

• 研究通讯 •

## 桑蚕丝腺体和丝纤维中金属离子的含量

周 丽<sup>a</sup>    TERRY, Ann E.<sup>a,b</sup>    黄郁芳<sup>c</sup>    邵正中<sup>a</sup>    陈 新<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> 复旦大学高分子科学系 教育部聚合物工程重点实验室 上海 200433)

(<sup>b</sup> 牛津大学动物系 牛津 OX1 3PS 英国)

(<sup>c</sup> 复旦大学材料科学系 国家微分析中心 上海 200433)

**摘要** 用不同的测试方法,即质子诱导 X 射线发射(PIXE)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)和原子吸收光谱(AAS)对桑蚕丝腺体和丝纤维中金属元素的含量进行了详细的表征。结果表明,在桑蚕丝腺体和丝纤维中含有钠、镁、钾、钙、铜、锌、铁、锰八种金属元素,同时还可能含有微量的铷和锶。这些金属元素在丝腺体和各种丝纤维(蚕茧丝、强拉丝和脱胶丝)中的含量都有所变化,而这些变化可能与之在成丝过程(丝蛋白的构象转变过程)中所起的作用有关。

**关键词** 丝蛋白; 构象转变; 吐丝机理; 人工纺丝; 微量分析; 蜘蛛丝

## Metal Element Contents in Silk Gland and Silk Fiber of *Bombyx mori* Silkworm

ZHOU, Li<sup>a</sup>    TERRY, Ann E.<sup>a,b</sup>    HUANG, Yu-Fang<sup>c</sup>

SHAO, Zheng-Zhong<sup>a</sup>    CHEN, Xin<sup>\*,a</sup>

(<sup>a</sup> Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of the Ministry of Education of China, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

(<sup>b</sup> Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3PS, UK)

(<sup>c</sup> Department of Material Science, National Microanalysis Center, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** The contents of metal elements in silk gland and silk fiber of *B. mori* silkworm have been detailedly analyzed by proton induced X-ray emission (PIXE), inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) and atomic adsorption spectroscopy (AAS). The results showed that Na, Mg, K, Ca, Cu, Zn, Fe and Mn were found in both silk gland and silk fiber, while Rb and Sr were also possibly contained. The contents of these elements varied from silk gland to different kinds of silk fibers (*i.e.* cocoon silk, forced-drawn silk and degummed silk), and the changes of element content might correspond to the effect of these metal elements on the spinning process (conformation transition of silk fibroin) of *B. mori* silkworm.

**Keywords** silk fibroin; conformation transition; spinning mechanism; artificial spinning; microanalysis; spider silk

动物丝(桑蚕丝、蜘蛛丝等)作为一种性能优良的纤维,在纺织业、生物技术、医疗、精细化工以及军用材料等领域一直受到广泛的关注,特别是它们所具有的优异综合力学性能(相比于性能最优的合成纤维 Kevlar 显得更胜一筹)更使之成为各国科学家研究的热点<sup>[1~4]</sup>。但

是由于桑蚕丝的生产成本较高(属劳力密集型企业),加之人们无法象饲养蚕一样饲养蜘蛛,更无法象收集蚕丝一样收集蜘蛛丝,所以无法获得大量的天然动物丝,从而极大地制约了它们在各个领域内的广泛应用。由于天然动物丝优良的性能和可观的商业利润,促使人们不断

\* E-mail: chenx@fudan.edu.cn; Fax: 021-65640293.

Received January 26, 2005; revised and accepted May 10, 2005.

国家自然科学基金(Nos. 50373006, 20434010)、教育部优秀青年教师资助计划和复旦大学重点实验室高级访问学者基金资助项目。

寻找能够进行替代的方法,其中人工模拟生物纺丝是较为可行的一种。

近年来,虽然各国科学家都在尝试用各种丝蛋白溶液(天然的或再生的)进行人工模拟纺丝,但是纺出的人工丝的力学性能依然无法和天然丝相比<sup>[5]</sup>。尽管2002年加拿大 Nexia 公司<sup>[6]</sup>报道用高浓度的重组蜘蛛丝蛋白进行人工纺丝,其人工丝的模量和韧性都接近天然蜘蛛丝,但其弹性依旧相差很大。因此,了解动物吐丝的天然条件,进而掌握其吐丝机理,对成功进行模拟生物纺丝、获得高强度的人造纤维无疑具有非常重要的作用。

绝大多数科学家都同意天然的纺丝过程是一个在剪切力作用下丝蛋白的构象转变(从无规线团和/或螺旋向  $\beta$ -折叠)过程,并且在此过程中还包含许多其他因素的影响,如 pH<sup>[7~9]</sup>和金属离子<sup>[3,8,10]</sup>等。例如, Magoshi 等<sup>[11]</sup>在上世纪 90 年代就提出钾离子可能在桑蚕丝的形成过程中起作用;而我们也发现钾离子可以促使蜘蛛丝蛋白形成微纤<sup>[5,12]</sup>。由此可见,金属离子可能在动物吐丝过程中起着重要的作用。虽然 Magoshi 领导的课题组<sup>[13~16]</sup>在过去三年里报道了一些关于金属离子对桑蚕成丝作用的影响,但是他们主要研究钾离子和钙离子。在本研究中,我们对桑蚕丝腺体和丝纤维中金属元素的种类和含量都作了比较详尽的表征,首次获得了不同金属元素在丝腺体和丝纤维中含量的具体数值和变化趋势。根据这些实验结果,我们才有可能有的放矢地进行后续研究,如研究这些金属离子对桑蚕丝蛋白的构象转变,进而揭示金属离子在桑蚕吐丝机理中的独特作用,为人工模拟生物纺丝纺制出高性能的人造纤维提供坚实的理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 样品的制备

五龄桑蚕在吐丝前约 12 h 被解剖,取出完整的丝腺体。用少量去离子水淋洗除去表面粘液后擦干,然后在 80 °C 烘箱内干燥至恒重。蚕茧丝(cocoon silk)直接取自在干净环境下获得的蚕茧;强拉蚕丝(forced-drawn silk)为以 2.0 cm/s 的速度从桑蚕吐丝口中直接拉取的蚕丝。蚕茧丝和强拉蚕丝均未经进一步处理。脱胶丝(degummed silk)由以下方式获得:蚕茧丝在质量分数  $w=1.0\%$  的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中搅拌煮沸 30 min 后取出,用去离子水洗滌干净;重复以上操作两次后,在 80 °C 烘箱内烘干。

### 1.2 质子诱导 X 射线发射(PIXE)测定

具体 PIXE 的测试方法参见文献<sup>[17]</sup>。每个样品的数据至少是 3 次独立测试结果的平均。

### 1.3 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定

干燥的丝腺体和各种蚕丝在马弗炉中 700 °C 下灰化 4 h。灰化后的残渣定量地溶解于体积分数  $\varphi=50\%$  的硝酸中配成溶液,然后此溶液再用定量的去离子水进行稀释。测试使用 VG Plasma Quad 3 型电感耦合等离子体质谱仪,功率为 1350 W。每个样品的数据至少是 3 次独立测试结果的平均。

### 1.4 原子吸收光谱(AAS)测定

样品的处理方式同电感耦合等离子体质谱测定。测试使用 Unicam Solaar 939 型原子吸收光谱仪。对铜、锌、铁和锰采用石墨炉法;对钠、镁、钾和钙采用火焰法。其中对钠、镁、钾,使用空气-乙炔焰,对钙采用笑气-乙炔焰。每个样品的数据至少是 3 次独立测试结果的平均。

## 2 结果与讨论

### 2.1 丝腺体和蚕茧丝中金属元素含量的比较

由于 PIXE 一次可同时测定多种元素的种类和含量,因此我们首先使用 PIXE 对桑蚕丝腺体中的金属元素进行测定。从表 1 可以看出,由 PIXE 测定可发现桑蚕丝腺体中含钾、钙、铜、锌、铁和锰,同时还可能含有微量的铷和铯。另外由于 PIXE 测试方法本身的制约,它无法测定钠、镁等原子量很小的金属元素,因此我们在用 PIXE 进行预研的基础上,用 AAS 和 ICP-MS(用这两种方法可发现丝腺体中含钠和镁)对桑蚕丝腺体和各种丝纤维中金属元素的含量进行了较为准确的测定。

从表 1 可以发现,在桑蚕丝腺体和蚕茧丝中,钾和钙的含量最高,可达数千  $\mu\text{g/g}$ ;铜、锌、铁和锰的含量很低,大多只有几  $\mu\text{g/g}$ ;而钠和镁的含量介于其中,镁稍高,可到几百  $\mu\text{g/g}$ 。此外,比较同种金属元素在丝腺体和蚕茧丝中的含量,发现钠、钾、镁、锌和锰在丝腺体中的含量比蚕茧丝中要高;而钙、铜和铁的含量在蚕茧丝中比在丝腺体中高。

对于金属元素在丝腺体和蚕茧丝中含量的差异,我们认为这极有可能和这些金属元素参与丝蛋白的构象转变,即成丝过程有关,但是相关的研究却不多见。我们<sup>[18,19]</sup>曾研究铜离子对桑蚕丝蛋白构象转变的影响,结果表明,铜离子可以和丝蛋白分子链发生络合,从而诱导其发生由无规线团和/或螺旋结构向  $\beta$ -折叠的构象转变。这一结果显示铜离子的存在有利于丝蛋白  $\beta$ -折叠结构的形成,即有利于成丝过程,并且和本研究所展示的铜元素在丝腺体和丝纤维中的含量差别相符,即丝纤维中铜的含量要高于在丝腺体中的含量。我们<sup>[5]</sup>还研究了蜘蛛丝腺体和丝纤维中钾和钠的含量,结果为钾含量

表 1 桑蚕丝腺体和蚕茧丝中金属元素含量( $\mu\text{g/g}$ )的比较Table 1 Comparison of metal element content ( $\mu\text{g/g}$ ) in silk dope and cocoon silk of *Bombyx mori* silkworm

Element	Silk dope			Cocoon silk	
	AAS	ICP-MS	PIXE	AAS	ICP-MS
Na	27.4 $\pm$ 8.7	25.8 $\pm$ 2.6	undetectable	12.3 $\pm$ 6.4	25.3 $\pm$ 2.5
K	1900 $\pm$ 400	2650 $\pm$ 200	5330 $\pm$ 600	1160 $\pm$ 190	445 $\pm$ 50
Mg	430 $\pm$ 50	304 $\pm$ 30	undetectable	200 $\pm$ 14	210 $\pm$ 20
Ca	1500 $\pm$ 330	1750 $\pm$ 170	1630 $\pm$ 200	1960 $\pm$ 200	2360 $\pm$ 230
Cu	1.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.3
Zn	2.5 $\pm$ 1.1	11.5 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.3
Fe	1.8 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.1
Mn	20.7 $\pm$ 3.5	9.0 $\pm$ 1.5	6.4 $\pm$ 1.8	13.0 $\pm$ 2.8	3.1 $\pm$ 0.1

从丝腺体中的 750  $\mu\text{g/g}$  上升到丝纤维中的 2900  $\mu\text{g/g}$ , 而钠则从 3130  $\mu\text{g/g}$  下降至 300  $\mu\text{g/g}$  (原文献中将  $\mu\text{g/g}$  误刊为  $\mu\text{mol/L}$ , 特此更正), 这与钾离子能促使蜘蛛丝蛋白形成微纤<sup>[12]</sup>相符. 但是在本研究中我们发现, 桑蚕丝腺体和丝纤维中钾和钠的含量与其在蜘蛛中的情况有所区别, 首先钾在桑蚕蚕茧丝中的含量低于其在丝腺体中的含量, 这与蜘蛛的情况正好相反; 其次钠在桑蚕丝腺体和蚕茧丝中的含量比在蜘蛛中要低得多(低 1~2 个数量级). 这些区别表明虽然桑蚕和蜘蛛都能吐丝, 但是它们各自吐丝的生物环境不尽相同, 因此在本研究中所发现的这些存在于桑蚕丝腺体和丝纤维中的金属元素是否都对丝蛋白的构象转变有影响, 以及对构象转变的影响程度, 都值得我们进行深入的后续研究.

## 2.2 不同种类蚕丝中金属元素含量的比较

过去人们研究桑蚕丝的性能一般都采用蚕茧丝, 发现其力学性能较蜘蛛丝要差. 我们课题组<sup>[2]</sup>近来发现, 如果直接从桑蚕的吐丝口将蚕丝拉出, 其力学性能可以和蜘蛛丝媲美. 此外, 将生丝脱胶是获得丝蛋白, 进而制备丝蛋白溶液的必要处理方法, 因此我们在此对蚕茧丝、强拉丝和脱胶丝这三种不同方法得到的丝纤维中的金属元素含量进行比较, 以期了解桑蚕在成丝过程中对

这些金属元素分泌和吸收情况, 以及这些金属元素在丝纤维中和丝蛋白的结合情况.

从表 2 可以发现, 大多数金属元素(钠、镁、钾、铜、锌和铁)在强拉丝中的含量要高于蚕茧丝, 只有钙和锰在强拉丝中的含量比在蚕茧丝中低. 其次, 碱金属元素(钠和钾)以及碱土金属元素(镁和钙)在蚕茧丝和强拉丝含量的变化较为明显, 而过渡金属(铜、锌、铁和锰)含量的改变较少. 对桑蚕来说, 蚕茧丝是它在正常生理状态下吐的丝, 其对各种金属离子的分泌和吸收都达到一个平衡状态; 而在强迫拉丝过程中, 由于它是个非正常生理过程, 桑蚕对金属离子的分泌和吸收都会偏离平衡状态, 表现为金属元素含量在强拉丝中的增加或降低. 金属元素含量的变化, 可能会影响桑蚕成丝过程中丝蛋白的构象转变, 进而影响丝纤维的力学性能. 例如, 铜和锌的存在一般被认为有利于  $\beta$ -折叠的形成<sup>[20-22]</sup>. 钙的存在不利于  $\beta$ -折叠的形成<sup>[23,24]</sup>, 因此强拉丝中铜和锌的含量比蚕茧丝中高, 而钙含量却比蚕茧丝中低, 或许是强拉丝的力学性能比蚕茧丝好的另一原因(我们认为强拉丝力学性能比蚕茧丝好的主要原因是避免了桑蚕在结茧过程中“8”字型吐丝方式带来的丝纤维的结构缺陷<sup>[2]</sup>).

表 2 不同种类蚕丝中金属元素含量( $\mu\text{g/g}$ )的比较Table 2 Comparison of metal element content ( $\mu\text{g/g}$ ) in different kinds of silks of *Bombyx mori* silkworm

Element	AAS			ICP-MS		
	Cocoon silk	Forced-drawn silk	Degummed silk	Cocoon silk	Forced-drawn silk	Degummed silk
Na	12.3 $\pm$ 6.4	32.6 $\pm$ 5.0	558 $\pm$ 40	25.3 $\pm$ 2.5	49.6 $\pm$ 5.0	—
K	1160 $\pm$ 190	6300 $\pm$ 130	57.5 $\pm$ 3.5	445 $\pm$ 50	1890 $\pm$ 190	—
Mg	200 $\pm$ 14	505 $\pm$ 26	33.9 $\pm$ 3.8	210 $\pm$ 20	441 $\pm$ 40	—
Ca	1960 $\pm$ 200	520 $\pm$ 50	405 $\pm$ 40	2360 $\pm$ 230	1650 $\pm$ 150	—
Cu	1.3 $\pm$ 0.2	—	—	3.2 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
Zn	0.6 $\pm$ 0.1	—	—	3.2 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1
Fe	6.1 $\pm$ 0.3	—	—	6.8 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.1
Mn	13.0 $\pm$ 2.8	—	—	3.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1

此外,我们还研究了脱胶丝中金属元素的含量,结果发现除钠以外,所有金属元素的含量在脱胶丝中均有所下降.这表明有一部分(或大部分)的金属元素和丝蛋白的结合并不牢固,因此在脱胶过程中很容易被洗去.至于钠含量上升的原因,显而易见是由于我们使用碳酸氢钠进行脱胶,所以有相当量的钠离子被吸附在丝纤维上的结果.

### 2.3 金属元素含量测定的准确性

从表1和表2可以发现,用不同方法测定的金属元素含量的绝对值不尽相同,当然这可能是样品间的个体差异,但是我们认为其主要原因还是各种测试方法本身的检测原理所致.虽然各种金属元素含量的绝对值有差别,但是它们都在同一数量级上,并且它们在丝腺体和各种丝纤维中变化的趋势相同,因此我们可以认为结果是可信的,并有理由相信,通过本研究对丝腺体和丝纤维中各种金属元素的含量进行较为详尽的半定量测定,了解它们在丝腺体和丝纤维中的变化趋势,将有助于我们在今后的工作中进一步深入研究这些金属离子对丝蛋白构象转变的影响,了解它们在桑蚕吐丝过程中的作用,为模拟生物纺丝,获得高强度人造丝提供理论指导.

### References

- Vollrath, F.; Knight, D. P. *Nature* **2001**, *410*, 541.
- Shao, Z. Z.; Vollrath, F. *Nature* **2002**, *418*, 741.
- Peng, X.-N.; Chen, X.; Wu, P.-Y.; Shao, Z.-Z. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 2127 (in Chinese).  
(彭显能, 陈新, 武培怡, 邵正中, 化学学报, **2004**, *62*, 2127.)
- Chen, X.; Zhou, L.; Shao, Z.-Z.; Zhou, P.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 625 (in Chinese).  
(陈新, 周丽, 邵正中, 周平, Knight D. P., Vollrath F., 化学学报, **2003**, *61*, 625.)
- Chen, X.; Huang, Y.-F.; Shao, Z.-Z.; Huang, Y.; Zhou, P.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Chem. J. Chin. Univ.* **2004**, *25*, 1160 (in Chinese).  
(陈新, 黄郁芳, 邵正中, 黄曜, 周平, Knight D. P., Vollrath F., 高等学校化学学报, **2004**, *25*, 1160.)
- Lazaris, A.; Arcidiacono, S.; Huang, Y.; Zhou, J. F.; Duguay, F.; Chretien, N.; Welsh, E. A.; Soares, J. W.; Karatzas, C. N. *Science* **2002**, *295*, 472.
- Dicko, C.; Vollrath, F.; Kenney, J. M. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 704.
- Dicko, C.; Kenney, J. M.; Knight, D.; Vollrath, F. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14080.
- Terry, A. E.; Knight, D. P.; Porter, D.; Vollrath, F. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 768.
- Knight, D. P.; Vollrath, F. *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 179.
- Magoshi, J.; Magoshi, Y.; Nakamura, S. *ACS Symp. Ser.* **1994**, *544*, 292.
- Chen, X.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 644.
- Tanaka, T.; Magoshi, J.; Magoshi, Y.; Inoue, S. I.; Kobayashi, M.; Tsuda, H.; Nakamura, S. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *221*, 123.
- Kobayashi, M.; Tanaka, T.; Inoue, S.; Tsuda, H.; Magoshi, J.; Magoshi, Y.; Becker, M. A. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2001**, *222*, 113.
- Tsuda, H.; Kobayashi, M.; Tanaka, T.; Inoue, S.; Magoshi, Y.; Magoshi, J. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2002**, *223*, 67.
- Ochi, A.; Hossain, K. S.; Magoshi, J.; Nemoto, N. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1187.
- Liu, Y.; Yu, T.; Yao, H.; Yang, F. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 405.
- Zhou, L.; Chen, X.; Shao, Z. Z.; Zhou, P.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *FEBS Lett.* **2003**, *554*, 337.
- Zong, X. H.; Zhou, P.; Shao, Z. Z.; Chen, S. M.; Chen, X.; Hu, B. W.; Deng, F.; Yao, W. H. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11932.
- Stockel, J.; Safar, J.; Wallace, A. C.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7185.
- Jobling, M. F.; Huang, X. D.; Stewart, L. R.; Barnham, K. J.; Curtain, C.; Volitakis, I.; Perugini, M.; White, A. R.; Cherny, R. A.; Masters, C. L.; Barrow, C. J.; Collins, S. J.; Bush, A. I.; Cappai, R. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8073.
- Bush, A. I. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, *17*, 147.
- Ascoli, G. A.; Luu, K. X.; Olds, J. L.; Nelson, T. J.; Gusev, P. A.; Bertucci, C.; Bramanti, E.; Raffaelli, A.; Salvadori, P.; Alkon, D. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24771.
- Heredia, P.; De Las Rivas, J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11831.

(A0501264 SONG, J. P.)