

• 医药生物技术 •

重组贻贝粘蛋白 Mfp-3P 的制备及促进伤口愈合的作用

郝东, 魏文培, 周浩, 李敏, 乔莎, 赵硕文, 侯增森*

西安德诺海思医疗科技有限公司, 陕西 西安 710086

郝东, 魏文培, 周浩, 李敏, 乔莎, 赵硕文, 侯增森. 重组贻贝粘蛋白 Mfp-3P 的制备及促进伤口愈合的作用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1498-1508.

HAO Dong, WEI Wenpei, ZHOU Hao, LI Min, QIAO Sha, ZHAO Shuowen, HOU Zengmiao. Preparation of recombinant mussel mucin Mfp-3P and its promotion of wound healing[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1498-1508.

摘要: 为了研究重组贻贝粘蛋白的制备方法及其在伤口愈合中的作用, 本研究将贻贝的 Mfp-3 和 preCol-P 肽部分片段进行融合, 以毕赤酵母为宿主微生物进行表达, 经过发酵和纯化, 获得了纯的重组贻贝粘蛋白产物, 并在细胞水平检测其对小鼠成纤维细胞 L929 增殖和迁移的影响, 以及在动物水平检测其在大鼠全层皮肤切除后促进伤口愈合的能力。结果表明, 制备获得的重组贻贝粘蛋白纯度为 96.49%, 蛋白含量为 90.28%, 3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA) 含量为 0.73 wt%, 内毒素含量 < 0.5 EU/mg, 具有显著地促进小鼠成纤维细胞迁移、增殖及促大鼠皮肤创面伤口愈合的作用。本研究结果表明, 采用融合表达的思路能够实现贻贝 Mfp-3 在毕赤酵母表达体系的高效表达, 其产物易于纯化, 获取的纯品质量稳定, 具有促进伤口愈合的作用, 具备作为医用生物材料的潜质。

关键词: 贻贝粘蛋白; 基因重组; 生物材料; 内毒素; 3,4-二羟基苯丙氨酸(DOPA)

Preparation of recombinant mussel mucin Mfp-3P and its promotion of wound healing

HAO Dong, WEI Wenpei, ZHOU Hao, LI Min, QIAO Sha, ZHAO Shuowen, HOU Zengmiao*

Xi'an DeNovo Hith Medical Technology Co., Ltd., Xi'an 710086, Shaanxi, China

Abstract: To investigate the role of recombinant mussel mucin in wound healing, we aimed to prepare this mucin using *Pichia pastoris* as the host microbe. Our method involved constructing a genetically engineered strain of *P. pastoris* that expressed a fusion protein consisting of Mfp-3

*Corresponding author. E-mail: houzengmiao@zhanyan.com.cn

Received: 2023-07-28; Accepted: 2023-12-06; Published online: 2023-12-20

and preCol-P peptide segments of mussel. After fermentation and purification, we obtained a pure recombinant mussel mucin product. We then conducted experiments to evaluate its effect at both the cellular and animal levels. At the cellular level, we examined its impact on the proliferation and migration of mouse fibroblast L929. At the animal level, we assessed its ability to promote wound healing after full-layer skin resection in rats. Our results showed that the recombinant mussel mucin protein has a content of 90.28% and a purity of 96.49%. The content of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) was 0.73 wt%, and the endotoxin content was less than 0.5 EU/mg. Importantly, the recombinant mussel mucin protein significantly promoted both the migration and proliferation of mouse fibroblast, as well as the wound healing in rat skin. In conclusion, our findings demonstrate that recombinant mussel mucin has the potential to promote wound healing and can be considered a promising medical biomaterial.

Keywords: mussel mucin; gene recombination; biomaterials; endotoxin; 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)

贻贝粘蛋白(mussel adhesive protein, MAP)在贻贝足的腺体内生成和储存,又称为贻贝足丝蛋白,可以使贻贝在水中黏附生存,具有高强度、高韧性、防水性、生物降解性和超强的黏附性^[1],在生物技术应用领域具有十分广阔的前景。3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA, 多巴)的含量对贻贝粘蛋白的黏附功能至关重要^[2],而其无毒性及无免疫原性使其在医疗及医美领域具备广阔的应用潜力,比如作为医药黏合剂^[3-4]应用于牙科、皮肤科、骨科及眼科等生物组织或器官^[5],具有抗氧化、抗炎的作用^[6]。

贻贝中含有多种足丝蛋白,包括贻贝足丝蛋白(mussel foot proteins, MFPs)、前胶原蛋白(precolлагens)和基质蛋白(matrix proteins)等^[7],目前已经研究并鉴定的有 13 种贻贝粘蛋白。以紫贻贝为例,13 种贻贝粘蛋白分别为:位于足丝纤维外鞘的 Mfp-1 (分子量 108 kDa)^[8];位于足丝盘的 Mfp-2 (分子量 45 kDa)^[9];位于足丝盘与基底交接处的 Mfp-3F (分子量 5-7 kDa)^[10]和 Mfp-3S (分子量 5-7 kDa)^[9];位于足丝盘的 Mfp-4 (分子量 90 kDa)^[11];位于足丝盘与基底交接处的 Mfp-5 (分子量 11 kDa)^[12];位于足丝

盘的 Mfp-6 (分子量 12 kDa)^[13];位于足丝盘的 Mfp-7 (分子量 35 kDa)^[10];位于内核、足丝纤维的 pCOL-D (分子量 240 kDa)^[14];位于内核、足丝纤维的 pCOL-P (分子量 240 kDa)^[15];位于内核、足丝纤维的 pCOL-NG (分子量 240 kDa)^[16];位于足丝纤维的 PTMP-1 (分子量 50 kDa)^[17];位于足丝纤维的 TMP-1 (分子量 56.5 kDa)^[14]。

目前,贻贝粘蛋白的获取主要是从贻贝足腺中直接提取天然黏附蛋白成分,提取过程效率低,使得由此制备的黏合剂产品价格昂贵,且容易固化,极大程度上制约了贻贝粘蛋白的应用。采用基因工程手段制备重组贻贝粘蛋白是目前获得贻贝粘蛋白的另一有效途径,其产品作为生物黏合剂、黏附抗污涂层、组织工程材料及细胞固化材料在多领域已具有十分广阔的应用^[18]。如何大量制备纯度高、生物安全性好且具备很好的黏附性能的贻贝粘蛋白是未来重要的研究方向。

Mfp-3 的高多巴含量及其在斑块与表面之间的位置,揭示它在黏附过程中起着重要作用^[19]。但本公司在毕赤酵母表达厚壳贻贝 Mfp-3 的应用研究过程中,由于厚壳贻贝 Mfp-3 表达量过

低而未能成功制备 Mfp-3 纯品, 而毕赤酵母表达系统具备批量工业化表达生产重组胶原蛋白的能力^[20], 体现出毕赤酵母对胶原蛋白结构列表达具有较高的偏好性, 贻贝足丝纤维骨架蛋白与胶原蛋白氨基酸结构相似, 因此采用融合表达的方式将厚壳贻贝 Mfp-3 与贻贝足丝纤维骨架蛋白融合表达提高 Mfp-3 的表达量以实现贻贝粘蛋白的大量制备成为重点研究方向。本研究以毕赤酵母为宿主菌, 构建表达由厚壳贻贝 Mfp-3 与紫贻贝 preCol-P 的部分肽段组成的融合蛋白(命名为 Mfp-3P), 并对冻干粉纯品进行质量分析与检测, 为重组贻贝粘蛋白的生产及应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器

基因扩增仪(杭州博日科技股份有限公司), 电穿孔仪(BIO-RAD), 100 L 发酵系统(上海百仑生物科技有限公司), 大容量冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司), 全自动蛋白纯化层析系统(北京慧德易科技有限责任公司), 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)等。

1.2 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α [天根生化科技(北京)有限公司], 巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 (Invitrogen 公司), pPIC9K (Invitrogen 公司), Taq PCR Master Mix [天根生化科技[北京]有限公司], DNA 纯化回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 质粒小提试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 限制性内切酶(Thermo Fisher Scientific 公司), Solution I (TaKaRa 公司), 羧甲基强阳离子交换层析柱(SPF) (武汉汇研生物科技股份有限公司), 二乙氨基乙基弱阴离子交换层析柱(DEAE) [博格隆(上海)生物技术有限公司], 其他试剂均为国

产分析纯。

1.3 基因工程菌的构建

1.3.1 表达载体的构建

重组贻贝粘蛋白(命名为 Mfp-3P)的氨基酸序列(图 1A)由厚壳贻贝 Mfp-3 的氨基酸序列(GenBank: ACT66140.1)和选自紫贻贝 preCol-P (GenBank: AAB80719.1)的部分肽段组成, 理论分子量为 34.78 kDa, 理论等电点为 10.71。根据 Mfp-3P 的氨基酸序列, 按照毕赤酵母密码子偏好性设计对应的核苷酸序列(即 Mfp3P 的编码序列), 在 5'端添加 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点和 KEX 2 酶切位点, 在 3'端添加终止密码子和 *Not* I 限制性内切酶酶切位点; 将设计完成的核苷酸序列送生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成, 将合成的序列经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切连接到毕赤酵母载体 pPIC9K (Invitrogen 公司)中, 获得重组贻贝粘蛋白表达载体, 命名为 pPIC9K-Mfp3P, 并经测序鉴定, 质粒图谱如图 1B 所示。

1.3.2 基因工程菌筛选

将 pPIC9K-Mfp3P 电转化至毕赤酵母 GS115 菌株, 经遗传霉素(geneticin, G418)及摇瓶筛选, 获得重组贻贝粘蛋白基因工程菌。

1.4 重组贻贝粘蛋白的发酵及纯化

1.4.1 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的发酵

利用 100 L 中试发酵系统进行重组贻贝粘蛋白的发酵, 参考 Invitrogen 公司“Pichia Fermentation Process Guidelines”方法, 参数为: pH 4.9, 温度 28 $^{\circ}$ C, 溶氧控制大于 30%, 待发酵液湿菌重达 190 g/L 时进行甲醇诱导, 诱导时间为 48 h, 放罐收集发酵液。

1.4.2 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)发酵液粗处理

将发酵液用离心机进行固液分离, 利用 0.22 μ m 中空纤维膜过滤, 去除残留的菌体及杂质, 然后使用截留分子量为 3 kDa 的中空纤维膜超滤至截留液电导率 <0.3 mS/cm, 浓缩料液至发酵液放罐体积的 1/10, 收集截留液。

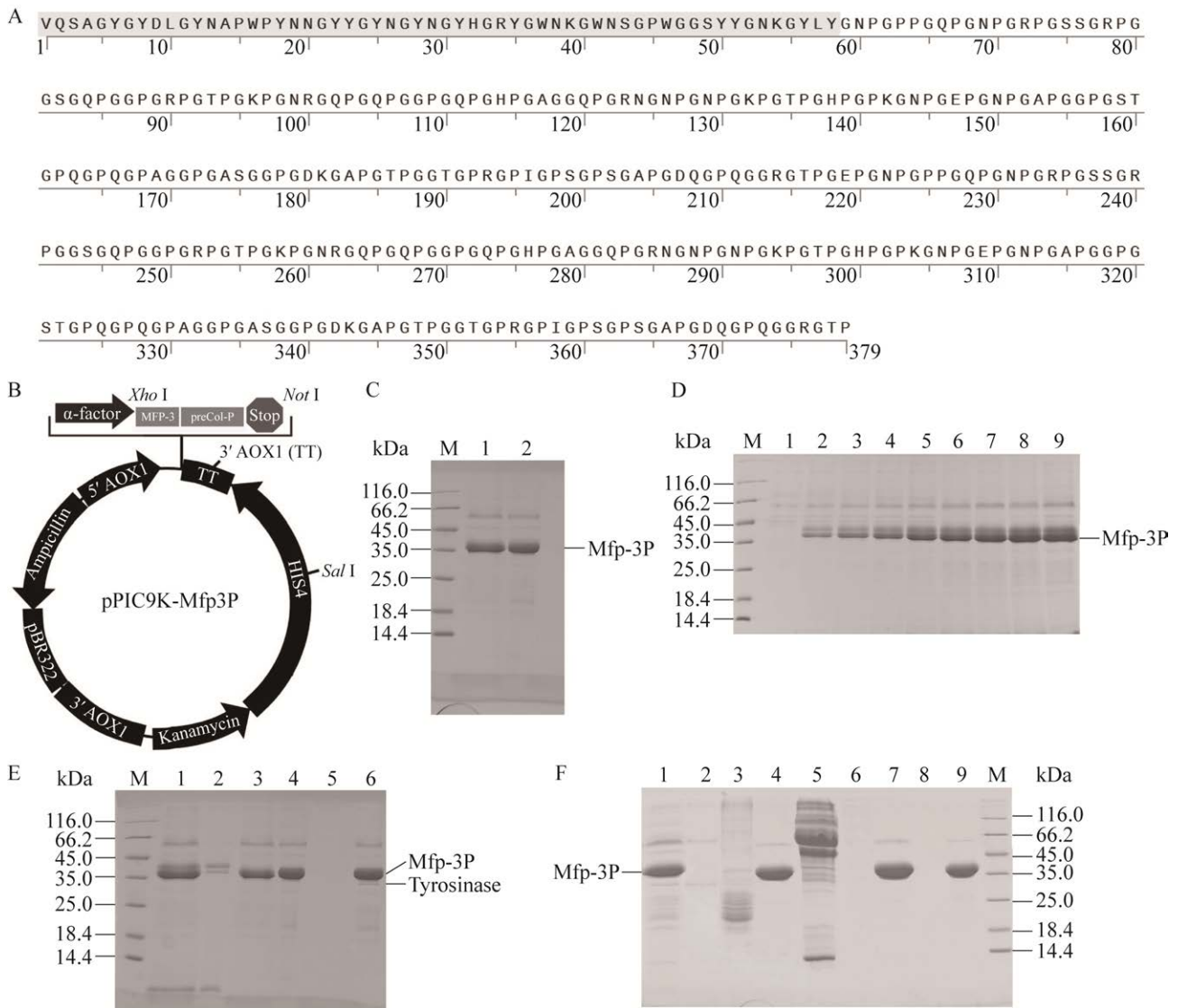


图 1 MFP-3P 制备过程 A: Mfp-3P 氨基酸序列. B: Mfp-3P 质粒图谱. C: 基因工程菌摇瓶筛选鉴定结果电泳图. D: 发酵过程样品检测电泳图. E: 粗处理至酶催化过程电泳图. F: 精纯过程电泳图

Figure 1 Diagram depicting the preparation process of MFP-3P. A: Amino acid sequence of recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P). B: Plasmid map of recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P) expression vector (pPIC9K-Mfp3P). C: Detection results of SDS-PAGE for screening recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P) by shake flask. D: SDS-PAGE results in different times of induction of recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P) fermentation process with fermentor. M: Marker; 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 18 h; 5: 24 h; 6: 30 h; 7: 36 h; 8: 42 h; 9: 48 h. E: SDS-PAGE test results of samples from Mfp-3P purification (fermentation broth rough treatment to enzyme catalysis). M: Marker; 1: Fermented supernatant; 2: Microfiltration interception; 3: Microfiltration permeation; 4: Ultrafiltration interception; 5: Ultrafiltration permeation; 6: Crude feed liquid after enzyme catalysis. F: SDS-PAGE test results of samples during Mfp-3P purification (two-step chromatography and ultrafiltration). M: Marker; 1: Crude feed liquid after enzyme catalysis; 2: SPFF flow through; 3: SPFF cleaning liquid; 4: SPFF eluent; 5: SPFF alkali cleaning; 6: Ultrafiltration permeation; 7: Ultrafiltration interception; 8: DEAE eluent; 9: DEAE flow through.

1.4.3 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的修饰

向截留液中加入 15 mmol/L 抗坏血酸、20 μ mol/L 硫酸铜、20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.6)和 20 U 酪氨酸酶, 室温下搅拌 3 h, 修饰 Mfp-3P 蛋白的酪氨酸残基为 DOPA, 修饰终点加入冰乙酸调节料液 pH 至 3.2。

1.4.4 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的纯化

用 SPFF 阳离子交换层析柱对酶反应液中的重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)进行挂柱洗脱纯化, 其中上样缓冲液为质量分数 0.1%的乙酸水溶液(0.1%乙酸, pH 3.5), 洗杂流动相采用含 0.19 mol/L NaCl 的 0.1%乙酸洗脱杂质, 洗脱流动相采用含 0.35 mol/L NaCl 的 0.1%乙酸洗脱重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P), 之后洗脱液采用截留分子量为 3.0 kDa 的中空纤维超滤系统进行脱盐浓缩, 收集截留液, 最后将该截留液利用 DEAE 阴离子交换层析柱流穿模式去除内毒素, 收集穿柱液进行冷冻干燥, 即可获得冻干粉纯品。

2 结果与分析

2.1 基因工程菌的构建

将构建的经基因测序鉴定正确的表达载体 pPIC9K-Mfp3P 电转化毕赤酵母宿主菌 GS115, 利用摇瓶发酵筛选, 加入甲醇诱导表达目的基因, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行检测的结果如图 1C 所示, 获得的目的蛋白条带明确, 杂蛋白较少, 表达菌株可用于下一步试验。

2.2 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的发酵

从甲醇诱导开始, 每隔 6 h 取样收集上清, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 1D 所示, 甲醇诱导后, 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)随着诱导时间的延长, 表达量呈逐渐升高趋势, 48 h 放罐后, 经 HPLC 检测, 发酵上清液中重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的表达量可达 1.4 g/L, 且在

发酵过程中重组贻贝粘蛋白降解少、杂蛋白少, 有利于后期的纯化。

2.3 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的纯化

发酵结束后经过固液分离、超滤浓缩及酪氨酸酶催化, 获取重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)粗品料液, 结果如图 1E 所示。粗品料液经 SPFF 层析纯化、超滤浓缩、DEAE 层析除内毒及冷冻干燥, 即可获得纯品冻干粉, 结果如图 1F 所示。纯品经高效液相色谱 C8 柱检测纯度, 结果如图 2A 所示, 纯度 96.49%, 用凯氏定氮法测得纯品蛋白含量为 90.28%, 纯化收率为 38.7%。

2.4 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)多巴含量检测

多巴是贻贝黏附的关键, 贻贝粘蛋白中的多巴及其氧化物极大地增强了黏附蛋白的附着能力, 这些附着能力主要由多巴侧链中的邻苯二酚提供^[21-22]。在碱性和甘氨酸作为还原剂存在的条件下, 贻贝粘蛋白分子内多巴残基的 1,2-苯二酚可氧化转化为醌类化合物, 加入氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium chloride blue, NBT)后, 生成不溶性的蓝紫色结晶甲臌(formazan), 用这一反应原理, 对重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)进行鉴别, 结果如图 2B 所示, 本研究获取的纯品含有多巴。采用改良的 Arnow 方法测得重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)的多巴含量为 0.73%。

2.5 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)内毒素含量检测

细菌内毒素试验可用于检测样品中所含引起机体发热的内毒素的情况, 是评价生物材料生物学安全性十分重要的指标。内毒素是由细菌死亡裂解或自溶引起的, 极微量的细菌内毒素进入动物或人体内都会引发强烈的炎症反应, 因此细菌内毒素在生产阶段的控制是十分必要的, 本研究中采用《中华人民共和国药典》2020 年版四部^[23](通则 1143)“细菌内毒素检查

法”方法—“凝胶法”对重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)内毒素进行检测,检测过程严格按照《中华人民共和国药典》2020年版四部(通则 9251)细菌内毒素检查法应用指导原则进行,检测结果小于 0.5 EU/mg。

2.6 重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)功效检测

采用细胞划痕实验来评价重组贻贝粘蛋白(Mfp-3P)对小鼠成纤维细胞(L929)的影响,实验过程采用 2×10^6 个细胞数接入 6 孔板中,培养 24 h 后用枪头划线,加入 PBS 清洗细胞 3 次,将空白对照及分组样品加入对应孔板中,培养 0、24、48、72 h 后在显微镜下拍照,用噻唑蓝比色法(MTT 法)来检测,分析细胞增值率,结果如图 2C-2E 所示。不同浓度的 MFP-3P 样品在处理 72 h 内均显著促进细胞迁移,且 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MFP-3P 样品迁移效果最好,具有极显著促进作用。MFP-3P 在 500、200、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下均显著促进 L929 细胞增殖,其中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下促进 L929 细胞增殖最为明显,有极显著促进作用。

2.7 SD 大鼠皮肤创面愈合试验

选取雄性 SD 大鼠 6 只,体重 180-220 g,麻醉脱毛后,在背部创建 2 块 1 cm \times 1 cm 的皮肤全层切除创面,空白组自然愈合不做处理,样品组采用以卡波姆 940 (0.1%)、甘油(5%)、三乙醇胺(1%)、水(93.85%)和 MFP-3P (0.05%)配制的重组 III 型贻贝粘蛋白(凝胶)每天给药 100 μL 涂抹于创面,于第 1、3、7、10、14 天使用标尺对伤口进行拍照(图 3A),计算伤口面积(图 3B),获取愈合百分比趋势图(图 3C),观察愈合过程中创面水肿、肉芽生长及再上皮化程度,统计完成目视观察创面恢复状态统计表(表 1)。本实验委托西安国联质量检测技术股份有限公司以“体内伤口愈合实验-大鼠”为题目进行,实验方案由西安国联质量检测技术股份

有限公司实验动物使用与管理(IACUC)委员会审核批准(批准号: AUP-TOX-20220519001)。

结果显示,重组 III 型贻贝粘蛋白样品组大鼠伤口的愈合明显优于空白组,在伤口愈合过程中起到显著的促进作用,重组 III 型贻贝粘蛋白样品组愈合过程中未出现明显水肿且肉芽组织自创面边缘向中部生长延伸,随着创面的缩小,愈合部分再上皮化恢复程度高,已恢复的表皮与正常表皮外观状态基本相同,创面未出现明显的肉芽组织增生,已愈合创面部分无明显肉眼可见疤痕形成,空白组创面在愈合过程中可明显观察到轻微水肿,肉芽组织生长缓慢,创面愈合程度低。

已有研究表明天然贻贝粘蛋白具有抗氧化^[6]、抑制 α -促黑素细胞激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)和促炎因子(IL-1 α , IL-6, COX-2)表达的作用^[24],贻贝粘蛋白偶联玻璃质粘连蛋白(fp-151-VT)同样具有抑制促炎因子 IL-6、IL-1 α 、COX-2 及 TNF- α 表达的作用^[25],从而在创面起到抗炎作用。本研究制备的重组 III 型贻贝粘蛋白(Mfp-3P)在大鼠皮肤创面愈合试验中表现出抗炎促愈合的结果,根据 Mfp-3P 的含多巴蛋白结构判断其作用机理与天然贻贝粘蛋白、贻贝粘蛋白偶联玻璃质粘连蛋白(fp-151-VT)的抗炎促愈合作用机理相同,应用前景广泛。

3 讨论与结论

贻贝粘蛋白以优良的生物粘合以及抗炎作用在伤口愈合黏合剂中应用广泛,使用过程中免疫原性低,具有良好的生物相容性。天然提取贻贝粘蛋白的高昂成本使得采用合成生物学方法开发工业化生产重组贻贝粘蛋白工艺获取原料成为研究热点。随着对贻贝粘蛋白研究的深入,多种贻贝粘蛋白型别被识别,对构效关

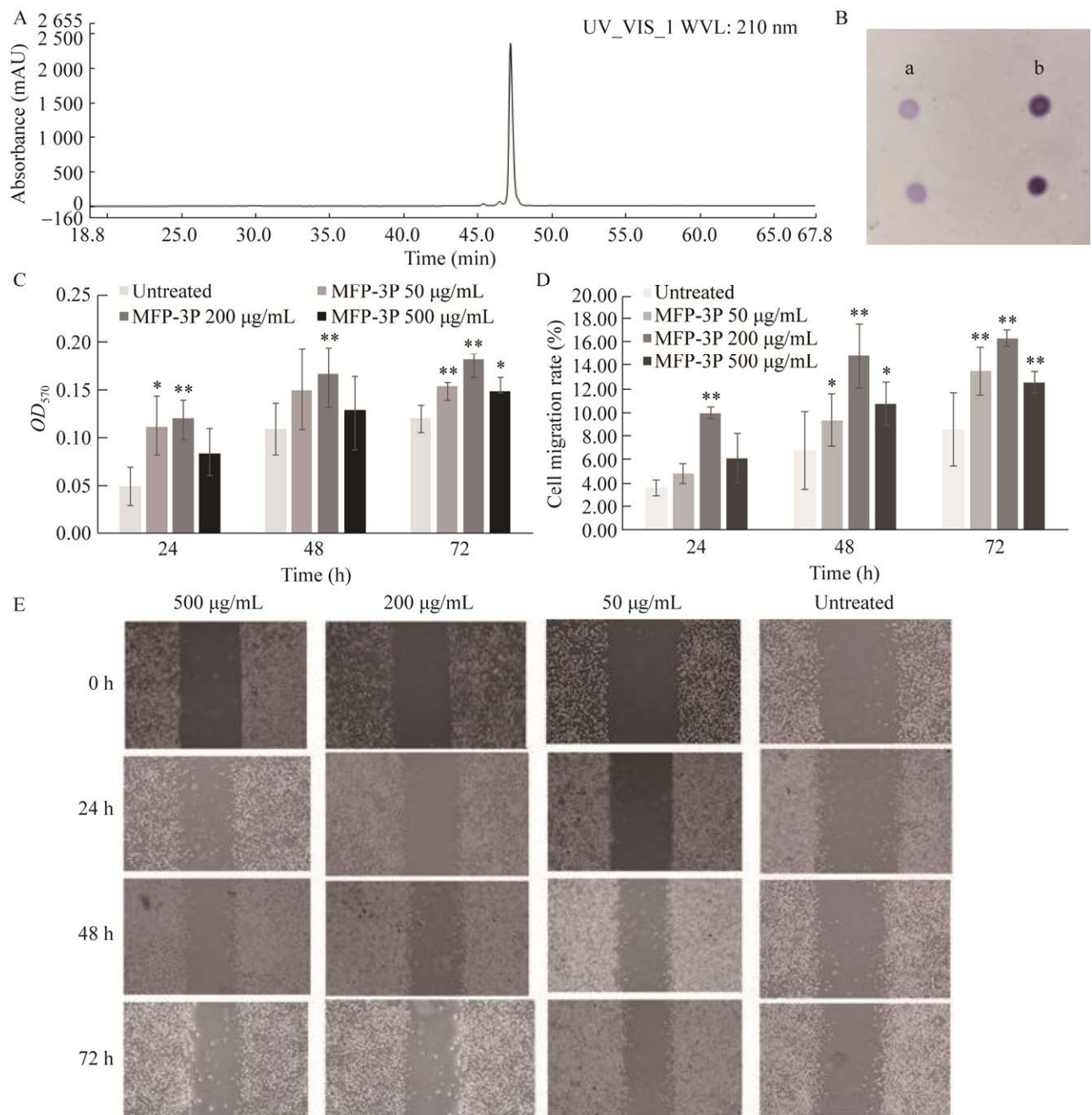


图 2 MFP-3P 纯度检测、鉴别及功效监测结果 A: HPLC 纯度鉴定结果. B: 多巴 NBT 鉴定结果. C: 促 L929 细胞增殖分析结果. D: 促 L929 细胞迁移分析结果. E: 促 L929 细胞迁移显微图像

Figure 2 Attached diagram of MFP-3P purity detection, identification, and efficacy monitoring results. A: Detection of the purity of recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P) by HPLC. B: NBT identification results of recombinant mussel adhesive protein (Mfp-3P). a: Crude feed liquid after enzyme catalysis; b: Freeze-dried powder pure product. C: Analysis results of Mfp-3P promoting L929 cell proliferation (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). D: Analysis results of Mfp-3P promoting 929 cell migration. E: Microscopic image of Mfp-3P promoting L929 cell migration (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

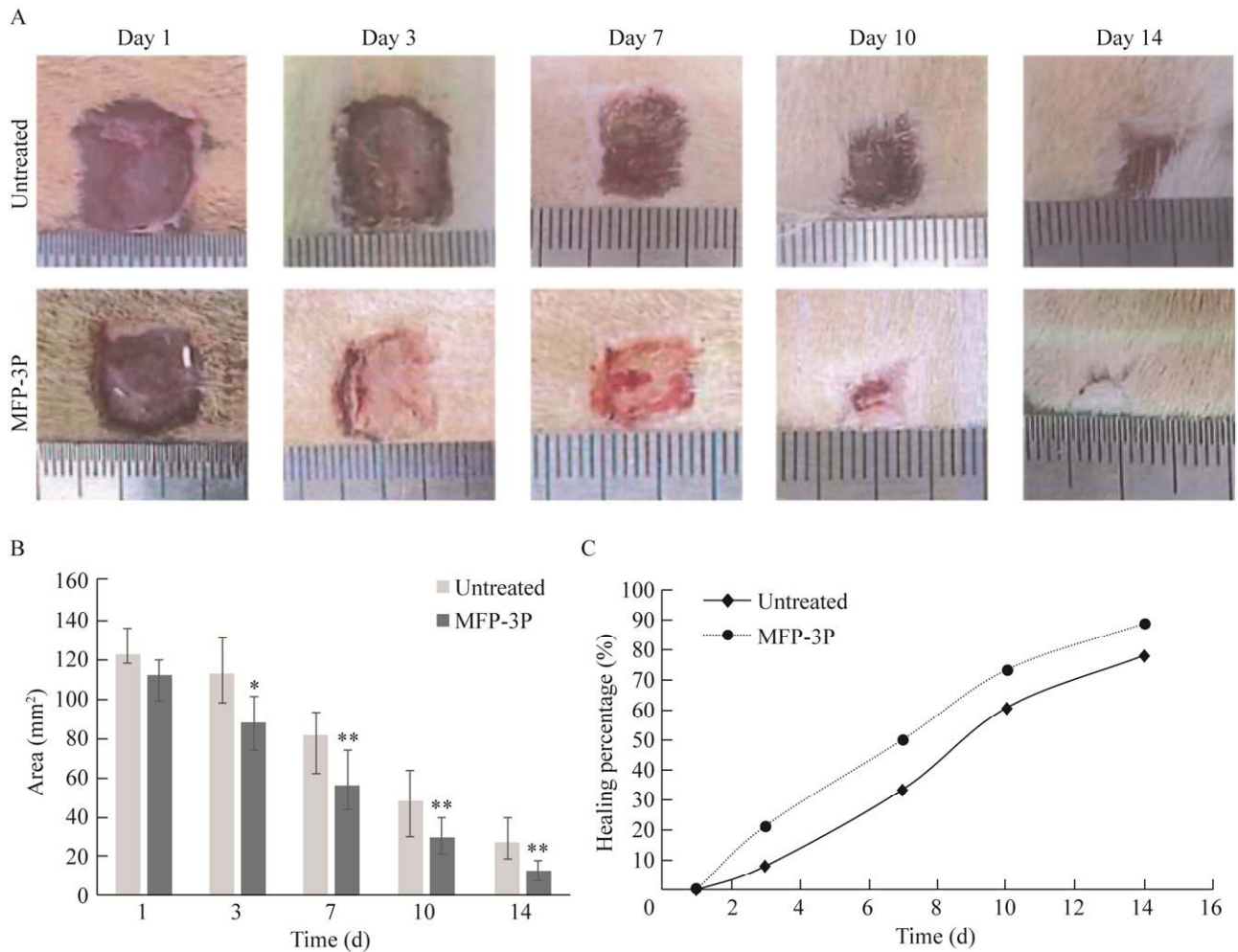


图3 大鼠皮肤创面愈合试验结果 A: 试验过程采集的照片. B: 伤口面积分析图. C: 伤口愈合趋势分析图

Figure 3 Results of rat skin wound healing test. A: Photos of the experimental process. B: Wound area chart (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). C: Trend chart of wound healing.

表1 伤口恢复状态目视观察统计表

Table 1 Statistical table for visual observation of wound recovery status

Day	Degree of re-epithelialization		Growth rate of granulation tissue		Edema degree	
	Untreated	MFP-3P	Untreated	MFP-3P	Untreated	MFP-3P
1	±	±	±	±	-	-
3	±	+	±	+	±	-
7	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	±	-
14	+	+	+	+	-	-

+: Significant change; ±: Slight change; -: No significant change.

系、层级结构以及功能多肽的深入解析,为使用基因工程开发工业菌株生产贻贝粘蛋白提供了丰富的资源,多年来已有许多成功采用基因工程构建工业菌株表达纯化获取重组贻贝粘蛋白纯品且具备优良的黏附作用的案例,但多数纯化工艺效果距离工业化低成本生产贻贝粘蛋白的目标仍具有一定的差距,究其原因可能是因为贻贝粘蛋白作为外源性蛋白,在大肠杆菌/毕赤酵母上的表达受阻,体现为不表达、表达量低、表达后不可溶等多种问题。重组单型贻贝粘蛋白的生物发酵表达以大肠杆菌作为宿主菌的研究开发获取了很大的进展,其中在V型贻贝粘蛋白(Mfp-5)的表达过程中,韩国浦项大学的Dong Soo Hwang团队采用在V型贻贝粘蛋白序列两端连接部分I型或III型贻贝粘蛋白序列进行融合表达构成Mfp-151/Mfp-353序列结构^[21,26],使原本V型贻贝粘蛋白表达后高度不溶的状态得到改善,制备获取含有多巴的贻贝粘蛋白纯品,但由大肠杆菌表达制备带来的内毒素含量控制困难、纯化工艺繁复成为进一步实现重组贻贝粘蛋白原料工业化制备的又一难点。随着贻贝粘蛋白应用研究的深入发展,极大地提升了对贻贝粘蛋白原料的需求及其安全性指标的要求,以毕赤酵母作为宿主菌表达制备重组贻贝粘蛋白,以其纯化工艺简便、内毒素含量低、更容易控制成为当下实现重组贻贝粘蛋白工业化生产的重点研究方向。贻贝粘蛋白作为外源性蛋白,在毕赤酵母中的表达同样会遇到大肠杆菌诱导表达相似的问题,如不表达、表达量低等问题。本研究采用融合蛋白改善目标蛋白表达的思路,将III型贻贝粘蛋白(Mfp-3)与跟胶原蛋白结构相似的贻贝足丝纤维骨架蛋白(preCol-P)的部分肽段进行融合表达,实现了Mfp-3在毕赤酵母菌中的表达,发酵液上清液

中重组贻贝粘蛋白(Mfp-3p)表达量达到1.4 g/L,结合分离纯化工艺,可以获得纯度高、内毒素含量低的重组贻贝粘蛋白,经鉴定测得多巴含量为0.73%。细胞实验表明其对小鼠成纤维细胞(L929)具备显著的促进细胞增殖及细胞迁移作用,动物实验表明其具备显著有效促进大鼠创面愈合及抗炎作用,同时也证明了通过将贻贝Mfp-3与构成贻贝足丝纤维骨架的蛋白融合的仿生贻贝足丝结构能够实现重组贻贝粘蛋白的高效表达及增产。本研究重组贻贝粘蛋白的成功制备为重组贻贝粘蛋白的工业化生产提供新的思路,采用融合表达的方法,将目标蛋白序列与经验证具备高效表达的辅助蛋白序列相连接,利用宿主菌对辅助蛋白表达的偏好性,达到促进贻贝粘蛋白序列诱导表达的目的,有望实现多种型别贻贝粘蛋白以毕赤酵母表达体系实现工业化生产,以此开发出更多可实现工业化生产且具备更多功效应用前景的重组贻贝粘蛋白,为重组贻贝粘蛋白的多领域应用提供原料支持,实现根据应用需求制备定制序列重组贻贝粘蛋白,推进贻贝粘蛋白在不同领域的应用。

REFERENCES

- [1] Dove J, Sheridan P. Adhesive protein from mussels: possibilities for dentistry, medicine, and industry[J]. The Journal of the American Dental Association, 1986, 112(6): 879.
- [2] YU ME, HWANG J, DEMING TJ. Role of l-3,4-dihydroxyphenylalanine in mussel adhesive proteins[J]. Journal of the American Chemical Society, 1999, 121(24): 5825-5826.
- [3] WAITE JH. Adhesion à la moule[J]. Integrative and Comparative Biology, 2002, 42(6): 1172-1180.
- [4] WU CT, HAN PP, LIU XG, XU MC, TIAN T, CHANG L, XIAO Y. Mussel-inspired bioceramics with self-assembled Ca-P/polydopamine composite nanolayer:

- preparation, formation mechanism, improved cellular bioactivity and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(1): 428-438.
- [5] 廖智, 申望, 王日昕. 海洋生物黏附蛋白研究进展[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2007, 26(4): 439-447. LIAO Z, SHEN W, WANG RX. Adhesive proteins from marine animals[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2007, 26(4): 439-447 (in Chinese).
- [6] 刘朝阳, 吴琳琳, 田茂生, 张明全, 赵娜, 高记华. 贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(5): 570-577. LIU ZY, WU LL, TIAN MS, ZHANG MQ, ZHAO N, GAO JH. Experimental study on the adhesion and antioxidant effect of MAP on ulcerative colitis in rats[J]. *Acta Lab Animal Science Sinica*, 2021, 29(5): 570-577 (in Chinese).
- [7] 牛继光. 紫贻贝的关键粘附基因及其选择性粘附行为研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学硕士学位论文, 2021. NIU JG. Study on key adhesion genes and their selective adhesion behavior of *Mytilus* mussel[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Engineering University, 2021 (in Chinese).
- [8] KIM S, HUANG J, LEE YJ, DUTTA S, YOO HY, JUNG YM, JHO Y, ZENG HB, HWANG DS. Complexation and coacervation of like-charged polyelectrolytes inspired by mussels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): E847-E853.
- [9] HOFMAN AH, van HEES IA, YANG J, KAMPERMAN M. Bioinspired underwater adhesives by using the supramolecular toolbox[J]. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla)*, 2018, 30(19): e1704640.
- [10] WAITE JH. Mussel adhesion-essential footwork[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(4): 517-530.
- [11] BRUBAKER CE, MESSERSMITH PB. Enzymatically degradable mussel-inspired adhesive hydrogel[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(12): 4326-4334.
- [12] CHEN T, CHEN YJ, REHMAN HU, CHEN Z, YANG Z, WANG M, LI H, LIU HZ. Ultratough, self-healing, and tissue-adhesive hydrogel for wound dressing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(39): 33523-33531.
- [13] KIM M, CHUNG H. Photo-responsive bio-inspired adhesives: facile control of adhesion strength via a photocleavable crosslinker[J]. *Polymer Chemistry*, 2017, 8(40): 6300-6308.
- [14] ZHANG H, BRÉ L, ZHAO TY, NEWLAND B, Da COSTA M, WANG WX. A biomimetic hyperbranched poly(amino ester)-based nanocomposite as a tunable bone adhesive for sternal closure[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(26): 4067-4071.
- [15] ZHANG H, BRÉLP, ZHAO TY, ZHENG Y, NEWLAND B, WANG WX. Mussel-inspired hyperbranched poly(amino ester) polymer as strong wet tissue adhesive[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(2): 711-719.
- [16] ZHOU JJ, BHAGAT V, BECKER ML. Poly(ester urea)-based adhesives: improved deployment and adhesion by incorporation of poly(propylene glycol) segments[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(49): 33423-33429.
- [17] ZHOU JJ, DEFANTE AP, LIN F, XU Y, YU JY, GAO YH, CHILDERS E, DHINOJWALA A, BECKER ML. Adhesion properties of catechol-based biodegradable amino acid-based poly(ester urea) copolymers inspired from mussel proteins[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(1): 266-274.
- [18] 薛瑞, 姚林, 王瑞, 罗正山, 徐虹, 李莎. 重组贻贝足蛋白的研究进展与应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(11): 82-89. XUE R, YAO L, WANG R, LUO ZS, XU H, LI S. Research progress and application of recombinant mussel podocin[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 40(11): 82-89 (in Chinese).
- [19] GUO Q, CHEN JS, WANG JL, ZENG HB, YU J. Recent progress in synthesis and application of mussel-inspired adhesives[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(3): 1307-1324.
- [20] 潘家豪, 潘炜松, 邱健, 谢东玲, 邹奇, 吴川. 重组胶原蛋白表达体系研究进展[J]. *合成生物学*, 2023, 4(4): 808-823. PAN JH, PAN WS, QIU J, XIE DL, ZOU Q, WU C. Research progress on recombinant collagen expression system[J]. *Synthetic Biology*, 2023, 4(4): 808-823 (in Chinese).

- [21] HWANG DS, GIM Y, YOO HJ, CHA HJ. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(24): 3560-3568.
- [22] 柯林楠, 汤京龙, 宋茂谦, 高敏, 陆云龙, 赵帅旗, 闭静秀, 何利中, 母瑞红. 贻贝粘蛋白中多巴氧化还原状态表征方法研究[J]. *中国医疗器械杂志*, 2018, 42(5): 365-367.
- KE LN, TANG JL, SONG MQ, GAO M, LU YL, ZHAO SQ, BI JX, HE LZ, MU RH. Study on the 3,4-dihydroxyphenylalanine redox state characterization method of mussel adhesive protein[J]. *Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 2018, 42(5): 365-367 (in Chinese).
- [23] 中华人民共和国药典: 2020 年版. 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [24] LIU ZQ, JIANG M, ZHAO JM, WANG QQ, ZHANG CF, GAO M, GU M, XIANG LH. Efficacy of a wound-dressing biomaterial on prevention of postinflammatory hyperpigmentation after suction blister epidermal grafting in stable vitiligo patients: a controlled assessor-blinded clinical study with *in vitro* bioactivity investigation[J]. *Archives of Dermatological Research*, 2020, 312(9): 635-645.
- [25] AHN JM, LEE JS, UM SG, RHO BS, LEE KB, PARK SG, KIM HJ, LEE Y, CHI YM, YOON YE, JO SH, KIM ME, PI KB. Mussel adhesive protein-conjugated vitronectin (fp-151-VT) induces anti-inflammatory activity on LPS-stimulated macrophages and UVB-irradiated keratinocytes[J]. *Immunological Investigations*, 2019, 48(3): 242-254.
- [26] GIM Y, HWANG DS, LIM S, SONG YH, CHA HJ. Production of fusion mussel adhesive fp-353 in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 24(6): 1272-1277.

(本文责编 郝丽芳)