

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-061

合成生物学在蛋白质功能材料领域的研究进展

王盼^{1,2}, 朱晨辉^{1,2}, 赵婧^{1,2}, 范代娣^{1,2}

(¹西北大学化工学院, 陕西省可降解生物医用材料重点实验室, 陕西 西安 710069; ²西北大学化工学院, 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心, 陕西 西安 710069)

摘要: 蛋白质功能材料具有良好的生物相容性、可降解性和多功能性, 在医药、军事和纺织等领域应用价值巨大。然而, 材料蛋白具有分子量大、高频氨基酸多和翻译后修饰特殊等独特性, 导致其在人工细胞合成中存在表达率低、各功能元件与底盘细胞适配性差、结构及功效不稳定等瓶颈, 严重限制了这些蛋白的高效生产与应用。掀起第三次生物技术革命的合成生物学技术, 以“基因调控, 工程设计”为核心, 可用于产品的精准化设计与高效合成, 实现人类对可持续发展工业模式的期待。本文介绍了蛋白质功能材料的应用及发展, 以蛋白高效合成及功能需求为导向, 从蛋白分子的定向设计、细胞工厂构建与适配调控以及蛋白材料加工应用等方面阐述蛋白质功能材料的合成策略, 以实现其功能定向强化及工业化生产。目前以合成生物学的科学理念为指导, 对生命体进行不断改造与优化, 以实现细胞工厂定向合成蛋白, 结合理性设计的材料模块, 赋予蛋白质在生产过程的智能可控以及性能的更新升级是研究的热点。展望未来, 讨论了蛋白质功能材料在面向产业应用过程中需要克服的挑战, 为性能优异的蛋白质功能材料广泛应用提供可能。

关键词: 合成生物学; 蛋白质功能材料; 高频氨基酸; 适配调控; 装配加工

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Research progress of synthetic biology in the field of protein functional materials

WANG Pan^{1,2}, ZHU Chenhui^{1,2}, ZHAO Jing^{1,2}, FAN Daidi^{1,2}

(¹Shaanxi Key Laboratory of Degradable Biomedical Materials, School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China; ²Shaanxi Research & Development Center of Biomaterial and Fermentation Engineering, College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China)

Abstract: Protein functional materials have good biocompatibility, degradability and versatility, so they have great application values in the fields of medicine, military and textile. However, due to their unique characteristics of high molecular weight, high-

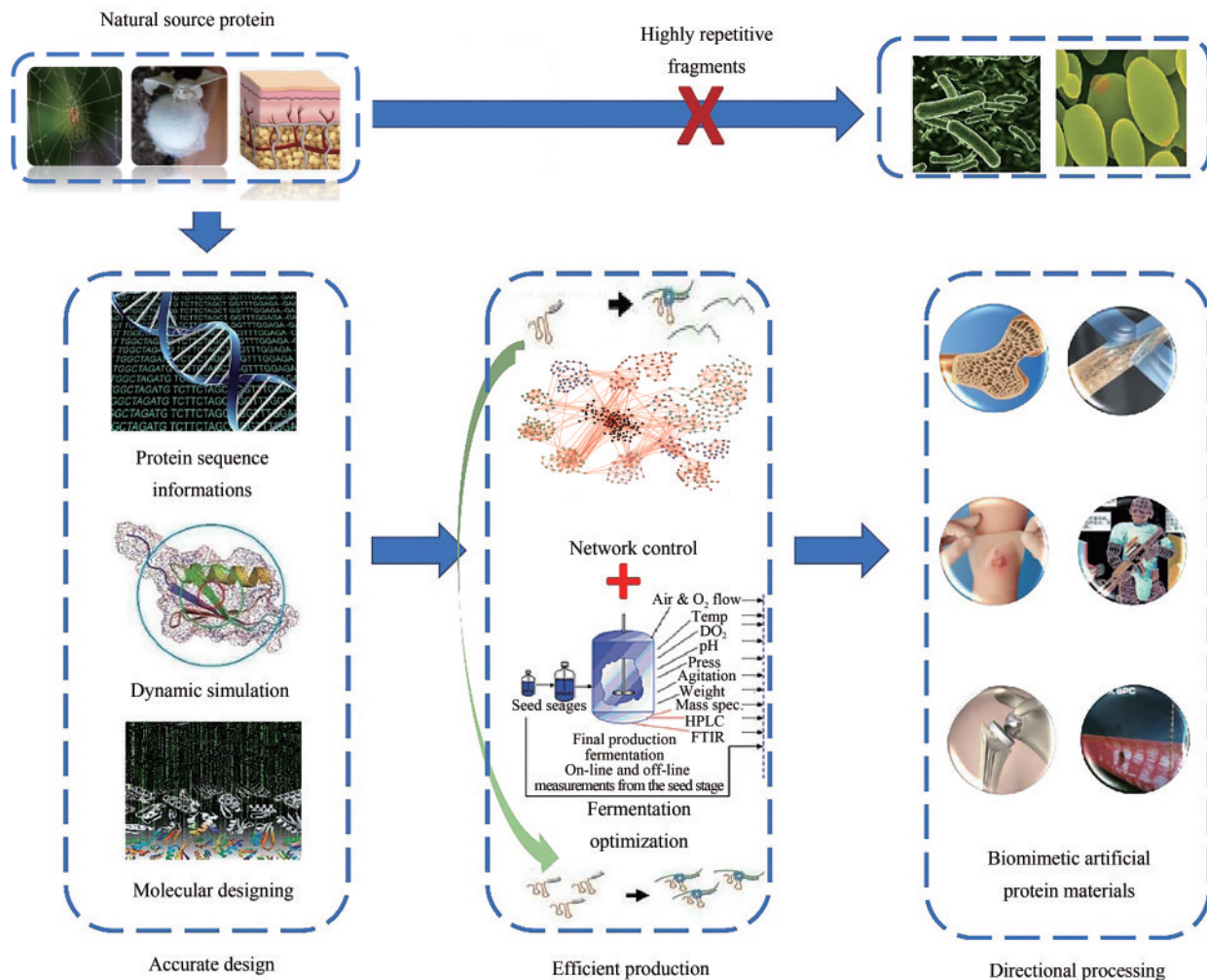
收稿日期: 2020-04-28 修回日期: 2020-09-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905200); 陕西省教育厅专项科研计划 (20JK0938)

引用本文: 王盼, 朱晨辉, 赵婧, 范代娣. 合成生物学在蛋白质功能材料领域的研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(1): 46-58

Citation: WANG Pan, ZHU Chenhui, ZHAO Jing, FAN Daidi. Research progress of synthetic biology in the field of protein functional materials [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(1): 46-58

frequency amino acids and special post-translation modifications, there are bottlenecks in its low expression rate in artificial cell synthesis, poor compatibility between functional elements and chassis cells, and unstable structure and efficacy, which seriously limit the efficient production and application of these proteins. Synthetic biology, as the third biotechnology revolution, has the advantages of renewable resources, low pollution, easy control and directional design of biological macromolecules. With the gradual excavation and analysis of the functional principles and novel design concepts of protein functional materials, and the development of alternative materials with excellent performance under specific conditions, it has brought revolutionary changes to human social life. It has been reported that such protein functional materials have great application value in cancer diagnosis and treatment, regenerative medicine, gene delivery system, data storage and so on. Although synthetic biology has broadened the range of potential applications of protein functional materials, there are still some limitations. This requires us to carry out research from two different perspectives, biology and materials science. On the one hand, we should establish a common technology platform to form a complete upper, middle and downstream research system. On the other hand, we should establish targeted research based on the characteristics of different protein materials to produce materials with better performance. This article introduces the application and development of protein functional materials. Taking the efficient protein synthesis and functional requirements as the guide, the synthesis strategy of protein functional materials are explained from the aspects of protein molecule orientation design, cell factory construction and adaptation control, and protein material processing applications, in order to realize their functional directional enhancement and industrial production. The limitations of synthetic biology oriented protein functional materials in biology and materials science are prospected, which lay a foundation for the wide application of protein functional materials with excellent properties.



Keywords: synthetic biology; protein functional materials; high-frequency amino acids; adaptation regulation; assembly processing

自然界中蕴藏着极为丰富的生物大分子或天然高分子，它们是自然界赋予人类最重要的物质资源和宝贵财富。其中蛋白质功能材料最基本的特点是具备良好的生物相容性和可降解特性。生物相容性是指材料与人体之间接触时相互作用产生的各种生物、物理及化学反应的性质，两者之间的接触不会对宿主产生不良影响的材料属性^[1]；生物可降解性是指材料通常具备被宿主降解并且不会对宿主产生持续性伤害的材料属性^[2]。此外许多蛋白质功能材料还具备低毒性、抗菌性等多功能特性，对它们的使用早就不仅仅局限于衣食住行等日常生活方面，随着科学技术的进步，蛋白质功能材料的应用获得越来越多的关注，在医药、军事和纺织等领域应用价值巨大，是一类具有极大发展潜力的天然大分子材料。

这类蛋白如果直接用动物组织的化学法提取普遍存在诸多问题，如受制于伦理和法律不能用人体组织提取（如胶原蛋白的胚胎提取），或者无法高密度饲养（如产生蛛丝蛋白的蜘蛛具有同类相残的天性），同时存在排斥反应大、产品批次质量不均一、生物功效不稳定等特点，严重阻碍了蛋白质功能材料的广泛应用。因此如何大量制备这些性能优异的蛋白质功能材料，一直是生物工程和材料工程交叉领域的热点问题。重组DNA技术出现之后，这些天然蛋白质功能材料的部分表达为人们带来希望，但是在基因表达、代谢、细胞信号和细胞外组装等过程中仍然存在诸多障碍。例如天然功能蛋白DNA序列在微生物体系中存在不稳定或者表达量低，甚至两者兼具的情况。在使用质粒载体系统进行微生物表达时，天然DNA序列的不稳定性可能是由于其序列高度重复，而低表达的原因可能是高效表达的微生物宿主与天然宿主之间密码子偏好性存在较大差异，另外这些具有高度重复氨基酸的蛋白质功能材料可能与微生物宿主的氨基酸库并不匹配，因而加剧了稀有密码子的使用效率，甚至可能使若干tRNA库负

担过重，导致蛋白质合成过程中若干氨基酸残基缺失，获得重组蛋白的功能和产量无法满足市场的需求，这也限制了蛋白质功能材料的范围、种类和功能。

为了克服这一限制，需要能够设计生物过程的工具。合成生物学作为一门多科学交叉融合的新兴学科，是现代生物化学和分子生物学、细胞生物学、进化系统学、信息学、数学、计算机和工程学等学科的综合，利用标准化生物元件（part），构建通用型生物学模块（module）及器件（device），设计组装具有特定新功能的人工生命系统（system），控制物质的生物合成，包括基因表达、蛋白质功能、新陈代谢、分泌和细胞外组装。理论上可以消除体内合成蛋白的历史难题，为蛋白质功能材料的高效生产与合成带来新动力。本文将“合成生物学”科学理念为指导，整合结构生物学、计算生物学和材料学等技术说明蛋白质功能材料的高效合成策略，从蛋白质功能材料的应用发展、构效关系解析及分子设计、蛋白质功能材料细胞工厂构建与适配调控、蛋白材料装配加工及应用四个方面对蛋白质功能材料的高效合成展开介绍。

1 蛋白质功能材料的应用发展

蛋白质功能材料，包括蛛丝蛋白、蚕丝蛋白、贻贝蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白等，由于其独特的材料特性，近年来受到国内外研究者的广泛关注，也开展了大量研究^[3-6]。例如胶原蛋白以其良好的凝胶性、吸水性、生物相容性、可降解、无毒等诸多优良特性，在伤口缝线、软骨缺损填充、骨骼金属植入物镀膜等领域广泛应用，是一种非常重要的生物医用材料。本文作者以微生物为底盘，在胶原蛋白的高效合成领域取得了重要突破，在国际上首次实现了类人胶原蛋白的量产，创制了类人胶原原料、系列新型修复敷料的生产技术。蚕丝应用广泛且具有优异的穿戴舒适性，南开大学刘遵峰团队利用天

然纯蚕丝制备了一种新型的“人工肌肉”纤维，能够感知皮肤表面湿度而自动调节衣袖长短，可用于智能织物和柔软机器人研发等领域^[7]。此外蚕丝蛋白具有极佳的光学特性、优异的生物兼容性、可控的生物降解性以及简便的功能化手段，这些丝蛋白材料性质特别稳定，在高温甚至极端条件下仍能保持结构的稳定性，并且很容易被杀菌消毒，可以稳定释放生物活性物质，因此丝蛋白材料制备在医疗领域有巨大优势。塔夫茨大学 David L. Kaplan 教授团队使用软刻蚀技术加工蚕丝蛋白制作细胞培养支架、成骨细胞培养、骨骼修复螺钉、伤口愈合贴片等^[8]。上海微系统与信息技术研究所利用瞬态可溶微纳光学技术，展示了以蚕丝蛋白为基础的功能材料在光学与光电子学上的潜在应用，开创性地应用到信息保密和生物医疗领域中^[9]。海洋贻贝黏附蛋白具有高强度、高韧性、防水性以及极强的黏附基体等功能，兼具优异的生物相容性和可降解性，是实现细胞和组织之间的高效黏合的理想材料，并且可以在皮肤组织、黏膜组织、软骨、骨骼等创口和手术切口的黏合中发挥作用^[10-11]，是一类极具优势和潜力的光谱生物黏合剂。天津大学张雷和齐海山团队采用生物合成的方法成功制备出“贻贝仿生多功能蛋白材料”能够简便快速黏附在医用材料表面，同时具备抗污、抗菌、防雾和良好生物相容性等多种功能，可成为应用于医疗设备和体内植入器件的“超级涂层”^[12-13]。天然的蛛丝蛋白是一种极其柔软的蛋白，同时具有强度高、弹性好等极佳性能，是一种十分诱人的生物材料，并且具有非常优异的生物相容性和可降解性，在纺织、生物医学、美容保健、特种工业等领域能够为人类服务^[14-15]。基于体外重组蛛丝蛋白构成的新型生物材料，如纳米纤维、水凝胶、多孔海绵及微胶囊等，可应用于药物可控释放、组织工程支架等材料^[16]。这些蛋白质功能材料的多元化应用推动了科学家们对其进行更加深入的分子水平机理的阐释，并在前沿领域中取得一系列重大进展，这将推动先进技术水平的提升，从而拓展并推动其应用，带动产业发展。

蛋白质功能材料的诸多优异性能，促使科学家试图利用生物技术的方式复制这些特性，以解决这类蛋白在表达、生产以及实际应用中遇到的系列瓶颈问题。尽管蛋白材料的合成已取得了较

大进展，但是利用人工细胞表达蛋白质功能材料的研究还处在发展阶段，蛋白的产量和性能还无法满足应用需求，融合多学科技术才有望实现蛋白材料的高效合成与应用的更大突破。

2 蛋白质功能材料的构效关系解析及分子设计

蛋白质的功能活性与其结构密切相关，了解蛋白质的空间结构是理解其蛋白质功能以及活性机理的基础，其中序列特征和结构特征是蛋白质构效关系研究的重要参数。在人类基因组计划开展以来，我们已经获取了海量的生物序列数据，但是深入有效的信息挖掘和分析才能提炼出物质结构与功能的关系，解析生命的本质，从而实现蛋白生物合成的定向性和高效性。

2.1 蛋白质功能材料的结构特性

研究发现这些具有独特材料特性的蛋白质都具有特定氨基酸含量高、片段高度重复等特性(表1)，例如蛛丝蛋白主要由重复的 poly-Ala、Gly-Gly-X 和 Gly-Pro-Gly-Gln-Gln 组成，重复序列决定了蛛丝蛋白的纤维性能^[17]。天然胶原蛋白是结缔组织中最主要的结构蛋白，典型结构是三条多肽链组成的三螺旋结构，每个肽链中都含有多达300个以上的“Gly-X-Y”重复氨基酸序列，X通常是脯氨酸，Y通常是羟脯氨酸或者羟赖氨酸，形成300 nm左右的三股螺旋结构^[18]。丝蛋白中的蚕丝蛋白主要由 Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser 的重复序列组成^[19]。弹性蛋白是弹性纤维的主要成分，赋予组织和器官可逆的收缩变形能力，主要是由五肽的重复序列 Val-Pro-Gly-X-Gly 组成^[20]。对于不同的蛋白质，通过蛋白质结晶、冷冻电镜以及同源建模等不同手段确定其蛋白结构，并利用高精度动态模拟获得其动态构象。针对较易获得的晶体蛋白，采用结晶和X射线衍射确定蛋白结构；针对结晶困难的目标蛋白，采用冷冻电镜解析蛋白结构；而对于实验无法获得结构的蛋白，通过序列比对、同源建模、动力学模拟等方式获得最

接近蛋白真实状态的构象，为后续蛋白的设计和改造奠定基础。

表1 材料蛋白的重复单元

Tab. 1 The repetitive units of material proteins

材料蛋白	重复单元
蛛丝蛋白	poly-Ala, Gly-Gly-X, Gly-Pro-Gly-Gln-Gln
胶原蛋白	Gly-X-Y
蚕丝蛋白	Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Se
弹性蛋白	Val-Pro-Gly-X-Gly

基因核心序列的高度重复导致全长基因获取难度加大，高重复序列的结构也为后续的蛋白表达带来非常大的挑战^[21-22]。以蛛丝蛋白为例，目前已经表征了蛛丝蛋白在合成过程中蜘蛛腺体环境的变化，在此基础上提出了成丝机理的假设模型，为蛛丝蛋白的人工合成奠定了理论基础^[23-24]。研究发现，富含丙氨酸的 $[A_n/(GA)_m]$ 的重复序列主要形成 β -折叠片层，作为蜘蛛丝结晶区的一部分，为蜘蛛丝提供足够的强度^[25]。富含GPGXX（X通常代表Gln）的五肽基序可形成 β -转角结构，类似于弹簧，赋予蜘蛛丝足够的弹性^[26]。GGX基序和Spacer基序的重复序列也为蜘蛛丝提供了一定的弹性性能^[27-28]。N端和C端的非重复序列也高度保守，涉及蛛丝蛋白的组装和加工，如C端形成的 α -螺旋结构在丝纤维的组装过程中发挥重要作用^[29-30]。这些序列结构和功能之间的联系是人工合成蛛丝蛋白的重要依据。Prince等^[31]设计合成了来源于*Nephila clavipes*蜘蛛的主壶腹腺丝蛋白1（MaSp1）中典型的富含丙氨酸的[SGRGGLGGQGAGA-AAAAAAAAAGGAGQGGYGG LGSQGT]（SPI）序列，以及主壶腹腺丝蛋白2（MaSp2）中的[SGP-GGYGPGQQT]（SPII）序列，这些序列在大肠杆菌中加倍或组合表达，产生的一系列不同分子量聚合物均含有 β -折叠结构。Kaplan等^[32]通过对蛛丝蛋白序列的修饰，控制其产物自组装能力，提高蛋白的可溶性。在蛛丝蛋白形成 β -折叠结构的区域两侧加入蛋氨酸，形成类似氧化还原触发器的装置，根据蛋氨酸被氧化还原程度改变 β -结构和增加蛋白的溶解度。另外，虽然蜘蛛丝的拉伸强度和韧性与其分子量保持着正相关，但是目前最大的挑战仍是如何制造出足够大的蛋白质。Bowen等^[33]向丝DNA中添加了一个短的基因序列，该基因序列促进

产生蛋白质之间的化学反应，将它们融合在一起合成一个556kDa的蛛丝蛋白，首次实现了这种丝在拉伸强度、韧性等方面可比拟天然蜘蛛丝的性能。

2.2 蛋白质功能材料的设计与改造

蛋白质功能材料不仅需要提供结构支持作用，也需要考虑应用环境的温度、pH、黏附、增殖、降解等因素。类弹性蛋白多肽（elastin-like polypeptide, ELP）是由五肽重复序列Val-Pro-Gly-X-Gly组成的具有显著弹性和自组装特性的一类功能性材料，并且具有独特的低温临界溶液温度，在一定温度范围内可以表现可逆相转变特性，因此具有重要的应用前景。研究发现ELPs的临界温度参数受到氨基酸序列、链长、缓冲液浓度和多肽浓度等影响^[34]。Chilkoti等^[35]利用重组DNA技术改变氨基酸残基和链长，精确地调整了ELP临界温度，并且提出的模型能够在一定分子量和链长范围内预测ELP的临界温度。基于ELP的温敏特性，只需通过调节其氨基酸序列和重复单元，便能够精确控制其对不同环境条件的响应敏感性，以实现可逆的溶解转变。Conticello等^[36]已开发出不同类型的基于BAB弹性蛋白的三嵌段蛋白聚合物，其中B嵌段为疏水的五肽序列[(V/I)PAVG]，控制着ELP临界温度，A嵌段为亲水五肽序列[VPXYG]，研究发现X和Y分别为甘氨酸和谷氨酸时，该聚合物表现出更低的临界溶液温度，而当X位置的甘氨酸被丙氨酸替换时，该聚合物的机械性能可以从弹性变为塑性。这种热塑性水凝胶的独特性使其在组织工程、药物传递系统等方面应用潜力巨大。

蛋白质材料的功能特性也可以在分子水平上通过设计功能肽与目标蛋白的融合来实现。自组装多肽RADA-16（RADARADARADARADA）能够迅速自组装成网状纳米纤维屏障，起到快速止血的效果，李宏民等^[37]将多肽RADA-16与类弹性蛋白序列融合并在大肠杆菌中诱导表达，最终获得的融合蛋白具有良好的止血效果。RGD（Arg-Gly-Asp）肽是许多细胞表面整合素的特异性配体，也是应用非常广泛和有效的一种促黏附多肽^[38]。Du等^[39]在设计类人胶原蛋白时引入较多亲水性氨基酸并将来源于T4噬菌体纤维蛋白的

foldon 区域和 RGD 序列整合到该类人胶原蛋白序列中, 获得的重组蛋白具有亲水性、热稳定性以及对促小鼠的成纤维细胞生长的作用。Li 等^[40] 将类弹性蛋白分别与 RGD、MMP (金属蛋白酶敏感域) 和 HBD (肝素结合域) 片段融合, 为以类弹性蛋白为基础材料的水凝胶提供更加丰富的生物性能。来源于化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的一类高产 Scl2 胶原蛋白也得到了广泛的关注, 基于不同的功能应用, 通过人工设计与改造实现了特定的生物学功能。例如 Seo 等^[41] 将整联蛋白结合序列 (GFPGER) 插入到重组 Scl2 胶原蛋白中, 该改性胶原蛋白具有促进成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞黏附性能。Stoichevska 等^[42] 通过在 Scl2 系列蛋白后面引入酪氨酸 (Tyr) 和半胱氨酸残基 (Cys), 这些残基可以通过氧化实现交联, 以获得更稳定的胶原聚合体。金玲玲^[43] 将不同数量的 RGD 序列和整联蛋白结合序列 (GFPGER) 引入 Scl2 胶原蛋白骨架上, 改造后的 Scl2 的蛋白能够促进小鼠成纤维细胞的贴壁生长。

随着对序列-结构的深入挖掘和理解, 我们逐步探讨了蛋白质的结构-功能之间的内在关系, 这将促进人工设计越来越接近于自然功能的生物大分子, 为研发制造更多基于蛋白质的多功能新型材料奠定基础, 也是我国高端制造业的战略需要。

3 蛋白质功能材料细胞工厂构建与适配调控

蛋白质的表达是一个复杂而精密的动态过程, 任何环节的差错都会对底盘细胞的自身代谢产生干扰, 造成能量、物质的不平衡, 从而影响目标蛋白的高效表达。随着基因编辑技术和合成生物学的快速发展, 对蛋白质功能材料的合成途径与底盘细胞之间的适配性进行优化, 完善基因表达、蛋白质分泌和胞外自组装过程, 将会改善材料表达率低、适配性差、结构及功效不稳定等问题, 从而大幅提高蛋白质功能材料的合成效率 (图 1)。

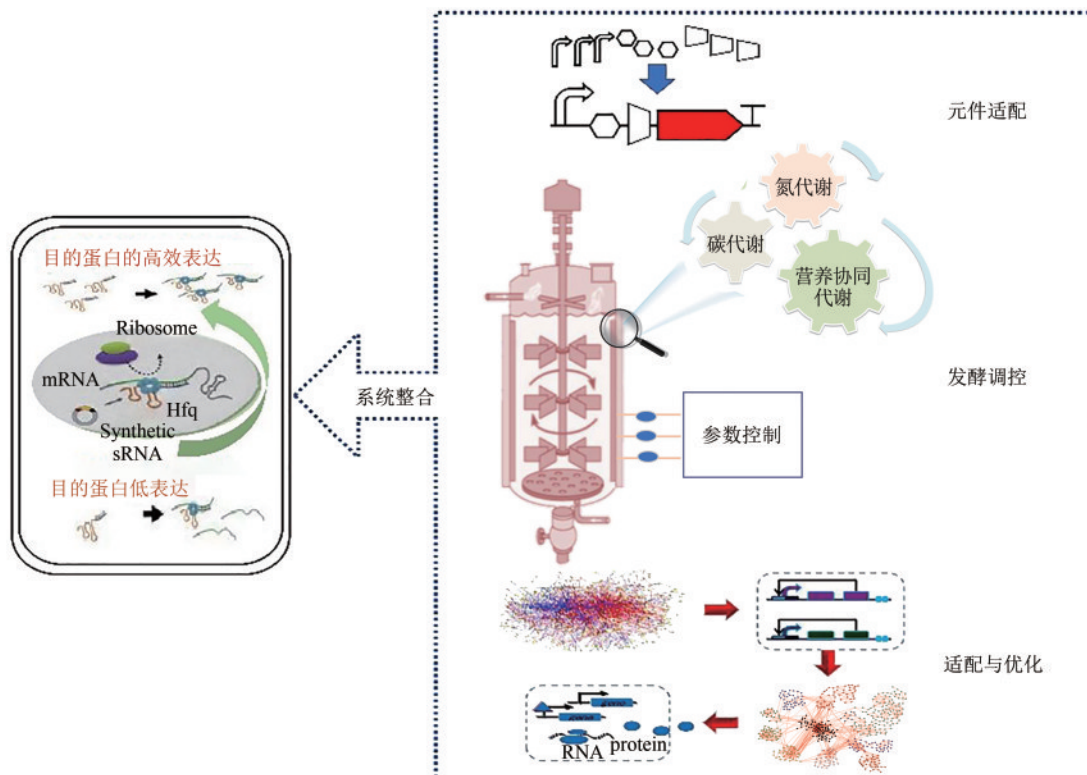


图1 材料蛋白的高效表达策略

Fig. 1 High-efficiency expression strategy of material proteins

3.1 目的蛋白的表达与修饰

针对功能材料蛋白表达元件的设计, 结合材料蛋白结构的不同, 可构建高效的生物元件库, 确保基因在转录和翻译过程中的稳定和高效。Fahnestock等^[44]发现重组蛛丝蛋白在大肠杆菌中表达, 蛋白产率随其分子量的增加而降低, 通过密码子优化可以改善重组蛋白的产量和均一性。Tian等^[45]利用融合标签技术, 以谷胱甘肽巯基转移酶(GST)为标签有效提高了蚕丝蛋白重链在大肠杆菌中的表达量。Bowen等^[46]通过优化5' UTR、RBS、终止子等表达元件, 并设计断裂蛋白质内含子(SI)序列构建了SI-Bricks系统, 可以触发蛋白质之间融合形成更大的蛋白质, 最终成功表达出556 kDa的丝蛋白链, 分子质量几乎是天然丝蛋白的两倍。其他促进转录、翻译、折叠和分泌等过程中基因稳定和高效表达的元件库也可以为功能材料蛋白的高效表达提供借鉴意义。

针对功能材料蛋白中特定氨基酸的表达, 例如蛛丝蛋白和胶原蛋白中的Gly、蚕丝蛋白中Gly和Ala, 这些特定氨基酸含量很高, 而影响蛋白的正常表达, 通过调控蛋白翻译过程中相关氨基酸tRNA供应状况, 为目标蛋白翻译提供充足原料。Xiao等^[47]基于重组蛛丝蛋白编码基因的特点, 通过扩增关键氨基酸tRNA池的方法, 优化大肠杆菌代谢途径, 最终成功得到284.9 kDa的蛛丝蛋白重复单元嵌合体。这些功能材料中还有特定氨基酸需要特殊修饰, 例如将胶原蛋白的脯氨酸催化为羟基脯氨酸的脯氨酸-4-羟化酶对胶原蛋白三螺旋的形成与稳定起重要作用, 是胶原蛋白合成过程中的关键酶。本文作者团队将来源于人脯氨酸-4-羟化酶与天然胶原蛋白 $\alpha 1$ 链在毕赤酵母和大肠杆菌中进行共表达, 可以成功实现胶原蛋白的羟基化^[48-49], 经大规模诱导表达, 胶原蛋白表达量最高可达4.71g/L的浓度^[49-50]。Cha等^[51]在大肠杆菌中利用非天然氨基酸掺入策略, 使酪氨酸残基的取代率达到90%以上, 实现了贻贝蛋白中多巴胺的掺入, 使重组贻贝黏附蛋白性能接近天然贻贝蛋白, 表现出优异的表面黏附性和耐水性。

3.2 发酵过程的调控与分离纯化

针对功能材料蛋白在翻译和发酵调控中的优化, Jia等利用伴侣蛋白GroEL-GroES和TF来促进类人胶原蛋白的表达^[52-53]。Sun等^[54]开发了胶原蛋白-mRNA平台, 用于蛋白质的可控生产。通过设计胶原蛋白基因将半胱氨酸序列插入到胶原蛋白链中, 使其具有有效的核糖体翻译活性。Xue等^[55]采用二氧化碳脉冲法首次研究了重组*E.coli*不同生长阶段二氧化碳浓度对重组蛋白生产的影响。针对高密度发酵时乙酸持续积累引起目标蛋白表达受阻, 利用脉冲补料方式控制细胞处于一定的饥饿阶段, 使细胞在葡萄糖存在的情况下利用乙酸作为碳源, 减小乙酸对细胞的毒性^[56]; Chi等^[57]采用遗传算法及人工神经网络模型, 建立了重组胶原高密度发酵的温度诱导调控策略; Guo等^[58]利用代谢流分析研究了C/N比对*Escherichia coli* BL21高效表达类人胶原蛋白II的影响, 从而确立了类人胶原蛋白高效表达的合理C/N比。

针对功能材料蛋白的分离纯化问题, 由于蛋白质氨基酸序列高度重复的特征, 表达的蛋白质中存在不同截短形式多肽, 这些多肽的性质与全长蛋白的化学性质非常相似, 很难从全长蛋白中分离出来, 因此蛋白质分泌系统的设计也需要改进, 例如用修饰的肠沙门氏菌的III型分泌系统表达这些特殊的蛋白质, 上调肠链球菌中III型分泌相关基因提高几种重组生物聚合物形成蛋白的分泌和纯度, 全长形式蛋白(包括节肢弹性蛋白、弹性蛋白和丝蛋白等)均一性显著增强, 改造之后的细胞分泌系统, 不分泌截短的蛋白质, 因此在培养物收获过程中没有发现, 这也为全长形式的生物大分子的纯化提供了极大便利^[59]。

3.3 细胞工厂的重构与优化

针对底盘细胞的构建与优化, 近年来研究者们通过系统生物学方法, 在基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学研究的基础上, 构建基因组规模代谢模型(genome-scale metabolic model, GSMM)^[60-62], 可以全局化、系统性地掌握底盘细胞的代谢及生理特性, 预测底盘细胞在特定环境中的表型, 从而合理设计代谢途径, 大大提高蛋白合

成效率。华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 Ye 等^[63]对已有毕赤酵母 GSMM 模型进行改进,得到包含 2407 个反应和 1094 个代谢物的 iRY1243 模型,探讨了细胞生长参数、以葡萄糖为唯一碳源的代谢通量分布等对毕赤酵母表达重组蛋白的影响。南京农业大学 Pan 等^[64]通过融合 PCR 将 Cre/lox 系统、筛选标记 Zeocin 以及同源臂成功拼接,建立了酵母基因组快速编辑方法,并且无需引入选择标记。中国科学院微生物研究所 Zhang 等^[65-66]建立了一个新的谷氨酸棒杆菌的基因组规模代谢网络模型 iCW773,在这一 GSMM 模型的指导下,通过敲除 *sucCD* 基因编码的琥珀酰辅酶 A 合成酶 (SUCOAS),在不影响谷氨酸棒杆菌生长速率的条件下将反式-4-羟基-L-脯氨酸的产率提高了 60%。为了使外源蛋白质的产量最大化, Zhao 等^[67]建立了一个包括 9 株枯草芽孢杆菌突变株的细胞表达系统,以改善枯草芽孢杆菌中外源蛋白的分泌。随着基因编辑技术和合成生物学的快速发展,CRISPR/Cas9 技术被应用在蛋白细胞工厂的构建当中,实现了高效、精准的基因编辑,避免了基因编辑对底盘细胞自身代谢造成干扰^[68]。美国犹他州立大学和苏州大学合作利用 CRISPR/Cas9 技术成功将蜘蛛丝基因(长达 10 kb)定点导入家蚕基因组并进行编辑,在家蚕丝腺中表达蛛丝蛋白,该蛛丝蛋白具有与天然蜘蛛丝几乎相同的机械性能^[69]。此外,日本神户大学的 Nishida 等^[70]将 CRISPR/Cas9 与激活诱导胞苷脱氨酶 (AID) 结合,有效降低 CRISPR/Cas9 技术造成的对啤酒酵母的细胞毒性,提高了这一技术在重组蛋白生产中的应用潜力。

4 蛋白材料装配加工及应用

蛋白质功能材料的后加工是实现其在生物医学等领域实际应用的关键步骤。近年来研究者们将光刻、3D 打印等微纳制造技术应用在了蛋白质功能材料的后加工中,制备出具有复杂三维结构的组织工程支架、微光学器件等功能性生物材料。上海微系统与信息技术研究所^[71-72]采用电子束和聚焦离子束复合光刻的方法,构建了形貌和功能可调的重组蛛丝蛋白积木,这种蛋白积木可以用

于组装更为复杂的三维生物结构。与天然蛛丝蛋白相比,重组蛛丝对蛋白质序列和分子量的精确控制赋予了蛋白积木前所未有的光刻分辨率、清晰度和生物功能。德国维尔茨堡大学的 Schacht 等^[73]将重组蛛丝蛋白制成“生物墨水”,通过 3D 打印的方式构建了具有高深宽比微纳结构的多孔生物支架,由于重组蛛丝蛋白的剪切稀释性和通过 β -折叠结构、疏水作用等形成的自成胶性,打印后无需额外添加交联剂即可形成稳定结构,此过程条件温和,可将活细胞与蛛丝蛋白混合打印,形成三维层次微组织结构。

4.1 贻贝蛋白的加工及应用

贻贝蛋白具有超强的黏性、柔韧性、防水性、生物降解和生物安全性,能够在湿性条件下黏附于各种材料表面^[74]。重组贻贝蛋白能够通过旋涂、浸涂等方法在医用材料表面形成涂层,改善细胞的黏附、增殖和分化等行为,还能作为介质材料将生物分子如细胞微环境因子、核酸、治疗药物、无机纳米粒子等固定在靶表面上^[75]。多项研究显示,整合贻贝蛋白和精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸细胞黏附三肽 (RGD) 的重组蛋白 (rMAP-RGD) 表面修饰能够改善钛植入材料及 PLGA/PCL、PCL 聚合物组织工程支架表面的细胞黏附、细胞分化及组织形成^[76-78]。Jo 等^[79]通过基因工程方法制备出贻贝蛋白-二氧化硅沉淀 R5 肽 (R5-MAP) 融合蛋白,可在温和条件下通过多层组装的方式将二氧化硅纳米微球修饰在医用钛植入材料表面调控其粗糙程度,有效促进了颅骨缺损部位的骨组织生长,同时提高了医用植入设备的稳定性和使用寿命。此外,天津大学 Qi 等^[12-13]在大肠杆菌中成功构建了贻贝蛋白-两性离子多肽融合蛋白,开发出一种通用的生物惰性表面涂层,该涂层可牢固地锚定在金属、塑料和矿物表面,具有高防污性能。

4.2 弹性蛋白的加工及应用

受到天然弹性蛋白结构的启发,研究者们利用重组蛋白技术制备了具有温度响应特性的弹性蛋白样多肽 (elastin-like polypeptide, ELP),在临界温度 (T_c) 以下,高分子链以无序、随机的水合形式

存在；当温度升高至 T_i 以上时，聚（GVGVP）序列产生疏水性折叠，形成 β -螺旋结构从而引起相分离。这种“逆温度转变”（inverse temperature transition, ITT）使得 ELP 能够在水溶液中发生自组装，形成水凝胶或者纳米凝胶，实现药物递送^[80]。Wang 等^[81] 针对泪蛋白在治疗干眼症时易被眼泪清除的问题，制备了泪蛋白-ELP 融合蛋白，在体研究显示，这一融合蛋白能够在泪腺中自组装形成“药品仓库”，将药品在患处的滞留时间提高了 6 倍。此外，重组蛋白技术制备的两亲 ELP 和含有亮氨酸拉链结构的 ELP 融合蛋白，能够在水中自组装形成微球、囊泡等结构，还可以进一步通过富含谷氨酸的亮氨酸拉链（ Z_E ）和富含精氨酸的亮氨酸拉链（ Z_R ）之间的相互作用，形成超分子结构，在蛋白质药物递送中具有较高的应用价值^[82-83]。

4.3 胶原蛋白的加工及应用

本文作者团队^[84] 将重组胶原蛋白与壳聚糖、透明质酸通过分子间自组装形成新型可注射 pH/温度敏感型的水凝胶，用于皮下填充及疤痕修复，能够快速促进疤痕修复，将重组胶原蛋白与不同分子量的普鲁兰多糖交联，获得抗降解能力的水凝胶，用于皮肤组织、软骨修复，使水凝胶的降解速度与组织的生成速度相匹配^[85]；Song 等^[86] 以谷氨酰胺转氨酶作为交联剂，牛血清白蛋白和氯化钠作为致孔剂，通过生物交联和热致相分离/冷冻干燥致孔技术，将重组胶原加工制备成具有三维多孔结构、用于软骨缺损修复和再生的水凝胶支架，能够快速促进软骨修复；Pan 等^[87] 利用重组胶原蛋白与聚乙烯醇、羧甲基壳聚糖等多糖通过非共价相互作用，获得保水性良好、透气、阻菌、止血的多孔水凝胶皮肤敷料，促进皮肤伤口快速愈合；Zhu 等^[88-90] 利用重组胶原共混多糖类大分子及静电纺丝技术制备出生物相容性及力学性能良好的顺序多层血管支架。血管内皮细胞种植于血管支架，15 天就可以在材料表面形成致密的单层细胞，该血管支架材料生物学相容性优良；范代娣等^[91] 以重组胶原为基础原料，通过添加不同比例的小分子壳聚糖获得了具有不同降解速度的植入型系列止血材料。与目前临床使用的植入型止血材料相比，该止血材料止血迅

速且生物相容性好。

5 总结和展望

随着现代工程技术的快速发展，人们对功能材料提出了更高的要求，也推动了蛋白质功能材料向高性能化、功能化和生物化方向的发展。蛋白质经过自然界进化，物种已经发展出将这些序列保存在基因组中的方法，但是当研究人员尝试将这类 DNA 序列放入其他生物体时，基因表现非常不稳定，经常被宿主细胞机械剪断或改变，导致其生产能力和产品质量远不能满足市场需求，因此国内外成功产业化的案例极少。合成生物学具有可利用再生资源、低污染、易控制、可对生物大分子进行定向设计的优点，伴随着蛋白质功能材料的功能原理及新颖设计理念被逐步挖掘和解析，已经发展出在特定条件下性能优异的替代材料，已有报道证实了这类蛋白质功能材料在癌症诊断与治疗^[92-93]、再生医学^[94-96]、基因传递系统^[97-98]、数据存储^[99-100] 等领域具有巨大的应用价值。

虽然基于特定需求开发出了许多具有多功能的蛋白质功能材料，拓宽了蛋白质功能材料的潜在应用范围，但是这些材料大多还处于实验阶段，尚未投入到真正的产业应用中。为解决这一挑战，我们需要从生物学和材料学等不同角度入手开展研究。一方面，生物系统是经过亿万年自然选择压力下形成的高度动态、灵活控制、非线性的复杂天然生物，通过设计、构建和调试优化突破自然进化的限制，使细胞工厂功能日益强大，实现人工设计指导下材料蛋白的定量可控表达与规模化生产。另一方面，针对人类需求的多元化，功能材料的发展也朝着动态可调控、高效多功能的方向发展，通过对材料性能机理的深入研究与解析，指导设计具有优异性能的蛋白质功能材料，为其成功迈入应用的大门提供可能。在充分认识合成生物学在蛋白质功能材料领域中的重要作用的同时，我们还需要考虑如何充分结合现有技术，为蛋白质功能材料应用于生物医药、能源环境、国防军事等领域提供全新的发展思路。

参 考 文 献

- [1] VERT M, DOI Y, HELLWICH K H, et al. Terminology for bio-related polymers and applications[J]. *Pure & Applied Chemistry*, 2014, 84(2):377-410.
- [2] BLUME J, SCHWOTZER W. Medical products and their application range[M]. Berlin: Springer-verlag, 2010:213-224.
- [3] WANG X, KIM H J, WONG C, et al. Fibrous proteins and tissue engineering[J]. *Materials Today*, 2006, 9(12):44-53.
- [4] GIROTTI A, FERNÁNDEZ C A, LÓPEZ I M, et al. Elastin-like recombinamers: biosynthetic strategies and biotechnological applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2011, 6(10):1174-1186.
- [5] YIGIT S, DINJASKI N, KAPLAN D L. Fibrous proteins: at the crossroads of genetic engineering and biotechnological applications[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2016, 113(5):913-929.
- [6] DESAI M S, LEE S W. Protein-based functional nanomaterial design for bioengineering applications[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 2015, 7(1):69-97.
- [7] JIA T J, WANG Y Y, DOU Y Y, et al. Moisture sensitive smart yarns and textiles from self-balanced silk fiber muscles[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(18). DOI: 10.1002/adfm.201808241.
- [8] HUANG W, LING S, LI C, et al. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(17):6486-6504.
- [9] ZHOU Z, SHI Z, CAI X, et al. The use of functionalized silk fibroin films as a platform for optical diffraction-based sensing applications[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(15). DOI: 10.1002/adma.201605471.
- [10] 宫永宽. 仿生胶粘剂研究发展前景诱人[J]. *粘接*, 2014, 11:87-91.
GONG Y K. Research development on biomimetic adhesives showing attractive prospects[J]. *Adhesion*, 2014, 11:87-91.
- [11] 刘加鹏. 海洋贻贝粘附蛋白新型生物粘合剂的研究[D]. 厦门:厦门大学, 2008.
LIU J P. Research on a novel bioadhesive made of marine mussel adhesive protein[D]. Xiamen: Xiamen University, 2008.
- [12] QI H, ZHENG W, ZHOU X, et al. A mussel-inspired chimeric protein as a novel facile antifouling coating[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54:11328-11331.
- [13] QI H, ZHENG W, ZHANG C, et al. A novel mussel-inspired universal surface functionalization strategy: protein-based coating with site-specific posttranslational modification *in vivo*[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(13):12846-12853.
- [14] KOEPEL A, HOLLAND C. Progress and trends in artificial silk spinning: a systematic review[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3(3):226-237.
- [15] MARLENE A, JAN J, ANNA R. Silk spinning in silkworms and spiders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8). DOI: 10.3390/ijms17081290.
- [16] RISING A, WIDHE M, JOHANSSON J, et al. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2011, 68(2):169-184.
- [17] HINMAN M B, JONES J A, LEWIS R V. Synthetic spider silk: a modular fiber[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(9):374-379.
- [18] JULIO B, OLSEN D, POLAREK J W. Recombinant microbial systems for the production of human collagen and gelatin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(3):245-252.
- [19] WANG J N, YAN S Q, LU C D, et al. Biosynthesis and characterization of typical fibroin crystalline polypeptides of silkworm *bombyx mori*[J]. *Materials Science & Engineering*, 2009, 29(4):1321-1325.
- [20] YAMAUCHI M, TAGA Y, HATTORI S, et al. Analysis of collagen and elastin cross-links[J]. *Methods in Cell Biology*, 2017, 143:115-132.
- [21] WEN R, WANG K, LIU X, et al. Molecular cloning and analysis of the full-length aciniform spidroin gene from *Araneus ventricosus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117:1352-1360.
- [22] WEN R, LIU X, MENG Q. Characterization of full-length tubuliform spidroin gene from *Araneus ventricosus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105(1):702-710.
- [23] SIMMONS A H, MICHAL C A, JELINSKI L W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk[J]. *Science*, 1996, 271(5245):84-87.
- [24] MEYERS M A, MCKITTRICK J, CHEN P Y. Structural biological materials: critical mechanics-materials connections[J]. *Science*, 2013, 339(6121):773-779.
- [25] SIMMONS A, RAY E, JELINSKI L W. Solid-state ¹³C NMR of nephila clavipes dragline silk establishes structure and identity of crystalline regions[J]. *Macromolecules*, 1994, 27(18):5235-5237.
- [26] CHANG D K, VENKATACHALAM C M, PRASAD K U, et al. Nuclear overhauser effect and computational characterization of the β -spiral of the polypeptide of elastin[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1989, 6(5):851-858.
- [27] VAN BEEK J D, HESS S, VOLLRATH F, et al. The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone.[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16):10266-10271.
- [28] HUEMMERICH D, HELSEN C W, QUEDZUWEIT S, et al. Primary structure elements of spider dragline silks and their

- contribution to protein solubility[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(42):13604-13612.
- [29] SPONNER A, UNGER E, GROSSE F, et al. Conserved C-Termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3):840-845.
- [30] JIN H J, KAPLAN D L. Mechanism of silk processing in insects and spiders[J]. *Nature*, 2003, 424(6952):1057-1061.
- [31] PRINCE J T, MCGRATH K P, DIGIROLAMO C M, et al. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(34):10879-10885.
- [32] SZELA S, AVTGES P, VALLUZZI R, et al. Reduction-oxidation control of β -sheet assembly in genetically engineered silk[J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(4):534-542.
- [33] BOWEN C H, BIN D, SARGENT C J, et al. Recombinant spidroins fully replicate primary mechanical properties of natural spider silk[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(9):3853-3860.
- [34] JONATHAN R M, CHRISTOPHER R, ASHUTOSH C. A unified model for *de novo* design of elastin-like polypeptides with tunable inverse transition temperatures[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(8):2866-2872.
- [35] MEYER D E, CHILKOTI A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3):846-851.
- [36] WRIGHT E R, CONTICELLO V P. Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(8):1057-1073.
- [37] YANG S, WEI S, MAO Y, et al. Novel hemostatic biomolecules based on elastin-like polypeptides and the self-assembling peptide RADA-16[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1):12-20.
- [38] HERSEL U, DAHMEN C, KESSLER H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(24):4385-4415.
- [39] DU C, WANG M, LIU J, et al. Improvement of thermostability of recombinant collagen-like protein by incorporating a foldon sequence[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(2): 195-202.
- [40] LI L, TONG Z, JIA X, et al. Resilin-like polypeptide hydrogels engineered for versatile biological function[J]. *Soft Matter*, 2012, 9(3):665-673.
- [41] SEO N, RUSSELL B H, RIVERA J J, et al. An engineered alpha1 integrin-binding collagenous sequence[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285:31046-31054.
- [42] STOICHEVSKA V, AN B, PENG Y Y, et al. Formation of multimers of bacterial collagens through introduction of specific sites for oxidative cross-linking[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, 104(9): 2369-2376.
- [43] 金玲玲. 含多种人工设计功能域胶原蛋白的高效制备及应用开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- JIN L L. Efficient expression and purification of designer collagens for biomedical applications[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [44] FAHNESTOCK S R, IRWIN S L. Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(1): 23-32.
- [45] TIAN Z F, ZHAO H R, YI H G, et al. Recombinant cloning of gene sequence encoding silk fibroin heavy chain[J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 796:83-86.
- [46] BOWEN C H, DAI B, SARGENT C J, et al. Recombinant spidroins fully replicate primary mechanical properties of natural spider silk[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(9): 3853-3860.
- [47] XIAO X, QIAN Z, CHANG S K, et al. 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.
- [48] SHI J J, MA X X, GAO Y, et al. Hydroxylation of human type III collagen alpha chain by recombinant coexpression with a viral prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*[J]. *Protein Journal*, 2017, 36(4):322-331.
- [49] HE J, MA X X, ZHANG F L, et al. New strategy for expression of recombinant hydroxylated human collagen $\alpha 1$ (III) chains in *Pichia pastoris* GS115[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2014, 62(3): 293-299.
- [50] 李伟娜, 尚子方, 段志广, 等. 毕赤酵母高密度发酵产III型类人胶原蛋白及其胃粘膜修复功能[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(4):672-682.
- LI W N, SHANG Z F, DUAN Z G, et al. Production of gastric-mucosa protective collagen III by *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(4): 672-682.
- [51] YANG B, AYYADURAI N, YUN H, et al. *In vivo* residue-specific dopa-incorporated engineered mussel bioglue with enhanced adhesion and water resistance[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(49):13360-13364.
- [52] JIA Q L, LUO Y E, FAN D D. Application of molecular chaperone to increase the expression of soluble human-like collagen in *Escherichia coli*[J]. *BioTechnology: An Indian Journal*, 2013, 7(12):531-536.
- [53] JIA Q, LUO Y E, FAN D D, et al. The different roles of chaperone teams on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, 45(6):2843-2850.
- [54] SUN L P, XIONG Y J, BASHAN A, et al. A recombinant collagen-mRNA platform for controllable protein synthesis[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16, 1415-1419.
- [55] XUE W J, FAN D D, SHANG L, et al. Production of biomass and recombinant human-like collagen in *Escherichia coli* pro-

- cesses with different CO₂ pulses[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(2):221-226.
- [56] XUE W, FAN D D, SHANG L, et al. Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(3):257-261.
- [57] CHI L, FAN D D, MA X X, et al. A genetic algorithm for the optimization of the thermoinduction protocol for high-level production of recombinant human-like collagen from *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2011, 58(3):175-184.
- [58] GUO J Q, LUO Y E, FAN D D, et al. Medium optimization based on the metabolic-flux spectrum of recombinant *Escherichia coli* for high expression of human-like collagen II[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2010, 57(2):55-62.
- [59] AZAM A, LI C, METCALF K J, et al. Type III secretion as a generalizable strategy for the production of full-length biopolymer-forming proteins[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2016, 113(11):2313-2320.
- [60] OTERO J M, NIELSEN J. *Industrial systems biology*[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 105(3):439-460.
- [61] ZACHARY A K, COLTON J L, ADAM M F, et al. Next-generation genome-scale models for metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 35:23-29.
- [62] 刘立明, 陈坚. 基因组规模代谢网络模型构建及其应用[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(9):1176-1186.
- LIU L M, CHEN J. Reconstruction and application of genome-scale metabolic network model[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(9):1176-1186.
- [63] YE R, HUANG M, LU H, et al. Comprehensive reconstruction and evaluation of *Pichia pastoris* genome-scale metabolic model that accounts for 1243 ORFs[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1):22-34.
- [64] PAN R, ZHANG J, SHEN W, et al. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette[J]. *FEMS Yeast Research*, 2011, 11(3):292-298.
- [65] ZHANG Y, CAI J, SHANG X, et al. A new genome-scale metabolic model of *Corynebacterium glutamicum* and its application[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10:169-185.
- [66] ZHANG Y, ZHANG Y, SHANG X, et al. Reconstruction of tricarboxylic acid cycle in *Corynebacterium glutamicum* with a genome-scale metabolic network model for trans-4-hydroxyproline production[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 116(1):99-109.
- [67] ZHAO L, YE B, ZHANG Q, et al. Construction of second generation protease-deficient hosts of *Bacillus subtilis* for secretion of foreign proteins[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(8): 2052-2060.
- [68] WENINGER A, HATZL A M, SCHMID C, et al. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 235:139-149.
- [69] ZHANG X L, XIA L J, DAY B A, et al. CRISPR/Cas9 initiated transgenic silkworms as a natural spinner of spider silk[J]. *Bio-macromolecules*, 2019, 20(6):2252-2264.
- [70] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems[J]. *Science*, 2016, 353(6305). DOI: 10.1126/science.aaf8729.
- [71] JIANG J, ZHANG S, QIAN Z, et al. Protein Bricks: 2D and 3D bio-nanostructures with shape and function on demand[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(20). DOI: 10.1002/adma.20170519.
- [72] LIU W P, ZHOU Z T, ZHANG S Q, et al. Precise protein photolithography (P-3): high performance biopatterning using silk fibroin light chain as the resist[J]. *Advanced Science*, 2017, 4(9):1700191-1700200.
- [73] SCHACHT K, JUNGST T, SCHWEINLIN M, et al. Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(9):2816-2820.
- [74] 吕亚维, 王睿劼, 张雨靖, 等. 重组贻贝黏蛋白Mgfp-5的表达及功能评价[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10):4108-4115.
- LV Y W, WANG R J, ZHANG Y J, et al. The expression and function evaluation of the recombinated mussel adhesive protein Mgfp-5[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(10): 4108-4115.
- [75] JO Y K, KIM H J, JEONG Y, et al. Biomimetic surface engineering of biomaterials by using recombinant mussel adhesive proteins[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2018, 5(9): 1800068-1800081.
- [76] JO Y K, CHOI B H, ZHOU C, et al. Bioengineered mussel glue incorporated with a cell recognition motif as an osteostimulating bone adhesive for titanium implants[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(41):8102-8114.
- [77] HONG J M, KIM B J, SHIM J H, et al. Enhancement of bone regeneration through facile surface functionalization of solid freeform fabrication-based three-dimensional scaffolds using mussel adhesive proteins[J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(7): 2578-2586.
- [78] KANG T Y, LEE J H, KIM B J, et al. *In vivo* endothelialization of tubular vascular grafts through in situ recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins[J]. *Biofabrication*, 2015, 7(1):015007-015018.
- [79] JO Y K, CHOI B H, KIM C S, et al. Diatom-inspired silica nanostructure coatings with controllable microroughness using an engineered mussel protein glue to accelerate bone growth on titanium-based implants[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(46):1704906-1704915.
- [80] RODRIGUEZ-CABELLO J C, ARIAS F J, RODRIGO M A,

- et al. Elastin-like polypeptides in drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97:85-100.
- [81] WANG W, JASHNANI A, ALURI S R, et al. A thermo-responsive protein treatment for dry eyes[J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 199:156-167.
- [82] MCDANIEL J R, BHATTACHARYYA J, VARGO K B, et al. Self-assembly of thermally responsive nanoparticles of a genetically encoded peptide polymer by drug conjugation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(6):1683-1687.
- [83] JANG Y, CHAMPION J A. Self-assembled materials made from functional recombinant proteins[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2016, 49(10):2188-2198.
- [84] LI X, FAN D D, ZHU C H, et al. Effects of self-assembled fibers on the synthesis, characteristics and biomedical applications of CCAG hydrogels[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(9):1234-1249.
- [85] LI X, XUE W J, LIU Y N, et al. A novel multifunctional materials PB hydrogels and PBH hydrogels as soft filler for tissue engineering[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3: 4742-4755.
- [86] SONG X, ZHU C H, FAN D D, et al. A novel human-like collagen hydrogel scaffold with porous structure and sponge-like properties[J]. *Polymer*, 2017, 9(12):638-654.
- [87] PAN H, FAN D D, CAO W, et al. Preparation and characterization of breathable hemostatic hydrogel dressings and determination of their effects on full-thickness defects[J]. *Polymers*, 2017, 9(12):727-755.
- [88] ZHU C H, FAN D D, WANG Y Y. Human-like collagen/hyaluronic acid 3D scaffolds for vascular tissue engineering[J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2014, 34:393-401.
- [89] CHEN L, ZHU C, FAN D D, et al. A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: *Electrospun mechanism* and biocompatibility[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 99A(3):395-409.
- [90] ZHU C, FAN D D, MA X, et al. Effects of chitosan on properties of novel human-like collagen/chitosan hybrid vascular scaffold[J]. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2009, 24(6):560-576.
- [91] 范代娣, 马晓轩, 米钰, 等. 一种可生物降解止血海绵材料及其制备方法[P]. 200610041913.3. 2006-08-23.
FAN D D, MA X X, MI Y, et al. A biodegradable hemostatic sponge material and its preparation method[P]. 200610041913.3. 2006-08-23.
- [92] JASTRZEBSKA K, KUCHARCZYK K, FLORCZAK A, et al. Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy[J]. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 2015, 20(2): 87-98.
- [93] ISHIIHARA J, ISHIIHARA A, SASAKI K, et al. Targeted anti-body and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(487): 3259-3270.
- [94] GOMES S, LEONOR I B, MANO J F, et al. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering[J]. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(1): 1-17.
- [95] WANG Y, WANG F, XU S, et al. Genetically engineered bifunctional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 86: 148-157.
- [96] WANG F, WANG Y, TIAN C, et al. Fabrication of the FGF1-functionalized sericin hydrogels with cell proliferation activity for biomedical application using genetically engineered *Bombyx mori* (*B. mori*) silk[J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 79: 239-252.
- [97] ZHANG W, CHEN L K, CHEN J L, et al. Silk fibroin biomaterial shows safe and effective wound healing in animal models and a randomized controlled clinical trial[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(10). DOI: 10.1002/adhm.201700121.
- [98] HE S, SHI D, HAN Z, et al. Heparinized silk fibroin hydrogels loading FGF1 promote the wound healing in rats with full-thickness skin excision[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2019, 18(1):97-108.
- [99] LEE W, ZHOU Z, CHEN X, et al. A rewritable optical storage medium of silk proteins using near-field nano-optics[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020. DOI: 10.1038/s41565-020-0755-9.
- [100] WANG C, XIA K, ZHANG Y, et al. Silk-based advanced materials for soft electronics[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(10): 2916-2927.



通讯作者：范代娣(1965—)，女，博士，教授，主要研究方向为可降解生物材料、预防医学和营养医学。
E-mail: fandaiddi@nwu.edu.cn



第一作者：王盼(1989—)，女，博士，讲师，主要研究方向为微生物酶学。
E-mail: panwanghxy@nwu.edu.cn