

纤维连接蛋白 C 端肝素结合域多肽在毕赤酵母中的表达、纯化及鉴定

陈小芳¹, 陈显凌¹, 邹起练², 吴勇¹, 陈元仲¹

1 福建省血液病研究所 福建医科大学附属协和医院血液科, 福建 福州 350001

2 福建医科大学 基础医学院细胞生物学与遗传学系, 福建 福州 350004

陈小芳, 陈显凌, 邹起练, 等. 纤维连接蛋白 C 端肝素结合域多肽在毕赤酵母中的表达、纯化及鉴定. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1265–1273.

Chen XF, Chen XL, Zou QL, et al. Expression, purification and identification for fibronectin C-terminal heparin-binding domain polypeptide in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1265–1273.

摘 要: 为在毕赤酵母中表达纤维连接蛋白 C 端肝素结合域 (Fibronectin C-terminal heparin-binding domain FNCHBD) 多肽并研究其功能, 通过 PCR 技术扩增 FNCHBD 目的基因, 将目的基因与 T 载体连接, 经测序正确后, 插入 pAo815SM 酵母表达载体增加基因拷贝数, 然后酶切克隆入酵母表达载 pPIC9K; 将重组质粒 *Sal* I 酶切线性化后转化毕赤酵母菌株, 筛选工程菌, 经甲醇诱导表达, 用 SDS-PAGE 检测发酵上清液, 表明有重组蛋白 FNCHBD 多肽的高表达, 表达产物通过离心、超滤、离子交换层析纯化, 纯化产物通过 SDS-PAGE、Western blotting 印迹、质谱及肝素亲和层析对表达产物进行鉴定。结果表明利用酵母工程菌成功表达和纯化了 FNCHBD 多肽, 多肽的分子量接近 32 kDa, 纯化产物的纯度可达 95% 以上, 能被 FN 多克隆抗体特异识别且具有多肽肝素结合活性, 为后续结构及功能的研究奠定基础。

关键词: 纤维连接蛋白, 肝素结合域, 毕赤酵母, 表达纯化

Received: April 6, 2012; **Accepted:** July 24, 2012

Supported by: Science and Technology Innovation Platform Construction Project of Fujian Province (No. 2009J1004).

Corresponding author: Yuanzhong Chen. Tel: +86-591-83357896; E-mail: chenyz@pub.fjmu.edu.cn

福建省科技创新平台建设项目 (No. 2009J1004) 资助。

Expression, purification and identification for fibronectin C-terminal heparin-binding domain polypeptide in *Pichia pastoris*

Xiaofang Chen¹, Xianling Chen¹, Qilian Zou², Yong Wu¹, and Yuanzhong Chen¹

¹ Fujian Institute of Hematology, Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China

² Department of Cell Biology and Genetics, Basic Medical College Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China

Abstract: To express and identify fibronectin C-terminal heparin-binding domain (FNCH BD) polypeptides in *Pichia pastoris* expression system and study its function, the fragment of FNCHBD was amplified by PCR and inserted into pGEM-T vector. After sequenced, the fragment was inserted into pAo815SM vector, and then cloned into the expression vector pPIC9k. The recombinant plasmid was linearized with restrict enzyme *Sal* I and transferred into the yeast host cell KM71 and GS115. The positive yeast clone was screened by G418 resistant, and the target protein was induced to express in the medium containing 0.5% methanol. The culture supernatant was collected and then was purified with membrane ultrafiltration and ion exchange chromatography. The purified product was analyzed with mass spectrogram, SDS-PAGE, Western blotting and heparin affinity chromatography. The results showed that the target protein was around 32 kDa and the purity of the product was above 95%. FNCHBD could be specifically recognized by fibronectin polyclonal antibody. These results suggest that FNCHBD could be expressed and purified successfully in *Pichia pastoris*, which provides a good strategy to further studies.

Keywords: fibronectin, heparin-binding domain, *Pichia pastoris*, expression and purification

纤维连接蛋白 (Fibronectin, FN) 是一个多功能的糖蛋白, 参与多种细胞的黏附、扩展、迁移、分化、增殖及存活^[1-3], 因此它在胚胎发育^[4]、组织修复^[5]、基质聚集^[6]、肿瘤转移^[7-8]、抗感染^[9]、出血及血栓^[10]、肌肉再生^[11]等方面都发挥了重要作用。FN 是由两个相同单体通过二硫键连接组成的二聚体, 每个单体由 3 种类型 (I、II、III 型) 的结构域重复不同次数构成。FN 的结构中含有各种生物大分子的结合位点, 包括成纤维细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、细菌、胶原、肝素等, 因此形成了多种功能结构域, 其中包含 2 个肝素结合域^[12-13], 一个位于 FN 的 N 端, 由第 1~5 五个 I 型的同源结构组成, 与肝素的结合力较弱, 另一个位于 FN 的 C 端, 由第 12~14 三

个 III 型的同源结构组成, 与肝素的结合力较强^[12]。血浆 FN 在抑制肿瘤迁移、抗感染及损伤修复等方面的作用已经得到了广泛的肯定。但从血浆分离 FN 存在着血浆资源的浪费及可能传播血源性传染病的问题, 同时由于 FN 分子量大, 表达全长 FN 分子又存在技术上的难题, 因此表达 FN 的功能区多肽并研究其功能是较为可行的方法。我们前期研究已合成了 FN N 端的肝素结合域多肽, 动物实验研究表明其具有抗小鼠败血症及大鼠 DIC 的作用^[14-15]。目前国际上对 FN C 端的肝素结合域的生物学功能有了较深入的研究, 如促进细胞粘附^[16-17]、促进血管内皮生长因子的活性^[18]、促进血管的生成^[19]、调节细胞的凋亡^[20]、抗感染^[21]等; 但表达 FN C 端的肝素结合域多肽

目前国内外还未见报道。FN C 端的肝素结合域含 272 个氨基酸 (Tyr1720-Gly1991), 编码该多肽的 DNA 序列从 5 428 bp~6 244 bp, 长 816 bp, 本实验成功地通过酵母表达系统表达 FN C 端的肝素结合域多肽并进行鉴定, 为进一步研究结构及功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

FN cDNA、大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, pGEM-T TA 克隆试剂盒、酵母表达系统 (包括表达载体及酵母菌株及培养基) 购自 Invitrogen 公司, pAo815SM 载体由厦门特宝公司提供, *PrimeSTART HS* DNA 聚合酶、*pfu* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; pUC8、pUC18 DNA Marker、*EcoR* I、*BamH* I、*Xho* I 内切酶、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 低分子量标

准蛋白质 Marker LMW 购自 GE 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 兔抗人 FN 多克隆抗体、羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司产品; 1 mL 的肝素亲和层析预装柱 HiTrap Heparin HP 购自 GE 公司; 其他试剂为国产或进口分析纯产品。

1.2 目的基因的 PCR 扩增和 pGEM-T-FNCHBD 载体的构建

以本实验室所保存的 FNcDNA 为模板, 设计特异性引物 (M1、M2, ↓箭头表示酶切位点, 下划线表示 KEX2 信号肽水解位点), 具体序列见表 1, 通过 PCR 扩增 FNCHBD 基因片段, PCR 扩增产物长 855 bp。PCR 扩增产物胶回收后经末端加 A, 连接至 pGEM-T 载体上, 连接产物转染大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 通过氨苄青霉素抗性和蓝白筛选挑白色克隆进行扩增, 提取质粒进行 PCR 和 *Xho* I、*EcoR* I 双酶切鉴定后进行 DNA 测序。

表 1 引物 DNA 序列

Table 1 DNA sequence of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
M1	ATGCTC↓TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGGCACCAACTGAC	<i>Xho</i> I
M2	ACGTAG↓AATTCTTC GTCTGTCTTTTTCCTTCC	<i>EcoR</i> I

1.3 重组 pAo815SM-FNCHBD 质粒的构建

为增加目的基因的拷贝数, 将测序正确的重组 pGEM-T-FNCHBD 质粒由 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后回收目的 DNA, 然后克隆入用同样酶切处理的 pAo815SM 载体上, 构建质粒 pAo815SM-FNCHBD, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 转化菌涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的低盐 LB 固体培养基平板上。挑选

单个菌斑扩增, 提取质粒酶切鉴定。

1.4 重组 pPIC9K-FNCHBD 表达载体的构建

将鉴定正确的重组 pAo815SM-FNCHBD 质粒由 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切后胶回收目的基因, 然后克隆到用同样酶切的 pPIC9K 载体上, 重组 pPIC9K-FNCHBD 载体转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑单菌斑扩增, 提质粒酶切鉴定。

1.5 FNCHBD 多肽在酵母细胞中的表达

1.5.1 FNCHBD 多肽在酵母细胞 GS115 中的表达

Sal I 酶切线性化重组 pPIC9K-FNCHBD 质粒 (pPIC9K-FNCHBD/*Sal* I)。线性化质粒转染 GS115, 转染的 GS115 细胞涂布 RDB 平板上, 28 °C 培养 96 h, 收取 RDB 平板上的菌落, 涂于浓度分别为 1~4 g/L 的 G418-YPD 平板上, 挑取 4 g/L G418-YPD 平板上的菌落分别接种至 5 mL YPD 液体培养基中, 28 °C、250 r/min 振摇 24 h 后转接于装有 30 mL 含 0.25% 甲醇的 BMGY 培养基, 28 °C、250 r/min 振荡培养, 每 12 h 添加甲醇至浓度为 0.25%, 48 h 后发酵液经 4 °C、离心 30 min (10 000 r/min), 留取上清, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5.2 FNCHBD 多肽在酵母细胞 KM71 中的表达

线性化质粒转染 KM71 酵母细胞, 转染的 KM71 细胞涂布于 RDB 平板上, 28 °C 培养 120 h, 收取 RDB 平板上的菌落, 涂于浓度分别为 1~4 g/L 的 G418-YPD 平板上, 挑取 4 g/L G418-YPD 平板上的菌落分别接种至 5 mL YPD 液体培养基中, 28 °C、250 r/min 振摇 24 h 后转接于装有含 0.25% 甲醇的 30 mL BMGY 培养基, 28 °C、250 r/min 振荡培养, 每 12 h 添加甲醇至浓度为 0.25%, 诱导表达 72 h 后发酵液经 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 留取上清, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.6 FNCHBD 多肽的纯化

挑选表达较好的 KM71-FNCHBD 菌株接种于 300 mL BMGY 培养基扩大发酵, 诱导表达条件同上, 72 h 后发酵液经 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 上清用 10 kDa、容积为 300 mL 的中空纤维膜超滤浓缩后至 1/10 体积后用 5 L 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的缓冲液置

换, 然再过用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 预平衡过的 CM Sepharose FF 离子交换柱纯化, 用 50 mmol/L Tris HCl、350 mmol/L NaCl 的洗脱液 (pH 8.0) 洗脱, 监测 UV280 的波形, 收集含目的蛋白的洗脱液经 SDS-PAGE 电泳检测, 初步纯化的样品进一步经 Sephacryl S-100HR 分离纯化, 纯化产物 SDS-PAGE 电泳检测产物的纯度。

1.7 FNCHBD 的鉴定和活性分析

1.7.1 通过质谱分析测定多肽的分子量

将纯化的 FNCHBD 多肽产物经质谱仪测定多肽的分子量及纯度。

1.7.2 Western blotting 方法鉴定多肽的抗原性

按 Western blotting 常规方法制胶, 将过 HiTrap Heparin HP 柱子的样品经 SDS-PAGE 电泳后, 350 mA 稳流 1 h 转移到硝酸纤维素膜上, 用封闭液 (5% 的封闭蛋白的 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS, 0.05% Tween20) 室温作用 1.5 h 后加一抗 (兔抗人 FN 多克隆抗体 1 : 500) 4 °C 包被过夜, TBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加二抗 (羊抗兔 IgG 1 : 5 000), 室温摇 1.5 h 后 TBS 漂洗 3 次, 加 AB 工作液 (1 : 1) 后 X 光片曝光 5 min, 显影, 定影。

1.7.3 FNCHBD 多肽的肝素亲和活性鉴定

将 FNCHBD 的酵母发酵液上清过用 10 mmol/L 的 PBS (pH 7.0) 预平衡后 1 mL 的 HiTrap Heparin HP 柱子, 用 10 mmol/L 的 PBS、500 mmol/L 的 NaCl (pH 7.0) 洗脱, 监测 UV280 的波形, 收集活性峰, 小量处理样品进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 FNCHBD 多肽基因的克隆和 T 载体的构建

以本实验室保存的 FNcDNA 为模板进行

PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见 FNCHBD 多肽基因的扩增产物在 700 bp 的上方有特异性条带, 片段大小与预计的 855 bp 相符 (图 1)。回收的 PCR 产物与 T 载体连接, 重组质粒经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定正确后, 经测序表明插入的 FNCHBD 多肽基因与基因库中的完全相符。

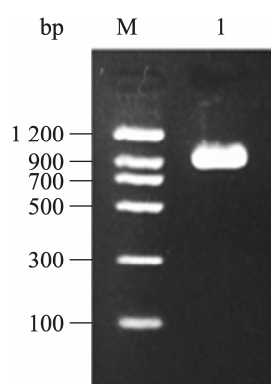


图 1 FNCHBD 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of FNCHBD. M: DNA marker; 1: FNCHBD.

2.2 酵母表达载体的构建

Xho I 和 *Eco*R I 双酶切 pGEM-T-FNCHBD 载体, 酶切目的片段, 回收后与 pAo815SM 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选平板上的抗性菌落, 提取质粒进行 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 构建的 pAo815SM-FNCHBD 载体经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切, 酶切目的片段与 pPIC9K 酵母表达载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选平板上的抗性菌落, 扩增后提取质粒进行 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定, 所切下的片段与预期结果相符 (图 2), 说明成功构建 pPIC9K-FNCHBD 表达载体。

2.3 FNCHBD 多肽在酵母细胞中的表达

将 4 g/L G418-YPD 平板上的挑选的 GS115

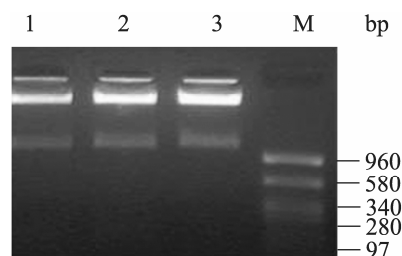


图 2 重组质粒 pPIC9K-FNCHBD 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPIC9K-FNCHBD by enzyme digestion. M: pUC18 DNA marker; 1-3: pPIC9K-FNCHBD digested with *Eco*R I and *Bam*H I.

和 KM71 酵母细胞, 经上述诱导表达后, 发酵液均经 4 $^{\circ}$ C 离心后取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 可见 KM71 菌株在 30 kDa 的上方出现明显的条带, 与预计结果相符, 且表达的杂蛋白的本底较低 (图 3), 因此选用阳性的 KM71 菌株作为扩大规模发酵的表达菌株。

2.4 FNCHBD 多肽的纯化

阳性 KM71 菌株的发酵上清经过超滤使蛋白得到浓缩, 同时去掉一些小分子的杂蛋白, 然后通过 CM 柱进一步富集目的蛋白, 使蛋白得到初步纯化, 最后通过 S100 柱分离出目的蛋白从而得到较纯的蛋白, SDS-PAGE 电泳可见到大小约 32 kDa 的目的多肽条带 (图 4)。

2.5 FNCHBD 鉴定和活性分析

将纯化后的 FNCHB 多肽通过质谱分析, 确定其分子量为 31.051 kDa, 与用 PROSIS 软件分析的理论预计值相符 (图 5), 证明所得到的多肽为目的蛋白, 纯化后样品的纯度 >95%, 为今后的结构和功能研究奠定基础。Western blotting 法显示在与 SDS-PAGE 的 FNCHBD 条带相应的位置出现清晰的条带 (图 6), 表明 FNCHBD 多肽可

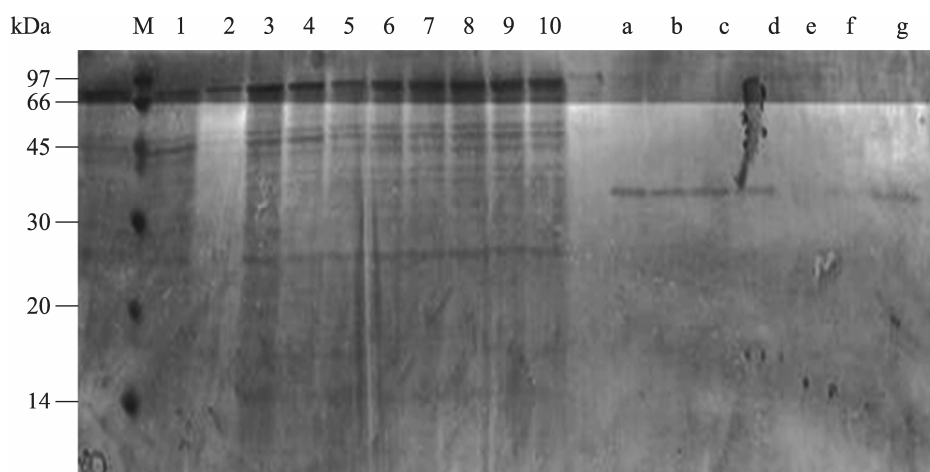


图3 表达产物 FNCHBD 多肽的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed FNCHBD. M: low molecular protein marker LMW; 1–10: supernatant liquid of GSII5/pPIC9K-FNCHBD; a–g: supernatant liquid of KM71/pPIC9K-FNCHBD.

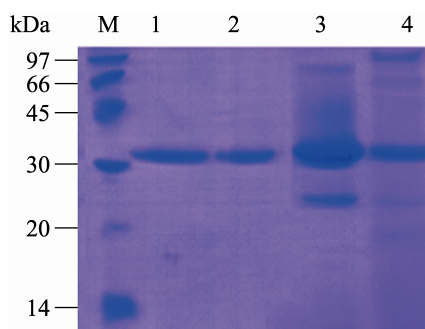


图4 FNCHBD 多肽纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of samples collected at different stages of FNCHBD purification. M: Low molecular protein marker (LMW); 1, 2: fraction eluted from Sephacryl S-100HR; 3: fraction eluted from CM Sepharose FF; 4: dialyzed supernatant of KM71/pPIC9K-FNCHBD.

与 FN 的多克隆抗体结合，具有免疫原性，同时也进一步证明了所表达纯化的多肽是目的多肽。FNCHBD 少量发酵上清过 1 mL 的 HiTrap Heparin HP 柱子，洗脱时监测 UV280 的波形 (图 7)，出峰时收集的样品行 SDS-PAGE 电泳可目的蛋白条带 (图 8)。表明通过 FNCHBD 多肽具有肝素结合活性，能够通过肝素亲和层析纯化。

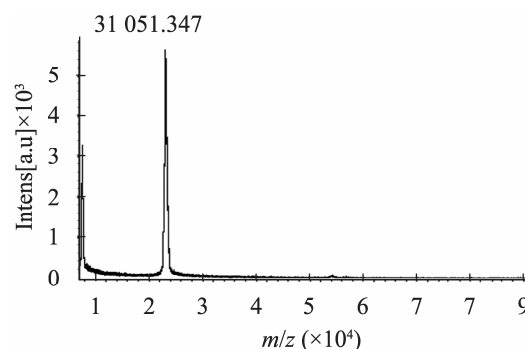


图5 纯化的 FNCHBD 多肽的质谱图

Fig. 5 MS of recombinant FNCHBD.

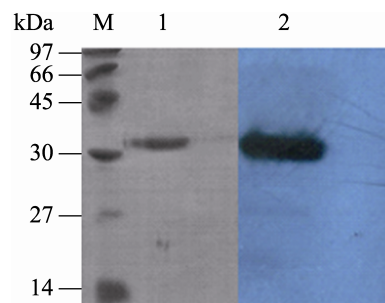


图6 纯化的 FNCHBD 多肽的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blotting analysis of purified FNCHBD. M: low molecular protein marker (LMW); 1: SDS-PAGE analysis of purified FNCHBD; 2: Western blotting analysis of purified FNCHBD.

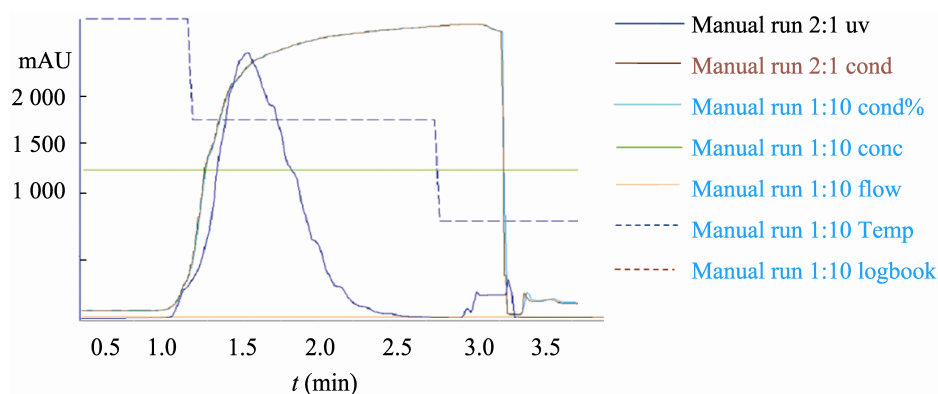


图 7 FNCHBD 发酵液上清的肝素亲和层析图

Fig. 7 Diagram of heparin affinity chromatography of supernatant liquid of KM71/pPIC9K-FNCHBD.

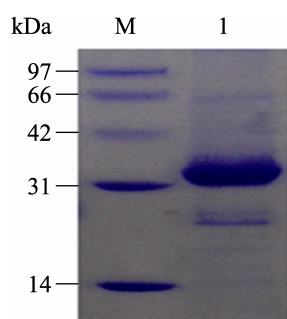


图 8 肝素亲和层析产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of fraction eluted from HiTrap Heparin HP. M: low molecular protein marker (LMW); 1: fraction eluted from HiTrap Heparin HP.

3 讨论

酵母是一种低等真核生物,既具有类似原核生物的生长特性,又具有一般真核生物的分子和细胞生物学特性。酵母作为基因工程的表达系统,无细菌细胞壁的热原问题,也不必考虑动物细胞中可能含有原癌基因及病毒 DNA 等影响,其中毕赤酵母因具备良好的发酵与分泌性能尤其引人注目。毕赤酵母作为甲醇营养型酵母,该表达系统使用的乙醇氧化酶基因 (AOX1) 启动子为强诱导启动子,在 AOX1 启动子控制下的外

源基因表达水平高且便于调控,重组株可按需要在诱导前高密度生长,加入甲醇诱导后能高水平表达,表达外源蛋白基因遗传稳定,具有糖基化、酰基化、蛋白磷酸化等翻译后修饰加工功能,使生产的蛋白具有天然的高级结构及生物学活性;发酵工艺成熟,易放大,产物易纯化,所用发酵培养基十分廉价,一般碳源为甘油或葡萄糖及甲醇,其余为无机盐,成本远低于昆虫和哺乳动物表达系统。因此,将外源基因整合于毕赤酵母染色体上,蛋白表达含量高、表达产物生物学活性好、背景蛋白质少、操作简便及易于工业化生产^[22-23]。近年来毕赤酵母表达系统应用的范围越来越广泛,人们已经用毕赤酵母表达体系成功表达了 500 多种蛋白^[24],包括疫苗、激素、干扰素、抗菌肽、酶、膜受体蛋白、细菌毒素及其衍生物等。因此本文尝试用该系统进行 FN C 端肝素结合域 (FNCHBD) 多肽的表达研究并取得了成功。

在本研究中,我们将 FNCHBD 基因插入 T 载体上通过转化大肠杆菌抽提质粒,使目的基因进一步扩增及易于酶切获得粘性末端,然后通过

pAo815SM 中间载体增加目的基因的拷贝数, 最后将目的基因插入 pPIC9K 酵母表达载体 α -factor 信号肽的下游, 构建成 FNCHBD 基因的重组酵母表达载体 pPIC9K-FNCHBD, 转化酵母细胞 GS115 和 KM71, 获得阳性重组菌株。由于 pPIC9K 质粒所带 Kanamycin 抗性基因在酵母中表现为抗 G418 的抗性, 利用这一点可以用来筛选多拷贝的菌株, 因此本实验通过将初步筛选的阳性酵母菌株再涂布于浓度分别为 1~4 g/L 的 G418-YPD 平板上, 在 4 g/L 的 G418-YPD 平板上筛选出高拷贝数的菌株。由于目的基因插入到 α -factor 信号肽的下游, 因此在甲醇的诱导下, 目的基因表达产物分泌于酵母培养上清液中, 由于在目的基因中引入的 KEX2 蛋白酶的酶切点, 减少了额外氨基酸的加入。表达产物通过 SDS-PAGE 检测发现其分子量与 prosis 软件分析的预计值相符, 且 KM71 阳性菌株中目的蛋白的表达量较高且背景蛋白较少, 因此选用 KM71 阳性菌株作为我们下一步实验的菌株。经扩大规模发酵后, 发酵液离心后所得的上清经过超滤使蛋白得到浓缩, 同时去掉一些小分子的杂蛋白, 然后通过 CM 离子交换柱进一步富集目的蛋白, 使目的蛋白得到初步纯化, 最后通过 S100 离子交换柱分离出目的蛋白从而得到较纯的蛋白, 通过 SDS-PAGE 及质谱显示, 所纯化蛋白的分子量约为 32 kDa, 且纯化蛋白的纯度达 95% 以上, 最后通过 Western blotting 法和肝素亲和层析法证明纯化的目的多肽具有免疫原性和肝素结合活性, 以上充分表明了我们成功地在酵母表达系统中表达和纯化了 FNCHBD 多肽, 且表达的多肽具有抗原结合和肝素结合活性, 这为后续 FNCHBD 的结构和功能实验奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Yamada KM. Fibronectin peptides in cell migration and wound repair. *J Clin Invest*, 2000, 105(11): 1507–1509.
- [2] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110(6): 673–687.
- [3] Kang W, Park S, Jang JH. Kinetic and functional analysis of the heparin-binding domain of fibronectin. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(1): 55–59.
- [4] Hynes RO. *Fibronectins*. New York: Springer-Verlag, 1990: 333–348.
- [5] Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, et al. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin wound healing and hemostasis. *Nat Med*, 2001, 7(3): 324–330.
- [6] Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis: a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*, 2005, 24(6): 389–399.
- [7] Yi M, Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 620–624.
- [8] Labat-Robert J. Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(3): 187–195.
- [9] Liu X, Collodi P. Novel form of fibronectin from zebrafish mediates infectious hematopoietic necrosis virus infection. *J Virol*, 2002, 76(2): 492–498.
- [10] Adili R, Hong Yang, Guangheng Zhu, et al. Plasma fibronectin depletion enhances platelet aggregation and thrombus formation in mice lacking fibrinogen and vonWillebrand factor. *Blood*, 2009, 113(8): 1809–1817.
- [11] Vaz R, Martins GG, Thorsteinsdottir S, et al. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an *in vitro* myoblast cell model. *Cell Tissue Res*, 2012, 348(3): 569–578.
- [12] Roumen P, Kenneth MY. Fibronectin at a glance. *Cell Science*, 2002, 115(20): 3861–3863.
- [13] Iwona WP, Jean ES. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*, 2003, 116(16): 3861–3863.

- 3269–3276.
- [14] Zou QY, Guo JR, Chen XF, et al. Preparation of recombinant polypeptide of N-terminal heparin binding domain of fibronectin and its effect on disseminated intravascular coagulation in rats. *J Experi Hemaol*, 2010, 18(3): 698–703.
邹起练, 郭江睿, 陈小芳, 等. 纤维连接蛋白 N 端肝素结合域多肽的制备及其对 DIC 大鼠的治疗作用. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(3): 698–703.
- [15] Zou QY, Guo JR, Chen XF, et al. Recombinant polypeptide of N-terminal heparin binding domain of fibronectin antagonizes hepatic failure induced by endotoxin in mice. *Natl Med J China*, 2009, 89(48): 3425–3429.
邹起练, 郭江睿, 陈小芳, 等. 重组纤维连接蛋白 N 端肝素结合域多肽抗内毒素所致小鼠肝衰竭的作用. *中华医学杂志*, 2009, 89(48): 3425–3429.
- [16] Kim JH, Park SO, Jang HJ, et al. Importance of the heparin-binding domain of fibronectin for enhancing cell adhesion activity of the recombinant fibronectin. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(17): 1409–1413.
- [17] Kang W, Park S, Janq JH. Kinetic and functional analysis of the heparin binding domain of fibronectin. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(1): 55–59.
- [18] Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor matrix protein synergism. *Circ Res*, 2006, 99(8): 853–860.
- [19] Viji RI, Kumar VB, Kiran MS, et al. Angiogenic response of endothelial cells to heparin-binding domain of fibronectin. *Biochem Cell Biol*, 2008, 40(2): 215–226.
- [20] Kapila YL, Wang S, Dazin P, et al. The heparin-binding domain and V region of fibronectin regulate apoptosis by suppression of p53 and c-myc in human primary cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 8482–8491.
- [21] Andersson E, Rydengard V, Sonesson A, et al. Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur Biochem*, 2004, 271(16): 1219–1226.
- [22] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6(5): 527–533.
- [23] Faber KN, Hader W, Ab G, et al. Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast*, 1995, 11(14): 1331–1334.
- [24] Maeauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249–270.