

双组分快速固化生物软组织黏合剂的研制



黄娟¹, 李浩榕², 王谦²

1. 浙江理工大学 生命科学学院 (杭州 310018)

2. 中国科学院理化技术研究所 杭州研究院 (杭州 310018)

【摘要】 贻贝足丝蛋白 (MFp) 是一类能够在水下迅速固化, 并能黏附在不同基材表面的特殊蛋白质, 作为蛋白类生物黏合剂具有广泛的应用前景。本文在大肠杆菌中高效可溶性地表达了贻贝足丝融合蛋白 SFp3 (Sumo-Fp3), 并通过蘑菇酪氨酸酶在柱催化, 将其中约 5% 的酪氨酸残基转化为 DOPA。在含 DOPA 的 SFp3 (DSFp3) 中加入分子量为 1 500 kD 的透明质酸后, 形成的双组分生物胶水在牛皮表面的黏附力超过氰基丙烯酸酯组织黏合剂 Dermabond[®] 的两倍, 并在 5 min 内达到 52% 最大黏附强度。通过扫描电子显微镜和生物膜层干涉技术, 观测到透明质酸与 DSFp3 的静电层层组装行为, 并形成紧密片层结构。本研究为蛋白类生物胶水黏附强度低、固化慢提供了一种解决方法和理论基础。

【关键词】 贻贝足丝蛋白; 透明质酸; 黏附蛋白; 层层组装; 快速固化

Development of double-component rapid curing bioadhesive

HUANG Juan¹, LI Haorong², WANG Qian²

1. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tec University, Hangzhou 310018, P.R.China

2. Hangzhou Research Institute of Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310018, P.R.China

Corresponding author: WANG Qian, Email: QianWang@mail.ipc.ac.cn

【Abstract】 Mussel foot proteins (MFp) could cure rapidly under water and adhere to different substrates. It has broad application prospects as a biocompatible bioglue. The soluble recombinant SUMO-MFp fusion protein (SFp3) was efficiently expressed in *E.coli*, and about 5% of tyrosine of SFp3 were converted into DOPA by using mushroom tyrosinase. The adhesion strength of DOPA-containing SFp3 (DSFp3) and hyaluronic acid (MW = 1 500 kD) was more than twice the cyanoacrylate-based tissue adhesives, Dermabond[®], and it reached 52% of its maximal strength within 5 minutes on cowhide. A layer-by-layer assembly of hyaluronic acid with DSFp3 was observed to form compact sheet structures through scanning electron microscopy and biofilm interferometry assay. This work provides a solution and theoretical basis for the low adhesion strength and slow curing of protein-based bioglue.

【Key words】 mussel foot protein; hyaluronic acid; adhesive protein; layer-by-layer assembly; rapid solidification

引言

医用软组织黏合剂使用方便, 能快速封闭切口或创口, 在眼科、心脏修补、血管等手术中具有极其显著的优势^[1]。医用组织黏合剂可分为化学类和生物类。化学类组织黏合剂以氰基丙烯酸酯类黏合剂为代表, 氰基丙烯酸酯类化合物 (cyanoacrylate) 的极性基团产生诱导效应, 使 β 位的碳原子有很强的吸电效应, 在水、蛋白质的存在下能迅速发生阴离子聚合, 短时间内即可形成较强粘结^[2]。Derma-

bond[®] (2-octyl cyanoacrylate) 即是基于氰基丙烯酸酯类的常用黏合剂, 其毒性较小, 易于使用, 3.6 min 可闭合皮肤^[3-4]。尽管 Dermabond[®] 能够快速固化, 黏合性能强, 但具有一定的临床风险, 如炎症反应、异物反应以及促进肿瘤发展^[5-6]。与化学类组织黏合剂相比, 生物软组织黏合剂具有临床不良反应少、组织相容性更好以及体内可降解的优点, 因而一直是研究热点。

生物软组织黏合剂主要分为蛋白类黏合剂和多糖类黏合剂。纤维蛋白黏合剂是最常用的蛋白类黏合剂, 临床上主要用于止血, 也可用于吻合周围神经和固定移植皮肤。纤维蛋白黏合剂由纤维蛋白原和凝血酶组成, 纤维蛋白原被凝血酶切后,

释放出纤维蛋白 A 肽及 B 肽, 纤维蛋白结合形成多聚体凝块封闭创口, 并发挥止血的作用。人纤维蛋白黏合剂主要通过人血浆进行分离纯化获得, 受限于血浆供给, 而且还具有传播血液疾病的风险^[7]。

贻贝足丝蛋白 (mussel foot proteins, MFP) 是极具潜力的生物软组织黏合剂候选蛋白分子。贻贝足丝蛋白使贻贝在海水中持久且高强度地黏附于各种材料表面, 例如钢铁、岩石、特氟龙等材料表面^[8]。从贻贝中提取的天然足丝蛋白, 在猪小肠黏膜上的黏附强度是氰基丙烯酸辛酯黏合剂的两倍^[9]。足丝蛋白 3 (foot protein 3, Fp3) 是主要的界面黏附蛋白之一, 并具有最小的分子量和较高的二羟苯丙氨酸 (DOPA) 含量^[10]。然而 Fp3 蛋白可溶性较差, 限制了重组蛋白的研究及应用^[11]。因此, 科学家们将水溶性强的蛋白质与 Fp3 融合表达, 以增加水溶性。

此外, 透明质酸 (35 kD) 能与 Fp131 融合蛋白 (在 Fp3 的 N 端和 C 端各有 6 个 Fp1 的 10 肽重复序列) 结合, 形成直径为 5 ~ 20 μm 的囊泡结构, 使复合物的黏附强度增加了 1.1 倍^[2-11]。虽然该复合物固化时间长达 24 h, 较难应用于临床, 但为研发高性能生物软组织黏合剂提供了新的思路。

透明质酸是由重复双糖单位组成的酸性黏多糖, 糖链长度决定了不同分子量的透明质酸黏弹性、流动性等基本属性^[12]。为了提高蛋白类黏合剂的黏合强度和加快其固化速度, 我们重组表达了融合蛋白 SFp3 (Sumo-Fp3) 并系统研究 SFp3 与不同分子量的透明质酸形成的二组分的黏合剂的性能。为了更直观地考察含 DOPA 的 SFp3 和透明质酸的相互作用, 我们采用生物膜层干涉技术实时监测其结合过程, 利用扫描电子显微镜观察固化后的微观结构。本研究在机制和实效上有助于实现具有快速固化和高强度黏附能力的蛋白-多糖双组分黏合剂。

1 材料和方法

1.1 试剂

大肠杆菌表达载体 pE-Sumo 购自 LifeSensors 公司; 克隆菌株 *E. coli* DH5 α 、BL21 (DE3)、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN 公司; 核酸聚合酶, 限制性内切酶 *Bsa* I、*Xho* I 购自 NEB 公司; DNA Ligation Kit Ver.2.1 购自 Takara 公司; 基因和引物合成, 核酸测序委托 Genewiz 公司; Ni-NTA 亲和层析柱购自

BioRad 公司; 蘑菇酪氨酸酶购自 Sigma 公司; 透明质酸购自华熙福瑞达生物医药有限公司。

1.2 SFp3 重组表达载体的构建

根据紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) Fp3 成熟肽的基因序列 (GenBank 数据库编号: AB049579) 分别设计正、反向引物。在正向 Fp3-F 引物的 5' 端加入酶切位点 *Bsa* I; 在反向 Fp3-R 引物的 5' 端加入酶切位点 *Xho* I。引物序列如下, Fp3-F: GGTCTCAAGG TGCCGATTATTATGGC; Fp3-R: CCGCTCGAGTCATTATTAATGATGGTGATGATG G。PCR 扩增反应循环为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 循环 35 次。扩增产物用试剂盒纯化后, 和表达载体 pE-Sumo 以 *Bsa* I 和 *Xho* I 双酶切, 用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 连接后转化至 DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 挑取阳性单克隆测序验证。

1.3 重组 SFp3 蛋白的表达、纯化及后修饰

将测序鉴定的 pE-Sumo/Fp3 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 挑取阳性单克隆在 LB 培养基中过夜培养。菌液按照 1: 100 进行扩大培养, 在菌液 OD₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.6 时加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG, 1 mmol/L) 进行诱导。16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜后, 离心收菌, 用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤菌体。裂解液 (300 mmol/L NaCl, 100 mmol/L PBS, 1% triton X100, pH 7.4) 重悬菌体, 冰浴超声破碎, 离心弃沉淀。上清加入已平衡的镍柱, 以洗脱液 A (100 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L PBS, pH 7.4) 清洗镍柱。用 PBS 洗柱后, 加入 0.5 g/L 蘑菇酪氨酸酶 (20 mmol/L 硼酸钠, 100 mmol/L PBS, 100 mmol/L 抗坏血酸, pH 7.0) 室温孵育 3 h。洗脱液 A 清洗, 洗脱液 B (500 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L PBS, pH 5.0) 洗脱目的蛋白。5% 醋酸溶液透析, 并用 3 kD 超滤离心管浓缩蛋白样品至约 70 g/L。

采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪 (美国, Waters, ACQUITYTMUPLC&Q-TOF MS Premier) 检测标准溶液中酪氨酸和 DOPA 的保留时间及提取离子峰面积。相同色谱、质谱条件下分析 SFp3 蛋白酸水解产物, 根据提取离子峰面积计算游离酪氨酸和 DOPA 的含量。

1.4 Zeta 电位测定

采用纳米激光粒度仪 (奥地利, Anton Paar, Litesizer 500) 测定 0.1 g/L 透明质酸或 SFp3 溶液

(pH 3、5、7)的 Zeta 电位。

1.5 万能材料测试机检测黏附强度

将聚四氟乙烯膜分割为 10 mm × 25 mm 小块,并标出 10 mm × 10 mm 的待粘结区域。在两块聚四氟乙烯膜的粘结区域分别加入 100 μg 不含 DOPA 的 SFp3 和含 DOPA 的 SFp3, 醋酸钠缓冲溶液调整总体积至 30 μL, 交叠涂匀, 放置于温度 37℃、相对湿度 70% ~ 80% 的孵育箱中固化。万能材料测试机(美国, Instron, 5966)负载单元为 500 N, 拉伸速率 10 mm/min。测试样本数为 3 ($n=3$)。

将牛皮分割为 10 mm × 25 mm 小块, 并标出 10 mm × 10 mm 的待粘结区域。在两块牛皮的粘结区域分别加入含 DOPA 的 SFp3 和 HA, 醋酸钠缓冲溶液调整总体积至 30 μL, 交叠涂匀, 放置于温度 37℃、相对湿度 70% ~ 80% 的孵育箱中固化。相同步骤处理涂布有等体积 Dermabond® 的牛皮或者四氟乙烯膜。万能材料测试机负载单元为 500 N, 拉伸速率 10 mm/min。测试样本数为 3 ($n=3$)。

1.6 分子相互作用仪研究层层组装行为

分子相互作用仪(美国, Pall ForteBio, OctetK2)含 DOPA 的 SFp3 溶液(1 g/L, pH 5)中加入 NHS-PEG4-Biotin 室温孵育 1 h, 进行蛋白生物素修饰。亲和素标记的检测器放置在纯水中 15 min, 清洁表面。将清洁后的检测器放入生物素修饰的 DSFp3 溶液(1 g/L, pH 5)中结合 10 min, 再放入醋酸钠缓冲液(100 mmol/L, pH 5)清洗 60 s。然后将检测器放入分子量分别为 8 kD 或 1 500 kD 的 HA 溶液(0.4 g/L)中, 结合 60 s 后, 再放入醋酸钠缓冲液(100 mmol/L, pH 5)清洗 60 s。将已结合透明质酸的检测器放入 DSFp3 溶液(1 g/L, pH 5)中结合 60 s, 再放入醋酸钠缓冲液(100 mmol/L, pH 5)清洗 60 s。有序重复上述步骤, 逐层结合透明质酸或 SFp3。

1.7 扫描电镜观察表面结构

浓度约 70 g/L 含 DOPA 的 SFp3 (DSFp3) 溶液在 37℃ 固化 3 h, 形成淡黄色凝胶。将该凝胶涂布在铜片表面, 扫描电子显微镜(日本, Hitachi, SU3500)观察凝胶结构。取 10 mm 宽纸条, 两末端分别涂布 DSFp3 (100 μg) 和 HA (1 500 kD, 25 μg), 立刻混合两末端的物质, 约 30 s 后分开, 纸条的两表面间形成丝状。采用扫描电子显微镜观察黏丝截面形貌。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 16.0 进行统计学分析, 实验数据用平均值 ± 标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFp3 的重组表达、纯化和修饰

由于溶解性差和部分区域不具备固定结构, 贻贝足丝蛋白的重组表达一直是个难题。我们首先尝试了在大肠杆菌中直接表达贻贝足丝蛋白 Fp3, 但是没有检测到明显的可溶表达。Sumo 蛋白标签具有促溶能力, 因此将 Sumo 融合在 Fp3 基因序列的 N 端, 以增加融合蛋白的可溶性。在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中表达后, 可溶性重组 SFp3 融合蛋白约为总蛋白的 7%。经 Sumo 蛋白 N 端的 His 6 标签亲和层析纯化后, SFp3 产率约为 3 mg/L。Tris-Tricine SDS-PAGE 凝胶电泳(见图 1a)中, SFp3 迁移位置约为 23 kD, 形成了一条清晰不拖尾的条带, 说明 SFp3 可溶性好且稳定。我们也尝试了用 Sumo 蛋白酶降解 SFp3, SDS-PAGE 分析显示酶解后生成了 Sumo 标签蛋白(约 17 kD)和 Fp3 产物(约 7 kD)(见图 1b)。

DOPA 是贻贝足丝蛋白产生黏性的重要分子基础。为了将重组蛋白中的酪氨酸残基转化为 DOPA, 我们采用了蘑菇酪氨酸酶催化的方法。pH 值在 5 ~ 7 时, 蘑菇酪氨酸酶的活力较高。Fp3 蛋白在 pH 5 ~ 7 的缓冲液中溶解性 < 0.1 g/L, 而 SFp3 在 pH 5 的醋酸钠缓冲液中溶解性 > 1 g/L, 因此选择 SFp3 进行后续试验。根据文献报道, 将蘑菇酪氨酸酶与 SFp3 在溶液中孵育, 结果显示 DOPA 转化效率极低, 且难以将蘑菇酪氨酸酶分离。于是建立了在柱催化方法: 将 SFp3 结合在 Ni-NTA 亲和树脂上, 采用蘑菇酪氨酸酶催化, 冲洗分离酪氨酸酶, 然后洗脱 SFp3。这样能够成功获得 DSFp3 重组蛋白。为了鉴定 DOPA 的含量, DSFp3 经酸解后, 通过 UPLC-TOF/MS 测定溶液中游离酪氨酸和 DOPA 含量, 结果表明约 5% 酪氨酸残基转化为 DOPA。此转化效率与文献中蘑菇酪氨酸酶催化其他贻贝足丝融合蛋白的效率接近^[13]。

2.2 SFp3 和透明质酸构成的双组分黏合剂的性能测试

我们首先测试了 SFp3 在 DOPA 修饰前后的黏合能力。万能材料测试机是检测黏附强度的最常用仪器之一。采用万能材料测试机, 可以在不同的基材表面上进行检测, 例如骨骼、皮肤、金属和塑料等(见图 2a)。聚四氟乙烯常用于炊具和医疗器械的防粘涂层, 可用于灵敏地检测黏合剂。结果表明, 未修饰的 SFp3 几乎不能粘结聚四氟乙烯膜。然而, 经蘑菇酪氨酸酶催化转化后的 DSFp3 在聚

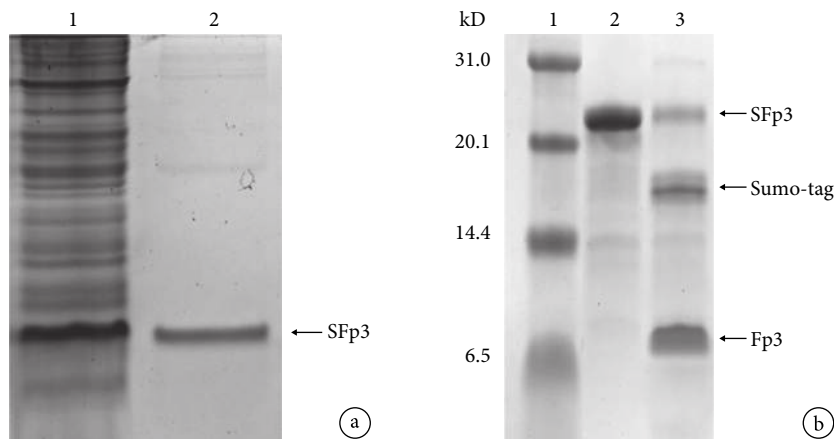


图1 Tris-Tricine SDS-PAGE 考马斯亮蓝鉴定 SFp3 的表达和纯化 a. 在大肠杆菌中表达并纯化 SFp3 重组蛋白。泳道 1: 全菌裂解样品; 泳道 2: 亲和纯化获得的 SFp3 蛋白。b. 蛋白酶切验证 SFp3。泳道 1: 蛋白 marker; 泳道 2: SFp3 蛋白; 泳道 3: SUMO 蛋白酶消化 SFp3 蛋白, 形成两条新的蛋白条带

Fig.1 Tris-Tricine SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue staining to analyze SFp3 expression and purification a. purification of recombinant SFp3 from *E. coli* BL21. Lane 1: whole-cell lysate; Lane 2: purified SFp3. b. enzyme digestion analysis of SFp3 by SUMO protease 1. Lane 1: protein marker; Lane 2: SFp3 before digestion; Lane 3: SFp3 digested by SUMO Protease 1

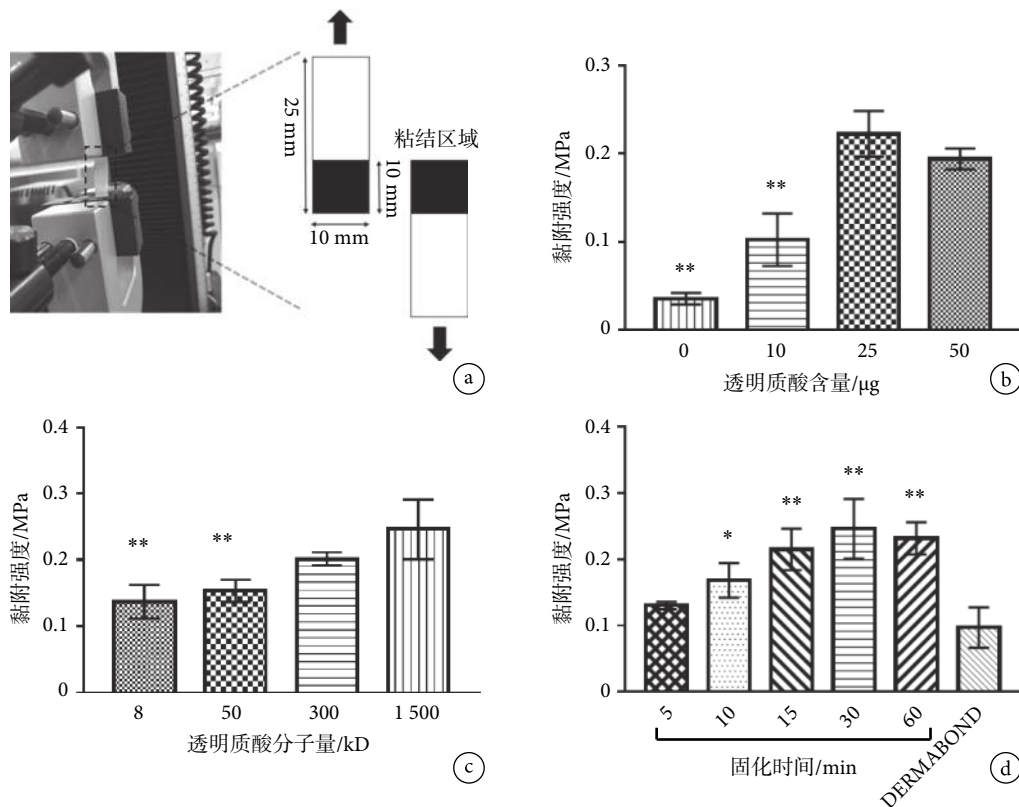


图2 透明质酸对 DSFp3 黏附强度和固化的作用 a. 万能材料测试机检测黏附强度的示意图; b. 100 μg DSFp3 与不同质量的透明质酸 (1 500 kD) 固化 1 h 后的黏附强度, 与 50 μg 透明质酸组比较, ** $P < 0.01$; c. 100 μg DSFp3 与 25 μg 的不同分子量的透明质酸固化 1 h 后的黏附强度, 与 1 500 kD 透明质酸组比较, ** $P < 0.01$; d. DSFp3 与透明质酸 (1 500 kD) 固化不同时间后的黏附强度, 与 30 μL DERMABOND® 固化 1 h 后进行比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig.2 Effect of hyaluronic acid (HA) on SFp3 adhesive strength and solidification a. schematic illustration of measurement of the adhesive strength using the universal material testing machine; b. adhesive strength of 100 μg DOPA-containing SFp3 and different amounts of HA (1 500 kD) cured at 37 °C for 1 h before measurement, ** $P < 0.01$ vs 50 μg HA; c. adhesive strength of 100 μg DOPA-containing SFp3 and 25 μg HA with different molecular weight cured at 37 °C for 1 h before measurement, ** $P < 0.01$ vs 1 500 kD HA; d. adhesive strength of 100 μg DOPA-containing SFp3 and 25 μg HA (1 500 kD) was cured for indicated duration, compared with 30 μL DERMABOND® cured for 1 h before measurement, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

四氟乙烯膜上的黏附强度测量为 (0.036 ± 0.007) MPa。因此,酪氨酸转化为 DOPA 显著增强了 SFp3 的黏附能力,与文献报道的结果一致^[11-13]。

DSFp3 在 37℃ 固化 3 h 能形成淡黄色黏性凝胶。为了提高黏合性能和缩短固化时间,在其中添加了透明质酸。由于聚四氟乙烯膜自身的强度低,不能承受较高的拉伸力,同时也为了测试表面更接近皮肤,我们使用牛皮作为黏合剂的测试基材。当仅使用透明质酸的时候,牛皮不能被粘结。只有 DSFp3 与透明质酸混合才能黏合牛皮,证明 DSFp3 是粘结的必须组分。为了获得透明质酸与 DSFp3 的最佳质量比,我们改变了体系中透明质酸的质量并测量黏附强度(见图 2b)。当 DSFp3 与透明质酸质量比为 4:1 时,牛皮的黏附强度达到最大值 (0.22 ± 0.03) MPa。继续增加透明质酸质量,胶水的黏附强度无显著变化。

进一步研究了不同分子量的透明质酸对黏附强度的影响。如图 2c 结果所示,分子量越大的透明质酸,形成的黏附强度越大。例如,使用 8 kD 的透明质酸时,混合物的黏附强度为 (0.14 ± 0.03) MPa;当透明质酸分子量增大到 1 500 kD 时,黏附强度增大到 (0.25 ± 0.05) MPa。

确定优化后的透明质酸的分子量(1 500 kD)和质量比(DSFp3: HA 4:1)之后,测量黏合剂的固化速度。测试结果如图 2d 所示,黏合强度随着时间而增强,在半小时左右达到最大值。我们的黏合剂的黏附强度最大值超过相同体积 DERMABOND[®]

的 2 倍,即比市场上常用的化学类黏合剂更加牢固。另外,透明质酸和 DSFp3 固化 5 min 后,就能达到最大黏附强度的 52%。这种快速固化的优异性能将有利于其实际运用。

2.3 DSFp3 和透明质酸构成的黏合剂的形态研究

为了解透明质酸对 DSFp3 形态的影响,以探索上述优良黏附性能的成因,采用扫描电子显微镜观测了 DSFp3 在添加透明质酸前后的形态变化。DSFp3 固化 3 h 后能形成黏性凝胶,凝胶在扫描电子显微镜下呈现三维网状结构。当加入 1 500 kD 透明质酸后约 30 s, DSFp3 与透明质酸形成黏丝并迅速固化。用扫描电子显微镜观测固化后的黏丝截面,观察到多层片状结构,与之前的网状结构形成鲜明的对比(见图 3)。

2.4 DSFp3 和透明质酸能进行逐层组装

扫描电子显微镜揭示的凝胶结构提示 DSFp3 和透明质酸能在微观上能形成规则的层状结构。由于很多有序结构是自组装形成的,我们测量了 SFp3 蛋白和透明质酸的 Zeta 电位。在 pH 5 的醋酸钠缓冲液中, SFp3 和 DSFp3 的电势分别为 +18.4 mV、+3.6 mV,而透明质酸的电势为 -13.8 mV。可见酪氨酸转化为 DOPA 后降低了 SFp3 蛋白电势,这有助于减少分子间静电斥力,促进聚合。由于 SFp3 蛋白分子与透明质酸多糖分子分别带有不同的电荷,静电相互作用力可能是 SFp3 和透明质酸结合的主要驱动力。

为了更直观地考察 DSFp3 和透明质酸的相互

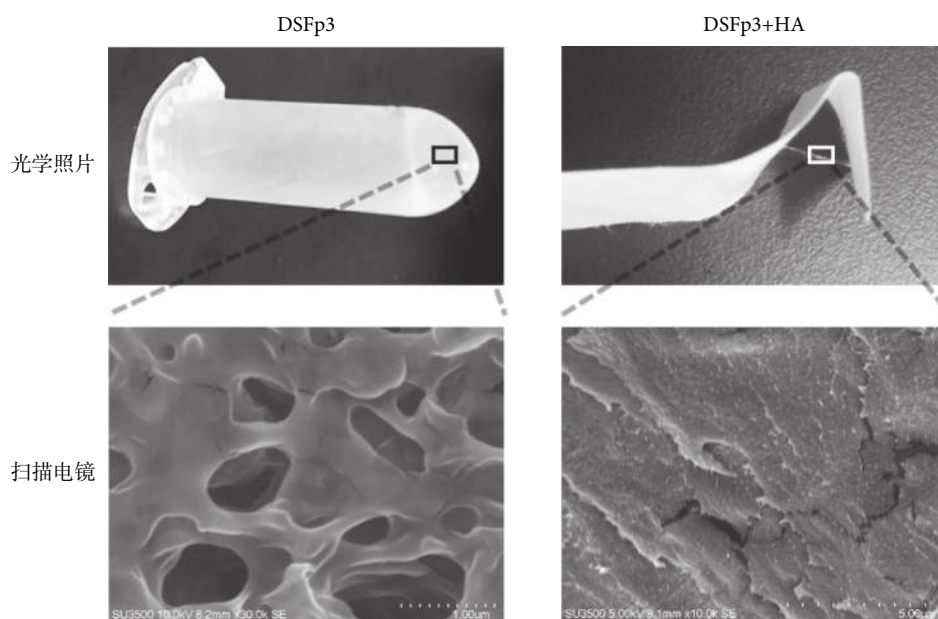


图 3 光学照片和扫描电子显微镜观测 DSFp3 凝胶和加入透明质酸(1 500 kD)后形成的黏丝截面

Fig.3 Photographs and scanning electron micrographs of the gel formed by DOPA-containing SFp3 and the strings formed by DOPA-containing SFp3 and HA (1 500 kD)

作用, 我们采用生物膜层干涉技术实时监测它们的结合过程。生物膜层干涉技术能够实时检测大分子的相互作用引起的生物膜变化。生物大分子与检测器结合后, 在分子相互作用仪检测器形成稳定的生物膜, 通过光波的相位移就能检测生物膜垂直方向的厚度。将 DSFp3 固定在检测器的表面, 依次把检测器放入透明质酸或 DSFp3 溶液中, 监测膜层厚度的变化。传感器结合透明质酸或 DSFp3 产生的厚度变化值为 ΔHA 或 $\Delta DSFp3$ 。

由图 4a 的结果可以看出, 透明质酸和 DSFp3 能够依次成膜, 逐步增加膜的厚度。DSFp3 结合引起的厚度增加 ($\Delta DSFp3$) 比透明质酸 (ΔHA) 高出近一个数量级, 这跟 DSFp3 是球形结构而透明质酸是链状结构的情况相吻合。随着层层组装的进行达到 10 次后, DSFp3 与 8 kD 的透明质酸在传感器

表面形成的生物膜厚度可达到 59 nm, 而 DSFp3 与 1 500 kD 的透明质酸在传感器表面形成的生物膜厚度只达到 16.2 nm。比较 DSFp3 每层的厚度 ($\Delta DSFp3$), 与 8 kD 的透明质酸结合时, 每层 $\Delta DSFp3$ 呈指数增长; 而与 1 500 kD 的透明质酸结合时, 每层 $\Delta DSFp3$ 的数值增加很少(见图 4b), 每次 DSFp3 结合的数量近似相同。同样方法分析透明质酸每层的厚度 (ΔHA) 变化, 发现结合 8 kD 的透明质酸时, 每层 ΔHA 数值也都在随层数而增长; 然而结合 1 500 kD 的透明质酸时, ΔHA 为负值, 表明在结合过程中厚度降低, 且每层降低数值近似相同(见图 4c)。高分子量透明质酸具有较长的柔性糖链, 能够形成线团、螺旋等空间结构, 这些结构可以伸展并穿插到其他聚电解质层里。因此, 当 1 500 kD 的透明质酸结合 DSFp3 层后, 糖链

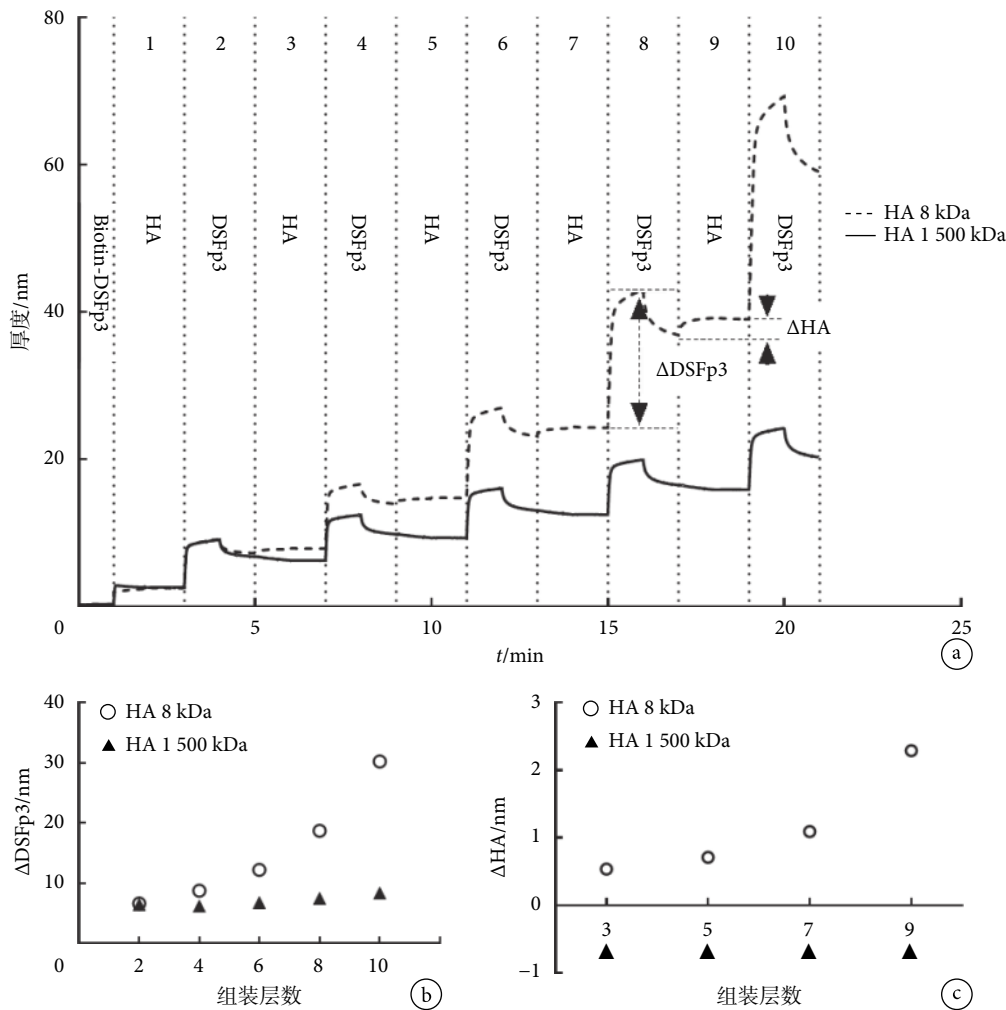


图 4 分子相互作用仪检测 DSFp3 与透明质酸 (HA) 形成的层层组装 a. 用分子相互作用仪分别测量 DSFp3 和 HA (8 kD or 1 500 kD) 的结合数据; b. 不同组装层的 DSFp3 膜厚度变化值 ($\Delta DSFp3$); c. 不同组装层的透明质酸膜厚度变化值 (ΔHA)

Fig.4 Biofilm interferometric analysis suggests that hyaluronic acid (HA) and DSFp3 formed layer-by-layer assembly a. binding data of DSFp3 and HA (8 kD or 1 500 kD) measured by interferometry; b. thickness of DSFp3 layer ($\Delta DSFp3$) in different layers; c. thickness of HA layer (ΔHA) in different layers

构象改变可能引起生物膜的厚度在结合阶段降低。这些数据有力地说明,当1 500 kD的透明质酸和DSFp3结合时,每层结合的量二者基本保持不变,因而能够形成均一、稳定且紧密的层状结构。

3 讨论

Fp3蛋白中疏水氨基酸数量约为36%,因而在水溶液中溶解性差。Hwang等^[14]首先在大肠杆菌中获得Fp3重组蛋白,但在5%醋酸溶液中蛋白溶解度约为1 g/L。通过与Sumo蛋白融合,我们成功地在大肠杆菌中高效可溶性地表达和纯化了贻贝足丝蛋白SFp3,在5%醋酸溶液中,SFp3重组蛋白浓度可高达70 g/L以上。

纯化获得的重组蛋白通过体外酶催化生成DOPA后,需通过高压分子筛柱分离除去体系中的蘑菇酪氨酸酶^[15]。由于蘑菇酪氨酸酶不会结合Ni柱,本文将蘑菇酪氨酸酶与已结合SFp3的亲 and 填料共孵育,在柱酶催化完成后,清洗亲和填料即可除去蘑菇酪氨酸酶。通过在柱催化,既达到了文献报道的DOPA催化效率^[13],又简化了蛋白制备流程。

Gim等^[16]在Fp5基因两端连接Fp3序列,表达并纯化Fp353融合蛋白。在牛皮表面固化6h后,酪氨酸酶修饰的Fp353(10 mg)黏附强度约为0.52 MPa。Lim等^[11]在含DOPA的Fp131融合蛋白(40 mg)中加入35 kD的透明质酸(10 mg),形成由微囊组成的生物胶水。在铝表面固化24h后,其黏附强度可达4 MPa。本工作发现,含DOPA的SFp3中加入1 500 kD的透明质酸能够制备高黏附强度和快速固化的生物胶水。在牛皮表面,DSFp3(100 μg)与透明质酸(25 μg)固化30 min后其黏附强度约为0.25 MPa,超过相同体积化学胶水Dermabond[®]的两倍,并且固化5 min即可达到52%最大黏附力。

由于带同种电荷的相邻分子间存在静电排斥力,聚电解质层内并不是紧密排列。新吸附的聚电解质层向上一层聚电解质扩散,能形成穿插结构^[17]。透明质酸的糖链越长,越容易在多层膜中穿插,形成紧密排列的膜结构。因此,高分子量的透明质酸与DSFp3逐层结合后,可形成均一紧密的结构,从而提高胶体内聚力,并减少固化时间。本研究结果为解决蛋白质类生物胶水面临的强度低和固化慢

这两个难题提供了一种途径,有助于将来制备高效的医用生物组织黏合剂。

参考文献

- Behrns K E. Tissue adhesives in clinical medicine. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(8): 1185.
- Bouten P J, Zonjee M, Bender J, et al. The chemistry of tissue adhesive materials. *Prog Polym Sci*, 2014, 39(7): 1375-1405.
- Quinn J, Wells G, Sutcliffe T, et al. A randomized trial comparing octylcyanoacrylate tissue adhesive and sutures in the management of lacerations. *J Am Med Assoc*, 1997, 277(19): 1527-1530.
- Quinn J, Maw J, Ramotar K, et al. Octylcyanoacrylate tissue adhesive versus suture wound repair in a contaminated wound model. *Surgery*, 1997, 122(1): 69-72.
- Dragu A, Unglaub F, Schwarz S, et al. Foreign body reaction after usage of tissue adhesives for skin closure: a case report and review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2009, 129(2): 167-169.
- Bhatia S K. Traumatic Injuries. New York: Springer, 2010.
- Lee M G, Jones D. Applications of fibrin sealant in surgery. *Surg Innov*, 2005, 12(3): 203-213.
- 樊廷俊,汪小锋. 贻贝足腺细胞的超强度粘液. 生命的化学, 2001, 21(4): 331-332.
- Ninan L, Stroshine R L, Wilker J J, et al. Adhesive strength and curing rate of marine mussel protein extracts on porcine small intestinal submucosa. *Acta Biomater*, 2007, 3(5): 687-694.
- Zhao Hua, Waite J H. Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26150-26158.
- Lim S, Choi Y S, Kang D G, et al. The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3715-3722.
- Selyanin M A, Boykov P Y, Khabarov V N, et al. Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.
- Yang B, Kang D G, Seo J H, et al. A comparative study on the bulk adhesive strength of the recombinant mussel adhesive protein fp-3. *Biofouling*, 2013, 29(5): 483-490.
- Hwang D S, Gim Y, Cha H J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(3): 965-970.
- 李楠楠,谭亮,王智平,等. 厚壳贻贝足丝黏附蛋白mfp-3重组表达及黏附功能分析. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(9): 851-857.
- Gim Y, Hwang D S, Lim S, et al. Production of fusion mussel adhesive fp-353 in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(6): 1272-1277.
- 沈家骢. 超分子层状结构: 组装与功能. 北京: 科学出版社, 2005.

收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-07-27

本文编辑: 李蓓兰