

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/78

C12P 21/02



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01106757.8

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1196712C

[22] 申请日 2001.2.21 [21] 申请号 01106757.8

[71] 专利权人 范代娣

地址 710075 陕西省西安市西北大学化工系

[72] 发明人 范代娣

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 西安新思维专利事务所有限公
司

代理人 李 罡

权利要求书 3 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 一种类人胶原蛋白及其生产方法

[57] 摘要

本发明公开一种类胶原蛋白及通过基因工程菌生产类胶原蛋白的方法。其类人胶原蛋白的生产方法包括：类人胶原蛋白的工程菌的构建；将工程菌的发酵培养；再经类人胶原蛋白的诱导及表达，提纯，获得目的蛋白。该方法获得的重组蛋白在单细胞内的表达高，其类胶原蛋白为螺旋结构，异于动物体原蛋白的交叉结构，因此它具有很好的可加工性而不改变其分子量，因此类人胶原蛋白可加工成手术缝合线、人工皮肤、胶片余层，人工器官涂层等，也可与卤化银、染料等结合形成具有优良表面粘性的涂料。

1、一种类人胶原蛋白，其特征在于：其序列如下

HDP VVL QRR DWE NPG VTQ LNR HLA HAH PPF ASD HPM GAP
GPA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP
GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA
GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAH GPA GAL GAH
GPA GPL GPA GPP GSA GAP GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH
GPA GPL GAH GPA GPL GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA
GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAP
GPA GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP
GPA GPP GSA GAP GPP GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA
GPL GAH GPA GPL GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GSA GAP GPP GAP GPA

GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAM GAP
 GAT GLS AGA THG LVT CGL ,

所述结构为三链、三螺旋结构，其核酸长度为 1071bp。

2、根据权利要求 1 所述的类人胶原蛋白的生产方法，其特征在于：

- 1)、类人胶原蛋白的工程菌的构建；
- 2)、工程菌的发酵培养；
- 3)、类人胶原蛋白的诱导及表达；
- 4)、类人胶原蛋白的提纯。

3、根据权利要求 2 所述的类人胶原蛋白的生产方法，其特征在于：

所述类人胶原蛋白的工程菌的构建如下：

- 1)、将人体已知胶原蛋白序列的一段基因抽提出来并进行修饰后，再特定重复，然后进行连接，DNA 重组；
- 2)、将重组 DNA 转入到大肠杆菌。

4、根据权利要求 2 所述的类人胶原蛋白的生产方法，其特征在于：

所述工程菌的发酵培养基为：

酵母粉	10-30g/L	葡萄糖	15-38g/L
NaHPO ₄	2.5-8.7g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.6-5.6g/L
FeCl ₃	0.8-1.6 g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1-0.3 g/L
ZnSO ₄	0.1-0.3 g/L		

5、根据权利要求 2 所述的类人胶原蛋白的生产方法，其特征在于：

所述工程菌的发酵培养条件为

培养温度 34℃，pH7.0 溶氧 DO 20%，空气流量为 1VVM-4VVM，搅拌转速 450r / min-1000r / min，接种量 5%，种子培养基，LB 培养基、卡

那霉素 0.5mg / L、葡萄糖 5g / L，以葡萄糖浓度控制 1.5%为宜，用 D
O 量控制为 40%为宜，当 OD₆₀₀ 的值为 100 时收获细胞。

6、根据权利要求 2 所述的类人胶原蛋白的生产方法，其特征在于
所述类人胶原蛋白的提纯如下：

细胞经离心收集后经高压细胞匀浆，然后用缓冲液抽提，经过第一
次甲酸或乙酸缓冲液盐析后，接着进行离子树脂交换，再经金属离子螯
合吸附，精制和除热源，精品去冷冻干燥。

一种类人胶原蛋白及其生产方法

本发明涉及一种类人胶原蛋白及通过基因工程菌生产类人胶原蛋白的方法。

胶原蛋白是人体固有蛋白之一，它在皮肤里的含量最多，由于胶原蛋白固有的生物兼容性、生物降解性和吸收性、促新细胞形成及促上皮细胞形成功能，胶原蛋白在医学领域、美容、化妆品、保健品行业的潜在用途不断拓宽，但是，动物体胶原蛋白是一种硬蛋白（水不溶），并且随着年龄的增长，内部双键越来越多，同时也越来越硬。一般，经酶解获得的胶原蛋白为水不溶性蛋白，也不可能在不改变分子量情况下重溶解。因此，可加工性能很弱，直接限制了许多潜在用途的开发。另外，来自动物体的胶原蛋白不可能排除病毒隐患，同时始终带有牛胶原的特性，为了降低其免疫排异反应，科学家们曾想法从人胎盘中获取胶原蛋白，但是，该研究受到世界人权组织及 FDA 的阻力，因为，不能确切检测每个胎盘组织的病毒和细菌。

在现有技术中，国内外市场小批量胶原蛋白的生产均来自动物皮、跟腱、软骨和人胎盘的提取物。其提取工艺分三步，一、溶解；二、酶处理；三、纯化。但通过动物皮提取类胶原蛋白可能带有各种病毒，因此动物皮及脏器提取物的各种产品直接用于人体会造成严重隐患。

国外报道用重组技术生产胶原蛋白研究有：重组酵母细胞生产准人胶原蛋白 II，重组哺乳动物细胞生产准人胶原蛋白 I，II，III型，重组啤酒酵母细胞生产准人胶原蛋白 VI，重组昆虫细胞生产准人胶原

蛋白 II, 表达量为 50mg / ml, 人肿瘤细胞生产准人纤维胶原 1A1 和 1A2, 由于动物细胞培养成本昂贵, 周期长, 一般 15 天甚至更长, 另外培养规模只能限于实验规模, 要满足产业化、大批量需求几乎是完全不可能。另外, 这些重组类胶原蛋白都必须有后转化酶的参与, 必须有一个后转化工艺, 到目前为止, 用重组动物细胞生产胶原蛋白必须 8 种后转化酶的参与, 转化工艺相当复杂。

本发明目的是提供一种能在单细胞内取得高表达的类人胶原蛋白, 其具有优于动物体胶原蛋白的独特的化学结构和性能, 同时提供该胶类人原蛋白的生产方法。

为达到上述目的, 本发明所采用的技术方案为:

一种类人胶原蛋白, 其特殊之处在于: 其序列为

HDP VVL QRR DWE NPG VTQ LNR HLA HAH PPF ASD HPM GAP
 GPA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
 GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
 GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP
 GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA
 GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
 GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
 GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH
 GPA GPL GAH GPA GPL GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA
 GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
 GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
 GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAP

GPA GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP
 GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP
 GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP
 GPA GPP GSA GAP GPP GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA
 GPL GAH GPA GPL GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GSA GAP GPP GAP GPA
 GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP
 GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA GAP GPP GAP GPA GPP GSA
 GAP GPP GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAH GPA GPL GAM GAP
 GAT GLS AGA THG LVT CGL ,

其结构为三链、三螺旋结构，其核酸长度为 1071bp。

一种类人胶原蛋白的生产方法，其特殊之处在于：它包括以下步骤

- 1)、类人胶原蛋白的工程菌的构建；
- 2)、工程菌的发酵培养；
- 3)、类人胶原蛋白的诱导及表达；
- 4)、类人胶原蛋白的提纯。

一种类人胶原蛋白的生产方法，其特殊之处在于：所述类人胶原蛋白的工程菌的构建如下：

- 1)、将人体已知胶原蛋白序列的一段基因抽提出来并进行修饰后，再特定重复，然后进行连接，DNA 重组；
- 2)、将重组 DNA 转入到大肠杆菌；

一种类人胶原蛋白的生产方法，其特殊之处在于：所述工程菌的

发酵培养基为：

酵母粉	10-30g/L	葡萄糖	15-38g/L
NaH ₂ PO ₄	2.5-8.7g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.6-5.6g/L
FeCl ₃	0.8-1.6 g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1-0.3 g/L
ZnSO ₄	0.1-0.3 g/L		

一种类人胶原蛋白的生产方法，其特殊之处在于：所述工程菌的发酵培养条件为：

培养温度 34℃，PH7.0 溶氧 DO 20%，空气流量为 1VVM-4VVM，搅拌转速 450r/min-1000r/min，接种量 5%，种子培养基，LB 培养基、卡那霉素 0.5mg/L、葡萄糖 5g/L，以葡萄糖浓度控制 1.5%为宜，用 DO 量控制为 40%为宜，当 OD₆₀₀ 的值为 150 时收获细胞。

一种类人胶原蛋白的生产方法，其特殊之处在于所述类人胶原蛋白的提纯如下：

细胞经离心收集后经高压细胞匀浆，然后用缓冲液抽提，经过第一次甲酸缓冲液盐析后，接着进行离子交换，再经金属离子螯合吸附，精制和除热源，精品去冷冻干燥。

下面结合具体实施例，详细描述本发明如下：

类人胶原蛋白的生产方法包括：类人胶原蛋白的工程菌的构建；工程菌的发酵培养和诱导；胶原蛋白的提纯，获得目的蛋白。

一、类人胶原蛋白的工程菌的构建

(一)、从 E. coli 菌株制备质粒 DNA：

在小规模制备时：质粒 DNA 从 1.5ml 大肠杆菌培养物经酸溶解法制备。

在大规模制备时：载体菌株在含有抗菌素的培养基上培养过夜，

离心收集细胞、离心速度 10000r/min 5 分钟, 然后重新悬浮于 10ml 冰冷的 TE 缓冲液溶液(10ml EDTA, pH 8,)再离心, 再悬浮于 4ml TES (TE 及 20%的蔗糖液中), 加入溶解酶培养 5 分钟后加入 2ml 0.5M EDTA, 培养 10 分钟后加入蛋白溶解酶及溶解缓冲液, 后经培养、离心收集 (35000r / min 收集 2hr) 后上清液转入离心管按比例加入 CsCl 等。

(二)、DNA 醇析

在 DNA 样品中加入 10%的醋酸钠 (pH7.5) 及 3 倍体积的冷乙醇, -70 °C 培养 30min, 此时 DNA 析出。4 °C 离心 5min 后将上清液重新醇析 (用 80%的冷乙醇), 之后重新溶入 DNA 缓冲液中。

(三)、DNA 限制性内切酶消化

将 DNA 用限制性内切酶在其相应的缓冲液中用酶消化, DNA 浓度维持 4%, 37 °C 培养 3hr, 缓冲液配比 (0.37mol / L Tris, 0.74mol / L 醋酸钠), 0.2mol / L 乙酸镁 0.05mol / L DTT (二硫苏糖醇), PH=8.0

(四)、DNA 电泳分析

于 DNA 样品中加入电泳缓冲液, 50V 恒压下运行 20hr。缓冲液配比同常规电泳缓冲液。

实施例 1: D1 型胶原蛋白

用限制性内切酶 HindIII 合成 PPD1121 质粒进行消化, 然后用琼脂糖分离, 取胶原蛋白基因片段, 纯化后与消化后的质粒 PSC101 缝合, 缝合 DNA 转入大肠杆菌 BL21 或 HB101 中, 用卡纳霉素进行克隆选择。将克隆株重新培养, 用 SDS—Page 进行抗性识别和蛋白表达分析。

(五)、DNA 连接

在 DNA 缝合粘合剂作用下于室温下反应 2hr。对钝端反应剂为每微克 DNA 加入 $MgCl_2$ 5mmol / μg 、Tris-HCl 20-25mmol / μg 、DTT 5-10mmol

/ μg 、BSA 180-220mg / μg 、ATP 0.5-0.75mmol 和 400-450 单位。

T4 DNA 连接酶，缝合反应室温下 1hr-2hr。

(六)、DNA 琼脂糖连接

将琼脂糖溶解(65°C)，降至 37°C时，加入缝合缓冲液，室温缝合 1hr。

(七)、DNA 纯化及琼脂糖 DNA 纯化

分别依据 Millipore ultrafree—probind filter Unit 处理，或用 Bio-Spin 6 Column 柱处理。

(八)、转细菌方法

1、E. coli 细胞的制备

接种大肠杆菌细胞 BL21 于无菌 LB 培养基中 34°C 振荡培养，当 OD_{600} 为 0.5 时，置于冰浴中 10min，然后离心分离(6000r / min 下 10min)，细胞收集物重新悬浮于 0.1MMgCl₂ 溶液中冰浴 40min 中，离心收集，于细胞收集物中加入冰浴过的 100mM CaCl₂ 2ml，无菌条件下，冰浴培养 24hr，细胞被分到小离心管内-70°C 保存。

2、E. coli 转化

将细胞解冻并冰浴，每 50 μl 细胞加 1 μg DNA，冰浴 30 分钟，然后 42°C 水浴 2 分钟，加入 1ml LB 培养基，将混合物转入 34°C 振荡培养 2hr。此时 10%的转化物含有抗菌素。

(九)、蛋白表达分析

在摇瓶内装入 10%LB 培养液加入 5%的卡那霉素于 34°C 培养过夜，当 OD_{600} 达 1 时，将温度调至 42°C 培养 2hr 后冰浴，以备免疫印标实验用。

(十)、免疫印迹实验

依据蛋白电泳实验程序，将凝胶一维电泳转化到二维凝胶电泳，然后经过牛奶培养，用小鼠抗体 IgG 及磷酸丝氨酸抗体 PSR-45 进行免疫印迹实验。

(十一)、氨基酸含量分析

使用氨基酸分析仪，样品经 6 N H C L 水解。

(十二)、DNA 序列分析

使用 DNA 序列分析仪

(十三)、氨基酸序列分析

使用氨基酸序列分析仪

二、工程菌的发酵培养和诱导

发酵条件

培养温度 34℃，pH7.0 溶氧 DO 20%，空气流量为 1VVM-4VVM，搅拌转速 450r / min-1000r / min，接种量 5%，种子培养基，LB 培养基、卡那霉素 0.5mg / L、葡萄糖 5g / L。

流加策略：以葡萄糖浓度控制 1.5%为宜，用 D O 量控制为 40%为宜。

当 OD₆₀₀ 的值为 100 时将培养温度调节到 42℃ 诱导 2 小时收获细胞。

发酵培养基为：

酵母粉	10-30g/L	葡萄糖	15-38g/L
NaH P O ₄	2.5-8.7g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.6- 5.6g/L
FeCl ₃	0.8-1.6 g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1-0.2 g/L
ZnSO ₄	0.1-0.3 g/L		

发酵培养基的最佳方案为：

酵母粉	20 g/L,	葡萄糖	30g/L
NaH P O ₄	6.7g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6g/L

微量元素 FeCl_3 1.2g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L
 ZnSO_4 0.2 g/L

补料培养基：10 倍浓缩的发酵培养基

三、类人胶原蛋白的提纯

分离纯化工艺

离心收集→细胞匀浆→缓冲液抽提→盐析→离子交换→柱层析精制→冷冻干燥

细胞经离心后加入缓冲液(Tris pH8.0, 10mM EDTA)按 5 倍于细胞湿重加缓冲液体积。超声破碎 20min 后, 用甲酸缓冲液盐析粗提后, 用离子交换树脂吸附以 0.5M NaCl、20mM Tris pH8.0 洗脱后, 再用金属螯合柱吸附、洗脱, 收集蛋白冷冻干燥。

本发明将人体已知序列的胶原蛋白的一段基因经修饰后进行特定重复而后克隆到大肠杆菌中, 籍细胞的快速繁殖在特定条件下通过诱导获得的, 并经过对其水溶性、免疫排异性、稳定性、成胶性、吸收性等特性的改进, 使其产品结构及性能在国内、外属首创。该发明取得了胶原蛋白的高表达, 其表达量为 20-50%, 其生成的类人胶原蛋白脯氨酸较动物体胶原蛋白少 40%-60%, 这给本发明生产的类人胶原蛋白增添了很多动物体胶原蛋白不具备的优势, 其化学活性氨基酸部位更多, 其衍生物种类将更加多样化, 其性能将更能满足不同行业的需求。

该技术所产生的类人胶原蛋白不但具有动物体胶原蛋白固有的生物兼容性及生物重吸收性, 而且在特定温度下具有热可逆成胶的特性; 具有低免疫排异反应和无病毒隐患的优点, 它可以实现高分子胶原蛋

白在单细胞内的高表达；它产生的类人胶原蛋白为螺旋结构，具有优于动物体胶原蛋白的独特的化学结构和性能，如热可逆成胶性，水溶性，低免疫排异反应等，例如，为了降低生物体胶原蛋白的免疫排异反应，我们使用的三肽链含有带有简单侧链的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸等进行独特的序列重复，这种重复序列来自生物体已知胶原蛋白序列的结构中的一部分，改进了生物体胶原蛋白的——GXY结构（这里的X，Y可以是任何氨基酸，）。动物体胶原蛋白由于旋转、定型等不可能在不减少分子量条件下重溶解，因此类人胶原蛋白便可加工成手术缝合线人工皮肤、胶片涂层，人工器官涂层等，也可与卤化银、染料等结合形成具有优良表面粘性的涂料。