



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111944057 B

(45) 授权公告日 2021.09.10

(21) 申请号 202010717892.2

C12N 15/12 (2006.01)

(22) 申请日 2020.07.23

C12N 15/70 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 1/21 (2006.01)

申请公布号 CN 111944057 A

A61K 38/39 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.11.17

A61P 17/02 (2006.01)

(73) 专利权人 广州启妆生物科技有限公司

A61K 8/65 (2006.01)

地址 510000 广东省广州市黄埔区云展路
11号C栋4楼

A61Q 19/00 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

审查员 刘芳

(72) 发明人 陈伟 熊盛 孙云起 郭朝万

柳耀平 苏志旭 熊灿 王一婷

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

代理人 颜希文

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

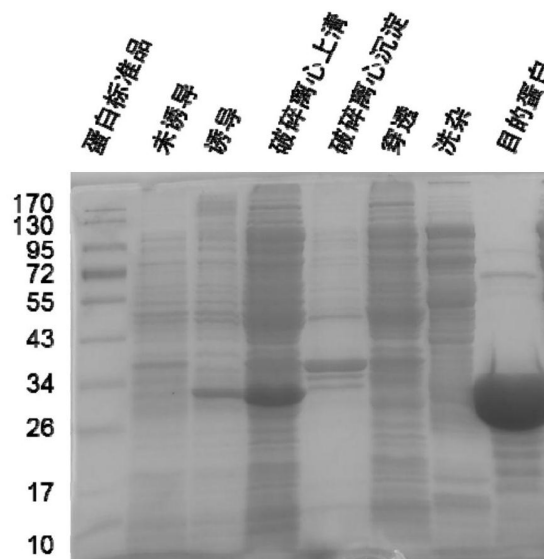
序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

一种重组人胶原蛋白肽及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物工程领域,尤其涉及一种重组人胶原蛋白肽及其应用。本发明的一种重组人胶原蛋白肽的氨基酸序列如(a)或(b)所示:(a)氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;(b)在(a)中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有人胶原蛋白肽活性的由(a)衍生的蛋白质。本发明重组人胶原蛋白肽在大肠杆菌中以可溶性的方式表达,表达效率高;且本发明重组人胶原蛋白肽活性高,重组人胶原蛋白肽具有促进增殖活性、促进细胞迁移活性和促进细胞粘附活性,可广泛应用在医药化工、食品、化妆品等行业。



1. 一种重组人胶原蛋白肽,其特征在于,所述重组人胶原蛋白肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 编码权利要求1所述重组人胶原蛋白肽的基因。
3. 携带权利要求2所述基因的载体或细胞。
4. 表达权利要求1所述重组人胶原蛋白肽的基因工程菌。
5. 根据权利要求4所述的基因工程菌,其特征在于,所述基因工程菌以大肠杆菌为宿主。
6. 根据权利要求4所述的基因工程菌,其特征在于,所述基因工程菌以pET-28a为表达载体。
7. 一种促进细胞增殖活性剂,其特征在于,所述促进细胞增殖活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。
8. 一种促进细胞迁移活性剂,其特征在于,所述促进细胞迁移活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。
9. 一种促进细胞粘附活性剂,其特征在于,所述促进细胞粘附活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。

一种重组人胶原蛋白肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,尤其涉及一种重组人胶原蛋白肽及其应用。

背景技术

[0002] 胶原蛋白在动物体内含量丰富,广泛分布在动物的皮肤、骨骼、肌腱、韧带和血管之中,是哺乳动物体内含量最多的一类蛋白质,也是细胞外基质的重要组成成分。人体中胶原蛋白含量占总蛋白的25%~30%,是一种重要的结构蛋白,起着保护机体、支撑器官的重要作用。

[0003] 目前已发现胶原蛋白有28种类型,不同类型的胶原蛋白具有不同的功能。一般分为两大类:一类是成纤维胶原蛋白;另一类是非成纤维胶原蛋白;成纤维胶原蛋白包括I、II、III、V、VI和XXVI型胶原蛋白,其余属于非纤维胶原蛋白。人体中含量最多的是I型胶原蛋白,约占85%以上,I型胶原蛋白在骨、皮肤、腱和角膜中含量高,II型存在于软骨、椎间盘和玻璃体中,III型存在于血管、新生皮肤和瘢痕组织中。

[0004] 胶原蛋白具有很好的生物相容性、生物降解性以及生物活性,例如低免疫原性、在体内易被人体吸收,能促进细胞增殖、促进血小板凝结、参与细胞迁移、粘附等方面。胶原蛋白广泛应用在医药化工、食品、化妆品等行业中。胶原可以用于烧伤、创伤和眼角膜疾病的治疗;其次在美容、组织修复、药物缓释剂等方面也有广泛应用。临床上的应用包括:烧伤创伤治疗的胶原膜,美容矫形的胶原医用注射剂,创伤止血的胶原止血海绵等。在化妆品领域,胶原蛋白是皮肤细胞外基质的重要组成成分,具有保湿、补充皮肤胶原、抗衰老等方面的功效。

[0005] 目前胶原蛋白主要有动物组织提取以及基因工程方法制备两种途径来源。天然提取的胶原蛋白是多种不同分子量胶原蛋白组成的混合物,不溶于水,生物相容性较差;此外,由于来源于动物组织,对于动物源疾病或者人传染疾病有交叉感染的风险。通过基因工程方法制备的胶原蛋白,可以解决传统方式提取的胶原蛋白带来的疾病感染风险,并且通过对胶原蛋白氨基酸序列的优化,可以提高胶原蛋白的亲水性、稳定性,优化胶原蛋白的分子量;从而使制备的胶原蛋白具有良好的组织相容性、皮肤透过性,安全性。

[0006] 胶原蛋白的基本结构是原胶原,每个原胶原分子都由三条 α 肽链组成,每个 α 肽链都会形成左手螺旋,三条左手螺旋扭在一起形成一个大的右手三股螺旋结构。胶原蛋白有特定Gly-Xaa-Yaa的重复氨基酸序列组成,其中,Xaa通常是脯氨酸,Yaa通常是羟脯氨酸或者羟赖氨酸。由于胶原蛋白特定的氨基酸组成,通过基因工程方式制备的胶原蛋白,如何提高胶原蛋白稳定性、表达量以及是否能形成正确的折叠结构,是制约其应用的关键方面。因此,胶原蛋白通过基因工程方式制备过程中,需要选择合适的胶原结构域,以及对选择的胶原域的氨基酸序列进行合理的优化能够提高胶原蛋白的制备效率,以及提高制备的胶原蛋白的稳定性及活性。

[0007] 此外,我们之前的研究表明,蛋白质在核糖体上合成的过程中,其合成的速度并非恒定,在某些氨基酸部位上合成速度会比较慢,这种现象称为翻译暂停。如果蛋白质上

的翻译暂停位点不合适,该慢的地方快,或者该快的地方慢,都将造成蛋白质的错误折叠,可能无法得到正确折叠的蛋白质。因此,对胶原蛋白的核苷酸序列进行优化,也是提高胶原蛋白表达效率的重要途径之一。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种重组人胶原蛋白肽及其应用,使得重组人胶原蛋白肽的制备效率快且活性高。

[0009] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种重组人胶原蛋白肽,所述重组人胶原蛋白肽的氨基酸序列如(a)或(b)所示:

[0010] (a)氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;

[0011] (b)在(a)中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有人胶原蛋白肽活性的由(a)衍生的蛋白质。

[0012] 以人I型胶原蛋白1076~1202位氨基酸,III型胶原蛋白594~846位氨基酸作为重组类人胶原蛋白的模板。该序列是胶原蛋白上特定的(Gly-X-Y)重复序列,具有整合素结合结构域、促细胞增殖结构域。根据选择的氨基酸序列重新设计和优化了重组人胶原蛋白肽的核苷酸序列,并且,通过翻译暂停理论,对胶原蛋白的核苷酸序列进行优化,最终得到本发明重组人胶原蛋白肽(核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示)。

[0013] 本发明提供编码所述重组人胶原蛋白肽的基因。

[0014] 本发明提供携带所述基因的载体或细胞。

[0015] 本发明提供表达所述重组人胶原蛋白肽的基因工程菌。

[0016] 作为本发明所述的基因工程菌的优选实施方式,所述基因工程菌以大肠杆菌为宿主。

[0017] 作为本发明所述的基因工程菌的优选实施方式,所述基因工程菌以pET-28a为表达载体。

[0018] 本发明提供一种促进细胞增殖活性剂,所述促进细胞增殖活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。

[0019] 本发明提供一种促进细胞迁移活性剂,所述促进细胞迁移活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。

[0020] 本发明提供一种促进细胞粘附活性剂,所述促进细胞粘附活性剂含有权利要求1所述的重组人胶原蛋白肽。

[0021] 本发明还提供所述的重组人胶原蛋白肽在医药化工、食品或化妆品领域的应用。

[0022] 本发明的有益效果:

[0023] (1)本发明根据选择的氨基酸序列重新设计和优化了重组人胶原蛋白肽的核苷酸序列,将优化后的胶原蛋白核苷酸序列连接到载体pET-28a上,并转入大肠杆菌BL21中得到工程菌pET-28a-Collgen-2/BL21,工程菌经IPTG诱导之后,胶原蛋白肽在大肠杆菌中以可溶性的方式表达,且表达效率高;

[0024] (2)本发明的重组人胶原蛋白肽活性高,重组人胶原蛋白肽对BALB/c 3T3细胞有促增殖活性,最高促细胞增值率为26.60%;重组人胶原蛋白肽促进细胞迁移活性测定表

明,本发明重组人胶原蛋白肽处理组细胞划痕恢复面积为95.52%,远高于对照组(65.12%);细胞粘附实验结果表明,本发明重组人胶原蛋白肽有较好的促细胞粘附效果。

附图说明

[0025] 图1:本发明重组胶原蛋白翻译速度曲线图;其中,A:优化前胶原蛋白;B优化后胶原蛋白。

[0026] 图2:本发明未经翻译暂停优化的胶原蛋白SDS-PAGE电泳图。

[0027] 图3:本发明优化后的重组胶原蛋白SDS-PAGE电泳图。

[0028] 图4:本发明重组人胶原蛋白肽促进BALB/c 3T3细胞增值率曲线图。

[0029] 图5:本发明重组人胶原蛋白肽促进细胞迁移实验结果图。

[0030] 图6:本发明重组人胶原蛋白肽促进细胞粘附结果图。

[0031] 图7:本发明重组人胶原蛋白肽促进细胞粘附结果分析图。

具体实施方式

[0032] 为更清楚地表述本发明的技术方案,下面结合具体实施例进一步说明,但不能用于限制本发明,此仅是本发明的部分实施例。

[0033] 本发明实施例涉及的主要材料如下:宿主菌大肠杆菌BL21 (DE3) (Merck)、质粒pET-28a (Merck)、预染蛋白Marker购自Fermentas公司,Ni Sepharose™6Fast Flow购自GE公司,CCK-8试剂盒购自美国SIGMA公司。其它试剂均为分析纯试剂。NTA-20缓冲液(20mmol/L Tris-HCl、pH 8.0+0.15mol/L NaCl+20mmol/L咪唑),NTA-60缓冲液(20mmol/L Tris-HCl、pH 8.0+0.15mol/L NaCl+60mmol/L咪唑),NTA-250缓冲液(20mmol/L Tris-HCl、pH 8.0+0.15mol/L NaCl+250mmol/L咪唑)。

[0034] 本发明涉及的序列:

[0035] (1) SEQ ID NO.1:优化的胶原蛋白的氨基酸序列;

[0036] (2) SEQ ID NO.2:优化的胶原蛋白的核苷酸序列;

[0037] (3) SEQ ID NO.3:未优化的胶原蛋白的氨基酸序列;

[0038] (4) SEQ ID NO.4:未优化的胶原蛋白的核苷酸序列。

[0039] 实施例1:重组人胶原蛋白肽表达载体构建

[0040] 以人I型胶原1076~1202位氨基酸,III型胶原蛋白594~846位氨基酸作为重组类人胶原蛋白的模板。该序列是胶原蛋白上特定的Gly-X-Y重复序列,具有整合素结合结构域、促细胞增殖结构域。我们根据选择的氨基酸序列重新设计和优化了重组人胶原蛋白肽的核苷酸序列,并且通过翻译暂停理论,对胶原蛋白的核苷酸序列进行优化,优化前的胶原蛋白的翻译速度曲线如图1A,优化后的胶原蛋白的翻译速度曲线如图1B。从图中可以看出,与图1A相比,图1B在速度曲线后面有一个下降,说明优化后的蛋白质在核糖体上翻译的时候速度会减慢,从而使蛋白质在核糖体上有充足的时间折叠,得到正确折叠的空间结构,这样有两个好处,第一表达的蛋白可能以可溶性的方式表达,第二,表达的蛋白是有正确折叠构象的,从而活性更高。

[0041] 委托苏州泓迅生物科技股份有限公司分别全基因合成优化前和优化后的重组人胶原蛋白肽的核苷酸序列,并构建到pET-28a质粒中。利用未优化的重组人胶原蛋白肽的核

昔酸序列(核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,氨基酸序列如SEQID NO.3所示),构建的表达质粒记为pET-28a-Collgen-1;利用优化后的重组人胶原蛋白肽的核苷酸序列(核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,氨基酸序列如SEQID NO.1所示),构建的表达质粒记为pET-28a-Collgen-2。

[0042] 实施例2:重组人胶原蛋白肽的表达、纯化

[0043] (1) 重组人胶原蛋白肽表达工程菌的制备:

[0044] ①大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞的制备:制备过程详见《分子克隆实验指南》第三版;[美]J. 莎姆布鲁克著,黄培堂译。

[0045] ②将实施例1中构建得到的表达载体pET-28a-Collgen-1、pET-28a-Collgen-2分别转化至大肠杆菌BL21感受态细胞,得到表达菌株pET-28a-Collgen-1/BL21、pET-28a-Collgen-2/BL21。转化过程详见《分子克隆实验指南》第三版;[美]J. 莎姆布鲁克著,黄培堂译。

[0046] (2) 胶原蛋白肽诱导表达和可溶性分析

[0047] 将步骤(1)得到的表达菌株pET-28a-Collgen-1/BL21、pET-28a-Collgen-2/BL21分别接种到10mL含50 μ g/mL卡那霉素含量的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C、180rpm培养,当OD₆₀₀=0.8时,加IPTG,终浓度为1mM,37 $^{\circ}$ C诱导表达4h后,5000g、4 $^{\circ}$ C离心10min收集菌体。菌体用20mmol/L Tris-HCl (pH8.0,0.15mol/L NaCl)缓冲液重悬,高压(800bar)均质破碎细胞,18000 \times g、4 $^{\circ}$ C离心30min,上清和沉淀分别留样待后续的SDS-PAGE电泳(5%浓缩胶、12%分离胶)及Western blot分析。

[0048] 结果表明,未优化的胶原蛋白序列构建的pET-28a表达载体,转化BL21之后,经IPTG诱导,蛋白没有表达(图2);而优化之后的胶原蛋白在BL21中表达(图3)。

[0049] (3) 胶原蛋白摇瓶发酵和纯化

[0050] 将步骤(1)得到的菌株pET-28a-Collgen-2/BL21接种到1L、卡那霉素含量为50 μ g/mL的LB培养基中,按步骤(2)中的表达条件进行摇瓶发酵并诱导。4 $^{\circ}$ C、6000 \times g、10min离心收集菌体,然后将菌体沉淀按体积比1:10比例重新悬浮于NTA-10缓冲液,高压(800bar)均质破碎细胞。4 $^{\circ}$ C、25000 \times g、30min离心收集上清。

[0051] 上清上样至柱床体积为20mL的Ni-NTA亲和层析柱中,流速0.6mL/min,NTA-10缓冲液洗回基线,流速为1mL/min,NTA-40缓冲液洗杂蛋白,NTA-200缓冲液洗脱目的蛋白;纯化后的胶原蛋白肽经Sephadex G-25分子筛脱咪唑,SDS-PAGE电泳鉴定纯化的胶原蛋白的纯度。

[0052] 结果如图3所示,工程菌pET-28a-Collgen-2/BL21经IPTG诱导之后,胶原蛋白肽有明显表达,且表达的胶原蛋白肽主要存在于细菌破碎离心的上清中,即优化后的胶原蛋白肽在大肠杆菌中以可溶性的方式表达。工程菌破碎离心上清经Ni-NTA亲和层析纯化,200mM咪唑洗脱得到重组胶原蛋白肽(目的蛋白)。

[0053] 实施例3:重组人胶原蛋白肽促进细胞增殖活性

[0054] (1) BALB/c 3T3细胞接种于96孔细胞培养板中(5000个细胞/孔),37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱培养24h。

[0055] (2) 换用DMEM无血清培养基继续培养12h。

[0056] (3) 在细胞培养板中分别加入10 μ l实施例2中纯化得到的优化后的重组人胶原蛋

白肽溶液(溶液中重组人胶原蛋白肽浓度为10 μ g/ml)以及PBS(空白对照),继续培养48~72h。

[0057] (4) 每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱孵育2h后取出。

[0058] (5) 用酶标仪读取96孔板在450nm和630nm的吸光值,以630nm为参比波长,在450nm处测定吸光度,记录测定结果。相对促细胞增殖率=(实验组450nm吸光值-阴性对照组450nm吸光值)/阴性对照组450nm吸光值 \times 100%。

[0059] 结果如图4所示,重组人胶原蛋白肽对BALB/c 3T3细胞有促增殖活性,最高促细胞增殖率为26.60%。

[0060] 实施例4:重组人胶原蛋白肽促进细胞迁移活性测定

[0061] (1) BALB/3T3细胞消化后,2 \times 10⁵cells/ml接种6孔板,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养;待细胞密度达到90%后,用tip头在6孔板上画线,并在显微镜下拍照记录起始的划痕位置。

[0062] (2) 向步骤(1)的6孔板中每孔加入50 μ L实施例2中纯化得到的优化后的重组人胶原蛋白肽溶液(重组人胶原蛋白肽溶液浓度为10 μ g/ml)或普通胶原蛋白溶液(该普通胶原蛋白从Abcam公司购买,货号ab7535,胶原蛋白浓度为10 μ g/ml),对照组每孔加入50 μ L PBS,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱继续培养24h。

[0063] (3) 显微镜下拍照记录同一划痕位置的细胞;用Image J软件计算细胞划痕面积恢复比率。

[0064] 结果如图5所示,实验组细胞中加入50 μ L浓度为10 μ g/ml重组人胶原蛋白肽培养24h后,划痕恢复显著快于对照组。通过Image J软件计算划痕面积,结果表明,重组人胶原蛋白肽处理组细胞划痕恢复面积为95.52%,对照组为65.12%(表1)。

[0065] 表1重组人胶原蛋白肽促细胞迁移率

样品	划痕相对恢复面积(%)
重组人胶原蛋白肽	95.52
普通胶原蛋白	66.24
对照组	65.12

[0067] 实施例5:重组人胶原蛋白肽促进细胞粘附活性测定

[0068] 细胞粘附活性测定的具体过程为:

[0069] (1) 分别取50 μ L实施例2中纯化得到的优化后的重组人胶原蛋白肽溶液(重组人胶原蛋白肽溶液浓度为10 μ g/ml)、普通胶原蛋白溶液(该普通胶原蛋白从Abcam公司购买,货号ab7535,胶原蛋白浓度为10 μ g/ml)加入96孔细胞培养板,37 $^{\circ}$ C放置2h,阴性对照组加PBS。

[0070] (2) BALB/3T3细胞用胰酶消化,计数,每孔加入5 \times 10⁴个细胞。37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱培养4h;

[0071] (3) PBS洗3遍,洗去未粘附的细胞,再加入200 μ L细胞培养基;

[0072] (4) 显微镜下拍照记录。

[0073] (5) 每孔加入10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱孵育2h后取出。

[0074] (5) 用酶标仪读取96孔板在450nm和630nm的吸光值,以630nm为参比波长,在450nm处测定吸光度,记录测定结果。

[0075] 促细胞粘附率=(实验组450nm吸光值-阴性对照组450nm吸光值)/阴性对照组450nm吸光值 \times 100%。

[0076] 结果如图6、图7所示,细胞粘附实验结果表明,重组人胶原蛋白肽有较好的促细胞粘附效果,和普通胶原蛋白相比,本发明优化后的重组人胶原蛋白肽促细胞粘附率更高。

[0077] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 广州启妆生物科技有限公司

[0003] <120> 一种重组人胶原蛋白肽及其应用

[0004] <160> 4

[0005] <170> PatentIn version 3.3

[0006] <210> 1

[0007] <211> 272

[0008] <212> PRT

[0009] <213> 人工合成

[0010] <400> 1

[0011] Met Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro

[0012] 1 5 10 15

[0013] Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly

[0014] 20 25 30

[0015] Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro

[0016] 35 40 45

[0017] Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser

[0018] 50 55 60

[0019] Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly

[0020] 65 70 75 80

[0021] Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro

[0022] 85 90 95

[0023] Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala

[0024] 100 105 110

[0025] Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly

[0026] 115 120 125

[0027] Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Lys

[0028] 130 135 140

[0029] Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Pro Gly

[0030] 145 150 155 160

[0031] Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Gln Gly

[0032] 165 170 175

[0033] Leu Pro Gly Thr Gly Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro Gly Glu

[0034] 180 185 190

[0035] Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Gly Lys

[0036] 195 200 205

[0037] Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly

[0038] 210 215 220

[0039]	Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu Gly Gly	
[0040]	225	230 235 240
[0041]	Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly Thr Pro	
[0042]		245 250 255
[0043]	Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Pro Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly Gly	
[0044]		260 265 270
[0045]	<210> 2	
[0046]	<211> 819	
[0047]	<212> DNA	
[0048]	<213> 人工合成	
[0049]	<400> 2	
[0050]	atggggcctc aaggtattgc tggacagcgt ggtgtggtcg gcctgcctgg tcagagagga	60
[0051]	gagagaggct tccttgggtct tcttgcccc tctggtgaac ctggcaaaca aggtccctct	120
[0052]	ggagcaagtg gtgaacgtgg tccccctggt cccatgggcc cccctggatt ggctggacct	180
[0053]	cctggtgaat ctggacgtga gggggctcct ggtgccgaag gttcccctgg acgagacggt	240
[0054]	tctcctggcg ccaagggtga ccgtggtgag accggcccc ctggaccccc tgggtctcct	300
[0055]	ggtgctcctg gtgccccctgg ccccgttggc cctgctggca agagtgggtga tcgtggtgag	360
[0056]	actggtcctg ctggtccccg cggagaacga ggtggccctg gaggacctgg ccctcagggt	420
[0057]	cctcctggaa agaatggtga aactggacct cagggacccc cagggcctac tgggcctggt	480
[0058]	ggtgacaaag gagacacagg accccctggt ccacaaggat tacaaggctt gcctggtaca	540
[0059]	ggtggtcctc caggagaaaa tggaaaacct ggggaaccag gtccaaaggg tgatccggt	600
[0060]	gcacctggag ctccaggagg caagggtgat gctggtgccc ctggtgaacg tggacctcct	660
[0061]	ggattggcag gggccccagg acttagaggt ggagctggtc cccctggtcc cgaaggagga	720
[0062]	aagggtgctg ctggtcctcc tgggccacct ggtgctgctg gtactcctgg actacaagga	780
[0063]	atgcctggcc cgccaggtcc atgctgtgga ggtggataa	819
[0064]	<210> 3	
[0065]	<211> 272	
[0066]	<212> PRT	
[0067]	<213> 人工合成	
[0068]	<400> 3	
[0069]	Met Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val Gly Leu Pro	
[0070]	1	5 10 15
[0071]	Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly	
[0072]		20 25 30
[0073]	Glu Pro Gly Lys Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ser Gly Glu Arg Gly Pro	
[0074]		35 40 45
[0075]	Pro Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly Pro Pro Gly Glu Ser	
[0076]		50 55 60
[0077]	Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg Asp Gly	

[0078]	65	70	75	80
[0079]	Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro			
[0080]		85	90	95
[0081]	Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala			
[0082]		100	105	110
[0083]	Gly Lys Ser Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Ala Gly			
[0084]		115	120	125
[0085]	Glu Arg Gly Gly Pro Gly Gly Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Lys			
[0086]		130	135	140
[0087]	Asn Gly Glu Thr Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Pro Gly			
[0088]		145	150	155
[0089]	Gly Asp Lys Gly Asp Thr Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Gln Gly			
[0090]		165	170	175
[0091]	Leu Pro Gly Thr Gly Gly Pro Pro Gly Glu Asn Gly Lys Pro Gly Glu			
[0092]		180	185	190
[0093]	Pro Gly Pro Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Gly Lys			
[0094]		195	200	205
[0095]	Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Leu Ala Gly			
[0096]		210	215	220
[0097]	Ala Pro Gly Leu Arg Gly Gly Ala Gly Pro Pro Gly Pro Glu Gly Gly			
[0098]		225	230	235
[0099]	Lys Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly Thr Pro			
[0100]		245	250	255
[0101]	Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Pro Pro Gly Pro Cys Cys Gly Gly Gly			
[0102]		260	265	270
[0103]	<210> 4			
[0104]	<211> 819			
[0105]	<212> DNA			
[0106]	<213> 人工合成			
[0107]	<400> 4			
[0108]	atggggcctc aaggtattgc tggacagcgt ggtgtggtcg gcctgcctgg tcagagagga 60			
[0109]	gagagaggct tccttggtct tcttgcccc tctggtgaac ctggcaaaca aggtccctct 120			
[0110]	ggagcaagtg gtgaacgtgg tccccctggt cccatgggcc cccctggatt ggctggacct 180			
[0111]	cctggtgaat ctggacgtga gggggctcct ggtgccgaag gttccccctgg acgagacggt 240			
[0112]	tctcctggcg ccaagggtga ccgtggtgag accggcccc ctggaccccc tgggtctcct 300			
[0113]	ggtgctcctg gtgccccctgg ccccgttggc cctgctggca agagtgggtga tcgtggtgag 360			
[0114]	actggtcctg ctggtcccc cggagaacga ggtggccctg gaggacctgg ccctcagggt 420			
[0115]	cctcctggaa agaatggtga aactggacct cagggacccc cagggcctac tgggcctggt 480			
[0116]	ggtgacaaag gagacacagg accccctggt ccacaaggat tacaaggctt gcctggtaca 540			

[0117] ggtggtcctc caggagaaaa tggaaaacct ggggaaccag gtccaaaggg tgatgccggt 600
[0118] gcacctggag ctccaggagg caagggtgat gctggtgccc ctggtgaacg tggacctcct 660
[0119] ggattggcag gggccccagg acttagaggt ggagctggtc cccctgggtcc cgaaggagga 720
[0120] aagggtgctg ctggtcctcc tgggccacct ggtgctgctg gtactcctgg tctgcaagga 780
[0121] atgcctggcc cgccagggtcc gtgctgtggc ggtggctaa 819

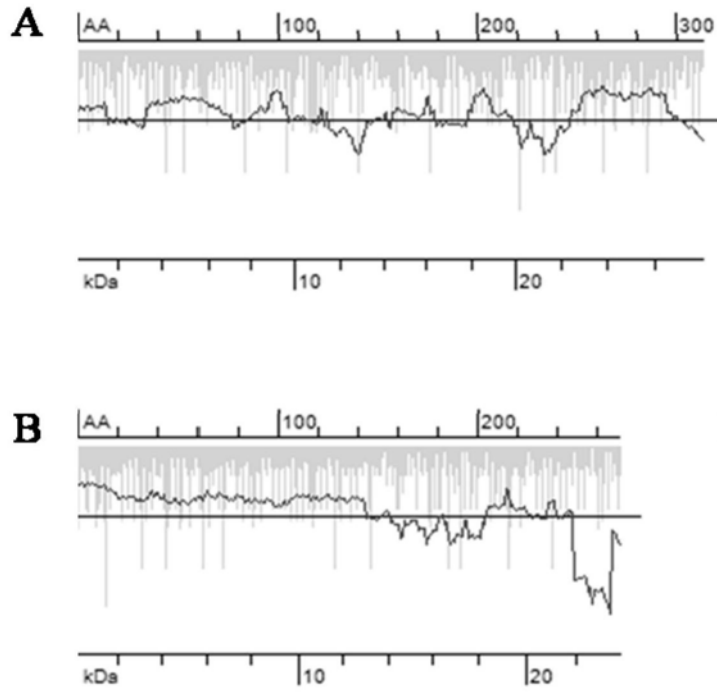


图1

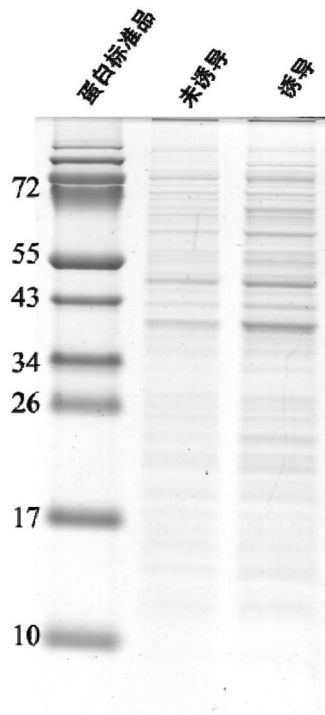


图2

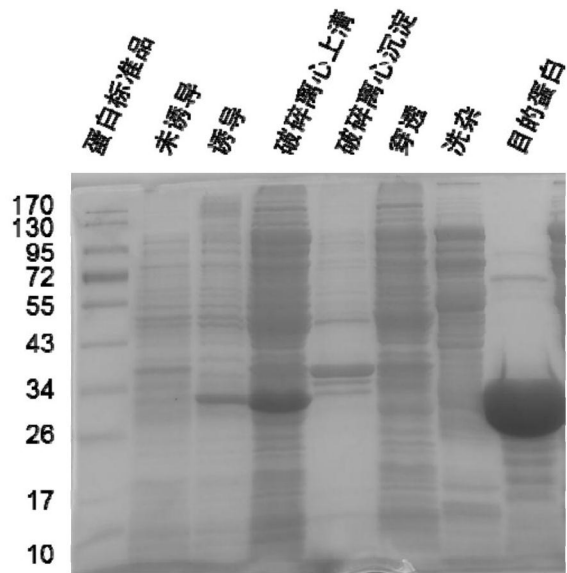


图3

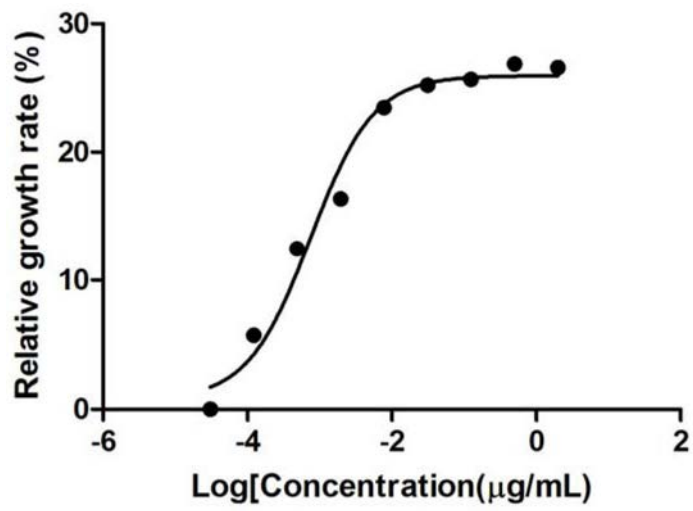


图4

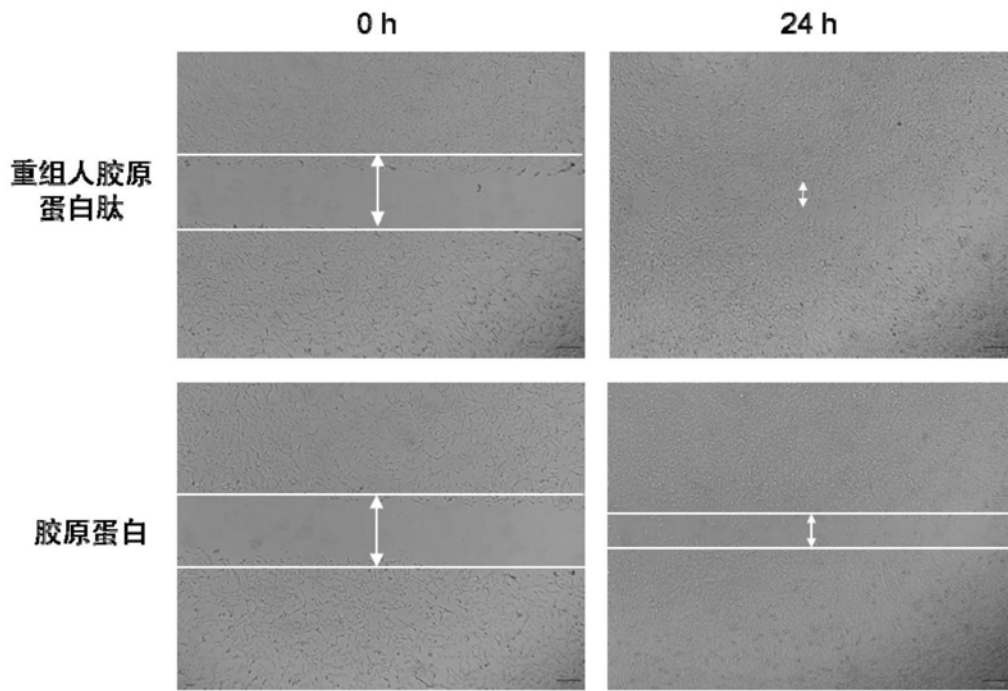


图5

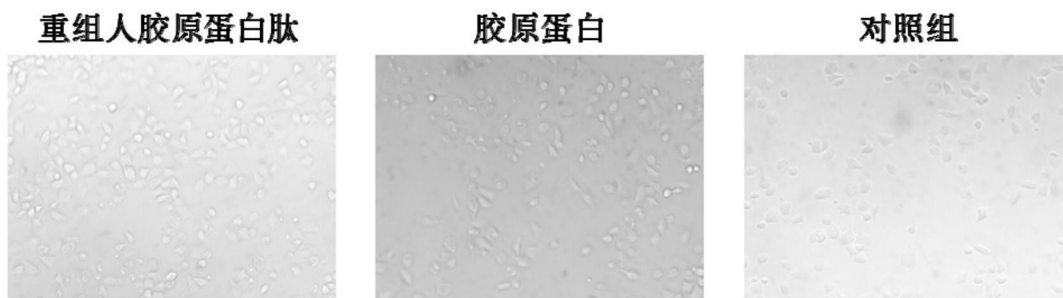


图6

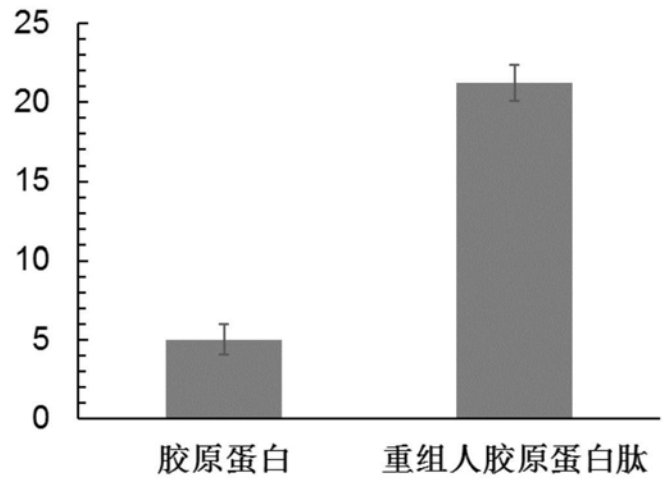


图7