

厚壳贻贝粘附蛋白十肽重复序列的表达及功能分析

蒋臻¹⁾, 刘加鹏¹⁾, 杨丙晔¹⁾, 金利华¹⁾, 张其清^{1) 2)}*

(¹⁾ 厦门大学材料学院生物材料系, 厦门大学生物医学工程研究中心, 福建省生物医学工程重点实验室, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 福建 厦门 361005;

(²⁾ 中国医学科学院 中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

摘要 利用 PCR 扩增 *Mcfp-1* (*M. coruscus* foot protein-1) 基因的 12 个十肽重复序列粘附功能片段 (*Mcfp-1* 1~12) 并连接到 pGEX-4T1 表达载体中, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达. 纯化的多肽产物经凝血酶处理切除 GST 标签, 获得 *Mcfp-1* 1~12 功能肽段, 最后用酪氨酸酶对该产物进行修饰. 通过材料表面包被、石英晶体微天平 (QCM, quartz crystal microbalance) 分析、细胞粘附和细胞毒性等实验, 研究了该表达产物作为生物粘合剂的粘附特性. 结果显示, 重组表达产物 *Mcfp-1* 1~12 在多种材料表面的包被能力与 Cell-TakTM (天然提取的贻贝粘附蛋白混合物) 相当, 甚至更佳; 对细胞的粘附能力与 Cell-TakTM 相当; 用 HeLa 细胞和 293T 细胞进行的 MTT 实验未发现细胞毒性. 上述结果表明, *Mcfp-1* 1~12 作为生物医用粘合剂具有潜在应用价值; 同时, 基因重组技术可以为制备新型海洋贻贝粘附蛋白防水生物粘合剂提供有效的手段. 本研究为临床使用更优质的生物医用粘合剂提供了理论依据.

关键词 贻贝粘附蛋白; 基因重组; 重组多肽; 粘合剂; 生物材料

中图分类号 Q78; Q819

Expression and Functional Analysis of Recombinant Decapeptidyl Repeats of *Mytilus Coruscus* Foot Protein as the Bioadhesive

JIANG Zhen¹⁾, LIU Jia-Peng¹⁾, YANG Bing-Ye¹⁾, JIN Li-Hua¹⁾, ZHANG Qi-Qing^{1) 2)} *

(¹⁾ Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian, Technology Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen, Xiamen 361005, Fujian, China;

(²⁾ Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China)

Abstract The decapeptidyl repeats from *M. coruscus* foot protein-1 (*Mcfp-1*) was amplified by PCR and cloned into pGEX-4T1 expression vector. The recombinant *Mcfp-1* fragment 1-12 GST fusion was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified with glutathione-Sepharose 4B. Thrombin was used to remove GST to obtain the recombinant the *Mcfp-1* 1-12 peptide, and the adhesive bioactivity was characterized by tyrosinase modification, surface coating analysis, QCM (quartz crystal microbalance), and cell adhesion and cytotoxicity analysis. The results showed that the coating and adhesive ability of *Mcfp-1* 1-12 on several material surfaces was comparable to or better than that of Cell-TakTM (mixture of naturally extracted mussel adhesive protein, MAP). No cytotoxicity was detected by the MTT assays in HeLa and 293T cells. It suggested that recombinant *Mcfp-1* 1-12 might be used as the bioadhesive for

收稿日期: 2009-08-19; 接受日期: 2009-12-06

国家自然科学基金 (No. 30600147) 和福建省青年科技人才创新项目 (No. 2004J022) 资助

* 联系人 Tel/Fax: 0592-2185299; E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

Received: August 19 2009; Accepted: December 6 2009

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30600147) and Scientific Technology Innovation Fund for Young Scholar of Fujian Province (No. 2004J022)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

* Corresponding author Tel/Fax: 0592-2185299; E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

medical purpose.

Key words mussel adhesive protein; genetic recombinant; recombinant peptide; adhesive; biomaterial

海洋贻贝 (*Mytilus coruscus*) 的足丝腺能分泌足丝附着于不同的底材上,使其能在巨浪冲刷下仍紧紧附着于底材.已发现的贻贝粘附蛋白共有 6 种:足蛋白 (foot protein, fp) fp-1、fp-2、fp-3、fp-4、fp-5 和 fp-6.所有这 6 种贻贝粘附蛋白 (mussel adhesive proteins, MAP) 都含有 L-3,4-二羟基苯丙氨酸,即多巴 (DOPA,由酪氨酸羟基化衍生而来),而多巴则是该类蛋白发挥粘附活性的关键因素^[1,2].在这 6 种 MAPs 中,fp-1 蛋白家族中的蛋白含有大约 80 个保守的十肽重复序列 AKPSYP**P*TY* K(P**P*和 Y* 分别代表反式-2,3-顺式-3,4-二羟基苯丙氨酸 4-羟脯氨酸和多巴^[3-6]),此序列是足丝包被蛋白的主要成分,也被认为在足丝粘附性能中起重要作用^[5].

由于 MAPs 的高强度、高韧性和防水性,该类蛋白在外科医用粘合剂和防水粘合剂等科技领域的潜在应用前景已经越来越受到关注^[1].目前,唯一商业化应用的 MAP,即 Cell-TakTM (从紫贻贝 *Mytilus edulis* 中提取的足蛋白混合物),具有低细胞毒性和很好的粘附性能,但 Cell-TakTM 的制备方法非常低效而且浪费资源^[7].

近年来,已经有科研人员构建了重组的紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 足蛋白亚类 3A (*Mgfp-3A*) 和亚类 5 (*Mgfp-5*),并且在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中成功表达,表达产物均具有粘合剂的性质^[7-11],但产率较低.该类融合蛋白被认为是具有高产率、易纯化、高生物相容性的实用型生物粘合剂^[10,11].fp-1 的功能性全序列曾被构建到几种表达体系中进行研究,均告失败.重组的 fp-1 六个十肽重复序列曾被成功表达过,但对其粘附特性并未进行分析^[12].考虑到 fp-1 在重组粘附蛋白中的粘附性能和特点^[3-6,10,11],本室尝试构建厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) fp-1 即 *Mcfp-1* 的 12 个十肽重复序列,并在大肠杆菌中进行表达.对粘附功能分析的结果显示,这种重组多肽在医药和水中环境中具有潜在应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料

厚壳贻贝 (福州水产市场),pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司).限制性内切酶 (TaKaRa 公司),T4

DNA 连接酶 (Invitrogen 公司),RNase 酶 (Sigma 公司),*Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司),溶菌酶 (Sigma 公司),MLLV reverse transcriptase (TaKaRa 公司),酪氨酸酶 (Invitrogen 公司).氨苄青霉素 (Sigma 公司),DNA Marker (TaKaRa 公司),预染蛋白 Marker (Fermentas MBI 公司),非预染蛋白 Marker (上海生工公司),IPTG (Bio BASIC INC),Trizol (Invitrogen 公司),UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (Bio BASIC INC),GST 抗体 (Protein Tech Group, Inc),二抗 (辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG) (厦门联科生物公司),琼脂糖珠 (glutathione-agarose, Sigma 公司).引物合成由上海生工生物工程有限公司完成,PAGE 级,纯度 98%,测序由上海生工生物工程有限公司完成.

凝胶图像分析系统 Tanon GIS-2008 (天能科技上海有限公司),超声波细胞粉碎机 JY92-II (宁波新芝生物科技股份有限公司),PCR 仪 T3 Thermocycle (德国 Biometra),组织匀浆机 T18 basic (德国 IKA 公司),标准型 PH 计 PB-10 (德国赛多立斯),高速冷冻离心机 Avanti J-25 (BECKMAN),电子分析天平 AUY220 (日本岛津公司),电泳仪 (BIO-RAD 公司),恒温培养摇床 QYC-200 (上海福马实验仪器有限公司),核酸蛋白检测仪 DU800 (BECKMAN 公司),冷冻干燥机 FreeZone (Labconco 公司),单人双面净化工作台 SW-CJ-1F (苏州净化设备有限公司),荧光倒置显微镜 (德国 ZEISS),石英晶体微天平及晶片 (Technobiochip 意大利)

1.2 重组表达载体的构建

从福建省福州市海产品市场购得贝壳长度 7~9 cm 活的厚壳贻贝 *M. coruscus*.根据 TRIZOLR LS 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书提取厚壳贻贝足尖部位酚腺体中的总 RNA,反转录得到 cDNA;再以 cDNA 为模板,PCR 扩增 *Mcfp-1* 基因 (GenBank, No. D63777) 中编码 *Mcfp-1* 氨基酸序列第 692 位到第 811 位氨基酸残基的 12 个连续十肽重复序列的 cDNA 片段 (*Mcfp-1* 1~12).PCR 引物由上海生工生物工程公司合成,在正向引物末端加入 *Eco*R I 酶切位点,反向引物末端加入终止密码子和 *Sal* I 酶切位点,引物序列如下:正向引物 F: 5' 忆cgaattctataaacctaagaaaacttatcc-3' 忆反向引物 R: 5' 忆atgtcagcttacggttgatagcgtatc-3' 忆

PCR用高保真 *Pyrobest*TM DNA聚合酶(TaKaRa公司大连分公司),PCR反应循环为:94℃变性30 s,65℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环30次。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离并回收后,以 *EcoR* I和 *Sal* I双酶切,再次纯化DNA产物,用T4 DNA连接酶(Invitrogen公司)连接到经同样酶切并经牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化处理的pGEX-4T1载体上。将连接产物pGEX-4T1-Mcfp-1~12转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂布于含氨苄青霉素100 μ g/ml的LB固体培养基上,37℃恒温培养16 h。挑取单克隆菌落,于液体LB(含氨苄青霉素100 μ g/ml)培养基中,37℃,255 r/min摇菌过夜,煮沸法提取质粒。双酶切检测,同时经上海生工公司测序以验证重组质粒。

1.3 重组多肽的表达

将重组质粒pGEX-4T1-Mcfp-1~12转化到大肠杆菌BL21感受态细胞中,涂布于LB固体培养基上(含氨苄青霉素100 μ g/ml)培养过夜,挑取单克隆菌落到3 ml液体LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/ml)中,37℃,255 r/min摇菌过夜。将菌液转入3 L LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/ml),37℃摇床培养至 A_{600} 为0.6~1.0,加入IPTG,使之终浓度为1.0 mmol/L;30℃诱导目的蛋白表达5 h。离心(8 000 g,10 min,4℃)得到大肠杆菌细胞沉淀,原80℃保存。

1.4 SDS-PAGE和Western印迹检测

细胞沉淀经煮沸裂解后,各组分通过12% SDS-PAGE分离,以考马斯亮蓝R-250染色或是Western印迹检测。Western印迹检测时,用Bio-Rad的小型电转印槽将胶内蛋白转移到硝酸纤维素膜(Millipore,USA)上,100 V转膜1 h。目的蛋白以GST抗体(Protein Tech Group,USA)和过氧化物偶联的羊抗兔二抗(MultiScience Biotech,China)检测。再经抗体孵育后,膜以DAB(二氨基联苯胺)缓冲液(0.8 mg/ml DAB,0.4 mg/ml NiCl₂,0.009% H₂O₂,100 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5)孵育,显色检测目的蛋白。

1.5 重组多肽的纯化

向表达产物细胞沉淀中加入适量PBS(140 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L KH₂PO₄,1.8 mmol/L Na₂HPO₄)洗涤沉淀2次,用冰预冷PBS-T(PBS中加入1% Triton)重悬沉淀;冰上超声破碎至菌液澄清;冰浴15 min;4℃,12 000 g离心15 min,取上清,并向其中加入适量谷胱甘肽-

琼脂糖珠(glutathione-Sepharose 4B,Amersham Biosciences公司);4℃温和摇晃3 h以混匀;然后在4℃500 g离心5 min,弃上清,PBS洗涤沉淀3次后加入1 ml洗脱液(0.154 g还原型谷胱甘肽溶解在50 ml 50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0),室温下轻摇10 min洗脱,获得与GST融合纯化的Mcfp-1功能区域重组多肽产物GST-Mcfp-1 1~12。

1.6 表达产物的酶切和修饰

凝血酶(thrombin,Sigma)按0.5 U/nmol将纯化产物GST-Mcfp-1 1~12在25℃酶切16~20 h以切除GST;4℃,12 000 r/min离心60 min,弃上清;PBS洗涤沉淀2次,离心得到白色沉淀,即为目的重组多肽产物Mcfp-1 1~12(WO),用5%醋酸溶解。将该多肽溶液稀释至1.44 mg/ml,加入酪氨酸酶(tyrosinase mushroom,Sigma)至终浓度为10 U/ml,25℃反应6 h^[3],从而将酪氨酸残基修饰成多巴,即得到Mcfp-1功能区域重组多肽修饰终产物Mcfp-1 1~12(WT)。

1.7 多种材料表面包被能力的分析

参考文献[8]方法检测该重组多肽在玻片、铝片、钛片、聚苯乙烯片表面的包被能力。溶于5%醋酸的GST-Mcfp-1 1~12、小牛血清白蛋白(BSA)和Cell-TakTM(BD Bioscience,USA)作为对照,以Mcfp-1 1~12(WT)和Mcfp-1 1~12(WO)作为相互对比样品。在洗净的上述几种材料表面滴加10 μ l浓度为1.44 μ g/ μ l上述样品,在相对湿度80%环境中,25℃放置12 h,取出后,蒸馏水冲洗2 h;考马斯亮蓝R-250染色观察包被情况。

1.8 微量粘附分析

纯化的重组蛋白在金表面的吸附量用QCM(quartz crystal microbalance)进行分析^[8]。分析使用直径6 mm石英晶片(Technobiochip,Italy),震动频率9.949 MHz,金电极。分析时,向晶片上的金表面滴加上述材料包被实验中所用的每种样品各5 μ l,待样品干燥后,将石英晶片连接到石英晶体微天平分析仪(Technobiochip,Italy)上,检测并记录震动频率的变化,根据公式转换成金表面吸附蛋白的量^[8]。

1.9 动物细胞粘附以及细胞毒性分析

HeLa细胞、293T细胞用含有10%胎牛血清(FBS),100IU青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM培养基,在含5% CO₂环境中37℃培养。样品为Mcfp-1 1~12(WT)和Mcfp-1 1~12(WO);Cell-TakTM,多聚赖氨酸(PLL,poly-L-lysine,Sigma)和未

经包被的玻片表面作为对照. 向洗净的盖玻片(18 mm 伊 8 mm) 表面滴加 5 μ l, 44 mg/ml 的上述纯化样品. Cell-Tak™ 和 PLL 的样品溶液制备方法按照说明书操作. 纯化的重组多肽样品制备与 Cell-Tak™ 样品制备方法一致. 玻片于超净台中干燥, 然后用 PBS 清洗 2 次. 将 HeLa 细胞和 293T 细胞消化分散后低速离心, 弃上清, 用 PBS 清洗 2 次, 然后用无血清的 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司) 重悬细胞, 计数. 将细胞浓度稀释到 1 伊 10⁴ 个/ml, 种入放有上述处理玻片的细胞培养皿中, 37 益培养 1 h 后, 取出玻片, 用 PBS 洗涤 5 遍, 洗去未粘附细胞, 然后以台盼兰(0.4% W/V) 染色盖玻片, 显微镜下观察细胞粘附情况^[11].

重组多肽的细胞毒性用 MTT 法进行分析. 用上述包被盖玻片的方法向 96 孔板每孔中滴加 4 μ l, 44 mg/ml 样品(Mcfp-1 1 ~ 12 (WT)、Cell-Tak™ 和 PLL), 每个样品重复 4 次, 并以未包被孔作为对照. 将 100 μ l HeLa 细胞(5 伊 10³ cells/ml) 或 293T 细胞(1 伊 10⁴ cells/ml) 种入处理后的 96 孔板中, 参照 MTT 试剂盒(ATCC, USA) 说明书方法, 每培养 12 h 检测 490 nm 处的吸光值以反映细胞活性.

1.10 塑料耗材及骨组织的粘连检测

待检样品为 BSA, Mcfp-1 1 ~ 12 (WT) 和 Mcfp-1 1 ~ 12 (WO). 根据文献[10]方法, 用 4 μ l, 44 μ g/ μ l 样品滴于细胞培养皿上, 再将塑料枪头置于其上, 检测培养皿与塑料枪头之间的粘附作用. 同样用 8 μ l, 44 μ g/ μ l 样品滴于小鼠股骨断裂处, 将断裂的两段股骨固定连在一起. 将粘合的连接物置于相对湿度 80% 潮湿环境中 25 毅, 观察交联效果.

2 结果

2.1 重组多肽的表达和纯化

PCR 扩增获得 Mcfp-1 1 ~ 12 的 DNA 片段(363 bp), 将该片段连接至 pGEX-4T 载体中, 以 IPTG 诱导重组蛋白在大肠杆菌中表达(Fig. 1), 因表达水平较低(Fig. 1A), 所以应用 Western 印迹检测表达产物. 结果显示有 2 条特异条带(Fig. 1B). 分子量较大的特异条带对应的分子量为 40.5 kD, 与 GST-Mcfp-1 1 ~ 12 的理论分子量相接近(Fig. 1B); 分子量较小的特异条带分子量为 35.1 kD(Fig. 1 B, lane 4), 所对应的蛋白可能是大肠杆菌中因稀有密码子导致的截短表达产物. SDS-PAGE 和 Western 印迹分析结果都显示表达的这两种融合蛋白均为可溶.

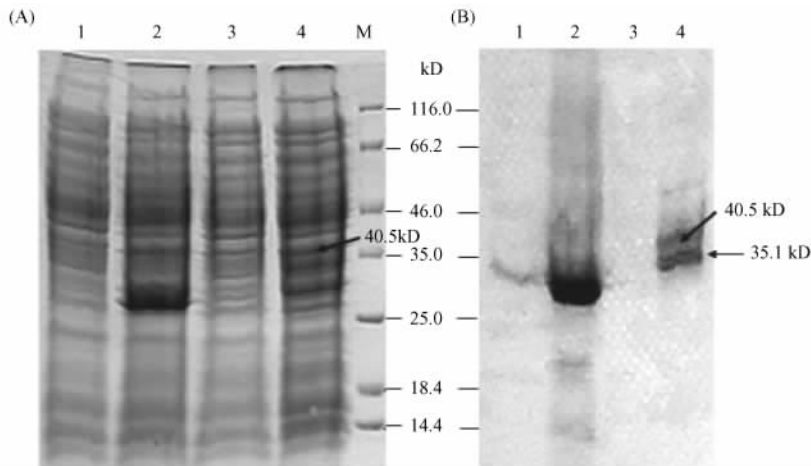


Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant Mcfp-1 1 ~ 12 (A) Coomassie blue-stained SDS-PAGE analysis. (B) Western blot analysis of expressed GST and GST-Mcfp-1 1 ~ 12. M, protein molecular weight marker (kD); 1 and 2, whole cell lysate transformed with empty pGEX-4T vector without and with IPTG inducement; 3 and 4, whole cell lysate transformed with recombinant expression vector induced without and with IPTG. Western blot analysis showed that molecular mass of the higher band in lane 4 was 40.5 kD, close to that of GST-Mcfp-1 1 ~ 12, while the lower band was 35.1 kD, which might be closed with the truncated expression

2.2 多种材料表面包被能力的分析

用 4 种材料检测了重组多肽的包被能力. 结果显示, 对照的 BSA 和 GST 融合蛋白斑点在流水冲洗

中被洗掉, 而对照的 Cell-Tak™ 和 Mcfp-1 1 ~ 12 (WT) 蛋白斑点冲洗后在 4 种材料表面都仍然存在(Fig. 2). 该玻片经考马斯亮兰染色后, 对照的 BSA

和 GST-Mcfp-1 1~12 滴加处没有蛋白染色信号, Mcfp-1 1~12 (WT) 蛋白斑点被染成蓝色。结果显示,在玻片和钛片表面, Mcfp-1 1~12 与 Cell-Tak™ 有相似的包被能力 (Fig. 2A, 2C); 而在聚苯乙烯和铝片表面, Mcfp-1 1~12 (WT) 的包被量多于 Cell-Tak™ (Fig. 2B, 2D)。这表明, Mcfp-1 1~12 (WT) 有着类似于或优于 Cell-Tak™ 的包被能力。另外, Mcfp-1-12 (WO) 在材料表面的包被能力显示与 Mcfp-1 1~12 (WT) 相似 (Fig. 2), 说明 Mcfp-1 1~12 (WO) 也具有一定的包被能力。

2.3 微量粘附分析

QCM 更精确的分析结果也证实了以上实验结果。与 BSA 和 GST-Mcfp-1 1~12 相比, Mcfp-1 1~12 和 Cell-Tak™ 在 QCM 晶片上产生的频率变化更大, $P < 0.05$ (Fig. 3), 说明 Mcfp-1 1~12 和 Cell-Tak™ 在石英晶片的金表面粘附的蛋白量明显多于 BSA 和 GST-Mcfp-1 1~12。而 Mcfp-1 1~12 (WT) 产生的频率变化比 Mcfp-1 1~12 (WO) 大 ($P < 0.05$), 说明在酪氨酸被修饰为多巴后, 确实增强了 Mcfp-1 1~12 的吸附能力。另外, Mcfp-1 1~12 (WT) 和 Mcfp-1 1~12 (WO) 产生的频率变化都比 Cell-Tak™ 高 ($P < 0.05$), 表明 Mcfp-1 1~12 的吸附能力较 Cell-Tak™ 要高。这样的结果与之前在多种材料表面的包被能力实验分析结果 (Fig. 2, 见第 281 彩页) 相符合。

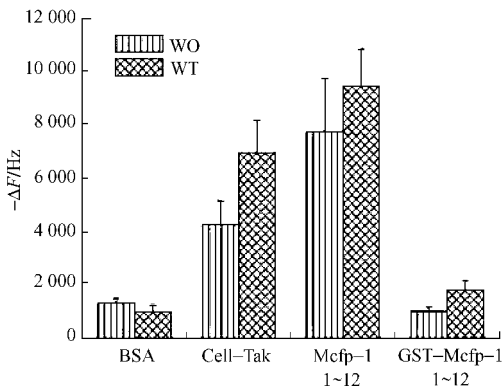


Fig. 3 QCM analyses for absorption of recombinant Mcfp-1 1~12 on a gold surface BSA and GST-Mcfp-1 1~12 were used as negative controls, and commercial Cell-Tak™ was used as a positive control. 5 μ l 1.44 mg/ml protein sample was coated on the gold surface. Each value and error bar represent the mean of triplicate independent experiments and its standard deviation

2.4 动物细胞粘附以及细胞毒性分析

在细胞粘附实验中, HeLa 细胞和 293T 细胞均

在无血清培养基中培养, 因为含血清的培养基中含有诸如纤连蛋白、粘连蛋白等促进细胞粘附的因素^[14]。将 Mcfp-1 1~12 (WT) 包被的玻片表面对细胞粘附的效果与 Cell-Tak™、PLL、Mcfp-1 1~12 (WO) 包被表面以及未包被的表面相比较, 在玻片表面培养细胞 1h 后, 以光学显微镜 (Axiovert 200, ZEISS) 观察粘附细胞数。结果显示, Mcfp-1 1~12 (WT) 和 Mcfp-1 1~12 (WO) 包被表面均有较多细胞粘附, 但数量略少于 Cell-Tak™ 包被表面粘附的细胞数 ($P < 0.05$), 而未包被蛋白的玻片表面, 细胞几乎全被冲洗掉。PLL 包被的玻片表面粘附的细胞也同样被冲洗掉 (Fig. 4)。另外, Mcfp-1 1~12 (WO) 包被表面粘附的细胞数略少于 Mcfp-1 1~12 (WT) ($P < 0.05$), 但数量差别不大 (Fig. 4), 这一结果与上述材料表面包被实验以及 QCM 检测分析结果相符合。

为了评价该重组 Mcfp-1 1~12 对细胞培养的安全性影响, 同样利用 HeLa 细胞和 293T 细胞, 应用 MTT 法分析该重组 Mcfp-1 1~12 的细胞毒性。与未包被的培养材料相比, Mcfp-1 1~12 在两种细胞系中均未检测到有细胞毒性反应 (Fig. 5, 见第 281 页)。

2.5 塑料及骨组织的粘连检测

利用聚苯乙烯细胞培养皿与枪头来检测该重组 Mcfp-1 1~12 的粘连性能, 实验中仅使用了大约 6 μ g 蛋白样品。在潮湿环境中 Mcfp-1 1~12 (WT) 成功地将细胞培养皿和枪头粘连在一起, 而 BSA 对照组在同样条件下仍然呈液体状未见粘住枪头。Mcfp-1 1~12 (WO) 也能将枪头粘连在细胞培养皿上, 但粘连牢固度低于 Mcfp-1 1~12 (WT) 枪头易脱落。在检测 Mcfp-1 1~12 对断裂小鼠股骨的粘接作用显示, 结果与上述塑料的粘接情况相似。Mcfp-1 1~12 (WT) 对断裂小鼠股骨的粘接效果最好, Mcfp-1 1~12 (WO) 粘接的断裂股骨较易再次折断, 而 BSA 则未显示出任何粘接能力 (Fig. 6, 见第 281 彩页)。

3 讨论

由于 fp-1 类蛋白含有大量的十肽重复序列, 利用 PCR 技术较难扩增得到 Mcfp-1 的全部重复序列区域。然而, 并不是每个十肽都具有完全一致的核酸序列。因此, 根据其中 12 个十肽重复序列两端特异的核酸序列设计 PCR 引物, 从而特异性的扩增出该特定的片段 Mcfp-1 1~12。转入重组表达质粒的 BL21 细胞的生长曲线显示, 重组 Mcfp-1 1~12 的表达对细胞生长不利, 这可能是 Mcfp-1 1~12 表达水

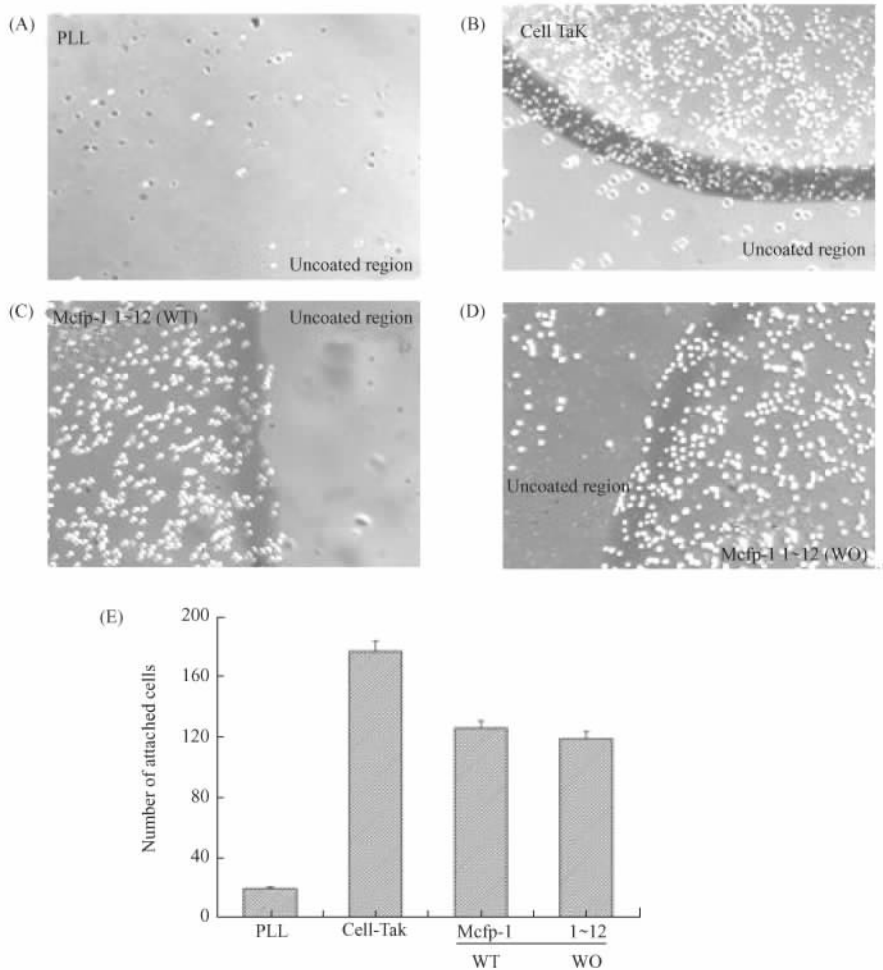


Fig. 4 Adhesion analysis of HeLa cells (A) Adhesion analysis of HeLa cells on PLL coated surfaces of glass slide; (B) Adhesion analysis of HeLa cells on Cell-TakTM coated surfaces of glass slide; (C) Adhesion analysis of HeLa cells on Mcfp-1 1~12 (WT) coated surfaces of glass slide; (D) Adhesion analysis of HeLa cells on Mcfp-1 1~12 (WO) coated surfaces of glass slide. Living cells were visualized by staining with trypan blue. The uncoated region of each surface was used as negative control; (E) The number of attached cells on coated surface on an 8 cm × 8 cm area of a visual field under microscopy (100×). Cells attached to Mcfp-1 1~12 (WT) and Mcfp-1 1~12 (WO) coated surfaces were fewer than that of Cell-TakTM coated surfaces ($P < 0.05$). And cells attached to Mcfp-1 1~12 (WO) coated surfaces were fewer than that of Mcfp-1 1~12 (WT) coated surfaces ($P < 0.05$). Each value and error bar represent the mean of triplicate samples and its standard deviation

平较低的原因之一。

由于 BL21 等原核细胞系中含有几种稀有密码子,而实验中表达的 Mcfp-1 1~12 是真核蛋白,因此,当蛋白翻译进行到这些稀有密码子所处位置时,翻译过程因没有足够可与这些密码子匹配的 tRNA 而被提前终止,因而导致表达产物中存在截短型的重组蛋白。在表达的目的蛋白序列中,存在该类稀有密码子,它们分布在多肽序列中的 5 个位置,Western 印迹检测结果中(Fig. 1 B;泳道 4) 较小条带的分子量减去 GST 分子量后与多肽序列中第 3

个稀有密码子对应的位置相符(第 75 个氨基酸),即与截短表达产物的理论分子量 35.1 kD 相符,由此可以推测有 2 种重组多肽被表达。另外,其在真核细胞内的表达情况也需要进一步研究。鉴于 fp-1 的十肽重复序列被认为在足丝粘附性能中发挥着重要作用,而且根据以往研究^[5,10,11],它被认为是发挥粘附性能的主要结构域,因此, Mcfp-1 1~12 的全长表达产物与截短表达产物都应具有一定的粘附性能。

多种材料表面包被能力和 QCM 的分析结果都显示,该重组 Mcfp-1 1~12 的粘附能力与 Cell-TakTM

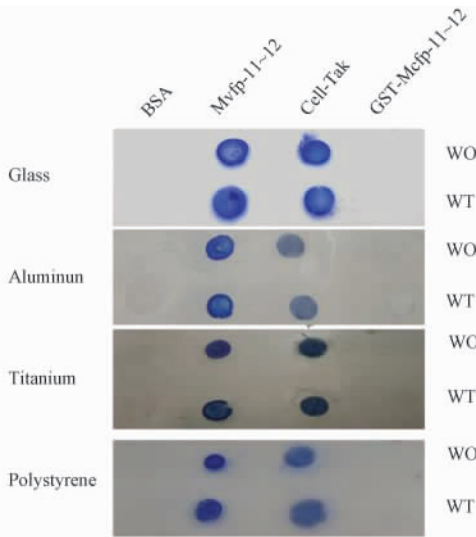


Fig. 2 Recombinant Mcfp-1 1 ~ 12 coating on various material surfaces BSA and GST-Mcfp-1 1 ~ 12 were used as negative controls , and commercial Cell-Tak™ was used as positive control. WO , protein samples without tyrosinase modification; WT , protein samples modified with tyrosinase. 10 μ l 1.44 mg/ml protein samples were coated on each surface; the surfaces were incubated for 12 hours at 25 $^{\circ}$ C in a humid environment , and then washed with deionized water for 2 hours. Coated proteins were visualized by Coomassie blue staining

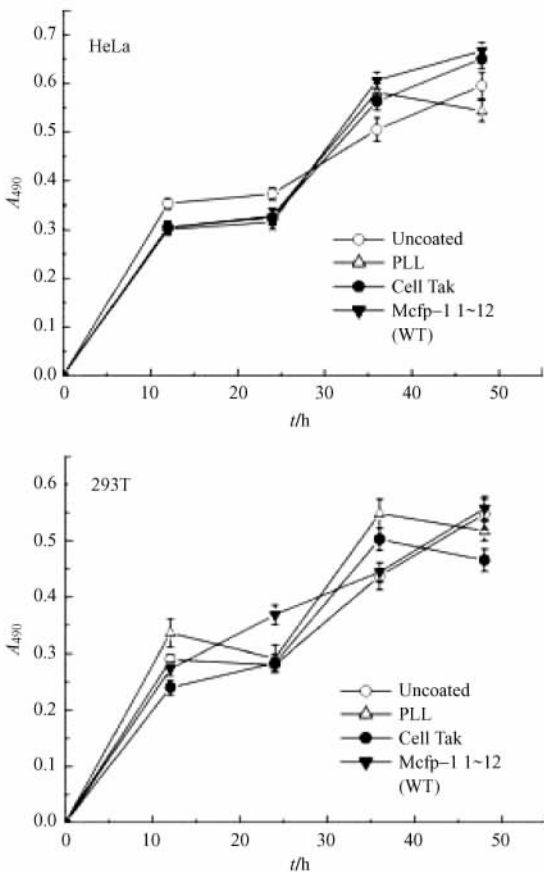


Fig. 5 Cytotoxicity assay of Mcfp-1 1 ~ 12 (WT) compared with PLL and Cell-Tak using human 293T and HeLa cells

Uncoated surface was used as a negative control. 100 μ l of 293T cells (1 $\times 10^4$ cells/ml) or HeLa cells (5 $\times 10^3$ cells/ml) in serum-free medium was seeded into each well of 96-well cell plates , and MTT assay was performed every 12 hours. The absorbance were measured at 490 nm. Each value and error bar represent the mean of quadruplex samples and its standard deviation

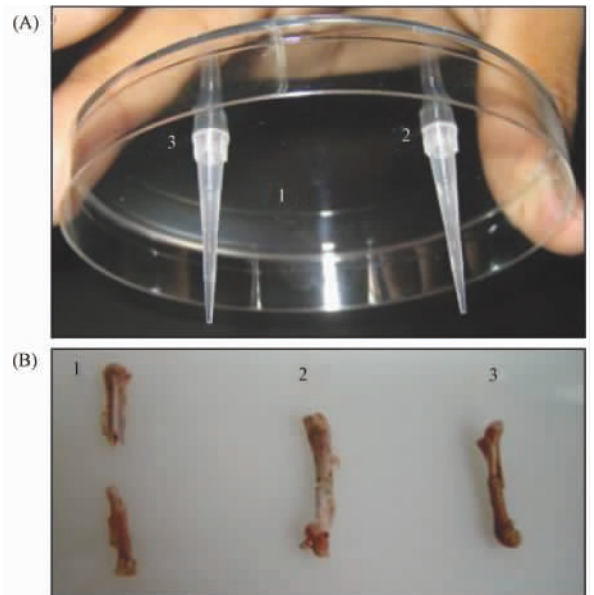


Fig. 6 Conglutination test of recombinant Mcfp-1 1 ~ 12 on laboratory plastic consumables and broken mouse thigh bone (A) Test on laboratory plastic consumables. (B) Test on broken mouse thigh bone. The amount of protein applied to each joint was 4 μ l (1.44 mg/ml) in Fig. A and 8 μ l (1.44 mg/ml) in Fig. B. The fixtures were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 12 hours in a humid environment. 1 , BSA; 2 , Mcfp-1 1 ~ 12 (WO) ; 3 , Mcfp-1 1 ~ 12 (WT)

相近甚至更佳 而且在细胞粘附实验中 ,Mcfp-1 1 ~ 12 也显示了较好的粘附效果并且不具有细胞毒性 , 但细胞在 Mcfp-1 1 ~ 12 包被表面的粘附量仍然略低于 Cell-Tak™. 这可能是因为 Cell-Tak™ 是从贻贝足部提取得到的蛋白混合物 ,其成分中含有诸如胶原蛋白等有利于细胞粘附的细胞外基质(ECM) 所

致^[15],而本实验中表达的重组 Mcfp-1 1~12 不含细胞外基质的蛋白成分.该重组 Mcfp-1 1~12 在实验分析中显示了比常用细胞粘附剂(如 PLL)更好的防水性能,而 PLL 在冲洗操作中较易被冲洗.粘附实验结果显示,该重组 Mcfp-1 1~12 具有优于 Cell-Tak™ 的表面包被能力,而相对较弱的细胞粘附能力则可能归因于该 Mcfp-1 1~12 的纯度不够.因此,对 Mcfp-1 1~12 进一步的纯化方法仍有待改进.修饰后的重组多肽 Mcfp-1 1~12 (WT) 可以在潮湿环境中粘接断裂的小鼠股骨,但未修饰的重组多肽 Mcfp-1 1~12 (WO) 的粘接能力则相对较弱.这进一步表明,将重组 Mcfp-1 1~12 中的酪氨酸修饰成多巴是增强其粘附能力的重要因素.

综上所述,重组 Mcfp-1 1~12 具有与天然提取的 MAPs(如 Cell-Tak™,被认为是最好的可用于人细胞的生物粘合剂)相似的粘附能力,因此可以作为 MAPs 的潜在替代物.对断裂的动物骨组织较好的粘接效果表明了重组 Mcfp-1 1~12 作为功能性的生物粘合剂用于医学领域的可能性.虽然诸如优化纯化条件、增加表达产量等研究还需进一步进行,但本实验结果表明,重组 Mcfp-1 1~12 在医药领域中具有成为新型实用生物粘合剂的潜在应用价值,为临床使用更优质的生物医用粘合剂打下了良好的基础.

致谢 感谢厦门大学固体表面与物理化学国家重点实验室田中群教授在 QCM 仪器使用中提供大力帮助.

参考文献(References)

- [1] Silverman H G, Roberto F F. Understanding marine mussel adhesion [J]. Mar Biotechnol (NY), 2007, 9(6): 661-681
- [2] Akemi Ooka A, Garrell R L. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DOPA-containing peptides related to adhesive protein of marine mussel *Mytilus edulis* [J]. Biopolymers, 2000, 57(2): 92-102
- [3] Inoue K, Odo S. The adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide

motif [J]. Biol Bull, 1994, 186(3): 349-355

- [4] Taylor S W, Waite J H, Ross M M, et al. Trans-2,3-cis-3,4-dihydroxyproline, a new naturally occurring amino acid, is the sixth residue in the tandemly repeated consensus decapeptides of an adhesive protein from *Mytilus edulis* [J]. J Am Chem Soc, 1994, 116(23): 10803-10804
- [5] Waite J H. Evidence for a repeating 3, 4-dihydroxyphenylalanine and hydroxyproline containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L [J]. J Biol Chem, 1983, 258(5): 2911-2915
- [6] Waite J H, Housley T J, Tanzer M L. Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations [J]. Biochemistry, 1985, 24(19): 5010-5014
- [7] Hwang D S, Gim Y, Kang D G, et al. Recombinant mussel adhesive protein Mgfp-5 as cell adhesion biomaterial [J]. J Biotechnol, 2007, 127(4): 727-735
- [8] Hwang D S, Yoo H J, Jun J H, et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgfp-5 in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3352-3359
- [9] Hwang D S, Gim Y, Cha H J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Prog, 2005, 21(3): 965-970
- [10] Hwang D S, Gim Y, Yoo H J, et al. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151 [J]. Biomaterials, 2007, 28(24): 3560-3568
- [11] Hwang D S, Simc S B, Cha H J. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide [J]. Biomaterials, 2007, 28(28): 4039-4046
- [12] Kitamura M, Kawakami K, Nakamura N, et al. Expression of a model peptide of a marine mussel adhesive protein in *Escherichia coli* and characterization of its structural and functional properties [J]. J Polym Sci Part A Polym Chem, 1999, 37(6): 729-736
- [13] Hwang D S, Yoo H J, Jun J H, et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgfp-5 in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3352-3359
- [14] Underwood P A, Bean P A, Mitchell S M, et al. Specific affinity depletion of cell adhesion molecules and growth factors from serum [J]. Immunol Methods, 2001, 247(1-2): 217-224
- [15] Coyne K J, Qin X X, Waite J H. Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer [J]. Science, 1997, 277(5333): 1830-1832