

文章编号: 1671-7104(2018)05-0365-03

贻贝粘蛋白中多巴氧化还原状态表征方法研究

【作者】柯林楠¹, 汤京龙¹, 宋茂谦², 高敏², 陆云龙², 赵帅旗², 闭静秀², 何利中², 母瑞红¹

1 中国食品药品检定研究院(医疗器械标准管理中心, CFDA), 北京市, 102629

2 江阴贝瑞森生化技术有限公司, 江阴市, 214437

【摘要】目的 对高效液相色谱法表征贻贝粘蛋白中多巴氧化-还原状态可行性进行研究。方法 用高效液相色谱法、Arnow法和考马斯亮兰法测定贻贝粘蛋白中多巴含量及蛋白质含量。结果 随着氧化时间延长, 贻贝粘蛋白样品中蛋白含量不变, 还原态的多巴含量下降。加速氧化和自然存放样品的色谱峰保留时间均随着放置时间的延长发生偏移, 与多巴的氧化还原状态变化有关。结论 高效液相色谱法可以用来表征贻贝蛋白的氧化还原程度, 对于产品设计研发与质量控制具有重要意义。

【关键词】多巴; 高效液相色谱法; 贻贝粘蛋白; 氧化还原状态

【中图分类号】Q51

【文献标志码】A

doi: 10.3969/j.issn.1671-7104.2018.05.015

Study on the 3,4-Dihydroxyphenylalanine Redox State Characterization Method of Mussel Adhesive Protein

【Writers】KE Linnan¹, TANG Jinglong¹, SONG Maoqian², GAO Min², LU Yunlong², ZHAO Shuaiqi², BI Jingxiu², HE Lizhong², MU Ruihong¹

1 National Institutes for Food and Drug Control (Center for Medical Device Standardization Administration, CFDA), Beijing, 102629

2 Jiangyin USUN Biochemical Technology Co. Ltd, Jiangyin, 214437

【Abstract】Objective To investigate the feasibility of using liquid chromatography (HPLC) to characterize the 3, 4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) redox state of mussel adhesive protein (MAP). Methods The DOPA and protein contents of MAP were determined by HPLC, Arnow and Bradford methods respectively. Results With extended oxidation time, the protein contents of MAP samples remained unchanged whereas the DOPA contents declined. The retention times of main peaks in HPLC for both the accelerated oxidation and retained samples shifted as the storage time extended, which could be related to the changes of sample redox state. Conclusion The redox state of MAP can be characterized by the change of HPLC peak retention time. HPLC can be used in the research on the MAP redox state, which is beneficial to the product development and quality control.

【Key words】DOPA, liquid chromatography, mussel adhesive protein, redox state

0 引言

贻贝粘蛋白 (Mussel Adhesive Protein, MAP) 是从紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 的足丝腺中提取纯化的一种蛋白质。由于MAP具有优良的粘附特性、生物相容性及生物可降解性^[1-2], 其在医疗领域具有广泛的应用前景, 可作为生物粘合剂, 用于修复断裂骨骼、皮肤创伤等^[3-5]。MAP中含有大量的3, 4-二羟基苯丙氨酸 (即多巴Dopa)。Dopa是一类邻羟基酚类衍生物, 特殊的结构使得它呈现出多样的化学反应性, 可以通过非共价键和共价键与多种基材表面键合, 形成很强的粘附力^[6-9]。同时研究者还发现Dopa的氧化还原态对MAP粘附性能也有很大影响, 还原态的多巴与无机表面有很强的键合力。设计原位固化材料和粘附生物底物时需要氧化态的多巴配^[10]。

因此, Dopa氧化还原状态的研究对于MAP粘合剂在临床上成功应用, 以及产品的质量控制都是非常必要的。本文对MAP的氧化还原态进行了研究, 探讨HPLC法对MAP的氧化还原态表征的可行性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪, 岛津LC-15C; 紫外分光光度计, 岛津UV-2401PC; ACO-001电磁式空气泵, 森森集团股份有限公司。

1.2 试剂

1 mmol/L DOPA标准溶液配制: 精密称取L-DOPA标准品197.2 mg, 至1 L容量瓶中, 加1 mL浓盐酸溶解, 加蒸馏水定容至1 L。

考马斯亮蓝G-250试剂: 取0.1 g考马斯亮蓝G-250溶于50 mL 95%乙醇, 加入100 mL质量浓度为0.85 g/mL的磷酸, 作为母液保存, 使用时用水稀释到1 000 mL。

收稿日期: 2018-01-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFC1103204)

作者简介: 柯林楠, E-mail: kelinnan@sina.com

通信作者: 母瑞红, E-mail: muruihong@nifdc.org.cn

酸试剂：取4.3 mL浓盐酸，加95.7 mL蒸馏水，摇匀。

碱试剂：取4 g氢氧化钠，加蒸馏水溶解，并稀释至100 mL。

亚硝酸试剂：1.45 mol/L 亚硝酸钠溶液和0.41 mol/L 钼酸钠溶液；取亚硝酸钠10 g与钼酸钠10 g，加水稀释至100 mL。

2 样品制备

2.1 不同年份生产的样品留样

分别取2012年到2016年间MAP原液（江苏省江阴贝瑞森生化技术有限公司），在洁净工作台上用含有0.005%乙酸的生理盐水溶液将样品蛋白质含量稀释至0.5 mg/mL，作为供试液。

2.2 加速氧化试验样品

取“2.1”节中2016年的供试液，用0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调pH至7.0，随后移取50 mL至250 mL的灭菌烧瓶中。将烧瓶置于37 °C水浴中，用空气泵充气，气流速度为6 L/min，空气引入MAP溶液之前先通过装有水的瓶子。每24 h从烧瓶中取出5 mL作为供试液，共进行6天。

3 方法

3.1 MAP高效液相色谱(HPLC)分析

分别取“2.1”“2.2”节中的供试液进行高效液相色谱分析。色谱条件为色谱柱：Agilent Zobax SB 300A C8 (4.6×250 mm)；流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液；流动相B：乙腈；梯度洗脱程序：0 min~8 min, 5%~12% B；8.01 min~20 min, 15% B；20.01 min~45 min, 15%~100% B；进样量：20 μL；检测波长：280 nm；柱温：25 °C；流速：0.9 mL/min。

3.2 MAP中蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝法^[11]测定MAP中蛋白质含量，测定波长595 nm。

3.3 MAP中多巴含量测定

MAP中多巴含量采用改良的Arnow方法测定^[12]，测定波长为500 nm。

4 结果与讨论

4.1 不同年份生产的样品留样测定结果

取“2.2”节中制备的供试液进行高效液相色谱测试，色谱图见图1。

结果表明，随着存储时间的增加，样品主峰的保留时间从30 min向29 min偏移，2016年的样品主峰保

留时间为30.24 min，2012年为29.05 min。保留时间在30 min左右的主峰峰面积在变小，29 min的峰面积在增大。分析原因可能是随着存放时间，多巴基团会有部分被空气中的氧气自然氧化，还原态逐渐转变成氧化态，保留时间发生变化。

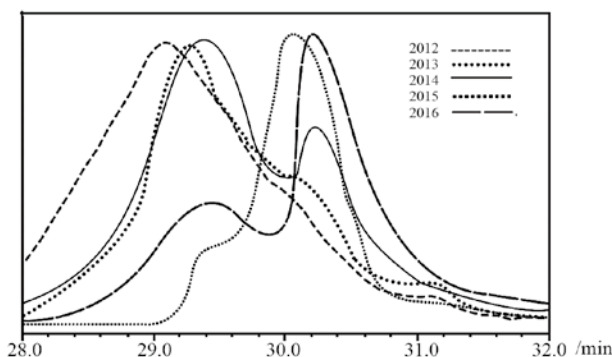


图1 不同生产时间的半成品样品的色谱图
Fig.1 Chromatograms of the different retained samples

4.2 加速氧化样品试验结果

表1为加速氧化样品的多巴浓度和蛋白含量测试结果。结果显示：样品中多巴浓度随着暴露时间的增长而减少，蛋白质含量基本保持恒定。

表1 暴露在空气中不同时间的样品中蛋白含量和多巴含量测试结果
Tab.1 Determination of protein and dopa for samples in accelerated oxidation time

样品暴露在空气中的天数(d)	0	1	2	3	4	5	6
蛋白浓度(mg/mL)	0.46	0.45	0.46	0.45	0.45	0.45	0.45
多巴浓度(mg/mL)	0.023 8	0.023 4	0.023 1	0.021 2	0.022 1	0.020 7	0.019 5

改良的Arnow方法测定多巴含量的原理如图2^[12]所示。MAP中的多巴首先在酸性环境下，与亚硝酸钠反应，然后，碱试剂与多巴的两个酚羟基反应，生成红色的醌类化合物，根据显色程度测定MAP中多巴的含量，其特点是对邻苯二酚基团具有很强的特异性^[13-14]。该法用于MAP中多巴含量测定时，不需要对样品水解前处理。加速氧化样品随着在空气中暴露时间的增长，多巴逐渐氧化成多巴醌，无法参与图2所示的反应，多巴含量下降。

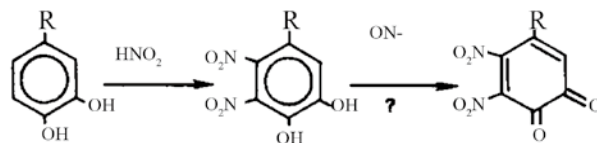


图2 多巴比色法检测原理

Fig.2 Schematic representation of colorimetric method for Dopa

图3为加速氧化样品的色谱图，结果表明样品加速氧化的时间越长，主峰保留时间偏移越明显。与图1结果基本一致。结合比色法测定多巴含量的结果可

以看出, MAP色谱峰保留时间的偏移与多巴的氧化-还原态有关。

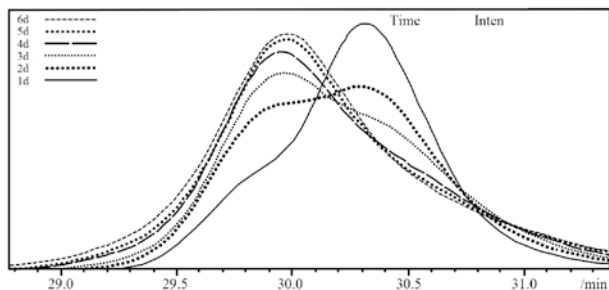


图3 加速氧化样品的色谱图

Fig.3 Chromatogram of samples in accelerated oxidation

5 结论

贻贝粘蛋白中的多巴基团对于其功能的实现至关重要, 多巴及其氧化产物对于贻贝粘蛋白的粘附、交联成膜以及促愈合功能的实现是不可或缺的。因此, 贻贝粘蛋白氧化还原状态评价是MAP质量控制的关键性步骤, MAP氧化还原状态的量化表征也是至关重要的。本文首次采用HPLC法对MAP氧化还原状态进行了研究, 结合比色测定多巴含量的结果后发现MAP色谱峰的保留时间变化与MAP氧化还原状态存在相关性, 可以通过特征吸收峰的变化鉴别贻贝粘蛋白的氧化还原状态。实验结果对于贻贝粘蛋白医疗产品开发、产品改性以及产品的质量控制在提供方法有重要的指导意义。

参考文献

- [1] SILVERMAN H G, ROBERTO F F. Understanding marine mussel adhesion[J]. Mar Biotechnol, 2007, 9(6): 661-681.
- [2] CHOI B H, CHEONG H, JO Y K, et al. Highly purified mussel

adhesive protein to secure biosafety for in vivo applications[J]. Microbial Cell Factories. 2014, 13: 52.

- [3] JEON E Y, HWANG B H, YANG Y J, et al. Rapidly light-activated surgical protein glue inspired by mussel adhesion and insect structural crosslinking[J]. Biomaterials, 2015, 67:11-19.
- [4] LEE B P, MESSERSMITH P B, ISRAELACHVILI J N, et al. Mussel-inspired adhesives and coatings[J]. Ann Review Mater Res, 2011, 41: 99-132.
- [5] 刘加鹏. 海洋贻贝粘附蛋白新型生物粘合剂的研究[D]. 福建: 厦门大学, 2008.
- [6] 于东宁, 张国安, 顾铭. 贻贝粘蛋白治疗瘢痕瘙痒的临床研究[J]. 中华损伤与修复杂志 (电子版), 2013, 8(6): 39-41.
- [7] YU M, DEMING T J. Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives [J]. Macromolecules, 1998, 31:4739-4745.
- [8] YU M, HWANG J, DEMING T J. Role of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in mussel adhesive proteins[J]. J Am Chem Soc, 1999, 121(24): 5825-5826.
- [9] GAO C L, LI G Z, XUE H, et al. Functionalizable and ultra-low fouling zwitterionic surfaces via adhesive mussel mimetic linkages[J]. Biomaterials, 2010, 31(7): 1486-1492.
- [10] FOROOSHANI P K, LEE B P. Recent approaches in designing bioadhesive materials inspired by mussel adhesive protein[J]. Polymer Chem, 2017, 5(1): 9-33.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社.
- [12] WAITE J H, BENEDICT C V. Assay of dihydroxyphenylalanine (dopa) in invertebrate structural proteins[J]. Meth Enzymol, 1984, 107: 397-413.
- [13] YAMAMOTO H, HAYAKAWA T. Synthesis of sequential polypeptides containing L-β-3,4-dihydroxyphenyl-α-alanine (DOPA) and L-glutamic acid[J]. Biopolymers, 1979, 18(12): 3067-3076.
- [14] WAITE J H, TANZERM L. Specific colorimetric detection of o-diphenols and 3,4-dihydroxyphenylalanine-containing peptides[J]. Anal Biochem, 1981, 111: 131-136.

新型人造血管

俄罗斯科学院西伯利亚分院化学生物学和基础医学研究所与俄罗斯国家医学研究中心联合开发了新型人造血管。

首先, 采用静电纺丝方法制备人造丝, 并通过电场对成丝过程进行控制, 这种人造丝编织的血管易于固定细胞。然后, 在人造血管上“预埋”人体内皮组织细胞, 之后再植入体内。动物实验结果证明, 血管内壁可形成具有相应功能的内皮组织层。

为提高人造血管的使用寿命, 减少更换血管的手术次数, 正尝试在人造血管内壁涂覆聚合物涂层, 在涂层内掺杂药物, 以达到防止内皮组织细胞过度繁殖, 控制内皮组织厚度的目的, 延长使用寿命。

(本刊讯)