



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109593126 B

(45)授权公告日 2019.11.22

(21)申请号 201811438582.6

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2018.11.28

C12N 1/21(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 1/18(2006.01)

申请公布号 CN 109593126 A

C12R 1/19(2006.01)

(43)申请公布日 2019.04.09

(56)对比文件

(73)专利权人 山西锦波生物医药股份有限公司

CN 103122027 A,2013.05.29,

地址 030032 山西省太原市经济技术开发区
经北街18号

CN 103122027 A,2013.05.29,

CN 108822209 A,2018.11.16,

(72)发明人 杨霞

张军辉.“TEV酶在大肠杆菌中的融合表达及其分析方法研究”.《中国优秀硕士学位论文全文数据库·基础科学辑》.2017,(第03期),

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

审查员 刘俊香

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/78(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

C12N 15/12(2006.01)

序列表13页 附图4页

(54)发明名称

多肽、其生产方法和用途

(57)摘要

本发明涉及多肽、其生产方法和用途。本发明属于基因工程技术领域。本发明提供了多肽，所述多肽包含以SEQ ID No.1所示的序列的n个重复，n为大于等于1的整数，其中当n为大于等于2的整数时，各重复序列之间是直接连接的。本发明的多肽黏附效果优越，在水溶液中稳定性高，且更容易除去内毒素。

1. 多肽,所述多肽由SEQ ID No. 3的氨基酸序列组成。
2. 多核苷酸,其编码根据权利要求1所述的多肽。
3. 表达载体,其包含根据权利要求2所述的多核苷酸,但不包含编码以SEQ ID No. 2所示的序列的多核苷酸。
4. 根据权利要求3所述的表达载体,其中所述表达载体包含编码SEQ ID NO. 5的氨基酸序列的核酸序列。
5. 宿主细胞,其包含根据权利要求3或4所述的表达载体。
6. 根据权利要求5所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌。
7. 根据权利要求1所述的多肽的生产方法,其包括:
 - (1) 在生产培养基中培养根据权利要求5或6所述的宿主细胞并生产多肽;
 - (2) 收获多肽;和
 - (3) 通过Ni柱和/或阴离子交换层析纯化多肽。
8. 根据权利要求7所述的生产方法,其包括酶切多肽的步骤。
9. 根据权利要求8所述的生产方法,其包括用TEV蛋白酶酶切多肽的步骤。
10. 根据权利要求7所述的生产方法,其不包括另外的除去内毒素的步骤。
11. 根据权利要求7所述的生产方法,其中纯化的多肽含有5EU/ml以下的内毒素。
12. 组合物,其包含根据权利要求1所述的多肽。
13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述组合物是医疗器材、组织工程产品、化妆品或保健品。
14. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述多肽为多肽的水溶液形式。
15. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述组合物不含防止多肽降解的组分。
16. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述组合物是长期使用的组合物,其中所述长期使用为半年以上的使用。
17. 根据权利要求1所述的多肽在制备组合物中的用途。
18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述组合物是医疗器材、组织工程产品、化妆品或保健品。
19. 根据权利要求17所述的用途,其中所述多肽为多肽的水溶液形式。
20. 根据权利要求17所述的用途,其中所述组合物不含防止多肽降解的组分。
21. 根据权利要求17所述的用途,其中所述组合物为长期使用的组合物,所述长期使用为半年以上的使用。
22. 根据权利要求1所述的多肽在制备用于促进细胞黏附的药物中的用途。
23. 以SEQ ID No. 4所示的氨基酸序列或根据权利要求3或4所述的表达载体在生产根据权利要求1所述的多肽中的用途。

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,涉及多肽及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是广泛分布于人体结缔组织的一类蛋白质,也是人体中含量最多的蛋白质,可以占到蛋白质总量的25%~35%。它的主要功能体现在维护细胞外环境,维持组织器官的正常生理功能,修复肌体损伤等方面。胶原蛋白是天然的生物资源,具有其它高分子材料所望尘莫及的生物组织相容性,对细胞的支撑弹性和可降解性,因此,胶原蛋白可以广泛的应用在医药和化妆品等行业中。

[0003] 然而,天然胶原蛋白无法溶于水,性质不均一,很难被人体利用,往往需要利用化学手段处理之后使用。而且,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,很难避免病毒感染,同时无法与人体相容,会导致免疫排斥和过敏症状。如果从人胎盘原料中提取,不仅来源有限,更面临法律的严惩。所以,目前的胶原蛋白只能在化妆品和保健品中使用,根本无法发挥胶原蛋白的原本生物学功能。

[0004] 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。天然胶原分子形成了一种特殊的超螺旋结构,由三条无链内氢键形成而仅受链间氢键支撑的多肽链组成。这种螺旋性的结构是以3个氨基酸残基为基本重复体的左手螺旋,这3个氨基酸残基通常为Gly-X-Pro。Gly对胶原蛋白中氢键的形成是必须的,它本身没有侧链,可以使胶原蛋白紧密堆积。在更高级的结构层次上,胶原超螺旋会进一步缔合成为胶原原纤维。在生物体中,胶原蛋白的合成和修饰从原胶原开始,经历了羟基化、糖基化、相互交联等诸多化学变化,受到了多种生物酶的复杂调控。原胶原除了含有胶原链之外,还含有球状的头部和尾部。没有这些头部和尾部,胶原链就不会折叠成为正确的三螺旋,从而缺乏胶原蛋白的生物学活性。因此,按照原始基因序列制备的胶原蛋白不可能在体外自发的组织形成正确的空间结构。这样的困难严重阻碍了人胶原蛋白的研发和生产。

[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。随着现代生物技术的发展,人们不断尝试利用转基因技术,在动物、植物和微生物表达体系中制备重组人胶原蛋白,解决了传统提取工艺的诸多缺点。国外研究机构通过培育含人胶原蛋白基因的小鼠,得到了含有人胶原蛋白的乳汁,但是这样生产的成本过高,生产周期过长,无法投入大规模生产。

[0006] 中国专利发明201210482543.2公开了一种重组人源胶原蛋白以及其生产方法,其中公开了通过接头连接III型胶原蛋白肽段并且在C端添加稳定序列获得的重组人源胶原蛋白。

[0007] 然而,本领域需要更多的具有更好特性的重组人源胶原蛋白。

发明内容

[0008] 本发明提供以下内容：

[0009] 1. 多肽，所述多肽包含以SEQ ID No.1所示的序列的n个重复，n为大于等于1的整数，优选地为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、20、24、或32，其中当n为大于等于2的整数时，各重复序列之间是直接连接的。

[0010] 2. 根据项1所述的多肽，其中所述多肽包含以SEQ ID No.2所示的序列或者不含以SEQ ID No.2所示的序列。

[0011] 3. 根据项1或2所述的多肽，其中所述多肽包含：

[0012] a) SEQ ID No.3的氨基酸序列；

[0013] b) 与SEQ ID No.3的氨基酸序列具有90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果；

[0014] c) SEQ ID No.3的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列，其保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果；或

[0015] d) 由核苷酸序列编码的氨基酸序列，所述核苷酸序列与编码SEQ ID No.3的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交，所述氨基酸序列保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果，所述严格条件是中等严格条件，中-高严格条件，高严格条件或非常高严格条件。

[0016] 4. 多核苷酸，其编码根据项1-3中任一项所述的多肽。

[0017] 5. 表达载体，其包含根据项4所述的多核苷酸，并且任选地包含编码SEQ ID No.4的核酸序列，其中所述编码SEQ ID No.4的核酸序列与所述多肽的编码核酸序列的5'端直接连接，优选所述表达载体包含SEQ ID NO.5的核酸序列。

[0018] 6. 宿主细胞，其包含根据项5所述的表达载体，其中所述宿主细胞优选是大肠杆菌。

[0019] 7. 根据项1所述的多肽的生产方法，其包括：

[0020] (1) 在生产培养基中培养根据项6所述的宿主细胞并生产多肽；

[0021] (2) 收获多肽，并且任选地酶切多肽，优选用TEV蛋白酶酶切多肽；和(3) 通过Ni柱和/或阴离子交换层析纯化多肽；

[0022] 其中任选地所述生产方法不包括另外的除去内毒素的步骤；其中优选地纯化的多肽基本上不含内毒素或者含有5EU/ml以下的内毒素。

[0023] 8. 组合物，其包含根据项1所述的多肽，其中所述组合物优选是医疗器材、组织工程产品、化妆品或保健品，优选地所述多肽为多肽的水溶液形式，优选地所述组合物不含防止多肽降解的组分，优选地所述组合物是长期使用的组合物，所述长期使用优选为半年以上的使用。

[0024] 9. 根据项1所述的多肽在制备组合物，优选医疗器材、组织工程产品、化妆品、保健品中的用途，优选地所述多肽为多肽的水溶液形式，优选地所述组合物不含防止多肽降解的组分，所述组合物为长期使用的组合物，所述长期使用为半年以上的使用。

[0025] 10. 根据项1所述的多肽促进细胞黏附的用途。

[0026] 11. 以SEQ ID No.4所示的氨基酸序列或本发明的表达载体在生产根据本发明的多肽中的用途。

[0027] 本发明的多肽的优点:与现有的重组III型胶原蛋白相比具有更高的细胞黏附性质;在水溶液中具有更高的稳定性,如半年以上的降解情况证明,因此无需添加防止多肽降解的试剂;通过Ni柱和阴离子交换层析纯化就可以消除大部分的内毒素,纯化后的多肽产物基本上不含内毒素或者含有5EU/ml以下的内毒素;本发明的多肽从宿主细胞中以更高的产率和纯度获得。

附图说明

- [0028] 图1:表达产物的质谱出峰结果;
[0029] 图2:不同重组III型胶原蛋白的细胞黏附活性比较;
[0030] 图3:不同重组III型胶原蛋白的细胞表达量情况;
[0031] 图4:不同重组III型胶原蛋白的纯化情况;
[0032] 图5:不同重组III型胶原蛋白的稳定性情况;
[0033] 图6:不同重组III型胶原蛋白的残留内毒素情况;
[0034] 图7:重组III型胶原蛋白TE16C结构解析情况。

具体实施方式

[0035] 下文提供进一步的描述以便于理解本发明。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 本发明部分基于发明人的下述发现:在大肠杆菌中表达包含多个以SEQ ID No.1为重复序列的多肽时,由于目的蛋白为截短体蛋白,缺乏全长蛋白的铰链区结构,为了提高重组表达多肽的成胶性,往往需要在多肽C末端加入铰链区氨基酸GPPGPCCGGG (SEQ ID No.2)等序列帮助成胶(参考文献:Journal Of Biochemistry.2004;136:643-649)。因此,设计了包含SEQ ID NO.3和SEQ ID No.2的多肽序列,例如SEQ ID No.9的序列T16a,但是却发现T16a这种序列的多肽在摇瓶或者发酵培养的时候,大部分目的多肽形成胶状沉淀无法溶解提纯,所以得率很低。之前,为了解决该问题,通过在各重复序列(SEQ ID No.1)之间增加非胶原氨基酸接头来获得包含多个此重复序列的多肽,并且对于此种多肽的改造也主要集中在接头氨基酸残基和C端铰链区氨基酸,又称为C端稳定序列。

[0039] 令人惊讶地,发明人解析了SEQ ID No.1的晶体结构之后发现,SEQ ID No.1这个区域在无铰链区参与的前提下,可以形成非常稳定的胶原三聚体结构。因此,发明人继续改造多肽序列,发现当表达以SEQ ID NO.5所示的序列(其包含以SEQ ID No.4所示的序列和以SEQ ID NO.3所示的序列)的多肽时可以大量获得以包含SEQ ID NO.3所示的序列的多肽,再也不需要C端稳定序列的参与。而且,此时多肽在重组表达的同时不会过早形成胶体结构而影响后期蛋白纯化。此外,发明人还惊讶地发现与中国发明专利201210482543.2中的重组人源胶原蛋白(SEQ ID NO.6)相比,本发明的多肽在水溶液中更稳定,并且可以从宿主细胞中以更高的产率和纯度获得,在通过Ni柱和阴离子交换柱纯化后具有显著更低的内毒素。

(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。

[0049] 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℃，220rpm培养12-16小时；(2) 将菌液按照1:100接种到2×YT培养基中放大培养，37℃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℃继续培养20小时，离心收集菌体。

[0050] 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4℃，16h柱上酶切，最后获得目的胶原蛋白多肽。

[0051] 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。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。

[0052] 本发明还提供了核酸分子，所述核酸分子包括编码本发明的多肽的核酸序列。核酸可以是DNA或cDNA。核酸分子可以主要由编码本发明所述肽的核酸序列组成，或可以仅由编码本发明所述的肽组成。此类核酸分子可以用本领域已知的方法合成。由于遗传密码的简并性，本领域技术人员应理解，不同核酸序列的核酸分子可以编码相同的氨基酸序列。

[0053] 本发明还提供了载体，所述载体中包括本发明所述的核酸序列。合适的载体是载体构建领域已知的，包括启动子的选择和其他调控元件，例如增强子元件。本发明所述的载体包括适合引入细胞的序列。例如，载体可以是表达载体，在该载体中，所述多肽的编码序列受到它自身顺式作用调控元件的控制，载体的设计便于宿主细胞的基因整合或基因替换等。

[0054] 本领域普通技术人员应理解，在本发明中，术语“载体”包括DNA分子，例如，质粒、噬菌体、病毒或其他载体，它含有一个或多个异源的或重组的核酸序列。合适的噬菌体和病毒载体包括，但不限于： λ -噬菌体、EMBL噬菌体、猿猴病毒、牛痘病毒、Epstein-Barr病毒、腺病毒、疱疹病毒、小鼠肉瘤病毒、鼠类乳癌病毒、慢病毒等。

[0055] 本发明的多肽包含以SEQ ID No.3所示的序列或以SEQ ID No.3所示的序列中取代、缺失、插入和/或添加一个或多个氨基酸的序列，只要本发明的多肽保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果。“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个。

[0056] 氨基酸添加指在氨基酸序列，例如SEQ ID NO:3的C端或N端添加氨基酸，只要本发明的多肽保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0057] 氨基酸取代指在氨基酸序列，例如SEQ ID NO:3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，只要本发明的多肽保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0058] 氨基酸插入指在氨基酸序列例如SEQ ID NO:3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，只要本发明的多肽保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果。在本文中氨基酸的插入位置不在各重复序列之间。

[0059] 氨基酸缺失指可以从氨基酸序列，例如SEQ ID NO:3的序列中删除1、2或3个以上

氨基酸,只要本发明的多肽保留SEQ ID No.3的氨基酸序列的细胞黏附效果。

[0060] 在本发明中,取代可以是保守氨基酸取代,指与SEQ ID NO:3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。

[0061]

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

[0062] 如本文所使用的,术语“中等严格条件”,“中-高严格条件”,“高严格条件”或“非常高严格条件”描述了核酸杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导参见Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6,其通过引用并入本文。在该文献中描述了含水的和非含水的方法,且可以使用任一种。例如,具体的杂交条件如下:(1)低严格性杂交条件在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,在约45℃,然后在至少50℃,在0.2X SSC,0.1%SDS中洗涤2次(对于低严格性条件,可以将洗涤温度升高到55℃);(2)中等严格性杂交条件在6X SSC,在约45℃,然后在60℃,在0.2X SSC,0.1%SDS中洗涤1次或多次;(3)高严格性杂交条件在6X SSC,在约45℃,然后在65℃,在0.2X SSC,0.1%SDS中洗涤1次或多次;且优选地(4)非常高的严格性杂交条件是0.5M磷酸钠,7%SDS,在65℃,然后在65℃,在0.2X SSC,1%SDS中洗涤1次或多次。

[0063] 实施例

[0064] 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

体过程如上述。

[0097] 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。

[0098] 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和充分分离。

[0099] 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。最后加入适量具有His标签的Prescission Protease(简称PPase)(Sigma,SAE0045)蛋白酶,于4 $^{\circ}$ C孵育16h后,收集穿流液,即为去除载体蛋白的目的胶原蛋白。所得产物透析过夜,冻干为干粉待用。

[0100] 6. 所得T16b蛋白利用SDS-PAGE检测纯度。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。

[0101] 实施例2:TE16C蛋白的质谱检测

[0102] 实验方法

[0103]

仪器名称	基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪 MALDI-TOF/TOF Ultraflex TM , Brucker, Germany		
基质	CHCA	激光能量	125
数据检索软件	Mascot	检索物种	ALL entries
检索数据库	NCBIprot		

[0104] 蛋白样品经DTT还原和碘代乙酰胺烷基化处理后,加入胰蛋白酶酶解过夜。酶解后得到的肽段再经C18ZipTip脱盐后,与基质 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)混合点板。最后用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪MALDI-TOF/TOF UltraflexTM, Brucker, Germany进行分析(肽指纹图谱的技术可以参考:Protein J.2016;35:212-7)。

[0105] 数据库检索是通过从本地mascot网站上MS/MS Ion Search页面处理的。蛋白质鉴

[0116] 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℃孵育60min。

[0117] 4、每孔用PBS清洗4次。

[0118] 5、用LDH检测试剂盒(Roche,04744926001)检测OD492nm的吸光度。根据空白对照的数值,可以计算出细胞的贴壁率。计算公式如下:细胞贴壁率=(测试孔-空白孔)×100%/(阳性孔-空白孔)。细胞的贴壁率即可以反应胶原蛋白的活性。蛋白的活性越高,越能在短时间给细胞提供优质的外环境,帮助细胞贴壁。

[0119] 结果参见图2。

[0120] 图2的结果表明,两种人重组胶原蛋白(即III型胶原蛋白HC16和III型胶原TE16C)与商品化的人胶原蛋白相比,皆具有更好的黏附活性,而且本发明的重组III型胶原蛋白TE16C实现了最强力的细胞黏附活性。而作为对照用的T16a和T16b的两种构建方式得到的蛋白,细胞黏附活性均低于本发明的TE16C蛋白。

[0121] 实施例4:重组III型胶原蛋白的表达和纯化

[0122] TE16C蛋白表达和纯化

[0123] 1.根据实施例1中的步骤1-5,获得去除载体蛋白的目的胶原蛋白TE16C,透析到阴离子交换柱的A液(10mM Na_2CO_3 ,pH 10.5,10mM NaCl)中。

[0124] 2.用5倍柱体积的A液(10mM Na_2CO_3 ,pH 10.5,10mM NaCl)平衡阴离子交换柱(Hitrap Q HP column,5ml,GE Healthcare Biosciences)。然后将透析后的TE16C蛋白上柱,收集穿过的蛋白峰,即为纯化后的TE16C蛋白。所得产物透析过夜,冻干为干粉待用。

[0125] 3.用5倍柱体积的B液(10mM Na_2CO_3 ,pH 10.5,1M NaCl)洗脱阴离子交换柱,将杂质蛋白和内毒素洗下柱子。

[0126] 以同样的方式处理HC16蛋白、包含重复序列和C端稳定序列的多肽T16a和包含重复序列和接头氨基酸的多肽T16b。

[0127] 图3显示了重组III型胶原蛋白的表达情况。III型胶原蛋白HC16提纯之后,1L菌液可以得到8mg左右的纯蛋白。III型胶原蛋白TE16C提纯之后,1L菌液可以得到15mg以上左右的纯蛋白。而作为对照用的T16a和T16b的两种构建方式得到的蛋白,表达量也均没有本发明中的TE16C蛋白高。特别注意的是,T16a的构建方式由于蛋白纯化中形成了大量的胶体结构,上清中的可溶蛋白量非常低。

[0128] 图4显示了重组III型胶原蛋白的纯化情况。III型胶原蛋白HC16在Ni柱和阴离子交换之后纯度在95%左右,而III型胶原蛋白TE16C可以通过Ni柱和阴离子交换柱快速纯化到超过99%的纯度。而作为对照用的T16a和T16b的两种构建方式得到的蛋白,纯度虽然较高,但是得率都不高,远低于本发明中的TE16C蛋白。

[0129] 实施例5:重组III型胶原蛋白在水溶液中的稳定

[0130] 稳定性研究

[0131] 1.根据实施例4,获得纯化后的TE16C蛋白、HC16、T16a和T16b蛋白,然后对生理盐水(0.9%NaCl)透析。收集透析后的蛋白溶液,用0.22 μm 的滤膜过滤除菌,然后在4-8℃的环境中长期静置。

[0132] 2.在不同的时间点,比如1月,2月,3月,半年,1年等,收集TE16c蛋白和HC16蛋白的水溶液,利用SDS-PAGE(参考实施例1的方法)检测纯度。图5显示了在半年的时间点,HC16、

TE16C、T16a和T16b电泳图像。III型胶原蛋白HC16在水溶液中不太稳定,1个月之后就存在明显的降解,半年的降解就非常严重了。但是III型胶原蛋白TE16C结构稳定,在水溶液中放置半年仍保持90%以上的蛋白为完整的全长蛋白存在,只有少量发生了降解情况。而作为对照用的T16a和T16b的两种构建方式得到的蛋白,也都发生了不同程度的降解,其中T16b的降解情况更为严重,它们的稳定性都远低于本发明中的TE16C蛋白。

[0133] 实施例6:重组III型胶原蛋白的内毒素检测

[0134] TE16c蛋白、HC16蛋白、T16a蛋白和T16b蛋白的内毒素检测

[0135] 1. 根据实施例4,准备纯化的TE16c蛋白、HC16蛋白、T16a蛋白和T16b蛋白。

[0136] 2. 准备试剂,包括鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, $\lambda=0.015\text{EU/ml}$)和稀释剂I(湛江安度斯生物有限公司)。

[0137] 3. 将内毒素标准品稀释为E1、E0.5、E0.25、E0.125、E0.0625。使用稀释剂I对样品进行5、8、16、32、50、100、200、300、400倍稀释,其它为检测用水稀释,使样品终浓度分别为10、16、32、64、100、200、400、600、800倍。

[0138] 4. 将内毒素标准品和稀释的蛋白样品加入鲎试剂中进行观察。结果同时与阴性和阳性对照比较。计算出样品内毒素。

[0139] 图6显示了重组III型胶原蛋白残留内毒素情况。III型胶原蛋白HC16结构不太均一,容易与内毒素结合,因此在Ni柱和阴离子交换之后残留内毒素约为100EU/ml左右,而新III型胶原蛋白TE16C可以通过Ni柱和阴离子交换柱快速纯化到5EU/ml以下的内毒素。而作为对照用的T16a和T16b的两种构建方式得到的蛋白,也和内毒素结合较紧,不容易去除内毒素。

[0140] 实施例7:重组III型胶原蛋白的解析

[0141] 1. TE16C的序列中含有的人III型胶原蛋白Pro488到Gly510的区段,根据此区域序列合成若干多肽(北京中美泰和公司)进行广泛的晶体筛选,比如GFRGPAGPNGIPGEKGPAGERG多肽。

[0142] 2. 将多肽用水溶解成为15mg/ml的溶液,用悬滴法进行晶体生长,其中池液的配方为30% (w/v) PEG 400, 0.1M Na Acetate pH 4.6, 0.1M Cadmium Chloride。将多肽溶液和池液各取1 μl 混合,然后和1ml的池液封闭在一起。

[0143] 3. 大约一周之后,液滴中逐渐长出多肽的单晶,捞出后用液氮快速冷却保存。

[0144] 4. 将收集好的多肽晶体送往上海光源的BL-18U1线站进行X射线晶体衍射数据的收集,同时利用线站配套的计算器进行数据分析和结构的解析。

[0145] 通过蛋白质晶体学的方法,我们解析得到了新III型胶原蛋白TE16C中含有的人III型胶原蛋白Pro488到Gly510区域的高分辨率三维结构,如图7所示。证实这段区域形成了非常稳定的三聚体结构。因此,不需要再额外添加GPPGPCCGGG的C末端序列,就可以拥有完整的胶原蛋白的结构和功能。

[0042]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0043]	85 90 95
[0044]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0045]	100 105 110
[0046]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0047]	115 120 125
[0048]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0049]	130 135 140
[0050]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0051]	145 150 155 160
[0052]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0053]	165 170 175
[0054]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0055]	180 185 190
[0056]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0057]	195 200 205
[0058]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
[0059]	210 215 220
[0060]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0061]	225 230 235 240
[0062]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
[0063]	245 250 255
[0064]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
[0065]	260 265 270
[0066]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0067]	275 280 285
[0068]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly
[0069]	290 295 300
[0070]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu
[0071]	305 310 315 320
[0072]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0073]	325 330 335
[0074]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0075]	340 345 350
[0076]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0077]	355 360 365
[0078]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0079]	370 375 380
[0080]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0081]	385 390 395 400
[0082]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0083]	405 410 415

[0084]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0085]	420 425 430
[0086]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0087]	435 440 445
[0088]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
[0089]	450 455 460
[0090]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0091]	465 470 475 480
[0092]	<210> 4
[0093]	<211> 6
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> 人工序列
[0096]	<220>
[0097]	<223> N端序列
[0098]	<400> 4
[0099]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
[0100]	1 5
[0101]	<210> 5
[0102]	<211> 486
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 人工序列
[0105]	<220>
[0106]	<223> 具有N端序列的TE16C
[0107]	<400> 5
[0108]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0109]	1 5 10 15
[0110]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0111]	20 25 30
[0112]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0113]	35 40 45
[0114]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0115]	50 55 60
[0116]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
[0117]	65 70 75 80
[0118]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0119]	85 90 95
[0120]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
[0121]	100 105 110
[0122]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
[0123]	115 120 125
[0124]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0125]	130 135 140

[0126]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly
[0127]	145 150 155 160
[0128]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu
[0129]	165 170 175
[0130]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0131]	180 185 190
[0132]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0133]	195 200 205
[0134]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0135]	210 215 220
[0136]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0137]	225 230 235 240
[0138]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0139]	245 250 255
[0140]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0141]	260 265 270
[0142]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0143]	275 280 285
[0144]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0145]	290 295 300
[0146]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
[0147]	305 310 315 320
[0148]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0149]	325 330 335
[0150]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
[0151]	340 345 350
[0152]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
[0153]	355 360 365
[0154]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0155]	370 375 380
[0156]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly
[0157]	385 390 395 400
[0158]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu
[0159]	405 410 415
[0160]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0161]	420 425 430
[0162]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0163]	435 440 445
[0164]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0165]	450 455 460
[0166]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0167]	465 470 475 480

[0168]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0169]	485
[0170]	<210> 6
[0171]	<211> 501
[0172]	<212> PRT
[0173]	<213> 人工序列
[0174]	<220>
[0175]	<223> HC16
[0176]	<400> 6
[0177]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
[0178]	1 5 10 15
[0179]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
[0180]	20 25 30
[0181]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0182]	35 40 45
[0183]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly
[0184]	50 55 60
[0185]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu
[0186]	65 70 75 80
[0187]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0188]	85 90 95
[0189]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0190]	100 105 110
[0191]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Arg Ser Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0192]	115 120 125
[0193]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0194]	130 135 140
[0195]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0196]	145 150 155 160
[0197]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0198]	165 170 175
[0199]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0200]	180 185 190
[0201]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0202]	195 200 205
[0203]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0204]	210 215 220
[0205]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0206]	225 230 235 240
[0207]	Ala Pro Arg Ser Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0208]	245 250 255
[0209]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly

[0210]	260	265	270
[0211]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro		
[0212]	275	280	285
[0213]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro		
[0214]	290	295	300
[0215]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly		
[0216]	305	310	315 320
[0217]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu		
[0218]	325	330	335
[0219]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro		
[0220]	340	345	350
[0221]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Arg Ser Gly Glu		
[0222]	355	360	365
[0223]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro		
[0224]	370	375	380
[0225]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly		
[0226]	385	390	395 400
[0227]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu		
[0228]	405	410	415
[0229]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro		
[0230]	420	425	430
[0231]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly		
[0232]	435	440	445
[0233]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe		
[0234]	450	455	460
[0235]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala		
[0236]	465	470	475 480
[0237]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Arg Ser Pro Glu Phe Gly Pro Pro Gly Pro		
[0238]	485	490	495
[0239]	Cys Cys Gly Gly Gly		
[0240]	500		
[0241]	<210> 7		
[0242]	<211> 1458		
[0243]	<212> DNA		
[0244]	<213> 人工序列		
[0245]	<220>		
[0246]	<223> 具有N端序列的TE16C		
[0247]	<400> 7		
[0248]	gaaacctgt atttccaggg tgaacgtggt gcaccaggtt ttcgtggtcc ggcaggtccg 60		
[0249]	aatggaattc cgggtgagaa aggaccggct ggtgagcgtg gtgcccggg tgaacgtgga 120		
[0250]	gcgctggtt ttcgtggccc agcaggtccg aacggtattc ctggtgaaaa aggtccggcg 180		
[0251]	ggagagcgtg gtgcaccggg tgaacgcggt gcaccgggat ttcgtggtcc agcaggaccg 240		

[0252]	aatggtatcc ctggtgaaaa aggaccggca ggtgagcgtg gagcgccagg tgaacgtggc	300
[0253]	gcaccgggtt ttcgtggacc ggcaggcccg aatggtattc cgggtgaaaa aggcccggca	360
[0254]	ggtgaacgtg gtgccccggg tgaacgtggt gcgcctggat ttcgtggccc ggcaggaccg	420
[0255]	aacggtatcc ctggagaaaa aggtcctgca ggtgagcgcg gtgcccggg cgagcgtggt	480
[0256]	gcccctggtt ttcgcggtcc ggcaggcctt aatggtattc ctggagaaaa aggccctgca	540
[0257]	ggtgaacgcg gagcaccggg tgagcgtggc gcacctggtt ttcgtggtcc tgcaggcccc	600
[0258]	aacggtattc cgggcgaaaa aggtccagca ggtgaacgtg gtgctccggg tgaacgtggt	660
[0259]	gcacctggat ttcgcggtcc tgctggtccg aatggtattc cagggtgaaaa aggtccggca	720
[0260]	ggagagcgtg gagcaccggg agaacgtggt gcaccgggct ttcgtggtcc ggcgggtcct	780
[0261]	aacggtatcc cagggtgaaaa aggtccggcc ggcgagcgtg gcgcccctgg tgagcgtggt	840
[0262]	gctcctggtt ttcgtggtcc ggctggtccg aacggaattc ctggtgagaa aggtccggct	900
[0263]	ggcgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt gcaccgggtt tccgtggtcc ggcgggtcct	960
[0264]	aatggtatcc cgggtgaaaa aggtccggca ggtgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt	1020
[0265]	gcaccgggtt ttcgcggacc ggcaggacct aatggtattc cgggagaaaa aggacctgcg	1080
[0266]	ggtgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt gcaccgggtt ttcgtggtcc ggcaggctcct	1140
[0267]	aatggaattc ctggagagaa aggacctgca ggtgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt	1200
[0268]	gcaccgggtt ttcgtggtcc ggcaggcca aatggtattc cgggtgaaaa aggtccggca	1260
[0269]	ggtgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt gcaccgggtt ttcgtggtcc ggcaggctcc	1320
[0270]	aatggcattc ctggtgaaaa aggtccggca ggtgaacgtg gtgcaccggg tgaacgtggt	1380
[0271]	gcaccgggtt ttcgtggtcc ggcaggctcc aatggtattc cgggtgaaaa aggtccggca	1440
[0272]	ggtgaacgtg gtgcaccg	1458
[0273]	<210>	8
[0274]	<211>	1503
[0275]	<212>	DNA
[0276]	<213>	人工序列
[0277]	<220>	
[0278]	<223>	HC16
[0279]	<400>	8
[0280]	ggcgagcgtg gtgcacctgg ttttcgtggc cctgcaggcc cgaatggcat cccgggtgaa	60
[0281]	aaaggcccgg caggcgaacg tggcgcccct ggtgaacgcg gcgcacctgg tttccgtggc	120
[0282]	ccggcaggtc ctaacggtat cccggcgcaa aagggtcctg caggcgagcg tggcgccccg	180
[0283]	ggtgaacgcg gtgcccctgg ctttcgcggt cctgccggcc ctaacggcat tccgggtgag	240
[0284]	aaaggtcctg ccggtgagcg cggtgcccct ggtgagcgcg gcgcaccggg ctttcgtggc	300
[0285]	ccggccggtc ctaatggtat tcttggcgag aagggtccgg cagggtgaac cgggtgcacct	360
[0286]	agatccggcg agcgtggtgc acctggtttt cgtggccctg caggcccgaa tggcatcccg	420
[0287]	ggtgaaaaag gcccggcagg cgaactggc gccctggtg aacgcggcgc acctggtttc	480
[0288]	cgtggcccgg caggctcctaa cggtatcccg ggcgaaaagg gtcctgcagg cgagcgtggc	540
[0289]	gccccgggtg aacgcggtgc ccctggtttt cgcggtcctg ccggccctaa cggcattccg	600
[0290]	ggtgagaaaag gtctctccgg tgagcgcggt gccctggtg agcgcggcgc accgggcttt	660
[0291]	cgtggcccgg ccggtcctaa tggattcct ggcgagaagg gtccggcagg tgaacgcggt	720
[0292]	gcacctagat ccggcgagcg tgggtcacct ggttttcgtg gccctgcagg cccgaatggc	780
[0293]	atccccgggtg aaaaaggccc ggcaggcgaa cgtggcggcc ctggtgaac cggcgcacct	840

[0336]	180	185	190
[0337]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly		
[0338]	195	200	205
[0339]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro		
[0340]	210	215	220
[0341]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro		
[0342]	225	230	235
[0343]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly		
[0344]	245	250	255
[0345]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu		
[0346]	260	265	270
[0347]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro		
[0348]	275	280	285
[0349]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly		
[0350]	290	295	300
[0351]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu		
[0352]	305	310	315
[0353]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro		
[0354]	325	330	335
[0355]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly		
[0356]	340	345	350
[0357]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe		
[0358]	355	360	365
[0359]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala		
[0360]	370	375	380
[0361]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly		
[0362]	385	390	395
[0363]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu		
[0364]	405	410	415
[0365]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala		
[0366]	420	425	430
[0367]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly		
[0368]	435	440	445
[0369]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro		
[0370]	450	455	460
[0371]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro		
[0372]	465	470	475
[0373]	Gly Pro Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly Gly		
[0374]	485	490	
[0375]	<210> 10		
[0376]	<211> 1470		
[0377]	<212> DNA		

[0378] <213> 人工序列
 [0379] <220>
 [0380] <223> T16a
 [0381] <400> 10
 [0382] ggtgaacgtg gtgcaccagg ttttcgtggt ccggcaggtc cgaatggaat tccgggtgag 60
 [0383] aaaggaccgg ctggtgagcg tggcgcgccg ggtgaacgtg gagcgcctgg ttttcgtggc 120
 [0384] ccagcaggtc cgaacggtat tcctggtgaa aaaggtccgg cgggagagcg tggcgcaccg 180
 [0385] ggtgaacgcg gtgcaccggg atttcgtggt ccagcaggac cgaatggtat ccctggtgaa 240
 [0386] aaaggaccgg caggtgagcg tggagcgcca ggtgaacgtg gcgcaccggg ttttcgtgga 300
 [0387] ccggcaggcc cgaatggtat tccgggtgaa aaaggcccgg caggtgaacg tggcgcaccg 360
 [0388] ggtgaacgtg gtgcgcctgg atttcgtggc ccggcaggac cgaacggtat ccctggagaa 420
 [0389] aaaggtcctg caggtgagcg cggcgcgccg ggcgagcgtg gtgcccctgg ttttcgcggt 480
 [0390] ccggcaggcc ctaatggtat tcctggagaa aaaggccctg caggtgaacg cggagcaccg 540
 [0391] ggtgagcgtg gcgcacctgg ttttcgtggt cctgcaggcc cgaacggtat tccgggcgaa 600
 [0392] aaaggtccag caggtgaacg tggcgcctcg ggtgaacgtg gtgcacctgg atttcgcggt 660
 [0393] cctgctggtc cgaatggtat tccaggtgaa aaaggtccgg caggagagcg tggagcaccg 720
 [0394] ggagaacgtg gtgcaccggg ctttcgtggt ccggccggtc ctaacggtat cccaggtgaa 780
 [0395] aaaggtccgg ccggcgagcg tggcgcctcg ggtgagcgtg gtgctcctgg ttttcgtggt 840
 [0396] ccggtggtc cgaacggaat tcctggtgag aaaggtccgg ctggcgaacg tggcgcaccg 900
 [0397] ggtgaacgtg gtgcaccggg tttcctggtt ccggcgggtc ctaatggtat cccgggtgaa 960
 [0398] aaaggtccgg caggtgaacg tggcgcaccg ggtgaacgtg gtgcaccggg ttttcgcgga 1020
 [0399] ccggcaggac ctaatggtat tccgggagaa aaaggacctg cgggtgaacg tggcgcaccg 1080
 [0400] ggtgaacgtg gtgcaccggg ttttcgtggt ccggcaggtc ctaatggaat tcctggagag 1140
 [0401] aaaggacctg caggtgaacg tggcgcaccg ggtgaacgtg gtgcaccggg ttttcgtggt 1200
 [0402] ccggcaggtc caaatggtat tccgggtgaa aaaggtccgg caggtgaacg tggcgcaccg 1260
 [0403] ggtgaacgtg gtgcaccggg ttttcgtggt ccggcaggtc cgaatggcat tcctggtgaa 1320
 [0404] aaaggtccgg caggtgaacg tggcgcaccg ggtgaacgtg gtgcaccggg ttttcgtggt 1380
 [0405] ccggcaggtc cgaatggtat tccgggtgaa aaaggtccgg caggtgaacg tggcgcaccg 1440
 [0406] ggcccgcctg gtccctgttg tggcggcgcc 1470
 [0407] <210> 11
 [0408] <211> 486
 [0409] <212> PRT
 [0410] <213> 人工序列
 [0411] <220>
 [0412] <223> T16b
 [0413] <400> 11
 [0414] Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
 [0415] 1 5 10 15
 [0416] Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
 [0417] 20 25 30
 [0418] Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
 [0419] 35 40 45

[0420]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly
[0421]	50 55 60
[0422]	Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu
[0423]	65 70 75 80
[0424]	Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0425]	85 90 95
[0426]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0427]	100 105 110
[0428]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Arg Ser Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0429]	115 120 125
[0430]	Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly
[0431]	130 135 140
[0432]	Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe
[0433]	145 150 155 160
[0434]	Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala
[0435]	165 170 175
[0436]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly
[0437]	180 185 190
[0438]	Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu
[0439]	195 200 205
[0440]	Arg Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0441]	210 215 220
[0442]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0443]	225 230 235 240
[0444]	Ala Pro Arg Ser Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala
[0445]	245 250 255
[0446]	Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly
[0447]	260 265 270
[0448]	Ala Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro
[0449]	275 280 285
[0450]	Asn Gly Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro
[0451]	290 295 300
[0452]	Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly
[0453]	305 310 315 320
[0454]	Ile Pro Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Gly Glu
[0455]	325 330 335
[0456]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0457]	340 345 350
[0458]	Gly Glu Lys Gly Pro Ala Gly Glu Arg Gly Ala Pro Arg Ser Gly Glu
[0459]	355 360 365
[0460]	Arg Gly Ala Pro Gly Phe Arg Gly Pro Ala Gly Pro Asn Gly Ile Pro
[0461]	370 375 380

[0504] ggcgagcgtg gcgccccggg tgaacgcggt gccctggct ttcgcggtcc tgccggcct 1320
[0505] aacggcattc cgggtgagaa aggtcctgcc ggtgagcgcg gtgccctgg tgagcgcggc 1380
[0506] gcaccgggct ttcgtggccc ggccggtcct aatggtattc ctggcgagaa ggtccggca 1440
[0507] ggtgaacgcg gtgcacct 1458

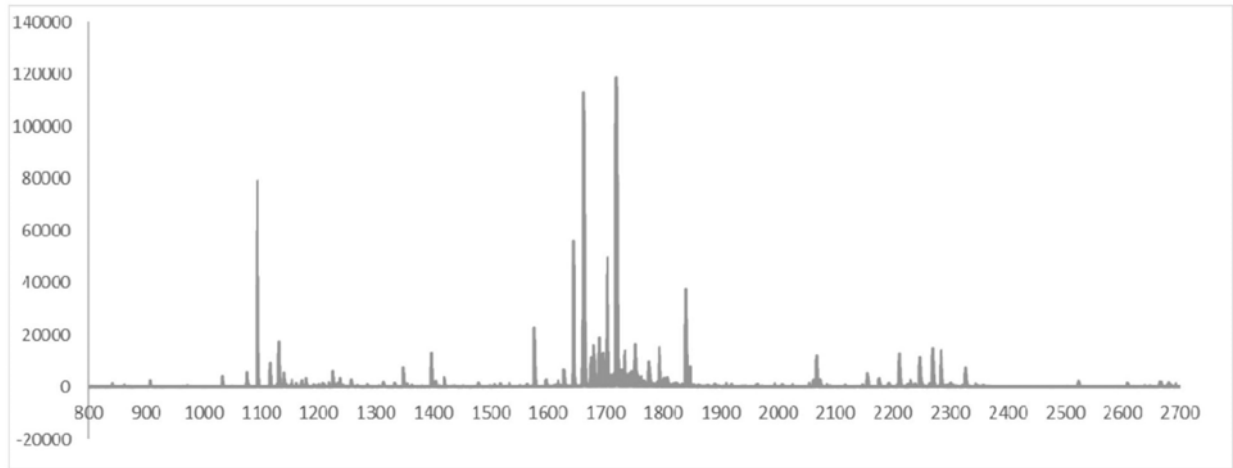


图1

细胞黏附活性检测

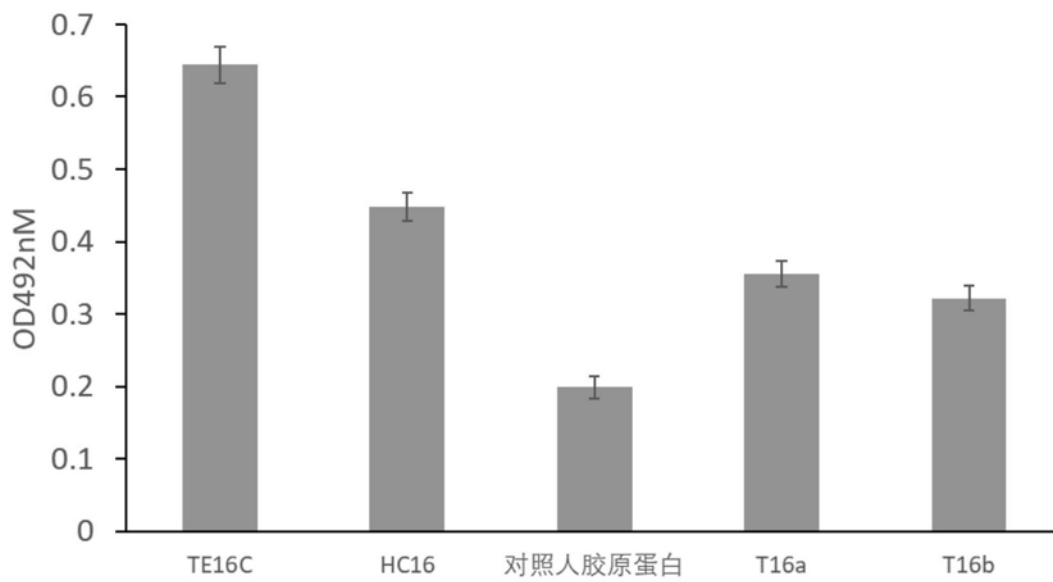


图2

重组蛋白表达量

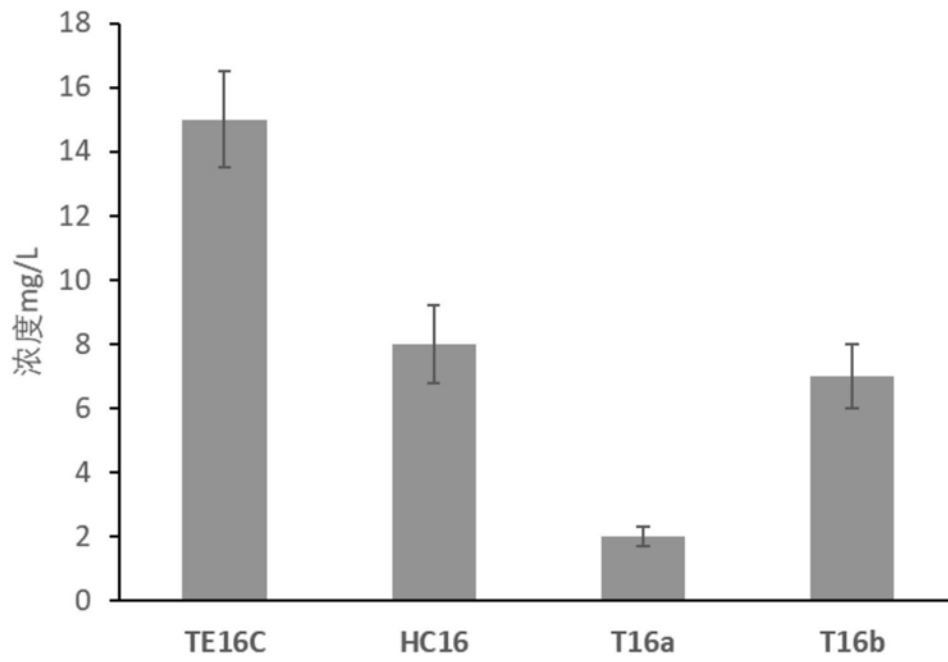


图3

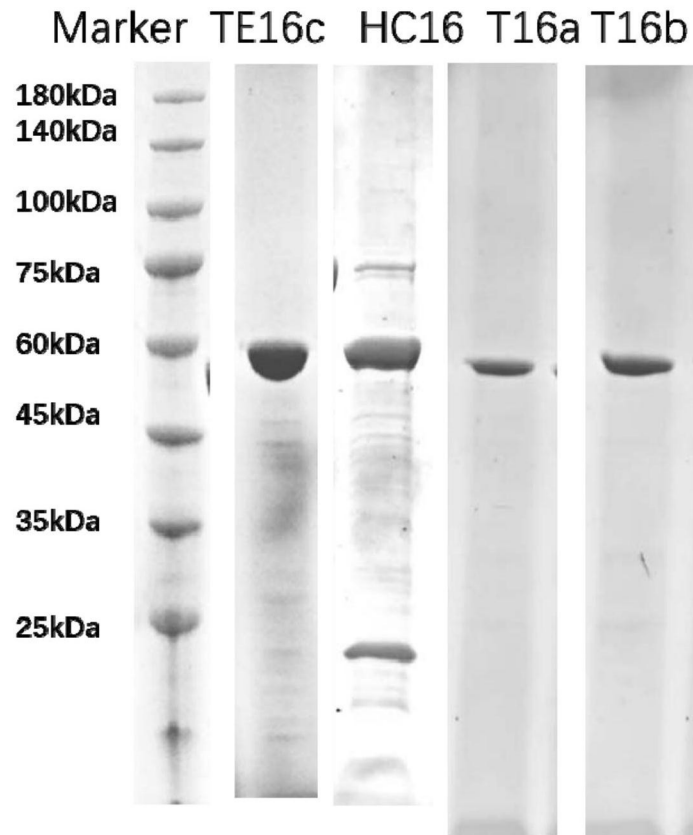


图4

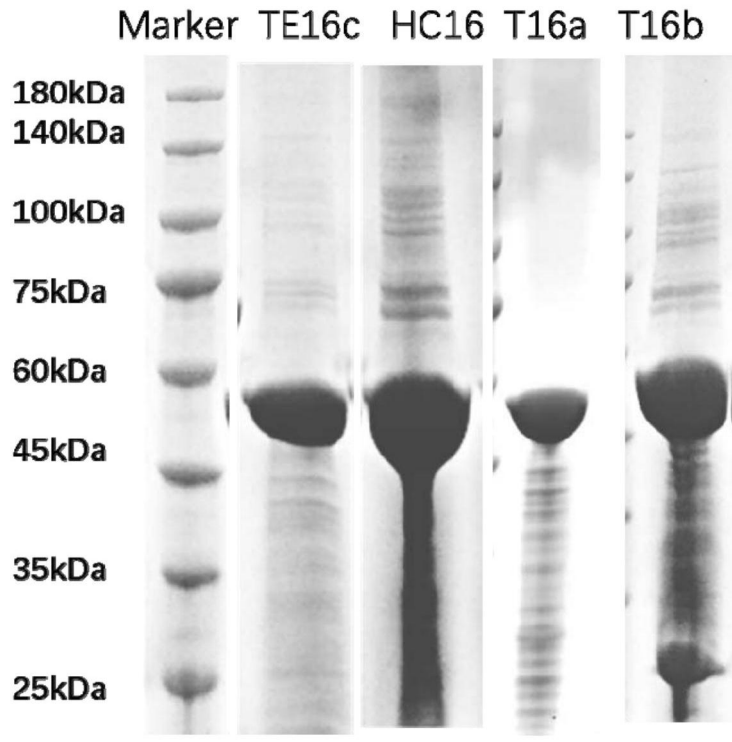


图5

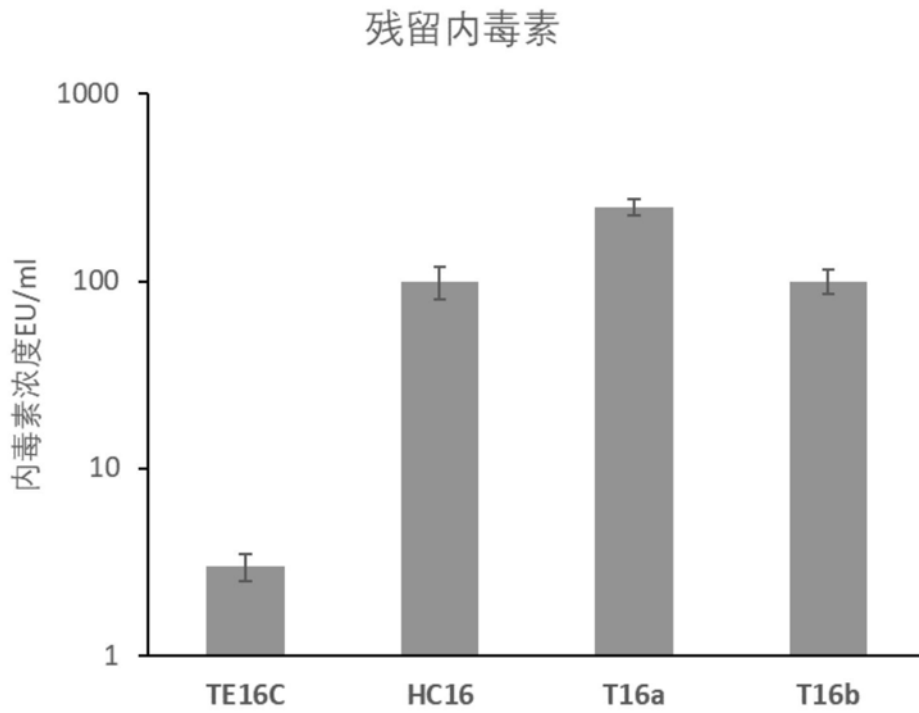


图6

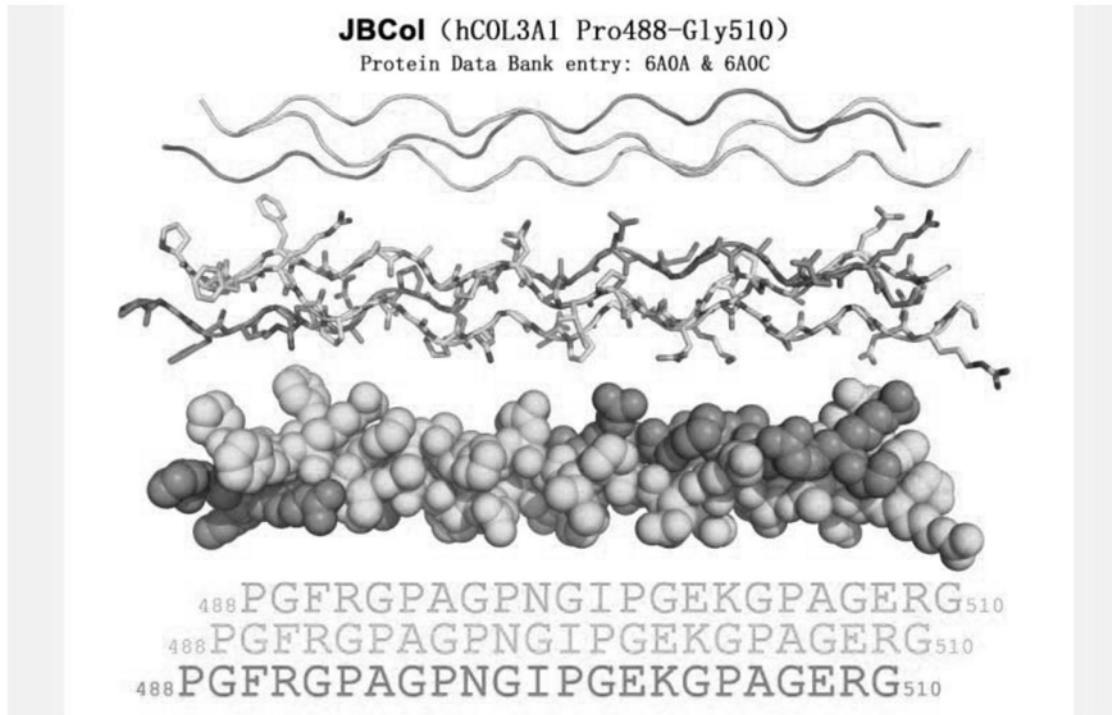


图7