

非胶原蛋白模拟多肽 E8DS 促进 I 型胶原仿生矿化*

王秀梅 王琼 程振江 崔福斋

(清华大学材料科学与工程系新型陶瓷与精细工艺国家重点实验室 北京 100084)

摘 要 通过分析骨涎蛋白和牙本质基质蛋白的功能域, 设计合成了一种非胶原蛋白模拟多肽 E8DS (EEEEEEED-SESSEEDR), 引入胶原蛋白仿生矿化体系, 共同调控磷酸钙晶体的矿化过程。圆二色谱和红外光谱分析结果表明, 多肽 E8DS 可与钙离子和胶原分子通过静电作用相结合。使用稳态凝胶系统对多肽 E8DS 的分析结果表明, E8DS 具有很强的调控钙磷盐矿化的能力。多肽的加入有助于胶原纤维的分子组装, 增加了形核位点, 促进了磷酸钙在胶原纤维表面矿化, 使胶原纤维的矿化程度明显提高。

关键词 有机高分子材料, 生物矿化, 非胶原蛋白, 胶原纤维, 多肽

分类号 TB324

文章编号 1005-3093(2011)03-0225-06

Biom mineralization of Type I Collagen Promoted by an Engineered Non-collagen Protein-derived Peptide E8DS

WANG Xiumei** WANG Qiong CHENG Zhenjiang CUI Fuzhai

(State Key Laboratory of New Ceramics and Fine Processing, Department of Materials Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

*Supported by National Natural Science Foundation of China No.50830102, and National High Technology Research and Development Program No.2011AA030105.

Manuscript received February 23, 2011; in revised form March 21, 2011.

** To whom correspondence should be addressed, Tel:(010)62772977, E-mail:wxm@tsinghua.edu.cn

ABSTRACT Peptides with sequence (EEEEEEEDS_pES_pSpEEDR) were synthesized to mimic the biom mineralization function of non-collagenous protein over the type I collagens. The results show that the peptide can be bound to Ca²⁺ and type I collagen by electrostatic interactions. Moreover, synthetic peptide is conducive to calcium ions binding and promotes the nucleation and formation of minerals on the surface of collagen fibrils. Designed peptides also presented a function of accelerating type I collagen fibrillogenesis and the formation of fibrils bundle or network.

KEY WORDS organic polymer materials, biom mineralization, non-collagenous protein, collagen, peptide

在生物矿化过程中有机基质的调控作用一直是近代生物矿化研究的核心问题。通过有机-无机界面的分子识别, 有机分子在晶体形核、生长以及微结构的有序组装方面起着关键作用。骨、牙本质等组织的矿化过程, 受到很多因素的影响。在参与生物矿化的有机基质中, 蛋白质精密、有序地调控矿化过程, 从而形成具有复杂结构和优异力学性能的矿化组织。影响生物矿化的蛋白质, 可分为有机模板蛋白和可溶性功能蛋白。前者主要作为矿化模板, 提供矿化空间与

位点, 例如在牙本质和骨中占主要成分的 I 型胶原蛋白。后者的种类繁多, 参与矿化的细胞不同, 相关的调控蛋白也不同, 其作用基质也不同。例如调控形核、控制晶体生长方向和形态的牙本质基质蛋白 (dentin matrix protein 1, DMP1)^[1], 以及含有连续谷氨酸片段和 RGD 序列、促进矿物形核的骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP)^[2,3] 等。作为有机模板的胶原蛋白和具有调控功能的非胶原蛋白, 在矿化过程中由相关细胞控制, 具有精确的时间序列和空间位置, 它们相互协调、共同作用并最终产生了多级有序结构的矿化组织^[4,5]。

I 型胶原作为骨、牙本质等组织的矿化支架, 主要提供矿化的结构网络, 调控矿物定向沉积和生长。在过饱和的矿化液中, 在多级自组装的 I 型胶原纤维

* 国家自然科学基金 50830102 重点资助项目和国家高技术研究发展计划 2011AA030105 资助项目。

2011 年 2 月 23 日收到初稿; 2011 年 3 月 21 日收到修改稿。

本文联系人: 王秀梅

上表面会形成定向生长的羟基磷灰石晶体,其C轴平行于胶原纤维纵向^[6]。在自组装过程中,原胶原分子以相互错开四分之一的阵列规则排列构成胶原微纤维,形成了间隙区与重叠区相互交替的67 nm周期性结构。在这些间隙区也有矿物形成,间隙区的矿物对矿化组织,特别是牙本质的力学性能具有重要的作用和意义^[7]。

体外实验显示,酸性非胶原蛋白在磷灰石的沉积中具有关键作用^[8,9]。在人体矿化组织中,有含量很高的酸性非胶原蛋白,如骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨粘连蛋白(osteocalcin OC)、牙本质涎磷蛋白(dentine phosphophoryn, DPP)和牙本质基质蛋白(dentin matrix protein 1, DMP1)。这些蛋白通过静电吸附、疏水性吸附以及范德华力与胶原结合在一起,这些特定的结合区域一般在胶原的间隙区。这些蛋白的酸性片段具有很强的钙离子吸附能力,促使羟基磷灰石晶体的形核,并控制它们的取向和生长^[10]。

本文设计的多肽EEEEEEEDS_pES_pS_pEEDR(E8DS)来源于BSP和DMP1蛋白中的两组功能多肽片段。BSP有两个典型的酸性结构域DSSEENGNGDSSEEEEEETS和EDESDEEEEEEEEEE,这些连续的谷氨酸和磷酸化的丝氨酸片段对钙离子的吸附和羟基磷灰石的沉积有关键作用^[11,12]。DMP1蛋白多肽片段中羟基末端的DSESSEEDR序列,具有胶原蛋白的吸附能力^[1]。

在骨组织工程和修复中,大多采用胶原基支架材料。为了提高骨的修复效果,往往需要加入多种生长因子促进骨的矿化。随着人们对非胶原蛋白理解的加深,很多骨材料中也开始加入特定的非胶原蛋白,以促进矿化早起的矿物形核,调控矿物晶体的定向生长^[13]。也有相关研究用聚电解质(polyelectrolyte)和多聚乙烯基磷酸分子(polyvinylphosphonic acid macromolecules)模拟天然蛋白的功能域调控矿化^[14,15]。但是,引入非胶原蛋白势必增加人们对滤过性病毒和阮病毒等潜在威胁的担忧。而引入化学高分子,也要考虑其生物相容性。因此,引入具有特定结构和功能的多肽,使其发挥类似于非胶原蛋白的调控作用,将极大地促进胶原基材料的矿化。本文设计特定的多肽序列(EEEEEEEEDS_pES_pS_pEEDR),研究其吸附钙离子的能力、与胶原纤维的相互作用以及对胶原矿化体系的影响,从而探索非胶原蛋白与胶原的相互作用机理。

1 实验方法

1.1 多肽和胶原蛋白的制备

采用固相合成法合成非胶原蛋白模拟多肽E8DS(EEEEEEEEDS_pES_pS_pEEDR)(纯度 > 85%),

其中丝氨酸位点进行磷酸化处理。

采用Pins等所描述的方法^[16],从鼠尾腱提取酸可溶I型胶原蛋白。先将成年大鼠鼠尾外皮剥去,用手术刀将白色胶原纤维与肌纤维分离。将分离后的胶原纤维分为直径约0.15 mm,长10 cm左右的微纤维。将其放在丙酮中约半分钟以去除表面油脂,然后用去离子水反复冲洗,在4 °C去离子水中保存。在室温下将提取的胶原纤维溶解在10 mmol/L HCl溶液约10 h,然后离心45 min(离心机CR21F, Hitachi, Japan, 转速:15000 r/min, 4 °C; 以下离心参数同此)。随后去上清液并加入NaCl固体,使NaCl溶度达到0.7 mol/L,同时搅拌促进溶解。再将溶液离心30 min。去掉上清液后将沉淀物溶于10 mmol/L HCl溶液中,充分搅拌,溶解后倒入透析袋。将透析袋浸入缓冲液(20 mmol/L Na₂HPO₄, pH=7.4)中,在4 °C下透析24 h,然后离心45 min,再用同样方式透析24 h,最后在透析袋中溶解的溶液即为制备的胶原母液。将胶原母液冷冻干燥后溶于10 mmol/L HCl溶液,制得2 mg/mL胶原溶液,存放在4 °C冰箱备用。

1.2 多肽矿化能力的分析

采用稳态凝胶系统(steady-state agarose gel system)^[17](图1)分析多肽的矿化能力。称取适量琼脂糖(agarose)于去离子水中加热至沸腾溶解,配置成3%的琼脂糖溶液。将其冷却到50 °C以下后分别加入NaCl、Tris-HCl和多肽母液,使其最终浓度为:2%琼脂糖,150 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl。不同实验组所采用多肽浓度,分别为0、0.03、0.3、3、30和100 μg/mL。将配好的琼脂糖混合溶液5 mL迅速装入封有半透膜(截留分子量为1000Da)的反应槽中,待其凝胶化后通入钙、磷反应液。其中钙反应液的成分为:6.5 mmol/L CaCl₂,150 mmol/L NaCl,20 mmol/L HEPES, pH=7.4,磷反应液的成分为:3.9 mmol/L Na₃PO₄,150 mmol/L NaCl,20 mmol/L HEPES, pH=7.4,在37 °C反应7 d。反应溶液的流入由蠕动泵控制,流速1 mL/h。实验结束后,将凝胶取出并置入10 mL的浓硝酸溶液中,加热至80 °C使其充分溶解,直至体积减少到1 mL。将该酸溶液从

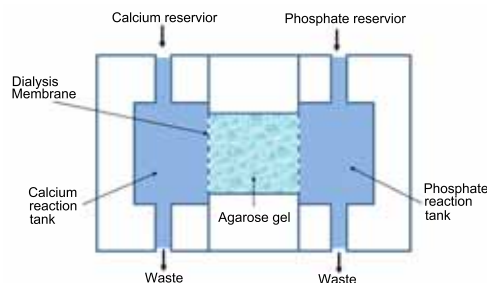


图1 稳态凝胶反应系统示意图

Fig.1 Scheme of steady-state agarose gels system

1 mL 稀释成 10 mL, 分别测量钙、磷含量。采用原子吸收光谱 (172-8035, Japan) 测量钙离子含量, 采用磷钼酸比色法分析磷酸根离子含量^[18]。

1.3 胶原/多肽的矿化

在 2 mL 的小试管中加入 1.5 mL 胶原溶液 (2 mg/mL), 再滴加 30 多肽溶液 (1 mg/mL), 充分混合后置于 4 °C 冰箱过夜。用半透膜 (SpectraPor-3, 截留分子量为 3500Da) 将试管封口。将小试管浸入装有 200 mL 浓度为 2 mmol/L CaCl₂ 溶液的烧杯中, 静置 1 h 后在烧杯中加入 200 mL 缓冲液 (1.2 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH=7.4)。反应在 37 °C 下进行 1 d、7 d 后结束。对照组实验不添加多肽, 其他条件相同。

1.4 圆二色谱分析 (CD)

采用圆二色谱分析多肽与钙离子、胶原与多肽混合后二级结构的变化。配置测试的样品: 溶液 A: 0.4 mg/mL 多肽, 0.1 mmol/L HEPES, pH=7.4; 溶液 B: 0.4 mg/mL 多肽, 3 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L HEPES, pH=7.4; 溶液 C: 0.6 mg/mL I 型胶原, 5 mmol/L tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH=7.4; 溶液 D: 0.6 mg/mL I 型胶原, 0.4 mg/mL 多肽, 5 mmol/L tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH=7.4。采用圆二色谱仪 JASCO J-715 dichrograph (Jasco Corp, Tokyo, Japan) 对上述四种样品进行测试。测试温度为 20 °C, 溶液池厚度为 0.01 cm, 扫描范围和速度分别为 260~190 nm 和 100 nm/min。8 次扫描取平均值。

1.5 红外光谱分析 (FTIR)

分别制备胶原、胶原/多肽、胶原/CaCl₂、胶原/多肽/CaCl₂ 样品, 以及胶原/多肽矿化溶液冻干样品, 进行红外光谱分析。取 10 mL 0.6 mg/mL 的胶原溶液, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液小心调整至 pH=7.0 后冷冻干燥, 制得胶原样品。取 10 mL 胶原溶液, 加入 0.4 mL 多肽溶液 (1 mg/mL), 混合均匀过夜, 再用 0.1 mol/L NaOH 调至 pH=7.0, 放置 30 min 后冷冻干燥, 制得胶原/多肽样品。取 10 mL 胶原溶液, 加入 0.4 mL 多肽溶液 (1 mg/mL), 混合均匀过夜, 加入 1.4 mL CaCl₂ 溶液 (0.1 mol/L), 再用 0.1 mol/L NaOH 调至 pH=7.0, 放置 30 min 后冷冻干燥, 制得胶原/多肽/CaCl₂ 样品。将胶原/多肽矿化溶液离心 (5000 r/min), 清洗 3 次后冷冻干燥, 制得胶原/多肽矿化溶液冻干样品。用红外光谱仪 (MAGNA-IR 750 FTIR, Maclesfield, UK) 分析这五种样品, 扫描范围为 400-4000 cm⁻¹。

1.6 试样的形貌观察

将冷冻干燥后的胶原/多肽矿化溶液样品固定在

导电胶上, 喷金厚度为 10 nm, 在扫描电镜下 (LEO-153, Germany) 观察其形貌, 工作电压为 5 kV。

2 结果与讨论

2.1 多肽 E8DS 与胶原及钙离子的结合

多肽 E8DS 与钙离子、胶原与多肽混合前后的圆二色谱如图 2 所示。曲线 (b) 表明, 多肽 E8DS 在水溶液中呈无规则卷曲状态。当存在钙离子时其二级结构发生转变, 在 198 nm 处出现较强的正峰, 在 217 nm 处出现明显的负峰, 为典型的 β - 折叠结构, 如曲线 (a) 所示。曲线 (c) 代表典型的胶原三股螺旋结构, 即 198 nm 左右有一个很强的负峰, 而在 215-227 nm 处有一个较弱的正峰。加入多肽后, 混

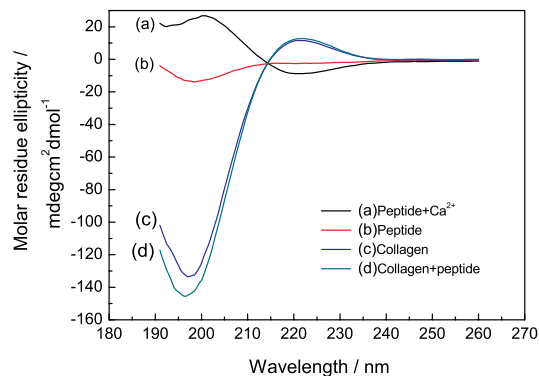


图 2 多肽/钙离子混合溶液、多肽溶液、胶原溶液和胶原/多肽混合溶液的圆二色谱分析

Fig.2 Comparative CD spectra study. (a) E8DS peptide solution with calcium ion; (b)E8DS peptide solution; (c)collagen solution; (d) collagen mixed with E8DS peptide

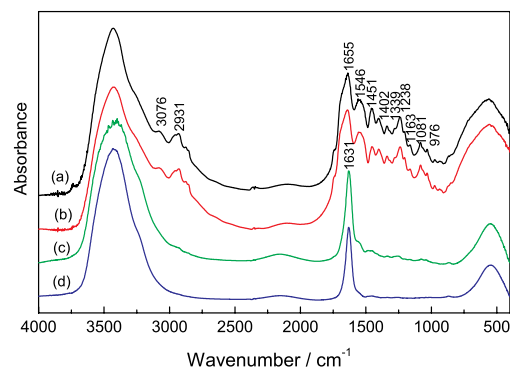


图 3 纯胶原、多肽作用下的胶原、钙离子作用下的胶原以及钙离子和多肽共同作用下的胶原的红外光谱

Fig.3 Comparative FTIR spectra study. (a) collagen; (b) collagen mixed with E8DS peptide; (c) collagen with calcium ion; (d) collagen mixed with both E8DS peptide and calcium ion

合溶液的圆二色谱谱线具有和纯胶原相似的形状,表明多肽的加入并不改变胶原的二级结构类型。但是在 222 nm 的正峰和 198 nm 的负峰增强了,表明多肽与胶原之间发生了相互作用。前人的研究表明,胶原圆二色谱的正峰负峰的增强对应于胶原分子的三股螺旋结构的变紧。因此,多肽 E8DS 与胶原的结合加强了胶原三股螺旋链间或链内作用,使三股螺旋结构变紧。

对胶原、胶原/多肽、胶原/多肽/CaCl₂ 样品的红外吸收光谱分析如图 3 所示。曲线 (a) 为胶原蛋白的典型 FTIR 谱,主要特征峰包括酰胺 I、II、III。其中酰胺 I 峰 (1656 cm⁻¹) 对应于 C=O 的伸展运动,II 峰 (1542 cm⁻¹) 对应酰胺键中 N—H 面内弯曲振动和 C—H 伸展振动的合峰,III 峰 (1243 cm⁻¹) 为酰胺键中 C—N 伸展振动和 N—H 面内弯曲振动的合峰。此外,3400 cm⁻¹ 附近的吸收峰对应 N—H 和 O—H 的伸缩振动。对比图 3 中 (a) 和 (b) 线,在胶原中加入多肽后胶原的红外光谱的峰位并未发生变化,表明胶原的整体结构并未发生明显的变化。但是计算发现,酰胺 I 峰强度有所增加。由于酰胺 I 峰对应于 C=O 的伸展运动,这可能是多肽 E8DS 中大量存在的谷氨酸和天冬氨酸的贡献。此外,3400–3450 cm⁻¹ 处的强宽峰变弱了,表明胶原中的 N—H 振动很有可能受到了多肽的影响。多肽 E8DS 具有强负电性,可能与胶原中的氨基基团静电吸附发生相互作用,使 N—H 伸缩振动强度大大降低。

对比图 3 中 (a) 和 (c) 线中的酰胺带,可以看出:在胶原溶液中加入钙离子后,酰胺键的三个谱带强度显著降低,且峰位发生了明显变化:酰胺 I 带由 1655 cm⁻¹ 移动到 1631 cm⁻¹,发生了红移,而酰胺 II、III 带已接近消失,主要是钙离子与胶原中的羧基和肽键的羰基发生配位作用引起的。在胶原/CaCl₂ 冷冻干燥过程中,CaCl₂ 在羧基和羰基位点上结晶、生长,将羧基和羰基紧密地“包裹”在晶体中。被“包裹”的 C=O 键的伸展振动和 N—H 键面内弯曲振动受到阻碍,不产生红外光谱,只有那些没有“包裹”或部分“包裹”的羰基才表现出红外振动光谱。因此,图中 (c) 线的酰胺 I、II、III 带的强度大大地减弱了。对比图 3 中的 (a), (c), (d) 线,发现酰胺 I 带的峰值明显降低,酰胺 II、III 也都消失。这表明,在多肽的作用下酰胺 I 带中的羧基与钙离子结合更多,其振动强度下降程度更大。

2.2 多肽 E8DS 的矿化能力和胶原/多肽 E8DS 仿生矿化

采用稳态凝胶系统分析多肽 E8DS 调控磷酸钙矿化的能力,用原子吸收光谱和磷钼酸比色法分析其凝胶中钙磷含量(表 1)。可以看到:随着多肽浓度的增加,其形成的钙磷盐含量明显增加。这表明,多肽对钙磷盐具有很强的形核能力,高浓度的多肽溶液能够捕获更多的钙离子和磷酸根离子,从而促进矿物的沉积。多肽 E8DS 具有连续的 8 个谷氨酸,能提供多个钙结合位点,促进磷酸钙的矿化。

表 1 稳态凝胶矿化体系下多肽矿化能力分析

Table 1 Effects of E8DS peptide on nucleation of hydroxyapatite in steady-state agarose gels

Concentration of polypeptide/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0.03	0.3	3	30	100
Concentration of Ca+P/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.20 \pm 0.09	3.81 \pm 0.54	6.16 \pm 0.62	13.62 \pm 1.11	15.93 \pm 1.21	38.62 \pm 5.50

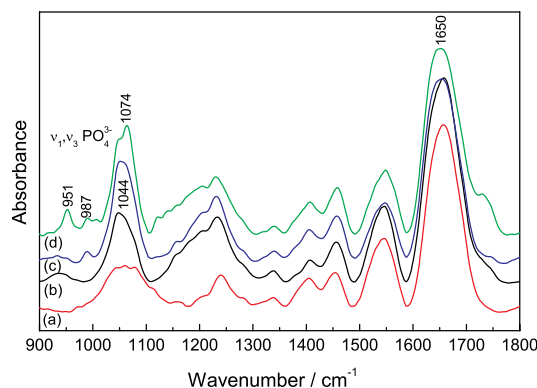


图 4 胶原矿化 1 d、胶原矿化 7 d、胶原/多肽矿化 1 d 以及胶原/多肽矿化 7 d 纤维的红外光谱

Fig.4 Comparative FTIR spectra of mineralized collagenous fibrils. (a) mineralized collagenous fibrils for 1 day; (b) mineralized collagenous fibrils for 1 week; (c) mineralized collagenous fibrils with E8DS peptide for 1 day; (d) mineralized collagenous fibrils with E8DS peptide for 1 week

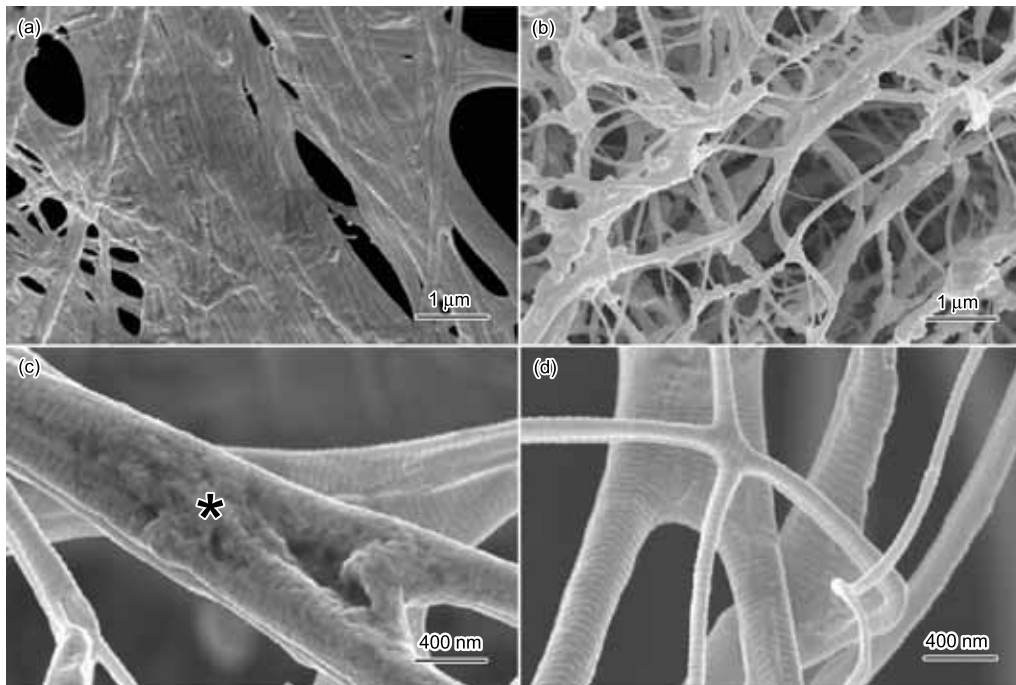


图 5 体外仿生胶原/多肽体系矿化 1 d、胶原体系矿化 1 d、胶原/多肽体系矿化 7 d 以及胶原体系矿化 7 d 纤维的 SEM 形貌

Fig.5 SEM images of mineralized collagenous fibrils. (a) Mineralized collagenous fibrils with E8DS peptide for 1 d; (b) mineralized collagenous fibrils for 1 d; (c) mineralized collagenous fibrils with E8DS peptide for 7 d; (d) mineralized collagenous fibrils for 7 d

对添加多肽和未添加多肽的矿化胶原纤维的红外光谱分析,如图 4 所示。900–1200 cm^{-1} 的峰对应 PO_4^{3-} ν_1, ν_3 峰,其中 951 cm^{-1} 和 987 cm^{-1} 处峰分别对应于 $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ 和羟基磷灰石晶体中的 PO_4^{3-} 或者磷酸钙中对称伸展振动的 PO_3 , 表明矿物为磷酸钙晶体(与 TEM 选区电子衍射结果一致,此结果未展示)。900–1200 cm^{-1} 的 PO_4^{3-} ν_1, ν_3 峰和 1650 cm^{-1} 的酰胺 I 峰的峰面积比 ($\text{PO}_4^{3-}/\text{amide I}$) 对应于矿化体系无机/有机含量比,反映了矿化体系矿化程度的不同。胶原/多肽体系中矿化 1 d 和 7 d 后的 FTIR 谱计算得到 $\text{PO}_4^{3-}/\text{amide I}$ 面积比分别为 0.4478 和 0.6988,而纯胶原矿化体系分别为 0.3509 和 0.4601。由此可见,随着矿化时间的延长矿化程度明显提高,多肽的添加也明显提高了胶原矿化程度。

将多肽 E8DS 加入胶原仿生矿化体系,矿化 1 d 和 7 d 后的矿化胶原纤维 SEM 形貌如图 5 所示。图 5a 和 5b 分别为多肽添加前后胶原纤维矿化 1 d 后的 SEM 形貌。添加多肽后胶原分子组装成直径为 40 nm 左右的胶原纤维,且彼此平行排列,进一步组装成直径较粗的胶原纤维束。而在未添加多肽的胶原矿化体系中,胶原纤维束直径较细,一般由 3–10 根胶原纤维组成,直径为 130–300 nm。由此可见,多肽促进了胶原纤维的分子组装,相邻胶原纤维更倾向于

相互平行,紧密排列,形成了带状的粗纤维或编织成纤维束网。图 5c 和 5d 为该矿化体系反应 7 d 后的胶原纤维的形貌。与矿化 1 d 的结果类似,添加多肽后的胶原纤维更倾向于形成较粗的纤维束或编织网。特别是添加多肽后的胶原纤维,其纤维束表面可见明显的矿化层,如图 5c 中星号所示。

上述结果表明,多肽 E8DS 基本上实现了设计功能,促进胶原蛋白纤维化,实现对磷酸钙晶体矿化的调控。胶原纤维的形成需要胶原分子的活化。其纤维化过程包括两个阶段,迟滞阶段和纤维生长阶段^[19]。前者主要是通过线性聚合形成能够促进纤维化的核。在胶原纤维化的过程中,很多蛋白能够促进纤维的线性聚合,使纤维直径增加。本研究中,在胶原矿化体系中加入多肽后,胶原纤维束明显变粗,有的胶原纤维束交织成网状。这表明,多肽中大量的酸性序列能够作为非共价键交联剂,在胶原纤维之间建立桥梁,最终形成有序结构。多肽的加入对于胶原纤维的矿化具有明显的促进作用。多肽与胶原的结合,提供了大量的形核位点。多肽能够吸附在胶原的间隙区,沿着胶原纤维长轴方向,形成周期性排列的连续的形核位点。这与体内起形核作用的非胶原蛋白功能非常相似,主要是通过其一级结构中大量的羧基和磷酸化丝氨酸中的磷酸根捕获大量的钙离子,进而调控矿物的生长。

3 结 论

对应设计合成的一种非胶原蛋白模拟多肽 E8DS(EEEEEEEEDS_pES_pS_pEEDR), 多肽 E8DS 与钙离子和胶原分子通过静电作用相结合。对应多肽 E8DS, E8DS 具有很强的调控钙磷盐矿化的能力。关于胶原-多肽混合体系的仿生矿化, 多肽的加入有助于胶原纤维的分子组装, 增加了形核位点, 促进了磷酸钙在胶原纤维表面矿化, 胶原纤维矿化程度明显提高。

参 考 文 献

- G.He, A.George, Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, **279**(12), 11649(2004)
- R.Fujisawa, Y.Nodasaka, Y.Kuboki, Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen, *Calcified Tissue International*, **56**(2), 140(1995)
- C.E.Tye, G.K.Hunter, H.A.Goldberg, Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction, *Journal of Biological Chemistry*, **280**(14), 13487(2005)
- J.J.Hao, A.Ramachandran, A.George, Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **57**(3), 227(2009)
- S.Weiner, W.Traub, H.D.Wagner, Lamellar bone: Structure-function relations, *Journal of Structural Biology*, **126**(3), 241(1999)
- W.Zhang, S.S.Liao, F.Z.Cui, Hierarchical self-assembly of nano-fibrils in mineralized collagen, *Chemistry of Materials*, **15**(16), 3221(2003)
- J.H.Kinney, S.Habelitz, S.J.Marshall, G.W.Marshall, The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin, *Journal of Dental Research*, **82**(12), 957(2003)
- S.X.Xiao, C.Yu, X.M.Chou, W.J.Yuan, Y.Wang, L.Bu, G.Fu, M.Q.Qian, J.Yang, Y.Z.Shi, L.D.Hu, B.Han, Z.M.Wang, W.Huang, J.Liu, Z.Chen, G.P.Zhao, X.Y.Kong, Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP, *Nature Genetics*, **27**(2), 201(2001)
- R.Srinivasan, B.Chen, J.P.Gorski, A.George, Recombinant expression and characterization of dentin matrix protein 1, *Connective Tissue Research*, **40**(4), 251(1999)
- A.George, A.Veis, Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition, *Chemical Reviews*, **108**(11), 4670(2008)
- R.M.Wazen, C.E.Tye, H.A.Goldberg, G.K.Hunter, C.E.Smith, A.Nanci, In vivo functional analysis of polyglutamic acid domains in recombinant bone sialoprotein, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **55**(1), 35(2007)
- N.L.Harris, K.R.Ratray, C.E.Tye, T.M.Underhill, M.J.Someran, J.A.D'Errico, A.F.Chambers, H.G.K.unter, H.A.Goldberg, Functional analysis of bone sialoprotein: Identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis, *Bone*, **27**(6), 795(2000)
- D.Iejima, T.Saito, T.Uemura, A collagen-phosphoryn sponge as a scaffold for bone tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **14**(10), 1097(2003)
- F.R.Tay, D.H.Pashley, Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine, *Biomaterials*, **29**(8), 1127(2008)
- E.K.Girija, Y.Yokogawa, F.Nagata, Apatite formation on collagen fibrils in the presence of polyacrylic acid, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **15**(5), 593(2004)
- G.D.Pins, D.L.Christiansen, R.Patel, F.H.Silver, Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties, *Biophysical Journal*, **73**(4), 2164(1997)
- G.K.Hunter, P.V.Hauschka, A.R.Poole, L.C.Rosenberg, H.A.Goldberg, Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins, *Biochemical Journal*, **317**(1), 59(1996)
- G.K.Hunter, H.A.Goldberg, Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(18), 8562(1993)
- K.E.Kadler, D.F.Holmes, J.A.Trotter, J.A.Chapman, Collagen fibril formation, *Biochemical Journal*, **316**(1), 1(1996)