

研究报告

新型促细胞粘附重组人源性胶原的原核表达
及功能性研究*胡 堃¹ 崔福斋^{1**} 徐 莉¹ 王恒樑² 黄留玉²

(1 清华大学材料系生物材料实验室 北京 100084 2 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 选择一段与 COL1A1 基因相应序列同源、适合于在大肠杆菌 *E. coli* 中表达、含有编码促细胞粘附位点 GER 三肽密码子的基因序列。利用 RT-PCR 技术从人组织扩增该序列,构建 pET28a(+)-COL 重组表达质粒并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS。IPTG 诱导表达获得重组人源性胶原 RHDC,表达量达到菌体总蛋白的 40% 左右,SDS-PAGE 和 Western blot 结果推测该胶原具有三螺旋结构,细胞粘附试验证明 RHDC 具有促细胞粘附能力,有应用于生物材料领域的潜力。

关键词 重组人源性胶原 细胞粘附 原核表达 功能研究

中图分类号 Q78

胶原占到动物体总蛋白的 25%,是含量最多的蛋白,是细胞外基质的主要成分。胶原具有良好的力学性能,稳定性优异,与活体组织间的相容性良好^[1,2]。这使其在医学领域获得广泛的应用,包括组织工程和药物载体材料。胶原蛋白分子中由 α 链组成的三螺旋构象被称为“胶原域”,胶原蛋白分子中至少应有一个胶原域。胶原域中有“甘氨酸-X-Y”重复序列存在。目前,胶原主要来源于牛皮、牛蹄筋等,具有交叉感染、污染以及超敏性反应等风险^[3]。因而,需要代替性的胶原来满足组织工程等的应用。

重组胶原在转染的哺乳动物细胞^[4,5],昆虫细胞^[6],酵母^[7-9],大肠杆菌 *E. coli*^[10],转基因烟草^[11-13],鼠^[14,15]和蚕^[16]中进行了表达。在哺乳动物细胞中表达水平在 0.6~20mg/L;可溶性前胶原在鼠奶中表达量达到 8mg/ml;昆虫细胞中达到 40mg/L;而在蚕茧中,平均每个蚕茧含有重组胶原的量为 70mg,这种融合蛋白占到提取总蛋白量的 3.6%^[16]。然而这种表达量远远没有达到商业应用的水平。而且,这些细胞的培养过

程成本是其它类型细胞,比如酵母和大肠杆菌的 5~10 倍^[17]。大肠杆菌表达存在密码子偏性等问题,多数研究者将适于大肠杆菌表达的 DNA 片段进行剪切重复连接到表达载体进行表达,以获得较高表达量的类胶原蛋白^[18]。

许多胶原上的序列被确认是细胞粘附位点^[19]。GER 是 I 型胶原序列中第 5 常见的三肽序列^[20],研究发现含有 GER 三肽的胶原序列能够促进细胞的粘附和血小板聚集,而且还是血管生长的必要因素^[21-23]。

组织工程框架材料的使用需要免疫原性低,生物相容性高,能够促进细胞的粘附,亲水性好等特点。如果来源的蛋白和人类的蛋白完全同源,并含有特异的功能位点,不易引起人体免疫排斥反应,同时细胞识别和组织长入将变得更加容易。针对此我们对 GenBank 库中已知的人 I 型胶原基因进行了生物信息学分析,筛选相应的 DNA 片段。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,从人组织中体外扩增了表达 I 型胶原 $\alpha 1$ 链的基因 COL1A1 的 cDNA。根据密码子偏性、GER 分布含量等因素,我们设计引物扩增了一段 DNA 序列,连接到原核表达载体 pET28a(+)中,成功地构建了高表达的重组质粒 pET28a(+)-COL。将其转化到

大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中并经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明获得了具有天然胶原三螺旋结构特征的重组人源性胶原 (recombinant human-derived collagen, RHDC)。RHDC 选自人 I 型胶原 α 链 Gly-X-Y 重复序列区, 含有 GER 功能位点, 目的基因片段经过生物信息学分析和筛选, 同时测序确定 DNA 序列和人 I 型胶原蛋白对应序列完全相同, 不经任何修饰。鼠纤维原细胞 3T3 粘附试验证明, 重组胶原促进了细胞的粘附。

1 材料与方法

1.1 试剂、材料与设备

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、BL21 (DE3) pLysS、和质粒 pET28a(+) 均为军事医学科学院生物工程研究所第 4 研究室保存和馈赠。鼠纤维原细胞 3T3 为本实验室保存。

提取总 mRNA 的 RNeasy Mini kit 和逆转录 PCR 使用的两步法 RT-PCR kit 为 Qiagen 公司产品。DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA Marker 和蛋白 Marker 购自天根公司。Thrombin 凝血酶购自 Sigma 公司。Ni-NTA His⁺ Bind Resin 购自 Novagen 公司。异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 Sigma 公司。抗 His-标签抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠 IgG 和 DAB 显色试剂盒购自中山生物公司。Tris-盐酸、甘油、乙酸钾、琼脂粉、尿素、二硫苏糖醇等为进口或国产分析纯试剂。

引物合成, 测序由上海 Sangon 公司提供服务。

基因扩增仪 GeneAmp ABI 9700, 美国; 台式高速冷冻离心机 Sigma 3K30, 德国; 台式高速离心机 Sigma 1-13, 德国。超低温冰箱为日本 Sanyo 产品。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 抽提及 cDNA 合成 取外伤健康成年志愿者术后皮肤及骨膜组织, 根据 RNeasy Mini kit 试剂盒提供的方法提取总 mRNA。然后利用逆转录试剂盒直接进行逆转录反应。所得逆转录产物总 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计与 DNA 合成 参照 GenBank 中收录的人 I 和 II 型胶原基因和蛋白序列。利用 DNASTar、Primer Premier 5、序列处理在线工具包 (The Sequence Manipulation Suite, SMS, <http://www.bio-soft.net/sms/>

[index.html](http://www.bio-soft.net/sms/), 是 DNA 与蛋白序列分析与格式化在线工具的集合) 和美国国立生物技术信息中心 (National center for biotechnology information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 提供的在线工具等对基因序列和蛋白序列进行分析和筛选。筛选的标准是: 偏性密码子少, 有功能位点 GER 等。设计并合成了针对 I 型胶原基因的特异性引物。

上游引物: 5'-CGCCATATCGGTTTCAGTGGTTTGG-3', 划线处为 *Nde* I 酶切位点; 下游引物: 5'-CAAGCTTAATTCTCTCTCGCCTCTTGC-3', 划线处为 *Hind* III 酶切位点, 末端加入终止密码子 TAA。

以逆转录获得的 cDNA 为模板, 利用上述引物扩增目的 1233bp 的 DNA 片段。扩增条件为: 94℃ 变性 5min; 94℃ 变性 30s, 62℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.2.3 重组质粒 pET28a(+) -COL 的构建 上述 PCR 产物和 pET28a(+) 载体质粒分别经纯化、*Nde* I 和 *Hind* III 双酶切、T4 DNA 连接酶连接、构建重组质粒。重组质粒转化 *E. coli* DH5 α , 卡那霉素筛选获得含有表达载体的阳性转化子, 提取质粒做限制性内切酶鉴定、PCR 鉴定和 DNA 序列分析鉴定。重组质粒命名为 pET28a(+) -COL。

1.2.4 pET28a(+) -COL 在 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 中的表达、纯化及鉴定 取 pET28a(+) -COL 重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 在含有卡那霉素的 LB 固体培养基中 37℃ 过夜。随机挑取 6 个菌落, 各加 5ml LB 液 (Km^{+}) 于 37℃ 过夜。各取 50 μ l 菌液加 5ml LB 液 (Km^{+}), 37℃ 摇床培养 2h (OD 值约为 0.2 ~ 0.6), 于各管中加 IPTG (终浓度为 1mmol/L) 进行诱导, 继续培养 6h。离心收集菌体, 100 μ l 上样缓冲液重悬, 沸水浴中变性 5min; 取未经 IPTG 诱导的菌体作阴性对照, 同样变性处理。12% SDS-PAGE 电泳, 判断蛋白表达情况。取表达量最大的菌种进行 IPTG 浓度及表达温度的优化实验。经优化条件后蛋白表达量最高的菌体进行培养, 菌体裂解后上清用 Ni-NTA 纯化, 获得纯化重组胶原蛋白。进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

重组胶原经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上。膜经 5/L 脱脂奶封闭后, 先后与一抗 (抗 His-标签抗体, 1:50 稀释) 及二抗 (抗鼠-HRP, 1:50 稀释) 反应后, 用 DAB 原位显色。同时将表达的重组胶原与 Thrombin 凝血酶混合作用去 His-标签, 利用该胶原作

为抗原和佐剂结合免疫 Balb/c 雄性小鼠获得 RHDC 抗体。将重组胶原经 SDS-PAGE 分离,利用 RHDC 抗体作为一抗,抗鼠-HRP 为二抗再次进行 Western blot 分析^[24]。

鉴定后的含有重组质粒的菌体大量培养,根据选用 pET28a(+)表达载体质粒的特点,将表达的初始重组蛋白与 Thrombin 凝血酶混合作用去 His-标签,获得可应用于生物材料制备的重组胶原。

1.2.5 细胞粘附实验 使用鼠纤维原 3T3 细胞进行细胞粘附实验^[25]。RHDC 溶解在 PBS 溶液中,浓度为 1mg/ml。溶液以 500μl/孔加到 48 孔细胞培养板中。培养板在室温下干燥 1h,每孔加入 500μl 含有 3T3 细胞的 DMEM 培养基(10% 胎牛血清)。培养板放入 37℃ 孵育箱中培养 2h。培养的细胞用 PBS 冲洗后使用 200μl 0.5% Triton-X100/PBS 溶液进行分离。使用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)探测试剂盒并根据其提供的方法处理上述溶液。基于 NADP⁺ 转化到 NADPH,利用分光光度计测量 340nm 吸收值。自由选择 6 个培养孔测量其吸收值,结果取平均值。

2 实验结果及讨论

2.1 基因选择及表达载体的构建

重组胶原的 DNA 序列设计成含有 5'-*Nde* I 和 3'-*Hind* III 末端。插入载体(比如 T 载体,利于保存 DNA 序列)后,*Nde* I 和 *Hind* III 双酶切即可获得目的基因序列。该序列经过生物信息学分析筛选,其中的每个氨基酸密码子都可以在大肠杆菌 *E. coli* 中使用^[26];序列中含有多个 GER 序列。因为 DNA 序列的组成影响多肽的表达和 DNA 自身的稳定,选择序列使其密码子的 A-T 含量达到最佳化。

纯化的 DNA 片段插入到 pET28a(+)的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点间,获得重组质粒 pET28a(+)-COL。*Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,显示重组质粒构建成功(图 1),目的基因插入到表达载体中。利用该质粒为模板,上述的引物进行 PCR,结果扩增出了 1233bp 的条带(图 2),说明质粒中含有目的基因。将 pET28a(+)-COL 测序,结果确定重组质粒构建成功,基因序列与 COL1A1 相应序列完全相同。测序结果进行表达蛋白的氨基酸残基序列预测(图 3)。RHDC 含有 411 个氨基酸残基,组成 137 个 Gly-X-Y 三肽重复序列。包含 5 个 GER 功能位点。RHDC 的两侧是表达载体 pET28a(+)含有的 Thrombin 凝血酶酶切识别位点和 His-标签

蛋白,利于蛋白的鉴定和纯化。最终的重组蛋白经 Thrombin 凝血酶处理后即可获得不含 His-标签的纯净的重组蛋白。

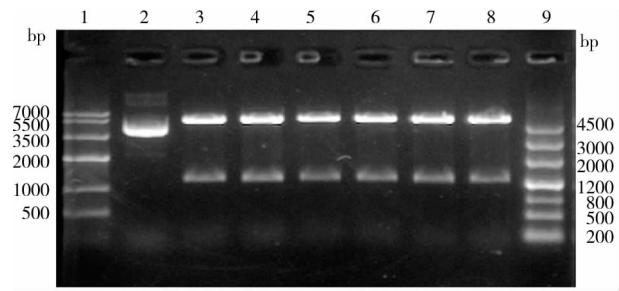


图 1 重组质粒 pET28a(+)-COL 的 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切鉴定
1: DNA Marker IV;2:pET28a(+)-COL 质粒;3~8:pET28a(+)-COL/*Nde* I + *Hind* III;9:DNA Marker III

Fig. 1 *Nhe* I and *Hind* III digestion analyses of the recombinant expression vector pET28a(+)-COL

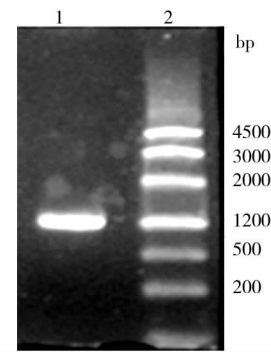


图 2 重组质粒 pET28a(+)-COL 的 PCR 鉴定
1:以 pET28a(+)-COL 质粒为模板的 PCR 结果;
2:DNA Marker III

Fig. 2 PCR identification of the recombinant expression vector pET28a(+)-COL

2.2 RHDC 的诱导表达、纯化与鉴定

重组质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 菌株中,该菌株为以 T7 RNA 聚合酶为表达系统的高效外源基因的蛋白表达宿主。T7 噬菌体 RNA 聚合酶基因的表达受控于 λ 噬菌体 DE3 区的 lacUV5 启动子,该区整合于 BL21 的染色体上。pLysS 质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因,能够降低目的基因的背景表达水平,但不干扰 IPTG 诱导的表达。

对含有重组质粒的工程菌的诱导条件进行优化后行 SDS-PAGE 电泳,确认在诱导温度为 30℃,诱导时间为 4 小时,IPTG 终浓度为 1mmol/L 时表达量最高。蛋

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGFSLDGAAGDAGAGPKGEPGSPGENGAPGQMGRPLPGERGRPGAP
 GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGPGFPAVGAKEAGPQGPRGSEPGQGVREPGPPGAPAGAAGA
 GNPAGDGGPGAKGANGAPGIAAGPFGPARGPSGPQGPGGPPGPKGNSGEPGAPGSKGDTGAKGEPGPV
 GVQGGPPGPAAGEEGKRGARGEPGPTGLPGPPGERGGPSRGFPAGDGVAGPKGPAGERGSPGAPGPKGSP
 GEAGRPGEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGAGQDGRPGPPGARGQAGVMGFPGPKGAAGEP
 GKAGERGVPGPPGAVGAPAGKDGEAGAQGPPGAPGAGERGEQGPAGSPGFQGLPGAPGPPGAEAGKPGEQ
 GVPGLDGAAPGSPGARGER*

图3 RHDC 氨基酸序列

加框为 His-标签;下划线序列是 Thrombin 凝血酶识别位点;
 斜体部分为 RHDC 序列;阴影部分为 GER 三肽;* 为终止密码子

Fig.3 The designed oligonucleotide sequences of RHDC

白可溶性分析表明所表达的蛋白为可溶性,薄层灰度扫描表明表达水平可达 40%。根据重组质粒 pET28a (+)-COL 的特点,表达产物的 5'端带有 6 个组氨酸和凝血酶识别切割序列。后续研究中使用 Thrombin 凝血酶将 6His-Thrombin 识别位点编码的氨基酸切除,可得到纯净的 RHDC。利用镍离子柱与多聚组氨酸间的特异性结合,取菌体上清液经 Ni^{2+} + 金属离子吸附层析柱纯化得到 36kDa 的重组胶原(图 4)。

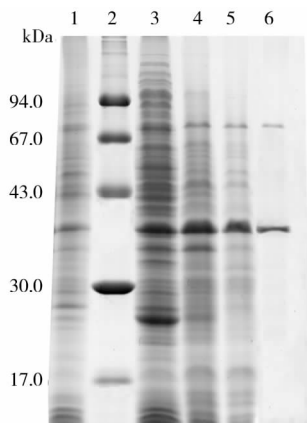


图4 RHDC 表达与纯化的 SDS-PAGE 电泳结果

1:未诱导的菌体总蛋白;2:蛋白 Marker;3:IPTG 诱导 4 小时菌体沉淀蛋白;4:IPTG 诱导 4 小时菌体总蛋白;5:IPTG 诱导 4 小时菌体蛋白上清;6:纯化的重组蛋白

Fig.4 SDS-PAGE analysis of RHDC expression

分别采用抗 His-标签抗体和抗 RHDC 抗体作为一抗,标记 HRP 的抗鼠抗体作为二抗,DAB 作为显色底物,对纯化的重组胶原进行 Western blot 检测,有明显的条带出现,说明纯化的蛋白是所要表达的 RHDC 蛋白(图 5,6)。

重要的是,从图 4 上可以看到两条条带:36kDa,对应的是 RHDC;在 80kDa 左右出现了另一条带。图 5 中

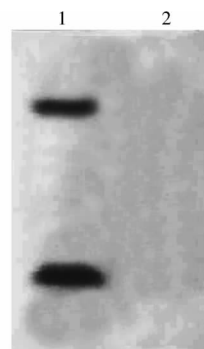


图5 RHDC Western blot 检测结果

1:RHDC 蛋白;2:诱导前菌体总蛋白

Fig.5 Western blot analysis of RHDC

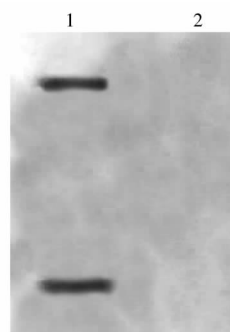


图6 抗血清特异性的 Western blot 分析

1:RHDC 与抗血清相互作用;2:RHDC 与免疫前血清相互作用

Fig.6 Western blot analysis of the specificity of antiserum

Western blot 结果表明两个条带都是带有 His-标签的重组蛋白,图 6 中 Western blot 结果进一步验证了重组胶原的正确性。上面条带蛋白的分子量约是下面条带蛋白分子量的 2 到 3 倍,推测该蛋白应该是 RHDC 的分子链发生聚合作用后形成的具有天然胶原三螺旋结构特征的重组胶原蛋白。

2.3 RHDC 的细胞粘附实验

利用鼠纤维原 3T3 细胞检测 RHDC 促细胞粘附能力(图 7)。实验设 3 组对照,每组加同样的细胞:空白细胞孔、自然 I 型胶原和纤维粘连蛋白。纤维粘连蛋白已经被研究证实是很好的粘附蛋白,它的核心序列就是 RGD 三肽。由图 7 可知,本研究中获得重组蛋白的粘附活性略小于纤维粘连蛋白,显著大于自然 I 型胶原蛋白。由此可知,RHDC 具有高的细胞粘附能力,适合于生物材料的应用。

前人的研究已经表明胶原能够促进细胞的粘附、铺展、迁移、基质金属酶结合位点和人血小板粘附聚

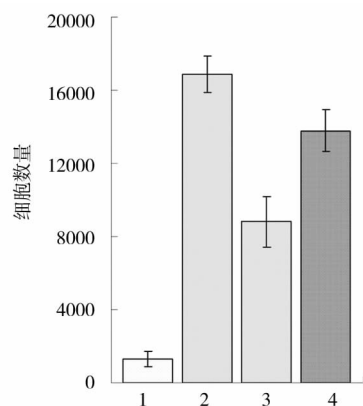


图 7 RHDC 促进鼠纤维原 3T3 细胞粘附实验结果

1:空白板;2:自然 I 型胶原蛋白;3:纤维黏连蛋白;4:RHDC

Fig.6 The result of cell adhesive assay of RHDC to mouse 3T3 fibroblasts

集。然而对于重组胶原,具备所有这些功能比较困难。因为胶原的生物合成都需要一个翻译后修饰过程,比如羟脯化酶的作用,但多数细菌和酵母菌中没有这种酶。在我们的研究中,通过分析和筛选,选取了含有 GER(含量占到 I 型胶原 α 链的一半)与原 I 型胶原 α 链编码基因 COL1A1 相应片段完全同源的 DNA 片段进行表达,获得的 RHDC 具有非常高的细胞粘附能力;选择的 DNA 片段完全位于胶原基因的三螺旋结构区,由 SDS-PAGE 和 Western blot 结果可推测 RHDC 也具有三螺旋结构。

3 结 论

经过生物信息学分析,设计和表达了与人 I 型胶原 α 链对应序列完全同源的具有三螺旋结构的重组人源性胶原蛋白。表达量达到总蛋白的 40%。该蛋白含有 GER 功能位点,能促进细胞的粘附。

参考文献

[1] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 221 (1-2):1 ~ 22

[2] Wong Po Foo C, Kaplan D L. Genetic engineering of fibrous proteins; spider dragline silk and collagen. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54 (8):1131 ~ 1143

[3] Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol*, 1984, 10 (4):638 ~ 646

[4] Geddis A E, Prockop D J. Expression of human COL1A1 gene

in stably transfected HT1080 cells; the production of a thermostable homotrimer of type I collagen in a recombinant system. *Matrix*, 1993, 13 (5):399 ~ 405

[5] Frischholz S, Beier F, Girkontaite I, et al. Characterization of human type X procollagen and its NC-1 domain expressed as recombinant proteins in HEK293 cells. *J Biol Chem*, 1998, 273 (8):4547 ~ 4555

[6] Myllyharju J, Lamberg A, Notbohm H, et al. Expression of wild-type and modified proalpha chains of human type I procollagen in insect cells leads to the formation of stable [alpha1(I)]2alpha2(I) collagen heterotrimers and [alpha1(I)]3 homotrimers but not [alpha2(I)]3 homotrimers. *J Biol Chem*, 1997, 272 (35):21824 ~ 21830

[7] Toman P D, Chisholm G, McMullin H, et al. Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2000, 275 (30):23303 ~ 23309

[8] Olsen D R, Leigh S D, Chang R, et al. Production of human type I collagen in yeast reveals unexpected new insights into the molecular assembly of collagen trimers. *J Biol Chem*, 2001, 276 (26):24038 ~ 24043

[9] Myllyharju J, Nokelainen M, Vuorela A, et al. Expression of recombinant human type I-III collagens in the yeast *pichia pastoris*. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28 (4):353 ~ 357

[10] Buechter D D, Paoletta D N, Leslie B S, et al. Co-translational incorporation of trans-4-hydroxyproline into recombinant proteins in bacteria. *J Biol Chem*, 2003, 278 (1):645 ~ 650

[11] Ruggiero F, Exposito J Y, Bournat P, et al. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett*, 2000, 469 (1):132 ~ 136

[12] Perret S, Merle C, Bernocco S, et al. Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation. *J Biol Chem*, 2001, 276 (47):43693 ~ 43698

[13] Merle C, Perret S, Lacour T, et al. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett*, 2002, 515 (1-3):114 ~ 118

[14] John D C, Watson R, Kind A J, et al. Expression of an engineered form of recombinant procollagen in mouse milk. *Nat Biotechnol*, 1999, 17 (4):385 ~ 389

[15] Toman P D, Pieper F, Sakai N, et al. Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Res*, 1999, 8 (6):415 ~ 427

- [16] Tomita M, Munetsuna H, Sato T, et al. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*, 2003, 21 (1): 52 ~ 56
- [17] Datar R V, Cartwright T, Rosen C G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/technology* (Nature Publishing Company), 1993, 11 (3): 349 ~ 357
- [18] 范代娣, 段明瑞, 米钰, 等. 重组 *E. coli* 工程菌高密度培养生产人源型胶原蛋白. *化工学报*, 2002, 53 (7): 752 ~ 754
Fan D D, Duan M R, Mi Y, et al. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2002, 53 (7): 752 ~ 754
- [19] Pfaff M, Aumailley M, Specks U, et al. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp Cell Res*, 1993, 206 (1): 167 ~ 176
- [20] Bachinger H P, Davis J M. Sequence specific thermal stability of the collagen triple helix. *International journal of biological macromolecules*, 1991, 13 (3): 152 ~ 156
- [21] Knight C G, Morton L F, Onley D J, et al. Identification in collagen type I of an integrin $\alpha 2 \beta 1$ -binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem*, 1998, 273 (50): 33287 ~ 33294
- [22] Sweeney S M, DiLullo G, Slater S J, et al. Angiogenesis in collagen I requires $\alpha 2 \beta 1$ ligation of a GFP * GER sequence and possibly p38 MAPK activation and focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, 2003, 278 (33): 30516 ~ 30524
- [23] Xu Y, Gurusiddappa S, Rich R L, et al. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$. *J Biol Chem*, 2000, 275 (50): 38981 ~ 38989
- [24] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [25] Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res*, 1994, 28 (7): 783 ~ 789
- [26] Aota S, Gojobori T, Ishibashi F, et al. Codon usage tabulated from the GenBank Genetic Sequence Data. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 315-402

Prokaryotic Expression and Functional Study of a Novel Recombinant Human-derived Collagen

HU Kun¹ CUI Fu-zhai¹ XU Li¹ WANG Heng-liang² HUANG Liu-yu²

(1 Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(2 Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract The DNA sequences, which originated from gene COL1A1, optimized for *E. coli* codon usage and contained cell adhesion domains of GER units, was amplified by RT-PCR technology from human tissue. The recombinant expression vector pET28a(+) -COL encoded the recombinant human-derived collagen (RHDC) was constructed and transformed host *E. coli* strain BL21(DE3) pLysS. The RHDC production was induced by the addition of IPTG and approximately 40% of the total strain proteins. RHDC could form a triple-helical structure suggested by the SDS-PAGE and Western blot analysis. Cell adhesion assay indicated that RHDC had high cell adhesive character, which makes it suitable for use as biomaterials.

Key words Recombinant human-derived collagen Cell adhesive Prokaryotic expression Functional study