

学校编码:10384
学号: 20720141150114

分类号__密级__
UDC__

厦门大学

硕士学位论文

丝素蛋白微结构图案化的设计构建及其应用探索

Silk Fibroin Micro-structures: From Design to Applications

罗文昊

指导教师姓名: 刘向阳 教授

林友辉 副教授

专业名称: 材料工程

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩时间: 2017年 月

学位授予日期: 2017年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017年4月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

丝素蛋白具有优异独特的力学性质，光学性质，生物相容性和可控的降解性。近年来，有着精细结构的丝素蛋白被证明在生物工程和医疗等方向上有许多潜在的应用价值。但在常见的微结构制备中，运用光刻构筑丝素蛋白图案的研究相对较少。另一方面，如何加入其他介观材料，调控丝素蛋白的组装，也一直是自组装领域的研究热点。

本硕士学位论文的主要贡献可以分为以下几个部分：

1、拓展了蚕丝素蛋白通过非共价键，在紫外光条件下引发自组装交联的微结构成型技术。利用光刻技术和光敏小分子在紫外光下释放质子的反应，引发蚕丝素蛋白水凝胶锁住水分的pH值降低，并在水溶液浸泡的条件下成胶，利用该技术，我们将蚕丝素蛋白的图案做到了10微米的尺度。

2、拓展了以胶体小球为模板，制备丝素蛋白反蛋白石结构光子晶体的成型方法。本文类比了二氧化硅-聚苯乙烯微球二元体系中正硅酸乙酯的溶胶-凝胶转变和丝素蛋白-聚苯乙烯微球二元体系中蚕丝素蛋白的溶胶-凝胶转变，并探究了共组装法制备丝素蛋白反蛋白石结构的条件。

3、检测了丝素蛋白微结构的细胞毒性，掺杂功能化的可行性，并探讨了其作为忆阻器的可能性。首先，在有蚕丝微结构的图案上培养了3T3小鼠成纤维细胞，初步观察了细胞在该微结构上的可成长性和取向性。然后，在蚕丝素蛋白中掺杂荧光分子，观察其荧光图案化的结果。最后，在蚕丝素蛋白中掺杂了牛血清蛋白包裹的纳米银簇，共混旋涂在ITO玻璃上后测量了其IV曲线，验证了其制备忆阻器的可能性。

关键词：丝素蛋白；光刻微结构；自组装

Abstract

Silk fibroin, as a general natural material, has great advantages based on its unique properties on mechanical strength, optical properties, biocompatibility and controllable degradation. Based on its great universality, high efficiency on constructing, low energy cost and environmental friendly, silk fibroin has intriguing lots of researchers digging on their structures and applications. With the continuous development of related technologies, precise spatial patterns and micro and nanostructures of proteins have widespread applications in tissue engineering, bioelectronics, photonics, and therapeutics. However, the balance of high resolution and complex structure means great challenges. One of the main problems is the technologies for making precise protein patterns. To date, micro-architectures of silk have been formed using techniques such as imprinting, molding via soft-lithography, embossing and inkjet printing, and these techniques usually need high temperature and pressure or expendable molding masters. Photolithography, as one of the common micro-fabrication methods which can provide an option for rapid and direct fabrication of complex features with high fidelity, has little use on the patterning of fibroin protein. On the other hand, since the gelation of protein were determined by the self-assembly process at mesoscale, inducing this process by adding other component with self-assembly property, to achieve a co-assembly structure, like photonic crystals, is also an intriguing issue. Thus, extending optical and self-assembly technologies for fibroin micro-fabrication is an important and challenge task.

This paper introduces one photolithography method for fibroin, that is creating light-induced fibroin gelation with non-covalent bond. Besides, the possibility of co-assembly process of polystyrene nanoparticles and fibroin protein at different conditions were also studied. And finally, we determined the cell toxicity for the micro-patterned fibroin and made some demos for the integration of functional protein patterning. The main achievements are summarized as follows:

1. Development of fibroin micro-manufacture photolithography technology via

non-covalent self-assembly process. 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA), as a photosensitive super-molecule, can release protons when activated by ultraviolet light. By adding some 2-NBA into amorphous fibroin films, the pH of water blocked by the fibroin can be declined under the isoelectric point of silk fibroin by UV-light. In this way, when the fibroin films meet water, proteins will assemble at the domains with less pH degree, while others dissolved by water. Thus, micropatterns under 10 μ m was achieved.

2. Development of technologies for fabricating silk fibroin inverse opal structure by using colloidal nanoparticles as mold and investigating the possibility of co-assembly system, such as polystyrene nanoparticles and silk fibroin. Here, we compared two similar systems: TEOS-polystyrene nanoparticle binary system and fibroin-polystyrene nanoparticle binary system. Then, we studied the possible conditions for fibroin-polystyrene binary system, and compared the silk fibroin inverse opal structures manufactured from co-assembly technology and traditional molding methods.

3. Determining the cell toxicity of silk fibroin and its possibility for functional modifying, communicating its potential applications as a memristor by adding nanoclusters. First of all, we cultured the cells onto the fibroin patterns to determine toxicity and cell orientation of fibroin micro-structure. Secondly, we integrated fluorescent molecule, Rhodamine B, into silk micropatterns to determine the possibility of multifunctional modifying. Finally, we measured the iv curves of fibroin films, which sprawled onto the ITO glasses and doped BSA-Ag clusters, to determine whether fibroin films have the possibility to make memristor.

Key Words: Silk Fibroin; Photolithography; Self-assembly

目录

摘要	I
Abstract.....	II
目 录.....	III
Contents	V
第一章 绪论	1
1.1 丝素蛋白的结构和性质	2
1.2 丝素蛋白微结构图案化的研究现状	5
1.3 丝素蛋白微结构的应用及功能化	15
1.4 课题研究内容	22
参考文献	24
第二章 丝素蛋白微结构的光刻	30
2.1 引言	30
2.2 仪器和材料	31
2.3 丝素蛋白再生溶液的制备方法	32
2.4 加速丝素蛋白成胶的影响因素	34
2.5 紫外光控制的丝素蛋白溶胶凝胶转变	36
2.6 丝素蛋白的成膜工艺	40
2.7 丝素蛋白-2-NBA 混合光胶溶液的制备	44
2.8 丝素蛋白的光刻	46
2.9 本章小结	54
参考文献	56
第三章 丝素蛋白反蛋白石结构成型探究	59
3.1 引言	59

3.2 仪器和材料	60
3.3 聚苯乙烯微球的制备	61
3.4 聚苯乙烯微球光子晶体的制备	62
3.5 铸模法形成丝素蛋白光子晶体反蛋白石结构	64
3.6 聚苯乙烯小球-SiO ₂ 二元体系共自组装	66
3.7 聚苯乙烯小球-丝素蛋白二元体系共聚自组装	69
3.8 聚苯乙烯小球-丝素蛋白二元体系共聚自组装的优化	70
3.9 本章小结	72
参考文献	74
第四章 丝素蛋白微结构的细胞毒性检测及功能化和作为忆阻器	
的应用前景	76
4.1 引言	76
4.2 实验药品及仪器	77
4.3 丝素蛋白的细胞毒性检测	78
4.4 丝素蛋白的功能集成化	81
4.5 丝素蛋白作为生物忆阻器的前景	82
4.6 本章小结	85
参考文献	86
第五章 全文总结和展望	88
5.1 总结	88
5.2 展望	89
硕士期间发表论文	90
致谢	91

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Review	1
1.1 The structure and property of silk fibroin solution	2
1.2 Summary of silk fibroin microstructure	5
1.3 Summary of the applications of silk fibroin microstructure.....	15
1.4 The proposal and contents of this study.....	22
References	24
Chapter 2 Silk fibroin photolithography	30
2.1 Introduction.....	30
2.2 Materials and instruments	31
2.3 Method of making silk fibroin regenerated solution	32
2.4 Factors that accelerate the formation of silk fibroin	34
2.5 UV-light control of silk fibroin sol-gel transformation	36
2.6 Fabrication of silk fibroin films	40
2.7 Modulation of silk fibroin-2-NBA solution	44
2.8 Silk fibroin photolithography	46
2.9 Summary.....	54
References	55
Chapter 3 Silk fibroin inverse opal structure	58
3.1 Introduction.....	58
3.2 Materials and instruments	59

3.3 Preparation of polystyrene microspheres	60
3.4 Fabrication of PS photonic crystals.....	61
3.5 Making silk fibroin inverse opal structure by molding	63
3.6 Co-assembly system: polystyrene particle & TEOS	65
3.7 Co-assembly system: polystyrene particle & silk fibroin	68
3.8 Modifications for polystyrene particle & silk fibroin co-assembly	69
3.9 Summary.....	71
References	73
Chapter4Cytotoxicity detection, functionalization and application	
prospects of silk fibroin microstructures	75
4.1 Introduction.....	75
4.2 Materials and instruments	76
4.3 Cytotoxicity of silk fibroin.....	77
4.4 Functional integration of silk fibroin	80
4.4 The prospect of silk fibroina as a biological memristor	81
4.5 Summary.....	84
References	85
Chapter 5 Conclusion and outlook.....	87
5.1 Conclusion	87
5.2 Outlook.....	88
Research achievements.....	89
Acknowledgements	90

第一章 绪论

在现代社会对新一代材料具有较好的可持续性和绿色环保的要求背景下，许多天然的生物材料成为了现代制造业需求的原材料。而要让天然材料成为我们现代社会里现有的塑料、半导体和无机陶瓷等常用材料有力的替代品，两个问题需要解决，一个是如何让这些加工的原材料在保持环境可持续性的同时，在物理和材料性质上能与现代已有的加工技术对接。另一问题是如何选择天然材料，使其能在现有的全球商业供应链中有广泛的可用性和相对有竞争力的价格^[1]。这其中，生物大分子是一个相对理想的绿色原材料。自然界有机生命体本身的生产是这类高分子的主要来源，且经过生物本身的优化，再结合其独特的自组装特性，这类材料能形成微米和纳米级的多级网络结构。而这类结构能赋予这类材料更多的应用价值，从蝴蝶翅膀上的壳聚糖^[2]到胶原束阵列能产生的彩虹色表皮^[3]，种类繁多的自然生物现象吸引着人们去探索、认知并应用这类材料。

对于这类生物大分子的最直接的应用是将其重新加工并与我们现有的制造技术相结合，许多的实验室都搭建了类似的平台，开发了这一类绿色再生的天然材料。其中丝素蛋白是生物大分子中一个重要的分支，且其来源广阔，成本低廉，环境友好，并有一定的机械特性^[4]。随着人们对其的不断研究，对这些蛋白质的再生还原已变得十分成熟方便。近十年来，人们对丝素蛋白的研究大都集中在用丝素蛋白制造水凝胶，纤维，颗粒或者薄膜上，或者与其他高分子和无机物混合进行改性^[5-6]。而最近的研究则关注于在光学，可植入电学，药物传输等更加复杂的应用上^[1, 7-9]。而这类应用迫切需求多尺度复杂结构的丝素蛋白结构。最近对蚕丝微结构的制造工艺如压印，软刻蚀，电刻蚀和注入式打印有着令人惊讶的成果^[10-11]。借助着科学技术，如高精度磨具的压印^[12]，毛细作用引起的转移刻蚀^[13]，均能得到纳米尺度的分辨率。但上述的研究往往工程量大，且成本高昂。例如电刻蚀需要的真空环境^[14]，微结构铸模所需要的高温高压^[15]，都是较为苛刻的条件。相对而言，利用光刻这一相对容易可靠，成本相对低廉直接的刻蚀技术来制造高分辨率的生物高分子微结构是目前蚕丝研究领域的新课题和新方向。另一方面，丝素蛋白等大分子的一个重要特性是成型过

程中自组装产生的二级结构^[16]。如何诱导生物大分子的组装行为是控制其形貌结构的关键。通过互相掺杂具有自组装行为的材料来实现多种材料的共同组装是提高材料性能，创造新型复合材料的重要方式。丝素蛋白作为生物大分子，在介观尺寸上的组装情况和其宏观的性能密切相关^[17]。探究其他材料与丝素蛋白的共组装行为同样是现在材料学的研究的热点^[18]。

此外，丝素蛋白材料和许多水相的掺杂物都有很好的相容性，而因此有着各种各样功能化的研究^[19]。通过丝素蛋白的微结构加工工艺，意味着各类能与丝素蛋白结合的功能可以集成化，为人造皮肤，生物芯片等潜在应用提供了更多的手段。

1.1 丝素蛋白的结构和性质

丝素蛋白在纺织和药物应用上有着悠久的历史^[6]，蚕丝是人类利用最早的蛋白质之一。蚕丝原料来源广泛且可再生，所以成本低廉，而其自身具有力学性能好，对环境友好及光学性能好等优势。随着科学技术的不断发展，蚕丝蛋白的应用从过去相对单一的纺织用品拓展到了更多的领域。现今，随着人们对蚕丝蛋白不断地深入研究，其开发利用的价值也从过去单纯作为纺织物，逐渐延伸到食品发酵、生物制药、环境保护、能源利用等领域^[1, 7-9, 20-21]。

蚕丝作为一种天然的蛋白质纤维，由丝素蛋白和丝胶蛋白两部分构成^[22]。其中占到蚕丝重量约 75% 的丝素蛋白由于其所含纤维的三维网络结构，有着卓越的力学性能，生物相容性和光学透明性，在丝素蛋白中有着重要的地位，也是蚕丝科学研究领域的重点^[1]。

丝素蛋白作为一个生物大分子，有着一个轻链（约为 26kDa）和一个重链（约为 390kDa）^[23]。这两种链以接近 1:1 的比例被一个二硫键相连接。通过去除天然蚕丝里的丝胶蛋白并通过蛋白质变性剂（溴化锂溶液）我们可以处理得到再生丝素蛋白溶液^[24]。而该溶液可以更进一步形成我们常见的水凝胶、支架、薄膜和纤维。最近的研究表明，蚕丝材料卓越的特性是和其内部的多级结构密切相关的。如图 1-1 所示，天然蚕丝纤维和再生丝素蛋白材料如水凝胶和薄膜包含直径约为 30~35 纳米的纳米原纤（nanofibril）。而每一个纳米原纤都由许多 β 片状微晶通过无定形链连接。根据近期的研究，蚕丝素蛋白的多级网络结构是

一个单区 β -片状折叠结构通过无定形链集合而成的一个多路链接网络，也就是说纳米原纤之间再通过无定形链去连接成网络^[16, 25-27]。

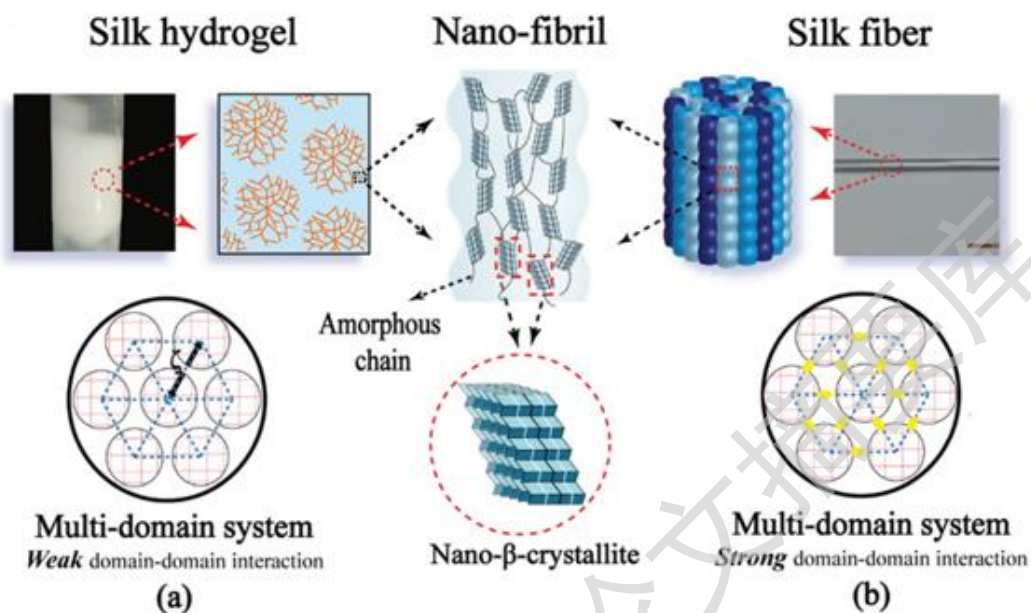


图 1-1 蚕丝的多级网络结构示意图。蚕丝由纳米原纤组成，而一些纳米原纤由 β 片状微晶通过无定形链段链接。这里显示了蚕丝的两种典型多级结构。a) 纳米原纤的域与域之间由相对无序的弱相互作用连接，例如水凝胶；b) 纳米原纤的域与域之间由于统一取向引起的缠结导致的强相互作用连接，例如纤维^[28]

Figure 1-1 Illustration of hierarchical network structures of silk materials. Silk materials consist of nanofibrils. Some nano- β -crystallites are connected by the amorphous chains in nanofibrils. There are two typical hierarchical structures of silk materials. a) Multidomain network with weak domain-domain interaction (e.g., silk hydrogel); b) Multidomain network with strong domain-domain interaction (e.g., silk fiber)^[28]

当这些纳米原纤无取向时，如图 1-1 (a) 中的水凝胶，原纤之间的作用力较弱。而当所有纳米原纤通过取向排列成型，如图 1-1 (b) 中的纤维，纳米原

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库