说明书

发明名称: 具有三螺旋结构的重组ⅩⅦ型胶原蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质工程技术领域，尤其涉及具有三螺旋结构的重组ⅩⅦ型胶原蛋白及其应用。

背景技术

[0002] XVII型胶原蛋白在体内含量极其微量，极难通过提取方式直接获得，且该方法成本高，故目前基本都用重组方式实现体外量产，涉及的常用的体外重组表达系统有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞等。

[0003] 天然胶原蛋白具有独特的三螺旋结构，与其稳定性及促细胞增殖、粘附、迁移等多种生物学活性密切相关（Marion，2010年）。XVII型胶原蛋白全长1497个氨基酸，包含胞内结构域、跨膜结构域和胞外结构域，进一步划分为16个非三螺旋区和15个三螺旋区，交错排列，体外重组表达难度大，产量低、易降解，而需要组装成天然的非三螺旋与三螺旋交错的天然构象更为困难。

[0004] 专利公开号CN110845603A选取C15螺旋区的截短序列及XVII型胶原蛋白C端接近130个氨基酸进行表达验证，具有较好的产量，采用大肠杆菌表达系统，无翻译后修饰活性；专利公开号CN116640205A采用毕赤酵母表达系统，选取非螺旋区NC16、C15螺旋区的截短序列及XVII型胶原蛋白C端进行拼接组合；专利公开号CN116751282A采用酿酒酵母表达系统，C15螺旋区的截短序列及C1螺旋区进行拼接组合。但上述技术都未显示能够形成胶原蛋白天然的三螺旋结构。

[0005] 在作为护肤品成分之一时，胶原蛋白天然的胶束结构和大分子量特性，使其不易透过皮肤屏障到达真皮层发挥作用。

发明概述

技术问题

[0006] 综上，现有技术存在以下问题：1）受限于传统的原核表达系统，重组胶原蛋白翻译后未修饰；2）未形成高级的三螺旋构象；3）生物活性低；4）稳定性差；5）天然胶原蛋白分子量大，不易透皮等。

技术解决方案

[0007] 有鉴于此，本发明的第一目的在于提供一种具有三螺旋结构的重组ⅩⅦ型胶原蛋白，本发明提供的重组胶原蛋白纯度高、热稳定性好、生物活性高，且分子量显著小于天然全长的胶原蛋白，实验表明具有促细胞迁移等多种生物活性。

[0008] 本发明所述一种重组ⅩⅦ型胶原蛋白，其氨基酸序列包含n个核心单元，其中n是1或大于1的整数，所述核心单元的氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示。

[0009] 优选地，所述蛋白是由n个核心单元进行重复串联形成，其头部和尾部还可以拼接多个氨基酸，优选为1-2个氨基酸。

[0010] 优选地，所述n选自3、4、5、6、7、8中的任一个数值。最优选地，所述n选自8。

[0011] 所述的重复串联可以是核心单元头尾相串联，还可以是由连接子（linker）将核心单元串联起来，所述linker优选含有甘氨酸（Gly）和/或丝氨酸（Ser），所述linker优选含有1-5个氨基酸。

[0012] 优选地，所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO：2-7任一项所示。

[0013] 本发明提供了编码所述的重组ⅩⅦ型胶原蛋白的基因。

[0014] 所述编码包括由DNA分子转录形成RNA产物，随后翻译所产生的蛋白；或由DNA分子转录以提供RNA产物，经加工以提供加工的RNA产物，随后翻译而产生的蛋白。

[0015] 本发明提供了表达所述的重组ⅩⅦ型胶原蛋白的重组载体，包括所述的基因。

[0016] 载体包括衍生自任何来源并且能够基因组整合或自主复制的任何核酸分子（例如质粒、粘粒、病毒、自主复制的多核苷酸分子、噬菌体、或线性或环状单链或双链DNA或RNA核酸分子），其包含已可操作连接的一种或更多种核酸分子的核酸分子。载体可以包括，例如一个或多个可选择的标记物、一个或多个复制起点（例如原核和真核起点）、至少一个多克隆位点、和/或促进构建

体稳定整合到宿主细胞基因组中的元件。优选的，所述载体包括但不限于pET28a、pCDFDuet-1、pPICZαA和pPIC9k。

[0017] 在本发明中，载体可以单独克隆有所述重组人III型胶原蛋白基因，也可以在同一载体上克隆有脯氨酸羟化酶基因和/或赖氨酸羟化酶基因与重组人III型胶原蛋白基因。

[0018] 本发明提供了表达所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的重组细胞，所述重组细胞中转染有所述的重组载体。

[0019] 所述重组细胞包括但不限于大肠杆菌、毕赤酵母。

[0020] 本发明的第二目的是提供所述重组ⅩⅧ型胶原蛋白表达的方法。

[0021] 在一优选例中，所述重组ⅩⅧ型胶原蛋白是在大肠杆菌优选在大肠杆菌BL21(DE3)中表达，包括以下步骤：

[0022] 1）将所述的基因连接到载体pET28a上获得重组载体；

[0023] 2）将所述的重组载体转染至大肠杆菌BL21(DE3)中获得重组细胞；

[0024] 3）培养所述的重组细胞后，离心，收集上清液；

[0025] 4）从所述的上清液中分离纯化获得所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白。

[0026] 更优选地，还包括将编码羟化酶L593和L230的基因片段，构建到表达载体pCDFDuet-1上获得重组载体pCDFDuet-1-L593-L230，转染至大肠杆菌BL21(DE3)。

[0027] 更优选地，步骤3）所述的培养包括加入终浓度为10mg/ml 的抗坏血酸、1mM $FeSO_4$和1mM的IPTG诱导表达目的蛋白，能够使目的蛋白的热稳定性进一步提高。

[0028] 在另一优选例中，所述重组ⅩⅧ型胶原蛋白是在大肠杆菌优选在毕赤酵母GS115中表达，包括以下步骤：

[0029] 1）将所述的基因连接到载体pPICZαA上获得重组载体；

[0030] 2）将所述的重组载体转染至毕赤酵母GS115中获得重组细胞；

[0031] 3）培养所述的重组细胞后，离心，收集上清液；

[0032] 4）从所述的上清液中分离获得所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白。

[0033] 更优选地，还包括将编码羟化酶BaP4H的基因片段，构建到表达载体pPIC9k上获得重组载体pPIC9k-BaP4H，转染至毕赤酵母GS115。

[0034] XVII型胶原蛋白除了是皮肤老化和创伤修复的关键因子，还是维持毛囊干细胞防止脱发和白发等具有重要作用。Col17A1在毛囊干细胞（HFSCs）中高度表达，Col17A1对维持毛囊干细胞和黑素细胞干细胞（MSCs）至关重要（Shintaro Tanimura，2011年）。胶原蛋白因具有良好的生物相容性、生物可降解性而被广泛研究和应用于生物材料领域，如组织工程支架、可吸收缝合线等。

[0035] 因此，本发明的第三目的是提供所述的重组ⅩⅦ型胶原蛋白、所述制备方法制备获得的重组ⅩⅦ型胶原蛋白包括有以下任一项中的应用：

[0036] i）促进细胞增殖；

[0037] ii）促进细胞迁移；

[0038] iii）制备化妆品；

[0039] iv）制备医用材料。

[0040] 所述的促进细胞增殖，可以作为培养液基本成分促进细胞增殖，包括应用于体外毛囊干细胞或毛囊组织的培养和保存。

[0041] 所述的促进细胞迁移，可以作为培养液基本成分促进细胞迁移，包括应用于体外毛囊干细胞或毛囊组织的培养和保存。

[0042] 所述的化妆品包括但不限于护肤液、护肤霜、精华水、面膜、头皮精华液、洗发露。

[0043] 所述的医用材料包括但不限于填充材料、修复材料、植入剂、组织工程支架、止血剂、药物释放载体，其中修复材料包括但不限于骨修复材料、创面敷料、缝合线。

[0044] 本发明还提供一种包括美容上或药学上有效量的至少一种根据前述的蛋白以及至少一种赋形剂或美容上或药学上可接受的佐剂的组合物。在一些实施方式中，所述组合物的剂型包括但不限于膏霜、乳液、水剂、凝胶、油剂、粉剂、泥类、贴类、膜类或冻干类；进一步地，为了促进胶原蛋白分子透皮吸收，可以利用无纺布等固体载体制备成贴类产品，贴敷于面部，延长胶原蛋白液与皮肤表面的作用时间。本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白可与重组或天然的I型胶原蛋白

、Ⅱ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、V型胶原蛋白、纤连蛋白、人表皮生长因子等生物活性成分串联制备使用，还可以与上述生物活性成分在分别制备后混合使用。

有益效果

[0045] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0046] 1）本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白，理论分子量约为33kDa，显著小于天然全长的胶原蛋白（150kDa），为胶原蛋白穿过皮肤屏障发挥生物学功能减少障碍，且具有促细胞迁移的作用；

[0047] 2）本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白具有高级的三螺旋结构，分子结构稳定，其热稳定性能够维持在40℃。

[0048] 3）本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白序列是基于人ⅩⅦ型胶原的原始氨基酸序列，优化选择其中生物活性高、稳定高级结构的部分，得到了全新的重组ⅩⅦ型胶原蛋白序列，具有良好生物相容性等特点；

[0049] 4）本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白具有非常良好的促细胞迁移活性。

附图说明

[0050] 图1为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=3）的SDS-PAGE图。

[0051] 图2为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=4）的SDS-PAGE图。

[0052] 图3为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=5）的SDS-PAGE图。

[0053] 图4为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=6）的SDS-PAGE图。

[0054] 图5为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=7）的SDS-PAGE图。

[0055] 图6为在大肠杆菌表达系统中，本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白LY1701（n=8）的SDS-PAGE图。

[0056] 图7为在毕赤酵母表达系统中，本发明重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白LY1701（n=8）的SDS-PAGE图。

[0057] 图8为本发明重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白LY1701（n=3、4、5、6、7、8）在常温下的圆二色谱图。

[0058] 图9为本发明重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白LY1701（n=3、4、5、6、7、8）在不同温度下的圆二色谱图。

[0059] 图10为本发明重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白LY1701（n=8）的细胞划痕实验结果图。

[0060] 图11为本发明重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白LY1701（n=8）的细胞划痕恢复面积分析图。

本发明的最佳实施方式

[0061] 在本发明中，重组Ⅹ Ⅶ型胶原蛋白以核心单元（SEQ ID NO：1）为基础重复串联形成，该系列包含核心单元重复次数为3、4、5、6、7、8，可以在大肠杆菌、酵母表达系统生产及纯化得到，能够发挥促细胞迁移等的生物活性。

本发明的实施方式

[0062] 在本发明中，所述基因可以通过生物技术公司合成获得。本发明对所述重组载体、重组细胞的制备方法没有特殊限定，采用本领域常规的重组载体、重组细胞的制备方法即可。

[0063] 本发明对所述分离纯化的方法没有特殊限定，采用本领域常规的蛋白分离纯化方法即可；优选的技术方案参见实施例记载。

[0064] 本发明对胶原蛋白的结构表征是采用本领域常用的圆二色谱法(circular dichroism，CD)，CD是用于测定具有手性结构、能产生左右旋光差异性吸收的化合物结构，主要用于测定分子结构不对称性的光谱学方法。一般生物大分子中均含有手性的基团和结构，因而CD常用来测量和观察生物大分子的结构和构象的变化。胶原蛋白三螺旋结构的CD特征一般是在221 nm附近有一个正吸收峰，在195 nm附近有一个负吸收峰（行业标准YY/T 1849—2022），吸收峰的位置随着氨基酸序列和长度的变化会发生偏移。胶原蛋白的热稳定性包括胶原纤维的热收缩温度（Thermal shrinkage temperature，Ts）和胶原蛋白的热变性温度

（Thermal denaturation temperature，Td）。胶原纤维的热收缩温度是指胶原纤维被加热时，发生轴向收缩，缩短至原长的5%左右时的温度。胶原蛋白的热变性温度是指胶原蛋白在介质中受热，到达一定温度后，三螺旋结构发生解旋，各自形成单链，三螺旋解旋到50%时的温度。因此，CD谱可用来研究胶原蛋白螺旋结构及其热变性过程。

[0065] 在以下实施例中，LY1701是表示以核心单元（SEQ ID NO：1）为基础重复串联形成的系列蛋白，该系列包含核心单元重复次数为3、4、5、6、7、8。

[0066] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明，但不应把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0067] 实施例1 本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701的表达（大肠杆菌表达体系）与分离纯化

[0068] 1.LY1701序列合成

[0069] 以本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701的氨基酸序列（SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7）委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因片段的合成，构建到pET28a大肠杆菌表达载体。羟化酶L593、L230委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因片段的合成，构建到表达载体pCDFDuet-1的两个启动子后。

[0070] 2.构建大肠杆菌表达体系

[0071] 2.1转化

[0072] XVII型胶原蛋白质粒pET28a-LY1701（卡那霉素抗性）和羟化酶质粒pCDFDuet-1-L593-L230（链霉素抗性）双质粒共转化感受态细胞BL21（DE3）（深圳康体生命），冰上静置30 min，42℃水浴热激45 s后，立即置于冰上冷却2 - 3 min，加入900 μl SOC或LB培养基（不添加抗生素），37℃摇菌1 h（转速200 - 250 rpm），同时将卡那霉素和链霉素双抗性的LB固体培养基平板（10g/L蛋白胨，5g/L酵母提取物，10g/L氯化钠，15g/L琼脂，100μg/ml卡那霉素抗生素）在37℃培养箱中预热。摇菌后5000 rpm（2400 × g）离心5 min，弃掉900 μl上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在预热好的双

抗性的平板上轻轻涂匀。37℃培养箱中倒置培养12 – 16 h至长出清晰可见的菌落。

[0073] 2.2 将长有菌落的平板取出，从中挑取单克隆菌落，分别接种于10ml LB液体培养基（含卡那霉素和链霉素抗生素），37℃、220rpm培养过夜，再按1:100的比例中加入到1L的LB培养基（含卡那霉素和链霉素抗生素）中，37℃、220rpm培养3-5h后开始监测OD值，OD_{600}值到1.0-1.2时，加入终浓度为10mg/ml的抗坏血酸（上海生工生物）、1mM $FeSO_4$（上海生工生物）和1mM的IPTG（Biosharp）诱导表达，16℃、180rpm，诱导18-24h。离心收菌进行下一步纯化或-20℃以下冻存菌体。

[0074] 3.蛋白纯化

[0075] 3.1 将诱导结束后的菌液留样跑胶备用后，8000rpm离心20min收集菌体。

[0076] 3.2 配制Ni-NTA（生工生物工程股份有限公司）纯化缓冲液：

[0077] 裂解缓冲液（Lysis buffer）：50mM Tris-HCl，500mM NaCl，10mM 咪唑，5%甘油，pH7.0；

[0078] 洗涤缓冲液（Wash buffer）：50mM Tris-HCl，500mM NaCl，20mM 咪唑，5%甘油，pH7.0；

[0079] 洗脱缓冲液（Elution buffer）：50mM Tris-HCl，500mM NaCl，300mM 咪唑，5%甘油，pH7.0。

[0080] 3.3 配制裂解液

[0081] 裂解液成分（Lysis buffer）：终浓度1mM的PMSF（MIKX）、蛋白酶抑制剂（MCE）、超级核酸酶（碧云天）、终浓度1mM的$MgCl_2$（生工生物）。

[0082] 根据菌体重量，按1:10加入相应体积的裂解液，使用混匀仪将菌体重悬起来，吹打混匀。

[0083] 3.4 亲和纯化

[0084] 提前打开高压均质机（多宁生物）进行预冷。倒入菌液，700-800 bar，循环3次，收集破碎好的菌液。用高速冷冻离心机（贝克曼）4℃，20000rpm，离心1h。离心结束，转移上清至新的50ml 离心管，并用0.45μm滤器过滤。取出Ni-NTA重力柱（1ml Ni-NTA），过滤的纯水清洗5倍柱体积，用lysis buffer润洗

3倍柱体积，用蠕动泵进行上样，蠕动泵管路先用纯水进行大量清洗，再用Lysis buffer进行润洗。然后用蠕动泵将过滤的上清上样至Ni-NTA重力柱中，收集流穿液。用100ml 的Wash buffer洗涤Ni-NTA，收集洗杂液。用Elution buffer洗脱目的蛋白，每次加入1ml，孵育5min，收集洗脱液。

[0085] 3.5 离子交换纯化

[0086] 将目的蛋白透析到缓冲液A（20mM PB，PH=7.0），蛋白样品使用0.22μm，13mm滤膜进行过滤，使用AKTA pure进行阳离子交换（5ml SP柱），缓冲液B（20mM PB和1M NaCl，PH=7.0）进行线性洗脱得到纯度较高的目的蛋白。SDS-PAGE电泳验证蛋白的分子量和纯度，取蛋白样品与蛋白上样缓冲液（DTT）混匀后，置于金属浴中，95℃煮10min后跑胶上样。BCA法测定蛋白浓度，估算蛋白产量。根据蛋白纯度，进行浓缩或冻干保存。

[0087] 4.结果

[0088] 图1-图6的本发明重组XVII型胶原蛋白在大肠杆菌表达、纯化后的SDS-PAGE电泳图。

[0089] 实施例2 本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701的表达（毕赤酵母表达体系）与分离纯化

[0090] 1.LY1701序列合成

[0091] 委托金斯瑞生物科技股份有限公司合成编码本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701的氨基酸序列（SEQ ID NO.7）的基因片段，构建到pPICZalphaA 毕赤酵母表达载体。羟化酶BaP4H委托金斯瑞生物科技股份有限公司进行基因片段的合成，构建到pPIC9k载体。

[0092] 2.构建毕赤酵母表达体系

[0093] 2.1 电转

[0094] XVII型胶原蛋白质粒pPICZalphaA-LY1701通过PCR扩增在SacI位点进行线性化，然后进行PCR片段回收（Thermo GeneJET PCR Purification Kit）。感受态细胞GS115冰上解冻，加入5-10 μg线性化质粒，冰上孵育15min，将质粒和感受态细胞一同加入预冷的电转杯。电转化：电压2000v，电阻200Ω，电容25μF，电转杯直径0.2mm，击穿时间5ms。电转完成后立即加入1ml预冷的山

梨醇，转移至无菌1.5ml离心管，30℃，230rpm活化2h。5000g离心1min，弃去300μl上清，重悬菌体后涂布YPDSZ固体平板（胰蛋白胨20 g/L，酵母浸粉10 g/L，D-山梨醇182.1 g/L，20%葡萄糖，100μg/ml 博来霉素），30℃、230rpm培养48h。

[0095] 2.2 将长有菌落的平板取出，从中挑取单克隆菌落，复制到具有高浓度（400μg/ml或800μg/ml）博来霉素的YPD固体培养基上进行筛选。

[0096] 2.3 将长有菌落的平板取出，从中挑取单克隆菌落，分别接种于50ml YPD液体培养基（含100μg/ml 博莱霉素）进行30℃，230rpm种子液培养过夜。将过夜培养的种子液按照1：50比例接种至1L BMGY培养基（胰蛋白胨20 g/L，酵母浸粉10g/L，磷酸二氢钾（KH_2PO_4）11.73g/L，磷酸氢二钾（K_2HPO_4）2.4g/L，丙三醇 10g/L，YNB 134g/L和1×生物素）中进行放大。30℃，230rpm培养48h。BMGY培养的种子液置于3000rpm离心5min，弃去上清，无菌水重悬，再次3000rpm离心5min，弃去上清，加入1L BMMY培养基（不加甲醇）重悬，并添加1%甲醇诱导，每24h添加1%甲醇。诱导72h后离心收上清纯化。

[0097] 2.4离子交换纯化

[0098] 将目的蛋白透析到缓冲液A（20mM PB，PH=7.0），蛋白样品使用孔径为0.22μm、直径为13mm的滤膜进行过滤，使用AKTA pure进行阳离子交换（5ml SP柱），缓冲液B（20mM PB和1M NaCl，PH=7.0）进行线性洗脱得到纯度较高的目的蛋白。SDS-PAGE电泳验证蛋白的分子量和纯度，取蛋白样品加Protein loading buffer（添加DTT），混匀后，置于金属浴中，95℃，加热10min后，1500rpm 离心1min，取上清进行SDS-PAGE检测。BCA法测定蛋白浓度，估算蛋白产量。根据蛋白纯度，进行浓缩或冻干保存。

[0099] 2.5制备含LY1701表达质粒的酵母感受态细胞

[0100] 挑选表达产量较高的LY1701单克隆菌落于5ml的YPD培养基（博来霉素抗性）进行30℃，230rpm培养过夜，按1:200的比例接种于500ml新鲜YPD培养基（博莱霉素抗性）培养过夜至OD_{600}=1.3-1.5之间。4℃、1500g离心5min收菌体，500ml预冷的无菌水洗涤重悬菌体，再次4℃、1500g离心5min收菌体，预冷无菌水洗3遍，用20ml 浓度为1M的山梨醇洗涤重悬菌体，弃上清，重复洗涤

2-3次，4℃、1500g离心5min收菌体，加500μl浓度为1M的山梨醇重悬菌体，按100μl每管保存在-80℃冰箱。

[0101] 2.6 BaP4H-pPIC9k线性化、电转

[0102] 设计引物在pPIC9k的SalI位点PCR线性化，PCR片段回收（Thermo GeneJET PCR Purification Kit）。将本实施例2.4中获得的含LY1701表达质粒的酵母感受态细胞进行冰上解冻，加入5-10μg线性化质粒，冰上孵育15min，将质粒和感受态细胞一同加入预冷的电转杯。电转化：电压2000v，电阻200Ω，电容25μF，电转杯直径0.2mm，击穿时间5ms。电转完成后立即加入400μl预冷的山梨醇，转移至无菌1.5ml离心管，30℃、230rpm活化2h。5000g离心1min，弃去300μl上清，重悬菌体后涂布YPDSZ固体平板（胰蛋白胨20 g/L，酵母浸粉10 g/L，20%葡萄糖，4mg/ml G418），30℃，230rpm培养48h。

[0103] 2.7 诱导表达

[0104] 选择抗性平板生长良好的单菌落接种至1L BMGY培养基，30℃、230rpm培养48h。3000rpm离心5min，弃去上清；500ml无菌水重悬，再次3000rpm离心5min，弃去上清；加入1L BMMY培养基（不加甲醇）重悬，并转移至锥形瓶，并添加1%甲醇，每24h补加1%甲醇。诱导72h后离心收上清纯化。

[0105] 2.8离子交换纯化

[0106] 将目的蛋白透析到缓冲液A（20mM PB，PH=7.0），蛋白样品使用孔径为0.22μm、直径为13mm的滤膜进行过滤，使用AKTA pure进行阳离子交换（5ml SP柱），缓冲液B（20mM PB和1M NaCl，PH=7.0）进行线性洗脱得到纯度较高的目的蛋白。SDS-PAGE电泳验证蛋白的分子量和纯度，取蛋白样品加Protein loading buffer（添加DTT），混匀后，置于金属浴中，95℃，加热10min后，1500rpm 离心1min，取上清进行SDS-PAGE检测。BCA法测定蛋白浓度，估算蛋白产量。根据蛋白纯度，进行浓缩或冻干保存。

[0107] 3.结果

[0108] 图7为本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701在毕赤酵母表达、纯化后的SDS-PAGE电泳图，其分子量为49KDa（理论值33.75KDa）。

[0109] 实施例3 圆二色谱（CD）检测XVII型胶原蛋白的三螺旋构象

[0110] 将实施例1制备得到的XVII型胶原蛋白冻干粉末LY1701分别溶解在20mM的PB缓冲液（PH7.4）中，使其浓度在0.5mg/ml，进一步稀释样品浓度为0.01mg/ml、体积3ml，将待测样品转移到圆二色谱仪的10mm×10mm样品池中，设置扫描波长范围为190nm-260nm，扫描速度为100nm/min，扫描温度为常温，CD光谱均为三次扫描的平均值。结果如图8所示，本发明重组XVII型胶原蛋白在221nm处具有最大特征正峰，小于200nm处出现负峰，根据已知的胶原蛋白三螺旋结构的圆二色谱特征，判断该胶原蛋白样品具有三螺旋结构。

[0111] 实施例4 圆二色谱（CD）检测XVII型胶原蛋白的热稳定性

[0112] 参照实施例3所述的方法稀释胶原蛋白样品，以1℃/min的速度进行实时升温检测蛋白的热稳定性，CD光谱均为三次扫描的平均值，数据在软件上进行分析计算，并在221nm处测定重组胶原蛋白的摩尔椭圆度与温度的关系。结果如图9所示，以221nm处的特征正峰消失为判断依据，优选的LY1701热稳定性能够维持在40℃。

[0113] 实施例5 细胞划痕实验检测XVII型胶原蛋白的细胞迁移活性

[0114] 细胞划痕实验是一种常用的方法来检测胶原蛋白的细胞迁移活性，迁移率越高反映胶原蛋白的生物学活性越好。具体步骤如下：

[0115] 1.提前3天复苏并传代小鼠3T3细胞（海星生物），使其维持较好的状态与活率，待细胞活率达到98%以上，接种到6孔板中，6孔板接种密度为5×10^{5}个/ml，铺板体积为2ml，37℃、5%CO_2培养箱静置培养24h，当细胞铺满6孔板（90%以上）时，再进行下一步的划痕实验。

[0116] 2.将实验组待测的XVII型胶原蛋白冻干粉末LY1701（SEQ ID NO.7）、对照组BSA及市面上可购买的重组胶原蛋白产品（对比竞品1、2）溶解在20mM的PB缓冲液（PH7.4）中，检测溶解后的蛋白浓度并稀释，使其浓度在0.5mg/ml。

[0117] 3.用紫外线照射30min后的直尺以及黑色记号笔在6孔板的底部画出距离为0.5-1cm的平行横线，每孔至少画3条，画好横线后在板上分别做好标记，便于后续的观察。

[0118] 4.再用细胞刮刀或300ul枪头垂直于6孔板表面，在铺满的单层细胞中划出一条与6孔板底部直线垂直的划痕，过程中尽量保证划痕宽度一致，用PBS洗涤3次，

去除掉划痕所导致的游离的细胞和细胞碎片，并于孔中加入2ml的DMEM无血清培养基以及准备好的蛋白溶液，并保证蛋白的终浓度为50μg/ml，继续放入37℃、5%CO_2培养箱静置培养。

[0119] 5.于0h、12h分别使用显微镜观察细胞划痕的情况并拍照。用Image J软件对细胞迁移的图片进行处理，获得初始划痕面积和细胞迁移后的空白区域面积，计算迁移率，迁移率＝(初始划痕面积−细胞迁移后的空白区域面积/初始划痕积)*100%。

[0120] 结果如图10所示，仅处理12h，本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701细胞划痕恢复面积相对于对照组明显缩小，并且空白区域细胞聚集现象比其他组更为显著。

[0121] 数据分析如图11所示，BSA处理组的为23.61 %，本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701细胞划痕恢复面积为39.68 %，而对比竞品1胶原蛋白处理组的为24.88 %，对比竞品2胶原蛋白处理组的为 28.92%。

[0122] 可见，本发明重组XVII型胶原蛋白LY1701具有优良的促进细胞迁移的效果。

[0123] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

工业实用性

[0124] 胶原蛋白因具有良好的生物相容性、生物可降解性而被广泛研究和应用于生物材料领域，如组织工程支架、可吸收缝合线等。

[0125] 本发明重组ⅩⅦ型胶原蛋白通过实验验证了具有促进细胞增殖、促进细胞迁移等多种功能；可以用来制备化妆品、医用材料等；可以作为培养液基本成分，包括应用于体外毛囊干细胞或毛囊组织的培养和保存。

[0126] 所述的化妆品包括但不限于护肤液、护肤霜、精华水、面膜、头皮精华液、洗发露。

[0127] 所述的医用材料包括但不限于填充材料、修复材料、植入剂、组织工程支架、止血剂、药物释放载体，其中修复材料包括但不限于骨修复材料、创面敷料、缝合线。

[0128] 本发明还提供一种包括美容上或药学上有效量的至少一种根据前述的蛋白以及至少一种赋形剂或美容上或药学上可接受的佐剂的组合物。在一些实施方式中，所述组合物的剂型包括但不限于膏霜、乳液、水剂、凝胶、油剂、粉剂、泥类、贴类、膜类或冻干类；进一步地，为了促进胶原蛋白分子透皮吸收，可以利用无纺布等固体载体制备成贴类产品，贴敷于面部，延长胶原蛋白液与皮肤表面的作用时间。本发明重组ⅩⅧ型胶原蛋白可与重组或天然的I型胶原蛋白、Ⅱ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白、IV型胶原蛋白、V型胶原蛋白、纤连蛋白、人表皮生长因子等生物活性成分串联制备使用，还可以与上述生物活性成分在分别制备后混合使用。

权利要求书

[权利要求 1] 一种重组ⅩⅧ型胶原蛋白，其特征在于，其氨基酸序列包含n个核心单元，其中n是1或大于1的整数，所述核心单元的氨基酸序列如SEQ ID NO：1所示。

[权利要求 2] 根据权利要求1所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白，其特征在于，所述n选自3、4、5、6、7、8中的任一个数值。

[权利要求 3] 编码权利要求1或2所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的基因。

[权利要求 4] 表达权利要求1或2所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的重组载体，其特征在于，包含权利要求3所述的基因。

[权利要求 5] 表达权利要求1所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的重组细胞，其特征在于，所述重组细胞中转染有权利要求4所述的重组载体。

[权利要求 6] 权利要求1所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1）将权利要求3所述的基因重组到载体pET28a上获得重组载体；

2）将所述的重组载体转染至大肠杆菌BL21(DE3)中获得重组细胞；

3）培养所述的重组细胞后，离心，收集上清液；

4）从所述的上清液中分离获得所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白。

[权利要求 7] 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于，还包括将编码羟化酶L593和L230的基因片段，构建到表达载体pCDFDuet-1上获得重组载体pCDFDuet-1-L593-L230，转染至大肠杆菌BL21(DE3)。

[权利要求 8] 根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于，步骤3）所述的培养包括加入终浓度为10mg/ml 的抗坏血酸、1mM $FeSO_4$和1mM的IPTG诱导表达目的蛋白。

[权利要求 9] 权利要求1所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1）将权利要求3所述的基因重组到载体pPICZαA上获得重组载体；

2）将所述的重组载体转染至毕赤酵母GS115中获得重组细胞；

3）培养所述的重组细胞后，离心，收集上清液；

4）从所述的上清液中分离获得所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白。

[权利要求 10] 根据权利要求9所述的制备方法，其特征在于，还包括将编码羟化酶BaP4H的基因片段，构建到表达载体pPIC9k上获得重组载体pPIC9k−BaP4H，转染至毕赤酵母GS115。

[权利要求 11] 权利要求1所述的重组ⅩⅧ型胶原蛋白、权利要求6或9所述制备方法制备获得的重组ⅩⅧ型胶原蛋白包括有以下任一项中的应用：

i）促进细胞增殖；

ii）促进细胞迁移；

iii）制备化妆品；

iv）制备医用材料。