



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111132995 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880062422.8

(22)申请日 2018.09.26

(30)优先权数据

17193218.9 2017.09.26 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/076066 2018.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/063590 EN 2019.04.04

(71)申请人 斯柏博科技有限公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72)发明人 米·赫德哈马尔

林内亚·古斯塔夫松 罗尼·扬松

沃特·范德尔韦恩加德

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限公司 11021

代理人 张莹 王新华

(51)Int.Cl.

G07K 14/435(2006.01)

B82Y 40/00(2006.01)

B29C 33/42(2006.01)

B29C 39/02(2006.01)

B29C 39/10(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页

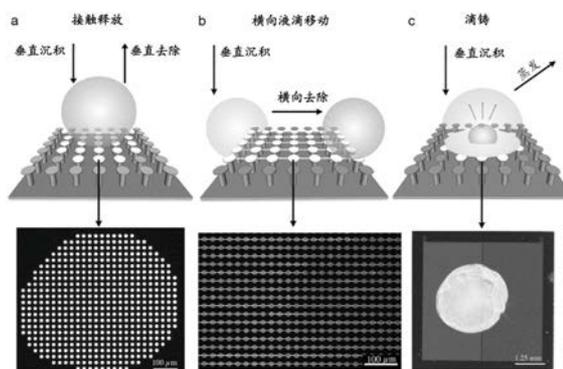
序列表9页 附图4页

## (54)发明名称

表面活性大分子的结构化

## (57)摘要

提供了一种用于生产表面活性大分子的成形聚合物特别是丝的方法。所述方法包括以下步骤：  
• a) 在表面上沉积所述表面活性大分子的水溶液，其中所述表面活性大分子的水溶液以液滴的形式沉积，并且其中所述表面是疏水性微图案表面，适于防止所述水溶液渗透入所述图案中并适于接收所述表面活性大分子的水溶液的液滴并保持其液滴状态；以及  
• b) 在所述表面上形成所述表面活性大分子的成形聚合物。



1. 一种用于生产丝蛋白的成形聚合物的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 在表面上沉积丝蛋白的水溶液,其中所述丝蛋白的水溶液以液滴的形式沉积,并且其中所述表面是疏水性微图案表面,适于防止所述水溶液渗透入所述图案中并适于接收所述丝蛋白的水溶液的液滴并保持其液滴状态,并且其中所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,所述表面与水的接触角为 $90^\circ$ 或更大;以及

b) 在所述表面上形成所述丝蛋白的成形聚合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述丝蛋白是蜘蛛丝蛋白。

3. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述丝蛋白进一步包含功能部分。

4. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中步骤a)的所述沉积通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向朝向所述表面的运动而实现。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中步骤a)的所述沉积通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而实现。

6. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中步骤b)的所述形成包括通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向远离所述表面的运动而从所述表面去除所述沉积的液滴。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述沉积的液滴通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而从所述表面被去除。

8. 根据权利要求6-7中任一项所述的方法,其中在已完成所述沉积步骤a)后30-240秒内,比如约60秒内,去除所述液滴。

9. 根据权利要求6-8中任一项所述的方法,其中步骤b)的所述形成不包括所述沉积的液滴在其去除之前在所述表面上的任何横向移动。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述丝蛋白的成形聚合物是涂层的形式,所述涂层具有 $1-100\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在超疏水性微图案表面的突出元件上。

11. 根据权利要求6-8中任一项所述的方法,其中步骤b)的所述形成包括在去除所述沉积的液滴之前使其在表面上横向移动。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中液滴移动速度(s)在 $0.1-10\text{mm s}^{-1}$ 的范围内,比如约 $5\text{mm s}^{-1}$ 。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述丝蛋白的成形聚合物是纳米线的形式,所述纳米线具有 $1-100\mu\text{m}$ 的长度,以及 $10-372.5\text{nm}$ 的厚度。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述纳米线的长度为 $10-100\text{nm}$ 。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中所述纳米线是无支撑纳米线。

16. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中步骤b)的所述形成包括以完好的状态蒸发在所述表面上的所述沉积的液滴。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述丝蛋白的成形聚合物是丝片的形式,所述丝片的厚度为 $1-10\mu\text{m}$ 。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述丝片是无支撑丝片。

19. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述超疏水性微图案表面与水的接触角为 $100^\circ$ 或更大,比如 $120^\circ$ 或更大,比如 $150^\circ$ 或更大。

20. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述疏水性微图案表面包括间隔开 $1-100\mu\text{m}$ 的距离i的突出元件,其中所述突出元件具有 $1-100\mu\text{m}$ 的最大横向延展d。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述突出元件具有1-50 $\mu\text{m}$ 的最大横向延展d,比如5-30 $\mu\text{m}$ 。

22. 根据权利要求20-21中任一项所述的方法,其中所述突出元件之间的间隔距离i为1-50 $\mu\text{m}$ ,比如5-30 $\mu\text{m}$ 。

23. 根据权利要求20-22中任一项所述的方法,其中所述突出元件为柱状,并且其中最大横向延展d是柱的最大直径。

24. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述疏水性微图案表面包含硅。

25. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述疏水性微图案表面包含疏水性涂层材料的外层。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述疏水性涂层材料是全氟碳化合物。

27. 根据任一项前述权利要求所述的方法,所述方法进一步包括以下步骤:

c) 从所述表面去除所述丝蛋白的成形聚合物。

28. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中所述丝蛋白的水溶液包含碳酸盐缓冲液。

29. 一种结构,所述结构具有适于接收丝蛋白的水溶液的液滴的表面,其中所述表面是疏水性的并且包含微结构的图案;其中所述表面适于防止水溶液渗透入图案中并适于保持其液滴状态,并且其中所述疏水性表面是超疏水性表面,所述表面与水的接触角为90°或更大;并且其中所述表面适于允许在其上形成丝蛋白的成形聚合物。

30. 根据权利要求29所述的结构,其中所述超疏水性表面与水的接触角为100°或更大,比如120°或更大、比如150°或更大。

31. 根据权利要求29-30中任一项所述的结构,其中所述疏水性微图案表面包括间隔开1-100 $\mu\text{m}$ 的距离i的突出元件,其中所述突出元件具有1-100 $\mu\text{m}$ 的最大横向延展d。

32. 根据权利要求31所述的结构,其中所述突出元件具有1-50 $\mu\text{m}$ 的最大横向延展d,比如5-30 $\mu\text{m}$ 。

33. 根据权利要求31-32中任一项所述的结构,其中所述突出元件之间的间隔距离i为1-50 $\mu\text{m}$ ,比如5-30 $\mu\text{m}$ 。

34. 根据权利要求31-33中任一项所述的结构,其中所述突出元件为柱状,其中最大横向延展d是柱的最大直径。

35. 根据权利要求29-34中任一项所述的结构,其中所述疏水性微图案表面包含硅。

36. 根据权利要求29-35中任一项所述的结构,其中所述疏水性微图案表面包含疏水性涂层材料的外层。

37. 根据权利要求36所述的结构,其中所述疏水性涂层材料是全氟碳化合物。

38. 根据权利要求29-37中任一项所述的结构,所述结构进一步包含在所述表面上的所述丝蛋白的成形聚合物。

39. 根据权利要求29-38中任一项所述的结构在生产由丝蛋白制成的成形聚合物中的用途。

40. 一种蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构选自以下组成的组:

(i) 涂层,所述涂层具有1-100 $\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在疏水性微图案表面的突出元件上,其中所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,所述表面与水的接触角为90°或更大;

(ii) 无支撑纳米线,所述无支撑纳米线具有1-100 $\mu\text{m}$ 的长度,以及10-372.5nm的厚度;  
和

(iii) 无支撑丝片,所述无支撑丝片具有1-10 $\mu\text{m}$ 的厚度。

41. 根据权利要求40所述的蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构是(i) 涂层,所述涂层具有5-30 $\mu\text{m}$ ,比如5-20 $\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在疏水性微图案表面的突出元件上,其中所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,所述表面与水的接触角为90°或更大。

42. 根据权利要求40或41所述的蜘蛛丝结构,其中所述涂层包含功能部分。

43. 根据权利要求40所述的蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构是(ii) 无支撑纳米线,所述无支撑纳米线具有5-30 $\mu\text{m}$ ,比如5-20 $\mu\text{m}$ 的长度,和/或10-372.5nm的厚度。

44. 根据权利要求43所述的蜘蛛丝结构,其中所述纳米线的厚度为10-100nm. 比如36-88nm。

45. 根据权利要求40或43-44所述的蜘蛛丝结构,其中所述无支撑纳米线包含功能部分。

46. 根据权利要求40所述的蜘蛛丝结构,其是(iii) 无支撑丝片,所述无支撑丝片的厚度为2-8 $\mu\text{m}$ ,比如3-5 $\mu\text{m}$ 。

47. 根据权利要求40或46所述的蜘蛛丝结构,其中所述无支撑丝片包含功能部分。

## 表面活性大分子的结构化

### 技术领域

[0001] 本发明涉及表面化学领域,并且更具体地涉及生产表面活性大分子的成形聚合物。本发明提供了生产表面活性大分子(比如丝蛋白)的成形聚合物的方法。

### 背景技术

[0002] 数百年来,人们一直大量使用蚕生产的丝。近年来,蜘蛛丝受到了越来越多的关注,这主要是由于其优越的机械强度(与Kevlar相当)、高弹性以及与蚕丝相仿、生物相容性。由于蜘蛛的掠食性使养殖蜘蛛不现实,因此只有在可获得产生仿丝蛋白的重组系统后,蜘蛛丝的产生才变得可行。在自然收获的基础上使用重组系统不仅在产量和可再生性方面具有优势,而且还因为它可以使丝功能化,即将生物活性域与丝部分共价连接。

[0003] 无论丝蛋白是使用重组系统产生还是直接从蚕中收获,它们都必须从可溶性蛋白转化为固体丝。蜘蛛使用的自然过程复杂,并且包括许多步骤,其中使用通过狭窄管道的拉伸流动将蛛丝蛋白转化为丝线,该狭窄管道增加剪切力结合离子交换、再水化和降低pH值。已尝试使用比如微流体系统、湿纺和电纺以模拟纺丝工艺。这些工艺中的许多工艺设计相当复杂,并且需要苛性化学物质(比如甲醇)使线在形成后不溶于水,这对于功能化的丝来说会杀灭其生物活性。

[0004] 蜘蛛和蚕通常产生线状(1D)的丝,而从蚕中收获或重组产生的蛛丝蛋白可以产生其他形状,比如薄膜(2D)、颗粒/微球(3D)、泡沫(3D)和凝胶(3D)。产生这些形状的许多方法均需要采用刺激性的化学物质。

[0005] Tsioris等人, *Mater. Res. Soc. Mater.* [材料研究科学进展] 1052:1-7 (2007) 描述了一种使用模压PDMS表面形成丝结构的方法,其中亲水性和疏水性受控。丝溶液均匀地沉积在表面上,并渗透入图案的亲水性通道中,并在其中进行模压。形成的丝结构的几何形状和尺寸取决于PDMS的模具。该技术的挑战是产生具有任何期望尺寸的丝结构,例如,由于PDMS模具对成形结构的铸造存在限制。Tsioris等人得出结论,成功的关键部分是填充通道的特征在于在PDMS压模的上表面上没有液体。

[0006] WO 2017/025964描述了合成牵引蜘蛛丝的制造。纤维被描述为纤维材料的细绳,该纤维材料由两个或更多个细丝缠绕在一起构成。因此,该结构具有相当大的复杂性,因为它包含以复杂方式布置的几根细丝。WO 2017/025964进一步推测构成纤维的这些细丝的不同尺寸,但是完全没有提及如何控制该尺寸。

[0007] Xu等人, *Polymer* [聚合物] 55 (7):1845-1853 (2014) 显示使用双重空气界面将蜘蛛丝薄膜浇铸在玻璃载玻片上。由Xu等人得到的薄膜尺寸只能由装在载玻片上的垫片的尺寸进行控制,这是有限制的。

[0008] Gomes等人, *Biomaterials* [生物材料] 32:4255-4266 (2011) 描述了通过将蜘蛛丝蛋白与抗菌肽融合以扩展其功能的方法。

[0009] 尽管在该领域取得了进步,但仍需要用于生产表面活性大分子(比如丝蛋白)的确定且可再生的微结构的方法。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是提供用于生产表面活性大分子(比如丝蛋白)的确定且可再生的微结构的方法。

[0011] 对于从以下披露内容将显而易见的这些目的和其他目的,根据第一方面,本发明提供了根据所附权利要求和分项实施方式以及如本文所示的生产表面活性大分子的成形聚合物的方法。

[0012] 该生产方法的优势在于它允许生产比如丝蛋白的具有良好确定形状和尺寸的微结构,这在现有技术方法中是不可能的。

[0013] 该生产方法在提供可再生性和控制微结构的形状和尺寸方面特别有优势。

[0014] 根据第二方面,本发明进一步提供了根据所附权利要求和分项实施方式以及如本文所示的蜘蛛丝结构。

[0015] 根据第三方面,本发明进一步提供了一种结构,该结构的表面适于接收根据所附权利要求和分项实施方式以及如本文所示的表面活性大分子的水溶液的液滴。

## 附图说明

[0016] 图1是代表性制备方法和结果的示意图。

[0017] 图2示出了使用接触释放法生成的局部Z-丝涂层的特征。

[0018] 图3示出了使用横向液滴移动方法形成Z-丝纳米线的结果。

[0019] 图4示出了滴铸丝片形成方案的结果。

[0020] 附加序列表

[0021] SEQ ID NO:

- |        |    |   |
|--------|----|---|
| [0022] | 1  | 非功能化蜘蛛丝(“4RepCT”)                                   |
| [0023] | 2  | Z功能化蜘蛛丝(“Z-4RepCT”)                                 |
| [0024] | 3  | FN <sub>cc</sub> 功能化蜘蛛丝(“FN <sub>cc</sub> -4RepCT”) |
| [0025] | 4  | CT  |
| [0026] | 5  | CT大腹园蛛(Araneus ventricosus) MiSp                    |
| [0027] | 6  | IKVAV   |
| [0028] | 7  | YIGSR   |
| [0029] | 8  | EPDIM   |
| [0030] | 9  | NKDIL   |
| [0031] | 10 | GRKRK   |
| [0032] | 11 | KYGAASIKVAVSADR                                     |
| [0033] | 12 | NGEPRGDTYRAY  |
| [0034] | 13 | PQVTRGDVFTM   |
| [0035] | 14 | AVTGRGDSPASS  |
| [0036] | 15 | TGRGDSPA  |
| [0037] | 16 | CTGRGDSPAC  |
| [0038] | 17 | FN <sub>cc</sub> 基序                                 |

## 具体实施方式

[0039] 本发明基于可溶性丝蛋白与疏水性微图案表面之间的相互作用可以产生多种丝形成的理解。疏水性微图案表面是几何图案化的疏水性表面。在保持功能化丝的生物活性的条件下,使用微图案化的疏水性表面可实现功能化丝蛋白的结构化。保留生物活性在许多应用中具有优势,并且由于该方法中不包括苛性化学物质和/或条件而是可能的。在本文提出的使用微结构产生图案化丝片的方法中,液体未渗透图案。

[0040] 通过将疏水性和图案表面特征与丝溶液处理参数结合,本发明允许可控且可再生地产生多种形状(包括涂层、纳米线和片)。通过将丝蛋白溶液的液滴短暂垂直沉积到表面的突出元件上并去除液滴,可以获得良好确定的涂层。纳米线通过使丝蛋白液滴在表面上横向滚动而获得。通过将一滴丝溶液垂直沉积在表面上,然后进行蒸发,可以获得粘合片。由于表面活性丝蛋白在受控界面上的有序排列而获得结构化。在我们的工作中形成的丝的全部侧面均与疏水性界面(包括空气)接触。因此,该方法应适用于允许组装成多聚体或聚合物的任何表面活性大分子。

[0041] 表面活性大分子是能够自定向以使亲水性区域暴露于极性环境而疏水性片段暴露于非极性相的大分子。这样将减小界面张力。有天然和合成表面活性聚合物。主链可以是亲水性或疏水性,具有连接的其他性质的侧链。可选地,这两种性质(疏水性和亲水性)可以分段交替。蛋白质可以通过具有交替性质的氨基酸的蛋白质链以获得表面活性,或者包含翻译后修饰(比如加入特定特征的磷酸基或碳水化合物残基)。表面活性大分子的非限制性实例包括丝蛋白(来自蜘蛛或蚕)、乳蛋白、肌肉蛋白(肌球蛋白)、疏水蛋白、黑革兰球蛋白、罗定蛋白(rodmins)、chaplins、聚阴离子脂多糖、壳聚糖衍生物和淀粉衍生物。

[0042] 根据本发明的第一方面,用于生产表面活性大分子的成形聚合物的方法包括以下步骤:

[0043] a) 在表面上沉积表面活性大分子的水溶液;以及

[0044] b) 在表面上形成表面活性大分子的成形聚合物;以及可选地

[0045] c) 从表面去除表面活性大分子的成形聚合物。

[0046] 在该方法中,表面活性大分子的水溶液以液滴的形式沉积。此外,所述表面是疏水性微图案表面,适于防止水溶液渗透入图案中并适于接收表面活性大分子的水溶液的液滴并适于保持其液滴状态。优选地,所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,其与水的接触角为 $90^\circ$ 或更大。

[0047] 在优选的实施方式中,其中表面活性大分子是蛋白。特别地,所述表面活性大分子可以是丝蛋白。

[0048] 在本发明的某些优选实施方式中,所述丝蛋白是丝素。丝素存在于由蜘蛛、蛾(比如蚕)和其他昆虫产生的丝中。优选的丝素来源于蚕(Bombyx)属,优选地来自于家蚕(Bombyx mori)。

[0049] 在本发明的某些优选实施方式中,所述丝蛋白是蜘蛛丝蛋白。在整个说明书中,术语“蛛丝蛋白(spidroin)”和“蜘蛛丝蛋白(spider silk protein)”可互换使用,并且包括所有已知的蜘蛛丝蛋白,包括主要的壶腹蜘蛛丝蛋白,其通常缩写为“MaSp”,在欧洲花园蛛(Araneus diadematus)的情况下缩写为“ADF”。这些主要的壶腹蜘蛛丝蛋白通常分为两种类型(1型和2型)。这些术语还包括与已知蜘蛛丝蛋白具有高度同一性和/或相似度的非天

然蛋白。

[0050] 在本发明的这些方面和其他方面的一些优选实施方式中,所述蜘蛛丝蛋白包含蛋白部分REP和CT或由它们组成,其中

[0051] REP是具有70至300个氨基酸残基的重复片段,选自由L (AG)<sub>n</sub>L、L (AG)<sub>n</sub>AL、L (GA)<sub>n</sub>L和L (GA)<sub>n</sub>GL组成的组,其中n是2至10的整数;每个单独的A段是具有8至18个氨基酸残基的氨基酸序列,其中0至3氨基酸残基不是Ala,其余的氨基酸残基是Ala;每个单独的G段是具有12至30个氨基酸残基的氨基酸序列,其中至少40%的氨基酸残基是Gly;每个单独的L段是0至30个氨基酸残基的接头氨基酸序列;并且CT是70至120个氨基酸残基的片段,与SEQ ID NO:4-5中的任一个具有至少70%的同一性。任选地,功能部分末端排列在蜘蛛丝蛋白的末端、或在部分之间、或在任一部分内,优选在蜘蛛丝蛋白的末端。

[0052] 所述蜘蛛丝蛋白通常包含140至2000个氨基酸残基,比如140至1000个氨基酸残基、比如140至600个氨基酸残基,优选140至500个氨基酸残基,比如140至400个氨基酸残基。小尺寸具有优势,因为包含蜘蛛丝蛋白片段的较长蛋白可以形成无定形聚集体,这需要使用苛性溶剂进行增溶和聚合。

[0053] 蜘蛛丝蛋白可以包含一个或多个接头肽或L段。所述接头肽可以排列在蜘蛛丝蛋白的任何部分之间,例如,在REP和CT部分之间、在蜘蛛丝蛋白的任一末端或在蛛丝蛋白片段与细胞结合基序之间。所述接头可以在蜘蛛丝蛋白的功能单元之间提供间隔区,但也可以构成用于鉴定和纯化蜘蛛丝蛋白的手柄,例如,His和/或Trx标签。如果蜘蛛丝蛋白包含两个或更多个用于鉴定和纯化蜘蛛丝蛋白的接头肽,则优选它们被间隔序列(例如,His<sub>6</sub>-间隔区-His<sub>6</sub>-)分离。所述接头还可以构成信号肽,比如信号识别颗粒,其将蜘蛛丝蛋白导向膜和/或引起蜘蛛丝蛋白从宿主细胞分泌至周围介质中。所述蜘蛛丝蛋白还可以在其氨基酸序列中包括切割位点,其允许切割和去除接头和/或其他相关部分。各种切割位点对于本领域技术人员是已知的,例如,化学试剂的切割位点,比如Met残基后的CNBr和Asn-Gly残基之间的羟胺,蛋白酶的切割位点,比如凝血酶或蛋白酶3C,和自剪接序列,比如内含子自剪接序列。

[0054] 蛋白质部分REP是具有重复特征的片段,在富含丙氨酸区段和富含甘氨酸区段之间交替。REP片段通常包含70个以上(比如140个以上),且小于300个、优选小于240个(比如200个以下)氨基酸残基,并且自身可以分为多个L(接头)段、A(富含丙氨酸)段和G(富含甘氨酸)段,下面将对此进行更详细的解释。通常,所述接头段是任选的,位于REP片段末端,而其余的片段依次是富含丙氨酸和富含甘氨酸的片段。因此,REP片段通常可以具有任一下结构,其中n是整数:

[0055] L (AG)<sub>n</sub>L,比如LA<sub>1</sub>G<sub>1</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>3</sub>G<sub>3</sub>A<sub>4</sub>G<sub>4</sub>A<sub>5</sub>G<sub>5</sub>L;

[0056] L (AG)<sub>n</sub>AL,比如LA<sub>1</sub>G<sub>1</sub>A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>A<sub>3</sub>G<sub>3</sub>A<sub>4</sub>G<sub>4</sub>A<sub>5</sub>G<sub>5</sub>A<sub>6</sub>L;

[0057] L (GA)<sub>n</sub>L,比如LG<sub>1</sub>A<sub>1</sub>G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>G<sub>4</sub>A<sub>4</sub>G<sub>5</sub>A<sub>5</sub>L;或者

[0058] L (GA)<sub>n</sub>GL,比如LG<sub>1</sub>A<sub>1</sub>G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>G<sub>4</sub>A<sub>4</sub>G<sub>5</sub>A<sub>5</sub>G<sub>6</sub>L。

[0059] 由此得出结论,富含丙氨酸段或富含甘氨酸段与N端或C端接头段相邻并非关键。n优选为2至10的整数、优选为2至8的整数、还优选为4至8的整数、更优选为4至6的整数,即n=4、n=5或n=6。

[0060] 在一些实施方式中,REP片段的丙氨酸含量高于20%、优选高于25%、更优选高于

30%，并且低于50%、优选低于40%、更优选低于35%。可以设想，较高的丙氨酸含量提供了更硬和/或更坚固和/或更少延伸性的纤维。

[0061] 在某些实施方式中，REP片段缺乏脯氨酸残基，即REP片段中没有Pro残基。

[0062] 目前转向构成REP片段的段，强调每个段是单独的，即特定REP片段的任两个A段、任两个G段或任两个L段可以是相同的或可以是不同的。因此，在特定的REP段内，每种类型的段均相同，这不是蛛丝蛋白的一般特征。相反，以下披露内容为技术人员提供了如何设计单独的段并将它们聚集到REP片段的指南，所述REP片段是可用于细胞支架材料的功能性蜘蛛丝蛋白的一部分。

[0063] 每个单独的A段是具有8至18个氨基酸残基的氨基酸序列。优选每个单独的A段包含13至15个氨基酸残基。还可能大多数或多于两个的A段包含13至15个氨基酸残基，而少数（比如一个或两个）A段包含8至18个氨基酸残基（比如8-12个或16-18个氨基酸残基）。这些氨基酸残基的绝大多数是丙氨酸残基。更具体地，0至3个氨基酸残基不是丙氨酸残基，而其余氨基酸残基是丙氨酸残基。因此，每个单独的A段中的所有氨基酸残基均是丙氨酸残基，没有例外或具有例外一个、两个或三个氨基酸残基可以是任何氨基酸。取代丙氨酸的氨基酸优选是天然氨基酸，优选单独选自自由丝氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的组，更优选是丝氨酸。当然，一个或多个A段可能是全丙氨酸段，而其余A段包含1-3个非丙氨酸残基，比如丝氨酸、谷氨酸、半胱氨酸或甘氨酸。

[0064] 在一个实施方式中，如上所述，每个A段包含13-15个氨基酸残基，包括10-15个丙氨酸残基和0-3个非丙氨酸残基。在一个更优选的实施方式中，如上所述，每个A段包含13-15个氨基酸残基，包括12-15个丙氨酸残基和0-1个非丙氨酸残基。不希望受任何特定理论的束缚，设想根据本发明的A段形成螺旋结构或 $\beta$ 折叠。

[0065] 此外，从实验数据已经得出结论，每个单独的G段是具有12至30个氨基酸残基的氨基酸序列。优选每个单独的G段由14至23个氨基酸残基组成。每个G段的至少40%的氨基酸残基是甘氨酸残基。通常，每个单独的G段的甘氨酸含量在40%-60%的范围内。

[0066] 在某些实施方式中，每个G段的前两个氨基酸残基不是-Gln-Gln-。

[0067] 每个单独的L段代表任选的接头氨基酸序列，其可以包含0至30个氨基酸残基，比如0至20个氨基酸残基。尽管该段是任选的，并且对于蜘蛛丝蛋白的功能不是关键的，但是其存在仍允许功能完整的蜘蛛丝蛋白及其聚合物形成纤维、薄膜、泡沫和其他结构。特别地，接头段的氨基酸序列可以类似于任何所述A段或G段，但是通常不足以满足其本文定义的标准。

[0068] 在REP片段的一个实施方式中，L段之一包含0个氨基酸，即L段之一空缺。在REP片段的另一个实施方式中，两个L段均包含0个氨基酸，即两个L段均空缺。因此，根据本发明的REP片段的这些实施方式可以如下示意性表示： $(AG)_nL$ 、 $(AG)_nAL$ 、 $(GA)_nL$ 、 $(GA)_nGL$ ； $L(AG)_n$ 、 $L(AG)_nA$ 、 $L(GA)_n$ 、 $L(GA)_nG$ ；和 $(AG)_n$ 、 $(AG)_nA$ 、 $(GA)_n$ 、 $(GA)_nG$ 。这些REP片段中的任一个均适用于以下定义的任一CT片段。

[0069] 细胞支架材料中蛛丝蛋白的CT片段与蜘蛛丝蛋白的C端氨基酸序列具有高度相似度。如WO 2007/078239中所示，该氨基酸序列在各种种属和蜘蛛丝蛋白（包括MaSp1、MaSp2和MiSp（较小的壶腹蛛丝蛋白））之间是非常保守的。

[0070] 在细胞支架材料的蜘蛛丝蛋白中存在何种特定的CT片段并非关键。代表性CT片段

是源自南方育儿网蛛 (*Euprosthenoops australis*) 的 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 166-263, 即 SEQ ID NO:4。另一代表性 CT 片段是 MiSp 序列 SEQ ID NO:5。因此, 在一个实施方式中, CT 片段与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 具有至少 70%, 比如至少 80%、比如至少 85%, 优选至少 90%, 比如至少 95% 的同一性。CT 片段可以与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 相同。

[0071] CT 片段通常由 70 至 120 个氨基酸残基组成。优选地, CT 片段包含至少 70 个或大于 80 个、优选大于 90 个氨基酸残基。还优选地, CT 片段包含最多 120 个或少于 110 个氨基酸残基。典型的 CT 片段包含约 100 个氨基酸残基。

[0072] 如本文所用, 术语“同一性% (%identity)”计算如下。使用 CLUSTALW 算法将查询序列与靶序列比对 (Thompson 等人, *Nucleic Acids Research* [核酸研究], 22:4673-4680 (1994))。在对应于最短比对序列的窗口进行比较。比较每个位置的氨基酸残基, 并将查询序列中与靶序列具有相同对应关系的位置百分比报告为同一性%。

[0073] 如本文所用, 术语“相似度% (%similarity)”是如上文针对“同一性%”所计算的, 除了疏水性残基 Ala、Val、Phe、Pro、Leu、Ile、Trp、Met 和 Cys 相似; 碱性残基 Lys、Arg 和 His 相似; 酸性残基 Glu 和 Asp 相似; 并且亲水性、不带电荷的残基 Gln、Asn、Ser、Thr 和 Tyr 相似。在该背景下其余的天然氨基酸 Gly 与任何其他氨基酸均不相似。

[0074] 在整个说明书中, 根据本发明的可选实施方式代替了指定的同一性百分比而实现了相应的相似度百分比。其他可选实施方式实现了指定的同一性百分比以及另一更高的相似度百分比, 其选自每个序列的优选同一性百分比。例如, 一个序列可能与另一个序列的相似度为 70%; 或其可能与另一个序列的同一性为 70%; 或其可能与另一个序列的同一性为 70% 和相似度为 90%。

[0075] 在根据本发明的优选的蜘蛛丝蛋白中, REP-CT 片段与 SEQ ID NO:1 具有至少 70%, 比如至少 80%、比如至少 85%, 优选至少 90%, 比如至少 95% 或甚至 100% 的同一性。

[0076] 所述丝蛋白有利地进一步包含功能部分。该功能部分可以是本文示例的蛋白部分或非蛋白部分。所述功能部分排列在丝蛋白末端或丝蛋白内, 优选在丝蛋白的 N 端或 C 端。

[0077] 各种生物活性蛋白和肽 (比如增强细胞在丝涂层上的细胞粘附和增殖的纤连蛋白肽基序) 和抗菌肽 Magainin I 均可引入所需的生物活性。在生物材料应用中, 包括功能部分的潜力至关重要, 以优化植入物在体内的接受度并解决感染问题, 这也给成功植入带来挑战。此外, 可以使用与具有折叠依赖性功能的蛋白质结构域形式的功能部分融合的丝蛋白来引入更高级的生物活性, 所述蛋白质结构域比如亲和力结构域 (例如, 结合 IgG 的 Z 结构域)、酶 (例如, 木聚糖酶) 或生长因子 (例如, 成纤维细胞生长因子, FGF)。

[0078] 蛛丝蛋白片段和功能部分彼此直接或间接连接。直接连接意味着部分之间的直接共价结合, 而没有间插序列 (比如接头)。间接连接还意味着这些部分通过共价键连接, 但是存在间插序列 (比如接头和/或一个或多个其他部分 (例如, 1 至 2 个 NT 部分))。

[0079] 功能部分可以排列在蜘蛛丝蛋白的内部或两端, 即排列在 C 端或排列在 N 端。优选地, 功能部分排列在蜘蛛丝蛋白的 N 端。如果蜘蛛丝蛋白包含一种或多种用于鉴定和纯化蜘蛛丝蛋白的接头肽, 例如, His 或 Trx 标签, 优选其排列在蜘蛛丝蛋白的 N 端。

[0080] 优选的蜘蛛丝蛋白具有 N 端排列的功能部分的形式, 其通过 0-30 个氨基酸残基 (比如 0-10 个氨基酸残基) 的接头肽与 REP 部分偶联。任选地, 蜘蛛丝蛋白具有 N 端或 C 端接头肽, 其可以包含纯化标签 (比如 His 标签) 和切割位点。

[0081] 丝蛋白任选地包含细胞结合基序(CBM)作为功能部分。任选的细胞结合基序排列在丝蛋白末端或丝蛋白内,优选在丝蛋白的N端或C端。

[0082] 在本发明的这些方面和其他方面的某些优选实施方式中,所述功能部分是选自以下的细胞结合基序:RGD、IKVAV(SEQ ID NO:6)、YIGSR(SEQ ID NO:7)、EPDIM(SEQ ID NO:8)、NKDIL(SEQ ID NO:9)、GRKRK(SEQ ID NO:10)、KYGAASIKVAVSADR(SEQ ID NO:11)、NGEPRGDTYRAY(SEQ ID NO:12)、PQVTRGDVFTM(SEQ ID NO:13)、AVTGRGDSPASS(SEQ ID NO:14)、TGRGDSPA(SEQ ID NO:15)、CTGRGDSPAC(SEQ ID NO:16)和FN<sub>cc</sub>(SEQ ID NO:17);以及优选地选自FN<sub>cc</sub>、GRKRK、IKVAV、RGD和CTGRGDSPAC,更优选地选自FN<sub>cc</sub>和CTGRGDSPAC;其中FN<sub>cc</sub>是C<sup>1</sup>X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>RGDX<sup>3</sup>X<sup>4</sup>X<sup>5</sup>C<sup>2</sup>;其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>和X<sup>5</sup>各自独立地选自除半胱氨酸以外的天然氨基酸残基;并且C<sup>1</sup>和C<sup>2</sup>通过二硫键连接。

[0083] FN<sub>cc</sub>的最常见形式是C<sup>1</sup>X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>RGDX<sup>3</sup>X<sup>4</sup>X<sup>5</sup>C<sup>2</sup>(SEQ ID NO:17);其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>和X<sup>5</sup>各自独立地选自除半胱氨酸以外的天然氨基酸残基;并且C<sup>1</sup>和C<sup>2</sup>通过二硫键连接。FN<sub>cc</sub>是一种修饰的细胞结合基序,其通过将半胱氨酸定位在与RGD序列相邻的精确位置来模拟纤连蛋白的α5β1特异性RGD环基序,从而形成二硫桥以将链限制成类型相似的回环。该环状RGD细胞结合基序提高了细胞对由包含细胞结合基序的蛋白质(比如重组产生的蜘蛛丝蛋白)制成的基质的粘附力。如本文所用,术语“环状(cyclic)”是指其中两个氨基酸残基经由其侧链,更具体地通过两个半胱氨酸残基之间的二硫键共价键合的肽。环状RGD细胞结合基序FN<sub>cc</sub>促进原代细胞的增殖和迁移。与包含线性RGD肽的相同材料相比,在包含环状RGD细胞结合基序的细胞支架材料上培养的人原代细胞显示出附着、扩散、应力纤维形成和焦点粘连增加。

[0084] 在FN<sub>cc</sub>的优选实施方式中,X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>和X<sup>5</sup>各自独立地选自由以下组成的氨基酸残基的组:G、A、V、S、T、D、E、M、P、N和Q。在FN<sub>cc</sub>的其他优选实施方式中,X<sup>1</sup>和X<sup>3</sup>各自独立地选自由以下组成的氨基酸残基的组:G、S、T、M、N和Q;并且X<sup>2</sup>、X<sup>4</sup>和X<sup>5</sup>各自独立地选自由以下组成的氨基酸残基的组:G、A、V、S、T、P、N和Q。在FN<sub>cc</sub>的某些优选实施方式中,X<sup>1</sup>选自由以下组成的氨基酸残基的组:G、S、T、N和Q;X<sup>3</sup>选自由以下组成的氨基酸残基的组:S、T和Q;并且X<sup>2</sup>、X<sup>4</sup>和X<sup>5</sup>各自独立地选自由以下组成的氨基酸残基的组:G、A、V、S、T、P和N。在FN<sub>cc</sub>的一些优选实施方式中,X<sup>1</sup>是S或T;X<sup>2</sup>是G、A或V;优选是G或A;更优选是G;X<sup>3</sup>是S或T;优选是S;X<sup>4</sup>是G、A、V或P;优选是G或P;更优选是P;并且X<sup>5</sup>是G、A或V;优选是G或A;更优选是A。

[0085] 在FN<sub>cc</sub>的某些优选实施方式中,所述细胞结合基序包含氨基酸序列CTGRGDSPAC(SEQ ID NO:16)。根据本发明的进一步优选的环状RGD细胞结合基序显示与CTGRGDSPAC(SEQ ID NO:16)至少60%(比如至少70%、比如至少80%、比如至少90%)的同一性,前提是位置1和10始终是C;位置4始终是R;位置5始终是G;位置6始终是D;以及位置2-3和位点7-9绝不是半胱氨酸。可以理解的是位置2-3和位置7-9之间的非同位位置可以如上所述自由选择。

[0086] 细胞结合基序的优选组是FN<sub>cc</sub>、GRKRK、IKVAV和RGD,特别是FN<sub>cc</sub>,比如CTGRGDSPAC。

[0087] 在优选的实施方式中,本发明利用在疏水性表面上的丝蛋白溶液产生三种不同形式的丝:局部涂层、局部定向线阵列、和自由丝片(即无支撑丝片)。在一个优选的实施方式中,丝形式是无支撑纳米线。无支撑表示该结构的产生未附于任何支撑结构。无支撑结构可以在未经苛性处理(例如,加热)的情况下去除,这将明显改变丝蛋白的二级结构。制备方法示意图和代表性结果如图1所示:

[0088] a) 在表面的突出元件上垂直沉积并立即去除丝溶液液滴,从而在突出元件的顶部形成局部的丝涂层;

[0089] b) 丝溶液液滴在突出元件上的横向滚动使得形成丝纳米线;以及

[0090] c) 丝溶液液滴垂直附着于突出元件,然后蒸发,从而形成丝片。

[0091] 使用我们的便捷方法生成这三种形式,具有在表面上的几种潜在应用:表面的突出元件上的局部微结构涂层可以用作小型化的微阵列,线可以用作光波导,片可以用于细胞培养;当从表面释放时:释放的(即无支撑的)涂层和丝可以用作生物医学应用的悬浮液,并且可以通过在片生成之前通过用不同的抗体预先图案化以扩展片的细胞生长应用,从而控制细胞的生长。

[0092] 除了提供了三种示例性技术及其相应的丝形式外,我们还研究了每种形式的生长参数。通过将处于CaSSie-Baxter状态的丝蛋白溶液液滴置于超疏水性表面上,促进了液体与固体和液体与空气界面处的丝-丝相互作用。因此,有可能在温和的条件下形成功能化的丝,产生具有保留生物活性的丝结构。在本文中,我们证明了两种不同功能的丝蛋白的原理;对抗体具有选择性亲和力的Z-丝适用于诊断应用,而具有细胞结合能力的FN<sub>cc</sub>-丝因此可用于细胞培养应用。

[0093] 在优选的实施方式中,疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,通过液滴形状分析测量其与水的接触角为90°或更大,比如100°或更大、比如120°或更大或者甚至150°或更大。超疏水性微图案表面是几何图案化的超疏水性表面。超疏水性表面是由于其表面结构而非润湿的表面。水不能渗透入这种结构中,因此丝蛋白会在疏水性表面、液体和周围空气之间的三点界面处组装。与表面接触的液体通常将具有大于90°(比如大于100°)的接触角。自然界中有许多此类表面的实例,最常见的是自洁荷叶。

[0094] 超疏水性图案有利地产生尺寸受控的单独纳米纤维素和纳米线。纳米纤维素和纳米线可以以无支撑纳米纤维素和纳米线产生。相似地,超疏水性表面、液体和空气之间的三点界面使丝能够组装成可移动的片。因此,片可以以无支撑片产生。

[0095] 在优选的实施方式中,疏水性微图案表面包括间隔开1-100μm的距离*i*的突出元件,其中所述突出元件具有1-100μm的最大横向延展*d*。优选地,所述突出元件具有1-50μm的最大横向延展*d*,比如5-30μm。优选地,所述突出元件之间的间隔距离*i*为1-50μm,比如5-30μm。

[0096] 在优选的实施方式中,所述突出元件为柱状,其中最大横向延展*d*是柱的最大直径。可以以多种方式制备柱状表面,例如,使用逐层和胶体组装、自组装、自然折叠以及光刻和蚀刻。根据该过程的完成方式,可以实现不同类型的柱状结构,例如:“T”形柱是直杆,“T”形柱被称为单凹入结构,而新罗马字体“T”形柱则被称为双凹入结构。这些中的前两个需要涂有疏水性材料(例如,C<sub>4</sub>F<sub>8</sub>)以变得具有超疏水性,而最后一个可以由亲水性材料(例如,SiO<sub>2</sub>)制成。

[0097] 多种材料可用于生产超疏水性表面,其范围从疏水性材料,例如但不限于氟化聚合物(聚四氟乙烯(Teflon))、硅酮(PDMS)、有机材料(聚乙烯、聚酰胺、聚碳酸酯)和无机材料(ZnO、TiO<sub>2</sub>)。但是,通过使柱正确结构化,还可以使用亲水性材料(比如SiO<sub>2</sub>)制成超疏水性表面。

[0098] 在某些实施方式中,疏水性微图案表面包含硅。在一个优选的实施方式中,疏水性

微图案表面由硅制成。

[0099] 在一些实施例中,疏水性微图案表面包含疏水性涂层材料(比如全氟碳化合物)的外层。

[0100] 在某些实施方式中,疏水性微图案表面包含超疏水性涂层材料的外层。

[0101] 根据第二方面,本发明提供了新型丝结构,优选蜘蛛丝结构:

[0102] (i) 涂层,其具有1-100 $\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在疏水性微图案表面的突出元件上。优选地,所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,其与水的接触角为90°或更大。优选地,所述涂层具有5-30 $\mu\text{m}$ (比如5-20 $\mu\text{m}$ )的横向延展。

[0103] (ii) 纳米线,其长度为1-100 $\mu\text{m}$ ,厚度为10-372.5nm,比如10-300nm、10-200nm、优选10-100nm。优选地,所述纳米线具有5-30 $\mu\text{m}$ (比如5-20 $\mu\text{m}$ )的长度、和/或36-88nm的厚度。优选地,所述纳米线是无支撑的。为避免疑问,纳米线是有序蛋白质的单丝,例如,丝蛋白。

[0104] (iii) 丝片,其厚度为1-10 $\mu\text{m}$ 。优选地,所述丝片的厚度为2-8 $\mu\text{m}$ ,比如3-5 $\mu\text{m}$ 。优选地,所述丝片是无支撑的。

[0105] 根据第三方面,本发明提供了一种结构,其具有适于接收表面活性大分子(比如丝蛋白)的水溶液的液滴的表面,其中所述表面是疏水性的并且包含微结构的图案;其中所述表面适于防止水溶液渗透入图案中并适于保持其液滴状态;并且其中所述表面适于允许在其上形成所述表面活性大分子的成形聚合物。优选地,所述疏水性表面是超疏水性表面,其与水的接触角为90°或更大。

[0106] 根据上文的详细描述,该结构及其表面的优选特征是显而易见的。该结构可用于生产由如上所述的表面活性大分子制成的成形聚合物。

[0107] 分项列出实施方式

[0108] 1. 一种用于生产表面活性大分子的成形聚合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0109] a) 在表面上沉积表面活性大分子的水溶液,其中所述表面活性大分子的水溶液以液滴的形式沉积,并且其中所述表面是疏水性微图案表面,适于防止所述水溶液渗透入所述图案中并适于接收所述表面活性大分子的水溶液的液滴并保持其液滴状态;以及

[0110] b) 在所述表面上形成所述表面活性大分子的成形聚合物。

[0111] 2. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述表面活性大分子是蛋白。

[0112] 3. 根据实施方式2的方法,其中所述表面活性大分子是丝蛋白,比如蜘蛛丝蛋白。

[0113] 4. 根据实施方式3的方法,其中所述丝蛋白进一步包含功能部分。

[0114] 5. 根据任一项前述实施方式的方法,其中步骤a)的所述沉积通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向朝向所述表面的运动而实现。

[0115] 6. 根据实施方式5的方法,其中步骤a)的所述沉积通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而实现。

[0116] 7. 根据任一项前述实施方式的方法,其中步骤b)的所述形成包括通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向远离所述表面的运动而从所述表面去除所述沉积的液滴。

[0117] 8. 根据实施方式7的方法,其中所述沉积的液滴通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而从所述表面被去除。

[0118] 9. 根据实施方式7-8中任一项的方法,其中在已完成所述沉积步骤a)后30-240秒内,比如约60秒内,去除所述液滴。

- [0119] 10. 根据实施方式7-9中任一项的方法,其中步骤b)的所述形成不包括所述沉积的液滴在其去除之前在所述表面上的任何横向移动。
- [0120] 11. 根据实施方式7-9中任一项的方法,其中步骤b)的所述形成包括在去除所述沉积的液滴之前使其在所述表面上横向移动。
- [0121] 12. 根据实施方式11的方法,其中液滴移动速度(s)在 $0.1-10\text{mm s}^{-1}$ 的范围内,比如约 $5\text{mm s}^{-1}$ 。
- [0122] 13. 根据实施方式1-6中任一项的方法,其中步骤b)的所述形成包括蒸发所述表面上的沉积液滴。
- [0123] 14. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述疏水性微图案表面是超疏水性微图案表面,所述表面与水的接触角为 $90^\circ$ 或更大。
- [0124] 15. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述疏水性微图案表面包括间隔开 $1-100\mu\text{m}$ 的距离*i*的突出元件,并且其中所述突出元件具有 $1-100\mu\text{m}$ 的最大横向延展*d*。
- [0125] 16. 根据实施方式15的方法,其中所述突出元件具有 $1-50\mu\text{m}$ 的最大横向延展*d*,比如 $5-30\mu\text{m}$ 。
- [0126] 17. 根据实施方式15-16中任一项的方法,其中所述突出元件之间的间隔距离*i*为 $1-50\mu\text{m}$ ,比如 $5-30\mu\text{m}$ 。
- [0127] 18. 根据实施方式15-17中任一项的方法,其中所述突出元件为柱状,其中所述最大横向延展*d*是柱的最大直径。
- [0128] 19. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述疏水性微图案表面包含硅。
- [0129] 20. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述疏水性微图案表面包含疏水性涂层材料的外层。
- [0130] 21. 根据实施方式20的方法,其中所述疏水性涂层材料是全氟碳化合物。
- [0131] 22. 根据任一项前述实施方式的方法,所述方法进一步包括以下步骤:
- [0132] c) 从所述表面去除所述表面活性大分子的成形聚合物。
- [0133] 23. 根据任一项前述实施方式的方法,其中所述表面活性大分子的水溶液包含碳酸盐缓冲剂。
- [0134] 24. 一种蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构选自由以下组成的组:
- [0135] (i) 涂层,所述涂层具有 $1-100\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在疏水性微图案表面的突出元件上;
- [0136] (ii) 纳米线,所述纳米线具有 $1-100\mu\text{m}$ 的长度,以及 $10-100\text{nm}$ 的厚度;和
- [0137] (iii) 丝片,所述丝片具有 $1-10\mu\text{m}$ 的厚度。
- [0138] 25. 根据实施方式24的蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构是(i)涂层,所述涂层具有 $5-30\mu\text{m}$ ,比如 $5-20\mu\text{m}$ 的横向延展,附着在疏水性微图案表面的突出元件上。
- [0139] 26. 根据实施方式24的蜘蛛丝结构,所述蜘蛛丝结构是(ii)纳米线,所述纳米线具有 $5-30\mu\text{m}$ ,比如 $5-20\mu\text{m}$ 的长度,和/或 $36-88\text{nm}$ 的厚度。
- [0140] 27. 根据实施方式24的蜘蛛丝结构,其是(iii)丝片,所述丝片的厚度为 $2-8\mu\text{m}$ .比如 $3-5\mu\text{m}$ 。
- [0141] 28. 一种结构,所述结构具有适于接收表面活性大分子的水溶液的液滴的表面,其中所述表面是疏水性的并且包含微结构的图案;其中所述表面适于防止所述水溶液渗透入

所述图案中并适于保持其液滴状态；并且其中所述表面适于允许在其上形成所述表面活性大分子的成形聚合物。

[0142] 29. 根据实施方式28的结构,其中所述疏水性表面是具有与水的接触角为 $90^\circ$ 或更大,比如 $120^\circ$ 或更大、比如 $150^\circ$ 或更大的超疏水性表面。

[0143] 30. 根据实施方式28-29中任一项的结构,其中所述疏水性微图案表面包括间隔开 $1-100\mu\text{m}$ 的距离 $i$ 的突出元件,并且其中所述突出元件具有 $1-100\mu\text{m}$ 的最大横向延展 $d$ 。

[0144] 31. 根据实施方式30的结构,其中所述突出元件具有 $1-50\mu\text{m}$ 的最大横向延展 $d$ ,比如 $5-30\mu\text{m}$ 。

[0145] 32. 根据实施方式30-31中任一项的结构,其中所述突出元件之间的间隔距离 $i$ 为 $1-50\mu\text{m}$ ,比如 $5-30\mu\text{m}$ 。

[0146] 33. 根据实施方式30-32中任一项的结构,其中所述突出元件为柱状,其中所述最大横向延展 $d$ 是柱的最大直径。

[0147] 34. 根据实施方式28-33中任一项的结构,其中所述疏水性微图案表面包含硅。

[0148] 35. 根据实施方式28-34中任一项的结构,其中所述疏水性微图案表面包含疏水性涂层材料的外层。

[0149] 36. 根据实施方式35的结构,其中所述疏水性涂层材料是全氟碳化合物。

[0150] 37. 根据实施方式28-36中任一项的结构,所述结构进一步包含在所述表面上的表面活性大分子的成形聚合物。

[0151] 38. 根据实施方式28-37中任一项的结构在生产由表面活性大分子制成的成形聚合物中的用途。

[0152] 实施例

[0153] 使用标准微加工工艺制备被成形为具有不同直径( $d$ )和间隔( $i$ )的圆形硅柱的凸出元件的微阵列,其中 $d, i = 5, 10, 15$ 或 $20\mu\text{m}$ ,并使用等离子体沉积对其涂覆上疏水层。

[0154] 功能化的可溶性丝蛋白按Jansson等人, *Biomacromolecules* [生物大分子] 15: 1696 (2014) 制备。然后使用以下三种方法之一在表面上处理丝溶液的液滴:接触释放、横向液滴移动或滴铸,如图1所示,并在实验部分详细说明。表面的抗湿性可防止液体渗透这些柱,即保持Cassie-Baxter状态,并使三种方法分别产生局部涂层、纳米线和丝片。Z-丝的生物活性通过使用标记抗体的成功染色得到证实,该抗体被用于通过荧光显微镜对丝涂层和纳米线结构进行可视化。与如何操作液滴无关,与丝溶液接触的柱顶表面始终涂有丝。此外,丝的形成具有意外优势,因为丝蛋白在所有疏水性表面(即下部液体与突出元件界面和上层液体与空气界面两者)均自组装成丝。

[0155] 在优选的实施方式中,方法步骤a)的所述沉积通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向朝向所述表面的运动而实现。优选地,方法步骤a)的所述沉积通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而实现。

[0156] 在一个优选的实施方式中,方法步骤b)的形状形成包括通过所述液滴沿着与所述表面的平面相交的方向远离所述表面的运动而从所述表面去除所述沉积的液滴。优选地,所述沉积的液滴通过所述液滴相对于所述表面的平面的基本上垂直的运动而从所述表面被去除。优选地,在已完成沉积步骤a)后30-240秒内(比如约60秒内),去除所述液滴。

[0157] 在某些实施例中,方法步骤b)的所述形成不包括所述沉积的液滴在其去除之前在

所述表面上的任何横向移动。这允许在表面的任何突出元件上生产局部表面涂层。

[0158] 图2示出了使用接触释放法生成的局部Z-丝涂层的特征。图2a示出了Z-丝涂层微柱阵列的荧光显微镜图像( $d=15\mu\text{m}$ ;  $i=15\mu\text{m}$ )。图2b)示出了相对于具有不同柱直径和间隔的表面,所生成的丝线的量与所涂覆的柱的量有关,其中对于阵列涂层应用,通常需要零根线。使用接触释放法在具有大柱间距( $i\geq 15\mu\text{m}$ )和小直径( $d\leq 10\mu\text{m}$ )的表面上形成了无线的均匀局部表面涂层(图2b)。当从表面垂直去除丝绸溶液时,微滴留在柱的顶部,这些液滴蒸发并形成丝涂层。因此,丝蛋白在所有疏水性表面(即液体与柱界面和液体与空气界面两者)均自组装成丝。

[0159] 为了研究涂层的稳定性,将 $d=15\mu\text{m}$ 和 $i=20\mu\text{m}$ 的表面涂覆丝,经IgG-Alexa Fluor 488染色,然后浸入水中1、2、8、24或48小时。然后将样品经IgG-Alexa Fluor 488复染。在浸入前后拍摄图像。当浸入水中长达8小时时,丝涂层仍附着于柱。在载玻片上将表面温育的水干燥,干燥溶液的荧光图像表明涂层已以小片形式释放到溶液中。24小时后,大多数涂层材料已经以小片形式释放到水中。

[0160] 图2c)示出了图2a)的平均荧光强度。图2d)示出了图2a)中每个柱的平均强度的直方图,其中正态高斯拟合的标准偏差为9%。没有线或片的丝涂层的柱阵列的特征是涂层相对均匀(图2c-2d)。比较在相同几何形状的柱阵列上处理的样品,阵列之间的平均荧光强度分布的平均标准偏差为2.5%(最小0.3%;最大5.7%)。阵列中的柱间平均荧光强度分布的平均标准偏差为6.6%(最小2.1%;最大16.1%)。我们通常观察到整个涂层阵列的强度梯度较小(图2c),这可能是由于液滴去除不均匀而引起的丝溶液与柱之间的接触时间不同所致。单独柱上的荧光强度分布的平均标准偏差为9.8%(最小5.0%;最大20.3%)。图2e)示出了一个柱的荧光强度的表面特征。我们通常观察到柱边缘的强度比中心高(图2e),这可以归因于咖啡环效应。柱表面的SEM和AFM图像未显示任何表面粗糙度。柱的悬垂几何形状防止了与柱顶表面的电流接触,这由于涂层的带电而限制了SEM成像的放大率。AFM图像缺少详细信息可能是由涂层的柔软性引起的。释放涂层并在真空下干燥后,它们会显示出收缩的不均匀表面。但是,当粘附到柱或其他突出元件上时,该几何形状不一定代表涂层。

[0161] 在一个实施方式中,方法步骤b)的所述形成包括在去除沉积的液滴之前使其在表面上横向移动。优选地,液滴移动速度( $s$ )在 $0.1-10\text{mm s}^{-1}$ 的范围内,比如约 $5\text{mm s}^{-1}$ 。这允许生产延伸形状,比如纳米线。

[0162] 图3示出了在柱直径 $d=15\mu\text{m}$ 和间隔 $i=10\mu\text{m}$ ,液滴速度为 $10\text{mm s}^{-1}$ 的阵列上使用横向液滴移动形成Z-丝纳米线的结果。图3a-c示出了使用横向液滴移动生成的Z-丝纳米线的图像:3a)纳米线形成后的上视图荧光图像;3b) 3a)的放大图;3c)柱、褶皱片形式的涂层及其间的纳米线的SEM图像。

[0163] 研究了三种不同表面几何形状,  $(d, i) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m})$ 、 $(20\mu\text{m}, 5\mu\text{m})$ 和 $(20\mu\text{m}, 10\mu\text{m})$ 的线径,以及液滴速度 $s$ ,在 $0.1$ 至 $10\text{mm s}^{-1}$ 之间。进一步在图3中,相对于以如下速度横向液滴移动的涂层柱的量,产生的平均丝量:3d)  $0.1\text{mm s}^{-1}$  3e)  $10\text{mm s}^{-1}$ ; 3f) 对于 $d=15\mu\text{m}$ 和 $i=5\mu\text{m}$ 的表面,速度为 $0.1-10\text{mm s}^{-1}$ ;正常高斯拟合的3g)  $(d, i, s) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m}, 1\text{mm s}^{-1})$ 的平均线直径的直方图,即产生最小相对线径变化的参数,和3h)  $(d, i, s) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m}, 5\text{mm s}^{-1})$ ,即产生最大线产量的参数。对于 $(d, i, s) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m}, 0.1\text{mm s}^{-1})$ ,测得的最大平均线直径为 $372.5\pm 85\text{nm}$ ,对于 $(d, i, s) = (20\mu\text{m}, 5\mu\text{m}, 0.1\text{mm s}^{-1})$ ,最小为 $168.9\pm 36\text{nm}$ 。对于不同的液

滴速度,线直径没有明显变化。同样对于几何形状  $(d, i) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m})$  和  $(20\mu\text{m}, 10\mu\text{m})$ , 线径也没有显著差异。但是,针对几何形状  $(d, i) = (20\mu\text{m}, 5\mu\text{m})$  生成的线直径,最大 $d:i$ 比显著小于其他两个几何的比。每个样品上丝直径的绝对变化在36nm至88nm之间变化,并且在该变化与表面几何参数 $d$ 和 $i$ 或液滴速度 $s$ 之间未发现相关性。直径的变化均匀地分布在整个液滴路径上,并且发现丝的方向性与速度无关。此数据表明在同一方向上生成线时具有高可再生性。

[0164] 蜘蛛丝纳米线在超疏水性表面上的形成不仅受单个液相、气相和固相之间界面的表面能最小化的控制。蜘蛛丝线的形成还意外受液体中自组装的第二固相——在液体与气体和液体与固体界面处的丝的表面能的控制。已经观察到,线的形成开始于后退的液滴界面,在柱之间形成看起来像局部纱的状态,然后将该纱收缩成线状。我们假设这些结构的形成始于纱顶部和底部表面的自组装但尚未固化的丝层,中间是薄的液体层。通过蒸发到周围环境和/或通过从对流到移动液滴的对流传输,将液体从该流径中去除。在此过程中,位于柱的顶部的纱部分会收缩成一片,而悬在柱之间的部分会进一步收缩以形成丝。在荧光图像中,柱上的收缩片可见,在柱的中央有明显的暗条纹(图3b),在SEM图像中可以清楚地看到它们的褶皱(图3c)。所得的平均柱间荧光强度标准偏差为12.5%(最小3.8%;最大28.4%),几乎是未形成线的表面的两倍,证实了柱涂层形成的差异。发现线和柱涂层强度之间存在弱相关性。

[0165] 线的产量,这本文定义为线的量与涂层柱的量之比,取决于三个参数(见图3d-f): (1) 减少柱间隔产生更多线; (2) 增加柱直径产生更多线; (3) 液滴移动速度,其中 $s = 5\text{mm s}^{-1}$ 比更高和更低的液滴速度更均匀地产生更多线。预期在低流速条件下,液体优先发生丝的自组装:空气界面,以及通过蒸发去除水的方式会局部增加丝蛋白的浓度。对于低液滴速度,预期出现低流速,这可以解释与 $10\text{mm s}^{-1}$ 相比,在 $0.1\text{mm s}^{-1}$ 液滴速度下 $d = 5\mu\text{m}$ 丝的形成增加。超疏水性表面上的表观壁滑随着柱间距的减小和柱直径的增加而减小,从而使得底部液体与空气界面的流速降低。实际上,在所有流动条件下,在这样的几何形状上会形成更多线。纱的尺寸小于液滴的尺寸,因此与液滴相比,高液滴速度使得纱中的流动阻力相对较大,即纱中的液体“不能跟随”液滴。在这种条件下,通过蒸发去除的水将因对流而增加,这可以解释在液滴直径为 $10\text{mm s}^{-1}$ 的情况下,与 $0.1\text{mm s}^{-1}$ 相比,大直径柱表面上的丝形成增加。在 $(d, i) = (15\mu\text{m}, 5\mu\text{m})$ 的情况下,进一步研究了速度对线产量的影响,在速度为 $5\text{mm s}^{-1}$ 时,发现最高产量。将其与直径变化进行比较(对于同一表面,该变化最低,但速度为 $1\text{mm s}^{-1}$ ),似乎在产量和均匀性之间进行了权衡。

[0166] 浸入水中48小时后,发现它们保留在表面上。但是,可以通过将样品超声处理10分钟从基质释放线。通过接触晒印,还成功地将线从超疏水性基质转移到平化学计量的硫醇-烯聚合物(OSTE)表面。

[0167] 在优选的实施方式中,步骤b)的形成包括蒸发所述表面上的沉积液滴。这表示步骤b)的所述形成包括以完好的状态蒸发在表面上沉积的液滴。这允许生产片结构。

[0168] 图4示出了滴铸丝片形成方案的结果。图4a)是非功能化的丝片( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 缓冲液,环境条件)的照片。图4b)上图和图4c)下图示出了释放后 $\text{FN}_{\text{cc}}$ 丝片( $\text{NaHCO}_3$ 缓冲液,环境条件)的SEM图像。图4d)是断裂的非功能化的丝片的SEM侧视图,其示出了底层和顶层以及内部结构( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 缓冲液,环境条件)。图4e)是非功能化的丝片的SEM顶视图,其示出了底层和顶层

以及内部结构( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 缓冲液,潮湿条件)。

[0169] 在温和的条件下,使用滴铸法和蒸发法生成不溶丝片(图4a)。与先前的报道相反,不需要苛性后处理以使片材不溶于水。我们将此归因于我们表面的疏水性增加,这支持了丝蛋白从无规/螺旋向 $\beta$ -折叠形成的转变,从而使折叠更加稳定。SEM图像支持了这一点,该图像显示片由两层丝组成,一层在片的顶部,另一层在片的底部,中间有丝蛋白的聚集体(图4d-e)。使用共聚焦显微镜也可以看到片的内部结构。顶层和底层是在丝自组装过程中在疏水性空气和柱表面形成。它们之间的无序丝结构是由于蒸发过程中困在丝片之间的蛋白质的自发聚集而产生的。根据SEM图像,片的表面特征似乎是由顶部和底部丝层之间的聚集丝结构生成的(图3e)。使用共聚焦显微镜可以进一步观察到这一点,其中未观察到超过几微米的变化。

[0170] 这种类型的片形成发生在表面、缓冲液、浓度和丝类型的所有尝试组合中,尽管具有明显差异。与由低浓度丝蛋白制成的片相比,由高丝蛋白浓度的溶液产生的片的透明度较低(即不可能透过片看到底部基质)。这是因为它们较厚,在顶部和底部丝层之间包含更高密度的丝聚集体。使用 $0.3\text{mg mL}^{-1}$ 的蛛丝蛋白浓度在结构化基质上产生的片厚度约为 $1\mu\text{m}$ ,而使用 $3\text{mg mL}^{-1}$ 的蛛丝蛋白浓度在结构化基质上产生的片厚度约为 $10\mu\text{m}$ 。与在低湿度下产生的片相比,在高湿度条件下产生的片使得平均片尺寸略大,并且片尺寸的变化增加。在结构化表面上产生的片小于在非结构化表面上产生的片,这可以根据润湿性降低预期。

[0171] 使用碳酸盐缓冲液( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 或 $\text{NaHCO}_3$ )中的 $3\text{mg mL}^{-1}$ 丝溶液在结构化表面上生成的片通常可以在干燥后手动从表面去除。所有其他溶液均会生成以干燥形式附着在表面上的片。对于使得在平表面(而不是结构化表面)上生成片时被卡住的缓冲液,我们假设这是由于结构化表面上的表面交互作用减少所致。使用Tris缓冲液时,片附着力增加可归因于干燥后形成盐晶体,从而增加了丝与表面之间的相互作用。后一项观察得到先前研究的支持,该研究使用了基于挥发性碳酸盐的缓冲液。干燥后附着的片通在水中浸入2小时后以湿形式释放,但由 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 缓冲液浇铸在平表面上的非功能化丝片在48小时后保持附着状态。值得注意的是,使用Tris缓冲液在结构化表面和平表面上生成的片在浸入水中时倾向于分裂成两层,其中底层保持附着在表面上,而顶层可以脱离。通过将其浸入水中48小时或浸入细胞培养基中7天以上以检测片的稳定性。片保持完整,无可见的溶解迹象,证实蛋白质已经转变为稳定的丝形式。

[0172] 总之,我们确定了在超疏水性表面上形成丝涂层、纳米线和片的特定参数:

[0173] i) 接触并立即垂直去除一系列直径小且间隔大的突出元件上的丝溶液液滴,产生不含线的涂层;

[0174] ii) 以适当的速度沿着大直径、小间隔的突出元件阵列横向移动丝溶液液滴,从而产生大量对齐的线;和

[0175] iii) 在一系列突出元件的顶部上蒸发高浓度的丝蛋白液体,形成可以从表面释放的丝片。

[0176] 实验部分

[0177] 表面的生产:

[0178] 使用标准的微加工技术生产具有可再进入的硅微柱阵列的芯片,这些微柱具有最大直径 $d$ 和间隙 $i$ (分别为 $5$ 、 $10$ 、 $15$ 和 $20\mu\text{m}$ ),并且具有无图案的表面。在4英寸硅(Si)晶片的

表面上热生长 $1\mu\text{m}$ 的二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )层。将HDMS抗蚀剂SPR 700-1.2(美国微细加工材料技术公司)以4000RPM的速度旋转,然后将晶片在 $100^\circ\text{C}$ 的热板上烘烤1min(Maximus 804,SSE公司,德国)。使用 $140\text{mJ cm}^{-2}$ 的真空接触器(Karl Suss掩模对准器,Karl Suss公司,德国)对晶片进行曝光。在 $110^\circ\text{C}$ 下硬烘烤1min(Maximus)后,在CD46中显影40s。使用RIE(Applied Materials Precision 5000 mark II,Applied Materials公司,美国)对氧化物进行蚀刻,然后进行各向同性Si蚀刻10秒,然后进行各向异性Si蚀刻20个周期(Centura II (DPS&MxP) Applied Materials公司,美国)。将晶片钝化,并在感应耦合等离子体机ICP(ICP,STS公司,英国)中通过 $\text{C}_4\text{F}_8$ 的等离子体沉积30秒生成疏水性涂层。公司在切割之前,用切割胶带(SPS,德国)覆盖晶圆。将芯片从胶带上剥离并保存,直至使用,然后依次使用丙酮、异丙醇、水和乙醇清洗。所有化学品均购自瑞典Sigma-Aldrich公司。

#### [0179] 蜘蛛丝蛋白的制备:

[0180] 从大肠杆菌(*Escherichiacoli*)表达重组物中纯化可溶性丝蛋白、非功能化的蜘蛛丝(“4RepCT”;SEQ ID NO:1)、Z功能化的蜘蛛丝(SEQ ID NO:2)和 $\text{FN}_{\text{cc}}$ 功能化的蜘蛛丝(SEQ ID NO:3),由Spider Technologies AB公司提供在 $20\text{mM Tris (pH 8)}$ 中终浓度为 $3\text{mg mL}^{-1}$ ,并保存在 $-20^\circ\text{C}$ 下直至进一步使用。为了用 $20\text{mM NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8)和 $20\text{mM NaHCO}_3$  (pH 8)中的丝蛋白进行实验,可以通过透析从Tris交换丝蛋白缓冲液。

#### [0181] 涂层和线的制备:

[0182] 通过从 $0.4\text{mm}$ 注射器针头喷出 $20\text{mM Tris}$ 缓冲液中的 $5-10\mu\text{L}$ 悬滴的 $0.1\text{mg mL}^{-1}$ 的Z-丝悬滴生成涂层和线,然后相对于柱阵列表面移动液滴。研究了两种液滴移动,如图1所示:接触释放法,目的是仅在柱的顶部形成丝涂层,在该涂层中,液滴与表面垂直移动并立即被去除;和横向液滴移动,目的是形成纳米线,其中液滴在柱阵列上水平滚动。通过将表面水平放置在电动线性平台(NEMA 17 Stepper Motor MOX-02-30,生产商,中国)上,进行横向液滴移动(图1b);将注射器置于表面上方;从注射器针头喷出液滴;并以 $0.1、0.5、1、5$ 或 $10\text{mm s}^{-1}$ 的速度移动平台。垂直接触释放液滴移动(图1a)手动进行。

[0183] 一旦从表面去除液滴,随后将它们用 $20\text{mM Tris}$ 洗涤两次,并用MilliQ水洗涤一次;在添加有 $0.05\%$ Tween 20的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释的 $0.005\text{mg mL}^{-1}$ IgG-Alexa Fluor 488偶联物(兔源,Thermo Fisher Scientific公司)中温育30分钟;并在含 $0.05\%$ Tween 20的PBS中洗涤两次,在PBS和MilliQ水中洗涤一次,然后将它们用气枪吹干。所有实验均重复三次。

[0184] 通过在水中浸泡1、2、8、24和48小时之前和之后拍摄荧光图像,研究涂层对超疏水性基质的附着力。浸没后将样品在IgG-Alexa Fluor 488偶联物中重新温育,并如上所述洗涤。在显微镜载玻片上蒸发已其中温育涂层底物的水。通过在水中浸泡48小时之前和之后以及在超声处理(EMAG Emmi-12HC,EMAG公司,德国)10分钟之前和之后拍摄荧光图像,研究线对超疏水性基质的附着力。在显微镜载玻片上蒸发已对带有线的基质进行超声处理的水。通过在丝液滴横向移动后立即将线从超疏水性基质转移到平OSTE220(Mercene Labs公司,瑞典)基质上,用 $20\text{mM Tris}$ 清洗超疏水性基质一次,然后将表面压在一起。然后将表面在IgG-Alexa Fluor 488偶联物中温育并如上所述清洗。

#### [0185] 片的制备:

[0186] 使用在 $20\text{mM Tris}$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 或 $\text{NaHCO}_3$ 缓冲液中滴加 $0.3\text{mg mL}^{-1}$ 和 $3.0\text{mg mL}^{-1}$  $\text{FN}_{\text{cc}}$ -丝

或非功能化的丝溶液的滴铸法生产丝片。在环境条件(22℃下相对湿度为35%)或高湿度条件下(22℃下相对湿度为90%)下,将20μL液滴在平表面或超疏水性表面上蒸发24小时。之后,将表面在水中清洗。将片在0.1%罗丹明B中温育30分钟,在水中稀释,然后用PBS清洗3次。

[0187] 首先尝试在干燥条件下去除片,然后将其浸入水中1、2、8、24和48小时后,研究片在表面上附着力。通过将其浸没在水中24小时并在浸没之前和之后拍摄片的荧光图像研究片的水不溶性;然后浸入完全内皮细胞培养基(PromoCell GmbH,德国)中7天以上。

[0188] 表征:

[0189] 使用测角计(ThetaLite,Biolin Scientific公司,瑞典)测量表面的接触角和滚落角。使用荧光显微镜(Nikon Microphot-FXA,Nikon公司,美国)评价涂层和丝。对于横向移动实验,在路径的中心捕获图像。对于滴-移动实验,图像以液滴阵列接触区域为中心。不同的放大倍数用于不同的柱尺寸:对于柱直径 $d=15$ 和 $20\mu\text{m}$  10X;对于 $d=10\mu\text{m}$  20X;对于 $d=5\mu\text{m}$  40X。所有图像均在MATLAB(R2016a)中进行分析。对于没有线的图像,测量并比较两柱之间和多柱之间的强度分布。对于存在线的图像,使用图像处理算法对线进行计数。

[0190] 此外,使用扫描电子显微镜(SEM)(Gemini Ultra 55,Zeiss公司,德国)对纳米线的结构进行评价,其中沿液滴路径拍摄顶部图像以测量线的直径,并通过倾斜图像显示有关顶部涂层的信息。还拍摄了涂层的SEM图像和AFM(Dimension Icon,Bruker公司,美国)图像。使用荧光显微镜和SEM,在载玻片上蒸发水后,研究涂层和片已在其中温育的水。

[0191] 这些片的特征在于其外观、平均尺寸(定义为最大和最小横向距离之间的平均值)以及它们在浸入水中之前或之后从表面去除的能力。使用SEM和共聚焦显微镜(Olympus FV1000,Olympus公司,日本)研究了表面粗糙度、内部结构和厚度。

[0192] 为了进一步研究线生成过程,将20mM Tris缓冲液(约2μL)中的0.1mg mL-1Z-丝液滴置于表面,并使用配有相机(MU503-CK,AmScope公司,美国)的光学显微镜(Nikon Optiphot,Nikon公司,美国)记录蒸发过程。

## 序列表

<110> 斯柏博科技有限公司  
 <120> 表面活性大分子的结构化  
 <130> PCT-21100916  
 <150> EP17193218.9  
 <151> 2017-09-26  
 <160> 17  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> 南方育儿网蛛 (Euprosthenoops australis)

<220>  
 <221> 结构域  
 <222> (1)..(158)  
 <223> REP片段

[0001]

<220>  
 <221> 结构域  
 <222> (159)..(165)  
 <223> 间隔子片段

<220>  
 <221> 结构域  
 <222> (166)..(263)  
 <223> CT片段

<400> 1

Gly Pro Asn Ser Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Gln Gly Gly  
 1 5 10 15

Tyr Gly Gln Gly Ala Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala  
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Gly  
 35 40 45

Gln Gly Ser Gly Gly Ser Ala  
 50 55 60

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Arg Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Ser  
 65 70 75 80

Gly Gly Asn Ala  
85 90 95

Ala Ala Gly Gln Gly Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Arg Gln Ser Gln Gly  
100 105 110

Ala Gly Ser Ala  
115 120 125

Ala Gly Ser Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr  
130 135 140

Gly Gln Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ser Thr  
145 150 155 160

Val Ala Asn Ser Val Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ser Ala Val Ser Arg  
165 170 175

Val Ser Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Asn Gly Gln Val Asn Met  
180 185 190

[0002]

Ala Ala Leu Pro Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Ser Ser Val Ser Ala  
195 200 205

Ser Ala Pro Gly Ala Ser Gly Cys Glu Val Ile Val Gln Ala Leu Leu  
210 215 220

Glu Val Ile Thr Ala Leu Val Gln Ile Val Ser Ser Ser Ser Val Gly  
225 230 235 240

Tyr Ile Asn Pro Ser Ala Val Asn Gln Ile Thr Asn Val Val Ala Asn  
245 250 255

Ala Met Ala Gln Val Met Gly  
260

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 融合蛋白

&lt;400&gt; 2

Met Gly Ser Ser Gly His His His His His His His Met Val Asp Asn Lys  
1 5 10 15

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
20 25 30

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
35 40 45

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
50 55 60

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Leu Glu Ala Leu Phe Gln Gly Pro Asn Ser  
65 70 75 80

Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly  
85 90 95

Ala Gly Ser Ser Ala  
100 105 110

[0003]

Gly Gly Gln Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Ser Ala  
130 135 140

Ala Gly Arg Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Gly Asn Ala  
145 150 155 160

Ala Gly Gln  
165 170 175

Gly Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Arg Gln Ser Gln Gly Ala Gly Ser Ala  
180 185 190

Ala Gly Ser Gly  
195 200 205

Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Ser Ser  
210 215 220

Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ser Thr Val Ala Asn Ser



Ala Gly Gly Gln Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Ser  
50 55 60

Gly Gly Ser Ala  
65 70 75 80

Ala Ala Gly Arg Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Gly Asn  
85 90 95

Ala Gly  
100 105 110

Gln Gly Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Arg Gln Ser Gln Gly Ala Gly Ser  
115 120 125

Ala Gly Ser  
130 135 140

Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Gln Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gln Ser  
145 150 155 160

[0005] Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ser Thr Val Ala Asn  
165 170 175

Ser Val Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ser Ala Val Ser Arg Val Ser Ser  
180 185 190

Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Asn Gly Gln Val Asn Met Ala Ala Leu  
195 200 205

Pro Asn Ile Ile Ser Asn Ile Ser Ser Ser Val Ser Ala Ser Ala Pro  
210 215 220

Gly Ala Ser Gly Cys Glu Val Ile Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Ile  
225 230 235 240

Thr Ala Leu Val Gln Ile Val Ser Ser Ser Ser Val Gly Tyr Ile Asn  
245 250 255

Pro Ser Ala Val Asn Gln Ile Thr Asn Val Val Ala Asn Ala Met Ala  
260 265 270

Gln Val Met Gly  
275

<210> 4  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 南方育儿网蛛 (Euprostheno australis)

<400> 4

Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ser Ala Val Ser Arg Val Ser Ser Ala Val  
 1 5 10 15

Ser Ser Leu Val Ser Asn Gly Gln Val Asn Met Ala Ala Leu Pro Asn  
 20 25 30

Ile Ile Ser Asn Ile Ser Ser Ser Val Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ala  
 35 40 45

Ser Gly Cys Glu Val Ile Val Gln Ala Leu Leu Glu Val Ile Thr Ala  
 50 55 60

Leu Val Gln Ile Val Ser Ser Ser Ser Val Gly Tyr Ile Asn Pro Ser  
 65 70 75 80

[0006]

Ala Val Asn Gln Ile Thr Asn Val Val Ala Asn Ala Met Ala Gln Val  
 85 90 95

Met Gly

<210> 5  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> 大腹园蛛

<400> 5

Asn Arg Leu Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Arg Val Ser Ser Asn Ile  
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Ala Ser Gly Gly Ala Ser Ala Leu Pro Ser Val Ile Ser  
 20 25 30

Asn Ile Tyr Ser Gly Val Val Ala Ser Gly Val Ser Ser Asn Glu Ala  
 35 40 45

Leu Ile Gln Ala Leu Leu Glu Leu Leu Ser Ala Leu Val His Val Leu  
 50 55 60

Ser Ser Ala Ser Ile Gly Asn Val Ser Ser Val Gly Val Asp Ser Thr  
65 70 75 80

Leu Asn Val Val Gln Asp Ser Val Gly Gln Tyr Val Gly  
85 90

<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 6

Ile Lys Val Ala Val  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 7

[0007]

Tyr Ile Gly Ser Arg  
1 5

<210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 8

Glu Pro Asp Ile Met  
1 5

<210> 9  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 9

Asn Lys Asp Ile Leu  
1 5

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 10

Gly Arg Lys Arg Lys  
1 5

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Lys Tyr Gly Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Arg Ala Tyr  
1 5 10

[0008]

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe Thr Met  
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser  
1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala  
1 5

<210> 16  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 由智人修饰而得

<220>  
<221> 二硫化  
<222> (1)..(10)

<400> 16

Cys Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Cys  
1 5 10

[0009]

<210> 17  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 细胞结合肽

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> X = 半胱氨酸以外的任何氨基酸

<220>  
<221> 二硫化  
<222> (1)..(10)

<400> 17

Cys Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Xaa Xaa Cys  
1 5 10

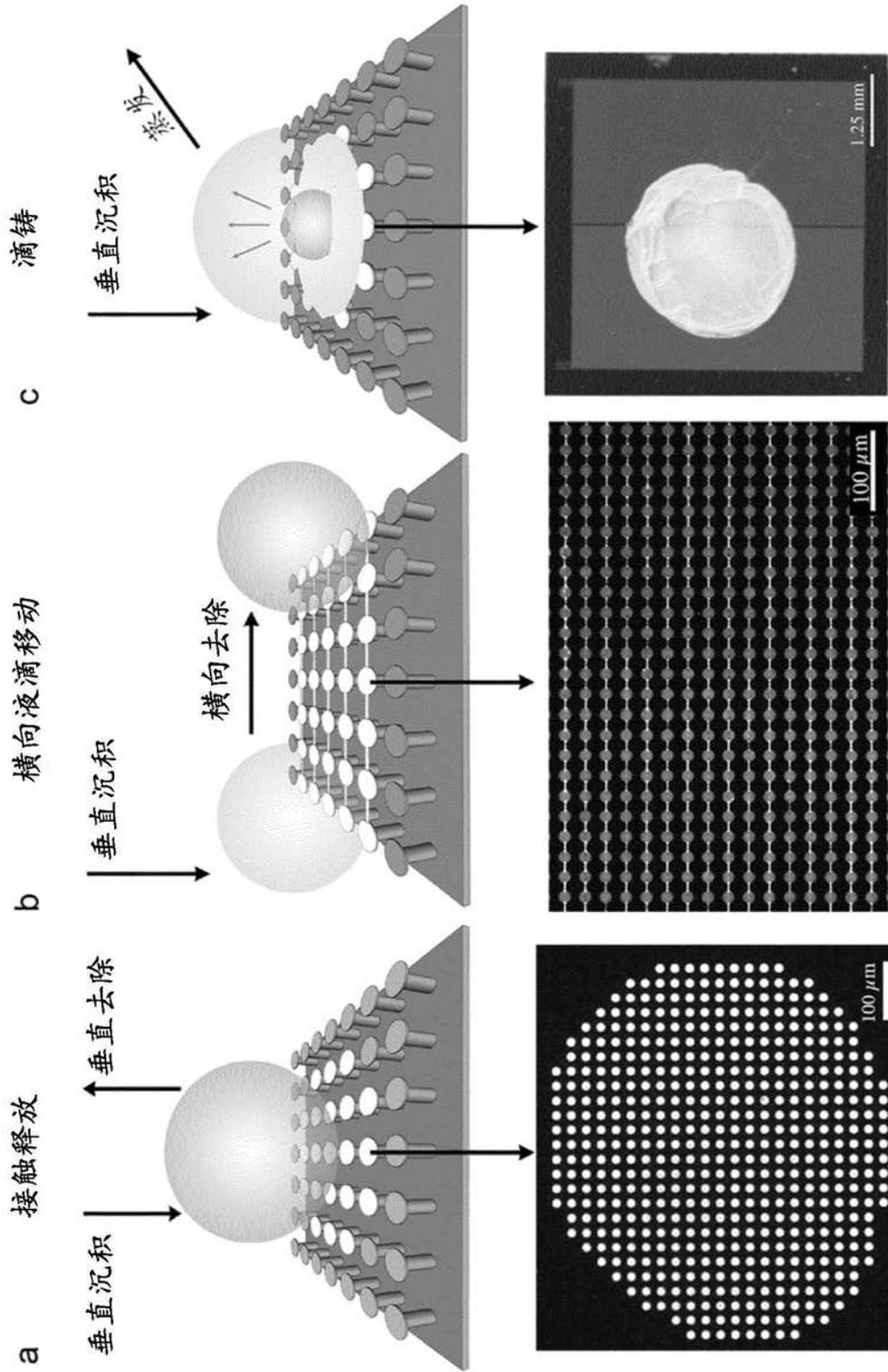


图1

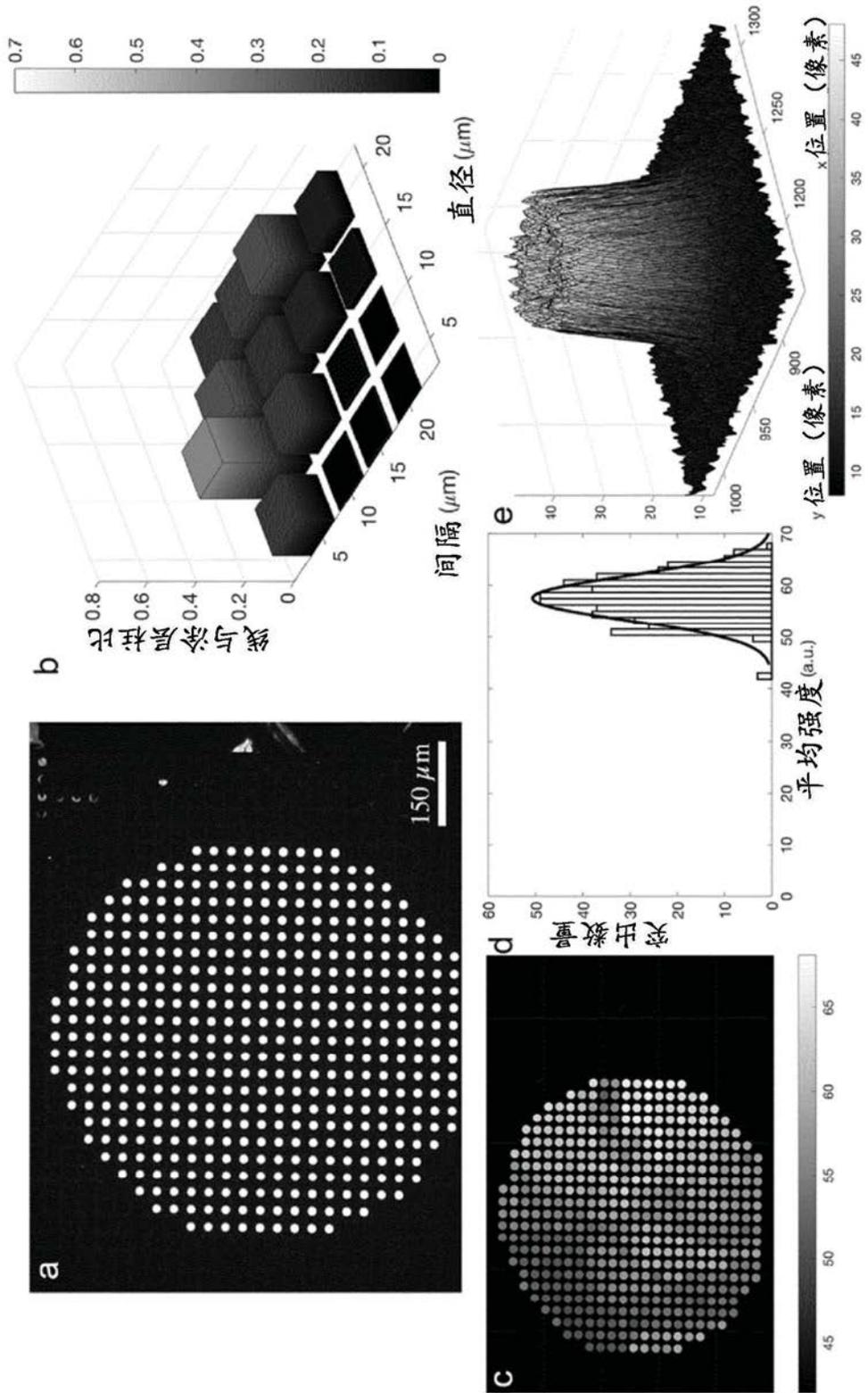


图2

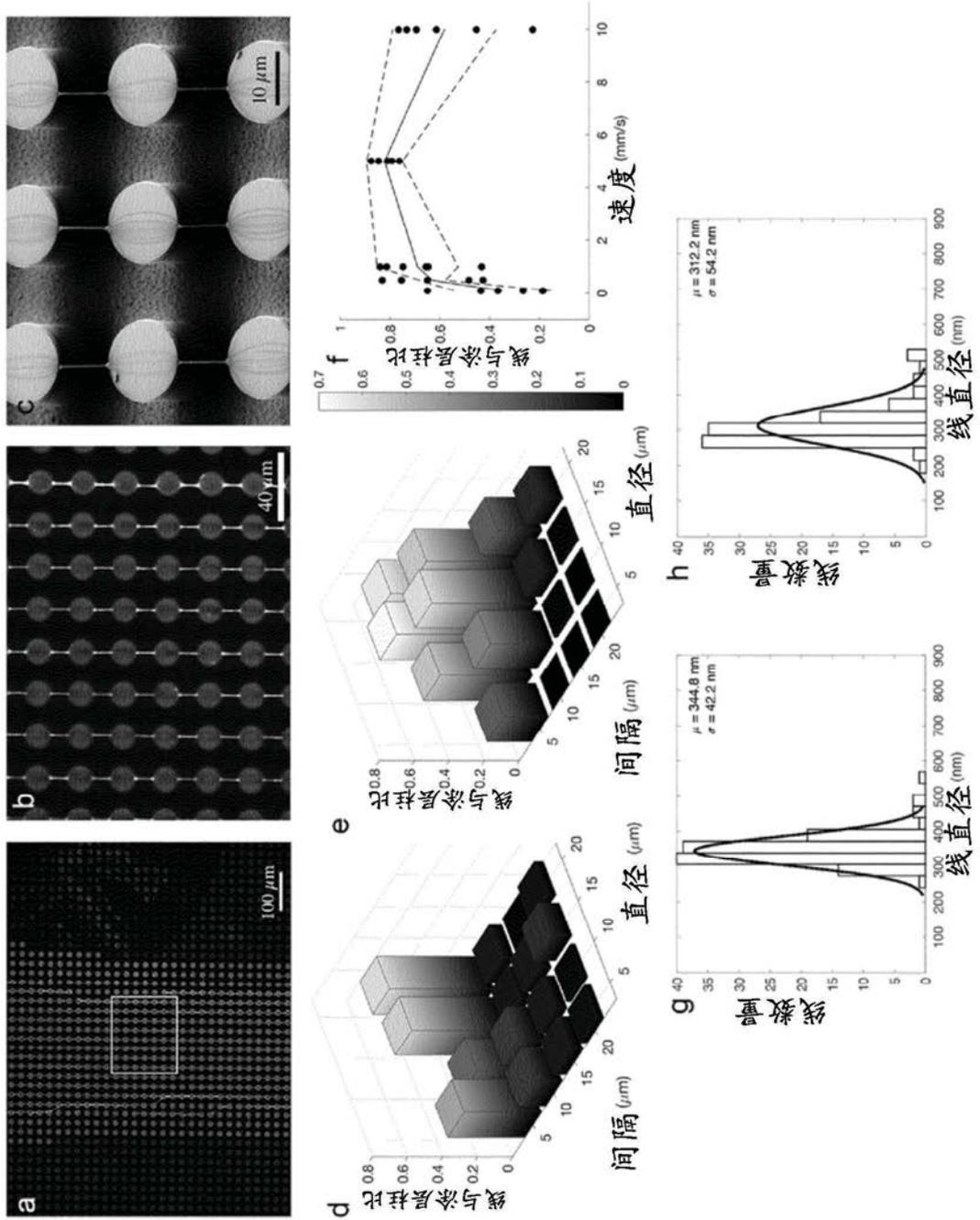


图3

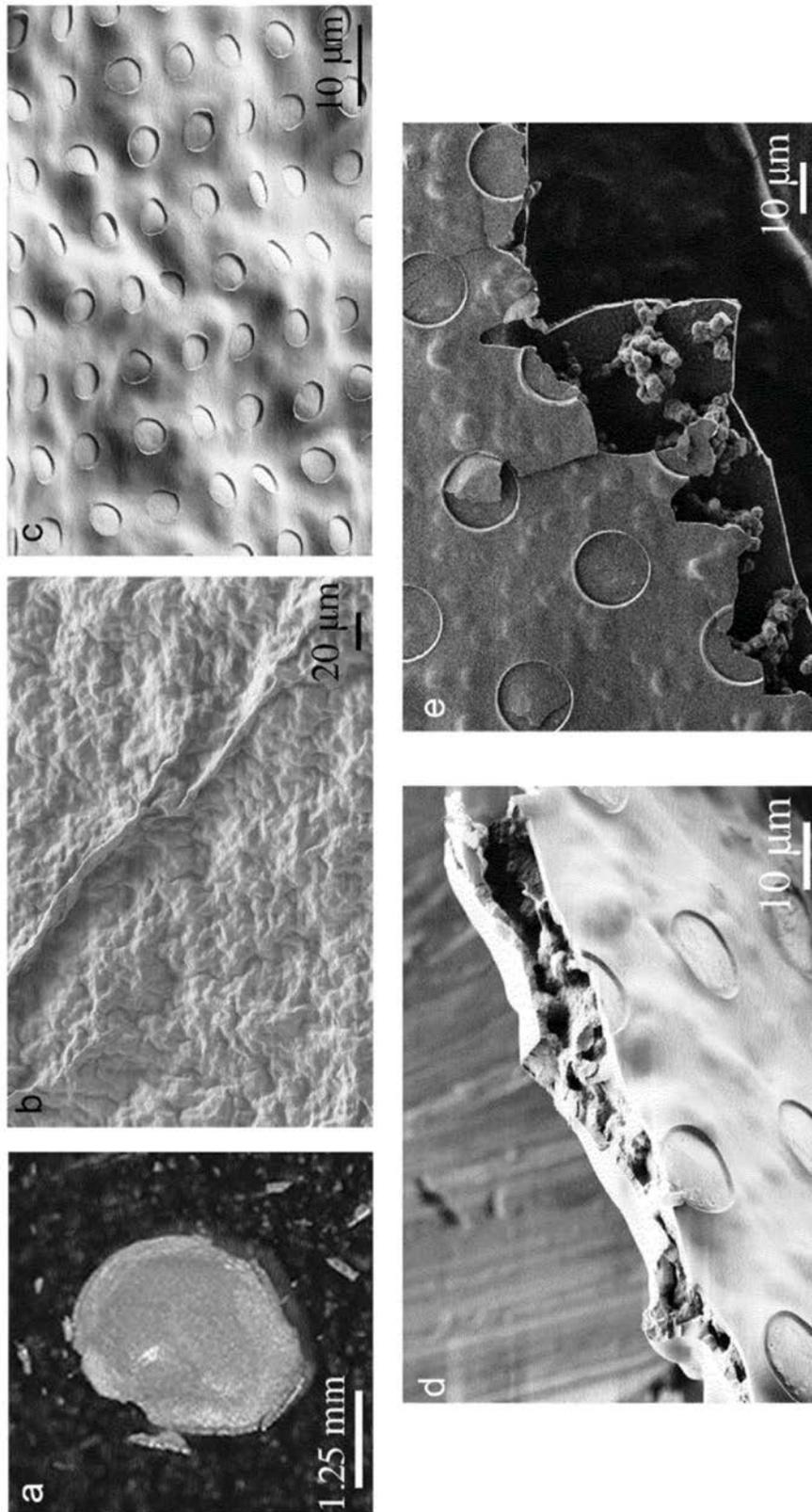


图4