

蚕体内不同丝腺部位丝蛋白溶液结构与性质的研究

金 媛, 张耀鹏, 杭怡春, 罗 杰, 邵惠丽*, 胡学超

(东华大学纤维材料改性国家重点实验室 材料科学与工程学院, 上海 201620)

摘要:采用偏光显微镜研究了蚕体内不同丝腺部位(包括前部、中部和后部)中丝蛋白溶液的性质变化,并采用了拉曼光谱和旋转流变仪对中部丝腺(包括前区、中区及后区)的丝蛋白分子结构和流变性能进行了分析。结果发现:蚕体内只有前部丝腺及中部丝腺前区的丝蛋白溶液具有偏光现象;丝蛋白溶液在由中部丝腺后区向前区流动的过程中,粘度及弹性均逐渐变小,其构象则由无规卷曲逐渐向 α -螺旋转变,并进一步形成 β -折叠构象。由此表明,在蚕体内中部丝腺前区的丝蛋白溶液很可能已经形成了液晶态结构。

关键词:蚕;丝腺;丝蛋白;结构;流变

引言

蜘蛛和蚕都能在环保经济的条件下,即以水为溶剂和常温、常压下,以最小能量、最高效率纺出强韧的纤维。目前,对蜘蛛和蚕仿生纺丝技术的研究,正成为众多领域尤其是高分子材料领域研究的热点之一。其中,由于蚕丝蛋白来源丰富、便于提纯获取,更成为了研究者们深入研究的对象。在这过程中,人们首先对蚕丝的纤维化机理展开了大量的研究。液晶纺丝通常被认为是蚕纺出高性能纤维的关键技术^[1~5]。但迄今人类并未完全地证明活体蚕腺体中液晶态结构的存在,并且,关于该结构的形成理论也未达成共识。因此,本文从蚕体内的后部丝腺、中部丝腺(包括前区、中区及后区)和前部丝腺等部位分别取样,使用偏光显微镜进行观察,并且使用拉曼光谱和旋转流变仪对中部丝腺各区段丝蛋白溶液的结构和流变性能进行测试分析,以了解蚕体内各部位纺丝液的状态,从而更深入地了解蚕的纺丝机理,为以后仿生制备出高性能的丝蛋白纤维奠定基础。

1 实验部分

1.1 试样制备

实验用蚕由浙江桐乡购得,将即将吐丝的五龄蚕置于乙醚中 1min 后用去离子水清洗。将洗净的蚕解剖后取出丝腺放入去离子水中浸泡,除前部丝腺由于过细无法去表皮外,包裹在中部及后部丝腺外的表皮均被仔细剥除。将得到的丝腺用去离子水浸洗 5min 以除去表面丝胶后,作为后续测试样品。

1.2 实验仪器及实验条件

(1)采用日本奥林巴斯株式会社的 BX51 型偏光显微镜在 25℃ 下观察解剖后的新鲜丝腺样品的双折射现象,并分别在普通和偏光状态下间隔一定时间拍照。

(2)采用法国 Dilor 公司的 Labram00 型显微激光拉曼光谱仪分析中部丝腺样品的构象变化。使用氩-氟激光光源(激发 $\lambda=632.8\text{nm}$),激光功率为 6mW,分辨率为 2cm^{-1} 。

(3)采用 HAAKE RS150 型旋转流变仪测试中部丝腺各区段样品的流变性能,选用直径为 20mm 的

收稿:2011-11-07; 修回:2011-11-29;

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(200802550001);国家自然科学基金青年科学基金(50803011);中央高校基本科研业务费专项基金(2011D10604);东华大学 2011 年度博士研究生创新基金(BC201106);上海市教育委员会科研创新项目;

作者简介:金媛(1985—),女,浙江兰溪人,在读博士生,从事生物可降解及仿生高分子材料的研究工作;

* 通讯作者:E-mail:HLshao@dhu.edu.cn.

平板,温度控制在 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 。在测试前需在平板外缘抹少许硅油,以防止丝腺在测试时因失水而影响结果。

2 结果与讨论

2.1 蚕体内丝蛋白溶液的光学性质分析

Magoshi^[6]曾推测从蚕的前部丝腺流出的丝蛋白具有向列型液晶态,即便该推测是正确的,但由于丝蛋白在前部丝腺中受到的剪切速率较中部丝腺大6个数量级^[7],因此仍无法确定该液晶态是丝蛋白在前部丝腺受到高剪切力及拉伸条件作用后产生的,还是原来就存在于蚕的中部丝腺内的。于同隐等^[8]则发现缺乏剪切应力作用的蚕的中部丝腺中区和前区在正交偏振光下具有双折射现象,由此初步认定蚕中部丝腺内丝蛋白呈液晶有序态,其吐丝具有液晶纺丝的特点。但是,前人对蚕中部丝腺试样的相关测试过程伴随着试样水分的逐渐挥发,因此尚不能完全排除所观察到的双折射现象是与空气接触的丝腺液态蛋白表层发生失水固化结晶所导致的可能性。为此,本文研究中,将按1.1步骤处理后的蚕前部丝腺、中部丝腺(分为前区、中区和后区)和后部丝腺样品立即放在载玻片上使用偏光显微镜进行观察(通过滴加适量去离子水以防止其表面干燥固化),部分结果见图1。实验研究发现,只有前部丝腺和中部丝腺前区(即中部丝腺与前部丝腺交界处漏斗状部分)的丝蛋白溶液有偏光现象(参见图1a和b),而中部丝腺其他部位和后部丝腺则无此现象(参见图1c、d和e)。根据文献报道可知^[9],蚕体内丝蛋白溶液的浓度从后部至前部丝腺呈递增趋势,pH值则从6.9下降到4.8,研究者们认为浓度的增加及酸性条件均有利于丝蛋白分子形成 β -折叠构象。同时,丝蛋白溶液中金属离子的含量也沿吐丝方向逐渐变化,其中,钙离子等金属离子的存在也有利于 β -折叠的产生^[9]。另外,在蚕吐丝的过程中,丝蛋白溶液在丝腺内持续受到剪切作用,因此研究者们普遍认为剪切力对丝蛋白分子的构象转变也起着至关重要的作用^[10]。本论文上述的实验结果也再次表明:蚕体内丝蛋白溶液从后部丝腺向前部丝腺流动的过程中,随浓度、pH值、金属离子和剪切作用等因素的调节,溶液中的丝蛋白分子逐渐由原先的无序状态转变成了有序态结构。并且,该有序态结构最早出现在中部丝腺前区的漏斗状部位,我们认为在该处首先出现偏光现象的原因是由于漏斗状部位的丝腺半径发生了急剧收缩(参见图1b),导致丝腺体内丝蛋白分子在该处受到急剧增大的剪切作用,同时还受到拉伸作用,从而开始转变成有序态结构,使溶液呈现出各向异性的性质。

另外,我们将解剖后无偏光现象的新鲜中部丝腺中区及后区样品在空气中放置30min后在偏光下拍照,所得结果见图2,可以发现两者均出现了偏光现象。这是由于丝蛋白样品体系水分挥发,使表层固化结晶所致。由此我们推测前人研究蚕中部丝腺中区时,发现其具有偏光现象很可能也是由于丝蛋白在空气中失水所引起的。

2.2 蚕体内丝蛋白溶液的构象分析

已有的研究表明,蚕在成丝的过程中,其体内纺丝液丝蛋白分子的构象逐渐从无规卷曲/ α -螺旋向 β -折叠转变^[7]。为了更好地了解该转变过程,本文使用拉曼光谱对蚕中部丝腺各区段的构象变化也进行了测试分析。图3是蚕解剖后中部丝腺后、中、前三个区段制样立即测试得到的拉曼光谱。从图3中可以看出,中部丝腺三个区段样品的无规卷曲构象(1252cm^{-1})、 α -螺旋构象($945, 1105\text{cm}^{-1}$)和中间态构象(1678cm^{-1})^[11]的特征峰都较明显,表明中部丝腺中,丝蛋白分子以上述几种构象为主。并且,从图3中还可以发现,中部丝腺从后区至前区,对应样品的 β -折叠构象特征峰(1665cm^{-1})也逐渐清晰,表明流至蚕中部丝腺前区附近的丝蛋白溶液中已含有少量的 β -折叠构象。为了定量分析蚕丝腺内丝蛋白溶液在流动过程中丝蛋白分子的构象变化,本文进一步采用了文献报道^[12,13]的方法,即以 1450cm^{-1} 处亚甲基弯曲振动峰为强度标准峰,并将丝蛋白分子不同的构象特征峰强与 1450cm^{-1} 处的峰强相比,由所得到的比值作为对应丝蛋白分子构象的相对强度来反映溶液中的构象状态。分析中,我们将图3中出现的各个构象的特征吸收峰强按上述方法进行计算,结果列于表1。从中可以发现,蚕体内丝蛋白溶液由中部丝腺后区流动至前区后,其无规卷曲构象的相对强度降低了0.20, 945cm^{-1} 和 1105cm^{-1} 处的 α -螺旋构象的相对强度分别增加了0.11和0.10, β -折叠构象的相对强度则增加了0.23。由此我们推测,丝蛋白溶液在蚕

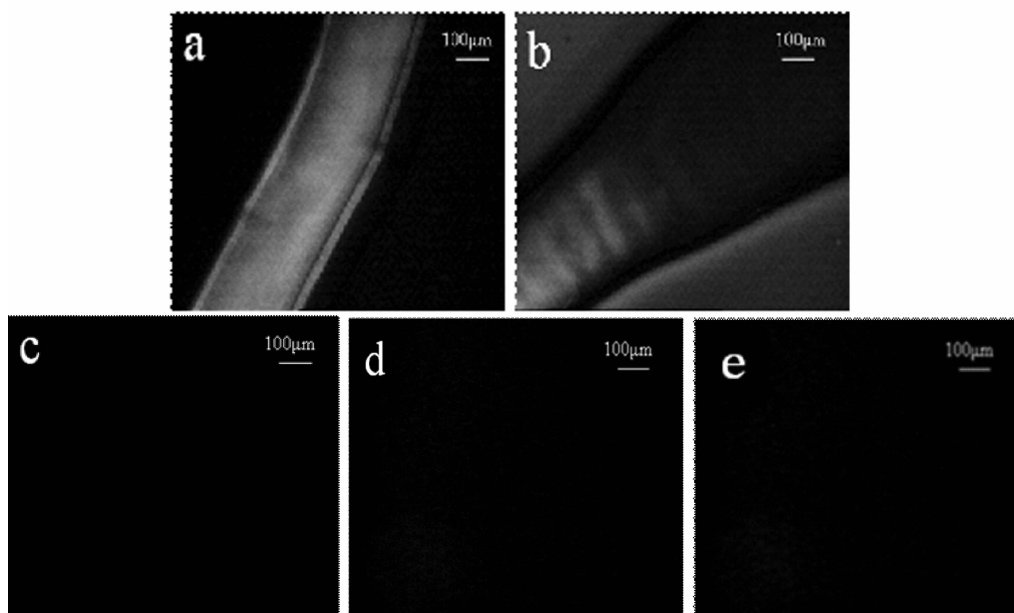


图 1 蚕体不同丝腺部位新鲜样品的偏光照片

(a)前部丝腺；(b)中部丝腺前区；(c)中部丝腺中区；(d)中部丝腺后区；(e)后部丝腺

Figure 1 Polarized light photos of silk fibroin solution in different parts of middle silk gland from silkworm

(a)anterior division; (b) anterior part of the middle division; (c) middle part of the middle division;

(d) posterior part of the middle division; (e) posterior division

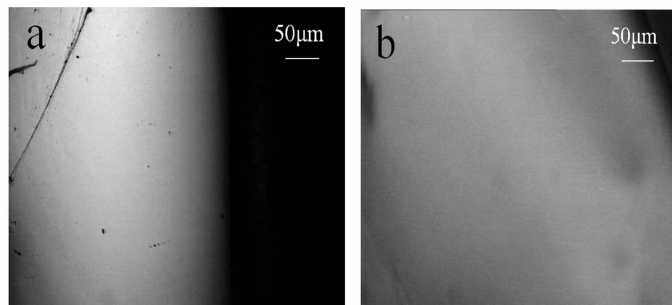


图 2 蚕体中部丝腺在空气中干燥 30min 后的偏光照片

(a)中区；(b)后区

Figure 2 Polarized light photos of silk fibroin solution in middle silk gland from silkworm dried in air for 30min

(a) middle division; (b) posterior division

中部丝腺内由后向前流动的过程中,其分子构象由无规卷曲逐渐向 α -螺旋构象转变,并进一步形成 β -折叠构象。

2.3 蚕体内丝蛋白溶液的流变性能分析

对于蚕腺体内丝蛋白溶液的流变性能,前人曾进行过初步的探讨^[14,15]。有的研究者^[14]是将蚕丝腺中取出的液体,用纯水稀释成各种低浓度的溶液来进行分析,由于所用的稀释后试样与蚕体内实际的纺丝液样品性质有较大差异,故研究结果尚不能准确反映蚕成丝过程中体内纺丝液流变性能变化的真正状态。另有研究者^[15]虽然直接用了蚕丝腺进行了流变测试,但未能针对丝腺不同部位溶液流变性能的差异性展开细致的分析研究。

为此,本论文为了更好地研究蚕体内丝腺各个部位纺丝液的状态,直接用解剖后的中部丝腺各个区段进行了流变性能测试。图 4 为 1~3 号不同蚕体的中部丝腺各区段溶液的稳态流变曲线,可以看出,虽然蚕的个体不同,其流变性能略有差异,但不同蚕个体(1~3 号)流变性能的变化规律基本一致。在低剪

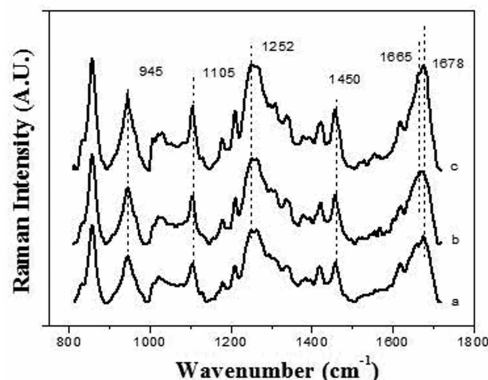


图 3 蚕中部丝腺各区段的 Raman 谱图

(a)中部丝腺后区；(b)中部丝腺中区；(c)中部丝腺前区

Figure 3 Raman spectra of silk fibroin solution in different parts of middle silk gland from silkworm

(a) posterior part of the middle division; (b) middle part of the middle division; (c) anterior part of the middle division

切速率条件($<0.1\text{s}^{-1}$)下,蚕体内丝蛋白溶液类似于牛顿流体,该区的粘度基本不变,属于第一牛顿区。

表 1 蚕中部丝腺各区段丝蛋白各种构象的相对强度

Table 1 Relative intensity of each conformation of silk fibroin solution in different parts of middle silk gland from silkworm

中 部 丝 腺	构象	无规卷曲	α -螺旋	α -螺旋	β -折叠	中间态
		(1252cm ⁻¹)	(945cm ⁻¹)	(1105cm ⁻¹)	(1665cm ⁻¹)	(1678cm ⁻¹)
后区		2.70	1.71	1.42	2.08	2.32
中区		2.61	1.74	1.45	2.20	2.14
前区		2.50	1.82	1.52	2.31	2.39

随着剪切速率的增加,部分丝蛋白分子间及分子内的缠结点被拆除,从而使丝蛋白大分子之间的相对运动容易,体系粘度急剧减小。当剪切速率继续增大到较高剪切速率区($>40\text{s}^{-1}$),粘度再次趋于稳定,溶液渐近第二牛顿区。同时,从图中可以进一步看出,从蚕中部丝腺后区到前区,丝蛋白溶液的粘度逐渐变小,如前面 2.1 节中所述,这是由于丝蛋白分子在向吐丝口流动的过程中,随着体内一系列环境(如浓度、pH 值、金属离子和剪切作用等)的改变,分子链沿流动方向逐渐进行有序排列,从而使溶液粘度变小。Magoshi 等^[1]曾使用针刺的方法粗略地估计认为蚕沿吐丝方向丝蛋白体系粘度降低,并由此推测蚕的纺丝过程为液晶纺,而本文上述的研究则进一步从流变学角度更精确地验证了前人的推断。并且,结合前述 2.1 和 2.2 节的实验结果,我们认为蚕体内丝蛋白溶液在向吐丝口流动的过程中,随着各种因素的调节,可能在中部丝腺前区的漏斗状部位首先形成了液晶态结构。

图 5 为同一蚕体中部丝腺各区段的动态流变曲线,其中储能模量(G')可反映溶液的弹性行为,损耗模量(G'')可反映溶液的粘性行为。从图中可以发现,角频率较低($<1\sim2\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$)时, G'' 大于 G' ,溶液的粘性占主要优势,溶液表现类似液体。当角频率达到一定值后,两者出现了交点,转变为 G' 大于 G'' ,这可能是由于溶液发生了溶胶向凝胶的转变^[15]。交点之后, G' 随角频率单调增加,表明溶液的弹性不断增大, G'' 则略有下降,溶液表现类似固体。随着角频率进一步升至较高区段($>100\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$),溶液的动态流变性能变得不稳定, G' 和 G'' 均出现了跳跃点,这可能是由于蛋白质溶液对环境的影响非常敏感,在高剪切作用下极易变性所致。另外,从图 5 中还可以看出,中部丝腺后区的 G' 及 G'' 相对较大,随着丝腺溶液向前区流动, G' 及 G'' 均逐渐减少,这表明丝蛋白溶液由中部丝腺后区向前区流动的过程中,其粘性和弹性均逐渐降低。以上结果说明在蚕的中部丝腺内,随着体内各种因素的变化,丝蛋白溶液的粘弹性能也随之改变,并在向吐丝口流动的过程中,逐渐调节至有利于后续纺丝的最佳状态。

3 结论

(1) 蚕体内只有前部丝腺及中部丝腺前区漏斗状部位的丝蛋白溶液具有偏光现象;

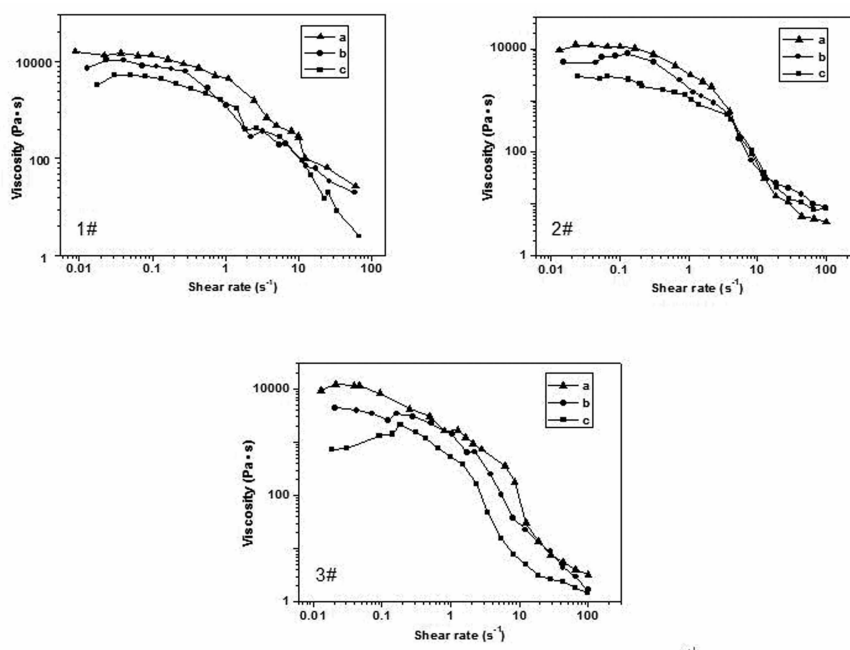


图 4 不同蚕体(1-3#)的中部丝腺各区段溶液的稳态流变曲线

(a)中部丝腺后区;(b)中部丝腺中区;(c)中部丝腺前区

Figure 4 Viscosity - shear-rate results of silk fibroin solution in different parts of middle silk gland from different silkworms
(a) posterior part of the middle division; (b) middle part of the middle division; (c) anterior part of the middle division

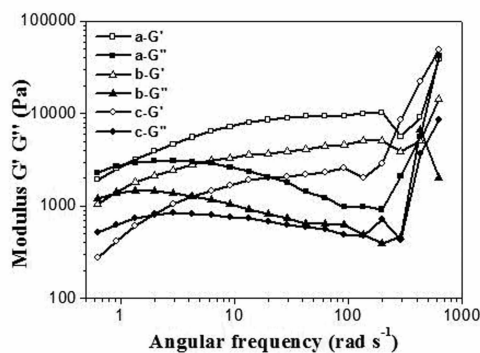


图 5 同一蚕体中部丝腺各区段的动态流变曲线

(a)中部丝腺后区;(b)中部丝腺中区;(c)中部丝腺前区

Figure 5 Oscillatory characterization of silk fibroin solution in different parts of middle silk gland from the same silkworm
(a) posterior part of the middle division; (b) middle part of the middle division; (c) anterior part of the middle division

(2) 丝蛋白溶液在蚕中部丝腺内由后向前流动的过程中,其分子构象由无规卷曲逐渐向 α -螺旋构象转变,并进一步形成 β -折叠构象;

(3) 不同蚕体中部丝腺丝蛋白溶液的流变性能变化规律基本一致,从中部丝腺后区至前区,溶液粘度及弹性均逐渐变小;

(4) 综合以上结果表明,蚕体内丝蛋白溶液从后部丝腺向前部丝腺流动的过程中,在浓度、pH 值、金属离子和剪切作用等因素的调节下,溶液中的丝蛋白分子逐渐由原先的无序状态转变成有序态结构。并且,在蚕体内中部丝腺前区的丝蛋白溶液很可能已经形成了液晶态结构。

参考文献:

- [1] Magoshi J, Magoshi M, Magoshi Y, Nakamura S. J Appl Polym Sci, Appl Polym Symp, 1985, 41: 187.

- [2] Knight DP, Vollrath F. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2002, 357 (1418): 155~163.
- [3] Viney C. Supramolecular Science, 1997, 4(1~2): 75~81.
- [4] Jin H J, Kaplan DL. Nature, 2003, 424 (6952): 1057~1061.
- [5] Vepari C, Kaplan D L. Prog Polym Sci, 2007, 32(8~9): 991~1007.
- [6] Magoshi J, Magoshi Y, Becker M A, Nakamura S. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1996, 212: 53-Cell.
- [7] 于同隐, 邵正中. 高分子通报, 1990(3): 154~156.
- [8] 李光宪, 于同隐. 科学通报, 1989, 21: 1656~1659.
- [9] Foo C W P, Bini E, Hensma J, Knight D P, Lewis R V, Kaplan D L. Appl Phys A: Mater Sci Proc, 2006, 82(2): 223~233.
- [10] Breslauer D N, Lee LP, Muller S J. Biomacromolecules, 2009, 10(1): 49~57.
- [11] Zhou L, Chen X, Shao Z Z, Huang Y F, Knight D P. J Phys Chem B, 2005, 109(35): 16937~16945.
- [12] Kurkov A S, Paramonov V M P, Medvedkov O I, Zalevskii I D, Goncharov S E. Laser Phys, 2008, 18: 1234~1237.
- [13] Pezolet M., Gosselin M. P., and Coulombe L. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1976, 453: 502~512.
- [14] Ochi A, Nemoto N, Magoshi J, Ohyama E, Hossain K S. J Soc Rheol Jp, 2002, 30(5): 289~294.
- [15] Holland C, Terry A E, Porter D, Vollrath F. Nature Mater, 2006, 5(11): 870~874.

Studies on the Structures and Properties of Silk Fibroin Solution in Different Divisions of Silk Gland of Silkworm

JIN Yuan, ZHANG Yao-peng, HANG Yi-chun, LUO Jie, SHAO Hui-li*, HU Xue-chao

(State Key Laboratory for Modification of Chemical Fibers and Polymer Materials, College of Materials Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: In this paper, the properties of silk fibroin solution from different divisions of silk gland of silkworm (including the anterior, the middle and the posterior divisions) were investigated by polarized microscope. Meantime, Raman spectrum and rotational rheometer were used to analyze the structures and rheological properties of silk fibroin solutions in the different parts of the middle division (including the anterior, the middle and the posterior parts). It was found that only the anterior division and the anterior part of the middle division showed birefringence. Furthermore, with flowing from the posterior part to the anterior part in the middle division of silkworm, the silk fibroin was gradually transferred from random coil into α -helix conformation and then into β -sheet, the viscosity and elasticity of the silk fibroin solution decreased. These results implied that the liquid crystal state structure had been possibly formed in the anterior part of the middle silk gland of silkworm.

Key words: Silkworm; Silk gland; Silk fibroin; Structure; Rheology