

# 重组类人 I 型胶原蛋白肽在大肠杆菌中的表达纯化及功能鉴定

杨晶, 余洁莹, 王蒙, 吴少敏, 马毅, 王菊芳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究构建了编码重组类人 I 型胶原蛋白肽基因的原核表达载体 pET28a-rhC I, 并将其转化到大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行诱导表达。采用 PCR 的方法扩增重组类人 I 型胶原蛋白肽的 cDNA 序列, 并将其克隆到原核表达载体 pET28a 上; 重组质粒转化到大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行 IPTG 诱导表达, 并优化表达条件。利用 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测表达产物。大量表达重组蛋白, 采用镍亲和层析进行纯化, 并对纯化后的蛋白进行体外抗氧化研究以及促细胞增殖分析。结果表明, 通过大肠杆菌 Rosetta (DE3) 诱导表达获得了分子量约为 40 ku 的重组蛋白, 与预期相符。经镍亲和层析获得纯度较高的蛋白, 通过 DPPH 实验证明其具有一定的抗氧化活性; 而且 MTT 实验证实该蛋白可以促进小鼠成纤维细胞 3T3 细胞的增殖, 为其在食品、化妆品和医疗行业的应用提供一定的理论依据。

**关键词:** 胶原蛋白; 重组表达; 抗氧化; 细胞增殖

文章编号: 1673-9078(2016)2-60-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.010

## Expression, Purification, and Functional Characterization of Recombinant Human-like Type I Collagen Peptide in *E. coli*

YANG Jing, YU Jie-ying, WANG Meng, WU Shao-min, MA Yi, WANG Ju-fang

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** A prokaryotic expression vector, pET28a-rhC I was constructed, with recombinant, human-like type I collagen peptide gene and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) for inducible expression. The cDNA sequence of recombinant human-like collagen type I peptide was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the prokaryotic expression vector, pET28a. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) for IPTG-induced expression and gene expression conditions were optimized. The expressed products were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot. The expressed recombinant proteins were purified by nickel affinity chromatography. Additionally, *in vitro* antioxidant activity and cell proliferation assay were conducted on the purified proteins. The results showed that the molecular weight of the expressed recombinant protein induced by of *E. coli* Rosetta (DE3) was approximately 40 ku, consistent with the expected value. Nickel affinity chromatography produced a collagen peptide with relatively high purity, and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free-radical test revealed that the recombinant protein showed antioxidant activity. In addition, the methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay showed that the recombinant protein promoted the proliferation of mouse embryonic fibroblasts cells (3T3). These results indicate potential applications of this protein in industries such as food, cosmetics, and medicine.

**Key words:** collagen; recombinant expression; antioxidant; cell proliferation

胶原蛋白是一种非常关键的结构蛋白, 主要存在于哺乳动物结缔组织的细胞外基质中, 占全身蛋白总量的 25%~35%<sup>[1]</sup>。胶原蛋白由三条  $\alpha$  链相互缠绕形成

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21306055); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130172120041) 中央高校基本科研业务费 (2013M0059)

作者简介: 杨晶 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质工程

通讯作者: 马毅 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 蛋白质科学与工程

的右手螺旋结构,  $\alpha$  链是由 (G-X-Y) 3 个氨基酸的重复序列构成, G 是甘氨酸, X 和 Y 通常是脯氨酸和羟脯氨酸<sup>[2]</sup>。到目前为止, 已发现 29 种胶原蛋白, 在这些蛋白中, I 型胶原蛋白含量最高, 约占 90%<sup>[3]</sup>。在新组织的形态发生和细胞代谢中, 它赋予新组织机械强度和生化特性<sup>[4]</sup>。

胶原蛋白具有生物可降解性、良好的生物相容性、无细胞毒性、抗氧化性等功能, 并且能促进细胞

增殖<sup>[5]</sup>。它被加工形成各种形式,例如交联的膜、薄片、珠粒、纤维和海绵<sup>[6]</sup>。基于以上特性,胶原蛋白在临床医学上的应用非常广泛,例如注射型胶原蛋白可以用于止血、烧伤、绷带、血管移植等<sup>[7]</sup>。

胶原蛋白的生产目前主要通过酸、碱水解的方式从动物结缔组织中提取,在提取的时候无法避免的会丧失部分生物活性,如果作用到人体会产生异种的排斥反应,而且存在着极大的病毒隐患<sup>[8]</sup>。由于胶原蛋白在医用材料等领域有广阔的应用前景,所以迫切需要新的手段制备胶原蛋白,利用基因工程技术重组人胶原蛋白就成了一个很好的研究方向<sup>[9]</sup>。西北大学范代娣等人将人I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的氨基酸序列进行拼接和重复,在大肠杆菌中表达纯化,并证明其能促进乳仓鼠肾细胞的增殖<sup>[10]</sup>。东京农业科技大学的Juming Yao选择人I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链的特定的肽段进行重复,并在大肠杆菌中表达纯化,证明了该序列可以促进小鼠成纤维细胞3T3粘附和自身交联<sup>[11]</sup>。

本研究利用大肠表达系统截短表达出重组类人I型胶原蛋白,其结构如下:在人I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链660~964位肽段的基础上,在其N端添加680~694位的15个氨基酸以及在C端添加949~964位的15个氨基酸,添加的680~694位肽段和949~964位已被证明可以支持细胞粘附和细胞增殖<sup>[11]</sup>。本研究成功得到了具有一定抗氧化性和较强促进细胞增殖的高纯度重组类人I型人胶原蛋白肽为胶原蛋白商业化应用提供了一定的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

*rhC I*的基因序列由上海生工生物工程有限公司合成。大肠杆菌Rosetta (DE3)和质粒pET28a均为本实验室保存。PrimeStar HS Premix、限制性核酸内切酶*Nde I*和*Xho I*、T4 DNA连接酶、感受态大肠杆菌DH 5 $\alpha$ 均购于Takara公司。质粒小提试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自Magen公司。抗体His-tag抗体购于abcam公司。牛血清白蛋白、胶原蛋白购于广州普博欣生物科技有限公司。小鼠胚胎成纤维细胞(3T3)由暨南大学黄亚东老师惠赠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的基因的扩增

##### 1.2.1.1 PCR扩增

以上海生工生物工程有限公司提供的质粒pUC57-rhC I为模版,引物为:F:GGAATTCATATG

GAACAAGGCGTTCCAGGT(下划线为*Xho I*酶切位点)R:CCGCTCGAGGCGCGTTCGCCGCGTTCGCCACG(下划线为*Nde I*酶切位点)。

100  $\mu$ L PCR反应体系为: PrimeStar HS Premix 50  $\mu$ L; 模版pUC57-rhC I 2  $\mu$ L; Primer F/R 2  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 44  $\mu$ L。反应条件: 98  $^{\circ}$ C 5 min, 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 62 s, 共30个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增完毕后,用琼脂糖凝胶电泳进行检测,并用Magen公司琼脂糖凝胶回收试剂盒切胶回收。

#### 1.2.2 pET28a-rhC I表达质粒构建

分别对质粒pET28a和PCR产物进行*Nde I*和*Xho I*双酶切,回收目的片段和pET28a载体,连接后转化至感受态细胞大肠杆菌DH 5 $\alpha$ ,利用含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的LB平板和菌落PCR筛选阳性转化子。挑选阳性转化子送深圳华大基因公司测序鉴定。将鉴定正确的重组质粒热激转化到大肠杆菌Rosetta (DE3)中。

#### 1.2.3 pET28a-rhC I小量诱导表达和Western Blot检测

将含有pET28a-rhC I质粒的工程菌37  $^{\circ}$ C过夜培养,按照1%接种量接种于Kana<sup>r</sup>的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、220 r/min摇床培养,当OD<sub>600</sub>=0.5时加入IPTG(终浓度为0.8 mmol/L),培养5 h后,OD<sub>600</sub>=1.5时收菌。5000 g离心10 min,菌体沉淀用1 $\times$ PBS重悬,使用超声破碎仪裂解菌体,制备SDS-PAGE电泳样品进行电泳检测。SDS-PAGE电泳结束后,转膜至NC膜,5%的脱脂奶粉封闭2 h,用抗体His-tag孵育2 h, TBST洗涤3次,最后进行ECL显色,曝光室曝光。

#### 1.2.4 pET28a-rhC I小量表达IPTG诱导浓度优化

将含有pET28a-rhC I质粒的工程菌37  $^{\circ}$ C过夜培养,按照1%接种量接种于Kana<sup>r</sup>的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、220 r/min摇床培养,当OD<sub>600</sub>=0.5时分别加入不同浓度的IPTG(终浓度依次为0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.7 mmol/L、1.0 mmol/L,培养5 h后,OD<sub>600</sub>=1.5时收菌。5000 g离心10 min,菌体沉淀用1 $\times$ PBS重悬,使用超声破碎仪裂解菌体,制备SDS-PAGE电泳样品进行电泳检测。

#### 1.2.5 大量表达及纯化

将含有pET28a-rhC I质粒的工程菌过夜培养物接种于1 L的Kana<sup>r</sup>的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、220 r/min摇床培养,当OD<sub>600</sub>=0.5时加入IPTG(终浓度为0.4 mmol/L),培养5 h后,OD<sub>600</sub>=1.5时收菌。5000 g,离心10 min,菌体沉淀用1 $\times$ PBS重悬,使用超声破碎仪裂解菌体。12000 r/min离心30 min,收集上清液,

并用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 用镍亲和层析柱子 (5 mL His-Trap, GE) 纯化, 收集洗脱液。制备 SDS-PAGE 电泳样品电泳检测后, 收集目的蛋白透析过夜。将透析后的样品用冷冻干燥机进行冻干处理。

### 1.2.6 DPPH 自由基清除力测定<sup>[12]</sup>

将经过纯化的蛋白冻干后, 用蒸馏水分别配制成不同浓度的蛋白溶液。在 96 孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的蛋白溶液与 100  $\mu\text{L}$  的  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 乙醇溶液, 室温避光反应 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 的吸光值 ( $A_1$ )。同时测定 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的蛋白溶液与 100  $\mu\text{L}$  的无水乙醇溶液的吸光值 ( $A_2$ ), 100  $\mu\text{L}$  的  $2 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 乙醇溶液与 100  $\mu\text{L}$  的无水乙醇溶液的吸光值 ( $A_3$ )。阳性对照 Vc 采用上述同样的方法, 测定其对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率公式} = \frac{A_3 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\%$$

### 1.2.7 MTT 检测细胞存活率

取生长对数期的小鼠胚胎成纤维细胞(3T3)每个孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 换上含不同浓度样品的培养基中, 阴性对照为: 培养基加  $1 \times \text{PBS}$  加细胞 (无重组类人 I 型人胶原蛋白肽), 阳性对照为市售重组胶原蛋白, 样品的浓度分别为 40  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ 、400  $\mu\text{g/mL}$ , 培养基成分为 DMEM+10% 胎牛血清。用不同浓度的重组胶原蛋白处理 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/mL), 37  $^\circ\text{C}$  培养 4 h。除去培养基, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 低速振荡 20 min, 用酶标仪检测 490 nm 各个孔的吸光值。MTT 主要用于检测细胞毒性,  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值越高, 表示活细胞数目越多。

细胞相对存活率 =  $\frac{\text{样品 } \text{OD}_{490\text{nm}}}{\text{空白组样品 } \text{OD}_{490\text{nm}}} \times 100\%$ 。

### 1.2.8 数据统计分析

用 Origin 7.5 软件对数据进行处理与作图。采用 SPSS17.0 进行多重比较 (Duncan 检验), 显著水平设为 0.05, 极显著水平设为 0.01。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pET28a-rhC I 表达质粒的构建

以上海生工生物工程有限公司的质粒 pUC57-rhC I 为模版, PCR 扩增目的基因, 引物两端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。电泳结果表明(图 1)显示扩增片段大小与预期大小 (1044 bp) 一致。PCR 产物经过切胶回收后双酶切, 并与双酶切后的载体 pET28a 连接, 转化到 DH5 $\alpha$ , 菌落 PCR 初步筛选阳性克隆,

并进行双酶切鉴定, 测序显示外源基因与目的基因序列完全一致, 说明 pET28a-rhC I 表达质粒已经构建成功。

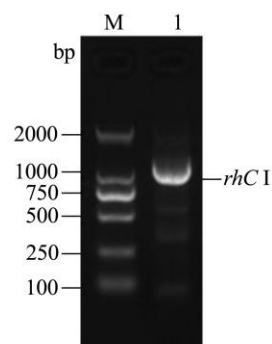


图 1 PCR 扩增目的基因

Fig.1 PCR amplification of rhCI gene

注: M: DNAMarker; 1: PCR 产物。

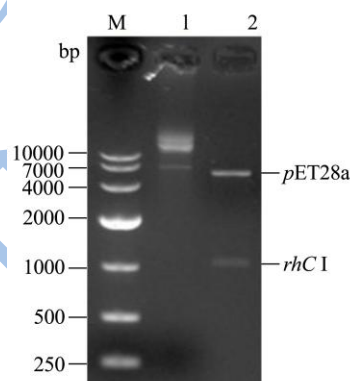


图 2 重组质粒双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by double-enzyme digestion

注: M: DNA Marker 1: 未酶切的重组质粒 2: 重组质粒双酶切。

### 2.2 含重组质粒 pET28a-rhC I 大肠杆菌

#### Rosetta (DE3) 小量诱导表达

将含有 pET28a-rhC I 质粒的工程菌 37  $^\circ\text{C}$  过夜培养, 按照 1% 接种量接种于 Kana<sup>r</sup> 的 LB 液体培养基中, 37  $^\circ\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养, 当  $\text{OD}_{600} = 0.5$  时加入 IPTG (终浓度为 0.8 mmol/L), 对照组不加入诱导剂 IPTG, 诱导表达后制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测。图 3 显示在预期位置 (40 kDa) 出现明显的目的条带, 并且是上清表达。

### 2.3 pET28a-rhC I 小量表达 IPTG 诱导浓度优

化

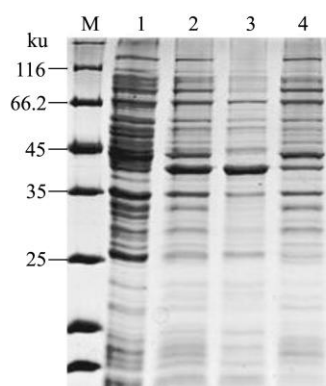


图3 重组类人胶原蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 SDS-PAGE analysis of rhC I expression

注: M: Marker; 1: 1号克隆未诱导全菌; 2: 1号克隆诱导全菌; 3: 1号克隆诱导上清; 4: 1号克隆诱导沉淀。

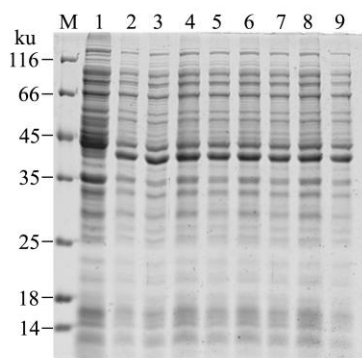


图4 IPTG 浓度优化

Fig.4 Optimization of rhC I expression at different concentrations of IPTG

注: M: Marker; 1: 未诱导全菌; 2:0.1 mmol/L IPTG 诱导全菌; 3:0.1 mmol/L IPTG 诱导上清; 4:0.4 mmol/L IPTG 诱导全菌; 5:0.4 mmol/L IPTG 诱导上清; 6:0.7 mmol/L IPTG 诱导全菌; 7:0.7 mmol/L IPTG 诱导上清; 8:1.0 mmol/L IPTG 诱导全菌; 9:1.0 mmol/L IPTG 诱导上清。

将含有 pET28a-rhC I 质粒的工程菌 37 °C 过夜培养,按照 1% 接种量接种于 Kana<sup>r</sup> 的 LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 摇床培养,当 OD<sub>600</sub>=0.5 时分别加入不同浓度的 IPTG (终浓度依次为 0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.7 mmol/L、1.0 mmol/L),制备 SDS-PAGE 电泳样品进行电泳检测。结果如图 4,用软件 BandsScan 分析后发现 IPTG 浓度在 0.4 mmol/L 时表达量最高。

#### 2.4 重组蛋白 Western Blot 验证

在 37 °C 和 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 的条件下,胶原蛋白 rhC I 小量表达 Western Blot 结果如图 5 所示,在预期位置 (40 ku) 处有明显条带,说明重组蛋白 rhC I 在大肠杆菌中有表达,且是上清表达。

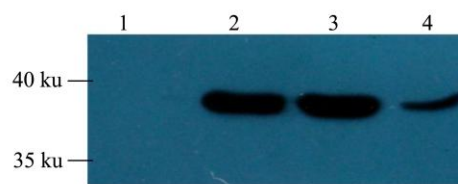


图5 重组 I 型胶原蛋白 Western Blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of recombinant rhC I

注: M: Marker; 1: 未诱导全菌; 2: 诱导全菌; 3: 诱导上清; 4: 诱导沉淀。

#### 2.5 pET28a-rhC I 大量表达与纯化

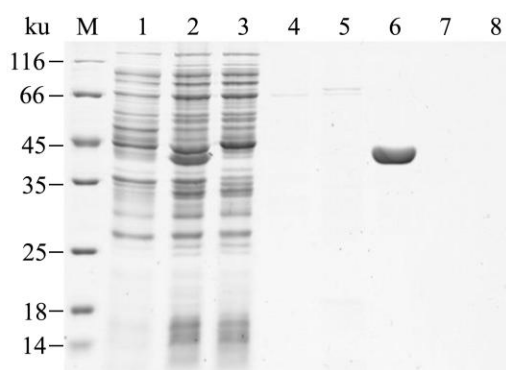


图6 大肠杆菌 rosetta 菌株中的人 I 型胶原蛋白大量表达与纯化

Fig.6 Expression and purification of recombinant rhC I

注: M: Marker; 1: 未诱导全菌; 2: 诱导全菌; 3: 穿过峰; 4: 10% Buffer B 洗脱; 5: 20% Buffer B 洗脱; 6: 40% Buffer B 洗脱; 7: 60% Buffer B 洗脱; 8: 100% Buffer B 洗脱。

在 37 °C 和 IPTG 诱导浓度为 0.4 mmol/L 的条件下,将重组 I 型类人胶原蛋白进行大量发酵培养,SDS-PAGE 结果显示 (图 6), Buffer B 浓度为 40% 时,可以把目的蛋白洗脱下来。用软件 BandsScan 对 SDS-PAGE 胶图进行灰度分析, I 型胶原蛋白占总蛋白量的 94.5%,利用 BCA 法测得胶原蛋白浓度为 520 μg/mL。

#### 2.6 DPPH 自由基清除力测定

DPPH 自由基是一种稳定的自由基,具有孤对电子,在 517 nm 出具有强吸收峰。DPPH 自由基清除率实验结果如图 7 所示,重组类人 I 型胶原蛋白符合二项式  $y = -0.36x^2 + 8.86x + 0.16$ ,  $IC_{50} = 8.90$  mg/mL;而阳性对照 Vc 符合二项式  $y = -0.02x^2 + 2.74x + 0.99$ ,  $IC_{50} = 26.70$  μg/mL。重组类人胶原蛋白具有一定的抗氧化性。胶原蛋白分子量较大,一些具有抗氧化性的氨基酸没有暴露出来,因此就有较弱的抗氧化性。胶原蛋白经过

酶水解后, 抗氧化性的氨基酸暴露出来, 具有较强的抗氧化性<sup>[12]</sup>。

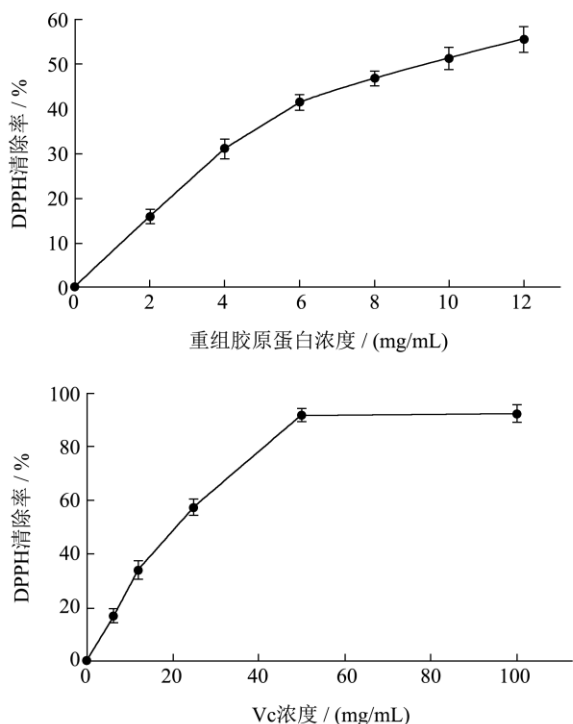


图7 Vc和重组I型类人胶原蛋白对DPPH自由基的清除率

Fig.7 Clearance rates of Vc and rhC I

### 2.7 MTT 检测细胞存活率

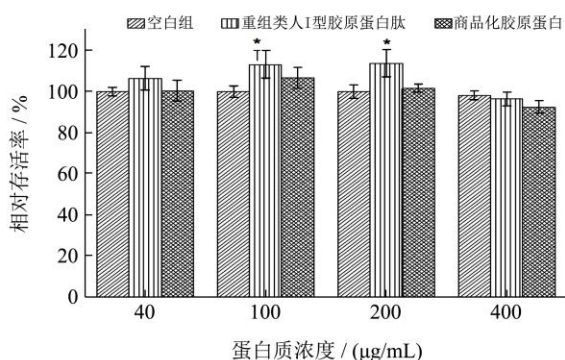


图8 蛋白质对细胞增殖的影响

Fig.8 Effect of proteins on cell proliferation

MTT 主要用于检测细胞毒性, OD<sub>490nm</sub> 值越高, 表示活细胞数目越多<sup>[13]</sup>。如图8所示, 40 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL 的重组类人I型胶原蛋白肽能促进细胞的增殖, 细胞的增值率分别为 6.5%、13.2%、13.8%, 但是 400 µg/mL 的重组类人I型胶原蛋白肽对细胞有轻微抑制作用。而商品化的重组胶原蛋白只有在浓度为 100 µg/mL, 细胞的增值率为 6.7%, 其他浓度基本没有促进作用。采用 Duncan 检验法对实验数据进行显著性差异分析, 发现大肠杆菌表达的重组类人I型胶原蛋白肽与商品化的胶原蛋白均具有显著性

差异(P<0.05)。因此, 低浓度的重组类人I型胶原蛋白能促进3T3细胞的增殖, 且增殖率高于商品化胶原蛋白。

### 3 结论

3.1 大肠杆菌表达系统是非常成熟表达外源蛋白的体系, 其生长周期短、培养成本低, 适合工业化生产。本研究成功构建了原核表达载体 pET28a-rhC I, 并在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 高效表达, 经过镍亲和层析后, 获得纯度约为 91% 胶原蛋白肽。本研究中 cDNA 来源于人源 I 型胶原蛋白 α1 链, 和从动物皮肤中提取的胶原蛋白相比, 其优势在于对于人体产生异体免疫排斥反应低和也不会存在动物病毒隐患。

3.2 自由基是由人体新陈代谢产生, 带有不配对电子的原子、分子或离子。过量的自由基会引起机体损伤、衰老, 因此需要通过摄入抗氧化的物质来清除过量的自由基, 从而维持机体的正常功能<sup>[14]</sup>。化学合成的抗氧化剂由于其较高的副作用使用受到限制, 相对而言天然的抗氧化物质因其低毒、生物相容性高受到市场的欢迎, 其中活性蛋白肽就是抗氧化物质的研究热点之一。本研究中利用大肠杆菌表达纯化的类人胶原蛋白具有一定的抗氧化性, DPPH 自由基清除实验中, 重组类人胶原蛋白符合二项式  $y = -0.36x^2 + 8.86x + 0.16$ ,  $IC_{50} = 8.90 \text{ mg/mL}$ 。重组类人胶原蛋白作为食品的包装薄膜和涂层可以防止食物被氧化, 延长食物保质期。同时, 本研究获得的重组类人胶原蛋白肽对哺乳动物细胞的增殖有明显的促进作用, 且由于其和人皮肤胶原结构相似, 相容性好, 可以进入皮肤的真皮层, 对人皮肤有较好的营养作用, 既可以作为护肤品的添加剂广泛地应用于化妆品行业, 也可以作为促进伤口愈合的止血材料应用于医疗行业。

3.3 本研究获得具有生物活性的截短的 I 型胶原蛋白肽, 并对其体外抗氧化作用性和细胞增殖进行初步研究, 为其在食品、化妆品和医疗行业的应用提供理论依据。在此基础上, 我们还需要进一步探索胶原蛋白肽是通过何种方式实现对哺乳动物细胞的增殖作用, 为其进一步的开发应用打下基础。

### 参考文献

[1] Muyonga J, Cole C and Duodu K. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 81-89

[2] He L, Mu C, Shi J, et al. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(2): 354-359

- [3] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1531-1546
- [4] Ferreira A M, Gentile P, Chiono V, et al. Collagen for bone tissue regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(9): 3191-3200
- [5] Chen J P, Chang G Y, Chen J K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 313: 183-188
- [6] Lee C, Lee Y. Biomedical applications and tissue engineering of collagen [J]. *Advanced Drug Delivery*, 2013: 445-447
- [7] Prajapati V D, Jani G K, Kapadia J R. Current knowledge on biodegradable microspheres in drug delivery [J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2015: 1-17
- [8] Olsen D, Jiang J, Chang R, et al. Expression and characterization of a low molecular weight recombinant human gelatin: development of a substitute for animal-derived gelatin with superior features [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 40(2): 346-357
- [9] Olsen D, Yang C, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1547-1567
- [10] 米钰, 惠俊峰, 范代娣, 等. 类人胶原蛋白生物相容性实验研究[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2004, 34(1): 66-68
- MI Yu, HUI Jun-feng, FAN Dai-di, et al. The study on the compatibility of human-like collagen [J]. *University Northwest (Natural Science)*, 2004, 34(1): 66-68
- [11] Yao J, Yanagisawa S, Asakura T. Design, expression and characterization of collagen-like proteins based on the cell adhesive and crosslinking sequences derived from native collagens [J]. *Journal of Biochemistry*, 2004, 136(5): 643-649
- [12] Saiga A I, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3661-3667
- [13] Aziz D. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay [J]. *Animal Reproduction Science*, 2006, 92(1): 1-8
- [14] Parrado J, Bougria M, Ayala A, et al. Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factor 2 [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(3): 362-370