, *C. moluccensis* 蜘蛛来源的 MaSp1s (MaSp1 short)<sup>[21]</sup>,重复核心区缺乏通常的重复特征和典型的序列基序,仅含有少量且较短的寡聚丙氨酸(A)<sub>n</sub> (n=4–6)基序,通过将其与 *L. hesperus* 蜘蛛的 N 端区与 C 端区嵌合成的 eMaSp1s,在大肠杆菌中实现了高效异源表达,该重组蛛丝蛋白湿纺纤维显示出较好的机械性能,在相同延伸率的条件下,与相似分子量的 NT-MaSp1-CT 的重组蛛丝蛋白湿纺纤维相比,显示出更高的强度 [(282±66) MPa]与更高的韧性 [(144±44) MJ/m<sup>3</sup>]。

#### 4.2 淀粉样蛋白基序形成的空间拉链结构对纺丝性能的影响

受蛛丝蛋白中  $\beta$ -折叠结构的启发,研究者关注到一类具有高  $\beta$ -折叠结构倾向性的淀粉样蛋白。淀粉样蛋白通常能形成高度有序的反平行  $\beta$ -折叠片层,而相邻  $\beta$  片层之间又通过静电相互作用、 $\pi$ - $\pi$  堆积或疏水效应进一步形成空间拉链结构<sup>[76]</sup>,这赋予这些淀粉样纳米纤维非凡的机械性能。类似地,天然蛛丝蛋白微晶区中

的 2 个或多个  $\beta$ -折叠片层之间也会形成紧密互补的界面,从而促进微晶区的稳定性,增强腺丝性能<sup>[77]</sup>。Kaplan 等<sup>[78]</sup>以 RNaseA 为模型系统,用基于 NNQQNY 晶体结构的三维轮廓法对不同六肽序列形成空间拉链构型的倾向性进行了预测,最终通过实验证明空间拉链结构与氨基酸在多肽中的排列顺序密切相关,并成功验证了三维轮廓法预测多肽形成空间拉链结构倾向性的准确性。

Zhang 等<sup>[79]</sup>通过引入淀粉样多肽替代天然蛛丝蛋白微晶区的聚丙氨酸基序,设计合成了具有空间拉链构型的淀粉样嵌合蛛丝蛋白(构建方法如图 3 所示)。含淀粉样多肽 FGAILSS 的 128 倍体嵌合蛛丝蛋白纺出的纤维丝的强度达到约 0.98 GPa,韧性达约 161 MPa,展现出比相同分子量重组蛛丝蛋白更高的强度(2.8–3.4 倍)和韧性(1.5–2.6 倍),纺丝后的重组蛛丝中  $\beta$ -微晶结构的含量(19.1%)高于重组蛛丝纤维(4.2%)甚至天然蛛丝(18.3%)。此外,由于该嵌合蛛丝蛋白微晶区的特定氨基酸含量大大降低,使得表达量显著提高,蛋白含量可达细胞干重的 16%–24%。这种对天然蛛丝蛋白关

键基序的设计与改造,实现蛛丝蛋白的成丝性能与易表达性的双重优化,为人造蛛丝蛋白序列的理性设计提供了新的思路。

基于空间拉链构型的计算机预测,Arndt 等<sup>[80]</sup>通过引入自行设计的高空间拉链构型形成倾向性的淀粉样六肽序列合成了人造迷你蛛丝蛋白(设计原理如图 4 所示),获得了抗拉强度更高、韧性与天然牵引丝相当的人造蛛丝。他们以 3 种具有高  $\beta$ -折叠结构倾向性的氨基酸(异亮氨酸、缬氨酸和苏氨酸)作为基本氨基酸,设计了多组六肽序列,三维轮廓法预测显示这些序列具有空间拉链构型,并且具有较强的成纤维倾向性。利用所设计的六肽序列对可溶性重组蛛丝蛋白微晶区的聚丙氨酸序列进行替换,在大肠杆菌中表达出一种具有高成纤维性能的迷你蛛丝蛋白(A3I)3-A14,表达量为 9 g/L,同时具有高度水溶性(30%–50%,质量体积分数),以较低分子量蛋白实现了与天然蛛丝相仿的性能(韧性达到 150–200 MJ/m<sup>3</sup>)。该研究巧妙利用了淀粉样多肽倾向形成空间拉链结构的特点,设计出新型丝蛋白韧性模块,该策略有望应用于其他含有空间拉链结构的蛋白序列。

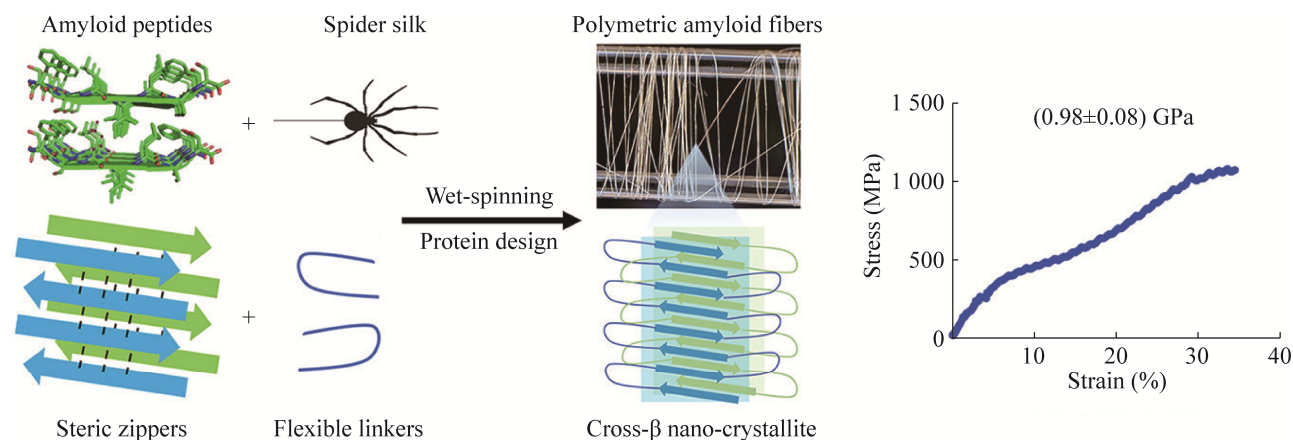
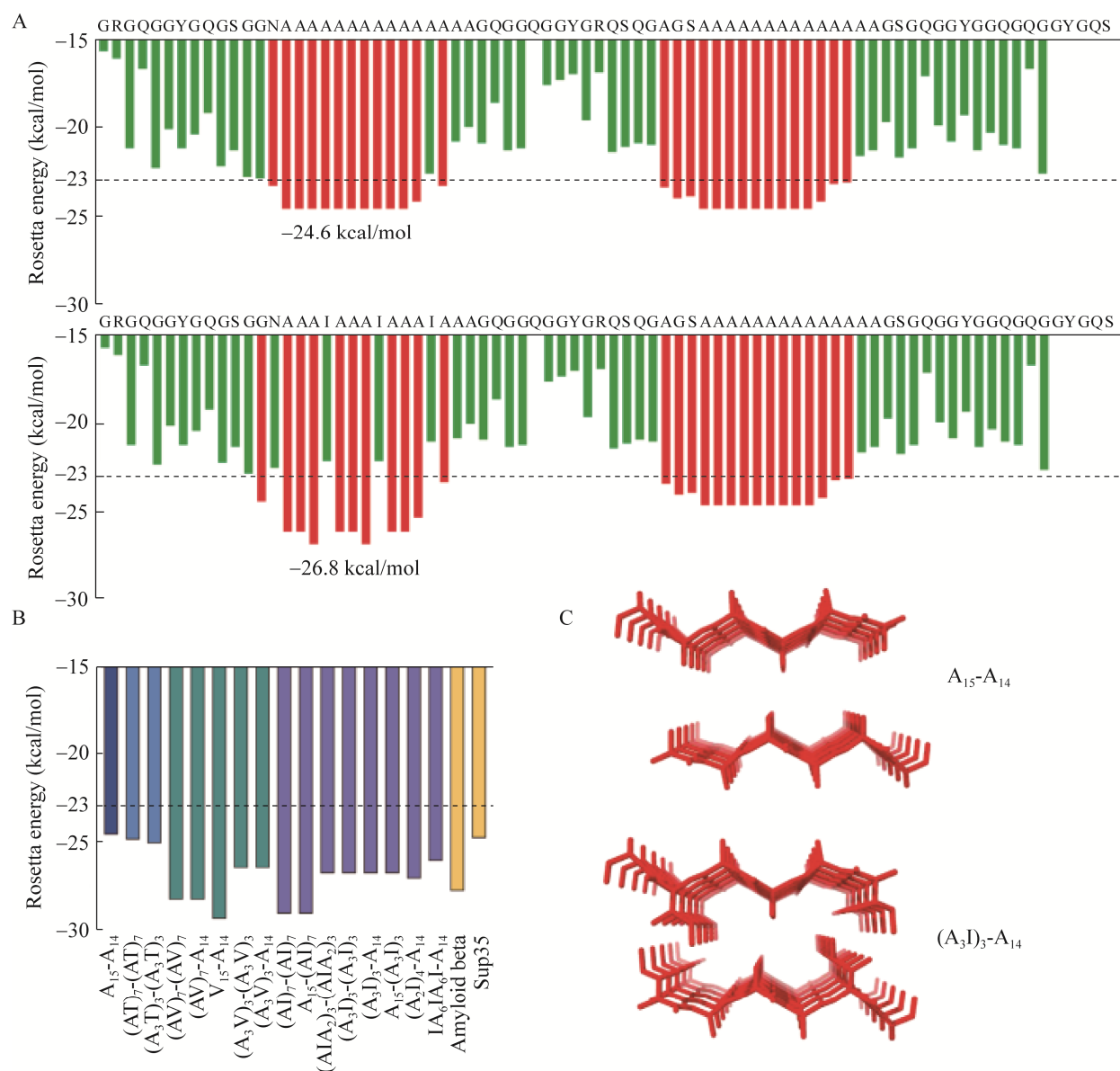


图 3 淀粉样嵌合蛛丝蛋白构建示意图<sup>[79]</sup>

Figure 3 Schematic representation of constructing the amyloid chimeric arachnid protein<sup>[79]</sup>.



**图 4** 人造迷你蛛丝蛋白的设计原理<sup>[80]</sup> A: A15-A14 和(A3I)3-A14 的 Rosetta 能量谱图柱状图表示移动六肽的罗塞塔能量(在每个六肽的第一个残基处表示), 红色柱状图表示罗塞塔能量等于或低于 -23 kcal/mol (虚线). 绿条表示高于阈值的 Rosetta 能量, 不太可能形成立体拉链. B: 条形图表示 A15-A14 和工程迷你蜘蛛中预测能量最低的六肽的 Rosetta 能. C: 假设由 A15-A14 中的六肽 AAAAAA 和(A3I)3-A14 中的 AIAAI 组成的两个  $\beta$  片的拉链结构

Figure 4 Principles for designing artificial miniature arachnid proteins<sup>[80]</sup>. A: Rosetta energy profiles of A15-A14 and (A3I)3-A14. Bars show Rosetta energies for moving hexapeptides (indicated at the first residue of each hexapeptide), red bars indicate Rosetta energies equal or below  $-23$  kcal/mol (dashed line). Green bar indicate Rosetta energies above the threshold and are unlikely to form steric zippers. B: Bars indicate the Rosetta energy of the hexapeptide with the lowest predicted energy from A15-A14 and the engineered mini-spidroins. C: Hypothetical zipper structure of two  $\beta$ -sheets composed of hexapeptides AAAAAA from A15-A14 and AIAAI derived from (A3I)3-A14, respectively.



## 5 总结与展望

现有研究证明天然蛛丝蛋白的序列与结构的多样性在天然蛛丝上展现出不同的力学性能, 这为易表达与高性能重组蛛丝蛋白的设计提供了无限的可能, 蛛丝蛋白序列理性设计逐渐开始建立。同时, 通过基因工程、代谢工程和发酵工程等策略的交叉融合为实现蛛丝蛋白的高效异源表达提供强有力的支撑, 可能使蜘蛛丝蛋白的生产达到工业规模。

天然蛛丝蛋白丰富的种类和结构特性对于重组蛛丝蛋白的构建提供了序列设计上的灵活性。目前, 蛛丝蛋白功能材料的研究大多数局限于同一种蜘蛛重复模块的叠加以提高蛛丝纤维的功能。随着对各种多种蛛丝蛋白特征基序的多变性、自组装能力及蛛丝性能的深入了解, 可设计出易表达和功能强化的高性能仿生蛛丝蛋白; 还能够根据不同功能材料的特殊需求, 实现以功能为导向的蛛丝蛋白的定向改造。如, 可以通过合理设计蛛丝蛋白微晶区与柔性区的比例, 获得具有一定抗拉强度和高延展性的重组蛛丝蛋白材料, 用于易形成伤口二次损伤的糖尿病伤口敷料; 或可以通过改良蛛丝蛋白中微晶区序列的构成, 以获得具有高抗拉强度材料用于需要高强度的颈椎固定骨钉; 还可以针对蛛丝蛋白高甘氨酸含量的柔性区进行相似结构序列的替换, 设计出更加适合异源表达载体高效表达的序列, 使未来蛛丝蛋白的生产达到工业化规模。

## REFERENCES

- [1] JALEEL Z, ZHOU S, MARTÍN-MOLDES Z, BAUGH LM, YE H, DINJASKI N, BROWN LT, GARB JE, KAPLAN DL. Expanding canonical spider silk properties through a DNA combinatorial approach[J]. *Materials*, 2020, 13(16): 3596.
- [2] BHATTACHARYYA G, OLIVEIRA P, KRISHNAJI ST, CHEN D, HINMAN M, BELL B, HARRIS TI, GHAZITABATABAEI A, LEWIS RV, JONES JA. Large scale production of synthetic spider silk proteins in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 183: 105839.
- [3] XUE CC, SUTRISNO L, LI M, ZHU W, FEI Y, LIU C, WANG X, CAI K, HU Y, LUO Z. Implantable multifunctional black phosphorus nanoformulation-deposited biodegradable scaffold for combinational photothermal/chemotherapy and wound healing[J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120623.
- [4] KOH LD, CHENG Y, TENG CP, KHIN YW, LOH XJ, TEE SY, LOW M, YE EY, YU HD, ZHANG YW, HAN MY. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials[J]. *Progress in Polymer Science*, 2015, 46: 86-110.
- [5] ZHOU Y, SHEN Q, LIN Y, XU S, MENG Q. Evaluation of the potential of chimeric spidroins/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) (PLCL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 111: 110752.
- [6] WITHANAGE S, SAVIN A, NIKOLAEVA V, KISELEVA A, DUKHINOVA M, KRIVOSHAPKIN P, KRIVOSHAPKINA E. Native spider silk-based antimicrobial hydrogels for biomedical applications[J]. *Polymers*, 2021, 13(11): 1796.
- [7] WU SD, CHUANG WT, HO JC, WU HC, HSU SH. Self-healing of recombinant spider silk gel and coating[J]. *Polymers*, 2023, 15(8): 1855.
- [8] LIU Y, HUANG W, MENG MS, CHEN MH, CAO CJ. Progress in the application of spider silk protein in medicine[J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2021, 36(5): 859-871.
- [9] KOH K, WANG JK, CHEN JXY, HIEW SH, CHENG HS, GABRYELCZYK B, VOS MIG, YIP YS, CHEN LY, SOBOTA RM, CHUA DKK, TAN NS, TAY CY, MISEREZ A. Squid suckerin-spider silk fusion protein hydrogel for delivery of mesenchymal stem cell secretome to chronic wounds[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(1): 2201900.
- [10] HEROLD HM, DÖBL A, WOHLRAB S, HUMENIK M, SCHEIBEL T. Designed spider silk-based drug carrier for redox- or pH-triggered drug release[J]. *Biomacromolecules*, 2020, 21(12): 4904-4912.
- [11] ZHANG YX, NING YG, ZHANG M, GUO HG, ZHANG Y, LIU ZH, JI XH, ZHANG JZ, YANG XH, YUAN LB. Spider silk-based fiber magnetic field sensor[J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2021,

- 39(20): 6631-6636.
- [12] QIN N, QIAN ZG, ZHOU CZ, XIA XX, TAO TH. 3D electron-beam writing at sub-15 nm resolution using spider silk as a resist[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5133.
- [13] RAMEZANIAGHDAM M, NAHDI ND, RESKI R. Recombinant spider silk: promises and bottlenecks[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 835637.
- [14] 杨子江, 陈格飞, 孟清. 大腹园蛛次壶腹腺丝的表达[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1323-1331.  
YANG ZJ, CHEN GF, MENG Q. Expression of *Araneus ventricosus* minor ampullate spidroin[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(9): 1323-1331 (in Chinese).
- [15] SIDORUK KV, DAVYDOVA LI, KOZLOV DG, GUBAIDULLIN DG, GLAZUNOV AV, BOGUSH VG, DEBABOV VG. Fermentation optimization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain producing 1F9 recombinant spidroin[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, 51(7): 766-773.
- [16] XIA XX, QIAN ZG, KI CS, PARK YH, KAPLAN DL, LEE SY. 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.
- [17] BOWEN CH, DAI B, SARGENT CJ, BAI WQ, LADIWALA P, FENG HB, HUANG WW, KAPLAN DL, GALAZKA JM, ZHANG FZ. Recombinant spidroins fully replicate primary mechanical properties of natural spider silk[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(9): 3853-3860.
- [18] SCHMUCK B, GRECO G, BARTH A, PUGNO NM, JOHANSSON J, RISING A. High-yield production of a super-soluble miniature spidroin for biomimetic high-performance materials[J]. *Materials Today*, 2021, 50: 16-23.
- [19] YANG YX, QIAN ZG, ZHONG JJ, XIA XX. Hyper-production of large proteins of spider dragline silk MaSp2 by *Escherichia coli* via synthetic biology approach[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(4): 484-490.
- [20] 张秀丽, 陈格飞, 林瑛, 李佳, 孟清. *Euprosthenops australis* 牵引丝蛋白的原核表达[J]. *生命科学研究*, 2013, 17(1): 14-19, 62.  
ZHANG XL, CHEN GF, LIN Y, LI J, MENG Q. Prokaryotic expression of *Euprosthenops australis* dragline silk protein[J]. *Life Science Research*, 2013, 17(1): 14-19, 62 (in Chinese).
- [21] THAMM C, SCHEIBEL T. Recombinant production, characterization, and fiber spinning of an engineered short major ampullate spidroin (MaSp1s)[J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(4): 1365-1372.
- [22] ZHOU YZ, RISING A, JOHANSSON J, MENG Q. Production and properties of triple chimeric spidroins[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(7): 2825-2833.
- [23] ZHU H, RISING A, JOHANSSON J, ZHANG X, LIN Y, ZHANG L, YI T, MI J, MENG Q. Tensile properties of synthetic pyriform spider silk fibers depend on the number of repetitive units as well as the presence of N- and C-terminal domains[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 765-772.
- [24] 汪双祝, 温睿, 王康康, 田露阳, 孟清, 林瑛. 大腹园蛛管状腺丝重组蛋白的克隆表达及纺丝[J]. *工业微生物*, 2020, 50(2): 15-21.  
WANG SZ, WEN R, WANG KK, TIAN LY, MENG Q, LIN Y. Expression and spinning of tubuliform silk fiber recombinant protein from *Araneus ventricosus*[J]. *Industrial Microbiology*, 2020, 50(2): 15-21 (in Chinese).
- [25] SHOUYING X, XUE L, YIZHONG Z, YING L, QING M. Structural characterization and mechanical properties of chimeric Masp1/Flag minispidroins[J]. *Biochimie*, 2020, 168: 251-258.
- [26] 李雪, 陈格飞, 张晓玲, 孟清. 大腹园蛛鞭状腺蛛丝蛋白 N 端结构域的克隆表达及圆二色谱分析[J]. *生命科学研究*, 2017, 21(5): 392-398, 416.  
LI X, CHEN GF, ZHANG XL, MENG Q. Cloning and expression and CD spectra of the N-terminal domain of flagelliform spidroin from *Araneus ventricosus*[J]. *China Industrial Economics*, 2017, 21(5): 392-398, 416 (in Chinese).
- [27] KRONQVIST N, SARR M, LINDQVIST A, NORDLING K, OTIKOV M, VENTURI L, PIOSELLI B, PURHONEN P, LANDREH M, BIVERSTÅL H, TOLEIKIS Z, SJÖBERG L, ROBINSON CV, PELIZZI N, JÖRNVALL H, HEBERT H, JAUDZEMS K, CURSTEDT T, RISING A, JOHANSSON J. Efficient protein production inspired by how spiders make silk[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15504.
- [28] SCHEIBEL T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins[J]. *Microbial Cell Factories*, 2004, 3(1): 1-10.
- [29] HUMENIK M, SMITH AM, SCHEIBEL T.

- Recombinant spider silks—biopolymers with potential for future applications[J]. *Polymers*, 2011, 3(1): 640-661.
- [30] RISING A, NIMMERVOLL H, GRIP S, FERNANDEZ-ARIAS A, STORCKENFELDT E, KNIGHT DP, VOLLRATH F, ENGSTRÖM W. Spider silk proteins-mechanical property and gene sequence[J]. *Zoological Science*, 2005, 22(3): 273-281.
- [31] AYOUB NADIA A, GARB JESSICA E, TINGHITELLA ROBIN M, COLLIN MATTHEW A, HAYASHI CHERYL Y. Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e514.
- [32] HARDY JG, SCHEIBEL TR. Production and processing of spider silk proteins[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2009, 47(16): 3957-3963.
- [33] ADRIANOS SL, TEULÉ F, HINMAN MB, JONES JA, WEBER WS, YARGER JL, LEWIS RV. *Nephila clavipes* Flagelliform silk-like GGX motifs contribute to extensibility and spacer motifs contribute to strength in synthetic spider silk fibers[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(6): 1751-1760.
- [34] COLLIN MA, CLARKE TH, AYOUB NA, HAYASHI CY. Genomic perspectives of spider silk genes through target capture sequencing: conservation of stabilization mechanisms and homology-based structural models of spidroin terminal regions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 829-840.
- [35] KONO N, NAKAMURA H, OHTOSHI R, MORAN DAP, SHINOHARA A, YOSHIDA Y, FUJIWARA M, MORI M, TOMITA M, ARAKAWA K. Orb-weaving spider *Araneus ventricosus* genome elucidates the spidroin gene catalogue[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 8380.
- [36] STENGEL D, SARIC M, JOHNSON HR, SCHILLER T, DIEHL J, CHALEK K, ONOFREI D, SCHEIBEL T, HOLLAND GP. Tyrosine's unique role in the hierarchical assembly of recombinant spider silk proteins: from spinning dope to fibers[J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(3): 1463-1474.
- [37] GARB JE, HANEY RA, SCHWAGER EE, GREGORIČ M, KUNTNER M, AGNARSSON I, BLACKLEDGE TA. The transcriptome of Darwin's bark spider silk glands predicts proteins contributing to dragline silk toughness[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 275.
- [38] GAO ZW, LIN Z, HUANG WD, LAI CC, FAN JS, YANG DW. Structural characterization of minor ampullate spidroin domains and their distinct roles in fibroin solubility and fiber formation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56142.
- [39] 贾小娜, 陈格飞, 孟清. 次壶腹腺丝蛋白功能模块的研究[J]. *生命科学研究*, 2014, 18(1): 28-32, 49. JIA XN, CHEN GF, MENG Q. The research of MiSp modules[J]. *Life Science Research*, 2014, 18(1): 28-32, 49 (in Chinese).
- [40] 田露阳, 孟清, 林瑛. 嵌合蛛丝蛋白 Flag-MaSp1 重复模块的表达及二级结构分析[J]. *生命科学研究*, 2020, 24(5): 396-403. TIAN LY, MENG Q, LIN Y. Expression and secondary structure analysis of chimeric spidroin from flag-MaSp1 repetitive modules[J]. *Life Science Research*, 2020, 24(5): 396-403 (in Chinese).
- [41] CHAW RC, SASKI CA, HAYASHI CY. Complete gene sequence of spider attachment silk protein (P<sub>y</sub>Sp1) reveals novel linker regions and extreme repeat homogenization[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 81: 80-90.
- [42] WANG KK, WEN R, JIA QP, LIU XQ, XIAO JH, MENG Q. Analysis of the full-length pyriform spidroin gene sequence[J]. *Genes*, 2019, 10(6): 425.
- [43] TREMBLAY ML, XU LL, LEFÈVRE T, SARKER M, ORRELL KE, LECLERC J, MENG Q, PÉZOLET M, AUGER M, LIU XQ, RAINEY JK. Spider wrapping silk fibre architecture arising from its modular soluble protein precursor[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11502.
- [44] WEN R, WANG K, YANG D, YU T, ZAN X, MENG Q. The novel aciniform silk protein (AcSp2-v2) reveals the unique repetitive domain with high acid and thermal stability and self-assembly capability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 202: 91-101.
- [45] WEN R, WANG K, LIU X, LI X, MI J, MENG Q. Molecular cloning and analysis of the full-length aciniform spidroin gene from *Araneus ventricosus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 1352-1360.
- [46] 王金雷, 陈格飞, 李佳, 林瑛, 孟清. 悦目金蛛丝蛋白 TuSp1 重复模块特征[J]. *东华大学学报(自然科学版)*, 2013, 39(2): 196-201. WANG JL, CHEN GF, LI J, LIN Y, MENG Q. Characterization of spidroin TuSp1 repeat module from *Argiope amoena*[J]. *Journal of Donghua University (Natural Science Edition)*, 2013, 39(2): 196-201 (in Chinese).
- [47] LIN Z, HUANG WD, ZHANG JF, FAN JS, YANG



- DW. Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(22): 8906-8911.
- [48] COLLIN MA, CLARKE TH, AYOUB NA, HAYASHI CY. Evidence from multiple species that spider silk glue component ASG2 is a spidroin[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21589.
- [49] MIAO YG, ZHAO AC, ZHANG YS, NAKAGAKI K, MENG Y, ZHAO TF, NAKAGAKI M. Silkworm, *Bombyx mori* larvae expressed the spider silk protein through a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus[J]. Journal of Applied Entomology, 2006, 130(5): 297-301.
- [50] Lewis RV. Spider silk: ancient ideas for new biomaterials[J]. Chemical Reviews, American Chemical Society, 2006, 106(9): 3762-3774.
- [51] XU J, DONG QL, YU Y, NIU BL, JI DF, LI MW, HUANG YP, CHEN X, TAN AJ. Mass spider silk production through targeted gene replacement in *Bombyx mori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(35): 8757-8762.
- [52] ZHANG XL, XIA LJ, DAY BA, HARRIS TI, OLIVEIRA P, KNITTEL C, LAURA LICON A, GONG CL, DION G, LEWIS RV, JONES JA. CRISPR/Cas9 initiated transgenic silkworms as a natural spinner of spider silk[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(6): 2252-2264.
- [53] HAUPTMANN V, WEICHERT N, MENZEL M, KNOCH D, PAEGE N, SCHELLER J, SPOHN U, CONRAD U, GILS M. Native-sized spider silk proteins synthesized *in planta* via intein-based multimerization[J]. Transgenic Research, 2013, 22(2): 369-377.
- [54] WEICHERT N, HAUPTMANN V, HELMOLD C, CONRAD U. Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 6.
- [55] SCHILLBERG S, RAVEN N, SPIEGEL H, RASCHE S, BUNTRU M. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 720.
- [56] XU HM, FAN B, YU SY, HUANG YH, ZHAO ZH, LIAN Z, DAI YP, WANG LL, LIU ZL, FEI J, LI N. Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice[J]. Animal Biotechnology, 2007, 18: 1-12.
- [57] COPELAND CG, BELL BE, CHRISTENSEN CD, LEWIS RV. Development of a process for the spinning of synthetic spider silk[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2015, 1(7): 577-584.
- [58] FAHNESTOCK SR, BEDZYK LA. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(1): 33-39.
- [59] WIDMAIER DM, TULLMAN-ERCEK D, MIRSKY EA, HILL R, GOVINDARAJAN S, MINSHULL J, VOIGT CA. Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers[J]. Molecular Systems Biology, 2009, 5: 309.
- [60] LEWIS RV, HINMAN M, KOTHAKOTA S, FOURNIER MJ. Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins[J]. Protein Expression and Purification, 1996, 7(4): 400-406.
- [61] FAHNESTOCK SR, IRWIN SL. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(1): 23-32.
- [62] TANG NC, CHILKOTI A. Combinatorial codon scrambling enables scalable gene synthesis and amplification of repetitive proteins[J]. Nature Materials, 2016, 15(4): 419-424.
- [63] BINI E, HUANG J, LEE SY, KAPLAN DL. Solution behavior of synthetic silk peptides and modified recombinant silk proteins[J]. Applied Physics A, 2006, 82(2): 193-203.
- [64] SZELA S, AVTGES P, VALLUZZI R, WINKLER S, WILSON D, KIRSCHNER D, KAPLAN DL. Reduction-oxidation control of  $\beta$ -sheet assembly in genetically engineered silk[J]. Biomacromolecules, 2000, 1(4): 534-542.
- [65] JIN Q, PAN F, HU CF, LEE SY, XIA XX, QIAN ZG. Secretory production of spider silk proteins in metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for spinning into tough fibers[J]. Metabolic Engineering, 2022, 70: 102-114.
- [66] HEIDEBRECHT A, EISOLDT L, DIEHL J, SCHMIDT A, GEFFERS M, LANG G, SCHEIBEL T. Biomimetic fibers made of recombinant spidroins with the same toughness as natural spider silk[J]. Advanced Materials, 2015, 27(13): 2189-2194.
- [67] ANDERSSON M, JIA QP, ABELLA A, LEE XY, LANDREH M, PURHONEN P, HEBERT H, TENJE M, ROBINSON CV, MENG Q, PLAZA GR, JOHANSSON J, RISING A. Biomimetic spinning of

- artificial spider silk from a chimeric minispidroin[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(3): 262-264.
- [68] CAO H, PARVEEN S, DING D, XU HJ, TAN TW, LIU L. Metabolic engineering for recombinant major ampullate spidroin 2 (MaSp2) synthesis in *Escherichia coli*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 11365.
- [69] CHENG C, QIU YM, TANG SM, LIN BY, GUO MZ, GAO BB, HE BF. Artificial spider silk based programmable woven textile for efficient wound management[J]. Advanced Functional Materials, 2022, 32(6): 2107707.
- [70] LIN BY, YUAN LQ, GAO BB, HE BF. Patterned duplex fabric based on genetically modified spidroin for smart wound management (adv. healthcare mater. 4/2023)[J]. Advanced Healthcare Materials, 2023, 12(4): 2202213.
- [71] KETEN S, BUEHLER MJ. Atomistic model of the spider silk nanostructure[J]. Applied Physics Letters, 2010, 96(15): 153701.
- [72] CHENG Y, KOH LD, LI DC, JI BH, HAN MY, ZHANG YW. On the strength of  $\beta$ -sheet crystallites of *Bombyx mori* silk fibroin[J]. Journal of the Royal Society, Interface, 2014, 11(96): 20140305.
- [73] BRATZEL G, BUEHLER MJ. Sequence-structure correlations in silk: Poly-*Ala* repeat of *N. clavipes* MaSp1 is naturally optimized at a critical length scale[J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2012, 7: 30-40.
- [74] KETEN S, XU ZP, IHLE B, BUEHLER MJ. Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of  $\beta$ -sheet crystals in silk[J]. Nature Materials, 2010, 9(4): 359-367.
- [75] RABOTYAGOVA OS, CEBE P, KAPLAN DL. Role of polyalanine domains in  $\beta^2$ -sheet formation in spider silk block copolymers[J]. Macromolecular Bioscience, 2010, 10(1): 49-59.
- [76] LESTER-ZER N, GHAYEB M, CHAI L. Nanomechanical properties of steric zipper globular structures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(45): 22478-22484.
- [77] DAI B, SARGENT CJ, GUI XR, LIU C, ZHANG FZ. Fibril self-assembly of amyloid-spider silk block polypeptides[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(5): 2015-2023.
- [78] GOLDSCHMIDT L, TENG PK, RIEK R, EISENBERG D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(8): 3487-3492.
- [79] LI JY, ZHU YG, YU H, DAI B, JUN YS, ZHANG FZ. Microbially synthesized polymeric amyloid fiber promotes  $\beta$ -nanocrystal formation and displays gigapascal tensile strength[J]. ACS Nano, 2021, 15(7): 11843-11853.
- [80] ARNDT T, GRECO G, SCHMUCK B, BUNZ J, SHILKOVA O, FRANCIS J, PUGNO NM, JAUDZEMS K, BARTH A, JOHANSSON J, RISING A. Engineered spider silk proteins for biomimetic spinning of fibers with toughness equal to dragline silks (adv. funct. mater. 23/2022)[J]. Advanced Functional Materials, 2022, 32(23): 2200986.

(本文责编 郝丽芳)