

## \* 专题评述 \*

## 蜘蛛牵引丝蛋白的特性及其分子工程\*

张恒木 刘进元\*\*

清华大学生物科学与技术系, 分子生物学实验室及教育部蛋白质科学重点实验室, 北京 100084

**摘要** 蜘蛛牵引丝是由蜘蛛主壶腹腺产生的一种具有高度重复结构的蛋白质纤维, 它将高抗张强度和弹性奇妙地结合于一体, 是自然界强度最高的纤维. 基因解析揭示出牵引丝至少存在两种高度重复的蛋白组分, 每种蛋白的重复单元都显示出富丙氨酸区和富甘氨酸区交替的模块结构特征. 采用分子工程技术不仅可以生产出具有天然牵引丝蛋白特性的重组蜘蛛丝蛋白, 也可为研究牵引丝蛋白的模块结构与功能特性之间的关系开辟道路. 文中结合我们的研究综述了牵引丝蛋白的模块结构及其分子工程的研究进展, 并就其未来发展进行展望.

**关键词** 蜘蛛 牵引丝蛋白 模块结构 分子工程

蜘蛛(*Araneida*)牵引丝作为蜘蛛的“保险绳”和“生命网”的框架线, 素有“生物钢”之美誉. 经过4亿年微妙进化, 牵引丝将高抗张强度和弹性奇妙地集于一体, 是其他纤维材料无法比拟的, 已成为自然界力学性能最优良的天然蛋白质纤维. 牵引丝与防弹纤维凯夫拉的强度相当, 按重量来说比钢的强度还要强, 具有重要的应用价值<sup>[1,2]</sup>. 人工生产牵引丝一直是困惑人类的难题. 蜘蛛不喜群居且为肉食性, 生长密度高时就会自相残杀, 故难以批量饲养. 而且每只蜘蛛仅产生少量的牵引丝, 使得利用蜘蛛丝的成本十分昂贵. 由于上述特点显然靠饲养蜘蛛来生产天然牵引丝是不现实的. 早期也有研究者曾试用培养蜘蛛腺体来表达蜘蛛丝, 但并不十分成功<sup>[3]</sup>. 随着对牵引丝蛋白的基因和分子结构的深入解析, 科学家们进而尝试采用基因工程来生产牵引丝蛋白. Lazaris等<sup>[4]</sup>已成功地在体外拉成具有天然蜘蛛丝特性的纤维, 从而为研究牵引丝蛋白的模块结构和功能特性之间的关系奠定了基础,

也为人类利用蜘蛛丝开辟了道路.

## 1 牵引丝蛋白的分子基础

蜘蛛牵引丝是由蜘蛛主壶腹腺的柱形上皮细胞产生的, 至少以两种蛋白质组分为核心形成的一种具有等级结构的蛋白质纤维<sup>[2,5-8]</sup>, 其一级结构是牵引丝特性的分子基础, 控制着形成高级结构的潜力. 我们综合比较了数据库中3种不同蜘蛛的11条牵引丝蛋白的氨基酸序列, 发现它们具有保守的组织形式: 牵引丝蛋白的大部分是高度重复的序列, 且每个重复单元都是由富丙氨酸(Ala)区和富甘氨酸(Gly)区组合而成, 而C端则是保守的非重复序列(图1). 另一方面不同蜘蛛的牵引丝蛋白的氨基酸组成有着明显的差异, 即使同一种蜘蛛的牵引丝蛋白的序列间也存在一定的差异, 有时同一基因内的个别重复单元在基序的数目及其排列顺序上也可能发生一定的变化(图1), 表现出丰富的多态性.

C端保守的非重复序列在组成上主要表现出

2004-10-20 收稿, 2004-12-14 收修改稿

\* 国家“八六三”计划(批准号: 2002AA212051, 2002AA206007, 2002AA222100)和国家重点基础研究发展规划(批准号: 2004CB117300)资助项目

\*\* 通讯作者, E-mail: liujy@mail.tsinghua.edu.cn

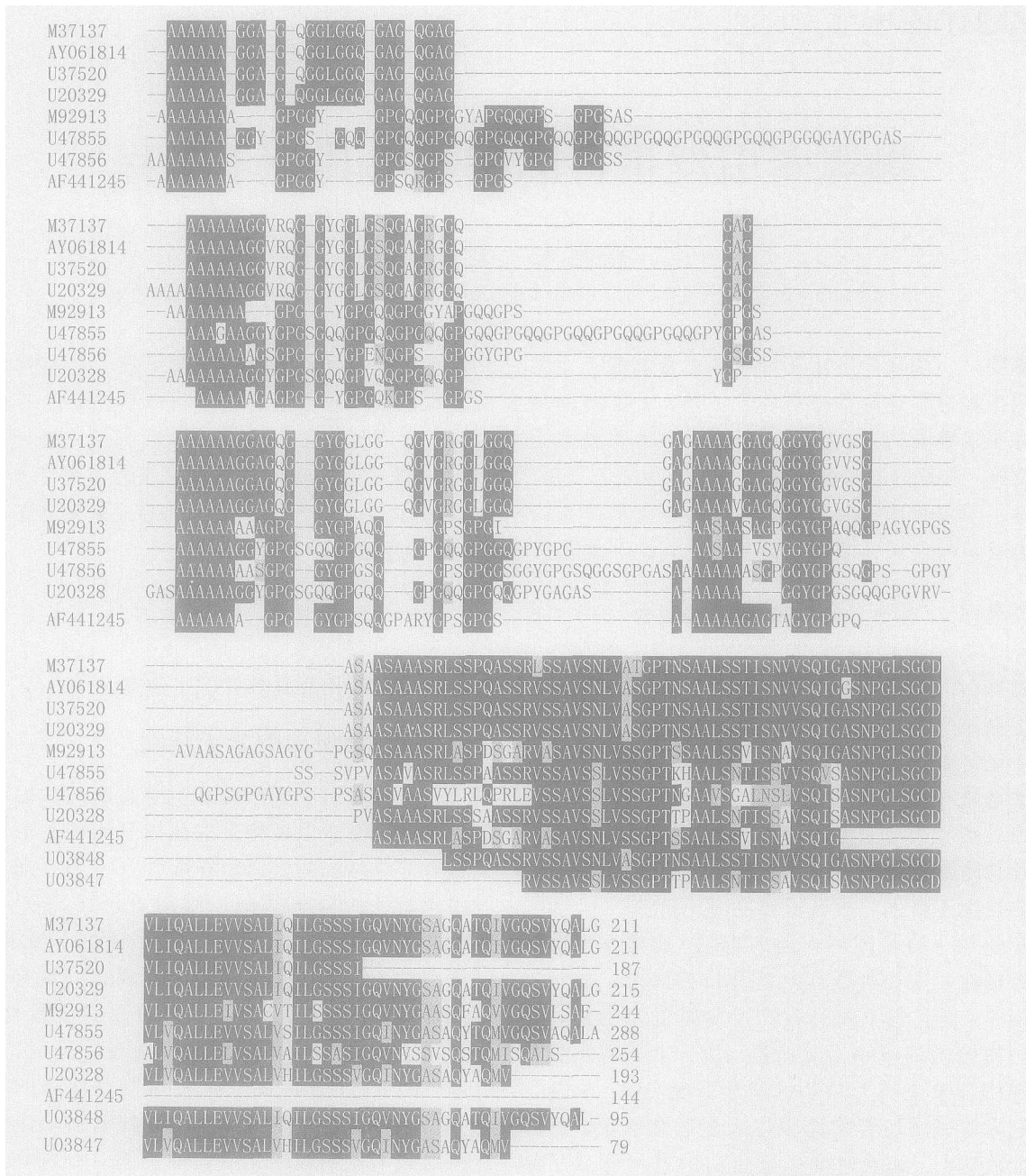


图1 根据在 GenBank 中登录的部分 cDNA 序列所推测的 11 条蜘蛛牵引丝蛋白氨基酸序列的比较分析

其中 U47855 和 U47856 来自 *Araneus diadematus*. U03847 和 U20328 来自 *Araneus bicentenarios*, 而 AY061814, AF441245, U37520, U20329, U03848, M292913 和 M37137 来自 *Nephila clavipes*

Ala 和 Gly 含量低, 并存在半胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、甲硫氨酸(Met)等重复序列中极稀少的氨基酸残基. 尽管其 C 末端非重复序列的意义尚待确定, 但其高度保守性表明了 C 末端不仅能作为牵引丝的进化标记<sup>[6]</sup>, 而且可能具有重要的作用, 如 C 端含

有高度保守的 Cys 残基可能参与蛋白分子间二硫键的交链<sup>[9]</sup>; C 端具有更高的亲水性可能增加了牵引丝蛋白的可溶性<sup>[4]</sup>, 这在纺丝过程中具有重要的意义.

牵引丝蛋白的高度重复部分显示出富 Ala 区和富 Gly 区交替的特征. 富 Ala 区以多聚 Ala( $A_n$ )基

序为主, 还含少量的 GA 基序; 富 Gly 区主要包括 GGX, GPX, GPGXX (X 表示甘氨酸(G)脯氨酸(P)以外的任何氨基酸) 3 种基序, 各种牵引丝蛋白之间的差异主要在于这些基序的排列和出现的频率不同. 在每种牵引丝蛋白的分子内, 这些基序被组织成更高级有序的重复单元<sup>[4-8]</sup>.

富 Ala 区主要折叠成  $\beta$  片层 ( $\beta$ -sheet), 进而可聚合成微晶体, 赋予牵引丝高强度特性<sup>[10,11]</sup>. 金纺蜘蛛 (*Nephila clavipes*) 牵引丝中含有 20%—30% 体积的晶体, 恰好与 2 种牵引丝蛋白质组分 (MaSp-1 和 MaSp-2) 的富 Ala 区含量一致. 此外, 富 Ala 的两种基序还存在于蚕丝蛋白、牡蛎壳基质蛋白、贝类的足丝蛋白等高强度蛋白中; 而低强度、高弹性的蜘蛛鞭毛状丝蛋白则缺乏富 Ala 区所形成的晶体结构<sup>[12]</sup>, 这从另一个侧面反映了富 Ala 区与强度有关.

富 Gly 区形成的构型比较复杂, 一般认为 GPGXX 很可能形成  $\beta$  转角 ( $\beta$ -turn), 串联的  $\beta$ -turn 又进一步形成了  $\beta$  螺旋 ( $\beta$ -spiral) 结构. 这种弹簧样的螺旋结构可能赋予牵引丝以弹性<sup>[2,5]</sup>. 在 elastin, lamprin, gluten 等富弹性的蛋白质中也存在这种基序, 而且这个基序串联的数目和几种蜘蛛丝的弹性存在明显的对应关系. 例如, 牵引丝的拉伸上限约为 35%, 它最多存在 9 个连续串联的 GPGXX 基序; 鞭毛状丝拉伸上限超过 200%, 其中至少存在 43 个连续串联的 GPGXX 基序; 而小囊状腺丝缺乏弹性 (<5%), 其蛋白也缺乏 GPGXX 基序<sup>[2]</sup>. 富 Gly 区的 GPX 基序在牵引丝蛋白组分 2 (MaSp-2) 中是高度保守的, 而且有规则地出现在 GPGXX 和 An 基序之间的连接处, 可能充当弹性区和晶体区之间的桥梁. 富 Gly 区的另一个基序 GGX 可能形成  $\beta$  片层<sup>[13,14]</sup> 或  $3_{10}$ -螺旋结构 ( $3_{10}$ -helix)<sup>[15]</sup>.

## 2 牵引丝蛋白的分子结构

在天然的牵引丝中, 高度的分子定向和结构组织形式是其独特性能的基础. 牵引丝的两蛋白质骨架肽链主要与纤维轴向平行, 分子内的所有区域都有二级结构并明确定向<sup>[16-20]</sup>. 富 Ala 区的 Ala 存在两种状态: 大部分 Ala 残基整合在  $\beta$ -sheet 形成的微晶体区域, 晶体区沿着纤维高度定向并且排列整齐, 其中的 Ala 残基与纤维轴向垂直; 另一部分

Ala 存在于轻度定向和非聚合的  $\beta$ -折叠中<sup>[10]</sup>. 而富 Gly 区并不像原先认为的那样形成“无定形”或“橡胶样”结构, 而是与富 Ala 区一样含严格有序的微结构, 其中部分 Gly 整合到  $\beta$ -sheet 微晶体区<sup>[21]</sup>, 当拉伸牵引丝时, 不含脯氨酸的富 Gly 区也易形成大量的  $\beta$ -sheet 晶体结构<sup>[13]</sup>; 另一部分 Gly 主要形成  $3_{10}$ -helix<sup>[10,15]</sup>, 邻近的  $3_{10}$ -helix 在蛋白中可以相互作用使邻近的蛋白分子或晶体区堆列整齐, 缺失这一区域可能会破坏晶体区之间整齐的队伍, 从而影响丝的性能<sup>[18]</sup>. 此外, 牵引丝中可能还存在少量的  $\beta$ -spiral 结构<sup>[20]</sup>. 最近, Oroudjev 等<sup>[21]</sup> 根据重组牵引丝蛋白自发形成纳米纤维的分节状特征提出了形成牵引丝蛋白纳米纤维的板层状结构模型 (图 2): 单分子牵引丝蛋白形成板层状结构 (图 2(a)), 其中富 Ala 区形成疏水的  $\beta$ -sheet, 富 Gly 区形成亲水的“半定形的基质”. 在水环境中, 因为  $\beta$ -sheet 之间的疏水相互作用, 这些分子板块将趋于聚合, 大约 30 个板片状分子以整齐或交错的方式堆积形成一个节 (图 2(b)); 每个节的末端携带促进纳米纤维形成的信息或结构, 通过末端一定的相互作用形成长度不等的具有分节状亚结构的纳米纤维 (图 2(c)). 在纳米纤维中, 蛋白分子沿着  $\beta$ -strand 轴向对齐, 由于氢键和强疏水相互作用, 板中的  $\beta$ -sheet 将形成三维晶体结构; 当在外力作用下, 如蜘蛛纺丝过程的拉力, 富 Gly 区可由“半定形”构

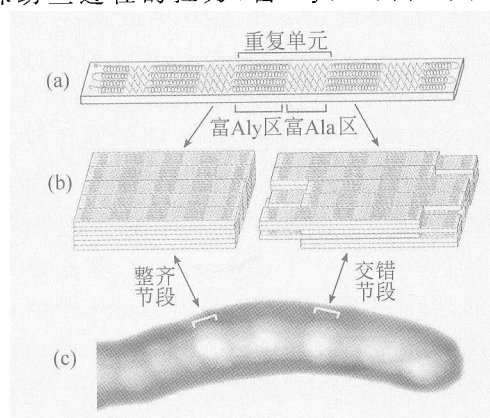


图 2 牵引丝蛋白形成纳米纤维的板状结构模型<sup>[21]</sup>  
 (a) 单分子牵引丝蛋白形成的板片状结构; (b) 约 30 个单分子板片状结构进一步以整齐 (左) 或交错 (右) 的方式聚合堆积成纳米纤维的节; (c) 牵引丝蛋白形成的分节状纳米纤维

型转变为更为伸展的构型, 如 $3_{10}$ -helix 或 $\beta$ -sheet 构型, 伴随形成大量的分子内和分子间氢键, 从而稳定了这些伸展的新结构. 由于重组牵引丝蛋白与天然的蛋白具有相似的结构<sup>[22]</sup>, 因此, 这一模型有助于我们理解天然牵引丝蛋白的分子结构和功能特性的关系, 但尚待进一步证实.

### 3 牵引丝蛋白的分子工程

#### 3.1 牵引丝蛋白基因的合成及其在微生物中的表达

天然牵引丝基因在序列上的高度重复, 不存在可用于克隆的单一位点; 另一方面, 天然牵引丝蛋白基因又富含 G/C 碱基, 转录的 mRNA 结构异常复杂. Arcidiacono 等<sup>[23]</sup>表达天然牵引丝蛋白时发现较大的天然 cDNA 片段一克隆进 *E. coli* 就发生缺失, 所能得到的稳定 cDNA 克隆最长 1.5 kb, 而且蛋白表达量也偏低(表 1). 由于天然牵引丝蛋白基因本身的高度重复以及富 G/C 的本质, 加之真核生物和原核生物的密码子使用规律大相径庭, 因此利用天然牵引丝蛋白基因在 *E. coli* 中的表达并不十分成功. 因而大多数研究者先后选择了合成基因来表达牵引丝蛋白. 与天然的牵引丝蛋白基因的克隆相比, 合成基因无疑具有较多的优势: (1) 可选取宿主偏爱性密码子, 并通过精心设计尽可能避免或减少 mRNA 二级结构的形成; (2) 可以按照基因的模式结构设计合成较大的基因或具有新特性的基因; (3) 可按设计组合一种或多种不同的基序来研究结构和功能特性的关系<sup>[14]</sup>或对牵引丝蛋白进行有目的地改造在分子水平上调节重组蛋白的装配<sup>[24, 25]</sup>. Prince 等<sup>[22]</sup>和 Lewis 等<sup>[26]</sup>率先以牵引丝蛋白的两个主要组分 MaSp-1/MaSp-2 的序列为基础, 按照 *E. coli* 的密码子偏爱性成功地设计合成并尝试了牵引丝基因的异源表达. 他们先合成寡核苷酸, 经退火形成带有粘性末端或两侧带有相容性酶切位点的重复单元, 并使之以首尾相接的方式形成具有多个重复单元 DNA 片段, 从而定向克隆到较大的牵引丝蛋白基因, 但是在 *E. coli* 中的表达产量仍然偏低(表 1), 而且高度重复的序列在遗传上表现很不稳定, 引起高频率

的内部缺失或一定程度的重组. Fahnestock 等<sup>[27]</sup>在前人的基础上, 通过控制重复单元的长度 (>300 bp)使内部缺失程度最小化, 显著提高了牵引丝蛋白在 *E. coli* 中的表达量. 近年来, 我国学者在 *E. coli* 表达牵引丝蛋白方面做了有价值的尝试<sup>[28, 29]</sup>. 但利用 *E. coli* 来表达牵引丝蛋白存在一些难以避免的缺陷: 由于牵引丝蛋白富含 Gly 和 Ala, 合成基因也难以避免高 G/C 含量, 加之丝蛋白高度重复的本质, 大大增加了 DNA 水平上的重组和缺失的几率, 而且这种 DNA 水平上的遗传不稳定性并不仅仅是由同源重组造成的, 还与宿主 *E. coli* 自身特性有关<sup>[27]</sup>; 转录产生的 mRNA 容易形成复杂的高级结构, 增加了翻译停顿的频率<sup>[3]</sup>; 同时, 快速生长的 *E. coli* 中表达富含 Gly/Ala 的牵引丝蛋白时, Gly/Ala 库和相应的 tRNA 库显得尤为不足, 因此当表达较大的牵引丝蛋白时, 在翻译水平上易于发生错误终止造成截断翻译, 表达出的蛋白质在凝胶上呈现“阶梯”状, 截断翻译的存在可能反映了 *E. coli* 核糖体系统的一种内在特性<sup>[27]</sup>.

相比之下, 甲醇酵母是表达牵引丝蛋白的一个较好的宿主<sup>[30]</sup>. 合成的牵引丝蛋白基因在甲醇诱导性启动子 AOX1 控制之下能够高水平表达(表 1), 而且未发现明显的缺失, 相对比较稳定. 但在酵母中, 非分泌型蛋白的表达量依赖于基因的拷贝数, 分泌型蛋白的表达量虽不依赖于基因的拷贝数但比较低, 可能是由于分泌限制造成的. 但在两种情况下, 大分子量蛋白的表达产量比小分子量蛋白产量低得多. 总之, 微生物系统虽能有效表达出高分子量蛋白, 但表达量却随着所表达蛋白的分子量增大而减小; 而且重组蛋白的均质性(homogeneity)由于截断翻译而受到一定程度的限制.

#### 3.2 牵引丝蛋白在动植物细胞中的表达

为了克服微生物表达系统的局限性, 人们探索了牵引丝蛋白在动植物细胞中的表达. Lazaris 等<sup>[4]</sup>在哺乳动物细胞系中表达出预期大小(60—140 ku)的蜘蛛牵引丝蛋白 ADF-3, MaSP-1 和 MaSP-2, N 端测序证实了牵引丝蛋白在哺乳动物细胞系中获得了正确翻译和加工. 但在哺乳动物细胞系中, 分泌分泌的高分子量蛋白(110和140ku)显然比低分子

表1 蜘蛛牵引丝蛋白的重组表达

基因	表达系统	分子质量 (ku)	产量	文献
cDNA	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	43	4 mg/L	[23]
合成	<i>E. coli</i> SG13009pREP4	15—41	15 mg/L	[22]
合成	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	31/58/112	10 mg/g	[26]
合成	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	65—163	300 mg/L	[27]
合成	<i>Pichia pastoris</i> YFP5028	65—163	1000 mg/L	[28]
合成	<i>E. coli</i> JM109	10—20	1.2—5.2 mg/L	[14]
合成	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	25	20 mg/L	[24]
合成	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	25	10 mg/L	[25]
cDNA	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	37	20 mg/L	[28]
合成	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	56	53 mg/L	[29]
cDNA	哺乳动物细胞系	60—140	25—50 mg/L	[4]
合成	烟草和马铃薯	13—100	总蛋白的2%	[31]
合成	烟草	90/129	80 mg/1 kg	[32]

量蛋白(60 ku)少得多,这可能是高分子量蛋白的基因二级结构更为丰富导致翻译效率低或高分子量蛋白的分泌效率低下,或者转染细胞中所含目的基因的拷贝数较少,也可能受到细胞内翻译装置数量的限制<sup>[4]</sup>。另一方面,在表达高分子量蛋白的过程中也出现了低分子量蛋白“阶梯”,这可能是由于离体培养细胞系中氨酰 tRNA 库消耗殆尽导致了翻译终止的错误。

与微生物和动物细胞系相比,以植物作为生物反应器相对廉价得多而且易于规模化<sup>[31]</sup>。Scheller 和 Piruzian 等将合成的 *MaSp-1* 基因置于 CaMV 35S 启动子控制之下导入烟草和马铃薯,分子检测表明 *MaSp-1* 基因在转基因烟草和马铃薯中高效而稳定地表达。牵引丝蛋白在植物表达系统中不仅得到了正确的翻译、加工和定位,而且蛋白的表达量和均质性并不因蛋白高分子量而降低<sup>[31,33]</sup>。目前,在实验室中可从 1 kg 的重组烟草叶片中提纯到 80 mg 的重组蛛丝蛋白,表明植物是适合用来表达牵引丝蛋白的生物反应器<sup>[31]</sup>。

### 3.3 利用牵引丝蛋白改良纤维品质

在天然的纤维材料中,棉纤维在纺织工业中一直占有重要的地位。随着人们对衣着要求的普遍提高和纺纱新技术的涌现,特别是对纤维强度提出了更高的要求。因此,在植物适合表达牵引丝蛋白的实验基础上,本实验室提出了利用牵引丝蛋白来提

高棉纤维强度的设想,并按照棉花密码子偏爱性规律构建了一套牵引丝蛋白基因,将其置于棉纤维特异性启动子控制之下成功地导入了棉花<sup>[35]</sup>。目前转基因棉花的表达模式和纤维强度正在进一步检测之中。另一方面,在长期协同进化过程中,蚕和蜘蛛相似都进化出了一套适合于富含 Ala 和 Gly 丝蛋白表达和产丝的系统,因此国内也有学者进行了蚕“吐”蛛丝研究尝试。

## 4 重组牵引丝蛋白的加工

重组牵引丝蛋白的成功表达是迈向生产牵引丝的第一步,随即面临的挑战是将重组牵引丝蛋白加工成牵引丝。蜘蛛本身具有复杂精巧的纺丝系统,在环境温度下以水为溶剂,只需极低的能量代价就生产出高性能的牵引丝。简单地说,牵引丝蛋白首先在主壶腹腺内表达产生并形成高浓度(~50%)液晶态“粘稠胶状液滴”,以极低的速度通过一条连续而狭长的双曲线导管,最后通过纺丝器喷嘴离开蜘蛛体并用轻微的作用力在空气中拉伸后形成牵引丝<sup>[36]</sup>。由于纺丝加工过程促进丝蛋白的微结构更有规则地排列,因此这一过程能大幅度地提高丝的强度<sup>[17,19,37,38]</sup>。早在 1996 年 Lewis 等<sup>[26]</sup>就尝试将纯化的重组牵引丝蛋白以 2—4 mg/mL 的浓度溶于甲酸,挤压使其通过一个 23 号针头进入甲醇形成了固体丝纤维。但用光学显微镜检测发现,在拉成的丝表面存在较多起伏不平的区域,丝的性能也与天然牵

引丝相差甚远, 后来 Lazaris 等<sup>[1]</sup>将高浓度( $>23\%$ )的重组牵引丝蛋白溶液以  $2 \sim 10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度通过内径  $0.125 \text{ mm}$ , 长  $6 \text{ cm}$  的细管泵入甲醇溶液, 并立即进行二次高比例的拉伸过程, 纺成了直径  $10 \sim 10 \mu\text{m}$  的丝, 其外观、强度和模数值与天然蛛丝接近, 但韧性较差(表 2)。这是首次将重组牵引丝蛋白拉成了性能与天然牵引丝接近的实例, 尽管尚无法精确控制影响丝性能的纺丝参数, 但从中可得到几点启示: (1) 纤维的形成、外观和机械特性至少部分地依赖于重组牵引丝蛋白的浓度和纯度, 要提高丝的机械特性, 用于纺丝的重组蛋白应具有较高的浓度和纯度(当浓度为  $2.8\% \sim 8.3\%$ , 纯度  $70\% \sim 80\%$  时重组蛋白纺的丝脆得难以操作; 而当浓度为  $10\% \sim 28\%$ , 纯度  $80\% \sim 90\%$  的重组蛋白纺的丝即可用于机械特性的检测; 当浓度大于  $23\%$  时, 获得的丝强度最高, 蜘蛛纺丝时牵引丝蛋白的

浓度更是高达  $50\%$ ); (2) 纺后拉伸(postspinning draw)过程可大幅度地提高丝的强度, 纺后可立即进行单次或二次拉伸, 单次拉伸可在  $70\% \sim 80\%$  甲醇中进行, 二次拉伸可先在甲醇中拉伸, 再在水中进一步拉伸, 两次拉伸的纤维机械性能优于单次拉伸的纤维, 可能是因为增加了分子定向的程度, 另一方面拉伸的比率也十分重要, 高拉伸比率的纤维表现出较高的强度、韧性、模数值(表 2); (3) 选择拉伸的溶剂也值得重视, 用水作溶剂有着明显的优势, 因为水能使丝具有可塑性并通过折叠和包装富 Ala 区形成  $\beta$ -sheet 来稳定拉丝过程<sup>[11]</sup>。尽管目前重组牵引丝纤维的韧性比天然的要差, 但是从拉伸对强度等性能影响来看(表 2), 随着纺丝过程的优化制作出与天然的牵引丝相媲美的纤维是完全可能的。

表 2 重组的牵引丝和天然牵引丝机械性能比较<sup>[11]</sup>

样品	拉伸次数	拉伸比率	强度 (gpd)	模数 (gpd)	韧性 (gpd)
重组牵引丝 1	2	5	0.895	12.8	1.91
重组牵引丝 2	2	5	0.850	110.6	2.26
重组牵引丝 3	1	4	0.615	63.2	1.8
天然牵引丝			0.613	38.76	7.11

## 5 展望

尽管目前利用分子工程表达出了重组牵引丝蛋白并纺出了重组的牵引丝<sup>[11]</sup>, 但离完全再现天然牵引丝的强度和弹性还有一段距离<sup>[22-31]</sup>。一方面是由于对天然牵引丝的结构基础和功能特性的关系缺乏全面而清楚的认识, 目前克隆的牵引丝基因的 cDNA 仅占全长基因的极小一部分, 即便如此, 对于其中的富 Gly 区和 C 端部分的结构和功能特性仍然知之甚少; 另一方面, 目前还不能完全模仿蜘蛛精妙的纺丝过程, 来实现蛋白质序列赋予牵引丝形成高性能的潜力, 因此, 随着牵引丝蛋白完整基因的克隆、对分子结构与功能特性关系的深入剖析以及纺丝工艺的不断优化, 按人类的意愿设计牵引丝蛋白的一级结构及纺丝参数, 生产出具有系列特性的纤维材料是可能的, 到那时将会开创出人工生产的“生物钢”在纺织、医疗、军事、航天、航

海、建筑等领域的应用前景。

## 参 考 文 献

- 1 Xu M, Lewis R V. Structure of a protein superfiber: Spider dragline silk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(18): 7120-7124
- 2 Hinman M B, Jones J A, Lewis R V. Synthetic spider silk: A modular fiber. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(9): 371-379
- 3 Candliss G C, Ortiz A, Rodriguez O. Translational pauses during a spider fibroin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 116(3): 1033-1038
- 4 Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Source*. *Science*, 2002, 297(5554): 172-176
- 5 Hinman M B, Lewis R V. Isolation of a clone encoding a second dragline silk fibroin. *Nephila clavipes* dragline silk is a two protein fiber. *J Biol Chem*, 1992, 267(27): 19320-19324
- 6 Guerette P A, Ginzinger D G, Weber B H, et al. Silk properties determined by gland specific expression of a spider fibroin gene family. *Science*, 1996, 272(5278): 112-115
- 7 Hayashi C Y, Lewis R V. Molecular architecture and evolution

- of a modular spider silk protein gene. *Science*, 2000, 287(5157): 1477-1479
- 8 Gatesy J, Hayashi C Y, Motriuk D, et al. Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences. *Science*, 2001, 291(5513): 2603-2605
- 9 Jackson C, O'Brien J P. Molecular weight distribution of *Nephila clavipes* dragline silk. *Macromolecules*, 1995, 28(17): 5975-5977
- 10 Simmons A H, Michal C A, Jelinski L W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science*, 1996, 271(5245): 84-87
- 11 Parkhe A D, Seeley S K, Gardner K, et al. Structural studies of spider silk proteins in the fiber. *J Mol Recognit*, 1997, 10(1): 1-6
- 12 Hayashi C Y, Lewis R V. Evidence from flagelliform silk cDNA for the structural basis of elasticity and modular nature of spider silks. *J Mol Biol*, 1998, 275(5): 773-784
- 13 Thiel B L, Guess K B, Viney C. Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk. *Biopolymers*, 1996, 41(7): 703-719
- 14 Fukushima Y. Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers*, 1998, 45(4): 269-279
- 15 Kummerlen J, Vanbeek J, Vollrath F, et al. Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance. *Macromolecules*, 1996, 29(8): 2920-2928
- 16 Yang Z, Grubb D T, Jelinsky L W. Small-angle X-ray scattering of spider dragline silk. *Macromolecules*, 1997, 30(26): 8254-8261
- 17 Jelinski L W, Blye A, Liivak O, et al. Orientation, structure, wet-spinning, and molecular basis for supercontraction of spider dragline silk. *Int J Biol Macromol*, 1999, 24: 197-201
- 18 Jelinski L W. Establishing the relationship between structure and mechanical function in silks. *Curr Opin Solid St M*, 1998, 3(3): 237-243
- 19 Seidel A, Luvak O, Calve S, et al. Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure. *Macromolecules*, 2000, 33(3): 775-780
- 20 van Beek J D, Hess S, Vollrath F, et al. The molecular structure of spider dragline silk: Folding and orientation of the protein backbone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10266-10271
- 21 Oroudjev E, Soares J, Arcidiacono S, et al. Segmented nanofibers of spider dragline silk: Atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(Suppl 2): 6460-6465
- 22 Prince J T, McGrath K P, DiGirolamo C M, et al. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry*, 1995, 34(34): 10879-10885
- 23 Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, et al. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(1): 31-38
- 24 Winkler S, Wilson D, Kaplan D L. Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. *Biochemistry*, 2000, 39(11): 12739-12746
- 25 Szela S, Avtges P, Valluzzi R, et al. Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules*, 2000, 1(4): 531-542
- 26 Lewis R V, Hinman M, Kothakota S, et al. Expression and purification of a spider silk protein: A new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Expr Purif*, 1996, 7(4): 400-406
- 27 Fahnestock S R, Irwin S L. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(1): 23-32
- 28 牛恒尧, 王义琴, 萨其拉, 等. 在大肠杆菌中表达蜘蛛拖丝融合蛋白. *高技术通讯*, 2001, (11): 5-9
- 29 李敏, 章文贤, 黄智华, 等. 蜘蛛拖丝蛋白基因的构建及在大肠杆菌中的表达. *生物工程学报*, 2002, 18(3): 331-334
- 30 Fahnestock S R, Bedzyk L A. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(1): 33-39
- 31 Scheller J, Guhrs K H, Grosse F, et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(6): 573-577
- 32 Scheller J, Henggeler D, Viviani A, et al. Purification of spider silk elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res*, 2004, 13(1): 51-57
- 33 Piruzian E S, Bogush V G, Sidoruk K V, et al. Construction of synthetic genes for analogs of spider silk spidroin 1 and their expression in tobacco plants. *Mol Biol (Mosk)*, 2003, 37(4): 651-662
- 34 Gosline J M, Guerette P A, Ortlepp C S, et al. The Mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol*, 1999, 202: 3295-3303
- 35 刘进元, 武耀廷, 张恒木, 等. 一种编码蛛丝蛋白的基因及其应用. *中国发明专利*, 03136984, 7, 2003
- 36 Vollrath F, Knight D. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001, 410: 541-548
- 37 Liivak O, Blye A, Shah N, et al. A microfabricated wet-spinning apparatus to spin fibers of silk proteins. Structure-property correlations. *Macromolecules*, 1998, 31: 2947-2951
- 38 Termonia Y. Computer model for the mechanical properties of fibers. In: *Structural Biological Materials: Design and Structure-Property Relationships*. Washington, DC: American Chemical Society, 2000, 271-285