

人源Ⅲ型胶原蛋白在毕赤酵母中的多拷贝重组表达、鉴定及抗氧化活性分析

蔡思泽, 王斌*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 胶原蛋白在人体内有重要作用, 并且在食品、保健品、医疗等方面有广泛应用。该研究针对毕赤酵母的密码子偏好性对人源Ⅲ型胶原蛋白基因进行了密码子优化, 在此基础上构建了人源Ⅲ型胶原蛋白单串联、二串联和二串联四拷贝表达载体 pPIC9K-COL3-S、pPIC9K-COL3-2 和 pPIC9K-COL3-4, 转化毕赤酵母 GS115 实现了人源Ⅲ型胶原蛋白的整合表达, 获得了胶原蛋白单串联、胶原蛋白二串联和胶原蛋白二串联四拷贝的毕赤酵母工程菌株。对 pPIC9K-COL3-S、pPIC9K-COL3-2 重组菌株进行了摇瓶模拟高密度发酵, 甲醇诱导浓度为 0.5%, 经 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测, 重组菌株成功表达了重组胶原蛋白, 其中单串联蛋白表观分子量约为 26.7 ku, 双串联蛋白表观分子量约为 52.3 ku。四拷贝重组菌株在 0.5% 甲醇诱导下的高密度摇瓶发酵产量最高, 在最佳诱导时间为 72 h 时, 蛋白产量达到约 0.45 g/L。通过镍柱纯化后获得高纯度重组蛋白, 抗氧化活性实验表明, 重组胶原蛋白 DPPH 自由基清除率达到 51.49%、ABTS 自由基清除率达到 41.24%, 证明具有抗氧化活性, 为其在食品、保健品和医疗领域的应用提供理论依据。

关键词: 胶原蛋白; 毕赤酵母; 重组表达; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2023)03-129-137

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0510

Recombinant Expression, Structural Identification, and Antioxidant

Activity Analysis of Human Type III Collagen in *Pichia pastoris*

CAI Size, WANG Bin*

(School of Biology and Biological Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Collagen plays a vital role in the human body and is widely used in food, health products, and medical treatment. Codon optimization of the human type III collagen gene was carried out according to the codon usage bias of *Pichia pastoris*. The single-tandem, two-tandem, and four-copy two-tandem expression vectors pPIC9K-COL3-S, pPIC9K-COL3-2, and pPIC9K-COL3-4, respectively, were constructed and transformed into *P. pastoris* GS115 to achieve integrated expression of human type III collagen, thereby obtaining engineered strains of *P. pastoris* containing single-tandem collagen, two-tandem collagen, and four-copy two-tandem collagen. The pPIC9K-COL3-S and pPIC9K-COL3-2 recombinant strains were mixed and shaken with a 0.5% induction concentration of methanol to stimulate high-density fermentation. SDS-PAGE and western blot analysis demonstrated that the recombinant strains successfully expressed recombinant collagen, where the apparent molecular weight of the single-tandem protein was approximately 26.7 ku, and that of the two-tandem protein was approximately 52.3 ku. The yield of the high-density shake flask fermentation of the four-copy recombinant strain induced by 0.5% methanol was the highest, with an optimal induction time of 72 h and protein yield reaching approximately 0.45 g/L. A high-purity recombinant protein of this strain was obtained after purification using a nickel column. Antioxidant activity experiments showed that the DPPH free-radical scavenging

引文格式:

蔡思泽,王斌.人源Ⅲ型胶原蛋白在毕赤酵母中的多拷贝重组表达、鉴定及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2023,39(3):129-137.

CAI Size, WANG Bin. Recombinant expression, structural identification, and antioxidant activity analysis of human type III collagen in *Pichia pastoris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 129-137.

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2022A1515010291)

作者简介: 蔡思泽 (1996-), 男, 硕士, 研究方向: 微生物学, E-mail: 531209208@qq.com

通讯作者: 王斌 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 工业生物技术, E-mail: btbinwang@scut.edu.cn

rate of the recombinant collagen reached 51.49%, whereas the ABTS free-radical scavenging rate reached 41.24%, thus proving its antioxidant activity. This provides a theoretical basis for its application in the fields of food, health products, and medicine.

Key words: collagen; *Pichia pastoris*; recombinant expression; antioxidant

胶原蛋白 (Collagen) 主要存在于动物的结缔组织之中, 主要通过蛋白多聚形成的高级结构而行使各类功能, 在细胞, 组织, 器官的生命活动中起到重要作用^[1]。由于其在生物体中的种种功能和重要性, 且胶原蛋白具有优异的生物相容性, 因此被广泛应用于骨修复、烧伤修复^[2]和美容、药物递送、食品^[3]等领域。其中, III型胶原蛋白属于非纤维胶原蛋白, 存在于真皮, 心血管等组织和器官中。传统的胶原蛋白获取方式主要来源于动物来源的酸解^[4]、碱解^[5]、酶解以及化工合成^[6], 但这些方法都存在各种问题, 例如具有病毒隐患、有一定抗原性、进入机体将导致免疫排斥反应等^[7]。

毕赤酵母表达系统由于其表达蛋白稳定, 有利于蛋白折叠, 蛋白修饰较多等优点^[8], 经常被应用于动物来源蛋白的异源表达, 经过多年的研究与发展, 毕赤酵母已经成为一种成熟的外源蛋白表达系统^[9], 且不含内毒素^[10], 有成熟的表达载体和转化筛选体系, 已经成功表达了上百种不同来源的蛋白^[11], 其中胞外表达的发酶产物通常背景蛋白含量低, 生物活性高^[12]。有研究人员通过定点诱变技术, 使得毕赤酵母表达人胶原蛋白的产量达到 3.36 g/L^[13]; Wang 等^[14]用 1% 甲醇和 8% 甘油在摇瓶中混合发酵重组毕赤酵母 GS115, 最大胶原产量达到 1.27 g/L。与单碳诱导相比, 混合碳诱导发酵策略的发酵时间缩短了 50%, 大大提高产品在后续大规模合成中的经济效益。Olsen 等^[15]根据胶原蛋白序列特征设计了 101 个氨基酸的人工胶原序列, 通过筛选高拷贝整合的酵母菌株, 使产量达到 1.47 g/L; 徐立群等^[16]在毕赤酵母中分泌表达了 VI 型人胶原蛋白, 产量达到 1.06 mg/L。

本研究选取人 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的第 908 至 1137 位的氨基酸作为目的蛋白, 经密码子优化后, 通过同尾酶原理构建多拷贝的表达载体, 转化酵母细胞后, 通过 SDS-PAGE 和 Western-blot 方法检测目的蛋白的表达, 并根据表达量筛选高产菌株。在此基础上, 通过硫酸铵沉淀、亲和层析纯化重组胶原蛋白, 进而研究了重组胶原蛋白的抗氧化活性、并通过电镜观察胶原蛋白的结构, 为胶原蛋白的应用奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

菌株毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115, 美国 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Match1 T1, 美国 Invitrogen 公司; 质粒 pPIC9K, 美国 Invitrogen 公司; 质粒 pUC57-COL3, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.1.2 试剂

限制性核酸内切酶 *Bgl* II、*Bam* H I、*Eco* R I、*Not* I、*Sal* I, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 高保真 DNA 扩增酶 Prime STAR HS DNA Polymerase (premix)、T4 连接酶, 购于日本 TaKaRa 公司; HiFi DNA Assembly Cloning Kit 试剂盒, 美国 NEB 公司; Dream Taq Green PCR Master Mix、DNA marker (200 bp Ladder、DL 5000 和 26616 Protein Marker), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒, Magen 公司。His-tag 抗体一抗及二抗, 广州捷倍斯生物科技有限公司; 牛血清白蛋白, 北京索莱宝科技有限公司; 核酸凝胶回收试剂盒, 广州美基生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (质量分数): 1% 蛋白胨、1% 氯化钠、0.5% 酵母粉。

YPD 液体培养基 (质量分数): 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖。

BMGY 液体培养基 (质量分数): 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、1.34% YNB、0.3% K_2HPO_4 、1.18% KH_2PO_4 、10% 甘油。

BMMY 液体培养基 (质量分数): 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、1.34% YNB、0.3% K_2HPO_4 、1.18% KH_2PO_4 、0.5% 甲醇。

1.1.4 引物

PCR 扩增引物序列见表 1 所示。

1.2 仪器

Veriti 96-Well Thermal Cycler 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; AKATA 层析仪, 美国通用电气公司; 浸入式水平电泳系统, 垂直电泳系统美国 Bio-Rad 公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN 公司; 移液枪和高速离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.3.4 毕赤酵母工程菌株的摇瓶发酵及重组胶原蛋白的诱导表达、鉴定

将酵母菌株接种到 10 mL YPD 培养基内, 30 °C 250 r/min 培养 16~20 h, 在 OD₆₀₀ 达到 10 左右时, 接种至 BMGY 培养基使初始 OD₆₀₀ 为 0.2, 30 °C, 250 r/min 培养 16 h~20 h; 控制起始 OD₆₀₀ 为 1, 将菌体离心取上清, 转移至 50 mL 的 BMMY 培养基 30 °C, 250 r/min 培养, 每隔 24 h 取样, 同时补充甲醇至 0.5%, 诱导发酵 120 h。发酵上清离心后通过 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白表达情况。电泳结束后, 转膜至 PVDF 膜上, 封闭液封闭 1 h, 用 His-tag 抗体一抗 37 °C 孵育 1 h, 二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 显色, 凝胶成像仪曝光。

1.3.5 摇瓶模拟高密度发酵

前期处理与 1.3.4 相同, 但是在转移到 BMMY 培养基时, 将 5 瓶 50 mL 的 BMGY 发酵培养物离心, 将菌体重悬于 100 mL BMMY 培养基中 30 °C 250 r/min 培养, 每隔 24 h 取样, 同时补充甲醇至 0.5%, 诱导发酵 120 h, 即浓缩了 2.5 倍, 以达到在摇瓶中模拟高密度发酵的目的。

1.3.6 重组胶原蛋白的纯化

亲和层析: 将重组毕赤酵母的发酵液 6 000 r/min 离心 10 min; 得到上清液, 将上清液通过 0.22 μm 的滤膜过滤, 用镍柱 (5 mL His-Trap, GE) 亲和层析纯化, 收集不同洗脱峰的洗脱液, 通过 SDS-PAGE 电泳检测后, 将相应蛋白洗脱液过夜透析, 冷冻干燥备用。

硫酸铵分级沉淀: 将不同质量的硫酸铵溶解于发酵液上清中, 4 °C 静置 12 h, 10 000 r/min 离心 30 min, 将沉淀用 1/10 发酵液体积的蒸馏水溶解, 在上清液中倒入硫酸铵提高浓度, 继续重复这一过程, 直至硫酸铵浓度达到饱和, 溶解的沉淀通过 SDS-PAGE 鉴定。

1.3.7 重组胶原蛋白的抗氧化性分析

1.3.7.1 DPPH 自由基清除力测定

制备不同浓度的蛋白样品, 在 96 孔的酶标板内加入 100 μL 的蛋白溶液, 加入 100 μL 的 2×10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 乙醇溶液作为实验组, 将 100 μL 的蛋白溶液和 100 μL 无水乙醇混合, 空白组; 将 100 μL 无水乙醇和 2×10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 乙醇溶液混合, 记为对照组; 将实验组, 空白组, 对照组于室温避光反应 30 min, 测定 517 nm 下的吸光值, 记为 A₁、A₂、A₃。阳性对照使用 Vc 代替蛋白样品进行反应^[17]。

$$B = \frac{A_3 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B——DPPH 自由基清除率, %;

A₁——实验组在 517 nm 下的吸光值;

A₂——空白组在 517 nm 下的吸光值;

A₃——对照组在 517 nm 下的吸光值。

1.3.7.2 ABTS 清除能力测定

配置 7 mmol/L ABTS⁺溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液, 两溶液按相同体积比例充分混合后, 在室温下避光放置 16 h 备用。用 5 mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液在 734 nm 波长处将该混合物吸光值稀释至 0.70±0.02 备用。取 0.4 mL 不同浓度的样品与 0.4 mL 已稀释好的 ABTS 溶液充分混合, 在室温下避光反应 10 min, 后 734 nm 波长处测定吸光值 A₄。分别以无水乙醇作为空白对照, 同样反应后测吸光值 A₀。以 Vc 作为阳性对照^[18]。

$$C = \left(1 - \frac{A_4}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C——ABTS 清除率, %;

A₄——样品与 ABTS 溶液混合后在 734 nm 处的吸光值;

A₀——空白对照在 734 nm 处的吸光值。

1.3.8 扫描电子显微镜观察胶原蛋白的微观结构

将纯化后的溶液使用透析袋透析过夜, 回收后冷冻干燥, 将完全冻干的胶原蛋白粉末固体镀金后, 使用仪器日本日立 S-3700N 钨丝灯电子扫描显微镜, 加速电压 1.5 kV, 对胶原蛋白粉末成像, 以观察其是否含有胶原蛋白纤维结构。

1.3.9 数据分析

本研究展示的所有数据均已重复三次, 所有的实验数据采用 SPSS 19.0 取平均值后进行方差分析, 图表制作使用误差线, 使用 GraphPad Prism 8 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 胶原蛋白表达载体及酵母工程菌株的构建与鉴定

胶原蛋白基因片段按毕赤酵母偏好密码子优化, GC 含量为 69.72%, 密码子适应指数 (CAI) 为 0.71, 优化后的自由能 (-343.10 kcal/mol) 比优化前 (-315.30 kcal/mol) 更低, mRNA 更加稳定, 有利于基因的高效表达。

以质粒 pUC57-COL3 为模板, 使用引物 COL3-F、COL3-R、COL3-1F、COL3-1R 和 COL3-2F, PCR 扩增结果如图 1a 所示, 分别得到片段 COL3-S (707 bp), COL3-1 (734 bp) 和 COL3-2 (706 bp), 其中 COL3-1 和 COL3-2 作为胶原蛋白两串联表达的上半部分和下

半部。目的片段与载体按照摩尔比 3:1 用 Hi Fi DNA Assembly Cloning Kit 进行无缝连接, 构建表达载体 pPIC9K-COL3-S (单串联表达载体)、pPIC9K-COL3-2 (双串联单拷贝表达载体), 经 DNA 测序验证无突变, 成功构建重组质粒。

将上述步骤得到的 pPIC9K-COL3-2 质粒使用 *Bgl*II、*Sal*I 酶切, 回收表达框; 将 pPIC9K-COL3-2 质粒使用 *Bam*H I 和 *Sal*I 酶切, 回收载体骨架片段; 将上述表达框和骨架片段使用 T4 连接酶连接, 得到二拷贝载体 pPIC9K-(COL3-2)₂, 再将二拷贝载体重复此步骤一次, 得到胶原蛋白双串联四拷贝表达载体 pPIC9K-COL3-4; 单串联载体, 双串联单拷贝载体, 双串联二拷贝载体, 双串联四拷贝载体大小分别为 9.93、10.66、13.62、19.56 kb, 使用 *Bgl*II、*Bam*H I 酶切验证, 得到含有抗氨苄青霉素编码的骨架片段 1 (2 403 bp)、含有卡那霉素抗性编码的片段 2 (5 293 bp) 及表达框片段, 表达框片段的分子量随拷贝数增加而递增, 分别为 2.31、2.96、5.92 和 11.86 kb, 如图 1c 所示。

将表达质粒使用 *Sal*I 内切酶线性化, 使用电击法转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 在 MD 平板上筛选阳性转化子, 提取基因组 DNA 经过 PCR 凝胶电泳鉴定, 如图所示, 预期转入 pPIC9K-COL3-S、pPIC9K-COL3-2 和 pPIC9K-COL3-4 的酵母菌株会分别

在 0.92、1.58 和 1.58 kb 有特异性条带, 如图 1b 所示, 与预期的目的片段大小一致, 得到表达重组胶原蛋白单串联表达菌株 GS115/pPIC9K-COL3-S, 双串联二拷贝表达菌株 GS115/pPIC9K-COL3-2 和双串联四拷贝表达菌株 GS115/pPIC9K-COL3-4。胶原蛋白多拷贝载体示意图如图 2。

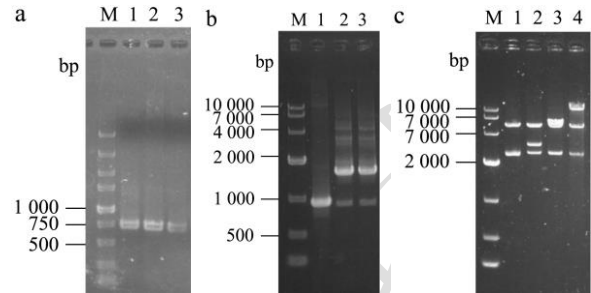


图 1 表达载体及酵母工程菌株的构建与鉴定

Fig.1 Construction and identification of expression vectors and yeast engineering strains

注: a 为目的片段 PCR 结果 (M: DNA Marker; 1: COL3-1 片段; 2: COL3-2 片段; 3: COL3-S 片段); b 为 PCR 鉴定酵母工程菌 (M: DNA Marker; 1: GS115/pPIC9K-COL3-S PCR 验证; 2: GS115/pPIC9K-COL3-2 PCR 验证; 3: GS115/pPIC9K-COL3-4 PCR 验证); c 为酶切验证多拷贝载体 (M: DNA Marker; 1: pPIC9K-COL3-S 双酶切; 2: pPIC9K-COL3-2 双酶切; 3: pPIC9K-(COL3-2)₂ 双酶切; 4: pPIC9K-COL3-4 双酶切)。

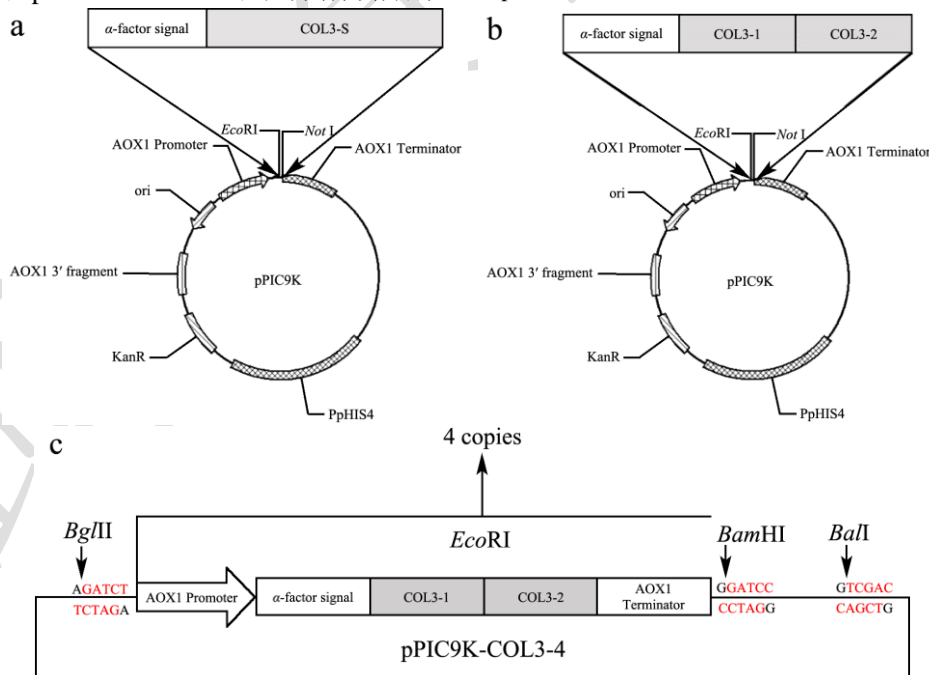


图 2 胶原蛋白多拷贝载体示意图

Fig.2 Construction of vector pPIC9K-COL3-S, pPIC9K-COL3-2 and pPIC9K-COL3-4

注: a 为单拷贝质粒 pPIC9K-COL3-S 示意图; b 为双串联单拷贝质粒 pPIC9K-COL3-2 示意图; c 为双串联四拷贝质粒 pPIC9K-COL3-4 示意图。

2.2 重组胶原蛋白的诱导表达及鉴定

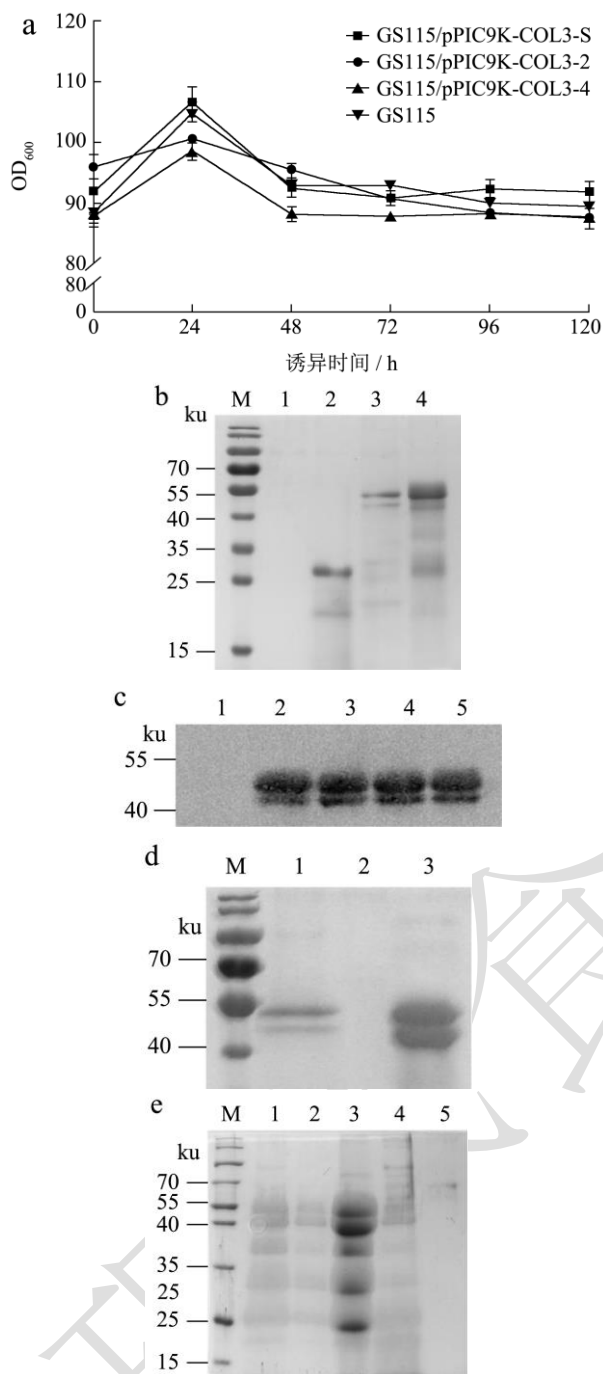


图3 重组胶原蛋白的诱导表达及鉴定

Fig.3 Inducible expression and identification of recombinant collagen

注: a为甲醇诱导期间菌株的生长情况; b为不同拷贝数菌株的蛋白表达情况(M: #26616蛋白Marker; 1: GS115菌株宿主发酵上清; 2: GS115/pPIC9K-COL3-S发酵上清; 3: GS115/pPIC9K-COL3-2发酵上清; 4: GS115/pPIC9K-COL3-4发酵上清); c为重组胶原蛋白Western Blot分析(M: #26616蛋白Marker; 2~5: $\varphi=0.5\%$ 甲醇诱导发酵上清); d为重组胶原蛋白镍柱纯化图(M: #26616蛋白Marker; 1: 发酵上清; 2:

穿过峰; 3: 使用10% Buffer B洗脱之后回收洗脱下来的溶液, 含有目的蛋白); e为硫酸铵分级沉淀。(M: #26616蛋白Marker; 1: 发酵液上清; 2: $m=20\%$ 硫酸铵沉淀; 3: $m=40\%$ 硫酸铵沉淀; 4: $m=60\%$ 硫酸铵沉淀; 5: $m=100\%$ 硫酸铵沉淀)。

从三组转化子中随机挑选5个转化子, 经过BMMY培养基培养之后, 接种到BMMY培养基, 30℃、250 r/min, 用 $\varphi=0.5\%$ 甲醇诱导表达5 d, 发酵液上清经过SDS-PAGE分析蛋白表达情况。由于目的蛋白表达量过低, 在胶上无法清晰辨认, 故尝试使用高密度摇瓶发酵方法模拟上罐发酵。

将转化子在BMMY培养基培养1 d之后, 离心取沉淀, 转移至BMMY培养基, 使得菌体浓度达到原来的2.5倍, 以达到模拟高密度发酵的目的。30℃、250 r/min条件下发酵3 d后, 取发酵上清经SDS-PAGE凝胶鉴定表达情况。如图3b所示, 单串联菌株GS115/pPIC9K-COL3-S(预期蛋白分子量20.19 ku)、双串联菌株GS115/pPIC9K-COL3-2、GS115/pPIC9K-COL3-4(预期蛋白分子量42.31 ku)均能表达相应蛋白, 且四拷贝菌株GS115/pPIC9K-COL3-4的目的蛋白表达量高于单拷贝菌株。条带大小与预期相比偏大, 推测是由于毕赤酵母将重组蛋白进行糖基化修饰而形成的, 且在较大条带下方有一预期蛋白大小的条带, 推测是未完全糖基化的目的蛋白。甲醇诱导后菌株生长曲线如图3a, 在诱导24 h之后OD值有所上升, 之后不断下降并趋于平稳, 可能是由于摇瓶的溶氧效果较差, 在第一天的生长之后菌株生长趋于停滞。通过凝胶成像软件分析表明, 双串联单拷贝菌株的胶原蛋白在发酵液中的浓度达到0.12 g/L, 四拷贝菌株的表达水平则达到0.45 g/L。

将GS115/pPIC9K-COL3-4菌株的发酵液进行Western Blot验证, 结果如图3c所示, 在预期42 ku位置附近有明显条带, 表明双串联胶原蛋白在毕赤酵母中能够成功表达, 且能分泌到胞外。

将发酵液上清液通过镍柱亲和层析, 并将洗脱液进行SDS-PAGE电泳检测, 结果如图3d所示, 泳道3是纯化之后的蛋白样品, 条带大小和发酵上清中的一致。上样的发酵液中胶原蛋白浓度为152 mg/L, 上样量为80 mL, 因此上样的胶原蛋白总量为12.16 mg; 纯化后回收溶液共6 mL, 胶原蛋白浓度为0.61 mg/mL, 回收的胶原蛋白总量为3.66 mg, 因此蛋白回收率为29.61%。使用硫酸铵分级沉淀法纯化重组蛋白, 结果如图3e, 在 $m=40\%$ 硫酸铵下能够较好地沉淀出胶原蛋白, 但也能沉淀出被降解的胶原蛋白片段, 因此回收纯度不高, 无法实现纯化效果。

2.3 重组胶原蛋白的性质及抗氧化活性分析

将 WB 鉴定过后的条带切下, 送往生工生物公司通过 MalDI-TOF-TOF 鉴定表达蛋白。经鉴定, 该条带确为目的蛋白。将该蛋白样品按照终浓度 250 mg/mL 溶解于 Tris-HCL 溶液后, 经圆二色谱检测, 得到如图 4 结果, 由于胶原蛋白的氨基酸残基中极少含有芳香族氨基酸, 因此在紫外扫描中, 280 nm 波长处几乎无吸收峰, 而在 200~220 nm 的肽键特征峰处有明显吸收峰。圆二色谱扫描图显示在 200 nm 左右有明显负峰, 数据通过计算^[19], 得出重组胶原蛋白的二级结构, 其中 α 螺旋占比 1.80%, β 折叠为 49.50%, 转角 22.70%, 无规则卷曲 25.70%。

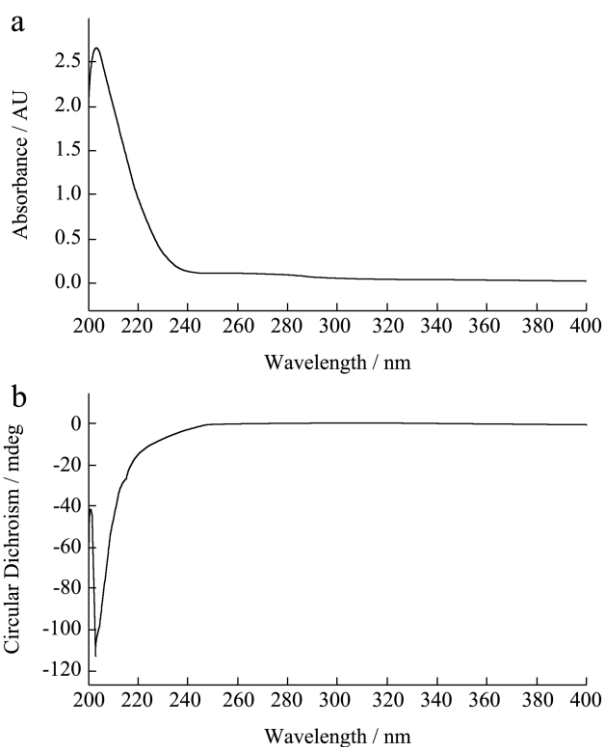


图 4 重组胶原蛋白的紫外吸收和圆二色谱

Fig.4 UV absorption and circular dichroism of recombinant collagen

注: a 为紫外吸收曲线; b 为圆二色谱曲线。

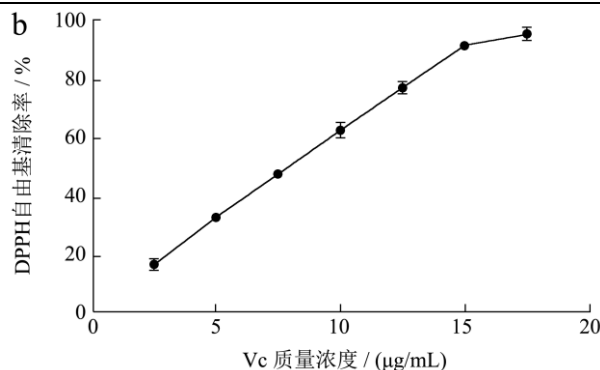
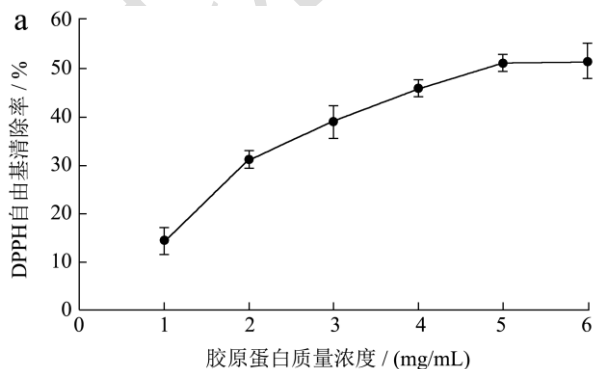


图 5 重组人 III 型胶原蛋白和 Vc 对 DPPH 自由基的清除率

Fig.5 Clearance rates of Vc and recombinant collagen

注: a 为胶原蛋白 DPPY 清除率曲线; b 为 Vc 的 DPPH 清除率曲线。

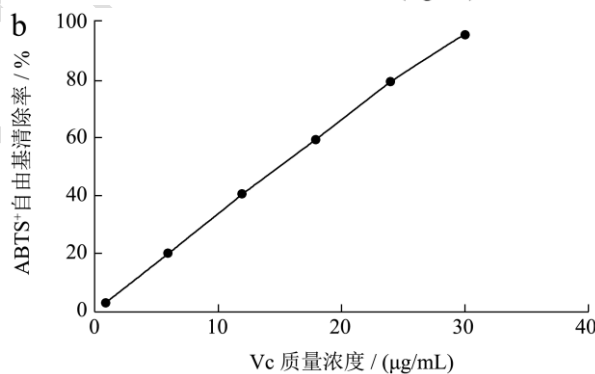
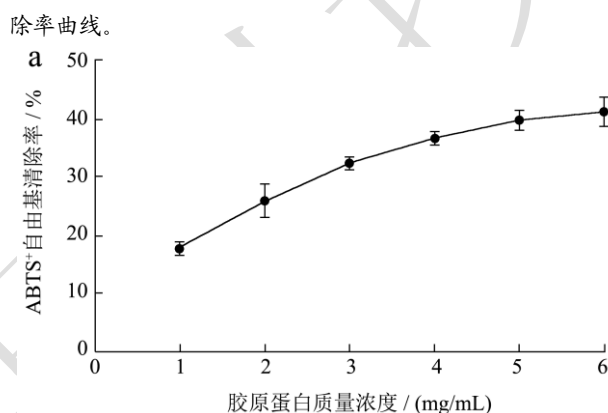


图 6 重组胶原蛋白和 Vc 对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.6 Scavenging ability of recombinant collagen and Vc on ABTS

注: a 为胶原蛋白对 ABTS⁺ 自由基的清除能力; b 为 Vc 对 ABTS⁺ 自由基的清除能力。

DPPH 的乙醇溶液含有单电子, 在 517 nm 处有强烈的吸收峰, 溶液呈紫色; 具有抗氧化性的物质能通过 与 DPPH 结合或者竞争的方式使得溶液颜色变浅。DPPH 自由基清除力的实验结果如图 5 所示, 重组胶原蛋白在 1 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率为 14.39%, 当浓度达到 6 mg/mL 时, DPPH 清除率提高到 51.49%, 表明重组胶原蛋白具有一定的 DPPH 清除力, 且随着浓度的增加清除力也相应增加, 但清除力远不及阳性对照。

ABTS⁺法也是测定体外抗氧化活性的较准确的方法,与 DPPH 法原理相似。ABTS⁺自由基清除法能够测定多组分混合物的抗氧化状态,可以用来衡量总体抗氧化性程度。ABTS⁺自由基能与抗氧化剂发生反应,去除阳离子,吸光值也随之呈现线性变化。

如图 6 的清除率曲线可知,胶原蛋白对 ABTS⁺自由基清除率的线性关系较高,在 6 mg/mL 时,ABTS 清除率提高到 41.24%;与阳性对照 Vc 相比,仍存在不足。

2.4 重组胶原蛋白甲醇诱导表达的条件优化

在 0.5% 甲醇浓度下,使用高密度摇瓶发酵方法,对菌株进行发酵,每 24 h 取样上清液,通过 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。如图 7a 所示,在诱导后 72 h 蛋白表达量达到最高,之后由于毕赤酵母本身的蛋白酶影响,目的蛋白被逐步降解,在目的条带下方产生弥散状条带。

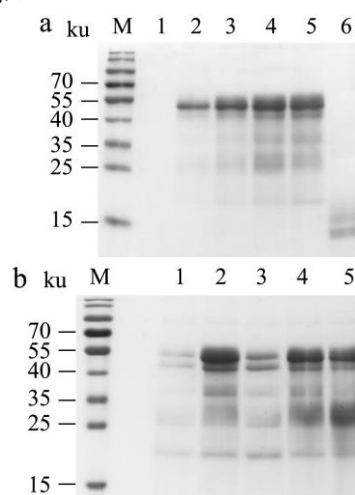


图7 甲醇诱导四拷贝重组菌株 GS115/pPIC9K-COL3-4 表达胶原蛋白的条件优化

Fig.7 Optimization of conditions for methanol-induced expression of recombinant collagen

注: a 为重组菌株发酵过程的蛋白表达检测 (M: #26616 蛋白 Marker; 1: GS115 菌株宿主; 2~6: 重组菌株诱导表达第一到第 5 天的发酵样品); b 为不同甲醇浓度诱导蛋白表达情况 (M: #26616 蛋白 Marker; 1: $\varphi=0.25\%$ 甲醇; 2: $\varphi=0.5\%$ 甲醇诱导; 3: $\varphi=0.25\%$ 甲醇诱导, 每 12 h 补充一次; 4: $\varphi=1\%$ 甲醇诱导; 5: $\varphi=2\%$ 甲醇诱导)。

挑选 GS115/pPIC9K-COL3-4 菌株中的最高表达量菌株,使用高密度摇瓶发酵方法,做五组对照,分别将甲醇诱导期间的甲醇体积分数调整为 0.25%、0.25% (每 12 h 补充一次)、0.5%、1% 和 2%,每组做三次重复,用以探究目的蛋白表达的最适甲醇诱导浓度。同理制备 SDS-PAGE 电泳样品电泳检测,结果如图 7b 所

示。使用凝胶成像软件分析表明甲醇诱导浓度在 0.5% 时目的蛋白表达量最高。

2.5 重组胶原蛋白的扫描电镜结构观察结果

使用电子扫描显微镜在 250、500、1 500 和 5 000 的放大倍数下观察胶原蛋白的结构。如图 8 所示,本实验的重组胶原蛋白冻干样品中存在明显的卷曲、絮状、螺旋缠绕结构,蛋白形成的丝状明显,具有一定的海绵状结构特点。推测原因是本研究获得的胶原蛋白片段长度较短,且肽链上的羟脯氨酸修饰不完全,因此无法自主形成大规模的高分子结构。但是总体上的絮状、海绵状结构,也表明其有作为生物医疗方面的填充物、起到结构支撑功能的开发潜力。

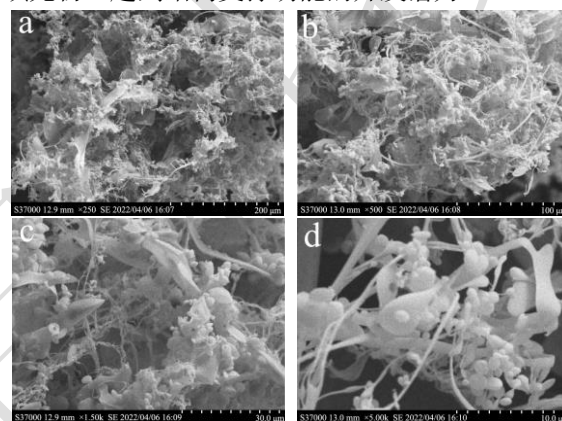


图8 扫描电镜检测重组胶原蛋白的微观结构

Fig.8 Scanning electron microscope image of collagen lyophilized powder

注: a 为 250 倍显微结构; b 为 500 倍显微结构; c 为 1 500 倍显微结构; d 为 5 000 倍显微结构。

3 结论

本研究选取人 III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的 908~1,137 位肽段作为表达片段,构建了毕赤酵母重组胶原蛋白单串联、双串联及双串联四拷贝分泌表达菌株,并且在毕赤酵母 GS115 中成功表达,联合高密度摇瓶发酵方式模拟发酵罐环境以及优化甲醇诱导的浓度和诱导时间的方式,得出最适甲醇诱导浓度为 0.5%,最适诱导时间为 72 h,最终使双串联单拷贝菌株的重组胶原蛋白表达量从难以检测的水平提高达到 0.12 g/L 的水平,双串联四拷贝菌株的表达量从难以检测的水平提高到 0.45 g/L 的水平。通过体外实验,使用 DPPH 和 ATBS 法检测重组胶原蛋白的抗氧化性,结果表明,重组胶原蛋白具有良好的抗氧化能力,其中 DPPH 自由基清除力达到了 58.91%,ABTS 自由基清除能力达到 41.24%,使重组胶原蛋白作为抗氧化剂的应用成为可能。圆二色谱结果显示重组胶原蛋白难以形成有序

的高级三螺旋结构, 扫描电镜对重组胶原蛋白成像显示其具有螺旋缠绕结构, 整体呈海绵状结构, 因此具有一定的在医疗上作为填充物的应用潜力。

参考文献

- [1] Chen Z G, Wang P W, Wei B, et al. Electrospun collagen-chitosan nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(2): 372-382.
- [2] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(12): 1531-1546.
- [3] Sabatelli P, Gualandi F, Gara S K, et al. Expression of collagen VI alpha5 and alpha6 chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2012, 31(3): 187-196.
- [4] Blanco M, G S C, I P R. New strategy to cope with common fishery policy landing obligation: collagen extraction from skins and bones of undersized hake (*Merluccius merluccius*) [J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(9): 1485.
- [5] Kim H W, Yeo I J, Hwang K E, et al. Isolation and characterization of pepsin-soluble collagens from bones, skins, and tendons in duck feet [J]. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 2016, 36(5): 665-670.
- [6] Gimenez B, Turnay J, Lizarbe M A, et al. Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(6): 941-950.
- [7] Riccetto C L, Novaski G L, Palma P C, et al. New biocompatible highly purified collagen gel for therapeutic renal artery embolization [J]. *Urology*, 2006, 67(4): 851-854.
- [8] Pan Z Y, Yang Z M, Pan L, et al. Displaying *Candida antarctica* lipase B on the cell surface of *Aspergillus niger* as a potential food-grade whole-cell catalyst [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(4): 711-720.
- [9] Damasceno L M, Huang C J, Batt C A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(1): 31-39.
- [10] Gorbet M B, Sefton M V. Endotoxin: the uninvited guest [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 6811-6817.
- [11] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology (N Y)*, 1993, 11(8): 905-910.
- [12] Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway [J]. *Embo J*, 2008, 27(2): 315-327.
- [13] Li L, Fan D, Ma X, et al. High-level secretory expression and purification of unhydroxylated human collagen alpha1(III) chain in *Pichia pastoris* GS115 [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(4): 467-475.
- [14] Wang L, Fan D, He J, et al. A new strategy for secretory expression and mixed fermentation of recombinant human collagen $\alpha 1$ (III) chain in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2014, 19(5): 916-924.
- [15] Olsen D, Yang C, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(12): 1547-1567.
- [16] 徐立群,王皓,孙旻,等.VI型类人胶原蛋白基因 COL6A2 的克隆及在毕赤酵母中的分泌表达[J].*食品科学*,2013,34(9): 224-227.
- [17] Parejo I, Codina C, Petrakis C, et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000, 44(3): 507-512.
- [18] Anna F, Dae-Ok K, Sang-Jin C, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, 24(7): 1043-1048.
- [19] Sreerama N, Woody R W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set [J]. *Anal Biochem*, 2000, 287(2): 252-260.