

# CaCl<sub>2</sub>/EDTA 및 비이온성 계면활성제 활용 Inclusion Body 정제법을 이용한 BA-RGD 단백질의 생산

송우호, 변창우, 윤민호, 엄지훈, 최유성\*

## Simple Purification of BA-RGD Protein Based on CaCl<sub>2</sub>/EDTA Treatment and Inclusion Body Washing

Wooho Song, Chang Woo Byun, Minho Yoon, Ji Hoon Eom, and Yoo Seong Choi\*

Received: 1 October 2015 / Revised: 6 November 2015 / Accepted: 7 November 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The limited productivity of natural shell matrix proteins has hampered the investigation of their biochemical properties and practical applications, although biominerals in nature obtained by organic-inorganic assemblies have attractive mechanical and biological properties. Here, we prepared a vector for the expression of a fusion protein of a shell matrix protein from *Pinctada fucata* (named as GRP\_BA) with the GRGDSP residue. The fusion protein of BA-RGD was simply produced in *E. coli* and purified through sequential steps including the treatment with CaCl<sub>2</sub> and EDTA solution for cell membrane washing, mechanical cell disruption and the application of non-ionic surfactant of Triton X-100 for BA-RGD inclusion body washing. The production yield was approximately 60 mg/L, any other protein band was not observed in SDS-PAGE and it was estimated that above 97% endotoxin was removed compared to the endotoxin level of whole cell. This study showed this simple and easy purification approach could be applied to the purification of BA-RGD fusion protein. It is expected that the protein could be utilized for the preparation of biominerals in practical aspects.

**Keywords:** Recombinant shell matrix protein, Protein purification, Lipopolysaccharide, Inclusion body

충남대학교 응용화학공학과  
Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea  
Tel: +82-42-821-5682, Fax: +82-42-822-8995  
e-mail: biochoi@cnu.ac.kr

## 1. INTRODUCTION

바이오키네랄은 인체의 뼈, 치아, 조류의 껍질 및 해양 무척추동물의 껍질 등 여러 생명체에서 고강도 기능성 물질로서 기본적으로 구조적 지지체 및 생체조직을 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 다양한 생물학적 역할에 관여하고 있다. 또한 뛰어난 기계적, 생물학적 물성으로 인해, 생체재료로서 치과용 임플란트, 골대체 물질, 약물전달 소재 등 다양한 산업적 적용 분야에 활용 가능성이 높다 [1-3]. 지금까지 자연계에서 다양한 형태의 바이오키네랄이 보고되었지만 그 형성 메커니즘에 대한 이해는 많이 미흡한 실정이다. 최근 대표적인 바이오키네랄로서 탄산칼슘 기반의 바이오키네랄에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 진주조개와 같은 해양 연체류의 껍질의 형성 메커니즘에 대한 연구는 상대적으로 매우 활발하다. 구체적으로 이러한 껍질은 파열강도 (puncture resistance)가 좋은 외부의 prismatic 층과 파쇄저항성 (fracture resistance)이 뛰어난 내부의 nacreous 층의 두 층으로 되어 있고, 여러 형태의 5% 미만의 단백질과 당 그리고 95% 이상의 탄산칼슘으로 구성되어 있다 [4-7]. 특히 아직까지 그 메커니즘이 정확히 밝혀지지는 않았지만, 상기 구성 성분들 중 칼슘이온과 결합능력을 지닌 껍질에 존재하는 껍질 매트릭스 단백질 (shell matrix proteins)은 바이오키네랄을 구성하는 탄산칼슘 결정의 성장 및 조절에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [8-9]. 지금까지 많은 종류의 껍질 매트릭스 단백질의 아미노산 서열이 천연 단백질의 추출 및 유전체 정보에 기반한 분석을 통하여 밝혀져 단백질 1차 구조에서의 공통적 특징들을 알게 되었다. 구체적으로 아미

노산 서열 간에 구조적 유사성이 별로 없으나, 아스파르트산 (aspartic acid)과 글루탐산 (glutamic acid) 같은 음이온성 아미노산이 많고, 본질적으로 안정한 2~3차 구조를 형성하기 어려운 아미노산 (intrinsically disordered proteins)이 반복적으로 특징적으로 많이 분포하고 있는 것으로 알려졌다 [9-13]. 하지만, 상기 단백질들의 기능적 특성을 분석하기 위하여, 추출하여 얻을 수 있는 단백질은 매우 제한적이고, 추출이 가능한 단백질이라 하더라도 산업적 적용 측면에서 그 양이 매우 미미하여, 상기 바이오미네랄 형성에 관여하는 단백질의 생화학적 특성을 이해하는 데 많은 어려움이 따르고, 이를 극복하기 위한 대안의 마련이 필요한 상황이다.

본 연구에서는 상기 언급한 껍질 매트릭스 단백질을 효율적으로 확보하기 위하여 재조합 단백질 생산 및 정제법을 이용하였다. 많은 껍질 매트릭스 단백질은 아미노산 서열 특성과 이전의 추출에 기반한 단백질 정제법을 볼 때, 단백질 응집체 (inclusion body)로부터 refolding에 의하여 단백질을 정제하여도 단백질이 여전히 높은 활성을 나타낼 가능성이 매우 높다 [4, 14]. 본 연구팀은 이전의 연구에서 진주조개 유래의 칼슘 결합 단백질인 재조합 BA 단백질 (NCBI reference sequence; BAA20465)을 성공적으로 대량생산하였다 [14]. 재조합 BA 단백질은 pET 벡터 시스템에서 응집체 (inclusion body) 형태로 대장균에서 대량 발현되었고, 응집체 단백질은 대장균 세포의 불용성 부분의 대부분을 차지하였다. 그리고 8M urea에 의해 단백질의 3차 구조가 풀리는 조건에서 C-말단에 도입된 6개의 히스티딘에 의해 Ni-NTA 친화도 크로마토그래피에 의해 실험실 수준에서 95% 이상 순도로 리터당 약 30 mg의 정제된 단백질을 얻을 수 있었다. 본 논문에서는 상기 BA 단백질을 모델 단백질로 하였고, 이를 의료용 바이오미네랄 소재 개발에 활용하기 위한 측면에서, C-말단의 6개의 히스티딘을 제거하고 여기에 동물세포 배양에 도움을 줄 수 있는 알기닌 (R)-글리신 (G)-아스파틱산 (D) 펩타이드 서열을 도입하였다. 또한 응집체 형태로 대장균에서 대량 발현된 재조합 BA 단백질을 매우 빠르고 용이하게 정제하기 위하여, 이전에 보고된  $\text{CaCl}_2$ 와 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 이용하여 대장균의 세포막에 붙어있는 lipopolysaccharide (LPS)를 제거하고, 비이온성 계면활성제를 활용한 응집체 세척을 통하여 단백질을 단백질을 정제하는 방법을 [15,16], 재조합 BA 단백질 정제에 적용하였다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 균주 및 발현벡터 구축

대장균 DH5 $\alpha$  (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)가 재조합 벡터 제작에 이용되었고, 대장균 BL21 (DE3)(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)가 재조합 BA-RGD 단백질 발현에 활용되었다. 대장균은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  엠포실린이 포함된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양되었다. pBA-RGD 벡터를 제작하기 위하여, pET-23b 벡터의 *NdeI*과 *XhoI* 사이에 GRP\_BA 단백질 유

전자가 도입된 pBA 벡터를 주형으로 하고, T7 프로모터 프라이머와 RGD 서열과 STOP 코돈이 도입된 프라이머인 5'-GTG GTG GTG CTC GAG TCA CGG TGA ATC ACC ACG ACC GAC CAC GCT GAC-3를 이용하여 BA-RGD 유전자를 PCR를 통해 증폭하고, 이를 *NdeI*과 *XhoI* 사이트를 이용하여 다시 pET-23b 벡터에 도입해 pBA-RGD 벡터를 완성하였다. 구축된 BA-RGD 발현 벡터는 시퀀싱을 통해 모든 서열이 정확히 도입되었는지 검증하였다.

### 2.2. BA-RGD 단백질 대량발현 및 정제

pBA-RGD 벡터를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하였다. BA-RGD 단백질의 대량발현 조건은 이전의 BA 단백질 발현 조건을 활용하였다 [14]. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 엠포실린이 포함된 LB 배지에 상기 벡터가 포함된 대장균 세포를 접종하여, 37°C에서 진탕배양하였다. 재조합 BA-RGD 단백질 발현을 유도하기 위하여 흡광도 ( $\text{OD}_{600}$ )값이 0.8-1.0이 되었을 때, 단백질 발현 유도물질인 Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.2 mM 되도록 첨가하였고, 37°C에서 4시간 동안 추가로 배양하였다. 배양된 세포를 8,000 RCF로 10분 동안 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 우선 대장균 세포막의 LPS를 제거하기 위하여  $\text{CaCl}_2/\text{EDTA}$  세척을 수행하였다. 회수된 세포는 전 세포 g 당 15 mL의 세척용액 1 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 분산하고, 5,000 RCF로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 버린 후 세척용액 2 (5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 다시 분산하고, 마찬가지로 5,000 RCF로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 버린 후 세척용액 3 (10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 분산하는 방식으로 하여 상기 세척용액 1-3의 과정을 두 번 더 반복하였다. 마지막으로 다시 5,000 RCF로 10분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 세포파쇄를 위하여 세척용액 1에 분산하였다. 다음으로, LPS가 제거된 세포를 세포파쇄기 (PandaPLUS, GEA Group, Germany)를 이용하여 900 bar로 두 번 분쇄하고, 8,000 RCF로 10분 동안 원심분리를 하여 응집체를 회수하였다. 회수된 응집체는 다양한 Triton X-100을 포함하고 있는 TTE I 용액 (다양한 농도의 Triton X-100, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 이용하여 세척하고, 다음으로 TTE II 용액 (다양한 농도의 Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 세척한 후, 마지막으로 증류수를 이용하여 응집체를 세척하였다. 그리고 세척된 응집체를 8 M urea 용액으로 용해시켜 상등액을 회수한 후, 12-14 kDa MWCO의 투석용 막 (Spectra/Por®; Spectrum Lab. Inc., USA)에 정제된 단백질 (100 mL)을 담고, 3 L 증류수를 이용한 투석을 4회 진행하여 정제된 단백질 용액을 확보하였다. 투석을 진행하였을 응집체의 재형성이 거의 이루어지지 않았고, 최종적으로 확보된 단백질 용액을 동결건조하여 정제된 단백질 파우더를 얻었다.

### 2.3. 단백질 정량 및 SDS-PAGE 분석

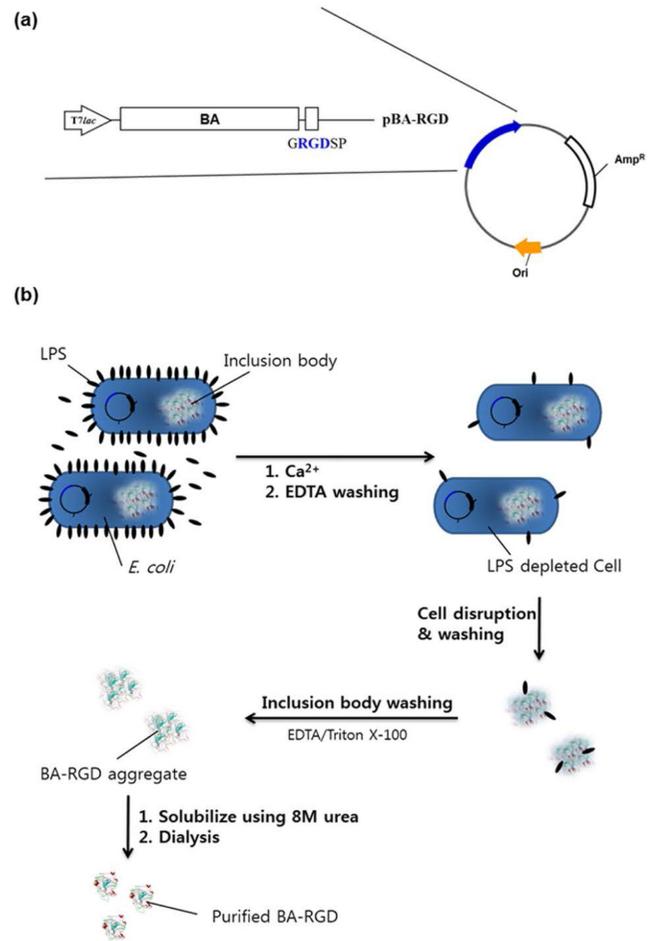
단백질 정량을 위하여 bicinchoninic acid (BCA)를 이용하여

BSA 단백질의 정량선을 구하였고 (Sigma-Aldrich), 이를 통해 정제된 BA-RGD 단백질의 양을 결정하였다. 또한, 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 통하여 BA-RGD 단백질 밴드를 얻었고, 이미지 분석 프로그램 (CLIQS; TotalLab Ltd., Newcastle upon Tyne, UK)를 이용하여 단백질 순도를 분석하였다. 한편, 정제된 BA-RGD 단백질의 박테리아 유래 내독소 (endotoxin) 함유 수준을 LAL 정량법 (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 결정하였다. Kit에 포함되어 있는 LAL 용액의 pro-enzyme는 박테리아 내독소에 의해 활성화되어 그 양을 정량할 수 있도록 되어 있어, 정제된 단백질 샘플을 LAL 용액과 혼합하여 반응 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 정량할 수 있다.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

본 연구에서 취급하는 GRP\_BA 단백질은 진주조개 껍질 부위에 존재하고, 유기기복합화에 의해 진주조개 껍질 형성에 관여할 것으로 판단되어, 생체재료 개발을 위한 바이오미네랄화에 활용될 것으로 기대된다. 이러한 맥락에서 본 연구에서는 본 연구팀이 기존에 대량생산한 재조합 BA 단백질의 C-말단에 정제를 위한 6개의 히스티딘을 제거하고, 세포외기질 (extracellular matrix)을 구성하는 여러 단백질에 공통적으로 포함되어 있고 인테그린 (integrin) 기반의 신호 전달에 주도적으로 관여하여 동물세포의 부착 및 증식에 중요한 역할을 하는 RGD 펩타이드 서열을 도입하여, 재조합 BA-RGD 단백질을 구성하였다 [17,18]. 재조합 BA 단백질의 유전자서열 C-말단에, 통상적으로 기능성 RGD 펩타이드 도입에 많이 활용되는 GRGDSP 펩타이드 서열을 코딩하는 대장균에 최적화된 유전자서열을 연결하여, 강력한 T7 프로모터에 의해 발현이 조절되는 pET 벡터 시스템에 도입하였다 (Fig. 1a).

BA-RGD 단백질의 대량발현은 이전에 보고된 재조합 BA 단백질과 대량발현 조건 (0.2 mM IPTG 발현 유도 후, 37°C에서 4 h 간 추가 배양)과 동일하게 수행하였다 [14]. 그리고 BA-RGD 단백질 응집체를 포함한 대장균 전세포에서 BA-RGD 단백질을 정제하는 과정은 크게 두 단계로 구분하여 진행하였다. 첫 번째로, 대장균 세포를 파쇄하기 전에, 생체재료로 활용할 때 내독소로 작용할 가능성이 높은 세포막에 붙어있는 LPS를 제거하는 과정을 수행하였다. LPS는 대장균과 같은 그람음성균 (gram-negative bacteria)의 세포막에 존재하는 대표적인 불순물로 LPS의 효율적인 제거는 생체재료로서의 생물안정성을 확보하는 데 매우 중요하다 [19,20]. 세포막 구성성분을 효율적으로 제거하는 한 방법으로 CaCl<sub>2</sub>와 같은 다가 이온과 EDTA와 같은 킬레이트제를 처리하는 방법이 제안되어 왔다 [15,21-22]. 이 방법은 매우 단순하고 빠르게 세포막의 구성성분을 효율적으로 제거할 수 있어 본 연구에 적용하였고, CaCl<sub>2</sub>/EDTA 처리를 통해 우선 세포막의 LPS를 중심으로 한 불순물을 제거하고 세척한 후, 전세포를



**Fig. 1.** Schematic diagram of the vector system to overexpress BA-RGD protein (a) and simple purification process for obtaining purified BA-RGD by CaCl<sub>2</sub>/EDTA treatment and inclusion body washing (b).

파쇄하여 응집체를 확보하였다. 두 번째로, 계면활성제를 이용하여 응집체에 일부 붙어있는 LPS와 잔류 세포막 파쇄물을 제거하는 과정을 통해 단백질 정제를 수행하였다. 특히 Triton X-100과 같은 비이온성 계면활성제는 단백질의 구조에 상대적으로 매우 미미한 영향을 주면서 응집체 단백질 세척에 효율적으로 사용할 수 있어 [15,16,23], Triton X-100에 의한 응집체 세척과정을 BA-RGD 단백질 정제에 적용하였다. 하지만, 계면활성제를 활용할 경우 응집체부터 잔류 불순물을 용이하게 제거할 수 있을 것으로 판단되지만, 계면활성제의 특성상 한편으로 응집체로부터 오히려 계면활성제를 제거하는 데 다소 어려워 불순물 제거의 효율이 오히려 떨어질 가능성이 있어, Triton X-100 0-1%의 다양한 농도의 세척용액을 준비하여 두 번째 단계의 응집체 세척을 수행하였다. 전체적인 상기의 두 단계 BA-RGD 단백질 정제 과정을 Fig. 1b에 도식으로 나타내었다.

Table 1은 상기 두 단계의 정제과정을 통해 결정된 정제된 BA-RGD 단백질의 정제 수율과 내독소의 양을 요약하였다.

**Table 1.** Purification yield and endotoxin level of purified BA-RGD obtained by CaCl<sub>2</sub>/EDTA treatment and inclusion body washing

	Triton X-100 concentration (%) in the inclusion body washing buffers				
	0	0.25	5	0.75	1
Relative purification yield (%)	0.1044	0.1953	0.1932	0.1823	0.1822
Endotoxin level (EU/mg-total protein)	39,218	10,015	2,914	11,262	67,374

구체적으로 BA-RGD 단백질의 수율은 Triton X-100이 존재할 때, 대장균 전세포 양 대비 0.18-0.2%의 효율로 단백질을 확보할 수 있었고, 이는 대장균 세포 배양 부피 기준으로 환산하면 약 60 mg/L의 정제 수율이다. 그리고 정제된 단백질의 잔류하는 내독소 양을 결정하였을 때, Triton X-100 처리에 의해 내독소 수준이 점차 감소하여 0.5%의 Triton X-100 조건에서 가장 낮은 수준의 내독소가 검출되었다. 이 때 내독소의 제거 수준은 문헌상에서 전 세포의 내독소 수준이 100,000 Eu/mg-total protein 이상임을 감안할 때 [15] 97% 이상의 내독소가 제거된 것으로 판단되었다. 하지만 그 이상 농도의 Triton X-100이 포함된 용액으로 정제를 수행하였을 때, 오히려 내독소 수준이 점차 올라가는 것을 확인하였으며, 이는 Triton X-100 용액 처리 이후에 세척 단계에서 Triton X-100이 충분히 세척되지 않아 발생된 것으로 추정되었다. 최종적으로 확보된 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였을 때, Fig. 2a에서와 같이 약 37 kDa 부근에서 단일의 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 이론적인 분자량 값이 33.4 kDa 값보다 높은 위치에서 BA-RGD 밴드가 나오는 것은 이전의 재조합 BA 단백질의 경우에서와 마찬가지로 동일하였다 [14]. BA-RGD 단백질의 계산에 의한 pI 값은 재조합 BA 단백질과 마찬가지로 3.85로 산성이고, 산성이 강한 단백질의 SDS-PAGE에서 통상적으로 나타나는 현상이며 [4,24,25], 이는 음이온성 아미노산 잔기들과 SDS 사이의 반발력에 의해, 단백질 마커로 활용되는 통상의 동일 분자량의 단백질과 비교하여 이

동성이 낮아지는 것에 기인한다 [25]. 그리고 최종적으로 정제된 단백질을 동결건조하여 최종적으로 BA-RGD 단백질 파우더를 확보하였다 (Fig. 2b).

#### 4. CONCLUSION

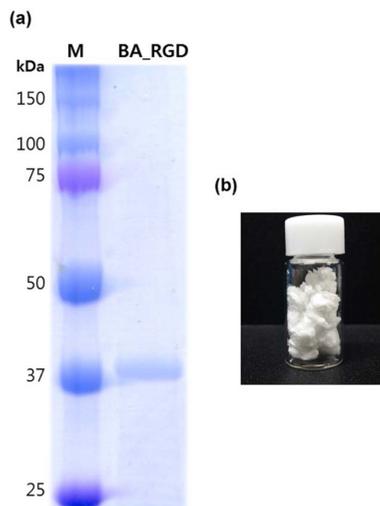
본 연구에서는 대장균에서 응집체로 과량 발현되는 BA-RGD 단백질을 별도의 크로마토그래피 과정 없이 두 단계의 정제 과정을 통해 쉽고 빠르게 확보하였다. 우선, 대장균 세포막에 붙어 있어 내독소로 작용하는 LPS를 제거하기 위하여 CaCl<sub>2</sub>/EDTA 처리를 하였고, 이후 전세포를 세포 파쇄하여 BA-RGD 응집체를 확보하였으며, 다음으로 Triton X-100이 포함된 용액으로 응집체를 세척하고, 8M urea로 용해한 후 증류수로 투석처리하여 최종적으로 정제된 BA-RGD 단백질을 쉽고 빠르게 확보하였다. 최근 유무기복합체 형태의 바이오미네랄을 생체재료의 소재로 활용하고자 많은 노력들이 이루어지고 있고, 특히 경조직에 활용하기 위한 무기질 기반의 생체재료에 생체기능성 및 생체적합성을 도입하기 위한 유무기복합화 연구가 활발히 진행되고 있는 상황에서, 본 연구결과는 바이오미네랄화에 관여하는 껍질 매트릭스 단백질을 대량확보하여, 향후 생명체의 유무기복합화 바이오미네랄화 연구와 바이오미네랄 기반의 생체재료 개발에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgements

이 연구는 2014년도 충남대학교 CNU 학술연구비 연구과제의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

#### REFERENCES

- Dhami, N. K., M. S. Reddy and A. Mukherjee (2013) Biom mineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Front. Microbiol.* 4: 31.
- Feng, Q. (2011) Principles of calcium-based biomineralization. pp. 113-140. In: W. E. G. Muller (ed.). *Molecular Biomineralization: Aquatic Organisms Forming Extraordinary Materials*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wang, X. H., H. C. Schroder and W. E. Muller (2014) Enzyme-based biosilica and biocalcite: biomaterials for the future in regenerative medicine. *Trends Biotechnol.* 32: 441-447.



**Fig. 2.** (a) SDS-PAGE analysis of purified BA-RGD. Lanes: M, protein marker; BA\_RGD, purified BA-RGD. (b) Lyophilized powder of the purified BA-RGD.

4. Bahn, S. Y., B. H. Jo, B. H. Hwang, Y. S. Choi and H. J. Cha (2015) Role of Pif97 in nacre biomineralization: *In vitro* characterization of recombinant Pif97 as a framework protein for the association of organic-inorganic layers in nacre. *Cryst. Growth Des.* 15: 3666-3673.
5. Belcher, A. M., X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky and D. E. Morse (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381: 56-58.
6. Falini, G., S. Albeck, S. Weiner and L. Addadi (1996) Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271: 67-69.
7. Ponce, C. B. and J. S. Evans (2011) Polymorph crystal selection by n16, an intrinsically disordered nacre framework protein. *Cryst. Growth Des.* 11: 4690-4696.
8. Furuhashi, T., C. Schwarzingger, I. Miksik, M. Smrz and A. Beran (2009) Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comp. Biochem. Phys. B* 154: 351-371.
9. Marin, F., G. Luquet, B. Marie and D. Medakovic (2008) Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80: 209-276.
10. Joubert, C., D. Piquemal, B. Marie, L. Manchon, F. Pierrat, I. Zanella-Cleon, N. Cochenne-Laureau, Y. Gueguen, and C. Montagnani (2010) Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: Focus on biomineralization. *BMC Genomics* 11: 613.
11. Miyamoto, H., H. Endo, N. Hashimoto, K. Iimura, Y. Isowa, S. Kinoshita, T. Kotaki, T. Masaoka, T. Miki, S. Nakayama, C. Nogawa, A. Notazawa, F. Ohmori, I. Sarashina, M. Suzuki, R. Takagi, J. Takahashi, T. Takeuchi, N. Yokoo, N. Satoh, H. Toyohara, T. Miyashita, H. Wada, T. Samata, K. Endo, H. Nagasawa, S. Asakawa and S. Watabe (2013) The diversity of shell matrix proteins: Genome-wide investigation of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Zool. Sci.* 30: 801-816.
12. Picker, A., M. Kellermeier, J. Seto, D. Gebauer and H. Colfen (2012) The multiple effects of amino acids on the early stages of calcium carbonate crystallization. *Z. Kristallogr.* 227: 744-757.
13. Magdalena, W., P. Dobryszycycki and A. Ozyhar (2012) Intrinsically disordered proteins in biomineralization. pp 3-32. In: J. Seto (ed.), *Advanced Topics in Biomineralization*. InTech.
14. Song, A., S. Y. Bahn, H. J. Cha and Y. S. Choi (2014) Recombinant Calcium Binding Proteins and Nanofibrous Web Containing the Same. *Korea Patent* 10-2014-0053450.
15. Choi, B-H., H. Cheong, Y. K. Jo, S. Y. Bahn, J. H. Seo and H. J. Cha (2014) Highly purified mussel adhesive protein to secure bio-safety for in vivo applications. *Microb. Cell Fact.* 13: 52.
16. Kumar, A., S. Tiwari, D. Thavaselvam, K. Sathyaseelan, A. Prakash, A. Barua, S. Arora and M. K. Rao (2012) Optimization and efficient purification of recombinant Omp28 protein of *Bruceella melitensis* using Triton X-100 and beta-mercaptoethanol, *Protein Expres. Purif.* 83: 226-232.
17. Frisch, S. M. and H. Francis (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124: 619-626.
18. Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
19. Wang, X. and P. J. Quinn (2010) Endotoxins: Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Subcell Biochem.* 53: 3-25.
20. Magalhaes, P. O., A. M. Lopes, P. G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T. C. V. Penna and A. Pessoa (2007) Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10: 388-404.
21. Hedhammar, M., H. Bramfeldt, T. Baris, M. Widhe, G. Askarieh, K. Nordling, S. von Aulock and J. Johansson (2010) Sterilized recombinant spider silk fibers of low pyrogenicity, *Biomacromolecules* 11: 953-959.
22. Leive, L. (1974) The barrier function of the gram-negative envelope. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235: 109-129.
23. Lezin, G., M. R. Kuehn and L. Brunelli (2011) Hofmeister series salts enhance purification of plasmid DNA by non-ionic detergents. *Biotech. Bioeng.* 108: 1872-1882.
24. Lim, S., Y. S. Choi, D. G. Kang, Y. H. Song and H. J. Cha (2010) The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins. *Biomaterials.* 31: 3715-3722.
25. Shirai, A., A. Matsuyama, Y. Yashiroda, A. Hashimoto, Y. Kawamura, R. Arai, Y. Komatsu, S. Horinouchi and M. Yoshida (2008) Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J. Biol. Chem.* 283: 10745-10752.