

ИСКУССТВЕННАЯ ПАУТИНА – НАНОТКАНЬ БУДУЩЕГО

Логинов П. Б.¹, Клинов Д.В.¹, Богуш В.Г.², Соколова О.С.³, Давыдова Л. И.², Сидорюк К.В.², Есипова Е.Г.⁵, Неретина Т.В.¹, Оршанский И.А.⁴, Макеев В.Г.⁴, Туманян В.Г.⁵, Михайлов А.Г.¹, Шайтан К.В.³, Дебабов В.Г.², Кирпичников М.П.³

¹Институт Биоорганической Химии им. Шемякина и Овчинникова РАН

²Государственный научный центр «ГосНИИГенетика»

³Биофак МГУ

⁴Институт биохимии РАН

⁵Институт молекулярной биологии РАН

Создание текстильных материалов на основе биополимеров является перспективной областью исследований [1]. Широко известен факт, что шёлковые изделия высоко ценятся, а также что появление синтетического шёлка резко увеличило объем текстильной промышленности. Также известно, что прочность нитей паутины превышает прочность стальной проволоки той же толщины, и даже превышает прочность нитей полимера кевлара, который является основной составляющей современных бронежилетов [2]. Уже из этих фактов становится понятно, почему в исследовании искусственной паутины на сегодняшний день заинтересованы многие лаборатории.

Как известно, волокна паутины являются чрезвычайно прочными и вместе с этим обладают так называемой мягкой эластичностью. Так, природная паутина легче и прочнее аналогичного биополимера – шёлка. Чтобы разобраться в разнице свойств этих материалов, необходимо обратиться к их способу синтеза в природе. Оказывается, что нить паутины состоит из множества связанных нановолокон, тогда как нить шёлка является единым цельным волокном. Таким образом, чтобы ответить на вопрос, как создать искусственную паутину, необходимо определить её структуру, молекулярные особенности синтеза.



Рис 1. Желёзы, выделяющие нити паутины. Фотография с электронного микроскопа

```
GPGGYGPQQGPG      AAAAAAA 6
GSGA GGYGPQQGPG   GPGAAAAAA 7
GPGGYGPQQGPG      AAAAAAA 6
GSGPGGYGPQQGPG    GSSAAAAAA 8
GPGRYGPQQGPG      AAAAAA 1
GRGPGGYGPQQGPG    GPGAAAAAA 5
```

Рис 2. Фрагмент аминокислотной последовательности рекомбинантного белка Spidroin 1

Природная нить паутины имеет толщину около 5 микрон. При исследованиях синтеза паутины пауками класса *Nephila*, было показано, что специальные желёзы на брюшке паука выделяют нановолокна, сплетающиеся впоследствии в единую нить (рис. 1). Первой целью работы было: исследовать строение нановолокон паутины. Для работы использовался искусственный белок паутины Spidroin 1, экспрессированный в дрожжах в институте НИИ Генетики. В аминокислотной последовательности белка ярко выделяются следующие особенности (рис.2): повторяющиеся полиаланиновые фрагменты, длинные глицин-богатые фрагменты. Как известно, первые способны объединяться из разных частей белка в β -

структуры, прочные листы, в то время как глицин-богатые участки образуют гибкие связывающие мостики между ними.

Необходимо было показать, что самосборка нановолокон паутины из раствора белка возможна. Для этого скалывалась поверхность слюды, затем наносилась на неё капля исследуемого раствора заранее заданной концентрации. Образец держался около минуты в ёмкости с 100% влажностью, чтобы капля не испарялась, а затем быстрым движением капля удалялась со слюды струёй аргона. Полученные таким образом образцы были исследованы с помощью атомно-силового микроскопа “Solver” фирмы NT-MDT резонансным методом, с использованием высокочастотных кантилеверов NSG10 и NSG01 с выращенными на остриях алмазоподобными иглами. Оказалось, что путём самосборки из раствора белка концентрацией около 0.15 мг/мл образуются нановолокна паутины длиной от 100 нм до 5 микрон, и толщиной около 3 нм (рис. 3). Также благодаря использованию зондов высокого разрешения удалось различить периодически меняющуюся толщину нановолокна.

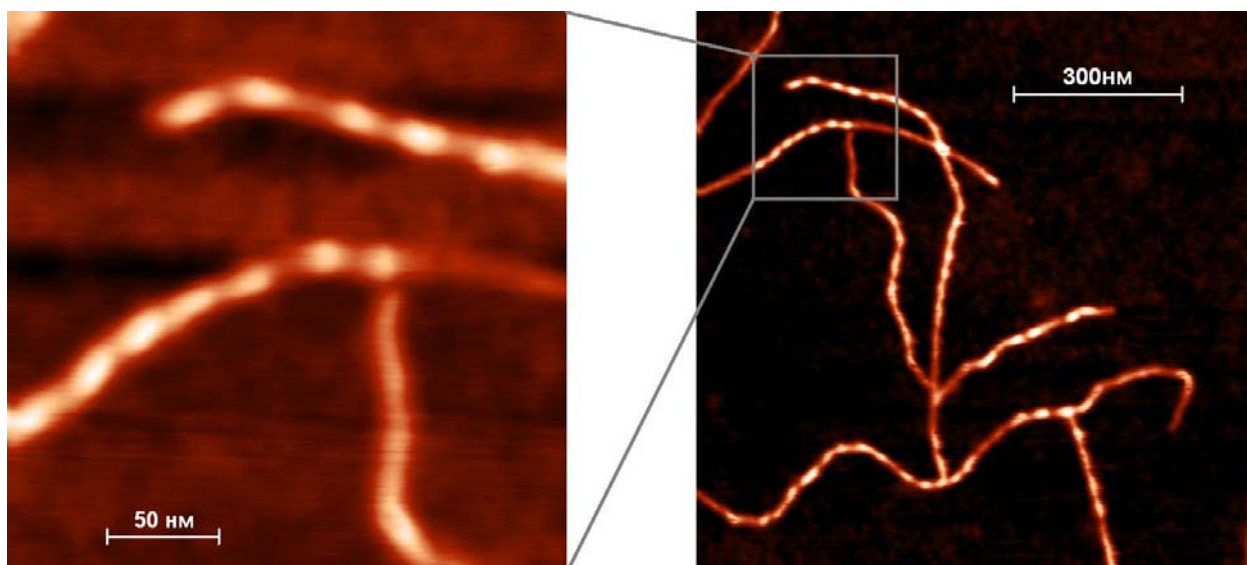


Рис.3. Нановолокна рекомбинантного белка паутины 1F9. Толщина нанофибриллы меняется с периодом 25-30 нм.

Обнаружение периодичности нановолокон паутины и её количественное исследование позволило аргументировано предложить модель структуры нановолокна. Согласно этой модели полиаланиновые последовательности объединяются не в плоскую β -структуру, а суперсложенную, при этом соседние β -структуры соединяются между собой глицин-богатые участки. Такая модель имеет вид скрученной ленты.

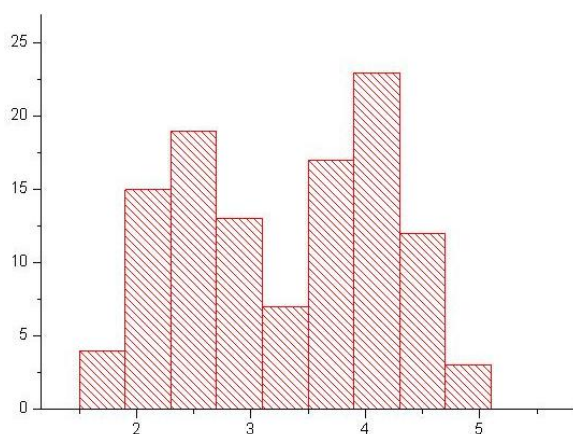


Рис.4. Гистограмма высот в максимумах и минимумах нановолокна.

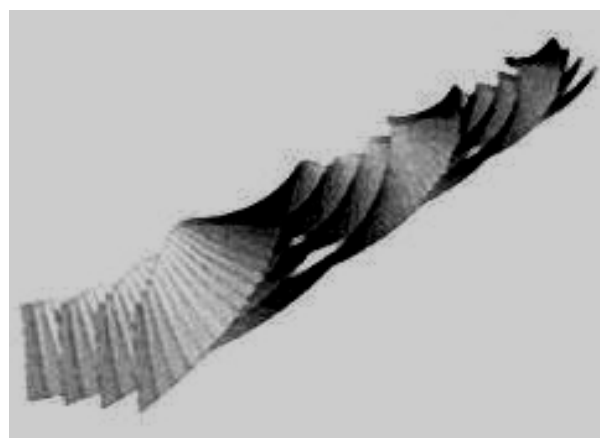


Рис. 5. Модель нановолокна паутины.

Если рассмотреть статистику толщины нановолокна в максимумах и минимумах, мы увидим, что в максимумах это около 4 нм, что удовлетворяет ширине β -структуры из 6-7 полиаланиновых цепей (рис.4). Однако толщина волокна в минимумах равна примерно 2.5 нм, что почти в 2-3 раза больше, чем толщина β -структуры. В связи с этим фактом сделано предположение, что нановолокно состоит из нескольких лент, идущих параллельно друг-другу и связанных водородными связями между β -структурами (рис.5). Эта модель косвенно подтверждается и другими наблюдаемыми явлениями, например разветвлением нановолокон. Предполагается, что во время самосборки нанофибрилл, от основного нановолокна отслаиваются отдельные ленты, на которые в последствии наращиваются другие ленты, дополняя ответвление до полноразмерной нанофибриллы.

В качестве метода, позволяющего в перспективе получать нановолокна волокна паутины, был выбран метод микрокапиллярного электрораспыления. Была собрана установка, с помощью которой производилось распыление раствора искусственного белка паутины на подложку при различных параметрах (рис.6). При этом оказалось, что при относительно больших концентрациях раствора, а именно около 70 мг/мл, на подложке наблюдаются волокна паутины толщиной от 10 до 400 нм, и длиной до сантиметра и более (рис.7).

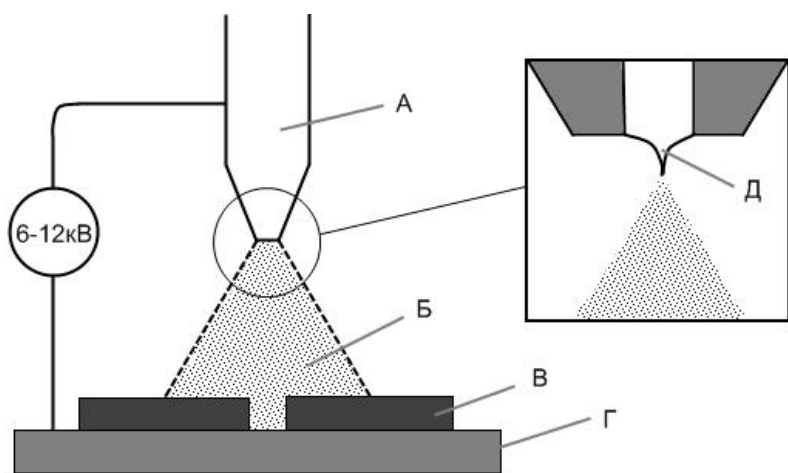


Рис.6. Схема установки микрокапиллярного электрораспыления. А-металлическая игла с раствором паутины. Б-область распыления В-диэлектрический слой, ограничивающий напыление. Г-проводящая подложка. Д-мениск, образующийся вследствие действия высоких электрических полей

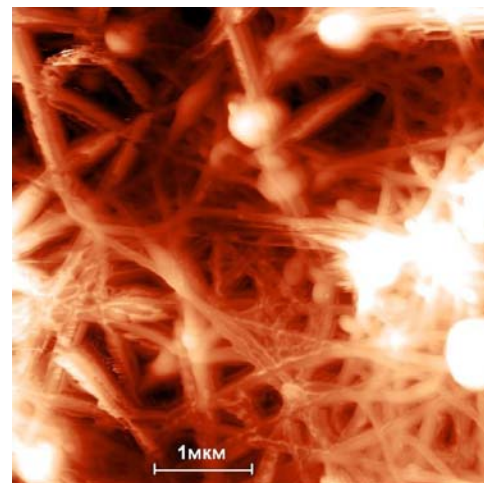


Рис. 7. Волокна паутины, полученные методом электрораспыления раствора искусственного белка паутины. Концентрация 70 мг/мл.

Таким образом в работе показано, что образование волокон из искусственного (рекомбинантного) белка паутины возможно, разработан метод их получения, установлена структура нановолокон паутины. Благодаря свойствам биосовместимости, нановолокна паутины могут использоваться для создания тканей в медицинских и других целях.

Работа была выполнена по проекту «Разработка научных основ нанотехнологии для создания биосовместимых материалов медицинского назначения на базе рекомбинантных аналогов белков паутины» в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по критической технологии «Технологии создания биосовместимых материалов» (мероприятие 1.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. David P.Knight, Fritz Vollrath. Biological liquid crystal elastomers. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B(2002) 357, 155-163.
2. Fritz Vollrath, David Porter. Spider silk as archetypal protein elastomer. // Soft Matter, 2006, 2, 377-385.