



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110845603 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911051106.3

A61Q 19/08(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

A61L 27/24(2006.01)

A61L 31/04(2006.01)

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 朱赟

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 柴云峰 张莹

(51)Int.Cl.

C07K 14/78(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

A61K 38/39(2006.01)

A61P 17/18(2006.01)

A61K 8/65(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图5页

(54)发明名称

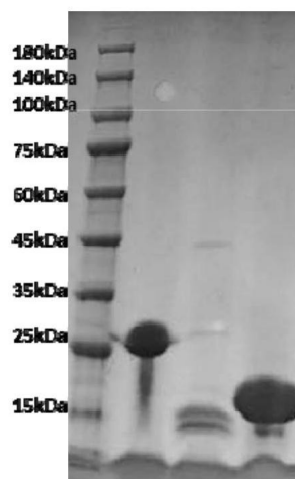
人胶原蛋白17型多肽、其生产方法和用途

(57)摘要

本发明提供了一种多肽,所述多肽包含SEQ ID No. 9的63至1496个连续的氨基酸残基,其中所述多肽包含(A)_m所示的序列或者由(A)_m所示的序列组成,其中每个A为选自SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列或SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个取代、添加、或缺失了1或多个,例如2、3、4或5个氨基酸残基的氨基酸序列或者与SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列具有83%-97%序列同一性的序列;m为1-10之间的整数;其中每个A相同或不同并且相邻两个A之间直接通过肽键连接或者通过1个以上的氨基酸残基连接;其中所述多肽具有细胞粘附活性,以及所述多肽的生产方法和用途。

COL17A3

M 纯蛋白标签



1. 多肽,所述多肽包含SEQ ID No.9中的63至1496个连续的氨基酸残基,其中所述多肽具有细胞粘附活性。

2. 多肽,其中所述多肽包含(A)_m所示的序列或者由(A)_m所示的序列组成,其中每个A为选自SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列或SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个取代、添加、或缺失了1或多个,例如2、3、4或5个氨基酸残基的氨基酸序列或者与SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列具有83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%或97%序列同一性的序列;m为1-10之间的整数;其中每个A相同或不同并且相邻两个A之间直接通过肽键连接或者通过1个以上的氨基酸残基连接;其中所述多肽具有细胞粘附活性。

3. 权利要求1或2所述的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4或SEQ ID No.6所示的氨基酸序列或由其组成。

4. 多核苷酸,其编码根据权利要求1-3中任一项所述的多肽,优选地,所述多核苷酸包含SEQ ID No.5、SEQ ID No.7、或SEQ ID No.8所示的核苷酸序列或由SEQ ID No.5、SEQ ID No.7、或SEQ ID No.8所示的核苷酸序列组成。

5. 表达载体,其包含根据权利要求4所述的多核苷酸。

6. 宿主细胞,其包含根据权利要求5所述的表达载体或者表达权利要求1-3中任一项所述的多肽,其中所述宿主细胞优选是大肠杆菌细胞。

7. 制备根据权利要求1-3中任一项所述的多肽的方法,其包括:

- (1) 在生产培养基中培养根据权利要求6所述的宿主细胞;
- (2) 从宿主细胞分离出权利要求1-3中任一项所述的多肽。

8. 组合物,其包含根据权利要求1-3中任一项所述的多肽或权利要求7的方法制备的多肽。

9. 制品,其包含根据权利要求1-3中任一项所述的多肽或权利要求7的方法制备的多肽或者权利要求8所述的组合物,其中所述制成品为药物组合物、医疗器材、组织工程产品、化妆品或保健品,优选地所述药物组合物是外用制剂,优选外用涂抹制剂,例如外用凝胶剂或外用浸润制剂;其中优选地所述外用凝胶剂还包含药学上可接受的载体,所述外用浸润制剂还包含无菌医用棉球。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽或权利要求7的方法制备的多肽、权利要求4的多核苷酸、权利要求5的表达载体、权利要求6的宿主细胞、或权利要求8的组合物在制备制成品,优选医疗器材、组织工程产品、化妆品、保健品中的用途。

人胶原蛋白17型多肽、其生产方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,涉及多肽、其生产方法和用途。

背景技术

[0002] 胶原蛋白

[0003] 胶原蛋白一般为白色、透明、无分支的原纤维,是皮肤和骨骼的基础支撑物,可以占到蛋白质总量的25%~35%,主要分布于人体的皮肤、血管、骨骼、筋腱、牙齿和软骨等处,是这些组织的主要基质和支架,保护并连结各种组织,在体内发挥着重要的生理功能。因此,胶原蛋白可以广泛的应用在医药和化妆品等行业中。

[0004] 当前市场上销售的胶原蛋白产品都是取自猪、牛、鱼等动物组织中。虽然某些动物与人的胶原蛋白相似度较高,其仍然难以避免病毒感染以及致敏性的危险。目前少部分动物来源的胶原蛋白已经运用于化妆品中,但很难被广泛用于医疗器材或较精密的组织工程产品中,根本无法发挥胶原蛋白的原本生物学功能。而且,常规方法制备的胶原蛋白一般具有较强的凝血功能,导致其应用于某些组织工程产品中的时候,带来很大的血栓形成的风险,极大地限制了其广泛深入的应用。

[0005] 生产胶原蛋白的传统方法是利用酸、碱、酶解法处理动物来源的组织,提取胶原蛋白衍生物。这些方法提取的胶原蛋白本身已经丧失了原本的生物学活性,无法应用于生物医学领域发挥真正的功能。国内外一些研究机构通过常规重组表达的方法体外表达人源胶原蛋白,但是通常生产的成本过高,生产周期过长,无法投入大规模生产。因此市场上急需一种具有优良生物材料性质,氨基酸序列与人体高度同源,且能在工业化体系中大量制备的胶原蛋白材料。

[0006] 17型人胶原蛋白

[0007] 从结构上来说,人体天然的胶原蛋白的结构非常的复杂,所以才导致人源胶原蛋白极难通过常规手段表达和大量制备。胶原蛋白最普遍的结构特征是由3条肽链形成的三螺旋结构,即由3条A肽链以右手超螺旋方式形成蛋白质,这样的三股螺旋区域被称为胶原区域。每个A肽链在分子结构上都是由重复出现的Gly-X-Y(X、Y代表Gly之外的任何氨基酸残基,X往往是Pro,Y往往是Hyp)肽段构成左手螺旋,3条链在氨基酸残基的相互作用下,以同一轴为中心,以右手超螺旋方式形成稳定的三股螺旋结构。因此,一般胶原蛋白的序列很难自发结合成为稳定的三螺旋结构发挥生物学功能,这样的困难严重阻碍了人胶原蛋白的研发和生产。

[0008] 人体中含有28种不同型别的胶原蛋白,分为常见的纤维类胶原蛋白和不常见的非纤维类胶原蛋白。人体皮肤中I型,II型,III型等都属于纤维类胶原蛋白。在非纤维类胶原蛋白中,有一个非常重要的胶原蛋白亚型就是17型胶原蛋白collagen XVII(人体中由COL17A1基因编码)。17型胶原蛋白是由三个COL17A1链结合形成的同源三聚体,单链分子量180kDa。其中包含有70kDa的球状胞内结构域,一个跨膜域和120kDa的胞外胶原结构域,具有非常强的热稳定性。近期研究证实,17型胶原蛋白在人体中是表皮干细胞半桥粒的重要

组成成分,对于细胞衰老和皮肤分化都具有重要的作用。然而,目前人类对于非纤维类胶原蛋白的结构功能认识非常有限,尤其是对于17型胶原蛋白知之甚少。

[0009] 发明人对于胶原蛋白的结构和功能已经深入研究多年,特别是国际首次解析了人胶原蛋白多个区段的全新的原子结构,并投递到国际蛋白质结构数据库中公开展示,积累了丰富的研究经验。通过反复摸索,发明人已经成功实现了17型胶原蛋白胞外若干功能区的重组表达,发现其具有优良的生物材料特性,其制备方法简单,易于扩大生产,可以广泛的应用在医药和化妆品等行业中。

发明内容

[0010] 本发明部分基于以下发现:

[0011] 本发明的多肽C17A3、C17B3和C17C1与现有人胶原蛋白相比具有相当或更高的细胞粘附效果,并且多肽C17A3、C17B3和C17C1在宿主细胞中表达后以水溶形式存在,且制备方法简单,易于扩大生产。

[0012] 针对背景技术所示的现有技术缺陷,本发明提供了:

[0013] 项目1.多肽,所述多肽包含SEQ ID No.9中的63至1496个连续的氨基酸残基,其中所述多肽具有细胞粘附活性。

[0014] 项目2.多肽,其中所述多肽包含(A)_m所示的序列或者由(A)_m所示的序列组成,其中每个A为选自SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列或SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个取代、添加、或缺失了1或多个,例如2、3、4或5个氨基酸残基的氨基酸序列或者与SEQ ID No.1、SEQ ID No.2和SEQ ID No.3任一个所示的氨基酸序列具有83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%或97%序列同一性的序列;m为1-10之间的整数;其中每个A相同或不同并且相邻两个A之间直接通过肽键连接或者通过1个以上的氨基酸残基连接;其中所述多肽具有细胞粘附活性。本文所述的区间包括端点,例如1-10之间包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,即,m可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0015] 项目3.项目1或2所述的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4或SEQ ID No.6所示的氨基酸序列或由其组成。

[0016] 项目4.多核苷酸,其编码根据项目1-3中任一项所述的多肽,优选地,所述多核苷酸包含SEQ ID No.5、SEQ ID No.7、或SEQ ID No.8所示的核苷酸序列或由SEQ ID No.5、SEQ ID No.7、或SEQ ID No.8所示的核苷酸序列组成。

[0017] 项目5.表达载体,其包含根据项目4所述的多核苷酸。

[0018] 项目6.宿主细胞,其包含根据项目5所述的表达载体或者表达项目1-3中任一项所述的多肽,其中所述宿主细胞优选是大肠杆菌细胞。

[0019] 项目7.制备根据项目1-3中任一项所述的多肽的方法,其包括:

[0020] (1) 在生产培养基中培养根据项目6所述的宿主细胞;

[0021] (2) 从宿主细胞分离出项目1-3中任一项所述的多肽。

[0022] 项目8.组合物,其包含根据项目1-3中任一项所述的多肽或项目7的方法制备的多肽。

[0023] 项目9.制品,其包含根据项目1-3中任一项所述的多肽或项目7的方法制备的多肽

或者项目8所述的组合物,其中所述制成品为药物组合物、医疗器材、组织工程产品、化妆品或保健品,优选地所述药物组合物是外用制剂,优选外用涂抹制剂,例如外用凝胶剂或外用浸润制剂;其中优选地所述外用凝胶剂还包含药学上可接受的载体,所述外用浸润制剂还包含无菌医用棉球。

[0024] 项目10.根据项目1-3中任一项所述的多肽或项目7的方法制备的多肽、项目4的多核苷酸、项目5的表达载体、项目6的宿主细胞、或项目8的组合物在制备制成品,优选医疗器材、组织工程产品、化妆品、保健品中的用途。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有以下特点:

[0026] (1) 本发明首次选择的17型人胶原蛋白序列为长期筛选优化的序列;

[0027] (2) 采用大肠杆菌表达系统,适于大规模放大,20小时即可完成一轮发酵,生产成本非常低,由于对基因序列进行了大肠杆菌的密码子优化以及选用2×YT培养基,使得产量非常大。

[0028] (3) 生产的重组人源胶原蛋白具有非常好的亲水性和稳定性,其氨基酸组成与天然胶原蛋白氨基酸序列相应部分100%相同,应用于人体不会产生免疫排斥和过敏反应,可以广泛应用于生物医药和化妆品行业;

[0029] (4) 本发明产品经过活性检测,具有达到甚至超过人体天然蛋白的生物学活性,可以在人体中行使天然蛋白的功能,达到真正的产品应用的目的。

[0030] (5) 本发明的技术设计可以有效减少胶原蛋白在人体使用时的凝血风险,同时保留胶原蛋白高细胞粘附活性,具有广泛的组织工程应用前景。

附图说明

[0031] 图1为本发明载体pET32a-C17A3、pET32a-C17B3、PET32a-C17C1构建的质粒图谱;

[0032] 图2为本发明Trx-C17A3蛋白表达纯化后得到的蛋白电泳图;Trx-C17A3蛋白的电泳检测分子量约为42kDa。

[0033] 图3为本发明Trx-C17B3蛋白表达纯化后得到的蛋白电泳图;Trx-C17B3蛋白的电泳检测分子量约为40kDa。

[0034] 图4为本发明Trx-C17C1蛋白表达纯化后得到的蛋白电泳图;Trx-C17C1蛋白的电泳检测分子量约为32kDa。

[0035] 图5为本发明Trx-C17A3蛋白表达后经过酶切切除Trx标签和离子交换纯化得到的目的蛋白C17A3蛋白的电泳图;C17A3蛋白的电泳检测分子量约为25kDa,对应于具有SEQ ID NO.4的氨基酸序列的蛋白质。

[0036] 图6为本发明Trx-C17B3蛋白表达后经过酶切切除Trx标签和离子交换纯化得到的目的蛋白C17B3蛋白的电泳图;C17B3蛋白的电泳检测分子量约为23kDa,对应于具有SEQ ID NO.6的氨基酸序列的蛋白质。

[0037] 图7为本发明Trx-C17C1蛋白表达后经过酶切切除Trx标签和离子交换纯化得到的目的蛋白C17C1蛋白的电泳图;C17C1蛋白的电泳检测分子量约为16kDa,对应于具有SEQ ID NO.3的氨基酸序列的蛋白质。

[0038] 图8为本发明C17A3蛋白与C17A1蛋白(SEQ ID No.1)、人胶原蛋白相比较的生物活性检测结果。

[0039] 图9为本发明C17B3蛋白与C17B1蛋白 (SEQ ID No.2)、人胶原蛋白相比较的生物活性检测结果。

[0040] 图10为本发明C17C1蛋白与人胶原蛋白相比较的生物活性检测结果。

具体实施方式

[0041] 下文提供进一步的描述以便于理解本发明。

[0042] 如本文中使用的“医疗器械”是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、体外诊断试剂及校准物、材料以及其他类似或者相关的物品。

[0043] 如本文中使用的“组织工程产品”是指用于组织工程的产品。组织工程是一门以细胞生物学和材料科学相结合,进行体外或体内构建组织或器官的新兴学科。

[0044] 如本文中使用的“分离”指从培养的宿主细胞中分离出目标多肽,例如,对宿主细胞进行破胞,并纯化出目标多肽。在纯化出的目标多肽带有纯化标签,如Trx或His标签的情况下,“分离”还包括酶切切除Trx或His标签。

[0045] “药学上可接受的载体”是本领域技术人员公知的,并且本领域技术人员可以选择适用于本发明组合物或制品中药学上可接受的载体。例如,药学上可接受的载体包括但不限于:缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(低于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清清蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖、和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反荷离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。

[0046] 在本发明中,选择人17型胶原蛋白COL17A1序列进行筛选优化。所述人胶原17型的序列是NCBI参照序列:Q9UMD9.3 (SEQ ID No.9),参见<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q9UMD9.3>。

MDVTKKNKRDGTEVTERIVTETVTTRLTSLPPKGGTSNGYAKTASLGGGSRLKQSLT
 HGSSGYINSTGSTRGHASTSSYRRAHSPASTLPNSPGSTFERKTHVTRHAYEGSSSGNSS
 PEYPRKEFASSTRGRSQTRESEIRVRLQSPSTRWTELDVVKRLLKGRSASVSPTRN
 SSNTLPIPKKGTVETKIVTASSQSVSGTYDATILDANLPSHVWSSTLPAGSSMGTYHNN
 MTTQSSSLNTNAYSAGSVFGVPNMASCPTLHPGLSTSSSVFGMQNNLAPSLTTLT
 HGTTTTSTAYGVKKNMPQSPAANTGVSTSAACTTSVQSDDLHKDCKFLILEKDNT
 AKKEMELLIMTKDSGKVFTASPASIAATSFSEDTLKKKQAAYNADSGLKAANGDL
 KTVSTKGKTTTADIHSYGSSGGGGGGGGVGGAGGGPWGPAPAWCPCGCCSWW
 KWLLGLLLWLLLLGLLFLIALAEEVRKLLKARVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRL
 QGMAPAAGADLDKIGLHSDSQEELWMFVRKLLMMEQENGNLR**GSPGPKGDMGSP**
GPKGDRGFPGTPGIPGLGHPGPGQPKGQKGSVGDPMGEGPMGQRGREGPMGP
RGEAGPPGSGEKGERGAAGEPGPHGPPGVPVGSVGPKGSSGSPGPPGPPV**GLQLR**
GEVGLPGVKGDKGPMGPPGPKGDQGEKGPRLTGEPMRGLPGAVGE**PGA**K**G**
 [0047] **AMGPA**GPDGHQGP**RGEQ**LTGM**PGIR**GPPG**SGDP**GP**GLTGP**Q**PPGL**TP**GRPI**
 KG**EPAG**PKIVTSEGSSMLTV**PGPP**PPG**AMGPP**PPG**APG**PAG**PLPH**QEVNLQ
 GPPGPPG**PRGPP**PSIPGPPG**PRGPP**GE**LP**PPGPPG**SFL**SNSET**FLSG**PPGPPG**PPGPK**
 DQ**PPGPR**HQ**GEQ**LP**GF**STSGSS**FGL**NLQ**PPGPP**GP**QPK**GD**GP**V**PGAL**GIP
 SG**PSE**GS**SS**TM**YV**SG**PP**PPG**PPG**PPG**SI**SSSG**QEI**Q**Y**ISE**YMQ**SD**SIR**YL**SG**V**Q**PP
 GPPGPPG**PVT**TTIT**GET**FD**YSEL**ASH**VV**SY**LRT**SG**YGV**SL**FSS**IS**SED**IL**AVL**Q**RD**D**VR**Q
 Y**L**R**Q**Y**L**M**G**PR**GPP**PPG**AS**GD**SLL**SL**DY**A**EL**SR**IL**SY**MSS**GIS**IG**LP**PP**PP**GL**PG
 T**SYE**LL**SLL**R**G**SE**FR**G**IV**PPG**PP**PPG**IP**GN**V**SS**IS**VE**DL**SS**YL**HT**AG**LS**FIP**PPG**PP**
 GPPG**PR**PPG**V**SG**AL**AT**YAA**EN**SD**S**FR**SE**LIS**YL**TSP**D**V**RS**FIV**PPG**PP**GP**Q**PPG**DS**R
 LL**ST**D**ASH**R**GSS**SS**SH**SS**VRR**G**SS**Y**SS**M**ST**GG**G**AG**SL**G**AG**GA**FGE**A**AG**DR**GP**Y**G**
 TD**IG**PPG**GY**AAA**EG**MY**AG**NG**LL****GAD**F**AG**DL**DY**NE**LAV**R**V**SE**S**M**OR**Q**GL**L**Q**
MAYTV**Q**PPG**Q**PPG**Q**PPG**IS**K**V**FS**AYS**SN**V**T**AD**LM**DF**F**Q**TY**GAI**Q**PP**Q**K**G**EM**
GTPGP**K**DR**GP**AG**PP**HP**PP**PR**GH**K**GE**K**G**D**K**D**Q**V**Y**AG**R**RR**R**RS**IA**V**K**P(S**E**Q
 ID No. 9)

[0048] 上述序列中粗体下划线部分即为本发明选择的氨基酸序列。申请人经过大量的研究发现,选择的上述序列水溶性强,重组表达产量高,纯化工艺简单,且比商品化的人胶原蛋白或SEQ ID No.9中的其他序列实现更好的细胞粘附效果,具有多种优良的生物材料特性。在本发明中,多肽不是SEQ ID No.9的全长序列。

[0049] 本发明部分基于以下发现:包含SEQ ID No.9中的至少63个连续的氨基酸残基的多肽能够比商品化的人胶原蛋白具有更好的生物材料特性,如实施例证明。本领域技术人员可以适当选择构成重组胶原蛋白的连续的氨基酸残基。例如,连续的氨基酸残基的长度可以是48-100、50-72、54-57、48-72等等。

[0050] 在本发明中,对几个具体的氨基酸区域的序列进行了测试:

[0051] (1) C17A:GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPGQPKGQKGSVGDPMGEGPMGQRGRE
 GPMGPRGEA (SEQ ID No.1);

[0052] (2) C17B:GLQLRGEVGLPGVKGDKGPMGPPGPKGDQGEKGPRLTGEPMRGLPGA**V**GE**PGA**K**G**AM
 GPA (SEQ ID No.2);

[0053] (3) C17C:GADFAGLDYNE**LAV**R**V**SE**S**M**OR**Q**GL**L**Q**M**AY**TV**Q**PPG**Q**PPG**Q**PPG**I**S**K**V**F**S**AYS**SN**V**T
 AD**LM**DF**F**Q**TY**G**AI**Q**PP**Q**K**G**EM**G**T**P**G**P**K**DR**GP**AG**PP**HP**PP**PR**GH**K**GE**K**G**D**K**D**Q** (SEQ ID No.3);

[0054] 多肽在本文中可以是重组人源胶原蛋白C17A3,为C17A的三次重复序列,包括氨基酸207个,基本重复单元为:

[0055] GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPGQPKGQKGSVGDPMGEGPMGQRGREGPMGPRGEA
 (SEQ ID No.1),为人胶原蛋白17型肽段。

[0056] C17A3的氨基酸序列如下:

[0057] GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMEGPMGQRGREGPMGPRGE AGSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMEGPMGQRGREGPMGPRGEAGSPGPK GDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMEGPMGQRGREGPMGPRGEA (SEQ ID No.4)。

[0058] C17A3的DNA序列如下：

[0059] GGTAGCCCAGGTCCAAAAGGTGATATGGGAAGCCCAGGTCCGAAAAGGTGATCGTGGTTTTCCGGGTAC ACCAGGTATTCCGGGTCCACTGGGTTCATCCAGGTCCGCAAGGTCCGAAAAGGCCAGAAAAGGTAGCGTGGGTGATCCG GGTATGGAAGGGCCTATGGGGCAGCGTGGGCGTGAAGGGCCGATGGGTCCGCGTGGTGAAGCAGGTAGCCCCGGGGC CTAAAGGGGATATGGGGAGTCCGGGTCCGAAAAGGGGATCGTGGATTTCCGGGTACGCCGGGTATCCCCGGGTCCGCT GGGTTCATCCGGGTCCGCAAGGGCCTAAAGGTTCAGAAAAGGTAGTGTGGGTGATCCTGGTATGGAAGGTCCGATGGGT CAGCGTGGTTCGTGAGGGTCCGATGGGACCGCGTGGTGAAGGCTGGTAGCCCTGGTCCGAAAAGGAGATATGGGTAGCC CGGGTCCGAAAAGGTGACCGTGGTTTTCTGGTACACCGGTATTCCAGGGCCTCTGGGTTCATCCTGGTCTCAGGG TCCGAAAAGGTTCAGAAAAGGGAGTGTGGGAGATCCGGGTATGGAGGGTCCGATGGGGCAGCGCGGTTCGTGAAGTCCG ATGGGCCCGCGTGGTGAAGCC (SEQ ID No.5)。

[0060] 多肽在本文中可以是人源胶原蛋白C17B3,为C17B的三次重复序列,包括189个氨基酸,基本重复单元为：

[0061] GLQGLRGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPA (SEQ ID No.2),为人胶原蛋白17型肽段。

[0062] C17B3的氨基酸序列如下：

[0063] GLQGLRGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAAGLQGL RGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAAGLQGLRGEVGLPGVKGDG KPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPA (SEQ ID No.6)。

[0064] C17B3的DNA序列如下：

[0065] GGTCTGCAGGGTCTGCGTGGTGAAGTAGGACTGCCGGGTGTGAAAGGAGATAAAGGACCAATGGGTCC ACCAGGACCAAAAAGGAGATCAAGGAGAAAAAGGACCACGTGGTCTGACAGGTGAACCGGGTATGCGTGGGCTGCCG GGAGCAGTTGGAGAACCAGGAGCAAAAGGAGCAATGGGTCCAGCAGGACTGCAGGGTCTGCGCGGTGAAGTGGGAC TGCCTGGTGTAAAGGGGATAAAGGGCCGATGGGTCCGCCGGGTCCGAAAAGGAGATCAGGGAGAAAAAGGGCCGCG TGGTCTGACCGGTGAACCGGGAATGCGTGGTCTGCCGGGGTGTGGGTGAGCCAGGTGCAAAAGGTGCAATGGGT CCTGCAGGTCTGCAAGGACTGCGTGGAGAAGTGGGTCTGCCTGGTGTGAAAGGTGATAAAGGTCCGATGGGTCTCCT CGGGTCCGAAAAGGTGATCAGGGTGA AAAAGGTCCGCGTGGTCTGACGGGTGAACCGGGCATGCGTGGTCTGCCTGG GGCAGTTGGTGAACCGGGGGCAAAAAGGTGCTATGGGGCCGGCA (SEQ ID No.7)。

[0066] 多肽在本文中可以是人源胶原蛋白C17C1,为C17C的1次重复,包括氨基酸119个,基本重复单元为：

[0067] GADFAGDLDYNELAVRVSESMQRQGLLQGMAYTVQPPGQPGPQPPGISKVFSAYSNTADLMDFEQ TYGAIQPPGQKQKEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDGDQ (SEQ ID No.3),为人胶原蛋白 17型肽段。

[0068] C17C1的氨基酸序列如下：

[0069] GADFAGDLDYNELAVRVSESMQRQGLLQGMAYTVQPPGQPGPQPPGISKVFSAYSNTADLMDFEQ TYGAIQPPGQKQKEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDGDQ (SEQ ID No.3)

[0070] C17C1的DNA序列如下：

[0071] GGTGCAGATTTTGCAGGTGATCTGGATTATAATGAACTGGCAGTTCGTGTTAGCGAAAGCATGCAGCGTCAGGGACTGCTGCAGGGAATGGCATATACCGTTCAGGGTCCGCCGGGTCAGCCGGGTCCTCAAGGTCCTCCTGGTATTAGCAAAGTTTTTTAGTGCATATTCAAACGTGACGGCAGATCTGATGGATTTTTTTCAGACGTATGGTGCAATTCAGGGTCTCCTGGGCAAAAAGGTGAAATGGGTACACCTGGTCCGAAAAGGCGATCGTGGTCCGGCCGGTCCGCCGGGCCACCCTGGTCTCCTGGCCCTCGTGGTCATAAAGGTGAGAAAAGGTGATAAAGGTGATCAA (SEQ ID No.8)。

[0072] 在本文中,多肽可以包括以SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种所示的氨基酸序列中取代、添加、缺失或插入了1个或多个,优选2、3、4或5个氨基酸残基的氨基酸序列或与SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种所示的氨基酸序列具有83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%或97%序列同一性的氨基酸序列。相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分数”定义为在将候选序列与参考多肽序列进行比对并在必要时引入空位以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的一部分之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。用于确定氨基酸序列同一性百分数的比对可以用本领域技术人员熟知的各种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0073] 氨基酸添加指在氨基酸序列,例如SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种的C端或N端添加氨基酸,只要所述多肽具有胶原蛋白特征和细胞粘附活性。

[0074] 氨基酸取代指在氨基酸序列,例如SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种的序列的某个位置的某个氨基酸残基被其他氨基酸残基替代,只要所述多肽具有胶原蛋白特征和细胞粘附活性。

[0075] 氨基酸插入指在氨基酸序列例如SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种的序列的适当位置插入氨基酸残基,插入的氨基酸残基也可以全部或部分彼此相邻,或插入的氨基酸之间都不彼此相邻,只要所述多肽具有胶原蛋白特征和细胞粘附活性。

[0076] 氨基酸缺失指可以从氨基酸序列,例如SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种的序列中删除1、2或3个以上氨基酸,只要所述多肽具有胶原蛋白特征和细胞粘附活性。

[0077] 在本发明中,取代可以是保守氨基酸取代,指与SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.6和SEQ ID NO:9中任一种的氨基酸序列相比,有3个,更佳地2个氨基酸或1个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成肽。这些保守性变异肽可以根据表1进行氨基酸替换而产生。

[0078] 表1:氨基酸保守取代

[0079]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln

Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0080] 本文的多肽序列中的所有氨基酸可为L型氨基酸,其中的一个或多个(如2-5个、2-4个或2-3个)氨基酸也可以用构象为D型的氨基酸、人工修饰的氨基酸、自然界存在的稀有氨基酸等进行替换,以提高多肽的生物利用度、稳定性和/或抗病毒活性。其中D型氨基酸是指与组成蛋白质的L型氨基酸相对应的氨基酸;人工修饰的氨基酸指经过甲基化、磷酸化等修饰的组成蛋白质的常见L型氨基酸;自然界存在的稀有氨基酸包括组成蛋白质的不常见氨基酸和不组成蛋白质的氨基酸,例如5-羟基赖氨酸、甲基组氨酸、 γ 氨基丁酸、高丝氨酸等。

[0081] 在本发明中,重组人源胶原蛋白可以通过本领域中常规的方法进行。例如,可以如下步骤生产:(1)大肠杆菌基因工程菌的构建;(2)大肠杆菌基因工程菌的发酵培养;(3)重组人源胶原蛋白的诱导和表达;以及(4)重组人源胶原蛋白的纯化和任选的酶切。

[0082] 在步骤(1)中,大肠杆菌基因工程菌的构建可以如下进行:(1)利用PCR方法对人源性17型胶原蛋白的基因螺旋区的DNA片段进行密码子优化和拼接重组,最终得到目的基因片段;(2)将得到的目的基因片段插入PET-32a表达载体中得到重组表达质粒;(3)将重组表达质粒转入大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3)中,筛选得到阳性大肠杆菌基因工程菌。

[0083] 在步骤(2)与(3)中,大肠杆菌基因工程菌的发酵培养和重组人源胶原蛋白的诱导和表达可以如下进行:(1)从LAB平板中挑取优选后的大肠杆菌基因工程菌单菌落,置于10ml的LB培养基中37 $^{\circ}$ C,220rpm培养12-16小时;(2)将菌液按照1:100接种到2 \times YT培养基中放大培养,37 $^{\circ}$ C培养约3小时,待OD₆₀₀在0.4-0.6时,加入终浓度为0.5mM IPTG进行诱导,16 $^{\circ}$ C继续培养20小时,离心收集菌体。

[0084] 在步骤(4)中,重组人源胶原蛋白多肽的纯化和酶切可以如下进行:(1)用磷酸盐缓冲液(40mM NaH₂PO₃,500mM NaCl,pH 7.8)重悬细菌,超声破碎,离心收集上清液;(2)利用NI-NTA亲和柱结合重组人源胶原蛋白,10mM咪唑漂洗杂蛋白后,加入Tev蛋白酶(Tobacco

Etch Virus enzyme) 4℃, 16h柱上酶切, 最后获得目的胶原蛋白多肽。

[0085] 宿主细胞可以是真核细胞, 例如真菌和酵母, 原核细胞, 例如肠杆菌科细菌, 如大肠杆菌。应当理解, 本领域技术人员可以通过用其它表达菌株替换上述大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

[0086] 实施例

[0087] 提供以下实施例来阐述本发明。本领域技术人员应当理解实施例仅仅是例示性的而非限制性的。本发明仅仅由所附权利要求书的范围限定。

[0088] 实施例1: 重组人源胶原蛋白多肽的构建、表达与纯化

[0089] C17A3基因表达载体的构建及表达

[0090] 1. 实施例1中使用的人源胶原蛋白C17A3全长基因序列以SEQ ID No. 5显示。该序列已经针对大肠杆菌的密码子进行了密码子优化。

[0091] 2. C17A3基因全长621bp, 根据优化后的C17A3密码子基因序列SEQ ID No. 5, 委托北京盛元科萌基因生物科技有限公司进行基因片段的合成, 并将合成后的C17A3基因片段连接上Tev蛋白酶切位点之后通过Kpn I和Xho I的酶切位点插入PET32a表达载体(由中科院生物物理所提供)。将该构建成功的表达质粒转化大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) (Merck公司)。具体过程为: 1: 取1μl的该质粒于100μl的大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) 中, 冰上静置30min。2: 将该混合物于42℃水浴锅中热激90s, 然后迅速置于冰上静置2min。3: 向该混合物中加入600μl无抗性的LB, 37℃, 220rpm条件下培养1h。4: 取200μl该菌液均匀的涂布在含有氨苄青霉素抗性的LB平板上(10g/L蛋白胨, 5g/L酵母提取物, 10g/L氯化钠, 15g/L琼脂, 100μg/ml氨苄抗生素)。5: 将平板倒置培养于37℃温箱中, 培养约20h待长出清晰可见的菌落。

[0092] 3. 从转化好的LB平板中挑取单克隆菌落于10ml LB(含100μg/ml氨苄抗生素)培养基中培养12h-16h后, 再按照1:100的比例转接到2×YT培养基(16g/L蛋白胨, 10g/L酵母提取物, 5g/L氯化钠)中进行扩大培养, 37℃, 220rpm培养至菌液OD₆₀₀在0.4-0.6时, 加入终浓度为0.5mM IPTG (Sigma公司, 货号: I5502-1G) 进行诱导表达, 诱导条件为18℃、180rpm培养20h。最后离心收集菌体, 保存于-20℃或者立即进入下步纯化。

[0093] 4. 用磷酸盐缓冲液(pH 7.8) (40mM磷酸二氢钠, 500mM氯化钠) 约50ml重悬(1L) 菌体沉淀, 利用高压破菌仪器(新芝生物) 进行破菌后, 13000rpm离心30min, 使可溶性蛋白与包涵体充分分离。

[0094] 5. 用5倍柱体积的结合缓冲液(Binding buffer) (40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 平衡Ni-NTA (Qiagen公司, 货号: 30210) 亲和柱。然后加入蛋白上清于4℃条件下孵育0.5-1h, 使目的重组蛋白充分结合到柱材上。再用200ml含有10mM咪唑 (Sigma公司) 的洗涤缓冲液(washing buffer) (10mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 漂洗杂蛋白。如果需要带Trx标签的目的蛋白, 可以直接用洗脱缓冲液(elution buffer) (250mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 洗脱目的蛋白Trx-C17A3。如果需要切除Trx标签的目的蛋白, 可以加入适量具有His标签的TEV蛋白酶, 于4℃孵育16h后, 收集流穿液, 即为去除载体蛋白Trx的目的胶原蛋白C17A3。

[0095] 6. 用阴离子交换柱可以进行目的蛋白快速纯化。将目的蛋白透析到缓冲液A (20mM Tris, 15mM NaCl, pH 8.0) 中, 流穿阴离子交换柱Hitrap Q (GE Healthcare), 并用缓冲液B

(20mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0) 梯度洗脱, 收集不同洗脱组分检测蛋白。所得目的蛋白产物透析过夜, 冻干为干粉待用。

[0096] 7. 所得C17A3蛋白利用SDS-PAGE检测分子量和纯度。具体过程为: 取纯化后的蛋白液40 μ l, 加入10 μ l 5 \times 的蛋白上样缓冲液(250mM的Tris-HCl (pH:6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5% β -巯基乙醇), 置于100 $^{\circ}$ C沸水中煮10min, 然后每孔10 μ l加入SDS-PAGE蛋白胶中, 电压80V跑2h后, 用考马斯亮蓝染色液(0.1% 考马斯亮蓝R-250, 25% 异丙醇, 10% 冰醋酸) 进行蛋白染色20min, 再利用蛋白脱色液(10% 醋酸, 5% 乙醇) 进行脱色。最后与人天然胶原蛋白相对照测量蛋白活性。

[0097] C17B3基因表达载体的构建及表达

[0098] 1. 实施例2中使用的人源胶原蛋白C17B3全长基因序列以SEQ ID No.7显示。该序列已经针对大肠杆菌的密码子进行了密码子优化。

[0099] 2. C17B3基因全长567bp, 根据优化后的C17B3密码子基因序列SEQ ID No.7, 委托北京盛元科萌基因生物科技有限公司进行基因片段的合成, 并将合成后的C17B3基因片段连接上Tev蛋白酶切位点之后通过Kpn I和Xho I的酶切位点插入PET32a表达载体(由中科院生物物理所提供)。将该构建成功的表达质粒转化大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) (Merck公司)。具体过程为: 1: 取1 μ l的该质粒于100 μ l的大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) 中, 冰上静置30min。2: 将该混合物于42 $^{\circ}$ C水浴锅中热激90s, 然后迅速置于冰上静置2min。3: 向该混合物中加入600 μ l无抗性的LB, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm条件下培养1h。4: 取200 μ l该菌液均匀的涂布在含有氨苄青霉素抗性的LB平板上(10g/L蛋白胨, 5g/L酵母提取物, 10g/L氯化钠, 15g/L琼脂, 100 μ g/ml氨苄抗生素)。5: 将平板倒置培养于37 $^{\circ}$ C温箱中, 培养约20h待长出清晰可见的菌落。

[0100] 3. 从转化好的LB平板中挑取单克隆菌落于10ml LB(含100 μ g/ml氨苄抗生素)培养基中培养12h-16h后, 再按照1:100的比例转接到2 \times YT培养基(16g/L蛋白胨, 10g/L酵母提取物, 5g/L氯化钠)中进行扩大培养, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm培养至菌液OD₆₀₀在0.4-0.6时, 加入终浓度为0.5mM IPTG(Sigma公司, 货号: I5502-1G)进行诱导表达, 诱导条件为18 $^{\circ}$ C、180rpm培养20h。最后离心收集菌体, 保存于-20 $^{\circ}$ C或者立即进入下步纯化。

[0101] 4. 用磷酸盐缓冲液(pH 7.8)(40mM磷酸二氢钠, 500mM氯化钠)约50ml重悬(1L)菌体沉淀, 利用高压破菌仪器(新芝生物)进行破菌后, 13000rpm离心30min, 使可溶性蛋白与包涵体充分分离。

[0102] 5. 用5倍柱体积的结合缓冲液(Binding buffer)(40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8)平衡Ni-NTA(Qiagen公司, 货号: 30210)亲和柱。然后加入蛋白上清于4 $^{\circ}$ C条件下孵育0.5-1h, 使目的重组蛋白充分结合到柱材上。再用200ml含有10mM咪唑(Sigma公司)的洗涤缓冲液(washing buffer)(10mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8)漂洗杂蛋白。如果需要带Trx标签的目的蛋白, 可以直接用洗脱缓冲液(elution buffer)(250mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8)洗脱目的蛋白Trx-C17B3。如果需要切除Trx标签的目的蛋白, 可以加入适量具有His标签的TEV蛋白酶, 于4 $^{\circ}$ C孵育16h后, 收集流穿液, 即为去除载体蛋白Trx的目的胶原蛋白C17B3。

[0103] 6. 用阴离子交换柱可以进行目的蛋白快速纯化。将目的蛋白透析到缓冲液A(20mM Tris, 15mM NaCl, pH 8.0)中, 流穿阴离子交换柱Hitrap Q(GE Healthcare), 并用缓冲液B

(20mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0) 梯度洗脱, 收集不同洗脱组分检测蛋白。所得目的蛋白产物透析过夜, 冻干为干粉待用。

[0104] 7. 所得C17B3蛋白利用SDS-PAGE检测分子量和纯度。具体过程为: 取纯化后的蛋白液40 μ l, 加入10 μ l 5 \times 的蛋白上样缓冲液(250mM的Tris-HCl (pH:6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5% β -巯基乙醇), 置于100 $^{\circ}$ C沸水中煮10min, 然后每孔10 μ l加入SDS-PAGE蛋白胶中, 电压80V跑2h后, 用考马斯亮蓝染色液(0.1% 考马斯亮蓝R-250, 25% 异丙醇, 10% 冰醋酸) 进行蛋白染色20min, 再利用蛋白脱色液(10% 醋酸, 5% 乙醇) 进行脱色。最后与人天然胶原蛋白相对照测量蛋白活性。

[0105] C17C1基因表达载体的构建及表达

[0106] 1. 实施例2中使用的人源胶原蛋白C17C1全长基因序列以SEQ ID No.8显示。该序列已经针对大肠杆菌的密码子进行了密码子优化。

[0107] 2. C17C1基因全长357bp, 根据优化后的C17C1密码子基因序列SEQ ID No.8, 委托北京盛元科萌基因生物科技有限公司进行基因片段的合成, 并将合成后的C17C1基因片段连接上Tev蛋白酶切位点之后通过Kpn I和Xho I的酶切位点插入PET32a表达载体(由中科院生物物理所提供)。将该构建成功的表达质粒转化大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) (Merck公司)。具体过程为: 1: 取1 μ l的该质粒于100 μ l的大肠杆菌感受态细胞BL21 (DE3) 中, 冰上静置30min。2: 将该混合物于42 $^{\circ}$ C水浴锅中热激90s, 然后迅速置于冰上静置2min。3: 向该混合物中加入600 μ l无抗性的LB, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm条件下培养1h。4: 取200 μ l该菌液均匀的涂布在含有氨苄青霉素抗性的LB平板上(10g/L蛋白胨, 5g/L酵母提取物, 10g/L氯化钠, 15g/L琼脂, 100 μ g/ml氨苄抗生素)。5: 将平板倒置培养于37 $^{\circ}$ C温箱中, 培养约20h待长出清晰可见的菌落。

[0108] 3. 从转化好的LB平板中挑取单克隆菌落于10ml LB(含100 μ g/ml氨苄抗生素)培养基中培养12h-16h后, 再按照1:100的比例转接到2 \times YT培养基(16g/L蛋白胨, 10g/L酵母提取物, 5g/L氯化钠)中进行扩大培养, 37 $^{\circ}$ C, 220rpm培养至菌液OD600在0.4-0.6时, 加入终浓度为0.5mM IPTG (Sigma公司, 货号: I5502-1G) 进行诱导表达, 诱导条件为18 $^{\circ}$ C、180rpm培养20h。最后离心收集菌体, 保存于-20 $^{\circ}$ C或者立即进入下步纯化。

[0109] 4. 用磷酸盐缓冲液(pH 7.8) (40mM磷酸二氢钠, 500mM氯化钠) 约50ml重悬(1L) 菌体沉淀, 利用高压破菌仪器(新芝生物) 进行破菌后, 13000rpm离心30min, 使可溶性蛋白与包涵体充分分离。

[0110] 5. 用5倍柱体积的结合缓冲液(Binding buffer) (40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 平衡Ni-NTA (Qiagen公司, 货号: 30210) 亲和柱。然后加入蛋白上清于4 $^{\circ}$ C条件下孵育0.5-1h, 使目的重组蛋白充分结合到柱材上。再用200ml含有10mM咪唑 (Sigma公司) 的洗涤缓冲液(washing buffer) (10mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 漂洗杂蛋白。如果需要带Trx标签的目的蛋白, 可以直接用洗脱缓冲液(elution buffer) (250mM咪唑, 40mM NaH₂PO₃, 500mM NaCl, pH 7.8) 洗脱目的蛋白Trx-C17C1。如果需要切除Trx标签的目的蛋白, 可以加入适量具有His标签的TEV蛋白酶, 于4 $^{\circ}$ C孵育16h后, 收集流穿液, 即为去除载体蛋白Trx的目的胶原蛋白C17C1。

[0111] 6. 用阴离子交换柱可以进行目的蛋白快速纯化。将目的蛋白透析到缓冲液A (20mM Tris, 15mM NaCl, pH 8.0) 中, 流穿阴离子交换柱Hitrap Q (GE Healthcare), 并用缓冲液B

(20mM Tris, 1M NaCl, pH 8.0) 梯度洗脱, 收集不同洗脱组分检测蛋白。所得目的蛋白产物透析过夜, 冻干为干粉待用。

[0112] 7. 所得C17C1蛋白利用SDS-PAGE检测分子量和纯度。具体过程为: 取纯化后的蛋白液40 μ l, 加入10 μ l 5 \times 的蛋白上样缓冲液(250mM的Tris-HCl (pH:6.8), 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5% β -巯基乙醇), 置于100 $^{\circ}$ C沸水中煮10min, 然后每孔10 μ l加入SDS-PAGE蛋白胶中, 电压80V跑2h后, 用考马斯亮蓝染色液(0.1% 考马斯亮蓝R-250, 25% 异丙醇, 10% 冰醋酸) 进行蛋白染色20min, 再利用蛋白脱色液(10% 醋酸, 5% 乙醇) 进行脱色。最后与人天然胶原蛋白相对照测量蛋白活性。

[0113] 结果

[0114] 图2-图4的电泳图分别表明得到表观分子量42kDa、40kDa和32kDa的Trx-C17A3, Trx-C17B3和Trx-C17C1融合蛋白。

[0115] 图5-图7的电泳图分别表明得到表观分子量25kDa, 23kDa, 16kDa的C17A3、C17B3和C17C1融合蛋白。

[0116] 实施例2C17A3、C17B3、C17C1蛋白的细胞粘附活性检测

[0117] 胶原蛋白的活性检测方法可以参考文献Juming Yao, Satoshi Yanagisawa, Tetsuo Asakura, Design, Expression and Characterization of Collagen-Like Proteins Based on the Cell Adhesive and Crosslinking Sequences Derived from Native Collagens, J Biochem. 136, 643-649 (2004)。具体实施方法如下:

[0118] 1、利用紫外吸收法检测待测蛋白样品的浓度, 包括对照人胶原蛋白(Sigma, C7774)、C17A3、C17A1 (SEQ ID No. 1, 与C17A3相同方法制备)、C17B3、C17B1 (SEQ ID No. 2, 与C17B3相同方法制备)、C17C1蛋白样品。具体为分别测定样品在215nm和225nm下的紫外光吸收, 利用经验公式 $C(\mu\text{g}/\text{mL}) = 144X(A_{215} - A_{225})$ 计算蛋白质浓度, 注意需在 $A_{215} < 1.5$ 的情况下检测。该方法的原理是测定肽键在远紫外光下的特征吸收, 不受生色团含量的影响, 干扰物质少, 操作简便, 适合检测考马斯亮蓝不显色的人胶原蛋白及其类似物。(参考文献为Walker JM. The Protein Protocols Handbook, second edition. Humana Press. 43-45)。检测完蛋白浓度后, 用PBS将所有待测蛋白浓度调整到0.5mg/ml。

[0119] 2、向96孔板中加入100 μ l各种蛋白溶液和空白PBS溶液对照, 室温静置60min。

[0120] 3、每孔中加入 10^5 个培养状态良好的3T3细胞(来自清华大学童佩老师), 37 $^{\circ}$ C孵育60min。

[0121] 4、每孔用PBS清洗4次。

[0122] 5、用LDH检测试剂盒(Roche, 04744926001) 检测OD_{492nm}的吸光度。OD_{492nm}的吸光度可以反应胶原蛋白或其片段的细胞粘附活性。蛋白的细胞粘附活性越高, 越能在短时间给细胞提供优质的外环境, 帮助细胞贴壁。

[0123] 结果参见图8至图10, 图8至图10基于三次平行实验的OD_{492nm}平均值和标准误差作图。

[0124] 图8至图10的结果表明, 三种人重组胶原蛋白(即C17A3、C17B3、C17C1) 与商品化的人胶原蛋白相比, 皆具有很好的细胞粘附活性。

[0125] 序列

[0126] SEQ ID NO. 1 (C17A)

[0127] GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPGQPKGQKGSVGDPMGEGPMGQRGREGPMGPRGEA

[0128] SEQ ID NO.2 (C17B)

[0129] GLQGLRGEVGLPGVKGDKGPMPPGPKGDQGEKGPRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPA

[0130] SEQ ID NO.3 (C17C1)

[0131] GADFAGDLDYNELAVRVSESMQRQGLLQGMAYTVQGPPGQPGPQGGPPGISKVFSAYSNTADLMDFFQT
YGAIQGGPPGQKQKEMGTPGPKGDRGPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDQ

[0132] SEQ ID NO.4 (C17A3)

[0133] GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMGPMQQRGREGPMGPRGEA
GSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMGPMQQRGREGPMGPRGEAGSPGPKGD
MSPGPKGDRGFPGTPGIPGPLGHPGPQGPKGQKGSVGDPMGPMQQRGREGPMGPRGEA

[0134] SEQ ID NO.5 (C17A3-DNA)

[0135] GGTAGCCAGGTCCAAAAGGTGATATGGGAAGCCAGGTCCGAAAGGTGATCGTGGTTTTCCGGGTACA
CCAGGTATTCCGGGTCCACTGGGTCATCCAGGTCCGCAAGGTCCGAAAGGCCAGAAAGGTAGCGTGGGTGATCCGGG
TATGGAAGGGCCTATGGGGCAGCGTGGGCGTGAAGGGCCGATGGGTCCGCGTGGTGAAGCAGGTAGCCCGGGCCTA
AAGGGATATGGGGAGTCCGGGTCCGAAAGGGGATCGTGGATTCCGGGTACGCCGGGTATCCCGGGTCCGCTGGGT
CATCCGGGTCCGCAAGGGCCTAAAGGTCAGAAAGGTAGTGTGGGTGATCCTGGTATGGAAGGTCCGATGGGTGAGCG
TGGTCTGAGGGTCCGATGGGACCGCGTGGTGAAGGCTGGTAGCCCTGGTCCGAAAGGAGATATGGGTAGCCCGGGTC
CGAAAGGTGACCGTGGTTTTCTGTTACACCGGGTATTCAGGGCCTCTGGGTATCCTGGTCTCAGGGTCCGAAA
GGTCAGAAAGGGAGTGTGGGAGATCCGGGTATGGAGGGTCCGATGGGGCAGCGGGTCTGTAAGGTCCGATGGGCC
CGTGGTGAAGCC

[0136] SEQ ID NO.6 (C17B3)

[0137] GLQGLRGEVGLPGVKGDKGPMPPGPKGDQGEKGPRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAGLQGLR
GEVGLPGVKGDKGPMPPGPKGDQGEKGPRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPAGLQGLRGEVGLPGVKGDKGP
MGPPGPKGDQGEKGPRGLTGEPGMRGLPGAVGEPGAKGAMGPA

[0138] SEQ ID NO.7 (C17B3-DNA)

[0139] GGTCTGCAGGGTCTGCGTGGTGAAGTAGGACTGCCGGGTGTGAAAGGAGATAAAGGACCAATGGGTCCA
CCAGGACCAAAAAGGAGATCAAGGAGAAAAAGGACCACGTGGTCTGACAGGTGAACCGGGTATGCGTGGGCTGCCGGG
AGCAGTTGGAGAACCGGGAGCAAAAAGGAGCAATGGGTCCAGCAGGACTGCAGGGTCTGCGCGGTGAAGTGGGACTGC
CTGGTGTAAAGGGGATAAAGGGCCGATGGGTCCGCCGGTCCGAAAGGAGATCAGGGAGAAAAAGGGCCGCGTGGT
CTGACCGGTGAACCGGAATGCGTGGTCTGCCGGGGCTGTGGGTGAGCCAGGTGCAAAAGGTGCAATGGGTCTCTGC
AGGTCTGCAAGGACTGCGTGGAGAAGTGGGTCTGCCTGGTGTGAAAGGTGATAAAGGTCCGATGGGTCTCCGGGTC
CGAAAGGTGATCAGGGTGA AAAAGGTCCGCGTGGTCTGACGGGTGAACCGGGCATGCGTGGTCTGCCTGGGGCAGTT
GGTGAACCGGGGCAAAAAGGTGCTATGGGGCCGGCA

[0140] SEQ ID NO.8 (C17C1-DNA)

[0141] GGTGCAGATTTTGCAGGTGATCTGGATTATAATGAACTGGCAGTTCGTGTTAGCGAAAGCATGCAGCGT
CAGGGACTGCTGCAGGGAATGGCATATAACGTTCCAGGGTCCGCCGGTCCAGCCGGTCTCAAGGTCTCTCTGGTAT
TAGCAAAGTTTTTGTAGTCATATTCAAACGTGACGGCAGATCTGATGGATTTTTTTCAGACGTATGGTGCAATTCAGG
GTCCTCTGGGCAAAAAGGTGAAATGGGTACACCTGGTCCGAAAGGCGATCGTGGTCCGGCCGGTCCGCCGGGCCAC
CCTGGTCTCTGGCCCTCGTGGTCATAAAGGTGAGAAAGGTGATAAAGGTGATCAA

[0142] SEQ ID NO.9 (COL17A1)

[0143] MDVTKKNKRDGTEVTERIVTETVTTRLTSLPPKGGTSNGYAKTASLGGGRLEKQSLTHGSSGYINSTG
 STRGHASTSSYRRAHSPASTLPNSPGSTFERKTHVTRHAYEGSSSGNSSPEYPRKEFASSTRGRSQTRESEIRVRL
 QSASPSTRWTELDDVKRLLKGSRSASVSPTRNSSNTLPIPKKGTVETKIVTASSQSVSGTYDATILDANLPSHVWSS
 TLPAGSSMGTYHNNMTTQSSSLLNTNAYSAGSVFGVPPNMASCPTLHPGLSTSSSVFGMQNNLAPSLTTLSHGTTT
 TSTAYGVKKNMPQSPAAVNTGVSTSAACTTSVQSDDLLHKDCKFLILEKDNTPAKKEMELLIMTKDSGKVFTASPAS
 IAATSFSEDTLKKEKQAAYNADSGLKAEANGDLKTVSTKGTITTADIHSYGSSGGGGSGGGGGVGGAGGGPWGPAPA
 WCPCGSCCSWKKWLLGLLLWLLLLGLLFGLIALAEVRKLRVDELERIRRSILPYGDSMDRIEKDRLQGMAPAA
 GADLDKIGLHSDSQEELWMFVRKKLMMEQENGLRGSPGPKGDMGSPGPKGDRGFPPTGIPGPLGHPGPGPKGQK
 GSVGDPGMEGPMGQRGREGPMGRGEAGPPGSGEKGERGAAGEPGPHGPPGVPGSVGPKGSSGSPGQPPGPPVGLQ
 GLRGEVGLPGVKGDGKPMGPPGPKGDQGEKGRGLTGEPMRGLPGA VGEPGA KAMGPAGPDGHQGRGEQGLTGM
 PGIRGPPGPGSDPGPKPLTGPQGPQGLPGTPGRPGIKGEPGAPGKIVTSEGSSMLTVPGPPGPPGAMGPPGPPGAPG
 PAGPAGLPGHQEVLNLQPPGPPGPRGPPGPSIPGPPGPRGPPGGLPGPPGPPGSFLSNSETFLSGPPGPPGPPGP
 KGDQPPGPRGHQGEQGLPGFSTSGSSSFGNLNLQPPGPPGPPGPKGDKGDPGVGALGIPSGPSEGGSSSTMYVSG
 PPGPPGPPGPPGISSSSQEIQQYISEYMQSDSIRSYLSGVQPPGPPGPPGPVTTITGETFDYSELASHVVSYLRT
 SGYGVSLFSSSISSEDI LAVLQRDDVRQYLRQYLMGPRGPPGPPGASGDGSLSLDYAELSSRILSYMSSSGISIGL
 PGPPGPPGLPGTSYEELLSLLRGSEFRGIVGPPGPPGPPGIPGNVWSSISVEDLSSYLHTAGLSFIPGPPGPPGPPG
 PRGPPGVSGALATYAAENSDSFRSELISYLTSPDVRSFIVGPPGPPGPPGQPPGDSRLLSTDASHRGSSSSSSHSSSV
 RRGSSYSSSMSTGGGAGSLGAGGAFGEAAGDRGPYGTDIGPGGGYAAAEGGMYAGNGLLGADFAGLDYNELAV
 RVSESMQRQGLLQGMAYTVQPPGQPGPQPPGISKVFSAYSNVTADLMDFFQTYGAIQPPGQKQKEMGTPGPKGDR
 GPAGPPGHPGPPGPRGHKGEKGDQVYAGRRRRRSIAVKP

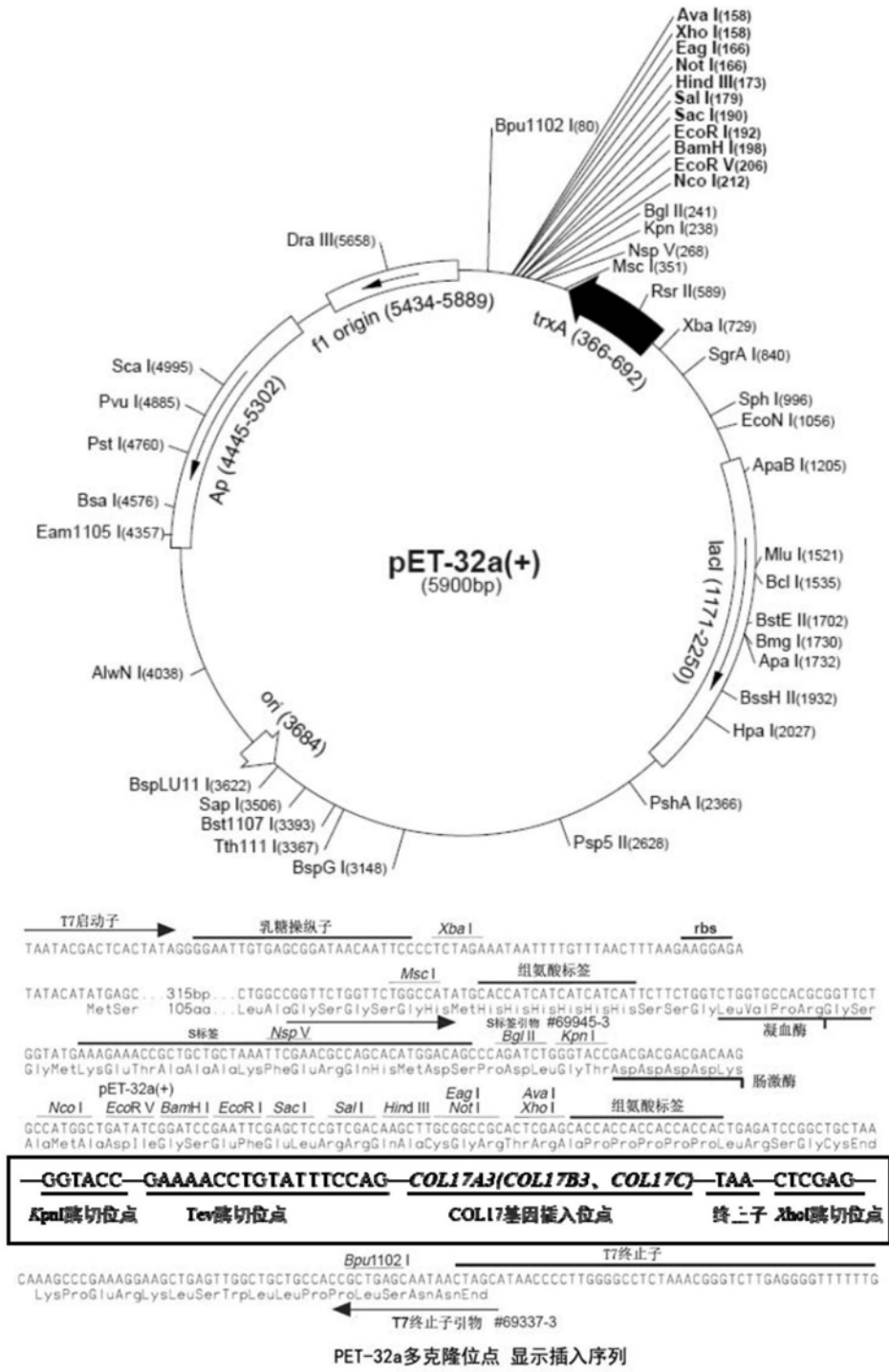


图1

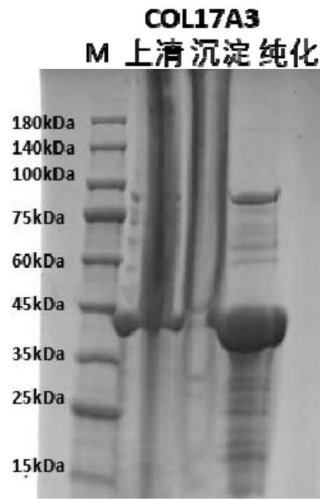


图2

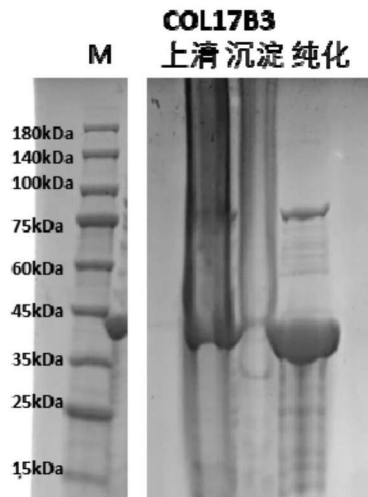


图3

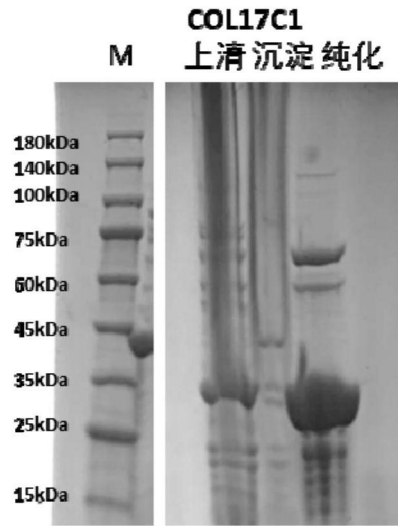


图4

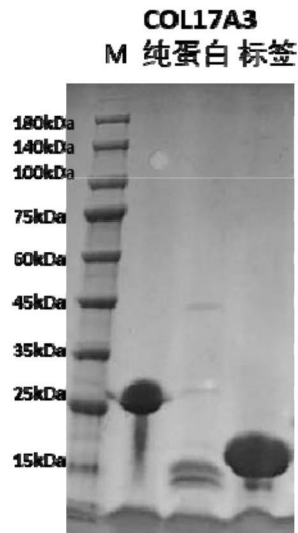


图5

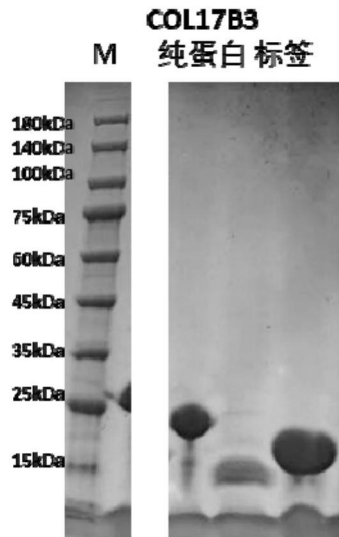


图6

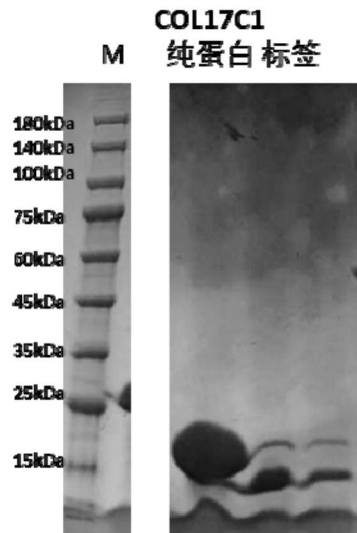


图7

细胞黏附活性检测

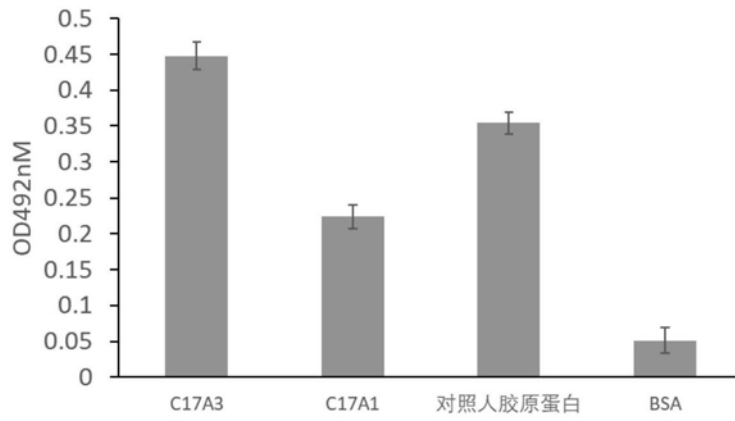


图8

细胞黏附活性检测

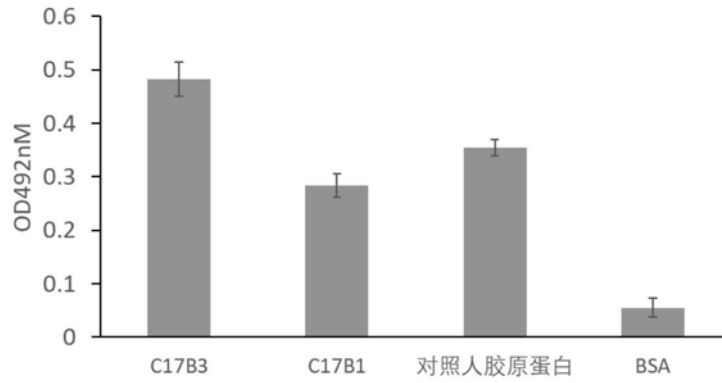


图9

细胞黏附活性检测

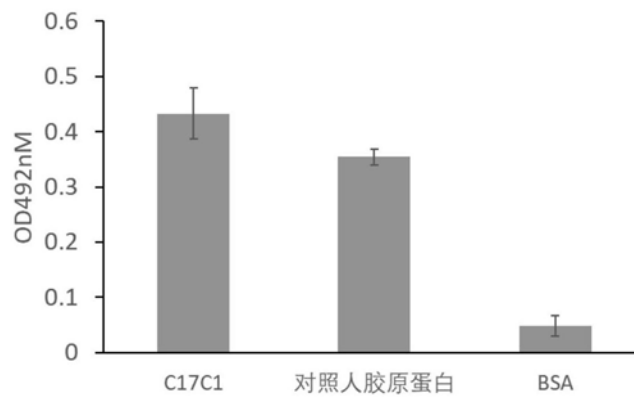


图10